

耕作方式和秸秆还田对稻田表层土壤微生物群落的短期影响

郭梨锦, 曹凑贵, 张枝盛, 刘天奇, 李成芳*

(农业部长江中游作物生理生态与耕作重点实验室/华中农业大学植物科技学院, 武汉 430070)

摘要:土壤微生物作为土壤生态系统的重要组成部分,对农艺措施响应敏感,为此采用磷脂脂肪酸(PLFA)法研究短期耕作和小麦秸秆还田对稻田表层土壤(0~5 cm)微生物群落结构和多样性的影响。2011年在湖北省均川镇,设置了免耕(NT)和翻耕(PT)两种耕作方式以及 6000 kg·hm⁻²(SR₃)、4000 kg·hm⁻²(SR₂)、2000 kg·hm⁻²(SR₁)、0 kg·hm⁻²(SR₀)四种还田量试验。为期两年的试验结果表明,试验田土壤共检测出了 21 种不同的磷脂脂肪酸类型,以 iC15:0、C16:0、10Me17:0、Cyc19:0 为主,分别占总磷脂脂肪酸的 9.6%~11.6%、16.1%~19.0%、8.7%~13.0%和 7.6%~9.8%,各处理土壤总磷脂脂肪酸含量在 25.35~43.06 nmol·g⁻¹波动;免耕显著提高了表层土壤革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌,显著降低真菌和革兰氏阴性菌的生物量以及真菌/细菌、单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸和 Shannon-Winner 指数;秸秆还田显著提高了细菌、真菌、革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的生物量以及真菌/细菌、Shannon-Winner 指数、Simpson 指数和 Margalf 丰度指数。因此,秸秆还田提高了表层土壤微生物生物量和微生物多样性,短期免耕主要影响微生物群落结构。

关键词:水稻;秸秆还田;土壤微生物;磷脂脂肪酸

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)08-1577-08 doi:10.11654/jaes.2013.08.013

Short-term Effects of Tillage Practices and Wheat-straw Returned to Rice Fields on Topsoil Microbial Community Structure and Microbial diversity in Central China

GOU Li-jin, CAO Cou-gui, ZHANG Zhi-sheng, LIU Tian-qi, LI Cheng-fang*

(MOA Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in the Middle Reaches of the Yangtze River/College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Soil microbial community which responses soil quality has been regarded as a sensitive indicator of soil ecosystems. A field experiment was conducted to investigate the effects of tillage practices and residue returning on top soil(0~5 cm) microbial community structures and microbial diversity using phospholipid fatty acid(PLFA) at Junchuan town in Hubei Province of China. Treatments were established following a split-plot design of a randomized complete block with tillage practices[plough tillage(PT) and no-tillage(NT)] as the main plot and wheat straw returning level [6000 kg·hm⁻²(SR₃), 4000 kg·hm⁻²(SR₂), 2000 kg·hm⁻²(SR₁) and 0 kg·hm⁻²(SR₀)] as the sub-plot treatment. The results showed that the PLFAs of iC15:0, C16:0, 10Me17:0, Cyc19:0 were dominant in microbial community. They accounted for 9.6%~11.6%, 16.1%~19.0%, 8.7%~13.0% and 7.6%~9.8% of total PLFAs contents, respectively. The PLFAs contents of different treatments ranged from 25.35 nmol·g⁻¹ to 43.06 nmol·g⁻¹. Tilling soil significantly enhanced the abundance of PLFAs indicator of fungi, Gram-negative bacteria, fungi/bacterial ratio, MUFA/STFA ratio and Shannon-Winner index, while G⁺/G⁻ bacteria ratio decreased significantly under PT as compared with NT. Residue straw returning had a significant positive effect on bacteria, fungi, Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, fungi/bacteria, Shannon-Winner, Simpson index and Margalf index. Therefore, our results suggest that wheat straw residue returned to paddy fields enhanced microbial community biomass and increased microbial diversity, while tillage practices significantly changed microbial community structure on paddy topsoil.

Keywords: rice; straw returning; soil microbial communities; phospholipid fatty acids(PLFA)

收稿日期:2013-04-20

基金项目:国家科技支撑项目“粮食丰产科技工程”;国家自然科学基金(31100319);中央高校基本科研业务费专项资金(2013PY106)

作者简介:郭梨锦(1990—),男,硕士。主要研究方向农业微生物。E-mail:guolijin@webmail.hzau.edu.cn

*通信作者:李成芳 E-mail:lichengfang@mail.hzau.edu.cn

作为能量和养分的载体^[1],还田后的秸秆腐解对于促进作物生长、改善和提高土壤质量具有重要作用^[2]。土壤微生物作为土壤生态系统重要组成部分,在秸秆腐解和营养元素释放过程中具有举足轻重的作用^[3],可作为衡量土壤肥力的指标^[4]。磷脂脂肪酸只存在于活细胞中,在细胞死亡后会很快分解掉^[5-6],所以 PLFA 可以用来评价活体微生物生物量和微生物群落组成^[7]。

