

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2019.0327

苏鑫,郭迎岚,卢嫚,等.2020.3种碳添加对退化农田土壤固碳细菌群落结构多样性的影响[J].环境科学学报,40(1):234-241

Su X, Guo Y L, Lu M, et al. 2020.Effects of three kinds of carbon addition on community structure diversity of CO<sub>2</sub>-assimilating bacterial in degraded farmland soil[J].Acta Scientiae Circumstantiae,40(1):234-241

## 3 种碳添加对退化农田土壤固碳细菌群落结构多样性的影响

苏鑫,郭迎岚,卢嫚,冯程程,岳中辉\*

哈尔滨师范大学生命科学与技术学院,黑龙江省普通高等学校植物生物学重点实验室,哈尔滨 150025

**摘要:**为研究秸秆、生物炭和纳米碳添加对退化农田土壤固碳细菌群落结构多样性的影响,利用高通量测序技术,对 3 种碳源添加后黑龙江省嫩江县退化农田土壤的固碳细菌群落结构及多样性进行研究.结果表明:①在 97% 相似度水平下,秸秆、生物炭添加后土壤固碳细菌的 Chao1 指数、Observed species 和 Shannon 指数高于纳米碳添加后的土壤.②群落组成方面,在门水平上,变形菌门(Proteobacteria)为优势菌门,在生物炭添加后的相对丰度最高,为 94.35%;在纲水平上, $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)为优势菌纲,在纳米碳添加后的相对丰度最高,为 67.45%;在目水平上,着色菌目(Chromatiales)为优势菌目,在纳米碳添加后的相对丰度最高,为 50.83%;在科水平上,节外硫红螺菌科(Ectothiorhodospiraceae)为优势菌科,在纳米碳添加后的相对丰度最高,为 34.34%;在属水平上,硫碱弧菌(*Thioalkalivibrio*)、*Sulfurifustis*、*Thiobacillus* 为优势菌属,分别在生物炭、纳米碳和秸秆添加后的相对丰度最高,相对丰度分别为 17.02%、16.40%、13.03%.③层次聚类和主成分分析结果显示,生物炭和纳米碳添加后土壤固碳细菌群落结构差异显著,进一步进行组间差异显著性分析表明,显著差异标记主要富集在生物炭添加的土壤中,主要为硫碱弧菌和硫腺菌(*Thiocystis*)最为显著.④冗余分析结果表明,土壤固碳细菌群落结构受土壤 pH、有机碳、全氮、全磷、碱解氮及有效磷的综合影响,其中,土壤 pH 和全氮含量是影响土壤固碳细菌群落结构的主要理化性质.上述结果表明,秸秆添加对土壤固碳细菌群落结构及多样性影响较小,生物炭添加可显著提高土壤固碳细菌群落多样性,纳米碳添加对土壤固碳细菌的影响具有一定特异性;土壤固碳细菌群落结构受土壤 pH 和全氮含量显著影响.

**关键词:**退化农田;碳添加;固碳细菌;*cbtL* 基因;高通量测序

文章编号:0253-2468(2020)01-234-08 中图分类号:X53 文献标识码:A

## Effects of three kinds of carbon addition on community structure diversity of CO<sub>2</sub>-assimilating bacterial in degraded farmland soil

SU Xin, GUO Yinglan, LU Man, FENG Chengcheng, YUE Zhonghui\*

Key Laboratory of Plant Biology, Colleges and Universities in Heilongjiang Province, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025

**Abstract:** In order to study the effects of straw, biochar and nano-carbon on the structure and diversity of carbon-fixing bacterial community in degraded farmland, the high throughput sequencing technology was used to study the characteristics of CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria community in soil with three different carbon sources adding in Nenjiang County, Heilongjiang Province. The results show that: ①At 97% similarity level, Chao1 index, observed species and Shannon index of CO<sub>2</sub>-assimilating soil bacteria with straw addition and biochar addition were higher than with nano-carbon addition. ②In terms of community composition, Proteobacteria was dominant at the phylum level, and the relative abundance was the highest after the addition of biochar, which was 94.35%. At the class level, Gammaproteobacteria is the dominant one, and the relative abundance reaches highest at 67.45% in soil amended with nano-carbon. Chromatiales is the dominant order, with the relative abundance of 50.83% in nano-carbon amended soil. Ectothiorhodospiraceae is the dominant family, and the highest relative abundance reaches 34.34% also in nano-carbon amended soil. At the genus level, *Thioalkalivibrio*, *Sulfurifustis* and *Thiobacillus* are the dominant, and the relative abundance is 17.02%, 16.40% and 13.03%, respectively, after the addition of biochar, nano-carbon and straw, respectively. ③The results of hierarchical clustering and principal component analysis show that there were significant differences in the community structure of CO<sub>2</sub>-assimilating soil bacteria after the addition of different carbon sources. It was found that the markers of significant differences were mainly concentrated in the soil added with biochar, especially the *Thioalkalivibrio* and *Thiocystis*. ④The results of

收稿日期:2019-06-15 修回日期:2019-08-16 录用日期:2019-08-16

基金项目:黑龙江省自然科学基金(No.C2017039);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(No.2017-KYYWF-0135);哈尔滨师范大学硕士研究生创新科研项目(No.HSDSSCX2018-52)

作者简介:苏鑫(1995—),女,E-mail:18746428101@163.com; \* 责任作者,E-mail:yuezhonghui@163.com

Redundancy analysis showed that the structure of CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria community in soil was influenced by pH, organic carbon, total nitrogen, total phosphorus, available nitrogen and phosphorus. Soil pH and total nitrogen content were the main physical and chemical properties of soil CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria community structure. The above results show that the addition of straw had little effect, but the addition of biochar significantly increased the diversity of soil CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria community. nano-carbon has special effect on soil CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria.

