

葡萄废果酵素肥对葡萄园土壤细菌多样性的影响

赵 峥, 褚长彬*, 周德平, 王庆峰, 吴淑杭*

(上海市农业科学院生态环境保护研究所, 上海 201403)

摘 要:【目的】将葡萄废果进行厌氧发酵制成酵素液肥并在葡萄园中进行回田施用,探索葡萄废果酵素肥对土壤微生物多样性和土壤生态健康的潜在影响。【方法】采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术,评价葡萄废果酵素肥的施用对土壤细菌多样性和群落结构特征的影响。【结果】施用葡萄废果酵素肥后土壤微生物多样性 Chao1 指数和 ACE 指数,以及 OTU 总数均出现了显著降低;与常规施肥处理相比,土壤细菌群落结构组成在门水平和属水平均产生了显著差异;施用葡萄废果酵素肥后,土壤微生物优势种群分布规律发生了显著变化,在某些与氮循环相关的菌属如硝化菌属 *Nitrobacter* 和中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium* 中具有明显丰度优势。【结论】施用葡萄废果酵素液肥会显著影响葡萄园土壤细菌多样性和群落结构特征,研究结果为葡萄废果酵素肥的推广应用和土壤风险评估提供了科学依据。

关键词: 葡萄废果; 酵素肥; 循环利用; 微生物多样性; 高通量测序

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)08-1207-11

Effects of ferment fertilizer from waste grape berry on soil bacterial diversity in vineyards

ZHAO Zheng, CHU Changbin*, ZHOU Deping, WANG Qingfeng, WU Shuhang*

(Eco-environmental Protection Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Abstract: 【Objective】Due to diseases and pests, climate conditions and management practices, a certain amount of waste grape is produced in the vineyards every year. The disposal of the waste berry has always been one of the problems besetting the farmers, which seriously restricted the clean and efficient production of large-scale vineyards. Producing ferment fertilizer with waste grape is an effective way to solve the problem. Many studies have shown that the application of ferment fertilizer can promote the decomposition and utilization of soil nutrients and improve yield and quality of crops. However, the effects of the application of ferment fertilizer on soil microbial diversity remain unclear. The objective of this study is to evaluate the effects of application of ferment fertilizer from waste grape berry on soil microbial diversity and community structure characteristics in vineyards. 【Methods】Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology was adopted to evaluate the impact of the application of ferment fertilizer made from waste grape on soil microbial diversity and community structure characteristics. CK indicates the grapevines that were applied with traditional fertilizer, while F treatment indicates the grapevines that were applied with ferment fertilizer. Total bacterial genomic DNA from soil samples of CK and F were extracted using the Fast DNA SPIN extraction kits (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to further analysis. PCR amplification of V3 - V4 region of the bacterial 16S rRNA genes was performed using the forward primer 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') and the reverse primer 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Thermal cycles consisted of initial denaturation at $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, followed by 25 cycles consisting of denaturation at $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ for

收稿日期: 2019-12-08 接受日期: 2020-05-08

基金项目: 上海市市级农口系统青年人才成长计划(沪农青字 2017 第 1-20 号)

作者简介: 赵峥, 男, 博士, 研究方向为土壤生态健康。Tel: 18917061047, E-mail: zhaozheng21@foxmail.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 18918162298, E-mail: wushuhang88@163.com; Tel: 13564258845, E-mail: davidchu_123@sohu.com

15 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s, with a final extension of 5 min at 72 °C. PCR amplicons were purified with Agencourt AMPure Beads (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) and quantified using the PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and then sequencing was performed using the Illumina MiSeq platform with MiSeq Reagent Kit v3 at Shanghai Personal Biotechnology Co., Ltd (Shanghai, China). **【Results】**A total of 568 608 sequences were obtained by Illumina MiSeq sequencing, among which 99 757 sequences were obtained in CK and 89 779 sequences were obtained in F. Alpha diversity index showed that the Chao1 and ACE index were significantly lower in F than in CK, which indicated that the richness of soil bacteria community was significantly decreased by application of grape waste ferment fertilizer. The Venn analysis showed that the CK and F shared 4 235 OTUs, while CK had 1 271 unique OTUs and F had 1 034 unique OTUs. The community structure composition on phylum level showed that the top 5 phyla in abundance in CK were *Proteobacteria* (24.67%), *Chloroflexi* (22.10%), *Actinobacteria* (16.23%), *Acidobacteria* (14.98%) and *Gemmatimonadetes* (4.29%), while the most abundant 5 phyla in F were *Proteobacteria* (29.73%), *Chloroflexi* (17.87%), *Actinobacteria* (16.62%), *Acidobacteria* (13.52%) and *Gemmatimonadetes* (4.54%). The phylum community structure composition was similar between CK and F. However, the abundance distribution was significantly different. The community structure composition on genus level indicated that the top 5 abundant genus in CK were *Haliangium* (1.96%), *RB41* (1.46%), *Roseiflexus* (1.41%), *Streptomyces* (1.14%) and 11-24 (1.07%), while the 5 most abundant genus in F were *Azotobacter* (4.03%), *Haliangium* (1.81%), *RB41* (1.87%), *Roseiflexus* (1.62%) and *Streptomyces* (1.31%). Significant differences were observed in both community structure composition and abundance distribution between CK and F on genus level. The heatmap analysis on the top 50 genus showed that CK1, CK2 and CK3 samples had high community structure similarity and clustered into one group. F2 and F3 samples clustered into one group with high similarity, and then clustered together with the CK group. F1 samples showed significant difference with other samples. NMDS and PLS-DA analyses were used to group the experimental samples and evaluate the similarity of community structure among different samples. The results indicated that the CK and F groups can be better distinguished according to NMDS2 and PLS-DA1 factors. Metastats analysis was adopted to identify the dominant species in different groups. The results showed that 3 phyla and 63 genera were different between CK and F. Phyla *BRC1* and *Planctomycetes* were enriched in CK, while phylum *Ignavibacteriae* was enriched in F. Among the top 20 different genera, 15 genera were enriched in CK and 5 genera enriched in F. **【Conclusion】**Application of the ferment fertilizer from waste grape showed clear effects on soil microbial diversity and community structure characteristics. Significant differences on phylum and genus levels were observed between CK and F groups. The Chao1 and ACE index indicated that application of this fertilizer is effective to reduce the soil microbial diversity in vineyard. It also promotes some microbial populations, such as *Nitrobacter* and *Mesorhizobium*, which plays a very important role in nitrogen cycle.

