

DOI: 10.11686/cyxb2018781

<http://cyxb.magtech.com.cn>

张文文, 刘秉儒, 牛宋芳. 引黄灌区不同种植年限紫花苜蓿土壤养分与细菌群落特征研究. 草业学报, 2019, 28(5): 46—54.

Zhang W W, Liu B R, Niu S F. Correlation between soil nutrient status and the bacterial community composition in alfalfa stands of different ages in the Yellow River irrigation area. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(5): 46—54.

# 引黄灌区不同种植年限紫花苜蓿 土壤养分与细菌群落特征研究

张文文, 刘秉儒\*, 牛宋芳

(宁夏大学西北土地退化与生态恢复国家重点实验室培育基地, 宁夏大学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:**以宁夏引黄灌区种植年限为1~6年(2012—2017年)的紫花苜蓿地土壤为研究对象,采用16S rRNA扩增子测序技术对细菌群落组成、丰度和多样性等特征进行研究,分析了土壤养分与细菌种群多样性的相关关系。结果表明:不同种植年限苜蓿地土壤中共检测出细菌约40个门、78个纲、151个目、275个科和416个属;在门水平下细菌的优势门类为变形菌门、酸杆菌门和拟杆菌门,共占细菌总数的68%;随种植年限的增加,细菌菌群丰度和多样性变化表现为1 yr>5 yr>3 yr>4 yr>2 yr>6 yr;土壤pH、有机碳、全氮和碱解氮呈先降低后增大的变化趋势,且都在第5年时达到最大,与细菌群落组成变化规律基本保持一致。Spearman相关性分析结果表明,有机碳、全氮和碱解氮对细菌群落组成具有显著影响( $P<0.05$ )。

**关键词:**紫花苜蓿; 细菌群落; 细菌丰度; 多样性; 土壤养分

## Correlation between soil nutrient status and the bacterial community composition in alfalfa stands of different ages in the Yellow River irrigation area

ZHANG Wen-wen, LIU Bing-ru\*, NIU Song-fang

Breeding Base of State Key Laboratory for Preventing Land Degradation and Ecological Restoration, Key Laboratory for Restoration and Reconstruction of Degraded Ecosystem in Northwest China of Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

**Abstract:** The soil bacterial community composition, abundance and diversity were studied in alfalfa stands between 1—6 years of age (i. e. established 2012—2017), in the Ningxia Yellow River irrigation area. The determination of the soil bacterial community characteristics was achieved by DNA extraction followed by PCR amplification, and sequencing using the HiSeq platform. The 16S rRNA amplifier sequencing technique was used in the study. The correlation between soil nutrients and bacterial population diversity was analyzed. The results indicate that there are about 40 phyla, 78 classes, 151 orders, 275 families and 416 genera of bacteria in the soils of the various alfalfa stands of different ages. At the phylum level, the dominant genera of bacteria detected were *Proteobacteria*, *Acidobacteria* and *Bacteroidetes*, accounting for 68% of the total bacterial population. The ranking of bacterial abundance and diversity with stand age was: 1 yr>5 yr>3 yr>4 yr>2 yr>6 yr. Soil pH, organic carbon, total nitrogen and alkali-hydrolysable nitrogen all decreased initially, and then in-

收稿日期:2018-12-10;改回日期:2019-01-29

基金项目:国家自然科学基金地区基金项目(31860158)和宁夏科技基础条件建设计划创新平台专项资金项目(2018DPC05021)资助。

作者简介:张文文(1994-),女,甘肃陇南人,在读硕士。E-mail: 1098880134@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: bingru.liu@163.com

creased with stand age, reaching their maxima at year 5. The result is basically consistent with findings of other studies of factors affecting bacterial community composition. Analysis using Spearman's correlation showed that organic carbon, total nitrogen and alkaline nitrogen were significantly ( $P < 0.05$ ) correlated with bacterial community composition. In general, the dominant taxa of soil bacterial communities present in the Yellow River irrigation area did not change with stand age, but population numbers and bacterial community diversity did vary from year to year, though not with any consistent trend over time. Soil organic carbon, soil alkali-hydrolysable nitrogen and soil total nitrogen were the main factors associated with changes in bacterial taxa present across years.

**Key words:** alfalfa; bacterial community; bacterial abundance; diversity; soil nutrients

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,直接或间接参与土壤碳氮养分循环、土壤结构的优化、植物生长调节等过程<sup>[1-4]</sup>,土壤细菌作为土壤微生物的主要成员,能够快速高效地分解与转化营养物质<sup>[5]</sup>,影响植物对养分的获取和土壤肥力<sup>[6]</sup>,同时细菌群落结构的差异和变化规律也能反映土壤现状及变化趋势,可用来指示土壤生态功能,因此土壤细菌群落和土壤养分关系的研究对引黄灌区紫花苜蓿(*Medicago sativa*)的生长具有重要指导意义。高通量测序技术能够全面系统的分析土壤细菌的多样性,深度测序的性能是高通量测序技术的优点所在<sup>[7]</sup>,也为本领域研究提供了极大的技术便利。