**Keywords:** degraded farmland; carbon addition; CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria; *cbbL* gene; high-throughput sequencing

## 1 引言 (Introduction)

农田生态系统是陆地生态系统的重要组成部分,也是固碳潜力最大的碳库之一,其中固碳细菌分布广泛,环境适应能力强,能够较好地反映土壤肥力变化特征(袁红朝等,2011).近年来,由于人类过度开垦和不合理使用,致使生态系统严重受损,农田土壤退化现象极为严重,土壤中的固碳细菌群落结构极有可能产生了较大变化,进而影响其固碳功能,并最终对陆地生态系统土壤碳库产生一定影响(Smith,2004;韩冰等,2005).碳源材料具有高度的生物化学稳定性和较强的吸附性能,能够改善土壤质量、持留土壤养分,同时也对土壤微生物群落结构产生一定的影响(Awad *et al.*,2012).研究不同碳源对土壤固碳细菌群落结构、多样性的影响,分析引起固碳细菌群落变化的主控土壤理化因子,对明晰农田土壤生态系统固碳机制具有一定的意义.

碳源添加会对农田土壤理化性质及微生物活性产生一定的影响.研究发现,秸秆添加可以改善土壤结构,使土壤土质疏松多孔,提高土壤中的微生物及酶活性(Alison *et al.*,2000; Sapkota *et al.*,2012);生物炭添加可以减少土壤养分流失,提高细菌群落结构丰富度及多样性(侯建伟等,2018),并使土壤生物活性得到明显改善(Karhu *et al.*,2011);纳米碳是一种新型的碳材料,施用纳米碳可以维持土壤有机质的稳定性,其小尺寸效应强化了肥料吸附性能,可防止肥料在土壤中流失,避免对土壤造成污染,在改善土壤肥力、提高作物产量等方面具有一定的作用(高荣广等,2018;史妍君等,2018).高通量测序(Illumina Miseq)技术具有测序深度深、获得数据量大等优点,能更加真实地揭示微生物群落的复杂性和多样性(Shokralla *et al.*,2012).将 *cbbL* 作为标记基因,已被国内外学者广泛应用于生物固碳分子生态学研究,并已取得了一定的进展(Yuan *et al.*,2012; Selesi *et al.*,2015).现有的研究主要集中于农田土壤中秸秆、生物炭添加后土壤细菌群落的变化,对纳米碳添加后土壤细菌群落的变化研究较少,尤其是对东北退化农田区添加 3 种碳

源(秸秆、生物炭、纳米碳)后土壤固碳细菌群落结构及多样性的变化研究鲜见报道.因此,本文以秸秆、生物炭和纳米碳为添加材料,以 16S rRNA 基因为标靶,借助荧光定量 PCR 技术和 Illumina MiSeq 高通量测序平台,分析 3 种碳源添加对退化农田土壤固碳细菌群落结构多样性的影响及与土壤理化性质间的关系,以期对退化农田土壤改良和碳源的合理利用提供理论参考.

## 2 材料与方 法 (Materials and methods)

### 2.1 试验材料

秸秆为当季作物秸秆(玉米秸秆),碳含量为 40%;生物炭为溧阳活性炭公司生产的由作物(玉米)秸秆制成的混合碳粉,碳含量为 79.68%;纳米碳为溧阳活性炭公司生产的由柱状活性炭、椰鞘活性炭、纳米矿晶混合生产而成的颗粒碳,碳含量为 14.06%.试验所用肥料为红四方复合肥料,N+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+K<sub>2</sub>O≥45%.

### 2.2 试验设计与样品采集

试验土壤选自黑龙江省嫩江县中储粮北方农业开发有限公司科技园区内的退化农田,地理位置为北纬 49°33′、东经 125°27′,属温带大陆性季风气候.区域年平均气温为 -1℃,年均无霜期为 110 d,年平均降水量为 450 mm,土壤类型为黑土,pH 为 5.97,有机碳含量为 6.61 g·kg<sup>-1</sup>,主要种植玉米、大豆和小麦.

于 2016 年 8 月在试验区域选择面积约为 99 m<sup>2</sup> (9 m×11 m)的田块单元作为本试验的研究样地,先将样地平均分成 4 部分,每部分面积约为 4 m×5 m,中间间隔宽 1 m、深 50 cm 的长沟,不种植作物,作为隔离带.于 2016 年 10 月秋整地后以“等碳量”原则添加 3 种碳源,共计 4 个处理,每个处理 3 次重复,其中,秸秆(S)7500 kg·hm<sup>-2</sup>、生物炭(B)3764.71 kg·hm<sup>-2</sup>、纳米碳(N)21333.33 kg·hm<sup>-2</sup>,并且施入深度为 20 cm,未施碳源处理的样地作为对照样地(CK),各处理均施用 250 g 复合肥.2016 年、2017 年种植作物均为玉米.

添加 3 种碳处理 2 年后于 2018 年 10 月

(2016—2018年无其他对土壤有影响的活动),取作物收获后耕层(0~20 cm)土壤,每个小区随机取5个样点混合成1个样品,现场挑选出杂质(石子、作物根系残体等),然后用聚乙烯塑料袋分装,并在袋上做好标记,放进干冰保温箱中,运回实验室后保存于-80℃的冰箱,用于土壤微生物分析.用于土壤理化性质测定的土样,通过风干过2 mm筛后,于干燥环境中常温保存.

