

DOI: 10.11766/trxb201710270425

化学氮肥与绿肥对麦田土壤细菌多样性和功能的影响*

包明 何红霞 马小龙 王朝辉 邱炜红[†]

(农业部西北植物营养与农业环境重点实验室/西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 基于渭北旱塬8年田间定位试验, 利用高通量测序技术研究了化学氮肥和绿肥施用对麦田土壤细菌丰度、多样性及其功能的影响。结果表明: 与对照(CK)相比, 化学氮肥施用处理(FP)显著增加了土壤有机碳含量(8.0%), 氮肥+绿肥施用处理(FGM)显著增加了土壤有机碳(20.0%)、微生物生物量碳(62.0%)、微生物生物量氮(35.9%)、可溶性有机碳(7.27%)和有机氮(56.3%)含量。不同处理麦田土壤细菌OTU(基本分类单元)数平均为3792, 丰度和多样性指数在各处理间均无显著性差异。优势菌群为变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)等, 各处理之间无显著性差异。但在属水平上, 与CK相比, FP处理显著降低了*Pseudoduganella*、*Steroidobacter*、*Adhaeribacter*、*Nordella*、*Ralstonia*等细菌属的相对丰度, FGM处理则显著提高了*Steroidobacter*、*Chryseolinea*、*Lentzea*、*Chitinophaga*和降低了*Lactobacillus*细菌属的丰度。FAPROTAX细菌功能分组主要以化能异养、硝化作用、氨氧化、亚硝酸盐氧化作用、硝酸盐还原作用等为主, Tax4Fun功能分组主要以碳水化合物代谢、氨基酸代谢、膜转运、信号传导和能量代谢等为主, 各处理之间无显著性差异。因此, 化学氮肥和绿肥施用对该区域旱地麦田土壤的细菌多样性、群落组成和功能影响相对较小, 但可在一定程度上提高土壤肥力。

关键词 绿肥还田; 细菌群落结构; α 多样性; 黄土高原

中图分类号 S154 **文献标识码** A

施用化学氮肥对粮食产量的提高起着重要的作用, 是提高农作物产量最迅速、最有效的方法之一。据联合国粮食与农业组织(FAO)统计^[1], 全球化学氮肥2015年消费总量达到 1.09×10^8 t, 其中中国消费 3.10×10^7 t, 占全球总消费的28.5%, 较1978年的 7.5×10^6 t增加3.15倍。化学氮肥在增加粮食产量的同时, 亦对全球环境如温度(温室效应^[2])、土壤(酸化^[3])、生态环境(面源污染^[4])等方面产生重要影响。此外, 长期大量的化学氮肥施用对土壤物理、化学、生物性

质产生影响^[5-9], 进而影响到土壤微生物群落多样性。有研究表明, 长期化学氮肥施用降低了旱地土壤真菌的丰度和多样性^[10], 增加了水稻土细菌的丰度和多样性^[11-12], 同时也改变了不同生态系统的细菌和真菌群落结构^[10, 13]。

绿肥是一种养分完全的生物肥源, 也是目前化学肥料零增长计划和土壤有机质提升计划的重要替代肥源, 对农业的可持续发展有着重要意义。研究表明, 绿肥可促进后茬作物(小麦)生长并提高产量, 提供大量的碳源和养分, 改善土壤物理、化学

* 国家重点研发计划项目(2016YFD0200105)和国家自然科学基金青年项目(41501308)资助Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0200105) and the National Natural Science Foundation of China (No. 41501308)

[†] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: qwh@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 包明(1990—), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要从事作物施肥与环境效应研究。E-mail: baoming08@163.com

收稿日期: 2017-10-27; 收到修改稿日期: 2017-12-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2018-01-31

和生物学性状, 缓解化肥资源紧张并节约化肥投入成本^[14]。同时, 绿肥也改变了土壤细菌多样性及群落组成^[15]。

黄土高原旱地是我国西北地区重要的耕地资源, 但土壤全氮含量和有机质含量相对较低, 其中有机质含量平均值仅有1.1%^[16], 且超过1/2的土壤有机质含量低于1%。在此条件下, 为了提高作物产量, 化学氮肥往往会过量施用^[17], 利用绿肥部分替代化肥既可以培肥又可以改善土壤性质和替代部分化肥^[14], 是提高作物产量的重要措施之一。但在此区域, 关于长期化学氮肥和绿肥施用对土壤的生化性质、微生物多样性及其功能的研究相对较少。因此, 本研究基于8年的定位试验, 利用高通量测序技术研究分析了化学氮肥和绿肥施用对土壤细菌多样性及其功能的影响, 以期为该区域旱地土壤肥料管理提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验地位于渭北旱塬雨养农业区陕西省长武县丁家镇十里铺村(35° 12' N, 107° 45' E, 海拔1 200 m)。该地区年均气温9.1℃, 年均降水量579 mm, 降水主要集中在7—9月, 占全年降水量的50%~60%。试验区地势平坦, 供试土壤为黑垆土, 母质为中壤质马兰黄土。定位试验开始时耕层土壤(0~20 cm)基本理化性质为: pH 8.17、容重1.35 g cm⁻³、有机碳8.52 g kg⁻¹、全氮0.78 g kg⁻¹、硝态氮13.1 mg kg⁻¹、有效磷(Olsen-P) 4.5 mg kg⁻¹、速效钾129.6 mg kg⁻¹。

