

DOI: 10. 11766/trxb201311030512

菌肥对青稞根际土壤理化性质以及 微生物群落的影响*

朱丹¹ 张磊^{1†} 韦泽秀² 刘晓燕¹ 周志峰¹ 代先祝¹ 王晓锋¹
夏志强¹ 吴先勤¹ 蔚建军¹ 付莉¹

(1 西南大学资源环境学院, 重庆 400716)

(2 西藏自治区农牧科学院农业研究所, 拉萨 850032)

摘要 应用化学分析、聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术和 DNA 测序技术, 研究了西藏棕色砂壤土中微生物肥料不同施用量和施用期对青稞根际土壤理化性质和细菌群落多样性的影响。结果表明, 施用谷特菌肥能显著提高土壤全氮、全磷、全钾、有机质、碱解氮、有效磷和速效钾的水平, 如播前施用菌肥浓度 750 ml hm^{-2} 的处理较不施用菌肥的处理上述指标分别提高 13.32%、28.42%、16.20%、9.81%、21.36%、39.35% 和 30.48%, 拔节期施用菌肥浓度 2250 ml hm^{-2} 的处理较不施用菌肥的处理分别提高 7.25%、29.35%、18.04%、12.86%、15.90%、43.27% 和 53.99%。DGGE 分析表明, 相同施用方式中不同施用量土样中微生物的 DGGE 图谱相似。非加权组平均法 (UPGMA) 聚类分析将 DGGE 图谱分为 2 大类群。Shannon-Wiener 指数表明, 施用菌肥的土壤细菌多样性先增加后逐渐降低, 播前以喷施谷特菌浓度 750 ml hm^{-2} 时的细菌多样性最高; 拔节期则以喷施谷特菌浓度 2250 ml hm^{-2} 处理的细菌多样性最高, 且两种施用方式土壤养分的释放与 Shannon 指数的变化规律均为播前 > 拔节期。测序结果表明, 不同施肥浓度土样微生物种群分布较为广泛, 其中 *Actinobacteria* 纲细菌种类略多, 少数菌种为未经培养菌种 (Uncultured bacterium)。典型对应分析 (CCA) 表明, DGGE 图谱条带分布与土壤理化性质密切相关, 碱解氮、全磷和全氮是影响微生物群落的主要环境因子。研究结果表明, 施用谷特菌肥可明显改善青稞根际土壤理化性状, 提高土壤细菌多样性。

关键词 菌肥; 根际土壤; 理化指标; PCR-DGGE; 微生物多样性

中图分类号 Q938.1³; S154.36 **文献标识码** A

土壤微生物是土壤生态系统中极其重要和最为活跃的部分^[1], 在养分循环、系统稳定性和抗干扰能力以及可持续生产力中占主导地位^[2], 是土壤 C、N 和 P 等元素转化和循环的主要动力, 也是土壤有机质分解、腐殖质形成等生化过程的主要参与者, 在整个生态系统中起重要作用^[3]。因此研究土壤微生物对不同田间管理措施的响应, 可以用于评价田间管理措施。

生物菌肥主要以微生物生命活动的产物及其所含的酶类来改善植物根际的营养条件和抑制病原菌, 是一种无公害肥料^[4], 其主要作用在于增强土壤生物活性、提高植物的抗逆抗病能力和提高作物生长状况及品质^[5]。随着生物科学技术的不断

发展, 微生物肥料在研究与应用方面取得了很大进展^[6]。关于微生物菌肥对根际土壤微生物群落结构的影响, 虽有少量研究报道, 但缺乏运用现代分子生物学技术手段。本研究将着眼于用化学和分子生物学手段评价施用菌肥对土壤肥效和微生物群落的影响, 以探讨微生物菌肥培肥种植青稞土壤的可行性和机理。

传统的实验室培养鉴定的微生物种类仅占土壤微生物种类总数的 0.1% ~ 1%^[7], 运用传统的微生物分离培养方法研究土壤微生物种群构成, 会导致严重的微生物多样性信息的缺失。自 1993 年 Muyzer 等^[8]首次将变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术应用于分析

* 国家农业部“948”项目 (2011-Z35) 资助

† 通讯作者, E-mail: zhanglei03@aliyun.com

作者简介: 朱丹 (1986—), 女, 湖南娄底人, 硕士研究生, 主要从事农业、环境微生物研究。E-mail: zhudanzgy@126.com

收稿日期: 2013-11-03; 收到修改稿日期: 2014-01-17

土壤微生物群落结构的研究以来,如今已成为研究种群动态性和微生物群落多样性的一种最常用现代分子生物学技术,被广泛应用于土壤^[9]、江河^[10]和根际^[11]等微生物生态环境的研究之中。

西藏位于我国西南边陲,高寒低温等极端环境胁迫造成土壤保肥性能差^[12]和微生物活性下降^[13]。青稞是西藏的第一大作物,也是西藏地区最具特色的原料作物。但西藏高寒地区农民习惯施肥量少,土地肥力低,青稞产量低,制约经济发展。因此,为了改善当地土壤肥力条件,提高青稞的产量和质量,对青稞及其土壤施用微生物菌肥有极其重要的意义。

有关微生物菌肥及其施肥方式对土壤理化性质影响方面的研究较多,而对其对根际土壤的影响研究较少,尤其是从分子水平进行的研究就更少。本文将化学分析、PCR-DGGE 和 DNA 测序技术结合,分析比较谷特菌肥不同施用量和施用期处理西藏青稞地土壤肥力指标和细菌群落结构多样性,探讨菌肥对土壤肥力和微生物多样性的影响,旨在为揭示生物肥料效果和科学合理评价微生物菌肥肥效提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验地位于西藏拉萨堆龙德庆县羊达乡羊达村(N29°39'4",E90°59'45"),海拔 3 700 m,最高气温 29℃,最低气温零下 16.5℃,年均气温 7.4℃,气候寒冷潮湿,昼夜温差大,太阳辐射强,全年日照时间 3 023 h 以上。降雨集中在 7、8、9 月份,年降水量约 500 mm。

1.2 供试材料

供试土壤为河谷农区棕色砂壤土,基础理化性质如下:有机质 9.58 g kg⁻¹、全氮 0.93 g kg⁻¹、全磷 0.28 g kg⁻¹、全钾 20.98 g kg⁻¹、碱解氮 123.0 mg kg⁻¹、有效磷 5.66 mg kg⁻¹、速效钾 50.32 mg kg⁻¹、pH 6.60。

供试青稞品种为藏青 320,由西藏自治区农牧科学院农业研究所制种。

供试菌肥为谷特菌肥,购买自禾康肥料有限公司。谷特菌肥含有有机质 98%、全氮 2.0%、P₂O₅ 1.0% 和 K₂O 0.5%,活菌数达到 9 × 10⁸ cfu g⁻¹。试验中菌肥配置方法为:0.15 kg 谷特菌肥一瓶,60 kg 黄豆粉,60 kg 二号砂糖或糖蜜,600 L 水,一起搅

