

刘瑛涵, 任伟征, 赵璐峰, 等. 稻鱼共生系统土壤微生物群落组成和功能特征 [J]. 华南农业大学学报, 2024, 45(6): 865-877.
LIU Yinghan, REN Weizheng, ZHAO Lufeng, et al. Community structure and functional features of soil microbes in the rice-fish co-culture system[J]. Journal of South China Agricultural University, 2024, 45(6): 865-877.

稻鱼共生系统土壤微生物群落组成和功能特征

刘瑛涵¹, 任伟征², 赵璐峰¹, 郭 梁³, 刘益曦¹, 胡亮亮^{1,4}, 陈 欣¹

(1 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310058; 2 河南农业大学 林学院, 河南 郑州 450002;

3 浙江树人大学 生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310015; 4 上海海洋大学

水产与生命学院, 上海 201306)

摘要:【目的】研究稻鱼共生系统 (Rice-fish co-culture system, RF) 土壤微生物群落结构特征, 并分析其碳氮循环相关功能与水稻单作系统 (Rice monoculture system, RM) 的差异。【方法】水稻生长季在全球重要农业文化遗产——青田稻鱼共生系统的保护地开展稻田土壤取样, 采用高通量测序技术, 比较 RF 和 RM 中土壤细菌和古菌群落结构和功能差异。【结果】RF 土壤细菌和古菌的优势菌门和优势菌属与 RM 保持一致, 但 α 多样性均显著提高; RF 促进土壤微生物间相互作用和网络优势模块功能多样化, 但是对于群落网络稳定性的影响并不明确。基于 FAPROTAX 功能预测, 相较于 RM, RF 增强了甲烷氧化和氮固定作用之间的正相关关系, 减弱了硝化作用与甲烷产生和反硝化作用之间的相关性以及甲烷氧化与反硝化作用之间的相关性。典型关联分析结果表明, 与 RM 相比, RF 降低了土壤有机质、速效氮和速效磷含量对土壤微生物群落结构的影响, 同时增强了土壤总磷含量和土壤 pH 的影响。【结论】青田传统稻鱼共生系统有助于提高稻田土壤微生物群落 α 多样性, 整体上增强土壤微生物间的相互作用和网络复杂性, 但是减弱了甲烷和氮素循环过程相关微生物功能群的相互关系。本研究结果为进一步揭示水稻-水生动物共生系统的微生物生态学过程提供了研究基础。

关键词: 稻鱼共生; 土壤微生物; 微生物网络; 功能预测

中图分类号: Q143; S154.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2024)06-0865-13

Community structure and functional features of soil microbes in the rice-fish co-culture system

LIU Yinghan¹, REN Weizheng², ZHAO Lufeng¹, GUO Liang³, LIU Yixi¹, HU Liangliang^{1,4}, CHEN Xin¹

(1 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2 College of Forest, Henan Agricultural University,

Zhengzhou 450002, China; 3 College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren

University, Hangzhou 310015, China; 4 College of Fisheries and Life Science,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: 【Objective】This study aimed to investigate the soil microbial community structure of the rice-fish co-culture system (RF), and compare its microbial functions on carbon and nitrogen cycling to those of rice monoculture system (RM). 【Method】We sampled soil from paddies during the rice growth season at the site of

收稿日期: 2024-06-22 网络首发时间: 2024-09-19 09:24:13

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20240918.1737.012>

作者简介: 刘瑛涵, 博士研究生, 主要从事农业生态学和微生物生态学研究, E-mail: lyh09190215@126.com; 通信作者:

胡亮亮, 副研究员, 博士, 主要从事农业生物多样性利用原理和效应研究, E-mail: zjuhull@126.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFD2401801); 浙江省“领雁”研发攻关计划 (2022C02058); 浙江省公益技术应用项目 (LGN22C030002); 浙江省“尖兵”研发攻关计划 (2022C02008)

the Qingtian rice-fish co-culture system, a globally important agricultural cultural heritage. Using high-throughput sequencing technology, we compared the structure and function of soil bacterial and archaeal communities between RF and RM. 【Result】 RF significantly increased the α -diversity of bacterial and archaeal communities, while the dominant phyla or genera remained the same as RM. RF also improved the interactions among soil microbes and the functional diversity of dominant network modules, but its effect on network stability was unclear. Based on FAPROTAX prediction of functions, RF strengthened the positive relationship between methane oxidation and nitrogen fixation compared to RM. However, RF weakened the relationship between nitrification and methane production/denitrification, as well as the relationship between methane oxidation and denitrification. The canonical correlation analysis results demonstrated that, compared with RM, RF reduced the effects of soil organic matter, available N, and available P contents on soil microbial community structure but enhanced the effects of soil total phosphorus content and soil pH. 【Conclusion】 In Qingtian, the traditional rice-fish co-culture system increases the α -diversity of soil microbial communities, global microbial interactions, and the complexity of microbial networks. However, traditional RF weakens the relationships between different microbial functional groups involved in methane and nitrogen cycling. These findings provide a basis for further research on the microbial ecological processes in rice-aquatic animal co-culture systems.

Key words: Rice-fish co-culture; Soil microbe; Microbial network; Function prediction

水稻种植和水产养殖的结合 (即稻田综合种养, 在稻田中养殖各种水生动物, 包括鲤鱼、螃蟹、小龙虾等) 被认为是一种可减少农业化学品投入、有效利用耕地和淡水资源, 从而实现碳水化合物 (水稻) 和动物蛋白 (水生动物) 绿色生产的可持续农业模式。稻鱼共生系统 (Rice-fish co-culture system, RF) 在我国和东南亚国家具有悠久历史^[1-2], 传统养殖的对象以鲤鱼和鲫鱼为主。截至 2022 年, 我国稻田综合种养面积达 $2.86 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 其中, 稻鱼共生系统占比 34.92%, 为现阶段第二大模式^[3]。

与水稻单作相比, 水稻和水生动物的种养结合可促进稻田资源的高效利用和生态系统服务的提升^[4-5]。文献整合分析表明, 稻田综合种养系统水稻产量较水稻单作系统 (Rice monoculture system, RM) 提高 1.45%~27.00%^[6]。水生动物的觅食和排泄活动增加了土壤氮、磷元素及有机质的含量, 且长期淹水环境减缓了养分的流失^[7], 因此稻鱼共生系统能够显著增加稻田土壤有机碳和总氮含量^[8]。研究表明, 稻鱼共生系统可以减少化肥施用, 提高养分利用效率^[4], 减少 NH_3 挥发、N 径流和 N 淋溶等途径的氮素流失^[9], 并减缓稻田温室气体排放^[10-11]。

近年来, 微生物测序与分析技术被用于稻田土壤微生物群落研究。其中, 微生物网络分析逐渐被应用于探索群落聚集模式、可视化展示不同类

群对农艺措施的响应模式和识别微生物群落关键种等方面^[12]。对于稻鱼共生系统的研究表明, 该系统不仅能够增加土壤微生物多样性^[13], 还能够提高土壤微生物共现网络节点、连接数等, 增加微生物群落的复杂性^[14]。此外, 稻鱼共生系统也对土壤微生物群落功能产生影响。例如, 稻鱼共生系统产甲烷菌和甲烷氧化菌丰度显著高于水稻单作^[15-16]。鱼类活动增加水体氧气含量, 增加土壤微生物对土壤氮等物质的矿化作用^[17], 且鱼类对于沉积物的取食进一步增加了土壤细菌丰度^[18], 加速微生物土壤营养元素循环。但是现阶段稻鱼共生系统土壤微生物的分析方法还多集中于土壤微生物多样性和丰富度等群落组成和结构方面, 对于微生物功能的研究也多基于对微生物功能基因片段的测定。依据可培养分类群数据对土壤微生物群落进行原核分类群生态相关功能注释的 FAPROTAX 算法^[19]与基于 KEGG 代谢通路对微生物潜在功能基因分析方法的出现, 为稻田土壤微生物研究的发展提供了新的思路。功能预测或能够帮助我们进一步了解该系统中土壤微生物群落特征, 揭示水稻和动物共存如何影响稻田土壤微生物群落结构与功能的机理。

为此, 本研究以全球重要农业文化遗产——青田稻鱼共生系统为研究对象, 在水稻分蘖后期对 9 个自然村稻鱼共生系统和水稻单作系统田块土壤

进行采样, 分析土壤细菌和古菌群落结构及生态功能特征, 以阐明当地农户的生产管理下稻鱼共生系统对土壤微生物的影响特征。

1 研究方法

1.1 研究地点简介

青田稻鱼共生系统作为首批全球重要农业文化遗产, 主要分布在青田县东南部的方山乡及其周边的仁庄镇和小舟山乡等乡镇^[20]。当地保留了较为传统的山区稻田养鱼方式, 养殖品种为‘青田田鱼’ *Cyprinus carpio qingtianensis*, 是经历稻田生境长期驯化得到的地方品种, 具有丰富的体色和遗传多样性^[21]。生长季内稻田保持流水淹灌, 投喂以农家饲料为主 (小麦、豆饼和稻谷等), 鲤鱼产量较低 (大多低于 375 kg·hm⁻²)。

