

# 玉米免耕秸秆覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响<sup>1</sup>

董立国<sup>1</sup>, 袁汉民<sup>1\*</sup>, 李生宝<sup>1</sup>, 袁海燕<sup>3</sup>, 潘占兵<sup>1</sup>

(1. 宁夏农林科学院, 宁夏银川, 750002; 3. 宁夏气象研究所, 宁夏银川, 750002)

**摘要:** 为了研究免耕对土壤微生物功能多样性的影响, 本项试验运用 Biolog-ECO 检测手段, 对连续 2 年的玉米 (*Zea mays* L) 保护性耕作试验全部秸秆覆盖免耕和常规耕作 2 种耕作处理的土样进行了土壤微生物功能多样性研究。试验表明: (1) 免耕土壤微生物对碳源利用率以及不同碳源利用率高于常规耕作, 免耕对总体碳源利用率平均值比常规耕作高 53.1%; (2) 免耕土壤微生物丰富度指数、多样性指数显著高于常规耕作, 免耕微生物群落丰富度指数  $22.33 \pm 0.57$ , 多样性指数  $3.02 \pm 0.04$ , 常规耕作微生物群落丰富度指数  $14.33 \pm 1.15$ , 多样性指数  $2.56 \pm 0.12$ 。免耕秸秆覆盖耕作措施促进了土壤微生物活性、增加土壤微生物数量。

**关键词:** 免耕, 玉米秸秆, 土壤微生物, 生态板, 宁南山区

免耕是保护性耕作中一种重要的耕作形式, 它具有保持土壤水分, 增加土壤养分、防止沙尘暴等功能<sup>[1, 2]</sup>, 土壤微生物既是土壤形成的作用者, 又是土壤的重要组成份<sup>[3]</sup>, 是土壤养分循环的主要驱动者之一, 土壤微生物功能多样性是反映不同土壤类型土壤质量的指标之一, 目前已有关于不同森林恢复类型土壤微生物群落的影响研究<sup>[4]</sup>、不同培肥措施下茶园土壤微生物群落功能多样性的变化<sup>[5]</sup>, 但是关于免耕对土壤微生物的影响的研究鲜有报道, 本文针对免耕这一耕作方式, 运用 Biolog 方法进行土壤微生物功能多样性研究, 旨在探讨免耕对土壤微生物的影响, 为免耕耕作方式的发展提供一定的理论依据。

## 1. 试验设计与方法

### 1.1 土壤样品来源与试验处理

2005 年选取种植玉米比较平整的水平梯田, 设留全部玉米秸秆覆盖留膜和留茬留膜越冬 2 处理, 重复 3 次, 2 年玉米秸秆全部生物量平均值  $5670 \text{ kg/hm}$ 。2006 年在全部秸秆覆盖留膜处理上直接免耕种植玉米, 在留茬留膜处理上进行揭膜翻地覆盖地膜播种玉米, 2006 玉米收获后与 2005 年同样的处理, 2007 年种植玉米与 2006 年相同, 田间管理同大田。

### 1.2 样品采集及 Biolog-ECO 分析

#### 1.2.1 土壤样品的采集

在作物收获以后, 于 2007 年 11 月 9 日, 在上述 2 种处理的小区中采用 3 点取样混合后, 取半斤样装入保鲜袋, 后去后放入冰箱  $4^\circ\text{C}$  保存, 第二天放入存有冰袋水桶里, 快速运回实验室存入冰箱  $4^\circ\text{C}$  保存, 待实验。

#### 1.2.2 Biolog-ECO 实验

---

<sup>1</sup>基金项目: “Challenge Program on Water & Food -Conservation agriculture for the dry-land areas of the Yellow River Basin” (CPWFYRB200504) “国家“十一五”科技攻关计划重大项目 (2006BAC01A07)” 资助。

**作者简介:** 董立国 (1980 年生), 男, 宁夏青铜峡, 双学士, 研究实习员。主要从事保护性农业、水土保持、生态农业等研究工作。E-mail: dlq0303@163.com。地址: 宁夏银川黄河东路 590 号, 邮编: 750002。

**通讯作者:** 袁汉民 (1947-) 男, 北京人, 研究员, 主要从事小麦遗传育种、作物栽培等方面的研究, hanminyuan886@yahoo.com.cn。

Biolog 技术通过分布于 96 孔中的碳源底物来分析评价土壤微生物生理代谢特征。本研究采用有 31 种碳源的生态板 (Biolog -ECO) 分析微生物群落的代谢特征, 即功能多样性。生态板利用更多的与生态有关的化合物, 具有 31 种培养基, 其组成主要为: 氨基酸(6 种)、醣类(10 种) 和羧酸(7 种)。试验溶液: 0.9% 的生理盐水。

