

长期定位施肥对紫色水稻土硝化作用 及硝化细菌群落结构的影响

辜运富¹, 张小平^{1,*}, 涂仕华², 孙锡发², Kristina Lindström³

(1. 四川农业大学资源环境学院微生物系, 雅安 625014; 2. 四川省农业科学院土壤肥料研究所, 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:采用化学分析和变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术,从表层土壤的微生物活性及基因多样性角度研究了长期不同施肥制度对紫色水稻土硝化作用及硝化细菌群落结构的影响。结果表明,经过 24a 长期定位肥料试验,不同施肥处理土壤 pH 和硝化作用均不相同,施肥在降低土壤 pH 的同时会增加土壤的硝化作用;不同作物种植方式也会影响土壤 pH 和硝化作用,紫色水稻土旱季 pH 和硝化作用均大于淹水土壤。施用化肥以及化肥配施有机肥不仅可以提高土壤硝化作用,也能够改变土壤中硝化细菌的群落结构;与长期单施化肥相比,长期化肥配施农家肥不仅提高了土壤的硝化作用,而且提高了土壤硝化细菌的分子多样性。UPGMA 聚类分析显示,10 种不同施肥处理的聚类图也不同;在水稻收割后,M,NM,NPM 与 NPKM 聚在一个群里,CK,N 和 NP 聚在第二个群里,而 NPK,NPKMZn 和 NPKMMn 聚成第三个群;在小麦收割后,M,NM,NPM,N,NP 和 NPKMMn 肥料影响下的硝化细菌群落聚成一个群,NPK,NPKMZn 和 NPKMMn 肥下的硝化细菌聚在一起,形成第二个群,对照(无肥)下的硝化细菌群落单独成为第三个群。应用 PCR-DGGE 技术可以揭示石灰性紫色水稻土上 24a 不同施肥及作物栽培管理措施下的硝化细菌分子群落结构特点。

关键词:长期定位施肥;DGGE;硝化作用;硝化细菌群落结构;稻麦轮作

文章编号:1000-0933(2008)05-2123-08 中图分类号:Q142,Q938,S154.36 文献标识码:A

Effect of long-term fertilization on nitrification and nitrobacteria community in a purple paddy soil under rice-wheat rotations

GU Yun-Fu¹, ZHANG Xiao-Ping^{1,*}, TU Shi-Hua², SUN Xi-Fa², KRISTINA Lindström³

1 College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China

2 Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

3 Department of Applied Chemistry and Microbial, University of Helsinki, SF-00014, Helsinki, Finland

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(5): 2123 ~ 2130.

Abstract: Chemical analysis and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were employed to determine the influence of long-term application of fertilizers on nitrification rates and nitrobacteria community in a calcareous purple paddy soil under rice-wheat rotations. Results showed that both pH and nitrification rates of the same soil varied substantially after long-term treatments with various fertilizers. Generally, soil amended with any fertilizers tended to reduce soil pH but

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

收稿日期:2007-08-31; 修订日期:2008-01-24

作者简介:辜运富(1977~),男,四川广汉人,博士,主要从事农业微生物研究. E-mail: gungyf@yahoo.com.cn.

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: aumdwbs@sicau.edu.cn

致谢:美国 Dow Corning 公司 XU Shihe 研究员润色英文摘要, DGGE 实验在浙江大学环境资源学院土水所完成,特此致谢。

Foundation item: The project was financially supported by National Key Technology R and D Program of China (No. 2006BAD05B06 and No. 2006BAD 02A 14-13)

