

长期施用绿肥对小麦玉米间作 土壤微生物的影响

许小虎¹,车宗贤^{1,2},赵旭¹,崔恒^{1,2},张久东^{1,2}

(1.甘肃农业大学,甘肃省农业科学院土壤肥料与节水农业研究所,甘肃 兰州 730070;

2.农业部甘肃耕地保育与农业环境科学观测试验站,甘肃 武威 733017)

摘要:利用 Biolog 微平板法和高通量测序技术,研究小麦玉米间作条件下,不同长期施肥处理土壤微生物对不同碳源的利用差异以及土壤微生物群落在门、属水平上的变化,探明长期施用绿肥对土壤微生物群落多样性及代谢功能的影响。结果表明:长期施用绿肥可显著提高土壤有机质、速效磷和速效钾含量,降低土壤 pH 值,增强土壤微生物碳源代谢能力。不同施肥条件下,放线菌门(Actinobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)为土壤优势菌群,绿肥处理的放线菌门丰度最高(29.94%),农家肥处理最低(22.95%);秸秆还田处理的变形菌门丰度最高(22.32%),对照处理最低(18.85%);酸杆菌门(Acidobacteriota)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)在各个处理中的相对丰度较高,分别为 13.39%~19.71%、10.85%~14.56%、3.54%~12.98%。长期施用绿肥有效提高了土壤放线菌门、厚壁菌门、芽孢杆菌属(*Bacillus*)以及假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)的丰度,降低了酸杆菌门的丰度,增加了土壤微生物种群数量。综上可知,长期施用绿肥不仅可以提高土壤肥力,还能增强土壤抵御土传病害的能力。

关键词:施肥;土壤微生物;长期定位试验;群落多样性

中图分类号:S154.36 **文献标志码:**A

Effects of long-term application of green manure on soil microorganisms in wheat maize intercropping

XU Xiaohu¹, CHE Zongxian^{1,2}, ZHAO Xu¹, CUI Heng^{1,2}, ZHANG Jiudong^{1,2}

(1. Gansu Agricultural University, Institute of Soil Fertilizer and Water Saving Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China; 2. Gansu Cultivated Land Conservation and Agricultural Environment Science Observation Experimental station, Ministry of agriculture, Wuwei, Gansu 733017, China)

Abstract: Using Biolog microplate method and high-throughput sequencing technology, we examined the differences of soil microbial utilization of different carbon sources and the changes of soil microbial community at the phylum and genus levels under wheat-corn intercropping conditions with different long-term fertilization treatments and investigated the effects of long-term green manure application on soil microbial community diversity and metabolic functions. The results showed that long-term application of green manure significantly increased soil organic matter, fast-acting phosphorus and fast-acting potassium content, reduced soil pH, and enhanced the metabolic capacity of soil microbial carbon sources. Under different fertilization conditions, Actinobacteria and Proteobacteria were the dominant soil bacterial groups, and the highest abundance of Actinobacteria was 29.94% in the green manure treatment and the lowest was 22.95% in the farmyard manure treatment; the highest abundance of Proteobacteria was 22.32% in the straw return treatment and the lowest was 18.85% in the control treatment. The relative abundance of Acidobacteriota, Chloroflexi and Firmicutes was higher in each treatment, ranging from 13.39%~19.71%, 10.85%~14.56% and 3.54%~12.98%, respectively. Long-term application of green manure effectively increased the abundance of soil Actinobacteria, Firmicutes, *Bacillus* spp. and *Pseudarthrobacter* spp. and decreased

the abundance of Acidobacteriota and increased the number of soil microbial populations. In conclusion, long-term application of green manure not only improved soil fertility, but also enhanced the ability of soil to resist soil-borne diseases.

Keywords: fertilization; soil microorganisms; long-term positioning test; community diversity

微生物是土壤生物区系最重要的组成部分,也是土壤生态系统中极其活跃的部分,在土壤养分转化循环、抗干扰能力以及可持续生产力中发挥了重要作用^[1-3]。近年来,国内外学者对土壤微生物群落结构及多样性开展了全方面研究,梁斌等^[4]研究发现,施用氮肥能有效增加土壤微生物的氮含量;蔡燕飞等^[5]通过研究表明,有机肥能够改善土壤微生物生态环境,有效提高土壤微生物量,特别是有机肥和有机无机肥配施在整个生育期对土壤微生物数量的增加作用明显。化肥对当季作物的生长有重要促进作用^[6],但其当季损失率较高^[7],对土壤培肥贡献不大,且高量氮肥会导致土壤中 NO_3^- -N 大量累积,增加污染环境的风险^[8]。

绿肥作为一类纯天然的肥料,将其翻压还田可以有效提高土壤的有机质含量^[9],改善土壤理化性质,为微生物的生长繁殖提供良好的环境^[10]。万水霞等^[11]研究表明,与不施肥的土壤相比,长期施用绿肥的土壤中微生物总量显著增加了 58.09%~86.86%,尤其是细菌数量增加了 77.93%~112.76%。高菊生等^[12]研究表明,与冬闲处理相比,绿肥还田能促进水稻增产,其增产稳定性较好,还能显著增加土壤有机质含量,提高土壤全氮、碱解氮含量,加速土壤矿化,促进水稻对磷素及钾素的吸收。李文广等^[13]研究发现,黄土高原旱地麦后复种饲料油菜还田后,有效改善了土壤细菌群落组成,增加了有益菌的丰度,酸杆菌门、芽单胞菌门以及硝化螺旋菌门丰度显著增加。

Biolog 技术由美国 Biolog 公司于 1989 年研发,能够用于鉴定细菌、霉菌等多种微生物,并且可以判断微生物群落的代谢活性以及生长发育情况^[14]。高通量测序技术是目前应用最为普遍的测序技术,与传统的基因测序方法相比,它具有灵敏性高、准确性高以及成本较低的特点,通过检测土壤微生物的遗传物质,能够准确、全面、快速地了解土壤微生物群落的复杂性以及多样性^[15-16]。本研究基于农业部甘肃耕地保育与农业环境科学观测试验站长期定位试验田(1988,灌漠土),利用 Biolog 技术以及高通量测序技术研究长期施用绿肥对土壤养分、微生物代谢功能及微生物群落组成的影响,探讨长期施用绿肥对土壤肥力的影响,以期建立科学的

施肥制度、提高土壤肥力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验地位于甘肃省武威市凉州区农业部甘肃耕地保育与农业环境科学观测试验站长期定位试验田(102°40'E,38°37'N),地处温带大陆性干旱气候区,海拔 1 504 m,年均气温 7.7℃,降水量 150 mm,蒸发量 2 021 mm,日照时数 3 023 h,无霜期约 150 d。试验地土壤为灌漠土,长期定位试验于 1988 年开始,初始耕层(0~20 cm)土壤基本理化性质为:速效钾 180 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,pH 值 8.8,容重 1.4 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$,孔隙度 47.8%,有机质 16.4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮 1.06 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全磷 1.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,有效磷 13.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2 试验设计

本研究设置了 5 个不同施肥处理,分别为绿肥(G)、化肥(N)、农家肥(M)、小麦秸秆(S)、不施肥(CK),每个处理 3 次重复,共 15 个小区,随机排列,小区面积为 31.05 m^2 (6.9 m×4.5 m)。绿肥主要为箭筈豌豆鲜草(含有机质 455~504 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮 36.9~40.1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全磷 5.42~7.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全钾 28.4~30.3 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),秸秆主要为小麦秸秆;绿肥与小麦秸秆分别在前一年 10 月初铡成 20 cm 左右的小段,翻压在 30 cm 的耕层内,随即灌水,以利腐解。农家肥为牛粪(含有机质 180~220 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮 1.78~2.05 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全磷 1.83~2.58 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全钾 23.1~30.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),播种前将其粉碎后翻压在 30 cm 的耕作层内。绿肥、小麦秸秆、农家肥全部作为基肥一次性施入土壤;化肥主要为尿素,施用方法为 20%基施+80%追施。绿肥和小麦秸秆的施用量分别为每公顷农田鲜绿肥或小麦秸秆的平均产量,而化肥与农家肥的施用量为当地农户施用肥料的最佳量。除不施肥处理(CK)外,其余处理均在小麦播种前基施磷肥(P_2O_5) 150 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,除化肥处理外的其他处理全生育期不再施肥,具体施肥方案见表 1。

