

DOI: 10.19741/j.issn.1673-4831.2020.0807

高威,王连峰,贾仲君.长期不同施肥模式对农田黑土微生物群落构建的影响[J].生态与农村环境学报,2021,37(11):1437-1448.

GAO Wei, WANG Lian-feng, JIA Zhong-jun. Changes in Community Assembly of Microbiomes in Black Soil under Distinct Scenarios of Long-term Field Fertilization[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2021, 37(11): 1437-1448.

长期不同施肥模式对农田黑土微生物群落构建的影响

高威^{1,2,3}, 王连峰⁴, 贾仲君^{1①} (1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008; 2. 中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态重点实验室, 湖南 长沙 410125; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 大连交通大学环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116028)

摘要: 高强度集约化农业管理模式影响土壤微生物区系及其功能。围绕我国典型黑土生态环境重点野外科学观测试验站 36 年的长期不同施肥管理土壤: 不施肥 (CK)、单施化肥 (NPK)、单施有机肥 (OM) 和有机-无机肥配施 (MNPK), 研究了土壤肥力和微生物呼吸, 并通过高通量测序技术和微生物群落构建模型探讨了长期不同施肥模式对土壤功能微生物演替的环境驱动机制。结果表明: 长期施肥提升了土壤肥力, 如土壤有机碳、全氮、有效磷含量以及微生物活性。不同施肥管理模式土壤微生物呼吸活性存在显著差异, 由大到小依次为 MNPK、OM、NPK 和 CK。与 CK (以 C 计, $186.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 相比, MNPK 处理土壤微生物呼吸 (以 C 计, $228.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 增幅高达 22.4%。差异物种分析 (LEfSe) 表明, NPK 和 MNPK 处理具有相似的指示物种, 主要为 *Dyella marensis*、*Bacillus megaterium* 和 *Herbaspirillum* sp., OM 处理则主要包括 *Bacillus acidicer* 和 *Bacillus megaterium*。长期施肥刺激了氨氧化细菌 (*Nitrosospora*) 生长, NPK 处理氨氧化细菌丰度增加 3.61 倍, 而黑土中氨氧化古菌和亚硝酸盐氧化细菌的优势类群分别为 *Nitrososphaera* 和 *Nitrospira*。微生物共存网络分析表明, MNPK 处理土壤微生物的关联度最为紧密, 其正向网络关联度占比高达 99.6%, 显著高于 NPK 处理的 78.4% 和 OM 处理的 97.4%。 β NTI 分析表明, 长期施肥导致微生物类群定向富集而强化了群落组装的确定性过程, 且 MNPK 处理确定性过程占比最高。结构方程模型 (SEMs) 进一步分析表明, 长期施肥模式土壤肥力提升与微生物区系活性呈显著正相关, 其解释度 >90%。上述结果表明, 长期施肥显著刺激功能菌生长, 改变土壤微生物区系, 提升土壤肥力, 且 MNPK 处理对土壤肥力及其功能稳定性的提升, 明显优于 NPK 和 OM 处理。研究结果可为确立更为完善的农田黑土施肥管理制度提供科学依据。

关键词: 黑土; 长期施肥; 高通量测序; 微生物群落构建; 关键微生物功能群

中图分类号: S154 文献标志码: A 文章编号: 1673-4831(2021)11-1437-12

Changes in Community Assembly of Microbiomes in Black Soil under Distinct Scenarios of Long-term Field Fertilization. GAO Wei^{1,2,3}, WANG Lian-feng⁴, JIA Zhong-jun^{1①} (1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. School of Environmental and Chemical Engineering, Dalian Jiaotong University, Dalian 116028, China)

Abstract: Intensive agricultural management is influential to soil microbiome and its functions. Based on a 36-year fertilization experiment at the Ministry of Agriculture Key Field Observation Station of Harbin Black Soil Ecological Environment, effects of four fertilization managements (CK: no fertilizer; NPK: mineral fertilizer; OM: organic fertilizer; MNPK: mineral NPK plus organic fertilizer) on soil fertility and microbial respiration were quantitatively studied, and microbial community assembly mechanisms were analyzed using the high-throughput sequencing and community assembly models. Results show that long-term fertilization improved soil fertility, such as soil organic carbon, total nitrogen, available phosphorus and microbial activity. Soil microbial respiration was increased in the order of CK < NPK < OM < MNPK. Compared with CK (calculated in carbon, $186.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), soil microbial respiration in MNPK (calculated in carbon, $228.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) was increased by 22.4%. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) indicates that NPK and MNPK treatments

收稿日期: 2020-09-27

基金项目: 国家自然科学基金 (41530857, 41471205)

① 通信作者 E-mail: jia@issas.ac.cn

had similar keystones including *Dyella marenensis*, *Bacillus megaterium* and *Herbaspirillum* sp., while OM was predominated by *Bacillus acidiceler* and *Bacillus megaterium*. As compared with CK, long-term fertilization stimulated the growth of ammonia oxidizing bacteria (AOB) with the *Nitrosospira*-like AOB increased by 3.61 times in NPK treatment. The dominant phylotypes of ammonia oxidizing archaea (AOA) and nitrite oxidizing bacteria (NOB) were *Nitrososphaera* and *Nitrosospira*, respectively. The co-occurrence network analysis revealed that soil microbial community in MNPK had the most closely links, with the proportion of positive links reached 99.6% versus 78.4% in NPK and 97.4% in OM. The analysis of β NTI indicates that long-term fertilization strengthened the deterministic processes of microbial community assembly, with the strongest determinism occurred in MNPK. Structural equation models (SEMs) further suggest strongly positive correlations between soil fertility improvement and microbial respiration (explaining > 90% of variation) among fertilization managements. This study demonstrates that long-term fertilization significantly stimulated the growth of functional microbiomes, altered community structure and improved soil fertility. Compared with NPK and OM, MNPK treatment was more efficient in enhancing soil fertility and stability of microbial community. As a whole, these results provide scientific basis for optimizing the efficient fertilization managements in black soils.

Key words: black soil; long-term fertilization; high-throughput sequencing; community assembly; keystone phylotypes

《东北黑土地白皮书(2020)》显示,东北黑土区总面积为 109 万 km²,是我国重要的商品粮生产基地,贡献了我国粮食总产量的1/4。黑土被认为是所有土壤分类中最肥沃的土类。然而,过去几十年,不良的农田施肥管理模式导致黑土质量退化严重^[1]。长期过度施用化肥引起土壤板结、土壤酸化、养分利用率低和环境污染等问题,导致黑土质量大幅度下降^[1-2]。因此,如何保护“耕地中的大熊猫”,实现黑土质量可持续已成为当前热点研究课题之一^[3]。越来越多的研究表明,有机物料添加,如农家有机肥、秸秆等,具有替代工业化肥的巨大潜力^[4-5]。针对全球 690 个不同试验的荟萃分析发现,与单施化肥相比,施用有机肥可显著提升 27% 的作物产量,土壤有机碳提升幅度更大,高达 38%^[6]。而无机化肥-有机肥配施的平衡施肥管理模式不仅可以快速提升土壤肥力,增加作物产量,还可以缓解单施化肥对土壤质量和生态环境造成的危害^[7]。人们在重视不同施肥管理模式下土壤物理和化学性质演替的同时,长期施肥对土壤生物学性质影响的研究也在不断深入。例如,针对新西兰 606 个样点 3 000 多个土壤样品细菌群落的结果表明,通过微生物群落组成的变化可以预测不同土地的利用情况,预测准确率高达 85%^[8]。土壤微生物作为生态系统最敏感的指标,参与了土壤质量演替的全过程。因此,阐明不同施肥管理模式下土壤微生物群落构建差异,对于预测土壤演替方向和优化施肥管理具有参考价值。

不同施肥模式下土壤微生物群落构建过程也可能遵循了生态学理论。然而,已有的生态学理论主要来自于动物和植物宏观生态学,经典生态学理论在微生物群落构建过程中的作用尚不清楚^[9]。

