

研究报告

三种不同土壤改良剂对黄瓜根际微生物数量和群落代谢功能多样性的影响

申佳丽, 安明远, 魏彦凤, 张文文, 游宏建, 杨海波, 马兰, 曹云娥*

宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021

申佳丽, 安明远, 魏彦凤, 张文文, 游宏建, 杨海波, 马兰, 曹云娥. 三种不同土壤改良剂对黄瓜根际微生物数量和群落代谢功能多样性的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1651-1663

Shen Jiali, An Mingyuan, Wei Yanfeng, Zhang Wenwen, You Hongjian, Yang Haibo, Ma Lan, Cao Yun'e. Effects of three different soil amendments on the number and metabolic function diversity of rhizospheric microorganisms of cucumber[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1651-1663

摘要:【背景】土壤微生物在调节植物生长、提高土壤养分利用率及维持生态系统稳定性等方面发挥着重要作用。【目的】探讨蚯蚓原位处理废弃物及脱硫石膏改良土壤后的微生物群落结构多样性特征, 深入研究黄瓜根际微生物群落数量与微生物指数之间的相关性。【方法】通过平板培养法测定可培养真菌、细菌、放线菌群落数量与 Biolog-ECO 微平板法分析 OD_{590} 值微生物碳源利用率相结合, 研究蚯蚓处理废弃物原位生成蚯蚓粪替代土壤(T1)、脱硫石膏(3 t/hm^2) (T2)、蚯蚓处理废弃物原位生成蚯蚓粪与脱硫石膏混施(T3)这 3 种土壤处理下载培黄瓜, 其根际微生物群落多样性特征。【结果】T1、T3 处理的可培养放线菌数量显著高于 CK、T2; 细菌与真菌菌落数量无显著性差异。各处理的平均每孔颜色变化率(average well color development, *AWCD*)呈“厂”型趋势变化, 在 0-96 h 上升迅速, 96-144 h 缓慢上升至最高值, T1、T3 处理的 *AWCD* 值高于 CK、T2。与对照相比, 各处理的 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数和 McIntosh 指数存在显著性差异。与 CK 相比, T1 与 T2 处理的碳源利用率较高。细菌、放线菌数量与 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、McIntosh 指数和 Pielou 指数呈显著性正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而真菌可培养数量与 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、McIntosh 指数和 Pielou 指数呈显著性负相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。【结论】蚯蚓原位处理废弃物种养模式下, 土壤可培养微生物总菌群落较多, 群落多样性指数较高, 微生物碳源利用率较高, 探究蚯蚓处理废弃物的生态功能特征变化, 以期新型栽培模式提供理论依据。

关键词: 黄瓜; 脱硫石膏; 蚯蚓原位处理; Biolog-ECO 微平板法

基金项目: 国家自然科学基金(31760569)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31760569)

*Corresponding author: E-mail: caohua3221@163.com

Received: 2021-07-22; Accepted: 2021-08-25; Published online: 2022-01-28

Effects of three different soil amendments on the number and metabolic function diversity of rhizospheric microorganisms of cucumber

SHEN Jiali, AN Mingyuan, WEI Yanfeng, ZHANG Wenwen, YOU Hongjian, YANG Haibo, MA Lan, CAO Yun'e*

School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

Abstract: [Background] Soil microbes play an important role in regulating plant growth, improving soil nutrient utilization rate and maintaining ecosystem stability. [Objective] To explore the structure diversity of the microbial community in cucumber rhizospheric soil under the *in situ* treatment of waste by earthworms and the treatment with desulfurization gypsum for soil improvement, and reveal the relationship between the number of soil microorganisms and microbial diversity indexes. [Methods] We determined the number of cultivable fungi, bacteria, and actinomycetes in the cucumber rhizospheric soils treated with three different amendments (T1–T3), and employed Biolog-ECO microplate method to study the metabolic functions of microbial communities. We then compared the number and metabolic function diversity between the *in-situ* treatment of waste by earthworms (T1), the treatment with desulfurization gypsum (T2), and the combination of the above two treatments (T3). [Results] The number of cultivable actinomycetes of T1 and T3 treatments was significantly higher than that of CK and T2, and that of bacterial and fungal colonies had no significant difference among treatments. The *AWCD* values of different treatments presented an upward trend, rising rapidly within 0–96 h and then slowly to the maximum. The *AWCD* values of T1 and T3 were higher than those of CK and T2. The *AWCD*, Shannon index, Simpson index, Pielou index, and McIntosh index all showed significant differences among treatments. Compared with CK, T1 and T2 had efficient carbon source utilization. The number of bacteria and actinomycetes had positive correlations with *AWCD* value, Shannon index, Simpson index, McIntosh index, and Pielou index ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while that of cultivable fungi was negatively correlated with *AWCD* value, Shannon index, Simpson index, McIntosh index, and Pielou index ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). [Conclusion] Upon the *in situ* treatment of waste by earthworms, the soil can harbor more microbial communities with higher diversity and higher efficiency of carbon source utilization, which reveals the good performance of earthworms in the treatment of waste and the corresponding changes of ecological functions under the new cultivation mode. The findings of this study are expected to provide a theoretical basis for new cultivation modes.

Keywords: cucumber; desulfurization gypsum; earthworm *in situ* treatment; Biolog-ECO microplate method

随着科技的进步，人们对微生物的认识及研究越来越深入，土壤微生物在生态系统中的作用日益凸显^[1-2]。微生物的物种资源极其丰富^[3]，土壤微生物是土壤生物的重要组成部分

分, 微生物多样性代表着微生物群落的稳定性, 也能客观反映土壤生态机制和土壤胁迫作用对群落的影响^[4-5]。地上作物和地下微生物间具有协同作用和正负反馈效应的互作机制。探讨地上作物和土壤微生物多样性之间的互作关系, 为设施蔬菜栽培和设施生态系统的可持续发展研究提供参考^[6]。微生物对环境的作用主要是通过群落代谢功能差异实现的, 因此微生物功能多样性信息对于明确不同环境中微生物群落的作用、深入了解生态系统内部结构和功能变化具有重要意义^[7]。

经济作物黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是我国重要的设施蔬菜作物之一^[8]。宁夏设施栽培黄瓜面积较大, 由于温室栽培温湿度高、复种指数高, 导致土壤板结, 土壤微生物群落平衡破坏, 进而加重了黄瓜枯萎病、根腐病和根结线虫等土传病害的发生, 对黄瓜产量和品质造成不可避免的负面影响。因此, 改良土壤, 增加土壤有益微生物种群及数量, 解决重茬和土传病害、线虫等防治难题, 是黄瓜栽培的重中之重^[9]。