1.2 试验设计

试验开始于2008年9月, 以冬小麦为研究作物, 一年一季, 于9月底播种、翌年6月底收获。设置3个处理: 对照(CK)、化学氮肥(FP)、氮肥+绿肥(FGM)。其中CK处理仅施过磷酸钙(P₂O₅105 kg hm⁻²a⁻¹), FP处理施用尿素(N 150 kg hm⁻²a⁻¹)与过磷酸钙(P₂O₅105 kg hm⁻²a⁻¹), FGM处理化肥施用量同FP, 并于小麦收获后不施肥硬茬播种绿肥(大豆, 地方品种), 播种量75 kg hm⁻², 下季小麦播前2周将绿肥打碎后翻压入土壤, 耕深为30 cm。所有处理的秸秆在冬小麦收获后移出小区, 不还田。冬小麦品种为长武521,

播种密度为150 kg hm⁻², 行距20 cm。小区面积6 m×22 m=132 m²。每处理重复4次, 采用完全随机区组试验设计。冬小麦整个生育期不灌水, 田间管理与当地农户一致。

1.3 样品采集与分析

于2016年9月18日小麦播种前随机选取各处理3个区组, 按五点采样法采集耕层0~20 cm的土样, 混匀后立即带回实验室, 去除根系等杂物后分为3部分: 一部分土样作为鲜土用来测定土壤微生物生物量碳、微生物生物量氮、可溶性有机碳、可溶性有机氮、土壤矿质氮(硝态氮和铵态氮); 一部分-80℃冷冻保存用于测定细菌多样性; 一部分土样经过风干后过筛, 用于土壤理化性质测定。土壤pH、有机碳、矿质氮采用常规方法测定^[18]。土壤微生物生物量氮、微生物生物量碳采用氯仿熏蒸-K₂SO₄提取法测定^[19-20]。可溶性有机氮、可溶性有机碳采用0.5 mol L⁻¹ K₂SO₄提取后利用碳自动分析仪、流动分析仪测定。

1.4 DNA提取及高通量测序

称取0.3 g土壤样品, 采用CTAB改进方法对土壤样本基因组DNA进行提取, 之后利用琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度, 取适量的样品于离心管中, 使用无菌水稀释样品至1 mg L⁻¹。以稀释后的基因组DNA为模板, 使用带Barcode的特异引物(515F(5' -GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和806R(5' -GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')), 利用Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer(New England Biolabs公司)和高效高保真酶对细菌V4区进行PCR。PCR反应程序为98℃预变性1 min; 30个循环为(98℃, 10 s; 50℃, 30 s; 72℃, 30 s); 然后72℃, 延伸5 min(所用仪器为Bio-rad T100梯度PCR仪)。PCR产物使用2%的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 然后根据PCR产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 对目的条带使用胶回收试剂盒(Qiagen公司)回收产物。使用TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit(Illumina公司)建库试剂盒进行文库构建, 经Qubit和Q-PCR定量合格后, 使用HiSeq2500 PE250进行上机测序(委托北京诺禾致源科技股份有限公司测定)。

1.5 数据处理

测序后的序列按照标准方法处理后, 利用Uparse软件 (Uparse v7.0.1001) 对样品有效序列进行聚类, 以97%的一致性将序列聚类成为OTU (基本分类单元)。然后对OTU序列进行物种注释, 用Mothur方法与SILVA (Release128, <http://www.arb-silva.de/>) 的SSUrRNA数据库进行物种注释分析, 获得分类学信息并分别在各个分类水平统计各样本的群落组成。然后利用Qiime软件 (Version 1.7.0) 计算基本分类单元数、丰度指数 (Chao1指数) 和多样性指数 (Shannon指数), 利用R软件 (Version 3.2.5) 和相关软件包进行细菌群落组间差异分析 (主坐标分析、非度量多维尺度分析和Anosim分析)、组间差异物种分析和细菌功能预测分析 (FAPROTAX (<http://www.zoology.ubc.ca/louca/FAPROTAX>))、Tax4Fun

(<http://tax4fun.gobics.de/>))。其他数据采用Excel 2016、DPS (v7.05) 进行处理分析, 多重比较采用LSD法, 显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 土壤生物化学性质

化学氮肥和绿肥施用对旱地麦田土壤性质有不同影响 (表1)。与对照 (CK) 相比, 化学氮肥处理 (FP) 仅显著增加了土壤有机碳含量 (8.0%), 而对其他土壤性质均无显著性影响。氮肥+绿肥处理 (FGM) 显著增加了土壤有机碳 (20.0%)、微生物生物量碳 (62.0%)、微生物生物量氮 (35.9%)、可溶性有机碳 (7.27%) 和可溶性有机氮 (56.3%) 含量, 而对土壤硝态氮和铵态氮含量无显著性影响。

表1 不同处理条件下土壤生物化学性质

Table 1 Biochemical properties of the soil relative to treatment

处理 Treatment	有机碳SOC (g kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N (mg kg ⁻¹)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N (mg kg ⁻¹)	pH	微生物生物量 碳MBC (mg kg ⁻¹)	微生物生物量 氮MBN (mg kg ⁻¹)	可溶性有 机碳DOC (mg kg ⁻¹)	可溶性有 机氮DON (mg kg ⁻¹)
CK	6.96c	5.25a	0.29a	8.23a	118.5b	40.53b	156.9b	2.84b
FP	7.52b	5.70a	0.36a	8.09a	135.0b	37.91b	155.9b	2.60b
FGM	8.36a	6.66a	0.39a	8.18a	192.0a	55.09a	168.3a	4.44a