Received date: 2007-08-31; **Accepted date:** 2008-01-24

Biography: GU Yun-Fu, Ph. D. candidate, mainly engaged in agricultural microbiology. E-mail: gungyf@yahoo.com.cn

increase nitrification rates compared to the control without fertilization (CK). The pH values and the nitrification rates of the soil appeared to be lower under rice rotation than those of the same soil under wheat rotation. Fertilizer amendment not only increased the soil nitrification rates but also altered the nitrobacteria community structures. As compared to the mineral fertilizer treatments, soil amendment with a combination of the mineral fertilizers with farmyard manure increased the rates of soil nitrification and the diversity of the nitrobacteria community as revealed by Unweighted Pair Group Method Clustering Analysis (UPGMA) of the DGGE banding patterns and cluster analysis of the DGGE profiles. In the soil under rice rotation, the nitrobacteria communities in soil amended with mineral nitrogen (N) or nitrogen-phosphor (NP) fertilizers was in the same cluster as that of the control (i. e., CK). Nitrobacteria communities exposed to the fertilizer treatments with manure [manure only (M), nitrogen plus manure (NM), nitrogen and phosphor plus manure (NPM), and nitrogen, phosphor and potassium plus manure (NPKM)] fell into the second group while that exposed to the NPK, NPKMZn, NPKMMn treatments was in the third group. In the soil under wheat rotation conditions, nitrobacteria communities in M, NM, NPM, N, NP and NPKMMn fertilizer treatments were clustered into one group, those in NPK, NPKMZn and NPKMMn to another group, and those in CK as a single cluster. The study demonstrated that PCR-DGGE technique was suitable for characterizing the nitrobacteria community of the calcareous purple paddy soil under different fertilizer treatments and crop rotations.

Key Words: Long-term fertilization; DGGE; nitrification; nitrification bacteria community; rice-wheat rotation

长期定位肥料试验,可以定向培育土壤质量和功能特点显著不同的农田土壤生态系统,可以用作评价不同施肥方式对农业生产以及农田生态系统可持续发展的影响^[1,2]。合理施用氮肥是现代农业高产、高效的基础,硝化作用是全球氮素循环的重要环节,其研究热点是了解不同施肥处理土壤的硝化活性及硝化细菌群落结构^[3,4]。

硝化细菌是环境中一类广泛分布的细菌,对氮素在环境中的循环起着主导作用,囿于生长代时,使用传统的微生物纯种分离培养方法研究时遇到了困难^[5],近年来主要采用分子生物学的一些手段进行研究。DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis,变性梯度凝胶电泳)最早是一项用于 DNA 突变检测的电泳技术^[6],1993 年 Muzyer 等首次将 DGGE 技术应用于微生物生态学研究,证实了这种技术在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性^[7]。近年来,DGGE 技术被应用到对不同环境中硝化细菌种群的研究中^[8,9],对微生物生态的发展产生了极大的促进作用。

紫色土是中国重要的土壤资源,总面积约 2000 多万 hm^2 ,也是四川盆地广为分布的一种主要农业土壤(面积 1127.53 多万 hm^2 ,含重庆),其中石灰性紫色水稻土分布最广,面积约 400 多万 hm^2 ^[10]。为了监测施肥对石灰性紫色水稻土质量的影响,四川省农业科学院土壤肥料研究所于 20 世纪 80 年代初在川中紫色丘陵区石灰性紫色水稻土上建立了长期定位施肥试验点。研究石灰性紫色水稻土上长期定位施肥对土壤硝化作用及硝化细菌种群结构的影响,这对于在石灰性紫色水稻土区建立长效合理施肥制度,保护土壤生物,改善石灰性紫色水稻土的土壤质量及可持续发展具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验点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,试验开始于 1982 年,土壤为原生钙质紫色土属,遂宁组母质,二泥田土种。试验采用完全随机区组设计方案,设置 10 个处理:①农家肥(主成份为畜禽粪便,M);②NM;③NPM;④NPKM;⑤CK(无肥区);⑥N;⑦NP;⑧NPK;⑨NPKMZn;⑩NPKMMn。其中每种肥料的施用量为,农家肥(M) $3 \times 10^4 \text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$;氮肥(N,尿素) $55.2 \text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$;磷肥(P,过磷酸钙) $13.2 \text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$;钾肥(K,氯化钾) $31.5 \text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。⑨和⑩号处理是在第④种施肥处理的基础上分别加施硫酸锌(锌肥,Zn)和硫酸锰(锰肥,Mn),用量均为 $15 \text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。每种处理设 4 次重复,共 40 个小区,小区面

