

长期氮肥施用对农田黑土 NLFA 与 PLFA 特性的影响*

白震^{1,3} 张旭东^{1,2†} 何红波¹ 闫颖^{1,3} 侯松岷^{1,3} 陈盈^{1,3} 解宏图^{1,2}

(1 中国科学院沈阳应用生态所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016)

(2 辽宁沈阳农田生态系统国家野外研究站, 沈阳 110016)

(3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 以不施肥与休闲处理为对照, 通过对土壤微生物磷脂脂肪酸 (PLFA)、中性磷脂脂肪酸 (NLFA)、NLFA/PLFA 比值及各菌群特定 PLFA 比值的测定, 研究不同氮肥处理条件下东北黑土微生物群落变化规律。PLFA 测定结果表明, 氮磷配施能促进土壤微生物生长; 氮磷钾配施未表现出促进土壤微生物生长的作用; 单施氮肥处理因有效磷等养分过度消耗而抑制真菌生长。不同菌群之间 PLFA 比值表明, 真菌较细菌更能适应养分贫瘠条件, 而氮肥与磷肥的施入则能促进细菌生物量增加。不同氮肥处理 NLFA 含量及个别 NLFA/PLFA 比值存在较大差异, 可用来说明土壤微生物生理状态和土壤养分水平。

关键词 磷脂脂肪酸; 中性磷脂脂肪酸; 真菌; 细菌; 微生物量; 中国黑土

中图分类号 Q938.1

文献标识码 A

黑土是我国东北地区重要的战略资源, 所辖区域是国家重要商品粮基地及饲料原料供应地^[1]。虽然黑土相对肥沃, 但是为了获得高产仍需施用大量氮肥且其施用量逐年上升。目前, 东北黑土区氮肥施用存在的主要问题是损失严重、利用率较低。如何通过化肥合理配施提高氮肥利用率一直为人们所关注^[2]。以复杂群落形式存在的土壤真菌与细菌是农田土壤氮素生物循环的重要参与者。因此, 原位土壤微生物群落代谢周转规律与生理状态的变化, 能反映不同肥料配施条件下氮素等养分利用率高低^[3~5]。磷脂脂肪酸 (Phospholipid fatty acid, PLFA) 已被广泛应用于原位土壤活体微生物研究^[6~9], 且各菌群 PLFA 组成差异大^[10~12], 例如 C18:2, 6, 9 常见于真菌, 细菌多含有 C15:0, C17:0, cy17:0, cy19:0 等脂肪酸^[13~17]。另外, 土壤中存在真菌和细菌源中性脂肪酸 (Neutral lipid fatty acid, NLFA), 其含量可反映菌群生理状况^[18]。C14:0 含量可代表土壤总体微生物量水平^[19]。本研究采集了公主岭国家级黑土长期监测站不同氮肥处理土壤样品, 将 PLFA 与 NLFA 测定相结合, 试图揭示不同氮肥处理条件下土壤真菌、细菌群落组成变化规律, 探讨 NLFA/PLFA 比值作为土壤养分水平和土壤微生物群落代谢状态指标的可能性, 了解肥料氮素土

壤微生物转化的某些过程和机制, 为肥料的合理施用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤与试验设计

2004 年 10 月底于公主岭国家黑土长期定位站 (东经 124°48'33.9", 北纬 43°30'23") 采集氮肥不同处理土壤样品: 单施氮肥处理 (N)、氮磷处理 (NP)、氮磷钾处理 (NPK), 以休闲处理 (Fallow) 和不施肥处理 (CK) 为对照。化肥及用量: 氮, 150 kg hm⁻², 肥料为尿素; 磷, 32.73 kg hm⁻², 重过磷酸钙; 钾, 62.27 kg hm⁻², 硫酸钾。氮肥 1/3 为底肥, 2/3 追施; 磷肥与钾肥全部做底肥。作物为玉米 (吉单 101、丹玉 13 等)。肥料长期试验始于 1980 年, 保持了相同的处理和种植制度。田间试验未设重复, 每个施肥处理均分 3 个小区, 作为重复。采样深度为 0~20 cm 耕层土壤, 按蛇形方式取五点混匀后备用。

1.2 测定方法

土壤样品在 24 h 内去除植物残根、过 2 mm 筛, -20℃ 冷冻保存直至磷脂分析^[20] (1 个月内完成磷脂测定工作)。测定土壤基本性质的试剂为分析纯,

* 国家自然科学基金重点项目 (40535028)、中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX3-SW-433) 资助

† 通讯作者, E-mail: xdzhang@iae.ac.cn

作者简介: 白震 (1975~), 男, 辽宁沈阳人, 博士研究生, 主要从事土壤微生物学研究。E-mail: esbaizhen@163.com

收稿日期: 2006-02-19; 收到修改稿日期: 2006-08-25

磷脂分析试剂为色谱纯。氯仿熏蒸法测定鲜土微生物量碳与微生物量氮,速效钾采用乙酸铵浸提火焰光度计法测定,有效磷测定采用碳酸氢钠提取钼锑抗比色法测定紫外吸收法,碱解扩散法测定有效氮,室内密闭培养法测定土壤呼吸(于28℃恒温培养24 h,以标准HCl滴定法测定培养过程CO₂生成量来表示土壤微生物总的活性)^[21](表1)。NLFA与PLFA提取参照Bligh-Dyer修正方法^[22,23],酯化C19:0为内标,用Agilent 6890气相色谱仪(GC)测定。色谱条件:HP-5柱(30.0 μm × 320 μm × 0.25 μm),进

