

秸秆还田下氮肥运筹对夏玉米不同时期土壤酶活性及细菌群落结构的影响

张鑫¹, 周卫^{1*}, 艾超¹, 黄绍敏², 梁国庆¹

(1 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/农业农村部植物营养与肥料重点实验室, 北京 100081;
2 河南省农业科学院植物营养与资源环境研究所, 郑州 450002)

摘要:【目的】通过研究秸秆还田下氮肥运筹对夏玉米不同生育期土壤酶活性和细菌群落结构的影响, 揭示土壤细菌群落对不同施肥措施的响应规律, 为调节土壤养分, 提高作物产量, 改善土壤生物功能提供科学依据。【方法】基于河南农业科学院原阳试验基地 5 年连续定位试验, 选取不施肥 (CK)、单施化肥 (氮肥基追比 1 : 1, N) 和秸秆全量还田下氮肥基追比 1 : 1 (SN1)、1 : 1.5 (SN2) 和 1 : 2 (SN3) 共 5 个处理, 于 2016 年夏玉米抽丝期和收获期采集 0—20 cm 土壤样品, 采用常规方法测定土壤基础理化性质, 采用荧光微型板酶检测技术测定土壤酶活性, 采用 Illumina Miseq 高通量测序方法测定土壤细菌群落结构。【结果】秸秆还田下氮肥基追比对玉米产量及氮肥利用率产生明显影响, 相比于 N 处理, SN1 处理显著增产 9.98%; SN1 和 SN2 处理氮肥利用率分别提高 9.83、5.10 个百分点。在夏玉米抽丝期和收获期, 相比于 N 处理, 秸秆还田下各氮肥运筹处理不同程度地提高了土壤 pH、有机碳、全氮和速效钾含量, 其中均以 SN1 处理增幅最为明显。在玉米抽丝期, 除土壤磷酸酶外, SN1 处理土壤酶活性均为最高; SN1 处理对收获期土壤 β -葡萄糖苷酶、纤维二糖苷酶、 β -木糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶和酚氧化酶活性的促进最明显。细菌群落除抽丝期 SN1 与 CK 处理 Shanno 指数显著高于 N 处理而 Simpson 指数显著低于 N 处理外, 其余处理间差异不显著。各施肥处理下门水平和纲水平的主要优势种群均为变形菌门、放线菌门和 α -变形菌纲和放线菌纲。线性判别效应分析 (LEfSe) 显示, 不同生育期比较, 抽丝期最大 LDA (linear discriminant analysis) 值为酸杆菌纲, 收获期为芽单胞菌纲; 而同一生育期各处理间比较, 抽丝期各处理最大 LDA 值均为变形菌门的 α -变形菌纲, 收获期均为 γ -变形菌纲。典范对应分析表明, 抽丝期土壤 pH ($P=0.002$)、有机质含量 ($P=0.004$) 和收获期土壤 pH ($P=0.03$)、硝态氮 ($P=0.036$)、速效钾 ($P=0.044$) 含量对细菌群落结构产生显著影响。【结论】土壤 pH、有机碳、硝态氮和速效钾含量是影响细菌群落结构变化的主要因素。秸秆还田条件下, 氮肥运筹显著影响土壤酶活性和细菌群落结构, 氮肥基追比为 1 : 1 时可显著提升土壤养分含量和酶活性, 提高 δ -变形菌纲、绿弯菌纲和 TK10 (未分类) 相对丰度, 从而更有效地促进秸秆分解和转化, 发挥有机质调节土壤养分释放、减少养分损失的作用, 最终提高玉米产量和氮肥利用率。
关键词: 秸秆还田; 小麦-玉米轮作体系; 氮肥运筹; 高通量测序; 土壤酶活性; 细菌群落

Effects of nitrogen management on soil enzyme activities and bacterial community structure in summer maize growing stages under straw incorporation

ZHANG Xin¹, ZHOU Wei^{1*}, AI Chao¹, HUANG Shao-min², LIANG Guo-qing¹

(1 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081, China; 2 Institute of Plant Nutrient and Environmental Resources, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: 【Objectives】Wheat straw directly returning to field before summer maize sowing is common practice in winter wheat–summer maize rotation system in North China Plain. Suitable nitrogen managements

收稿日期: 2019-02-22 接受日期: 2019-05-24

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2016YFD0200109); 国家自然科学基金项目 (31772392)。

联系方式: 张鑫 E-mail: zxbedo@163.com; * 通信作者 周卫 E-mail: wzhou@caas.ac.cn

on maize in the system were studied from enzymatic activity and bacterial communities, aiming to deeper understanding on the mechanism in increasing yield and fertilizer efficiency. **【 Methods 】** A field experiment was conducted consecutively for five years in Henan Academy of Agricultural Sciences. The treatments included zero fertilization (CK), mineral N application (the ratio of basal : topdressing nitrogen was 1 : 1, N), and whole wheat straw returned into field with mineral N separately applied in ratio of basal to topdressing of 1 : 1 (SN1), 1 : 1.5 (SN2) and 1 : 2 (SN3). Soil samples were collected from topsoil (0–20 cm) at silking stage and harvesting stage of maize in 2016. The soil basic physicochemical properties were determined by conventional method, enzyme activities by fluorescence microplate enzyme assays, and soil bacterial community structures by PCR and Illumina Miseq high-throughput sequencing platform. **【 Results 】** The three straw incorporation with N management treatments improved maize yield and nitrogen use efficiency. Compared with N treatment, SN1 treatment increased the yield by 9.98%. The nitrogen use efficiency of SN1 and SN2 treatments was 9.83 and 5.10 percentage points higher than that of N treatment, respectively. Compared with N treatment, the highest increase in soil total-N, NO_3^- -N, NH_4^+ -N, available P and available K contents at silking stage and harvesting stages were all in SN1; all the enzyme activities, except phosphatase at silking stage, were significantly enhanced in SN1 treatment; the diversity of bacterial community was significantly increased in SN1 at the silking stage. The dominant populations in the phylum and class levels were Proteobacteria, Actinomycetes and α -Proteobacteria, Actinomycetes, respectively. LEfSe analysis showed that the maximum LDA (linear discriminant analysis) value of individual SN treatments was α -Proteobacteria and γ -Proteobacteria at silking stage and harvesting stage, respectively; while that was Pcidobacteria at silking stage and Blastomonas at harvesting stage. Canonical correspondence analysis (CCA) showed that soil pH ($P = 0.002$), organic matter content ($P = 0.004$) at silking stage and soil pH ($P = 0.03$), nitrate N ($P = 0.036$), available K ($P = 0.044$) at the harvesting stage significantly affected bacterial community structure. **【 Conclusions 】** Soil pH, organic carbon, nitrate nitrogen and available potassium contents are the main factors influencing the bacterial community structure. Under straw incorporation, the ratio of basal application to topdressing of nitrogen fertilizer significantly effects the soil enzymatic activities, the diversities and richness of bacterial community and the bacterial community structure. When the ratio of basal : topdressing N is 1 : 1, the activities of most soil nutrients and enzymes, the relative abundance of α -Proteobacteria, Chloroflexi and TK10 (unclassified) will be increased significantly, which implies the fast decomposition of returned straws and the effective nutrition regulation by the formed organic matters, thereby the increase of maize yield and nitrogen use efficiency.