主要设备: Biolog MICROSOFT 全自动微生物鉴定分型系统; Biolog 电动八孔移液器; 人工气候箱; 超净工作台; 摇床。主要耗材来源: Biolog 公司生产, 华粤企业集团有限公司提供。试验步骤: 称取 10 克鲜土 (称量前测量含水量), 加入 90ml 无菌生理盐水中稀释, 在摇床里振摇 30 分钟, 静止沉淀 3~5min, 然后进行 100 倍稀释, 以每孔 150 微升稀释液加入微孔板中, 将制备好的菌悬液倒入无菌移液槽中, 使用八孔移液器将其接种于微平板的 96 孔中。接种好的微平板放到铺有六层纱布的塑料饭盒中, 为防止微平板鉴定孔中的菌悬液挥发, 纱布保持一定的湿度。塑料饭盒用保鲜膜包裹, 保鲜膜上用注射针头扎若干个小眼, 以保证微生物的培养所需要的氧气, 将微平板避光培养。培养温度: ECO 生态板放到 30℃ 恒温培养。微平板读数时间: 微平板分别在培养 24h、48h、72h、96h、120h 时读数。测定波长: 测定波长为 590nm。

### 1.2.3 数据统计分析

孔的平均颜色变化率<sup>[6]</sup> (Average well color development, AWCD) 计算方法如下:

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

公式中:  $C_i$  为每个有培养基孔的光密度值;

R 为对照孔的光密度值;

n 为培养基碳源种类数, 本研究中为 31

丰富度指数指被利用的碳源的总数目, 为每孔中 (C-R) 的值大于 0.25 的孔数<sup>[7]</sup>。

多样性指数采用 Shannon-Wiener 指数 ( $H'$ ):  $H' = - \sum (P_i \times \ln P_i)$ ,  $P_i$  为有培养基的孔与对照孔的光密度值差与整板总差的比值, 即  $P_i = (C-R) / \sum (C-R)$ <sup>[8]</sup>。

数据统计分析应用 Excel2007、spss15.0 进行。

## 2. 结果与分析

### 2.1 不同处理微生物利用全部碳源的动力学特征

由图 1 可以得出: 免耕土壤细菌对底物碳源的利用能力显著高于常规耕作, 所测时间内的平均值比常规耕作高 53.1%。

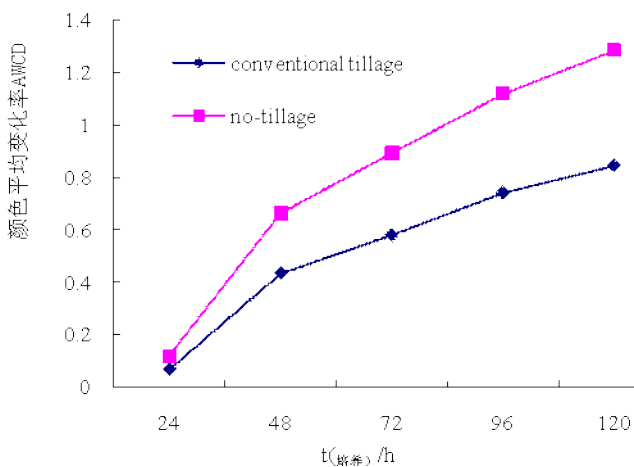


图 1 不同耕作处理土壤微生物在 Biolog -ECO 板上的平均颜色变化率 (AWCD)

Fig1 AWCD of microbe of different tillage treatments on Biolog - ECO plates

## 2.2 不同处理微生物利用不同种类碳源的动力学特征

按化学基团的性质对ECO 板上的31 种碳源分成6 类, 即羧酸类、氨基酸类、碳水化合物、聚合物、胺类、酚类。并将每类碳源的OD 值平均。2图2可知: 6类碳源的利用率都随时间的延长而增加, 免耕土壤微生物对各个碳源的利用率都高于常规耕作对碳源的利用率。

