

不同有机肥源对土壤微生物生物量及花生产量的影响^{*}

林新坚 王 飞 蔡海松 林戎斌 何春梅 李清华 李 昱

(福建省农业科学院土壤肥料研究所 福州 350013)

摘 要 通过盆栽试验,采用平板计数法和 DGGE 分析法,研究施用化肥与不同来源的有机肥对土壤微生物生物量及花生产量的影响。结果表明,施肥均显著提高了花生的经济产量与生物产量,其中以施用麸酸有机复混肥处理最高;土壤中细菌、真菌、放线菌总量以施用鸡粪处理最高,其他处理差别不大;土壤微生物总 DNA 提取、PCR 扩增及其产物 DGGE 分析表明,施用各品种有机肥较不施肥与施用化肥促进了土壤某些微生物量的提高,而施用不同有机肥品种促使不同种类微生物量的提高。故不同有机肥源对土壤微生物生物量乃至其多样性特征均产生影响。

关键词 花生 有机肥 土壤微生物量 变性梯度凝胶电泳法

中图分类号: S141.8; S154.3 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2009)02-0235-04

Effects of different organic fertilizers on soil microbial biomass and yield of peanut

LIN Xin-Jian, WANG Fei, CAI Hai-Song, LIN Rong-Bin, HE Chun-Mei, LI Qing-Hua, LI Yu

(Institute of Soil and Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract A pot experiment was set up to investigate the effects of different organic fertilizers on soil microbial biomass and yield of peanut. The results show that economic and biologic yields of peanut are improved by applying fertilizers. The highest yields are for the treatment with compound organic fertilizer containing monosodium glutamate. The total amount of bacteria, epiphyte and actinomyce of soil in the treatment with chicken faeces is highest among the different fertilizer treatments, while the other treatments have only minor differences. Through total DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of soil microbe, it is found that the certain microbe population increases by the application of various organic fertilizers compared with the treatments of inorganic fertilizer and CK. Also the application of different organic fertilizers improves microbial biomass though to different degrees. Therefore different organic fertilizers affect both soil microbial biomass and diversity trait.

Key words Peanut, Organic fertilizer, Soil microbial biomass, DGGE

(Received April 12, 2008; accepted July 7, 2008)

施用有机肥是培肥土壤的重要途径之一。有机肥料除供给作物所需的营养元素、改善土壤理化性状外,还可提高土壤生物化学活性,如提高土壤酶的活性,增加土壤微生物总量等^[1-3]。由于自然环境条件下许多微生物处于贫营养或不可培养状态,而在实验室用营养丰富的牛肉汁蛋白测定微生物总数,大量的贫营养微生物不适宜生长,因而测定的误差较大。而常规的平板培养分离方法研究土壤微生物只可分离出微生物种类总数的 0.1%~1%,不能很好地反映土壤微生物多样性的原始状态^[4-6]。随着分子

生物学技术的兴起,通过提取土壤微生物总 DNA 的方法反映土壤原生态条件下微生物的种群特性从而拓展对土壤中不可培养微生物的认识成为新的研究热点。张树声等^[7]研究了轮作对土壤微生物群落结构和组成多样性的影响, Bossio 等^[8]研究了不同土地利用方式对土壤微生物多样性的影响。目前,施用不同种类有机肥对土壤微生物多样性的影响研究尚鲜见报道。本文通过花生盆栽试验,探讨施用不同肥源有机肥对微生物多样性及花生产量的影响,以期有有机肥的合理施用提供依据。

^{*} 福建省科技开发计划项目(2005D058)和福建省中小企业创新资金项目(2005CD15T)资助

林新坚(1955~),男,研究员,研究方向为农业应用微生物、生态环境。E-mail: xinjianlin@163.net

收稿日期: 2008-04-12 接受日期: 2008-07-07

1 材料与方法

1.1 供试材料

盆栽试验在福建省农业科学院土壤肥料研究所盆栽网室进行。供试土壤采自闽侯县白沙镇溪头村水稻土, 土壤类型为灰黄泥田。供试土壤主要理化性状为全氮 $1.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、全磷 $0.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、全钾 $4.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、碱解氮 $183.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效磷 $39.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效钾 $25.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有机质 $10.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、交换性镁 $1.43 \text{ cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有效硫 $47.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、pH 5.3, 质地为黏土。供试主要肥料基本性质见表 1, 其中麸酸有机复混肥是利用味精有机废液加工而成, 由福建省三联化工股份有限公司提供; 牛粪、猪粪与鸡粪均充分腐熟。供试花生品种为福建省农业科学院作物研究所选育的“抗黄 1 号”。