### 2.3 土壤理化性质测定

土壤 pH 采用电位法测定(水土比为 2.5:1);有机碳(Soil organic carbon, SOC)采用浓硫酸-重铬酸钾消煮-硫酸亚铁滴定法测定;全氮(Total nitrogen, TN)采用半微量凯氏定氮法测定;全磷(Total phosphorus, TP)采用 NaOH 熔融-钼锑抗比色法测定;碱解氮(Active nitrogen, AN)采用碱解扩散法测定;有效磷(Active phosphorus, AP)采用钼锑抗比色法测定.上述测定具体方法参见《土壤农化分析》(鲍士旦, 2000).

### 2.4 DNA 提取、PCR 扩增及 MiSeq 测序

DNA 提取及高通量测序时取 0.5 g 土壤样品,用土壤 DNA 提取试剂盒 Power Soil DNA Isolation Kit(MoBio Laboratories, Carlsbad, CA)提取总 DNA,在 0.8%琼脂糖凝胶上检测基因组 DNA 的纯度和质量,取适量的样品于离心管中测浓度后置于-80℃冰箱保存.

对 16S rRNA 基因的 V4~V5 高变区片段进行 PCR 扩增,引物序列为 *cbbL-F*: 5'-GACTTCACCAAAGACGACGA-3' 和 *cbbL-R*: 5'-TCGAACCTTGATTCTTTCAC-3'; *cbbL-F*: 5'-CAT CATGTTTCGACCA GGACT-3' 和 *cbbL-R*: 5'-TCGAACCTTGATTCTT TCCA-3'(季风云等, 2016).PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 60 s,52℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 60 s,共 30 个循环;72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存.每个样本 3 次重复,将同一样本的 PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用 Axy Prep DNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物,Tris HCl 洗脱;2%琼脂糖电泳检测.根据电泳初步定量结果,对 PCR 产物进行定量检测,按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合.DNA 样品送至北京 Allwegene 公司 Illumina MiSeq PE300 平台上机测序.

### 2.5 数据处理与分析

通过 MiSeq PE300 测序平台获得双端序列数

据,为了保证后续生物信息分析的准确性,在 Trimmomatic 和 FLASH 软件平台上对测序数据进行过滤和拼接:过滤 Read 尾部质量值 20 以下的碱基;根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对 reads 拼接(merge)成 1 条序列,最小 overlap 长度为 10 bp;拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.1,不符合序列直接成对过滤掉;根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品,并调整序列方向,barcode 允许的错配数为 0.

基于 97%相似度水平,在 Usearch(vesion7.0)平台上进行 OTU 聚类分析,并在门、纲、目、科、属水平上统计并分析各个样品的细菌群落组成(Edgar, 2013);根据 OTU 分析结果利用 R 语言工具,作图并分析样品稀释性曲线(Rarefaction Curve),绘制 goods coverage、Observed species、Chao1 指数及 Shannon 指数的曲线(Yu *et al.*, 2012);利用韦恩图比较样本间 OTU 相似性;利用 LefSe 分析方法设定显著差异的 LDA 值为 4.0,寻找组间丰度差异显著物种.

利用 Excel 软件对数据进行整理、汇总;利用 SAS9.2 软件进行差异显著性分析( $p < 0.05$  为差异显著)及主成分分析(PCA);利用 Qiime 软件计算 Unifrac 距离,并基于 WeightedUnifrac 方法构建 UPGMA 样品聚类树(Jiang *et al.*, 2013);利用 CANOCO 4.5 软件进行冗余分析.

## 3 结果与分析(Results and analysis)

### 3.1 不同碳添加后的土壤理化性质变化

3 种碳源添加对土壤理化性质的影响如表 1 所示,秸秆添加后土壤有机碳、全磷、有效磷含量无显著变化( $p > 0.05$ ),土壤 pH 显著升高,升高率为 1.71%,土壤全氮、碱解氮含量显著降低( $p < 0.05$ ),降低率分别为 10.71%、10.05%;生物炭添加后土壤有机碳、碱解氮、有效磷含量无显著变化( $p > 0.05$ ),pH、全磷含量显著升高( $p < 0.05$ ),升高率分别为 2.80%、6.32%,全氮含量显著降低( $p < 0.05$ ),降低率为 5.95%;纳米碳添加后土壤 pH、全磷含量无显著变化( $p > 0.05$ ),有效磷含量显著升高( $p < 0.05$ ),升高率为 15.53%,有机碳、全氮、碱解氮含量显著降低( $p < 0.05$ ),降低率分别为 10.76%、21.43%、14.06%.

表 1 不同碳添加后的土壤理化性质

Table 1 Soil physical-chemical characteristics under different carbon treatments

处理	pH	变化率	有机碳/ (g·kg <sup>-1</sup> )	变化率	全氮/ (g·kg <sup>-1</sup> )	变化率	全磷/ (g·kg <sup>-1</sup> )	变化率	碱解氮/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	变化率	有效磷/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	变化率
对照	6.43±0.04 <sup>c</sup>	—	7.25±0.56 <sup>a</sup>	—	0.84±0.00 <sup>a</sup>	—	0.95±0.02 <sup>b</sup>	—	72.63±0.88 <sup>a</sup>	—	59.23±0.87 <sup>b</sup>	—
秸秆	6.54±0.01 <sup>b</sup>	1.71%	7.88±0.30 <sup>a</sup>	8.69%	0.75±0.00 <sup>c</sup>	-10.71%	0.95±0.03 <sup>b</sup>	0.00	65.33±1.01 <sup>b</sup>	-10.05%	61.13±1.78 <sup>b</sup>	3.21%
生物炭	6.61±0.03 <sup>a</sup>	2.80%	8.09±0.21 <sup>a</sup>	11.57%	0.79±0.00 <sup>b</sup>	-5.95%	1.01±0.00 <sup>a</sup>	6.32%	72.92±1.01 <sup>a</sup>	0.40%	55.92±1.34 <sup>b</sup>	-3.01%
纳米碳	6.45±0.03 <sup>c</sup>	0.31%	6.47±0.24 <sup>b</sup>	-10.76%	0.65±0.02 <sup>d</sup>	-21.43%	0.94±0.00 <sup>b</sup>	-1.05%	62.42±2.02 <sup>c</sup>	-14.06%	68.43±0.55 <sup>a</sup>	15.53%

注:同列数字后不同小写字母表示不同处理间差异显著( $p < 0.05$ ).

