植物营养与肥料学报 2014,20(1):99-109
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer doi: 10.11674/zwyf.2014.0111

不同施肥处理对农田土壤微生物区系和功能的影响

武晓森[1,2], 杜广红[2], 穆春雷[1,2], 马鸣超[2], 周晓琳[3], 赵同凯[3], 朱宝成[1], 李洪杰[3], 沈德龙[2*]

(1 河北农业大学生命科学学院,河北保定 071000; 2 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所,北京 100081; 3 德州市农业科学研究院,山东德州 253015)

摘要: 本研究采用 DGGE 和 Biolog 两种方法,研究了五种不同施肥处理对土壤微生物区系组成和功能的影响。采用 UPGMA 对 DGGE 试验结果进行聚类分析得出,小麦季中不施肥对照(T1)和常规氮磷钾肥(T2)聚为一类,相似性为 41%,常规氮磷钾肥+秸秆还田(T4)和常规氮磷钾肥+秸秆还田+秸秆腐熟剂(T5)聚为一类,相似性为 52%,而 70% 常规氮磷钾肥+有机肥(T3)单独聚为一类;玉米季也得到类似的结果,只是 T1 和 T2 的相似性为 68%,T4 和 T5 相似性达 78%,而 T3 依然归为一类,这说明不同施肥处理间土壤微生物区系存在相似性。经过切胶测序及 BLAST 比对,发现大多为不可培养细菌,可培养细菌中多为芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属。Biolog 试验采用主成份分析得出,T1 和 T2 土壤微生物功能类似,T4 和 T5 土壤微生物也具有相似的功能,而 T3 则单独分为一类。其中,T5 和 T4 的土壤细菌群落对底物碳源的代谢活性最强,T3 处理次之,T2 和 T1 最低。通过这两种不同试验方法的分析可以看出,不同施肥处理对土壤微生物区系和功能的影响存在关联性。

关键词: 施肥; 微生物区系; DGGE; Biolog

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2014)01-0099-11

Effects of different fertilization on structure and function of soil bacterial community

WU Xiao-sen[1,2], DU Guang-hong[2], MU Chun-lei[1,2], MA Ming-chao[2], ZHOU Xiao-lin[3], ZHAO Tong-kai[3], ZHU Bao-cheng[1], LI Hong-jie[3], SHEN De-long[2*]

(*1 College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; 2 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, CAAS, Beijing 100081, China; 3 Dezhou Academy of Agricultural Sciences, Dezhou, Shandong 253015, China*)

Abstract: In this paper, we used DGGE and Biolog to study the composition and function of soil microbial flora. Based on the UPGMA analysis, the results of the DGGE indicate that T1(CK) and T2(single inorganic fertilizer treatment) have a similarity of 41% in wheat season, T4(conventional NPK + straw) and T5(conventional NPK + straw + straw decomposing inoculants) have a similarity of 52%, and T3(70% conventional NPK + organic fertilizer) is clustered into one group alone. In corn season, the similarity between T1 and T2 is 68%, which is grouped into the first category, the similarity between T4 and T5 is 78%, which is grouped into the second category, and T3 as the third category. These results show that there are similarities between different fertilizer treatments. Through a series of experiments of gel cutting, sequencing and BLAST comparison, we find that most of bacteria in the tested soils is uncultured and the main cultured bacteria belong to *Bacillus* and *Paenibacillus*. Using principal component analysis, the results of Biolog show that T1 and T2 have similar microbial functions, and T4

收稿日期: 2013-05-07 **接收日期:** 2013-08-26

基金项目: 农业部公益性农业行业科研专项(201103004)资助。

作者简介: 武晓森(1987—),男,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事微生物生态学方面的研究。E-mail: mrwuxiaosen@163.com

* 通信作者 Tel: 010-82106208, E-mail: dlshen@caas.ac.cn

and T5 also have similar functions, while T3 has different functions. Carbon source utilization characteristics of microbial communities have different results, T5 and T4 have the strongest metabolic function, and then T3 treatment, and T2 and T1 have the minimum. Our study suggests that the composition and function of soil bacteria have certain consistency under different fertilizer treatments.

Key words: fertilization; microbial flora; DGGE; Biolog

目前我国耕地总量共1.2亿公顷,高、中、低产田各占1/3,第二次土壤普查资料显示,优质地只占12%,总的来看,我国耕地土壤肥力不高,土壤养分转化速度慢,土壤生物活性不高,土壤肥力不能满足农作物产量日益增长的需要,培肥土壤将是今后的战略措施。土壤微生物是土壤生物肥力的核心,是构成土壤肥力不可或缺的组分,不仅可以调节植物生长发育、抑制病害微生物的生长,而且可以促进植物所需营养元素的循环、土壤肥力的保持及能量转化[1-3],土壤微生物的研究已成为土壤研究中的一个热点。随着研究技术的进步,对微生物的研究不仅仅局限在传统的纯培养技术方面,更多的是把目光放在分子水平上。变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术自从1993年由Myuzer等引入微生物生态学研究以来,已被广泛地用于反映微生物群落的多样性以及种群动态变化,可以较完全地了解环境过程和人类活动对土壤微生物多样性的影响[4]。而基于不同微生物种群对不同碳源利用的选择性,Biolog方法可测定土壤微生物群落的功能多样性,可直接反映微生物在土壤物质转化和能量循环中的作用,这两种方法弥补了传统方法上对微生物研究的有限性和片面性[5],更真实全面地反映自然状况下的土壤微生物区系结构变化和功能。

山东省德州市土层深厚、土质肥沃,土壤类型以潮土为主,是国家和山东省重要的粮、棉、蔬生产基地,但由于长期的过度耕作和不良的经营管理方式,在近几年土壤肥力监测中发现土壤肥力偏低[6],目前不同的施肥及耕作方式对该地区的土壤养分、作物产量和土壤酶活性等方面的研究已经有了较多报道,但有关土壤微生物区系组成和功能的研究还鲜有研究。

本试验采用PCR-DGGE和Biolog相结合的方法对山东德州市哨马营村的土壤进行了研究,旨在从区系多样性和功能多样性方面探索不同施肥处理对土壤微生物的影响,为进一步获得良好的施肥方式提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验设计

