

Contents lists available at ScienceDirect

# Engineering



journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng

#### Research Biodiversity to Fertilization—Article

## 生态背景决定土壤细菌多样性对施肥的响应

冯有智<sup>a</sup>, Manuel Delgado-Baquerizo<sup>b</sup>, 朱永官<sup>cd</sup>, 韩晓增<sup>e</sup>, 韩晓日<sup>f</sup>, 信秀丽<sup>a</sup>, 李玮<sup>g</sup>, 郭志彬<sup>h</sup>, 党廷辉<sup>i</sup>, 李晨华<sup>j</sup>, 朱波<sup>k</sup>, 蔡泽江<sup>lm</sup>, 李大明<sup>n</sup>, 张佳宝<sup>a</sup>\*

<sup>a</sup> State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

<sup>b</sup> Department of Physical, Chemical, and Natural Systems, Pablo de Olavide University, Sevilla 41013, Spain

<sup>c</sup> State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

<sup>d</sup> Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China

<sup>e</sup> National Observation Station of the Hailun Agroecology System, Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 130102, China

<sup>1</sup> College of Land and Environment, National Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China <sup>g</sup> Crop Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230001, China

<sup>h</sup> Soil and Fertilizer Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230001, China

<sup>1</sup> Institute of Soil and Water Conservation, Northwest A&F University, Chinese Academy of Science & Ministry of Water Resources, Yangling 712100, China

<sup>1</sup> Fukang Station of Desert Ecology, Key Laboratory of Oasis Ecology and Desert Environment, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China <sup>k</sup> Key Laboratory of Mountain Environment Evolvement and Regulation, Institute of Mountain Hazards and Environment, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

<sup>1</sup> Qiyang Agroecosystem of the National Field Experimental Station, Yongzhou 426199, China

<sup>m</sup> National Engineering Laboratory for Improving the Quality of Arable Land, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

<sup>n</sup> Jiangxi Institute of Red Soil, Nanchang 331717, China

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 21 February 2021 Revised 18 July 2021 Accepted 1 September 2021 Available online 25 November 2021

关键词

养分添加 人为活动 生物多样性 土壤pH

#### 摘要

施肥是人类改造自然环境的主要农业活动之一,不仅会引发全球变化,也会影响土壤微生物多样性。但 是,当前对生态背景如何影响土壤微生物多样性对施肥响应的问题尚不明确。该问题的解答有助于预测 全球变化下土壤微生物多样性的变化轨迹。为此,本研究大规模联网分析了中国10个长期(大于20年) 定位施肥(有机vs无机)试验,发现土壤细菌多样性对施肥的响应取决于当地生态背景。在酸性土壤中, 化肥施用加剧了土壤酸化,进而降低土壤细菌的多样性;相比之下,有机肥施用对土壤细菌多样性的影响 较小。除此之外,还发现部分微生物相对丰度对施肥的响应一致,不受生态背景的影响。例如,氮肥添加 刺激了 Nitrosospira 和 Nitrososphaera,以及有机肥施用增加了 Chitinophagaceac、Bacilli 和光合细菌的相 对丰度。这些物种或可作为指示生物来监测施肥对土壤肥力的影响。综上所述,本研究发现生态背景决 定了土壤微生物多样性对施肥的响应,其中酸性地区的土壤微生物多样性对施肥措施更敏感。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND licenses (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 1. 引言

土壤微生物多样性能够调节自然和农田生态系统中的

养分循环、作物产量和生态系统可持续性,进而维持生态 功能[1-3]。施肥是人类改造自然的大规模活动,影响陆 地生态系统并引发全球变化,同样会对土壤微生物多样性

\* Corresponding author.

*E-mail address:* jbzhang@issas.ac.cn (J. Zhang).

英文原文:Engineering 2022, 12(5): 164-170

<sup>2095-8099/© 2021</sup> THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

引用本文: Youzhi Feng, Manuel Delgado-Baquerizo, Yongguan Zhu, Xiaozeng Han, Xiaori Han, Xiuli Xin, Wei Li, Zhibing Guo, Tinghui Dang, Chenhua Li, Bo Zhu, Zejiang Cai, Daming Li, Jiabao Zhang. Responses of Soil Bacterial Diversity to Fertilization are Driven by Local Environmental Context Across China. *Engineering*, https:// doi.org/10.1016/j.eng.2021.09.012

