

任 强,陈连水,邹义冬,等. 不同南丰蜜橘园挂果期土壤微生物的多样性[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):414-417.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.130

不同南丰蜜橘园挂果期土壤微生物的多样性

任 强,陈连水,邹义冬,吴心怡

(东华理工大学化学生物与材料科学学院,江西南昌 330013)

摘要:通过对江西省抚州市南丰县市山镇郊橘园土壤、莱溪水田边橘园土壤、军峰山石桥橘园下层土壤、盱江边橘园上层土壤的微生物进行培养,再通过菌落观察、测量、计数及细胞形态、大小的观测,计算出各土壤培养组中固氮菌群落的 Margalef 丰富度指数(dma)、Simpson 优势度指数(D)、Shannon-Winener 多样性指数(H')、Pielou 均匀度指数(Jsw)、每皿平均种类数和平均个体数,再进行种群间的相似性分析,以期能体现南丰蜜橘的独特性和南丰蜜橘橘园土壤微生物的多样性状况。试验结果表明,南丰蜜橘不同耕作方式对土壤有一定影响,合理的种植措施可以改善土壤微生物多样性,从而使南丰蜜橘高产、优质。初步得出结论:除保证品系、苗木质量、合理施肥外,保护产地的生态条件是目前情形下保护南丰蜜橘优良品质最有效的措施。

关键词:南丰蜜橘;土壤微生物;多样性;土壤固氮菌;丰富度指数

中图分类号:S666.206 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0414-03

南丰蜜橘(*Citrus reticulata*)香甜可口,核小,果实色泽金黄,皮薄肉嫩,食不存渣,风味浓郁,芳香扑鼻,以其滋味浓醇而著称于世,是江西省甚至是全国的著名良种。南丰蜜橘的品质是南丰蜜橘研究的核心问题,但随着种植面积大幅度增加以及产量的提高,人们普遍反映南丰蜜橘的质量和风味下降,值得研究者和种植者关注。品质是蜜橘产业化的核心,南丰蜜橘发展的关键点应当放在提高品质上,应加大南丰蜜橘产业产前、产中、产后的投入力度。南丰蜜橘整体品质自1991年大冻后有所下降,在不同程度上出现皮厚、不化渣、味不浓、籽多、偏酸等现象。据江西省南丰蜜橘普查工作小组1999年对南丰县36个典型橘园36个果样的调查分析,符合江西省标准DB36/T127—1993《南丰蜜橘》的仅有13个果样,占总样的36%,19%的果样可溶性固形物含量低于标准,64%的果样含酸量不符合标准^[1-6]。方治军等研究发现,南丰蜜橘在果实的色泽、肉质、风味、可溶性固形物含量、维生素C含量等方面存在较大的差异,并与产地气候、土壤等主要生态因子有一定的相关性^[7],其中土壤养分是影响土壤性质的重要因子,对南丰蜜橘产量和品质有显著的影响。土壤中的氮素损失一直是土壤微生物学家重视的问题,目前正在研究以抑制硝化细菌活动的方式减少土壤中的硝化、反硝化作用,从而防止氮肥的损失和避免因形成亚硝酸而污染水域。固氮菌除能固氮之外,还能形成维生素和异生长素,不仅能刺激农作物生长发育、提高产量,也能加强其他根际微生物的生命活动,促进土壤有机物质的矿化作用,从而改良土壤结构,改善农作物品质^[8-13]。许多对植物或动物有害的物质如农药、重金属等超过一定限度同样会影响或危及土壤微生物种类,而

土壤具有分解有毒化合物的作用,这种作用是靠土壤中的微生物(主要是细菌)来完成的^[14-16],这也是橘园土壤固氮菌研究的重要性在另一个方面的体现。陈品等研究表明,不同农药及其不同浓度对自生固氮菌生长及固氮量的影响有所不同,从而为添加固氮菌以提高农作物产量、监测固氮菌含量来评估作物产量,以及田间正确使用农药提供了理论依据。另外,目前利用固氮菌开发的生物型肥料也日益应用在绿色农业生产中^[15-17]。

本研究通过对江西省抚州市南丰县市山镇郊橘园土壤、莱溪水田边橘园土壤、军峰山石桥橘园下层土壤、盱江边橘园上层土壤的微生物进行培养、观察、计算,分析土壤微生物的多样性指标,以期为保持南丰蜜橘生长所需的土壤条件提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料来源 所用土样分别采自江西省南丰县莱溪田边橘园土壤、市山镇郊平地橘园土壤、盱江边平地橘园土壤、军峰山脚下橘园土壤。

