

# 不同共作模式的稻田土壤细菌群落结构分析

宋宇, 王鹏, 韦月平

(辽东学院, 辽宁 丹东 118003)

**摘要:**为分析不同共作模式的稻田土壤细菌群落结构,利用高通量测序技术,在水稻结穗期对不同共作模式的稻田土壤细菌进行测序,研究稻田单作(SDKBZ)、河蟹共作稻田(SDHXZ)和龙虾共作稻田(SDLXZ)表层土壤细菌群落多样性、丰富度和群落结构的变化。各样本共检测到细菌类群46门、112纲、210目、370科、664属、1 227种。主要的优势菌门是变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、蓝藻菌门(Cyanobacteria)、Sacharibacteria、疣微菌门(Verrucomicrobia)和厚壁菌门(Firmicutes)。河蟹稻田和龙虾稻田的Chao 1指数均高于单作稻田。PCoA分析结果显示,河蟹稻田和龙虾稻田两种稻田共作模式与稻田单作模式的土壤细菌群落构成差异大。研究初步揭示了河蟹和龙虾与水稻共作复合生态系统具有较丰富的微生物生态组成。

**关键词:**高通量测序;河蟹共作稻田;龙虾共作稻田;群落结构;16S rDNA

中图分类号:S154.3

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2019)04-0046-04

## Analysis of Soil Bacterial Community Structure in Different Paddy Field Co-Cropping Models

SONG Yu, WANG Peng, WEI Yueping

(Eastern Liaoning University, Dandong 118003, China)

**Abstract:** In order to analysis the soil bacterial structure community in different paddy co-cropping models, high throughput sequencing technique was used to study the diversity of bacterial community, richness and changes of community structure in the surface soil of rice field at panicle setting stage for rice field monoculture, river crab paddy field co-cropping and lobster rice field co-cropping. A total of 46 phyla, 112 classes, 210 orders, 370 families, 664 genera and 1 227 species of bacteria were detected. The dominant phylum is Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Actinobacteria and Acidobacteria. The chao index of crab paddy field and lobster paddy field is higher than that of monoculture rice field. The results of PCoA analysis showed that the composition of soil bacterial community for crab rice field and lobster paddy field was quite different from that of rice field monoculture. The study showed that the ecosystem of rice co-cropping with crab and lobster had richer microbial ecological components.

**Key words:** High-throughput sequencing; Paddy field co-cropping with river crab; Paddy field co-cropping with lobster; Structure of community; 16S rDNA

现代农业生产中化肥和农药的长期使用已引发土壤肥力下降、药物残留和环境污染等一系列问题<sup>[1-2]</sup>,增加生产成本的同时更危及农业可持续发展。现在人们广泛采取稻田种养复合生态系统用于绿色安全稻米的生产。国内外研究表明,稻田种养模式将是保证粮食安全,保持土壤肥力及促进农业可持续发展的有效途径<sup>[3]</sup>。目前对稻田养殖模式研究主要集中在病虫害控制及土壤生

理特征和水稻增产等方面<sup>[4-6]</sup>,而对稻田土壤中微生物数量及群落多样性及其功能的研究还较少。微生物群落结构的研究最早采用传统培养分离方法,该方法只能培养自然界中不到1%的微生物,随后的荧光原味杂交、变形梯度凝胶电泳及基因芯片技术等分子生物学技术的发展虽能使环境微生物的分析扩大到10%,但群落多样性和结构的研究依然无法深入。而如今广泛使用的第二代测序技术(next generation sequencing, NGS)和第三代测序技术(third generation sequencing, TGS)就能够克服上述的分子生物学技术的不足且具有测序通量高、定量准和成本低的特点。第三代测序技术

收稿日期:2019-01-07

基金项目:2018年中央财政专项创新团队建设(8888-851800501)

作者简介:宋宇(1971-),女,高级实验师,研究方向:环境微生物。

虽然比第二代测序技术在测序原理上有较大的提升,但技术还不够成熟,国内外测序公司运用不多,现多采用 Illumina 的 MiSeq 测序仪为主要平台的高通量测序技术来分析环境样品中微生物多样性及种群结构<sup>[7-10]</sup>。目前国内外针对稻田种养模式中养殖生物的活动对土壤微生物多样性及群落结构的影响还少有研究。本实验拟采用高通量测序技术对河蟹共作稻田(SDHXZ)、龙虾共作稻田(SDLXZ)和稻田单作(SDKBZ)三种模式下表层土壤细菌(16S rDNA)多样性特征进行比较分析,探讨不同种养模式对水稻表层土壤微生物多样性和群落结构的影响,为改进种养工艺提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品采集和处理

