

秸秆还田配施复合微生物菌剂对退化褐土修复及关键微生物筛选

崔家馨¹, 韩钰¹, 冯晨², 武清涵¹, 郭萍¹, 杨世琦¹

(1. 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081; 2. 中国科学院应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:【目的】探究秸秆还田配施复合微生物菌剂对退化褐土土壤养分和微生物群落多样性的影响, 并筛选修复过程中关键微生物, 为修复因长期集约化耕作和养护不足而退化的土壤提供有效且可行的措施。【方法】以未处理的退化褐土为对照 (CK), 分别在退化褐土中添加秸秆 (T1) 及秸秆和复合微生物菌剂 (枯草芽孢杆菌+绿僵菌) (T2), 测定土壤养分指标, 利用宏基因组测序分析土壤微生物群落的差异性, 并筛选退化褐土修复过程中的关键微生物。【结果】秸秆和复合微生物菌剂的添加改善了土壤 pH 值, 提高了有机碳、速效钾、速效磷、碱解氮和微生物量碳质量分数。宏基因组测序结果表明, 秸秆还田配施复合微生物菌剂能够提高土壤微生物种水平 α 多样性, 土壤中变形菌门、放线菌门和拟杆菌门相对丰度显著增加。相关性分析结果表明, 土壤有机碳和微生物量碳质量分数与微生物群落结构密切相关。放线菌门的野野村氏菌属 (*Nonomuraea*) 与有机碳的变化显著相关, 在退化褐土的修复过程中发挥关键作用。【结论】通过秸秆配施复合微生物菌剂修复退化褐土, 可以使土壤养分大幅度提升, 土壤微生物物种组成发生改变, 种水平 α 多样性得到提高, 而野野村氏菌属为该修复过程中的关键微生物。

关键词: 退化褐土; 秸秆还田; 复合微生物菌剂; 土壤养分; 关键微生物

中图分类号: S154.3; 文献标志码: A

Remediation effects and keystone microbial taxa screening in degraded cinnamon soil using straw returning combined with microbial agents

CUI Jiaxin¹, HAN Yu¹, FENG Chen², WU Qinghan¹, GUO Ping¹, YANG Shiqi¹

(1. Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Institute of Applied Ecology, Chinese

收稿日期: 2025 - 03 - 04

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1500600)

作者简介: 崔家馨 (1999—), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生, 主要从事微生物组学研究, E-mail: 3211086122@qq.com。

通信作者: 杨世琦 (1970—), 男, 陕西咸阳人, 研究员, 博士, 博士生导师, E-mail: shiqiyang@126.com; 郭萍 (1967—), 女, 陕西西安人, 研究员, 博士, 硕士生导师, E-mail: guoping@caas.cn。

Academy of Sciences, Liaoning 110016, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of straw returning combined with microbial agent on soil nutrients and microbial community diversity in degraded cinnamon soil, and to provide effective and feasible restoration measures for soils degraded due to long-term intensive cultivation and insufficient maintenance. 【Method】 Using untreated degraded cinnamon soil as the control (CK), straw was applied to the degraded soil (T1), and a combination of straw and microbial agent (*Bacillus subtilis* and *Metarhizium*) was applied (T2). Soil nutrient indicators were measured, and metagenomic sequencing was used to analyze differences in soil microbial communities across treatments. Key microbial taxa associated with soil organic carbon (SOC) were identified. 【Result】 The addition of straw and microbial agent improved soil pH and increased the content of soil organic carbon (SOC), available potassium (AK), available phosphorus (AP), alkali-hydrolyzable nitrogen (AN), and microbial biomass carbon (MBC). Metagenomic sequencing results indicated that the combined application of straw and microbial agent enhanced the α diversity of soil microorganisms at the species level. The relative abundance of Proteobacteria, Actinobacteria, and Bacteroidetes in the soil significantly increased. Correlation analysis revealed that soil organic carbon is closely related to microbial community structure. Among the microbial taxa with significant differences, *Nonomuraea* (Actinobacteria) was significantly correlated with changes in organic carbon and may play a key role in the restoration of degraded cinnamon soil. 【Conclusion】 In the process of restoring degraded cinnamon soil, the combined application of straw and microbial agent can significantly improve soil nutrient levels, alter the composition of soil microbial species, and enhance α diversity at the species level, and screen *Nonomuraea* as the keystone microbial taxa.

Keywords: degraded cinnamon soil; straw returning; microbial agent; ~~S~~soil nutrient; keystone microbial taxa

褐土是半淋溶土纲的典型地带性土壤，具有黏化层与钙积层共存的剖面特征，多分布于中国华北暖温带半湿润气候区及太行山、伏牛山等山地丘陵地带。河南省褐土面积为 27 970.5 km²，是中国重要的农业土壤资源，主要支撑小麦和玉米等粮食作物的生产^[1]。目前，褐土在长期“重用轻养”的耕作模式下出现了明显的退化现象，主要表现为土壤沙化、有机质减少、微生物多样性减少、作物产量下降、化肥利用效率降低等^[2]。这种退化状况严重威胁着区域农业可持续发展，因此开展退化褐土修复研究十分重要。秸秆还田作为退化土壤修复的重要措施，能够显著提升土壤质量^[3]。研究表明，秸秆还田能增加土壤有机碳(soil organic carbon, SOC)^[4]、速效磷(available phosphorus, AP)和速效钾(available kalium, AK)质量分数，有效降低土壤板结风险^[5]。然而，秸秆还田的修复效果受到多方面限制。首先，土壤碳饱和效应制约秸秆还田的长期效果^[6]；其次，北方地区年积温偏低导致秸秆分解缓慢，无法短期内达到理想修复效果；此外，未完全腐解的秸秆可能成为地下害虫和病原菌的越冬

场所，增加作物病害风险^[7]。因此，在秸秆还田基础上配合使用其他措施，有助于进一步提升退化土壤的修复效果。微生物修复是一种利用微生物自身的代谢作用改善土壤质量的技术，具有绿色环保、成本低廉等特点。但是，单独使用该技术进行退化土壤修复，存在单次接种菌株难以存活、微生物的功能不能完全恢复、无法在短期内改变退化土壤性质等问题^[8]。微生物菌剂含有功能性微生物活菌，包括枯草芽孢杆菌和绿僵菌等。枯草芽孢杆菌不仅能够裂解秸秆中纤维素和半纤维素，而且确保菌剂在土壤中的存活与功能稳定性。绿僵菌具有抗病促生和靶向控虫功能。研究发现，微生物菌剂与秸秆等外源有机质配施可显著提高土壤持水能力，并增加土壤养分^[9]。同时，秸秆还田配施微生物菌剂可产生协同效应，一方面加快秸秆腐解释放养分，保证了农作物的碳、氮需求，有效调节土壤微生物活性；另一方面，丰富的有机质促使细菌和真菌大量繁殖，提高有益微生物数量，抑制致病微生物生长^[10]。此外，复合微生物菌剂较单一菌株具有更好的秸秆降解能力^[11]，同时还能激发作物免疫基因表达，增强抗病性，改善病害防治效果。

土壤中存在丰富的微生物类群，包括拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、浮游菌门(*Planctomycetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)等，然而不同土壤类型的微生物群落结构不同。例如，放线菌门在沙质土壤中更易定植，厚壁菌门具有更强的环境胁迫耐受性，而酸杆菌门(*Acidobacteria*)则对酸性土壤表现出更高亲和力^[12]，这些菌门的数量可作为土壤退化的指标。关键微生物是指维持土壤功能和农业生产的重要微生物。研究表明，土壤退化会导致关键微生物类群减少，整个微生物群落的稳定性下降^[13-15]。然而，关于退化褐土及其修复过程中的指示微生物仍缺乏系统研究。因此，本研究通过多维度验证（养分指标+宏基因组学）揭示了传统秸秆还田配施菌剂模式下被忽视的微生物功能强化效应，通过观测土壤养分改变下的土壤微生物群体结构变化，揭示退化褐土修复过程中微生物的响应和驱动机制，并筛选该修复过程中关键微生物，为退化褐土修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验位于辽宁朝阳建平县实验站(41°42'N, 119°33'E)，属北温带大陆性季风气候，年降水量 480 mm，半湿润易旱。雨热同季，平均气温 7.9 °C，≥10 °C积温为 3 420 °C，无霜期 151 d。日照充足，年均日照 2 850~2 950 h。海拔 250 m。农田表土呈现中度片蚀，原腐殖质层侵蚀严重，心土层多裸露，处于重度退化状态。

