

谭 骏, 黄 河, 汤 薇, 等. 蚯蚓粪有机肥对土壤微生物群落的影响[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(20): 228-233.

doi: 10. 15889/j. issn. 1002-1302. 2021. 20. 037

蚯蚓粪有机肥对土壤微生物群落的影响

谭 骏¹, 黄 河², 汤 薇¹, 朱 琳¹, 王冬梅¹

(1. 南宁市农业科学研究所, 广西南宁 530000; 2. 广西大学, 广西南宁 530004)

摘要:将蚯蚓粪有机肥以 0.0、4.5、9.0、13.5、18.0 g/kg 施加到土壤中进行培养, 并种植野菜红枸杞, 待收获后采集根区土壤, 利用高通量测序技术研究添加了不同量蚯蚓粪有机肥的土壤中细菌和真菌多样性以及群落结构。结果表明, 土壤细菌的 OTU(运算的分类单位)数目随着蚯蚓粪有机肥的添加而增加, 添加蚯蚓粪有机肥提高了真菌 OTU 数, 但添加量和提高幅度没有明显趋势。同时, 蚯蚓粪有机肥提高了土壤中细菌和真菌的多样性, 提高幅度较高的处理分别为 E20、E10。此外, 从主成分分析可以看出, 蚯蚓粪有机肥的施加改变了土壤真菌和细菌的群落结构。从门水平看, 细菌主要菌群的丰度没有发生显著的变化, 而真菌优势菌群的变化具有明显的规律; 从属的水平来看, 蚯蚓粪有机肥提高了土壤主要细菌菌群中芽孢杆菌(*Bacillus*)的相对丰度, 真菌主要菌群轮枝菌(除了 E10 处理外)随着蚯蚓粪有机肥添加的增加呈现先上升后下降的趋势。综上所述, 添加蚯蚓粪有机肥能够增加土壤微生物特有物种数目, 并提高益生菌丰度, 对农田土壤的安全利用产生了积极影响。

关键词:蚯蚓粪有机肥; 土壤; 细菌; 真菌; 高通量测序

中图分类号: S158; S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)20-0228-06

有机肥相较于化肥, 是一种来源更广泛、成本更低廉的肥料^[1-2], 在改善土壤性质、提高水土保持和保肥缓冲等方面都具有卓越的成效^[3]。蚯蚓粪有机肥是使用蚯蚓降解畜禽废物后得到的产物, 除了具有很好的孔性、通气性、排水性、保水性外, 还含有丰富的有机质及 N、P、K、Fe、Mn、Zn、Cu、Mg 等多种元素^[4-5]。在减少化肥农药施用量、加强禽畜废弃物资源化利用已成为主流的当下, 使用禽畜废弃物降解后得到的蚯蚓粪有机肥已成为绿色农业发展的趋势^[6]。

蚯蚓粪在养分供应和改善土壤理化性质等方面具有巨大优势, 对于作物生长、产量和品质的提升都能产生巨大的促进作用^[7]。张聪俐等研究表明, 当蚯蚓粪有机肥的施用量在 20% 以下时, 蚯蚓粪有机肥能有效提高玉米的产量和品质, 且添加的量越多, 效果越好^[8]。吕振宇等通过田间试验发现, 蚯蚓粪有机肥配施无机肥可以显著增加甘蓝产量, 并降低甘蓝硝酸盐含量, 提高维生素 C 含量^[9]。

Federico 等通过试验证明, 蚯蚓粪有机肥可增加番茄的株高和果实中碳水化合物含量^[10]。李继蕊等通过盆栽试验研究发现, 黄瓜在使用蚯蚓粪有机肥定植 35 d 后, 株高、茎粗、产量分别增加 31.3%、14.0%、36.7%, 同时果实品质也有显著提升^[11]。

目前对于蚯蚓粪有机肥的研究多集中于提升作物产量与品质等方面, 对于土壤微生物的影响还鲜有报道。在土壤生产力形成的生物进程中, 土壤微生物发挥着重要作用^[12], 它是土壤生态系统持续发挥功能的重要媒介^[13], 是反映与土壤肥力状况的重要指标^[14]。本研究采用盆栽试验的方法, 探究不同添加量蚯蚓粪有机肥对土壤细菌和真菌的影响, 以为未来蚯蚓粪有机肥的推广提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