1.1.2 试验试剂 主要试剂有:50 mg/L 重铬酸钾抑制剂溶液、1 mol/L NaOH 溶液、复红染剂、改良的 Ashby 培养基、革兰氏染色剂、95% 乙醇溶液、0.85% 生理盐水、番红溶液、碘液、结晶紫染液、无菌水等。

1.1.3 仪器与耗材 主要仪器与耗材有:DHG-9003BS-Ⅲ型电热恒温鼓风干燥箱、DNP-9002BC-Ⅲ型电热恒温培养箱、BD-156CT 型超低温冰柜、SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台、B-103 单目显微镜、BCD-193A 冰箱、BS223S 电子天平、CJ-2FD 型超净工作台、B203LED 生物显微镜、YX280A 手提式不锈钢蒸气消毒器、锥形瓶、电炉、无菌试管、无菌培养皿、无菌烧杯、玻璃棒、接种环、无菌吸管、无菌棉、吸水纸、擦镜纸、量筒、试管架、刷子、载玻片、显微镜、滴管、无菌锥形瓶、石棉网、手套、无菌袋、移液枪、涂棒、锡纸、盖玻片、精确 pH 试纸等。

收稿日期:2014-10-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:21107014);江西省自然科学基金(编号:2009GZH0008)。

作者简介:任 强(1982—),男,山东济南人,硕士,讲师,主要从事植物生物学和生物技术研究。E-mail:1351994425@qq.com。

1.2 试验方法与步骤

1.2.1 配制改良后的 Ashby 培养基 分别在加有一定蒸馏水的烧杯中加入 100 g 甘露醇、5 g CaCO_3 、0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g KH_2PO_4 、0.1 g $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g NaCl、20 g 琼脂,加热使琼脂融化后加蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.2.2 南丰蜜橘土壤中固氮菌的分离培养 制备土壤稀释液,用移液枪吸取 0.1 mL 土壤稀释液涂布在改良的 Ashby 培养基中,将平板倒置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 4 d^[18]。之后每过 1 d 对每个培养皿中产生的固氮菌分别进行计数并描述各种固氮菌的形态、生化生理特征^[19-21]。

1.2.3 革兰氏染色及个体形态观察与计数 取固氮菌常规涂片、干燥、固定。滴加结晶紫(刚好将菌膜覆盖即可)染色 1~2 min,之后水洗。残水用碘液冲去,并用碘液覆盖约 1 min,再水洗。用滤纸吸去玻片上的残水,将玻片倾斜,置于白色背景下,用滴管流加 95% 的乙醇脱色,直至流出的乙醇不出现紫色时,立即水洗。用番红液复染约 2 min,水洗。干燥后,用油镜观察菌种的形态,结合细菌计数板计数。

1.3 计算公式:

$$\text{总个体数: } N = \sum N_i S_i;$$

$$\text{总种数: } S = \sum S_i;$$

$$\text{Margalef 丰富度指数: } dma = (S - 1) / \ln N;$$

$$\text{Simpson 优势度指数: } D = 1 - \sum P_i^2;$$

$$\text{Shannon - Winener 多样性指数: } H' = - \sum P_i \ln P_i;$$

$$\text{Pielou 均匀度指数: } Jsw = H' / H'_{\max}。$$

2 结果与分析

2.1 南丰蜜橘土壤固氮菌多样性指数统计分析结果

通过对市山镇郊橘园土壤(1 号土样)、莱溪水田边橘园上层土壤(2 号土样)、莱溪水田边橘园中层土壤(3 号土样)、军峰山石桥橘园下层土壤(4 号土样)、盱江边橘园上层土壤(5 号土样)、莱溪水田边橘园下层土壤(6 号土样)的土壤固氮菌种数和个体数对应关系计算出 N_i 、 S_i ,再运用“1.3”节各公式计算出各土壤培养组固氮菌群落的 Margalef 丰富度指数(dma)、Simpson 优势度指数(D)、Shannon - winener 多样性指数(H')、Pielou 均匀度指数(Jsw)、每皿平均种数和平均个体数,结果见表 1、图 1、图 2。

