

# 长期不同施肥对潮土芽胞杆菌数量的影响 及其优势度的季节变化\*

王锐<sup>1,2</sup> 林先贵<sup>1†</sup> 陈瑞蕊<sup>1</sup> 胡君利<sup>1</sup> 张佳宝<sup>1</sup> 王俊华<sup>1</sup> 武敬<sup>1,2</sup> 张华勇<sup>1</sup>

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

(2 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要** 以河南封丘潮土养分平衡长期定位试验地为研究对象, 于各季节分别采集耕作层土壤样品, 比较不同施肥处理潮土芽胞杆菌数量及其占细菌总数的比例, 并解析其与土壤养分之间的关系。结果发现, 与不施肥对照相比, 长期施肥尤其是施用有机肥和磷肥的处理土壤有机碳与速效氮、有效磷、速效钾等的含量趋于升高, 除不施磷肥处理(NK)外其他施肥处理土壤有机碳含量在四季的增幅范围为 0.91 ~ 7.00 g kg<sup>-1</sup>。长期不同施肥后土壤细菌与芽胞杆菌在数量上也发生了明显分异, 且在各季均呈现稳定的梯度规律, 即施肥处理(除 NK 外)显著高于不施肥处理、施有机肥处理显著高于施化肥处理、平衡施化肥处理高于缺素施肥处理, 除 NK 外其他施肥处理与不施肥对照相比在四季的增幅范围为 0.02 ~ 0.54 lg (CFU g<sup>-1</sup>)。长期施化肥的处理芽胞杆菌占细菌数量的比例(即优势度)在冬、夏季高于春、秋季, 而施有机肥的处理在不同季节保持相对恒定。相关性分析显示, 芽胞杆菌数量与土壤有机碳和有效磷含量均呈极显著相关( $p < 0.01$ )。长期施用有机肥更有利于提高土壤肥力、促进土壤微生物生长繁育, 且芽胞杆菌的数量可敏感地反映土壤肥力。

**关键词** 细菌; 有机肥; 土壤肥力; 有机碳; 有效磷

**中图分类号** S154.36 **文献标识码** A

土地的高强度利用会导致土壤肥力质量的下降<sup>[1]</sup>, 施肥已经成为保障作物产量和粮食安全的重要途径<sup>[2]</sup>。然而, 长期施肥会导致土壤理化性质和生物学性质发生改变。例如, 长期施肥提高了土壤有机碳与养分含量, 改善了土壤酸碱度, 并增加了土壤微生物的数量, 其中施有机肥最能促进土壤微生物的生长<sup>[3]</sup>。此外, 于树等<sup>[4]</sup>的研究也发现, 长期施肥能提高土壤微生物生物量, 并改变其群落结构。土壤微生物是土壤生态系统中极其重要和最为活跃的部分<sup>[5]</sup>, 不仅是土壤养分重要的源和汇, 也是土壤养分转化和供应的重要调控者<sup>[6]</sup>。研究发现, 土壤微生物的活动能直接影响土壤的物理、化学和生物学性质<sup>[7]</sup>, 其数量不仅可以敏感地反映土壤环境质量的变化, 而且亦是土壤中生物活性的具体体现<sup>[8]</sup>。随着对微生物在农田生态系统中重要功能认识的不断深入, 国内外学者越来越将注意

力从用土壤理化性质作为持续性指标来评价土壤肥力的影响研究中, 转移到用土壤微生物参数来评估土壤的健康和质量<sup>[9-10]</sup>。

在土壤微生物类群中, 芽胞杆菌(*Bacillus*)是一类好氧或兼性厌氧、革兰氏阳性的杆状细菌<sup>[11]</sup>, 在遭受热、紫外等环境胁迫时能产生一个强抗逆性的内生孢子, 条件合适时又恢复成营养细胞继续生长<sup>[12]</sup>, 因而能忍受各种不良环境<sup>[13]</sup>。芽胞杆菌是土壤细菌的优势种群和最具活力的部分之一, 在土壤生态系统中占有重要地位<sup>[14]</sup>。芽胞杆菌参与土壤中有有机物分解和无机物转化等重要过程, 影响着土壤中各类元素的循环速率, 它们的活动又能影响到土壤的物理、化学和生物学性质, 所以芽胞杆菌的动态变化也有可能成为土壤生态系统变化的敏感指标<sup>[15]</sup>。在长期施用厩肥的土壤中, 以芽胞杆菌为主体的革兰氏阳性细菌与革兰氏阴性细菌在数

\* 国家自然科学基金面上项目(41071168)、国家重点基础研究发展计划项目(2011CB100505)、国家自然科学基金青年科学基金项目(40901117)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-EW-409)和中国科学院南京土壤研究所知识创新工程领域前沿项目课题(ISSASIP1118-3)联合资助

† 通讯作者: Tel: 025-86881589; E-mail: xglin@issas.ac.cn

作者简介: 王锐(1987—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物生态方向研究。E-mail: rwang@issas.ac.cn