宁夏引黄灌区享引黄灌溉之利,水土光热资源充足,农业发达,灌溉历史悠久,是全国 12 个商品粮基地之一<sup>[8-9]</sup>。因日照充足,有灌溉条件,宁夏成为全国最适合种植苜蓿的区域,截止 2015 年,紫花苜蓿种植面积已达 40 多万  $\text{hm}^2$ ,干草产量达  $18 \sim 22 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ ,为宁夏畜牧业带来极大经济效益<sup>[10]</sup>。以往关于紫花苜蓿的研究主要集中在土壤养分变化,如杨恒山等<sup>[11-12]</sup>通过对不同种植年限紫花苜蓿土壤养分变化研究得到种植苜蓿对土壤理化性状具有显著影响,除 pH 外不同种植年限间差异明显,任继周<sup>[13]</sup>研究表明土壤有机质和全氮含量随着种植年限的增加而升高,但其增长率随种植年限的增加而降低。也有学者提出苜蓿地土壤养分增长年限受区域影响,如黄土高原区土壤有机质、全氮的变化表现为种植 5~10 年为增长期<sup>[14]</sup>,干旱区表现为种植 4 年养分含量最高<sup>[15]</sup>。引黄灌区苜蓿种植最佳年限的探讨尚有缺乏,且大多学者研究主要集中于土壤养分和团粒结构,在土壤微生物与土壤养分之间的互作关系等方面研究尚不清楚。鉴于此,本研究采用 16S rRNA 扩增子测序技术研究了宁夏引黄灌区不同种植年限(1~6 年)紫花苜蓿土壤细菌群落和土壤养分分布特征,旨在从微生物和养分等角度探讨紫花苜蓿的最佳种植年限,为西北地区紫花苜蓿种植及持续高产提供科学指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况及样品采集

研究区位于宁夏回族自治区银川市(N  $38^{\circ}30'$ , E  $106^{\circ}06'$ )西夏区贺兰山人工紫花苜蓿农场。研究区海拔为 1135 m,属于温带大陆性季风气候,年平均气温为  $8.4^{\circ}\text{C}$ ,最高气温为  $38^{\circ}\text{C}$ ,最低气温为  $-20^{\circ}\text{C}$ ,年平均降水量约为 200 mm,年蒸发量约为 2250 mm,年平均日照时数为 3075.5 h,无霜期为 160 d,土壤类型为淡灰钙土,地下水位约 4~5 m<sup>[16]</sup>。

本研究分别以种植时间为 1~6 年(2012—2017 年)的紫花苜蓿地为 6 个处理,每个处理设置 3 个面积  $30 \text{ m} \times 30 \text{ m}$  的小样方作为 3 个重复,每个小样方按照 S 型布点,清除掉地上凋落物和其他多余物质,用直径 4 cm、高 20 cm 土钻,采用 5 点混合法取 0~20 cm 土壤样品,每个重复均取 3 个平行样,6 个处理共采集土样 54 个。每个土样采集 2 份,1 份将鲜样装入经高温灭菌的冻存管并立即放入  $-196^{\circ}\text{C}$  的液氮带回室内测定,另 1 份装入自封袋带回实验室自然风干,并按照实验后期要求过筛用于土壤各项理化指标测定。

### 1.2 测定方法

土壤理化指标测定:采用水土比 2.5 : 1.0 悬液测定土壤 pH;采用水土比 5 : 1 浸提液测定土壤电导率;采用重铬酸钾氧化—外加加热法测定土壤有机碳;采用凯式定氮法测定全氮;采用碱解扩散法测定碱解氮;采用 NaOH 碱溶—钼锑抗比色法测定全磷;采用  $\text{NaHCO}_3$  浸提—钼锑抗比色法测定速效磷<sup>[17]</sup>。

细菌总 DNA 的提取:土壤碾碎过 0.18 mm 筛后,首先采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium ammonium bromide)或十二烷基苯磺酸钠(sodium dodecyl sulfate)方法对样本的基因组 DNA 进行提取,用 Qubit 2.0 检测 DNA 浓度,琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性<sup>[18]</sup>。每个样品 3 个重复,将同一样品的土壤 DNA 混合,作为每份土壤样品的总 DNA。取适量的样品于离心管中,使用无菌水稀释样品至  $1\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,以稀释后的基因组 DNA 为模板,采用 16S rRNA 基因中的 V4 高变区引物 515 F 和 806 R 鉴定细菌多样性,New England Biolabs 公司的 Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR 扩增,确保扩增效率和准确性,根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,之后通过 HiSeq 2500 PE 250 进行上机测序。下机数据采用 prinseq 去除低质量的数据(reads),然后根据下机得到的数据之间的 overlap 关系将成对的 reads 拼接成一条序列,为得到高质量的 reads,去除 tags 两端的 barcode 引物序列,去除嵌合体及其短序列等后得到 clean tags<sup>[19-20]</sup>。拼接过滤后的 clean tags 与物种注释数据库进行比对检测嵌合体序列,并最终去除其中的嵌合体序列<sup>[21]</sup>,得到最终的有效序列(effective tags)。

1.3 数据分析

利用 Uparse 软件对序列进行聚类,相似性定为 0.97,操作分类单元被认为可能接近于属。用 Qiime 软件 (Version 1.9.1)中的 blast 方法与 Unit 数据库进行物种分类、细菌丰度及多样性指数的计算、环境因子(土壤理化数据)关联分析和主成分分析(principle component analysis,PCA),使用 R 软件 (Version 2.15.3)绘制 PCA 和环境因子分析热图。采用 SPSS 19.0 对土壤理化数据进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同种植年限苜蓿地土壤养分变化