样量1 μl,分流比10:1,载气(N₂)流速0.8 ml min⁻¹。初始温度140℃维持3 min,分三个阶段程序性升温:140~190℃,4 min⁻¹,保持1 min;190~230℃,3 min⁻¹,保持1 min;230~300℃,10 min⁻¹,保持2 min。火焰离子检测器(FID)检测。峰面积通过计算机自动积分,各脂肪酸的识别与定量分别参照BAME(Bacterial Acid Methyl Esters) Mix和Supelcoe 37 Component FAME Mix。以C15:0、C16:1和C18:0等作为细菌源脂肪酸,真菌源脂肪酸为C18:2,6,9,以C14:0表示总微生物量^[18,19,24~26]。

表1 土壤基本性质

Table 1 Basic properties of soils

施肥处理 Treatments	pH	有机质 Organic matter	总氮 Total N	碱解氮 Alkalytic N	有效磷 Available P	速效钾 Readily available K	微生物量氮 Microbial biomass N	微生物量碳 Microbial biomass C	土壤呼吸 Soil respiration
		(g kg ⁻¹)			(mg kg ⁻¹)				(CO ₂ ml kg ⁻¹)
CK	8.43 A	32.86 A	1.65 A	95.92 B	2.00 C	104.1 B	22.90 B	52.47 D	277.1 B
N	8.40 A	33.84 A	1.75 A	112.5 A	1.46 D	105.7 B	13.62 C	157.8 B	274.9 B
NP	8.41 A	33.01 A	1.74 A	99.15 B	4.19 A	101.6 B	16.21 C	113.0 C	272.5 B
NPK	8.40 A	33.19 A	1.65 A	112.9 A	4.03 A	106.5 B	15.16 C	119.3 C	269.4 B
休闲	8.40 A	31.79 A	1.57 A	101.6 B	2.49 B	129.7 A	30.15 A	267.8 A	304.8 A
Fallow									

注:土重以干土计。在同一列中有相同字母的数据间差异未达到极显著水平 $p=0.01$ Note: Soil samples are measured on a dried soil basis. Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at $p=0.01$ level

1.3 数据分析

利用SPSS 13.0分析软件处理数据,差异显著性采用单因素方差分析LSD计算检验,每处理设3次重复,重复方式为:每个施肥处理均分3个小区,每个小区内以蛇形方式取五点混匀后备用。表格内数据右侧及柱形图上方的大写英文字母代表数据之间差异的显著程度, $p<0.01$ 。主成分分析具体指标为:旋转方法采用“Quatimax”,最大迭代步数为25;公因子提取采用主成分分析法;其抽样适当性参数(Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy)检验值为0.641,球形检验(Bartlett's Test of Sphericity)表明各指标并非独立。

2 结果与分析

2.1 不同氮肥处理土壤微生物PLFA组成变化

PLFA是活体微生物细胞膜恒定组分、对环境因素敏感、在生物体外迅速降解,因此特定菌群PLFA数量变化可反映出原位土壤真菌、细菌活体生物量

与菌群结构^[6-9]。NLFA与PLFA图谱如图1A与图1B所示。

由于供试土壤中所提取的脂肪酸中仅有八种可与Supelcoe 37 Component FAME Mix定量脂肪酸标准相对比,显然通过脂肪酸加和形式表示总土壤脂肪酸不太合适。由于土壤微生物量可用C14:0表示,因此本文以C14:0 PLFA来代替土壤总PLFAs^[19,27]。同时,本文仅利用了可定量且在细菌中广泛存在的三种脂肪酸C15:0、C16:1和C18:0来代表细菌PLFAs。结果表明,C14:0脂肪酸与三种细菌脂肪酸在不同处理间变化极为相似(图2)。

就C14:0而言,氮磷处理(0.35 nmol g⁻¹)与休闲处理(0.36 nmol g⁻¹)含量最高,其次为单施氮肥(0.29 nmol g⁻¹)与氮磷钾处理(0.24 nmol g⁻¹),不施肥处理(0.19 nmol g⁻¹)最低。三种细菌脂肪酸(C15:0、C16:1和C18:0)之和规律亦同,氮磷(3.56 nmol g⁻¹)或休闲(3.28 nmol g⁻¹)高于单施氮肥处理(3.10 nmol g⁻¹),氮磷钾处理(2.66 nmol g⁻¹)显著高于不施肥处理(1.82 nmol g⁻¹)。总体上,氮

