

绿肥与化肥配施对植烟土壤微生物群落的影响^①

佘国涵¹, 王 瑞², 袁家富¹, 谭 军², 熊又升¹, 徐大兵¹, 赵书军^{1*}

(1 湖北省农业科学院植保土肥研究所, 武汉 430064; 2 湖北省烟草公司恩施州公司, 湖北恩施 445000)

摘 要: 土壤微生物群落被认为是土壤生态系统变化的预警及敏感指标, 指示着土壤质量的变化。本研究利用 3 年定位试验, 通过测定磷脂脂肪酸(PLFAs)的含量, 分析了连年绿肥和化肥配施对植烟土壤微生物群落结构的影响。研究表明: 施肥明显地提高了土壤中 PLFAs 的种类和总量; 在绿肥和化肥配施处理中, 当翻压 15 000 kg/hm² 绿肥的基础上施用大于 85% 常规化肥时, 明显提高了土壤中细菌、AM 真菌及微生物总的 PLFAs 含量; 而当化肥的施用量减至常规施肥 70% 时, 对土壤细菌、真菌及微生物总 PLFAs 含量的积累产生不利影响。从不同处理的主成分分析和聚类分析的结果可知, 不同绿肥和化肥配施比例对土壤微生物群落结构变化有明显影响。经相关性分析表明, PLFA 分析方法和氯仿熏蒸法之间具有很好的一致性, 且土壤速效钾和速效磷含量与革兰氏阴性菌的 PLFAs 含量呈显著相关, 而与土壤真菌 PLFAs 含量则无明显的相关性。

关键词: 绿肥; 植烟土壤; 磷脂脂肪酸; 微生物群落结构

中图分类号: S154.36

土壤微生物群落是土壤生物区系中最重要的功能组分, 土壤微生物群落组成、结构、数量、生理生化活性等对土壤环境条件变化反应敏感, 常被作为评价指标用于土壤质量和土壤生态系统健康状况的研究^[1]。由于土壤微生物的数量巨大, 组成极为复杂, 用传统的土壤微生物研究方法往往会低估价土壤微生物的真实状况, 无法得到它们在土壤生态系统中的重要信息。磷脂是构成生物细胞膜的主要成分, 约占细胞干重的 5%, 只存在于所有活细胞膜中, 一旦生物细胞死亡, 其中的磷脂类化合物马上消失^[2]。不同种类微生物体内磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acids, PLFAs)组成及含量显示出极大的差异, 通过提取分析 PLFAs, 可以比较准确地反映样品中微生物群落的组成和结构的变化。

施肥是农业中最为重要和普遍的增产手段, 不同种类肥料的施入可影响甚至改变土壤养分的循环, 从而影响土壤微生物的群落结构及多样性。于树等^[3]研究表明, 长期施肥能提高玉米地土壤中真菌、细菌及微生物总生物量, 而且有机肥和有机无机配施对微生物总生物量的增加作用更明显。Dick 研究^[4]表明, 施厩肥、绿肥等有机肥有利于维持土壤微生物的多样

性及活性。白震等^[5]通过对长期施用氮、磷及有机肥对农田黑土 PLFAs 的影响研究表明, 有机肥及单施磷处理显著促进真菌、细菌生长, 提高真菌/细菌比值, 单施氮对细菌生长有抑制作用, 但对真菌无显著影响。

绿肥作为一种重要的有机肥料, 在改善土壤结构、培肥土壤地力及提高作物产量等方面起到积极的作用。近年来, 涉及绿肥及植烟土壤方面的研究主要集中在土壤微生物生物量碳、土壤酶及土壤理化性质方面, 而对土壤生态功能尤其是对土壤微生物群落结构的研究报道较少。本文采用 PLFA 法研究了连年绿肥化肥配施对土壤微生物群落结构的影响, 为连年绿肥化肥配施对改变植烟土壤生态功能的研究提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点及材料

供试烤烟品种为云烟 87, 绿肥品种为光叶紫花苕子。试验区位于湖北恩施清江源现代烟草农业科技园(30°20'14" N, 109°26'13"E), 土壤类型为山地黄棕壤(铁质湿润淋溶土)。绿肥鲜草的养分状况为:

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200803029-01-08), 国家烟草专卖局项目(110201202014)和湖北省农业科技创新中心项目(2007-620-001-03)资助。

* 通讯作者(zhaosj@163.com)

作者简介: 佘国涵(1981—), 男, 河南濮阳人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物营养与土壤微生物方面的研究。E-mail: siguoh@qq.com

全氮 5.0 g/kg，全磷 1.2 g/kg，全钾 4.7 g/kg。

1.2 试验设计

试验从 2009—2011 年进行了 3 年的定位试验，采用烤烟-绿肥轮作的方法，于每年 4 月 20 日翻压绿肥，5 月 15 日移栽烟苗。常规施肥的施氮量为 105 kg/hm²，施肥配比为 N：P₂O₅：K₂O = 1：1.2：3，减施化肥处理的化肥用量按照相应的比例进行减少，但氮、磷、钾施用的比例不变。试验设以下 5 个处理：不翻压绿肥，不施化肥(CK)；化肥施用量为常规施肥的 100%(F1)；翻压绿肥 15 000 kg/hm²，化肥施用量为常规施肥的 70%(GMF1)；翻压绿肥 15 000 kg/hm²，化肥施用量为常规施肥的 85%(GMF2)；翻压绿肥 15 000 kg/hm²，化肥施用量为常规施肥的 100%(GMF3)。试验区组随机排列，3 次重复，试验小区的面积为 27 m²。于烟叶采烤后期，采集 0 ~ 20 cm 混合土样。

1.3 分析方法

1.3.1 PLFAs 测定 采用改正的 White 等^[6]的方法进行脂类提取和 PLFAs 分析，土壤用柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L，pH 7.0)、甲醇和氯仿混合液(v/v = 0.8：2：1)进行提取，提取液用硅酸键合固相萃取柱层析，分别用氯仿、丙酮和甲醇洗脱，将含磷脂的部分在氮气流下吹干，然后用碱性甲醇水解和皂化得到磷脂脂肪酸甲酯(FAME)。用气相色谱和质谱联用仪(安捷伦 6890N GC-5973N MS)测定提取的 FAME。色谱条件：30.0 m × 0.25 mm × 0.25 μm，进样量 1 μl，载气(氦气)流速为 0.9 ml/min。升温程序为：初始温度 70℃保持 5 min 后，以 20℃/min 升至 190℃，再以 5℃/min 升至 200℃后以 10℃/min 升至 280℃。以甲酯化的 C19:0 为内标物质，其含量用 nmol/g 表示。PLFAs 采用 Frostegård 等^[7]的方法命名，分子式以“X:YωZ(c/t)”表示，其中“X”代表脂肪酸分子的碳原子总数，“Y”

代表不饱和烯键的数目，“ω”代表烯键距离羧基的位置，“Z”为烯键或环丙烷链的位置。前缀“i”(iso)代表异构甲基支链(距甲基端的第二个碳原子)，“a”(anteiso)代表前异构甲基支链(距甲基端的第三个碳原子)，“cyc”代表环丙基支链，“br”表示甲基支链的位置未知。后缀“c”和“t”分别代表顺式和反式同分异构体，“OH”前的数字表示羟基的位置(从羧基端计数，第二个碳为 α、第三个碳为 β)。

1.3.2 土壤微生物生物量碳与土壤理化性质分析 采用氯仿熏蒸-K₂SO₄ 提取方法测定土壤微生物生物量碳，碱解扩散法测定土壤碱解氮，碳酸氢钠-钼锑抗比色法测定土壤速效磷，中性 NH₄OAC 浸提-火焰光度法测定土壤速效钾，pH 计法(水土比为 1：2.5)测定土壤 pH，重铬酸钾容量法测定土壤有机质^[8]。

试验数据采用 Excel 2003 和 SAS V9.1 统计分析软件进行相关性和主成分分析。

2 结果与分析

2.1 绿肥化肥配施对土壤养分的影响

从烟叶采烤后期不同处理的土壤养分(表 1)可知，施肥后土壤的有机质、碱解氮、速效磷、速效钾和土壤微生物生物量碳的含量均有所增加；在翻压绿肥的基础上，随着施用化肥量的增加，土壤中速效磷、速效钾和微生物生物量碳的含量均呈增加趋势；GMF3 处理和 GMF2 处理的有机质、碱解氮、速效磷、速效钾和土壤微生物生物量碳的含量均高于 F1 处理，其中速效磷含量处理间差异达到了显著性水平；GMF3 处理的速效磷、速效钾和微生物生物量碳的含量较 F1 处理分别提高了 30.0%、22.4% 和 18.1%。GMF1 处理和 F1 处理的有机质、碱解氮、速效磷、速效钾和全氮的含量差异不显著。

