

方 宇, 王 飞, 贾宪波, 等. 绿肥配施减量化肥对土壤固氮菌群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(9): 1933–1941.

FANG Yu, WANG Fei, JIA Xian-bo, et al. Effect of green manure and reduced chemical fertilizer load on the community of soil nitrogen-fixing bacteria[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2018, 37(9): 1933–1941.

绿肥配施减量化肥对土壤固氮菌群落的影响

方 宇, 王 飞, 贾宪波, 林陈强, 张 慧, 陈龙军, 陈济琛*

(福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福建 福州 350003)

摘 要:为了探讨绿肥配施减量化肥对土壤固氮菌的影响,以开展八年的紫云英配施减量化肥的长期定位试验站为平台,选取不施肥(CK)、单施化肥(NPK)、紫云英配施80%化肥(MF80)、紫云英配施60%化肥(MF60)和紫云英配施40%化肥(MF40)共5个处理,于水稻分蘖期采集土样,采用荧光定量PCR和Illumina Miseq高通量测序技术,分析了不同施肥制度下土壤固氮菌 *nifH* 基因丰度和多样性的变化规律。结果表明:与单施化肥相比,翻压紫云英的减量施肥处理水稻产量与其无显著差异,从化肥用量和产量综合考虑,MF60处理是一种适宜的施肥制度。翻压绿肥处理土壤全氮明显增加;碱解氮含量(除MF60处理)与NPK处理无显著差异。翻压紫云英配施减量化肥的施肥处理(除MF40处理)土壤固氮菌丰度明显高于NPK处理,且固氮菌丰度与土壤碱解氮、硝态氮和pH呈显著正相关。翻压紫云英后土壤固氮菌Shannon指数明显低于NPK处理,各施肥处理间OTU指数差异不明显。各施肥处理的土壤固氮菌均以变形菌门为绝对优势菌门,翻压紫云英的减量施肥处理变形菌门丰度显著低于单施化肥处理。主坐标分析表明,翻压紫云英配施减量化肥的3个施肥处理与CK、NPK处理的土壤固氮菌的群落结构差异较明显。研究表明,紫云英配施减量化肥有利于提升土壤肥力和固氮菌的数量,紫云英的施用和化肥用量都是影响土壤固氮菌群落结构的重要因素。

关键词:绿肥;减量化肥;固氮菌;荧光定量PCR;高通量测序;群落结构

中图分类号:S154 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2018)09-1933-09 doi:10.11654/jaes.2018-0509

Effect of green manure and reduced chemical fertilizer load on the community of soil nitrogen-fixing bacteria

FANG Yu, WANG Fei, JIA Xian-bo, LIN Chen-qiang, ZHANG Hui, CHEN Long-jun, CHEN Ji-chen*

(Institute of Soil and Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Chinese milk vetch (MV) is a type of green manure that has the potential to replace a portion of the chemical fertilizer load; however, it remains unclear how MV would replace N fertilizer. This study was conducted at a long-term field experimental station in Fuzhou, China. The treatments conducted for this study are CK (without fertilization), NPK (chemical fertilizer), MF80 (MV plus 80% NPK), MF60 (MV plus 60% NPK), and MF40 (MV plus 40% NPK). Soil samples were collected from the 0–20 cm soil layer at the rice tillering stage. We determined the soil physicochemical properties. The abundances and community structures of nitrogen-fixing bacteria were assessed using the *nifH* gene. Quantitative PCR and Illumina MiSeq sequencing were used to determine the abundance and community structure of nitrogen-fixing bacteria in the paddy soil. The results showed that there was no significant difference in the rice yield between the green manure treatments and NPK treatment. MF60 is an appropriate fertilization regime when considering the yield and application rates of chemical fertilizer. Long-term application of green manure combined with a reduced chemical fertilizer load increased the total nitrogen content in comparison with the NPK treatment, and there was no significant difference in the available nitrogen content between the green manure treat-

收稿日期:2018-04-17 录用日期:2018-07-03

作者简介:方 宇(1979—),女,安徽定远人,助理研究员,从事环境微生物研究。E-mail:fangyu1106@163.com

*通信作者:陈济琛 E-mail:chenjichen@163.com

基金项目:国家自然科学基金项目(41501269);福建省农业科学院英才项目(YC2015-1);福建省农业科学院科技创新团队PI项目(STIT2017-3-11);国家绿肥产业技术体系项目(CARS-22-G-01);福建省属公益类科研院所专项(2016R1021-1)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (41501269); Youth Talent Program of Fujian Academy of Agricultural Sciences (YC2015-1); Science and Technology Innovative Team Program of Fujian Academy of Agricultural Sciences (STIT2017-3-11); The National Green Manure Industrial Technology System of China (CARS-22-G-01); Special Fund for Research Institutes on Public Causes of Fujian Province, China (2016R1021-1)

ments (except for MF60) and NPK treatment. Compared with the NPK treatment, the green manure treatments (except for MF40) increased the abundance of nitrogen-fixing bacteria, and positive correlations between the bacterial abundance and available nitrogen, nitrate nitrogen, and pH were observed. Shannon indices of the nitrogen-fixing bacteria with the green manure treatments were lower than that with the NPK soil, but there was no significant difference in the operational taxonomic unit (OTU) number. Proteobacteria was the dominant phylum for all treatments, and NPK treatment led to a higher relative abundance of Proteobacteria than the green manure treatments. Principal coordinate analysis demonstrated that the community structures of nitrogen-fixing bacteria with the green manure treatments were significantly distinct from that with the NPK treatment. Our results indicated that green manure combined with reduced chemical fertilizer load could increase soil fertility and the abundance of nitrogen-fixing bacteria. Application of MV and application rates of chemical fertilizer are both important factors in shaping the community structure of nitrogen-fixing bacteria in the paddy soil studied.

