农业环境科学学报
JOURNAL OF AGRO-ENVIRONMENT SCIENCE
中文核心期刊/CSCD
请通过网上投稿系统投稿
网址：http://www.aes.org.cn

不同施肥措施对华北潮土区玉米田土壤微生物碳源代谢多样性的影响

刘红梅， 安克锐， 王慧， 张思宇， 赵建宁， 杨殿林， 张贵龙

引用本文:
刘红梅, 安克锐, 王慧, 等. 不同施肥措施对华北潮土区玉米田土壤微生物碳源代谢多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(10): 2336-2344.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0509

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

长期施肥对黄土旱塬农田土壤微生物量碳、氮、磷的影响
李春越, 郝亚辉, 薛英龙, 王益, 党廷辉
农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1783-1791 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0240

施用鸡粪有机肥对种植小油菜土壤微生物群落结构多样性的影响
李可, 孙彤, 孙涛, 徐应明, 孙约兵
农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2316-2324 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0036

长期氮添加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落多样性的影响
刘红梅, 张海芳, 皇甫超河, 李洁, 周广帆, 杨殿林
农业环境科学学报. 2017, 36(4): 709-717 https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1267

外加镉处理下生物质炭对土壤微生物碳代谢功能多样性的影响
张秀, 尚艺婕, 夏运生, 赵青青, 史静
农业环境科学学报. 2016, 35(7): 1308-1313 https://doi.org/10.11654/jaes.2016.07.012

豆科秸秆、氮肥配施玉米秸秆还田对秸秆矿化和微生物功能多样性的影响
李涛, 葛晓颖, 何春娥, 欧阳竹
农业环境科学学报. 2016, 35(12): 2377-2384 https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0539

关注微信公众号，获得更多资讯信息

刘红梅, 安克锐, 王慧, 等. 不同施肥措施对华北潮土区玉米田土壤微生物碳源代谢多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(10): 2336-2344.
LIU Hong-mei, AN Ke-rui, WANG Hui, et al. Effects of fertilization regimes on the metabolic diversity of microbial carbon sources in a maize field of fluvo-aquic soil in North China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(10): 2336-2344.

开放科学OSID

不同施肥措施对华北潮土区玉米田土壤微生物碳源代谢多样性的影响

刘红梅, 安克锐, 王慧, 张思宇, 赵建宁, 杨殿林, 张贵龙

(农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘　要:探讨长期不同施肥措施下华北潮土区玉米田土壤微生物碳源代谢多样性特征,为华北地区可持续性施肥管理提供理论依据和数据支持。以农业农村部环境保护科研监测所建立的武清长期定位试验站为平台,采用Biolog生态板技术,研究6种不同施肥处理[不施肥对照(A0)、单施有机肥(A1)、氮肥减量配施有机肥(A2)、常量化肥配施有机肥(A3)、氮肥增量配施有机肥(A4)和单施化肥(A5)]对华北潮土区土壤微生物碳源代谢多样性的影响。结果表明,与不施肥对照相比,A1、A2、A3、A4和A5处理显著提高了土壤全氮和硝态氮含量,显著降低了土壤碳氮比和pH;施用有机肥处理(A1、A2、A3和A4)显著增加了有机碳和微生物量氮含量。培养96 h时,反映土壤微生物活性的平均颜色变化率(*AWCD*)变化顺序为:A2>A3>A4>A5>A1>A0。A2的土壤微生物Shannon指数*H*显著高于其他施肥处理。主成分分析表明,不同施肥处理显著影响土壤微生物的碳源利用特征,A2和A3集中在第1主成分正方向,得分系数在1.125~1.473,土壤微生物碳源利用特征相似;A0、A1、A4和A5位于第1主成分负方向,得分系数在-1.157~-0.167。土壤微生物利用的碳源主要为碳水类、羧酸类、氨基酸和聚合物类。相关分析表明,土壤碳氮比、铵态氮、硝态氮、pH和微生物量氮是影响土壤微生物碳源代谢多样性的主要因素。氮肥减量配施有机肥有利于提高土壤微生物代谢活性和碳源代谢多样性。

关键词:施肥措施;土壤微生物;功能多样性;Biolog生态板;玉米田
中图分类号:S147.2;S154.3　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1672-2043(2020)10-2336-09　　doi:10.11654/jaes.2020-0509

Effects of fertilization regimes on the metabolic diversity of microbial carbon sources in a maize field of fluvo-aquic soil in North China

LIU Hong-mei, AN Ke-rui, WANG Hui, ZHANG Si-yu, ZHAO Jian-ning, YANG Dian-lin, ZHANG Gui-long
(Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China)

Abstract: To reveal the effects of long-term fertilization regimes on the metabolic diversity of the soil microbial community of a maize field in North China in order to provide a theoretical basis and data support for sustainable fertilization management in North China. This study was conducted in the Wuqing Experimental Station of the Agro-Environmental Protection Institute of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. The field experiment included six treatments, no fertilizer (A0), organic fertilizer (A1), reduced nitrogen fertilizer plus organic fertilizer (A2), normal chemical fertilizer plus organic fertilizer (A3), increased nitrogen fertilizer plus organic fertilizer (A4), and chemical fertilizer (A5). Soil samples were separately collected from the 0~20 cm soil layer. A Biolog EcoPlate was applied to test the changes in the soil microbial diversity under different fertilization treatments. The results showed that compared with the A0 treatment, the A1, A2, A3, A4, and A5 treatments significantly increased the contents of total nitrogen and nitrate nitrogen and significantly decreased the soil carbon/nitrogen ratio and pH. The application of organic fertilizer treatments (A1, A2, A3, and A4) significantly increased the organic carbon and

