

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2020.06.015

郝燕, 李金霞, 孙小妹, 等. 沼液对河西绿洲葡萄园土壤微生物功能多样性的影响. 土壤, 2020, 52(6): 1203–1211.

沼液对河西绿洲葡萄园土壤微生物功能多样性的影响^①

郝燕, 李金霞, 孙小妹, 陈年来*

(甘肃农业大学资源与环境学院, 兰州 730070)

摘要: 在甘肃祁连葡萄观光园进行了增施沼液试验, 旨在探明沼液施用量和年限对土壤质量和土壤微生物功能多样性的影响, 试验设置的处理包括: 对照处理(施用化肥, N 180 kg/hm², P₂O₅ 150 kg/hm², K₂O 22.5 kg/hm²)、沼液替代化肥处理(33%、67% 和 100% 化肥氮分别被沼液氮替代)及沼液增施处理(沼液氮用量分别为化肥氮的 133%、167% 和 200%), 采用 Biolog-ECO 微平板法测定土壤微生物功能多样性。结果表明: ①33% 沼液处理的土壤微生物群落代谢活性最高, 连续 2a 使用沼液的处理间差异大于 1a 使用。②土壤微生物利用的主要碳源为碳水化合物类, 使用沼液能够显著提高土壤微生物对氨基酸类和羧酸类碳源的利用率。连续两年使用沼液, 133% 和 167% 沼液处理的效果优于其他处理。③与对照相比, 使用沼液处理仅在提高土壤微生物均一度指数方面存在优势, 且 133% 和 167% 沼液处理效果优于其他处理。④主成分分析表明, 沼液使用量和使用年限对土壤微生物碳源利用水平以及代谢多样性的影响有差异, 且使用年限增加能使各处理间变异程度增大。⑤碳水化合物类和氨基酸类碳源是引起不同沼液处理土壤微生物功能群分异的主要碳源, 其中碳水化合物类是沼液使用年限增加后土壤微生物群落变化的敏感碳源。⑥Pearson 相关性分析表明, 土壤微生物功能多样性与土壤有机质、碱解氮含量呈正相关关系, 与有效磷、速效钾含量呈负相关关系。综上, 长期使用沼液(尤其是沼液与化肥配施)有利于提高土壤微生物代谢活性和土壤微生物群落功能多样性, 且当沼液使用量较大时可以完全取代化肥。

关键词: 沼液; 使用年限; Biolog-ECO 微平板法; 土壤微生物功能多样性

中图分类号: S154.1 文献标志码: A

Effects of Biogas Slurry on Soil Microbial Functional Diversity of Vineyard in Hexi Oasis

HAO Yan, LI Jingxia, SUN Xiaomei, CHEN Nianlai*

(College of Resources and Environment, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: A 2a field experiment was conducted in Qilian Grape Sightseeing Garden of Gansu Province in order to investigate the effects of biogas slurry application amount and year on soil quality and soil microbial functional diversity. The designed treatments included CK treatment (pure chemical fertilizer, N 180 kg/hm², P₂O₅ 150 kg/hm², K₂O 22.5 kg/hm²), biogas slurry replacing chemical fertilizer treatments (biogas slurry nitrogen replaced 33%, 67% and 100% of chemical fertilizer nitrogen), and increasing biogas slurry treatments (biogas slurry nitrogen were 133%, 167% and 200% of chemical fertilizer nitrogen). Soil microbial functional diversity was determined by Biolog method. The results showed that metabolic activity of soil microbial community was the lowest in 100% biogas slurry treatment but the highest in 33% biogas slurry treatment. Meanwhile the differences in metabolic activity between the treatments with 2a application biogas slurry were greater than those of 1a. The main carbon sources used by soil microbes were carbohydrates, biogas slurry application significantly increased the utilization rates of amino acids and carboxylic acids. Under the condition of applying biogas slurry for 2a, the effects of 133% and 167% biogas slurry treatments were better than those of other treatments. Compared with CK, biogas slurry application only had obvious advantage in promoting the McIntosh index, and the effects of 133% and 167% biogas slurry treatments were better than those of other treatments. Principal component analysis (PCA) showed that biogas slurry applying amount and year had different effects on soil microbial carbon source utilization rate and metabolic diversity, and the variation degree among treatments increased with increasing applying year of biogas slurry. Carbohydrates and amino acids were the main carbon sources that caused the

①基金项目: 甘肃农业大学盛彤笙科技创新基金项目(31270472)和沼液综合利用研究项目(037036235)资助。

* 通讯作者(chennl@gsau.edu.cn)

作者简介: 郝燕(1992—), 女, 江苏扬州人, 硕士研究生, 主要从事植物生态学研究。E-mail: 1447397812@qq.com

differentiation of soil microbial functional groups treated with different amounts of biogas slurry, and carbohydrates were the sensitive carbon sources for soil microbial community changes after the increase of applying year of biogas slurry. Pearson correlation analysis showed that soil microbial community functional diversity had positive correlation with soil organic matter and available N, and negative correlation with available P and K. In conclusion, biogas slurry application (particularly combined with chemical fertilizer) is beneficial to improve soil microbial metabolic activity and soil microbial community functional diversity, and it can completely replace chemical fertilizer when enough amount is applied.

Key words: Biogas slurry; Application years; Biolog-ECO microplate method; Soil microbial functional diversity

随着乡村畜禽养殖业的迅速发展,畜禽粪便的产生量增长加快,已占农业有机废弃物的 2/5 以上^[1],超过 220 亿 t 的年固废产量使畜禽养殖业成为仅次于造纸废水污染的社会公害。据推算,2020 年我国畜禽粪便的产生量将达到 28.75 亿 t,其中羊粪占比 13.25%、猪粪占比 19.59%、牛粪占比 33.85%;2030 年我国畜禽粪便的产生量将进一步提高到 37.43 亿 t,羊粪、猪粪、牛粪的占比将分别达到 15.08%、15.71%、44.61%^[2]。畜禽粪便的大量产生对我国生态环境造成严重威胁,其中牛粪占比最大,增长幅度较快,因此如何有效、充分利用牛粪成为畜禽养殖业可持续发展的首要问题。

