

长期施肥对植烟土壤微生物的影响

丁伟¹, 叶江平¹, 蒋卫¹, 霍沁建¹, 陈晓明¹,
梁永江¹, 张长华¹, 袁玲^{2*}

(1 贵州省烟草公司遵义市公司, 贵州遵义 563000; 2 西南大学资源环境学院, 重庆 400716)

摘要: 利用 7 年的定位施肥试验, 研究了不施肥 (CK)、单施化肥 (CF) 和有机无机肥配施 (MCF) 对植烟土壤微生物的影响。平板计数、微生物碳、氮含量和磷脂脂肪酸的测定结果均表明, 土壤微生物数量以有机无机配施的处理最多, 单施化肥次之, 不施肥最少。在 3 种施肥处理的土壤中, 分别检测出 20 (CK)、27 (CF) 和 31 种 (MCF) 磷脂脂肪酸; 施肥提高了代表细菌 (12~20 碳) 和放线菌 (10Me17: 0 和 10Me18: 0) 的磷脂脂肪酸; 但是, 代表真菌的磷脂脂肪酸 18: 1 ω 9c 无显著变化 (CF) 或显著降低 (MCF)。有机无机肥配施处理显著提高了土壤微生物的多样性指数和优势度指数, 说明有机无机配施改善了土壤生态环境, 微生物种群丰富, 优势种群突出。在土壤自生固氮菌、磷细菌和钾细菌中, 分离率最高的是芽孢杆菌属, 在 26%~50% 之间变化。有机无机肥配施还提高了这 3 种有益微生物的数量, 单施化肥则无显著影响。此外, 在有机无机肥配施的土壤中, 自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的多样性指数、均匀度指数和优势度指数均较高。从土壤微生物的角度看, 生产上采用有机无机肥配施很有必要。

关键词: 烤烟; 土壤; 长期施肥; 微生物

中图分类号: S154.38

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2012)05-1168-09

Effects of long-term fertilization on microorganisms in flue-cured tobacco grown soil

DING Wei¹, YE Jiang-ping¹, JIANG Wei¹, HUO Qin-jian¹, CHEN Xiao-ming¹, LIANG Yong-jiang¹,
ZHANG Chang-hua¹, YUAN Ling^{2*}

(1 Technique Center of Zunyi Branch Company of Guizhou Tobacco Company, Zunyi, Guizhou 563000, China;

2 College of Resource & Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: A 7-year experiment was carried out to investigate the effects of no fertilizer (CK), chemical fertilizer (CF) and the mixture of manure and chemical fertilizer (MCF) on microorganisms in flue-cured tobacco grown soils. Plate count, microbial C and microbial N as well as phosphor lipid fatty acids (PLFAs) showed highest microorganisms in the soil treated with MCF, less with CF and lowest with CK. There were 20 (CK), 27 (CF) and 31 types of PLFAs (MCF) in soils, respectively. Fertilization increased the PLFAs contained in bacteria (12–20 C) and actinomycetes (10Me 17: 0 and 10Me18: 0). There were no obvious changes in fungal PLFAs (18: 1 ω 9c) in soils without fertilizer but a reduction with MCF. MCF increased both diversity and dominance indexes of soil microorganisms, indicating the improvement of soil environment because of abundant microbial groups and obvious dominant species. In addition, most of azotobacteria, phosphobacteria and potassium bacteria in soils belonged to *Bacillus* genus with the isolation rates ranged from 26% to 50%. Compared to CK, these three beneficial bacteria were increased by MCF but changed little by CF. The indexes of their diversity, homogeneity and dominance were higher in the soils under MCF treatment than CK. Taking into account of the numbers and

收稿日期: 2011-11-18 接受日期: 2012-05-29

基金项目: 贵州省烟草公司遵义市公司科技攻关项目(2011-05); 贵州省烟草公司科技攻关项目(2006-04) 资助。

作者简介: 丁伟(1964—), 男, 贵州省兴义市人, 硕士, 高级农艺师, 从事烤烟营养与施肥方面的研究。E-mail: 13985251761@126.com

* 通讯作者 E-mail: lingyuanh@hotmail.com

groups of soil microorganisms, it is necessary to advocate MCF in fertilization practice.

