

不同栽培环境下有机与常规蔬菜土壤的 细菌群落多样性差异

叶 俊, Pablo Gonzalez Perez, 王小丽, 黄丹枫*

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘 要:土壤细菌群落在蔬菜栽培中发挥着重要作用。基于 DNA 和 RNA 水平,利用 PCR-DGGE 技术研究了不同栽培环境下有机与常规蔬菜土壤细菌群落多样性差异,以及土壤理化性质与细菌群落多样性的关系。结果表明:不同栽培方式下土壤细菌多样性存在明显差异,土壤微生物的优势种群和数量受有机、常规栽培和季节影响,有机栽培较之常规栽培能够显著增加土壤细菌群落多样性;聚类分析表明,16S rDNA 细菌群落多样性与季节相关,而 16S rRNA 细菌群落多样性与栽培方式相关;差异条带测序显示,大多细菌与不可培养细菌种属有较高同源性,其余 9 种推测属于假单胞菌属;CCA 分析说明 pH 是影响土壤细菌群落多样性的主要因素,有机栽培土壤中微生物生物量 C、N 以及有机质含量显著高于常规栽培土壤。综上,有机栽培能够丰富活性细菌群落多样性,具有土壤优化效应。

关键词:蔬菜土壤;有机栽培;常规栽培;温室;露地;PCR-DGGE;细菌多样性

中图分类号:S154.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)04-0728-08

Bacterial Community Diversity of Vegetable Soils in Organic and Conventional Managements Under Different Cultivated Environments

YE Jun, Pablo Gonzalez Perez, WANG Xiao-li, HUANG Dan-feng*

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China)

Abstract: Bacterial community plays a significant role in vegetable cultivation. In this study, PCR-DGGE method was used to study patterns of bacterial community diversity under organic versus conventional management in horticultural soil based on 16S rDNA/rRNA. Also its relationship with soil physicochemical properties was researched. The results indicated that soil bacterial diversity has a significant change under different managements and sample period as analysis DGGE gels. Moreover, the abundance of each dominant band varied among each treatment during sample period. On the other hand, by observing 16S rRNA DGGE fingerprint we found that there is less variability than 16S rDNA fingerprint has, and 16S rRNA DGGE fingerprint can be grouped separately in terms of organic and conventional management by UPGMA. Additionally, analysis of 16S rDNA DGGE fingerprint indicated a seasonal influence on bacterial community. From 26 different bands which were excised from DGGE gel, the result showed us that there were 9 bands belong to *Pseudomonas* and the rest of bands belong to uncultured bacterium clones. Shannon-Wiener index showed organic management promoted bacterial diversity of soil more intensively than conventional management does. According to the figure drew by CCA, it points out soil pH is the strongest environmental factor which can influence soil bacterial diversity. Meantime, the level of microbial mass C, N and organic matter had a significant increase under organic management. On the other side, it indicated that soil of greenhouse had a higher humidity than soil from open field. During the same period, pH value was higher in organic management soil than it under conventional management virtually. In sum, organic management can diversify active bacterial community and have beneficial ecological effects.

Keywords: vegetable soils; organic management; conventional management; greenhouse; open field; PCR-DGGE; bacterial diversity

收稿日期:2011-11-03

基金项目:上海市科委设施蔬菜清洁高效生产与环境质量保障技术研究与示范项目(09391910400);上海市农委设施园艺高效生态生产关键技术研究示范项目(沪农科攻字 20080803,沪农推字 20090102);农业部行业项目(200903056);上海市蔬菜学重点学科项目(B209)

作者简介:叶 俊(1987—),男,江西景德镇人,硕士研究生,主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail:yejun19871113@hotmail.com

* 通讯作者:黄丹枫 E-mail:hdf@sjtu.edu.cn

较之常规农业,有机农业通过自然和生态的理念对农业生产进行管理,使得土壤具备优良的质量而易于作物的生长^[1]。有机栽培中禁止施用化学肥料和杀虫剂,强调合理的种植制度和病虫害的生态学管理^[2]。而传统常规农业中大量的生产投入(化肥和农药等)使土壤生态系统不断变化并日趋脆弱,最终导致农业生产的可持续发展受到土壤质量退化的限制。使得有机栽培与常规栽培土壤在肥力水平、病害程度、作物产量等方面存在差异^[3]。通过研究微生物多样性以了解这些差异的发生机制成为近年来的热点之一^[4-5]。土壤微生物是土壤中最活跃的生物因子,其在土壤养分循环、有机物质形成和分解、肥力的保持和提高、植物的生长发育、生态环境的改善和作物病虫害防治等方面均起着极其重要的作用^[6]。为了能更科学合理的利用土壤,提高蔬菜产量和品质并最大限度的减小农业栽培方式对环境造成的负面影响,研究不同农业栽培方式对蔬菜土壤微生物群落结构的影响是至关重要的。但传统的平板培养法只能分离土壤微生物种类的 1%~10%,这对于了解土壤微生物与其所处土壤环境间的关系是远远不够的。随着分子生物学方法的发展使得微生物群落多样性的研究更加高效与全面,1993 年 Mueyzer 将 DGGE 技术首次应用于微生物生态学研究^[7],随后该技术在微生物多样性的研究中得到广泛的应用。