沼液是作物秸秆和人畜粪便等原料经过沼气池厌氧发酵制取沼气后的有机残留物,是畜禽粪便资源化利用的直接途径。厌氧发酵后产生的沼液除碳素损失较大外,90% 的营养成分仍得以保持,是一种速效有机液体肥料^[3]。大量研究表明,沼液可以改善农田土壤肥力^[4-5]、提高农产品产量和品质^[6-7]、预防和控制作物病害^[8],增加土壤微生物生物量碳氮含量^[9]。因此,以畜禽粪便为原料的沼液应用于作物生产既可以节约化肥的使用量,减轻其对环境的污染,又能解决养殖业产生的粪污问题。

Galvez 等^[10]研究发现适量的沼液可以改善土壤质量,使土壤中各类营养元素更加均衡;Abubaker 等^[11]研究发现合理使用沼液可以提高小麦产量和品质;Terhoeven Urselmans 等^[12]研究发现沼液农用可以进一步提高土壤酶活性。目前关于沼液还田的研究主要集中在土壤质量、作物产量和品质、土壤酶活性等方面,但关于以牛粪为原料的沼液在农作物上的应用,尤其是沼液化肥配施以及使用年限对作物根际土壤微生物功能多样性的研究鲜有报道。

土壤微生物功能多样性是衡量土壤质量和健康状况的重要生物学指标,能够反映土壤微生物群落组成和结构变化^[13-14]。随着土壤微生物研究方法的进步与革新,许多高新技术被应用于土壤微生物功能多样性的研究,目前使用较多的是 Biolog 法。Biolog 法

是一种通过测定土壤微生物对不同碳源利用能力及其代谢差异,进而用以表征土壤微生物功能多样性的方法,因其具有简便、灵敏、迅速等优点而被广泛地使用^[15]。

因此,本文以牛粪发酵的沼液为原料,通过连续 2a 大田试验研究沼液替代与增施对土壤微生物功能多样性的影响,旨在探讨土壤微生物群落结构对沼液使用量和使用年限的响应,为绿洲农田土壤质量改善和沼液资源化利用提供理论依据和科学指导。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

试验于 2017 年 5 月至 2018 年 8 月在甘肃省高台县祁连葡萄观光园内进行。该试验区属大陆性干旱荒漠草原气候,年均日照时数 3 118 h,无霜期 150 d,年均气温 7.5 °C,极端最高气温 38.7 °C,极端最低气温 -31 °C,昼夜温差大,园区海拔 1 359 m。土壤为风沙土,0~20 cm 土层有机质含量 10.96 g/kg,碱解氮含量 52.73 mg/kg,有效磷含量 20.14 mg/kg,速效钾含量 138.67 mg/kg, pH 为 7.32。

1.2 试验材料

供试葡萄品种为红巴拉多,4a 生,小棚架栽培,独龙干形整枝,种植行距 4 m,株距 0.9 m,密度 2 775 株/hm²。

供试沼液为牛粪经正常厌氧发酵产生沼气后固液分离的原沼液,采自甘肃省高台县方正节能科技服务有限公司。该原液含有机质 55.6 g/L、全氮 2.6 g/L、全磷 0.12 g/L、全钾 3.6 g/L、速效氮 1.4 g/L、速效磷 0.04 g/L、速效钾 2.2 g/L。

1.3 试验设计

田间试验采用裂区设计,主区为沼肥使用年限,设 1a 和 2a 两个处理;副区为沼液用量,设置沼液替代(利用沼液替代化学肥料中 33%、67% 和 100% 氮素)和沼液增施(沼液氮用量相当于对照氮素用量的 133%、167% 和 200%)2 组处理。经换算,沼液替代组沼液用量为 35 775、72 675、100 530 kg/hm²,沼液增施组沼液用量为 133 650、167 805、198 090 kg/hm²。

以传统施肥(化肥配施, 折纯养分为 N 180 kg/hm²、P₂O₅ 150 kg/hm²、K₂O 22.5 kg/hm²)为对照, 每个处理 3 次重复, 共 39 个小区, 小区面积为 72 m²。

沼液使用时间与当地习惯施肥相同, 即第一次 5 月上旬, 第二次 6 月中旬, 第三次 7 月中旬。试验期间葡萄园整枝、除草、疏穗、病虫害防治等农事操作按常规方式进行。

1.4 土壤样品采集及处理

土壤取样时间为 2018 年 7 月中旬。为使土样具有代表性, 采用五点法分别在每个小区随机选 5 个点, 每个点在距葡萄主根 15 cm 处, 分别采集 0~20 cm 土层样品, 混合均匀, 快速剔除植物残体后放入冰盒并及时运回实验室, 置于冷冻冰箱(温度控制在 4℃)保存用于测定土壤微生物功能多样性。

1.5 土壤理化性质测定

土壤 pH 采用电位法测定, 土壤有机质(SOM)采用重铬酸钾-外加热法测定, 碱解氮(AN)采用碱解扩散法测定, 有效磷(AP)采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法测定, 速效钾(AK)采用 NH₄OAc 浸提-火焰光度法测定^[16]。

1.6 土壤微生物功能多样性测定

土壤微生物功能多样性采用 Biolog-ECO 微平板(BIOLOG EcoPlatesTM)法测定^[17]。在超净工作台中称取 10 g 土样于 250 ml 灭菌三角瓶中, 加入 90 ml 浓度为 0.85 g/ml 的 NaCl 溶液后封口, 振荡 1 h(220 r/min), 静置 30 min, 吸取 5 ml 上清液于装有 45 ml 浓度为 0.85 g/ml NaCl 溶液的三角瓶中, 振荡 30 min(220 r/min)后备用。用 Biolog 系统自带加样器将其接种到培养板上, 每个微孔 150 μl, 每样 1 板, 3 次重复, 之后放入 25℃ 恒温培养箱中连续培养 240 h。每隔 24 h 用 Biolog 配套读数器分别读取 ECO 培养板在 590 nm(颜色+浊度)和 750 nm(浊度)波长下的吸光值。

通过计算平均颜色变化率(average well color development, AWCD)来反映土壤微生物整体活性, 并通过计算 Shannon-Wiener 多样性指数(H')、McIntosh 均一度指数(U)、Simpson 优势度指数(D)以及碳源丰富度指数(S)来表征土壤微生物群落代谢功能多样性^[18]。

