



## 哈尼梯田稻鲤共作模式下的微生物群落结构

聂志娟<sup>1</sup>, 李非凡<sup>2</sup>, 赵文武<sup>3</sup>, 徐钢春<sup>1</sup>, 刘波<sup>1</sup>,  
王裕玉<sup>1</sup>, 邵乃麟<sup>1</sup>, 胡佳雯<sup>1</sup>, 徐跑<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,  
农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214128;  
2. 中国科学院大学, 北京 100049;  
3. 全国水产技术推广总站, 中国水产学会, 北京 100125)

**摘要:** 为了探究哈尼梯田稻鲤共作模式(复合生态系统)微生物菌落结构特征, 本实验拟采用高通量测序技术对稻鲤共作(RC)与稻田单作(CK)2种模式下水体、表层以及根系土壤及鲤肠道细菌(16S *rDNA*)多样性特征进行分析。高通量测序结果显示, 复合生态系统中主要细菌门类为变形菌门、放线菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、拟杆菌门及硝化螺旋菌门等。与CK相比, RC表层土壤中绿弯菌门和厚壁菌门相对丰度显著增加, 主要显著增加的优势菌属为厌氧绳菌(*Anaerolineaceae\_norank*)、*Aminicenantes\_p\_norank*、未定义的绿弯菌(*Chloroflexi\_P\_unclassified*)、梭菌(*Clostridium\_sensu\_stricto\_1*)、梭菌(*C.\_sensu\_stricto\_12*)、互营菌(*Syntrophaceae\_f\_norank*)、芽单胞菌(*Gemmatimonadaceae\_f\_norank*); RC根系土壤中绿弯菌门含量显著高于CK组, 主要是*Anaerolineaceae\_norank*、*Sideroxydans*、*Aminicenantes\_p\_norank*、*Chloroflexi\_p\_unclassified*、*Gemmatimonadaceae\_f\_norank*优势菌属显著增加。RC模式中鲤肠道优势菌主要为厚壁菌门和变形菌门, 其中厚壁菌门相对丰度为58.59%, 超过一半的丰度。RC模式组相比CK组, 土壤的有机质、总氮、总磷等理化指标都有所降低, 其中pH、总磷和速效磷显著降低; 稻田表层和根系土壤的细菌Sobs指数及PD指数也均增加, 其中稻田表层土壤组显著增加。研究表明, 增加鲤养殖后, 稻田表层土壤的理化性质和细菌群落结构产生明显变化, 同时也在一定程度上对水稻根系和养殖生物肠道的群落结构产生了影响。本研究初步揭示了RC复合生态系统优于CK系统的微生物生态基础。

**关键词:** 哈尼梯田; 稻鲤共作模式; 菌群结构; 高通量测序

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

稻渔综合种养是在传统稻田养殖基础上发展而来的, 将水稻种植和水产养殖互利结合, 建立多物种共栖、多层次配置、多级物质利用和能量循环的新型复合立体农业模式及其综合性技术<sup>[1]</sup>, 能够实现减量、提质、稳粮、增效, 生产绿色、有机的农副水产品的多重目标<sup>[2-5]</sup>。

减少了农业污染源农药化肥施用量、提高农产品品质、提升食品安全、增加农民收入, 具有显著生态和经济效益, 因此受到了产、学、研、推各界的重视, 目前在我国推广辐射范围广泛, 涉及20余省份, 成为当前水产养殖发展的一个新亮点。然而在稻渔综合种养得到大力推广

收稿日期: 2019-04-03 修回日期: 2019-07-09

资助项目: 中国水产科学研究院院本级基本科研业务费专项(2019HY-YJ0201)

通信作者: 徐跑, E-mail: xup@ffrc.cn

发展的同时,相关的基础理论研究却还不能跟上快速推进的产业化发展的需要。当前对稻渔综合种养生态学机理和环境效益研究,主要集中在土壤理化性质及温室气体的排放等方面<sup>[6-7]</sup>,有关稻田养殖系统中的土壤微生物数量及多样性、对稻田土壤中细菌功能基因的多样性及其功能的研究,近期出现少量报道<sup>[8-10]</sup>。研究发现,综合种养后土壤微生物的多样性和丰富度都有所增加,但具体菌群结构组成各有差异。品种化、区域化、养殖技术多样化等形成的综合种养技术会因养殖品种、养殖地理环境的不同而形成不同的效应和调控机制。

哈尼梯田历史悠久,规模宏大,是古代山区哈尼族人利用“山有多高,水有多高”的特殊地形开垦共创了梯田农耕文明奇观,是全球重要农业文化遗产。哈尼梯田呈现森林—村寨—梯田—水系“四素同构”的农业生态系统,山区气候、水源丰富、空气湿润,为生物多样性提供了良好的环境条件。但是受社会、经济等因素影响,可持续保护形势严峻。近几年,由政府牵头组织、科研机构支撑、龙头企业带动实施推广示范进行了“稻渔共作”综合种养模式试验,实施精准扶贫,增加了梯田附加值,有效缓解了冬闲田、水改旱、抛荒等现象,实现经济、社会和生态效益三赢<sup>[11]</sup>。目前,有关哈尼梯田稻渔综合养殖模式下的相关科学研究非常少,本实验拟采用高通量测序技术对稻鲤共作组(RC组)与稻田单作组(CK组)两种模式下水体、表层以及根系土壤细菌(16S *rDNA*)多样性特征进行比较,探讨不同种养模式对水稻表层和根系土壤微生物群落结构以及组成的影响,以期揭示土壤微生物群落结构、多样性特征与稻田种养之间的内在联系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验区概况

采样点位于云南红河哈尼族彝族自治州红河县宝华镇龙玛村(23°15'58"N, 102°21'47"E),海拔1 752.6 m,属于低纬度亚热带高原型湿润季风气候,光照充足、雨量充沛、生物资源丰富,为主要粮食和经济作物的最佳种植适宜区和主产区。

### 1.2 实验设计

实验在海拔相差不超过5 m的小田块中进

行,设置RC组和CK组共2个处理,每个处理各3个重复,共6块稻田(图1),每块稻田面积为300 m<sup>2</sup>左右,田块之间有田埂相隔。其中,RC组的种植面积为273 m<sup>2</sup>,梯田靠内侧养殖沟的面积为27 m<sup>2</sup>,外侧种水稻,养殖沟上宽1.0 m,底宽0.7 m,深0.5 m,除种植水稻外,每块稻田还在水稻移栽后20 d(返青后)投入100尾10 g左右的福瑞鲤(*Cyprinus carpio*)。整个水稻生长期间不施用农药且自流水位始终保持在5.0~10.0 cm。水稻于4月9日进行移植,使用本地历年栽培的水稻品种“紫谷”,株间距为20 cm×20 cm,10月25日进行水稻收割。CK与RC组所施肥料均为基肥,施用量为0.225 kg/m<sup>2</sup>,水稻种植前一次性施用。

