

DOI:10.11937/bfyy.201709032

氮钾配施对设施番茄土壤微生物群落及土壤养分和盐分的影响

何志刚, 娄春荣, 王秀娟, 董 环, 韩 瑛 祚

(辽宁省农业科学院 植物营养与环境资源研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:为了探明不同氮钾肥用量对番茄根际土壤细菌群落及土壤养分和盐分的影响,以番茄为研究对象,设置不同氮肥和钾肥用量,通过土培盆栽模拟试验,利用高通量测序技术测定根际土壤微生物及土壤养分的变化。结果表明:1)施肥使主要的优势菌群发生明显改变,过量施肥显著降低根际土壤的细菌数量,根际土壤中肠杆菌科(Enterobacteriaceae)细菌的相对丰度明显下降,但鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)和黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)相对丰度略有增加,细菌种群分布趋于单一化。2)过量施肥导致的土壤电导率(EC)增加、C/N下降,是土壤根际细菌群落发生改变的主要原因。3)过量施肥显著降低番茄株高、茎粗,但叶片叶绿素 SPAD 相对含量却呈现增加趋势,叶片光合作用受到抑制,从而产量明显下降。研究表明,施肥过量是导致设施土壤次生盐渍化的主要因素,次生盐渍化导致土壤中细菌群落发生改变,植株生长受到抑制,从而产量下降。

关键词:土壤微生物;高通量测序;电导率(EC)

中图分类号:S 641.226.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)09-0148-06

设施农业作为我国农业现代化的重要标志和农业结构调整的重要选择而得到迅速发展,以辽宁省

第一作者简介:何志刚(1978-),男,硕士,副研究员,现主要从事设施土壤等研究工作。E-mail:hezhiang1227@126.com.

责任作者:娄春荣(1966-),男,硕士,研究员,现主要从事设施土壤等研究工作。E-mail:lcllys@126.com.

基金项目:国家现代农业产业技术体系辽宁省科技厅农业攻关资助项目(201415003);辽宁省科技厅创新人才资助项目(2015028)。

收稿日期:2017-02-08

为例,从2008年开始,辽宁省政府启动设施农业建设工程,在政策的推动下,2011年以来,辽宁省设施蔬菜以年均新增超千公顷的速度,实现了跨越式发展。但随着设施农业的迅猛发展,地表长期覆盖栽培改变了土壤原有的生态环境,其温度、湿度、光照、小气候等都发生了很大的变化,土壤经常处于高温、高湿、高蒸发、无雨水淋溶的环境中,同时生产中盲目追求高产采取了高施肥、高用药等管理措施,使土壤的理化性状和生物学特性产生了很大的变化。不合理施肥,特别是大量施用氮肥、钾肥可能是设施栽

and then gradually changed to be a steady state. In the process, the pH values were enhanced significantly in spite of small fluctuations, and ultimately they were increased to the range of 7.5—9.0. In the process, the C/N ratios had a decreased trend with the composting; 2) from the point of physical characteristics, when the mushroom substrates of *Pleurotus ostreatus*, *Auricularia auricula-judae* and chicken manure being blended according to the proportion of 2 : 4 : 4 (I-2, II-2), their color, odor, colony growth and water content would have a better compost maturity; 3) the composting composed of mushroom substrates of *Pleurotus ostreatus*, *Auricularia auricula-judae* and chicken manure, whose total P and total K contents were enhanced first and then reduced in the period of composting. However, the *Lentinula edodes*, *Auricularia auricula-judae* mushroom substrates were mixed by chicken manure according to the ratios of 3 : 4 : 3, 2 : 4 : 4 and 1 : 4 : 5 (I-1, I-2, I-3), their total P and total K contents would be enhanced at the end of composing; 4) When the ratio of *Pleurotus ostreatus*, *Auricularia auricula-judae* and chicken manure was 3 : 4 : 3 (II-1), the 90 days' composting was still unable to ensure the maturity from the perspective of biology, on the contrary, the other two treatments (II-2, II-3) could effectively promote the maturity of compost.