例如,确定性和随机性过程被认为是动植物地理分异规律的重要驱动力,但在土壤微生物群落构建方面的上述相关研究仅有少量报道^[10]。确定性过程包括非生物和生物因素的生态选择,这些因素影响微生物的适应性,从而决定微生物群落组成和丰度^[11]。相反,随机性过程涉及不可预测的扰动以及微生物随机的出生、死亡和扩散过程^[12]。近年来,随着统计技术的发展,研究确定性和随机性过程的相对贡献成为研究热点^[10,13]。最新的微生物群落构建模型主要通过 β MNTD 和 β NTI 来表征。例如, β NTI 用于比较在经历 105 年演替后土壤确定性和随机性过程的变化,研究发现确定性过程主导了土壤生态系统的转变过程,且高有机碳周转则被认为是驱动土壤微生物群落构建的关键因子^[10]。而针对不同空间尺度微生物群落的构建研究也发现,小空间尺度由于具有高度相似的管理模式从而导致较强的确定性过程^[14]。然而,东北黑土较其他土壤类型更加复杂,且长期不同施肥模式下外源输入物料类型显著不同。因此,在田块尺度下,农田黑土微生物群落构建对于长期不同施肥模式是如何响应的,目前并不清楚。

据此,该研究以揭示长期不同施肥模式对农田黑土微生物群落构建的影响机制为目标,依托农业农村部哈尔滨黑土生态环境重点野外科学观测试验站的长期定位试验平台,选择代表性的 4 种施肥管理模式农田土壤,通过实时荧光定量 PCR 和 16S rRNA 基因高通量测序技术,阐明长期不同施肥管理模式土壤微生物数量和丰度的变化规律。利用微生物生态网络和群落构建模型 β NTI,解析长期不同施肥管理模式土壤微生物群落构建规律。通过差异物种分析(linear discriminant analysis effect

size, LEfSe), 明确长期不同施肥管理模式土壤关键微生物功能群。通过结构方程模型 (structural equation model, SEM) 将土壤理化性质、关键微生物功能群和微生物群落构建过程联系起来, 揭示长期不同施肥管理模式对农田黑土微生物群落构建机制。研究结果可为确立完善的农田黑土施肥管理制度和助力黑土可持续健康发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品概况

研究区位于农业农村部哈尔滨黑土生态环境重点野外科学观测试验站 (45°40' N, 126°35' E), 年均气温为 4~5 °C, 年最高气温为 34 °C, 年最低气温为 -35 °C, 年降水量为 450~650 mm。试验于 1979 年设置, 1980 年开始进行小麦-大豆-玉米轮作。试验区土壤类型为黑土, 由第四纪黄土状沉积物发育形成。选取代表性的 4 个试验处理进行土壤样品分析, 即: (1) 长期不施肥 (CK); (2) 单施化肥 (NPK); (3) 单施有机肥 (OM); (4) 化肥-有机肥配施 (MNPK)。在施肥量上, 小麦和玉米为 N 150 kg · hm⁻², P₂O₅ 75 kg · hm⁻², K₂O 75 kg · hm⁻²; 大豆为 N 75 kg · hm⁻², P₂O₅ 150 kg · hm⁻², K₂O 75 kg · hm⁻²; 有机肥为纯马粪, 按氮量 75 kg · hm⁻² (马粪约 18 600 kg · hm⁻²) 施用。土壤样品采集于 2015 年小麦收获季, 每个处理随机选取 6 个采样点, 采集 0~20 cm 新鲜土壤, 去除细根及杂物, 研磨并过 2 mm 孔径筛, 保存在 4 °C 冰箱中待用。

1.2 土壤理化性质的测定

土壤理化性质用来表征不同施肥处理黑土养分的变化情况。主要理化指标包括: 土壤田间持水量 (SWHC)、土壤 pH、土壤总有机碳 (SOC)、土壤全氮 (TN)、铵态氮 (NH₄⁺)、硝态氮 (NO₃⁻) 和有效磷 (AP)。所用测定方法参见文献 [15-16]。SWHC 测定采用环刀法; 土壤 pH 测定采用 pH 计, V(水): m(土) = 2.5: 1; SOC 测定采用燃烧法; 土壤 TN 测定采用碳氮元素分析仪 (Vario Max CN, Germany); 土壤 NH₄⁺ 和 NO₃⁻ 测定采用 2 mol · L⁻¹ KCl 浸提后用流动分析仪 Skalar (San ++ System, Netherlands) 测定。土壤 AP 通过 0.3 mol · L⁻¹ 盐酸氟化氢铵提取, 采用经典的 Bray 法测定。

1.3 土壤微生物呼吸活性的测定

利用土壤 CO₂ 排放通量变化表征土壤微生物呼吸活性。具体操作如下: 对于 4 种处理, 每种处理设置 6 个重复, 每个重复称取 6 g 相当于干土的新鲜土壤均匀平铺于 120 mL 血清培养瓶底部, 调节土壤

含水量至 40% 土壤田间持水量, 预培养 24 h。预培养结束后, 调节土壤含水量至 60% 土壤田间持水量, 通过高纯氩气反复冲刷培养瓶 2 min 后, 注入高纯空气, 28 °C 恒温密封避光培养 14 d。培养 0、1、4、7、10 和 14 d 时动态监测培养瓶顶空气中 CO₂ 浓度, 随后立即置换高纯空气。CO₂ 浓度采用气相色谱仪 (Agilent 7890, USA) 测定。CO₂ 累积排放量计算公式为

$$F = \Delta C \times V \times \rho / m \times 273 / T。 \quad (1)$$

式(1)中, F 为 CO₂ 累积排放量, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; ΔC 为 CO₂ 浓度变化量, 10⁻⁶; V 为培养瓶体积, L; ρ 为标准状态下 CO₂ 密度, g · L⁻¹; m 为干土质量, g; T 为培养温度, K。

1.4 土壤总 DNA 提取、实时荧光定量 PCR 和 Miseq 高通量测序

土壤微生物总 DNA 采用 FastDNA Spin Kit for Soil (MP Bio, 美国) 试剂盒提取, 具体操作参考试剂盒使用指南。土壤 DNA 质量和纯度采用微量紫外分光光度计 (NanoDrop ND-1000, USA) 测定。提取的土壤 DNA 保存于 -20 °C 条件下待用。采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 测定 16S rRNA 基因拷贝数以表征土壤细菌数量。16S rRNA 基因定量的通用引物为 515F/907R^[17]。利用 *nifH* 基因拷贝数表征功能固氮菌数量, *nifH* 基因定量的通用引物为 polF/polR^[18]。具体操作参见文献 [16], 16S rRNA 基因和 *nifH* 基因的扩增效率分别为 97.2% 和 99.3%。进一步通过 16S rRNA 基因的 Miseq 高通量测序分析土壤微生物群落结构。16S rRNA 基因 V4-V5 区扩增通用引物为 515F/907R^[17]。50 μL PCR 反应体系包括: 25 μL SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa)、1 μL 正反向引物 (50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、2.5 μL DNA 模板以及 20.5 μL 无菌双蒸水。反应条件: 95 °C 条件下预变性 3 min; 95 °C 条件下变性 30 s, 55 °C 条件下退火 30 s, 72 °C 条件下延伸 45 s, 30 个循环; 72 °C 条件下延伸 10 min。获得 16S rRNA 基因的扩增产物后, 利用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 试剂盒 (TaKaRa Biotech, Dalian, China) 进行切胶纯化, 并将纯化产物溶于无菌双蒸水中。测定浓度后进行等质量混合, 最后进行建库测序。建库试剂盒为 VAHTSTM Nano DNA Library Prep Kit for Illumina[®], 测序试剂盒为 MiSeq Reagent Kit v3。所有 24 个样本 Miseq 高通量测序原始数据均提交到 NCBI 网站的 SRA 数据库, 检索号为 SRP282507 (SRR12648880-SRR12648903)。

1.5 高通量测序数据分析和关键微生物功能群鉴定

高通量测序数据分析主要借助 QIIME 软件完成,分析步骤参见文献[16]。具体地,首先通过“join_paired_ends.py”指令合并双端测序文件,通过“extract_barcode.py”指令去除测序接头。然后,去除序列片段长度<200 bp、质量控制参考值<25、无法匹配的低质量序列,并通过 USEARCH61 去除嵌合体,共计获得 495 169 条高质量序列。所有高质量序列进一步通过 UCLUST 算法以 97% 的相似度聚类成 OTU。最后,与 RDP 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu>) 进行比对,得到每个样品的物种组成。