注: CK, 对照; FP, 化学氮肥; FGM, 化肥+绿肥。同一列中字母不同表示处理之间差异达到显著水平 ($p<0.05$, $n=3$)。下同
Note: CK: control; FP: applied with N fertilizer; FGM: FP plus green manure. Different letters in the same column indicate significant difference between treatments at 0.05 level ($n=3$). The same below

2.2 细菌群落丰度与多样性

高通量测序后获得691 724条有效序列, CK、FP和FGM处理的平均有效序列分别为76 689、80 774、73 112。经过与数据库比对注释后, 共获得34 134个OTU (基本分类单元), CK、FP和

FGM的平均OTU数为3 792, 各处理之间无显著性差异 (表2)。细菌群落丰度指数 (Chao1) 和多样性指数 (Shannon) 各处理之间均无显著性差异。说明与对照相比, 化学氮肥和绿肥施用并未显著改变细菌群落丰度及多样性。

表2 不同处理细菌群落丰度与多样性指数

Table 2 Bacterial community richness (OTU number) and diversity indices (Chao1, Shannon) relative to treatment

处理 Treatment	基本分类单元数OTU number	Chao1指数 Chao 1 index	香农指数 Shannon index
CK	3 678a	4 086a	9.77a
FP	4 021a	4 489a	9.94a
FGM	3 679a	3 951a	9.84a

2.3 细菌群落组成与群落结构

细菌16S rDNA 高通量测序序列经物种注释后共获得49个门、101个纲、200个目、360个科和552个属类细菌。在门和属水平上，细菌群落组成如图1所示。可以看出在门水平，CK、FP和FGM处理的相对丰度>1%的细菌分别占总细菌总数的95.0%、94.5%和94.3%。CK、FP和FGM各处理的菌群相对丰度无显著性差异，其中优势菌群为变形菌门（Proteobacteria）、酸杆菌门（Acidobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）、芽单胞菌门（Gemmatimonadetes）和拟杆菌门（Bacteroidetes），各处理的平均相对丰度分别为35.6%、18.6%、12.6%、7.2%和6.7%。在属水平上，CK、FP和FGM各处理相对丰度≥0.5%的属占总细菌属的15.6%、13.3%和13.8%，其中优

势细菌属为鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）、乳酸菌属（*Lactobacillus*）、节杆菌属（*Arthrobacter*）、*Haliangium*和*Gaiella*，各处理平均相对丰度分别为3.5%、0.8%、1.1%、1.2%和0.9%。这些优势菌群属中，仅有乳酸菌属（*Lactobacillus*）在CK、FP和FGM处理中存在显著性差异，即FGM处理显著低于CK和FP处理。此外，有部分其他细菌属（相对丰度<0.5%）在CK、FP、FGM处理之间存在着显著性差异（表3），说明化学氮肥和绿肥施用显著改变了土壤细菌在属水平上的群落组成。但从整体来看，排序分析（图2）和Anosim分析（ $p(CK-FP)=1$ ； $p(CK-FGM)=1$ ； $p(FP-FGM)=0.7$ ）均表明CK、FP、FGM处理之间的细菌群落结构并无显著性差异，说明化学氮肥和绿肥施用并未改变土壤的细菌群落结构。

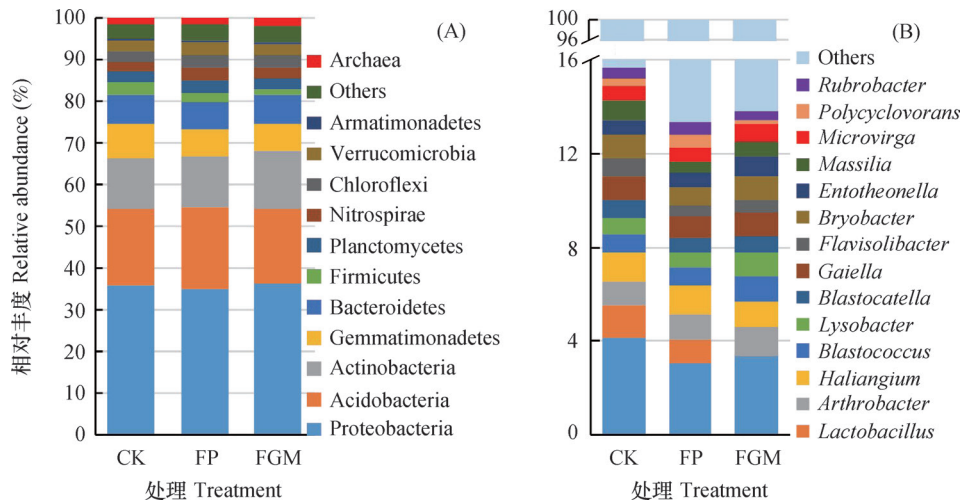


图1 不同处理条件下土壤细菌在门水平（A）和属水平（B）上的优势物种丰度图

Fig. 1 Dominant species abundance map at the phylum (A) and genus (B) levels relative to treatment

表3 不同处理间相对丰度达到差异显著的细菌属（相对丰度>0.1%）列表

Table 3 List of soil bacterial genera (with abundance > 0.1%) with significant difference between treatments

