

王超,刘明庆,黄思杰,等. 不同施肥处理对有机种植土壤微生物区系的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):266-272.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.061

不同施肥处理对有机种植土壤微生物区系的影响

王超,刘明庆,黄思杰,李妍,田伟,陈秋会,王磊,席运官

(生态环境部南京环境科学研究所,江苏南京 210042)

摘要:在有机种植条件下,基于高通量测序分析复合微生物肥及有机肥的施用对有机冬瓜根区土壤微生物区系的影响,结合土壤化学性质及酶活性、有机冬瓜果实品质作相关分析。结果显示,复合微生物肥的施用显著降低土壤真菌群落丰富度,施用有机肥提高真菌群落丰富度,二者均提高土壤真菌、细菌种群多样性;根区土壤中变形菌门、厚壁菌门和放线菌门是优势细菌,子囊菌门是优势真菌;复合微生物肥和有机肥的施用均降低厚壁菌门和芽孢杆菌科的相对丰度,施用复合微生物肥提高结合菌门的相对丰度,降低毛壳菌科和肉座菌科的相对丰度,施用有机肥则相反。施肥显著提高土壤过氧化氢酶、蔗糖酶活性;显著提高冬瓜总氨基酸含量,显著降低可溶性固形物含量。因此,施用复合微生物肥及有机肥可改变有机冬瓜根区土壤微生物的丰富度、多样性及群落结构,提高土壤酶活性,改善有机冬瓜品质。

关键词:复合微生物肥;有机肥;有机冬瓜;高通量测序;微生物区系

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0266-07

健康的土壤是农业种植生产的基础,通过施肥培育健康土壤、提升土地质量是当前我国农业种植生产中提高作物产量和品质的关键环节。相较于常规农业中化学肥料的大量使用,施用复合微生物肥及有机肥是当前有机种植生产中改良土壤、增加土壤肥力的重要手段。与传统有机肥料不同,复合微生物肥含有特定微生物^[1],田间施用会将大量微生物引入土壤局部区域,对有机种植土壤中原有的微生物区系造成影响,甚至会破坏土壤微生态平衡,须科学评价其对土壤微生态的影响。以往的研究主要探讨了有机肥料施用对植物生产及土壤养分的影响,部分研究关注其对常规农业种植土壤微生物区系的影响^[2-3],而针对有机肥料影响有机种植土壤微生物区系的研究极少。对于土壤微生物的研究,传统的分析方法包括琼脂培养基培养法、Biolog 平板法、磷脂脂肪酸法、PCR-变性梯度凝胶电泳(DGGE)和限制性内切酶片段长度

多态性(RFLP)等,但均存在操作复杂、试验周期长、痕量微生物检测困难等弊端,无法深入分析,而高通量测序技术通过检测土壤微生物细胞内特定遗传物质(原核微生物 16S rDNA/rRNA、真核微生物 18S rDNA/rRNA)的碱基序列,可以更全面、准确地揭示土壤中微生物群落的复杂性和多样性,已被广泛应用于土壤微生物区系研究^[4-6]。

2015 年农业部制定了《到 2020 年化肥使用量零增长行动方案》,明确了“有机肥替代化肥”的技术路径,同时确立“一控两减三基本”的目标,力争实现农药化肥的零增长。在此背景下,有机肥料及微生物肥料的作用越来越凸显。截至 2016 年 7 月,农业部登记的微生物肥料产品达到 2 780 个,年产量已突破 1 000 万 t,应用面积超过 1 333 万 hm²^[7]。与之相对应的是我国有机作物种植面积快速增长,截至 2015 年年底,有机植物生产面积为 222.4 万 hm²,有机生产面积已达全国农业耕地面积的 0.77%^[8]。随着我国有机作物种植面积的不断增长,有机肥及复合微生物肥必将被大量施用,然而其在提升有机种植耕作层土壤质量中的作用尚缺乏明确的科学依据,因此需要科学评测二者对有机种植土壤微生物区系的影响。本研究基于 Illumina 新一代 Miseq 平台的高通量测序技术,结合相关生物信息学方法,全面分析土壤细菌 16S rRNA 基因 V3+V4 区和真菌 ITS1 区的多样性指数及群落结构,旨在研究江苏省仪征市有机蔬菜田在轮作种植条件下,复

收稿日期:2018-07-25

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务专项(编号:GYZX170307);云南省环保公益专项(编号:45014)。

作者简介:王超(1989—),男,山东费县人,博士,主要从事有机种植病虫害防治、土壤健康及相关机理研究。Tel:(025)85287062;E-mail:wcofrcc@126.com。

通信作者:席运官,博士,研究员,主要从事生态农业等研究。E-mail:xygofrc@126.com。

auxiliary information[J]. Geoderma,2012,171(1):35-43.

[35] Phil-Eze P O. Variability of soil properties related to vegetation cover in a tropical rainforest landscape[J]. Journal of Geography and Regional Planning,2010,3(7):177-184.

[36] 程街亮,史舟,朱有为,等. 浙江省优势农产区土壤重金属分异特征及评价[J]. 水土保持学报,2006,20(1):103-107.

[37] Gu Y G, Gao Y P, Lin Q. Contamination, bioaccessibility and human health risk of heavy metals in exposed-lawn soils from 28 urban

parks in southern China's largest city, Guangzhou [J]. Applied Geochemistry,2016,67:52-58.

