

长期施用不同肥料塿土 PLFA 指纹特征

郭芸¹, 孙本华¹, 王颖¹, 魏静¹, 高明霞², 张树兰¹, 杨学云¹

(¹西北农林科技大学资源环境学院/农业部西北植物营养与农业环境重点实验室, 陕西杨凌 712100; ²西北农林科技大学水利与建筑工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】土壤微生物群落结构的组成与活性的变化是衡量土壤肥力的重要指标, 研究长期不同施肥和土壤管理方式对塿土微生物群落结构的影响, 对于指导塿土施肥和土壤管理, 实现农田可持续利用具有重要意义。

【方法】以陕西杨凌“国家黄土肥力与肥料效益监测基地”长期肥料定位试验为基础, 运用磷脂脂肪酸标记法(PLFA), 研究了塿土长期不同施肥及土地利用方式下土壤微生物群落结构及其与土壤理化性质的关系。处理包括: 长期不施肥(CK)、单施氮肥(N)、长期配合施用氮钾(NK)、磷钾(PK)、氮磷(NP)、有机肥和氮磷钾(MNPK)以及长期休闲(FL)和撂荒(AB)。【结果】与对照相比, MNPK、NP和撂荒处理土壤总PLFA分别增加218.8%、73.9%和74.3%, 细菌分别增加188.3%、80.8%和82.6%, 真菌分别增加了315.8%、111.5%和167.0%, 放线菌分别增加了23.7%、21.3%和16.3%, 同时也显著增加了真菌/细菌比; N、NK和PK土壤总PLFA、细菌、真菌差异不显著, 但PK显著降低放线菌的含量; 与农田施肥相比, 休闲和撂荒显著降低G⁺和G⁻含量。多样性指数结果表明, 长期有机无机配施明显提高土壤微生物群落的Shannon-Winner多样性指数、Simpson优势度和Pielou均匀度指数, 撂荒和NP也能显著增加Shannon-Winner多样性指数和Pielou均匀度指数, 而长期休闲处理均明显降低了这些指数。主成分分析表明, MNPK、NP、撂荒和休闲土壤微生物群落结构发生较大变化; MNPK显著提高G⁺(18:1ω5c, cy19:0ω7c)、细菌(16:0, 10Me22:0饱和脂肪酸)及真核生物(18:3ω6c, 16:3ω6c, 22:2ω6c)的多度值, 撂荒(AB)和NP显著提高细菌(15:0, 18:0, 22:0, 17:0饱和脂肪酸)的多度值。RDA分析表明, 土壤理化性质对微生物菌群影响的重要性依次为有机质>全氮>含水量>速效磷>pH>容重>速效钾, 这些理化因子均是微生物生长的关键因子。【结论】长期有机无机肥配施、氮磷配施和撂荒提高了土壤微生物群落结构多样性, 从而改善了土壤生态环境, 而长期休闲不利于土壤生态系统的稳定和健康。

关键词: 塿土; 长期施肥; 土壤管理; 微生物群落结构; 磷脂脂肪酸

PLFA Fingerprint Characteristics of An Anthropogenic Loess Soil Under Long-Term Different Fertilizations

GUO Yun¹, SUN BenHua¹, WANG Ying¹, WEI Jing¹, GAO MingXia², ZHANG ShuLan¹, YANG XueYun¹

(¹College of Natural Resources and Environment, Northwest A & F University/Key Laboratory of Plant Nutrition and the Agri-Environment in Northwest China, Ministry of Agriculture, Yangling 712100, Shaanxi; ²College of Water Resources and Architectural Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract: 【Objective】 The changes of soil microbial community structure and activity are the key indicators for evaluating soil fertility. It is important to study the effects of long-term different fertilizations and soil managements on soil microbial community structure for fertilization and soil management, and even on the sustainable utilization of farmland of the anthropogenic loess soil. 【Method】 This research was based on the long-term trial of “National Monitoring Base of Soil Fertility and Fertilizer

收稿日期: 2016-06-20; 接受日期: 2016-11-11

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201203030)、陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2015JM4130)、中央高校基本科研创新项目(QN2012038)、高等学校学科创新引智计划(B12007)

联系方式: 郭芸, E-mail: 857606550@qq.com. 通信作者孙本华, E-mail: sunbenhua@126.com

Efficiency on Loess Soil” in Yangling, Shaanxi province. Soil samples were collected from treatments as farmland without fertilization (CK), farmland with N fertilizer (N), N and K fertilizer (NK), P and K fertilizer (PK), N and P fertilizer (NP), and NPK plus cattle manure (MNPK), fallow land (FL) and abandoned land (AB). The effects of long-term fertilization and soil management on soil microbial community structure and its relationship with basic soil physio-chemical properties were studied by PLFA and routine analysis. **【Result】** Compared to CK, total PLFAs, bacteria, fungi, and actinomycetes PLFAs of MNPK, NP and AB were increased by 218.8%, 73.9% and 74.3%, 188.3%, 80.8% and 82.6%, 315.8%, 111.5% and 167.0%, 23.7%, 21.3% and 16.3%, respectively, and also the fungi/bacteria ratio (F/B) was significantly increased. Total PLFAs, bacteria, fungi of N, NK and PK were not significantly different, but PK reduced actinomycetes PLFAs significantly. Compared to farmland soil, FL and AB inhibited the growth of G^+ and G^- significantly. Shannon-Winner richness index (H), Simpson dominance index (S), Pielou evenness index (J) and richness index (S) were all the highest in MNPK, and the lowest in FL. AB and NP could also increase Shannon-Winner richness index (H) and Pielou evenness index (J) significantly. The result of principal component analysis showed that MNPK, AB, NP and FL could significantly change soil microbial community structure. MNPK could increase the abundance value of G^- (18:1 ω 5c, cy19:0 ω 7c), (16:0, 10Me22:0 saturated fatty acid) and eukaryot (18:3 ω 6c, 16:3 ω 6c, 22:2 ω 6c). AB and NP could also increase the abundance values of bacteria (15:0, 18:0, 22:0, 17:0 saturated fatty acid). The result of redundancy analysis (RDA) showed that the importance of soil properties for microbial growth in the order were as organic matter > total nitrogen > soil moisture > Olsen-P > pH > bulk density > available-K, which are all important for microbial growth. **【Conclusion】** Farmland with NPK fertilizer plus manure, NP fertilizer and abandoned land could improve the diversity of soil microbial community structure, thus improving the ecological environment of soil, while long-term absolute bare fallow had a negative impact on soil health.

