

DOI: 10.5846/stxb202201270261

王利民, 黄东风, 何春梅, 刘彩玲, 李清华, 黄毅斌, 王飞. 紫云英还田对黄泥田土壤理化和微生物特性及水稻产量的影响. 生态学报, 2023, 43(11): 4782-4797.

Wang L M, Huang D F, He C M, Liu C L, Li Q H, Huang Y B, Wang F. Impacts of the Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus* L.) residue incorporation on soil physicochemical, microbial properties and rice yields in yellow-mud paddy field. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(11): 4782-4797.

# 紫云英还田对黄泥田土壤理化和微生物特性及水稻产量的影响

王利民, 黄东风, 何春梅, 刘彩玲, 李清华, 黄毅斌, 王 飞\*

福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福州 350012

**摘要:**为探明紫云英连年还田化肥减施单季稻田土壤性质及水稻产量的变化规律, 依托位于福建省东部 12 年黄泥田紫云英-单季稻轮作定位试验, 研究了不施肥 ( $C_0$ )、单施化肥 ( $C_{100}$ )、紫云英还田 (M)、紫云英还田+全量化肥 ( $MC_{100}$ ) 及紫云英还田+减量 20% 化肥 ( $MC_{80}$ ) 处理的土壤理化性状、微生物群落结构和功能及稻谷产量的变化。结果表明:  $C_{100}$ 、M、 $MC_{100}$ 、 $MC_{80}$  处理土壤有机碳含量比  $C_0$  分别提高 6.97%、15.05%、10.38%、11.15%, 全氮分别提高 9.52%、18.25%、15.87%、15.87%, 硝态氮分别提高 6.51%、69.52%、66.87%、78.19% ( $P < 0.05$ )。冗余分析表明, 土壤有机碳、全氮、硝态氮含量对细菌和古菌群落结构和功能有显著的影响。与  $C_0$  相比,  $C_{100}$ 、M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理土壤慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 丰度分别增加 0.52%、24.30%、7.59%、11.93%, 其中 M 处理增加达显著水平 ( $P < 0.05$ ); 分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 分别增加 5.51%、21.58%、10.00%、14.74%, 其中 M 处理增加显著 ( $P < 0.05$ ); 亚硝化杆菌属 (*Candidatus\_Nitrosotalea*) 分别增加 22.93%、17.21%、65.39%、89.89%, 其中  $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理增加均达显著水平 ( $P < 0.05$ )。相比  $C_0$ , M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理土壤链霉菌属 (*Streptomyces*) 分别增加 6.76%、16.89%、12.16%, 其中  $MC_{100}$  处理增加显著 ( $P < 0.05$ ), 而  $C_{100}$  却减少 2.50%。物种贡献度分析发现, 土壤碳代谢和氨基酸合成的主要功能微生物为细菌慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和古菌亚硝化杆菌属 (*Candidatus\_Nitrosotalea*)。M、 $MC_{100}$ 、 $MC_{80}$  处理稻谷产量比  $C_0$  分别增加 9.68%、19.16%、18.72%。阐明紫云英培肥处理能提升单季稻黄泥田土壤肥力水平, 调节土壤微生物群落结构, 促进土壤碳水化合物和氨基酸代谢。

**关键词:** 黄泥田; 紫云英; 理化性质; 微生物群落结构和功能

## Impacts of the Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus* L.) residue incorporation on soil physicochemical, microbial properties and rice yields in yellow-mud paddy field

WANG Limin, HUANG Dongfeng, HE Chunmei, LIU Cailing, LI Qinghua, HUANG Yibin, WANG Fei\*

Institute of Soil and Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350012, China

**Abstract:** To evaluate the effects of milk vetch (*Astragalus sinicus* L.) residue combined with different rates of chemical fertilizers on soil properties and rice yields in a yellow-mud paddy field, a 12-year field experiment in eastern Fujian Province was conducted to investigate soil physicochemical properties, microbial community structure and function, and rice yields in the  $C_0$  (without fertilization),  $C_{100}$  (chemical fertilizers), M (Chinese milk vetch),  $MC_{100}$  (Chinese milk vetch combined with 100% chemical fertilizers), and  $MC_{80}$  (Chinese milk vetch combined with 80% chemical fertilizers)

**基金项目:** 福建省自然科学基金项目 (2020J011358); 福建省农业科学院英才项目 (YC2019006); 国家绿肥产业体系项目 (CARS-22-G-01)

**收稿日期:** 2022-01-27; **网络出版日期:** 2023-02-07

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: fjiwangfei@163.com

treatments. Results showed that soil organic carbon (SOC) concentration in the  $C_{100}$ , M,  $MC_{100}$  and  $MC_{80}$  treatments increased by 6.97%, 15.05%, 10.38%, 11.15%, total nitrogen (TN) increased by 9.52%, 18.25%, 15.87%, 15.87%, and nitrate nitrogen ( $NO_3^-$ -N) increased by 6.51%, 69.52%, 66.87%, 78.19% compared with those in the  $C_0$  treatment, respectively ( $P<0.05$ ). Furthermore, SOC, TN, and  $NO_3^-$ -N concentrations were the main factors driving the variation in soil bacterial, archaeal community structure and function under different fertilization regimes using redundancy analysis. In addition, the relative abundance of the bacterial genus *Bradyrhizobium* in the  $C_{100}$ , M,  $MC_{100}$  and  $MC_{80}$  treatments increased by 0.52%, 24.30%, 7.59%, 11.93%, and a significant increase in the relative abundance of *Bradyrhizobium* was found in the M treatment ( $P<0.05$ ); the abundance of *Mycobacterium* increased by 5.51%, 21.58%, 10.00%, 14.74%, and a significant increase in the relative abundance of *Mycobacterium* was found in the M treatment ( $P<0.05$ ); the abundance of the archaeal genus *Candidatus\_Nitrosotalea* increased by 22.93%, 17.21%, 65.39%, 89.89% compared with those in the  $C_0$  treatment, respectively, and a significant increase in the relative abundance of *Candidatus\_Nitrosotalea* was found in the  $MC_{100}$  and  $MC_{80}$  treatments ( $P<0.05$ ); in addition, the relative abundance of *Streptomyces* in the M,  $MC_{100}$  and  $MC_{80}$  treatments increased by 6.76%, 16.89%, 12.16%, and a significant increase in the relative abundance of *Streptomyces* was found in the  $MC_{100}$  treatment ( $P<0.05$ ), whereas decreased by 2.50% in the  $C_{100}$  treatment comparing with the  $C_0$  treatment. Compared with the  $C_0$  treatment, the M,  $MC_{100}$  and  $MC_{80}$  treatments increased the average rice yield by 9.68%, 19.16%, 18.72%, respectively. Soil microbial genus-functional contribution analysis revealed that the bacterial genera *Bradyrhizobium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, and the archaeal genus *Candidatus\_Nitrosotalea* were the key drivers of the top two kinds of functions: amino acid and carbon metabolism under different fertilization regimes. In general, these findings indicate that the Chinese milk vetch residue incorporation might ameliorate soil properties, regulate soil microbial community structure, accelerate metabolism of amino acids and carbohydrates in a yellow-mud paddy field in a single rice cropping system.

**Key Words:** yellow-mud paddy field; milk vetch; physicochemical property; microbial community structure and function

中国是世界稻米产量最大的国家,占全球水稻生产总量的 28%左右。在水稻生产过程中,由于长期大量施用化肥而导致稻田土壤质量退化,稻米品质下降,已成为水稻生产的重要制约因素<sup>[1]</sup>。因此,研究化肥绿色替代技术,实现稻田生态系统的可持续发展迫在眉睫。紫云英(*Astragalus sinicus* L.)是我国南方稻区主要的绿肥作物,属于豆科黄芪属越年生草本植物,其根瘤具有很强的固氮功能,能减少水稻化肥尤其是氮肥用量<sup>[2]</sup>。紫云英配施减量化肥能降低土壤容重,增加大团聚体组成,增强团聚体稳定性,从而改良土壤物理性状<sup>[3]</sup>。与未施肥对照和全施化肥处理相比,紫云英还田条件下减施 20%化肥处理土壤大团聚体含量分别提高 76.7%和 10.1%,减施 40%化肥分别提高 80.6%和 12.5%;与对照相比,紫云英配施减施 20%化肥处理土壤团聚体平均重量直径(MWD)和几何平均直径(GMD)分别增加 51.4%和 22.7%,配施减施 40%化肥处理 MWD 和 GMD 分别增加 54.3%和 22.7%<sup>[4]</sup>。此外,紫云英还田还能提升土壤有机碳和全氮含量<sup>[5]</sup>。湖南南县 2008—2018 年的试验表明,与全施化肥处理相比,紫云英与化肥配施均不同程度提高土壤可溶性有机碳(DOC)、可溶性有机氮(DON)含量;当紫云英还田量为 15—22.5 t/hm<sup>2</sup>时,土壤 DOC 和 DON 均随还田量增加而增加,当还田量超过 22.5 t/hm<sup>2</sup>时呈下降趋势<sup>[5]</sup>。紫云英配施化肥还能优化水稻产量构成因子,增加稻谷产量<sup>[1]</sup>。相比全施化肥处理,紫云英配施减量化肥能提高水稻株高、有效穗数及千粒重等产量构成因素值,并增加水稻叶面积指数和光合速率,促进叶片光合作用,增加水稻产量<sup>[1]</sup>。与全施化肥相比,在 15—30 t/hm<sup>2</sup>紫云英还田条件下,晚稻稻谷产量随紫云英还田量的增加而增加,但还田量超过 30 t/hm<sup>2</sup>时,晚稻稻谷产量则呈下降趋势<sup>[5]</sup>。紫云英还田年限也是决定水稻产量的另一个关键因素。江西余江区的紫云英还田试验表明,随着紫云英还田年限延长,稻谷产量越高<sup>[6]</sup>。此外,紫云英还田下双季水稻稻谷产量随化肥用量减少而下降。其中,紫云英配施全量化肥稻谷产量最高,比全施化肥处理增加 13.5%<sup>[7]</sup>。由此可知,紫云英还田对水

