

秸秆还田后土壤微生物群落结构变化的初步研究

赵 勇^{1,3}, 李 武², 周志华², 张晓君², 潘迎捷³, 赵立平²

(1. 南京农业大学微生物学系, 江苏 南京 210095; 2. 上海交通大学生命科学技术学院微生物分子生态学与基因组学实验室, 上海 200240; 3. 上海水产大学食品科学学院, 上海 200090)

摘要:通过实验室条件下的小麦秸秆粉和油菜秸秆粉的还土试验,结合常规的分析手段和基于 DNA 的分子技术(变性梯度凝胶电泳(DGGE)及测序技术),初步研究了秸秆粉还田后土壤物理化学特性及生物学特性的变化。结果表明,培养 60 d 后,秸秆还田土壤的肥力明显提高,其纤维素酶活性明显增强。DGGE 图谱表明,对照土壤(S)以及处理土壤(SW 和 SR),在培养过程中, β -Proteobacteria 类细菌组成都在发生变化。对其中一个样品的 DGGE 条带进行了割胶测序,测序结果表明,大部分条带代表的微生物是未培养的或不可培养的。采用传统分离培养技术,从秸秆还田土壤中分离了 2 株纤维素降解菌。以上结果说明,秸秆还田具有良好的土壤综合效应。

关键词:秸秆; 纤维素酶活性; 变性梯度凝胶电泳; β -Proteobacteria; 纤维素降解菌

中图分类号:Q938.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)06-1114-05

Changes of Microbial Community Structure in Straw Amended Soil

ZHAO Yong^{1,3}, LI Wu², ZHOU Zhi-hua², ZHANG Xiao-jun², PAN Ying-jie³, ZHAO Li-ping²

(1. Department of Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 3. School of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 201106, China)

Abstract: Changes of physical, chemical and biological characteristics of soils amended with wheat and rape straws were analyzed by either routine approaches or DNA-based molecular techniques (denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing) under laboratory conditions. The results showed that after treatment for 60 days, fertilities of the amended soils increased significantly at range from 23.9% to 52.5% in varying items, but there was little difference for the amended soils for treatment between with wheat and rape straw. Cellulase activities in amended soils were significantly higher than that in the control, and in the first 24 days, the cellulase activities in wheat straw amended soils were higher than that in soils amended with rape straw, in contrast, after 25 days, the case was reversed. DGGE profiles showed that during the incubation period, the composition of β -Proteobacteria in the control and amended soils changed variously. The DGGE bands of one sample were sequenced, and it demonstrated that most of the microorganisms represented by the DGGE bands were uncultured or uncultivable bacteria. Two cellulolytic bacteria were isolated from the straw amended soils by traditional cultivation-dependent technique, one was relative to Cellulosimicrobium cellulans with 99% similarity, and another matched with 98% similarity to Cellulomonas fiavigena. In conclusion, soils amended with straws have beneficial ecological effects.

Keywords: straw; cellulase activity; denaturing gradient gel electrophoresis; β -proteobacteria; cellulolytic bacteria

秸秆还田不仅可以改善土壤结构,提高土壤肥力,而且对土壤的生物学特性也具有很重要的影响^[1]。很多研究就不同作物秸秆还田后,土壤理化特性及生物学特性的变化做了较为深入的调查^[2-4]。但这些研究

当中,基本上都采用传统的培养计数方法去了解秸秆还田后对土壤微生物的影响。然而研究表明,土壤中只有不到 1%的微生物是可培养的^[5],因此采用培养的方法,是很难真实地反映出土壤微生物的变化的。近年来,不依赖于培养直接从土壤中提取微生物总 DNA 进行分析的分子方法被广泛应用于土壤微生物群落结构、功能以及动态监测研究^[6]。Dilly 等^[7]应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)的分子方法研究了作物残渣在降解过程中细菌多样性的变化,结果表明不同土

收稿日期:2005-01-17

基金项目:国家 863 计划(2001AA214131);上海市农委资助项目(2002-4-4-2; 2003-15-2);上海市重点学科建设项目资助,项目编号:T1102

