

利用 T-RFLP 技术在施用解磷菌剂土壤中 微生物群落多样性分析

柯春亮¹, 戴嘉欣¹, 周登博², 张锡炎^{2*}

(1. 广东石油化工学院, 茂名 525000; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘要:为探讨解磷微生物菌肥对香蕉土壤根际微生态的影响,利用 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 技术分析土壤均匀度指数、香农指数和优势种群等分析微生物多样性,研究高效解磷菌剂与化学磷肥的不同组合施用方式对香蕉植株的生长情况和根际土壤微生物物量和群落结构的影响。结果显示,与对照 CK 相比, T 处理组香蕉苗较 CK 组生长健壮,地上部分鲜重平均值为 42.2 cm,明显比 CK 高出 35.2%。接 M-3-01 解磷细菌处理组 T1、T3 生长势最为显著 ($P < 0.05$),其中, T3 株高和茎围分别是 CK 的 1.26、1.16 倍。T-RFLP 技术分析微生物多样性表明, T1、T3 多样性指数和均匀度指数指标分别为 2.12/2.11 和 0.93/0.88,与 CCK 差异性不明显,但略微高于 CK。同时,分析土壤优势种群,处理组 T1、T3 处理组土壤优势微生物种群数分别为 12 和 14,数目基本与处理前土壤 CCK 的一致,而 T2 略低于 CK。拟柱孢藻 (*Cylindrospermopsis*) 和北里孢菌 (*Kitasatospora*) 只存在于 CK 和施用解磷菌剂 T1、T3 处理土壤中。土壤种植香蕉苗后,不同施用方式对土壤微生物群落丰富度和多样性的稳定具有积极影响。因此,施用高效解磷菌剂对维持土壤微生物群落丰富度和均匀度效果较好。

关键词: T-RFLP; 解磷菌剂; 土壤; 微生物; 多样性

中图分类号: S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)03-0471-07

Microbial community diversity in the soil fertilized with phosphate solubilizing bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis

KE Chunliang¹, DAI Jiixin¹, ZHOU Dengbo², ZHANG Xiyan²

(1. Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000;

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101)

Abstract: In order to study the impact of microbial fertilizer on banana soil rhizosphere's micro-ecology, we used T-RFLP technology to analyze Evenness index E, Shannon-Weiner H index and dominant population. We extracted the total DNA from the soil to study the influences of different combinations of efficient phosphorus bacteria and chemical fertilizers on the growth of banana plants and rhizosphere soil microbial community quantity and structure. Compared with the control group, the banana seedling in T treatment groups was more robust with an average height of 42.2 cm, 35.2% higher than that of the control group, especially in T treatment groups with M3-01 phosphorus bacteria inoculums. Seedlings in group T1 and T3 grew significantly vigorously ($P < 0.05$), of which, the plant height and stalk width of T3 seedlings was 1.26 and 1.16 times greater than CK, respectively. T-RFLP data also showed that indexes of diversity and evenness in T1 and T3 were subtly higher than those in CCK, reaching at 2.12/2.11 and 0.93/0.88. In the meantime, after analyzing the soil dominant group, we found the amount of soil predominant microorganisms in T1 and T3 was 12 and 14, respectively, almost with no difference from the CCK data, but slightly higher than that in T2. *Cylindrospermopsis* and *Kitasatospora* can be only found in CK and T1 and T3 with application of phosphorus bacteria inoculums. Different application methods showed positive impacts on stabilizing the richness and diversity indexes of the soil microorganism populations. In conclusion, the application of phosphorus bacteria inoculums can improve the richness and diversity indexes of the soil microorganism

收稿日期: 2016-09-10

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-32)资助。

共同第一作者简介: 柯春亮, 助教。E-mail: kecliang@163.com 戴嘉欣, 本科生。E-mail: 648985080@qq.com

* 通信作者: 张锡炎, 研究员, 博士生导师。E-mail: zxyan1981@163.com

populations; but the mechanisms are yet to be explored.

