

稻鸭、稻鱼复合生态系统土壤微生物多样性特征分析*

展 茗 曹湊贵[†] 汪金平 代光照

(华中农业大学作物生理生态与栽培研究中心, 武汉 430070)

ANALYSIS OF DIVERSITY OF SOIL MICROBIAL COMMUNITY OF THE WETLAND RICE-DUCK AND RICE-FISH COMPLEX ECOSYSTEM

Zhan Ming Cao Cougui[†] Wang Jinping Dai Guangzhao

(Crop Physiology and Production Center, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

关键词 稻田复合生态系统;土壤微生物群落;代谢功能多样性

中图分类号 S154.3 文献标识码 A

21 世纪以来,由于其良好的生态环境效应及市场对绿色安全稻米的需求,稻田种养复合生态系统的应用范围不断扩大,模式多种多样,在我国南方地区主要以稻田养鸭、养鱼、养虾为主。同时对稻田种养复合生态系统的机理及其效应也进行了较为广泛的研究。相关研究表明:稻鸭共生可利用鸭子的活动、觅食产生中耕除虫的效果^[1,2],减少农药对环境的污染;稻鸭共生有利于稻田通风透光,改善水稻群体结构;提高土壤肥力^[3-5];还能减少稻田中的产甲烷菌数量,减少甲烷排放^[6-9]等方面作用。然而对于稻田养鸭、养鱼后对土壤微生物数量及多样性方面的研究还很少,甘德欣等^[10]研究表明稻田养鸭后能增加土壤微生物的数量,但对土壤微生物多样性影响的研究还有待深入。

土壤生态系统是保证农业可持续发展的基础。土壤微生物群落是其中重要的活性组分,对土壤养分循环、有机质分解、土壤结构和肥力维持、温室气体产生、环境污染物净化等发挥着重要作用。正是由于土壤微生物在陆地生态系统中的重要性,有关土壤生物多样性的研究得到了广泛的重视。传统的培养法仅能培养不足 1% 的土壤微生物,对研究土壤微生物多样性存在很大的局限性。近年来,非培养法得到了广泛应用,为微生物多样性的深入研

究带来了新的契机。如生物标记法的磷脂脂肪酸分析研究土壤微生物的结构多样性;B DLOG 碳源利用法研究功能(代谢)多样性;分子生物学方法研究基因多样性^[11,12]。B DLOG 法因其快捷、简便在国内外的土壤微生物多样性的研究中得到了较为广泛的应用^[13-17]。

本研究利用 B DLOG 碳源利用法和传统培养法研究稻田复合生态系统土壤微生物多样性特征,一方面揭示地上生物多样性的增加对土壤微生物多样性的影响,另一方面为进一步评价稻鸭(鱼)复合生态系统的生态经济效应提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地设在华中农业大学试验农场。土壤为第四纪黄土沉积物发育的水稻土,耕层土壤厚 20 cm,下为 10 cm 厚的犁底层。土壤全氮 0.35 g kg⁻¹,全磷 1.17 g kg⁻¹,有机质 16.8 g kg⁻¹,硝态氮 12.1 mg kg⁻¹,铵态氮 0.52 mg kg⁻¹,pH6.8。前茬为油菜。

1.2 供试材料

中稻品种为两优培九,鸭为本地麻鸭,鱼为长

* 国家重大科技专项(2004BA520A02)资助

[†] 通讯作者, E-mail: ccgui@mail.hzau.edu.cn

作者简介:展茗(1973~),女,博士研究生,研究方向为农业生态学

收稿日期:2007-05-09;收到修改稿日期:2007-09-13

江流域常见的鲤鱼。

1.3 田间试验方法

试验设 3 个处理: (1)放鸭 (每小区 4 只) (D); (2)不放鸭、不养鱼 (CK); (3)养鱼 (F), 各小区随机区组设计, 3 次重复。小区面积为 160 m²。养鸭处理田间开挖围沟深 30 cm、宽 40 cm, 以便鸭子嬉水和取样。小区之间用泥巴砌成田埂, 覆上地膜, 防止水肥串流。沿田埂围 0.6~0.8 m 的尼纶丝网, 以防鸭逃走。养鱼处理田间挖两条交叉的十字形沟, 沟深 30 cm, 供鲤鱼栖息。水稻种植方式以宽窄行栽插, 各小区均实行浅水淹灌 (无沟处水深 10 cm)。2006 年 4 月 20 日播种, 5 月 27 日移栽, 6 月 10 日放入鸭、鱼, 至 8 月 15 日水稻齐穗期收鸭和鱼。鸭放养期间, 根据田间饵料情况酌情补饲料, 在水稻全生育期不进行化学除草治虫、不施肥。