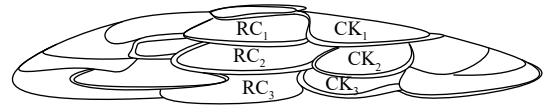


图1 实验梯田示意图

稻鲤共作田: RC<sub>1</sub>、RC<sub>2</sub>、RC<sub>3</sub>; 稻田单作田: CK<sub>1</sub>、CK<sub>2</sub>、CK<sub>3</sub>

Fig. 1 Schematic diagram of experimental terraces

Rice-carp co-culture terrace: RC<sub>1</sub>, RC<sub>2</sub>, RC<sub>3</sub>; carp monoculture terrace: CK<sub>1</sub>, CK<sub>2</sub>, CK<sub>3</sub>

### 1.3 样品采集与处理

于2018年8月26日,对实验梯田中水体、表层土壤、根系土壤及养殖鲤肠道样本进行采集。哈尼梯田多为不规则长条状,采样方式为S形多点分散采样法,3个重复组实验梯田分别采样后混合,再进行后期处理。水体样品:利用250 mL医用注射器,不扰动土层小心抽取梯田田面水,并注入500 mL集水瓶中,每个实验田采集10处点,收集2.5 L水样,实验室混合并取1 L测定水体理化因子,取4 L用0.22 μm滤膜抽滤收集,分为4组并冷冻保存。表层土壤样品:采用带有刻度的柱状取土器,用无菌刀切取柱状土样前10 cm泥土样放入无菌采样袋,每个实验田多点分散采集1袋(共500 kg),实验室混合,分装为5组无菌采样管并冷冻保存,其他泥土样用于测定土壤理化指标。根系土壤样品:每种模式每个实验田分散随机取5株水稻,并整株连根挖起,剪取根系样品放入采样袋,于实验室量取10~20 cm的根系周围土壤,混合后分5组冷冻保存。肠道样品:在稻鲤共作的梯田中,随机抓取10条健康、活力强的鲤,带回实验室后先用75%的乙醇擦拭体表,在无菌环境下立即解剖采

集肠道, 无菌解剖刀刮取肠道内容物, 2条鱼提取的样品合并为一组, 共5组, 冷冻保存, 用于总DNA提取。

#### 1.4 水体土壤理化性质测定

需要检测理化性质的土壤冻存送至江苏省农科院, 土壤pH值测定采用酸碱度玻璃电极法, 有机质含量采用重铬酸钾—硫酸溶液氧化法测定, TN测定采用凯氏定氮法, TP测定采用钼锑抗比色法, 有效氮采用碱解扩散吸收法测定, 速效磷测定采用碳酸氢钠浸提—钼锑抗比色法, 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量用2 mol/L KCl浸提土壤分析仪测定<sup>[12-15]</sup>。

#### 1.5 样本总DNA提取、PCR扩增及测序

根据E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行总DNA抽提, DNA浓度和纯度利用NanoDrop 2000进行检测, 利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量; 用338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R (5'-GGACTACH VG GG TW TCTAAT-3')引物对V3~V4可变区进行PCR扩增, 扩增程序: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 27个循环; 72 °C终延伸10 min (PCR仪: ABI GeneAmp<sup>®</sup> 9700型)。扩增体系为20  $\mu\text{L}$ : 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ FastPfu缓冲液、2  $\mu\text{L}$  2.5 mmol/L dNTPs、0.8  $\mu\text{L}$  引物(5  $\mu\text{mol/L}$ )、0.4  $\mu\text{L}$  FastPfu聚合酶; 10 ng DNA模板。

使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物, 利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, Tris-HCl洗脱, 2%琼脂糖凝胶电泳检测。利用QuantiFluor<sup>™</sup>-ST (Promega, USA) 进行定量检测。根据Illumina MiSeq平台(Illumina, San Diego, USA)标准操作规程将纯化后的扩增片段构建PE 2 $\times$ 300的文库。构建文库步骤: ①连接“Y”字形接头; ②使用磁珠筛选去除接头自连片段; ③利用PCR扩增进行文

库模板的富集; ④氢氧化钠变性, 产生单链DNA片段。利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

#### 1.6 数据分析

原始测序序列使用Trimmomatic软件质控, 使用FLASH软件进行拼接: ①设置50 bp的窗口, 如果窗口内的平均质量低于20 bp, 从窗口前端位置截去该碱基后端所有序列, 之后再去除质控后长度低于50 bp的序列; ②根据重叠碱基overlap, 将两端序列进行拼接, 拼接时overlap之间的最大错配率为0.2, 长度需大于10 bp; ③根据序列首尾两端的barcode和引物将序列拆分至每个样本, barcode需精确匹配, 引物允许2个碱基的错配, 去除存在模糊碱基的序列。使用UPARSE软件, 根据97%的相似度对序列进行OTU聚类, 并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。利用RDP对每条序列进行物种分类注释, 比对Silva数据库(SSU123), 设置比对阈值为70%。稻田土壤理化性质、微生物多样性指数及主要菌属的相对丰度的差异运用Canoco 4.5软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 两种模式下的稻田土壤理化性质

对两种模式下稻田土壤的理化性质进行了测定, 比较发现, 2种模式之间稻田土壤理化性质变化较大(表1)。与CK组相比, RC组土壤的有机质、总氮、总磷等理化指标都有所降低, 其中pH、总磷和速效磷的指标显著降低( $P<0.05$ ), 因养殖全程无饲料添加, 鲤的引入加快了稻—鲤共作模式复合系统物质的吸收代谢。

### 2.2 两种模式下样品高通量测序情况概述以及优势菌门群落结构及差异

通过对测序所得的序列进行预处理, 去除低质量序列和模糊序列, 33个样本总共获得了

表 1 两种模式下稻田土壤理化性质

Tab. 1 Soil properties of paddy field in two models

| 处理组<br>treatment | pH                     | 铵态氮/(mg/kg)<br>$\text{NH}_4^+\text{-N}$ | 硝态氮/(mg/kg)<br>$\text{NO}_3^-\text{-N}$ | 水解性氮/(mg/kg)<br>hydrolysis N | 总磷/(mg/kg)<br>total P     | 总氮/(g/kg)<br>total N   | 速效磷/(mg/kg)<br>available P | 有机质/(g/kg)<br>soil organic carbon |
|------------------|------------------------|---|---|------------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| CKS              | 5.23±0.17 <sup>a</sup> | 11.64±2.18 <sup>a</sup>                 | 1.93±0.49 <sup>a</sup>                  | 225.39±33.83 <sup>a</sup>    | 649.72±50.44 <sup>a</sup> | 1.44±0.04 <sup>a</sup> | 11.66±8.86 <sup>a</sup>    | 46.14±1.42 <sup>a</sup>           |
| RCS              | 4.89±0.04 <sup>b</sup> | 8.30±0.33 <sup>a</sup>                  | 1.15±0.38 <sup>a</sup>                  | 181.06±22.15 <sup>a</sup>    | 430.64±41.47 <sup>b</sup> | 1.32±0.15 <sup>a</sup> | 4.22±0.97 <sup>b</sup>     | 44.61±1.89 <sup>a</sup>           |