Key words: T-RFLP; phosphate solubilizing bacteria; soil; microorganism; diversity

作为植物生长必需的肥料三要素之一, 磷素以多种的形式参与植物体内的生理生化代谢过程, 对植物的生长代谢起着重要的作用, 是农业生产的重要物质保障^[1]。全世界 43% 的农业土壤缺磷, 中国 $1.07 \times 10^8 \text{ hm}^2$ 农田中大约有 2/3 严重缺磷^[2]。为满足当今农业生产的需要, 在农业生产中大量施入可溶性磷肥, 造成了成本高、污染大以及使用时磷的固定现象严重, 破坏土壤结构, 影响作物的产量与品质等后果。目前, 微生物菌肥作为改善土壤营养状况和提高植物抗逆性的作用越来越受到重视。微生物菌肥是由一种或数种有益微生物经发酵而成的无毒害绿色生物性肥料。土壤微生物多样性是衡量土壤微生物群落结构稳定性的重要指标, 反应了土壤生态和土壤胁迫对微生物群落的影响^[3]。以目前的条件, 自然界中 85%~99% 微生物还难以培养^[4], 而且将这有机群体脱离土壤这一特定环境进行培养, 进行 16SrRNA 基因的处理分析, 无法准确地反映原始群落结构和微生物多样性^[5]。

T-RFLP 技术是将 RFLP 技术和荧光标记技术相结合后发展的一种较先进的分子生态学方法, 由 Liu 等^[6]于 1997 年首次应用于微生物群落多样性的研究。有研究认为, 该方法适于微生物群落多样性中等或更低环境样品的多样性分析^[7]。本研究目的通过利用 T-RFLP 技术, 探究用高效解磷细菌制成的微生物菌肥直接施入土壤中对香蕉植株的生长情况和微生物群落结构的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 本试验所用主要生化试剂有: 土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒升级版 (溶液型), 海口越凡科技技术有限公司生产; DNA 凝胶回收试剂盒, 康宁生命科学有限公司生产; *Msp* I 限制性内切酶, NEB 公司生产; $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$, 博迈德生物公司生产; DL2000 DNA Marker (MD114), 天根生化科技有限公司生产; 磷矿粉 (柠檬酸浸提方法有效磷 (P) 含量为 $2.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1:1 硝酸测定的全磷 (P) 为 $237.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 产地江苏锦屏。

1.1.2 供试菌株 本研究供试高效解磷矿粉菌株: 虫内生沙雷氏菌 M-3-01。分离于海口市临高县南宝镇 ($19^{\circ}47'1''\text{N}$, $109^{\circ}51'17''\text{E}$) 香蕉种植基地根系土

壤。

1.1.3 主要培养基 基础培养基: 葡萄糖 10 g, 硫酸铵 0.5 g, MgSO_4 0.3 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, 磷矿粉 5 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH7.0~7.2。

1.1.4 PCR 引物 本研究所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物信息见表 1。

表 1 PCR 引物
Table 1 Primers for PCR

引物名称 Primer name	序列 Sequence
Eubac27F[106]	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
Eubac1492R[106]	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3'

1.1.5 供试土壤 取自海口市龙华区 ($19^{\circ}59'7.09''\text{N}$, $110^{\circ}19'24.97''\text{E}$), 为少砾质粘土, 其理化性状为: pH4.53, 有机质含量 0.51%, 全氮 (TN) 0.0873%, 碱解氮 (N) 含量为 $53.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有效磷 (P_2O_5) 含量为 $3.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效钾 (K_2O) 含量为 $47.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2 主要方法

盆栽试验于 2015 年 5—7 月在中国热带农业科学院热带生物技术研究所温室进行, 温室的条件控制为: 温度为 28°C 左右, 湿度为 86%, 自然光照。试验设 4 个处理:

CK: 无机磷基础培养基 B (除磷矿粉);

T1: M-3-01 解磷菌剂;

T2: 化学磷矿粉; T3: M-3-01 解磷菌剂+化学磷矿粉。

本试验采用完全随机区组设计。

制备菌株 M-3-01 菌液: 挑取代表细菌 M-3-01 少许接种到液体种子培养液中, 转速设计 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温摇床培育 1 d; 无菌水稀释至活菌浓度为 $10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 量级菌液备用。

盆栽试验操作: 提前一周, 按照磷土质量 $0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例将施磷处理的磷矿粉与土壤混匀后, 备用。将处理好的香蕉杯苗移栽到营养钵中, 每个处理 15 盆。解磷菌液需要 1:50 稀释比例浇灌。移栽后第 1 天开始, 按照试验设计浇灌相应的处理液, CK、T2 同样施入等量灭菌无机磷培养基。每次每株浇灌 50 mL, 每隔 5 d 浇灌 1 次。试验期间, 施磷处理组补充一次磷矿粉, 各处理的其他管理措