[38] Zhao L, Xu Y F, Hou H, et al. Source identification and health risk assessment of metals in urban soils around the Tanggu chemical industrial district, Tianjin, China [J]. Science of the Total Environment,2014,468:654-662.

[39] 谷阳光,高富代. 我国省会城市土壤重金属含量分布与健康风险评价[J]. 环境化学,2017,36(1):62-71.

合微生物肥及有机肥对有机冬瓜根区土壤微生物多样性和群落结构的影响,并结合土壤化学性质、酶活性以及有机冬瓜果实品质作相关分析,以期科学反映施用复合微生物肥及有机肥对有机种植土壤健康的影响。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

田间试验选址在江苏省仪征江扬生态农业有限公司四庄基地有机蔬菜田(119°7'4.3"E,32°22'59.8"N;有机认证证书编号:134OP1200259),土壤类型为潮土,年平均气温 15.3℃,年日照时数 2 054.1 h,无霜期 224 d,年均降水量约 994 mm。经本研究种植前采样分析测定得到,试验田 0~20 cm 土壤基本性质:pH 值 6.59,铵态氮含量 12.67 mg/kg,速效磷含量 20.33 mg/kg,速效钾含量 201.06 mg/kg,有机质含量 33.27 g/kg,过氧化氢酶活性 10.16 U/g,蔗糖酶活性 15.67 U/g,脱氢酶活性 271.91 U/g,脲酶活性 1 330.98 U/g,酸性磷酸酶活性 17.42 U/g。

1.2 试验设计

试验于 2017 年 5—10 月进行,采用随机区组设计,共设置 3 个处理,分别为复合微生物肥处理(B)、有机肥处理(O)和对照(C),每个处理设置 3 个重复,共 9 个小区,每个小区面积为 3 m×10 m=30 m²,保护行宽为 1 m,走道宽及小区间排水沟宽均为 0.5 m。试验作物为冬瓜 [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.],前茬作物为青菜 (*Brassica chinensis* L.)。复合微生物肥处理和有机肥处理施肥作为基肥,施用量均为 1 500 kg/hm²,对照组不施肥。田间管理及有害生物防治采取有机管理模式。

复合微生物肥[微生物肥(2017)准字(2285)号]由作物秸秆制作而成,总养分含量为 8%,有机质含量为 20%,有效活菌数为 0.2 亿个/g,其中细菌数量为 0.16 亿个/g,真菌数量为 0.03 亿个/g,其他菌种数量为 0.01 亿个/g。有机肥[苏农肥(2012)准字 0381 号]的有机质含量≥45%,总养分含量≥5%。

1.3 样品采集

土壤样品采集于第 1 次盛花期进行,用土壤采样器钻取各处理小区 0~20 cm 根区土壤,按照“S”形多点取样,每小区钻取 6 钻,去除根系、杂草、土壤动物和石块等杂质后充分混匀作为 1 个根区土壤样品,采用四分法平均分成 2 份,低温保存带回实验室,分别置于-80℃和-20℃冰箱保存备用。

有机冬瓜样品统一采集第 2 批进入成熟期的冬瓜果实,每个处理随机选取 3 个果实进行品质测定。

1.4 土壤性质测定

土壤样品经自然风干、研磨过筛(1 mm)后,参照文献[9]的方法测定其理化性质。其中,pH 值使用 pH 计测定(土水比 1 g:5 mL);将土壤样品用浓度为 0.5 mol/L 的 K₂SO₄ 溶液浸提 1 h 后,用连续流动分析仪测定氨态氮含量;速效磷含量采用 0.5 mol/L NaHCO₃ 浸提-分光光度法测定;速效钾含量采用 1 mol/L CH₃COONH₄ 浸提-火焰光度法测定;有机质含量采用油浴外加热-K₂Cr₂O₇ 容量法测定。土壤过氧化氢酶、蔗糖酶、脱氢酶、脲酶和酸性磷酸酶的活性分别使用南

京建成生物工程研究所提供的土壤酶试剂盒测定。

1.5 土壤微生物总 DNA 提取和高通量测序

采用 E. Z. N. A. ® Soil DNA Kit(OMEGA,美国)的试剂盒提取土壤微生物总 DNA,采用 NanoDrop-ND1000 测定提取的 DNA 浓度,并经 2% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 样品进行检测,合格后用于构建文库;以各土壤样品微生物总 DNA 为模板,以细菌 V3+V4 区(338F 5'-ACTCTACGGGAGGCAGCA G-3';806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[10]和真菌 ITS1 区(ITS1F 5'-CTTGGTCATTGAGGAAGTAA-3';2043R 5'-GCTGCGTCTTCATCGATGC-3')^[11]特异性引物为扩增引物进行融合引物 PCR;采用 Illumina MiSeq 测序平台对 PCR 扩增产物进行双端测序分析,测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.6 有机冬瓜品质测定

