赵晓楠,李玉红,芦阿虔,等. 有机肥不同施肥量对茶园土壤微生物区系的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):311-314. doi:10.15889/j. issn. 1002-1302.2018.24.082

# 有机肥不同施肥量对茶园土壤微生物区系的影响

赵晓楠,李玉红,芦阿虔,王 岩(郑州大学化丁与能源学院,河南郑州 450001)

摘要:土壤微生物在茶园土壤养分生物循环中具有十分重要的作用,为研究有机肥不同施肥量对茶园土壤微生物多样性的影响,选取河南省信阳市浉河区浉河港镇的茶园进行大田试验,并利用 Miseq 测序平台测定细菌、真菌的群落组成与多样性。结果表明:在不同施肥处理下,其茶园土壤微生物的 OTU 的种类和数量不同,且所含微生物属水平的数量和占比也不同。从对照中共检测出 441 种细菌属,总数为 14 944 个,共检测出 47 种真菌属,总数是 5 687 个;从  $T_1$  处理(有机肥施用量为 1 500 kg/hm²) 中检测到 493 个细菌属,总数是 8 529 个,共检测到 64 个真菌属,总数是 86 112 个;从  $T_2$  处理(有机肥施用量为 3 000 kg/hm²) 中检测到 535 种细菌属,总数是 9 672 个,共检测到 70 个真菌属,总数是 11 736 个。此外,施用有机肥可以提高土壤微生物群落的丰度,增强茶园土壤生态系统的稳定性。

关键词:茶园土壤;有机肥;微生物多样性;基因测序;丰度;稳定性

中图分类号: S158.5;S571.106 文献标志码: A 文章编号:1002-1302(2018)24-0311-04

茶树是多年生经济作物,喜酸聚铝,因此茶园土壤比较特 殊。为了提高茶叶产量,茶农长期大量使用化肥,导致茶园土 壤综合肥力下降,茶园土壤生态遭到破坏。土壤是茶树生长 发育、营养吸收的重要场所,是一个非常复杂的生态系统。施 肥是影响土壤质量及其可持续发展最重要的农业措施之一, 在农业生产实践中,施肥技术在土壤肥力、土壤微生物及作物 产量和品质方面具有非常重要的影响,而土壤微生物在促进 土壤有机质分解、土壤矿质营养循环、维持和提高土壤肥力等 方面发挥着关键作用[1]。20世纪90年代以来,关于不同施 肥方式对土壤生态系统的影响已有多人进行研究,但是前人 对茶园土壤微生物的研究,受研究技术手段所限,大多数仅限 于实验室可培养微生物,基于分子生物学的研究尚不多见。 由于环境中的微生物只有1%可用传统平板计数法进行分离 培养[2-3], 势必会低估土壤微生物的群落结构组成, 无法对土 壤微生物群落结构及组成进行全面精准的分析。随着分子生 物学技术的发展,基于分子生物学的土壤微生物的研究方法, 如高诵量测序技术解决了微生物不可培养的问题,能够准确 地反映土壤微生物群落的丰度和多样性。因此,研究不同施 肥制度下茶园土壤微生物区系的特征,可为茶园合理施肥和 营造良好的茶树生长环境提供理论支撑。

河南省信阳市是历史名茶信阳毛尖的产地,其茶叶种植面积较大,但在茶叶生产过程中同样存在片面追求产量而忽视土壤质量的问题。鉴于此,笔者在河南省信阳市浉河区浉河港镇的茶园进行大田试验,研究有机肥不同施用量对茶园

土壤性质和土壤微生物区系的影响,以期通过合理的施肥措施,实现信阳市茶产业生态,可持续发展。

## 1 材料与方法

#### 1.1 试验设计

选取位于河南省信阳市浉河区浉河港镇林场村八里坡组的茶园进行大田试验,供试茶园的生境状况如下:茶树品种为福建大白茶 7 号,树龄为 16 年,地理位置为 32.026° N、113.849°E,面积为 0.5 hm²,海拔为 284.3 m,坡向为东坡,坡度为 25°,前作为林地。分别于 2012 年 12 月、2013 年 12 月和 2014 年 12 月进行有机肥表面撒施,茶园按当地习惯进行田间管理,于每年清明节前采取土壤样品进行相关测定。试验置 3 个处理:不施肥(CK)、施有机肥 1 500 kg/hm²( $T_1$ )和施有机肥 3 000 kg/hm²( $T_2$ )。试验用有机肥养分含量标准:有机质 > 45%, $N+P_2O_5+K_2O_7$ 0%。