作者简介:赵 勇(1975—),男,湖北黄冈人,博士研究生,主要从事土壤微生物分子生态学研究。

联系人:赵立平 E-mail:lpzhao@sjtu.edu.cn

壤类型,不同作物残渣在不同降解阶段,其细菌的多样性是不一样的。

本研究结合常规分析手段与基于 DNA 的分子生态学技术,对在实验室条件下处理的小麦秸秆粉和油菜秸秆粉还田后的土壤理化特性及生物学特性变化进行了初步分析,同时采用传统分离培养技术,从秸秆还田的土壤中分离出与纤维素降解相关的细菌。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤样品

土壤样品采自上海交通大学闵行校区外围农田,用无菌小钢铲去除土壤表面杂草及小石块等,然后取 0~10 cm 表层土壤,过 20 目筛,在室温下放置 1 d 后即 用。其基本理化性状为:有机碳 26.70 g· kg⁻¹,总氮 1.40 g·kg⁻¹,速效磷 25.52 mg·kg⁻¹,速效钾 120.01 mg·

kg⁻¹,pH(H₂O)为 6.71。

1.1.2 供试作物秸秆

试验用秸秆为收割后的小麦秸秆及油菜秸秆,晒干后旋风捣碎器磨碎,过 10 目筛后存于阴凉处备用。小麦秸秆粉及油菜秸秆粉基本理化性状如表 1。

1.1.3 供试土壤的处理

试验设置 3 种处理,分别为不加秸秆的空白对照处理土壤(S)、含 50 g·kg⁻¹ 小麦秸秆粉的处理土壤(SW)和含 50 g·kg⁻¹ 油菜秸秆粉的处理土壤(SR)。土样经滚筒充分混匀 30 min,用灭菌的去离子水调节含水量至最大持水量的 60%后,分别置于容积为 2 L 的灭菌玻璃烧杯中,每个烧杯中装土 1.5 kg,室温黑暗条件下培养 60 d,定期测定土壤含水量以维持土壤湿度。试验开始后,每 10 d 采样 1 次,直至第 60 d 试验结束,采样用直径为 28 mm 的无菌玻璃管三点垂直法采集,经充分混匀后备用。所有试验均设置 3 次重复。

表 1 供试秸秆的基本理化性状

Table 1 General characteristics of the straws used in the test

秸秆名称	总碳 /g·kg ⁻¹	总氮 /g·kg ⁻¹	碳氮比 C/N	速效磷 /mg·kg ⁻¹	速效钾 /mg·kg ⁻¹
小麦秸秆	483.7(±2.5)	5.21(±0.07)	92.7	1.54(±0.02)	4.34(±0.11)
油菜秸秆	468.6(±2.9)	7.34(±0.08)	63.8	1.41(±0.01)	3.23(±0.07)

注:样品用 H₂SO₄-H₂O₂ 消煮,总碳用 K₂Cr₂O₇ 氧化法测定,总氮用凯氏定氮法测定,速效磷用钼锑抗比色法测定,速效钾用火焰光度法测定。括号内数字为 3 个重复的标准偏差。

1.2 方法

1.2.1 土壤样品理化特性的测定

土壤样品理化特性的测定参照文献[8]的方法。有机碳测定采用重铬酸钾外加热法;总氮测定采用凯氏定氮法;速效磷测定采用钼锑抗比色法;速效钾测定采用火焰光度法;土壤 pH 测定为水土比 2.5:1,应用 inolab pH 计测定。

1.2.2 土壤纤维素酶活性的测定

土壤纤维素酶活性的测定参照文献[9],采用蒽酮比色法。

1.2.3 土壤样品 DNA 的提取

应用 Bio 101 FastDNA Spin Kit (For Soil)试剂盒 (Bio 101, Lajolla, Calif.)提取土壤样品 DNA,具体操作参见试剂盒说明书。

1.2.4 PCR 扩增

用于 DGGE 分析的细菌 16S rDNA V3 区的扩增参见文献[10];用于 DGGE 分析的 β-Proteobacteria 类群特异的 PCR 扩增参见文献[11]。

1.2.5 DGGE 分析

应用 BIO RAD DCode Universal Mutation System DGGE 电泳系统,条件为:8%聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为 35%~60%(100%变性剂浓度为 7 mol·L⁻¹ 尿素,40%甲酰胺),取 250 ng 16S rDNA V3 区或 β-Proteobacteria 类群特异的 PCR 产物,在 60℃、200V 恒定电压电泳 4 h。电泳结束后,凝胶立即应用 SYBR Green I 染色并拍照。DGGE 指纹图谱应用 U-VIBandMap 软件(UVItec Limited, England)分析并画出聚类树状图。