土壤样品采集于2018年9月28日(水稻结穗期)丹东东港市北井子镇盖家坝农场。分别在稻田单作模式(SDKBZ)、河蟹稻田共作模式(SDHXZ)和龙虾稻田共作模式(SDLXZ)的稻田上随机选5个点,采集土层深度约0~5.0 cm的表层土壤后将5点采集的土样混合为1个样品,样品编号分别为 SDKBZ1、SDKBZ2、SDKBZ3、SDHXZ1、SDHXZ2、SDHXZ3、SDLXZ1、SDLXZ2、SDLXZ3 鲜土去除杂质混匀装入50 mL离心管后-80℃冷冻保存,用于微生物多样性分析。

### 1.2 土壤微生物 DNA 提取与检测

提取微生物基因组 DNA, Nanodrop 检测 DNA 浓度和总量,PCR 预扩增检测样品。

### 1.3 PCR 扩增及高通量测序

通用引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGGAGCA-3') 和 806R(5'-GGACTCHVGGGTWTCTAAT-

3'),文库构建使用 PCR-Free Sample Prep Kit (FC-121-3001/3002),测序平台为 ILLumina 公司 Miseq PE300 平台。

### 1.4 生物信息处理方法

利用 Flash 和 Trimmomatic 软件完成优化序列统计。对比 Silva 16 S rRNA 数据库利用 RDP 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析并统计各个分类水平上样品群落组成。利用主成分分析(PCoA)分析样本间 OTU 相似性。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌群落多样性、丰度及结构差异性

Shannon 指数和 Chao1 指数可以反映细菌群落的多样性和丰度。Shannon 指数值越大说明细菌群落多样性越高或者菌群越均匀。Chao1 值越高说明细菌群落丰度越高,物种种类越丰富。细菌群落结构差异性可以通过 PCoA 分析即主成分分析进行。通过样本间距离的远近来判断群落结构的相近或差异性。

三种模式下土壤样品的高通量测序共得到 581 818 条高质量序列,平均长度为 5 263.62 bp。以 97%相似度划分,共得到 2 898 个 OTUs。表 1 为三种模式下土壤样品中的优化序列、OTU 数量及多样性指数。各样品文库的样品覆盖度均在 98%以上,说明土样中基因序列被检出概率很高,这也能反映不同稻田共作模式土壤细菌群落的真实情况。表 1 为反映三种模式稻田土壤细菌的多样性和丰度的相关指数。由表 1 可知,SDHXZ 和 SDLXZ 的 Chao1 指数要高于 SDKBZ 而 Shannon 指数则是 SDKBZ 高于 SDHXZ 和 SDLXZ。说明河蟹和龙虾的引入提高了土壤微生物群落的丰富度,但菌群不够均匀。

表 1 三种模式下稻田土壤细菌多样性与丰度

分组	序列数	OTU 数	覆盖度	丰富度指数(chao1 指数)	香浓指数(shannon 指数)
SDKBZ	45 282	2 443	0.985 7	2 271	6.436
SDHXZ	48 451	2 540	0.984 1	2 345	6.274
SDLXZ	52 820	2 570	0.984 5	2 346	6.007

对三种模式下稻田土壤中 OTU 的组成进行 PCoA 分析(图 1)可以看出:二种共作稻田与单作稻田的距离较远,说明土壤 OTU 组成差异较大,细菌群落结构差异较大,而河蟹稻田和龙虾稻田之间的距离较近,说明土壤 OTU 组成相近,细菌群落结构也相近。

### 2.2 细菌门水平分类

三种模式的土壤样品的 2 898 条 OTUs 分别属于 46 个门、112 个纲、210 个目、370 个科、664 个属、1 227 个种。图 2 为门水平的细菌分类,相对丰度较高的分别为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、蓝藻菌门(Cyanobacteria)、Saccharibacteria、疣微菌

门(Verrucomicrobia)和厚壁菌门(Firmicutes)。变形菌门(Proteobacteria)为所有样品中相对丰度最高的门。平均相对丰度为37.3%(最高为41.8%,最低为33.4%)。本研究中使用高通量测序在河蟹和龙虾稻田土壤当中得到的变形菌门(Proteobacteria)和罗衡等的相对丰度相近<sup>[11]</sup>,但比以前的研究则更高<sup>[12-14]</sup>。对样品中优势菌门的相对丰度进行对比可以看出,各类菌群在不同样品中的相对丰度存在一定差异,引入河蟹和龙虾后,稻田表层土壤的变形菌门、拟杆菌门、Saccharibacteria和厚壁菌门的相对丰度都得到提升。河蟹稻田的绿弯菌门相对丰度得到提升而龙虾稻田则减少,龙虾稻田的放线菌门的相对丰度较稻田单作组升高显著( $P<0.05$ )而河蟹稻田的则减少。河蟹和龙虾稻田的酸杆菌门则显著低于稻田单作组。