稻产量和土壤理化特性的影响因紫云英还田量、还田年限及培肥处理不同而异。

紫云英还田不仅影响土壤理化性质,而且通过改变稻田环境而影响土壤微生物群落的结构和功能<sup>[8-9]</sup>。微生物在土壤物质分解和合成中起重要作用<sup>[10]</sup>。已有研究表明,种植紫云英有利于稻田土壤微生物生长繁殖,且增加微生物多样性,增强土壤酶活性,从而促进水稻养分吸收<sup>[11-13]</sup>。种植紫云英还能调节土壤微生物群落结构,使土壤好气性细菌和真菌数量增加,放线菌数量减少<sup>[14]</sup>。此外,长期种植绿肥对稻田土壤功能微生物产生显著影响,紫云英还田下土壤磷循环功能基因 *phnA*、*phnN*、*phnV* 丰度上升,而 *phnI*、*phnL*、*glpB*、*glpO*、*pitA*、*phoA*、*phoP*、*phoU* 基因丰度下降<sup>[15]</sup>。紫云英还田还能增加土壤甲烷氧化菌<sup>[16]</sup>。而且,紫云英与稻草秸秆协同还田比稻草单独还田能降低土壤产甲烷古菌 *mcrA*/甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因丰度比值,提高 Type I/Type II 型甲烷氧化细菌丰度比值<sup>[17]</sup>。紫云英配施减量化肥能增加土壤固氮菌 *nifH* 基因丰度,改变固氮菌群落结构<sup>[18]</sup>。然而,种植紫云英对氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)的影响则因土壤类型而异。在酸性红壤稻田中,AOA-*amoA* 的主要分类操作单元(OTU)在不同紫云英处理间差异较大,而 AOB-*amoA* 在处理间差异较小,且稻田土壤 AOA 在数量上占优势,表明酸性红壤稻田 AOA 对紫云英还田的响应更灵敏,在土壤氨氧化中的贡献比 AOB 大<sup>[19-20]</sup>,但也有研究得出相反的结果<sup>[21]</sup>。在碱性紫潮泥水稻土中,种植紫云英能提高 AOA 中的 *Nitrosopumilus* 丰度,降低 AOB 中的 *Nitrosomonas* 丰度<sup>[22]</sup>。如果紫云英还田量超过 22.5 t/hm<sup>2</sup> 时,那会导致紫云英腐解时间延长,在腐解过程中引起土壤氧化还原电位下降,产生大量的 H<sub>2</sub>S 等有毒物质,致使土壤 AOB 数量减少<sup>[23]</sup>。综上,紫云英还田下土壤微生物的影响因素极其复杂,紫云英还田量、培肥处理、土壤类型等对微生物群落结构和功能均产生影响。因此,尽管已经开展了大量紫云英还田下土壤微生物群落影响的研究,但更多是集中在单一功能微生物种的研究,且部分研究结果存在争议。在自然界土壤中,微生物参与物质循环往往是通过群落而非单一微生物种执行<sup>[24]</sup>。目前,关于紫云英还田下黄泥田土壤微生物群落整体结构和功能发生了怎样的变化尚不清楚。

黄泥田是我国南方稻区广泛分布的中低产田。福建省黄泥田面积占全省水稻土总面积的 30% 左右,主要分布于山地丘陵、滨海台地和河谷阶地,存在酸、粘、瘦等障碍因素<sup>[25]</sup>。虽然课题组前期通过水稻-紫云英轮作试验发现,紫云英能够替代部分化肥并保持黄泥田水稻高产稳产<sup>[26]</sup>,但仍缺乏紫云英还田下黄泥田土壤理化性质、微生物群落结构和功能的系统研究。为此,本研究通过田间试验研究紫云英-水稻长期轮作下化肥减施土壤性质的变化,尤其是采用宏基因组学技术,从微生物群落水平上探究土壤微生物群落结构和功能的变化,为福建省黄泥田化肥减施和水稻增产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区自然概况

紫云英-水稻轮作定位试验位于福建省福州市闽侯县白沙镇溪头村的农业农村部福建耕地保育科学观测实验站(119°04'10"E, 26°13'31"N),属于亚热带季风气候,海拔高度 15.4 m,年均降水量为 1350.9 mm,年日照时数 1812.5 h,年均温度 19.5 °C,无霜期 311 d。供试土壤为渗育型水稻土,成土母质为低丘红壤坡积物。试验始于 2009 年,同年采集的试验前土壤基础肥力为:pH 值 4.78,有机质含量 24.4 g/kg,全氮 1.23 g/kg,全磷 0.60 g/kg,全钾 13.3 g/kg,碱解氮 171.6 mg/kg,有效磷 13.5 mg/kg,速效钾 83.4 mg/kg。

### 1.2 试验设计

试验设 5 个处理,分别为不施肥对照(C<sub>0</sub>)、单施化肥(C<sub>100</sub>,施用量:N 135 kg/hm<sup>2</sup>、P 24 kg/hm<sup>2</sup>、K 78 kg/hm<sup>2</sup>)、紫云英还田(M,施用量:2014 年前鲜紫云英还田量为 18000 kg/hm<sup>2</sup>、2014 年后还田量为 22500 kg/hm<sup>2</sup>)、紫云英还田+全量化肥(MC<sub>100</sub>)、紫云英还田+减量 20% 化肥(MC<sub>80</sub>)。每处理重复 3 次,采用随机区组排列。小区面积为 15 m<sup>2</sup>。为了防止小区间串水、串肥和侧渗,用水泥田埂隔开,筑高 20 cm,埋深 40 cm。供试水稻品种 2009—2011 年为宜香优 2292,2012—2016 年为中浙优 1 号,2017—2020 年为中浙优 8 号。水稻秧苗移栽时间为每年的 6 月下旬至 7 月上旬,种植密度 20×10<sup>4</sup> 丛/hm<sup>2</sup>,收获时间为 10 月中旬。化肥施用量

的依据主要是参照黄泥田晚稻氮磷钾肥优化施肥技术<sup>[27]</sup>。氮、磷、钾肥分别使用尿素、过磷酸钙和氯化钾。磷肥全部基肥,氮、钾肥 60%基施,40%在分蘖期追施。紫云英在盛花期还田,前两年将其他田块的紫云英收割后用于试验田,后 9 年是原田种植还田,干耕翻压至 20 cm 土层。在紫云英盛花期采用 20 cm × 40 cm 的样方从各小区取样,小心将紫云英根部一起挖出现场用水洗净,并称重,计算每小区紫云英鲜草产量,多余的紫云英原田移出,不足部分外源补充。2009 年的供试紫云英品种为“弋江籽”,2010—2016 年为“闽紫 7 号”,2017 年为“信阳籽”,2018—2020 年为“闽紫 8 号”。紫云英鲜草的平均有机质为 101.2 g/kg、氮(N) 4.0 g/kg、磷(P) 0.4 g/kg、钾(K) 2.2 g/kg 及含水量 85.9%。

### 1.3 样品采集与处理

水稻成熟期在每个小区采用水稻联合收割机收获测产,随机抽取实收数量的 10% 左右进行称重、去杂,测定杂质率,取去杂后的 1.0 kg 稻谷烘干计算晒干率和空瘪率,并计算实收稻谷产量。2019 年,水稻收割后采集各小区土样,事先须对采样器进行酒精棉擦拭,待酒精挥发完全后,使用采样小区土壤浸润采样器。后续每次更换小区均重复此步骤。各试验小区采用五点采样法,采集 0—20 cm 土层样品 1.5 kg 左右。然后,剔除土壤样品中的动植物残体和石块,混匀,置于无菌的自封袋中,封口后放入冰盒中低温保存运回实验室。一部分新鲜土样液氮速冻后转移至 -80 °C 冰箱保存,用于土壤微生物分析;另一部分土样风干后磨细、过筛,以备土壤化学性质测定。同时,采集土壤环刀样品。

### 1.4 测定方法

土壤密度、含水量和孔隙度采用环刀法测定。土壤 pH 值用蒸馏水浸提(土水比 1:2.5) pH 计测定,土壤有机质采用  $K_2Cr_2O_7$ - $H_2SO_4$  外加热法、全氮采用半微量凯氏法、铵态氮( $NH_4^+$ -N)采用靛酚蓝比色法、硝态氮( $NO_3^-$ -N)采用紫外分光光度法,有效磷采用 0.5 mol/L  $NaHCO_3$  浸提-钼锑抗比色法测定<sup>[28]</sup>。紫云英植株样品经  $H_2SO_4$ - $H_2O_2$  消煮后,采用凯氏法、钒钼黄比色法和火焰光度计法分别测定全氮、全磷、全钾<sup>[28]</sup>。

土壤微生物群落结构与功能分析采用宏基因组高通量测序。主要步骤依次为土壤 DNA 提取、建库与宏基因组测序;数据质控和拼接组装<sup>[29]</sup>;基因预测、非冗余基因集构建和基因丰度计算<sup>[30-32]</sup>。然后,使用 BLASTP (BLAST Version 2.2.28+, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将非冗余基因集序列与非冗余蛋白数据库(NR)数据库进行比对(BLAST 比对参数设置期望值 e-value 为  $1e-5$ )<sup>[33]</sup>,获得物种注释,并使用物种对应的基因丰度总和计算该物种的丰度,最终可获得微生物在域和属分类学水平上的物种注释信息。使用 BLASTP 将非冗余基因集序列与京都基因与基因组百分全书(KEGG)的基因数据库(GENES)进行比对(BLAST 比对参数设置期望值 e-value 为  $1e-5$ ),用 KOBAS 2.0 (KEGG Orthology Based Annotation System, <http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>) 进行功能注释,并用代谢通路对应的基因丰度总和计算对应功能类别的丰度<sup>[34]</sup>。最后,通过上海美吉生物医药科技有限公司提供的交互式 I-Sanger 生信云平台进一步开展微生物信息学分析。

### 1.5 数据分析

主坐标分析(PCoA)、冗余分析(RDA)和相关性热图(Heatmap)分析采用 R 软件(3.3.1 版本)完成;物种贡献度分析基于土壤微生物的物种和功能相对丰度,进行物种丰度与功能丰度之间的关联分析,找出特定功能的物种贡献度。方差分析(ANOVA)和 Duncan's 新复极差法多重比较使用 SAS 8.02 软件分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 各处理水稻土理化性状和稻谷产量的变化

紫云英还田后土壤密度和含水量无显著的变化(表 1)。与  $C_{100}$  处理相比,  $M$ 、 $MC_{100}$ 、 $MC_{80}$  处理土壤总孔隙度分别增加 9.33%、16.89%、15.34%,表明长期紫云英还田可以在一定程度上减轻因单施化肥造成的土壤板结现象。相比  $C_0$  处理,  $C_{100}$ 、 $M$  处理土壤 pH 值无显著的差异,但  $MC_{100}$ 、 $MC_{80}$  土壤 pH 均降低 4.96%,达显著水平( $P < 0.05$ )。与  $C_0$  相比,除  $C_{100}$  外,  $M$ 、 $MC_{100}$ 、 $MC_{80}$  处理土壤有机碳增加 15.05%、10.38%、11.15%,全氮增加

