

不同施肥处理对石灰性紫色土微生物数量及氨氧化细菌群落结构的影响

辜运富¹, 云翔¹, 张小平¹, 涂仕华², 孙锡发², Kristina Lindström³

(¹四川农业大学资源与环境学院微生物学系, 中国四川雅安 625014; ²四川省农业科学院土壤肥料研究所, 中国成都 610066;

³赫尔辛基大学应用化学与微生物学系, 赫尔辛基 00014, 芬兰)

摘要: 【目的】通过测定不同施肥制度下的微生物数量和氨氧化细菌群落结构特点, 认识长期施肥对石灰性紫色水稻土培肥和肥力演化的重要作用。【方法】利用稀释平板法以及最大或然法(MPN法)和变性梯度凝胶电泳法(DGGE)分别研究农家肥(M), 氮肥+农家肥(NM), 氮磷肥+农家肥(NPM), 氮磷钾肥+农家肥(NPKM), 无肥(CK), 氮肥(N), 氮磷肥(NP)和氮磷钾肥(NPK)等不同施肥制度对微生物数量和氨氧化细菌群落结构的影响。【结果】与对照无肥处理相比, 施肥能增加微生物数量并改变氨氧化细菌的群落结构。无机肥配施农家肥的土壤微生物数量及氨氧化细菌的群落结构丰富度均比施用无机肥的处理高。主成分分析将8种施肥处理划分成两个主成分。植稻土壤, 主成分1为NP、NM、NPM和NPKM, 主成分2为CK、N、M和NPK; 植麦土壤, 主成分1为M、NM、NPM和NPKM, 主成分2为CK、N、NP和NPK。主成分1的氨氧化细菌群落结构丰富度高于主成分2。水稻收获后土壤的氨氧化细菌群落结构丰富度高于小麦收获后土壤。【结论】施肥会改变石灰性紫色水稻土微生物的数量以及氨氧化细菌的种群结构, 无机肥(N、NP、NPK)配施农家肥更有利于提高微生物的数量以及氨氧化细菌的种群结构进而维持土壤生物肥力状况。

关键词: 长期施肥; 石灰性紫色水稻土; 微生物数量分析; DGGE; 氨氧化细菌群落结构

Effect of Different Fertilizer Treatments on Soil Microbes and Ammonium Oxidizing Bacterial Community in a Calcareous Purple Paddy Soil

GU Yun-fu¹, YUN Xiang¹, ZHANG Xiao-ping¹, TU Shi-hua², SUN Xi-fa², Kristina Lindström³

(¹College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, Sichuan, China; ²Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China; ³Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki 00014, Finland)

Abstract: 【Objective】 In order to better understand the important role of different fertilizer systems on soil fertility buildup and evolution, the soil microbes and ammonium oxidizing bacterial community under different long term fertilizer treatments were studied. 【Method】 Based on the N, P, K long-term fertilizer application field experiment on a calcareous purple paddy soil which was set up in 1982 in Chuanshan district, Suining city, Sichuan province by the Soil and Fertilizer Institute of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, the influence of M, MN, MNP, MNPK, CK, N, NP and NPK fertilizer treatments on soil microbes and ammonium oxidizing bacterial community structure were analyzed by using the dilution plate counting method or most probable number method (MPN) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), respectively. 【Result】 The treatments receiving any fertilizer application tended to increase the number of soil microbes and alter the ammonium oxidizing bacterial community

收稿日期: 2008-02-25; 接受日期: 2008-07-15

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2006BAD05B06、2006BAD 02A 14-13)

作者简介: 辜运富(1977—), 男, 四川广汉人, 博士, 研究方向为农业微生物。Tel: 0835-2882710; E-mail: gungyf@yahoo.com.cn。通讯作者张小平(1962—), 男, 四川南充人, 教授, 博士, 研究方向为农业微生物。Tel: 0835-2882330; E-mail: aumdwbs@sicau.edu.cn

compared with the control (no fertilizer treatment). Among the eight fertilizer treatments, soil samples from the treatments of chemical fertilizers in combination with farmyard manure acquired higher soil microbial numbers and more complex ammonium oxidizing bacterial community structure than those receiving chemical fertilizers alone. The principal component analyses (PCA) of ammonium oxidizing bacterial community structure showed that the eight fertilizer treatments were grouped into two PCAs. In the soil after rice harvested, PCA1 included NP, NM, NPM and NPKM fertilizer treatments, PCA2 included of CK, N, M and NPK fertilizer treatments. In the soil after wheat harvested, PCA1 included by M, NM, NPM and NPKM fertilizer treatments. PCA2 included CK, N, NP and NPK fertilizer treatments. The richness of ammonium oxidizing bacterial community in PCA1 was higher than that in PCA2 and also higher in the soil after rice harvested than that after wheat harvested. 【Conclusion】 The results indicated that different fertilizer treatments resulted in changes of soil microbe number and ammonium oxidizing bacterial community. Furthermore, chemical fertilizers (N, NP, NPK) combined with farmyard manure were beneficial to increase the soil microbes, enrich ammonium oxidizing bacterial community, and maintain the soil bio-fertility.