拌、混匀,每日搅拌或通气,7 ~ 10 d 后制成菌肥悬液,使用时稀释 500 倍。

1.3 试验方法

1.3.1 试验设计 青稞的施肥采用化肥与谷特菌肥配施,根据菌肥用量不同设 9 个处理,分别为不施菌肥对照 0 ml hm⁻² (T1),菌肥播前底施(2011 年 5 月 1 日将菌肥稀释后直接喷洒于土壤中): 750 ml hm⁻² (T2)、1 500 ml hm⁻² (T3)、2 250 ml hm⁻² (T4)、3 000 ml hm⁻² (T5);和拔节期根施(2011 年 5 月 20 日将菌肥稀释后均匀喷洒于土壤中): 750 ml hm⁻² (T6)、1 500 ml hm⁻² (T7)、2 250 ml hm⁻² (T8)、3 000 ml hm⁻² (T9)。化肥施用量为磷酸二铵 112.5 kg hm⁻²,尿素 75 kg hm⁻²,氯化钾 22.5 kg hm⁻²,作为基肥一次性全部施入,各处理间保持一致。小区面积 50 m² (5 m × 10 m),3 次重复。种植期间施肥、灌溉、中耕除草等统一管理,种植时间为 2011 年 5 月初至 7 月末。

1.3.2 样品采集与分析 青稞收获后,在试验区内用土钻以“S”型随机选择青稞根际土壤进行混合作为测定样品。先将青稞根部的浮土抖去,用无菌小刀将根附近 5 mm 范围内的土壤小心刮下作为根际土壤。取样后将土壤中的植物残渣除去,土壤样品风干后过 1 mm 和 0.25 mm 土壤筛,用于测定土壤 pH(m_水:m_土 = 5:1);有机质采用重铬酸钾-硫酸外加热法;全氮采用高氯酸-浓硫酸消化、半微量开氏蒸馏法;全磷采用高氯酸-浓硫酸消化、钼蓝比色法;全钾采用 NaOH 熔融、火焰光度计测定;碱解氮采用碱解扩散法;有效磷采用 NaHCO₃ 浸提、钼锑抗比色法^[14];速效钾采用醋酸铵浸提、火焰光度计测定。

1.3.3 基因组总 DNA 的提取和 PCR 扩增 采用 OMEGA 公司 E. Z. N. A Soil DNA Kit D5625-01 提取试剂盒 (<http://www.omegabiotek.com/genomicsoilmini.asp>) 进行提取。提取的土壤 DNA 稀释 20 倍用于后续 PCR 扩增实验。使用细菌 16S rDNA 通用引物 338F-GC (5'-GC-clamp-ACTCCTACGGGAG-GCAGCAG-3') 和 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (GC 夹序列为:CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGG) 扩增。PCR 反应体系为 50 μl: TaKaRa Taq (5 U μl⁻¹) 0.25 μl、10 × PCR Buffer (Mg²⁺) 5 μl、MgCl₂ (25 mmol L⁻¹) 3 μl、dNTP Mixture (各 2.5 mmol L⁻¹) 4 μl、模板 DNA (100 μg ml⁻¹) 2 μl、引物 1 (20 μmol L⁻¹) 1 μl、引物 2 (20 μmol L⁻¹) 1 μl,灭菌纯水补齐至 50 μl。

PCR 反应条件为:预变性 95℃ 3 min,32 个 PCR 循环 (94℃ 30 s、53℃ 30 s、72℃ 30 s) 和最终延伸 72℃ 10 min,4℃ 保存。PCR 反应产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, -20℃ 保存备用。

1.3.4 变性梯度凝胶电泳 通过基因突变检测仪 (Bio-Rad) 对 PCR 扩增产物进行电泳。制备 8% 的变性剂浓度为 35% ~ 60% (100% 变性剂为 40% 的去离子甲酰胺和 7 mol L⁻¹ 尿素混合物) 的聚丙烯酰胺凝胶。将已浓缩的 PCR 样品 30 μl 和 6 μl 6 × Loading Buffer 混匀后加入上样孔,将胶板放入 1 × TAE 电泳液中,在 70 V 的电压和 60℃ 恒温下电泳 14 h。电泳完毕后,将凝胶用稀释一万倍的 SYBR Green I 溶液避光染色 30 min。用凝胶成像仪对染色后的凝胶进行拍照。

1.3.5 切胶与测序 用灭菌刀将 DGGE 胶上比较亮的条带进行切割后放入 1.5 ml 的离心管中,将回收的条带用灭菌枪头挤碎,加入 50 μl 的 TE 缓冲液并放入 4℃ 冰箱中过夜。次日,于 2000 r min⁻¹ 常温下离心 1 min,取 2 μl 上清液为模板,引物为不带 GC 夹的 338F 和 518R,按 1.3.3 中的 PCR 反应体系和程序再次扩增。PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行切胶,利用 Biospin 胶回收试剂盒对切割后的条带进行回收。胶回收产物与 pMD[®]20-T Vector 连接 (TaKaRa 公司 pMD[®]20-T Vector) 后转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5α 感受态细胞,在含氨苄青霉素、IPTG 和 x-gal 的 LB 培养基上筛选白色克隆子,并接种于 LB 液体培养基中,37℃ 振荡,采用 T 载体通用引物进行菌落 PCR 检测,将菌液送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.4 数据处理

使用 SAS 9.1 软件对试验数据进行双因素方差分析和相关分析。使用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 4.6.2 软件分析 DGGE 指纹图谱中微生物群落结构。采用 Shannon-Wiener 指数 (H)、Margalef 丰富度指数 (d_{Ma})、Pielou 均匀度指数 (E) 和 Simpson 优势度指数 (D_s) 对土壤细菌多样性和优势度进行评价,以上指数计算方法同文献 [15]。将目标序列提交至 GenBank 数据库,采用 Blast 进行相似性分析。采用 MEGA 4.0 中的 Neighbor-Joining 程序进行细菌聚类分析并构建系统进化树。使用 CANOCO 4.5 软件进行典型对应分析 (Canonical correspondence analysis, CCA)。

