植物营养与肥料学报 2014,20(5):1186-1193
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer doi: 10.11674/zwyf.2014.0515

长期施肥对植烟土壤微生物的影响

杨宇虹[1], 晋 艳[1], 黄建国[2], 段玉琪[1], 徐照丽[1], 袁 玲[2*]
(1 云南省烟草农业科学研究院, 云南玉溪 650032; 2 西南大学资源环境学院,四川重庆 400716)

摘要:【目的】微生物是土壤的重要组成分,与土壤养分转化供应密切相关。本研究利用12年肥料定位试验研究了云南植烟土壤可培养微生物数量、微生物量碳氮、标记性磷脂脂肪酸(PLFAs)、微生物种群特征及有益微生物的变化。**【方法】**试验设置不施肥(CK)、单施化肥(CF)和化肥配施有机肥(CFM)处理,在烟株旺长期,采集0—20 cm耕作层土壤,测定了微生物量碳、氮含量,微生物标记磷脂脂肪酸(PLFAs)含量和可培养微生物数量;鉴定自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的数量;根据PLFAs计算了微生物种群特征值。**【结果】**有机无机肥配施处理的土壤中,可培养细菌比不施肥土壤增加了6.14倍、真菌增加了2.30倍、放线菌增加了1.56倍,增幅显著高于化肥处理;施肥显著提高土壤微生物量碳、氮量。化肥和有机无机肥配合处理土壤的微生物量碳分别比CK增加了71.8%和246%;不同施肥处理土壤微生物量碳/氮比值显著不同,分别为14.8(CK)、13.3(CF)和11.2(CFM)。微生物标记性PLFAs含量以化肥有机肥配合处理最高,化肥处理次之,CK最低。化肥、化肥配施有机肥处理土壤细菌PLFAs比对照分别增加了25.41%和87.66%,真菌PLFAs分别增加了15.59%和39.24%,化肥处理代表放线菌的PLFAs降低了24.63%,化肥配施有机肥处理增加了83.86%,表明施肥尤其是化肥配施有机肥改善了土壤环境,促进了微生物的生长繁殖,并改变了土壤微生物种群结构;施肥处理土壤中微生物群落多样性指数上升,化肥处理还提高了微生物的优势度指数,说明施肥有益于增加微生物的种群数量,化肥配施有机肥处理显著提高了无机磷细菌和钾细菌的数量,两者分别比对照增加了1.15倍和1.02倍,化肥处理则相反,自生固氮菌和无机磷细菌数量分别比CK降低了56.69%和41.30%;化肥配施有机肥处理土壤中的自生固氮菌、磷细菌和钾细菌共有20个属,CK土壤有19个属,化肥处理土壤仅16个属。**【结论】**CFM促进微生物生长繁殖,增加种群多样性,有益于微生物固氮、溶磷、解钾,对于提高肥料利用率和保持土壤健康有重要意义。在烟叶栽培过程中,提倡化肥与有机肥配合施用很有必要。

关键词: 烤烟; 施肥; 土壤微生物
中图分类号: S154.38 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2014)05-1186-08

Effects of long-term fertilization on soil microorganisms in tobacco fields

YANG Yu-hong[1], JIN Yan[1], HUANG Jian-guo[2], DUAN Yu-qi[1], XU Zhao-li[1], YUAN Ling[2*]
(*1 Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Yuxi, Yunnan 650032, China;*
2 College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing, Sichuan 400716, China)

Abstract:【Objectives】Microbes are important components of soils because they participate in nutrient turnover and supplies. A 12-year field experiment was used to investigate the effects of different fertilization on the soil cultural microorganisms, microbial biomass carbon(C) and nitrogen(N) contents, labeled phospholipid fatty acids (PFLAs) contents, microbial groups and beneficial microorganisms in tobacco cultivated fields. **【Methods】**The soils from the three treatments were used: no fertilizer (control), single chemical fertilizer (CF) and combined chemical fertilizer and manure (CFM). Cultivated soils (0-20 cm) were sampled at the fast growing period of tobacco. Microbial biomass carbon and nitrogen, labeled phospholipid fatty acids of microbes were determined. The character values of microbial community including diversity, evenness and dominant indexes were calculated according to the corresponding content of PLFAs, the number of microorganisms were measured, the *azotobacteria*,