#### 1.2 样品采集

连续施用有机肥 3 年后,采用五点取样法对各处理试验 田进行土壤样品采集。取 0~20 cm 土层的土壤,剔除土样中 较大的根和石子等杂物,之后将土样中较大的土块捏碎,混合 均匀,然后采用四分法,将一部分装入 15 mL 离心管中冷藏, 用于土壤微生物分析;另一部分于托盘中自然风干后磨细,过 18、80 目筛,用于土壤养分含量的测定。

### 1.3 测定方法

- 1.3.1 土壤养分含量测定方法 土壤 pH 值的测定采用 SPM-10 数字式 pH 计测定,碱解氮含量的测定采用碱解扩散法,土壤速效磷含量的测定采用碳酸氢钠提取-钼锑抗比色法,土壤速效钾含量的测定采用乙酸铵提取-火焰光度法,土壤有机质含量的测定采用重铬酸钾-油浴法<sup>[4]</sup>。
- 1.3.2 土壤微生物区系测定 土壤微生物区系采用高通量测序技术<sup>[5-6]</sup>,细菌以 16S rDNA 作为标记基因,真菌以 18S rDNA 作为标记基因,测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行。

收稿日期:2017-08-01

基金 项 目:河 南 省 科 技 攻 关 项 目 (编 号: 122102110104、142102110149)。

作者简介:赵晓楠(1991—),女,河南汝州人,硕士研究生,主要从事土壤肥力与微生物研究。E-mail;765247487@qq.com。

通信作者:芦阿虔,研究员,主要从事农业生态修复研究。E - mail: aqlu@zzu.edu.cn。

## 2 结果与分析

#### 2.1 不同处理对茶园土壤养分会量的影响

从表1可以看出,施用有机肥可以提高土壤中有机质、全氮、碱解氮和速效钾含量,对土壤 pH 值和速效磷含量的影响不大。

表 1 供试茶园的土壤养分含量

	养分含量					
处理 pH 值	有机质	全氮	碱解氮	速效磷	速效钾	
	(g/kg)	(g/kg)	( mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	
CK 4.60	21.41	1.49	131.05	17.60	157.44	
$T_1$ 4.43	28.33	1.83	144.04	19.03	157.04	
$T_2$ 4.14	41.14	2.08	171.69	14.35	185.04	

2.2 不同处理对茶园土壤微生物群落结构组分的影响 2.2.1 不同处理对茶园土壤细菌群落结构组分的影响 从 图 1 中不同处理茶园土壤细菌群落结构组分分析结果可以看 出,不同处理茶园土壤所含细菌属的种类和数量均发生了变 化。从对照土样中共检测出 441 个细菌属,总数是 14 944 个;从 T<sub>1</sub> 处理土样中共检测到 493 个细菌属,总数是 8 529 个。随着有机肥施用量的增加,检测出的细菌属的种类增加。 在检测出的所有细菌属中,除去未检测到的和未命名的, 将各处理细菌属含量排名前10的列出。由表2可知,不同处 理的茶园土壤中优势细菌属的种类和数量均有差异,其中数 量达到总数 2%以上的细菌属,对照有 6 种,分别为 Go1、鞘氨 醇单胞菌(Sphingomonas)、Gp3、Gp6、芽单胞菌属 (Gemmatimonas)和生丝微菌属(Rhizomicrobium):T. 处理中 数量达到总数 2% 以上的有 10 个属, 分别为沙雷氏菌属 (Serratia)、黄色杆菌属(Xanthobacter)、芽孢杆菌属 (Bacillus)、食酸菌属(Acidovorax)、绿脓杆菌(Pseudomonas)、 发光细菌属(Spartobacteria\_genera\_incertae\_sedis)、戴尔福特 菌属(Delftia)、Gp4、铁杆菌属(Ferruginibacter)和乳酸杆菌属 (Lactobacillus);T,处理土壤中数量达到总数2%以上的有7 个属,分别为假单胞菌属(Pseudomonas)、Gp4、Gp1、乳酸杆菌 属(Lactobacillus)、黄色杆菌属(Xanthobacter)、发光细菌属 (Spartobacteria genera incertae sedis) 和芽孢杆菌属 (Bacillus)