积 13.2m^2 。整个试验小区之间用水泥板隔开,重复之间留有排水沟。采用小麦-水稻轮作。供试土壤的基础理化性质见表 1。

1.2 取样方法

于 2005 年 10 月水稻收割后和 2006 年 5 月小麦收割后进行田间取样,用土钻钻取 0 ~ 20cm 的土样,混匀,用无菌 PET 树脂袋封装带回实验室。放在 -20°C 的冰箱里保存以备后续分析。另取一部分放于室内风干,研细过 2mm 筛,用于土壤硝化作用的分析。

1.3 硝化作用的测定

硝化作用的测定参考范晓辉等的方法,用 MgO -代氏合金法分析其中的铵态氮和硝态氮,以 $(\text{NO}_3^- - \text{N} / (\text{NH}_4^+ - \text{N} + \text{NO}_3^- - \text{N}) \times 100\%)$ 计算土壤硝化率^[11]。

表 1 钙质紫色土定位试验田的原初养分状况

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

土样类型 Soil type	pH	有机质 OM (g/kg)	全量 N、P、K Total N、P、K (%)			有效 N, P, K, Mn, B, Mo, Zn, 缓效 K AN, AP, AK, AMn, AB, AMo, AZn, SRK (mg/kg)							
			全氮 TN	全磷 TP	全钾 TK	碱解氮 AN	有效磷 AP	有效钾 AK	缓效钾 SRK	有效锰 AMn	有效硼 AB	有效钼 AMo	有效锌 AZn
钙质紫色土 Calcareous Purple paddy Soil	8.6	15.9	0.109	0.135	2.689	66.3	3.9	130.6	699.4	6.9	0.18	0.06	0.74

1.4 土壤硝化细菌群落结构的 PCR-DGGE 分析

1.4.1 主要仪器和试剂

DGGE 所用仪器为, DcodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Co.)。引物为特异性扩增硝化细菌 16S rDNA V3 高变区的引物,应用 Nested-PCR 扩增程序,第一轮 PCR 扩增所用引物为 Ntspa0685r 和 PRBA338f,第二轮 PCR 扩增所用引物为 PRBA338f-GC 与 P518r,所有引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

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 0.5g 于 -20°C 保存的土壤样品,按试剂盒的给定步骤进行土壤微生物总 DNA 的提取。

1.4.3 硝化细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增^[12]

第一次 PCR 所用引物为 Ntspa0685r 和 PRBA338f。反应体系为 PCR Master Mix (TIANGEN BIOTECH. BEIJING) $25\mu\text{l}$, 每种引物 $0.5\mu\text{l}$ ($25\text{pmol}/\mu\text{l}$), $0.5\mu\text{l}$ 10 倍稀释的土壤总 DNA,加 ddH_2O 至终体积 $50\mu\text{l}$ 。为减少非特异性产物,采用 Touch-down PCR 扩增程序,反应程序: 94°C 预变性 5min, 94°C 1min, $65 \sim 55^{\circ}\text{C}$ 50s (每个循环温度降低 0.5°C), 72°C 1.30min, 20 个循环,然后在其它条件不变的情况下,在 55°C 的退火温度下继续扩增 15 个循环, 72°C 7min,产物于 4°C 恒定保存。

第二次 PCR 第一次 PCR 产物 1:10 稀释后作模板进行,所用引物: PRBA338f-GC 和 P518r。体系为 $10 \times \text{PCR}$ 缓冲液 $5\mu\text{l}$, MgCl_2 ($25\text{mmol}/\mu\text{l}$) $3\mu\text{l}$, dNTP ($2.5\text{mmol}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$, PRBA338F-GC ($25\text{pmol}/\mu\text{l}$) $0.5\mu\text{l}$, P518R ($25\text{pmol}/\mu\text{l}$) $0.5\mu\text{l}$, Taq DNA 聚合酶 ($5\text{u}/\mu\text{l}$) $0.5\mu\text{l}$, 模板 DNA $1\mu\text{l}$,加 ddH_2O 至终体积 $50\mu\text{l}$ 。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 $63 \sim 53^{\circ}\text{C}$,后 15 个循环为 53°C ,其它步骤与第一轮 PCR 相同。

