

长期氮磷配施对褐土细菌多样性 及土壤酶活性的影响

刘志平,周怀平,解文艳,杨振兴,马晓楠,胡雪纯

(山西农业大学资源环境学院,省部共建有机旱作农业国家重点实验室(筹),山西太原 030031)

摘要:为探明不同氮磷化肥配施对土壤细菌群落结构和酶活性的影响,以山西寿阳褐土长期施肥定位试验为依托,选择5个施肥处理:CK(不施肥)、 N_1P_1 (N:60 kg·hm⁻²;P:37.5 kg·hm⁻²)、 N_2P_2 (N:120 kg·hm⁻²;P:75 kg·hm⁻²)、 N_3P_3 (N:180 kg·hm⁻²;P:112.5 kg·hm⁻²)和 N_4P_4 (N:240 kg·hm⁻²;P:150.0 kg·hm⁻²),采集玉米收获后耕层(0~20 cm)土样,通过Illumina HiSeq高通量测序技术,对土壤细菌16S rRNA的V3-V4区进行测序;采用比色法测定土壤蔗糖酶、脲酶和碱性磷酸酶活性,分析细菌群落结构与土壤酶活性之间的相关性。结果表明,4个氮磷配施处理均提高了土壤养分及玉米产量。与CK相比, N_1P_1 、 N_2P_2 、 N_3P_3 和 N_4P_4 处理中,碱解氮、有效磷、有机质及玉米产量的增加率分别为3.3%~60.9%,120.1%~862.6%,7.9%~18.4%和63.9%~86.1%。随着氮磷施用量的增加,细菌 α -多样性在 N_1P_1 处理中达到最高,之后呈现下降趋势; β -多样性分析发现,不同氮磷配施显著影响细菌群落结构。RDA分析表明,土壤有效磷和全氮对细菌群落结构差异的贡献率最大。随着氮磷施用量的增加,脲酶活性逐渐升高,碱性磷酸酶和蔗糖酶的活性呈现降低趋势。因此,化肥施用过量,不利于土壤中细菌多样性及土壤酶活性的维持和提高。

关键词:细菌多样性;酶活性;氮磷配施;褐土;玉米

中图分类号:S365;S15 **文献标志码:**A

Effects of long-term combined application of nitrogen and phosphorus on bacterial diversity and soil enzyme activities in cinnamon soil

LIU Zhiping, ZHOU Huaiping, XIE Wenyan, YANG Zhenxing, MA Xiaonan, HU Xuechun

(Institute of Resources and Environment, Shanxi Agricultural University, State Key Laboratory of Sustainable Dryland Agriculture(in preparation), Taiyuan, Shanxi 030031, China)

Abstract: To explore the effects of different combinations of nitrogen and phosphorus fertilizer application on soil bacterial community structure and enzyme activities, five fertilization treatments were set up based on the long-term fertilization experiment in cinnamon soil of Shouyang, Shanxi Province. The treatments included CK (no fertilizer), N_1P_1 (N: 60 kg·hm⁻²; P: 37.5 kg·hm⁻²), N_2P_2 (N: 120 kg·hm⁻²; P: 75 kg·hm⁻²), N_3P_3 (N: 180 kg·hm⁻²; P: 112.5 kg·hm⁻²) and N_4P_4 (N: 240 kg·hm⁻²; P: 150.0 kg·hm⁻²). Soil samples from the tillage layer (0~20 cm) after maize harvest were collected, and the V3-V4 region of soil bacteria 16S rRNA was sequenced by Illumina HiSeq high-throughput sequencing technology. The activities of soil sucrase, urease and alkaline phosphatase were measured by colorimetric method, and the correlation between bacterial community structure and soil enzyme activities was analyzed. The results showed that the combined application of nitrogen and phosphorus increased soil nutrients and maize yield. Compared with CK, the yield of maize under N_1P_1 , N_2P_2 , N_3P_3 and N_4P_4 treatments increased by 3.3%~60.9%, 120.1%~862.6%, 7.9%~18.4% and 63.9%~86.1%, respectively. With the increase of nitrogen and phosphorus application rates, bacterial α -diversity reached the highest in N_1P_1

收稿日期:2021-06-24

修回日期:2021-11-30

基金项目:山西农业大学省部共建有机旱作农业国家重点实验室自主研发项目(202001-7);山西省农业科学院博士研究基金(YBSJJ2012);山西省青年科技研究基金(201901D211557)

作者简介:刘志平(1988-),女,山西繁峙人,博士,助理研究员,主要从事土壤微生物研究。E-mail:lzp.19881006@163.com

通信作者:周怀平(1964-),男,山西昔阳人,研究员,主要从事耕地质量保育研究。E-mail:huaipingzhou@126.com

treatment, and then showed a downward trend. β -diversity analysis indicated that different nitrogen and phosphorus combinations significantly affected bacterial community structure. RDA analysis showed that soil available phosphorus and total nitrogen contributed the most to the difference of bacterial community structure. With the increase of nitrogen and phosphorus application amount, urease activity increased gradually, while alkaline phosphatase and sucrase activity displayed a trend of decrease. Therefore, excessive application of chemical fertilizer was not conducive to the maintenance and improvement of soil bacterial diversity and soil enzyme activity.