个:从T。 处理十样中共检测到 535 个细菌属, 总数是 9 672

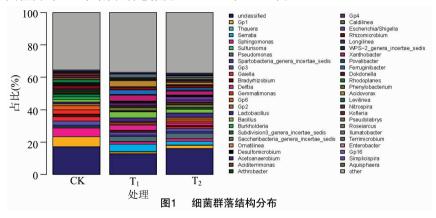


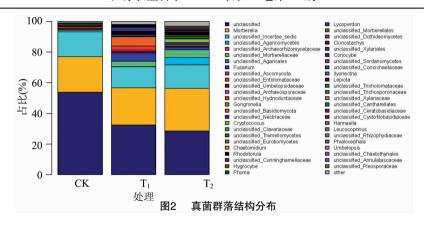
表 2 不同处理土壤中优势细菌属含量及占比

北片	CK			T <sub>1</sub> 处理			T <sub>2</sub> 处理		
排序	种类	数量(个)	比例(%)	种类	数量(个)	比例(%)	种类	数量(个)	比例(%)
1	Gp1	1 021	6.8	沙雷氏菌属	357	4.2	假单胞菌属	284	2.9
2	鞘氨醇单胞菌	740	4.9	黄色杆菌属	298	3.5	Gp4	269	2.8
3	Gp3	402	2.7	芽孢杆菌属	282	3.3	GpI	236	2.4
4	Gp6	388	2.6	食酸菌属	278	3.3	乳酸杆菌属	234	2.4
5	芽单胞菌属	384	2.6	绿脓杆菌	237	2.8	黄色杆菌属	226	2.3
6	生丝微菌属	360	2.4	发光细菌属	233	2.7	发光细菌属	212	2.2
7	红游动菌属	295	1.9	戴尔福特菌属	231	2.7	芽孢杆菌	200	2.1
8	缺缘跳小蜂属	257	1.7	Gp4	217	2.5	沙雷菌属	188	1.9
9	嗜热毛壳菌属	251	1.7	铁杆菌属	216	2.5	<i>Gp3</i>	185	1.9
10	Dongia	246	1.7	乳酸杆菌属	183	2.2	TM7 属	170	1.8

由表 2 还可以看出,不同处理茶园土壤优势菌属种类及 其占比均发生了变化。与对照相比,施用有机肥数量增加的 细菌有芽孢杆菌属、乳酸杆菌属、发光菌属和黄色杆菌属等。 其中,乳酸杆菌属于厌氧性微生物,关于乳酸杆菌的应用在畜 牧业和医学上已有很多人进行研究<sup>[7-8]</sup>,但是其在农业方面 的应用研究很少。发光细菌是一种在正常的生理条件下能够 发射可见荧光的细菌,发光细菌及其发光基因在环境监测等 领域中具有广泛的应用价值,可以用来检测土壤毒性<sup>[9-11]</sup>。 黄色杆菌属对农田中的对鳞翅目害虫有很好的防治作用,可 用来杀死菜青虫<sup>[12]</sup>。至于茶园土壤中这些细菌的功能和作用到底是什么尚不得而知,须要进一步探讨与研究。

2.2.2 不同处理对茶园土壤真菌群落结构组分的影响 从图 2 的不同处理对茶园土壤真菌的群落结构组分的影响可以看出,不同施肥处理的茶园土壤所含真菌属的种类和数量均发生了变化,其中从对照中检测出 47 个真菌属,总数是 5 687个;从 T<sub>1</sub> 处理中检测到 64 个真菌属,总数是 86 112 个;从 T<sub>2</sub> 处理检测到 70 个真菌属,总数是 11 736 个。