收稿日期:2020-05-07　　**录用日期:**2020-07-06
作者简介:刘红梅(1976—),女,河北沧州人,副研究员,从事生物多样性与生态农业研究。E-mail: liuhongmei@caas.cn
基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0800905-3)
Project supported: National Key R&D Program of China(2018YFD0800905-3)

microbial biomass nitrogen content. The average well color development values of the soil microbial communities in culture for 96 h were as follows: A2>A3>A4>A5>A1>A0. The Shannon index of the A2 treatment was significantly higher than that of the other fertilization treatments. The results of the principal component analysis showed that there were significant differences in the microbial utilization of carbon in the different fertilization treatments. The A2 and A3 treatments were concentrated in the positive direction of the first principal component with score coefficients ranging from 1.125 to 1.473, and had similar carbon utilization. Conversely, the A0, A1, A4, and A5 treatments were concentrated in the negative direction of the first principal component, and the score coefficients ranged from −1.157 to −0.167. The carbon sources mostly used by soil microbes were carbohydrates, carboxylic acids, amino acids, and polymers. The correlation analysis showed that the soil carbon/nitrogen ratio, ammonium nitrogen, nitrate nitrogen, pH, and microbial biomass nitrogen were the main factors affecting the metabolic diversity of the soil microbial carbon sources. The A2 treatment improved the activity and functional diversity of the soil microbial community.

Keywords: fertilization regimes; soil microbial community; functional diversity; Biolog EcoPlate; maize field

施肥是农业生产提高产量的主要措施之一,施肥量和施肥方式对土壤质量和农业可持续发展具有重要的影响。氮肥施用是土壤氮素的主要来源,是提高农作物产量的重要保障。为了确保粮食作物自给自足,我国现阶段作物生产以高化肥投入的集约化种植模式为主。大量化学氮肥投入不能被作物吸收利用,以NH_3、N_2O和硝态氮等形式进入大气、土壤和水体,导致温室效应、水体富营养化等生态环境问题[1]。施用有机肥替代部分化肥,减少氮肥投入,提高氮肥利用效率,降低农业生产对土壤和环境的负面影响,是实现农业可持续发展的重要出路。土壤微生物是农田生态系统中极为重要的组成部分,对植物生长、物质循环和生态系统中能量流动等都起着十分重要的作用。研究土壤微生物对不同施肥管理的响应,对评价土壤肥力和质量变化具有重要意义。

Biolog生态板技术基于微生物对不同种类碳源底物的利用情况分析,来表达微生物代谢特征[2],是近年来用于研究微生物功能多样性的一种快速简便的方法[3]。前人研究表明,长期施肥可改变土壤微生物群落结构[4-6],长期施用无机氮肥可降低土壤微生物活性[7]。路花等[8]采用Biolog生态板法研究了氮肥减半配施有机肥对燕麦田土壤微生物群落功能多样性的影响,结果表明,氮肥减半后随配施有机肥量增加,燕麦田土壤微生物群落的丰富度和均匀度显著提高。郭莹等[9]研究表明,长期施用粪肥有助于提高水稻土土壤微生物对碳源的利用能力和群落多样性。虽然已有大量研究表明无机肥和有机肥配施有利于提高土壤微生物活性和微生物功能多样性,但由于肥料类型、施肥量、施肥方式、施肥年限和作物类型等的差异,不同研究者得出的研究结论不尽相同。因此有必要针对不同区域、土壤类型和作物类型等情况,开展不同施肥措施对土壤微生物群落的影响研究。

华北平原是我国主要的粮食主产区,其耕地面积约占全国耕地面积的21%,在保障我国粮食生产中起着重要作用。但是该区域农业生产中存在化肥施用量过高、肥料利用效率低等问题,农业可持续发展面临严峻挑战[10]。面对这一现状,农业农村部积极倡导发展循环农业,提倡有机肥与无机肥配合施用,逐步实现化肥使用量零增长,促进农业可持续发展。目前,长期不同施肥措施对华北农田土壤微生物碳源代谢多样性的影响还不明确。为此,本研究以农业农村部环境保护科研监测所武清野外科学试验站长期定位试验中不同施肥处理的表土(0~20 cm土层)为研究对象,运用Biolog生态板技术,研究不同施肥处理下华北平原典型小麦-玉米轮作农田土壤微生物碳源代谢特征与多样性的变化规律,同时分析探讨微生物碳源代谢多样性与土壤环境因子之间的相关关系,以期为提高华北地区农田土壤肥力、促进农业可持续发展和合理施肥管理提供理论依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验在农业农村部环境保护科研监测所武清野外科学试验站内开展,位于武清区梅厂镇(39°21′N,117°12′E)。研究区属温带半湿润大陆性季风气候,四季分明。年平均气温11.6 ℃,年均降水量520~660 mm,年平均无霜期为196~246 d。土壤类型为潮土。试验开始前土壤基本理化性质为:土壤全氮1.18 g·kg^{-1},全磷0.72 g·kg^{-1},有机碳10.83 g·kg^{-1},硝态氮19.95 mg·kg^{-1},铵态氮5.06 mg·kg^{-1},速效磷18.6 mg·kg^{-1},pH 7.58。