Key words: anthropogenic loess soil; long-term fertilization; soil management; microbial community structure; PLFA

0 引言

【研究意义】土壤微生物是土壤生物区系中最重要的功能组分,参与土壤有机质的分解及腐殖质的形成等过程^[1],在土壤生态系统中发挥着重要作用,可用来反映土壤质量的变化。土壤质量的变化是一个相对缓慢的过程,期间环境条件也在不断地发生难以预测的变化,因此,长期农田肥料试验对研究土壤质量演化具有重要价值^[2]。土壤微生物能在土壤有机质变化被测度之前对土壤的变化提供可靠的预警,是表征土壤质量变化的敏感指标之一^[3-4]。随着研究的广泛、深入,有很多方法被引入到土壤微生物研究中,其中,PLFA 生物标记方法灵敏且具备快速、直接、有效地提供较为客观可靠的土壤微生物含量、组成及群落信息等优点而被广泛运用^[5-6]。**【前人研究进展】**张焕军等^[7]在潮土上的研究发现,有机肥的长期施用提高了土壤微生物 PLFA 总量和细菌的生物量,却抑制了放线菌的生长;GUNNAR 等^[8]对瑞典饱和始成土的研究指出,与长期单施无机肥相比,长期施用有机肥料会增加土壤总 PLFA 含量,却对真菌生物量无影响,pH 会抑制革兰氏阴性菌的生长;KAMAA 等^[9]的研究发现长期施用有机肥可提高腐殖质黏缔土(humic nitisol)真菌和细菌的多样性;夏昕等^[10]认为有机肥施用会显著增加红壤性水稻土细菌和放线菌的生物量。尽管应用 PLFA 方法对不同土壤微生物群落结构

的研究已较多,但结果不尽相同,在不同土壤类型和气候条件下的进一步工作仍具有重要意义。**【本研究切入点】**塿土是陕西省关中平原的主要土壤类型,对其土壤微生物群落功能的研究已有一些报道^[11-12],但 PLFA 研究报道较少。本文采用 PLFA 方法研究不同施肥和土壤管理方式土壤微生物群落的变化,对于评价施肥对关中地区塿土土壤质量的影响具有重要意义。**【拟解决的关键问题】**本研究以陕西杨凌国家黄土肥力与肥料效益监测基地的长期肥料定位试验为平台,探讨长期施用化肥、有机无机配施及不同土壤管理方式(休闲和撂荒)对土壤微生物群落结构产生的影响,为合理的肥料管理措施制定及土壤可持续利用提供决策依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地点与试验设计

试验在“国家黄土肥力与肥料效益监测基地”进行,位于陕西杨凌示范区五泉镇(34°17'51"N, 108°00'48"E),海拔 516 m,年平均气温 13℃,≥10℃积温 4 196.2℃,年均降水量 550—600 mm,主要集中在 7—9 月,年均蒸发量 993 mm,无霜期 184—216 d。供试土壤为土垫旱耕人为土,黄土母质。

长期试验始于 1990 年秋,共设 13 个处理,本研究选用其中 8 个处理,即:(1)长期不施肥(CK);(2)长期施氮肥(N);(3)施氮钾肥(NK);(4)

施磷钾肥 (PK); (5) 施氮磷肥 (NP); (6) 有机肥与氮磷钾肥配施 (MNPK); (7) 休闲 (FL), 与农田同样耕作, 不施肥, 期间及时除草, 基本保持没有植被生长; (8) 撂荒 (AB), 不施肥, 自然生长荒草。其中撂荒和休闲的小区面积为 98 m^2 ($7 \text{ m} \times 14 \text{ m}$), 其余处理的小区面积均为 196 m^2 ($14 \text{ m} \times 14 \text{ m}$), 各处理均单次重复。施肥处理的种植制度实行当地普遍采用的冬小麦—夏玉米一年两熟制。冬小麦所有肥料于播种前一次施入, 氮肥用量为 $165.0 \text{ kg N} \cdot \text{hm}^{-2}$, 磷肥为 $132.0 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \cdot \text{hm}^{-2}$, 钾肥为 $82.5 \text{ kg K}_2\text{O} \cdot \text{hm}^{-2}$; 夏玉米于大喇叭口期结合中耕除草施入, 用量 $187.5 \text{ kg N} \cdot \text{hm}^{-2}$, $56.25 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \cdot \text{hm}^{-2}$, $93.75 \text{ kg K}_2\text{O} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。有机肥与氮磷钾配施处理, 有机肥仅小麦季施用, 总施氮量与其他无机肥处理相等, 有机肥氮: 无机肥氮=7: 3, 未考虑有机肥带入的磷钾量; 玉米季全部为无机肥。小麦生长期灌溉 1—2 次, 每次灌水量为 90 mm 左

右。玉米的灌溉根据降雨情况而定, 一般 2—3 次, 每次灌水量也为 90 mm 左右。

1.2 土壤样品的采集与处理

于 2013 年 6 月小麦收获后采集各处理 0—20 cm 耕层土样。采样时每小区采 9 点组成一个混合样品, 重复采集 3 次, 样品装入塑封袋并置于冰盒中运回实验室。新鲜样品剔除动植物残体, 过 2 mm 筛后分两部分, 一部分土样保存在 -80°C , 用于 PLFA 分析; 其余土样风干测定基本理化性状。

1.3 测定项目及方法

pH 用水浸提 (水土比为 1: 1) 法测定; 有机碳、全氮分别用重铬酸钾容量法、硫酸消煮-凯氏定氮法测定; 速效磷、速效钾分别用 NaHCO_3 浸提-钼锑抗比色法、 NH_4OAC 浸提-火焰光度法; 土壤水分含量用烘干法测定; 土壤容重测定采用环刀取土烘干称重法, 每个处理平均划分为 3 个区域, 作为 3 次重复 (表 1)。

表 1 供试土壤理化指标 (平均值)

Table 1 Properties of tested soils (Mean)

