

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2023.02.011

朱孔鑫, 庄舜尧, 钱壮壮, 等. 套种绿肥对尾巨桉人工林土壤细菌群落特征的影响. 土壤, 2023, 55(2): 313–320.

套种绿肥对尾巨桉人工林土壤细菌群落特征的影响^①

朱孔鑫^{1,2}, 庄舜尧², 钱壮壮^{1,2}, 王会利³, 王艮梅^{1*}

(1 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京 210037; 2 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008; 3 广西壮族自治区林业科学研究院, 南宁 530002)

摘要: 不合理的桉树人工林种植会对土壤质量产生负面影响。本研究通过田间试验, 探讨不同豆科绿肥套种对土壤养分、酶活性以及细菌群落特征的影响, 分析在桉树人工林套种绿肥的可行性, 从而为改善桉树人工林土壤质量提供参考。试验设置白灰毛豆套种、田菁套种以及无套种对照 3 种处理。结果表明: 套种白灰毛豆和套种田菁可提高土壤养分含量、微生物生物量及酶活性; 两种绿肥套种措施对土壤细菌多样性无显著影响, 而细菌群落结构存在较大差异; 套种田菁时厚壁菌门、绿弯菌门、产醋杆菌属、瘤胃梭菌属和 *Candidatus Solibacter* 属的相对丰度较高, 而套种白灰毛豆时变形菌门和铁还原菌属的相对丰度更高; 细菌群落功能预测表明, 套种白灰毛豆的固氮和硝酸盐还原功能显著表达, 而套种田菁的芳香族化合物降解功能显著表达。相关性分析表明, 土壤有效硼是微生物生物量及酶活性的主要影响因子, 而水解氮是细菌门和属相对丰度的主要影响因子。综上, 林下套种豆科绿肥可以改善土壤养分状况, 提高土壤酶活性, 调节土壤微生物群落结构, 可作为改善桉树人工林土壤质量和实现桉树人工林可持续经营的有效措施。

关键词: 桉树; 绿肥; 土壤养分; 细菌群落; 酶活性

中图分类号: S723.8 文献标志码: A

Effects of Green Manure Intercropping on Soil Bacterial Community of *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* Plantation

ZHU Kongxin^{1,2}, ZHUANG Shunyao², QIAN Zhuangzhuang^{1,2}, WANG Huili³, WANG Genmei^{1*}

(1 Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3 Academy of Forestry Research of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530002, China)

Abstract: Irrational *Eucalyptus* plantation could induce the degradation of soil quality. A field experiment was conducted to investigate the effects of green manure intercropping on soil nutrient, enzyme activity and bacterial community in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* plantation in order to guide *Eucalyptus* sustainable production, in which three treatments of *Tephrosia candida* (TC), *Sesbania cannabina* (SC) and control without green manure (CK) were setup. The results show that both TC and SC increase soil available nutrients, enzyme activity and microbial biomass. The relative abundances of Firmicutes, Chloroflexi, *Oxobacter*, *Ruminiclostridium* and *Candidatus Solibacter* are higher under SC, while those of Proteobacteria and *Thermincola* are higher under TC. TC greatly influences nitrogen fixation and nitrate reduction related bacteria, while SC significantly affects aromatic compound degradation related bacteria. Soil available boron is the main factor influencing soil microbial mass and enzyme activity, while soil alkaline hydrolysis nitrogen is the main factor affecting the abundances of bacteria in phylum and family levels. In conclusion, green manure intercropping can improve soil nutrient, increase soil enzyme activity and regulate soil microbial structure, thus it is an effective measure for *Eucalyptus* sustainable production.

Key words: *Eucalyptus*; Green manure; Soil nutrient; Soil microorganism; Enzyme activity

①基金项目: 广西创新驱动发展专项资金项目(桂科 AA17204087-11)资助。

* 通讯作者(wanggenmei@njfu.edu.cn)

作者简介: 朱孔鑫(1995—), 男, 江西鄱阳人, 硕士研究生, 主要从事人工林地力培育研究。E-mail: 18702621803@163.com

桉树是世界三大速生丰产树种之一,因其适应强、生长迅速、收获周期短、用途多样以及经济效益高等特点,作为木材林、纸浆林和工业原料林等在我国南方各地引种栽培。随着种植面积逐年增加,带来经济效益的同时,有研究发现不合理的桉树种植(如单一无性系造林、纯林经营和清除林下植被等)引发许多生态问题,如林下生境恶化、林地土壤退化和地下水污染等^[1]。

森林生态系统地上部分和地下部分有着复杂的能量转化和物质迁移过程。林下植被类型的改变能通过改变林地凋落物数量和质量、地表径流和根系分泌物等来影响土壤养分^[2],进而影响森林地下部分土壤酶活性、微生物生物量和微生物群落特征及其功能,并最终影响林木生长。同样,土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,广泛参与土壤养分循环,且微生物生物量是土壤养分重要的源与汇,土壤微生物驱动土壤生物化学反应来反馈森林地上部分。随着对土壤微生物研究的不断深入,采用土壤微生物群落特征来评价土壤质量越发广泛^[3]。

研究表明,绿肥能改善土壤微生物特性,促进微生物生物量的增加,对提升土壤质量具有积极影响^[4]。绿肥不仅可为土壤提供养分,为动物提供饲草,还能部分替代化肥从而减少化肥使用量以降低环境污染。豆科绿肥,是指用于肥料的豆科植物,因其独特的根瘤菌的共生固氮能力,在农业生产中已被广泛应用^[5]。其中,白灰毛豆(*Tephrosia candida*)和田菁(*Sesbania cannabina*)均具有耐贫瘠和耐干旱的特性,常被用于土壤质量改良。并且,这两种植物均在广西有自然分布,可以适应桉树人工林林下种植。