盆栽试验土壤采自南宁市农业科学研究所蔬菜试验基地。土壤的主要理化性质如下: pH 值为 6.2, 有机质含量为 10.3 g/kg, 速效氮含量为 65.5 mg/kg, 速效磷含量为 15.8 mg/kg, 速效钾含量为 70.2 mg/kg。供试作物由南宁市农业科学研究所提供, 为野菜红枸杞。

1.2 试验设计

试验于 2020 年 7—8 月进行, 设置 5 个处理(表

收稿日期: 2020-11-21

基金项目: 广西南宁市重点研发计划(编号: 20182026)。

作者简介: 谭 骏(1994—), 男, 湖南冷水江人, 硕士研究生, 从事土壤修复研究。E-mail: 845707092@qq.com。

通信作者: 王冬梅, 博士, 高级农艺师, 从事作物遗传育种研究。

E-mail: 807487254@qq.com。

1)。用规格为 50 cm × 30 cm × 25 cm (长 × 宽 × 高) 的花盆装土 10 kg, 种植红枸杞 6 株, 每个处理重复 3 次。置于温室中培养至红枸杞成熟为止。

表 1 试验设计

处理	试验设计
CK	野菜常规种植, 不做任何特殊处理
E10	种植前添加 4.5 g/kg 蚯蚓粪有机肥
E20	种植前添加 9.0 g/kg 蚯蚓粪有机肥
E30	种植前添加 13.5 g/kg 蚯蚓粪有机肥
E40	种植前添加 18.0 g/kg 蚯蚓粪有机肥

1.3 土壤样品采集

种植 1 个月后进行破坏性采样, 将红枸杞连根拔起, 直接采集种植点的根区土壤, -80 °C 保存待用, 然后送至上海美吉生物医药科技有限公司进行后续的 DNA 提取扩增以及高通量测序过程, 测定土壤细菌和真菌的多样性和群落组成。

1.4 测定方法

1.4.1 土壤 DNA 提取 土壤总 DNA 使用试剂盒 (FastDNA[®] Spin Kit for Soil) 提取。DNA 纯度和浓度用分光光度计 (NanoDrop 2000) 检测。DNA 提取质量用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 PCR 扩增与纯化 细菌。使用引物 338F (5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3') 和 806R (5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3') 对 V3 ~ V4 可变区进行 PCR 扩增^[15]。

真菌。使用引物 ITS1F (5' - CTTGGTCATTTAG AGGAAGTAA - 3') 和 ITS2R (5' - GCTGCGTTCTTC ATCGATGC - 3') 对 ITS (内转录间隔区) 可变区进行 PCR 扩增^[16]。

扩增程序。使用的 PCR 仪为 ABI GeneAmp[®] 9700 型。3 min 95 °C 预变性; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 27 次循环; 最后 72 °C 延伸 10 min^[17]。

扩增体系为 20 μL, 4 μL 5 × FastPfu 缓冲液, 2 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 0.8 μL 引物 (5 μmol/L), 0.4 μL FastPfu 聚合酶, 纯水补充至 20 μL; 添加 10 ng DNA 模板。使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit [爱思进生物技术 (杭州) 有限公司] 进行纯化, Tris - HCl (三羟甲基氨基甲烷盐酸盐) 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测。利用 QuantiFluor[™] - ST [普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司] 进行检测定量。最后利用 Illumina (因美纳) 公司的 Miseq PE300 平台进行测序。

1.5 数据分析

高通量测序的数据处理及作图均在上海美吉生物医药科技有限公司云平台上完成。

2 结果与分析

2.1 不同处理对微生物多样性的影响

由图 1 可知, 添加蚯蚓有机肥土壤细菌和真菌 OTU (运算的分类单位) 总数分别为 4 012、220 个, 与 CK 相比, 添加蚯蚓有机肥能增加土壤细菌 OTU 数, 且呈现出添加的蚯蚓有机肥越多, 细菌 OTU 数越多的趋势, 但是对真菌 OTU 数的影响没有呈现出明显的规律。另外, 各处理土壤中细菌共同包含的 OTU 数为 1 545 个, 占总 OTU 数的 38.51%; 真菌共同包含的 OTU 数为 97 个, 占总 OTU 数的 44.09%。CK、E10、E20、E30、E40 处理土壤细菌特有 OTU 分别为 101、64、71、69、90 个, 真菌特有 OTU 分别为 6、3、7、2、10 个, 这表明添加蚯蚓有机肥使土壤中细菌和真菌特有的 OTU 数目增多。