Keywords: spent mushroom substrates; chicken manure; composting; characteristics

培蔬菜土壤酸化和次生盐渍化的主要原因,关于设施栽培过量施肥后土壤盐分累积状况及施肥对作物生长、产量等影响已引起人们关注并进行了大量研究^[1-4],但针对参与不同施肥量下设施蔬菜土壤微生物群落结构和数量变化的研究则相对较少,该试验运用高通量测序技术研究不同氮钾配施用量下,对设施番茄根际土壤有效养分及微生物多样性的影响,以有效地调控施肥过量,减少土壤盐分累积,维持和提高土壤肥力,为实现可持续发展提供理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验地点设在辽宁省农业科学院设施蔬菜长期定位试验基地。试验地耕层土壤为草甸土,壤质,土

表 1 土壤理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties

土壤深度 Soil depth /cm	有机质 SOM /(g·kg ⁻¹)	全氮 Soil nitrogen /(g·kg ⁻¹)	全磷 Soil phosphorus /(g·kg ⁻¹)	全钾 Soil potassium /(g·kg ⁻¹)	速效氮 Soil alkali-hydrolyzed nitrogen /(mg·kg ⁻¹)	速效磷 Soil available phosphorus /(mg·kg ⁻¹)	速效钾 Soil available potassium /(mg·kg ⁻¹)	容重 Soil bulk density /(g·cm ⁻³)	pH	电导率 EC /(μS·cm ⁻¹)
0~20	41.9	0.96	1.32	22.0	224	520	448	1.34	6.7	550

种植收获时间为 2015 年 3 月 28 日至 8 月 5 日。盆栽种植采用底部内径 23 cm、上部内径 28 cm、高 25 cm 的塑料盆,每盆装鲜土 20 kg。土壤以及肥料混合均匀后装盆,随机排列,5 次重复。于番茄不同生育时期分别取样测定相关指标。管理措施同常规大棚。每处理 2 次重复,分别采集 5 个样点并均匀混合后留取部分样品用聚乙烯袋密封,将样品放入预先准备好的冰盒,带回实验室于-80℃冰箱中保存,作为微生物分析用。另留取部分样品自然风干,用于土壤理化性质测定。

1.3 项目测定

1.3.1 微生物种群测定基因组 DNA 提取 土壤微生物总 DNA 的提取及细菌的高通量测序采用土壤 DNA 提取试剂盒(Power Soil® DNA Isolation Kit),提取土壤微生物基因组 DNA。所提取的土壤总 DNA 浓度和纯度用核酸定量仪(Nano Drop ND-1000)检测。各样品纯化后 DNA 送至北京诺禾致源公司应用 Illumina 平台的 HiSeq 进行测序。PCR 扩增:以稀释后的基因组 DNA 为模板,根据测序区域的选择,使用带 Barcode 的特异引物,New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer,和高效高保真的酶进行 PCR,确保扩增效率和准确性。引物对应区域:16SV4 区引

壤理化性质如表 1。

供试番茄品种为“元鸿粉旺”。供试肥料为尿素(N 46%)、磷酸二铵(N 18%,P₂O₅ 46%)、硫酸钾(K₂O 50%)和过磷酸钙(P₂O₅ 12%)。

1.2 试验方法

在设施常规番茄施肥(N:450 kg·hm⁻²、K₂O:502.5 kg·hm⁻²)基础上,采用盆栽试验的方法,设氮肥和钾肥不同用量,氮和钾用量的比例为 1.0:1.1,其中 P₂O₅ 的用量为 0.3 g·kg⁻¹土,试验处理的设置借鉴前期工作基础^[5],共设 3 个处理。处理 CK:不施肥;处理 FP:常规施肥(N 0.2、P₂O₅ 0.3、K₂O 0.22 g·kg⁻¹土;处理 HS:高量施肥(N 1.6、P₂O₅ 0.3、K₂O 1.76 g·kg⁻¹土)。