在检测出的所有真菌属中,除去未检测到的和未命名的,



将各处理真菌属数量排名前 10 的列出,由表 3 可以看出,占比达到 2%以上的真菌属数量作为优势菌属,对照中优势真菌属有 4 种,分别为粗糙孔菌属(Trechispora)、镰刀菌属(Fusarium)、隐球菌属(Cryptococcus)、被孢霉属(Mortierella);T<sub>1</sub> 处理有 8 种,分别为接合菌纲未命名属(unclassified Zygomycota)、镰刀菌属(Fusarium)、隐球菌属(Cryptococcus)、被孢霉属(Mortierella)、原金蝗属(Gongronella)、糙孢孔目 - 未命名属(unclassified Trechisporales)、红酵母(Rhodotorula)和Umbelopsis;T<sub>2</sub>处理有 8 种,分别为隐球菌属(Cryptococcus)、糙孢孔目未命名属(Unclassified Trechisporales)、镰刀菌属(Fusarium)、红酵母(Rhodotorula)、皮司霉属(Guehomyces)、Adisciso、被孢霉属(Mortierella)和Mrakia。

从表 3 还可看出,不同处理下茶园土壤的优势真菌属种 类及其占比均发生了变化。与对照相比,施用有机肥后数量 增加的真菌主要有镰刀菌属、隐球菌属和被孢霉属等,从 T<sub>1</sub>、 T<sub>2</sub> 处理中均检测到了红酵母。有研究表明,镰刀菌属广泛分布于自然界中,能产生植物刺激素(赤霉素),可使农作物增产,同时也是一类重要的植物病原菌,能引起许多植物病害,如由禾谷镰刀菌为病原的小麦赤霉病是宁夏小麦的常发性病害。"然而,镰刀菌在植物线虫防治方面却有重要作用,而且非致病性镰刀菌还可用来防治镰刀菌病害。壶菌门是高等植物的寄生虫,虽然对植物生长的直接影响不大,但是其游动孢子是传播土壤中一些病毒的介体,研究发现,壶菌门的玉蜀黍节壶菌能引起玉米褐斑病,内生集壶菌能引起马铃薯癌肿病,因此,该菌的减少有助于土壤环境的改善。红酵母是一种腐生菌,可分解多种物质,是天然的清洁工[14]。然而,这些茶园土壤中的优势真菌到底有什么样的功能尚不清楚,如何筛选出具有促生型或抗病型功能的有益菌值得进一步研究。

T<sub>1</sub> 处理 T, 处理 排序 种类 种类 数量(个) 比例(%) 种类 数量(个) 比例(%) 数量(个) 比例(%) 1 粗糙孔 菌属 211 3.7 接合菌纲 - 未命名属 1 497 17.4 隐球菌属 2 9 2 6 24.9 2 镰刀菌属 137 2.4 镰刀菌属 1 276 14.8 糙孢孔目 - 未命名属 1 306 11.1 3 隐球菌属 136 2.4 隐球菌属 838 9.7 镰刀菌属 578 4.9 4 被孢霉属 125 2.2 被孢霉属 751 8.7 红酵母 470 4.0 5 无梗囊霉属 42 0.7 原金蝗属 707 8.2 皮司霉属 389 3.3 6 壶菌门 - 未命名属 27 0.5 糙孢孔目 - 未命名属 706 8.2 Adisciso 296 2.5 7 Adisciso 24 0.4 红酵母 362 4.2 被孢霉属 275 2.3 8 皮司霉属 21 0.4 Umbelopsis 226 2.6 Mrakia 250 2.1 9 茎点霉 20 0.4 弹球菌目 165 1.9 Holtermanniella 149 1.3 10 白囊耙齿菌 14 0.3 伞菌科 - 未命名属 115 1.3 Delicatula 1.0 116

表 3 不同处理优势真菌属含量及其占比

### 2.3 不同处理对茶园土壤生物多样性的影响

α 多样性分析可以反映微生物群落的丰度和多样性,计算群落分布丰度(community richness)的指数有 Chao 指数、ACE 指数,这 2 个指数用来估计群落中 OTU(操作分类单元)数。用 Shannon 指数来计算群落分布多样性(community diversity), Shannon 值越大,说明群落的多样性越高。用各样品文库的覆盖率可以反映测序结果的真实情况。

由表 4 不同处理对茶园土壤细菌多样性的影响结果可知,在 97% 分类水平下,不同施肥处理下微生物 OTU 数量、Chao 指数、ACE 指数和 Shannon 指数有所差异。Chao 指数的大小顺序为  $T_2 > CK > T_1$ ; Shannon 指数的大小顺序为  $T_2 > CK > T_1$ ; Shannon 指数的大小顺序为  $T_2 > CK > T_1$ ; Ghannon 指数的大小顺序为  $T_2 > CK > T_2$ ; Shannon 指数的大小顺序为  $T_2 > CK > T_2$ ; Shannon 指数的大小顺序为  $T_2 > CK > T_2$ ; Shannon 指数的大小顺序为  $T_2 > T_2$ 。由此可见,施用