1.2 试验设计

于 2023-04-19 通过五点取样法随机从试验地中选取耕层土壤(20 cm 深)，剔除植物残体和石块后作为供试土壤。供试土壤 pH 值为 5.94，有机碳质量分数为 13.56 g·kg⁻¹，速效钾质量分数为 7.55 g·kg⁻¹，速效磷质量分数为 11.79 mg·kg⁻¹，碱解氮(alkali-hydrolyzable nitrogen, AN)质量分数为 81.08 mg·kg⁻¹，微生物量碳(microbial biomass carbon, MBC)质量分数为 92.14 mg·kg⁻¹。试验共设置 3 个处理，包括未处理的退化褐土(CK)、退化褐土添加玉米秸秆(T1)，以及退化褐土同时添加玉米秸秆和复合微生物菌剂(T2)，每个处理重复 7 次。

玉米秸秆为试验地上一年的玉米收获后风干所得。采用盆栽方式，花盆高 25 cm，内径 20 cm，每盆装土 5 kg，装盆时将土壤与玉米秸秆粉碎（1 cm 长）混合均匀装入盆中，秸秆施用量为耕层土壤质量的 5%。复合微生物菌剂由宁夏中微泰克生物技术有限责任公司提供的枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）和绿僵菌（*Metarhizium*）组成（配方不公开），菌剂的施用量同样为耕层土壤质量的 5%。

盆栽试验开始于 2023-05-09，结束于 2023-08-19，花盆灌足水分，放置温棚（ 26 ± 1 °C）。供试作物为紫花苜蓿（品种 WL358HQ，由北京正道种业有限公司提供），每盆播种 10 株，出苗后观察记录其生长状况并进行间苗，每盆保留长势相同的 5 株紫花苜蓿。在苜蓿生长过程中定期去除杂草，加强病虫害防治，做好水分管理。试验过程中各盆栽浇水量与浇水次数保持一致，每隔 3 天浇 1 次水，浇水体积为 500 mL。

1.3 取样与指标测定方法

在盆栽土层 13 cm 的温度稳定（ 26 ± 1 ） °C 时，此时秸秆腐熟进入成熟期。采用五点混合采样法收集土壤样本。每个处理的土壤样本采集 2 份，一份立即冷冻于 -80 °C 冰箱用于测定微生物宏基因组和土壤微生物量碳质量分数，另一份土壤自然风干后过 0.15 mm 筛，用于测定土壤养分各指标。土壤含水量采用 105 °C 下烘干土样 24 h 后测定。土壤养分指标检测重复 7 次，微生物样品检测重复 3 次。土壤 pH 值采用水浸电位法测定，有机碳质量分数采用 $K_2Cr_2O_7$ -容量法测定，微生物量碳质量分数采用氯仿熏蒸浸提法测定，碱解氮质量分数采用碱解扩散法测定，速效钾质量分数采用 NH_4OAc 浸提—火焰光度法测定，速效磷质量分数采用 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaHCO}_3$ 浸提法测定^[16]。

1.4 宏基因组测序方法

1.4.1 建库测序 使用 E.Z.N.A. 土壤 DNA 试剂盒（Omega Bio-tek, Inc., USA）从 0.25 g 新鲜土壤样品中分离基因组 DNA。提取得到的 DNA 用质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的纯度和完整性，Qubit 对 DNA 浓度进行精确定量。检测合格的 DNA 样品用 Covaris 超声波破碎仪（美国）将基因组 DNA 随机打断成长度约 300 bp 的小片段，经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个文库制备。文库质检合格后，把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后在 Illumina NovaSeq PE150 平台测序。

1.4.2 分析方法 使用 fastp 对 reads 3'端和 5'端的 adapter 序列进行质量剪切，去除含有接头和低质量的 Reads，得到高质量的 clean reads。使用基于 succinct de Bruijn graphs 原理的拼接软件 MEGAHIT 对优化序列进行拼接组装。在拼接结果中筛选 ≥ 800 bp 的 contigs 作为最终的组装结果。使用 Prodigal 对拼接结果中的 contigs 进行 ORF 预测。选择核酸长度大于等于 100 bp 的基因，并将其翻译为氨基酸序列。用 CD-HIT 对所有样品预测出来的基因序列进行聚类，每类取最长的基因作为代表序列，构建非冗余基因集。使用 bowtie2 软件，分别将每个样品的 clean reads 与非冗余基因集进行比对（95% 一致性），统计基因在对应样品中的丰度信息。基于比对上的 reads 数目及基因长度，计算得到各基因在各样品中的丰度信息^[17]。

1.4.3 物种分类学注释 使用 Diamond 将非冗余基因集的氨基酸序列与 NR 数据库 (Version:2021.11) 进行比对 (BLASTP 比对参数设置期望值为 $1e^{-5}$), 并通过 NR 库对应的分类学信息数据库获得物种注释, 然后使用物种对应的基因丰度总和计算该物种的丰度。

1.5 数据处理

采用 SPSS 25.0 对土壤养分指标进行单因素方差分析 (ANOVA) 和非参数分析, 通过 Tukey 和 Kruskal Wallis 检验计算处理间的差异显著性, 当 $p<0.01$ 或 $p<0.05$ 具有统计学意义。使用 Graphpad Prism 10 进行 α 多样性和微生物群落组成的绘图。R (版本 4.3.3) 被用于多种分析。使用 R 语言 “vegan” 包进行 ANOSIM (Analysis of Similarities) 分析, 通过分析结果评估不同处理组间差异与组内差异的关系, 检验分组的有效性, R 值表示组间差异与组内差异的程度, 其范围为 $(-1, 1)$; 当 $R>0$ 时, 组间差异大于组内差异; 当 $R<0$ 时, 组内差异大于组间差异。基于距离矩阵 (Bray-Curtis) 进行主坐标分析 PCoA (Principal Coordinates Analysis) 评估不同处理间土壤微生物在门/纲和种水平上的丰度差异。Mantel 检验 (Mantel Test) 使用 R 语言 “linkET” 包进行土壤养分与土壤微生物在门/纲和种水平上的丰度之间的相关性分析。通过火山图进行与有机碳相关的微生物群落差异分析, 根据结果进一步筛选出关键微生物。

2 结果与分析

2.1 秸秆还田配施复合微生物菌剂修复对退化褐土土壤养分的影响

退化褐土修复后的土壤养分指标见表 1。与 CK 相比, T1 和 T2 分别提高土壤 pH 值 0.15 倍和 0.08 倍 ($p<0.01$)、土壤有机碳质量分数 0.16 倍和 0.53 倍 ($p<0.01$)、土壤速效钾质量分数 0.18 倍和 0.77 倍 ($p<0.01$), 表明秸秆还田与秸秆还田配施复合微生物菌剂能够极显著影响土壤 pH 值、有机碳与速效钾质量分数, 且秸秆还田配施复合微生物菌剂情况下影响更明显。与 CK 相比, T1 对土壤速效磷质量分数无显著影响 ($p>0.05$), 而 T2 提高土壤速效磷质量分数 15.6 倍 ($p<0.01$), 同时与 T1 相比, T2 速效磷质量分数增加了 11.6 倍 ($p<0.01$), 表明单一秸秆对土壤速效磷质量分数无显著影响, 而秸秆添加菌剂能够促进秸秆中磷的释放。与 CK 相比, T1 和 T2 分别提高土壤碱解氮质量分数 0.53 倍和 2.09 倍 ($p<0.01$), 提高土壤微生物量碳质量分数 2.59 倍和 6.85 倍 ($p<0.01$)。这表明秸秆与秸秆添加菌剂能够极显著影响土壤碱解氮与土壤微生物量碳, 激发了秸秆分解, 显著促进土壤微生物活性, 且秸秆添加外源菌剂影响更为明显。