取 PCR 产物各 $3\mu\text{l}$, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 (DcodeTM, 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^[7]

取第二次 PCR 产物 $15\mu\text{l}$ 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 7mol 和 40%的去离子甲酰胺)。在 $1 \times \text{TAE}$ 缓冲液中, 50V 30min 进胶, 再在 150V 60℃ 下电泳 5h。电泳后采用改进的硝酸银染色法^[13]对凝胶进行染色。用数码相机拍照。指纹图谱借助于 Bio-Rad 公司的凝胶成像系统[Quantity One, Bio-Rad, USA]分析样品电泳条带。

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

1.5 数据处理

硝化作用的基础数据利用 Excel2003 进行处理, 利用 SPSS12.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 紫色水稻土种植小麦和淹水种植水稻后的硝化作用测定结果

紫色水稻土在长期不同施肥处理下种植小麦和淹水种植水稻后的硝化作用见图 1。

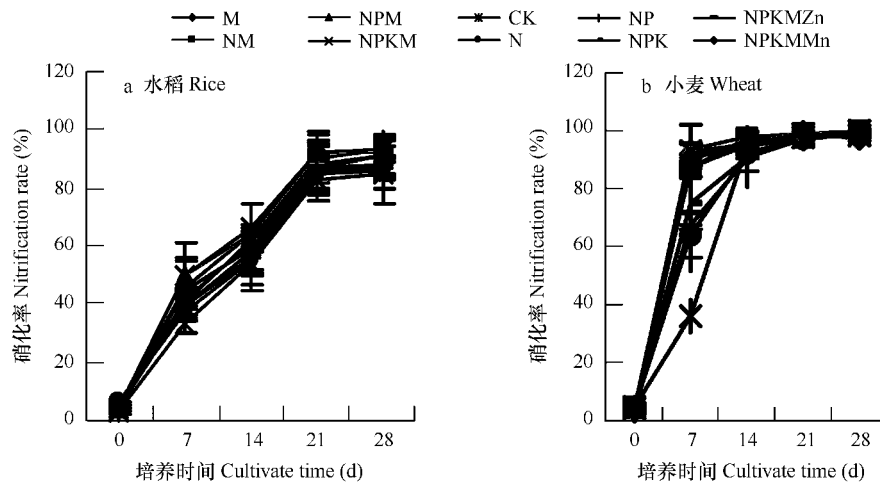


图 1 不同作物种植后土壤的硝化作用

Fig. 1 Nitrification rate of the soil after rice and wheat

表 2 种植不同作物后各施肥处理表层土壤的 pH 值

Table 2 Top soil pH in the different fertilizer treatments after rice and wheat

项目 Item	施肥方式 Fertilizer treatments									
	M	NM	NPM	NPKM	CK	N	NP	NPK	NPKMZn	NPKMMn
水稻收获后土壤 Soil after rice	7.59	8.13	8.09	7.98	8.20	8.22	8.02	8.02	8.02	8.00
小麦收获后土壤 Soil after wheat	8.00	8.23	8.11	8.02	8.24	8.26	8.09	8.08	8.07	8.05

图 1 显示, 紫色水稻土在种植小麦和淹水种水稻后土壤的硝化率在整个培养过程中总体变化规律较为一致, 即都随着培养时间的延长而逐渐增加, 在培养 4 周后, 经过水、旱作后该土壤各自的硝化率都可以达到 90% 左右, 但在两种土壤的培养过程中, 它们的硝化率也存在一定的差异, 表现在, 种植水稻后的表层土壤在培养 2 周后, 硝化率仅为 50%, 而种植小麦后的表土层在培养 2 周后, 硝化率却可以高达 90%。显示不同作物种植方式会影响紫色水稻土的硝化作用。