微生物的多样性和群落结构在一定程度上反映了农田生态系统的基本情况,保持土壤微生物多样性及其驱动下的生态过程多样性是农业生产赖以生存的基础。目前关于长期耕作和秸秆还田对微生物群落结构和多样性方面研究较多,并形成较为一致的结论。一般认为长期保护性耕作(免耕,少耕和秸秆还田等)能改善微生物群落结构,提高土壤微生物多样性。樊晓刚等^[8]研究发现,在长期免耕条件下,土壤微生物数量明显高于传统耕作。Adl 等^[9]研究发现长期免耕(25年)能增加微生物多样性。然而,有关短期耕作和秸秆还田对微生物群落结构和多样性的影响研究尚未形成一致的结论。Jackson 等^[10]和 Minoshima 等^[11]研究皆表明短期耕作改变了土壤微生物群落的动力学特征,包括细菌和真菌的生物量^[11-12]。但也有部分研究结果指出短期耕作并未影响微生物群落结构和多样性^[13-14]。为此,本试验采用磷脂脂肪酸(PLFA)技术研究2年耕作和秸秆还田对表层土壤(0~5 cm)群落结构和多样性的影响,以期正确评价短期保护性耕作的生态效益和建立科学合理的生态农业系统提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况与供试材料

试验位于湖北省随州市均川镇试验基地(东经113°17',北纬31°36'),年平均气温14.5~16℃,冬季最低气温-2~-5℃,夏季气温26.5~37℃,无霜期为194~280 d。年均日照时间260 d,年均降雨量970 mm。耕层土壤厚约20 cm,前茬为小麦,小麦收获后测定的耕作层土壤的基本理化性状为:pH 5.38、有机质23.82 g·kg⁻¹、全氮1.42 g·kg⁻¹、NH₄⁺-N 0.49 mg·kg⁻¹、NO₃⁻-N 12.87 mg·kg⁻¹、速效磷50.28 mg·kg⁻¹、速效钾44.38 mg·kg⁻¹,供试土壤为水稻土粉质黏壤土。供试水稻品种为黄华粘(中稻)。种植方式为小麦-中稻轮作,小麦采用直播技术,中稻采用直播技术。

1.2 试验设计

试验于2011年5月底开始,试验为裂区设计,耕作方式为主区,分免耕(NT)与翻耕(PT);还田量为副区,分为6000 kg·hm⁻²(SR₃)、4000 kg·hm⁻²(SR₂)、2000 kg·hm⁻²(SR₁)与0 kg·hm⁻²(SR₀),共8个处理:PT+SR₀;PT+SR₁;PT+SR₂;PT+SR₃;NT+SR₀;NT+SR₁;NT+SR₂;NT+SR₃。小区面积90 m²,3次重复。水稻施一次底肥三次追肥,底肥在水稻直播前施,追肥时期分别为:分蘖期、抽穗期、灌浆期。水稻施肥措施为每667 m²施纯氮14 kg,其中底肥40%、分蘖肥20%、穗肥20%、粒肥20%;施磷肥7 kg和钾肥12 kg,作为底肥一次性施用。

1.3 磷脂脂肪酸分析

2012年10月10日水稻收获后,于每个小区随机取5点采集0~5 cm耕层土壤样品,冰冻保藏带回实验室,去除沙石、根系等杂质,混匀,放置在-20℃冰箱中,并及时进行磷脂脂肪酸的测定。

1.3.1 脂肪酸的提取

采用修正的吴愉萍方法^[15]。称取3 g冷冻干燥的土样于特氟隆离心管中,加入15.8 mL的单相提取剂(氯仿:甲醇:柠檬酸=1:2:0.8),在室温下,于250 r·min⁻¹的水平振荡器中振荡2 h。然后于4000 r·min⁻¹离心5 min,上清液收集于玻璃试管中,剩下土样再加入7.6 mL的提取剂,旋涡振荡后,再放入水平振荡器中振荡提取2 h,离心,合并上清液,并加入4.8 mL柠檬酸缓冲液和6 mL氯仿,静置过夜,分层。然后把氯仿相转移到一干净试管中,用氮气吹干。

1.3.2 磷脂脂肪酸的分离

磷脂、糖脂和中性脂的分离均采用购买的商品SPE柱(Supeleo公司)。首先用5 mL氯仿活化柱子,然后用氯仿(3次,每次约250 μL)转移脂类到SPE柱中。再分别加入10 mL的氯仿和10 mL的丙酮洗去中性脂和糖脂,最后用10 mL甲醇淋洗磷脂,并收集于一新试管中,用氮气吹干。

1.3.3 磷脂脂肪酸碱性甲醇水解和甲酯化

磷脂通过温和碱性甲酯化为磷脂脂肪酸甲酯^[16-17]。具体而言,在含有磷脂的试管中加入1 mL的甲醇甲苯混合液(甲醇:甲苯=1:1)和1 mL 0.2 mol·L⁻¹的KOH甲醇溶液,放入37℃的水浴锅中加热15 min进行甲酯化后,加入2 mL蒸馏水、0.3 mL冰醋酸,再用正己烷(两次,每次2 mL)萃取磷脂脂肪酸甲酯,加入内标(十九脂肪酸甲酯,C19:0)80 μL(浓度为0.1 mg·L⁻¹),并用氮气吹干得到脂肪酸甲酯。

1.3.4 磷脂脂肪酸的测定

将脂肪酸重新溶解于 80 μL 的正己烷中, 利用 GC-MC 检测(参数如下), 进样量为 2 μL 。本实验检测由安捷伦 GC-MC(6890-5973 N)完成, 色谱柱为 HP5-MS(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)石英毛细管柱。GC-MS 分析条件: 初始温度为 120 $^{\circ}\text{C}$ 保持 7 min, 以 4 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温到 170 $^{\circ}\text{C}$ 并保持 3 min, 再以 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温到 250 $^{\circ}\text{C}$ 并保持 5 min。进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 载气为 He (0.9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), 不分流, 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$, 四极杆 150 $^{\circ}\text{C}$, 质谱全扫描范围 30~500 $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$ 。脂肪酸定量用峰面积和内标曲线法。PLFA 含量用 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 表示。