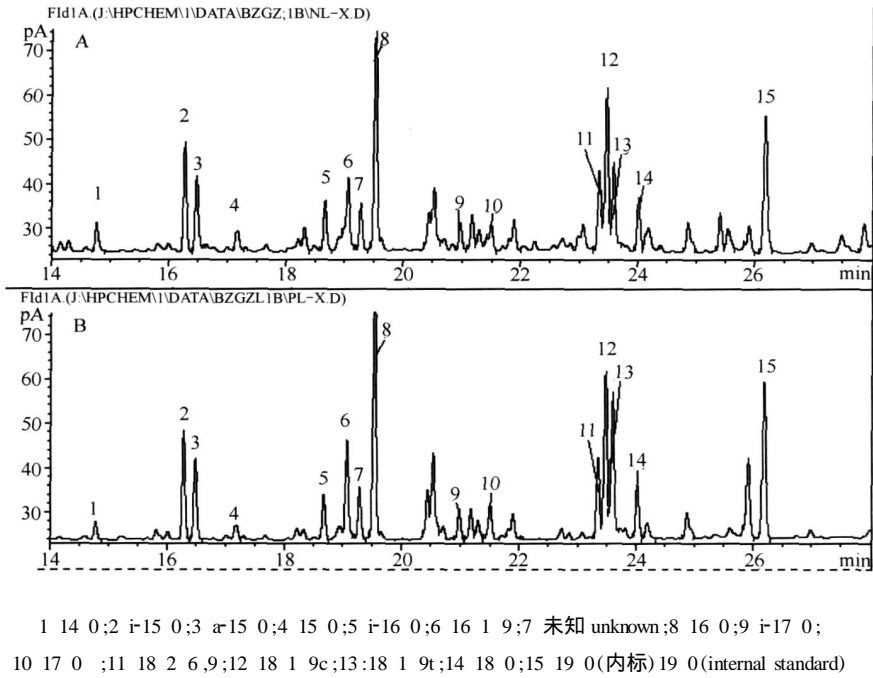


图1 NLFA(A)与HLFA(B)图谱
Fig. 1 Gas chromatogram of NLFA (A) and HLFA (B)

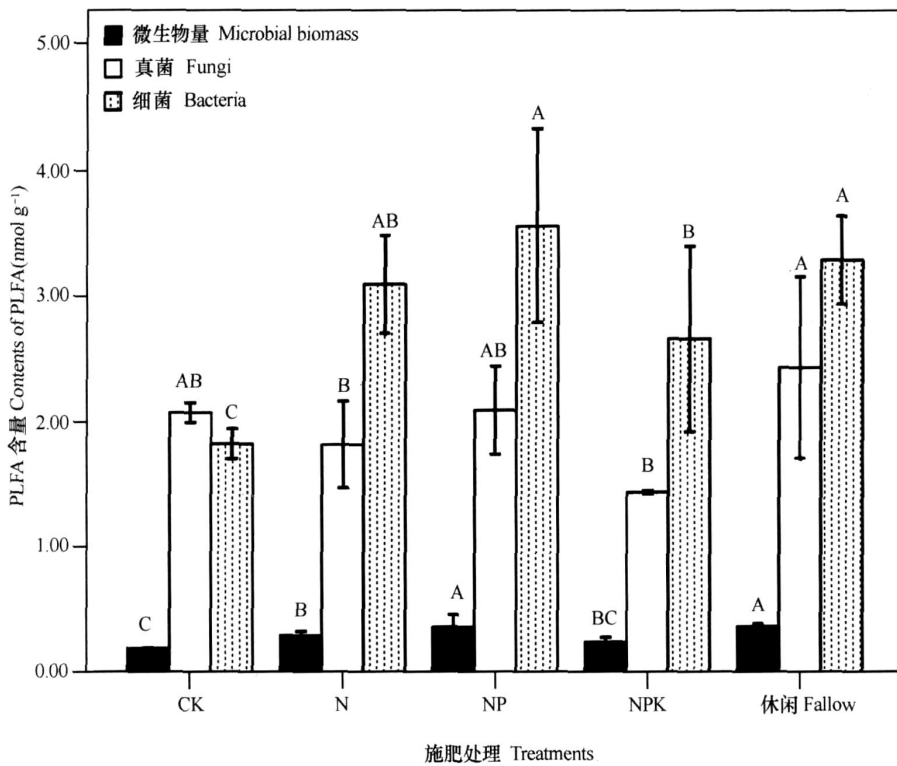


图2 不同施肥处理土壤 PLFA 含量(柱状图上方相同字母表示数据间差异未达到极显著水平 $p = 0.01$)
Fig. 2 PLFA contents in different fertilization treatments (Values with the same letter are not significantly different at $p = 0.01$ level)

肥施用能够促进细菌以及土壤微生物量积累。氮磷处理土壤细菌及生物量特定脂肪酸含量最高而碱解氮含量最低(表1),该结果表明磷肥施用促进了土壤微生物对氮肥利用。氮磷钾处理的细菌与生物量脂肪酸含量略低于氮磷处理而与单施氮肥处理相当,而碱解氮含量显著高于氮磷处理(表1)。单施氮肥处理可能导致氮肥施入初期少量优势菌群短期内消长而严重地影响土壤总体微生物量长期稳定积累^[28];另外,正如 Richard 等^[15]曾经指出的,氮肥的施入可促进微生物体对土壤有机质和其他有效养分进一步同化,易造成其他养分耗竭(如有效磷含量显著降低,表1),引起土壤养分严重不均衡,导致菌群生存环境进一步恶化。