因此,本研究在广西国营东门林场,以尾巨桉(*Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*)人工林为研究对象,开展两种豆科绿肥(白灰毛豆和田菁)的田间套种试验,探究豆科绿肥对林地土壤养分、微生物生物量、酶活性以及细菌群落特征的影响,为改善桉树人工林土壤质量和实现桉树人工林可持续经营提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于广西壮族自治区崇左市扶绥县国营东门林场(107°3'35"E ~ 108°6'46"E, 22°1'15"N ~ 22°58'05"N)。所在区域属于热带湿润季风区,年均气温 21 ~ 22 °C,年均降水量约 1 200 mm,年日照时数 1 634 ~ 1 719 h,年无霜期 346 d 以上。

试验林地 2017 年实生苗(3 年生)种植的尾巨桉(*E. urophylla* × *E. grandis*)人工林(行间距: 4 m × 2 m),林地土壤为砂岩、砂页岩发育的赤红壤。造林前施用复合肥 0.5 kg/株(N : P : K=15 : 6 : 9,氮肥为尿素,磷肥为磷酸一铵,钾肥为氯化钾),造林后每年 4 月份施用复合肥 0.5 kg/株。2019 年 6 月调查林地,桉树保存率为 97%,坡度 20°,土壤有机质 17.05 g/kg,全氮 0.76 g/kg,全磷 0.34 g/kg,林木平均树高 13.70 m,平均胸径 9.80 cm,巨尾桉林下植被主要有:鬼针草(*Bidens pilosa*)、狗尾草(*Setaria viridis*)、翅荚决明(*Cassia alata*)和盐肤木(*Rhus chinensis*)等。

1.2 试验设计与土样采集

2019 年 6 月开展田间试验,选择种植林龄为 3 a 的尾巨桉一代纯林,设 3 个试验处理,林下套种白灰毛豆(*Tephrosia candida*, TC)、套种田菁(*Sesbania cannabina*, SC)以及无套种的空白对照组(CK),每个处理 3 次重复,合计 9 个试验小区,采用随机区组设计。套种方式为:3 个处理的林木两行中间(宽约 2 m)均匀铺有机肥(施肥量 4 500 kg/hm²,总养分 ≥ 5%,有效有益活菌数量 ≥ 5 亿/g,南宁市桂田复合肥料厂提供);机翻整地,起畦开行,TC 和 SC 处理分别条播白灰毛豆和田菁种子(播种量 30 kg/hm²)。

2020 年 5 月,两种绿肥均成熟且生长良好,未进行翻压,每个试验小区(面积约 0.18 hm²)内按 S 型选择 5 个采样点,采样点选择在桉树周围,并避开绿肥根系生长区域,去除表层枯枝落叶,用土钻采集 0 ~ 20 cm 土壤,对应小区的土样混合。

1.3 土样分析

土壤养分参照以下方法测定^[6]:pH 采用电位法测定(pH 计 FE28, FiveEasy Plus),有机质采用高温外热重铬酸钾氧化-容量法测定,水解氮采用碱解扩散法测定,有效磷采用盐酸-氟化铵浸提法测定,有效硼采用沸水浸提-甲亚胺比色法测定,阳离子交换量采用乙酸铵交换法测定。

土壤微生物生物量采用氯仿熏蒸浸提法测定^[6]。土壤脲酶活性采用水杨酸钠-二氯异氰尿酸钠比色法测定^[7],计算单位时间内每克土壤水解尿素产生铵态氮的量,μg/(g·h);蔗糖酶活性采用二硝基水杨酸比色法测定^[7],计算培养 24 h 后每克土壤中葡萄糖的量,mg/g;酸性磷酸酶活性采用对硝基苯磷酸二钠比色法测定^[7],计算单位时间内每克土壤中对硝基苯酚的量,μg/(g·h);过氧化氢酶活性采用紫外分光光度法测定^[8],计算单位时间内每克土壤分解过氧化氢的量,mg/(g·h)。

1.4 土样细菌测定

土壤细菌 DNA 采用 E.Z.N.A[®](Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA)试剂盒提取。使用 515 F(5'-GTG CCAGCCGG-3')和 907 R(5'-CCGTCAATTCMTTTT-3')引物, 通过 PCR 扩增细菌 16S 核糖体 RNA 基因的 V4-V5 区域。PCR 反应在 30 μ L 混合物(15 μ L 2 \times Phanta 主混合物、1 μ L 10 μ mol/L 的引物和 20 ng 模板 DNA)中进行。PCR 反应步骤: 95 $^{\circ}$ C 预变性持续 5 min, 然后在 95 $^{\circ}$ C 变性持续 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火持续 30 s, 72 $^{\circ}$ C 退火持续 45 s, 最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min, 合计 30 个循环。使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)进行纯化, 从 2% 琼脂糖凝胶中提取扩增子, 并使用 Qubit[®] 3.0 (Life Invitrogen)定量提取。

纯化的 PCR 产物通过 Qubit[®] 3.0 (Life Invitrogen)定量提取, 每 20 个条形码不同的扩增子平均混合一次。按照 Illumina 的基因组 DNA 文库制备程序, 使用汇集的 DNA 产物构建 Illumina 对端文库。然后在 Illumina Novaseq 6000 平台(南京集思慧远有限公司), 根据标准协议对扩增子库进行配对末端测序(2 \times 250)。

1.5 数据分析

测序得到的原始序列, 存在一定比例的干扰, 为了使信息分析的结果更加准确和可靠, 对原始序列进行拼接和过滤, 得到有效序列, 后续分析均基于有效序列进行。采用 QIIME v1.9.1 计算 α 多样性指数, 包括 Shannon 和 chao1 指数; 基于 unweight unifracc 距离进行非度量多维尺度分析(NMDS), 检验各处理细菌群落多样性的差异。基于物种分类信息, 使用 FAPROTAX v1.1 对土壤细菌群落的功能分类进行预测。