近年来, 宁夏地区利用脱硫石膏改良盐碱地取得初步成果^[10]。目前对于含钙物质改良盐碱土壤的机理比较明确, 其原理为利用 Ca^{2+} 置换土壤胶体上吸附的交换性 Na^{+} 。研究表明蚯蚓粪栽培葡萄, 不仅可以提升葡萄的品质, 还可以增加产量^[11]。蚯蚓吞食过程促进有机质原料的物理分解, 增加供给微生物生长代谢作用的表面积并刺激其活性^[12], 其肠道中多种酶(如蛋白酶、酯酶、淀粉酶、纤维素酶、几丁质酶等)及肠道内微生物群落^[13]可加速分解基质纤维素及蛋白质成分, 同时促进 β -糖苷酶、纤维素酶、蛋白酶、磷酸酶等胞外酶的分泌, 加快有机碳、含氮化合物及有机磷等生物降解, 最终将有机废弃物中诸如 N、P、K、Ca 等重要营养

元素转化为比原废弃物更易溶、易吸收的形态^[14], 而收获的蚯蚓除用于动物饲料外^[15], 还可综合运用用于医疗保健^[16]。目前的研究多集中在脱硫石膏对盐碱指标等化学性质的影响, 关于从土壤微生物群落功能多样性角度研究脱硫废弃物改良盐碱地效应的研究较少。牛粪作为养殖业的废弃物, 不仅影响市容, 而且污染环境^[17], 本研究将养殖场的新鲜牛粪经过半腐熟后, 利用蚯蚓处理半腐熟的牛粪生成蚯蚓粪用于蔬菜的生产, 这种蚯蚓原位处理废弃物种养结合栽培蔬菜的模式较少, 特别是微生物群落多样性及碳源利用分析鲜有研究。虽然前人对土壤改良已有大量研究, 但将蚯蚓原位处理废弃物形成蚯蚓粪与脱硫石膏耦合在一起的鲜有研究。而且, 根际微生物主导的植物碳利用过程的反馈机制仍是研究的难点之一。

1991年, Biolog-ECO 由 Garland 和 Mills 首次应用于研究微生物群落代谢功能多样性^[18], 该技术操作简单, 功能强大, 近年来已成为研究微生物功能多样性的重要工具, 在环境^[19]、农业^[20-21]、水产和食品等领域得到了很好的应用。基于此, 本研究以黄瓜品种‘德尔 88’为研究对象, 研究不同碳源利用底物与土壤可培养微生物菌群数量之间的关系, 以揭示蚯蚓处理废弃物的生态功能变化, 为新型栽培模式的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地介绍

采样地位于宁夏贺兰县宁夏园艺产业园, 该园区为宁夏示范性园区, 属大陆性季风气候, 年降水量为 200–300 mm, 年最高温度 (37±1) °C, 年最低温度为 -18 °C。试验温室为宁夏二代日光温室, 高 4 m, 长 100 m, 宽 8 m, 东西走向。

1.2 试验设计

蚯蚓处理废弃物原位替代土壤是本课题组长期研究发明出的一种新型栽培模式,起两条垄,每条垄宽 0.4 m,长 7.0 m,一垄作为养殖垄,用腐熟一个月后的牛粪作为蚯蚓培育垄,蚯蚓养殖垄上放置 2 条滴灌带,每日滴水,使养殖垄的湿度达到 55%–70%;另一垄作为栽培垄,通过蚯蚓吞食牲畜粪便产生成蚯蚓粪作为黄瓜栽培基质,每种植一茬,种植垄与养殖垄互换一次。试验设计见表 1。

1.3 样品采集及分析

1.3.1 土壤微生物数量测定

采样时期为黄瓜结果盛期,每个小区内取 10 株黄瓜根际土壤后充分混匀,组成一个试验样品,置于 4 °C 冰箱,进行后续测定。

称取冷藏于冰箱中不同处理试验样品各 10 g 于 90 mL 无菌水振荡均匀,拟定为 10^{-1} 浓度,依次 10 倍比稀释至 10^{-4} 。采用传统稀释涂布平板法^[22]测定土壤中细菌、真菌和放线菌数量。其中,分离细菌采用悬浮液 10^{-4} 稀释梯度在牛肉膏蛋白胨固体培养基(青岛海博生物有限公司,用于一般细菌培养、转种、复壮和增菌等)上 28 °C 培养 3 d 后待用;真菌采用悬浮液 10^{-4} 稀释梯度在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(青岛海博生物有限公司,用于霉菌和酵母菌计数)上 28 °C 培养 5 d 后采用 Scan 500 (INTERSCIENCE 公司)进行菌落计数;放线菌采用悬浮液 10^{-4} 稀释梯度在

高氏 1 号固体培养基(青岛海博生物有限公司,用于筛选、培养放线菌)上 30 °C 培养 5 d 后采用 Scan 500 进行菌落计数。CFU/g 代表:每克试验土壤可以在培养基上培养出的菌落数。

1.3.2 土壤微生物碳源代谢测定

土壤微生物碳源代谢特征的测定采用 Biolog-ECO 微平板法^[23]。具体步骤:取不同处理土壤各 10 g 放入 250 mL 锥形瓶中,加入 90 mL 0.85% NaCl 溶液,180 r/min 振荡 30 min 制备成土壤微生物悬浮液,静置片刻吸取上清液并稀释 1 000 倍得到菌悬液。吸取 150 μ L 的菌悬液接种在 Biolog-ECO 微平板中,置于 25 °C 恒温培养箱连续黑暗培养 240 h,在培养过程中,每隔 24 h 通过 Infinite F50 酶标仪读取 590 nm 处的吸光值(OD)^[24]。

1.4 Biolog-ECO 原理

Biolog-ECO 96 孔微平板上分布 31 种单一碳源和空白对照,每种碳源和空白有 3 个平行^[25]。31 种单一碳源大致可分为 6 大类,分别是糖类、氨基酸类、酯类、醇类、胺类和酸类^[26]。每个微平板孔中除了含有一种碳源外,还有四唑紫染料,微生物利用碳源所产生的自由电子可与四唑紫反应,通过颜色的深浅变化来反映微生物对碳源的利用程度,不同的微生物群落对 31 种单一碳源的利用类型不同,从而反映微生物代谢功能的多样性^[27]。选用 240 h OD_{590} 值分析黄瓜根际土壤微生物对不同碳源的利用以及

表 1 试验设计

Table 1 Experimental design

处理 Treatments	编号 No.
对照 Control	CK
蚯蚓处理废弃物原位生成蚯蚓粪替代土壤 Earthworm treatment waste <i>in situ</i> to generate earthworm dung replacement soil	T1
脱硫石膏(3 t/hm ²) Desulfurized gypsum (3 t/hm ²)	T2
蚯蚓处理废弃物原位生成蚯蚓粪替代土壤+脱硫石膏(3 t/hm ²) Earthworm treatment waste <i>in situ</i> to generate earthworm dung replacement soil + desulfurized gypsum (3 t/hm ²)	T3

代谢功能多样性的差异^[28]。将每孔 OD_{590} 值减去培养空白孔的 OD_{590} 值, 用以排除干扰, 然后计算平均每孔颜色变化率(average well color development, *AWCD*)。参考文献[7]选用 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数、McIntosh 指数、Richness 指数反映微生物群落代谢功能的多样性。

