

应用 T-RFLP 技术分析不同土壤温度和施肥方式下 设施土壤细菌群落结构^①

董飞^{1,2}, 闫秋艳¹, 李汛², 段增强^{2*}, 邢鹏³

(1 山西省农业科学院小麦研究所, 山西临汾 041000; 2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 3 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

摘要:采用末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)和荧光定量 PCR 技术,研究了两种土壤温度(对照不增温, 10℃ ± 2℃; 增温, 20℃ ± 2℃)和两种施肥方式(对照不施肥; 鸡粪有机肥底肥+尿素追肥)对土壤细菌群落结构及其多样性和数量特征的影响。结果表明:相同施肥方式下,土壤增温增加土壤速效养分含量,尤其在施肥时增加幅度更明显。分析显示施肥对土壤细菌群落结构的影响在不同土壤温度条件下表现不同。土壤不增温条件下,施肥增加细菌 Pielou 均匀度指数和 Shannon-Weiner 多样性指数, Simpson 优势度指数降低;土壤增温条件下,则效果相反。与不增温比,增温使土壤细菌 Pielou 均匀度指数和 Shannon-Weiner 多样性指数降低,但物种个体数和 Simpson 优势度指数增加明显。增温改变了土壤细菌群落结构,62 bp 和 93 bp 两种限制性末端片段在土壤增温条件下优势度提高,主要包括共生菌和杆菌。

关键词:设施土壤; T-RFLP 技术; 施肥方式; 土壤温度; 细菌群落和丰度

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A

土壤微生物群落是土壤中的活性组分,是土壤分解系统的主导者,在推动土壤物质转换、能量流动和生物地球化学循环中起着重要作用^[1]。土壤微生物对供养植物有效养分起着关键的作用,主要通过改变土壤物理性质间接影响作物养分吸收^[2]。土壤温度对微生物活性的影响极其明显。大多数土壤微生物能够在温度为 10~45℃ 范围内生长,最适温度为 30℃。在 10~30℃ 温度范围内,温度越高,微生物活动能力越强,超出这一温度范围,则微生物活动受到抑制,从而影响到土壤的腐殖或矿质化过程,影响到各种养分的形态转化^[3]。土壤微生物群落结构组成及其变化在一定程度上反映了土壤的质量及其健全性^[4]。

目前对土壤温度影响微生物群落结构的研究主要侧重于气候变暖或气温升高间接引起的土壤温度升高使微生物群落结构发生改变^[5-8]。而对于低气温下改变土壤温度环境条件对细菌群落多样性和结构的影响报道较少。而且,传统细菌培养方法主要依赖于细菌分离与培养,只能获取 0.001%~15% 的环境微生物信息,且研究周期长,对种群的动态分析难以

进行;另外,人工培养条件对种群的原始结构存在极大的干扰性,降低了结果的可信度^[9-10]。

基于聚合酶链式反应(PCR)的分子指纹图谱技术——末端限制性片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)是一种全面、分辨率高、重现性良好的分子指纹图谱技术,自 1997 年起受到研究者的关注^[11-12]。因此,本研究采用基于 T-RFLP 技术初步研究了设施栽培自然环境条件下,土壤温度对不同施肥方式下设施菜地土壤细菌群落多样性和组成的影响,旨在为土壤养分有效性提供解释,以期为设施土壤施肥、土壤微生物生态环境健康维护和土壤可持续发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验在江苏省苏州市太仓陆渡镇现代农业园大棚内进行。大棚规格为 8 连栋大棚,每单栋大棚长 40 m、宽 8 m、高 5 m,种植年限约 3 a,以种植小白菜为主。供试土壤为潮土,砂壤土,基本理化性状为

基金项目:国家科技支撑计划项目(2014BAD14B04)和土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放课题(Y20160019)资助。

* 通讯作者(zqduan@issas.ac.cn)

作者简介:董飞(1983—),男,山西襄汾人,硕士,助理研究员,主要从事设施栽培及植物营养方面研究。E-mail: sxnkyyqy@163.com

pH 8.31、有机质 13.8 g/kg、电导率(EC) 467.33 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 、碱解氮 59.5 mg/kg、有效磷 35.97 mg/kg、速效钾 104.24 mg/kg。试验前,整地,30 cm 深度耕地。每单栋大棚分为四畦,每半畦为一处理小区,小区面积 24 m^2 (长 16 m \times 宽 1.5 m)。采用裂区组设计,每小区为 1 个重复,共 3 个重复。