徐永刚等通过 PCR-DGGE 技术证明长期施用化肥降低了潮棕壤细菌种群结构多样性^[8]。吴凤芝等通过研究轮套作对温室黄瓜根际细菌多样性影响,指出轮套作对其多样性指数以及均匀性指数均有一定影响^[9]。这些研究主要集中在施肥水平及不同作物对土壤细菌种群多样性的影响方面,而关于不同栽培方式对土壤细菌种群多样性的影响研究则较少。除此之外,对土壤细菌多样性的研究多集中于 DNA 水平,从 RNA 水平探究土壤细菌多样性几乎是空白。细菌 DNA 水平多样性所反映的是一段时间内处于活性状态和非活性状态下细菌的种群信息,而通过细菌 RNA 水平多样性分析,能够去除非活性状态微生物信息,只包含活性微生物的信息。这样能够更清晰地认识诸如土壤养分、环境条件等变化对土壤中细菌群落多样性的影响^[10]。

本研究通过对温室及露地环境下有机和常规栽培蔬菜土壤进行多季节采样,并分别提取土壤微生物 DNA 和 RNA,利用 PCR-DGGE 技术阐明有机和常规栽培对蔬菜种植土壤细菌群落多样性的影响以及其

与土壤相关理化指标的关系。为蔬菜有机生产系统土壤微生物多样性评价,以及合理规划农业管理制度提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究地区概况

本实验在上海崇本堂农场进行,该地位于上海市松江区叶榭镇(30°57'N,121°21'E),北距黄浦江约 2.5 km,南距杭州湾约 23 km。属亚热带湿润气候,海拔 4 m,年平均降雨量为 1 550 mm,70%发生在 5—9 月之间,年平均气温为 17.5 °C,年平均日照时间为 1 778 h。供试土壤由冲击土发育演变而来,40 cm 以上土层成分为:9.3%沙质、70.7%淤泥、20%粘土。其中有机地块已有 5 a 有机栽培历史(不包含 1 a 转换期),并经南京国环有机产品认证中心认证(证书号:OF-3106-931-044C)。实验地初始主要理化性质见表 1。

表 1 取样地土壤主要理化性质

Table 1 Main properties of sampled area

采样深度/cm	pH	EC/ μS·cm ⁻¹	全碳/ g·kg ⁻¹	全氮/ g·kg ⁻¹	有机质/ g·kg ⁻¹	有效磷/ mg·kg ⁻¹
0~20	6.9±0.1	638.4±28	18.2±0.1	1.7±0.1	7.68±0.5	28.7±0.2

注:Mean ± SE, n=3, 下同。The same below.

本实验共包括 4 个处理:有机温室栽培(GO),每年 5 茬,年有机肥施用量为 120 000 kg·hm⁻²;有机露地栽培(LO),每年 3 茬,年有机肥施用量为 112 500 kg·hm⁻²;常规温室栽培(GC),每年 5 茬,年化肥施用量为复合肥(N:P:K 14:16:15)4 000 kg·hm⁻²,尿素 1 200 kg·hm⁻²;常规露地栽培(LC),每年 3 茬,年化肥施用量为复合肥(N:P:K=14:16:15)4 000 kg·hm⁻²,尿素 1 200 kg·hm⁻²。小区面积 90 m²,采取杭白菜、花菜、包心菜轮作。

1.2 土壤样品的采集

分别于 2010 年 2 月 16 日、7 月 15 日、11 月 10 日定点采样。各处理 3 次重复,用取土器(内径 4 cm)按 S 形取 0~20 cm 土层 8 点混合。取样后去除可见植物残渣,立刻存于自封袋内,放于事先准备好的冰盒中带回实验室。将新鲜土壤混匀过 2 mm 筛,一部分存于-20 °C 用于微生物碳氮测定;一部分存于-80 °C 用于提取 DNA/RNA;一部分自然风干用于测定其他理化性质。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤理化性质的测定

土壤 pH 测定:用风干土按照土液比 1:2, 20 mL 0.01 mol·L⁻¹CaCl₂ 浸提 30 min, 静置 1 h 后用 pH 计测定悬浮液^[1]。土壤 EC 测定:用风干土按照土液比 1:5, 50 mL 超纯水振荡 3 min 后, 采用 EcoScan 便携式电导率仪(Eutech, 新加坡)测定。土壤含水率测定:采用双极平衡法, 每个样品分别称量 1 g 和 10 g 置于 105 °C 烘箱中至恒重, 计算每个样品损失重量, 两级相加求平均值, 此为土壤含水率^[2]。全碳及全氮的测定:使用风干土(过 0.25 mm 筛), 采用元素分析仪(Elementar Vario EL III, 德国)测定。有机质测定:使用风干土(过 0.25 mm 筛), 采用重铬酸钾氧化还原滴定法测定^[12]。微生物碳、微生物氮使用鲜样, 采用氯仿熏蒸提取法测定^[12]。

1.3.2 土壤 DNA/RNA 提取及 cDNA 合成

用于核酸提取的土壤样品为各处理下 3 个重复土样均匀混合而成。土壤微生物 DNA 提取及纯化使用 E.Z.N.A.TM Soil DNA Kit(OMEGA, 美国); 土壤微生物 RNA 提取及纯化使用 E.Z.N.A.TM Soil RNA Kit(OMEGA, 美国)。DNA/RNA 浓度及纯度鉴定使用微量紫外分光光度计 NanoDrop1000(Thermo Fisher Scientific, 美国)。cDNA 合成使用 PrimeScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(Takara, 大连)。