Keywords: bacterial diversity; enzyme activity; combined application of nitrogen and phosphorus; cinnamon soil; maize

土壤微生物和酶活性是表征土壤肥力的重要指标,二者在土壤物质转化和能量流动过程中起着极其重要的作用^[1-2]。土壤微生物作为土壤生态系统的重要组成部分,包括细菌、真菌、古菌等。其中,细菌是土壤中最大的功能性类群之一,参与土壤呼吸、养分转化、有机物分解等过程^[3-4],其多样性是评价土壤质量及生产力的重要指标^[5]。土壤酶是由微生物、动植物活体分泌以及由动植物残体、遗骸分解,释放于土壤中的一类具有催化能力的生物活性物质,是土壤生态系统新陈代谢的重要动力,其活性可以反映出不同土壤生物化学反应的相对强度和土壤养分状况^[6]。研究表明,土壤微生物及酶活性与土壤的理化性质、施肥方式、耕作措施等密切相关^[7-8]。施肥是农业生产中的一项重要措施,可以提升土壤养分,增加粮食产量。近年来,为了保证粮食供给,大量的化肥输入农田,导致土壤出现板结、盐碱化、粮食减产等现象^[9-10],同时也影响到了土壤细菌的生存环境及土壤酶活性。细菌的丰富度、均匀度、结构组成都会直接或者间接影响到土壤肥力、土壤酶活性,进而威胁到粮食安全。

大量研究表明,施肥影响土壤细菌的多样性,合理施肥能显著提高细菌 OTU 数量、功能多样性及活性^[11],而长期不合理施肥却降低了细菌的 α -多样性,很大程度上改变了细菌的物种组成^[12],细菌群落的变化又会间接影响土壤酶活性,合理施肥可以提高土壤蔗糖酶、脲酶、碱性磷酸酶等的活性^[13-15]。土壤酶参与不同物质的分解与转化,通常与土壤养分状况关系密切,也会随着作物生育期发生变化^[16]。

随着人口增加及人为扰动加剧,我国耕地土壤出现不同程度的退化现象。山西是我国特色农业大省,也是重要的粮食种植区。褐土是山西主要类型之一,研究褐土不同施肥下土壤细菌的多样性及土壤酶活性,对我省土壤肥力培育及合理施肥具有重要意义。土壤细菌群落结构的形成与演替需要

经历漫长的过程,长期定位试验有利于合理、全面地解释这一过程。目前用 16S rRNA 测序技术研究褐土区不同氮磷配施对细菌多样性的报道比较少。本试验基于山西寿阳长达 28 a 的定位试验,以 5 个不同氮磷配施处理的耕层土壤(0~20 cm)为研究对象,采用 Illumina HiSeq 高通量测序技术,对土壤细菌 16S rRNA 的 V3-V4 区进行测序,探讨氮磷化肥配施对细菌多样性及群落结构的影响,通过测定蔗糖酶、脲酶和碱性磷酸酶的活性,分析细菌群落与酶活性及环境因子之间的相关性,为山西褐土的肥力培育及氮磷化肥的合理减施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

长期定位试验地点位于山西省晋中市寿阳县宗艾镇宗艾村“国家农业环境寿阳观测试验站(113°06'38"E, 37°58'23.0"N)”。试验站海拔为 1130 m,土壤发生分类为褐土,成土母质为马兰黄土,系统分类属于筒育干润锥形土(Hapli-Ustic Cambosols)^[17]。该区属中纬度暖温带半湿润偏旱区大陆性季风气候区,年均气温为 7.4℃,年均降水量 500 mm。试验地初始 pH 值为 8.4,有机质为 23.8 g·kg⁻¹、碱解氮为 117.69 mg·kg⁻¹、有效磷为 4.84 mg·kg⁻¹、有效钾为 100 mg·kg⁻¹。

本长期定位试验从 1992 年春开始种植春玉米,采用大田裂区方式分布。按照氮肥和磷肥的用量梯度,共设置 5 个处理: N₁P₁, N₂P₂, N₃P₃, N₄P₄ 和 CK,每个处理 3 个生物学重复,共 15 个小区,每个小区长 8.3 m,宽 8 m,面积约为 66 m²,各小区间起垄隔离。玉米品种为大丰 30,播种密度为 66 000 株·hm⁻²,玉米播种前进行旋地和施肥,氮肥为尿素(46% N),磷肥为过磷酸钙(46% P₂O₅),施肥量见表 1,方式为全部播前基施。

1.2 样品采集

2018 年 10 月玉米收获后,各小区采用“S”形取样法,取 5 点制成一个混合土样。用土钻采集 0~20

cm 的土壤样品去掉明显的石砾、残枝败叶等杂物,用无菌袋装好,将其置于冰盒带回实验室后分为两部分,一部分用于土壤 DNA 的提取和微生物多样性分析,可暂时保存于 -80°C ;另一部分自然风干后过筛,进行土壤酶活性及理化性质的测定分析。

表 1 试验处理及施肥

Table 1 Experimental treatment and fertilization

处理 Treatment	$\text{N}/(\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2})$	$\text{P}_2\text{O}_5/(\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2})$
CK	0	0.0
N_1P_1	60	37.5
N_2P_2	120	75.0
N_3P_3	180	112.5
N_4P_4	240	150.0

1.3 测定方法

1.3.1 土壤理化性质测定 土壤理化性质的测定方法均参照鲍士旦编著的《土壤农业化学分析方法》^[18]。

1.3.2 土壤细菌多样性分析 准确称取 0.5 g 土样,采用 Fast DNA SPIN DNA 提取试剂盒 (MP Bio-medicals, Santa Ana, CA, United States),按照说明书的方法进行土壤 DNA 的提取,用 0.7% 的琼脂糖凝胶进行电泳,观察条带是否清晰、完整;用紫外分光光度计 NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 测定 DNA 的浓度。

通过 PCR 扩增细菌的高变区 V3-V4 区,引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[19],在上游引物中加入 7 个碱基的寡核苷酸标签序列 barcode,用来区分不同样品。PCR 扩增采用 NEB Q5 DNA 高保真聚合酶,反应体积为 25 μL ,体系组成为:模板 DNA 2 μL ,上下游引物各 1 μL ,Q5 DNA 聚合酶 0.25 μL ,反应缓冲液 5 μL ,dNTP 2 μL ,补无菌水到 25 μL 。PCR 程序为:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15",55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30",72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30",反复 25 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 5 min。扩增结果进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,切取目的片段,然后用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City, U.S.) 回收目的片段,通过 PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.) 进行定量。将扩增产物送至上海派森诺生物科技股份有限公司,进行高通量测序。

1.3.3 土壤酶活性的测定 脲酶活性采用苯酚钠-次氯酸钠比色法,以 24 h 后 1 g 土壤中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的质量 (mg) 表示脲酶活性;碱性磷酸酶活性采用磷酸苯二钠法,以 24 h 后 1 g 土壤中酚的质量 (mg) 表示脲