物(515F 和 806R)鉴定细菌多样性。PCR 产物的混样和纯化:PCR 产物使用 2%琼脂糖凝胶进行电泳检测;根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,对目的条带使用 qiagen 公司提供的胶回收试剂盒回收产物。文库构建和上机测序:试验采用双端(pair-end)测序。首先对原始数据进行质量控制,用软件 Flash 连接通过质量控制的序列,舍弃无法连接的序列。根据试验要求,过滤 read 尾部质量值 20 bp 以下的碱基,设置 50 bp 的窗口,如果窗口内的平均质量值低于 20 bp,从窗口开始截去后端碱基,过滤质控后 50 bp 以下的 read;根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对 reads 拼接(merge)成一条序列,最小 overlap 长度为 10 bp;拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2,筛选不符合序列;检测序列末端 box 序列,最小错配数为 0,将起始端包含 box 的序列进行反向互补,并去除 box;检测序列上的 barcode 并区分样品,barcode 错配数为 0,最大引物错配数为 2,获得最终用于分析的序列^[6-7]。使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 QPCR 定量,文库合格后,使用 Hiseq2500 PE250 进行上机测序。

1.3.2 理化性质测定 测定盛果期土壤的速效氮、速效磷、速效钾、EC、pH、有机质、碳氮比。方法见土壤农化分析^[8]。

1.3.3 植株生理指标与光合性能测定 每小区选取 10 株番茄,测定株高、茎粗、标记功能叶测定叶绿素 SPAD(主茎倒 3 叶),于晴朗天气 10:00—14:00 使用 LI-6400XT 光合仪测定番茄主要生育时期即苗期功能叶片净光合速率(Pn)及细胞间隙二氧化碳浓度(Ci),取 10 株平均值。

1.3.4 番茄产量测定 在收获期记录不同时期采摘果实记录质量并取样。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003、MEGA 5.05 软件和 DPS 7.05 软件进行数据处理和统计分析,采用 LSD 法进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 土壤细菌群落变化情况

对 3 个处理根系土壤中的细菌 16S rRNA 基因

表 2 高通量序列数及其微生物分类水平概述

Table 2 High throughput sequence number and taxonomic classification of endophytic microbes

处理 Treatment	高质量序列数目	序列被鉴定到各个分类水平的百分比 Percentage of the sequence identified at different taxonomic levels/ %				
	High quality	门	纲	目	科	属
	reads number	Phylum	Phylum	Order	Order	Genus
CK	56 744.0±5 973.0a	99.25±0.02a	98.65±0.02a	88.56±0.01a	75.68±0.30a	38.56±0.46a
FP	52 452.5±6 298.5a	99.78±0.04a	98.21±0.01a	88.21±0.44a	74.65±1.80a	39.57±1.98a
HS	35 874.0±3 034.5b	98.25±0.06a	97.25±0.08a	88.26±1.15a	72.80±1.27a	35.68±0.03b

注:不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P<0.05$). The same below.

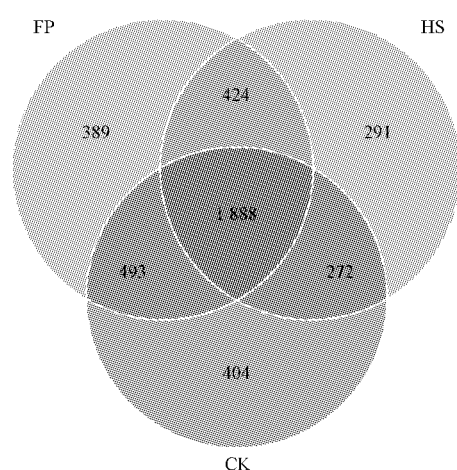


图 1 不同处理土壤优势细菌维恩图

Fig. 1 Venn diagram of dominant genera in different treatment soils

序列进行了高通量测序,结果表明,删除掉低质量序列后,所有样品共得到 145 070.5 条高质量的 16S rRNA 基因序列(表 2),平均每个样品的序列数为 48 357,平均序列长度 402 bp,几乎所有序列均被鉴定为细菌,古菌占比例低于 0.01%。处理中 CK 数量最多,HS 数量最低,CK 与 FP 处理间差异不显著,HS 与其它 2 个处理达到差异显著水平。