1.5 数据分析

利用 SPSS 20.0 进行数据处理, 通过单因素方差分析、最小显著性差异法、Pearson 相关性分析和主成分分析(principal component analysis, PCA)进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物数量

土壤微生物数量能反映土壤微生物能量代谢的旺盛程度, 而黄瓜根际微生物数量对黄瓜生长发育有重要意义。研究表明, 不同处理黄瓜根际可培养放线菌群落数量差异显著, 与 CK 相比, T1、T3 分别升高了 29.74%、13.81%, 而 T2 处理降低了 40.11%; 细菌、真菌群落数量差异不显著(表 2)。整体来说, 黄瓜根际可培养微生物数量排序为 T3>T1>CK>T2, 与对照相比, 蚯蚓处理废弃物原位生成蚯蚓粪后使土壤可培养微生物总量显著提高了 10.56%; 添加脱硫石膏使黄瓜根际可培养微生物数量降低了 4.01%; 二者混合使黄瓜根际可培养微生物数量增加了

13.49%。

2.2 不同处理 *AWCD* 值的变化

不同处理黄瓜根际微生物的 31 种碳源利用情况, 如图 1 所示, *AWCD* 值随时间的增加而不断升高, 呈“厂”型趋势变化; 不同碳源的 *AWCD* 值随时间的变化呈先上升后不变的趋势, 0–96 h 上升速度较快, 说明这段时间内微生物对碳源利用较好, 其中 T1 和 T3 处理的上升趋势显著高于 T2 处理和 CK; 96–120 h 平均颜色变化率上升速度较缓慢; 120–168 h 上升较缓慢; 168–240 h 趋于稳定。Garland 等^[18]认为微生物的数目和种类会影响微生物群落酶链反应速度, 通过 *AWCD* 值随时间变化的趋势差异可区分不同的微生物群落。一般变化幅度越大, 碳源利用能力越强, 微生物丰度也越高^[29]。

2.3 不同处理的不同物质吸光度值变化

采用生态学中最常用的 6 种多样性指数来反映微生物群落功能多样性, 结果如图 2 所示。培养 96 h, 采用 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数、McIntosh 指数和 Richness 指数等 6 种多样性指数侧面反映不同处理黄瓜根际微生物群落功能的多样性。由图 2A 可看出, 培养 96 h 的 *AWCD* 值排序为 T3>T1>T2>CK, 与 CK 相比, T1 显著高于 T2; T1 处理与 T3 处理无显著性变化。由图 2B 可看出, 培养 96 h T1 的 Shannon 指数显著高于 T2 处理, 其余处理无显著性差异。由图 2C 可

表 2 可培养土壤微生物数量

Table 2 Number of soil microbes

处理	细菌	真菌	放线菌	微生物总量
Treatment	Bacteria ($\times 10^6$ CFU/g)	Fungi ($\times 10^5$ CFU/g)	Actinomycetes ($\times 10^5$ CFU/g)	Total number of microbes ($\times 10^6$ CFU/g)
CK	2.17 \pm 0.12a	1.23 \pm 0.51a	7.53 \pm 0.57b	4.15 \pm 0.61b
T1	2.60 \pm 0.09a	1.06 \pm 0.16a	9.77 \pm 0.40a	4.64 \pm 0.26a
T2	2.30 \pm 0.18a	1.25 \pm 0.09a	4.50 \pm 0.61c	3.99 \pm 0.25c
T3	2.46 \pm 0.11a	1.39 \pm 0.27a	8.57 \pm 1.27ab	4.71 \pm 0.40a

注: 同列不同小写字母表示不同处理黄瓜根际微生物数量在 0.05 水平差异性显著

Note: Different lowercase letters in the same column indicate that different treatment in cucumber are significantly different at 0.05 level.

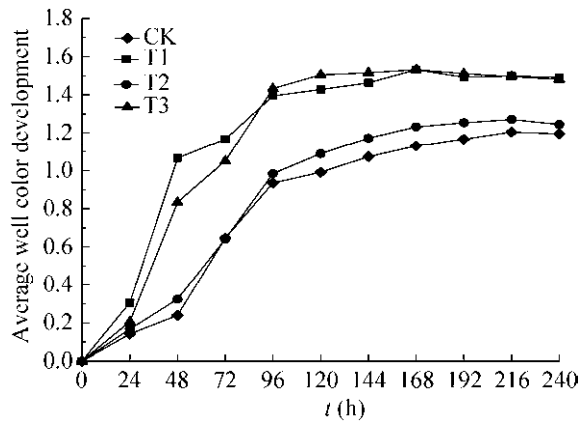


图1 不同处理下 *AWCD* 值在 240 h 内的变化趋势
Figure 1 The trend of *AWCD* value in 240 hours under different treatments.

看出, 培养 96 h 的 Simpson 指数 T1 与 T3 显著高于 T2 处理, 其余处理无显著性差异。由图 2D 可看出, T1 处理 Pielou 指数显著高于其余处理。由图 2E 可看出, T1 处理 McIntosh 指数显著高于其余处理。由图 2F 可看出, 各处理 Richness 指数无显著性差异。

综上所述, T1 即蚯蚓处理废弃物原位生成蚯蚓粪替代土壤处理的根际微生物 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数和 McIntosh 指数显著高于其余处理, 说明蚯蚓处理废弃物原位生成蚯蚓粪栽培黄瓜, 黄瓜根际微生物对 31 种碳源利用度较高, 群落多样性程度高; 而 T3 处理即脱硫石膏与蚯蚓处理废弃物混合替代土壤处理微生物群落指数较低。据报道, 蚯蚓肠道内具有大量的微生物, 蚯蚓分泌的蛋白可以作为植物直接吸收的营养^[30]。

2.4 不同处理的微生物利用特征

不同碳源的利用情况能够反映微生物群落碳代谢功能多样性, 此试验将 96 h 测定的 *AWCD* 值按照不同碳源利用特征进行热图绘制, 如图 3 所示, 不同处理黄瓜根际微生物对

土壤中碳源的有效利用有一定差异, 使得 31 种单一碳源被不同植被根际土壤微生物利用时差异显著。如图 3 所示, 与 CK 相比, T1 与 T3 处理对丙酮酸甲酯、吐温-40、D-纤维二糖、D-甘露醇、 γ -羟丁酸、D-苹果酸、L-精氨酸、L-天冬氨酸、L-丝氨酸、苯乙胺、腐胺等多种碳源的利用程度较高。T2 处理对 D-乳糖、肝糖、 γ -羟丁酸、D-半乳糖酸内酯等碳源利用程度较高。总之, T1 与 T3 处理对 31 种碳源利用较其他处理更优化。