Keywords: green manure; fertilizer reduction; nitrogen-fixing bacteria; real-time PCR; high-throughput sequencing; community structure

生物固氮是指在固氮微生物的作用下将空气中的氮气还原成氨的过程,是全球生态系统最主要的氮源^[1]。固氮菌群落结构组成对土壤氮素固定及维持氮素循环具有重要意义。固氮菌体内存在一种具有催化功能的固氮酶,固氮酶是由 *nifD* 和 *nifK* 基因编码的钼铁蛋白和 *nifH* 编码的铁蛋白构成。*nifH* 基因只存在于固氮菌中,其核酸序列保守,系统进化关系和 16S rRNA 基因相一致,是研究固氮菌群落结构的最好标记基因^[2]。

为了获得作物高产,化肥施用量不断增加,化肥的过量施用对土壤质量产生了严重影响,导致土壤质量明显下降^[3]。因此,改善施肥方式,实现农业的可持续发展迫在眉睫。绿肥是有机肥的一种,它是一种养分完全的优质生物能源,可提供作物所需养分、改善农田生态环境,是保持土壤质量和农业可持续利用的措施之一。紫云英 (*Astragalus sinicus*) 是我国水稻产区主要的绿肥作物,水稻可以利用紫云英的生物固氮能力,减少对化学氮肥的依赖,降低生态环境压力。在水稻种植区利用冬闲种植绿肥,可以有效改善土壤性状,并在一定程度上替代部分化学肥料,减少氮肥用量^[4]。据报道化肥配施绿肥有利于培肥土壤^[5]和作物增产^[6]。因此建立绿肥化肥配施的施肥体系对于保障粮食安全和节约自然资源具有十分重要的意义。

研究表明施肥制度对土壤固氮菌有一定影响。例如 Berthrong 等^[7]报道添加氮肥明显改变了森林土壤固氮菌的群落结构。Tan 等^[8]也报道水稻土壤添加氮肥后快速改变了固氮菌的群落结构。然而 Wakelin 等^[9]研究显示施用尿素并没有影响固氮菌群落。黎睿智^[10]指出单施有机肥和无机有机肥混施能在一定程度上提升土壤固氮菌的丰富度和多样性,而单施化肥的土壤固氮菌的多样性和丰富度会有所下降。有机肥的施用量对土壤固氮菌也有显著影响,低量有机

肥能够增加玉米土壤固氮菌多样性^[11]。然而目前关于绿肥对土壤固氮菌影响的研究较少。仅王秀呈^[12]发现翻压紫云英增加了土壤固氮菌的丰度。有关绿肥配施减量化肥对土壤固氮菌群落影响的研究尚属空白。因此为了揭示绿肥配施减量化肥对我国南方水稻土壤固氮菌群落多样性的影响,本研究以紫云英化肥定位试验站土壤为研究对象,通过荧光定量和高通量测序技术研究了绿肥配施不同比例化肥处理下土壤固氮菌丰度和群落结构的变化规律及其与土壤理化性质间的相关关系,以期为该区合理施肥提供科学依据,从而促进水稻土壤的可持续发展。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

紫云英定位试验站位于福州市白沙镇,地理位置为北纬 26°13'31",东经 119°04'10",海拔高度 15.4 m,年均降雨量 1 350.9 mm,年日照时数 1 812.5 h,年平均温度 19.5 °C,无霜期 311 d;土壤类型为渗育型水稻土黄泥田。紫云英-水稻长期轮作定位试验始于 2008 年,试验开始时土壤基础理化性质:有机质 24.4 g·kg⁻¹、全氮 1.23 g·kg⁻¹、碱解氮 171.6 mg·kg⁻¹、速效磷 13.5 mg·kg⁻¹、速效钾 83.4 mg·kg⁻¹、pH 4.78。

本研究共设置 5 个处理:(1)对照,不施紫云英和化肥,CK;(2)单施化肥,NPK;(3)紫云英配施 80% 化肥,MF80;(4)紫云英配施 60% 化肥,MF60;(5)紫云英配施 40% 化肥,MF40。NPK 处理的年化肥用量为 N 135 kg·hm⁻²、P₂O₅ 54 kg·hm⁻²、K₂O 94.5 kg·hm⁻²。每个处理设 3 个小区,完全随机排列,每个小区面积为 15 m²。紫云英前两年为异地方式翻压,第三年起于水稻成熟前套播紫云英种子(播种密度为 22.5 kg·hm⁻²),于次年 4 月份翻压。紫云英翻压量 2014 年前鲜草量为 18 000 kg·hm⁻²,2014 年起翻压量为 22 500

kg·hm⁻²。

1.2 样品采集

土样采集时间为2016年8月(水稻分蘖期)。各试验小区内按“S”形取样,随机布点采集耕作层(0~20 cm)土壤样品,混匀后置于无菌自封袋迅速带回实验室。部分土样风干后测定土壤养分;部分土样置于-80℃保存用于分子试验。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤理化性质测定

土壤基本养分测定参照鲁如坤《土壤农业化学分析方法》^[13]。土壤pH值用蒸馏水浸提(土水比1:2.5)pH计测定;有机质用K₂Cr₂O₇-H₂SO₄外加热法;全氮用凯氏定氮法;碱解氮用碱解扩散法;NH₄⁺-N用2 mol·L⁻¹ KCl溶液浸提-靛酚蓝比色法;NO₃⁻-N用双波长分光光度法^[14]。