2 结果

2.1 播前和拔节期不同菌肥施用量对土壤养分的影响

表 1 比较了 9 个处理即谷特菌肥不同施用量和施用期对土壤养分的影响。从各测量指标结果来看,除处理 5 (即播前施用菌肥浓度 3 000 ml hm⁻²) 外,其他处理均提高了土壤全氮、全磷、全钾、有机质、碱解氮、有效磷和速效钾的含量,与对照相比达到显著水平 ($p < 0.05$)。播前和拔节期分别施用菌肥浓度 750 ml hm⁻² 和 2 250 ml hm⁻² 的两个处理对改善土壤理化性状效果最好,处理 2 (即播前施用菌肥浓度 750 ml hm⁻²) 的上述土壤肥力指标较不施用菌肥的处理分别提高 13.32%、28.42%、16.20%、9.81%、21.36%、39.35% 和 30.48%,处理 8 (即拔节期施用菌肥浓度为 2 250 ml hm⁻²) 较不施用菌肥的处理分别提高 7.25%、29.35%、18.04%、12.86%、15.90%、43.27% 和 53.99%。结果表明,施用适量的谷特菌肥能改善土壤理化性状,但是施用量过高,即播前施用菌肥浓度为 3 000 ml hm⁻² 时反而使土壤养分降低,说明在不同施肥时期加入适量菌剂主要促进了根系微生物的生长,增强了活性微生物对土壤养分的转化效果,从而促进根际土壤养分的提高。当菌肥施入过量时,反而造成根际土壤养分下降,可能是促进青稞生长,导致根际土养分暂时亏缺的原因。从双因素分析结果可以看出,播前底施谷特菌肥 750 ml hm⁻² 处理具有相当于拔节期根施 2 250 ml hm⁻² 处理的效果,且播前对土壤全氮、全磷、碱解氮和有机质的影响更显著 ($p < 0.05$),从而说明菌肥的两种施用方式对提高土壤养分的效果表现为:播前 > 拔节期,施肥方式的影响大于施肥量。

2.2 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

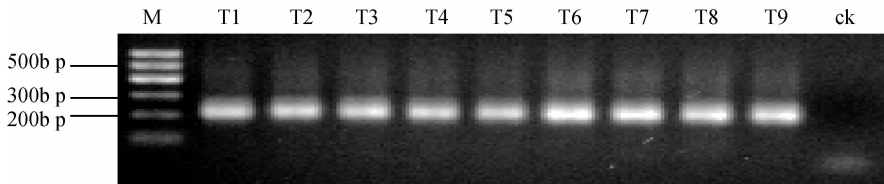
将提取的土壤总 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳显示,不同处理土样的 DNA 片段大小在 10 kb 以上,且不同处理土样 DNA 的 A260/A280 比值在 1.84 ~ 1.96 之间 (样本 DNA 的 A260/A280 比值一般情况下在 1.75 ~ 2.1 之间),表明提取的土壤总 DNA 适合 16S rDNA 分析且纯度较好,可以直接用于 PCR-DGGE 等分析。不同处理土壤细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增结果 (图 1) 表明,所用样品均扩增出单一的目的条带,目的片段长度约 230 bp 左右,且阴性对照 (ck) 没有出现特异性条带,说明各个样品的扩增具有很好的特异性,扩增产物可以作为 DGGE 样品。

表 1 不同施肥处理对土壤养分的影响

Table 1 Effects of application of bacterial manure on soil nutrients

菌肥施用方式 Bacterial manure application method	处理 Treatment	pH	有机质 OM (g kg ⁻¹)	全氮 Toatal N (g kg ⁻¹)	全磷 Toatal P (g kg ⁻¹)	全钾 Toatal K (g kg ⁻¹)	碱解氮 Alkalytic N (mg kg ⁻¹)	有效磷 Available P (mg kg ⁻¹)	速效钾 Readily available K (mg kg ⁻¹)
不施 Non application	T1	6.64a	12.44c	1.186b	0.377c	22.28c	140.9e	10.47c	56.96c
底施 Basal application	T2	6.55ab	13.66a	1.344a	0.484a	25.89a	171.0a	14.59a	74.32a
	T3	6.54ab	13.43a	1.215b	0.421bc	24.22b	163.5b	12.10b	57.44c
	T4	6.70a	13.12b	1.111c	0.445ab	22.68c	145.4d	10.72c	60.17b
	T5	6.42b	11.82d	0.980d	0.371c	21.98c	148.8c	7.67d	54.26d
	平均值 Average	6.57B	12.89A	1.169A	0.418A	23.41B	153.9A	11.11B	60.63B
不施 Non application	T1	6.64a	12.44b	1.186b	0.377b	22.28c	140.9d	10.47d	56.96c
根施 Root application	T6	6.75a	12.63b	1.103c	0.404b	22.70c	147.3b	11.95c	57.73c
	T7	6.78a	12.68b	1.066c	0.399b	25.91a	146.8bc	13.65b	59.12bc
	T8	6.32b	14.04a	1.272a	0.488a	26.30a	163.3a	15.00a	87.71a
	T9	6.78a	11.75c	1.073c	0.402b	24.25b	145.1c	9.47e	60.85b
	平均值 Average	6.66A	12.71B	1.141B	0.414A	24.29A	148.7B	12.11A	64.47A

注:同列不同小写字母表示该使用方式下不同施肥量差异显著 ($p < 0.05$), 同列不同大写字母表示不同施肥时期差异显著 ($p < 0.05$), 平均值表示不同施肥时期各处理土壤养分的平均值 Note: Different lowercase letters in the same column mean significant difference between fertilization rates at 0.05 level, and different capital letters in the same column mean significant difference between fertilization timings at 0.05 level, average mean the average value of fertilization timings of soil nutrients



注: M: Maker 600; ck: 阴性对照 Note: M: Maker 600; ck: Negative control

图 1 土样中细菌的反应产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the bacteria in soil samples

2.3 不同施肥方式对土壤微生物群落的影响

2.3.1 不同施肥方式土壤细菌群落 DGGE 图谱分析

不同土壤中细菌群落 DGGE 结果如图 2 所示。各样品经 DGGE 电泳后均分离得到相同长度但是不同序列的 DNA。图中各泳道的条带数从 38~46 条不等, 各泳道亮度高的条带位置分布的差异表明土样微生物菌群多样性丰富, 且各土样细菌优势种群不同。选择图像中较亮的条带进行切割, 图像中被标以黑色实心三角符号的条带为下文中进一步割胶测序的条带。通过 Quantity One 软件分析得到了以 T7 为标准的 DGGE 条带强度示意图 3。

图中 9 个样品的图谱在条带的位置和数目上有一定差别, 不同处理土壤间存在许多共同条带, 然而这些公共条带的亮度却不相同, 条带 6、9、10、11、13、14、和 17 几乎存在所有小区土壤中, 这些条带所代表的细菌在施用菌肥前就普遍存在小区土壤中, 且它们所代表的细菌对施用谷特菌具有较好的适应性; 相对地, 条带 1、2、3、4、5、7、8、12、15 和 16 为某一群落的特征带, 是在施用菌肥后出现的特殊细菌种属, 其中 1、2 和 15 为播前根施 750 ml hm⁻² 处理所独有, 条带 5 和条带 7 在其他处理中也出现, 但在播前根施 750 ml hm⁻² 处理中亮度很高。