供试玉米为‘利单 295’,小麦为‘宁春 53 号’。试验地为小麦玉米间作田(每年 3 月中旬播种小麦,4 月中旬播种玉米,间作模式为小麦—玉米—小麦),且每年倒茬(倒茬次序为 7 月底收获小麦,10

月中旬收获玉米,收获后统一翻地,来年种小麦的行改种玉米)。单种小麦播种量为 375 kg · hm⁻²,带田小麦播种量为 225 375 kg · hm⁻²,玉米保苗 67 500 株 · hm⁻²;小麦玉米带田采用 150 cm 带幅(小麦:玉米=70 cm:80 cm)。播种、除草、配药、收获等农事均为人工操作,3 月中旬播种小麦,4 月中上旬出苗,7 月中旬收获;4 月中下旬覆膜播种玉米,5 月初出苗,10 月初收获。熟制为一年一熟。

表 1 施肥方案
Table 1 Fertilization scheme

处理 Treatment	施肥种类 Fertilization type	施肥量 Fertilization amount
G	绿肥 Green manure	绿肥为箭筈豌豆鲜草(陇箭 1 号),施肥量为 45 000 kg · hm ⁻² The green manure is arrow pea fresh grass (Longjian No.1), and the fertilization amount is 45 000 kg · hm ⁻²
	化肥 Chemical fertilizer	化肥主要为尿素,施肥量为 375 kg · hm ⁻² The chemical fertilizer is mainly urea, and the fertilization amount is 375 kg · hm ⁻²
M	农家肥 Farm manure	农家肥为当地的土圈粪,施肥量为 120 000 kg · hm ⁻² The farm manure is the local soil circle manure, and the fertilization amount is 120 000 kg · hm ⁻²
S	小麦秸秆 Wheat straw	施肥量为 10 500 kg · hm ⁻² The fertilization amount is 10 500 kg · hm ⁻²
CK	不施肥 No fertilization	不施任何肥料 No fertilizer is applied

注:化肥处理(N)氮肥的施用方式为小麦播种时基施 20%,小麦拔节期施肥 20%,玉米拔节期施肥 30%,玉米大喇叭口期追施 30%,时间、田间管理等同当地;除不施肥对照外,其他处理基施磷肥 P₂O₅ 150 kg · hm⁻²。

Note: Nitrogen fertilizer method of chemical fertilizer treatment (N) is 20% for wheat planting, 20% for wheat jointing period, 30% for corn jointing period, and 30% for corn big bell mouth period. The time and field management are the same as those in the local area. Except for the control, the base application of phosphorus fertilizer P₂O₅ is 150 kg · hm⁻².

1.3 土壤样品采集

于 2020 年 7 月小麦收获后进行取样,采用对角线采样法按不同处理取 0~20 cm 耕层土样 3 份,将 3 份土样混合均匀,共计 15 个土壤混合样。去除根系、枯落物,将土样装入灭菌自封袋中,放入装有冰块保温箱,带回实验室立即冷藏,一部分过筛冷冻用于测定土壤微生物,一部分自然风干常温保存,用于测定土壤理化性质。

1.4 Biolog-ECO 测定方法以及高通量测序

取 10 g 新鲜土壤样品,置于已灭菌的装有 90 mL 0.85% NaCl 溶液的三角瓶中,25℃、200 r · min⁻¹条件下振荡 30 min,并用 NaCl 溶液稀释到 10⁻³ g · mL⁻¹后,向 ECO 微平板的 96 孔中分别加入 150 μL 稀释液,将接种好的 Biolog-ECO 板于 25℃ 黑暗环境下培养 10 d,每隔 24 h 在 Biolog 微平板读数仪上测定 590 nm 与 750 nm 波长下吸光值,并用 OD590 值与 OD750 值的差值来表征代谢活性^[17-18]。

平均颜色变化率(Average well color development, AWCD)表示土壤微生物利用碳源的能力,采用 Biolog 微平板培养 240 h 的数据进行统计。土壤微生物群落功能多样性指数分析采用 Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数。

平均颜色变化率: $AWCD = \sum (C_i - R)/N$

Shannon 指数: $H' = - \sum p_i(\ln p_i)$

Simpson 指数: $D = 1 - \sum p_i^2$

McIntosh 指数: $U = \sqrt{\sum n_i^2}$

式中,C_i为第 i 个非对照孔的吸光值,R 为对照孔的吸光值,N 为微孔板中所含的 31 种碳源数量;n_i为第 i 孔的相对吸光值(C_i - R),p_i为第 i 孔的相对吸光值与整个微平板所有相对吸光值总和的比值(C_i - R)/∑(C_i - R)。

高通量技术使用 338F (ACTCCTA CGGGAG-GCAGCAG)和 806R (GGACTACHVGGGTW TCTAAT)对 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:预变性 95℃ 3 min; 95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 45 s,27 个循环;然后 72℃ 稳定延伸 10 min,最后 10℃ 进行保存。用 2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,并使用 AXYGEN 公司的 AxyPrepDNA 纯化回收试剂盒回收。PCR 回收产物后,用 Quantus™ Fluorometer (Promega,USA)对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX^R Rapid DNA-Seq Kit 进行建库:(1)接头链接;(2)使用磁珠筛选去除接头自连片段;(3)利用 PCR 扩增进行文库模板的富集;(4)磁珠回收 PCR 产物得到最终的文库。最后将 PCR 产物利用 Illumina 公司 Miseq PE300 平台(上海美吉生物医药科技有限公司)进行测序^[19]。

1.5 土壤理化性质测定

土壤 pH 值采用酸度计电位法测定^[20],土壤有机质、土壤速效钾、土壤速效磷含量分别采用重铬酸钾外加热法 GB 9834-88、火焰光度计法 GB 7856

-87、钼锱抗比色法 GB 7853-87 测定^[21],土壤含水率采用烘干法测定^[21]。

1.6 数据处理

利用 Excel 2016 以及 SPSS 20.0 进行数据分析,用 Duncan 法进行多重比较 ($\alpha = 0.05$)。用 Pearson 法进行相关性分析,运用 Excel 2016 及 Origin 2019 绘图。土壤微生物高通量测序数据基于上海美吉生物医药科技有限公司云平台 (<http://edu.majorbio.com/lesson/1463>) 进行分析。

2 结果与分析

2.1 长期施用绿肥对土壤理化性质的影响

不同施肥处理对土壤理化性质的影响如表 2 所示,不同施肥条件下,处理 G 的 pH 值与处理 N、处理 CK 存在显著性差异且前者较后 2 个处理分别下降了 0.75% 和 2.86%;处理 G 的土壤有机质含量与处理 N、处理 CK 存在显著性差异,且前者较后 2 个处理分别高出 42.64% 和 45.67%;处理 M 全氮含量高于其他处理,但各处理间差异不显著;处理 G 的速效磷和速效钾含量均显著高于处理 N 和 CK,速效磷分别提高了 156.05%、1 233.40%,速效钾分别提高了 70.66% 和 16.08%;处理 M 的速效磷与速效钾含量均远高于其他处理。长期施用绿肥可有效提高土壤中的有机质、速效磷和速效钾含量,且可以降低土壤 pH 值。

表 2 不同施肥处理土壤理化性质(2020 年)

Table 2 Soil physical and chemical properties of different fertilization treatments (2020)

处理 Treatment	pH	有机质 Organic matter /(g · kg ⁻¹)	全氮 Total N /(g · kg ⁻¹)	速效磷 Available P /(mg · kg ⁻¹)	速效钾 Available K /(mg · kg ⁻¹)
CK	8.17±0.006a	18.83±0.88cd	1.30±0.06ab	5.30±1.27e	118.60±9.28d
G	7.94±0.015e	27.43±0.35a	1.79±0.08ab	70.67±5.65b	137.67±0.67bc
S	8.10±0.012ab	25.73±0.18ab	1.57±0.04ab	67.60±3.44bc	146.00±4.93b
M	8.08±0.015bc	28.83±0.23e	2.68±0.36a	215.60±4.83a	354.67±5.36a
N	8.00±0.025d	19.23±0.37c	1.34±0.04ab	27.60±1.70d	80.67±1.67e

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments ($P<0.05$). The same below.

