

施肥和土壤管理对土壤微生物生物量碳、氮和群落结构的影响

毕明丽^{1,2}, 宇万太^{1,*}, 姜子绍¹, 周桦¹, 沈善敏¹

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:以中国科学院沈阳生态试验站的长期定位试验为平台,研究了不同施肥和土壤管理对潮棕壤微生物生物量碳、氮和群落结构的影响。结果表明,裸地和农田处理的微生物生物量碳、氮较低,但是农田处理下施肥增加了微生物生物量,其中 NPK + M 效果最明显。DGGE 图谱显示,处理间细菌条带分布较相似,其中裸地的细菌多样性最高;长期施肥和土壤管理改变了土壤真菌群落结构,施肥增加了真菌多样性,且有机肥的影响大于化肥;不同处理间氨氧化细菌群落结构差异显著,NPK + M 显著增加了氨氧化细菌多样性,且无机肥和有机肥对氨氧化细菌群落影响不同。施肥和土壤管理对细菌影响较小,但显著改变了真菌和氨氧化细菌的群落结构。聚类分析结果显示,土壤管理措施较施肥对细菌、真菌和氨氧化细菌群落的影响更为显著。

关键词:施肥;土壤管理;微生物多样性;变性梯度凝胶电泳;微生物生物量;氨氧化细菌

Effects of fertilization and soil management on microbial biomass and community

BI Mingli^{1,2}, YU Wantai^{1,*}, JIANG Zishao¹, ZHOU Hua¹, SHEN Shanmin¹

1 Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Based on a field study of the aquic brown soil in the suburbs of Shenyang City in Northeast China over a consecutive 19 years, the effects of fertilization and soil management on the microbial biomass (C and N) and communities were investigated. The results showed that microbial biomass of the bare land and farmland was low. Fertilization increased the microbial biomass, especially when mineral fertilizers and pig manure (NPK + M) were applied. DGGE fingerprinting indicated a high similarity in the distribution of most bacterial bands among all treatments, and the bacterial diversity of the bare land was the highest. There were significant variations of fungal community structure among different treatments. Long-term fertilization increased fungal diversity and manure was more effective than mineral fertilizer to increase fungal diversity. Long-term fertilization and soil management had a large effect on the ammonia-oxidizing bacteria structure in soil. Moreover, manure and mineral fertilizer influenced the ammonia-oxidizing bacterial communities in different ways. When applied together NPK + M increased the diversity most significantly. On the contrary, fertilization and soil management had less effect on the bacterial communities. Cluster analysis suggested that soil management practice had a larger effect on the community structures of bacteria, fungi and ammonia-oxidizing bacteria than fertilization.

Key Words: long-term fertilization; soil management; genetic diversity; DGGE; microbial biomass; ammonia-oxidizing bacteria

土壤微生物参与有机质的形成和分解、养分循环和转化等过程,对土壤养分供应起着重要作用,其生物量

基金项目:中国科学院创新资助项目(KZCX2-YW-407, KZCX2-YW-405);国家科技支撑计划课题资助项目(2006BAD05B05);国家自然科学基金资助项目(40701067)

收稿日期:2008-09-11; 修订日期:2009-02-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wtyu@iae.ac.cn

和多样性的变化是监测土壤质量变化的重要指标^[1]。已有研究表明,农业实践措施会对土壤微生物的数量、组成和活性产生影响,秸秆还田可以提高土壤微生物生物量碳和活跃微生物量^[2],而化肥配施有机肥不仅增加了土壤细菌、放线菌和真菌量,而且增加了固氮菌、氨化细菌等功能菌的数量^[3],因此探究施肥和土壤管理对土壤微生物特性的影响对维护和提高土壤质量具有重要意义。

土壤中 99% 以上的微生物种类在实验室不可培养,随着现代技术的发展,越来越多的学者开始从分子水平上认识土壤的微生物多样性。国外关于应用 PCR-DGGE 技术研究施肥和土壤管理对土壤微生物群落结构的影响方面已有不少报道^[4-6],Stark 等^[7]认为,长期土地管理对土壤微生物群落的影响比短期处理明显,且长期施用有机肥的土壤细菌条带要多于无机肥处理^[8],Wakelin 等^[9]研究发现,根茬还田和施用氮肥对真菌的影响比细菌大。国内罗海峰^[10]、钟文辉^[11]等学者也成功地运用此技术对农田土壤的微生物多样性进行了探索。

目前关于施肥和土壤管理对微生物群落的影响多侧重细菌,综合分析细菌、真菌和功能菌种的研究较少。氨氧化菌是一类能够将氨氧化成亚硝酸盐的细菌,在硝化过程中起着重要作用,了解土壤中氨氧化细菌的群落结构对养分利用具有重要意义。因此,本研究将传统方法和 PCR-DGGE 技术相结合,以中科院沈阳生态站长期定位试验为平台,对不同施肥和土壤管理制度下土壤微生物生物量碳、氮及细菌、真菌和氨氧化细菌的群落结构进行了测定分析,旨在阐明这些农业经营措施在可持续发展农业中对维护土壤质量的作用,为土地合理利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究地区概况

本试验在中国科学院沈阳生态试验站(41°32'N,122°23'E)进行,该站处于下辽河平原中部偏东,沈阳以南 35 km 处,属暖温带湿润半湿润大陆性季风气候,四季分明,雨热同季,夏天炎热,冬天寒冷。年平均温度 7—8℃,夏季平均气温 24℃。≥10℃ 年活动积温为 3300—3400℃,太阳总辐射量为 5409.9—5599.8 kJ·cm⁻²,无霜期 147—168 d。年降雨量平均 600—700 mm。试验始于 1990 年,土壤为潮棕壤,试验地初始理化性质见表 1。

表 1 试验地的基本理化性质

Table 1 Soil physical and chemical factors of study site

采样深度 Sampling depth /cm	全氮 Total nitrogen /(g·kg ⁻¹)	全磷 Total phosphorus /(g·kg ⁻¹)	全钾 Total potassium /(g·kg ⁻¹)	速效磷 Available phosphorus /(mg·kg ⁻¹)	速效钾 Available potassium /(mg·kg ⁻¹)	有机质 Organic matter /(g·kg ⁻¹)	pH
0—20	1.06	0.47	16.39	9.26	96.24	19.94	6.5