### 3.2 不同碳添加土壤固碳细菌群落多样性

在 97% 相似度水平下, 稀释曲线均趋于平缓(图 1), 表明所测序列已经基本覆盖到土壤样品中的所有物种, 测序数据量合理。从图 1a 可以看出, 土壤固碳细菌群落分析获得的有效序列覆盖率达 98% 以上, 可以满足解释土壤细菌群落多样性的需要。土壤固碳细菌群落结构丰富度和多样性主要是

由 OTUs 统计的 Observed species、表征菌群丰度的 Chao1 指数及反映菌群多样性的 Shannon 指数来表示。从图中可以看出, 秸秆、生物炭添加后土壤中固碳细菌的 Observed species 指数(图 1b)、Chao1(图 1c)指数及 Shannon 指数(图 1d)均高于纳米碳添加的土壤样品, 说明秸秆、生物炭的添加有利于提高土壤固碳细菌群落多样性。

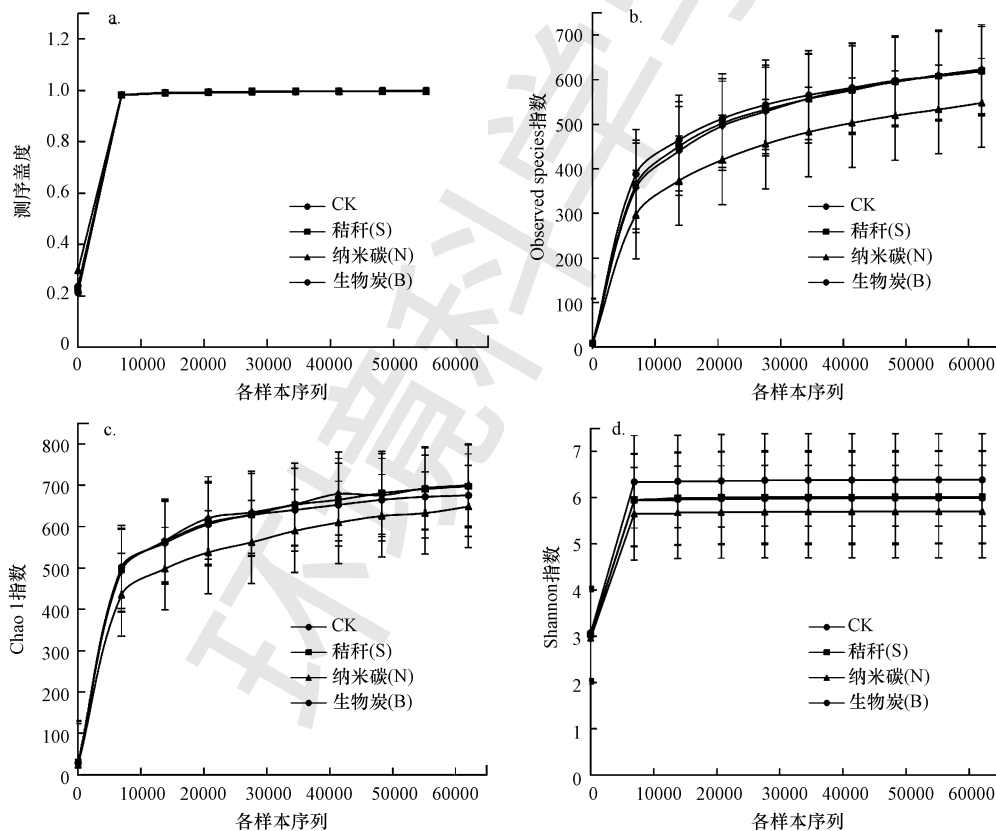


图 1 不同碳源添加后的土壤固碳细菌群落多样性

Fig.1 Community diversity of CO<sub>2</sub>-assimilating soil bacteria with different carbon treatments

### 3.3 不同碳添加土壤固碳细菌物种丰度

不同碳源添加后土壤 OTU 数量关系韦恩图如图 2 所示, 3 种碳源添加和无碳添加的土壤样品共产生 857 个 OTUs, 共同包含 632 个 OTUs, 占总体 OTU 个

数的 73.75%。其中, CK 共得到 759 个 OTUs, 秸秆添加土壤共得到 740 个 OTUs, 生物炭添加土壤共得到 777 个 OTUs, 纳米碳添加土壤共得到 734 个 OTUs。说明秸秆和纳米碳添加后土壤固碳细菌物种丰度减少, 而生

物炭添加后土壤固碳细菌物种丰度增加。

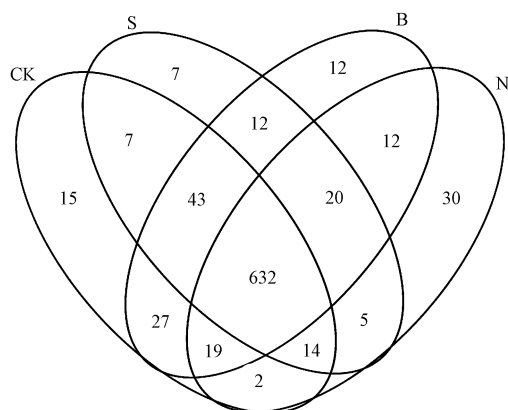


图2 不同碳源添加的土壤固碳细菌 Venn 图 (CK: 对照样地, S: 秸秆, B: 生物炭, N: 纳米碳)