Key words: Long-term fertilization; Calcareous purple paddy soil; Soil microbes; DGGE; Ammonium oxidizing bacterial community

0 引言

【研究意义】农田生态系统中土壤生物多样性是物质和能量转化、循环、利用的基础，是生态系统稳定性和可持续性的保障^[1]。随着对微生物在农田生态系统中重要功能认识的不断深入，用土壤微生物生物量、种群结构以及土壤酶活性等土壤微生物参数来评价土壤的健康和质量愈来愈受到人们的关注^[2-3]。氨氧化细菌被认为是影响硝化作用速率的主要因素^[4]，是研究土壤微生物生态学的模式生物^[5]，广泛用于土壤质量的监测^[6-8]。施肥是影响土壤质量及其可持续利用最深刻的农业措施之一，会对土壤结构、生物肥力和生产力产生重要影响^[3]。研究不同施肥处理下土壤微生物数量以及氨氧化细菌群落结构的差异，对于建立石灰性紫色土的合理施肥制度，保护土壤生物肥力，维持土壤质量具有重要意义。【前人研究进展】土壤微生物特性与土壤质量关系密切，对土壤微生物多样性研究具有重要意义^[9]。20世纪90年代中期以来，土壤质量的微生物学特性及分子生态足迹作为对生态系统演变的灵敏响应不断得到注意^[10-12]。人们在重视研究长期施肥对土壤物理与化学性质影响的同时^[13-14]，也不断加强了长期施肥对土壤微生物学特性影响的研究。Tiquia等^[15]研究了地膜覆盖以及施肥对土壤营养成分，微生物活性以及根际细菌群落结构的影响研究。Crecchio^[16]、Phillips^[17]和钟文辉^[18]等研究了长期耕作，使用杀虫剂和除草剂以及施肥等不同农业措施对土壤理化性质，微生物活性以及氨氧化细菌群落结构的影响。研究表明，土壤微生物学特性对各种不同农业措施产生明显的响应，可以反映土壤质量的变化。

【本研究切入点】中国幅员辽阔，自然条件复杂，植

被类型众多，农业历史悠久，土壤类型丰富，目前，有关长期施肥对土壤微生物数量特征和特殊生理类群微生物群落结构影响的研究还不多，关于不同施肥处理对石灰性紫色土中微生物数量以及氨氧化细菌群落结构的影响的研究更无报道。【拟解决的关键问题】在国家科技支撑计划项目的支持下，笔者于2005年10月和2006年5月，采集8种不同施肥处理下的石灰性紫色水稻土土样，利用稀释平板计数、最大或然法(MPN)分析不同施肥处理下石灰性紫色土中土壤微生物数量，利用变性梯度凝胶电泳法(DGGE)分析氨氧化细菌群落结构，以期建立该类土壤长效合理施肥制度，保护土壤微生物，维持土壤质量。

1 材料与方法

1.1 试验点及试验处理

试验在四川省农业科学院土壤肥料研究所于20世纪80年代初建立的“水稻氮、磷、钾长期定位施肥”基地进行。试验基地位于四川省遂宁市船山区联盟乡二村五组，气候为亚热带湿润季风气候，全年气候温和，光照较少，雨量充沛，四季分明。试验始于1982年，土壤为原生钙质紫色土属，遂宁组母质，二泥田土种。供试土壤当时的基本理化性质见表1。试验采用完全随机区组设计方案，设置10个处理：①农家肥（主要成分为猪厩肥，有机质含量 $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，M）；②NM；③NPM；④NPKM；⑤CK（无肥区）；⑥N；⑦NP；⑧NPK。各处理每种肥料的施用量为，农家肥（M）： $3\times 10^4\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ；氮肥（N）： $55.2\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ；磷肥（ P_2O_5 ）： $13.2\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ；钾肥（KCl）： $31.5\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ 。每种处理设4次重复，共32个小区，小区面积 $4.4\text{ m}\times 3\text{ m}$ 。整个试验小区之间用水泥板隔开，重复之间留有

表 1 钙质紫色土定位试验点的最初养分状况

Table 1 Nutrient status of the calcareous purple soil from the long-term fertilizer experiment prior to study

| 土样类型 Soil type | pH | 有机质 OM (g·kg ⁻¹) | 全氮 TN (g·kg ⁻¹) | 全磷 TP (g·kg ⁻¹) | 全钾 TK (g·kg ⁻¹) | 碱解氮 Alkali-hydrolyzable nitrogen (mg·kg ⁻¹) | 有效磷 Available phosphorus (mg·kg ⁻¹) | 有效钾 Available potassium (mg·kg ⁻¹) | 缓效钾 Slowly available potassium (mg·kg ⁻¹) |
|---|-----|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|--|---|--|
| 钙质紫色水稻土 Calcareous purple paddy soil | 8.6 | 15.9 | 1.09 | 1.35 | 26.89 | 66.3 | 3.9 | 130.6 | 699.4 |

