

不同施肥制度土壤微生物量碳氮变化及细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析

刘恩科¹, 赵秉强^{1,*}, 李秀英¹, 姜瑞波¹, Hwat Bing So²

(1. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081 ;

2. School of Land and Food Sciences, The University of Queensland, Brisbane Qld 4072 Australia)

摘要 :应用化学分析和变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术分离 PCR 扩增的 16S rDNA 的方法, 研究了不同施肥制度对土壤微生物量碳、氮变化及微生物多样性的影响。结果表明, 连续 15a 长期试验下, 土壤微生物量碳 (SMB-C) 和微生物量氮 (SMB-N) 的含量大小均为长期撂荒 (CK0) 土壤高于农田土壤, 而在农田土壤中, 长期施肥的处理 (NPK、NPKM、NPKSt 和 NPKF) 高于长期不施肥处理 (CK), 不同的种植制度中, 长期复种轮作 (NPKF) 高于长期复种连作 (NPK); 各处理的 SMB-C/SOC (土壤有机碳) 和 SMB-N/TN (全氮) 的比值的的变化趋势与 SMB-C 和 SMB-N 变化一致; 从 PCR-DGGE 分析, 长期氮磷钾化肥配施有机肥 (NPKM) 处理的微生物量碳、氮的含量最高, 微生物丰度最高, 细菌物种最多, 其次为长期撂荒 (CK0), CK 处理细菌物种最少。UPGMC 聚类分析表明 NPK 和 NPKF 处理细菌的群落结构相似, CK 和 CK0 处理细菌的群落结构相似, 而 NPKM 和 NPKSt 处理细菌的群落结构相似。

关键词 : DGGE ; 微生物多样性 ; 不同施肥制度 ; 微生物量

文章编号 : 1000-0933 (2007) 03-1079-07 中图分类号 : S154.36 文献标识码 : A

Microbial C and N biomass and soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V3 fragment PCR products under different long-term fertilization systems

LIU En-Ke¹, ZHAO Bing-Qiang^{1,*}, LI Xiu-Ying¹, JIANG Rui-Bo¹, Hwat Bing-So²

1 Agricultural Resources and Regional Planning, CAAS Beijing 100081, China

2 School of Land and Food Sciences, The University of Queensland, Brisbane Qld 4072, Australia

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (3) 1079 ~ 1085.

Abstract : Microbial biomass C and N content and analysis of soil bacteria with different fertilization systems were carried out based on a 15-year long term fertilizer experiment in Drab Fluvo-aquic soil in Beijing. At this site, 13 different treatments were established in 1990. Six treatments were chosen for this work: Four were in a wheat-maize rotation receiving either no fertilizer (CK), mineral fertilizers (NPK), mineral fertilizers plus farmyard manure (NPKM) or mineral fertilizers with maize straw incorporated (NPKSt). One was in a wheat-maize/wheat-soybean rotation receiving NPK

基金项目 : 国家自然科学基金资助项目 (30471012) ; 国家基础研究重大项目 (973) 前期研究专项资助项目 (2001CCB00800, 2003CCB00300) ; 中国农业科学院杰出人才基金资助项目

收稿日期 : 2006-04-17 ; 修订日期 : 2006-10-21

作者简介 : 刘恩科 (1979 ~) 男, 山东烟台人, 博士生, 主要从事长期土壤肥力与农业微生物研究. E-mail : enke0008@sina.com

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

致谢 : 英国洛桑实验站的 David S. Powlson 教授对本文的英文摘要进行润色, 特此致谢 !

Foundation item : The project was financially supported by Nation Natural Science Foundation of China (No. 30471012), the "973" Priority Fund under the auspices of the National Science and Technology Department, China (No. 2001CCB00800), the elitist foundation of the Chinese Academy of Agriculture Sciences

Received date 2006-04-17 ; **Accepted date** 2006-10-21

Biography : LIU En-Ke, Ph. D. candidate, mainly engaged in soil Fertility and Fertilizer Efficiency Long Term Monitor. E-mail : enke0008@sina.com