1.3.5 磷脂脂肪酸命名

采用 Frostegard 等^[18]方法, 分子式以 (i/a/cyc) X:Y ω Z(c/t), 其中, “X”代表脂肪酸分子的 C 原子总数, Y 表示不饱和烯键的数目, “ 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 3 个碳原子), “a” (anteiso) 代表前异构甲基支链 (距甲基端的第 3 个碳原子), “cyc” 代表环丙基。后缀 “c” 和 “t” 分别代表顺式和反式同分异构体。

1.3.6 微生物的磷脂脂肪酸表征

以磷脂脂肪酸 14:0, 15:0, a15:0, i15:0, i16:0, 16:1 ω 5, 16:1 ω 7, 16:1 ω 9, 17:0, a17:0, i17:0, 18:0, 18:1 ω 7, cy17:0, cy19:0 表征细菌^[19,14]; 以磷脂脂肪酸 18:2 ω 6, 9 表征真菌^[20]; 以 10Me16:0, 10Me17:0 和 10Me18:0 表征放线菌^[21-22]; 用 18:2 ω 6, 9/细菌总脂肪酸含量表征真菌/细菌^[14,23]。以磷脂脂肪酸 i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0 表征革兰氏阳性细菌^[24]; 以磷脂脂肪酸 16:1 ω 7t, 16:1 ω 9c, 16:1 ω 7c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 9c, cy17:0, cy19:0 表征革兰氏阴性细菌^[25]; 以 (15:1 ω 6c, 16:1 ω 9c, 16:1 ω 7c, 17:1 ω 8c, 18:1 ω 9c, 18:1 ω 9t, 20:1 ω 9, 22:1 ω 9, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 20:1, 22:1)/(10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0) 表征单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸 (MUFA/STFA ratio)^[21-22]。

1.3.7 微生物多样性指数测度

本研究将 PLFA 生物标记作为数量测度, 引入生态学多样性测度 Shannon-Winner (H)^[26]、丰富度 (S)^[27-28]、Simpson 优势度 (D)^[27] 和 Margalef 指数^[28]等方法, 计算微生物 PLFA 生物标记生态学参数, 通过相关系数, 分析各参数的相关性。重要生态学参数的计算方法如下:

(1) Shannon-Winner 多样性指数 H ^[26]:

$$H = -\sum P_i \ln P_i$$

式中: $P_i = N_i/N$, N_i 为处理 i 的特征磷脂脂肪酸个数, N 为本试验中总特征磷脂脂肪酸个数。

(2) Simpson 优势度 D ^[27]:

$$D = 1 - \sum P_i^2$$

(3) Margalef 指数^[28]:

$$M = (S - 1) / \ln N$$

式中: S 为微生物群落中 PLFA 生物标记出现的频次 (S), 即丰富度。

1.3.8 磷脂脂肪酸数据统计与分析

将分析结果重复处理计算平均值, 分别构建以磷脂脂肪酸生物标记的含量和百分含量为样本, 以不同耕作方式和秸秆还田为指标的数据矩阵, 分析磷脂脂肪酸生物标记含量在不同处理中的分布, 并以磷脂脂肪酸生物标记的百分含量数据矩阵进行聚类分析 (尺度: Euclidian Distance; 方法: Hierarchical cluster analysis) 阐明不同处理微生物群落结构的相似程度。

1.4 数据分析

本文数据采用 Excle 整理数据、SAS 8.1 做方差分析、SPSS17.0 做相关分析和聚类分析、Cannoco 4.5 做主成分分析。为减少误差, 剔除三个重复中仅有一个重复检测到或百分含量低于 1% 的脂肪酸。

2 结果与分析

2.1 耕作方式和秸秆还田对微生物群落结构组成的影响

耕作显著影响了真菌、真菌/细菌、革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌和单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸。从表 1 可知, 与翻耕相比, 免耕显著提高了土壤中的革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌 (5.1%~122.7%), 显著降低了真菌 (44.3%~100%) 和革兰氏阴性菌 (46.3%~47.1%) 的生物量以及真菌/细菌 (18.2%~100%) 和单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸 (6.9%~78.1%)。

秸秆还田显著影响总磷脂脂肪酸、细菌、革兰氏阴性菌、真菌、真菌/细菌和革兰氏阳性菌, 且随秸秆还田量增加总磷脂脂肪酸、细菌、革兰氏阴性菌的含量呈增加的趋势 (除了 PT+SR₁ 和 NT+SR₂)。与 SR₀ 相比, SR₁ 和 SR₂ 对这 3 个指标的影响不显著, SR₃ 显著增加了总磷脂脂肪酸 (1.0%~70.4%)、细菌 (0%~100%)、革兰氏阴性菌 (0%~100%); 与 SR₀ 相比, SR₁、SR₂、SR₃ 显著增加了真菌 (0%~39.3%、2.0%~4.5% 和