收稿日期: 2012-10-11; 收到修改稿日期: 2012-12-18

量上的比值趋于增大<sup>[16]</sup>。此外,Chu 等<sup>[17]</sup>在使用 PCR-DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, 变性梯度凝胶电泳)方法研究连续施肥对细菌群落结构的影响时,发现施有机肥土壤会出现特异性的芽胞杆菌优势种群条带。然而,长期不同施肥特别是施有机肥与施化肥以及平衡施肥与缺素施肥等措施会对土壤芽胞杆菌的数量产生何种影响,目前还鲜有报道。在相同土壤环境中,季节性的水热条件差异会导致土壤微生物在数量上发生季节性变化<sup>[18]</sup>,不同施肥处理土壤芽胞杆菌的优势度也许也会呈现出不同的变化规律。本文以中国科学院封丘农业生态试验站养分平衡长期试验地为平台,比较不同施肥处理潮土芽胞杆菌数量及其优势度的季节变化,解析芽胞杆菌数量与土壤养分之间的关系,旨在为合理施肥、完善管理、提升土壤肥力、维持土壤质量和可持续发展提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

中国科学院封丘农业生态试验站(35°04'N, 113°10'E)位于河南省封丘县,属半干旱、半湿润的暖温带季风气候,年均降水量 605 mm,年蒸发量 1 875 mm,年均气温为 13.9℃。潮土农田生态系统养分平衡长期定位施肥试验起始于 1989 年秋季,采用小麦—玉米一年两熟轮作方式,品种为当地大面积推广品种。试验灌水视当年降水情况而定,一般小麦灌水 2~3 次,玉米灌水 1~2 次,每次灌水量 900~1 200 m<sup>3</sup> hm<sup>-2</sup>。供试土壤为轻壤质黄潮土,试验初始时土壤的基础化学性质为:有机碳 4.5 g kg<sup>-1</sup>、全氮 0.45 g kg<sup>-1</sup>、全磷 0.50 g kg<sup>-1</sup>、全钾 18.6 g kg<sup>-1</sup>、速效氮 9.51 mg kg<sup>-1</sup>、有效磷(以 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 计) 1.93 mg kg<sup>-1</sup>、速效钾(以 K<sub>2</sub>O 计) 78.8 mg kg<sup>-1</sup> 和 pH 8.65,土壤总体呈缺氮磷而富钾。

### 1.2 试验设置

该试验共设 7 个施肥处理,分别为:CK(不施肥对照)、NK、PK、NP、NPK、OM(有机肥)、1/2OMN(即 1/2 OM + 1/2 NPK)。每个处理设 4 个重复,随机区组排列,小区面积为 47.5 m<sup>2</sup>。其中,N、P、K 化肥分别为尿素、过磷酸钙和硫酸钾。小麦和玉米每季 N 肥和 K 肥用量分别为 N 150 kg hm<sup>-2</sup> 和 K<sub>2</sub>O 150 kg hm<sup>-2</sup>,小麦和玉米 P 肥用量分别为 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 75 kg hm<sup>-2</sup> 和 60 kg hm<sup>-2</sup>。试验用有机肥以粉碎的麦秆为主,加入适量粉碎后的大豆饼和棉仁饼,以提高

有机肥的 N 含量,每季用量约 4500 kg hm<sup>-2</sup>。有机肥经堆腐、发酵后施用,施用前先分析 N、P、K 养分含量,以等 N 量为标准,有机肥中的 P、K 不足部分用 P、K 化肥补足至等量。与当地农户当时所种大田的施肥量相比,试验地的施肥量居中等水平。

### 1.3 试验方法

土壤样品依次采集于 2010 年 12 月 20 日(冬季)、2011 年 3 月 28 日(春季)、2011 年 6 月 1 日(夏季)、2011 年 9 月 26 日(秋季)。采样时,在各个小区内采用多点混合采样法采集 0~15 cm 土壤,混合装袋后带回实验室,存于 4℃ 冰箱,尽快测定土壤微生物数量,部分样品风干后过 20 目筛测土壤 pH 和速效养分含量、并过 100 目筛测土壤有机碳含量。芽胞杆菌和细菌的计数采用稀释平板法<sup>[19]</sup>,其中细菌采用牛肉膏-蛋白胨培养基,测定芽胞杆菌时先将适当稀释度的菌悬液置于 80℃ 的恒温水浴中热处理 10 min 以杀死其他微生物<sup>[20-21]</sup>,待冷却后均匀涂布至麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂平板上<sup>[19,22]</sup>,28℃ 培养 48 h 后计数,以 lg(CFU g<sup>-1</sup>) 干土表示,并计算不同处理土壤中芽胞杆菌的优势度。采用重铬酸钾容量法测定土壤有机碳,氯化钾浸提-分光光度计法测定速效氮,碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法测定有效磷,醋酸铵浸提-火焰光度法测定速效钾,以及用 1:2.5(土水质量比)水浸提液测定 pH<sup>[23]</sup>。

芽胞杆菌的优势度计算公式如下:

$$\text{芽胞杆菌优势度} = \frac{\text{芽胞杆菌数量}}{\text{可培养细菌数量}}$$

### 1.4 数据处理

试验数据使用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件进行统计分析,使用 Duncan 检验进行多重比较( $p < 0.05$ ),并使用双侧检验及线性回归分析对 4 次采样统计的土壤理化性质与微生物数量进行相关性分析(Person 系数,  $n = 112$ )。

## 2 结果

### 2.1 长期施肥对土壤化学性质的影响

长期施肥后土壤基本性质见表 1。与对照相比,所有施肥处理土壤 pH 均降低,2010 年 12 月和 2011 年 3 月降幅达显著水平( $p < 0.05$ )。不同施肥处理对土壤有机碳含量的影响表现为:OM > 1/2OMN > NPK、NP > PK、NK、CK,除 2011 年 9 月 NPK 处理与 NP、PK 处理之间的差异不显著外,OM、1/2OMN 和 NPK 等 3 个处理的有机碳含量 4 次采样