微生物多样性主要通过 Alpha 和 Beta 多样性指数构建。进行多样性分析之前,先通过 goods coverage 指数 (0.976~0.988) 评估微生物多样性覆盖度,并通过稀释曲线 Rarefaction curves 验证测序深度。Alpha 多样性指数包括 Chao1 指数 (丰富度) 和 Shannon 指数 (均匀度) 等,通过“collate alpha”指令完成。Beta 多样性通过 PCoA (principal co-ordinates analysis) 反映微生物群落组成的变化情况,PCoA 计算通过 R 语言 Vegan 软件包完成。

将关键微生物功能群 (keystone phylotypes) 作如下定义:在 OTU 分类水平上,与不施肥 (CK) 处理相比,长期不同施肥管理模式下土壤微生物丰度发生显著增加的生物标志物 (biomarker)。这部分微生物被认为在长期土壤培肥过程中发挥了重要作用。关键微生物功能群的鉴定采用经典的差异物种分析方法,具体步骤参考 Galaxy 在线分析平台 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>)。

1.6 微生物分子生态网络构建、群落构建分析和结构方程模型构建

生态网络构建:首先,剔除微生物类群 (OTUs) 丰度低于 0.1/100 的低丰度类群,并利用 R 语言的 corr.test 函数计算 OTUs 之间的 Spearman 相关系数,得到相关性系数矩阵和 P 值矩阵,Spearman 相关系数和 P 值的阈值分别设定为 0.7 和 0.05。然后,通过 Gephi 软件构建关联网。网络中每一个节点 (node) 代表一个 OTU,各节点间的连接线 (edge) 代表各菌群之间的相关性。最后,通过 Gephi 软件中的 Analyzer 工具计算生态网络的节点数、连接数、网络密度、聚类系数、度等网络拓扑结构。

微生物群落构建过程:主要通过基于零模型的微生物群落构建参数 β NTI 来表征确定性过程和随

机性过程的相对贡献,具体分析参见文献[10,16]。简要来说,当 β NTI>2 和 β NTI<-2 时,分别表示确定性过程的异质性选择和同质性选择占主导,而 $|\beta$ NTI|<2 表示随机性过程占主导。为了进一步区分不同随机性过程的相对贡献,引入 RC_{bray} 。当 $|\beta$ NTI|<2 且 $RC_{bray}<-0.95$ 时,表示随机性过程的内质化扩散占主导;当 $|\beta$ NTI|<2 且 $RC_{bray}>0.95$ 时,表示随机性过程的扩散限制占主导。

结构方程模型构建:结构方程模型的基本假设为长期施肥直接或者间接改变了土壤养分状况和微生物群落构建过程,进而提升了土壤有机碳含量。该模型中,土壤呼吸通过土壤 CO_2 排放量来表征,群落组成通过 PCoA1 来表征,多样性通过 Shannon 指数来表征。

1.7 统计分析

数据处理采用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 22.0 完成。理化参数处理之间的差异采用 SPSS 22.0 软件包完成 (SPSS Inc., Cary, NC, USA), $P<0.05$ 表示差异显著。微生物类群差异通过 LEfSe 分析完成。采用 Heml 软件绘制 Heatmaps,采用 Origin 软件 (OriginPro 2016, USA) 绘制其他图表。采用 SPSS AMOS 21.0 软件分析构建 SEM。

2 结果与分析

2.1 不同施肥管理模式黑土主要性状的演替规律

表 1 显示,长期不同施肥管理均显著提升 SOC 含量。土壤 TN 含量也呈类似变化趋势。与 CK 相比,MNPK 处理土壤 TN 含量增幅最大,为 33.1%,而 NPK 和 OM 处理则分别增加 15.4% 和 7.7%。土壤 NH_4^+ 、 NO_3^- 和 AP 含量均呈类似变化规律。与 CK 相比,MNPK 处理 NO_3^- 和 AP 含量分别增加 8.43 和 8.48 倍。值得注意的是,长期施用 NPK 导致土壤出现一定程度的酸化,NPK 处理土壤 pH 显著低于 CK 处理,而长期施用 MNPK 则在一定程度上缓解了土壤 pH 的下降。此外,MNPK 处理土壤持水性能也发生显著提升。

土壤微生物数量是表征土壤肥力状况的重要生物学指标。基于 16S rRNA 基因的 qPCR 分析表明,长期施肥管理显著增加土壤微生物数量 (表 1)。与 CK 相比,NPK、OM 和 MNPK 处理 16S rRNA 基因拷贝数增幅分别达 5.81%、24.4% 和 8.14%。就功能固氮类群而言,长期施用 OM 和 MNPK 导致土壤 *nifH* 固氮基因数量显著升高,而 NPK 处理 *nifH* 基因数量有所降低。同时,长期施肥管理显著影响微生物多样性。施用 NPK 导致土壤微生物多样性显著

降低。与 CK 相比, NPK 处理微生物 Chao1 指数降低 16.1%, 而 MNPk 处理 Chao1 指数降幅有所减缓, 为 14.0%。上述结果表明, 长期施用有机-无机

肥的平衡施肥管理模式(MNPk)不仅可以提升土壤肥力, 而且在一定程度上减缓了单施化肥对土壤功能微生物数量和多样性的危害。

表 1 长期不同施肥管理黑土基本理化 and 微生物性质

Table 1 Physicochemical and microbial properties of black soil under different fertilization managements

处理	田间持水量/ %	pH(H ₂ O)	w(SOC)/ (g · kg ⁻¹)	w(TN)/ (g · kg ⁻¹)	w(NH ₄ ⁺)/ (mg · kg ⁻¹)	w(NO ₃ ⁻)/ (mg · kg ⁻¹)
CK	39.8±1.4 ^c	6.2±0.1 ^a	16.2±0.2 ^d	1.30±0.02 ^d	48.3±2.0 ^c	11.1±0.5 ^d
NPK	40.7±0.8 ^c	5.6±0.2 ^c	17.4±0.2 ^c	1.50±0.05 ^b	67.0±2.5 ^a	51.0±1.1 ^b
OM	44.3±0.5 ^a	6.0±0.2 ^a	18.6±0.1 ^b	1.40±0.02 ^c	54.8±3.9 ^b	22.3±2.0 ^c
MNPk	42.0±0.9 ^b	5.8±0.1 ^b	19.2±0.1 ^a	1.73±0.01 ^a	69.9±0.8 ^a	104.7±2.2 ^a

