

沼液原位厌氧发酵对土壤微生物群落结构特征及功能的影响^①

孙菊悦^{1,2}, 张军鹏², 刘玉庆², 母锐敏¹, 许晓晖^{2*}, 刘兴华², 陈飞勇³, 马桂霞¹, 范兵兵¹

(1 山东建筑大学市政与环境工程学院, 济南 250101; 2 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 济南 250100; 3 山东建筑大学资源与环境创新研究院, 济南 250101)

摘要: 针对我国设施农业因长期集约化种植导致的土壤连作障碍及微生物群落失衡问题, 本研究引入生物闷棚(Biological soil disinfestation, BSD)理念, 将沼液作为外源碳源与接种物诱导土壤原位厌氧发酵, 通过设置对照(CK)、单淹水对照(WCK)及低(LG)、中(MG)、高(HG)3种沼液添加量处理, 在 37 °C 恒温条件下进行 15 d 原位厌氧发酵, 旨在探究沼液驱动的 BSD 过程对土壤理化性质及微生物群落演变的影响。结果表明: 相比于 CK 和 WCK, 沼液发酵处理显著提升了土壤 pH, 有效缓解了土壤酸化; 速效钾和有效磷含量显著增加, 而有机质和全氮因发酵消耗显著降低, 且沼液发酵处理的有机质含量低于 WCK 处理。微生物多样性分析表明, 沼液发酵处理的细菌 Chao1 指数均高于 CK 和 WCK, 且 LG 和 MG 处理维持了较高的细菌多样性; 而相比之下, WCK 处理刺激了真菌的生长。PCoA 与 LEfSe 分析证明沼液发酵重构了土壤微生物群落结构, 且 LG、MG 处理微生物群落结构相近。在功能层面, MG 和 HG 处理上调了辅因子和维生素代谢等功能的相对丰度, 而沼液发酵处理整体降低了碳水化合物代谢等功能的相对丰度。利用 NCyc 和 PCyc 数据库进行功能挖掘发现, 沼液发酵处理显著改变了氮、磷循环相关功能基因的丰度分布, 普遍增加了 *nmo*、*nosZ*、*gdh_K00262* 等关键功能基因的相对丰度, 协同强化了矿化、反硝化及氨同化等过程, 在提升微生物利用沼液中有机关能源物质能力的同时, 有利于降低 N₂O 排放风险。其中, MG 处理对不同功能基因的提升作用表现较为均衡。综合而言, 沼液驱动的 15 d 原位厌氧发酵通过触发强烈的正激效应激活了土壤微生物代谢, 驱动了群落向富营养专性厌氧方向的稳态演替, 显著提升了设施退化土壤的生物修复效能与养分供应容量。其中, 中浓度沼液添加(MG)结合原位厌氧发酵在改善土壤性质、重构微生物群落功能方面效果最佳。本研究证明了沼液作为 BSD 添加物修复设施土壤的可行性, 为沼液资源化利用与连作障碍治理提供了理论依据。

关键词: 沼液; 微生物群落; 宏基因组

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A

Effects of *In-situ* Anaerobic Fermentation of Biogas Slurry on Soil Microbial Community Structure and Function

SUN Juyue^{1,2}, ZHANG Junpeng², LIU Yuqing², MU Ruimin¹, XU Xiaohui^{2*}, LIU Xinghua², CHEN Feiyong³, MA Guixia¹, FAN Bingbing¹

(1 School of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101, China; 2 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 3 Institute of Resource and Environmental Innovation, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101, China)

Abstract: In order to solve the problems of soil continuous cropping obstacle and microbial community imbalance caused by long-term intensive planting in facility agriculture in China, the concept of biological soil disinfestation (BSD) was introduced in this study. Biogas slurry was used as exogenous carbon source and inoculum to induce *in-situ* anaerobic fermentation of soil, five treatments were set up, including control (CK), single flooding control (WCK), low (LG), medium (MG) and high (HG) biogas slurry concentrations, *in-situ* anaerobic fermentation was carried out at 37 °C for 15 days, and the effects of biogas slurry-driven BSD process on soil physicochemical properties and microbial community evolution were explored. The results showed that compared with CK and WCK, biogas slurry fermentation significantly increased soil pH and effectively alleviated soil acidification. Available potassium and phosphorus contents increased significantly, while organic matter and total nitrogen

①基金项目: 山东省现代农业产业技术体系家禽创新团队环境控制岗位专家项目(SDAIT-11-09)、泰山产业创业领军人才项目和山东省引进顶尖人才“一事一议”项目(0031504)资助。

* 通信作者(xmsxuxiaohui@163.com)

作者简介: 孙菊悦(2001—), 女, 山东海阳人, 硕士研究生, 主要研究方向为农牧废弃物资源化与土壤生态。E-mail: sunjyue@163.com

contents decreased significantly due to fermentation consumption, and organic matter content was lower under biogas slurry fermentation than under WCK. Microbial diversity analysis showed that the bacterial Chao1 index in biogas slurry fermentation treatments was higher than those in the CK and WCK, and LG and MG maintained higher bacterial diversity, while WCK stimulated the growth of fungi. PCoA and LEfSe analyses demonstrated that biogas slurry fermentation reconstructed the soil microbial community structure, and the community structures of the LG and MG treatments were similar. At the functional level, MG and HG treatments up-regulated the relative abundance of functions such as cofactor and vitamin metabolism, while biogas slurry fermentation generally reduced carbohydrate metabolism functions. Functional mining using the NCyc and PCyc databases revealed that biogas slurry fermentation significantly altered the abundance distribution of functional genes involved in nitrogen and phosphorus cycling. It generally increased the relative abundance of key functional genes such as *nmo*, *nosZ*, and *gdh_K00262*, synergistically enhancing mineralization, denitrification, and ammonia assimilation processes. This improved the microbial capacity to utilize organic energy substances in the biogas slurry while simultaneously mitigating the risk of N_2O emissions. Specifically, the MG treatment exhibited a relatively balanced enhancement across various functional genes. In conclusion, the 15-day *in-situ* anaerobic fermentation driven by biogas slurry activated soil microbial metabolism by triggering a strong positive excitation effect, drove the steady-state succession of the community to the direction of eutrophic obligate anaerobic, and significantly improved the bioremediation efficiency and nutrient supply capacity of facility degraded soil. Among them, MG combined with *in-situ* anaerobic fermentation had the best effect in improving soil properties and reconstructing microbial community function. This study proved the feasibility of biogas slurry as BSD additive to repair facility soil, and provided a theoretical basis for the resource utilization of biogas slurry and the treatment of continuous cropping obstacles.

Key words: Biogas slurry; Microbial community; Metagenome

根据农业农村部统计数字,目前我国现代设施种植面积已超 4 000 万亩(15 亩=1 hm^2)^[1]。然而,长期高强度利用导致的连作障碍已成为制约其可持续发展的瓶颈^[2],其核心在于土壤生物多样性的丧失与致病菌的定向累积。闷棚是设施蔬菜连作障碍治理中常用的综合措施之一^[3]。传统的化学闷棚(如使用威百亩)虽见效快,但易导致“误杀”有益菌及土壤板结。相比之下,基于添加外源碳源驱动的生物闷棚(Biological soil disinfestation, BSD)技术,国际上也称之谓为土壤厌氧消毒(Anaerobic soil disinfestation, ASD)或强还原土壤灭菌(Reductive soil disinfestation, RSD),通过添加外源有机碳源、灌水覆膜及高温诱导,驱动土壤微生物进行剧烈的原位厌氧发酵,该过程产生的挥发性有机酸(VFAs)和氨气能定向清除病原微生物,同时实现受损微生物区系的重塑^[4-5]。