田间试验在山东省德州市德城区哨马营村进行,德州市地处北纬36°24′~38°0′、东经115°45′~117°24′,属暖温带大陆性季风气候,年平均气温12.9℃,年平均降水量547.5 mm。试验设5个处理:不施肥对照(T1),常规氮磷钾肥(T2),70%常规氮磷钾肥+有机肥(T3),常规氮磷钾肥+全量秸秆还田(T4),常规氮磷钾肥+全量秸秆还田+秸秆腐熟剂(T5)(见表1)。每个处理4次重复,小区面积50 m^2(5 m×10 m),共20个小区,随机排列。小区间隔1 m,试验区外设置5 m保护行。试验前农田土壤0—20 cm土层基本理化性质为:有机质含量20.3 g/kg,全氮1.2 g/kg,全磷0.83 g/kg,全钾20.8 g/kg,有效磷37.4 mg/kg,速效钾282 mg/kg,pH 8.3。氮肥用尿素(含N 46%),磷肥用过磷酸钙(含P_2O_5 16%),钾肥用硫酸钾(含K_2O 50%)。

1.2 样品采集

试验自2010年10月开始,种植作物为冬小麦—夏玉米,小麦品种为济麦22,玉米品种为郑单958。分别于小麦收获后(2011年6月13日)和玉米收获后(2011年10月4日)进行采样,采取0—20 cm土层土壤样品,在每个处理的4个小区分别取9个点的土样,混匀后作为该施肥处理的一个土壤样品,样品于-70℃保藏。

1.3 试验方法

1.3.1 DGGE试验方法

1.3.1.1 土壤微生物群落总DNA的提取 本试验土壤总DNA提取采用美国MOBIO公司的Power Max Soil DNA Isolation Kit。

1.3.1.2 16S rDNA的V3区PCR扩增

1)16S rDNA V3区扩增引物 以样品总DNA为PCR模板,使用Bio-rad C1000 PCR仪对土壤V3区进行扩增,引物为对大多数细菌的16S rRNA基因V3区具有特异性的引物对P2和P3[7],该引物对带有"GC夹子",能够显著提高DGGE的检出率,引物序列为:

表 1　各试验小区施肥量(kg/plot)

Table 1　The fertilizer amounts applied in each treatment plot

处理 Treatment	氮肥 N	磷肥 P_2O_5	钾肥 K_2O	有机肥 Organic fertilizer	秸秆 Straw	秸秆腐熟剂 Straw decomposing inoculants
T1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
T2	3.26/2.72	3.75/1.41	1/0.45	0/0	0/0	0/0
T3	2.27/1.91	2.63/0.98	0.7/0.32	14.99/14.99	0/0	0/0
T4	3.26/2.72	3.75/1.41	1/0.45	0	36.23/42.5	0/0
T5	3.26/2.72	3.75/1.41	1/0.45	0	36.23/42.5	0.75/0.75

注(Note): 表中数据为小麦季施肥量/玉米季施肥量;有机肥为商品有机肥,主要成分为猪粪。Data in the table are wheat season fertilizer/corn season fertilizer; organic fertilizer as commercial organic fertilizer and the main component is pig manure.

P2: 5′-ATTACCgCggCTgCTgg-3′;

P3: 5′-CgCCCgCCgCgCgCggCgggCggggCgggggCACgggggggCCTACgggAggCAgCAg-3′;

P3(无 GC): 5′-CCTACgAggCAgCAg-3′。

2)PCR 反应体系 25.0 μL 体系: DNA 模版 1 μL,Buffer(Mg^{2+} free)2.5 μL,Mg^{2+} 1.5 μL,dNTP 2.0 μL,引物各 1 μL,Taq 酶 0.2 μL,去离子水 15.8 μL。Taq DNA 聚合酶,dNTP 等均购自大连宝生物工程公司;引物合成由上海生工生物技术有限公司引物合成订购表完成。

3) PCR 反应程序为[8]: 预变性 94℃,5 min;94℃,1 min;65℃～56℃,1 min;72℃,3 min(每个循环退火温度下降 0.5℃),20 个循环;94℃,1 min;55℃,1 min;72℃,3 min,10 个循环;延伸 72℃,7 min;PCR 产物长约 230 bp,PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,点样量为 2.5 μL。

4)为获得高质量的产物,采用 Reconditioning PCR(Rec-PCR)进行再次扩增,扩增反应条件为采用 16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物 3.0 μL 为模板,反应程序: 预变性 94℃,5 min;94℃,1 min;55℃,1 min;72℃,3 min,3 个循环,再次进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,点样量 2.5 μL。

1.3.1.3 DGGE 操作　采用 Bio-Rad Dcode 电泳系统,变性剂梯度为 30%～60% 的 8% 聚丙烯酰胺凝胶,加入 Rec-PCR 产物 20 μL,以 0.5 ×TAE 为电泳缓冲液,60℃、70V 条件下电泳 16 h,用 SYBR Green I 染色 30 min,最后用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行条带分析[9]。

1.3.1.4 DGGE 条带回收　DGGE 条带采用酒精沉淀法回收,具体步骤如下: 1)用小刀(每次切胶前将刀子蘸酒精火烧灭菌)将目的条带切下,放入已编号的 1.5 ml 的离心管中。2)在每个管中加入 400 μL 乙醇(分析纯),待 10～15 min 胶变为白色后真空吸走上清液,在离心管中加入 200 μL diffusion buffer,胶转变为透明后,4℃过夜(可以采用 50℃水浴 30 min)。3)分别在每个离心管中加入 3 mol/L NaOAC 20 μL,无水乙醇 500 μL,轻轻上下混匀后于 -80℃放置 30 min。4)离心(4℃,5000 r/min,20 min)去掉上清。5)在离心管中加 70%(体积分数)乙醇 1 mL,混匀后离心(4℃,15000 r/min,2 min),弃上清,室温干燥。6)在离心管中分别加 15 μL TE 溶解,-20℃保存,回收的 DNA 用不带 GC 夹子的引物 P3(无 GC)再次进行 PCR 扩增。

从变性胶板切取典型的条带,再扩增、浓缩、检测后利用 ABI Prism GeneScan System Model 377 进行 DNA 序列分析,根据序列检索 BLAST 数据库查询各条带所代表的近缘种及相似率。