AWCD 作为反映土壤微生物群落利用单一碳源的重要指标, 其随着培养时间的变化曲线可以揭示土壤微生物群落的代谢强度。计算公式如下:

$$AWCD = \sum_{i=1}^{31} (C_i - R) / 31 \quad (1)$$

式中: C_i 为各反应孔在 590 nm 和 750 nm 下的吸光值

之差; R 为对照孔在 590 nm 和 750 nm 下的吸光值之差; $C_i - R < 0$ 时记为 0。

Shannon-Wiener 多样性指数(H'):

$$H' = -\sum P_i \cdot \ln P_i \quad (2)$$

式中: P_i 为第 i 孔的相对吸光值与微平板所有相对吸光值总和之比(下同), 计算公式如下:

$$P_i = (C_i - R) / \sum (C_i - R) \quad (3)$$

McIntosh 指数(U):

$$U = \sqrt{\sum n_i^2} \quad (4)$$

式中: n_i 为第 i 孔的相对吸光值($n_i = C_i - R$)。

Simpson 优势度指数(D):

$$D = 1 - \sum P_i^2 \quad (5)$$

碳源利用丰富度指数(S):

S =被利用碳源总数(相对吸光值>0.200 的反应孔数目) (6)

1.7 数据处理

本文数据均用 3 次重复的平均值表示。数据经 Excel 2018 软件整理后, 运用 SPSS 21.0 统计分析软件进行单因素方差分析、主成分分析和 Pearson 相关性分析, 差异显著性分析采用 Duncan 新复极差法, 显著性水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 沼液使用量对土壤微生物整体代谢活性的影响

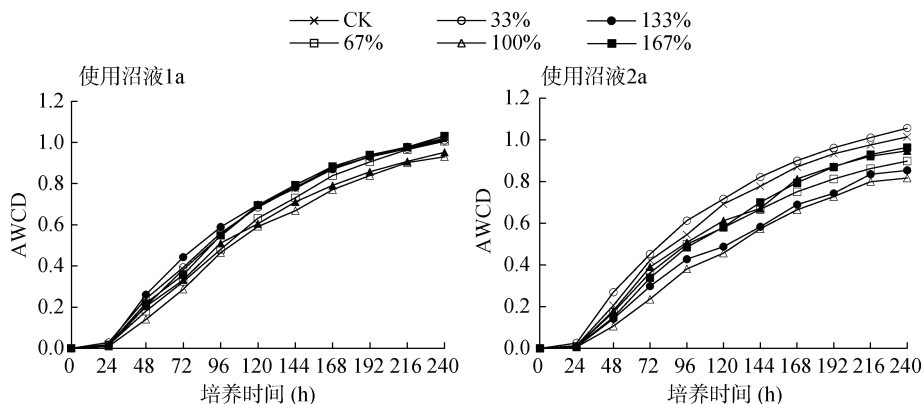
各处理土壤样品 AWCD 值均随培养时间延长呈现类似 logistic 的增长态势(图 1)。0~24 h(缓慢期)各样品 AWCD 值无明显变化, 24~96 h(对数期)AWCD 值快速升高, 96~168 h(减速期)上升速度减缓, 168~240 h(稳定期)曲线基本平稳(图 1)。

使用沼液 1a 时, 在对数期, 133% 沼液处理 AWCD 值最大, 100% 沼液处理 AWCD 值最小; 在减速期至稳定期, 67%、100%、200% 沼液处理间 AWCD 值出现明显差异, 其余处理 AWCD 曲线发生重合。使用沼液 2a 时, 各处理间 AWCD 值差异于对数期开始显现, 33% 沼液处理 AWCD 值最大, 单施化肥的 CK 处理次之, 67%、167%、200% 沼液处理居中, 133%、100% 沼液处理最小; 在减速期, 67%、167%、200% 沼液处理 AWCD 曲线出现交叉现象; 在稳定期, 67% 沼液处理 AWCD 值上升速度减缓, 与其他处理差异明显, 167%、200% 沼液处理 AWCD 曲线基本重合。

对比沼液使用不同年限土壤样品 AWCD 变化曲线发现, 33% 沼液处理土壤微生物代谢活性始终较

高, 100% 沼液处理土壤微生物代谢活性始终最低。使用沼液 2a 的土壤样品 AWCD 平均值(0.584)略低于

使用沼液 1a 土壤样品(0.631), 但各处理间差异较第 1 年更明显。



(图例中 CK 为单施化肥处理, 33%、67%、100% 分别表示沼液替代 33%、67%、100% 化肥氮量处理, 133%、167%、200% 分别表示沼液氮用量为化肥氮的 133%、167%、200% 处理; 下同)

图 1 不同沼液处理下土壤微生物的 AWCD 曲线

Fig. 1 AWCDs of soil microbial communities under different biogas slurry treatments

2.2 沼液使用量对土壤微生物群落碳源利用强度的影响

总体来看, 试验区土壤微生物利用的主要碳源是碳水化合物类, 其次是氨基酸类、聚合物类、羧酸类, 分别占总碳源利用量的 41.36%、20.41%、14.68%、14.16%, 对酚酸类和胺类碳源的利用率不足总碳源的 10%(图 2)。使用沼液能够明显提高土壤微生物对除碳水化合物外其他碳源的利用能力, 使用沼液 1a 时的提高幅度大于使用沼液 2a 时(图 2)。

使用沼液 1a 时, 200% 沼液处理土壤微生物对碳水化合物类碳源利用率与 CK 间无显著差异, 其余沼液处理均使土壤微生物对其他碳源的利用率提高, 其中 67% 沼液处理对氨基酸类碳源的利用率最高, 比 CK 显著提高 34.0%; 33% 和 167% 沼液处理对羧酸类碳源利用率最高, 分别比 CK 显著提高 46.7% 和 38.1%; 对聚合物类、酚酸类、胺类碳源利用率最高的是 67%、133%、67% 沼液处理, 与 CK 相比分别提高 7.1%、103.4%、70.2%, 但无显著差异。