产生重大影响[4-6]。过量施肥会造成多种负面影响,甚 至引发全球效应,如生产成本提高、对不可再生能源的高 度依赖、水污染和土壤退化等[7]。为此,学界围绕施肥 对农田土壤微生物的影响已经开展数十年的研究[8-10], 但是大多聚焦于局域或者区域尺度。在更大空间范围下, 由于不同地区的土壤性质不同,施肥对土壤微生物多样性 的影响也会不同。研究发现施用有机肥能够增加酸性土壤 的微生物多样性[11],但却会降低碱性土壤的微生物多样 性[12],而对中性土壤微生物多样性没有影响[13]。此外, 施肥类型(如无机vs有机)也会对土壤微生物多样性产 生不同影响[6,8]。尽管前人也在大空间尺度下探究了养分 添加对土壤微生物多样性的影响[4,14],但这些工作都是 基于自然生态系统,且试验周期相对较短(小于4年)。 因此,目前对于较长时间尺度和较大空间范围下农田生态 系统施肥影响的认知仍然有待提升,不同生态背景下土壤 微生物多样性对长期施肥响应的方向和幅度也需要研究。 本研究假设在大尺度环境梯度下, 生态背景——包括当地 气候[15-16]和土壤理化性质[17]——决定了土壤微生物多 样性(丰富度、群落组成和物种水平)对施肥的响应[4, 14]。简而言之,本研究认为在不同的生态背景下,施肥 对土壤微生物多样性的影响不一致。此外,还认为可能存 在一些"机会主义型"或者"敏感型"的微生物,它们受 到肥料中养分和碳的刺激或者抑制,而不受生态背景的控 制,进而对施肥表现出一致的响应。这些物种可以作为施 肥影响土壤肥力的指示生物。揭示大尺度(如洲际)生态 背景如何影响土壤微生物多样性对施肥的响应,以及识别 响应一致的微生物类群,有助于准确预测全球变化下土壤 微生物多样性变化以及功能分布。

为此,本研究收集了中国10个20年以上的长期定位 田间施肥试验基地(农作物主要是小麦和玉米)的表面非 根际土(见附录A中的图S1和表S1)。试验站点的选择基 于以下两个理由:①过量施肥是中国农田生态系统主要关 注的问题之一。比如,小麦和玉米的氮肥施用量可分别高 达283 kg·hm<sup>2</sup>·a<sup>-1</sup>和402 kg·hm<sup>2</sup>·a<sup>-1</sup>[18]。②小麦和玉米是 中国主要的粮食作物,其种植面积覆盖了中国大部分农业 生态区[小麦面积共2.45×10<sup>7</sup> hm<sup>2</sup>(占19.6%)和玉米面 积共4.24×10<sup>7</sup> hm<sup>2</sup>(占34.0%),2017][19]。每个试验站 点的运行时间都在20年以上(见附录A中的图S1和表 S2): control(不施肥)、氮钾无机肥(NK)和氮磷钾 (NPK)以及有机无机配施[有机粪肥(OM)]和NPKM (OM + NPK)。这些试验站点覆盖了中国大部分气候类 型、土壤特征和农业制度(见附录A中的图S1),为评估 生态背景影响土壤微生物多样性对施肥的响应提供了理想 的供试材料。本研究利用扩增子测序探究细菌丰富度、群落组成和优势物种类群(相对丰度在前10%的物种)对施肥的响应(包括方向和幅度)。选择细菌群落作为研究 对象基于两个理由:①细菌是地球上最多样和最丰富的生物;②在农业生态系统中,细菌是土壤肥力、土壤健康和 植物生产力的重要引擎[2]。

## 2. 材料和方法

#### 2.1. 长期施肥试验资料

10个长期施肥试验站点的详细信息见附录A中的图 S1和表S1。站点以及施肥起始时间如下:新疆阜康荒漠 生态系统试验站 (FK), 始于1987年; 河南封丘潮土农田 生态系统试验站 (FQ), 始于1989年; 陕西长武黄土高原 农田生态系统试验站 (CW), 始于1984: 江西鹰潭红壤 农田生态系统试验站(YT),始于1980年;安徽杨柳砂 姜黑土农田生态系统试验站(YL),始于1981年;安徽 蒙城砂姜黑土农田生态系统试验站(MC),始于1982年; 黑龙江海伦黑土农田生态系统试验站(HL),始于1987 年;辽宁沈阳农田生态系统试验站(SY),始于1979年; 江西进贤红壤油料作物试验站 (JX), 始于1986年; 湖南 祁阳红壤农田生态系统试验站 (QY), 始于1990年。主 要的施肥处理如下:① control,不施肥;② NK,施用尿 素和硫酸钾,不施用过磷酸钙;③ NPK,施用尿素、硫 酸钾和过磷酸钙;④ NPKM (50% 氮来自堆肥,无机肥 包括50%氮和磷钾); ⑤ OM (总氮量全部来自堆肥,加 上与NPK 处理相同的无机磷、钾肥)。