18.25%、15.87%、15.87%，硝态氮增加 69.52%、66.87%、78.19%，说明紫云英连年还田后提升了稻田土壤肥力水平。但是，土壤铵态氮和有效磷在所有供试处理中无显著的差异。 $C_{100}$ 、M、 $MC_{100}$ 、 $MC_{80}$ 处理的 9 年平均稻谷产量较  $C_0$  分别增加 16.01%、9.68%、19.16%、18.72% ( $P < 0.05$ )，尤其是  $MC_{100}$ 、 $MC_{80}$  处理稻谷产量增幅较大，而 M 处理增幅较小(图 1)。综上，紫云英连年还田和化肥配施可以改良稻田土壤理化性质，水稻增产潜力较大。

表 1 不同培肥处理下稻田土壤理化性状的变化

Table 1 Soil physicochemical properties under different fertilization regimes

| 处理<br>Treatments | 土壤密度<br>Soil bulk<br>density/<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | 总孔隙度<br>Total<br>porosity/% | 含水量<br>Water<br>content/% | 土壤 pH<br>Soil pH | 有机碳<br>organic C/<br>(g/kg) | 全氮<br>Total N/<br>(g/kg) | 碳/氮比<br>C/N ratio | 硝态氮<br>Nitrate N/<br>(mg/kg) | 铵态氮<br>Ammonium N/<br>(mg/kg) | 有效磷<br>Available P/<br>(mg/kg) |
|------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| $C_0$            | 1.03±0.07a                                            | 65.62±8.61ab                | 27.53±0.74a               | 5.24±0.07a       | 14.35±0.20b                 | 1.26±0.01b               | 11.39±0.19a       | 8.30±1.67b                   | 4.95±1.99a                    | 12.50±2.01a                    |
| $C_{100}$        | 1.04±0.02a                                            | 57.77±0.85b                 | 27.40±0.92a               | 5.11±0.09ab      | 15.35±0.54ab                | 1.38±0.07ab              | 11.16±0.18ab      | 8.84±1.92b                   | 6.54±0.76a                    | 17.54±2.84a                    |
| M                | 0.96±0.00a                                            | 63.16±5.42ab                | 30.83±2.11a               | 5.18±0.07ab      | 16.51±0.72a                 | 1.49±0.08a               | 11.11±0.10ab      | 14.07±2.96a                  | 5.46±0.61a                    | 12.71±6.23a                    |
| $MC_{100}$       | 1.00±0.06a                                            | 67.53±4.34a                 | 25.53±1.15a               | 4.98±0.16b       | 15.84±1.02a                 | 1.46±0.14a               | 10.87±0.38b       | 13.85±0.94a                  | 5.79±0.74a                    | 15.85±3.19a                    |
| $MC_{80}$        | 1.00±0.13a                                            | 66.63±6.70ab                | 26.72±1.58a               | 4.98±0.16b       | 15.95±1.22a                 | 1.46±0.10a               | 10.90±0.21b       | 14.79±3.13a                  | 5.54±0.87a                    | 19.83±5.35a                    |

$C_0$ : 对照(不施肥) control (without fertilization);  $C_{100}$ : 单施化肥 chemical fertilizers alone; M: 紫云英还田 milk vetch alone;  $MC_{100}$ : 紫云英还田+全量化肥 milk vetch and 100% chemical fertilizers;  $MC_{80}$ : 紫云英还田+减量 20% 化肥 milk vetch and 80% chemical fertilizers; 不同小写字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 表中数据为平均值±标准差 ( $n = 3$ )

2.2 各处理水稻土微生物群落结构和丰度的变化

2.2.1 黄泥田土壤微生物群落结构

$C_0$ 、 $C_{100}$ 、M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理土壤细菌共有物种数为 12013(图 2)。其中,含有紫云英的 M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理相比其他两个处理土壤细菌物种数目均有不同程度升高,前 3 个处理土壤独有的细菌物种数为 43。所有供试处理土壤共有古菌物种数为 876,含有紫云英的 3 个处理独有古菌物种数为 7。但是,  $C_0$  和  $C_{100}$  处理比含有紫云英的其他 3 个处理古菌物种数目均有不同程度上升,原因是古菌在寡营养或高盐等极端环境条件下表现出优越的适应性。所有供试处理土壤共有真核生物数为 977;含有紫云英的 3 个处理土壤独有的真核生物物种数为 12,比其他两个处理真核生物物种数均有不同程度增加,因为紫云英还田为异养型的土壤真核生物提供了丰富的有机能源物质,进而增加土壤真核生物数量。由此可知,所有供试处理土壤共有和独有的细菌物种数目高于古菌和真核生物。

通过 PCoA 分析,不同培肥处理对土壤细菌、古菌和真核生物群落结构均有显著的影响,受影响较大的是细菌,其次是古菌,最后是真核生物(图 2)。 $C_0$  和  $C_{100}$  处理土壤细菌组成靠近第一主成分 PC1 的右边,而含有紫云英的 M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理相对靠近 PC1 的左边,表明前两个处理土壤细菌在物种组成上较相似,而后 3 个处理细菌组成相似性更高。土壤细菌群落组成总变化的 59.27% 可以被前两个主成分所解释,其中

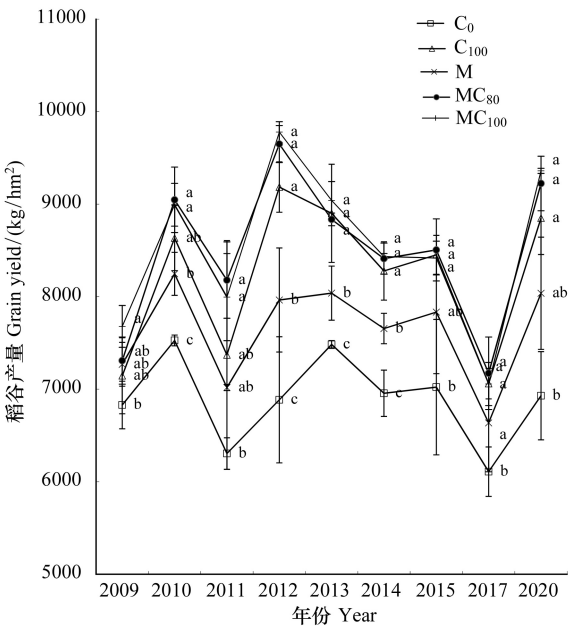


图 1 不同培肥处理下稻谷产量的变化

Fig.1 Rice grain yield under different fertilization regimes

图中不同小写字母表示有显著差异 ( $P < 0.05$ );  $C_0$ : 对照(不施肥) control (without fertilization);  $C_{100}$ : 单施化肥 chemical fertilizers alone; M: 紫云英还田 milk vetch alone;  $MC_{100}$ : 紫云英还田+全量化肥 milk vetch and 100% chemical fertilizers;  $MC_{80}$ : 紫云英还田+减量 20% 化肥 milk vetch and 80% chemical fertilizers

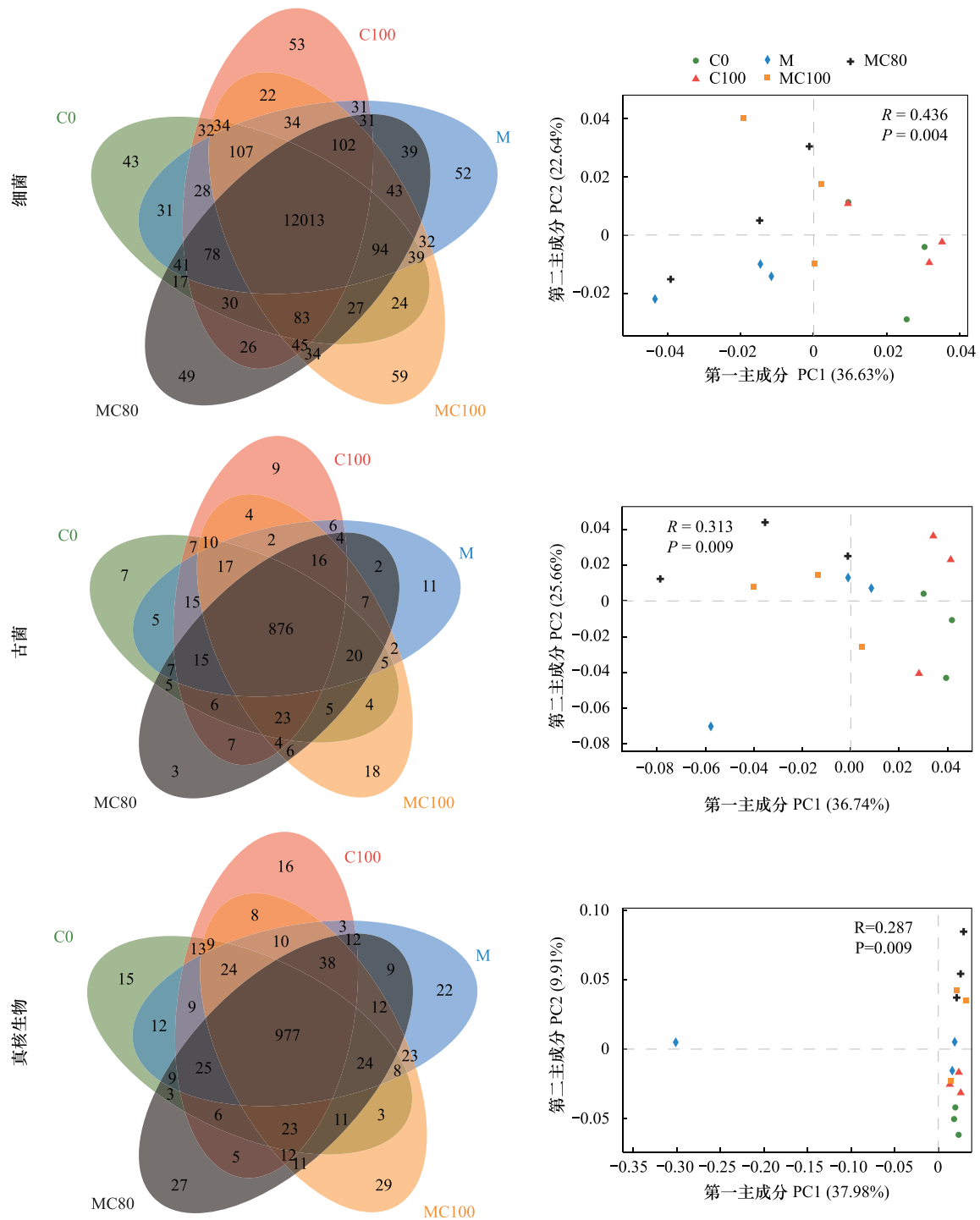


图2 不同培肥处理下稻田土壤细菌、古菌和真核生物群落结构的变化  
Fig.2 Soil bacterial, archaeal, and eukaryotic community structure under different fertilization regimes