1.3.2 Biolog 试验

1.3.2.1 Biolog Eco 板接种和培养

1) 土壤菌悬液的制备: 分别称取 20 g 各处理供试土壤,放入灭菌的装有 100 mL 浓度为 0.145 mol/L NaCl 的带玻璃珠的 500 mL 三角瓶中,在旋转式摇床上以 200 r/min 充分震荡 40 min,即成土壤菌悬原液。将土壤菌悬原液进行连续两次 10 倍稀释后,即为初步的土壤菌悬液[10]。

2)土壤接种液的制备: 将混匀的土壤菌悬液静置 5 min,让土壤中沙粒稍稍沉淀,用标准浊度管校正浊度计,在 20 mL 已灭菌的生理盐水(0.9% NaC1)中小心地滴加上述步骤中制成的菌悬液,边

混合边滴加,调节接种液浊度为63%。

3)微板中接入土壤接种液:将调节好浊度的土壤接种液倒入专用接种液槽,用8通道移液器吸取土壤接种液,在Biolog生态微板的每孔中加入150 μL土壤接种液,在微板侧边写好时间、样品编号后放入25℃培养箱培养[11]。

4)微板读数:每隔24 h,在Microlog4.2软件平台支持下用Biolog Reader(美国BIOLOG公司)读取各板孔在590 nm和750 nm处的吸光值,并存入结果文件。

1.3.2.2 Biolog数据分析 利用Microlog4.2软件平台,将各数据转换成Excel格式,在Excel及SPSS 19.0统计软件中进行分析。

1)各ECO-MicroPlate数据的AWCD(average well color development)分析 Biolog微孔板的单孔颜色平均值计算采用Classen等[12]的方法。即将单孔在590 nm和750 nm的光密度值分别减去对照孔光密度值,然后再用每个对应孔590 nm的值减去750nm的值,即为单孔实际颜色反应而测得的光密度值,其中数值小于0.06时按0处理。

利用上述处理后的数据,每块微板在某特定时间的整体显色强度,即单孔平均光密度值计算按照Garland和Mills的方法[13],计算方法如下:

$$AWCD = \sum(Ci\text{-}C0)/n \quad (1)$$

式中:Ci为每个培养基孔的吸光度值,C0为对照孔的吸光度值,n为培养基种类(ECO-MicroPlate为31)。

2)各供试土壤微板数据的Shannon-Weinner丰富度指数(H) 土壤悬液所含的微生物物种丰富度用Shannon-Weinner指数(H)表征,计算方法如下:

$$H = -\sum(Pi \times \log Pi);Pi = (Ci\text{-}C0)/\sum(Ci\text{-}C0) \quad (2)$$

式中:Ci与C0含义同(1)式,Pi为有培养基的孔与对照孔的吸光度值差与整个微板总差的比值。

3)各供试土壤微板数据的Shannon-Weinner均匀度指数(E) 土壤悬液所含的微生物物种均匀度用Shannon-Weinner指数(E)表征,计算方法如下:

$$E = H/\ln S \quad (3)$$

式中:H即为Shannon-Weinner丰富度指数,S为有颜色变化的孔数目。

由于Biolog试验获得的数据多,因此直观上很难比较处理间存在的差异,所以主成分分析常被用来比较不同样品微生物群落结构和功能多样性:选取72 h的AWCD值,经过转换计算后得到的单孔相对光密度值用于主成分分析(PCA)[14-18]。

2 结果与分析

2.1 DGGE试验结果

2.1.1 16S rDNA V3区扩增 经PCR扩增后,经1%琼脂糖电泳检测得到大小约为230 bp的片段,特异性好、无杂带,与预期片段大小相符,说明该程序适合用于16S rDNA的扩增,并且能够得到较好的产物,结果见图1和图2。

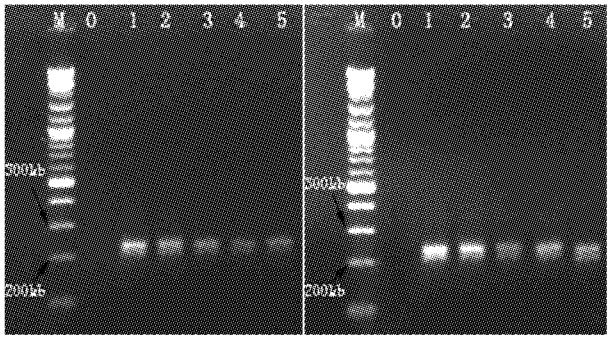

图1 小麦季(左)和玉米季(右)16S rDNA V3区PCR扩增结果

Fig.1 16S rDNA V3 region segment amplified by PCR of wheat season(left) and corn season(right) under different fertilizing treatments

[注(Note):M为Marker,1、2、3、4、5分别为T1、T2、T3、T4、T5的提取结果。M for Marker, 1, 2, 3, 4 and 5 for T1, T2, T3, T4 and T5 extraction results, respectively.]

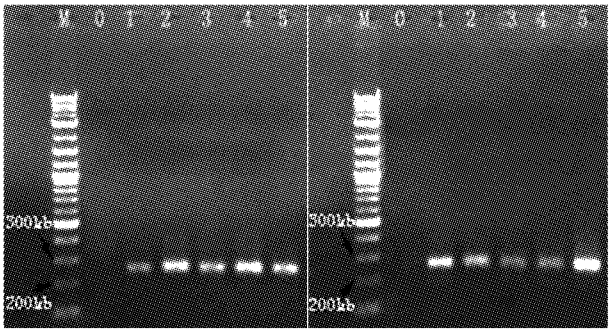

图2 小麦季(左)和玉米季(右)16S rDNA V3区Reconditioning PCR扩增结果

Fig.2 16S rDNA V3 region segment amplified by Reconditioning PCR of wheat season(left) and corn season(right) under different fertilizing treatments

[注(Note):M为Marker,1、2、3、4、5分别为T1、T2、T3、T4、T5的提取结果。M for Marker, 1, 2, 3, 4 and 5 for T1, T2, T3, T4 and T5 extraction results, respectively.]