使用沼液 2a 时, 各沼液处理使土壤微生物对除碳水化合物外其他碳源的利用率均有所提高, 其中, 33% 和 133% 沼液处理使土壤微生物对氨基酸类和羧酸类碳源的利用率显著提高 12.8%、33.2% 和 41.8%、22.9%, 其余处理碳源利用率与 CK 无显著差异。对聚合物类、酚酸类、胺类碳源利用率最高的是 100%、167%、133% 沼液处理, 与 CK 相比分别提高 13.8%、40.5%、48.2%, 但无显著差异。

综上, 使用沼液能显著提高氨基酸类和羧酸类碳源的利用率, 同时酚酸类和胺类碳源的利用率也得到

大幅度提高, 说明使用沼液改变了土壤微生物的适宜性, 从而影响其对碳源的选择性利用。

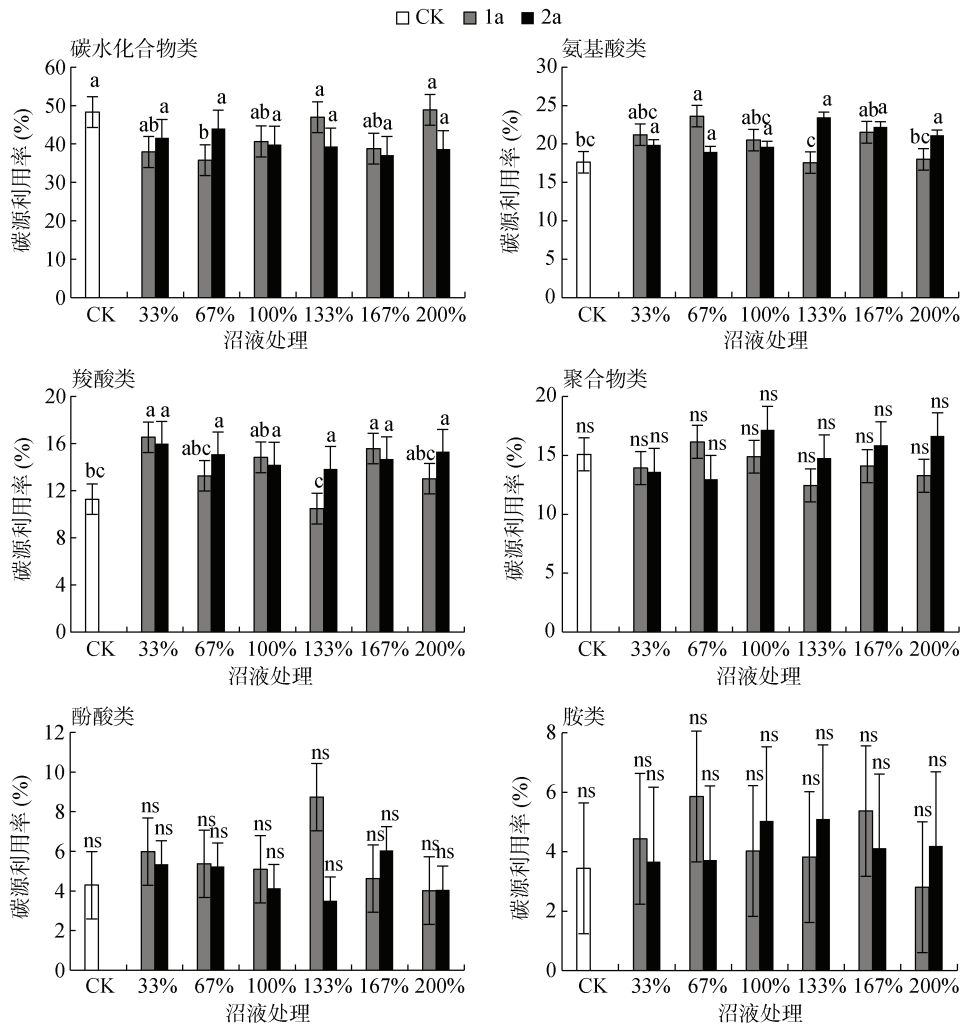
2.3 沼液使用量对土壤微生物群落功能多样性的影响

沼液用量对供试葡萄园土壤微生物 McIntosh 均一度指数 U 产生明显影响, 但对 Shannon-Wiener 多样性指数 H'、碳源丰富度指数 S 和 Simpon 优势度指数 D 影响不大(表 1), 连续 2a 使用沼液, 100% 沼液处理的 McIntosh 均一度指数显著低于 33% 沼液处理。无论是 Shannon-Wiener 多样性指数和 McIntosh 均一度指数, 还是 Simpon 优势度指数和碳源丰富度指数均为 100% 沼液处理最低, 说明沼液完全替代化肥远不如沼液化肥配施亦或使用高量沼液效果理想。

2.4 土壤微生物群落功能主成分分析

根据主成分分析法(PCA), 在使用沼液 1a 和 2a 试验样品中各自提取 9 个主成分(特征根>1), 累积贡献率分别达 84.38% 和 86.44%, 第 1 主成分(PC1)贡献率分别是 25.12% 和 35.12%, 第 2 主成分(PC2)贡献率分别是 14.45% 和 10.93%。因第 3 至第 9 主成分方差贡献率较小, 本文选取第 1 主成分和第 2 主成分作图来表征土壤微生物群落碳源代谢特征(图 3)。

使用沼液 1a 时, 133%、200% 沼液处理主要分布在第二象限, 100% 沼液处理主要分布在第三象限, 33%、67% 和 167% 沼液处理主要分布在第四象限, CK(单施化肥)主要分布在 PC1 和 PC2 轴上, 表明 133%、200% 沼液处理碳源利用方式相似, 33%、67% 和 167% 沼液处理碳源利用方式相似, 而单施化肥、100% 沼液处理与上述两类土壤微生物群落代谢结构存在明显差异。



(图中不同小写字母表示同一年限下各处理间差异显著($P<0.05$), ns 表示差异不显著;下同)。

图 2 不同沼液处理下土壤微生物碳源利用率

Fig. 2 Use efficiency of soil microbial carbon source under different biogas slurry treatments

