

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

唐海明*, 肖小平, 李微艳, 孙耿, 程凯凯

湖南省土壤肥料研究所, 湖南 长沙 410125

摘要: 微生物群落功能多样性是表征土壤质量变化的敏感指标, 施肥措施可对土壤微生物群落功能多样性产生明显的影响。以位于双季稻主产区湖南省宁乡县国家级稻田肥力长期定位试验田为研究对象, 应用 Biolog 技术分析了不同施肥处理(化肥、秸秆还田+化肥、30%有机肥、60%有机肥、无肥对照)对双季稻田根际土壤微生物功能多样性的影响, 从根际土壤微生物功能多样性的角度评价施肥对土壤质量的影响。研究表明, 有机肥与化肥配施以及单施化肥处理水稻根际土壤微生物对碳源的利用程度均显著高于其他处理, 而秸秆还田处理水稻根际土壤微生物对碳源的利用程度低于无肥处理。在早稻和晚稻成熟期, McIntosh 指数均以 60%有机肥和 30%有机肥处理为最高, 其次为施用化肥和无肥处理, 秸秆还田处理最低; Richness 和 Shannon 指数大小顺序均表现为 60%有机肥>30%有机肥>秸秆还田>无肥>化肥。土壤微生物碳源利用的主成分分析表明, 各施肥处理水稻根际土壤微生物群落利用的主要碳源为氨基酸类和糖类, 但不同施肥处理间碳源利用类型存在较大差异。总的来说, 不同的施肥处理对水稻根际土壤微生物功能多样性产生了不同影响, 长期有机肥配施化肥有利于维持稻田根际土壤微生物群落多样性。

关键词: 双季稻; 长期施肥; 根际土壤; 群落功能多样性

DOI: 10.16258/j.cnki.1674-5906.2016.03.006

中图分类号: S154.36; X17

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906 (2016) 03-0402-07

引用格式: 唐海明, 肖小平, 李微艳, 孙耿, 程凯凯. 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.

TANG Haiming, XIAO Xiaoping, LI Weiyang, SUN Geng, CHENG Kaikai. Effects of Long-term Different Fertilization Regimes on the Rhizospheric Microbial Community Functional Diversity in Paddy Field [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2016, 25(3): 402-408.

微生物是土壤生物中最重要的组成部分, 在土壤营养元素循环、土壤肥力形成和保持、生态环境改善等方面起着重要作用。土壤微生物对环境变化十分敏感, 是土壤环境质量重要的指标 (Insam et al., 1996)。根际土壤微生物具有繁殖快、数量多、代谢能力强的特点, 它对根际土壤有机质的分解、转化、氮的固定以及对植株养分吸收、植株生长发育均具有明显的影响 (Zak et al., 1994)¹¹⁰¹⁻¹¹⁰⁸。土壤微生物群落功能多样性是土壤微生物群落状态与功能的指标, 反映了土壤中微生物的生态特征。因此, 微生物群落功能为评价微生物多样性提供了一个可行的、生态相关的测量方法 (Zak et al., 1994)¹¹⁰¹⁻¹¹⁰⁸。目前测定土壤微生物多样性的方法很多, 从最常规的稀释平板法到微生物量测定、磷脂脂肪酸分析法、Biolog 微平板分析法到分子生物技术方法等。Biolog 微平板分析法是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一种最具代表性的方法 (Garland et al., 1991)²³⁵¹⁻²³⁵⁹。

施肥是农业生产主要的措施之一, 对土壤质量和可持续利用具有深远影响, 长期施肥可改变土壤理化性质和生物活性, 影响作物产量 (Zhong et al., 2010)。施肥使土壤微生物群落结构发生显著变化, 谭周进等 (2007)⁴³⁰⁻⁴³⁵ 认为, 大量有机肥的施用并不会提高土壤微生物数量, 但会显著增强土壤微生物活性。长期平衡施肥使土壤微生物量碳、氮和微生物功能活性增强 (Hu et al., 2011), 如侯晓杰等 (2007)⁶⁵⁵⁻⁶⁶¹ 研究表明, 肥料合理配施可以增强微生物对碳源的利用程度 (AWCD), 显著增加微生物功能多样性 (Shannon 指数)。徐万里等 (2015) 认为, NPK 及 NPK 配施有机肥可提高土壤微生物多样性。但也有研究表明, 长期施用无机氮肥可降低土壤微生物活性 (Lovell et al., 1995)。因此, 长期定位施肥, 使农田生态系统的质量和功能发生了

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201178; 31571591); 湖湘青年科技创新创业平台资助项目

作者简介: 唐海明 (1980 年生), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为耕作生态与农作制。E-mail: tanghaiming66@163.com

*通信作者

收稿日期: 2015-12-04

显著变化, 研究不同施肥措施对农田养分循环的影响以及施肥与环境关系等对土地可持续发展具有重要价值。

湖南是我国重要的双季稻区, 对我国的粮食安全具有重要的意义, 保持该区域稻田土壤肥力的稳定和持续是水稻高产、稳产的重要基础。近年来, 我国学者在双季稻区主要开展了不同施肥措施(制度)对水稻某一时期稻田土壤微生物群落功能多样性等方面影响的研究(谭周进等, 2007⁴³⁰⁻⁴³⁵; 罗希茜等, 2009⁷⁴⁰⁻⁷⁴⁸), 在大麦-双季稻三熟制种植模式条件下, 不同施肥措施对早、晚稻成熟期双季稻田周年根际土壤微生物群落功能多样性影响的研究还有待进一步开展。因此, 本文以湖南宁乡长期定位试验为平台, 利用 Biolog 技术, 探索 29 a 不同施肥管理模式双季稻田水稻根际土壤微生物功能的响应, 以了解双季稻田土壤的长期培肥效应, 为提高稻田土地生产力和可持续发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