(NPKF). The other was abandoned arable land (CK0) growing weeds. The amount of chemical fertilizer per year was N 150 kg hm^{-2} , P_2O_5 75 kg hm^{-2} , K_2O 45 kg hm^{-2} , manure 22.5 t hm^{-2} and maize straw 2.25 t hm^{-2} . The results showed that microbial biomass C and N in the abandoned arable soil were higher than that in arable soils. Soil microbial biomass C and N in treatments with fertilizer input NPK, NPKM, NPKSt and NPKF were higher than that in CK (without fertilization). The rotation of wheat-maize/wheat-soybean had higher microbial biomass C and N than continuous wheat-maize cropping. The ratio of microbial C to soil organic C (SMB-C/SOC) and microbial N to soil total N (SMB-N/TN) had similar trends to SMB-C and SMB-N. The community structure of bacteria microorganisms was assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and Unweighted Pair Group Method Clustering (UPGMC) analysis of the DGGE banding patterns showing that the bacterial community structure was affected by the treatments. The results indicated a significant increase in microbial diversity by fertilization treatments compared to that without fertilizer (CK). However the composition of the bacterial community in NPKM treatment was more complex than that in others. Cluster analysis of the DGGE profiles pointed out that bacteria in the six soils belonged to three clusters. Bacterial communities in CK and NPK soils belonged to one cluster, those in NPKF and CK0 soils to another cluster, and that in NPKSt and NPKM soil to a single cluster. The similarity of bacterial community in soils with six treatments was 53%. This study demonstrated that mineral fertilizer with farmyard manure increased both biomass and diversity of bacterial community in the soil.

Key Words : DGGE ; microbial community structure ; different fertilization systems ; microbial biomass

施肥是影响土壤微生物数量及其多样性的重要农业措施。自从科学家发明了土壤微生物量的测定方法以来^[1~3],人们对土壤微生物量的影响进行了大量的研究^[4~5]。许多研究结果表明,施用有机肥料或实行秸秆或绿肥还田,可以显著的提高土壤微生物量碳的含量,并且随着有机肥施用量的增大,效果越明显^[6,7]。施用化学肥料也有提高土壤微生物量的效应,但过量的施用 NPK 化肥,降低了土壤微生物量碳的含量^[8]。

传统实验室培养鉴定的微生物种类数量不到其总数的 1%,因此,运用传统的微生物分离培养方法研究土壤微生物种群构成会导致严重的微生物多样性信息的丢失。近年来,随着生物技术的发展,运用 DNA 分析技术,分析和研究施肥对土壤微生物多样性的影响,逐渐受到重视^[9]。利用这种方法,Carmino Crecchio 等研究了^[9]不同的耕作措施对土壤微生物多样性的影响,Bossio 等^[10]研究了不同的土地利用方式对土壤微生物多样性的影响。

长期肥料试验在研究施肥与土壤肥力和环境演化、作物产量品质变迁等方面具有十分重要的意义,深受国内外重视^[11,12]。前人对长期不同施肥制度的研究多集中在对土壤的基本理化性质影响方面,而对土壤生物量变化影响的研究相对薄弱^[13~15]。利用 DNA 分析技术研究长期施肥条件下土壤微生物多样性的变化,则报道更少^[16,17]。本研究是以北京昌平国家褐潮土土壤肥力与肥料效益长期监测基地的长期肥料定位试验平台,研究了长期不同施肥制度对土壤的微生物量碳、氮以及土壤微生物多样性的影响,以为建立合理施肥制度,保护土壤生物,提高土壤质量和实现土壤可持续利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验点基本情况

试验在“国家褐潮土土壤肥力与肥料效益长期监测基地”的大田长期肥料定位试验中进行。监测基地位于北京市昌平区,北纬 $40^{\circ}13'$,东经 $116^{\circ}14'$,海拔高度 43.5 m ,年平均温度 11°C , $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 积温 4500°C ,年降雨量 600 mm ,年蒸发量 1065 mm ,无霜期 210 d ,灾害性天气主要是春旱和夏季暴雨。试验始于 1990 年,土壤母质为黄土性物质,属褐潮土,试验开始时耕层土壤理化性质为:有机质 $12.310 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全氮 $0.805 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全磷 $0.687 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全钾 $14.582 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、速效磷 $4.62 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、速效钾 $65.27 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、缓效钾 $407.60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、pH 8.22。