1.2.6 DGGE 条带的割胶测序

按照文献[12]中描述的方法,对 DGGE 胶上某些条带进行割胶回收测序。测序工作由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2.7 序列的系统发育分析

应用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。

1.2.8 纤维素降解相关菌的分离与鉴定

土壤纤维素降解相关菌的分离按文献 [13] 中方法,采用赫奇逊氏培养基,利用稀释涂板法。对分离所得菌株进行 16S rDNA 部分测序(测序工作由上海博

亚生物技术有限公司完成), 并应用邻接法(Neigh-
bor-Joining)构建系统发育树确定其系统发育地位。

2 结果与分析

2.1 土壤基本理化特性分析

培养 60 d 后,3 种处理土壤的基本理化特性见表 2。小麦秸秆粉处理土壤(SW)中有机碳、总氮、速效磷以及速效钾分别比对照(S)提高了 30.3%、44.6%、30.3%以及 32.3%。油菜秸秆粉处理土壤(SR)中有机碳、总氮、速效磷以及速效钾分别比对照(S)提高了 23.9%、52.5%、28.1%以及 27.3%。然而 2 种秸秆粉处理土壤的 pH 值比对照都有所下降,SW 下降了 0.31, SR 下降了 0.35。SW 与 SR 相比,差别不大。

2.2 土壤纤维素酶活性分析

在 60 d 培养过程中,3 种处理土壤纤维素酶活性

的动态变化如图 1 所示。加入秸秆粉后,土壤纤维素酶活性明显提高,而对照处理土壤在培养过程中纤维素酶活性略有下降,但变化不大。小麦秸秆粉处理的土壤(SW)在培养前期(到 24 d 左右)其纤维素酶活性比油菜秸秆粉处理的土壤(SR)的纤维素酶活性要高,但到培养后期(约 25 d 后),其纤维素酶活性明显低于 SR 的。SW 和 SR 2 种处理的纤维素酶活性均在第 30 d 的时候达到最大,随后略有下降。

2.3 土壤微生物结构变化的 DGGE 分析

应用 Bio 101 Kit 提取了处理 0、30、60 d 的 3 种处理土壤样品(S,SW,SR)的总 DNA。应用细菌通用的 16S rDNA V3 区的引物扩增对照处理(S)第 0 d 的土壤样品总 DNA,做 DGGE 分析,由于土壤细菌种类多样性太高,所以 DGGE 图谱整个泳道密密麻麻全是条带,整体表现出 Smear 状(图略),无法进行分析。

表 2 培养 60 d 后 3 种处理土壤基本理化特性

Table 2 Main characteristics of three treated soils after incubation for 60 days

土壤样品	有机碳 /g · kg ⁻¹	总氮 /g · kg ⁻¹	速效磷 /mg · kg ⁻¹	速效钾 /mg · kg ⁻¹	pH
S	26.62(±0.83)	1.39(±0.04)	25.49(±0.66)	119.73(±2.13)	6.72(±0.02)
SW	34.68(±1.01)	2.01(±0.03)	33.21(±0.81)	158.43(±1.98)	6.41(±0.02)
SR	32.98(±0.78)	2.12(±0.03)	32.64(±0.43)	152.47(±1.85)	6.37(±0.01)

注:括号内数字为 3 个重复的标准偏差。

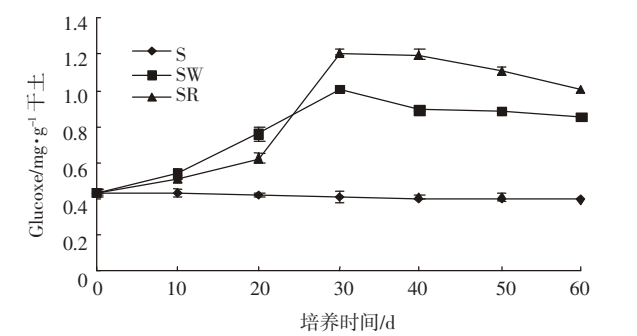


图 1 3 种处理土壤纤维素酶活性动态变化

Figure 1 Dynamics of cellulase activity in three different treatment soils(The bars mean SE of triplicate)