均显著高于其他处理 ( $p < 0.05$ ); 土壤有效磷含量的变化规律与有机碳含量基本一致, 其中 PK 处理较高的有效磷残留是因为土壤缺氮在很大程度上限制了作物的生长及其对磷素的吸收, 造成了磷素的累积<sup>[28]</sup>; 施有机肥以及施钾肥的处理中, 土壤速效钾含量显著升高 ( $p < 0.05$ ), 其中 NK 和 PK 处理土壤中钾素累积最为显著。长期施用有机肥在提高土壤供氮、供磷含量及土壤有机质含量方面强于单施化肥处理。

## 2.2 长期施肥对土壤细菌与芽胞杆菌数量的影响

长期施肥处理土壤中细菌与芽胞杆菌的数量

见图 1。不同施肥处理土壤中细菌的数量存在明显的差异, 其中施有机肥处理 (OM) 和有机-无机配施处理 (1/2OMN) 4 次采样均显著高于施用化肥的处理和不施肥对照 ( $p < 0.05$ )。与对照相比, 所有施用磷肥的处理 (如 PK、NP、NPK) 具有升高的趋势, 除 12 月外, 平衡施化肥处理 (NPK) 土壤中细菌的数量相对于缺素施肥处理在另外三季均有升高的趋势。两个施有机肥的处理 (OM 和 1/2OMN) 芽胞杆菌数量均显著高于其他施无机肥的处理和不施肥对照 (CK) ( $p < 0.05$ ), 这与细菌的规律一致。比较几种施化肥的处理, 可以发现: 平衡施化肥处

表 1 长期定位施肥处理后土壤基本化学性质的比较

Table 1 Soil chemical properties as affected by a long-term stationary fertilization experiment

采样日期 Sampling date (yyyy - mm - dd)	处理 Treatment	pH (H <sub>2</sub> O)	有机碳 Organic C (g kg <sup>-1</sup> )	速效氮 Available N (mg kg <sup>-1</sup> )	有效磷 Available P (mg kg <sup>-1</sup> )	速效钾 Available K (mg kg <sup>-1</sup> )
2010 - 12 - 20	CK	8.38 ± 0.12 a	5.15 ± 0.59 e	7.43 ± 0.73 b	1.01 ± 0.24 d	78 ± 23 d
	PK	8.17 ± 0.12 b	6.07 ± 0.17 d	6.93 ± 0.82 b	30.99 ± 1.77 a	314 ± 25 b
	NK	8.13 ± 0.11 b	4.78 ± 0.24 e	33.59 ± 15.69 a	0.87 ± 0.41 d	351 ± 29 a
	NP	8.05 ± 0.14 b	6.38 ± 0.11 d	24.99 ± 8.08 a	12.20 ± 1.05 c	56 ± 8 d
	NPK	8.10 ± 0.12 b	7.05 ± 0.20 c	27.88 ± 8.33 a	12.20 ± 1.39 c	210 ± 14 c
	1/2OMN	8.09 ± 0.08 b	9.37 ± 0.36 b	24.54 ± 10.78 a	15.96 ± 1.15 b	215 ± 8 c
2011 - 03 - 28	OM	8.17 ± 0.12 b	11.92 ± 0.28 a	25.27 ± 10.51 a	16.87 ± 3.25 b	185 ± 33 c
	CK	8.92 ± 0.03 a	4.35 ± 0.13 e	7.08 ± 1.83 d	1.09 ± 0.54 e	81 ± 6 c
	PK	8.78 ± 0.04 b	5.26 ± 0.31 d	3.67 ± 0.49 d	28.06 ± 1.77 a	316 ± 7 a
	NK	8.66 ± 0.04 c	4.32 ± 0.06 e	46.20 ± 7.44 a	1.18 ± 0.42 e	346 ± 11 a
	NP	8.48 ± 0.06 d	5.78 ± 0.16 d	48.90 ± 5.21 a	9.23 ± 2.10 d	64 ± 9 c
	NPK	8.50 ± 0.10 d	6.27 ± 0.23 c	33.49 ± 13.21 b	11.57 ± 3.69 cd	178 ± 64 b
2011 - 06 - 01	1/2OMN	8.46 ± 0.12 d	8.55 ± 0.67 b	17.47 ± 2.91 c	16.44 ± 4.00 b	167 ± 45 b
	OM	8.68 ± 0.10 c	10.56 ± 0.37 a	8.99 ± 1.64 cd	14.57 ± 4.28 bc	186 ± 13 b
	CK	8.73 ± 0.08 a	4.82 ± 0.59 f	8.00 ± 2.93 b	0.92 ± 0.15 e	80 ± 13 e
	PK	8.60 ± 0.08 ab	5.93 ± 0.24 e	6.08 ± 1.10 b	26.32 ± 1.00 a	288 ± 11 b
	NK	8.46 ± 0.14 b	4.95 ± 0.17 f	41.68 ± 25.34 a	0.73 ± 0.15 e	348 ± 14 a
	NP	8.54 ± 0.10 ab	6.56 ± 0.28 d	9.14 ± 1.45 b	9.58 ± 0.18 d	54 ± 7 f
2011 - 09 - 26	NPK	8.46 ± 0.20 b	7.27 ± 0.20 c	6.40 ± 0.88 b	9.63 ± 1.05 d	166 ± 8 c
	1/2OMN	8.49 ± 0.11 b	9.48 ± 0.42 b	9.63 ± 1.41 b	12.98 ± 0.72 c	147 ± 13 d
	OM	8.49 ± 0.11 b	11.82 ± 0.16 a	11.31 ± 4.76 b	15.08 ± 0.61 b	177 ± 17 c
	CK	8.86 ± 0.03 a	4.06 ± 0.27 d	4.00 ± 0.48 c	0.87 ± 0.23 d	96 ± 8 d
	PK	8.70 ± 0.15 ab	5.17 ± 0.61 c	3.92 ± 1.37 c	20.08 ± 1.66 a	253 ± 16 b
	NK	8.68 ± 0.15 abc	4.21 ± 0.20 d	4.37 ± 1.78 bc	0.96 ± 0.53 d	284 ± 15 a
2011 - 09 - 26	NP	8.57 ± 0.14 bc	5.47 ± 0.13 c	4.38 ± 0.86 bc	6.83 ± 0.61 c	71 ± 14 d
	NPK	8.60 ± 0.16 bc	5.56 ± 0.53 c	4.48 ± 0.72 bc	5.41 ± 1.00 c	141 ± 22 c
	1/2OMN	8.44 ± 0.18 c	7.57 ± 0.45 b	6.17 ± 1.61 ab	9.17 ± 1.50 b	152 ± 32 c
	OM	8.50 ± 0.17 bc	9.59 ± 0.52 a	6.48 ± 1.21 a	10.22 ± 1.52 b	161 ± 20 c