表 1 不同修复处理下退化褐土土壤养分的变化

Table 1 Changes in the soil nutrients of degraded cinnamon soil under different restoration treatments

处理 Treatment	CK	T1	T2
pH 值 pH value	6.20±0.05 cC	7.16±0.05 aA	6.67±0.08 bB

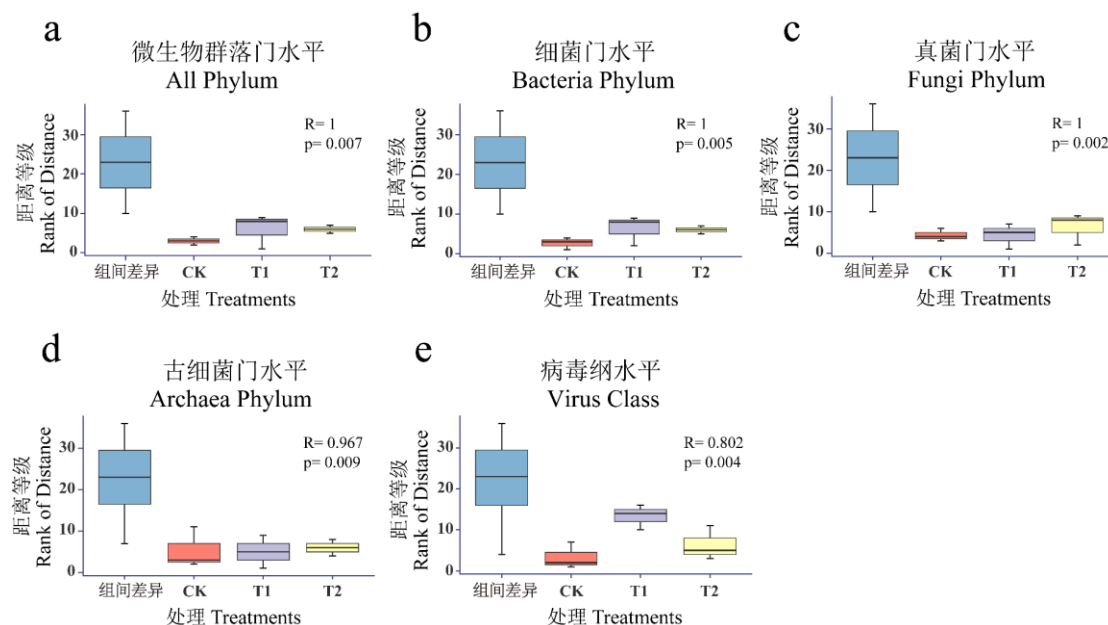
有机碳质量分数/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	14.20 $\pm$ 0.82 cC	16.46 $\pm$ 1.03 bB	21.74 $\pm$ 1.65 aA
Soil organic carbon			
速效钾质量分数/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	8.24 $\pm$ 0.52 cC	9.73 $\pm$ 0.86 bB	14.56 $\pm$ 1.20 aA
Available kalium			
速效磷质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	12.80 $\pm$ 1.04 bB	9.67 $\pm$ 1.37 bB	160.20 $\pm$ 7.02 aA
Available phosphorus			
碱解氮质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	78.79 $\pm$ 2.42 cC	120.44 $\pm$ 3.23 bB	243.52 $\pm$ 25.36 aA
Alkali-hydrolysed nitrogen			
微生物量碳质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	87.65 $\pm$ 21.05 cC	315.00 $\pm$ 24.16 bB	688.20 $\pm$ 76.99 aA
Microbial biomass carbon			

注：同组不同小写字母表示在统计学意义上差异显著 ($p<0.05$)；同组不同大写字母表示在统计学意义上差异极显著 ($p<0.01$)。

Note: The same group of different lowercase letters indicates significant differences in statis($p<0.05$); the same group of different uppercase letters indicates extremely significant differences in statis($p<0.01$).

2. 2 秸秆还田配施复合微生物菌剂修复对退化褐土土壤微生物的影响

2. 2. 1 土壤微生物群落多样性 在最高分类水平（门或纲）的 ANOSIM 分析显示，不同处理间微生物群落丰度存在显著差异。结果表明，微生物群落丰度 ($R=1$, $p=0.007$)、细菌 ($R=1$, $p=0.005$)、真菌 ($R=1$, $p=0.002$)、古细菌 ($R=0.97$, $p=0.009$) 和病毒 ($R=0.80$, $p=0.004$) 的差异极为显著（图 1）。这些结果表明，秸秆还田和添加复合微生物菌剂显著提高了门或纲水平的土壤微生物群落多样性。



图中展示了土壤总微生物（a）、细菌（b）、真菌（c）、古细菌（d）和病毒（e）在门/纲水平的 ANOSIM 分析结果。 p 值表示差异检验的结果，当 $p<0.05$ 时，在统计学意义上差异显著。

ANOSIM analysis at the phylum (class) for soil total microorganisms (a), bacteria (b), fungi (c), archaea (d), and

viruses (e). The p -value represents the result of the difference test, with significance indicated at the $p<0.05$ level.

图 1 不同修复处理下退化褐土土壤微生物门/纲水平的 ANOSIM 分析

Fig.1 ANOSIM analysis of microbial phylum/class level in degraded cinnamon soil under different restoration treatments

最高分类水平（门或纲）的 PCoA 分析结果得出，土壤微生物群落多样性的 2 个主坐标的方差贡献率分别为微生物群落 99.22%、细菌 99.48%、真菌 95.23%、古细菌 92.03%和病毒 98.05%（图 2）。这表明，秸秆和秸秆与复合微生物菌剂的组合对土壤微生物群落结构有显著影响。不同处理在坐标轴上的明显分离突出了添加复合微生物菌剂对修复退化褐土的有效性。虽然细菌和总微生物群落在 PCoA1 和 PCoA2 上的影响较为一致，但其他类群（真菌、古细菌和病毒）和总微生物群落在主坐标上的影响存在一定差异。