1.2 试验设计

试验设置土壤温度和肥料处理两个因素。土壤温度采用地热线(宁波市鄞州东海畜牧器械厂生产,长 100 m,功率为 800 W)加热的方式,待整地均匀后将地热线铺设于 5~25 cm 深度,利用定时器和温控器调节温度。试验设对照不增温($10^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$)和增温($20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$)两个温度水平,大棚内气温和湿度均为自然状态。根据当地施肥习惯鸡粪有机肥作为底肥,后期进行尿素追肥,设置习惯施肥和不施肥对照两种施肥模式。施用的商品有机肥鸡粪基本理化性质为 pH 7.83、EC 3.37 mS/cm 、碱解氮 486.5 mg/kg、有效磷 1.0 g/kg、速效钾 9.1 g/kg,用量 30 000 kg/hm^2 ,撒施翻耕于 0~25 cm 土层;尿素用量 N 360 kg/hm^2 ,其中 40% 基施(N 144 kg/hm^2),追肥 3 次,每次追肥 72 kg/hm^2 。所有肥料处理的磷钾肥用量均相同。磷肥为过磷酸钙,用量为 1 031.25 kg/hm^2 ,钾肥为硫酸钾,用量为 660 kg/hm^2 ,全部基施。作物定植前 15 d 施入有机肥,精耕 0~20 cm 土层土壤,使肥料与土壤混匀。供试作物黄瓜和辣椒苗分别于 2012 年 10 月 15 日和 16 日定植。定植一周后开始进行土壤温度处理。试验处理设置见表 1。

表 1 试验处理
Table 1 Treatments of experiment

植物种类	处理编号	温度	施肥方式
黄瓜	T1	不增温	不施肥
	T2	不增温	鸡粪底肥+尿素追肥
	T3	增温	不施肥
	T4	增温	鸡粪底肥+尿素追肥
辣椒	T5	不增温	不施肥
	T6	不增温	鸡粪底肥+尿素追肥
	T7	增温	不施肥
	T8	增温	鸡粪底肥+尿素追肥

1.3 样品采集与测定

1.3.1 土壤基本理化性状 于黄瓜和辣椒的生长末期,2013 年 1 月 20 日采土壤样品,按照“S”曲线采取耕层 0~20 cm 的混合土样。土壤自然风干,研磨过 2 mm 筛,参照鲁如坤^[13]相关方法测定土壤基本理化性状。

1.3.2 土壤细菌群落结构 采集新鲜土壤样品,采用 PCR 的分子指纹图谱技术——末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)初步研究土壤细菌群落结构多样性。

1) DNA 提取。取新鲜土壤 500 mg,利用 DNA 提取试剂盒(FastDNA[®] SPIN Kit for Soil)提取土壤总 DNA,具体步骤按照厂家提供的说明书进行。最后得到的基因组 DNA 保存于 -20°C 以进行下一步试验。

2) PCR 扩增。采用针对细菌 16S rRNA 基因特异性引物,上游引物为 8f(5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3'),5'末端带有 Cy5 荧光标记;下游引物为 926r(5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'),PCR 产物长 900 bp。PCR 反应体系为 25 μl ,其组分包括:15.8 μl ddH₂O,2.5 μl 2.5 mmol/L dNTP,2.5 μl 10 \times PCR buffer(不含 Mg),2 μl 25 mmol/L MgCl₂,上下游引物(10 pmol/L)各 0.5 μl ,0.2 μl 5 U/ μl rTaq 酶,0.1 μl 模板 DNA。PCR 反应条件为:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,54 $^\circ\text{C}$ 复性 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。取 5 μl PCR 产物用 1% 的琼脂糖(质量分数)凝胶电泳检测。然后用纯化试剂盒 AxyPrep PCR 纯化 PCR 产物。

3) T-RFLP 分析。用绿豆酶(Mung bean nuclease, TaKaRa)在 30 $^\circ\text{C}$ 下硝化 PCR 产物 35 min,50 μl 硝化反应体系包含 5 μl 10 \times 绿豆酶 buffer,0.1 μl 绿豆酶和 45 μl PCR 产物;然后用 PCR 产物纯化试剂盒(Axygen)纯化硝化后的产物;接着用限制性核酸内切酶 Hha I (TaKaRa)酶切硝化纯化后产物,37 $^\circ\text{C}$ 酶切硝化 3 h,此时 10 μl 酶切反应体系中包含 1 μl 10 \times buffer、1 μl Hha I、8 μl 纯化后产物、0.5 μl 去离子水。上样体系剂量及电泳条件见表 2。对于细菌,由于相对数量过小的限制性末端片段(T-RFs)不会对群落的特性产生明显的影响^[10],故在本研究中舍去了相对数量 <1% 的 T-RFs,然后分别计算图谱中每一个峰的峰面积与所有峰总面积的比值。