处理 Treatment	土壤有机质 SOM ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全氮 Total N ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	速效磷 Olsen-P ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	速效钾 Available K ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	pH	容重 Bulk density ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)
CK	12.85e	0.90e	1.90d	166.50h	8.19a	1.49b
N	14.54d	1.06d	2.60d	183.48f	8.18a	1.51a
NK	14.12d	1.02d	2.30d	393.53c	8.21a	1.47cd
PK	15.48d	1.02d	51.17b	402.76b	8.17a	1.46de
NP	18.64c	1.19c	39.20c	173.58g	8.08b	1.45e
MNPK	26.85a	1.73a	138.54a	424.10a	7.99c	1.40f
FL	15.10d	1.04d	4.48d	229.09e	8.16a	1.47cd
AB	19.98b	1.27b	3.28d	310.15d	7.99c	1.48bc

同一列数据后不同字母表示差异达 5% 显著水平。下同

Different lower-case letters mean significantly different between treatments at the 5% level in a same column. The same as below

土壤微生物磷脂脂肪酸 (PLFA) 的测定采用 BOSSIO 等^[13]的方法进行提取: 称取 3 g 冷冻干燥土样于 Teflon 试管中, 用柠檬酸缓冲溶液 (pH 4.0): 氯仿: 甲醇 (体积比为 0.8: 1: 2) 振荡提取总脂类, 经过 SPE 硅胶柱分离去除中性脂、糖脂, 从而得到磷脂, 碱性甲酯化后, 用 Agilent7890A 气相色谱仪分析 PLFA 的成分, 内标为正十九烷酸甲酯 (19: 0), 各成分脂肪酸通过 MIDI Sherlock 软件进行微生物的鉴定。

研究发现, 从土壤中直接提取磷脂类化合物的量, 可以准确表达微生物的生物量^[14] (表 2)。PLFA 的命名采用以下原则^[15]: X:Y ω Z(c/t), 其中: X 为碳原子

总数; Y 代表不饱和烯键的数目; ω 表示甲基末端; Z 为烯键或环丙烷链的位置, 前缀 a (anteiso) 和 i (iso) 分别代表支链的反异构和异构, cy 代表环丙基支链; 后缀 c 和 t 分别代表顺式和反式同分异构体; 10Me 表示 1 个甲基团在距分子末端第 10 个碳原子上。

1.4 数据处理

PLFA 测定的数据按公式 (1)、(2)、(3) 分别计算 Shannon-Winner 多样性指数 H、Simpson 优势度 D 和 Pielou 均匀度指数 J ^[19]。

$$\text{Shannon-Wiener 多样性指数}(H): H = -\sum P_i \ln P_i \quad (1)$$

$$\text{Simpson 优势度指数}(D): D = 1 / \sum P_i^2 \quad (2)$$

$$\text{Pielou 均匀度指数}(J): J = \sum P_i \ln P_i / \ln S \quad (3)$$

表 2 估算微生物生物量的脂肪酸

Table 2 The PLFAs used to evaluate the microbial biomass

微生物类群 Microbial community	磷脂脂肪酸标记 PLFA Markers	文献 Reference
细菌 饱和脂肪酸 Saturated Fatty Acid	14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0, 10Me22:0	[14-15]
Bacteria 革兰氏阳性菌 Gram-positive	i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i17:1 ω 9c, i22:0	[16]
革兰氏阴性菌 Gram-negative	16:1 ω 7c, 17:1 ω 8c, 18:1 ω 9c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 5c, cy19:0 ω 7c, 22:1 ω 5c	[16]
放线菌 Actinomycete	10Me17:1 ω 7c, 10Me18:0, 10Me16:0	[14-15,17]
真核生物 Eukaryot	18:3 ω 6c, 16:3 ω 6c, 22:2 ω 6c	[17]
真菌 Fungi	18:2 ω 6c	[18]
丛枝菌根真菌 AM Fungi	16:1 ω 5c	[18]

式中, P_i 为特征脂肪酸占该试验中总的特征脂肪酸个数比例, $P_i = N_i/N$, N_i 为处理 i 的特征脂肪酸个数, N 为该试验中总特征脂肪酸个数, S 为特征脂肪酸 i 在供测土样中出现的次数。

试验所得数据采用 SPSS19.0、CANOCO4.5 软件分别进行方差分析、主成分分析和冗余分析 (RDA 分析)。

2 结果

2.1 PLFA 总量

MNPK、NP 和撂荒 (AB) 处理土壤 PLFA 总量显著高于其他处理, 分别比 CK 土壤高 218.8%、73.9 和 74.3%; 休闲 (FL) 最低, 而 N、NK 和 PK 土壤 PLFA 总量与 CK 相似 (表 3)。

2.2 PLFA 指纹

撂土土壤微生物 PLFA 特征, 以细菌为主体 (9.44—29.78 nmol·g⁻¹), 其次为革兰氏阳性菌 (1.65—2.31 nmol·g⁻¹), 再次为革兰氏阴性菌 (1.07—2.62 nmol·g⁻¹), 真菌和放线菌最低。各土壤细菌 PLFA 变化趋势与 PLFA 总量变化趋势一致; MNPK、NP 和 AB 土壤真

菌含量显著高于其他土壤, 分别比 CK 高 315.5%、111.5% 和 165.6%, 而 N、NK 和 PK 土壤真菌含量与 CK 相似, FL 最低但与 CK 差异不显著; MNPK、NP 和 AB 土壤放线菌含量显著高于其他土壤, 分别比 CK 土壤高 23.7%、21.3% 和 16.3%, PK 和 FL 最低, 而 N 和 NK 土壤放线菌含量与 CK 土壤相近; MNPK 土壤 G⁺ 和 G⁻ 含量最高, NP 次之, AB 和 FL 最低, 而 N、NK 和 PK 土壤与 CK 相近 (表 3)。

由表 3 可见, MNPK 和 AB 处理土壤真菌/细菌比显著高于其他处理, NP 次之, FL 最低, 而 N、NK 和 PK 土壤真菌/细菌比与 CK 相近; FL 处理土壤 G⁺/G⁻ 显著高于其他处理, MNPK 和 NP 最低, 而 N、NK、PK 和 AB 与 CK 相近。

MNPK、NP 和 AB 的土壤微生物的 Shannon-Winner 多样性指数显著高于其他处理, N、NK 和 PK 次之, FL 与 CK 最小且显著低于其他处理。MNPK 土壤微生物的 Simpson 优势度指数显著高于其他处理, FL 最低, N、NP 和 AB 与 CK 相近。MNPK、NP 和 N 土壤微生物的 Pielou 均匀度指数显著高于其他处