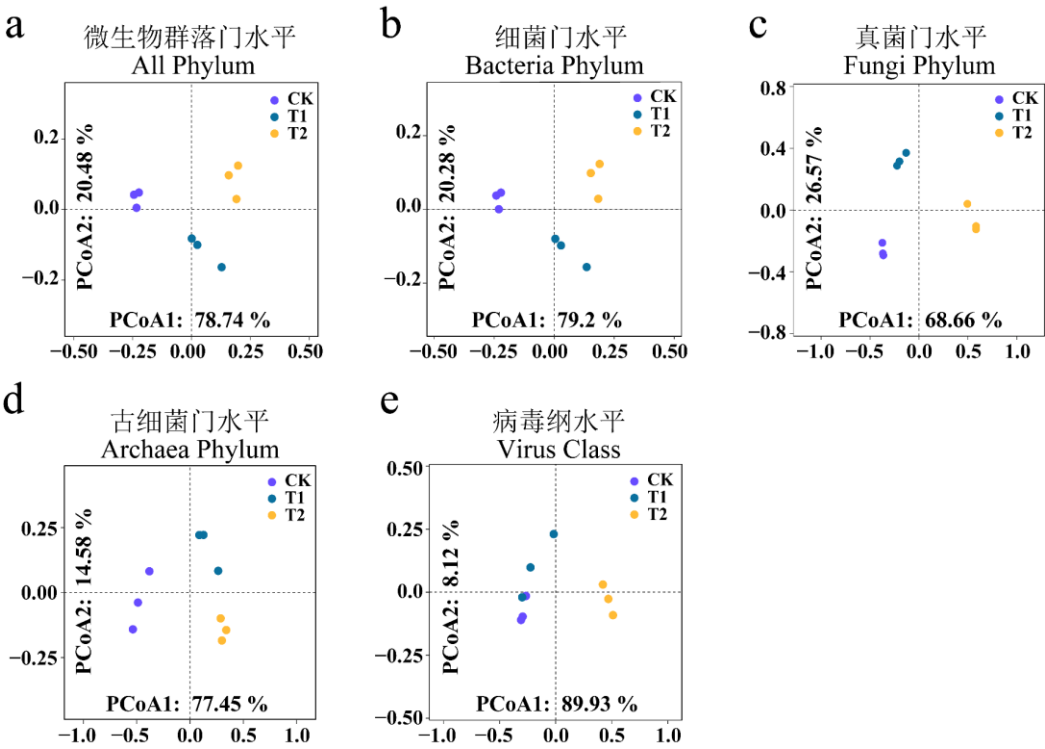
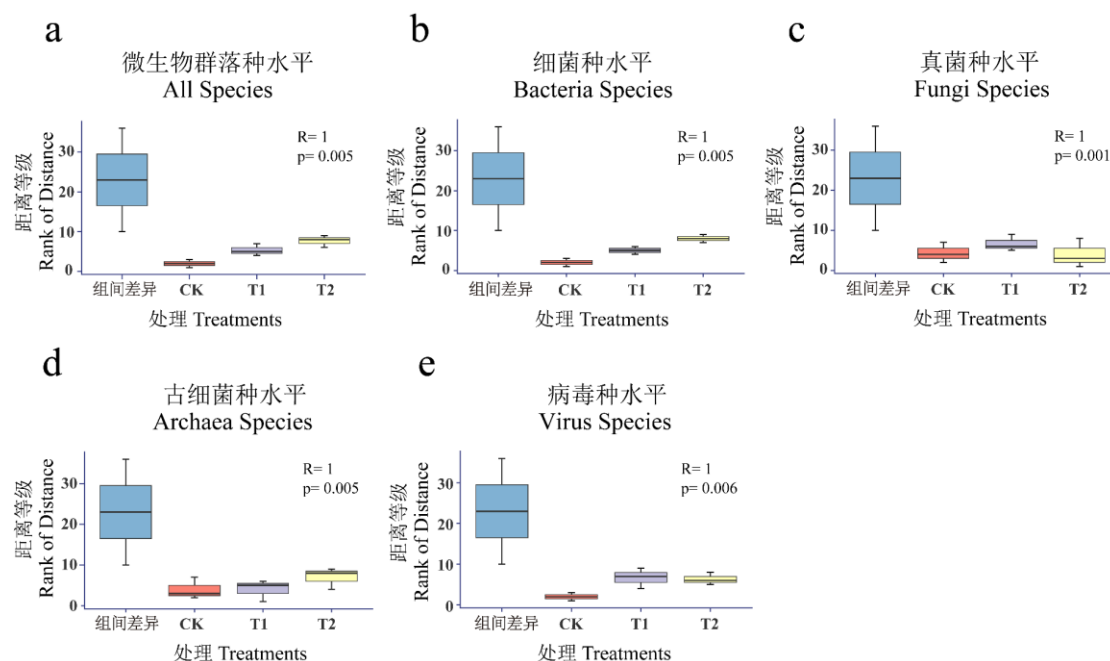


图 2 不同修复处理下退化褐土土壤微生物门/纲水平的主坐标分析（PCoA）

Fig.2 Principal Coordinate Analysis (PCoA) of microbial phylum/class level in degraded cinnamon soil under different restoration treatments

在最低分类水平（种水平）的 ANOSIM 分析显示，不同处理间微生物群落丰度存在显著差异。结果表明，微生物群落 ($R=1$, $p=0.005$)、细菌物种 ($R=1$, $p=0.005$)、真菌物种 ($R=1$, $p=0.001$)、古细菌物种 ($R=0.97$, $p=0.005$) 和病毒物种 ($R=0.80$, $p=0.006$) 的差异极为显著（图 3）。这些结果表明，秸秆还田和添加复合微生物菌剂显著提高了物种水平的土壤微生物群落多样性。



p 值表示差异检验的结果，当 $p < 0.05$ 时，在统计学意义上差异显著。

The p -value represents the result of the difference test, with significance indicated at the $p < 0.05$ level.

图 3 不同修复处理下退化褐土土壤微生物种水平的 ANOSIM 分析

Fig.3 ANOSIM analysis of microbial species level in degraded cinnamon soil under different restoration treatments

在种水平的 PCoA 分析表明，种水平微生物群落多样性的 2 个主坐标的方差贡献率分别为微生物群落 89.47%、细菌 89.45%、真菌 85.61%、古细菌 83.19%和病毒 76.87%（图 4）。这些结果表明，秸秆和秸秆与复合微生物菌剂的组合对物种水平的土壤微生物群落组成有显著影响。不同处理在坐标轴上的明显分离突出了添加复合微生物菌剂对修复退化褐土在物种水平的显著效果。

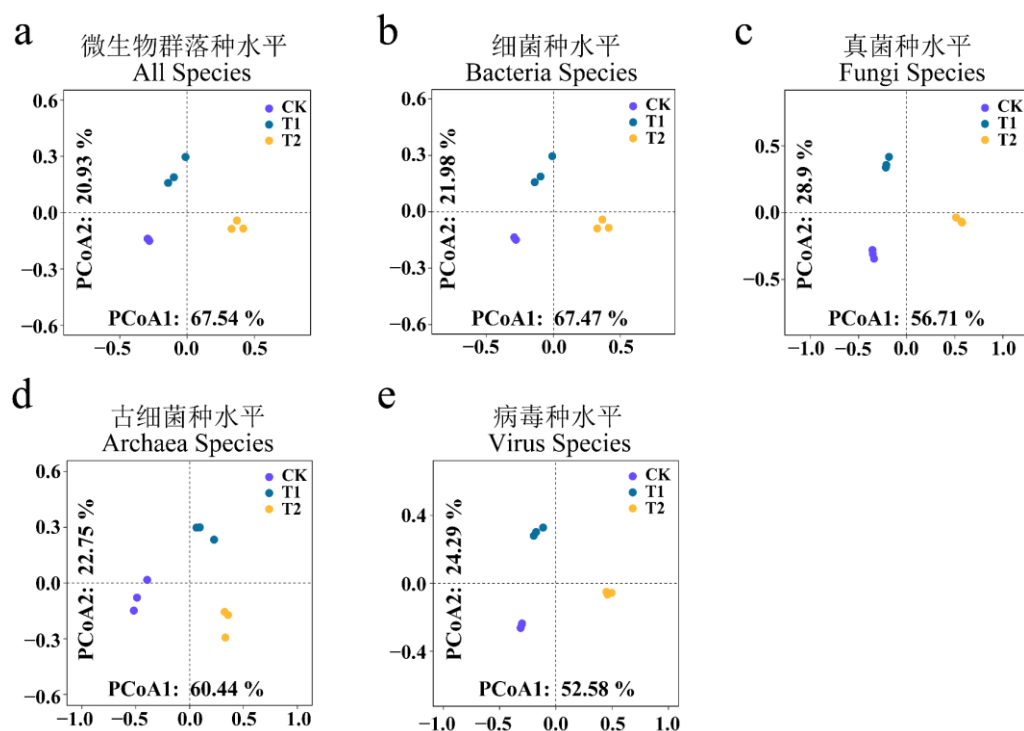
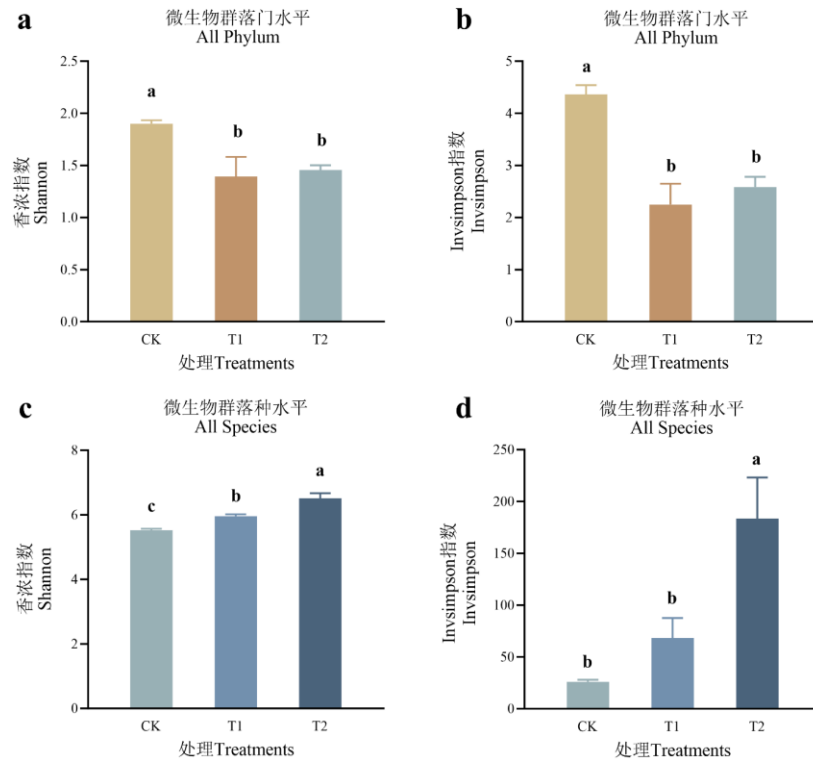