Key words: flue-cured tobacco; soil; long-term fertilization; microorganisms

施肥对烟叶产量、产值和香气的贡献率分别达到 39.19%、47.28% 和 24.8%, 仅次于品种^[1]。在烤烟栽培过程中, 单施化肥和有机无机肥配合施用是主要的两种施肥方式。研究表明, 有机无机肥配施有益于协调烟叶化学成分, 提高烟叶香气量, 改善香气, 减少杂气, 降低刺激性^[2]。在适宜种植烤烟的土壤中, 烟叶产量高, 质量好, 根际微生物的多样性和均匀性指数显著高于不宜植烟的土壤; 在前者的根际中分离出近 20 株木霉属的微生物, 而后者根际中的木霉种属较少, 还检测出青枯病菌^[3]。此外, 在烤烟根际中, 自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的数量高于非根际, 施肥不仅影响烟叶产量和品质, 而且还影响它们的种群结构和生物多样性^[4]。长期定位试验结果表明, 施用化肥减少代表细菌种群的含异丙基-15 碳的磷脂脂肪酸(iC15:0) 含量, 但施有机肥却增加了其含量^[5]; PCR-DGGE 分析表明, 在长期施用有机肥之后, 土壤微生物的多样性指数提高, 细菌种群增加, 单施化肥的细菌种群较少, 不施肥处理的细菌种群最少^[6]。土壤微生物是土壤肥力的重要组成成分, 驱动土壤新陈代谢和生物化学反应, 与土壤养分的转化和供应密切相关^[7]。因此, 施肥不仅影响烤烟的产量和质量, 还对土壤微生物的数量和种群结构产生重要影响。

自上世纪九十年代以来, 我国在全国主要农业生产区域建立了长期肥力肥效监测基地, 包括水稻土、潮土、黑土、黄土、黑钙土和红壤等。目前, 长期施肥对作物产量和质量以及土壤微生物的影响已有大量报道^[5-7]。但是, 作为主要种植烤烟的云贵高原地区, 其成土母质的土壤理化性状和生物学性质显著不同于我国其它地区, 而在该地区研究施肥对植烟土壤微生物的影响的报道还较少。为此, 本文利用贵州省烟草公司遵义市科技园的长期定位肥料试验, 研究了施肥对土壤微生物的影响, 旨在为烤烟科学施肥和提高肥料利用率积累资料。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验始于 2004 年, 在贵州省烟草公司遵义市科技园进行, 该园位于北纬 27°08′、东经 105°

36′, 年平均气温 15.2℃, 年降水量 1098 mm。供试土壤为贵州省遵义市典型的具有代表性的灰岩黄壤, 质地中壤, 土壤有机质含量 25.68 g/kg、全氮 1.69 g/kg、全磷 0.63 g/kg、全钾 19.12 g/kg、碱解氮 116.4 mg/kg、速效磷 20.3 mg/kg、速效钾 177.1 mg/kg, pH 值 6.07。

1.2 试验设置

试验在烤烟-小麦(烤烟连作)和烤烟-小麦-玉米(烤烟轮作)两种种植模式的基础上, 分别设置不施肥(CK), 单施化肥(CF)和有机无机肥配施(MCF)3 个处理。在有机无机肥配施处理中, 有机氮:无机氮=1:1, 氮、磷、钾总养分施用量同单施化肥。小区面积 24 m², 三次重复, 随机区组排列。在种植小麦和玉米时, 氮肥用尿素、磷肥用过磷酸钙, 钾肥用硫酸钾, 有机肥为猪粪, 施肥量、施肥时间和基追比例等均同当地的大田生产。在种植烤烟时, 单施化肥的处理施纯氮 90 kg/hm², N:P₂O₅:K₂O=1:1:2。其中磷肥全部作基肥, 氮、钾肥 70% 作基肥, 30% 作追肥, 氮、磷、钾肥分别为硝酸铵、磷铵和硫酸钾。在有机无机肥配施处理中, 氮、磷、钾总用量和基追比例以及追肥时间等均同单施化肥, 有机肥全部作基肥, 由腐熟的菜籽粕(含 N 4.2%、P₂O₅ 2.2%、K₂O 1.5%)提供, 不足的养分用化肥补充。烤烟在移栽后 40 d 左右打脚叶, 并适时打顶(留叶 18 片)和防治病虫害, 采用化学抑芽剂抹杈, 采收、烘烤等其它管理均同当地优质烤烟生产。

考虑到当地烤烟连作的现象十分普遍。在本项研究中, 选择烤烟连作的三种施肥处理进行分析。

1.3 样品采集与分析

在 2010 年(种植烤烟的第 7 季)烤烟旺长期, 多点采集处理小区 0—20 cm 的耕作层土壤, 样品混匀后去除植物残体、砾石等, 过 2 mm 筛, 置于 4℃ 冰箱保存备用。

土壤微生物生物量采用氯仿熏蒸(0.5 mol/L K₂SO₄ 提取, 提取液中的微生物生物量碳用 K₂Cr₂O₇ 氧化法测定, 微生物生物量氮用凯氏定氮法测定^[8]。微生物磷脂脂肪酸(phosphor lipid fatty acids, 简称 PLFAs)的命名、提取和分析参照

Frostegard 和 Kourtev 的方法^[9-10]: 将从土壤中提取并干燥的 PLFAs 溶解于正己烷中, 利用气相色谱 (Hewlett-Packard 6890) 测定 PLFAs; 载气为氦气, 补偿气体为氮气, 助燃气体为空气; 流量分别为 20 ~ 30 mL/min、30 mL/min 及 300 mL/min; 初始温度为 70℃ 保持 1 min 后, 以 20℃/min 增加到 150℃, 再以 5℃/min 升至 250℃, 最后以 10℃/min 升至 300℃。每个样品运行总时间为 31 ~ 32 min。