1.2 盆栽试验设计

试验设不施肥(CK)、施化肥、施猪粪、施牛粪、施麸酸有机复混肥和施鸡粪 6 个处理, 4 次重复, 完全随机排列。每盆装土 7.5 kg , 每 kg 土施 N 0.1 g , N:P₂O₅:K₂O=5:4:6。各处理氮、磷、钾施用量相等, 施用有机肥的氮磷钾不足部分由相应化肥(尿素、磷酸二氢钾、氯化钾)补足。7 月 29 日施肥, 将各肥料与土壤置于塑料布上充分拌匀, 装盆, 塑料盆的规格为上口直径 26.0 cm , 下口直径 21.5 cm , 高 22.5 cm 。8 月 8 日播种, 每盆播种 7 粒, 最终定苗 3 株, 12 月 4 日收获并测产。

1.3 研究方法

于试验结束后采集各处理土壤混合样品风干, 研磨过 1 mm 筛, 4°C 低温冷藏, 备用。常规土壤微生物数量测定采用平板计数法(GB 20287-2006)。土壤细菌总 DNA 提取采用赵勇等^[9]方法略加改进, 并利用 16S rDNA V3 区引物对土壤微生物总 DNA 进行扩增。其引物 1 为 5-ATTACCGCGGCTGCTGG-3, 引物 2 为 5-(GC)-CCTACGGGAGGCAGCAG-3; 反应体系为 $10 \times$ 扩增缓冲液 $2.5 \mu\text{L}$, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂ $2 \mu\text{L}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP $2.5 \mu\text{L}$, $20 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物 1、引物 2 分别为 $0.5 \mu\text{L}$, 模板 DNA $20\text{--}40 \text{ ng}$, 加水至 $24.5 \mu\text{L}$, Taq 酶 $0.5 \mu\text{L}$ ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 总体积为

$25 \mu\text{L}$ 。扩增程序为 95°C 变性 5 min ; 94°C 1 min , 50°C 1 min , 72°C 40 s , 30 个循环, 72°C 延伸 10 min , 4°C 保存。用 Dcode universal mutation detection system(Bio-Rad)对 16S rDNA(V3 区)扩增产物进行 DGGE 电泳分析。制备变性剂浓度为 30%到 70%的 8%的聚丙烯酰胺凝胶, 其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增, 胶凝固后, 预热到 60°C 。每个加样孔加样量为 $20 \mu\text{L}$ PCR 扩增产物和 $2 \times$ loading buffer(70%甘油, 0.05%溴酚兰, 0.05%二甲苯青), 70 V , 电泳 16 h 。电泳完毕后, 将凝胶用稀释 10 000 倍 syber green 染色 30 min 。将染色后的凝胶用凝胶成像系统(Bio-Rad)观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 不同施肥处理对土壤微生物数量的影响

从土壤微生物数量测定可知(表 2), 除麸酸有机复混肥外, 施肥提高了土壤细菌总数, 其中以施鸡粪处理土壤细菌数增幅最大, 较对照提高 432.71% ; 从土壤真菌看, 除牛粪外, 其余施肥处理真菌数均较对照有所提高, 其中也以施用鸡粪处理增幅最大, 较对照提高 712.50% ; 不同处理土壤放线菌除施用化肥外, 其余均较对照有不同程度提高, 鸡粪增幅最大, 较对照提高 498.48% 。综合分析表明, 不同施肥处理以施用鸡粪土壤微生物总数增加最多, 其他处理差异不大。

2.2 不同施肥处理对土壤微生物量的影响

2.2.1 总 DNA 提取和纯化

由图 1 可知, 各种不同处理的土样均能提取出清晰的且大于 20 kb 的总 DNA 片段, 说明提取纯化的 DNA 片段基本是没有降解的, 完好的。

2.2.2 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

从图 2 可知, 提取纯化的各种处理的 DNA 片段, 应用通用的细菌 16S rDNA V3 区引物进行扩增, 可得到特异的目标片段, 片段小于 500 bp , 具有良好的扩增特异性。