PC1 可以解释细菌组成变化的 36.63%, PC2 解释细菌组成变化的 22.64%。C<sub>0</sub> 和 C<sub>100</sub> 处理土壤古菌组成靠近第一主成分 PC1 的右边, 而其他含有紫云英的 M、MC<sub>100</sub> 和 MC<sub>80</sub> 处理相对靠近 PC1 的左边, 说明 C<sub>0</sub> 和 C<sub>100</sub> 处理古菌组成与 M、MC<sub>100</sub> 和 MC<sub>80</sub> 处理差异性较大。土壤古菌组成总变异的 62.40% 可以被前两个主成分所解释, 其中 PC1、PC2 能分别解释古菌组成变异的 36.74% 和 25.66%。C<sub>0</sub> 和 C<sub>100</sub> 处理土壤真核生物组成靠近第二主成分 PC2 的下面, 而 M、MC<sub>100</sub> 和 MC<sub>80</sub> 处理相对靠近 PC2 的上面, 表明前两个 C<sub>0</sub> 和 C<sub>100</sub> 处理真核生物在物种组成上较为相似, 后 3 个处理真核生物组成相似性较高。真核生物组成总变化的 47.89% 可以被前两个主成分

所解释,其中 PC1、PC2 可以分别解释土壤真核生物组成变化的 37.98% 和 9.91%。综上表明,紫云英培肥处理能调节黄泥田水稻土微生物群落结构。

### 2.2.2 黄泥田土壤微生物群落丰度

紫云英连年还田下土壤细菌、古菌和真核生物域的丰度均无显著的变化 ( $P>0.05$ ) (表 2)。供试处理土壤细菌相对丰度为 97.48%—97.64%,古菌为 1.90%—2.10%,而真核生物仅为 0.22%—0.27%,表明在黄泥田土壤微生物三域中细菌占据数量上的绝对优势,真核生物处于弱势。供试处理土壤细菌优势属主要包括 *Bradyrhizobium* (4.61%—5.73%)、*Mycobacterium* (1.90%—2.31%)、*Streptomyces* (1.45%—1.73%),等(相对丰度  $>1\%$ ) (图 3)。相比  $C_0$ 、M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理土壤细菌属 *Bradyrhizobium* 丰度分别增加 24.30%、7.59%、11.93%,其中 M 处理增加达显著水平 ( $P<0.05$ ); *Mycobacterium* 丰度增加 21.58%、10.00%、14.74%,其中 M 处理达显著水平 ( $P<0.05$ ); *Streptomyces* 增加 6.76%、16.89%、12.16%,其中  $MC_{100}$  处理达显著水平 ( $P<0.05$ ),说明这些细菌属在含有紫云英还田土壤中相对富集。供试处理土壤古菌优势属主要包括 *Methanosaeta* (12.70%—14.90%)、*Candidatus\_Nitrosotalea* (6.01%—11.42%)、*Methanosarcina* (5.42%—5.84%),等。除  $C_{100}$  和  $MC_{100}$  外, M 和  $MC_{80}$  处理土壤古菌属 *Methanosaeta* 丰度比  $C_0$  分别显著增加 11.84%、12.28% ( $P<0.05$ )。M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理土壤古菌属 *Candidatus\_Nitrosotalea* 丰度比  $C_0$  分别增加 17.21%、65.39%、89.89%,其中  $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理均达显著水平 ( $P<0.05$ ); *Methanosarcina* 增加 5.19%、2.32%、2.18%,但处理间无显著差异 ( $P>0.05$ )。供试处理土壤真核生物属主要包括 *Panholops* (8.43%—11.16%)、*Exaiptasia* (1.56%—3.20%)、*Trichinella* (0.36%—1.19%),等。M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理土壤真核生物属 *Trichinella* 丰度比  $C_0$  分别提高 29.90%、75.09% 和 230.98%,其中  $MC_{80}$  处理达显著水平 ( $P<0.05$ )。

表 2 不同培肥处理下稻田土壤微生物域相对丰度的变化

Table 2 Relative abundances of soil microbial community at domain level under different fertilization regimes

| 处理<br>Treatments | 细菌<br>Bacteria/% | 古菌<br>Archaea/% | 真核生物<br>Eucarya/% | 未知类群微生物<br>Unknown microbial groups/% |
|------------------|------------------|-----------------|-------------------|---------------------------------------|
| $C_0$            | 97.54±0.05a      | 2.04±0.05a      | 0.23±0.01a        | 0.14±0.01a                            |
| $C_{100}$        | 97.48±0.10a      | 2.10±0.11a      | 0.22±0.00a        | 0.14±0.00a                            |
| M                | 97.64±0.24a      | 1.90±0.19a      | 0.27±0.09a        | 0.13±0.01ab                           |
| $MC_{100}$       | 97.61±0.08a      | 1.97±0.07a      | 0.23±0.01a        | 0.13±0.00b                            |
| $MC_{80}$        | 97.56±0.14a      | 2.01±0.14a      | 0.23±0.00a        | 0.13±0.00b                            |

### 2.3 各处理水稻土微生物群落功能的变化

$C_0$ 、 $C_{100}$ 、M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理土壤细菌共有的 KEGG 代谢通路第 3 层级注释功能数目为 372,古菌共有的功能数目为 269,以及真核生物共有的数目为 336 (图 4),表明细菌在黄泥田土壤中的核心 KEGG 代谢通路第 3 层级注释功能丰度上占据优势地位。此外,不同培肥处理对土壤细菌和古菌功能直系同源物 KEGG Orthology (KO) 组成均有显著的影响,受影响较大的是细菌,而真核生物 KO 组成未受显著的影响,说明土壤细菌和古菌 KO 对不同培肥处理敏感性更高,而真核生物敏感性较低。 $C_0$  和  $C_{100}$  处理土壤细菌 KO 组成靠近 PC1 的右边,而 M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理相对靠近 PC1 的左边,表明前两个处理土壤细菌在功能直系同源物 KO 组成上较为相似,而与后 3 个含有紫云英的处理细菌 KO 组成差异较大。前两个主成分 PC1、PC2 可以分别解释土壤细菌 KO 组成变化的 21.37% 和 18.32%。 $C_0$  和  $C_{100}$  处理土壤古菌 KO 组成靠近坐标轴的右下角,而 M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理相对远离右下角区域,说明前两个处理土壤古菌功能直系同源物 KO 组成较为相似,而后 3 个处理古菌功能组成相似性较高。前两个主成分 PC1、PC2 可以分别解释土壤古菌 KO 组成变化的 25.44% 和 10.02%。综上,紫云英培肥处理可以调节土壤细菌和古菌群落功能直系同源物 KO 组成。

$C_0$ 、 $C_{100}$ 、M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理土壤细菌 KEGG 代谢通路第 3 层级注释功能主要包括碳代谢 (5.42%—5.47%) 和氨基酸合成 (4.32%—4.35%),土壤古菌主要功能也包括碳代谢 (7.05%—7.28%) 和氨基酸合成 (6.06%—6.31%) (图 5)。M、 $MC_{100}$  和  $MC_{80}$  处理土壤古菌氨基酸合成的丰度比  $C_0$  分别增加 2.59%、1.27%、

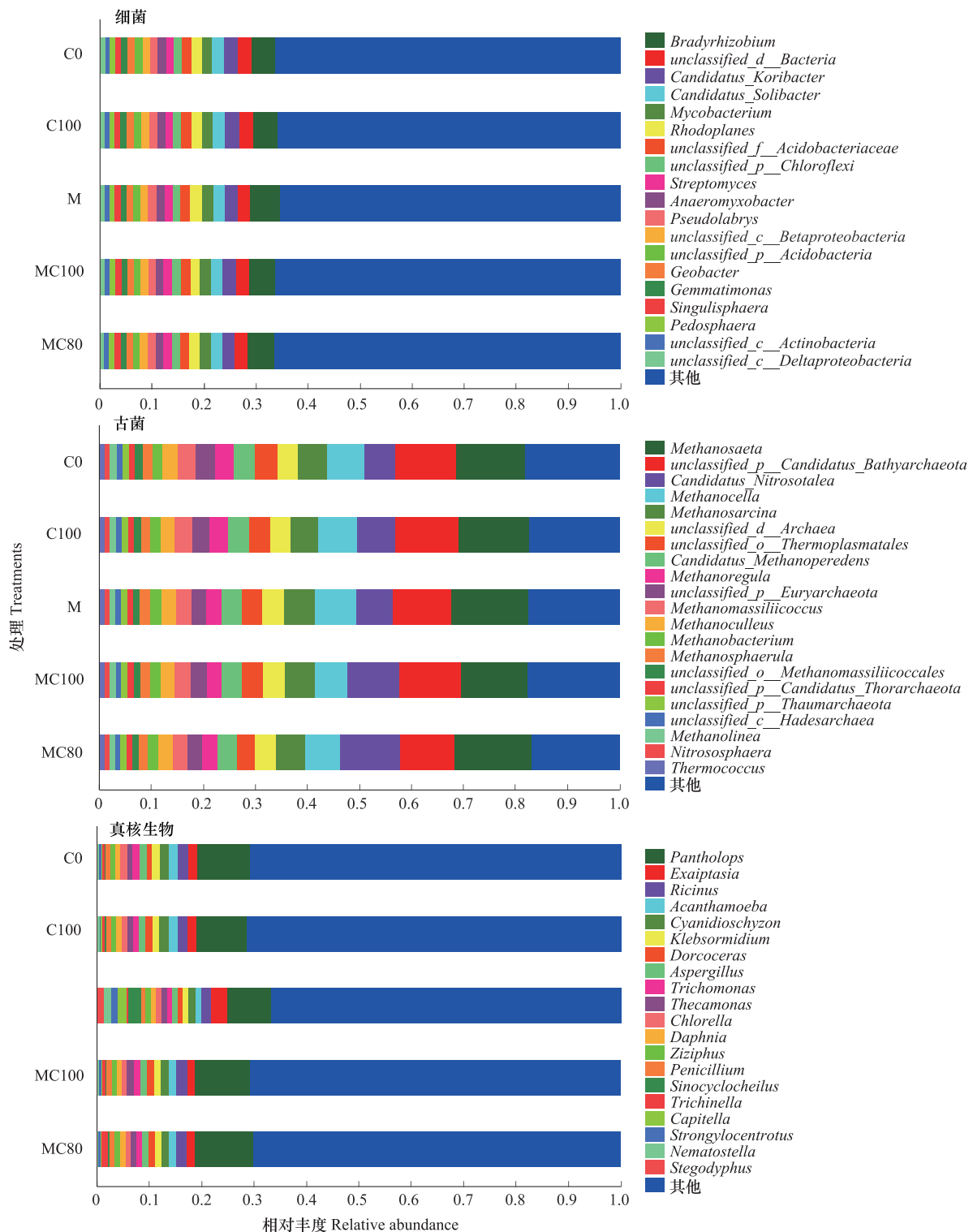


图3 不同培肥处理下稻田土壤细菌、古菌和真核生物属相对丰度的变化

Fig.3 Relative abundances of dominant bacterial, archaeal, and eukaryotic genera (&gt;1.0%) under different fertilization regimes