#### 2.2. 土壤取样和化学测量

2015年收获季后采集中国10个长期施肥试验站点的 表层非根际土。YT、YL、CW、SY、MC、QY、JX每个 施肥处理各有3个重复小区,而FQ、FK、HL每个施肥处 理各有4个重复小区,分别在每个小区内采取两个复合样 品。混合10个10 cm深度的随机土芯,得到一个复合样 品。所有工具都用75%的乙醇消毒。共采集284个土壤样 品,用于后续土壤理化性质和分子实验分析。样品放入无 菌自封袋中,一周内送往实验室保存于4℃冰箱。用于生 物测定的土壤样品过筛(2 mm 目)后保存于-40℃冰箱中 以进行 DNA提取。用于土壤理化性质分析的土壤样品风 干后过筛(100 目),根据《土壤理化分析》(鲁如坤编) [20]提供的方法测定土壤pH值,有机质(SOM)、可溶性 有机碳(DOC)、总氮(TN)、总磷(TP)、总钾(TK)、 有效氮(AN)、有效磷(AP)、有效钾(AK)、硝酸盐 (N以一NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的形式存在)和铵盐(N以一NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的形式存 在)的含量。土壤理化性质的详细信息见附录A中的 表S2。

#### 2.3. 土壤 DNA 提取

对每个样品,使用试剂盒FastDNA SPIN Kit (MP Biomedicals,美国)提取土壤总DNA。DNA样溶于50 μL Tris-EDTA缓冲液,用微量分光光度计(Nanodrop 1000)定量,并保存于-40 ℃冰箱中待后续使用。

### 2.4. 扩增子文库的制备及高通量测序

利用16S扩增子测序表征细菌群落。对每个DNA样 本,使用通用引物 519F/907R 对细菌 16S rRNA 基因的 V4~V5 片段(约400 bp)进行扩增[21-22]。正向引物加 入5 bp已知碱基序列的分类标签以区分不同样本。随后进 行聚合酶链反应 (PCR), 50 µL反应体系包括: 脱氧核 苷三磷酸4 μL (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>); 2 μL 正向和反向引物 (10 mmol·L<sup>-1</sup>); 2 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa, 日本) 和1 µL DNA 模板 (50 ng)。每一批次实验均设置以无菌 水(ddH,O)为模板的阴性对照以排除环境污染。反应进 行35个循环(95℃45s、56℃45s和72℃60s),最终 在72 ℃下复性延伸7 min。使用 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen,德国) 纯化试剂盒纯化 PCR 扩增产物, 然后以等摩尔量进行混合。随后用 TruSeq DNA 样品制备 试剂盒和MiSeq试剂盒(600个循环)进行测序。本研究 所用的细菌 16S rRNA 基因序列已上传至日本 DNA Databank数据库(DDBJ)中(索引号PRJDB9137)。

#### 2.5. 处理高通量测序数据

原始双端序列数据用FLASH [23]组装并用UPARSE [24]算法处理。用Cutadapt(v1.9.2)去除引物[25]。去除 平均质量分数低于 25 且长度低于 300 bp 的序列,并使用 UPARSE 过滤嵌合体。基于 97% 的相似性阈值聚类得到分 类操作单元(operational taxonomic unit, OTU),然后利用 核糖体数据库项目(ribosomal database project, RDP) classifier(v2.12)进行物种注释以确定细菌分类(置信度 大于 80%)[26]。基于 PyNAST 算法以 GreenGene 数据库 (v13\_8)为模板对 OTU代表序列进行排序对齐[27],使用 FastTree 构建系统发育树[28]。最终,共获得 20 294 908条 优质的细菌 16S rRNA 基因序列,每个样本的序列数在 40 691 到 158 122 之间,中值为 68 470。由于不同样本间 alpha(α)和beta(β)多样性的比较需要基于同样的采 样深度,故将所有样本的序列统一抽平到 40 000条用于下 游分析。 2.6. 细菌丰富度、群落组成和响应施肥的指示生物

使用响应率算法(log response ratio, lnRR)来表征, 与不施肥对照相比施肥处理对细菌丰富度(OTU数量)的影响,包括变化的幅度和方向。该项分析使用R软件(v3.3.1)的工具包"Metafor"进行[29]。