排水沟。采用小麦-水稻轮作。

1.2 取样方法

于 2005 年 10 月水稻收割后和 2006 年 5 月小麦收割后, 在田间采用“梅花型”布点取样, 用土钻采取 0~20 cm 的土样, 混匀, 用无菌 PET 树脂袋封装带回实验室。立即进行土壤微生物数量的分析以及土壤中 DNA 的提取。另取一部分放于室内风干, 研细过 2 mm 筛, 用于土壤理化性质的分析。其它放在 -20℃ 的冰箱里保存以备后续分析。

1.3 土壤微生物数量的测定^[19]

土壤微生物数量采用固体平板法进行分离测定。细菌、真菌、放线菌分别用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、马丁氏培养基和改良高氏 1 号培养基; 自生固氮菌用阿须贝氏培养基进行选择培养, 稀释平板法计数; 硝化细菌、反硝化细菌、氨氧化细菌、纤维素分解菌均采用各生理类群的特定液体培养基进行选择培养, 利用 MPN 法计数。

1.4 土壤氨氧化细菌群落结构的 PCR-DGGE 分析^[20]

1.4.1 主要仪器和试剂 DGGE 所用仪器 the D-code™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Co.)。引物扩增 16S rDNA V3 高变区, 第一轮 PCR 扩增所用引物为 CTO189Abf、CTO189Cf 和 CTO654r, 第二轮 PCR 扩增所用引物为 P338f-GC 和 P518r。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 具体引物序列参见文献^[20]。

1.4.2 土壤微生物总 DNA 提取 采用 Fast DNA SPIN Kit For Soil (Bio-Rad Co.) 的试剂盒方法, 称取 0.5 g -20℃ 保存的土壤样品, 按试剂盒给定步骤进行土壤微生物总 DNA 的提取。

1.4.3 氨氧化菌 16S rDNA 的 PCR 扩增 采用 Nested-PCR 程序。

第一次 PCR: 所用引物为扩增氨氧化细菌 16S rDNA 的引物 CTO189Abf、CTO189Cf 和 CTO654r。反应体系为: PCR Master Mix (TIANGEN BIOTECH. BEIJING) 25 μ l, 每种引物 0.5 μ l (25 pmol· μ l⁻¹), 0.5

μ l 10 倍稀释的土壤总 DNA, 加 ddH₂O 至终体积 50 μ l。为减少扩增过程中的非特异性产物, 采用 Touch-down PCR 程序, 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 1 min, 65~55℃ 50 s (每个循环温度降低 0.5℃), 72℃ 1.30 min, 20 个循环, 然后在其它条件不变的情况下, 在 55℃ 的退火温度下继续扩增 15 个循环, 72℃ 7 min, 最后于 4℃ 恒定保存。

第二次 PCR: 第一次 PCR 产物 1 : 10 稀释后作模板进行, 引物为 P338f-GC 和 P518r, 体系: 10×PCR buffer 缓冲液 5 μ l, MgCl₂ (25 mmol· μ l⁻¹) 3 μ l, dNTP (2.5 mmol· μ l⁻¹) 1 μ l, P338F-GC (25 pmol· μ l⁻¹) 0.5 μ l, P518R (25 pmol· μ l⁻¹) 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 (5 u· μ l⁻¹) 0.5 μ l, 模板 DNA 1 μ l, 加 ddH₂O 至终体积 50 μ l。反应程序是在第一轮 PCR 的基础上, 退火温度变为在前 20 个循环中为 63~53℃, 后 15 个循环为 53℃, 其它步骤与第一轮 PCR 相同。

取 PCR 产物各 3 μ l, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 (D-code TM, Bio-Rad), Bio-Rad 公司凝胶成像系统 (Gel Doc Documentation System) 观察。

1.4.4 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析 取第二次 PCR 产物 15 μ l 进行 DGGE 分析, 变性剂梯度范围为 20%~50%, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (100% 的变性剂为尿素 7 mol 和 40% 的去离子甲酰胺)。在 1×TAE 缓冲液中, 50 V 30 min 进胶, 再在 150 V 60℃ 下电泳 5 h。电泳后采用银染法对凝胶进行染色。然后用数码相机拍照。DGGE 指纹图谱分析借助于 Bio-Rad 公司的凝胶成像系统 (Quantity One, Bio-Rad, USA) 分析样品电泳条带。

在图像处理过程中, 对于在 DGGE 电泳图上是肉眼可见、但被软件忽略掉的一些小条带进行了手动处理, 条带的密度由该软件自动算出。

1.5 数据处理

微生物数量测定数据的处理利用 Excel 软件完成, 数据之间的方差分析以及氨氧化细菌 DGGE 图谱的主成分分析利用 SPSS12.0 完成。

2 结果与分析

2.1 长期不同施肥对土壤微生物数量的影响

各种不同施肥处理, 水稻和小麦收获后土壤微生物数量的测定结果分别见表 2 和表 3。

从表 2 和表 3 可以看出, 土壤微生物数量以 N、P、K 配施农家肥(NPKM)的最高, 对照不施肥处理(CK)最低, 施氮(N)处理土壤次低。但本试验中, 不施