1.2 试验设计

本研究选择了6个长期肥料试验处理:(1)对照(CK,不施肥种植作物);(2)氮磷钾(NPK);(3)氮磷钾+有机肥(NPKM);(4)氮磷钾+秸秆(NPKSt);(5)氮磷钾肥+种植方式Ⅱ(NPKF);(6)撂荒(CK0)。

其中,氮肥为尿素,磷肥为过磷酸钙,钾肥为氯化钾,施用量分别为 $N\ 150\ kg\cdot hm^{-2}$ 、 $P_2O_5\ 75\ kg\cdot hm^{-2}$ 、 $K_2O\ 45\ kg\cdot hm^{-2}$;M为猪厩肥,用量 $22.5\ t\cdot hm^{-2}$,St为玉米秸秆,用量 $2.25\ t\cdot hm^{-2}$ 。化肥于小麦和玉米(大豆)播种前一次性施入,厩肥和秸秆在施入化肥的基础上每年施用1次,于小麦播种前做基肥。种植制度Ⅰ为冬小麦-夏玉米复种连作。种植方式Ⅱ为小麦-玉米→小麦-大豆复种轮作。小区处理面积 $200m^2$,不设重复。田间管理按大田丰产要求进行。

1.3 测试方法

试验于2005年10月2日夏玉米收获后在田间取样,每个处理又分为3个取样小区,在距离地表0~20cm处取样,3个取样小区再分别取5个点的土壤混匀后作为该取样小区的样品。

新鲜土样通过2mm筛后,4℃保存供分析微生物生物量碳、氮。
每个处理的3个取样小区混合后取100g土在4℃条件下保存,一周后提取土壤DNA,测定土壤微生物多样性。6个样品依次标记为:1(CK)、2(NPK)、3(NPKM)、4(NPKSt)、5(NPKF)和6(CK0)。

1.3.1 微生物量碳氮测定

土样微生物量碳氮采用 Joergensen 等^[1]和 Vance 等^[2]的氯仿熏蒸- K_2SO_4 浸提法,浸提液中的微生物量碳采用 $K_2Cr_2O_7$ 加热氧化, $FeSO_4$ 滴定法;微生物量氮采用开氏定氮法。每个土样重复3次测定。

1.3.2 土壤 DNA 提取、聚合酶链反应 (PCR) 和变性梯度凝胶电泳

(1)主要仪器和试剂
DGGE 所用仪器为 The Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Co.),引物扩增16SrDNA V3 高变区,引物为带有GC夹子的357f-GC和517R,其中V357f-GC(5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'),V517R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

(2)抽提土壤总 DNA
DNA 的提取 参照 Miller^[18]的方法,用酚:氯仿抽提法代替基因组 DNA 纯化试剂盒对总 DNA 进行初步纯化。然后用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测。

DNA 的定量测定 用紫外分光光度仪(日本岛津 UV-1600)测量样品在260nm和310nm的吸光值,然后根据公式计算 DNA 的浓度,计算公式为:

[DNA] = 50 × (OD₂₆₀ - OD₃₁₀) [ng/μl]

(3)PCR 扩增

50μlPCR 体系 10 × PCR buffer (含 Mg^{2+})5μl,脱氧核苷酸(dNTP)1μl,上游引物500nmol/L,下游引物500nmol/L;TaqDNA 聚合酶2U;模版10ng;最后加灭菌双蒸馏水至50μl。

PCR 反应条件如下:95℃,预变性3min,然后加入Taq酶,25个循环为93℃ 1min,48℃ 1min,72℃ 1min 10s,最后在72℃下延伸5min;扩增后的PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测质量。

(4)变形梯度凝胶电泳 (DGGE)

对于变性梯度从上到下是20%到60%,聚丙烯酰胺凝胶浓度是8%;在200V的电压下,上样量为13μl。其运行条件是:0.5 × TAE 电泳缓冲液,60℃电泳条件下,220V,5h,电泳完毕后,用0.8μg/ml的SYBR GREEN I 染色20 min,再用去离子水漂洗。将染色后的凝胶用Bio-RAD的GelDoc-2000凝胶影像分析系统拍照,用Quantity One 分析软件(Bio-Rad)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。