Key words: Waste grape; Enzyme fertilizer; Recycling; Microbial diversity; High-throughput sequencing

葡萄坏果、烂果的处置问题一直是困扰果农的生产难题之一,严重制约了规模化葡萄园的清洁高效生产。由于受病虫害、气候条件以及管理措施的影响,葡萄园中每年都会产生一定量的葡萄废果,以上海郊区的规模化葡萄园为例,某些葡萄园中废

果率可超过 30%^[1]。葡萄废果问题不仅给果农造成了严重的经济损失,同时,废果的随意弃置也极易滋生病原菌,从而导致葡萄病害的发生和传播,严重威胁葡萄园的生产环境^[2]。目前,将果蔬废弃物进行厌氧发酵制成液体肥料是实现其资源化循环

利用的有效手段之一。诸多研究表明,将果蔬废弃物发酵液作为肥料回施到土壤中,对土壤养分的分解利用、作物的产量和品质均有良好的促进作用^[3-4]。然而,施用葡萄废果发酵液对土壤微生物多样性和群落结构特征的影响还鲜有报道。

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,在土壤物质循环及各类反应过程中扮演着重要角色,如土壤有机质分解、硝化作用、反硝化作用、土壤结构稳定与功能维持、土壤腐殖质和团粒结构的形成,以及 C、N、P、S 等养分的迁移转化等^[5-6]。因此,土壤微生物多样性与群落结构特征也是衡量土壤质量和土壤生态健康的重要指标^[7-8]。土壤微生物多样性是指土壤生态系统中所有的微生物种类、微生物拥有的基因以及这些微生物与环境之间相互作用的多样化程度^[9]。土壤微生物多样性和群落结构特征对生存环境十分敏感,能够迅速对农业管理措施的变化做出反应,可以用来衡量土壤肥力的高低、物质代谢的旺盛程度以及土壤健康状况等,是评价土壤质量和农业生态系统结构功能稳定性的重要指标^[10-12]。近年来,随着 PCR、DGGE、real-time qPCR 以及高通量深度测序等分子生物学技术的发展,为土壤微生物多样性和群落结构特征的研究提供了可能^[13-15]。诸多研究表明不同肥料种类、不同施肥时间和不同施肥方式等因素均会显著影响土壤微生物多样性和群落结构特征^[16-18]。施肥是重要的农田管理措施,同时也是影响土壤微生物多样性和群落结构特征的关键因素^[19-20]。长期施用氮肥会显著影响固氮菌、氨氧化菌等氮循环菌群的群落结构特征^[21];而磷肥施用会影响土壤微生物的种群数量、活力、群落结构组成、以及某些特异性细菌和真菌的丰度^[22-23];不同有机肥种类能够显著改变土壤微生物多样性和群落结构特征,同时,有机肥的施用也能够提高土壤微生物量和代谢活性^[24-26]。目前,有关土壤微生物多样性的研究主要集中于传统施肥手段,而对于新型农业生产技术如果蔬废弃物酵素肥的施用对土壤微生物影响的研究还报道较少。因此,探讨葡萄废果酵素肥的施用对土壤微生物多样性及群落结构特征的影响很有必要,这对葡萄废果资源化循环利用技术的推广应用具有重要意义。

目前,施用葡萄废果酵素肥对土壤微生物的影响并不明确。本研究针对葡萄废果酵素肥在土壤

中的资源化循环利用问题,采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术,以土壤微生物多样性和群落结构特征为评价指标,分析葡萄废果酵素肥的施用对葡萄园土壤生态健康的影响,以期为葡萄废果酵素肥的推广应用和土壤风险评估提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验地概况

实验地位于上海市农业科学院金山果树试验站内,该试验站建于 2004 年,位于上海市金山区廊下镇中华村,占地面积约 13.33 公顷,主要以葡萄栽培为主,其中葡萄总栽培面积约为 6.67 公顷,栽培品种主要以‘巨峰’‘醉金香’和‘夏黑’等欧美杂交系品种为主,也是上海地区葡萄的主食品种。该试验站自建站以来开始进行葡萄栽培的研究和生产工作,农业管理措施主要参照当地果农的操作习惯,对上海郊区葡萄设施栽培和生产具有良好的代表性。本研究中的葡萄废果酵素肥施用效果实验在 2017 年葡萄生长季进行,实验选择的葡萄品种为‘巨峰’,树龄 8 a(年)。

1.2 实验设计

实验共设两个处理,分别为常规施肥的对照组 CK 和施用酵素的实验组 F,每个处理 3 次重复(即 3 个大棚,每个棚面积约为 240 m²)。两处理的施肥方案均参照当地果农的管理习惯,其中,除基肥中有机肥施用量相同以外,实验组 F 的化肥施用量均比对照组 CK 减量 25%,具体施肥方案如表 1 所示。而实验组 F 增施葡萄废果酵素肥,酵素肥的施用方法为自施用萌芽肥开始每两周施用 1 次,施用时考虑到酵素肥的 pH 较低,将酵素肥原液稀释 20 倍后均匀施到葡萄根部周围 1 m 范围内,每次施肥每棵葡萄藤施用 5 L 酵素肥(即 250 mL 酵素肥原液),直至葡萄成熟采摘。2017 年葡萄生长季实验组 F 总计施用酵素肥 8 次,即每棵葡萄藤施用酵素肥原液 2 L。

1.3 葡萄废果酵素肥制备

采用上一生长季葡萄园中采集的葡萄废果制备葡萄废果酵素肥,即本实验中施用的葡萄废果酵素肥为 2016 季葡萄废果制得。制备的基本方法为:将采集的葡萄废果带回实验室去除垃圾杂物后洗净,人工捏碎后取 15 kg 放入 50 L 发酵桶,加入 5 kg 红糖作为碳源(红糖能较好的启动发酵,同时

表1 葡萄废果酵素肥施肥方案

Table 1 Fertilization scheme of waste grape ferment fertilizer

(kg per 666.7m²)

处理 Treatment	基肥 Basal fertilizer		萌芽肥 Bud fertilizer	坐果肥 Boron fertilizer		着色肥 Coloring fertilizer	
	有机肥 Organic manure	P肥 Phosphorus fertilizer	复合肥 Compound fertilizer	复合肥 Compound fertilizer	尿素 Urea	复合肥 Compound fertilizer	K肥 Potassium fertilizer
CK	1 500	20	20	10.0	10.0	10.0	20
F	1 500	15	15	7.5	7.5	7.5	15

注:有机肥为上海市政府补贴的商品有机肥,含氮量 1.2%;P 肥施用过磷酸钙;K 肥施用硫酸钾;复合肥 N、P、K 比例为 15:15:15;尿素含氮量 46%。

Note: The nitrogen content of Organic fertilizer is 1.2%, which was subsidized by Shanghai municipal government. The P fertilizer use superphosphate. The K fertilizer use potassium sulfate. The ratio of N, P and K in chemical compound fertilizer is 15:15:15. The nitrogen fraction in Urea is 46%.