酶活性;蔗糖酶采用 3,5-二硝基水杨酸比色法,以 24 h 后 1 g 土壤中葡萄糖的质量 (mg) 表示蔗糖酶活性,详见参考文献^[20]。

1.4 数据统计

采用 QIIME 对测序数据进行处理^[21]。首先,将与 Barcode 精确匹配的原始测序 Reads 分配给各样本,去除低质量序列,使用 FLASH (v1.2.7) 进行组装和拼接^[22],UCHIME (v4.2) 进行嵌合体剔除,剩余的优质序列通过 UCLUST 以 97% 的相似度阈值划分 OTU (Operational taxonomic units)^[23]。从每个 OTU 中选择一个具有代表性的序列,与 Silva 132 数据库进行比对和 OTU 分类^[24]。序列数据分析主要采用 QIIME 和 R (v 3.6.3, Vegan package) 进行^[25-26]。利用 QIIME 计算 Chao1 和 Shannon 指数。采用主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 研究不同样品间细菌群落结构的变化。采用置换多元方差分析 (PERMANOVA)^[27] 评估各组间细菌群落组成差异的显著性。利用 MEGAN^[28] 进行细菌群落分类组成和丰度可视化。采用无加权组算术平均法 (UPGMA),利用 R 软件进行物种组成相似性分析,并通过 CANOCO 软件进行细菌群落与环境因子的冗余分析 (Redundancy analysis, RDA)。15 个土壤样本共得到 376833 条高质量序列,原始数据已提交至 NCBI 数据库中,编号为 PRJ-NA706469。

采用 SPSS 软件 (version 22) 进行单因素方差分析 (ANOVA),检验土壤理化性质、土壤酶活性、细菌 α -多样性指数等的正态分布和方差同质性。在 $P=0.05$ 水平下,采用 LSD (Least significant difference) 检验分析数据间的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同氮磷配施对土壤理化性质及玉米产量的影响

2.1.1 不同氮磷配施对土壤理化性质的影响 不同氮磷施肥对土壤理化性质的影响如表 2 所示,与 CK 相比,氮磷化肥配施降低了土壤 pH,并且提高了土壤 AN、AP、AK、OM、TN、TP 和 TK 的含量。其中,AN、AP、AK、OM 和 TP 在各处理之间均存在显著差异 ($P<0.05$)。与 CK 相比, N_1P_1 、 N_2P_2 、 N_3P_3 、 N_4P_4 处理的 AN 增幅分别为:97.8%,116.6%,159.0% 和 208.2%;AP 的增加率分别为 120.1%,387.7%,635.2% 和 862.6%。与 CK 相比,各氮磷配施处理土壤有机质的增加率范围为 84.8%~102.9%,在 N_2P_2 处理中土壤有机质达到最高,之后出现下降的趋势。

2.1.2 不同氮磷配施对玉米产量的影响 氮磷配施显著提高了玉米产量,且各处理间的差异显著($P < 0.05$)。与 CK 相比, N_1P_1 、 N_2P_2 、 N_3P_3 、 N_4P_4 处理的玉米产量增加率分别为 63.9%、86.1%、83.1%和 79.9%。玉米产量在 N_2P_2 处理中达到最高,之后呈现下降趋势,说明超过一定界限后继续增加施肥量并不能增加玉米的产量。

2.2 不同氮磷配施处理下土壤细菌的多样性

2.2.1 土壤细菌的 α -多样性 细菌的 α -多样性指数如表 3 所示,Chao1 指数在不同处理间未见差异,Shannon 指数只有在 N_1P_1 和 N_4P_4 两处理间差异显著($P < 0.05$),其他处理之间差异不显著。随着氮磷化肥用量的增加,Chao1 指数和 Shannon 指数均出现波动,在 N_1P_1 处理下,两种指数均达到最高,之后开始下降,虽然在 N_3P_3 处理下 Chao1 指数重新出现上升,但是整体上呈现下降的趋势,在 N_4P_4 处理中,两种指数低于 CK 处理。

2.2.2 门水平土壤细菌相对丰度 通过对各处理细菌 16S rDNA 的高通量测序结果进行分析和比对得知,所有细菌共注释到 33 个门,111 个纲,315 个目,522 个科和 956 个属。相对丰度值排序位于前 10 位的细菌门如图 1 所示。排名在前 5 位的门依次为:变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、酸杆菌门(Ac-

idobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes),共占所有菌门的 85%以上,在各个处理中平均相对含量为:23.3%~26.8%,20.5%~23.3%,15.0%~17.8%,12.9%~15.7%,7.1%~10.2%。与 CK 相比, N_1P_1 、 N_2P_2 、 N_3P_3 、 N_4P_4 处理芽单胞菌门的相对含量提高,并且随着氮磷化肥用量的增加,芽单胞菌门的相对含量逐渐升高,增加率依次为 0.05%、2.47%、3.07%、3.09%。与此相反,酸杆菌门的相对含量随着氮磷化肥用量的增加而呈现降低规律,与 CK 相比, N_1P_1 、 N_2P_2 、 N_3P_3 、 N_4P_4 处理中酸杆菌门依次显著降低了 0.98%、1.52%、2.29%、2.79%。此外,放线菌门相对丰度依次降低了 0.38%、2.22%、3.22%、2.52%。

2.2.3 土壤细菌的 β -多样性 采用主成分分析进行土壤细菌 β -多样性检验,结果如图 2 所示,PC1 和 PC2 两个轴分别解释了 64.1%和 22.0%的细菌群落变化。整体来看,同一处理的 3 个重复距离较近,说明平行性较好,而不同处理的样本彼此分离,说明不同施肥下土壤细菌群落结构有差异。置换多元方差分析(图 3)表明,组间差异显著高于组内差异($P < 0.001$), R 值为 0.898,接近于 1,因此,不同处理之间细菌群落差异显著。