由表 1 可知,研究区 pH 为 8.5~8.7,属于碱性土壤。多重比较结果显示,随着种植年限的增加,土壤电导率、全磷和速效磷含量均无显著变化;土壤、有机碳、全氮和碱解氮含量均表现为先降低后增高的趋势,且在第 5 年达到最大,说明苜蓿地土壤养分随着种植年限的增加可能会出现一个周期性的变化规律。

2.2 不同种植年限苜蓿地土壤 OTU 水平分析

对操作分类单位(operational taxonomic units,OTU)聚类和注释结果显示,6 个样本得到的总 tag 数为 518456,其中用于构建 OTUs 并且获得注释信息的 tags 数为 483980,占总数的 95%;unclassified tags 和频数为 1 的 unique tags 是无法被聚类到 OTUs 的 tags 数目,共计 24477,各样本统计结果如表 2 所示。采用随机抽样方法抽取数据,随机抽取它们所代表物种数目(即 OTUs 数目),以抽取的测序数据量与对应的物种数来构建稀释曲线。6 个样本的稀释曲线如图 1 所示,不同种植年限苜蓿地土壤细菌丰富程度表现为  $1\text{ yr}>5\text{ yr}>4\text{ yr}>3\text{ yr}>6\text{ yr}>2\text{ yr}$ 。

表 1 不同种植年限紫花苜蓿土壤理化性状

Table 1 Soil physical and chemical properties of alfalfa with different cultivation years (mean±SD, n=3)

种植年限 Cultivation year (yr)	pH	电导率 Electrical conductivity ( $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	有机碳 Soluble organic carbon ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	全氮 Total N ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	碱解氮 Alkalyzable N ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	全磷 Total P ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	速效磷 Available P ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
1	8.67±0.04a	163.90±4.39a	18.33±0.03a	0.13±0.02b	34.36±3.21a	0.33±0.13a	11.30±1.34a
2	8.56±0.04b	168.93±23.72a	18.73±0.74a	0.15±0.03b	21.46±4.49b	0.26±0.03a	11.58±2.11a
3	8.58±0.01ab	159.37±5.11a	17.43±1.16b	0.08±0.03c	25.01±5.02b	0.24±0.04a	14.15±4.81a
4	8.58±0.04ab	167.40±11.95a	16.65±0.37b	0.08±0.03c	26.08±4.93b	0.24±0.03a	10.91±1.13a
5	8.63±0.02a	161.53±2.23a	18.00±0.64a	0.22±0.02a	34.41±1.34a	0.28±0.01a	7.89±6.76a
6	8.56±0.02b	173.67±17.81a	18.34±0.29a	0.11±0.02bc	28.64±5.06ab	0.26±0.02a	11.18±0.95a

注: 同列不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
Note: Different lowercase letters in the same column represent significant difference at the  $P<0.05$  level.

表 2 不同种植年限苜蓿地土壤 OTU 聚类 and 注释情况统计

Table 2 Statistics of soil OTU clustering and annotation in alfalfa fields with different cultivation years

样品名称 Sample name	总 Tag 数 Total tags	已注释 Tag 数 Taxon tags	未注释 Tag 数 Unclassified tags	未聚类 Tag 数 Unique tags	OTU 数 OTU numbers
1 yr	85864	80848	3	5012	5163
2 yr	86238	83146	9	3083	4637
3 yr	86975	82826	7	4142	4758
4 yr	87132	82233	6	4893	4901
5 yr	88783	84507	10	4267	4999
6 yr	83464	80420	13	3032	4425

2.3 不同种植年限苜蓿地土壤细菌组成分析

2.3.1 各样地细菌群落在门水平上的组成和相对丰度

6 个不同种植年限苜蓿地土壤样品中细菌群落相对丰度前十的细菌门分别为:变形菌门(Proteobacteria) (44%)、酸杆菌门(Acidobacteria) (13%)、拟杆菌门(Bacteroidetes) (11%)、厚壁菌门 (Firmicutes) (4%)、放线菌门 (Actinobacteria) (5%)、单胞菌门 (Gemmatimonadetes) (6%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia) (3%)、浮霉菌门 (Planctomycetes) (3%)、绿弯菌门 (Chloroflexi) (2%)和奇古菌门 (Thaumarchaeota) (0.2%),共占细菌总数的91.2%。其中变形菌门、酸杆菌门和拟杆菌门占细菌总数的 68%,说明这 3 个门的细菌为苜蓿地土壤样本中较具优势的菌群。除厚壁菌门在 6 年中有大幅度的波动变化外(相差 10 倍左右),其余菌门变化幅度都较小,1~6 年总体变化呈先升高后降低的变化趋势,这与之前土壤有机质、全氮和碱解氮变化趋势正好相反(图 2)。

2.3.2 各样地细菌群落在目水平上的组成和相对丰度

目水平上细菌群落相对丰度前十的分析结果表明,相对丰度占比由高到低分别为 unidentified\_Gammaproteobacteria (18%)、壳聚糖目(Chitinophagales) (7%)、unidentified\_Acidobacteria (6%)、梭菌目(Clostridiales) (3%)、粘球菌目(Myxococcales) (5%)、单胞菌目(Gemmatimonadales) (4%)、噬纤维菌目(Cytophagales) (4%)、假单胞菌(Rhizobiales) (3%)、鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales) (3%)、黄色单胞菌目(Xanthomonadales) (3%),共占细菌总数 56%。Unidentified\_Gammaproteobacteria 为目水平上优势菌,占了丰度前十菌群数的 27%,其余各菌所占比例较为均匀(图 3)。