1.2 田间试验设计

试验共包括 7 个处理,其中农田生态系统包括:①不施肥(CK);②循环猪圈肥(M),每年收获籽实的 80% 喂猪,大豆秸秆全部和玉米秸秆的一半经粉碎后掺土垫圈,翌年春将循环猪圈肥返回本处理,因此,本处理自 1991 年起每年施用猪圈肥;③化肥(NPK),氮肥用量为纯 N 150kg·hm⁻²,用尿素折算,磷肥用量为纯 P 25kg·hm⁻²,用重过磷酸钙折算,K 肥用量为纯 K 60kg·hm⁻²,用硫酸钾折算;④化肥 NPK + 循环猪圈肥(NPK + M),NPK 用量同处理 3,循环操作同处理 2。小区面积为 162m²,采取玉米-玉米-大豆轮作制度。

其它 3 种土壤管理方式分别为:⑤裸地(始于 1990 年),每年数十次铲除地表草芽,保持地表无植被,呈裸露状态;⑥割草(始于 1990 年),撂荒之后,每年秋季割掉地上植被,称重,测养分量;⑦休闲地(始于 1990 年),处于自然演替状态,为撂荒荒地。

1.3 样品采集及分析

本试验于 2008 年 4 月 15 日在各处理采集供分析用的土壤样品,采样深度为 0—20cm,每小区采 3 个样品作为重复,每个样品均为多点混合。挑出土壤样品中大的石砾、作物残留根和其它废弃物后,过 2mm 筛。

所有土壤样品分成两部分,一部分立刻测定微生物生物量碳、氮,另一部分土样 -20°C 保存,1 周内提取土壤 DNA,测定土壤微生物多样性。

1.3.1 微生物生物量碳、氮测定

土壤微生物生物量碳、氮的测定采用氯仿熏蒸- K_2SO_4 提取方法^[12-13],浸提液中的微生物生物量碳采用 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 加热氧化- FeSO_4 滴定法测定;微生物生物量氮采用凯氏定氮法测定。

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

(1) 土壤总 DNA 的提取

DNA 的提取参照 Miller^[14] 的方法,用酚-氯仿抽提法代替基因组 DNA 纯化试剂盒对总 DNA 进行纯化,然后用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

(2) 土壤 DNA 的 PCR 扩增

土壤 DNA 的 PCR 扩增条件见表 2,反应体系均为: $10 \times \text{PCR buffer}$ (含 Mg^{2+}) $5\mu\text{l}$, 脱氧核苷酸 (dNTP) $4\mu\text{l}$, 引物 ($10\text{pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) 各 $1\mu\text{l}$, Taq DNA 聚合酶 1.25U, 模版 $1\mu\text{l}$, 最后加灭菌双蒸水至 $50\mu\text{l}$, 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。所用引物及 Taq 酶由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

表 2 PCR-DGGE 条件

Table 2 PCR-DGGE condition used in this study

模板 Target	引物 Primer	扩增条件 PCR condition	电泳条件 DGGE condition	
			聚丙烯酰胺凝胶浓度 Polyacrylamide gel	变性梯度 Denaturing gradients
细菌 Bacteria	341F-GC (5'-CGCCCGCCGCGC-CCCGCGCCCGTCCCGCCGCC-CCCGCGCCTACGGGAGGCAG-CAG3'), 519R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3') ^[15]	94℃ 4min; 94℃ 1min, 60℃ 30s, 72℃ 2min, 9 cycles; 94℃ 30s, 60℃ 30s (−0.5℃/cycle), 72℃ 2min, 9 cycles; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 2min, 9 cycles; 72℃ 8min	8%	40%—60%
真菌 Fungi	U1 (5'-GTGAAATTGTTGAAAGGAA-3'), U2-GC (5'-CGCCCGCGCGCGGGGCGGGGCGGGGACCGGGGGGACTC-CTTGCTCCGTGT-3') ^[16]	94℃ 5min; 94℃ 1min, 50℃ 40s, 72℃ 1min, 35cycles; 72℃ 10min	8%	30%—60%
氨氧化细菌 Ammonia-oxidizing bacteria	巢室第一步 First PCR round β -AMOf (5'-TGGGGRATAACGCAYCGAAAG-3'), β -AMOr (5'-AGACTCCGATCCGGACTACG-3') ^[17]	94℃ 5min; 94℃ 1min, 65℃ 1min, 72℃ 1min, 20cycles; 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 1min, 12cycles; 72℃ 10min	6%	30%—60%
	巢室第二步 Second PCR round CTO189f-GC (5'-CCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGCACGGGGAGRAAAGYAGGGGATCG-3'), CTO654r (5'-CTAgCYTTgTAgTTTCAAACgC-3') ^[18]	94℃ 5min; 94℃ 1min, 65℃ 1min, 72℃ 1min, 20cycles; 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 1min, 12cycles; 72℃ 10min		

(3) 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

采用 D-Code system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) 对 PCR 反应产物进行 DGGE 分析。聚丙烯酰胺凝胶浓度和变性梯度见表 2, 上样量为 $40\mu\text{l}$, 运行条件是: $1 \times \text{TAE}$ 电泳缓冲液, 200V, 5h。电泳完毕后, 使用 GeneFinder (BIO-V) 染料将凝胶染色 45min。采用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统观察样品的电泳条带并拍照, 条带密度由该软件自动算出。

1.4 数据处理

实验数据用 Microsoft Excel 2003 及 SPSS13.0 统计软件处理。

PCR-DGGE 图谱采用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件分析,由系统依据戴斯系数 C_s (Dice coefficient) 按照非加权成对算术平均法 (UPGMA) 对所有土壤样品进行聚类分析:

$$C_s = 2j / (a + b)$$

式中, 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,用它可以对 DGGE 图谱中各泳道样品间的相似性进行比较;

