

施肥对贺兰山东麓酿酒葡萄园土壤细菌多样性的影响

孙豪杰¹, 王 静^{2, 3, 4*}, 程昱润¹, 肖国举^{2, 3, 4}, 毕江涛^{2, 3, 4}

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学生态环境学院, 宁夏 银川 750021;
3. 西北土地退化与生态恢复国家重点实验室培育基地, 宁夏 银川 750021;
4. 西北退化生态系统恢复与重建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 探究微生物肥料对不同生长时期酿酒葡萄园土壤化学性质和细菌群落组成的影响及其相互关系, 为贺兰山东麓酿酒葡萄园健康种植及土壤管理提供科学依据。以广泛种植于宁夏贺兰山东麓的酿酒葡萄品种“梅鹿辄”为试验材料, 采用随机区组试验设计设置 4 个处理: 生物有机肥 + 化肥减量、生物有机肥灭活 + 化肥减量、常规化肥用量和空白对照, 通过高通量测序技术比较分析了不同生长时期各施肥处理条件下土壤细菌多样性以及群落结构的变化规律。结果表明: 不同生长时期各施肥处理土壤细菌优势门为变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteriota)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、放线菌门 (Actinobacteriota), 优势菌属为亚硝化螺菌属 (*Nitrosospora*)、酸杆菌属 (*Acidobacterium*) RB41、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)。各施肥处理土壤细菌多样性指数显著高于对照, 且转色期较收获期土壤细菌群落结构差异显著。施用生物有机肥及其基质处理分别显著增加了亚硝化螺菌属和酸杆菌属 RB41 的相对丰度, 而不施肥处理则降低了亚硝化螺菌属的相对丰度。通过冗余及相关性分析结果发现, 土壤碱解氮、有机质含量及 pH 值是影响土壤细菌群落多样性的主要因子, 其中碱解氮含量为最主要驱动因子, 放线菌可以适应该研究区土壤盐渍化程度。微生物肥料能够不同程度提高土壤养分含量、降低土壤 pH 值和全盐含量, 增加土壤细菌群落多样性, 其中以施用生物有机肥配施化肥减量处理整体效果最显著。

关键词: 微生物肥料; 土壤养分; 土壤细菌; 群落多样性

宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄“原产地保护区”因独特的气候条件与土壤类型使该地区成为发展优质酿酒葡萄的主栽产区。然而, 由于长期生产导致葡萄病理性病害频发, 导致葡萄产量和品质稳定性差等问题发生。微生物群落生物多样性是植物生长和土壤健康的驱动力^[1]。土壤微生物参与了成土过程、有机质分解、养分循环等一系列生态学过程, 影响植物根系对土壤养分的吸收、种子萌发以及植物生长发育, 是陆地生态系统的功能支柱^[2-3]。土壤微生物总数的 70% ~ 90% 为土壤细菌, 且细菌量的增减程度是体现土壤肥力水平的一个生物学标志^[4], 它能促进土壤养分循环, 是土壤微生物群落的重要组成部分, 驱动着生态系统物质和能量

的流动, 调控着养分元素在生态系统中的循环^[5], 因其对环境变化十分敏感, 所以常作为评估土壤养分循环和维持生态系统平衡的重要指标之一^[6]。因此, 研究基于有益微生物驱动的葡萄园土壤肥力保持和提升的方法, 解决葡萄园土壤微生物多样性差、葡萄生产力水平低的问题, 形成葡萄园促生抗病微生物菌剂的开发利用, 逐步优化施肥方式成为今后贺兰山东麓葡萄产业可持续发展的必然选择。

目前, 有关贺兰山东麓葡萄园土壤微生物的研究主要围绕栽培技术、管理模式、养分吸收等方面。关于不同施肥方式对贺兰山东麓土壤微生物多样性及群落结构的研究还相对较少。随着分子生物学技术的发展, 微生物肥料对土壤微生物多样性的影响更加明显, Ling 等^[7]利用变性梯度凝胶电泳聚合酶链式反应 (PCR) 技术分析了连续施用微生物肥料对土壤细菌多样性的影响, 结果表明微生物肥料将土壤微生物群落调节到适当水平可以保持植物健康。王艳平等^[8]研究生物有机肥和微生物菌剂对北京山区连作茶菊生长及土壤肥力的结果表明,

收稿日期: 2023-08-04; 录用日期: 2023-11-07

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金 (2022AAC03079); 国家重点研发计划项目 (2021YFD1900603)。

作者简介: 孙豪杰 (1999-), 硕士研究生, 从事农业资源与环境研究。E-mail: 2059625797@qq.com。

通讯作者: 王静, E-mail: wangjing@nxu.edu.cn。

施用生物有机肥和微生物菌剂改善了土壤肥力和土壤微生物群落结构,增加养分有效供给,对减轻连作障碍具有积极作用。高通量测序技术的发展使研究人员能够获得更多关于土壤微生物种群的信息,更清楚的是,微生物肥料能够改善土壤微生物的多样性和丰富度。在农业生产中,酿酒葡萄需果粒小、果穗散且浆果含有丰富的糖、酸和酚类物质,但传统的栽培技术常在酿酒葡萄萌芽期和展叶期施用大量的化肥,导致酿酒葡萄成熟过快,浆果内含物累积不足等问题,而对于微生物肥料替代部分化肥在酿酒葡萄生产上的应用及效果目前鲜见报道。转色期是酿酒葡萄浆果养分积累的重要阶段,也是葡萄开始成熟的标志,成熟期是酿酒葡萄品质形成的关键时期,因此,本研究通过 Illumina MiSeq 高通量测序技术,以广泛种植于宁夏贺兰山东麓的酿酒葡萄品种“梅鹿辄”为试验材料,探究酿酒葡萄

转色期和成熟期土壤细菌群落特点及变化规律,从而揭示微生物肥料对酿酒葡萄土壤细菌多样性和群落结构及其与生态因子的关系,以期为更全面地了解贺兰山东麓酿酒葡萄土壤群落的组成和结构、科学合理地评价微生物肥料效果提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

试验区位于贺兰山东麓葡萄产区银川园林场,地处 38° 39' 18" N, 106° 9' 50" E,气候类型属于中温带大陆性气候,昼夜温差大,降水量少,蒸发强烈,气候干燥。年平均气温 8.5℃左右,年平均日照时数 2800 ~ 3000 h,光照较为丰富。年平均降水量 200 mm 左右,无霜期 185 d 左右。土壤类型为淡灰钙土,土质粗且富含砾石,成土母质为洪积冲积物,试验区土壤的基本化学性质见表 1。

表 1 试验区土壤基本化学性质

土层 (cm)	pH 值	全盐 (g/kg)	有机质 (g/kg)	碱解氮 (mg/kg)	有效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)
0 ~ 20	8.86	0.7973	9.58	14.47	40.90	24.77
20 ~ 40	8.79	0.8807	8.23	16.66	52.66	36.81