本研究开展于青田县 (120.17°E, 28.08°N) 西南部的仁庄镇 (120.25°E, 28.04°N)。仁庄镇与方山乡毗邻, 海拔 80 m, 地属中亚热带季风气候, 温暖湿润, 四季分明, 全年平均气温 18 °C, 无霜期 280 d, 年降雨量 1 897 mm。该地区水稻土的质地为砂壤土, 容重约为 1.12 g·cm⁻³, 土壤呈弱酸性。

1.2 土壤样本采集和保存

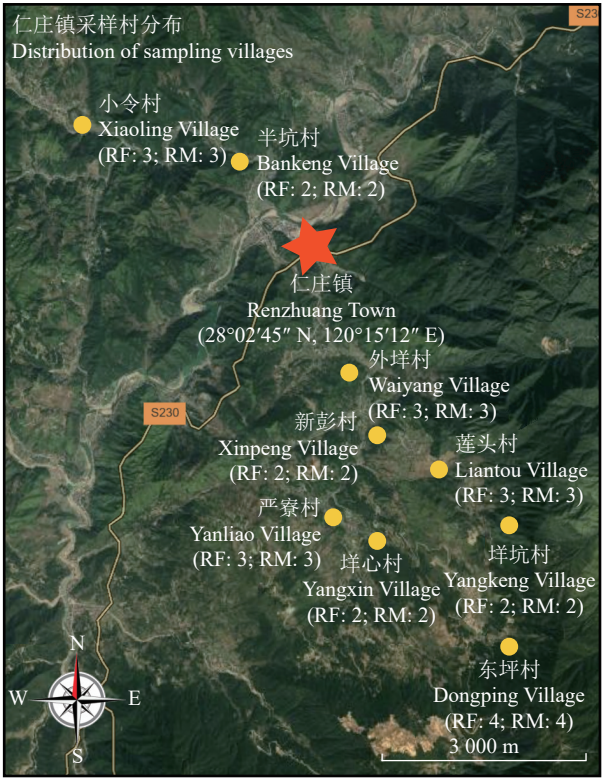
于 2018 年 7 月 20 日—7 月 25 日 (属当地一季稻的分蘖后期), 在仁庄镇随机选择的 9 个自然村 (半坑、东坪、莲头、外垵、小令、新彭、垵坑、严寮和垵心) 内, 随机选择毗邻的稻鱼共生系统 (RF) 和水稻单作系统 (RM) 田块各 2~4 块 (图 1)。在每个田块内随机采集 6 个土芯 (深度 0~10 cm) 后合并为 1 份混合样本。共采集土壤混合样本 48 份, 其中 RF 样本 24 份, RM 样本 24 份。

每份土壤混合样本充分混匀后平均分为 2 个部分。一部分过 20 目网筛后在 4 °C 条件下保存, 用于土壤微生物 DNA 提取; 另一部分放于阴凉通风处干燥, 用于土壤理化性质测定。

1.3 土壤 DNA 提取、PCR 扩增及测序

土壤样本在采集后 1 周内采用 BioFast 土壤基因组提取试剂盒 (杭州博日) 提取微生物 DNA, 样品用量 0.5 g。DNA 提取后经过 7 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳质检, 不合格的样品进行重提。

使用引物组 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 和 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') 从土壤基因组 DNA 中扩增细菌 16S rRNA 基因的 V4~V5 高可变区, 使用引物组 Arch344F (5'-ACGGGGYG CAGCAGGCGCGA-3')



RF 和 RM 后面的数字代表取样田块的数量。
The numbers following RF and RM represent the number of sampling fields.
图 1 稻鱼共生系统 (RF) 和水稻单作系统 (RM) 研究区域示意图

Fig. 1 Map of the research area of rice-fish co-culture system (RF) and rice monoculture system (RM)

和 Arch915R (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3') 从土壤基因组 DNA 中扩增古菌 16S rRNA 基因的 V3~V4 高可变区^[22]。引物由上海生工生物合成。对于正向引物 (515F 和 Arch334F), 在其 5'端添加 barcode 序列 (6 个碱基的随机序列) 用以测序时区分不同样本, 本研究中实际使用 48 个不同的 barcode 序列。PCR 反应体系总体积 25 μL, 由 2.5 μL Buffer, 2.0 μL dNTPs, 0.5×2 μL 引物, 0.5 μL DNA 模板, 0.5 μL rTaq 酶和 18.5 μL ddH₂O 构成。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 45 °C 20 s, 65 °C 30 s 下进行 5 个循环, 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s 进行 20 个循环, 72 °C 5 min。PCR 产物质检、文库构建和高通量测序均由广州美格生物科技有限公司完成, 测序方案为 Illumina Hiseq 2500 双末端测序。

1.4 微生物群落特征和功能分析

细菌和古菌群落 16sRNA 高通量测序数据分析参考 Callahan 等^[23]的方法进行。对原始数据 (Reads) 删除 barcode 和引物序列, 剔除质检不合格的 Reads, 通过 DADA 模型推断实际序列变异数

(Actual sequence variants, ASV)。根据 ASV 进行物种注释。

在对所得 ASV 数据进行抽平处理后,使用 `vegan` 包进行土壤细菌和古菌群落 α 多样性分析,分析群落内分类群的数量和丰度。

对细菌和古菌丰度分别进行归一化处理后,应用在线 LEfSe 分析方法 (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse>),基于 LDA 得分默认值寻找 RF 和 RM 之间差异显著的细菌和古菌类群 (Biomarker)。

为分析 RF 和 RM 土壤微生物群落结构的差异,我们使用 `igraph` 包^[24] 分别针对 RF 和 RM 土壤样本进行微生物共现网络的构建。绘制网络前先将土壤细菌和古菌群落丰度数据分别进行线性函数归一化处理,汇总后再次进行线性归一化处理,以此消除 2 种引物扩增速率差异。微生物网络的节点为 ASV,节点之间的连线代表 ASV 之间显著的相关性。ASV 相关性的计算基于 FastSpar 的 SparCC 方法^[25],保留连线的阈值为 $r>0.6$, $P<0.05$ 。采用 9999 Fruchterman-Reingold 的布局方式在 Gephi 中实现网络可视化^[26]。利用贪婪算法分析网络模块结构并计算各网络属性指标,根据优化得分对识别出的模块进行排序命名。使用 `ggClusterNet` ^[27] 包分别计算 RM 和 RF 网络中各节点的模块内连通性 (Z_i)、参与系数 (P_i)。 Z_i 得分大于 2.50 的 ASV 为模块中心点,而 P_i 得分大于 0.62 的 ASV 为模块连接点。模块中心点和连接点在微生物群落中均扮演着关键种 (Keystone species) 的作用^[28]。

为了评估微生物网络的稳定性,使用 `ggClusterNet` 包对反映网络稳定性的脆弱性指数 (Vulnerability) 和鲁棒性指数 (Robustness) 进行计算^[29]。脆弱性指数为微生物共现网络中各点脆弱值中的最大值,脆弱性指数越小,表示网络稳定性越高。鲁棒性指数指人为随机去除网络中 50% 物种条件下模拟网络物种灭绝后剩余物种数占原物种数比例,鲁棒性指数越大,表示网络稳定性越高。在网络鲁棒性测定时,分别使用了随机去除所有物种和随机去除靶向物种 (针对关键种) 2 种模拟方式。

使用 FAPROTAX v.1.1 算法^[30] 对相对丰度大于 1% 的 ASV 的元素循环相关功能进行预测。对 RF、RM 土壤微生物功能群分别进行相关性网络构建,并采用 9999 Fruchterman-Reingold 的布局方式在 Gephi 中实现网络可视化^[26]。使用 `ggalluvial` 包对 RF 和 RM 微生物群落中碳氮相关功能的 ASV 在优势模块之间的流动进行可视化展示。

1.5 土壤理化性质的测定

采用重铬酸钾氧化-外加热法测定土壤有机碳含量^[31]。采用硫酸-催化剂消解,凯式法测定土壤全氮质量^[32]。分别采用双波长比色法^[33] 和靛酚蓝比色法^[34] 测定土壤硝态氮和铵态氮含量。采用碳酸氢钠法测定速效磷含量^[34]。

1.6 统计分析

为分析 RF 与 RM 土壤微生物群落结构变化的主控环境因子,使用 `vegan` 包将土壤微生物群落结构与土壤理化性质进行典型关联分析 (Canonical correlation analysis, CCA)。

采用单因素方差分析 (SPSS V26.0) 对 RF 和 RM 间土壤微生物多样性指数与土壤微生物各功能群相对丰度的差异进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 稻鱼共生系统和水稻单作系统土壤微生物群落组成和多样性

根据高通量测序结果,平均每份土壤样本细菌和古菌单向序列数分别为 36348 和 47799 条,对正反向序列比对合并后平均片段长度分别为 373、383 bp。去除重复序列及嵌合体后,使用 DADA 模型推断获得细菌和古菌的 ASV 数量分别为 8495 和 3433 个。其中,RF 和 RM 共有的土壤细菌 ASV 数量为 2196 个,分别占 RF(总 ASV 数量 5535) 和 RM(总 ASV 数量 5156) 的 39.67% 和 42.59%;共有的土壤古菌 ASV 数量为 831 个,分别占 RF(总 ASV 数量 2123) 和 RM(总 ASV 数量 2141) 的 39.14% 和 38.81%。