土壤中细菌主要包括厚壁菌门(Firmicutes),变形菌门(Proteobacteria),绿弯菌门(Chloroflexi),酸杆菌门(Acidobacteria),拟杆菌门(Bacteroidetes),放线菌门(Actinobacteria),疣微菌门(Verrucomicrobia),蓝藻门(Cyanobacteria),及浮霉菌门(Planctomycetes)。其中变形细菌、拟杆菌和放线细菌是优势菌。属于变形菌门的细菌最多达 26.53%,包括 α (10.20%)、 β (0.68%)、 γ (10.20%)、 δ (5.44%) 4 个变形菌纲,拟杆菌主要包括黄杆菌纲(Flavobacteria)、鞘脂杆菌纲(Sphingobacteria)、拟杆菌纲(Bacteroidetes)。

通过 Venn 图(图 1)分析了 3 个处理土壤细菌共有的优势属(相对丰度 $>1\%$)的数量及特有的优势属,3 个处理优势属共有 4 161 个,3 个处理中均有分布的优势种属有 1 888 个;FP 处理中优势属的种类最多,为 3 194 个;HS 处理中优势属的种类最少,为 2 875 个。FP 常规施肥均显著提高了土壤优势属数量,HS 高量施肥明显降低了土壤优势属数量。

由图 2 聚类分布可见,FP 和 CK 处理布赫纳氏菌科(Buchnera)的相对丰度分别达到 23.61%、39.75%,但 HS 处理的相对丰度只有 0.05%;3 个处理的鞘脂单胞菌科(Kaistobacter)相对丰度分别为 FP(24.82%)和 CK(22.46%)、HS(32.95%);HS 中盐单胞菌属(Halomonas)相对丰度为 7.05%,明显高于其它 2 个处理,说明过量施肥明显改变了土壤细菌群落结构。

由图 3 可知,3 个处理土壤样品共有的相对丰度较高的优势属鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)

表 3 不同处理土壤养分和盐分

Table 3 Soil nutrients and salinity in different treatment soils

处理 Treatment	速效氮 Alkali-hydrolyzed nitrogen /(g · kg ⁻¹)	速效磷 Available phosphorus /(g · kg ⁻¹)	速效钾 Available potassium /(g · kg ⁻¹)	电导率 EC /(μS · cm ⁻¹)	pH	有机质 SOM /(g · kg ⁻¹)	碳氮比 C/N ratio
CK	90.30±16.74c	75.93±9.87b	95.00±11.53c	89.67±15.50c	6.53±0.23a	1.227±0.12a	7.50±0.43a
FP	135.00±18.68b	81.60±13.86b	362.00±26.87b	273.33±165.40b	6.20±0.20a	1.203±0.04a	5.86±0.22b
HS	315.00±2.83a	102.58±7.00a	1 173.00±162.60a	960.00±127.30a	6.30±0.10a	1.250±0.08a	4.84±0.94b

氮比影响较大,碳氮比分别达到 7.50、5.86、4.84,处理间达到差异显著水平,土壤的碳氮比和土壤速效养分变化呈现相反的趋势,均随着施肥量的增加呈现下降趋势。

2.3 植株生理性状及产量情况

温室栽培条件下过量施肥引起的积盐主要是养分离子 NO₃⁻、Ca²⁺、K⁺ 等的累积,其对作物生长影响的表现、机理和程度可能不同,以往关于这方面的研究相对较少^[12]。不同氮钾施肥量对番茄生长影响(表 4)说明,过量施用氮肥和钾肥均显著降低番茄株高、茎粗,但叶片叶绿素 SPAD 相对含量却呈现增加