表 1 不同施肥处理的土壤养分含量
Table 1 Soil nutrient contents under different fertilization

处理	pH	有机质 (g/kg)	碱解氮 (mg/kg)	速效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)	全氮 (g/kg)	微生物生物量碳 (mg/kg)
CK	5.9 a	23.9 a	120.8 a	13.3 c	104.2 c	1.7 a	225.3 c
F1	6.1 a	24.7 a	124.0 a	15.2 c	138.3 b	1.6 a	964.9 ab
GMF1	6.1 a	24.8 a	123.0 a	16.2 bc	137.1 b	1.7 a	654.6 b
GMF2	6.0 a	25.5 a	135.0 a	21.1 ab	141.7 b	1.6 a	1 054.2 a
GMF3	5.9 a	25.1 a	127.8 a	21.9 a	178.3 a	1.7 a	1 178.4 a

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异在 P<0.05 水平显著。

2.2 绿肥化肥配施对特征微生物 PLFAs 的影响

Bardgett 等^[9]认为土壤中 PLFAs 的组成可以表示

土壤微生物群落的生物量和结构。目前，越来越多的 PLFAs 被用作特定微生物标记，如将 18:2ω6、9、

18:1 ω 9、16:1 ω 5 作为真菌的标记，其中 16:1 ω 5 作为土壤中孢囊从枝菌(AM 真菌)的标记；将 10Me18:0 作为放线菌的标记；将 C16:1 ω 7、C17:1 ω 7c、cyC17:0、C18:1 ω 7 作为革兰氏阴性菌(G⁻)，将 iC15:0、aC15:0、iC16:0、iC17:0、aC17:0 作为革兰氏阳性菌(G⁺)，将 iC13:0、iC14:0、C12:0、C14:0、C15:0、C16:0 作为细菌的标记等^[10-12]。在供试的土样中共检测到包括饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸、环丙烷脂肪酸和甲基脂肪酸在内的 19 种 PLFAs。其中 17 种 PLFAs (C12:0、iC14:0、C14:0、iC15:0、aC15:0、C15:0、iC16:0、C16:1 ω 5、C16:1 ω 7、C16:0、iC17:0、C17:1 ω 7c、aC17:0、cyC17:0、C18:2 ω 6、C18:1 ω 9、C18:1 ω 7)在所有土样中均被检出，10MeC18:0 仅在处理 GMF3 中检出，iC13:0 在 CK 处理中未检出。

从供试土样的土壤特征微生物 PLFAs 结果(表 2)来看，与不施肥处理相比，施肥明显地提高了土壤中 PLFAs 的种类和含量；在翻压等量绿肥的条件下，细菌、真菌和微生物总 PLFAs 含量随着施用化肥量的增加而增加。GMF1 处理的细菌、真菌和微生物总 PLFAs 含量均小于 F1 处理，其中细菌和真菌 PLFAs 含量的差异达到了显著水平；GMF2 处理和 GMF3 处理的细菌和微生物总 PLFAs 含量均高于 F1 处理，但差异不显著，在各处理中，以 GMF3 处理的细菌和微生物总 PLFAs 含量最高，其细菌和微生物总 PLFAs 含量分别比 F1 处理提高了 9.2% 和 12.4%，比 CK 处理分别提高了 29.5% 和 31.0%。这表明在翻压绿肥 15 000 kg/hm² 的基础上，当施用大于 85% 的常规化肥用量时，对土壤中细菌、AM 菌