施均一致。取香蕉苗试验处理 60 d 后各处理香蕉苗根际土壤样品, 采用 5 点混样, 为距离香蕉假茎 0.5 m 以内, 深度为 4~6 cm。土壤样品采集后置于无菌封口袋中, 准确标记, 冰盒密封 4℃ 保存备用。

1.2.1 香蕉植株生物量统计 取试验 60 d 的香蕉植株, 测量它们株高、茎围、植株地上、下部分鲜重和干重。以上生物量数据均为平均值。测定数据 3 次重复, 平均值作为试验结果。

1.2.2 基于 T-RFLP 方法土壤微生物群落多样性分析

(1) 土壤总 DNA 的提取。取 5 g 土样, 在放于 2 mL 的灭菌离心管中, 用 DNA 提取试剂盒(土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒升级版(溶液型))提取总 DNA 并纯化, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(2) 引物设计与细菌的 16S rDNA 的聚合酶链反应(Polymerase chain reaction-PCR)扩增。16S rDNA 引物: 以 27F、1492R 双向引物进行 PCR 扩增, 27F 5' 端用 FAM 标记。

PCR 反应体系: 2×*Taq* MasterMix 25 μL、10 μmol·L⁻¹ Forward primer 1 μL、10 μmol·L⁻¹ Reverse primer 1 μL 和模板 1 μL, 补充 RNase-free 水至 50 μL。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 0.5 min, 55℃ 退火 0.5 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。其中, 2×*Taq* PCR Master Mix 中含 *Taq* DNA Polymerase 1.25 U, dNTPs 0.4 mmol·L⁻¹, Mg²⁺ 4 mmol·L⁻¹。50 μL PCR 产物用 1% 的 TAE-琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并用 DNA 纯化试剂盒纯化。

(3) 扩增产物限制性内切酶酶切反应。纯化后的 PCR 产物用 *Msp* I 酶进行单酶切, 酶切反应体系: *Msp* I 1 μL、10×NEB buffer 5 μL、100×BSA 37℃ 0.5 μL 和模板 10 μL, 补充 RNase-free 水至 50 μL。温育 4 h 后, 65℃ 终止反应 30 min。吸取 5 μL 酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余产物密封后用锡箔纸避光保藏, 并送测。

(4) T-RFLP 图谱与数据统计分析。样品 T-RFLP 结果用软件 Peak Scanner Software v1.0 分析, 数据输出前需先设定片段阈值, 末端限制性片段(T-RFs)长度为 50~500 bp, (峰面积/总面积)% ≥ 0.5%, 荧光强度 > 50 FU (荧光单位) 的 TRFs 视为有效峰, 每个有效 TRFs 代表一个 OTU, 可作群落丰富度分析, 并通过网站 (<http://trflp.limnology.wisc.edu/index.jsp>) 检索每个有效 TRFs 片段所代表的微生物类群。以有效 TRFs 片段的相对峰面积(P_i)作为对应 OTU 的相对丰度, 相对峰面积可表示为: $P_i = n_i/N \times 100\%$, 式中 n_i 表示第 i 个 TRFs

的峰面积, N 表示 i 所在图谱中有效峰的总面积^[8]。其他数据统计分析利用 SPSS19.0 和 Microsoft Excel 2010 完成。

根据图谱中 OTU 的数目以及相对峰面积值, 通过以下公式计算多样性指数:

(1) 香农指数(Shannon-Wiener index) $H' = -\sum(n_i/N) \ln(n_i/N) = -\sum P_i \ln P_i$ 。

(2) 均匀度指数(Evenness index) $E = H'/H'_{\max}$ (其中, $H'_{\max} = \ln S$)。

2 结果与分析

2.1 解磷菌剂对香蕉植株生物量的影响

如图 1 所示, 不同处理组的香蕉苗生长状况均与对照表现出一定的差异性, 香蕉苗生长情况为: 处理 3 > 处理 1 > 处理 2 > CK。从表 2 可以看出, T 处理组香蕉苗较 CK 组生长健壮。T 处理组中, 接 M-3-01 解磷细菌处理组 T1、T3 的生长势最为显著。CK 表现出一定的植株矮小, 叶片偏黄而狭小。处理 T3 是所有处理组效果最好的。平均株高为 52.84 cm, 平均茎围为 6.5 cm。分别是 CK 的 1.26 和 1.16 倍。T 处理组的植株生物量整体生长体现较好的效果。不仅对植物下部的生长有效果, 对地上部分也比较显著。T 处理组地上部分鲜重平均值为 42.2 cm, 明显比 CK 高出 35.2%。说明磷素可以促进植物生长, 施加解磷菌剂的效果相对明显。