1.3.3 样品 PCR 扩增

采用细菌 16S rDNA 基因 V6~V8 区段具有特异性的 PCR 引物 968-GC 和 1401r^[13] 对土壤 DNA 和 cDNA 进行扩增。PCR 反应体系为 50 μL, 其中包含: 1 μL 模板 DNA、5 μL 10×反应缓冲液、0.2 mmol DNTp、5 μL 3%牛血清蛋白、2.5 μL 二甲基亚砷、正反向引物各 5 mmol、0.5 U 热启动 Ex taq DNA 聚合酶(Takara, 大连)、30 μL 灭菌双蒸水。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 15 min; 35 个循环为 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s; 最后在 72 °C 下延伸 10 min。PCR 扩增片段长约 450 bp。

1.3.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

使用 D-Code 基因突变检测系统(Bio-Rad Laboratories Inc, USA)对 PCR 产物进行 DGGE 分析。采用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度为 30%~60%(100% 变性剂为 7 mol·L⁻¹ 尿素和 40% 的去离子甲酰胺混合物), 1×TAE 作为电泳缓冲液, 每孔上样量为 40 μL PCR 产物与加样缓冲液的混合溶液, 电压 60 V, 温度 60 °C, 电泳 15 h。电泳完毕后, 取凝胶进行银染^[14]。最后使用 Epson Perfection V750 Pro(Epson, 日本)扫描仪获取图像。

1.3.5 细菌 16S rDNA 和 16S rRNA 片段的克隆和测序

将目的条带切下后, 放入 1.5 mL 离心管中研磨, 而后加入 20 μL 灭菌双蒸水并进行沸水浴 5 min, 4 °C 过夜, 重复 1.3.3 和 1.3.4 步骤以确定切下条带是否为单一条带。而后按照前述方法处理目的条带, 取 1 μL 作为模版, 以 968f(不含 GC 夹)和 1401r 作为引物再次进行 PCR 扩增, PCR 反应体系以及扩增程序同 1.3.3。然后对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳, 使用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit(Takara, 大连)对目的片段进行回收纯化。纯化产物与 pMD[®] 19-T Vector(Takara, 大连)连接过夜后, 转化 DH5α 感受态细胞(Takara, 大连), 挑取白斑筛选阳性克隆, 将筛选到的阳性克隆进行测序。

1.3.6 数据处理

利用 Quantity One 软件(Bio-Rad Laboratories Inc, USA)对 DGGE 图谱进行数字化处理, 并使用非加权组算术平均法(Unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)对 DGGE 图谱进行聚类分析; 土壤微生物群落多样性采用 Shannon-Wiener 指数(H')、Pielou 均匀度指数(E')和 Margalef 丰富度指数(D)进行评价^[15]。计算公式为:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i = \sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln (N_i/N)$$

$$E' = H'/\ln S$$

$$D = (S-1)/\ln N$$

其中: P_i 为某一条带的光密度值(N_i)与同泳道中所有条带总光密度值(N)的比值; S 为每一泳道的总条带数。

利用 NCBI 的 BLAST 程序进行序列同源性比较, 本文中测序序列均已上传 GeneBank, 登录号为 JN583455~JN583475; 使用 Canoco 4.51 进行典型对应分析; 试验数据使用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 有机与常规栽培对土壤理化性质的影响

由表 2 可以看出, 不同栽培方式下土壤理化性质产生显著差异。在含水率方面温室栽培土壤高于露地栽培土壤, 而有机栽培与常规栽培无显著差异; 其次常规温室栽培(GC)和有机温室栽培(GO)土壤 EC 值高于常规露地栽培(LC)和有机露地栽培(LO)土壤, 表明温室栽培中表土的盐分积累问题较露地栽培严重; 从整个取样期间土壤 pH 的动态变化来看, LC 和 GC 土壤 pH 变化幅度很小, 而 LO 和 GO 土壤变化幅

度较大。这可能是由于对比营养成分相对单一的无机化肥,有机肥包含多样化的营养成分使得土壤在响应不同作物根系分泌物、气候环境变化时有更广泛的适应范围。各栽培方式土壤的总碳、总氮含量比较稳定,温室土壤总碳、总氮含量皆表现高于露地土壤,而各土壤碳氮比并无显著差异,均在 0.8~0.9 之间;GO 和 LO 土壤微生物生物量碳、微生物生物量氮以及有机质含量显著高于 GC 和 LC。这说明有机栽培中有机肥的施用给土壤带进大量有机态营养,较之常规栽培中施用化肥更能促进微生物的生长。总之,有机栽培显著改善土壤养分状况,并且有机栽培土壤 pH 适应性较常规土壤高。

2.2 细菌 16S rDNA 基因的 PCR-DGGE

4 种栽培方式下不同时期土壤样品 16S rDNA 片段的 DGGE 结果如图 1-I 所示,可以看出 12 个供试土壤条带类型出现明显差异。其中 A、B、D、E、F 为 12 个供试土壤所共有条带,说明在不同栽培方式以及取样期下细菌优势菌群结构基本保持一致,但根据取样期以及栽培方式的不同它们的亮度发生了明显变化,而且各土壤样品中出现了自己的特征条带。