2.3 不同氮磷配施对土壤酶活性的影响

如表 4 所示,不同氮磷配施对蔗糖酶、脲酶及碱性磷酸酶的影响规律不同。氮磷配施增加了土壤脲

表 2 不同氮磷配施处理下土壤的理化性质及玉米产量

Table 2 Physicochemical properties of soil and maize yield under different nitrogen and phosphorus combinations

处理 Treatment	pH	碱解氮 AN /(mg·kg ⁻¹)	有效磷 AP /(mg·kg ⁻¹)	有效钾 AK /(mg·kg ⁻¹)	有机质 OM /(g·kg ⁻¹)	全氮 TN /(g·kg ⁻¹)	全磷 TP /(g·kg ⁻¹)	全钾 TK /(g·kg ⁻¹)	玉米产量 Maize yield /(kg·hm ⁻² ·a ⁻¹)
CK	8.65±0.03a	32.76±0.12e	4.57±0.05e	21.68±0.04e	12.90±0.07e	0.83±0.01d	0.50±0.01e	14.67±0.05d	3695.13±191.21e
N_1P_1	8.49±0.04b	64.81±0.03d	10.06±0.04d	62.41±0.05b	25.82±0.05b	1.02±0.02c	0.61±0.01d	15.44±0.03c	6054.98±285.14d
N_2P_2	8.42±0.01c	70.95±0.08c	22.29±0.02c	81.16±0.09a	26.17±0.02a	1.28±0.01b	0.79±0.02c	16.04±0.02a	6877.09±312.45a
N_3P_3	8.47±0.05b	84.81±0.03b	33.60±0.08b	59.93±0.03d	23.84±0.03d	1.29±0.03b	0.82±0.01b	15.44±0.03c	6763.97±121.23b
N_4P_4	8.49±0.02b	100.95±0.06a	43.99±0.03a	60.29±0.10c	24.28±0.02c	1.36±0.02a	1.25±0.02a	15.89±0.05b	6649.21±50.02c

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$). The same below.

表 3 不同氮磷配施处理下细菌的 α -多样性

Table 3 Bacterial α -diversity under different nitrogen and phosphorus combinations

处理 Treatment	Chao1 指数 Chao1 index	Shannon 指数 Shannon index
CK	2931.36±482.38a	10.71±0.08ab
N_1P_1	3929.85±423.41a	10.79±0.05a
N_2P_2	3113.99±830.26a	10.73±0.06ab
N_3P_3	3493.44±401.18a	10.71±0.12ab
N_4P_4	2901.02±464.32a	10.56±0.04b

酶活性, N_3P_3 和 N_4P_4 处理中,脲酶活性显著高于 CK 处理,并且随着氮磷用量的增加,脲酶活性呈现逐渐增长的趋势, N_1P_1 、 N_2P_2 、 N_3P_3 、 N_4P_4 处理中脲酶活性较 CK 分别增加 3.2%、4.7%、8.4%和 14.9%;相反,与 CK 相比,氮磷配施显著降低了土壤碱性磷酸酶的活性,随着氮磷用量的增加,碱性磷酸酶活性逐步降低, N_1P_1 、 N_2P_2 、 N_3P_3 、 N_4P_4 处理中碱性磷酸酶活性较 CK 分别降低 16.9%、18.5%、28.4%和 29.0%。与 CK 相比,氮磷配施降低了土壤蔗糖酶活

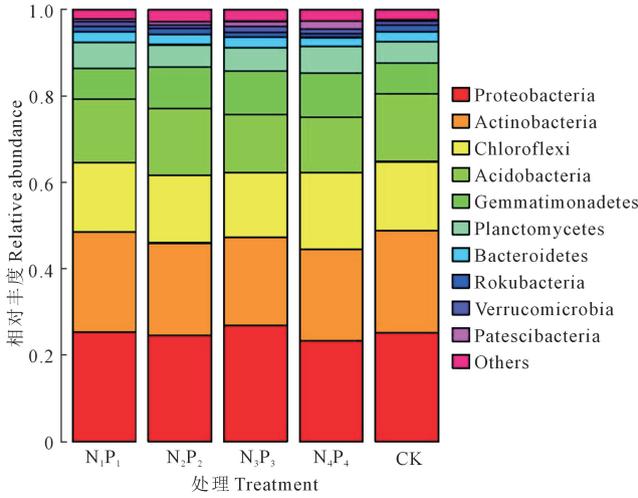


图 1 不同处理下土壤细菌在门水平上的相对丰度
Fig.1 Relative abundance of bacteria at phylum level under different treatments

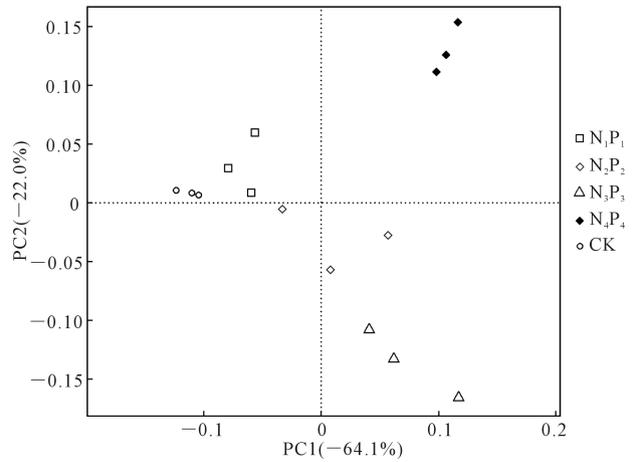


图 2 不同处理土壤细菌 β-多样性检验的主成分分析
Fig.2 Principal component analysis of soil bacteria β-diversity under different fertilization treatments