根据每种土壤在 DGGE 图谱上的条带信息,计算 Shannon-Wiener 指数 (H)、丰富度 (S) 和均匀度 (E_H):

$$H = - \sum p_i \ln p_i, E_H = H / H_{\max} = H / \ln S$$

式中, p_i 为某一条带的强度与同泳道中所有条带总强度的比值, S 为某一泳道总的条带数。这 3 个指数可以用来评价土壤微生物群落的基因多样性。

2 结果与分析

2.1 施肥和土壤管理对土壤微生物生物量的影响

由表 3 可以看出,微生物生物量碳的含量介于 125.08—276.21 mg kg^{-1} 之间,微生物生物量氮的含量介于 14.27—43.33 mg kg^{-1} 之间,二者变化规律大体一致。裸地的微生物生物量碳、氮含量较低,割草和休闲地则显著高于其它处理,农田处理除 CK 的微生物生物量碳、氮低于裸地外,其它处理均介于裸地和割草之间。在农田生态系统中,长期单施循环猪圈肥和长期单施化肥处理的微生物生物量碳、氮与不施肥处理相比均略有增加,而在施用化肥基础上配合养分循环再利用,微生物生物量碳、氮均显著提高。

2.2 施肥和土壤管理对土壤微生物多样性的影响

不同处理土样 DNA 的 PCR 产物经 DGGE 分离

后,其条带数、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。不同土样间既具有相同的公共条带,也有各自特有的条带,并且这些条带在亮度上也不相同^[10,19],说明 PCR-DGGE 技术能够区分不同土地利用方式下土壤细菌、真菌和氨氧化细菌的基因多样性,是一种有效的微生物群落分析方法。

2.2.1 施肥和土壤管理对土壤细菌多样性的影响

DGGE 指纹图谱显示,代表不同细菌种类的条带离散分布,处理间条带类型的差异说明不同施肥和土壤管理之间细菌群落结构存在差异,图中空心圆点代表的条带是裸地、割草和休闲处理有而农田处理所没有的,实心圆点代表的条带裸地要比其它处理亮,一般认为条带的相对亮度代表某一特定微生物在群落中的相对丰度,裸地的条带数最多,相对丰度也最高。总体而言,不同处理间具有基本相似的细菌谱带类型,大多数条带为所有土壤共有,说明供试土壤之间存在很大一部分共有细菌类型 (1-a)。各处理的细菌多样性均较高 (表 4),聚类分析 (UPGMA) 显示 (图 1-b),割草和休闲处理为一类,其它处理归为一类,其中 CK 和 M 聚为一类, NPK、NPK + M 和裸地为一类。

2.2.2 施肥和土壤管理对土壤真菌多样性的影响

从图 2-a 可以看出,不同的施肥和土壤管理对土壤中真菌的分布产生了很大的影响,三角符号标出了一些差别较为明显的条带,实心三角所示条带仅出现在休闲和割草处理中。施肥提高了真菌条带数,但化肥或循环猪圈肥处理条带位置存在差异, NPK 处理的条带在 NPK + M 处理中均存在,而 M 处理的条带在 NPK + M 处理中有消失的现象 (空心三角所示),说明化肥可能会抑制某些真菌的生长。休闲地和割草地的真菌多样

表 3 施肥和土壤管理对土壤微生物生物量的影响

Table 3 The content of microbial biomass in soil with different treatments

处理 Treatments	MBC/(mg kg^{-1})	MBN/(mg kg^{-1})
CK	125.08c	14.27c
M	140.49c	15.75c
NPK	140.95c	16.02c
NPK + M	187.00b	30.09b
裸地 Bare	133.98c	15.95c
割草 Mowing	252.48a	31.14b
休闲 Fallow	276.21a	43.33a

表中不同的字母表示 5% 水平的差异显著性

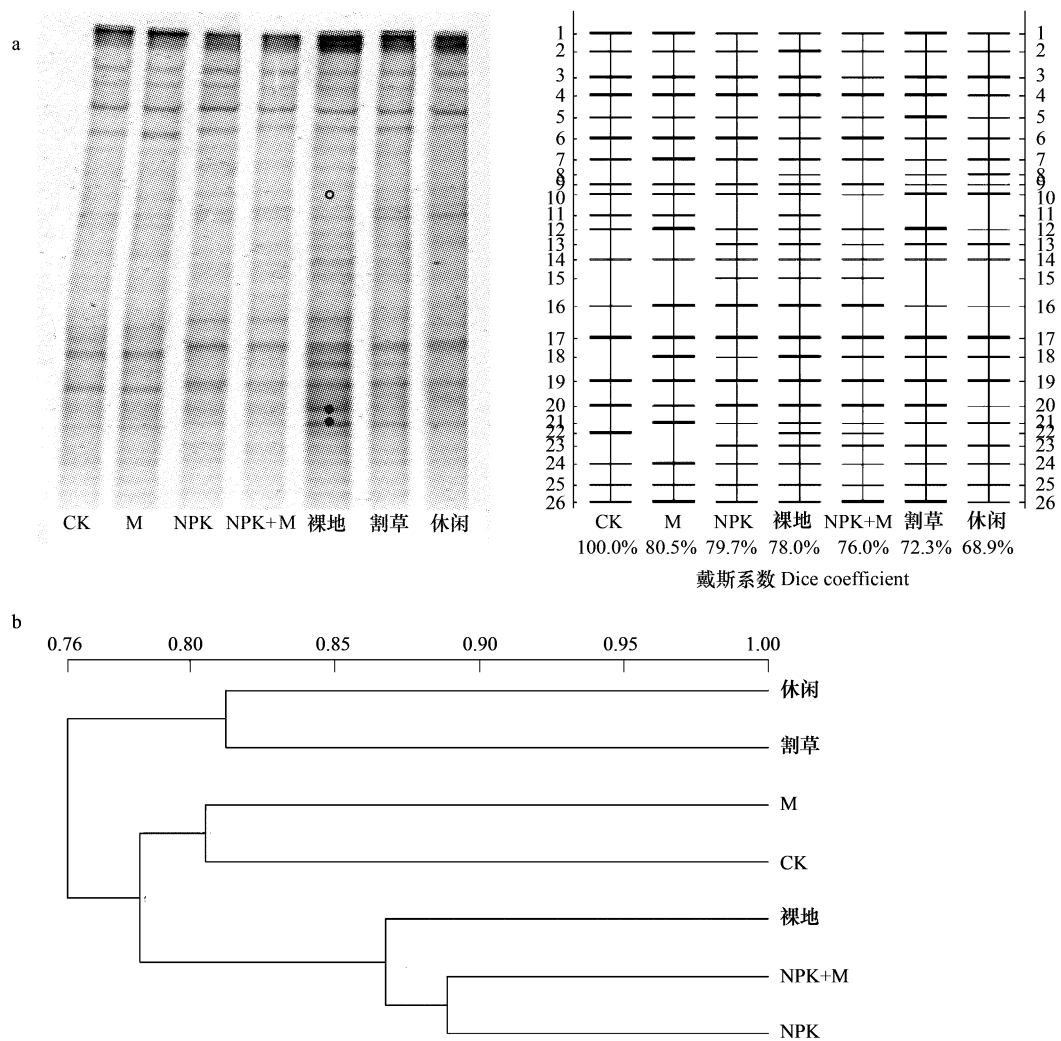


图1 土壤细菌的 PCR-DGGE 图谱(a)和聚类分析(b)
Fig.1 PCR-DGGE profile(a) and cluster analysis (UPGMA) (b) of bacteria