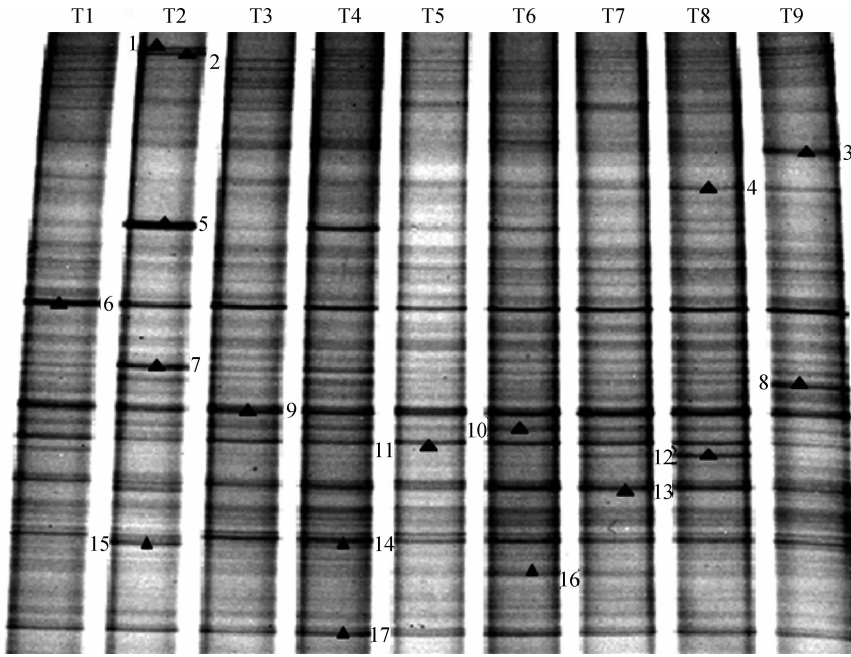


图 2 土壤细菌 16S rDNA V3 区 DGGE 图谱

Fig. 2 16S rDNA V3 region DGGE profiles of soil bacteria

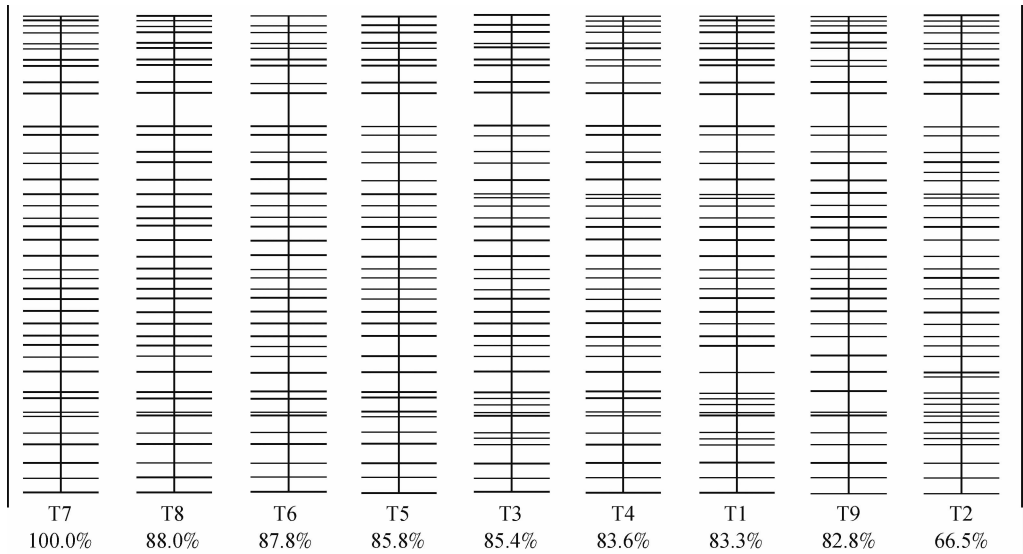


图 3 土样微生物 DGGE 图谱的条带分布和强度示意图

Fig. 3 Sketch map of distribution and relative luminance of the bands in DGGE profile of the bacteria in soil samples

2.3.2 不同施肥方式土壤细菌群落相似性分析

通过软件对 DGGE 指纹图谱采用非加权组平均法 (Unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 进行聚类分析如图 4 所示, 9 个土壤样品被分为 2 大类, 处理 2 和其他 8 个处理。一般认为相似值高于 0.6 的两个群体具有较好的相似性^[16]。试验的 9 个土样归为一类的相似值为 0.68, 说明施加谷特菌未从本质上改变土壤细菌的种类和分布。

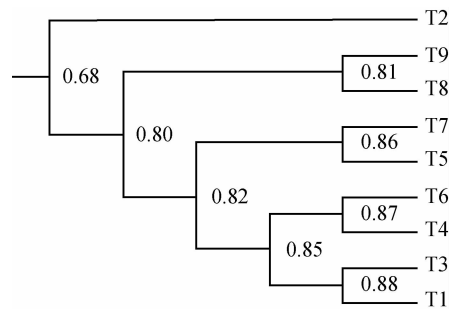


图 4 DGGE 图谱 UPGMA 聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of DGGE with UPGMA

2.3.3 不同施肥方式土壤细菌群落多样性分析

从表 3 可以看出,各处理 Pielou 均匀度指数(E)和 Simpson 优势度指数(D_s)几乎没有差异,Shannon-Wiener 指数(H)和 Margalef 丰富度指数(d_{Ma})在处理间产生差异。处理 2 (即播前施用菌肥浓度 750

ml hm⁻²)和处理 8 (即拔节期施用菌肥浓度 2 250 ml hm⁻²)的 Shannon-Wiener 指数(H)和 Margalef 丰富度指数(d_{Ma})最高。两种施用方式中, H 和 d_{Ma} 均表现为播前 > 拔节期,显示了菌肥施用时机对土壤细菌多样性的影响。

表 2 不同处理土壤细菌多样性

Table 2 Bacterial diversity in soils different in manure application rate

处理 Treatment	多样性指数 H Shannon-Wiener index H	均匀度指数 E Pielou index E	丰富度指数 d_{Ma} Margalef index d_{Ma}	优势度指数 D_s Simpson index D_s
T1	5.18	0.97	5.08	0.97
T2	5.23	0.97	5.12	0.97
T3	5.22	0.97	5.12	0.97
T4	5.20	0.97	5.09	0.97
T5	5.09	0.97	5.00	0.97
T6	5.15	0.98	5.06	0.97
T7	5.17	0.97	5.09	0.97
T8	5.21	0.98	5.14	0.97
T9	5.08	0.97	5.00	0.97

表 3 DGGE 图谱条带的序列比对结果

Table 3 Alignment of bands in DGGE profile

条带 Band	序列长 Sequence length (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession number	GenBank 数据库中最相近的菌种名称 Name of the closest species in GenBank database	同源性 Homology (%)
1	177	KC215438	Uncultured bacterium clone FL4Bh9_20429	97
2	197	KC215439	<i>Bacillus</i> sp. AMF3684	100
3	172	KC215440	Uncultured <i>Roseiflexus</i> sp. clone A9_14	100
4	177	KC215441	<i>Janibacter</i> sp. NRTY	100
5	172	KC215442	<i>Azospirillum</i> sp. GD9	100
6	177	KC215443	<i>Streptomyces</i> sp. SW12	100
7	197	KC215444	<i>Bacillus</i> sp. 6034	100
8	197	KC215445	<i>Rhodanobacter</i> sp. T2-YC6779	100
9	172	KC215446	Uncultured <i>actinobacterium</i> clone HG-J01239	99
10	172	KC215447	<i>Mesorhizobium</i> sp. SL-6-Salir	100
11	172	KC215448	Uncultured <i>planctomycete</i> clone COM-32	99
12	177	KC215449	<i>Arthrobacter oxydans</i> strain CB-281518	100
13	187	KC215450	<i>Nitrospira</i> sp. enrichment culture clone JAC29	98
14	177	KC215451	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i> strain CB-281418	100
15	172	KC215452	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Z2-YC6857	100
16	177	KC215453	<i>Microbacterium</i> sp. KM-251CO	100
17	172	KC215454	<i>Sinorhizobium</i> sp. AS08	99