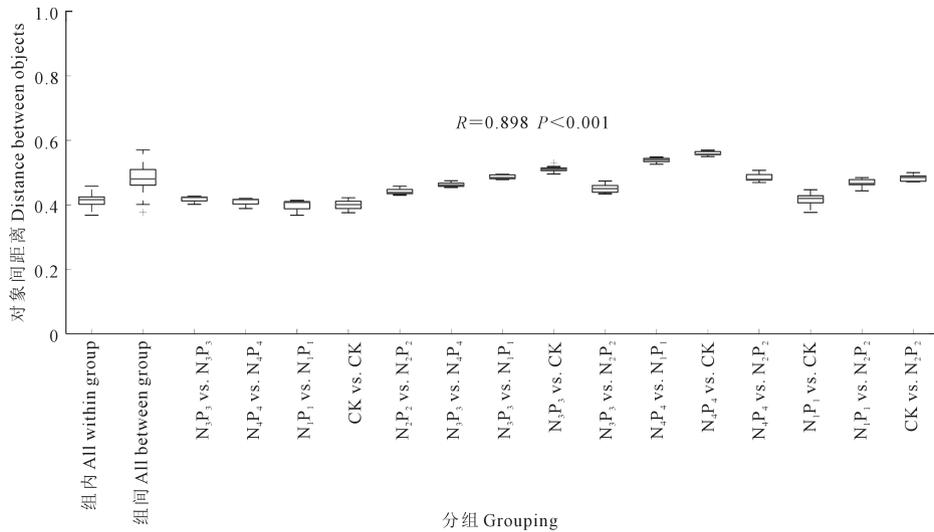


图 3 置换多元方差分析
Fig.3 PERMANOVA analysis

表 4 不同处理对土壤酶活性的影响/(mg·g⁻¹·24h⁻¹)

Table 4 Effects of different treatments on soil enzyme activity

处理 Treatment	蔗糖酶 SUC	脲酶 URE	碱性磷酸酶 ALP
CK	97.41±2.02a	2.125±0.070c	0.891±0.020a
N ₁ P ₁	80.39±4.42b	2.193±0.033bc	0.740±0.010b
N ₂ P ₂	82.77±9.47ab	2.225±0.062bc	0.726±0.003b
N ₃ P ₃	69.68±6.19b	2.304±0.011ab	0.683±0.051bc
N ₄ P ₄	71.52±1.79b	2.441±0.176a	0.633±0.041c

性,降低范围为 15.0%~28.5%,除 N₂P₂ 处理外,差异均达到显著水平;4 个氮磷配施的处理中,N₂P₂ 处理蔗糖酶活性最高。

2.4 影响细菌群落结构的土壤理化因子及酶活性的 RDA 分析

通过 CANOCO 软件对各处理下细菌群落和土壤理化因子及酶活性进行 RDA 分析,结果如图 4 所示。前两个轴总共解释了 76% 的细菌群落变化,第

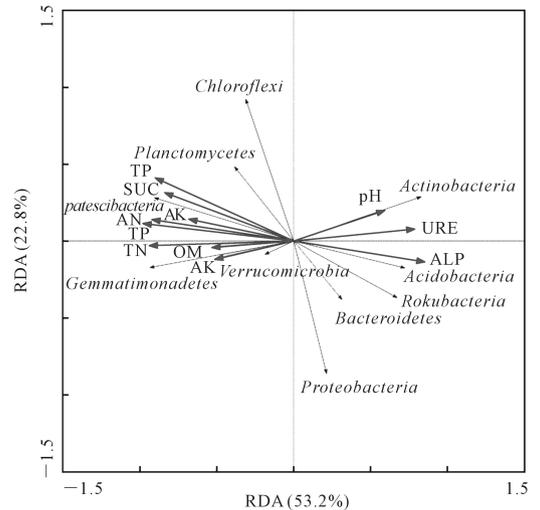


图 4 不同处理下土壤细菌群落与土壤理化因子及酶活性的冗余分析
Fig.4 Redundancy analysis of bacterial community and soil properties under different treatments

一轴为 53.2%, 第二轴为 22.8%。其中, 土壤 AP ($F = 13.705, P = 0.002$) 对细菌群落结构的贡献率最大; 其次为 TN ($F = 11.507, P = 0.002$), 8 个土壤理化因子及 3 个酶活性贡献率顺序为: AP > TN > TP > AN > SUC > ALP > URE > TK > pH > OM > AK。

2.5 玉米产量与土壤理化因子及酶活性的相关性

玉米产量与土壤理化因子及酶活性间均存在不同程度的相关性(表 5)。玉米产量与土壤 AK、OM、TN、TK 呈显著正相关, 与 pH 呈极显著负相关, 与 ALP 呈显著负相关; pH 与 AK、OM 和 TK 均呈显著或极显著负相关; AN 与 TN 和 URE 均呈显著正相关; ALP 活性与 SUC 活性呈显著正相关, 与 URE 活性呈显著负相关。

3 讨论

3.1 氮磷配施对土壤理化性质及玉米产量的影响

大量研究表明, 长期施用化肥会造成土壤的酸化^[29-30]。本研究中试验地虽然偏碱性, 但是与 CK 处理相比, 施肥降低了土壤的 pH 值, 可能是酰胺态

氮肥尿素施入土壤中水解硝化逐年释放 H^+ 所致^[31-32]。施肥可以提高各类型土壤中养分的含量及作物产量^[33-34], 本研究 CK 处理中, 土壤有机质主要来源为作物根茬, 每年玉米残留根茬积累在土壤中的有机质远不能满足土壤每年分解的有机质, 因此不能维持试验前的有机质水平。研究表明, 适量施用化肥能够提高土壤有机质的含量或者极大程度地维持土壤有机质的平衡^[8-9], 在本结果中, 随着氮磷化肥量的增加, 有机质出现先增加后降低的趋势, 并在 N_2P_2 处理中达到最高, 可能是因为 N_2P_2 处理的生物量最高, 残留根茬中有机碳含量也最高, 有利于土壤中有机质的维持与提升, 而过度施用化肥导致土壤有机质含量下降, 可能是因为氮肥用量过高会改变土壤 pH 值, 降低土壤中的 C/N, 从而影响土壤有机质的分解与转化。

玉米产量在 N_2P_2 处理中达到最高, 且显著高于其他处理, 说明在一定范围内增施化肥可以提高作物产量, 超过这个范围便不再有增产作用。本研究中, N_2P_2 的施肥量 ($N 120 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, $P_2 O_5 75 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$) 更适合山西褐土玉米的生长。