2.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

对不同施肥处理的土壤微生物总 DNA 16S

表 1 供试有机肥料养分实测值
Tab.1 Nutrition value of tested organic fertilizers

肥料种类 Kind of fertilizer	有机质 Organic matter ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全 N Total N ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全 P Total P ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全 K Total K ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	pH
麸酸有机复混肥 Organic compound fertilizer of monosodium glutamate	180	105.0	13.0	30.0	6.1
猪粪 Pig manure	500	8.8	26.0	9.5	8.7
牛粪 Cattle manure	410	13.0	9.0	11.0	6.9
鸡粪 Chicken manure	410	29.3	36.8	18.7	8.3

表 2 不同施肥处理对土壤微生物区系的影响

Tab.2 Effects of different fertilization treatments on microbial community				个·g ⁻¹
处理 Treatment	细菌 Bacteria	真菌 Epiphyte	放线菌 Actinomycetes	
不施肥 CK	5.35×10 ⁶	2.40×10 ⁵	6.60×10 ⁵	
化肥 Inorganic fertilizer	6.10×10 ⁶	4.00×10 ⁵	5.70×10 ⁵	
猪粪 Pig manure	6.40×10 ⁶	5.95×10 ⁵	1.08×10 ⁶	
牛粪 Cattle manure	5.40×10 ⁶	2.20×10 ⁵	8.15×10 ⁵	
麸酸有机复混肥 Organic compound fertilizer of monosodium glutamate	3.80×10 ⁶	5.95×10 ⁵	8.05×10 ⁵	
鸡粪 Chicken manure	2.85×10 ⁷	1.95×10 ⁶	3.95×10 ⁶	

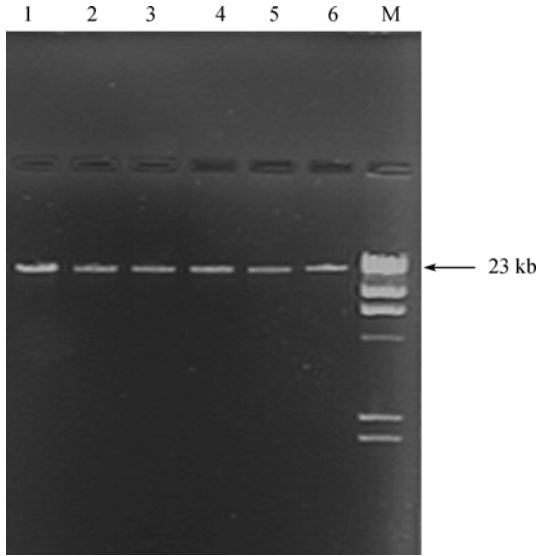


图 1 土壤微生物总 DNA 的提取纯化
Fig.1 Extraction and purification of total DNA from the soil microbe

M 为 λDNA / HindIII marker, 1~6 分别为: 1 不施肥(CK); 2 化肥; 3 猪粪; 4 牛粪; 5 麸酸有机复混肥; 6 鸡粪。下同。M shows λDNA / HindIII marker; 1 CK; 2 Inorganic fertilizer; 3 Pig manure; 4 Cattle manure; 5 Organic compound fertilizer of monosodium glutamate; 6 Chicken manure. The same below.

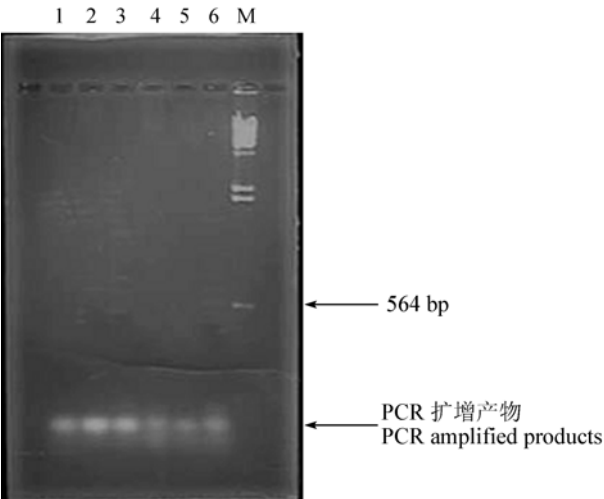


图 2 16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物
Fig.2 16S rDNA amplified products