2.4 不同种植年限苜蓿地土壤细菌群落多样性分析

2.4.1 多样性指数分析

不同种植年限苜蓿地土壤细菌多样性指数分析结果表明,Shannon 多样性指数、Chao1 指数和 ACE 指数在种植 1 年苜蓿地最大,分别为 10.06、5157.33 和 5261.06,其中 Shannon 多样性指数与其他各年限之间均无显著性差异,Chao1 指数与 ACE 指数表现为 1 yr 与 2 和 6 yr 间均存在显著性差异,从大到小依次为 1 yr>5 yr>4 yr>3 yr>2 yr>6 yr (表 3)。

2.5 土壤环境因子与土壤细菌群落组成相关性分析

对土壤环境因子与土壤细菌门水平下丰度进行 Spearman 相关性分析,结果表明碱解氮、全氮和有机碳与一部分细菌门类存在显著和极显著相关性。有机碳与 Candidatus\_Magasanikbacteria、Candidatus\_Yanofskybacteria 具有极显著负相关关系,与 Hydrogenedentes、Candidatus\_Peregrinibacteria、Melainabacteria 具有显著负相关关系;碱解氮与 Candidatus\_Peregrinibacteria 具有极显著负相关关系,与 Candidatus\_Yanofskybacteria、Par-

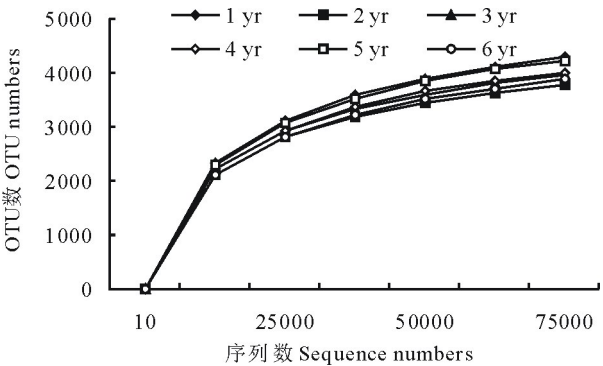


图 1 细菌稀释曲线分析

Fig. 1 Analysis of bacterial dilution curve



cubacteria 具有显著负相关关系;全氮与螺旋原虫门(Spirochaetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、无壁细菌门(Tenericutes)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)具有显著正相关关系,与浮霉菌门(Planctomycetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)具有显著负相关关系。全磷、电导率和 pH 与个别细菌门类存在显著相关性(图 4)。

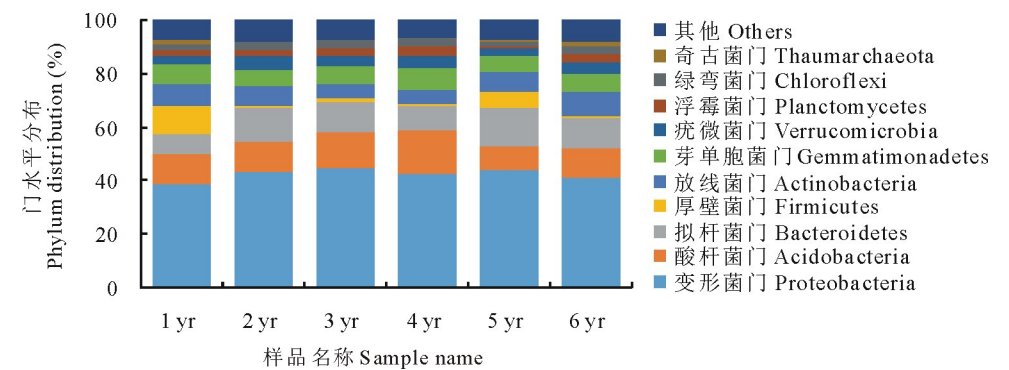


图 2 不同种植年限苜蓿地土壤细菌群落相对丰度前十的细菌门

Fig. 2 The first ten phylum of soil bacterial community in alfalfa field with different cultivation years

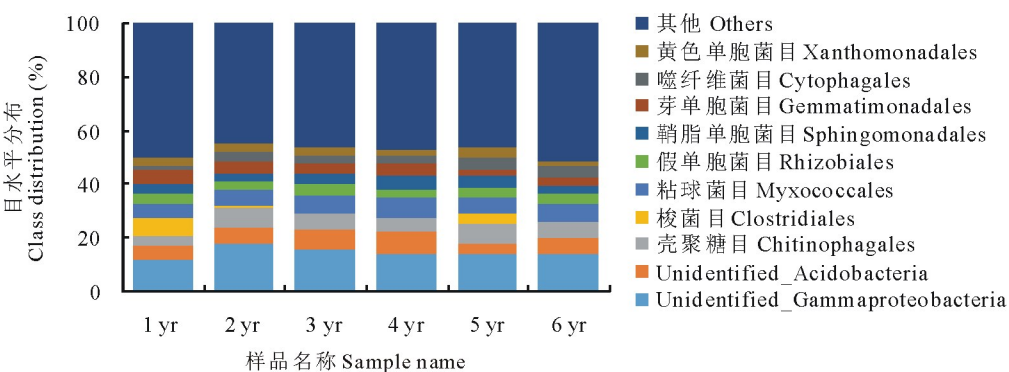


图 3 不同种植年限苜蓿地土壤细菌群落相对丰度前十的细菌目

Fig. 3 The first ten order of soil bacterial community in alfalfa field with different cultivation years