2 结果与分析

2.1 不同施肥制度对土壤微生物量碳与氮的影响

不同施肥处理下的土壤微生物量碳、氮的分析结果列于表 1。供试土壤微生物量碳的变化介于 133.28 ~ 282.75 mg·kg⁻¹,而微生物量氮的变化介于 16.97 ~ 70.17 mg·kg⁻¹。长期撂荒 (CK0)土壤微生物量碳、氮显著高于其它各农田土壤处理,这与前人报道的撂荒下表土层微生物生物量和微生物过程总是显著地高于耕翻土壤的结果相似^[19]。产生这种差异的原因是由于土壤微生物以异养型种群为主,其生命活动过程需要消耗一定的能量,撂荒不扰动土层,植物残体主要积累在表土层中,相对来说,可供微生物维持生命活动的能量充足,同时,长期撂荒使植物根系多集中分布于表土层,根系分泌的大量低分子量的根系分泌物也加剧了土壤微生物的繁衍,使其生命活动旺盛。从而导致该土层中土壤微生物生物量 C、N 含量比农田土壤的高。对于不同的农田土壤来说,4 种施肥处理小区 (NPKM、NPKF、NPKSt 和 NPK)的微生物量碳、氮都显著高于长期不施肥处理 (CK)。说明施肥有利于提高土壤微生物量碳、氮的含量。其中长期化肥配施厩肥 (NPKM)明显提高了土壤微生物量碳、氮的含量,这是由于化肥与有机肥配合施用,既补充输入了有机碳源,提高了养分的有效性和保水能力,又改善土壤物理性状,这大大刺激了土壤微生物群落和活性^[20,21]。不同的种植方式,长期复种轮作 (NPKF)处理的微生物量碳、氮显著高于长期复种连作 (NPK),产生这种差异的原因一是种植大豆不仅可以降低氮素的损失,还可以增加有机碳源,降低有机碳损失^[22]。二是不同作物的根系可以改善土壤物理结构,促进微生物生长。

微生物商 (SMB-C/SOC)变化反映了土壤中输入的有机质向微生物量碳的转化效率、土壤中碳损失和土壤矿物对有机质的固定。微生物商的变化比土壤有机碳和微生物量碳更稳定,表现出更平滑的变化趋势^[23]。长期撂荒 (CK0)处理,土壤微生物商显著高于农田土壤,这与 Saggarr 等研究是一致的。Saggarr 等^[24]在研究耕作对土壤生物性质和有机碳动态的影响时发现,随着农业耕作,微生物量碳和土壤全碳含量减少 (土壤有机碳减少 60%,微生物量碳减少 83%),微生物商变小。而 Sparling^[25]研究认为土壤被开发利用,土壤微生物量碳库下降速率比土壤有机质的下降速率快,微生物商也随之降低。长期各施肥处理微生物商显著高于长期不施肥 (CK)处理,主要是因为施肥可以增加生物产量,改善土壤环境有利于土壤有机质的降解和微生物量碳的增加。长期不同施肥各个处理的微生物商并没有显著的变化,说明经过 15a 的不同施肥,农田土壤的碳库系统趋于稳定。

微生物量氮与土壤全氮的比值 (SMB-N/TN)变化趋势与土壤微生物量氮的变化趋势基本相似,均为长期撂荒高于长期施肥,长期施肥高于长期不施肥的处理。其中各施肥处理中,长期 NPK 与有机肥配施的 SMB-N/TN 值最高。这是由于长期撂荒和施肥后,促进了土壤微生物大量繁殖,从而被微生物固持了一部分氮素。这些微生物固持氮素中的一部分在作物生长期间可逐渐矿化释放出来,供作物吸收,而另一部分则转化为性质稳定的有机氮,最终使土壤氮素含量增加。

土壤微生物量 C/N 比可反映微生物群落结构信息,其显著变化喻示着微生物群落结构变化可能是微生物量较高的首要原因^[26]。从表 1 中可见,长期化肥与有机肥配施 (NPKM)SMB-C/SMB-N 的比值最低,其比值显著低于其它各处理,其次为长期撂荒处理,长期不施肥 (CK)处理比值最高。