表 2 T-RFLP 上样体系
Table 2 Sampling system of T-RFLP analysis

组分	体积	电泳条件
酶切纯化后的产物	1 μl	90 $^\circ\text{C}$ 变性 2 min,2.1 kV 下
上样缓冲液(SLS)	25 $\mu\text{l}/\text{样}$	注射 30 s,4.8 kV 下分离
640 bp 内标	0.25 $\mu\text{l}/8$ 个样	120 min,毛细管温度为 55 $^\circ\text{C}$

4) 细菌种群组成及变化的多样性指数测度。本研究主要采用 α 多样性方法,包括物种丰富度(S)、Margalef 物种丰富度指数(d_a)、多样性指数(Shannon-Weiner)、均匀度指数(Pielou)和优势度指数(Simpson)。

其中 Shannon-Weiner 指数反映了物种的多样性，Pielou 指数反映了物种的均匀度，Simpson 指数反映了物种的优势度。

5) 细菌群落结构相似性分析。采用非加权配对算术平均法(UPGMA)聚类分析不同土壤样品细菌群落结构的相似性。将 T-RFLP 数据转化为由 0 和 1 组成的二元矩阵，采用 Bray-Curtis 算法计算各样品之间物种群落组成的相似性。

1.4 数据分析

采用 Primer 5.0 软件进行多样性指数分析，采用 Excel 2003 作图。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性状

从表 3 可以看出，施肥使土壤 pH 升高，EC 值大幅增加，同时速效养分及有机质含量均不同程度增加。不施肥处理，土壤增温比不增温使土壤速效养分、有机质含量略有增加，但增加不显著。施肥处理中，土壤增温明显增加土壤速效养分含量和 EC 值，但 pH

降低。

2.2 土壤细菌的多样性

表 4 显示了不同土壤温度和施肥方式下蔬菜结果期土壤细菌多样性指数的分析结果。可以看出，在种植黄瓜条件下，土壤细菌物种数目(S)在 T4 和 T3 处理中较高，T1 和 T2 处理无差异，物种的个体数之和(N)大小排列顺序为 T4>T3>T2>T1，说明增温增加了土壤细菌物种的种类和数量。物种丰富度(d)除 T4 处理最低外，其余处理间差异不大。增温处理细菌 Pielou 指数低于对照不加热处理。Shannon-Weiner 指数除 T4 处理最低外，其余处理间差异不大。增温使某些细菌的优势度体现出来，Simpson 指数大小排列顺序为 T4>T3>T1>T2。

在种植辣椒条件下，土壤细菌物种数目大小排列顺序为 T6>T7>T8>T5。增温使细菌物种个体数增加明显，大小排序为 T8>T7>T5>T6。物种丰富度大小顺序为 T6>T7>T8>T5。Pielou 指数以 T6 处理最高，T8 处理最低，其余处理间差异不大。Shannon-Weiner 指数表现为 T6>T7>T5>T8。Simpson 指数大小排序为 T8>T5>T7>T6。

表 3 不同土壤温度和施肥方式下设施蔬菜生育中期土壤基本理化性状
Table 3 Soil physicochemical properties under different soil temperatures and fertilization patterns

蔬菜	处理	pH	EC(μS/cm)	有机质(g/kg)	碱解氮(mg/kg)	有效磷(mg/kg)	速效钾(mg/kg)
黄瓜	T1	7.70 ± 0.22 a	501.3 ± 21.3 c	13.8 ± 2.1 cd	39.1 ± 2.3 b	47.2 ± 3.1 ab	103.4 ± 11.2 b
	T2	7.83 ± 0.13 a	850.6 ± 17.3 b	17.6 ± 1.5 b	74.1 ± 1.8 a	64.7 ± 2.6 a	120.9 ± 13.1 a
	T3	7.63 ± 0.12 b	532.0 ± 15.4 c	14.7 ± 2.1 c	55.2 ± 1.6 b	44.5 ± 2.1 b	112.5 ± 12.3 ab
	T4	7.62 ± 0.21 b	882.3 ± 23.4 a	19.5 ± 2.2 a	88.3 ± 2.4 a	55.5 ± 1.8 a	131.0 ± 21.3 a
辣椒	T5	7.78 ± 0.19 a	483.2 ± 31.2 c	13.6 ± 1.9 d	45.3 ± 2.8 c	43.1 ± 1.6 b	98.7 ± 22.3 b
	T6	7.60 ± 0.21 a	778.3 ± 28.9 b	17.3 ± 1.8 b	63.2 ± 3.1 b	58.4 ± 1.5 a	100.2 ± 20.1 a
	T7	7.34 ± 0.10 b	503.4 ± 22.3 c	15.1 ± 1.9 c	42.3 ± 1.6 c	45.3 ± 1.6 b	105.6 ± 17.6 a
	T8	7.38 ± 0.09 b	867.8 ± 19.9 a	20.1 ± 2.4 a	71.2 ± 1.7 a	57.3 ± 2.1 a	110.5 ± 12.5 a

