

刘 敏,张广宇,张永北,等. 竹荪间作对橡胶园土壤微生物区系与群落功能多样性的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):295-298.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.13.068

# 竹荪间作对橡胶园土壤微生物区系与群落功能多样性的影响

刘 敏,张广宇,张永北,李智全,冀春花

(海南省农垦科学院,海南海口 570206)

**摘要:**为考察竹荪间作对橡胶园土壤微生物特性的影响,采用培养法和 BIOLOG ECO 微平板法对间作前后橡胶园土壤微生物区系和群落功能多样性进行分析。结果表明,间作竹荪后,橡胶园土壤细菌、放线菌和 5 类微生物特殊生理类群数量增加,真菌数量减少。土壤微生物群落平均吸光度(AWCD)随培养时间的延长而增大,变化速率和最大值表现为采后>采收>种前。间作后,土壤微生物 Shannon-Wiener、Simpson、McIntosh 功能多样性指数显著增加。橡胶园土壤微生物利用的主要碳源是碳水化合物、氨基酸类,其次为羧酸和多聚物,酚酸和胺类的利用率最低。31 种碳源主成分分析表明,间作竹荪后橡胶园土壤微生物碳源利用特征出现分异,在分异中起主要作用的是羧酸类、酚酸类、多聚物类和碳水化合物类碳源。间作竹荪提高了橡胶园土壤 6 类碳源的相对利用率、土壤微生物群落碳源代谢活性、碳源利用多样性和土壤肥力,促进了微生物类群向更好的趋势发展。

**关键词:**竹荪;橡胶园;间作;微生物区系;群落功能多样性

**中图分类号:** S154.37;S344.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2018)13-0295-04

林下经济是一种人工生态经济复合系统,其投入小、见效快。近年来,林下经济蓬勃发展,其中林菌循环经济模式是最具林业特色的林下经济发展模式<sup>[1]</sup>。林菌循环经济模式就是利用林木枝桠作为栽培料,在林下阴蔽环境中开展食用菌栽培,再将菌糠还田培土以促进林木生长的一种可持续发展的复合种植模式。目前,各地区因食用菌种类、林地资源差异等因素形成了多样的林菌循环经济模式。海南省作为天然橡胶主产区,光温资源丰富,林下空间广阔,十分适合中高温型食用菌生产。近年来,竹荪因市场前景广阔、喜偏酸性土壤等特点已在海南省橡胶园大面积推广。

食用菌菌糠含有丰富的植物养分、有机质和微生物,施入土壤后,会对土壤物理、化学、生物性质产生一系列影响,可提高土壤孔隙度,增强土壤通透性,提升土壤养分含量,增加土壤微生物种群及数量,促进作物生长<sup>[2-3]</sup>。陈兵等研究表明,竹荪间种后,将菌糠施入使胶园,土壤水分状态显著得到改善,有机质、速效氮、速效钾、有效磷等养分含量显著提高,使地力培肥,橡胶产量提高<sup>[4]</sup>。而施用竹荪菌糠对橡胶园土壤微生物影响的研究还未见报道。土壤微生物作为反映土壤肥力的重要指标,其种类、数量和活性可以更全面、真实地反映土壤的营养状态<sup>[5]</sup>。因此本研究采用传统培养和 BIOLOG ECO 微平板法测定相结合的方法,研究竹荪间种对橡胶园土

壤微生物区系和群落功能多样性的影响,试图以此评价“橡胶-竹荪”胶菌循环经济模式的土壤改良效果,以期为该模式提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品

土壤样品采集地点位于海南省万宁市北山镇某橡胶林地,土壤类型为赤红壤,橡胶定植时间为 2002 年,种植规格为 2.8 m×7 m,采用“一行三畦两沟”模式在橡胶园行间栽培长裙竹荪。土壤样品采集采用“S”形 5 点混合法,分别于竹荪种植前(2015 年 12 月 8 日)、竹荪采收时(2016 年 4 月 19 日)和竹荪采收后 3 个月(2016 年 7 月 12 日)用木铲从地表向下取 0~20 cm 新鲜土样。除种植前,土壤样品采集时需先将上层栽培料剥离干净。样品采集后低温运输,立即送回实验室进行测定。