2.2 长期施用绿肥对土壤微生物群落结构的影响

2.2.1 对土壤微生物群落 AWCD 值的影响 不同处理 AWCD 变化曲线如图 1 所示,土壤微生物对碳源的利用率随着时间的增长而逐渐上升,且呈“S”型变化,在 24~48 h 内增长缓慢,48~120 h 增长速度加快,168 h 达到峰值后趋于稳定。因 168 h 为 AWCD 值拐点,故选取 168 h 的土壤微生物 AWCD

值进行方差分析。168 h 时,处理 G 的 AWCD 值与处理 N、处理 CK 存在显著性差异且前者较后 2 个处理分别高出 21.78% 和 32.26%;处理 M 与处理 CK 有显著性差异,M 较 CK 提高 21.04%;不同施肥条件下的土壤微生物 AWCD 值表现为 $G>M>S>N>CK$ 。处理 G 的土壤微生物 AWCD 值在第 168 h 达到最高值,且高于其他时间段的其他处理;处理 G 与处理 M 的土壤微生物 AWCD 值在各时间段均高于其他处理,说明长期施用绿肥可显著提高土壤微生物的多样性及微生物群落的活性。

2.2.2 对土壤微生物群落多样性指数的影响 不同处理土壤微生物的 Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数如图 2、图 3、图 4 所示。168 h 时,处理 M 与处理 N 的 Shannon 指数之间存在显著性差异,处理 M 比处理 N 提高了 1.50%;处理 G、处理 S 以及处理 M 均与处理 N 在 Simpson 指数上存在显著性差异,3 个处理分别较处理 N 提高了 0.21%、0.17% 和 0.22%;处理 G 与处理 N、处理 CK 的 McIntosh 指数之间存在显著性差异,处理 G 比处理 N、处理 CK 分别提高了 18.46% 和 29.07%。5 种不同施肥条件下,土壤微生物的 Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数在 168 h 均达到了稳定,且 5 种处理的 Shannon 指数与 Simpson 指数在第 168 h 有高度一致性。24~120 h,处理 N 的 McIntosh 指数均低于处理 CK。

2.2.3 对土壤微生物碳源代谢能力的影响 如图 5 所示,不同施肥处理下土壤微生物对 31 种碳源的利用能力存在显著性差异。处理 G 的土壤微生物碳源代谢能力最强;处理 G 与 M 的土壤微生物代谢能力大于 1.0 的碳源最多,有 28 种,占总碳源的 90.32%;处理 N 的土壤微生物代谢能力大于 1.0 的碳源有 20 种,占总碳源的 64.52%;处理 CK 仅有 14 种,占总碳源的 45.16%。各个处理均对 4-羟基苯甲酸、 α -羟基丁酸、L-精氨酸、L-天冬酰胺酸以及衣康酸有着较高的利用能力,而均对 α -丁酮酸、D,L- α -甘油、甘氨酸-L-谷氨酸利用率较差。

处理 N 与处理 CK 的土壤微生物对酯类、醇类以及一些氨基酸类的利用率较差,对葡萄糖-1-磷酸盐、L-苏氨酸、L-丝氨酸、D-半乳糖酸 γ 内脂、I-赤藻糖醇、2-羟苯甲酸、腐胺利用率均低于其他处理;处理 G 对酸类碳源的利用明显高于其他处理;处理 G 与处理 M 的土壤微生物对 L-苯基丙氨酸的利用率明显高于其他处理。可见,处理 G 与 M 对土壤碳源的代谢能力最强。

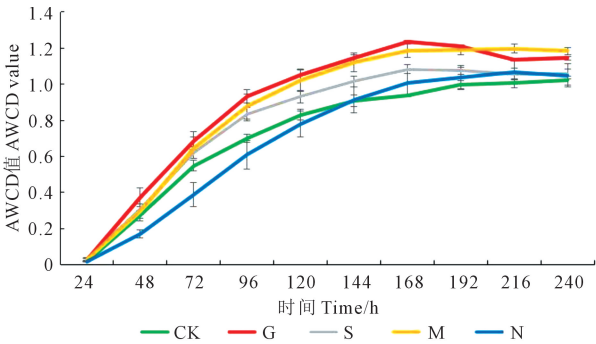


图 1 平均颜色变化率

Fig.1 Average color change rate

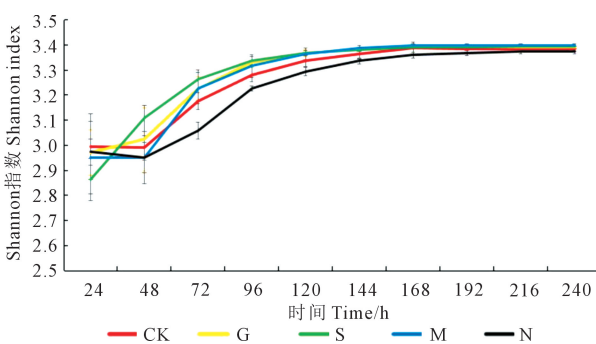


图 2 Shannon 指数变化图

Fig.2 Shannon index change chart

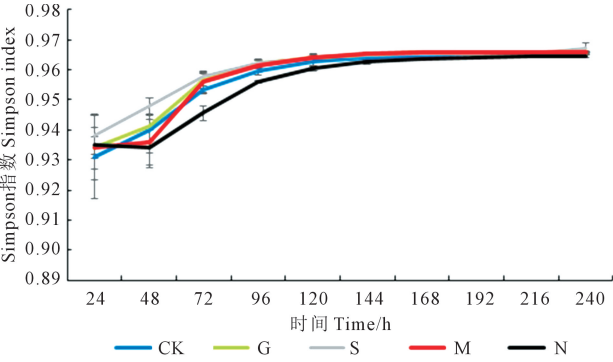


图 3 Simpson 指数变化图

Fig.3 Simpson index change chart

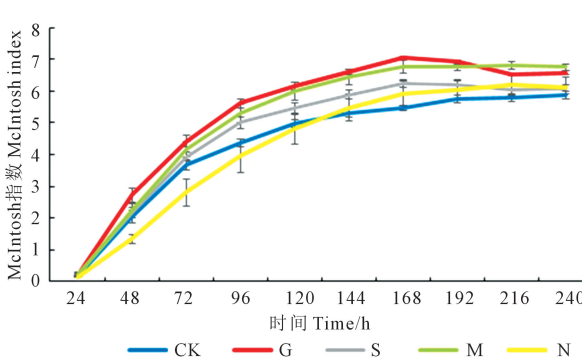


图 4 McIntosh 指数变化图

Fig.4 McIntosh index change chart

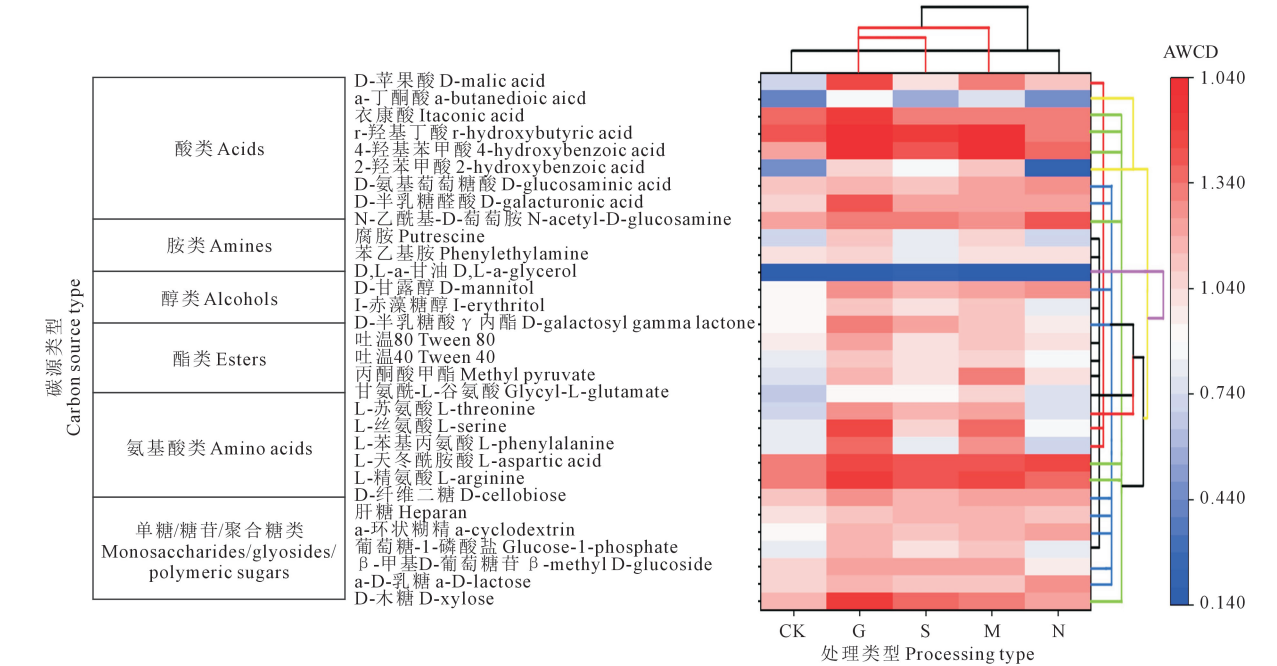


图 5 微生物 168 h 碳源利用聚类热图

Fig.5 Clustering heatmap of microbial 168 h carbon source utilization

通过聚类分析可以看出,处理 G 与 M 的土壤微生物对碳源的代谢能力相似,处理 N 与 CK 的土壤微生物对碳源的代谢能力相似;通过聚类分析将碳源分为 6 类,土壤微生物对酸类碳源与单糖/糖苷/聚合糖类碳源的利用情况相似,而对胺类、酯类以及醇类碳源利用情况相似。