注：表中同列数据后不同小写字母表示同一蔬菜不同处理下差异显著(P<0.05)，下表同。

表 4 不同土壤温度和施肥方式下蔬菜结果期土壤细菌的多样性指数
Table 4 Indexes of soil bacteria diversity in fruiting period under different soil temperatures and fertilization patterns

蔬菜	处理	S	N	d	Pielou 指数	Shannon-Weiner 指数	Simpson 指数
黄瓜	T1	32.1 ± 1.2 b	58.3 ± 2.1 c	7.6 ± 0.1 a	0.96 ± 0.01 a	3.33 ± 0.01 a	0.044 ± 0.001 b
	T2	32.2 ± 1.0 b	65.5 ± 1.7 b	7.4 ± 0.3 a	0.96 ± 0.03 a	3.34 ± 0.20 a	0.040 ± 0.008 c
	T3	33.0 ± 0.9 b	76.5 ± 1.2 a	7.4 ± 0.3 a	0.95 ± 0.02 a	3.31 ± 0.07 a	0.046 ± 0.003 b
	T4	35.3 ± 0.8 a	78.4 ± 1.1 a	5.5 ± 0.5 b	0.94 ± 0.01 b	3.02 ± 0.08 b	0.058 ± 0.000 a
辣椒	T5	29.2 ± 0.8 c	75.1 ± 0.9 b	6.5 ± 1.1 c	0.94 ± 0.04 a	3.18 ± 0.09 b	0.050 ± 0.002 a
	T6	39.2 ± 1.1 a	72.4 ± 0.8 b	8.9 ± 0.9 a	0.97 ± 0.03 a	3.56 ± 0.12 a	0.032 ± 0.002 c
	T7	35.6 ± 1.3 a	75.7 ± 0.7 b	7.8 ± 0.4 b	0.94 ± 0.02 a	3.35 ± 0.14 a	0.045 ± 0.001 b
	T8	31.3 ± 0.9 b	81.6 ± 1.2 a	6.8 ± 0.5 c	0.92 ± 0.01 b	3.14 ± 0.23 b	0.059 ± 0.003 a

