

# 巨大芽孢杆菌对土壤 N<sub>2</sub>O 释放量及土壤微生物的影响

高琳<sup>1,2</sup> 王立为<sup>2,3</sup> 潘志华<sup>2\*</sup> 徐慧<sup>4</sup> 杨书运<sup>1</sup> 李玉婷<sup>4</sup>

(1. 安徽农业大学 资源与环境学院, 合肥 237182;

2. 中国农业大学 资源与环境学院, 北京 100193;

3. 沈阳农业大学 农学院, 沈阳 110866;

4. 中国科学院 沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

**摘要** 培养筛选出一种能够将土壤中铵态氮转化为微生物氮, 减少硝态氮形成及 N<sub>2</sub>O 排放的巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*, 并通过小麦盆栽试验探索该微生物抑制土壤 N<sub>2</sub>O 排放的效果。结果显示: 1) 高氮肥浓度下, *B. megaterium* 提高土壤中活性微生物数量、种群的相对丰度, 降低高浓度氮肥对土壤微生物生长繁殖的抑制作用。2) *B. megaterium* 降低土壤中硝化菌 (*Nitrospirae*) 的相对丰度, 继而减少硝态氮的形成。3) 施加 *B. megaterium* 后土壤 N<sub>2</sub>O 排放通量整体小于普通氮肥处理。试验期间 *B. megaterium* 处理的 N<sub>2</sub>O 累积排放量较相同氮肥水平下普通氮肥减少 4%~53%, 且随着氮肥水平的增加, N<sub>2</sub>O 减排效果逐渐加强。巨大芽孢杆菌 *B. megaterium* 可减缓氮肥对气候和土壤环境的影响。

**关键词** 巨大芽孢杆菌; N<sub>2</sub>O 排放; 土壤微生物

中图分类号 S 16

文章编号 1007-4333(2016)07-0076-09

文献标志码 A

## Impact of *Bacillus megaterium* on soil N<sub>2</sub>O emission and soil microorganisms

GAO Lin<sup>1,2</sup>, WANG Li-wei<sup>2,3</sup>, PAN Zhi-hua<sup>2\*</sup>, XU Hui<sup>4</sup>, YANG Shu-yun<sup>1</sup>, LI Yu-ting<sup>4</sup>

(1. College of Resources and Environmental Sciences Anhui Agricultural University, Hefei 237182, China;

2. College of Resources and Environmental Sciences China Agricultural University, Beijing 100193, China;

3. Agronomy college Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

4. Institute of Applied Ecology Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

**Abstract** Microorganisms such as *Bacillus megaterium* can convert the ammonium nitrogen into microbial nitrogen and restrain the formation of nitrate nitrogen and N<sub>2</sub>O emission in the soil. To explore the effect of *B. megaterium* on inhibiting soil N<sub>2</sub>O emission, the pot experiments of wheat were conducted. The results showed: 1) Under high nitrogen concentration, *B. megaterium* increased the amount and relative abundance of the active micro-population, and reduced the inhibition effect of high concentration nitrogen fertilizer on the microbial growth and reproduction of the microbial. 2) *B. megaterium* could diminish the relative abundance of nitrifying bacteria (*Nitrospirae*) in the soil and then inhibit the formation of nitrate nitrogen. 3) N<sub>2</sub>O emission fluxes in the treatments with *B. megaterium* were less than that in the ordinary nitrogen treatments. During the whole process in the experiment, under the same nitrogen level, the accumulated N<sub>2</sub>O emissions decreased by 4% - 53% in the treatments with *B. megaterium* than that in the ordinary nitrogen treatments. With the increase of nitrogen level, N<sub>2</sub>O emission reduction became gradually strengthened. Therefore, *B.*

收稿日期: 2015-09-29

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103039); 公益性行业(气象)科研专项(GYHY201506016); 国家自然科学基金项目(41271110; 41371232); 国家重大科学研究计划“973”项目(2012CB956204); 国家科技支撑计划(2012BAD09B02)

第一作者: 高琳, 硕士研究生, E-mail: gaolincau@163.com

通讯作者: 潘志华, 教授, 主要从事气候变化与旱地农业可持续发展、陆面水文过程与机理、生态恢复与重建研究, E-mail: panzhihua@cau.edu.cn

*megaterium* retarded the effects of nitrogenous fertilizer on climate and soil environment, especially under high-concentration nitrogen level.

**Keywords** *Bacillus megaterium*; N<sub>2</sub>O emission; soil microorganisms

IPCC 第 5 次评估报告指出,1880—2012 年,全球平均地表气温升高 0.85 °C,其中,1951—2012 年全球平均地表气温平均每 10 年升高 0.12 °C<sup>[1]</sup>。而在中国,1951—2009 的近 60 年,全国地表平均气温升高了 1.38 °C<sup>[2]</sup>。大气中 CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>O 和 CH<sub>4</sub> 是最重要的温室气体,对温室效应的贡献率近 80%,其中,N<sub>2</sub>O 对温室效应的贡献率约占 5%<sup>[3]</sup>。Hansen 等<sup>[4]</sup> 研究认为每年有 80%~90% 的 N<sub>2</sub>O 来源于土壤。农田土壤是温室气体的一个重要排放源<sup>[5]</sup>,氮肥是造成农田土壤 N<sub>2</sub>O 大量排放的最大来源<sup>[6-7]</sup>,在一定施氮水平下,N<sub>2</sub>O 的排放通量随着施氮量的增加而呈线性(或指数)增加<sup>[8]</sup>。中国农田化肥施用量近年来在不断增长。据统计,2013 年氮肥用量相比 1990 年增加了 46%。逐年增加的氮肥是农田温室气体排放增加的重要原因<sup>[9-10]</sup>。因此有效抑制因施肥造成的温室气体排放是减少农田温室气体排放的重点。随着人口持续增加,粮食需求相应增加,不断提高粮食产量是人类社会发展的客观需要。在这种背景下,研发既能有效提高粮食产量,又能有效减少温室气体排放的生产技术对农业可持续发展具有特别重要的意义。