1.2 试验设计

1.2.1 微生物肥料来源

选择项目组自行研发的生物有机肥作为试验配施微生物肥源,常规化肥购自当地市场。供试生物有机肥配方及(嗜)耐盐菌种均由课题组提供,宁夏某生态肥业有限公司生产,配料中加入不同基质(牛粪、腐殖酸、氨基酸)作为载体底物制成盐碱地葡萄专用生物有机肥 [N+P₂O₅+K₂O>5.0%,有机质>45.0%,有效活菌数(枯草芽孢杆菌、多黏类芽孢杆菌、盐单胞菌、乳酸菌、光合细菌等)>500 亿 cfu/g];供试化肥为市售磷酸二铵(P₂O₅ 46%,N 18%)。

1.2.2 试验样地设计

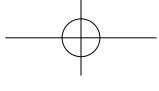
参照肥料合理使用准则微生物肥料(NY/T 1535—2007,NY/T 884—2012)技术规程设置试验,不同类型微生物肥料的田间试验设计 4 个处理:T1 为空白对照(不施肥)、T2 为常规化肥用量(磷酸二铵 427.49 kg/hm²)、T3 为生物有机肥+减量施肥(生物有机肥 1500 kg/hm²+磷酸二铵 213.75 kg/hm²)、T4 为生物有机肥基质(灭活)+

减量施肥(生物有机肥灭活 1500 kg/hm²+磷酸二铵 213.75 kg/hm²)。生物有机肥基质(灭活)是对生物有机肥进行高压高温灭菌以杀死其中的有益微生物,便于与含有有益微生物的生物有机肥进行比对。采用多因素随机区组设计,于 2021 年 4 月酿酒葡萄萌芽期一次性施入微生物肥料,施肥方式为距葡萄行两侧 30 cm 处开施肥沟。每个处理设 3 个平行样地,每个样地面积 18 m²(9 m×2 m),每个样地之间用 0.5 mm 厚的防渗膜进行阻隔,防渗膜埋深为 40 cm,防止不同样地间相互渗漏干扰。每个样地间设置 30 cm 宽步道,以供现场检测和样品采集。所有处理均采取滴灌的灌溉方式,田间管理及栽培措施一致。在微生物群落多样性分析中,酿酒葡萄转色期不同施肥处理以 M1—M4 表示,酿酒葡萄收获期不同施肥处理以 S1—S4 表示。

1.3 土壤样本采集与方法

1.3.1 取样

酿酒葡萄土壤分别于 2021 年 7 月下旬(转色期)、9 月下旬(收获期)采集土壤样品,选取园



区内3个植株长势相对均匀的样地(样地面积200 m×200 m,同时避开田埂和道路),每个样地按照对角线法选取5株生长健壮的酿酒葡萄植株,先用铁锹弃去土壤表层杂物,在距离根系10~20 cm处,分别采集0~20、20~40 cm土层土壤。每个处理采5个点混合并用“四分法”获得1个土样,将一部分土壤样品装入无菌离心管并放入冰盒中,带回实验室置于-80℃冰箱中保存,用于土壤细菌群落多样性的测定^[9];另一部分装入自封袋带回实验室,去除植物根系和石块,风干后过1和0.25 mm筛用于土壤化学性质的测定^[10]。

1.3.2 土壤化学性质的测定

以水土质量比5:1制备土壤水浸提液,用土壤pH计和电导率仪测定土壤pH值和全盐;有机质采用重铬酸钾-硫酸外加热法;碱解氮采用碱解扩散法;有效磷采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法;速效钾采用醋酸铵浸提-火焰光度计测定^[11]。

1.3.3 基因组DNA提取、PCR扩增和测序

通过十六烷基三甲基溴化铵法提取样品的基因组DNA,然后采用琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度,在离心管中用无菌水将适量样品的DNA稀释至1 ng/μL。根据测序区域的选择,将稀释后的基因组DNA作为模板,通过New England Biolabs公司的Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer和高效高保真酶进行PCR,细菌多样性的引物对应区域为16S V4区引物515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR扩增产物通过2%的琼脂糖凝胶电泳检测,使用TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit建库试剂盒构建文库。高通量测序由北京诺禾致源Illumina MiSeq 2500平台运行(<http://www.novogene.com/index.php>)。

1.4 数据处理

所测得原始数据在截去每个样本数据Barcode和引物序列后,使用FLASH 1.2.7(参数设置为-m10-f300-x0.2-p33-r219-m213,16S rDNA为-m10-f300-x0.1-p33-r180-M135)经过拼接得到原始Tags数据。原始Tags经QIIME 1.7.0(质控参数为QIIME默认值,参照http://qiime.org/scripts/split_libraries.html)的Tags质量控制流程,进行Tags截取和长度过滤,经过上述处理后,最终从Tags去除其中的嵌合体序列,得到最终的有效数

据。采用Vsearch将序列相似性大于或等于97%的归于1个OTU单元,最终得到多个OTU。使用QIIME挑选出各个OTU的代表序列,并使用RDP classifier将所有16S代表序列与Greengenes数据库进行比对注释,并保留置信区间大于0.7的注释结果;使用BLAST将所有ITS代表序列与Unite数据库进行比对注释。

Alpha和Beta多样性分析采用QIIME和R包vegan 2.5-6实现,在Alpha多样性分析中主要进行了物种数、Chao1指数、Shannon指数、Simpson指数计算。试验数据以Excel 2016整理,采用SPSS 22.0进行统计分析,通过Origin 2021、Canoco 5.0进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同生长时期施肥处理条件下酿酒葡萄园土壤化学性质

不同施肥处理酿酒葡萄园土壤化学性质如表2和3所示。施肥处理与对照相比均提高了土壤有机质、碱解氮、有效磷和速效钾的含量,降低了土壤pH值、全盐含量,大部分有显著性差异($P<0.05$)。在不同生长时期,微生物肥料均能不同程度地降低土壤pH值和全盐含量,其中以生物有机肥效果最好,与对照和其他处理具有显著差异($P<0.05$)。在转色期,生物有机肥处理的有机质含量较对照在0~20和20~40 cm土层分别增加了53.40%和65.53%;在收获期分别增加了121.01%和486.30%,为各处理中最显著($P<0.05$),说明施用生物有机肥有效提高了土壤中有机质含量。在转色期,各施肥处理土壤碱解氮含量较对照均有所提高,在0~20和20~40 cm土层分别增加了4.36%~13.16%和17.52%~35.11%,在收获期生物有机肥和生物有机肥基质(灭活)处理碱解氮含量显著提高($P<0.05$)。收获期土壤有效磷、速效钾含量整体较转色期有所下降,施肥处理下土壤有效磷、速效钾含量较对照均有显著提高。在转色期,各处理的有效磷含量较对照在0~20和20~40 cm土层分别增加了51.47%~58.10%和26.61%~56.20%;在收获期分别增加了60.13%~131.14%和150.06%~191.84%。在转色期,各处理的速效钾含量较对照在0~20和20~40 cm土层分别增加了39.15%~46.13%和44.28%~104.79%;在收获期分别增加了30.43%~42.12%和43.36%~52.43%。