不同施肥模式定位试验始于 1986 年, 在湖南省宁乡县农技中心内进行(112°18'E, 28°07'N), 为典型的双季稻主产区, 海拔 36.1 m, 年均气温 16.8 °C, 年平均降雨量 1553.70 mm, 年蒸发量 1353.9 mm, 无霜期 274 d。试验地土壤为水稻土, 河沙泥土种, 种植制度为大麦-双季稻, 肥力中等, 排灌条件良好。1986 年试验前耕层土壤(0~20 cm)基础肥力: 有机质 29.39 g·kg⁻¹、全氮 2.01 g·kg⁻¹、全磷 0.59 g·kg⁻¹、全钾 20.6 g·kg⁻¹、碱解氮 144.1 mg·kg⁻¹、有效磷 12.87 mg·kg⁻¹、速效钾 33.0 mg·kg⁻¹ 和 pH 6.85。

1.2 试验设计及田间管理

试验设 5 个施肥处理: (1) 化肥处理: 施氮、磷、钾化肥, 不施任何有机肥(MF: mineral fertilizer alone); (2) 秸秆还田+化肥处理: 施用晚稻秸秆与化肥处理(RF: rice residues plus mineral fertilizer); (3) 30%有机肥处理: 有机肥的氮含量占总施氮量的 30%, 其余 70%的氮为化肥氮(OM1: 30% organic matter plus 70% mineral fertilizer); (4) 60%有机肥处理: 有机肥的氮含量占总施氮量的 60%, 其余 40%的氮为化肥氮(OM2: 60% organic matter plus 40% mineral fertilizer); (5) 无肥对照: 不施任何肥料(CK: without fertilizer)。每个小区长 10.00 m, 宽 6.67 m, 面积 66.7 m², 小区间用水泥埂隔开, 埋深 100 cm, 高出田面 35 cm。保证各小区不窜灌、窜排。该试验田开始于 20 多年以前, 受当时条件的限制没有设置重复。2014 年, 早稻供试品种为湘早籼 45 号, 4 月 1 日播种育苗, 5 月 2 日进行大田耕

地和施基肥, 5 月 3 日移栽, 7 月 24 日收获; 晚稻供试品种为五优 308, 6 月 25 日播种育苗, 7 月 25 日进行大田耕地和施基肥, 7 月 26 日移栽, 10 月 17 日收获。早稻和晚稻均采用人工移栽, 移栽行株距均为 25.0 cm×25.0 cm, 均为二本栽插。早稻各施肥处理总施 N 142.5 kg·hm⁻²、P₂O₅ 54.0 kg·hm⁻² 和 K₂O 63.0 kg·hm⁻²; 晚稻各施肥处理总施 N 157.5 kg·hm⁻²、P₂O₅ 43.2 kg·hm⁻² 和 K₂O 81.0 kg·hm⁻²; 早稻季秸秆还田量为 2775.0 kg·hm⁻²(秸秆中 N、P₂O₅、K₂O 含量分别为 0.65%、0.13%和 0.89%), 晚稻季秸秆还田量为 3600.0 kg·hm⁻²(秸秆中 N、P₂O₅、K₂O 含量分别为 0.68%、0.15%和 0.91%); 施用有机肥的处理, 早稻和晚稻有机肥均为腐熟鸡粪, 早稻季 30%有机肥和 60%有机肥处理有机肥的施用量分别为 2625.0、5250.0 kg·hm⁻², 晚稻季 30%有机肥和 60%有机肥处理有机肥的施用量分别为 2670.0、5340.0 kg·hm⁻²(有机肥养分含量均为 N 1.77%、P₂O₅ 0.80%和 K₂O 1.12%), 各处理以等氮量为基准, 不足的氮、磷、钾肥用化肥补足; 早稻和晚稻各施肥处理秸秆和有机肥均于稻田耕地时作基肥一次性施入; N 和 K₂O 作基肥和追肥 2 次施入, 基肥在耕地时施入, 追肥在移栽后 7 d 施用, 基追肥比例均按 7:3 施用; P₂O₅ 均在耕地时作基肥一次性施入。早稻和晚稻田间管理为均在移栽后保持浅水条件, 结合施用分蘖肥进行杂草防除, 分蘖期进行晒田, 晒田后复水, 后期进行干湿交替灌溉, 水稻完熟后落干晒田、收获。其他管理措施同常规大田生产。

1.3 样品采集与测定方法

试验于 2014 年分别于早稻和晚稻的成熟期, 进行土壤样品的采集, 每个小区采取多点取样采集根际土壤组成 1 个样品, 重复 3 次。根际土壤取样方法采用“抖根法”, 即先将植株根系从土壤中挖出, 抖掉与根系松散结合的土体, 然后将与根系紧密结合在 0~4 mm 范围的土壤用刷子刷下来作为根际土壤。土壤剔除石砾及植物残茬等杂物后, 迅速装入塑料袋并置于冰盒中, 运至实验室, 4 °C 冰箱保存, Biolog 分析在取样后 48 h 内进行。同时, 在晚稻成熟期, 采用 5 点法采集各小区 0~20 cm 新鲜土壤样品, 风干过筛, 用于测定土壤基础理化性质。