2.2 根据固氮菌进行样点间聚类分析

本试验中,采用最短距离法进行聚类分析,以 2 个样方间距离系数 BC 为指标,各样方用 Sample i 表示(Sample 1 代表市山镇郊橘园土壤、Sample 2 代表莱溪水田边橘园上层土壤、Sample 3 代表莱溪水田边橘园中层土壤、Sample 4 代表军峰

表 1 各采样点橘园土壤固氮菌个体数目与种数对应关系

土样 编号	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天	第 9 天	总计	每皿平均	dma	D	H'	Jsw
1 号	1(1)	4(2)	12(1)	21(1)	517(1)					556(6)	55.5(0.6)	0.791 2	0.136 9	0.322 5	0.179 9
2 号	5(1)	12(1)	19(1)	115(1)	782(1)					933(5)	93.3(0.5)	0.584 9	0.281 6	0.489 9	0.304 4
3 号	1(1)	3(1)	7(1)	8(1)	161(1)					180(5)	18.0(0.5)	1.252 7	0.196 5	0.460 6	0.286 3
4 号	1(2)	4(1)	5(1)	159(1)	267(1)					437(6)	43.7(0.6)	0.822 3	0.494 3	0.776 9	0.433 6
5 号	1(4)	2(1)	3(1)	5(2)	7(1)	14(1)	17(1)	29(1)	35(1)	121(13)	12.1(1.3)	2.538 6	0.821 8	1.683 9	0.656 5
6 号	1(1)	2(2)	6(1)	27(1)	283(1)					321(6)	32.1(0.6)	0.866 4	0.215 2	0.382 9	0.213 7

注:括号外为固氮菌数,括号内为种数。

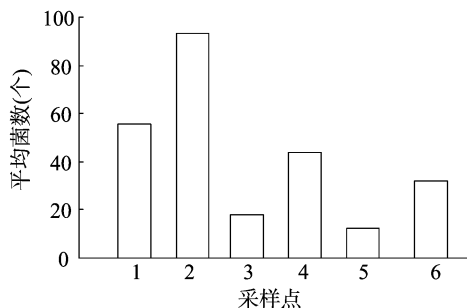


图1 不同采样点南丰蜜橘土壤固氮菌平均菌数比较

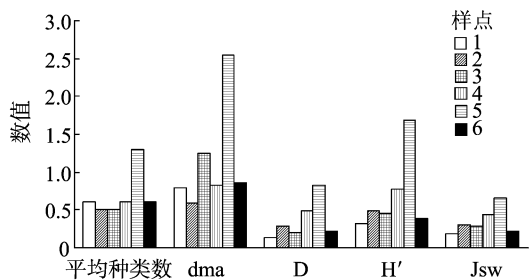


图2 不同采样点南丰蜜橘挂果期土壤固氮菌不同多样性指数比较

山石桥橘园下层土壤、Sample 5 代表盱江边橘园上层土壤、Sample 6 代表莱溪水田边橘园下层土壤), d_{ij} 表示 x_i 与 x_j 之间的距离, D_{pq} 表示样方 Sample p 与样方 Sample q 之间的距离。则 2 个样方间的最短距离表示为: $D_i(p, q) = \min \{ d_{jk} \mid j \in G_p, k \in G_q \}$ 。采用最短距离法对本试验中的 6 个样方进行分类,得各样方间距离, $D(0)$ 矩阵见表 2。

表 2 不同样方间距离 $D(0)$ 矩阵

类别	相似率(%)					
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
Sample 1	100	69.839 1	0.000 0	0.200 8	6.176 5	0.227 3
Sample 2		100	20.664 9	19.708 0	6.831 1	21.371 6
Sample 3			100	51.863 9	27.907 0	67.465 1
Sample 4				100	12.544 8	49.076 5
Sample 5					100	16.289 6
Sample 6						100

表 3 样点之间的相似度

步骤	簇	距离(%)	相似度(%)	Joined 1	Joined 2
1	5	30.160 858 15	69.839 141 85	1	2
2	4	32.534 931 18	67.465 068 82	3	6
3	3	48.136 142 73	51.863 857 27	3	4
4	2	72.093 025 21	27.906 974 79	3	5
5	1	78.628 387 45	21.371 612 55	1	3