与细菌和生物量特征性脂肪酸变化规律不同,真菌 PLFA (18 2 6, 9, 下同)在不施肥处理(2.07 nmol g⁻¹)与氮磷处理(2.09 nmol g⁻¹)时水平相当且高于单施氮肥处理(1.82 nmol g⁻¹)或氮磷钾处理(1.44 nmol g⁻¹),休闲处理(2.43 nmol g⁻¹)最高。其原因一方面可能是庞大的菌丝体结构能够促进真菌较细菌更好地适应低养分环境;另一方面,单施氮所造成的有效磷等养分不足对真菌抑制作用远高于细菌菌群。

不施肥、单施氮、氮磷及氮磷钾配施4个处理 PLFA 测定结果暗示,黑土区土壤磷素能够促进细菌等微生物群落对氮肥同化与固持,而钾素施用对其生长不利。

通过对氯仿熏蒸法测定的微生物量碳与脂肪酸标识的细菌及整体土壤微生物量结果进行比较,发现三者在不同施肥处理中变化规律较为相似:即休闲处理最高,不施肥处理最低,氮肥处理高于氮磷钾处理。只是氯仿熏蒸法测定的氮磷处理微生物量碳小于单施氮处理,而脂肪酸标识的氮磷生物量高于单施氮肥处理。由于土壤微生物群落组成复杂,因此采用熏蒸法测定的整体微生物量碳必然与个别脂肪酸代表的特定菌群生物量之间存在微生物学意义上的差异。但就特定菌群微生物量而言,C14:0或细菌脂肪酸是有一定意义的,只是在说明土壤微生物量时,应该辅以其他方法加以校准。当把真菌 PLFA 与氯仿熏蒸法测定的微生物量氮结果进行比较时,可发现两者之间规律完全一致:休闲处理最高,不施肥处理次之,氮磷处理与氮磷钾处理较低,单施氮肥处理最低。可以推断,氯仿熏蒸法测定的微生物量氮主要贡献者极有可能是以真菌群落为主(真菌 PLFA 与氯仿熏蒸测定微生物量氮相关性达

显著水平的结果也支持上述结论,数据未列出)。

虽然休闲处理全氮、全碳、碱解氮与有效磷等养分并不高于各氮肥处理,但仍然明显促进土壤微生物量积累。显然,休闲处理较少农业翻耕、机械破碎既保留真菌菌丝体结构完整性,使其生物量有机会持续稳定增长;同时,又减少了细菌菌群与土壤有效养分的接触机会,使土壤养分耗竭减少到最低限度。

Bååth 等^[10]认为土壤微生物量是氮素等养分快速转化库,而作为其主要参与者的细菌与真菌 C/N 比率不同(真菌碳同化效率高于细菌^[17])。因此,真菌与细菌生物量相对变化,会影响整个微生物群落 C/N,最终影响土壤氮素转化。

对各处理土壤真菌/细菌、真菌/生物量、细菌/生物量之 PLFA 比值作图(图3),发现真菌/细菌或真菌/生物量变化规律相似:不施肥处理显著高于其他处理,休闲处理比值居中,而单施氮、氮磷或氮磷钾配施结果最低。显然,真菌较细菌更适应养分贫瘠条件,这可能与真菌菌丝体可以允许真菌运动、寄居并且降解土壤表面植物残体等有机物有关,而细菌无法实现这种功能。不同氮肥处理条件下真菌/细菌比值降低的结果与 Richard 等^[15]的结论相似,可以解释为氮肥施入促进了土壤有机质分解及有效养分耗竭(如有效磷含量明显降低,表1),不利于真菌而利于细菌生长,最终降低了真菌/细菌比率。

2.2 不同氮肥处理土壤微生物 NLFA 含量变化

真菌以三乙酰甘油形式贮能^[18],而细菌则以聚羟基丁酸贮能^[29]。与后者不同,三乙酰甘油是 NLFA 的主要部分,因此通过 NLFA 可以了解真菌代谢状态。由于磷脂的磷酸基团易被水解而形成二乙酰基甘油(也属于 NLFA),这使得细菌脂肪酸中也会有非三乙酰基甘油的 NLFA 本底存在^[18],从而使细菌脂肪酸的 NLFA > 0。

在真菌 NLFA 测定中(图4):单施氮肥(6.23 nmol g⁻¹)显著高于不施肥(5.00 nmol g⁻¹)处理,氮磷(3.57 nmol g⁻¹)与氮磷钾(3.36 nmol g⁻¹)处理次之,休闲(2.70 nmol g⁻¹)处理含量显著低于其他处理。真菌 PLFA 结果已表明,休闲处理促进真菌生物量的积累,氮肥处理显著阻碍真菌生长;真菌 NLFA 与 PLFA 变化规律相反的事实说明,个别养分匮乏或其他不利条件(如耕作对菌丝体破碎、单施氮肥所致的其他养分耗竭)会诱导真菌将能源以 NLFA 形式大量积累。可见,NLFA 含量能反映真菌代谢状态,从而进一步反映影响真菌生理状态的各处理养分水平高低。