收稿日期: 2013-07-23 **接受日期:** 2013-11-28
基金项目: 中国烟草总公司科技项目(110201102008);云南省烟草专卖局(公司)科技项目(2011YN08,2013YN11,2012yn55)资助。
作者简介: 杨宇虹(1963—),女,云南大理人,研究员,主要从事烟草营养与烟叶品质方面的研究。E-mail: toyyred@263.net
* 通信作者 E-mail: lingyuanh@yahoo.com.cn

phosphobacteria and potassium bacteria were indentified by microscope together with physiological and biochemical reactions. 【**Results**】 The results showed more cultural microorganisms existed in the soil treated with CFM than with CF. Compared to CK, CFM increased the bacteria population by 6.14 times, fungi by 2.30 times and actinomycetes by 1.56 times, respectively, CF increased those obvious less than CFM. Fertilization also increased microbial biomass C and N contents. The microbial biomass C with CFM was increased by 2.46 times and 71.8% with CF than that with CK. The ratio of microbial biomass C to N changed with different treatments. CK showed the highest ratio (14.8), followed by CF (13.3) and the lowest with CFM (11.2). The total PFLAs in the soil with CFM is higher than soils with CF and CK. Compared with CK soil, the bacterial and the fungal PFLAs were increased by 25.41% and 15.59%, but the actinomycetal PFLAs was decreased by 24.63% in CF soil; all the bacterial, fungal and actinomycetal PFLAs were increased by 87.66%, 39.24% and 83.86% respectively in CFM soil. The phosphobacteria in the CFM soil was 1.15 times and potassium bacteria 1.02 times higher than those in CK soil, while the azotobacteria in CF soil was decreased by 56.69% and phosphobacteria by 41.30% than those in CK soil. There are totally 20 genera of azotobacteria, phosphobacteria and potassium bacteria in CFM soil, 19 genera in CK soil and 16 genera in CF soil. 【**Conclusions**】 Combined use of chemical and organic fertilizer in long-term promotes the microbial growth, reproduction and their biodiversity, resulting high fertilizer use efficiency and healthy soil with strong resistance to the potential decrease in microbial groups after a long-term application of chemical fertilizers. The chemical fertilizer plus manures in the tobacco cultivation should be advocated.

Key words: flue-cured tobacco; fertilization; soil microorganism

在烤烟栽培过程中，施肥显著影响烟叶产量、产值和香气[1]，单施化肥和化肥有机肥配合施用是目前采用的主要施肥方式。长期定位试验表明，单施化肥短期内不造成烟叶减产和质量降低，但不利于培肥土壤和烤烟的可持续生产[2]。

化肥配施有机肥能提供土壤微生物需要的碳源和氮源，显著提高微生物量碳和氮[3-4]。长期大量施用化肥可增加含 iC15∶0 磷脂脂肪酸的细菌种群；长期施用有机肥和秸秆还田则相反，但可增加含 aC15∶0 的细菌种群[5]。利用 Biolog 进行的研究表明，在氮、磷、钾长期平衡施肥的稻田土壤中，微生物活性强、代谢快[6]。通过 PCR-DGGE 分析结果显示，在长期氮、磷、钾无机肥配施有机肥处理的土壤中，微生物多样性指数最大、细菌种类最多，显著高于不施肥的处理[3]。因此，施肥显著影响土壤微生物的数量、种群和多样性。土壤微生物是土壤的主要组成部分，驱动土壤新陈代谢和生物化学反应，与土壤养分的转化供应密切相关。在多数情况下，土壤微生物活性与土壤有效氮的含量呈正相关；在有机质含量较高的土壤中，微生物活性与土壤磷的生物有效性密切相关[7-8]。因而土壤微生物活性可视为土壤健康和肥力的重要指标之一[9]。施肥通过影响土壤微生物活动，进而影响土壤养分的转化、供应和作物生长发育。

自上世纪九十年代以来，我国在主要农业生产区域建立了长期肥力肥效监测基地，大量报道了施肥对水稻土、潮土、黑土、黄土、黑钙土和红壤等土壤微生物的长期作用[3-6,10]。云南是我国烤烟主产区，当地红壤的成土母质和理化及生物学性质显著不同于我国其它地区的红壤。由于施肥对植烟土壤微生物影响方面的研究还少有报道，为此，本试验利用云南省烟草农业科学研究院云南玉溪研和试验基地的长期肥料试验，研究了长期单施无机肥与长期无机肥和有机肥配施对土壤微生物的影响，旨在为烤烟科学施肥和土壤培肥提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验地概况