2.5 土壤微生物对碳源利用多样性的主成分分析

主成分分析法是 Biolog-ECO 技术在研究微生物功能多样性中常用于分析微生物群落代谢功能多样性的方法之一, 该方法尤其受国内研究者的喜爱^[31]。为进一步了解不同处理黄瓜根际土壤微生物群落功能的差异, 由于多元向量不易直观地比较不同微生物群落间的差异, 因此选用降维的方法, 将不同样本的多元向量变换成互不相关的 2 个主元向量(PC1 和 PC2)。通过观察不同样品在降维后的二维空间上的位置, 可直观反映不同微生物群落间的代谢特征差异的大小。由表 3 可知, 选用培养 144 h 土壤微生物对 31 种碳源的 *AWCD* 值进行 PCA 分析, 提取 3 个主成分, 即第 1 主成分(PC1)、第 2 主成分(PC2)与第 3 主成分(PC3)。图 4 表示了黄瓜根际微生物对 31 种碳源的利用情况。PC1 的贡献率为 63.82%, PC2 的贡献率为 18.17%, PC3 的贡献率为 18.01%。PC1 载荷值较高的碳源有 (1) 丙酮酸甲酯、(2) 吐温-40、(4) α -环式糖精、(6) D-纤维二糖、(8) β -甲基-D-葡萄糖苷、(11) D-甘露醇、(15) D,L- α -磷酸甘油、(16) D-半乳糖酸内酯、(17) D-半乳糖醛酸、(18) 2-羟基苯甲酸、(19) 4-羟基苯甲酸、(20) γ -羟丁酸、(23) D-苹果酸、(24) L-精氨酸、(27) L-丝

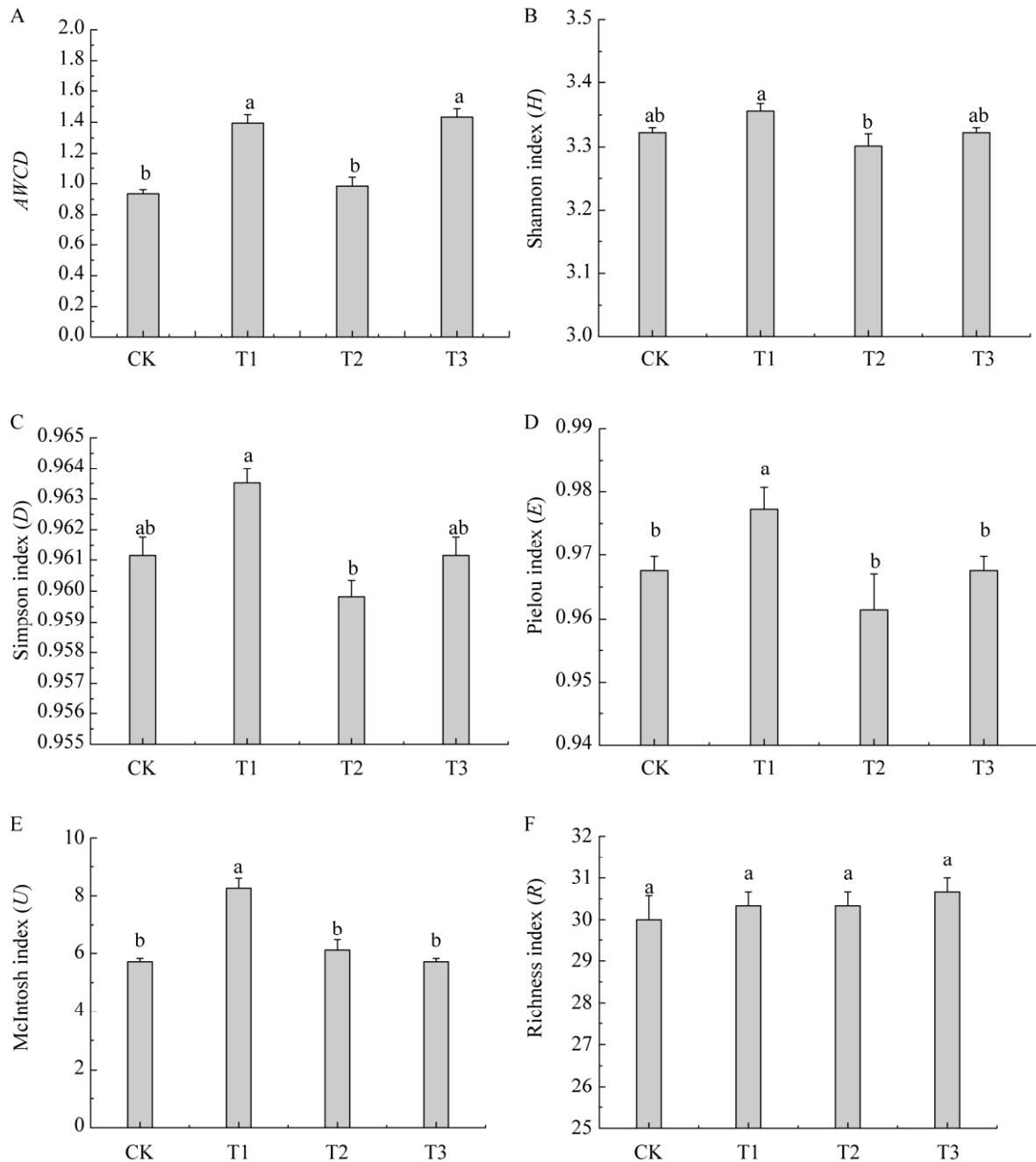


图 2 培养 96 h 后不同处理黄瓜根际微生物多样性指数变化 A: AWCD 值; B: Shannon 指数; C: Simpson 指数; D: Pielou 指数; E: McIntosh 指数; F: Richness 指数。不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)

Figure 2 The cucumber rhizosphere microbial diversity index changes under different treatments after 96 hours. A: AWCD value; B: Shannon index; C: Simpson index; D: Pielou index; E: McIntosh index; F: Richness index. Different lowercase letters in the same column indicate that different treatments are significantly different at 0.05 level.