1.4 室内培养与分析

于 2006 年 6 月 9 日放鸭、放鱼前及 2006 年 7 月 10 日养鸭、养鱼 1 个月时两次取土样, 每小区按“S 曲线五点取样, 迅速带回实验室, 过 2 mm 筛后, 混合均匀, 放在 4℃ 下冷藏备用。

1.4.1 土壤细菌、真菌、放线菌的培养和测定 细菌采用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基, 放线菌采用改良高氏 1 号培养基, 真菌采用马丁氏培养基, 均采用平板菌落计数法计算其数量。

1.4.2 B DLOG 碳素利用法测定土壤微生物代谢多样性 B DLOG GN 和 GP 测试盘有 95 个含有不同碳源的孔和一个水对照孔, 不同的微生物群落对不同碳源的利用能力不同, 因而其每孔的光密度值不同, 以此为基础分析评价土壤微生物的代谢多样性。称取 10 g 新鲜土样于 250 ml 的三角瓶中, 加入 100 ml 灭菌的生理盐水 (0.85%), 150 r min⁻¹ 震荡 40 min, 取上清液接种至 B DLOG GN 和 GP 微孔板的微孔内, 每孔为 150 μl。将接种土壤微生物的微平板于 28℃ 培养箱中培养 7 d, 每隔 24 h 用 B DLOG 自动读数仪在 590 nm 波长下读数, 使用 Microlog4101 软件转化数据。

1.5 数据处理

使用统计软件 SPSS13.0 进行方差分析和主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)。对于 B DLOG 碳素利用的数据, 为避免接种密度造成的微孔光密度值的差异, 每孔的光密度值用相对光密度值表示, 即每孔实际光密度值和对照孔的差值与所有孔光密度值总和的比值。采用 Shannon 多样性指数和 Shannon 均匀度指数来表征土壤微生物群落代谢功

能多样性。其表达式为: $H = -\sum p_i \ln p_i$ (H 为 Shannon 多样性指数, p_i 为某孔的相对光密度值与所有孔总相对光密度值的比例); $E = H / \ln S$ (E 为 Shannon 均匀度指数, S 为最终发生颜色反应的孔数)。

2 结果与分析

2.1 不同处理土壤细菌、真菌、放线菌的数量特征

利用传统的培养平板计数法研究了稻田养鸭、养鱼后土壤三大区系微生物数量上的差异。从表 1 可看出, 随着水稻生育进程的延长, 稻田凋落物的增多及水稻根系的生长, 释放至土壤中的分泌物增多, 土壤微生物的数量增加, 主要是土壤细菌的数量增加明显。稻田养鸭、养鱼后, 虽然土壤三大类型微生物均较对照有所增加, 但 3 个处理之间差异不显著。

表 1 稻田养鸭、养鱼后不同处理土壤微生物数量状况

取样时间	处理	细菌	放线菌	真菌
		($\times 10^6$ cfu g ⁻¹ 干土)	($\times 10^4$ cfu g ⁻¹ 干土)	($\times 10^2$ cfu g ⁻¹ 干土)
养鸭、养鱼前	D	4.7 \pm 0.9 a	7.6 \pm 2.6 a	5.8 \pm 1.5 a
	CK	3.0 \pm 0.5 a	3.9 \pm 1.0 a	5.5 \pm 3.1 a
	F	6.9 \pm 1.0 a	9.5 \pm 2.6 a	13.6 \pm 4.0 a
养鸭、养鱼 31 d	D	24.8 \pm 6.8 a	12.7 \pm 3.5 a	6.9 \pm 2.8 a
	CK	21.8 \pm 1.6 a	6.8 \pm 3.2 a	4.2 \pm 2.6 a
	F	25.1 \pm 9.7 a	8.6 \pm 3.2 a	5.1 \pm 3.3 a