3.36%。各处理土壤真核生物 KEGG 代谢通路第 3 层级注释功能主要包括氨基酸合成(4.05%—4.58%)、碳代谢(3.66%—4.09%)、群体感应(2.19%—2.83%)、磷酸肌醇代谢(1.80%—2.47%)、烷基磷脂代谢(1.73%—2.39%)、甲状腺激素信号通路(1.66%—2.21%)及丙酮酸代谢(1.77%—2.00%)。M、MC<sub>100</sub>和 MC<sub>80</sub>处理土壤真核生物群体感应的丰度比 C<sub>0</sub>分别提高 1.28%、20.43%、15.74%，磷酸肌醇代谢分别提高 3.03%、24.75%、

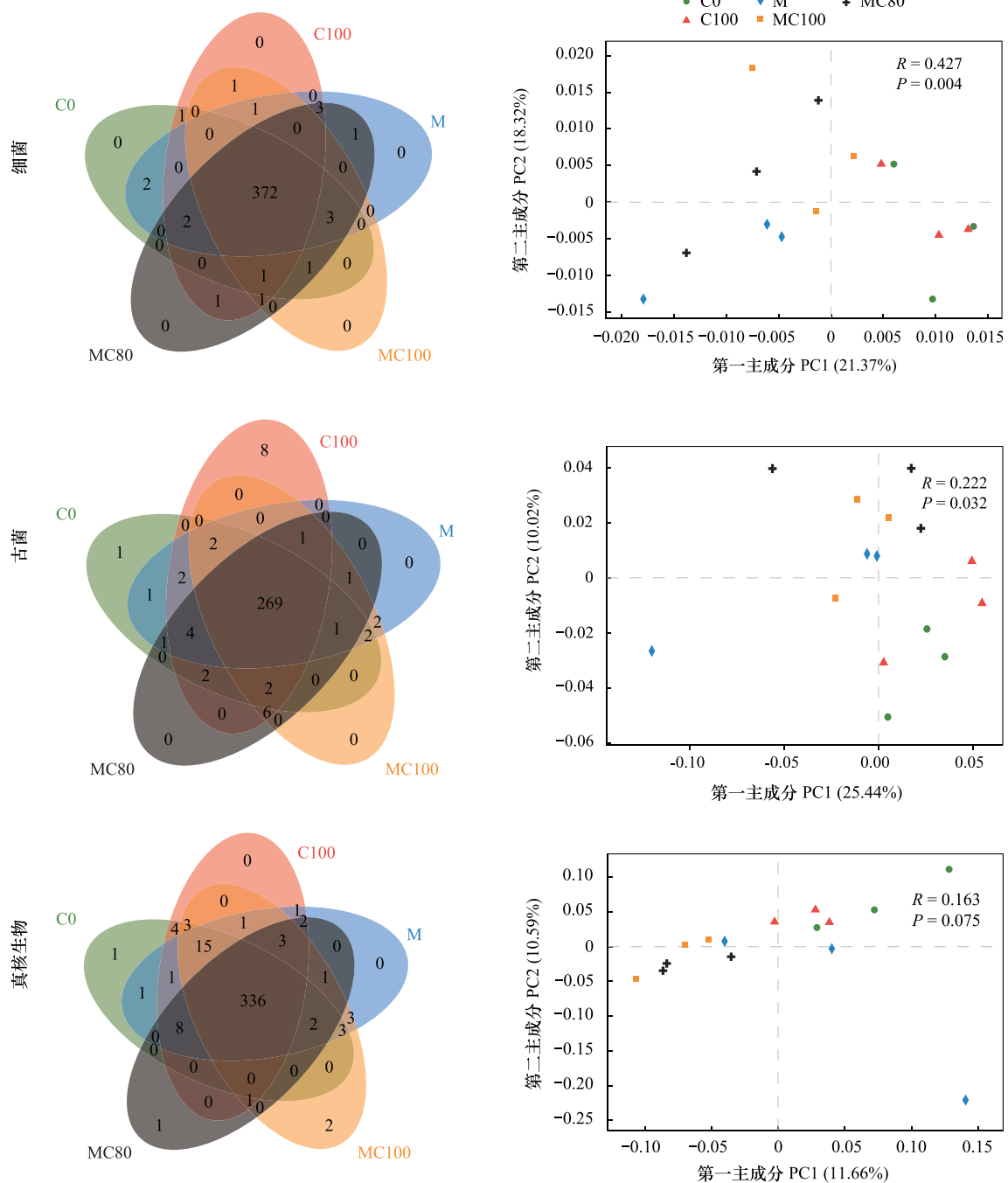


图4 不同培肥处理下稻田土壤细菌、古菌和真核生物功能类群的组成变化

Fig.4 Variations in soil bacterial, archaeal, and eukaryotic functional composition under different fertilization regimes

18.69%, 烷基磷脂代谢分别提高 4.66%、23.83%、18.13%, 甲状腺激素信号通路分别提高 6.08%、27.62%、22.10%, 丙酮酸代谢分别提高 2.26%、11.86%、12.90%。综上, 紫云英培肥处理土壤中的部分古菌和真核生物 KEGG 代谢通路第 3 层级功能均有不同程度富集。

#### 2.4 黄泥田土壤微生物物种的功能贡献度分析

细菌功能总丰度前 5 的碳代谢、氨基酸合成、ABC 转运蛋白、群体感应、双组分系统的主要细菌属依次为 *Bradyrhizobium*、*Candidatus \_ Koribacter*、*Candidatus \_ Solibacter*、*Mycobacterium*、*Rhodoplanes*、*Pseudolabrys*、*Streptomyces*, 等(图 6)。古菌功能总丰度前 5 的碳代谢、氨基酸合成、甲烷代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢的主要古

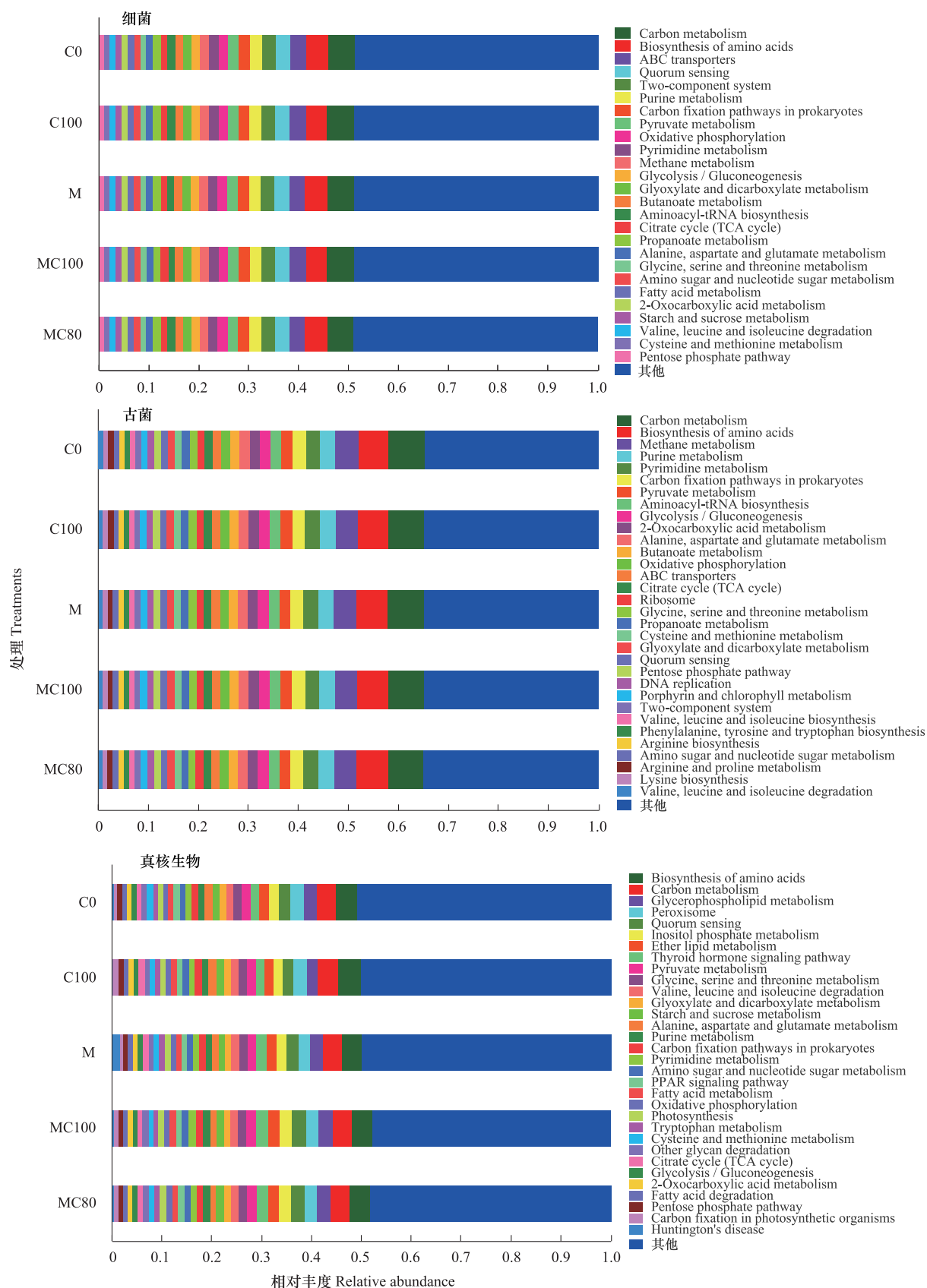


图5 不同培肥处理下稻田土壤细菌、古菌和真核生物群落京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 代谢通路第3层级注释功能的相对丰度变化