成本较低、性价比高),加入 3 L 发酵接种液(接种液为葡萄园废果堆积点分离的酵母菌、霉菌和乳酸杆菌的培养液各 1 L),然后加入蒸馏水至 50 L,即葡萄废果、红糖和发酵液的比例为 3:1:10。盖紧发酵桶盖后在室温下进行自然发酵,发酵桶盖开有单向排气孔用于发酵过程中产生的气体排放。发酵过程中监测发酵液的 pH 和 EC 值动态变化,当 pH 和 EC 值稳定不再变化时即可认为发酵结束(时间约为 3 个月),之后将发酵液在室温下保存待用。本研究中施用的葡萄废果酵素肥原液中所含的主要成分如表 2 所示。其中,游离氨基酸采用全自动氨基酸分析仪测定(上海交通大学,分析测试中心);主要阴阳离子采用离子色谱分析测定(上海

交通大学,分析测试中心),总酸采用酸碱滴定法测定;总酚采用福林酚法测定;有效氮采用国标法进行测定。

1.4 土壤 DNA 提取与 PCR 扩增

土壤样品在葡萄成熟采摘后 7 d 内进行采集,每个葡萄棚随机选取 10 棵葡萄藤在根部周围 1 m 范围内(即酵素肥施肥区)采集 10 个样点形成一个混合样,采样深度为 20 cm,样品采集后用保温箱低温保存带回实验室以待后续实验。土壤样品的总 DNA 抽提根据 E.Z.N.A.® soil 试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行,DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop2000 进行检测,利用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量,同时采用紫外分光

表2 葡萄废果酵素肥原液主要成分

Table 2 Major components of the ferment fertilizer from waste grape

pH	EC/ (mS·cm ⁻¹)	ρ (游离氨基酸) Free amino acids/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	w(总酸) Total acids/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	ρ (总酚) Total phenols/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	ρ (有效氮) Available N/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{NH}_4^+)/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{NO}_3^-)/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{PO}_4^{3-})/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{K}^+)/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{Ca}^{2+})/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{Mg}^{2+})/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
4.03	3.37	395.7	94.7	433.1	124.2	17.6	29.6	195.1	1086.1	107.6	50.8

光度计对 DNA 进行定量。土壤细菌的扩增引物为 338F (5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG- 3') 和 806R (5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),扩增区域为 V3-V4 可变区,扩增体系为 20 μL ,扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,27 个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s),最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min(PCR 仪:ABI GeneAmp® 9700 型)。PCR 扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目标片段进行切胶回收,回收采用 AXYGEN 公司的凝胶回收试剂盒。

1.5 高通量测序

样品的深度测序工作委托上海派森诺生物科技股份有限公司进行,测序平台为 Illumina

MiSeq。首先制备测序文库并对其进行质检,然后使用 MiSeq 测序仪(Illumina, San Diego, USA)进行 2 \times 300 bp 的双端测序(Paired-end)。原始下机数据根据序列质量进行初步筛查,运用 QIIME 软件(Quantitative Insights Into Microbial Ecology, v1.8.0)识别疑问序列,除了要求序列长度 \geq 150 bp,且不允许存在模糊碱基 N 之外,还将剔除 5' 端引物错配碱基数 $>$ 1 的序列和含有连续相同碱基数 $>$ 8 的序列。同时,通过 QIIME 软件调用 USEARCH 检查并剔除嵌合体序列。随后,使用 QIIME 软件调用 UCLUST 这一序列比对工具(Edgar, 2010),对前述获得的序列按 97%的序列相似度进行归并和 OTU 划分(Operational Taxonomic Units,可操作分类单

元),并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列,根据每个 OTU 在每个样本中所包含的序列数,构建 OTU 在各样本中丰度的矩阵文件(即 OTU table)。对于每个 OTU 的代表序列,在 QIIME 软件中使用默认参数,通过将 OTU 代表序列与对应数据库(Greengenes, Release 13.8)的模板序列相比对,获取每个 OTU 所对应的分类学信息,以备后续分析使用。

1.6 数据分析

本研究中 Alpha 多样性指数采用 QIIME 软件进行计算,包括 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数。不同分组多样性指数间的显著性差异检验采用 SPSS 23 软件的单因素 ANOVA 进行。Chao1 指数和 ACE 指数侧重于体现群落的丰富度,而 Shannon 指数和 Simpson 指数则综合考虑群落的丰富度和均匀度。Venn 图使用 R 软件根据 OTU 丰度矩阵进行绘制,直观地呈现各样本组之间所共有和独有 OTU 数量。微生物群落结构 Bar 图使用 QIIME 软件绘制,用以呈现不同分类水平土壤微生物的群落结构组成和丰度分布。结合聚类分析的群落组成 Heatmap 图使用 R 软件绘制,通过聚类可以将高丰度和低丰度的分类单元加以区分,并以颜色梯度反映样本之间的群落组成相似度。Beta 多样性分析使用 QIIME 软件和 R 软件进行,主要包括层级聚类分析(Hierarchical clustering)、非度量多维尺度分析(NMDS)和偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),用以考察不同样本(组)之间群落结构的相似性。Metastats 分析使用 Mothur 软件进行,对门和属水平的各个分类单元在样本(组)之间的序列量(即绝对丰度)差异进行两两比较检验,以此识别不同样本(组)之间存在显著性差异的物种,分析结果以小提琴图结合箱线图的形式展示。此外,葡萄采摘后对葡萄的产量和品质进行分析,用以评价施用酵素肥对‘巨峰’葡萄产量和品质的影响。其中,葡萄产量为人工测产,葡萄果实 Vc 含量采用抗坏血酸法测定,可溶性固形物含量采用糖度仪(日本, ATAGO)测定。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物多样性指数分析

采用 Illumina MiSeq 深度测序技术共获得 568 608 条序列,其中对照组 CK 平均获得 99 757

条序列,施用葡萄废果酵素肥的实验组 F 平均获得 89 779 条序列。将获得的序列按 97%的相似度进行归并和 OTU 划分建立 OTU table,基于 OTU table 采用 QIIME 软件计算 Alpha 多样性指数,结果如表 3 所示。分析结果显示,实验组 F 的丰富度指数 Chao1 和 ACE 显著低于对照组 CK,这表明施用葡萄废果酵素的土壤细菌群落丰富度出现了显著降低;而兼顾群落丰富度和均匀度的多样性指数 Shannon 和 Simpson 虽然实验组 F 仍然低于对照组 CK,但二者之间没有统计学意义上的显著性差异。

表3 土壤细菌 Alpha 多样性指数比较

Table 3 Comparison of soil bacterial Alpha diversity index

处理 Treatment	多样性指数 Diversity index			
	Chao1	ACE	Shannon	Simpson
CK	4 294.70	4 449.52	10.20	0.997 7
F	3 516.72*	3 545.92*	9.86	0.994 4

注:*表示在 $p < 0.05$ 水平具有统计学意义的显著性差异。

Note: *indicate significant difference at $p < 0.05$.