表 3 不同施肥和土壤管理方式下土壤微生物 PLFA 含量 (平均值)

Table 3 Content of soil microbial PLFAs under different fertilizations and soil managements (Mean)

处理 Treatment	总磷脂脂肪酸 Total PLFA (nmol·g ⁻¹)	细菌 Bacteria (nmol·g ⁻¹)	真菌 Fungi (nmol·g ⁻¹)	放线菌 Actinomycete (nmol·g ⁻¹)	革兰氏阳性菌 Gram-positive (G ⁺)(nmol·g ⁻¹)	革兰氏阴性菌 Gram-negative (G ⁻)(nmol·g ⁻¹)	真菌/细菌 Fungi/ Bacteria	革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌 G ⁺ /G ⁻
CK	13.59c	10.33c	0.61de	0.80b	2.07c	1.74c	0.06bc	1.19bc
N	13.65c	10.35c	0.60de	0.82b	2.11c	1.77c	0.05c	1.20bc
NK	13.66c	10.30c	0.63de	0.84b	2.11c	1.78c	0.06bc	1.19bc
PK	13.62c	10.31c	0.64d	0.61c	2.12bc	1.73c	0.06bc	1.23b
NP	23.64b	18.68b	1.29c	0.97a	2.13b	2.37b	0.07b	0.90d
MNPK	43.31a	29.78a	2.53a	0.99a	2.31a	2.62a	0.08a	0.88d
FL	10.25d	9.44d	0.30e	0.60c	1.65e	1.07e	0.03d	1.54a
AB	23.67b	18.86b	1.62b	0.93a	1.84d	1.65d	0.08a	1.11c

理, AB、NK 和 PK 次之, FL 最低 (表 4)。

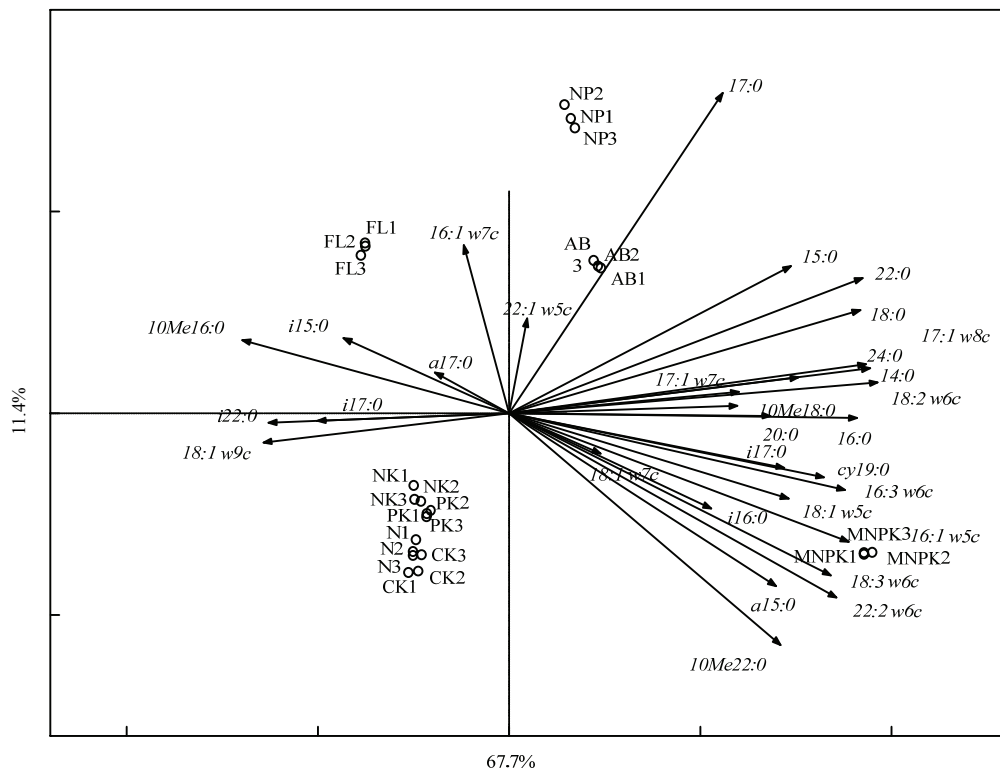
PCA 分析表明, N、NK 和 PK 土壤微生物群落结构与 CK 相似, 而 MNPK、NP、AB 和 FL 土壤微生物群落结构发生较大变化; MNPK 显著提高革兰氏阴

性菌 (18:1 ω 5c, cy19:0 ω 7c)、细菌 (16:0, 10Me22:0 饱和脂肪酸)及真核生物 (18:3 ω 6c, 16:3 ω 6c, 22:2 ω 6c) 的多度值, AB 和 NP 显著提高细菌 (15:0, 18:0, 22:0, 17:0 饱和脂肪酸) 的多度值 (图 1)。

表 4 不同施肥和土壤管理方式下土壤微生物多样性指数 (平均值)

Table 4 Soil microbial diversity indices under different fertilizations and soil managements (Mean)

处理 Treatment	多样性指数 Shannon-Winner Diversity Index (<i>H</i>)	优势度指数 Simpson Dominance Index (<i>D</i>)	均匀度指数 Pielou Evenness Index (<i>J</i>)
CK	2.408c	0.900b	0.779e
N	2.582b	0.903b	0.840a
NK	2.576b	0.888cd	0.811cd
PK	2.549b	0.886d	0.802d
NP	2.800a	0.896bc	0.832ab
MNPK	2.828a	0.915a	0.824bc
FL	2.424c	0.859e	0.784e
AB	2.799a	0.895bc	0.815cd



射线代表土壤微生物 PLFA, 圆圈代表处理, 每个处理后的数字 1、2、3 代表处理的 3 次重复, 处理之间的线段距离越短代表土壤微生物结构差异性越小, 反之越大
Rays represent soil PLFAs, circles represent treatments, the number 1, 2 and 3 after the treatments represent three replicates, the shorter the lines between treatments represent the smaller the soil microbial structure difference, vice versa