以Bray-Curtis距离来量化群落物种组成差异,使用非 度量多维标度(NMDS)进行可视化,并通过置换多元方 差分析(PERMANOVA)检验不同处理间微生物群落组 成的差异[30]。PERMANOVA得出的F值代表细菌群落结 构的差异程度。

针对常见丰富类群(相对丰度前10%的OTU,合计 占总序列数的87.5%),基于 lnRR 量化施肥处理下其相对 丰度的变化情况,并将其划分为4种响应策略[31-32]:在 9个位点以上相对丰度均增加的微生物(即95%置信区间 lnRR>0)被归为"机会主义型";而在9个位点以上其相 对丰度均减少的微生物(即95%置信区间 lnRR<0)被归 为"敏感型";在每个位点中相对丰度均没有显著变化的 微生物(即95%置信区间 lnRR 跨越零)被归为"耐受 型";在不同站点间其相对丰度变化趋势不一致的微生物 被归为"背景依赖型"。使用 iTOL (Interactive Tree of Life)工具(https://itol.embl.de)绘制细菌分类群的系统 发育树和每个分类单元在施肥后的响应策略。

#### 2.7. 数据分析

单因素方差分析(ANOVA)用以评估施肥的影响, 使用诚实性显著差异(honestly significant difference, HSD)进行事后比较(*post hoc*)。分别进行 Pearson 和 Mantel分析,评估细菌群落(即丰富度和组成)与环境变 量的相关性[33]。 $P < 0.05 \, \pi P < 0.01 \,$ 分别表示样本间差异 显著和差异极显著。为了确定环境变量对细菌的 lnRR、 群落组成变化和常见丰富分类群变化的直接和间接影响, 利用 AMOS 20.0(SPSS Inc.)建立并测试结构方程模型 (SEM)。使用最大似然估计法比较 SEM 与观察结果。模 型的准确性由卡方( $\chi^2$ )检验、比较拟合指数(CFI)、拟 合优度指数(GFI)和近似均方根误差(RSMEA)确定。 不显著的  $\chi^2$ 、高 CFI、高 GFI(> 0.9)和低 RSMEA (<0.05)表示模型准确性高。

### 3. 结果与讨论

3.1. 生态背景决定细菌多样性对施肥的响应

首先评估了中国10个代表性试验站点的土壤细菌丰 富度对施肥的响应[图1(a)]。这些站点代表了不同的气 候条件[如不同的年均气温(MAT)和年均降雨量 (MAP) ] 和土壤性质 (如土壤 pH) (见附录A中的 表S1)),且试验设置包括了无机和有机两种典型施肥处 理(见附录A中的表S2)。结果表明,生态背景(站点环 境)和施肥策略决定细菌丰富度对施肥响应的方向和幅度 [见图1(a)和附录A中的图S2],即土壤微生物多样性 的响应与当地的土壤性质、气候条件和施肥策略有关[图1 (b)、(c)]。该结果与Leff等[4]和Ramirez等[14]的研究 结论有所不同,其主要原因可能源自于以下差异:①施肥 时间不同(施肥时间:小于4年vs 20年); ②施肥类型不 同(如无机 vs 无机有机配施);③生态系统类型不同(如 自然生态系统 vs 农业生态系统)。本研究拥有更大的空间 范围以及更多的施肥类型,使得研究结果相对于前人的工 作更加的全面和准确。众所周知,大尺度下气候状况(如 MAT 和 MAP) [34-35] 和土壤性质 [16-17] 驱动土壤微生物 群落多样性、结构和生态功能,并决定微生物对环境变化 的响应[1]。例如,在MAT和MAP高的酸性土壤中,施用 有机肥能够增加微生物多样性[11],而与之相反,在MAT 和MAP低的碱性土壤中微生物多样性则下降[12]。