表 2 转色期各处理土壤化学性质

土层 (cm)	处理	pH 值	全盐 (g/kg)	有机质 (g/kg)	碱解氮 (mg/kg)	有效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)
0 ~ 20	T1	8.98 ± 0.04a	0.5665 ± 0.0000a	8.09 ± 0.37d	13.30 ± 0.00b	17.35 ± 4.01b	34.38 ± 0.66c
	T2	8.95 ± 0.05ab	0.5045 ± 0.0100b	9.16 ± 0.16c	15.05 ± 0.00a	27.43 ± 2.11a	48.03 ± 0.30b
	T3	8.56 ± 0.08c	0.4385 ± 0.0200c	12.41 ± 0.07a	13.88 ± 0.82ab	27.41 ± 0.96a	50.24 ± 0.14a
	T4	8.82 ± 0.10b	0.5163 ± 0.0100b	10.09 ± 0.42b	14.47 ± 0.82ab	26.28 ± 0.60a	47.84 ± 0.60b
20 ~ 40	T1	8.91 ± 0.01a	0.7693 ± 0.0500a	6.47 ± 0.09b	13.30 ± 0.00c	26.94 ± 0.71c	36.72 ± 0.52c
	T2	8.80 ± 0.05b	0.6858 ± 0.0000b	6.77 ± 0.20b	15.63 ± 0.82b	41.45 ± 0.46a	52.98 ± 0.65b
	T3	8.52 ± 0.07c	0.4761 ± 0.0100c	10.71 ± 0.31a	16.80 ± 2.47ab	42.08 ± 1.96a	75.20 ± 1.60a
	T4	8.84 ± 0.02b	0.5088 ± 0.0200c	10.62 ± 0.63a	17.97 ± 1.65a	34.11 ± 0.54b	53.34 ± 0.86b

注：同一土层同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。

表 3 收获期各处理土壤化学性质

土层 (cm)	处理	pH 值	全盐 (g/kg)	有机质 (g/kg)	碱解氮 (mg/kg)	有效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)
0 ~ 20	T1	8.74 ± 0.03a	0.8231 ± 0.0100a	8.52 ± 0.57d	20.88 ± 2.97c	7.45 ± 0.23c	30.20 ± 0.38d
	T2	8.71 ± 0.08a	0.5645 ± 0.0000b	12.62 ± 0.40c	27.30 ± 1.43b	11.93 ± 0.75b	39.39 ± 0.09c
	T3	8.56 ± 0.00b	0.5417 ± 0.0000c	18.83 ± 0.47a	37.80 ± 2.47a	17.22 ± 0.73a	42.92 ± 0.14a
	T4	8.72 ± 0.06a	0.5610 ± 0.0000b	17.12 ± 0.03b	29.63 ± 5.77b	13.02 ± 0.61b	40.22 ± 0.40b
20 ~ 40	T1	8.69 ± 0.01a	0.9692 ± 0.0500a	2.92 ± 0.38d	18.55 ± 2.47b	8.95 ± 0.37c	32.31 ± 0.09c
	T2	8.68 ± 0.04a	0.6310 ± 0.0000bc	11.07 ± 0.76c	25.55 ± 4.95a	22.38 ± 1.58b	46.55 ± 0.83b
	T3	8.24 ± 0.02c	0.5870 ± 0.0000c	17.12 ± 0.56a	27.88 ± 4.59a	25.30 ± 0.41a	49.25 ± 0.91a
	T4	8.52 ± 0.03b	0.6414 ± 0.0000b	15.80 ± 0.39b	28.47 ± 0.82a	26.12 ± 1.06a	46.32 ± 0.33b

2.2 不同生长时期各施肥处理条件下土壤细菌 DNA 测序分析

对不同样本进行 Illumina HiSeq 高通量测序，结果见表 4，各样点的测序覆盖率均在 98.4% 以上，表明取样合理，测序结果真实可靠。由韦恩图 (OTU 水平) 可知，转色期各施肥处理土壤细菌群落共有的 OTU 数目为 4419 个 (图

1a)，其中生物有机肥处理土壤中独有的 OTU 数目最多，为 1515 个，化肥处理土壤中最少，为 608 个。收获期各施肥处理土壤细菌群落共有的 OTU 数目为 4769 个 (图 1b)，较转色期增加 350 个。各施肥处理土壤中特有 OTU 数量为生物有机肥 > 生物有机肥基质 (灭活) > 化肥 > 不施肥。

表 4 不同生长时期各施肥处理土壤细菌群落 Alpha 多样性指数

生长时期	处理	物种数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	测序覆盖率
转色期	M1	2866.33 ± 63.37b	3198.70 ± 73.42a	9.00 ± 0.15b	0.9893 ± 0.0000b	0.9857
	M2	3144.83 ± 64.31a	3492.21 ± 75.20a	9.61 ± 0.05a	0.9958 ± 0.0000a	0.9860
	M3	3287.50 ± 98.88a	3633.24 ± 124.18a	9.88 ± 0.05a	0.9967 ± 0.0000a	0.9854
	M4	3078.17 ± 51.60a	3598.56 ± 217.13a	9.49 ± 0.09a	0.9945 ± 0.0000a	0.9865
收获期	S1	3064.92 ± 97.25b	3439.18 ± 103.81b	9.14 ± 0.20b	0.9878 ± 0.0000b	0.9857
	S2	3338.00 ± 92.18ab	3717.79 ± 106.57ab	9.74 ± 0.11a	0.9961 ± 0.0000a	0.9846
	S3	3401.08 ± 70.31a	3787.42 ± 76.90a	9.82 ± 0.08a	0.9965 ± 0.0000a	0.9845
	S4	3314.33 ± 72.88ab	3661.29 ± 84.03ab	9.69 ± 0.11a	0.9933 ± 0.0000ab	0.9850