试验使用 Biolog ECO 微平板法进行测定。反应平板的第 1 个孔为不含任何 C 源的对照, 其余每孔中含有 1 种 C 源和氧化还原染料四氮唑蓝。微生物利用碳源进行呼吸使氧化还原电势发生变化, 并将四唑类(TV)从无色还原成紫色(程池等, 2006)。通过测定反应平板各孔的吸光值及其变化来反映微生物群落代谢功能的多样性。具体实验步骤是,

取经预培养的新鲜土样 10 g, 加 95 mL 无菌的 $0.145 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液在摇床上振荡 15 min, 然后用无菌水分步稀释至 10^{-3} , 取上清液 (125 μL) 接种到反应平板的每个孔中, 将接种好的反应平板放至 25°C 下培养, 每隔 12 h 在波长为 590 nm 的 Biolog 读数器上读数, 实验持续 12 d。

土壤 pH 值采用土:水=1:2.5 法、有机质采用重铬酸钾容量法、全氮采用重铬酸钾-硫酸消化法、土壤碱解氮采用碱解扩散法、有效磷采用 NaHCO_3 浸提-钼锑抗比色法以及速效钾含量采用 NH_4Ac 浸提-火焰光度法 (鲍士旦, 2000)。

1.4 数据处理

根据公式 (1) 计算反应平板孔中溶液吸光值平均变化率 (average well color development, AWCD); 根据公式 (2) 计算 Shannon 指数 H (用于评估物种的丰富度); 根据公式 (3) 计算 McIntosh 指数 U (用于评估群落物种均匀度) (Garland et al., 1991²³⁵¹⁻²³⁵⁹; Jeffrey et al., 1997)。

$$\text{AWCD} = \sum (C-R)/n \quad (1)$$

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

$$U = \sqrt{\left(\sum n_i^2\right)} \quad (3)$$

式中, C 为每个有培养基孔的吸光值, R 为对照孔的吸光值, n 为培养基孔数, GN 板 n 值为 95。 P_i 为第 i 孔的相对吸光值与所有反应孔相对吸光值总和的比值, 即: $P_i = (C-R)/\sum(C-R)$ 。

数据处理、相关分析采用 Excel 2003 软件进行, 方差分析、主成分分析和多重比较采用 DPS 3.11 (Data Processing System for Practical Statistics) 软件进行, 多重比较采用 LSD 法 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 板孔平均颜色变化率

平均颜色变化率 (AWCD) 表征微生物群落碳源利用率, 是土壤微生物群落利用单一碳源能力的重要指标, 反映了土壤微生物活性、微生物群落生

理功能多样性 (Garland et al., 1991)²³⁵¹⁻²³⁵⁹。早稻和晚稻成熟期, 各施肥处理根际土壤 AWCD 变化如图 1 中所示, AWCD 随培养时间的延长而提高, 不同施肥处理均表现为在开始的 24 h 变化不大, 在第 24~108 小时内快速升高, 随后持续缓慢地升高直到实验结束。其中, 化肥、30% 有机肥和 60% 有机肥处理的快速增加过程一直持续到第 108 小时以后, 而秸秆还田和无肥处理基本上在第 108 小时就结束了。

与无肥处理相比, 不同施肥处理对 AWCD 有较大影响。在早稻和晚稻成熟期土壤培养结束时, 有机肥与化肥配施以及施用化肥处理的 AWCD 显著高于其他处理; 秸秆还田处理的 AWCD 低于无肥处理。

2.2 土壤微生物群落代谢多样性变化

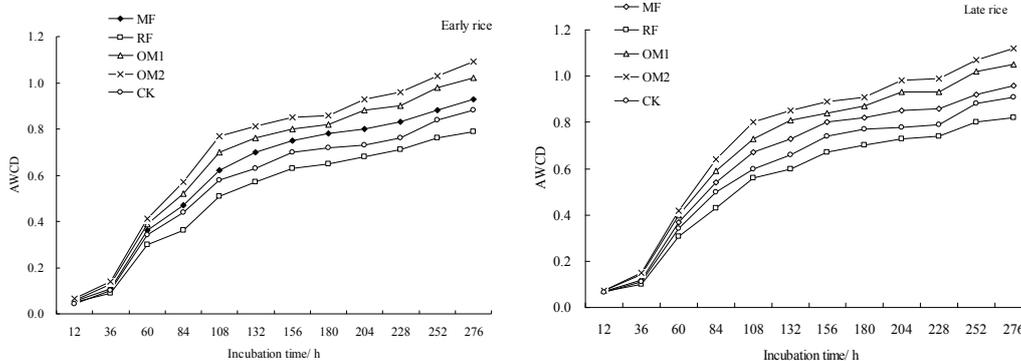
利用 Richness、Shannon 和 McIntosh 指数, 分别反映早稻和晚稻成熟期土壤微生物群落物种的丰富度和均匀度。如表 1 中所示, 早稻和晚稻成熟期, 60% 有机肥处理 Richness 指数均显著高于化肥处理, 其大小顺序为 60% 有机肥 > 30% 有机肥 > 秸秆还田 > 无肥 > 化肥。早稻和晚稻成熟期, 60% 有机肥