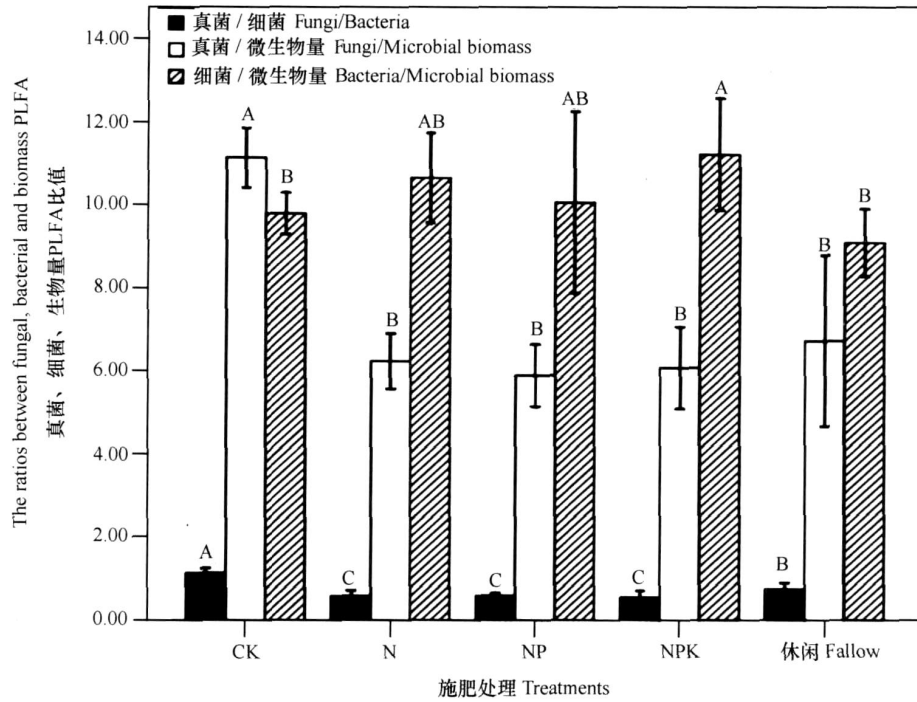


图 3 不同菌群 PLFA 比值变化 (柱状图上方相同字母表示数据间差异未达到极显著水平 $p = 0.01$)

Fig. 3 Variation between different microbial groups in PLFA ratio (Values with the same letter are not significantly different at $p = 0.01$ level)

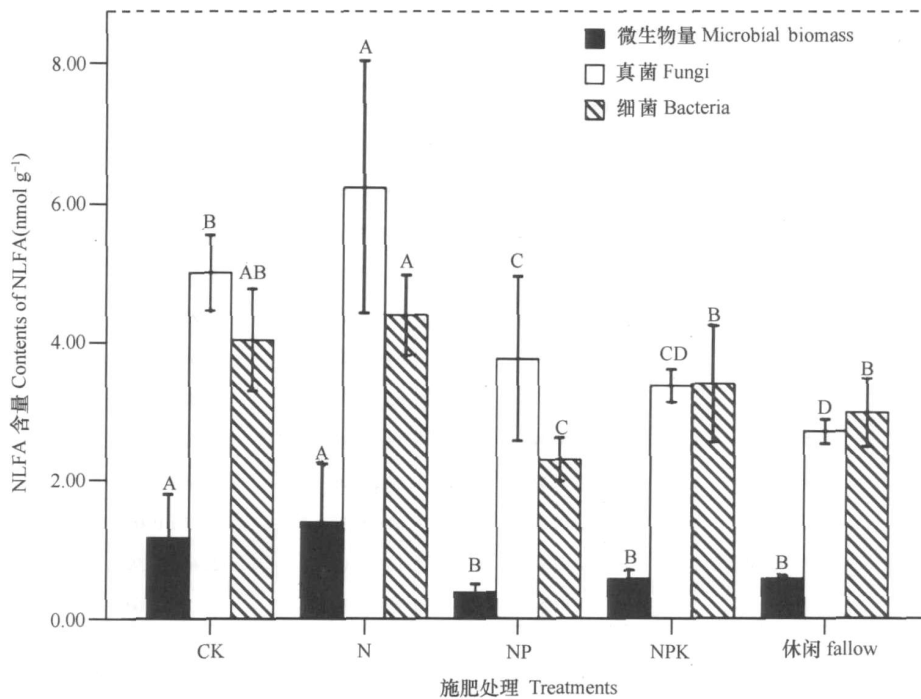


图 4 不同施肥处理土壤 NLFA 含量 (柱状图上方相同字母表示数据间差异未达到极显著水平 $p = 0.01$)

Fig. 4 NLFA contents in different fertilization treatments (Values with the same letter are not significantly at $p = 0.01$ level)

