

长期施肥对黑土农田土壤微生物群落的影响*

魏巍^{1,2} 许艳丽^{1†} 朱琳³ 韩晓增¹ Li S⁴

(1 中国科学院东北地理与农业生态研究所黑土区农业生态国家重点实验室, 哈尔滨 150081)

(2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

(3 东京大学生物工学专攻, 日本东京 1138657)

(4 美国农业部农业研究局作物遗传研究中心, 美国 Stoneville 38776)

摘要 基于中国科学院海伦农业生态试验站长期定位试验区, 应用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 和变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术研究了无施肥 (NF)、单施 N、P 化肥 (NP) 以及化肥配施有机猪粪肥等 3 种长期施肥措施对黑土区玉米田土壤微生物群落密度和结构的影响。Real-time PCR 方法定量 NF、NP 及 NPM 措施土壤细菌群落基因组 DNA 质量分别为 381、1351 和 1773 ng g⁻¹ 干土, 真菌群落基因组 DNA 质量分别为 113.3、127.3 和 20.6 ng g⁻¹ 干土, 真菌与细菌的比率分别为 0.31、0.09 和 0.01, NPM 措施显著低于另两种施肥方式 ($p < 0.05$)。DGGE 方法研究表明, NP 和 NPM 措施不能改善土壤细菌和真菌群落的多样性、均匀性及优势菌优势程度; 但主成分分析结果显示 NP 和 NPM 措施均可改变土壤细菌和真菌群落的构成, 且真菌群落的变化更为显著; 聚类分析结果显示 NP 和 NPM 措施下细菌群落结构较相近, 其相似系数为 0.89, 真菌群落中 NP 措施与 NF 措施相近, 相似系数为 0.63, 高于 NP 与 NPM 措施的相似系数 0.51。上述结果表明有机猪粪肥的长期施用可以显著降低黑土农田土壤真菌与细菌的比率, 且明显地改变土壤细菌和真菌群落的结构。

关键词 长期施肥; 土壤微生物群落; Real-time PCR; DGGE

中图分类号 Q938.1⁺3

文献标识码 A

东北黑土区是世界上仅有的三大块黑土带之一, 其土壤具有土质肥沃、质地疏松以及有机质含量丰富等特征, 是我国重要的商品粮生产基地^[1]。但是由于长期的过度垦殖和不良的经营管理方式, 该地区农田黑土质量退化问题日益严重^[2]。为了维持黑土区农田的生产力, 向土壤中施用化肥和有机肥已成为常规的农业生产措施。施用化肥和有机肥措施可明显地改善土壤理化性质、增加土壤肥力、调节土壤酶活性以及提高作物产量^[3-4], 同时也对栖息于土壤中的微生物群落产生重要的影响。已有研究指出, 长期单施化肥或化肥配施有机肥措施均可以影响土壤细菌和真菌群落密度和结构^[5-6]; 土壤细菌与真菌群落密度的比率、细菌和真菌群落结构多样性水平等指标又可间接地指示土壤肥力及致病能力^[7-8], 因此长期施肥措施下土壤微生物群落的研究对东北黑土区土壤肥力及健康评价具有重要意义。然而东北黑土区长期单施化

肥以及化肥配施有机肥措施对农田土壤细菌和真菌群落影响的相关研究仍鲜见报道^[9]。

土壤微生物群落的研究多应用传统稀释平板法来完成目标微生物的分离计数、培养以及形态学鉴定等过程。然而由于传统稀释平板法自身缺陷所造成的局限性, 导致其无法全面反映自然条件下微生物的生长状况, 从而容易使研究结果产生偏差^[10]。近年来随着分子生态学技术的发展, 尤其是实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 和变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术的应用, 实现了避免传统方法所必须的培养过程, 直接通过解析土壤微生物基因组 DNA 信息来研究土壤微生物群落^[11]。Boyle 等^[12]应用 Real-time PCR 方法, 分别以 16S rRNA 和 ITS 序列为靶基因对不同植被覆盖土壤中细菌和真菌的群落密度进行了定量研究; 而 Dematheisl 等^[13]则应用 DGGE 方法, 同样 16S rRNA 和 ITS 序列为目标基因分析了玉米根际土壤中的细菌和真菌群落

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (编号 kzcx2-yw-408-3) 资助

† 通讯作者, E-mail: xyll@neigaeherb.ac.cn

作者简介: 魏巍 (1984—), 男, 黑龙江人, 博士研究生, 主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail: weiwei0274@hotmail.com

收稿日期: 2012-02-29; 收到修改稿日期: 2012-06-15

结构。结果均显示这两种方法可以更为全面、实时地分析自然环境中微生物群落变化情况,是传统研究手段的必要补充。因此,本研究采用 Real-time PCR 和 DGGE 方法对东北黑土区 3 种长期施肥措施下的土壤微生物群落密度和结构进行研究,旨在探讨长期施肥措施对土壤微生物群落的影响,进而通过土壤微生物群落信息来评价长期单施化肥以及化肥配施有机肥措施下土壤肥力及健康程度,以期为黑土土壤合理利用和科学施肥提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样地设置