表1 水稻成熟期不同施肥处理根际土壤微生物群落的多样性指数值

Table 1 Genetic diversity indices of rhizospheric soil microbial communities for different fertilizer treatments at early and late rice maturity stage

Rice	Treatments	Item		
		Richness indices	Shannon indices	McIntosh indices
Early rice	MF	16.8±0.49b	2.24±0.06b	5.78±0.48ab
	RF	17.8±0.51ab	2.42±0.07ab	4.78±0.50c
	LOM	18.2±0.53ab	2.51±0.07ab	6.21±0.51ab
	HOM	18.5±0.53a	2.63±0.08a	6.45±0.55a
	CK	17.4±0.50ab	2.38±0.07b	5.34±0.44bc
Late rice	MF	15.1±0.44b	2.21±0.06c	5.88±0.46ab
	RF	15.8±0.46ab	2.47±0.07ab	4.87±0.41c
	LOM	16.2±0.47ab	2.58±0.07a	6.29±0.44ab
	HOM	16.6±0.48a	2.66±0.08a	6.55±0.47a
	CK	15.6±0.45ab	2.35±0.07bc	5.45±0.48bc

MF: 化肥; RF: 秸秆还田; OM1: 30% 有机肥+70% 化肥; OM2: 60% 有机肥+40% 化肥; CK: 无肥。同列数据后不同字母表示差异达到 5% 的显著水平。 $n=3$ 。下同



MF: 化肥; RF: 秸秆还田; OM1: 30% 有机肥+70% 化肥; OM2: 60% 有机肥+40% 化肥; CK: 无肥。 $n=3$ 。下同

图1 早稻和晚稻成熟期不同施肥处理根水际土壤微生物吸光值AWCD

Fig. 1 AWCD changes with incubation progress at early and late rice maturity stage with different fertilizer treatments

和 30% 有机肥处理 Shannon 指数均显著高于其他处理，其大小顺序为 60% 有机肥 > 30% 有机肥 > 秸秆还田 > 无肥 > 化肥。Shannon 指数的结果表明，有机肥与化肥配施以及秸秆还田配施化肥处理的群落丰富度均高于化肥和无肥处理，单施化肥处理最低。McIntosh 指数的结果表明有机肥与化肥配施处理（60% 有机肥和 30% 有机肥处理）的物种均匀度最高，其次为化肥和无肥处理，而秸秆还田处理最低，表明其均匀度与群落丰富度之间有着不一致的表现。

2.3 水稻根际土壤微生物群落代谢功能主成分分析

利用培养 72 h 后测定的 AWCD 数据，经过标准化处理后，利用相关文献提供的方法进行了主成分分析（Kela et al., 2007; Grove et al., 2004; Min et al., 2007; Wolfgang et al., 1997）。早稻和晚稻成熟期，根据提取的主成分个数一般要求累计方差贡献率达到 85% 的原则（Hao et al., 2003），共提取了 9 个主成分，累计贡献率分别达 85.73%、86.67%。其中早稻成熟期第 1 主成分（PC1）的方差贡献率为 35.42%，第 2 主成分（PC2）为 15.26%，第 3~9 主成分贡献率均较小，分别为 8.42%、6.14%、5.37%、4.17%、4.11%、3.72% 和 3.12%；晚稻成熟期 PC1 的方差贡献率为 37.68%，PC2 为 16.34%，第 3~9 主成分贡献率均较小，分别为 7.57%、5.56%、5.14%、4.02%、3.79%、3.53% 和 3.04%，因此本文

只对前 2 个主成分进行分析（图 2）。结果表明，不同施肥处理在 PC 轴上出现明显的分异，在 PC1 轴上各处理分布分散，秸秆还田处理主要分布在负方向，而化肥、60% 有机肥和 30% 有机肥处理主要分布在 PC1 轴正方向；PC2 轴上秸秆还田处理分布在负方向，60% 有机肥和 30% 有机肥处理分布在正方向，其中化肥处理在 PC2 正负轴上均有分布。整体来看，不同施肥处理间土壤微生物群落存在较大的差异。

对 PC1 和 PC2 具有较高相关性的 19 个碳源的分析结果表明，对 PC1 和 PC2 差异起作用的主要碳源是氨基酸和糖类物质（表 2）。氨基酸类碳源在 PC1 的权重较大，而与 PC2 相关性较大的碳源主要是糖类；氨基酸类、糖类碳源是区分各施肥处理的主要碳源。

本文对不同施肥处理具体利用的前 5 种碳源进行了分析（表 3）。不同处理的根际土壤微生物虽然利用的主要都是糖类、氨基酸类以及少量其他物质，但各处理间所存在的相同之处较少，这表明不同施肥处理对根际土壤微生物利用碳源情况存在明显的影响。