2.3 土壤细菌群落结构的相似性

首先，用 Treeflap 软件对处理后的 T-RFLP 输出

数据进行分析，然后，用 Primer 5 对土壤细菌群落结构的相似性进行分析和计算，并作出聚类图，如图 1

所示。从图 1A 可以看出 ,T3 和 T4 处理相似度较高 , T1 和 T2 处理具有较高的相似性。从图 1B 可以看出 ,

T6 和 T7 处理表现较高的相似性 ,出现差异较大的是 T5 处理 , 其次是 T8 处理。

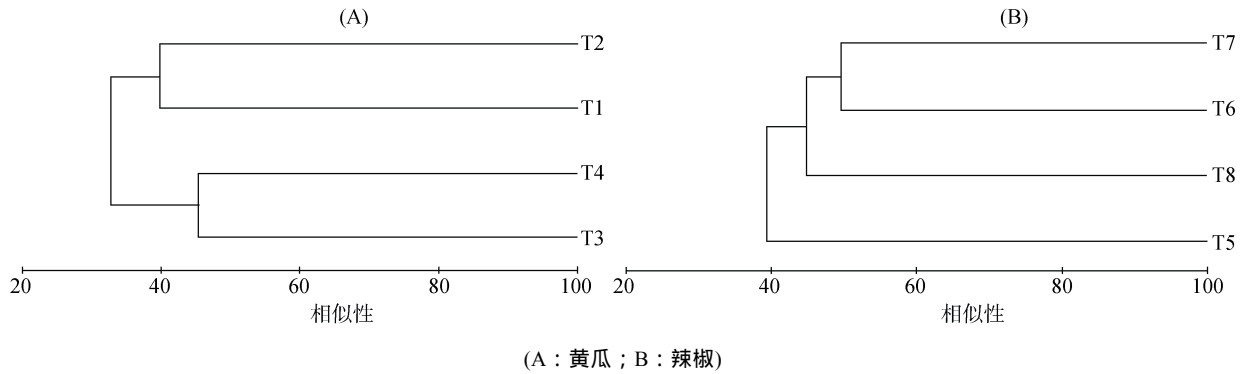


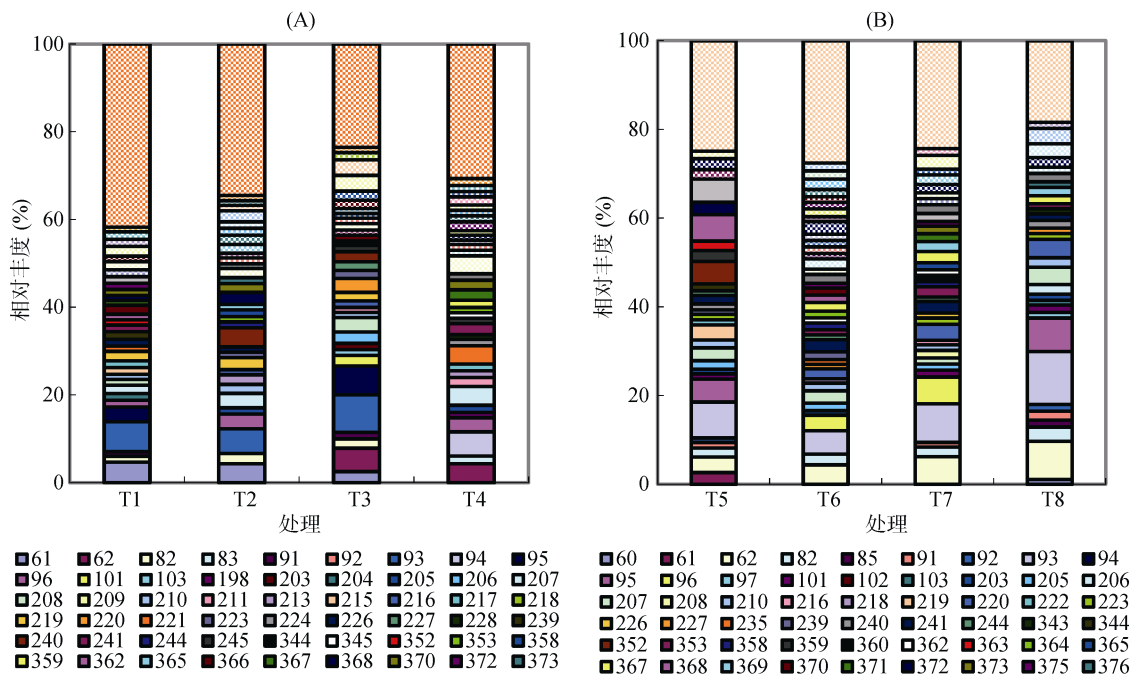
图 1 基于 T-RFLP 图谱的聚类分析

Fig. 1 Hierarchical cluster analysis based on T-RFLP profiles

2.4 土壤细菌群落结构的相对丰度

从图 2A 可以看出 ,在黄瓜种植条件下 ,除 T4 处理外 ,其余处理均含有 T-RF 61 bp。T3 和 T4 增温处理出现 T-RF 62bp ,相对丰度分别为 5.37% 和 4.34% , T1、T2 和 T3 处理的 T-RF 93 bp 相对丰度较大 ,分别为 6.84%、5.61% 和 8.57%。T-RF 94 bp 只出现在 T4 处理中 ,相对丰度 5.51%。T-RF 95 bp 仅出现在不施肥的 T1 和 T3 处理中。96、205、207、213、353、378、382 bp T-RFs 在施肥的 T2 和 T4 处理中相对丰度较高。T1、T2、T3 和 T4 处理中相对丰度最大出现在 93、93、93 和 94 bp T-RFs。