图 1 接种解磷菌剂 45 d 后香蕉苗生长情况

Figure 1 The growth situation of banana seedlings after inoculation of phosphate solubilizing for 45 days

2.2 T-RFLP 分析解磷菌剂对土壤微生物多样性的影响

土壤微生物群落多样性一般用多样性指数表示, 多样性指数是综合反映群落丰富度和均匀度的指标。Shannon-Weiner 指数和 Simpson 指数包括了种的多寡和群落的异质性两方面^[9]。Shannon-Weiner 指数反映土壤中微生物种群丰富度; Evenness index 指数则反映土壤微生物群落的均匀度。表 3 表示处理前土壤和经不同处理 60 d 后土壤微生物的 TRFs 有效片段(丰富度)数量、Shannon-Weiner 指数和

Evenness index 指数。研究表明, CK 和 T2 土壤微生物群落的 TRFs 片段数量同为 8, 多样性指数和均匀度指数指标为 1.17/1.42 和 0.56/0.68 均低于 CCK。而 T1、T3 处理多样性指数和均匀度指数指标分别为 2.12/2.11 和 0.93/0.88, 与 CCK 差异性不明显, 但略微高于 CK 的 0.56/1.17。说明高效解磷菌剂本身含有丰度的微生物, 这对处理土壤微生物群落丰富度、优势度和均匀度影响较大。从试验数据分析, CK 较其处理前的土壤或其他处理组的土

壤微生物群落丰度数低, 各项多样性指标均低。说明在土壤种植香蕉苗后, 各处理组对土壤微生物群落丰富度和多样性的稳定具有积极影响。其中, 使用高效解磷菌剂的处理 T1 和 T3, TRFs 片段数量 (10/11)、Shannon-Weiner 指数 (2.12/2.11) 和 Evenness index 指数 (0.93/0.88) 较 T2 均提高, 对提高土壤微生物群落丰富度和均匀度稳定性较高, 而只施用无机磷处理 T2 的土壤差异不明显, 对土壤微生物群落多样性影响最大。

表 2 不同处理对香蕉植株的生长影响

Table 2 Effects of different treatments on the growth of banana seedlings

处理 Treatment	株高/cm Plant height	茎围/cm Stem	鲜重 Fresh weight /g·plant ⁻¹		干重 Dry weight /g·plant ⁻¹	
			地上部分 Shoot fresh weight	地下部分 Root fresh weight	地上部分 Shoot dry weight	地下部分 Root dry weight
CK	42.07±4.07 ^c	5.6±0.88 ^b	31.2±3.82 ^c	16.9±2.16 ^a	2.76±0.06 ^c	0.65±0.02 ^b
T1	46.10±3.86 ^b	6.7±0.97 ^a	39.1±3.12 ^b	18.5±1.13 ^a	3.05±0.05 ^b	0.75±0.01 ^a
T2	51.10±5.32 ^a	5.9±0.58 ^b	39.7±1.77 ^b	16.6±1.64 ^b	3.03±0.12 ^b	0.71±0.01 ^a
T3	52.82±5.91 ^a	6.5±0.60 ^a	47.8±3.81 ^a	18.5±1.66 ^a	4.26±0.10 ^a	0.76±0.01 ^a

注: 表中不同的小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$); CK: 基础培养基 (除磷矿粉); T1: M-3-01 解磷菌剂; T2: 化学磷矿粉; T3: M-3-01 解磷菌剂+化学磷矿粉, 下同。

Note: Different letters meant significant difference at 0.05 level in the table; CK: Basic medium (except Phosphate rock) T1:M-3-01 phosphate solubilizing bacteria; T2: Phosphate rock; T3:M-3-01 phosphate solubilizing bacteria added with Phosphate rock. The same below.

表 3 不同处理后土壤微生物多样性变化

Table 3 Variation of soil microbial communities from different treatments

样品编号 No.	丰富度指数 <i>S</i> Richness index	多样性指数 <i>H</i> Shannon-Weiner	均匀度指数 <i>E</i> Evenness index
CCK	9	2.01	0.92
CK	8	1.17	0.56
T1	10	2.12	0.93
T2	8	1.42	0.68
T3	11	2.11	0.88

注: CCK 为处理前原土壤。下同。Note: CCK show soil before treatment. The same below.