生物量与细菌特定 NLFA 变化规律相似,前者为单施氮肥(1.39 nmol g⁻¹)与不施肥(1.16 nmol g⁻¹)处理最高,氮磷钾(0.56 nmol g⁻¹)、休闲(0.57 nmol g⁻¹)或氮磷(0.37 nmol g⁻¹)处理较低;后者为单施氮肥(4.39 nmol g⁻¹)略高于不施肥(4.03 nmol g⁻¹)处理,氮磷钾(3.39 nmol g⁻¹)或休闲(2.97 nmol g⁻¹)处理次之,氮磷(2.30 nmol g⁻¹)处理最低(图4)。由于细菌 NLFA 含量高低只指示刚刚死亡菌体的生物量^[23],因此不施肥或单施氮处理高水平 NLFA 说明这两种处理细菌菌群高代谢周转速率,这可能是因为个别养分不足或养分平衡遭受严重破坏(如有效磷水平显著低于其他处理,表1)促使细菌菌群间形成极高竞争压力,致使劣势菌群被快速淘汰,使土壤 NLFA 维持在较高水平,而氮磷、氮磷钾或休闲处理中有效磷等养分在一定程度上满足了细菌等菌群生长需要。

由于本文仅采用了 C14:0 脂肪酸来代表土壤总的微生物量,并且 C14:0 占土壤微生物脂肪酸比例

较小(见图1A),必定会导致以 C14:0 表示的土壤微生物 PLFA 与 NLFA 值小于真菌与细菌脂肪酸。

2.3 不同氮肥处理土壤微生物 NLFA/PLFA 比值变化

Malosso 等认为,NLFA 可以指示刚刚死亡的微生物量而 PLFA 代表活体微生物量,因此 NLFA/PLFA 比值可说明微生物群落代谢状态^[23]。本文计算了各施肥处理 14:0, i-15:0, a-15:0, 15:0, i-16:0, 16:1, 9, 16:0, i-17:0, 17:0, 18:2, 6, 9, 18:1, 9 c, 18:1, 9 t, 18:0 等脂肪酸的 NLFA/PLFA 比值(表2),并进行了主成分分析(图5),其中第一主成分占 83.76%,第二主成分占 10.43%。

结果表明,不同菌群特定脂肪酸 NLFA/PLFA 比值明显不同,比如不施肥处理生物量特征性脂肪酸 C14:0(NLFA/PLFA_{max}为 6.23)或细菌特征性脂肪酸(C15:0 NLFA/PLFA_{max}为 5.13)明显高于其他处理。这种特定脂肪酸 NLFA/PLFA 比值的较大差异,也许可指示土壤养分水平,并成为研究不同菌群生物量周转速率的有力工具。

表2 不同氮肥处理各脂肪酸 NLFA/PLFA 比值

Table 2 NLFA/PLFA ratios among different treatments

脂肪酸 Fatty acids	CK	N	NP	NPK	休闲 Fallow
14:0	6.23 ±1.99	4.76 ±1.37	1.04 ±0.16	2.38 ±0.09	1.57 ±0.03
i-15:0	0.57 ±0.02	1.05 ±0.01	0.63 ±0.05	0.89 ±0.05	0.84 ±0.04
a-15:0	0.83 ±0.20	1.23 ±0.08	0.65 ±0.04	1.03 ±0.04	0.82 ±0.01
15:0	5.13 ±1.12	3.85 ±0.93	1.86 ±0.65	2.12 ±0.05	1.51 ±0.04
i-16:0	0.83 ±0.08	1.19 ±0.03	0.73 ±0.03	1.03 ±0.04	1.01 ±0.01
16:1, 9	2.13 ±0.22	1.07 ±0.01	0.52 ±0.02	1.24 ±0.14	0.89 ±0.01
FAx	7.29 ±0.28	3.34 ±0.07	2.75 ±0.12	2.92 ±0.26	3.87 ±0.06
16:0	1.98 ±0.16	1.71 ±0.17	0.84 ±0.03	1.07 ±0.02	0.99 ±0.06
i-17:0	0.49 ±0.01	0.91 ±0.05	0.65 ±0.05	0.90 ±0.07	0.78 ±0.03
17:0	0.58 ±0.04	0.80 ±0.04	0.34 ±0.01	0.79 ±0.05	0.75 ±0.03
18:2, 6, 9	2.41 ±0.12	3.42 ±0.20	1.80 ±0.39	2.34 ±0.08	1.12 ±0.15
18:1, 9 c	2.54 ±0.11	3.10 ±0.21	1.35 ±0.07	2.13 ±0.05	1.13 ±0.05
18:1, 9 (tra)	1.39 ±0.07	1.48 ±0.07	1.12 ±0.08	2.46 ±0.59	1.31 ±0.02
18:0	1.63 ±0.22	1.77 ±0.24	0.91 ±0.02	1.17 ±0.00	0.73 ±0.02

主成分分析结果表明(图5),休闲与单施氮肥处理处于两个极端,而不施肥与氮磷钾处理极接近,氮磷处理介于休闲与不施肥或氮磷钾处理之间。脂肪酸测定、氯仿熏蒸法测定微生物量和土壤呼吸结果已表明,休闲处理有利于土壤微生物生长;而单施氮肥处理不利于有效磷、土壤微生物量

