DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2010.06.005

文章编号:1003-8701(2010)06-0032-05

农田栽参根区土壤微生物结构特征的研究

张亚玉[1,2],孙 海[1],宋晓霞[1],汪景宽[2]

(1.中国农业科学院特产研究所,吉林 132109;2.沈阳农业大学土地与环境学院,沈阳 110161)

摘 要:为了了解农田栽培人参对土壤微生物群落结构的影响,采用磷脂脂肪酸法(PLFA)测定了1、2、3、4、5年生农田栽参根区土壤微生物量的活性部分,分析了群落结构的变化。结果表明:农田栽培人参根区土壤以i15:0,a15:0,16:1ω9c,16:0等4种PLFAs占有优势地位;农田栽参根区土壤微生物总量和细菌生物量具有相同的降低趋势,均低于对照,且2年生降低的幅度最明显;真菌生物量和放线菌生物量具有相同的增加趋势,与对照相比均有增加,但增加的比率相差明显,真菌增加的幅度明显,接近10倍,放线菌虽有增加,但幅度微弱。真菌占总生物量的比率迅猛增加,是农田栽参土壤微生物群落结构变化的主要特征。

关键词:农田栽培人参;土壤微生物群落结构;磷脂脂肪酸

中图分类号:S154.37 文献标识码:A

Studied on Soil Microbial Community Structure in Farmland Cultivated Ginseng

ZHANG Ya-yu[1,2], SUN Hai[1], SONG Xiao-xia[1], WANG Jing-kuan[2]

(1. *Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, CAAS, Jilin* 132109;
2. *Shenyang Agricultural University, Shenyang* 110161, China)

Abstract: In order to study the effects of cultivating ginseng in farmland on soil microbial community structures, active microbial mass and community structure in rhizosphere of ginseng of 1, 2, 3, 4 and 5 years old were determined by phosphor lipid fatty acid (PLFA). The results showed the microorganisms containing the PLFA of i15:0, a15:0, 16:1ω9c and 16:0 were dominance in microbial community in farmland root zone soil cultivating ginseng. Bacterial biomass and total biomass were decreased significantly, and total biomass was more declined at 2 years old. Fungal biomass were enhanced significantly and raised by 10 times, while actinomycete biomass increased slightly. In the community structure, fungi ratio in total biomass were enhanced compared with the control, which was key characters of soil microbial community structure in farmland cultivated ginseng.

Keywords: Cultivating ginseng in farmland; Soil microbial community structure; Phosphor lipid fatty acid

1998年国家实行"天保"工程以来,人参产业主要朝着林下参和农田栽参两条途径发展[1-2]。由于林下参受到可利用林地和生长年限的限制,产品不能满足市场的需要,农田栽参可充分利用丰富的农田资源进行人参栽培,不仅减少了毁林栽参造成的生态环境破坏,同时为农村经济结构调整,农民增收致富提供了途径。对于农田栽参土壤的改良,从土壤的物理[3-5]、化学[6-8]及微生物学[9-11]角度都进行了大量的研究报道,为农田栽培人参提供了技术指导。但由于农田土壤改良技术难度较大,至今未能从根本上解决农田栽参产量低、病害重的关键问题。土壤微生物群落被认为是土壤生态系统的预警及敏感指标,指示土壤质量变化,

收稿日期:2010-05-27

基金项目:国家科技支撑计划子课题(2007BAI38B01);吉林省科技发展计划(20090573)

作者简介:张亚玉(1968-),女,研究员,主要从事人参西洋参栽培土壤改良营养培肥研究。

决定着土壤的生态功能。本文利用磷脂脂肪酸法(PLFA)对1、2、3、4年生农田栽培人参根区土壤的微生物群落结构特征及变化趋势进行了分析研究,期望为农田栽参的科学改土提供参考,为人参产业的健康发展提供指导。

1　材料与方法

1.1　材料

供试土壤样品采自吉林省长春市乐山镇农田栽参种植基地,采样区属于东北嫩江平原,东经125°20′,北纬43°30′,海拔241 m,年降雨量586 mm,无霜期151 d,冬季温度低,年平均气温4.6℃。采样时间为2007年8月5日,人参红果期,采集地土壤类型为白浆土。选择1、2、3、4年生人参,将芦头以上的土壤剥去,采集参根周边土壤(3~15 cm),边挖参边取土,每个年生选取5株混合,同时采集未生长人参的土壤作为对照。将土壤装入封口塑料袋中,带回实验室,冰箱保存。