农家肥处理(NP、NPK)的土壤微生物数量增加并不明显, 只是高于不施肥(CK)和不施氮肥(N)的处理。分析原因是农家肥虽然营养元素比较全面, 但各矿质营养元素的含量较少, 不能满足土壤各类微生物的需要。对比不施肥(CK)处理, 各种施肥处理均能增加土壤中的微生物数量。另外各施肥处理中, 无机肥配施农家肥处理的土壤微生物数量比施用无机肥处理的土壤要高。

表 2 水稻收获后不同施肥处理对土壤微生物数量的影响

Table 2 Effect of long-term fertilization on the number of soil microbes after rice harvest (cfu·g⁻¹)

| 处理 Treatment | 细菌 Bacteria (×10 ⁶) | 放线菌 Actinomycetes (×10 ⁴) | 真菌 Fungi (×10 ³) | 自生固氮菌 Azotobacteria (×10 ⁴) | 纤维素降解菌 Cellulose decomposing bacteria (×10 ⁵) | 硝化细菌 Nitrifiers (×10 ⁵) | 氨氧化菌 Ammonifiers (×10 ⁵) |
|-----------------|---------------------------------------|---|------------------------------------|---|---|---|--|
| M | 1.96c | 2.94ab | 0.91b | 0.92ab | 0.94ab | 1.03c | 4.71b |
| NM | 2.12c | 3.48a | 1.07ab | 0.92ab | 0.97ab | 1.31b | 6.86a |
| NPM | 2.78b | 3.78a | 1.33a | 0.97ab | 1.07ab | 1.57a | 6.85a |
| NPKM | 3.99a | 3.82a | 1.51a | 1.13a | 1.23a | 1.70a | 6.27a |
| CK | 1.45d | 1.23c | 0.92b | 0.48c | 0.58b | 0.86c | 1.16d |
| N | 1.68c | 1.88bc | 0.65b | 0.61bc | 0.67b | 0.54d | 3.06c |
| NP | 1.75c | 2.05bc | 1.04ab | 0.67bc | 0.73b | 0.87c | 3.05c |
| NPK | 2.45bc | 2.35b | 1.29a | 0.78bc | 0.85b | 0.94c | 4.01b |

数据后具有相同字母表示差异不显著 (Duncan 新复极差法测验 $P=0.01$)。下表同

The same letter after the numbers mean the treatments are not significantly different ($P=0.01$, LSR test). The same as Table 3

表 3 小麦收获后不同施肥处理对土壤微生物数量的影响

Table 3 Effect of different fertilization on the number of soil microbes after wheat harvest (cfu·g⁻¹)

| 处理 Treatments | 细菌 Bacteria (×10 ⁶) | 放线菌 Actinomycetes (×10 ⁴) | 真菌 Fungi (×10 ³) | 自生固氮菌 Azotobacteria (×10 ⁴) | 纤维素降解菌 Cellulose decomposing bacteria (×10 ⁵) | 硝化细菌 Nitrifiers (×10 ⁵) | 氨氧化菌 Ammonifiers (×10 ⁵) |
|------------------|---------------------------------------|---|------------------------------------|---|---|---|--|
| M | 2.68a | 1.02ab | 2.37a | 0.98b | 1.17b | 3.97bc | 2.88c |
| NM | 3.54a | 0.99a | 3.19a | 0.97b | 1.28b | 4.03bc | 3.25b |
| NPM | 3.76a | 1.03ab | 3.36a | 1.01ab | 1.34ab | 4.45b | 3.73a |
| NPKM | 4.07a | 1.25ab | 3.24a | 1.25a | 1.67a | 5.79a | 3.92a |
| CK | 2.09a | 0.65ab | 1.75a | 0.67c | 0.57c | 1.35d | 0.78e |
| N | 2.43a | 0.27b | 1.83a | 0.77bc | 0.87c | 1.64d | 1.13d |
| NP | 2.91a | 0.89a | 2.32a | 0.69c | 0.89c | 2.20d | 2.63c |
| NPK | 3.38a | 0.98a | 3.22a | 0.84bc | 0.94b | 3.29c | 2.68c |

试验点长期采用水稻-小麦轮作方式, 每季作物种植后的土壤微生物数量有所差异。具体表现在: 种植水稻后土壤中放线菌和氨氧化菌数量高于种植小麦后的土壤; 细菌、真菌和硝化细菌表现为种植水稻的土壤高于种植小麦的土壤。而对于纤维素降解菌和固氮菌来说, 二者在土壤种植不同作物后, 变化不大。结