而应用类群特异(Group-Specific)的引物能大大降低 DGGE 分析时图谱的复杂程度^[4]。Gomes 等^[11]应用 β -Proteobacteria 类群的特异引物研究了玉米根围土壤 β -Proteobacteria 类群分布及动态变化。

本研究应用 β -Proteobacteria 类群特异的引物 PCR 扩增了上述 9 个 DNA 样品,并进行了 DGGE 分析,DGGE 图谱中的条带清晰可辨,每个样品条带数从 11~20 条不等,如图 2-A 所示。第 0 d 的 3 个处理,

其 DGGE 图谱基本相同,表明 3 种处理刚开始的时候,土壤中 β -Proteobacteria 类群细菌的结构组成基本一样。而处理后第 30 d 的和 60 d 的其 DGGE 图谱各不相同,并且与第 0 d 的也不一样,表明这 3 种处理在培养过程中,土壤中的 β -Proteobacteria 类群细菌的组成在发生变化。基于 DGGE 图谱的聚类分析结果如图 2-B 所示,也表明了这一点。

2.4 DGGE 条带的序列分析

为了了解 SR 处理到 60 d 时,其土壤样品中主要 β -Proteobacteria 类群的组成,对图 2-A 中第 9 泳道中主要的 9 条 DGGE 条带进行了割胶回收测序。每个 DGGE 条带对应的序列分析结果如图 3 所示。9 条 DGGE 条带,对应着 12 条序列,序列长度从 468bp 到 472bp 之间不等,其中条带 c、e、g 包含 2 种序列,分别编号为 c1、c2;e1、e2;g1、g2。12 条序列代表的 12 种 β -Proteobacteria 类细菌中,有 8 种(分别是 b、c1、d、f、g1、g2、h、i 代表的)是属于未培养的或不可培养的,其他 4 种(分别是 a、c2、e1、e2 代表的)分属于 Burkholderia 属及 Ralstonia 属中的一些未定种。这个结果同样表明,土壤中大部分的微生物是不可培养的

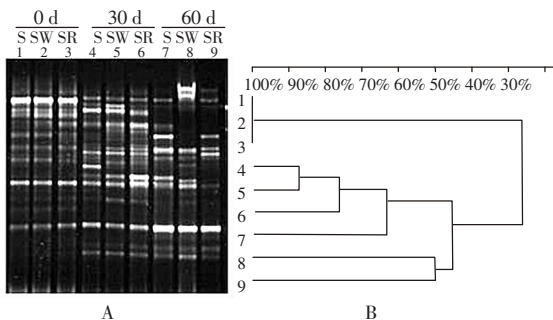


图 2 3 种处理土壤样品中 β -Proteobacteria 类群结构组成的 DGGE 图谱(A)及聚类分析(B)

Figure 2 DGGE profile of β -Proteobacteria in three different treatment soils (A) and cluster analysis resu

或未培养的,由于没有纯培养物,就很难鉴定这些微生物在原位生态环境中的生理生化特性及其所具备的生态功能意义。要具体了解这些微生物与土壤中油菜秸秆粉的加入之间的关系,就需要进一步通过大量试验去检验。

另外,应用邻接法(Neighbor-Joining)构建了这 12 条序列的系统发育树,结果如图 4 所示。

2.5 纤维素降解相关菌的分离

分别在小麦秸秆粉及油菜秸秆粉处理 60 d 的土壤中分离到两株与纤维素降解相关的细菌,编号为 IS01 和 IS02,经 16S rDNA 部分测序,序列的系统发