### 1.2 土壤微生物数量测定

根据《土壤微生物研究原理与方法》<sup>[6]</sup>,采用平板计数法测定土壤中细菌、真菌、放线菌、氨化细菌、自生固氮菌数量,采用最大或然数(most probable number,简称 MPN)计数法测定土壤中纤维素分解菌、硝化细菌、反硝化细菌数量。细菌、真菌、放线菌、氨化细菌、自生固氮菌、纤维素分解菌、硝化细菌、反硝化细菌分别使用营养琼脂、玫瑰红钠、高氏 1 号、牛肉膏蛋白胨、阿须贝无氮、赫奇逊、铵氧化细菌、反硝化细菌培养基培养。

### 1.3 土壤微生物群落碳源代谢利用测定

采用 BIOLOG ECO 微平板法。具体方法如下:称取 10 g 新鲜土壤于 90 mL 灭菌去离子水中,置于摇床振荡 10 min,按 10 倍稀释法制成 10<sup>-2</sup> 土壤稀释液,静置 2 min,取上清液接种到 BIOLOG ECO Plate™ 板(BIOLOG Inc, USA)的微孔内,每孔

收稿日期:2017-02-15

基金项目:海南省自然科学基金(编号:20153111);海南省重大科技项目(编号:ZDZX2013020)。

作者简介:刘 敏(1986—),女,吉林辽源人,硕士,助理研究员,主要从事土壤肥料和微生物技术相关研究。Tel:(0898)66556562;E-mail:tinalm@126.com。

通信作者:冀春花,硕士,副研究员,主要从事林下经济和土壤肥料相关研究。Tel:(0898)66556562;E-mail:jchlover@163.com。

150  $\mu\text{L}$ 。将微孔板置于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 9 d,并每隔 24 h 用 BIOLOG 微生物鉴定仪读取 590、750 nm 处的吸光度。取 120 h 平均吸光度 (average well color development, 简称 AWCD) 进行主成分分析。

微生物对各类碳源相对利用率的测定参考皱春娇等的方法<sup>[7]</sup>,以所有样品中 6 类碳源的最大 AWCD 值记为 100%,其余各样品中各类碳源 AWCD 值与最大值的比值即为相对利用率。

1.4 多样性指数

通过计算 McIntosh、Shananon – Wiener 和 Simpson 指数来反映土壤微生物碳源利用多样性。

1.5 数据处理

使用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 进行相关数据分析。

2 结果与分析

2.1 竹荪间作对橡胶园土壤主要微生物类群数量的影响

由表 1 可知,橡胶园间作竹荪后,土壤微生物总数明显增加,采收时和采后 3 个月分别增加了 66.72% 和 124.25%。采收时和采后 3 个月细菌总数略有增加;真菌总数显著减少,分别减少了 71.84% 和 67.82%;放线菌总数明显增加,分别增加了 1 966.67% 和 2 833.33%,差异达极显著水平。由此可见,间作竹荪可提高橡胶园土壤微生物总量,促进放线菌生长,抑制真菌生长。

表 1 竹荪间作前后橡胶园土壤主要微生物类群数量

时间	细菌数量 ( $\times 10^5$ CFU/g)	真菌数量 ( $\times 10^5$ CFU/g)	放线菌数量 ( $\times 10^5$ CFU/g)	微生物总数 ( $\times 10^5$ CFU/g)
种前	10.10 $\pm$ 0.42aA	1.74 $\pm$ 0.11aA	0.45 $\pm$ 0.16aA	12.29 $\pm$ 0.47aA
采收	10.70 $\pm$ 0.14aA	0.49 $\pm$ 0.04bB	9.30 $\pm$ 0.71bB	20.49 $\pm$ 0.81bA
采后	13.80 $\pm$ 2.55aA	0.56 $\pm$ 0.06bB	13.20 $\pm$ 0.57cC	27.56 $\pm$ 1.92cB

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),标有不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。表 3 同。

2.2 间作竹荪对橡胶园土壤微生物特殊生理类群的影响

由表 2 可知,采收时,橡胶园土壤中氨化细菌、自生固氮菌、纤维素分解菌、硝化细菌、反硝化细菌数量较种前分别增加了 292.77%、107.06%、1 166.67%、900.00%、9 900.00%。采后 3 个月,除反硝化细菌,各微生物生理群数量较采收时分别增加了 43.56%、18.18%、110.53%、66.67%。间作前,氨

化细菌、自生固氮菌为橡胶园土壤中主要生理类群;采收时,反硝化细菌数量骤增,替代自生固氮菌成为主要生理类群;采后 3 个月,纤维素分解菌替代反硝化细菌成为主要生理类群。由此可见,竹荪间作对橡胶园土壤各类群微生物生长繁殖有促进作用,主要生理类群随采样时间变化而更替。