经注释后,细菌划分为 15 个门、28 个纲、50 个目、77 个科和 153 个属,古菌则为 7 个门、14 个纲、16 个目、17 个科和 17 个属。

在门分类水平上,细菌群落中相对丰度较高的为变形菌门 *Proteobacteria* (RF: 25.53%, RM: 27.82%)、绿弯菌门 *Chloroflexi* (RF: 16.78%, RM: 14.38%)、酸杆菌门 *Acidobacteria* (RF: 15.65%, RM: 17.61%) 和拟杆菌门 *Bacteroidetes* (RF: 14.11%, RM: 13.22%)(图 2a)。古菌群落中相对丰度较高的为泉古菌门 *Crenarchaeota* (RF: 34.16%, RM: 26.10%)、奇古菌门 *Thaumarchaeota* (RF: 21.94%, RM: 33.27%)、佩斯古菌门 *Pacearchaeota* (RF: 13.66%, RM: 14.67%)、广古菌门 *Euryarchaeota* (RF: 11.71%, RM: 9.53%) 和乌斯古菌门 *Woesearchaeota* (RF: 8.84%, RM: 6.82%)(图 2b)。虽然 RF 显著提高

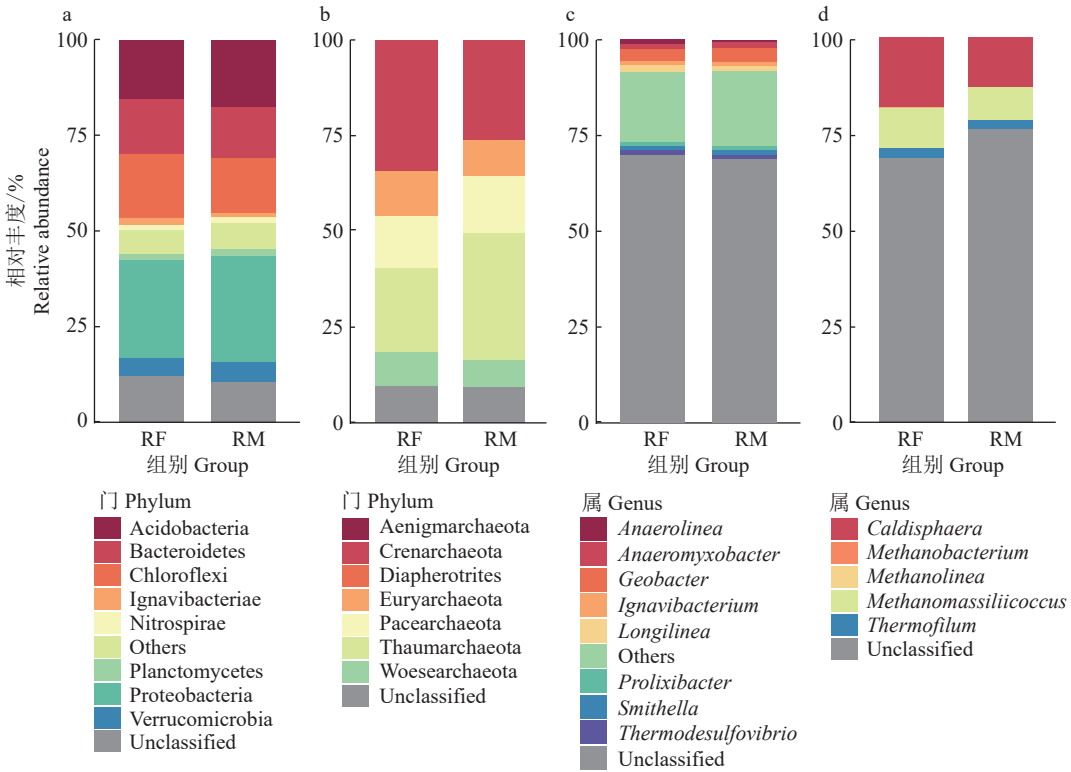


图 2 稻鱼共生系统 (RF) 和水稻单作系统 (RM) 土壤细菌 (a、c) 和古菌 (b、d) 群落组成

Fig. 2 Community compositions of soil bacteria (a, c) and archaea (b, d) in the rice-fish co-culture system (RF) and rice monoculture system (RM)

了稻田土壤中泉古菌门 ($P=0.008$) 与绿弯菌门 ($P=0.026$) 的相对丰度, 但 RF 和 RM 土壤微生物群落优势菌门的种类并无显著差异。

在属分类水平上, 细菌群落中相对丰度较高的菌属为鲍特氏菌属 *Smithella* (RF: 2.95%, RM: 3.74%)、伊格纳维菌属 *Ignavibacterium* (RF: 1.97%, RM: 1.53%) 和厌氧黏细菌菌属 *Anaeromyxobacter* (RF: 1.54%, RM: 1.53%)(图 2c)。古菌群落中仅有 5 个菌属被鉴定, 为大洋球形菌属 *Caldisphaera*(RF: 18.91%, RM: 12.30%)、甲烷杆菌属 *Methanobacterium* (RF: 0.20%, RM: 0.18%)、甲烷粒菌属 *Methanolinea* (RM: 0.001%)、甲烷螺菌属 *Methanomassiliicoccus* (RF: 10.65%, RM: 8.02%) 和热丝菌属 *Thermofilum* (RF: 2.40%, RM: 2.01%)(图 2d)。其中, 大洋球形菌属和甲烷罗菌属占比最高, 而甲烷粒菌属仅在 RM 中被检出。RF 和 RM 土壤微生物群落优势菌属的种类并无显著差异。

LEfSe 分析结果(图 3)表明, RF 土壤显著富集的细菌类群隶属 3 个菌门。其中, 绿弯菌门中有 5 个类群: 暖绳菌属 *Bellilinea*、*Leptolinea*、厌氧绳菌属 *Anaerolinea*、长绳菌属 *Longilinea* 和厌氧绳菌科 *Anaerolineaceae* (科分类名, 以下水平未注释); 变形菌门有 4 个类群: *Rivicola*、罗斯氏菌属 *Roseateles*、

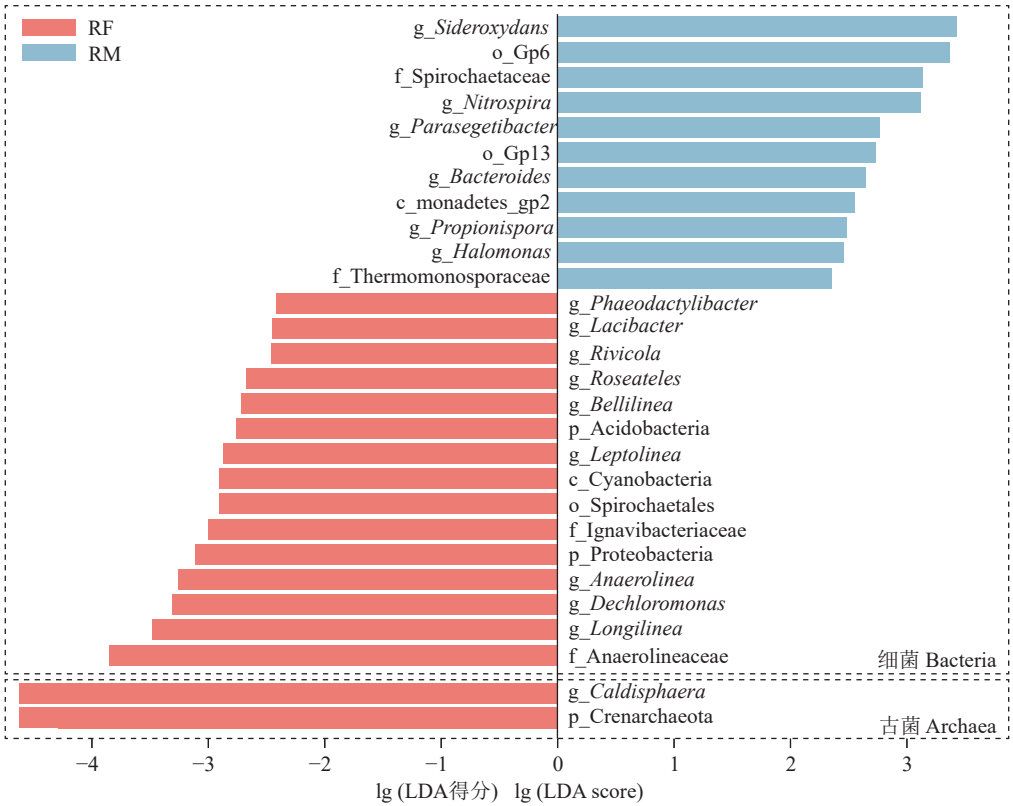
脱氯菌属 *Dechloromonas* 和未分类 (门分类以下水平未注释); 拟杆菌门有 2 个类群: *Phaeodactylibacter* 和乳酸杆菌 *Lacibacter*。而 RM 中显著富集的细菌类群共 11 个, 主要分布于变形菌门、拟杆菌门和酸杆菌门。