1.2　方法

采用改进的White[12]方法提取磷脂脂肪酸,基本步骤为:①称4 g新鲜土壤样品于玻璃离心管中,按顺序加入4 mL左右柠檬酸缓冲液(减去土壤中含水量)、5 mL氯仿、10 mL甲醇(柠檬酸缓冲液∶氯仿∶甲醇=0.8∶1∶2),25℃避光震荡4 h,离心15 min(3 000 r/min)。②转移上清液到25 mL试管中,加1.6 mL柠檬酸缓冲液、2 mL氯仿、4 mL甲醇到原离心管中进行第二次提取,震荡2 h,离心15 min(3 000 r/min)。③转移上清液与原上清液合并,加7 mL柠檬酸缓冲液、7 mL氯仿(柠檬酸缓冲液∶氯仿∶甲醇=0.9∶1∶1),震荡5 min,避光保存18 h。④经18 h分离后,用吸管把上层液吸走,包括杂质膜(切记勿留水相,水分子会攻击脂肪酸双键),下层液转移到新试管中,氮气吹干。⑤用柱层析硅胶0.8 g(在120℃下烘干2 h)填充玻璃管柱(直径6 mm),10 mL氯仿洗柱后,用5×0.1 mL氯仿溶解样品并注入硅胶柱中。加10 mL氯仿和10 mL丙酮(少量多次)依次洗脱,去除中性脂和糖脂。最后用10 mL甲醇洗脱磷脂脂肪酸于10 mL离心管中,在氮气流下吹干样品。⑥向干样品中加入1 mL甲醇∶甲苯(1∶1)混合液,溶解脂类,再加1 mL 0.2M KOH甲醇溶液,37℃水浴15 min后,冷却至室温,依次加入2 mL去离子水,0.3 mL 1M醋酸溶液,2 mL正己烷,震荡1 min,离心10 min(3 000 r/min),转移上层有机相到10 mL样品瓶中。剩余下层相再加2 mL正己烷,重复上一步骤提取,合并两次提取的正己烷相,氮气流下吹干,于-20℃下保存。⑦上机前加入0.05 mL甲酯化的C19:0内标,氮气流下吹干,用0.15 mL正己烷定溶转移至GC内插管中待测(色谱纯)。用气质联机检测得到的PLFA谱图。

检测部分由安捷伦GC-MS (6890N-5973N)完成。色谱柱为hp5-MS(30 m×250 um×0.25 um)石英毛细管柱。GC-MS分析条件:升温程序:进样后在70℃保持0.5 min,之后以20℃/min的速率升至190℃,保持1 min,以5℃/min的速率上升到200℃,停留2 min,以10℃/min的速率上升到280℃,保留8 min。进样口温度为250℃,载气为He(0.9 mL/min),分流比为10∶1,离子源温度230℃,四极杆:150℃,质谱全扫描范围:30~600 m/z。

脂肪酸定量用峰面积和内标曲线法。内标为甲酯化的19:0,外标为SupelcoTM 37 Component FAME Mix和Bacterial Acid Methl Esters Mix。PLFA含量用nmol/g表示。

脂肪酸链长以碳原子总数计算,从羧基开始,冒号后数字代表双键数目,ω后数字代表双键的位置(从羧基端算起),c表示顺势双键,t表示反式双键,i表示顺势支链,a表示反势支链,br表示不确定支链位置,Me表示甲基位置,cy表示环丙基。