2.1.2 DGGE 指纹图谱优势条带的回收测序与 UPGMA 聚类分析

2.1.2.1 小麦季和玉米季土壤细菌 DGGE 图谱　由小麦季和玉米季土壤细菌 DGGE 图谱(图 3)可以看出,小麦季中不同施肥处理样品经 DGGE 分离后条带亮度和数量出现一定差异,但也有很多相同的条带。条带 A 在 T2 中亮度最高;条带 B 在各处理中亮度相似;条带 C 在 T1 中亮度最低,在 T3 中亮度最高;条带 D、E 在 T1 中亮度最低,在其它处理中亮度相似;条带 F、G、H、I、J 在各处理间亮度相似。

玉米季中,与小麦季 DGGE 图谱相似,各泳道条带亮度和数量也存在一定差异。与 T1 相比,T2 增加了条带 c;T3 中增加了条带 c,减少了条带 d、f、l;T4 中增加了条带 c,减少了条带 f;T5 中增加了条带 c、h,减少了条带 f。条带 a、b、c 在 T1 ~ T5 处理间亮度依次逐渐提高,然后再降低,在 T3 中亮度最高。条带 f 在 T1、T2 中亮度逐渐降低,在 T3、T4、T5 中消失。其它条带在各处理间的亮度比较接近。各施肥处理细菌 DGGE 图谱显示,不同施肥处理土壤细菌种类及数量存在差异,说明不同施肥处理对土壤细菌组成有一定影响。将条带切胶测序,经 BLAST 比对,结果见表 2 和表 3。

表 2 表明,小麦季条带 F 为类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.),类芽孢杆菌在农业生产上应用广泛,微生物肥料中常见的功能菌株很多来自该属,如具有生防作用的多粘类芽孢杆菌[19]、能够提高土壤中速效钾和速效磷含量的胶质类芽孢杆菌[20]。条带 I(*Bacillus* sp.)为芽孢杆菌属,芽孢杆菌与农业生产的关系密切,在生物肥料、生物农药的生产中有广泛的应用。巨大芽孢杆菌等在降解土壤中难溶的含磷化合物中起着重要的作用,以苏云金芽孢杆菌研制的杀虫剂,是世界上产量最大的微生物杀虫剂[21]。本研究测序结果表明,各处理土壤细菌中

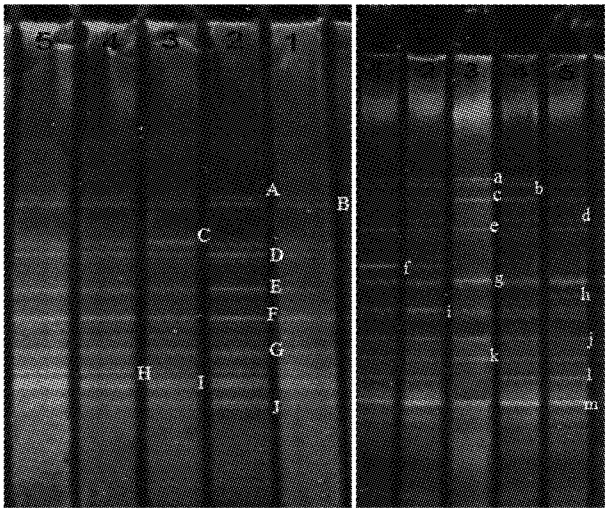

图 3　小麦季(左)和玉米季(右)16S rDNA PCR DGGE 图谱

Fig. 3　16S rDNA PCR DGGE map of wheat season (left) and corn season (right) under different fertilizing treatments

[注(Note):M 为 Marker,1、2、3、4、5 分别为 T1、T2、T3、T4、T5 的提取结果。M for Marker, 1, 2, 3, 4 and 5 for T1, T2, T3, T4 and T5 extraction results, respectively.]

表 2　小麦季 DGGE 图谱中各条带的近缘菌株

Table 2　Identities of wheat season DGGE bands

序号 No.	最相似菌株(NCBI 登录号) Most similar to the strain (NCBI accession number)	相似性(%) Similarity
A	Uncultured Acidobacteria bacterium clone KBS(HM062406.1)	98
B	Uncultured bacterium clone WW2_IND_D1(JQ413497.1)	94
C	Bacterium enrichment culture clone BBMC-2(GU476602.1)	97
D	Uncultured bacterium clone Pohang(HQ504611.1)	90
E	*Pontibacter* sp. ML44(JN791361.1)	85
F	*Paenibacillus* sp. 3LF14TD(EU417658.1)	99
G	Uncultured soil bacterium clone Bact. wet. ECATD09(GU375095.1)	97
H	Uncultured soil bacterium clone S2(EU401880.1)	93
I	*Bacillus* sp. cp-h24(EU584537.1)	99
J	Uncultured bacterium clone CRO_C6_GW_(JQ041436.1)	91

表3 玉米季 DGGE 图谱中各条带的近缘菌株

Table 3 Identities of corn season DGGE bands

序号 No.	最相似菌株(NCBI 登录号) Most similar to the strain (NCBI accession number)	相似性(%) Similarity
a	*Bacillus* subtilis strain FPA3 2-2(JQ308552.1)	99
b	Uncultured bacterium clone WW1_a55(GQ264187.1)	91
c	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band e1(GU384995.1)	93
d	Uncultured Bacteroidetes bacterium(FM877553.1)	92
e	Microbacterium hydrocarbonoxydans strain ATY39(HQ219958.1)	99
f	Uncultured bacterium clone ST350(JF701411.1)	98
g	Uncultured bacterium(GU384995.1)	93
h	Uncultured *Cytophaga ceae* bacterium clone 4.6h40(JN679127.1)	90
i	Uncultured soil bacterium clone Bact. wet. ECATD09(GU375095.1)	98
j	Uncultured bacterium clone MRFbacterium111(FJ223727.1)	90
k	*Paenibacillus* sp. ITCr59(FR823415.1)	99
l	*Bacillus* aryabhattai isolate PSB54(HQ242767.1)	100
m	*Bacillus* aryabhattai strain R5-306(JQ659724.1)	99

多数为不可培养细菌。主要为芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属菌群,在土壤养分循环和生物防治中可能发挥着重要的作用。

玉米季土壤细菌组成和小麦季类似,多为不可培养细菌,可培养细菌中,主要为芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属菌群。在玉米季测序结果中也发现了与小麦季不同的菌群,其中条带 e(*Microbacterium*)为微杆菌属,在各施肥处理土壤中广泛存在。有研究称,在污泥中分离出的 S1 为微杆菌属,可降解有机磷[22]。条带 h(*Cytophaga ceae*)为噬纤维细菌,属噬纤维菌属,仅分布在 T5 中。研究表明,噬纤维细菌具有降解纤维素的能力[23]。其在 T5 中为优势菌,有助于降解 T5 中还田的秸秆,增加土壤养分。与小麦季相比,玉米季土壤中增加了一些功能菌群。