试验设在中国科学院海伦农业生态试验站(47°26'N, 126°38'E)长期定位试验区,地处黑土区中部,海拔高度 240 m,属于温带大陆性季风气候区,冬季寒冷干燥,夏季高温多雨,雨热同季。年平均气温 1.5 °C,年均降水量 570 mm,年均有效积温 2 400 °C。供试土壤类型属典型黑土,开垦前植被为草甸草原植被,开垦历史为 100 a 左右。1993 年设置定位试验区,将已开垦的农田系统设为 3 个施肥处理:无肥处理(No Fertilizer, NF)、化肥处理(chemical fertilizer Nitrogen and Phosphorus applied, NP)和化肥配施有机肥处理(chemical fertilizer Nitrogen and Phosphorus and organic manure, NPM)。每个施肥处理设置 3 个重复小区,小区面积为 64 m² (8 m × 8 m) 且随机排列。施肥量为 N 32.26 kg hm⁻²、P₂O₅ 82.44 kg hm⁻²、有机肥 15 000 kg hm⁻²,有机肥为腐熟猪粪^[14-15]。施肥方式为大豆和小麦在春季播种时将化肥作为基肥一次性全部施入,玉米的施肥方式是将氮肥施用量的 1/3 和磷肥作为基肥在春季同播种一起施用,而预留 2/3 的氮肥在拔节期作为追肥。田间管理与一般生产田相同,采用人工播种,三铲三趟,秋季旋松起垄。农田种植方式为小麦-玉米-大豆轮作,本研究取样时农田作物为玉米。供试土壤的基本理化性质如表 1 所示。

1.2 样品采集

2010 年的夏季(7 月 5 日)采集 3 种施肥措施土壤,均采用土钻按五点取样法采集各重复小区中的非根际土壤样品。同时为避免表层土壤受空气影响,各小区去除 0~5 cm 表土,采集 5~20 cm 土壤样品^[8]。混合均匀后用无菌封口袋包扎密封,置于冰盒中带回实验室,新鲜土样过 2 mm 土壤筛,于 4 °C 和 -80 °C 分别保存备用。

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical property of the soils

处理 Treatment	有机碳 Organic C (g kg ⁻¹)	全氮 Total N (g kg ⁻¹)	全磷 Total P (g kg ⁻¹)	全钾 Total K (g kg ⁻¹)	pH
NF	27.21	2.10	0.83	23.2	6.3
NP	27.91	2.19	1.02	24.4	5.8
NPM	33.75	2.82	1.73	26.0	6.1

1.3 土壤微生物群落分析

1.3.1 土壤微生物及 Real-Time PCR 标准品微生物基因组总 DNA 提取及纯化 土壤微生物基因组总 DNA 的提取应用美国 Omega 公司的 Soil DNA Kit,按照操作手册提取 1 g 的土壤样品。细菌和真菌群落实时荧光定量 PCR 体系应用荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 和尖镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 的基因组 DNA 作标准品。上述标准品基因组 DNA 的提取应用美国 MoBio 公司的 Microbial DNA Isolation kit 试剂盒。DNA 纯化应用大连宝生物工程公司的 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒,提取的土壤总 DNA 大小和浓度通过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳进行检查。

1.3.2 PCR 扩增反应 所有 PCR 反应的引物均由大连宝生物公司合成(表 2)。Real-time PCR 反应体系为 25 μl,采用大连宝生物工程公司的 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) 试剂盒进行扩增。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 s;然后 94 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,并收集荧光信号,40 个循环;72 °C 5 min。熔点曲线分析温度设于 65~95 °C 之间,每隔 0.2 °C 收集荧光信号 1 s。DGGE 分析细菌和真菌群落用的 PCR 反应体系均为 50 μl,包括 2 μl(约 20 ng) DNA 样品,1.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 0.25 μmol · L⁻¹ 正反向引物,400 μmol · L⁻¹ dNTP,1U TaqDNA 聚合酶及 1 倍的反应缓冲液,用无菌双蒸水补到 50 μl。DGGE 分析用细菌和真菌群落的巢式 PCR 反应条件相同,均为 95 °C 预变性 5 min;然后 95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 °C 10 min。

1.3.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析 DGGE 在变性梯度凝胶电泳仪(Bio-Rad laboratories,美国)上进行。细菌聚丙烯酰胺凝胶强度为 8%,变性剂梯度为 30%~70%;真菌聚丙烯酰胺凝胶强度为 8%,变性剂梯度为 20%~60%。每孔加样量为 20 μl 的 PCR 产物(100 ng)和 10 μl 的 1 × Loading dye。电泳温度为 60 °C,电压为细菌 100 V、真菌 75 V,电泳时间为 16 h。电泳结束后,将凝胶,放在稀释

10 000 倍的 SYBR Green I 核酸染料中避光染色 20 min,然后在凝胶成像仪下进行观察并成像。

1.4 数据分析

采用 MJ Opticon Monitor TM 3.1 实时荧光定量分析软件对 Real-time PCR 试验数据进行统计分析。采用 QuantityOne 软件 (Version 4.5) 对 DGGE 条带进行灰度及聚类分析。并计算土壤微生物群落结构

