

长期不同施肥措施下塿土细菌群落结构变化 及其主要影响因素

刘平静¹, 肖杰¹, 孙本华^{1,4*}, 高明霞², 张树兰¹, 杨学云¹, 冯浩^{2,3,4}

(1 西北农林科技大学资源环境学院/农业部西北植物营养与农业环境重点实验室, 陕西杨凌 712100; 2 西北农林科技大学水利与建筑工程学院, 陕西杨凌 712100; 3 西北农林科技大学水土保持研究所, 陕西杨凌 712100; 4 西北农林科技大学中国旱区节水农业研究院, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】研究不同施肥处理下土壤细菌群落的特征, 为建立促进土壤生态系统稳定和健康的养分管理制度提供依据。【方法】陕西省杨凌示范区“国家黄土肥力与肥料效益监测基地”的28年长期定位试验始于1990年秋, 种植制度为冬小麦-夏休闲, 无灌溉。本研究选取定位试验中不施肥(CK)、施用氮磷钾肥(N、P₂O₅、K₂O分别为135、108、67.5 kg/hm², NPK)和有机无机肥配施(70% N来自牛粪, MNPK)3个处理。于2018年6月小麦收获后采集0—20 cm耕层土样, 测定养分含量、含水量、微生物量碳含量、微生物量氮含量及目标土壤微生物。以1%琼脂糖凝胶电泳法检测土壤中DNA, 根据97%相似度对序列进行OTU聚类、 α 多样性分析(包括Shannon、ACE和Chao1等指数), 使用CANOCO 4.5软件对土壤细菌门水平群落结构、细菌相对丰度等与土壤理化性质进行冗余分析。【结果】与CK相比, NPK和MNPK处理显著提高了土壤有机碳、全氮、微生物量碳、微生物量氮、硝态氮和铵态氮含量, 显著降低了土壤pH值。不同处理细菌基因拷贝数为每克干土 $6.69 \times 10^9 \sim 16.46 \times 10^9$, 与CK相比, NPK和MNPK处理细菌数量分别提高了77%和146%。MNPK处理的土壤细菌Shannon多样性指数显著高于CK和NPK处理, 而Simpson指数显著低于CK和NPK处理, NPK与CK处理间两个指数无显著差异。3个处理的细菌丰富度指数(Chao1指数和ACE指数)和均匀度指数均没有显著差异。在门水平上, 共获得35个细菌类群, 其中, 放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)和绿弯菌门(Chloroflexi)为主要优势菌门(相对丰度>10%), 占到全部菌门的80.1%~81.7%。与CK相比, MNPK处理显著降低了放线菌门($F=5.845, P<0.05$)的相对丰度, 增加了拟杆菌门($F=4.461, P<0.05$)的相对丰度, 3个处理间其他菌门均无显著差异。冗余分析结果显示, CK与NPK、MNPK处理的土壤细菌群落结构具有明显差异, 且MNPK处理对土壤细菌群落组成的影响更大。土壤理化性质对细菌群落影响表现为: 土壤硝态氮>可溶性有机碳>pH>铵态氮>有机碳>土壤含水量, 这些理化因子均是影响微生物生长的关键因子。【结论】关中塿土区旱作雨养条件下, 化肥平衡施用和有机无机肥配施均显著提高了土壤中细菌数量、多样性和丰富度, 有机无机肥配施还改变了细菌群落结构, 特别是降低了放线菌门、增加了拟杆菌门的丰度, 更有利于土壤生态系统的稳定和健康。

关键词: 塿土; 氮磷钾平衡施肥; 有机无机配合施肥; 细菌群落结构; 功能多样性指数; 硝态氮; 可溶性有机碳

Variation of bacterial community structure and the main influencing factors in Eum-orthic Anthrosols under different fertilization regimes

LIU Ping-jing¹, XIAO Jie¹, SUN Ben-hua^{1,4*}, GAO Ming-xia², ZHANG Shu-lan¹, YANG Xue-yun¹, FENG Hao^{2,3,4}

(1 College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University/Key Laboratory of Plant Nutrition and Agro-Environment in Northwest China, Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Water Resources and Architectural Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Institute of Soil and Water Conservation, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4 Institute of Water-Saving Agriculture in Arid Areas of China, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

收稿日期: 2019-03-22 接受日期: 2019-05-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2013AA102904); 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2016KTZDNY03-06); 陕西省自然科学基金研究计划项目(2018JM4007); 高等学校学科创新引智计划资助(B12007)。