云南省烟草农业科学研究院云南玉溪研和试验基地位于北纬 24°14′，东经 102°30′，海拔高度 1680 m，年平均温度 15.9℃，年降水量 918 mm，雨季（4～9 月）降水量占全年的 79.5%，年日照时数 2072 h，雨季（4～9 月）日照时数占全年的 41%。长期定位试验始于 1998 年，供试土壤为云南省典型的具有代表性的砂质红壤。土壤 pH 6.4，有机质含量 10.70 g/kg、全氮 0.54 g/kg、全磷 1.01 g/kg、全钾 6.43 g/kg、有效氮 82 mg/kg、有效磷 90 mg/kg、速效钾 160 mg/kg。

1.2　试验处理

试验地采用烤烟-小麦种植制度，设 3 个处理：

不施肥(CK);单施化肥(CF);化肥有机肥配施(CFM)。小区面积15.4 m^2,3次重复,随机区组排列。CF处理的施氮量为75 kg/hm^2,由N:P_2O_5:K_2O=10:10:25的烤烟专用肥提供;CFM处理的70%的养分由上述烤烟专用肥提供,30%的氮来源于腐熟厩肥。施肥处理中,全部有机肥作基肥,化肥的1/3作基肥,2/3于移栽后15～20 d追施。田间管理和收烤均同当地大田生产。

1.3 土样采集与分析

在烟株旺长期,采集0—20 cm的耕作层,去除植物残体、砾石等,置于4℃冰箱保存备用。采用氯仿熏蒸(0.5 mol/L K_2SO_4提取土壤,$K_2Cr_2O_7$氧化法测定微生物量碳,凯氏定氮法测定微生物量氮[11]。微生物磷脂脂肪酸(phosphor lipid fatty acids,简称PLFAs,下同)的提取、分析和命名参照Frostegard和Kourtev的方法[12-13]。用"X:YωZ"表示PLFAs分子式,其中X代表脂肪酸分子的C原子总数,Y代表不饱和烯键的数目,ω代表烯键距离羧基的位置,Z为烯键的位置。

土壤中的细菌(牛肉膏蛋白胨琼脂培养基)、真菌(马丁氏琼脂培养基)、放线菌(高氏一号琼脂培养基)以及自生固氮菌(Ashby无氮琼脂培养基)、磷细菌(磷酸钙+植酸培养基)、钾细菌(铝土矿琼脂培养基)等[14]用常规分离计数法。

通过形态和生理生化反应等将自生固氮菌、磷细菌和钾细菌鉴定至属[13],包括革兰氏和芽孢染色,好氧性测定;并对氧化酶、过氧化氢酶、MR和VP反应;葡萄糖氧化,甘乳醇和乳糖发酵;脲素、淀粉和明胶分解;H_2S和吲哚产生,柠檬酸盐利用等指标进行测定。

1.4 土壤微生物种群特征参数的计算

利用PLFAs计算土壤细菌、真菌和放线菌及其菌落数,计算土壤自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的种群特征值。Shannom-Wiener多样性指数H的计算公式为:$H = -\sum P_i \ln P_i$,式中$P_i = N_i/N$,N_i为属i的单菌落数(或PLFAs含量),N为土样的总单菌落数(或PLFAs总含量)。Pielou均匀度指数J的计算公式为:$J = -\sum P_i \ln P_i / \ln S$,其中$S$为属$i$(或PLFAs)所在土样中的属(或PLFAs)数目。Simpson优势度指数D的计算公式为:$D = 1 - \sum P_i^2$[15]。

1.5 数据分析

试验数据用Excel进行计算,SPSS 16.0软件进行统计分析及显著性水平检验。

2 结果与分析

2.1 土壤可培养微生物数量

在植烟土壤中,可培养细菌最多,真菌次之,放线菌最少;施肥显著提高了可培养细菌、真菌和放线菌数量(细菌例外,CF与CK处理相似)。在CFM处理的土壤中,可培养微生物数量显著高于CF处理。可培养细菌、真菌、放线菌数量CFM分别比CK增加了6.14倍、2.30倍、1.56倍(表1)。

表1 植烟土壤可培养细菌、真菌和放线菌的数量

Table 1 Numbers of bacteria, fungi and actinomycetes in soil grown with flue-cured tobacco