平板分离计数土壤中的细菌(牛肉膏蛋白胨培养基)、真菌(马丁氏培养基)、放线菌(高氏一号培养基), 以及自生固氮菌(Ashby 无氮培养基)、磷细菌(磷酸钙 + 植酸培养基)、钾细菌(铝土矿培养基)等^[11]均以干土基计算。

通过形态和生理生化反应等对自生固氮菌、磷细菌和钾细菌鉴定至属^[12], 包括革兰氏和芽孢染色、好氧性测定; 氧化酶、过氧化氢酶、MR 和 VP 反应; 葡萄糖氧化、甘乳醇和乳糖发酵; 脲素、淀粉和明胶分解; H₂S 和吲哚产生、柠檬酸盐利用等。

1.4 土壤微生物种群特征参数计算

用土壤 PLFAs 含量和自生固氮菌、磷细菌和钾细菌等有益微生物的菌落数计算土壤微生物的种群特征值, 包括多样性指数、均匀度指数和优势度指数等。

Shannon-Wiener 多样性指数 H 的计算公式为: $H = -\sum P_i \ln P_i$, 其中 $P_i = N_i/N$, N_i 为属 i 的单菌落数(或 PLFAs 含量), N 为土样的总单菌落数(或 PLFAs 总含量)。Pielou 均匀度指数 J 的计算公式为: $J = -\sum P_i \ln P_i / \ln S$, 其中 S 为属 i (或 PLFAs) 所在土样中的属(或 PLFAs) 数目。Simpson 优势度指数 D 的计算公式为: $D = 1 - \sum P_i^2$ ^[13]。

1.5 数据分析

试验数据用 Excel 进行基本计算, SPSS16.0 软件进行统计分析, Duncan 法进行显著性检验 ($P \leq 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 植烟土壤细菌、放线菌和真菌的数量

从表 1 可以看出, 植烟土壤的细菌数量最多, 放线菌次之, 真菌最少。施肥尤其是有机无机肥配施可显著提高土壤微生物数量。在单施化肥和有机无机肥配施的处理中, 细菌分别比不施肥增加了 14 倍和 89 倍, 真菌分别增加了 18 倍和 42 倍, 放线菌分别

表 1 植烟土壤细菌、真菌和放线菌的数量

Table 1 The numbers of bacteria, fungi and actinomycete in flue-cured tobacco grown soil

处理 Treatments	细菌 Bacteria ($\times 10^7$ cfu/g)	真菌 Fungi ($\times 10^3$ cfu/g)	放线菌 Actinomycete ($\times 10^5$ cfu/g)
CK	0.5 ± 0.1 c	0.4 ± 0.1 c	0.6 ± 0.2 c
CF	7.5 ± 2.2 b	7.5 ± 1.4 b	8.3 ± 1.7 b
MCF	45.1 ± 8.5 a	17.2 ± 2.3 a	22.1 ± 4.0 a

注(Note): 表中数据为平均值 ± 标准差 The data were means ± SD. 同列数据后不同小写字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

增加了 13 倍和 36 倍; 三者合计分别比对照增加了 15 倍和 55 倍。

2.2 植烟土壤的微生物量碳和微生物量氮

由图 1 可知, 有机无机肥配施的土壤微生物量碳、氮最高, 单施化肥次之, 不施肥最低。在有机无机配施的处理中, 土壤微生物量碳、氮分别比不施肥增加了 114.2% 和 91.9%; 在单施化肥的处理中, 土壤微生物量碳、氮比不施肥分别增加了 46.7% 和 22.9%。根据微生物量碳、氮计算 C/N 值, 发现施肥后土壤微生物的 C/N 比有所提高, 单施化肥和有机无机肥配施处理的 C/N 比变化于 9.68 ~ 9.81 之间, 不施肥的仅为 8.68。

2.3 植烟土壤磷脂脂肪酸(PLFAs)的组成及含量

由表 2 可见, 在不施肥、单施化肥和有机无机肥配施的土壤中, 分别检测出 20、27 和 31 种 PLFAs, 包括代表细菌的 12 ~ 20 碳 PLFAs, 代表放线菌的 10Me 17: 0 和 10Me 18: 0, 以及代表真菌的 18: 1 ω 9c 和 18: 3 ω 6c 标记性 PLFAs。从 PLFAs 总量看, 不施肥最低, 单施化肥次之, 有机无机配施最高, 分别为 590.13 ng/g、661.8 ng/g 和 859.51 ng/g。在施肥的土壤中, 代表细菌的 12 ~ 20 碳 PLFAs 提高了 9.66% ~ 50.53%; 代表放线菌的 10Me 18: 0 和 10Me 17: 0 共增加了 4.29 ~ 8.10 倍; 代表真菌的 18: 3 ω 6c 增加了 54.00% ~ 97.75%。但是在有机无机肥配施的土壤中, 代表真菌的 18: 1 ω 9c 降低了 22.61%, 单施化肥的无显著变化。