表 1 不同耕作方式和秸秆还田处理土壤微生物群落结构

Table 1 PLFA(phospholipid fattyacid) profiles under different treatments

处理 Treatment	总磷脂脂肪酸 Total PLFAs/ nmol·g ⁻¹	细菌 Bacteria/ nmol·g ⁻¹	真菌 Fungi/ nmol·g ⁻¹	真菌/细菌 Fungi/Bacteria	放线菌 Actinobacte/ nmol·g ⁻¹	革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria/nmol·g ⁻¹	革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria/nmol·g ⁻¹	革兰氏阳性菌/ 革兰氏阴性菌 G ⁺ /G ⁻	单不饱和脂肪酸/ 饱和脂肪酸 MUFA/STFA ratio
PT+SR ₀	33.58±3.87a(b)	20.34±1.77a(b)	0.55±0.06a(b)	0.03±0.00a(b)	4.21±0.83a(a)	6.66±0.81a(c)	10.28±1.14a(b)	0.65±0.09b(a)	1.21±0.32a(b)
PT+SR ₁	31.09±3.95a(b)	18.29±2.21a(b)	0.44±0.14a(a)	0.02±0.00a(a)	3.92±0.41a(a)	8.73±0.87a(b)	6.59±0.81a(b)	1.33±0.04b(a)	0.49±0.06a(b)
PT+SR ₂	34.05±3.03a(b)	21.25±2.24a(b)	0.68±0.24a(a)	0.03±0.01a(a)	3.97±0.21a(a)	7.96±0.63a(bc)	9.91±1.32a(b)	0.81±0.07b(a)	1.17±0.22a(ab)
PT+SR ₃	33.86±2.60a(a)	21.76±2.10a(a)	0.47±0.05a(a)	0.02±0.00a(a)	3.72±0.26a(a)	8.48±0.17a(a)	9.42±1.41a(a)	0.91±0.13b(a)	1.09±0.06a(a)
NT+SR ₀	25.27±0.93a(b)	14.50±0.56a(b)	0b(b)	0 b(b)	3.85±0.22a(a)	7.86±0.37a(c)	5.44±0.30b(b)	1.45±0.13a(a)	0.26±0.06b(b)
NT+SR ₁	32.92±3.84a(b)	20.2±2.09a(b)	0.48±0.04b(a)	0.02±0.00b(a)	3.83±0.75a(a)	8.08±0.72a(b)	8.32±0.86b(b)	0.97±0.08a(a)	1.01±0.27b(b)
NT+SR ₂	25.3a±3.07a(b)	14.79±2.62a(b)	0.38±0.01b(a)	0.03±0.00b(a)	3.52±0.13a(a)	7.32±0.18a(bc)	5.32±0.77b(b)	1.47±0.41a(a)	0.55±0.39b(ab)
NT+SR ₃	43.06±4.64a(a)	27.24±3.20a(a)	0.72±0.10b(a)	0.03±0.00b(a)	4.61±0.45a(a)	10.82±1.30a(a)	11.28±1.31b(a)	0.96±0.02a(a)	1.02±0.11b(a)
T	ns	ns	9.48**	15.24**	ns	ns	9.00**	17.62**	9.54**
SR	9.08**	12.75**	9.59**	13.73**	ns	12.60**	7.83**	ns	ns
T*SR	9.46**	10.56**	15.68**	15.40**	ns	6.14**	14.85**	15.58**	12.44**

注:括号外不同字母表示相同秸秆还田量不同耕作处理间差异达到 0.05 显著水平;括号内不同字母表示相同耕作措施下不同秸秆还田量处理间差异达 0.05 显著水平。PT 表示传统耕作;NT 表示免耕;SR 表示秸秆还田。* 表示差异达 0.05 水平;** 表示差异达 0.01 水平,ns 表示差异不显著。

Note: Different letters outside the brackets stand for significance at $P<0.05$ between treatments in tillage and no-tillage; Different letters in brackets stand for significance at $P<0.05$ between different amount of wheat-straw returned. PT, conventional tillage; NT, no-tillage; SR, wheat-straw returned to the field. ** $P<0.01$; * $P<0.05$; ns-non-significant.

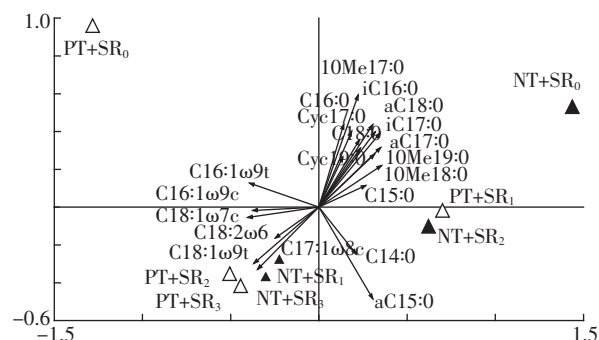
7.0%~87.9%)、真菌/细菌(0%~100%、18.4%~100%和 0%~100%);与 SR₀ 相比,SR₁ 和 SR₃ 显著增加了革兰氏阳性菌(2.7%~31.1%和 27.3%~37.6%),SR₂ 对革兰氏阳性菌影响不显著。耕作和秸秆还田的交互作用,除了放线菌外,对其他微生物群落指标皆有极显著的影响。

2.2 耕作方式和秸秆还田对土壤微生物群落结构的影响

本研究共检测出 21 种磷脂脂肪酸,以 iC15:0、C16:0、10Me17:0、Cyc19:0 为主,分别占总磷脂脂肪酸含量的 9.6%~11.6%、16.1%~19.0%、8.8%~13.0%和 7.6%~9.8%,占总磷脂脂肪酸含量的 43.7%~53.7%。