试验表明, 不同施肥制度对土壤的硝化作用具有明显的影响。单施用有机肥或无机肥与有机肥配合施用都可以明显提高该土壤的硝化作用, 特别是当 NPK 与有机肥配合施用(即 NPKM)时, 土壤中的硝化作用最为强烈, 表现为在培养 2 周后其硝化率比其它处理都高。培养 4 周后, 淹水后的土壤硝化率可以达到 66%, 而旱作后的土壤则可高达 99%。NPM 次之, 但在培养 4 周后也可以达到 40% 以上, CK(无肥)处理的硝化作用最弱。

从图 1 和表 2 可以看出,经过 24a 的施肥管理,10 种施肥处理土壤的 pH 和硝化作用均出现了不同程度的变化,表现为施肥在降低土壤 pH 的同时会增加土壤中的硝化作用,施用农家肥,或者农家肥加无机肥比施用无机肥或不施肥能够更明显的改变土壤 pH 和硝化作用,其中以农家肥配施无机肥的影响最大;不同的作物种植对土壤 pH 和硝化作用也有影响,本试验中石灰性紫色土壤 pH 和硝化作用均是旱作土壤大于淹水土壤。

2.2 不同施肥制度对土壤硝化细菌多样性的影响

2.2.1 不同施肥制度下土壤硝化细菌群落 DGGE 图谱分析

采用 Nested-PCR 扩增硝化细菌 16S rRNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2a、图 2b。从图 2 可以看出,硝化细菌的 16S rRNA 基因得到了有效扩增,扩增产生的片段长度分别是:第一次 330bp 左右,第二次 220bp 左右。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 3),不同土壤样品出现的带型有一定差别,从 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,充分显示了硝化细菌的多样性。

图谱中,不同土壤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硝化细菌类群,但这些公共条带的亮度不相同,表明土壤硝化细菌在 DNA 水平上有一定的改变。就 10 种施肥方式而言。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 NPK 与农家肥配施的 DNA 条带数量相对其它施肥方式明显偏多,说明其硝化细菌种群丰富度最高,而长期不施肥(CK)的土壤可见带数量较少,土壤微生物丰度较低。造成这种现象的原因可能是由于长期农家肥配施无机肥可以更明显改善土壤的微域生境,为硝化细菌提供更佳的生境条件及更多的营养物质,从而促进硝化细菌种类和数目增加。

就水作与旱作而言,水作后土壤中的 DNA 条带数明显多于旱作后,表现为在图谱的 A 区域由于条带数目过多而出现明显的“Smear”区域,显示水作后土壤中的硝化细菌种群丰富度高于旱作后。原因可能是由于水稻收获前土壤落干过程刺激了硝化细菌的大量繁殖,而小麦收获前由于气温较高、土壤干燥而抑制了土壤硝化细菌的生长。旱作时施入钾肥的处理表现出与其它施肥处理明显不同的硝化细菌群落结构,主要表现为施入钾肥会降低土壤中硝化细菌的种群丰富度,直观体现为 DGGE 图谱上条带亮度的减弱或者缺失。可能是由于施入钾肥(KCl)中的 Cl^- 离子对硝化细菌形成毒害作用所致。

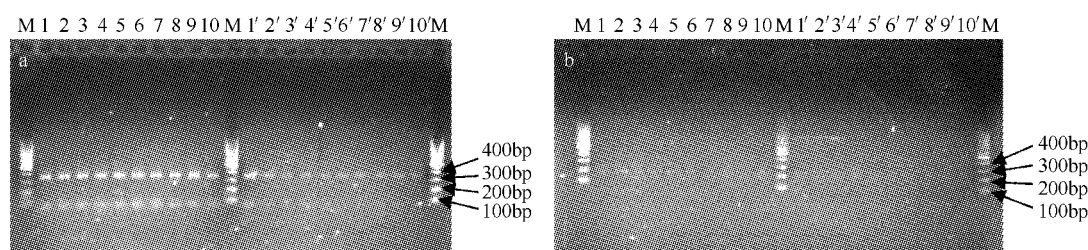


图 2 土壤硝化细菌 16S rRNA 基因第一次(a)和第二次(b)扩增结果

Fig. 2 The first(a) and second(b) PCR amplification of 16S rRNA gene of the soil nitrobacteria