Shannon-Wiener 多样性指数 (H)、Pielou 均匀度指数 (E) 和 Simpson 优势度指数 (C)。计算公式: $H = -\sum (P_i \times \ln P_i)$; $E = H/\ln S$; $C = \sum P_i^2$ [21-22]。 P_i 为某一条带灰度值与所有条带灰度值之和的百分比, S 为所有条带灰度值的总和。主成分分析 PCA (principal component analysis) 采用 Minitab 软件进行分析制图。聚类树形图应用 ntsys 2.0 软件进行分析绘制。

表 2 用于 PCR 反应的引物名称、序列及长度

Table 2 Names, sequences and lengths of the primers used in PCR amplification

	引物 Primers		扩增片段长度 (bp) Length	用途 Application
	引物名称 Name	引物序列 Sequence		
细菌 Bacteria	27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1400	DGGE 第一轮反应 ^[16]
	1492r	5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3'		
	GC-357f	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	230	DGGE 第二轮反应 ^[17]
	517r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'		
	Eub338	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	120	Real-time PCR ^[18]
	Eub518	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'		
	ITS1f	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'		
真菌 Fungi	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	500 ~ 700	DGGE 第一轮反应 ^[19]
	GC-ITS1 f	5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3'		
	ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	300	DGGE 第二轮反应 ^[20]
	ITS1	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'		
	5.8s	5'-CGCTGCGTTCTTCATCG-3'	200	Real-time PCR ^[18]

注 note: GC-Clamp 5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG-

2 结果与分析

2.1 长期施肥对土壤微生物群落密度的影响

以荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 基因组 DNA 为标准品,制作土壤细菌群落 real-time PCR 的标准曲线 (图 1A)。曲线斜率为 -0.2523 , R^2 为 0.988 , 扩增效率 E 为 79% 。应用该标准曲线绝对定量 3 种长期施肥方式下土壤细菌群落密度 (图 2A), 结果表明 NPM 措施土壤细菌群落密度最高, 为 $1773 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土⁻¹, 显著高于 NF 措施 ($p < 0.05$)。NP 措施土壤细菌群落密度为 $1351 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土, 虽高于 NF 措施, 但与 NF 和 NPM 措施间的差异均不显著 ($p > 0.05$)。该结果说明与长期单施化肥相比较, 施有机肥可以更为显著地增加土壤细菌群落的密度。

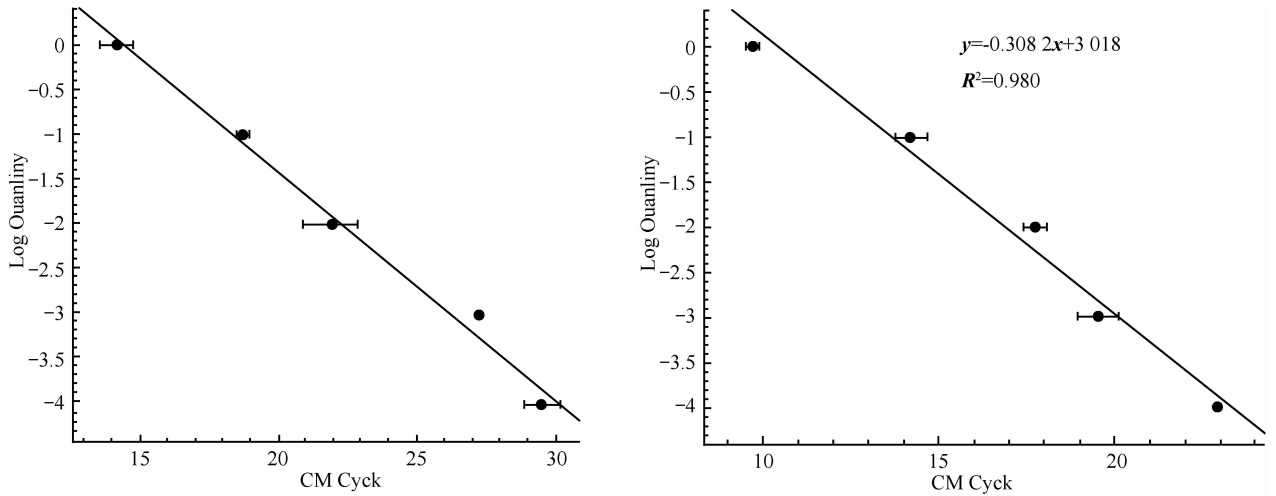
以尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysproum* 基因组 DNA 为标准品, 制作土壤真菌群落 real-time PCR 的标准曲线 (图 1B)。曲线斜率为 -0.3082 , R^2 为 0.980 ,

扩增效率 E 为 103% 。应用该标准曲线绝对定量 3 种长期施肥方式下土壤真菌群落密度 (图 2B), 结果表明 NPM 措施土壤真菌群落密度显著低于 NF 和 NP 措施, 为 $20.6 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土 ($p < 0.05$)。NF 和 NP 措施土壤真菌群落密度间的差异不显著 ($p > 0.05$)。该结果表明有机肥的长期配施可以降低土壤真菌群落密度。