果显示, 不同作物对土壤中的微生物数量有不同影响。原因是不同作物能够分泌不同的根系分泌物, 而土壤中的各种微生物对这些分泌物具有不同的响应作用。从而表现出不同的数量变化特点。

三大类微生物中, 以细菌的数量最大, 放线菌次之, 真菌的数量最少。特殊生理类群的细菌中, 自生

固氮菌数量最少，植稻后土壤氨氧化细菌数量最多，植麦后土壤硝化细菌数量对大。

2.2 不同施肥处理对土壤氨氧化细菌多样性的影响

2.2.1 土壤氨氧化细菌群落 DGGE 图谱分析

应用 DGGE 技术对 PCR 产物进行分离，通过指纹图谱可以看到分离为若干条带（图 1），不同土壤样品出现的带型有一定差别，对 DGGE 图谱进行统计发现：供试土壤在 DGGE 图谱中电泳条带数目、强度和迁移率均存在一定程度的差异，充分显示了氨氧化细菌的多样性。

图谱中，不同处理土壤样品间具有一些共同的条带（箭头所示），说明供试土壤间可能存在共同的氨氧化细菌类群，但这些公共条带的亮度不相同，显示土壤氨氧化细菌在 DNA 水平上有一定的改变。就 8 种施肥处理而言。通过指纹条带数目的多寡可以看出，不论是淹水种稻后还是旱季种植小麦后，长期无机肥与农家肥配施的土壤 DNA 条带数量相对其它施肥处理明显偏多，说明长期无机肥配施农家肥能够增加土壤中氨氧化细菌种群丰富度，而不施肥或者只施无机肥处理，不利于土壤中氨氧化细菌的生长，故条带减少，种群丰富度降低。造成该现象的原因是在施用无机肥基础上，配施农家肥可以改善土壤的营养条件，为氨氧化细菌提供更佳的生境条件及更多的营养物质，从而促进种类和数目的增加。

另外，通过 DGGE 图谱可以看出，种植水稻和小麦后土壤中氨氧化细菌的群落结构既有相似之处也有所差异，相似之处在于不管种植哪种作物，DGGE 图

谱的 C 区域都会由于条带数目过多而出现明显的“Smear”区域，该区域无机肥配施农家肥处理（NM、NPM、NPKM）的颜色均深于无肥（CK）及无机肥处理（N、NP、NPK）；水稻收获后土壤 DGGE 图谱中的“Smear”区域颜色深于小麦收获后土壤 DGGE 图谱中的相应区域。说明水稻收获后土壤的氨氧化细菌群落结构丰富度高于小麦收获后土壤，原因可能是由于水稻收获前土壤落干过程刺激了氨氧化细菌的大量繁殖，而小麦收获前由于气温较高、土壤干燥而抑制了土壤氨氧化细菌的生长。

2.2.2 土壤氨氧化细菌 DGGE 图谱的主成分分析

为进一步了解 8 种不同施肥处理对氨氧化细菌群落结构的影响，利用主成分分析法对不同施肥处理下的氨氧化细菌群落结构 DGGE 图谱进行统计分析，结果如图 2-A 和图 2-B 所示。可看出，在种植水稻和小麦时，不同施肥处理对氨氧化细菌群落结构具有不同的影响。各施肥处理均被分成两个主要主成分。水稻收获后，土壤的主成分 1 为 NP，NM，NPM 与 NPKM，主成分 2 为 CK，N，M 和 NPK；而小麦收获后，土壤的主成分 1 为 M，NM，NPM 与 NPKM，主成分 2 为 CK，N，NP 和 NPK。通过对比相应施肥处理下的氨氧化细菌群落结构丰富度，可以看出主成分 1 与氨氧化细菌群落结构丰富度呈正相关关系，主成分 2 与氨氧化细菌群落结构丰富度呈负相关关系。在种植水稻的情况下，主成分 1 和 2 的特征值分别占了总方差的 49.89% 和 27.96%。而在种植小麦的情况下，主成