使用 SPSS 22.0 对不同处理的土壤性质、细菌群落组成、 α 多样性和预测功能的相对丰度进行单因素方差分析, 并在显著性 0.05 的水平下, 采用 Tukey 的多范围检验处理的差异显著性。对土壤性质与细菌门和属相对丰度之间的相关性, 使用 SPSS 22.0 进行

Pearson 分析, 并使用 Canoco 4.5 进行 RDA 分析。

2 结果与分析

2.1 土壤化学性质

由表 1 可知, 套种绿肥对土壤化学性质均有一定的影响。与对照组(CK)相比, 套种白灰毛豆(TC)和套种田菁(SC)分别显著提高 6.14% 与 12.69% 的土壤水解氮($P<0.05$), 显著提高土壤阳离子交换量 15.54% 与 13.18%($P<0.05$)。与 CK 相比, 套种白灰毛豆对土壤有机质和有效磷的影响不明显, 而套种田菁显著提高土壤有机质 13.22% 和有效磷 21.64%。套种白灰毛豆较 CK 显著提高土壤有效硼 33.33% ($P<0.05$), 而套种田菁的增加效果不显著。此外, 土壤 pH 在 TC 和 CK 间差异不显著, 但在 TC 和 SC 间差异显著($P<0.05$)。

表 1 不同处理尾巨桉人工林土壤化学性质
Table 1 Soil chemical properties of *E. urophylla* \times *E. grandis* plantations under different treatments

指标	TC	SC	CK
pH	4.87 \pm 0.10 a	4.53 \pm 0.11 b	4.70 \pm 0.09 ab
有机质(g/kg)	24.94 \pm 2.20 b	27.40 \pm 0.75 a	24.20 \pm 0.14 b
水解氮(mg/kg)	159.48 \pm 4.18 a	169.31 \pm 8.80 a	150.25 \pm 9.30 b
有效磷(mg/kg)	19.33 \pm 4.28 b	23.55 \pm 3.17 a	19.36 \pm 2.96 b
有效硼(mg/kg)	4.00 \pm 0.26 a	3.26 \pm 0.20 b	3.00 \pm 0.13 b
阳离子交换量 (cmol/kg)	3.42 \pm 0.25 a	3.35 \pm 0.52 a	2.96 \pm 0.28 b

注: TC, 套种白灰毛豆; SC, 套种田菁; CK, 无套种对照组; 同行小写字母不同表示处理间差异显著($P<0.05$); 下同。

2.2 土壤微生物生物量及酶活性

由表 2 可知, 与 CK 相比, 两种绿肥套种措施均提高土壤微生物生物量碳氮含量、蔗糖酶和过氧化氢酶活性, 其中套种白灰毛豆(TC)效果较好, 与 CK 相比, 显著提高微生物生物量碳含量 56.29%、微生物生物量氮含量 31.37%、过氧化氢酶活性 26.04%、蔗糖酶活性 43.61%。并且, 套种白灰毛豆较对照组显著提高土壤脲酶活性 44.09% 和酸性磷酸酶活性 18.01%($P<0.05$), 而土壤脲酶和酸性磷酸酶活性在 SC 与 CK 间差异不显著。

表 2 不同处理尾巨桉人工林土壤微生物生物量及酶活性
Table 2 Soil microbial biomass and enzyme activities under different treatments

指标	TC	SC	CK
微生物生物量碳(mg/kg)	344.68 \pm 50.04 a	262.89 \pm 58.95 ab	220.54 \pm 55.48 b
微生物生物量氮(mg/kg)	74.88 \pm 1.67 a	68.84 \pm 2.19 b	57.00 \pm 3.82 c
蔗糖酶(mg/g)	3.82 \pm 0.33 a	3.29 \pm 0.23 a	2.66 \pm 0.30 b
过氧化氢酶(mg/(g·h))	2.13 \pm 0.22 a	2.00 \pm 0.13 ab	1.69 \pm 0.17 b
脲酶(μ g/(g·h))	57.42 \pm 5.55 a	43.81 \pm 3.50 b	39.85 \pm 3.12 b
酸性磷酸酶(μ g/(g·h))	471.65 \pm 30.99 a	372.05 \pm 30.32 b	399.67 \pm 15.44 b

2.3 土壤细菌测序及多样性统计

不同处理尾巨桉人工林土壤细菌样本测定的原始序列数均在 95 000 条以上,有效序列数均在 90 000 条以上,有效率均达到 96% 以上,覆盖率均高于 98%(表 3),表明土壤样本中细菌的测出率较高,本次所测序列库容能较为全面地反映细菌群落的种类和数量,基本排除数据差异来源于细菌有效序列数不够的可能性。

对获得的细菌序列,根据 97% 的序列相似性划分 OTU(表 4)。OTU 能直接反映细菌丰富度,由表 4 可知,3 种处理下的土壤细菌丰富度无显著差异。而 α 多样性能反映各处理土壤细菌的物种多样性,其中 3 种处理的 Chao1 指数范围在 3 766.18 ~ 3 848.98, Shannon 指数范围在 9.93 ~ 9.95,处理间无显著差异。

表 3 细菌测序处理结果统计

Table 3 Sequencing statistics of bacteria under different treatments

处理	原始序列数	有效序列数	有效率(%)	覆盖率(%)
TC	95 628	92 407	96.63	98.54
SC	105 685	102 015	96.53	98.44
CK	101 872	98 415	96.61	98.52

表 4 细菌 OTU 数目与 α 多样性

Table 4 Alpha diversity indices of soil bacterial community under different treatments

