

潘红坤,王清位,余亚军,等. 氮肥对烟草根际土壤微生物群落的影响[J]. 江苏农业科学,2025,53(19):288-292.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.19.036

氮肥对烟草根际土壤微生物群落的影响

潘红坤¹,王清位¹,余亚军¹,王锦丹¹,贺彪²,柳金德²,和旭芳²,
罗坤²,蔡宪杰³,沈毅³,黄飞燕¹,韩天华²

(1. 昆明学院云南省都市特色农业工程技术研究中心/云南省魔芋生物学重点实验室,云南昆明 650200;
2. 云南省烟草公司丽江市公司,云南丽江 674100; 3. 上海烟草集团有限责任公司,上海 200000)

摘要:为了探究施用氮肥对丽江植烟区烟草根际土壤细菌群落结构的影响,依据当地常规氮肥施用量,设置低于常规施用量(90.0 kg/hm² 纯氮,T1 处理)、高于常规施用量(127.5 kg/hm² 纯氮,T6 处理)2 个处理。采用高通量测序技术,比较 2 个处理间土壤细菌群落结构的组成和多样性。结果表明,2 个处理共鉴定出 3 410 种共有细菌群落,T1 处理的细菌群落多样性高于 T6 处理,其种群结构相对完整。从细菌门水平结构组成的分析发现,2 个处理均以放线菌门、厚壁菌门、变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门等为优势细菌门;从细菌属水平结构组成的分析发现,芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、节杆菌属等是 2 个处理的优势菌属;从土壤细菌群落的 β 多样性分析发现,2 个处理间的细菌群落主成分有明显差异,且存在一定变异。研究结果可为丽江烟草生产过程中的氮肥施用量设计及植烟区土壤改良提供理论依据。

关键词:氮肥;烟草;根际;土壤细菌群落;高通量测序;多样性;优势菌

中图分类号:S572.06 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)19-0288-05

烟草是我国重要经济作物^[1],烟叶的产量、质量在很大程度上影响着地区经济发展水平,而其生长发育及品质受栽培措施的影响较大^[2]。氮素是烟草生长发育过程中必需的营养元素,是影响烟叶产量、质量的重要因素^[3]。随着烟草复种指数的不断提高,农户为了追求高产量而盲目过量施用氮肥,导致土壤养分失衡,不仅对烟草生长及烟叶品质造成不利影响,大大降低了烟草的经济效益^[4-8],而且对土壤微生态环境产生了负面影响,导致土壤质量退化^[9]。

微生物在土壤养分循环和周转中起着关键作用^[10],其多样性及群落结构是评价土壤肥力的重要指标^[11-12]。施肥可以改变土壤中的营养物质,从而

显著影响微生物的结构和功能^[13]。养分可以为根际细菌提供生长和繁殖的基本原料^[14]。微生物和环境间的相互作用,促进了植物对养分的吸收、增强了植物的抵抗力,并提高了作物的产量和品质^[15]。因此,本研究选取烟草根际土壤为研究对象,用 16S rRNA 基因高通量测序的方法分析氮肥对烟草根际土壤细菌群落的影响,旨在揭示烟草根系土壤中细菌群落组成对施肥的响应机制,为改善植烟土壤状况提供科学依据,对于提升烟草产量、质量具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

本试验于 2023 年 5—9 月在云南省丽江市永胜县永北镇胜利村烟草种植田(100°75'E,26°71'N)内进行,试验地平均海拔为 2 132.9 m。该县气候条件以亚热带山地季风气候为主,平均气温为 13.5 ℃,年均降水量为 929.8 mm。

1.2 试验设计

在试验地块内设置 10 m × 12 m 土壤肥力均匀且前茬作物一致的试验小区,其土壤质地为壤土。所有小区于试验田内随机分布。供试品种为云烟 121。共设置 2 个处理,分别用 T1、T6 处理表示,其