CK-FP处理之间 Between CK and FP	CK-FGM处理之间 Between CK and FGM	FP-FGM处理之间 Between FP and FGM
<i>Pseudoduganella</i>	<i>Steroidobacter</i>	<i>Lysobacter</i>
<i>Steroidobacter</i>	<i>Chryseolinea</i>	<i>Steroidobacter</i>
<i>Adhaeribacter</i>	<i>Lentzea</i>	<i>Adhaeribacter</i>
<i>Nordella</i>	<i>Chitinophaga</i>	<i>Chryseolinea</i>
<i>Ralstonia</i>		<i>Roseiflexus</i>
		<i>Lentzea</i>
		<i>Chitinophaga</i>

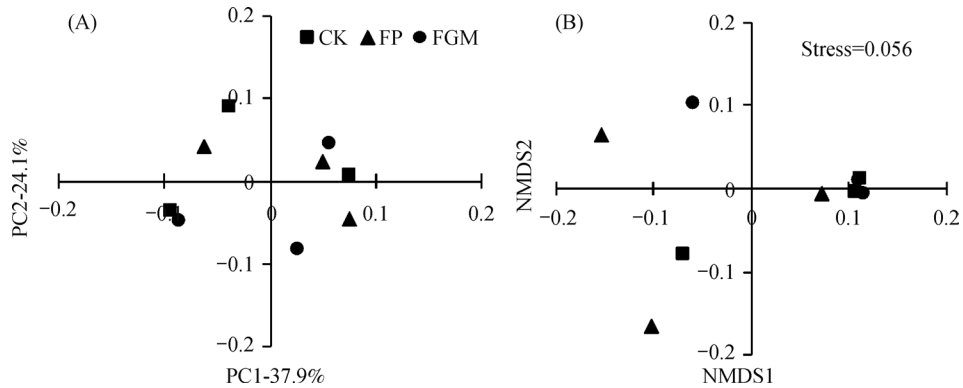


图2 基于主坐标 (PCoA) (A) 和非度量多维尺度 (NMDS) (B) 的群落结构分析

Fig. 2 The principal coordinate analysis (PCoA) (A) and non-metric multi dimensional scale (NMDS) analysis (B) of soil microbial community structures relative to treatment

2.4 细菌功能

根据16S序列的分类注释结果采用FAPROTAX工具对微生物群落功能注释后共获得63种功能分组, 这些功能菌群包含1301个OTU, 占全部OTU的16.3%, 而其序列数占总序列数的27.7%。相对丰度较高的功能分组信息如图3所示。可以看出, 化能异养 (包括chemoheterotrophy和aerobic chemoheterotrophy)、硝化作用 (nitrification)、氨氧化作用 (aerobic ammonia oxidation)、亚硝酸盐氧化作用 (aerobic nitrite oxidation)、硝酸盐还原作用 (nitrate reduction) 功能类细菌相对丰度较高, 分别占总细菌群落的14.9%、3.3%、2.0%、1.2%和1.1%。采用Tax4Fun功能预测工具对微生物群落功能注释后共获得41种二级 (Level 2) 功能分组和271种三级 (Level 3)

功能分组, 其相对丰度排名前10的功能分组如图4所示。可以看出二级和三级分组中优势功能菌群的相对丰度在CK、FP、FGM各处理中均无显著性差异。绿肥C/N比相对较低, 还田后易被微生物快速分解, 但分析数据表明参与碳氮代谢的微生物功能菌群 (包括碳水化合物代谢、氨基酸代谢、氮代谢、氮循环等功能菌群) (图3和图4) 在各处理之间并无差异, 说明在本研究条件下绿肥施用并未改变土壤微生物功能。

3 讨论

3.1 化学氮肥和绿肥施用对土壤生物化学性质的影响

本研究表明多年化学氮肥施用显著提高了旱地土壤有机碳的含量, 而对土壤微生物生物量氮、微生物生物量碳、可溶性有机氮、可溶性有机碳含量无显著影响 (表1), 而王慧等^[6]研究表明在黄土高原南部旱地, 与对照相比, 长期化学氮肥施用除了显著增加旱地土壤有机碳含量外, 还显著提高了土壤有机氮、微生物生物量氮含量。此外, 化学氮肥施用提高了玉米-小麦轮作体系土壤有机碳和有机氮含量^[5]、潮土有机氮含量^[8]、淮河中游水稻土^[9]和黄淮海平原潮土^[7]土壤微生物生物量碳氮含量。同时也有研究表明化学氮肥施用对旱地土壤有机碳、微生物生物量碳含量无显著性影响^[21]。可以看出, 化学氮肥施用对不同生态区土壤生物化学性质影响不一, 与不同区域土壤性质与气候有关。

与化学氮肥施用处理不同, 氮肥+绿肥处理显

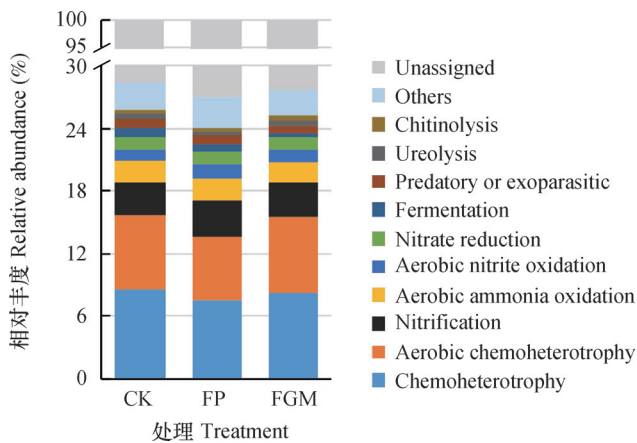


图3 不同处理条件下基于FAPROTAX预测的细菌功能分组丰度图

Fig. 3 Abundance of soil bacterial function groups predicted with the FAPROTAX tool relative to treatment