2.2 不同土壤微生物群落对碳源利用的动力学特征

土壤微生物群落对碳源利用的动力学过程符合 Logistic 增长方程曲线^[16,18,19]: $Y = OD_{590} = K / (1 + e^{-r(t-s)})$ 。式中, K 表示在培养过程中土壤微生物群落的最大平均吸光值, r 表示其平均吸光值的变化指数, t 为测定微生物群落功能代谢的培养时间, s 为当达到最大平均吸光值 1/2 时所需的时间。为了避免培养时间上的差异, 本模拟曲线方程中的培养时间 t 为时间间隔, OD 值为相邻时间段的平均吸光值的差值。通过模拟, 微生物群落对 GP 板和 GN 板上碳源的利用均符合 Logistic 增长曲线 (图 1、图 2), 相关性均达到极显著水平。随着水稻生育进程的延长, 土壤微生物对 GP 和 GN 板上的碳源利用速率 r 均增大。稻田养鸭、养鱼后对 GP 板的碳源利用的代谢剖面相似, 差异极小。稻田养鸭后, 与对照相比, 对 GN 板的碳源利用速率 r 虽有所增加, 但 3 个处理之间差异不显著。

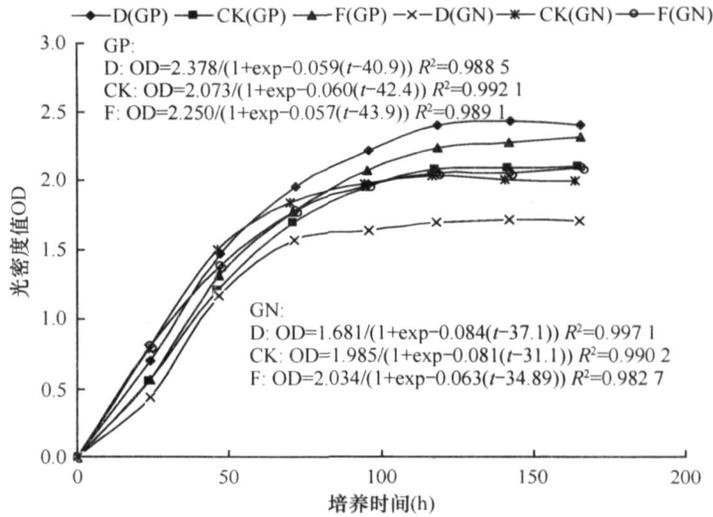


图1 稻田养鸭、养鱼前土壤微生物群落对碳源利用(GN板和GP板)的动力学特征

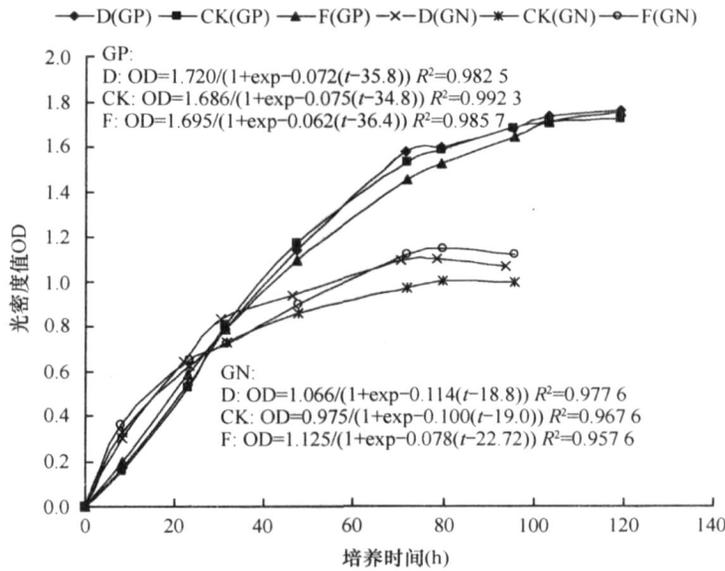


图2 稻田养鸭、养鱼31 d时土壤微生物群落对碳源利用(GN板和GP板)的动力学特征

2.3 土壤微生物群落功能多样性的变化

表2中的多样性和均匀度指数为培养96 h左右时不同碳源微孔光密度值计算而得。由表2可看出,稻田养鸭、养鱼前,不同处理土壤微生物多样性差异不显著。稻田养鸭、养鱼31 d时,土壤微生物GN板碳源代谢功能的Shannon多样性指数较对照增加,养鸭处理与对照之间差异达到了显著水平,养鱼处理与两者之间均差异不显著;3处理土壤微生物GP板碳源代谢功能的Shannon多样性指数之间差异不显著。养鸭、养鱼后GN板和GP板碳源代谢功能的Shannon均匀度指数与对照之间差异均不显著。