性高于农田处理,裸地亦高于不施肥处理,说明农业开垦降低了真菌多样性,而施肥尤其是有循环猪圈肥投入的处理则提高了真菌多样性(表4)。真菌的聚类分析(图2-b)结果与细菌较相似。

2.2.3 施肥和土壤管理对土壤氨氧化细菌多样性的影响

氨氧化细菌是土壤中重要的功能菌群,不同处理土壤氨氧化细菌 PCR 产物出现的带型存在差别(图3-a),长期施肥和土壤管理的不同显然导致了氨氧化细菌群落的改变,空心菱形代表的条带仅存在于休闲和割草处理,而空心矩形所代表的条带仅存在于 NPK + M 处理。CK 只有3条可见带,丰富度较低,单施循环肥和单施化肥处理与 CK 相比增加了几条条带,且增加的条带位置不同(实心菱形所示);NPK + M 处理的条带最多,有13条可见带。裸地、割草和休闲处理的氨氧化细菌多样性要高于 CK、M 和 NPK 处理,说明农业开垦降低了氨氧化细菌多样性,而施肥提高了氨氧化细菌的多样性,其中 NPK + M 效果最明显。聚类分析(图3-b)将供试土壤分为两大类群,CK、M 和 NPK 处理为一类,而 NPK + M 处理的氨氧化细菌多样性很高,与未经农业耕作的3个处理较为相似。

3 讨论

3.1 施肥和土壤管理对土壤微生物生物量的影响

试验结果表明,裸地的微生物生物量碳、氮较低,割草和休闲地则显著高于其它处理。休闲处理地表植被

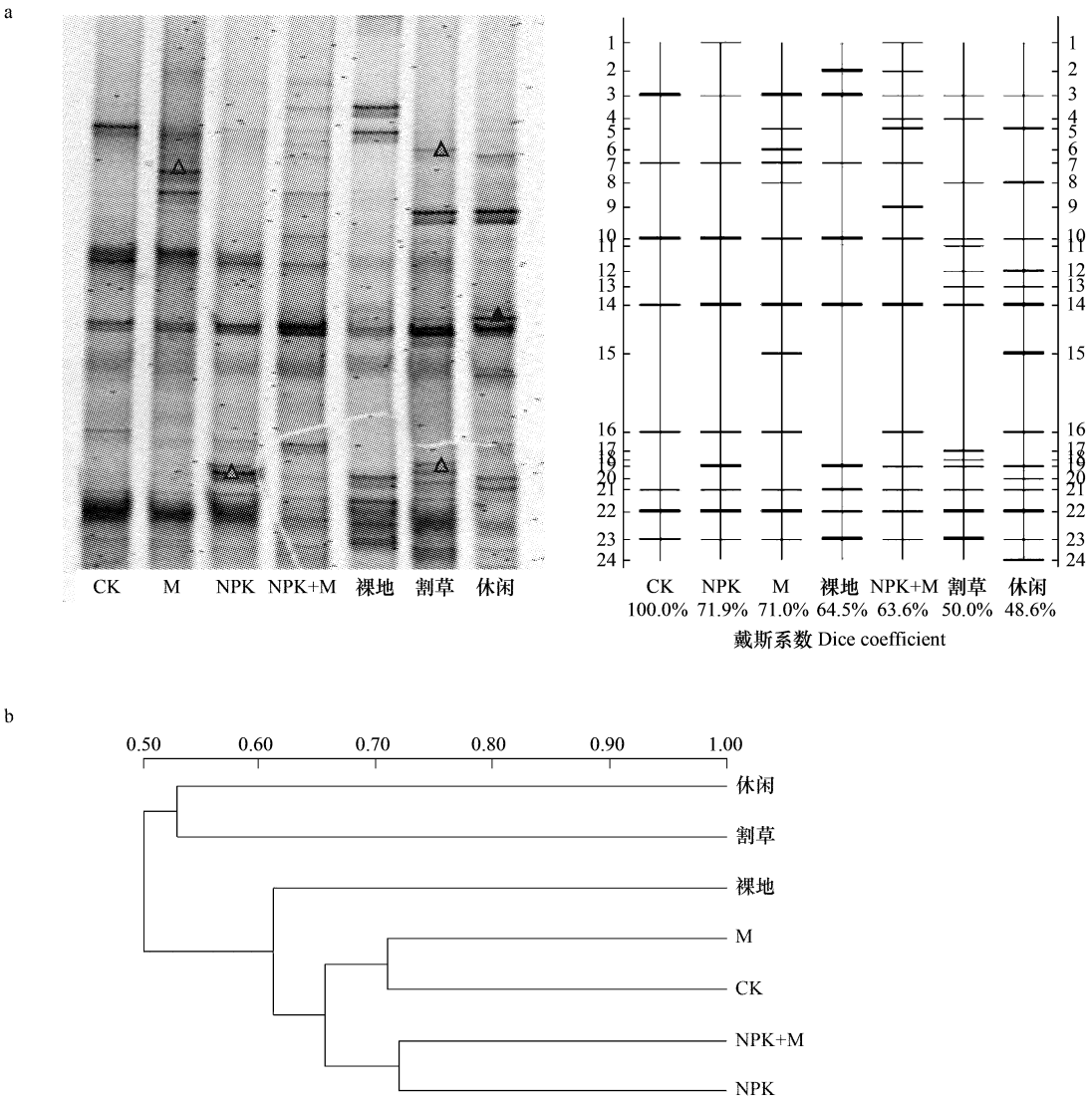


图2 土壤真菌的 PCR-DGGE 图谱(a)和聚类分析(b)
Fig.2 PCR-DGGE profile(a) and cluster analysis (UPGMA)(b) of fungi