2.4 植烟土壤微生物种群特征

表 3 的结果是利用 PLFAs 计算所获得的植烟

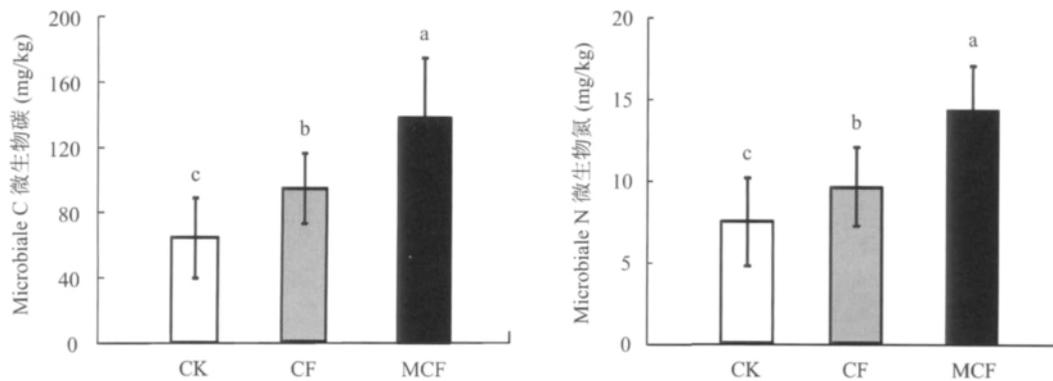


图1 施肥对土壤微生物量碳、氮的影响

Fig. 1 Effect of fertilization on microbial C and microbial N in soil

[注(Note): 柱上不同字母分别表示处理间差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars mean significant at the 5% level.]

土壤的微生物种群特征值。其中多样性指数为不施肥最低(2.578),单施化肥处理次之(2.748),有机无机肥配施处理最高(2.971)。微生物群落的均匀性指数为不施肥处理显著高于单施化肥,有机无机肥配施与不施肥和单施化肥处理间无显著差异。

有机无机肥配施的处理其优势度指数显著高于不施肥,单施化肥与有机无机肥配施处理间差异不显著。

2.5 植烟土壤中的自生固氮菌、磷细菌和钾细菌

2.5.1 数量 表4显示,在植烟土壤中,自生固氮菌的数量最多,在每克干土中有 $4.4 \times 10^4 \sim 9.1 \times 10^4$ cfu/g,显著多于磷细菌和钾细菌。与不施肥处理相比,单施化肥对土壤自生固氮菌、磷细菌和钾细菌无显著影响,但在有机无机肥配施的土壤中,自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的数量显著高于单施化肥和不施肥处理,分别是它们的1.97~2.07倍(自生固氮菌)、3.39~3.55倍(磷细菌)和2.82~4.00倍(钾细菌)。

2.5.2 属群鉴定 形态和生理生化反应鉴定表明,自生固氮菌、磷细菌和钾分别属于21个属(表5)。其中,自生固氮菌有5个属:固氮菌属(*Azotobacter*)、固氮单胞菌属(*Azomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia*),1个属未明确。磷细菌有10个属:黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、

欧文氏杆菌(*Erwinia*)、色杆菌属(*Achromobacter*)。钾细菌有6个属:芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、1个属未明确。

在分离出的21个属中,因菌属不同,不同处理的分离率也不一样,但分离率最高的是芽孢杆菌属。在自生固氮菌中,芽孢杆菌属的分离率为36.95%~50.00%;在磷细菌中,芽孢杆菌属的分离率为26.09%~36.36%;在钾细菌中,芽孢杆菌属的分离率为29.17%~50.00%。其余菌属所占的比例较低。此外,在不施肥、单施化肥和有机无机肥配施的土壤中,分别分离出20属、19个属和21个属的三种有益微生物。

用无菌水提取土壤(水:土=10:1),再稀释100倍后,在有机无机肥配施的植烟土壤中,自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的总菌落数最多,为217个;单施化肥与不施肥处理的总菌落数相似,分别为79个和85个,但显著低于有机无机肥配施的土壤。

2.5.3 群落特征 由植烟土壤自生固氮菌、磷细菌和钾细菌等有益微生物的群落特征值(表6)分析可知,多样性指数、均匀度指数和优势度指数等均表现出有机无机肥配施的处理显著高于不施肥,单施化肥与不施肥处理间差异不显著。单施化肥和有机无机肥配施处理之间也没有明显差异。

表 2 不同施肥处理的土壤磷脂脂肪酸的组成及含量 (ng/g)

Table 2 Compositions and concentrations of PLFAs in soil under different fertilizer treatments