趋势。特别是过量施肥会抑制番茄生长,使生长期相同的番茄光合速率、细胞间隙二氧化碳浓度(Ci)等数据均表现为番茄叶片光合作用受到抑制,气孔导度和胞间 CO₂ 浓度显著降低。这一结果可能解释和印证了生产实际中遇到的实际问题:农户常反映自家与其它农户同时栽植的番茄,但自家的生长缓慢,误以为施肥量和灌水不足,进而不断施肥灌水,结果却适得其反。从产量数据观察到,过量施肥产量明显下降,明显低于常规施肥和不施肥处理,处理间达到差异显著水平,说明过量施肥导致的次生盐渍化是导致产量下降的主要原因。

表 4 不同处理植株生理性状和光合特性及产量

Table 4 Plant physiological traits, photosynthetic characteristics and yield in different treatment soils

处理 Treatment	叶绿素 SPAD	株高 Plant height /cm	茎粗 Stem diameter /cm	光合速率 Photosynthetic rate /(μmol · m ⁻² · s ⁻¹)/(H ₂ O mol · m ⁻² · s ⁻¹)	气孔导度 Stomatal conductance /(μL · L ⁻¹)	胞间 CO ₂ 浓度 Ci /(mmol · m ⁻² · s ⁻¹)	蒸腾速率 Transpiration rate /(t · hm ⁻²)	产量 Yield
CK	42.27±1.83b	38.40±2.07a	7.92±0.94a	22.13±1.44a	0.636±0.14b	299.32±15.70b	10.878±0.69a	107.19±0.57b
FP	44.53±3.20b	39.40±3.44a	7.64±0.85a	22.24±2.70a	0.819±0.22a	309.70±8.21a	10.086±2.43a	123.66±0.36a
HS	49.58±3.96a	29.40±3.21b	5.31±0.43b	21.92±0.86a	0.596±0.27b	295.00±18.11b	10.441±1.26a	41.94±0.34c

3 结论与讨论

该研究利用 Illumina 平台 Hiseq 高通量测序技术对土壤细菌 16S rDNA V3~V4 区进行扩增测序,各样本的覆盖率指数显示在相似度为 0.97 的条件下,OTUs 涵盖了土壤中 99% 以上的细菌;同时测序还发现了许多未被分类的细菌,说明高通量测序可以得到较为全面的生物学信息,一些未被认识和分类的细菌也能通过测序有所体现。3 个处理间土壤未被分类的细菌在各个分类学水平上相对丰度差异并不大。土壤优势细菌类群相对丰度与土壤理化性质有一定的相关性^[13]。该研究通过测定不同施肥处理的土壤细菌类群现,施肥可以改变土壤中的菌群变化主要的优势菌群发生明显改变,过量施肥显著降低根际土壤中肠杆菌科(Enterobacteriaceae)细菌的相对丰度,但鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)和黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)相对丰度略有增加,细菌种群分布趋于单一化。过量施用氮钾肥引起土壤盐分累积^[14]。该研究通过测定土壤的养分以及盐分的变化发现,影响菌群变化的主要因子是土

壤的 EC、C/N,施肥导致的土壤 EC 变化,随着施肥量的增加土壤 EC 增加、C/N 下降、从而导致土壤根际细菌群落的改变。该研究通过测定植株的生理性状和光合特性及产量变化发现,过量施用氮肥和钾肥均显著降低番茄株高、茎粗,但叶片叶绿素相对含量却呈现增加趋势,叶片光合作用受到抑制,从而产量明显下降。该研究只分析了土壤细菌群落的整体变化,对于特殊功能类群(如固氮菌、硝化细菌等)和其它在土壤生态系统中扮演重要角色的微生物种类(如古菌、真菌等)没有进行研究,对于土壤生态系统中各类微生物的系统研究将是课题未来研究的重要方面,进而为探究环境友好型的可持续农业提供坚实基础。

参考文献

- [1] 王琦,李锋瑞,张智慧.灌溉与施肥对黑河中游新垦沙地农田土壤硝态氮动态的影响[J].环境科学,2008,29(7):291-299.
- [2] 尹辉,张恩和,王琦,等.春小麦留茬处理对复种油菜产量和水分利用效率的影响[J].农业工程学报,2011,27(2):83-88.
- [3] CHESHIRE M V, BEDROCK C N, WILLIAMS B L, et al. The immobilization of nitrogen by straw decomposition in soil[J]. Eur J Soil

Sci,1999,50:320-341.