2.2.4 土壤微生物群落的 Alpha 多样性分析 利用生信云平台对原始测序数据进行质量控制,从 15 个土壤样品中共获得 647 949 条高质量且有效的细菌基因序列,通过 97%的 OTU 聚类后获得 4 640 个细菌 OTUs。由表 3 可知,不同施肥条件下 0~20 cm 土层土壤样本 Shannon 指数大体相似;Coverage 指数均大于 0.97,说明各个土壤样本中基因序列被检

出率很高,能够正确合理地反映各个土壤样本中细菌群落的多样性情况;处理 G 与处理 N、处理 CK 在 Simpson 指数上存在显著差异,表明在不同类型施肥土壤样本中细菌群落多样性存在显著差异,表现为 G>CK>N;处理 G、处理 S、处理 M 的 OTU 数目均明显高于处理 N;处理 N 和处理 CK 的 ACE 指数和 Chao1 指数均低于其他 3 个处理。

表 3 各土壤样品微生物多样性指数表
Table 3 Microbial diversity index of soil samples

处理 Treatment	OTU 总数 Total OTU	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	Coverage
CK	2642±33a	6.64±0.020ab	0.003±0.00b	3260.81±37.40a	3244.58±21.87a	0.977±0.00033a
G	2659±74a	6.51±0.052c	0.003±0.00a	3380.10±26.42a	3369.27±36.50a	0.976±0.00033b
S	2700±63a	6.72±0.021a	0.003±0.00b	3348.56±42.06a	3349.60±45.24a	0.977±0.00033ab
M	2669±3a	6.55±0.030bc	0.003±0.00ab	3349.54±36.37a	3354.58±52.48a	0.976±0.00058ab
N	2608±36a	6.62±0.015ab	0.003±0.00b	3268.05±39.18a	3255.81±40.84a	0.977±0.00058ab

2.2.5 对土壤细菌门水平上群落结构的影响 将各处理土壤样品中得到的 OTU,在不同水平上进行物种注释,选取相对丰富度大于 1.0%的细菌门分析样品中细菌群落的组成。如图 6 所示,不同施肥条件下土壤细菌门水平的群落结构基本一致,包括 11 个细菌门:Actinobacteriota、Proteobacteria、Acidobacteriota、Chloroflexi、Firmicutes、Bacteroidota、Myxococcota、Gemmatimonadota、Planctomycetota、Methylophilota 和 Nitrospirota;其中 Actinobacteriota、Proteobacteria、Acidobacteriota、Chloroflexi、Firmicutes 为优势菌门。处理 G 中放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度最高,占总丰度的 29.95%,分别比处理 CK 和处理 N 提高了 21.35%和 16.86%;变形菌门(Proteobacteria)相对丰度占 20.45%,略高于处理 N 与处理 CK;酸杆菌门(Acidobacteriota)相对丰度最低,占 13.39%,而处理 CK 与处理 N 最高,分别占 19.71%和 18.23%;绿弯菌门(Chloroflexi)占比也较低,为 11.4%,而处理 CK 与处理 N 的相对丰度分别为 14.56%和 13.43%。处理 M 的厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度最高,为 12.98%,处理 CK 最低,为 3.54%,而处理 G 的相对丰度明显高于处理 CK 与处理 N。

不同施肥条件下,长期施用绿肥处理的变形菌门(Proteobacteria)相对丰度高于其他处理,酸杆菌门(Acidobacteriota)、绿弯菌门(Chloroflexi)的相对丰度则表现出相反的变化趋势。拟杆菌门(Bacteroidota)、粘球菌门(Myxococcota)、芽单胞菌门(Gemmatimonadota)、硝化螺旋菌门(Nitrospirota)等在长期不同施肥条件下土壤中的相对丰度变化不明显。此外,厚壁菌门(Firmicutes)仅在施用农家肥

以及绿肥的土壤中大量存在,分别占总丰度的 12.98%和 7.29%,其他施肥土壤中丰度不足 4.00%。
2.2.6 对土壤细菌属水平群落结构的影响 对不同处理土壤细菌 OTU 丰度排名前 20 的属进行聚类分析,如图 7 所示,处理 G 增加了芽孢杆菌属(*Bacillus*)、斯科尔曼菌属(*Skermanell*)、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)丰度,分别比处理 N 提高了 126.06%、65.27%和 317.12%;处理 G 还增加了链霉菌(*Streptomyces*)和类诺卡氏菌(*Nocardioides*)的丰度,分别比处理 N 提高了 43.12%和 27.01%。而处理 G 中 OTU>500 的有 10 类,处理 CK 中有 12 类,处理 N 中有 11 类。除了不施肥对照与单施氮肥处理,其他 3 种施肥处理均降低了 *RB41* 的丰度。未鉴别的细菌种类在各个土壤样本中也以极高的丰度水平存在。通过聚类分析可以看出,处理 N 与处理 CK 对土壤细菌群落属水平上影响情况类似,处理 S 与处理 M 情况类似;而从细菌种类的角度来看,芽孢杆菌属(*Bacillus*)、盖拉菌属(*Gaiella*)以及芽生球菌属(*Blastococcus*)在不同施肥条件下相对丰度情况类似,相对丰度较高;类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)以及斯科尔曼菌属(*Skermanella*)情况类似,相对丰度均较低。

2.2.7 不同施肥处理土壤微生物 β 多样性分析 不同施肥条件下土壤细菌门水平主坐标分析(PCoA)如图 8 所示,第 1 主坐标轴(PC1)与第 2 主坐标轴(PC2)对样本组成差异的解释度分别为 47.59%和 26.69%,2 个主坐标轴累积解释度达 74.28%,说明其可以代表土壤微生物门水平群落组成的特征。处理 G 与处理 CK、处理 N 在 PC1 轴上明显分开,而处理 M 与其他样本在 PC2 轴上明显分开,

说明处理 G 与 CK、N 在土壤细菌微生物群落结构上存在显著差异,而处理 M 与其他处理存在显著差异。

2.3 长期不同施肥条件下环境因子对土壤细菌群落的影响

2.3.1 基于 Biolog-ECO 长期不同施肥对土壤微生物群落多样性的影响 为了进一步研究土壤微生物群落与环境因子之间的相关性,采用 R 语言中 Vegen 法进行 RDA 分析,结果如图 9 所示。各指标用带箭头的矢量线表示,连线的长短表示微生物群落特征与该环境因子相关系数的大小,箭头连线与排序轴的夹角表示该环境因子与排序轴的相关性,与排序轴的夹角越小,该指标与排序轴的相关性越大^[22]。从图 9 可以看出,6 个环境因子对微生物群落的影响均表现出显著性,RDA1 和 RDA2 解释率分别为 66.45% 和 2.95%,其中对微生物群落影响最大的环境因子是 pH 值($r^2=0.5651, P=0.0048$)和有机质 OM($r^2=0.4038, P=0.400$)。

2.3.2 土壤细菌在门水平下基于高通量的 db-RDA 分析 土壤理化性质与细菌门水平的关系如图 10 所示,不同处理的微生物群落分别聚集在不同位置,表明不同处理之间土壤微生物群落存在显著差异。环境因子对不同施肥处理土壤微生物的影响不同。pH 值与有机质对土壤细菌群落的影响最大;速效磷、速效钾、含水率、全氮与 pH 值之间的夹角为锐角,除速效磷之外其他环境因子与 pH 值之间的夹角为钝角,说明这几种环境因子之间是正相关关系;有机质与 pH 值之间的夹角为钝角,两者之间呈负相关关系;速效磷与有机质之间呈正相关关