Fig.2 OTUs venn of soil CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria in different carbon treatments

### 3.4 不同碳添加土壤固碳细菌群落组成及相对丰度

研究所得的序列被归为 3 门、4 个纲、7 个目、11 个科和 15 个属, 如图 3 所示, 这些微生物大多只能归类到分类水平比较高级的变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 的细菌类群中. 以门作为分类学水平, 变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌门, 在生物炭添加后的相对丰度最高, 为 94.35%; 在纲水平上,  $\gamma$ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 为优势菌纲, 在纳米碳添加后的相对丰度最高, 为 67.45%; 在目水平上, 着色菌目 (Chromatiales) 为优势菌目, 在纳米碳添加后的相对丰度最高, 为 50.83%; 在科水平上, 节外硫红螺菌科 (Ectothiorhodospiraceae) 为优势菌科, 在纳米碳添加后的相对丰度最高, 为 34.34%; 在属水平上, 硫碱弧菌 (*Thioalkalivibrio*)、*Sulfurifustus*、*Thiobacillus* 为优

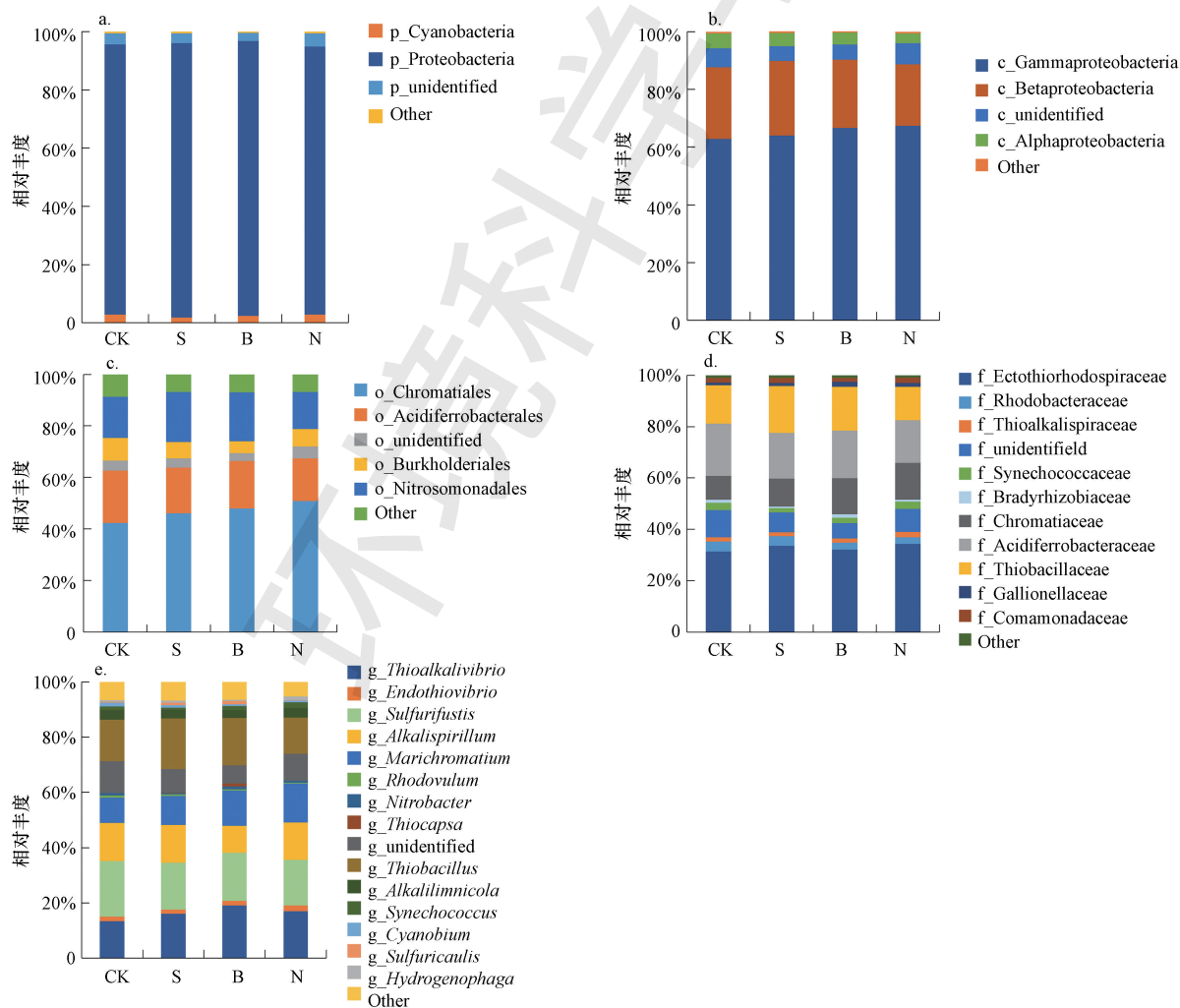


图3 不同碳源添加下土壤固碳细菌群落在门(a)、纲(b)、目(c)、科(d)、属(e)水平上的组成及相对丰度

Fig.3 Soil CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria community composition and relative abundance at phylum(a), class(b), order(c), family(d) and genus(e) level with different carbon treatments

势菌属,分别在生物炭、纳米碳和秸秆添加后的相对丰度最高,相对丰度分别为 17.02%、16.40%、13.03%。说明在门水平上,生物炭添加是影响固碳细菌群落结构的重要因素,而在纲、目、科水平上,纳米碳添加是影响固碳细菌群落结构的重要因素,在属水平上,秸秆、生物炭和纳米碳添加是影响固碳细菌群落结构的重要因素。