游离氨基酸含量测定参照 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》;可溶性固形物含量测定参照 GB/T 8210—2011《柑桔鲜果检验方法》;可溶性总糖含量测定参照 NY/T 1278—2007《蔬菜及其制品中可溶性糖的测定 铜还原碘量法》;总酸度测定参照 GB/T 12456—2008《食品中总酸的测定》;糖酸比以可溶性总糖含量与总酸度的比值表示;蛋白质含量测定参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》;粗纤维含量测定参照 GB/T 5009.10—2003《植物类食品中粗纤维的测定》;维生素 C 含量测定参照 GB 5009.86—2016《食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定》;硝酸盐含量测定参照 GB 5009.33—2016《食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》。

1.7 数据处理与分析

土壤理化性质、土壤酶活性及有机冬瓜品质数据采用 Microsoft Excel 2010 软件进行整理和图表制作,用 DPS 7.05 进行方差分析(LSD 法),显著性水平设定为 0.05。

测序数据采用 FLASH^[12]和 Trimmomatic^[13]软件进行过滤优化和双端序列连接,优质序列利用 Usearch 软件基于 97% 的相似水平进行 OTU (operational taxonomic units) 聚类,根据 Silva 细菌数据库^[14]和 Unite 真菌数据库利用 RDP Classifier 进行物种注释和分类^[15];基于 OTU 丰度信息,利用 R 语言工具制作稀释曲线(rarefaction curve)、Venn 图和群落柱形图,利用 Mothur 软件计算 α-多样性指数(Shannon、Simpson、Chao、ACE)^[16-17],并用 Excel 和 DPS 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物文库测序结果评价

本研究对 9 个土壤样品进行了 Illumina MiSeq 高通量测序,数据经过过滤优化,细菌文库共得到 392 525 条有效序列,序列长度分布在 267~516 bp 之间,97% 相似水平下聚类获得 21 528 个 OTU;真菌文库共得到 541 244 条有效序列,序列长度分布在 204~452 bp 之间,97% 相似水平下聚类获得 5 694 个 OTU。每个样品的有效序列数量和 OTU 数量如表 1 所示,各处理组间细菌文库的有效序列数和 OTU 数、真菌文库的有效序列数差异不显著,处理组 B 真菌文库的 OTU 数显著低于处理组 O 和对照组 C(P<0.05)。

表 1 根际土壤细菌、真菌 OTU 序列读数

处理	细菌(V3 + V4 区)		真菌(ITS1 区)	
	序列数(条)	OTU 数(个)	序列数(条)	OTU 数(个)
C	43 131 ± 1 790.7a	2 373 ± 234.1a	61 080 ± 3 945.4a	631 ± 101.6b
B	45 870 ± 5 500.5a	2 422 ± 209.0a	57 292 ± 2 225.4a	595 ± 92.9c
O	41 840 ± 4 169.4a	2 380 ± 208.6a	62 042 ± 8 403.9a	672 ± 106.9a

注:数值为“平均值 ± 标准差”,不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著(LSD test)。下表同。

稀释曲线反映了样品文库测序数据量的合理性,可用于评价测序数据量能否覆盖所有类群。细菌和真菌多样性稀释曲线(图 1)显示,随着测序量的不断增大,各样品 OTU 数目的增加趋势趋于平缓,最终基本达到饱和,说明测序数据量合理;在 97% 相似水平上计算各土壤样品测序的覆盖率,结果

(表 2)显示,细菌文库测序覆盖率在 98% 以上,真菌文库测序覆盖率在 99% 以上,说明取样合理,处理组间微生物文库测序覆盖率差异不显著。因此,测序数据能够真实地反映土壤样品中的微生物群落,但可能仍有少量微生物种类未被发现。

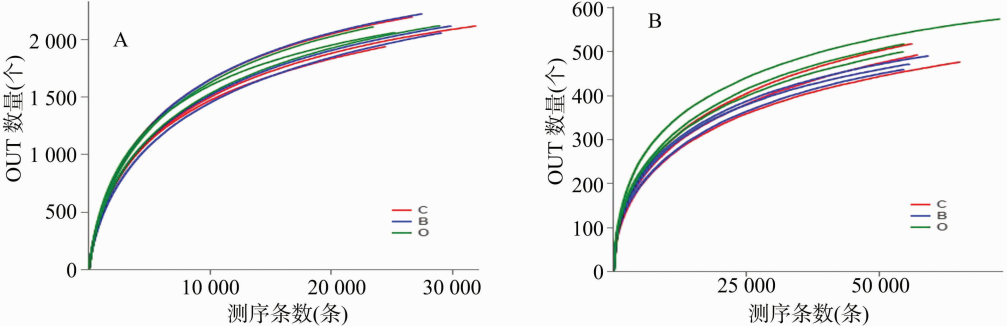


图1 有机冬瓜根区土壤样品细菌(A)、真菌(B)多样性稀释曲线

表 2 有机冬瓜根区土壤细菌、真菌群落丰富度和多样性指数

处理	细菌(V3 + V4 区)				
	Shannon 指数	Simpson 指数	ACE 指数	Chao 指数	文库覆盖率(%)
C	6.339 6 ± 0.118 0a	0.005 9 ± 0.000 8a	2 464.5 ± 88.63a	2 457.3 ± 77.71a	98.19 ± 0.31a
B	6.301 1 ± 0.189 4a	0.005 8 ± 0.001 8a	2 542.7 ± 37.71a	2 555.1 ± 68.47a	98.17 ± 0.13a
O	6.433 4 ± 0.147 6a	0.004 7 ± 0.001 2a	2 466.8 ± 58.93a	2 453.0 ± 6.01a	98.09 ± 0.24a