表 2 竹荪间作前后胶园土壤微生物特殊生理类群数量

时间	氨化细菌数量 ( $\times 10^5$ CFU/g)	自生固氮菌数量 ( $\times 10^5$ CFU/g)	纤维素分解菌 ( $\times 10^2$ MPN/g)	硝化细菌 ( $\times 10^2$ MPN/g)	反硝化细菌 ( $\times 10^5$ MPN/g)
种前	4.15	4.25	0.75	0.45	0.25
采收	16.30	8.80	9.50	4.50	25.00
采后	23.40	10.40	20.00	7.50	9.50

2.3 间作竹荪对橡胶园土壤微生物群落功能多样性的影响

2.3.1 土壤微生物利用碳源动力学特征 AWCD 表征土壤微生物群落对碳源的利用情况及活性,是表征土壤微生物群落碳源代谢能力的一个重要指标<sup>[8]</sup>。间作前后橡胶园土壤微生物利用 31 种碳源的 AWCD 值变化曲线如图 1 所示,可见 AWCD 值随培养时间的增长而升高,碳源利用程度增大,168 h 后趋于稳定状态。间作前后橡胶园土壤 AWCD 值变化速率(斜率)表现为采后 > 采收 > 种前,采后 3 个月橡胶园土壤 AWCD 值增长最快,微生物对碳源的总体代谢活性最高。对 168 h(拐点)处 AWCD 值进行方差分析,结果表明,采收时、采后 3 个月与种前土壤 AWCD 值差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

2.3.2 土壤微生物对各类碳源的利用特征 BIOLOG ECO 微平板的碳源包括 12 种碳水化合物类、5 种羧酸类、6 种氨基酸类、4 种多聚物类、2 种酚酸类和 2 种胺类<sup>[9]</sup>。竹荪间作前后橡胶园土壤中微生物对 6 类碳源的相对利用率如图 2 所示,可见碳水化合物、氨基酸类碳源有较高的利用率,其次为羧酸类和多聚物类,胺类、酚酸类的利用率最低。采收时,土壤微生物对各类碳源利用率均有所提高,其中多聚物类与种植前差异显著,酚酸和碳水化合物类差异极显著;与采收时相比,采后 3 个月除碳水化合物类碳源利用率略微下降外,其他

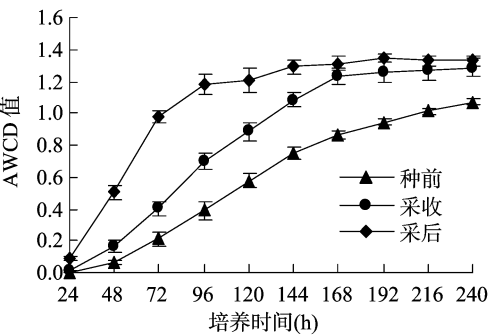


图1 供试土壤微生物培育过程中的平均吸光度(AWCD)的变化

类碳源利用率均有所升高,但幅度较小,仅羧酸类与采收时差异显著。

2.3.3 土壤微生物功能多样性指数 选取 168 h 处 AWCD 值,计算 McIntosh、Shananon – Wiener 和 Simpson 指数来反映土壤微生物碳源利用多样性。如表 3 所示,采收时各土壤微生物碳源利用多样性指数均高于种植前,Shannon – Wiener 指数差异显著,McIntosh 和 Simpson 指数差异极显著。采后 3 个月各指数较采后略有增加,但差异不显著。由此可见,间种竹荪后,橡胶园土壤微生物的均匀度、丰富度和优势度均有所提高。

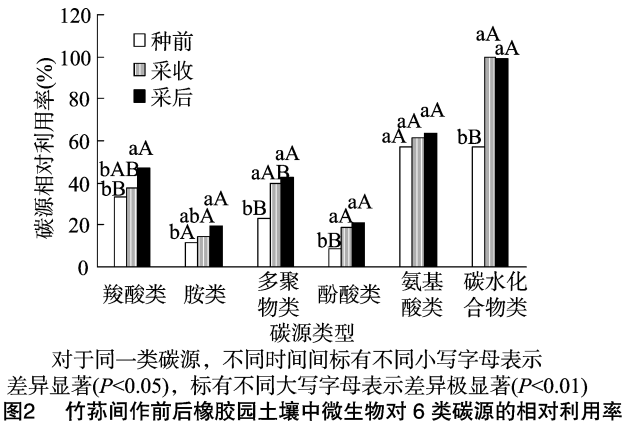


表 3 供试土壤中微生物碳源利用多样性指数			
时间	McIntosh 指数	Shannon - Wiener 指数	Simpson 指数
种前	5.870 ± 0.203bB	3.118 ± 0.091bA	0.952 ± 0.003bB
采收	7.362 ± 0.234aA	3.329 ± 0.123aA	0.963 ± 0.002aA
采后	7.540 ± 0.216aA	3.393 ± 0.091aA	0.966 ± 0.002aA