Fig.5 Relative abundances of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) level 3 function of soil bacterial, archaeal, and eukaryotic communities under different fertilization regimes

菌属依次是 *Methanosaeta*、*Candidatus\_Nitrosotalea*、*Methanocella*、*Methanosarcina*、*Candidatus\_Methanoperedens*、*Methanoregula*, 等。真核生物功能总丰度前 5 的氨基酸合成、碳代谢、过氧化物酶体、脂代谢、群体感应的主要真核生物属依次为 *Panthalops*、*Exaiptasia*、*Ricinus*、*Acanthamoeba*、*Cyanidioschyzon*、*Klebsormidium*, 等。

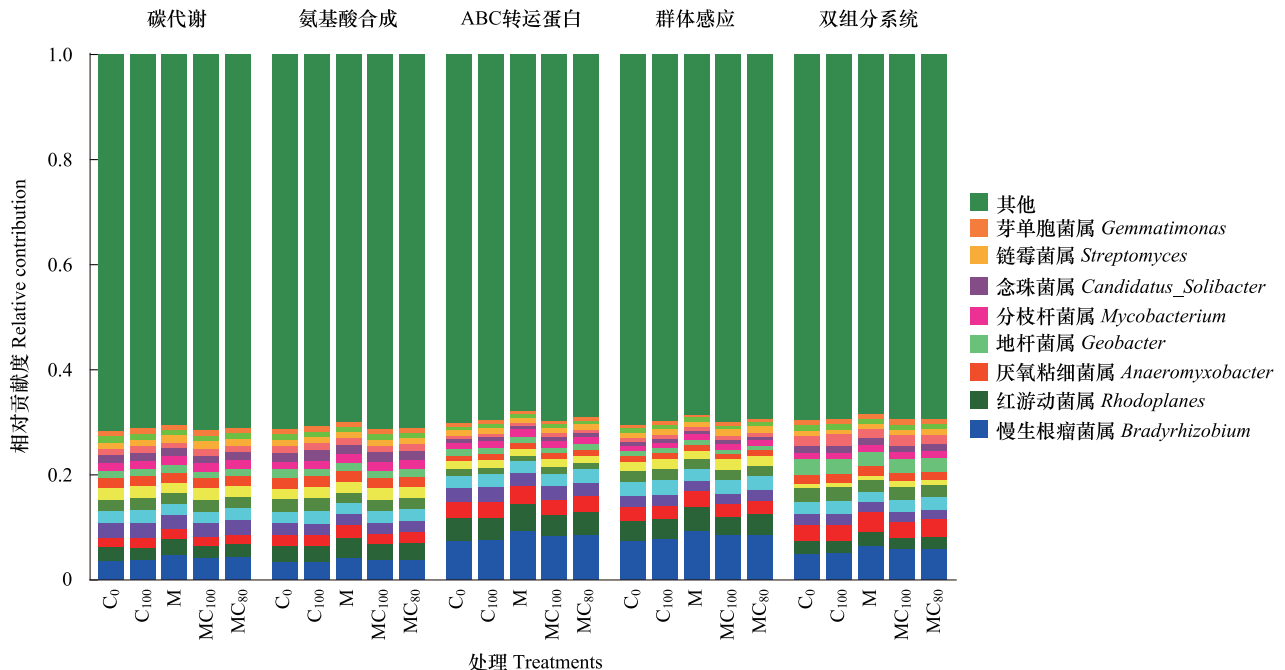


图 6 不同培肥处理下土壤微生物属的功能贡献度分析

Fig.6 Soil microbial genus-functional contribution analysis under different fertilization regimes

## 2.5 黄泥田土壤微生物群落结构和功能变化的影响因素

由 RDA 分析图 7 可知,对土壤细菌群落结构和功能影响较大的土壤因子主要是有机碳、全氮、硝态氮含量,而影响较小的则是土壤铵态氮、总孔隙度、密度和含水量。土壤细菌群落结构冗余分析组分 1(RDA1)可以解释细菌群落结构变化的 25.43%,与土壤有机碳( $r^2=0.469, P=0.026$ )、全氮( $r^2=0.447, P=0.037$ )、硝态氮( $r^2=0.445, P=0.025$ )含量具有正的相关关系;其功能 RDA1 能解释细菌功能变化的 35.89%,与土壤有机碳( $r^2=0.496, P=0.027$ )、全氮( $r^2=0.461, P=0.036$ )、硝态氮( $r^2=0.432, P=0.040$ )含量具有正的相关关系。土壤古菌群落结构 RDA1 可以解释古菌结构变异的 74.91%,与土壤有机碳( $r^2=0.496, P=0.027$ )、全氮( $r^2=0.461, P=0.036$ )、硝态氮( $r^2=0.432, P=0.040$ )含量呈正相关;其功能 RDA1 可以解释古菌功能变化的 23.30%,与有机碳( $r^2=0.422, P=0.040$ )、全氮( $r^2=0.401, P=0.048$ )、硝态氮( $r^2=0.596, P=0.002$ )含量呈正相关。土壤真核生物结构 RDA1 可以解释真核生物结构变化的 64.76%,与土壤硝态氮( $r^2=0.488, P=0.015$ )含量具有正的相关关系;其功能 RDA1 能解释真核生物功能变化的 42.30%,与土壤有机碳( $r^2=0.478, P=0.010$ )、全氮( $r^2=0.550, P=0.006$ )、硝态氮( $r^2=0.537, P=0.004$ )含量及碳/氮比( $r^2=0.438, P=0.027$ )具有正的相关关系。综上,有机碳、全氮和硝态氮含量是影响土壤微生物群落结构和功能变化的核心环境因子。

由相关性 Heatmap 分析图 8 可知,土壤有机碳与细菌属 *Bradyrhizobium* ( $r=0.668, P=0.007$ )、*Mycobacterium* ( $r=0.775, P=0.001$ )呈正相关。土壤全氮与 *Bradyrhizobium* ( $r=0.619, P=0.014$ )、*Mycobacterium* ( $r=0.733, P=0.002$ )呈正相关,土壤硝态氮与 *Bradyrhizobium* ( $r=0.627, P=0.012$ )、*Mycobacterium* ( $r=0.629, P=0.012$ )呈正相关。相反,土壤碳/氮比与 *Mycobacterium* 呈负相关( $r=-0.543, P=0.037$ )。此外,土壤 pH 值与细菌 KEGG 代谢通路第 3 层级注释功能 ABC 转运蛋白( $r=0.629, P=0.012$ )、群体感应( $r=0.654, P=0.008$ )呈正相关;土壤碳/氮比与碳代谢( $r=0.589, P=0.021$ )、氨基酸合成( $r=0.525, P=0.044$ )、群体感应( $r=$

0.521,  $P=0.046$ ) 呈正相关; 土壤铵态氮与碳代谢呈负相关 ( $r=-0.593, P=0.020$ )。

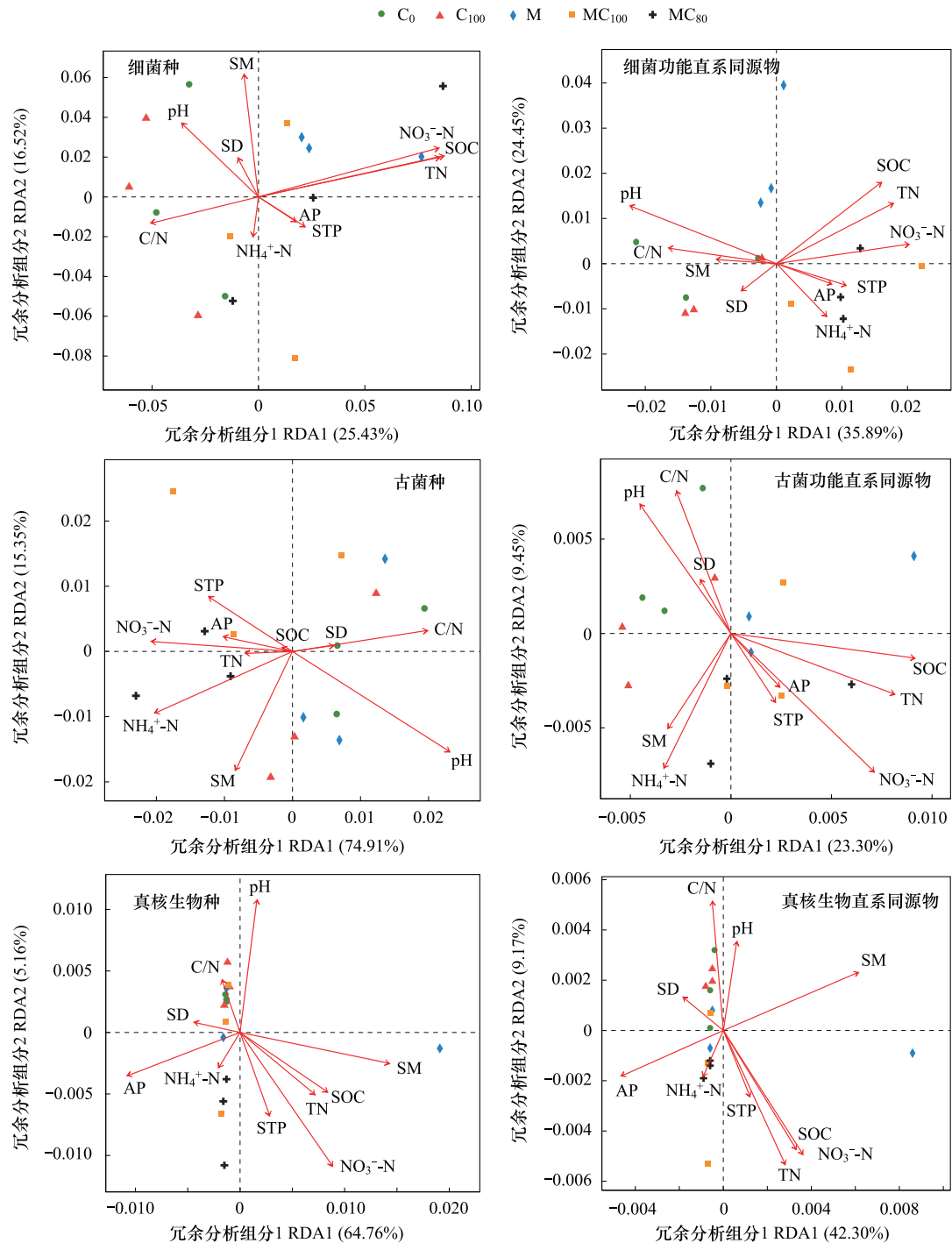


图7 不同培肥处理下土壤微生物群落结构和功能与土壤理化性质的冗余分析

Fig.7 Redundancy analysis (RDA) of soil microbial community composition and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) level 3 and edaphic factors under different fertilization regimes