NF、NP 和 NPM 3 种长期施肥措施土壤中真菌与细菌的比率分别为 0.31 ± 0.19 、 0.09 ± 0.01 和 0.01 ± 0.01 , NPM 措施显著低于另两种施肥方式 ($p < 0.05$)。该结果表明, 长期单施化肥以及化肥配施有机肥等方式均可降低土壤真菌与细菌的比率, 其中有机肥配施后效果更为显著。

2.2 长期施肥对土壤微生物群落结构的影响

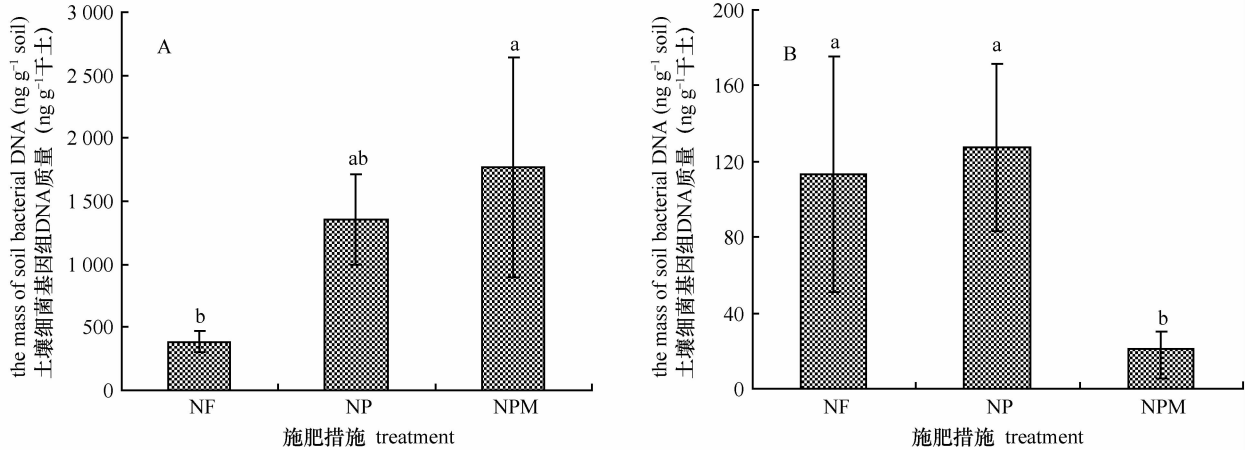
土壤细菌群落 DGGE 图谱 (图 3A) 分析结果表明, 3 种施肥措施中, NF 措施细菌群落多样性水平高于 NP 和 NPM 措施 (表 3), 而 3 种措施下细菌群落均匀程度和优势菌的优势程度间无显著差异 ($p > 0.05$)。



注：A, B分别代表细菌和真菌 Note: A and B represented the result of bacteria and fungi

图 1 土壤细菌和真菌群落密度 real-time PCR 检测体系的标准曲线

Fig. 1 Standard curves of the real-time PCR system for density of the soil bacterial and fungal communities

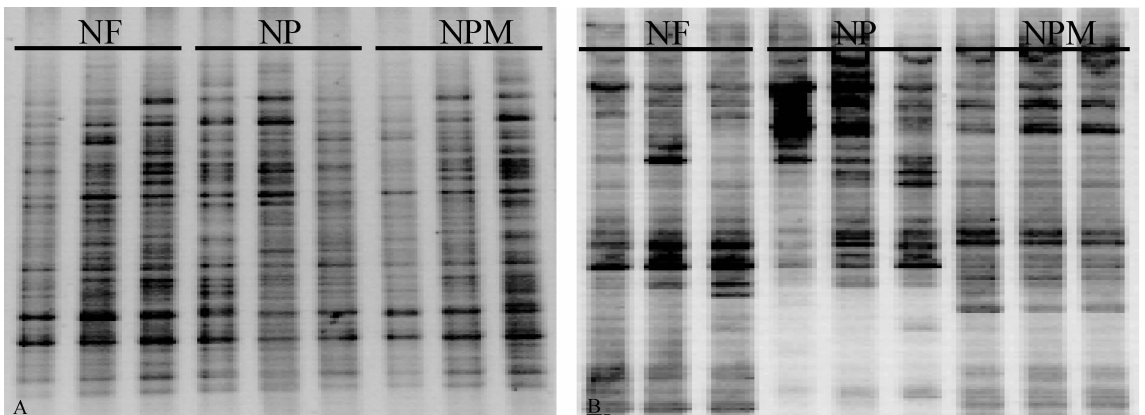


注：A, B分别代表细菌和真菌群落；不同字母表示在5%差异水平上差异显著，即p<0.05

Note: A and B stands for bacteria and fungi, respectively, and different letters mean significant difference at $p < 0.05$

图 2 3种长期施肥措施土壤细菌和真菌基因组DNA含量

Fig. 2 Quantities of genomic DNA of the soil bacteria and fungi in 3 soils under long-term fertilization



注：A, B分别代表细菌和真菌群落；NF、NP和NPM分别代表无肥处理、化肥处理和化肥配施有机肥处理

Note: A and B stands for bacterial and fungal communities, respectively, and NF, NP and NPM for NF (no fertilizer), treatment NP (chemical fertilizer N & P) and treatment NPM (chemical fertilizer N & P plus organic manure)