2.1.2.2 小麦季和玉米季 DGGE 指纹图谱的 UPGMA 聚类分析 为了进一步分析不同施肥处理对土壤细菌的影响,运用 UPGMA 对小麦季和玉米季 DGGE 图谱进行聚类分析(图4)。

小麦季土壤细菌 DGGE 图谱显示,T1 和 T2 相似性为41%,T4 和 T5 相似性为52%,而 T3 单独聚为一类。因此,小麦季不同施肥处理土壤细菌群落可分为三大类群:不施肥处理(T1)和单施无机肥

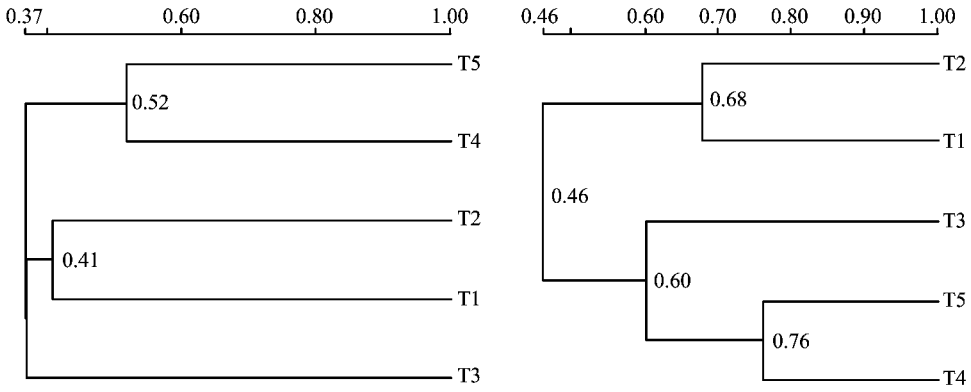

图4 小麦季(左)和玉米季(右)的 DGGE 图谱的 UPGMA 聚类分析

Fig.4 UPGMA cluster analysis of wheat season(left) and corn season(right) DGGE map

处理(T2)为第一类群;秸秆还田配施无机肥处理(T4、T5)土壤细菌群落为第二类群;而有机肥配施无机肥处理(T3)为第三类群。玉米季土壤细菌DGGE 图谱聚类分析得到的结果和小麦季类似,不同施肥处理土壤细菌群落也可分为三大类群: 不施肥处理(T1)和单施无机肥处理(T2)相似性为68%,可归为第一类;同样的秸秆还田配施无机肥处理(T4、T5)相似性达 76%,为第二类; 而有机肥配施无机肥处理(T3)归为第三类,但其与第二类相似性也达到了 60%。说明不同施肥制度影响了土壤细菌群落的组成,然而,在 DGGE 图谱中,不同处理间仍然存在许多共同的条带,说明土壤微生物是个不断变化的过程,不同的施肥措施会对其产生相似的影响,某些种属的微生物始终存在,其可能是一些生态幅比较广泛的细菌种属[24],而这种影响可能会越来越类似。

以上结果说明,不同施肥处理对土壤细菌群落结构的影响存在差异。与单施无机肥和不施肥处理相比,经秸秆还田或有机肥处理后,土壤细菌群落结构发生了较大的变化,而秸秆还田和有机肥对土壤细菌的作用效果不同,造成了相应处理间土壤细菌群落结构的差异。小麦季中 T1 和 T2 相似性为41%,T4 和 T5 的相似性为 52%,但到了玉米季 T1 和 T2 相似性达到了 68%,T4 和 T5 也提高到了76%。而随着长期施肥,土壤对这些施肥处理的逐渐适应和调整,这种相似性会越来越高,形成稳定的微生物区系。

2.2　Biolog 试验结果

2.2.1 单孔颜色平均变化　平均颜色变化率(AWCD)是反映土壤微生物代谢活性的重要指标,AWCD 的高低可用来表征微生物对碳源的利用率高低。AWCD 值越大,表明细菌密度越大、活性越高;反之,细菌密度越小、活性越低[25]。小麦季和玉米季不同施肥处理土壤的 AWCD 分析结果如图 5 所示,可以看出,两季不同施肥处理土壤微生物 AWCD 的变化趋势均表现为 24 ～72 h 曲线斜率最大,表明此阶段土壤微生物碳源代谢活性最高,之后进入平稳期,代谢活性正常。而不同处理间比较(以 168 h 数据为例),发现施肥处理 AWCD 值高于不施肥对照。施肥处理中 T5 最高,T4、T3 次之,由此可以说明,秸秆还田和施用有机肥及无机肥处理的土壤微生物代谢活性高于单施化肥处理,而不施肥对照土壤微生物的代谢活性最低。

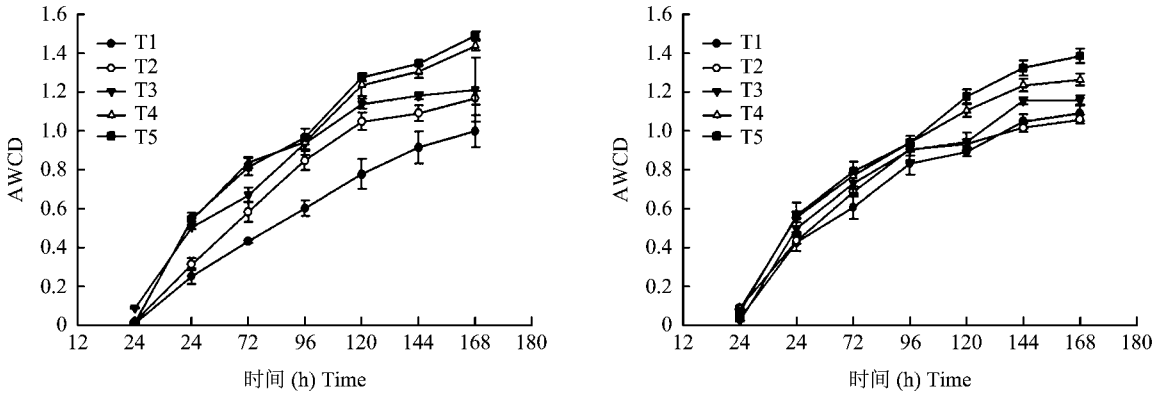

图 5　小麦季(左)和玉米季(右)不同施肥处理土壤微生物的孔平均颜色变化率(AWCD)