磷脂脂肪酸 PLFA	处理 Treatments		
	CK	CF	MCF
12:0	6.14 ± 1.22 b	6.66 ± 1.35 b	10.39 ± 2.45 a
a14:0	0 c	2.35 ± 0.09 b	8.25 ± 2.13 a
14:0	15.25 ± 3.24 b	16.27 ± 3.51 b	29.25 ± 4.55 a
i14:0	5.05 ± 1.05 a	0 b	7.05 ± 1.27 a
a15:0	0 b	0 b	5.51 ± 0.98 a
i15:0	0 c	5.42 ± 1.27 b	12.17 ± 2.01 a
i15:1	29.21 ± 4.57 b	37.15 ± 5.44 ab	41.24 ± 5.44 a
16:0	120.57 ± 25.12 c	150.98 ± 25.15 b	190.56 ± 35.71 a
10Me16:0	40.45 ± 5.14 a	16.72 ± 3.76 c	25.12 ± 4.51 b
a16:0	15.13 ± 3.48 a	9.80 ± 2.35 b	12.45 ± 2.18 ab
i16:0	30.23 ± 5.66 b	30.15 ± 4.26 b	35.35 ± 4.57 a
16:0	10.77 ± 2.35 a	0 c	5.25 ± 0.79 b
16:1	0 b	5.14 ± 1.21 a	7.17 ± 1.18 a
16:1 ω 5c	7.25 ± 1.77 ab	5.37 ± 1.01 b	8.05 ± 1.45 a
17:0	11.24 ± 2.56 c	25.47 ± 4.13 a	17.24 ± 2.55 b
10Me17:0	5.23 ± 1.05 c	10.13 ± 2.14 b	18.16 ± 3.24 a
a17:0	12.17 ± 3.44 c	20.55 ± 3.78 b	35.45 ± 4.51 a
cy17:0	12.29 ± 3.28 b	18.19 ± 4.55 a	20.41 ± 3.77 a
i17:0	22.54 ± 4.57 b	17.77 ± 3.65 c	30.37 ± 5.66 a
17:1 ω 8c	0 b	0 b	5.05 ± 1.02 a
18:0	40.24 ± 8.24 b	45.12 ± 5.67 ab	48.03 ± 5.25 a
i18:0	0 c	5.37 ± 1.22 b	9.18 ± 2.14 a
10Me18:0	0	17.57 ± 2.45	29.43 ± 4.43
18:1 ω 7c	47.47 ± 5.31 a	40.13 ± 5.81 b	50.45 ± 7.67 a
18:1 ω 9c	100.29 ± 18.42 a	98.12 ± 17.55 ab	77.61 ± 18.54 b
11Me18:1 ω 7c	0 c	5.25 ± 0.92 b	9.08 ± 2.19 a
18:3 ω 6c(6,9,12)	10.24 ± 1.52 c	15.77 ± 2.44 b	20.25 ± 3.14 a
cy19:0 ω 8c	48.37 ± 5.67 a	40.14 ± 4.32 b	50.44 ± 7.87 a
i19:0	0 c	6.74 ± 1.14 b	12.17 ± 2.44 a
20:0	0 c	5.16 ± 1.05 b	13.03 ± 2.59 a
20:1 ω 9	0 c	4.31 ± 0.57 b	15.35 ± 3.45 a
总量 Total PLFAs	590.13 c	661.8 b	859.51 a

注 (Note): 表中数据为平均值 ± 标准差 The data were means ± SD. 同行数据后不同字母者表示差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a row are significant among treatments at the 5% level. PLFAs 用分子式用“X: Y ω Z”表示, 其中 X 代表脂肪酸分子的 C 原子总数, Y 代表不饱和烯键的数目, ω 表示出现双键, Z 为烯键的位置; i, a, cy 和 Me 分别表示异丙基、反异丙基、环丙基和甲基分支脂肪酸; c 表示该双键为顺式构型。异丙基-15 碳饱和和磷脂脂肪酸 PLFAs were expressed as X: Y ω Z. X = carbon numbers, Y = numbers of unsaturated ethylene linkage, ω = double bond, Z = ethylene linkage location, i = isopropyl, a = anteisorpropyl, cy = cyclopropyl, Me = methyl branching, c = cis-configuration.

表 3 利用磷脂脂肪酸(PLFAs)获得的植烟土壤微生物种群特征值

Table 3 Character values of microorganism colonies in flue-cured tobacco grown soil obtained by PLFAs

特征值 Characteristic values	处理 Treatments		
	CK	CF	MCF
多样性指数 Diversity index	2.578 c	2.748 b	2.971 a
均匀度指数 Homogeneity index	0.871 a	0.824 b	0.834 ab
优势度指数 Dominance index	0.887 b	0.901 ab	0.929 a

注(Note): 同行数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a row are significant among treatments at the 5% level.