1.2 试验设计及样品采集

自2010年开始长期试验，试验设6个施肥处理：对照A0（不施肥）、单施有机肥A1（有机肥15 t·hm^{-2}）、氮肥减量配施有机肥A2（有机肥15 t·hm^{-2}，氮基肥55.2 kg·hm^{-2}、追肥36.8 kg·hm^{-2}，P_2O_5 81.0 kg·hm^{-2}，K_2O 75.0 kg·hm^{-2}）、常量化肥配施有机肥A3（有机肥15 t·hm^{-2}，氮基肥117.3 kg·hm^{-2}、追肥78.2 kg·hm^{-2}，P_2O_5 81.0 kg·hm^{-2}，K_2O 75.0 kg·hm^{-2}）、氮肥增量配施有机肥A4（有机肥15 t·hm^{-2}，氮基肥172.5 kg·hm^{-2}、追肥115.0 kg·hm^{-2}，P_2O_5 81.0 kg·hm^{-2}，K_2O 75.0 kg·hm^{-2}）、单施化肥A5（氮基肥117.3 kg·hm^{-2}、追肥78.2 kg·hm^{-2}，P_2O_5 81.0 kg·hm^{-2}，K_2O 75.0 kg·hm^{-2}）。小区面积为400 m^2，各小区间隔50 cm，每个处理3次重复。有机肥由牛粪和鸡粪混合堆腐而成，氮含量为0.69%，P_2O_5含量为0.65%，K_2O为0.38%。氮肥为尿素（N，46.4%），磷肥为过磷酸钙（P_2O_5，12%），钾肥为硫酸钾（K_2O，50%）。有机肥和磷钾肥全部作基肥，氮肥60%作基肥，40%在玉米小喇叭口期作追肥施入。其他田间管理同一般大田生产。种植制度为典型的冬小麦-夏玉米轮作。

2019年9月底在玉米收获期采样。用直径为5 cm土钻，在每个小区内按照S形取样法选取5个点，采集0~20 cm土壤样品，用冰盒带回实验室。去除植物根系、凋落物和其他杂质，将土壤样品分成两份，一份放入4 ℃冰箱中保存，用于测定土壤速效养分、微生物量碳氮含量和微生物碳源代谢多样性；另一份土样放在室内自然风干，用于其他土壤化学指标测定。

1.3 测定方法

土壤pH采用玻璃电极法（水土比2.5∶1），土壤有机碳采用重铬酸钾外加热法测定，土壤全磷采用钼锑抗比色法测定，土壤全氮、硝态氮和铵态氮含量采用流动分析仪（AA3，德国）测定，土壤速效磷采用碳酸氢钠提取-钼锑抗比色法测定[11]。土壤微生物量碳（Microbial biomass carbon，MBC）和微生物量氮（Microbial biomass nitrogen，MBN）采用氯仿熏蒸-硫酸钾提取，总有机碳分析仪（Multi N/C 3000）测定[12]。

土壤微生物碳源代谢多样性测定：应用Biolog生态板测定土壤微生物对碳源的利用情况[13]。称取相当于10 g烘干土质量的新鲜土壤样品放入事先灭过菌的三角瓶中，在三角瓶中加入90 mL灭菌的0.85%NaCl溶液中，以转速250 r·min^{-1}在摇床上振荡30 min，摇匀，静置10 min后，吸取上清液依次稀释至10^{-3}。向Biolog生态板的每个孔中加入150 μL 10^{-3}的土壤悬浮液。将Biolog生态板放在遮光的生化培养箱中，在27 ℃下连续培养7 d，用Biolog自动分析仪（BIOLOGInc，USA）每24 h读数一次。

1.4 数据计算

土壤微生物对碳源的利用率采用平均颜色变化率（Average well color development，*AWCD*）来表示[14]。对培养96 h时的Biolog生态板孔中吸光值进行统计分析，采用Shannon指数*H*、Simpson优势度指数*D*和Shannon-Wiener均匀度指数*E*来表征土壤微生物群落代谢功能多样性。计算公式如下：

$$AWCD=\Sigma(C_i-R)/n$$

Shannon指数：$H=-\Sigma P_i\times\ln P_i$

Simpson优势度指数：$D=1-\Sigma P_i^2$

Shannon-Wiener均匀度指数：$E=H/\ln S$

式中：C_i为每个有培养基孔的光密度值，为各反应孔在590 nm与750 nm的吸光值差；R为碳源空白对照孔的光密度值；n为碳源数量，n=31；P_i为第i孔吸光值与整个平板吸光值总和的比率；S为发生颜色变化的孔的数目。

1.5 数据分析

采用Excel 2010软件对数据进行统计分析和作图。应用SPSS 16.0软件对土壤化学性质、MBC、MBN、培养96 h吸光值和多样性指数进行单因素方差分析（One-way ANOVA）和Duncan多重比较；对培养96 h的31种碳源进行主成分分析（Principle component analysis，PCA）；利用Pearson相关分析比较土壤化学性质、MBC和MBN与多样性指数和*AWCD*之间的相关性。

2 结果与分析

2.1 不同施肥措施对土壤化学性质、MBC和MBN的影响

由表1可知，A1、A2、A3和A4的有机碳含量显著高于对照A0，A5的有机碳含量显著低于对照A0。5种施肥处理的土壤全氮和硝态氮含量均显著高于对照。5种施肥处理的土壤碳氮比和pH值均显著低于对照A0。A2、A3和A4的MBC含量显著高于对照A0，A1和A5的MBC含量与对照A0无显著差异。A1、A2、A3和A4的MBN含量显著高于对照A0，A5的MBN含量与对照A0无显著差异。

2.2 不同施肥措施下土壤微生物群落代谢活性变化特征

连续10 a不同施肥处理下，土壤*AWCD*值变化见

表1 不同施肥措施下土壤化学性质、MBC和MBN变化

Table 1 Soil chemical properties, MBC, and MBN in different fertilization treatments