处理 Treatment	细菌 Bacteria ($\times 10^7$ cfu/g, dry soil)	真菌 Fungi ($\times 10^4$ cfu/g, dry soil)	放线菌 Actinomycete ($\times 10^3$ cfu/g, dry soil)
CK	2.1 b	1.2 c	2.5 c
CF	4.3 b	5.4 b	8.7 b
CFM	30.7 a	17.8 a	22.3 a

注(Note):同列数据后不同字母表示处理间差异达5%显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

2.2 土壤微生物量碳和微生物量氮

从表2可以看出,施肥显著提高土壤微生物量碳、氮,尤以CFM处理最为显著。在CF和CFM处理的土壤中,微生物量碳分别比CK增加了71.8%和2.46倍。值得注意的是,在不同施肥的土壤中,微生物量碳/氮比显著不同,分别为14.8(CK)、13.3(CF)和11.2(CFM)。

2.3 土壤微生物标记性PLFAs组成及含量

表3可见,在CK、CF和CFM处理的土壤中,分别检测到17、19和22种土壤微生物的标记性PLFAs,包括细菌(12:00、i14:0、i15:0、a15:0、15:00、14:02OH、14:03OH、i16:0 c、16:1 c、16:00、a16:0 2OH、i17:0、17:1ω6,c、a17:0、17:0 c、18:1ω7 c、17:00、20:00)、放线菌(10Me 17:0、10Me18:0)

表 2　施肥对土壤微生物量碳和氮的影响(μg/g, dry soil)
Table 2　Effect of the fertilization on carbon and nitrogen in soil microorganisms

处理 Treatment	微生物量碳 Micro-biomass C	微生物量氮 Micro-biomass N	微生物量碳/氮 Micro-biomass C/N
CK	56.7 c	3.82 c	14.8 c
CF	97.4 b	7.31 b	13.3 b
CFM	186.5 a	16.7 a	11.2 a

注(Note):同列数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平。Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

和真菌(18:1ω9 c、18:8ω9, 12)土壤微生物的标记性 PLFAs。

从土壤微生物标记性 PLFAs 总量看,CFM 处理的土壤最高,CF 次之,CK 最低。其中,与 CK 相比,代表细菌的 PLFAs,分别增加了 40.49%(CF)和 105.91%(CFM);代表真菌的 PLFAs 分别增加了 15.59%(CF)和 39.24%(CFM);代表放线菌的 PLFAs 分别增加了 -28.56%(CF)和 33.65%(CFM)。此外,各 PFLAs 的增减变化因其种类和施肥处理不同而异。

2.4　植烟土壤细菌、真菌、放线菌的种群特征

利用 PLFAs 计算获得的植烟土壤细菌、真菌和放线菌种群特征值如表 4 所示。施肥显著提高了土壤微生物多样性指数,但 CF 和 CFM 处理之间无显著差异。土壤微生物的均匀度指数 CK 处理最高,达到 1.7385,CF 和 CFM 显著低于 CK 处理,但 CF 和 CFM 处理的均匀度指数相似。CF 处理与 CK 相比土壤微生物优势度指数明显提高,但 CFM 对优势度指数无显著影响。

2.5　土壤有益微生物

2.5.1 有益微生物数量　从表 5 可以看出,CFM 处理对自生固氮菌数量无显著影响,但显著提高了土壤无机磷细菌和钾细菌的数量,分别比不施肥(CK)处理增加了 1.15 倍和 1.02 倍。在 CF 处理的土壤中,自生固氮菌和无机磷细菌数量分别比不施肥降低了 56.69% 和 41.30%,但钾细菌与 CK 无显著差异。

2.5.2 属群的鉴定　用无菌水提取供试土壤(水:土=10:1),再稀释 100 倍。在各处理的土壤中,自生固氮菌、无机磷细菌和钾细菌的菌落总数 CFM 最高,CK 次之, CF 最低,分别为 226、189 和 144 个(表 6)。

表 3　不同施肥处理土壤 PLFAs 的组成及含量(μg/g)
Table 3　Types and concentrations of PLFAs in different fertilization treatments