及微生物总的 PLFAs 含量的积累具有明显的促进作用，而当施用化肥量减至常规施肥的 70% 时，则不利于土壤细菌、真菌及微生物总 PLFAs 含量的积累。

GMF3 处理的真菌 PLFAs 含量高于其他处理，其中比 F1 处理和 CK 处理分别提高了 14.2% 和 24.1%，但是 GMF2 处理的真菌 PLFAs 含量却低于 F1 处理，其真菌 PLFAs 含量比 F1 处理降低了 7.7%，这表明在翻压绿肥 15 000 kg/hm² 的基础上，当施用化肥量减至常规施肥的 85% 时，不利于土壤中的真菌生物量的积累。放线菌只有在 GMF3 处理中检出，而在其他处理中均未检出。

真菌/细菌的 PLFAs 比值可反映真菌和细菌相对含量的变化范围^[7]和两个种群的相对丰富程度^[13]。不同处理中以 CK 处理的真菌/细菌 PLFAs 比值最高，其次为 F1 处理和 GMF3 处理，GMF1 处理和 GMF2 处理的真菌/细菌 PLFAs 比值最低。G⁺/G⁻ 的 PLFAs 比值以 CK 处理的最高，其次为 GMF2 处理和 F1 处理，以 GMF3 处理和 GMF1 处理最低。

AM 真菌有促进植物生长和增强植物抗逆性的能力，16:1 ω 5 可用于估算土壤中 AM 真菌生物量^[14]。不同处理中 AM 真菌 PLFAs 含量的趋势为 GMF3>GMF2>F1>CK>GMF1；在翻压等量绿肥的条件下，随着使用化肥量的减少，土壤中的 AM 真菌相对含量呈逐渐降低；当化肥施用量减至常规施肥的 70% 时，明显地影响了土壤中的 AM 真菌 PLFAs 量，GMF3 处理的 AM 真菌的 PLFAs 量比常规施肥处理 F1 和不施肥处理 CK 分别提高了 7.4% 和 12.3%。

表 2 不同处理土壤特征微生物 PLFAs 类型和含量(nmol/g)
Table 2 Types and concentrations of soil characteristic microbial PLFAs under different fertilization

PLFA 种类	GMF3	GMF2	GMF1	F1	CK
细菌	44.42 a	42.1 a	34.21 b	40.33 a	31.3 b
革兰氏阳性菌 G ⁺	17.32 a	17.16 a	12.53 b	15.5 ab	12.18 b
革兰氏阴性菌 G ⁻	13.67 a	12.6 ab	9.83 b	11.89 ab	8.90 c
G ⁺ /G ⁻	1.27 a	1.36 a	1.27 a	1.30 a	1.37 a
真菌	5.48 a	4.34 a	3.50 b	4.70 a	4.16 a
真菌/细菌	0.12 a	0.10 a	0.10 a	0.12 a	0.13 a
AM 真菌	0.81 a	0.8 a	0.61 b	0.75 a	0.71 a
微生物总 PLFAs	51.38 a	46.43 ab	37.71 b	45.02 ab	35.46 c

注：同行数据后不同小写字母表示处理间差异在 $P<0.05$ 水平显著。

2.3 绿肥化肥配施对土壤微生物群落结构的影响
对不同施肥处理下土壤微生物群落 PLFAs 进行主成分分析(图 1)，结果表明主成分一的方差贡献率为 74.5%，主成分二的方差贡献率为 11.2%，两者之

和达到 85.7%，可代表系统内的变异状况，基本可以把经过不同施肥处理的土壤区分开。GMF3 处理在主成分一上表现出高度正相关，在主成分二上表现出负相关；F1 处理和 GMF2 处理在主成分一和主成分二

上均表现出正相关,这表明这两种施肥处理的土壤具有相似的微生物群落结构;GMF1 处理和 CK 处理与主成分一均表现出负相关,但 GMF1 在主成分二上表现出正相关,而 CK 处理则表现出负相关,这表明这两种施肥处理的土壤微生物群落结构存在一定的差异。

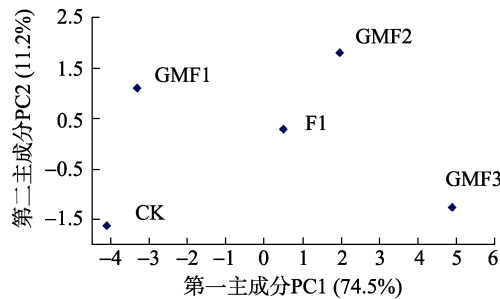


图 1 不同施肥处理下土壤微生物 PLFAs 的主成分分析
Fig. 1 Principal component analysis of soil microbial PLFAs under different fertilization