2.2 土壤微生物群落结构组成分析

基于 OTU table 的 Venn 图分析如图 1 所示,结果显示对照组 CK 和实验组 F 共有的 OTU 数为 4 235 个,而 CK 和 F 组独有的 OTU 数分别为 1 271 和 1 034 个,施用葡萄废果酵素肥的实验组 F 土壤细菌的 OTU 数出现明显降低,这与 Alpha 多样性指数分析结果一致。门水平(A)和属水平(B)的群落结构组成和丰度分布如图 2 所示,图中显示了丰度水平在前 20 位的物种。其中,对照组 CK 丰度水平前 5 的菌门为变形菌门 Proteobacteria(24.67%)、绿弯菌门 Chloroflexi(22.10%)、放线菌门 Actinobacteria(16.23%)、酸杆菌门 Acidobacteria(14.98%)和芽单胞菌门 Gemmatimonadetes(4.29%);而实验组 F 丰

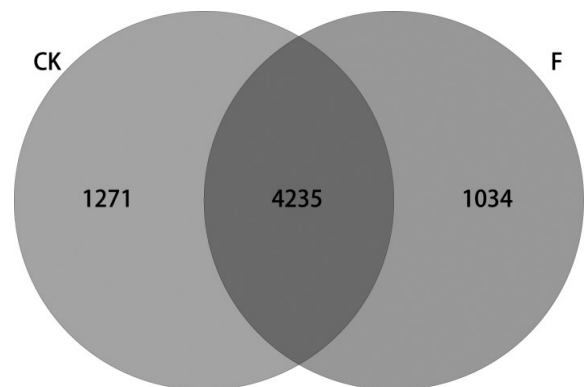


图1 OTU水平的Venn图分析

Fig. 1 Venn analysis on OTU level

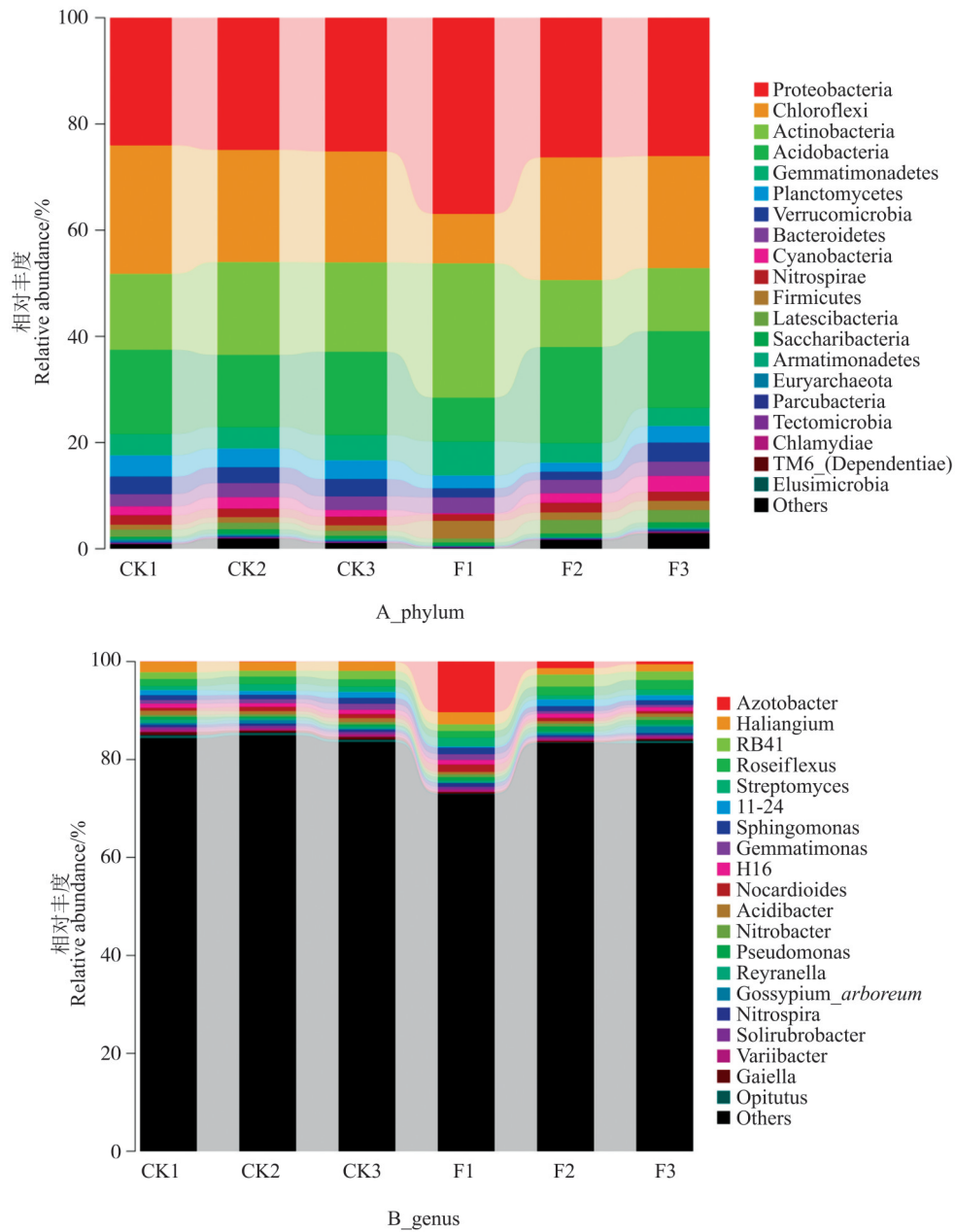


图2 门水平(A)和属水平(B)群落结构组成丰度分布图

Fig. 2 Abundance distribution map of community structure composition on phylum level (A) and genus level (B)

度水平前5的菌门也为变形菌门 Proteobacteria (29.73%)、绿弯菌门 Chloroflexi (17.87%)、放线菌门 Actinobacteria (16.62%)、酸杆菌门 Acidobacteria (13.52%) 和芽单胞菌门 Gemmatimonadetes (4.54%)，两组之间虽然主要菌门的群落结构组成相似，但各菌门丰度水平差异明显。而在属分类学水平，对照组 CK 丰度水平前5的菌属分别为粘球菌目的 Haliangium 菌属 (1.96%)、酸杆菌门的 RB41 菌属 (1.46%)、玫瑰湾菌属 Roseiflexus (1.41%)、链霉菌属 Streptomyces (1.14%) 和酸杆菌门的 11-24 菌属 (1.07%)；而实验组 F 丰度水平前5的菌属则为固氮

菌属 Azotobacter (4.03%)、粘球菌目的 Haliangium 菌属 (1.81%)、酸杆菌门的 RB41 菌属 (1.87%)、玫瑰湾菌属 Roseiflexus (1.62%) 和链霉菌属 Streptomyces (1.31%)，二者的群落结构组成和丰度分布均产生了显著差异。值得注意的是对照组 CK 的固氮菌属 Azotobacter 丰度水平仅为 0.02%，与施用葡萄废物酵素肥的实验组 F 有着数量级的显著性差异。