### 3.5 不同碳添加土壤固碳细菌群落组间差异

基于 OTU 的层次聚类分析结果显示,不同碳源添加后土壤固碳细菌群落结构差异明显,树枝长度代表样本间的距离,越是相似的样本越能聚到一起,N1 与 B1、B2、B3,CK3 与 S1、S2、S3 距离较近(图 4a)。主成分分析进一步证实了不同碳源添加后固碳细菌群落结构差异明显,第一、二主成分轴对

细菌群落结构变异的解释量分别为 33.79% 和 18.21%。其中,CK3 与 S1、S2、S3 聚集在一起,而 N1、N2、N3 与 B1、B2、B3 相距较远(图 4b)。说明纳米碳和生物炭添加的土壤样本中固碳细菌群落差异显著。

进一步通过 LEfSe 分析,可以找出组间具有显著差异的物种(Biomarker),以及显著影响组间差异性的物种或群落。不同碳源添加后土壤固碳细菌群落组间差异 LEfSe 分析柱状图如图 5 所示,不同碳源添加对应不同的物种,从图中可以看出生物炭添加后显著性差异物种最多,主要为硫碱弧菌(*Thioalkalivibrio*)和硫腺菌(*Thiocystis*)间的差异最为显著,对照处理次之,秸秆和纳米碳添加后群落组间无显著差异物种。

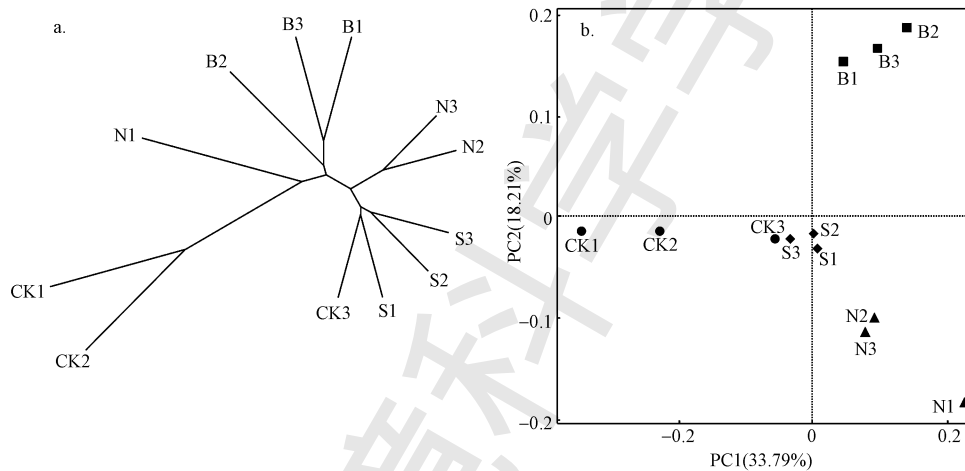


图 4 不同碳处理固碳细菌群落结构的层次聚类树(a)和主成分分析(b)

Fig.4 Hierarchical clustering tree(a) and principal components analysis(b) of the soil CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria community structure in different carbon treatments

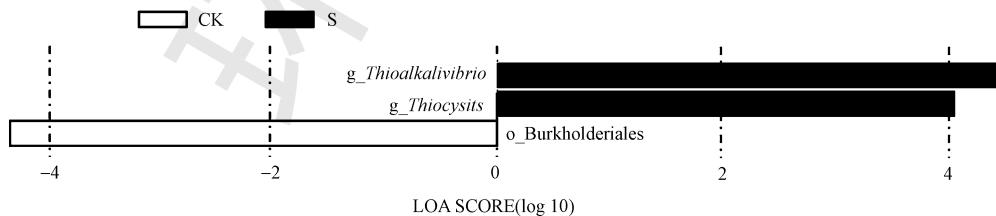


图 5 不同碳源添加下土壤固碳细菌物种差异分析(Lefse 分析)

Fig.5 Lefse analysis on species difference of soil CO<sub>2</sub>-assimilating bacteria with different carbon treatments

### 3.6 不同碳添加土壤固碳细菌群落结构与土壤理化性质的关系

对不同碳源添加后土壤固碳细菌群落结构与土壤理化性质进行冗余分析(图 6),第一排序轴对

土壤固碳细菌群落变化解释最多,达 40.69%;第二排序轴仅解释了固碳细菌群落变化的 10.09%,前两轴共解释了固碳细菌群落总变异的 50.78%,在对固碳细菌群落变异的解释中起主导作用。结果显示,第

一排序轴与 pH(相关系数为 0.767)、TN(0.787)、AN(0.650)、SOC(0.199)呈正相关,与 AP(-0.472)呈负相关( $p < 0.05$ );第二排序轴与 pH(0.354)、AP(0.751)呈正相关,与 SOC(-0.391)、TN(-0.456)、AN(-0.523)、TP(-0.764)呈负相关( $p < 0.05$ ).说明土壤固碳细菌的群落结构受土壤 pH、有机碳、全氮、全磷、碱解氮及有效磷含量的综合影响,土壤 pH 和全氮是影响碳添加后土壤固碳细菌群落结构的主要理化性质.