联系方式: 刘平静 E-mail: lpj19920516@126.com; *通信作者 孙本华 E-mail: sunbenhua@126.com

Abstract: [Objectives] The fertility change in nutrient contents and microbial structure of farmland after long-term fertilization was studied in this paper, which would provide theoretical base for reasonable fertilization practice to maintain a stable and healthy soil ecosystem. **[Methods]** The investigated farmland was from a 28-years' long-term fertilization experiment in the "National Monitoring Base of Soil Fertility and Fertilizer Efficiency on Loess Soil" in Yangling Demonstration Zone, Shaanxi Province, where the cropping system was winter wheat-summer fallow and without irrigation. The soil samples were collected from three of the experiment treatments, namely, no fertilization control (CK), pure chemical fertilizer (NPK, N-P₂O₅-K₂O = 135-108-67.5 kg/hm²) and chemical fertilizer and manure combination (MNPK, 70% of N from cattle manure). After harvest of wheat, soil samples of 0-20 cm in depth were collected. The soil nutrient contents, water content, microbial biomass C and N contents were determined. The DNA of genome in soil samples were extracted and detected by 1% agarose gel electrophoresis, and sequenced afterwards. The Shannon, ACE and Chao1 indices were calculated. **[Results]** Compared with CK, the NPK and MNPK significantly increased soil organic carbon, total nitrogen, microbial biomass carbon, microbial biomass nitrogen, nitrate nitrogen and ammonium nitrogen, while significantly reduced soil pH. The copy number of bacterial genes were $6.69 \times 10^9 - 16.46 \times 10^9$ per gram of dry soil for the three treatments, and those in NPK and MNPK treatments were 77% and 146% significantly higher than that in CK. The Shannon diversity index of soil bacteria of MNPK was significantly higher, while Simpson index were significantly lower than those of CK and NPK treatments, and there was no significant difference between NPK and CK. The bacterial richness index (Chao1 index and ACE index) and the uniformity index were not significantly different among the 3 treatments. A total of 35 groups of bacteria were obtained at the level of phylum, in which Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria and Chloroflexi were the main dominant ones (relative abundance > 10%), and accounted for 80.1%-81.7% of the total bacteria phyla. Compared with CK, MNPK significantly reduced the relative abundance of Actinomycetes ($F = 5.845, P < 0.05$) and increased that of Bacteroides ($F = 4.461, P < 0.05$). There was no significant difference for other phyla of bacteria among the 3 treatments. The results of redundancy analysis showed that the soil bacterial community structures were significantly different between no fertilization (CK) and fertilization (NPK and MNPK), and MNPK had a greater impact than NPK on soil bacterial community composition. The importance of soil physical and chemical properties affecting the bacterial communities was as follows: nitrate nitrogen > soluble organic carbon > pH > ammonium nitrogen > organic carbon > soil water content. **[Conclusions]** In the rain-fed farmland in Eum-orthic anthrosol area of Guanzhong, the bacteria population, diversity and richness are significantly improved in soils under long-term balanced chemical fertilization and combination of organic and inorganic fertilization. Combination of organic and inorganic fertilizers could increase the bacteria diversity that is more efficient in increasing the abundance of Bacteroides and decreasing that of Actinomycetes, which represents more stable and healthy in soil ecosystem.

Key words: Eum-orthic Anthrosols; balanced NPK fertilization; combined chemical and organic fertilization; bacterial community structure; functional diversity index; nitrate nitrogen; soluble organic carbon

土壤微生物作为土壤生态系统中最重要、最活跃和敏感的组成部分,参与其中的养分转化、物质循环等过程,在改善土壤环境、培肥土壤、促进植物吸收利用营养物质、生长发育等方面发挥着非常重要的作用^[1]。所有土壤微生物中,细菌的丰富度最高,是衡量土壤质量和健康程度、反映土壤环境条件的重要标志之一^[2-3],其数量、多样性以及群落结构组成特征的变化等均会影响土壤肥力和农田的可

持续生产力,因此,维持高水平的细菌群落多样性对农业可持续发展至关重要^[4-5]。外界条件的改变如降雨、施肥和耕作等,均会影响土壤中细菌的数量、多样性和群落结构特征^[6]。农业生态系统中,长期不同的施肥措施会改变土壤性质,影响土壤环境,进而改变土壤细菌的群落结构,对土壤质量和生态系统的稳定性产生一定的影响^[7]。许多研究表明,长期施用有机肥以及有机无机肥配合施用会明

显改变土壤细菌群落结构组成, 提高其数量和多样性等, 潮土、黄泥田、灰漠土、水稻土和潮棕壤等土壤上所得的研究结果相对一致^[8-12]。对于长期施用化肥来说, 在不同类型土壤上的研究结果不尽相同; 在水稻土和潮棕壤上的研究结果表明, 长期单施化肥显著降低了细菌数量和多样性^[11-13]; 而在砂姜黑土和灌溉塿土上的研究结果表明, 长期平衡施用化肥会显著增加土壤细菌数量以及提高细菌群落的多样性和丰富度^[13-14]。

塿土是陕西省关中平原的主要土壤类型, 属于西北半干旱地区特有的土壤资源, 对于关中平原小麦和玉米的生产至关重要。除旱作灌溉外, 旱作雨养亦是本区域重要的栽培管理方式。本研究运用 16S rDNA 高通量测序技术, 对旱作雨养条件下长期不同施肥处理塿土土壤细菌的丰富度、多样性和群落结构组成等进行了分析, 较为客观地反映不同施肥措施下细菌群落的实际状况, 对于评价施肥对关中地区塿土土壤质量的影响具有重要意义, 同时为塿土区合理的肥料管理措施制定及土壤可持续利用提供决策依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地点与试验设计

供试土样采自陕西省杨凌示范区五泉镇的“国家黄土肥力与肥料效益监测基地”长期肥料定位试验田(34°17'N、108°00'E), 海拔高度为 516 m, 该基地年平均气温 13℃, 年平均降水量在 550~600 mm, 且主要集中在 7 月至 10 月^[15], 属于温带大陆性季风气候。