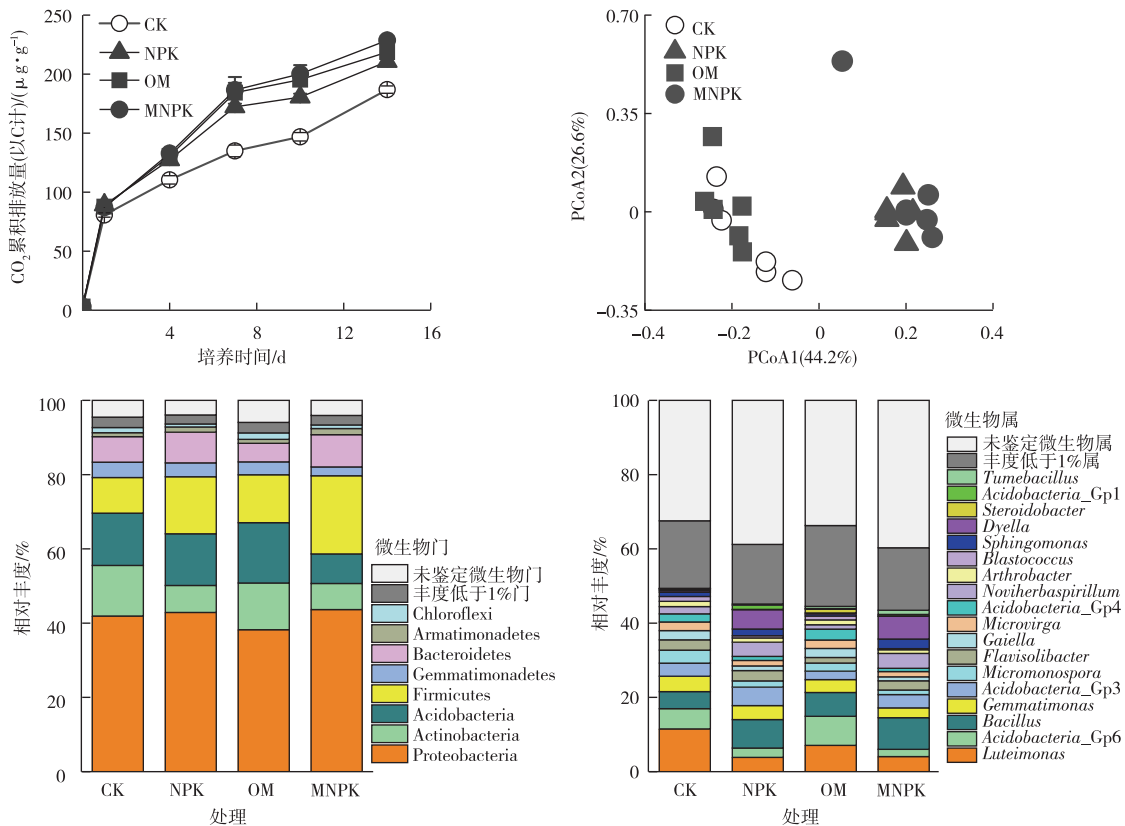
处理	w(AP)/ (mg · kg ⁻¹)	C/N 比值	16S rRNA 基因拷贝数/ (10 ⁹ copies · g ⁻¹)	nifH 基因拷贝数/ (10 ⁷ copies · g ⁻¹)	Chao1 指数	Shannon 指数
CK	6.3±0.5 ^d	12.5±0.3 ^b	8.6±0.3 ^c	9.5±0.8 ^c	1 467±98 ^a	7.0±0.3 ^b
NPK	31.1±2.3 ^b	11.6±0.4 ^c	9.1±0.1 ^{bc}	9.1±0.6 ^c	1 231±55 ^b	6.8±0.2 ^{bc}
OM	10.8±0.4 ^c	13.3±0.2 ^a	10.7±0.8 ^a	24.5±2.1 ^a	1 586±190 ^a	7.5±0.1 ^a
MNPk	59.7±3.7 ^a	11.1±0.0 ^d	9.3±0.2 ^b	11.1±0.6 ^b	1 262±142 ^b	6.6±0.3 ^c

平均值±标准差(n=6); 同一列数据后英文小写字母不同表示处理间某指标差异显著(P<0.05)。

2.2 长期不同施肥管理模式对黑土微生物呼吸性和群落组成的影响

土壤微生物呼吸是表征土壤微生物活性的重要参数, 对于指示土壤有机碳周转具有重要参考意

义。土壤 CO₂ 动态监测结果表明, 长期不同施肥管理均显著提升土壤微生物基础呼吸, 且有机-无机肥配施的平衡施肥管理模式下土壤微生物呼吸活性最强(图 1)。



CK 为不施肥, NPK 为单施化肥, OM 为单施有机肥, MNPk 为有机-无机肥配施。

图 1 长期不同施肥管理土壤 CO₂ 累积排放量、微生物群落结构及优势微生物门和属

Fig. 1 Changes of CO₂ cumulative emissions, β-diversity by principal co-ordinates analysis, and predominant phylotypes at phylum and genus level of black soil under different fertilization managements

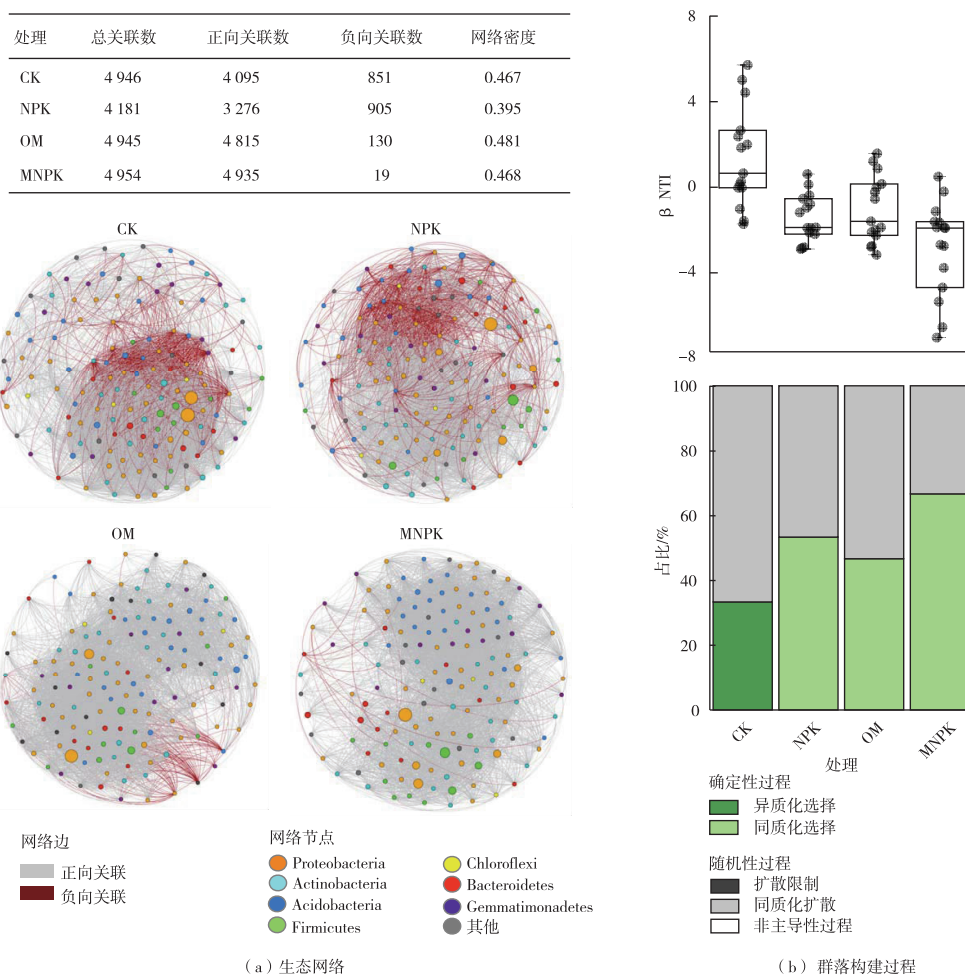
动态监测 14 d, CK 土壤 CO₂ 累积排放量(以 C 计)为 186.9 μg · g⁻¹, NPK、OM 和 MNPK 处理分别为 210.6、218.7 和 228.7 μg · g⁻¹, 增幅分别为 12.7%、17.0%和 22.4%。不同施肥管理土壤微生物呼吸活性由低到高依次为 CK<NPK<OM<MNPK。

基于 16S rRNA 基因高通量测序分析表明, 长期施肥管理导致土壤微生物群落结构发生明显分异。CK 与 OM 处理土壤微生物群落表现出一定的相似性, 而长期 NPK 和 MNPK 施肥则显著改变微生物群落结构(图 1)。在微生物分类门水平上, CK 优势微生物门为变形菌门(*Proteobacteria*, 41.9%)和酸杆菌门(*Acidobacteria*, 14.1%), OM 处理也为变形菌门(38.2%)和酸杆菌门(16.3%), 而 NPK 处理为变形菌门(42.9%)和厚壁菌门(*Firmicutes*, 15.4%), MNPK 处理为变形菌门(43.7%)和厚壁菌门(21.1%)。在微生物分类属水平上, 这种趋势更