注：同一生长时期同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

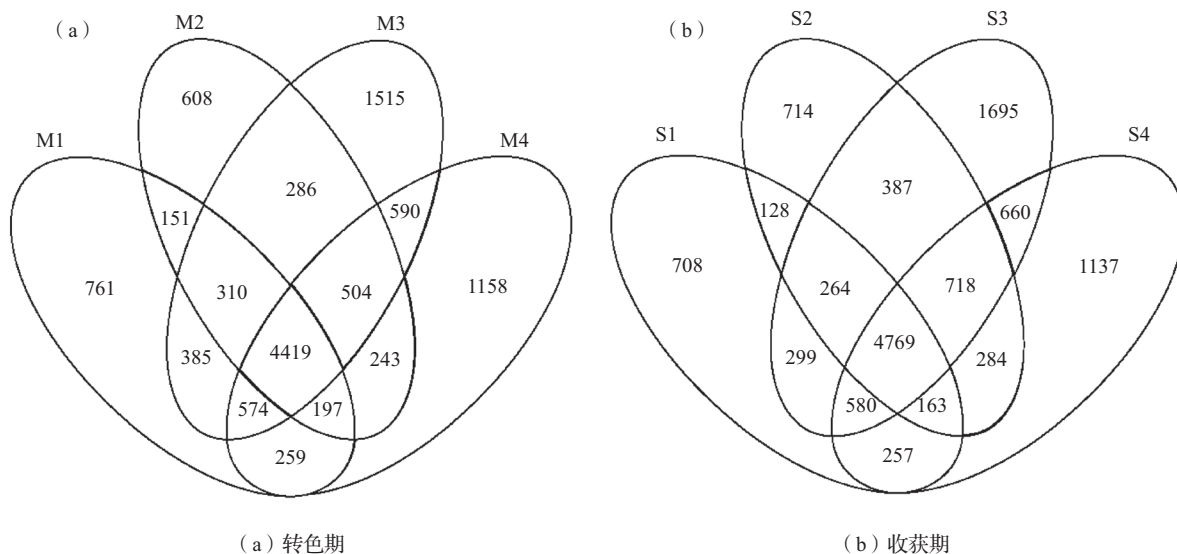


图1 不同生长时期各施肥处理土壤细菌 OTU 数目比较

2.3 不同生长时期各施肥处理间土壤细菌群落多样性分析

Alpha 多样性是反映土壤微生物丰富度和多样性的综合指标。在 97% 的分类水平下, 对不同生长时期各施肥处理土壤细菌群落多样性指数进行分析, 结果 (表 4) 表明, 施肥处理的土壤细菌 Chao1、Shannon 和 Simpson 多样性指数均高于不施肥处理, 且大部分存在显著差异 ($P < 0.05$), 且收获期生物有机肥处理的丰富度 Chao1 指数为各处理中最高, 生物有机肥可以显著增加土壤细菌群落丰富度。由此表明, 施肥处理土壤细菌群落的物种丰富度和均匀度均显著高于不施肥处理。不同生长时期不施肥处理的物种数量均为最低, 生物有机肥处理的物种数量均为最高, 说明施肥可以显著增加土壤物种数量。

基于样本间 Bray-Curtis 距离, 利用主坐标分析进行不同生长时期不同施肥处理下微生物群落组成的相似性或差异性分析结果如图 2 所示。不同施肥处理影响了酿酒葡萄园土壤微生物群落的组成, 与郭鹏飞等^[12]的研究结果基本一致。主坐标 PC1 轴解释了全部样本细菌群落丰富度和多样性方差的 26.75%, 主坐标 PC2 轴解释细菌群落丰富度和多样性方差的 12.29%。进一步通过非参数检验分析发现, 转色期与收获期土壤细菌群落结构产生显著性差异 ($R=0.142$, $P=0.001$), 不同生长时期同一施肥处理间土壤细菌群落也具有显著性差异 ($R>0$, $P<0.05$)。不同施肥处理下微生物群落组成在 PC 轴上差异显著, 在 PC1 轴上各处理分布比较分散, M

组在正负轴均有分布, PC2 轴上 S 组主要分布在正方向, 结果表明, M 和 S 组微生物群落结构差异较大, 不同施肥处理不同程度地影响土壤细菌群落结构特征。

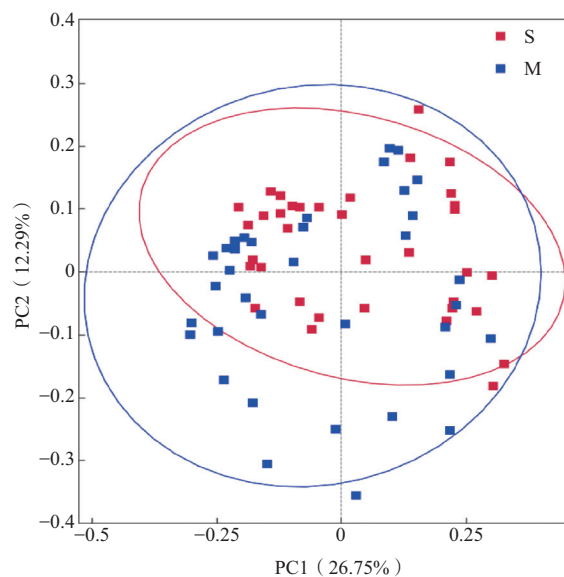


图2 不同生长时期各施肥处理土壤细菌群落结构基于 Bray-Curtis 距离矩阵的主坐标分析

2.4 不同生长时期各施肥处理土壤细菌群落组成及优势物种差异

通过图 3 发现, 在门水平上, 不同生长时期各处理土壤中相对丰度排名前 10 的优势细菌门分别是变形菌门 (Proteobacteria)、未确认的细菌门 (unidentified_Bacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteriota)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、放线菌门 (Actinobacterio-

ta)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、粘球菌门 (Myxococcota)、厚壁菌门 (Firmicutes)、泉古菌门 (Crenarchaeota)、蓝菌门 (Cyanobacteria)。在已被注释的细菌门中,变形菌是最优菌,相对丰度为 23.4% ~ 30.7%,不同菌门在不同施肥处理间的响应不同。具体表现为 M4 和 S4 处理有利于增加变形菌门和拟杆菌门的相对丰度以及降低酸杆菌门的相对丰度;M2、S2 处理降低了拟杆菌门、放线菌门的相对丰度;M3、S3 处理降低了酸杆菌门的相对丰度,这说明在细菌群落排名前 10 的菌门中,M4 和 S4 处理增加了相对

丰度第一的放线菌门的相对丰度、降低了相对丰度第三的酸杆菌门的相对丰度;M3 和 S3 处理降低了相对丰度居中的拟杆菌门和酸杆菌门的相对丰度。通过对不同生长时期各处理优势细菌门进行聚类分析,发现不同生长时期明显聚为两类,各时期间微生物肥料处理与不施肥及化肥处理也明显聚为两类,表明微生物肥料处理与其他 2 种处理均存在差异。

由图 4 扩增子丰度聚类热图可知,在酿酒葡萄土壤中丰度较高的细菌属有亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*)、