RF 土壤显著富集的古菌类群分布在泉古菌门, 为暖球形菌属 *Caldisphaera* 和 1 个未知类群 (门分类以下水平未注释); 而 RM 中无显著富集的古菌类群。

RF 和 RM 的土壤微生物群落 α 多样性存在显著差异(表 1)。对于细菌群落而言, RF 中 3 个物种丰富度指标 (Richness、Chao1、ACE) 分别比 RM 提高 19.79% ($P=0.003$)、20.79% ($P=0.004$) 和 20.59% ($P=0.003$), 而 Shannon 多样性指标比 RM 增加 3.19% ($P=0.003$)。对于古菌群落而言, RF 中 3 个物种丰富度指标 (Richness、Chao1、ACE) 分别比 RM 提高 7.56% ($P<0.001$)、9.21% ($P=0.001$) 和 8.63% ($P=0.001$), 2 个多样性指标 (Shannon 和 Simpson) 分别比 RM 增加 3.80% ($P=0.001$) 和 1.04% ($P=0.009$)。

2.2 稻鱼共生系统和水稻单作系统土壤微生物网络结构

为进一步了解 RF 和 RM 土壤微生物群落差



各名称前小写字母代表所能鉴别到的最小分类单元 (p: 门, c: 纲, o: 目, f: 科, g: 属)。

The lowercase letters before each name represent the smallest identifiable taxonomic unit (p: Phylum, c: Class, o: Order, f: Family, g: Genus).

图 3 稻鱼共生系统 (RF) 和水稻单作系统 (RM) 土壤细菌和古菌群落 LEfSe 分析

Fig. 3 LEfSe analysis of soil bacteria and archaea in the rice-fish co-culture system (RF) and rice monoculture system (RM)

表 1 稻鱼共生系统 (RF) 和水稻单作系统 (RM) 的土壤微生物群落 α 多样性¹⁾

Table 1 Alpha diversity of soil microbial communities in the rice-fish co-culture system (RF) and rice monoculture system (RM)

界 Kingdom	系统 System	Shannon	Simpson	Richness	Chao1	ACE
细菌 Bacteria	RF	5.83±0.05**	1.00±0.000	470.54±23.79**	486.73±26.32**	481.69±25.75)**
	RM	5.65±0.05	1.00±0.000	392.79±24.71	402.97±27.41	399.46±26.57
古菌 Archaea	RF	4.37±0.09***	0.97±0.004**	177.25±12.79***	191.93±14.97***	192.28±15.66***
	RM	4.21±0.12	0.96±0.006	164.79±14.75	175.75±17.01	177.00±17.58

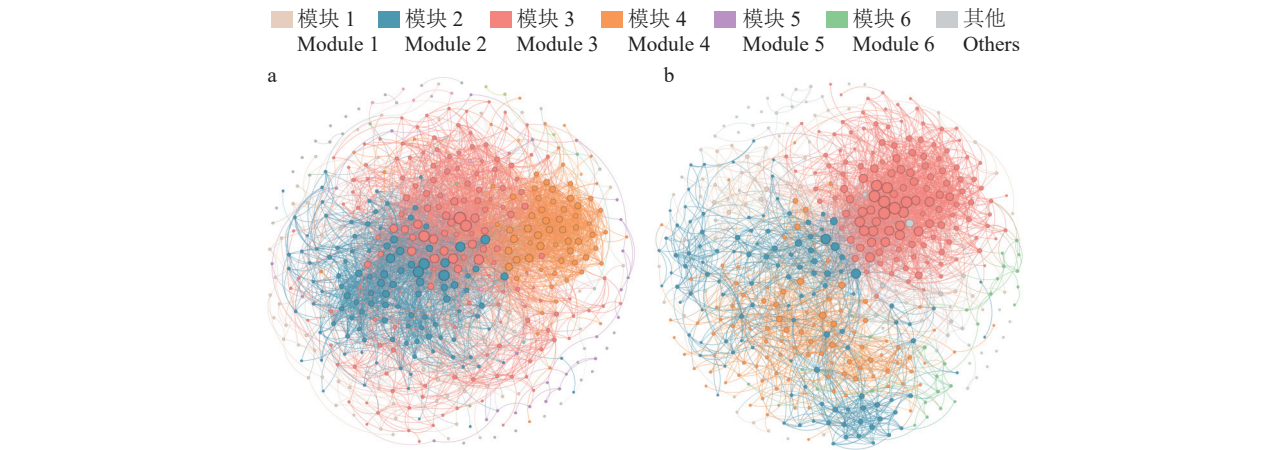
1)表中数据为平均值±标准误; “**” “***” 分别表示处理间差异达到0.01和 0.001的显著水平 (单因素方差分析)。
1) Data in the table is mean±standard error; “**” and “***” indicate the differences between treatments reach 0.01 and 0.001 significance levels, respectively(One-way ANOVA).

异, 构建基于相对丰度相关性的微生物网络 (图 4) 并计算网络的拓扑性质 (表 2)。

结果表明, RF 和 RM 的微生物网络节点数量差异微小, 分别包含 475 和 480 个节点。RF 网络中表征物种共现性的连接数、平均度、连接密度以及平均聚类系数分别较 RM 提高 41.1%、42.6%、46.4% 和 2.4%, 而平均路径长下降 12.7%, 表明 RF 土壤微生物之间存在更多的共生关系。在模块化结构性方面, RF 网络模块数量较 RM 增加 19.2%, 分别是 31 和 26, 其模块性指数较 RM 增加 27.9%,

分别为 0.916 和 0.716(网络模块指数理论范围为 -0.5~1.0, 越接近 1 代表模块性越高)。综合以上网络拓扑性质, 表明 RF 土壤微生物群落比 RM 具有更高的网络复杂性, 模块内物种之间具有更强的相关性。

RF 和 RM 微生物网络均具有明显的模块聚集效应, 即少数优势模块包含了绝大部分的 ASV, 而大部分模块仅包含微量 ASV (ASV 总数小于 10)。在 RF 网络中, 模块 1、2、3、4 和 5 包含了 90.32% 的节点; 而在 RM 网络中, 模块 1、2、3、4 和 6 包含了 90.46% 的节点。进一步分析各



节点代表 ASV, 节点连接线代表节点之间相对丰度具有显著相关性 ($r>0.60$, $P<0.01$, 单因素方差分析); 模块排序基于其模块化得分。
Nodes represent ASVs and edges indicate significant correlations of relative abundance between nodes ($r>0.60$, $P<0.01$, One-way ANOVA); Modules were ranked based on their modularity score.

图 4 稻鱼共生系统 (a) 和水稻单作系统 (b) 的土壤微生物群落共现网络
Fig. 4 The co-occurrence network of soil microbial community in the rice-fish co-culture system (a) and rice monoculture system (b)

表 2 稻鱼共生系统 (RF) 和水稻单作系统 (RM) 土壤微生物网络主要拓扑性质

Table 2 Major topological properties of microbial networks in the rice-fish co-culture system (RF) and rice monoculture system (RM)

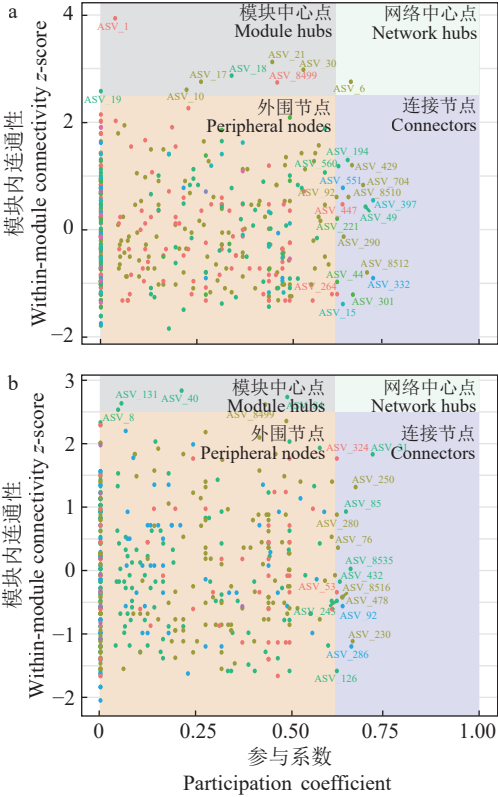
网络属性 Network property	RF	RM
节点数量 Number of nodes	475	480
连接数量 Number of edges	4590	3253
连接密度 Edges density	0.041	0.028
平均度 Average degree	19.326	13.555
平均路径长 Average path length	4.932	5.654
聚类系数 Clustering coefficient	0.419	0.409
模块数量 Number of modules	31	26
模块性 Modularity index	0.916	0.716
脆弱性 Vulnerability	0.009	0.011
鲁棒性(随机去除) Random robustness	0.414	0.434
鲁棒性(靶向去除) Targeted robustness	0.926	0.922

ASV 的拓扑结构属性, 发现 RF 网络中模块中心点和连接点的 ASV 数量较 RM 分别增加 60.0% 和 28.6%(图 5)。

在网络稳定性方面, RF 脆弱性指数较 RM 降低 18.0%, 分别为 0.009 和 0.011; 在随机移除情况下, RF 网络鲁棒性较 RM 降低 6.2%($P=0.043$); 而关键物种的去除对于 RF 和 RM 网络影响的差异相对微小 (表 2)。

2.3 稻鱼共生系统和水稻单作系统土壤微生物群落功能特征

功能预测分析发现, 土壤微生物各功能群相对丰度在 RF 和 RM 之间无显著差异 ($P>0.05$), 排



横线表示模块内连通性 (Z_i) 为 2.50, 竖线表示参与系数 (P_i) 为 0.62, 图中点代表不同 ASV。

The horizontal line indicates that the connectivity (Z_i) within the module is 2.5, the vertical line indicates that the participation factor (P_i) is 0.62, and the dots represent different ASVs.