表 4 土壤微生物群落基因多样性指数

Table 4 Genetic diversity indices of soil microbe communities

处理 Treatments	细菌 Bacteria			真菌 Fungi			氨氧化细菌 Ammonia-oxidizing bacteria		
	多样性指数 Diversity index	丰富度 Richness	均匀度 Evenness	多样性指数 Diversity index	丰富度 Richness	均匀度 Evenness	多样性指数 Diversity index	丰富度 Richness	均匀度 Evenness
CK	2.9913	20	0.9985	2.0711	8	0.9960	1.0983	3	0.9998
M	3.0404	21	0.9987	2.4802	12	0.9981	1.3857	4	0.9996
NPK	3.1290	23	0.9979	2.2902	10	0.9946	1.7880	6	0.9979
NPK + M	3.1746	24	0.9989	2.6310	14	0.9969	2.5616	13	0.9987
裸地 Bare	3.2518	26	0.9981	2.1891	9	0.9963	2.0710	8	0.9959
割草 Mowing	3.1320	23	0.9989	2.6297	14	0.9964	2.1919	9	0.9976
休闲地 Fallow	3.1314	23	0.9987	2.6989	15	0.9966	2.2989	10	0.9984

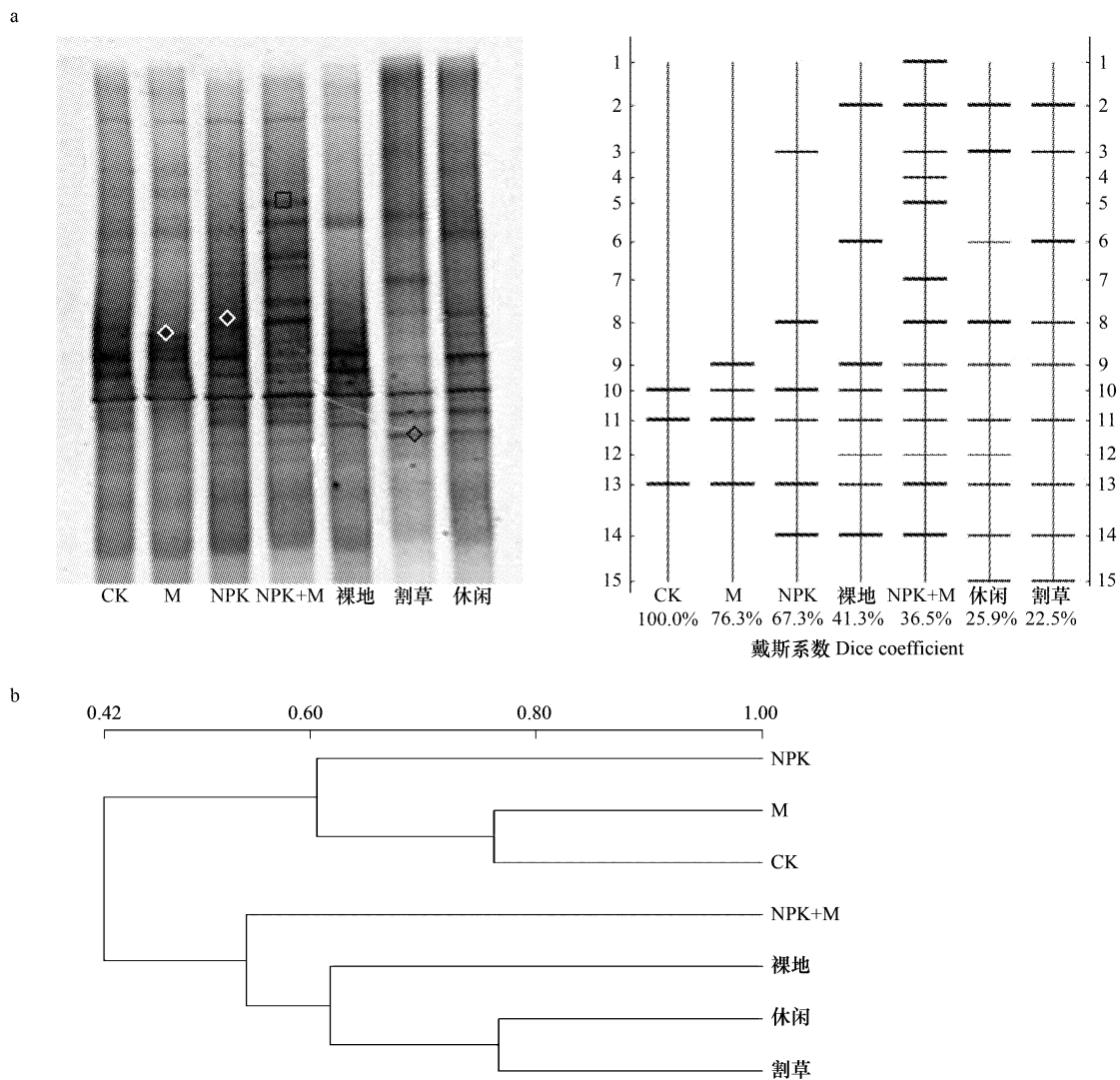


图3 土壤氨氧化细菌的 PCR-DGGE 图谱(a)和聚类分析(b)

Fig. 3 PCR-DGGE profile(a) and cluster analysis (UPGMA)(b) of ammonia-oxidizing bacteria

丰富,每年归还土壤的有机物料较多,有利于土壤微生物的繁殖发育,导致土壤微生物生物量较高^[20]。割草处理虽然移出了地上生物量,但地下生物量对土壤有机质的积累仍起着重要作用,且土壤未经翻耕,不扰动土层,表层有机质较丰富^[21],因此,其微生物生物量虽低于休闲地,但显著高于其它处理。王金华等的研究结果也表明,自然恢复地的微生物生物量要高于种植作物的处理^[22]。