有机肥可提高茶园土壤细菌的丰度,但并未提高细菌群落的 多样性。

由不同施肥处理对茶园土壤真菌多样性的影响(表 5)可知, Chao 指数表现为  $T_2 > CK > T_1$ , ACE 指数表现为  $T_2 > CK > T_1$ , Shannon 指数表现为  $T_2 > T_1 > CK$ 。以上结果表明,有机肥的施入并不一定会提高真菌的丰度,但对于丰富土壤真菌的多样性是有利的。

### 3 讨论与结论

目前,高通量测序方法已经成为研究不同地区土壤微生物群落结构及组成的主要方法。刘洋等分析了基于 454 高通量测序的黄土高原不同乔木林土壤细菌群落特征,结果表明,

表 4 不同处理对茶园土壤细菌多样性的影响

样品	序列数 (个)	OTU 数 (个)	ACE 指数	Chao 指数	Shannon 指数	覆盖率
CK	14 944	4 778	15 828.0	10 552.0	7.558 9	0.806 344
$T_1$	8 529	3 192	15 767.0	8 762.9	6.856 2	0.735 373
$T_2$	9 672	4 063	19 533.3	10 790.2	7.419 5	0.706 679

表 5 不同处理对茶园土壤真菌多样性的影响

样品	序列数 (个)	OTU 数 (个)	ACE 指数	Chao 指数	Shannon 指数	覆盖率
CK	5 687	385	1 351.11	897.55	3.227 4	0.961 315
$T_1$	8 612	429	1 119.03	795.65	3.718 1	0.975 383
$T_2$	11 736	625	1 924.16	1 470.32	4.115 2	0.971 711

不同乔木林土壤中的优势菌来自变形菌门(Proteobacteria)、 放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌 门(Chloroflexi)和浮霉菌门(Planctomycetes),主要优势菌纲 为放线杆菌纲(Actinobacteria)、α - 变形菌纲 (Alphaproteobacte ria)、酸杆菌(Acidobacteria)、B - 变形菌纲 (Betaproteo bacteria)、浮霉菌纲(Planctomycetacia)<sup>[15]</sup>。汪其 同等基于高通量测序分析了杨树人工林根际和非根际细菌群 落结构的不同,发现根际和非根际相对丰度 > 4% 的属有 8 个, 分别是 Acidobacterium、Gp1、Acidobacterium、Gp3、 Gp6Gemmatimonas. Bradyrhizobium. Acidobacterium Burkholderia Streptomyces 和 Acidobacterium Gp4<sup>[16]</sup>。α 多样性 分析表明,根际土壤细菌群落多样性高干非根际土壤,但差异 未达到显著水平。

施用有机肥对土壤微生物的影响已有很多研究,朱庆松 等分析了不同覆盖措施对信阳毛尖茶园土壤微生物量动态变 化的影响,结果表明,稻草覆盖处理与白三叶覆盖处理均能增 加土壤微生物的数量和活性[17]。朱海平等通过分析不同培 肥管理措施对土壤微生物生态特征的影响发现,施入厩肥、化 肥或秸杆还田均能明显增加土壤微生物生物量及呼吸量[18]。 林新坚等研究表明,施用有机肥可有效改善土壤物理性状,增 加土壤微生物总量[19]。王鹏研究发现,有机生物活性肥料能 够促进土壤中有益微生物的繁衍,有效提高土壤酶生物活 性[20]。单武雄等发现,施用菜籽饼肥加稻草覆盖处理可以显 著提高 0~20 cm 土层的蚯蚓数量和生物量、氨氧化细菌、好 气性自生固氮菌、嫌气性自生固氮菌、放线菌、真菌和细菌等 物生物数量[21]。温延臣等研究发现,施用有机肥以及有机无 机配肥与化肥相比,土壤微生物碳、氮含量分别增加50%~ 112%、34%~79%,提高了土壤活性养分供应能力[22]。总体 来说,施用有机肥可以增加土壤中微生物的数量,但是目前基 于高通量测序的方法对土壤微生物群落结构和生物多样性的 研究尚不多见。