磷脂脂肪酸 PLFA	处理 Treatment		
	CK	CF	CFM
12:00	1.23 b	—	2.56 a
i14:0	5.22 a	3.04 a	4.15 a
i15:0	9.45 c	19.42 b	28.22 a
a15:0	15.28 b	14.45 b	26.15 a
15:00	2.34 a	—	1.43 b
14:02OH	—	2.27 a	2.34 a
14:03OH	—	4.17 a	—
i16:0 c	5.01 c	7.12 b	12.44 a
16:1 c	—	2.55 b	4.67 a
16:00	—	5.45 a	4.24 a
16:0 2OH	5.91a	6.12 a	5.88 a
i17:0	2.15 b	4.34 a	3.87 a
17:1ω6,c	—	5.12 b	8.34 a
a17:0	3.41b	—	4.17 a
17:0 c	—	2.32 b	5.22 a
18:1ω7 c	13.26 b	15.66 b	21.27 a
17:00	3.48 b	6.65 a	7.24 a
10Me 17:0	5.18 a	4.45 a	7.02 a
18:8ω9,12	3.27 a	3.42 a	4.08 a
18:1ω9 c	4.17 b	5.18 ab	6.28 a
10Me18:0	17.26 b	12.46 c	24.07 a
19:0 c9,10	10.62 b	13.04 ab	17.26 a
20:00	2.14 b	—	4.35 a
总量 Total PLFAs	109.4	137.2	205.3

注(Note):"—"—未检出 Not detected. i、a、c、y 和 Me 分别表示异丙基、反异丙基、环丙基和甲基分支脂肪酸 i,a,c,y and Me mean iso, anteisor, cyclopropyl and methyl branching fatty acids, respectively; ω 表示出现双键, c 和 t 分别表示该双键为顺式构型和反式构型 ω, c and t indicate the bivalence location, cis-configuration and trans-configuration, respectively. 同行数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a row are significant among treatments at the 5% level.

表4 基于PLFAs的土壤微生物种群特征值

Table 4 Character values of soil microbial colonies calculated from PLFAs

处理 Treat.	多样性指数 Diversity index	均匀度指数 Homogeneity index	优势度指数 Dominance index
CK	2.5826 b	1.7385 a	0.9088 b
CF	2.7313 a	1.4988 b	0.9221 a
CFM	2.7295 a	1.3834 b	0.9198 ab

注(Note):同列数据后不同字母表示处理间差异达5%显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

表5 植烟土壤自生固氮菌、无机磷细菌和钾细菌数量 (cfu $\times 10^3$/g, dry soil)

Table 5 Numbers of azotobacteria, phosphorbacteria and potassium bacteria in soil grown with flue-cured tobacco

处理 Treatment	自生固氮菌 Azoto-bacteria	无机磷细菌 Phosphor-bacteria	钾细菌 potassium bacteria
CK	5.3 a	4.6 b	4.1 b
CF	2.3 b	2.7 c	3.4 b
CFM	4.8 a	9.9 a	8.3 a

注(Note):同列数据后不同字母表示处理间差异达5%显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

通过形态和生理生化反应鉴定表明,在供试土壤中,自生固氮菌、无机磷细菌和钾细菌均分别属于20个属。其中,自生固氮菌有4个属,为固氮单胞菌属(*Azomonas*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)。无机磷细菌有11个属,为产碱菌属(*Alcaligenes*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、假单胞菌杆属(*Pseudomonas*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、沙雷氏菌属(*SerratiaBizio*)、分支杆菌属(*Mycobacterium*)、欧文氏杆菌(*Erwinia*)、色杆菌属(*Achromobacter*)。钾细菌有5个属,为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)和埃希氏菌属(*Escherichia*)。需要指出的是,在CFM处理的土壤中,自生固氮菌、磷细菌和钾细菌有20个属,CK土壤有19个属,CF土壤仅16个属。在鉴定的20个属中,因菌属不同,在土壤中的分离率也不一样。其中分离率最高的是芽孢杆菌属,占总菌落数的44.97%~50.69%。在自生固氮菌中,芽孢杆菌占51.11%~58.33%;在无机磷细菌中,芽孢杆菌占38.83%~45.07%;在钾细菌中,芽孢杆菌占51.02%~55.10%。