2.4 测序结果与系统进化树分析

当前,GenBank 数据库中已经包含了大量的各种类型的保守性序列和微生物基因组可供检索和比对,这为微生物的分类和鉴定提供了宝贵的生物信息资源。一般情况下,当微生物的 16S rDNA 序列的同源性达到 97% 或更多时,这些菌可以被归类为一个种;同源性达到 94% 或更多时,这些菌可以被归类为一个属^[17]。DGGE 图谱上的每一条条带代表一个可能的可操作分类单位 (OTU) 或细菌种群。

将 DGGE 图谱上各处理中条带信号较亮的条带进行切胶回收,共得到 17 条 DGGE 条带。将条带进行克隆、测序,所得到的序列大小为 172 ~ 197 bp。将序列提交至 GenBank 核酸数据库,序列号为 KC215438 ~ KC215454(表 4)。从表 4 可以看出,所提交的条带序列在 GenBank 数据库中进行比对后均找到了与所测序列同源性很高的种群,所测序列

与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列同源性在 97% ~ 100% 之间。本试验结果表明,17 个克隆分别属于 6 个门:放线菌门 (*Actinobacteria*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、硝化螺旋菌门 (*Nitrospirae*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 和浮霉菌门 (*Planctomycetes*)。综合表 5 和图 5 表明,不同处理土样细菌群落的优势种群分布较广泛,其中 *Actinobacteria* 纲和 *Proteobacteria* 纲细菌种类略多。优势条带在 GenBank 中的最相似菌群为放线菌、变形菌和厚壁菌等。条带 1、2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16 和 17 为土著细菌,只是在施用菌肥后条带亮度发生了不同程度的变化,条带 5 和 15 是施用微生物菌肥后增加的新条带。其中条带 5、10、15 和 17 为变形菌纲中的固氮细菌,这与处理 2 (施用菌肥 750 ml hm⁻² 的处理) 的碱解氮含量较其他处理高相符;条带 2 和条带 7 为芽孢杆菌属 (*Bacillus*),对病原真菌具有抑制作用^[18]。条带 4 为两面神菌属

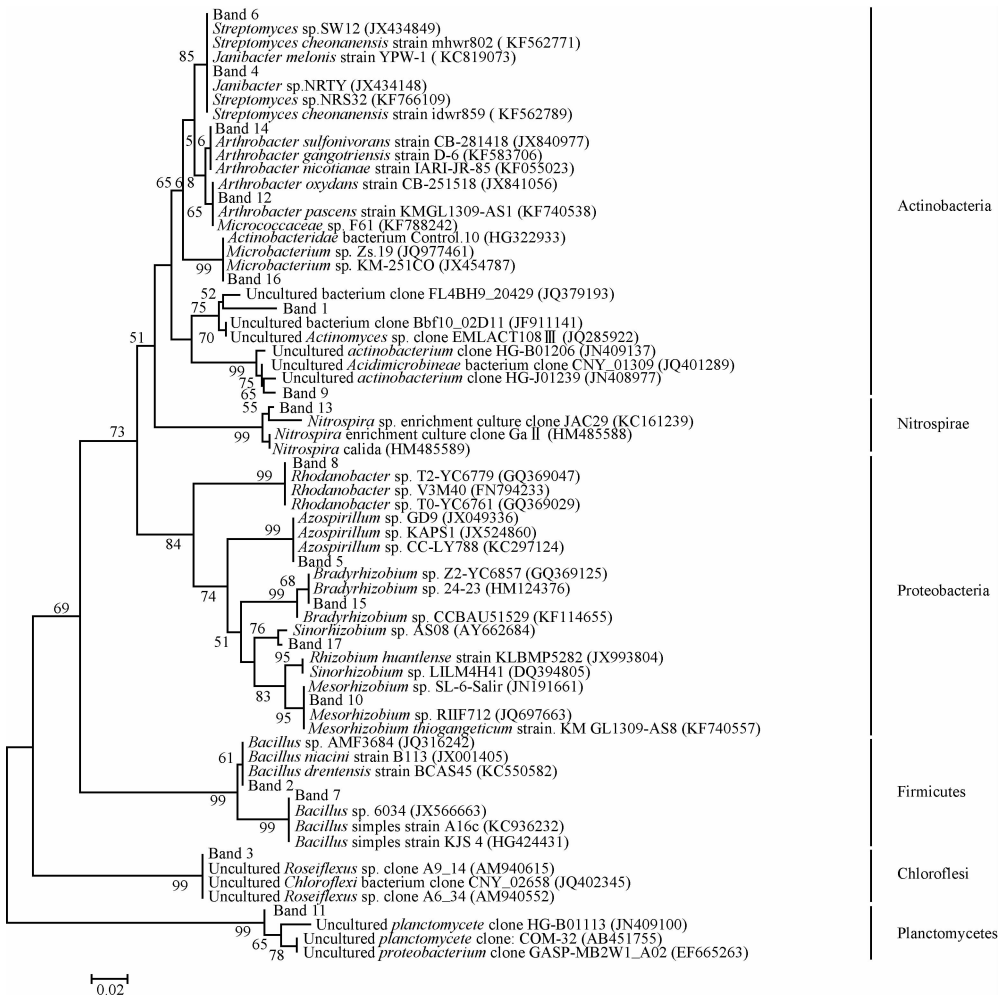


图 5 回收条带序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed with the sequences of the retrieved DGGE bands

(*Janibacter*)^[19]、条带 14 和条带 16 为节细菌属(*Arthrobacter*)^[20]对土壤具有生物修复作用。在施加菌肥后,增加了条带 5 和 15,条带 12 除在对照和拔节期施用菌肥浓度 2 250 ml hm⁻²以及 3 000 ml hm⁻²处理存在外,在其他处理中没有发现。少数菌种为未经培养菌种(Uncultured bacterium),另一些细菌所属的具体种属和理化性质还未被鉴定清楚。

2.5 土壤理化性质和细菌多样性的相关性

为揭示土壤理化性质与微生物群落结构之间的相互关系,对各理化指标和细菌多样性指数进行相关分析,发现多样性指数(H)分别与土壤全氮($r=0.817, p<0.01$)、全磷($r=0.692, p<0.05$)、有机质($r=0.916, p<0.01$)和有效磷($r=0.762, p<0.05$)显著相关,丰富度指数(d_{Ma})分别与土壤全氮($r=0.813, p<0.01$)、全磷($r=0.727, p<$