表 1 不同施肥制度对土壤微生物量碳、氮含量的影响

Table 1 The effect of long-term different fertilization systems on Microbial Biomass C and N of soil (0 ~ 20cm)					
处理 Treatments	SMB-C (mg·kg ⁻¹)	SMB-N (mg·kg ⁻¹)	SMB-C/SOC (%)	SMB-N/TN (%)	SMB-C/SMB-N
CK	133.28 D d	16.97 E e	2.22 c	2.86 d	7.86 a
NPK	167.94 CD cd	32.53 D d	2.31 b	4.73 c	5.16 b
NPKM	226.95 B b	59.53 B b	2.33 b	5.28 b	3.81 d
NPKSt	181.82 BCD c	39.09 CD cd	2.29 bc	4.91 c	4.65 c
NPKF	194.02 BC c	43.96 C c	2.37 b	5.16 b	4.41 c
CK0	282.57 A a	70.17 A a	2.58 a	5.98 a	4.03 cd

表中不同的大 (小)写字母表示 1% (5%)水平的差异显著性,下同 Note: Figures with the same capital or small letter are not significant at 1% or 5% level respectively, the same below

2.2 不同施肥制度对土壤细菌多样性的影响

2.2.1 不同施肥制度微生物群落 DGGE 图谱分析

应用 DGGE 技术分离 16S rDNA V3 片段 PCR 产物,可以看到分离为若干条带(图 1),但不同土壤样品的 16SrDNA V3 片段 PCR 产物出现的带型有一定差别,从 16SrDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 图谱进行初步统计发现 6 种土壤在 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,充分显示了微生物的多样性。不同土壤间具有许多共同的条带,说明这些供试土壤之间可能存在一些共有的细菌类型,然而这些公共条带的亮度也不相同,表明土壤微生物在 DNA 水平上有明显的改变。长期化肥与厩肥配施的土壤条带数量相对其它土壤明显多,有 28 条可见带,说明其微生物丰度最高,而长期不施肥而种植作物(CK)的土壤可见带数量相对其它土壤较少,只有 19 条,说明其微生物丰度较低。

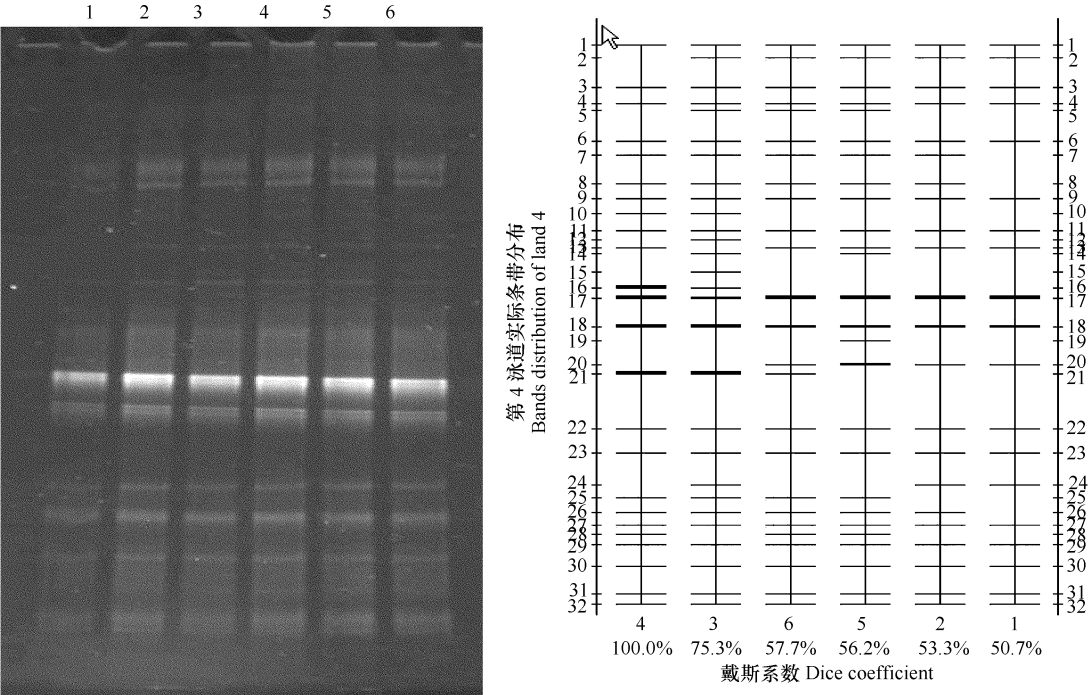


图 1 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 图谱以及泳道比较图

Fig. 1 DGGE profile of amplified 16S rDNA fragments from soil samples and land compare