注: 表中数据为平均值 ± 标准偏差。同一日期各个处理不同字母表示差异达到显著水平 ( $p < 0.05$ ) Note: Values in the table are means of four replicates ± standard errors. Different letters used in the treatments of the same date mean significant difference at  $p < 0.05$

理(NPK)芽胞杆菌数量有高于缺素施肥处理和不施肥对照的趋势,并在春季达到显著( $p < 0.05$ );除6月外,缺磷处理(NK)芽胞杆菌数量在其他季节中均为最低,而施用磷肥的处理(如PK、NP、NPK)芽胞杆菌数量均有升高的趋势,此现象在秋季表现得尤其明显。这与封丘潮土的营养元素状况有关,封丘潮土中最重要限制性营养元素为磷,因此直接向土壤中施用磷肥,可有效缓解微生物的磷素缺乏,从而促进芽胞杆菌数量的上升,这也与上述土壤化学性质的结果一致。

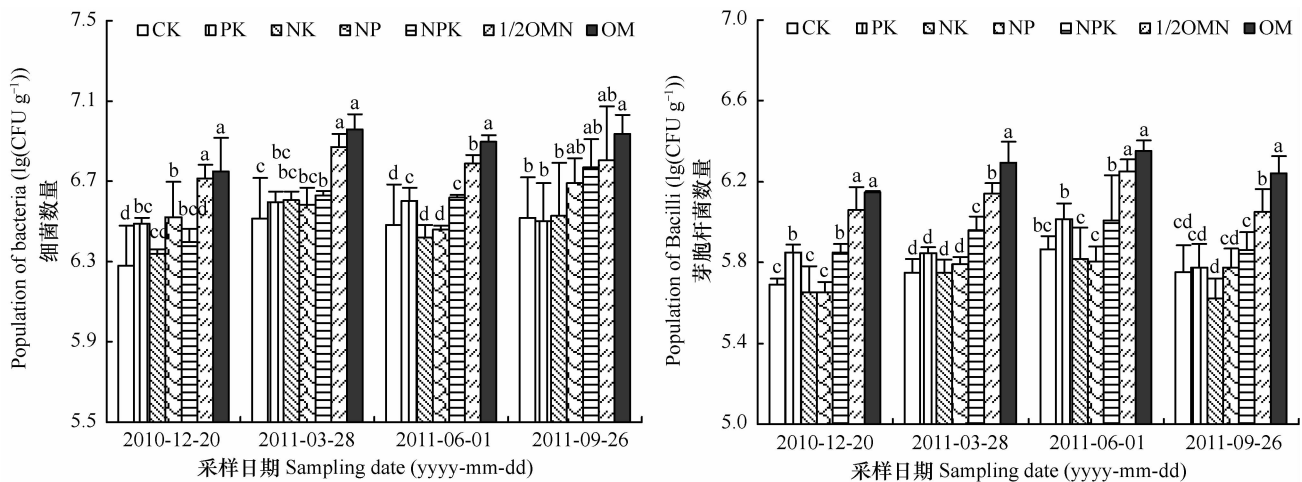
### 2.3 长期不同施肥处理土壤芽胞杆菌优势度的季节变化

长期不同施肥处理土壤中芽胞杆菌的优势度见表2。总体看来,芽胞杆菌占可培养细菌的比例在10.0%~29.2%间浮动,其中冬、夏两季主要在14.9%~29.2%之间变化,而春、秋两季在10.0%~22.6%之间变化。所有施化肥的处理,该比例冬、夏两季高于春、秋两季,主要原因在于春、秋两季的土壤环境更适宜普通细菌的增殖,细菌的数量较高(图1),而芽胞杆菌具有很强的抗逆性,可以通过形