表 1 不同沼液处理下土壤微生物群落功能多样性指数变化

Table 1 Functional diversity indexes of soil microbial communities under different biogas slurry treatments

沼液处理	Shannon-Wiener 多样性指数 H'		McIntosh 均一性指数 U		Simpon 优势度指数 D		碳源丰富度指数 S	
	1a	2a	1a	2a	1a	2a	1a	2a
CK	3.161 ± 0.021 a	3.161 ± 0.021 a	3.732 ± 0.134 ab	3.732 ± 0.134 ab	0.951 ± 0.002 a	0.951 ± 0.002 a	22±1a	22±1a
33%	3.133 ± 0.043 a	3.107 ± 0.129 a	3.854 ± 0.530 ab	4.185 ± 0.585 a	0.949 ± 0.003 a	0.947 ± 0.010 a	22±2a	21±4a
67%	3.138 ± 0.049 a	3.075 ± 0.063 a	3.322 ± 0.375 ab	3.557 ± 0.237 ab	0.949 ± 0.003 a	0.946 ± 0.004 a	22±3a	20±2a
100%	3.091 ± 0.073 a	3.040 ± 0.087 a	3.260 ± 0.326 ab	2.810 ± 0.397 b	0.947 ± 0.005 a	0.940 ± 0.009 a	19±2a	19±2a
133%	3.126 ± 0.010 a	3.093 ± 0.022 a	4.095 ± 0.520 ab	3.121 ± 0.468 ab	0.950 ± 0.001 a	0.944 ± 0.003 a	22±0a	19±1a
167%	3.119 ± 0.038 a	3.152 ± 0.022 a	3.848 ± 0.026 ab	3.333 ± 0.362 ab	0.949 ± 0.002 a	0.950 ± 0.002 a	21±1a	21±1a
200%	3.128 ± 0.013 a	3.093 ± 0.036 a	3.604 ± 0.446 ab	3.606 ± 0.301 ab	0.948 ± 0.001 a	0.947 ± 0.002 a	22±1a	22±1a

使用沼液 2a 时, 33%、167% 沼液处理主要分布在第一象限, 200% 沼液处理主要分布在第二象限, 67% 沼液处理主要分布在第三象限, CK、100%、133% 沼液处理主要分布在第四象限, 表明 33%、167% 沼液处理碳源利用方式相似, CK、100% 和 133% 沼液处理碳源利用方式相似, 而 67%、200% 沼液处理与上

述两类土壤微生物群落代谢结构具有明显差异。此外, 可以推测沼液和化肥对土壤微生物群落代谢存在交互影响, 但沼液对土壤微生物群落代谢结构的影响更大, 这可能与使用沼液后土壤养分发生变化有关。

使用沼液 1a 时, 决定 PC1 变异的碳源主要有 13 种, 其中碳水化合物 1 种(D-甘露醇), 羧酸 2 种(γ -

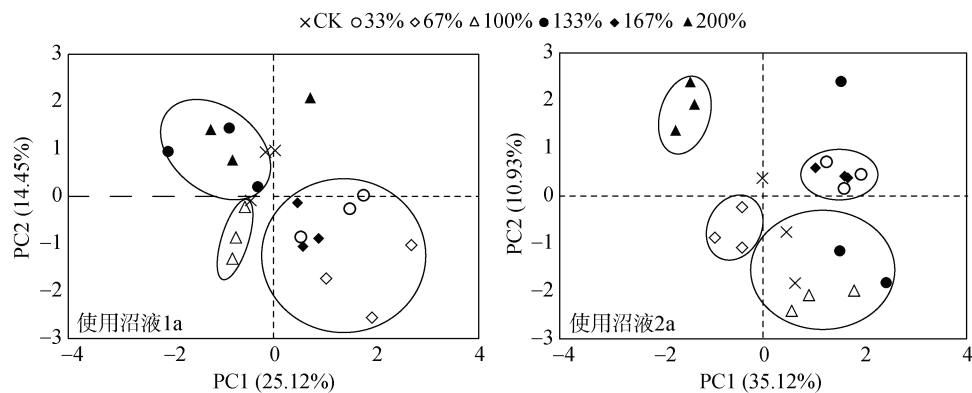


图 3 不同沼液处理下土壤微生物群落功能主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of microbial community function under different biogas slurry treatments

羟丁酸、衣康酸), 氨基酸 4 种(L-精氨酸、L-天门冬酰胺、L-丝氨酸、L-苏氨酸), 聚合物 2 种(吐温 40、吐温 80), 酚酸 2 种(2-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸), 胺 2 种(苯乙胺、腐胺); 决定 PC2 变异的碳源主要有 5 种, 其中碳水化合物 4 种(D-纤维二糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷、N-乙酰-D-葡萄糖胺、D-半乳糖酸- γ -内脂), 胺 1 种(腐胺)(表 2)。

使用沼液 2a 时, 决定 PC1 变异的碳源主要有 22 种, 其中碳水化合物 8 种(D-纤维二糖、 α -D-乳糖、 β -

甲基-D-葡萄糖苷、D-木糖、D-甘露醇、N-乙酰-D-葡萄糖胺、D,L- α -磷酸甘油、D-半乳糖酸- γ -内脂), 羧酸 3 种(丙酮酸甲酯、衣康酸、D-苹果酸), 氨基酸 4 种(L-天门冬酰胺、L-苯基丙氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸-L-谷氨酸), 聚合物 3 种(吐温 40、 α -环式糊精、肝糖), 酚酸 2 种(2-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸), 胺 2 种(苯乙胺、腐胺); 决定 PC2 变异的碳源主要有 5 种, 其中碳水化合物 2 种(D-葡萄糖胺酸、D-半乳糖醛酸), 羧酸 1 种(γ -羟丁酸), 氨基酸 2 种(L-精氨酸、L-天门冬酰胺)(表 2)。

表 2 31 种碳源在第 1、2 主成分上的载荷值

Table 2 Loaded values of 31 carbon sources on primary, secondary principal components (PC1,PC2) respectively