2.4 土壤基础理化性质变化

各处理间土壤 pH 值无显著性差异。与无肥处理相比，施用有机肥显著提高土壤有机质、全氮、碱解氮、有效磷和速效钾含量（表 4）。其中，60%

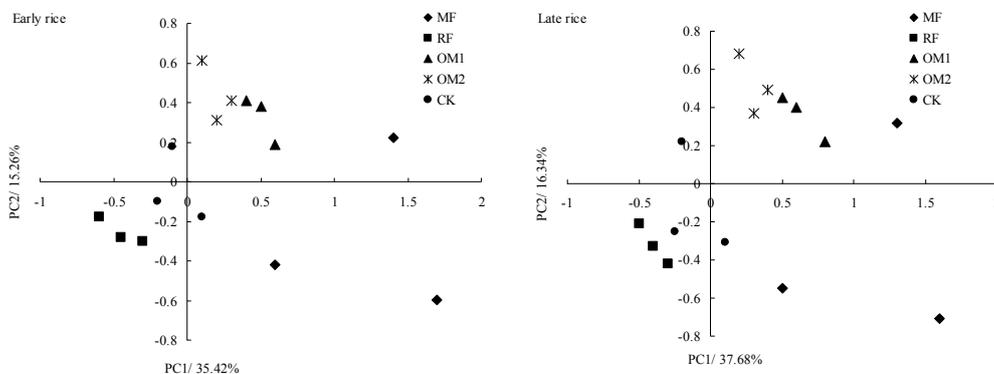


图2 早稻和晚稻成熟期不同施肥处理根际土壤微生物碳源利用类型的主成分分析

Fig. 2 Principal components for carbon utilization of rhizospheric soil microbial communities in different fertilizer treatments at early and late rice maturity stage

表2 与PC1和PC2相关显著的主要培养基

Table 2 Correlation coefficients between main substrates and PC1 or PC2

PC1		PC2	
Substrates	r	Substrates	r
D-甘露醇(糖类)	0.932	D-丙氨酸(氨基酸类)	0.887
D-葡萄糖胺酸(羧酸类)	0.915	L-丙氨酸(氨基酸类)	0.885
p-羟基苯乙酸(羧酸类)	0.912	L-天门冬氨酸(氨基酸类)	0.881
奎尼酸(羧酸类)	0.904	L-天门酰氨酸(氨基酸类)	0.877
L-丝氨酸(氨基酸类)	0.901	甲基丙酮酸(酯类)	0.873
α-D-葡萄糖(糖类)	0.897	尿苷酸(核苷类)	0.870
L-焦谷氨酸(氨基酸类)	0.893	γ-氨基丁酸(氨基酸类)	0.862
L-亮氨酸(氨基酸类)	0.891	D-葡萄糖酸(羧酸类)	0.858
L-脯氨酸(氨基酸类)	0.890	丙三醇(醇类)	0.826
丁二胺(胺类)	0.887		
		尿苷(核苷类)	0.863
		L-阿拉伯糖(糖类)	0.845
		6-磷酸葡萄糖(糖类)	0.838
		麦芽糖(糖类)	0.824
		乳果糖(糖类)	0.818
		β-甲基-D-葡萄糖苷(糖类)	0.804
		肌苷(核苷类)	0.787
		D-海藻糖(糖类)	0.782
		1-磷酸葡萄糖(糖类)	0.795
		葵二酸(羧酸类)	0.790
		甲酸(羧酸类)	0.787
		D-果糖(糖类)	0.783
		D-棉子糖(糖类)	0.765
		D-甘露醇(糖类)	0.742
		D-蜜二糖(糖类)	0.628
		N-乙酰-D-葡萄糖胺	0.624
		丙二酸(羧酸类)	0.618
		糊精(聚合物)	0.602

表3 各处理利用的主要碳源

Table 3 Main carbon substrates utilized by rhizospheric soil microbial communities for different fertilizer treatments

Treatment	PC1	PC2
MF	D-半乳糖(糖类)	L-阿拉伯糖(糖类)
	D-甘露糖(糖类)	N-乙酰基-D-半乳糖胺(糖类)
	L-焦谷氨酸(氨基酸类)	N-乙酰-D-葡萄糖胺(糖类)
	丁二胺(胺类)	尿苷(核苷类)
	木糖醇(糖类)	1-磷酸葡萄糖(糖类)
RF	D-甘露糖(糖类)	L-丙氨酰甘氨酸(氨基酸类)
	D-山梨醇(糖类)	L-天冬酰胺(氨基酸类)
	D-L- α -磷酸甘油(糖类)	甘氨酸-L-天冬氨酸(氨基酸类)
	苯乙胺(胺类)	N-乙酰基-D-半乳糖胺(糖类)
	γ -氨基丁酸(氨基酸类)	海藻糖醇(糖类)
OM1	D-海藻糖(糖类)	β -甲基-D-葡萄糖苷(糖类)
	D-半乳糖醛酸(羧酸类)	β -甲基-D-葡萄糖苷(糖类)
	侧金花盏醇(糖类)	m-肌醇(糖类)
	6-磷酸葡萄糖(糖类)	L-果糖(糖类)
	松二糖(糖类)	羟基-L-脯氨酸(氨基酸类)
OM2	ρ -羟基苯乙酸(羧酸类)	D-阿拉伯糖(糖类)
	木糖醇(糖类)	L-亮氨酸(氨基酸类)
	γ -羟基丁酸(羧酸类)	L-果糖(糖类)
	m-肌醇(糖类)	γ -氨基丁酸(氨基酸类)
	L-天冬酰胺(氨基酸类)	阿洛酮糖(糖类)
CK	D-甘露糖(糖类)	L-丝氨酸(氨基酸类)
	D-葡萄糖胺(羧酸类)	L-阿拉伯糖(糖类)
	D-阿拉伯糖(糖类)	L-鸟氨酸(氨基酸类)
	苯乙胺(胺类)	侧金花盏醇(糖类)
	肉碱(氨基酸类)	2,3-丁二醇(醇类)