沼液作为厌氧消化的副产物,已有研究表明,沼液或沼液配施处理可改善土壤养分状况并影响微生物群落结构^[6-7]。其组分特性与 BSD 的技术需求高度契合。首先,沼液富含不稳定有机碳(DOC),能为厌氧发酵提供充足底物;其次,其携带的高浓度氨氮是杀灭病原菌的强力化学因子;同时,沼液本身含有的厌氧微生物群落可作为接种剂,直接加速土壤原位发酵进程^[8]。研究表明,沼液相关组分可影响植物磷吸收和土壤磷酸酶活性^[9]。然而,在 BSD 过程中,有

机质的降解受外源沼液与土壤内源碳库的共同驱动。为明确沼液的独立贡献,本研究引入单淹水对照,以扣除淹水环境的基础生化影响,进而明晰沼液中养分与菌群对土壤重塑的贡献。目前研究多聚焦于沼液的直接肥效作用^[6,10],而对沼液驱动的原位厌氧发酵对土壤理化性质和微生物的影响尚不明确。因此,本研究模拟设施大棚闷棚环境(土壤温度 $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 、密闭控氧),探究不同沼液添加强度下土壤理化性质、微生物群落演替及功能代谢谱的动态响应。研究旨在量化沼液在 BSD 中的适宜施用强度,阐明原位厌氧发酵的改良效应,为设施土壤修复与沼液资源化利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤采集于山东省临沂市沂水县马站镇徐家店子村青杨家庭农场种植大棚($36^{\circ}00'41.98''N$, $118^{\circ}44'11.74''E$),大棚以番茄种植为主,连续多年重茬种植,取样前为 2024 年种植的第二茬番茄果实进入转色期。土壤样品采集自 0~20 cm 耕作层,多点取样混合均匀后,置于阴凉通风处自然风干,并人工剔除可见植物残体与根系,随后过 5 mm 筛备用。土壤基本理化性质: pH 5.26,土壤容重 $1.29 g/cm^3$,含水率 17.7%,有机质含量 $23.36 g/kg$,全氮含量

4.55 g/kg, 有效磷和速效钾含量分别为 145.4 mg/kg 和 367.33 mg/kg。沼液在完全混合式厌氧发酵工艺条件下产生, 水力停留时间为 35~38 d, 发酵温度为 37~38.5 °C。沼液基本理化性质: 全氮含量 3.2 g/kg, 全磷和全钾含量分别为 4.8 g/kg 和 2.9 g/kg, pH 8.1, 灰分含量达 657 g/kg。试验用袋规格为 20 cm × 27 cm 厌氧袋。

1.2 试验设计

试验于 2024 年 12 月 27 日至 2025 年 1 月 26 日在山东省农业科学院试验基地完成。本研究基于 BSD 原理, 将沼液作为外源碳源与微生物接种物诱导土壤原位厌氧发酵。试验设 5 个处理, 每处理 3 次重复。为确保水分一致, 参考 BSD 饱和灌水要求, 各处理(除空白对照外)均添加 250 mL 液体使土壤达到饱和持水量。具体设置如下: 空白对照(CK), 1.7 kg 原始土壤, 不进行发酵处理, 作为改良效应评价的基准; 单淹水对照(WCK), 1.7 kg 原始土壤添加 250 mL 无菌去离子水, 模拟常规淹水闷棚, 旨在明确利用土壤自身碳源进行 BSD 过程的效应; 沼液发酵组(LG、MG、HG, 分别代表低量、中量、高量沼液添加量), 先后添加水和沼液(总体积 250 mL), 各组沼液添加量分别为 83、167 和 250 mL, 旨在探究沼液输入的剂量效应。试验采用密封厌氧袋模拟设施大棚“闷棚”操作。将液体与 1.7 kg 土壤充分混匀后装入专用厌氧袋, 排除空气并密封。样本置于生化培养箱中, 在 37 °C 恒温条件下进行 15 d 原位厌氧发酵。

1.3 样品采集与处理

试验开始前, 在田间大棚试验样地内按五点采样法采集土壤样品, 现场混合均匀后获得原土。原土带回实验室后, 剔除石砾、植物残体等杂物, 过 2 mm 筛并充分混匀。混匀后的土壤一部分用于测定初始土壤理化性质及微生物群落结构, 剩余部分进一步拣除可见细根及杂物后作为供试土壤进行室内模拟原位厌氧发酵试验。15 d 厌氧发酵结束后采集土壤样品, 将土样分为两部分, 一部分土样在实验室经自然风干后过筛混匀, 用于测定土壤理化性质; 另一部分新鲜土样置于 -80 °C 的冰箱中恒温保存, 用于检测土壤微生物群落结构。

1.4 样品测定

1.4.1 土壤理化性质测定 土壤容重与孔隙度通过环刀法进行测定; 土壤含水量采用烘干法测定; 土壤 pH 采用 pH 仪测定(水土质量比为 2.5 : 1); 土壤有效磷采用 0.5 mol/L NaHCO₃ 浸提-钼锑抗比色法测定; 速效钾采用乙酸铵浸提-火焰光度法测定; 有机

质采用重铬酸钾氧化-外加热法测定; 全氮采用浓硫酸消煮-半自动凯氏定氮仪滴定法测定^[11]。

1.4.2 土壤微生物宏基因组测序 将保存于 -80 °C 冰箱中的土壤样品送至上海派森诺生物科技股份有限公司, 提取微生物 DNA, 构建宏基因组文库。依托 Illumina novaseq X plus 高通量测序平台进行 2 × 150 bp 模式测序。运用 fastp(v 0.23.2)软件对测序下机的原始数据进行筛查和过滤后, 使用 MEGAHIT 软件进行拼接。完成拼接组装后, 利用 Prodigal 软件(<https://github.com/hyattpd/Prodigal>)识别其中的开放阅读框(Open reading frame, ORF), 并预测其中的编码区域, 从而获得对应的基因序列文件。利用 MMseqs2 的 cluster 模块对基因序列集按相似度 95% 和覆盖度 90% 进行聚类去冗余, 获得非冗余基因集。利用 Strobealign 软件将高质量 reads 映射回非冗余基因集, 并使用 featureCounts 统计各基因丰度。利用 Kraken 2 软件将高质量 reads 与 GTDB 数据库进行比对, 获取各分类能级的微生物物种组成信息。同时, 利用 MMseqs 2 对非冗余蛋白集分别与 KEGG、NCyc、PCyc 数据库进行比对注释, 用于后续功能分析。

1.5 数据统计与分析

使用 Excel 2019 软件整理数据, SPSS 软件进行统计分析, 土壤理化数据采用 Duncan 新复极差法进行多重比较分析($P < 0.05$)。基于上述同一套非冗余基因丰度矩阵进行后续生物信息学统计分析。对物种丰度表进行序列抽平处理后, 利用 R 4.3.2 软件的 vegan 包计算 Chao1 指数和 Shannon 指数(α 多样性)。采用 Kruskal-Wallis 非参数检验进行多组间比较, 事后两两比较使用 Dunn 检验($P < 0.05$)。基于 Bray-Curtis 距离, 采用 R 4.3.2 和 QIIME 软件进行微生物群落结构主坐标分析(PCoA), 同时用 Adonis 分析进行组间差异检验。LEfSe 分析通过派森诺生物云平台(<https://www.genescloud.cn>)完成。多尺度相对丰度图通过 Origin 2024 绘制。利用 R 包 circlize 构建 circos 图, 用于展示各样本间的功能组成关系。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

不同添加量沼液厌氧发酵处理对土壤理化性质的影响如表 1 所示, 沼液厌氧发酵处理显著改善了土壤理化性质。WCK 处理虽提升了土壤 pH, 但沼液发酵处理(LG、MG、HG)土壤 pH 较 WCK 进一步提升 1.4%~9.3%, 且随沼液用量增加呈阶梯式上升。在速

效养分方面, WCK 处理土壤碱解氮、有效磷及速效钾含量较 CK 均显著下降;而沼液发酵处理不仅完全弥补了淹水损失,且进一步显著提高土壤速效养分含量,如有效磷含量较 CK 显著提高 9.81%~10.73%,