长期定位试验始于 1990 年秋, 主要实行冬小麦—夏休闲的种植制度, 在小麦生长期不进行人工灌溉, 作物生长所需水分主要来自自然降水。试验地共设 7 个不同的施肥处理, 本研究选取其中 3 个处理: 1) 长期不施肥 (CK); 2) 氮磷钾化肥平衡施用 (NPK); 3) 有机肥与氮磷钾化肥配施 (MNPK)。每个试验小区长 21 m, 宽 19 m, 总面积为 399 m²。不同处理施用的所有肥料均在小麦播种前一次性施入, 其中, 氮、磷、钾养分量分别为 N 135 kg/hm²、P₂O₅ 108 kg/hm²、K₂O 67.5 kg/hm², 相应肥料种类为尿素、过磷酸钙、硫酸钾。MNPK 处理中的 N 30% 由化肥提供, 剩下的由有机肥提供, 按比例折合施用本试验所用有机肥 (牛粪)。土壤类型为黄土母质上形成的土垫旱耕人为土 (塿土)。试验开始时

耕层土壤基本理化性状为土壤有机质 10.92 g/kg, 全氮 0.83 g/kg, 全磷 1.39 g/kg, 全钾 2.28 g/kg, 碱解氮 61.3 mg/kg, 有效磷 9.57 mg/kg, 速效钾 191 mg/kg, pH 8.62, 孔隙度 49.63%, 田间持水量 21.12%。

1.2 土壤样品采集与处理

2018 年 6 月小麦收获后采集 0—20 cm 耕层土样。处理平均划分为 3 个区域, 作为 3 次重复, 每个区域采六钻, 将混合四分后的土样装入塑封袋后带回实验室。将部分新鲜土样中的动植物残体和石子等杂物直接剔除, 过 2 mm 筛, 及时测定土壤的含水量、微生物量碳氮及硝态氮、铵态氮的含量。一部分鲜样保存在-80℃ 的超低温冰箱中, 用来分析目标土壤微生物; 其它样品经过自然风干后, 用于测定土壤中的其余养分含量。

土壤基本理化性质的测定方法参照土壤农化分析^[16], pH 测定采用水土比为 1:1 浸提; 用重铬酸钾容量法测定土壤有机碳; 全氮用硫酸消煮—凯氏定氮法测定; 土壤微生物量碳、氮采用氯仿熏蒸—K₂SO₄ 浸提法测定; 土壤可溶性有机碳采用总有机碳分析仪测定; 土壤硝态氮、铵态氮用 KCl 浸提后, 用流动注射分析仪测定。

1.3 土壤微生物总 DNA 的提取及细菌高通量测序

每个样品称取约 0.5 g 鲜土, 根据 E.Z.N.A.® soil 试剂盒 (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 说明书提取总 DNA, 完成基因组 DNA 的抽提后, 用百分之一的琼脂糖凝胶电泳检测。然后样品送至美吉公司进行测序。用 ABI GeneAmp®9700 型 PCR 仪, 采用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对土壤细菌的 V3—V4 可变区进行 PCR 扩增。扩增体系为 20 μL, 5 × FastPfu 缓冲液 4 μL, 2 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 0.8 μL 引物 (5 μmol/L), 0.4 μL FastPfu 聚合酶; 10 ng DNA 模板。扩增程序为: 95℃ 预变性 3 min, 27 个循环 (95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s), 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物使用 2% 的琼脂糖凝胶进行回收, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, Tris-HCl 缓冲液洗脱, 2% 的琼脂糖电泳检测。利用 QuantiFluor™-ST (Promega, USA) 进行检测定量^[17], 将其按照要求混合。

1.4 高通量测序数据分析

构建好的质粒经测序鉴定无误后用紫外分光光度计 (NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定质粒 OD₂₆₀ 的值, 通过公式换算成拷贝数 (copies/ μ L)。利用 Illumina 公司的 MiseqPE300 平台进行测序后, 将原始数据上传至相应数据库中。采用 Trimmomatic 和 FLASH^[18] 进行原始测得序列质控和拼接, 主要步骤: 1) 过滤 reads 尾部质量值 20 以下的碱基, 设置 50 bp 的窗口, 截去窗口内平均质量值低于 20 的碱基后端所有序列, 之后再去除质控后长度低于 50 bp 的序列; 2) 根据重叠碱基, 将两端序列进行拼接, 拼接时重叠区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 (version7.1, <http://drive5.com/uparse/>), 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 classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对每条序列进行物种分类注释, 比对 Silva (Release115, <http://www.arb-silva.de>) 数据库^[19], 设置比对阈值为 70%。

利用美吉的 I-Sanger 生信云平台 (<https://www.i-sanger.com/>) 进行 α 多样分析 (包括 Shannon、ACE、Chao1 等指数), 使用 SPSS 21 软件, 进行单因素 ANOVA 分析和 Pearson 相关性分析; 用 Excel 制作相关图表。使用 CANOCO 4.5 软件对土壤细菌门水平群落结构、细菌相对丰度等与土壤理化性质进行冗余分析 (RDA 分析, redundancy analysis)。

