

研究报告

红黄泥水稻土剖面细菌群落构建及功能特征

赵升, 骆乐丹, 熊轩, 严贵丽, 刘单鹏, 蒋宇, 汤宇晴, 欧阳凯*

湖南农业大学资源学院, 湖南 长沙 410128

赵升, 骆乐丹, 熊轩, 严贵丽, 刘单鹏, 蒋宇, 汤宇晴, 欧阳凯. 红黄泥水稻土剖面细菌群落构建及功能特征[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 1934-1949.

ZHAO Sheng, LUO Yuedan, XIONG Xuan, YAN Guili, LIU Shanpeng, JIANG Yu, TANG Yuqing, OUYANG Kai. Assembly and functional characterization of the bacterial community of reddish clayey paddy soil profile[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 1934-1949.

摘要:【背景】细菌群落在水稻土剖面的垂直分布对稻田土壤的形成和养分循环等有着重要影响, 而剖面发生层细菌群落构建和功能特征尚不清楚。【目的】探究水稻土剖面各发生层细菌群落特征和功能差异, 以及发生层细菌群落结构的驱动机制。【方法】选择第四纪红色黏土发育的红黄泥水稻田作为研究对象, 挖掘剖面, 依据剖面诊断层次划分土壤发生层, 采集各发生层土壤样品, 最后通过高通量测序技术进行分析。【结果】耕作层(Ap1, 0–19 cm)细菌群落的 α 多样性显著高于其他发生层, β 分析表明垂直方向上剖面细菌群落结构存在显著差异。绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)等相对丰度随土壤发生层深度的增加而减少, 而 GAL15 和脱硫弧菌门(*Desulphurivibrio*)等则相反; 甲基菌门(*Methylomirabilota*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirota*)等随土壤发生层深度的增加呈现先增加再减少, 变形菌门(*Proteobacteria*)等随土层深度的增加呈现先减少再增加。土壤有效磷(available phosphorus)和土壤有机质(soil organic matter, SOM)显著促进了土壤剖面的细菌多样性, 有机质、总钾(total potassium)、硝态氮(nitric nitrogen)是影响细菌群落构建的主要环境因子。TaxFun2 分析表明, 细菌群落功能在剖面发生层之间存在显著性差异, 在 Ap1 (0–19 cm)、Ap2 (20–30 cm)、BrC (95–112 cm)的功能较为强烈, 在水耕氧化还原层 Br (31–94 cm)较弱。表层土壤和接近母质层的土壤中拥有更多的独特细菌类群。高丰度和低丰度的细菌类群都对细菌网络的连通性起到重要作用。确定性过程主导了剖面细菌群落的构建。【结论】红黄泥水稻土剖面细菌群落结构和功能存在显著差异, 确定性过程主导了剖面细菌群落的构建。

关键词: 细菌群落; 水稻土; 土壤发生层; 群落功能; TaxFun2

资助项目: 国家自然科学基金青年基金(42007021); 湖南省自然科学基金青年基金(2020JJ5250); 中国博士后科学基金(2020M672498); 湖南农业大学青年基金(19QN39)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42007021), the Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ5250), the China Postdoctoral Science Foundation (2020M672498), and the Foundation of Hunan Agricultural University (19QN39).

*Corresponding author. E-mail: Kai_ouyang@hunau.edu.cn

Received: 2024-01-08; Accepted: 2024-03-01; Published online: 2024-03-20

Assembly and functional characterization of the bacterial community of reddish clayey paddy soil profile

ZHAO Sheng, LUO Yuedan, XIONG Xuan, YAN Guili, LIU Shanpeng, JIANG Yu, TANG Yuqing, OUYANG Kai*

College of Resources, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: [Background] The vertical distribution of bacterial communities impacts the formation and nutrient cycling of paddy soils, while the assembly and functional characteristics of bacterial communities in different soil genetic horizons remain unclear. [Objective] To explore the characteristics and functional differences of bacterial communities in different paddy soil genetic horizons and reveal the driving mechanism of bacterial community assembly in each horizon. [Methods] The reddish clayey paddy soil was excavated and profiled, and soil samples were collected from different soil genetic horizons. The bacteria in each horizon were analyzed by high-throughput sequencing. [Results] The α diversity of the bacterial community in the cultivated horizon (Ap1, 0–19 cm) was significantly higher than that in the other horizons. The β diversity analysis showed that the bacterial community structure was significantly different among different horizons. The relative abundance of *Chloroflexi* and *Acidobacteriota* decreased with the increase in soil depth, while that of GAL15 and *Desulphurvibrio* showed the opposite trend. As the soil horizon deepened, the relative abundance of *Methyloirabilota* and *Nitrospirota* first increased and then decreased, while that of *Proteobacteria* first decreased and then increased. Available phosphorus and soil organic matter significantly improved bacterial diversity in the soil, and soil organic matter, total potassium, and nitric nitrogen were the main environmental factors affecting the bacterial community assembly. The TaxFun2 analysis showed that there were significant differences in bacterial community functions among different soil horizons, with stronger metabolism in Ap1 (0–19 cm), Ap2 (20–30 cm), and BrC (95–112 cm) horizons and weaker metabolism in the Br horizon (31–94 cm). Surface soil and the soil close to the parent material had more unique bacterial taxa than other soil horizons. Both the bacteria taxa with high relative abundance and those with low relative abundance played a role in the bacterial network connectivity, and deterministic processes dominated the bacterial community assembly of the soil profile. [Conclusion] There are significant differences in the structure and function of bacterial communities of the reddish clayey paddy soil profile, and deterministic processes dominate the bacterial community assembly.

Keywords: bacterial community; paddy soil; soil genetic horizon; community function; TaxFun2

土壤的形成是一个极缓慢和复杂的过程，长时间的生物因素和非生物因素相互作用造就了层次各异的土壤剖面发生层^[1]。其中，生物

因素，尤其是微生物与土壤的形成具有紧密联系^[2]。土壤微生物在调节生物地球化学循环和维持生态系统功能等方面发挥重要作用，是保障

农业生态系统稳定性与可持续性的重要因子^[3]。水稻土是我国一种重要的土地资源, 约占全国耕地面积的五分之一, 主要分布在秦岭-淮河一线以南的平原地区, 水稻土不仅是维系水稻等粮食作物安全生产的重要保障, 更是挖掘土壤微生物种质资源的重要场所之一^[4-5]。

由于水稻土类型的多样性、土壤性质的复杂性, 以及水稻土对于人为干扰和环境响应的不确定性且目前的研究大多集中在表层土壤, 对水稻土剖面微生物群落的维持机制还十分有限。有学者认为, 深层土壤中的微生物在土壤发育和生物地球化学循环中起着更重要的作用, 由于更接近母质, 对土壤的发育形成有更紧密的联系^[6-7]。解读土壤微生物的地理空间分布格局一直是生态学家关注的热点, 有学者研究发现, 单一土壤剖面内垂直距离间隔 20 cm 左右的微生物群落间的差异相当于水平距离几千千米的差距^[8-9]。土壤剖面深度是土壤性质的生态过滤器^[10], 在土壤的形成过程及人类活动的影响下, 土壤各发生层之间土壤性质差异明显, 土壤性质的差异会直接导致微生物的栖息地和群落功能等发生改变, 例如 pH、土壤养分等均会影响微生物群落结构多样性^[11-12]。目前研究土壤微生物垂直分布的主流方法是沿着土壤剖面间隔一定距离采集土壤样品^[13-14], 但是土壤的发生层之间差异较大, 这种方法不能直接反映微生物群落构建与土壤发生之间的直接关系。另一种方法是挖掘剖面, 依据剖面诊断层次划分土壤发生层, 采集各发生层土壤样品, 这是研究微生物与土壤形成关系的最佳方法^[15]。由于采样难度大, 需要挖掘整个剖面, 相关研究很少报道, 因此很有必要对这种采样方法下的土壤剖面细菌群落进行研究。

红黄泥水稻土是南方水稻土的主要类型之一, 主要分布于湖南地区。本研究选择湖南省

长沙市的第四纪红色黏土发育的红黄泥水稻田进行剖面挖掘, 依据剖面诊断层次, 划分土壤发生层, 进行土壤样品采集。应用 Illumina MiSeq 测序技术分析各发生层之间细菌群落的分布特征, 通过了解土壤剖面细菌群落多样性、丰度以及群落功能的变化规律及其驱动因子, 以期阐明红黄泥水稻土土壤微生物群落的构建机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