Key words: straw incorporation; wheat–maize rotation system; nitrogen management; high throughput sequencing; soil enzyme activity; bacterial community

农作物秸秆作为一种重要的可再生资源, 不仅含有丰富的碳、氮、磷、钾和微量元素, 同时包含大量的木质素和纤维素等有机物^[1]。我国是农业大国, 2011 年我国秸秆总产量已达到 8.63 亿 t, 约占世界秸秆总产量的 30%, 秸秆年产量位居世界第一^[2]。秸秆还田不仅能够为作物生长提供必需的营养元素, 还能够调节土壤物理结构和改善土壤生物功能, 达到培肥地力的目的^[1,3]。

氮素是影响秸秆分解的关键因子。秸秆包含大量的纤维素、半纤维素、木质素等含碳物质, C/N 值一般高于微生物, 致使微生物在秸秆分解过程中

与作物争氮, 影响作物生长和产量^[4]。在江西水稻土上的研究表明, 水稻秸秆还田量为 6000 kg/hm² 时的最佳施氮量为 180 kg/hm²; 在山东旱地土壤上, 玉米秸秆全量还田条件下的最佳施氮量为 225 kg/hm², 该施肥处理作物产量最高, 并提高了氮肥偏生产力、氮素利用效率、氮素收获指数, 显著降低了 0–60 cm 土层的硝态氮积累量^[5-6]。最近的研究表明, 秸秆还田不仅提高水稻产量, 还能提高稻米的蛋白质含量, 降低垩白粒率和垩白度, 对改善稻米的外观和品质有一定作用^[7]。一般认为, 秸秆还田条件下应当提高氮肥施入的基肥比例, 确保作物生长前期有充

足的氮素供给^[8-9]。然而, 土壤氮素动态变化可能是最复杂的生物地球化学循环之一^[10], 氮肥运筹对秸秆分解、转化和养分释放的影响机制目前还没有得到充分认识。

土壤酶和微生物参与整个地球生物化学循环过程, 在秸秆分解过程中发挥着不可替代的作用^[11-12]。Guo 等^[5]研究发现, 水稻秸秆养分的释放高峰期为 0~14 天, 秸秆中一些易分解的碳水化合物以及胺类在此阶段被富营养型细菌分解利用, 同时几丁质酶和亮氨酸氨基肽酶活性在此阶段更高; 而真菌和放线菌在秸秆分解后期发挥重要作用。秸秆还田也会对土壤土著微生物群落产生重要影响。Zhao 等^[13]研究发现, 秸秆还田使得土壤细菌群落结构发生明显变化, 同时土壤细菌和真菌的丰富度和多样性与土壤硝态氮呈显著正相关。Sun 等^[14]的结果表明, 秸秆还田配施化肥可以提高所有与氮素循环相关的功能基因丰度。6 年的定位试验结果表明, 秸秆还田配施化肥相比于单施秸秆显著提升了土壤肥力, 增加了土壤酶活性, 改变了细菌群落结构^[15]。Sun 等^[16]研究发现, 相比于单施化肥处理, 秸秆还田配施化肥可以提高相似细菌群落结构的丰度。由此可见, 施用氮肥对秸秆分解相关的微生物学过程产生重要影响。

本研究通过分析秸秆还田下不同氮肥基追比例对夏玉米不同生育期土壤酶活性和细菌群落结构影响, 揭示土壤细菌群落对不同施肥措施的响应规律, 为调节土壤养分, 提高作物产量, 改善土壤生物功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

本试验于 2012 至 2016 年在河南省农业科学院现代农业科技示范基地 (N34°47'、E113°40') 进行, 试验地地处暖温带, 年均气温 14.4℃, 年积温约 5169℃, 年均降雨量 640.9 mm, 无霜期约 225 天, 年日照时数 2400 h, 当地主要种植制度为小麦-玉米轮作。试验区土壤为石灰性潮土, 土壤基本理化性质为: pH 8.3、有机质 9.65 g/kg、全氮 0.87 g/kg、有效磷 21.43 mg/kg、速效钾 115.43 mg/kg。

1.2 试验设计

试验小区完全随机排列, 小麦季试验处理: 不施肥 (CK); 单施化肥 (氮肥基追比 5:5, N); 秸秆

基追比 5:5, SN2; 氮肥基追比 7:3, SN3), 共 5 个处理。秸秆还田处理的玉米秸秆粉碎后翻埋入耕层, 秸秆不还田处理的玉米秸秆全部移除小区。每个处理设置 3 个重复, 推荐施氮量为 210 kg/hm², 氮肥的基肥及追肥分别在小麦季的苗期和拔节期施用。除处理 CK 外, 剩余各处理磷肥和钾肥用量一致, 分别为 120 和 90 kg/hm², 均作基肥一次性施用。玉米季试验处理包括: 不施肥 (CK); 单施化肥 (氮肥基追比 1:1, N); 秸秆全量还田下配施氮肥 (氮肥基追比 1:1, SN1; 氮肥基追比 1:1.5, SN2; 氮肥基追比 1:2, SN3), 共 5 个处理。秸秆还田处理的小麦秸秆粉碎后翻埋入耕层, 秸秆不还田处理的小麦秸秆全部移除小区。每个处理设置 3 个重复, 推荐施氮量为 210 kg/hm², 氮肥的基肥及追肥分别在玉米季的苗期和大喇叭口期施用。除处理 CK 外, 剩余各处理磷肥和钾肥用量一致, 分别为 75 kg/hm² 和 90 kg/hm², 均作基肥一次性施用。供试氮、磷、钾肥分别为尿素 (含 N 46%), 过磷酸钙 (含 P₂O₅ 12%) 和氯化钾 (含 K₂O 60%)。冬小麦于每年 10 月播种, 次年 6 月收获; 夏玉米于每年 6 月播种, 当年 10 月收获。2015 年冬小麦于 10 月 9 日播种, 2016 年 6 月 3 日收获; 夏玉米于 2016 年 6 月 10 日播种, 当年 10 月 5 日收获。

1.3 样品采集与测定

于 2016 年 8 月 23 日夏玉米抽丝期和 10 月 9 日收获期, 按五点采样法分别采集 0—20 cm 耕层土壤样品, 混匀后装于放有冰袋的保温箱中立即带回实验室。将一部分土壤样品风干研磨, 分别过 0.85 和 0.15 mm 筛测定土壤养分含量; 一部分土壤样品作为鲜土测定土壤硝态氮和铵态氮含量, 测定土壤酶活性; 一部分土壤样品保存于 -80℃, 用于土壤微生物分析。玉米收获时用多点法测取植株养分含量, 同时按小区计产。

土壤基本理化性质依据《土壤农化分析》^[17]测定。土壤硝态氮 (NO₃⁻-N) 和铵态氮 (NH₄⁺-N) 采用 0.01 mol/L CaCl₂ 浸提—流动分析仪法测定; 土壤有机碳 (SOC) 采用 K₂Cr₂O₇ 氧化 (外加热油浴) 法, 0.2 mol/L FeSO₄ 溶液滴定法测定; 土壤全氮、植株和籽粒全氮采用凯氏法消煮半微量滴定法测定; 土壤有效磷采用 0.5 mol/L NaHCO₃ 浸提—钼锑抗比色法测定; 土壤速效钾采用 1 mol/L CH₃COONH₄ 浸提—原子吸收分光光度计法测定; 土壤 pH 采用酸度计法测定 (水土比 2.5:1)。

土壤胞外酶种类包括: 土壤磷酸酶 (Pho)、β-葡

葡萄糖苷酶 (β G)、纤维二糖苷酶 (CBH)、 β -木糖苷酶 (β X)、 α -葡萄糖苷酶 (α G)、氨基基酶 (NAG)、酚氧化酶 (PhOx) 和过氧化物酶 (Perox), 测定方法为荧光微型板酶检测技术^[18-20]。称取相当于 1.0 g 干土的新鲜土样, 加入 50 mmol/L 的醋酸盐缓冲液 100 mL 混匀, 然后用磁力搅拌器维持土壤悬浊液的均匀度。缓冲液、土壤样品悬浊液、10 μ mol/L 标准品和 200 μ mol/L 相应底物严格按照一定体积和顺序加入到黑色的 96 孔酶标板中, 使用多功能酶标仪 (Scientific Fluoroskan Ascent FL, Thermo) 在激发波长为 365 nm、发射波长为 450 nm 的条件下测定荧光。