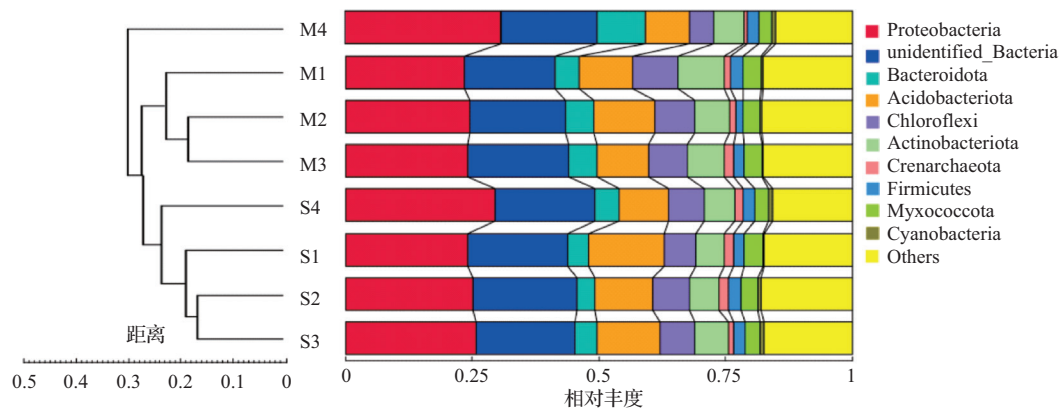


图 3 门水平各施肥处理土壤细菌优势门分布及聚类分析

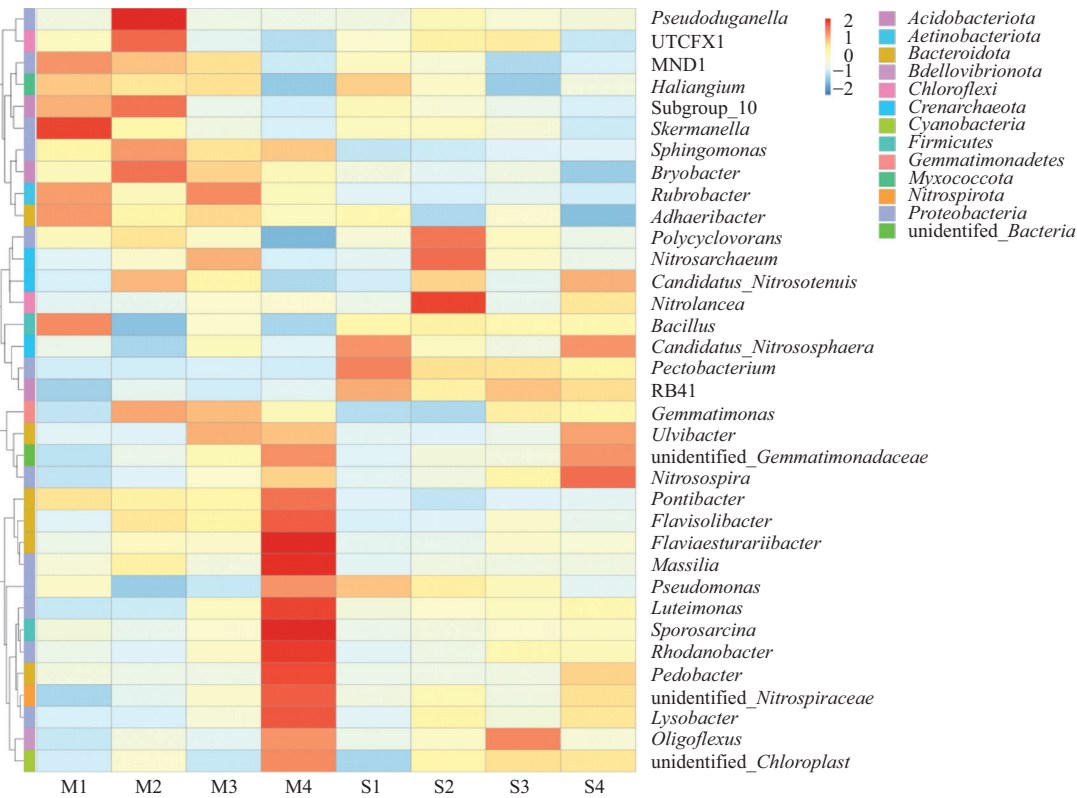


图 4 属水平各施肥处理土壤细菌优势属分布

酸杆菌属 (*Acidobacterium*) RB41、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、MND1、海洋杆菌属 (*Pontibacter*)、芽孢八叠球菌属 (*Sporosarcina*)、地杆菌属 (*Pedobacter*)、黄色土源菌属 (*Flavisolibacter*)、绿脓杆菌属 (*Pseudomonas*)。其中,亚硝化螺菌属是已知细菌属中优势度最大的菌属,相对丰度为0.9%~7.7%。扩增子丰度聚类热图中左侧的聚类是基于物种在样本中群落结构相似性进行的聚类,群落结构越相似,便聚为一类,从而依次聚类。

2.5 环境因子对土壤细菌多样性及群落结构的影响

为揭示影响酿酒葡萄土壤细菌群落组成的环境因子,以不同生长时期各施肥处理土壤细菌群落多样性指数为响应变量,土壤pH值及全盐、有机质、碱解氮、有效磷、速效钾含量为解释变量,通过冗余分析方法进行分析。如图5所示,土壤化学性质解释土壤细菌群落多样性指数的49.7%,其中第一、二轴分别解释变异的49.6%、0.1%,2个轴能够反映环境因子与细菌多样性指数的相互关系。土壤细菌群落的丰富度指数和均匀度指数与有机质、碱解氮和速效钾含量呈正相关,与pH值和全盐含量呈负相关。同时,Simpson指数与有效磷含量代表的箭头较短,表明其影响较小。通过蒙特卡罗检验结果表5可知,土壤碱解氮、有机质含量和pH值是影响酿酒葡萄土壤细菌群落多样性的关键因子,其中碱解氮含量的解释度为37.3%,为主要影响因子。

通过不同生长时期各施肥处理土壤细菌优势门与环境因子的相关系数分析(表6)表明,厚壁菌以及泉古菌均与土壤养分有机质、碱解氮、有效磷以及速效钾含量呈正相关。变形菌与有机质及碱解氮含量呈正相关,酸杆菌和粘球菌与有效磷及速效钾含量呈正相关。土壤pH值和全盐含量与变形菌、酸杆菌及泉古菌均呈负相关关系,放线菌与pH值和全盐含量呈显著正相关,表明环境因子对土壤优势细菌门的影响具有差异。

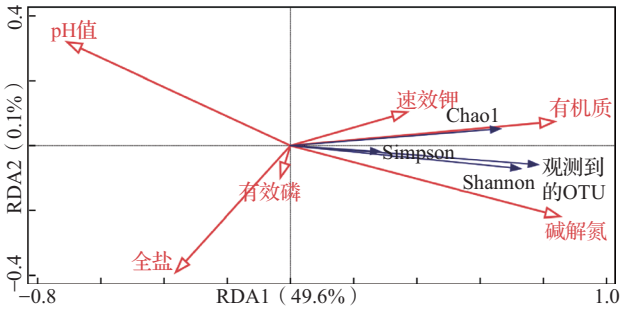


图5 不同生长时期各施肥处理土壤细菌群落多样性指数与环境因子冗余分析

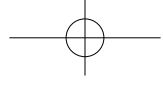
表5 环境因子对不同生长时期各施肥处理土壤细菌多样性指数的影响

环境因子	解释度(%)	P值
碱解氮	37.3	0.020
有机质	35.9	0.010
pH值	25.7	0.036
速效钾	7.0	0.298
全盐	6.8	0.344