在农田生态系统中,NPK + M 处理微生物生物量碳、氮最高,M 和 NPK 处理与 CK 相比亦略有增加。长期施用循环有机肥虽然有利于土壤团聚体的形成并且带入了一部分微生物,但每年只有 80% 收获产品经喂饲-堆腐后以猪圈肥形式返回,并无外界养分输入,养分循环通量不能满足作物的增产生长,导致产量呈下降趋势^[23],返还的养分也呈递减趋势,因此微生物生物量碳、氮较低。长期施用化肥虽然增加了养分投入,但破坏了土壤团聚体,使土壤微生物的生命活动减弱^[24],因此微生物生物量也不高。而在施用化肥基础上配合养分循环再利用,不仅提供了充足的养分,而且改善了土壤的物理性状^[25],为微生物的生长繁殖提供了良好的条件,因此微生物生物量呈现较高值。Bhattacharyya 等研究表明,施肥能增加土壤微生物生物量,其中化肥和有机肥配施效果最显著^[26]。刘文娜等也认为,有机肥能提高土壤微生物生物量碳水平,化肥在一定程度上也能够增加微生物生物量碳^[27]。

3.2 施肥和土壤管理对土壤细菌群落的影响

裸地处理近 20a 无肥料和有机物输入,细菌多样性却最高,其原因可能有以下几点:(1)严酷的环境和食物短缺可能迫使微生物转入休眠状态而并未损失基因多样性^[24];(2)一年中不下数十次铲除地面草苗,虽然每次铲地后形成的死根量有限,但一年中有数十次草苗的死根归还土壤,推测其总量仍相当可观,并且一定程度的干扰有利于增加细菌多样性;(3)裸地虽然地上生物量很低,但其土壤并未经农业耕作,这也是其保持土壤微生物多样性的原因之一。钟文辉等研究表明,农田邻近的未开垦荒地土壤肥力水平很低,但细菌多样性却很高^[11]。孟庆杰的试验结果也证明裸地的细菌多样性要高于农田^[28]。

总体而言,绝大多数 16S rDNA 条带在所有处理中都有分布,所指示微生物稳定、不易受土壤管理措施的影响。从戴斯指数来看,不同处理土壤间细菌的相似性很高,均高于 70%,施肥和土壤管理没有显著改变土壤细菌结构。很多研究表明,土壤类型比施肥方式^[29]和土壤管理^[30-31]对细菌结构的影响大,在相似的土壤类型下,施肥和土壤管理对细菌群落结构没有明显的影响。Gelsomino 等^[32]对两种粉沙壤土和 15 种其它土壤的研究也表明相同的土壤具有同样的细菌种群。但是也有试验结果显示,长期施肥会对土壤细菌结构产生影响。Wei 等认为,长期施用化肥会增加细菌多样性,而长期施用有机肥影响较小^[33]。Chu 则发现,长期施用化肥不会对细菌结构产生影响,而长期施用有机肥会增加土壤细菌多样性,并且认为有机肥处理中增加的细菌并非来源于肥料本身,而是有机肥促进了土壤中土著菌种的增长^[34]。施肥和土壤管理可以直接或间接地影响土壤物理、化学和生物特性,长期影响可能会导致土壤微生物环境的改变^[33],从而对土壤微生物群落结构产生影响。Mäder 等发现,施肥改变了土壤 pH 值^[35],而 van Diepeningen 等在荷兰对长期有机肥施用下土壤物理化学性状进行了分析,没有发现很大的 pH 变化^[36],这可能是导致目前结果差异的主要原因。本试验地属于潮棕壤,长期施肥和土壤管理并未明显改变土壤质地^[19],因此细菌结构变化不明显。

3.3 施肥和土壤管理对土壤真菌群落的影响

虽然一些真菌确定会引起植物疾病,但土壤真菌仍然在碳循环、腐殖质分解、减少和抑制植物疾病、稳定土壤团聚体和产生 N₂O 方面起着重要的作用^[37]。

试验结果显示,施肥和土壤管理显著改变了土壤真菌结构。农业开垦降低了真菌多样性,而施肥提高了真菌多样性。化肥和有机肥增加的真菌类型不同,且有机肥增加的条带要多于化肥。M 处理的条带在 NPK + M 处理中有消失的现象,说明长期施用猪圈肥可能促进了土壤中某类真菌的生长,而长期施用化肥则抑制了这类真菌。真菌聚类并不比细菌聚类紧密,说明施肥和土壤管理对真菌的影响比细菌大,与 Wakelin 等的研究结果相一致^[9]。Postma 等的研究结果也显示,同一农场的两块地之间细菌差异是很小的,而真菌则有较大的变动^[38]。因此,真菌对土壤环境的变化比细菌更敏感^[39]。许多研究证明,土壤类型是影响细菌的最主要因素,而土壤管理是影响真菌的最主要因素^[40]。但也有试验结果显示,长期施肥影响了细菌结构而没有影响真菌结构^[41]。目前有关施肥和土壤管理对土壤微生物多样性的影响报道存在矛盾之处,这可能与施肥方式和施用时间、土壤类型和利用方式等因素有关。

真菌的聚类分析结果与细菌相似,土壤管理措施比施肥对细菌和真菌影响大,割草和休闲地未经翻耕等农业措施,保持了较高的微生物多样性^[42]。Sall 等比较了休闲地和耕作土壤的微生物特性,结果表明,自然土壤的微生物活性和多样性要高于耕作地^[39]。施肥处理中,M 处理与 CK 的群落结构相似,NPK 和 NPK + M 相似,与 Sun 等的研究结果一致^[8, 33]。

3.4 施肥和土壤管理对土壤氨氧化细菌群落的影响

氨氧化菌难以人工培养,在很大程度上阻碍了人们对其生理、生态学的研究^[43]。在以往的培养试验中,施肥没有引起氨氧化细菌群落的变化^[29]。而本试验 DGGE 结果显示,施肥和土壤管理均影响了氨氧化细菌群落结构,与 Mendum 的研究结果相符^[44]。

农田土壤的氨氧化细菌结构与自然土壤明显不同,说明农业耕作改变了氨氧化细菌的群落结构。长期施肥增加了土壤氨氧化细菌的多样性,且化肥和循环猪圈肥增加的类群不同。化肥处理的氨氧化细菌多样性略