从图 2B 可以看出 ,在辣椒种植条件下 ,T5、T6、T7 和 T8 处理主要 T-RFs 为 93 bp 和 62 bp。93 bp 在每个处理中相对丰度值均最大 ,分别为 8.07%、5.26%、8.70% 和 11.89% , T-RF 62 bp 在 T5、T6、T7 和 T8 处理中相对丰度分别为 3.53%、4.37%、6.23% 和 8.61%。增温的 T7 和 T8 处理中 T-RF 93 bp 和 T-RF 62 bp 均高于不增温的 T6 和 T7 处理。T-RF 96 bp 仅存在于 T6 和 T7 处理中。T-RF 82 bp 存在于每个处理中 ,其中以 T8 处理中相对丰度值最大。T-RF 220 bp 在增温的 T7 和 T8 处理中表现明显。T-RF 95 bp 在 T5 和 T8 处理中应特别关注。



(A : 黄瓜 ; B : 辣椒)

图 2 土壤细菌 16S rDNA 酶(Hha I)切后各限制性片段(bp)的相对丰度

Fig. 2 Average relative abundances of soil bacterial 16S rDNA T-RFs with endonuclease Hha I under different soil temperatures and fertilization patterns

利用网络在线服务 (<http://trflp.limnology.wisc.edu/index.jsp>) 查询得知 :T-RF 62 bp 未找到相似菌类。T-RF 93 bp 代表蚜虫内共生菌 *Buchnera aphidicola* M63254, 大量的脱磷孤菌 *Desulfovibrio senezii* AF050100, *Desulfovibrio* sp. U52959。T-RF 94 bp 代表圆杆菌 *Cyclobacterium marinum* M62788, 大量的食纤维菌属 *Cytophaga* AB015524、AB015532、AB015587、AB015265, 乙酸氧化脱硫单胞菌 *Desulfomonas acetoxidans* M26634, 黄杆菌 *Flavobacterium columnare* AB010952, 土地杆菌 *Pedobacter heparinus* M11657, 鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium spiritivorum* M58778。T-RF 95 bp 代表芽孢杆菌 *Bacillus arsenicoselenatis* AF064705; 大量的硫酸盐还原菌: 脱硫球茎菌属 *Desulfobulbus* U85473、脱硫杆菌属 *Desulfobalobium retbaense* U48244、脱硫管状菌属 *Desulforhopalus vacuolatus* L42613、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio alcoholovorans* AF053751。T-RF 82 bp 代表芽单胞菌属 *Blastomonas natatoria* AB024288, 长赤细菌 *Erythrobacter longus* M59062, 赤单胞菌 *Erythromonas ursincola* AB024289, 侵蚀侏囊菌 *Nannocystis exedens* M94279, 大量的紫杆菌属 *Porphyrobacter* KK348 AB033325、*Porphyrobacter* KK351 AB033326 和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas subterranea* AB025014、*Sphingomonas yanoikuyae* U37524。

3 讨论

土壤微生物在其生命活动中需要能量和养料,因此它们所处的生存条件,如温度、湿度、通气性、外界干扰(施肥等)均会对其生命过程产生影响。本研究结果表明,土壤不增温条件下,栽培黄瓜和辣椒土壤施肥均比不施肥使细菌多样性指数增加,但物种优势度降低。曾希柏等^[14]研究表明适量化肥和有机肥配合施用可以显著增加土壤中细菌的丰度。土壤增温条件下,细菌多样性指数在施肥处理中较低,但物种的优势度提高。这可能是充足的养料供给和适宜的温度条件,使一部分对温度敏感的细菌活跃度增加,微生物生物量增加明显,成为优势物种^[15]。土壤微生物的群体作用在一定程度上对抑制植物土传病害有积极的作用,土壤微生物群落结构越丰富,物种越均匀,多样性指数越高,对抗病原菌的综合能力越强^[16-17]。本研究表明,土壤不增温条件下,辣椒 T6 处理比 T5 处理的细菌物种均匀度和多样性均高,但是 T6 处理的辣椒植株成活率和产量比 T5 处理低,因此,病原