研究区位于湖南省长沙市(113°09'E, 28°20'N), 该区域年平均气温 17.2 °C, 年降水量 1 361 mm, 属亚热带季风气候。2022 年 11 月在一块面积为 0.2 hm² 的标准样地(40 m×50 m)中采用五点取样法, 选取 5 个点进行剖面挖掘, 剖面深度 130 cm, 根据其剖面层次、颜色、松紧度等特征将剖面划分为 5 个层次, 分别为耕作层(Ap1, 0–19 cm)、犁底层(Ap2, 20–30 cm)、氧化还原层(Br1, 31–71 cm)、氧化还原亚层(Br2, 72–94 cm)和氧化还原层向母质层的过渡层(BrC, 95–112 cm)。从下而上, 根据划分的层次分别采集土壤样品, 去除植物根系、砾石等土壤杂质后分别将每一层样品混匀分为两部分, 分装于无菌自封袋内后, 冰上运输回实验室。一部分保存于 4 °C 的冰箱内, 用于发生层理化因子的测定; 另一部分保存于–80 °C 的冰箱中, 用于高通量测序。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒和 PCR 试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; 琼脂糖, Biowest 公司; *FastPfu* Polymerase, TransGen 公司; Extraction Kit, Axygen 公司; 凝胶提取试剂盒, Axygen Biosciences 公司。电泳仪, 北京市六一仪器厂;

PCR 仪, ABI 公司; 火焰光度计, 上海美仪器有限公司; pH 计, 广州瑞彬科技有限公司; 酶标仪, 帝肯公司; NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 发生层土壤理化性质的测定

土壤样品的 pH 用 pH 计测定(土壤与水的比例为 1:2.5); 土壤有机质(soil organic matter, SOM)采用重铬酸钾-外部加热法; 全磷(total phosphorus, TP)采用钼锑抗比色法; 有效磷(available phosphorus, AP)采用钼锑抗比色法; 速效钾(rapidly available potassium, AK)和全钾(total potassium, TK)采用火焰光度法测定; 硝态氮(nitric nitrogen, NO_3^-)采用 KCl 溶液浸提法^[16]测定。

1.3 发生层土壤微生物 DNA 的提取和测序

采用 DNA 提取试剂盒分别提取 15 个土壤样品的 DNA, NanoDrop 2000 检测 DNA 纯度和浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳对 DNA 完整性进行检测。采用引物 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增细菌 16S rRNA 基因 V1-V9 区片段。PCR 反应体系(20 μL)^[17]: 5×FastPfu Buffer 4 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , 上、下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.8 μL , Faustus Polymerase (5 U/ μL) 0.4 μL , BSA (0.8 mg/mL) 0.2 μL , 模板 DNA 10 μL , ddH₂O 补足 20 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 60 s; 95 °C 60 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 纯化后的 PCR 产物送至上海凌恩生物科技有限公司进行测序。本研究原始序列可在国家微生物科学数据中心(<https://nmdc.cn/>)获得, 登录号为 MDCN000375N-NMDCN00037KO。

1.4 数据分析

使用 QIIME 2 软件中的 DATA2 进行去引物、过滤、去噪, 并以 100%相似度扩增子变异

序列(amplicon sequence variant, ASV)聚类, 从而获得最终的 ASV 及信息表^[9]。在 R 4.2.2 和 Excel 2016 中进行统计分析, 采用 IBM SPSS 25 进行方差分析(ANOVA)。使用非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)分析剖面发生层细菌群落结构的差异, 典型相关分析(canonical correlation analysis, CCA)常用作评估环境因子对细菌群落构建的贡献度。采用“Vegan”包进行细菌 α 、 β 多样性分析, 采用“ggVennDiagram”包分析发生层之间共有和特有物种, 采用“TaxFun2”包进行细菌群落功能预测, 采用“heatmap”包分析细菌相对丰度与环境因子的相关关系, 采用“psych”和“graph”包计算细菌类群之间的共现网络, 网络使用 Gephi 0.9.6 美化, “ggplot2”包绘制柱状图, “NST”包计算剖面群落组装机制。

2 结果与分析

2.1 剖面发生层土壤理化性质的变化

红黄泥水稻土不同发生层的土壤理化性质如图 1 所示, 耕作层(Ap1)的 AK、AP、TP、SOM、 NO_3^- 含量显著高于其他 4 个发生层; TP、SOM 含量随土壤发生层深度的增加而逐渐减少; AK 含量随土壤深度先下降再升高, 在 Br 层含量最低; AP 在其他 4 个发生层(Ap2-BrC)无显著变化; NO_3^- 含量在犁底层(Ap2)显著低于耕作层和氧化还原层(Br1); TK 含量在犁底层(Ap2)的含量最高, 在 Br1-BrC 逐渐降低; 土壤通体呈酸性, 土壤 pH 先升高再降低, 且在氧化还原亚层(Br2)达到最大值。

2.2 剖面发生层细菌群落组成

15 个土壤样品优化后一共获得高质量序列总数 6 403 927, 平均序列长度为 454 bp。经过组装和质量筛选后分类为 14 113 个物种(ASV), 共包括 55 门 150 纲 338 目 483 科。本研究将丰

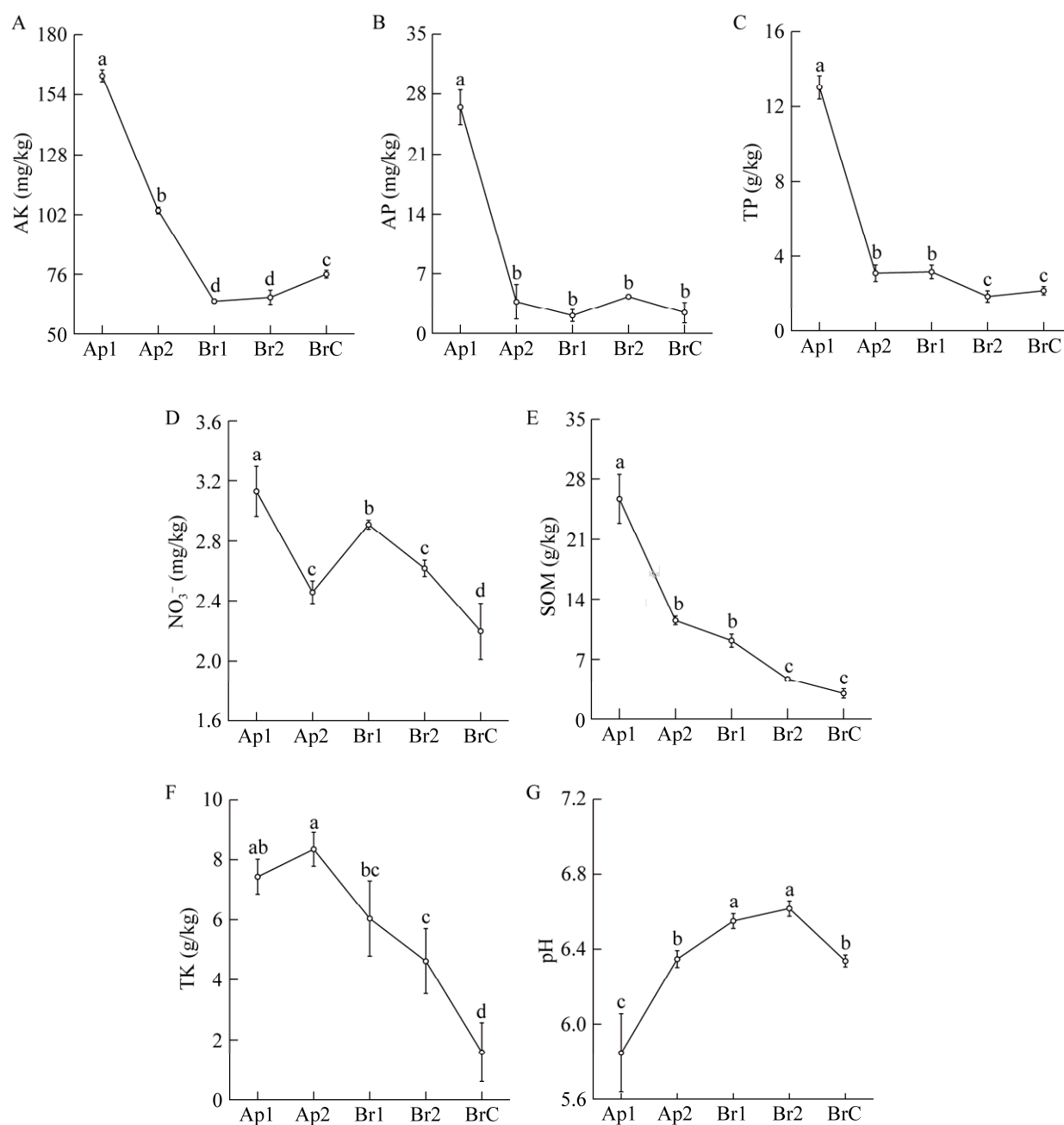


图1 剖面发生层土壤理化性质的变化 不同小写字母表示差异显著

Figure 1 Changes of soil physicochemical properties in the genetic horizon of soil profiles. Different lowercase letters indicate significant differences.