2.3 T-RFLP 图谱分析

如图 2 所示, 对于盆栽土壤的群落结构, 处理前 (CCK) 原始土壤的优势 T-RFs 片段有: 54、55、57、58 和 91 bp; CK 对照土壤中优势 T-RFs 片段为 54、56、57 和 90 bp; T1 处理土壤中优势 T-RFs 片段有 59、60 和 98 bp; T2 处理土壤中优势 T-RFs 片段有 60、61 和 98 bp; T3 菌群发酵液处理土壤中优势 T-RFs 片段主要有 56、60、58、61、96 和 112 bp。从优势 T-RFs 片段分布可以看出, CCK 和 CK 处理土壤在 54 bp 和 57 bp 处有共同优势 T-RFs; T1、T2 和 T3 处理土壤共同优势 T-RFs 片段为 60 bp; T1、T2 处理土壤共同优势 T-RFs 片段为 98 bp; T2、T3 处理土壤共同优势 T-RFs 片段为 61 bp; T3 处理土

壤优势 T-RFs 片段为 6 段比较丰富。

如图 3 所示, 处理前 CCK 和空白对照土壤 CK 的相对丰度分布在 50~100 bp 和 100~150 bp 2 区间, 其 50~100 bp 的值分别为 90.23%和 90.12%, 较单一; T 处理和 CK 处理土壤相对丰度较显著性差异, 在 T 处理土壤中, 它们相对分度片段区间分布较广。其中 50~100 bp 区间的相对丰度大小分别为 95.31%、98.15%和 82.5%; 100~150 bp 区间的相对丰度分别为 3.40%、0%、和 16.58%; T1、T2 在 150~200 bp 区间的相对分度为 1.28%、1.85%, ≥200 bp 只有 T3, 相对丰度为 0.92%; 纵观分析结果, T1 和 T3 处理土壤群落结构多样性优势种群丰富, 且种群分布面广。