2.3 优势菌群热图与聚类分析

在属水平对丰度前50位的优势菌群绘制热度并根据群落结构组成相似度进行聚类分析，结果如图3所示，图中红色代表在对应样本中丰度

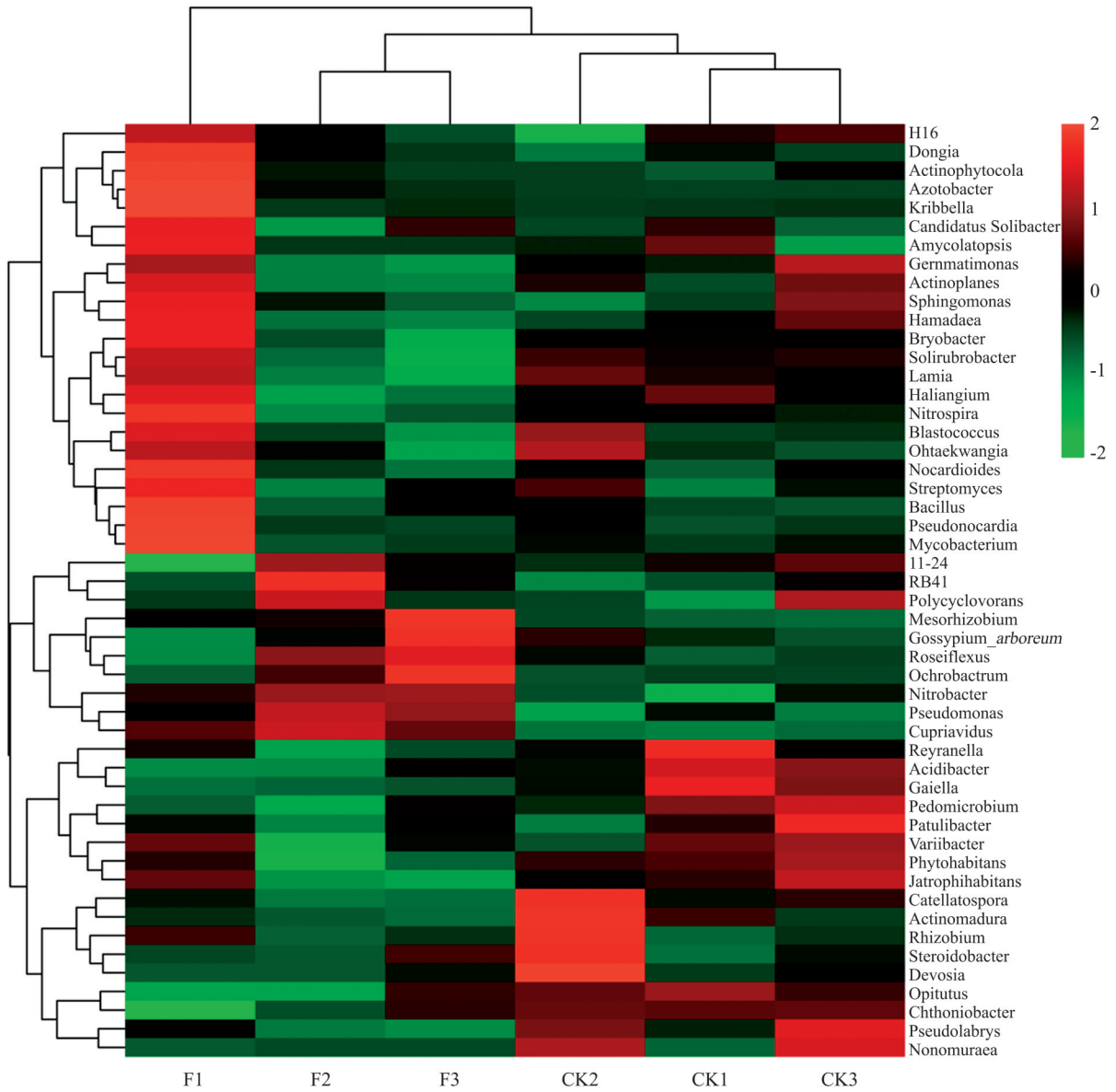


图3 优势菌群热图与聚类分析

Fig. 3 Heatmap and cluster analysis of dominant flora

较高的属,绿色代表丰度较低的属。结果显示对照组 CK 组内具有较高的群落结构相似度,首先聚为一类;实验组中样本 F2 和 F3 具有较高的群落结构相似度先聚为一类,然后再与对照组 CK 聚为一类;而实验组中样本 F1 与其他各样本的群落结构组成则差异性较高。从总的趋势来看,对照组 CK 具有丰度优势的菌群多于实验组 F,且 CK 组内优势菌群的分布规律较为一致;实验组 F 组内优势菌群的分布较为散乱,主要体现在样本 F1 中。值得注意的是,虽然实验组 F 中具有明显丰度优势的菌群少于对照组 CK,但某些优势菌群如硝化菌属 *Nitrobacter* 和中慢生根瘤菌属 *Meso-*

rhizobium 等在土壤氮的分解利用和转化循环过程中起着关键作用。

2.4 样本分组分析

采用非度量多维尺度分析(NMDS)和偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)对实验样本进行分组,考察不同样本之间群落结构的相似性。基于 *Weighted UniFrac* 距离矩阵的 NMDS 分析如图 4 所示,结果显示对照组 CK 和实验组 F 在 NMDS2 方向能较好的区分,在 NMDS1 方向对照组 CK 也能较好的聚集,而实验组 F 的分布则较为散乱,这表明不同分组组内具有较高的群落结构相似性,且对照组 CK 的群落结构相似性优于实验组 F。根据物种丰

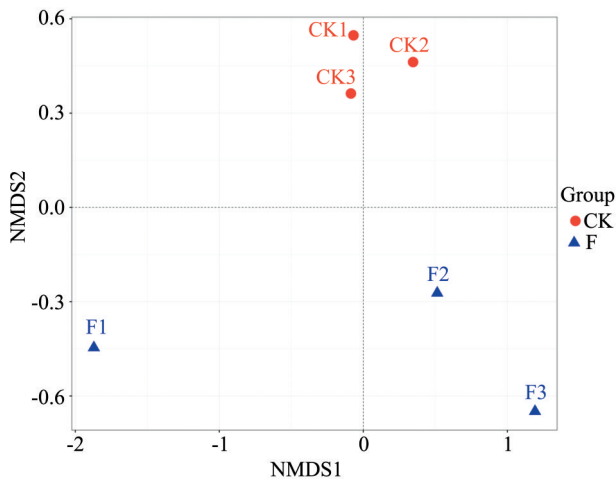


图4 基于Weighted UniFrac距离矩阵的NMDS分析
Fig. 4 NMDS analysis based on weighted-uniFrac distance matrix

度矩阵和样本分组数据构建的 PLS-DA 判别模型如图 5 所示,结果显示在 PLS1 方向对照组 CK 和

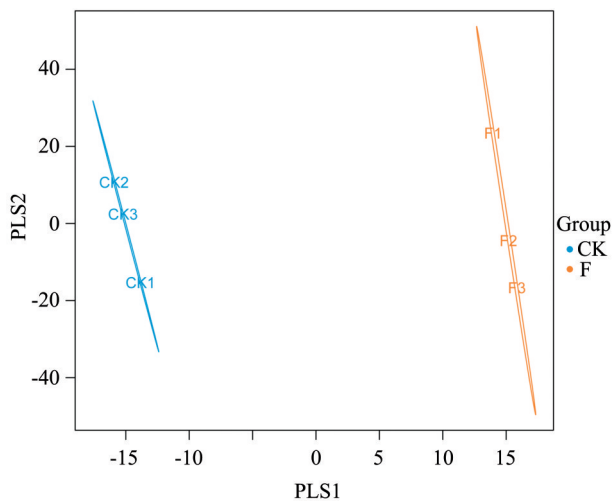


图5 样本分组PLS-DA判别模型分析
Fig. 5 PLS-DA discriminant model analysis for sample grouping