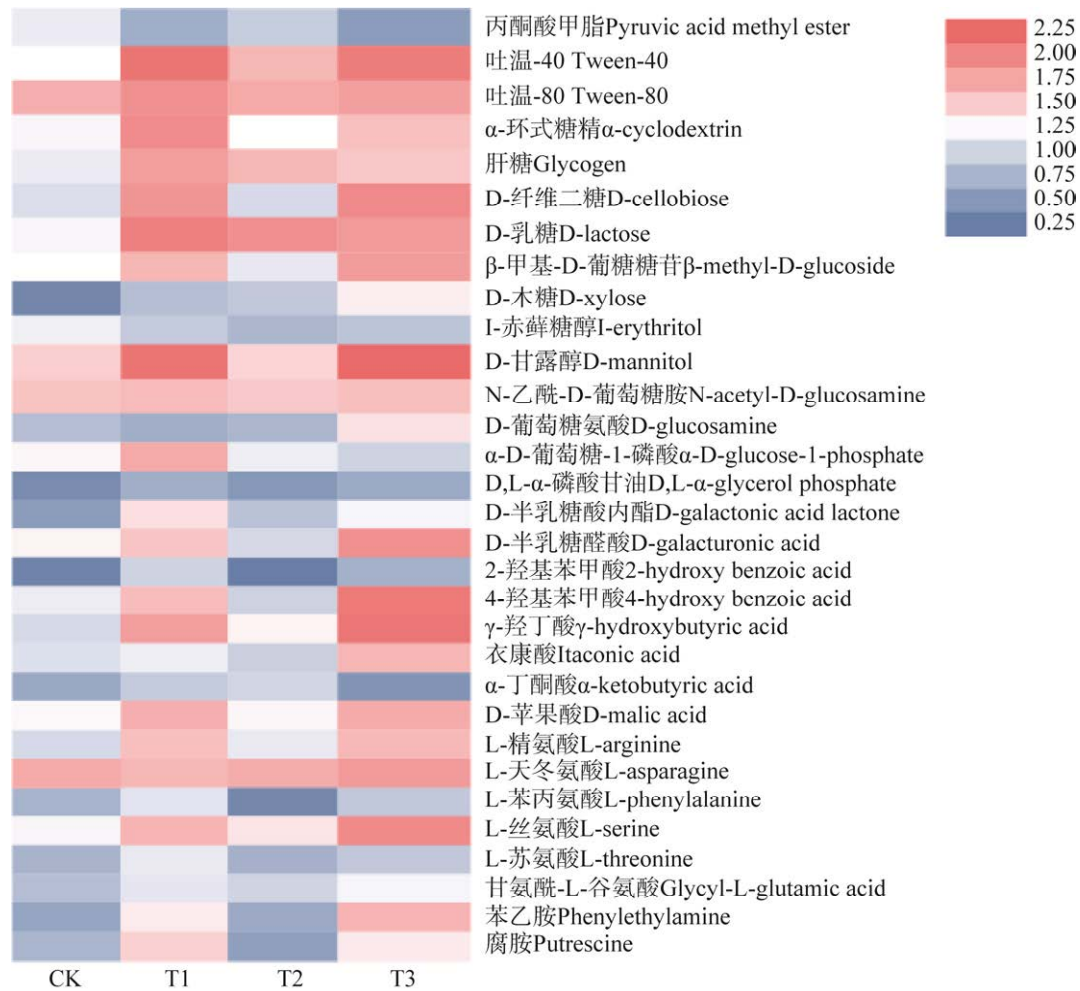


图 3 不同处理黄瓜根际微生物对不同碳源利用热图 暖色表示对应样本中 *AWCD* 值较高的碳源，冷色表示对应样本的 *AWCD* 值较低的碳源；横向表示不同处理，右侧纵向表示不同碳源，图例为碳源的 *AWCD* 值

Figure 3 Different carbon sources utilization heatmap of cucumber rhizosphere microorganisms among different treatments. Warm color block indicates the carbon source with a higher *AWCD* value in the corresponding sample, and cool color blocks indicate the carbon source with a lower *AWCD* value, respectively. The horizontal indicates the sample information, and the vertical on the right indicates the different carbon sources. The legend is the *AWCD* value of the carbon source.

表 3 培养 144 h 黄瓜根际微生物群落 31 种碳源利用 *AWCD* 值进行主成分分析

Table 3 The 31 carbon sources of cucumber rhizosphere microbial community were analyzed for PCA using *AWCD* values

主成分 Principal component	相关矩阵特征值 Eigenvalues of correlation matrix			提取因子载荷平方和 Extract factor load square sum		
	特征值 Eigenvalue	方差百分比 Variance (%)	累积方差 Cumulative variance (%)	特征值 Eigenvalue	贡献率 Contribution (%)	累积贡献率 Cumulative contribution (%)
	PC1	19.78	63.82	63.82	19.78	63.82
PC2	5.63	18.17	81.97	5.63	18.17	81.97
PC3	5.58	18.01	81.99	5.58	18.01	100.00

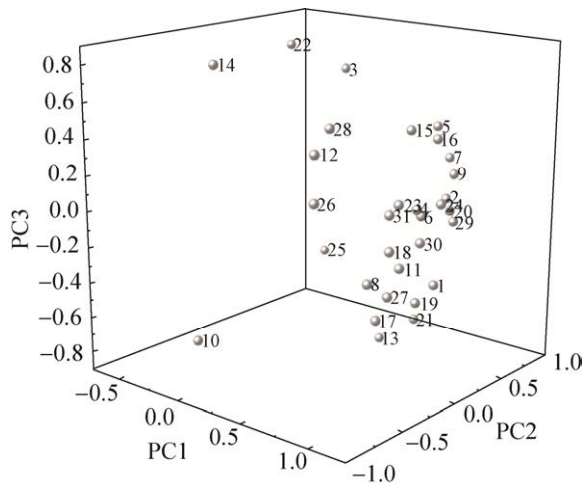


图 4 培养 144 h 后各碳源利用水平主成分分析
1: 丙酮酸甲酯; 2: 吐温-40; 3: 吐温-80; 4: α -环式糖精; 5: 肝糖; 6: D-纤维二糖; 7: D-乳糖; 8: β -甲基-D-葡萄糖苷; 9: D-木糖; 10: I-赤藓糖醇; 11: D-甘露醇; 12: N-乙酰-D-葡萄糖胺; 13: D-葡萄糖氨酸; 14: α -D-葡萄糖-1-磷酸; 15: D,L- α -磷酸甘油; 16: D-半乳糖酸内酯; 17: D-半乳糖醛酸; 18: 2-羟基苯甲酸; 19: 4-羟基苯甲酸; 20: γ -羟丁酸; 21: 衣康酸; 22: α -丁酮酸; 23: D-苹果酸; 24: L-精氨酸; 25: L-天冬氨酸; 26: L-苯丙氨酸; 27: L-丝氨酸; 28: L-苏氨酸; 29: 甘氨酸-L-谷氨酸; 30: 苯乙胺; 31: 腐胺

Figure 4 PCA of the utilization level of each carbon source after 144 h incubation. 1: Pyruvic acid methyl ester; 2: Tween-40; 3: Tween-80; 4: α -cyclodextrin; 5: Glycogen; 6: D-cellobiose; 7: D-lactose; 8: β -methyl-D-glucoside; 9: D-xylose; 10: I-erythritol; 11: D-mannitol; 12: N-acetyl-D-glucosamine; 13: D-glucosamine; 14: α -D-glucose-1-phosphate; 15: D, L- α -glycerol phosphate; 16: D-galactonic acid lactone; 17: D-galacturonic acid; 18: 2-hydroxy benzoic acid; 19: 4-hydroxy benzoic acid; 20: γ -hydroxybutyric acid; 21: Itaconic acid; 22: α -ketobutyric acid; 23: D-malic acid; 24: L-arginine; 25: L-asparagine; 26: L-phenylalanine; 27: L-serine; 28: L-threonine; 29: Glycyl-L-glutamic acid; 30: Phenylethy lamine; 31: Putrescine.