度排名前10的物种定义为优势菌门,其余合并为其他(others),丰度前10的物种占总丰度的72.4%–84.4%(图2A)。红黄泥水稻土耕作层(Ap1)的优势菌门为绿弯菌门(*Chloroflexi*, 23.4%)、变形菌

门(*Proteobacteria*, 17.4%)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*, 16.2%)、甲基菌门(*Methylomirabilota*, 6.4%)等;犁底层(Ap2)的优势菌门为绿弯菌门(*Chloroflexi*, 26.2%)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*, 16.8%)、甲

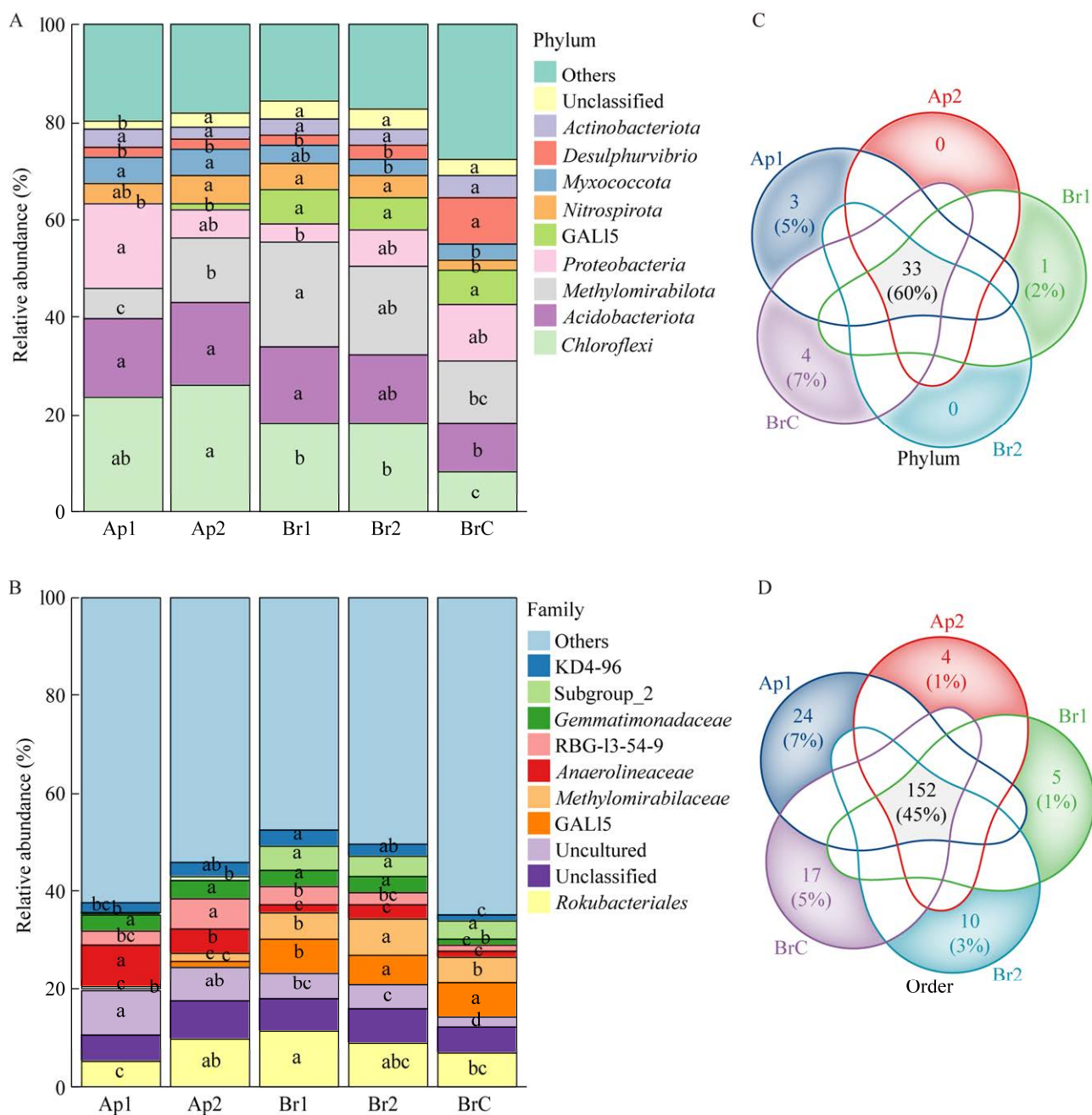


图 2 剖面细菌群落组成和相对丰度的变化 A: 门分类水平下细菌群落物种组成和相对丰度. B: 科分类水平下细菌群落物种组成和相对丰度. C: 门分类水平下发生层特有和共有细菌物种. D: 目分类水平下发生层特有和共有细菌物种

Figure 2 Difference in bacterial community composition and relative abundance in soil profiles. A: Species composition and relative abundance of bacterial communities at phylum classification levels. B: Species composition and relative abundance of bacterial communities at family classification levels. C: Endemic and common bacteria species at phylum classification levels. D: Endemic and common bacteria species at order classification levels.

基菌门(*Methyloirabilota*, 13.4%)和变形菌门(*Proteobacteria*, 5.7%)等;氧化还原层(Br1)的优势菌门为甲基菌门(*Methyloirabilota*, 21.5%)、绿弯菌门(*Chloroflexi*, 18.4%)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*, 15.4%)和 GAL15 (7%)等;氧化还原亚层(Br2)的优势菌门为甲基菌门(*Methyloirabilota*, 18.3%)、绿弯菌门(*Chloroflexi*, 18.2%)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*, 14%)和变形菌门(*Proteobacteria*, 7.7%)等;氧化还原层向母质层的过渡层(BrC)的优势菌门为甲基菌门(*Methyloirabilota*, 12.5%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 11.9%)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*, 10.3%)和脱硫弧菌门(*Desulphurivibrio*, 9.4%)等。

绿弯菌门、酸杆菌门、黏细菌(*Myxococcota*)随发生层深度的增加相对丰度显著下降,而 GAL15 和脱硫弧菌门则显著上升($P<0.05$);甲基菌门、硝化螺旋菌门(*Nitrospirata*)随发生层深度的增加呈现先上升再下降的趋势,而变形菌门随土层深度的增加呈现先下降再上升的趋势($P<0.05$)。科分类水平下(图 2B), Ap1–BrC 物种平均相对丰度之间的差异显著($P<0.05$),未分类菌科(unclassified, 8.8%)是 Ap1 中相对丰度最高的物种,其次是厌氧绳菌科(*Anaerolineaceae*, 8.5%)等; Ap2–Br2 中最丰富的菌科是棒状杆菌科(*Rokubacteriales*, 8.6%–11.1%), BrC 中最丰富的菌科是 GAL15 (8.6%)。GAL15 和 Subgroup_2 的相对丰度随着土层深度的增加而增加,而未分类细菌和厌氧绳菌科(*Anaerolineaceae*)则相反, *Rokubacteriales*、RBG-13-54-9 和 *Methyloirabilaceae* 先上升再下降。栖息地环境的不同是造就微生物差异性的主要因子之一^[18],探究微生物物种组成的常见方式是韦恩图(Venn diagram),常被用于展示不同样本或分组间共有的或特有的组分。本研究在门(图 2C)和目(图 2D)分类水平下,将各发生层中共有和特