土壤微生物 DNA 采用 FastDNA[®] SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, Illkirch, France) 试剂盒对 15 个土壤样品的 DNA 进行提取, 提取的 DNA 用 1% 的琼脂糖电泳检验其完整性, 存放于 -80°C 。细菌 16S rRNA 扩增引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGC AGCAG-3') 和 806R (5'-GACTACHVGGGTWTCTA AT-3'), 扩增区域为 16S rRNA 的 V3-V4 高变区, 前引物端添加 Barcode 接头。PCR 扩增体系 (25 μ L) 为: 12.5 μ L Super Mix (Bio-Rad, USA), 前后引物各 1 μ L (终浓度为 0.2 μ mol/L), 10.3 μ L 无菌水, 0.2 μ L 稀释 10 倍的 DNA 模板。扩增程序为: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 共 25 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。使用 Illumina Miseq PE300 (Illumina, Inc., CA, USA) 测序平台完成测序。所有序列已提交到 NCBI 的 SRA (Sequence Read Archive) 数据库 (SRP191342)。

1.4 数据处理

测序结果首先使用 QIIME (Quantitative Insights

Into Microbial Ecology) (v1.2.1) 对原始数据进行拼接, 过滤, 并去除嵌合体。不满足以下条件的低质量序列将被删除: 1) Barcode 和引物序列无错误碱基; 2) 序列长度大于 200 bp; 3) 平均质量得分 $Q \geq 25$ 。所有处理随机抽取 20000 条高质量序列用于下流分析。分类操作单元 (OTU) 采用 USEARCH 软件在 97% 的阈值下进行划分。利用 Silva 数据库对 OTU 代表序列进行比对和分类。LEfSe 分析在 Galaxy 平台进行 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>)。采用 Canoco 5.0 进行典范对应分析 (CCA)。以 OTU 相对丰度构建 Bray-Curtis 矩阵, 应用多元方差分析 (PERMANOVA) 评价不同施肥处理下土壤微生物群落结构变化的显著性 (permutation = 999)。其他试验数据采用 Excel 2016 对试验数据进行整理。方差分析和相关分析采用 SAS 9.1 软件进行, 多重比较采用 LSD 最小极差法 ($P = 0.05$)。

氮肥利用率 (%) = (施氮区地上部分吸氮量 - 不施氮区地上部分吸氮量) / 施氮量 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 玉米产量、氮肥利用率及土壤理化性质

秸秆还田下氮肥不同基追比例对玉米产量及氮肥利用率产生明显影响。相比于单施化肥处理, 秸秆还田下 SN1 处理显著增产 9.98%, SN2、SN3 与 N 处理差异不显著 (图 1A)。不同施肥方式对氮肥利用率的影响与产量结果相似。SN1 和 SN2 处理氮肥利用率分别比单施化肥处理分别显著提高了 9.83 和 5.10 个百分点, SN3 处理提高不明显 (图 1B)。

由表 1 可知, 经过 5 年的试验, 在玉米抽丝期

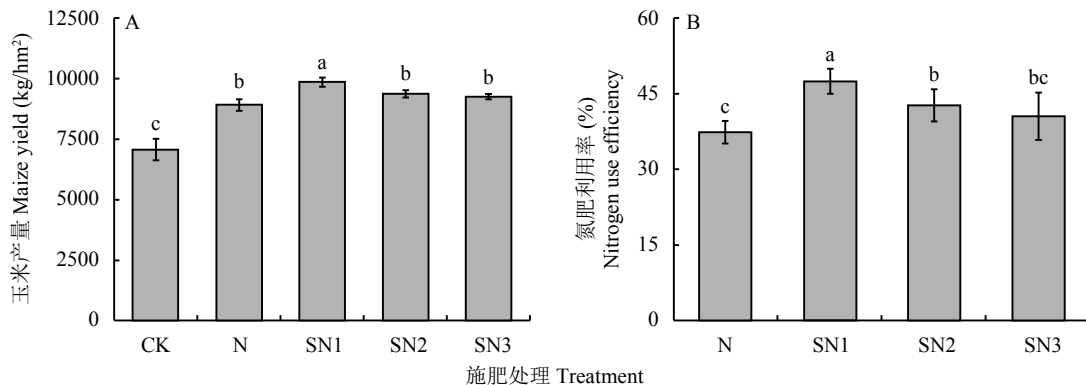


图 1 秸秆还田和不同氮肥管理下玉米产量及氮肥利用率

Fig. 1 Maize yields and nitrogen use efficiency under different nitrogen management with straw incorporation

[注 (Note): 柱上不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)]

Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

表 1 秸秆还田和不同氮肥管理下土壤 pH 及养分含量

Table 1 pH and nutrient contents of soil under different nitrogen management with straw incorporation

处理 Treatment	pH (H ₂ O)		有机碳 SOC (g/kg)		全氮 Total N (g/kg)		NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	
	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting
CK	8.46 ± 0.05 a	8.25 ± 0.02 a	8.66 ± 0.44 b	7.69 ± 0.67 b	0.60 ± 0.03 c	0.55 ± 0.04 c	1.53 ± 0.45 b	5.99 ± 0.88 c
N	7.99 ± 0.07 d	7.80 ± 0.04 c	8.68 ± 0.33 b	8.66 ± 0.31 b	0.71 ± 0.01 b	0.67 ± 0.05 b	17.88 ± 1.17 a	22.31 ± 2.70 b
SN1	8.11 ± 0.04 c	7.95 ± 0.05 b	11.24 ± 0.77 a	10.72 ± 0.41 a	0.79 ± 0.07 a	0.75 ± 0.03 a	26.79 ± 2.82 a	32.02 ± 1.75 a
SN2	8.17 ± 0.03 bc	7.95 ± 0.06 b	11.23 ± 0.46 a	10.47 ± 0.70 a	0.74 ± 0.02 ab	0.74 ± 0.03 ab	26.11 ± 3.04 a	30.17 ± 2.42 ab
SN3	8.22 ± 0.06 b	7.98 ± 0.03 b	10.47 ± 0.46 a	10.26 ± 0.32 a	0.73 ± 0.06 ab	0.74 ± 0.03 ab	21.69 ± 1.63 a	30.60 ± 2.19 ab

处理 Treatment	NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)		有效磷 Available P (mg/kg)		速效钾 Available K (mg/kg)	
	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting
CK	2.16 ± 0.18 b	1.86 ± 0.18 b	7.54 ± 0.80 b	7.78 ± 1.24 b	98.42 ± 3.65 c	88.58 ± 2.92 c
N	2.96 ± 0.18 a	2.68 ± 0.07 ab	16.98 ± 0.74 a	18.89 ± 0.60 a	148.75 ± 4.46 b	135.92 ± 2.44 b
SN1	3.50 ± 0.16 a	3.21 ± 0.19 a	19.36 ± 1.15 a	20.34 ± 1.02 a	166.82 ± 4.34 a	154.85 ± 6.36 a
SN2	3.30 ± 0.16 a	3.03 ± 0.16 a	18.67 ± 1.50 a	20.33 ± 1.12 a	162.92 ± 5.63 a	145.32 ± 4.27 ab
SN3	2.99 ± 0.17 a	3.03 ± 0.09 a	18.27 ± 1.75 a	19.02 ± 1.36 a	159.65 ± 4.76 a	149.65 ± 4.59 a

注 (Note): 同列数值后不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different letters in a column indicate significantly different among treatments ($P < 0.05$).