氮肥是农田土壤铵态氮的重要来源,氮肥施入土壤后,在土壤微生物分泌的脲酶作用下,水解成碳

酸铵,继而再分解为氨(铵)<sup>[11]</sup>。释放到土壤的氨(铵)除产生气态 NH<sub>3</sub> 挥发损失外,在土壤中可直接供植物吸收利用,或进入硝化过程产生硝酸盐以及被微生物吸收固定产生微生物量氮。其中土壤氨(铵)的微生物固定是土壤氮素循环中的重要过程<sup>[12]</sup>,该过程使土壤氮素避开或暂缓进入硝化和反硝化过程,从而不产生 N<sub>2</sub>O,因此可以减少或暂缓土壤温室气体的释放。农田作物对氮素的摄取速率受到作物生长等因素的限制,若通过微生物作用使刚施入土壤中的氮肥尽可能多的通过生物固定,避开或暂缓进入硝化和反硝化过程,不仅对减缓温室气体有着重要的作用,对植物有效利用土壤氮素也至关重要。已有研究表明,促使无机氮肥的微生物固定是减少氮肥损失的有效途径<sup>[13-14]</sup>。土壤中影响无机氮微生物固定的因素很多,以往的研究多集中在碳源的种类、数量和腐解条件<sup>[15]</sup>,而对固定无机氮的土壤微生物研究较为少见。因此,筛选出能固定氮肥且不产生 N<sub>2</sub>O 的微生物对于高氮肥投入的农田在减缓温室气体排放方面具有非常重要的实际利用价值。

本研究通过小麦盆栽试验,旨在定量分析微生物 *Bacillus megaterium* 对旱地栗钙土土壤的 N<sub>2</sub>O 排放及土壤微生物群的影响。

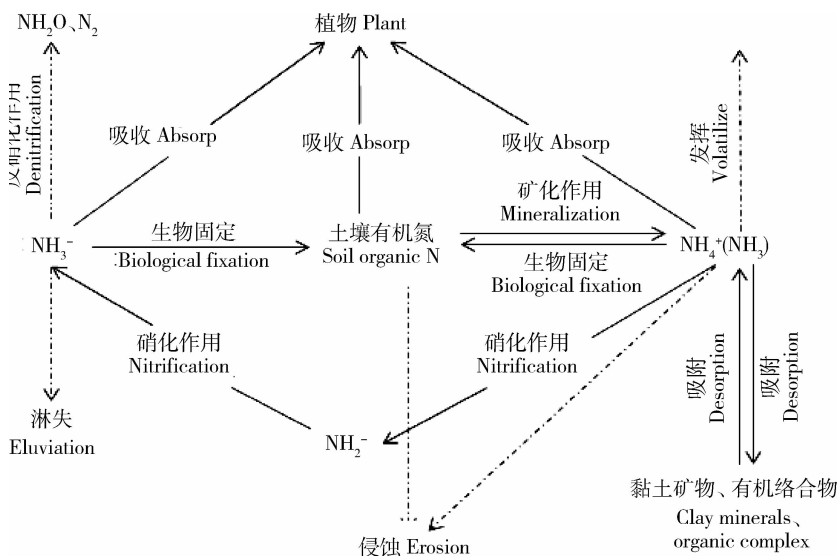


图 1 土壤氮素转化及去向示意图<sup>[11]</sup>

Fig. 1 The soil nitrogen transformation and transport diagram<sup>[11]</sup>

## 1 材料与方法

### 1.1 微生物的筛选与培养

以探索能够利用氮肥,生物固定氮(铵)的微生物为目的,课题组以尿素为原料,通过培养,筛选出了一株微生物菌株。通过 PCR 扩增测序和 Genbank 对比,判定该细菌属于巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)中的一个种或亚种。

培养 *B. megaterium* 的培养基配方为:酵母提取物 5 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 15~20 g、蒸馏水 1 000 mL,培养基用氢氧化钠调节 pH 至 7.4~7.6。选用平板计数法测定培养后菌液浓度。播种时,取定量的菌液与播种所浇水分均匀混合后施入土壤中。

### 1.2 效果试验

为验证该微生物的减排效果,进行了盆栽试验,作物选取春小麦品种。

试验选用内蒙古自治区呼和浩特市武川县(半干旱地区)的旱地栗钙土,土壤 pH 平均为 8.5,有机碳含量为 10.30 g/kg,全氮量为 0.79 g/kg,全磷量为 0.45 g/kg,全钾量为 2.45 g/kg。试验设计普通氮肥和微生物添加 2 种处理,每种处理设有 3 个氮肥水平,未施氮肥处理作为对照,共计 7 个处理,每个处理 6 个重复。具体试验设计如下表 1。

表 1 试验处理设计  
Table 1 The experimental design

处理 Manage	肥料种类及用量 The type and dosage of fertilizer
CK	不施氮肥
N1	低肥(尿素(N)75 kg/hm <sup>2</sup> )
N2	中肥(尿素(N)150 kg/hm <sup>2</sup> )
N3	高肥(尿素(N)225 kg/hm <sup>2</sup> )
N1GY	低肥;巨大芽孢杆菌 1×10 <sup>5</sup> cfu/g
N2GY	中肥;巨大芽孢杆菌 1×10 <sup>5</sup> cfu/g
N3GY	高肥;巨大芽孢杆菌 1×10 <sup>5</sup> cfu/g