图 5 稻鱼共生系统 (a) 和水稻单作系统 (b) 土壤微生物拓扑角色

Fig. 5 Topological roles of soil microbial communities in the rice-fish co-culture system (a) and rice monoculture system (b)

序为硝化作用>甲烷产生作用>甲烷氧化作用>氮固定作用>反硝化作用 (图 6a)。功能群丰度相关

性分析 (图 6b、6c) 表明, 甲烷产生和甲烷氧化在 RF、RM 中均呈现显著正相关关系 (RF: $r=0.40$, $P=0.042$; RM: $r=0.43$, $P=0.046$), 甲烷产生和氮固定 (RF: $r=-0.40$, $P<0.001$; RM: $r=-0.46$, $P=0.030$), 甲烷氧化和硝化 (RF: $r=-0.01$, $P=0.028$; RM: $r=-0.48$, $P=0.025$) 则均呈现显著负相关关系。RF 中甲烷氧化和氮固定存在显著正相关关系 ($r=0.05$, $P=0.049$), 但在 RM 中相关性并不显著

($r=0.17$, $P>0.05$); 与之相反, 仅在 RM 中存在显著关系但在 RF 中相关性不显著的有: 甲烷产生与硝化之间的负相关关系 (RF: $r=-0.52$, $P>0.05$; RM: $r=-0.66$, $P<0.001$), 硝化与反硝化作用的正相关关系 (RF: $r=0.38$, $P>0.05$; RM: $r=0.46$, $P=0.032$) 以及甲烷氧化和反硝化之间的负相关关系 (RF: $r=0.11$, $P=0.072$; RM: $r=-0.58$, $P=0.004$)。

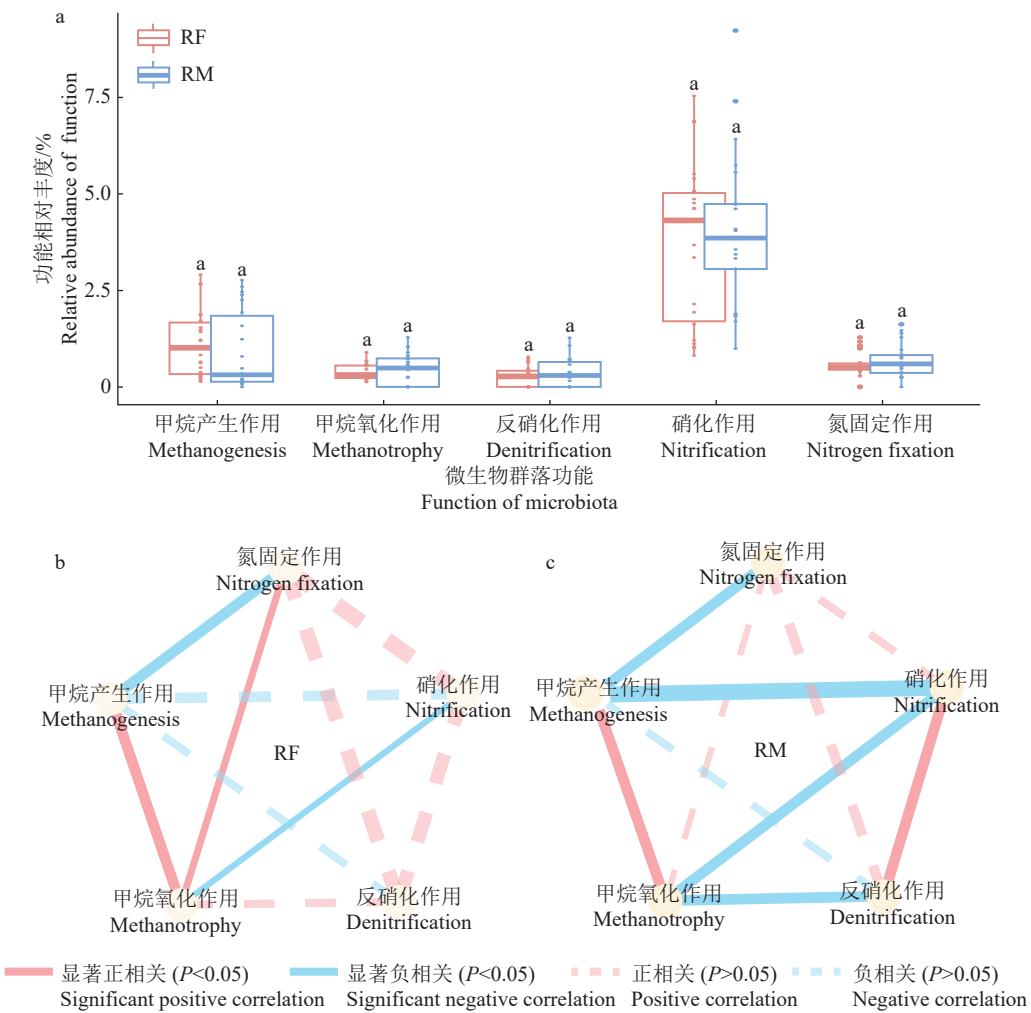


图 a 中, 不同箱型图上方, 相同的小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$, 单因素方差分析)。
In figure a, the same lowercase letters above the boxes indicate no significant difference ($P>0.05$, One-way ANOVA).

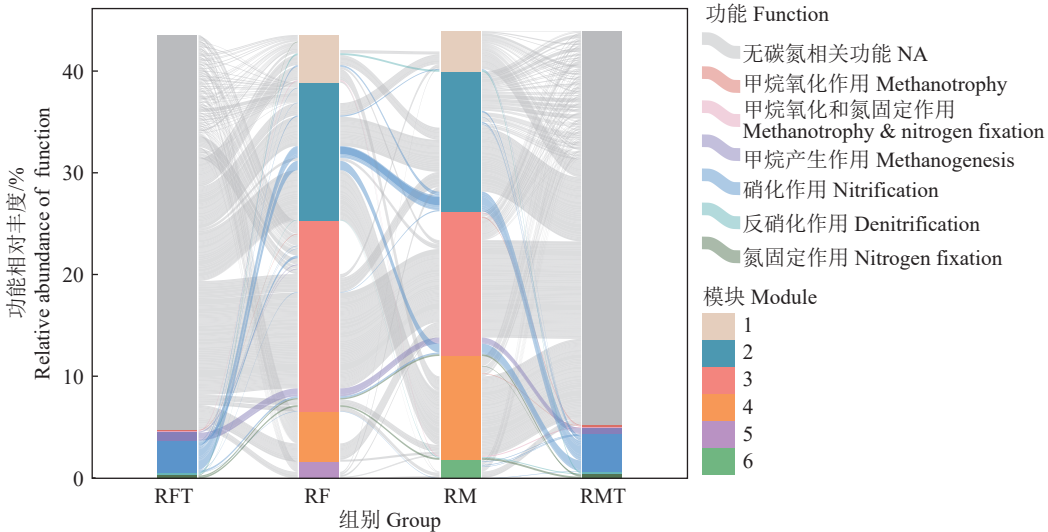
图 6 稻鱼共生系统 (RF) 和水稻单作系统 (RM) 土壤功能微生物相对丰度 (a) 和相关性网络 (b、c)
Fig. 6 Relative abundance (a) and correlation networks (b, c) of functional microbes in the soils of rice-fish co-culture system (RF) and rice monoculture system (RM)

RF 和 RM 网络的优势模块中, 功能微生物群落结构存在显著差异。其中, RF 优势模块的甲烷产生 ($P<0.001$) 与反硝化 ($P=0.001$) 相关微生物丰度均显著高于 RM。另一方面, 不同功能在优势模块之间的分布也存在差异。RM 优势模块中的功能较为分散, 如硝化作用分散于模块 1、2、3 和 6 而反硝化作用同时存在于模块 1 和 4, 但是在 RF 网络中

硝化和反硝化作用均集中于模块 2 中; 氮固定作用在 RM 网络中分散于模块 3 和 4, 但是在 RF 网络则集中于模块 1 中 (图 7)。

2.4 土壤微生物群落与土壤理化性质的关系

CCA 结果表明, 土壤理化性质对 RF 和 RM 土壤微生物群落结构的影响存在差异 (图 8)。土壤 pH 和总磷含量主要决定 RF 中 ASV 在轴 1 的分



RFT: RF 网络优势模块的微生物功能组成; RMT: RM 网络优势模块的微生物功能组成; 柱间连线基于共有 ASV 绘制。

RFT: Functional composition of the dominant modules in the RF network; RMT: Functional composition of the dominant modules in the RM network; Belts connect the same ASVs among all columns.