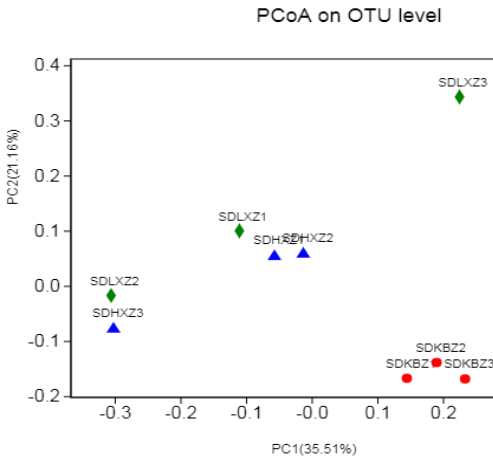


图1 三种模式下稻田土壤OUT主成分分析

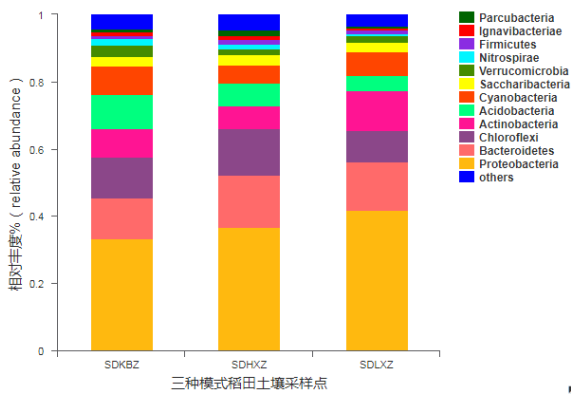


图2 三种模式下稻田表层土壤门水平的微生物组成丰度图

相对丰度低于0.01%的物种归于“其他”组内。SDKBZ为稻田单作土壤组,SDHXZ为河蟹稻田组,SDLXZ为龙虾稻田组

2.3 细菌属水平分类

图3为属分类水平上的细菌分类,平均丰度低于0.01%的物种将被合并为图中的others。共

31个属水平分类中有21个属因在分类学数据库分类学谱系的中间等级,没有科学名称,所以用norank作为标记。蓝藻属(norank\_c\_Cyanobacteria)为样品土壤中平均丰度最高的属,在SDKBZ中要高于SDHXZ和SDLXZ。硫化菌属(Sulfuricurvum)的相对丰度则在SDHXZ和SDLXZ中高于SDKBZ,其平均丰度分别达到2%、3.5%和0.8%,SDLXZ和SDKBZ差别显著( $P<0.05$ )。norank\_p\_Saccharibacteria在SDHXZ和SDLXZ中的相对丰度也高于SDKBZ,分别达到3.1%、3.87%和2.67%,但彼此差异不显著。而norank\_c\_Bacteroidetes\_VadinHA17则在SDHXZ中相对丰度最高达到4.74%,与SDKBZ(1.85%)差别显著( $P<0.05$ )。SDLXZ的相对丰度为2.06%,虽高于SDKBZ但差别不大。优势属分析可以看出稻田由于有河蟹、龙虾的引入,属水平还是发生了一定变化。

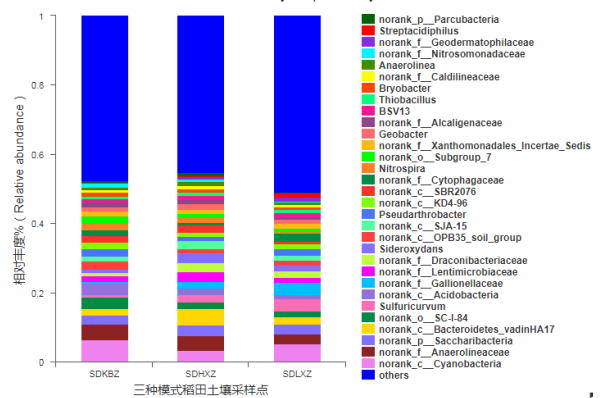


图3 三种模式下水稻表层土壤主要属的微生物组成丰度图

分析过程中将相对丰度低于0.01%的归于“其他”组内。SDKBZ为稻田单作土壤组,SDHXZ为河蟹稻田组,SDLXZ为龙虾稻田组

3 结论

3.1 作为稻田土壤生态系统的重要组成部分,稻田土壤微生物对外界环境的作用非常敏感<sup>[15]</sup>。由于河蟹和龙虾的粪便及排泄作用可为土壤微生物的生长提供充足的营养,同时河蟹和龙虾的活动也改变了稻田表层土壤的氧气条件,这些都对河蟹和龙虾与稻田的共生系统土壤微生物组成产生一定影响。这和赵翔刚等的研究结果一致<sup>[16]</sup>。