处理	OTUs	Chao1 指数	Shannon 指数
TC	3 344.67 ± 44.97 a	3 766.18 ± 94.42 a	9.93 ± 0.01 a
SC	3 388.67 ± 35.35 a	3 848.98 ± 52.82 a	9.94 ± 0.01 a
CK	3 406.00 ± 46.51 a	3 811.91 ± 50.98 a	9.95 ± 0.04 a

注:同列小写字母相同表示处理间差异不显著($P>0.05$)。

2.4 土壤细菌群落组成与结构

非度量多维尺度分析(NMDS)可以基于进化关系或数量距离矩阵,对比样本组之间的差异。因此基于 unweight unifracc 距离进行非度量多维尺度分析,结果见图 1。图中每一个点代表一个样本,相同形状的点来自同一个分组,两点之间的距离越近表明两者的群落构成差异越小。由 Stress=0.06 可知,该分析结果解释率为 94%。此外 Anosim 分析结果表明,不同处理的群落结构差异显著($P=0.028$, $R^2=0.081$)。

在“门”水平上(图 2A),本次共测出 33 个门,各处理土壤细菌群落平均相对丰度排名前 10 的有:厚壁菌门(Firmicutes, 32.21%)、绿弯菌门(Chloroflexi, 18.00%)、酸杆菌门(Acidobacteria, 9.43%)、变形菌门(Proteobacteria, 7.41%)、髌骨菌门(Patescibacteria, 6.18%)、放线菌门(Actinobacteria, 6.11%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 5.78%)、浮霉菌门(Planctomycetes,

3.61%)、WS4(3.37%)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes, 2.95%)。其中,与其他处理相比,套种田菁(SC)措施,厚壁菌门和绿弯菌门的相对丰度较高;而套种白灰毛豆(TC)措施,变形菌门的相对丰度更高($P<0.05$)。

在“属”水平上(图 2B),本次共测出 344 个属,各处理土壤细菌群落平均相对丰度排名前 10 的有:产醋杆菌属(*Oxobacter*, 3.08%)、厌氧绳菌属(*Anaerolinea*, 3.06%)、*Anaerovorax*(2.90%)、铁还原菌属(*Thermincola*, 2.50%)、瘤胃梭菌属(*Ruminiclostridium* 1, 2.31%)、*BSV13*(2.31%)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 2.13%)、*Christensenellaceae* R-7 group 属(2.10%)、*Candidatus Solibacter* 属(1.87%)和厌氧粘细菌属(*Anaeromyxobacter*, 1.66%)。其中,与其他处理相比,套种田菁(SC)措施,产醋杆菌属、瘤胃梭菌属和 *Candidatus Solibacter* 属的相对丰度较高;而套种白灰毛豆(TC)措施,铁还原菌属的相对丰度较高;两种绿肥套种措施均显著提高厌氧粘细菌属的相对丰度($P<0.05$)。

2.5 土壤性质与细菌门和属相对丰度的相关性

通过 Canoco 软件去趋势对应分析(DCA),结果表明轴长小于 3,选择 RDA 分析。结合 Pearson 相关性分析与 RDA 分析,如图 3A 所示,绿弯菌门和 pH 显著负相关($r=-0.706^*$, $P<0.05$),酸杆菌门和阳离子交换量显著正相关($r=0.724^*$, $P<0.05$),芽单胞菌门和有机质显著正相关($r=0.697^*$, $P<0.05$),拟杆菌门和有效磷显著负相关($r=-0.693^*$, $P<0.05$),WS4 门和蔗糖酶显著负相关($r=-0.759^*$, $P<0.05$),变形菌门和过氧化氢酶显著正相关($r=0.725^*$, $P<0.05$)。此外,水解氮是细菌“门”相对丰度的主要影响因素($P=0.018$, $F=2.19$)。

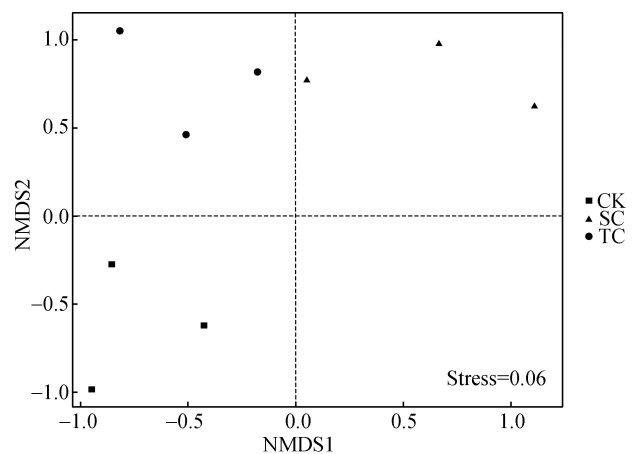
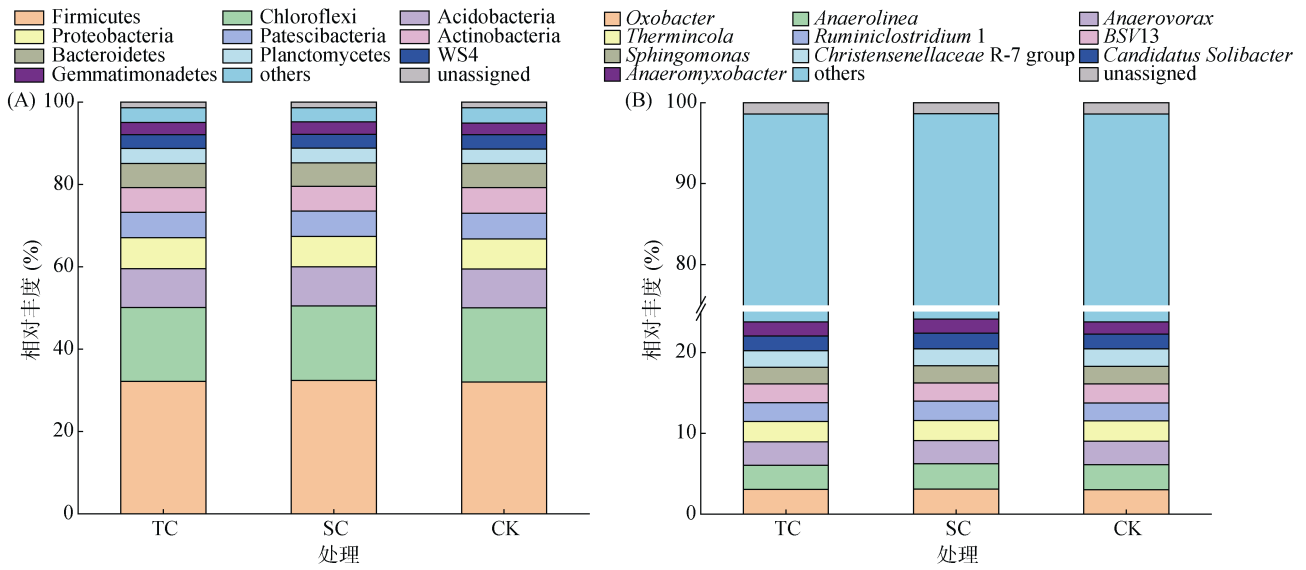