2.3.4 土壤微生物群落功能多样性的主成分分析 对 3 组土壤样品 31 种碳源 168 h 处的 AWCD 值进行主成分分析,得到特征值大于 1 的主成分 2 个,其中第 1 主成分方差贡献率为 71.41%,第 2 主成分方差贡献率为 28.59%。由表 4 各碳源在第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)上的载荷值可知,对 PC1 贡献大(载荷值 >0.8)的碳源有 21 种,其中碳水化合物类 9 种,多聚物类 4 种,氨基酸和羧酸类各 3 种,酚酸类和胺类各 1 种。对 PC2 贡献大(载荷值 >0.8)的碳源有 5 种,其中氨基酸类 2 种,碳水化合物类、羧酸类和胺类各 1 种。取主成分 1 和 2 得分载荷作图,来表征间作前后土壤中微生物群落碳源代谢特征。如图 3 所示,竹荪间作前后土壤中微生物对碳源的利用情况不同,具有明显差异。

3 讨论

土壤中细菌、放线菌和真菌数量及其比例是衡量土壤肥力及健康状况的重要指标。一般说来,土壤中细菌、放线菌密度越高,该土壤肥力水平也就越高。研究表明,双孢菇、香菇和茶树菇等菌糠还田均可提高土壤微生物数量,提升细菌、放线菌所占比例,促进养分活化与吸收<sup>[10-12]</sup>。本试验结果显示,橡胶园间作竹荪后,土壤细菌、放线菌数量增加,真菌数量减少,放线菌与真菌数量比值(A/F 值)明显提高,橡胶园土壤肥力得到了提升,同时,真菌相对数量的降低可能会对减轻橡胶病害起到积极作用<sup>[12]</sup>。

土壤中存在自生固氮菌、氨化细菌、硝化细菌、反硝化细菌、纤维分解细菌等微生物生理群,它们在土壤养分循环和污染降解转化中起着重要作用<sup>[6]</sup>。间作竹荪后,橡胶园土壤 5 种微生物量均有所增加。其中,自生固氮菌、氨化细菌、硝化细菌与纤维素分解菌都是参与土壤养分循环的有益微生物生理群。自生固氮菌数量增加,可增加土壤氮素营养;氨化细菌、硝化细菌数量增加,有利于含氮有机物富集、分解和氮素循环速率的提高;纤维素分解菌数量增加,可加快植物残体转化和碳素循环,为胶树生长提供更多碳素和能源<sup>[13-15]</sup>。然

表 4 31 种碳源在第 1、2 主成分上的载荷值			
碳源类型	碳源名称	第一主成分 (PC1)	第二主成分 (PC2)
碳水化合物	<i>N</i> -乙酰基- <i>D</i> -葡萄糖胺	-0.259	-0.966
	<i>D</i> -半乳糖内酯	0.934	-0.356
	<i>D</i> -纤维二糖	0.784	-0.621
	<i>D</i> -木糖	0.889	0.458
	<i>D</i> -甘露醇	0.653	-0.757
	<i>D,L</i> - $\alpha$ -磷酸甘油	0.899	0.437
	<i>D</i> -半乳糖醛酸	-1.000	-0.030
	<i>D</i> -氨基葡萄糖酸	0.994	0.106
	$\alpha$ - <i>D</i> -乳糖	0.949	-0.317
	$\beta$ -甲基- <i>D</i> -葡萄糖苷	0.997	-0.077
氨基酸	<i>i</i> -赤藓糖醇	0.979	0.203
	葡萄糖-1-磷酸	0.975	-0.223
	<i>L</i> -苯基丙氨酸	-0.581	0.814
	<i>L</i> -天冬酰胺	-0.992	-0.129
	<i>L</i> -精氨酸	0.610	-0.793
	<i>L</i> -苏氨酸	0.954	-0.298
	<i>L</i> -丝氨酸	-0.452	0.892
羧酸类	葡萄糖- <i>L</i> -谷氨酸	0.970	0.244
	衣康酸	0.972	0.234
	<i>D</i> -苹果酸	0.924	0.382
	$\gamma$ -羟基丁酸	0.655	0.756
	$\alpha$ -丁酮酸	0.300	0.954
多聚物	丙酮酸甲酯	0.922	-0.387
	吐温 40	0.942	0.335
	吐温 80	0.822	-0.569
	糖原	0.884	0.468
酚酸类	$\alpha$ -环糊精	0.955	-0.298
	2-羟基苯甲酸	0.975	-0.224
胺类	4-羟基苯甲酸	0.740	0.672
	苯基乙胺	0.979	0.203
	腐胺	0.371	0.929