M; 100bp ladder marker, 两图中的数字 1~10(种水稻后土壤)和 1'~10'(植小麦后土壤)均表示 10 种不同的施肥方式,从 1 到 10(或 1'到 10')依次是:农家肥(M);农家肥加氮肥(NM);农家肥加氮磷肥(NPM);农家肥加氮磷钾肥(NPKM);无肥(CK);氮肥(N);氮磷肥(NP);氮磷钾肥(NPK);农家肥加氮磷钾锌肥(NPKMZn);农家肥加氮磷钾锰肥(NPKMMn)

M; 100bp ladder marker. The number (1—10 and 1'—10') in the two figures refer to ten fertilizer treatments as: N, nitrogen; NP, nitrogen and phosphate, NPK, nitrogen, phosphate and Potassium; CK, no fertilizer; M, farmyard manure; NM, nitrogen plus farmyard manure; NPM, nitrogen, phosphate plus farmyard manure; NPKM, nitrogen, phosphate and potassium plus farmyard manure; NPKMZn, nitrogen, phosphate, potassium and zinc plus farmyard manure; NPKMMn, nitrogen, phosphate, potassium and manganese plus farmyard manure

2.2.2 不同施肥制度土壤硝化细菌群落相似性分析

土壤硝化细菌的聚类分析见图 4。该紫色水稻土在种植水稻后的聚类分析(UPGMA)表明(图 4a),供试

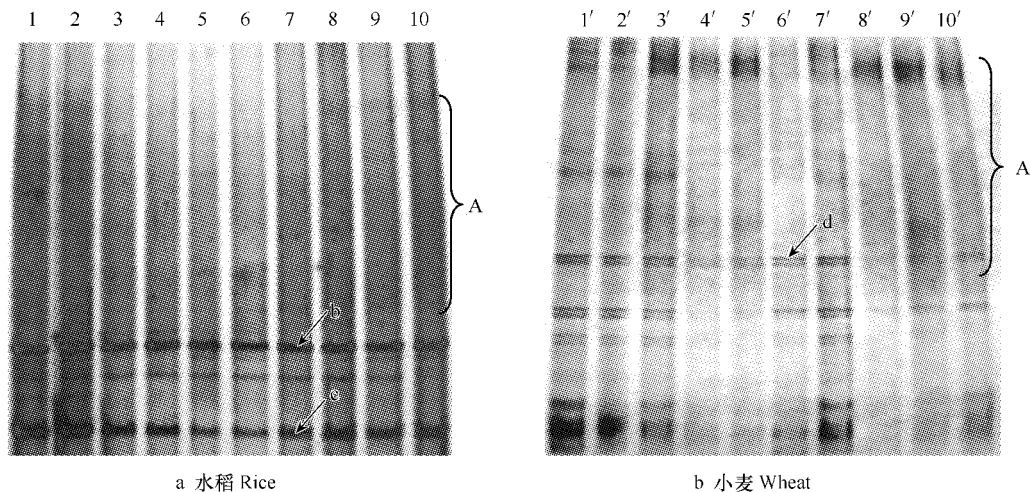


图3 种植不同作物后土壤硝化细菌的 DGGE 指纹图谱

Fig. 3 DGGE profile of nitrobacteria communities of the soil after rice and wheat

图中数字代表的意思与图2中的一样 The meanings of the numbers are the same as that in Fig. 2.