高于循环猪圈肥处理,说明长期施用化肥对氨氧化细菌的影响要比循环猪圈肥明显。Chu 等的研究结果也显示,长期施用氮肥会增加土壤硝化能力和改变土壤氨氧化细菌群落,并且矿质氮肥的氨氧化细菌多样性要高于有机肥^[45]。Innerebner 则认为,长期堆肥处理的土壤氨氧化细菌多样性要比化肥处理高^[46]。另有研究显示,猪粪的用量对土壤氨氧化种群有影响,亚硝化螺菌在所有处理中均有发现,而亚硝酸细菌仅在施用高量猪粪处理中才出现^[47],这可能除了有机肥对土壤理化性质的改善有关外,还与氮素供应量有关。本研究中,化肥配施循环猪圈肥不仅改善了土壤环境,而且提供了丰富的氮素,因此极大地提高了氨氧化细菌多样性,与辜运富等的研究结果一致^[48]。

4 结论

(1)施肥和土壤管理影响了土壤微生物生物量碳、氮,农业开垦降低了微生物生物量,而施肥可以增加微生物生物量,其中化肥配施循环猪圈肥效果最明显。

(2)长期的施肥和土壤管理措施没有显著改变土壤细菌群落结构,各处理中裸地的细菌多样性最高。

(3)长期施肥和土壤管理显著改变了土壤真菌结构,施肥增加了真菌多样性,其中化肥配施循环有机肥效果最明显。化肥和有机肥增加的真菌类型不同,且有机肥处理的真菌多样性高于化肥处理。

(4)长期施肥和土壤管理影响了氨氧化细菌的群落结构,化肥配施循环猪圈肥显著提高了氨氧化细菌的多样性,长期单施化肥对氨氧化细菌的影响比单施循环猪圈肥明显。

(5)真菌和氨氧化细菌对土壤环境的变化比细菌更敏感。因此,以后管理方式对微生物的研究应该细菌、真菌和功能微生物多方面综合进行。

(6)农业开垦降低了土壤微生物生物量和基因多样性,而施肥有利于生物量和多样性的保持。聚类分析结果显示,土壤管理措施较施肥对微生物群落的影响更明显。

致谢: DGGE 实验在中国科学院沈阳应用生态研究所分子生物学平台完成,特此致谢。

References:

- [1] Zhang H B, Duan C Q, Qu L H. Culture independent methods for studies on microbial ecology of soils. *Chinese Journal of Ecology*, 2003, 22 (5): 131-136.
- [2] Wang Y, Han B, Shi Z Q, Shao G Q, Jiang X D, Ning T Y, Jiao N Y, Li Z J. Effects of conservation tillage on soil microbial characters and soil enzyme activities. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2006, 20(4): 120-142.
- [3] Li X Y, Zhao B Q, Li X H, Li Y T, Sun R L, Zhu L S, Xu J, Wang L X, Li X P, Zhang F D. Effects of different fertilization systems on soil microbe and its relation to soil fertility. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(8): 1591-1599.
- [4] Smit E, Leeftang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S, Wernars K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2284-2291.
- [5] Buckley D H, Schmidt T M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, 2003, 5 (6): 441-452.
- [6] Peacock A D, Mullen M D, Ringelberg D B, Tyler D D, Hedrick D B, Gale P M, White D C. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(7/8): 1011-1019.
- [7] Stark C H, Condon L M, O'Callaghan M, Stewart A, Di H J. Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(6): 1352-1363.
- [8] Sun H Y, Deng S P, Raun W R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 5868-5874.
- [9] Wakelin S A, Colloff M J, Harvey P R, Marschner P, Gregg A L, Rogers S L. The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59(3): 661-670.
- [10] Luo H F, Qi H Y, Xue K, Zhang H X. A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8): 1570-1575.
- [11] Zhong W H, Cai Z C, Yin L C, Zhang H. The effects of the long-term application of inorganic fertilizers on microbial community diversity in rice-planting red soil as studied by PCR-DGGE. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(10): 4011-4018.

- [12] Joergensen R G. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k_{EC} value. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28(1): 25-31.
- [13] Joergensen R G, Mueller T. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k_{EN} value. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28(1): 33-37.
- [14] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, Ghiorse W C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11): 4715-4724.
- [15] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [16] Sandhu G S, Kline B C, Stockman L, Roberts G D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(11): 2913-2919.
- [17] McCaig A E, Embley T M, Prosser J I. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidizers. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 120(3): 363-367.
- [18] Kowalchuk G A, Stephen J R, de Boer W, Prosser J I, Embley T M, Woldendorp J W. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1489-1497.
- [19] Liu E K, Zhao B Q, Li X Y, Jiang R B, Hwat B S. Microbial C and N biomass and soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V3 fragment PCR products under different long-term fertilization systems. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 1079-1085.
- [20] Zhang F D, Xu J, Sun R L. Effects of long-term fertilization on soil microbial number//Zhang F D ed. *Soil biological evolution and safety evaluation in China*. Beijing: China Agricultural Press, 2006: 169.
- [21] Wright A L, Hons F M, Lemon R G, McFarland M L, Nichols R L. Microbial activity and soil C sequestration for reduced and conventional tillage cotton. *Applied Soil Ecology*, 2008, 38(2): 168-173.
- [22] Wang G H, Jin J, Han X Z, Liu J D, Liu X B. Effects of different land management practices on black soil microbial biomass C and enzyme activities. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(6): 1275-1280.
- [23] Yu W T, Zhang L, Yin X Y, Ma Q, Shen S M. Geographic differentiation of yield-increase efficiency caused by recycled nutrients in agro-ecosystems. *Transactions of the CSAE*, 2003, 19(6): 28-31.
- [24] Yu W T, Jiang Z S, Liu M, Zhao X. Effect of different land use patterns on soil microbial biomass carbon. *Chinese Journal of Soil Science*, 2008, 39(2): 282-286.
- [25] 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 Ecologica Sinica*, 2004, 24(12): 2818-2824.
- [26] Bhattacharyya R, Kundu S, Prakash V, Gupta H S. Sustainability under combined application of mineral and organic fertilizers in a rainfed soybean-wheat system of the Indian Himalayas. *European Journal of Agronomy*, 2008, 28(1): 33-46.
- [27] Liu W N, Wu W L, Wang X B, Wang M X, Mao W F. Effects of soil type and land use pattern on microbial biomass carbon. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2006, 12(3): 406-411.
- [28] Meng Q J, Xu Y L, Li C J, Han X Z, Pei X C. Effects of different fertilization and land use history on the bacterial diversity in black soils. *Soybean Science*, 2008, 27(3): 480-486.
- [29] Enwall K, Nyberg K, Bertilsson S, Cederlund H, Stenstrom J, Hallin S. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39(1): 106-115.
- [30] Liu B, Tu C, Hu S J, Gumpertz M, Ristaino J B. Effect of organic, sustainable, and conventional management strategies in grower fields on soil physical, chemical, and biological factors and the incidence of Southern blight. *Applied soil Ecology*, 2007, 37(3): 202-214.
- [31] Girvan M S, Bullimore J, Pretty J N, Osborn A M, Ball A S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1800-1809.
- [32] Gelsomino A, Keijzer-Wolters A C, Cacao G, van Elsland J D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Method*, 1999, 38(1/2): 1-15.
- [33] Wei D, Yang Q, Zhang J Z, Wang S, Chen X L, Zhang X L, Li W Q. Bacterial community structure and diversity in a black soil as affected by long-term fertilization. *Pedosphere*, 2008, 18(5): 582-592.
- [34] Chu H, Lin X G, Fujii T, Morimoto S, Yagi K, Hu J, Zhang J B. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39(11): 2971-2976.
- [35] Mäder P, Fließbach A, Dubois D, *et al.* Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*, 2002, 296(5573): 1694-1697.
- [36] van Diepeningen A D, de Vos O J, Korthals G W, van Bruggen A H C. Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Applied Soil Ecology*, 2006, 31(1/2): 120-135.
- [37] Gomes N C M, Fagbola O, Costa R, Rumjanek N G, Buchner A, Mendona-Hagler L, Smalla K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7): 3758-3766.