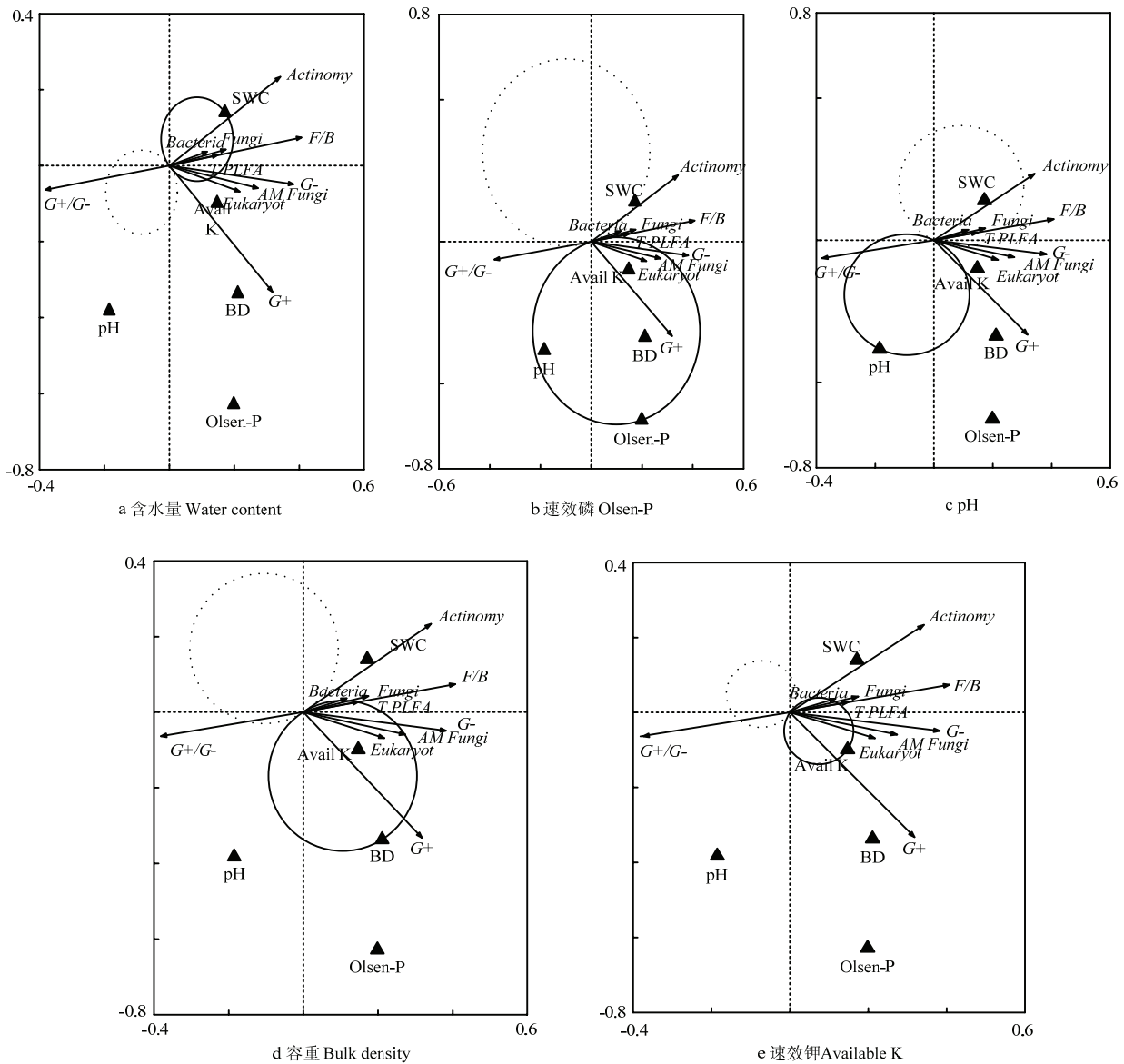
图 1 不同施肥和土壤管理方式下土壤微生物群落 PLFA 的主成分分析

Fig. 1 PCA of PLFAs of soil microbial communities of different long-term fertilizations and soil managements

2.3 PLFA 与土壤理化指标的关系

为了探讨 PLFA 与土壤理化性质之间的关系，对二者进行冗余分析 (RDA)。由表 5 可见，对土壤微生物菌群影响的重要性由大到小依次为有机质、全氮、含水量、速效磷、pH、容重和速效钾。除速效钾对土壤微生物影响显著外 ($P < 0.05$)，其他理化指标均对土壤微生物群落结构影响极显著 ($P < 0.01$)，说明这些理化因子均是影响微生物群落的关键因子。

有机质和全氮具有较高的膨胀因子 (> 20)，表明与其他因子具有较高的多重共线性^[20]，因此对其他因子进行 T-value 检验，明确各指标与各微生物类群的关系。从图 2-a 可以看出，真菌、细菌和总 PLFA 完全落在含水量的实线圈内，表明随着含水量的增加，土壤真菌、细菌和总微生物量将呈现明显增加的趋势；速效磷对革兰氏阳性菌、真核生物和丛枝菌根真菌有显著促进作用 (图 2-b)；真菌、细菌和总 PLFA 完全



T PLFA: 土壤微生物 PLFA 总量；实线圈区域表示正相关；虚线圈区域表示负相关
 T PLFA: Total of PLFA; Solid circle area represents a positive correlation; Dashed circle area represents a negative correlation

图 2 单一理化因子对土壤 PLFA 影响的 T-value 检验结果

Fig. 2 T-value test result of influence of single physic-chemical parameter on soil PLFA

表 5 理化因子变量解释的重要性排序和显著性检验结果

Table 5 Importance and significance levels of physico-chemical parameters

土壤理化指标 Soil physicochemical parameters	重要性排序 Importance rank	理化因子所占解释量 Variance explanation of different parameters (%)	<i>F</i>	<i>P</i>	膨胀因子 Inflation factor
有机质 Organic matter	1	73.9	62.2	0.002	56.9
全氮 Total N	2	72.2	57.3	0.002	25.7
含水量 Water content	3	63.6	38.5	0.002	20.0
速效磷 Olsen-P	4	62.2	36.2	0.002	9.7
pH	5	54.8	26.6	0.002	8.0
容重 Bulk density	6	47.0	19.5	0.002	9.7
速效钾 Available K	7	18.0	4.8	0.044	4.9