图 4 不同修复处理下退化褐土土壤微生物种水平的主坐标分析 (PCoA)

Fig.4 Principal Coordinate Analysis (PCoA) of microbial species level in degraded cinnamon soil under different restoration treatments

2.2.2 微生物组成多样性 土壤微生物群落门水平和种水平 α 多样性分析结果见图 5。与 CK 相比, T1 降低土壤微生物群落门水平的 α 多样性, Shannon 指数和 Invsimpon 指数差异显著; 但在微生物种水平的 α 多样性提高, 且 Shannon 指数差异显著; T2 降低了土壤微生物群落门水平的 α 多样性, Shannon 指数和 Invsimpon 指数差异显著, 但提高了种水平的 α 多样性, Shannon 指数和 Invsimpon 指数差异显著。T1 和 T2 的土壤微生物群落门水平 α 多样性 Shannon 指数和 Invsimpon 指数均无显著差异, 但种水平 α 多样性 Shannon 指数和 Invsimpon 指数均提高, 且差异显著。



不同字母表示多重比较的差异显著性 ($p < 0.05$), 误差条表示标准差。

Different letters indicate significant differences in multiple comparisons ($p < 0.05$), and error bars represent standard deviations.

图 5 不同修复处理下退化褐土土壤微生物群落门水平和种水平 α 多样性分析

Fig.5 Analysis of α diversity at the phylum and species levels of soil microbial communities in degraded cinnamon soil under different restoration treatments

依据宏基因组测序结果进行物种注释, 所有土壤样品共获得 194 门、471 纲、759 目、1 418 科、4 465 属物种, 土壤微生物的相对丰度因秸秆和菌剂的添加而产生了不同的差异 (图 6)。变形菌门是各样本中最明显的优势菌门 (占 35.20%~73.89%), 其次为酸杆菌门 (0.94%~27.02%), 放线菌门 (3.64%~23.25%), 芽单胞菌门 *Gemmatimonadetes* (1.57%~11.95%), 拟杆菌门 (1.61%~11.17%), 这些优势菌门的丰度之和占微生物群落的 80% 以上。T1 优势菌门的相对丰度与 CK 相比, 土壤中变形菌门、拟杆菌门的丰度显著增加, 酸杆菌门、芽单胞菌门的丰度显著降低; T2 中变形菌门、放线菌门、拟杆菌门的丰度显著增加, 土壤中酸杆菌门、芽单胞菌门的丰度显著降低。T2 与 T1 相比, 土壤中放线菌门、拟杆菌门的丰度显著增加, 酸杆菌门的丰度显著降低。