0.05)、有机质($r=0.953, p<0.01$)和有效磷($r=0.859, p<0.01$)显著相关,说明不同施肥处理细菌多样性与环境理化性质密切相关。同时,土壤有机质与全氮和有效磷极显著($p<0.01$)相关,与全磷、碱解氮、速效钾显著($p<0.05$)相关,速效钾与全磷极显著($p<0.01$)相关,说明不同施肥处理各理化性质之间相互影响。

为了进一步探讨影响土壤中微生物群落结构组成的主要环境因子,将 DGGE 图谱的数字化结果和理化指标结合在一起进行 CCA 排序分析(图 6)。从排序图上各环境因子的矢量长度看,第一排序轴 AN(碱解氮)夹角最小,相关性最大,其次 TN(全氮)、TP(全磷)和 OM(有机质)对第一排序轴的影响也较大;第二排序轴与 TK(全钾)呈强负相关(-0.4020),但 pH 对群落结构的影响最小。

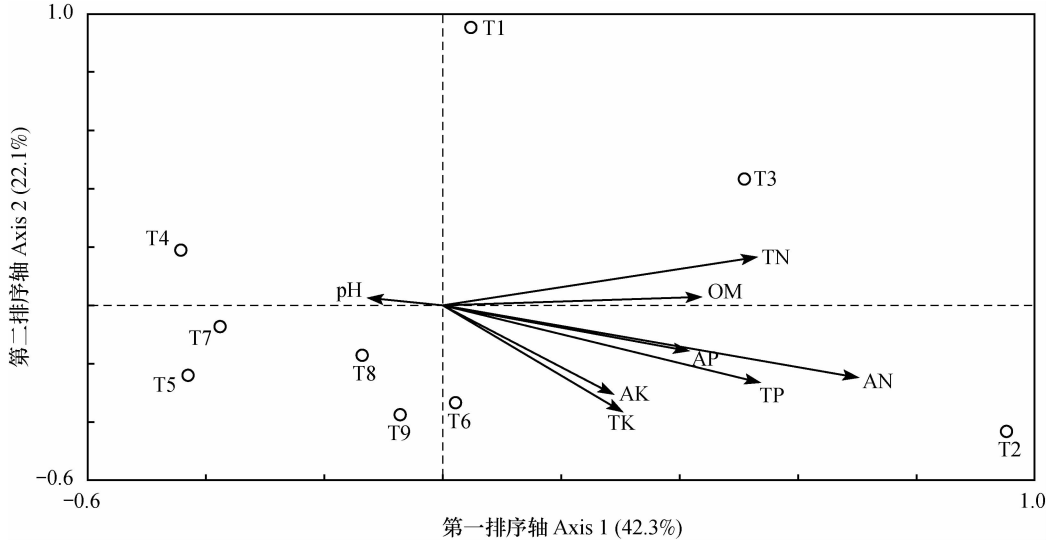


图 6 细菌群落结构的典型对应分析

Fig. 6 CCA of bacterial community structure

3 讨论

长期以来,中国农业增产主要依赖于投入大量的肥料,不合理施肥造成农业生态环境问题日益严重,如土壤板结、土壤次生盐渍化以及面源污染导致水体富营养化^[21]等。近些年,随着生态农业的发展和环境保护的日益重视,不断深入对新技术和新产品的研发以及探索新肥料(尤其是生物菌肥)来替代化肥的研究倍受关注^[22]。例如,逢焕成等^[23]用微生物菌剂处理土壤,使土壤速效钾、碱解氮、有效磷和有机质较基础土样分别提高了 28.9%、50.2%、71.4% 和 55.9%。韩光等^[24]用

PGPR 菌肥处理土壤,使土壤全氮、全钾、全磷、有机质、速效钾和有效磷的含量较只种植苜蓿土壤分别提高了 58.8%、12.6%、8%、42.2%、40.2% 和 37.2%。与前人相比,本试验在青稞种植不同时期施用不同浓度的谷特菌肥对土壤理化性质的影响不同,两种施用方式均可以促进青稞种植土壤和肥料中营养的释放,但对土壤肥效的提高均表现为播前>拔节期,本研究在上述已有研究与 Summer 等^[25]的短期生化处理对土壤理化性质的改变不大的结论不同。由于西藏高原气候环境、土壤肥力低和施肥技术落后等原因,从而导致青稞产量不稳^[26]。本研究结果显示,施用谷特菌肥在一定程度上能改善土壤理化性状,对科学合理施肥、提高

青稞产量和品质有极其重要的指导意义。然而,菌肥施用效果与土壤类型、施肥方式,以及施用量密切相关。如西藏自治区农牧科学院农业研究所4号试验地土壤为河谷农区棕色砂壤土(所处地理环境条件和本试验不一样),在根施与本试验相同谷特菌肥浓度并种植相同青稞品种和相同时长后,土壤碱解氮、全磷和全氮等理化因子均低于未施菌肥对照(此数据将另文发表本)。试验中施肥方式对土壤理化性质和细菌群落的影响大于施用量的影响,本试验条件下,播前底施谷特菌肥 750 ml hm^{-2} 处理具有相当于拔节期根施 $2\ 250 \text{ ml hm}^{-2}$ 处理的效果,菌剂的加入促进了根际土壤养分的提高。不同施肥处理细菌多样性与环境理化性质密切相关,播前底施谷特菌肥 750 ml hm^{-2} 处理和拔节期根施 $2\ 250 \text{ ml hm}^{-2}$ 处理,其土壤全氮、全磷等土壤养分和细菌多样性较其他处理高,这与 Sun 等^[27] 的土壤肥力与细菌数量呈正相关相符。同时,相关分析和 CCA 分析结果表明,不同施肥处理各理化性质之间相互影响,土壤中速效养分如碱解氮、有效磷的累积与土壤群落结构的变化具有较强的相关性,可能是由于大量养分的累积使土壤肥力提高,进而影响微生物种群的分布,具体的机理还没有明确,有待于进一步研究。所以,微生物菌肥均有最佳的施用量,并非施用越多效果越好,在施用生物菌肥时要根据不同的环境条件和土壤类型确定最佳的施用量。