收稿日期:2024-08-09

基金项目:中国烟草总公司云南省公司科技计划(编号:2022530700242001);云南省科技厅基础研究专项(编号:202401AT070034);上海烟草集团有限责任公司科技项目(编号:2024410103600013)。

作者简介:潘红坤(1997—),女,山东青岛人,硕士研究生,从事烟草栽培方面的研究。E-mail:hongkunpan123@163.com。

通信作者:黄飞燕,博士,研究员,从事烟草栽培与病害防控研究, E-mail:125593879@qq.com;韩天华,农艺师,从事烟草生产研究, E-mail:hth741200@126.com。

中 T1 处理的纯氮施用量为 90.0 kg/hm^2 , T6 处理的纯氮施用量为 127.5 kg/hm^2 , 每个处理重复 3 次。

1.3 取样方法

在烤烟成熟期, 按对角线五点取样法分别取各小区烟株的根际土。将土壤去除杂质、均匀混合后, 用无菌密封袋装好并及时封存于干冰中邮寄给测序公司(上海美吉生物医药科技有限公司)提取 DNA, 对烟草根际土壤细菌群落进行高通量测序。

1.4 测定方法

土壤细菌 DNA 的提取及测序: 使用土壤 DNA 提取试剂盒(上海美吉生物医药科技有限公司)对 2 个处理的细菌提取 DNA 后, 用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度、浓度, 并用超纯水稀释至 $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。使用引物 338F(5' - ACTCCTACGGAGGCAGCAG - 3') 对 16S rRNA 基因的可变区(V3 ~ V4) 进行 PCR 扩增, 扩增后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。纯化后, 用 Illumina 高通量测序平台进行测序分析。

1.5 数据处理

使用绿色基因数据库(GreenGene)、核糖体数据库项目分类器(RDP Classifier)将代表性序列集合注释并分析样品物种。依据样本文库的操作分类单元(OTU)丰度信息, 用 QIIME (Version 1.7.0) 软件计算土壤样品的细菌多样性指数。

2 结果与分析

2.1 土壤细菌群落香农指数稀释度曲线分析

不同处理根际土壤细菌群落的香农指数稀释曲线见图 1。香农指数(Shannon - Wiener diversity index)是表征土壤微生物多样性的常用指标, 它表示各种间个体分配的均匀性, 香农指数越高, 则表明个体分配越均匀, 群落多样性越大, 对比不同处理的稀释曲线就可以直观显示处理间物种多样性差异。由图 1 可以看出, 随着测序数量的增加, 土壤样品的细菌香农指数稀释曲线斜率先逐渐减小后趋于平缓, 本研究中的物种数量没有显著增加, 说明采用高通量测序技术分析施肥对烟草根际土壤细菌群落结构组成、多样性的影响是可行的, 同时说明本研究数据是合理的。T1 处理香农指数对应的 OTU 数量高于 T6 处理; 同一处理的不同重复中, T1 处理的均匀性更好。