试验于 2014 年 8 月 30 日—9 月 30 日进行,采用底部直径 8 cm,顶部直径 11 cm,高 13 cm 的培养钵作为盆栽用盆。所有处理均以过磷酸钙做磷肥,用量为(P)27.7 kg/hm<sup>2</sup>。施肥方式均采用播种前一次性施肥。

### 1.3 气体采样和分析

采用密闭静态箱法测定 N<sub>2</sub>O 排放通量并计算其排放总量。静态箱由两部分组成,下部为基座,上部为采样箱,顶部带有三通阀。采样时,采样箱的下沿插入基座的槽内,箱内形成 1 个底面半径和高分别为 0.08 和 0.265 m 的密闭空间。试验采用一个 50 mL 的注射器从采样箱内抽取气体,抽取的气体立即转移到 1 个 0.03 L 的用丁基橡胶薄片密封的真空(air-evacuated)玻璃瓶。每个试验处理选取 3 个重复采集气体,封箱 0 min 随机采集 3 个静态箱内气体,20 min 时采集所有气体样品。采样时间为播种后第 2 天开始采集气体,连续 1 周每天采集 1 次,后续时段每隔 1 d 采集 1 次。取样时间在 9:00—11:00。气体中 N<sub>2</sub>O 浓度采用 Gas Chromatograph (Agilent GC-7890A)测定。经线性回归分析得出当天 N<sub>2</sub>O 排放通量,公式如下<sup>[16]</sup>:

$$\text{Flux} = \rho \times V/A \times \Delta C/\Delta t \times 273/(273 + T) \quad (1)$$

式中:Flux 为气体通量; $\rho$  为标准状况下 N<sub>2</sub>O 的气体密度,kg/m<sup>3</sup>;V 为采样箱有效体积,m<sup>3</sup>;A 为箱底面积,m<sup>2</sup>; $\Delta C$  为气体浓度差, $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; $\Delta t$  为时间间隔,h;T 为箱内温度,℃。气体通量为负值时表示被观测系统从大气中吸收该气体,正值时表示被观测系统向大气排放该气体。

### 1.4 土壤样品测定

分别于 9 月 12、18 和 30 日采集盆栽新鲜土样,每一处理取 3 个重复,运用 Continuous Flow Injection Analyzer (Alliance,France)连续流动分析仪测定无机氮,配备 MT7 和 MT8 这 2 个化学模块分别运用靛酚蓝比色法和紫外分光光度法测定滤液中的铵态氮和硝态氮含量。9 月 30 日试验结束时采集土壤样品,采用氯仿熏蒸-浸提法测定微生物生物量碳含量<sup>[17]</sup>。

### 1.5 高通量测序数据的分析

基于 Illumina MiSeq 测序平台,利用双末端测序(Paired-End)的方法,构建小片段文库进行双末端测序。通过对 Reads 拼接过滤,OTUs (Operational Taxonomic Units)聚类,进行物种注释及丰度分析。在作群体分析时,根据一定标准进行归纳整理和聚类,将序列按照彼此的相似性归为许多小组,1 个小组即为 1 个 OTU。本研究按相似性 97%时归得的 1 个 OTU 指代 1 个菌种,95%指代的 1 个菌属,对所有样品进行 OTU 生成并对

OTU 进行生物信息统计分析。在 OTU 生物信息的基础上,利用 Chao-the Chao1 estimator (<http://www.mothur.org/wiki/Chao>) 指数计算菌群丰度 (Community richness); 以及 Shannon-the Shannon index (<http://www.mothur.org/wiki/Shannon>) 指数计算菌群多样性 (Community diversity), 分析微生物菌肥对土壤总微生物群落结构的影响。计算公式如下:

$$S_{\text{chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} \quad (2)$$

式中:  $S_{\text{obs}}$  表示实际测量出的 OTU 数目;  $n_1$  表示含有 1 条序列的 OTU 数目;  $n_2$  表示含有 2 条序列的 OTU 数目。

$$H_{\text{shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (3)$$

式中:  $S_{\text{obs}}$  表示实际测量出的 OTU 数目;  $n_i$  表示含有  $i$  条序列的 OTU 数目;  $N$  表示所有的序列数。

### 1.6 数据分析

数据处理、显著性分析和 ANOVA 分析采用

EXCEL 2013 和 SPASS 17.0 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 N<sub>2</sub>O 排放特征

如图 2 所示, 播种后盆栽 N<sub>2</sub>O 排放通量基本大于 0, 即土壤排放 N<sub>2</sub>O。施加氮肥对农田 N<sub>2</sub>O 的排放量的影响主要表现在施肥初期。例如, 播种后第 2 天 (8 月 31 日), 普通氮肥处理 (N1, N2, N3) 及未施氮肥的 CK 处理均出现 N<sub>2</sub>O 高排放, 排放通量达 200  $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$  以上, 其中中肥处理 (N2) 最高达 243  $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 。这是因为施加氮肥提高了土壤氮含量, 促进了硝化过程, 从而引起土壤 N<sub>2</sub>O 排放峰值的出现。在同一氮肥水平下, 微生物 *Bacillus megaterium* 处理的 N<sub>2</sub>O 排放通量低于普通氮肥处理, 尤其在播种后的 10 d 之内, *Bacillus megaterium* 抑制 N<sub>2</sub>O 排放效果显著。例如, 播种后第 2 天 *Bacillus megaterium* 处理 (N1GY, N2GY, N3GY) 的 N<sub>2</sub>O 排放通量非常低, 均 < 20  $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , 仅是普通氮肥处理的 10% 左右。