表2 稻田养鸭、养鱼对土壤微生物群落代谢功能Shannon多样性和均匀度指数的影响

取样时间	处理	GN板		GP板	
		Shannon多样性指数	Shannon均匀度指数	Shannon多样性指数	Shannon均匀度指数
养鸭、养鱼前	D	4.385 a	0.972 a	4.347 a	0.958 a
	CK	4.399 a	0.968 a	4.321 a	0.959 a
	F	4.382 a	0.969 a	4.315 a	0.952 a
养鸭、养鱼 31 d	D	4.411 a	0.981 a	4.356 a	0.964 a
	CK	4.315 b	0.959 a	4.309 a	0.953 a
	F	4.337 ab	0.966 a	4.319 a	0.958 a

2.4 土壤微生物群落代谢功能主成分分析

对3个处理9个小区微生物群落对GN板95种碳源利用情况进行主成分分析,从图3可看出,养鸭、养鱼前除因区间的差异引起3个处理中各有一个小区落在较远的区间外,其他小区均落在了较相近的区间内。而养鸭、养鱼31d后,土壤微生物群落对碳源的利用发生了较大的差异,从图4可看出,与养鸭、养鱼前相比,3处理在PC₁、PC₂、PC₃三轴的区间上分散度增大,而且每个处理的3个小区在图中的分布距离较近,说明养鸭、养鱼使稻田土壤微生物的多样性发生了较大的变化。

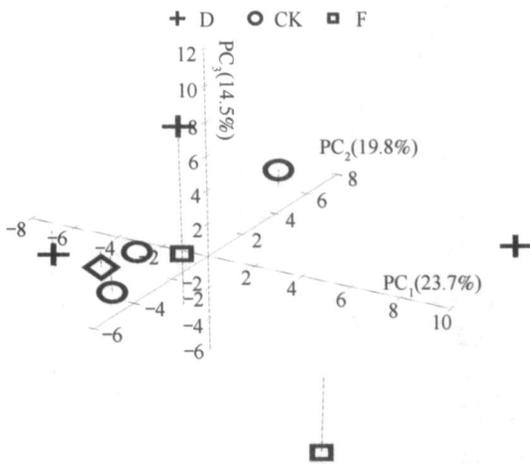


图3 养鸭、养鱼前各处理土壤微生物群落利用碳源能力主成分分析(GN板)

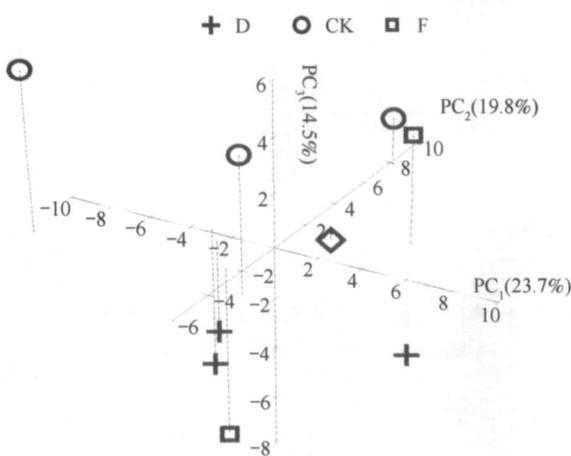


图4 养鸭、养鱼31d时各处理土壤微生物群落利用碳源能力主成分分析(GN板)

3 结论与讨论

稻田生态系统引入其他物种后,随着地上部分

组成的变化和多样性的增加,对地下部土壤生态系统也会带来影响。如杨志辉等^[5]研究表明稻田养鸭能增加土壤养分含量,提高土壤肥力。甘德欣等^[10]等研究表明免耕稻田养鸭能提高土壤微生物量,增加土壤三大区系微生物的数量。本试验研究表明稻田养鸭、养鱼后能提高土壤微生物的多样性,且养鸭后,土壤微生物的多样性与未养鸭处理差异达到了显著水平。虽然养鸭、养鱼后提高了土壤微生物的数量,但3处理之间并未达到显著水平。说明在本试验条件下稻田养鸭、养鱼后能提高土壤微生物的丰富度,对其均匀度、数量及其代谢强度没有影响。结合前人研究及本研究的结果来看,稻田土壤微生物的数量、物种丰富度、均匀度受复合稻田生态系统引入的物种种类、数量(干扰强度)的影响,其更深一层的相互作用机制有待进一步研究。