rDNA V3 区扩增产物进行变形梯度凝胶电泳分析, 结果见图 3。不同有机肥肥源样品经过 DGGE 电泳

都分离出数目不等的电泳条带, 且条带的强度和迁移率各不相同。同时, 各处理中又具有许多共同的条带, 只是条带强度有所不同。其中施猪粪、鸡粪以及施麸酸有机复混肥的样品都有较其他样品更浓的条带(如图标记), 说明施各肥源有机肥较不施肥和施化肥, 可以促进某些微生物生物量的提高。施不同肥源有机肥出现条带不相同, 如施猪粪组出现的猪粪的条带, 施麸酸有机复混肥出现的麸酸和麸酸的条带, 这可能与猪粪、麸酸有机复混肥中的某些特别物质对土壤微生物多样性的影响有关, 其相关程度仍需进一步研究。施麸酸有机复混肥与施鸡粪组的微生物条带很相似, 条带麸酸和麸酸, 鸡粪组也有, 但浓度较弱, 说明麸酸有机复混肥和鸡粪有机肥都具有某些可以促使微生物繁殖的物质。

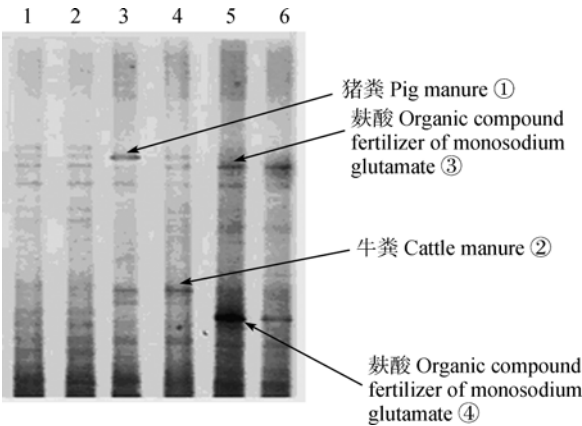


图 3 不同施肥处理的土壤 DGGE 图谱
Fig.3 Soil DGGE pattern of different fertilization treatments

2.3 不同施肥处理对花生产量的影响

由表 3 可知, 施用化肥与各有机肥处理的花生荚果产量均比对照显著或极显著增产, 增幅达 44.44%~75.00%, 荚果产量高低顺序为麸酸有机复混肥处理>猪粪处理>牛粪处理>化肥处理>鸡粪处理, 但方差分析表明各施肥处理间产量无显著差异。从不同处理对花生生物总产量影响来看, 不同施肥处理较对照增幅为 28.57%~50.26%, 达极显著增产水平, 其生物产量高低顺序为麸酸有机复混肥

表 3 不同施肥处理对花生产量的影响
Tab. 3 Effects of different fertilization treatments on the yield of peanut

处理 Treatment	荚果产量 Peanut yield (g · 盆 ⁻¹)	较对照增产 Increased production compared to CK (%)	生物产量 Biologic yield (g · 盆 ⁻¹)	较对照增产 Increased production compared to CK (%)
不施肥 CK	7.2±1.11bB	□	18.9±1.46cB	□
化肥 Inorganic fertilizer	10.5±1.25aA	45.83	28.1±3.31abA	48.68
猪粪 Pig manure	11.3±2.92aA	56.94	27.0±4.73 abA	42.86
牛粪 Cattle manure	10.8±1.06 aA	50.00	24.3±0.66bAB	28.57
麸酸有机复混肥 Organic compound fertilizer of monosodium glutamate	12.6±0.90 aA	75.00	28.4±2.25aA	50.26
鸡粪 Chicken manure	10.4±1.30 aAB	44.44	25.6±0.92abA	35.50