和收获期, 与单施化肥相比, 秸秆还田配施化肥处理均不同幅度的提高了土壤 pH、有机质、全氮、硝态氮和速效钾含量。其中, pH 在玉米抽丝期和收获期分别提高了 1.5%~2.9% 和 1.5%~2.3% ($P < 0.05$); 有机碳含量分别提高了 2.0%~2.9% 和 1.8%~2.4% ($P < 0.05$); 全氮含量分别增加了 0.7%~11.2% 和 7.4%~11.9%, 且均以 SN1 处理最高, 与 N 处理相比差异达到显著水平; 硝态氮含量分别升高了 21.3%~49.8% 和 1.0%~18.2%, 以 SN1 处理效果最为明显; 速效钾含量分别提高了 7.3%~12.2% 和 6.9%~13.9%, 以 SN1 处理增幅最为明显, 与 N 处理相比差异达显著水平。而秸秆还田下氮肥不同基追比例处理之间在有机质和养分含量的差异均未达到显著水平。

2.2 土壤酶活性

不同施肥处理下与土壤碳、氮和磷循环相关的 8 种酶活性变化趋势 (表 2) 表明, 在玉米的抽丝期和收获期, 不同土壤酶活性在不同施肥处理间差异达到显著水平, 土壤磷酸酶 (Pho)、 β -葡萄糖苷酶 (β G)、纤维二糖苷酶 (CBH)、 β -木糖苷酶 (β X)、 α -葡萄糖苷酶 (α G)、氨基基酶 (NAG)、酚氧化酶 (PhOx) 和过氧化物酶 (Perox) 均在 CK 处理下最低。秸秆还

田配施化肥的 3 个处理 (SN1、SN2 和 SN3) 相比于单施化肥处理 (N) 均显著提高了土壤 β G、 β X、 α G 活性, 抽丝期增幅在 64.9%~133.5%, 收获期增幅在 41.8%~115.4%。结果还表明, 无论是玉米抽丝期和收获期, SN1 处理的土壤 β G、CBH、 β X、 α G、PhOx 活性在所有处理中均为最高, 且显著高于单施化肥处理 (N), 这些酶主要涉及碳水化合物的分解; 相反, 与氮磷分解相关的 NAG 和 Pho 活性在单施化肥处理 (N) 和施用秸秆处理 (SN1、SN2 和 SN3) 之间差异不显著。整体上讲, 收获期土壤酶活性要高于抽丝期 (两因素方差分析, $P < 0.05$)。

2.3 细菌群落多样性及群落组成

由表 3 可知, 在玉米抽丝期和收获期, 不同施肥处理细菌 16S 序列测序覆盖度 (Coverage) 在 0.9893~0.9947。细菌丰富度指数 (Chao1) 在玉米抽丝期和收获期不同处理之间差异不显著。在玉米抽丝期, 单施化肥处理 (N) 土壤细菌香农多样性指数 (Shanno) 显著低于 CK 处理和 SN1 处理, 而施用秸秆的 3 个处理之间 (SN1、SN2 和 SN3) 无显著差异。辛普森多样性指数在抽丝期单施化肥处理 (N) 显著高于 CK 处理和 SN1 处理, SN1、SN2 和 SN3 之间差异不显著。上述结果表明, 长期单施氮

表 2 秸秆还田下不同氮肥管理的土壤酶活性

Table 2 Soil enzyme activities under different nitrogen management with straw incorporation

处理 Treatment	Pho [nmol/(g·h)]		βG [nmol/(g·h)]		CBH [nmol/(g·h)]		βX [nmol/(g·h)]	
	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting
CK	297.16 ± 28.45 c	430.27 ± 33.25 b	110.50 ± 5.12 e	232.97 ± 17.24 c	23.13 ± 4.16 c	51.59 ± 6.64 d	34.64 ± 6.85 c	35.39 ± 4.08 d
N	844.49 ± 38.85 b	950.64 ± 65.14 a	209.49 ± 10.84 d	329.80 ± 19.43 d	39.37 ± 4.70 b	64.73 ± 2.32 c	42.39 ± 6.00 c	51.97 ± 6.16 c
SN1	805.93 ± 46.20 b	896.62 ± 59.59 a	437.15 ± 8.69 a	511.57 ± 26.15 a	86.91 ± 6.78 a	95.61 ± 5.68 a	98.99 ± 6.23 a	96.89 ± 4.24 a
SN2	858.41 ± 18.66 b	954.88 ± 45.04 a	404.15 ± 13.36 b	467.62 ± 24.78 b	85.43 ± 4.47 a	78.62 ± 4.79 b	79.76 ± 7.29 b	89.37 ± 6.94 ab
SN3	936.17 ± 47.08 a	884.43 ± 53.94 a	345.47 ± 4.84 c	489.84 ± 18.12 ab	80.61 ± 5.93 a	80.02 ± 5.65 b	90.44 ± 5.85 ab	85.63 ± 7.03 b

处理 Treatment	αG [nmol/(g·h)]		NAG [nmol/(g·h)]		PhOx [nmol/(g·h)]		Perox [nmol/(g·h)]	
	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting
CK	30.88 ± 7.43 c	38.01 ± 4.10 c	204.65 ± 16.73 b	223.67 ± 17.32 b	1.00 ± 0.16 c	1.54 ± 0.11 c	0.88 ± 0.14 b	1.55 ± 0.14 b
N	51.61 ± 7.18 b	49.31 ± 7.20 b	288.18 ± 11.86 a	346.42 ± 11.78 a	1.45 ± 0.11 c	1.71 ± 0.16 bc	1.25 ± 0.09 a	1.97 ± 0.17 a
SN1	99.39 ± 3.02 a	106.19 ± 7.99 a	312.95 ± 6.83 a	362.25 ± 19.25 a	2.57 ± 0.08 a	2.69 ± 0.15 a	1.55 ± 0.14 a	2.12 ± 0.12 a
SN2	92.30 ± 6.35 a	100.37 ± 5.08 a	305.93 ± 10.87 a	365.83 ± 19.77 a	2.42 ± 0.16 ab	2.35 ± 0.19 ab	1.34 ± 0.17 a	2.09 ± 0.18 a
SN3	99.10 ± 8.78 a	96.73 ± 5.41 a	309.32 ± 16.02 a	353.66 ± 14.16 a	2.04 ± 0.05 b	2.43 ± 0.12 a	1.28 ± 0.17 a	2.08 ± 0.19 a

注 (Note): Pho—磷酸酯酶 Phosphatase; βG—β-葡萄糖苷酶 β-Glucosidase; CBH—纤维二糖苷酶 Glycosylase; βX—β-木糖苷酶 β-Xylosidase; αG—α-葡萄糖苷酶 α-Xylosidase; NAG—氨基基酶 Aminopeptidases; PhOx—酚氧化酶 Phenol oxidase; Perox—过氧化物酶 Peroxidase; 同列数值后不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different letters in a column indicate significantly different among treatments ($P < 0.05$).

表 3 秸秆还田和不同氮肥管理下土壤细菌群落 Alpha 多样性指数

Table 3 Alpha diversity index of soil bacterial community affected by different nitrogen management with straw incorporation

处理 Treatment	16S 序列测序覆盖度 Coverage		丰富度指数 Chao1		香农多样性指数 Shanno		辛普森多样性指数 Simpson	
	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting	抽丝期 Silking	收获期 Harvesting
CK	0.9931 a	0.9906 a	2278 a	2214 a	6.702 a	6.581 a	0.0030 b	0.0046 a
N	0.9893 a	0.9938 a	2288 a	2232 a	6.448 b	6.607 a	0.0071 a	0.0043 ab
SN1	0.9933 a	0.9943 a	2325 a	2299 a	6.736 a	6.696 a	0.0030 b	0.0028 b
SN2	0.9907 a	0.9915 a	2302 a	2266 a	6.655 ab	6.649 a	0.0034 ab	0.0032 ab
SN3	0.9942 a	0.9947 a	2325 a	2274 a	6.642 ab	6.689 a	0.0035 ab	0.0030 ab

注 (Note): 同列数值后不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different letters in a column indicate significantly different among treatments ($P < 0.05$).

