

单季不施氮肥对太仓水稻土的微生物功能多样性的影响^①

张华勇 林先贵 李忠佩 尹睿 褚海燕 车玉萍 杨林章

(中国科学院南京土壤研究所 南京 210008)

摘要 氮肥的过量施用在浪费资源的同时也污染了环境, 单季不施 N 肥是太仓地区探索的减少 N 肥施用量方法中的一种。本文通过比较短时期的单季不施 N 肥区和常规施肥区中土壤中微生物的数量和群落水平的功能多样性指数来研究单季不施 N 肥对土壤质量的影响。结果表明: 细菌、真菌、放线菌的数量在两种施肥方式下没有显著差异; BIOLOG 平板法获得的平均吸光度、多样性指数 Shannon 指数 H' 和 Simpson 指数的变型 G 在两种施肥方式下没有显著差异; 主成分分析 (PCA) 在 95 种因子中提取的 3 个主成分因子, 尽管主成分因子 2 在两种施肥方式下略有差别, 主成分因子 1 和 3 却无法区分两种施肥方式。这说明短时期的单季不施 N 肥不会对土壤中微生物数量造成影响, 对土壤微生物功能多样性也仅对细微有影响。

关键词 单季不施氮肥; 微生物; 功能多样性; BIOLOG; 水稻土

中图分类号 S154.3; S157.4

由于肥料具有增产作用, 导致投入到农田的化学肥料特别是 N 肥有明显的递增趋势^[1]。这种现象在我国尤其明显, 我国化学 N 肥的使用量已占世界化学 N 肥用量的 28%^[2]。N 肥过量使用不仅提高种植成本, 而且可能影响农产品品质^[3]; 同时 N 的径流损失会使得地表水体富营养化^[4,5], 淋洗损失会造成地下水污染^[6]; 气态损失过程中产生的 N₂O、NO、NO₂ 和 NH₃ 等都直接或间接地增加温室气体效应^[7]。因此, 在不降低作物产量和土壤质量的前提下减少农田中 N 肥施用量有显著的经济效益和生态效应。单季不施 N 肥是苏南地区探索的施肥方法中的一种, 即每年轮换不同的田块在两季农作物中的一季不施加任何 N 肥以减少 N 肥的总施用量。目前尚没有单季不施 N 肥对土壤质量影响方面的研究。

微生物是土壤质量的主要指标之一, 其数量、种类和多样性对土壤表现出来的生物活性有着重要的影响^[8-10]。早期由于方法的限制, 微生物多样性工作很难开展, 近年来, 新方法的应用使得微生物多样性技术日渐成熟, BIOLOG 平板法就是其中的一种。此方法主要是通过群落水平的微生物对 95 种单一 C 源利用图谱来检测环境样品中微生物功能多样性^[11]。本文通过对微生物数量和功能多样性分析

来研究江苏太仓地区水稻土采取单季不施 N 肥措施对土壤质量的影响。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集

在太仓直塘镇采集单季不施 N 肥区 (1 年) 和常规施肥区各 3 个样点土样, 每个样点用 5 点取样法采 0~20 cm 表土并混匀, 4℃ 保存, 尽快测定。供试土壤基本性状见表 1。

表 1 供试土壤的基本性质
Table 1 Some properties of test soils

项目	单季不施 N 肥	常规施肥
pH	7.14	7.68
全 C (mg/g)	18.9	19.2
全 N (mg/g)	0.79	0.83

1.2 土壤基本理化性状分析

全 C, 重铬酸钾氧化法测定; 全 N, 凯氏消煮法测定; pH, 蒸馏水按水土比 5:1 浸提, 电位法测定^[12]。

1.3 微生物计数

真菌、细菌和放线菌的计数均采用稀释平板法。细菌培养采用牛肉蛋白胨琼脂培养基, 真菌培养采用 Czapek 培养基, 放线菌培养采用淀粉铵琼脂培

①中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX3-SW-417) 资助。

培养基^[13]。

1.4 BIOLOG 平板测定

称取 10 g 新鲜土置于灭菌的 250 ml 三角瓶(内装 100 ml 0.05 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液)中, 振荡 20 min。在超净台上用无菌的 0.05 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液稀释到 10^{-3} 后, 用 8 通道加样器向 BIOLOG GN 96 孔板各孔中分别添加 150 μ l 稀释后的悬液。每个土壤样品做 3 个重复。25 $^{\circ}$ C 恒温培养, 在 24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144、156 h 后测定各孔在 750 nm 和 590 nm 波长下的光吸收值。