- [38] Postma J, Schilder M T, Bloem J, van Leeuwen-Haagsma W K. Soil suppressiveness and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(9): 2394-2406.
- [39] Sall S N, Masse D, Ndour N Y B, Chotte J L. 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.
- [40] Wakelin S A, Macdonald L M, Rogers S L, Gregg A L, Bolger T P, Baldock J A. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(3): 803-813.
- [41] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35(3): 453-461.
- [42] Ibekwe A M, Kennedy A C, Frohne P S, Papiernik S K, Yang C H, Crowley D E. Microbial diversity along a transect of agronomic zones. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39(3): 183-191.
- [43] Gu Y F, Zhang X P, Tu S H. Application of denaturing gradient gel electrophoresis to the study of soil microbial diversity. *Soils*, 2008, 40(3): 344-350.
- [44] Mendum T A, Hirsch P R. Changes in the population structure of β -group autotrophic ammonia oxidising bacteria in arable soils in response to agricultural practice. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34(10): 1479-1485.
- [45] 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.
- [46] Innerebner G, Knapp B, Vasara T, Romantschuk M, Insam H. Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost-treated soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(5): 1092-1100.
- [47] Hastings R C, Ceccherini M T, Miclaus N, Saunders J R, Bazzicalupo M, McCarthy A J. Direct molecular biological analysis of ammonia oxidizing bacteria populations in cultivated soil plots treated with swine manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 23(1): 45-54.
- [48] Gu Y F, Zhang X P, Tu S H, Sun X F, Lindström K. Effect of long-term fertilization on nitrification and nitrobacteria community in a purple paddy soil under rice-wheat rotations. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(5): 2123-2130.

参考文献:

- [1] 张汉波, 段昌群, 屈良鹤. 非培养方法在土壤微生物生态学研究中的应用. *生态学杂志*, 2003, 22(5): 131-136.
- [2] 王芸, 韩宾, 史忠强, 邵国庆, 江晓东, 宁堂原, 焦念元, 李增嘉. 保护性耕作对土壤微生物特性及酶活性的影响. *水土保持学报*, 2006, 20(4): 120-142.
- [3] 李秀英, 赵秉强, 李絮花, 李燕婷, 孙瑞莲, 朱鲁生, 徐晶, 王丽霞, 李小平, 张夫道. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系. *中国农业科学*, 2005, 38(8): 1591-1599.
- [10] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 张洪勋. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用. *生态学报*, 2003, 23(8): 1570-1575.
- [11] 钟文辉, 蔡祖聪, 尹力初, 张鹤. 用 PCR-DGGE 研究长期施用无机肥对种稻红壤微生物群落多样性的影响. *生态学报*, 2007, 27(10): 4011-4018.
- [19] 刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 姜瑞波, Hwat B S. 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.
- [20] 张夫道, 徐晶, 孙瑞莲. 长期施肥对土壤微生物特性的影响 // 张夫道主编. 中国土壤生物演变及安全评价. 北京: 中国农业出版社, 2006: 169.
- [22] 王光华, 金剑, 韩晓增, 刘居东, 刘晓冰. 不同土地管理方式对黑土土壤微生物量碳和酶活性的影响. *应用生态学报*, 2007, 18(6): 1275-1280.
- [23] 宇万太, 张璐, 殷秀岩, 马强, 沈善敏. 农业生态系统养分循环再利用作物产量增益的地理分异. *农业工程学报*, 2003, 19(6): 28-31.
- [24] 宇万太, 姜绍, 柳敏, 赵鑫. 不同土地利用方式对土壤微生物量碳的影响. *土壤通报*, 2008, 39(2): 282-286.
- [25] 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.
- [27] 刘文娜, 吴文良, 王秀斌, 王明新, 毛文峰. 不同土壤类型和农业用地方式对土壤微生物量碳的影响. *植物营养与肥料学报*, 2006, 12(3): 406-411.
- [28] 孟庆杰, 许艳丽, 李春杰, 韩晓增, 裴希超. 不同施肥/土地利用方式对黑土细菌多样性的影响. *大豆科学*, 2008, 27(3): 480-486.
- [43] 辜运富, 张小平, 涂仕华. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术在土壤微生物多样性研究中的应用. *土壤*, 2008, 40(3): 344-350.
- [48] 辜运富, 张小平, 涂仕华, 孙锡发, Lindström K. 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. *生态学报*, 2008, 28(5): 2123-2130.