注: CKS. 稻田单作表层土壤组, RCS. 稻鲤共作表层土壤组; 不同字母代表处理间存在显著差异( $P<0.05$ ); 下同

Notes: CKS. surface soils of CK group; RCS. surface soils of RC group; the different letters mean that there are statistically significant differences between groups( $P<0.05$ ); the same below

2 033 016条合格16S *rDNA*序列, 每个样本产生的有效序列数目为21 268~146 779条, 有效序列的平均长度为437 bp。对所有序列进行97%相似水平OTU划分并物种注释, 可划分为5 699个OTU, 分为54个门、128个纲、249个目、478个科、989个属、1 992个种。

对各样本中大于1%的优势菌门进行分析发现, 在稻鲤共作模式水体(RCW)中, 丰度大于1%的门有6个, 其中绝对优势菌群主要是变形菌门(Proteobacteria, 63.11%)、放线菌门(Actinobacteria, 12.94%)、厚壁菌门(Firmicutes, 8.88%); 在单稻模式水体(CKW)中丰度大于1%的门有8个, 其中变形菌门(50.53%)、放线菌门(20.19%)、厚壁菌门(14.37%)占据绝对优势地位, 从两种种养模式水体中发现主要优势菌群相同, 都为变形菌门、放线菌门、厚壁菌门(图2)。

在稻鲤共作模式表层土壤(RCS)中, 丰度大于1%的菌门有9个, 分别为变形菌门(29.87%)、

绿弯菌门(Chloroflexi, 25.13%)、放线菌门(11.04%)、厚壁菌门(9.21%)、酸杆菌门(Acidobacteria, 8.65%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 3.14%)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae, 2.36%)、(Aminicenantes, 1.78%)、螺旋体菌门(Spirochaetae, 1.06%); 在单稻模式表层土壤(CKS)中丰度大于1%的菌门有9个, 分别为变形菌门(43.10%)、放线菌门(16.36%)、绿弯菌门(12.32%)、酸杆菌门(7.90%)、厚壁菌门(6.35%)、拟杆菌门(3.12%)、硝化螺旋菌门(2.10%)、疣微菌门(Verrucomicrobia, 2.08%)、浮霉菌门(Planctomycetes, 1.75%)。2种模式种养梯田表层土壤中, 丰度大于1%的优势菌门数量相同, 但是2组中变形菌门、绿弯菌门、放线菌门、厚壁菌门等优势菌丰度存在显著差异。RC组中变形菌门(29.87%)、放线菌门(11.04%)丰度分别显著低于CK组(43.10%、16.36%)( $P < 0.05$ ) (图3); 而绿弯菌门(25.13%)、厚壁菌门(9.21%)丰度分别显著高于CK组(12.32%、

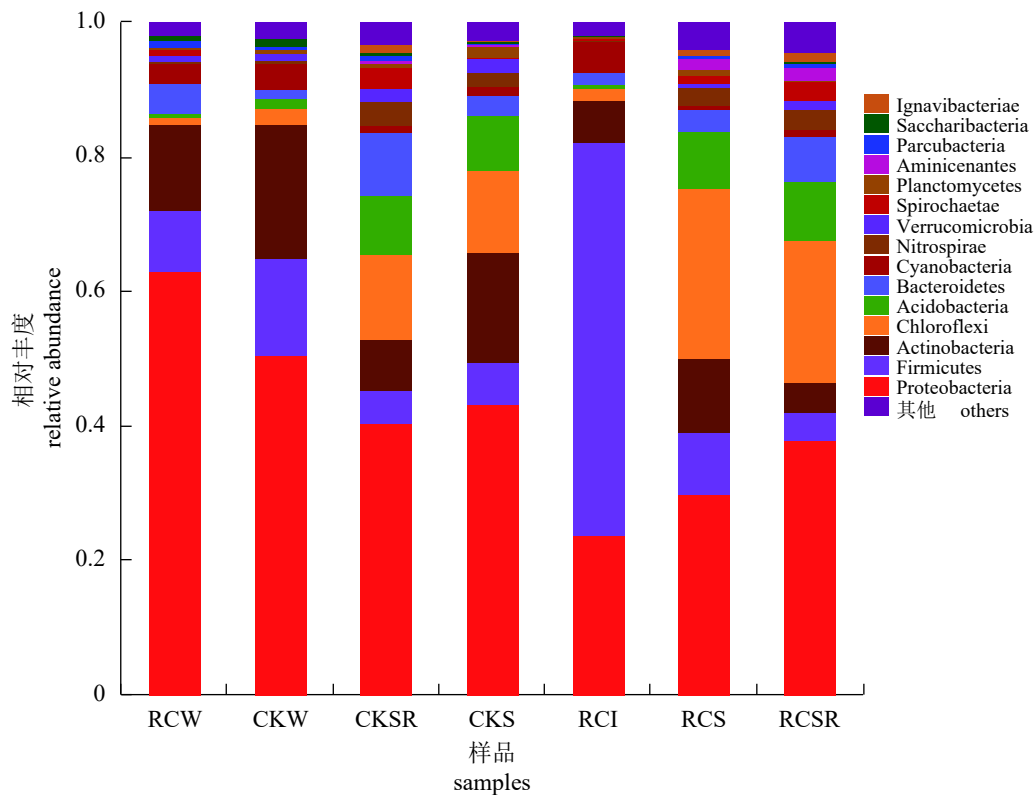


图2 两种模式下微生物的组成与相对丰度

CKSR. 稻田单作根系土壤组; RCSR. 稻鲤共作根系土壤组; CKW. 稻田单作水体组; RCW. 稻鲤共作水体组; RCI. 稻鲤共作鲤肠道组; 下同

Fig. 2 Relative abundances of the dominant phyla in paddy field under rice-carp co-culture and rice monoculture models

CKSR. rhizosphere soils of CK group; RCSR. rhizosphere soils of RC group; CKW. water of CK group; RCW. water of RC group; RCI. carp intestinal of RC group; the same below