氨酸、(29) 甘氨酸-L-谷氨酸、(30) 苯乙胺、(31) 腐胺这 18 种碳源, 其中主要有 3 种糖类、3 种氨基酸类、4 种酯类、1 种醇类、2 种胺类和 5 种酸类, 这 18 种碳源之间具有较高的相关性; PC2 中吐温-80、D-乳糖、L-天冬氨酸, 这 3 种碳源具有较高的相关性, PC3 中 D-葡萄糖氨酸、 α -D-葡萄糖-1-磷酸、 α -丁酮酸, 这 3 种碳源具有较高的相关性。PC1 分出来的碳源可能是蚯蚓处理废弃物原位生成蚯蚓粪后显著提升的碳源, PC2 分出的碳源可能是脱硫石膏处理后显著提升的碳源, PC3 则指的是 CK 组。

2.6 不同处理与土壤微生物 AWCD 值和群落多样性与土壤微生物数量相关性分析

表 4 相关性分析表明, 细菌与土壤微生物 AWCD 值和多样性指数 H 、 D 、 E 、 U 、 R 呈显著正相关性 ($P < 0.05$), 与可培养土壤微生物总数呈极显著正相关性 ($P < 0.05$); 真菌数量与 AWCD 值、多样性指数 H 、 D 、 E 呈显著负相关 ($P < 0.05$); 与多样性指数 U 呈极显著负相关 ($P < 0.01$); 放线菌与 AWCD 值、多样性指数 H 、 D 、 E 呈极显著正相关 ($P < 0.01$); 可培养微生物总数与 AWCD 值呈极显著正相关 ($P < 0.01$); 与多样性指数 H 、 D 、 E 、 R 呈显著相关 ($P < 0.05$)。研究表明, 在一般情况下, 细菌和放线菌数量越大, 土壤微生物碳代谢能力和微生物群落多样性越高; 真菌数量越大, 土壤微生物碳代谢能力和微生物群落多样性越小。

3 讨论

土壤微生物在生态系统中起着举足轻重的作用, 是土壤中物质循环的主要动力。土壤微生物在植物生长过程中主要有以下几方面作用: (1) 分解有机物质, 参与有机物质合成, 改善土壤结构; (2) 促进养分循环和有效性;

表 4 培养 144 h 后黄瓜根际可培养微生物群落数量与多样性指数相关性

Table 4 After 144 hours of cultivation, the correlation between the number of cultivable microbial communities in the rhizosphere of cucumber and diversity index

Item	<i>AWCD</i> value	Shannon index (<i>H</i>)	Simpson index (<i>D</i>)	Pielou index (<i>E</i>)	McIntosh index (<i>U</i>)	Richness index (<i>R</i>)
细菌 Bacteria	0.765*	0.732*	0.755*	0.755*	0.759*	0.628*
真菌 Fungi	-0.738*	-0.710*	-0.761*	-0.761*	-0.872**	0.490
放线菌 Actinomycetes	0.668*	0.875**	0.821**	0.821**	0.521	0.191
微生物总数 Total number of microbes	0.814**	0.682*	0.640*	0.640*	0.405	0.643*

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

(3) 增加植物抗性, 促进植物对养分的吸收;

(4) 植物提供物理屏障, 有效防御病原菌的侵害^[32]。通过分析不同处理黄瓜根际土壤微生物群落对不同碳源的利用能力, 即对有机质的分解转化能力, 可深入探讨不同土壤改良剂对黄瓜根际微生物群落的功能多样性, 更好地反映群落总体的动态变化。本研究将传统的培养分离技术与 Biolog-ECO 微平板法相结合, 以探讨不同土壤处理对黄瓜根际微生物数量及群落代谢功能多样性的影响。结果表明, 不同处理黄瓜根际可培养微生物总数量存在显著差异, 由大到小的顺序为 $T3 > T1 > CK > T2$, $T1$ 、 $T3$ 处理的可培养放线菌数量显著高于 CK 、 $T2$, 而细菌与真菌无显著性差异。与 CK 相比, 蚯蚓处理废弃物原位生成蚯蚓粪替代土壤的黄瓜根际可培养微生物总数显著高于 10.56%; 添加脱硫石膏降低黄瓜根际可培养微生物数量高于 4.01%; 二者混合使黄瓜根际可培养微生物数量增加了 13.49%。利用 Biolog-ECO 微平板法将不同处理黄瓜根际微生物对碳源利用情况进行分析发现: 各处理呈“厂”型趋势变化; 0–96 h *AWCD* 值增长迅速, 96–120 h *AWCD* 值增长较缓慢, 120–168 h *AWCD* 值趋于缓慢, 168–240 h *AWCD* 值趋于稳定。在 $T1$ 与 $T3$ 处理中, 黄瓜根际土壤微生物群落对碳源的利用情况较好,

即蚯蚓原位处理废弃物原位生成蚯蚓粪替代土壤中的处理微生物数量较高, 群落较丰富, 碳源利用度较高。目前 *AWCD* 值、Shannon 指数 (*H*) 和 Simpson 指数 (*D*) 是应用最为广泛的群落多样性指数, 用来衡量土壤微生物多样性^[33–34]。

通过对不同处理下黄瓜根际土壤微生物 96 h 后的 *AWCD* 值、Shannon 指数 (*H*)、Simpson 指数 (*D*) 和 Pielou 指数 (*E*)、McIntosh 指数 (*U*)、Richness 指数 (*R*) 分析, $T1$ 、 $T3$ 处理的 *AWCD* 值、Shannon 指数 (*H*) 与 Simpson 指数 (*D*) 表现出了相似性, 而 $T2$ 处理的 *AWCD* 值、*H*、*D*、*E*、*U* 显著低于 $T1$ 处理, 说明添加脱硫石膏对土壤微生物种群多样性、均一性有负向影响, 可能由于脱硫石膏中含有重金属元素。有研究说明有机土壤改良剂比无机土壤改良剂对土壤微生物数量、功能类群具有较明显的影响^[35], 与本研究结果一致。

培养 96 h, $T1$ 处理 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、McIntosh 指数、Pielou 指数均显著高于其余处理, 说明此处理的微生物碳源利用度较高。由图 3 得出, $T1$ 处理下, 黄瓜根际微生物对丙酮酸甲酯、吐温-40、D-纤维二糖、D-甘露醇、 γ -羟丁酸、D-苹果酸、L-精氨酸、L-天冬氨酸、L-丝氨酸、苯乙胺、腐胺等碳源利用都较高。总体来说, $T1$ 、 $T3$ 处理的碳