结果表明,在全国范围内土壤酸度(即土壤pH,土 壤微生物变化的主要驱动因子[17])主导了细菌丰富度对 施肥的响应[见图1(b)和附录A中的表S3]。酸性土壤中 的细菌丰富度对施肥更敏感,尤其在降水量大和(或)土 壤肥力高的地区。在中性(如YL和MC)和酸性(如SY 和QY)土壤中(见附录A中的表S1),施用无机肥导致 土壤酸化或者进一步酸化(见附录A中的表S2),从而大 幅降低了细菌丰富度(见附录A中的表S4)。前人研究也 发现酸性环境抑制微生物生长,从而降低土壤细菌多样性 [36-37]。同时大量研究也报道了施用无机肥降低了酸性 和中性土壤中的微生物多样性[10,13,38-39]。相比之下, 碱性土壤对化肥施用导致的酸化有一定的缓冲作用,因而 其微生物多样性变化不大「如YT、FK和CW;图1(A)、 附录A中的图S2、表S2和S4]。土壤pH值是表征生态背 景的综合性代用指标,是较大空间范围内土壤细菌群落变 化的重要相关因子或驱动因素[37,40-41]。因此,以土壤 pH值为综合代用指标,有助于全面揭示施肥制度和生态 背景对土壤细菌多样性的影响机制。SEM 结果量化了生 态背景(即气候和土壤特性)和施肥制度对细菌丰富度 [图1(c)]和细菌群落组成变化(见附录A中的图S3、S4 和表S5)的直接和间接影响。该模型解释了土壤细菌对 施肥响应的大部分变异[细菌丰富度变化  $\ln RR$  模型的  $R^2 =$ 87.3%,图1 (c);群落组成变化模型的R<sup>2</sup>=62.8%,见附 录A中的图S4]。在所有的环境变量中,土壤pH与年均 降雨量、年均气温以及土壤肥力均紧密相关(见附录A中 的表S6),其对细菌丰富度对施肥响应程度的影响也最为 重要[见图1(c)和附录A中的表S6][37]。同样, 生态 背景(MAT、MAP、土壤 pH 和 TP)也影响了细菌群落 组成对施肥的响应(见附录A中的表S7~S9)。具体而言, 在全国范围内,细菌群落组成的变化也根据站点和施肥类 型不同而有差异, 且与施肥对土壤酸度的影响密切相关 (见附录A中的表S6)。

研究结果进一步表明,在10个试验站点中,有机肥 对细菌丰富度的影响要小于无机肥(t检验P=0.038)[见 图1(a)及附录A中的图S2和表S6][10]。即使如此,生 态背景依然影响着细菌丰富度对有机肥的响应。对于大多 数酸性土壤[如QY和JX(见附录A中的表S2)]来说,有 机肥降低土壤酸度(即提高土壤pH)并增加土壤细菌丰 富度。该结果再次验证土壤酸度调控细菌丰富度对施肥的



**图1.** (a)中国10个长期定位施肥试验站点(FK、FQ、CW、YT、YL、MC、HL、SY、JX和QY)有机无机配施[NPKM和(或)OM]和无机施肥 [NPK和(或)NK]对细菌丰富度的影响(lnRR)。水平误差棒表示95%置信区间。根据土壤pH梯度对所有样点进行着色。(b)10个站点细菌群落物 种丰富度变化与土壤pH值(经lg转换)的相关性。(c)纬度、经度、气候、土壤特性以及施肥类型对10个试验站点细菌丰富度变化的直接和间接影 响。箭头线条的宽度与该路径相关系数的大小成正比,并辅以数字表示。实线和虚线分别表示正负关系。R<sup>2</sup>:解释的方差比例。df:自由度。条形图 展示了SEM结果中施肥和当地生态背景对细菌群落物种丰富度变化的标准化总效应(直接效应+间接效应)。

响应这一结论。此外,与施用无机肥相比,施用有机肥向 土壤中投入了大量外源碳,能够刺激更多的微生物谱系, 进而降低生态背景引起的差异[42]。SEM结果进一步强调 了与生态背景相关的土壤肥力[包括总碳、磷和钾含量 [43-45](见附录A中的表S3、S4、S9和S10],同样影响 细菌丰富度和群落组成对施肥的响应。细菌丰富度对施肥 的响应机制与作物品种无关。小麦(FK和CW)或者玉 米(HL、SY和JX)并不影响土壤细菌丰富度对无机肥 (t检验P=0.43)或有机肥(t检验P=0.48)施用的响应。 综上所述,本研究表明施肥对土壤微生物多样性的影响因 当地生态背景的差异而有所不同。在全国范围内,酸性土 壤微生物多样性更易受施肥的影响,且无机肥比有机肥的 影响更大[见图1(c)和附录A中的图S4]。