成芽胞来应对恶劣的环境<sup>[24]</sup>,因而在高、低温时,相对于其他细菌更易存活生长,从而导致比例增加,这一点符合芽胞杆菌的主要生理特性。此外,长期施用有机肥(OM、1/2OMN)的处理一年四季没有显著变化,说明芽胞杆菌的优势度在施有机肥土壤中更稳定。施用有机肥在有效增加和活化土壤养分的同时,能改善土壤理化性质,增强土壤调理功能,为土壤微生物创造有利于生长繁育的良好生态化学环境<sup>[25-26]</sup>,对维持较高的土壤微生物活性、微生物多样性和生态稳定性十分重要<sup>[27]</sup>。

### 2.4 土壤细菌、芽胞杆菌数量与土壤养分的相关分析

土壤细菌、芽胞杆菌数量与土壤养分的相关分析见表3。在不同的施肥区,土壤中的有机碳含量对芽胞杆菌和细菌的数量影响最大。芽胞杆菌数量与土壤有机碳及有效磷含量均呈极显著相关( $p < 0.01$ ),且其相关系数高于细菌数量与土壤养分的相关系数,芽胞杆菌数量和细菌数量均与pH、速效氮、速效钾含量无明显相关性。芽胞杆菌占细菌数量的比值与土壤有机碳含量呈极显著相关( $p < 0.01$ ),说明土壤肥力影响着芽胞杆菌的优势度。



注:同一日期各个处理中不同字母表示差异达到显著水平( $p < 0.05$ )。误差线为标准偏差( $n=4$ ) Note: Different letters used in the treatments of the same date mean significant difference at  $p < 0.05$ . Vertical bars indicates standard deviation ( $n=4$ )

图1 长期施肥对土壤细菌和芽胞杆菌数量的影响

Fig. 1 Effects of long-term fertilization on populations of soil bacteria and *Bacilli*

表2 长期施肥潮土中芽胞杆菌数量占细菌数量的比例

Table 2 Ratio of *Bacilli* and bacteria in long-term fertilized fluoro-aquic soil (%)

采样日期 Sampling date	CK	PK	NK	NP	NPK	1/2OMN	OM
2010-12-20	25.7 ± 3.8 a	23.4 ± 3.5 ab	21.5 ± 7.0 ab	14.9 ± 6.9 ab	28.9 ± 6.7 a	22.6 ± 4.5 a	23.7 ± 9.6 a
2011-03-28	17.2 ± 2.7 b	17.7 ± 1.8 b	14.2 ± 4.0 ab	16.3 ± 3.5 ab	21.8 ± 4.2 ab	18.6 ± 1.7 a	22.6 ± 7.8 a
2011-06-01	24.2 ± 2.3 a	26.2 ± 5.7 a	26.5 ± 11.2 a	21.6 ± 3.0 a	19.3 ± 4.5 bc	29.2 ± 4.1 a	28.9 ± 4.6 a
2011-09-26	12.0 ± 4.1 b	19.7 ± 7.2 ab	10.0 ± 0.5 b	13.1 ± 5.4 b	12.5 ± 2.4 c	20.0 ± 12.3 a	20.3 ± 1.6 a

注:表中数据为平均值 ± 标准偏差。同一处理各个日期不同字母表示差异达到显著水平( $p < 0.05$ ) Note: Values in the table are means of four replicates ± standard errors. Different letters used in the same treatment regardless of date mean significant difference at  $p < 0.05$

表 3 土壤中芽胞杆菌数量和细菌数量与土壤理化性质的相关系数

Table 3 Correlation coefficient between soil properties and populations of soil bacteria and *Bacilli* ( $n = 112$ )

	pH	有机碳 Organic C	速效氮 Available N	有效磷 Available P	速效钾 Available K
芽胞杆菌数量 Population of <i>Bacilli</i>	- 0.018	0.853 **	- 0.148	0.313 **	- 0.038
细菌数量 Population of bacteria	0.054	0.666 **	- 0.160	0.197 *	- 0.116
芽胞杆菌占细菌数量比例 Ratio of <i>Bacilli</i> /bacteria	- 0.114	0.262 **	- 0.070	0.132	0.048

注: \*, \*\* 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著 Note: \*, \*\* Mean at 0.05 or 0.01 significance levels, respectively

### 3 讨论

长期施肥对土壤有机碳以及速效氮、有效磷、速效钾的含量均有明显的提高作用,并能有效地调节土壤的酸碱度向中性靠近。尤其有机肥处理(OM)条件下潮土耕层有机碳含量相较 20 年前增加了一倍左右,极大地提高了土壤肥力,并发挥着大气碳汇的重要功能<sup>[28]</sup>。对于农业土壤而言,由于收获物不断移出农业生态系统,及时向土壤补充和投入一定量的肥料是十分必要的。而单单施用化肥并不利于土壤肥力保育,化肥在为土壤带入速效养分的同时,会导致土壤结构的劣化和环境污染等诸多问题<sup>[6]</sup>,施用有机肥在显著增加土壤肥力的同时,能改善土壤质量,为作物创造良好的土壤生态化学环境,对土壤肥力的健康持续发展意义重大。

在长期不同施肥处理之后,土壤中的芽胞杆菌数量产生较大的分异,总体上是施肥处理显著高于不施肥处理,施有机肥处理显著高于施化肥处理,有机肥的用量影响着土壤中芽胞杆菌的数量,且施肥处理对芽胞杆菌数量的影响不会因为季节的变化而改变。这与已有的一些研究结果相一致,例如 Islam 等<sup>[29]</sup>通过脂肪酸甲酯指纹图谱分析表明,在稻田生态系统中,施用有机堆肥会增加革兰氏阳性菌如芽胞杆菌菌群的生长和丰富。施有机肥提高了土壤中有机质的含量,而有机质既能改善土壤理化性质,提高土壤透气性,又含有大量的碳水化合物和 N、P、K 等矿质营养,为芽胞杆菌生长提供丰富的碳源和氮源,较化肥更能激发其生长和繁育,从而极大地增加了芽胞杆菌的数量<sup>[25]</sup>。每年向土壤中投入适当的有机肥料、建立科学的施肥制度,不仅可以保持和提高农田的生产力,同时也可以保持