有的物种进行韦恩分析,结果显示 Ap1–BrC 共有的菌门为 33 个(60%),其中 BrC 拥有最多的(7%)独特菌门,其次是 Ap1 (5%); Ap1–BrC 共有菌目 152 个(45%), Ap1 拥有最多的独特菌目(7%), BrC 次之(5%)。

2.3 剖面发生层细菌群落多样性及差异性

基于细菌群落的 α 多样性分析,其中 Chao1 (图 3A)、ACE (图 3B)和 Shannon 指数(图 3C)差异分析显示,除 Ap1 显著高于其他 4 个发生层外,其他 4 个发生层之间的 α 多样性指数无显著差异,说明红黄泥水稻土剖面发生层土壤中从 Ap2 到 BrC 之间的细菌多样性差异不大。基于 Bray-Curtis 距离的 NMDS 分析了红黄泥水稻土剖面发生层细菌群落 β 多样性变化,分析结果的应力函数值(stress)为 0.138 4,小于 0.2 (图 3D),具有很合理的代表性,表明剖面发生层间的细菌群落差异显著($P=0.001$)。

2.4 细菌群落的时空分布及其对土壤理化因子的响应

Ning 等^[19]提出的标准化随机率(normalized stochasticity ratio, NST)是生态学研究定量评估生态随机性的常用方法之一。如果群落的 NST 值主要分布在 0.5 (50%)以上则认为随机性过程在群落组装内占主导,当 NST 主要分布在 0.5 (50%)以下则认为确定性过程占主导^[31]。在本研究中,整个土壤垂直剖面上的细菌群落的 NST 值均全部低于 50%阈值线(图 4A),这表明确定性过程在土壤剖面的细菌群落中占支配地位。并且, Ap2 的 NST 值显著高于 Ap1 和 BrC ($P<0.05$),表明确定性过程对 Ap2 的群落影响大于 Ap1 和 BrC。细菌群落的多样性以及群落构建与细菌所处环境息息相关,土壤剖面发生层之间的环境差异很有可能是影响细菌群落构建的主要因素之一。课题组构建了发生层细菌种群在门分类水平下主要菌门与发生层理化因

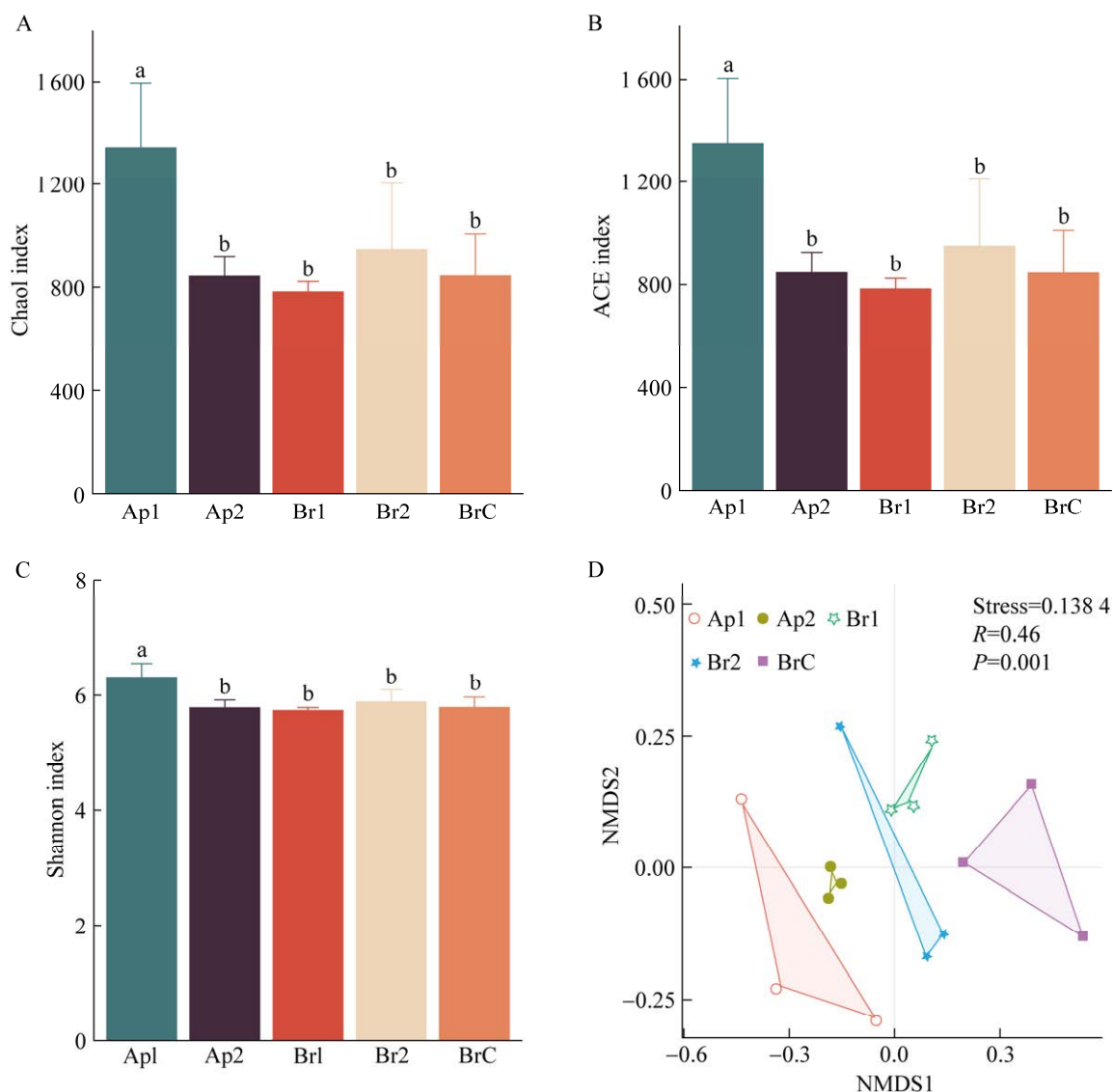


图3 细菌群落多样性变化 A: Chao1 指数. B: 基于丰度的覆盖估计度量指数. C: 香农指数. D: 非度量多维尺度分析. 不同小写字母表示差异显著

Figure 3 Changes in bacterial community diversity. A: Chao1 index. B: Coverage estimation metric index based on abundance index (ACE). C: Shannon index. D: Non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS). Different lowercase letters indicate significant differences.

子之间的相关关系(图 4B)。结果显示有效磷(AP)和有机质(SOM)显著促进了土壤剖面的细菌多样性,其他环境因子对细菌多样性无显著影响。SOM、TK、TP 与绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、黏细菌(*Myxococcota*)、MBNT15 和芽单胞菌门(*Gemmatimonadota*)的

相对丰度呈显著正相关,而与 GAL15、脱硫弧菌门(*Desulphurivibrio*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和弯杆菌门(*Campilobacterota*)呈显著负相关($P<0.05$);土壤 pH 显著促进了 *Methylomirabilota*、GAL15、厚壁菌门(*Firmicutes*)的相对丰度,而显著抑制了变形菌门(*Proteobacteria*)和 MBNT15 的相对丰

度。AP 和 AK 显著促进 MBNT15 的相对丰度，但是抑制了 *Methyloirabilota* 和 GAL15。CCA 是研究两组变量之间相关关系的一种多元统计方法，它能够揭示两组变量之间的内在联系^[14]。本

研究中，CCA 分析显示了各环境因子对细菌群落构建的影响，其中 SOM ($R=0.85$, $P=0.001$)、TK ($R=0.77$, $P=0.001$)、 NO_3^- ($R=0.78$, $P=0.003$) 是影响细菌群落构建的主要环境因子(图 4C)。