碱解氮则在 MG、HG 处理增幅显著。各处理土壤有机质与全氮含量较 CK 均呈显著下降趋势,沼液发酵处理有机质含量低于 WCK 处理,但不同添加量沼液发酵处理间无显著差异。

表 1 沼液处理对土壤理化性质的影响
Table 1 Soil physicochemical properties under different biogas slurry application rates

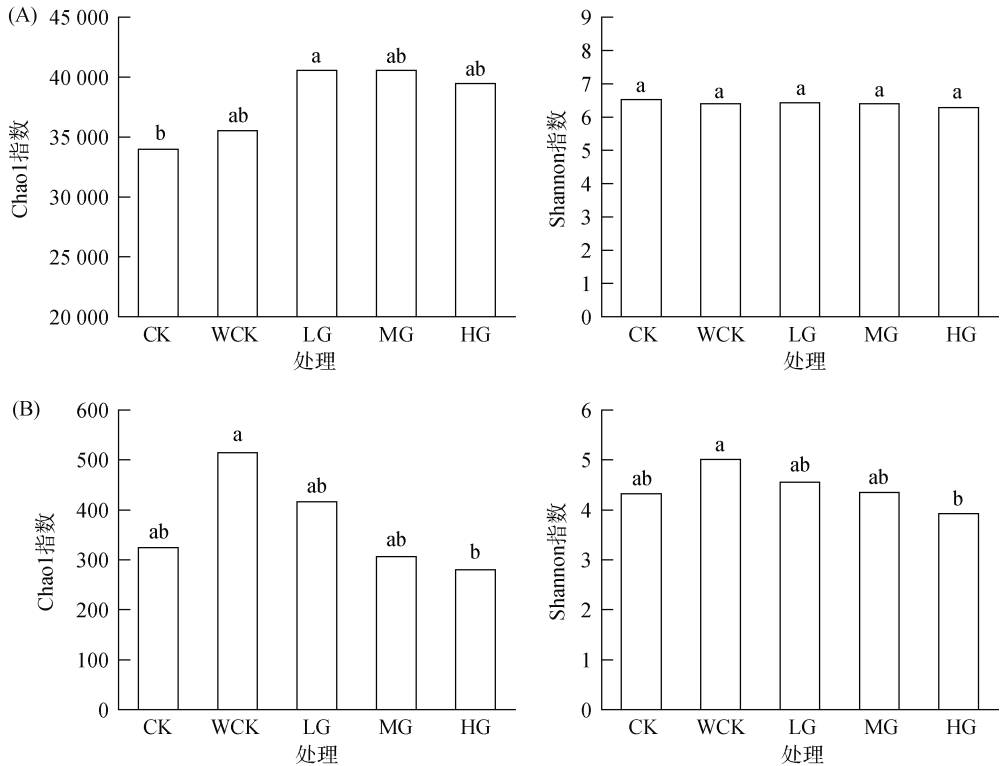
处理	pH	全氮(g/kg)	碱解氮(mg/kg)	有机质(g/kg)	有效磷(mg/kg)	速效钾(mg/kg)
CK	5.26±0.04e	2.28±0.05a	72.33±2.33b	23.36±1.07a	145.40±0.46b	367.33±1.76d
WCK	6.33±0.00d	1.57±0.00b	32.67±2.33c	16.92±0.65b	132.67±1.45c	352.33±0.33e
LG	6.42±0.01c	1.66±0.07b	65.33±6.17b	14.94±1.75b	161.00±6.11a	416.00±0.58c
MG	6.67±0.01b	1.68±0.20b	121.33±18.22a	15.10±1.32b	159.67±1.86a	508.67±0.33b
HG	6.92±0.01a	1.81±0.15b	126.00±4.04a	14.49±2.69b	159.67±1.45a	567.33±0.33a

注: 同列数据小写字母不同表示处理间差异显著($P<0.05$), 下同。

2.2 土壤微生物群落多样性

土壤微生物多样性是衡量土壤生态系统稳定性及修复效果的核心指标。为探究不同沼液施用量对设施大棚土壤中微生物群落多样性的作用,本研究分析了土壤细菌(图 1A)和真菌(图 1B)群落 α 多样性。结果显示,在不同处理下土壤细菌和真菌的多样性指数(Chao1 和 Shannon)表现出截然不同的演替趋势。与

CK 相比, LG 处理显著提高了细菌 Chao1 指数($P<0.05$), 并且处理间表现为 LG>MG>HG>WCK>CK。各处理间细菌群落 Shannon 指数未表现出显著差异。与细菌群落趋势不同, WCK 处理较 CK 显著提高了真菌的 Chao1 和 Shannon 指数。随着沼液添加量的增加, 真菌多样性呈现下降趋势, 其中, HG 处理的 Chao1 和 Shannon 指数均显著低于 WCK 处理($P<0.05$)。



(A. 细菌; B. 真菌。图柱上方小写字母不同表示处理间差异显著(Kruskal-Wallis 检验, Dunn 事后检验, $P<0.05$))

图 1 土壤微生物群落 α 多样性

Fig. 1 Alpha diversity of soil microbial communities

2.3 沼液诱导的土壤微生物群落物种组成分异

各处理土壤细菌门水平相对丰度如图 2A 所示, 主

要优势菌门包括变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)、芽单胞菌门(Gemmatimonadota)、拟

杆菌门(Bacteroidota)和绿弯菌门(Chloroflexota)等,在 CK 中占比分别为 37.32%、17.52%、9.69%、5.58%、6.78%。与 CK 和 WCK 相比,沼液发酵处理中放线菌门受到抑制,而拟杆菌门、厚壁菌门(Firmicutes A)得到富集,且各沼液发酵处理间无显著差异。与 CK 相比,WCK 处理显著增加了变形菌门的相对丰

度($P<0.05$)。细菌属水平上(图 2B),主要优势菌属包括藤黄单胞菌属(*Luteimonas B*)、鞘脂微菌属(*Sphingomicrobium*)、66-474 属、*JACDDX01* 属和 *JACDBZ01* 属等。与 CK 相比, MG 和 HG 处理显著提升了藤黄单胞菌属的相对丰度,鞘脂微菌属在 WCK 处理中得到富集,且显著高于 HG 处理。