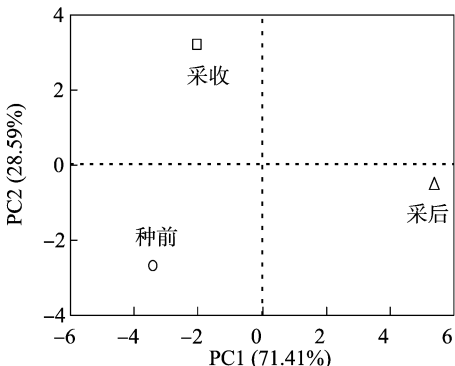


图3 供试土壤中微生物功能多样性的主成分分析

而,反硝化细菌数量增加会造成氮素损失,采收阶段出现这种现象的原因可能是菇畦覆盖形成了微氧条件,为其提供了良好的生存环境。但随着竹荪栽培料持续分解和氧气的进入,反硝化细菌数量在采后 3 个月明显下降,占比仅为 13.42%。也有研究表明,反硝化细菌数量与土壤养分呈正相关,对提高土壤肥力有促进作用<sup>[16]</sup>。总的来说,竹荪栽培料或菌糠的施入促进了微生物类群向更好的趋势发展。

大量研究表明,土壤中加入有机物料能够提高有机质含量及微生物群落多样性。不同腐熟水平的有机物料会造成土壤微生物的选择适应性,出现一些种群富集而一些种群数量降低的现象,进而导致微生物对碳源的利用能力出现显著差异<sup>[16-18]</sup>。利用 BIOLOG ECO 微平板法进行功能多样性研究的结果表明,竹荪间作增强了橡胶园土壤微生物对碳源的代谢活性,同时提高了土壤微生物碳源利用的多样性。主成分分析结果表明,间作前后,土壤微生物碳源利用特征出现分异,结合微生物对 6 类碳源的相对利用率发现,这种差异可能是羧酸类、酚酸类、多聚物类和碳水化合物类碳源引起的。在整个过程中,以橡胶木屑为主要成分的栽培料经过分解,使土壤中各类碳源得到积累,微生物大量繁殖,碳源利用率升高,其中碳水化合物和羧酸类物质为土壤微生物的主要碳源,碳水化合物类碳源相对利用率最高。氨基酸是土壤最大的有机氮库,有机物料的施入可诱导土壤微生物对氨基酸类碳源的利用<sup>[19]</sup>,这与本研究中竹荪菌糠的作用结果一致,主要原因在于竹荪菌丝体和子实体含有丰富的氨基酸;酚酸类物质对植物生长有抑制作用,可由植物残体和凋落物降解产生,积累到一定水平时会对目标植物产生毒性<sup>[20-22]</sup>,在本研究中,虽然种植后酚酸类碳源相对利用率极显著升高,但仅约为 20%,毒性作用有限。

有研究表明,气候变化可引起微生物群落结构变化并对微生物活动产生较大影响<sup>[23]</sup>。海南岛属热带季风气候,5—10 月为雨季。竹荪采收在雨季前完成,采收时,气候对土壤微生物特性的影响有限。然而采后 3 个月进入雨季,与采收时相比,温度升高,土壤含水量增加,菌糠分解加速,微生物生长代谢加快,橡胶园土壤微生物量、微生物碳源代谢活性和多样性在间作模式和气候的共同影响下得到进一步提高。

综上所述,本研究运用培养法和 BIOLOG ECO 微平板法分析竹荪间作对橡胶园土壤微生物特性的影响,研究表明,竹荪间作可提高橡胶园土壤有益微生物数量、微生物碳源代谢活性和多样性,促进土壤养分循环和肥力提升。土壤微生物作为土壤肥力的重要指标,其测定结果在一定程度上可以反映竹荪间作对橡胶园土壤的改良效果,但土壤肥力是土壤物理、化学、生物特性的综合表现,结合物理、化学性质进行分析将有助于进一步揭示“橡胶—竹荪”胶菌循环经济模式对橡胶园土壤改良的效果。