图 7 稻鱼共生系统 (RF) 和水稻单作系统 (RM) 土壤微生物网络优势模块相对丰度和功能分布

Fig. 7 Relative abundance and functional distribution of dominant modules in the microbial networks of the rice-fish co-culture system (RF) and rice monoculture system (RM)

布, 有效氮和总氮含量则为轴 2 分布的主要决定因素 (图 8a、8b)。RM 中 ASV 沿轴 1 与轴 2 的分布则分别由土壤有效磷和总磷含量、有效氮和有效磷含量决定 (图 8d、8e)。相较于 RM, 土壤速效氮

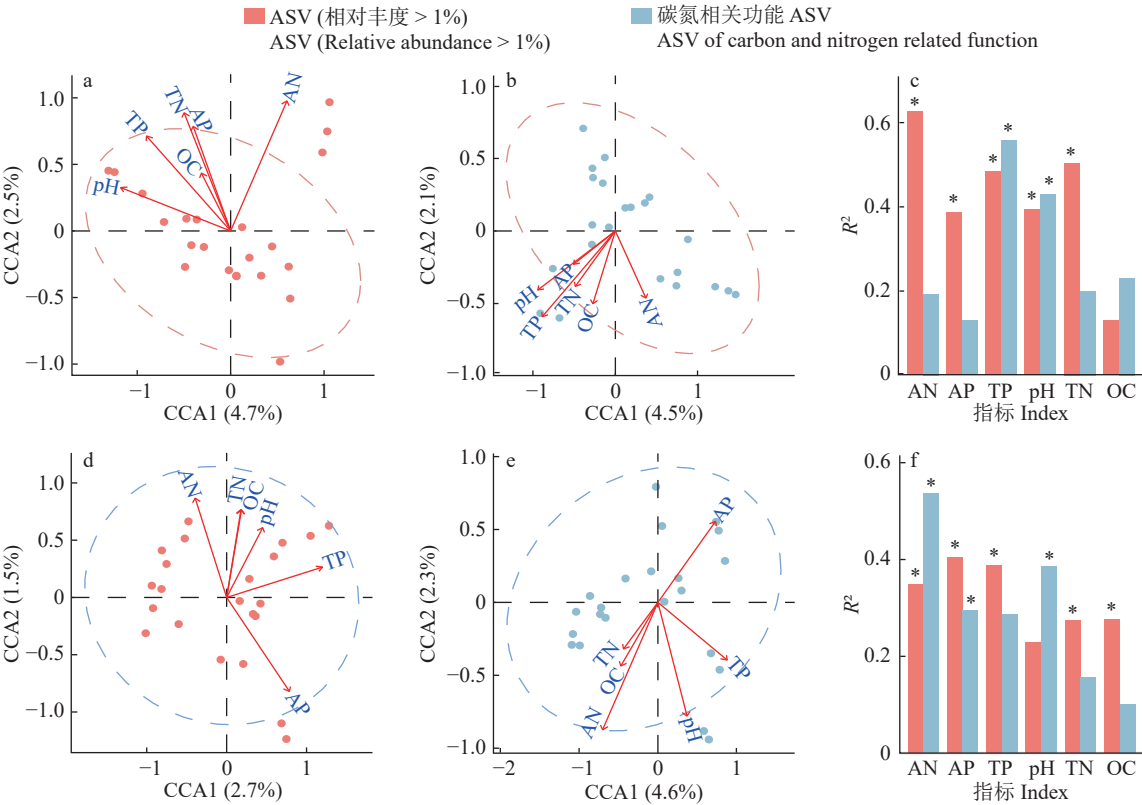


图 c 和 f 展示了 a、b、d 和 e 中不同土壤理化性质对土壤微生物群落的影响; AN: 土壤有效氮含量, AP: 土壤有效磷含量, TN: 土壤总氮含量, TP: 土壤总磷含量, OC: 土壤有机碳含量; “*” 表示影响显著 ($P<0.05$, CCA 法)。

Figures c and f show the effects of soil properties on the soil microbial structures in a, b, d and e; AN: Available nitrogen content, AP: Available phosphorus content, TN: Total nitrogen content, TP: Total phosphorus content, OC: Organic carbon content; “*” indicates the effect is significant ($P<0.05$, CCA method).

图 8 稻鱼共生系统 (RF)(a、b、c) 和水稻单作系统 (RM)(d、e、f) 土壤微生物群落与土壤理化性质的典型关联分析

Fig. 8 Canonical correlation analysis of the relationship between soil microbial communities and soil physicochemical properties in the rice-fish co-culture system (RF)(a, b, c) and rice monoculture system (RM)(d, e, f)

($R^2=0.63$, $P=0.001$) 和速效磷含量 ($R^2=0.39$, $P=0.007$) 均只影响 RF 中 ASV 的分布, 总磷含量则对 RF 碳氮相关功能菌群也表现出显著影响 ($R^2=0.56$, $P=0.002$), 土壤有机碳的影响在 RF 中消失。

3 讨论

3.1 稻鱼共生提高土壤微生物群落多样性

针对仁庄镇 9 个村稻田土壤的 16S rRNA 扩增子分析表明, 该地区水稻生长季中古菌优势菌门分别为泉古菌门、奇古菌门、佩斯古菌门、广古菌门和乌斯古菌门, 而细菌优势菌门为变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门和拟杆菌门。前人研究表明, 变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、拟杆菌门是稻鱼综合种养模式中普遍存在的优势菌门^[35-36], 具有代谢有机质、反硝化作用等土壤碳氮循环过程相关的重要作用^[35, 37]。在属水平上, 细菌群落中, 稻鱼共生系统与水稻单作系统中优势菌属均为鲍特氏菌属、伊格纳维菌属和厌氧黏细菌属; 古菌群落中则为大洋球形菌属、甲烷螺菌属和热丝菌属。与水稻单作系统相比, 青田传统稻鱼共生系统并不会对这些菌门和菌属的优势地位产生影响, 但是两系统中富集的微生物种类存在明显差异。稻鱼共生系统相较于水稻单作系统显著富集细菌群落中的绿弯菌门暖绳菌属、*Leptolinea*、厌氧绳菌属、长绳菌属和厌氧绳菌科, 以及古菌群落中的泉古菌门暖球形菌属。厌氧绳菌属的分布已被证明受到铵态氮和溶解氧的影响, 稻鱼共生系统中较高的铵态氮含量和氧气浓度可能是其富集存在的主要原因^[38]。

此外, 稻鱼共生系统能够显著提高细菌和古菌群落的 α 多样性水平。前人研究表明, 稻鱼共生系统^[13] 与其他稻田综合种养模式, 如稻鳖系统^[39]、稻蟹系统^[40]、稻虾系统^[41] 和稻蛙系统^[42], 均能显著提高土壤微生物多样性水平。Chen 等^[43] 认为, 稻虾共生系统中更多的植物源营养物质 (例如纤维素) 是土壤微生物群落多样性增加的可能原因之一。肖力婷等^[44] 研究发现, 中华鳖的觅食和翻耕等活动促进了土壤团聚体的形成, 增强了土壤透气性, 促进微生物生长繁殖, 进而提高了微生物的多样性; 养殖动物肠道微生物随排泄物进入稻田也影响着稻田土壤微生物群落多样性。此外, 排泄物还能够降低稻田土壤碳氮比, 从而影响稻田土壤微生物的群落结构。进一步对 α 多样性指标分析发现, 在物种丰富度方面, 稻鱼共生系统土壤古菌与细菌群落中无论是观察到的物种丰富度 (Richness) 还是基于估计得到的未被观察到的物种丰富度 (Chao1、ACE) 均

较水稻单作系统显著提高。Shannon 指数和 Simpson 指数都考虑了物种丰富度和均匀度这 2 个多样性维度, 但是 Shannon 指数赋予了丰度较低物种更大的权重而 Simpson 指数则相反。稻鱼共生系统中古菌和细菌群落的 Shannon 指数均较水稻单作显著增加, 但是仅有古菌群落的 Simpson 指数较水稻单作显著提高。由此可见, 稻鱼共生系统可能主要通过增加低丰度微生物种类以提高土壤微生物 α 多样性。若将相对丰度在所有样本中均小于 1% 的 ASV 看作是稀有微生物^[45], 稻鱼共生系统中共包含 439 个稀有 ASV, 占其 ASV 总量的 38.57%, 在数量和比例上均大于水稻单作系统 (426 个稀有 ASV, 占其 ASV 总量的 36.57%), 支持了以上的猜测。