源利用度较其余处理好, 可能原因是蚯蚓处理废弃物原位形成蚯蚓粪替代土壤的处理中, 由于蚯蚓处理牛粪的过程中蚯蚓及蚯蚓的伴生动物会产生较多的分泌物, 伴随有腐殖质的产生, 生态系统中食物链更为复杂, 微生物群落较丰富。细菌、放线菌数量与 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、McIntosh 指数、Pielou 指数呈显著性正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而真菌可培养数量与 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、McIntosh 指数、Pielou 指数呈显著性负相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。通过对土壤微生物 *AWCD* 值和功能多样性与土壤微生物数量相关性分析表明, 微生物数量越高, 土壤微生物碳代谢能力、微生物群落功能多样性越丰富。

蚯蚓处理废弃物原位形成蚯蚓粪替代土壤的种养模式结合, 可增加土壤微生物群落的碳利用, 有益效果明显, 是一种可温室化的绿色环保栽培方式。可能是蚯蚓及蚯蚓的伴生动物肠道体内具有大量的有益微生物, 促使替代土壤中的有益微生物大量繁殖, 而单一施加脱硫石膏会减少微生物的数量, 而 T3 (蚯蚓处理废弃物原位形成蚯蚓粪与脱硫石膏混施)处理的 *AWCD* 值、Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数、McIntosh 指数与单一原位处理无显著性差异。由此可见, T3 处理中, 脱硫石膏对微生物数量、多样性指数无明显影响。可能原因是脱硫石膏的量较少, 不足以影响蚯蚓粪中微生物的数量。

4 结论

本研究通过测定各处理可培养真菌、细菌、放线菌微生物群落数量和基于 Biolog-ECO 微平板法分析土壤微生物群落功能多样性, 发现不同处理的黄瓜根际可培养细菌、真菌无显著性变

化, 而 T1 处理的放线菌数量显著高于 CK, 微生物总数量 T1、T3 处理显著高于 CK。240 h 内各处理的黄瓜根际微生物群落碳源代谢变化呈“厂”型趋势变化。各处理土壤微生物多样性指数 *AWCD*、Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数、McIntosh 指数存在显著性差异。与 CK 相比, T1 与 T2 处理的碳利用度显著较高。总之, 蚯蚓原位处理废弃物种养模式下, 黄瓜根际微生物可培养数量较高, 微生物群落较丰富, 微生物碳源利用率较高, 对设施栽培蔬菜的可持续发展具有重要意义。

REFERENCES

- [1] 毕江涛, 贺达汉, 黄泽勇, 杨磊, 马巧荣. 退化生态系统植被恢复过程中土壤微生物群落活性响应[J]. 水土保持学报, 2008, 22(4): 195-200
Bi JT, He DH, Huang ZY, Yang L, Ma QR. Response of soil microbial community activity to vegetation restoration in degraded ecological system[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2008, 22(4): 195-200 (in Chinese)
- [2] 高雪峰, 韩国栋, 张国刚. 短花针茅荒漠草原土壤微生物群落组成及结构[J]. 生态学报, 2017, 37(15): 5129-5136
Gao XF, Han GD, Zhang GG. Soil microbial community structure and composition of *Stipa Breviflora* on the desert steppe[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(15): 5129-5136 (in Chinese)
- [3] 陈文新. 土壤和环境微生物学[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1990
Chen WX. Soil and Environmental Microbiology[M]. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1990 (in Chinese)
- [4] 杨海君, 肖启明, 刘安元. 土壤微生物多样性及其作用研究进展[J]. 南华大学学报(自然科学版), 2005, 19(4): 21-26, 31
Yang HJ, Xiao QM, Liu AY. Soil microbial diversity and its action[J]. Journal of Nanhua University (Natural Science Edition), 2005, 19(4): 21-26, 31 (in Chinese)
- [5] 陈声明, 林海萍, 张立钦. 微生物生态学导论[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 155-161
Chen SM, Lin HP, Zhang LQ. Introduction to Microbial Ecology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 155-161 (in Chinese)

- [6] 刘燕, 李世雄, 尹亚丽, 赵文, 王玉琴. 基于 Biolog 指纹解析黑土滩退化草地土壤微生物群落特征[J]. 生态环境学报, 2019, 28(7): 1394-1403
Liu Y, Li SX, Yin YL, Zhao W, Wang YQ. Analysis on soil microbial community characteristics of black soil beach degraded grassland based on biolog fingerprint[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2019, 28(7): 1394-1403 (in Chinese)
- [7] 田雅楠, 王红旗. Biolog 法在环境微生物功能多样性研究中的应用[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(3): 50-57
Tian YN, Wang HQ. Application of biolog to study of environmental microbial function diversity[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 34(3): 50-57 (in Chinese)
- [8] 董邵云, 苗晗, 薄凯亮, 张圣平, 顾兴芳. 黄瓜近缘野生资源的研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(6): 1446-1460
Dong SY, Miao H, Bao KL, Zhang SP, Gu XF. Research progress on wild relatives of cucumber[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(6): 1446-1460 (in Chinese)
- [9] 齐宝晗, 宋士清. 温室黄瓜抗土壤逆境栽培技术研究进展[J]. 现代园艺, 2021, 44(3): 20-22
Qi BH, Song SQ. Progress on soil adversity cultivation of cucumber in greenhouse[J]. Xiandai Horticulture, 2021, 44(3): 20-22 (in Chinese)
- [10] 樊丽琴, 杨建国, 尚红莺, 张永宏. 脱硫石膏施用下宁夏盐化碱土水盐运移特征[J]. 水土保持学报, 2017, 31(3):193-196
Fan LQ, Yang JG, Shang HY, Zhang YH. Characteristics of soil water and salt movement in a saline alkali soil treated with desulfurized gypsum[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2017, 31(3):193-196 (in Chinese)
- [11] 李博. 施用蚯蚓粪对葡萄生长品质及土壤的影响研究[D]. 天津: 天津农学院硕士学位论文, 2020
Li B. Effects of earthworm manure on grape growth quality and soil[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [12] Pramanik P, Chung YR. Changes in fungal population of fly ash and vinasse mixture during vermicomposting by *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*: documentation of cellulase isozymes in vermicompost[J]. Waste Management, 2011, 31(6): 1169-1175
- [13] Yadav A, Garg VK. Industrial wastes and sludges management by vermicomposting[J]. Reviews in Environmental Science and Bio-Technology, 2011, 10(3): 243-276
- [14] Gupta R, Garg VK. Stabilization of primary sewage sludge during vermicomposting[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 153(3): 1023-1030
- [15] 陈巧燕, 杨健, 王志强, 张国贞. 蚯蚓堆肥处理有机废弃物的国外研究进展[J]. 中国资源综合利用, 2006, 24(12): 8-10
Chen QY, Yang J, Wang ZQ, Zhang GZ. Worldwide progress on vermicomposting of organic waste[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2006, 24(12): 8-10 (in Chinese)
- [16] 鲍世铨, 曾耀辉. 蚯蚓在医药保健方面的综合利用研究[J]. 中国生化药物杂志, 1994, 14(3): 165-168
Bao SQ, Zeng YH. Studies on comprehensive utilization of earthworm in pharmaceutical and health field[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 1994, 14(3): 165-168 (in Chinese)
- [17] 高晓奇, 肖能文, 叶瑶, 付梦娣, 李俊生. 基于 Biolog-ECO 分析长庆油田土壤微生物群落功能多样性特征[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(5): 913-918
Gao XQ, Xiao NW, Ye Y, Fu MD, Li JS. Analysis of microbial community functional diversity in the Changqing oilfield based on Biolog-ECO method[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(5): 913-918 (in Chinese)
- [18] Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(8): 2351-2359
- [19] 金凌波, 周峰, 姚涓, 姜大刚, 梅曼彤, 穆虹. 磷高效转基因大豆对根际微生物群落的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(7): 2082-2090
Jin LB, Zhou F, Yao J, Jiang DG, Mei MT, Mu H. Effects of P-efficient transgenic soybean on rhizosphere microbial community[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(7): 2082-2090 (in Chinese)
- [20] 李志斐, 王广军, 谢骏, 郁二蒙, 余德光, 夏耘, 魏南. 草鱼养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢 Biolog 分析[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 1985-1995
Li ZF, Wang GJ, Xie J, Yu EM, Yu DG, Xia Y, Wei N. Microbial carbon metabolic characteristics of biofilm communities in the grass carp culture pond based on Biolog-ECO plates[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 1985-1995 (in Chinese)
- [21] 周庆伍, 李红歌, 李安军, 刘国英, 汤有宏, 何宏魁, 李晓欢. Biolog-ECO 解析不同产地大曲微生物群落功能多样性特征[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(3): 53-56
Zhou QW, Li HG, Li AJ, Liu GY, Tang YH, He HK, Li XH. Analysis of microbial community functional diversity in daqu from different regions using Biolog-ECO method[J]. Food and Fermentation Technology, 2014, 50(3): 53-56 (in Chinese)
- [22] 杨明娟, 杜玉芬. 用酵母菌进行“微生物的实验室培