1.5 平均吸光度值和多样性指数的计算

参照 Harch 等^[14] 的计算方法计算平均吸光度值和多样性指数。

2 实验结果

2.1 微生物数量

图 1 是两种施肥方式下的土壤微生物数量(取以 10 为底的对数值为纵坐标所作)。从中可以看出, 单季不施 N 肥区和常规施肥区都有细菌数量多于放线菌并且远远多于真菌的规律。但是两种不同的施肥方式下土壤中各类微生物的数量却没有显著性差异。

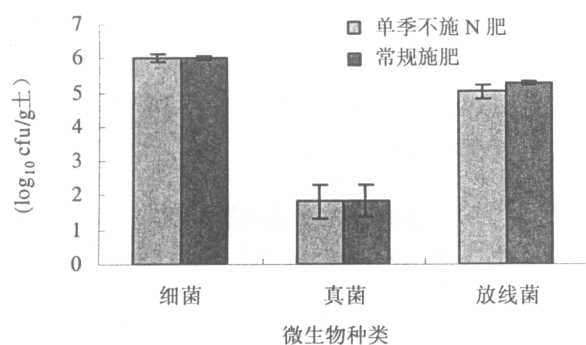


图 1 两种施肥方式下土壤微生物数量

Fig. 1 Soil microbe under two fertilizing modes

2.2 平均吸光度值

平均吸光度 (average well color development, AWCD) 可用于评判微生物群落对 C 源利用的总的能力。图 2 中单季不施 N 肥区与常规施肥区 AWCD 无论是趋势还是具体数值都没有显著性差异。

2.3 微生物功能多样性指数

由于在图 2 AWCD 随时间变化曲线中, 72 h 为

拐点, 所以选择 72 h 为后续多样性指数分析的时间点。

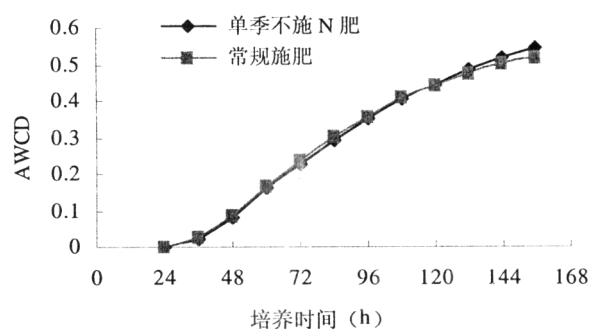


图 2 不同培养时间下的平均吸光度

Fig. 2 Effect of culturing time on AWCD

Simpson 指数和 Shannon 指数是最常用的两种多样性指数: Simpson 指数 D 对富集种的相对多度敏感, 主要测定群落的优势度; Shannon 指数 H' 对稀疏种敏感^[15]。图 3 的结果表明 BIOLOG 平板在培养 72 h 后, 土壤微生物对 95 种 C 源利用的 Simpson 指数 D 和 Shannon 指数 H' 在 2 种施肥方式下没有显著性差异。