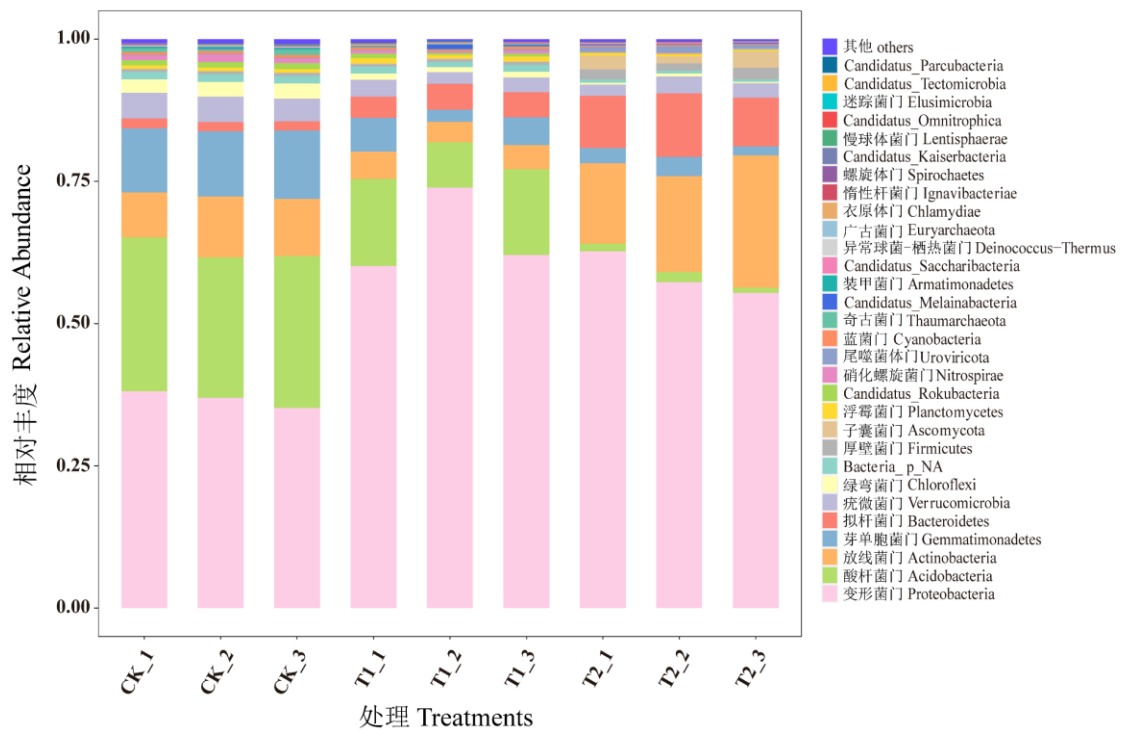


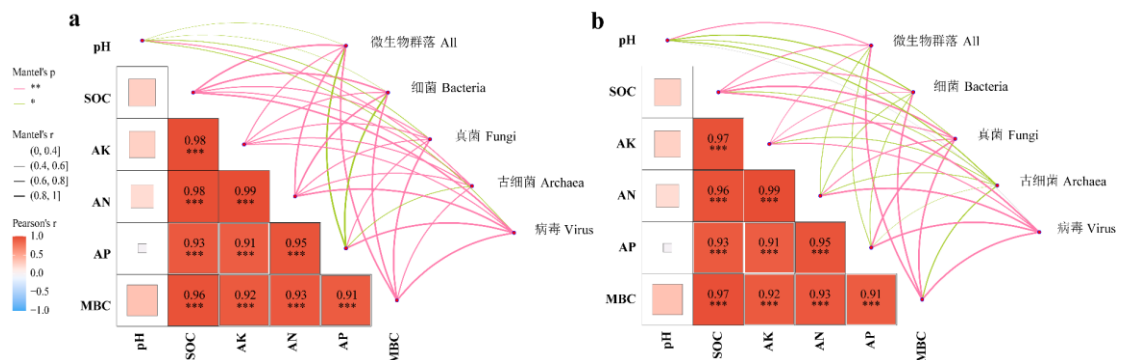
图 6 不同修复处理下退化褐土微生物组成分析

Fig.6. Analysis of microbial composition in degraded cinnamon soil under different restoration treatments

2. 3 秸秆还田配施复合微生物菌剂修复退化褐土的关键微生物筛选

2. 3. 1 退化褐土修复过程中土壤养分与微生物群落丰度相关性分析

如图 7 所示，土壤养分指标与土壤微生物门（纲）水平丰度相关性结果表明，除土壤 pH 值与病毒门水平上未达到显著差异外，MBC、SOC、AK、AP、AN 与微生物群落门、细菌门、真菌门、古细菌门和病毒纲水平均达到极显著或显著差异；土壤养分与土壤微生物种水平丰度相关性结果表明，MBC、SOC、AK、AP、AN、pH 与总体微生物群落、细菌、真菌、古细菌和病毒在种水平均达到极显著差异或显著差异。由此可见，各土壤养分指标对不同类别微生物群落的影响程度不同，但土壤 5 个分类群的微生物群落在最高分类单元和最低分类单元均对有机碳及微生物量碳相关性最强且显著性最高。因此选择与有机碳关联程度作为指标，筛选退化褐土修复过程中的关键微生物。



a: 门(纲)水平(病毒为纲水平,其余为门水平); b: 种水平。连线部分的颜色和粗细分别代表显著性 p 值和相关性 r 值。红色线条代表极显著,绿色线条代表显著,灰色代表未达到显著水平。

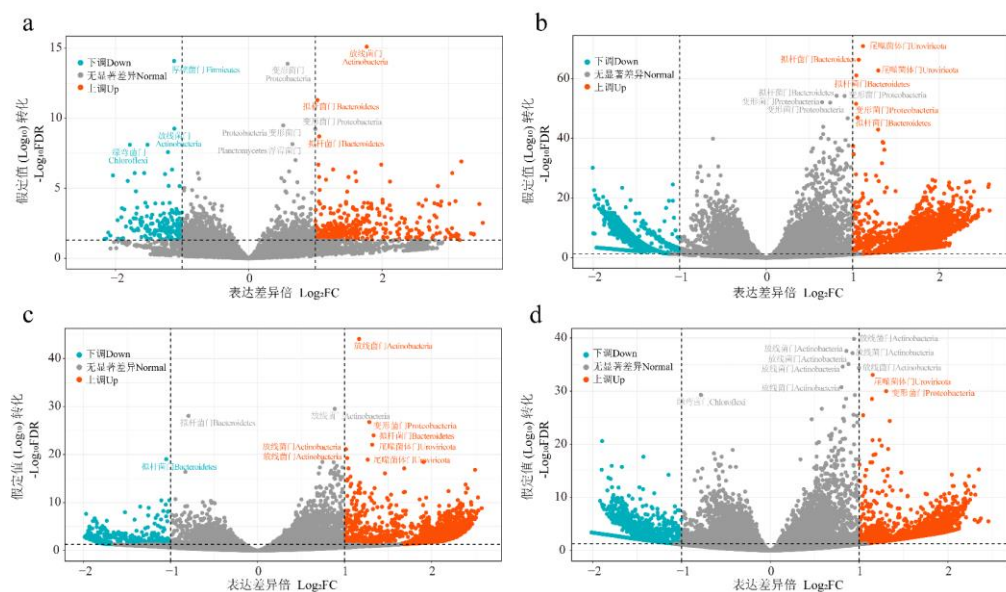
a: phylum (class) level (viruses are at the level of class, while the rest are at the level of phylum); b: species level. The color and thickness of the connected lines represent the significance of p -values and the correlation coefficients r , respectively. Red lines indicate extremely significant, green lines indicate significant, and gray indicates not reaching a significant level.

图 7 退化褐土修复过程中土壤理化性状对微生物群落的影响

Fig.7 The impact of soil nutrients on microbial communities during the restoration process of degraded cinnamon soil

2.3.2 退化褐土修复过程中关键微生物的筛选

不同退化褐土修复过程中,与有机碳关联微生物群落情况存在差异(图8)。T1 较 CK 微生物差异的前 10 位从强到弱顺序是放线菌门野野村氏菌、厚壁菌门梭菌属(*Clostridium*)、变形菌门 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)、拟杆菌门 *Niastella* 属、放线菌门弗兰克氏菌目(*Frankiales*)、变形菌门 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、拟杆菌门 *Niastella* 属、浮霉菌门 *Phycisphaera* 属。T2 较 CK 的微生物差异的前 10 位从强到弱的顺序是尾噬菌体门长尾噬菌体科(*Siphoviridae*)、拟杆菌门噬几丁质菌属(*Chitinophaga*)、尾噬菌体门 *Bonnellvirus* 属、变形菌门肠杆菌属(*Enterobacter*)、变形菌门 *Steroidobacter* 属、变形菌门纤维弧菌属(*Cellvibrio*)、变形菌门无色杆菌属(*Achromobacter*)。T2 较 T1 的微生物差异的前 10 位从强到弱的顺序是放线菌门小单孢菌属(*Micromonospora*)、放线菌门小双孢菌属(*Microbispora*)、拟杆菌门根瘤菌属(*Chryseolinea*)、变形菌门寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、拟杆菌门橄榄杆菌属(*Olivibacter*)、拟杆菌门 *Reichenbachiella* 属、放线菌门野野村氏菌属、尾噬菌体门长尾噬菌体科、放线菌门游动双孢菌属(*Planobispora*)。T2 和 T1 较 CK 的微生物差异的前 10 位从强到弱的顺序是放线菌门野野村氏菌、尾噬菌体门长尾噬菌体科、变形菌门无色杆菌属以及绿弯菌门。以上结果表明,有机碳对土壤微生物有很大影响,随着时间的推移在土壤中形成网络中心点、模块中心点或者模块连接点,可能是潜在的关键微生物。T2 和 T1 较 CK 受有机碳影响而产生的微生物差异排名前 10 位中有 7 个属于放线菌门野野村氏菌属,推测其为褐土退化修复过程中的关键微生物。T2 较 CK 和 T1 受有机碳强烈影响微生物类群中尾噬菌体门长尾噬菌体科病毒均显著增加,表明添加菌剂激发了病毒增殖。



a: T1 与 CK; b: T2 与 CK; c: T2 与 T1; d: T2、T1 与 CK。不同的点代表不同菌种。红色代表显著上调的微生物类群，蓝色代表显著下调的微生物类群。

a: T1 and CK; b: T2 and CK; c: T2 and T1; d: T2, T1 and CK. Different points represent different microbial species. Red indicates significantly upregulated microbial groups, and blue indicates significantly downregulated microbial groups.