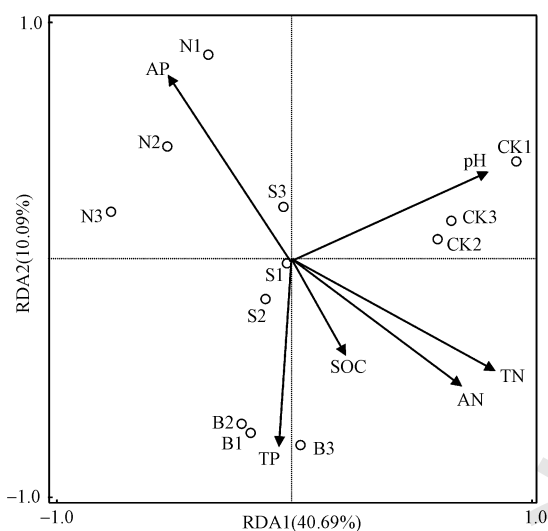


图6 土壤理化性质对固碳细菌群落结构影响的冗余分析

Fig.6 Redundancy analysis between soil physical and chemical properties and the  $\text{CO}_2$ -assimilating bacteria community structure

#### 4 讨论 (Discussion)

生物固碳是陆地生态系统中最直接有效的二氧化碳固定途径,其中,具有固碳功能的微生物分布广泛,环境适应能力强,从整个生物圈的物质能量流来看,二氧化碳的微生物固定是一支不容小觑的生物固碳力量(袁红朝等,2011).本研究采用 MiSeq 高通量测序技术,对比研究 3 种碳源添加后土壤固碳细菌群落结构及多样性的差异.结果表明,3 种碳源添加后变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)为研究菌群所属的两大门类,变形菌门在土壤中所占比例最大,这与以往学者的研究结论一致(季风云等,2016;刘琼等,2017).但本研究发现变形菌门的  $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)为土壤中的优势纲,与以往学者研究发现变形菌门的  $\alpha$ -变形菌纲( $\alpha$ -Proteobacteria)和  $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -Proteobacteria)为土

壤中的优势纲(戴雅婷等,2017)存在差异,可能是由于本研究的供试土壤为退化农田土壤, $\gamma$ -变形菌纲细菌具有一定降解能力,因此为本研究土壤中的优势菌纲.研究还发现,3 种碳源添加后节外硫红螺菌科(Ectothiorhodospiraceae)为  $\gamma$ -变形菌纲中的优势菌科,这是研究发现的一个新现象,节外硫红螺菌科微生物具有利用光能固定  $\text{CO}_2$  的显著作用,说明碳添加后土壤中固定  $\text{CO}_2$  的微生物菌群数量增多,有利于减少  $\text{CO}_2$  等温室气体的排放,在 3 种碳源中,纳米碳添加后节外硫红螺菌科微生物的数量最多,说明纳米碳在土壤固碳作用中有一定优势.

3 种碳源添加相比,秸秆添加后土壤固碳细菌物种丰度无明显变化,层次聚类分析结果也发现秸秆添加与无碳添加的土壤中固碳细菌群落相似性高,说明秸秆添加对土壤固碳细菌群落结构及多样性影响不大,这与 Yuan 等(2012)对水稻田土壤固碳细菌的研究结果一致,但也有研究发现秸秆和化肥共同施用能提高土壤固碳细菌多样性(Yuan *et al.*, 2013),因此,在生产上如何利用秸秆达到固碳的效果还需结合生产情况进行深入研究.生物炭添加后在门水平上土壤中固碳细菌群落的平均相对丰度最高,土壤固碳细菌群落组间差异物种也最多,这与武爱莲等(2016)研究发现随着生物炭施用量的增加土壤细菌多样性呈增加趋势,以及 Jin (2010)研究发现土壤细菌群落多样性随着生物炭的增加而变大的结论一致,说明生物炭相较于其他碳源来说,能够提高土壤固碳细菌群落的多样性;但也有学者持相反意见,如 Pietikainen 等(2000)研究发现生物炭施用对总体微生物量影响不大, Marris(2006)研究发现生物炭的施用会降低土壤微生物的多样性.这是由于生物炭产品种类多样,其组分和结构存在差异,因而造成微生物群落对生物炭添加的响应不同,在实际生产中要明晰不同生物炭的特性,并基于前期的调研和小区试验工作,结合土壤特性进行合理施用.纳米碳具有特殊的物理性质,其小尺寸和大表面积具有明显吸附作用(薛文强等,2018).本研究中虽然纳米碳添加后土壤中固碳细菌群落多样性最低,在纲、目、科这 3 个水平上,纳米碳添加后土壤固碳细菌群落相对丰度最高,这与以往学者研究发现纳米材料对特定微生物类群丰度具有显著的影响的结果一致(刘安勋等,2017),说明纳米碳对土壤固碳细菌的影响具有一定的特异性.但也有学者研究发现,纳米碳添加对土

壤养分循环转化具有一定的抑制作用 (Lehmann *et al.*, 2011), 且由于纳米材料的成本问题, 在生产上的应用还需进一步研究。

众所周知, 土壤微生物群落结构与土壤理化性质存在一定相关关系 (刘琼等, 2017), 本研究通过冗余分析发现, 3 种碳源添加后土壤固碳细菌群落与土壤各理化性质均有一定的相关关系 ( $p < 0.05$ ), 说明土壤固碳细菌群落结构受土壤理化性质的综合影响, 其中, 土壤 pH 和全氮对细菌群落的影响最显著, 这与 Liu 等 (2014) 的研究结果一致。土壤固碳细菌群落的第一与第二排序轴分别解释了样本 40.69% 和 10.09% 的总变异, 说明除了土壤性质外还有其他因素引起了固碳微生物群落结构的变化, 如植被的变化同样会引起固碳微生物群落的变化 (梁雪, 2017), 其具体情况还需在今后的工作中进一步研究。

## 5 结论 (Conclusions)

3 种碳源添加后对退化农田土壤固碳细菌群落结构及多样性影响不同, 添加秸秆对土壤固碳细菌群落结构及多样性影响较小; 生物炭添加显著提高了土壤固碳细菌群落多样性, 对土壤养分循环具有一定的促进作用; 纳米碳添加对土壤固碳细菌的影响具有一定的特异性, 且其添加后土壤中固定  $\text{CO}_2$  的微生物菌群数量显著增多, 有利于减少  $\text{CO}_2$  等温室气体的排放。土壤固碳细菌群落结构受土壤 pH、有机碳、全氮、全磷、碱解氮及有效磷的综合影响, 其中, pH 和全氮对土壤固碳细菌群落结构的影响最大。