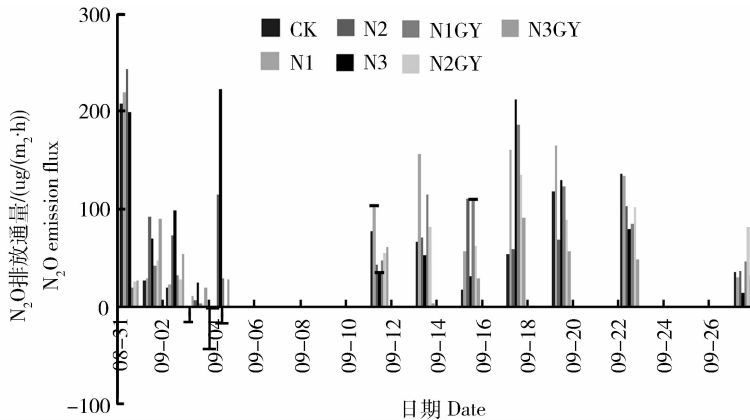


图 2 不同氮肥水平和菌剂添加下盆栽 N<sub>2</sub>O 排放通量

Fig. 2 N<sub>2</sub>O flux in pot experiment under different N-fertilizer levels with and without bacteria

图 3 显示试验期间各处理 N<sub>2</sub>O 的累积排放量, 普通氮肥处理中, N<sub>2</sub>O 累积排放量随着氮肥水平的上升而不断增加, 至 N3 水平 (225  $\text{kg}/\text{hm}^2$  (N)) 达到了 0.40  $\text{kg}/\text{hm}^2$  (N); *Bacillus megaterium* 处理的 N<sub>2</sub>O 累积排放量则随着氮肥水平的上升而逐渐减少, 至 N3GY 仅 0.19  $\text{kg}/\text{hm}^2$  (N)。同一氮肥水平下 *Bacillus megaterium* 处理 (N1GY, N2GY, N3GY) 较普通氮肥处理 (N1, N2, N3) 分别减少 N<sub>2</sub>O 排放 4%, 21% 和 53% ( $P < 0.05$ )。可见, 随着氮肥施肥量的增加, *Bacillus megaterium* 通过生物固氮, 减缓 N<sub>2</sub>O 排放的效果逐渐加强。

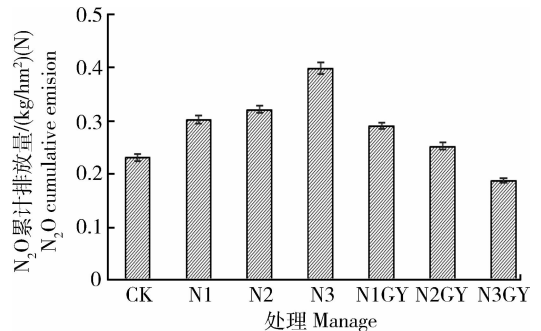


图 3 不同氮肥水平和菌剂添加下盆栽 N<sub>2</sub>O 累积排放量  
Fig. 3 Accumulated N<sub>2</sub>O emissions in pot experiment under different N-fertilizer levels with and without bacteria

## 2.2 土壤中无机氮含量、微生物生物碳变化

本试验分别在9月11日、9月18日和9月30日采取土样测定硝态氮和铵态氮含量。结果如表2所示,不施肥处理(CK)的硝态氮含量约在3.31~18.16 mg/kg(N)范围内波动。施加氮肥,土壤硝态氮含量增加。硝态氮测定结果显示,*Bacillus megaterium* 添加与否,硝态氮含量无显著差异,不考虑氮肥水平时,

普通氮肥处理的硝态氮含量在16.34~86.42 mg/kg(N)波动,*Bacillus megaterium* 处理后变化为22.90~63.63 mg/kg(N),整体变化幅度缩小。如9月30日N3硝态氮含量为86.42 mg/kg(N),N3GY的硝态氮含量降低为63.63 mg/kg(N)。结果初步显示*Bacillus megaterium* 具有调节土壤硝态氮含量的效果,高浓度硝态氮下减少其产生。

表2 不同处理下硝态氮、铵态氮(N)含量的测定

Table 2 Measurement of nitrate and ammonium nitrogen content under different treatments mg/kg

处理 Manage	硝态氮 Nitrate nitrogen			铵态氮 Ammonium nitrogen		
	9月11日	9月18日	9月30日	9月11日	9月18日	9月30日
CK	18.16±8.99 ab	3.310±0.14 a	14.60±1.20 a	1.830±0.09 a	1.90±0.09 a	1.71±0.27 a
N1	26.83±4.21 ab	16.34±4.67 abc	26.17±4.14 ab	2.38±0.27 abc	2.29±0.15 ac	1.85±0.08 a
N2	24.47±6.92 ab	19.48±6.18 abc	66.35±8.42 cd	3.87±0.93 abc	2.61±0.17 bc	1.69±0.12 a
N3	19.02±1.91 a	23.80±5.22 bc	86.42±11.00 d	3.44±0.26 c	2.84±0.07 b	2.28±0.43 a
N1GY	38.21±10.02 ab	25.14±5.25 bc	38.61±4.24 bc	2.00±0.09 abc	2.44±0.28 abc	1.42±0.10 a
N2GY	22.90±3.21 ab	23.63±4.28 ab	36.89±7.68 ac	2.39±0.04 bc	2.16±0.20 abc	1.58±0.20 a
N3GY	32.10±1.88 b	28.63±1.29 c	63.63±10.24 dc	2.88±0.08 c	2.46±0.07 c	2.15±0.36 a

注:同列不同的小写字母表示95%差异显著。

Note: Different small letters within the same column mean significant difference at 95% level.