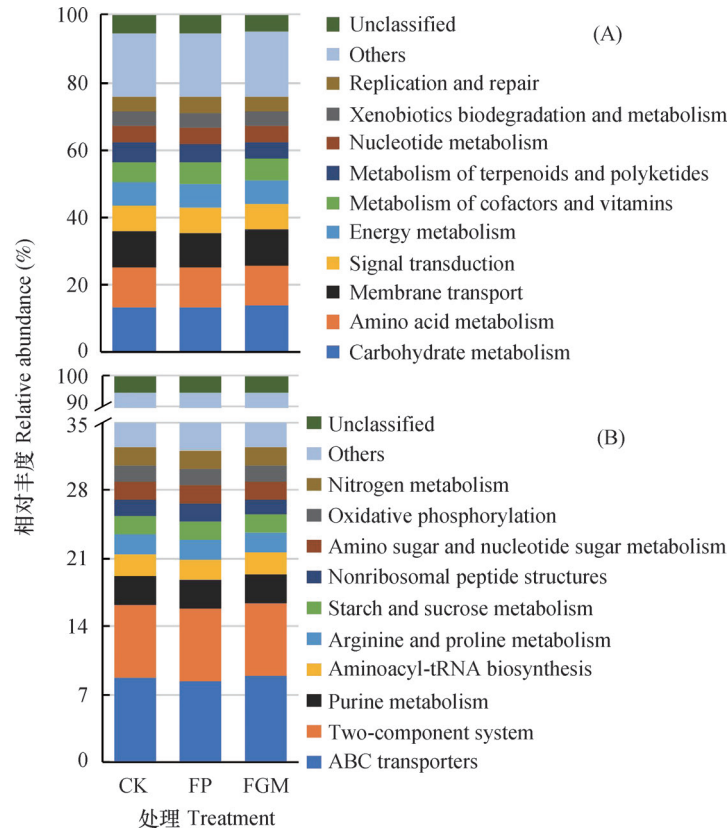


图4 不同处理条件下基于Tax4Fun预测的细菌功能分组丰度图 (A.二级功能分组, B.三级功能分组)

Fig. 4 Abundance of soil bacterial function groups predicted with the Tax4Fun tool relative to treatment (A. functional groups at level 2, B. functional groups at level 3)

著提高了土壤有机碳、微生物生物量氮、微生物生物量碳、可溶性有机氮、可溶性有机碳 (表1)。与处于该区域的绿肥研究结果一致^[22-24], 他们研究也表明在化学氮肥施用基础上种植绿肥翻压后土壤有机碳、微生物生物量碳含量较只施用化学氮肥处理显著提高。此外, 冬闲期间绿肥作物种植 (紫云英、油菜和黑麦草) 显著提高了湖南祁阳红壤水稻土土壤有机质、全氮和碱解氮含量^[25-26]; 夏闲期间种植绿肥 (籽粒苋) 翻压后同样在一定程度上提高了河北廊坊日光温室蔬菜大棚土壤可溶性有机碳、有机氮含量^[27]。由此可知, 种植绿肥处理可改善不同生态系统土壤性质, 提高土壤肥力。

3.2 化学氮肥和绿肥施用对土壤细菌群落多样性与功能的影响

化学氮肥施用对不同生态系统土壤细菌多样性及群落组成有不同的影响^[10, 28-31]。本研究中, 与对照相比, 化学氮肥施用处理并未显著改变旱地土壤的细菌多样性 (表2), 与Koyama等^[32]在美国北极苔原 (Arctic tundra) 和Shi等^[30]在我国

黑土土壤上的研究结果一致。同时亦有研究表明化学氮肥施用显著提高^[12]或降低了土壤细菌多样性^[10, 28, 33]。研究结果的差异可能与不同生态区土壤性质如有机碳、pH等因素有关。本研究中, 土壤有机碳含量相对较低, 尽管氮肥施用提高了土壤有机碳含量, 但该土壤有机碳的绝对值相对较低 (如对照处理仅有 6.96 mg kg^{-1}), 有机质含量的提高不足以改变土壤细菌丰度及多样性。而在我国东北的黑土上, 土壤有机碳含量相对较高 (15.8 mg kg^{-1}), 氮肥施用也提高了土壤有机碳含量, 但其细菌多样性反而下降, 这与氮肥施用降低了土壤pH密切相关^[33]。此外, 化学氮肥施用处理还会影响到土壤中细菌群落组成。本研究中, 化学氮肥施用处理未改变细菌门水平的群落组成 (图1A), 但改变了属水平的群落组成 (图1B), 与Zhong等^[10]研究结果一致, 说明在黄土高原旱地, 氮肥包括绿肥的合理使用对土壤微生物的多样性影响较小。