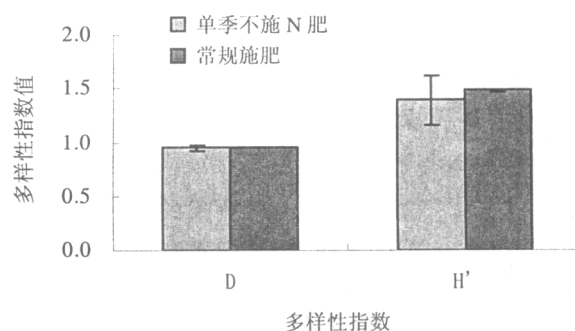


图 3 培养 72 h 的多样性指数

Fig. 3 Diversity index after 72 h culturing

主成分分析 (principal component analysis, PCA) 在 95 种因子中提取的 3 个主成分因子, 分别可以解释所有变量方差的 38%、27% 和 20%。从图 4 中可以看出主成分因子 1 和主成分因子 3 无法区分单季不施 N 肥和常规施肥这两种施肥方式, 而在主成分因子 2 上, 单季不施 N 肥区样点集中在负端, 而常规施肥区样点则趋向正端。考察 PCA 分析的相关性矩阵, 可知与主成分因子 2 正相关程度较高的 C 源有尿昔、m-肌醇、癸二酸和尿刊酸, 负相关程度比较高的 C 源有肌昔和淀粉。这提示单季不

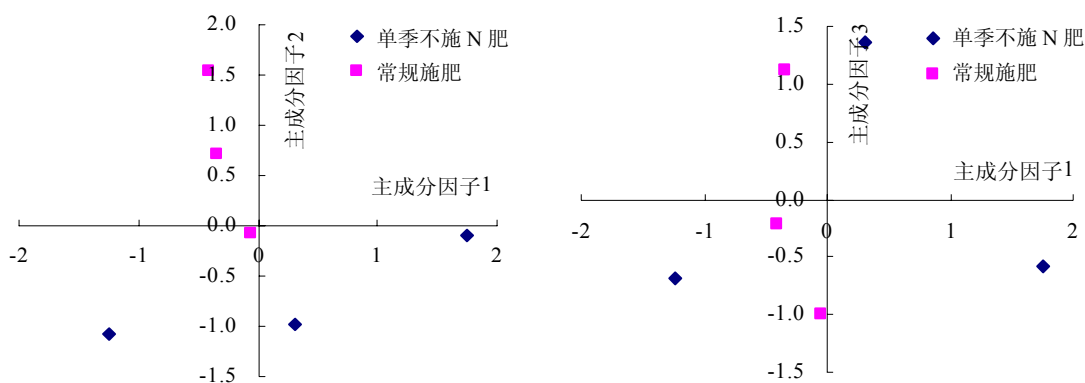


图 4 72 h 成分分析的因子荷载图

Fig. 4 Loadings of Principal Component Analysis after 72 h culturing

施 N 肥和常规施肥中的微生物群落在上述 C 源的利用能力上可能有差异。

3 讨论

短时期的单季不施 N 肥并没有明显影响土壤中微生物的数量，可能是因为微生物体积小，需要的养分也比较少，土壤中 N 肥残余已经可以满足土壤中微生物正常生长的需要；也有可能是采取单季不施 N 肥的田块持续时间不长，对微生物的影响尚未表现出来。BIOLOG 方法的结果中，AWCD 和 72 h 多样性指数分析也无法区分单季不施 N 肥与常规施肥间的差异，说明采用单季不施 N 肥的施肥方式时土壤中微生物的总 C 源利用能力没有显著变化；72 h 的主成分因子分析的结果是只占总变量方差 27 % 的主成分因子 2 能识别出两种施肥方式的差别，主成分因子 1 和因子 3 在两种施肥方式下没有显著的差异。综合以上结果，可以得出短时间的单季不施 N 肥不会改变土壤中微生物的数量，也不会改变土壤微生物的主要群落功能。所以，初步认为短时期的单季不施 N 肥对土壤质量特别是生物活性的影响不大。

另外，由于 BIOLG 方法是用微生物对 C 源的利用程度来反映微生物生理活动的轮廓，因此 BIOLG 方法比平板记数法等传统方法能更实际、更直观地反映微生物生理活动的强度。而且它还能反映出微生物群落结构的生理轮廓以及微生物功能多样性的变化情况，本研究的结果进一步证明了它在生态功能分析方面有着其他方法无可比拟的优点。