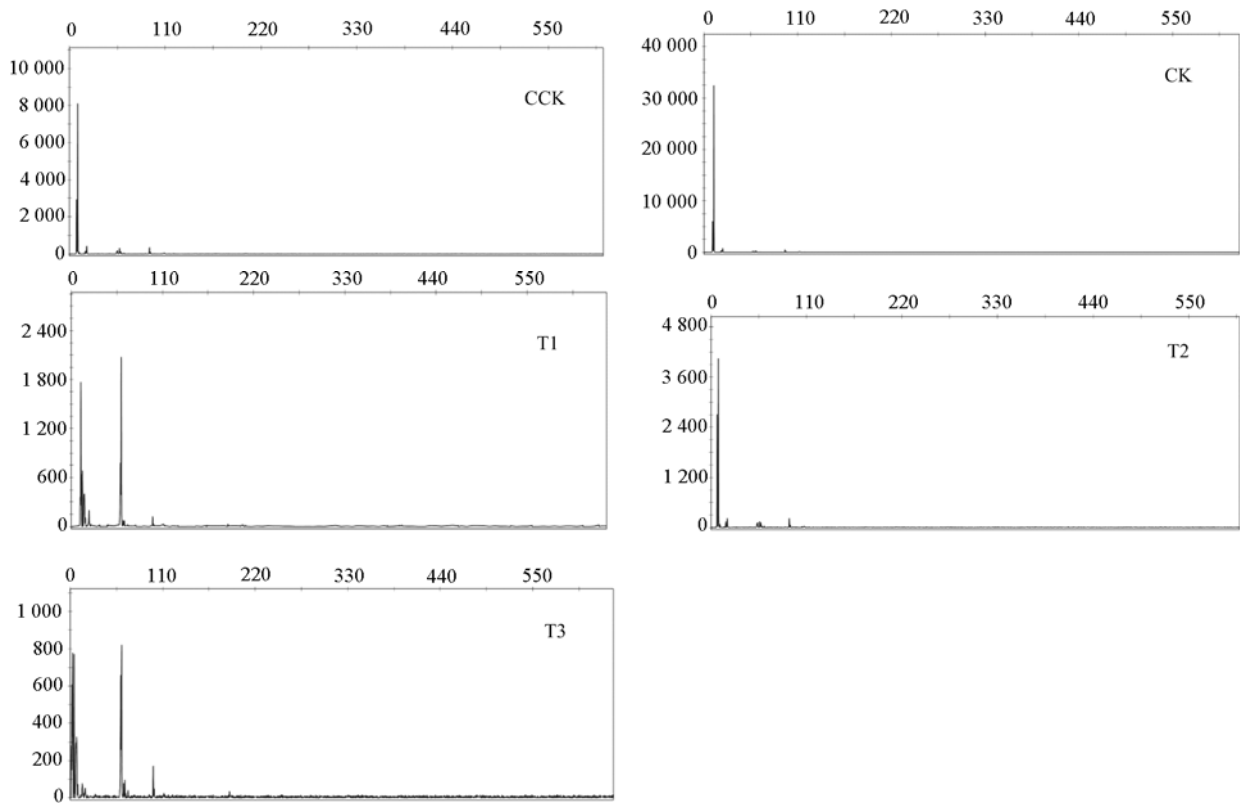


图 2 不同处理土壤的 T-RFLP 图谱

Figure 2 T-RFLP profile of soil with different treatments

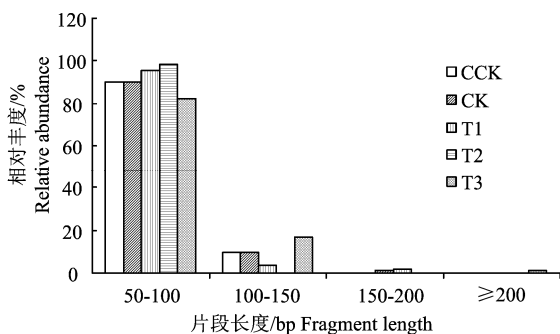


图 3 土壤样品酶切 TRFs 片段相对丰度

Figure 3 TRFs fragment length of the soil DNA after digestion

2.4 土壤微生物优势种群比较

本试验是将 *Msp* I 酶切后的 TRFs 片段, 通过与网站 (<http://trflp.limnology.wise.edu/index.jsp>) 数据库中的标准数进行比对, 取各样品均取峰面积排最前 3 大 TRFs 片段比对出的相同菌属 (重复率 ≥ 3 次) 视为该土壤样品的优势菌。不同处理土壤微生物群落的优势种群分析结果 (表 4) 显示, 本试验样品共有 19 种优势微生物种群。不同土壤处理组之间优势种群均有一定差异性, 各处理组土壤与 CK 土壤的优势种群均存在显著性差异。由表 4 中的数据可知, CK 处理组土壤优势微生物种群数量比

CCK 显著降低。CCK、CK 和各处理土壤中, 均存在优势种群食酸菌 (*Acidovorax*)、慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium*)、噬细胞菌 (*Cytophaga*) 和拟杆菌 (*Bacteroides*), 说明此 4 种群是原土壤中的固有菌属, 且不受菌剂或化学磷肥影响能稳定存在的菌属。而拟柱孢藻 (*Cylindrospermopsis*) 和北里孢菌 (*Kitasatospora*) 优势种群只存在于在 CK 和施用解磷菌剂 T1、T3 处理土壤中, 而施用化学磷肥的 T2 土壤却不存在。有研究表明, 施加外源微生物菌剂可以改变植物根际土壤微生物类群^[10]。施用化学磷矿粉或施用解磷菌剂在一定程度影响土壤某类菌类生存, 导致土壤微生物优势种群的变化。数据显示, T 处理组土壤优势微生物种群数量均高于 CK。施加解磷菌剂的 T1、T3 处理组土壤优势微生物种群数分别为 12 和 14, 优势微生物种群数目基本与处理前土壤 CCK 的一致。而 T2 略低于 CK。

综上所述, 不同处理土壤都会具有其特有的优势种群, 对比发现, 嗜气芽孢杆菌 (*Bacillus aerophilus*) 和嗜线虫沙雷氏菌 (*Serratia nematodiphila*) 优势种群仅存在于施用高效解磷菌剂处理土壤中, 说明该优势菌群是原解磷菌剂固有优势菌群, 对香蕉植株具有促生作用。处理前 CCK 土壤

的红球菌 (*Rhodococcus*) 优势菌群却在后期不同处理组土壤中不存在, 说明这些菌群在后期处理中不占优势。处理组 T1、T3 土壤优势微生物种群数量

均维系着处理前 CCK 的数目, 而 T2 的数量却减少, 说明解磷菌剂是施用维持土壤微生物群落多样性。

表 4 T-RFLP 分析不同处理土壤微生物的优势种群

Table 4 Dominant populations of microbial in soil under different treatments by T-RFLP