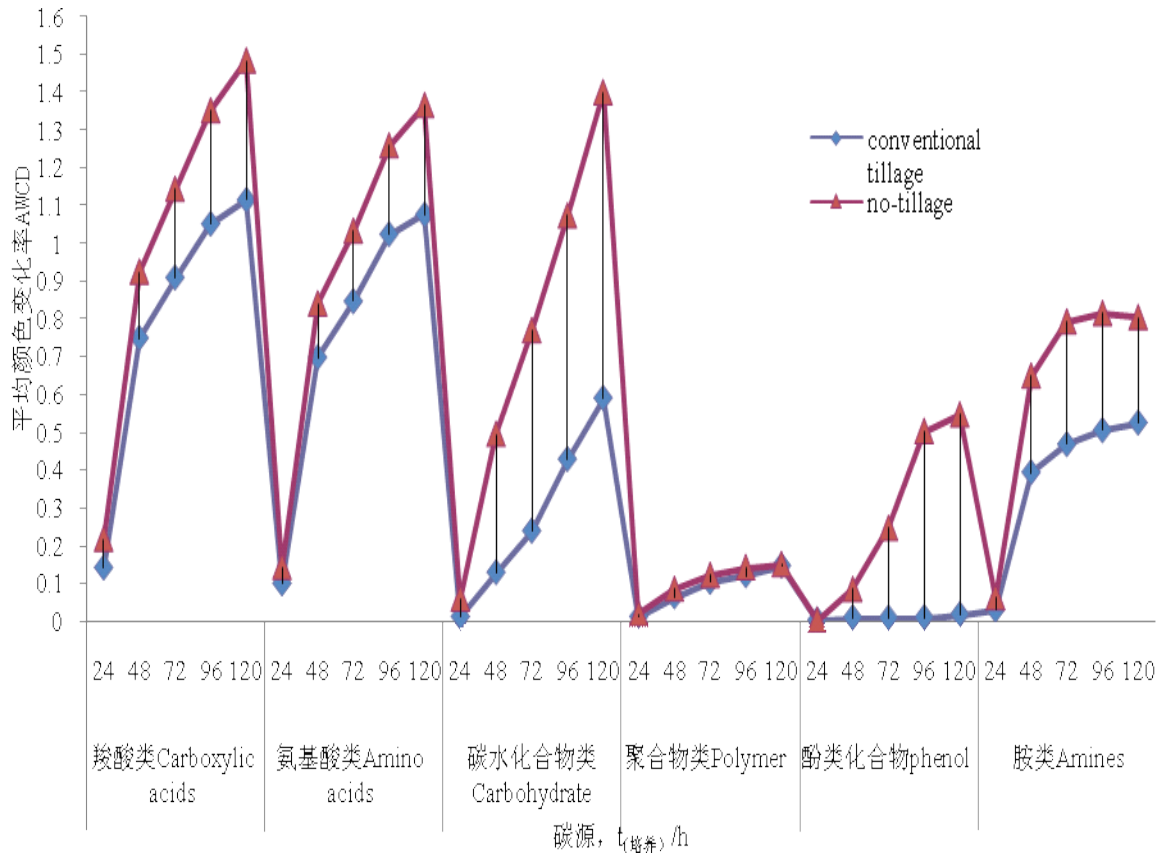


图2 不同耕作处理土壤微生物利用不同种类碳源平均颜色变化率 (AWCD)

Fig2 AWCD for different carbon sources utilized by microbe of different tillage treatments

## 2.3 不同处理微生物群落功能多样性分析

计算每孔中 (C-R) 的值, 根据丰富度、多样性计算方法计算不同耕作处理丰富度指数、多样性指数, 如表 1, 免耕土壤微生物丰富度指数、多样性指数显著高于常规耕作。

表 1 土壤微生物群落功能多样性分析 (n=3)

Table2 Diversity and richness indices for soil microbial communities

处理	丰富度指数	多样性指数
常规耕作	14.33±1.15 <sup>A</sup>	2.56±0.12 <sup>A</sup>
免耕	22.33±0.57 <sup>B</sup>	3.02±0.04 <sup>B</sup>

注: 均值±标准偏差 Mean ±SD, 同一列中不同字母表示差异显著

Different letters in the same vertical row show the significantly difference at p<0.01

## 2.4 不同耕作处理微生物群落功能多样性的主成分分析

利用 96 小时的 AWCD 值进行不同耕作处理微生物功能群落功能多样性的主成分分析 (图) 表明: 常规耕作和免耕秸秆覆盖土壤微生物群落有明显的分异, 常规耕作主要分布在 PCI 的负端, 也处在 PC2 轴的正