落在 pH 的虚线圈内,表明 pH 的升高会显著降低细菌、真菌和总微生物量的含量(图 2-c);土壤容重的升高会显著增加真核生物和丛枝菌根真菌的生物量(图 2-d);土壤速效钾与细菌呈显著正相关(图 2-e)。

3 讨论

本研究表明,与 CK 相比,长期施 NP 肥土壤中细菌、真菌、放线菌和革兰氏细菌明显提高,这是由于 NP 肥的施入会增加作物产量,从而增加了根茬及根分泌物的投入,因此增加了微生物碳源,促进了其生长^[21]。N、NK 和 PK 土壤细菌、真菌、放线菌、革兰氏细菌和总 PLFA 含量无差异且明显低于 NP 处理,主要原因是供试土壤作物主要限制因子为 N 和 P,长期不平衡施肥导致作物生长受到限制,随根茬等残落物及根分泌物进入土壤的有机碳显著低于 NP 处理^[22]。PK 土壤放线菌含量显著降低,这可能是因为长期磷钾施用加剧了矿质养分的不平衡,造成氮素供应严重不足,从而影响了放线菌的生长。HOGBERG 等^[23]的研究就发现氮元素的充足提供不仅增加放线菌的生物量,而且还会使稀有放线菌更多地出现。有机无机配施(MNPK)可显著提高土壤细菌、真菌、放线菌和总 PLFA 含量,可能原因有:(1)有机肥能使土壤中不能被植物所利用的有机态含氮化合物转化为可给态氮^[24],可以为微生物提供更多的可利用底物;(2)有机肥本身含有大量活的微生物、活性有机碳源和能源,会起到“接种”和“导入”作用;(3)施用有机肥会使土壤 pH 显著下降(表 1),同时会使土壤有效水分得到改善^[25],pH 下降和含水量升高均会促进细菌、真菌的生长(图 2-d)。闫浩等^[26]的研究结果也表明土壤微生物 PLFA 含量与土壤含水率显著正相关,在良好的土壤水分条件下土壤微生物

各类群活性较强。PCA 分析也进一步表明 MNPK 显著提高 16:0 和 10Me22:0 等饱和脂肪酸的多度值(图 1)。裴雪霞等^[27]的研究指出,施用有机肥会显著增加土壤真菌和革兰氏阴性菌的生物量,却降低了细菌和放线菌的生物量,而 ZHONG 等^[28]认为有机肥施用会显著增加土壤细菌和放线菌的生物量,造成结果不同的原因可能是土壤类型、环境及施肥的差异。

休闲土壤因长期处于无地表植被覆盖的状态,即没有外源有机物的输入,使得土壤有机质处于消耗状态,因而降低土壤各菌群微生物量(表 3)。PATERSON 等^[29]对草原和裸地的研究也表明长期没有植物残体施入的土壤中微生物的含量明显降低。撂荒处理因长期未扰动土层,根系多集中在土壤表层,且每年随地上部生物量和根系归还土壤的有机物料较多^[12],有利于土壤细菌、真菌和放线菌的繁衍。休闲明显增加 G^+/G^- , 主要是因为 G^+ 更能适应饥饿环境^[30],在肥力极低的休闲土壤中 G^+ 的生长速度比 G^- 快。

有研究表明,真菌比细菌能更好地降解复杂化合物^[31],此外真菌还能与作物共生形成菌根,因此较高的农田真菌/细菌比对促进植物生长具有重要作用^[32]。本研究中有有机肥配施化肥处理结果与此一致,MNPK 不仅显著提高土壤有机质、全氮、速效磷和速效钾(表 1),为作物生长创造了良好的生长环境,还提高了真菌/细菌比。但与 CWALINA 等^[33]和巍巍等^[34]的结果不一致,其研究表明真菌细胞中的 C/N 比远高于细菌细胞,真菌群落需要从环境中摄取更多的有机质作为自身的营养物质,因此较低的农田真菌/细菌比可以为作物提供更加良好的生长环境。其原因有待结合宏基因组及高通量测序等手段进一步分析。

较高的生物多样性指数、均匀度指数和优势度指数,是生态系统稳定和健康的表现^[35-36]。本

研究长期有机无机配施能明显提高土壤微生物群落的 Shannon-Winner 多样性指数、Simpson 优势度和 Pielou 均匀度指数, 丁伟等^[37]也得到类似的结果。撂荒和 NP 显著提高土壤微生物群落的 Shannon-Winner 多样性指数和 Pielou 均匀度指数。说明 土壤长期有机无机肥配施、NP 和撂荒增加了土壤微生物种群密度, 从而使土壤对抗病原菌的综合能力增强, 同时保持了优势种群, 因此改善了土壤的生态环境。而休闲却显著降低这些指数, 因此长期休闲不利于土壤生态系统的稳定和健康。

土壤有机质是衡量土壤肥力的重要指标, 合理施肥对土壤有机碳库功能及其演变过程均具有重要影响^[2]。本研究 RDA 的分析结果表明, 土壤有机质和全氮对土壤微生物菌群的影响最大, 但在分析单因子对土壤微生物类群的影响时, 有机质和全氮对所有微生物菌群都没有显著的影响。多数研究表明土壤有机质和全氮与各微生物指标之间均呈显著正相关^[38-39], 这似乎和上述文献结果有一定的冲突, 主要是因为土壤有机质和全氮与其他环境因子存在多重共线性, 土壤有机质和全氮是通过其他因子对土壤微生物群落起作用的。通过对表 1 中不同环境因子之间的相关性分析也可以发现, 土壤有机质和全氮的相关系数则达到 0.98**, 而土壤有机质与土壤水分 (SWC)、速效磷、pH、容重和速效钾的相关系数分别为 0.89**、0.83**、-0.87**、-0.81**、和 0.48*, 全氮则分别为 0.88**、0.84**、-0.82**、-0.78**、和 0.47*。这表明土壤有机质和全氮的提高可以进一步改善其他环境因子, 进而对土壤微生物群落产生影响, 也进一步证明了长期土壤培肥(如有机无机配施和平衡施肥等)在提高土壤肥力的同时对于促进土壤生态系统稳定和健康具有重要意义。