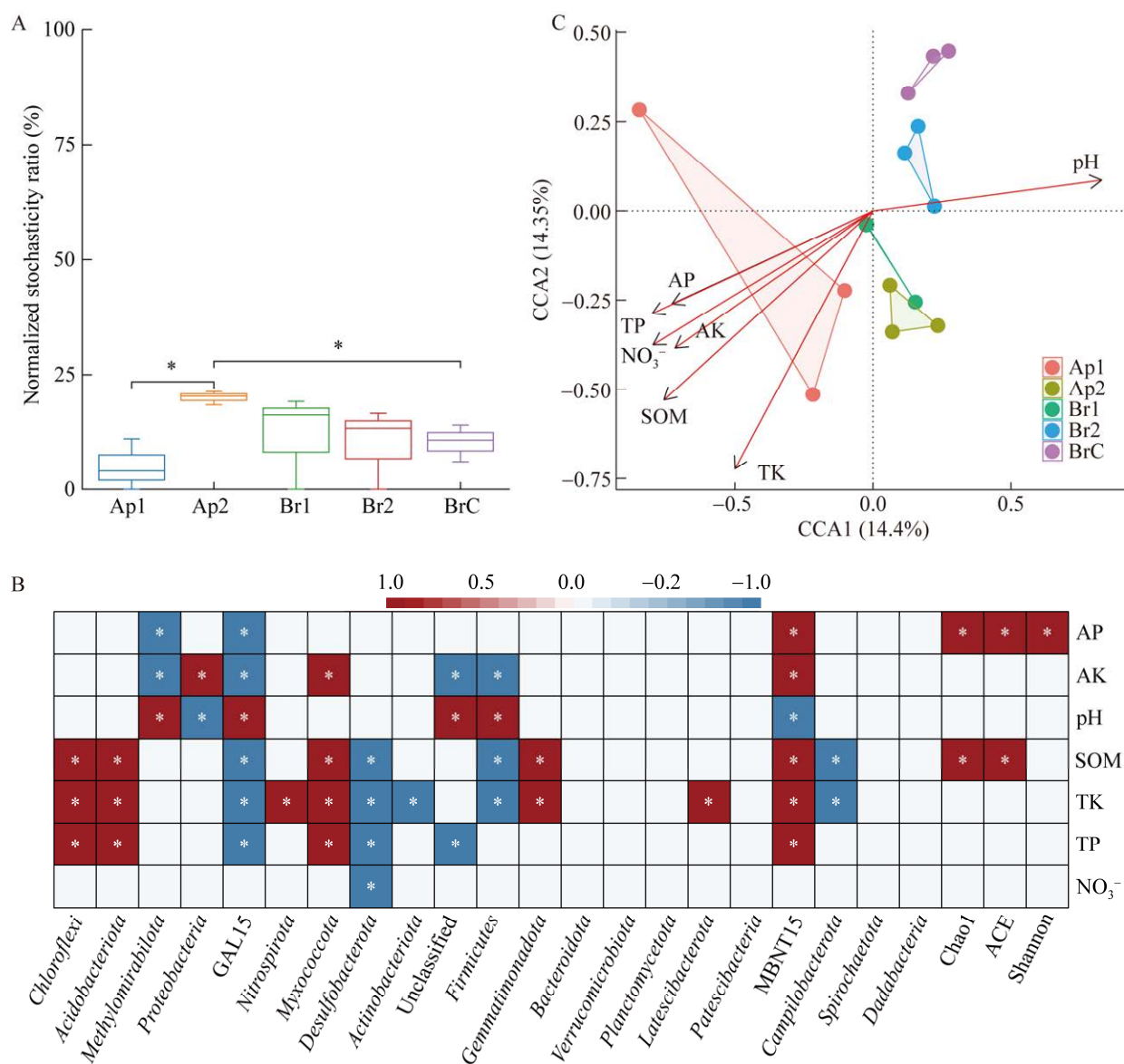


图 4 土壤理化因子对剖面细菌群落的影响 A: 细菌群落的构建机制. B: 理化因子与细菌相对丰度的相关关系. C: 理化因子对细菌群落构建的影响.

Figure 4 Effects of soil physicochemical factors on bacterial community in soil profiles. A: Mechanism of bacterial community construction. B: Correlation between physicochemical factors and the relative abundance of bacteria. C: Effects of physicochemical factors on bacterial community construction. *: $P < 0.05$.

2.5 不同发生层细菌群落潜在功能差异

根据细菌群落的 16S rRNA 基因序列结果, 基于 TaxFun2 进行发生层细菌群落功能预测, 预测结果与 KEGG 数据库进行比对, 共获得六类 KEGG 一级通路功能基因和一级通路下的 42 个二级通路功能基因。一级代谢功能主要包括六大类(图 5A): 有机系统(organic system)、代谢(metabolism)、人类疾病(human disease)、遗传信息处理(genetic information processing)、环境信息处理(environmental information processing)和细胞过程(cellular processes), 其中, 代谢、遗传信息处理和环境信息处理为主要的 3 个通路。二级通路下细菌群落功能预测的主要结果为碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、信号转导(signal transduction)、能量代谢(energy metabolism)、跨膜运输(transmembrane transport)、辅助因子和维生素的代谢(cofactors and vitamin metabolism)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism)、翻译(translation)、辅助和修复(replication and repair)、异种生物降解和代谢(xenobiodegradation and metabolism)、聚糖的生物合成和代谢(biosynthesis and metabolism of glycans)等(图 5B)。对二级通路下平均相对丰度大于 5% 的通路进行差异分析(图 5C), 差异分析显示 Ap1 和 Ap2 中其他次生代谢物的生物合成(biosynthesis of other secondary metabolites)、异种生物降解和代谢(xenobiotics biodegradation and metabolism)、脂质代谢(lipid metabolism)、神经系统(nervous system)等均显著高于 Ap2 以下的 3 个发生层(Br1–BrC); 而能量代谢(energy metabolism)、环境适应(environmental adaptation)、折叠-分类和降解(folding, sorting and degradation)、辅助因子和维生素的代谢(metabolism of cofactors and vitamins)、转录(transcription)、翻

译(translation)等则显著低于 Br1–BrC ($P<0.05$)。大多数细菌类群的功能在剖面不同发生层之间存在显著性差异, 其中在 Ap1 和 Ap2 的代谢较为强烈, 其次是 BrC, 中间的 Br (Br1 和 Br2) 相对较弱。

2.6 发生层细菌群落共现网络分析

细菌群落之间的共现网络可以用于识别细菌群落之间的相互作用关系, 因此被广泛应用于生态学研究^[20]。为进一步研究不同分类水平下红黄泥水稻土剖面细菌类群之间的相互关系, 本研究分别对土壤剖面细菌群落在纲(Class)和科(Family)分类水平下的所有细菌类群构建共现网络。本研究中, 网络中的连线可用于评估菌群之间的相互作用(图 6), 连线代表菌群之间相互作用关系显著($P<0.05$, $R>0.8$), 红色连线代表两个菌群之间显著正相关, 绿色连线表示菌群之间显著负相关, 连线数量越多, 作用也就越强烈^[21]。每一个节点代表一个细菌分类群, 节点大小表示连接度, 与之作用的菌群越多, 连接度也越大。细菌类群在纲(图 6A)水平下, 菌纲之间的正相关关系占比为 71.34%, 负相关占比为 28.66%, 菌科(图 6B)之间正相关占比为 80.73%, 负相关占比为 19.27%。网络中非白色节点代表连接度较大的细菌类群, *Chloroflexia*、*Polyangia*、梭状芽胞杆菌纲(*Clostridia*)、GAL15、酸微菌纲(*Acidimicrobiia*)、*Desulfovibrionia* 等菌纲在菌纲互作网络中起到重要作用。*Thermoanaerobaculaceae*、厌氧绳菌科(*Anaerolineaceae*)、乳酸细菌科(*Lactobacillaceae*)、脱硫弧菌科(*Desulfovibrionaceae*)、毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、GAL15 等菌科在菌科互作网络中起到重要作用。这些高连通度的节点大多数由高丰度菌群构成, 如变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*, 平均相对丰度占比 2.69%)、厌氧绳菌科(平均相对丰度占比 3.89%)等; 少部