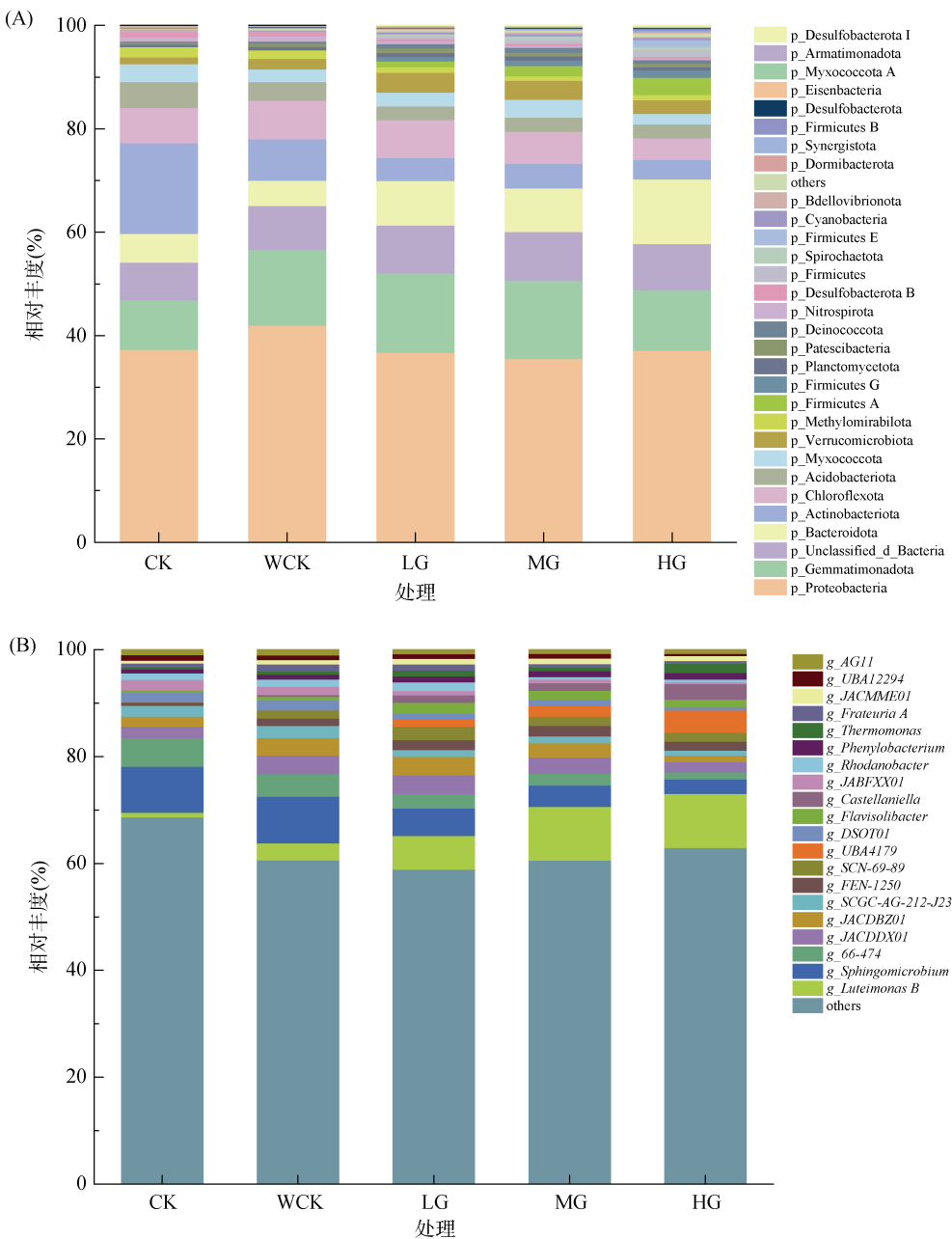


图 2 门(A)和属(B)水平上土壤细菌群落组成的相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of soil bacterial community compositions at phylum (A) and genus (B) levels

各处理土壤真菌门水平相对丰度如图 3A 所示。与 CK 相比, WCK 和沼液发酵处理组子囊菌门(Ascomycota)的相对丰度显著降低,降幅超过 30%;毛霉菌门(Mucoromycota)相对丰度则显著提高,且随

沼液添加量增加而持续升高, HG 处理相对丰度达 41.44%,成为绝对优势菌门;担子菌门(Basidiomycota)相对丰度在 LG、MG 处理提高,但 HG 处理又降至 14.05%,低于 CK。真菌属水平上(图 3B),主要优势

菌属包括根霉属(*Rhizopus*)、曲霉属(*Aspergillus*)、油壶菌属(*Olpidium*)等。与 CK 相比, 沼液发酵处理中

根霉属得到富集, 而曲霉属、镰刀菌属(*Fusarium*)丰度则被抑制。

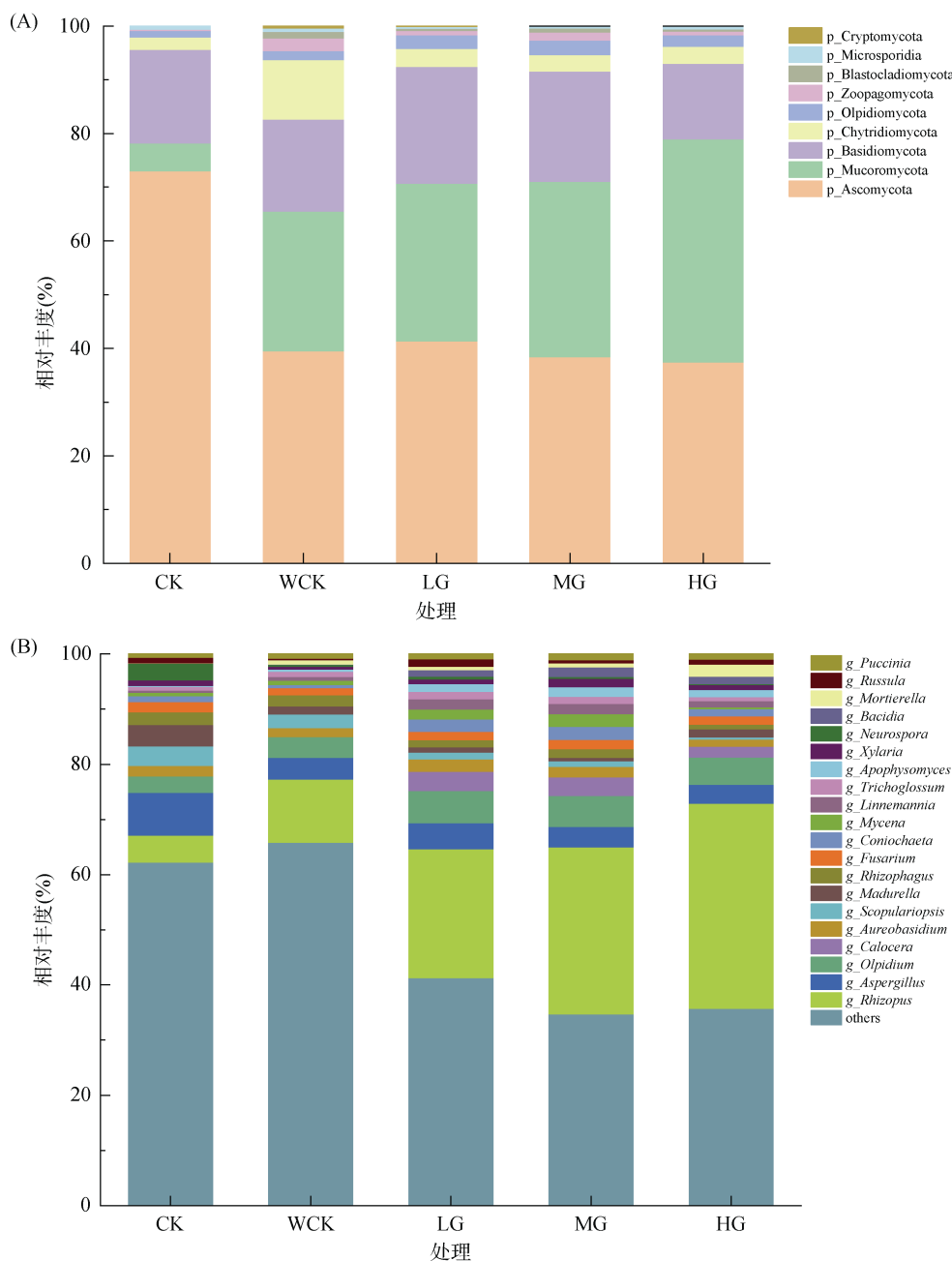


图 3 门 (A) 和属 (B) 水平上土壤真菌群落组成的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of soil fungal community compositions at phylum (A) and genus (B) levels

基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析(图 4)评估了不同处理组间微生物群落的相似性。结果显示, 沼液发酵处理(LG、MG、HG)与 CK 和 WCK 明显分离; 并且随着沼液用量的增加, MG 处理与 LG 处理样本聚集较近, 而 HG 处理组则逐渐远离。