实验组 F 能够较好地地区分,表明不同分组土壤微生物的群落结构在组间产生了显著差异,而在组内则具有较高的群落结构相似性。

2.5 物种差异分析

Metastats 分析通常用于识别不同分组之间具有显著性差异的物种,结果显示对照组 CK 和实验组 F 在 3 个门和 63 个属具有显著性差异。其中,对照组 CK 在 BRC1 菌门和 Planctomycetes 菌门具有显著性优势,而实验组 F 在 Ignavibacteriae 菌门具有显著性优势,如图 6 所示。而图 7 显示的为属水平差异最显著的前 20 个菌属,结果表明对照组 CK 在其中 15 个菌属具有显著性优势,而实验组 F 仅在 5 个菌属具有显著性优势。

2.6 废果酵素肥对葡萄产量和品质的影响

葡萄采摘后对其产量和常规品质指标进行了分析测定,分析结果如表 4 所示。结果显示施用葡萄废果酵素肥的实验组 F 其产量有一定程度提升,但与常规施肥的对照组 CK 相比未达到统计学意义的显著性差异。在品质指标方面,实验组 F 中葡萄果实的维生素 C 含量显著高于对照组 CK,施用葡萄废果酵素肥后葡萄果实品质有明显改善。而果实的可溶性固形物含量比较中,二者无显著性差异。总的来说,施用葡萄废果酵素肥对葡萄的产量和品质均有一定程度的提升。

3 讨 论

土壤和其中的微生物是密不可分的整体,据估计土壤中微生物数量可达 10^{29} 数量级^[13]。土壤微生物在维持生态系统功能与结构稳定性过程中发挥着重要作用,因此普遍认为土壤微生物多样性和

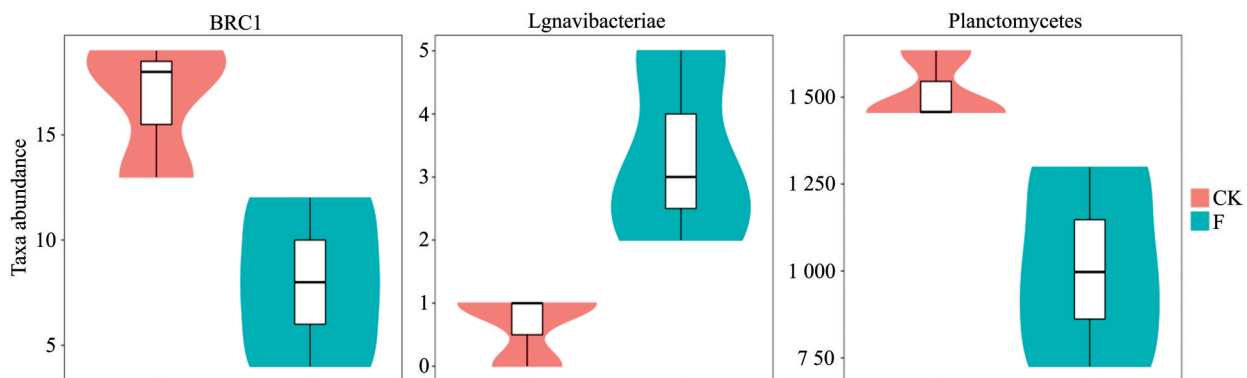


图6 门水平显著性差异物种Metastats分析
Fig. 6 Metastats analysis for significantly different species on Phylum level

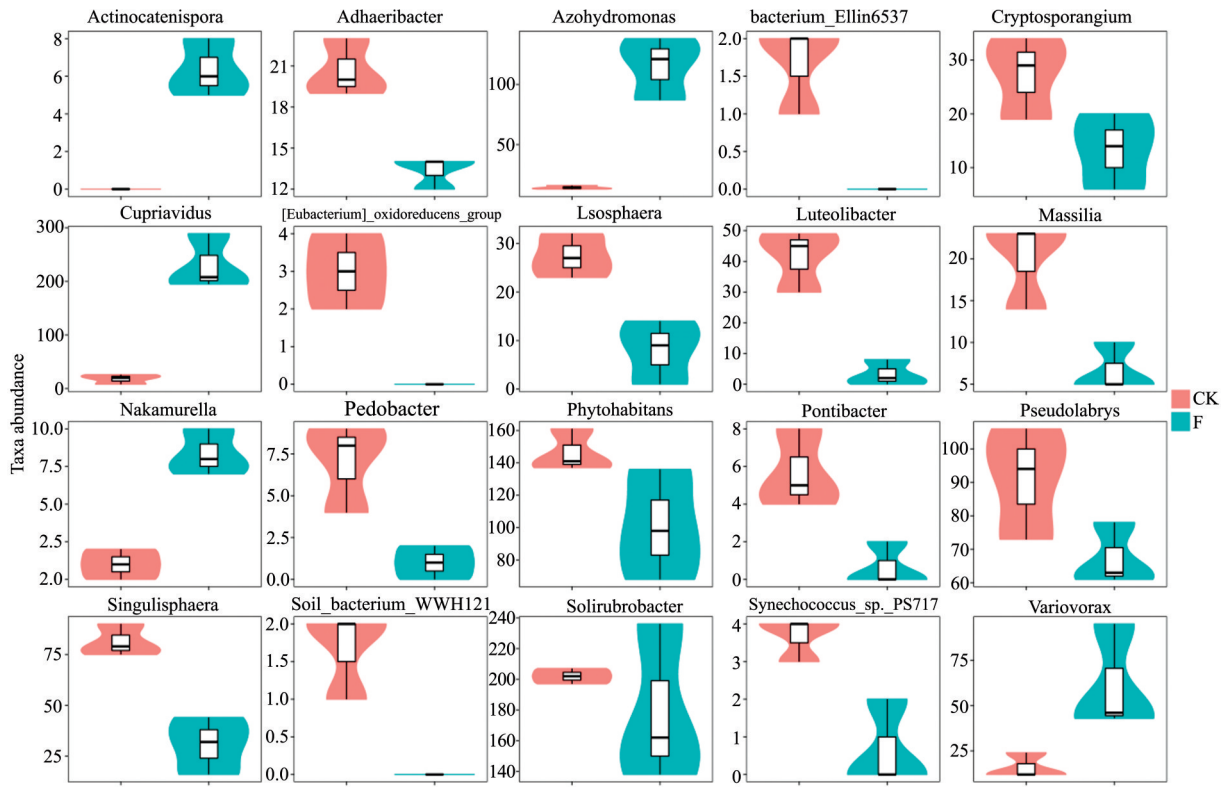


图7 属水平显著性差异物种 Metastats 分析

Fig. 7 Metastats analysis for significantly different species on genus level

表4 施用葡萄废果酵素肥对‘巨峰’葡萄产量和品质的影响
Table 4 The effects of ferment fertilizer from waste grape on grape yields and quality

处理 Treatment	产量 Yields/ (kg·hm ⁻²)	w(维生素C) Vitamin C content/ (mg·kg ⁻¹)	w(可溶性固形物) Soluble solid content/%
CK	7 275	125	18.6
F	7 800	153*	19.1

注:*表示在 $p < 0.05$ 水平上差异极显著。

Note: * indicate significant difference at $p < 0.05$.