与化学氮肥施用不同, 现有多数研究均表明

绿肥施用处理可增加土壤中细菌的丰度和多样性。如绿肥施用处理显著增加了黄土高原旱区土壤中微生物总数、细菌和放线菌数量^[34], 明显提高了湖北山地黄棕壤中细菌及微生物总的磷脂脂肪酸 (PLFAs) 含量 (即微生物总数)^[35], 显著增加了湖南红壤性水稻土细菌群落丰度与多样性^[23]和湘西烟田土壤细菌群落多样性, 其中黑麦草绿肥还田处理提高幅度最大^[36]。此外, 绿肥施用也改变了细菌群落组成, 如在湘西烟田中, 绿肥施用增加了变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和绿弯菌门 (Chloroflexi) 相对丰度^[36]; 在湖南红壤性水稻土上, 绿肥施用改变了变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和浮霉菌门 (Planctomycetes) 的相对丰度^[23]。而在本研究中, 绿肥施用并未显著影响到细菌的丰度、多样性 (表2) 以及门水平的细菌群落相对丰度 (图1), 仅改变了在属水平的细菌群落相对丰度 (图1、表3)。研究结果的差异可能与不同生态区土壤性质和气候等因素有关。

细菌在土壤养分循环中起着重要作用, 其功能在一定程度上决定土壤肥力高低, 但同时易受外界环境条件如施肥的影响。李晓慧^[37]研究表明长期施氮肥导致了东北黑土土壤中氨氧化古菌丰度的下降和功能的退化, 以及氨氧化细菌丰度的增加和功能的强化; 卞碧云^[38]研究表明长期高量施氮肥 (N870、N696) 明显降低了太湖地区设施栽培蔬菜地土壤氨单加氧酶功能基因 (amoA) 的数量, 导致土壤氨氧化作用显著降低, 主要是由土壤酸化引起的。此外, 绿肥施用也可在一定程度上改变土壤中细菌功能, 袁秀梅^[39]研究表明蚕豆绿肥覆盖或翻压均促进了土壤固氮功能细菌、氨化作用细菌、硝化作用细菌和反硝化作用等功能细菌数量的增长, 即绿肥施用促进了土壤的固氮作用和氮素转化过程。但在本研究中, 与对照相比, 化学氮肥和绿肥施用并未改变土壤中参与氮循环功能 (如氮代谢、氨基酸代谢、氨氧化作用、硝化作用等)、碳代谢功能 (如碳水化合物代谢、维生素代谢、淀粉和蔗糖代谢等) 和其他功能细菌相对丰度 (图3和图4), 这与不同研究中的土壤性质和生态条件差

异有关, 亦可能与土壤细菌空间变异和高通量测序分析变异较大有关, 导致处理之间变异较大, 差异不显著。

4 结 论

与对照相比, 化学氮肥处理可显著增加土壤有机碳含量, 而氮肥+绿肥处理显著提高了土壤有机碳、微生物生物量碳、微生物生物量氮、可溶性有机碳和有机氮含量。化学氮肥和绿肥施用并未显著影响细菌群落丰度、多样性, 未改变在门水平上的细菌群落组成以及主要功能基因细菌相对丰度, 但改变了细菌在属水平的群落组成。因此, 化学氮肥和绿肥施用对该区域旱地土壤的细菌多样性、群落组成和功能影响相对较小, 但可在一定程度上提高土壤肥力。

参 考 文 献

- [1] FAO STAT. Food and Agriculture of the United Nations, Rome 2017. [2017-09-19]. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- [2] Pachauri R K, Meyer L A. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change//IPCC. Climate change 2014: Synthesis report. Geneva, Switzerland: IPCC, 2014
- [3] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands. *Science*, 2010, 327 (5968): 1008—1010
- [4] 朱兆良, 孙波, 杨林章, 等. 我国农业面源污染的控制政策和措施. *科技导报*, 2005, 23 (4): 47—51
Zhu Z L, Sun B, Yang L Z, et al. Policy and countermeasures to control non-point pollution of agricultural in China (In Chinese). *Science & Technology Review*, 2005, 23 (4): 47—51
- [5] Yang X Y, Ren W D, Sun B H, et al. Effects of contrasting soil management regimes on total and labile soil organic carbon fractions in a loess soil in China. *Geoderma*, 2012, 177: 49—56
- [6] 王慧, 刘金山, 惠晓丽, 等. 旱地土壤有机碳氮和供氮能力对长期不同氮肥用量的响应. *中国农业科学*, 2016, 49 (15): 2988—2998
Wang H, Liu J S, Hui X L, et al. Responses of soil organic carbon, organic nitrogen and nitrogen supply capacity to long-term nitrogen fertilization practices in dryland soil (In Chinese). *Scientia Agricultura*