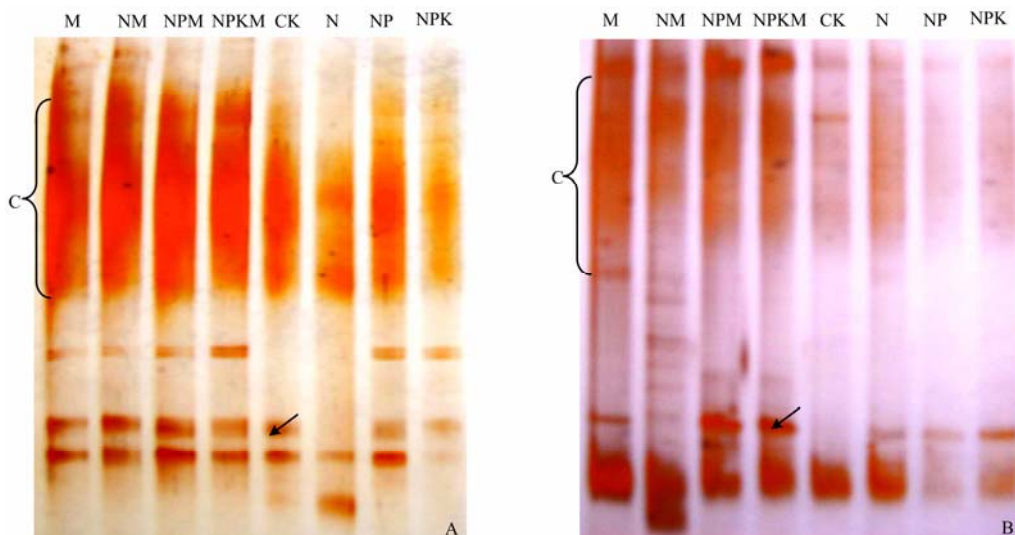


图 1 种植水稻和小麦后土壤氨氧化细菌的 DGGE 指纹图谱（A，水稻；B，小麦）

Fig. 1 DGGE profile of ammonium oxidizing bacterial communities of the soil after rice (A) and wheat (B)

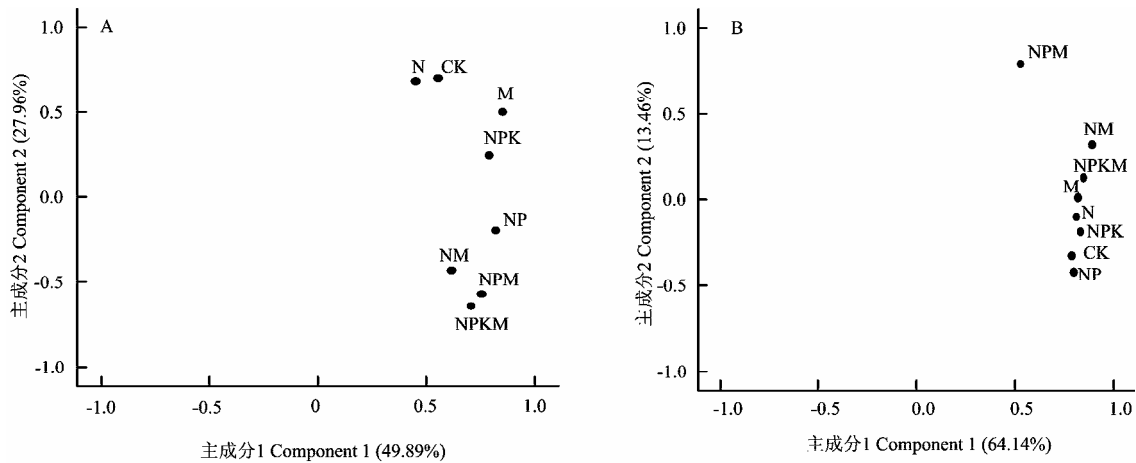


图 2 不同施肥处理下氨氧化细菌 DGGE 图谱的主成分分析 (A. 水稻; B. 小麦)

Fig. 2 Ordination plots of the principal component analyses based on the DGGE profile of AOB: (A) rice and (B) wheat under different fertilizer treatments

分 1 和 2 的特征值分别占了总方差的 64.14% 和 13.46%。

3 讨论

3.1 不同施肥处理对石灰性紫色土上种植水稻和小麦后微生物数量的影响

农业实践管理措施是影响土壤中各种微生物数量、活性及群落结构等的重要因素，如灌溉、氮肥施用和种植处理等因素都会影响到土壤中各种微生物的数量和结构^[21]。本试验表明，不同施肥处理以及作物种植制度都会对土壤中的各种微生物数量形成影响。表现为施肥能增加土壤中微生物的数量，无机肥配施农家肥处理表现更显著，以 NPK 配施农家肥处理的各种微生物数量最高。众多研究表明，农家肥或者有机肥的施入，可以增加土壤的有机质，从而改善土壤的物理结构，从而增加土壤中各种微生物的数量。本试验结果与该结论相似。NPK 配施农家肥能够在增加土壤有机质的前提下，提供更为全面的营养物质，所以该处理的土壤微生物数量也最高。值得一提的是，前人研究显示^[22-23]，施氮与对照 (CK) 相比，会减少土壤中的微生物数量，但在本试验中，施氮能提高土壤中各种微生物的数量。原因可能是施氮能够促进作物的发育，从而得到更多的根系分泌物，进而提高土壤中微生物数量。