处理 Treatments	有机碳 Total organic C/(g·kg^{-1})	全氮 Total N/(g·kg^{-1})	碳氮比 C/N	铵态氮 NH_4^+-N/(mg·kg^{-1})	硝态氮 NO_3^--N/(mg·kg^{-1})	pH	微生物量碳 MBC/(mg·kg^{-1})	微生物量氮 MBN/(mg·kg^{-1})
A0	8.97±0.11d	1.23±0.18e	7.39±0.93a	1.17±0.08c	6.39±0.10e	8.71±0.03a	365.97±32.76d	69.12±6.04b
A1	11.03±0.19b	2.08±0.04bc	5.32±0.03b	1.22±0.08c	8.34±0.28d	8.47±0.09bc	433.49±57.76cd	86.62±11.14a
A2	9.94±0.30c	1.96±0.01c	5.08±0.18b	1.70±0.22a	10.29±0.23c	8.52±0.04b	530.46±25.20ab	97.88±12.30a
A3	11.37±0.25b	2.21±0.07b	5.15±0.20b	1.62±0.22ab	11.00±0.07bc	8.29±0.10de	466.44±30.10bc	94.79±0.37a
A4	12.28±0.29a	2.43±0.09a	5.07±0.30b	1.37±0.13bc	12.77±0.32a	8.19±0.07e	557.25±53.33a	89.06±6.33a
A5	8.08±0.14e	1.64±0.21d	4.97±0.68b	1.70±0.13a	11.39±0.97b	8.39±0.03cd	389.52±10.71d	68.89±4.94b

注：同列不同字母表示差异显著（P<0.05）。下同。

Note: Different letters within the same column indicate significant differences among treatments (P<0.05). The same below.

图1。随着培养时间的延长，不同施肥处理的土壤微生物活性随时间延长而提高。培养24 h各处理的*AWCD*变化不明显，24~96 h *AWCD*快速增长，96 h后缓慢增长，直至趋于稳定。培养期间，A2处理的*AWCD*最高，对照A0处理*AWCD*最低，A3处理的*AWCD*高于A4、A2和A5。培养第96 h时，各处理的*AWCD*在0.227~0.584，土壤*AWCD*值顺序为：A2>A3>A4>A5>A1>A0。方差分析表明，各施肥处理间*AWCD*值差异显著（表2），施肥处理（A1、A2、A3、A4和A5）均显著高于不施肥对照A0（P<0.05）；A2、A3和A4的*AWCD*值显著高于A1和A5，且以A2处理的*AWCD*值最高。说明A2处理土壤微生物群落具有最强的代谢能力。

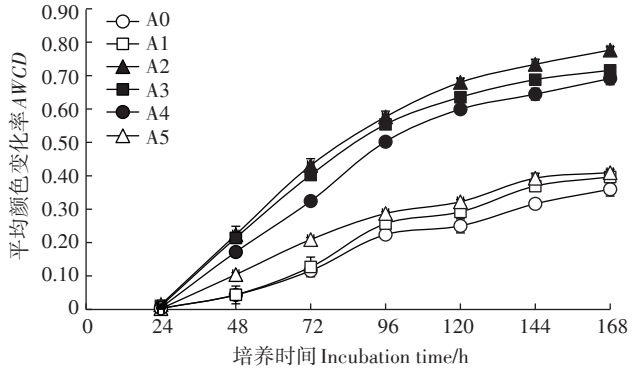

图1 不同施肥措施下土壤微生物群落的平均颜色变化率

Figure 1 Average well color development of soil microbe community in different fertilization treatments

2.3 土壤微生物群落碳源代谢多样性指数

土壤微生物群落碳源代谢多样性指数变化见表2。A2的Shannon指数显著高于对照和其他施肥处理；A3、A4和A5处理的Shannon指数均显著低于对照A0。各施肥处理间的优势度指数无显著差异。A1、A2的均匀度指数与对照A0无显著差异，A3、A4和A5的均匀度指数显著低于对照。

2.4 土壤微生物群落碳源利用的主成分分析

利用培养96 h的*AWCD*值，对不同施肥措施下土壤微生物利用碳源底物情况进行主成分分析。在31种碳源因子中共提取了5个主成分，累计贡献因子是94.98%。其中第1主成分PC1贡献率是52.71%，第2主成分贡献率是20.08%，第3主成分贡献率为11.48%，第4主成分贡献率为5.92%，第5主成分贡献率为4.79%。选取累计贡献率为72.79%的第1主成分和第2主成分进行分析（图2）。在主成分分析中，样本之间距离越近，表明样本间微生物群落代谢功能差异越小[15]。结果表明，不同施肥处理碳源利用在

表2 土壤微生物群落多样性指数和培养96 h时*AWCD*值

Table 2 Diversity index of soil microbial communities and *AWCD* at 96 h in different fertilization treatments

处理 Treatments	Shannon指数 Shannon index(H)	优势度指数 Dominance index(D)	均匀度指数 Evenness index(E)	96 h平均颜色变化率 *AWCD*
A0	4.653±0.109c	0.974±0.011a	1.222±0.031a	0.227±0.013f
A1	4.831±0.025b	0.968±0.021a	1.223±0.019a	0.260±0.014e
A2	5.151±0.036a	0.963±0.010a	1.189±0.031a	0.584±0.018a
A3	4.443±0.051d	0.984±0.012a	1.032±0.027b	0.562±0.009b
A4	4.234±0.042e	0.978±0.011a	1.066±0.033b	0.509±0.010c
A5	3.589±0.021f	0.977±0.015a	0.937±0.032c	0.291±0.005d