肥可以使抽丝期土壤细菌多样性降低, 而秸秆还田可以缓解这种氮肥的不利影响, 且以秸秆还田下氮肥基追比为 1:1 处理最佳。玉米收获期, 土壤细菌香农多样性指数 (Shanno) 趋于一致, 不同处理间均无显著差异, 表明此时氮肥运筹对土壤细菌多样性的影响已减弱。

细菌 16S rDNA 高通量测序序列经比对后分别属

于 27 个门、94 个纲、160 个目、299 个科和 532 个属。在门和纲水平上, 相对丰度 > 1% 的细菌群落组成见图 2。潮土细菌主要类群为变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria), 三者玉米抽丝期和收获期分别占土壤细菌群落的 76.9% 和 76.5% (图 2A); 从纲水平看, 相对丰度 > 5% 的纲有 α-变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、放线菌

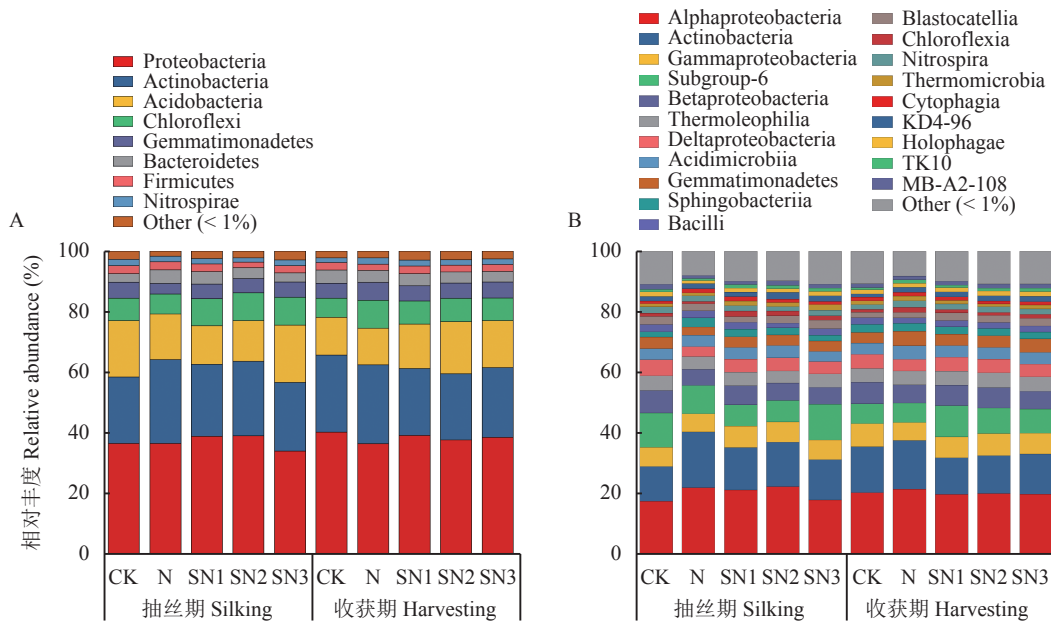


图 2 秸秆还田和不同氮肥管理下玉米不同生育期土壤细菌群落门水平 (A) 和纲水平 (B) 的相对丰度

Fig. 2 Soil bacterial community structure at phylum (A) and class (B) level of different maize growth stages under different nitrogen management with straw incorporation

纲 (Actinobacteria)、 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、Acidobacteria Subgroup-6 和 β -变形菌纲 (Betaproteobacteria) (图 2B)。

玉米抽丝期, 不同施肥处理下变形菌门、放线菌门、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的相对丰度发生显著变化。其中, 单施化肥处理 (N) 相比 CK 处理显著提高了放线菌门和拟杆菌门细菌的相对丰度 ($P < 0.05$), 且显著降低了芽单胞菌门细菌的相对丰度 ($P < 0.05$)。SN1 处理相比于 SN3 处理显著提高了变形菌门和拟杆菌门的相对丰度 ($P < 0.05$)。在纲水平上, 单施化肥处理 (N) 显著提高了放线菌纲的相对丰度, 增幅达到 25.9%~61.1%; 与单施化肥处理相比, SN1 处理明显提高了 δ -变形菌纲、绿弯菌纲和 TK10 (未分类) 的相对丰度, 增幅分别为 33.3%、132.5% 和 76.8%。

玉米收获期, 不同施肥处理对门水平的细菌群落组成未产生显著影响。在纲水平上, SN1 处理相比于单施化肥处理显著提高了 δ -变形菌纲的相对丰度 ($P < 0.05$), 增幅为 33.7%。不同生育期之间细菌群落的相对丰度在门水平没有显著变化, 而在纲水平上, 收获期相比于抽丝期显著提高了全噬菌纲的相对丰度 ($P < 0.05$), 增幅为 12.1%。

2.4 细菌群落与土壤理化性质的关系

玉米抽丝期细菌群落与土壤理化性质的典范对应分析 (CCA) 如图 3A 所示, 排序轴 1 (CCA1) 和排

序轴 2 (CCA2) 共解释了总变异的 51.56%。从图 3A 可知, 抽丝期 CK 处理、单施化肥处理 (N) 和秸秆还田配施氮肥处理 (SN1、SN2 和 SN3) 土壤微生物群落结构相互区分开来, 多因素方差分析 (PERMANOVA) 结果表明 CK 与 N 处理土壤群落结构之间, 以及 N 处理与秸秆还田配施氮肥处理 (SN1、SN2 和 SN3) 两两之间均存在显著差异 ($P < 0.01$), 但 SN1、SN2 和 SN3 处理之间无显著差异 ($P > 0.05$)。由 Canoco Forward 分析得出, 土壤 pH ($P = 0.002$) 和有机质 ($P = 0.004$) 含量对细菌群落组成影响显著。

图 3B 中, 玉米收获期 CCA 分析中两条排序轴共解释了总变异的 56.18%。收获期不同处理之间的细菌群落结构差异相比抽丝期变小, 多因素方差分析 (PERMANOVA) 结果表明, 此时仅有 CK 与其他处理之间有显著差异 ($P < 0.05$), 而 N、SN1、SN2 和 SN3 之间无显著差异 ($P > 0.05$)。土壤 pH ($P = 0.03$)、硝态氮含量 ($P = 0.036$) 和速效钾含量 ($P = 0.044$) 是收获期土壤细菌群落结构变化的主要影响因子。

2.5 不同施肥处理和生育期的差异细菌菌群判别

为了探究不同施肥处理之间细菌群落组成差异的标志性物种类群, 我们利用线性判别 (LDA) 效应大小分析 (LEfSe) 进一步鉴定了纲水平上细菌类群在不同施肥处理间和生育期间有显著差异的细菌类群。从图 4A 可以看出, 在玉米抽丝期, 共发现 9 个造成不同施肥处理间细菌群落差异的纲水平菌群类

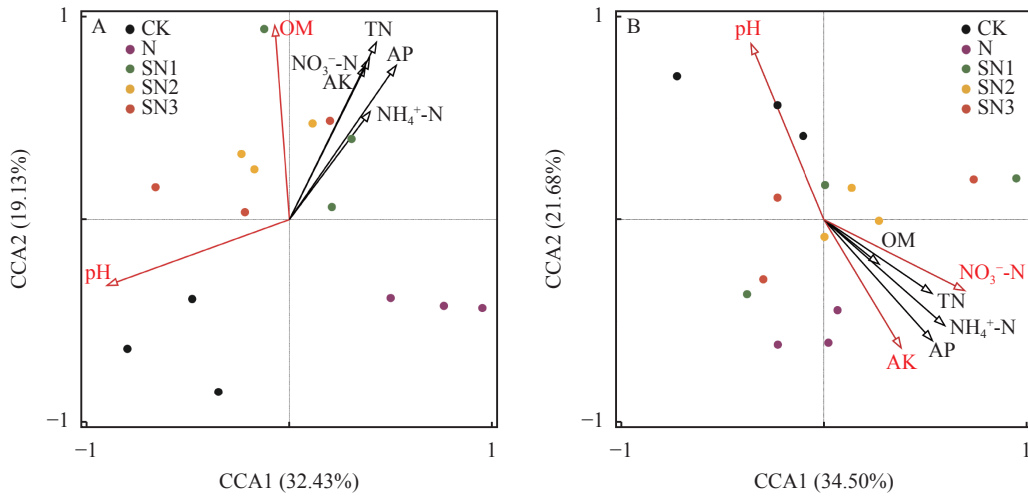


图 3 秸秆还田和不同氮肥管理下玉米抽丝期 (A) 和收获期 (B) 土壤细菌群落与土壤理化性质的典范对应分析 (CCA)
 Fig. 3 Canonical correspondence analysis (CCA) of soil bacterial communities and soil chemical properties in silking stage (A) and harvesting stage (B) under different nitrogen management with straw incorporation