不同作物可以分泌不同的根系代谢产物，对土壤中的微生物具有选择性作用。本试验表明石灰性紫色土中，种植水稻和小麦后土壤具有不同的微生物数量。

3.2 不同施肥处理及种植稻、麦对土壤氨氧化细菌群落结构的影响

PCR-DGGE 技术是研究环境样品非 (难) 培养微生物的有效方法，可以从土壤微生物宏基因组的角度揭示其多样性。土壤微生物多样性会对农业管理措施产生及时而准确的响应。宋亚娜等^[24]研究证实不同作物种植体系会影响根系土壤氨氧化细菌的群落结构。袁飞等^[25]研究发现，土壤不同，氨氧化细菌的种群结构和优势种属也不一样，认为这主要与土壤环境不同有关，其中土壤 pH 是最重要的影响因素。本试验中，不同施肥制度下土壤的 pH 变化不大 (数据已另文发表)，而氨氧化细菌群落结构明显不一样，显示施肥是影响土壤中氨氧化细菌群落结构变化的重要因素。本试验 8 种施肥处理中，施用农家肥能够明显增加土壤中氨氧化细菌的种群结构，土壤中氨氧化细菌群落结构丰富度的变化特点依次：无机肥配施农家肥处理 > 不施肥对照处理 (CK) > 无机肥处理。说明农家肥对于氨氧化细菌的发育具有促进作用。原因可能是由于农家肥能够增加土壤的营养元素，改善土壤的团粒结构，进而为氨氧化细菌提供更好的生境条件。稻麦轮作是研究区常用的作物种植方式，两种作物种植后土壤的氨氧化细菌 DGGE 图谱既有差异又有相似之处，说明水稻和小麦种植会对土壤中的氨氧化细菌产生一定的影响，原因是由于淹水种稻改变了土壤环境条件，由小麦季的氧化状况变为水稻季的还原 (嫌气) 状况，同时两种作物分泌不同的代谢产物，对土壤中的氨氧化细菌具有选择性作用。但不管种植哪种作物

都不能改变石灰性紫色水稻土本身的类型。而研究表明, 土壤中微生物的种群结构主要受该土壤类型以及所在地区的气候条件影响^[26], 所以氨氧化细菌种群结构在种植水稻和小麦的情况下变化并不明显, 具有相似性。通过主成分分析, 不同作物种植下, 8 种施肥处理均被分成 2 个主成分, 但各主成分的组成因子却各不相同, 说明石灰性紫色土上种植水稻和小麦会形成不同的氨氧化细菌群落结构。本试验通过对长期不同施肥处理下土壤微生物数量及群落结构的变化进行分析, 以期在石灰性紫色土区建立长效合理施肥制度, 保护土壤生物, 改善石灰性紫色土的土壤质量。

4 结论

4.1 长期施肥会改变石灰性紫色土壤中微生物数量及氨氧化细菌群落结构, 无机肥特别是 NPK 肥配施农家肥不但可以提高土壤中的微生物数量也能明显提高氨氧化细菌的群落结构丰富度, 说明无机肥配施有机肥更有利于保护土壤微生物, 维持土壤生物肥力。

4.2 各施肥处理均被分成两个主要主成分。水稻收获后, 土壤主成分 1 为 NP, NM, NPM 与 NPKM, 主成分 2 为 CK, N, M 和 NPK; 小麦收获后, 土壤主成分 1 为 M, NM, NPM 与 NPKM, 主成分 2 为 CK, N, NP 和 NPK。通过对比相应施肥处理下的氨氧化细菌群落结构丰富度, 可以看出主成分 1 与氨氧化细菌群落结构丰富度呈正相关关系, 主成分 2 与氨氧化细菌群落结构丰富度呈负相关关系。

致谢: DGGE 实验在浙江大学环境与资源学院土水资源与环境研究所完成, 特此致谢!

References

- [1] Chorover J, Kretzschmar R, Garcia-Pichel F, Sparks D L. Soil biogeochemical processes within the critical zone. *Elements*, 2007, 3: 321-326.
- [2] Liu B, Gumpertz M L, Hu S J, Ristaino J B. Long-term effects of organic and synthetic soil fertility amendments on soil microbial communities and the development of southern blight. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39: 2302-2316.
- [3] Carpenter-Boggs L, Kennedy A C, Reganold J P. Organic and biodynamic management: Effects on soil biology. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64: 1651-1659.
- [4] Oved T, Shaviv A, Goldrath T, Mandelbaum R T, Minz D. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3426-3433.
- [5] Horz H P, Barbrook A, Field C B, Bohannon B J M. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *PNAS*, 2004, 101(42): 15136-15141.
- [6] Chang Y J, Hussain A K M A, Stephen J R, Mullen M D, White D C, Peacock A. Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous β -subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20: 2462-2468.
- [7] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, Lin X G, Yagi K, Hu J L, Zhang J B. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(2): 485-491.
- [8] McCaig A E, Phillips C J, Stephen J R, Kowalchuk G A, Harvey S M, Herbert R A, Embley T M, Prosser J I. Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 213-220.
- [9] Brussaard L, de Ruyter P C, Brown G G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2007, 121: 233-244.
- [10] Kent A D, Smith D J, Benson B J, Triplett E W. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6768-6776.
- [11] Kong P, Richardson P A, Hong C X. Direct colony PCR-SSCP for detection of multiple pythiaceae oomycetes in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 61: 25-32.
- [12] Chu H Y, Lin X G, Fujii T, Morimoto S, Yagi K, Hu J L, Zhang J B. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39: 2971-2976.
- [13] Menéndez S, López-Bellido R J, Benítez-Vega J, González-Murua C, López-Bellido L, Estavillo J M. Long-term effect of tillage, crop rotation and N fertilization to wheat on gaseous emissions under rainfed Mediterranean conditions. *Europe Journal of Agronomy*, 2008, 28: 559-569.
- [14] 徐阳春, 沈其荣, 冉 炜. 长期免耕与施用有机肥对土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响. *土壤学报*, 2002, 39(1): 89-96.
Xu Y C, Shen Q R, Ran W. Effects of zero-tillage and application of manure on soil microbial biomass C, N and P after sixteen years of cropping. *Acta Pedologica Sinica*, 2002, 39(1): 89-96. (in Chinese)