处理	真菌(ITS1 区)				
	Shannon 指数	Simpson 指数	ACE 指数	Chao 指数	文库覆盖率(%)
C	3.215 6 ± 0.133 6a	0.089 2 ± 0.011 5a	624.7 ± 26.34ab	628.5 ± 39.44a	99.77 ± 0.03a
B	3.319 5 ± 0.068 6a	0.085 9 ± 0.017 0a	572.3 ± 9.27c	569.5 ± 10.79b	99.80 ± 0.02a
O	3.276 6 ± 0.091 9a	0.090 8 ± 0.008 2a	634.8 ± 21.18a	631.0 ± 15.96a	99.79 ± 0.05a

2.2 施肥对根区土壤微生物群落丰富度和多样性的影响

Shannon 指数和 Simpson 指数用于反映土壤样品中微生物的多样性,前者数值越大,表示群落多样性越高;后者数值越大,表示群落多样性越低^[18]。表 2 数据显示,施用肥料后,处理组 B 有机冬瓜根区土壤细菌 Shannon 指数、Simpson 指数下降,处理组 O Shannon 指数上升、Simpson 指数下降,但与对照组 C 之间差异均不显著。处理组 B 土壤真菌 Shannon 指数上升、Simpson 指数下降,处理组 O Shannon 指数、Simpson 指数上升,与对照组 C 之间差异均不显著。可见,有机冬瓜根区土壤施用复合微生物肥和有机肥可分别在一定程度上提高土壤真菌、细菌种群多样性。

ACE 指数和 Chao 指数可反映群落物种丰富度。由表 2 数据可知,有机冬瓜根区土壤细菌 ACE 指数和 Chao 指数在施用复合微生物肥后上升,上升幅度分别为3.17%和3.98%,处理组 O 指数变化幅度不大,均与对照组 C 之间差异均不显

著。与对照组 C 相比,施用复合微生物肥显著降低土壤真菌的 ACE 指数、Chao 指数($P < 0.05$),分别降低 8.39%、9.39%;处理组 O 指数小幅上升,差异不显著。结果表明,施用复合微生物肥在一定程度上丰富了有机冬瓜根区土壤细菌群落结构,但显著降低真菌群落丰富度;施用有机肥则提高了土壤真菌群落丰富度。

2.3 施肥后根区土壤微生物类群分析

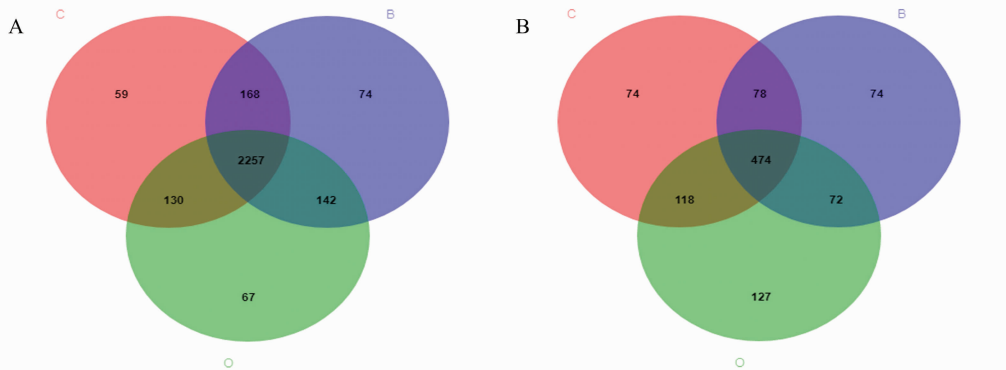
在 97% 的相似水平上,对照组 C、处理组 B、处理组 O 土壤样品分别得到 2 373、2 422、2 380 个细菌 OTU(平均值),差异不显著;得到 631、595、672 个真菌 OTU(平均值),处理组 O 显著高于对照组 C 和处理组 B(表 1)。可见,施用复合微生物肥和有机肥在一定程度上提高了有机冬瓜根区土壤细菌类群的特异性;施用复合微生物肥显著降低土壤真菌类群的特异性,施用有机肥则显著提高土壤真菌类群的特异性。

Venn 图可直观展现并反映组间或样品之间的 OTU 数目

组成相似性、重叠情况以及特异性^[19]。由图 2 - A 可知,对照组 C、处理组 B 和处理组 O 之间共有的细菌 OTU 数目为 2 257 个,代表的物种分别属于 α - 变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、芽孢杆菌纲 (Bacilli)、放线菌纲 (Actinobacteria)、 γ - 变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、酸杆菌纲 (Acidobacteria) 和芽单胞菌纲 (Gemmatimonadetes) (占比超过 1.5% 的纲)。对照组 C、处理组 B、处理组 O 特有的 OTU 数分别为 59、74、67 个,说明施用复合微生物肥和有机肥

会增加有机冬瓜根区土壤特有细菌物种。

从图 2 - B 中可以看出,对照组 C、处理组 B 和处理组 O 共有的真菌 OTU 数目为 474 个,主要共有物种分别属于盘菌纲 (Pezizomycetes) 和粪壳菌纲 (Sordariomycetes) (占比超过 7% 的纲)。对照组 C、处理组 B、处理组 O 特有的 OTU 数分别为 74、74、127 个,说明施用有机肥会增加根区土壤特有真菌物种。