从样本中随机抽取一定数量的读数 (reads), 统计这些序列对应样本的 OTU, 以读数为横坐标, OTUs 为纵坐标, 所得曲线即为稀释曲线^[18], 结果见图 2。读数在 10 000 以下时, 细菌和真菌的 OTUs 都随着读数增加而迅速提高; 而在读数从 10 000 增加到 30 000 这个过程中, 细菌和真菌的 OTUs 增长速度放缓; 当读数超过 30 000 后, 细菌和真菌的 OTUs 趋于平缓。这说明本次测序对土壤中微生物的检测比率接近饱和, 土壤中绝大部分样本目前的测序量都能够覆盖。另外, E40 处理土壤真菌 OTUs 最多, 细菌 OTUs 最多的是 E30 处理, 但与 E40 处理的差别不大, 总的来说添加蚯蚓粪有机肥能提高土壤中微生物 OTUs 的水平, 其中 E40 处理的最好。

Shannon (香农) 指数是评价微生物多样性的重要指标, 其数值越大, 则物种多样性越高, 在本研究中细菌和真菌 Shannon 多样性指数结果见图 3。对于土壤细菌来说, CK、E10、E20、E30 和 E40 处理的多样性指数分别为 6.59、6.53、6.63、6.59 和 6.62, 各处理之间并无明显差别; 对于真菌来说这 5 个处理相应的多样性指数分别为 2.00、2.62、1.60、2.13 和 2.99, 其中 E10、E30 和 E40 处理土壤真菌多样性要高于 CK, 而 E20 处理的多样性指数则要明显低于 CK。总的来说, 添加蚯蚓粪有机肥提高了土壤中细菌和真菌的多样性, 综合来看, 添加量为 18.0 g/kg 时的效果最好。