系。其中速效钾、含水率、全氮以及 pH 值与处理 N 和处理 CK 的土壤样本细菌群落结构存在较大的正相关性,而有机质与处理 G 和处理 M 的土壤样本细菌群落结构存在较大的正相关性。

2.3.3 长期不同施肥条件下细菌门水平群落相对丰度与环境因子的相关性 选取细菌门水平上丰度前 10 的物种,采用 Spearman 相关性系数,分析细菌种类与环境因子之间的相关性。结果表明(图 11),土壤速效磷、速效钾、有机质以及全氮的含量是影响细菌群落结构在门水平上最主要的环境因子。芽单胞菌门(Gemmatimonadota)和甲烷氧化菌门(Methyloirabilota)的群落相对丰度与有机质、全氮、速效磷和速效钾存在显著负相关;厚壁菌门(Firmicutes)与有机质、全氮、速效磷、速效钾以及含水率存在显著性正相关,酸杆菌门(Acidobacteriota)和甲烷氧化菌门(Methyloirabilota)与 pH 值存在显著正相关。

3 讨论

微生物是土壤生态的重要组成部分,其活性与土壤肥力密切相关。本研究发现长期施用绿肥有效提高了土壤微生物的种类和数量,与多位学者的研究结果相似^[23-26]。AWCD 值反映微生物群落的代谢活性,是指示微生物分解代谢能力的重要指标^[27]。本研究表明,长期施用绿肥和农家肥处理的 AWCD 值显著高于其他施肥处理,施用绿肥以及农家肥可以增加植物的凋落物和根系分泌物,补充土壤的有机质,进而提高土壤微生物的代谢活性^[28-29]。

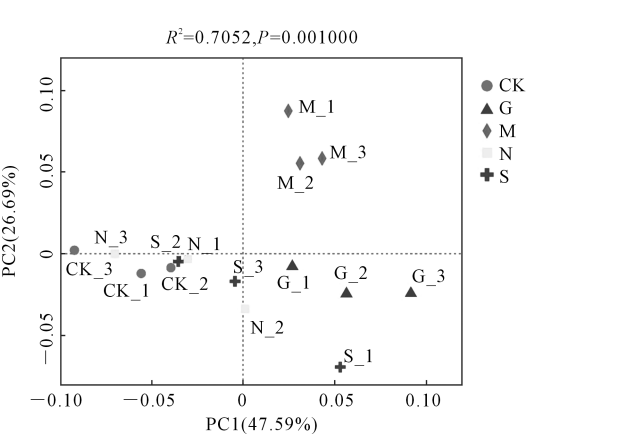
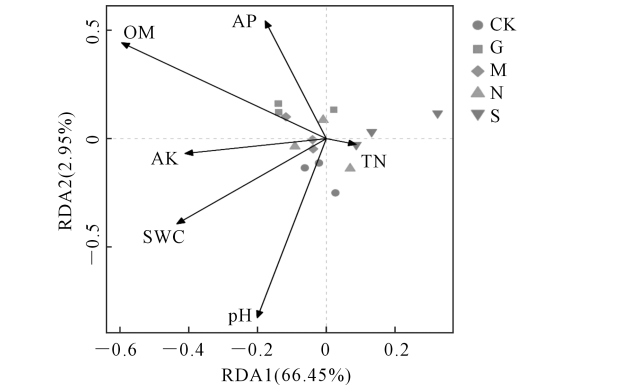


图 8 不同施肥条件下土壤细菌门水平群落主坐标分析 (PCoA)

Fig.8 Principal coordinate analysis of horizontal community of soil bacteria on phylum level under different fertilization conditions (PCoA)



注: OM—有机质; TN—全氮; AP—速效磷; AK—速效钾; SWC—土壤含水率。下同。

Note: OM—Organic matter; TN—Total N; AP—Available P; AK—Available K; SWC—Soil water content. The same below.

图 9 Biolog-ECO 与环境因子的 RDA 分析 (箭头代表环境因子)

Fig.9 RDA analysis of Biolog-ECO and environmental factors (the arrow represents environmental factors)

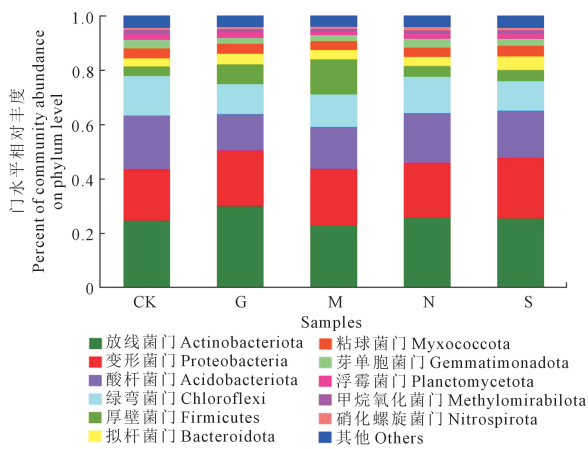
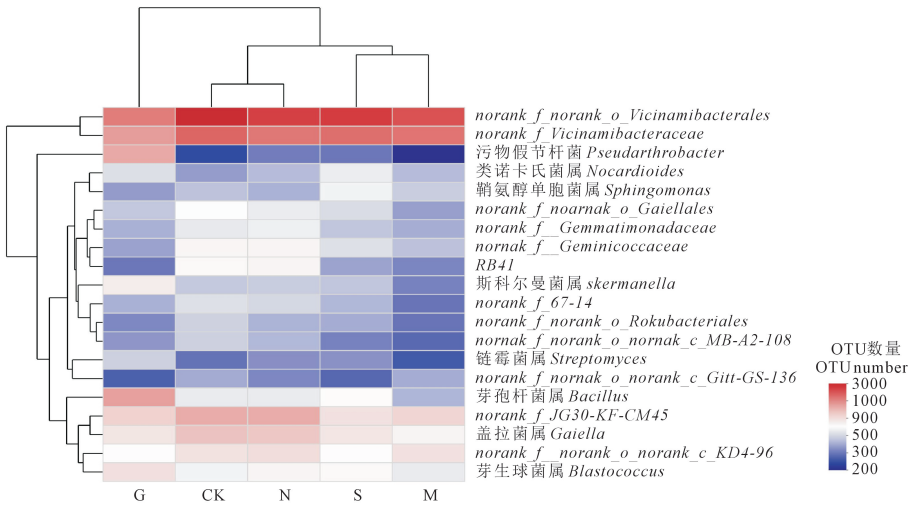


图 6 不同施肥条件下各土壤细菌群落在门水平的相对丰度
Fig.6 Relative abundance of soil bacterial communities at phylum level under different fertilization conditions



注:norank_f...代表目前未鉴别的细菌种类。
Note: norank_f... represents currently unidentified bacterial species.

图 7 不同施肥条件下各土壤细菌群落在属水平聚类热图

Fig.7 Heatmap of soil bacterial communities at genus level under different fertilization conditions

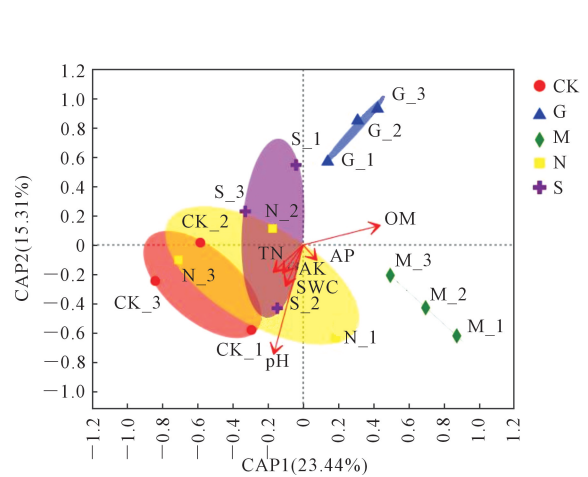
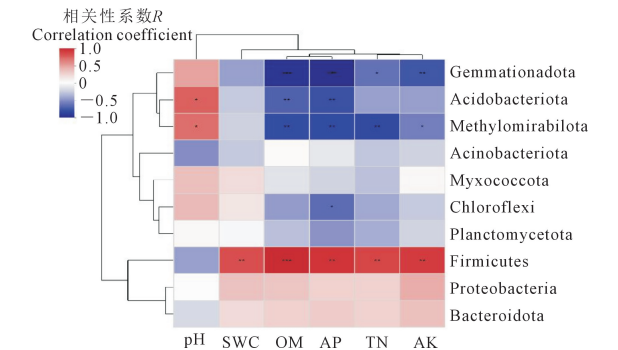