表 4 植烟土壤自生固氮菌、磷细菌和钾细菌数量变化($\times 10^4$ cfu/g)

Table 4 Changes in the numbers of azotobacteria, phosphobacteria and potassium bacteria in flue-cured tobacco grown soil

处理 Treatments	自生固氮菌 Azotobacteria	磷细菌 Phosphobacteria	钾细菌 Potassium bacteria
CK	4.4 \pm 1.1 b	2.3 \pm 0.7 cd	1.2 \pm 0.4 d
CF	4.6 \pm 1.5 b	2.2 \pm 0.5 cd	1.7 \pm 0.4 d
MCF	9.1 \pm 2.2 a	7.8 \pm 1.8 ab	4.8 \pm 1.3 bc

注(Note): 表中数据为平均值 \pm 标准差 The data were means \pm SD. 同列数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

3 讨论

通过平板计数,微生物量碳、氮和 PLFAs 总量等的测定分析,结果表明,施肥尤其是有机无机肥配施有利于增加土壤微生物数量,由此利于土壤养分的转化和生物有效性的提高。在种植玉米和水稻的土壤中,随着有机肥用量的增加,土壤微生物量碳、氮提高^[14-15]。在棉田土壤中,施用化肥和有机肥显著增加了细菌、真菌和放线菌等微生物的数量^[16]。在施用化肥、秸秆还田及有机无机肥配施的稻田土壤中,土壤微生物量碳和 PLFAs 总量显著高于不施肥土壤^[5]。因此,施肥显著增加土壤微生物的原因可能是提高了作物生物量,向土壤输入了更多的有机碳源。施用有机肥可直接向土壤提供有机质,增加微生物所需要的营养和能源物质,促进了它们的生长和繁殖^[17]。需要指出的是,施肥后土壤微生物的平板计数(细菌、真菌和放线菌之和)比不施肥增加了 15 ~ 55 倍,微生物量碳、氮最高增加 114.17%,PLFAs 总量的增值不超过 45.56%,说明平板计数更能灵敏地指示土壤微生物的数量变化。一般而言,平板计数耗时较长,操作繁琐;而微生物量碳、氮代表微生物整个细胞的固有成分,测定方

便;PLFAs 是微生物细胞膜的重要组成成份,只存在于活细胞中,细胞死亡后立即迅速分解。利用微生物量碳、氮和 PLFAs 估算微生物生物量对样品保存时间要求不高,操作简单,可快速测定。因此,在土壤微生物研究中,将传统与现代方法有效结合是必要的。

在有机无机肥配施的土壤中,自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的数量增加,单施化肥则对其无显著影响。说明化学肥料只能起到营养植物的作用,有机无机肥配施不仅直接提供植物营养,而且还可增加土壤有益微生物的数量,有利于固氮、溶磷、解钾。自生固氮菌、磷细菌和钾细菌均属于异养微生物,有机肥提供的碳源和能源可能促进了它们的生长繁殖。此外,在施肥处理中,单施化肥和有机无机肥配施的养分总用量相等,前者在土壤中迅速释放,高浓度的氮、磷、钾可能抑制固氮菌、磷细菌和钾细菌的生长繁殖^[16-17]。多数自生固氮菌、磷细菌和钾细菌属于根际促生细菌,既能固氮、溶磷、解钾,还能分泌生长活性物质,如生长素、细胞分裂素、玉米素等,促进植物生长^[18-20]。因此,无论是提供养分,还是促进植物生长发育,有机无机肥配施的效果可能优于单施化肥。

表 5 植烟土壤自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的属群鉴定

Table 5 Identification of azotobacteria, phosphobacteria and potassium bacteria in flue-cured tobacco grown soil

细菌类群 Bacteria groups	属名 Genus	处理 Treatments			菌落总数 Total colonies
		CK	CF	MCF	
自生固氮菌 Azotobacteria	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	22	17	44	83
	固氮菌属 <i>Azotobacter</i>	14	17	31	62
	固氮单胞菌属 <i>Azomonas</i>	2	7	4	13
	拜叶林克氏菌属 <i>Beijerinckia</i>	2	2	5	9
	未明确的属 <i>Unidentified genus</i>	4	3	7	14
磷细菌 Phosphobacteria	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	6	8	28	42
	假单胞杆菌属 <i>Pseudomonas</i>	1	2	6	9
	产碱菌属 <i>Alcaligenes</i>	1	2	4	7
	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	2	3	8	13
	微球菌属 <i>Micrococcus</i>	1	3	8	12
	黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	2	1	4	7
	固氮菌属 <i>Azotobacter</i>	1	2	7	10
	沙雷氏菌属 <i>Serratia/Bizio</i>	2	0	3	5
	欧文氏杆菌 <i>Erwinia</i>	1	1	4	6
	色杆菌 <i>Achromobacter</i>	6	0	6	12
钾细菌 Potassium bacteria	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	6	8	14	28
	假单胞杆菌属 <i>Pseudomonas</i>	2	1	7	10
	欧文氏菌属 <i>Erwinia</i>	1	1	9	11
	芽孢乳杆菌属 <i>Sporolactobacillus</i>	1	2	3	6
	埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>	0	2	7	9
	未明确的属 <i>Unidentified genus</i>	2	3	8	13
菌落总数 Total colonies		79	85	217	381

注 (Note): 表中数据为分离获得的菌落数 (用 10:1 的无菌水提取土壤,再稀释 100 倍) Data in the table indicate the total colonies, which was obtained by sterilized water extraction (soil: water = 1:10) and then diluted 100 times.