和改善土壤的生物学特性、提高土壤的生物肥力<sup>[30]</sup>。

季节对土壤微生物的影响是通过土壤温度、湿度、植物生长状况等因素的综合作用形成的,因此可以用季节的概念来说明不同温度和水分等对微生物多样性和活性的影响<sup>[31]</sup>。芽胞杆菌占细菌总数的比例在冬夏两季高于春秋两季,体现了环境条件不利时土壤中芽胞杆菌在数量上的优势。芽胞杆菌的优势度出现的季节差异,既表明了土壤微生物随着时间的变化不断发生着演替,也说明不同微生物在土壤营养成分的转化和利用方面存在一定的互补性和调节性<sup>[32]</sup>。前人也有一些关于芽胞杆菌数量季节动态的研究,如王天龙等<sup>[33]</sup>在研究内蒙古鄂尔多斯几种典型固沙植物根际微生物时发现,根际芽胞杆菌和内生芽胞杆菌的数量随季节变化,秋季数量均达到最大。吕桂芬<sup>[34]</sup>在研究科尔沁沙地土壤微生物区系季节动态时发现,芽胞杆菌的生长高峰在春季。这些结果与本文实验结果不尽相同,这可能与试验地的土壤类型和植物种类不同,使得土壤中芽胞杆菌对施肥处理的响应不同有关,其原因有待深入研究。尽管不同处理中芽胞杆菌的优势度存在季节波动,但长期施用有机肥的处理中该优势度在春、夏和秋季均为最高,且在四季中无显著变化,该结论也印证了添加有机肥在维持较高的土壤微生物活性和生态稳定性方面的重要作用。

土壤微生物数量与许多土壤养分指标密切相关,其高低在一定程度上反映了土壤的肥力水平,可以作为评定土壤肥力的重要生物学指标<sup>[8,35]</sup>。一般情况下,土壤细菌占微生物总量的 70%~80%,其数量往往决定着土壤微生物总量的变化<sup>[36]</sup>,显然与土壤肥力水平有密切的联系,然而关于芽胞杆菌与土壤肥力关系的研究却少见报道。本研究结果显

示,潮土中芽胞杆菌数量的增加与土壤有机碳和有效磷含量的提高有密切关系,且其相关系数高于细菌数量与土壤养分的相关系数,而芽胞杆菌优势度也与土壤有机碳含量呈极显著相关,有理由认为在一定条件下芽胞杆菌数量能敏感地反映土壤肥力的动态变化。同时,通过统计分析发现,芽胞杆菌的优势度与土壤含水量并无显著相关,可以排除芽胞杆菌数量占细菌数量比例的波动是受土壤含水量的影响所致。然而这个结论在其他不同种类的土壤中是否适用还不明确,由于未在其他地区得到相应的数据,还需要在更多长期施肥实验地进一步研究验证。