表 5 玉米产量与土壤理化性质及酶活性的 Pearson 相关性分析

Fig.5 Pearson correlation analysis between maize yield with soil physicochemical properties and enzyme activities

	玉米产量 Maize yield	酸碱度 pH	碱解氮 AN	有效磷 AP	有效钾 AK	有机质 OM	全氮 TN	全磷 TP	全钾 TK	蔗糖酶活性 SUC activity	脲酶活性 URE activity	碱性磷酸 酶活性 ALP activity
玉米产量 Maize yield	1.000											
酸碱度 pH	-0.968 **	1.000										
碱解氮 AN	0.869	-0.725	1.000									
有效磷 AP	0.725	-0.551	0.942 *	1.000								
有效钾 AK	0.929 *	-0.988 **	0.660	0.47	1.000							
有机质 OM	0.944 *	-0.958 *	0.746	0.51	0.953 *	1.000						
全氮 TN	0.914 *	-0.822	0.935 *	0.920 *	0.766	0.746	1.000					
全磷 TP	0.642	-0.477	0.905 *	0.945 *	0.437	0.481	0.846	1.000				
全钾 TK	0.911 *	-0.916 *	0.790	0.668	0.932 *	0.881 *	0.874	0.701	1.000			
蔗糖酶活性 SUC activity	-0.868	0.725	-0.947 *	-0.854	-0.630	-0.758	-0.860	-0.736	-0.663	1.000		
脲酶活性 URE activity	0.664	-0.474	0.942 *	0.970 **	0.408	0.497	0.847	0.978 **	0.639	-0.833	1.000	
碱性磷酸 酶活性 ALP activity	-0.917 *	0.795	-0.991 **	-0.892 *	-0.737	-0.826	-0.929 *	-0.851	-0.828	0.956 *	-0.892 *	1.000

注: * 代表在 $P < 0.05$ 水平差异显著, ** 代表在 $P < 0.01$ 水平差异显著。

Note: * represents significant difference at $P < 0.05$ level, and ** represents significant difference at $P < 0.01$ level.

3.2 氮磷配施对土壤细菌 α -多样性及群落组成的影响

α -多样性指数是评价细菌群落多样性的重要指标,多样性指数越高表明细菌群落的丰富度和均匀度越高。本研究中的 Chao1 指数侧重体现细菌群落的丰富度,Shannon 指数兼顾群落的均匀度。陈哲等^[35]研究发现,在稻田中长期氮磷钾配施可以增加土壤细菌的多样性,但是单施氮肥细菌多样性反而会降低;ZHOU 等^[36]研究发现在黑土上长期施化肥会降低土壤细菌的多样性。本结果的 5 个处理间两项指数差异均不明显,总体表现为下降趋势。

通过对各处理细菌 16S rDNA 的高通量测序结果进行分析和比对得知,所有细菌共注释到 33 个门。其中五大优势菌门依次为:变形菌门、放线菌门、绿弯菌门、酸杆菌门和芽单胞菌门,这些菌门普遍存在于森林、湖泊、温室等土壤中,具有较强的生成能力,但是细菌群落结构会随生态位点及作用底物的差异而发生变化^[37-38]。研究表明,酸杆菌门中的大部分细菌生长缓慢,适合在营养匮乏的环境中生长^[39],因此,随着氮磷化肥施用量的增加,酸杆菌门丰度呈现下降趋势。研究发现,芽单胞菌门适合在水分含量低的土壤中生存^[40],本研究 N_4P_4 处理氮磷化肥的施用量远超出作物需求,可能会导致土壤出现板结,进而影响水分的入渗,因此,更适合芽单胞菌门的生长。此外,不同土壤类型、不同试验环境及不同作物也会导致细菌各类群的相对丰度有一定差异^[41],这也造成了本研究中某些菌门的相对丰度与其他研究的差别。

3.3 氮磷配施对土壤酶活性的影响

蔗糖酶参与土壤中碳水化合物的转化,能促进蔗糖分解成葡萄糖和果糖,是参与土壤碳循环的重要酶类之一,也可用来评价土壤熟化程度;脲酶是一种作用于线型酰胺键的酶,能将尿素催化水解成氨、 CO_2 等小分子无机化合物,是参与土壤氮素循环的重要酶类之一,脲酶活性反映土壤有机态氮的转化能力和土壤无机氮的供应能力;磷酸酶能够催化土壤有机磷化合物矿化,其活性高低直接影响土壤中有有机磷的分解、转化及生物有效性,分为酸性磷酸酶、中性磷酸酶和碱性磷酸酶,本试验地的土壤 pH 值在 8.42~8.65 之间,以碱性磷酸酶为主。本研究选择这 3 种酶,研究不同氮磷配施对它们的影响。结果显示,脲酶活性随着施肥量的增加而不断提高,这与前人的研究结果类似^[42]。与 CK 相比,施肥整体降低了蔗糖酶的活性,但在 4 个氮磷梯度处

理中,随着氮磷化肥用量的增加,蔗糖酶活性出现先增加后降低的现象,在 N_2P_2 处理中达到最高,这一现象与土壤有机质的变化趋势吻合。陈文博等^[43]在研究化肥对稻田土壤酶活性的影响时发现,在水稻分蘖盛期,随着化肥量的增加,蔗糖酶活性下降,但在其他生育期蔗糖酶活性是增加的,说明蔗糖酶活性与作物生育期也有一定关系。碱性磷酸酶主要来源于植物根系和微生物的分泌物,在 pH 值为 9~10 之间活性达到最高。有研究表明,磷肥的施入可以提高土壤磷酸酶的活性,但在本研究的结果中,4 个氮磷配施的处理均降低了土壤碱性磷酸酶的活性,并且随着施磷量的增加,呈现降低趋势,可能是因为施肥后土壤 pH 值降低,碱性磷酸酶的活性受到一定程度的抑制。