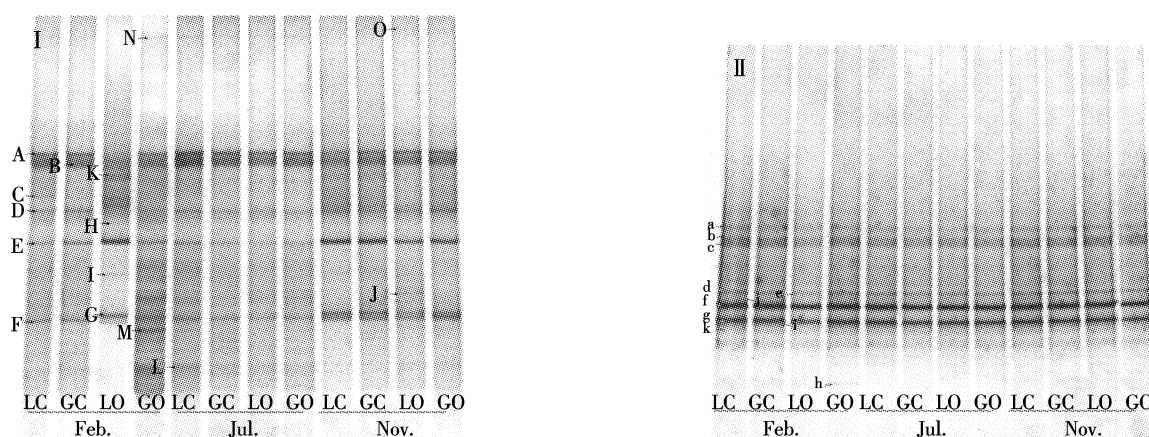
在 DGGE 图谱中,处于不同位置的每条带及其相对浓度(亮度)代表微生物群落中某一特定微生物种及其在群落中的相对丰度^[6]。因此,认为不同栽培方式以及取样时间在一定程度上对土壤中优势菌群在

表 2 不同栽培方式下土壤理化性质

Table 2 Physical-chemical properties of soil under different cultivation patterns

理化性质	2月16日				7月15日				11月10日			
	LC	GC	LO	GO	LC	GC	LO	GO	LC	GC	LO	GO
Humidity/%	21.7±1.0bc	24.3±1.0a	22.5±1.4ab	22.8±1.8abc	16.9±0.2e	20.5±0.5bed	16.7±2.5e	22.9±1.4ab	19.3±0.8de	20.2±2.1cd	20.4±1.1bcd	20.1±3.3cd
pH	7.1±0.1b	7.0±0.3bc	6.8±0.3c	7.5±0.4a	7.1±0.3b	7.0±0.1bc	7.1±0.1b	7.2±0.2b	7.0±0.5bc	7.0±0.3bc	7.4±0.1a	7.3±0.1ab
EC/μS·cm ⁻¹	638.5±71.5d	758.5±45.9bc	620.4±90.1d	841.3±52.3b	564.2±125.3d	786.2±148.2bc	721.3±80.5bc	843.1±30.4b	552.8±186.0d	845.0±54.9b	660.7±45.0cd	965.0±21.2a
TC/g·kg ⁻¹	2.0±0.1cd	2.5±0.1bc	1.7±0.2d	2.8±0.3ab	1.8±0.1d	2.3±0.1c	1.6±0.2d	2.8±0.3ab	1.9±0.3d	2.5±0.3bc	1.6±0.3d	2.9±0.1a
TN/g·kg ⁻¹	2.5±0.4de	2.8±0.4cd	2.2±0.3e	3.5±0.3a	2.2±0.2e	2.8±0.2bcd	1.9±0.1e	3.2±0.3abc	2.4±0.3de	2.8±0.2bcd	2.0±0.6e	3.3±0.1ab
C/N	0.8±0.1a	0.9±0.1a	0.8±0.1a	0.8±0a	0.8±0.1a	0.8±0.1a	0.8±0.1a	0.9±0.1a	0.8±0.2a	0.9±0a	0.9±0.3a	0.9±0a
MBC/mg·kg ⁻¹	65.3±2.5bc	40.1±3.2c	75.6±5.6b	134.2±21.4a	60.2±4.1bc	48.4±8.7c	95.6±11.3ab	94.5±14.5ab	53.4±10.4c	44.3±9.5c	99.4±17.5ab	125.9±18.8a
MBN/mg·kg ⁻¹	7.9±1.3d	7.5±1.4d	18.5±2.1bc	29.5±3.5b	8.4±2.1d	7.8±1.3d	25.6±7.8b	23.9±9.2bc	6.3±1.2d	8.9±1.6d	11.6±1.3cd	44.8±11.3a
OM/g·kg ⁻¹	19.5±2.8b	19.4±1.6b	20.4±1.4b	38.5±2.3a	18.5±2.1b	21.2±2.4b	30.5±1.5ab	35.3±4.1a	20.4±1.5b	17.9±3.9b	27.7±2.3ab	34.2±3.3a

注:不同字母表示差异显著水平($P<0.05$), Letters showed significant difference ($P<0.05$). Humidity: 含水率; TC: 总碳; TN: 总氮; C/N: 碳氮比; MBC: 微生物生物量碳; MBN: 微生物生物量氮; OM: 有机质; LC: 常规露地; GC: 常规温室; LO: 有机露地; GO: 有机温室。