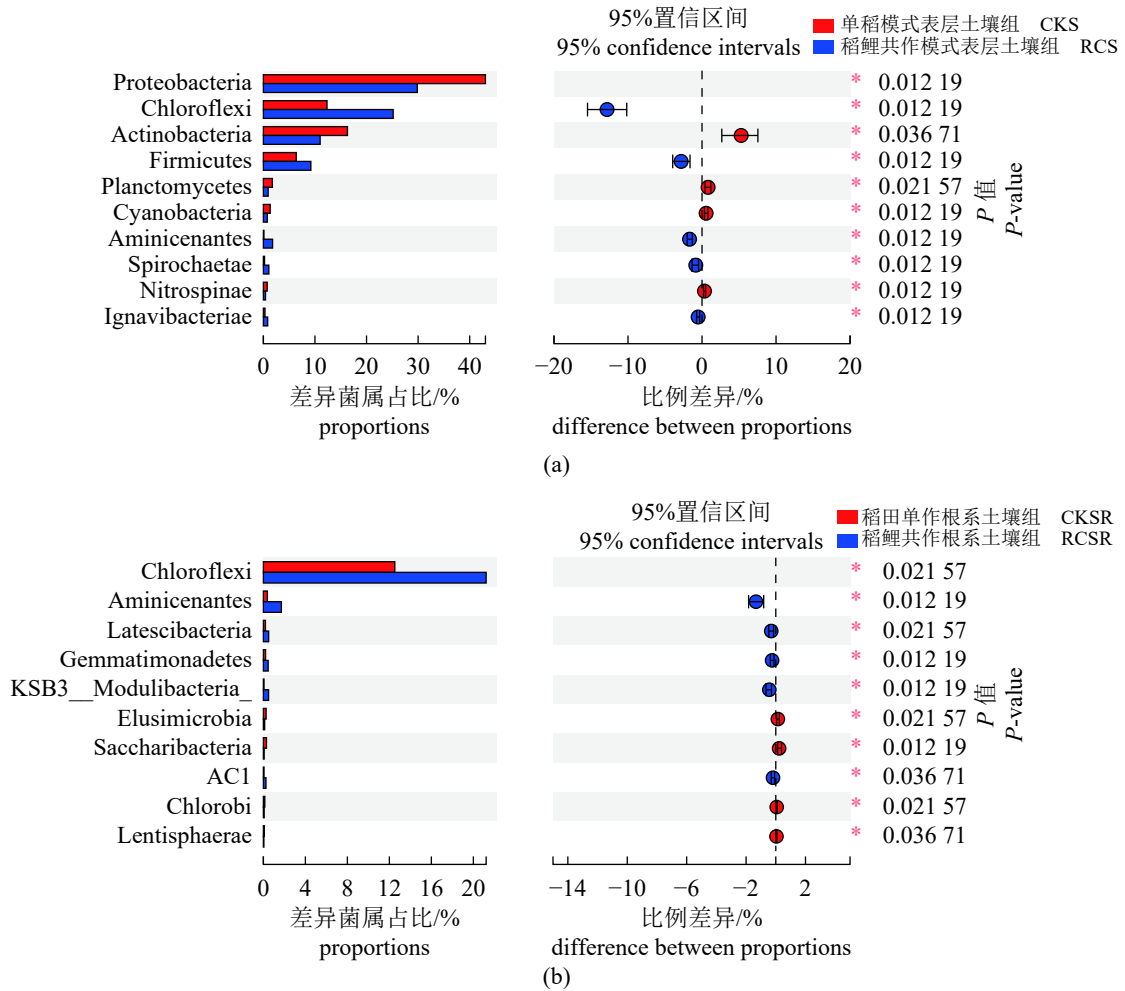


图 3 两种模式下的群落丰度差异

(a)表层土壤组; (b)根系土壤组

Fig. 3 Differences of relative abundance of microbiota at the phylum level in rice-carp co-culture and carp monoculture models

(a) surface soils; (b) rhizosphere soils

6.35%)( $P < 0.05$ )。

在稻鲤共作模式根系土壤(RCSR)中, 丰度大于1%的菌门有10个, 分别为变形菌门(37.85%)、绿弯菌门(21.31%)、酸杆菌门(8.61%)、拟杆菌门(6.75%)、放线菌门(4.37%)、厚壁菌门(4.23%)、硝化螺旋菌门(3.05%)、螺旋体菌门(2.72%)、(Aminicenantes, 1.73%)、(Ignavibacteriales, 1.43%); 在单稻模式根系土壤(CKSR)中, 丰度大于1%的菌门有11个, 分别为变形菌门(40.3%)、绿弯菌门(12.57%)、拟杆菌门(9.22%)、酸杆菌门(8.83%)、放线菌门(7.73%)、厚壁菌门(4.92%)、硝化螺旋菌门(3.60%)、螺旋体菌门(2.91%)、疣微菌门(2.02%)、蓝藻细菌(Cyanobacteria, 1.15%)、(Ignavibacteriales, 1.15%)。两种种养模式梯田根系土壤中, 微生物

门类组成比较均匀, 大部分优势菌门丰度差异不明显, RC组中丰度大于1%的菌门中, 绿弯菌门(21.31%)显著高于CK组(12.57%)( $P < 0.05$ )。

在稻鲤共作模式鲤鱼肠道(RCI)中, 丰度大于1%的菌门有6个, 分别为厚壁菌门(58.59%)、变形菌门(23.68%)、放线菌门(6.24%)、蓝藻细菌(4.79%)、拟杆菌门(1.80%)、绿弯菌门(1.74%), 稻鲤共作模式中, 鲤肠道优势菌群集中, 主要为厚壁菌门和变形菌门, 其中厚壁菌门相对丰度为58.59%, 超过一半的菌群含量。

### 2.3 两种模式下菌群多样性

两种种养模式下生物多样性分析结果显示, RC的表层土壤组的微生物Sobs指数及PD指数均为最高, 高于CK的表层土壤组, 且2组之间

存在显著差异( $P<0.05$ ),说明增加鲤的养殖可显著提高稻田表层土壤微生物的多样性和丰富度;稻田单作模式的根系土壤组PD指数和Sobs指数值低于RC的根系土壤组,但两组之间差异不显著,对根系土壤微生物的影响不及表