1.3.2 土壤微生物DNA的提取

采用PowerSoil DNA Isolation Kit(Mobio, USA)试剂盒提取土壤微生物总DNA。提取的DNA用1%琼脂糖凝胶电泳检测样品质量,并用Nanodrop 核酸蛋白测定仪(Nanodrop 2000)测定DNA的纯度和浓度。

1.3.3 土壤固氮菌 *nifH* 基因的荧光定量分析

选用引物 *nifH*-F(AAAGGYGGWATCGGYAART-CCACCAC) 和 *nifH*-R(TTGTTSGCSCGRTACATSGC-CATCAT)扩增固氮菌 *nifH* 基因^[15]。PCR体系为:2×Taq PCR Master Mix(Takara, 大连, 中国)25 μL, 上下游引物各2 μL(10 μmol·L⁻¹), DNA模板2 μL, 用灭菌超纯水补至50 μL。PCR反应条件:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 10 min。将PCR产物回收, 连接至pMD19-T载体(Takara, 大连, 中国), 转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中, 筛选阳性克隆测序分析。提取 *nifH* 基因阳性质粒, 用Nanodrop 核酸蛋白测定仪(Nanodrop 2000)测定质粒浓度, 计算 *nifH* 基因拷贝数, 按10倍梯度进行稀释, 用于制备标准品。荧光定量PCR在ABI 7500型荧光定量PCR仪(ABI, CA, USA)上进行, 反应体系(20 μL)为:SYBRGreen qPCR Master Mix 16.4 μL, 上下游引物各0.8 μL(10 μmol·L⁻¹), DNA模板2 μL。每个样品3次重复。荧光定量PCR采用两步法进行, PCR条件为95℃预变性10 min; 95℃ 15 s, 58℃退火延伸1 min, 40个循环。

1.3.4 固氮菌 *nifH* 基因的高通量测序分析

固氮菌 *nifH* 基因采用 *nifH*-F/*nifH*-R引物扩增, PCR体系:5×FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs

2 μL, 上下游引物各0.8 μL(5 μmol·L⁻¹), FastPfu Polymerase 0.4 μL, BSA 0.2 μL, 模板DNA约10 ng, 超纯水补足至20 μL。PCR反应条件:95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35个循环; 72℃ 10 min。扩增时在每个样品的上游引物5'端添加一段长度为6个碱基的特异性碱基序列(barcode), 用于区分样品。将扩增的 *nifH* 基因PCR产物经AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)纯化后, 使用QuantiFluor™-ST(Promega, USA)测定浓度, 将每个样品3次重复的PCR产物等摩尔混匀, 用Illumina Miseq测序平台进行双末端测序。测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

采用Flash和Trimmomatic软件对测序结果进行质量控制。首先根据PE reads之间的重叠关系, 将成对的reads拼接成一条序列, 同时对reads的质量和拼接的效果进行质控过滤, 根据序列两端的barcode和引物序列区分样品得到有效序列。数据去杂方法和参数如下:(1)过滤reads尾部质量值20以下的碱基, 设置50 bp的窗口, 如果窗口内的平均质量值低于20, 从窗口开始截去后端碱基, 过滤质控后50 bp以下的reads, 去除含N碱基的reads;(2)根据PE reads之间的重叠关系, 将成对reads拼接成一条序列, 最小重叠长度为10 bp;(3)拼接序列的重叠区允许的最大错配比率为0.2, 筛选不符合序列;(4)根据序列首尾两端的barcode和引物区分样品, 并调整序列方向, barcode允许的错配数为0, 最大引物错配数为2。

1.4 数据处理

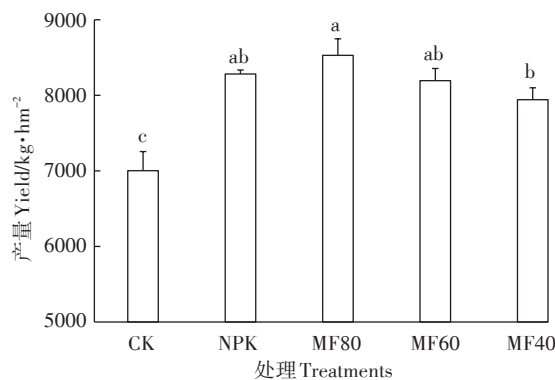
按样本最小序列进行抽平, 之后用Uclust v1.2.22软件对序列进行聚类合并, 选择97%作为相似性阈值。主坐标分析(Principal coordinate analysis, PCoA)采用R软件(3.2.1版本)完成。数据方差分析和相关性分析采用SPSS 19.0软件。

2 结果与讨论

2.1 绿肥配施减量化肥对水稻产量和土壤理化性质的影响

绿肥配施减量化肥对水稻产量(2009—2016年8年平均产量)的影响见图1。MF80处理的产量最高, 为8528 kg·hm⁻²; CK处理产量最低, 仅为7002 kg·hm⁻²。与NPK处理相比, 翻压紫云英配施减量化肥的3个处理水稻产量与其无显著差异($P>0.05$)。综合化肥用量和水稻产量, MF60(产量为8194 kg·hm⁻²)被认为是一种既环保又高产的施肥措施。

绿肥配施减量化肥对土壤理化性质的影响见表1。各施肥处理对土壤有机质含量无显著影响($P>0.05$)。与NPK处理相比,绿肥配施减量化肥处理组明显增加了土壤全氮含量($P<0.05$),而绿肥处理间无显著差异($P>0.05$)。与CK相比,施肥处理(除MF40处理)明显增加了土壤碱解氮(AN)含量,其中MF60处理的AN含量最高;绿肥配施减量化肥处理组(除MF60处理)的土壤AN含量与NPK处理相当。不同施肥处理对土壤铵态氮含量的影响无显著差异。与NPK处理相比,绿肥处理组(除MF40处理)土壤硝态氮含量无明显变化。翻压紫云英处理组土壤pH高于