2.4 土壤微生物物种 LEfSe 差异分析

为进一步探究不同沼液添加量下土壤原位厌氧发酵处理土壤微生物群落的变化, 利用 LEfSe 分析

($P < 0.05$) 判别不同处理土壤中差异显著的细菌 ($LDA > 5$, 图 5A) 和真核生物 ($LDA > 2$, 图 5B) 群落。进化分支显示了不同处理细菌和真核生物分别存在 31 和 23 个显著差异物种。细菌指示物种包括 6 目 9 科 7 属, CK 处理已知差异细菌为放线菌门下的盖勒氏菌目(Gaiellales)和盖勒菌科(Gaiellaceae); WCK 处理富集了伯克氏菌目(Burkholderiales)、鞘氨醇单胞菌科(Sphingomonadaceae)及鞘脂单胞菌目(Sphingo-

monadales)等;随着沼液添加量的增加,发酵处理组细菌群落向厌氧功能菌群定向漂移, LG 处理指示细菌为伯克霍尔德氏菌科(Burkholderiaceae)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)及其所属的疣微菌纲(Verrucomicrobiae)等, MG 处理已知指示细菌为黄色单胞菌属 B 型(*Luteimonas-B*)等, HG 处理指示细菌则主要包括黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)、拟杆菌门(Bacteroidota)和拟杆菌纲(Bacteroidia)等。真核生物差异物种包括 6 纲 5 目 3 科 3 属, CK 处理已知指示真核生物为盘菌目(Pezizales)、粪壳菌目(Sordariales)等; WCK 处理已知指示真核生物为变形虫界(Evosea, Discosea)、黏菌(Eumycetozoa)、绿藻门(Chlorophyta)以及卵菌门(Oomycota)等; HG 处理已知指示真核生物为根霉属(*Rhizopus*)及其所属的根霉科(Rhizopodaceae)。

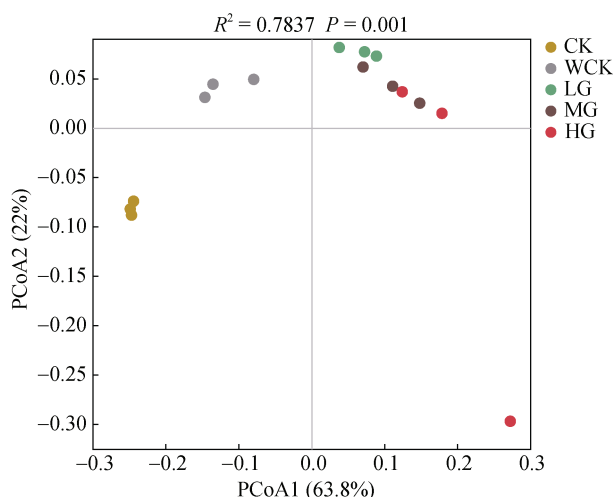


图4 土壤微生物群落结构差异

Fig. 4 Differences of soil microbial community structures

2.5 沼液驱动的微生物功能代谢重塑

根据 gene 的蛋白序列和 KEGG 数据库比对与功能注释的结果, L1 水平的代谢途径相对丰度分布如图 6 所示, 相对丰度从高到低依次为: 新陈代谢 (Metabolism)、遗传信息处理 (Genetic information processing)、细胞过程 (Cellular processes)、人类疾病 (Human diseases)、环境信息处理 (Environmental information processing) 和有机系统 (Organismal systems)。

在明确了 L1 水平上代谢功能 (Metabolism) 占绝对主导地位的基础上, 为了进一步剖析各处理组对不同细分代谢通路的贡献度及功能重叠情况, 本研究利用 Circos 图在 Level 2 水平上对微生物功能谱进行了可视化解析 (图 7)。结果显示, 碳水化合物代谢、氨

基酸代谢和能量代谢是各处理共同贡献的主要功能板块。MG 和 HG 处理辅因子和维生素代谢相对丰度高于 CK, 而 WCK、LG、MG、HG 处理碳水化合物代谢和氨基酸代谢相对丰度低于 CK。

处于核心地位的能量代谢直接关系到土壤养分的转化效率。由于二级水平下的能量代谢涵盖了固氮、硝化、反硝化以及磷酸盐增溶等关键生化过程, 本研究进一步针对发酵过程中氮、磷循环相关核心功能基因的相对丰度演替进行分析。氮循环过程主要由以下基因驱动: 氨同化基因 (*glnA*、*gs_K00265*、*gs_K00266* 和 *gdh_K00261* 等)、有机氮矿化基因 (*nmo* 和 *glsA* 等)、同化硝酸盐还原基因 (*nasA* 等) 和异化硝酸盐还原基因 (*nrfC* 等) (图 8A)。相较于 CK 和 WCK, 沼液发酵处理反硝化基因 *nirK* 和 *nosZ* 得到富集, 尤其是 LG 和 MG 处理; 相反, 氨同化基因 *glnA*、*gdh_K00261* 和同化型硝酸盐还原基因 *nasA* 的相对丰度表现出下降趋势。同时, 沼液发酵处理提高了 *gdh_K00262* 和 *gdh_K15371* 相对丰度。磷循环相关基因以调节基因 (*phoR*、*phoB* 和 *phoP*)、核苷酸代谢基因 (*pyrG*、*guaB*、*purL*、*guaA* 和 *purC* 等) 和转运基因 (*ugpC*) 为主 (图 8B)。相较于 CK, 沼液发酵处理增加了能量代谢基因 *pyk*、核苷酸代谢基因 *purC* 和 RNA 合成基因 *cmk* 的相对丰度, 降低了核苷酸代谢基因 *purL*、DNA 合成基因 *tmk* 和转运基因 *ugpC* 的相对丰度。

3 讨论

3.1 沼液处理对土壤理化性质的影响

沼液通常呈碱性, 有效养分含量较高, 在调节土壤酸碱度和提升土壤肥力等方面作用显著。土壤 pH 作为关键化学属性, 可调控养分形态并影响生物有效性。本研究中, 沼液厌氧发酵处理显著提升土壤 pH, 这与多数沼液直接施用或灌溉研究的结果一致^[12-13], 但本研究结果与王晶等^[14]在芹菜土壤尾菜沼液沟灌试验中观察到的 pH 变化趋势不完全一致。原因可能与供试土壤类型、沼液来源、施用方式及氧化还原环境不同有关。其采用常规沟灌方式, 土壤氧化还原状态多以好氧与短期缺氧交替为特征。而本研究采用密闭厌氧发酵处理, 在持续缺氧或厌氧条件下, 硝化过程可能受到抑制, 同时沼液自身偏碱性的输入效应较为明显, 二者共同导致土壤 pH 整体升高。pH 的改善不仅有助于缓解设施土壤酸化, 也为磷、钾等养分有效性的提高创造了更有利的土壤化学条件。