- Sinica, 2016, 49 (15): 2988—2998
- [7] 侯化亭, 张丛志, 张佳宝, 等. 不同施肥水平及玉米种植对土壤微生物生物量碳氮的影响. 土壤, 2012, 44 (1): 163—166
Hou H T, Zhang C Z, Zhang J B, et al. Effects of fertilization and maize growing on soil microbial biomass carbon and nitrogen (In Chinese). Soils, 2012, 44 (1): 163—166
- [8] 肖伟伟, 范晓晖, 杨林章, 等. 长期定位施肥对潮土有机氮组分和有机碳的影响. 土壤学报, 2009, 46 (2): 274—280
Xiao W W, Fan X H, Yang L Z, et al. Effects of long-term fertilization on organic nitrogen fractions and organic carbon in fluvo-aquic soil (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2009, 46 (2): 274—280
- [9] 肖新, 朱伟, 肖靛, 等. 适宜的水氮处理提高稻基农田土壤酶活性和土壤微生物量碳氮. 农业工程学报, 2013, 29 (21): 91—98
Xiao X, Zhu W, Xiao L, et al. Suitable water and nitrogen treatment improves soil microbial biomass carbon and nitrogen and enzyme activities of paddy field (In Chinese). Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2013, 29 (21): 91—98
- [10] Zhong Y, Yan W M, Shanguan Z P. Impact of long-term N additions upon coupling between soil microbial community structure and activity, and nutrient-use efficiencies. Soil Biology & Biochemistry, 2015, 91: 151—159
- [11] Dong W Y, Zhang X Y, Dai X Q, et al. Changes in soil microbial community composition in response to fertilization of paddy soils in subtropical China. Applied Soil Ecology, 2014, 84: 140—147
- [12] Yuan H Z, Ge T, Zhou P, et al. Soil microbial biomass and bacterial and fungal community structures responses to long-term fertilization in paddy soils. Journal of Soils and Sediments, 2013, 13 (5): 877—886
- [13] Su J Q, Ding L J, Xue K, et al. Long-term balanced fertilization increases the soil microbial functional diversity in a phosphorus-limited paddy soil. Molecular Ecology, 2015, 24 (1): 136—150
- [14] Zhang D B, Yao P W, Zhao N, et al. Contribution of green manure legumes to nitrogen dynamics in traditional winter wheat cropping system in the Loess Plateau of China. European Journal of Agronomy, 2016, 72: 47—55
- [15] Gao S J, Zhang R G, Cao W D, et al. Long-term rice-rice-green manure rotation changing the microbial communities in typical red paddy soil in South China. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14 (12): 2512—2520
- [16] Liu Z P, Shao M A, Wang Y Q. Effect of environmental factors on regional soil organic carbon stocks across the Loess Plateau region, China. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2011, 142 (3): 184—194
- [17] 赵护兵, 王朝辉, 高亚军, 等. 陕西省农户小麦施肥调研评价. 植物营养与肥科学报, 2016, 22 (1): 245—253
Zhao H B, Wang Z H, Gao Y J, et al. Investigation and evaluation of household wheat fertilizer application in Shaanxi Province (In Chinese). Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2016, 22 (1): 245—253
- [18] 鲍士旦. 土壤农化分析. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000
Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis (In Chinese). 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000
- [19] Brookes P C, Kragt J F, Powlson D S, et al. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: the effects of fumigation time and temperature. Soil Biology & Biochemistry, 1985, 17 (6): 831—835
- [20] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology & Biochemistry, 1987, 19 (6): 703—707
- [21] 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研究. 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 (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2015, 35 (5): 1445—1451
- [22] 彭映平, 和文祥, 王紫泉, 等. 黄土高原旱区绿肥定位试验土壤化学性质及酶活性特征研究. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2015, 43 (9): 131—138, 149
Peng Y P, He W X, Wang Z Q, et al. Soil chemical properties and enzyme activities in long term green manure plot in Loess Plateau (In Chinese). Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2015, 43 (9): 131—138, 149
- [23] 王峥, 梁颖, 姚鹏伟, 等. 绿肥播前施肥和翻压方式对旱地麦田土壤水肥性状的影响. 干旱地区农业研究, 2014, 43 (3): 119—126
Wang Z, Liang Y, Yao P W, et al. Effects of fertilization before sowing of leguminous green manure

- and its incorporation methods on soil moisture and nutrient regime of wheat field in Weibei Dryland (In Chinese). *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2014, 43 (3): 119—126
- [24] 张成兰, 艾绍英, 杨少海, 等. 双季稻-绿肥种植系统下长期施肥对赤红壤性状的影响. *水土保持学报*, 2016, 30 (5): 184—189
Zhang C L, Ai S Y, Yang S H, et al. Effects of long-term fertilization on lateritic red soil traits in cropping-green manure planting system (In Chinese). *Journal of Soil and Water Conservation*, 2016, 30 (5): 184—189
- [25] 高菊生, 曹卫东, 李冬初, 等. 长期双季稻绿肥轮作对水稻产量及稻田土壤有机质的影响. *生态学报*, 2011, 31 (16): 4542—4548
Gao J S, Cao W D, Li D C, et al. Effects of long-term double-rice and green manure rotation on rice yield and soil organic matter in paddy field (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31 (16): 4542—4548
- [26] 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. *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 cropping rotation on rice yield and soil fertility (In Chinese). *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39 (2): 343—349
- [27] 胡晓珊, 唐树梅, 曹卫东, 等. 温室夏闲季种植翻压绿肥对土壤可溶性有机碳氮及无机氮的影响. *中国土壤与肥料*, 2015 (3): 21—28
Hu X S, Tang S M, Cao W D, et al. Effects of plantation and utilization of green manures during the summer fallow season on soil dissolved organic carbon and nitrogen, and inorganic nitrogen in greenhouse (In Chinese). *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2015 (3): 21—28
- [28] Coolon J D, Jones K L, Todd T C, et al. Long-term nitrogen amendment alters the diversity and assemblage of soil bacterial communities in tallgrass prairie. *PLoS ONE*, 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0067884
- [29] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35 (3): 453—461
- [30] Shi P, Wang S P, Jia S G, et al. Effect of 25-year fertilization on soil microbial biomass and community structure in a continuous corn cropping system. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2015, 61 (9): 1303—1317
- [31] Wang J, Bao J, Su J, et al. Impact of inorganic nitrogen additions on microbes in biological soil crusts. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 88: 303—313
- [32] Koyama A, Wallenstein M D, Simpson R T, et al. Soil bacterial community composition altered by increased nutrient availability in Arctic tundra soils. *Frontiers in Microbiology*, 2014, DOI: 10.3389/fmicb.2014.00516
- [33] Zhou J, Guan D W, Zhou B K, et al. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 90: 42—51
- [34] 彭映平. 绿肥-小麦轮作及不同施氮量下土壤生物学特征研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2014
Peng Y P. Study on soil biological properties of green manure-wheat rotation and nitrogen rate (In Chinese). Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2014
- [35] 倡国涵, 王瑞, 袁家富, 等. 绿肥与化肥配施对植烟土壤微生物群落的影响. *土壤*, 2013, 45 (6): 1070—1075
Si G H, Wang R, Yuan J F, et al. Effects of green manure application combined with chemical fertilizers on soil microbial community structure of tobacco-planting soil (In Chinese). *Soils*, 2013, 45 (6): 1070—1075
- [36] 张超, 朱三荣, 田峰, 等. 不同绿肥对湘西烟田土壤细菌群落结构与多样性的影响. *贵州农业科学*, 2016, 44 (5): 43—46
Zhang C, Zhu S R, Tian F, et al. Effects of different green manure on bacterial community structure and diversity in tobacco-planting field in Xiangxi (In Chinese). *Guizhou Agricultural Sciences*, 2016, 44 (5): 43—46
- [37] 李晓慧. 不同作物与施肥对黑土氨氧化微生物的影响. 北京: 中国科学院大学, 2013
Li X H. Impact of different crops and fertilization on ammonia oxidizing bacteria and archaea in black soil (In Chinese). Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013
- [38] 卞碧云. 氮肥用量对设施栽培蔬菜土壤氨氧化微生物及氨氧化作用的影响. 南京: 南京师范大学, 2013
Bian B Y. Effects of nitrogen fertilizer application on ammonia-oxidizing microorganisms and ammonia oxidation in a greenhouse vegetable soil (In Chinese). Nanjing: Nanjing Normal University, 2013
- [39] 袁秀梅. 蚕豆绿肥对紫色土氮素转化及春玉米氮素利用的研究. 重庆: 西南大学, 2016
Yuan X M. Research of green manure of *Vicia faba* L. (Faba bean) on nitrogen transformation and nitrogen utilization of spring maize in purple soil (In Chinese). Chongqing: Southwest University, 2016