碳源类别	底物	使用沼液 1a		使用沼液 2a		碳源类别	底物	使用沼液 1a		使用沼液 2a	
		PC1	PC2	PC1	PC2			PC1	PC2	PC1	PC2
碳水化合物	D-纤维二糖	-	0.786	0.781	-	氨基酸类	L-精氨酸	0.704	-	-	-
	α -D-乳糖	-	-	0.647	-		L-天门冬酰胺	0.723	-	0.534	-
	β -甲基-D-葡萄糖苷	-	0.816	0.832	-		L-苯基丙氨酸	-	-	0.665	-
	D-木糖	-	-	0.551	-		L-丝氨酸	0.666	-	0.813	-
	i-赤藓糖醇	-	-	-	-		L-苏氨酸	0.599	-	-	-
	D-甘露醇	0.735	-	0.641	-	聚合物类	甘氨酸-L-谷氨酸	-	-	0.538	-
	N-乙酰-D-葡萄糖胺	-	0.723	0.793	-		吐温 40	0.655	-	0.562	-
	D-葡萄糖胺酸	-	-	-	0.504		吐温 80	0.636	-	-	-
	α -D-葡萄糖-1-磷酸	-	-	-	-		α -环式糊精	-	-	0.629	-
	D,L- α -磷酸甘油	-	-	0.570	-		肝糖	-	-	0.707	-
羧酸类	D-半乳糖酸- γ -内脂	-	0.758	0.832	-	酚类	2-羟基苯甲酸	0.547	-	0.532	-
	D-半乳糖醛酸	-	-	-	0.567		4-羟基苯甲酸	0.764	-	0.646	-
	丙酮酸甲酯	-	-	0.504	-	胺类	苯乙胺	0.806	-	0.556	-
	γ -羟丁酸	0.856	-	-	0.574		腐胺	0.604	-0.522	0.753	-
	衣康酸	0.590	-	0.674	-						
	α -丁酮酸	-	-	-	-						
	D-苹果酸	-	-	0.640	-						

结合表 2 可以发现,使用沼液 2a 显著提高了 7 种碳水化合物(D-纤维二糖、 α -D-乳糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-木糖、N-乙酰-D-葡萄糖胺、D,L- α -磷酸甘油、D-半乳糖酸- γ -内脂)、2 种羧酸(丙酮酸甲酯、D-苹果酸)、2 种氨基酸(L-苯基丙氨酸、甘氨酸-L-谷氨酸)和 2 种聚合物(α -环式糊精、肝糖)等共 13 种碳源的代谢能力。

2.5 土壤微生物功能多样性与土壤理化性质相关性

将土壤微生物功能多样性指数与土壤 pH、有机质以及速效养分进行相关性分析,由表 3 可以看出,使用沼液 1a 时,McIntosh 均一度指数与有效磷含量呈显著负相关($P<0.05$);碳源丰富度指数与 pH 呈显

著正相关($P<0.05$); Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 优势度指数与土壤理化因子间的相关性系数不显著。使用沼液 2a 时,Shannon-Wiener 多样性指数与有机质含量呈显著正相关($P<0.05$),与碱解氮含量呈极显著正相关($P<0.01$); McIntosh 均一度指数与 pH、速效钾含量呈显著负相关($P<0.05$),与有机质含量呈显著正相关($P<0.05$); Simpson 优势度指数与有机质含量呈显著正相关($P<0.05$),与碱解氮含量呈极显著正相关($P<0.01$); 碳源丰富度指数与有机质、碱解氮含量呈极显著正相关($P<0.01$)。因此,该试验地土壤微生物功能多样性与土壤有机质、碱解氮含量呈正相关关系,与有效磷、速效钾含量呈负相关关系。

表 3 微生物群落功能多样性指数与土壤理化性质相关性分析
Table 3 Correlation between functional diversity indexes of microbial community and soil physicochemical properties

理化指标	Shannon-Wiener 多样性指数 H'		McIntosh 均一度指数 U		Simpson 优势度指数 D		碳源丰富度指数 S	
	1a	2a	1a	2a	1a	2a	1a	2a
pH	0.053	0.068	0.227	-0.346*	-0.031	0.013	0.316*	-0.001
有机质	-0.183	0.302*	-0.008	0.311*	-0.199	0.351*	0.002	0.442**
碱解氮	-0.164	0.424**	-0.271	0.246	-0.221	0.435**	-0.158	0.507**
有效磷	-0.099	-0.022	-0.320*	-0.151	-0.135	-0.045	-0.055	-0.015
速效钾	0.049	0.108	-0.184	-0.353*	0.076	0.018	-0.214	-0.165

注: *表示显著相关($P<0.05$); **表示极显著相关($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 沼液使用量对土壤微生物整体代谢活性的影响

通常细菌板在 590 nm 波长下读数表征颜色变化,真菌板在 750 nm 波长下读数表征浊度变化,由于细菌板(26 ~ 37℃)和真菌板(26℃)培养温度相近^[19-20],故本文采用双波长检测,用 590 nm 与 750 nm 吸光值之差来表征细菌板的颜色变化,可以排除气泡、真菌引起的浊度变化等干扰。

平均颜色变化率(AWCD)能够有效反映土壤微生物群落利用碳源的能力(整体代谢活性),AWCD 值越大,表明土壤微生物整体代谢活性越高^[21]。唐海明等^[22]研究发现有机肥与化肥配施能显著提高土壤微生物利用碳源的整体能力,使土壤微生物的代谢活性得到显著增强。本研究发现,33% 沼液处理的土壤微生物代谢活性最高,可能是因为该替代比例可以极大改善土壤微生物群落的营养供应,进而提高土壤微生物群落代谢能力。经过 2a 沼液使用,100% 沼液处理土壤微生物代谢活性始终最低(与对照差异显著),说明沼液完全替代化肥(等氮量)会显著降低土壤

微生物群落整体代谢活性。

本研究还发现,除 33%、200% 沼液处理土壤微生物代谢活性于 2a 后略有提高外,其余处理土壤微生物代谢活性均降低,这与李娟等^[23]、孙瑞莲等^[24]研究结果不一致,可能是因为长期使用沼液有利于植物根系的生长,而植物根系与土壤微生物竞争养分,以致根系分泌大量化学物质抑制土壤微生物的活性^[25-26]。