与 WCK 处理相比, 沼液驱动的 BSD 过程导致土壤有机质含量不升反降, 提示外源高活性碳源的输

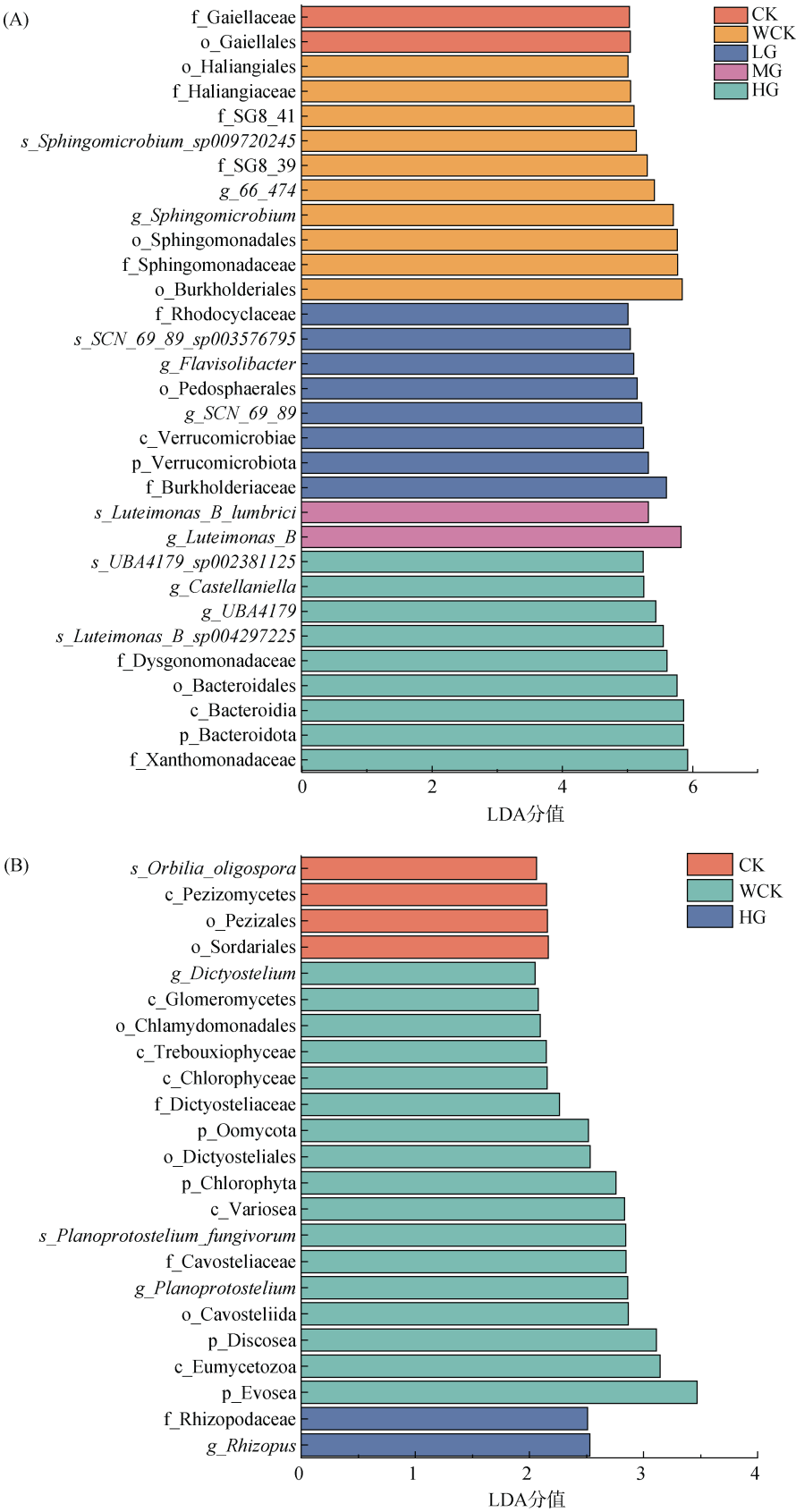


图 5 土壤细菌 (A) 和真菌 (B) 的 LEfSe 差异分析
Fig. 5 LEfSe difference analysis of soil bacteria (A) and fungi (B)

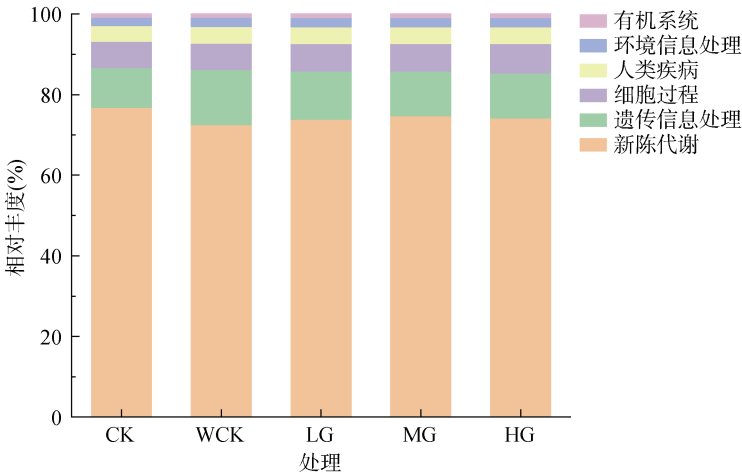


图 6 主要微生物代谢途径在 KEGG L1 水平上的分布
Fig. 6 Distributions of major metabolic pathways of microbial communities at KEGG L1 level

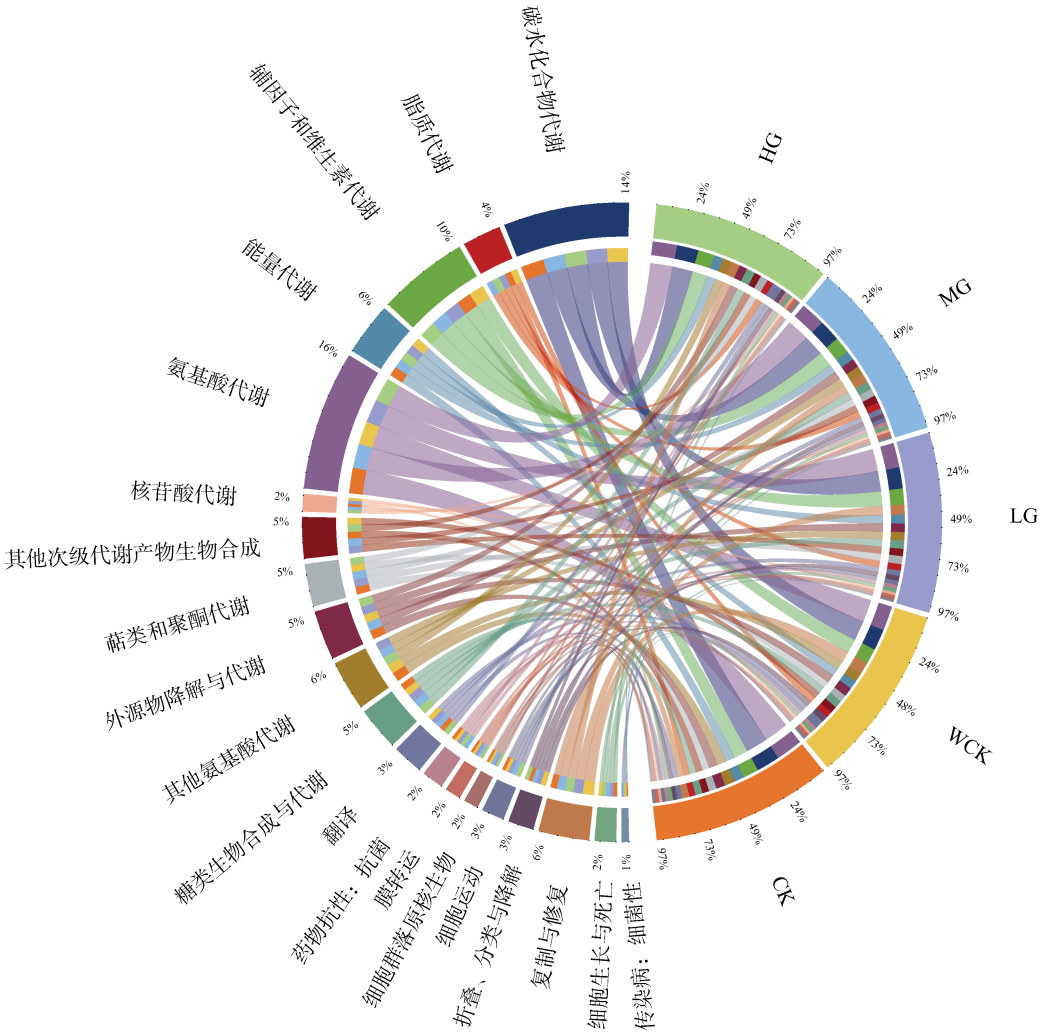
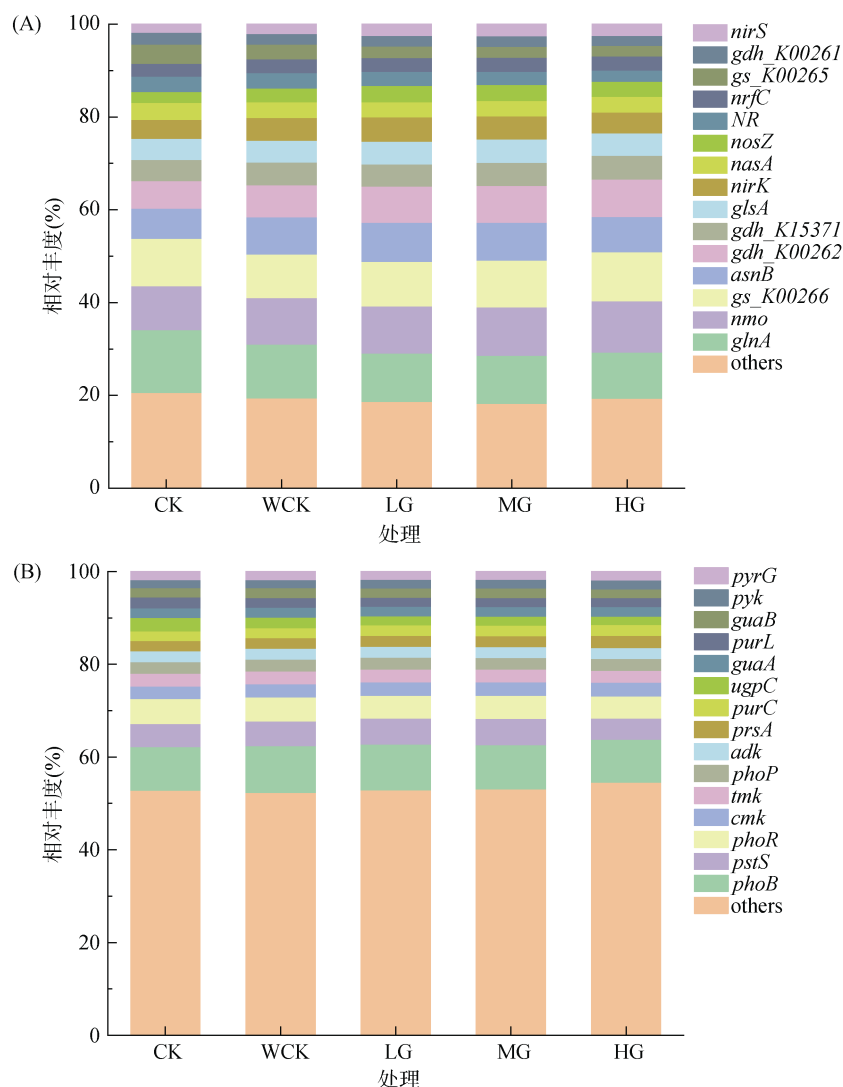