试验中铵态氮含量仅占总速效氮的10%左右,随着施肥量的增加及小麦苗生长,普通处理铵态氮含量无显著性变化。同一氮肥水平下,微生物处理的铵态氮的含量在数值上低于普通氮肥处理,但差异不显著。

氮肥进入土壤后分解成的氨(铵)一部分经硝化作用转变成硝态氮,硝态氮浓度对土壤微生物的繁殖生长有一定影响。本研究以微生物碳代表活性微生物,分析9月30日土壤微生物生物量碳与硝态氮含量的关系(如图4),结果显示随着土壤硝态氮含量的增加,土壤微生物碳含量呈明显的先增后减的抛物线趋势( $P < 0.01$ ),硝态氮含量为57.28 mg/kg(N)时,土壤微生物碳含量达到最大值。

上述结果显示,普通氮肥处理土壤硝态氮含量为16.34~86.42 mg/kg(N),*Bacillus megaterium* 处理下土壤硝态氮变化缩小为22.90~63.63 mg/kg(N),基本上均处于可以促进微生物生长的硝态氮浓度范围内,说明*B. megaterium* 菌能够通过调节土壤硝态氮含量提高土壤微生物活性。

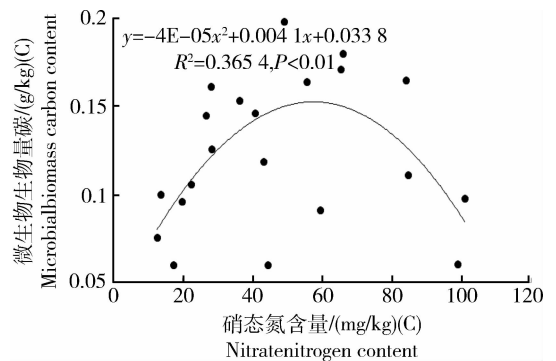


图4 微生物碳与硝态氮关系

Fig. 4 Relationship between the microbial biomass carbon content and nitrate nitrogen content

图5显示了9月30日不同处理下土壤微生物生物量碳含量,表明施加氮肥后各处理的微生物碳含量均大于空白处理CK( $P < 0.01$ )。随着施氮量从0(CK)增加到150 kg/hm<sup>2</sup>(N),普通氮肥处理的土壤微生物碳含量从0.08 g/kg逐渐增加到0.13 g/kg;当施氮量增加至225 kg/hm<sup>2</sup>(N)(N3)时,土

壤微生物含量下降至仅 0.08 g/kg。该结果表明适量氮肥施加能够有效提高土壤微生物碳含量,氮肥浓度过高(225 kg/hm<sup>2</sup>(N))对土壤微生物的生长繁殖产生明显的抑制作用。

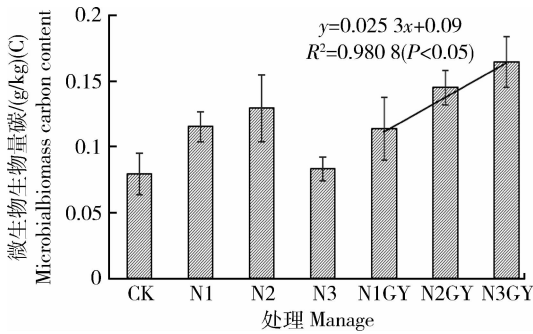


图 5 不同氮肥水平和菌剂添加下微生物生物量碳含量  
Fig. 5 The microbial biomass carbon content under different N-fertilizer levels with and without bacteria

添加 *Bacillus megaterium* 处理中,土壤微生物碳含量随氮肥水平上升呈线性增加的趋势( $P < 0.05$ ),没有出现高氮肥抑制土壤微生物群生长繁殖的现象。微生物碳与硝态氮关系显示高浓度氮肥下 *Bacillus megaterium* 作用降低土壤硝态氮含量,使之处于促进微生物生长的范围内,增加土壤活性微生物生物量。综合硝态氮、微生物生物量碳结果显示, *Bacillus megaterium* 具有调节土壤硝态氮浓度、高氮肥处理下提高活性微生物生物量,提高了土壤微生物适应氮肥的浓度。

### 2.3 高通量土壤微生物群落分析结果

本研究采用高通量 16S DNA 测序方法,通过 Mothur 软件以 97%为划定阈值对 16S 序列划分操作分类单元(OTU)。在聚类成 OTU 过程中,有效序列达 76%~81%,OTU 的稀释曲线(Rarefaction Curve)趋向平坦,说明测序数据量渐进合理,基本能够反映该区域群落的种类和结构,更多的数据量只会产生少量新的 OTU。测序分析结果显示 9 月 30 日样品土壤中未测到活性 *Bacillus megaterium* 菌,所测到的均为土壤原有的微生物。

#### 2.3.1 *Bacillus megaterium* 处理对 *Nitrospirae* 菌群的影响

*Nitrospirae*(硝化螺旋菌门)在土壤中以氨(铵)为原料进行硝化过程产生硝态氮(图 1)。如图 6 所示,通过物种注释,土壤样品在门水平上物种相对丰度前十的分别是 *Proteobacteria*,

*Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Actinobacteria*, *Plantomycetes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Nitrospirae*, *Armatimonadetes*。其中, *Nitrospirae* 排在第九,在土壤微生物群中占有重要地位。比较不同处理 *Nitrospirae* 相对丰度(表 3)发现,添加微生物处理后, *Nitrospirae* 相对丰度均有所下降,表现为  $N1GY < N1$ ,  $N2GY < N2$ ,  $N3GY < N3$ ,尤其是高氮浓度下( $N3GY$ )的降低效果最好,较普通氮肥( $N3$ )处理减少 29%。这说明 *Bacillus megaterium* 处理降低了土壤中硝化细菌在整个微生物中的比例,减少了硝态氮的形成。结论与表 2 中 9 月 30 日硝态氮的测定结果相吻合。