负 2 端；免耕+秸秆覆盖主要分布在 PC1 轴的正端，PC2 轴的负端。第一主成分变异的主要来源，占总变异的 41.7%，第二主成分占总变异的 25.6%。由 31 种碳源在 2 个主成分上载荷值（见表）可以得出，影响 PC1 的主要碳源是 D-葡萄糖胺酸、N-乙酰-D 葡萄糖氨、D-半乳糖酸  $\gamma$ -内酯、D-甘露醇、L-精氨酸、4-羟基苯甲酸、衣康酸、吐温 40、D-木糖/戊醛糖、D, L- $\alpha$ -磷酸甘油、1-磷酸葡萄糖、 $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、 $\alpha$ -丁酮酸、丙酮酸甲酯、i-赤藓糖醇、苯乙胺、L-天门冬酰胺。影响 PC2 的主要碳源是 D-纤维二糖、 $\alpha$ -D-乳糖、肝糖、 $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、 $\alpha$ -丁酮酸、丙酮酸甲酯、腐胺、衣康酸、D-苹果酸、吐温 40、吐温 80、甘氨酸-L-谷氨酸。结合 PC1、PC2 的分析结果，常规耕作利用的主要碳源是  $\alpha$ -丁酮酸、丙酮酸甲酯、i-赤藓糖醇、苯乙胺、L-天门冬酰胺、衣康酸、D-苹果酸、吐温 40、吐温 80、甘氨酸-L-谷氨酸等；免耕+秸秆覆盖主要利用的碳源是 D-葡萄糖胺酸、N-乙酰-D 葡萄糖氨、D-半乳糖酸  $\gamma$ -内酯、D-甘露醇、L-精氨酸、4-羟基苯甲酸、衣康酸、吐温 40、D-木糖/戊醛糖、D, L- $\alpha$ -磷酸甘油、1-磷酸葡萄糖、 $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷等，从图也可以看出免耕+秸秆覆盖利用的碳源数量优于常规耕作。

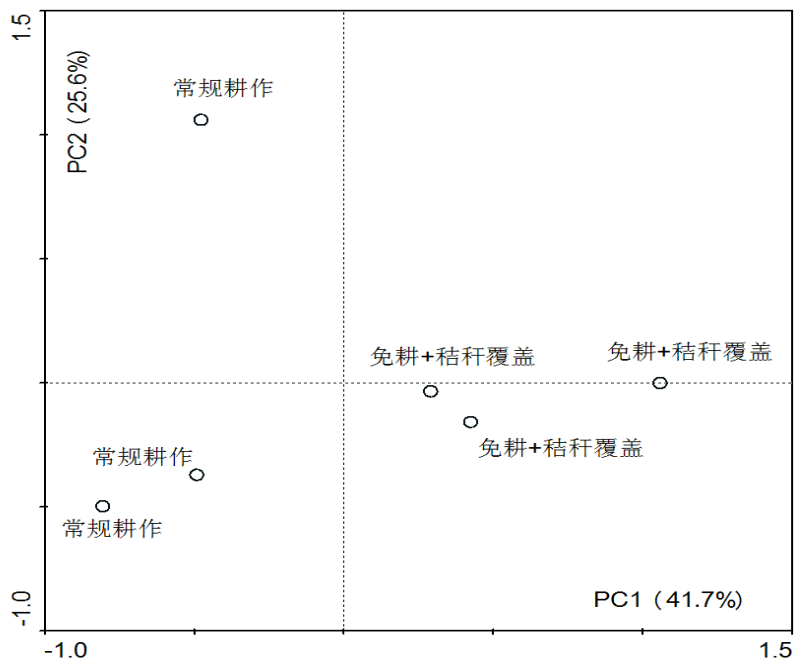
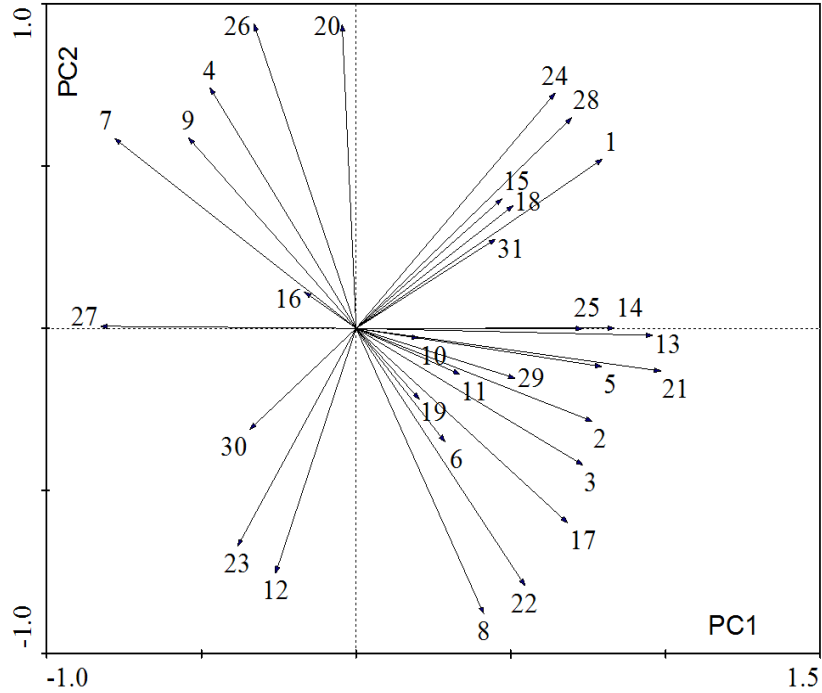