序列按相似度高于 0.97 进行 OUT 聚类
图2 有机冬瓜根区土壤细菌(A)、真菌(B)群落 OUT 分布的 Venn 分析

2.4 施肥对根区土壤微生物群落分布特征的影响

在门分类水平上的细菌类群分布及相对丰度如图 3 - A 所示,有机冬瓜根区土壤样品中的细菌包含变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 等菌群,处理组 B、处理组 O 和对照组 C 细菌群落组成相似;除了未分类的其他菌群,变形菌门、厚壁菌门和放线菌门的相对丰度较高,属于优势细菌;施用复合微生物肥和有机肥不同程度地降低了根区土壤厚壁菌门的相对丰度,分别比对照组 C 降低 18.55%、26.07%;处理组 B 根区土壤酸杆菌门相对丰度较对照组 C 降低 25.09%,而处理组 O 则升高 32.38%。从细菌科的分类水平(图 3 - B)上看,除未确定科类外,有机冬瓜根区土壤中芽孢杆菌科 (Bacillaceae)、黄色单胞菌科 (Xanthomonadaceae)、芽单胞菌科 (Gemmatimonadaceae) 和鞘酯菌科 (Sphingomonadaceae) 的相对丰度均较高(数值 >3%),属于优势细菌;施用复合微生物肥和有机肥分别使芽孢杆菌科相对丰度降低了 18.09%、26.37%。

图 3 - C 为有机冬瓜根区土壤真菌在门分类水平上的物种柱状图,子囊菌门 (Ascomycota)、接合菌门 (Zygomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、壶菌门 (Chytridiomycota) 等在处理组 B、处理组 O 和对照组 C 土壤样品中均有分布,子囊菌门是优势菌群,相对丰度占比超过 84%;受限于数据库的原因,相对丰度排名第 2 的菌群未能分类;施用复合微生物肥使根区土壤接合菌门的相对丰度提高 35.99%,施用有机肥则降低接合菌门的相对丰度,降幅为 22.29%。图 3 - D 显示,有机冬瓜根区土壤真菌在科水平上主要包括毛壳菌科 (Chaetomiaceae)、肉座菌科 (Hypocreaceae)、丛赤壳科 (Nectriaceae)、发菌科 (Trichocomaceae) 和小囊菌科

(Microascaceae) 等,除了未确定科类的菌群外,子囊菌门中毛壳菌科的相对丰度在处理组 B、处理组 O 和对照组 C 中均最大,是优势菌群;施用复合微生物肥降低了毛壳菌科、肉座菌科的相对丰度(比对照组 C 降低 19.37%、46.02%),施用有机肥则提高了毛壳菌科、肉座菌科的相对丰度(比对照组 C 提高 23.07%、42.00%);施用复合微生物肥、有机肥均降低了丛赤壳科的相对丰度(比对照组 C 降低 39.36%、22.95%)。

2.5 施肥对根区土壤化学性质及酶活性的影响

本研究于有机冬瓜第 1 次盛花期测定了根区土壤化学性质及酶活性,结果(表 3)显示,处理组 B、处理组 O 和对照组 C 土壤铵态氮、速效钾、速效磷含量均低于种植前,处理组 B 各项化学性质指标略低于对照组 C,处理组 O 则高于对照组 C(除 pH 值外),差异均不显著。施用有机肥和复合微生物肥显著提高了根区土壤过氧化氢酶及蔗糖酶活性,对脱氢酶、脲酶和酸性磷酸酶活性影响不显著(表 4)。

2.6 施肥对有机冬瓜品质的影响

本研究对第 2 批进入成熟期的有机冬瓜果实进行了营养品质指标测定分析,结果(表 5)显示,施用复合微生物肥和有机肥均显著提高有机冬瓜果实总氨基酸、总糖、总酸的含量(处理组 B 比对照组 C 分别上升 15.38%、135.29%、14.29%;处理组 O 比对照组 C 分别上升 7.69%、17.65%、14.29%),二者均显著降低了可溶性固形物、蛋白质、维生素 C 的含量(处理组 B 比对照组 C 分别下降 13.31%、26.86%、34.27%;处理组 O 比对照组 C 分别下降 17.34%、45.14%、14.77%);施用有机肥可提高有机冬瓜果实硝酸盐含量,较对照组 C 升高 5.64%,影响不显著;施用复合微生物肥可显著降低有机冬瓜果实硝酸盐含量($P < 0.05$),较对照组 C 降低 12.09%。