层土壤明显;稻田单作模式水体菌群多样性PD指数相似于RC的水体组,种养梯田水体一直从上到下流动,两组之间水体有水流互通,无明显差异(图4)。

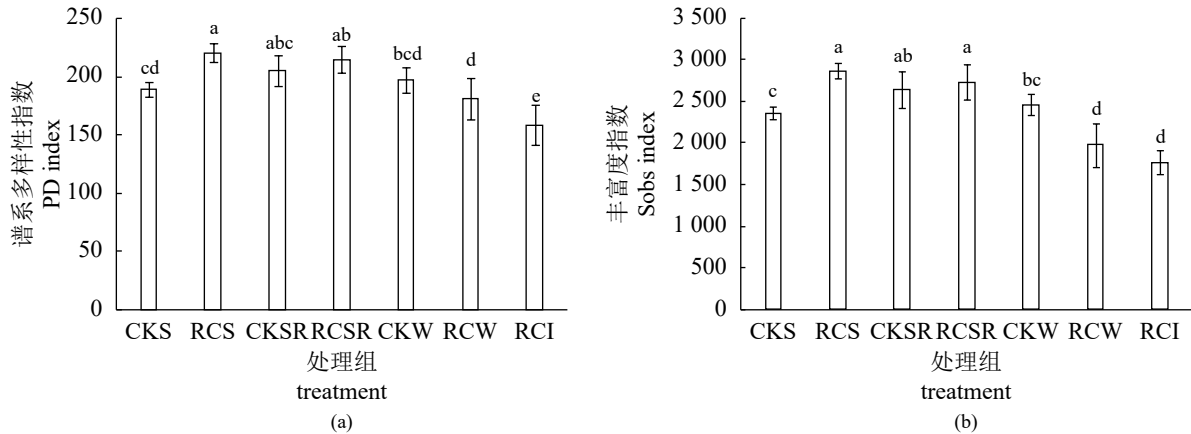


图4 两种模式下微生物的多样性

图中不同字母代表处理组间存在显著差异( $P<0.05$ )

Fig. 4 Diversity index in paddy field in two models

Different letters in the figure represent significant differences between treatment groups ( $P<0.05$ )

稻鲤共作的根系(RCSR)及表层(RCS)和稻田单作的根系(CKSR)及表层(CKS)土壤菌群物种组成分析得出,高通量测序序列在97%的相似性下得到的5109个OTU中,有2635个OTU为4个处理组共用OTU,占总OTU的51.58%,说明微生物种类的分布在各组之间较集中(图5)。图中数字代表样品间共有OTU数目,其中两两共享的OTU中,RCSR及RCS组共享数量最多,有3635个共

有OTU,而CKSR及CKS组,共有OTU为3261个,减少了374个共有OTU。这说明,增加鲤的养殖可明显加强稻田表层及根系土壤之间的菌群交流。

对两个模式4种类型的33个样本NMDS-weighted分析可看出,肠道、养殖水体、表层土壤及根系土壤微生物明显分开,相同处理下的重复组的样品菌群聚集在一起(图6),且stress值为 $0.041<0.05$ ,表明分析结果具有极好的代表性,样品具有很好的重复性,样品间具有明显的微生物群落差异,种间差异大于种内差异,其中肠道样本间存在较大差异,但也聚为一类。

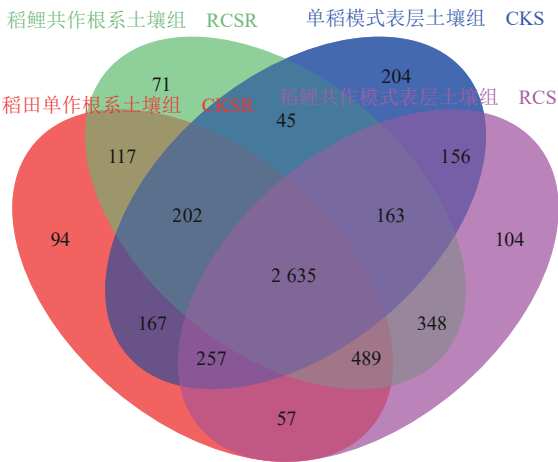


图5 两种模式下表层土壤和水稻根系OTU Venn图  
Fig. 5 Statistical result of OTU of samples CKS, RCS, CKSR and RCSR

### 2.4 两种模式下土壤差异菌属及与土壤理化因子的相关性

对两种模式下表层土壤与水稻根系土壤中有显著差异的菌门深入分析得出,绿弯菌门中的厌氧绳菌属(*Anaerolineaceae\_norank*)在4组土壤样品中平均相对丰度都很高,也存在显著差异( $P<0.05$ ),其在RCS、CKS、RCSR、CKSR组的相对丰度分别为 $9.22\% \pm 2.15\%$ 、 $1.58\% \pm 0.57\%$ 、 $9.43\% \pm 2.94\%$ 、 $4.91\% \pm 2.71\%$ (表2)。在RC表层土壤中,*Aminicenantes\_p\_norank*、*Chloroflexi\_p\_unclassified*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_1*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_12*、*Syntrophaceae\_f\_norank*、*Gemmatimonadaceae\_f\_norank*菌属的相对丰度显著高于CK组

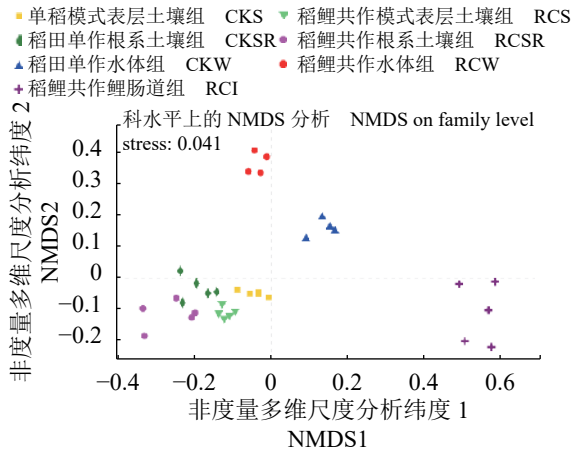


图 6 基于NMDS分析的两模式下水体、土壤、肠道微生物群落差异

Fig. 6 Difference of bacterial communities in water, sediment and intestine samples between rice-carp co-culture and rice monoculture based on NMDS analysis

( $P < 0.05$ ), 其中 *Aminicenantes\_p\_norank*、*Chloroflexi\_p\_unclassified*、*Gemmatimonadaceae\_f\_norank* 菌属的相对丰度在根系土壤中也显著高于CK组( $P < 0.05$ )。RC模式根系土壤中存在独有菌属 *Sideroxydans*, 且在根系土壤中占有绝对优势, 显著高于CK组( $P < 0.05$ )。表层土壤中甲基孢囊菌(*Methylocystaceae\_f\_unclassified*)、黄色杆菌(*Xanthobacteraceae\_f\_norank*)、蓝细菌(*Cyanobacteria\_c\_norank*)、黄色单胞菌(*Xanthomon-*

*adales\_Incertae\_Sedis\_f\_norank*)等菌都显著低于CK组( $P < 0.05$ ); 其中, 根系土壤中甲基孢囊菌、黄色杆菌的相对丰度都显著低于CK组( $P < 0.05$ )。梯田增加鲤的养殖后, 表层或者根系土壤中存在较多相对丰度差异显著的菌属。