2 结果与分析

2.1 长期不同施肥对土壤理化性质的影响

长期不同施肥明显改变了土壤理化性质 (表 1)。

各处理土壤 pH、有机碳、全氮和微生物量碳均差异显著 ($P < 0.05$)。施肥 (NPK 和 MNPK) 显著降低了土壤 pH 而提高了土壤有机碳、全氮、可溶性有机碳和微生物量碳含量, 且 MNPK 的作用强于 NPK。土壤微生物量氮、硝态氮和铵态氮, 两个施肥处理间差异不显著 ($P > 0.05$), 但均显著高于 CK ($P < 0.05$)。不同处理土壤含水量无显著差异。

2.2 长期不同施肥对土壤细菌群落数量、多样性及丰富度的影响

Shannon 多样性指数用来表示样品的多样性程度, 其值越大, 说明细菌群落物种的多样性就越高; Simpson 指数反映的是物种的优势度, 值越小, 代表群落物种的多样性越高; Chao1 指数和 ACE 指数均可用来表示土壤细菌群落的丰富度。MNPK 和 NPK 处理均显著增加了土壤细菌拷贝数, 与 CK 相比, NPK 和 MNPK 处理分别提高了 77% 和 146% (表 2)。土壤细菌 Shannon 多样性指数, MNPK 处理显著高于 CK 和 NPK 处理, 而 CK 和 NPK 间差异不显著。Simpson 优势度指数, MNPK 显著低于 CK 和 NPK, 同样 CK 和 NPK 间差异不显著。各处理的 Chao1 指数、ACE 指数和均匀度指数均无显著差异。

2.3 长期不同施肥对土壤细菌群落组成的影响

在门水平上, 共获得 35 个细菌类群, 得到 10 个相对丰度 $> 1\%$ 的类群 (图 1A)。其中, 放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 为主要优势菌门 (相对丰度 $> 10\%$), 相对丰度分别为 20.82%~26.83%、21.08%~24.71%、17.41%~23.72% 和 13.37%~15.50%, 占到全部菌门的 80.14%~81.67%。其他 6 类群平均相对丰度均 $< 1\%$, 只占整个菌门的 18.33%~19.86%。与 CK 相比, MNPK 显著降低了放线菌门 ($F = 5.845$, $P < 0.05$) 的相对丰度, 增加了

表 1 3 个处理土壤理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties in the three treatments

处理 Treatment	pH	有机碳 SOC (g/kg)	全氮 Total N (g/kg)	可溶性有机碳 DOC (mg/kg)	微生物量碳 MBC (mg/kg)	微生物量氮 MBN (mg/kg)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	土壤含水量 Soil water content (%)
CK	8.32 a	7.84 c	0.91 c	109.08 b	235.08 c	19.15 b	1.99 b	0.66 b	12.89 a
NPK	8.20 b	10.37 b	1.08 b	133.56 a	358.76 b	36.10 a	9.11 a	1.00 a	14.08 a
MNPK	8.11 c	13.95 a	1.47 a	135.36 a	445.73 a	36.95 a	9.14 a	1.07 a	12.85 a

注 (Note): 同列数值后不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著 Values followed by different lowercase letters in the same column indicate significant difference among treatments at the 0.05 level.

表 2 不同处理土壤细菌数量和功能多样性指数

Table 2 Quantities and functional diversity indices of soil bacteria in different treatments

处理 Treatment	细菌拷贝数 ($\times 10^9$) Bacterial copies	多样性指数 Shannon index	优势度指数 Simpson index	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	均匀度指数 Evenness index
CK	6.69 c	6.59 b	0.0030 a	2666 a	2656 a	0.975 a
NPK	11.81 b	6.64 b	0.0031 a	2734 a	2764 a	0.974 a
MNPK	16.46 a	6.75 a	0.0024 b	2750 a	2758 a	0.975 a

注 (Note): 同列数值后不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著 Values followed by different lowercase letters in the same column indicate significant difference among treatments at the 0.05 level.

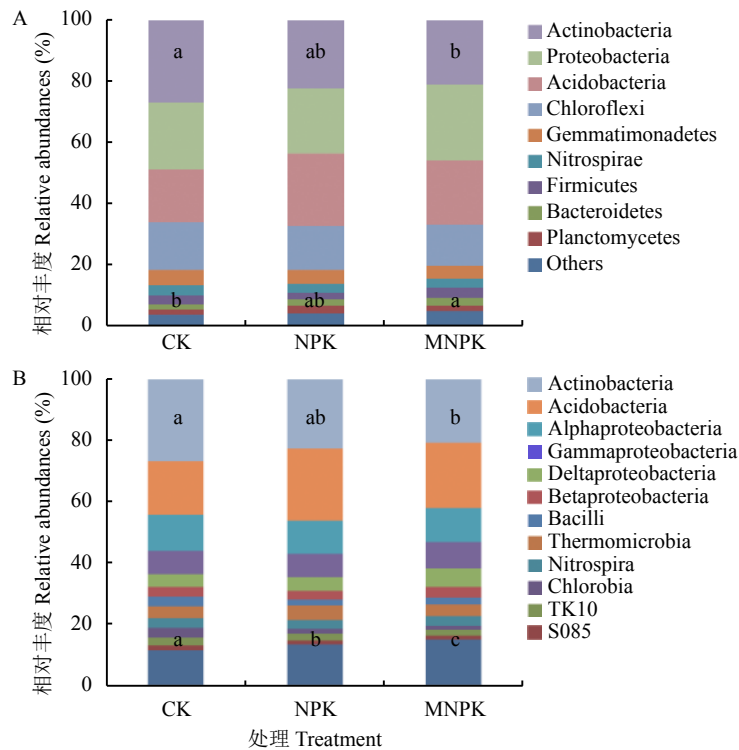


图 1 不同处理土壤细菌在门 (A) 和纲 (B) 分类水平上的类群组成

Fig. 1 Soil bacterial composition at the levels of phylum (A) and class (B) in different treatments

[注 (Note): 同类细菌不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments for the same type of bacteria at the 0.05 level.]