不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments at 0.05 level. The same below

图1 不同施肥处理的水稻产量

Figure 1 Rice yield under different fertilizer regimes

NPK处理。

2.2 绿肥配施减量化肥对土壤固氮菌丰度的影响

由图2可知,不同施肥处理对土壤固氮菌丰度产生了显著影响。与NPK处理相比,绿肥配施减量化肥(除MF40处理)明显增加了土壤固氮菌丰度。MF60处理*nifH*基因的拷贝数最高,为每克干土 2.45×10^9 基因拷贝数;CK和MF40处理固氮菌丰度最低,为 0.73×10^9 基因拷贝数。对土壤固氮菌丰度和土壤理化性质进行相关性分析(表2)得知,固氮菌丰度和土壤碱解氮、硝态氮和pH呈显著正相关。

固氮菌是环境变化的重要生物学指示,施肥对固氮菌有显著的影响,但是影响效果还没有达成一致的

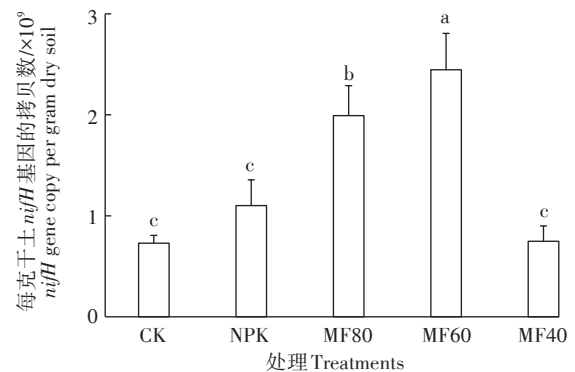


图2 不同施肥处理土壤固氮菌丰度

Figure 2 Abundance of soil nitrogen-fixing bacteria under different fertilizer regimes

表1 不同施肥处理下土壤理化性质

Table 1 Soil properties under different fertilizer regimes

处理 Treatments	有机质 Organic matter/g·kg ⁻¹	全氮 Total N/g·kg ⁻¹	碱解氮 Available N/mg·kg ⁻¹	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N/mg·kg ⁻¹	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N/mg·kg ⁻¹	pH
CK	22.26±0.19a	1.34±0.02b	108.68±1.83c	10.40±0.40ab	3.82±0.20a	5.55±0.07b
NPK	21.76±0.89a	1.41±0.03b	119.78±2.54b	9.67±0.09b	4.16±0.12a	5.51±0.04b
MF80	22.78±0.91a	1.52±0.08a	118.82±2.75b	10.28±0.04ab	3.81±0.21a	5.68±0.08a
MF60	23.22±1.35a	1.50±0.06a	132.79±1.12a	10.87±0.68a	4.37±0.43a	5.60±0.01ab
MF40	23.24±0.41a	1.51±0.09a	113.51±2.57bc	10.15±0.48ab	2.90±0.71b	5.58±0.01ab

注:表中数据均为平均值±标准差($n=3$),不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Data shown are the mean±SD ($n=3$). Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

表2 固氮菌丰度和土壤理化因子的相关性分析

Table 2 Spearman's correlation coefficients between the abundance of nitrogen-fixing bacteria and soil properties

	有机质 Organic matter	全氮 Total N	碱解氮 Available N	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N	pH
固氮菌丰度 The abundance of nitrogen-fixing bacteria	-0.079	0.429	0.811**	0.592*	0.114	0.519*

注:*和**分别表示0.05和0.01的显著水平。

Note: * and ** indicate significant difference at the 0.05 level and 0.01 level.

共识。长期施肥会对土壤固氮菌的群落大小产生显著的影响^[7,16]。本研究中不同处理固氮菌丰度对施肥的响应明显不同。与单施化肥处理相比,紫云英配施减量化肥处理(除 MF40 处理)土壤中固氮菌丰度均有大幅度提高。可见,绿肥的施用和化肥的用量对固氮菌丰度都会产生显著影响。氮肥(例如 N 和 NPK)的输入减少了固氮菌丰度可能是由于土壤酸化或高氮含量造成的^[17]。Tan 等^[8]也报道单施氮肥降低了水稻根际固氮菌的丰度,而且高量氮肥也降低了高粱根际固氮菌的丰度^[18]。本研究中翻压紫云英配施减量化肥处理增加了土壤 pH 值,而相关性分析表明固氮菌丰度与土壤 pH 值呈显著正相关,以及 NPK 处理含有高量氮肥,可能导致 NPK 处理的土壤固氮菌丰度较低。因此平衡施肥对控制土壤固氮菌的丰度至关重要。通过相关性分析得知,土壤固氮菌丰度与碱解氮、硝态氮和 pH 呈显著正相关。而 Reed 等^[19]报道固氮菌丰度与氮浓度呈负相关。侯海军等^[20]发现固氮菌的丰度与碱解氮含量呈负相关,氮肥会抑制固氮菌的生长。Wang 等^[17]认为这些不一致性可能是由于施肥制度对土壤产生的多重影响造成的,例如土壤碳^[21]、氮的可利用性^[22]、pH^[23]、土壤类型^[24]、地上作物^[8]等都会导致肥料对固氮菌的影响不一致。值得注意的是施肥制度对固氮菌丰度的影响存在季节波动。与取样时间相比,施肥措施仅仅是一个次要影响因子^[25-26]。例如 Reardon 等^[27]揭示不同的试验年份相较于施肥对固氮菌丰度的影响更大。多重因子,例如试验地气温、水稻生长状况、土壤类型以及取样时间等都可能引起本研究中固氮菌丰度与环境因子的关系和其他研究的差异。