表 3 细菌多样性指数特征

Table 3 characteristics of bacterial diversity index (mean±SD, n=3)

指数 Index	1 yr	2 yr	3 yr	4 yr	5 yr	6 yr
Shannon	10.06±0.12a	9.80±0.17a	9.90±0.23a	10.01±0.04a	9.96±0.04a	9.81±0.24a
Chao1	5157.33±310.31a	4467.96±230.03b	4703.16±329.02ab	4806.30±196.09ab	5087.91±150.72a	4395.99±457.96b
ACE	5261.06±312.91a	4538.10±255.48b	4792.38±372.63ab	4885.52±194.63ab	5168.96±136.93a	4466.54±457.52b

注:同行不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
Note: Different lowercase letters in the same line indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

2.6 土壤细菌群落间的主成分分析

主成分分析是一种对多维数据进行降维,从而提取出数据中最主要的元素和结构的方法。应用 PCA 分析能够提取出最大程度反映样本间差异的两个坐标轴,从而将多维数据的差异反映在二维坐标图上。样本在图中的距离越接近,则它们的群落组成越相似。基于 OTU 水平的 PCA 分析结果表明,PC1 和 PC2 的贡献率分别为 10.63%和 9.32%。1 和 5 yr 距离较近,2 和 6 yr 距离较近,3 和 4 yr 距离较近,即这 3 组间细菌群落组成相似性较高(图 5)。

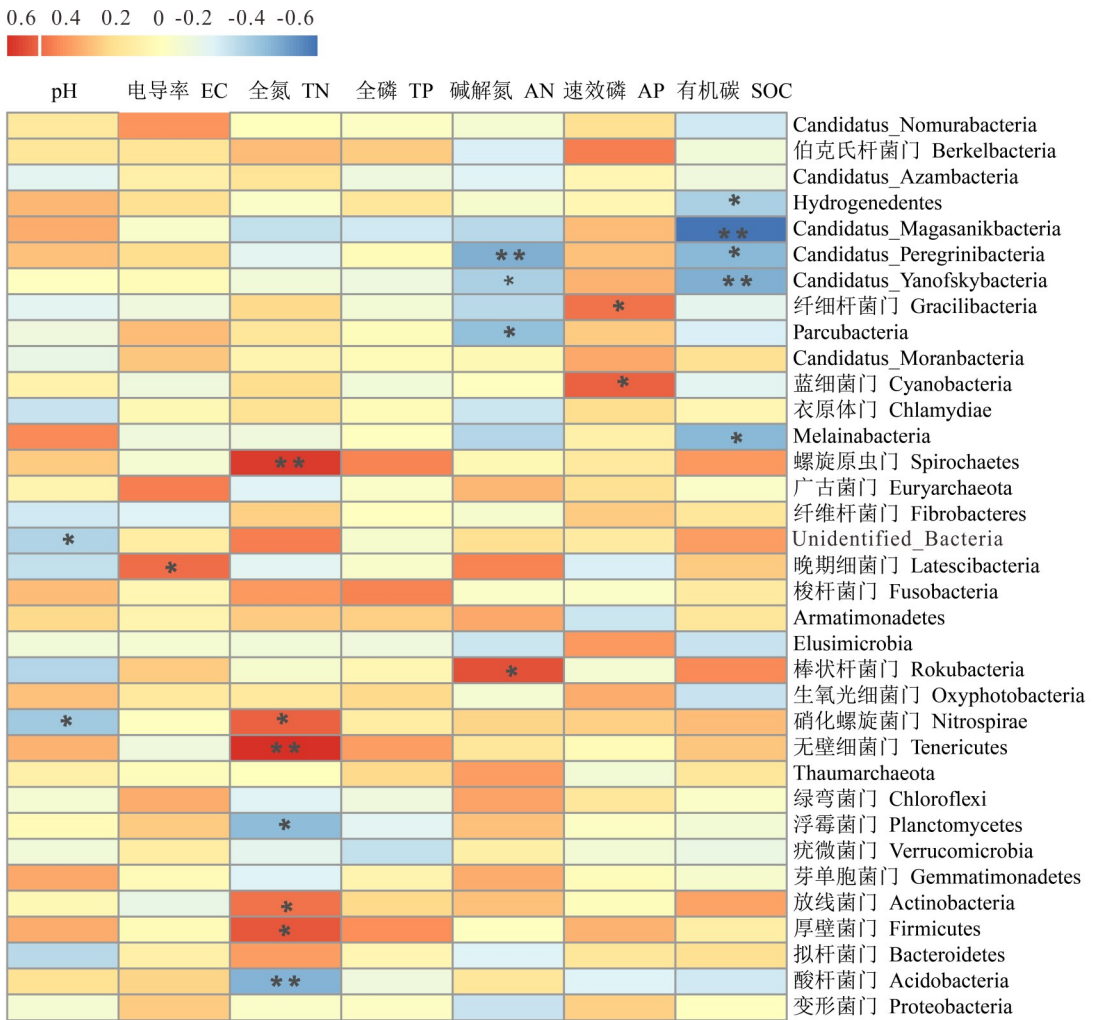


图 4 土壤环境因子与细菌门水平相关性

Fig. 4 Correlation between soil environmental factors and bacterial level

\* 表示显著相关( $P<0.05$ ), \* \* 表示及显著相关( $P<0.01$ )。\* represents significant correlation at  $P<0.05$  level, and \* \* represents significant correlation at  $P<0.01$  level.