优势菌群 Dominant population	CCK	CK	T1	T2	T3
无色菌 <i>Achromatium</i>	+	-	+	+	+
食酸菌 <i>Acidovorax</i>	+	+	+	+	+
放线杆菌 <i>Actinobacillus</i>	+	-	-	-	+
嗜气芽孢杆菌 <i>Bacillus aerophilus</i>	-	-	+	-	+
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	+	-	-	-	+
拟杆菌 <i>Bacteroides</i>	+	+	+	+	+
噬细胞菌 <i>Cytophaga</i>	+	+	+	+	+
慢生根瘤菌 <i>Bradyrhizobium</i>	+	+	+	+	+
嗜二氧化碳噬细胞菌 <i>Capnocytophaga</i>	-	-	-	-	+
拟柱胞藻 <i>Cylindrospermopsis</i>	+	-	+	-	+
嗜线虫沙雷氏菌 <i>Serratia nematodiphila</i>	-	-	+	-	+
屈挠杆菌 <i>Flexibacter</i>	-	-	+	+	-
梭形杆菌 <i>Fusobacterium</i>	-	-	+	+	-
北里孢菌 <i>Kitasatospora</i>	+	+	+	-	+
普氏菌 <i>Prevotella</i>	+	+	-	-	+
杆菌属 <i>Aneurinibacillus</i>	-	-	-	-	-
红球菌 <i>Rhodococcus</i>	+	-	-	-	-
红假单胞菌 <i>Rhodopseudomonas</i>	+	+	-	-	+
卟啉单胞菌 <i>Porphyromonas</i>	-	-	+	+	-

注: “+”表示该种群存在于样品中,“-”表示该种群不存在于样品中。

Note: “+” means that this genus exists in the sample, “-” means that this genus does not exist in the sample.

3 讨论与结论

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 其在有机质分解、营养循环、植物生长的促进或抑制以及各种土壤过程中发挥着重要的作用^[11]。T-RFLP 技术因重复性、高通量等优势, 在微生物多样性研究中发挥重要作用。如 Scavino 等^[12]和吴琼等^[13]运用 T-RFLP 技术研究了乌拉圭牧场、灌溉稻田和拙政园土壤微生物群落的结构和多样性。T-RFLP 技术在微生物多样性研究中广泛应用。有研究表明, 菌肥处理与未施菌肥对土壤微生物的影响不同, 会导致土壤微生物种类存在明显差异, 土壤微生物结构发生改变^[14]。长期施肥由于改变了土壤的理化性质, 进而改变了土壤中微生物群落构成, 其数量、生理类群和生态功能都会产生一定变化^[15-16]。本研究利用 T-RFLP 技术, 分析土壤微生物群落遗传多样性, 进而研究解磷菌剂对土壤微生物群落多样性的影响, 为微生物菌肥对植物生长及土壤改良效果提供理论依据。

土壤是一个非常复杂的微生态系统。研究表明: 高效解磷菌剂施入土壤后, 在 T 处理组与 CK 相比, 香蕉苗在株高、鲜重和茎围均有增长, 而接解磷细菌 M-3-01 处理组 T1 和 T3, 香蕉地上、地下部鲜干重明显比未接菌处理 T2 的高。试验表明, 施加高效解磷菌剂或化学磷肥都不同程度的促进香蕉苗的营养生长。施加菌肥的处理组 T1、T3 比只施加化学磷肥的处理组 T2 对促进香蕉苗的营养生长效果要好。林林等^[17]和顾淑娟等^[18]用微生物菌肥作试验, 证明不同的菌肥有利于作物生长, 在同等施肥水平下施加微生物菌肥可以提高作物长势。一些解磷菌不但可通过提供较多的有效磷及金属元素, 而且还可通过产生生物生长素、铁载体和 HCN 等物质促进植物生长^[19]。施加解磷菌剂对于香蕉植株生长是具有明显的促进作用的。结果显示, 随着栽培时间, 土壤微生物群落结构也发生改变, 空白对照土壤 (CK) 的微生物多样性、物种丰富度、均匀度等多样性指数降低, 菌群 TRFs 片段减少, 分布区间狭窄, 菌群相对丰度较低, 较单一, 土壤微生物