拟杆菌门 ($F = 4.461$, $P < 0.05$) 的相对丰度, 其他菌门均无显著差异。

纲水平上, 共获得 68 个类群, 其中 13 个类群相对丰富度较高, 其余类群平均相对丰度均 $< 1\%$ (图 1B)。放线菌纲 (Actinobacteria)、酸杆菌纲 (Acidobacteria) 和 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 为主要优势菌纲 (相对丰度 $> 10\%$), 相对丰度分别为 20.82%~26.83%、17.41%~23.72% 和 10.62%~11.80%, 占到全部菌纲的 53.06%~56.82%。与 CK 相比, MNPK 显著降低了放线菌纲 ($F = 5.845$, $P < 0.05$) 和绿弯菌纲 ($F = 33.960$, $P < 0.05$) 的相对丰度, 3 个处理间其他菌纲均无显著差异。

2.4 细菌群落结构与土壤性质的关系

为进一步分析不同土壤环境因子对细菌门水平群落结构的影响, 对细菌群落结构与土壤环境因子进行 RDA 分析 (图 2)。结果表明, RDA1 能解释总变异的 56.9%, 而 RDA2 能解释总变异的 22.8%。细菌门水平上, 各个处理在 RDA 图上分布存在显著差异, CK 处理明显与其他处理分布位置不同, 表明单施化肥和有机无机肥配施均会改变土壤细菌群落结构, MNPK 处理与 CK 的距离更大, 说明有机无机肥配施对土壤细菌群落结构影响更大。环境因子对土壤细菌群落结构影响由高到低依次为土壤硝态氮

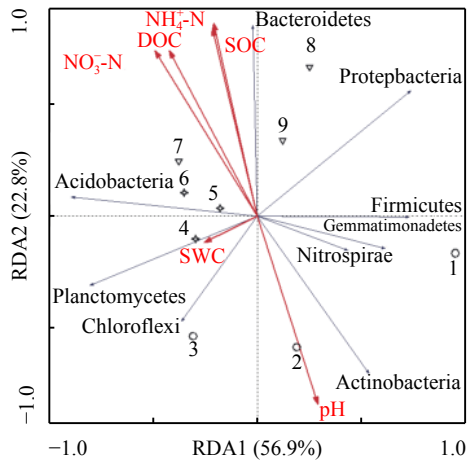


图 2 基于门水平的 RDA 结果

Fig. 2 RDA results based on phylum level of bacteria

[注 (Note): 1, 2, 3—CK; 4, 5, 6—NPK; 7, 8, 9—MNPK. DOC—可溶性有机碳 Soluble organic carbon; SOC—土壤有机碳 Soil organic carbon; SWC—土壤含水量 Soil water content.]

(NO_3^- -N)、可溶性有机碳 (DOC)、pH、铵态氮 (NH_4^+ -N)、有机碳 (SOC) 和土壤含水量 (SWC)。CK 点在 pH 上的投影在正方向，而 NPK 和 MNPK 在 pH 负方向上，表明施肥通过降低土壤 pH 与 CK 形成差异。NPK 和 MNPK 到 SOC、DOC、 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 上的投影分布在正方向，而 CK 分布在负方向上，表明施肥提高了这些土壤性质从而与 CK 处理产生差异。pH 与放线菌门 (Actinobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、硝化螺菌门 (Nitrospirae) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 呈明显锐角，为正相关关系；与拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 呈明显钝角，为负相关关系。土壤 SOC、DOC、 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 等与放线菌门 (Actinobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、硝化螺菌门 (Nitrospirae)、厚壁菌门 (Firmicutes) 以及拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 的相关关系与 pH 值相反。

3 讨论

施肥能够提高作物产量，增加作物秸秆和根茬量，提高土壤有机碳和全氮含量，培肥土壤^[20]，同时也可以改善土壤通气状况和含水量^[21]，促进微生物的生长活动，提高土壤微生物量碳、氮含量^[22]。本研究表明，与对照处理相比，施用化肥 (NPK) 和有机无机肥配施 (MNPK) 显著增加了土壤 SOC、全氮、DOC、 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 含量 (表 1)，这与前人研究结果一致。杨旸等^[15]、林治安等^[20]和杨晓等^[23]在不同类型土壤上的研究结果同样表明，长期施肥有利于

提高作物产量和土壤养分水平，改善土壤肥力。本研究结果表明，单施化肥和化肥配施有机肥均显著降低陕西关中雨养农田瘦土的 pH；聂三安等^[9]研究发现，在黄土高原单施无机肥和有机无机肥配施均会降低土壤 pH；郭芸等^[24]和马琳等^[14]对陕西关中灌溉农田瘦土的研究结果显示，有机无机肥配施会显著降低土壤 pH。其原因一方面可能是，施肥后氮素在转化和吸收时产生 H^+ ，从而降低土壤 pH^[25]；另一方面可能是，施肥显著增加了土壤中有有机碳的含量，而有机碳为酸碱缓冲物质，可使土壤趋于中性^[26]，本研究区域土壤为石灰性土壤，所以单施化肥或有机无机肥配施可使土壤 pH 下降。