10 种土壤样品共分为三大族群, NPK, NPKMZn 与 NPKMMn 为一个族群; M, NM, NPM, NPKM 为一个族群; CK, N, NP 为第三族群。在种植小麦后的聚类分析(图 4b) (UPGMA) 显示参试 10 土壤也被分为 3 个族群, M, NM, NPM, N, NP 和 NPKMMn 为一个族群; NPK, NPKMZn 与 NPKM 为一个族群; CK (无肥) 独立为第三族群。通过聚类图可以看出, 在不同的耕种方式下, 不同施肥处理聚在了不同的族群里, 说明耕种方式导致土壤理化性质的差异, 从而产生不同的施肥方式对土壤中硝化细菌群落结构的影响不一致。但总体而言, 外源有机物质(猪粪)配施 NPK 无机肥可能改变土壤的硝化细菌群落结构, 而不施肥或者单施化肥对土壤的硝化细菌群落结构影响不大。Petra Marschner 等认为土壤有机质的含量和 C/N 比能够显著影响土壤细菌群落结构的变化^[13]。本试验田都是属于石灰性紫色土, 长期不同施肥并不能引起土壤质地的变化, 但显然导致了土壤中有机质含量变化和其它理化性质的改变, 从而使硝化细菌群落结构出现了差异。不同处理间土壤硝化细菌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微域生态系统的改变所致, 这种改变必然引起土壤生境中硝化细菌对其响应。

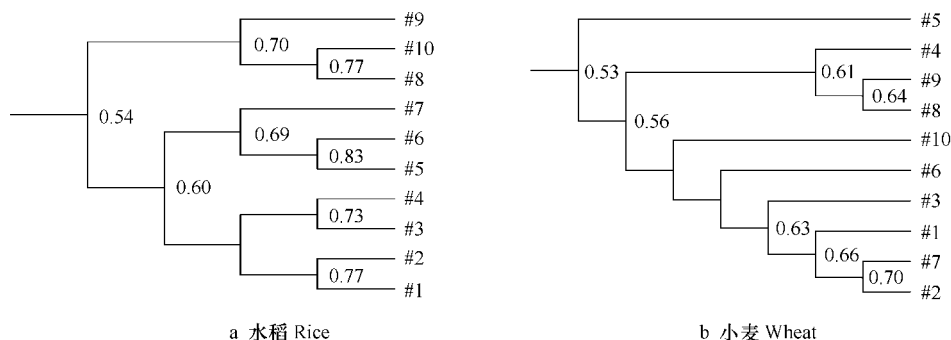


图4 不同作物栽培后土壤硝化细菌 16S rDNA DGGE 指纹图谱的聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis of 16S rDNA DGGE profiles for nitrobacteria communities in the soil after rice and wheat

图中数字代表意思与图2中的相同 The meanings of the numbers are the same as that in Fig. 2

3 讨论

3.1 试验表明, 长期不同施肥管理措施对紫色水稻土淹水种稻和种植小麦后 pH 值和硝化作用都有一定的影响, 与长期不施肥(CK)的土壤相比, 施肥可以降低土壤 pH 值, 提高硝化作用, 10 种施肥方式中, 长期 NPK

肥与农家肥配施对土壤的 pH 值和硝化作用的影响最为明显。本试验田土壤为石灰性紫色水稻土,但由于不同的耕种方式会形成不同土壤微域生态系统,相应的也会影响土壤中的硝化作用,水稻-小麦是四川地区石灰性紫色水稻土上的主要轮作方式,试验结果显示,植稻后土壤的 pH 和硝化作用均小于种植小麦后。研究表明,土壤 pH 是判断土壤硝化作用的一个重要依据^[14]。本试验表明在不同因素影响下,土壤 pH 与硝化作用呈现不同的变化特点,就施肥方式而言,土壤的 pH 与硝化作用变化趋势相反;就作物种植方式而言,土壤的 pH 与硝化作用变化趋势相同。