图 10 门水平细菌群落与环境因子的 db-RDA 分析
(红色箭头代表环境因子)
Fig.10 db-RDA analysis of bacterial community on phylum level and environmental factors (red arrow represents environmental factors)

Simpson 指数和 Shannon 指数是表征微生物功能多样性的指标^[30]。长期施用绿肥和农家肥可显著提高土壤微生物群落多样性。吕卓呈等^[31]研究发现绿肥还田为土壤微生物提供了大量的碳源和氮源,能够有效提高土壤微生物的 Shannon 指数和 Simpson 指数。在本研究当中,处理 G 在微平板培养 168 h 时 Simpson 指数较处理 N 显著提高了 0.21%,而 Shannon 指数两者基本没有差异,说明群落多样性差异不大。Sun 等^[32]研究发现长期单施化肥会导致土壤微生物群落多样性降低,而李猛等^[33]研究发现,长期单施氮肥会导致土壤中微生物的种类和数量减少,微生物整体代谢功能明显下降,常见菌群的均匀度也低于其他处理。本研究处理 N



注:X轴与Y轴分别为环境因子和不同物种,计算 Spearman 相关性系数 R 值和显著性 P 值,R 值在图中用不同颜色显示,而 P 值用星号显示。* 代表 $P<0.05$, ** 代表 $P<0.01$, *** 代表 $P<0.001$ 。
Note: X-axis and Y-axis are environmental factors and different species respectively. Calculate Spearman correlation coefficient R value and significance P value. R value is displayed in different colors in the figure, while P value is displayed with asterisk. * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$, *** represents $P<0.001$.

图 11 细菌门水平与环境因子之间的相关性热图
Fig.11 Heatmap of correlation between bacterial phylum and environmental factors

与处理 CK 的 3 种指数(Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数)结果相差不大,处理 N 的 AWCD 值均低于其他处理;处理 G 与处理 N 在 McIntosh 指数存在显著性差异,前者较后者提高了 18.46%,说明单施氮肥降低了土壤微生物活性及多样性,且会导致菌群均匀度降低。通过对不同施肥条件下土壤微生物的 Shannon 指数与 Simpson 指数进行分析发现,处理 N 的 Shannon 指数和 Simpson 指数一直低于其他 4 个处理的平均水平,这可能是由于农家肥、绿肥施入带来大量可被微生物利用的碳源和氮源,刺激了土壤微生物的生长;农家肥的施入带来大量的活性微生物,起到了“接种”的作用,促进了微生物生长以及其活性增加^[34]。绿肥在施入土壤后会被腐解,腐解过程中养分释放速度较为缓慢,可以满足作物长期生长过程中的养分需求,不仅能提高作物产量和养分利用率,还可以降低养分的淋溶损失^[35]。罗希茜等^[36]研究表明长期秸秆还田以及习惯施肥会导致微生物群落均匀度降低,与本研究处理 S 的 McIntosh 指数结果一致。通过微生物培养 168 h 碳源利用聚类分析热图来看,处理 G 的土壤微生物碳源代谢能力最高,且对酸类碳源的利用率明显高于其他处理;通过聚类分析可以看出一些酸类、氨基酸类以及单糖/糖苷/聚合糖类碳源在 5 种不同处理下土壤微生物利用率较高;而各处理均对 α -丁酮酸、D,L- α -甘油、甘氨酸-L-谷氨酸利用率较差。

从细菌群落门水平上的分布来看,长期施用绿肥与其他施肥条件的土壤细菌群落组成一致,但是各门类细菌的丰度大小存在差异。李秀英等^[37]研究表明,长期单施化肥会导致土壤细菌数量低于荒地,如土壤固氮菌、反硝化细菌、纤维分解菌等,而土壤放线菌和硝化细菌会增加。本研究中,放线菌门、变形菌门、酸杆菌门、绿弯菌门在各个土壤样本中均大量存在,为土壤优势菌群;处理 G 放线菌门丰度最高,占 29.94%,且处理 G 相比处理 N 放线菌门丰度提高了 16.86%。吕卓呈等^[31]研究表明长期施用绿肥可以有效提高土壤细菌 OTU 数量;与其他施肥条件相比,处理 G 土壤样本中的放线菌门丰度提高 7.01%,细菌的 OTU 数量相比施用化肥处理提高了 1.92%。邹湘等^[38]研究表明不施肥与化肥配施猪粪的土壤细菌群落聚类更接近,本研究也发现单施化肥与不施肥的土壤细菌群落结构相似;韩梅等^[39]研究表明,长期化肥、绿肥配施提高了土壤微生物群落的稳定性,并且使得变形菌门与酸杆菌门成为优势菌种;变形菌门是一种在土壤中大量存在

的富营养微生物,很多种类的变形菌都可以在土壤中起固氮作用^[40]。本研究各施肥处理的土壤中变形菌门种类丰度均高于不施肥对照,说明长期施肥有利于土壤固氮以及土壤微生物群落的稳定。宋兆齐等^[41]研究表明厚壁菌门有很强的适应能力,能够降解土壤中一些难溶化合物,并且可以有效防治一些植物病虫害,在土壤生态环境中发挥着重要作用;长期施用农家肥和绿肥的土壤样本中,厚壁菌门分别占总丰富度的 12.98% 和 7.29%。长期施用绿肥能有效提高土壤质量以及土壤肥力。酸杆菌门在土壤生态系统中有着重要的作用。本研究表明,施绿肥和施农家肥的土壤中酸杆菌门的丰度低于其他施肥条件下的土壤,且土壤 168 h 热图中绿肥处理明显提高了酸类碳源的利用率,这可能是由于绿肥与农家肥中某些物质增加了土壤碱性,或者是施用绿肥导致酸类碳源被其他微生物大量利用而影响了酸杆菌门的生长发育,导致其丰度降低。细菌群落在属水平上的 Heatmap 图(图 7)表明,不同处理土壤细菌群落在属水平上组成基本一致。芽孢杆菌是一种具有解磷、解钾、固氮等生物活性的微生物,有利于提高作物产量,且芽孢杆菌抗逆性好。在李彦林等^[42]的研究中,耕地中的优势菌属为芽孢杆菌属、葡萄球菌属、假节杆菌属等,耕地微生物数量大于其他类型土壤微生物数量。赵冬雪^[43]研究表明长期施用绿肥会导致土壤中芽孢杆菌属水平提高;本研究表明长期施用绿肥有效增加了芽孢杆菌的丰度,比单施氮肥处理提高了 126.06%,与其研究结果一致。这可能是由于绿肥翻压还田后增加了土壤中的磷、氮等元素含量,进而提高了芽孢杆菌的丰度。长期施用绿肥有效提高了假节杆菌属的含量,比单施氮肥处理提高了 317.12%,假节杆菌属有利于有机物的降解,提高了土壤养分含量以及土壤肥力。总体来看,长期施用绿肥有效提高了土壤中有益菌的含量,从而提高了土壤肥力,有利于作物的生长。

对 Biolog-ECO 检测以及高通量测序后的数据进行 RDA 相关性及相关性热图分析,可以看出,pH 值与有机质是影响土壤微生物群落多样性的最主要环境因素;土壤全氮、pH 值、土壤速效钾以及含水率之间呈显著正相关($P < 0.05$),而绿肥主要为豆科作物,能大量固定空气中的氮,通过其翻压还田,可有效增加土壤氮含量。氮素的增加可以极显著地提高土壤速效磷、速效钾含量以及土壤含水率,有利于土壤肥力的增加。Biolog-ECO^[30]和高通量测序方法对微生物群落多样性分析的侧重点不同,

Biolog-ECO 主要分析微生物的代谢活性,而高通量测序主要分析土壤中所有微生物基因的多样性。本研究结果表明绿肥以及农家肥有利于土壤肥力的提高,两种方法相互印证,如 Biolog-ECO 分析得出施绿肥使得酸类碳源的利用率较高,而高通量测序结果分析得出施用绿肥导致酸杆菌门相对丰度降低。土壤微生物的群落结构和丰度与有机质、氮、磷、钾含量及 pH 等土壤理化因子均呈现显著相关性,这些理化因子的改变对微生物群落变化有明显影响^[44]。

4 结 论

- 1) 长期施用绿肥有利于提高土壤微生物群落的多样性,单施氮肥降低了土壤微生物的多样性,绿肥处理相比氮肥处理的 McIntosh 指数提高了 18.46%。
- 2) 单施氮肥降低了土壤微生物对单糖/糖苷/聚合糖类的代谢能力,长期施用绿肥可以增强土壤微生物对碳源的代谢能力,且显著提高了对酸类碳源的利用,降低了土壤中酸杆菌门的丰度。
- 3) 与单施氮肥相比,长期施用绿肥土壤中放线菌门的丰度提高了 16.86%,芽孢杆菌属、厚壁菌门、链霉菌属的相对丰度也有所提高,从而提升了土壤抵御土传病害的能力。

参 考 文 献:

[1] 于树,汪景宽,李双昇.应用 PLFA 方法分析长期不同施肥处理对玉米地土壤微生物群落结构的影响[J].生态学报,2008,28(9): 4221-4227.
YU S, WANG J K, LI S Y. Effect of long-term fertilization on soil microbial community structure in corn field with the method of PLFA[J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(9): 4221-4227.