#### 4 结论

(1)间作竹荪可促进橡胶园土壤有益微生物生长繁殖,改变微生物区系,提高土壤肥力。

(2)间作竹荪后,橡胶园土壤微生物群落 AWCD 值、Simpson—Wiener 指数、Shannon 指数和 McIntosh 指数显著增加,微生物碳源代谢活性和多样性提高。

(3)橡胶园土壤微生物利用的碳源主要是碳水化合物和氨基酸类,其次为羧酸和多聚物类,酚酸和胺类的利用率较低。

(4)间作竹荪后,橡胶园土壤微生物碳源利用特征出现分异,在分异中起主要作用的是羧酸类、酚酸类、多聚物类和碳水化合物类碳源。

#### 参考文献:

- [1]周 杨,苗雨露,孙志蓉. 我国林药林菌经济模式发展现状及其优势分析[J]. 中国现代中药,2016,18(1):97—101.
- [2]纪毅远. 菌糠对土壤的改良效果研究[J]. 科技风,2016(7):96.
- [3]金 鑫,李春阳. 菌糠资源化利用及其提升土壤环境质量的作用[J]. 农业与技术,2014(10):20.
- [4]陈 兵,刘志威,莫东红,等. 橡胶林套种竹荪的土壤肥力效应分析研究[J]. 中国热带农业,2008(6):43—45.
- [5]孙启武,毛 琪. 浅析微生物对土壤肥力的贡献[J]. 农技服务,2015,32(9):96.
- [6]林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京:高等教育出版社,2010,52—58.
- [7]邹春娇,齐明芳,马 建,等. Biolog—ECO 解析黄瓜连作营养基质中微生物群落结构多样性特征[J]. 中国农业科学,2016,49(5):942—951.
- [8]Chen X Q, Yin H W. Progress on analytical methods used in microbial community diversity [J]. Shanghai Environmental Sciences,2003,22(3):213—217.
- [9]孔 滨,杨秀娟. Biolog 生态板的应用原理及碳源构成[J]. 绿色科技,2011(7):231—234.
- [10]赵 振,曲娟娟,许修宏,等. 双孢蘑菇菌糠对小白菜生长及根际土壤的影响[J]. 中国土壤与肥料,2009(6):74—78.
- [11]谢 放,魏孔丽,陈京津,等. 香菇渣对土壤微生物和酶活性的影响[J]. 湖南农业科学,2010(5):54—58.
- [12]徐江兵,林先贵,王一明,等. 施用茶树菇栽培废料对青菜土壤中微生物学特征的影响[J]. 农业环境科学学报,2012,31(1):131—136.
- [13]曹文亮,张丽华,王 静. 免耕与覆盖对土壤微生物生理类群的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2008,43(6):123—126.
- [14]王 静,张仁陟,张天佑. 保护性耕作方式对土壤微生物生理类群和酶活性的影响[J]. 干旱区资源与环境,2011,25(7):168—172.
- [15]罗炳辉. 不同类型林分土壤微生物生理类群分析[J]. 贵州林业科技,2006,34(3):41—44.
- [16]徐华勤. 稻草覆盖与三叶草间作茶园土壤微生物类群多样性及其活性研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2007.
- [17]孔维栋,刘可星,廖宗文,等. 不同腐熟程度有机物料对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报,2005,25(9):2291—2296.
- [18]刘 骅,林英华,张云舒,等. 长期施肥对灰漠土生物群落和酶活性的影响[J]. 生态学报,2008,28(8):3898—3904.
- [19]Sharma S, Rangger A, Insam H. Effects of decomposing maize litter on community level physiological profiles of soil bacteria [J]. Microbial Ecology,1998,35(3/4):301—310.
- [20]韩丽梅,王树起,鞠会艳,等. 大豆根茬腐解产物的鉴定及化感作用的初步研究[J]. 生态学报,2000,20(5):771—778.
- [21]李艳宾,张 琴,万传星,等. 棉秆腐解物的化感作用及其主要化学成分分析[J]. 棉花学报,2009,21(6):497—502.
- [22]谢星光,陈 晏,卜元卿,等. 酚酸类物质的化感作用研究进展[J]. 生态学报,2014,34(22):6417—6428.
- [23]汪 峰,蒋瑞霖,李昌明,等. 不同气候条件下潮土微生物群落的变化[J]. 土壤,2014,46(2):290—296.