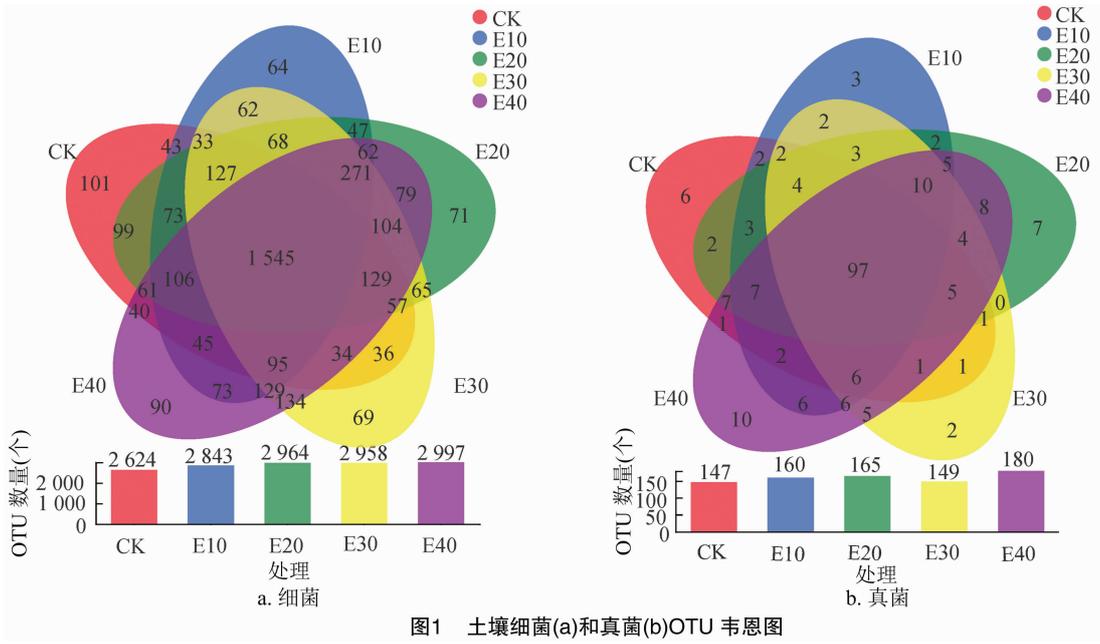


图1 土壤细菌(a)和真菌(b)OTU 韦恩图

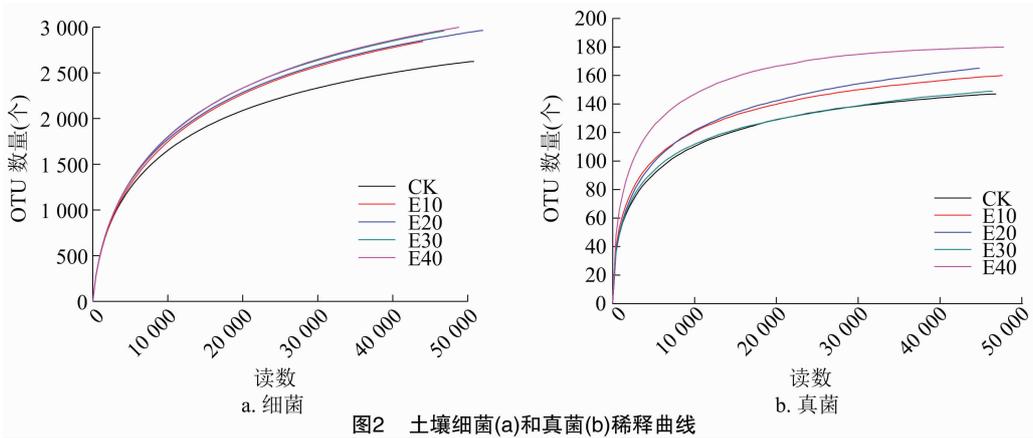


图2 土壤细菌(a)和真菌(b)稀释曲线

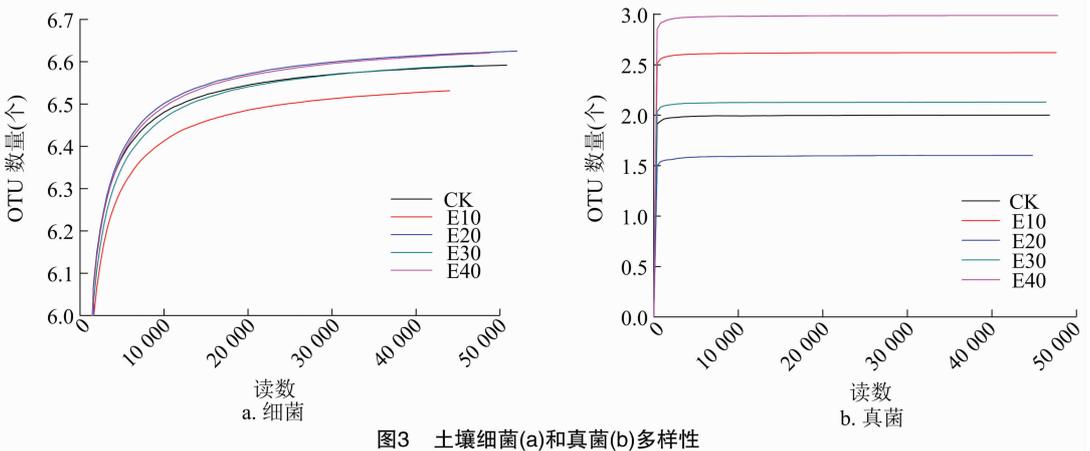


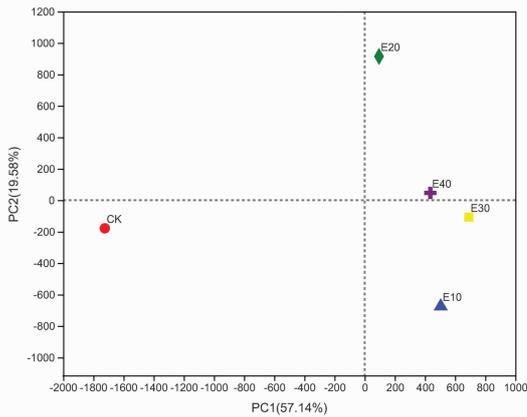
图3 土壤细菌(a)和真菌(b)多样性

进一步利用主成分分析来探讨蚯蚓粪有机肥对土壤细菌和真菌的影响,结果见图 4。对于土壤细菌,PC1 轴和 PC2 轴分别表示不同群落间 57.14% 和 19.58% 的变异度,其中,E20 和 E40 处