- 养”实验[J]. 生物学通报, 2018, 53(1): 50-52
Yang MX, Du YF. Yeast cells substitute *E. coli* for laboratory cultivation of microorganisms[J]. Bulletin of Biology, 2018, 53(1): 50-52 (in Chinese)
- [23] 邓茹, 陈曦, 裘丽萍, 孟顺龙, 陈家长. 基于高通量测序及 Biolog-ECO 方法的雄安新区鮡鲢淀细菌群落结构与功能多样性分析[J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(5): 752-759
Deng R, Chen X, Qiu LP, Meng SL, Chen JZ. High-throughput sequencing and Biolog-ECO method were used to analyze the bacterial community structure and functional diversity in the Shihou lake of Xiong'an Area[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2021, 36(5): 752-759 (in Chinese)
- [24] 周可, 谢凤行, 张峰峰, 孙海波, 赵玉洁, 赵琼. 养殖池塘底泥预处理方法对 Biolog-ECO 板分析结果的影响[J]. 天津农业科学, 2019, 25(8): 11-15, 22
Zhou K, Xie FX, Zhang FF, Sun HB, Zhao YJ, Zhao Q. Effects of preprocessing methods of sediment on analysis results of Biolog-Eco Plates[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2019, 25(8): 11-15, 22 (in Chinese)
- [25] 王强, 戴九兰, 吴大千, 余悦, 申天琳, 王仁卿. 微生物生态研究中基于 Biolog 方法的数据分析[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 817-823
Wang Q, Dai JL, Wu DQ, Yu Y, Shen TL, Wang RQ. Statistical analysis of data from Biolog method in the study of microbial ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(3): 817-823 (in Chinese)
- [26] 陈禹竹, 唐琦勇, 顾美英, 朱静, 刘晓静, 崔卫东, 张志东. 盐爪爪根部微生物分布特征及盐浓度对碳源代谢分析的影响[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 2900-2908
Chen YZ, Tang QY, Gu MY, Zhu J, Liu XJ, Cui WD, Zhang ZD. Microbial distribution characteristics around the roots of *Kalidium foliatum* and the effect of salt concentrations on microbial metabolism analysis[J]. Microbiology China, 2019, 46(11): 2900-2908 (in Chinese)
- [27] 李凤霞, 王学琴, 郭永忠, 许兴. 宁夏引黄灌区不同盐化程度土壤酶活性及微生物多样性研究[J]. 水土保持研究, 2013, 20(1): 61-65
Li FX, Wang XQ, Guo YZ, Xu X. Study of microbial diversity and the soil enzyme activity in different salinized soil in Ningxia Yellow River irrigation region[J]. Research of Soil and Water Conservation, 2013, 20(1): 61-65 (in Chinese)
- [28] 郭莹, 王一明, 巫攀, 彭双. 长期施用粪肥对水稻土中微生物群落功能多样性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(3): 593-602
Guo Y, Wang YM, Wu P, Peng S. Influence of long-term manure application in paddy soil on the functional diversity of microbial community[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2019, 25(3): 593-602 (in Chinese)
- [29] 席玢琪, 胡洪营, 钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 138-141
Xi JY, Hu HY, Qian Y. Application of Biolog system in the study of microbial community[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(1): 138-141 (in Chinese)
- [30] 张志剑, 刘萌, 朱军. 蚯蚓堆肥及蝇蛆生物转化技术在有机废弃物处理应用中的研究进展[J]. 环境科学, 2013, 34(5): 1679-1686
Zhang ZJ, Liu M, Zhu J. Organic waste treatment by earthworm vermicomposting and larvae bioconversion: review and perspective[J]. Environmental Science, 2013, 34(5): 1679-1686 (in Chinese)
- [31] Bracken CL, Hendricks CW, Harding AK. Apparent bias in river water inoculum following centrifugation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(2): 304-309
- [32] 杨君. 脱硫石膏改良盐碱土及其对 3 种宿根花卉生长生理特性的影响研究[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2020
Yang J. Study on effects of improved saline-alkali soil by flue gas desulfurization gypsum on plant growth and physiological characteristics of three perennial flowers[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2020 (in Chinese)
- [33] 王秀丽, 徐建民, 姚槐应, 谢正苗. 重金属铜、锌、镉、铅复合污染对土壤环境微生物群落的影响[J]. 环境科学学报, 2003, 23(1): 22-27
Wang XL, Xu JM, Yao HY, Xie ZM. Effects of Cu, Zn, Cd and Pb compound contamination on soil microbial community[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2003, 23(1): 22-27 (in Chinese)
- [34] Braun B, Böckelmann U, Grohmann E, Szewzyk U. Polyphasic characterization of the bacterial community in an urban soil profile with *in situ* and culture-dependent methods[J]. Applied Soil Ecology, 2006, 31(3): 267-279
- [35] 郭肖. 土壤改良剂对不同基因型苦荞连作下根际特性的影响[D]. 贵阳: 贵州师范大学硕士学位论文, 2016
Guo X. Effects of soil amendments on rhizosphere properties of different genotype *Tartary buckwheat* under continuous cropping[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou Normal University, 2016 (in Chinese)