由表 2、表 3 可画聚类图来表示,详见图 3。

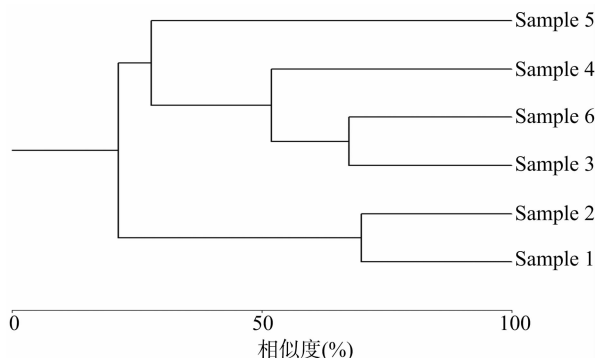


图3 最短距离法聚类结果

从图 3 可以通过距离的大小看出聚类的密切程度,距离越大,样本间的差异也越大;反之,样本间的差异越小。Sample 1 和 Sample 2 的距离最小,故二者间的相似度也就最高;其次是 Sample 3 与 Sample 6 之间的距离,也很近。将 Sample 3 与 Sample 6 的交点记为 A,则 A 与 Sample 4 的距离最短,若将 A 与 Sample 4 的距离记为 B,则 B 与 Sample 5 越近。相似度最远的是 Sample 1 与 Sample 5。也就是说,从固氮菌丰富性来讲,市山镇郊橘园土壤与莱溪水田边橘园上层土壤间的相似度最高,莱溪水田边橘园中层土壤与莱溪水田边橘园下层土壤相似度次之,而市山镇郊橘园土壤与莱溪水田边橘园下层土壤间的相似度最低。

值得注意的是,利用最短距离法进行聚类分析有很多优点,其分类简单、应用广泛,当两类合并后与其他类的距离是所有距离中最小者,从而缩小了新合并类与其他类的距离,产生空间收缩,因而其灵敏度相对较低。

3 讨论与结论

3.1 讨论

微生物参与土壤物质转化过程,在土壤形成、肥力演变、植物养分有效化和土壤结构的形成与改良、有毒物质降解及净化等方面起着重要作用,数量庞大、种类繁多的土壤微生物是丰富的生物资源库。由于人类对自然环境、自然资源的过度开发和干预,使得地球上数以万计的物种消失或濒临灭绝,生境被严重破坏,生物多样性丧失,生态系统稳定性变弱,资源日益枯竭。植物根际微生态环境中,土壤微生物数量多、密度大,能在植物根系周围形成一个物理屏障,由于在根际周围的分泌物很多,最后在根冠周围形成黏质层,进而构成一个相对稳定的微生态环境,这对保护植物根系、提供营养物质、减少病原菌和害虫入侵具有相当重要的作用。不同污染程度的土壤微生物群落序列在其均匀度指数、丰富度指数等方面均存在差异。通过对南丰蜜橘园土壤细菌 Margalef 丰富度指数、Simpson 优势度指数、Shannon - Winener 多样性指数、Pielou 均匀度指数、每皿平均固氮菌种数和平均固氮菌个体数的测算,侧面反映了南丰蜜橘不同橘园土壤微生物种群在均匀度指数、丰富度指数等方面存在的差异。

3.2 结论

通过对 6 种橘园土样挂果期土壤固氮菌的培养、菌落计数及统计计算,根据公式计算土样中固氮菌群落的 Margalef

丰富度指数 (dma)、Simpson 优势度指数 (D)、Shannon - Winener 多样性指数 (H')、Pielou 均匀度指数 (Jsw)、每皿平均固氮菌种数、平均固氮菌个体数。可以得出以下结论:(1) Margalef 丰富度指数 (dma) 大小为:5 号土样 > 3 号土样 > 6 号土样 > 4 号土样 > 1 号土样 > 2 号土样;(2) Simpson 优势度 (D) 大小为:5 号土样 > 4 号土样 > 2 号土样 > 6 号土样 > 3 号土样 > 1 号土样;(3) Shannon - Winener 多样性指数 (H') 大小为:5 号土样 > 4 号土样 > 2 号土样 > 3 号土样 > 6 号土样 > 1 号土样;(4) Pielou 均匀度指数 (Jsw) 大小为:5 号土样 > 4 号土样 > 2 号土样 > 3 号土样 > 6 号土样 > 1 号土样;(5) 平均种类数大小为:5 号土样 > 1 号土样 = 6 号土样 = 4 号土样 > 2 号土样 = 3 号土样;(6) 平均个体数大小为:2 号土样 > 1 号土样 > 4 号土样 > 6 号土样 > 3 号土样 > 5 号土样。