## 4 结 论

长期施有机肥会极大的增加土壤中细菌数量和芽胞杆菌数量,并且有机肥处理中芽胞杆菌的优势度在四季中保持相对稳定,说明有机肥对提高土壤微生物数量,维持土壤生态稳定性十分重要。长期缺磷处理芽胞杆菌数量降低,增施磷肥则数量增加,说明长期缺素施肥限制芽胞杆菌的增殖,而平衡施化肥对于维持潮土微生物种群数量具有积极的意义。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 周修冲,刘国坚,Portch S. 平衡施肥在广东“三高”农业中的作用. 广东农业科学, 1998(1): 32—34. Zhou X C, Liu G J, Portch S. Effects of balance fertilization on Guangdong three-high-agriculture (In Chinese). Journal of Guangdong Agricultural Sciences, 1998 (1): 32 - 34
- [ 2 ] 范晓晖,林德喜,沈敏,等. 长期试验地潮土的矿化与硝化作用特征. 土壤学报, 2005, 42(2): 340—343. Fan X H, Lin D X, Shen M, et al. Characteristics of mineralization and nitrification in the calcareous soils from a long term fertilization experimental field (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(2): 340—343
- [ 3 ] 王俊华,胡君利,林先贵,等. 长期定位施肥对潮土微生物活性和小麦养分吸收的影响. 土壤通报, 2010, 41(4): 807—810. Wang J H, Hu J L, Lin X G, et al. Changes in soil microbial activities and nutrient uptake of wheat in response to fertilization regimes in a long-term field experiment (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 2010, 41(4): 807—810
- [ 4 ] 于树,汪景宽,李双异. 应用 PLFA 方法分析长期不同施肥处理对玉米地土壤微生物群落结构的影响. 生态学报, 2008, 28(9): 4221—4227. Yu S, Wang J K, Li S Y. Effect of long-term fertilization on soil microbial community structure in corn field with the method of PLFA (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(9): 4221—4227
- [ 5 ] Jenkinson D S, Ladd J N. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover//Paul V E A, Ladd J N. Soil biochemistry. New York: Marcel Dekker, 1981: 415—471
- [ 6 ] 章家恩,廖宗文. 试论土壤的生态肥力及其培育. 土壤与环境, 2000, 9(3): 253—256. Zhang J E, Liao Z W. Discussion on soil ecological fertility and its cultivation (In Chinese). Soil and Environmental Sciences, 2000, 9(3): 253—256
- [ 7 ] Kennedy A C, Papendick R I. Microbial characteristics of soil quality. Journal of Soil & Water Conservation, 1995, 50: 243—248
- [ 8 ] 叶存旺,翟巧绒,郭梓娟,等. 沙棘-侧柏混交林土壤养分、微生物与酶活性的研究. 西北林学院学报, 2007, 22(5): 1—6. Ye C W, Zhai Q R, Guo Z J, et al. Soil nutrient, microorganism and enzyme activity of *Hippophae rhamnoides* and *Platycladus orientalis* mixed forests (In Chinese). Journal of Northwest Forestry University, 2007, 22(5): 1—6
- [ 9 ] Hatfield J L, Stewart B A. Soil biology: Effects on soil quality. Florida: CRC Press, 1994
- [ 10 ] Warentin B P. The changing concept of soil quality. Journal of Soil and Water Conservation, 1995, 50: 226—228
- [ 11 ] 熊峰,王晓霞,余雄. 芽胞杆菌作为微生物饲料添加剂的生理功能研究进展. 北京农学院学报, 2007, 22(1): 76—80. Xiong F, Wang X X, Yu X. Advances on physiological function of *Bacillus* as microbic additive for animals (In Chinese). Journal of Beijing University of Agriculture, 2007, 22(1): 76—80
- [ 12 ] Lechevalier N A, Solotorovsky M. Three centuries of microbiology. New York: McGraw-Hill Book Co, 1965
- [ 13 ] Slepecky R A. Ecology of bacterial sporeformers. Spores, 1974, 5: 297—313
- [ 14 ] 龚国淑,唐志燕,邓香洁,等. 成都郊区土壤芽胞杆菌的空间分布及其多样性. 生态学杂志, 2009, 28(10): 2009—2013. Gong G S, Tang Z Y, Deng X J, et al. Spatial distribution and species diversity of soil *Bacillus* spp. in Chengdu suburbs (In Chinese). Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(10): 2009—2013
- [ 15 ] Svirskiene A, Tarvidas J. Survey of investigation of the biological activity of neutral loamy soil in cultivated pastures. Lietuvos Zemdirbystes Institui to Mokslo Darbai, 1995, 43: 109—119
- [ 16 ] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. Soil Biology & Biochemistry, 2003, 35(3): 453—461
- [ 17 ] Chu H Y, Lin X G, Takeshi F, et al. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39(11): 2971—2976
- [ 18 ] Zeller V, Bardgett R D, Tappeiner U. Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: A study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33(4/5): 639—649
- [ 19 ] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法. 北京: 高等教育出版社, 2010: 52—62. Lin X G. Principles and methods of soil microbiology research (In Chinese). Beijing: Higher Education