因此,本试验运用 Miseq 测序平台研究了有机肥施用量对茶园土壤微生物群落结构和生物多样性的影响,结果表明,增施有机肥可以改变茶园土壤微生物的 OTU 数量和种类,且随着施肥量增加,茶园土壤微生物的 OTU 丰度越高。不同施肥处理的茶园土壤所含微生物属的种类和数量都有所差异,随着有机肥施用量的加大,可检测出的细菌和真菌属的种类也变多。

### 参考文献:

- [1]刘红艳,张亚莲,邓 欣,等. 不同栽培方式有机茶园土壤微生物群落组成、活性及脲酶活性比较[J]. 福建茶叶,2007(4):17-
- [2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiological Reviews 1995 59 (1) :143 – 169.
- [3] Brock T D. The study of microorganisms in situ: progress and problems [J]. Symp Soc Gene Microbiol, 1987, 41:1-47.
- [4] 鲍士旦. 土壤农业化学[M]. 北京:中国农业出版社,2000;22 100.
- [5] Schuster S C. Next generation sequencing transforms today's biology [J]. Nature Methods, 2008, 5(1):16 18.
- [6] Li Y Y, Chen L Q, Wen H Y. Changes in the composition and diversity of bacterical communities 13 years after soil reclamation of abandoned mine land in eastern China [J]. Ecological Society of Japan, 2015, 30(2):357-366.
- [7] 柳玲玲,孙长青. 乳酸杆菌的应用技术研究进展[J]. 耕作与栽培,2015(5):69-71.
- [8] 赵艳平,李建喜,黄小红,等. 乳酸杆菌的研究进展及其在畜牧业上的应用[J]. 广东畜牧兽医科技,2008,33(3):18-19,21.
- [9]杜宗军,王祥红,李海峰,等. 发光细菌的研究和应用[J]. 高技术通讯,2003(12):103-106.
- [10]黄 正,王家玲. 发光细菌的生理特性及其在环境监测中的应 用[J]. 环境科学,1995,16(3):87-90.
- [11] 韦东普. 应用发光细菌法测定我国土壤中铜、镍毒性的研究 [D]. 北京:中国农业科学院,2010.
- [12] 闫正跃, 孟 玲, 高晓文. 润州黄色杆菌对甜菜夜蛾的毒力测定 [J]. 中国生物防治, 2008, 24(1): 30-33.
- [13] 沈瑞清, 张 萍, 郭成瑾, 等. 宁夏镰刀菌属(Fusarium Link) 真菌的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(16):8869-8870,8875.
- [14]李 臣,阮榕生,林向阳,等. 红酵母的性质及其应用研究[J]. 农产品加工·学刊,2006(5);20-22,25.
- [15]刘 洋,曾全超,黄懿梅. 基于454高通量测序的黄土高原不同 乔木林土壤细菌群落特征[J]. 中国环境科学,2016,36(11): 3487-3494.
- [16]汪其同,朱婉芮,刘梦玲,等. 基于高通量测序的杨树人工林根际和非根际细菌群落结构比较[J]. 应用与环境生物学报,2015,21(5):967-973.
- [17]朱庆松,刘松虎,赵海英. 不同覆盖措施对信阳毛尖茶园土壤微生物量动态变化的影响[J]. 河南农业科学,2010(7):53-55.
- [18]朱海平,姚槐应,张勇勇,等. 不同培肥管理措施对土壤微生物 生态特征的影响[J]. 土壤通报,2003,34(2):140-142.
- [19] 林新坚, 林 斯, 邱珊莲, 等. 不同培肥模式对茶园土壤微生物活性和群落结构的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19 (1):93-101.
- [20]王 鹏. 有机生物活性肥料对土壤肥力、微生物及酶活性的影响[J]. 安徽农学通报,2006,12(12):114-115.
- [21]单武雄,罗 文,肖润林,等. 连续5年施菜籽饼肥和稻草覆盖对茶园土壤生态系统的影响[J]. 中国生态农业学报,2010,18 (3):472-476.
- [22] 温延臣,李燕青,袁 亮,等. 长期不同施肥制度土壤肥力特征 综合评价方法[J]. 农业工程学报,2015,31(7):91-99.