Fig. 5　The average well color development (AWCD) of soil microbe in different treatments of wheat season(left) and corn season(right)

2.2.2 微生物群落物种丰富度指数(H)和物种均匀度指数(E)　Shannon 多样性指数表示在颜色变化率一致的情况下,整个生态系统土壤微生物群落利用碳源类型的多与少,即功能多样性。某生态系统 Shannon 多样性指数值越大,表明该系统的土壤微生物群落功能多样性越高,反之,则多样性越低。Shannon 均匀度指数是通过 Shannon 多样性指数计算出来的均度,包含两个因素,其一是种类数目,即丰富度,其二是种类中个体分布的均匀性。种类数目越多,多样性越大;同样,种类之间个体分配的均匀性增加也会使多样性提高。Simpson 优势度指数反映了各物种种群数量的变化情况,指数越大,说明群落内物种数量分布越不均匀,优势种的地位越突出[26],微生物多样性较差。

从表4可以看出,秸秆还田配施无机肥和有机肥配施无机肥处理的微生物群落物种丰富度指数(H)和物种均匀度指数(E)均高于其它处理,不施肥对照最低。小麦季与玉米季土壤微生物群落物种丰富度指数和均匀度指数T5最高,造成这种结果的原因,一方面可能是由于秸秆还田,不仅增加了土壤碳素含量,还改善了土壤的物理性质,给土壤微生物提供了适宜的生长环境;另一方面施加秸秆腐熟剂,不仅有利于秸秆腐解,其中的微生物也对土壤起到了"接种"的作用,使土壤微生物丰富度增加。而优势度指数(D_S)的结果显示,单施无机肥和不施肥对照处理略高于其它施肥处理,这说明单施无机肥和不施肥的土壤微生物群落会受到优势菌群的影响,抑制了某些种群的正常代谢。这与时鹏等[27]通过玉米连作及施肥试验得出的结果一致。

表4 不同施肥处理土壤微生物多样性指数(72 h)

Table 4 The analysis of microbial community diversity index in different treatments (72 h)

处理 Treatment	物种丰富度指数(H) Shannon-Wiener diversity		物种均匀度指数(E) Shannon-Wiener evenness		优势度指数(D_S) Simpson	
	小麦季 Wheat season	玉米季 Corn season	小麦季 Wheat season	玉米季 Corn season	小麦季 Wheat season	玉米季 Corn season
T1	2.96 ±0.04 c	3.01 ±0.02 b	0.90 ±0.01 b	0.92 ±0.08 b	0.95 ±0.06 a	0.94 ±0.03 a
T2	3.12 ±0.04 b	3.67 ±0.01 a	0.92 ±0.02 b	1.05 ±0.03 b	0.99 ±0.02 a	0.98 ±0.03 a
T3	3.21 ±0.04 b	3.70 ±0.07 a	0.94 ±0.01 b	1.18 ±0.02 a	0.94 ±0.02 a	0.93 ±0.03 a
T4	3.90 ±0.04 a	3.83 ±0.02 a	0.93 ±0.02 b	1.21 ±0.05 a	0.94 ±0.02 a	0.93 ±0.07 a
T5	3.94 ±0.04 a	3.83 ±0.01 a	1.14 ±0.01 a	1.21 ±0.04 a	0.94 ±0.06 a	0.93 ±0.09 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 treatment at the 5% level.

2.2.3 主成分分析结果 Garland等[13]认为,在PCA图上各样本在空间上的位置和碳底物的利用能力有关,各样本在PC轴坐标的差异与聚集在该PC轴上碳源的利用能力有相关性,可以更直观地反映不同施肥处理碳源利用差异。图6显示,不同处理在PC轴上分布有一定的差异,说明不同处理在一定程度上对土壤微生物群落功能有影响。小麦季主成分散点图显示,在PC1轴上,对照(T1)和单施无机肥(T2)处理的分布接近,秸秆还田处理(T4、T5)分布接近,有别于有机肥处理(T3);在PC2轴上,对照(T1)、单施无机肥(T2)处理的分布较接近,而秸秆还田处理(T4、T5)分布接近。玉米季主成分散点图显示分布规律与小麦季略有不同,主要差异在于,在PC2轴上秸秆还田处理(T4 、T5)的分布在负方向上,与小麦季的分布规律相反。通过主成分分析可以发现,不同处理对土壤微生物群落功能会产生影响,不施肥和单施无机肥处理土壤微生物功能类似,同样,秸秆还田处理土壤微生物也具有相似的功能。罗希茜等[28]通过稻田施肥试验也得到了相同的结论。

3 讨论与结论

本研究通过DGGE试验表明,在小麦季和玉米季中,不同施肥处理对土壤细菌群落结构的影响存在差异,与单施无机肥和不施肥处理相比,经秸秆还田或有机肥处理后,土壤细菌群落结构发生了较大的变化,而秸秆还田和有机肥对土壤细菌的作用效果不同,造成了相应处理间土壤细菌群落结构的差异,其中,T1、T2聚为一个类群,T4、T5聚为一个类群,而T3单独为一个类群。经测序和BLAST比对,大多为不可培养细菌,可培养细菌中多为芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属。郭隽馥[29]在长期定位施肥试验中研究土壤细菌群落得出的结论显示,四种土壤样品共分为两大族群,不施肥对照、有机肥和有机肥配施氮肥为一种族群,单施氮肥为另一种族群。说明长期施用氮肥可改变土壤细菌群落结构,而长期施用有机肥以及有机肥和氮肥混施对土壤细菌群落结构影响不大。而且,有机肥和有机肥配施氮肥处理聚为更相近的一类,说明当氮肥跟有机肥混施时有机肥对土壤细菌类群起主要作用。武发思[30]研究长期定位施肥对黄土高原土壤微生物群落结构