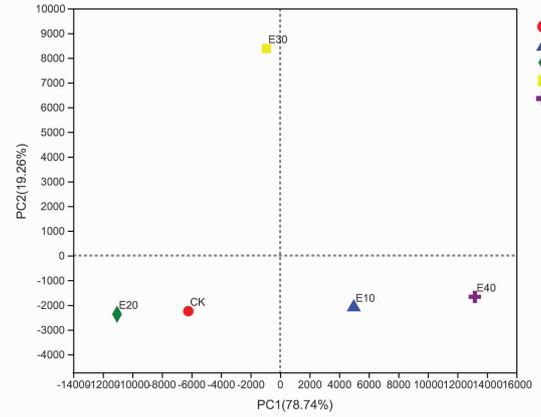
理位于第 I 象限,E30 和 E10 处理位于第 IV 象限,CK 远离其他处理独自处于第 III 象限。对于土壤真菌,PC1 轴和 PC2 轴分别表示不同群落间 78.74% 和 19.26% 的变异度,其中 E20 处理和 CK 位于第 III

象限, E10 和 E40 处理位于第Ⅳ象限, E30 处理独自位于第Ⅱ象限。综上所述, 添加蚯蚓有机肥对土壤细菌和真菌的群落构成都会产生明显的影响, 且改

变蚯蚓有机肥的添加量对土壤真菌群落构成的影响大于细菌, 可能是由土壤中真菌群落的稳定性不如细菌所造成的。



a. 细菌



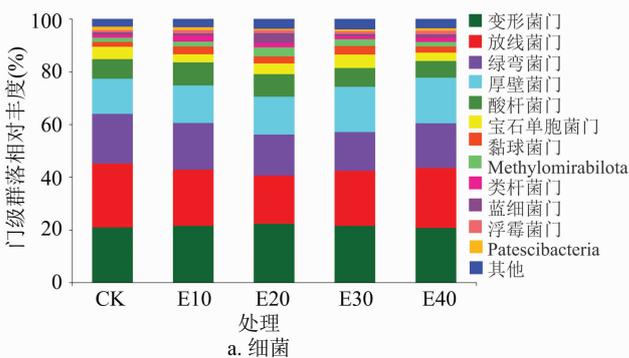
b. 真菌

图4 基于 OUT 水平的土壤细菌(a)和真菌(b)主成分分析

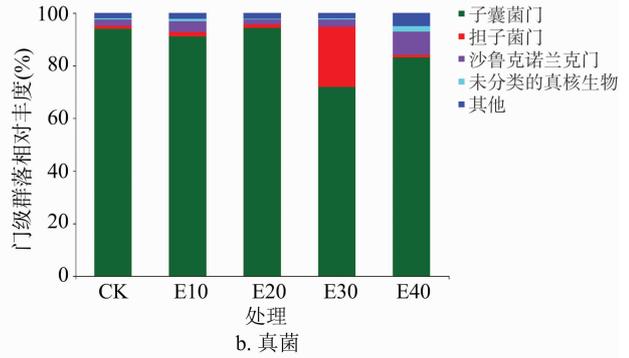
2.2 不同处理对土壤微生物群落结构的影响

土壤中细菌和真菌的群落组成如图 5 所示, 可知在门分类水平上不同添加量蚯蚓有机肥处理下细菌和真菌的群落组成及相对丰度。由图 5 - a 可知, 在门分类水平上, 各处理土壤细菌群落和优势物种的组成基本相同, 但是平均相对丰度存在一定差异。在对照 CK 中, 放线菌门为最优势门, 相对丰度所占比例为 24.30%。随着蚯蚓有机肥添加量的增加, 酸杆菌门相对丰度呈现先减小后增加的趋势。