2.2 土壤细菌群落分布

由图 2 可知, T1、T6 处理共鉴定出了 7 286 种细菌群落, 2 个处理共有 3 410 种细菌群落, 占总菌落

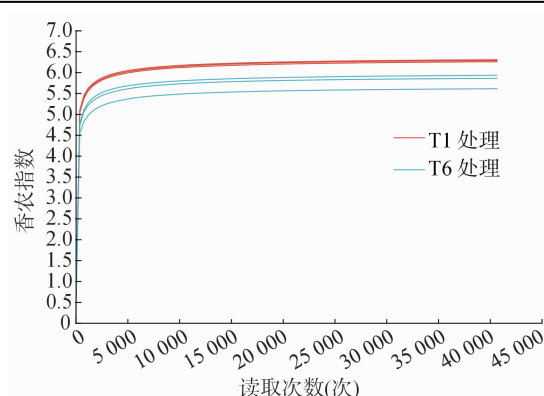


图1 不同处理植烟土壤细菌群落香农指数的稀释度曲线

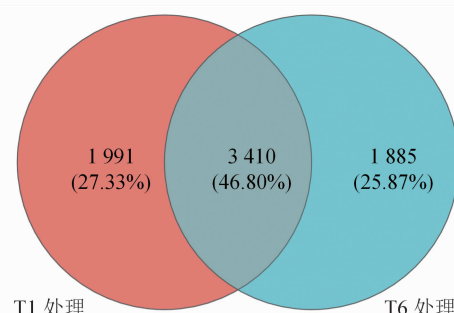


图2 不同处理根际土壤细菌丰度韦恩图

的 46.80%。T1 处理独有 1 991 种细菌群落, 占总菌落数的 27.33%。T6 处理独有 1 885 种细菌群落, 占总菌落数的 25.87%。T1 处理独有的细菌种类数较 T6 处理多 5.62%。

2.3 土壤细菌群落的 α 多样性分析

不同处理根际土壤细菌的 α 多样性分析结果见表 1。香农、辛普森指数能够反映测序样本的多样性, 其中香农指数越大, 样本的微生物群落多样性越高, 而辛普森值越大, 样本的微生物群落多样性反而越低。实际丰富度观测值、ACE 值、Chao 值则能够反映样本的微生物群落丰富度, 实际丰富度观测值、ACE 值、Chao 值越高, 表明微生物群落的丰富度越高, 反之, 表明微生物群落的丰富度越低。覆盖率能够反映群落覆盖度。由表 1 可以看出, 样品的测序覆盖率均达 98%, 说明样品序列绝大部分均已被检出, 测序结果能够展示样品的真实情况。T1 处理和 T6 处理的香农、辛普森指数分别为 6.28、0.01 和 5.80、0.03, T1 处理的香农指数较 T6 处理提高了 8.28%, 辛普森指数较 T6 处理降低了 66.67%。T1 处理和 T6 处理的实际丰富度观测值、ACE 指数、Chao 指数分别为 3 335.00、4 030.21、3 852.35 和 3 202.00、3 903.34、3 699.24, T1 处理的实际丰富度观测值、ACE、Chao 指数分别较 T6 处理提高了 4.15%、3.25%、4.14%。

表 1 不同处理根际土壤细菌群落的 α 多样性

处理	多样性指数		丰富度指数			覆盖率 (%)
	香农指数	辛普森指数	丰富度实际观测值	ACE 指数	Chao 指数	
T1	6.28 ± 0.02	0.01 ± 0.00	3 335.00 ± 29.51	4 030.21 ± 91.73	3 852.35 ± 94.00	98 ± 0.00
T6	5.80 ± 0.17	0.03 ± 0.01	3 202.00 ± 42.58	3 903.34 ± 39.27	3 699.24 ± 27.61	98 ± 0.00

2.4 土壤细菌群落种类的组成及丰度

2.4.1 优势菌门分析 由图 3 可知,2 个处理相对丰度排序前 10 的优势菌门分别为放线菌门、厚壁菌门、变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、芽单胞菌门、拟杆菌门、黏菌门、髌骨菌门、蓝菌门, T1、T6 处理的 10 种优势细菌门的相对丰度之和分别为 95.90%、96.68%。T1 处理的放线菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、黏菌门、蓝菌门的相对丰度分别为 26.49%、8.59%、9.25%、2.20%、1.03%, 分别较 T6 处理提高了 11.02%、30.55%、57.31%、22.22%、68.85%。T6 处理的厚壁菌门、髌骨菌门的相对丰度分别为 28.00%、1.13%, 分别较 T1 处理提高了 46.37%、32.94%。