主成分分析结果表明(图 1),第一主成分可以解释 64.8%的变异,第二主成分可以解释 21.8%的变异。试验处理分成四组,分别为 PT+SR₀、NT+SR₀、(PT+SR₁ 和 NT+SR₂)和 (NT+SR₁、NT+SR₃、PT+SR₂ 和 PT+SR₃)。翻耕条件下不饱和磷脂脂肪酸含量更高,耕作方式仅对 SR₃ 水平下的处理影响不明显,处理间未明显分开。秸秆还田条件下,不饱和磷脂脂肪酸含量更高,仅 SR₀ 与其他秸秆还田水平的处理明显分开。

磷脂脂肪酸的百分含量比脂肪酸的含量更能反映微生物群落结构的变化。由图 2 可知,不同处理间的聚类结果与图 1 相同,主成分分析与聚类分析结果进一步表明短期耕作显著影响了微生物群落结构,与



第一主成分可以解释 64.8%的变异,第二主成分可以解释 21.8%的变异。PT(△)表示传统耕作;NT(▲)表示免耕;SR 表示秸秆还田。Factor 1 accounted for 64.8% and Factor 2 for 21.8% of the variance. PT, conventional tillage; NT, no-tillage; SR, wheat-straw returned to the field.

图 1 不同处理下土壤微生物群落 PLFA 主成分分析

Figure 1 Principal components analysis of the PLFA profiles from soils microbial communities of different treatments

SR₀ 相比,SR₁、SR₂ 和 SR₃ 显著影响了微生物群落结构,但三者之间的微生物群落结构差异不显著。

2.3 耕作方式和秸秆还田对土壤微生物多样性的影响

从表 2 可以看出,与翻耕相比免耕显著降低 Shannon-Winner 指数(4.0%~5.8%),秸秆还田显著影响 Simpson 指数、Shannon-Winner 指数和 Margalef 指数。与 SR₀ 相比,SR₁、SR₂ 和 SR₃ 显著增加了 Simpson 指数(0%~2.2%、0.9%~1.2%和 1.0%~2.6%)、Shannon-

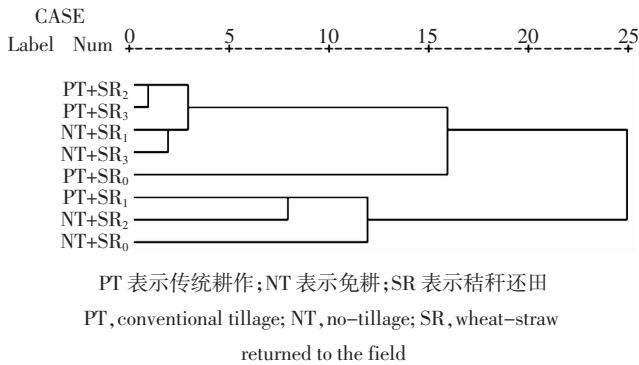


图 2 不同处理脂肪酸含量百分比的分层聚类分析
Figure 2 Hierarchical cluster analysis of PLFAs under different treatments

Winner 指数(0.4%~9.4%、3.5%~5.4%和 4.1%~11.7%) 和 Margalef 指数(8.3%~21.3%、7.4%~23.9%和 13.2%~22.8%)。耕作与秸秆还田的交互作用对多样性指标皆有显著的影响。

2.4 微生物群落结构指标和多样性指数相关性分析

由表 3 可知,Simpson 指数和 Shannon-Winner 多样性指数皆与磷脂脂肪酸总量、细菌、真菌和革兰氏阴性菌的生物量以及真菌/细菌和单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸呈显著正相关,而与革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌呈显著负相关。Margalef 与真菌向对方丰度呈显著正相关和单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸呈显著正相关,与真菌/细菌呈极显著正相关。

3 讨论

不同种类微生物磷脂脂肪酸(PLFA)组成和含量差异大,可用来直接估价其微生物的生物量及群落结构^[29]和定量地反映可繁殖或有潜在繁殖能力的不同类群微生物生物量和总生物量^[30]。Gouaerts 等^[31]发现 15 年免耕还田增加麦-玉轮作土壤微生物群落生物量和多样性。本研究结果与此报道一致,即秸秆还田

表 2 不同耕作方式和秸秆还田处理土壤微生物群落多样性指数

Table 2 Diversity of microbial communities in soils under different treatments

处理 Treatment	优势度指数 Simpson index	多样性指数 Shannon-Winner index	丰度指数 Margalef index
PT+SR ₀	0.91±0.01a(b)	2.65±0.04a(c)	4.85±0.16a(b)
PT+SR ₁	0.91±0.01a(a)	2.66±0.04a(b)	5.25±0.19a(a)
PT+SR ₂	0.92±0.00a(a)	2.75±0.02a(b)	5.21±0.30a(a)
PT+SR ₃	0.92±0.00a(a)	2.76±0.01a(a)	5.49±0.04a(a)
NT+SR ₀	0.90±0.00a(b)	2.50±0.01b(c)	4.34±0.05a(b)
NT+SR ₁	0.92±0.01a(a)	2.73±0.05b(b)	5.26±0.28a(a)
NT+SR ₂	0.91±0.01a(a)	2.64±0.05b(b)	5.37±0.06a(a)
NT+SR ₃	0.92±0.00a(a)	2.79±0.03b(a)	5.32±0.15a(a)
T	2.00	8.22*	2.91
SR	7.00**	33.97**	24.99**
T*SR	6.33**	14.28**	3.83*