加明显。CK 优势微生物属为藤黄单孢菌属(*Luteimonas*, 11.5%)、酸杆菌 Gp6 (*Acidobacteria_Gp6*, 5.4%)和芽孢杆菌属(*Bacillus*, 4.6%), OM 处理为藤黄单孢菌属(7.1%)、酸杆菌 Gp6(7.8%)和芽孢杆菌属(6.4%), 而 NPK 处理为芽孢杆菌属(7.1%)、戴氏菌属(*Dyella*, 7.8%)和酸杆菌 Gp3 (*Acidobacteria_Gp3*, 6.4%), MNPK 处理为芽孢杆菌属(8.5%)和戴氏菌属(6.1%)。

2.3 长期不同施肥管理模式对黑土微生物生态网络特征和群落构建过程的影响

微生物生态网络对于解释物种共存和维持物种多样性至关重要。结果表明, 长期 NPK 施肥管理导致微生物网络关联更松散, 且微生物类群间正向网络关联度显著降低, 而长期施用 OM, 尤其是施用 MNPK 导致土壤微生物网络关联度更紧密, 且微生物类群间正向网络关联度明显提升[图 2(a)]。



CK 为不施肥, NPK 为单施化肥, OM 为单施有机肥, MNPK 为有机-无机肥配施。

图 2 长期不同施肥管理土壤微生物生态网络和微生物群落构建过程

Fig. 2 The network analysis showing the co-occurrence patterns, and the β NTI analysis showing the community assembly processes of black soil under different fertilization managements

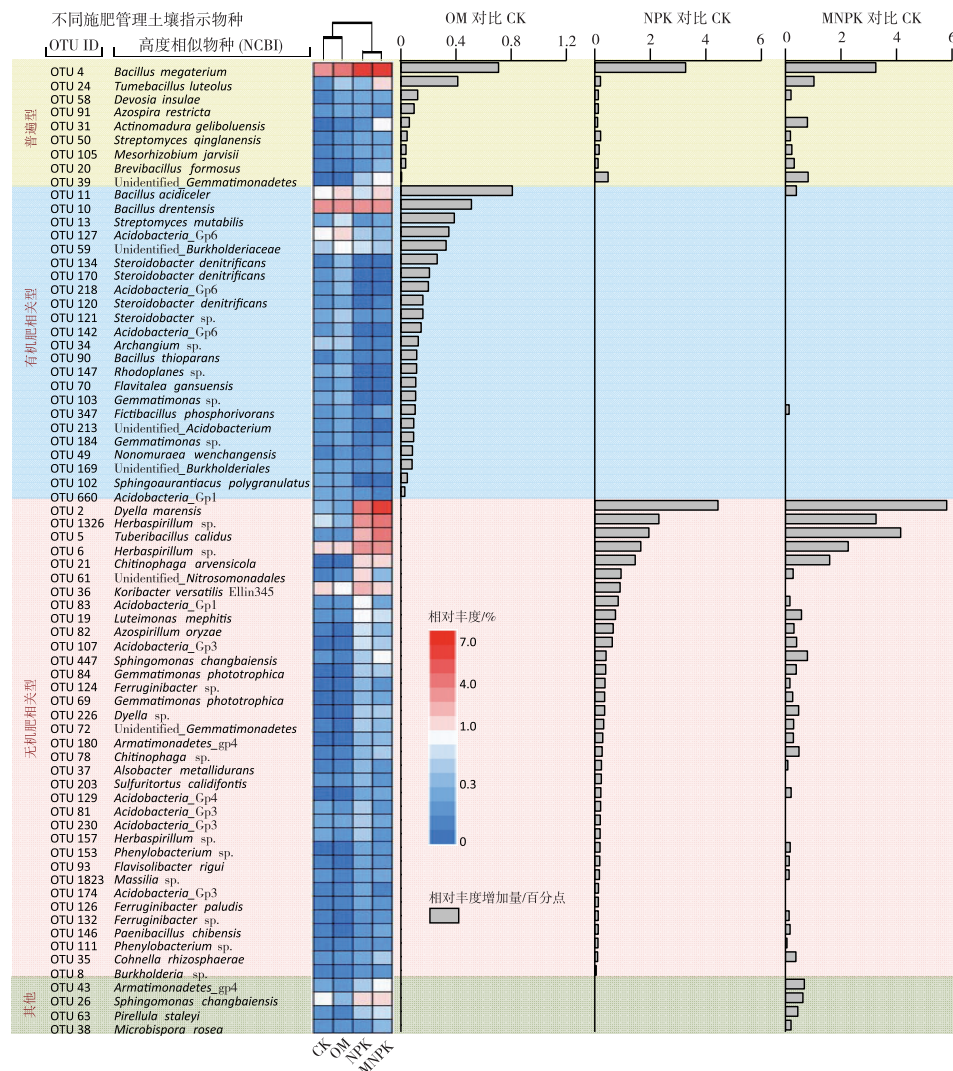
CK 处理共发现 4 946 条共存网络关联曲线, 其中, 正向关联网络占比为 82. 8%, 而 NPK 处理正向关联网络占比仅为 78. 4% (3 276/4 181)。相比较而言, OM 处理正向关联网络有所增加, 为 97. 4% (4 815/4 945), 而 MNPK 处理正向关联网络占比最高, 达 99. 6% (4 935/4 954)。这表明长期有机-无机肥平衡施肥管理模式有助于土壤微生物共存, 对于土壤功能的维持和稳定具有重要意义。

图 2(b) 表明, 长期施肥管理导致土壤微生物群落构建确定性过程占比增加, 主要为同质化选择的确定性过程。CK 处理确定性过程占比为 33. 3%,

而 NPK 处理确定性过程占比显著增加, 为 53. 3%, 且由 CK 处理的异质化选择过程转变为 NPK 处理的同质化选择过程。类似地, OM 处理同质化选择过程占比为 46. 7%, 而长期 MNPK 施肥管理导致土壤微生物群落构建确定性过程显著增强, 其同质化选择过程占比高达 66. 7%。上述结果表明, 长期施肥管理导致微生物类群定向富集, 并构建了稳定的土壤微生物区系。

2.4 不同施肥模式黑土关键微生物功能群分析

长期不同施肥管理土壤关键微生物功能群鉴定结果见图 3。



CK 为不施肥, OM 为单施有机肥, NPK 为单施化肥, MNPK 为有机-无机肥配施。

热图表示土壤指示物种相对丰度; 柱子长短表示与 CK 相比, 不同施肥管理土壤指示物种丰度的增加量。

图 3 长期不同施肥管理土壤关键微生物功能群的鉴定

Fig. 3 Taxonomic identities of soil biomarkers associated with different fertilization managements

通过经典的差异物种分析方法, 进一步明确不同施肥管理模式下农田黑土关键微生物功能群。

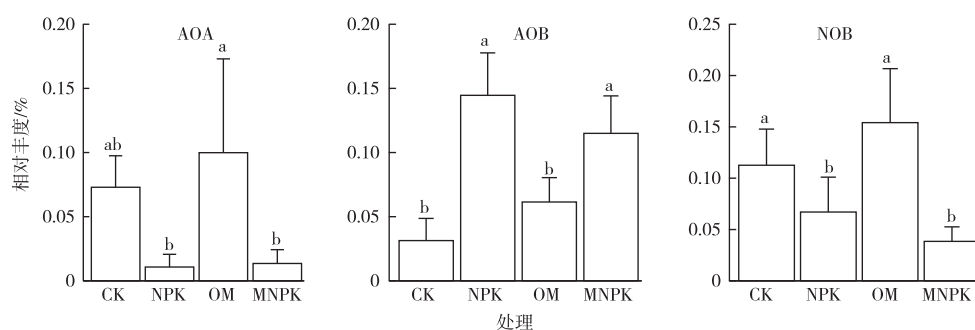
关键微生物功能群定义: 与不施肥 CK 相比, 长期施肥管理模式下土壤微生物丰度发生显著增加的类

群。16S rRNA 基因的高通量测序共计检测出 2 559 个 OTUs, 其中, 仅有 2.77% 的微生物类群 (71/2 559) 丰度发生显著性上调, 被称为关键微生物功能群 (图 3)。