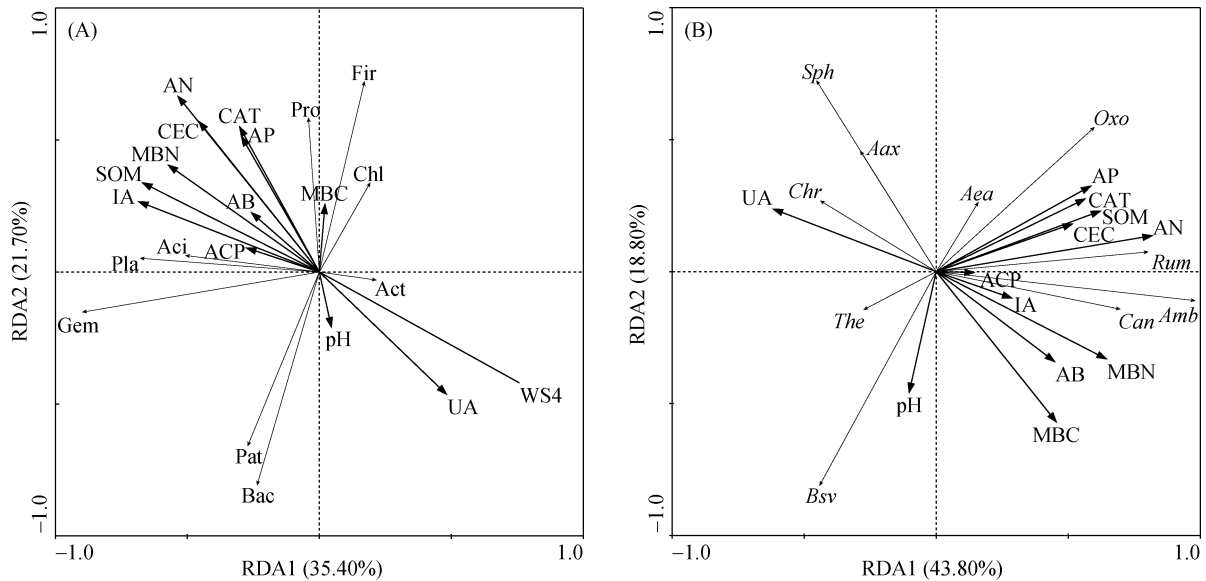
图 1 基于 unweight unifracc 距离度量的细菌群落 NMDS
Fig.1 NMDS of bacterial communities based on unweight unifracc distances metrics



(图中包含 unassigned 的信息，并且将相对丰度低于前 10 的物种合并为 others)

图 2 不同处理土壤细菌门和属的相对丰度

Fig. 2 Relative abundances of bacterial phyla (A) and genera (B) under different treatments



(SOM, 有机质; AN, 水解氮; AP, 有效磷; AB, 有效硼; CEC, 阳离子交换量; MBC, 微生物生物量碳; MBN, 微生物生物量氮; UA, 脲酶; IA, 蔗糖酶; CAT, 过氧化氢酶; ACP, 酸性磷酸酶; Fir, 厚壁菌门; Chl, 绿弯菌门; Aci, 酸杆菌门; Pro, 变形菌门; Pat, 髌骨菌门; Act, 放线菌门; Pla, 浮霉菌门; Bac, 拟杆菌门; Gem, 芽单胞菌门; Oxo, 产醋杆菌属; Aea, 厌氧绳菌属; Aax, Anaerovorax; The, 铁还原菌属; Rum, 瘤胃梭菌属; Bsv, BSV13; Sph, 鞘氨醇单胞菌属; Chr, Christensenellaceae R-7 group; Can, Candidatus Solibacter; Amb, 厌氧粘细菌属)

图 3 土壤性质与细菌门(A)、属(B)相对丰度的相关性

Fig. 3 Correlation between soil properties and relative abundances of bacterial phyla (A) and genera (B)