表 6 植烟土壤自生固氮菌、磷细菌和钾细菌等有益微生物的群落特征

Table 6 Characteristic values of beneficial microbial colonies such as azotobacteria, phosphobacteria and potassium bacteria in flue-cured tobacco grown soil

特征值 Characteristic values	处理 Treatments		
	CK	CF	MCF
多样性指数 Diversity index	2.3396 b	2.5047 ab	2.7808 a
均匀度指数 Homogeneity index	0.8043 b	0.8506 ab	0.8905 a
优势度指数 Dominance index	0.8556 b	0.8866 ab	0.9139 a

注 (Note): 同行数据后不同小写字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a row are significant among treatments at the 5% level.

施肥可显著提高土壤微生物的 C/N, 自生固氮菌、磷细菌和钾细菌也因菌属和施肥处理不同而表现出分离率各异, 说明施肥可影响土壤微生物包括有益微生物的种群结构。Frostegard 等^[9]和 Zelles 等^[21]发现, 代表细菌种群的 PLFAs 是 12~20 碳的 PLFAs; 代表真菌种群的 PLFAs 有 16: 1 ω 5c、18: 2 ω 6 9c、18: 1 ω 9c、18: 2 ω 9 12; 代表放线菌种群的 PLFAs 包括 10Me16: 0, 10Me17: 0 和 10Me18: 0。施肥提高了代表细菌和放线菌的 PLFAs, 有机无机肥配施降低了代表真菌的 18: 1 ω 9c。在土壤真菌中, 植物的病原真菌的比例显著高于细菌和放线菌^[9, 21], 说明有机无机肥配施相对增加了土壤细菌和放线菌的数量, 可能减少土壤中的病原真菌数量, 本研究结果类似前人的有关报道^[4, 6, 9, 21]。众所周知, 多样性指数表示生物群落中的物种多寡, 数值愈大表示群落中的物种越丰富; 优势度指数越大, 生物群落内的优势种越突出^[13]。在有机无机肥配施的土壤中, 微生物多样性指数和优势度指数最高, 说明微生物种群丰富, 优势种群突出。在稳定良好的生态环境中, 生物多样性指数、均匀度指数和优势度指数均较高, 是生态系统稳定和健康发展的重要表现^[22-24]。有机无机肥配施显著提高了自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的多样性指数、均匀度指数和优势度指数, 说明有机无机肥配施改善了土壤生态环境, 使之适合有益微生物的生长和繁殖, 增加种群密度, 保持优势种群。

总之, 施肥显著提高了土壤微生物生物量, 包括自生固氮菌、磷细菌和钾细菌等有益微生物数量。有机无机肥配施显著增加了土壤微生物的种群, 改善了它们的种群结构, 这可能是有机无机肥配施促进土壤养分转化利用的原因之一。因此在烤烟生产栽培过程中, 应大力推广有机无机肥配施的施肥措施。

参考文献:

- [1] 韩锦峰. 烟草栽培生理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
Hang J F. Tobacco cultivation [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003
- [2] 林桂华, 杨斌, 上官克攀, 等. 施用有机肥对龙岩特色烟叶香气质量的影响[J]. 中国烟草科学, 2003, 3: 9-10.
Lin G H, Yang B, Shanguan K P *et al.* Effect of organic fertilizers on volume and quality of aroma of flue-cured tobacco in Longyan[J]. Chin. Tob. Sci., 2003, 3: 9-10.
- [3] 湛方栋, 唐远驹, 黄建国. 烤烟根际微生物群落结构及其动态变化的研究[J]. 土壤学报, 2007, 42(3): 488-494.
Zhan F D, Tang Y J, Huang J G. Changes in the communities and species of microorganisms in the rhizosphere of tobacco[J]. Acta Pedol. Sin., 2007, 42(3): 488-494.
- [4] 陈尧, 郑华, 石俊雄, 等. 施用化肥和菜籽粕对烤烟根际微生物的影响[J]. 土壤学报, 2012, 49(1): 208-213.
Chen Y, Zheng H, Shi J X *et al.* Effects of chemical fertilizer and rapeseed meal on microorganisms in the rhizosphere of flue-cured tobacco seedlings [J]. Acta Pedol. Sin., 2012, 49(1): 208-213.
- [5] 张奇春, 王光火, 方斌. 不同施肥处理对水稻养分吸收和稻田土壤微生物生态特性的影响[J]. 土壤学报, 2005, 42(1): 116-121.
Zhang Q C, Wang G H, Fang B. Influence of fertilization treatment on nutrients uptake by rice and soil microbiological characteristics of microorganism in paddy field [J]. Acta Pedol. Sin., 2005, 42(1): 116-121.
- [6] 刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 等. 不同施肥制度土壤微生物量碳氮变化及细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析[J]. 生态学报, 2007, 27(3): 1079-1085.
Liu E K, Zhao B Q, Li X Y *et al.* Microbial C and N biomass and soil community analysis using DGGE of 16SrDNA V3 fragment PCR products under different long-term fertilization systems [J]. Acta Ecol. Sin., 2007, 27(3): 1079-1085.
- [7] 卜洪震, 王丽宏, 尤金成, 等. 长期施肥管理对红壤稻田土壤微生物量碳和微生物多样性的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3340-3347.
Bu H Z, Wang L H, You J C *et al.* Impact of long-term fertilization on the microbial biomass carbon and soil microbial communities in paddy red soil [J]. Sci. Agric. Sin., 2010, 43(16): 2240-3347.
- [8] Bookes P C, Andrea L, Pruden G *et al.* Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial nitrogen in soil [J]. Soil Biol. Biochem., 1985, 12(6): 837-842.
- [9] Frostegard A, Baath E, Tunlid A. Shift in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipids fatty acid analysis [J]. Soil Biol. Biochem., 1993, 25(6): 723-730.
- [10] Kourev P S, Ehrenfeld J G, Haggelom M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil [J]. Ecology, 2002, 83: 3152-3166.
- [11] 中国科学院南京土壤研究所微生物室编著. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
Soil Research Institute of Nanjing, the Academy of Sciences of China. Method of soil microorganism research [M]. Beijing: Science Press, 1985.
- [12] 中国科学院微生物所翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册(第八版) [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
Microorganism Research Institute, the Academy of Sciences of China (translation). Berger bacterial identification handbook (8th Edn) [M]. Beijing: Science Press, 1985.