表6 门水平不同生长时期各施肥处理土壤细菌与环境因子相关系数

分类	pH值	全盐	有机质	碱解氮	有效磷	速效钾
变形菌(Proteobacteria)	-0.463	-0.207	0.603	0.631	-0.434	-0.139
未确认菌门(unidentified)	-0.444	-0.777*	0.632	0.340	0.277	0.610
拟杆菌(Bacteroidota)	-0.048	0.007	-0.090	0.165	-0.313	-0.168
酸杆菌(Acidobacteriota)	-0.191	-0.320	-0.252	-0.416	0.450	0.358
厚壁菌(Firmicutes)	0.294	0.357	0.253	0.059	0.290	0.275
绿弯菌(Chloroflexi)	0.594	0.586	-0.376	-0.335	-0.022	-0.384
放线菌(Actinobacteriota)	0.858**	0.818*	-0.66	-0.509	0.034	-0.398
泉古菌(Crenarchaeota)	-0.222	-0.335	0.390	0.064	0.369	0.535
粘球菌(Myxococcota)	0.242	0.196	-0.382	-0.477	0.389	0.207

注: * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$ 。



3 讨论

3.1 不同生长时期各施肥处理土壤化学性质

土壤 pH 值以及全盐、有机质和速效养分含量是衡量土壤盐渍化程度和土壤养分供应的重要指标。本试验地银川园林场属于银北盐碱地区之一。通过施用微生物肥料,可以抑制土壤积盐,促使土壤养分含量和土壤微环境发生变化,增强土壤的肥力,改善土壤的微生态系统。土壤环境因子和土壤细菌群落结构的冗余分析表明,影响土壤细菌群落结构的主要环境因子为土壤碱解氮、有机质含量和 pH 值,这与 Guan 等^[13]的研究结果一致。土壤 pH 值是影响微生物的一个常见且重要的参数,是限制土壤微生物活动与植物生长发育的主要因素之一^[14],并显著影响土壤细菌群落多样性。同时,土壤 pH 值可以反映盐碱土壤改良情况,与土壤微生物的活性、有机质的分解、土壤养分的释放和固定等密切相关^[15]。不同生长时期各施肥处理较对照土壤 pH 值均有不同程度降低,这与前人研究结果一致^[16]。土壤全盐是影响作物生长和微生物活性的主要因素之一。土壤含盐量过高会造成土壤透气、透水性变差,表层板结,水分和养分有效性降低,从而阻碍作物生长,严重会造成作物缺苗或死亡,使作物直接减产^[17]。研究发现,生物有机肥与生物有机肥基质(灭活)处理土壤全盐含量较对照相比有明显降低,均有显著性差异($P<0.05$),且微生物肥料配施化肥脱盐效果优于单施菌肥。

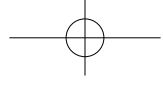
土壤养分含量可以反映土壤质量和土壤生产力的状况,为作物生长发育和土壤微生物活动供给必需的养分^[17]。土壤有机质和碱解氮是土壤养分含量的重要指标,这些养分可以促进植物生长,提高土壤肥力^[18]。本试验中,各施肥处理与对照相比,不同生长时期土壤有机质、碱解氮、有效磷和速效钾含量均有不同程度的增加,其中生物有机肥的效果更为明显。一方面可能是由于微生物肥料施入后,与作物产生根际效应,促进土壤养分转化,增加了土壤养分含量^[19];另一方面可能是因为微生物肥料可以改善土壤微生态系统,增加微生物群落多样性,促进土壤细菌和放线菌的繁殖。

3.2 不同生长时期各施肥处理细菌群落组成及多样性差异

通过本研究发现,施用微生物肥料较不施肥与化肥相比,可以明显提高土壤细菌 OTU 数量,尤

其以生物有机肥最明显,转色期与收获期分别较对照增长了 99.08% 和 139.41%,且收获期较转色期土壤细菌 OTU 数量也有明显提高。进一步通过土壤细菌群落 Alpha 多样性指数 Chao1、Shannon、Simpson 以及物种数可知,施肥处理的土壤细菌群落结构物种丰富度与多样性均显著高于不施肥处理,且生物有机肥处理的值为最高,这与前人研究较为一致^[20]。微生物肥料可以改变土壤细菌群落结构,提高细菌群落多样性^[21]。研究发现,微生物肥料可以改善土壤养分,这与它们所含细菌为芽孢杆菌属有关,可以在碱性条件下快速复苏,并与大量繁殖有关,丰富的芽孢杆菌菌群通过其促生能力提高土壤肥力^[22]。

微生物肥料的施用可以改变土壤细菌群落结构和微生物丰度,研究发现微生物肥料施用后,变形菌门、酸杆菌门相对丰度明显提高,而拟杆菌门的相对丰度明显降低。通过对土壤细菌群落水平上优势菌门的研究,发现变形菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、放线菌门等为主要菌群,这与杨亚东等^[23]在不同类型农田土壤分析得到的优势菌群相似。微生物肥料添加下变形菌门的相对丰度最高,其中生物有机肥基质(灭活)处理下变形菌门的相对丰度为各处理中最高,这与大部分研究发现变形菌门在盐胁迫环境下相对丰度最高一致^[24-25],说明变形菌门的耐盐能力较强^[26]。不同研究中,优势菌群的相对丰度存在显著差异,这表明农田土壤中的优势菌群也存在差异,且肥料性质、土壤类型或质地以及作物种类均可能影响优势菌群的相对丰度^[27]。同时,变形菌门、酸杆菌门和放线菌门作为优势菌门与许多盐碱土修复的研究结果相一致^[28-29],盐碱土的细菌群落结构可以通过施用微生物肥料而改变。变形菌门的主要功能是分解有机物、促进植物生长,多数变形菌门的细菌为贫养菌,其有从大气中摄取营养物质的能力,可用大气中的碳、氮源来维持正常的生长,因而在盐碱土壤中占主导地位^[30]。放线菌门由于其特殊的形态和细胞结构以及能产生菌丝和孢子,可以抵抗外界的恶劣环境,因此广泛分布于各种生态环境中,特别是在极端环境中^[31]。酸杆菌门是一类分布广、代谢类型丰富且常见的土壤细菌,其遗传和代谢多样性与变形菌门有着同样重要的生态学意义^[32],在各种环境中都有存在,其数量与变形菌门细菌相当,酸杆菌能够降解复杂的木质素与纤维素,进而提高土壤养