土壤微生物群落结构的多样性不仅能促进土壤生态系统的稳定发展,而且缓解了土壤微生物生态环境的恶化^[28]。高雪莲等^[29] 通过 DGGE 技术研究了施用微生物有机肥后,甜瓜根际土壤细菌和放线菌数量明显要较对照土壤多,病原菌和真菌的数量明显减少。李朔^[30] 利用 DGGE 法研究微生物肥料培养过程中菌群的变化,发现施用微生物肥料后使土壤中的微生物多样性增加。在本试验中,不同处理土样间大部分条带相似,仅部分条带的颜色较其他条带深,说明施用谷特菌肥对细菌种群结构改变不大,只是增加了土壤中一些优势菌群的数量以及降低一些有害菌群的数量,同时也说明 PCR-DGGE 方法能够区分不同施肥处理下土壤微生物群落结构的多样性,是一种有效的分析微生物群落结构的方法。本研究结果表明在青稞3个月生长期,菌肥虽然未从本质上改变土壤细菌的种类和分布,但已经对土壤细菌的多样性产生影响,进而影响到土壤肥力,其中对土壤氮素供应的影响最大。两种施肥方式在一定程度上影响了细菌的群落结

构,且施肥方式的影响大于施肥量,这与王光华等^[31] 的研究结果相符。克隆测序的分析也证实施用菌肥促进了土壤固氮细菌的生长。不同施肥处理土样中优势种群为放线菌,从而表明,施用菌肥有利于有益微生物的生存。在所有克隆中,占优势地位的还有 *Proteobacteria*, 这与来自其他相关农田生态系统的研究结果相符^[32]。

PCR-DGGE 技术具有重复性好、可靠性强和方便快捷等优点,是一种被广泛应用于环境生态学中微生物群落多样性分析和功能细菌跟踪的分子生物学技术。本研究尝试用化学分析、PCR-DGGE 和 DNA 测序等技术结合,比较和评价了菌肥不同施肥方式和施肥量对种植青稞的土壤肥力的影响,结果证明该类技术可以作为生态学指标,为培肥土壤提供科学依据。但该方法成本较高,手续繁杂,需要进行简化,以满足实际的需要。

4 结 论

施用菌肥能显著提高土壤全氮、全磷、全钾、有机质、碱解氮、有效磷和速效钾的水平,对改善青稞根际土壤理化性状有显著效果。相同施用方式不同施用量土样中微生物的 DGGE 图谱相似,细菌群落结构具有较好的相似性,但已经对土壤细菌的多样性产生影响。测序结果表明,不同施肥浓度土样微生物种群分布较为广泛,其中 *Actinobacteria* 纲细菌种类略多,少数菌种为未经培养菌种 (Uncultured bacterium)。DGGE 图谱条带分布与土壤理化性质密切相关,碱解氮、全磷和全氮是影响微生物群落的主要环境因子。两种施用方式的土壤养分的释放与 Shannon-Wiener 指数的变化规律均为播前 > 拔节期。可见,施用谷特菌肥可明显改善青稞根际土壤理化性状,提高土壤细菌多样性。

参 考 文 献

- [1] Jenkinson D S, Ladd J N. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover. New York: Marcel Dekker, 1981: 415—471
- [2] Abbott L K, Murphy D V. Soil biological fertility: A key to sustainable land use in agriculture. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003: 129—162
- [3] 李卓棣. 土壤微生物学. 北京: 中国农业出版社, 1996. Li F L. Soil microbiology (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 1996
- [4] 吴建峰, 林先贵. 我国微生物肥料研究现状及发展趋势. 土壤, 2002, 34(2): 68—72. Wu J F, Lin X G. Study of microbial fertilizer situation and development trend in China (In Chi-

- nese). *Soils*, 2002, 34(2): 68—72
- [5] 徐志峰, 王旭辉, 丁亚欣, 等. 生物菌肥在农业生产中的应用. 现代农业科技, 2010 (5): 269—270. Xu Z F, Wang X H, Ding Y X, et al. Biological fertilizer application in agricultural production (In Chinese). *Anhui Agriculture*, 2010 (5): 269—270
- [6] Tandon H L S. Fertilizers, organic manures, recyclable wastes and bio-fertilizers. New Delhi (India): Fertilizer Development and Consultation Organisation, 1992
- [7] Brock T D. The study of microorganisms in situ: Progress and problems. *Symposia of the Society for General Microbiology*, 1987, 41(3): 1—17
- [8] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695—700
- [9] Lalonde J, Villemur R, Deschênes L. A new framework to accurately quantify soil bacterial community diversity from DGGE. *Microbial Ecology*, 2013, 66(3): 647—658
- [10] Liu L, Zhang D, Lü H, et al. Plankton communities along a subtropical urban river (Houxi River, southeast China) as revealed by morphological and molecular methods. *Journal of Freshwater Ecology*, 2013, 28(1): 99—112
- [11] Chen F, Wang M, Zheng Y, et al. The effect of biocontrol bacteria on rhizosphere bacterial communities analyzed by plating and PCR-DGGE. *Current Microbiology*, 2013, 67(2): 177—182
- [12] 钟国辉, 田发益, 旺姆, 等. 西藏主要农区农田土壤肥力研究. 土壤学报, 2005, 42(6): 1030—1034. Zhong G H, Tian F Y, Wang M, et al. Soil fertility of croplands in major agricultural areas in Tibet (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(6): 1030—1034
- [13] 任佐华, 张于光, 李迪强, 等. 三江源地区高寒草原土壤微生物活性和微生物量. 生态学报, 2011, 31(11): 3232—3238. Ren Z H, Zhang Y G, Li D Q, et al. The soil microbial activities and microbial biomass in Sanjiangyuan Alpine grassland (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(11): 3232—3238
- [14] 杨剑虹. 土壤农化分析与环境监测. 重庆: 西南农业大学出版社, 2008. Yang J H. *Agrochemical soil analysis and environmental monitoring* (In Chinese). Chongqing: Southwest Agricultural University Press, 2008
- [15] 刘桂婷, 程林, 王保莉, 等. 长期不同施肥对黄土旱塬黑土氨氧化细菌多样性的影响. 中国农业科学, 2010, 42(13): 2706—2714. Liu G T, Cheng L, Wang B L, et al. Changes of soil ammonia-oxidizing bacterial diversity in response to long-term fertilization in dry highland of Loess Plateau (In Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 42(13): 2706—2714
- [16] 陈法霖, 张凯, 郑华, 等. PCR-DGGE 技术解析针叶和阔叶凋落物混合分解对土壤微生物群落结构的影响. 应用与环境生物学报, 2011, 17(2): 145—150. Chen F L, Zhang K, Zheng H, et al. Analyzing the effect of mixed decomposition of conifer and broadleaf litters on soil microbial communities by using PCR-DGGE (In Chinese). *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2011, 17(2): 145—150
- [17] 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002: 38—42. Liu Z H. *Modern microbiology* (In Chinese). Beijing: Science Press, 2002: 38—42
- [18] 刘芳, 薛鹏琦, 乔俊卿, 等. 西藏低温适生芽孢杆菌的分离鉴定及其抗菌和促生作用. 中国生物防治, 2010, 26(4): 453—460. Liu F, Xue P Q, Qiao J Q, et al. Isolation and identification of a low-temperature-adapted *Bacillus* in Tibet and its antagonistic and growth-promoting effect (In Chinese). *Chinese Journal of Biological Control*, 2010, 26(4): 453—460
- [19] 张国英. 多环芳烃、多氯联苯优良降解菌的分离鉴定及降解特性研究. 山东: 山东大学, 2009. Zhang G Y. *Study on isolation, identification and degradation characteristics of a novel PAHs and PCBs-degrading Janibacter sp. strain JY11* (In Chinese). Shandong: Shandong University, 2009
- [20] 刘春光, 杨峰山, 卢星忠, 等. 特拉津降解菌 T₃ AB₁ 的分离鉴定及土壤修复. 微生物学报, 2010, 50(12): 1642—1650. Liu C G, Yang F S, Lu X Z, et al. Isolation, identification and soil remediation of atrazine-degrading strain T₃ AB₁ (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(12): 1642—1650
- [21] 肖新成, 何丙辉, 倪九派, 等. 农业面源污染视角下的三峡库区重庆段水资源的安全性评价. 环境科学学报, 2013, 33(8): 2324—2331. Xiao X C, He B H, Ni J P, et al. Safe assessment of water resources in Chongqing section of the Three Gorges Reservoir Area based on DPSIR model from the perspective of agricultural nonpoint pollution source (In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(8): 2324—2331
- [22] 赵秉强, 张福锁, 廖宗文, 等. 我国新型肥料发展战略研究. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(5): 536—545. Zhao B Q, Zhang F S, Liao Z W, et al. Research on development strategies of fertilizer in China (In Chinese). *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2004, 10(5): 536—545
- [23] 逢焕成, 李玉义, 严慧峻, 等. 微生物菌剂对盐碱土理化和生物性状影响的研究. 农业环境科学学报, 2009, 28(5): 951—955. Pang H C, Li Y Y, Yan H J, et al. Effects of inoculating different microorganism agents on the improvement of salinized soil (In Chinese). *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(5): 951—955
- [24] 韩光, 张磊, 邱琴, 等. 复合型 PGPR 和苜蓿对新垦地土壤培肥效果研究. 土壤学报, 2011, 48(2): 405—411. Han G, Zhang L, Qiu Q, et al. Effects of PGPR and alfalfa on soil building of newly-reclaimed land (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(2): 405—411
- [25] Summer M E, Shahandeh H, Bouton J, et al. Amelioration of an acid soil profile through deep liming and surface application of gypsum. *Soil Science Society of America Journal*, 1986, 50(5): 1254—1258
- [26] 强小林, 次珍, 魏新虹, 等. 西藏青稞产业发展现状分析. 西藏农业科技, 2011, 33(1): 1—3. Qing X L, Ci Z, Wei X H, et al. Analysis on industry status of Tibetan highland barley (In Chinese). *Tibetan Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 33(1): 1—3
- [27] 孙瑞莲, 朱鲁生, 赵秉强, 等. 长期施肥对土壤微生物的影响及其在养分调控中的作用. 应用生态学报, 2004, 15(10):