PC轴上差异显著(图2),A2和A3相对聚集,A4和A5相对聚集,A0和A1相对聚集。A2和A3位于PC1轴和PC2轴正方向上,土壤微生物碳源利用功能相似。在PC1轴上,A2和A3处理分布在轴的正方向上,得分系数在1.125~1.473;A0、A1、A4和A5分布在轴的负方向上,得分系数在−1.157~−0.167。在PC2轴上,A0和A1处理分布在轴的负方向上,得分系数在−1.312~−1.246,A2、A3、A4和A5处理分布在轴的正方向上,得分系数在0.085~1.281。不同施肥处理在PC1和PC2轴上得分系数有显著差异(表3),说明不同施肥措施改变了土壤微生物群落代谢功能。

主成分分析中的载荷因子反映碳源利用的差异,载荷因子绝对值越大,表明该碳源基质影响越大[16],起主要分异作用[14]。由表4可见,第1主成分PC1载荷绝对值>0.5的有18种碳源,其中碳水类6种,氨基酸类3种,羧酸类4种,多聚物类2种,酚酸类1种,胺类2种。第2主成分PC2载荷因子绝对值>0.5的有15种碳源,其中碳水类2种,氨基酸类3种,羧酸类4种,多聚物类3种,酚酸类2种,胺类1种。由表5可知,影响第1主成分的碳源主要有碳水类、羧酸类、氨基酸类、多聚物类,影响第2主成分的碳源主要有碳水类、氨基酸类、羧酸类、多聚物类。分析表明,碳水类、羧酸类、氨基酸类和多聚物类是研究区微生物利用的主要碳源(表5)。碳水类的D−半乳糖酸γ−内酯、氨基酸类的甘氨酰−L−谷氨酸、羧酸类的D−葡糖胺酸、多聚物类的肝糖、酚酸类的2−羟基苯甲酸、胺类的腐胺,在PC1和PC2载荷因子绝对值均达到0.5以上,以上6种为研究区31种碳源中的最敏感类型。

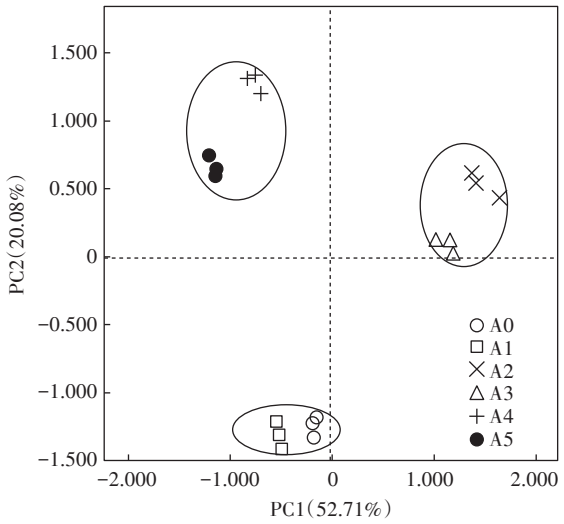

图2 土壤微生物碳源利用的主成分分析

Figure 2 Principal components analysis for carbon utilization of soil microbial communities

表3 不同施肥措施主成分得分系数

Table 3 PC scores in different fertilization treatments

处理Treatments	主成分1 PC1	主成分2 PC2
A0	−0.167±0.019c	−1.246±0.078d
A1	−0.513±0.029d	−1.312±0.101d
A2	1.473±0.147a	0.529±0.092b
A3	1.125±0.090b	0.085±0.058c
A4	−0.760±0.066e	1.281±0.073a
A5	−1.157±0.038f	0.663±0.076b

2.5 土壤化学性质、MBC和MBN与微生物碳源代谢多样性相关分析

相关分析表明,土壤有机碳与96 h平均颜色变化率呈显著正相关(表6)。土壤全氮和微生物量碳与96 h平均颜色变化率呈极显著正相关。土壤碳氮比与均匀度指数*E*呈显著正相关,与96 h平均颜色变化率呈显著负相关。土壤铵态氮与均匀度指数*E*呈显著负相关,与96 h平均颜色变化率呈显著正相关。土壤硝态氮与Shannon指数*H*呈显著负相关,与均匀度指数*E*呈极显著负相关,与96 h平均颜色变化率呈极显著正相关。土壤pH与均匀度指数*E*呈极显著正相关,与96 h平均颜色变化率呈显著负相关。土壤微生物量氮与Shannon指数*H*呈显著正相关,与96 h平均颜色变化率呈极显著正相关。土壤碳氮比、铵态氮、硝态氮、pH和微生物量氮是影响土壤微生物群落碳源代谢多样性的重要环境因子。分析结果说明,连续10 a不同施肥处理下土壤化学性质和微生物学性状发生了变化,从而影响了微生物碳源代谢多样性。

3 讨论

土壤微生物群落碳源代谢特征可以反映微生物活性和微生物群落对碳源的利用能力[17-18]。本研究发现施肥措施显著影响了土壤微生物对不同碳源的利用能力。反映微生物群落代谢活性的*AWCD*值表现为随着培养时间的延长,利用碳源量逐渐增加,有机无机配施处理的*AWCD*值均显著高于不施肥处理,这与武晓森等[19]在山东省德州市典型小麦−玉米轮作农田得出的有机肥与无机肥配施能够促进土壤微生物对碳源的代谢活性结果一致。本研究结果表明施肥处理的碳源利用能力均显著高于不施肥处理(表2),这与严君等[20]研究结果相似。本研究中连续10 a不同施肥措施导致土壤养分含量发生变化,影响了土