3 讨论与结论

烤烟是需肥量较大的作物,在种植过程中其化肥用量远远高于小麦、玉米、红薯等粮食作物。长期大量施用化肥会产生一系列的生态环境问题,如土壤板结、肥料利用率降低、水体富营养化等[16]。在植烟土壤中,可培养微生物数量(常规分离计数)、微生物量碳和氮以及PLFAs总量等不施肥(CK)处理最低,单施化肥(CF)次之,化肥与有机肥配施(CFM)最高,表明施肥尤其是化肥与有机肥配施能显著提高土壤微生物数量,有益于土壤养分的转化供应,提高生物有效性。在种植玉米和水稻的土壤中,施用有机肥提高了土壤微生物量碳和氮,并随着有机肥用量的增加而提高[17-18]。在棉田土壤中,施用化肥和有机肥显著增加细菌、真菌和放线菌等微生物的数量[19]。在施用化肥、秸秆还田及化肥配施有机肥的稻田土壤中,土壤微生物量碳和PLFAs总量显著高于不施肥的土壤[5]。施肥显著增加土壤微生物的原因可能是提高了作物生物量,归还土壤的枯枝落叶和根茬也相应增加。化肥与有机肥配施(CFM)处理不仅直接增加土壤有机质,同时又提供丰富的氮素,增加微生物需要的营养和能源物质,更加适合土壤微生物的生长繁殖[20]。位于我国西南地区的云南烟区,人多地少,烤烟连作现象比较普遍,为了防治病原微生物传播,烟叶收后植株残体全部取走。因此,单施化肥(CF)归还土壤的有机物极少,这可能是土壤微生物显著低于CFM处理的原因之一。

在植烟土壤中,可培养微生物数量、微生物量碳和氮以及PLFAs总量均表现出一致性的变化,说明它们都能指示土壤微生物的数量。但是,在CFM处理的植烟土壤中,细菌、真菌和放线菌总数比不施肥(CK)处理增加了7.92~13.83倍,微生量碳和氮分别增加了2.29倍和3.37倍,PLFAs总量增加了87.66%。说明常规分离获得的可培养微生物数量对施肥处理的响应最敏感,微生物量碳和氮次之,PLFAs总量最小,故微生物常规分离培养计数可灵敏地指示土壤微生物的数量变化,但常规分离计数需及时操作,方法繁琐,工作量大,耗时长。微生物

表 6　烤烟根际自生固氮菌、磷细菌和钾细菌的属群鉴定

Table 6　Identification of azotobacteria, phosphorbacteria and potassium bacteria in soil grown with flue-cured tobacco

细菌类群 Bacteria groups	属名 Genus	处理 Treatment		
		CK	CF	CFM
自生固氮菌 Azotobacteria	芽孢杆菌属（*Bacillus*）	20	14	23
	固氮菌属（*Azotobacter*）	9	6	11
	固氮单胞菌属（*Azomonas*）	5	2	6
	拜叶林克氏菌属（*Beijerinckia*）	3	2	5
	菌落小计 Σ	37	24	45
无机磷细菌 Phosphorbacteria	芽孢杆菌属（*Bacillus*）	40	32	45
	假单胞菌杆属（*Pseudomonas*）	30	15	23
	黄杆菌属（*Flavobacterium*）	4	6	5
	产碱菌属（*Alcaligenes*）	11	7	14
	微球菌属（*Micrococcus*）	2	4	3
	黄单胞菌属（*Xanthomonas*）	6	4	5
	固氮菌属（*Azotobacter*）	1	0	5
	分支杆菌属（*Mycobacterium*）	0	0	2
	沙雷氏菌属（*SerratiaBizio*）	3	2	2
	欧文氏杆菌属（*Erwinia*）	2	0	4
	色杆菌属（*Achromobacter*）	4	1	7
	菌落小计 Σ	103	71	115
钾细菌 Potassium bacteria	芽孢杆菌属（*Bacillus*）	25	27	34
	欧文氏菌属（*Erwinia*）	5	4	6
	假单胞杆菌属（*Pseudomonas*）	17	15	21
	芽孢乳杆菌属（*Sporolactobacillus*）	1	3	2
	埃希氏菌属（Escherichia）	1	0	3
	菌落小计 Σ	49	49	66
菌落总数 Total colonies		189	144	226

注(Note)：表中数据为分离获得的菌落数(用 10∶1 的无菌水提取土壤,再稀释 100 倍)Data in the table indicate the total colonies, which is obtained by the sterilized water extraction (soil∶water = 1∶10) and then is diluted 100 times.