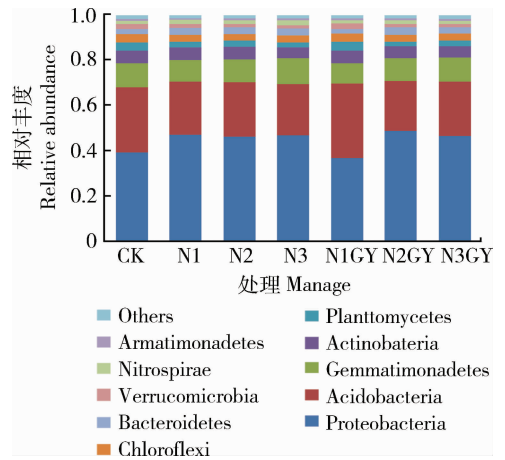


图 6 门水平上的细菌群落的相对丰度  
Fig. 6 Relative abundance of bacterial communities on the order level

表 3 门水平上的 *Nitrospirae* 相对丰度  
Table 3 Relative abundance of *Nitrospirae* on the order level

处理 Manage	相对丰度 Relative abundance
CK	0.016
N1	0.018
N2	0.018
N3	0.021
N1GY	0.014
N2GY	0.016
N3GY	0.015

### 2.3.2 微生物菌肥对土壤种群丰度及多样性的影响

Species richness estimators 估计群落样品中包含的物种总数。选取 Chao1 指数估计物种种群丰度,指数值越大,种群丰度越高;反应种群多样性选

取 Shannon 指数,指数值越大说明群落多样性越高,如图 7 所示,二者曲线趋向平坦时,说明测序数据量足够大,可以反映样品中绝大多数的微生物信息。

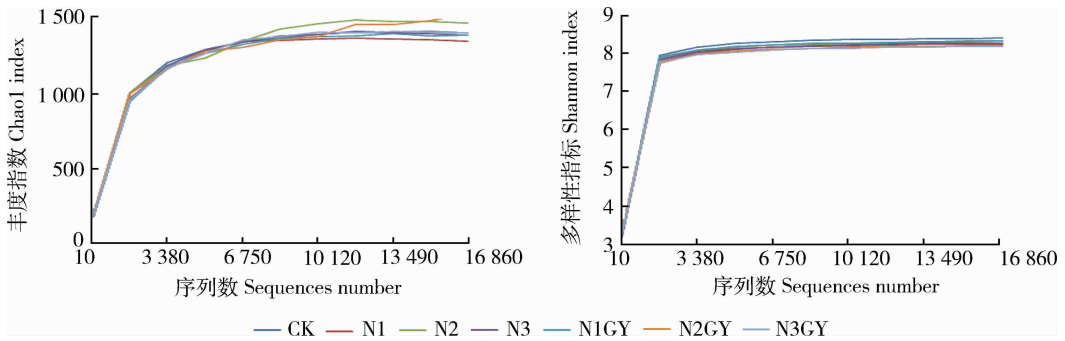


图 7 Chao1 和 Shannon 曲线

Fig. 7 The Chao1 index and Shannon index curve

通过种群丰度指数 Chao1 和多样性指标 Shannon(表 4)分析发现,随着施氮肥水平的提高,普通氮肥处理的细菌种群丰度和多样性均呈现先增后减的趋势,结果与微生物碳测定含量相一致(图 4),进一步说明高浓度氮肥降低了土壤中活性微生物数量,并减少了微生物多样性。

低浓度施氮时, *Bacillus megaterium* 处理(N1GY)的土壤整体活性微生物生物量与普通氮肥

(N1)差异不显著,但土壤微生物丰度及种群多样性增加(表 4)。当氮肥水平达到高浓度时,普通氮肥处理(N3)出现高氮浓度(硝态氮含量 86.42 mg/kg(N))抑制微生物繁殖生长的现象,相同氮肥水平下, *Bacillus megaterium* 处理(N3GY)降低土壤中硝态氮的浓度(63.63 mg/kg(N)),减小高浓度氮肥对土壤微生物生长繁殖的抑制作用,活性微生物数量、种群丰度高于 N3 处理,但种群多样性在数值上低于 N3 处理。

表 4 不同氮肥水平和菌剂添加下种群丰度和多样性指标

Table 4 Bacterial abundance and diversity under different N-fertilizer levels with and without bacteria

处理 Manage	丰度指数 Chao1	多样性指标 Shannon	分类单元 OUT
CK	1 403	8.394	1 418
N1	1 338	8.246	1 411
N2	1 477	8.309	1 301
N3	1 386	8.264	1 430
N1GY	1 382	8.314	1 407
N2GY	1 540	8.194	1 421
N3GY	1 401	8.177	1 418

## 3 结论

本研究通过小麦盆栽试验,探索不同氮肥浓度下微生物 *Bacillus megaterium* 对盆栽土壤无机氮、微生物及 N<sub>2</sub>O 排放的影响。得出结论如下:

1) *Bacillus megaterium* 对土壤微生物群的影

响主要体现在高浓度氮肥时, *Bacillus megaterium* 提高土壤活性微生物数量、种群相对丰度,减小高浓度氮肥对土壤微生物生长繁殖的抑制作用,提高了土壤微生物适应氮肥的浓度。