图 3 3种长期施肥措施土壤细菌和真菌群落 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE fingerprints of the bacterial and fungal communities in the 3 soils under long-term fertilization

表 3 3 种长期施肥措施土壤细菌和真菌群落多样性、均匀度和优势度指数

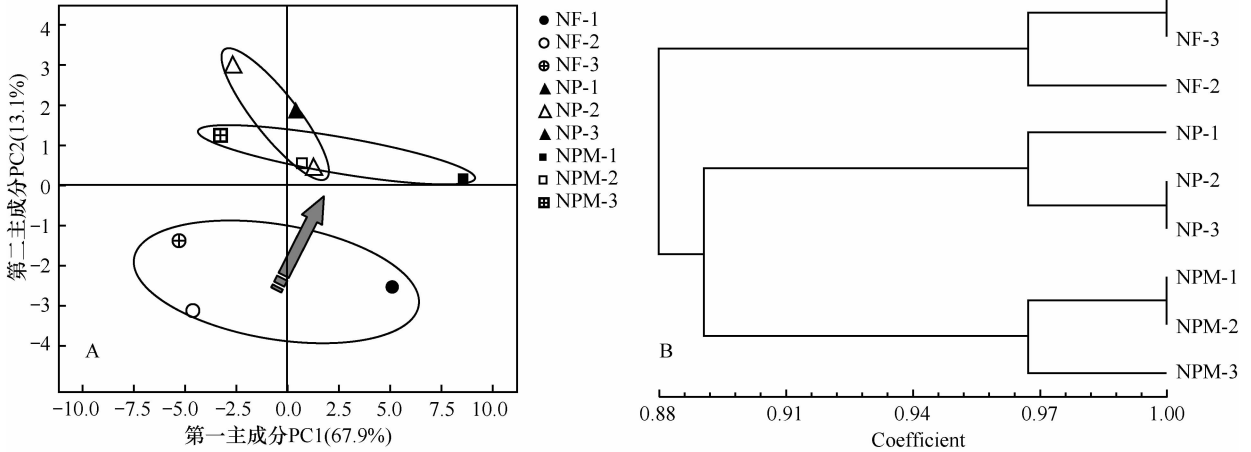
Table 3 Shannon-Wiener (H), Pielou (E) and Simpson (C) indices of the soil bacterial and fungal communities in the 3 soils under long-term fertilization

	多样性指数 Shannon-Wiener indice (H)		均匀度指数 Pielou indice (E)		优势度指数 Simpson indice (C)	
	真菌 Fungi	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	细菌 Bacteria
NF	3.40 ± 0.03a	2.58 ± 0.04a	0.41 ± 0.005a	0.34 ± 0.01a	0.03 ± 0.001b	0.08 ± 0.003a
NP	3.31 ± 0.02b	2.53 ± 0.10a	0.40 ± 0.003a	0.33 ± 0.01a	0.04 ± 0.001a	0.08 ± 0.010a
NPM	3.31 ± 0.03b	2.66 ± 0.08a	0.40 ± 0.004a	0.35 ± 0.01a	0.04 ± 0.001a	0.07 ± 0.005a

注:不同字母表示在 5% 差异水平上差异显著,即 $p < 0.05$ Note: Different letters mean significant difference at $p < 0.05$

主成分分析结果显示, NP 和 NPM 措施土壤细菌群落结构较为相似, 均较 NF 措施有明显地改变 (图 4A)。聚类分析结果中, NP 和 NPM 措施的相似系数为 0.89 (图 4B), 同样说明该两种措施具有较为相似的细菌群落构成。但 3 种施肥措施在相似系

数 0.88 处聚为一簇的结果也说明两种长期施肥措施并不能显著地改变土壤细菌群落构成。由此可见, 土壤长期施用 N、P 等化肥可以改变土壤细菌群落构成, 但并不显著。而有机肥的配施则对细菌群落构成没有影响。