4 结论

长期有机无机肥配施、氮磷配施和撂荒显著提高了 土壤细菌、真菌、放线菌 PLFA 量及真菌/细菌比, 同时提高了土壤微生物群落结构多样性, 从而改善了土壤的生态环境, 而长期休闲不利于土壤生态系统的稳定和健康。土壤养分对微生物菌群影响的重要性依次为有机质 > 全氮 > 含水量 > 速效磷 > pH > 容重 > 速效钾, 土壤有机质和全氮通过影响其他因子进而影响土壤微生物群落结构。建立科学的施肥和管理制度, 通过有机无机配施等培肥措施提高土壤肥力的同时改善土壤生物学特性对于促进土壤生态系统稳定和健康具有重要意义。

References

- [1] VARGAS GIL S, MERILES J, CONFORTO C, BASANTA M, RADL V, HAGN A, SCHLOTTER M, MARCH G J. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(1): 55-60.
- [2] 张淑香, 张文菊, 沈仁芳, 徐明岗. 我国典型农田长期施肥土壤肥力变化与研究展望. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(6): 1389-1393. ZHANG S X, ZHANG W J, SHEN R F, XU M G. Variation of soil quality in typical farmlands in China under long-term fertilization and research expedition. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21(6): 1389-1393. (in Chinese)
- [3] ZHANG D, ZHANG Y X, QU L Y, ZHANG S, MA K M. Effects of altitude on soil microbial community in *Quercus liaotungensis* forest. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(8): 2041-2048.
- [4] GE T D, CHEN X J, YUAN H Z, LI B Z, ZHU H H, PENG P Q, LI K L, JONES D L, WU J S. Microbial biomass, activity, and community structure in horticultural soils under conventional and organic management strategies. *European Journal of Soil Biology*, 2013, 58(3): 122-128.
- [5] 刘国华, 叶正芳, 吴为中. 土壤微生物群落多样性解析法: 从培养到非培养. *生态学报*, 2012, 32(14): 4421-4433. LIU G H, YE Z F, WU W Z. Culture-dependent and culture-independent approaches to studying soil microbial diversity. *Ecological Science*, 2012, 32(14): 4421-4433. (in Chinese)
- [6] 赵帅, 张静妮, 赖欣, 杨殿林, 赵建宁, 李刚, 邹雨坤. 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤微生物生物量碳、氮变化及微生物群落结构 PLFA 分析. *农业环境科学学报*, 2011, 30(6): 1126-1134. ZHAO S, ZHANG J N, LAI X, YANG D L, ZHAO J N, LI G, ZOU Y K. Analysis of microbial biomass C, N and soil microbial community structure of stipa steppes using PLFA at grazing and fenced in Inner Mongolia, China. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(6): 1126-1134. (in Chinese)
- [7] 张焕军, 郁红艳, 丁维新. 长期施用有机无机肥对潮土微生物群落的影响. *生态学报*, 2011, 31(12): 3308-3314. ZHANG H J, YU H Y, DING W X. The influence of the long-term application of organic manure and mineral fertilizer on microbial community in calcareous fluvo-aquic soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(12): 3308-3314. (in Chinese)
- [8] GUNNAR B, LORENZO M, HOLGER K, THOMAS K. Soil microbial community structure affected by 53 years of nitrogen fertilization and different organic amendments. *Biology and Fertility of Soil*, 2012, 48(3): 245-257.

- [9] KAMAA M, MBURU H, BLANCHART E, CHIBOLE L, CHOTTE J L, KIBUNJA C, LESUEU D. Effects of organic and inorganic fertilization on soil bacterial and fungal microbial diversity in the kabete long-term trail, Kenya. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 14(3): 315-321.
- [10] 夏昕, 石坤, 黄欠如, 李大明, 刘满强, 李辉信, 胡峰, 焦加国. 长期不同施肥条件下红壤性水稻土微生物群落结构的变化. *土壤学报*, 2015, 52(3): 698-705.
- XIA X, SHI K, HUANG Q R, LI D M, LIU M Q, LI H X, HU F, JIAO J G. The changes of microbial community structure in red paddy soil under long-term fertilization. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(3): 698-705. (in Chinese)
- [11] 夏雪, 谷洁, 车生国, 高华, 秦清军. 施氮水平对壤土微生物群落和酶活性的影响. *中国农业科学*, 2011, 44(8): 1618-1627.
- XIA X, GU J, CHE S G, GAO H, QIN Q J. Effects of nitrogen application rates on microbial community and enzyme activities in Lou soil. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(8): 1618-1627. (in Chinese)
- [12] 孙瑞, 孙本华, 高明霞, 杨学云, 张树兰. 长期不同土地利用方式下壤土土壤微生物特性的变化. *植物营养与肥科学报*, 2015, 21(3): 655-663.
- SUN R, SUN B H, GAO M X, YANG X Y, ZHANG S L. Changes of soil microbial characteristics under long-term different land use patterns on an anthropogenic loess soil. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21(3): 655-663. (in Chinese)
- [13] BOSSIO D A, SCOW K M, GUNAPALA N, GRAHAM K J. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, 1998, 36(1): 1-12.
- [14] FROSTEGARD A, BAATH E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22(1): 59-65.
- [15] FROSTEGARD A, BAATH E, TUNLID A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(6): 723-730.
- [16] STEINBERGER Y, ZELLES L, BAI Q Y, MUNCH C J. Phospholipid fatty acid profiles as indicators for community structure in soil along a climatic transect in the Judean Desert. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 28(3): 292-300.
- [17] ZELLES L. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere*, 1997, 35(1): 275-294.
- [18] OLSSON P A. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(4): 303-310.
- [19] 李新, 焦燕, 杨铭德. 用磷脂脂肪酸(PLFA)谱图技术分析内蒙古河套灌区不同盐碱程度土壤微生物群落多样性. *生态科学*, 2014, 33(3): 488-494.
- LI X, JIAO Y, YANG M D. Microbial diversity of different saline-alkaline soil analyzing by PLFA in the Hetao area of Inner Mongolia. *Ecological Science*, 2014, 33(3): 488-494. (in Chinese)
- [20] BEYENE A, ADDIS A, KIFLE D, LEGESSE A, KLOOS H, TRIEST L. Comparative study of diatoms and macroinvertebrates as indicators of severe water pollution: Case study of the Kebena and Akaki rivers in Addis Ababa, Ethiopia. *Ecological Indicators*, 2009, 9(2): 381-392.
- [21] KUNDU S, PRAKASH V, GHOSH B N, SINGH R D, SRIVASTVA A K. *Quantitative Relationship Between Annual Carbon Inputs and Soil Organic Carbon Build-Up in Soybean(Glycine Max)-Wheat (Triticum aestivum) Cropping Sequence. 2nd Edition*. New Delhi, India: Agronomy Congress, 2002: 108-110.
- [22] YANG X Y, SUN B H, ZHANG S L. Trends of yield and soil fertility in a long-term wheat-maize system. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13(2): 402-414.
- [23] HOGBERG M N, HOGBERG P, MYROLD D D. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by PH, C-to-N ration, the trees, or all-three? *Oecologia*, 2007, 150(4): 590-601.
- [24] 张淑红, 高巍, 张恩平, 李亮亮. 长期定位施肥对连作番茄土壤可培养微生物数量的影响. *土壤通报*, 2012, 43(1): 60-65.
- ZHANG S H, GAO W, ZHANG E P, LI L L. Effect of long-term nitrogen application on culturable microorganisms quantity of tomato continues cropping. *Chinese Journal of Soil Science*, 2012, 43(1): 60-65. (in Chinese)
- [25] 孙建, 刘苗, 李立军, 刘景辉. 不同施肥处理对土壤理化性质的影响. *华北农学报*, 2010, 25(4): 221-225.
- SUN J, LIU M, LI L J, LIU J H. The effect of different fertilization treatments on soil physical and chemical property. *Acta Agriculturae Boreal-Sinica*, 2010, 25(4): 221-225. (in Chinese)
- [26] 闫浩, 黄懿梅, 蒋跃利, 赵彤. 宁南山区两种灌木林土壤矿化过程中 PLFA 指纹季节变化特征. *环境科学学报*, 2014, 34(8): 2111-2120.
- YAN H, HUANG Y M, JIANG Y L, ZHAO T. Seasonal variation of PLFA during soil mineralization under two kinds of shrub lands in mountainous area of southern Ningxia Northwest China. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(8): 2111-2120. (in Chinese)
- [27] 裴雪霞, 周卫, 梁国庆, 孙静文, 王秀斌, 艾超. 长期施肥对黄棕