稻田养鸭、养鱼后提高了土壤微生物的丰富度,增加了微生物的功能种类。从对B DLOG微生物鉴定仪的革兰氏阳性板(GP板)和革兰氏阴性板(GN板)的研究来看,稻田养鸭、养鱼对GN板的代谢多样性有显著影响,而对GP板的代谢多样性影响不显著。已有的研究证明,土壤微生物中,与土壤有机质降解有关的细菌多数属于革兰氏阳性细菌,其他与物质循环有关的很多功能细菌属于革兰氏阴性菌^[20]。这表明本研究中稻田养鸭、养鱼后,能增加不同生态功能的细菌种类,但对与土壤有机质降解有关的细菌种类影响并不大。本研究仅从GN板和GP板代谢的差异上进行分析,还需要辅以其他方法和进一步的研究加以证明。

参考文献

- [1] Su S T. Evaluation of different duck varieties for the control of the golden apple snail (*Panacea canaliculata*) in transplanted and direct seeded rice. *Crop Protection*, 2001, 20: 599 ~ 604
- [2] 魏守辉, 强胜, 马波, 等. 稻鸭共作及其它控草措施对稻田杂草群落的影响. *应用生态学报*, 2005, 16(16): 1 067 ~ 1 071
- [3] 禹盛苗, 欧阳由男, 张秋英, 等. 稻鸭共育复合系统对水稻生长与产量的影响. *应用生态学报*, 2005, 16(7): 1 252 ~ 1 256
- [4] 王强盛, 黄丕生, 甄若宏, 等. 稻鸭共作对稻田营养生态及稻米品质的影响. *应用生态学报*, 2004, 15(4): 639 ~ 645
- [5] 杨志辉, 黄璜, 王华. 稻鸭复合生态系统稻田土壤质量研究. *土壤通报*, 2004, 35(2): 117 ~ 121
- [6] 邓晓, 廖晓兰, 黄璜. 稻鸭复合生态系统产甲烷细菌数量. *生态学报*, 2004, 24(8): 1 695 ~ 1 699
- [7] Huang Y, Wang H, Huang H, *et al*. Characteristics of methane

- emission from wetland rice-duck complex ecosystem. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 2005, 105: 181 ~ 193
- [8] 全国明, 章家恩, 黄兆祥, 等. 稻鸭共作系统的生态学效应研究进展. *中国农学通报*, 2005, 21(5): 630 ~ 635
- [9] 向平安, 黄璜, 黄梅, 等. 稻鸭生态种养技术减排甲烷的研究及经济评价. *中国农业科学*, 2006, 39(5): 968 ~ 975
- [10] 甘德欣, 黄璜, 蒋廷杰. 免耕稻鸭复合系统生态学特性研究. 土壤生物学特性. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 31(1): 35 ~ 38
- [11] Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, *et al* Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58: 169 ~ 188
- [12] 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
- [13] Tam L, Derry A M, Kevan P G, *et al* Functional diversity and community structure of microorganisms in rhizosphere and non-rhizosphere Canadian arctic soils. *Biodiversity and Conservation*, 2001, 10: 1933 ~ 1947
- [14] Ratcliff A W, Busse M D, Shestak C J. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34: 114 ~ 124
- [15] Ana P P, Veronique E H, Claude A. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38: 460 ~ 470
- [16] 滕应, 黄昌勇, 骆永明. 重金属复合污染下土壤微生物群落功能多样性动力学特征. *土壤学报*, 2004, 41(5): 735 ~ 741
- [17] 刘岳燕, 姚槐应, 黄昌勇. 水分条件对水稻土微生物群落多样性及活性的影响. *土壤学报*, 2006, 43(5): 828 ~ 834
- [18] Lindstrom J E, Barry R P, Braddock J F. Bacterial community analysis: A kinetic approach to constructing potential C source utilization pattern. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30: 231 ~ 239
- [19] Ros M, Gobema M, Moreno J L, *et al* Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34: 93 ~ 102
- [20] 李卓棣主编. *土壤微生物学*. 北京: 中国农业出版社, 1996