莱溪水田边橘园上层土壤的平均固氮菌个体数最多,说明其相对稳定的环境比其他样点的土壤更有利于固氮菌的生长;盱江边橘园上层土壤拥有的物种丰富度指数和多样性指数要远高于其他土壤。说明盱江边橘园上层土壤更有利于固氮菌物种多样性的发展。

不同样地的南丰蜜橘挂果期土壤固氮菌的数量、种类以及多样性差异的出现,是由于它们所处的地理位置不同,另外人为干扰也占绝大部分因素。南丰蜜橘品质的好坏原因中,其地理环境是最重要的,因为一方面它直接影响到微生物的生长情况,不同的地域可能由于气候和土壤条件的不同会使微生物的种类、个体数、多样性产生明显的差异。而另一方面人为干扰也会造成蜜橘品质不同,适当的施肥很重要,但过度施肥有可能导致南丰蜜橘品质下降,以致失去原味,变得更酸。同时,耕作方式和农药喷洒等因素都会造成生物群落的改变,从而对南丰蜜橘的品质造成一定的影响。由于盱江边橘园上层土壤微生物群落除受水质以及外围杂草侵入等少量因素影响外,基本保持原始状态;而其他的样地耕作方式、化肥和农药施用等人为环境的干扰较严重,土壤微生物群落变化较大。可以适当地进行人为的呵护,从而让其保持原有生态布局。研究表明,土壤微生物的多样性反映出南丰蜜橘各个橘园的土质情况,应结合当地实际情况,通过各种途径进行土壤改良。所以为了保护好南丰蜜橘的优良品质,应尽量让其在原产地生长。

参考文献:

- [1] 傅火生,王泽义,葛 斌,等. 南丰蜜橘优良株系——“杨小 2 - 6”的选育[J]. 中国南方果树,1999(6):6-7.
- [2] 殷剑敏,繆启龙,李迎春,等. 南丰蜜橘冻害的气候指标及风险评估[J]. 中国农业气象,2008,29(4):507-510.
- [3] 阎淑娜,汪春发,刘国华. 南丰蜜橘深度开发的思考[J]. 柑桔与亚热带果树信息,2002,18(5):6-7.
- [4] 刘平辉,芮玉奎,张福锁. 影响南丰蜜橘品质的土壤元素 ICP - MS/ICP - AES 分析[J]. 光谱学与光谱分析,2007,27(11):2380-2381.
- [5] 李祖章,刘光荣,刘益仁,等. 不同营养条件对南丰蜜橘产量与品质的影响效果研究[J]. 现代园艺,2006(6):19-20.
- [6] 李卫东,汤海涛,贺建华,等. 生态施肥技术对橘园土壤生态环境和柑橘产量及品质的影响[J]. 土壤通报,2006,37(6):1137-1141.

邱月,张辉.包膜氮肥、保水剂和生物炭在控制农田土壤氮素损失方面的应用综述[J].江苏农业科学,2015,43(10):417-422.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.131

包膜氮肥、保水剂和生物炭 在控制农田土壤氮素损失方面的应用综述

邱月,张辉

(上海交通大学环境科学与工程学院,上海 200240)

摘要:氮肥中的氮素损失是限制农业生产中肥料利用率的最主要因素,损失的氮素威胁着大气、水、土壤环境安全和人体健康。选取包膜氮肥、保水剂和生物炭 3 种用于控制土壤氮素损失的材料,分析了各自的作用机理、应用情况和存在的问题。结果表明:包膜氮肥利用膜材料阻隔肥料与土壤接触,从而控制养分释放,被应用到包膜上的材料有无机材料、有机聚合物和易降解的生物质材料;保水剂是一种吸水力极强的树脂,通过吸附土壤水分和养分、改变土壤理化性质影响氮的迁移转化,在与肥料结合制成凝胶、混合聚合物和包膜氮肥后能有效减少氮素损失;生物炭富含独特的微孔结构和多种养分,能有效吸附氮素并影响微生物对氮素的转化,其作用机理和效果目前还存在争议。由于这 3 种材料在控制氮素损失方面潜力巨大,文章最后给出了未来发展需要注意的问题。