字母标记条带为测序条带, I 为 16S rDNA, II 为 16S rRNA

Labeled bands were chosen for sequencing, I : 16S rDNA, II : 16S rRNA

图 1 不同管理措施下土壤细菌 16S rDNA/16S rRNA DGGE 图谱

Figure 1 DGGE profiles of 16S rDNA/16S rRNA fragments amplified from DNA under different cultivation pattern

群落中所占比例产生显著影响。例如:在 4 种不同栽培方式下土壤样品优势菌群所代表条带的亮度明显不同;11 月份土壤样品中优势菌群亮度明显高于 7 月份土壤样品。同时不同栽培方式以及取样时间对土壤细菌多样性也有影响。例如:2 月份土壤样品在不同栽培方式下,LC 出现特征条带 C;LO 出现特征条带 G、H、I、K;GO 出现特征条带 M。11 月份土壤样品较之另外两个月土壤样品在优势菌群 F 上方都出现了一条新特征带,并与 2 月份 LO 的特征带 G 具有相同的迁移率。同时对不同取样期下 4 种栽培方式细菌群落的多样性指数 H' 求平均数(数据未列出)发现 7 月份土壤 H' 最高。

进一步对 12 个样品进行聚类分析,结果如图 2-I 所示。12 个土壤样品被分为 2 类,11 月份土样与 2 月份 LO 土样属于一类,而 7 月份土样与 2 月份 GO、GC、LC 土样同属一类。这表明不同取样时间对土壤细菌 16S rDNA 多样性的影响大于栽培管理措施对其的影响。其次在第一类分支中,11 月份 GO、LO 土样与 GC、LC 土样分别位于 2 簇亚支上。这说明不同栽培方式对土壤细菌群落产生显著影响。从表 3 可以看出,各个月份土样多样性指数 H' 基本呈现有机温室栽培>有机露地栽培>常规温室栽培>常规露地栽培。说明有机温室栽培在一定程度上能够增加土壤细菌群落多样性,而常规露地栽培对土壤细菌群落多样性有一定副作用,并且温室环境下细菌群落多样性较之露地环境下高。

2.3 细菌 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE

基于土壤细菌 16S rRNA 基因的 DGGE 图谱如图 1-II 所示。结合表 3 中 RNA 丰富度指数可以看

出,在 RNA 水平,12 份供试土样细菌丰富度 D 显著低于 DNA 层面,这说明在一段时间内不是所有土壤细菌都处于活性状态,它们可能是分阶段分时期发挥作用的。从图 1-II 中还可以看出各土样基本呈现相同的带型,条带 a、b、c、d、e、f、g、k 代表处于活性状态细菌的优势菌群,它们仅在亮度上存在差别,但差异程度较之 DNA 层面所呈现的差异程度要小得多,同时也有部分土样出现了自己的特征带。例如:2 月份 GO 土样出现条带 h,同时发现 RNA 水平特征条带的数目没有 DNA 层面的多。在均匀度指数 E' 上 12 个供试土壤没有明显差异,都在 0.70~0.78 范围波动。对于多样性指数 H' ,GO 土壤中多样性指数一直维持较高水平,而 LO 土壤 H' 波动性较大。通过图 2-II 的聚类分析可以看出,12 个供试土样被分为 3 大类:11 月份 GO 土壤单独分为一类,剩余所有有机栽培土壤被分为一类,所有常规栽培土壤被分为一类。这说明在 4 种不同的栽培方式下,对土壤细菌多样性造成差异的主要因子是有机栽培与常规栽培,而温室与露地环境因子对 16S rRNA 基因造成的差异没有明显体现。

2.4 细菌 16S rDNA/16S rRNA 片段序列分析

对 16S rDNA/16S rRNA 片段 DGGE 图谱中 26 条差异条带测序,其中条带 E、G、a、b、c 测序失败。测序结果使用 BLAST 在 Genbank 数据库中进行检索和同源性比较并选取与之最相近序列,如表 4 所示。从这些 DGGE 条带所代表的微生物种类可以确定不同栽培方式下土壤细菌优势菌群的组成。其中有 12 条条带测序结果与目前未获得纯培养的未知名菌株同