2) *Bacillus megaterium* 对土壤硝态氮的影响随土壤硝态氮浓度变化而变,整体具有调节土壤硝

态氮,减小其变化幅度的作用,使其处于适宜的浓度范围内,缓冲高浓度氮肥对土壤微生物及作物本身的危害作用。同一氮肥水平下,*Bacillus megaterium* 对铵态氮含量的影响不显著。

3) 试验于施肥同时添加 *Bacillus megaterium*, 一段时间内 *Bacillus megaterium* 大量生长繁殖固定土壤铵态氮为微生物氮,同时降低了土壤中硝化细菌(*Nitrospirae*)在整个微生物中的比例,继而减少硝态氮产生,降低因施肥造成的 N<sub>2</sub>O 大量排放。随氮肥浓度的增加,N<sub>2</sub>O 减排效果逐渐加强。

## 4 讨论

氮肥施入土壤后,打破土壤原有氮循环,由于土壤中有机质或粘粒矿物对无机氮的固定是有限的,施肥后往往有相当数量的氮肥转化为硝态氮形式残留和微生物氮形式存在,且比例较高<sup>[18]</sup>。本试验中测定的土壤硝态氮含量占无机氮总量的近 90%,与 Powlson 等<sup>[18]</sup>报道相一致。土壤氮循环因外源氮的加入被打破,微生物类群及其数量的变化受到影响<sup>[19]</sup>。微生物碳(MBC)在土壤全碳中所占比例很小,但它是土壤有机质中的活性部分,能在很大程度上反应土壤微生物数量,是评价土壤微生物数量、活性以及土壤肥力的重要指标<sup>[20]</sup>。高通量测序结果显示随着施氮肥水平的提高,普通氮肥处理的细菌种群丰度和多样性均呈现先增后减的趋势与微生物碳测定含量相一致。

试验中所使用的微生物为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*, 低浓度氮肥时, *Bacillus megaterium* 对土壤微生物群影响较小,至高浓度时影响较为明显。原因可能是低浓度氮肥施入土壤中产生低浓度的硝态氮,具有促进土壤微生物生长繁殖的作用<sup>[21]</sup>,土壤微生物群的丰度及种群多样性随之增加,氮肥浓度低,*Bacillus megaterium* 生长繁殖受限,作用不显著。当氮肥浓度增加后,土壤硝态氮浓度不断增加,高浓度硝态氮对微生物有直接的毒害作用,同时影响了土壤理化性质,进而影响到微生物的活性和丰度<sup>[22]</sup>。齐莎等<sup>[23]</sup>研究表明高氮不仅显著降低了微生物功能多样性,而且改变了土壤微生物的种群结构,而微生物种群结构失衡是导致土壤质量下降主要原因之一<sup>[24]</sup>。此时添加 *Bacillus megaterium*,降低了土壤硝态氮浓度,土壤活性微生物数量、种群丰度均有所上升。

对盆栽 N<sub>2</sub>O 排放研究结果显示,随着氮肥施肥

量的增加,*Bacillus megaterium* 减缓 N<sub>2</sub>O 排放的效果逐渐加强。总结原因可能是在微生物 *Bacillus megaterium* 作用下土壤中大量铵态氮转化成微生物氮,进入硝化过程的铵态氮减少,从而降低硝化过程中产生的 N<sub>2</sub>O 排放。同时,高通量测序结果显示,添加 *Bacillus megaterium* 的处理降低了土壤中硝化细菌在整个微生物中的比例,减少了硝态氮的形成,进一步减缓 N<sub>2</sub>O 的排放。随着作物生长, *Bacillus megaterium* 逐渐死亡(9月30日高通量测序已经没有 *Bacillus megaterium*),微生物氮被矿化,重新释放至土壤中被利用。换言之,*Bacillus megaterium* 起到了类似缓冲氮肥的作用,减少施肥初期因 N<sub>2</sub>O 大量排放造成的氮肥损失、提高氮肥利用率。

致谢 感谢中国农业大学高建英副教授和王钢副教授对本研究的指导与建议。本研究所用微生物由中国科学院沈阳生态应用研究所环境微生物组提供,感谢实验室老师和同学们的帮助。

## 参 考 文 献

- [1] IPCC Climate change 2013: the physical science basis[M/OL]. 2013 [2014-02-02]. <http://www.climatechange2013.org/images/uploads/WGIARS-WGI-12Doc2b-Final-Draft-All.pdf>
- [2] 《第二次气候变化国家评估报告》编写委员会. 第二次气候变化国家评估报告[M]. 北京: 科学出版社, 2011
- [3] The second national climate change assessment report writing committee. *The Second National Assessment Report on Climate Change* [M]. Beijing: Science Press, 2011 (in Chinese)
- [4] IPCC. Climate Change 2007: The physical science basis [R]. Cambridge: Cambridge University Press, 2007
- [5] Hansen J E, Lacis A A, Sun and dust versus greenhouse gases: An assessment of their relative roles in global climate change [J]. *Nature*, 1990, 346(6286): 713-719
- [6] Melillo J M, Steudler P A, Aber J D, Newkirk K, Lux H, Bowles, F P, Morrisseau S. Soil warming and carbon-cycle feedbacks to the climate system [J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2173-2176
- [7] Bouwman A F. Direct emission of nitrous oxide from agricultural soils [J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1996, 46(1): 53-70
- [8] Houghton J T, Meira Filho L G, Lim B. Revised 1996 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories, emission factor database (EFDB) [R]. IPCC/OECD/IEA. UK Meteorological Office, Bracknell, 1996, [http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/EFDB/find\\_efmain](http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/EFDB/find_efmain), 2006