氮、真菌积累(表1,图2)。NLFA/PLFA 比值主成分分析结果刚好将上述两个处理区分开来,显然以 NLFA/PLFA 比值来衡量土壤微生物菌落结构与生理状态有一定意义。不施肥与氮磷钾处理极为接近并且居于氮磷与氮肥处理之间的事实说明,钾肥施入所引起的对土壤微生物可能的抑制作用抵消

了氮与磷养分效用,使得两种处理菌群生理状态极为接近。

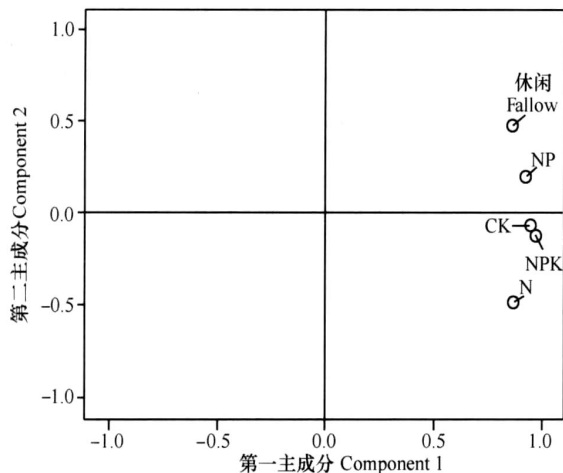


图5 不同施肥处理 NLFA/PLFA 比值主成分分析

Fig. 5 PCA of NLFA/PLFA ratios for different treatments

3 结 语

本文通过对不同氮肥处理农田黑土 PLFA 与 NLFA 的研究,初步揭示该区土壤微生物在不同施肥条件下代谢周转规律。结果表明:单施氮肥导致其他养分耗竭而不利于真菌生长;磷肥明显促进真菌、细菌菌群的生长;氮磷钾肥配施未表现出促进土壤微生物的生长作用。显然,磷肥的施用是调控土壤微生物生长的关键因素,所以在生产上应该适量施用磷肥,特别是在施用高量氮肥的条件下更应该补施磷肥,加强土壤微生物同化作用,促进肥料氮素的微生物高效固持。休闲处理较高微生物量表明,恰当耕作方式对土壤微生物有利。

不施肥条件下真菌生物量 PLFA/细菌生物量 PLFA 比值较高(而施肥条件该比值极低)说明,真菌对养分依赖性小于细菌。NLFA 含量及 NLFA/PLFA 比值主成分分析表明,二者可作为土壤养分水平与微生物群落生理状况的指标。

参 考 文 献

[1] 孟凯,张兴义,隋跃宇.东北北部农田黑土障碍因子分析.土壤,2003,35(2):145~151. Meng K,Zhang X Y,Sui Y Y. Impediment factors in black soil in the northern Northeast China (In Chinese). Soils,2003,35(2):145~151

[2] 王建国,何喜云,王守宇,等.典型黑土农田化肥氮素的优化管理.土壤,2000,32(5):266~273. Wang J G,He X Y,Wang S Y,*et al.* Optimization of nitrogen fertilizer in a typical arable black

soil (In Chinese). Soils,2000,32(5):266~273

[3] 王建国,刘鸿翔,王守宇,等.黑土农田养分平衡与养分消长规律.土壤学报,2003,40(2):246~251. Wang J G,Liu H X,Wang S Y,*et al.* Law of nutrient equilibrium, gain and loss in black soil farmland (In Chinese). Acta Pedologica Sinica,2003,40(2):246~251

[4] 王晶,朱平,张男,等.施肥对黑土活性有机碳和碳库管理指数的影响.土壤通报,2003,34(5):394~397. Wang J,Zhu P,Zhang N,*et al.* Effect of fertilization on soil active C and C pool management index of black soil (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science,2003,34(5):394~397

[5] 王晶,解宏图,张旭东,等.施肥对黑土土壤微生物生物量碳的作用研究.中国生态农业学报,2004,12(2):118~120. Wang J,Xie H T,Zhang X D,*et al.* Effect of fertilization on soil microbial biologic carbon in black soil (In Chinese). Chinese Journal of Eco-Agriculture,2004,12(2):118~120

[6] Liu B R,Jia GM,Chen J,*et al.* A review of methods for studying microbial diversity in soils. Pedosphere,2006,16(1):18~24

[7] Vestal J R,White D C. Lipid analysis in microbial ecology. BioScience,1989,39(8):535~541

[8] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil:A review. Biol. Fertil. Soils,1999,29(2):111~129

[9] Hill T C J,Mcpherson E F,Harris J A,*et al.* Microbial biomass estimated by phospholipid phosphate in soils with diverse microbial communities. Soil Biol. Biochem.,1993,25(12):1779~1786

[10] Bååth E,Anderson T H. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. Soil Biology & Biochemistry,2003,35(7):955~963

[11] Keinänen M M,Korhonen L K,Lehtola M J,*et al.* The microbial community structure of drinking water biofilms can be affected by phosphorus availability. Applied and Environmental Microbiology,2002,68(1):434~439