图 不同耕作处理微生物功能多样性 PCA 分析



注：(1:  $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷, 2: D-半乳糖酸  $\gamma$ -内酯, 3:L-精氨酸, 4:丙酮酸甲酯, 5:D-木糖/戊醛糖, 6:D-半乳糖醛酸, 7:L-天门冬酰胺, 8:吐温 40, 9:i-赤藓糖醇, 10:2-羟基苯甲酸, 11:L-苯丙氨酸, 12:吐温 80, 13:D-甘露醇, 14:4-羟基苯甲酸, 15:L-丝氨酸, 16:  $\alpha$ -环糊精, 17: N-乙酰-D-葡萄糖氨, 18:  $\gamma$ -羟丁酸, 19: L-苏氨酸, 20: 肝糖, 21: D-葡萄糖胺, 22: 衣康酸, 23: 甘氨酸-L-谷氨酸, 24: D-纤维二糖, 25: 1-磷酸葡萄糖, 26:  $\alpha$ -丁酮酸, 27: 苯乙胺, 28:  $\alpha$ -D-乳糖, 29: D,L- $\alpha$ -磷酸甘油, 30: D-苹果酸, 31: 腐胺

图 不同耕作处理不同碳源 PCA 分析

表 31 种碳源在第 1、2 主成分上的载荷值

碳源化学类别	底物	PC1	PC2
羧酸类 (7 种)	丙酮酸甲酯	-0.704	0.600
	D-葡萄糖胺酸	0.961	0.229
	D-半乳糖醛酸	0.471	-0.124
	$\gamma$ -羟丁酸	0.336	0.378
	衣康酸	0.741	-0.554
	$\alpha$ -丁酮酸	-0.658	0.745
	D-苹果酸	-0.275	-0.580
碳水化合物类 (10 种)	D-纤维二糖	0.364	0.905
	$\alpha$ -D-乳糖	0.445	0.880
	$\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷	0.582	0.799
	D-木糖/戊醛糖	0.705	0.231
	i-赤藓糖醇	-0.754	0.380
	D-甘露醇	0.856	0.355
	N-乙酰-D-葡萄糖氨	0.881	-0.245
	1-磷酸葡萄糖	0.586	0.236
	D, L- $\alpha$ -磷酸甘油	0.605	0.114
	D-半乳糖酸 $\gamma$ -内酯	0.876	-0.047

氨基酸类 (6种)	L-精氨酸	0.829	-0.224
	L-天门冬酰胺	-0.948	0.224
	L-苯丙氨酸	0.396	0.071
	L-丝氨酸	0.281	0.380
	L-苏氨酸	0.263	-0.016
	甘氨酸-L-谷氨酸	-0.172	-0.849
聚合物类 (4种)	吐温 40	0.711	-0.639
	吐温 80	0.116	-0.767
	$\alpha$ -环式糊精	-0.251	-0.006
	肝糖	-0.433	0.846
酚类化合物 (2种)	2-羟基苯甲酸	0.363	0.025
	4-羟基苯甲酸	0.749	0.270
胺类 (2种)	苯乙胺	-0.785	-0.206
	腐胺	0.370	0.576