碳和氮表示微生物整个细胞的固有成分,PLFAs 是微生物细胞膜的重要组成,约为干重的 5%,并只能存在于活细胞中,细胞死后立即迅速分解。利用微生物量碳和氮以及 PLFAs 估算微生物生物量对样品保存时间要求不高,操作简单,可快速、方便、准确地进行定量分析。因此,在土壤微生物研究中,应将传统与现代方法有机结合。

在不同施肥的土壤中,微生物量 C/N 显著不同,喻示着土壤微生物种群结构差异显著。本试验中,在 CK、CF 和 CFM 处理的土壤中,分别检测出 17、19 和 22 种微生物标记性 PFLAs,各 PFLAs 的增减变化也因其种类和施肥处理不同而异,与前人的研究结论类似[3,5-6]。施肥显著提高土壤微生物群落的多样性指数。在通常情况下,生态环境良好,生物群落稳定,物种丰富,故生物群落的多样性指数是评价生态环境的优劣的重要指标之一[21-22]。有理由认为,在烤烟种植过程中,施肥尤其是化肥与有机肥配施可以改善土壤生态环境。此外, CF 处理提

高土壤微生物优势度指数,表明化肥对土壤微生物具有选择富集作用,适者迅速生长繁殖,否则受到抑制。因此,长期单施化肥存在减少土壤微生物种群的风险。

从有益微生物(自生固氮菌、无机磷细菌和钾细菌)的数量看,尽管化肥与有机肥配施(CFM)对自生固氮菌数量影响不大,但显著提高了土壤无机磷细菌和钾细菌的数量;相反,单施化肥降低自生固氮菌和无机磷细菌数量。说明化肥与有机肥配施总体上促进土壤有益微生物的繁殖生长,CF处理则产生抑制作用。众所周知,在养分投入量相等,化学氮肥在土壤中迅速释放,高浓度的 NH_3 抑制固氮菌和无机磷细菌的繁殖生长[19]。需要指出的是,大多数自生固氮菌、无机磷细菌和钾细菌都属于根际促生细菌,能分泌生长活性物质,如生长素、细胞分裂素、玉米素等,进而促进植物生长[23-25]。化肥与有机肥配施不仅直接提供植物营养,而且还促进植物生长,增加生物固氮,活化土壤无机磷,提高肥料利用率。此外,在化肥与有机肥配施的土壤中,自生固氮菌、无机磷细菌和钾细菌共有20个属,不施肥土壤为19个属,单施化肥土壤仅16个属,说明单施化肥不仅降低了土壤有益微生物菌落数,而且减少了它们的属数量,长期单施化肥不益于土壤健康。

总之,在化肥与有机肥配施的土壤中,微生物尤其是有益微生物的数量和种群结构总体上优于单施化肥。因此在烟叶生产中,应提倡化肥与有机肥配施。

参考文献:

[1] 王东胜,刘贯山,李章海. 烤烟栽培技术[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,2002.
Wang D S, Liu G S, Li Z H. Tobacco cultivation[M]. Hefei: Press of China Science and Technology University, 2002.

[2] 朱红根,程小强,凡中良,等. 不同有机无机肥处理对烤烟生长及产量质量的影响[J]. 安徽农学通报,2012,18(23):77-80.
Zhu H G, Cheng X Q, Fan Z L *et al*. Effects of different organic and inorganic fertilizer on yield and quality of tobacoo[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2012, 18(23): 77-80.

[3] 刘恩科,赵秉强,李秀英,等. 不同施肥制度土壤微生物量碳氮变化及细菌群落16S rDNA V3片段PCR产物的DGGE分析[J]. 生态学报,2007,27(3):1079-1085.
Liu E K, Zhao B Q, Li X Y *et al*. Microbial C and N biomass and soil community analysis using DGGE of 16SrDNA V3 fragment PCR products under different long-term fertilization systems[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(3): 1079-1085.

[4] 杨劲峰,韩晓日,阴红彬,等. 不同施肥条件对玉米生长季耕层土壤微生物量碳的影响[J]. 中国农学通报,2006,22(1):173-175.
Yang J F, Han X R, Yin H B *et al*. Effect of different fertilization treatments on the soil microbial biomass carbon of maize[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(1): 173-175.

[5] 卜洪震,王丽宏,尤金成,等. 长期施肥管理对红壤稻田土壤微生物量碳和微生物多样性的影响[J]. 中国农业科学,2010,43(16):3340-3347.
Bu H Z, Wang L H, You J C *et al*. Impact of long-term fertilization on the microbial biomass carbon and soil microbial communities in paddy red soil[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(16): 3340-3347.