2.4 绿肥化肥配施对土壤微生物群落结构的聚类分析

对不同处理的土壤 PLFAs 的相对含量进行聚类分析(图 2)。结果表明 GMF1 处理与 CK 处理,GMF2 处理与 F1 处理在较短的距离处聚为一类,这表明它们的土壤微生物群落结构的 PLFAs 剖面有一定的相似性。而 GMF3 处理在较长的距离处与其他处理聚为一类,这表明 GMF3 处理的土壤微生物群落结构的 PLFAs 剖面与其他处理存在较大的差异,可见不同比例的绿肥和化肥配施对植烟土壤的微生物群落

结构具有较大的影响。

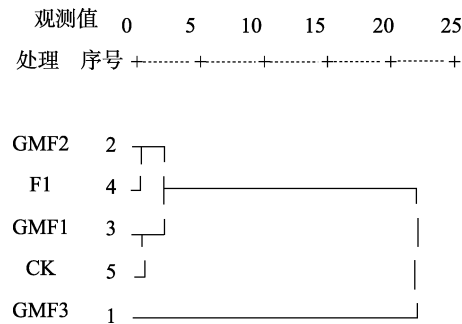


图 2 不同施肥处理土壤微生物 PLFAs 的聚类分析
Fig. 2 Cluster analysis of soil microbial PLFAs under different fertilization

2.5 土壤养分与微生物群落的相关性分析

土壤养分与特征微生物群落的相关性分析结果(表 3)表明,土壤微生物生物量碳与细菌和 G-菌的 PLFAs 含量达到极显著正相关,与 G+ 菌和微生物总 PLFAs 含量达到显著正相关。这表明 PLFA 分析方法测定的土壤 PLFAs 与氯仿熏蒸法测定的微生物生物量碳之间具有很好的一致性。

细菌、G-菌和微生物总 PLFAs 含量与速效钾含量达到了显著正相关;速效磷含量与 G-菌的 PLFAs 含量达到了显著性正相关,与细菌和微生物总 PLFAs 含量未达到显著相关,但均具有较高的相关系数。各菌群的 PLFAs 与 pH、有机质、碱解氮和全氮间无显著相关,且相关系数较低。由此可知,土壤速效钾和速效磷与土壤的微生物群落结构具有密切的联系。

表 3 土壤养分与特征微生物 PLFAs 的相关性分析
Table 3 Correlation analysis between soil nutrients and characteristic microbial PLFAs

	pH	有机质	碱解氮	速效磷	速效钾	全氮	微生物生物量碳
细菌	-0.181	0.814	0.732	0.849	0.878*	0.101	0.975 **
革兰氏阳性菌 G+	-0.298	0.811	0.816	0.849	0.784	0.070	0.926 *
革兰氏阴性菌 G-	-0.226	0.802	0.722	0.870*	0.879*	0.043	0.965 **
G +/ G-	-0.466	-0.246	0.190	-0.281	-0.680	-0.114	-0.447
真菌	-0.590	0.284	0.296	0.598	0.543	-0.481	0.636
真菌/细菌	-0.575	-0.714	-0.559	-0.363	-0.432	-0.749	-0.364
AM 真菌	-0.661	0.481	0.665	0.657	0.429	-0.270	0.643
微生物总 PLFAs	-0.270	0.749	0.668	0.856	0.866*	-0.031	0.947 *

注：* 表示在 $P<0.05$ 水平显著相关；** 表示在 $P<0.01$ 水平极显著相关。

3 结论与讨论

3 年绿肥和化肥配施增加了植烟土壤中 PLFAs 的种类和数量,但施肥对土壤中 PLFAs 的影响与施肥量、肥料配比等有关^[15]。绿肥作为一种重要的有机肥料,在与化肥配施时,不同配施比例对土壤微生物群落结构的影响具有明显的差异。在常规施肥的基础上配施绿肥,明显提高了土壤细菌、真菌、放线菌以及微生物总 PLFAs 含量,这是由于配施绿肥后增加了输入系统的碳量,而碳量经常是微生物繁殖的限制因子^[16];随着化肥施用量的减少,土壤的微生物群落结构出现了较大的变化,在翻压绿肥 15 000 kg/hm²