注:括号外不同字母表示相同秸秆还田量不同耕作处理间差异达到 0.05 显著水平;括号内不同字母表示相同耕作措施下不同秸秆还田量处理间差异达 0.05 显著水平。PT 表示传统耕作;NT 表示免耕;SR 表示秸秆还田。* 表示差异达 0.05 水平;** 表示差异达 0.01 水平,ns 表示差异不显著。

Note: Different letters outside the brackets stand for significance at $P < 0.05$ between treatments in tillage and no-tillage; Different letters in brackets stand for significance at $P < 0.05$ between different amount of wheat-straw returned. PT: tillage practices; NT: no-tillage; SR: wheat-straw returned to the field. Values with different letters represent significant difference; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns: non-significant.

显著地影响了微生物的生物量和多样性(图 1、2),但影响微生物群落结构的主要是耕作。这可能是耕作导致土壤理化性质的变化,显著改变了土壤微生物栖息地,从而改变土壤微生物群落结构^[32-33],而在生长季节秸秆还田的影响被作物生长效应对微生物群落的影响所掩盖^[14]。然而,Jackson 等^[10]指出(6 个月,蔬菜地)耕作对微生物群落影响不显著,Carpenter-Boggs 等^[34](至少 6 年)也得到类似结果。

长期耕作和秸秆还田对土壤微生物量的影响研

表 3 土壤微生物群落结构特征指标和多样性指数偏相关性分析

Table 3 Partial correlationship analysis between microbial characteristics and microbial diversity indiexs

	磷脂脂肪酸总量 Total PLFAs	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	革兰氏阴性菌 G ⁻
真菌/细菌 Fungi/bacteria	0.44*	0.46*	0.90**	0.47*
革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌 G ⁺ /G ⁻	-0.70**	-0.76**	-0.65**	-0.90**
单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸 MUFA/STFA ratio	0.56**	0.66**	0.71**	0.80**
Simpson 指数	0.57**	0.65**	0.81**	0.68**
Shannon-Winner 指数	0.64**	0.71**	0.80**	0.70**
Margalef 指数			0.51*	

注:* 为显著相关($P < 0.05$),** 为极显著相关($P < 0.01$)

Note:*,**Significant at $P < 0.05, 0.01$, respectively.

究结论较为统一,即免耕和秸秆还田能显著增加土壤微生物丰度^[31,33]。但是短期耕作方式和秸秆还田对微生物丰度的影响仍存在争论。强学彩等^[1]研究表明秸秆还田能显著增加麦玉轮作(2年)土壤微生物量;Wang等^[35]指出免耕3年显著提高玉-麦轮作系统土壤微生物量;而Adl等^[9]研究发现短期免耕(4年)不影响土壤微生物丰度。本研究表明短期耕作不影响表层土壤总磷脂脂肪酸含量,而秸秆还田显著提高总磷脂脂肪酸含量。这可能是因为短期耕作对不同微生物群落影响不同,不同微生物群落间丰度增降相互抵消^[9],导致磷脂脂肪酸总量变化不显著。秸秆还田增加了土壤微生物碳源^[1],从而促进土壤微生物繁殖。

真菌/细菌的比例可以反映两个微生物种群的相对丰度,是土壤生态系统缓冲能力的重要指标^[36],该比例越高则生态缓冲能力越高。秸秆还田显著提高真菌/细菌,说明秸秆还田改善了微生物栖息环境^[1],提高了土壤生态缓冲能力。免耕显著降低真菌/细菌,说明短期免耕降低了土壤生态缓冲能力,这主要是由于短期免耕降低了真菌的生物量(表1)。然而,Helgason等^[33]指出40年免耕处理具有更高的土壤真菌丰度。Gouaerts等^[31]15年的麦-玉轮作研究表明,免耕能增加土壤微生物群落,其中真菌占主导地位。这可能是短期免耕并未改变土壤理化性质^[37],从而无法为真菌的繁殖提供条件。Mathew等^[29]报道真菌在长期免耕系统中未占主导地位,因此关于短期耕作对土壤细菌与真菌的影响还有待进一步研究。

革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌可以指示土壤营养状况^[38],越高表示营养胁迫越强。本研究结果表明,短期免耕显著增加了革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌,说明短期免耕降低了土壤的营养状况,而Wang等^[35]得出相反的结论,Mathew等^[29]则指出耕作方式对革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌影响不显著。这可能与短期免耕显著降低了真菌生物量有关(表1),偏相关性分析的结果也表明革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌与真菌生物量显著负相关(表3)。Ogram^[39]和Kierkegaard等^[40]指出土壤真菌对于土壤肥力来说,有着举足轻重的作用。一方面分解有机质形成腐殖质并释放养分,另一方面又同化土壤碳素和固定无机营养,形成真菌生物量。真菌对土壤养分的调控作用,已经成为土壤培肥、耕作制度改革和作物栽培实践中的重要理论之一。