本研究中稻鱼共生系统和水稻单作系统土壤的各项理化指标在平均水平上没有显著差异。借助典型关联分析, 我们发现土壤理化性质中除土壤总氮含量外, 对于微生物群落结构的影响水平均在稻鱼共生系统和水稻单作系统间发生改变。土壤速效氮、速效磷和有机碳含量均未在稻鱼共生系统中碳氮相关功能菌群中表现出与水稻单作系统一致的显著影响, 且土壤有机碳含量对于土壤微生物群落结构也不存在显著影响。在稻鱼共生系统中, 人工投入的饵料中未经鱼类摄食和同化的部分, 增加了稻田土壤的有机质和氮磷养分输入^[35, 45-47], 为土壤微生物提供了额外能量和养分来源。另一方面, 鱼类的活动能够促进土壤有机氮的分解释放, 并提高磷元素的流动性和可利用性^[48-49]。因此, 土壤中的有机质、速效氮和速效磷或许不是稻鱼共生系统中土壤微生物群落的主要限制因素, 进而促使土壤总磷含量和土壤 pH 成为稻鱼共生模式中土壤微生物群落结构的重要影响因素。

3.2 稻鱼共生系统改变土壤微生物互作关系

在特定的微生物群落装配条件下, 各微生物通过相互作用维持土壤微生物的稳态, 形成复杂的微生物共现网络^[50-51]。在微生物网络中, 网络边缘紧密度、网络直径和平均路径长是反映网络紧密度的重要指标, 而网络平均聚类系数和模块化指数则主要反映了网络的复杂度^[52]。刘平平^[53] 针对稻鱼共生模式表层土壤微生物群落网络研究表明, 稻鱼共生能够增加土壤微生物网络节点数、模块化指数, 降低平均聚类系数和平均连接性, 从而改善网络稳定性。针对稻虾、稻蟹和稻鳊等共生系统的研究也被证明同样能够提高土壤微生物网络稳定性^[54-57]。在本研究中, 与水稻单作相比, 稻鱼共生系统土壤微生物网络节点连接更为紧密, 模块数量更多, 模块

性指数更高, 且网络连接节点和模块中心点数量显著增加, 表明稻鱼共生系统能够提高稻田土壤微生物间的相互联系^[58]。鱼类活动提高了稻田土壤的同质性^[59], 而环境同质性的提高或将导致微生物生态位共用程度的增加, 从而促进微生物间的相互作用^[60]。

本研究采用 3 个指标对网络稳定性进行评定。稻鱼共生系统降低了微生物网络脆弱性指数; 而在鲁棒性指数方面, 稻鱼共生系统虽然提高了靶向去除情况下的网络鲁棒性, 但却显著降低了随机去除情况下的网络鲁棒性。因此, 稻鱼共生系统对于土壤微生物网络稳定性的影响并不明确。

宏观生物学和微生物学研究都表明, 资源和食物的可获得性是群落网络结构的重要驱动因素^[58]。Zhou 等^[61] 对高 CO₂ 水平下土壤微生物分子生态网络响应的研究也表明, 微生物的网络结构变化与土壤碳氮含量显著相关。因此我们推测, 稻鱼共生系统中可能由于鱼类游动摄食等活动以及饲料中氮、磷等营养元素投入的原因, 土壤微生物代谢活动更为活跃, 使得该系统中整体网络以及模块内部的相互作用更为紧密。

3.3 稻鱼共生系统改变土壤微生物功能

总体上而言, 稻鱼共生系统土壤微生物的甲烷和氮相关功能群丰度与水稻单作系统并无显著差异, 甲烷产生和硝化作用的功能微生物丰度显著高于其他功能群; 甲烷和氮相关功能群内部均呈正相关关系, 而甲烷和氮相关功能群之间呈负相关关系。

一方面, 稻鱼共生系统维持了与水稻单作相同的甲烷产生-甲烷氧化的显著正相关关系, 以及甲烷产生-氮固定和甲烷氧化-硝化的显著负相关关系。由于长期淹灌, 稻田 0~10 cm 土层处于较为严重的厌氧状态, 甲烷相关的生态功能中以甲烷产生为主导, 而甲烷氧化微生物会随着甲烷产生量的增加而增加^[62], 因此甲烷产生作用和甲烷氧化作用通常会表现出正相关关系。基于甲烷相关功能与氮相关功能之间的负相关关系, 在稻田生态系统服务的管理目标上可以实现降低甲烷排放和改善水稻氮营养条件的双重目标。

另一方面, 与水稻单作相比, 稻鱼共生系统增强了甲烷氧化-氮固定的正相关关系, 并减弱了甲烷产生-硝化、甲烷氧化-反硝化的负相关关系, 以及硝化-反硝化的正相关关系。稻鱼共生系统中甲烷和氮素相关功能群关系的减弱, 可能是由于鱼类的扰动和摄食作用导致了土壤中微生物可利用性碳氮比例的改变^[61], 抑或是相关微生物对 pH 和氧化还原电位等其他理化性质变化的响应不同所导

致的^[12]。这种变化对于稻田生态系统多功能效应会产生怎样的影响, 还有待进一步研究。

由以上两方面可知, 稻鱼共生系统中甲烷和氮相关功能的相关性整体上呈现下降的趋势, 这在网络模块分析中得到了印证。具体体现在稻鱼共生系统微生物网络优势模块之间的功能相对独立, 即不同功能分布于不同的模块中; 而水稻单作系统中各功能在模块间的分布相对均匀, 即不同功能往往共同存在于多个模块中。

需要注意的是, FAPROTAX 功能预测分析只涉及数据库中已有的分类群或基因^[63-64], 这是该方法的局限性, 因此本研究的发现仍有待进一步验证。

4 结论

稻鱼共生系统对土壤微生物优势菌门和优势菌属的影响不显著, 但是能够显著提高稻田土壤微生物群落 α 多样性; 稻鱼共生系统促进土壤微生物间相互作用和网络优势模块功能多样化, 但是对于群落网络稳定性的影响并不明确; 与水稻单作相比, 土壤总磷含量和土壤 pH 在稻鱼共生模式中对于土壤微生物群落结构的影响得到了增强。此外, 相较于水稻单作模式, 稻鱼共生系统增强了甲烷氧化和氮固定作用之间的正相关关系, 减弱了硝化作用与甲烷产生和反硝化作用之间的相关性以及甲烷氧化与反硝化作用之间的相关性。但是, 对于土壤微生物群落功能相关性的研究和功能预测结果还有待进一步的试验验证。

参考文献:

- [1] XIE J, HU L L, TANG J J, et al. Ecological mechanisms underlying the sustainability of the agricultural heritage rice-fish coculture system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(50): E1381-E1387.
- [2] HALWART M, GUPTA M V. Culture of fish in rice fields[M]. Penang: FAO and the WorldFish Center, 2004.
- [3] 于秀娟, 郝向举, 党子乔, 等. 中国稻渔综合种养产业发展报告 (2023)[J]. *中国水产*, 2023(8): 19-26.
- [4] GUO L, ZHAO L F, YE J L, et al. Using aquatic animals as partners to increase yield and maintain soil nitrogen in the paddy ecosystems[J]. *eLife*, 2022, 11: 73869.
- [5] HU L L, ZHANG J, REN W Z, et al. Can the co-cultivation of rice and fish help sustain rice production?[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28728.
- [6] 李京咏, 戴林秀, 彭翔, 等. 氮肥减施对稻田综合种养水稻产量和品质的影响[J]. *中国稻米*, 2023, 29(5): 28-37.
- [7] 李文博, 刘少君, 叶新新, 等. 稻田综合种养模式对土壤生态系统的影响研究进展[J]. *生态与农村环境学报*, 2021, 37(10): 1292-1300.