物群落结构的影响具有明显的差异。在常规施肥的基础上配施绿肥,明显提高了土壤细菌、真菌、放线菌以及微生物总 PLFAs 含量,这是由于配施绿肥后增加了输入系统的碳量,而碳量经常是微生物繁殖的限制因子^[16];随着化肥施用量的减少,土壤的微生物群落结构出现了较大的变化,在翻压绿肥 15 000 kg/hm²

的基础上,当施用化肥量大于常规施肥的 85% 时,对植烟土壤的细菌、AM 真菌和微生物总 PLFAs 含量具有明显的提升作用;但当配施的化肥量减至常规施肥的 70% 时,土壤中的细菌、真菌及微生物总 PLFAs 含量均小于常规施肥处理。可见在绿肥和化肥配施时,限制化肥用量会对土壤微生物量的增加产生抑制作用,这与李正等人^[15]的研究结果一致。

Kieft 等^[17]认为,节杆菌等 G+ 菌对饥饿条件适应能力极强,而假单胞菌等 G- 菌对环境胁迫的适应能力较差,受底物供应水平影响显著,豆科绿肥是一种 C/N 值比较低的有机肥料,极易腐解,为土壤微生物提供了大量可利用的有机碳源,因此不施肥的 CK 处理的 G+/G- 比值明显高于施肥处理,而翻压绿肥的 GMF3 处理和 GMF1 处理的 G+/G- 比值明显低于 F1 处理。不同处理中以 CK 处理的真菌/细菌比值最高,这表明不施肥处理的土壤真菌丰富程度有所提高,而施肥处理却降低了真菌/细菌比值,其结果与 Bardgett 等人^[18]的研究结果一致,这可能与施肥后有利于细菌的生长,而真菌较细菌更能适应养分贫瘠的土壤有关^[19]。

土壤微生物生物量碳是反映土壤微生物活性的直接指标^[20],而 PLFAs 作为微生物细胞膜的重要组成部分,其总量已经成为表征现时活体微生物量的指标^[21]。在本试验中,土壤细菌和 G- 菌的 PLFAs 含量与土壤微生物生物量碳含量呈极显著正相关,与 G+ 菌和微生物总 PLFAs 含量呈显著正相关,可以推断,土壤微生物生物量碳的变化主要源于土壤中细菌尤其是 G- 菌的变化,这与毕明丽等人^[22]的研究不一致,其原因可能是不同肥料种类导致土壤微生物群落结构短期变化所致。有机质、全氮和碱解氮对土壤微生物无显著影响,其原因可能是由于本试验中大量含有较高氮素的豆科绿肥的施入,提高了土壤中的碳量和氮量,因此土壤微生物的生长未受到碳素和氮素的胁迫,其对土壤微生物无显著影响。随着化肥施用量的减少,土壤中的磷素和钾素均相应地减少,且随着种植年限的增长,土壤中微生物受磷素和钾素养分匮乏的影响增加,致使微生物表现出对磷、钾养分的依赖,其中速效钾含量与土壤细菌和微生物总量的相关性达到了显著水平,土壤速效磷含量虽与土壤的微生物总量虽未达到显著相关,但具有较高的相关系数。因此速效钾和速效磷可能是本研究中土壤微生物生长的主要影响因素。

参考文献:

[1] Kandeler E, Tscherko D, Bardgett RD, Hobbs PJ, Kampichler C, Jones TH. The response of soil microorg-

anisms and roots to elevated CO₂ and temperature in a terrestrial model ecosystem[J]. *Plant and Soil*, 1998, 202(2): 251–262