如图 3B 所示，瘤胃梭菌属与有机质显著正相关($r=0.680^*$, $P<0.05$)，与水解氮和有效磷极显著正相关($r=0.920^{**}$, $r=0.822^{**}$, $P<0.01$)。鞘氨醇单胞菌属与微生物生物量碳显著负相关($r=-0.741^*$, $P<0.05$)。Christensenellaceae R-7 group 属与蔗糖酶、微生物生物量氮和有效硼显著负相关($r=-0.723^*$, $r=-0.721^*$, $r=-0.687^*$, $P<0.05$)。厌氧粘细菌属与微生物生物量氮和水解氮显著正相关($r=0.667^*$, $r=0.711^*$, $P<0.05$)。此外，水解氮($P=0.016$, $F=3.10$)与 pH($P=0.030$, $F=1.97$)是细菌“属”相对丰度的主要影响因子。

此外，过氧化氢酶与阳离子交换量极显著正相关

($r=0.852^{**}$, $P<0.01$), 微生物生物量碳氮均与有效硼显著正相关($r=0.754^*$, $r=0.774^*$, $P<0.05$), 其中, 有效硼是微生物生物量及酶活性的主要影响因子($P=0.008$, $F=4.84$)。

2.6 土壤微生物功能预测

由表 5 可知, 根据 FAPROTAX 预测的功能, 3

种处理的主要功能群落类型有化能异养(8.55%)、发酵(4.33%)以及需氧化能异养(3.79%)。与其他处理相比, 套种白灰毛豆(TC)下的细菌群落在固氮和硝酸盐还原功能显著表达, 套种田菁(SC)下的细菌群落在芳香族化合物降解功能显著表达; 两种绿肥处理均在延胡索酸呼吸和铁呼吸功能显著表达。

表 5 土壤细菌群落的预测功能在不同处理下的相对丰度(%)
Table 5 Relative abundances of predicted functions of soil bacterial communities under different treatments

功能类型	TC	SC	CK
化能异养	8.466 6 ± 0.015 2 b	8.500 3 ± 0.010 7 ab	8.679 3 ± 0.011 5 a
发酵	4.312 1 ± 0.034 7 a	4.293 4 ± 0.030 5 a	4.377 2 ± 0.035 4 a
需氧化能异养	3.732 3 ± 0.030 9 a	3.753 0 ± 0.010 5 a	3.881 0 ± 0.012 6 a
硫酸盐呼吸	0.643 6 ± 0.002 0 b	0.644 1 ± 0.005 0 b	0.669 3 ± 0.001 3 a
硝酸盐还原	0.211 8 ± 0.014 8 a	0.178 9 ± 0.012 8 b	0.164 1 ± 0.024 8 b
延胡索酸呼吸	0.212 7 ± 0.000 7 a	0.207 5 ± 0.010 3 a	0.182 2 ± 0.016 6 b
硫化物呼吸	0.714 8 ± 0.005 6 c	0.729 9 ± 0.005 0 b	0.749 3 ± 0.004 8 a
固氮	0.368 8 ± 0.003 2 a	0.352 1 ± 0.007 5 b	0.344 0 ± 0.003 1 b
芳香化合物降解	0.767 3 ± 0.006 2 b	0.871 2 ± 0.031 4 a	0.773 9 ± 0.018 5 b
铁呼吸	0.444 6 ± 0.011 5 a	0.433 3 ± 0.008 5 a	0.396 2 ± 0.018 0 b

3 讨论

3.1 套种绿肥促进土壤养分转化和增加土壤酶活性

土壤是植物的养分库, 为植物生长提供所需的养分, 如氮和磷^[9]。本研究中, 两种绿肥套种措施对土壤养分均具有改善作用, 其中套种田菁显著增加土壤有机质含量($P<0.05$), 这与刘雅辉等^[10]研究 3 种耐盐植物(田菁、费菜 *Sedum aizoon* 和蒲公英 *Taraxacum mongolicum*)对滨海盐土化学性质影响的结果相似, 有机质是土壤养分的重要组成部分, 与土壤肥力及林木的生长量密切相关, 而套种绿肥能提高土壤中生物活性有机质组分。过氧化氢酶活性可以表征土壤腐殖化程度以及有机质的累积程度^[11], 本研究两种绿肥套种措施均提高土壤过氧化氢酶活性, 这可能是因为土壤积累较多腐殖质, 有机质含量高, 给微生物提供充足的营养条件, 有利于土壤微生物的生长繁殖。

豆科植物不仅能固碳, 还能通过根瘤菌共生固氮, 本研究两种绿肥套种措施均显著增加土壤水解氮含量($P<0.05$), 这与张达斌等^[12]研究结果相似, 这可能是因为套种绿肥提高了土壤脲酶活性^[13]。土壤脲酶是参与土壤氮素循环的酶类中唯一能够直接水解尿素的酶, 能够将有机氮化合物水解转化为无机氮化合物, 进而被植物直接吸收利用。

研究表明, 植物可通过增加的氮素从有机来源调用和吸收磷素^[14]。本研究中, 套种田菁显著增加土

壤有效磷含量, 这与套种田菁显著增加土壤水解氮含量的结果趋势相一致。此外, 土壤缺硼可能诱发桉树的缺素生理病, 如垂梢病^[15]。绿肥套种措施增加土壤有效硼含量, 可有效预防桉树缺素症。

3.2 套种绿肥增加土壤微生物生物量

土壤微生物生物量是土壤养分转化与循环的动力, 同时也是土壤中植物有效养分的储备库^[16]。本研究中, 两种绿肥套种措施均提高了土壤微生物生物量, 这与郑佳舜等^[17]研究结果相似。孔凡磊等^[18]研究表明, 外源有机物料输入是提高土壤微生物生物量和增强土壤养分固持能力的主要方式。同样, 官会林等^[19]研究发现, 植烟土壤轮作豆科类植物, 能提高烟地土壤微生物生物量碳的含量, 并且采用绿肥或豆科植物复种的模式, 促进土壤中微生物生物量碳的均匀分布。