- [8] 项虹艳,朱波,况福虹,李侃,王玉英,郑循华. 氮肥施用对紫色土玉米根系系统  $N_2O$  排放的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(3): 413-420  
Xiang H Y, Zhu B, Kuang F H, Li K, Wang Y Y, Zhen X H. 2007. Effects of nitrogen fertilizer application on  $N_2O$  emission in a purple soil and maize root system [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 27(3): 413-420 (in Chinese)
- [9] 王效科,李长生,欧阳志云. 温室气体排放与中国粮食生产[J]. 生态环境, 2003, 111-115  
Wang X K, Li C S, Ou Y Z Y. Greenhouse gases emission and Chinese crop production [J]. *Ecology and Environment*, 2003, 111-115 (in Chinese)
- [10] 李海波,韩晓增,王凤. 长期施肥条件下土壤碳氮循环过程研究进展[J]. 土壤通报, 2007, 38(2): 384-388  
Li H B, Han X Z, Wang F. Soil carbon and nitrogen cycle research progress under the condition of ong-term fertilization [J]. *Journal of Soil Bulletin*, 2007, 38(2): 384-388 (in Chinese)
- [11] 漆智平. 热带土壤学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007  
Qi Z P. *Tropical Soil Science* [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2007 (in Chinese)
- [12] 唐玉霞,孟春香,贾树龙,王惠敏,刘巧玲. 土壤肥力水平对肥料氮生物固定的影响[J]. 华北农学报, 2003, 18(S1): 136-138  
Tang Y X, Meng C X, Jia S L, Wang H M, Liu Q L. Effect of the level of soil fertility on biologic fixation of nitrogen fertilizer [J]. *North China Agriculture*, 2003, 18(S1): 136-138 (in Chinese)
- [13] 姚槐应,何振立,黄昌勇. 矿质氮素和有机碳源配合使用提高氮素利用效率的机制[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(6): 617-618  
Yao H S, He Z L, Huang C Y. Effect of nitrogen fertilizer in combination with organic carbon on nitrogen availability [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1998, 24(6): 617-618 (in Chinese)
- [14] 沈其荣,余玲. 有机无机肥料配和施用对滨海盐土土壤生物量态氮及土壤供氮特征的影响[J]. 土壤学报, 1994, 31(3): 287-292  
Shen Q R, Yu L. Impact of organic and inorganic fertilizer assorted application on coastal solonchak soil biomass nitrogen and soil nitrogen supplying characteristics [J]. *Journal of Soil*, 1994, 31(3): 287-292 (in Chinese)
- [15] 唐玉霞,孟春香,贾树龙,张贵民,刘春田. 土壤微生物生物量氮研究综述[J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(2): 76-78  
Tang Y X, Meng C X, Jia S L, Zhang G M, Liu C T. A summary of soil microbial biomass nitrogen [J]. *Journal of Chinese Ecological Agriculture*, 2002, 10(2): 76-78 (in Chinese)
- [16] 石书静,高志岭. 不同通量计算方法对静态箱法测定农田  $N_2O$  排放通量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(10): 2060-2065  
Shi S J, Gao Z L. Impact of different flux-calculation method on the  $N_2O$  fluxes from cropland measured with static chamber technique [J]. *Journal of Agricultural Environment Science*, 2012, 31(10): 2060-2065 (in Chinese)
- [17] 侯彦林,王曙光,郭伟. 尿素施肥量对土壤微生物和酶活性的影响[J]. 土壤通报, 2004, 35(3): 303-306  
Hou Y L, Wang S G, Guo W. The influence of urea fertilizer dosage application on soil microorganism and enzyme activity [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(3): 303-306 (in Chinese)
- [18] Powlson D S, Prookes P C, Christensen 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(2): 159-164
- [19] Bradley K L, Drijber R, Knops J. Increased N availability in grassland soils modifies their microbial communities and decreases the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38: 1583-1595
- [20] 李东坡,武志杰,陈利军,朱平,任军,彭畅,梁成华. 长期培肥黑土微生物量碳动态变化及影响因素[J]. 应用生态学报, 2004, 15(8): 1334-1338  
Li D P, Wu Z J, Chen L J, Zhu J, Ren J, Peng C, Liang C H. Dynamics of microbial biomass C in a black soil under long-term fertilization and related affecting factors [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(8): 1334-1338 (in Chinese)
- [21] 胡诚,曹志平,叶钟年,吴文良. 不同的土壤培肥措施对低肥力农田土壤微生物生物量碳的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(3): 808-814  
Hu C, Cao Z P, Ye Z N, Wu W L. Impact of soil fertility maintaining on microbial biomass carbon in low production agro-ecosystem in northern China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(3): 808-814 (in Chinese)
- [22] 曹志平,胡诚,叶钟年,吴文良. 不同土壤培肥措施对华北高产农田土壤微生物生物量碳的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(5): 1486-1493  
Cao Z P, Hu C, Ye Z N, Wu W L. Impact of soil fertility maintaining on microbial biomass carbon in high production agro-ecosystem in Northern China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(5): 1486-1493 (in Chinese)
- [23] 齐莎,赵小蓉,郑海霞,李贵桐. 内蒙古典型草原连续5年施用氮磷肥土壤生物多样性的变化[J]. 生态学报, 2010, 30(20): 5518-5526  
Qi S, Zhao X R, Zheng H X, Li G T. The change of soil biodiversity use nitrogen and phosphorus fertilizer for five consecutive years in typical grassland of Inner Mongolia [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(20): 5518-5526 (in Chinese)
- [24] 陈伟,束怀瑞. 施肥对平邑甜茶根际微生物的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(2): 328-333  
Chen W, Shu H R. Effects of fertilization on rhizosphere microorganisms of *Malus hupehensis* Rehd [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2008, 14(2): 328-333 (in Chinese)