结果表明, 长期不同施肥管理模式导致黑土关键微生物功能群发生明显分异 (图 3)。71 个关键微生物功能群中, 仅发现 9 个 OTUs 在不同施肥管理模式均发生显著性增加, 主要包括 OTU4 (*Bacillus megaterium*)、OTU24 (*Tumebacillus luteolus*) 和 OTU58 (*Devosia insulae*)。而高达 87.3% (62/71) 的关键微生物类群具有明显的生态位分化。例如, 共计 23 个关键微生物功能群必须在有机肥存在的施肥管理模式才发生显著增加, 主要包括 OTU11 (*Bacillus acidicer*)、OTU10 (*Bacillus drentensis*) 和 OTU13 (*Streptomyces mutabilis*), 这部分微生物类群适应于复杂的有机营养环境。而高达 35 个关键微生物类群必须在无机肥存在的施肥管理模式才发生显著增加, 主要包括 OTU2 (*Dyella marensis*)、OTU1326 (*Herbaspirillum* sp.) 和 OTU5 (*Tuberibacillus calidus*), 这部分微生物类群对无机营养环境比较敏感。此外, 仅发现 4 个关键微生物类群只在 MNPK 处

理土壤中显著增加, 包括 OTU43 (*Armatimonadetes_gp4*)、OTU26 (*Sphingomonas changbaiensis*)、OTU63 (*Pirellula staley*) 和 OTU38 (*Microbispora rosea*), 与 CK 相比, MNPK 处理这 4 个类群丰度分别增加 2.30、0.78、2.44 和 1.79 倍。这部分类群对环境要求较高, 适应于有机-无机配施的营养均衡环境中。

长期不同施肥管理模式导致功能硝化微生物发生明显的生态位分化 (图 4)。长期单施有机肥管理更有利于氨氧化古菌 (AOA, *Nitrososphaera*) 的生长, 而长期单施化肥或者有机-无机肥配施管理则更有利于氨氧化细菌 (AOB, *Nitrosospira*) 的生长。就优势的 AOA 而言, OM 处理增加, 而 NPK 和 MNPK 处理均显著降低。OM 处理 AOA 相对丰度为 0.10%, 而 NPK 和 MNPK 处理其相对丰度仅为 0.011% 和 0.014%, OM 处理分别为 NPK 和 MNPK 处理的 9.1 和 7.1 倍。与 CK 相比, NPK 和 MNPK 处理优势的 AOB 相对丰度均显著增加, 而 OM 处理无显著变化。而针对亚硝酸盐氧化细菌 (NOB, *Nitrospira*), 长期不同施肥均未促进其生长, 反而在长期 NPK 和 MNPK 施肥管理模式显著降低。



CK 为不施肥, NPK 为单施化肥, OM 为单施有机肥, MNPK 为有机-无机肥配施。

同一幅图中, 直方柱上方英文小写字母不同表示处理间优势菌群相对丰度差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 长期不同施肥管理模式土壤氨氧化古菌 (AOA)、氨氧化细菌 (AOB) 和亚硝酸盐氧化细菌 (NOB) 优势类群相对丰度变化

Fig. 4 Changes in relative abundance of soil predominant (> 0.05%) ammonia oxidizing archaea (AOA), ammonia oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB) under different fertilization managements

2.5 不同施肥管理模式黑土理化性质与微生物群落特征相互关系比较分析

通过 SEMs 进一步探究长期不同施肥管理模式土壤养分状况和微生物群落构建过程是如何直接或者间接影响 SOC 累积。SEMs 对 SOC 累积的解释度高达 95% 以上 (图 5)。研究结果表明, 长期施肥模式下微生物区系活性与土壤肥力呈显著正相关, 其在 NPK、OM 和 MNPK 处理的综合效应分别高达 97.3%、91.7% 和 98.6%。但长期不同施肥管理

模式下不同环境因子和不同微生物群落构建过程对 SOC 含量提升的作用机制不同。长期单施化肥管理模式主要通过改变土壤呼吸作用、有效磷的供应和土壤微生物多样性, 以提升 SOC 含量 [图 5(a)]。长期单施有机肥管理模式则主要通过改变土壤呼吸作用、土壤微生物群落构建和核心物种 *Bacillus* 以加速 SOC 累积 [图 5(b)]。而长期有机-无机肥配施的平衡施肥管理模式 SOC 含量的提升受土壤微生物呼吸、土壤有效磷的供应以及微生

物群落多样性和组成等多个环境因子的共同作用 调控[图 5(c)]。

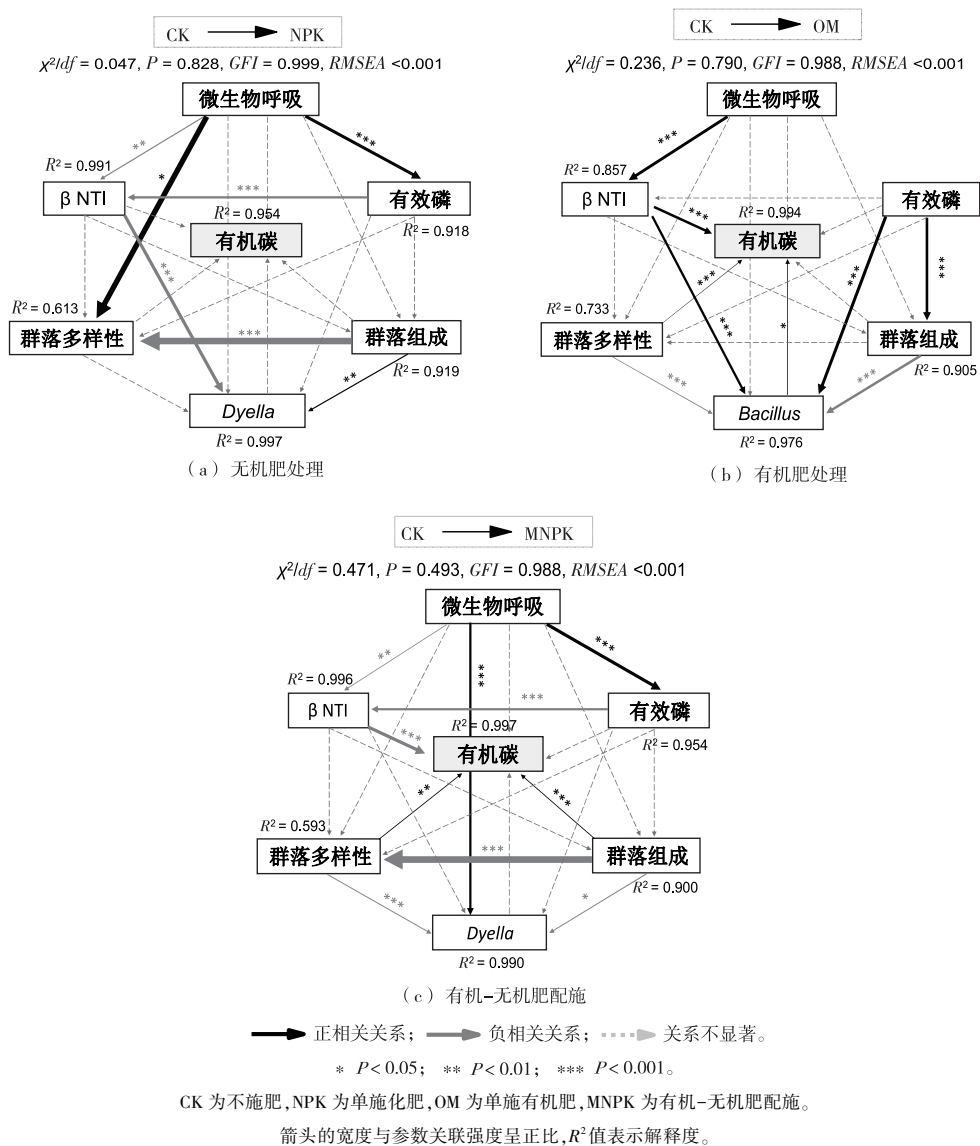


图 5 不同影响因素对 3 种施肥处理土壤有机碳提升的直接和间接作用

Fig. 5 Structural equation models (SEMs) showing the direct and indirect effects of different influencing factors on SOC under NPK, OM and MNPK fertilizer treatments