3.2 鉴于传统的PCR-DGGE技术对分析相对丰度大于1%的优势类群的局限性<sup>[17]</sup>,现在土壤大量丰度较低的细菌类群则通过高通量测序技术来检测<sup>[18]</sup>,本研究就是采用高通量测序技术来分析不

同稻田共作模式对土壤微生物群落结构的影响,所以能更全面地反映群落组成。从检测结果来看,各样本共检测到细菌类群46门、112纲、210目、370科、664属、1227种。和Jangid K<sup>[9]</sup>等的研究一致,在门的分类水平上各样品均以变形菌门为最优势菌门。在主要优势种属中,硫化菌属(*Sulfuricurvum*)的相对丰度则在SDHXZ和SDLXZ中高于SDKBZ,SDLXZ和SDKBZ差别显著( $P < 0.05$ )。norank\_c\_Bacteroidetes\_VadinHA17则在SDHXZ中相对丰度最高,与SDKBZ差别显著( $P < 0.05$ )。

**3.3 Yachi S**等研究证实生物多样性越高生态系统越稳定<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,河蟹和龙虾2种稻田共作模式的Chao指数均高于稻田单作组。这说明河蟹和龙虾引入后土壤的微生物种类越发丰富,土壤微生物群落结构在河蟹和龙虾两种共作模式中比稻田单作模式要稳定。河蟹和龙虾与水稻共作复合生态系统具有更加丰富的微生物生态组成。

#### 参考文献:

- [1] Tilman D, Cassman K G, Matson P A, et al. Agricultural sustainability and intensive production practices[J]. *Nature*, 2002, 418(6898): 671-677.
- [2] Bromley D W. Food security: Beyond technology[J]. *Science*, 2010, 328(5975): 169.
- [3] Pretty J. Agricultural sustainability: Concepts, principles and evidence[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2008, 363(1491): 447-465.
- [4] 金京德,张三元,岩石真嗣,等.水稻有机栽培苗期恶苗病和立枯病防治技术的研究[J]. *吉林农业科学*, 2008, 33(3): 30-32.
- [5] 高军,陈莫军,孟凡梅,等.增穗施肥对水稻产量和氮肥利用率的影响[J]. *东北农业科学*, 2018, 43(2): 1-4.
- [6] 赵旭,于凤泉,田春晖.稻田养蟹对防除杂草的效果[J]. *辽宁农业科学*, 2018(2): 68-70.
- [7] 朱杰,刘海,吴邦魁,等.稻虾共作对稻田土壤nirK反硝化微生物群落结构和多样性的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2018, 26(9): 1324-1332.
- [8] 房昫昊,彭剑峰,宋永会,等.高通量测序法表征潜流人工湿地中不同植物根际细菌群落特征[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(3): 911-918.
- [9] Bates S T, Berg-Lyons D, Caporaso J G, et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(5): 908-917.
- [10] 李金融,侯湖平,王琛,等.基于高通量测序的复垦土壤细菌多样性研究[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(12): 148-157.
- [11] 罗衡,赵良杰,李丰,等.养殖蟹的引入对稻田土壤细菌群落结构的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(5): 720-731.
- [12] 袁红朝,吴昊,葛体达,等.长期施肥对稻田土壤细菌、古菌多样性和群落结构的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(6): 1807-1813.
- [13] 陈哲,陈春兰,秦红灵,等.化肥对稻田土壤细菌多样性及硝化、反硝化功能菌组成的影响[J]. *生态学报*, 2009, 29(11): 6142-6147.
- [14] Ge Y, Zhang J B, Zhang L M, et al. Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(1): 43-50.
- [15] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [16] 赵翔刚,罗衡,刘其根,等.稻田养殖沙塘鳢对稻田水体及底泥微生物群落结构及多样性的影响[J]. *淡水渔业*, 2017, 47(4): 8-14.
- [17] Wietz M, Hall M R, Høj L. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(4): 266-277.
- [18] Kirchman D L, Cottrell M T, Lovejoy C. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1132-1143.
- [19] Jangid K, Williams M A, Franzluebbers A J, et al. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(11): 2843-2853.
- [20] Yachi S, Loreau M. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1463-1468.

(上接第45页)

- [4] 孙石.大豆疫霉根腐病抗性的遗传分析及基因定位的初步研究[D].南京:南京农业大学,2008.
- [5] Kyle D E, Nickell C D, Nelson R L, et al. Response of soybean accessions from provinces in southern China to *Phytophthora sojae*[J]. *Plant Disease*, 1998, 82: 555-559.

- [6] 鞠会艳,韩丽梅,王树起.邻苯二甲酸和丙二酸对大豆根腐病原菌的化感作用[J]. *吉林农业科学*, 2002, 27(5): 38-40.
- [7] Gordon S G, Martin S K, Dorrance A E. Rps8 maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F[J]. *Crop Science*, 2006, 46: 168-173.