群落结构特征是衡量土壤质量和健康状况的重要指标^[27]。葡萄废果酵素肥循环利用技术虽然目前已广泛被上海郊区的果农所采用,用以解决规模化葡萄园中坏果、烂果的处置问题,但该农业措施对葡萄园土壤生态健康是否存在潜在威胁并不清楚,葡萄废果酵素肥的施用对土壤微生物有着怎样的影响也不明确。因此,本研究以葡萄园土壤微生物多样性和群落结构特征为评价指标,研究葡萄废果酵素肥施用对葡萄园土壤微生态的影响,旨在为葡萄废果酵素肥循环利用技术的推广应用提供一定的评价标准与科学依据。

高通量测序结果显示葡萄废果酵素肥施用后,土壤微生物多样性指数和 OTU 总数均呈下降趋势,这可能与葡萄废果酵素肥的 pH 偏酸性有关,导

致土壤中某些微生物的活性受到了抑制^[28-29]。从门水平和属水平的群落结构组成分析来看,葡萄废果酵素肥的施用对土壤微生物群落结构特征产生了显著影响,样本分组分析也能够清楚的区分施用葡萄废果酵素肥的实验组和常规施肥的对照组,这表明葡萄废果酵素肥的施用对土壤微生物多样性产生了显著影响。而优势菌群和物种差异分析则显示,虽然施用葡萄废果酵素肥的处理土壤微生物多样性出现了降低,但某些菌群的丰度优势在显著升高,例如硝化菌属 *Nitrobacter* 和中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium* 等,这些菌属在土壤养分的转化与吸收利用中发挥着重要作用。

葡萄废果酵素肥中含有大量的活性物质,主要成分以小分子酸、酯类和各类离子等为主,这可能是导致葡萄园土壤微生物产生显著差异的根本原因,很多研究都表明土壤性质和环境因子的变化是导致土壤微生物产生选择性差异的主要原因^[30-32]。施用葡萄废果酵素肥对葡萄产量和品质的影响也与酵素肥的成分有关,酵素肥中含有丰富的养分和活性物质,与传统施肥方式相比能够补充葡萄生长过程中对各类氨基酸、以及中微量元素的需求,从而提高葡萄的产量与品质。

本研究为葡萄废果酵素肥的在农业生产中的应用提供了初步的评价标准和科学依据,但关于葡萄废果酵素肥的施用对土壤微生物和葡萄产量、品质的影响还需要进一步的深入研究。一方面,土壤微生物群落结构特征的变化可能是由于葡萄废果酵素肥的 pH 偏低所导致的,进一步调节肥料 pH 或稀释倍数对土壤微生物群落结构特征是否会产生不同的影响还有待进一步确认。另一方面,本研究只是葡萄废果酵素肥施用 1 年的结果,长期施用对土壤微生物和葡萄产量、品质的影响并不明确,其长期效应也有待进一步研究,施肥的长期效果对于农业措施的选择更具有实际的参考价值 and 意义。此外,在分析过程中发现样本 F₁ 的组内差异较为明显,在未来的研究中应该增加实验重复,从而使研究结论更加可靠。

4 结 论

(1) 施用葡萄废果酵素肥显著影响葡萄园土壤微生物多样性,土壤细菌群落结构特征在门水平和属水平均产生了显著性差异。

(2) 与常规施肥处理相比,施用葡萄废果酵素降低了葡萄园土壤的微生物多样性,Chao1 指数、ACE 指数和 OTU 总数均显著低于常规施肥土壤。

(3) 施用葡萄废果酵素肥的土壤在某些微生物种群具有明显优势,如与氮循环相关的硝化菌属 *Nitrobacter* 和中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium* 等。

(4) 施用葡萄废果酵素肥能在一定程度上提升‘巨峰’葡萄的产量和品质。

参考文献 References:

- [1] 查倩,奚晓军,蒋爱丽,田益华,王世平. 上海地区几个鲜食葡萄品种熟期的果实发育特性研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2015 (5):24-27.
ZHA Qian, XI Xiaojun, JIANG Aili, TIAN Yihua, WANG Shiping. Research on fruit development characteristics during mature period of several table grape varieties in Shanghai area [J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2015 (5):24-27.
- [2] 夏琼,刘璐璐,崔荣祥,沈霞. 上海设施栽培葡萄生产情况调查报告[J]. 上海农业科技, 2014(1):62-64.
XIA Qiong, LIU Lulu, CUI Rongxiang, SHEN Xia. The production situation report of grape facility cultivation in Shanghai[J]. Shanghai Agricultural Science and Technology, 2014(1):62-64.
- [3] 邓英毅,叶亦心,莫干辉,郑虚,雷雪娇,梁月滔,甘远东. 木薯淀粉厌氧发酵液对西瓜生长和产量及品质的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2017, 43(5): 529-532.
DENG Yingyi, YE Yixin, MO Ganhui, ZHENG Xu, LEI Xuejiao, LIANG Yuetao, GAN Yuandong. Effects of cassava starch anaerobic fermentation liquid on watermelon growth, yield and fruit quality[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences Edition), 2017, 43(5): 529-532.
- [4] 崔维香,林梅,秦松,庞云龙,王学江,王明鹏,刘正一,孙亚东. 海藻发酵液在樱桃番茄上的施用效果及分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(13):4387-4394.
CUI Weixiang, LIN Mei, QIN Song, PANG Yunlong, WANG Xuejiang, WANG Mingpeng, LIU Zhengyi, SUN Yadong. The applied effect and analysis of seaweed fermentation liquid on cherry tomato[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(13):4387-4394.
- [5] FINN D, KOPITTKER P M, DENNIS P G, DALAL R C. Microbial energy and matter transformation in agricultural soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 111: 176-192.
- [6] LI Y, CHANG S X, TIAN L, ZHANG Q. Conservation agriculture practices increase soil microbial biomass carbon and nitrogen in agricultural soils: A global meta-analysis[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 121: 50-58.
- [7] 孙瑞,孙本华,高明霞,杨学云,张树兰. 长期不同土地利用方式下土壤微生物特性的变化[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(3):655-663.
SUN Rui, SUN Benhua, GAO Mingxia, YANG Xueyun, ZHANG Shulan. Changes of soil microbial characteristics under long-term different land use patterns on an anthropogenic loess soil[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2015, 21(3): 655-663.
- [8] WANG C, LIU D, BAI E. Decreasing soil microbial diversity is associated with decreasing microbial biomass under nitrogen addition[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 120: 126-133.
- [9] 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.
LIN Xiangui, HU Junli. Scientific connotation and ecological service function of soil microbial diversity[J]. Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(5): 892-900.
- [10] 李晨华,张彩霞,唐立松,熊正琴,王保战,贾仲君,李彦. 长期施肥土壤微生物群落的剖面变化及其与土壤性质的关系[J]. 微生物学报, 2014, 54(3): 319-329.
LI Chenhua, ZHANG Caixia, TANG Lisong, XIONG Zhengqin, WANG Baozhan, JIA Zhongjun, LI Yan. Effect of long-term fertilizing regime on soil microbial diversity and soil property[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(3): 319-329.
- [11] 丁建莉,姜昕,关大伟,马鸣超,赵百锁,周宝库,曹凤明,李力,李俊. 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.
DING Jianli, JIANG Xin, GUAN Dawei, MA Mingchao, ZHAO Baisuo, ZHOU Baoku, CAO Fengming, LI Li, LI Jun. Response of micropopulation in black soil of northeast China to long-term fertilization and crops[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49 (22): 4408-4418.
- [12] LI W, WU M, LIU M, JIANG C, CHEN X, KUZYAKOV Y, RINKLEBE J, LI Z. Responses of soil enzyme activities and mi-