3 讨论

3.1 长期不同施肥管理模式对黑土理化和微生物性质的影响

合理的施肥管理措施是助力农田黑土肥力提升、保障黑土可持续健康发展的重要途径。笔者研究表明,有机-无机肥配施的平衡施肥管理模式有利于黑土肥力的快速提升和微生物功能的稳定。目前,基于长期单施化肥或者单施有机肥的管理模式下土壤理化和微生物性状的变化研究较为深入,而针对有机-无机肥配施管理下土壤肥力与土壤微生物活性、群落稳定性以及群落构建关联研

究鲜有报道。例如,通过为期 21 年的生物有机农业试验发现,有机地块中土壤肥力的增强和生物多样性的持续性增加,一方面维持了作物产量,另一方面减少了对外部环境的营养依赖^[5]。而通过全球实验的荟萃分析也发现,与单施化肥相比,施用有机肥可大幅度提升作物产量和土壤有机碳含量,有机培肥管理模式可以通过改变碳、氮、磷等营养元素激活相关的微生物胞外酶活性来加速土壤有机质的累积^[6]。笔者研究也得到类似结果。不仅如此,有机-无机肥配施的平衡施肥模式同时缓解了土壤酸化,极大地提升了土壤肥力,维持了土壤微生物功能稳定,其对土壤质量的提升效果明显优于

单施化肥以及单施有机肥管理模式。值得注意的是,长期单施化肥导致土壤固氮菌数量显著下降,可能是由于外源无机氮的引入削弱了土壤固氮微生物的固氮作用,而长期有机-无机肥配施或有机培肥管理模式均显著促进固氮微生物生长(表 1),这是因为大量有机物料的投入导致土壤碳氮比显著升高,固氮微生物则通过生物固氮作用补充氮素,进而维持土壤稳定的碳氮比^[19]。此外,笔者还发现土壤微生物呼吸活性与土壤有机碳的变化规律较为一致。而 SEMs 进一步证实,土壤微生物呼吸能够较好地反映土壤肥力状况,且微生物通过增加相互作用强度进而维持微生物功能(图 5)。这些结果暗示微生物对土壤质量的积极作用,同时也说明微生物性状指标,如微生物呼吸、微生物数量和微生物关联度等,可以较好地解释土壤肥力状况。因此,在未来土壤质量监测中可以考虑纳入微生物指标,例如微生物呼吸活性、微生物数量等,从而更全面地认识土壤质量状况,并为生态系统中有效的施肥管理提供重要依据。

3.2 长期不同施肥管理模式下黑土关键微生物功能群

施肥管理通过外源输入物料,使有限资源中的优势类群得以生长繁殖。因此,笔者研究通过比较不同施肥管理模式下核心物种差异,可为预测土壤演替方向、助力黑土定向培肥提供参考。已有研究表明,长期无机化肥施肥管理导致土壤微生物群落发生明显变化^[20]。笔者研究结果与之一致,即长期 NPK 施肥管理模式下土壤微生物群落结构显著不同于 CK。值得注意的是,笔者发现长期施用 OM 处理土壤微生物群落结构与 CK 高度相似(图 1)。这一结果表明,有机培肥管理有利于土壤微生物群落结构的稳定,主要原因是外源有机物料的营养供给相对较慢,对土壤环境扰动相对较小,从而导致微生物群落结构变异不明显。而长期有机-无机肥配施土壤微生物类群类似于长期单施化肥处理,这表明与有机肥相比,化肥对土壤细菌群落结构的影响更大。尽管如此,笔者仍然发现一部分类群在所有不同施肥管理模式下均大量富集,例如, OTU4 高度相似于 *Bacillus megaterium*,其可以通过降解土壤中难溶的含磷化合物为作物提供养分。同时也有报道认为,巨大芽孢杆菌与根瘤菌混合培养时具有固氮增效作用,非常适合于制成微生物肥料^[21]。而 OTU24 高度相似于 *Tumebacillus luteolus*,普遍存在于农田生态系统中^[22]。这类微生物对环境营养要求较低,适应能力极强,可以作为未来菌

种资源挖掘的重要突破口。然而,绝大部分核心菌群具有完全分化的生态位特征,这为识别不同施肥模式下的指示物种提供了很好的借鉴。例如, OTU2 (*Dyella marenensis*) 和 OTU1326 (*Herbaspirillum* sp.) 对无机氮磷钾肥的响应非常迅速,这类菌群属于典型的 *r*-型菌,因此,更容易在长期无机肥施肥管理土壤中生长^[23]。而 OTU11 (*Bacillus acidiceler*) 和 OTU10 (*Bacillus drentensis*) 属于植物根际促生菌,可以通过降解土壤中难溶的含磷化合物为作物提供养分,属于典型的 *K*-型菌,这类微生物对环境底物的利用能力较强,因此,容易在长期有机物料存在的土壤中富集^[23]。

长期不同施肥也导致功能硝化微生物发生明显的生态位分异。在长期施用 OM 土壤中 AOA 相对丰度较高,而其在长期施用 NPK 和 MNPK 土壤中显著下降(图 4)。这意味着长期施用化肥会导致氨氧化古菌功能逐渐丧失。与之相反, NPK 和 MNPK 处理 AOB 相对丰度均显著增加,而长期施用 OM 处理其丰度较低。笔者之前的研究结果与之一致,即细菌是农田氨氧化过程的主要作用者,长期施用化肥会导致土壤氨氧化细菌显著增加^[24]。AOA 和 AOB 的生态位分化受土壤 pH 影响显著。有研究表明, AOA 基因表达量一般随着 pH 的增加而增加,而 AOB 基因表达量一般随着 pH 的增加而减少^[25]。必须强调的是,尽管笔者研究通过系统发育分类解析了不同施肥管理模式下关键的微生物功能群,但是其生理生化意义有限。事实上,同一属的多个物种的功能表型可能完全不同^[26],而且微生物的存在并不代表微生物的功能。因此,未来的研究应同时开展同位素示踪和分离培养实验,从多个角度多个方面解析不同施肥管理模式下土壤核心物种的生理生化特征,为黑土定向培肥提供更重要的参考。

3.3 长期不同施肥管理模式对黑土微生物群落构建的影响

微生物群落构建机制研究对于预测黑土演替方向和黑土定向培肥具有重要意义。目前,主流的观点认为,土壤有机碳的周转速率是土壤微生物群落构建的关键因子^[10,27]。笔者前期的研究表明,在高有机碳周转的草地和农田土壤中,其确定性过程显著高于低有机碳周转的碱地,并且高有机碳周转是导致土壤确定性过程增加的关键因子^[16]。笔者研究结果与之具有相似之处,长期施肥管理在提升土壤肥力的同时,强化了土壤微生物群落构建的确定性过程。不仅如此,笔者还发现,微生物群落构建过程与施肥类型紧密相关,且单施无机肥处

理土壤微生物确定性过程显著高于有机肥处理(图 2)。由于无机肥的投入能够提供大量易利用底物,此时 *r*-型菌处于竞争优势,导致核心微生物定向富集而强化群落组装的确定性过程;而有机肥处理土壤易利用底物水平相对较低,微生物类群对环境资源的竞争更大,从而使得微生物定向富集的作用有所减弱。此外,笔者发现长期不施肥土壤微生物群落构建确定性过程占比高达 33.3%,这是由于黑土本身的肥力较高,微生物群落定向富集过程依然存在。而微生物共存网络也表明,单施有机肥土壤微生物正向网络关联度明显高于单施化肥处理。这进一步解释了有机培肥管理对土壤微生物群落稳定性的维持具有重要作用,这与前人的报道^[28]一致。同时,笔者发现无论是微生物关联度,还是正向网络关联度,有机-无机肥配施处理均显著高于其他施肥处理,这说明有机-无机肥配施的平衡施肥管理模式能够提供更加均衡的营养环境,也更有利于维持土壤功能菌群的长期稳定。