优势种群种类较少, 只有几个种属。土壤经解磷菌剂处理后, 多样性各项指数比 CK 高, 优势种群 TRFs 片段数量、优势种群的种属数量比 CK 多。与处理前土壤 CCK 的多样性各项指数、优势种群 TRFs 片段数量比较略有增加, 而只施加化学磷肥处理 T2 土壤各项指标不明显。说明在土壤种植香蕉苗后, 各处理组对土壤微生物群落丰富度和多样性的稳定具有积极影响。其中, 高效解磷菌剂对土壤微生物群落丰富度和均匀度稳定性较高。施用微生物菌剂后土壤细菌数量和种类有一定程度的提高^[20]。这与胡可等^[21]生物有机肥可提高微生物的数量、活性和提高了土壤微生物多样性的研究一致。对不同处理土壤优势种群进行分析比较可知, *Cylindrospermopsis* 和 *Kitasatospora* 优势种群只存在于在 CK 和施用解磷菌剂 T1、T3 处理土壤中。*Bacillus aerophilus* 和 *Serratianematodiphila* 优势种群仅存在于施用高效解磷菌剂处理土壤中, 说明该优势菌群是原解磷菌剂固有的优势菌群, 对香蕉植株具有促生作用。

结果表明, 用高效解磷矿粉的磷细菌制成的微生物菌肥直接施入土壤中, 既可以促进香蕉植株生长, 也能影响土壤的微生物群落结构, 各类多样性指数, 优势微生物种属数量维持原有并有所增加, 为土壤微生态系统提供动力和源泉。

参考文献:

- [1] SCHRÖDER J J, SMIT A L, CORDELL D, et al. Improved phosphorus use efficiency in agriculture: a key requirement for its sustainable use[J]. *Chemosphere*, 2011, 84(6): 822-831.
- [2] 曲均峰, 戴建军, 徐明岗, 等. 长期施肥对土壤磷素影响研究进展[J]. *热带农业科学*, 2009, 29(3): 75-80.
- [3] 任天志. 持续农业中的土壤生物指标研究[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(1): 68-75.
- [4] AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1995, 59(1): 143-169.
- [5] 王洪媛, 管华诗, 江晓路. 微生物生态学中分子生物学方法及 T-RFLP 技术研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(8): 42-47.
- [6] LIU W T, MARSH T L, CHENG H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11): 4516-4522.
- [7] 袁三青, 薛燕芬, 高鹏, 等. T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性[J]. *微生物学报*, 2007, 47(2): 290-294.
- [8] DUNBAR J, TICKNOR L O, KUSKE C R. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities[J]. *Appl Environ Microb*, 2001, 67(1): 190-197.
- [9] 马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法[J]. *生物多样性*, 1994, 2(4): 231-239.
- [10] 李飞, 王相晶, 吴青君, 等. 三种药剂喷雾和灌根施药方式对西花蓟马的残留毒力[J]. *植物保护*, 2013, 39(3): 173-177.
- [11] DEGENS B P, SCHIPPER L A, SPARLING G P, et al. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities[J]. *Soil Biol Biochem*, 2000, 32(2): 189-196.
- [12] SCAVINO A F, JI Y, PUMP J, et al. Structure and function of the methanogenic microbial communities in Uruguayan soils shifted between pasture and irrigated rice fields[J]. *Environ Microbiol*, 2013, 15(9): 2588-2602.
- [13] 吴琼, 陈紫丹, 邱业先. 基于 T-RFLP 技术的拙政园土壤微生物多样性分析[J]. *苏州科技学院学报(自然科学版)*, 2015, 32(3): 36-42.
- [14] 刘晓燕, 张磊, 韦泽秀, 等. 用 PCR-DGGE 研究菌肥对西藏青稞土壤微生物群落多样性的影响[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2014, 36(7): 39-48.
- [15] WU M, QIN H, CHEN Z, et al. Effect of long-term fertilization on bacterial composition in rice paddy soil[J]. *Biol Fert Soils*, 2011, 47(4): 397-405.
- [16] 徐永刚, 宇万太, 马强, 等. 长期不同施肥制度对潮棕壤微生物生物量碳、氮及细菌群落结构的影响[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(8): 2078-2085.
- [17] 林林, 张琪晓, 范海芬, 等. 几种微生物肥料在甜瓜栽培中的应用试验[J]. *上海农业科技*, 2012 (1): 100-101.
- [18] 顾淑娟, 叶玫, 袁勇. 微生物肥在大叶菠菜上的应用效果[J]. *上海蔬菜*, 2003(2): 39-40.
- [19] 邵玉芳, 樊明寿, 乌恩, 等. 植物根际解磷细菌与植物生长发育[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(4): 241-244.
- [20] 陈广波. 肥料和菌剂配施对红壤地区连作花生生育性状和土壤微生物多样性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [21] 胡可, 李华兴, 卢维盛, 等. 生物有机肥对土壤微生物活性的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2010, 18(2): 303-306.