注: A、B 分别为主成分分析和聚类分析结果; NF、NP 和 NPM 分别代表无肥处理、化肥处理和化肥配施有机肥处理; 数字 1-3 代表处理内重复样品

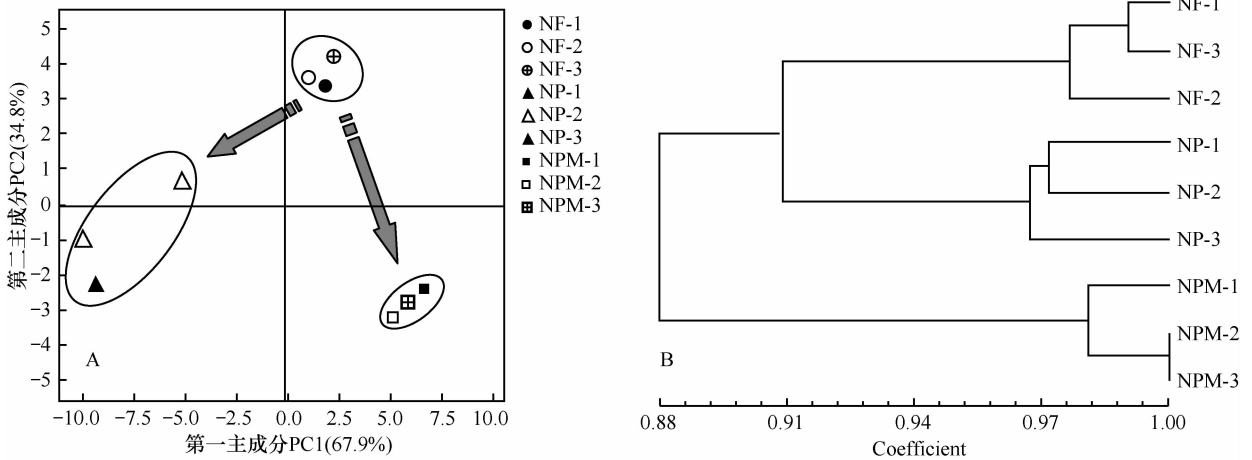
Note: A and B stands for results of the principal component analysis and tree clustering analysis, NF, NP and NPM for NF, treatment NP and treatment NPM, and Number 1 to 3 for three replicates the same in treatment, respectively.

图 4 3 种长期施肥措施土壤细菌群落结构主成分分析及树形聚类分析

Fig. 4 Principal component analysis (PCA) and tree clustering analysis of the soil bacterial population structure in the 3 soils under long-term fertilization

土壤真菌群落 DGGE 图谱 (图 3B) 分析结果表明, NPM 措施下真菌群落的多样性水平、均匀程度以及优势菌优势程度虽然均优于 NF 和 NP 措施, 但 3 种措施间的差异并不显著 ($p > 0.05$) (表 2)。主成分分析图谱显示 NP 和 NPM 措施下真菌群落的构成差别明显, 且与 NF 措施相比均可以显著地改变土壤真菌群落结构 (图 5A)。聚类分析

结果显示, NP 和 NF 措施真菌群落较相近, 但相似系数为 0.63。而 3 种施肥措施聚为一簇时的相似系数仅为 0.51, 同样证明 3 种长期施肥措施真菌群落构成差异显著 (图 5B)。由此可见, 土壤长期施用 N、P 等化肥以及配施有机肥均可以明显地改变土壤真菌群落构成, 其中有机肥的配施效果更为明显。



注：A、B分别为主成分分析和聚类分析结果；NF、NP和NPM分别代表无肥处理、化肥处理和化肥配施有机肥处理；数字1-3代表处理内重复样品

Note: A and B stands for principal component analysis and tree clustering analysis, NF, NP and NPM for NF, treatment NP and treatment NPM, and Number 1 to 3 for 3 replicates the same in treatment.

图5 3种长期施肥措施土壤真菌群落结构主成分分析及聚类分析

Fig. 5 Principal component analysis (PCA) and tree clustering analysis of the soil fungal population structure in the 3 soils under long-term fertilization

3 讨论与结论

土壤细菌群落的研究结果表明, NP措施的长期施用可以改变土壤细菌群落结构, 而NPM措施在此基础上更能增加细菌群落密度。已有研究表明, 化肥的长期施用可以显著地影响土壤中的大多数微生物的生长发育, 从而有选择性地改变土壤微生物群落结构, 这其中N肥在发挥着最主要的作用^[23]。Beauregard等^[24]通过结合磷脂脂肪酸(PF-LA)和DGGE的研究结果发现, 长期施用磷肥虽不能改变褐灰钙土土壤微生物群落总体的丰富度, 但可以控制一些特异性细菌及真菌的密度, 从而较精细地改变土壤微生物结构。同时研究还指出磷肥的施用对丛枝菌根真菌群落密度及结构均无影响。Jangid等^[25]则认为施用无机肥和有机禽粪肥措施均较土地利用及耕作方式更为有效地改变土壤(Ultisols)细菌群落, 其中无机肥措施细菌群落多样性水平高于有机禽粪肥措施。而Kelly等^[26]应用Real-time PCR技术对施用有机污泥及无机化肥作为肥料的农田土壤(Mollisols)中的氨单加氧酶(*amoA*)进行了定量检测, 证明有机肥料可以显著增加*amoA*的表达量, 进而推测有机肥料的施用可以提高土壤氨氧化古细菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)种群密度。由此可见, 土壤氮、磷等元素的

含量对土壤细菌群落结构改变的过程中发挥着重要的作用, 而有机质含量则能够更为有效地增加土壤细菌群落密度。研究中有有机猪粪肥的长期施用使土壤氮、磷以及有机碳的含量均有明显地提高(表1), 这也很可能是造成该措施土壤中细菌群落结构和密度变化的原因。