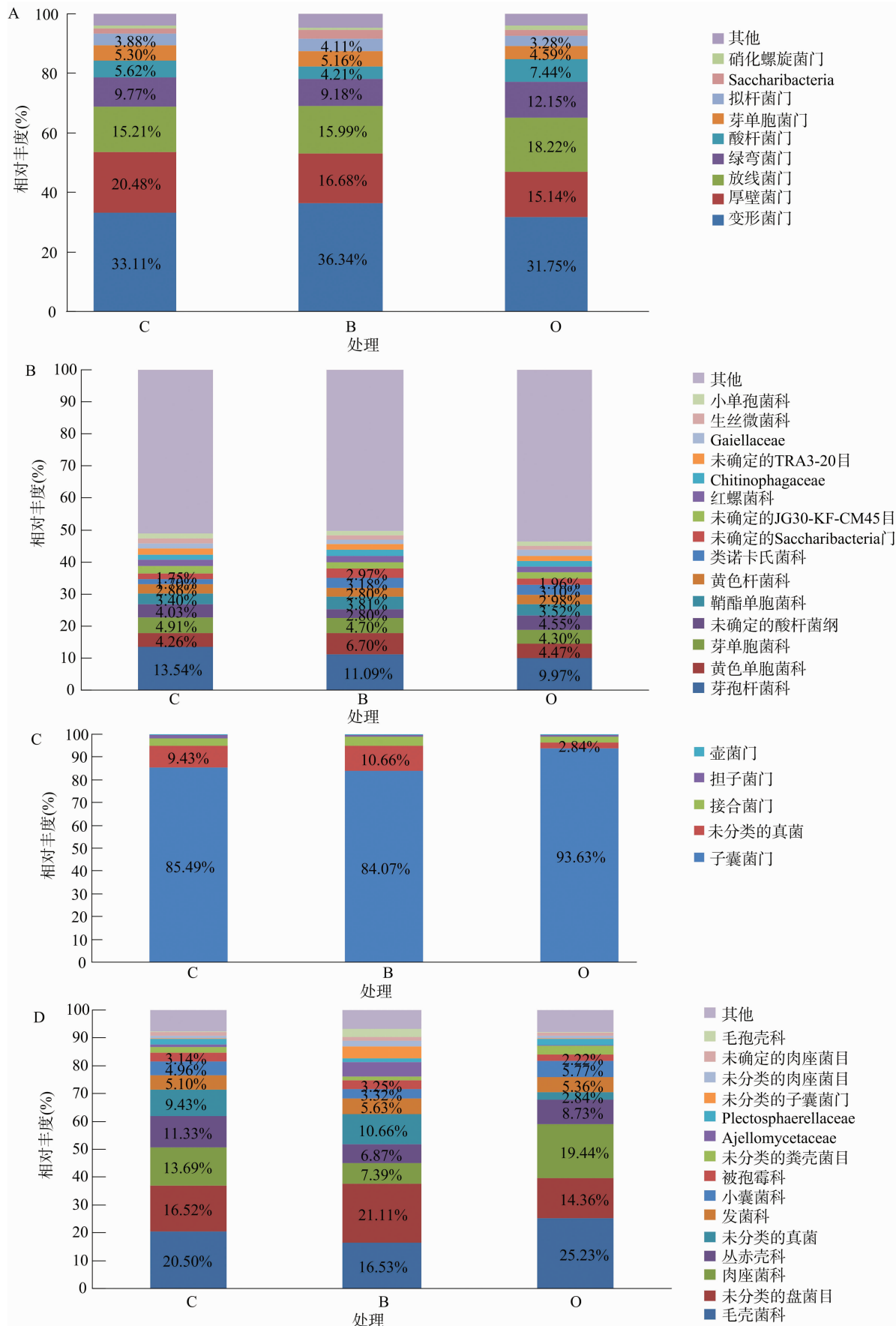


表 3 施肥对有机冬瓜根区土壤化学性质的影响

处理	pH 值	铵态氮含量 (mg/kg)	速效钾含量 (mg/kg)	速效磷含量 (mg/kg)	有机质含量 (g/kg)
O	6.35 ± 0.05a	12.17 ± 2.11a	192.00 ± 6.43a	19.02 ± 2.05a	33.32 ± 3.12a
B	6.40 ± 0.02a	11.15 ± 1.21a	188.02 ± 9.22a	17.82 ± 3.18a	31.15 ± 2.35a
C	6.43 ± 0.04a	11.66 ± 2.16a	191.33 ± 7.73a	18.33 ± 5.77a	31.51 ± 1.57a

表 4 施肥对有机冬瓜根区土壤酶活性的影响

处理	过氧化氢酶活性 (U/g)	蔗糖酶活性 (U/g)	脱氢酶活性 (U/g)	脲酶活性 (U/g)	酸性磷酸酶活性 (U/g)
O	16.93 ± 0.15a	11.98 ± 0.28a	259.28 ± 5.12a	1 558.28 ± 52.51a	13.49 ± 0.37a
B	17.02 ± 0.22a	12.28 ± 0.16a	249.62 ± 6.01a	1 562.22 ± 43.53a	13.76 ± 0.13a
C	16.46 ± 0.63b	10.67 ± 0.39b	262.57 ± 2.38a	1 550.64 ± 34.12a	13.36 ± 0.35a

表 5 施肥对有机冬瓜品质的影响

处理	总氨基酸含量 (%)	可溶性固形物 含量(%)	总糖含量 (%)	总酸含量 (%)	蛋白质含量 (%)	维生素 C 含量 (mg/100 g)	硝酸盐含量 (mg/kg)
O	0.14 ± 0.001b	2.05 ± 0.03c	0.20 ± 0.01b	0.08 ± 0.003a	0.96 ± 0.04c	22.73 ± 1.31b	906.58 ± 35.16a
B	0.15 ± 0.002a	2.15 ± 0.03b	0.40 ± 0.01a	0.08 ± 0.003a	1.28 ± 0.01b	17.53 ± 0.78c	754.40 ± 31.86b
C	0.13 ± 0.002c	2.48 ± 0.03a	0.17 ± 0.01c	0.07 ± 0.002b	1.75 ± 0.04a	26.67 ± 1.08a	858.14 ± 16.86a