3.4 不同因子间相关性分析

土壤中养分、酶、细菌都是作物生长不可或缺的因素。土壤酶很大一部分来自微生物的分泌物,因此细菌与土壤酶活性存在不同程度的相关关系。RDA 前两轴可以解释 76% 的细菌群落变化,细菌优势门与土壤理化因子及酶活性存在一定的相关性。玉米产量与土壤 AK、OM、TN、TK 呈显著正相关,与 pH 呈极显著负相关,与 ALP 呈显著负相关,这与前人研究结果类似^[44-46]。土壤各理化因子与酶活性之间相互影响,共同促进养分循环及能量流动,为作物生产提供良好环境。

4 结 论

1) 细菌 β -多样性在不同氮磷配施处理中差异显著;随着氮磷化肥用量的增加,细菌 α -多样性在 N_1P_1 处理中达到最高,之后呈现下降趋势。

2) 随着氮磷施用量的增加,土壤脲酶活性逐渐增加,蔗糖酶和碱性磷酸酶活性均呈现下降趋势。

3) RDA 分析表明,土壤有效磷和全氮对细菌群落结构差异的贡献率最大。

4) 土壤有机质和玉米产量在 N_2P_2 处理中达到最高,施肥量 $N 120 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, $P_2O_5 75 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 更适合山西褐土玉米的生长。

综上所述,化肥施用过量不利于土壤中细菌多样性及土壤酶活性的维持,农业生产中,需适当减少化肥用量,以保证作物产量、维持土壤健康。

致谢:诚挚感谢上海派森诺生物科技股份有限公司提供的测序平台。

参考文献:

- [1] CHAPARRO J M, SHEFLIN A M, MANTER D K, et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(5): 489-499.
- [2] CHEN H Q, LIANG Q, GONG Y S, et al. Reduced tillage and increased residue retention increase enzyme activity and carbon and nitrogen concentrations in soil particle size fractions in a long-term field experiment on Loess Plateau in China[J]. *Soil and Tillage Research*, 2019, 194: 104296.
- [3] POSTMA-BLAAUW M B, DE GOEDE R G M, BLOEM J, et al. Soil biota community structure and abundance under agricultural intensification and extensification[J]. *Ecology*, 2010, 91(2): 460-473.
- [4] OLLIVIER J, TÖWE S, BANNERT A, et al. Nitrogen turnover in soil and global change[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 78(1): 3-16.
- [5] 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(2): 189-196.
- [6] 刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 等. 长期施肥对土壤微生物量及土壤酶活性的影响[J]. *植物生态学报*, 2008, 32(1): 176-182.
- LIU E K, ZHAO B Q, LI X Y, et al. Biological properties and enzymatic activity of arable soils affected by long-term different fertilization systems[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2008, 32(1): 176-182.
- [7] ROMÓN P, ZHOU X D, ITURRONDOBEITIA J C, et al. *Ophiostoma* species (Ascomycetes: Ophiostomatales) associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) colonizing *Pinus radiata* in northern Spain [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2007, 53(6): 756-767.
- [8] DE'ATH G. Multivariate regression trees: a new technique for modeling species-environment relationships [J]. *Ecology*, 2002, 83(4): 1105-1117.
- [9] 李海波, 韩晓增, 王凤. 长期施肥条件下土壤碳氮循环过程研究进展 [J]. *土壤通报*, 2007, 38(2): 384-388.
- LI H B, HAN X Z, WANG F. Review of soil carbon and nitrogen cycling under long-term fertilization[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2007, 38(2): 384-388.
- [10] 隋跃宇, 张兴义, 焦晓光, 等. 长期不同施肥制度对农田黑土有机质和氮素的影响[J]. *水土保持学报*, 2005, (6): 190-192, 200.
- SUI Y Y, ZHANG X Y, JIAO X G, et al. Effect of long-term different fertilizer applications on organic matter and nitrogen of black farmland [J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2005, (6): 190-192, 200.
- [11] 罗希茜, 郝晓晖, 陈涛, 等. 长期不同施肥对稻田土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. *生态学报*, 2009, 29(2): 740-748.
- LUO X Q, HAO X H, CHEN T, et al. Effects of long-term different fertilization on microbial community functional diversity in paddy soil [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(2): 740-748.
- [12] LI Y L, TREMBLAY J, BAINARD L D, et al. Long-term effects of nitrogen and phosphorus fertilization on soil microbial community structure and function under continuous wheat production[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(3): 1066-1088.
- [13] 马晓霞, 王莲莲, 黎青慧, 等. 长期施肥对玉米生育期土壤微生物量碳氮及酶活性的影响[J]. *生态学报*, 2012, 32(17): 5502-5511.
- MA X X, WANG L L, LI Q H, et al. Effects of long-term fertilization on soil microbial biomass carbon and nitrogen and enzyme activities during maize growing season [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(17): 5502-5511.
- [14] 高梦瑶. 秸秆还田与化肥配施对土壤养分和土壤酶活性的影响 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020.
- GAO M Y. Effects of straw returning to field and combined application of chemical fertilizer on soil nutrient and soil enzyme activity [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2020.
- [15] 靳亚忠, 熊亚男, 孙雪, 等. 化肥减施与木霉菌有机肥配施对辣椒产量、品质及根际土壤酶活性的影响[J]. *四川农业大学学报*, 2021, 39(2): 198-204.
- JIN Y Z, XIONG Y N, SUN X, et al. Effects of combined application of chemical fertilizer reduction with trichoderma organic fertilizer on yield and quality of pepper and enzyme activities in rhizosphere soil [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2021, 39(2): 198-204.
- [16] 周东兴, 李欣, 宁玉翠, 等. 蚯蚓粪配施化肥对稻田土壤性状和酶活性的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2021, 52(2): 25-35.
- ZHOU D X, LI X, NING Y C, et al. Effect of chemical fertilizer combined with vermicompost on soil characters and enzyme activity in paddy fields [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2021, 52(2): 25-35.
- [17] 陈志诚, 龚子同, 张甘霖, 等. 不同尺度的中国土壤系统分类参比 [J]. *土壤*, 2004, 36(6): 584-595.
- CHEN Z C, GONG Z T, ZHANG G L, et al. Reference of soil taxonomy at different scales in China [J]. *Soils*, 2004, 36(6): 584-595.
- [18] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 90-129.
- BAO S D. *Soil and agricultural chemistry analysis* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 90-129.
- [19] DENNIS K L, WANG Y W, BLATNER N R, et al. Adenomatous polyps are driven by microbe-instigated focal inflammation and are controlled by IL-10-producing T cells [J]. *Cancer Research*, 2013, 73(19): 5905-5913.
- [20] 关松荫. 土壤酶及其研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986: 274-280.
- GUAN S Y. *Soil enzyme and its study method* [M]. Beijing: Agricultural Press, 1986: 274-280.
- [21] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [22] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [23] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [24] 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*, 2013, 41 (Database issue): D590-D596.
- [25] VARSOS C, PATKOS T, OULAS A, et al. Optimized R functions for analysis of ecological community data using the R virtual laboratory (RvLab) [J]. *Biodiversity Data Journal*, 2016, (4): e8357.
- [26] OKSANEN J, BLANCHET F G, KINDT R, et al. Package "vegan":