土壤真菌群落研究结果表明, 长期采用NP措施可以改变土壤真菌结构, 然而NPM措施的效果则更为明显, 同时NPM措施还可以显著地降低土壤真菌群落的密度。Cwalina-Ambroziak等^[27]研究认为, 在轮作田土壤中(Luvisol)施用由污水沉积物和粪肥组成的有机肥料后, 土壤真菌群落结构的改变较其群落密度的变化更为明显。在无肥对照土壤中, 腐霉菌(*Pythium* spp.)、疫霉菌(*Phytophthora* spp.)和镰孢菌(*Fusarium* spp.)等作物病原真菌数量较大, 而有机肥措施下上述病原真菌种群密度得到了有效地抑制。这种抑制被认为是来源于土壤中的粘帚霉菌(*Gliocladium* spp.)、青霉菌(*Penicillium* spp.)、拟青霉菌(*Paecilomyces* spp.)和木霉菌(*Trichoderma* spp.)等病原拮抗性真菌种群密度的增加。Ropek^[28]、Ndubuisi-Nnaji等^[29]以及王小兵等^[30]一致认为, 有机肥料中的有机质成分通过改善土壤结构及修复土壤肥力外, 还可以有效地控制土传细菌及真菌病害, 如甜菜立枯病、马铃薯晚疫病、香蕉叶斑病以及花生青枯病等。黑土区轮作大豆田不同

长期施肥措施对土壤镰孢菌 (*Fusarium* spp.) 种群影响的研究结果显示,长期施用有机粪肥可以降低大豆根腐病原尖镰孢 (*F. oxysporum*) 和禾谷镰孢菌 (*F. graminearum*) 的数量,从而减轻大豆根腐病的发病程度^[8]。由此可见,黑土农田土壤中有有机猪粪肥的长期施用可以降低土壤真菌群落的密度,这种变化很可能与土壤有机质的增加有直接的关系。同时,NPM 措施也很可能通过改善土壤真菌群落结构来降低病原真菌种群的密度,从而使土壤具有抑制病害发生的潜力。

土壤真菌与细菌的比率被认为是反映土壤肥力和健康状况的指标,其中低比率的“细菌型”土壤具有较高的肥力。这是由于真菌细胞中的 C/N 比率远高于细菌细胞,因此真菌群落需要从土壤环境中摄取更多有机物质作为 C 源的营养来源,从而可能较细菌群落更易降低土壤肥力^[7,27]。而高比率的“真菌型”土壤则具有较强的致病力。由于农作物土传病害多由病原真菌侵染所引起,而具有病原性的真菌在土壤真菌群落中占有很大的比率^[25],因此土壤表现出较高的真菌群落密度则表示其可能受到土传病原真菌的影响^[8,25,27]。综上所述,具有较低真菌与细菌比率的农田土壤更适于农作物种植,而有机猪粪肥的施用可以有效地降低黑土农田土壤中真菌/细菌比率,为作物提供更良好的生长环境。

参 考 文 献

- [1] 魏丹,杨谦,迟凤琴. 东北黑土区土壤资源现状与存在问题. 黑龙江农业科学, 2006, (6): 69—72. Wei D, Yang Q, Chi F Q. The soil resource conditions and the problems in north-east black soil regions (In Chinese). Heilongjiang Agricultural Sciences, 2006 (6): 69—72
- [2] Yu L, Zhang B. The degradation situation of black soil in China and its Prevention and counter measures. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2004, 18(1): 99—103
- [3] Li D P, Wu Z J, Chen L J, et al. Dynamics of urease activity in a long-term fertilized black soil and its affecting factors. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14 (12): 2208—2212
- [4] Wang Y, Qi X N, Wang Q C. Influences of applying stalk compost on the nutrient of field soil and corn yield of black soil. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2004, 12 (4): 132—134
- [5] Chu H Y, Lin X G, Fujii T I, et al. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, and bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(11): 2971—2976
- [6] Chu H, Fujii T, Morimoto S, et al. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral

fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73: 485—491

- [7] DeVries F T, Hoffland E, van Eekeren N, et al. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38: 2092—2103
- [8] Wei W, Xu Y L, Li S, et al. Analysis of *Fusarium* populations in a soybean field under different fertilization management by real-time quantitative PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Plant Pathology, 2012, 94(1): 119—126
- [9] 白震, 张明, 闫颖, 等. 长期施肥对农田黑土微生物活力与群落结构的影响. 土壤学报, 2009, 46(1): 107—116. Bai Z, Zhang M, Yan Y, et al. Effect of long-term fertilization on activity and community structure of soil microbe in farmland mollisol (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2009, 46(1): 107—116
- [10] 魏巍, 许艳丽, 刘金波, 等. 土壤镰孢菌 Real-Time QPCR 定量方法的建立及应用. 大豆科学, 2010, 29(4): 655—658. Wei W, Xu Y L, Liu J B, et al. Development and application of a Real-Time quantitative PCR assay for detection of *Fusarium* spp. in soil (In Chinese). Soybean Science, 2010, 29(4): 655—658
- [11] 魏巍, 许艳丽, 朱琳. 分子生物学技术在镰孢菌分类及生态学中的应用. 农业系统科学与综合研究, 2009, 26(2): 181—187. Wei W, Xu Y L, Zhu L. Applications of molecular biology techniques in taxonomy and ecology investigation of *Fusarium* spp. (In Chinese). System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture, 2009, 26(2): 181—187
- [12] 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. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40: 443—451.
- [13] Demathiesl F, Zimmerlingl U, Flocco C, et al. Multitrophic interaction in the rhizosphere of maize: root feeding of Western Corn Rootworm larvae alters the microbial community composition. PLoS One, 2012, 7(5): e37288
- [14] Pan F J, McLaughlin N B, Yu Q, et al. Responses of soil nematode community structure to different long-term fertilizer strategies in the soybean phase of a soybean-wheat-corn rotation. Eur J Soil Biol, 2010, 46: 105—111
- [15] 侯雪莹, 韩晓增, 王树起, 等. 不同土地利用和管理方式对黑土肥力的影响. 水土保持学报, 2008, 6(22): 99—103. Hou X Y, Han X Z, Wang S Q, et al. Different land uses and management effects on soil fertilities in black soil (In Chinese). Journal of Soil and Water Conservation, 2008, 6(22): 99—103
- [16] Muyzer G, De Wall E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59: 695—700
- [17] Zhang C L, Huang Z Y, Cantu J, et al. Lipid biomarkers and carbon isotope signatures of a microbial (beggiatoa) mat associated with gas hydrates in the Gulf of Mexico. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 2106—2112