3.2 沼液使用量对土壤微生物群落利用强度的影响

有机氮是土壤中有效氮的源和库,氨基酸类物质是有机氮的重要组成部分,土壤微生物可利用氨基酸合成植物生长调节剂以促进植物生长^[27]。此外,氨基酸类物质对有机质有正激发效应,能够加快土壤有机质的分解,降低土壤中有机质的含量^[28]。本研究发现,使用沼液 2a 各处理对氨基酸类碳源的利用率均显著提高,这是因为长期使用沼液使得碳源趋于稳定,促进了以氨基酸类物质为碳源的微生物群落的发育,能够加速土壤中有机质的分解。

酚酸类物质含量过高是农作物产生自毒作用的主要原因,前人研究表明使用有机肥能够降低土壤中酚酸类物质的含量^[29]。也有研究发现,使用生物有机肥可

显著提高微生物对酚酸类碳源的利用能力^[30]。本研究发现, 增施氮量处理(133%、167%沼液处理)能够大量消耗土壤中的酚酸类物质, 降低其在土壤中的积累, 从而在一定程度上抑制有害微生物的繁殖, 对减轻葡萄连作障碍有积极作用。

3.3 沼液使用量对土壤微生物群落功能多样性的影响

土壤微生物群落是土壤生态功能的基础, 一般来说, 使用沼液能够提高土壤微生物功能多样性指数^[31-32], 但本研究发现, 除 McIntosh 均一度指数外, 各沼液处理的土壤微生物 Shannon-Wiener 多样性指数和碳源丰富度指数均低于单施化肥对照, 可能是因为使用沼液能提高葡萄植株获取土壤养分的能力, 抑制土壤微生物的生长繁殖, 以致土壤微生物多样性明显降低^[33]。本研究还发现, 单施化肥处理 Shannon-Wiener 多样性指数较高, 而 McIntosh 均一度指数较低, 这可能是因为长时间使用化肥极大促进了某些微生物种群的生长代谢, 而他种微生物种群的生长代谢被抑制, 以致单施化肥处理下土壤微生物种类增加而均匀度下降^[34]。此外不同沼液使用年限土壤微生物多样性对沼液使用量的响应不一致, 说明沼液使用年限也是影响微生物多样性的一个重要因子, 可能是土壤间养分含量差异导致。

3.4 土壤微生物群落功能主成分分析

主成分分析表明, 不同沼液用量处理土壤微生物群落在碳源利用上存在较大差异, 长期使用沼液加剧了各处理间的变异程度, 增加了根际土壤微生物群落的变异性。这可能是因为沼液中丰富的营养成分使得土壤有机物质的含量和组成发生变化, 导致土壤中可提供的碳源种类及含量发生变化, 区分了不同碳源微生物, 最终产生了微生物功能多样性。此外, 使用沼液 2a 较使用沼液 1a 土壤微生物群落离散度大, 这是因为土壤微生物短期内会维持相对稳定, 只有长期使用沼液才会使土壤微生物区系结构发生变化, 使用年限间差异主要是由碳水化合物类碳源引起。

3.5 土壤微生物功能多样性与土壤养分的关系

土壤养分含量的高低对微生物功能多样性有重要影响^[35]。本研究发现, 土壤有机质和速效养分是影响土壤微生物功能多样性的重要因子。土壤微生物功能多样性与土壤有机质、碱解氮含量呈正相关, 与有效磷、速效钾含量呈负相关, 这与郝晓晖等^[36]、Dalmonech 等^[37]研究结果一致。钟芳等^[38]研究得出土壤微生物功能多样性与速效钾含量呈显著正相关, 与本研究结果不一致, 可能与本试验地土壤钾元素较丰

富有关。

本试验仅针对连续使用 2a 沼液的土壤微生物群落代谢活性及多样性进行研究, 结果表明沼液和化肥配施有利于提高土壤微生物代谢活性和土壤微生物群落功能多样性, 且当沼液使用量较大时能达到完全取代化肥的效果。而关于长期沼液农用对土壤微生物群落活性和多样性的影响以及是否对土壤质量带来负面影响等方面有待进一步研究。

4 结论

1) 沼液替代 100% 化肥氮处理对土壤微生物群落代谢活性影响最小, 沼液替代 33% 化肥氮处理对土壤微生物群落代谢活性影响最大。

2) 供试葡萄园土壤微生物主要利用碳水化合物类碳源, 其次是氨基酸类碳源。使用沼液能够改变土壤微生物的代谢结构, 显著提高土壤微生物对氨基酸类、羧酸类碳源的利用能力, 且随沼液使用年限增加, 增施氮量处理(133%、167% 沼液处理)在提高土壤微生物碳源利用能力方面较沼液部分替代化肥氮处理更具优势。

3) 各施肥处理土壤微生物 Simpson 优势度指数变化不明显, Shannon-Wiener 多样性指数、McIntosh 均一度指数和碳源丰富度指数均以沼液替代 100% 化肥氮处理最低。与单施化肥的对照相比, 使用沼液处理仅在提高土壤微生物 McIntosh 均一度指数方面存在优势, 增施氮量处理提高效果较好, 能使土壤生态系统更加稳定。

4) 结合主成分分析得出, 沼液处理下土壤微生物群落被划分为 3~4 个功能群, 碳水化合物类、氨基酸类是引起微生物类群分异的主要碳源, 其中碳水化合物类是沼液使用年限增加后土壤微生物群落发生变化的敏感碳源。

5) Pearson 相关性分析表明, 土壤有机质、碱解氮、有效磷和速效钾对土壤微生物功能多样性影响较大, 供试土壤微生物功能多样性与土壤有机质、碱解氮含量呈正相关关系, 与有效磷、速效钾含量呈负相关关系。

参考文献:

- [1] 朱宁, 马骥. 中国畜禽粪便产生量的变动特征及未来发展展望[J]. 农业展望, 2014, 10(1): 46-48, 74.
- [2] 王璟. 畜禽养殖污染的危害、主要原因及防治对策[J]. 养殖与饲料, 2018(11): 112-113.
- [3] 杨乐, 王开勇, 庞玮, 等. 新疆绿洲区连续五年施用沼液对农田土壤质量的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2012(5): 17-21.