2.3 绿肥配施减量化肥对土壤固氮菌群落结构的影响

2.3.1 测序结果和多样性指数

使用 Illumina Miseq 技术对固氮菌进行高通量测序分析,共得到有效序列 218 607 条,每个样品含有 10 891~18 937 条序列,平均长度为 380 bp。按照 97%

相似度对非重复序列进行 OTU 分析,共得到 724 个 OTUs。样品测序覆盖度在 97.19%~97.52%,稀释性曲线趋于饱和,表明测序深度可以反映土壤样品固氮菌的信息。

绿肥配施减量化肥对土壤固氮菌多样性的影响见表 3。各施肥处理对土壤固氮菌的 OTU 数目和 Chao1 指数没有显著影响($P>0.05$)。与 NPK 处理相比,绿肥配施减量化肥明显降低了土壤固氮菌的 Shannon 指数和均匀度指数;而绿肥处理之间无显著差异。与 NPK 处理相比,紫云英配施减量化肥的处理下土壤固氮菌的多样性指数降低可能是紫云英秸秆还田后促进了某些优势物种,从而降低了物种的多样性。

2.3.2 土壤固氮菌的群落组成

在门分类水平(图 3),变形菌门(Proteobacteria)是固氮菌的绝对优势菌门,占总 OTU 的 59.72%~80.86%,others 包括广古菌门和蓝菌门,其余 OTU 则隶属于未分类的细菌门。与 NPK 处理相比,翻压紫云英的施肥处理降低了变形菌门的丰度,而未分类的细菌种类增加。可见,翻压紫云英改变了土壤固氮菌优势类群的相对丰度,从而影响了固氮菌的群落组成。在纲水平(图 4),土壤固氮菌主要隶属于 α -变形菌、 β -变形菌和 δ -变形菌,还包括少量未分类的变形菌门种类和未分类的细菌种类,others 则包括甲烷微菌纲、未分类的蓝菌门种类。固氮菌的种类并不局限于某一属或某一种,而是广泛的分布在细菌界中,如古细菌中的广古菌门和真细菌中的变形菌门、放线菌门、蓝菌门、厚壁菌门及绿菌门等^[28]。在本研究中固氮菌主要集中在变形菌门,这与徐鹏霞^[29]和 Collavino 等^[30]的研究结果相一致。其他序列少量分布于蓝菌门,还有 17%~32% 属于未分类的细菌。在变形菌门中,本研究土壤中检测到 α -变形菌、 β -变形菌和 δ -变形菌的存在,而 γ -变形菌未检测到。Izquierdo 等^[31]也报道了一些热带土壤中缺乏 γ -变形菌的固氮菌。

表 3 不同施肥处理固氮菌多样性指数

Table 3 Diversity indices of nitrogen-fixing bacteria under different fertilizer regimes

处理 Treatment	操作分类单元 OTUs	Chao1 指数 Chao1 index	Shannon 指数 Shannon index	均匀度 Evenness	覆盖度 Coverage/%
CK	472±16a	593.09±15.61a	4.89±0.07ab	0.79±0.02ab	97.45±0.00a
NPK	497±21a	623.46±42.10a	5.11±0.05a	0.82±0.01a	97.32±0.00a
MF80	434±25a	554.53±19.00a	4.67±0.01b	0.77±0.01b	97.44±0.00a
MF60	440±15a	593.46±4.31a	4.57±0.23b	0.75±0.04b	97.19±0.00a
MF40	461±55a	558.19±39.60a	4.71±0.11b	0.77±0.01b	97.52±0.00a

在属水平(图5),大部分优势类群为未分类的种类,包括 unclassified Alphaproteobacteria、unclassified Proteobacteria、unclassified Deltaproteobacteria、unclassified Beltaproteobacteria。而地杆菌属(*Geobacter*)是唯一一个可分类的优势种群,丰度为6.88%~13.70%。地杆菌属在CK中丰度最高为13.70%,MF40处理中丰度最低为6.88%。与NPK处理相比,翻压绿肥显著降低了地杆菌属的丰度,但绿肥处理间无显著差异。此外土壤中还含有丰度较低(相对丰度<1%)的一些固氮菌属,如铁氧化细菌(*Sideroxydans*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、厌氧黏细菌(*Anaeromyxobacter*)、念珠藻属(*Nostoc*)、红螺菌属(*Rhodospirillum*)、固氮弓菌属(*Azoarcus*)、红微菌属(*Rhodomicrobium*)、互营杆

菌属(*Syntrophobacter*)、微鞘藻属(*Microcoleus*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)等。值得注意的是,本研究中与紫云英关系密切的根瘤菌丰度较低,仅为0.55%~0.73%。原因可能是紫云英于每年4月翻压入土,到8月取样时紫云英大部分物质已经腐解^[32]。

2.3.3 土壤固氮菌群落结构的主坐标分析

我们基于OTU水平对土壤固氮菌群落结构进行主坐标分析(图6)。结果显示:第一和第二排序轴对固氮菌群落变异的解释量分别为36.76%和25.08%,总解释量达到61.84%。由图6可知,施肥处理对土壤固氮菌的群落结构产生较大的影响,CK和NPK处理固氮菌的群落结构较相似,而翻压紫云英的所有施肥