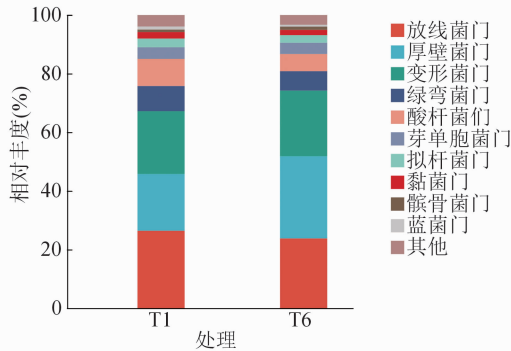


图 3 不同处理根际土壤细菌群落组成(门水平)的分布直方图

2.4.2 优势菌属分析 由图 4 可知,2 个处理的优

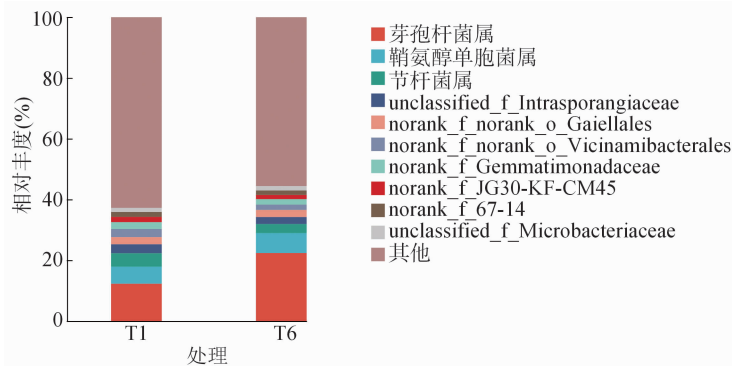


图 4 不同处理根际土壤细菌群落组成(属水平)分布直方图

势菌属包括芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、节杆菌属、unclassified_f_Intrasporangiaceae、norank_f_norank_o_Gaiellales、norank_f_norank_o_Vicinamibacterales、norank_f_Gemmatimonadaceae、norank_f_67-14、norank_f_JG30-KF-CM45、unclassified_f_Microbacteriaceae。T1、T6 处理的 10 种优势菌属的相对丰度之和分别为 37.27%、44.74%。T1 处理的节杆菌属、unclassified_f_Intrasporangiaceae、norank_f_norank_o_Vicinamibacterales、norank_f_Gemmatimonadaceae、norank_f_JG30-KF-CM45、norank_f_67-14 的相对丰度分别为 4.43%、2.96%、2.67%、2.25%、1.73%、1.62%, 分别较 T6 处理提高了 49.16%、27.57%、53.45%、22.95%、20.14%、20.00%。T6 处理的芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属的相对丰度分别为 22.40%、6.85%, 分别较 T1 处理提高了 81.67%、22.54%。

2.5 土壤细菌群落的 β 多样性分析

由图 5 可知,主成分 1、主成分 2 分别解释了 50.70%、14.99% 的群落差异,2 个处理的累计解释率达 65.69%。T1 处理处于主成分 1 的负值区域, T6 处理处于主成分 1 的正值区域,表明 2 个处理的细菌群落主成分之间有明显差异。T1、T6 处理均处于主成分 2 的正、负值区域,表明重复间存在一定变异性。