表4 31种碳源的主成分载荷因子

Table 4 Loading factors of principle components of 31 sole-carbon sources

碳源化学类别 Chemical guild	碳源类型 Carbon source	主成分1 PC1	主成分2 PC2
碳水类 Carbohydrate	i-赤藓糖醇 i-Erythritol(C2)	0.965	-0.036
	D-纤维二糖 D-Cellobiose(G1)	0.831	0.406
	α-D-乳糖 α-D-Lactose(H1)	0.773	0.432
	α-D-葡萄糖-1-磷酸 α-D-Glucose-1-Phosphate(G2)	0.683	-0.040
	D-半乳糖酸γ-内酯 D-Galactonic acid γ-Lactone(A3)	0.536	0.594
	D,L-α-磷酸甘油 D,L-α-Glycerol phosphate(H2)	0.815	0.487
	D-甘露醇 D-Mannitol(D2)	0.147	0.207
	β-甲基-D-葡萄糖苷 β-Methyl-D-Glucoside(A2)	-0.077	0.258
	D-木糖 D-Xylose(B2)	0.005	0.192
	N-乙酰-D 葡萄糖氨 N-Acetyl-D-Glucosamine(E2)	-0.034	0.979
氨基酸类 Amino acids	甘氨酰-L-谷氨酸 Glycyl-L-Glutamic acid(F4)	0.785	-0.537
	L-苏氨酸 L-Threonine(E4)	0.877	0.381
	L-丝氨酸 L-Serine(D4)	0.548	0.404
	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine(C4)	0.014	0.222
	L-精氨酸 L-Arginine(A4)	0.136	0.772
	L-天门冬酰胺 L-Asparagine(B4)	0.195	0.968
羧酸类 Carboxylic acids	α-丁酮酸 α-Ketobutyric acid(G3)	0.920	0.178
	衣康酸 Itaconic acid(F3)	0.942	0.135
	丙酮酸甲酯 Pyruvic acid methyl ester(B1)	0.911	0.086
	D-葡糖胺酸 D-Glucosaminic acid(F2)	0.625	0.633
	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid(B3)	0.441	0.817
	D-苹果酸 D-Malic acid(H3)	0.316	0.832
	γ-羟丁酸 γ-Hydroxybutyric acid(E3)	0.316	0.581
多聚物类 Polymer	肝糖 Glycogen(F1)	0.803	0.511
	吐温40 Tween 40(C1)	0.889	0.438
	α-环式糊精 α-Cyclodextrin(E1)	0.289	0.737
	吐温80 Tween 80(D1)	-0.278	0.789
酚酸类 Phenolic acids	2-羟基苯甲酸 2-Hydroxy benzoic acid(C3)	0.731	0.607
	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxy benzoic acid(D3)	0.129	0.844
胺类 Amine	苯乙胺 Phenylethyl-amine(G4)	0.926	-0.291
	腐胺 Putrescine(H4)	0.591	0.725

表5 影响PC1、PC2主要变量得分

Table 5 Score coefficient of variables affecting PC1 and PC2

主成分 Principal components	碳水类 Carbohydrate	氨基酸类 Amino acids	羧酸类 Carboxylic acids	多聚物类 Polymer	酚酸类 Phenolic acids	胺类 Amine
PC1	4.866	2.555	4.471	2.259	0.860	1.517
PC2	3.631	3.284	3.262	2.475	1.451	1.016

壤微生物对碳源的利用情况。肥料的施用提高了土壤硝态氮、铵态氮和MBC含量(表1),为微生物的生长繁殖提供了养分和碳源底物,从而提高了微生物活性,这与张瑞等[21]和刁婵等[3]对不同施肥措施土壤微生物代谢功能研究得出的单施化肥降低了土壤微生物碳源利用能力不一致,可能是肥料施用年限、作物类型不同造成的。

多样性指数通常与微生物群落的碳源利用效率呈正相关关系[22],是评价土壤微生物群落利用碳源程度的重要指标,可反映土壤微生物群落功能多样性。

表6 土壤化学性质、MBC和MBN与微生物群落多样性和*AWCD*之间的相关性分析

Table 6 Correlation analysis between soil chemical properties, and soil microbial communities diversity indices

项目 Items	Shannon指数 Shannon index(*H*)	优势度指数 Dominance index(*D*)	均匀度指数 Evenness index(*E*)	96 h平均颜色变化率 *AWCD*
有机碳 Total organic C	0.285	0.077	0.115	0.531*
全氮 Total N	0.050	0.056	−0.209	0.651**
碳氮比 C/N	0.223	0.051	0.491*	−0.496*
铵态氮 NH_4^+−N	−0.228	0.004	−0.556*	0.513*
硝态氮 NO_3^-−N	−0.471*	0.138	−0.727**	0.638**
pH	0.418	−0.214	0.619**	−0.524*
微生物量碳 MBC	0.264	0.001	−0.006	0.768**
微生物量氮 MBN	0.484*	0.100	0.120	0.727**

注：*表示显著相关（$P<0.05$），**表示极显著相关（$P<0.01$）。

Note: * indicates significant correlation ($P<0.05$), ** indicates highly significant correlation ($P<0.01$).