势。绿弯菌门和厚壁菌门也表现出相同趋势。而门的相对丰度则表现出先增加后减小的趋势。由图 5 - b 可知, 在门分类水平上, 各处理土壤真菌中子囊菌门为最优势门, 相对丰度高达 71.94% ~ 91.35%。另外, 在门分类水平上, 各处理土壤真菌的种类远远小于细菌, 且相对丰度的变化也没有呈现明显的规律。这可能是因为土壤中的真菌数量较少, 容易受到环境因素的影响。



a. 细菌



b. 真菌

图5 门水平土壤细菌(a)和真菌(b)的群落结构

在属的分类水平上, 各处理土壤细菌和真菌的群落组成及相对丰度见图 6。土壤细菌芽孢杆菌属、Viciniabacterales、鞘氨醇菌属、JG30 - KF - CM45、Gemnicoccaceae、Viciniabacteraceae、Rokubacteriales、Gemmatimonadaceae 较为丰富。与对照 CK 相比, 不同添加量的蚯蚓有机肥处理均能提高土壤中芽孢杆菌属的相对丰度, E30 处理效果最好, 芽孢杆菌属的相对丰度提升至 8.78%。另外, 在属分类水平上, 各处理土壤真菌的群落构成基本相同, 轮枝孢菌

属为最优势属, 相对丰度达 19.38% ~ 72.15%, 最高值出现在 E20 处理中。但是, 在属分类水平上, 各处理土壤真菌相对丰度的变化没有规律, 这与门分类水平中土壤真菌相对丰度的表现一致。

3 讨论与结论

蚯蚓粪有机肥是一种优质生物肥, 可以有效修复被污染土壤和改善土壤肥力, 并抑制某些植物病害^[19]。由于蚯蚓菌肥自身的特点, 当其进入土壤后

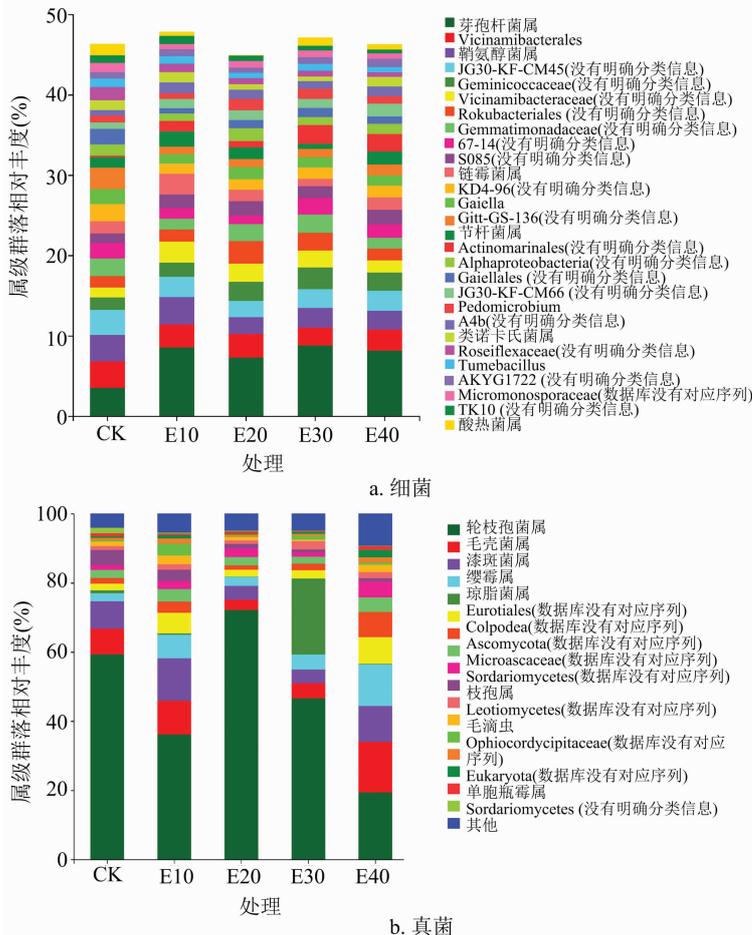


图6 属水平土壤细菌(a)和真菌(b)的群落结构

也相应地改变了土壤中微生物的群落结构和活性。土壤微生物在土壤养分的转化和循环过程中起到了推动作用^[20],是构成土壤肥力关键的组成部分,在调节植物生长发育、抑制病害微生物生长的同时,还可以促进植物所需营养元素的循环、土壤肥力的保持及能量的转化^[21]。