- [8] 周榆淇, 邹冬生, 王安崇, 等. 长期淹水条件下稻鱼复合种养对土壤养分和酶活性的影响[J]. 农业现代化研究, 2022, 43(5): 911-920.
- [9] CHEN B, GUO L, TANG J, et al. Comprehensive impacts of different integrated rice-animal co-culture systems on rice yield, nitrogen fertilizer partial factor productivity and nitrogen losses: A global meta-analysis[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 915: 169994.
- [10] ARUNRAT N, SEREENONCHAI S. Assessing ecosystem services of rice-fish co-culture and rice monoculture in Thailand[J]. *Agronomy*, 2022, 12(5): 1241.
- [11] SUN G, SUN M, DU L, et al. Ecological rice-cropping systems mitigate global warming-A meta-analysis[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 789: 147900.
- [12] HARTMANN M, FREY B, MAYER J, et al. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(5): 1177-1194.
- [13] 丁蛟龙. 稻鱼共生年限对耕层土壤养分与微生物影响研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- [14] REN L P, LIU P P, XU F, et al. Rice-fish coculture system enhances paddy soil fertility, bacterial network stability and keystone taxa diversity[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2023, 348: 108399.
- [15] 陈佳, 赵璐峰, 戴然欣, 等. 稻鱼共生系统的土壤产甲烷和甲烷氧化微生物群落[J]. 生态学杂志, 2023, 42(12): 2961-2971.
- [16] ZHAO L F, DAI R X, ZHANG T J, et al. Fish mediate surface soil methane oxidation in the agriculture heritage rice-fish system[J]. *Ecosystems*, 2023, 26(8): 1656-1669.
- [17] LIU X, JIA Q, SUN D, et al. Influence of nitrogen substitution at an equivalent total nitrogen level on bacterial and fungal communities, as well as enzyme activities of the ditch bottom soil in a rice-fish coculture system[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2024, 104(7): 4206-4217.
- [18] WIELTSCHNIG C, FISCHER U R, VELIMIROV B, et al. Effects of deposit-feeding macrofauna on benthic bacteria, viruses, and protozoa in a silty freshwater sediment[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 56(1): 1-12.
- [19] ELSER J J, BRACKEN M E S, CLELAND E E, et al. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems[J]. *Ecology Letters*, 2007, 10(12): 1135-1142.
- [20] 崔文超, 焦雯珺, 闵庆文. 不同土地经营模式的稻鱼共生系统环境影响评价[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2022, 30(4): 630-640.
- [21] REN W Z, HU L L, GUO L, et al. Preservation of the genetic diversity of a local common carp in the agricultural heritage rice-fish system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(3): E546-E554.
- [22] NELSON D M, OHENE-ADJEI S, HU F S, et al. Bacterial diversity and distribution in the Holocene sediments of a northern temperate lake[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 54(2): 252-263.
- [23] CALLAHAN B J, SANKARAN K, FUKUYAMA J A, et al. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses[J]. *F1000Research*, 2016, 5: 1492.
- [24] CSARDI G, NEPUSZ T. The igraph software package for complex network research[J]. *InterJournal, Complex Systems*, 2006, 1695(5): 1-9.
- [25] WATTS S C, RITCHIE S C, INOUE M, et al. FastSpar: Rapid and scalable correlation estimation for compositional data[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(6): 1064-1066.
- [26] CLAUSET A, NEWMAN M E, MOORE C. Finding community structure in very large networks[J]. *Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 2004, 70(6 Pt 2): 066111.
- [27] WEN T, XIE P H, YANG S D, et al. ggClusterNet: An R package for microbiome network analysis and modularity-based multiple network layouts[J]. *iMeta*, 2022, 1(3): e32.
- [28] GUO X, YUAN M, LEI J, et al. Climate warming restructures seasonal dynamics of grassland soil microbial communities[J]. *mLife*, 2022, 1(3): 245-256.
- [29] WU H, GAO T H, HU A, et al. Network complexity and stability of microbes enhanced by microplastic diversity[J]. *Environmental Science & Technology*, 2024, 58(9): 4334-4345.
- [30] LOUCA S, JACQUES S M S, PIRES A P F, et al. High taxonomic variability despite stable functional structure across microbial communities[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2016, 1(1): 15.
- [31] 中华人民共和国农业部. 土壤检测 第 6 部分: 土壤有机质的测定: NY/T 1121.6—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [32] 中华人民共和国农业部. 土壤检测 第 24 部分: 土壤全氮的测定自动定氮仪法: NY/T 1121.24—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [33] 中华人民共和国环境保护部. 土壤 氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的测定 氯化钾溶液提取-分光光度法: HJ 634—2012[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- [34] 中华人民共和国农业部. 中性、石灰性土壤铵态氮、有效磷、速效钾的测定 联合浸提-比色法: NY/T 1848—2010[S]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [35] ARUNRAT N, SANSUPA C, KONGSURAKAN P, et al. Soil microbial diversity and community composition in rice-fish co-culture and rice monoculture farming system[J]. *Biology*, 2022, 11(8): 1242.
- [36] 贾丽娟, 王广军, 夏耘, 等. 不同地区稻虾综合种养系统的微生物群落结构分析[J]. 水产学报, 2023, 47(6): 75-86.
- [37] JIANG X, MA H, ZHAO Q L, et al. Bacterial communities in paddy soil and ditch sediment under rice-crab co-culture system[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 163.
- [38] CAI W, LI Y, NIU L, et al. New insights into the spatial variability of biofilm communities and potentially negative bacterial groups in hydraulic concrete structures[J].

- [Water Research](#), 2017, 123: 495-504.
- [39] 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.
- [40] 王昂, 戴丹超, 马旭洲, 等. 稻蟹共作模式对土壤微生物量氮和酶活性的影响[J]. [江苏农业学报](#), 2019, 35(1): 76-84.
- [41] 侣国涵, 彭成林, 徐祥玉, 等. 稻-虾共作模式对涝渍稻田土壤微生物群落多样性及土壤肥力的影响[J]. [土壤](#), 2016, 48(3): 503-509.
- [42] YI X, YUAN J, ZHU Y, et al. Comparison of the abundance and community structure of N-cycling bacteria in paddy rhizosphere soil under different rice cultivation patterns[J]. [International Journal of Molecular Sciences](#), 2018, 19(12): 3772.
- [43] CHEN L, XU J, WAN W T, et al. The Microbiome structure of a rice-crayfish integrated breeding model and its association with crayfish growth and water quality[J]. [Microbiology Spectrum](#), 2022, 10(2): e02204-21.
- [44] 肖力婷, 杨慧林, 赖政, 等. 稻田土壤微生物群落对稻蟹共作模式的响应特征[J]. [农业工程学报](#), 2022, 38(24): 102-109.
- [45] LIANG Y, XIAO X, NUCCIO E E, et al. Differentiation strategies of soil rare and abundant microbial taxa in response to changing climatic regimes[J]. [Environmental Microbiology](#), 2020, 22(4): 1327-1340.
- [46] 谷婕. 稻鱼生态系统中氮、磷的循环与迁移研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.
- [47] 马祺聪. 稻鱼共作系统氮磷收支平衡与赋存形态[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [48] 张晓龙, 杨倩楠, 李祥东, 等. 不同稻田生态种养模式对土壤理化性质及综合肥力的影响[J]. [福建农业学报](#), 2023, 38(2): 202-209.
- [49] LIN K, WU J. Effect of introducing frogs and fish on soil phosphorus availability dynamics and their relationship with rice yield in paddy fields[J]. [Scientific Reports](#), 2020, 10: 21.
- [50] WANG C, YANG Q N, ZHANG C, et al. Rice-fish-duck system regulation of soil phosphorus fraction conversion and availability through organic carbon and phosphatase activity[J]. [Frontiers in Environmental Science](#), 2022, 10: 979234.
- [51] HASSANI M A, DURÁN P, HACQUARD S. Microbial interactions within the plant holobiont[J]. [Microbiome](#), 2018, 6(1): 58.
- [52] ZHANG B G, ZHANG J, LIU Y, et al. Co-occurrence patterns of soybean rhizosphere microbiome at a continental scale[J]. [Soil Biology and Biochemistry](#), 2018, 118: 178-186.
- [53] 刘平平. 稻渔生态种养的土壤理化性质与微生物群落结构和多样性特征研究[D]. 南充: 西华师范大学, 2023.
- [54] 褚向乾, 吕卫光, 樊海丹, 等. 稻蟹种养模式对土壤氨氧化微生物群落多样性和结构的影响[J]. [农业环境科学学报](#), 2024, 43(6): 1350-1359.
- [55] WU Y Y, LI Y, NIU L H, et al. Nutrient status of integrated rice-crayfish system impacts the microbial nitrogen-transformation processes in paddy fields and rice yields[J]. [Science of the Total Environment](#), 2022, 836: 155706.
- [56] 郑晗. 氮肥和养蟹对辽河三角洲水稻土壤微生物的影响[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2022.
- [57] YANG Z J, FENG Y M, ZHANG S L, et al. Effects of rice-prawn (*Macrobrachium nipponense*) co-culture on the microbial community of soil[J]. [Applied Microbiology and Biotechnology](#), 2022, 106(21): 7361-7372.
- [58] FOSTER E A, FRANKS D W, MORRELL L J, et al. Social network correlates of food availability in an endangered population of killer whales, *Orcinus orca*[J]. [Animal Behaviour](#), 2012, 83(3): 731-736.
- [59] 张军, 刘菁, 陈长青. 有机稻鸭共作对土壤理化性状和细菌群落空间分布的影响[J]. [生态学杂志](#), 2020, 39(3): 822-829.
- [60] SHI S J, NUCCIO E E, SHI Z J, et al. The interconnected rhizosphere: High network complexity dominates rhizosphere assemblages[J]. [Ecology Letters](#), 2016, 19(8): 926-936.
- [61] ZHOU J Z, DENG Y, LUO F, et al. Phylogenetic molecular ecological network of soil microbial communities in response to elevated CO₂[J]. [mBio](#), 2011, 2(4): 00122-11.
- [62] 那好为, 刘瑛涵, 赵璐峰, 等. 水稻品种间作对甲烷排放的影响[J]. [浙江大学学报\(农业与生命科学版\)](#), 2024, 50(2): 270-279.
- [63] SANSUPA C, WAHDAN S F M, HOSSEN S, et al. Can we use functional annotation of prokaryotic taxa (FAPROTAX) to assign the ecological functions of soil bacteria?[J]. [Applied Sciences](#), 2021, 11(2): 688.
- [64] LANGILLE M G, ZANEVELD J, CAPORASO J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. [Nature Biotechnology](#), 2013, 31: 814-821.

【责任编辑 庄 延】