单不饱和脂肪酸/支链脂肪酸的大小反映了好氧细菌与厌氧细菌的相对优势^[41],被用于表示土壤通气

条件^[22],越高表示土壤通气条件越好。从表3可知,单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸与革兰氏阴性菌、真菌、细菌和总磷脂脂肪酸显著正相关,说明通气状况与真菌、细菌和总磷脂脂肪酸的含量密切相关。表1的结果表明短期耕作显著提高土壤通气性,秸秆还田对此无显著影响,Wang等^[35]研究结论与此一致。这主要是因为短期耕作增加了土壤扰动,增加了土壤的通气性^[42],从而影响微生物群落结构,秸秆的作用可能被耕作所掩盖。

研究表明,保护性耕作如长期免耕和秸秆还田有利于提高土壤微生物多样性,而传统耕作则减少了微生物多样性。Ceja-Navarro等^[43]指出长期(超过10年)麦-玉轮作下,细菌群落在免耕秸秆还田条件下,有更高的多样性和丰度;Adl等^[9]研究发现长期免耕(免耕4~25年)可以增加棉田土壤微生物多样性;Carpenter-Boggs等^[34](至少6年)研究表明草地表层土壤的微生物土壤质量参数与耕作频度呈负相关。本研究表明秸秆还田显著提高了微生物多样性和丰度,与上述的研究结果一致。然而本研究还表明,短期免耕显著降低了Shannon-Winner多样性指数,这与上述结论不一致。由表3的相关性分析可知,单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸、革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌与Simpson指数、Shannon-Winner多样性指数密切相关,表明土壤微生物多样性与土壤的通气状况和营养状况密切相关。由表1可知,相对于翻耕处理,免耕处理具有更低的单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸和更高的革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌,表明短期免耕土壤具有较强的厌氧条件^[22]和较差的营养状况^[38],因而降低了微生物群落多样性。由表2可得,短期耕作对土壤微生物Simpson指数和Margalef指数无显著影响,这可能是与随着秸秆还田量的增加,短期耕作影响被秸秆还田所掩盖有关。

4 结论

本研究表明,短期的保护性耕作显著影响微生物群落结构与多样性:

(1)与翻耕相比,短期免耕显著降低了真菌/细菌和单不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸,显著增加了革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌,显著降低了Shannon-Winner多样性指数;(2)秸秆还田改善微生物群落结构,增加了微生物生物量和多样性。

本研究初步阐明了耕作与秸秆还田对微生物群落的影响,但对其影响机理尚不明确,下一步工作将

通过结合 DGGE(变性梯度凝胶电泳)和 Biolog 微平板法,进一步揭示耕作与秸秆还田对微生物群落的影响,并通过分析微生物群落与土壤有机碳库的关系,试图解释微生物群落变化的原因。

参考文献:

- [1] 强学彩,袁红莉,高旺盛. 秸秆还田量对土壤 CO₂ 释放和土壤微生物量的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(3):469-472.
Qiang X C, Yuan H L, Gao W S. Effect of crop-residue incorporation on soil CO₂ emission and soil microbial biomass[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(3):469-472.
- [2] Witt C, Cassman K, Olk DCO, et al. Crop rotation and residue management effects on carbon sequestration, nitrogen cycling and productivity of irrigated rice systems[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2000, 225:263-278.
- [3] 李学垣,王启发,徐凤琳. 稻草还田对土壤钾、磷、锌的吸附-解吸及其有效性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2000, 9(3):227-232.
Li X Y, Wang Q F, Xu F L. Effect of returning application of straw on soil K, P, Zn adsorption-desorption and their availability[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2000, 9(3):227-232.
- [4] Joergensen R G, Emmerling C. Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2006, 169(3):295-309.
- [5] White D C, Bobbie R J, Herron J S, et al. Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples. Native Aquatic Bacteria: Enumeration, activity and ecology[J]. *American Society for Testing and Materials*, 1979, 695:69-81
- [6] White D C, Davis W M, Nickels J S, et al. Determination of sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate[J]. *Oecologia*, 1979, 40(1):51-62.
- [7] Ringelberg D B, Davis J D, Smith G A, et al. Validation of signature polar lipid fatty acid biomarkers for alkane-utilizing bacteria in soils and subsurface aquifer materials[J]. *FEMS Microbial Ecology Letters*, 1989, 62(1):39-50.
- [8] 樊晓刚,金 轲,李兆君,等. 不同施肥和耕作制度下土壤微生物多样性研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(3):744-751.
Fan X G, Jin K, Li Z J, et al. Soil microbial diversity under different fertilization and tillage practices: A review[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2010, 16(3):744-751.
- [9] Adl S M, Coleman D C, Read F. Slow recovery of soil biodiversity in sandy loam soils of Georgia after 25 years of no tillage management[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2006, 114(2-4):323-334.
- [10] Jackson L E, Calderon F J, Steenwerth K L, et al. Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality[J]. *Geoderma*, 2003, 114(3-4):305-317.
- [11] Minoshima H, Jackson L E, Cavignaro T R, et al. Soil food webs and carbon dynamics in response to conservation tillage in California[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2007, 71(3):952-963.
- [12] Wortmann C S, Quincke J A, Drijber R A, et al. Soil microbial community change and recovery after one-time tillage of continuous no-till[J]. *Agronomy Journal*, 2008, 100(6):1681-1686.
- [13] Petersen S O, Frohne P S, Kennedy A C. Dynamics of a soil microbial community under spring wheat[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2002, 66(3):826-833.
- [14] Spedding T A, Hamel C, Mehuijs G R, et al. Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36(3):499-512.
- [15] 吴愉萍. 基于磷脂脂肪酸(PLFA)分析技术的土壤微生物群落结构多样性的研究[J]. 杭州:浙江大学, 2009.
WU Yu-ping. Studies on soil microbial community structure based on phospholipid fatty acid (PLFA) analysis[J]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009.
- [16] Guekert J B, Antworth C P, Nichols P D, et al. Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments[J]. *FEMS Microbial Ecology Letters*, 1985, 31(3):147-158.
- [17] Bossio D A, Scow K M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(11):4043-4050.
- [18] Frostegård Å, Bååth E, Tunlid A. Shift in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1993, 25(6):723-730.
- [19] Frostegård Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22(1):59-65.
- [20] Kaiser C A, Frank B, Wild M, et al. Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2ω6, 9 and 18:1ω9[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(9):1650-1652.
- [21] Bausenwein U, Gättinger A, Langer U, et al. Exploring soil microbial communities and soil organic matter variability and interactions in arable soils under minimum tillage practice[J]. *Applied Soil Ecology*, 2008, 40(1):67-77.
- [22] Bossio D A, Scow K M. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns[J]. *Microbial Ecology*, 1998, 35(3):265-278.
- [23] Boyle S A, Yarwood R R, Bottomley P J, et al. Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(2):443-451.
- [24] Hedrick D B, Peacock A, White D C. Interpretation of fatty acid profiles of soil microorganisms[M]//Margesin R, Schinner F.(Eds.) *Manual for Soil Analysis -Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*. Springer-Verlag, Berlin, 2005:251-259.
- [25] Macdonald L M, Paterson E, Dawson L A, et al. Short-term effects of defoliation on the soil microbial community associated with two contrasting *Lolium perenne* cultivars[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36(3):489-498.
- [26] 戈 峰. 现代生态学[M]. 北京:科学出版社, 2002:252-254.
Ge F. *Modern ecology*[M]. Beijing: Science Publishing Press, 2002: 252-254.
- [27] 孙海新,刘训理. 茶树根际微生物研究[J]. 生态学报, 2004, 24(7):