1. CK ;2. NPK ;3. NPKM ;4. NPKSt ;5 NPKF ;6. CK0

2.2.2 不同施肥制度微生物群落相似性分析

所得图像用 Bio Rad Quantity One 4.5.2 软件进行处理,有关泳道和条带的技术处理都用该软件进行。DGGE 条带图案相似性的系统树图,由系统依据戴斯系数 Cs (Dice coefficient)按照有关方法(如 complete linkage 算法,UPGMA 算法等)计算绘出。 $Cs = 2j / (a + b)$ j 是样品 A 和 B 共有的条带, a 和 b 分别是样品 A 和 B 中各自的条带数。戴斯系数的范围是从 0 (没有共同带)到 1 (所有的条带相同)。用戴斯系数计算出的各泳道样品相似性矩阵,用它可以对 V3 DGGE 图谱中各泳道样品间的相似性进行比较。

聚类分析 (UPGMA)表明 (图 2) 6 种土壤样品共分为两大族群,NPKM 与 NPKSt 为一种族群,CK、NPK、NPKF 和 CK0 为另一种族群。说明施入外源有机物质(猪粪、秸秆)可能改变土壤的细菌群落结构,而长期施入化肥对土壤的细菌群落结构影响不大。从相似性指数来看(表 2),各土壤间的相似性比较大,各土壤之间的相似性都高于 47.2%,其中,CK (长期不施肥)与 NPK 处理之间的相似性最高,可达到 90.8%。这与 Anthony G O Donnell 等^[27]和 Makoto Kinura 等^[28]报道相同。Antontio Gelsomino^[29]对两种粉沙壤土和 15 种其它土壤的研究表明了相同的土壤具有同样的微生物种群。本试验田都是属于褐潮土,不同的长期施肥措施

并未影响土壤质地的变化,但显然导致了有机碳含量变化和其它理化性质的改变。Petra Marschner 等^[16]认为土壤有机碳的含量和 C/N 比能够显著影响土壤细菌群落结构的变化。不同处理间土壤微生物群落结构的相似性或多样性变化主要是由于不同施肥下土壤的微域生境的改变所致,这种改变影响了土壤生境对多种微生物的适宜性。

4 讨论

4.1 长期撂荒 (不破坏土壤) 的土壤,微生物量碳、氮的含量显著高于农田土壤,并明显地提高 SMB-C/SOC 和 SMB-N/TN 的比值,说明人为的改变土壤能降低微生物量的含量;而对于农田土壤来讲,不同施肥管理和轮作措施对土壤微生物生物量也具有明显的影响,与长期不施肥 (CK) 的土壤相比,施肥可以显著的提高土壤的微生物量碳、氮的含量,其中长期 NPK 肥与厩肥配施的效果最为明显。小麦-玉米→小麦-大豆复种轮作方式 (NPKF) 土壤的微生物量碳、氮的含量高于玉米-小麦复种连作方式 (NPK)。长期施 NPK 肥与秸秆配施 (NPKSt) 处理与长期单施化肥 (NPK) 相比,并没有显著提高土壤微生物量碳、氮的含量。

4.2 PCR-DGGE 技术是一种免培养的方法,从土壤微生物基因组的角度研究其多样性。15a 长期不同施肥措施、轮作和撂荒下,对土壤微生物多样性有明显的影响。从 DGGE 图谱中我们发现,长期 NPK 肥配施外源有机物质 (猪粪、秸秆) 可以改变土壤细菌的群落结构,而长期单施化肥 (NPK、NPKF) 或不施肥 (CK) 与长期撂荒 (CK0) 的细菌的群落结构相似。但由于供试土壤均为北京的褐潮土,土壤的质地 in 长期试验中并没有改变,所以供试土壤间共有的条带相对较多,各泳道条带的相似性也比较高,说明各土壤间的微生物群落具有较高的相似性。