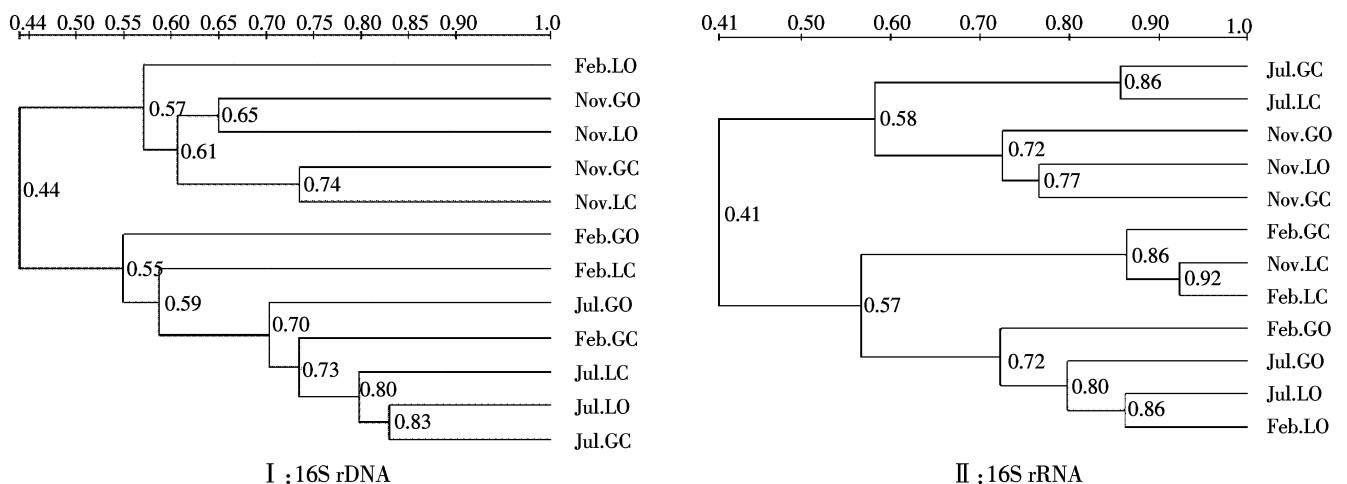


图 2 不同栽培方式下土壤细菌 16S rDNA/16S rRNA DGGE 图谱聚类分析

Figure 2 DGGE cluster analysis(UPGMA) of 16S rDNA/16S rRNA profiles of soli bacterial communities

源性大于 98%, 剩余 9 条条带序列比对结果都与假单胞菌最为相近。

2.5 土壤细菌群落多样性与土壤理化因子的典型对应分析

如图 3, 通过典型对应分析对土壤细菌 16S rDNA 多样性指数与土壤理化性质进行分析后发现: 该排序图对响应变量的解释比例分别达到 29.8% 和 13.5%, 能够较全面的概括土壤细菌多样性与土壤理化因子间的关系; 土壤细菌多样性受到 pH、微生物生物量氮、微生物生物量碳、有机质、土壤碳氮比的影响($P <$

0.05), 并且土壤 pH 是影响程度最深刻的环境因子, 其次为微生物生物量氮、有机质、土壤碳氮比和微生物生物量碳。

3 讨论

3.1 不同栽培方式对土壤微生物生物量的影响

土壤微生物生物量作为土壤有机质的组成部分之一, 其能够迅速响应土壤环境变化^[6]。本研究结果显示, 有机栽培能够显著提高土壤微生物生物量 C、N 含量, 分析原因主要是因为有机栽培中施用的有机肥

表 3 不同管理措施下土壤细菌多样性

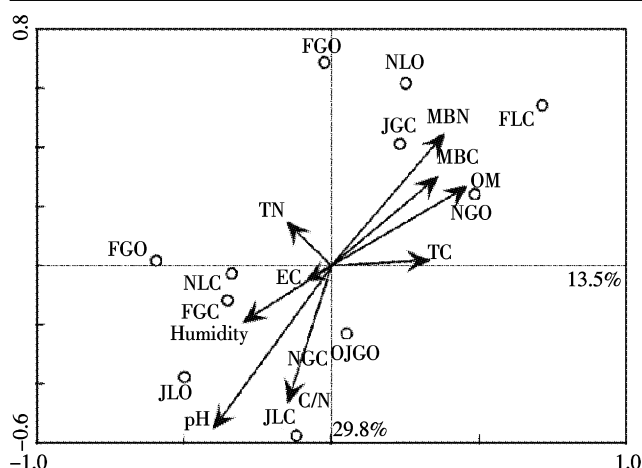
Table 3 The Shannon-Wiener index(H'), homogeneous degrees index(E') and richness index(D') of bacterial influenced by different cultivation patterns

项目		2 月 16 日				7 月 15 日				11 月 10 日			
		LC	GC	LO	GO	LC	GC	LO	GO	LC	GC	LO	GO
DNA	多样性指数 H'	2.67	2.37	2.03	3.13	2.54	2.56	2.67	2.71	2.27	2.41	2.49	2.58
	均匀度指数 E'	0.86	0.78	0.67	0.90	0.78	0.79	0.80	0.82	0.71	0.73	0.74	0.76
	丰富度指数 D'	4.03	4.12	3.17	4.88	4.05	4.56	4.57	4.31	4.20	4.52	4.54	4.52
RNA	多样性指数 H'	2.09	2.17	1.96	2.12	2.10	2.11	1.86	2.18	2.14	2.20	2.39	2.28
	均匀度指数 E'	0.74	0.78	0.74	0.75	0.76	0.72	0.73	0.70	0.73	0.73	0.73	0.72
	丰富度指数 D'	2.36	2.2	1.96	2.34	2.22	2.69	1.81	3.13	2.65	2.79	3.66	3.47

表 4 DGGE 条带基因片段序列 BLAST 结果

Table 4 Comparison of genomic sequences in DGGE bands by sequencing and BLAST analysis