3 讨论

微生物在农田系统中对植物的生长具有重要

作用,其多样性水平可以敏感地指示土壤健康并影响植物生长^[10-12]。通过土壤细菌分布和 α 多样性分析发现,T1 处理的细菌群落多样性丰富度高于 T6

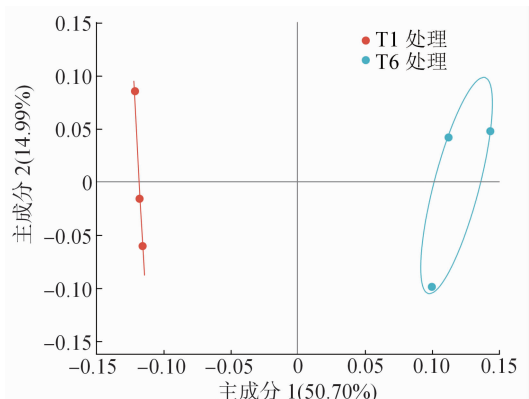


图5 不同处理根际土壤细菌群落组成的主坐标分析

处理,其种群结构相对完整。汪海静研究发现,过量施用氮肥反而会使土壤细菌的种类、数量减少,优势种群更加集中^[16],本研究结果与之一致。土壤细菌多样性、丰富度指数的增加,有助于提高土壤细菌群落的稳定性。对于不同类型的作物而言,由于根系分泌物的差异,导致作物根际土壤周围细菌群落也有较大差异^[17]。

本研究对烟草根际土壤细菌群落门水平结构组成进行分析发现,2个处理均以放线菌门、厚壁菌门、变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、芽单胞菌门、拟杆菌门、黏菌门、髌骨菌门、蓝菌门为优势菌门,这与前人的研究结果^[18-22]类似,说明各处理间的优势菌门存在较宽的生态位,能够适应各种生存环境,只是所占比例不同。T1处理的绿弯菌门、酸杆菌门、蓝菌门相对丰度均高于T6处理,绿弯菌门属于耐胁迫能力较强的微生物,对贫瘠环境的适应性强,适宜在低养分环境中生长繁殖^[23-24],本研究结果与杨玲等的研究结果^[25]一致。酸杆菌门是氮代谢的主要生态功能细菌^[26],具有较宽的生态位,且对不同环境的适应性较强^[18]。蓝菌门是地球上固氮量仅次于豆科植物、根瘤菌共生结合体的生物^[27],能将无机氮转化为有机氮^[28]。T6处理的厚壁菌门、髌骨菌门的相对丰度高于T1处理,厚壁菌门是许多盐渍化土壤中的优势菌群,本研究结果与前人研究^[29-34]一致。目前对髌骨菌门的研究较少,从现有的文献可知,髌骨菌门对土壤污染环境耐性较强^[35]。

通过烟草根际土壤优势细菌属水平结构组成分析发现,T6处理的芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属的相对丰度分别较T1处理大幅提高,2种优势菌属的相对丰度分别较T1处理提高了81.67%、22.54%。冯伟等研究发现,芽孢杆菌属是耐盐碱菌

的优势细菌种群^[36]。已有研究发现,芽孢杆菌可以产生内生孢子,在不利的环境下维持自身对外界的抵抗能力^[37-38],因而烟草在不利的根际环境下,可能通过产生大量芽孢杆菌,可以维持自身不受伤害。本研究结果与吴林坤等的研究结果^[39]相似。鞘氨醇单胞菌属具有较高的代谢能力^[40],被认为是具有植物促生特性的细菌,可在植物生长、植物耐受逆境胁迫等方面起到重要作用^[41]。有学者发现,施氮条件会增加鞘氨醇单胞菌等具有促生作用的细菌的相对丰度^[42],本研究结果与之一致。

4 结论

本研究利用Illumina高通量测序技术对丽江市永胜县不同氮肥施用量的烟草根际土壤细菌群落结构及其多样性进行了研究,发现氮肥可以改变土壤中的微生物群落结构,高于常规施用量的处理反而使细菌群落的种类、数量减少,优势菌群落更加集中,从而降低土壤微生物的丰富度,不利于土壤微生物多样性的保持。虽然大量研究发现,氮肥的施用在一定程度上可提高土壤中微生物的生物量,但是过量施肥反而不利于维持土壤微生物的种类、数量。本研究结果为丽江植烟区进一步开展施肥对烟草种植的研究提供了理论依据,但是高通量测序序列分析中有部分未被描述和鉴定的细菌,即在与现有数据库中已知序列进行比对时,无法获得该序列的分类学信息。因此,推测这些序列可能是烟草根际土壤中新发现的土壤微生物类群,还需采用其他分析手段进一步鉴定。

参考文献:

- [1] 毕庆文. 海拔高度对烤烟生长发育及品质的影响[D]. 郑州:河南农业大学,2009:5-9.
- [2] 徐艳丽. 移栽期与施氮量对不同品种烤烟生长发育及品质的影响[D]. 北京:中国农业科学院,2014:3-5.
- [3] 孙敬钊. 不同种植密度和施氮量对烤烟生长发育及产质量的影响[D]. 长沙:湖南农业大学,2016:1-10.
- [4] 李自林,刘书武,赵馨馨,等. 减氮施肥对烟叶品质及土壤肥力的影响[J]. 湖南农业科学,2021(7):40-43.
- [5] 邢云霞,刘世亮,朱金峰,等. 施氮调控豫中烟区烤烟品质及经济效益研究[J]. 干旱地区农业研究,2017,35(6):201-208.
- [6] 刘小芳,李万源,成红云,等. 不同施肥量对烟草生长发育及经济产量的影响[J]. 湖南农业科学,2014(10):36-39.
- [7] 靳冬梅,韩利红,杨兴有,等. 施氮量和钾氮比例对晒黄烟叶品质的影响[J]. 湖南农业科学,2019(10):36-39,42.
- [8] 彭桃军,沈雪婷,李亚纯,等. 不同施氮量对烤烟NC297产质量的影响[J]. 贵州农业科学,2017,45(3):67-70.