图 7 各处理功能 Cricos 图分析
Fig. 7 Analysis of function Cricos diagram across treatments

入诱导了正激发效应。沼液带来的高活性有机碳作为易利用底物，增强了微生物的代谢活性，并促进了土壤有机组分的周转与分解^[15]。同时，各发酵处理出

现有机质与全氮含量的同步锐减，其中，氮素并未表现为随沼液输入而发生简单积累，这说明在有机氮矿化增强的基础上，氮素进一步通过氨挥发或反硝化等



(A. 氮循环基因; B. 磷循环基因)

图 8 功能基因相对丰度

Fig. 8 Relative abundance of functional genes

途径发生损失。而中高量沼液处理(MG、HG)碱解氮提升 67.77%~74.23%, 可见, 沼液驱动的厌氧发酵显著强化了土壤有机组分转化过程, 并推动了氮素由有机态向活性态乃至气态损失途径的转移。本研究中土壤全氮损失幅度超过 30%, 该过程应予以重视。同时, 各沼液用量厌氧处理下土壤速效钾、有效磷等养分含量均有不同程度的增加, 表明沼液处理促进了土壤养分有效化。一方面, 这与沼液本身携带的可利用磷、钾直接输入有关; 另一方面, 也可能与厌氧发酵过程中有机组分分解、吸附态养分释放以及 pH 改善共同作用有关^[16]。因此, 本研究表明在外源易利用碳源的激活下, 土壤有机碳库周转加快, 伴随着养分的再分配与有效化提高, 在短期内维持了较高的养分供应水平。与仅淹水厌氧处理相比, 沼液输入不仅缓解了养分亏缺, 还表现出一定的培肥效应。有研究指出,

磷资源供给面临持续消耗压力^[17], 而沼液作为有机消化物可提高土壤有效磷水平。因此, 在磷资源日益枯竭的背景下, 沼液的资源化利用不仅实现了养分循环, 也为减少化学磷肥依赖提供了潜在途径。

3.2 沼液处理显著改变土壤微生物群落结构多样性

微生物群落的组成与多样性是土壤生态系统健康与稳定的关键决定因素, 而其动态平衡对于作物健康发育同样至关重要。沼液施入土壤后, 其中所含的大量营养物质和外源微生物可以直接或间接地改变土壤微生物的生境^[18]。本研究中, 沼液原位厌氧发酵后, 土壤细菌丰富度提高, 这可能是由于土壤有效养分含量升高, 从而有利于细菌的生长。尽管真菌占比很小, 但仅淹水的常规闷棚处理明显刺激了真菌的生长, 这可能归因于水分增加激活了原土中部分休眠的真菌孢子, 而沼液的进入和厌氧等条件对真菌具有

极强的筛选压力。

沼液施用显著改变了土壤微生物群落结构,且细菌优势门类与以往研究结果基本一致^[10]。有研究认为,这些微生物类群可能深度参与了有机质的矿化过程^[19]。放线菌门能够合成多种生物活性代谢产物及抗生素,沼液发酵处理土壤放线菌门的相对丰度显著下降 72.03%~77.35%,可能与其多为需氧菌有关^[20]。作为土壤微生物区系的关键组分,拟杆菌门在沼液发酵处理中相对丰度上升。有研究表明,拟杆菌门对农业管理措施较敏感,可作为土壤质量变化的重要指示类群^[21]。MG、HG 处理厚壁菌门相对丰度明显增加。Lee 等^[20]研究表明,番茄根际厚壁菌门和放线菌门丰度变化与青枯病发生密切相关,因此厚壁菌门的富集可能与根际微生态稳定性改善有关。真菌门相对丰度结果显示,子囊菌门的相对丰度显著降低,可能与密闭厌氧发酵形成的缺氧环境抑制部分好氧子囊菌类群有关。而毛霉菌门相对丰度的爆发性增长,可能与沼液厌氧发酵后 pH 升高、含水量增加及易利用有机底物输入有关。毛霉菌门类群广泛分布于土壤、腐解植物残体等有机质丰富的环境中,部分代表类群具有较强的有机底物利用能力^[22],并可在低氧或微氧条件下生长^[23],因而可能在密闭厌氧发酵过程中被富集。进一步在属水平上分析,根霉菌属、被孢霉菌属的相对丰度在沼液厌氧发酵处理后均有所提高,其中根霉菌属的比例随沼液浓度增加持续上升,而被孢霉菌属在高添加量沼液处理下富集更为明显。已有研究表明,部分被孢霉菌属菌株能够合成多种生物活性物质,并对植物生长和土壤生态功能具有潜在的促进作用^[24]。另外,沼液发酵处理镰刀菌属的相对丰度降低,镰刀菌属中包含多种重要土传植物病原菌,可引起多种作物病害^[25],这一结果提示沼液厌氧发酵处理可能有助于减少土壤中部分病原微生物的侵染风险。

基于 PCoA 分析结果,沼液处理能够显著影响土壤微生物的群落结构,并且 WCK 与沼液发酵处理群落结构存在明显差异,说明沼液带来的外源微生物和高负荷基质才是驱动微生物群落重塑的核心动力。低、中浓度沼液发酵处理的微生物群落构成较为相似。LEfSe 差异分析的指示物种结果清晰地揭示了随着沼液施用梯度的增加,土壤微生物群落实现了从寡营养好氧生境向富营养专性厌氧生境的根本性转变。拟杆菌门与黄单胞菌科的协同富集,不仅是驱动土壤速效养分跨越式提升的核心生物动力,更是构建抑病型土壤生境的关键生物学标志^[21]。