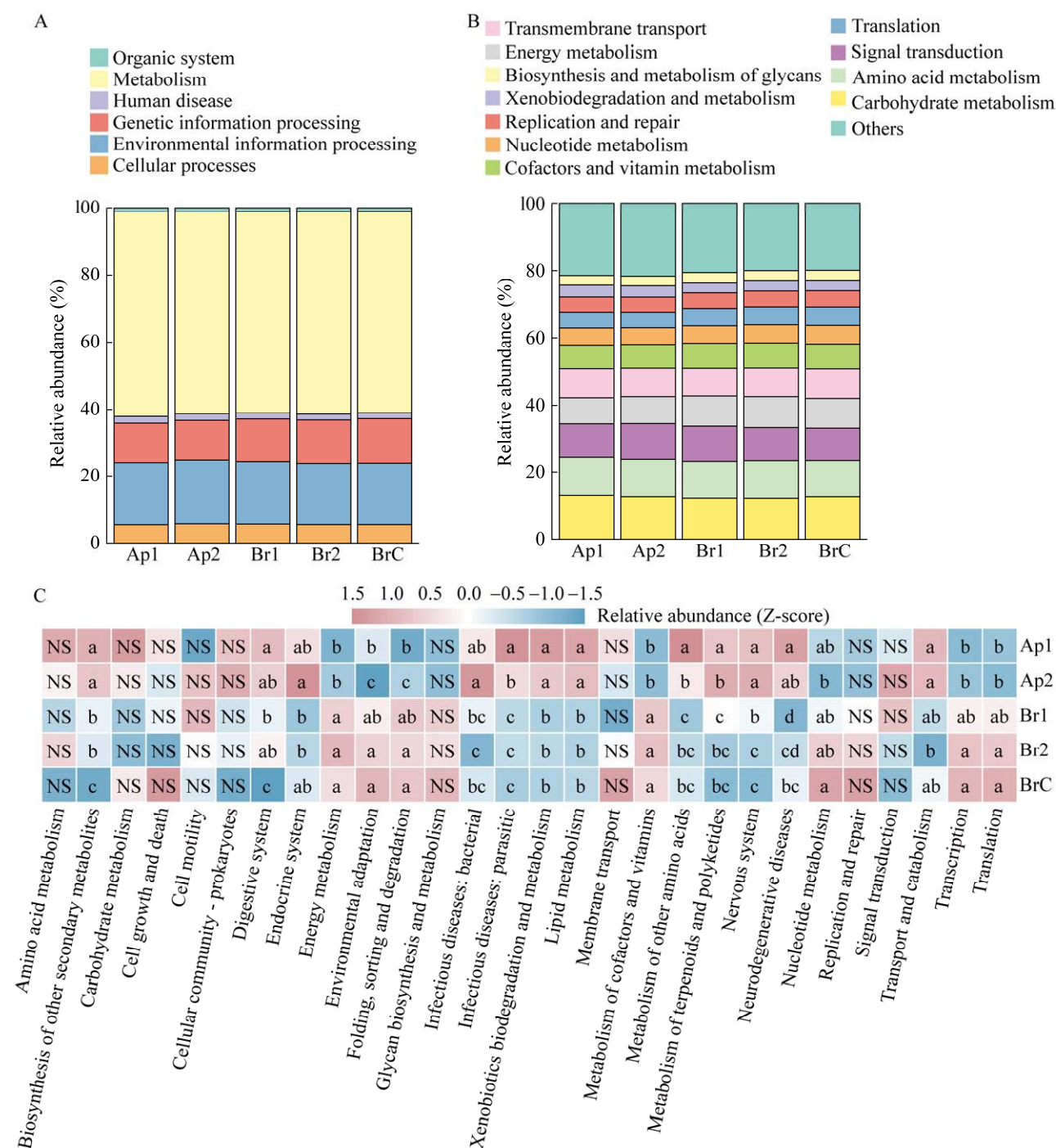


图5 土壤剖面细菌功能预测 A: 一级通路. B: 二级通路. C: 二级通路下的功能差异. 同一列中含有相同的小写字母表示处理之间差异无显著性($P>0.05$), 含有不同的小写字母则表示差异具有显著性($P<0.05$), NS 表示所有处理间差异均无显著性($P>0.05$)

Figure 5 Prediction of bacterial function in soil profiles. A: Pathway level one. B: Pathway level two. C: The functional differences on pathways level two. The same lower-case alphabet in the same column indicate no significant difference between treatments ($P>0.05$), the different lower-case alphabet indicate significant difference ($P<0.05$), NS indicates no significant difference between all treatments ($P>0.05$).

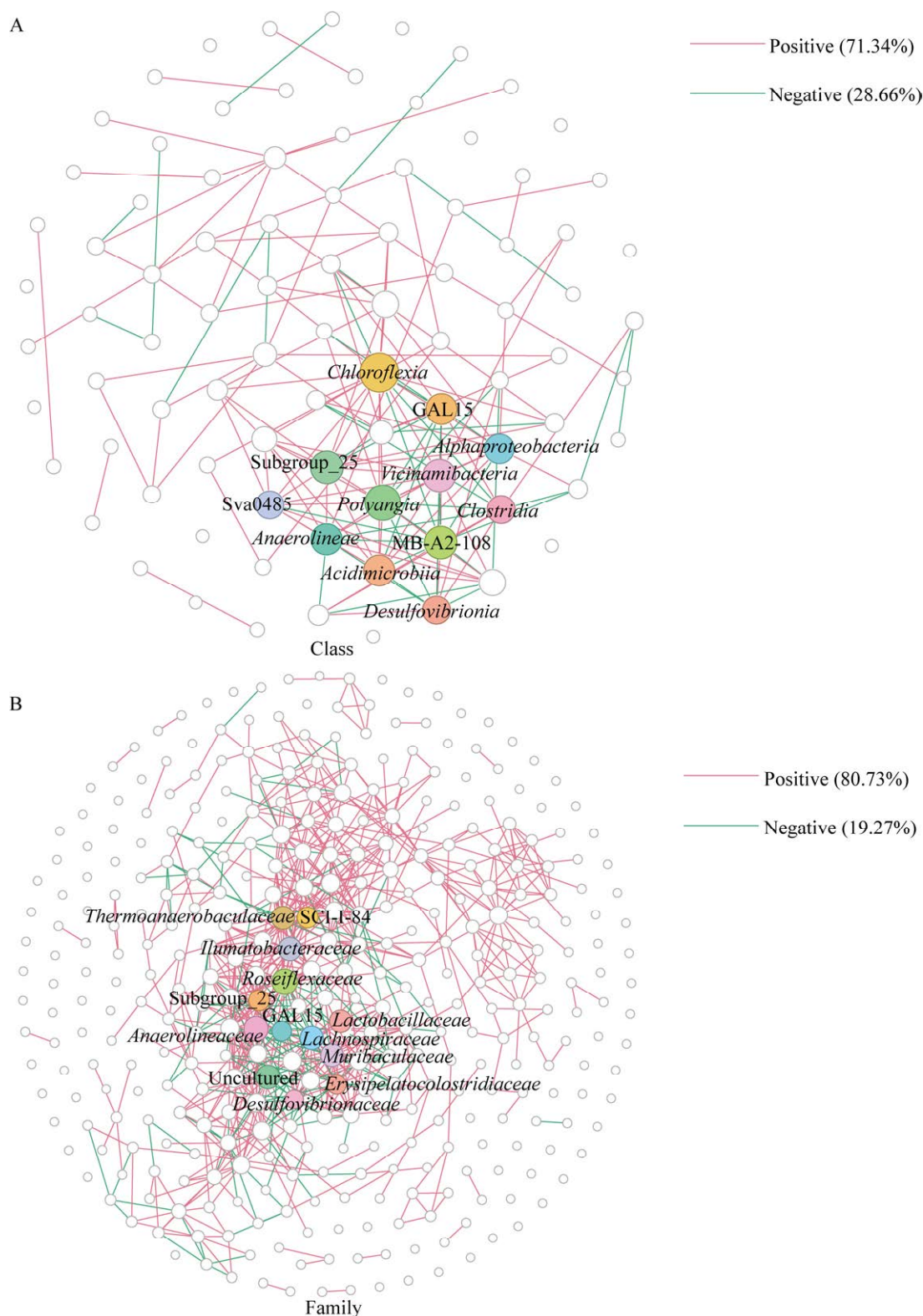


图 6 细菌群落共现网络关系 A: 纲分类水平下的网络. B: 科分类水平下的网络

Figure 6 The co-occurrence network relationships of bacterial communities. A: The co-occurrence network at class classification level. B: The co-occurrence network at family classification level.