- [18] Fierer N, Jackson J A, Vilgalys R, et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 4117—4120
- [19] White T J, Bruns T D, Lee S, et al. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990: 315—322
- [20] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*, 1993, 2: 113—118
- [21] Zak J C, Willig M R, Moorhead D L, et al. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26: 1101—1108
- [22] Yang C, Crowley D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (1): 345—351
- [23] Barabasz W, Albińska D, Jaskowska M, et al. Biological effects of mineral nitrogen fertilization on soil microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2002, 11 (3): 193—198
- [24] Beaugard M S, Hamel C, Nayyar A, et al. Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in Alfalfa. *Microb Ecol*, 2010, 59: 379—389
- [25] Jangid K, Williams M A, Franzluebbers A J. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40: 2843—2853
- [26] Kelly JJ, Policht K, Grancharova T, et al. Distinct responses in ammonia-oxidizing archaea and bacteria after addition of biosolids to an agricultural soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (18): 6551—6558
- [27] Cwalina-Ambroziak B, Bowszys T. Changes in fungal communities in organically fertilized soil. *Plant Soil Environment*, 2009, 55 (1): 25—32
- [28] Rópek D, Kacorzyk P. Effect of fertilization on healthiness of mountain meadow grasses. *Ecological Chemistry and Engineering*, 2008, 15 (1): 125—131
- [29] Ndubuisi-Nnaji U U, Adegoke A A, Ogbu H I, et al. Effect of long-term organic fertilizer application on soil microbial dynamics. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10 (4): 556—559
- [30] 王小兵, 骆永明, 李振高, 等. 长期定位施肥对红壤地区连作花生生物学性状和土传病害发生率的影响. *土壤学报*, 2011, 48 (4): 725—730. Wang X B, Luo Y M, Li Z G, et al. Effects of long-term stationary fertilization experiment on incidence of soil-borne diseases and biological characteristics of peanut in continuous monocropping system in red soil area (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48 (4): 725—730

EFFECT OF LONG-TERM FERTILIZATION ON SOIL MICROBIAL COMMUNITIES IN FARMLAND OF BLACK SOIL

Wei Wei^{1,2} Xu Yanli^{1†} Zhu Lin³ Han Xiaozeng¹ Li S⁴

(1 Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China)

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

(3 Department of Biotechnology, the University of Tokyo, Tokyo 1138657, Japan)

(4 Crop Genetics Research Unit, United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Stoneville 38776, USA)

Abstract Using real-time PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), effects of long-term fertilization on densities and structures of the soil microbial communities in corn fields of black soil were determined. The corn fields were located at the Hailun Experimental Station of Agricultural Ecology in Northeast China and had been under a long-term fertilization experiment designed to have 3 treatments, i. e. NF (no fertilizer), NP (chemical fertilizers nitrogen and phosphorus), and NPM (chemical nitrogen and phosphorus combined with pig manure). In real-time PCR analyses, the total genomic DNA of the microbial community in treatments NF, NP and NPM was found to be 381, 1351 and 1773 ng per gram of soil, and of the fungal community, 113.3, 127.3 and 20.6 ng respectively. Fungi to bacteria ratio in the 3 treatments was 0.31, 0.09 and 0.01, separately. Obviously Treatment NPM is lower than Treatments NF and NP in this aspect ($p < 0.05$). Analysis of the DGGE indices shows that Treatments NP and NPM did not improve the soil microbial communities in diversity, uniformity and dominance of dominant microbes. However, according to principal component

analysis, these two treatments altered the structures of the soil bacterial and fungi communities, especially the latter. Meanwhile, the tree clustering analysis indicates that the bacterial community structures in Treatments NP and NPM were quite similar, being 0.89 in similarity coefficient. But for the fungal community, its structure in Treatment NP is more similar to that in Treatment NF, with similarity coefficient being 0.63, which is higher than 0.51 between Treatments NP and NPM. All above findings indicate that the long-term fertilization using organic fertilizer (pig manure) could significantly decrease the fungal to bacterial ratio and alter the soil bacterial and fungal community structure in the field.

Key words Long-term fertilization; Soil microbial community; Real-time PCR; DGGE

(责任编辑:过 园)