从 DGGE 带谱的差异上,可以进一步初步比较土壤样品细菌多样性的差异,结果表明各个土壤具有丰富的细菌多样性组成,不同样品之间具有一定的差异性,长期 NPK 配施厩肥 (NPKM) 处理的微生物丰度最高,细菌物种最多,其次为长期小麦-玉米→小麦-大豆复种轮作 (NPKF) 处理和长期撂荒 (CK0) 处理,而长期不施肥种植作物的 (CK) 处理微生物丰度最低,细菌物种最低。说明长期的不同施肥措施改变了土壤微域生境条件,从而引起土壤微生物群落结构的变化。这对于研究不同环境中的土壤微生物多样性具有重要的指导意义。

总之,作为最有潜力和最敏感的生态学指标,通过分析土壤微生物量碳、氮的变化以及微生物群落组成和结构变化,可作为科学评价农田土壤健康质量和可持续发展的潜力预测,为寻求作物稳产、高产的土壤生态化学环境,更好地培肥土壤提供科学依据。

References :

[1] Jenkinson D S ,Powlson D S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil : A method for measuring soil biomass. *Soil Biology & Biochemistry* ,1976 ,8 (3) :209—213.

[2] Vance E D ,Brookes P C ,Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry* ,1987 ,19

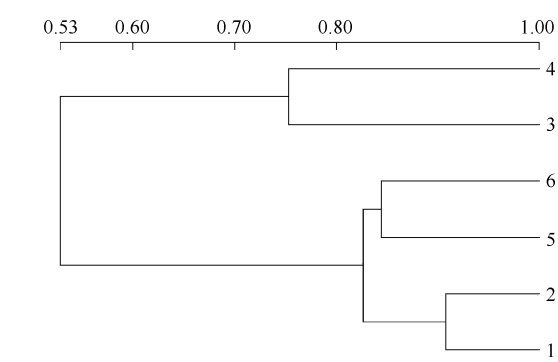


图2 DGGE UPGMA 分析

Fig. 2 DGGE Cluster analysis (UPGMA)of 16S rDNA profiles of bacterial communities in soil samples

1. CK ;2. NPK ;3. NPKM ;4. NPKSt ;5. NPKF ;6. CK0

表2 不同施肥制度微生物群落相似性指数

Table 2 Similarity coefficient of microbial populations under long-term different treatments

处理 Treatments	CK	NPK	NPKM	NPKSt	NPKF	CK0
CK	1.000					
NPK	0.908	1.000				
NPKM	0.472	0.525	1.000			
NPKSt	0.507	0.533	0.753	1.000		
NPKF	0.794	0.841	0.530	0.562	1.000	
CK0	0.816	0.856	0.524	0.577	0.845	1.000

(6):703—707.

[3] Joergensen R G and Mueller T. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass :calibration of the kEC value. *Soil Biology & Biochemistry* ,1996 ,28 (1):3—37.

[4] Kennday A C ,Papendick R I. Microbial characteristics of soil quality. *J Soil Water Conv* ,1995 ,50 (3) 243—248.

[5] Bunemanna E K ,Bossiob D A ,Smithsonb P C ,*et al.* Microbial community composition and substrate use in a highly weathered soil as affected by crop rotation and P fertilization. *Soil Biology & Biochemistry* ,2004 ,36 (6):889—901.

[6] Plaza C ,Hernández D ,García-Gil J C ,Polo A. Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. *Soil Biology & Biochemistry* ,2004 ,36 (10):1577—1585.

[7] Timo Kautz ,Stephan Wirth ,Frank Ellmer. Microbial activity in a sandy arable soil is governed by the fertilization regime. *European Journal of Soil Biology* ,2004 ,40 (2):87—94.

[8] Ebhin Masto R ,Chhonkar P K ,Dhyan Singh ,*et al.* Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a sub-tropical inceptisol. *Soil Biology & Biochemistry* ,2006 ,38 (7) :1577—1582.

[9] Carmine Crecchio ,Antonio Gelsomino ,Roberto Ambrosoli ,*et al.* Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology & Biochemistry* ,2004 ,36 (11):1873—1883.