土壤微生物数量、多样性指数、均匀度指数和优势度指数等是表征土壤生态系统健康稳定的重要指标。不管是施化肥 (NPK) 还是有机无机肥配施 (MNPK) 均可以促进旱作雨养农田瘦土微生物生长与繁殖，长期施用化肥和有机无机肥配施处理土壤 MBC 和 MBN 的明显增加 (表 1) 以及细菌拷贝数的显著提高 (表 2) 均证实了这点，这与聂三安等^[9]的研究结果一致，马琳等^[14]对陕西关中灌溉农田瘦土的研究也得到同样的结果。本研究利用 Illumina 平台 Miseq 高通量测序技术分析陕西关中雨养农田瘦土细菌多样性和群落结构特征发现，长期单施化肥 (NPK) 的细菌多样性与不施肥处理 (CK) 相比无显著差异，而长期有机无机肥配施 (MNPK) 能明显提高土壤细菌的 Shannon 指数和降低 Simpon 优势度指数 (表 2)。同样在瘦土上，马琳等^[14]利用 TRFLP 方法对瘦土细菌多样性的研究显示，长期单施化肥 (NPK) 和有机无机肥配施 (MNPK) 对土壤细菌多样性均无显著影响，孙瑞等^[27]利用 Biolog 方法的研究结果显示，长期施用无机肥能够显著提高土壤细菌多样性，而郭芸等^[24]利用 PLFA 法的研究结果显示，长期单施氮磷肥会显著增加土壤微生物群落的多样性，这种差异很可能是由于方法不同造成的。魏巍等^[28]在黑土上的研究结果显示，长期施用化肥和有机无机肥配施均会显著降低土壤细菌群落的多样性。这可能是由于土壤特性不同引起的，黑土土壤肥力相对较高，而陕西关中瘦土肥力相对较低。对于丰富度和均匀度来说，各处理均无显著差异，这与于冰等^[29]和王伏伟等^[30]的研究结果相似，马琳等^[14]用 TRFLP 方法对瘦土土壤细菌多样性的研究也显示出同样的结果。这可能是由于施肥的 2 个处理中各类细菌数量均有所提高，导致各类细菌所占比例没有明显变化，从而使土壤细菌群落丰富度和均匀度没有发生显著变化。

不同施肥方式均会影响细菌群落结构。本研究的 3 个不同施肥处理共得到 35 个门水平类群、68 个纲水平类群和超过 500 个属水平类群。不同处理的细菌优势门和纲类群 (相对丰度 > 10%) 相似, 但优势类群的相对丰度存在一定差异。不同施肥处理垆土细菌的优势菌门为放线菌门 (Actinobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、变形杆菌门 (Proteobacteria) 和绿弯菌门 (Chloroflexi), 这与孙瑞波等^[13]研究得到的细菌优势类群相似; 其次是芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 和硝化螺菌门 (Nitrospirae) (图 1A)。变形杆菌门 (Proteobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 在长期有机无机肥配施后的土壤中丰度较高, 说明有机无机肥配施能够为 Proteobacteria 和 Acidobacteria 提供良好的生存环境。主要原因可能是由于肥料可以为作物提供其生长所必需的营养元素, 促进作物根部器官的生长和物质分泌, 相应地提高了根系的生理活性, 进而影响与根际效应关系密切的变形杆菌门 (Proteobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria), 提高了其相对丰度^[31]; 而 MNPk 处理放线菌门的相对丰度明显低于 CK 处理, 这可能与施肥提高了土壤有机碳和全氮含量有一定的关系^[3]。放线菌门 (Actinobacteria) 和绿弯菌门 (Chloroflexi) 在 CK 处理中的丰度显著高于 MNPk 处理, Tian 等^[32]发现其相对丰度与有机肥施用量呈负相关关系。可能是因为绿弯菌和放线菌对有机肥施用非常敏感^[33], 施用有机肥反而会抑制绿弯菌和放线菌的生长和繁殖, 使绿弯菌门和放线菌门相对丰度降低。聂三安等^[9]在黄泥土上的研究结果也显示, Chloroflexi 在施肥处理中 (NPK 和 NPKS) 的相对丰度较不施肥处理显著下降。

将 RDA 分析加入到微生物信息分析的过程中, 能够更加直接清楚地显示出土壤环境因子对研究区土壤细菌群落特征的影响。RDA 分析结果表明, MNPk 和 NPK 处理与 CK 分布位置上存在明显差异, SOC、SWC、DOC、NO₃⁻-N、NH₄⁺-N 和 pH 均会影响土壤细菌群落结构 (图 2), 这与丁建莉等^[34]利用高通量测序研究东北黑土微生物群落对长期施肥响应的结果相似。土壤理化性质均会对土壤细菌群落产生一定的影响, pH 与放线菌门、芽单胞菌门、硝化螺菌门和厚壁菌门呈正相关关系, 与拟杆菌门和酸杆菌门呈负相关关系; SOC、DOC、NO₃⁻-N、NH₄⁺-N 等与放线菌门、芽单胞菌门、硝化螺菌门和厚壁菌门呈负相关关系, 而与拟杆菌门和酸杆菌门呈正相关关系; 这与王伏伟等^[30]利用高通量测序技术