- Press, 2010; 52—62
- [20] 张华勇, 李振高, 王俊华, 等. 红壤生态系统下芽孢杆菌的物种多样性. 土壤, 2003, 35(1): 45—47. Zhang H Y, Li Z G, Wang J H, et al. Diversity of *Bacillus* species in different red soil eco-system (In Chinese). Soils, 2003, 35(1): 45—47
- [21] Nishijima T, Toyota K, Mochizuki M. Predominant culturable *Bacillus* species in Japanese arable soils and their potential as biocontrol agents. Microbes Environment, 2005, 20(1): 61—68
- [22] 龚国淑, 张世榕, 唐志燕, 等. 土壤芽孢杆菌分离方法的比较——以成都郊区土壤为例. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3685—3690. Gong G S, Zhang S R, Tang Z Y, et al. A comparative study on isolation methods of *Bacillus* spp. —Taking Chengdu suburbs soil as an example (In Chinese). Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(11): 3685—3690
- [23] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999
- [24] Driks A. The *Bacillus anthracis* spore. Molecular Aspects of Medicine, 2009, 30: 368—373
- [25] 孙瑞莲, 朱鲁生, 赵秉强, 等. 长期施肥对土壤微生物的影响及其在养分调控中的作用. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1907—1910. Sun R L, Zhu L S, Zhao B Q, et al. Effect of long-term fertilization on soil microorganism and its role in adjusting and controlling soil fertility (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(10): 1907—1910
- [26] 张焕军, 郁红艳, 丁维新. 长期施用有机无机肥对潮土微生物群落的影响. 生态学报, 2011, 31(12): 3308—3314. Zhang H J, Yu H Y, Ding W X. The influence of the long-term application of organic manure and mineral fertilizer on microbial community in calcareous fluvo-aquic soil (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(12): 3308—3314
- [27] 李东坡, 武志杰, 陈利军. 有机农业施肥方式对土壤微生物活性的影响研究. 中国生态农业学报, 2005, 13(2): 99—101. Li D P, Wu Z J, Chen L J. Influence of fertilizing modes of organic agriculture on the soil microbial activities (In Chinese). Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2005, 13(2): 99—101
- [28] 王俊华, 胡君利, 林先贵, 等. 长期平衡施肥对潮土微生物活性和玉米养分吸收的影响. 土壤学报, 2011, 44(4): 766—772. Wang J H, Hu J L, Lin X G, et al. Effects of long-term balanced fertilization on microbial activity and nutrient uptake of maize in a fluvo-aquic soil (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2011, 44(4): 766—772
- [29] Islam M R, Trivedi P, Palaniappan P, et al. Evaluating the effect of fertilizer application on soil microbial community structure in rice based cropping system using fatty acid methyl esters (FAME) analysis. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(6): 1115—1117
- [30] 李秀英, 赵秉强, 李絮花, 等. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系. 中国农业科学, 2005, 38: 1591—1599. Li X Y, Zhao B Q, Li X H, et al. Effects of different fertilization systems on soil microbe and its relation to soil fertility (In Chinese). Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38: 1591—1599
- [31] Papatheodorou E M, Argyropoulou M D, Stamou G P. The effects of large-and small-scale differences in soil temperature and moisture on bacterial functional diversity and the community of bacterivorous nematodes. Applied Soil Ecology, 2004, 25: 37—49
- [32] 朱万泽, 王金锡, 张秀艳, 等. 华西雨屏区不同恢复阶段湿性常绿阔叶林的土壤微生物多样性. 生态学报, 2007, 27(4): 1386—1396. Zhu W Z, Wang J X, Zhang X Y, et al. The diversity of soil microorganism during different recovery phases of moist evergreen broad-leaved forest in the rainy zone of west China (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(4): 1386—1396
- [33] 王天龙, 朱天辉, 朴春根, 等. 鄂尔多斯固定、半固定沙丘固沙植物根际微生物区系研究. 四川农业大学学报, 2007, 25(3): 300—305. Wang T L, Zhu T H, Piao C G, et al. Studies on sand-fixing plants rhizosphere microflora in fixed dune and semifixed dune in Erdos, Inner Mongolia (In Chinese). Journal of Sichuan Agricultural University, 2007, 25(3): 300—305
- [34] 吕桂芬. 科尔沁沙地土壤微生物区系季节动态的初步研究. 中国沙漠, 1999, 19(增刊1): 107—109. Lü G F. The preliminary study on seasonal dynamics of soil microbe in Horqin sand land (In Chinese). Journal of Desert Research, 1999, 19(suppl 1): 107—109
- [35] 许景伟, 王卫东, 李成. 不同类型黑松混交林土壤微生物、酶及其与养分关系的研究. 北京林业大学学报, 2000, 22(1): 52—55. Xu J W, Wang W D, Li C. The correlation among soil microorganism, enzyme and soil nutrient in different types of mixed stands of *Pinus thunbergii* (In Chinese). Journal of Beijing Forestry University, 2000, 22(1): 52—55
- [36] 李克斌, 蔡喜运, 刘维屏. 除草剂单用与混用对土壤微生物活性的影响. 农业环境科学学报, 2004, 23(2): 392—396. Li K B, Cai X Y, Liu W P. Influences of single and combined herbicides on soil microbial activity (In Chinese). Journal of Agro-Environment Science, 2004, 23(2): 392—396

## EFFECT OF LONG-TERM FERTILIZATION REGIME ON POPULATION OF BACILLI AND SEASONAL VARIATION OF ITS DOMINANCE IN FLUVO-AQUIC SOIL

Wang Rui<sup>1,2</sup> Lin Xiangui<sup>1†</sup> Chen Ruirui<sup>1</sup> Hu Junli<sup>1</sup> Zhang Jiabao<sup>1</sup> Wang Junhua<sup>1</sup> Wu Jing<sup>1,2</sup> Zhang Huayong<sup>1</sup>

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Soil samples were collected in every season of a year from the plow layer of a long-term fertilization experimental field at the Fengqiu Agro-ecological Experimental Station, Fengqiu County, Henan Province, China, for investigation of effects of fertilization regimes on population of soil *Bacilli* and its proportion to the total of bacteria, and for analysis of relationship between population of *Bacilli* and soil fertility. The long-term fertilization experiment consisted of seven treatments, i. e. organic manure (OM), half the rate of organic manure plus half the rate of N fertilizer (1/2OMN), fertilizer NPK, fertilizer NP, fertilizer NK, fertilizer PK, and the control (without fertilizer), of which each had four replicates. Results show that long-term fertilization, especially in treatments that involved organic manure and fertilizer P, increased the contents of soil organic C, total N, available N, P and K, and the increase in soil organic C varied in the range of 0.91 ~ 7.00 g kg<sup>-1</sup> in all the fertilization treatments, except treatment NK. Regime of the long-term fertilization also significantly affected populations of *Bacilli* and soil bacteria, which showed steady gradients in all the seasons, that is, the populations were significantly higher in all the fertilization treatments, except NK than in the control; in the treatments involving organic manure than in the treatments involving chemical fertilizers only; and in the treatment of balanced fertilization than in the treatments missing any one element. The population of *Bacilli* increased in all the treatments except treatment NK by a range of 0.02 ~ 0.54 lg (CFU g<sup>-1</sup>) as compared that in the control. The ratio of *Bacilli*/bacteria was higher in summer and winter than in spring and autumn in all the chemical fertilizer treatments and relatively stable throughout the year in the treatments involving OM. Correlation analysis that the population of *Bacilli* was closely related to the contents of soil organic carbon and available P ( $p < 0.01$ ). All the findings demonstrate that, long-term application of organic manure is more conducive to build-up of soil fertility and growth and propagation of soil microbes, and that the population of *Bacilli* is a sensitive indicator of soil fertility.

**Key words** Bacteria; Organic manure; Soil fertility; Organic C; Available P

(责任编辑:卢 萍)