3.3 沼液处理对土壤微生物代谢功能的影响

土壤微生物主要通过其功能基因的表达来调节土壤养分转化^[26]。土壤微生物群落的代谢功能对沼液处理响应显著。MG 和 HG 处理中辅因子及维生素的代谢水平呈现明显上升趋势,而氨基酸和碳水化合物代谢活性则明显受到抑制。这些结果表明,施加沼液不仅能引导土壤微生物群落结构发生改变,还可强化某些关键代谢途径,进而提升沼液所含养分的转化与循环效率。

此外,沼液处理强烈影响了微生物氮循环相关功能基因的相对丰度。研究发现,沼液发酵处理在一定程度上增强了反硝化基因 *nosZ* 的相对丰度,其负责将温室气体 N_2O 还原为氮气,可降低 N_2O 排放风险^[27]。沼液处理提高了部分 GDH(谷氨酸脱氢酶)途径相关基因,尤其是 *gdh_K00262* 和 *gdh_K15371* 的相对丰度,可能与沼液提升土壤中 NH_4^+ 含量有关^[28],同时,降低 *glnA/gs_K00265* 基因相对丰度,说明微生物优先使用 GDH 途径节能高效同化氨,但可能因低亲和力导致氨挥发损失。与有机氮矿化过程相关的 *nmo/glsA* 基因相对丰度也得到提升,而与异化硝酸盐还原相关的 *nirB* 基因、与氮储存相关的 *asnB* 基因相对丰度下降,沼液输入显著改变了微生物群落的氮代谢策略,强化了有机氮向无机氮的转化,增强反硝化脱氮作用,并优先利用低能耗、高效的氨同化途径,同时减少非必要的氮储存和可能造成氮损失的异化还原途径^[29]。本研究中,沼液发酵处理显著增加能量代谢基因 *pyk*,其编辑的丙酮酸激酶是催化糖酵解途径最后一步的关键酶,表明发酵处理提升了微生物利用沼液中有有机能源物质的能力。

4 结论

沼液驱动的原位厌氧发酵通过触发强烈的正激发效应激活了土壤微生物代谢网络,在扣除水分物理背景的同时,驱动了群落向富营养专性厌氧方向的稳态演替,显著提升了设施退化土壤的生物修复效能与养分供应容量。其中,中浓度沼液添加(MG)在激活土壤活性、控制环境风险等方面取得最佳平衡,是提升土壤健康的最优选择。

参考文献:

- [1] 赵云云,何芬,尹义蕾,等.施用猪粪日光温室土壤抗生素风险及微生物群落特征——以河北永清县日光温室为例[J].中国农学通报,2024,40(35):82-88.
- [2] 卢维宏,张乃明,包立,等.我国设施栽培连作障碍特征与成因及防治措施的研究进展[J].土壤,2020,52(4):651-658.

- [3] 田福发, 张黎杰, 周玲玲, 等. 塑料大棚辣椒连作障碍综合治理技术[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(9): 59–60.
- [4] Ueki A, Kaku N, Ueki K. Role of anaerobic bacteria in biological soil disinfection for elimination of soil-borne plant pathogens in agriculture[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(15): 6309–6318.
- [5] 徐淑楠, 谢伟, 卢芝钰, 等. 土壤强还原处理防控番茄青枯病的微生物多界互作机制[J/OL]. 土壤学报, 2025: 1–13. (2025-08-29). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=TRXB20250828001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [6] 张文康, 陈渠东, 姚光伟, 等. 生物炭-沼液联用对土壤微生物及碳氮功能基因的影响[J]. 环境化学, 2026, 45(2): 527–537.
- [7] 巴仕浩, 叶生月, 蔡晶晶, 等. 不同施肥措施对酸化黄红壤改良效果及油菜农艺性状的影响[J]. 农业工程学报, 2025, 41(9): 93–102.
- [8] Li X, Wang Y, Nikolić V, et al. Demonstrating the application of batch anaerobic digestion recirculating slurry inoculation of food waste engineering from a microbiological perspective[J]. Renewable Energy, 2023, 209: 317–329.
- [9] Guo Y X, Lu Y Y, Eltohamy K M, et al. Contribution of biogas slurry-derived colloids to plant P uptake and phosphatase activities: Spatiotemporal response[J]. Environmental Science & Technology, 2023, 57(43): 16564–16574.
- [10] 许剑锋, 孟庆婷, 傅佳杰, 等. 沼液施用下的西蓝花种植土壤微生物群落演变特征[J]. 农业环境科学学报, 2025, 44(12): 3172–3180.
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [12] 王宗寿. 利用沼液种植黑麦草对土壤环境质量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(B3): 172–175.
- [13] 王康, 许玉超, 戴辉, 等. 沼液在土壤改良上的应用研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(24): 299–303.
- [14] 王晶, 汪建旭, 卢秀霞, 等. 施用不同浓度尾菜沼液对芹菜品质和产量及土壤基本性状的影响[J]. 西北农业学报, 2025, 34(5): 924–931.
- [15] Kuzyakov Y. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(9): 1363–1371.
- [16] Yu F B, Luo X P, Song C F, et al. Concentrated biogas slurry enhanced soil fertility and tomato quality[J]. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science, 2010, 60(3): 262–268.
- [17] Dawson C J, Hilton J. Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus[J]. Food Policy, 2011, 36: S14–S22.
- [18] Suleiman A K A, Gonzatto R, Aita C, et al. Temporal variability of soil microbial communities after application of dicyandiamide-treated swine slurry and mineral fertilizers[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 97: 71–82.
- [19] Wang M, Li S S, Chen S B, et al. Manipulation of the rhizosphere bacterial community by biofertilizers is associated with mitigation of cadmium phytotoxicity[J]. Science of the Total Environment, 2019, 649: 413–421.
- [20] Lee S M, Kong H G, Ryu C M. Disruption of Firmicutes and Actinobacteria abundance in tomato rhizosphere causes the incidence of bacterial wilt disease[J]. The ISME Journal, 2021, 15(1): 330–347.
- [21] Kruczyńska A, Kuźniar A, Podlewski J, et al. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality—a culture independent approach[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2023, 342: 108252.
- [22] Vellozo-Echevarría T, Barrett K, Vuillemin M, et al. Mini-review: The distinct carbohydrate active enzyme secretome of *Rhizopus* spp. represents fitness for *Mycelium* Remodeling and solid-state plant food fermentation[J]. ACS Omega, 2024, 9(32): 34185–34195.
- [23] Lin M S, Wang H H. Anaerobic growth and oxygen toxicity of *Rhizopus* cultures isolated from starters made by solid state fermentation[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 1991, 24(2): 229–239.
- [24] Johnson J M, Ludwig A, Furch A C U, et al. The beneficial root-colonizing fungus *Mortierella hyalina* promotes the aerial growth of *Arabidopsis* and activates calcium-dependent responses that restrict *Alternaria brassicae*-induced disease development in roots[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2019, 32(3): 351–363.
- [25] Todorović I, Moënné-Loccoz Y, Raičević V, et al. Microbial diversity in soils suppressive to *Fusarium* diseases[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1228749.
- [26] Chen Y, Xia A Q, Zhang Z J, et al. Extracellular enzyme activities response to nitrogen addition in the rhizosphere and bulk soil: A global meta-analysis[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2023, 356: 108630.
- [27] Palacin-Lizarbe C, Camarero L, Hallin S, et al. The DNRA-denitrification dichotomy differentiates nitrogen transformation pathways in mountain lake benthic habitats[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1229.
- [28] Du T Y, Hu Q F, Mao W J, et al. Metagenomics insights into the functional profiles of soil carbon, nitrogen, and phosphorus cycles in a walnut orchard under various regimes of long-term fertilisation[J]. European Journal of Agronomy, 2023, 148: 126887.
- [29] Yan L, Kuang Y L, Xie X J, et al. Insights into nitrogen biogeochemical cycling in mangrove wetland from Genome-Resolved metagenomic sequencing[J]. Journal of Hydrology, 2024, 640: 131741.

(责任编辑: 毛小芳)