关键词:肥料;氮素损失;包膜氮肥;保水剂;生物炭;农田;土壤氮素损失

中图分类号: S156.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0417-06

自然条件下植物能够吸收和固定的氮素非常有限,氮肥的使用有效提高了作物品质和产量。第 2 次世界大战以后,随着全球人口的快速增长,氮肥施用量也迅速增加。至 2009 年,中国氮肥生产量已达到 3 608 万 t,占全球的 34%,而施用量也达到 3 360 万 t,占全球的 33%^[1]。施入土壤中的氮一般只能被植物吸收 30%~40%,一半以上的氮素通过多种途径损失到环境中。过多的氮素滞留在土壤中造成土壤酸化,或随地表径流、淋溶水流失引起地下水硝酸盐超标^[2]、地表水

体富营养化^[3];气态的氨、一氧化氮、氧化亚氮进入大气,引起氮素沉降^[4]、酸雨、温室效应和臭氧层破坏^[5]。因此,寻求减少土壤氮素损失的有效方法、提高氮素利用率,对于节约农业成本、控制氮素引起的环境污染有着重要的现实意义。

为控制土壤氮素损失,国内外学者研究了多种材料和方法。其中包膜氮肥由于含氮量高、控释效果好受到广泛关注和应用;保水剂具有良好的保水能力,常添加到干旱土壤中用于保持水分,对土壤性质的改变也影响了氮素的迁移转化;生物炭是一种富含微孔和多种养分的生物质材料,近年来被用作土壤改良剂以改善土壤状况,而在控制土壤氮素损失方面还处于起步阶段。通过探讨这几种材料与氮素的作用机理,分析它们各自的研究和应用情况,有利于挖掘它们在氮素损失控制方面的价值,可为减少氮素污染提供有效的方法。

收稿日期:2014-10-23

作者简介:邱月(1991—),女,山东莱芜人,硕士研究生,主要从事土壤氮素污染控制的研究。E-mail:maria_qy@163.com。

通信作者:张辉,副教授,主要从事土壤有机污染、痕量金属污染的修复研究。Tel:(021)54748942;E-mail:huizhang@sjtu.edu.cn。

[7]方治军,徐小彪,辜青青,等.江西不同产地南丰蜜橘果实品质分析[J].中国南方果树,2009,38(3):22-23.

[8]李祖章,刘光荣,袁福生,等.南丰蜜橘生产环境状况调查研究[J].江西农业学报,2005,17(1):1-6.

[9]杨芳,徐秋芳.土壤微生物多样性研究进展[J].浙江林业科技,2002(6):40-42,56.

[10]张元龙.微生物学[M].北京:高等教育出版社,1958.

[11]周桔,雷霆.土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望[J].生物多样性,2007,15(3):306-311.

[12]杨海君,肖启明,刘安元.土壤微生物多样性及其作用研究进展[J].南华大学学报:自然科学版,2005,19(4):21-26,31.

[13]刘平辉,芮玉奎.南丰蜜橘果实微量元素和重金属含量研究[J].中国南方果树,2007,36(6):19-20.

[14]杨永华,姚健,华晓梅.农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响[J].微生物学杂志,2000(2):23-25,47.

[15]陈晶,杨海凌,陈向东.自生固氮菌的生态分布及其对农药抗

性的研究[J].氨基酸和生物资源,2009,31(1):19-24.

[16]Hu S J, Chapin F S, Firestone M K, et al. Nitrogen limitation of microbial decomposition in a grassland under elevated CO₂ [J]. Nature, 2001, 409:188-191.

[17]赵建卿,王冬华.南丰蜜橘施用生物有机肥优质高产试验[J].江西农业科技,2003(4):25-26.

[18]黄钧如,赵令喧,黄立新,等.影响南丰蜜橘品质的主导因素是有机肥料[J].江西园艺,1999(6):3-4.

[19]陈夕军,朱凤,童蕴慧,等.水稻内生联合固氮细菌的分离、种类及对水稻的促生长作用[J].扬州大学学报:农业与生命科学版,2007,28(2):61-64.

[20]程丽娟,薛泉宏,来航线,等.微生物学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,1988:15-38.

[21]向万胜,吴金水,肖和艾,等.土壤微生物的分离、提取与纯化研究进展[J].应用生态学报,2003,14(3):453-456.