- 1354-1359.
- Sun H X, Liu X L. Microbes studies of tea rhizosphere[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(7): 1353-1357.
- [28] 全向春, 汤茜, 俞博凡, 等. 大辽河水系沉积物对 PAHs 生物降解的特征[J]. *中国环境科学*, 2008, 28(8): 758-763.
- Quan X C, Tang Q, Yu B F, et al. Biodegradation of PAHs in sediments samples from three typical river sections of Dalao River watershed and characterization of microbial community[J]. *China Environmental Science*, 2008, 28(8): 758-763.
- [29] Mathew R P, Feng Y, Githinji L, et al. Impact of no-tillage and conventional tillage systems on soil microbial communities[J]. *Applied and Environmental Soil Science*, 2012, doi: 10. 1155/2012/548620.
- [30] 齐鸿雁, 薛凯, 张洪勋. 磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域的应用[J]. *生态学报*, 2003, 23(8): 1577-1580.
- Qi H Y, Xue K, Zhang H X. Phospholipid fatty acid analysis and its applications in microbial ecology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8): 1576-1582.
- [31] Gouaerts B, Mezzalama M, Unno Y, et al. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity[J]. *Applied Soil Ecology*, 2007, 37(1): 18-30.
- [32] Feng Y, Motta A C, Reeves D W, et al. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(12): 1693-1703.
- [33] Helgason B L, Walley F L, Germida J J. Fungal and bacterial abundance in long-term no-till and intensive-till soils of the Northern Great Plains[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2009, 73(1): 120-127.
- [34] Carpenter-Boggs L, Stahl P D, Lindstrom M J, et al. Soil microbial properties under permanent grass, conventional tillage, and no-till management in South Dakota[J]. *Soil and Tillage Research*, 2003, 71(1): 15-23.
- [35] Wang J J, Li X Y, Zhu A N, et al. Effects of tillage and residue management on soil microbial communities in North China[J]. *Plant and Soil Environment*, 2012, 58(1): 28-33.
- [36] Bossio D A, Scow K M, Gunapala N, et al. Determination of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipids fatty acid profiles[J]. *Microbial Ecology*, 1998(36): 1-12.
- [37] Sotomayor-Ramírez D, Espinoza Y, Ramos-Santana R. Short-term tillage practices on soil organic matter pools in a tropical Ultisol[J]. *Australian Journal of Soil Research*, 2006, 44: 687-693.
- [38] Hammesfahr U, Heuer H, Manzke B, et al. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(7): 1583-1591.
- [39] Ogram A. Soil molecular microbial ecology at age 20 methodological challenges for the future[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(11-12): 1499-1504.
- [40] Kierkegaard J A, Sarwar M, Wong P T W, et al. Field studies on the biofumigation of take all by *Brassica* break crops[J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2000, 51(4): 445-456.
- [41] Rajendran N, Matsuda O, Rajendran R, et al. Comparative description of microbial community structure in surface sediments of Eutrophic Bays[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1997, 34(1): 26-33.
- [42] Azooz R H, Arshad M A, Franzluebbers A J. Pore size distribution and hydraulic conductivity affected by tillage in Northwestern Canada[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1996, 60(4): 1197-1201.
- [43] Ceja-Navarro J A, Rivera-Orduna F N, Patino-Zuniga L, et al. Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil Bacterial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(11): 3685-3691.