### 3 讨论与结论

Bending,etal.(2002)<sup>[10]</sup>研究了作物残茬、土壤有机质质量和土壤微生物多样性之间的相互作用, 秸秆或根茬还田都能够提高土壤微生物的多样性。Lupwayi, etal.(1999)<sup>[11]</sup>认为, 传统耕作方式具有降低土壤微生物多样性的作用, 保护性耕作有利于提高土壤微生物多样性, 免耕与豆科作物为基础的轮作制能够促进多样性提高, 小麦根际土壤微生物的多样性大于其他作物。本研究免耕秸秆覆盖耕作措施显著提高了了土壤利用碳源的能力和土壤微生物多样性指数, 与 Bending 和 Lupwayi 的结论一致。

本研究通过对免耕和常规耕作处理土壤微生物碳源利用动力学特征以及功能多样性分析, 初步得出以下结论: (1) 免耕土壤微生物对碳源利用率以及不同碳源利用率高于常规耕作, (2) 免耕土壤微生物丰富度指数、多样性指数显著高于常规耕作。本试验虽然玉米产量方面是覆盖 1/2 玉米秸秆和全部玉米秸秆免耕处理产量分别比常规耕作减产 25.4%和 11.2%, 主要与积温有关。但就免耕所体现出来土壤微生物方面的效果, 可以肯定免耕秸秆覆盖能够增加土壤微生物活性, 促进土壤物质的循环, 减少能源投入, 有利于土壤微生物多样性的发育, 在气候变化的大背景下, 在有机农业等健康生产的理念下, 免耕少耕等保护性耕作措施具有较大的、积极的发展潜力。

### 参考文献

- [1] 董立国, 袁汉民, 李生宝, 等. 发展保护性耕作是实现农业可持续发展的重要举措[J]. 现代农业科技, 2006(05S):96-97  
DONG Ligu, YUAN Hanmin, LI Shengbao, et al. Developing protection cultivation, 2006, 5: 96-97.
- [2] 袁汉民, 董立国, 徐华军, 等. 水分和温度对冬小麦和玉米免耕作产量影响的研究 [J]. 干旱区资源与环境, 2008(7):172-177.  
YUAN Hanmi, DONG Ligu, XU HuaJun, et al. Effects of Water and Temperature on Winter Wheat and Maize Yields Under Conservation Tillage Condition[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2008, 7: 172-177.
- [3] 李阜棣, 胡正佳. 微生物学【M】. 中国农业出版社, 2006.  
LI Fulu, HU ZHengjia. MICROBIOLOGY, China Agriculture Press, 2006.
- [4] 郑华, 欧阳志云, 王效科, 等. 不同森林恢复类型对土壤微生物群落的影响[J], 应用生态学报, 2004, 15(11): 2019-2024.  
ZHENG Hua, OUYANG ZHiyong, WANG Xiaoke, et al. Effects of forest restoration patterns on soil microbial communities [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(11): 2019-2024.
- [5] 徐华勤, 肖润林, 宋同清, 等. 稻草覆盖与间作三叶草对丘陵茶园土壤微生物群落功能的影响[J]. 生物多样性, 2008, 16(2): 166-174.

- XU Huaqing, XIAO Runlin, SONG Tongqin, et al. Effects of mulching and intercropping on the functional diversity of soil microbial communities in tea plantations [J], *Biodiversity Science*, 2008, 16(2): 166-174.
- [6] GARLAND J L, MILL 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*, 57: 2351-2359.
- [7] ROGERS B F, TATE III R L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 1389-1401.
- [8] DOBRANIC J K, ZAK J C. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity [J]. *Mycologia*, 1999, 91: 756-765.
- [9] 尚文勤, 朱利平, 孙庆业, 等. 自然生态恢复过程中尾矿废弃地土壤微生物变化, *生态环境*, 2008, 17(2): 713-717.
- Shang Wenqin, Zhu Liping, Sun Qingye, et al. The changes of soil microbes of tailings wastelands in processes of restoration of natural ecology [J] *Ecology and Environment*, 2008, 17(2): 713-717.
- [10] Bending GD, Turner MK, Jones JE. Interaction between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities *Soil BIOLOGY and Biochemistry*. 2002, 34(8): 1073-1082.
- [11] Lupwayi NZ, Rhee WA, Clayton GW. Soil microbial biomass and carbon dioxide flux under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Canadian Journal of Soil Science*, 1999, 79(2): 273-280.

生态环境学报