处理>化肥处理>猪粪处理>鸡粪处理>牛粪处理, 麸酸有机复混肥处理荚果产量和生物产量均最高。

3 结论与讨论

3.1 不同施肥处理下的花生荚果产量与土壤微生物量关系

盆栽试验条件下,施用化肥及不同有机肥品种,各施肥处理的花生荚果产量较对照增加 44.44%~75.00%, 达到显著或极显著水平,其中以施麸酸有机复混肥增幅最大。不同施肥处理的荚果产量高低顺序为麸酸有机复混肥>猪粪>牛粪>化肥>鸡粪,但微生物数量与产量之间的相关性并不明显。由此可以看出,影响当季作物产量的主要因素是合理施肥和养分利用率。麸酸有机复合肥之所以有明显增产效果,可能与其中另含有 3.8%的氨基酸(主要为谷氨酸)和 7%的硫元素有关^[10,11],而土壤微生物数量的多寡与施入土壤中有机肥源的有机物碳氮比及有机物的品质有关。因此土壤微生物变化是一个动态的过程,受环境与土壤基质变化而变化。

3.2 不同有机肥源与土壤微生物多样性的关系

土壤微生物数量分析主要反映土壤中可经培养基培养繁殖的各大类种群,但其只占土壤微生物种群的一小部分,因而无法客观反映不同施肥处理对土壤原生态微生物种群的影响,而采用 DGGE 分析可弥补这一缺陷。本试验通过土壤微生物总 DNA 的提取,PCR 扩增 16S rRNA 基因,对 PCR 扩增产物的 DGGE 分析可知,不同有机肥源与不施肥及化肥比较电泳条带强度和迁移率有所不同;不施肥和化肥谱带数和谱带强度基本一致,说明不同有机肥源对土壤微生物多样性产生一定的影响,影响时间长短取决于施入土壤有机肥源的碳氮比、种类以及在土壤中被土壤微生物转化与矿化的持续时间,而不施肥和化肥处理的谱带强度基本一致,表明当季速效养分对土壤微生物影响是有限的。土壤微生物多样性相对稳定,只有长期持续的培肥地力,才会反映

出具有相对稳定的土壤微生物多样性特征组分,刘恩科^[12]等试验也表明,长期 NPK 肥配施外源有机物质(猪粪、秸秆)可改变土壤细菌的群落结构,而长期单施化肥或不施肥与长期撂荒的细菌的群落结构相似。本研究表明,施用各品种有机肥较不施肥和化肥可促进不同种类微生物量的提高,但具体何种微生物种群还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 吕卫光, 黄启为, 沈其荣, 等. 不同来源有机肥及有机肥与无机肥混施对西瓜生长期土壤酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(4): 67-71
- [2] 任祖淦, 陈玉水, 唐福钦, 等. 有机无机肥料配施对土壤微生物和酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 1996, 2(3): 279-283
- [3] 孙瑞莲, 赵秉强, 朱鲁生, 等. 长期定位施肥对土壤酶活性的影响及其调控土壤肥力的作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(4): 406-410
- [4] 蔡燕飞, 廖宗文. 土壤微生物生态学研究方法进展[J]. 土壤与环境, 2002, 11(2): 167-171
- [5] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生态学报, 2003, 23(8): 1570-1575
- [6] Vigdis T., Lisc O. Microbiol diversity and function in soil: From gene to ecosystems[J]. Current Opinion in Microbiology, 2002, 5: 240-245
- [7] 张树生, 杨兴明, 茆泽圣, 等. 连作土灭菌对黄瓜(*Cucumis sativus*)生长和土壤微生物区系的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(5): 1809-1817
- [8] Bossio D. A., Girvan M. S., Verchot L., et al. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya[J]. Microbial Ecology, 2005, 49(1): 50-62
- [9] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态研究中总 DNA 的提取[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 854-860
- [10] 黄启为, 杨志辉, 刘鹏, 等. 湖南省旱地土壤硫素状况及作物施硫效应[J]. 土壤, 2003 (2): 126-135
- [11] 何永群, 刘斌, 朱树标, 等. 氨基酸复混肥对几种作物产量和品质的影响[J]. 广西农业科学, 1995 (5): 211-213
- [12] 刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 等. 不同施肥制度土壤微生物量碳氮变化及细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析[J]. 生态学报, 2007, 27(3): 1079-1085