[6] 张奇春,王光火,方斌. 不同施肥处理对水稻养分吸收和稻田土壤微生物生态特性的影响[J]. 土壤学报,2005,42(1):116-121.
Zhang Q C, Wang G H, Fang B. Influence of fertilization treatment on nutrients uptake by rice and soil ecological characteristics of microorganism in paddy field[J]. Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(1): 116-121.

[7] Garland J I. Analytical approaches to the characterization source utilization[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1995, 28: 213-221.

[8] Powlson D S, Brookes P C, Chriscensen B T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1987, 19: 59-64.

[9] Sing J S, Stivastava S C. Microbial biomass acts as a source of plant nutrients in dry tropical forest and savanna[J]. Nature, 1989, 338: 499-500.

[10] 隋跃宇,张兴义,焦晓光. 不同施肥制度对玉米生育期土壤微生物量的影响[J]. 中国生态农业学报,2007,15(3):52-54.
Sui Y Y, Zhang X Y, Jiao X G. Effect of different fertilizer application strategies on soil microbial biomass during corn growth periods[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2007, 15(3): 52-54.

[11] Bookes P C, Andrea L, Pruden G *et al*. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial nitrogen in soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1985, 12(6): 837-842.

[12] Frostegard A, Baath E, Tunlid A. Shift in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipids fatty acid analysis[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1993, 25(6): 723-730.

[13] Kourev P S, Ehrenfeld J G, Haggelom M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil[J]. Ecology, 2002, 83: 3152-3166.

[14] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京:科学出版社,1985.
Soil Institute of Nanjing, Academy of Sciences of China. Method of soil microorganism research[M]. Beijing: Science Press, 1985.

[15] Diker K, Heermann D F, Bausch W C *et al.* Shannon-Wiener's diversity index for linking yield monitor and remotely sensed data for corn[J]. Transactions of ASAE, 2004, 47(4): 1347-1354.

[16] 周晓燕. 我国土壤污染因素分析与防治对策探讨[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2011.
Zhou X Y. Discussion on analysis and prevention countermeasures of soil pollution in China[D]. Jinan: Ms thesis of Shandong University, 2011.

[17] Böhme L, Langer U, Böhme F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2005, 109: 141-152.

[18] Yao H, He Z, Wilson M J, Campbell C D. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use[J]. Microbial Ecology, 2000, 40: 223-237.

[19] 罗明, 文启凯, 陈全家, 等. 不同用量的氮磷化肥对棉田土壤微生物区系及活性的影响[J]. 土壤通报, 2000, 31(2): 66-69.
Luo M, Wen Q K, Chen Q J. Influence of nitrogen and phosphorus fertilizers on communities and activities of microorganisms in cotton-grown fields[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2000, 31(2): 66-69.

[20] Kautz T, Wirth S, Ellmer F. Microbial activity in a sandy arable soil is governed by the fertilization regime[J]. European Journal of Soil Biology, 2004, 40 (2): 87-94.

[21] 汪诗平, 李家宏, 王艳芬, 等. 不同放牧率对内蒙古冷蒿草原植物多样性的影响[J]. 植物学报, 2001, 43(1): 89-96.
Wang S P, Li J H, Wang Y F *et al.* Influence of different stocking rates on plant diversity of *Artemisia frigida* community in Inner Mongolia steppe[J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(1): 89-96.

[22] 孔滨, 孙波, 郑宪清, 等. 水热条件和施肥对黑土中微生物群落代谢特征的影响[J]. 土壤学报, 2009, 46(1): 100-106.
Kong B, Sun B, Zeng X Q *et al.* Influence of water, temperature and fertilization on microbial colonies and metabolism in black soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2009, 46(1): 100-106.

[23] 徐进, 王玉珍, 罗兰景, 等. 肌醇与硝酸银对霍霍巴多芽苗增殖的促进作用简报[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(2): 77-78.
Xu J, Wang Y Z, Luo L J *et al.* Effect of inositol and Ag$(NO_3)_2$ on the shoot proliferation of Jojoba cultured in vitro[J]. Journal of Chinese Agroecosystem, 2005, 13(2): 77-78.

[24] 王振澜, 简庆德. 植物细胞肌醇类成分之生理功能及生物活性[J]. 台湾林业研究专讯, 2004, 11(6): 13-15.
Wang Z L, Jian Q D. Physiological functions and activities of inositols in plant cells[J]. Taiwan Forest Journal, 2004, 11(6): 13-15.

[25] Katarina H. Soil microbial community structure in relation to vegetation management on former agricultural land[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(9): 1299-1307.