图 8 退化褐土修复过程中土壤有机碳关联微生物筛选

Fig.8 Selection of organic carbon-associated microbes during the restoration process of degraded cinnamon soil

3 结论与讨论

退化褐土因土壤养分流失导致作物产量逐年递减。本研究发现，秸秆还田配施复合微生物菌剂（枯草芽孢杆菌+绿僵菌）是修复退化褐土的有效措施，可以提高退化褐土的 SOC、MBC、AK、AN、AP 质量分数和 pH 值，与 GONG 等^[18]、HAN 等^[19]和 WANG 等^[20]的研究结果一致。与其他研究不同，本研究使用的复合微生物菌剂（枯草芽孢杆菌+绿僵菌）兼具秸秆降解和靶向控虫功能。土壤有机碳质量分数是有效示警土壤退化的重要指标。秸秆还田配施复合微生物菌剂对土壤有机碳的提升是基于秸秆输入的碳源供给与微生物协同转化作用^[21]。复合微生物菌剂通过增强纤维素分解菌活性，加速秸秆腐化进程，促进稳定态有机碳的形成^[22]。相较于传统秸秆还田，菌剂的添加使 MBC 质量分数提升 1.19 倍，证明外源菌剂能够优化土壤原生微生物群落结构，增强碳代谢效率^[23]。秸秆配施菌剂使土壤 AP、AK 和 AN 质量分数分别增加 15.6 倍、0.77 倍和 2.09 倍，其机理可能涉及解磷菌和解钾菌向土壤溶质中释放低分子量有机酸（腐殖酸或富里酸）促进矿物态磷和钾的释放^[24]，以及固氮

菌与纤维素分解菌的互作效应^[25]。菌剂施入后降低了秸秆还田后土壤 pH 的提升幅度,可能是由于在微生物的作用下土壤发生的硝化作用、含羟基酚类化合物的合成和氨挥发^[26]。

本试验表明,土壤 pH 值、SOC、AK、AP、AN 和 MBC 影响土壤微生物群落、细菌、真菌、古细菌和病毒类群多样性,其中, MBC 与 SOC 有显著影响且相关性最强。WANG 等^[27]在盐碱地进行秸秆还田的试验中发现,土壤有机碳与细菌、真菌及其他微生物丰度呈显著正相关,这与本试验结果一致。这表明,土壤微生物群体与有机碳的变化有直接关系,可以根据有机碳质量分数变化筛选相关差异微生物。pH 值是影响相关微生物群落模块化的关键变量^[28],主要受影响的系统发育类群是放线菌门和变形菌门,本试验也证实了这一点。JIANG 等^[29]在抚顺西部的矿场土壤中发现,AN 对土壤微生物群落有较大影响,微生物生长主要受到氮而不是磷的限制。QI 等^[30]在灰色沙漠土栽种紫花苜蓿的研究中发现,AP 在形成微生物群落组成中同样起主导作用,本结果表明 AN 和 AP 对微生物不同群落多样性都有显著影响,只是 AP 对古细菌群落的影响弱于 AN。

秸秆还田显著影响微生物 β 多样性和 α 多样性,使土壤微生物具有更复杂、更稳定的网络结构和连接更紧密的分类群,相应的稳定群落还可能促进了有机碳的分解和利用^[31]。外源碳显著激发土壤细菌群落的机会性亚群繁殖,尤其是 γ -变形菌纲和厚壁菌门的成员^[32],与本研究在退化褐土修复中细菌群落增加的结果一致。土壤微生物可直接利用秸秆碳,尤其在低肥力水平下,秸秆碳贡献土壤 MBC 超过 75%,显著促进土壤微生物繁殖^[33]。本研究发现,秸秆还田使微生物群落门水平 Shannon 指数降低,而种水平 Shannon 指数增加,原因可能是玉米秸秆还田导致更具优势的微生物门扩大其内类群取代了其他门类的生态位,导致门水平群落多样性降低而种水平多样性增加^[34]。菌剂在修复土壤生态系统功能和提高土壤生产力方面具有巨大的潜力。添加利于秸秆分解的菌剂可以通过增加有效养分来刺激共生菌(如变形杆菌属 *Proteus*、 β 杆菌属和放线菌属 *Actinomyces*)的相对丰度^[35],与本研究添加菌剂也提高了土壤微生物群落多样性的结果吻合。

关键微生物菌群在驱动生态系统功能方面有重要作用,具有较多特定关键微生物菌群的生态系统土壤同时具有更高的植物生产力和有机质降解速率。LIN 等^[36]研究表明,热芽孢属(*Thermogemmatissporales*)与红壤中的 SOM 质量分数显著负相关,是红壤区关键微生物。FAN 等^[37]的研究结果表明,绿弯菌和慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*)等是东北黑土中的关键微生物。有机碳不仅是秸秆的主要成分,也是解释处理间微生物群落结构差异的最重要因素。本研究在分析差异微生物发现,秸秆添加菌剂对放线菌门的野野村氏菌属表现出与有机碳极大的相关性,表明该菌种在秸秆还田中对改善土壤具有重要作用,并确定其为潜在关键微生物。有研究表明,野野村氏菌属可以在干旱土壤、盐渍沙土和海岸沉积物等低有机质土壤中找到,说明该菌群对极端环境有较强的自然适应性和抗性^[38]。野野村氏菌属的菌种中可提取木聚糖酶,由于纤维素和木聚糖的密切相互作用,该酶可水解木聚糖和木质纤维素^[39],促进秸秆降解。野野村氏菌属等关键类群通过增强的纤维素和半纤维素降解来提高堆肥效率^[40]。另有研究表明退化土壤中关键微生物难以维持正常的生理活动,最终导致关键微生物的消灭和无功能微生物的富集^[41]。由此可见,增加与保持土壤中关键微生物的丰度对保持土壤健康和修复退化土壤都至关重要。

本研究以秸秆添加复合微生物菌剂（枯草芽孢杆菌+绿僵菌）修复退化褐土，突破单一菌剂或秸秆还田的常规思路，以“养分改良-微生物激活”耦合策略，改善土壤养分水平，并采用种水平 α 多样性分析替代常规属水平研究，以更微观的角度阐明微生物多样性的变化。此外，针对集约化农业区褐土退化难题，秸秆还田配施复合菌剂相比传统秸秆还田能够缩短修复周期，为退化褐土定向生物修复提供了可推广的微生物组干预方案。下一步可通过大田试验结合宏基因组学和代谢组学来阐明驱动功能基因表达和养分循环的机制。

参考文献 References:

- [1] 于建军, 杨锋, 吴克宁, 等. 河南省土壤有机碳储量及空间分布[J]. 应用生态学报, 2008, 19(5): 1058-1063.
- YU J J, YANG F, WU K N, et al. Soil organic carbon storage and its spatial distribution in Henan Province[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(5): 1058-1063.
- [2] DAVIS A G, HUGGINS D R, REGANOLD J P. Linking soil health and ecological resilience to achieve agricultural sustainability[J]. Frontiers in Ecology and the Environment, 2023, 21(3): 131-139.
- [3] 郭策, 赵兴敏, 王楠, 等. 秸秆还田配施氮肥对黑钙土有机碳及微生物量碳氮的影响[J]. 河南农业大学学报, 2022, 56(1): 21-30.
- GUO C, ZHAO X M, WANG N, et al. Effect of straw returning with nitrogen on organic carbon and microbial biomass carbon and nitrogen in chernozem[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2022, 56(1): 21-30.
- [4] LIU C, LU M, CUI J, et al. Effects of straw carbon input on carbon dynamics in agricultural soils: A meta-analysis[J]. Global Change Biology, 2014, 20(5): 1366-1381.
- [5] ZHOU Z J, LI Z Q, CHEN K, et al. Changes in soil physicochemical properties and bacterial communities at different soil depths after long-term straw mulching under a no-till system[J]. Soil, 2021, 7(2): 595-609.
- [6] 张佳麒, 王翠, 王明明, 等. 长期秸秆还田条件下黑土有机碳的动态变化及其组分积累特征[J/OL]. 土壤学报, 2024: 1-13. (2024-12-25). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFD&filename=TRXB20241224001>.
- ZHANG J Q, WANG C, WANG M M, et al. Temporal dynamics and fraction accumulation characteristics of black soil organic carbon under long-term continuous straw return[J/OL]. Acta Pedologica Sinica, 2024: 1-13. (2024-12-25). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFD&filename=TRXB20241224001>.
- [7] 王瑛, 郭梅燕, 郭书磊, 等. 玉米收割机械化作业对后茬小麦生长的影响[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(2): 273-276.
- WANG Y, GUO M Y, GUO S L, et al. Effect of mechanized harvester application in maize field on wheat growth[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2022, 63(2): 273-276.
- [8] YANG L Q, LI X Y, LI X, et al. Bioremediation of chlorimuron-ethyl-contaminated soil by *Hansschlegelia* sp. strain *CHL1* and the changes of indigenous microbial population and N-cycling function genes during the bioremediation process[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 274: 314-321.
- [9] JI C N, HUANG J, TIAN Y, et al. Feasibility study on the application of microbial agent modified water-jet loom sludge for the restoration of degraded soil in mining areas[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(13): 6797.
- [10] 丁钱华. 微生物菌剂对小麦抗病能力的影响[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(8): 1794-1797.
- DING Q H. Effect of microbial agents on disease resistance of wheat[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2022, 63(8): 1794-1797.
- [11] GAO X Y, LIU W Z, LI X Q, et al. A novel fungal agent for straw returning to enhance straw decomposition and nutrients release[J]. Environmental Technology & Innovation, 2023, 30: 103064.

- [12] ISLAM Z F, CORDERO P R F, FENG J, et al. Two Chloroflexi classes independently evolved the ability to persist on atmospheric hydrogen and carbon monoxide[J]. The ISME Journal, 2019, 13(7): 1801-1813.
- [13] XUE W Z, MA H K, XIANG M C, et al. From *Sphagnum* to shrub: Increased acidity reduces peat bacterial diversity and keystone microbial taxa imply peatland degradation[J]. Land Degradation & Development, 2023, 34(17): 5259-5272.
- [14] ZHANG Z M, HAN X Z, YAN J, et al. Keystone microbiomes revealed by 14 years of field restoration of the degraded agricultural soil under distinct vegetation scenarios[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1915.
- [15] QIAO Y Z, WANG T T, HUANG Q W, et al. Core species impact plant health by enhancing soil microbial cooperation and network complexity during community coalescence[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2024, 188: 109231.
- [16] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- [17] QIN J J, LI R Q, RAES J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
- [18] GONG H R, LI J, MA J H, et al. Effects of tillage practices and microbial agent applications on dry matter accumulation, yield and the soil microbial index of winter wheat in North China[J]. Soil and Tillage Research, 2018, 184: 235-242.
- [19] HAN J X, SONG X Y, FU H Y, et al. Effects of the decomposition agent application on the physicochemical properties and microbial community structure of wheat straw-returning soil[J]. Environmental Technology & Innovation, 2024, 35: 103668.
- [20] WANG X G, WANG Q S, ZHANG Y C, et al. Influence of decomposition agent application and schedule in wheat straw return practice on soil quality and crop yield[J]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2023, 10(1): 8.
- [21] 裴亚楠, 吕卫光, 郭涛, 等. 秸秆还田配施促腐菌剂对土壤团聚体及其养分的影响[J]. 应用生态学报, 2023, 34(12): 3357-3363.
- PEI Y N, LÜ W G, GUO T, et al. Effects of straw-returning combined with application of microbial inoculants on soil aggregates and related nutrients[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2023, 34(12): 3357-3363.
- [22] 李传宝, 王宏燕, 赵伟, 等. 秸秆还田配施微生物菌剂与有机肥施用对黑土微生物量碳的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 265-268.
- LI C B, WANG H Y, ZHAO W, et al. The impact of straw incorporation combined with microbial inoculants and organic fertilizer application on microbial biomass carbon in black soil[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(5): 265-268.
- [23] ZHAO Y X, WENG Q, HU B L. Microbial interaction promote the degradation rate of organic matter in thermophilic period[J]. Waste Management, 2022, 144: 11-18.
- [24] LIU X Q, LIU H R, ZHANG Y S, et al. Straw return drives soil microbial community assemblage to change metabolic processes for soil quality amendment in a rice-wheat rotation system[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2023, 185: 109131.
- [25] SUN J J, ZHANG Z, LIU J S, et al. Experimental study on biogas fermentation of corn stover pretreated with compound microbial agent[J]. Energy, 2024, 306: 132469.
- [26] XU P, SHU L L, YANG Y Y, et al. Microbial agents obtained from tomato straw composting effectively promote tomato straw compost maturation and improve compost quality[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024, 270: 115884.
- [27] WANG C, XIAO R, GUO Y T, et al. Changes in soil microbial community composition during *Phragmites australis* straw decomposition in salt marshes with freshwater pumping[J]. Science of The Total Environment,

2021, 762: 143996.

- [28] LIN Y B, YE Y M, HU Y M, et al. The variation in microbial community structure under different heavy metal contamination levels in paddy soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 180: 557-564.
- [29] JIANG B H, ZHANG B, LI L, et al. Analysis of microbial community structure and diversity in surrounding rock soil of different waste dump sites in Fushun western opencast mine[J]. *Chemosphere*, 2021, 269: 128777.
- [30] QI J J, FU D Q, WANG X Z, et al. The effect of alfalfa cultivation on improving physicochemical properties soil microorganisms community structure of grey desert soil[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 13747.
- [31] ZHANG M M, DANG P F, HAEGEMAN B, et al. The effects of straw return on soil bacterial diversity and functional profiles: A meta-analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2024, 195: 109484.
- [32] WHITMAN T, PEPE-RANNEY C, ENDERS A, et al. Dynamics of microbial community composition and soil organic carbon mineralization in soil following addition of pyrogenic and fresh organic matter[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(12): 2918-2930.
- [33] AN T T, SCHAEFFER S, ZHUANG J, et al. Dynamics and distribution of ¹³C-labeled straw carbon by microorganisms as affected by soil fertility levels in the Black Soil region of Northeast China[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51(5): 605-613.
- [34] SU Y, YU M, XI H, et al. Soil microbial community shifts with long-term of different straw return in wheat-corn rotation system[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 6360.
- [35] ZHAO J, NI T, XUN W B, et al. Influence of straw incorporation with and without straw decomposer on soil bacterial community structure and function in a rice-wheat cropping system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(11): 4761-4773.
- [36] LIN Y X, YE G P, KUZYAKOV Y, et al. Long-term manure application increases soil organic matter and aggregation, and alters microbial community structure and keystone taxa[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 134: 187-196.
- [37] FAN K K, DELGADO-BAQUERIZO M, GUO X S, et al. Biodiversity of key-stone phylotypes determines crop production in a 4-decade fertilization experiment[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(2): 550-561.
- [38] SUNGTHONG R, NAKAEW N. The genus *Nonomuraea*: A review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(5): 554-565.
- [39] ZHANG J H, SIIKA-AHO M, PURANEN T, et al. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4: 12.
- [40] QIAO C C, RYAN PENTON C, LIU C, et al. Key extracellular enzymes triggered high-efficiency composting associated with bacterial community succession[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 288: 121576.
- [41] ZHAO Y, LI W G, CHEN L, et al. Effect of enriched thermotolerant nitrifying bacteria inoculation on reducing nitrogen loss during sewage sludge composting[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 311: 123461.