SD: 土壤密度 Soil bulk density; STP: 总孔隙度 Total porosity; SM: 含水量 Soil moisture; C: 碳 Carbon; SOC: 土壤有机碳 Soil organic C; N: 氮 Nitrogen; TN: 全氮 Total N; C/N ratio: 碳/氮比; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N: 硝态氮 Nitrate N; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N: 铵态氮 Ammonium N; P: 磷 phosphorus; AP: 有效磷 available P

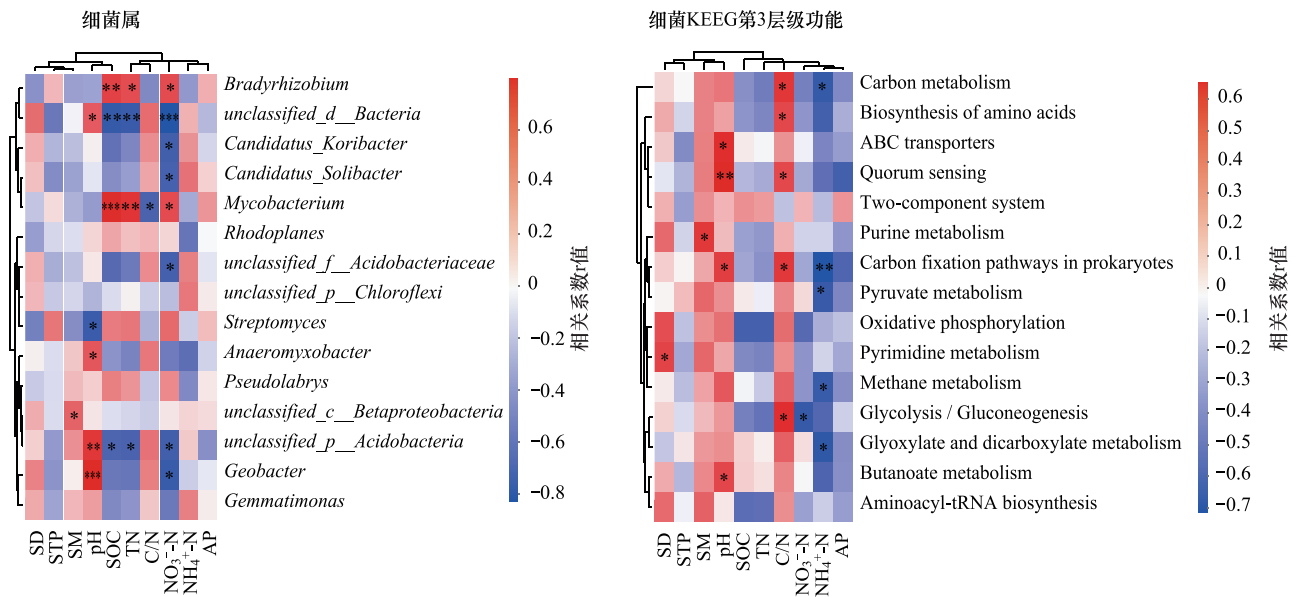


图8 不同培肥处理下稻田土壤细菌属、KEGG 代谢通路第3 层级注释功能与土壤理化因子间的相关性热图分析

Fig.8 Correlation heatmap between relative abundances of dominant bacterial genus, relative abundances of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) level 3 and soil properties under different fertilization regimes

\*, \*\*, \*\*\* 分别表示在 0.05、0.01 和 0.001 显著性水平下各指标间具有明显的相关性 \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; Carbon metabolism 碳代谢; Biosynthesis of amino acids 氨基酸合成; ABC transporters ABC 转运蛋白; Quorum sensing 群体感应; Two-component system 双组分系统; Purine metabolism 嘌呤代谢; Carbon fixation pathways in prokaryotes 原核生物碳固定途径; Pyruvate metabolism 丙酮酸代谢; Oxidative phosphorylation 氧化磷酸化; Pyrimidine metabolism 嘧啶代谢; Methane metabolism 甲烷代谢; Glycolysis / Gluconeogenesis 糖酵解/糖异生; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism 乙醛酸和二元酸代谢; Butanoate metabolism 丁酸盐代谢; Aminoacyl-tRNA biosynthesis 氨酰-tRNA 生物合成

### 3 讨论

紫云英根系共生大量的根瘤菌,可以固定空气中的氮气( $N_2$ ),且紫云英腐解后能增加原有稻田土壤的有机碳<sup>[35]</sup>。本研究表明,紫云英培肥处理(MC<sub>100</sub>、MC<sub>80</sub>和M)土壤有机碳比C<sub>0</sub>均有显著增加,尤其是M处理增幅更大,与2012年的土壤有机碳分析结果一致<sup>[36]</sup>。是由于紫云英还田和化肥配施(MC<sub>100</sub>和MC<sub>80</sub>),相对更能满足土壤微生物碳、氮、磷化学计量需求,增强微生物活性,促进土壤有机碳的分解,因而导致MC<sub>100</sub>、MC<sub>80</sub>与M处理虽有等量的有机物质投入,但土壤有机碳含量却比M处理有所下降<sup>[37]</sup>。同时,种植紫云英可以增加水稻叶面积指数和光合速率,促进光合作用,为水稻生长提供丰富的碳水化合物,提高水稻产量<sup>[38]</sup>。在湖南南县、江西丰城和河南信阳等县域长期定位试验发现,紫云英绿肥配施减量20%、40%化肥比常规施肥土壤有机碳含量分别增加3.95%和4.15%,全氮含量增加1.22%和1.74%,稻谷产量增加9.88%和3.98%,且这种培肥增产效果随紫云英还田年限的延长而增加<sup>[39]</sup>,表明紫云英减肥增效具有可持续性。

本研究RDA分析表明,紫云英还田下土壤有机碳、全氮及硝态氮含量增加,是导致土壤微生物群落结构和功能变化的核心影响因子。通过盆栽试验也有类似的发现,碳源和氮源的差异是影响土壤微生物群落结构和功能的重要因素<sup>[40]</sup>。供试黄泥田土壤碳代谢和氨基酸代谢是丰度前两位的微生物KEGG代谢通路第3层级注释功能;前者是作物生长所需的营养物质,与作物产量和品质密切相关,后者是合成蛋白质的物质基础。本研究发现,紫云英培肥处理土壤可以不同程度富集慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)和链霉菌属(*Streptomyces*),它们是碳代谢和氨基酸合成的主要细菌属。这是由于紫云英连年还田后土壤形成了团粒结构,有机质增加,为土壤细菌生长繁殖创造了适宜的微环境<sup>[6, 8]</sup>。本研究相关性

Spearman 分析发现,土壤有机碳、全氮和硝态氮与慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 均有显著的正相关关系 ( $P < 0.05$ )。相关研究也有类似发现,土壤全氮、碱解氮和硝态氮含量是紫云英季土壤固氮微生物慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium*) 和分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 丰度增加的重要土壤因子<sup>[18, 40]</sup>。此外,紫云英根系分泌物也是影响土壤固氮微生物群落结构和功能变异的重要原因。在紫云英根际以 L-丝氨酸为碳源的可快速培养微生物受抑制,而慢速培养固氮微生物根瘤菌 (*Bradyrhizobium*) 被激活<sup>[30]</sup>。综上,紫云英培肥处理土壤慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 产生富集现象,主要是由于紫云英还田后土壤物理性状和养分状况朝着有利于这些微生物生长繁殖的方向发展。

本研究显示,与  $C_0$  相比,紫云英连年还田下全量施用化肥会降低土壤古菌甲烷鬃菌属 (*Methanosaeta*) 丰度,而减施化肥则会提高该古菌丰度。这是由于紫云英连年还田条件下,减施化肥比全量施化肥处理土壤中残留的无机盐分尤其是乙酸盐浓度较低,更利于甲烷鬃菌属 (*Methanosaeta*) 的生长繁殖<sup>[41]</sup>。相比  $C_0$ ,紫云英绿还田下土壤富集的古菌还有亚硝化杆菌属 (*Candidatus\_Nitrosotalea*),它是古菌功能丰度前 3 的碳代谢、氨基酸合成、甲烷代谢的主要古菌属。亚硝化杆菌属 (*Candidatus\_Nitrosotalea*) 属于奇古菌门 (*Thaumarchaeota*),为嗜酸性氨氧化古菌,在 pH 值 5.0 左右时生长良好<sup>[42]</sup>。因此,本研究中紫云英连年还田后土壤 pH 值降低,有机碳升高,是氨氧化古菌亚硝化杆菌属 (*Candidatus\_Nitrosotalea*) 在紫云英处理土壤中增长的重要原因。在酸性红壤中,也发现紫云英还田后氨氧化古菌在土壤氨氧化过程中起主导作用,并对绿肥处理更加灵敏<sup>[19]</sup>。但有研究表明,氨氧化细菌在稻田土壤氨氧化中的作用强于古菌<sup>[43]</sup>。这种不一致的结论主要是供试土壤类型不同所致,由于土壤氨氧化细菌和古菌的生态位不同,氨氧化古菌喜欢酸性生境,而氨氧化细菌更嗜好中性环境<sup>[38]</sup>。其他研究也证实了种植紫云英可以增加土壤甲烷氧化菌、固氮菌以及硝化细菌的丰度<sup>[44-45]</sup>。总之,种植紫云英可以把空气中的  $CO_2$  和  $N_2$  分别合成碳水化合物和植物可利用的氮类化合物,这些植株体内的碳氮化合物经还田后又可以进一步调节参与稻田土壤碳代谢、氨基酸合成和甲烷代谢等碳氮循环相关的古菌群落结构。

#### 4 结论

紫云英连年还田后黄泥田水稻土有机碳、全氮及硝态氮含量显著增加,促使慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和亚硝化杆菌属 (*Candidatus\_Nitrosotalea*) 在土壤中富集。这些富集的细菌和古菌是土壤微生物重要功能碳水化合物代谢和氨基酸合成的主要微生物。而且,紫云英还田 ( $M$ )、紫云英还田+全量化肥 ( $MC_{100}$ ) 以及紫云英还田+减量 20% 化肥 ( $MC_{80}$ ) 处理比不施肥 ( $C_0$ ) 稻谷产量均有显著增加。由此可知,紫云英培肥处理黄泥田水稻土形成了独特的微生物群落结构,可以加速土壤碳水化合物和氨基酸等营养物质的代谢,是紫云英连年还田后黄泥田单季稻减肥增产潜在的微生物驱动机制。未来还需进一步联合转录组学、蛋白组学和代谢组学开展多组学研究,从不同的层面系统深入研究紫云英还田下黄泥田减肥增产的土壤微生物群落结构和功能变化,为微生物学机制提供更多证据。

#### 参考文献 (References):

- [1] 王赞,徐昌旭,周国朋,常单娜,高嵩涓,曹卫东. 连续种植翻压紫云英减施化肥对江西早稻产量、品质及土壤肥力的影响. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(10): 1735-1745.
- [2] 林多胡,顾荣申. 中国紫云英. 福州: 福建科学技术出版社, 2000: 1-17, 218-238, 245-252.
- [3] 刘小粉,刘春增,贾萌萌,潘兹亮. 化肥减施条件下紫云英翻压量对土壤物理特性和水稻产量的影响. 江苏农业科学, 2021, 49(16): 67-73.
- [4] Kamran M, Huang L, Nie J, Geng M J, Lu Y H, Liao Y L, Zhou F L, Xu Y H. Effect of reduced mineral fertilization (NPK) combined with green manure on aggregate stability and soil organic carbon fractions in a fluvo-aquic paddy soil. Soil and Tillage Research, 2021, 211: 105005.