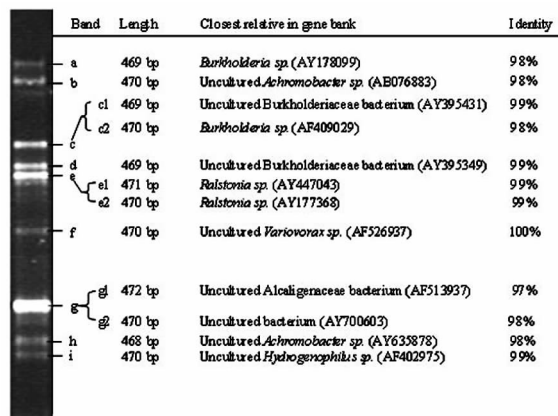


图 3 DGGE 条带对应的序列分析结果

Figure 3 Sequence analysis results of DGGE bands DGGE

育分析结果表明(图 5),IS01(16S rDNA 测序长度为 508bp) 是一株类似于 *Cellulosimicrobium cellulans* (X79456)的细菌,与其相似性为 99%,IS02(16S rDNA 测序长度为 500bp) 是一株类似于 *Cellulomonas fiavigena*(X79463)的细菌,与其相似性为 98%。

3 讨论与结论

由于秸秆中含有相当数量的碳、氮、磷、钾等营养元素^[1],在土壤中混入小麦秸秆粉和油菜秸秆粉,培养

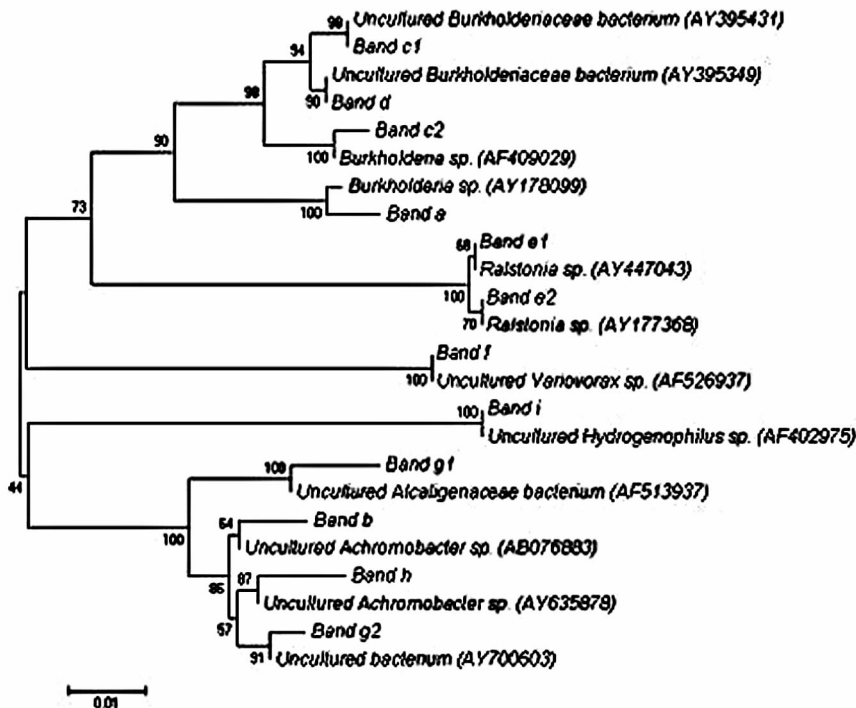


图 4 DGGE 条带对应的 12 条序列的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of 12 sequences corresponding to DG