- 壤性水稻土生物学特性的影响. 中国农业科学, 2010, 43(20): 4198-4206.
- PEI X X, ZHOU W, LIANG G Q, SUN J W, WANG X B, AI C. Effect of long-term fertilization on soil biological characteristics in a paddy soil derived from yellow-brown earth. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(20): 4198-4206. (in Chinese)
- [28] ZHONG W H, GU T, WANG W, ZHANG B, LIN X G, HUANG Q R, SHEN W S. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. *Plant and Soil*, 2010, 326(1): 511-522.
- [29] PATERSON E, SIM A, OSBORNE S M, PHIL J M. Long-term exclusion of plant-inputs to soil reduces the functional capacity of microbial communities to mineralize recalcitrant root-derived carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(9):1873-1880.
- [30] KIEFT T L, RINGELBERG D B, WHITE D C. Changes in Ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(9): 3292-3299.
- [31] NAIR A, NGOUAJIOM M. Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. *Applied Soil Ecology*, 2012, 58: 45-55.
- [32] BRITTO I, GOSSB M J, DE CARVALHO M, CHATAGNIER O, VAN TUINENC D. Impact of tillage system on arbuscular mycorrhiza fungal communities in the soil under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research*, 2012, 121: 63-67.
- [33] CWALINA A B, BOWSZYS T. Changes in fungal communities in organically fertilized soil. *Plant Soil Environment*, 2009, 55(1): 25-32.
- [34] 魏巍, 许艳丽, 朱琳, 韩晓增, LI S. 长期施肥对黑土农田土壤微生物群落的影响. 土壤学报, 2013, 50(2): 373-380.
- WEI W, XU Y L, ZHU L, HAN X Z, LI S. Effect of long-term fertilization on soil microbial communities in farmland of black soil. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(2): 373-380. (in Chinese)
- [35] 孔滨, 孙波, 郑宪清, 陈小云, 隋跃宇, 王帘里. 水热条件和施肥对黑土中微生物群落代谢特征的影响. 土壤学报, 2009, 46(1): 100-106.
- KONG B, SUN B, ZHENG X Q, CHEN X Y, SUI Y Y, WANG L L. Effect of hydro thermal conditions and fertilization on metabolic characteristics of microbial community in a black soil. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(1): 100-106. (in Chinese)
- [36] 姜海燕, 闫伟, 李晓彤, 杨秀丽, 吕洪丽. 大兴安岭不同落叶松林植被土壤微生物多样性. 微生物学通报, 2010, 37(2): 186-190.
- JIANG H Y, YAN W, LI X T, YANG X L, LÜ H L. The diversity of soil microorganism under different vegetations of *Larix gmelinii* forest in Great Xingan Mountains. *Microbiology*, 2010, 37(2): 186-190. (in Chinese)
- [37] 丁伟, 叶江平, 蒋卫, 霍沁建, 陈晓明, 梁永江, 张长华, 袁玲. 长期施肥对植烟土壤微生物的影响. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(5): 1168-1176.
- DING W, YE J P, JIANG W, HUO Q J, CHEN X M, LIANG Y J, ZHANG C H, YUAN L. Effects of long-term fertilization on microorganisms in flue-cured tobacco grown soil. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2012, 18(5): 1168-1176. (in Chinese)
- [38] 李文军, 彭宝发, 李奇勇. 长期施肥对洞庭湖双季稻区水稻土有机碳、氮积累及其活性的影响. 中国农业科学, 2015, 48(3): 488-500.
- LI W J, PEN B F, LI Q Y. Effects of long-term fertilization on organic carbon and nitrogen accumulation and activity in a paddy soil in double cropping rice area in Dong Ting Lake of China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(3): 488-500. (in Chinese)
- [39] 席军强, 杨自辉, 郭树江, 王强强, 张剑挥, 王多泽. 不同类型白刺沙丘土壤理化性质与微生物相关性研究. 草业学报, 2015, 24(6): 64-74.
- XI J Q, YANG Z H, GUO S J, WANG Q Q, ZHANG J H, WANG D Z. The correlation between soil physical and chemical properties and soil microbes in different types of Nitraria dune. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(6): 64-74. (in Chinese)

(责任编辑 杨鑫浩)