有机肥处理稻田土壤有机质、全氮、碱解氮、有效磷和速效钾含量均为最高,分别比无肥处理增加 $28.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $1.77 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $157.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $234.21 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $14.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;较化肥、秸秆还田和无肥处理,30% 有机肥处理提高了土壤的养分含量,但其含量均低于 60% 有机肥处理。秸秆还田和化肥处理土壤有机质、全氮、碱解氮和速效钾含量均显著高于无肥处理,而有效磷与无肥处理无显著性差异。

3 讨论

AWCD 的高低可用来表征微生物对碳源的利用率高,可作为土壤微生物活性有效指标。本研究在指数分析时利用的是培养 72 h 的吸光值结果,与侯晓杰等(2007)⁶⁵⁵⁻⁶⁶¹、张逸飞等(2006)研究中所采用的时间和方法并不一致。在本研究中,水稻根际土壤微生物经过 24 h 延滞期适应 Biolog 微平板提供的环境,然后对数生长至 72 h,之后生长减缓步入稳定期(图 1),本研究利用 72 h 培养后的 AWCD 值进行分析是适当的。前人研究表明,

施用厩肥有利于维持根际土壤微生物的多样性及活性(朱海平等,2003)¹⁴⁰⁻¹⁴²。侯晓杰等(2007)⁶⁵⁵⁻⁶⁶¹报道单施氮肥、氮肥磷肥配施条件下,微生物对碳源利用率较低。本研究结果表明,不同施肥措施对根际土壤微生物群落碳源利用能力具有明显的影响。有机肥与化肥配施以及施用化肥处理土壤 AWCD 显著高于无肥处理,表明这些处理有利于维持根际土壤微生物的碳源利用能力,提高了土壤碳的利用能力,这可能是由于长期有机-无机肥配施有较好的土壤培肥效果(表 4),能为土壤微生物提供较多的能源和养分,促进了土壤微生物的活性和多样性。施用化肥处理提高了根际土壤微生物对碳源的利用率,这可能是本研究的土壤质地(红黄泥水稻土)、土壤理化因素、种植制度(大麦-双季稻)与其他研究有所不同所导致的结果(侯晓杰等,2007)⁶⁵⁵⁻⁶⁶¹。而秸秆还田处理土壤 AWCD 均低于无肥处理,其原因可能是秸秆还田后无机 N、P 相对缺乏且 C/N 比高,养分释放缓慢,微生物分解慢,从而降低了土壤微生物活性和多样性(李新爱等,2006)。另外,秸秆还田处理可能改变了根际土壤微生物的优势种群,引起其对所测试碳源的利用率降低。

Richness、Shannon 和 McIntosh 指数分析结果表明,不同施肥处理对稻田根际土壤微生物群落多样性有显著的影响,根际土壤微生物物种的数量、各个物种均匀度在不同施肥处理间存在明显的差异。其中,有机肥与化肥配合施用(60%和 30% 有机肥处理)有利于提高根际土壤微生物群落物种数量、各物种均匀度,这可能是由于有机肥的 C/N 有利于根际土壤微生物的生长;且有机肥为微生物提供了较多的能源与养分,促进了根际土壤微生物大量繁殖(Tang et al., 2014),加快微生物的新陈代谢。秸秆还田处理虽然能增加微生物物种数量,但降低了物种均匀度指数,可能是由于长期秸秆还田促进了某些微生物种群(偏于利用植物残体的种群)生长代谢,而抑制了其他微生物种群的生长代谢,致使根际土壤群落均匀度下降(罗希茜等,2009)⁷⁴⁰⁻⁷⁴⁸。施用化肥处理降低了根际土壤微生物物种的数量、各个物种均匀度,这可能是由于长期单独施用化肥导致土壤所提供的生物有效碳源较少,维护较低的土壤微生物活性,从而降低了根际

表4 长期施肥对稻田土壤化学性质的影响(0-20 cm)

Table 4 Effects of different long-term fertilizer managements on soil chemical properties (0-20 cm)

Treatments	pH	Total N/(g·kg ⁻¹)	Available N/(mg·kg ⁻¹)	Available P/(mg·kg ⁻¹)	Available K/(mg·kg ⁻¹)	Organic matter/(g·kg ⁻¹)
MF	6.33a	1.77c	128d	10.2c	29c	27.6d
RF	6.65a	2.11b	166c	12.3c	31c	34.3c
OM1	6.37a	2.21b	186b	129.3b	34b	38.0b
OM2	6.73a	3.18a	253a	243.8a	40a	50.5a
CK	6.67a	1.41d	96e	9.59c	26d	22.5e

土壤微生物群落的多样性。有机肥与化肥配施能显著提高根际土壤微生物活性,使其碳源利用能力大大增强,其群落多样性也得到提高,土壤中有机质得到充分利用。秸秆还田处理虽然提高了根际微生物群落的物种丰富度,但降低了根际微生物利用碳源的能力以及群落物种均匀度,这可能与土壤碳、氮利用下降原因有关。