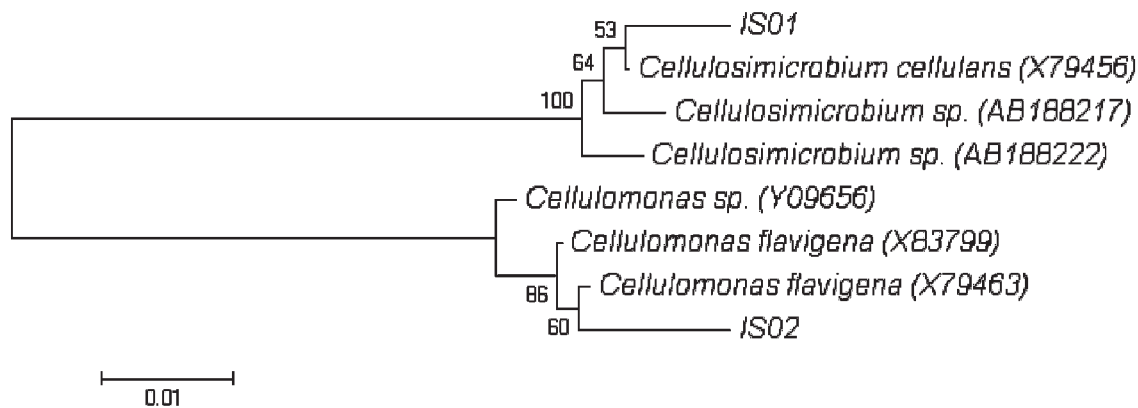


图 5 两株纤维素降解菌的系统发育分析

Figure 5 Phylogenetic analysis of two cellulolyt

60 d 后,土壤的肥力明显提高。秸秆主要成分包括纤维素、半纤维素等^[15],秸秆的加入,激活了土壤中纤维素降解菌群,使得土壤的纤维素酶活性明显提高。也许是秸秆的筛选富集作用,在小麦秸秆粉及油菜秸秆粉处理 60 d 的土壤中分离到了 2 株纤维素降解菌,分别与 *Cellulosimicrobium cellulans* 和 *Cellulomonas flavigena* 相似。通过培养计数的方法,很多研究结果表明^[2,3,16-19],秸秆还土后,对土壤微生物的结构组成产生了很大影响。然而,土壤中绝大多数的微生物是不可培养的^[5],应用培养的方法,是很难真实的反映出土壤微生物的变化的。基于 DNA 的分子方法不依赖于培养,有效避免了培养方法的这一缺陷。

本研究的 DGGE 图谱很直观地反映出了,不论是对照土壤(S)还是处理土壤(SW 和 SR),在培养过程中,土壤中的 β -Proteobacteria 类细菌组成都在发生变化。如果想要进一步知道微生物的组成,一种简便可靠的方法就是对 DGGE 条带进行割胶回收测序^[12]。

本研究对 SR 处理 60 d 的 DGGE 图谱中的 9 条主带进行了割胶回收测序,测序结果表明,大部分的条带代表的微生物是未培养的或不可培养的,这一结果与 Amann et al.^[5]所表述的结果相一致。当然,如果要全面了解微生物的组成结构与功能的对应关系,还需要做更全面、更细致、更深入的试验去检验。

参考文献:

- [1] 劳秀荣,孙伟红,王 真,等. 秸秆还田与化肥配合施用对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 2003, 40(4): 618-623.
- [2] 巩 杰,黄高宝,陈利顶,等. 旱作麦田秸秆覆盖的生态综合效应研究[J]. 干旱地区农业研究, 2003, 21(3): 69-73.
- [3] 蔡晓布,钱 成,张 元,等. 西藏中部地区退化土壤秸秆还田的微生物变化特征及其影响[J].应用生态学报, 2004, 15(3): 463-468.
- [4] 汪金平,何园球,柯建国,等. 南方双季稻田秸秆厢沟腐熟还田免耕

- 土壤生态效应研究[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(2): 21-24.
- [5] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 143-169.
- [6] Pace N R. A molecular view of microbial diversity in the biosphere [J]. *Science*, 1997, 276: 734-740.
- [7] Dilly O, Bloem J, Vos A, et al. Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 468-474.
- [8] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析[M]. 上海: 科学技术出版社, 1998. 24-142.
- [9] 李阜棣,喻子牛,何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 67-137.
- [10] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695-700.
- [11] Gomes N C M, Heuer H, Schonfeld J, et al. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis [J]. *Plant and Soil*, 2001, 232: 167-180.
- [12] Sun H Y, Deng S P, Raun W R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 5868-5874.
- [13] 许光辉,郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 农业出版社, 1986. 123-128.
- [14] Seghers D, Verthe K, Reheul D, et al. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 46: 139-146.
- [15] 王宏立,张祖立,白晓虎. 秸秆饲料资源开发利用的研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2003, 34(3): 228-231.
- [16] 张晓海,邵 丽,张晓林. 秸秆及土壤改良剂对植烟土壤微生物的影响[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(2): 169-172.
- [17] 沙 涛,程立忠,王国华,等. 秸秆还田对植烟土壤中微生物结构和数量的影响[J]. 中国烟草科学, 2000, (3): 40-42.
- [18] 刘 刚,佟万红,杜周和. 秸秆覆盖对桑园土壤微生物年变化的影响[J]. 蚕业科学, 2003, 29(2): 185-188.
- [19] 王洪兴,陈 欣,唐建军,等. 转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(1): 89-94.