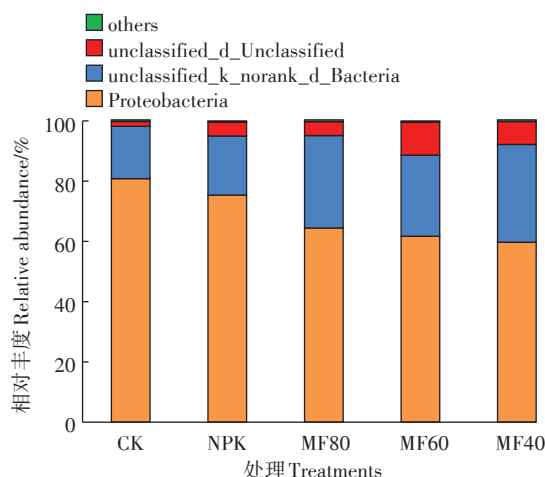


图3 不同施肥处理土壤固氮菌门水平组成

Figure 3 Composition of nitrogen-fixing bacteria at the phylum level under different fertilizer regimes

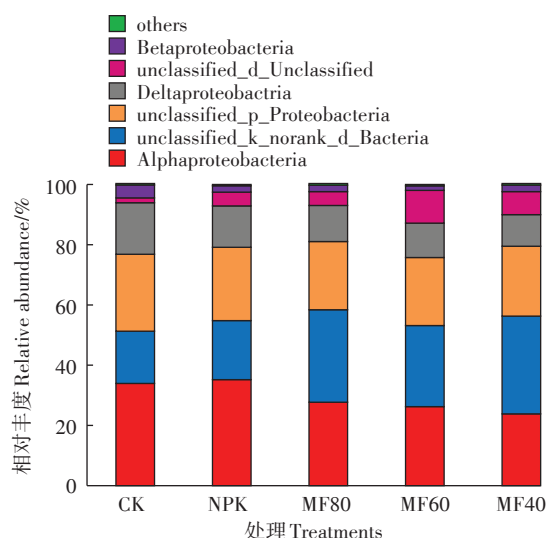


图4 不同施肥处理土壤固氮菌纲水平组成

Figure 4 Composition of nitrogen-fixing bacteria at the class level under different fertilizer regimes

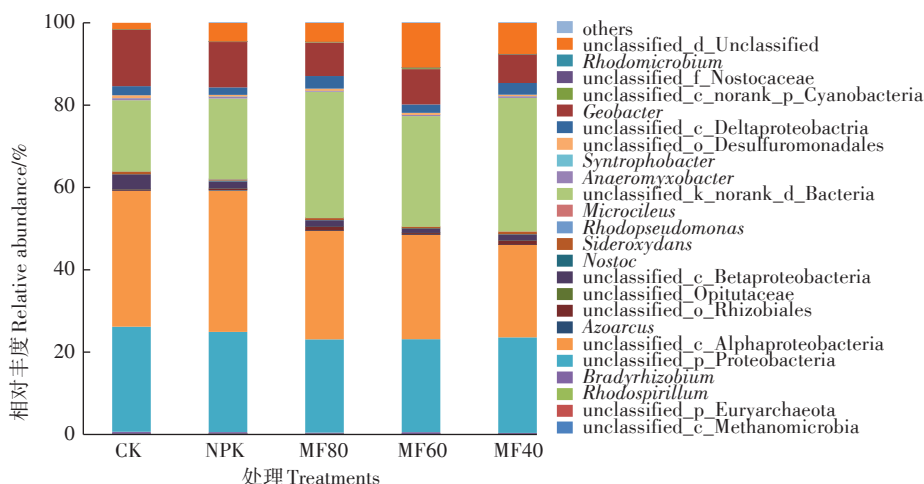


图5 不同施肥处理土壤固氮菌属水平组成

Figure 5 Composition of nitrogen-fixing bacteria at the genus level under different fertilizer regimes

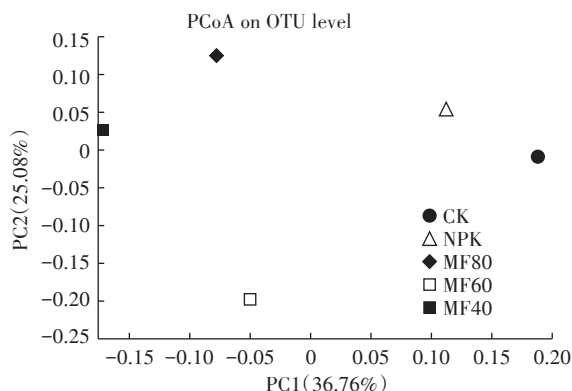


图6 不同施肥处理土壤固氮菌主坐标分析

Figure 6 Principal coordinates analysis (PCoA) of soil nitrogen-fixing bacteria under different fertilizer regimes based on the bray-curtis distance

处理都与NPK处理距离较远,表明翻压紫云英明显改变了土壤固氮菌的群落结构。而在翻压紫云英的处理间,MF40和MF80处理的样本距离较近,表明两者的固氮菌群落结构较相似,而MF60与它们距离较

远。主坐标分析表明紫云英配施减量化肥处理与NPK处理的土壤固氮菌群落结构存在明显的差异。有研究表明,氮肥和有机肥的施用会影响土壤固氮菌的群落组成^[33]。本研究中与CK和NPK处理相比,翻压紫云英的减量化肥处理土壤固氮菌组成发生了明显改变,可见绿肥和化肥用量都影响了固氮菌的群落组成。与单施化肥相比,翻压紫云英处理改变了土壤理化性质,而水稻的根系分泌物可能也会随之产生变化,分泌物的变化改变了土壤的微环境,从而引起土壤固氮菌群落组成的变化。

2.3.4 土壤固氮菌与环境因子的相关性分析

对固氮菌群落组成(属水平)和环境因子进行相关性分析见图7。由图7可知,环境因子和土壤固氮菌群落有着显著的相关性,尤其是土壤TN和AN。土壤TN、AN含量和*Anabaena*、*unclassified Nostocaceae*呈显著正相关($P<0.05$),与*unclassified Proteobacteria*、*unclassified Betaproteobacteria*和*unclassified Desulfuromonadales*呈显著负相关($P<0.05$)。土壤pH与