- [9] Wallenstein M D, McNulty S, Fernandez I J, et al. Nitrogen fertilization decreases forest soil fungal and bacterial biomass in three long-term experiments[J]. *Forest Ecology and Management*, 2006, 222(1/2/3):459–468.
- [10] Cusack D F, Silver W L, Torn M S, et al. Changes in microbial community characteristics and soil organic matter with nitrogen additions in two tropical forests[J]. *Ecology*, 2011, 92(3):621–632.
- [11] Degens B P, Schipper L A, Sparling G P, et al. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(2):189–196.
- [12] 孙峰, 田伟, 张非, 等. 丹江口库区库滨带植被土壤细菌群落多样性及 PICRUSt 功能预测分析[J]. *环境科学*, 2019, 40(1):421–429.
- [13] 冯艺博, 康超群, 李瑞霞, 等. 施肥对马铃薯根际细菌群落多样性与功能的影响[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(8):3004–3019.
- [14] Jing J Y, Cong W F, Martijn Bezemer T. Legacies at work: plant-soil-microbiome interactions underpinning agricultural sustainability[J]. *Trends in Plant Science*, 2022, 27(8):781–792.
- [15] 阎佩云. 土壤微生物在植物营养促进作用中的改善作用[J]. *吉林农业*, 2019(9):73.
- [16] 汪海静. 氮肥对土壤微生物多样性影响的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011:5–29.
- [17] 谷晓楠, 贺红土, 陶岩, 等. 长白山土壤微生物群落结构及酶活性随海拔的分布特征与影响因子[J]. *生态学报*, 2017, 37(24):8374–8384.
- [18] 高秀宏, 李敏, 卢萍, 等. 呼和浩特市大青山白桦根际土壤细菌群落结构研究[J]. *生态学报*, 2019, 39(10):3586–3596.
- [19] 丁新景, 敬如岩, 黄雅丽, 等. 基于高通量测序的4种不同树种人工林根际土壤细菌结构及多样性[J]. *林业科学*, 2018, 54(1):81–89.
- [20] 陈泽斌, 高熹, 王定斌, 等. 生物炭不同施用量对烟草根际土壤微生物多样性的影响[J]. *华北农学报*, 2018, 33(1):224–232.
- [21] 张妍妍, 杨建涛, 李喜凤, 等. 施用氮肥对烟草镉积累及其根际细菌群落的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2022, 56(1):11–20.
- [22] 毛晓宁, 刘美玲, 李然然, 等. 施肥对东北春玉米根际土壤细菌群落结构的影响[J]. *中国野生植物资源*, 2024, 43(3):34–38.
- [23] Zhou J, Guan D W, Zhou B K, et al. Influence of 34-year fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in Northeast China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 90:42–51.
- [24] Huang Q, Wang J L, Wang C, et al. The 19-year inorganic fertilization increased bacterial diversity and altered bacterial community composition and potential functions in a paddy soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 144:60–67.
- [25] 杨玲, 张艺, 钟俊杰, 等. 不同调酸剂对种植玉米红壤微生物群落的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2024, 43(3):609–616.
- [26] Wang Z H, Xu M Z, Li F, et al. Changes in soil bacterial communities and functional groups beneath coarse woody debris across a subalpine forest successional series[J]. *Global Ecology and Conservation*, 2023, 43:e02436.
- [27] 赵仪. 白三叶间作和腐解对幼龄茶园土壤特性、酶活性和细菌群落的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2023:33–42.
- [28] 杜琼, 孔维宝, 韩锐, 等. 土壤微藻的种类及其功能研究进展[J]. *生物学通报*, 2015, 50(1):1–5.
- [29] Ahmed V, Verma M K, Gupta S, et al. Metagenomic profiling of soil microbes to mine salt stress tolerance genes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:159.
- [30] 潘媛媛. 松嫩平原盐碱地中可培养耐(嗜)盐菌的多样性分析及两株中度嗜盐菌的多相分类鉴定[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013:40–50.
- [31] 代金霞, 田平雅, 张莹, 等. 银北盐渍化土壤中6种耐盐植物根际细菌群落结构及其多样性[J]. *生态学报*, 2019, 39(8):2705–2714.
- [32] Bhatt H B, Gohel S D, Singh S P. Phylogeny, novel bacterial lineage and enzymatic potential of haloalkaliphilic bacteria from the saline coastal desert of Little Rann of Kutch, Gujarat, India[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(1):53.
- [33] 白雪花, 陈晓蓉, 陈新范, 等. 连作与非连作苧麻根际微生物的多样性研究[J]. *中国麻业科学*, 2021, 43(5):222–230.
- [34] 王改萍, 阿依古丽·托乎提, 王茹, 等. 新疆乌鲁木齐地区盐渍土壤耐盐细菌多样性与群落结构研究[J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(2):17–26.
- [35] 陈海生, 陈韬略, 蔡林生, 等. 镉污染对滨海滩涂围垦区西兰花根际土壤细菌群落结构的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2024, 55(1):21–28.
- [36] 冯伟, 孙瑞, 高广海, 等. 天津团泊湖地区盐碱土壤中可培养微生物群落结构和归属分析[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(5):1028–1035.
- [37] Kerney K R, Schuenger A C. Survival of *Bacillus subtilis* endospores on ultraviolet-irradiated rover wheels and Mars regolith under simulated Martian conditions[J]. *Astrobiology*, 2011, 11(5):477–485.
- [38] 王兴松, 李恩星, 杨诗瀚, 等. 根结线虫病对烟草植株根际土壤微生物群落及其功能的影响[J]. *江苏农业学报*, 2024, 40(6):993–1003.
- [39] 吴林坤, 黄伟民, 王娟英, 等. 不同连作年限野生地黄根际土壤微生物群落多样性分析[J]. *作物学报*, 2015, 41(2):308–317.
- [40] 李茂森, 高卫锴, 任天宝, 等. 遵义烟区不同海拔下植烟土壤细菌群落及影响因素分析[J]. *作物杂志*, 2021(6):193–198.
- [41] Wang Q, Ge C F, Xu S A, et al. The endophytic bacterium *Sphingomonas* SaMR alleviates Cd stress in oilseed rape through regulation of the GSH-AsA cycle and antioxidative enzymes[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1):63.
- [42] Timmusk S, Paalme V, Pavlicek T, et al. Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3):e17968.