Shannon多样性指数表示生态系统土壤微生物群落利用碳源类型多少，其值越高，表明土壤微生物群落功能多样性越高[19]。本研究单施有机肥和氮肥减量配施有机肥处理显著提高了土壤微生物Shannon多样性指数，但常量化肥配施有机肥和氮肥增量配施有机肥处理显著降低了土壤微生物的Shannon多样性指数。李猛等[23]研究发现，氮肥减半配施有机肥处理提高土壤微生物群落物种丰富度，且显著高于常规施氮处理；过量施用化学氮肥降低土壤微生物功能多样性，与本研究结果一致。本研究单施化肥处理显著降低了土壤微生物Shannon多样性指数。夏昕等[7]研究发现，长期单施化肥使红壤性水稻土土壤微生物多样性降低，与本研究结果相似。相关性分析表明，Shannon指数*H*与硝态氮、MBN有显著相关性，均匀度指数*E*与碳氮比、氨态氮、硝态氮、pH均有显著相关性，*AWCD*与有机碳、全氮、碳氮比、铵态氮、硝态氮、pH、MBC、MBN均有显著相关性，说明长期不同施肥措施引起土壤理化因子和微生物学性状发生改变是导致土壤微生物功能多样性产生差异的重要原因，这与已有研究相互印证[23-24]。土壤pH是影响土壤微生物碳源代谢多样性的主要影响因子，长期施用肥料导致了土壤pH下降[25]，进而影响了土壤微生物功能多样性。

Biolog主成分分析显示土壤微生物群落在不同施肥处理下对碳源的响应，是反映土壤微生物群落结构特征的有效手段[26]。31种碳源的因子载荷值分析结果显示，研究区土壤微生物利用的碳源主要为碳水类、羧酸类、氨基酸类和多聚物类。Garland等[2]认为样本空间位置上的不同与微生物利用碳源底物的能力相关联。图2显示，不同施肥措施对第1主成分和第2主成分相关碳源利用能力不同，各处理在PC轴上出现了明显的分异，说明施肥显著改变土壤微生物对碳源的利用特征。单施化肥和氮肥增量配施有机肥处理相对聚集，位于PC1轴的负方向和PC2轴的正方向上，土壤微生物碳源利用功能相似。武晓森等[19]在山东德州的小麦−玉米轮作试验也得到类似结论。本研究表明不同施肥处理对碳源的利用情况存在明显差异，说明连续10 a不同施肥处理对某些特定的土壤微生物进行了富集和驯化[4,23]，促进了喜氮种群代谢活性[25]，抑制了某些种群的正常代谢，从而导致对不同碳源的代谢活性产生影响。综合分析可知，有机肥无机肥配施有利于提高土壤微生物碳代谢活性，在本研究中以氮肥减量配施有机肥处理的微生物活性最高。

本研究比较了长期连续不同施肥措施下华北典型轮作农田土壤微生物群落代谢特征和微生物代谢功能多样性变化，分析探讨了微生物碳源代谢多样性与土壤环境因子之间的相关关系。研究结果可为华北农田施肥管理提供理论依据和数据支持。由于Biolog技术局限性，研究结果具有一定片面性，在未来研究中应结合土壤酶活性变化，并利用高通量测序等分子生物学方法，进一步揭示不同施肥措施对土壤微生物群落结构和多样性的影响。

4 结论

（1）施肥处理的土壤全氮和硝态氮含量显著高于不施肥处理，土壤碳氮比和pH值均显著低于不施肥处理。与不施肥和单施化肥相比，施用有机肥处理显著增加了有机碳和MBN含量。

（2）连续10年有机肥与无机肥配合施用显著提高了土壤微生物碳源代谢活性，改变了土壤微生物对

碳源的利用模式,从而引起土壤微生物碳源代谢多样性的相应改变。氮肥减量配施有机肥处理有利于提高土壤微生物碳源利用能力和功能多样性。

(3)土壤微生物群落代谢特征因施肥措施不同而产生差异,其中氮肥减量配施有机肥与常量化肥配施有机肥土壤微生物群落代谢特征较为相似,与其他施肥处理的土壤微生物代谢特征显著不同。土壤碳氮比、铵态氮、硝态氮、pH和MBN是影响土壤微生物碳源代谢多样性的重要环境因子。

参考文献:

[1] Yang Y D, Ren Y F, Wang X Q, et al. Ammonia-oxidizing archaea and bacteria responding differently to fertilizer type and irrigation frequency as revealed by Illumina Miseq Sequencing[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2018, 18(3):1029-1040.

[2] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole carbon source utilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(18):2351-2359.

[3] 刁婵, 鲁显楷, 田静, 等. 长期氮添加对亚热带森林土壤微生物碳源代谢多样性的影响[J]. 生态学报, 2019, 39(18):6622-6630.
DIAO Chan, LU Xian-kai, TIAN Jing, et al. Effects of long-term nitrogen addition on the metabolic diversity of microbial carbon sources in subtropical forest soils[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(18):6622-6630.

[4] 王伟华, 刘毅, 唐海明, 等. 长期施肥对稻田土壤微生物量、群落结构和活性的影响[J]. 环境科学, 2018, 39(1):430-437.
WANG Wei-hua, LIU Yi, TANG Hai-ming, et al. Effects of long-term fertilization regimes on microbial biomass, community structure and activity in a paddy soil[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(1):430-437.

[5] Yu C, Hu X M, Deng W, et al. Changes in soil microbial community structure and functional diversity in the rhizosphere surrounding mulberry subjected to long-term fertilization[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 86:30-40.

[6] Kumar U, Shanid M, Tripathi R, et al. Variation of functional diversity of soil microbial community in sub-humid tropical rice-rice cropping system under long-term organic and inorganic fertilization[J]. *Ecological Indicators*, 2017, 73:536-543.

[7] 夏昕, 石坤, 黄欠如, 等. 长期不同施肥条件下红壤性水稻土微生物群落结构的变化[J]. 土壤学报, 2015, 52(3):697-705.
XIA Xin, SHI Kun, HUANG Qian-ru, et al. The changes of microbial community structure in red paddy soil under long-term fertilization[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(3):697-705.

[8] 路花, 张美俊, 冯美臣, 等. 氮肥减半配施有机肥对燕麦田土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学杂志, 2019, 38(12):3660-3666.
LU Hua, ZHANG Mei-jun, FENG Mei-chen, et al. Effects of half-reduced nitrogen fertilization combined with organic fertilizer on functional diversity of soil microbial communities in oat field[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(12):3660-3666.