[10] Bossio D A ,Girvan M S ,Verchot L ,Bullimore J. Soil Microbial Community Response to Land Use Change in an Agricultural Landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology* ,2005 ,49 (1) 50—62.

[11] Zhao B Q ,Zhang F D. Long-term fertilizer experiment in China. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* ,2002 ,8 (Supplement) 3—8.

[12] Campbell C A ,Lafond G P ,Harapiak J T ,*et al.* Relative cost to soil fertility of long-term crop production without fertilization. *Canadian Journal of Plant Science* ,1996 ,76 (3) 401—406.

[13] Belay A ,Claassens A S ,Wehner F C. Effect of direct nitrogen and potassium and residual phosphorus fertilizers on soil chemical properties , microbial components and maize yield under long-term crop rotation. *Biology and Fertility of Soils* ,2002 ,35 (6):420—427.

[14] Elcio L. Balota ,Arnaldo Colozzi Filho ,Diva S. Andrade ,*et al.* Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomassand C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. *Soil & Tillage Research* ,2004 ,77 (2):137—145.

[15] 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.

[16] Petra Marschnera ,Ellen Kandeler ,Bernd Marschner ,Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology & Biochemistry* ,2003 ,35 (3):453—461.

[17] Zhang P J ,Li L Q ,Pang G X ,*et al.* Influence of long- term fertilizer management on top soil microbial biomass and genetic diversity of a paddy soil from the Tai Lake region ,China. *Acta Ecologica Sinica* ,2004 ,24 (12):2818—2824.

[18] Miller N ,Bryant J E ,Madsen E L ,*et al.* Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Appl Envir Microbiol* ,1999 ,65 (11):4715—4724.

[19] Saidou Nourou Sall ,Dominique Masse ,Ndèye Yacine Badiane Ndour ,*et al.* Does cropping modify the decomposition function and the diversity of the soil microbial community of tropical fallow soil ?*Applied Soil Ecology* ,2006 ,31 (3):211—219.

[20] Debosz K ,Rasmussen P H ,Pedersen A R. Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils :effect of organic matter input. *Applied Soil Ecology* ,1999 ,13 (3) 209—218.

[21] Jackson L E ,Calderon F J ,Steenwerth K L ,*et al.* Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. *Geoderma* ,2003 ,114 (3-4):305—317.

[22] Drinkwater L E ,Wagoner P ,Sarrantonio M. Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature* ,1998 ,396 (6708) , 262—265.

[23] Sparling G P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research* ,1992 ,30 (2):195—207.

[24] Sagar S ,Yeates G W ,Shepherd T G. Cultivation effects on soil biological properties ,microfauna and organic matter dynamics in Eutric Gleysol and Gleyic Luvisol soils in New Zealand. *Soil Tillage Res* ,2001 ,58 (1-2):55—68.

[25] Sparling G P. Soil Microbial Biomass ,Activity and Nutrient Cycling as Indicators of Soil Health ,in :C. Pankhurst ,B. M. Doube ,V. V. S. R. Gupta eds. *Biological Indicators of Soil Health* ,CABI Publishing ,Wallingford ,Oxon ,UK ,1997. 97—120.

[26] Lovell R D ,Jarvis S C ,Bardgett R D. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland :effects of management changes. *Soil Biology & Biochemistry* ,1995 ,27 (7):969—975.

[27] Anthony G O'Donnell ,Melanie Seaman ,Andrew Macrae ,*et al.* Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil* ,2001 ,232 :135—145.

[28] Makoto Kinura ,Taketo shi Shibagaki ,Yasunori Nakajina ,*et al.* Community structure of the microbiota in the floodwater of a Japanese paddy field estimated by restriction fragment length polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis pattern analyses. *Biol Fertil Soils* ,2002 ,36 (4):306—312.

[29] Antonio Gelsomino ,Anneke C Kejer-Wolters ,Giovanni Cacao. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* ,1999 ,38 (1-2) :1—15.

参考文献：

[1] 赵秉强,张夫道. 我国的长期肥料定位试验研究. *植物营养与肥料学报*,2002 8 (增刊) 3~8.

[5] 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.

[7] 张平究,李恋卿,潘根兴,等. 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.