选择其中10种主要差异菌属与稻田当中土壤理化性质的变化做RDA冗余分析, 反映菌群与环境因子之间关系, 结果显示, 前2个排序轴的特征值分别为0.965和0.019。AP(-0.536 6)、pH(-0.761 4)、TP(-0.910 5)、HN(-0.659 6)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (-0.721 0)、 $\text{NO}_3\text{-N}$ (-0.542 3)主要贡献于第一排序轴, 前2轴中物种与环境关系的累积百分比为98.4%(图7)。图中M1、M2、M3、M4、M5、M6和pH、TP、AP、HN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 负相关; M7、M8、M9、M10和pH、TP、AP、HN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 正相关。

### 3 讨论

稻田生态系统为鱼、虾等综合养殖提供了良好的环境, 通过有效的养分循环, 提高了稻田的整体生产力, 是一种环境友好型的生态农渔复合生产技术, 许多研究表明该模式具有良好的生态效应<sup>[16]</sup>。本研究表明, 哈尼梯田稻鲤共作在全程无任何外源饲料添加的条件下, 由于增加鲤养殖, 加快了土壤有效养分的循环利

表 2 两种模式下土壤中有差异代表菌属的相对丰度

Tab. 2 Percentages of rhizosphere and surface soils difference represents genera in two models

| 菌属<br>species name                             | 稻鲤共作模式<br>表层土壤组<br>RCS | 单稻模式表层土壤组<br>CKS | 稻鲤共作根系土壤组<br>RCSR | 稻田单作根系土壤组<br>CKSR | % |
|--|------------------------|------------------|-------------------|-------------------|---|
| <i>Anaerolineaceae_norank</i>                  | 9.22±2.15              | 1.58±0.57        | 9.43±2.94         | 4.91±2.71         |   |
| <i>Aminicenantes_p_norank</i>                  | 1.79±0.45              | 0.10±0.03        | 1.72±0.57         | 0.38±0.33         |   |
| <i>Chloroflexi_p_unclassified</i>              | 1.65±0.17              | 0.17±0.03        | 1.25±0.39         | 0.20±0.14         |   |
| <i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>             | 1.42±0.30              | 0.94±0.12        | 0.50±0.30         | 0.70±0.37         |   |
| <i>Clostridium_sensu_stricto_12</i>            | 1.09±0.23              | 0.50±0.11        | 0.55±0.30         | 0.33±0.13         |   |
| <i>Syntrophaceae_f_norank</i>                  | 0.96±0.22              | 0.50±0.13        | 1.11±0.45         | 0.88±0.21         |   |
| <i>Gemmatimonadaceae_f_norank</i>              | 0.28±0.12              | 0.13±0.04        | 0.36±0.13         | 0.15±0.03         |   |
| <i>Methylocystaceae_f_unclassified</i>         | 3.42±0.33              | 7.12±1.02        | 1.67±0.73         | 3.63±1.37         |   |
| <i>Xanthobacteraceae_f_norank</i>              | 2.64±0.59              | 4.29±0.70        | 1.14±0.59         | 2.63±0.91         |   |
| <i>Xanthomonadales_Incertae_Sedis_f_norank</i> | 0.51±0.08              | 1.34±0.16        | 0.48±0.21         | 0.71±0.39         |   |
| <i>Cyanobacteria_c_norank</i>                  | 0.48±0.12              | 0.87±0.23        | 0.75±0.36         | 0.66±0.23         |   |
| <i>Sideroxydans</i>                            | 0                      | 0                | 4.27±6.40         | 0.37±0.21         |   |

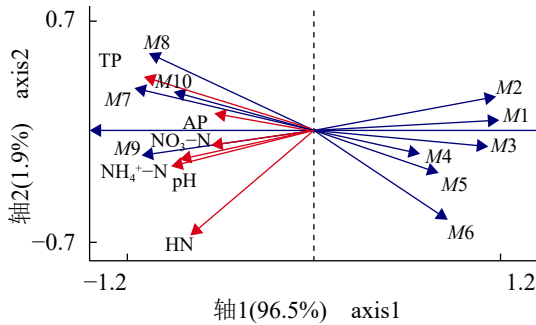


图7 10种主要差异菌属与土壤环境因子的RDA排序图

Fig. 7 RDA ordination biplot of ten major genera and soil environmental factors

M1. *Anaerolineaceae\_norank*; M2. *Aminicenantes\_p\_norank*; M3. *Chloroflexi\_p\_unclassified*; M4. *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*; M5. *Clostridium\_sensu\_stricto\_12*; M6. *Syntrophaceae\_f\_norank*; M7. *Methylocystaceae\_f\_unclassified*; M8. *Xanthobacteraceae\_f\_norank*; M9. *Xanthomonadales\_Incertae\_Sedis\_f\_norank*; M10. *Cyanobacteria\_c\_norank*

用,使得土壤的有机质、总氮、总磷等理化指标都有所降低,其中pH、总磷和速效磷显著降低。罗衡等<sup>[8]</sup>研究稻蟹共生系统结果得出,土壤的TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 均出现了显著升高,之所以有差异,可能因其养殖过程中有饲料的添加,产生的残饵和粪便使稻蟹共作稻田中土壤养分增加。Feng等<sup>[17]</sup>研究稻渔综合种养营养转移效率和经济效益得出,与单一养鱼相比,该系统显著降低了池塘水体和底泥的养分水平。其中土壤氨氮、总磷及磷酸盐含量分别降低了91.14%、36.99%和58.57%。土壤理化性质变化是相对的,受不同前处理及养殖方式等环境条件约束,但不同的研究结果都可得出,稻渔综合种养模式有利于营养转移、能量代谢,显现出良好的复合生态优势。

土壤养分是土壤微生物生存的物质基础,土壤微生物参与土壤有机质和养分转化、循环,在整个复合系统中扮演着重要的角色。本研究采用的高通量测序技术得出的结果显示,微生物种类丰富,共得到5 699个OUT,在门和属的微生物分类水平,共检测到54门989属的微生物种群,包含大量相对丰度小于1%的菌群,检测效率远远高于传统的变形梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术,因此能相对全面地反映细菌群落组成。在主要的优势种属中,与CK养殖模式相比,RC模式下的表层和根系土壤中厌氧绳菌、*Aminicenantes\_p\_norank*、未定义的绿弯菌都显著增加。有关厌氧绳菌研究报道不多,处理