Effects of Chemical Nitrogen Fertilizer and Green Manure on Diversity and Functions of Soil Bacteria in Wheat Field

BAO Ming HE Hongxia MA Xiaolong WANG Zhaohui QIU Weihong[†]

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

Abstract 【Objective】 Application of chemical nitrogen fertilizer and green manure is one of the important measures to improve crop yield and soil quality, but it also affects the soil bacterial community and its function, and thereby alters soil nutrient circulation. At present, there are few reports on whether long-term application of fertilizer nitrogen and green manure can improve diversity and functions of the soil microbia in the dryland soils. It is, therefore, of great significance to explore effects of application of chemical nitrogen fertilizer and green manure on the soil bacterial community and its functions. 【Method】 An eight-year-old winter wheat field experiment, designed to have three treatments: i.e. Treatment CK (control applied, with P_2O_5 105 kg $hm^{-2} a^{-1}$), Treatment FP (applied with P_2O_5 105 kg $hm^{-2} a^{-1}$, N150 kg $hm^{-2} a^{-1}$) and Treatment FGM (applied with P_2O_5 105 kg $hm^{-2} a^{-1}$, N 150 kg $hm^{-2} a^{-1}$, plus green manure), laid out in a randomized block design, was carried out in Shaanxi Province, China. Soil samples were collected September 2016 for analysis of soil biochemical properties (pH, nitrate N, ammonium nitrogen, soil organic carbon (SOC), microbial biomass carbon (MBC), microbial biomass nitrogen (MBN), dissolved organic carbon (DOC) and dissolved organic nitrogen (DON)). The high throughput sequencing technique was used to determine 16S rRNA gene sequence in V4 zone of the soil bacteria, and in the end soil microbial community and its functions in the soil were analyzed. 【Result】 Results show that Treatment FP was 8.0% higher in SOC than CK, while Treatment FGM was 20.0% higher in SOC, 62.2% higher in MBC, 35.9% higher in MBN, 7.27% higher in DOC and 56.3% higher in DON. The average OTUs number of the three treatments was 3 792, and no significant difference was observed between the treatments in Chao1 index and Shannon index. In the soil bacterial community Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes and Proteobacteria were dominant groups, regardless of treatments. However, at the genus level, Treatment FP was significantly lower than CK in abundances of *Pseudoduganella*, *Steroidobacter*, *Adhaeribacter*, *Nordella* and *Ralstonia*, while Treatment FGM was lower only in abundance of *Lactobacillus* but higher in abundance of *Steroidobacter*, *Chryseolinea*, *Lentzea* and *Chitinophaga*. Bacterial function prediction using FAPROTAX centered mainly on chemoheterotrophy, nitrification, ammonia oxidation, nitrite oxidation, and nitrate reduction, while the prediction using Tax4Fun did mainly on carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, membrane transport, signal transduction and energy metabolism. The three treatments did not vary much in functional fractionation. 【Conclusion】 All the findings in this experiment suggest that Treatment FP and Treatment FGM do not have much effects on bacterial richness, diversity and functions, while they do increase soil fertility, i.e. SOC, DOC and DON, by a certain degree.

Key words Green manure; Bacterial community structure; α diversity; Loess Plateau

(责任编辑：卢 萍)