[9] 郭莹, 王一明, 巫攀, 等. 长期施用粪肥对水稻土中微生物群落功能多样性的影响[J]. . 应用与环境生物学报, 2019, 25(3):593-602.
GUO Ying, WANG Yi-ming, WU Pan, et al. Influence of long-term manure application in paddy soil on the functional diversity of microbial community[J]. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2019, 25(3):593-602.

[10] 王敬国, 林杉, 李保国. 氮循环与中国农业氮管理[J]. 中国农业科学, 2016, 49(3):503-517.
WANG Jing-guo, LIN Shan, LI Bao-guo. Nitrogen cycling and management strategies in Chinese agriculture[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(3):503-517.

[11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 2000.
BAO Shi-dan. Soil and agriculture chemistry analysis[M]. 3rd Edition. Beijing:China Agriculture Press, 2000.

[12] 吴金水, 林启美, 黄巧云, 等. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京:气象出版社, 2006.
WU Jin-shui, LIN Qi-mei, HUANG Qiao-yun, et al. Method for measuring soil microbial biomass and its application[M]. Beijing: China Meteorological Press, 2006.

[13] 刘红梅, 张海芳, 皇甫超河, 等. 长期氮添加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(4):709-717.
LIU Hong-mei, ZHANG Hai-fang, HUANGFU Chao-he, et al. Effects of different long-term nitrogen addition on soil microbial diversity of *Stipa baicalensis* steppe in Inner Mongolia, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(4):709-717.

[14] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole carbon source utilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(18):2351-2359.

[15] Hadwin A M, Del Rio L F, Pinto L J, et al. Microbial communities in wetlands of the Athabasca oil sands:Genetic and metabolic characterization[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2006, 55(1):68-78.

[16] 时鹏, 高强, 王淑平, 等. 玉米连作及其施肥对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(22):6173-6182.
SHI Peng, GAO Qiang, WANG Shu-ping, et al. Effects of continuous cropping of corn and fertilization on soil microbial community functional diversity[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(22):6173-6182.

[17] 王楠楠, 韩冬雪, 孙雪, 等. 降水变化对红松阔叶林土壤微生物功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(3):1-9.
WANG Nan-nan, HAN Dong-xue, SUN Xue, et al. Effects of precipitation change on soil microbial functional diversity in the primitive Korean pine and broadleaved forests[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(3):1-9.

[18] Banning N C, Lalor B M, Cookson W R, et al. Analysis of soil microbial community level physiological profiles in native and post-mining rehabilitation forest: Which substrates discriminate? [J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, 56:27-34.

[19] 武晓森, 杜广红, 穆春雷, 等. 不同施肥处理对农田土壤微生物区系和功能的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(1):99-109.

WU Xiao-sen, DU Guang-hong, MU Chun-lei, et al. Effects of different fertilization on structure and function of soil bacterial community [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(1):99-109.

[20] 严君, 韩晓增, 陈旭, 等. 施肥对小麦、玉米和大豆连作土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2019, 37(6):171-177.
YAN Jun, HAN Xiao-zeng, CHEN Xu, et al. Effects of fertilization on soil microbial community and functional diversity under continuous cropping of wheat, maize and soybean[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2019, 37(6):171-177.

[21] 张瑞, 张贵龙, 陈冬青, 等. 不同施肥对农田土壤微生物功能多样性的影响[J]. 中国农学通报, 2013, 29(2):133-139.
ZHANG Rui, ZHANG Gui-long, CHEN Dong-qing, et al. The effects of different fertilization on the functional diversity of soil microbial community[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(2):133-139.

[22] 翟辉, 张海, 张超, 等. 黄土峁状丘陵区不同类型林分土壤微生物功能多样性[J]. 林业科学, 2016, 52(12):84-91.
ZHAI Hui, ZHANG Hai, ZHANG Chao, et al. Soil microbial functional diversity in different types of stands in the hilly-gully regions of Loess Plateau[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, 52(12):84-91.

[23] 李猛, 张恩平, 张淑红, 等. 长期不同施肥设施菜地土壤酶活性与微生物碳源利用特征比较[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(1):44-53.
LI Meng, ZHANG En-ping, ZHANG Shu-hong, et al. Comparison of soil enzyme activities and microbial C metabolism in installed vegetable fields under long-term different fertilization[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2017, 23(1):44-53.

[24] 张婷, 孔云, 修伟明, 等. 施肥措施对华北潮土区小麦-玉米轮作体系土壤微生物群落特征的影响[J]. 生态环境学报, 2019, 28(6):1159-1167.
ZHANG Ting, KONG Yun, XIU Wei-ming, et al. Effects of fertilization treatments on soil microbial community characteristics under the wheat-maize rotation system in fluvo-aquic soil region in North China [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2019, 28(6):1159-1167.

[25] 朱凡, 李天平, 郁培义, 等. 施氮对樟树林土壤微生物碳源代谢的影响[J]. 林业科学, 2014, 50(8):82-89.
ZHU Fan, LI Tian-ping, YU Pei-yi, et al. Carbon source utilization of soil microbial communities in response to nitrogen addition in the *Cinnamomum camphora* plantation[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, 50(8):82-89.

[26] 高明霞, 孙瑞, 崔全红, 等. 长期施用化肥对塿土微生物多样性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(6):1572-1580.
GAO Ming-xia, SUN Rui, CUI Quan-hong, et al. Effect of long-term chemical fertilizer application on soil microbial diversity in anthropogenic loess soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21(6):1572-1580.