3 讨论

通过对 6 个样本门水平下细菌群落组成和相对丰度分析发现,苜蓿地土壤中主要有 9 类细菌,分别是变形菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、芽单胞菌门、疣微菌门、浮霉菌门、绿弯菌门。其中郭丽丽等<sup>[22]</sup>研究发现疣微菌门的消失是油用风丹牡丹连作障碍形成的主要原因,而苜蓿地土壤中疣微菌门占细菌总数的 3%,且随着种植年限的增加变化较为稳定,这可能是苜蓿未出现连作障碍的主要原因。罗明等<sup>[23]</sup>研究发现芽单胞菌门在黄河三角洲地区含量较高,为 4.74%~5.69%,本研究中芽单胞菌门细菌丰度占比高达 6%,但本研究区位于干旱区,其占比高可能是因为引用黄河水灌溉的结果。另外变形菌门、放线菌门和酸杆菌门是许多土壤细菌的 3 大优势门

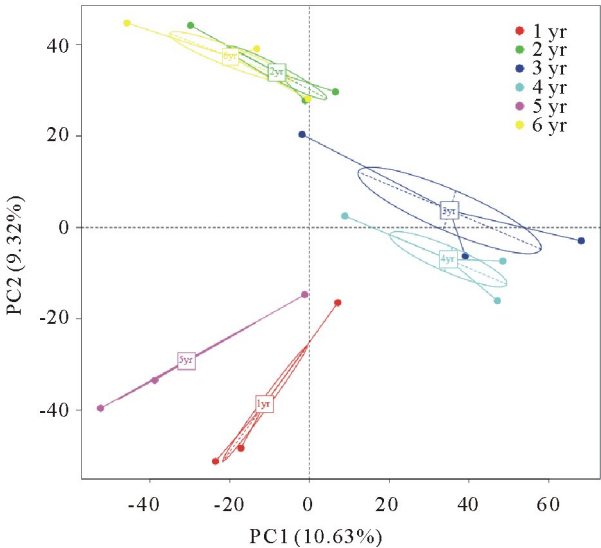


图 5 细菌群落间的主成分分析

Fig. 5 PCA analysis among bacterial communities

类<sup>[24-25]</sup>,且在本研究中发现这3大优势门类随种植年限变化呈现出较为稳定的变化趋势。

土壤中数量众多的微生物既是土壤形成过程的产物,也是土壤形成的推动者<sup>[26]</sup>,因此它参与完成土壤中各种复杂的生化反应过程<sup>[27]</sup>。Alpha多样性可分析样品内菌种类别的丰富度和菌种数目的均匀度,Alpha多样性越高,细菌种类越丰富,群落越稳定<sup>[22]</sup>。本研究结果表明,Shannon指数并无显著性变化,说明样地土壤细菌群落均匀度较高,这与细菌群落结构组成具有相同特征,可能的原因是样地为人工草场,具有相同的田间管理模式,因此细菌群落具有较好的均匀性。本研究Chao1指数和ACE指数以及物种丰度(稀释曲线)随着种植年限的递增出现先减小后增大的变化率,即说明连作会导致细菌丰富度和多样性下降,这与韩亚飞等<sup>[28]</sup>研究所得结果一致,并且在降低到一定程度又会有所回升,在第5年时达到最大值,南丽丽等<sup>[29]</sup>的研究结果支持这一结论。导致细菌群落丰富度和多样性回升的可能原因是随着种植时间的增加,土壤表面凋落物累积增多,从而导致土壤养分的回升,进而导致细菌群落丰富度和多样性增大。对各样本细菌群落间进行主成分分析表明,土壤细菌群落多样性变化可能存在一个周期性规律,但由于研究时间只有6年,对周期持续时间研究缺乏数据支持,因此具体周期变化需要后续工作进一步验证。

大量研究表明,土壤细菌多样性与土壤理化性质密切相关<sup>[30-31]</sup>。本研究将土壤理化指标与门水平下细菌组成进行Spearman相关性分析得到,有机碳与5类细菌呈显著负相关关系,与其中两类呈极显著负相关关系,Liu等<sup>[32]</sup>发现中国东北黑土的细菌多样性和有机碳呈负相关关系,Sul等<sup>[33]</sup>研究发现,有机碳含量低可能是导致微生物多样性低的原因。硝化螺旋菌门参与土壤硝化<sup>[34]</sup>,本研究发现硝化螺旋菌门与土壤全氮具有显著相关性。同时,紫花苜蓿共生固氮菌及其固氮能力的研究是土壤微生物学中的一个重要组成部分。在种植第二年的时候土壤碱解氮含量降到最低,可能原因是在生长前期,紫花苜蓿需从土壤中吸收大量的氮素<sup>[35]</sup>。随着种植年限的增加土壤氮素含量又呈现缓慢上升趋势,这与豆科植物的固氮作用有很大关系,因此看来在一定阈值内,紫花苜蓿种植年限越长对土壤的改良效果越好;全氮、碱解氮也有不同程度增加,这与有关研究结论一致<sup>[36-37]</sup>。综合来看,土壤理化性质与土壤细菌之间确实存在一种互相反馈机制,且种植年限为5年时紫花苜蓿土壤养分和微生物环境同时达到最佳水平,但这种现象会呈周期性循环还是5年以后会持续下降需要进一步研究。