厂活性污泥细菌中有检测,并为主要菌群<sup>[18]</sup>。*Aminicenantes*是1998年在黄石国家公园黑曜石池的沉积物样品中通过分子技术首次检测出, Farag等<sup>[19]</sup>调查分析*Aminicenantes*丰富度、多样性和群落结构发现,其在自然环境中普遍存在,具有代谢和适应多样性。麻微微<sup>[20]</sup>发现沼气发酵复合菌系中未定义的绿弯菌(*Chloroflexi\_p\_unclassified*)为主要的产酸发酵功能菌群, Zhao等<sup>[21]</sup>研究污泥消化得出,绿弯菌门和*Aminicenantes*在该厌氧污泥消化反应中占优势地位。以上几类相对丰度显著增加的菌属表明,养殖鲤的增加使稻田土壤富集了具有发酵代谢功能的菌群,有效促进了稻鲤种养过程中的物质能量循环。*Sideroxydans*为固氮菌<sup>[22]</sup>,只存在于梯田的根系土壤,且RC模式下此菌的相对丰度显著增加,成为优势菌属。鲤养殖间接改善根系土壤微生物环境,增加根系土壤固氮菌富集,提高了固氮作用,加快了系统的N循环。同时,稻田的表层以及根系土壤微生物的多样性和丰富度指数均得到提升,其中表层土壤显著提高,较高的生物多样性更能保证生态系统的功能冗余,从而维持生态系统的稳定<sup>[23]</sup>,这与很多对复合生态系统的研究得出的结果一致<sup>[8-10]</sup>。

肠道微生物群落结构主要由宿主自身及外界生长环境因素等所决定<sup>[24-25]</sup>。不同物种之间肠道微生物细菌群落结构不同,同一物种不同的遗传背景、发育阶段、生长环境、饮食条件等肠道菌群结构之间也存在很大差异<sup>[26-28]</sup>。饶刘瑜等<sup>[29]</sup>研究得出,转“全鱼”生长激素基因鲤与对照鲤肠道微生物组成不同,转基因鲤相比对照鲤肠道中存在较多的厚壁菌门细菌,也仅为占2.72%~14.93%,远远小于本研究得出的哈尼梯田稻鲤共作模式中鲤肠道中优势厚壁菌门的相对丰度58.59%。近年来,健康饮食、能量获取、肥胖与肠道细菌分布等有关方面受到了人们的广泛关注,肠内厚壁菌门细菌数量多于拟杆菌门使得肠道能更有效地吸收食物中的热量,从而导致肥胖<sup>[30]</sup>,说明厚壁菌门具有从相同饮食中获取更多能量的能力。哈尼梯田稻鲤共作模式中,鲤全程无任何投喂,摄食都是天然饵料水生动物或者小型昆虫,为了最有效地利用有限的食物资源以获取更多能量,鲤肠道形成了以厚壁菌门为绝对主导的优势菌群结构。

本研究从微生物角度揭示哈尼梯田稻田增



加鲤养殖后, 其综合种养复合生态系统的土壤理化性状变化情况, 及该系统适应菌群结构的变化机制, 但这一机制缺乏长期的指标检测验证, 同时哈尼梯田布局独特, 在海拔800~2 500 m都有分布, 此外, 一山分四季、十里不同天的奇异气候都有可能形成不同的微生态系统。因此, 仍需进一步对哈尼梯田复合生态系统中微生物群落结构进行研究, 尤其是增加长期的稻渔综合种养模式下的不同海拔、不同养殖阶段土壤相关指标的变化检测及养殖鱼类与其他地区相同养殖模式下的生长指标及肠道菌群差异比较, 从而更全面科学地了解哈尼梯田稻渔复合生态系统。

#### 参考文献:

- [1] 孙刚, 房岩, 韩德复. 复合种养水田生态系统的综合效益[J]. *农业与技术*, 2006, 26(5): 48-50.  
Sun G, Fang Y, Han D F. Comprehensive profits of integrated farming rice field ecosystem[J]. *Agriculture & Technology*, 2006, 26(5): 48-50(in Chinese).
- [2] Lu J B, Li X. Review of rice-fish-farming systems in China-one of the globally important ingenious agricultural heritage systems (GIAHS)[J]. *Aquaculture*, 2006, 260(1-4): 106-113.
- [3] Hu L L, Ren W Z, Tang J J, *et al.* The productivity of traditional rice-fish co-culture can be increased without increasing nitrogen loss to the environment[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2013, 177: 28-34.
- [4] Berg H, Tam N T. Decreased use of pesticides for increased yields of rice and fish-options for sustainable food production in the Mekong Delta[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 619-620: 319-327.
- [5] Islam M R, Tabeta S. Shrimp vs prawn-rice farming in Bangladesh: a comparative impacts study on local environments and livelihoods[J]. *Ocean & Coastal Management*, 2019, 168: 167-176.
- [6] Frei M, Becker K. A greenhouse experiment on growth and yield effects in integrated rice-fish culture[J]. *Aquaculture*, 2005, 244(1-4): 119-128.
- [7] Bhattacharyya P, Sinhababu D P, Roy K S, *et al.* Effect of fish species on methane and nitrous oxide emission in relation to soil C, N pools and enzymatic activities in rainfed shallow lowland rice-fish farming system[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2013, 176: 53-62.
- [8] 罗衡, 赵良杰, 李丰, 等. 养殖鳖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): 720-732.  
Luo H, Zhao L J, Li F, *et al.* Effects of the introduction of cultured turtle on soil bacterial community structure in paddy field[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(5): 720-732(in Chinese).
- [9] 成永旭, 刘洪天, 常东, 等. 稻蟹共作与蟹单作模式下中华绒螯蟹肠道及养殖环境细菌群落组成比较[J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(5): 682-690.  
Cheng Y X, Liu H T, Chang D, *et al.* A comparative study of microbiota from the intestine of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and their culture environment, between rice-crab co-culture and crab monoculture models[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(5): 682-690(in Chinese).
- [10] Si G H, Yuan J F, Xu X Y, *et al.* Effects of an integrated rice-crayfish farming system on soil organic carbon, enzyme activity, and microbial diversity in waterlogged paddy soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(1): 29-35.
- [11] 蒋哲姝, 陈红磊, 蒋高中. 世界文化遗产的可持续保护与精准扶贫有机结合的成功实践—以云南红河哈尼梯田“稻渔共作”养殖模式为例[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(23): 160-164.  
Jiang Z S, Chen H L, Jiang G Z. Combinative practice of sustainable protection of world cultural heritage and targeted poverty alleviation: a case study of “rice-fish culture” mode in Hani terraced fields of Honghe, Yunnan[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018, 34(23): 160-164(in Chinese).
- [12] 成斌斌. 土壤pH的测定[J]. *化学教与学*, 2014(4): 95-97.  
Cheng B B. Determination of soil pH[J]. *Chemistry Teaching and Learning*, 2014(4): 95-97(in Chinese).
- [13] 张薇, 付昀, 李季芳, 等. 基于凯氏定氮法与杜马斯燃烧法测定土壤全氮的比较研究[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(35): 172-175.  
Zhang W, Fu Y, Li J F, *et al.* Comparative study on Kjeldahl method and Dumas combustion method for total nitrogen measurement in soil[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(35): 172-175(in Chinese).
- [14] Webb B, Adeloju S B. Evaluation of some wet digestions methods for reliable determination of total phosphorus in Australian soils[J]. *Microchemical*