测序条带	登录号	片段长度	最相似序列近源菌株	同源性
A	JN583455	401	Uncultured bacterium clone ncd03d06c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(HM250610)	99%
B	JN583456	401	Pseudomonas putida strain NBM69 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(HQ703947)	100%
C	JN583457	401	Bacterium A14-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(HM140467)	100%
D	JN583458	401	Pseudomonas sp. S2IP20(2011)16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF767406)	100%
F	JN583459	401	Uncultured bacterium clone nbt181e04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(FJ894594)	100%
H	JN583460	401	Pseudomonas sp. NS009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF826528)	100%
I	JN583461	401	Pseudomonas sp. S2IP20(2011)16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF767406)	99%
J	JN583462	401	Uncultured bacterium clone A5134 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF332590)	99%
K	JN583463	401	Pseudomonas sp. S2IP20(2011)16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF767406)	99%
L	JN583464	401	Uncultured bacterium clone A5134 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF332590)	100%
M	JN583465	401	Uncultured bacterium clone A6.40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF332195)	99%
N	JN583466	401	Pseudomonas sp. enrichment culture clone C8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(FJ791168)	100%
O	JN583467	401	Uncultured bacterium clone BacTopLow068 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF731441)	99%
d	JN583468	401	Pseudomonas sp. S2IP20(2011)16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF767406)	100%
e	JN583469	401	Uncultured bacterium clone WSMA39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(GU291336)	100%
f	JN583470	401	Uncultured bacterium clone nbw220c01c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(GQ075376)	100%
g	JN583471	401	Uncultured bacterium clone A6.40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF332195)	100%
h	JN583472	401	Uncultured bacterium clone A6.40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF332195)	100%
i	JN583473	401	Uncultured bacterium clone 09-161 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF820239)	98%
j	JN583474	401	Pseudomonas sp. S2IP20(2011)16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JF767406)	99%
k	JN583475	401	Uncultured bacterium clone A8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(GQ422761)	100%



FLC,FGC,FLO,FGO,JLC,JGC,JLO,JGO,NLC,NGC,NLO,NGO 分别代表 2、7、11 月份的常规露地、常规温室、有机露地、有机温室土壤微生物多样性
 FLC,FGC,FLO,FGO,JLC,JGC,JLO,JGO,NLC,NGC,NLO,NGO correspond with soil microbial diversity of conventional open filed, conventional greenhouse, organic open filed, organic greenhouse in different sample date respectively

图 3 土壤细菌多样性与土壤理化因子的典型对应分析

Figure 3 Canonical correspondence analysis(CCA) elucidates the relationships between bacterial diversity and their chemical parameter

能够为微生物提供充足的碳氮源以及更适宜的生长环境。常规栽培中单一的化肥施用使得土壤有机质分解迅速,微生物生长所需的碳源匮乏^[8]。于树等指出长期施用化肥能够明显降低土壤微生物生物量^[17],同时姚政等也指出单施化肥使得土壤微生物生物量 C 明显下降^[18],分析其原因可能是由于施用化肥使得土壤酸化抑制了土壤微生物生长。尽管在本研究结果中土壤未呈现酸性,但可以看出同一时期内有机栽培土壤 pH 高于常规栽培土壤(除 2 月份有机露地低于常规露地),同时 CCA 分析指出 pH 是影响微生物多样性的关键因子,这说明在一定范围内土壤微生物生物量与土壤 pH 是密切相关的。因此,施用有机肥给土壤带入大量有机营养,优化土壤理化结构,使更多碳氮以微生物生物量 C、N 的形式固定在微生物中,减缓了碳氮营养的流失,增加了土壤肥力,为作物的营养充足供应提供了基础。

3.2 不同栽培方式对土壤细菌种群结构的影响

不同栽培方式在 DNA 水平上对土壤细菌群落结构产生显著影响,有机栽培土壤细菌多样性大于常规栽培土壤,而在 RNA 水平上不同栽培方式土壤细菌群落结构差异性不显著,Buckley 在长期耕作对土壤细菌群落多样性影响的研究中也发现:RNA 功能性

水平上所反映的细菌群落多样性在长期耕作与未耕作土壤中没有显著差异^[19]。这可能是因为 5 a 的有机栽培尽管带入了丰富多样的微生物,在 DNA 水平的细菌群落多样性上有所体现,但由于受到之前长期常规栽培作用,使得土壤中功能性细菌群落结构稳定形成,造成有机栽培中新带入的微生物并未能形成优势群落,这个过程可能需要几十年或者更长时间才能显现成效。其次在不同季节下土壤细菌群落多样性以及丰度也有所变化,但值得注意的是除了不同季节中出现的优势种群外,其优势条带只是在丰度上有所变化,这是因为土壤是个复杂的生态环境,其受到来自温度、水分、光照、作物种类、肥力情况等多方面的影响,这使得微生物生存环境随着季节改变,进而发生细菌群落多样性的差异变化。再次,典型对应分析(Canonical correspondence analysis)是用作分析 DGGE 图谱中微生物种群多样性与环境变量之间关系的有力工具^[20],本研究通过 CCA 分析发现土壤 pH 是影响土壤细菌多样性的关键因子,这与 Enwall 等^[21]研究结果相似,说明由于栽培方式所造成的土壤 pH 变化可能是导致土壤细菌群落多样性差异的主要原因。而有机栽培中施用的有机肥能够缓解土壤酸化问题^[22],在一定范围内提升土壤 pH 并结合其所带入的丰富有机物质为土壤细菌提供适宜的生存环境。而且土壤微生物群落多样性决定了其在土壤中发挥的作用,群落多样性的降低直接影响到不同微生物功能的发挥以及互作,进而影响到土壤养分循环、植物对养分的吸收、有机物的分解同化等生化过程。同时这也很可能是土壤退化的重要原因之一^[8]。结合本文的结果可以看出,有机栽培在一定程度上能够丰富土壤细菌群落多样性,增加土壤肥力,优化土壤环境。