- [15] Tiquia S M, Lloyd J, Herms D A, Hoitink H A J, Michel F C. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of TRFLPs of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21(1): 31-48.
- [16] Crecchio C, Curci M, Pellegrino A, Ricciuti P, Tursi N, Ruggiero P. Soil microbial dynamics and genetic diversity in soil under monoculture wheat grown in different long-term management systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39: 1391-1400.
- [17] Phillips C J, Harris D, Dollhopf S L, Gross K L, Prosser J I, Paul E A. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5410-5418.
- [18] 钟文辉, 蔡祖聪, 尹力初, 张鹤. 种植水稻和长期施用无机肥对红壤氨氧化细菌多样性和硝化作用的影响. *土壤学报*, 2008, 45(11): 105-111.
Zhong W H, Cai Z C, Yin L C, Zhang H. Effects of rice cultivation and long term application of inorganic fertilizers on ammonium oxidizers diversity and nitrification of red soils. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(11): 105-111. (in Chinese)
- [19] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986: 91-109.
Xu G H, Zheng H Y. *Analytical Handbook of Soil Microbes*. Beijing: Agricultural Press, 1986: 91-109. (in Chinese)
- [20] 张丹. OLAND生物脱氮系统运行条件及其微生物群落结构的研究. 中国科学院研究生院博士学位论文, 2003.
Zhang D. Research of the running conditions of OLAND biological nitrogen removal system and its microbial community structure. Ph. D. Dissertation of Graduate School of Chinese Academy of Science, 2003. (in Chinese)
- [21] 李娟, 赵秉强, 李秀英, Hwat Bing So. 长期有机无机肥料配施对土壤微生物学特性及土壤肥力的影响. *中国农业科学*, 2008, 41(1): 144-152.
Li J, Zhao B Q, Li X Y, So H B. Effects of long-term combined application of organic and mineral fertilizers on soil microbiological properties and soil fertility. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(1): 144-152. (in Chinese)
- [22] Zanatta J A, Bayer C, Dieckow J, Vieira F C B, Mielniczuk J. Soil organic carbon accumulation and carbon costs related to tillage, cropping systems and nitrogen fertilization in a subtropical Acrisol. *Soil & Tillage Research*, 2007, 94: 510-519.
- [23] 张彦东, 孙志虎, 沈有信. 施肥对金沙江干热河谷退化草地土壤微生物的影响. *水土保持学报*, 2005, 19(2): 88-91.
Zhang Y D, Sun Z H, Shen Y X. Effect of fertilization on soil microorganism of deteriorated grassland in dry-hot valley region of Jinsha River. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2005, 19(2): 88-91. (in Chinese)
- [24] 宋亚娜, 李隆, 包兴国, 张福锁, 郑伟文. 应用 DGGE 技术研究间、轮作对根际氨氧化细菌和固氮菌群落结构的影响. *江西农业大学学报*, 2006, 28(4): 506-511.
Song Y N, Li L, Bao X G, Zhang F S, Zheng W W. A study of rhizosphere ammonia-oxidizer and N₂-fixer community composition in different cropping systems by DGGE. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2006, 28(4): 506-511. (in Chinese)
- [25] 袁飞, 冉炜, 胡江, 沈其荣. 变性梯度凝胶电泳法研究我国不同土壤氨氧化细菌群落组成及活性. *生态学报*, 2005, 25(6): 1318-1324.
Yuan F, Ran W, Hu J, Shen Q R. Ammonia-oxidizing bacteria communities and their influence on the nitrification potential of Chinese soils measured by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Acta Ecological Sinica*, 2005, 25(6): 1318-1324. (in Chinese)
- [26] 张平究, 李恋卿, 潘根兴, 张俊伟. 长期不同施肥下太湖地区黄泥土表土微生物碳氮量及基因多样性变化. *生态学报*, 2004, 24(12): 2818-2824.
Zhang P J, Li L Q, Pan G X, Zhang J W. Influence of long-term fertilizer management on topsoil microbial biomass and genetic diversity of a paddy soil from the Tai Lake region, China. *Acta Ecological Sinica*, 2004, 24(12): 2818-2824. (in Chinese)

(责任编辑 李云霞)