3.3 套种绿肥影响土壤细菌群落组成和预测功能

微生物多样性与土壤生物过程及生态服务功能关系密切^[20]。本研究 3 种处理土壤细菌的微生物多样性(OTU、Chao1 指数和 Shannon 指数)均无显著差异, 这可能与绿肥种植时间有关, 周泉等^[21]通过半年的桶栽试验发现绿肥降低了土壤微生物多样性, 李丽娜等^[22]研究发现 3 a 的绿肥种植对各处理的细菌丰富度和多样性均无显著影响, 而高高涓^[23]研究表明长期种植绿肥(始于 1982 年)可提高土壤微生物多样性。

套种绿肥不仅影响土壤微生物多样性,还影响土壤微生物群落组成。土壤微生物群落组成与环境因子的变化密切相关。本研究表明厚壁菌门、绿弯菌门、酸杆菌门和变形菌门是土壤中主要的 4 个优势菌门。厚壁菌门多为革兰氏阳性菌,具有一层较厚的肽聚糖构成的细胞壁,与植物的抗逆性有关。而套种绿肥(田菁 SC)增加厚壁菌门的相对丰度,这可能有利于提高桉树人工林的抗逆性^[24]。绿弯菌门具有独特的 3-HP 固定 CO₂ 的功能^[25],在本研究中套种绿肥(SC)增加了绿弯菌门的相对丰度,可能因此促进了土壤有机质积累。酸杆菌门通常是嗜酸菌,与其他处理相比,套种田菁措施下的土壤 pH 最低,这可能有利于会增加酸杆菌门的相对丰度。变形菌门广泛存在于酸性土壤中^[26],参与小分子有机物的降解(如葡萄糖和短链脂肪酸)^[27],并且包含较多的固氮菌^[28]。本研究中套种白灰毛豆相关预测功能菌(固氮和硝酸盐还原菌)的相对丰度显著增加。因此,套种绿肥提高变形菌门的相对丰度,这将有助于充分利用有机肥,将其转化为桉树可直接吸收利用的养分。

在属水平上,产醋杆菌属、瘤胃梭菌属、*Candidatus Solibacter* 属和厌氧粘细菌属是土壤中主要的 4 个优势菌属。产醋杆菌属主要与发酵功能相关^[29],发酵能将复杂的有机化合物分解为简单的物质。研究表明功能组发酵(4.33%)是土壤微生物群落预测的主要功能之一。瘤胃梭菌属具有消化降解营养物质(如纤维素)的作用^[30]。本研究表明套种绿肥(SC)可提高瘤胃梭菌属的相对丰度,因此套种绿肥可促进土壤中植物残体的分解,而植物残体是土壤有机碳库的重要来源^[31],因此本研究中瘤胃梭菌属相对丰度和土壤有机质含量显著正相关。*Candidatus Solibacter* 属能分解有机质来获取碳源^[32],广泛存在于有机质丰富的土壤,因此在本研究中,套种绿肥(SC)的 *Candidatus Solibacter* 属相对丰度较高。厌氧粘细菌属常用于环境修复,与砷和铁的还原有关^[33],在一定条件下进行异化铁(III)的还原过程,对甲烷的产生具有抑制作用^[34]。而甲烷是重要的温室气体。本研究发现两种绿肥套种措施均增加了厌氧粘细菌属的相对丰度,这表明桉树林下套种绿肥可一定程度抑制土壤温室气体排放,改善土壤环境。

此外,本研究中与根瘤菌固氮作用相关的微生物相对丰度不高,原因可能是:有机肥的施用可能会导致土壤重金属含量的增加^[35],而过量的重金属可能会损害豆科植物的根系,影响固氮作用^[36],进而影响土壤微生物活性。如刘永厚等^[37]研究表明紫云英

在铜浓度为 60 mg/kg 时结瘤时间推后以及单株根瘤数和固氮酶活性降低;滕应和黄昌勇^[38]进一步研究表明土壤中氮素的矿化作用与重金属污染水平呈负相关。因此,在今后绿肥种植结合有机肥的施用过程中,应当选择重金属含量较少的肥料,以充分发挥绿肥的固氮作用。

4 结论

研究结果表明套种两种豆科绿肥均可增加桉树人工林土壤养分含量。并且,两种绿肥套种措施均可增加土壤微生物生物量,套种白灰毛豆和套种田菁对土壤酶活性具有不同程度的影响。此外,两种绿肥套种措施通过改善土壤水解氮含量影响细菌群落门和属的相对丰度,套种白灰毛豆措施主要影响变形菌门和铁还原菌属的相对丰度,套种田菁措施主要影响厚壁菌门、绿弯菌门、产醋杆菌属、瘤胃梭菌属和 *Candidatus Solibacter* 属的相对丰度。

因此,林下套种豆科绿肥可以改善土壤养分状况,影响土壤酶活性,调节土壤微生物群落结构,可作为改善桉树人工林土壤质量和实现桉树人工林可持续经营的有效措施。

参考文献:

- [1] 黄国勤,赵其国. 广西桉树种植的历史、现状、生态问题及应对策略[J]. 生态学报, 2014, 34(18): 5142-5152.
- [2] 刘兵. 桉树人工林林分结构变化对土壤真菌群落和功能结构的影响[D]. 南京: 南京林业大学, 2020.
- [3] 李秀英,赵秉强,李絮花,等. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1591-1599.
- [4] 高嵩涓,曹卫东,白金顺,等. 长期冬种绿肥改变红壤稻田土壤微生物生物量特性[J]. 土壤学报, 2015, 52(4): 902-910.
- [5] 曹卫东,包兴国,徐昌旭,等. 中国绿肥科研 60 年回顾与未来展望[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(6): 1450-1461.
- [6] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [7] 关松萌. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [8] 杨兰芳,曾巧,李海波,等. 紫外分光光度法测定土壤过氧化氢酶活性[J]. 土壤通报, 2011, 42(1): 207-210.
- [9] 江胜国,肖蒙,刘广明,等. 天津小站稻种植区土壤质量综合评价[J]. 土壤, 2022, 54(2): 371-378.
- [10] 刘雅辉,孙建平,马佳,等. 3 种耐盐植物对滨海盐土化学性质及微生物群落结构的影响[J]. 农业资源与环境学报, 2021, 38(1): 28-35.
- [11] 杨招弟,蔡立群,张仁陟,等. 不同耕作方式对旱地土壤酶活性的影响[J]. 土壤通报, 2008, 39(3): 514-517.