[2] PIOTROWSKA-DEUGOSZ A, DEUGOSZ J, FRAC M, et al. Enzymatic activity and functional diversity of soil microorganisms along the soil profile — a matter of soil depth and soil-forming processes[J]. Geoderma, 2022, 416: 115779.

[3] NIKITIN D A, LYSAK L V, KUTOVAYA O V, et al. Ecological-trophic structure and taxonomic characteristics of the communities of soil microorganisms in the northern part of the Novaya Zemlya Archipelago[J]. Eurasian Soil Science, 2021, 54(11): 1689-1704.

[4] 梁斌,周建斌,杨学云.长期施肥对土壤微生物生物量碳、氮及矿质态氮含量动态变化的影响[J].植物营养与肥料学报,2010,16(2): 321-326.
LIANG B, ZHOU J B, YANG X Y. Changes of soil microbial biomass carbon and nitrogen, and mineral nitrogen after a long-term different fertilization[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2010, 16(2): 321-326.

[5] 蔡燕飞,廖宗文,章家恩,等.生态有机肥对番茄青枯病及土壤微生物多样性的影响[J].应用生态学报,2003,14(3): 349-353.
CAI Y F, LIAO Z W, ZHANG J E, et al. Effect of ecological organic fertilizer on tomato bacterial wilt and soil microbial diversities[J]. Chi-

nese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(3): 349-353.

[6] 朱兆良,金继运.保障我国粮食安全的肥料问题[J].植物营养与肥料学报,2013,19(2): 259-273.
ZHU Z L, JIN J Y. Fertilizer use and food security in China[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2013, 19(2): 259-273.

[7] 谭德水,金继运,黄绍文,等.长期施钾与秸秆还田对华北潮土和褐土区作物产量及土壤钾素的影响[J].植物营养与肥料学报,2008,14(1): 106-112.
TAN D S, JIN J Y, HUANG S W, et al. Effect of long-term application of potassium fertilizer and wheat straw to soil on yield of crops and soil potassium in fluvo-aquic soil and brown soil of northcentral China[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2008, 14(1): 106-112.

[8] JU X T, XING G X, CHEN X P, et al. Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 3041-3046.

[9] 谭杰辉,付双军,南丽丽,等.轮作绿肥对黄土高原半干旱区土壤微生物数量及酶活性的影响[J].草原与草坪,2020,40(5): 116-123.
TAN J H, FU S J, NAN L L, et al. Effects of green manure crop rotation on soil microbial quantity and enzyme activity in semi-arid region of the Loess Plateau[J]. Grassland and Turf, 2020, 40(5): 116-123.

[10] 杜威,王紫泉,和文祥,等.豆科绿肥对渭北旱塬土壤养分及生态化学计量学特征影响[J].土壤学报,2017,54(4): 999-1008.
DU W, WANG Z Q, HE W X, et al. Effects of leguminous green manure on soil nutrients and their ecological stoichiometry characteristics in Weibei rainfed highland[J]. Acta Pedologica Sinica, 2017, 54(4): 999-1008.

[11] 万水霞,唐杉,蒋光月,等.紫云英与化肥配施对土壤微生物特征和作物产量的影响[J].草业学报,2016,25(6): 109-117.
WAN S X, TANG S, JIANG G Y, et al. Effects of purple yew with chemical fertilizer on soil microbial characteristics and crop yield[J]. Acta Prataculurae Sinica, 2016, 25(6): 109-117.

[12] 高菊生,徐明岗,董春华,等.长期稻-稻-绿肥轮作对水稻产量及土壤肥力的影响[J].作物学报,2013,39(2): 343-349.
GAO J S, XU M G, DONG C H, et al. Effects of long-term rice-rice green manure rotation on rice yield and soil fertility[J]. Acta Agonomica Sinica, 2013, 39(2): 343-349.

[13] 李文广,杨晓晓,黄春国,等.饲料油菜作绿肥对后茬麦田土壤肥力及细菌群落的影响[J].中国农业科学,2019,52(15): 2664-2677.
LI W G, YANG X X, HUANG C G, et al. Effects of rapeseed green manure on soil fertility and bacterial community in dryland wheat field [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(15): 2664-2677.

[14] 汤明先,荆英,徐志英. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J].南方农业,2016,10(21): 242-243.
TANG P X, JING Y, XU Z Y, et al. Application of BIOLOG in the study of functional diversity of soil microbial communities[J]. South China Agriculture, 2016, 10(21): 242-243.

[15] BOKULICH N A, MILLS D A. Improved selection of internal transcribed Spacer-Specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(8): 2519-2526.

[16] 楼骏,柳勇,李延.高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的应用进展[J].中国农学通报,2014,30(15): 256-260.
LOU J, LIU Y, LI Y. Review of high-throughput sequencing techniques in studies of soil microbial diversity[J]. Chinese Agricultural