3 讨论

当前,高通量测序技术已被广泛用于土壤微生物的群落结构及多样性研究^[5]。针对复合微生物肥及有机肥施用对有机种植土壤微生物区系影响的研究鲜有报道,本研究基于 Illumina Miseq 平台,对有机冬瓜根区土壤细菌 16S rRNA 基因 V3 + V4 区域和真菌 ITS1 区域进行高通量测序,结合相关生物信息学方法分析发现,施用复合微生物肥会提高细菌群落多样性,降低土壤真菌群落丰度,与顾欣等在设施田块西瓜种植中应用菌肥的研究结果^[20]一致。基于 Silva 和 Unite 数据库分析显示,有机冬瓜根区土壤中变形菌门、厚壁菌门和放线菌门是主要细菌类群,与 Schloss 等利用 16S rRNA 对农田土壤细菌进行生态学分类的结果^[21]一致;子囊菌门是主要真菌类群,与 Roesch 等对土壤微生物群落的研究结果^[22]一致。

α -多样性指数是有效评价土壤微生物群落多样性和物种丰富度的指标^[23]。本研究发现,施用有机肥提高了有机冬瓜根区土壤细菌多样性 Shannon 指数,施用复合微生物肥提高了细菌丰富度 ACE、Chao 指数,游偲等同样发现,采用枯草芽孢杆菌菌剂处理后的烟草根际土壤细菌多样性指数和丰富度指数均提高^[24]。多数植物病原菌来自真菌,康捷等发现,麻山药糊头病和根茎腐病发病植株土壤真菌多样性和丰富度均高于健康植株^[25],本研究显示,施用复合微生物肥能显著降低有机冬瓜根区土壤真菌群落丰富度,表明它在一定程度上能减少有机种植作物受病原真菌侵害的概率。有机肥可为土壤微生物的活动提供所需的碳源、氮源和能量,并可改善土壤微生态环境的理化性状,促进微生物的生长和繁殖,增加微生物数量^[26];有机质被认为是影响土壤微生物动态的主要因素^[27];本研究同样发现,施用有机肥会提高土壤细菌和真菌群落多样性及丰富度,土壤有机质含量也相应提高。

本研究发现,施用复合微生物肥和有机肥均会降低有机冬瓜根区土壤真菌丛赤壳科的相对丰度,同时,有机肥处理组

土壤毛壳菌科真菌相对丰度升高。李发虎等发现,施用玉米秸秆生物炭后黄瓜结果期土壤子囊菌门毛壳菌科比例明显提高^[28]。毛壳菌通过重寄生和产生毛壳素等抗生素对病原菌产生拮抗作用,是重要的植物病害生防真菌^[29]。子囊菌门丛赤壳科(Nectricaceae)菌多属菌生真菌,可以寄生病原真菌^[30]。可见,施用复合微生物肥有助于控制有机种植作物病害发生。

有机肥有机质含量高、养分全面、肥效长,在作物种植中发挥着改良土壤、改善土壤微生物群落结构、提高作物品质等作用^[31]。本研究发现,复合微生物肥及有机肥的施用均能显著提高土壤过氧化氢酶和蔗糖酶活性;与对照组相比,有机肥处理在一定程度上提高了有机冬瓜果实硝酸盐含量,与汪峰等对大棚黄瓜施用有机肥的研究结果^[32]一致;李瑞霞等研究表明,木霉 NJAU4742 生物有机肥处理的番茄果实硝酸盐含量降低^[33],本研究同样发现,施用复合微生物肥能显著降低有机冬瓜果实硝酸盐含量,可能与其中特定的微生物有关;同时,有机肥处理在一定程度上提高了土壤铵态氮、速效钾、速效磷和有机质等养分含量。曲成闯等同样发现,施用复合微生物肥能提高黄瓜不同生育期潮土土壤过氧化氢酶、脲酶活性^[34]。研究表明,土壤微生物量关系到土壤肥力状况是否良好,它们之间存在显著相关性^[35]。同样,土壤酶活性与土壤微生物关系密切,影响土壤微生物的因素同样影响土壤酶活性^[31]。珊丹等发现,施用微生物菌肥的土壤中可培养细菌、真菌菌落数量均显著高于未施肥处理($P < 0.05$),而且细菌、真菌菌落数量与土壤蔗糖酶、脲酶、过氧化氢酶活性之间有一定的正相关性^[36]。本研究中土壤微生物群落结构变化与过氧化氢酶、蔗糖酶活性显著变化的相关性还需进一步探讨。

土壤微生物类群复杂,微生物群落特征是多种微生物种群协同作用的结果,不能依照单一或某几个种群的变化阐释施肥对有机种植土壤微生物区系的影响,后续研究将进行长期定位连续观测,并对微生物群落特征与土壤化学性质及酶