3.2 PCR-DGGE 技术是研究环境样品非培养微生物的有效方法,它可以从土壤微生物宏基因组的角度揭示微生物多样性。农业管理措施是导致土壤微生物多样性变化的一个主要因素,本实验通过对石灰性紫色水稻土表层土壤的硝化作用及硝化细菌群落结构的初步研究表明,24a 长期不同施肥、作物轮作对表层土壤的硝化作用及硝化细菌群落结构具有明显的影响。在旱作小麦收获后农家肥配施无机肥比不施肥(CK)能显著提高土壤的硝化作用及硝化细菌的种群多样性。但是同样的施肥措施在不同的作物种植下,表现为不同硝化细菌群落结构特点,在淹水种植水稻后,长期 NPKM 处理硝化细菌群落结构最为丰富;在旱作小麦后,NPKM 处理土壤中的硝化细菌群落反而没有 M,NPM,NM 和 NP 的处理高。这可能是由于水作与旱作以及不同作物会形成不同的农田土壤微域生态系统,这样的生态系统对土壤中的硝化细菌具有定向选择性作用。虽然不同处理 DGGE 指纹图谱表现出明显的差异,但是通过 DGGE 指纹图谱我们也可以发现,由于供试土壤质地长期试验中并没改变,故不同处理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,显示各处理土壤间微生物群落结构具有较高的相似性。

土壤微生物学特性及其群落结构是有效的生态学指标,从土壤硝化作用及硝化细菌群落结构的变化出发,研究施肥对土壤生境的影响,可对科学评价农田土壤生境系统健康质量和可持续发展的潜力进行预测,为建构作物高产、稳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] Shen S M. The scientific value of long term soil fertility experiment. *Plant Nutrition and Fertilizer Sciences*, 1995, 1: 1—8.
- [2] Liu E K, Zhao B Q, Li X Y, *et al.* Microbial biomass C and N and soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V3 fragment PCR products under different long-term fertilization systems. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27: 1079—1085.
- [3] De Boer W, P J A Klein Gunnewiek, S R Troelstra, *et al.* Nitrification in Dutch heath land soils II. Characteristics of nitrate production. *Plant Soil*, 1990, 127: 193—200.
- [4] W De Boer, Klein Gunnewiek P J A, Veenhuis M, *et al.* Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57: 3600—3604.
- [5] Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, *et al.* Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira-like* bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol*, 1998, 64: 3042—3051.
- [6] Fisher S G, Lerman L S. DNA fragment differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 1579—1583.
- [7] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G, *et al.* Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 695—700.
- [8] Bruns M A, Stephen J R, Kowalchuk G A, *et al.* Comparative of ammonia-oxidizer 16S rRNA gene sequences in native tilled and successional soils. *Appl. Environ. Microbiol*, 1999, 65: 2994—3000.
- [9] Rothauwe J H, Witzel K P, Lieack W, *et al.* The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol*, 1997, 63: 4704—4712.
- [10] Liu S Q, Zhang M. *Regional Soil Geography*. Chengdu: Sichuan University Publishing House, 1996. 10.
- [11] Fan X H, Lin D X, Shen M, *et al.* Characteristics of Mineralization and nitrification in the calcareous soils from a long-term fertilization experimental field. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42: 340—343.

- [12] Zhang D. Research of the running conditions of OLAND biological nitrogen removal system and its microbial community structure. Doctor dissertation. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Science, 2003.
- [13] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M, *et al.* Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, 196: 81—84
- [14] Petra Marschnera, Elen Kandeler, Bernd Marschner, *et al.* Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 453—461.
- [15] Fan X H, Zhu Z L. Nitrification and denitrification in upland soils. *Chinese Journal of Soil Science*, 2002, 33: 385—391.

参考文献:

- [1] 沈善敏. 长期土壤肥力试验的科学价值. *植物营养与肥料学报*, 1995, 1(1): 1~8.
- [2] 刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 等. 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. *生态学报*, 2007, 27(3): 1079~1085.
- [10] 刘世全, 张明. 区域土壤地理. 成都: 四川大学出版社, 1996. 10.
- [11] 范晓晖, 林德喜, 沈敏, 等. 长期试验地潮土的矿化与硝化作用特征. *土壤学报*, 2005, 42(2): 340~343.
- [12] 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. 博士学位论文. 北京: 中国科学院研究生院, 2003.
- [15] 范晓辉, 朱兆良. 旱地土壤中的硝化-反硝化作用. *土壤通报*, 2002, 33(5): 385~391.