## 参考文献 (References):

Alison J E, Jeffrey A B, William R H, *et al.* 2000. Rice yield and nitrogen utilization efficiency under alternative straw management practices [J]. *Agronomy Journal*, 92: 1096-1103

Awad Y M, Blagodatskaya E, Ok Y S, *et al.* 2012. Effects of polyacrylamide, biopolymer, and biochar on decomposition of soil organic matter and plant residues as determined by  $^{14}\text{C}$  and enzyme activities [J]. *European Journal of Soil Biology*, 48: 1-10

鲍士旦. 2000. 土壤农化分析 [M]. 北京: 中国农业出版社

戴雅婷, 闫志坚, 解继红, 等. 2017. 基于高通量测序的两种植被恢复类型根际土壤细菌多样性研究 [J]. *土壤学报*, 54(3): 35-748

Edgar R C. 2013. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 10(10): 996-1000

高荣广, 赵鑫, 高晓兰, 等. 2018. 纳米碳对桃园土壤肥力及植株养分吸收的影响 [J]. *落叶果树*, 50(3): 11-14

韩冰, 王效科, 欧阳志云. 2005. 中国农田生态系统土壤碳库的饱和水平及其固碳潜力 [J]. *农村生态环境*, 21(4): 6-11

侯建伟, 邢存芳, 卢志宏, 等. 2018. 不同秸秆生物炭对贵州黄壤细菌群落的影响 [J]. *中国农业科学*, 51(23): 4485-4495

Jiang X T, Peng X, Deng G H, *et al.* 2013. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland [J]. *Microbiology Ecology*, 66: 96-104

Jin H. 2010. Characterization of microbial life colonizing biochar and biochar-amended soils [D]. New York: Cornell University, Ithaca

季风云, 明红霞, 李洪波, 等. 2016. 南海表层海水参与卡尔文循环的固碳基因多样性研究 [J]. *环境科学学报*, 36(11): 4037-4043

Karhu K, Mattilab T, Brgstroma I, *et al.* 2011. Biochar addition to agricultural soil increased  $\text{CH}_4$  uptake and water holding capacity—results from a short-term pilot field study [J]. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 140: 309-313

Lehmann J, Rillig M C, Thies J, *et al.* 2011. Biochar effects on soil biota—A review [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9): 1812-1836

Liu J J, Sui Y Y, Yu Z H, *et al.* 2014. High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 70(2): 113-122

刘安勋, 卢其明, 曹玉江, 等. 2017. 纳米复合材料对水稻生长发育的影响 [J]. *植物营养与肥料学报*, 13(2): 344-347

刘琼, 魏晓梦, 吴小红, 等. 2017. 稻田土壤固碳功能微生物群落结构和数量特征 [J]. *环境科学*, 38(2): 760-768

梁雪. 2017. 毛竹入侵阔叶林对土壤固碳功能菌群特征的影响及其机制 [D]. 杭州: 浙江农林大学

Marris E. 2006. Putting the carbon back; Black is the new green [J]. *Nature*, 442(3): 624-626

Pietikainen J, Kiikkila O, Fritze H. 2000. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus [J]. *Oikos*, 89(5): 231-242

Sapkota T B. 2012. Conservation Tillage Impact on Soil Aggregation, Organic Matter Turnover and Biodiversity//Organic Fertilisation, Soil Quality and Human Health [M]. Dordrecht: Springer. 141-160

Selesi D, Schmid M, Hartmann A. 2005. Diversity of green-like and red-like ribulose, 5-bisphosphate carboxylase oxy-genase large-subunit genes (*cbbL*) in differently managed agricultural soils [J]. *Applied and Environmental Micro-biology*, 171(1): 175-184

Shokralla S, Spall J L, Gibson J F, *et al.* 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research [J]. *Molecular Ecology*, 21(8): 1794-1805

Smith P. 2004. Carbon sequestration in croplands: the potential in Europe and the global context [J]. *European Journal of Agronomy*, 20(3): 229-236

史妍君, 钟建, 黄占斌, 等. 2018. 纳米碳增效剂对柑橘产量及土壤细菌种群结构的影响 [J]. *中国土壤与肥料*, (4): 40-47

武爱莲, 丁玉川, 焦晓燕, 等. 2016. 玉米秸秆生物炭对褐土微生物功能多样性及细菌群落的影响 [J]. *中国生态农业学报*, 24(6): 736-743

薛文强, 周蓓蓓, 毛通, 等. 2018. 纳米碳混合层对土壤水分入渗特性及水分分布影响 [J]. *水土保持学报*, 32(3): 152-159

Yuan H Z, Ge T, Wu X, *et al.* 2012. Long-term field fertilization alters the diversity of autotrophic bacteria based on the ribulose, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubis CO) large-subunit genes in paddy soil [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4): 1061-1071

Yuan M Z, Ge T D, Zou S Y, *et al.* 2013. Effect of land use on the abundance and diversity of autotrophic bacteria as measured by ribulose, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubis CO) large subunit gene abundance in soils [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 49(5): 609-616

Yu W, Hua A F S, Yan H, *et al.* 2012. Comparison of the Levels of Bacterial diversity in fresh water, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of Illumina Tags [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 78(23): 8264

袁红朝, 秦红灵, 刘守龙, 等. 2011. 固碳微生物分子生态学研究 [J]. *中国农业科学*, 44(14): 2951-2958