#### 4 结论

变形菌门、酸杆菌门、拟杆菌门和放线菌门是不同种植年限苜蓿地土壤优势菌群,酸杆菌门与土壤全氮具有极显著正相关关系,放线菌门与土壤全氮具有显著正相关关系;Shannon指数随着种植年限增加无显著性变化,种植时间为1~6年的紫花苜蓿地土壤细菌多样性组成相似性高,且群落优势菌群不受种植时间的影响;土壤养分和土壤细菌群落组成及丰度都在种植5年时达到最大,土壤有机碳、碱解氮、全氮是影响细菌群落组成的主要环境因子。

#### 参考文献 References:

- [1] Liu L, Xu M K, Wang S L, *et al.* Effect of different *Cunninghamia lanceolata* plantation soil qualities on soil microbial community structure. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(15): 4692—4706.  
刘丽, 徐明恺, 汪思龙, 等. 杉木人工林土壤质量演变过程中土壤微生物群落结构变化. *生态学报*, 2013, 33(15): 4692—4706.
- [2] Schnitzer S A, Klironomos J N, Hille R L J, *et al.* Soil microbes drive the classic plant diversity—productivity pattern. *Ecology*, 2011, 92(2): 296—303.
- [3] Schneider T, Keiblinger K M, Schmid E, *et al.* Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2012, 6(9): 1749—1762.
- [4] Meng F Q, Qiao Y H, Wu W L, *et al.* Environmental impacts and production performances of organic agriculture in China: A monetary valuation. *Journal of Environmental Management*, 2017, 188: 49—57.
- [5] Bardgett R D, van der Putten W H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 2014, 515(7528): 505—511.
- [6] He Z, Van Nostrand J D, Deng Y, *et al.* Development and applications of functional gene microarrays in the analysis of the functional diversity, composition, and structure of microbial communities. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*

- in China, 2011, 5(1): 1—20.
- [7] Yu P F, Wang Y, Ge Q Y. High-fluxed DNA sequencing technology and its application development. Journal of Nanjing Xiaozhuang University, 2010, 26(3): 1—5.  
于聘飞, 王英, 葛芹玉. 高通量 DNA 测序技术及其应用进展. 南京晓庄学院学报, 2010, 26(3): 1—5.
- [8] Zhang X J, Chen X Q, Liu H B, *et al.* Preliminary study on nitrogen and phosphorus loss in Yellow River irrigated paddy field of Ningxia. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(5): 1202—1209.  
张学军, 陈晓群, 刘宏斌, 等. 宁夏引黄灌区稻田氮磷流失特征初探. 生态环境学报, 2010, 19(5): 1202—1209.
- [9] Wang Y Q, Bai Y R, Zhan X L, *et al.* Spatial variability of soil nutrients at different sampling scales in farmland in the Yellow River irrigated area in Ningxia. Arid Zone Research, 2014, 31(2): 209—215.  
王幼奇, 白一茹, 展秀丽, 等. 在不同尺度下宁夏引黄灌区农田土壤养分空间变异分析. 干旱区研究, 2014, 31(2): 209—215.
- [10] Fu B Z, Gao X Q, Zhang R, *et al.* Comparison of different alfalfa cultivars in the Yellow River irrigation region of Ningxia. Journal of Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology (Natural Science Edition), 2017, 45(2): 71—78.  
伏兵哲, 高雪芹, 张蓉, 等. 宁夏引黄灌区不同紫花苜蓿品种比较. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(2): 71—78.
- [11] Yang H S, Cao M J, Fan F, *et al.* Effects of the number of growth years of alfalfa on the physical and chemical properties of soil. Chinese Journal of Grassland, 2006, (6): 29—32.  
杨恒山, 曹敏建, 范富, 等. 紫花苜蓿生长年限对土壤理化性状的影响. 中国草地学报, 2006, (6): 29—32.
- [12] Hu F C. Initial research report on soil fertility improvement by planting *Medicago sativa*. Pratacultural Science, 2005, 22(8): 47—49.  
胡发成. 种植苜蓿改良培肥地力的研究初报. 草业科学, 2005, 22(8): 47—49.
- [13] Ren J Z. Main forage cultivation and seed production. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1986: 1—3.  
任继周. 主要牧草栽培及种子生产. 成都: 四川科学技术出版社, 1986: 1—3.
- [14] Zhang C X, Hao M D, Wang X G, *et al.* Study on soil nitrogen and fertility distribution characteristics in alfalfa field in gully region of the Loess Plateau. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2004, (6): 1107—1111.  
张春霞, 郝明德, 王旭刚, 等. 黄土高原地区紫花苜蓿生长过程中土壤养分的变化规律. 西北植物学报, 2004, (6): 1107—1111.
- [15] Xu L J, Wang B, Xin X P. Soil nutrient and microbial characteristics associated alfalfa cultivated grassland. Acta Agrestia Sinica, 2011, 19(3): 406—411.  
徐丽君, 王波, 辛晓平. 紫花苜蓿人工草地土壤养分及土壤微生物特性. 草地学报, 2011, 19(3): 406—411.
- [16] Huang Z, Liu Y, Cui Z, *et al.* Soil water storage deficit of alfalfa (*Medicago sativa*) grasslands along ages in arid area (China). Field Crops Research, 2018, 221: 1—6.
- [17] Bao S D. Soil agrochemical analysis. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2000: 30—42.  
鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000: 30—42.
- [18] Liu B R. Experimental technology of soil bacterial diversity based on PCR—DGGE and 16S rDNA. Research of Agricultural Science, 2014, 35(3): 34—38.  
刘秉儒. 基于 PCR—DGGE 和 16S rDNA 克隆技术研究土壤细菌多样性的实验技术. 农业科学研究, 2014, 35(3): 34—38.
- [19] Jiao S, Liu Z, Liu Y, *et al.* Bacterial communities in oil contaminated soils: Biogeography and co-occurrence patterns. Soil Biology & Biochemistry, 2016, (98): 64—73.
- [20] Qin J, Li Y, Cai Z, *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature, 2012, 490(7418): 55—60.
- [21] Haas B J. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. Genome Research, 2011, 21(3): 494—504.
- [22] Guo L L, Yin W L, Guo D L, *et al.* Variations of bacterial biodiversity in rhizosphere soils of oil tree peony cropping continuously for different years. Scientia Silvae Sinicae, 2017, 53(11): 131—141.  
郭丽丽, 尹伟伦, 郭大龙, 等. 油用风丹牡丹不同种植时间根际细菌群落多样性变化. 林业科学, 2017, 53(11): 131—141.
- [23] Luo M, Han J, Jiang P A, *et al.* Diversity of culturable halophilic bacteria isolated from Lop Nur region in Xinjiang. Biodiversity Science, 2009, 17(3): 288—295.  
罗明, 韩剑, 蒋平安, 等. 新疆罗布泊地区可培养嗜盐细菌多样性. 生物多样性, 2009, 17(3): 288—295.
- [24] Bissett A, Richardson A E, Baker G, *et al.* Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. Applied Soil Ecology, 2011, (51): 66—78.