#### 3.2. 部分细菌类群对施肥具有相同的响应

按照之前的方法[32],进一步挑选群落中相对丰度前 10%的优势细菌物种(总计占群落相对丰度的87.5%) (见附录A中的图S5),在物种层面评估细菌对不同施肥 的响应(图2)。根据对施肥的响应策略,将微生物划分 为4种类群:①"机会主义型",定义为在90%的站点中 对施肥有一致积极响应(即相对丰度增加)的微生物类 群;②"敏感型",即在90%的站点中对施肥均有一致消 极响应(即相对丰度减少)的微生物类群;③"耐受 型",在90%的站点中对施肥均无显著响应的微生物类 群;④"背景依赖型",除以上三种类型之外的微生物类 群,即其相对丰度变化在不同位点不一致。结果表明,土 壤中的确存在少量微生物类群对施肥的响应一致,它们分 别是"机会主义型"微生物(有机肥施肥中2.3%和无机 肥施肥中 0.2%) 和"敏感型"微生物 (0.3% 和 0.7%) (见附录A中的图2和表S11)。与不施肥的土壤相比,施 肥后养分和碳输入可能诱导"机会主义型"微生物的富 集。SEM结果表明长期施肥对"机会主义型"微生物类 群相对丰度的影响要大于生态背景所造成的区域差异[包 括气候和土壤性质,图3(a)和图3(b)]。"机会主义 型"微生物类群主要隶属于变形菌门(Proteobacteria)和 拟杆菌门(Bateroidetes) [见图2和附录A中的图S6], 它 们都是富营养型微生物[46],因此在施肥后的富营养环境 中更具有竞争优势。例如,氮素的添加刺激了Nitrosospira 和*Nitrososphaera*;而拟杆菌门中的Chitinophagaceae、厚 壁菌门中的Bacilli和变形菌门中的光合细菌(Rhodopseudomonas、Rhodospirillaceae 和 Rhodospirillales) 对有机肥 中的碳输入有积极的响应(图2),能够成为高肥力土壤 的优势微生物[8,47-49]。因此,这些"机会主义型"微生



**图2.** 优势微生物(相对丰度占比前10%)对施用无机肥(外环)和有机肥(内环)的响应策略。表格展示了施肥后4种响应策略微生物的百分比。门水平微生物对应的值表示各门类下"机会主义型"、"敏感型"和"耐受型"三种分类群合计所占的百分比。各门类颜色与系统发育树分支颜色相对应。系统发育树中的饼图显示了无机(外部饼图)和有机(内部饼图)施肥下各门类微生物响应策略的分布情况。本文中,"机会主义型"和"敏感型"类微生物群分别是指在90%的站点中对施肥具有持续积极(相对丰度增加)和消极(相对丰度减少)响应的微生物;"耐受型"是指在90%的站点中对施肥具有持续积极(相对丰度增加)和消极(相对丰度减少)响应的微生物;"耐受型"是指在90%的站点中对施肥没有显著响应的微生物。系统发育树中排除了"背景依赖型"微生物,即除以上三种类型之外的微生物。



**图3.** 地理位置(经纬度)、气候、土壤性质与施肥措施[有机肥(a)和无机肥(b)]对"机会主义型"微生物的影响。条形图显示了由SEM得出的施肥和当地生态背景对"机会主义型"微生物的总效应(直接效应+间接效应)。

物类群可以用来表征土壤高肥力,进而评估和指导农业管理方式。"敏感型"微生物类群主要隶属于寡营养型的Acidobacteria和Actinobacteria(见图2和附录A中的图S6)[14,46]。施用有机肥和化肥均会增加土壤有效态氮,进而抑制土壤氮循环微生物。因此,研究发现Nitrospirae、Planctomycetes和Proteobacteria门中与氮循环相关的分类群,如Rhizobiales、Myxococcales和Burkholderiales [50](见图2和附录A中的图S6)均被施肥所抑制,也被归类为"敏感型"。这些物种可用作农业实践对土壤肥力负面影响(如氮肥的过量施用)的潜在预警指标。综上所述,研究结果表明,"机会主义型"和"敏感型"微生物分类群可作为农田土壤肥力的生物指标,指示人类活动对土壤肥力的影响。

## 4. 结论

基于中国10个20年以上具有代表性的田间定位施肥 试验,本研究明确了生态背景主导土壤微生物多样性对施 肥的响应,包括响应的方向和幅度。在这个空间尺度下, 酸性土壤中微生物多样性对施肥的响应更加敏感;由于化 肥能够加剧酸性土壤的酸化,因此化肥对土壤微生物多样 性的影响程度要大于有机肥。此外,土壤中存在部分细菌 类群,它们不受生态背景的影响,对施肥表现出一致的响 应。这些微生物可以作为土壤肥力变化的生物指标。以上 发现可以更好地用于预测全球变化下土壤微生物多样性的 潜在变化和分布[1]。此外,本研究还有助于进一步完善 现有的理论框架,即大尺度(如本研究的洲际尺度)下生 态环境控制土壤微生物多样性对人为扰动的响应(如幅度 和方向)[4,14]。