- [2] White DC, Davis WM, Nickels JS, Nickels JS, King JD, Bobbie RJ. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate[J]. *Oecologia*, 1979, 40(1): 51–62
- [3] 于树, 汪景宽, 李双异. 应用 PLFA 方法分析长期不同施肥处理对玉米地土壤微生物群落结构的影响[J]. *生态学报*, 2008, 28(9): 4 222–4 225
- [4] Dick RP. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1992, 40: 25–36
- [5] 白震, 张旭东, 何红波, 闫颖, 侯松岷, 陈盈, 解宏图. 长期氮肥施用对农田黑土 NLFA 与 PLFA 特性的影响[J]. *土壤学报*, 2007, 44(4): 709–714
- [6] White DC, Stair JO, Ringelberg DB. Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis[J]. *Journal of Industry Microbiology & Biotechnology*, 1996, 17: 185–196
- [7] Frostegård Å, Bååth E, Tunlio A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(6): 723–730
- [8] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 146–190
- [9] Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegård Å. Changes in soil fungal: Bacterial ratios following reductions in the intensity of management of upland grassland[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22: 261–264
- [10] Zelles L. Identification of single cultured micro-organisms based on their whole community fatty acid profiles using extraction procedure[J]. *Chemosphere*, 1999, 39: 665–682
- [11] Steinberger Y, Zelles L, Bai QY, Lützw MV, Munch JC. Phospholipid fatty acid profiles as indicators for community structure in soil along a climatic transect in the Judean Desert[J]. *Biology and Fertility of Soil*, 1999, 28: 292–300
- [12] Frostegård Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil[J]. *Biology and Fertility of Soil*, 1996, 22: 59–65
- [13] Bååth E, Anderson TH. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(7): 955–963
- [14] Gagliardi JV, Buyer JS, Angle JS, Russek-Cohen E. Structural and functional analysis of whole-soil microbial communities for risk and efficacy testing following microbial inoculation of wheat roots in diverse soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(1): 25–40
- [15] 李正, 刘国顺, 敬海霞, 叶协锋, 解昌盛, 向永光, 张文平, 杨超, 王永, 习相银. 绿肥与化肥配施对植烟土壤微生物量及供氮能力的影响[J]. *草业学报*, 2011, 20(6): 126–134
- [16] Gunapala N, Scow KM. Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30(6): 126–134

- 805–816
- [17] Kieft TL, Ringelberg DB, White DC. Changes in ester-linked PLFA profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(9): 3 292–3 299
- [18] Bardgett RD, Lovell RD, Hobbs PJ, Jarvis SC. Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(7): 1 021–1 030
- [19] Clegg CD. Impact of cattle grazing and inorganic fertilizer additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2006, 31(1): 73–82
- [20] Alvarez CR, Alvarez R. Short-term effects of tillage systems on active soil microbial biomass[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 31(2): 157–161
- [21] Bohme L, Langer U, Bohme F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2005, 109: 141–152
- [22] 毕明丽, 宇万太, 姜子绍, 马强, 张璐, 徐永刚. 利用 PLFA 方法研究不同土地利用方式对潮棕壤微生物群落结构的影响[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(9): 1 834–1 842
- [23] 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[J]. *生态学报*, 2011, 31(12): 3 308–3 314

Effects of Green Manure Application Combined with Chemical Fertilizers on Soil Microbial Community Structure of Tobacco-planting Soil

SI Guo-han¹, WANG Rui², YUAN Jia-fu¹, TAN Jun², XIONG You-sheng¹, XU Da-bing¹, ZHAO Shu-jun^{1*}

(1 *Plant Protection and Soil Fertilizer Institute, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China;*

2 *Enshi Branch of Hubei Tobacco Company, Enshi, Hubei 445000, China*)

Abstract: Soil microbial community can indicate soil quality change and is regarded as the early warning and the sensitive indicator. In order to study the effects of green manure application combined with chemical fertilizers on soil microbial community structure of tobacco-planting soils, the phospholipid fatty acids (PLFAs) were determined in 3a located experiment. The results showed that fertilization increased the kinds and amounts of soil PLFAs. The bacterial PLFAs, arbuscular mycorrhizal fungi PLFAs and total soil microbial PLFAs were enhanced distinctly when the amount of chemical fertilizers used more than 85% of conventional dosage with burying 15 000 kg/hm² green manure. The negative effect on soil microbial community structure was appeared when the amount of chemical fertilizers was used less than 70% of conventional dosage with burying 15 000 kg/hm² green manure. Principal component analysis and cluster analysis indicated that soil microbial community structure changed due to the ratio of green manure and chemical fertilizers. Correlation analysis showed the high agreement between chloroform–fumigation extraction and PLFA methods, available potassium and phosphorus were significantly positively correlated with the G-PLFAs, but not correlated with fungi PLFAs.

Key words: Green manure, Tobacco-planting soils, Phospholipid fatty acids, Microbial community structure