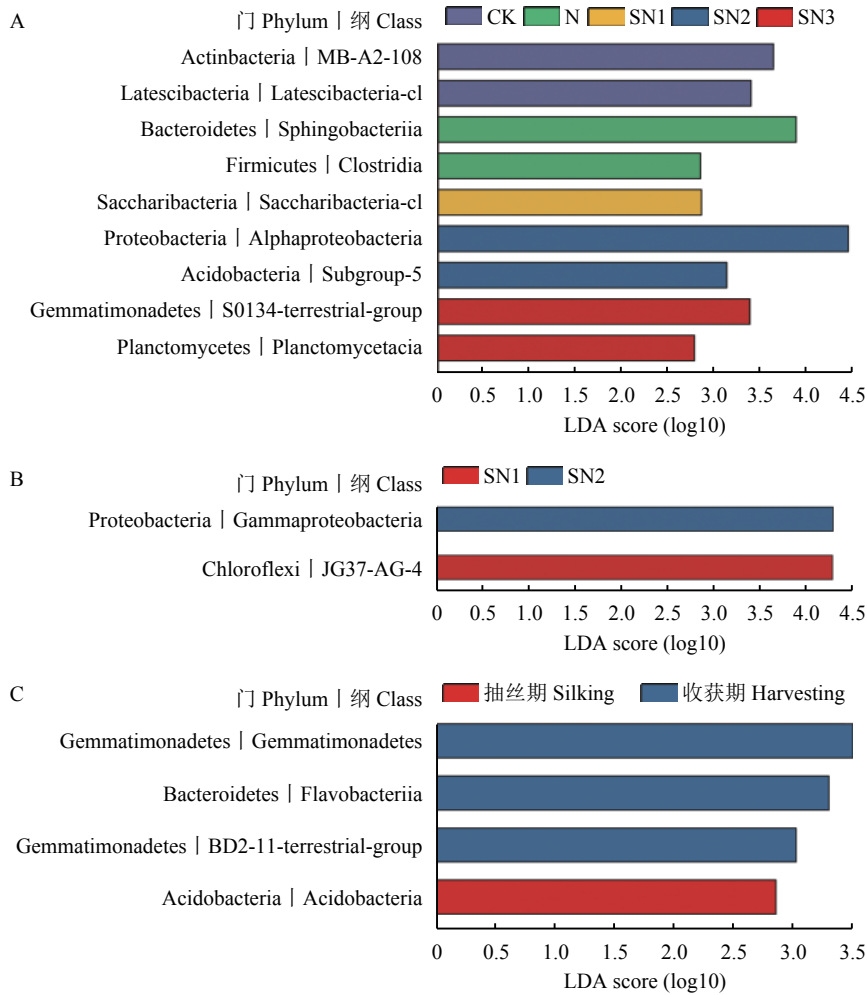


图 4 秸秆还田和不同氮肥管理下玉米抽丝期 (A) 和收获期 (B) 土壤细菌纲水平关键菌群和影响群落差异的主要菌群 (C) 的线性判别效应分析 (LEfSe)

Fig. 4 Key phylotypes of soil bacteria microbiota at silking (A) and harvesting (B) stage and the main bacteria microbiota causing the difference (C) under different nitrogen management with straw incorporation using linear discriminant analysis effect size (LEfSe) at class level

别。其中, CK 处理 2 个, 单施化肥处理 2 个, SN1 处理 1 个, SN2 处理 2 个, SN3 处理 2 个。放线菌门未分类的 MB-A2-108 纲和未分类的 Latescibacteria 是 CK 与其他处理群落结构差异的关键生物标志; 鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteriia) 和梭菌纲 (Clostridia) 是单施化肥处理 (N) 的关键生物标志。而在收获期 (图 4B), 仅发现 2 个影响不同施肥模式细菌群落差异的关键类群, 分别为 SN1 处理中 γ -变形菌纲和 SN3 处理中未分类的 JG37-AG-4。

不同生育期影响细菌群落差异的主要菌群类别如图 4C, 分析得到 4 个关键生物标志, 玉米抽丝期 1 个, 收获期 3 个。其中, 芽单胞菌门中的芽单胞菌纲和未分类的 BD2-11-terrestrial-group 是显著影响收获期土壤细菌群落变化的关键类群, 而酸杆菌纲是抽丝期土壤微生物群落变化的关键类群。

3 讨论

3.1 秸秆还田下氮肥运筹对夏玉米产量和氮肥利用率的影响

秸秆还田条件下合理的氮肥管理是实现秸秆资源高效利用和作物高产的关键措施^[21]。本研究结果显示, 秸秆还田下氮肥基追比例 1:1 时能够显著提高潮土玉米产量和氮肥利用率, 而氮肥基追比例 1:1.5 和 1:2 时效果不明显, 表明秸秆还田下氮肥适当前移有利于作物生长和养分吸收。在水稻-油菜和水稻-小麦轮作体系下, 张维乐等^[22]同样发现, 秸秆还田条件下两种水旱轮作模式均可以通过调整氮肥前移以保证作物稳产并提高氮肥利用率。研究表明, 秸秆还田条件下提高基肥比例, 可以降低作物生长前期土壤 C/N, 缓解前期微生物因分解秸秆与作物争氮, 促进秸秆的腐解, 有利于秸秆养分逐渐释放, 为作物后期生长提供养分, 进而提高作物产量^[23]。这里需要指出的是, 氮肥前移, 增加基肥比例并不意味着过分强调秸秆还田下作物前期基肥用量。王蔚华等^[24]研究结果表明, 当氮肥基肥比例达到 4:1 时, 由于前期氮肥用量占到全部的 80%, 导致作物生长后期缺肥和产量下降, 而氮肥基追比例为 1:1 时, 前期氮肥供应满足作物生长, 后期氮肥供应可延缓叶片衰老, 增加粒重, 提高产量, 这与本研究结果一致。

我们的研究结果表明, 单施化肥条件下, 氮肥的当季利用率在 36% 左右, 而氮肥与秸秆配合施用后, 不仅有利于秸秆分解矿化, 增加土壤养分含

量, 而且氮肥当季利用率也提高至 40%~45%, 以氮肥基追比例 1:1 时最佳。这主要是因为, 大量秸秆还田刺激了土壤微生物生长, 诱导微生物前期大量固持氮^[25], 而到作物生长中后期, 土壤微生物群落演替, 被微生物固持的氮素得以释放, 维持了土壤较高的矿质氮含量^[26]; 此外, 我们前期的研究表明, 秸秆分解残余物具有吸肥保肥特性, 这也有效地防止了氮肥损失 (数据暂未发表)。本研究中收获期土壤硝态氮含量高于抽丝期也证实了这一点。与此同时, 秸秆还田显著增加土壤有机质含量, 并抑制了单施化肥所引起的土壤酸化现象, 改善了土壤肥力, 这与前人^[14, 27-28]的结论一致。韩明明^[29]、李录久等^[30]研究表明, 秸秆还田可以显著提高土壤 pH 和有机质含量, 而秸秆还田下不同的氮肥管理方式对土壤的基础理化性质影响并不显著, 与本研究结果相似。在本试验中, 虽然秸秆还田下不同氮肥管理方式的土壤基础理化性质差异并不显著, 但是相比于单施化肥处理, 在玉米抽丝期和成熟期中均以 SN1 处理下的土壤全氮、硝态氮、铵态氮、有效磷和速效钾含量提升幅度最大。因此, 化肥与秸秆配合施用, 并适当氮肥前移是培肥潮土、提高玉米产量和肥料利用率的有效途径之一。