Garland et al. (1991)²³⁵¹⁻²³⁵⁹认为各试验样本在 PC 空间不同 PC 轴坐标的差异是与对聚集在该 PC 轴上碳源利用能力相联系的。在本试验的主成分分析中,共提取了 9 个主成分,但只对前 2 个主成分进行了分析。分析结果表明,不同施肥处理根际土壤微生物的碳源利用能力存在显著差异(图 2),体现了不同施肥处理对土壤碳库具有不同影响。氨基酸类和糖类物质是本试验双季稻田根际土壤微生物主要利用的碳源(表 2),但不同施肥处理根际土壤微生物所利用的氨基酸和糖类物质存在明显差异(表 3),可作为划分各处理对根际土壤微生物影响的依据(Ekkehard et al., 1997; Gabriela et al., 2006)。本研究结果表明,与单施化肥处理相比,长期有机-无机肥配合施用处理(60%、30%有机肥和秸秆还田处理)显著提高了根际土壤氨基酸和单糖的数量,这是因为长期施用有机肥和秸秆还田将到时可被微生物利用的碳源趋于稳定,促进偏好以氨基酸类和单糖糖类物质为碳源的微生物群落的发育,从而增加了有机肥处理稻田土壤中以氨基酸类和单糖糖类物质为主要碳源的根际土壤微生物群落,这与张继宏等(1995)研究结果相一致。

土壤微生物群落功能多样性变化不仅受施肥影响,还与土壤养分密切相关,孙瑞莲等(2004)发现,化肥与有机肥长期配合施用能明显提高土壤有机质和氮、磷、钾养分含量,促进微生物代谢和繁育,可为作物稳产高产创造良好的土壤生态环境。朱海平等(2003)¹⁴⁰⁻¹⁴²研究结果表明,不同施肥管理措施影响土壤养分含量和微生物生态特征,其中施用猪厩肥影响较大,化肥影响较小。本研究结果表明,各施肥处理间土壤微生物群落功能多样性受土壤养分含量影响较大。与单施化肥处理相比,在双季稻区稻田长期进行有机-无机肥配合施用处理(60%、30%有机肥和秸秆还田处理)可不同程度地增加土壤微生物群落功能多样性,这可能是由于有机物与化肥长期配施对土壤具有较好的培肥效果(表 4),能为土壤微生物提供较多的能源和养分,促进了土壤微生物大量繁殖,增加土壤微生物群落功能多样性,这与前人的研究结果相一致(李娟等, 2008);同时,所施用的肥料促进作物根系生长,

大量留田根茬和秸秆还田提高了微生物的活性,促进了土壤微生物的繁殖。而长期单独施用化学肥料对土壤微生物群落功能多样性影响较小,这是因为水稻生长消耗大部分养分且植株生长状况较差,根系及残留物均较少,且长期施用化肥,尤其是无机氮肥,使土壤 C/N 比降低,加速了土壤中原有有机碳分解,影响了土壤养分含量和微生物活性(徐阳春等, 2000)。

在本研究中,仅开展了不同施肥处理对双季稻田根际土壤微生物群落功能多样性的影响研究,而不同施肥处理对稻田非根际土壤微生物群落功能多样性的影响及根际和非根际土壤间的差异还需作进一步的研究。

4 结论

有机肥与化肥配合施用以及施用化肥处理稻田根际土壤微生物对碳源的利用程度均有所升高,而秸秆还田处理根际土壤微生物对碳源的利用程度有所下降。所有施肥处理均有利于维持稻田根际土壤微生物群落多样性,特别是有机肥与化肥配施能提高根际土壤微生物的物种丰富度和群落均匀度,但秸秆还田降低了根际土壤微生物群落均匀度。各施肥处理土壤微生物群落功能多样性与土壤养分含量关系密切。土壤微生物碳源利用的主成分分析结果表明,不同施肥处理根际土壤微生物主要利用氨基酸类和糖类碳源,各施肥处理稻田根际土壤微生物群落在碳源利用上存在较大的差异,施肥明显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。

参考文献:

- EKKEHARD G, HOLGER H, BERT E, et al. 1997. Statistical comparisons of community catabolic profiles [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 30(1): 71-80.
- GABRIELA D, MONICA A, HUGO C, et al. 2006. Effect of tillage and N fertilization on microbial physiological profile of soils cultivated with wheat [J]. *Soil and Tillage Research*, 91(1-2): 236-243.
- GARLAND J L, MILLS A L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole carbon-source-utilization [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8): 2351-2359.
- GROVE J A, KAUTOLA H, JAVADPOUR S, et al. 2004. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 18(2): 111-114.
- HAO LR, FAN Y, HAO Z O. 2003. *SPSS Practical Statistics Analysis* [M]. Beijing: China Water Power Press.
- HU J L, LIN X G, WANG J H, et al. 2011. Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2): 271-280.
- INSAM H, HUTCHINSON T C, REBER H H. 1996. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(4-5): 691-694.
- JEFFREY S B, DONALD D K. 1997. Microbial diversity in the rhizosphere of corn grown under conventional and low-input systems [J]. *Applied Soil Ecology*, 5(1): 21-27.
- KELA P W, JASON A G, MATTHIAS G, et al. 2007. Data transformations