- community ecology package [J]. *Time International*, 1997, (6): 15-17.
- [27] RAMETTE A. Multivariate analyses in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(2): 142-160.
- [28] MCARDLE B H, ANDERSON M J. Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis [J]. *Ecology*, 2001, 82(1): 290-297.
- [29] ZHANG H J, DING W X, HE X H, et al. Influence of 20-year organic and inorganic fertilization on organic carbon accumulation and microbial community structure of aggregates in an intensively cultivated sandy loam soil[J]. *Plos One*, 2014, 9(3): e92733.
- [30] GUO J H, LIU X J, ZHANG Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. *Science*, 2010, 327(5968): 1008-1010.
- [31] 孟红旗,刘景,徐明岗,等.长期施肥下我国典型农田耕层土壤的pH演变[J].*土壤学报*,2013,50(6):1109-1116.
MENG H Q, LIU J, XU M G, et al. Evolution of pH in topsoils of typical Chinese croplands under long-term fertilization[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(6): 1109-1116.
- [32] 汪吉东,许仙菊,宁运旺,等.土壤加速酸化的主要农业驱动因素研究进展[J].*土壤*,2015,47(4):627-633.
WANG J D, XU X J, NING Y W, et al. Progresses in agricultural driving factors on accelerated acidification of soils[J]. *Soils*, 2015, 47(4): 627-633.
- [33] 高圣超,关大伟,马鸣超,等.大豆连作条件下施肥对东北黑土细菌群落的影响[J].*中国农业科学*,2017,50(7):1271-1281.
GAO S C, GUAN D W, MA M C, et al. Effects of fertilization on bacterial community under the condition of continuous soybean monoculture in black soil in northeast China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(7): 1271-1281.
- [34] 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.
- [35] 陈哲,陈春兰,秦红灵,等.化肥对稻田土壤细菌多样性及硝化、反硝化功能菌组成的影响[J].*生态学报*,2009,29(11):6142-6147.
CHEN Z, CHEN C L, QIN H L, et al. Effect of fertilization on bacterial community, genetic diversity of amoA and nosZ genes in paddy soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(11): 6142-6147.
- [36] ZHOU J, JIANG X, ZHOU B K, et al. Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 95: 135-143.
- [37] 向君亮,刘权,申永瑞,等.松嫩草原盐碱土细菌多样性分析[J].*干旱地区农业研究*,2020,38(2):62-68.
XIANG J L, LIU Q, SHEN Y R, et al. Variation of bacterial commu-
- nities in the saline-alkaline soil of meadow on Songnen plain[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2020, 38(2): 62-68.
- [38] LING N, ZHU C, XUE C, et al. Insight into how organic amendments can shape the soil microbiome in long-term field experiments as revealed by network analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 99: 137-149.
- [39] FIERER N, BRADFORD M A, JACKSON R B. Toward an ecological classification of soil bacteria[J]. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364.
- [40] DEBRUYN J M, NIXON L T, FAWAZ M N, et al. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (17): 6295-6300.
- [41] SAIT M, DAVIS K E R, JANSSEN P H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 1852-1857.
- [42] 卢越,张健琳,杨兰芳.不同作物生长和施肥对土壤酶活性的影响[J].*环境生态学*,2019,1(6):81-85,90.
LU Y, ZHANG J L, YANG L F. Effects of growing crops and fertilization on soil enzyme activities[J]. *Environmental Ecology*, 2019, 1 (6): 81-85, 90.
- [43] 陈文博,王旭东,石思博,等.长期菌渣化肥配施对稻田土壤酶活性的影响及交互效应[J].*浙江农林大学学报*,2021,38(1):21-30.
CHEN W B, WANG X D, SHI S B, et al. Effects of long-term combined application of fungus residue and chemical fertilizer on soil enzyme activities in paddy field[J]. *Journal of Zhejiang A & F University*, 2021, 38(1): 21-30.
- [44] 杨畅,郝水源,赖黎明.有机肥替代化肥对春玉米土壤养分、酶活性及产量的影响[J].*内蒙古农业大学学报(自然科学版)*,2021,42(4):20-26.
YANG Y, HAO S Y, LAI L M. Effects of nitrogen of organic manure replacing chemical fertilizer on soil nutrients, enzyme activities, and yield of spring maize in Hetao irrigation district[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2021, 42 (4): 20-26.
- [45] 郭鹏飞,葛新伟,王锐,等.有机肥对酿酒葡萄土壤微生物、酶活性及产量的影响[J].*干旱地区农业研究*,2020,38(3):145-154.
GUO P F, GE X W, WANG R, et al. Effects of organic manure on soil microbial community, enzyme activity and yield of wine grape [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2020, 38(3): 145-154.
- [46] 王庆宇,李立军,阮慧,等.旱地燕麦间作对土壤酶活性、微生物含量及产量的影响[J].*干旱地区农业研究*,2019,37(2):179-184.
WANG Q Y, LI L J, RUAN H, et al. Effects of intercropping of oat on soil enzyme activity, microbial content and yield in arid land[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2019, 37(2): 179-184.