菌与微生物间的关系尚不明确,也可能是除细菌外的其他微生物活动的结果或者辣椒根系在低温下活性低导致的植株长势弱。

土壤增温比不增温使两种施肥条件下栽培黄瓜土壤细菌物种数目增加,物种总个体数增加。增温使细菌物种均匀度和多样性指数有所减小,但细菌物种的优势度提高。T3 和 T4 处理、T1 和 T2 处理种群结构相似度比较高,说明它们的种群结构比较接近,可能是土壤温度对细菌群落结构改变起主要作用。对生存环境变化较敏感的微生物种群丰度在土壤增温后发生了显著变化,其中一部分细菌种群丰度下降甚至消失,如增温使 T4 施肥处理微生物群落结构发生变化较大,61 bp 和 93 bp 两个 T-RFs 消失,相反另一部分细菌受激发效应,种群丰度上升,T3 和 T4 处理均出现两个新 T-RFs,62 bp 和 94 bp。增温比不增温使两种施肥条件下栽培辣椒土壤物种个体数均增加。菌种群结构相似性在 T6 和 T7 处理间较高,T8 处理次之,说明增温和施肥均改善了土壤菌群结构。土壤增温使 62 bp 和 93 bp 两个 T-RFs 相对丰度增加明显,且施肥比不施肥处理相对丰度高。368 bp 和 352 bp 两个 T-RFs 在低温土壤中相对丰度较大,而增温使这两种片段消失,表明 368 bp 和 352 bp 两个 T-RFs 代表的细菌可能比较耐受低温环境。此外,序列长度相同,但碱基排列可能不同,因此长度相同不一定是同一序列^[18-19]。本文采用 T-RFLP 方法已经可以明确反映温度和施肥方式对设施土壤细菌群落结构的影响。在后续的研究中,可以考虑用克隆建库的方法做进一步的探索。

土壤温度变化可能引起土壤微生物群落某些特定种群的生理机能和生长发生改变,原因在于特定微生物种群之间对土壤温度的耐受力存在差异^[20-21]。综上所述可以看出,两种作物栽培下,土壤增温对细菌群落 62 bp 作用明显,62 bp 可能代表的是增温下土壤养分有效性提高的主要有益微生物。由于 T-RF 62 bp 片段在数据库中未找到对应的功能细菌类群,因此它们对施肥和土壤温度的响应机理还有待进一步研究。土壤温度升高通常提高养分的矿化速率,使土壤养分的有效性增加,为土壤微生物提供更多基质,有利于微生物群落的生长和繁殖,并间接提高土壤酶活性,这些过程 and 变化可能是同时发生的,并存在相互刺激和反馈作用,从而提高土壤生态系统物质的循环速率^[22-23]。Malghani 等^[24]研究表明土壤微生物生物量碳氮在土壤温度 20℃ 和施用有机肥的处理中比低土壤温度(10℃)处理中高。总之,土壤微生物活性受

到多因素的影响,施肥、水分和温度等,这些因素可能共同作用影响微生物活性^[26]。

4 结论

与不增温相比,土壤增温促进不施肥和施肥两种处理土壤速效养分含量增加,这种促进作用在施肥处理下表现更明显。土壤不增温条件下,施肥使细菌 Pielou 均匀度指数和 Shannon-Weiner 多样性指数增加, Simpson 优势度指数降低。土壤增温条件下,施肥使土壤细菌 Pielou 均匀度和 Shannon-Weiner 多样性指数减小, Simpson 物种优势度提高。与不增温比,增温使土壤细菌均匀度指数和香浓多样性指数减低,但物种个体数和优势度指数增加明显。62 bp 和 93 bp 两种 T-RFs 在土壤增温条件下优势度较高,主要代表共生菌和杆菌,其可能是增温下土壤养分有效性提高的主要有益微生物。

参考文献:

- [1] 孔滨, 孙波, 郑宪清, 等. 水热条件和施肥对黑土中微生物群落代谢特征的影响[J]. 土壤学报, 2009, 46(1): 100–106
- [2] Paul E A, Clark F E. Soil microbiology and biochemistry[M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1996.
- [3] Yukiko S B, Takayuki N, Atsushi K. Effect of warming on the temperature dependence of soil respiration rate in Arctic, temperature and tropical soils[J]. Applied Soil Ecology, 2003, 22: 205–210
- [4] Visser S, Parkinson D. Soil biological criteria as indicators of soil quality: Soil microorganisms[J]. American Journal of Alternative Agriculture, 1992, 7(1): 33–37.
- [5] 张乃莉, 郭继勋, 王晓宇, 等. 土壤微生物对气候变暖和大气 N 沉降的响应[J]. 植物生态学报, 2007, 31(2): 252–261
- [6] Schindlbacher A, Rodler A, Kuffner M, et al. Experimental warming effects on the microbial community of a temperate mountain forest soil[J]. Soil Biology Biochemistry, 2011, 43(7): 1417–1425
- [7] Fierer N, Schimel J P, Holden P A. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure[J]. Microbial Ecology, 2003, 45: 63–71
- [8] 徐振锋, 唐正, 万川, 等. 模拟增温对川西亚高山西类针叶林土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(11): 2727–2733
- [9] 王蓓, 孙庚, 罗鹏, 等. 模拟升温和放牧对高寒草甸土壤微生物群落的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(2): 151–157
- [10] 史青, 柏耀辉, 李宗逊, 等. 应用 T-RFLP 技术分析滇池污染水体的细菌群落[J]. 环境科学, 2011, 32(6): 1786–1792
- [11] 尹承苗, 王功帅, 李园园, 等. 连作苹果园土壤真菌的 T-RFLP 分析[J]. 生态学报, 2014, 34(4): 837–846
- [12] 孙庆华, 柏耀辉, 赵翠, 等. DGGE、T-RFLP、LH-PCR 对两种活性污泥的微生物种群多样性分析的比较[J]. 环境工程学报, 2009, 3(8): 1365–1370
- [13] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999
- [14] 曾希柏, 王亚男, 王玉忠, 等. 不同施肥模式对设施菜地细菌群落结构及丰度的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(1): 69–79
- [15] 陈志豪, 梁雪, 李永春, 等. 不同施肥模式对雷竹林土壤真菌群落特征的影响[J]. 应用生态学报, 2017, 28(4): 1168–1176
- [16] 王亚男, 曾希柏, 王玉忠, 等. 设施蔬菜种植年限对氮素循环微生物群落结构和丰度的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(4): 1115–1124
- [17] 王亚男, 曾希柏, 王玉忠, 等. 施肥模式对设施菜地根际土壤微生物群落结构和丰度的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 826–834
- [18] 马栋山, 熊薇, 张琼琼, 等. 基于 T-RFLP 和因子分析的香蒲根际细菌群落研究[J]. 中国环境科学, 2014, 34(10): 2684–2691
- [19] Wang J J, Li Y M, Zhao Z W, et al. T-RFLP Analysis of soil microbial community from Shandong Province for forensic science[J]. Advanced Materials Research, 2012, 599: 250–253
- [20] 隋心, 张荣涛, 钟海秀, 等. 利用高通量测序对三江平原小叶章湿地土壤细菌多样性的研究[J]. 土壤, 2015, 47(5): 919–925
- [21] 戴雅婷, 闫志坚, 解继红, 等. 基于高通量测序的两种植被恢复类型根际土壤细菌多样性研究[J]. 土壤学报, 2017, 54(3): 735–748
- [22] Zsuzsanna N, Zalán G H, Károly M. Investigation of archaeal and bacterial community structure of five different small drinking water networks with special regard to the nitrifying microorganisms[J]. Microbiological Research, 2016, 188/189: 80–89
- [23] Wang J C, Zhang D, Zhang L, et al. Temporal variation of diazotrophic community abundance and structure in surface and subsoil under four fertilization regimes during a wheat growing season[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2016, 216(15): 116–124
- [24] Malghani S, Reim A, Fischerc J V, et al. Soil methanotroph abundance and community composition are not influenced by substrate availability in laboratory incubations[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 101: 184–194
- [25] 杨瑞红, 赵成义, 王新军, 等. 梭梭和柽柳土壤微生物多样性初步分析[J]. 土壤, 2016, 48(6): 1120–1130

Study on Bacterial Community Structure in Greenhouse Vegetable Soils Affected by Soil Temperature and Fertilization Pattern using T-RFLP Technology

DONG Fei^{1,2}, YAN Qiuyan¹, LI Xun², DUAN Zengqiang^{2*}, XING Peng³

(1 *Institute of Wheat Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Linfen, Shanxi 041000, China*; 2 *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*; 3 *Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*)

Abstract: The bacterial community structures in greenhouse vegetable soils were determined under different soil temperatures and fertilization patterns by the techniques of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and fluorogenic quantitative PCR. The results showed that soil available nutrients were increased with the increase of soil temperature under the same fertilization form, the increased effect was more obvious under fertilizer treatment. The effects of fertilization on soil bacterial community were different under different soil temperatures. Fertilization increased Shannon-Weiner and Pielou indexes while decreased Simpson index under the no heating condition, but on the contrary under the heating condition. Compared with the no heating treatment, the heating treatment decreased Shannon-Weiner and Pielou indexes but obviously increased species number and Simpson index. Temperature changed the community structure of soil bacteria and the increase of temperature promoted Simpson indexes of T-RFs of 62 bp and 93 bp, mainly including symbiotic bacteria and bacillus.

Key words: Greenhouse vegetable soil; T-RFLP technology; Fertilization; Soil temperature; Bacteria community and abundance