3.2 秸秆还田下氮肥运筹对夏玉米不同时期土壤生物学特性的影响

农业生态系统中土壤酶活性和微生物多样性是保持农田土壤质量、生产力和生态平衡的关键^[31-32]。其中, 酶是土壤中有机质分解和养分转化的催化剂^[33]。通过 8 种与土壤碳、氮、磷循环相关的酶活性分析发现, 无论是玉米抽丝期和收获期, 相比于单施化肥处理, 秸秆还田配合施用化肥处理显著提高了土壤 β -葡萄糖苷酶、纤维二糖苷酶、 β -木糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶的活性, 这些酶主要参与纤维素、半纤维素和淀粉分解, 这一结果与前人研究结果^[34-35]类似。当大量的有机物料 (秸秆) 和化肥施入土壤后, 为土壤中相关微生物提供了丰富的能量原料, 增强了它们新陈代谢功能, 因此, 相关的土壤酶活性得到显著提升, 从而促进秸秆的矿化和养分释放。本研究中, SN1 处理相比于 SN2 和 SN3 处理拥有较高的基肥比例, 在抽丝期, 土壤中与纤维素分解相关的 β -葡萄糖苷酶和纤维二糖苷酶活性表现为 SN1 > SN2 > SN3 的趋势, 与木质素分解相关的酚氧化酶和过氧化物酶也有类似的趋势。Guo 等^[5]也发现, 作物生长发育前期充足的氮肥投入可以增强与秸秆腐解相关

的 β -葡萄糖苷酶、纤维二糖苷酶和木糖苷酶的活性,加速秸秆的腐解,促进秸秆养分的释放;姚如男等^[36]同样发现,土壤有机质含量和土壤酶活性随着基肥比例的增加而增大。上述结果表明,秸秆还田条件下氮肥前移可以通过提高土壤酶活性加速秸秆分解,促进养分释放,减缓因大量秸秆还田对作物生长带来的不利影响。

土壤酶主要来源于微生物。尽管我们没有发现不同氮肥运筹处理对细菌群落丰富度产生显著影响,但是在玉米抽丝期,SN1处理相比于单施化肥处理显著提高了细菌群落的多样性,这可能是由于SN1处理基肥施入比例较大,刺激了某些富营养型细菌所导致,在玉米收获期则无显著变化,表明在玉米生长后期,氮肥对土壤微生物的影响减弱。不施用秸秆条件下,5年连续单施化肥,使得土壤多样性指数显著降低。长期单施化肥降低土壤细菌群落的丰富度和多样性已被Zhou等^[37]证实。我们的试验结果表明,秸秆还田配合氮肥施用,尤其是氮肥前移管理,能够维持土壤细菌多样性,防止土壤微生物群落结构和功能退化^[14]。

从细菌群落结构来看,抽丝期单施化肥处理(N)与秸秆还田配施氮肥的3个处理(SN1、SN2和SN3)土壤微生物群落结构有显著差异,而收获期这种差异消失,这进一步表明了秸秆与氮肥的相互作用及对土壤微生物的影响主要是发生在秸秆分解前期。从细菌组成来看,华北平原潮土优势细菌类群为变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、绿弯菌门和芽单胞菌门。这与前人^[38-39]研究结果基本一致,尤其是 α -变形菌纲在秸秆还田处理土壤中都具有最高的比例。许多研究发现变形菌门包含多种代谢种类,并且广泛参与了土壤中碳、氮等多种元素的生物化学循环^[40-41]。并且Zhou等^[42]研究发现 α -变形菌与土壤有机碳含量呈显著正相关。通过LEfSe分析,我们找到了9个造成玉米抽丝期不同施肥处理间细菌群落差异的关键细菌类群。其中在秸秆还田下氮肥基追比例1:1的处理,未分类的Saccharibacteria在玉米抽丝期土壤细菌群落变异中起到关键作用。最近的研究表明,该类微生物在自然界大量存在,并在有机化合物和糖类化合物分解转化中发挥重要作用^[43];同时,该类微生物在植物—微生物互作中参与碳素转化过程^[44]。由于该类微生物在自然界中的功能目前并不明确,因此还需进一步研究它们在秸秆分解过程中的作用与机理。

4 结论

土壤pH、有机质、硝态氮和速效钾含量是影响细菌群落结构变化的主要因素。秸秆还田下,氮肥基追比例1:1时能够显著增强与碳分解相关的土壤酶活性,提高细菌群落多样性和丰富度,促进秸秆的腐解和有机质含量的提升,发挥有机质调节土壤养分释放、减少养分损失的作用,提高夏玉米产量和氮肥利用效率。

参考文献:

- [1] Xu M, Lou Y, Sun X, *et al.* Soil organic carbon active fractions as early indicators for total carbon change under straw incorporation[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(7): 745–752.
- [2] 严奉君,孙永健,马均,等. 秸秆覆盖与氮肥运筹对杂交稻根系生长及氮素利用的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(1): 23–35.
Yan F J, Sun Y J, Ma J, *et al.* Effects of straw mulch and nitrogen management on root growth and nitrogen utilization characteristics of hybrid rice[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2015, 21(1): 23–35.
- [3] Cucu M A, Said-Pullicino D, Maurino V, *et al.* Influence of redox conditions and rice straw incorporation on nitrogen availability in fertilized paddy soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 50(5): 755–764.
- [4] 杨滨娟,黄国勤,钱海燕. 秸秆还田配施化肥对土壤温度、根际微生物及酶活性的影响[J]. *土壤学报*, 2014, 51(1): 150–157.
Yang B J, Huang G Q, Qian H Y. Effects of straw incorporation plus chemical fertilizer of temperature, root micro-organisms and enzyme activities[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51(1): 150–157.
- [5] Guo T, Zhang Q, Ai C, *et al.* Nitrogen enrichment regulates straw decomposition and its associated microbial community in a double-rice cropping system[J]. *Scientific Report*, 2018, 8(1): 1847.
- [6] 陈金,唐玉海,尹燕彬,等. 秸秆还田条件下适量施氮对冬小麦氮素利用及产量的影响[J]. *作物学报*, 2015, 41(1): 160–167.
Chen J, Tang Y H, Yin Y P, *et al.* Effects of straw returning plus nitrogen fertilizer on nitrogen utilization and grain yield in winter wheat[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(1): 160–167.
- [7] 陈梦云,李晓峰,程金秋,等. 秸秆全量还田与氮肥运筹对机插优质食味水稻产量及品质的影响[J]. *作物学报*, 2017, 43(12): 1802–1816.
Chen M Y, Li X F, Cheng J Q, *et al.* Effects of total straw returning and nitrogen application regime on grain yield and quality in mechanical transplanting japonica rice with good taste quality[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43(12): 1802–1816.
- [8] 何虎,吴建富,曾研华,等. 稻草全量还田下氮肥运筹对双季晚稻产量及其氮素吸收利用的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(4): 811–820.
He H, Wu J F, Zeng Y H, *et al.* Effects of nitrogen management on yield and nitrogen utilization of double cropping late rice under total rice straw incorporation[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2014, 20(4): 811–820.