活性等相关指标进行相关性分析,进一步揭示其影响作用。本研究还发现,根区土壤微生物中未分类或未确定种属的物种受复合微生物肥和有机肥施用的影响,受限于数据库原因,未能解释,有待通过深度测序或利用其他先进手段对这些微生物进行更细致深入的分类研究。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部. 复合微生物肥料: NY/T 798—2015 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [2] 郭振, 王小利, 徐虎, 等. 长期施用有机肥增加黄壤稻田土壤微生物量碳氮[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(5): 1168—1174.
- [3] 孙家骏, 付青霞, 谷洁, 等. 生物有机肥对猕猴桃土壤酶活性和微生物群落的影响[J]. 应用生态学报, 2016, 27(3): 829—837.
- [4] 楼骏, 柳勇, 李延. 高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(15): 256—260.
- [5] Zhang X M, Johnston E R, Liu W, et al. Environmental changes affect the assembly of soil bacterial community primarily by mediating stochastic processes[J]. Global Change Biology, 2016, 22(1): 198—207.
- [6] Guan Y Y, Zhu, Qiang J J, et al. A buried neolithic paddy soil reveals loss of microbial functional diversity after modern rice cultivation[J]. Science Bulletin, 2016, 61(13): 1052—1060.
- [7] 许景钢, 孙涛, 李嵩. 我国微生物肥料的研究及其在农业生产中的应用[J]. 作物杂志, 2016(1): 1—6.
- [8] 国家认证认可监督管理委员会. 中国有机产品认证与有机产业发展(2016) [M]. 北京: 中国质检出版社, 2017: 1—3.
- [9] 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, 2000: 107—109.
- [10] Xu N, Tan G C, Wang H Y, et al. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure[J]. European Journal of Soil Biology, 2016, 74: 1—8.
- [11] Bokulich N A, Mills D A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(8): 2519—2526.
- [12] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957—2963.
- [13] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114—2120.
- [14] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590—D596.
- [15] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261—5267.
- [16] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. The ISME Journal, 2012, 6(8): 1621—1624.
- [17] Pitta D W, Parmar N, Patel A K, et al. Bacterial diversity dynamics associated with different diets and different primer pairs in the rumen of Kankrej cattle[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111710.
- [18] 何芝, 赵天涛, 邢志林, 等. 典型生活垃圾填埋场覆盖土微生物群落分析[J]. 中国环境科学, 2015, 35(12): 3744—3753.
- [19] Chen H, Boutros P C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 35.
- [20] 顾欣, 孙权, 王锐, 等. 菌肥与有机肥配施对拱棚西瓜土壤的改良效果[J]. 干旱地区农业研究, 2017, 35(3): 219—225.
- [21] Schloss P D, Handelsman J. Status of the microbial census[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(4): 686.
- [22] Roesch L F, Fulthorpe R R, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity[J]. ISME Journal, 2007, 1(4): 283—290.
- [23] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335—336.
- [24] 游德, 张立猛, 计思贵, 等. 枯草芽孢杆菌菌剂对烟草根际土壤细菌群落的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(11): 3323—3330.
- [25] 康捷, 章淑艳, 韩韬, 等. 两种麻山药典型病害根际土壤微生物多样性的研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(7): 107—113.
- [26] Timo K, Cristina L F, Frank E. Abundance and biodiversity of soil microarthropods as influenced by different types of organic manure in a longterm field experiment in Central Spain [J]. Applied Soil Ecology, 2006, 33(3): 278—285.
- [27] Diacono M, Montemurro F. Long-term effects of organic amendments on soil fertility: a review[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2010, 30(2): 401—422.
- [28] 李发虎, 李明, 刘金泉, 等. 生物炭对温室黄瓜根际土壤真菌丰度和根系生长的影响[J]. 农业机械学报, 2017, 48(4): 265—270, 341.
- [29] Dipietro A, Gutrella M, Pachlatko J P, et al. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off[J]. Phytopathology, 1992, 82(2): 131—135.
- [30] 庄文颖. 我国丛赤壳类真菌分类研究[J]. 生命科学, 2010, 22(11): 1083—1085.
- [31] 宁川川, 王建武, 蔡昆争. 有机肥对土壤肥力和土壤环境质量的影响研究进展[J]. 生态环境学报, 2016, 25(1): 175—181.
- [32] 汪峰, 李国安, 王丽丽, 等. 减量施氮对大棚黄瓜产量和品质的影响[J]. 应用生态学报, 2017, 28(11): 3627—3633.
- [33] 李瑞霞, 陈巍, 蔡枫, 等. 贵州木霉 NJAU4742 生物有机肥对番茄种植的影响[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(3): 464—472.
- [34] 曲成闯, 陈效民, 韩召强, 等. 施用生物有机肥对黄瓜不同生育期土壤肥力特征及酶活性的影响[J]. 水土保持学报, 2017, 31(6): 279—284.
- [35] 徐阳春, 沈其荣, 冉炜. 长期免耕与施用有机肥对土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响[J]. 土壤学报, 2002, 39(1): 83—90.
- [36] 珊丹, 何京丽, 邢恩德, 等. 微生物菌肥对草原矿区排土场土壤微生物与土壤酶活性的影响[J]. 水土保持通报, 2017, 37(3): 81—85.