[4] ACKSON L E, WYLAND L J, STRIVERS L J. Winter cover crops to minimize nitrate losses in intensive lettuce production[J]. J Agric Sci,1993,121:55-62.

[5] 王秀娟,袁兴福,姜春荣,等. 不同氮钾用量对番茄生长和叶片超微结构的影响[J]. 中国土壤与肥料,2014(3):44-48.

[6] HUSE S M, HUBER J A, MORRISON H G, et al. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing[J]. Genome Biology, 2007,8(7):R143.

[7] ZHANG Y, WANG X, HU M, et al. Effect of hydraulic retention time(HRT) on the biodegradation of trichloroethylene waste water and anaerobic bacterial community in the UASB reactor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2015,99(4):1977-1987.

[8] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1999.

[9] 杨荣,苏永中. 水氮配合对绿洲沙地农田玉米产量、土壤硝态氮

和氮平衡的影响[J]. 生态学报,2009,29(3):1459-1469.

[10] 郑成岩,于振文,王西芝,等. 灌水量和时期对高产小麦氮素积累、分配和转运及土壤硝态氮含量的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2009,15(6):1324-1332.

[11] 沙海宁,孙权,李建设,等. 不同施氮量对设施番茄生长与产量的影响及最佳用量[J]. 西北农业学报,2010,19(3):104-108.

[12] 陈竹君,王益权,许安民,等. 施用不同种类氮肥对日光温室土壤溶液离子组成的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2008,14(5):907-913.

[13] SHEN C, XIONG J, ZHANG H, et al. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain[J]. Soil Biology and Biochemistry,2013,57(3):204-211.

[14] 赵文艳,张晓敏,石宗琳,等. 氮钾肥施用对土壤有效养分和盐分及番茄生长的影响[J]. 水土保持学报,2011(4):100-103,109.

Nitrogen and Potassium on Soil Microbial Communities of Tomato and Soil Nutrient and Salinity

HE Zhigang, LOU Chunrong, WANG Xiujuan, DONG Huan, HAN Yingzuo

(Plant Nutrition and Environmental Resources Research Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 100161)

Abstract: In order to investigate the influence of different nitrogenous and potassium fertilizers on soil bacterial community and soil nutrient and salt changes in tomato rhizosphere soil. Tomato was used as test object, different dosage of nitrogenous and potassium were set, with indoor pot simulation tests using high-throughput sequencing methods, the change of the soil bacterial community and soil nutrient and salt were studied. The results showed that, 1) Fertilization significantly changed the dominant microorganisms, high fertilization significantly reduced the number and species of bacteria in the soil. In the dominant microorganisms Enterobacteriaceae relative abundance significantly reduced, Sphingomonadaceae and Xanthomonadaceae relative abundance slightly increased. The dominant microorganisms tended to be single. 2) High fertilization significantly increased the soil conductivity (EC) and decreased the soil C/N, was the main reason for the change of the soil the dominant microorganisms. 3) High fertilization significantly decreased the plant height and diameter but significantly increased SPAD. High fertilization led to the inhibition of leaf photosynthesis, resulting in a significant decline in yield. The results showed that high fertilization was the main factor leading to the secondary salinization of the soil, and the secondary salinization led to the change of the bacterial community in the soil, and the secondary salinization led to the inhibition of leaf photosynthesis, resulting in a significant decline in yield.

Keywords: soil bacterial community; high throughput sequencing; conductivity