微生物是调控土壤养分循环的主角,而土壤养分的变化反过来也会塑造不同土壤特定的微生物群落^[28]。它们之间的直接或者间接作用关系很难通过常规分析手段来阐明。笔者通过结构方程模型则能够很好地将微生物类群与土壤养分变化建立联系。结果表明,长期不同施肥管理模式下环境因子和微生物群落构建过程对土壤有机碳含量提升的作用机制明显不同(图 5)。长期单施化肥管理模式由于提供了微生物易利用底物,则更多地影响微生物活性,而长期单施有机肥管理模式由于提供了复杂的有机物料,则强化了微生物群落构建和核心物种的重要作用。而长期有机-无机肥配施的平衡施肥管理模式提供了相对均衡的营养环境,受环境多因子的调控。尽管笔者研究并未设置多种有机-无机肥配比处理,但是将土壤肥力演替和微生物群落构建过程联系起来,从微生物群落构建角度,提供了有机-无机肥配施的平衡施肥管理模式有助于土壤质量稳定发展的实验证据。

4 结论

综上所述,长期不同施肥管理模式引起土壤有机碳含量、有效磷含量和土壤结构等发生明显变化,这些因素直接或间接地作用于土壤微生物并改变其生理活性,进而影响土壤有机质的累积及周转过程。长期有机-无机肥配施管理模式下土壤有机碳含量、土壤微生物活性以及微生物网络稳定性等土壤质量指标均明显优于单施化肥和单施有机肥。

这些结果表明,有机-无机肥配施管理模式更有利于提升土壤肥力和维持微生物功能的稳定。结合微生物群落构建也发现,长期施肥导致微生物类群定向富集而强化了群落组装的确定性过程。NPK 和 MNPK 处理土壤微生物群落结构更为相似,核心类群主要包括 *Bacillus* 和 *Dyella* 这 2 个属,而 OM 处理核心类群为 *Bacillus*。就土壤硝化微生物而言,施用 OM 土壤中氨氧化古菌 AOA 相对丰度较高,而施用 NPK 和 MNPK 土壤中 AOB 显著富集。研究结果强调了有机-无机肥配施管理模式的重要意义,为今后农田黑土合理施肥管理提供参考。

参考文献:

- [1] 汪景宽,李双异,张旭东,等.20 年来东北典型黑土地地区土壤肥力质量变化[J].中国生态农业学报,2007,15(1):19-24. [WANG Jing-kuan, LI Shuang-yi, ZHANG Xu-dong, et al. Spatial and Temporal Variability of Soil Quality in Typical Black Soil Area in Northeast China in 20 Years[J]. Chinese Journal of Eco-agriculture, 2007, 15(1): 19-24.]
- [2] OU Y, ROUSSEAU A N, WANG L X, et al. Spatio-temporal Patterns of Soil Organic Carbon and pH in Relation to Environmental Factors: A Case Study of the Black Soil Region of Northeastern China[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2017, 245: 22-31.
- [3] 韩晓增,邹文秀.我国东北黑土地保护与肥力提升的成效与建议[J].中国科学院院刊,2018,33(2):206-212. [HAN Xiao-zeng, ZOU Wen-xiu. Effects and Suggestions of Black Soil Protection and Soil Fertility Increase in Northeast China[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2018, 33(2): 206-212.]
- [4] BAI Z G, CASPARI T, GONZALEZ M R, et al. Effects of Agricultural Management Practices on Soil Quality: A Review of Long-term Experiments for Europe and China[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2018, 265: 1-7.
- [5] MÄDER P, FLIESSBACH A, DUBOIS D, et al. Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming[J]. Science, 2002, 296(5573): 1694-1697.
- [6] LUO G W, LI L, FRIMAN V P, et al. Organic Amendments Increase Crop Yields by Improving Microbe-mediated Soil Functioning of Agroecosystems: A Meta-analysis[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 124: 105-115.
- [7] BANDYOPADHYAY K K, MISRA A K, GHOSH P K, et al. Effect of Integrated Use of Farmyard Manure and Chemical Fertilizers on Soil Physical Properties and Productivity of Soybean[J]. Soil and Tillage Research, 2010, 110(1): 115-125.
- [8] HERMANS S M, BUCKLEY H L, CASE B S, et al. Using Soil Bacterial Communities to Predict Physico-chemical Variables and Soil Quality[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 79.
- [9] HUBBELL S P. Tree Dispersion, Abundance, and Diversity in a Tropical Dry Forest[J]. Science, 1979, 203(4387): 1299-1309.
- [10] DINI-ANDREOTE F, STEGEN J C, VAN ELSAS J D, et al. Disen-

- tangling Mechanisms that Mediate the Balance between Stochastic and Deterministic Processes in Microbial Succession [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(11) : E1326-E1332.
- [11] VELLEND M. Conceptual Synthesis in Community Ecology [J]. The Quarterly Review of Biology, 2010, 85(2) : 183-206.
- [12] CHASE J M, MYERS J A. Disentangling the Importance of Ecological Niches from Stochastic Processes across Scales [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2011, 366(1576) : 2351-2363.
- [13] STEGEN J C, LIN X, FREDRICKSON J K, *et al.* Estimating and Mapping Ecological Processes Influencing Microbial Community Assembly [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 370.
- [14] SHI Y, LI Y, XIANG X, *et al.* Spatial Scale Affects the Relative Role of Stochasticity versus Determinism in Soil Bacterial Communities in Wheat Fields across the North China Plain [J]. Microbiome, 2018, 6(1) : 27.
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2010: 25-114. [BAO Shi-dan. Soil and Agricultural Chemistry Analysis [M]. 2nd ed. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2010: 25-114.]
- [16] GAO W, XU J S, ZHAO J, *et al.* Prokaryotic Community Assembly after 40 Years of Soda Solonchets Restoration by Natural Grassland and Reclaimed Farmland [J]. European Journal of Soil Biology, 2020, 100: 103213.
- [17] STUBNER S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* Lineage 1 in Rice Field Soil by Real-time PCR with SybrGreen™ Detection [J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 50(2) : 155-164.
- [18] POLY F, MONROZIER L J, BALLY R. Improvement in the RFLP-procedure for Studying the Diversity of *nifH* Genes in Communities of Nitrogen Fixers in Soil [J]. Research in Microbiology, 2001, 152(1) : 95-103.
- [19] MASUDA T, INOMURA K, TAKAHATA N, *et al.* Heterogeneous Nitrogen Fixation Rates Confer Energetic Advantage and Expanded Ecological Niche of Unicellular Diazotroph Populations [J]. Communications Biology, 2020, 3: 172.
- [20] 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 [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 90: 42-51.
- [21] SAINI V K, BHANDARI S C, TARAFDAR J C. Comparison of Crop Yield, Soil Microbial C, N and P, N-fixation, Nodulation and Mycorrhizal Infection in Inoculated and Non-inoculated Sorghum and Chickpea Crops [J]. Field Crops Research, 2004, 89(1) : 39-47.
- [22] WEMHEUER F, KAISER K, KARLOVSKY P, *et al.* Bacterial Endophyte Communities of Three Agricultural Important Grass Species Differ in Their Response towards Management Regimes [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40914.
- [23] FIERER N, BRADFORD M A, JACKSON R B. Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria [J]. Ecology, 2007, 88(6) : 1354-1364.
- [24] JIA Z J, CONRAD R. Bacteria Rather than Archaea Dominate Microbial Ammonia Oxidation in an Agricultural Soil [J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(7) : 1658-1671.
- [25] NICOL G W, LEININGER S, SCHLEPER C, *et al.* The Influence of Soil pH on the Diversity, Abundance and Transcriptional Activity of Ammonia Oxidizing Archaea and Bacteria [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11) : 2966-2978.
- [26] SUN D L, JIANG X, WU Q L, *et al.* Intragenomic Heterogeneity of 16S rRNA Genes Causes Overestimation of Prokaryotic Diversity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19) : 5962-5969.
- [27] FENG Y Z, CHEN R R, STEGEN J C, *et al.* Two Key Features Influencing Community Assembly Processes at Regional Scale: Initial State and Degree of Change in Environmental Conditions [J]. Molecular Ecology, 2018, 27(24) : 5238-5251.
- [28] 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.

作者简介: 高威(1990—),男,湖北广水人,助理研究员,博士,主要研究方向为农田土壤肥力提升的微生物学机制。E-mail: gaowei@isa.ac.cn

(责任编辑:李祥敏)