- [9] 洪春来, 魏幼璋, 黄锦法, 等. 秸秆全量直接还田对土壤肥力及农田生态环境的影响研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003, 29(6): 627-633.
Hong C L, Wei Y Z, Huang J F, *et al.* Effects of total crop straw return on soil fertility and field ecological environment[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences Edition), 2003, 29(6): 627-633.
- [10] Reddy K R. Nitrogen cycling in a flooded-soil ecosystem planted to rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant and Soil*, 1982, 67(1-3): 209-220.
- [11] Bollag J. M., Stotzky G. Soil biochemistry[M]. New York: Marcel Dekker, Inc., 1990. 357-396.
- [12] Reddy A P, Simmons C W, D'haeseleer P, *et al.* Discovery of microorganisms and enzymes involved in high-solids decomposition of rice straw using metagenomic analyses[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e77985.
- [13] Zhao S, Qiu S, Xu X, *et al.* Change in straw decomposition rate and soil microbial community composition after straw addition in different long-term fertilization soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 138: 123-133.
- [14] Sun R, Guo X, Wang D, *et al.* Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on the abundance of microbial communities involved in the nitrogen cycle[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 95: 171-178.
- [15] Chen Y, Xin L, Liu J, *et al.* Changes in bacterial community of soil induced by long-term straw returning[J]. *Scientia Agricola*, 2017, 74(5): 349-356.
- [16] Sun R, Zhang X X, Guo X, *et al.* Bacterial diversity in soils subjected to long-term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock manure than wheat straw[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 88: 9-18.
- [17] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. Bao S D. Soil and agro-chemistry analysis (3rd ed.)[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000.
- [18] Wittmann C, Kähkönen M A, Ilvesniemi H, *et al.* Areal activities and stratification of hydrolytic enzymes involved in the biochemical cycles of carbon, nitrogen, sulphur and phosphorus in podsolized boreal forest soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(3): 425-433.
- [19] DeForest J L. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and L-DOPA[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(6): 1180-1186.
- [20] Ai C, Liang G, Sun J, *et al.* Responses of extracellular enzyme activities and microbial community in both the rhizosphere and bulk soil to long-term fertilization practices in a fluvo-aquic soil[J]. *Geoderma*, 2012, 173: 330-338.
- [21] 战秀梅, 李亭亭, 韩晓日, 等. 不同施肥方式对春玉米产量、效益及氮素吸收和利用的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(4): 861-868.
Zhan X M, Li T T, Han X R, *et al.* Effects of nitrogen fertilization methods on yield, profit and nitrogen absorption and utilization of spring maize[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2011, 17(4): 861-868.
- [22] 张维乐, 戴志刚, 任涛, 等. 不同水旱轮作体系秸秆还田与氮肥运筹对作物产量及养分吸收利用的影响[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(7): 1254-1266.
Zhang W L, Dai Z G, Ren T, *et al.* Effects of nitrogen fertilization managements with residues incorporation on crops yield and nutrients uptake under different paddy-upland rotation systems[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(7): 1254-1266.
- [23] 王激清, 马文奇, 江荣凤, 等. 我国水稻、小麦、玉米基肥和追肥用量及比例分析[J]. *土壤通报*, 2008, (2): 329-333.
Wang J Q, Ma W Q, Jiang R F, *et al.* Analysis about amount and ratio of basal fertilizer and topdressing fertilizer on rice, wheat, maize in China[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2008, (2): 329-333.
- [24] 王蔚华, 郭文善, 封超年, 等. 氮肥运筹对小麦花后剑叶衰老及籽粒发育的影响[J]. 扬州大学学报, 2002, (4): 61-65.
Wang W H, Guo W S, Feng C N, *et al.* Effects of nitrogen application methods on flag leaf senescence after anthesis and grain development in wheat[J]. Journal of Yanzhou University, 2002, (4): 61-65.
- [25] Thomsen I K. Nitrogen uptake in barley after spring incorporation of ¹⁵N-labelled Italian ryegrass into sandy soils[J]. *Plant & Soil*, 1993, 150(2): 193-201.
- [26] 马宗国, 卢绪奎, 万丽, 等. 小麦秸秆还田对水稻生长及土壤肥力的影响[J]. *作物杂志*, 2003, (5): 37-38.
Ma Z G, Lu X K, Wan L, *et al.* Effects of wheat straw returning on rice growth and soil fertility[J]. *Crops*, 2003, (5): 37-38.
- [27] 汪吉东, 戚冰洁, 张永春, 等. 长期施肥对砂壤质石灰性潮土土壤酸碱缓冲体系的影响[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(4): 1031-1036.
Wang J D, Qi B J, Zhang Y C, *et al.* Effects of long-term fertilization on pH buffer system of sandy loam calcareous fluvo-aquic soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(4): 1031-1036.
- [28] Zhao J, Ni T, Li Y, *et al.* Responses of bacterial communities in arable soils in a rice-wheat cropping system to different fertilizer regimes and sampling times[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e85301.
- [29] 韩明明. 秸秆还田及氮肥运筹对土壤肥力及冬小麦氮素利用的调控[D]. 山东泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2017.
Han M M. Effects of straw returning and nitrogen management on soil fertility and nitrogen utilization in winter wheat[D]. Tai'an, Shandong: MS Thesis of Shandong Agricultural University, 2017.
- [30] 李录久, 吴萍萍, 耿言安, 等. 秸秆还田结合氮肥运筹管理对白土稻田土壤理化性状的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2016, 22(5): 1259-1266.
Li L J, Wu P P, Geng Y A, *et al.* Effect of wheat straw addition with nitrogen application on physical-chemical properties of white paddy soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2016, 22(5): 1259-1266.
- [31] Li C, Yan K, Tang L, *et al.* Change in deep soil microbial communities due to long-term fertilization[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 75: 264-272.
- [32] Li Y, Chen L, Wen H, *et al.* 454 Pyrosequencing analysis of bacterial diversity revealed by a comparative study of soils from mining subsidence and reclamation areas[J]. *Journal of Microbiol Biotechnol*, 2014, 24(3): 313-323.
- [33] Frankenberger W T, Dick W A. Relationships between enzyme

- activities and microbial growth and activity indices in soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1983, 47(5): 945–951.
- [34] Zhao S, Li K, Zhou W, *et al.* Changes in soil microbial community, enzyme activities and organic matter fractions under long-term straw return in north-central China[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2016, 216: 82–88.
- [35] Zhang P, Chen X, Wei T, *et al.* Effects of straw incorporation on the soil nutrient contents, enzyme activities, and crop yield in a semiarid region of China[J]. *Soil and Tillage Research*, 2016, 160: 65–72.
- [36] 姚如男, 陶卫, 李成业, 等. 玉米秸秆全量还田条件下氮肥运筹对晚稻产量和土壤化学及微生物特性的影响[J]. *中国稻米*, 2019, 25(1): 53–57.
- Yao R N, Tao W, Li C Y, *et al.* Effects of corn straw incorporation with nitrogen management on the yield of late rice and soil chemical and microbial characteristics[J]. *China Rice*, 2019, 25(1): 53–57.
- [37] Zhou J, Guan D, Zhou B, *et al.* Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 90: 42–51.
- [38] Wang Q, Jiang X, Guan D, *et al.* Long-term fertilization changes bacterial diversity and bacterial communities in the maize rhizosphere of Chinese Mollisols[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 125: 88–96.
- [39] 王伏伟, 王晓波, 李金才, 等. 施肥及秸秆还田对砂姜黑土细菌群落的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2015, 23(10): 1302–1311.
- Wang F W, Wang X B, Li J C, *et al.* Effects of fertilization and straw incorporation on bacterial communities in lime concretion black soil[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2015, 23(10): 1302–1311.
- [40] Fan F, Yin C, Tang Y, *et al.* Probing potential microbial coupling of carbon and nitrogen cycling during decomposition of maize residue by ¹³C-DNA-SIP[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 70: 12–21.
- [41] Kersters K, Vos P D, Gillis M, *et al.* Introduction to the Proteobacteria[M]. New York: Springer Science and Business Media, 2006.
- [42] Zhou G, Zhang J, Zhang C, *et al.* Effects of changes in straw chemical properties and alkaline soils on bacterial communities engaged in straw decomposition at different temperatures[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22186.
- [43] Kindaichi T, Yamaoka S, Uehara R, *et al.* Phylogenetic diversity and ecophysiology of Candidate phylum Saccharibacteria in activated sludge[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(6): 1–11.
- [44] Starr E P, Shi S, Blazewicz S J, *et al.* Stable isotope informed genome-resolved metagenomics reveals that Saccharibacteria utilize microbially-processed plant-derived carbon[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 122.