在砂姜黑土上的研究结果一致。NPK 和 MNPk 处理土壤细菌群落结构均较不施肥处理 (CK) 发生了显著变化, 说明长期施肥能够改变土壤细菌生境条件, 从而引起土壤微生物群落结构的变化, 这也进一步证明了长期土壤培肥 (如氮磷钾化肥平衡施用、有机无机肥配施等) 在提高土壤肥力的同时, 可促进土壤生态系统稳定和健康。

4 结论

关中旱作雨养条件下, 长期氮磷钾化肥配施和有机无机肥配施均可以显著提高农田垆土肥力和改变土壤细菌群落结构, 有机无机肥配施还可以显著提高土壤细菌多样性。化肥平衡施用和有机无机肥配施对于提升旱作雨养农田土壤肥力以及促进土壤生态系统稳定和健康均具有重要作用, 其中有机无机肥配施是值得推荐的施肥方式。

参 考 文 献:

- [1] Degens B P, Schipper L A, Sparling G P, *et al.* Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 189–196.
- [2] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, *et al.* Microbial diversity and soil functions[J]. *European Journal of Soil Science*, 2003, 54(4): 655–670.
- [3] Kennedy A C, Smith K L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils[J]. *Plant and Soil*, 1995, 170: 75–86.
- [4] Bhat A K. Preserving microbial diversity of soil ecosystem: a key to sustainable productivity[J]. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2013, 2(8): 85–101.
- [5] Brussaard L, DeRuiter P C, Brown G G. Soil biodiversity for agricultural sustainability[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2007, 121(3): 233–244.
- [6] Tamilselvi S M., Chinnadurai C, Ilamurugu K, *et al.* Effect of long-term nutrient managements on biological and biochemical properties of semi-arid tropical Alfisol during maize crop development stages[J]. *Ecological Indicators*, 2015, 48: 76–87.
- [7] Zhao J, Ni T, Li J, *et al.* Effects of organic-inorganic compound fertilizer with reduced chemical fertilizer application on crop yields, soil biological activity and bacterial community structure in a rice-wheat cropping system[J]. *Soil Ecology*, 2016, 99: 1–12.
- [8] 袁铭章, 刘树堂, 陈延玲, 等. 16S rDNA 扩增子测序揭示长期定位秸秆还田对土壤细菌群落的影响[J]. *华北农学报*, 2016, 31(6): 157–163.
- [9] Yuan M Z, Liu S T, Chen Y L, *et al.* Illumina amplicon sequencing of 16S rDNA tag reveals bacteria community development of long-term straw returning soil[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2016, 31(6): 157–163.
- [9] 聂三安, 赵丽霞, 王伟, 等. 长期施肥对黄泥土土壤微生物群落结构