- [13] Diker K, Heermann D F, Bausch W C *et al.* Shannon-Wiener's diversity index for linking yield monitor and remotely sensed data for corn[J]. *Trans. ASAE*, 2004, 47(4): 1347-1354.
- [14] Böhme L, Langer U, Böhme F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments [J]. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 2005, 109: 141-152.
- [15] Yao H, He Z, Wilson M J, Campbell C D. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use [J]. *Microbiol. Ecol.*, 2000, 40: 223-237.
- [16] 罗明, 文启凯, 陈全家, 等. 不同用量的氮磷化肥对棉田土壤微生物区系及活性的影响 [J]. *土壤通报*, 2000, 31(2): 66-69.
- Luo M, Wen Q K, Chen Q J *et al.* Influence of nitrogen and phosphorus fertilizers on communities and activities of microorganisms in cotton-grown fields [J]. *Chin. J. Soil Sci.*, 2000, 31(2): 66-69.
- [17] Kautz T, Wirth S, Ellmer F. Microbial activity in a sandy arable soil is governed by the fertilization regime [J]. *Eur. J. Soil Biol.*, 2004, 40(2): 87-94.
- [18] 徐进, 王玉珍, 罗兰景, 等. 肌醇与硝酸银对霍霍巴多芽苗增殖的促进作用简报 [J]. *中国生态农业学报*, 2005, 13(2): 77-78.
- Xu J, Wang Y Z, Luo L J *et al.* Effect of inositol and Ag(NO₃)₂ on the shoot proliferation of Jojoba cultured in vitro [J]. *Chin. J. Eco-Agric*, 2005, 13(2): 77-78.
- [19] 王振澜, 简庆德. 植物细胞肌醇类成分之生理功能及生物活性 [J]. *台湾林业研究专讯*, 2004, 11(6): 13-15.
- Wang Z L, Jian Q D. Physiological functions and activities of inositols in plant cells [J]. *Taiwan For. J.*, 2004, 11(6): 13-15.
- [20] Katarina H. Soil microbial community structure in relation to vegetation management on former agricultural land [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, 34(9): 1299-1307.
- [21] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review [J]. *Biol. Fert. Soils*, 1999, 29: 111-129.
- [22] 孔滨, 孙波, 郑宪清, 等. 水热条件和施肥对黑土中微生物群落代谢特征的影响 [J]. *土壤学报*, 2009, 46(1): 100-106.
- Kong B, Sun B, Zeng X Q *et al.* Influence of water, temperature and fertilization on microbial colonies and metabolism in black soil [J]. *Acta Pedol. Sin.*, 2009, 46(1): 100-106.
- [23] 汪诗平, 李家宏, 王艳芬, 等. 不同放牧率对内蒙古冷蒿草原植物多样性的影响 [J]. *植物学报*, 2001, 43(1): 89-96.
- Wang S P, Li J H, Wang Y F *et al.* Influence of different stocking rates on plant diversity of *Artemisia frigida* community in Inn Mongolia steppe [J]. *Acta Bot. Sin.*, 2001, 43(1): 89-96.
- [24] 姜海燕, 闫伟, 李晓彤, 等. 大兴安岭不同落叶松林植被土壤微生物多样性 [J]. *微生物学通报*, 2010, 37(2): 186-190.
- Jiang H Y, Yan W, Li X T *et al.* The diversity of soil microorganism under different vegetations of *Larix gmelinii* forest in Great Xingan Mountains [J]. *Microbiology*, 2010, 37(2): 186-190.