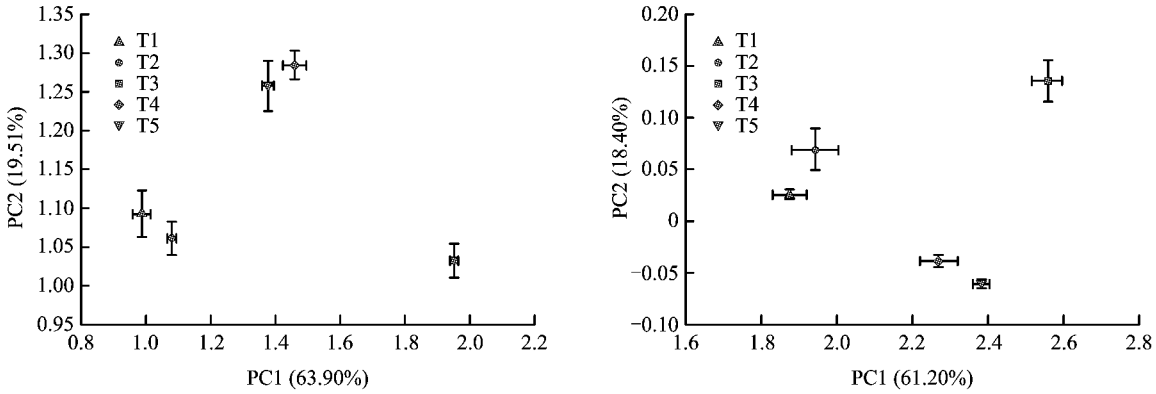

图 6　小麦季(左)和玉米季(右)各施肥处理主成份散点图

Fig. 6　Scattered dot diagram of principal components in different treatments of wheat season(left) and corn season(right)

的影响发现,长期施肥可以增加小麦根际细菌多样性。施有机肥有利于提高根际细菌物种丰富度和多样性。不同施肥处理对根际细菌群落结构影响不同,有机肥对细菌多样性增加和群落结构改变作用明显。解开治等[31]在多年连作的老菜地上,采用 DGGE 技术发现不同种植模式可调控土壤细菌群落结构组成。但 DGGE 也有一些缺陷,只能反映土壤菌群中的优势菌群,而弱势菌群则不能检测到[32]。

Biolog 的试验结果表明,Biolog 分析土壤微生物功能多样性结果可知,T3、T4 和 T5 的 AWCD 值、微生物群落物种多样性指数(H)、均匀度指数(E)高于 T2 和 T1,而优势度指数(D_S)的结果恰恰相反,说明不施肥和单施无机肥处理降低了微生物群落结构的多样性,而秸秆还田和有机肥处理大大提高了土壤中的微生物多样性。主成分分析结果表明,不同施肥处理的土壤微生物对碳源的利用情况存在相似性,其中,不施肥处理和单施无机肥处理土壤微生物功能类似,秸秆还田处理利用碳源的种类类似,这与上文中 DGGE 结果相似。王艳霞等[33]利用 Biolog 技术对不同肥料处理的微生物群落进行分析,结果表明,生物复混肥可提高土壤微生物对单一碳源利用的能力。侯晓杰等[11]试验表明,裸地各施肥处理在碳源的利用上存在着较大的差异,裸地不同施肥处理在 PC1 轴上出现了明显的分异,这也与本研究结果类似。尽管 Biolog 技术常被用于研究土壤微生物群落功能,但该技术本身也有局限性。Biolog 技术表征的只是土壤中生长快速或富营养微生物的活性,而不能反映土壤中生长缓慢或不可培养微生物活性[34-35]。因此采用 Biolog 技术解析的只能是土壤中部分微生物群落特征,要全面解析土壤微生物群落结构还需结合其他的研究手段。

综上所述,在各施肥处理中单施无机肥,降低了微生物群落的活性,秸秆还田和有机无机肥配施处理中,不仅显著提高了微生物活性,而且丰富了微生物多样性,添加腐熟剂与秸秆还田配施无机肥变化不明显,可能是由于种植时间短,还没有显现出显著的优势。Biolog 分析结果与 DGGE 方法分析土壤细菌群落组成和功能都表明,不施肥对照和常规氮磷钾肥处理为一个类群,常规氮磷钾肥 + 秸秆还田和常规氮磷钾肥 + 秸秆还田 + 秸秆腐熟剂处理为一个类群,而 70% 常规氮磷钾肥 + 有机肥处理单独为一个类群,两种方法得出的结果存在关联性。

参 考 文 献:

[1] 李阜棣, 胡正佳. 微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社. 2006.
Li F D, Hu Z J. Microbiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006.

[2] Enwall K, Nyberg K, Bertilsson S *et al*. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil[J]. Soil Biol. Biochem, 2007, 39(1): 106-115.

[3] Bradley J C, Diane S S, Duffy E *et al*. Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems[J]. Nature, 2006, 443: 989-992.

[4] Muyzer G, De Waal 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[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59: 695-700.

[5] Ward D M, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a nature community[J]. Nature, 1990, 344: 63-65.

[6] 李怀军, 刘忠海, 曲善功, 等. 德州市土壤肥力变化及分析

[J]. 中国农学通报, 2009, 25(13): 134-137.
Li H J, Liu Z H, Qu S G *et al*. Dezhou soil fertility change and analysis[J]. Chin. Agric. Sci. Bull., 2009, 25(13): 134-137.

[7] Haruta S, Cui Z J, Huang Z, Li M *et al*. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 59: 529-534.

[8] Erik J van Hannen, Zwart G, Miranda P van Agterveld *et al*. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with virus[J]. Appl Environ. Microbiol, 1999, 65: 795-801.

[9] Sekiguchi H, WatanabeM, Tadaatsu N *et al*. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68(10): 5142-5150.

[10] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 赵同谦. BIOLOG在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J]. 土壤学报, 2004, 41(3): 456-461.
Zheng H, Ouyang Z Y, Fang Z G, Zhao T Q. Application of biolog to study on soil microbial community functional diversity [J]. Acta Pedol. Sin., 2004, 41(3): 456-461.

[11] 侯晓杰, 汪景宽, 李石朋. 不同施肥处理与地膜覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(2): 655-661.
Hou X J, Wang J K, Li S P. Effects of different fertilization treatments and plastic-mulching on functional diversity of soil microbial community[J]. Acta Ecol. Sin., 2007, 27(2): 655-661.

[12] Classen A T, Boyle S I, Heskins K E *et al*. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils[J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2003, 44: 319-328.

[13] Gafand 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]. Appl. Enviro. Microbiol., 1991, 57: 2351-2359.

[14] 郭宝林, 杨俊霞, 李永慈, 于树胜. 主成分分析法在仁用杏品种主要经济性状选种上的应用研究[J], 林业科学, 2006, 36(6): 53-56.
Guo B L, Yang J X, Li Y C, Yu S S. The application of principal component analysis on main economic characters and superior variety selection of apricot for nucleolus using[J]. Sci. Silv. Sin. 2006, 36(6): 53-56.