- icrobial community composition to moisture regimes in paddy soils under long-term fertilization practices[J]. *Pedosphere*, 2018, 28(2): 323-331.
- [13] 楼骏, 柳勇, 李延. 高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(15): 256-260.
LOU Jun, LIU Yong, LI Yan. Review of high-throughput sequencing technology in studies of soil microbial diversity[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(15): 256-260.
- [14] 夏国围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价[J]. *微生物学报*, 2014, 54(12): 1489-1499.
XIA Weiwei, JIA Zhongjun. Comparative analysis of soil microbial communities by pyrosequencing and DGGE[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(12): 1489-1499.
- [15] WANG J, SONG Y, MA T, RAZA W, LI J, HOWLAND J G, HUANG Q, SHEN Q. Impacts of inorganic and organic fertilization treatments on bacterial and fungal communities in a paddy soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 112: 42-50.
- [16] 夏昕, 石坤, 黄欠如, 李大明, 刘满强, 李辉信, 胡锋, 焦加国. 长期不同施肥条件下红壤性水稻土微生物群落结构的变化[J]. *土壤学报*, 2015, 52(3): 697-705.
XIA Xin, SHI Kun, HUANG Qianru, LI Daming, LIU Manqiang, LI Huixin, HU Feng, JIAO Jianguo. The changes of microbial community structure in red paddy soil under long-term fertilization[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(3): 697-705.
- [17] 陆海飞, 郑金伟, 余喜初, 周惠民, 郑聚锋, 张旭辉, 刘晓雨, 程琨, 李恋卿, 潘根兴. 长期无机有机肥配施对红壤性水稻土微生物群落多样性及酶活性的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(3): 632-643.
LU Haifei, ZHENG Jinwei, YU Xichu, ZHOU Huimin, ZHENG Jufeng, ZHANG Xuhui, LIU Xiaoyu, CHENG Kun, LI Lianqing, PAN Genxing. Microbial community diversity and enzyme activity of red paddy soil under long-term combined inorganic-organic fertilization[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21(3): 632-643.
- [18] WANG Q, MA M, JIANG X, GUAN D, WEI D, ZHAO B, CHEN S, CAO F, LI L, YANG X, LI J. Impact of 36 years of nitrogen fertilization on microbial community composition and soil carbon cycling-related enzyme activities in rhizospheres and bulk soils in northeast China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 136: 148-157.
- [19] 袁红朝, 吴昊, 葛体达, 李科林, 吴金水, 王久荣. 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.
YUAN Hongzhao, WU Hao, GE Tida, LI Kelin, WU Jinshui, WANG Jiurong. Effects of long-term fertilization on bacterial and archaeal diversity and community structure within subtropical red paddy soils[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(6): 1807-1813.
- [20] ZHOU Z, WANG C, ZHENG M, JIANG L, LUO Y. Patterns and mechanisms of responses by soil microbial communities to nitrogen addition[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 433-441.
- [21] JORQUERA M A, MARTÍNEZ O A, MARILEO L G, ACUÑA J J, SAGGAR S, MORA M L. Effect of nitrogen and phosphorus fertilization on the composition of rhizobacterial communities of two Chilean Andisol pastures[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30: 99-107.
- [22] BEAUREGARD M S, HAMEL C, ATUL-NAYYAR, ST-ARNAUD M. Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not am fungal community in Alfalfa[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59: 379-389.
- [23] SHI Y, ZIADI N, HAMEL C, BÉLANGER G, ABDI D, LAJEUNESSE J, LAFOND J, LALANDE R, SHANG J. Soil microbial biomass, activity and community structure as affected by mineral phosphorus fertilization in grasslands[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 146: 103391.
- [24] BÖRJESSON G, MENICHETTI L, KIRCHMANN H, KÄTTERER T. Soil microbial community structure affected by 53 years of nitrogen fertilisation and different organic amendments[J]. *Biology & Fertility of Soils*, 2012, 48: 245-257.
- [25] BERTHRONG S T, BUCKLEY D H, DRINKWATER L E. Agricultural management and labile carbon additions affect soil microbial community structure and interact with carbon and nitrogen cycling[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 66: 158-170.
- [26] GU S, HU Q, CHENG Y, BAI L, LIU Z, XIAO W, GONG Z, WU Y, FENG K, DENG Y, TAN L. Application of organic fertilizer improves microbial community diversity and alters microbial network structure in tea (*Camellia sinensis*) plantation soils[J]. *Soil and Tillage Research*, 2019, 195: 104356.
- [27] PERUZZI E, FRANKE-WHITTLE I, KELDERER M, CIAVATTA C, INSAM H. Microbial indication of soil health in apple orchards affected by replant disease[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 119: 115-127.
- [28] XING J, WANG H, BROOKES P C, SALLES J F, XU J. Soil pH and microbial diversity constrain the survival of *E. coli* in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 128: 139-149.
- [29] ACIEGO PIETRI J C, BROOKES P C. Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40: 1856-1861.
- [30] PINGEL M, REINEKE A, LEYER I. A 30-years vineyard trial: Plant communities, soil microbial communities and litter decomposition respond more to soil treatment than to N fertilization[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2019, 272: 114-125.
- [31] MORUGÁN-CORONADO A, GARCÍA-ORENES F, MCMILLAN M, PEREG L. The effect of moisture on soil microbial properties and nitrogen cyclers in Mediterranean sweet orange orchards under organic and inorganic fertilization[J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 655: 158-167.
- [32] NIVELLE E, VERZEAUX J, HABBIB H, KUZYAKOV Y, DECOCQ G, ROGER D, LACOUX J, DUCLERCQ J, SPICHER F, NAVA-SAUCEDO J-E, CATTEROU M, DUBOIS F, TETU T. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 108: 147-155.