在本研究中,当蚯蚓菌肥进入土壤后,土壤OTU数增加,添加蚯蚓菌肥的土壤特有的OTUs数目也要高于空白对照,这一方面是由于蚯蚓菌肥进入土壤后,改变了土壤环境,增加了土壤营养,并影响了土壤中原有微生物的互作,从而使得随着时间的增加而灭亡部分的微生物数目减少;另一方面可能是由于蚯蚓菌肥自身带有部分特有的微生物,这部分微生物进入土壤后,成为土壤微生物区系的一部分,从而使得土壤中特有的OTUs数目增加。

而对于土壤细菌和真菌的多样性指数来说,添加13.5、18.0 g/kg蚯蚓菌肥的土壤的细菌和真菌的多样性指数要高于CK;添加量为4.5 g/kg的处理降低了细菌的多样性指数,而增加了真菌的多样性指

数;添加9.0 g/kg的处理增加了细菌的多样性指数,而降低了真菌的多样性指数。这说明高添加量的处理能够提供充足的营养物质,各种类的微生物均能获得充足的营养元素,从而提高微生物的多样性,前人研究也证明,添加菌肥能够提高土壤的有机质和养分水平,从而提高土壤微生物的数量和活性^[22]。而低添加量的处理对于土壤中细菌和真菌的影响不一,这有可能是由于在低水平的添加量下,土壤中的营养物质并没有特别明显的提高,在这种情况下,对于微生物互作的趋势并不一致,可能是增加了土壤微生物之间对于能源物质的竞争,使部分劣势微生物消亡,从而降低了微生物的多样性,添加有机肥改变了土壤中营养物质的含量和组成比例,从而改变了微生物之间的稳态及其交互作用^[23],并有可能加剧其竞争关系。

由主成分分析可知,添加蚯蚓菌肥显著地改变了细菌的群落结构,而真菌的群落结构并无明显的改变,添加蚯蚓菌肥微生物的群落分布特征会随着土壤环境的改变而改变,而不同的微生物群落有着

不一样的生态功能。其中芽孢杆菌属细菌具有较强的防病促生和抗逆能力,能够促进植物生长、增强植物抗逆性^[24-25],在农业生产研究中被广泛应用,有着较高的经济价值^[26]。在本研究中,添加蚯蚓粪有机肥能有效提高土壤中芽孢杆菌属细菌的相对丰度,这说明蚯蚓粪有机肥是通过影响土壤中芽孢杆菌属细菌的途径来提高作物产量和增强作物抗逆性的。对于真菌来说,子囊菌门真菌具有降解有机物质作用,通常在有机质含量高的土壤中含量丰富^[27]。在本研究中,子囊菌门是相对丰度最高的门,而添加了蚯蚓粪有机肥对其的丰度没用明显的提高,甚至出现降低的现象,这可能由原土壤中的有机质含量较高所致。

本研究表明添加蚯蚓粪有机肥能够提高土壤中细菌和真菌的特有物种的数目,并且能够提高其多样性指数。总的来说,添加 18.0 g/kg 蚯蚓粪有机肥的效果最好。此外,添加蚯蚓粪有机肥提高了土壤中芽孢杆菌属细菌的丰度,这类细菌具有提高作物产量和增强作物抗逆性的作用,可作进一步研究。

参考文献:

- [1] Farrell M, Perkins W T, Hobbs P J, et al. Migration of heavy metals in soil as influenced by compost amendments [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(1): 55-64.
- [2] Bolan N S, Duraisamy V P. Role of inorganic and organic soil amendments on immobilisation and phytoavailability of heavy metals: A review involving specific case studies [J]. *Australian Journal of Soil Research*, 2003, 41(3): 533-555.
- [3] 王元元, 李超, 刘思超, 等. 有机肥对水稻产量、品质及土壤特性的影响研究进展 [J]. *中国稻米*, 2019, 25(1): 15-20.
- [4] 刘大伟, 陈井生, 王芳, 等. 蚯蚓粪在农业生产中的应用研究进展 [J]. *湖北农业科学*, 2019, 58(14): 8-11.
- [5] 刘磊, 刘丽云. 新型有机肥蚯蚓粪的性质及应用简介 [J]. *农家参谋*, 2019(20): 71.
- [6] 张晓绪, 张嘉伟, 孙星星, 等. 蚯蚓粪对镉在土壤-水稻系统中迁移转化影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(8): 1723-1733.
- [7] 单颖, 赵凤亮, 林艳, 等. 蚯蚓粪对土壤环境质量和作物生长影响的研究现状与展望 [J]. *热带农业科学*, 2017, 37(6): 11-17.
- [8] 张聪刚, 戴军, 周波, 等. 不同比例蚯蚓粪对玉米生长以及土壤肥力特性的影响 [J]. *华南农业大学学报*, 2013, 34(2): 137-143.
- [9] 吕振宇, 马永良. 蚯蚓粪有机肥对土壤肥力与甘蓝生长、品质的影响 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21(12): 236-240.
- [10] Federico A, Gutierrez M, Jorge S B, et al. Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 2781-2786.
- [11] 李继蕊, 史庆华, 王秀峰, 等. 不同配比蚯蚓堆肥和牛粪堆肥对根际微环境及黄瓜产量、品质的影响 [J]. *山东农业科学*, 2013, 45(6): 66-70.
- [12] Zhao S, Liu D Y, Ling N, et al. Bio-organic fertilizer application significantly reduces the *Fusarium oxysporum* population and alters the composition of fungi communities of watermelon *Fusarium* wilt rhizosphere soil [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(5): 765-774.
- [13] 郝文英. 中国农业百科全书: 土壤卷 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [14] 邹莉, 袁晓颖, 李玲, 等. 连作对大豆根部土壤微生物的影响研究 [J]. *微生物学杂志*, 2005, 25(2): 27-30.
- [15] 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.
- [16] Lu L H, Yin S X, Liu X, et al. Fungal networks in yield-involving and -debilitating soils induced by prolonged potato monoculture [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 65: 186-194.
- [17] Qu M J, Li N, Li H D, et al. Phytoextraction and biodegradation of atrazine by *Myriophyllum spicatum* and evaluation of bacterial communities involved in atrazine degradation in lake sediment [J]. *Chemosphere*, 2018, 209: 439-448.
- [18] Amato K R, Yeoman C J, Kent A, et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes [J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(7): 1344-1353.
- [19] 范延夏. 蚯蚓粪有机肥的应用 [N]. *山东科技报*, 2020-07-24(4).
- [20] 李云, 孙波, 李忠佩, 等. 不同气候条件对旱地红壤微生物群落代谢特征的长期影响 [J]. *土壤*, 2011, 43(1): 60-66.
- [21] 武晓森, 杜广红, 穆春雷, 等. 不同施肥处理对农田土壤微生物区系和功能的影响 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(1): 99-109.
- [22] 王梦雅, 符云鹏, 贾辉, 等. 不同菌肥对土壤养分、酶活性和微生物功能多样性的影响 [J]. *中国烟草科学*, 2018, 39(1): 57-63.
- [23] Gao C H, Cao H, Cai P, et al. The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity [J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(1): 29-40.
- [24] 陈志谊, 刘永峰, 刘卮洲, 等. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展 [J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(5): 999-1006.
- [25] 张猛, 王琼, 冯发运, 等. 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌防治西瓜枯萎病 [J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(6): 1308-1315.
- [26] 刘国红, 林乃铨, 林营志, 等. 芽孢杆菌分类与应用研究进展 [J]. *福建农业学报*, 2008, 23(1): 92-99.
- [27] Guo J, Liu W, Chen Z. Bacterial rather than fungal community composition is associated with microbial activities and nutrient-use efficiencies in a paddy soil with short-term organic amendments [J]. *Plant Soil*, 2017, 424: 335-349.