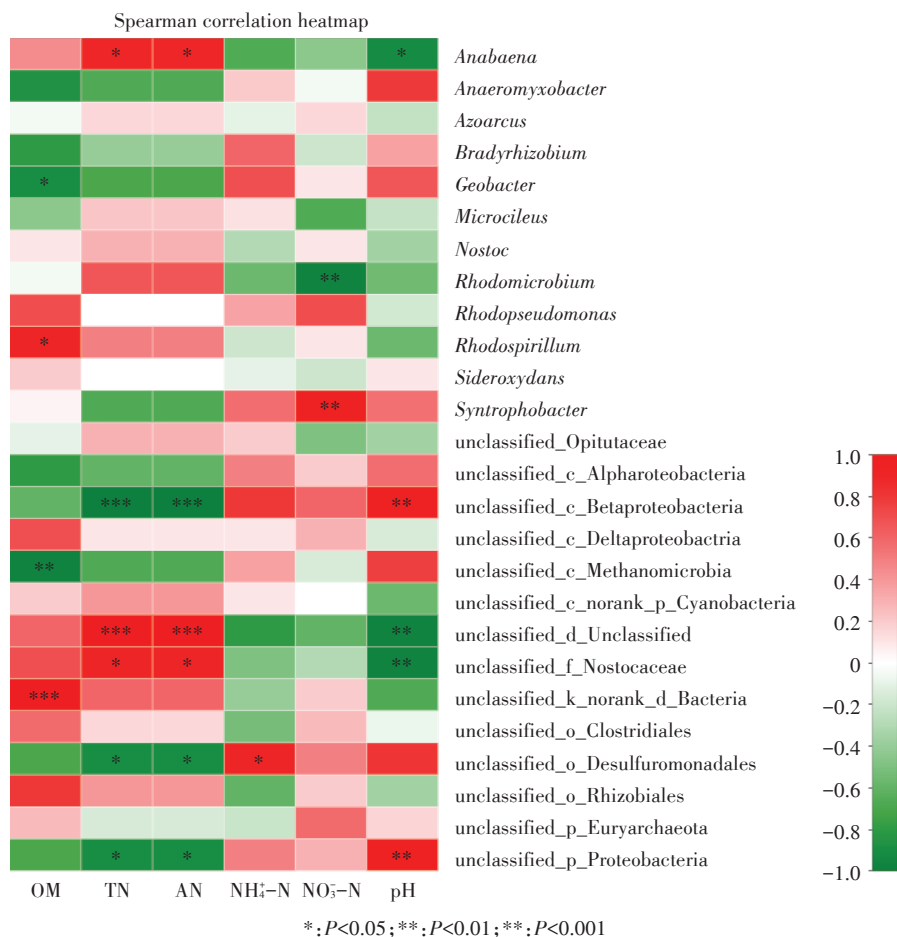


图7 土壤固氮菌群落组成与土壤因子的相关性分析

Figure 7 Spearman's correlation heatmap of nitrogen-fixing bacterial community composition at the genus level and soil properties

固氮菌丰度也有显著的相关性,例如 pH 与 unclassified Proteobacteria 和 unclassified Betaproteobacteria 呈显著正相关($P<0.05$),而与 *Anabaena*、unclassified Nostocaceae 呈显著负相关($P<0.05$)。Juraeva 等^[34]研究发现,土壤 TN 含量能够影响固氮菌的分布。何冬华等^[35]和董志新等^[36]研究报道 pH 对固氮菌群落也会产生显著影响。本研究中环境因子与固氮菌群落组成的相关性分析说明土壤中固氮菌的群落结构可由多个土壤性质共同影响和控制。

3 结论

(1)在长期施肥条件下,翻压紫云英配施减量化肥有利于提升土壤肥力和固氮菌的数量,并且提升幅度与化肥用量有关。

(2)翻压紫云英配施减量化肥处理对土壤固氮菌群落结构产生明显影响。翻压紫云英和化肥用量都是影响土壤固氮菌组成的重要因素。

参考文献:

- [1] Fowler D, Pyle J A, Raven J A, et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century: Introduction[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2013, 368 (1621):20130165.
- [2] 陈清华, 韩云蕾, 马尧, 等. 生物固氮基因簇结构与进化研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(4):129-138.
CHEN Qing-hua, HAN Yun-lei, MA Yao, et al. Research progress on structure and evolution of biological nitrogen-fixing gene cluster[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(4):129-138.
- [3] 徐明岗, 梁国庆, 张夫道, 等. 中国土壤肥力演变[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2006.
XU Ming-gang, LIANG Guo-qing, ZHANG Fu-dao, et al. The evolution of soil fertility in China[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2006.
- [4] 曹卫东, 黄鸿翔. 关于我国恢复和发展绿肥若干问题的思考[J]. 中国土壤与肥料, 2009(4):1-3.
CAO Wei-dong, HUANG Hong-xiang. Ideas on restoration and development of green manures in China[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2009(4):1-3.
- [5] 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[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(16):4542-4548.
- [6] Tejada M, Gonzalez J L, García-Martínez A M, et al. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99:1758-1767.
- [7] Berthrong S T, Yeager C M, Gallegos-Graves L, et al. Nitrogen fertilization has a stronger effect on soil nitrogen-fixing bacterial communities than elevated atmospheric CO₂[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(10):3103-3112.
- [8] Tan X Y, Hurek T, Reinhold-Hurek B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10):1009-1015.
- [9] Wakelin S A, Colloff M J, Harvey P R, et al. The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59(3):661-670.
- [10] 黎睿智. 长期施肥对土壤钼含量和固氮微生物区系的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
LI Rui-zhi. Effects of long-term fertilization on the content of soil molybdenum and flora of nitrogen-fixing microbes[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [11] Teng Q H, Sun B, Fu X R, et al. Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, south China[J]. *The Journal of Microbiology*, 2009, 47(2):135-141.
- [12] 王秀星. 稻-稻-绿肥长期轮作对水稻土壤及根系细菌群落的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
WANG Xiu-cheng. The influence of long term rice-rice-green manure rotation on rice bulk soil and root-associated bacteria[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
- [13] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1999:107-159.
LU Ru-kun. Soil agricultural chemical analysis methods[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999:107-159.
- [14] 黄玉芳, 叶优良, 杨素勤. 双波长分光光度法测定土壤硝态氮的可行性研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(2):43-45.
HUANG Yu-fang, YE You-liang, YANG Su-qin. Feasibility of NO₃-N determination by dual wavelength spectrophotometric method[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(2):43-45.
- [15] Rösch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(8):3818-3829.
- [16] Shu W, Pablo G P, Jun Y, et al. Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under different duration of organic management[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(2):493-503.
- [17] Wang C, Zheng M M, Song W F, et al. Impact of 25 years of inorganic fertilization on diazotrophic abundance and community structure in an acidic soil in southern China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113:240-249.
- [18] Coelho M R R, Marriel I E, Jenkins S N, et al. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 42(1):48-53.
- [19] Reed S C, Cleveland C C, Townsend A R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective[J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2011, 42(1):489-512.
- [20] 侯海军, 秦红玲, 陈春兰, 等. 土壤氮循环微生物过程的分子生态学研究进展[J]. 农业现代化研究, 2014, 35(5):588-594.
HOU Hai-jun, QIN Hong-ling, CHEN Chun-lan, et al. Research progress of the molecular ecology on microbiological processes in soil

- nitrogen cycling[J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2014, 35(5):588-594.
- [21] Wakelin S A, Gupta V V S R, Forrester S T. Regional and local factors affecting diversity, abundance and activity of free-living, N_2 -fixing bacteria in Australian agricultural soils[J]. *Pedobiologia*, 2010, 53(6): 391-399.
- [22] Poly F, Ranjard L, Nazaret S, et al. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5):2255-2262.
- [23] Limmer C, Drake H L. Non-symbiotic N_2 -fixation in acidic and pH-neutral forest soils: Aerobic and anaerobic differentials[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(2):177-183.
- [24] Hayden H L, Drake J, Imhof M, et al. The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(10):1774-1783.
- [25] Mergel A, Kloos K, Bothe H. Seasonal fluctuations in the population of denitrifying and N_2 -fixing bacteria in an acid soil of a Norway spruce forest[J]. *Plant and Soil*, 2001, 230:145-160.
- [26] Hai B, Diallo N H, Sall S, et al. Quantification of key genes steering the microbial nitrogen cycle in the rhizosphere of sorghum cultivars in tropical agroecosystems[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15):4993-5000.
- [27] Reardon C, Gollany H, Wuest S. Diazotroph community structure and abundance in wheat-fallow and wheat-pea crop rotations[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 69:406-412.
- [28] Young J P W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms [M]//In Stacey, et al (eds). *Biological nitrogen fixation*. New York: Chapman and Hall, Inc. 1992.
- [29] 徐鹏霞. 典型旱地作物生长期及施肥对氮转化相关微生物的研究[D]. 重庆:西南大学, 2017.
- XU Peng-xia. Research on typical dryland crops growing season and fertilization on related nitrogen transformation microbia[D]. Chongqing: Southwest University, 2017.
- [30] Collavino M M, Tripp H J, Frank I E, et al. *nifH* pyrosequencing reveals the potential for location-specific soil chemistry to influence N_2 -fixing community dynamics[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(10):3211-3223.
- [31] Izquierdo J A, Nüsslein K. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments[J]. *Microbial Ecology*, 2006, 51(4):441-452.
- [32] 王 飞, 林 诚, 李清华, 等. 亚热带单季稻区紫云英不同翻压量下有机碳和养分释放特征[J]. 草业学报, 2012, 21(4):319-324.
- WANG Fei, LIN Cheng, LI Qing-hua, et al. A study on organic carbon and nutrient releasing characteristics of different *Astragalus sinicus* manure use levels in a single cropping region of subtropical China [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2012, 21(4):319-324.
- [33] Tang H, Yu M, Wang Y. Effects of long-term fertilization on *nifH* gene diversity in agricultural black soil[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(11):2659-2266.
- [34] Juraeva D, George E, Davranov K, et al. Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52(8):731-739.
- [35] 何冬华, 沈秋兰, 徐秋芳, 等. 不同年限毛竹林土壤固氮菌群落结构和丰度的演变[J]. 土壤学报, 2015, 52(4):934-942.
- HE Dong-hua, SHEN Qiu-lan, XU Qiu-fang, et al. Evolvment of structure and abundance of soil ntirogen-fixing bacterial community in *Phyllostachys edulis* plantations with age of time[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(4):934-942.
- [36] 董志新, 孙 波, 殷士学, 等. 气候条件和作物对黑土和潮土固氮菌群落多样性的影响[J]. 土壤学报, 2012, 49(1):130-138.
- DONG Zhi-xin, SUN Bo, YIN Shi-xue, et al. Impacts of climate and cropping on community diversity of diazotrophs in pachic udic argiboroll and fluventic ustochrept[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49(1):130-138.