- [ 5 ] 程会丹, 鲁艳红, 聂军, 朱启东, 聂鑫, 曹卫东, 高雅洁, 廖育林. 减量化肥配施紫云英对稻田土壤碳、氮的影响. 农业环境科学学报, 2020, 39(6): 1259-1270.
- [ 6 ] 柳开楼, 韩天富, 李文军, 余喜初, 胡志华, 叶会财, 胡丹丹, 宋惠洁, 李大明, 黄庆海. 紫云英不同翻压年限下驱动水稻产量变化的土壤理化因子分析. 中国水稻科学, 2021, 35(3): 291-302.
- [ 7 ] Zhou X, Lu Y H, Liao Y L, Zhu Q D, Cheng H D, Nie X, Cao W D, Nie J. Substitution of chemical fertilizer by Chinese milk vetch improves the sustainability of yield and accumulation of soil organic carbon in a double-rice cropping system. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(10): 2381-2392.
- [ 8 ] Gao S J, Gao J S, Cao W D, Zou C Q, Huang J, Bai J S, Dou F G. Effects of long-term green manure application on the content and structure of dissolved organic matter in red paddy soil. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(8): 1852-1860.
- [ 9 ] Yang L, Bai J S, Zeng N H, Zhou X, Liao Y L, Lu Y H, Rees R M, Nie J, Cao W D. Diazotroph abundance and community structure are reshaped by straw return and mineral fertilizer in rice-rice-green manure rotation. Applied Soil Ecology, 2019, 136: 11-20.
- [ 10 ] Falkowski P G, Fenchel T, Delong E F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. Science, 2008, 320(5879): 1034-1039.
- [ 11 ] 李增强, 张贤, 王建红, 曹凯, 徐昌旭, 曹卫东. 紫云英施用量对土壤活性有机碳和碳转化酶活性的影响. 中国土壤与肥料, 2018, (4): 14-20.
- [ 12 ] Zhang X X, Zhang R J, Gao J S, Wang X C, Fan F L, Ma X T, Yin H Q, Zhang C W, Feng K, Deng Y. Thirty-one years of rice-rice-green manure rotations shape the rhizosphere microbial community and enrich beneficial bacteria. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 104: 208-217.
- [ 13 ] Zhang X X, Gao J S, Cao Y H, Ma X T, He J Z. Long-term rice and green manure rotation alters the endophytic bacterial communities of the rice root. Microbial Ecology, 2013, 66(4): 917-926.
- [ 14 ] 万水霞, 唐杉, 王允青, 朱宏斌, 郭熙盛. 紫云英还田量对稻田土壤微生物数量及活度的影响. 中国土壤与肥料, 2013, (4): 39-42.
- [ 15 ] 唐治喜, 高菊生, 宋阿琳, 王恩召, 司知远, 易可可, 黄晶, 赵士诚, 范分良. 用宏基因组学方法研究绿肥对水稻根际微生物磷循环功能基因的影响. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(9): 1578-1590.
- [ 16 ] Gao S J, Zhang R G, Cao W D, Fan Y Y, Gao J S, Huang J, Bai J S, Zeng N H, Chang D N, Katsu-Yoshi S, Thorup-Kristensen K. 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(2): 2512-2520.
- [ 17 ] Zhou G P, Gao S J, Xu C X, Dou F G, Shimizu K Y, Cao W D. Rational utilization of leguminous green manure to mitigate methane emissions by influencing methanogenic and methanotrophic communities. Geoderma, 2020, 361: 114071.
- [ 18 ] 方宇, 王飞, 贾宪波, 林陈强, 张慧, 陈龙军, 陈济琛. 绿肥配施减量化肥对土壤固氮菌群落的影响. 农业环境科学学报, 2018, 37(9): 1933-1941.
- [ 19 ] Gao S J, Chang D N, Zou C Q, Cao W D, Gao J S, Huang J, Bai J S, Zeng N H, Rees R M, Thorup-Kristensen K. Archaea are the predominant and responsive ammonia oxidizing prokaryotes in a red paddy soil receiving green manures. European Journal of Soil Biology, 2018, 88: 27-35.
- [ 20 ] 王艳秋, 高嵩渭, 曹卫东, 李景环, 聂军, 徐昌旭, 白金顺, 曾闹华, 周国朋. 多年冬种紫云英对两种典型双季稻田土壤肥力及硝化特征的影响. 草业学报, 2017, 26(2): 180-189.
- [ 21 ] Fang Y, Wang F, Jia X B, Chen J C. Distinct responses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to green manure combined with reduced chemical fertilizer in a paddy soil. Journal of Soils and Sediments, 2019, 19(4): 1613-1623.
- [ 22 ] Gao S J, Zhou G P, Rees R M, Cao W D. Green manuring inhibits nitrification in a typical paddy soil by changing the contributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria. Applied Soil Ecology, 2020, 156: 103698.
- [ 23 ] 刘祥臣, 赵海英, 李本银, 卢兆成, 丰大清, 乔利. 紫云英翻压量和沤田时间对覆膜水稻返青期植株的影响. 中国土壤与肥料, 2012, (3): 90-93.
- [ 24 ] Zhou G P, Gao S J, Chang D N, Rees R M, Cao W D. Using milk vetch (*Astragalus sinicus* L.) to promote rice straw decomposition by regulating enzyme activity and bacterial community. Bioresource Technology, 2021, 319: 124215.
- [ 25 ] 王飞, 李清华, 林诚, 何春梅. 福建黄泥田肥力质量特征与最小数据集. 中国生态农业学报, 2018, 26(12): 1855-1865.
- [ 26 ] 王飞, 李清华, 林诚, 钟少杰, 何春梅, 刘玉洁. 不同施肥模式对南方黄泥田耕层有机碳固存及生产力的影响. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(6): 1447-1454.
- [ 27 ] 陈映霞. 黄泥田连作晚稻氮磷钾肥料效应函数与分析. 福建农业科技, 2000, (2): 5-6.
- [ 28 ] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 128-129.
- [ 29 ] Li D H, Liu C M, Luo R B, Sadakane K, Lam T W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct *de Bruijn* graph. Bioinformatics, 2015, 31(10): 1674-1676.
- [ 30 ] Noguchi H, Park J, Takagi T. MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences. Nucleic Acids Research, 2006, 34(19): 5623-5630.

- [31] Fu L M, Niu B F, Zhu Z W, Wu S T, Li W Z. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 2012, 28(23): 3150-3152.
- [32] Li R Q, Li Y R, Kristiansen K, Wang J. SOAP: short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713-714.
- [33] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, Zhang J H, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [34] Xie C, Mao X Z, Huang J J, Ding Y, Wu J M, Dong S, Kong L, Gao G, Li C Y, Wei L P. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(S2): W316-W322.
- [35] 高菊生, 曹卫东, 李冬初, 徐明岗, 曾希柏, 聂军, 张文菊. 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.
- [36] 颜志雷, 方宇, 陈济琛, 王飞, 何春梅, 林新坚. 连年翻压紫云英对稻田土壤养分和微生物学特性的影响. *植物营养与肥科学报*, 2014, 20(5): 1151-1160.
- [37] 张叶叶, 莫非, 韩娟, 温晓霞, 廖允成. 秸秆还田下土壤有机质激发效应研究进展. *土壤学报*, 2021, 58(6): 1381-1392.
- [38] 高嵩涓, 周国朋, 曹卫东. 南方稻田紫云英作冬绿肥的增产节肥效应与机制. *植物营养与肥科学报*, 2020, 26(12): 2115-2126.
- [39] 高菊生, 曹卫东, 董春华, 徐明岗, 曾希柏, 文石林. 长期稻-稻-绿肥轮作对水稻产量的影响. *中国水稻科学*, 2010, 24(6): 672-676.
- [40] 杨璐, 曾闹华, 白金顺, 周兴, 周国朋, 高嵩涓, 聂军, 曹卫东. 紫云英季土壤固氮微生物对外源碳氮投入的响应. *中国农业科学*, 2020, 53(1): 105-116.
- [41] Carr S A, Schubotz F, Dunbar R B, Mills C T, Dias R, Summons R E, Mandernack K W. Acetoclastic *Methanosaeta* are dominant methanogens in organic-rich antarctic marine sediments. *The ISME Journal*, 2018, 12(2): 330-342.
- [42] Lehtovirta-Morley L E, Stoecker K, Vilcinskas A, Prosser J I, Nicol G W. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(38): 15892-15897.
- [43] 方宇, 景晓明, 王飞, 陈济琛, 林诚, 林新坚. 长期施肥对氨氧化古菌丰度及群落结构的影响. *植物营养与肥科学报*, 2015, 21(6): 1607-1614.
- [44] 唐海明, 肖小平, 孙继民, 汤文光, 汪柯, 李微艳, 杨光立. 种植不同冬季作物对稻田甲烷、氧化亚氮排放和土壤微生物的影响. *生态环境学报*, 2014, 23(5): 736-742.
- [45] Antoun H, Beauchamp C J, Goussard N, Chabot R, Lalande R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes; effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, 1998, 204(1): 57-67.