- 和多样性的影响[J]. 农业现代化研究, 2018, 39(4): 689–699.
- Nie S A, Zhao L X, Wang W, *et al.* Effects of long-term fertilizations on microbial community structure and diversity in yellow clayey paddy soil[J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2018, 39(4): 689–699.
- [10] 徐万里, 唐光木, 葛春辉, 等. 长期施肥对新疆灰漠土土壤微生物群落结构与功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(2): 468–477.
- Xu W L, Tang G M, Ge C H, *et al.* Effects of long-term fertilization on diversities of soil microbial community structure and function in grey desert soil of Xinjiang[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(2): 468–477.
- [11] 郭奇峰, 陆扣萍, 毛霞丽, 等. 长期不同施肥对农田土壤养分与微生物群落结构的影响[J]. 中国农学通报, 2015, 31(5): 150–156.
- Wu Q F, Lu K P, Mao X L, *et al.* Responses of soil nutrients and microbial biomass and community composition to long-term fertilization in cultivated land[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(5): 150–156.
- [12] 徐永刚, 宇万太, 马强, 等. 长期不同施肥制度对潮棕壤微生物生物量碳、氮及细菌群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(8): 2078–2085.
- Xu Y G, Yu W T, Ma Q, *et al.* Effects of long-term fertilizations on microbial biomass C and N and bacterial community structure in an aquic brown soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(8): 2078–2085.
- [13] 孙瑞波, 郭熙盛, 王道中, 等. 长期施用化肥及秸秆还田对砂姜黑土细菌群落的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 2049–2057.
- Sun R B, Guo X S, Wang D Z, *et al.* The impact of long-term application of chemical fertilizers and straw returning on soil bacterial community[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(10): 2049–2057.
- [14] 马琳, 孙本华, 孙瑞, 等. 长期不同施肥对壤土细菌群落多样性的影响[J]. 西北农业学报, 2015, 24(6): 162–170.
- Ma L, Sun B H, Sun R, *et al.* Effects of long-term different fertilization on bacterial community diversity in an anthropogenic loess soil[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2015, 24(6): 162–170.
- [15] 杨昉, 张树兰, 杨学云, 等. 长期定位施肥对旱作壤土小麦产量、养分效率及养分平衡的影响[J]. 土壤通报, 2017, 48(5): 1162–1168.
- Yang Y, Zhang S L, Yang X Y, *et al.* Effect of long-term fertilization on wheat yield, nutrient use efficiency and nutrient balance in rain-fed loess soil[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2017, 48(5): 1162–1168.
- [16] 鲍士旦. 土壤农化分析(第3版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 25–114.
- Bao S D. *Soil and agricultural chemistry analysis (The third edition)*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000. 25–114.
- [17] Huse S M, Huber J A, Morrison H G, *et al.* Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing[J]. *Genome Biology*, 2007, 8(7): 149–155.
- [18] Zhang Y, Wang X, Hu M, *et al.* Effect of hydraulic retention time (HRT) on the biodegradation of trichloroethylene wastewater and anaerobic bacterial community in the UASB reactor[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1977–1987.
- [19] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 41(1): 590–596.
- [20] 林治安, 赵秉强, 袁亮, 等. 长期定位施肥对土壤养分与作物产量的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2809–2819.
- Lin Z A, Zhao B Q, Yuan L, *et al.* Effects of organic manure and fertilizers long-term located application on soil fertility and crop yield[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(8): 2809–2819.
- [21] 彭娜, 王开峰, 谢小立, 等. 长期有机无机肥配施对稻田土壤基本理化性状的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2009, (2): 6–10.
- Peng N, Wang K F, Xie X L, *et al.* Effects of long-term integrated fertilization with organic manure and chemical fertilizers on basic physical and chemical properties in paddy soils[J]. *Soil and Fertilizer Science in China*, 2009, (2): 6–10.
- [22] 臧逸飞, 郝明德, 张丽琼, 等. 26 年长期施肥对土壤微生物量碳、氮及土壤呼吸的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(5): 1445–1451.
- Zang Y F, Hao M D, Zhang L Q, *et al.* Effects of wheat cultivation and fertilization on soil microbial biomass carbon, soil microbial biomass nitrogen and soil basal respiration in 26 years[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(5): 1445–1451.
- [23] 杨晓, 郝明德, 李芳林. 黄土区长期施肥对小麦产量和养分吸收的影响[J]. 土壤通报, 2010, 41(1): 164–169.
- Yang X, Hao M D, Li F L. Effect of long-term fertilization on wheat yield and nutrients absorption in loess plateau[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2010, 41(1): 164–169.
- [24] 郭芸, 孙本华, 王颖, 等. 长期施用不同肥料土 PLFA 指纹特征[J]. 中国农业科学, 2017, 50(1): 94–103.
- Guo Y, Sun B H, Wang Y, *et al.* PLFA fingerprint characteristics of an anthropogenic loess soil under long-term different fertilizations[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(1): 94–103.
- [25] 蔡泽江, 孙楠, 王伯仁, 等. 几种施肥模式对红壤氮素形态转化和 pH 的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(14): 2877–2885.
- Cai Z J, Sun N, Wang B R, *et al.* Experimental research on effects of different fertilization on nitrogen transformation and pH of red soil[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(14): 2877–2885.
- [26] 王媛华, 段增强, 汤英, 等. 不同施肥处理对碱性设施土壤酸化的影响[J]. 土壤, 2016, 48(2): 349–354.
- Wang Y H, Duan Z Q, Tang Y, *et al.* Effect of different fertilization treatments on soil acidification of alkaline facilities[J]. *Soils*, 2016, 48(2): 349–354.
- [27] 孙瑞, 孙本华, 高明霞, 等. 长期不同土地利用方式下土壤微生物特性的变化[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(3): 655–663.
- Sun R, Sun B H, Gao M X, *et al.* Changes of soil microbial characteristics under long-term different land use patterns on an anthropogenic loess soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2015, 21(3): 655–663.
- [28] 魏巍, 许艳丽, 朱琳, 等. 长期施肥对黑土农田土壤微生物群落的影响[J]. 土壤学报, 2013, 50(2): 373–380.
- Wei W, Xu Y L, Zhu L, *et al.* Effect of long-term fertilization on soil microbial communities in farmland of black soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(2): 373–380.
- [29] 于冰, 宋阿琳, 李冬初, 等. 长期施用有机和无机肥对红壤微生物群落特征及功能的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2017, (6): 58–65.

- Yu B, Song A L, Li D C, *et al.* Influences of long-term application of organic and inorganic fertilizers on the structure and function of microbial community in red soil[J]. *Soil and Fertilizer Science in China*, 2017, (6): 58–65.
- [30] 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.
- [31] 袁红朝, 吴昊, 葛体达, 等. 长期施肥对稻田土壤细菌、古菌多样性和群落结构的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(6): 1807–1813.
- Yuan H C, Wu H, Ge T D, *et al.* Effects of long-term fertilization on bacterial and archaeal diversity and community structure within subtropical red paddy soils[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(6): 1807–1813.
- [32] Tian W, Zhang Z, Hu X, *et al.* Short-term changes in total heavy metal concentration and bacterial community composition after replicated and heavy application of pig manure-based compost in an organic vegetable production system[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51(5): 593–603.
- [33] Sun J, Zhang Q, Zhou J, *et al.* Pyrosequencing technology reveals the impact of different manure doses on the bacterial community in apple rhizosphere soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 78(6): 28–36.
- [34] 丁建莉, 姜昕, 关大伟, 等. 东北黑土微生物群落对长期施肥及作物的响应[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(22): 4408–4418.
- Ding J L, Jiang X, Guan D W, *et al.* Responses of micro-population in black soil of northeast China to long-term fertilization and crops[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(22): 4408–4418.