分属于低丰度类群,如 *Thermoanaerobaculaceae* (平均相对丰度占比 0.07%)等。这表明较高丰度的细菌类群是维持网络的主要类群,但是低丰度的稀有类群在维持土壤剖面细菌群落构建等方面也发挥着重要作用^[22]。

3 讨论

本研究探讨了红黄泥水稻土剖面各发生层土壤理化性质与细菌群落构建之间的联系。研究发现各发生层之间的理化性质差异显著,总体上从 Ap1 到 BrC 呈现逐级递减的趋势,但是 pH 却相反。表层土壤(Ap1)长期受到施肥、耕作、降雨等活动的影响,导致整体的理化因子显著高于犁底层(Ap2)及以下的发生层,而 Ap2 土壤密度紧实,透气透水能力较差,有效阻隔了 Ap1 与 Br、BrC 之间的交流,导致整体的理化因子在 Ap2 层显著下降。pH 的变化不仅与成土母质有关,还与地表径流的淋溶作用息息相关^[23],该剖面的成土母质是第四纪红色黏土,土壤通体酸性,加上该地区属于酸雨沉降区^[24],长时间的地表淋溶下渗,使得越接近表层的土壤受酸雨淋溶作用越强烈,因此 pH 也就越低。本研究中,确定性过程主导了剖面细菌群落的构建,而在大尺度的研究中,细菌群落的构建大多是由随机性过程主导的。例如,有研究表明在 0–900 km 的尺度下细菌群落的构建主要受随机性过程主导,而在 900–1 090 km 的尺度下主要是确定性过程主导^[25]。此外,最近一项对森林土壤剖面的研究发现,确定性过程对不同深度森林土壤构建过程的影响随着土壤深度的增加而增加^[26]。一项对不同海拔带土壤细菌群落构建的研究表明,随机过程对土壤细菌群落构建的影响随着海拔的升高而增加,而确定性过程则逐渐减弱^[27]。综上,确定性过程对土壤垂直深度的影响大于随机过程,而在大范围的地

理空间尺度下则主要是由于随机性过程主导的。

此外,本研究还发现 Ap1 的细菌 α 多样性指数显著高于其他 4 个发生层,但是其他 4 个发生层之间的差异性不显著。这与大多数学者研究得出土壤微生物多样性随着土层深度的增加而显著降低不同,但是也有学者研究发现剖面不同深度细菌群落多样性的变化不显著,如 Chernov 等^[28]对比研究了碱土和草原栗钙土剖面细菌群落结构,发现细菌 α 多样性在碱土中随深度增加而下降,而在栗钙土上变化不明显。Watanabe 等^[29]发现在稻田不同深度土壤中,仅古菌的群落多样性存在差异,而细菌无显著性差异。可见,不同研究者得到的结果存在差异,细菌多样性随土壤剖面变化可能与土壤类型、土地利用方式、土壤发育程度等紧密相连。然而,在本研究中造成剖面细菌多样性差异的原因可能是水稻土长期属于淹水状态,微生物随水流迁徙导致耕作层以下细菌群落结构相对均一化^[30]。表层土壤养分相对充足(图 1),微生物之间的竞争较弱,使得 Ap1 的细菌多样性远高于其他发生层。

独特的栖息地造就了独一无二的细菌群落,水稻土剖面发生层之间物理化学性质等差异较大,这为细菌的生存提供了不同的生境选择^[18]。本研究得出相较于中层土壤(Br),表层土壤(Ap1)与深层土壤(BrC)存在更多的独特物种(图 2C–2D),另外,Ap1 和 BrC 之间的环境因子差异显著(图 1),表明二者之间的环境差异很大,细菌的生境选择也大大不同,这可以解释 Ap1 和 BrC 拥有较多独特物种的原因。Ap1 和 Ap2 中的最大优势菌门是绿弯菌门,有学者得出绿弯菌门是一种兼性厌氧菌,在有氧的环境下生长繁殖更为旺盛^[31],在接近地表的透气土壤中氧气含量大于长期处于淹水的厌氧环境,导致绿弯菌门存在差异性;Br1–BrC 的最

大优势菌门是甲基菌门, 有研究指出甲基细菌是一种固氮菌, 随着土壤深度的增加其相对丰度也增加^[32-33], 这与我们的结论相同。GAL15、*Desulfobacterota* 等细菌类群的相对丰度随着发生层深度的增加而增加(图 2A), 二者与土壤理化因子基本呈显著负相关, 仅与 pH 呈显著正相关。有研究指出 GAL15 细菌随着土壤深度的增加而增加^[34]。这与我们的研究结论一致, 说明这 2 种细菌更容易在贫瘠的环境中生存。

表层土壤的大部分功能基因相对丰度高于深层土壤^[35], 本研究异种生物降解和代谢、脂质代谢等显著高于底层土壤, 相较于底层土壤, 表层土壤营养物质充足, 细菌群落的物种多样性较高, 从而具有更高的功能多样性^[12]。然而, 环境适应、折叠-分类和降解等基因在深层土壤具有较高的丰度, 这可能是由于深层细菌为了面对环境变化, 通过改变细菌之间适应性和物种间的相互作用来应对相对贫瘠的环境^[7]。

4 结论

红黄泥水稻土剖面耕作层(Ap1)土壤中的细菌 α 多样性指数显著高于其他发生层(Br1-BrC), 且各发生层土壤中的细菌群落结构存在显著差异。土壤 pH 随着剖面深度的增加而增加, TP 和 SOM 含量则呈现相反趋势。SOM 和 TK 是影响细菌群落构建的主要环境因子。确定性过程主导了剖面细菌群落的构建。随着水稻土剖面深度的增加, 细菌群落的功能基因丰度呈现先下降再增加的趋势, 且在水耕氧化还原层(Br)的丰度相对较低。Ap1 和 BrC 层土壤中拥有更多的独特类群, 丰度较高的细菌种群是维护细菌网络联通的主要类群。

REFERENCES

[1] 刘株秀, 刘俊杰, 胡晓婧, 金剑, 王光华. 土壤剖面

微生物群落分布规律研究进展[J]. 土壤与作物, 2022, 11(2): 129-138.

LIU ZX, LIU JJ, HU XJ, JIN J, WANG GH. Research progress on the distribution of microbial community in soil profile[J]. Soils and Crops, 2022, 11(2): 129-138 (in Chinese).

[2] 林先贵, 胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能[J]. 土壤学报, 2008, 45(5): 892-900.

LIN XG, HU JL. Scientific connotation and ecological service function of soil microbial diversity[J]. Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(5): 892-900 (in Chinese).

[3] 朱永官, 彭静静, 韦中, 沈其荣, 张福锁. 土壤微生物组与土壤健康[J]. 中国科学: 生命科学, 2021, 51(1): 1-11.

ZHU YG, PENG JJ, WEI Z, SHEN QR, ZHANG FS. Linking the soil microbiome to soil health[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2021, 51(1): 1-11 (in Chinese).

[4] 余涛, 杨忠芳, 侯青叶, 夏学齐, 宗思锋, 李彪. 我国主要农耕区水稻土有机碳含量分布及影响因素研究[J]. 地学前缘, 2011, 18(6): 11-19.

YU T, YANG ZF, HOU QY, XIA XQ, ZONG SF, LI B. Distribution and influencing factors of paddy soil organic carbon content in China's major farming areas[J]. Earth Science Frontiers, 2011, 18(6): 11-19 (in Chinese).

[5] 黄晶, 韩天富, 申哲, 柳开楼, 马常宝, 王慧颖, 曲潇琳, 于子坤, 谢建华, 张会民. 基于模糊数学(Fuzzy)法的中国水稻土肥力质量近 30 年的时空变化特征[J]. 土壤学报, 2023, 60(2): 355-366.

HUANG J, HAN TF, SHEN Z, LIU KL, MA CB, WANG HY, QU XL, YU ZK, XIE JH, ZHANG HM. Spatiotemporal variation of fertility quality of Chinese paddy soil based on fuzzy method in recent 30 years[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(2): 355-366 (in Chinese).

[6] WU WX, LU HP, SASTRI A, YEH YC, GONG GC, CHOU WC, HSIEH CH. Contrasting the relative importance of species sorting and dispersal limitation in shaping marine bacterial versus protist communities[J]. The ISME Journal, 2018, 12(2): 485-494.