- [25] Lauber C L, Hamady M, Knight R, *et al.* Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5111–5120.
- [26] Chen H K. Soil microbiology. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1981.  
陈华葵. 土壤微生物学. 上海: 上海科学技术出版社, 1981.
- [27] Li Y M, Hu J C, Wang S L, *et al.* Function and application of soil microorganisms in forest ecosystem. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, (10): 1943–1946.  
李延茂, 胡江春, 汪思龙, 等. 森林生态系统中土壤微生物的作用与应用. *应用生态学报*, 2004, (10): 1943–1946.
- [28] Han Y F, Yi W H, Wang W B, *et al.* Soil bacteria diversity in continuous cropping poplar plantation by high throughput sequencing. *Journal of Shandong University (Science Edition)*, 2014, 49(5): 1–6.  
韩亚飞, 伊文慧, 王文波, 等. 基于高通量测序技术的连作杨树人工林土壤细菌多样性研. *山东大学学报(理学版)*, 2014, 49(5): 1–6.
- [29] Nan L L, Shi S L, Yu J H. Soil microbial properties in alfalfa field with different growing years in arid desert oasis. *Acta Agrestia Sinica*, 2016, 24(5): 975–980.  
南丽丽, 师尚礼, 郁继华. 荒漠灌区不同种植年限苜蓿草地土壤微生物特性. *草地学报*, 2016, 24(5): 975–980.
- [30] Sui X, Zhang R T, Zhong H X, *et al.* Study on the bacterial diversity in the soil of launzhang wetland in Sanjiang Plain by high flux sequencing. *Soils*, 2015, 47(5): 919–925.  
隋心, 张荣涛, 钟海秀, 等. 利用高通量测序对三江平原小叶章湿地土壤细菌多样性的研究. *土壤*, 2015, 47(5): 919–925.
- [31] Yang J, Zhou G Y, Tian Y Y, *et al.* Differential analysis of soil bacteria diversity in different mixed forests of *Dalbergia odorifera*. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(24): 8117–8127.  
杨菁, 周国英, 田媛媛, 等. 降香黄檀不同混交林土壤细菌多样性差异分析. *生态学报*, 2015, 35(24): 8117–8127.
- [32] Liu J, Sui Y, Yu Z, *et al.* High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 70: 113–122.
- [33] Sul W J, Asuming-Brempong S, Wang Q, *et al.* Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 65: 33–38.
- [34] Baker B J, Sheik C S, Taylor C A, *et al.* Community transcriptomic assembly reveals microbes that contribute to deep-sea carbon and nitrogen cycling. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2013, 7(10): 1962–1973.
- [35] Heichel G H, Barnes D K, Vance Lucerne C P. Nitrogen fixation of alfalfa in the seeding year 1. *Crop Science*, 1981, 21(2): 330–335.
- [36] Yang Y H, Jiang P A. Studies on soil properties of with different cultivating ages. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2005, 19(2): 110–113.  
杨玉海, 蒋平安. 不同种植年限苜蓿地土壤理化特性研究. *水土保持学报*, 2005, 19(2): 110–113.
- [37] Liu E B. Experimental study on improving soil fertility of loess slope by planting alfalfa. *Shaanxi Agricultural Science*, 2007, (4): 60–62.  
刘恩斌. 种植紫花苜蓿提高黄土坡地土壤肥力试验研究. *陕西农业科学*, 2007, (4): 60–62.