分。在属水平上,微生物肥料施用后亚硝化螺菌、酸杆菌相对丰度有明显提高,海洋杆菌的相对丰度有明显降低。其中 RB41 在维持低营养或胁迫条件下土壤的代谢和生态平衡具有重要作用^[33]。因此,建议选用含有枯草芽孢杆菌的生物有机肥作为宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄园土壤改良与利用的有效措施。

3.3 环境因子与土壤细菌多样性和群落组成的关系

在土壤中添加具有特定功能的微生物肥料是改善土壤营养元素、土壤肥力和土壤微生物群落组成的有效途径。以往的研究发现,施用不同的微生物肥料可以降低土壤盐分、增加养分含量^[34]。枯草芽孢杆菌作为植物促生菌,在改善土壤环境、提高作物抗逆抗病性、促进作物生长等方面都有良好的效果^[35]。施用添加枯草芽孢杆菌的菌剂可以有效抑制尖孢炭疽菌引起的落果,显著提高作物结实率^[36]。多黏类芽孢杆菌是一种常见的植物根际促生细菌,可通过生产各种抗菌物质、生长必需物质的竞争以及植物的过敏防御反应来实现。本研究中变形菌门为各处理中的最优菌门,其中以生物有机肥基质(灭活)处理相对丰度最高,在属水平上,亚硝化螺菌属为最优菌属,表明该类细菌能够适应研究区土壤盐渍化程度。已有研究发现,变形菌等具有固氮、解磷作用^[37],能够促进土壤的氮磷循环,对于改善土壤环境具有重要作用;增加土壤变形菌门、放线菌门细菌比例可以提高碱解氮、有效磷以及速效钾的质量比^[38]。在本研究中,通过冗余分析结果表明,土壤碱解氮、有机质含量以及 pH 值是影响酿酒葡萄园土壤细菌群落多样性的主要因子,土壤有机质和碱解氮含量与细菌群落多样性指数呈正相关,表明土壤微生物群落在一定程度上可以反映土壤养分含量水平,可以作为衡量土壤质量的生物指标。同时土壤微生物作为土壤养分的主要分解者,通过分解有机物等获取自身所需营养物质的同时,为植物的生长发育提供必要的营养,从而使作物增产增质^[17]。许多研究表明土壤盐碱度增加会导致厚壁菌门以及绿弯菌门的相对丰度增加^[39],添加微生物肥料能够改善土壤理化性质,增加土壤孔隙度,降低土壤盐分含量和 pH 值,增加土壤养分含量,改善土壤微生态环境,丰富土壤微生物多样性。土壤 pH 值与全盐含量也是土壤细菌群落多样性的主要影响因子,这

与本文研究结果相似,厚壁菌门和绿弯菌门为优势菌门,且与细菌群落多样性指数呈负相关关系,是决定细菌群落组成、系统类型丰富度的首要因素,对土壤微生物生长以及繁殖影响较大^[40]。说明微生物肥料的施用主要影响了贺兰山东麓酿酒葡萄园土壤细菌群落的 Alpha 和 Beta 多样性及其功能。目前研究认为,土壤 pH 值直接影响细菌群落结构,且作为一个综合变量,直接或间接地影响土壤性质如土壤水分状况和盐度等。其次,土壤 pH 值在小范围内的微小差异能够影响细菌群落变化^[33]。环境因子与土壤优势细菌门的相关分析表明,土壤 pH 值及全盐含量与放线菌呈显著正相关,且与厚壁菌和绿弯菌呈正相关。

4 结论

微生物肥料的施入可以提高土壤养分含量,且能够增加土壤细菌群落多样性。本研究中,不同生长时期各施肥处理土壤细菌多样性存在差异,施肥处理土壤细菌多样性指数显著高于对照,且细菌群落结构之间也存在显著差异。变形菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、放线菌门为各施肥处理土壤细菌优势菌门,亚硝化螺菌属、酸杆菌属、鞘氨醇单胞菌属为优势菌属。放线菌与土壤 pH 值、全盐含量呈显著正相关,表明该类放线菌能够适应研究土壤盐渍化程度。土壤碱解氮、有机质含量和 pH 值是驱动酿酒葡萄园土壤细菌多样性变化的主要因子,其中碱解氮含量为最主要因子。施肥能够不同程度提高土壤养分含量,以生物有机肥整体效果最显著,可以显著增加土壤有机质、碱解氮含量,降低土壤 pH 值及全盐含量。

参考文献:

- [1] Saleem M, Hu J, Jousset A. More than the sum of its parts: microbiome biodiversity as a driver of plant growth and soil health [J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2019, 50: 145-168.
- [2] Bonfante P, Anca I. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 363-383.
- [3] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7 (5): 335-336.
- [4] 路怡青. 保护性耕作对潮土酶活性、微生物群落及肥力的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [5] Guo Y, Ren C, Yi J, et al. Contrasting responses of rhizosphere

- bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi along an elevational gradient in a temperate montane forest of China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1–13.
- [6] Shen C, Ni Y, Liang W, et al. Distinct soil bacterial communities along a small-scale elevational gradient in alpine tundra [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 582.
- [7] Ling N, Deng K, Song Y, et al. Variation of rhizosphere bacterial community in watermelon continuous mono-cropping soil by long-term application of a novel bioorganic fertilizer [J]. *Microbiological Research*, 2014, 169 (7–8): 570–578.
- [8] 王艳平, 李萍, 吴文强, 等. 生物有机肥和微生物菌剂对北京山区连作茶菊生长及土壤肥力的影响 [J]. *中国土壤与肥料*, 2023 (12): 107–113.
- [9] 陈雅涵, 谢宗强. 保存过程对土壤生化指标的影响及保存土样的应用 [J]. *土壤学报*, 2018, 55 (4): 783–796.
- [10] 苗万强. 土壤采集制备及样品前处理方法的研究进展 [J]. *黑龙江环境通报*, 2017, 41 (2): 65–68.
- [11] 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.
- [12] 郭鹏飞, 葛新伟, 王锐. 有机肥对酿酒葡萄土壤微生物、酶活性及产量的影响 [J]. *干旱地区农业研究*, 2020, 38 (2): 145–154.
- [13] Guan Y, Jiang N, Wu Y, et al. Disentangling the role of salinity-sodicity in shaping soil microbiome along a natural saline-sodic gradient [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 765: 142738.
- [14] Lammel D R, Barth G, Ovaskainen O, et al. Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures [J]. *Microbiome*, 2018, 6 (1): 106.
- [15] 张晓丽, 张宏媛, 卢闯, 等. 河套灌区不同秋浇年限对土壤细菌群落的影响 [J]. *中国农业科学*, 2019, 52 (19): 3380–3392.
- [16] 蒋静, 翟登攀, 张超波. 灌溉施肥水平对盐渍化农田水盐分布及玉米产量的影响 [J]. *应用生态学报*, 2019, 30 (4): 1207–1217.
- [17] 屈忠义, 孙慧慧, 杨博, 等. 不同改良剂对盐碱地土壤微生物与加工番茄产量的影响 [J]. *农业机械学报*, 2021, 52 (4): 311–318.
- [18] 马剑, 刘贤德, 李广, 等. 祁连山中段青海云杉林土壤肥力质量评价研究 [J]. *干旱区地理*, 2019, 42 (6): 1368–1377.
- [19] 李国, 易强, 许世武, 等. 微生物菌剂对新疆棉花连作障碍的消减研究 [J]. *中国土壤与肥料*, 2020 (1): 202–207.
- [20] 李凤霞, 王长军, 肖国举, 等. 生物有机肥对宁夏盐碱地土壤理化性质及微生物的影响 [J]. *宁夏农林科技*, 2021, 62 (7): 18–22.
- [21] 张凯煜, 谷洁, 王小娟, 等. 微生物有机肥对樱桃园土壤细菌群落的影响 [J]. *中国环境科学*, 2019, 39 (3): 1245–1252.
- [22] 宋建. 耐盐碱微生物的筛选及其在赤泥改良中的应用 [D]. 开封: 河南大学, 2018.
- [23] 杨亚东, 王志敏, 曾昭海. 长期施肥和灌溉对土壤细菌数量、多样性和群落结构的影响 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51 (2): 290–301.
- [24] Chatterjee P, Samaddar S, Anandham R, et al. Beneficial soil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* OS261 augments salt tolerance and promotes red pepper plant growth [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 705.
- [25] Zhang S, Fan C, Wang Y, et al. Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2018, 64 (12): 968–978.
- [26] Zheng W, Xue D, Li X, et al. The responses and adaptations of microbial communities to salinity in farmland soils: a molecular ecological network analysis [J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 120: 239–246.
- [27] 丁建莉, 姜昕, 关大伟, 等. 东北黑土微生物群落对长期施肥及作物的响应 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49 (22): 4408–4418.
- [28] Xie K, Deng Y, Zhang S, et al. Prokaryotic community distribution along an ecological gradient of salinity in surface and subsurface saline soils [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 13332.
- [29] Yang Y, Liu L, Singh R P, et al. Nodule and root zone microbiota of salt-tolerant wild soybean in coastal sand and saline-alkali soil [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 2178.
- [30] 杨云礼, 徐明, 邹晓, 等. 不同植被类型对黔中山地丘陵区土壤细菌群落特征的影响研究 [J]. *生态与农村环境学报*, 2021, 37 (4): 518–525.
- [31] Tian X, Zhang C. Illumina-based analysis of endophytic and rhizosphere bacterial diversity of the coastal halophyte *Messerschmidia sibirica* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2288.
- [32] 王光华, 刘俊杰, 于镇华, 等. 土壤酸杆菌门细菌生态学研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32 (2): 14–20.
- [33] Foessel B U, Rohde M, Overmann J. *Blastocatella fastidiosa* gen. nov., sp. nov., isolated from semiarid savanna soil – the first described species of *Acidobacteria subdivision 4* [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36 (2): 82–89.
- [34] Chen C, Zhang J, Lu M, et al. Microbial communities of an arable soil treated for 8 years with organic and inorganic fertilizers [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52 (4): 455–467.
- [35] Hashem A, Tabassum B, Abd_Allah E F. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, 26 (6): 1291–1297.
- [36] Klein M N, Da Silva A C, Kupper K C. *Bacillus subtilis* based formulation for the control of postbloom fruit drop of citrus [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32 (12): 1291–1297.

- 205.
- [37] 薛银刚, 刘菲, 周璐璐, 等. 基于高通量测序的工业园区地下水和土壤细菌群落结构比较研究[J]. 生态毒理学报, 2017, 6 (12): 107–115.
- [38] 李明, 胡云, 黄修梅, 等. 生物炭对设施黄瓜根际土壤养分和菌群的影响[J]. 农业机械学报, 2016, 47 (11): 172–178.
- [39] 杨惠婷, 冷小云, 石春芳. 盐碱化土壤细菌群落研究进展[J]. 环境科学与技术, 2021, 44 (6): 230–236.
- [40] Kim J M, Roh A, Choi S, et al. Soil pH and electrical conductivity are key edaphic factors shaping bacterial communities of greenhouse soils in Korea [J]. Journal of Microbiology, 2016, 54 (12): 838–845.

Effects of microbial fertilizer application on the diversity of soil bacterial microbial community of wine vineyards in the eastern foot of Helan mountain

SUN Hao-jie¹, WANG Jing^{2, 3, 4*}, CHENG Yu-run¹, XIAO Guo-ju^{2, 3, 4}, BI Jiang-tao^{2, 3, 4} (1. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan Ningxia 750021; 2. School of Ecology and Environment, Ningxia University, Yinchuan Ningxia 750021; 3. Breeding Base for State Key Laboratory of Land Degradation and Ecological Restoration in Northwestern China, Yinchuan Ningxia 750021; 4. Key Laboratory of Restoration and Reconstruction of Degraded Ecosystems in Northwestern China of Ministry of Education, Yinchuan Ningxia 750021)

Abstract: The effects of microbial fertilizer on soil bacterial microbial community structure and soil chemical properties of wine grape in different fertilization treatments at different stages and their relationship were explored to provide a scientific basis for healthy planting and soil management of wine vineyards in the eastern foot of Helan mountain. Taking the wine grape variety “meilutou” widely planted in the eastern foot of Helan mountain in Ningxia as the test material, the field plot experimental design was adopted to set up the four treatments of no fertilization, conventional chemical fertilizer, bio-organic fertilizer + reduced chemical fertilizer, and powdered microbial bio-organic fertilizer + reduced chemical fertilizer. High throughput sequencing technology was used to study and analyze the soil bacterial diversity and community composition of various fertilization treatments in different periods. The results showed that the dominant groups of soil bacteria in different fertilization treatments were Proteobacteria, Acidobacteriota, Bacteroidota and Actinobacteriota, and the dominant genus were *Nitrosospora*, *Acidobacterium* RB41 and *Sphingomonas*. The soil bacterial diversity index of each fertilization treatment was significantly higher than that of the non-fertilization control, and there was significant difference in soil bacterial community structure between break period and harvest period. The relative abundance of *Nitrosospora* and *Acidobacterium* RB41 was significantly increased by bio-organic fertilizer and its substrate treatment, respectively, while the relative abundance of *Nitrosospora* was decreased by no fertilization treatment. Through redundancy analysis and correlation analysis, it was found that soil alkali-hydrolyzable nitrogen and organic matter contents, pH value were the main factors affecting the diversity of soil bacterial community, among which alkali-hydrolyzable nitrogen content was the main driving factor, and *Actinomycetes* could adapt to the degree of soil salinization in the study area. Microbial fertilizer could improve soil nutrient content, reduce soil pH value and total salt content, and increase soil bacterial community diversity, among which the overall effect of bio-organic fertilizer was the most significant.

Key words: microbial fertilizer; soil nutrients; soil bacteria; community diversity