[12] Sundh I,Borgå P,Nilsson M,*et al.* Estimation of cell numbers of methanotrophic bacteria in boreal peatlands based on analysis of specific phospholipid fatty acids. FEMS Microbiology Ecology,1995,18(2):103~112

[13] Ringelberg D B,Sutton S,White D C. Biomass, bioactivity and biodiversity:Microbial ecology of the deep subsurface:Analysis of ester-linked phospholipid fatty acids. FEMS Microbiology Review,1997,20(3/4):371~377

[14] Zelles L,Bai Q Y,Beck T,*et al.* Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. Soil Biol. Biochem.,1992,24(4):317~323

[15] Richard D B,Walker L R. The measurement of soil fungal:Bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. Biol. Fertil. Soil,1999,29(3):282~290

[16] Olsson P A,Thingstrup I,Jakobsen I,*et al.* Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. Soil Biology and Biochemistry,1999,31(13):1879~1887

[17] Bailey V L,Smith J L,Bolton H Jr. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. Soil Biology & Biochem

- istry, 2002, 34(7) : 997 ~ 1 007
- [18] Bååth E. The use of neutral lipid fatty acids to indicate the physiological conditions of soil fungi: comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Microb. Ecol.*, 2003, 45 (4) : 373 ~ 383
- [19] Mummy D L, Stahl P D, Buyer J S. Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21(3) : 251 ~ 259
- [20] Keinänen M M, Korhonen L K, Martikainen P J, *et al.* Gas chromatographic-mass spectrometric detection of 2- and 3-hydroxy fatty acids as methyl esters from soil, sediment and biofilm. *Journal of Chromatography B*, 2003, 783(2) : 443 ~ 451
- [21] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. 231 ~ 233, 193 ~ 196, 179 ~ 181, 150 ~ 152, 239 ~ 240. Lu R K. ed. *Soil and Agrochemistry Analyse Methods* (In Chinese). Beijing: Chinese Agricultural Science & Technology Press, 1999. 231 ~ 233, 193 ~ 196, 179 ~ 181, 150 ~ 152, 239 ~ 240
- [22] Blich E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37(8) : 911 ~ 917
- [23] Malossoa E, English L, Hopkins D W, *et al.* Use of ^{13}C -labelled plant materials and ergosterol, PLFA and NLFA analyses to investigate organic matter decomposition in Antarctic soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36(1) : 165 ~ 175
- [24] Kieft T L, Ringelberg D B, White D C. Changes in Ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(9) : 3 292 ~ 3 299
- [25] Abraham W R, Hesse C, Pelz O. Ratios of carbon isotopes in microbial lipids as an indicator of substrate usage. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11) : 4 202 ~ 4 209
- [26] Drenovsky R E, Elliott G N, Graham K J, *et al.* Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36(11) : 1 793 ~ 1 800
- [27] Arnowski R Z. Fatty acid profiling: Its usefulness in the evaluation of microbial associations with the green microalga *Apatococcus constipatus*. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2002, 7(1) : 61 ~ 67
- [28] Alden L, Demoling F, Bååth E, *et al.* Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4) : 1 830 ~ 1 838
- [29] Findlay R H, White D C. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, 45(1) : 71 ~ 78

EFFECTS OF LONG TERM NITROGEN FERTILIZER APPLICATION ON NLFA AND PLFA IN MOLLISOL FARMLAND

Bai Zhen^{1,3} Zhang Xudong^{1,2†} He Hongbo¹ Yan Ying^{1,3} Hou Songmei^{1,3} Chen Ying^{1,3} Xie Hongtu^{1,2}

(1 Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, CAS, Shenyang 110016, China)

(2 National Field and Research Station of Liaoning Shenyang Agroecosystems, Shenyang 110016, China)

(3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Effects of long-term application of N fertilizer on microbial communities in Mollisol, in Northeast China, were investigated by determining phospholipid fatty acid (PLFA) and neutral lipid fatty acid (NLFA) of soil microbes, NLFA/PLFA ratio, and PLFA composition in soil samples different in nitrogen treatment with or without phosphorus and potassium fertilizer. Treatments Nil-fertilizer and Fallow were set as controls. Results of PLFA determination show that application of nitrogen coupled with phosphorus promoted microbial growth and immobilization of nitrogen in the soil, while application of nitrogen coupled with phosphorus and potassium did not show any similar effect. Application of nitrogen alone, however, inhibited growth of fungi, probably due to the excessive consumption of nutrients such as available phosphorus. Comparison between different microbial groups in PLFA ratio demonstrates that fungi were better adapted to nutritional stress than bacteria, while the latter accumulated more rapidly in biomass than the former in Treatment N or Treatment NP. NLFA content and NLFA/PLFA ratio varied sharply between treatments different in N rate, suggesting that they could be used as indicators of bio-physiological conditions of soil microorganisms and nutrient level of the soil.

Key words Phospholipid fatty acid (PLFA); Neutral lipid fatty acid (NLFA); Fungi; Bacteria; Microbial biomass; Mollisol in China