- 1907—1910. Sun R, Zhu L, Zhao B, et al. Effects of long-term fertilization on soil microorganism and its role in adjusting and controlling soil fertility (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(10): 1907—1910
- [28] 焦晓丹, 吴凤芝. 土壤微生物多样性研究方法的进展. 土壤通报, 2004, 35(6): 789—792. Jiao X D, Wu F Z. Progress of research methods for soil microbial diversity (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 2004, 35(6): 789—792
- [29] 高雪莲, 邓开英, 张鹏, 等. 不同生物有机肥对甜瓜土传枯萎病防治效果及对根际土壤微生物区系的影响. 南京农业大学学报, 2012, 35(6): 55—60. Gao X L, Deng K Y, Zhang P, et al. Effects of different bio-organic fertilizers on fusarium wilt control and on the rhizosphere microbial community with muskmelon (In Chinese). Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(6): 55—60
- [30] 李朔. 利用 DGGE 法研究微生物肥料培养过程中菌群的变化. 北京: 北京化工大学, 2012. Li S. The culture of function bacteria and bacteria colony's change in compound microorganism fertilizer by DGGE (In Chinese). Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2012
- [31] 王光华, 金剑, 韩晓增, 等. 不同土地管理方式对黑土土壤微生物量碳和酶活性的影响. 应用生态学报, 2007, 18(6): 1275—1280. Wang G H, Jin J, Han X Z, et al. Effects of different land management practices on black soil microbial biomass C and enzyme activities (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(6): 1275—1280
- [32] Borneman J, Skroch P W, O'Sullivan K M, et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(6): 1935—1943

EFFECTS OF BACTERIAL MANURE ON SOIL PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND MICROBIAL COMMUNITY DIVERSITY IN RHIZOSPHERE OF HIGHLAND BARLEY

Zhu Dan¹ Zhang Lei^{1*} Wei Zexiu² Liu Xiaoyan¹ Zhou Zhifeng¹ Dai Xianzhu¹ Wang Xiaofeng¹
Xia Zhiqiang¹ Wu Xianqin¹ Yu Jianjun¹ Fu Li¹

(1 College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China)

(2 Tibet Autonomous Region Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850032, China)

Abstract Chemical analysis, PCR-DGGE and DNA sequencing methods were used to investigate effects of bacterial manure varying in application rate and applied at different time on soil physicochemical properties and microbial community diversity in the rhizosphere of highland barley in Tibet. Results show that application of bacterial manure significantly increased total N, total P, total K, organic matter, alkalytic N, available P and readily available K in the soil, for instance, by 13.32%, 28.42%, 16.20%, 9.81%, 21.36%, 39.35% and 30.48% respectively over that in CK when 750 ml hm⁻² of bacterial manure was applied before sowing; and by 7.25%, 29.35%, 18.04%, 12.86%, 15.90%, 43.27% and 53.99%, respectively, when 2 250 ml hm⁻² of bacterial manure was applied at the jointing stage of the crop. DGGE analysis demonstrates that DGGE atlases of microorganisms in the soils the same in application method, were all quite similar regardless of application rate. Cluster analysis with UPGMA sorted the DGGE atlases into two clusters. Shannon indices suggest that soil microbial diversity in soils applied bacterial manure increased first and decreased gradually afterwards. Application of 750 ml hm⁻² of bacterial manure prior to sowing brought about the highest soil microbial diversity, while application of 2 250 ml hm⁻² at the jointing stage did. Moreover, the former was higher than the latter in nutrient releasing and Shannon index as well. DNA sequencing shows that microbial populations were widely distributed and dominated with bacteria of *Actinobacteria* class, and a few uncultured strains in the soils applied with bacterial manure, regardless of application rate. Canonical correspondence analysis (CCA) reveals that the distribution of DGGE fingerprints was strongly related to physical and chemical properties of the soil. AN (Alkalytic N), TP and TN were the main environmental factors influencing structure of the microbial community. All the findings demonstrate that application of bacterial manure significantly improves physicochemical properties of the soil and microbial community diversity of the rhizosphere soil of highland barley.

Key words Bacterial manure; Rhizosphere soil; Physicochemical indicators; PCR-DGGE; Microbial diversity

(责任编辑: 卢 萍)