- in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 69(3): 461-469.
- LOVELL R D, JARVIS S C, BARDGETT R D. 1995. Soil microbial biomass and activity in long term grass land: effects of management change [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(7): 969-975.
- MIN L, XIAO M X. 2007. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(2): 217-223.
- TANG H M, XU Y L, SUN J M, et al. 2014. Soil enzyme activities and soil microbe population as influenced by long-term fertilizer management under an intensive cropping system [J]. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 8(2): 15-23.
- WOLFGANG H, MICHAEL H, MARKUS K. 1997. Application of multivariate analysis of variance and related techniques in soil studies with substrate utilization tests [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 30(1): 81-89.
- ZAK J C, WILLIG M R, MOORHEAD D L, et al. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(9): 1101-1108.
- ZHONG W H, GU T, WANG W, et al. 2010. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity [J]. *Plant and Soil*, 326(1): 511-522.
- 鲍士旦. 2000. 土壤农化分析(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社: 25-108.
- 程池, 杨梅, 李金霞, 等. 2006. Biolog微生物自动分析系统—细菌鉴定操作规程的研究[J]. *食品与发酵工业*, 32(5): 50-54.
- 侯晓杰, 汪景宽, 李世朋. 2007. 不同施肥处理与地膜覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. *生态学报*, 27(2): 655-661.
- 李娟, 赵秉强, 李秀英, 等. 2008. 长期有机无机肥料配施对土壤微生物学特性及土壤肥力的影响[J]. *中国农业科学*, 41(1): 144-152.
- 李新爱, 童成立, 蒋平, 等. 2006. 长期不同施肥对稻田土壤有机质和全氮的影响[J]. *土壤*, 38(3): 298-303.
- 罗希茜, 郝晓晖, 陈涛, 等. 2009. 长期不同施肥对稻田土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. *生态学报*, 29(2): 740-748.
- 孙瑞莲, 朱鲁生, 赵秉强, 等. 2004. 长期施肥对土壤微生物的影响及其在养分调控中的作用[J]. *应用生态学报*, 15(10): 1907-1910.
- 谭周进, 周卫军, 张杨珠, 等. 2007. 不同施肥制度对稻田土壤微生物的影响研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 13(3): 430-435.
- 徐万里, 唐光木, 葛春辉, 等. 2015. 长期施肥对新疆灰漠土土壤微生物群落结构与功能多样性的影响[J]. *生态学报*, 35(2): 468-477.
- 徐阳春, 沈其荣, 雷宝坤, 等. 2000. 水旱轮作下长期免耕和施用有机肥对土壤某些肥力性状的影响[J]. *应用生态学报*, 11(4): 549-552.
- 张继宏, 颜丽, 窦森. 1995. 农业持续发展的土壤培肥研究[M]. 沈阳: 东北大学出版社.
- 张逸飞, 钟文辉, 李忠佩, 等. 2006. 长期不同施肥处理对红壤水稻土酶活性及微生物群落功能多样性的影响[J]. *生态与农村环境学报*, 22(4): 39-44.
- 朱海平, 姚槐应, 张勇勇, 等. 2003. 不同培肥管理措施对土壤微生物生态特征的影响[J]. *土壤通报*, 34(2): 140-142.

Effects of Long-term Different Fertilization Regimes on the Rhizospheric Microbial Community Functional Diversity in Paddy Field

TANG Haiming*, XIAO Xiaoping, LI Weiyang, SUN Geng, CHENG Kaikai

Hunan Soil and Fertilizer Institute, Changsha 410125, China

Abstract: Microbial community functional diversity is a sensitive indicator of soil quality; soil management such as fertilization regimes which can affect the microbial community functional diversity of paddy fields. In this paper, the average well color development (AWCD) in BIOLOG plates indicated the ability of rhizosphere microbial community to utilize carbon. The indices of Richness, Shannon and McIntosh were calculated to show the richness and evenness of the functional diversity, while the principal component analysis (PCA) of substrate reaction reflected the main carbon source utilized by rhizosphere microbial community. Our objective was to explore the rhizosphere microbial community functional diversity of a paddy field at early and late rice mature stages under different long-term fertilization regimes in a double cropping rice system. A long-term experiment was established in 1986 in Ningxiang county of Hunan Province, China, and five different fertilizer treatments were applied: (1) no fertilizer input (CK), (2) mineral fertilizer alone (MF), (3) rice residue plus mineral fertilizer (RF), (4) 30% organic matter and 70% mineral fertilizer (OM1), and (5) 60% organic matter and 40% mineral fertilizer (OM2). We analyzed the rhizosphere microbial community functional diversity of the fields with the above five treatments using BIOLOG system. The results showed that both applications of organic manure mixed with chemical fertilizer, and chemical fertilizer alone caused high increase of the AWCD while straw incorporation had less effect on the AWCD, which effect was even lower than in the treatment without fertilizer. It was implied that long-term fertilization regime resulted in the variation of the carbon utilization efficiency of rhizosphere soil microbial communities. In addition, the indices of McIntosh under different fertilization regimes were ordered as follows: OM2>OM1>MF>CK>RF at mature stages of early and late rice. And the indices of Richness, Shannon under different fertilization regimes were ordered as follows: OM2>OM1>RF>CK>MF at mature stages of early and late rice. PCA analysis indicated that there were different carbon-substrate-utilization patterns among different fertilizer treatments. Carbohydrates and Amino acids were the main carbon resources utilized by rhizosphere microbes. There were significant differences in carbon-substrate-utilization patterns among different fertilizer treatments. Therefore, the combined application of chemical fertilizer and recycled organic manure could significantly increase the rhizosphere microbial community functional diversity of paddy fields at mature stages of early and late rice.

Key words: double rice; long-term fertilization regime; rhizospheric soil; community functional diversity