## 致谢

感谢科技部国家重点研发计划(2016YFD0300802、2019YFC1520700)和中国科学院野外站联合体计划(KFJ-SW035)的资助。感谢西班牙科学和创新部Ramón y Cajal (RYC2018-025483-I)的资助与支持。感谢农业生态试验站10位工作人员在日常田间管理和土壤采样方面给予的帮助。

## Authors' contributions

Jiabao Zhang, Manuel Delgado-Baquerizo, Yongguan Zhu, and Youzhi Feng developed the ideas in this article. Jiabao Zhang and Yongguan Zhu designed the experimental survey. Xiaozeng Han, Xiaori Han, Xiuli Xin, Wei Li, Zhibing Guo, Tinghui Dang, Chenhua Li, Bo Zhu, Zejiang Cai, and Daming Li conducted the field samplings. Youzhi Feng, Manuel Delgado-Baquerizo, Yongguan Zhu and Jiabao Zhang analyzed the data. Youzhi Feng, Manuel Delgado-Baquerizo, Yongguan Zhu, and Jiabao Zhang wrote the manuscript with contributions from all the co-authors.

## Compliance with ethics guidelines

Youzhi Feng, Manuel Delgado-Baquerizo, Yongguan Zhu, Xiaozeng Han, Xiaori Han, Xiuli Xin, Wei Li, Zhibing Guo, Tinghui Dang, Chenhua Li, Bo Zhu, Zejiang Cai, Daming Li, and Jiabao Zhang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.09.012.

### References

- Delgado-Baquerizo M, Bardgett RD, Vitousek PM, Maestre FT, Williams MA, Eldridge DJ, et al. Changes in belowground biodiversity during ecosystem development. Proc Natl Acad Sci USA 2019;116(14):6891–6.
- [2] Bardgett RD, van der Putten WH. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. Nature 2014;515(7528):505–11.
- [3] Wall DH, Nielsen UN, Six J. Soil biodiversity and human health. Nature 2015; 528(7580):69–76.
- [4] Leff JW, Jones SE, Prober SM, Barberán A, Borer ET, Firn JL, et al. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. Proc Natl Acad Sci USA 2015;112(35):10967–72.
- [5] Sayer J, Cassman KG. Agricultural innovation to protect the environment. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110(21):8345–8.
- [6] Seufert V, Ramankutty N, Foley JA. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. Nature 2012;485(7397):229–32.
- [7] Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature 2002;418(6898):671–7.
- [8] Feng Y, Chen R, Hu J, Zhao F, Wang J, Chu H, et al. *Bacillus asahii* comes to the fore in organic manure fertilized alkaline soils. Soil Biol Biochem 2015;81: 186–94.
- [9] Van der Bom F, Nunes I, Raymond NS, Hansen V, Bonnichsen L, Magid J, et al. Long-term fertilisation form, level and duration affect the diversity, structure and functioning of soil microbial communities in the field. Soil Biol Biochem 2018;122:91–103.
- [10] Sun L, Xun W, Huang T, Zhang G, Gao J, Ran W, et al. Alteration of the soil bacterial community during parent material maturation driven by different fertilization treatments. Soil Biol Biochem 2016;96:207–15.
- [11] Ye G, Lin Y, Liu D, Chen Z, Luo J, Bolan N, et al. Long-term application of manure over plant residues mitigates acidification, builds soil organic carbon and shifts prokaryotic diversity in acidic Ultisols. Appl Soil Ecol 2019;133:24–33.
- [12] Feng Y, Guo Z, Zhong L, Zhao F, Zhang J, Lin X. Balanced fertilization decreases environmental filtering on soil bacterial community assemblage in north China. Front Microbiol 2017;8:2376.
- [13] Sun R, Zhang X, Guo X, Wang D, Chu H. Bacterial diversity in soils subjected to long-term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock manure than wheat straw. Soil Biol Biochem 2015;88: 9–18.
- [14] Ramirez KS, Craine JM, Fierer N. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. Glob Change Biol 2012;18(6):1918–27.