4 结论

不同栽培方式以及季节变化能够导致土壤细菌群落多样性发生显著变化。有机栽培显著增加土壤细菌群落多样性,而常规栽培土壤细菌多样性水平较低。同时有机栽培能够较好地优化土壤微环境,增加有机质含量和微生物生物量。另外,土壤 pH 是影响土壤细菌群落多样性最直接的因素。通过 RNA 水平 DGGE 可知,有机栽培能够直接影响土壤中活性细菌群落多样性,而季节变化对其没有显著影响。

参考文献:

[1] Romina Romaniuk, Lidia Giuffre, Alejandro Costantini, et al. Assess-

- ment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems[J]. *Ecological Indicators*, doi:10.1016/j.ecolind.2011.02.08
- [2] Ge T D, Nie S A, Wu J S, et al. Chemical properties, microbial biomass, and activity differ between soils of organic and conventional horticultural systems under greenhouse and open field management: A case study [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11: 25–36
- [3] 杨合法, 范聚芳, 戈志奇, 等. 有机、无公害及常规生产模式番茄病害及防治效果比较研究[J]. *中国生态农业学报*, 2009, 17(5): 933–937.
- YANG He-fa, FAN Ju-fang, GE Zhi-qi, et al. Main diseases and control effects of organic, integrated and conventional cultivation patterns of greenhouse tomato[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2009, 17(5): 933–937
- [4] 雷丽娟, 周艳虹, 丁 桔, 等. 不同蔬菜连作对土壤细菌 DNA 分子水平多态性影响的研究[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(10): 2076–2083.
- LEI Li-juan, ZHOU Yan-hong, DING Ju, et al. Effect of continuous cropping of different vegetables on DNA polymorphism of soil bacterial[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(10): 2076–2083.
- [5] Ana R Lopes, Cátia Faria, Ángeles Prieto-Fernández, et al. Comparative study of the microbial diversity of bulk paddy soil of rice fields subjected to organic and conventional farming[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43: 115–125.
- [6] Penny R Hirsch, Tim H Mauchline, Ian M Clark. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42: 878–887.
- [7] Muyzer G, Ellen C W, Andre G U. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain amplified reaction genes encoding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695–700.
- [8] 徐永刚, 宇万太, 马 强, 等. 长期不同施肥制度对潮棕壤微生物生物量碳、氮及细菌群落结构的影响[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(8): 2078–2085.
- XU Yong-gang, YU Wan-tai, MA Qiang, et al. Effect of long-term fertilizations on microbial biomass C and N and bacterial community structure in an aquic brown soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(8): 2078–2085
- [9] 吴凤芝, 王 澍, 杨 阳. 轮套作对黄瓜根际土壤细菌种群的影响[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(12): 2717–2722.
- WU Feng-zhi, WANG Shu, YANG Yang. Effects of rotation and intercropping on bacterial communities in rhizosphere soil of cucumber[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(12): 2717–2722.
- [10] Sharma S, Aneja M K, Mayer J, et al. RNA fingerprinting of microbial community in the rhizosphere soil of grain legumes [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 240: 181–186.
- [11] Carter M R, Gregorich E G. Soil sampling and methods of analysis[M]. Second edition. Canada: Taylor & Francis Group LLC – CRC Press, 2006.
- [12] Christian Witt, John L Gaunt, Catherine C Galicia, et al. A rapid chloroform–fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 30: 510–519
- [13] 邢德峰, 任南琪, 宋佳秀, 等. 不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响[J]. *环境科学*, 2006, 27(7): 1425–1428.
- XING De-feng, REN Nan-qi, SONG Jia-xiu, et al. 16S rDNA community of activated sludge based on different targeted sequence of 16S rDNA by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(7): 1425–1428.
- [14] Li Z Y, He L M, Miao X L. Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis[J]. *Current Microbiology*, 2007, 55: 465–472
- [15] 张金屯. 数量生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 173–174.
- ZHANG Jin-tun. Quantitative ecology[M]. Beijing: Science Press, 2004: 173–174.
- [16] Gregorich E G, Carter M R, Doran J W, et al. Biological attributes of soil quality[M]. Elsevier, Amsterdam, 1997: 81–113.
- [17] 于 树, 汪景宽, 王 鑫, 等. 不同施肥处理的土壤肥力指标及微生物碳、氮在玉米生育期内的动态变化[J]. *水土保持学报*, 2007, 21(4): 137–140.
- YU Shu, WANG Jing-kuan, WANG Xin, et al. Dynamical changes of soil fertility and microbial biomass carbon and nitrogen in different fertilizations within corn development period[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2007, 21(4): 137–140.
- [18] 姚 政, 赵京音, 蒋小华. 施用不同有机物后土壤微生物量的动态变化[J]. *上海农业学报*, 1997, 13(1): 47–48.
- YAO Zheng, ZHAO Jing-yin, JIANG Xiao-hua. Dynamic changes of soil microbial biomass in soils after applying chemical fertilizers and different organic matters[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 1997, 13(1): 47–48.
- [19] Buckley D H, Schmidt T M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation[J]. *Microbial Ecology*, 2001, 42: 11–21.
- [20] Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, et al. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(11): 634–643.
- [21] Enwall K, Nyberg K, Bertilsson S, et al. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39: 106–115.
- [22] Lehtovirta L E, Prosser J I, Nicol G W. Soil pH regulates the abundance and diversity of group 1.1c Crenarchaeota[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70: 367–376.