- [12] 张达斌, 姚鹏伟, 李婧, 等. 豆科绿肥及施氮量对旱地麦田土壤主要肥力性状的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(7): 2272–2281.
- [13] 杨曾平, 高菊生, 郑圣先, 等. 长期冬种绿肥对红壤性水稻土微生物特性及酶活性的影响[J]. 土壤, 2011, 43(4): 576–583.
- [14] Schleuss P M, Widdig M, Heintz-Buschart A, et al. Interactions of nitrogen and phosphorus cycling promote P acquisition and explain synergistic plant-growth responses[J]. Ecology, 2020, 101(5): e03003.
- [15] 蓝佩玲, 廖新荣, 李淑仪, 等. 硼配施多种微量元素对桉树生长的效应[J]. 生态环境, 2007, 16(3): 1035–1039.
- [16] 朱小梅, 王甫同, 邢锦城, 等. 田菁翻压还田对滩涂土壤碳氮及微生物生物量的影响[J]. 土壤, 2021, 53(3): 529–536.
- [17] 郑佳舜, 胡钧铭, 韦翔华, 等. 绿肥压青对粉垄稻田土壤微生物量碳和有机碳累积矿化量的影响[J]. 中国生态农业学报, 2021, 29(4): 691–703.
- [18] 孔凡磊, 张明园, 范士超, 等. 耕作方式对长期免耕农田土壤微生物生物量碳的影响[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(2): 240–245.
- [19] 官会林, 郭云周, 张云峰, 等. 绿肥轮作对植烟土壤酶活性与微生物量碳和有机碳的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(10): 2366–2371.
- [20] 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.
- [21] 周泉, 王龙昌, 邢毅, 等. 间作紫云英下油菜根际土壤微生物群落功能特征[J]. 应用生态学报, 2018, 29(3): 909–914.
- [22] 李丽娜, 席运官, 陈鄂, 等. 耕作方式与绿肥种植对土壤微生物组成和多样性的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2018, 34(4): 342–348.
- [23] 高嵩涓. 长期冬绿肥—水稻制度下稻田土壤部分环境化学及分子生态学特征[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [24] Cheng H Y, Zhang D Q, Huang B, et al. Organic fertilizer improves soil fertility and restores the bacterial community after 1, 3-dichloropropene fumigation[J]. Science of the Total Environment, 2020, 738: 140345.
- [25] 鲜文东, 张潇瞳, 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.
- [26] Zeng Q C, Dong Y H, An S S. Bacterial community responses to soils along a latitudinal and vegetation gradient on the loess plateau, China[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0152894.
- [27] Awasthi M K, Zhang Z Q, Wang Q, et al. New insight with the effects of biochar amendment on bacterial diversity as indicators of biomarkers support the thermophilic phase during sewage sludge composting[J]. Bioresource Technology, 2017, 238: 589–601.
- [28] Jabir T, Jesmi Y, Vipindas P V, et al. Diversity of nitrogen fixing bacterial communities in the coastal sediments of southeastern Arabian Sea (SEAS)[J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2018, 156: 51–59.
- [29] 任翠娟, 姜金仲, 王自布, 等. 两株茶叶籽水浆发酵杆菌的分离鉴定及其数量动态分析[J]. 南方农业学报, 2018, 49(8): 1603–1611.
- [30] 金磊, 王立志, 王之盛, 等. 基于高通量测序技术对山羊盲肠细菌多样性的分析[J]. 微生物学通报, 2019, 46(6): 1423–1433.
- [31] 汪景宽, 徐英德, 丁凡, 等. 植物残体向土壤有机质转化过程及其稳定机制的研究进展[J]. 土壤学报, 2019, 56(3): 528–540.
- [32] Cheng Z, Jiang J Q, Wu H, et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glucose via malonyl-CoA pathway by engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2016, 200: 897–904.
- [33] Qiao J T, Li X M, Li F B. Roles of different active metal-reducing bacteria in arsenic release from arsenic-contaminated paddy soil amended with biochar[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 344: 958–967.
- [34] 朱超, Stefan Ratering, 曲东, 等. 短期淹水培养对水稻土中地杆菌和厌氧粘细菌丰度的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(15): 4251–4260.
- [35] Tian W, Zhang Z H, Hu X F, et al. Short-term changes in total heavy metal concentration and bacterial community composition after replicated and heavy application of pig manure-based compost in an organic vegetable production system[J]. Biology and Fertility of Soils, 2015, 51(5): 593–603.
- [36] 韩晓姝, 曹成有, 姚金冬, 等. 铜、镉对三种豆科植物生长及氮磷钾含量的影响[J]. 生态学杂志, 2009, 28(11): 2250–2256.
- [37] 刘永厚, 黄细花, 赵振纪, 等. 铜对紫云英固氮作用及养分吸收的影响[J]. 土壤肥料, 1993(5): 23–27.
- [38] 滕应, 黄昌勇. 重金属污染土壤的微生物生态效应及其修复研究进展[J]. 土壤与环境, 2002, 11(1): 85–89.