- [15] Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. Science 2003;301(5635):976–8.
- [16] Nelson MB, Martiny AC, Martiny JBH. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. Proc Natl Acad Sci USA 2016;113(29):8033–40.
- [17] Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. ISME J 2010;4(10):1340–51.
- [18] Chen X, Cui Z, Fan M, Vitousek P, Zhao M, Ma W, et al. Producing more grain with lower environmental costs. Nature 2014;514(7523):486–9.
- [19] Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT [Internet]. Rome: Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations [cited Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture database. (2017). FAOSTAT http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/home/E.
- [20] Lu R. Analytical methods of soil and agricultural chemistry. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press; 1999. Chinese.
- [21] Muyzer G, Teske A, Wirsen CO, Jannasch HW. Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Arch Microbiol 1995;164(3):165–72.
- [22] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York: Wiley; 1991.
- [23] Magoe T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics 2011;27(21):2957–63.
- [24] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. Nat Methods 2013;10(10):996–8.
- [25] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet J 2011;17(1):10–2.
- [26] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol 2007;73(16):5261–7.
- [27] Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. Bioinformatics 2010;26(2):266–7.
- [28] Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. Mol Biol Evol 2009;26(7):1641–50.
- [29] Viechtbauer W. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. J Stat Softw 2010;36(3):1–48.
- [30] Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecol 2001;26(1):32–46.
- [31] Evans SE, Wallenstein MD, Fierer N. Climate change alters ecological strategies of soil bacteria. Ecol Lett 2014;17(2):155–64.
- [32] Delgado-Baquerizo M, Oliverio AM, Brewer TE, Benavent-González A, Eldridge DJ, Bardgett RD, et al. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. Science 2018;359(6373):320–5.
- [33] Legendre P, Legendre L. Numerical ecology. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2002.
- [34] Větrovský T, Kohout P, Kopecký M, Machac A, Man M, Bahnmann BD, et al. A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. Nat Commun 2019;10(1):5142.
- [35] Neilson JW, Califf K, Cardona C, Copeland A, van Treuren W, Josephson KL, et al. Significant impacts of increasing aridity on the arid soil microbiome. mSystems 2017;2(3):e00195–16.
- [36] Joner EJ, Eldhuset TD, Lange H, Frostegård Å. Changes in the microbial community in a forest soil amended with aluminium *in situ*. Plant Soil 2005;275 (1-2):295–304.
- [37] Lammel DR, Barth G, Ovaskainen O, Cruz LM, Zanatta JA, Ryo M, et al. Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures. Microbiome 2018;6(1).
- [38] Liu W, Wang Q, Wang B, Wang X, Franks AE, Teng Y, et al. Changes in the abundance and structure of bacterial communities under long-term fertilization treatments in a peanut monocropping system. Plant Soil 2015;395(1-2):415–27.
- [39] Wang Q, Jiang X, Guan D, Wei D, Zhao B, Ma M, et al. Long-term fertilization changes bacterial diversity and bacterial communities in the maize rhizosphere of Chinese Mollisols. Appl Soil Ecol 2018;125:88–96.
- [40] Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Appl Environ Microbiol 2009;75(15):5111–20.
- [41] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(3):626–31.
- [42] Chen R, Zhong L, Jing Z, Guo Z, Li Z, Lin X, et al. Fertilization decreases compositional variation of paddy bacterial community across geographical

190

gradient. Soil Biol Biochem 2017;114:181-8.

- [43] Conyers M, Liu DL, Kirkegaard J, Orgill S, Oates A, Li G, et al. A review of organic carbon accumulation in soils within the agricultural context of southern New South Wales, Australia. Field Crops Res 2015;184:177–82.
- [44] Walker TW, Syers JK. The fate of phosphorus during pedogenesis. Geoderma 1976;15(1):1–19.
- [45] Martin HW, Sparks DL. Kinetics of nonexchangeable potassium release from two coastal plain soils. Soil Sci Soc Am J 1983;47(5):883–7.
- [46] Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecology 2007;88(6):1354–64.
- [47] Wang Z, Zhang Q, Staley C, Gao H, Ishii S, Wei X, et al. Impact of long-term

grazing exclusion on soil microbial community composition and nutrient availability. Biol Fertil Soils 2019;55(2):121-34.

- [48] Wu L, Yang Y, Chen S, Jason Shi Z, Zhao M, Zhu Z, et al. Microbial functional trait of rRNA operon copy numbers increases with organic levels in anaerobic digesters. ISME J 2017;11(12):2874–8.
- [49] Liang CM, Hung CH, Hsu SC, Yeh IC. Purple nonsulfur bacteria diversity in activated sludge and its potential phosphorus-accumulating ability under different cultivation conditions. Appl Microbiol Biotechnol 2010;86(2):709–19.
- [50] Wang L, Luo X, Liao H, Chen W, Wei D, Cai P, et al. Ureolytic microbial community is modulated by fertilization regimes and particle-size fractions in a black soil of northeastern China. Soil Biol Biochem 2018;116:171–8.