- Science Bulletin, 2014, 30(15): 256-260.
- [17] 柳炳俊, 王永, 金刚. 基于 Biolog 微平板技术解析典型煤矿区煤层微生物代谢及其多样性分析[J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(2): 275-282.
- LIU B J, WANG Y, JIN G. Analysis of microbial metabolism diversity of coal seam in typical coal mining areas based on Biolog microplate technology [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2020, 47(2): 275-282.
- [18] 严君, 韩晓增, 陈旭, 等. 施肥对小麦、玉米和大豆连作土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2019, 37(6): 171-177.
- YAN J, HAN X Z, CHEN X, et al. Effects of fertilization on soil microbial community and functional diversity under continuous cropping of wheat, maize and soybean[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2019, 37(6): 171-177.
- [19] 姜伟, 白红梅, 薛国萍, 等. 基于高通量测序的设施连作果菜类根际土壤细菌群落结构和多样性分析[J]. 华北农学报, 2021, 36(4): 82-89.
- JIANG W, BAI H M, XUE G P, et al. Analysis of bacterial community structure and diversity in rhizosphere soil of different fruit vegetables in greenhouse continuous cropping on high-throughput sequencing[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2021, 36(4): 82-89.
- [20] 李海玲. 土壤 pH 值的测定——电位法[J]. 农业科技与信息, 2011, (13): 47-48.
- LI H L. Determination of soil pH by potentiometric method[J]. Information of Agricultural-Science and Technology, 2011, (13): 47-48.
- [21] 徐学义, 崔兆韵, 黄华, 等. FDR 与烘干法测定土壤水分对比分析[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2013, 44(2): 190-192.
- XU X Y, CUI Z Y, HUANG H, et al. Comparative analysis of soil moisture determination by FDR and drying method [J]. Journal of Shandong Normal University (Natural Science), 2013, 44(2): 190-192.
- [22] 王雪梅, 黄利群, 刘成, 等. 基于 Biolog-ECO 分析稀土、铅和氟复合污染农田土壤微生物群落功能多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27(6): 1485-1491.
- WANG X M, HUANG L Q, LIU C, et al. Analysis of microbial community functional diversity in rare earth element, lead and fluorine compound-polluted soil based on Biolog-ECO[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2021, 27(6): 1485-1491.
- [23] 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.
- [24] 卜洪震, 王丽宏, 尤金成, 等. 长期施肥管理对红壤稻田土壤微生物量碳和微生物多样性的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3340-3347.
- BU H Z, WANG L H, YOU J C, et al. Impact of long-term fertilization on the microbial biomass carbon and soil microbial communities in paddy red soil [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(16): 3340-3347.
- [25] 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 carbon and nitrogen and enzyme activities during maize fertility [J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(17): 5502-5511.
- [26] 唐海明, 肖小平, 汤文光, 等. 长期施肥对双季稻田甲烷排放和关键功能微生物的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(22): 7668-7678.
- TANG H M, XIAO X P, TANG W G, et al. Effects of long-term fertilizer treatments on CH₄ fluxes and key functional microorganisms in a double-cropping paddy field [J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(22): 7668-7678.
- [27] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 42-108.
- BAO S D. Soil and agricultural chemistry analysis [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 42-108.
- [28] LUO R Y, KUZYAKOV Y, LIU D Y, et al. Nutrient addition reduces carbon sequestration in a Tibetan grassland soil: disentangling microbial and physical controls [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 144: 107764.
- [29] 陈建英, 罗超越, 邱慧珍, 等. 不同施氮量对半干旱区还田玉米秸秆腐解及养分释放特征的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2020, 38(1): 101-106.
- CHEN J Y, LUO C Y, QIU H Z, et al. Effects of application of different nitrogen levels on decomposition characteristics and nutrient release of returning straw [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2020, 38(1): 101-106.
- [30] LI C, LIU X, MENG M J, et al. The use of Biolog Eco microplates to compare the effects of sulfuric and nitric acid rain on the metabolic functions of soil microbial communities in a subtropical plantation within the Yangtze River Delta region [J]. Catena, 2021, 198: 105039.
- [31] 吕卓呈, 李廷亮, 谢英荷, 等. 夏闲期种植翻压绿肥作物对麦田土壤细菌多样性的影响[J]. 山西农业科学, 2021, 49(3): 305-310.
- LV Z C, LI T L, XIE Y H, et al. Effects of planting green manure crops on soil bacteria diversity in summer fallow period of winter wheat [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2021, 49(3): 305-310.
- [32] SUN L, XUN W B, HUANG T, et al. Alteration of the soil bacterial community during parent material maturation driven by different fertilization treatments [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 96: 207-215.
- [33] 李猛, 张恩平, 张淑红, 等. 长期不同施肥设施菜地土壤酶活性与微生物碳源利用特征比较[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(1): 44-53.
- LI M, ZHANG E P, ZHANG S H, et al. Comparison of soil enzyme activities and microbial C metabolism in installed vegetable fields under long-term different fertilization [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2017, 23(1): 44-53.
- [34] PARHAM J A, DENG S P, DA H N, et al. Long-term cattle manure application in soil. II. Effect on soil microbial populations and community structure [J]. Biology and Fertility of Soils, 2003, 38(4): 209-215.
- [35] 张达斌. 黄土高原地区种植豆科绿肥协调土壤水分和氮素供应的效应及机理 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- ZHANG D B. Effects of leguminous green manure on soil water and nitrogen supply and its mechanism in the Loess Plateau [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016.
- [36] 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 X, HAO X H, CHEN T, et al. Effects of long-term fertilization on the functional diversity of soil microbial communities in rice

fields[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(2): 740-748.

[37] 李秀英, 赵秉强, 李絮花, 等. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1591-1599.

LI X Y, ZHAO B Q, LI X H, et al. Effects of different fertilization systems on soil microbe and its relation to soil fertility[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(8): 1591-1599.

[38] 邹湘, 易博, 张奇春, 等. 长期施肥对稻田土壤微生物群落结构及氮循环功能微生物数量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(12): 2158-2167.

ZOU X, YI B, ZHANG Q C, et al. Effects of long-term fertilization on the microbial community structure and the population of N cycle-related functional microorganism in paddy soil[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2020, 26(12): 2158-2167.

[39] 韩梅, 刘蕊, 李正鹏, 等. 种植绿肥对作物产量和细菌群落稳定性的影响[J]. 中国环境科学, 2021, 41(11): 5382-5390.

HAN M, LIU R, LI Z P, et al. Green manuring increased crop yields and the stability of bacterial community[J]. China Environmental Science, 2021, 41(11): 5382-5390.

[40] LV N N, LIU Y, GUO T F, et al. The influence of *Bt* cotton cultivation on the structure and functions of the soil bacterial community by soil metagenomics [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 236: 113452.

[41] 宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 等. 云南和西藏四处热泉中的厚壁菌门多样性[J]. 生物技术, 2015, 25(5): 481-486, 436.

SONG Z Q, WANG L, LIU X H, et al. Diversities of Firmicutes in four hot springs in Yunnan and Tibet[J]. Biotechnology, 2015, 25(5): 481-486, 436.

[42] 李彦林, 陈吉祥, 张彦, 等. 半干旱黄土高原生态区不同土地利用类型土壤可培养微生物群落分析[J]. 干旱区资源与环境, 2017, 31(9): 150-155.

LI Y L, CHEN J X, ZHANG Y, et al. Analysis of culturable microbial communities in different land utilization types in semi-arid loess plateau ecological zones[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2017, 31(9): 150-155.

[43] 赵冬雪. 绿肥对植烟土壤微生物群落多样性的影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.

ZHAO D X. Effect of green manure on the diversity of soil microbial communities in planted tobacco[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019.

[44] 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 micropopulation in black soil of Northeast China to long-term fertilization and crops[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(22): 4408-4418.

(上接第 32 页)

[9] YAKUBOVICH A, YAKUBOVICH I, et al. Using the response surface to assess the reliability of the Russian cryolithozone road network in a warming climate[C]//International Scientific Conference Energy Management of Municipal Facilities and Sustainable Energy Technologies EMMFT 2019, Cham; Springer, 2021: 486-495.

[10] 张秋霞, 钟增涛, 徐阳春, 等. 多粘芽孢杆菌芽孢荧光原位杂交检测技术研究及其在有机肥发酵中的应用[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(5): 1276-1281.

ZHANG Q X, ZHONG Z T, XU Y C, et al. Detection of *Paenibacillus polymyxa* spores by fluorescent in situ hybridization (FISH) and its application in organic compost fermentation[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2010, 16(5): 1276-1281.

[11] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 178-181.

LI F D, YU Z N, HE S J. Experimental techniques of agricultural microbiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 178-181.

[12] 邵阳, 崔孟奇, 田霄鸿, 等. 枯草芽孢杆菌与解磷细菌对猕猴桃园土壤及果实品质的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2016, 34(5): 180-184.

SHAO Y, CUI M Q, TIAN X H, et al. Effects of *Bacillus subtilis* and phosphorus solubilizing bacteria on soil and fruit quality in rhesus macaque peach orchard[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2016, 34(5): 180-184.

[13] SUN B, GU L K, BAO L J, et al. Application of biofertilizer containing *Bacillus subtilis* reduced the nitrogen loss in agricultural soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 148: 107911.

[14] ZHANG N, WU K, HE X, et al. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11[J]. Plant and Soil, 2011, 344(1): 87-97.

[15] THOMAS L, LARROCHE C, PANDEY A. Current developments in solid-state fermentation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 81: 146-161.

[16] KUINAR M, OU Y L, LIN J G. Co-composting of green waste and food waste at low C/N ratio[J]. Waste Management, 2010, 30(4): 602-609.

[17] DE BERTOLDI M, VALLINI G, PERA A. The biology of composting: a review[J]. Waste Management & Research, 1983, 1(2): 157-176.

[18] 黄瑜倩. 基于代谢产物的微生物生长模型研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2019.

HUANG Y Q. Study on microbial growth model based on metabolites [D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2019.

[19] 贾璇, 李迎新, 吴雅楠, 等. 温度和初始 pH 对农业固体废物暗发酵产氢的影响[J]. 环境工程学报, 2019, 13(9): 2233-2242.

JIA X, LI Y X, WU Y N, et al. Effects of temperature and initial pH on the hydrogen production by dark fermentation of agricultural solid waste[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2019, 13(9): 2233-2242.

[20] 黄小琴, 刘勇, 周西全. 枯草芽孢杆菌 Bs2004 固体发酵与干燥工艺研究[J]. 现代农业科技, 2011, (1): 186-187, 190.

HUANG X Q, LIU Y, ZHOU X Q. Study on solid fermentation and drying process of *Bacillus subtilis* strain Bs2004[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2011, (1): 186-187, 190.