[7] HOBLEY E, WILSON B, WILKIE A, GRAY J, KOEN T. Drivers of soil organic carbon storage and vertical distribution in Eastern Australia[J]. Plant and Soil, 2015, 390(1): 111-127.

[8] EILERS KG, DEBENPORT S, ANDERSON S, FIERER N. Digging deeper to find unique microbial communities: the strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil[J]. Soil

- Biology and Biochemistry, 2012, 50: 58-65.
- [9] CHU HY, SUN HB, TRIPATHI BM, ADAMS JM, HUANG R, ZHANG YJ, SHI Y. Bacterial community dissimilarity between the surface and subsurface soils equals horizontal differences over several kilometers in the western Xizang Plateau[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(5): 1523-1533.
- [10] LIU ZX, GU HD, YAO Q, JIAO F, LIU JJ, JIN J, LIU XB, WANG GH. Microbial communities in the diagnostic horizons of agricultural *Isohumosols* in Northeast China reflect their soil classification[J]. CATENA, 2022, 216: 106430.
- [11] 刘晓华, 魏天兴. 高通量测序分析黄土高原退耕还林区土壤细菌群落特征[J]. 环境科学, 2021, 42(9): 4489-4499.
- LIU XH, WEI TX. High-throughput sequencing analysis of soil bacterial community in the grain for green project areas of the Loess Plateau[J]. Environmental Science, 2021, 42(9): 4489-4499 (in Chinese).
- [12] 毛晓雅, 刘晋仙, 贾彤, 吴铁航, 柴宝峰. 芦芽山华北落叶松林土壤剖面细菌群落分布格局[J]. 环境科学, 2023, 44(6): 3376-3385.
- MAO XY, LIU JX, JIA T, WU TH, CHAI BF. Distribution pattern of bacterial community in soil profile of *Larix principis-rupprechtii* forest in Luya Mountain[J]. Environmental Science, 2023, 44(6): 3376-3385 (in Chinese).
- [13] HAO JJ, CHAI YN, LOPES LD, ORDÓÑEZ RA, WRIGHT EE, ARCHONTOULIS S, SCHACHTMAN DP. The effects of soil depth on the structure of microbial communities in agricultural soils in Iowa, USA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(4): e02673-e02620.
- [14] LUAN L, LIANG C, CHEN LJ, WANG HT, XU QS, JIANG YJ, SUN B. Coupling bacterial community assembly to microbial metabolism across soil profiles[J]. mSystems, 2020, 5(3): e00298-e00220.
- [15] SEMENOV MV, CHERNOV TI, TKHAKAKHOVA AK, ZHELEZOVA AD, IVANOVA EA, KOLGANOVA TV, KUTOVAYA OV. Distribution of prokaryotic communities throughout the chernozem profiles under different land uses for over a century[J]. Applied Soil Ecology, 2018, 127: 8-18.
- [16] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000 (in Chinese).
- [17] INNIS MA, DAVID H. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications[M]. New York: American Academic Press, 1990.
- [18] YIN Y, WANG XJ, HU YA, LI FD, CHENG HF. Soil bacterial community structure in the habitats with different levels of heavy metal pollution at an abandoned polymetallic mine[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 442: 130063.
- [19] NING DL, DENG Y, TIEDJE JM, ZHOU JZ. A general framework for quantitatively assessing ecological stochasticity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(34): 16892-16898.
- [20] CHEN D, FENG QY, LIANG HQ. Effects of long-term discharge of acid mine drainage from abandoned coal mines on soil microorganisms: microbial community structure, interaction patterns, and metabolic functions[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(38): 53936-53952.
- [21] 李冰, 李玉双, 魏建兵, 宋雪英, 史荣久, 侯永侠, 刘△瑶. 不同土地利用方式对土壤细菌分子生态网络的影响[J]. 环境科学, 2020, 41(3): 1456-1465.
- LI B, LI YS, WEI JB, SONG XY, SHI RJ, HOU YX, LIU SY. Effects of different land use types on the molecular ecological network of soil bacteria[J]. Environmental Science, 2020, 41(3): 1456-1465 (in Chinese).
- [22] CHEN QL, DING J, ZHU D, HU HW, DELGADO-BAQUERIZO M, MA YB, HE JZ, ZHU YG. Rare microbial taxa as the major drivers of ecosystem multifunctionality in long-term fertilized soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 141: 107686.
- [23] 温皓天, 董秋瑶, 王攀, 宋超, 杨振京, 赵元艺, 严明疆. 桐柏山北麓土壤 pH 值空间分布特征及其影响因素[J]. 土壤通报, 2023, 54(2): 295-305.
- WEN HT, DONG QY, WANG P, SONG C, YANG ZJ, ZHAO YY, YAN MJ. Spatial variation characteristics and influencing factors of soil pH value at the northern foot of Tongbai Mountain[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2023, 54(2): 295-305 (in Chinese).
- [24] 陈卫平, 杨阳, 谢天, 王美娥, 彭驰, 王若丹. 中国农田土壤重金属污染防治挑战与对策[J]. 土壤学报, 2018, 55(2): 261-272.
- CHEN WP, YANG Y, XIE T, WANG ME, PENG C, WANG RD. Challenges and countermeasures for heavy metal pollution control in farmlands of China[J]. Acta Pedologica Sinica, 2018, 55(2): 261-272 (in Chinese).

- [25] SHI Y, LI YT, XIANG XJ, SUN RB, YANG T, HE D, ZHANG KP, NI YY, ZHU YG, ADAMS JM, CHU HY. Spatial scale affects the relative role of stochasticity versus determinism in soil bacterial communities in wheat fields across the North China Plain[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 27.
- [26] HE LB, SUN XY, LI SY, ZHOU WZ, YU JT, ZHAO GY, CHEN Z, BAI XT, ZHANG JS. Depth effects on bacterial community altitudinal patterns and assembly processes in the warm-temperate montane forests of China[J]. *The Science of the Total Environment*, 2024, 914: 169905.
- [27] LIU ZH, FANG J, SONG B, YANG Y, YU Z, HU JL, DONG K, TAKAHASHI K, ADAMS JM. Stochastic processes dominate soil arbuscular mycorrhizal fungal community assembly along an elevation gradient in central Japan[J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 855: 158941.
- [28] CHERNOV TI, LEBEDEVA MP, TKHAKAKHOVA AK, KUTOVAYA OV. Profile analysis of microbiomes in soils of solonetz complex in the Caspian Lowland[J]. *Eurasian Soil Science*, 2017, 50(1): 64-69.
- [29] WATANABE T, WANG GH, TAKI K, OHASHI Y, KIMURA M, ASAKAWA S. Vertical changes in bacterial and archaeal communities with soil depth in Japanese paddy fields[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2010, 56(5): 705-715.
- [30] LI WT, KUZYAKOV Y, ZHENG YL, LI PF, LI GL, LIU M, ALHARBI HA, LI ZP. Depth effects on bacterial community assembly processes in paddy soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 165: 108517.
- [31] 鲜文东, 张潇潼, 李文均. 绿弯菌的研究现状及展望[J]. *微生物学报*, 2020, 60(9): 1801-1820.
- XIAN WD, ZHANG O, LI WJ. Research status and prospect on bacterial Phylum *Chloroflexi*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 1801-1820 (in Chinese).
- [32] ZHU YG, PENG JJ, CHEN C, XIONG C, LI SL, GE AH, WANG ET, LIESACK W. Harnessing biological nitrogen fixation in plant leaves[J]. *Trends in Plant Science*, 2023, 28(12): 1391-1405.
- [33] HUANG LB, LEVINTAL E, ERIKSON CB, COYOTLA A, HORWATH WR, DAHLKE HE, MAZZA RODRIGUES JL. Molecular and dual-isotopic profiling of the microbial controls on nitrogen leaching in agricultural soils under managed aquifer recharge[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(30): 11084-11095.
- [34] LI WH, SIDDIQUE MS, LIU MJ, GRAHAM N, YU WZ. The migration and microbiological degradation of dissolved organic matter in riparian soils[J]. *Water Research*, 2022, 224: 119080.
- [35] YOUNG JM, SKVORTSOV T, KELLEHER BP, MAHANEY WC, SOMELAR P, ALLEN CCR. Effect of soil horizon stratigraphy on the microbial ecology of alpine paleosols[J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 657: 1183-1193.