- [4] 博文静, 郭立月, 李静, 等. 不同耕作与施肥方式对有机玉米田杂草群落和作物产量的影响[J]. 植物学报, 2012, 47(6): 637-644.
- [5] 李松林, 吕军, 张峰, 等. 高浓度沼液淹灌土水系统中氮、磷和有机物的动态变化[J]. 水土保持学报, 2011, 25(2): 125-129.
- [6] 唐微, 伍钧, 孙百晔, 等. 沼液不同施用量对水稻产量及稻米品质的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(12): 2268-2273.
- [7] 汪吉东, 曹云, 常志州, 等. 沼液配施化肥对太湖地区水蜜桃品质及土壤氮素累积的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(2): 379-386.
- [8] 曹云, 常志州, 马艳, 等. 沼液施用对辣椒疫病的防治效果及对土壤生物学特性的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(3): 507-516.
- [9] 尚斌, 陈永杏, 陶秀萍, 等. 猪场沼液对蔬菜病原菌的抑制作用[J]. 生态学报, 2011, 31(9): 2509-2515.
- [10] Galvez A, Sinicco T, Cayuela M L, et al. Short term effects of bioenergy by-products on soil C and N dynamics, nutrient availability and biochemical properties[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2012, 160: 3-14.
- [11] Abubaker J, Risberg K, Pell M. Biogas residues as fertilisers - Effects on wheat growth and soil microbial activities[J]. Applied Energy, 2012, 99: 126-134.
- [12] Terhoeven-Urselmans T, Scheller E, Raubuch M, et al. CO₂ evolution and N mineralization after biogas slurry application in the field and its yield effects on spring barley[J]. Applied Soil Ecology, 2009, 42(3): 297-302.
- [13] Gu Y F, Zhang X P, Tu S H, et al. Soil microbial biomass, crop yields, and bacterial community structure as affected by long-term fertilizer treatments under wheat-rice cropping[J]. European Journal of Soil Biology, 2009, 45(3): 239-246.
- [14] 吴松芹, 汪成忠, 李梦莎. 模拟氮沉降对滨海湿地土壤微生物功能多样性的影响[J]. 土壤, 2017, 49(6): 1153-1158.
- [15] 胡君利, 林先贵, 褚海燕, 等. 种植水稻对古水稻土与现代水稻土微生物功能多样性的影响[J]. 土壤学报, 2007, 44(2): 280-287.
- [16] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 30-83.
- [17] 张旭. 不同耕作措施对陇中黄土高原土壤微生物功能多样性的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [18] Schutter M, Dick R. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(11): 1481-1491.
- [19] 田雅楠, 王红旗. Biolog 法在环境微生物功能多样性研究中的应用[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(3): 50-57.
- [20] 邹春娇, 齐明芳, 马建, 等. Biolog-ECO 解析黄瓜连作营养基质中微生物群落结构多样性特征[J]. 中国农业科学, 2016, 49(5): 942-951.
- [21] 张红, 吕家珑, 曹莹菲, 等. 不同植物秸秆腐解特性与土壤微生物功能多样性研究[J]. 土壤学报, 2014, 51(4): 743-752.
- [22] 唐海明, 肖小平, 李微艳, 等. 长期施肥对双季稻田根际土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态环境学报, 2016, 25(3): 402-408.
- [23] 李娟, 赵秉强, 李秀英, 等. 长期不同施肥制度下几种土壤微生物学特征变化[J]. 植物生态学报, 2008, 32(4): 891-899.
- [24] 孙瑞莲, 赵秉强, 朱鲁生, 等. 长期定位施肥对土壤酶活性的影响及其调控土壤肥力的作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(4): 406-410.
- [25] 王伟, 德科加. 不同氮肥及施氮水平对称多县高寒草甸生物量和养分的影响[J]. 草地学报, 2015, 23(5): 968-977.
- [26] 刘敏, 王长庭, 字洪标, 等. 火烧干扰下高寒草甸土壤微生物群落功能多样性变化特征[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(2): 263-270.
- [27] 王晶晶, 樊伟, 崔珺, 等. 氮磷添加对亚热带常绿阔叶林土壤微生物群落特征的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(24): 8361-8373.
- [28] Li F L, Liu M, Li Z P, et al. Changes in soil microbial biomass and functional diversity with a nitrogen gradient in soil columns[J]. Applied Soil Ecology, 2013, 64: 1-6.
- [29] 张玥琦, 刘慧, 赵凤艳, 等. 不同施肥措施对番茄连作土壤酚酸含量和微生物功能多样性的调节[J]. 土壤通报, 2017, 48(4): 887-894.
- [30] 李轶, 唐佳妮, 吕绪凤, 等. 施用沼肥对设施土壤真菌动态变化的影响[J]. 中国沼气, 2013, 31(5): 29-31, 39.
- [31] 赵帆, 赵密珍, 王钰, 等. 基于高通量测序研究草莓根际微生物群落结构和多样性[J]. 土壤, 2019, 51(1): 51-60.
- [32] 郑学博, 樊剑波, 崔键, 等. 沼液还田对旱地红壤微生物群落代谢与多样性的影响[J]. 生态学报, 2016, 36(18): 5865-5875.
- [33] Yao M J, Rui J P, Li J B, et al. Rate-specific responses of prokaryotic diversity and structure to nitrogen deposition in the Leymus chinensis steppe[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 79: 81-90.
- [34] 代迪, 字洪标, 杨有芳, 等. 高寒草甸土壤微生物功能多样性对氮肥添加的响应[J]. 水土保持研究, 2018, 25(2): 137-144.
- [35] Edwards K A, Clancy H A, Baemner A J. Bacillus anthracis: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 384(1): 73-84.
- [36] 郝晓晖, 胡荣桂, 吴金水, 等. 长期施肥对稻田土壤有机氮、微生物生物量及功能多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(6): 1477-1484.
- [37] Dalmonech D, Lagomarsino A, Moscatelli M C, et al. Microbial performance under increasing nitrogen availability in a Mediterranean forest soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(9): 1596-1606.
- [38] 钟芳, 赵瑾, 孙荣高, 等. 兰州南北两山五类乔灌木林草地土壤养分与土壤微生物空间分布研究[J]. 草业学报, 2010, 19(3): 94-101.