[15] 何晓群. 多元统计分析(第二版)[M]. 北京: 中国人民大学出版社, 2008.
He X Q. Multivariate statistical analysis (2nd Ed.)[M]. Beijing: China Renmin University Press, 2008.

[16] Kela P W, Jason A G, Matthias G *et al*. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates[J]. J. Microbiol. Methods, 2007, 69: 461-469.

[17] Grove J A, Kautola H, Javadpour S *et al*. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter[J]. Biochem. Eng. J., 2004, 18: 111-114.

[18] Min L, Xiao M X, Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area[J]. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2007, 66: 217-223.

[19] 赵仲麟, 马鑫, 袁超, 等. 3株产β-甘露聚糖酶菌株的分离和鉴定[J]. 河南农业大学学报, 2011, 45(6): 684-687.
Zhao Z L, Ma X, Yuan C *et al*. Isolation and identification of three strains with β-mannanase activity[J]. J. Henan Agric. Univ. 2011, 45(6): 684-687.

[20] 赵艳, 洪坚平, 张晓波. 胶质芽孢杆菌遗传多样性ISSR分析[J]. 草地学报, 2010, 18(2): 212-218.
Zhao Y, Hong J P, Zhang X B. Analysis of genetic diversity in *Bacillus mucilaginosus* determined by Inter-simple sequence repeats markers[J]. Acta Agrestia Sin., 2010, 18(2): 212-218.

[21] 张华勇, 李振高. 土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用[J]. 土壤, 2001, (2): 92-97.
Zhang H Y, Li Z G. The sustainable use of the soil bacillus and its resources[J]. Soils, 2001, (2): 92-97.

[22] 陈倩颖, 胡子全, 刘连生, 等. 6株解有机磷细菌的分离鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(3): 417-421.
Chen Q Y, Hu Z Q, Liu L S *et al*. Isolation and identification of six phosphate-solubilizing bacteria[J]. J. Anhui Agric. Univ., 2009, 36(3): 417-421.

[23] 韩文彬, 徐正学, 苏婧, 等. 哈氏噬纤维菌生活史中形态的变化[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 18-22.
Han W B, Xu Z X, Su J *et al*. Morphologic changes in the life cycle of *Cytophaga hutchinsonii*[J]. Acta Microbiol. Sin., 2009, 49(1): 18-22.

[24] 李娜, 林晓珊, 张毅. PCR-DGGE技术分析倒置A2/O工艺处理染织废水中的微生物区系[J]. 环境科学学报, 2010, 30(3): 490-495.
Li N, Lin X S, Zhang Y. Microbial community structure analysis in activated sludge of dyeing-weaving wastewater treated with anoxic-anaerobic-aerobic process by PCR-DGGE[J]. Acta Sci. Circumst., 2010, 30(3): 490-495.

[25] Haack S K, Garchow H, Klug M J *et al*. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 1458-1468.

[26] 孟庆杰, 许艳丽, 李春杰, 等. 不同植被覆盖对黑土微生物功能多样性的影响[J]. 生态学杂志, 2008, 27(7): 1134-1140.
Meng Q J, Xu Y L, Li C J *et al*. Effects of diffeent vegetation coverage on microbial functional diversity in black soil[J]. Cin. J. Ecol., 2008, 27(7): 1134-1140.

[27] 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 P, Gao Q, Wang S P *et al*. Effects of continuous cropping of

corn and fertilization on soil microbial community functional diversity[J]. Acta Ecol. Sin., 2010, 30(22): 6173-6182.

[28] 罗希茜，郝晓晖，陈涛，等. 长期不同施肥对稻田土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报，2009，29(2)：740-748.
Luo X Q, Hao X H, Chen T *et al*. Effects of long-term different fertilization on microbial community functional diversity in paddy soil[J]. Acta Ecol. Sin., 2009, 29(2): 740-748.

[29] 郭隽馥. 长期定位施肥棕壤及西藏高原土土壤微生物特性研究[D]. 沈阳：东北大学硕士学位论文，2008.
Guo J F, Studies on soil microbial characteristics of brown soil in long-term fertilization experiment and tibet plateau soil [D]. Shenyang: Ms thesis of North Eastern University, 2008.

[30] 武发思. 长期定位施肥对黄土高原土壤微生物群落结构的影响[D]. 兰州：兰州大学硕士学位论文，2009.
Wu F S. The effect of long-term fertilization on the soil microbial community in the Loess Plateau of China [D]. Lanzhou: Ms thesis of Lanzhou University, 2009.

[31] 解开治，徐培智，李康活，等. 三种不同种植模式对土壤细菌群落多样性的影响[J]. 植物营养与肥料学报，2009，15(5)：1107-1113.
Xie K Z, Xu P Z, Li K H *et al*. Effects of three different cropping systems on diversity of soil bacterial community [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2009, 15(5): 1107-1113.

[32] 孙晓棠，姚青，刘琼光，朱红惠. 利用 DGGE 评价不同培养基回收番茄根际细菌类群的能力[J]. 微生物学报，2006，45(3)：482-486.
Sun X T, Yao Q, Liu Q G, Zhu H H. Capacity evaluation of different media for isolating bacteria populations from the rhizosphere of tomato plants with DGGE [J]. Acta Microbiol. Sin., 2006, 45(3): 482-486.

[33] 王艳霞，冯宏，李华兴，等. 生物复混肥对土壤微生物的影响研究[J]. 植物营养与肥料学报，2008，14(6)：1206-1211.
Wang Y X, Feng H, Li H X *et al*. Effects of bio-compound fertilizer on soil microorganism [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2008, 14(6): 1206-1211.

[34] 李春格，李晓鸣，王敬国. 大豆连作对土体和根际微生物群落功能的影响[J]. 生态学报，2006，26(4)：1144-1150.
Li C G, Li X M, Wang J G. Effect of continuous soybean cropping on bulk and rhizosphere soil microbial community function[J]. Acta Ecol. Sin., 2006, 26(4): 1144-1150.

[35] Konopka A, Oliver L, Turco R F. The use of carbon substrate utilization pattens in environmental and ecological microbiology [J]. Microbiol. Ecol., 1998, 35(2): 103-115.