- Journal*, 2013, 111: 47-52.
- [15] 夏栋, 潘家荣, 张博, 等. 土壤速效氮两种测定方法的测定值相关性研究[J]. 三峡大学学报(自然科学版), 2010, 32(2): 95-97, 102.
- Xia D, Pan J R, Zhang B, *et al.* Relational analysis of measurement values of available N in soil with two methods[J]. *Journal of China Three Gorges University (Natural Science Edition)*, 2010, 32(2): 95-97, 102(in Chinese).
- [16] 杨勇. 稻渔共作生态特征与安全优质高效生产技术研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2004.
- Yang Y. Study on ecological characteristic and technique for safe, good quality and high benefit of rice-fish culture[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2004(in Chinese).
- [17] Feng J F, Li F B, Zhou X Y, *et al.* Nutrient removal ability and economical benefit of a rice-fish co-culture system in aquaculture pond[J]. *Ecological Engineering*, 2016, 94: 315-319.
- [18] 洪颖. 活性污泥沉降性能的影响因子及微生物群落分布研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2018.
- Hong Y. Study on influencing factors and microbial community of activated sludge settling performance[D]. Urumqi: Xinjiang University, 2018(in Chinese).
- [19] Farag I F, Davis J P, Youssef N H, *et al.* Global patterns of abundance, diversity and community structure of the *Aminicenantes* (candidate phylum OP8)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92139.
- [20] 麻微微. 沼气发酵复合菌系厌氧发酵特性及微生物群落结构分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015.
- Ma W W. Methane-producing composite strains anaerobic digestion and microbial community structure analysis[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2015(in Chinese).
- [21] Zhao L, Ji Y, Sun P Z, *et al.* Effects of individual and complex ciprofloxacin, fullerene C60, and ZnO nanoparticles on sludge digestion: methane production, metabolism, and microbial community[J]. *Bioresour Technol*, 2018, 267: 46-53.
- [22] 刘其根, 李丰, 罗衡, 等. 引入养殖鳖对稻田土壤固氮菌的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(3): 483-492.
- Liu Q G, Li F, Luo H, *et al.* The influence of introducing soft-shelled turtle on soil nitrogen-fixing microorganisms in paddy field[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(3): 483-492(in Chinese).
- [23] 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.
- [24] Meng H, Zhang Y, Zhao L L, *et al.* Body weight selection affects quantitative genetic correlated responses in gut microbiota[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89862.
- [25] Benson A K, Kelly S A, Legge R, *et al.* Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(44): 18933-18938.
- [26] Rawls J F, Mahowald M A, Ley R E, *et al.* Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection[J]. *Cell*, 2006, 127(2): 423-433.
- [27] Wei S, Morrison M, Yu Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome[J]. *Poultry Science*, 2013, 92(3): 671-683.
- [28] 谭振, 翟丽维, 陈少康, 等. 肠道微生物与宿主遗传背景互作关系的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2016, 52(5): 84-88.
- Tan Z, Zai L W, Chen S K, *et al.* Research progress of intestinal microbes interactions with the host genetic background[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2016, 52(5): 84-88(in Chinese).
- [29] 饶刘瑜, 李学梅, 李星浩, 等. 转基因鲤鱼与对照鲤肠道微生物群落差异研究[J]. 水生生物学报, 2018, 42(2): 349-355.
- Rao L Y, Li X M, Li X H, *et al.* Comparison between the intestinal bacterial communities of the transgenic common carp and the controls[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(2): 349-355(in Chinese).
- [30] Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.

## Microbial community structure of the rice-carp co-culture systems in Hani Terraces

NIE Zhijuan<sup>1</sup>, LI Feifan<sup>2</sup>, ZHAO Wenwu<sup>3</sup>, XU Gangchun<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1</sup>,  
WANG Yuyu<sup>1</sup>, SHAO Nailong<sup>1</sup>, HU Jiawen<sup>1</sup>, XU Pao<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214128, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. National Fisheries Technical Extension Center, China Society of Fisheries, Beijing 100125, China)

**Abstract:** This study was conducted to explore the ecological advantages in the rice-fish co-culture systems in Hani Terrace. High-throughput sequencing technique was used to analyse the bacterial diversity of water, surface soil, root soil and carp intestine (16S *rDNA*) between rice-carp co-culture (RC) and rice-monoculture (CK) models. The results showed that Proteobacteria, Actinomycetes, Firmicutes, Chlorobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Nitrospira and Bacteroidetes were the dominant phyla of the rice-fish co-culture systems. Compared with CK group, the relative abundance of Chlorobacteria and Firmicutes in RC surface soil significantly increased, and the significantly increased genera mainly included *Anaerolineaceae\_norank*, *Aminicenantes\_p\_norank*, *Chloroflexi\_p\_unclassified*, *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*, *Clostridium\_sensu\_stricto\_12*, *Syntrophaceae\_f\_norank*, *Gemmatimonadaceae\_f\_norank*. The relative abundance of Chlorobacteria in root soil was significantly increased in RC group compared with CK group, and the significantly increased genera included *Anaerolineaceae\_norank*, *Sideroxydans*, *Aminicenantes\_p\_norank*, *Chloroflexi\_p\_unclassified*, *Gemmatimonadaceae\_f\_norank*. The dominant phyla of intestine bacterial communities in RC group were Firmicutes and Proteobacteria, and the relative abundance of Firmicutes was 58.59%. The pH, total nitrogen, ammonia-N, nitrate-N, hydrolysis nitrogen, total phosphorus, available phosphorus and soil organic carbon contents were lower in the surface soil of RC group than the CK group, and the pH, total P and available P were significantly reduced. Sobs and PD indexes of bacteria in surface and root soil of RC group were also increased, and these two indexes were significantly increased in the surface soil of RC group. In brief, the introduction of fish to rice farming ecosystems changed the physico-chemical properties and bacterial community structure of surface soils, and also affected the microbiota community structure of root soil and fish intestine to a certain extent. Our preliminary results provide microbial ecological evidences for the advantages of rice-carp co-culture over rice monoculture system.

**Key words:** Hani Terraces; the rice-carp co-culture systems; microbial community structure; high-throughput sequencing

**Corresponding author:** XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn

**Funding projects:** Special Project of Basic Scientific Research Operation Expenses of Chinese Academy of Fishery Sciences(2019HY-YJ0201)