参考文献

- 1 孙文涛, 肖千明, 朱洪国, 付仲鑫, 李亮亮. 试论氮肥施用对环境的影响. 杂粮作物, 2000, 20 (1): 38 ~ 41
- 2 郭胜利, 周印东, 张文菊, 荣丽媛, 刘振赏, 高长青. 长期施用化肥对粮食生产和土壤质量性状的影响. 水土保持研究, 2003, 10 (1): 16 ~ 22
- 3 王正银, 李会合, 李宝珍, 叶学见, 孙彭寿, 戴亨林, 向天常. 氮肥、土壤肥力和采收期对小白菜体内硝酸盐含量的影响. 中国农业科学, 2003, 36 (9): 1057 ~ 1064
- 4 黄满湘, 章申, 张国梁, 张秀梅. 北京地区农田氮素养分随地表径流流失机理. 地理学报, 2003, 58 (1): 147 ~ 154
- 5 Gao XJ, Hu XF, Wang SP, He BG, Xu SY. Nitrogen losses from flooded rice field. *Pedosphere*. 2002, 12 (2): 151 ~ 156
- 6 董悦安, 沈照理, 钟佐. 菜田施肥 (化肥) 对地下水氮污染影响的实验研究. 地球科学—中国地质大学学报, 1999, 24 (1): 101 ~ 104
- 7 Reay DS, Smith KA, Edwards AC. Nitrous oxide emission from agricultural drainage waters. *Global Change Biology*, 2003, 9 (2): 195 ~ 203
- 8 Visser S, Parkinson D. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *Amer. J. Altern Agric.*, 1992, 7 (1): 33 ~ 37
- 9 张桃林, 潘剑君, 赵其国. 土壤质量研究进展与方向. 土壤, 1999, 31 (1): 1 ~ 7
- 10 郑昭佩, 刘作新. 土壤质量及其评价. 应用生态学报, 2003, 14 (1): 131 ~ 134
- 11 Garland JL, Mills AL. Classification and characterization

- of Heterotrophic microbial communities on basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental microbiology*, 1991, 57 (8): 351 ~ 2359
- 12 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业出版社, 2000, 248 ~ 255
- 13 许光辉, 郑洪元主编. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986, 1 ~ 314
- 14 Harch BD, Correll RL, Meech W, Kirkby CA, Pankurst CE. Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilization data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30: 91 ~ 101
- 15 马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法 I. α 多样性的测度方法 (下). *生物多样性*, 1994, 2 (4): 231 ~ 239

EFFECTS OF SEASONAL WITHDRAWAL OF NITROGENOUS FERTILIZER ON MICROBIAL FUNCTION DIVERSITY IN PADDY SOIL IN TAICANG

ZHANG Hua-yong LIN Xian-gui LI Zhong-pei YIN Rui
CHU Hai-yan CHE Yu-ping YANG Lin-zhang

(*Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008*)

Abstract Excessive input of nitrogenous fertilizer not only wastes resources but also pollutes environment. Seasonal withdrawal of nitrogenous fertilizer is a practical method to reduce application rate of the fertilizer in Taicang. This paper compares this practice with the traditional one in soil microbe population and functional diversity index of the microbe at the community level. The results showed that no significant difference was found in populations of bacteria, fungi and actinomyce between the two fertilization modes. BIOLOG analysis indicated that no significant difference was observed either in value of Average Well Color Development (AWCD), Shannon diversity index and Simpson diversity index between the two. There were 3 principal component factors (PCF), screened out of 95 factors by Principal Component Analysis (PCA). Although PCF 2 showed some difference between the two, but PCF 1 and 3 did not. All of the above imply that short-term seasonal withdrawal of nitrogenous fertilizer has no significant effect on soil microbe in population and only a little in functional diversity.

Key words Seasonal withdrawal of nitrogenous fertilizer, Microbes, Function diversity, BIOLOG, Paddy soil