2　结果与分析

表1　估算微生物生物量的脂肪酸

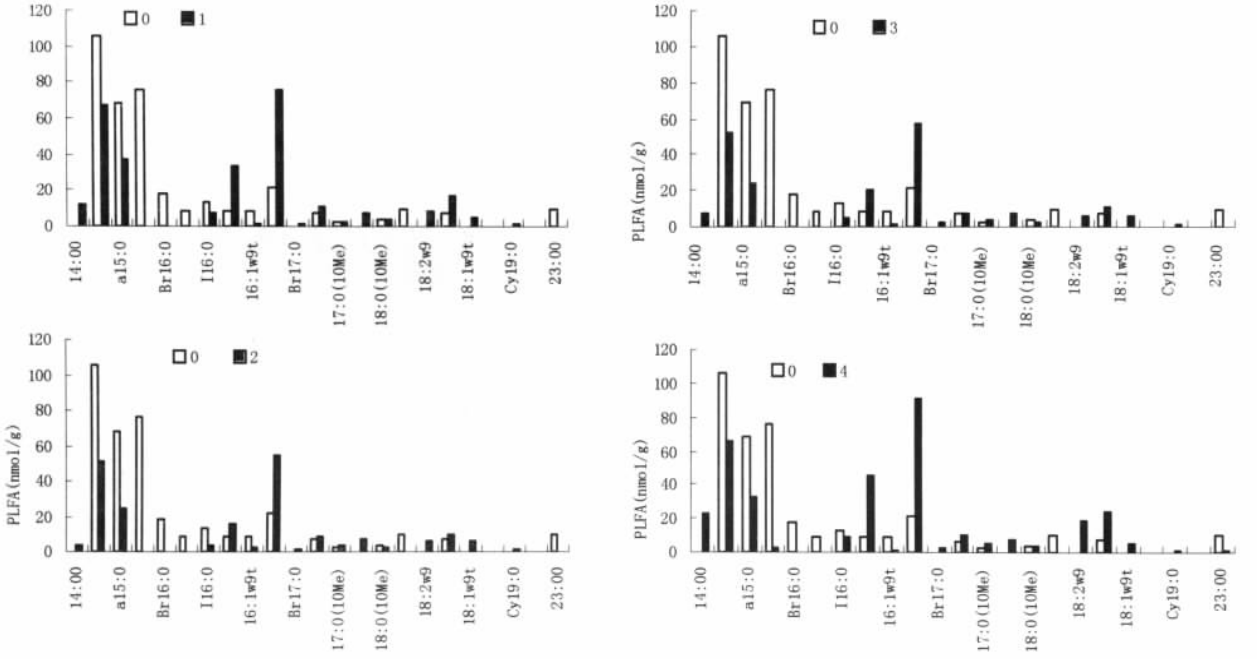
微生物类型	磷脂脂肪酸标记	文献
细菌	14∶0、15∶0、16∶0、17∶0、i15∶0、a15∶0、i17∶0、a17∶0	13～14
放线菌	10Me16∶0、10Me17∶O、10Me18∶O	
真菌	18∶1ω9c、18∶1ω9t、18∶2ω6、18∶3ω6、18∶2ω3、21∶0、23∶0	

磷脂脂肪酸已被广泛应用于原位土壤活体微生物群落研究,且各菌群PLFA组成差异显著。例如,18:2ω6,9常见于真菌,细菌多含有14:O、15:O、16:O、17:O、i15:O、a15:O、i17:O、a17:O、i19:O、16:1ω7、cy17:O、cy19:O等。

Bardgett[15]等认为土壤中磷脂脂肪酸的组成可以表示土壤微生物群落的生物量和结构。不同菌群的磷脂脂肪酸图谱不同,可以作为微生物群落中不同群体的标记物,微生物的生物量可以通过脂肪酸的含量来估算。

2.1　农田栽培人参根区土壤微生物PLFA图谱特征

测得农田栽培人参1年生根区土壤中脂肪酸种类18种,2、3年生19种,4年生20种,对照土



壤微生物所含脂肪酸种类 16 种。

鉴定的 PLFAs，C 链长度从 14 到 24，包括饱和、不饱和、甲基化分支和环化脂肪谱，在 1 年生农田栽培人参根区土壤的 PLFAs 中，14:0，i15:0，a15:0，16:1ω9c，16:0，i17:0，18:1ω9c 等 7 种 PLFAs 丰度较高，是 1 年农田根区土壤微生物的主要成分。根区土壤中 i15:0，a15:0 摩尔浓度与对照相比有减少的趋势，而其它主要组成则有增加的趋势。

在 2 年生农田栽培人参根区土壤的 PLFAs 中，i15:0，a15:0，16:1ω9c，16:0 等 4 种 PLFAs 丰度较高，是 2 年农田根区土壤微生物的主要成分。与对照相比，2 年生农田栽培人参土壤微生物磷脂脂肪酸的摩尔浓度均有增加的趋势。

在 3 年生农田栽培人参根区土壤的 PLFAs 中，i15:0，a15:0，16:1ω9c，16:0，18:1ω9c 等 5 种 PLFAs 丰度较高，是 3 年农田根区土壤微生物的主要成分。与对照相比，3 年生农田栽培人参根区土壤微生物的磷脂脂肪酸的摩尔浓度与 2 年生相似均有增加的趋势。

在 4 年生农田栽培人参根区土壤的 PLFAs 中，i15:0，a15:0，16:1ω9c，16:0，18:2ω9，18:1ω9c 等 6 种 PLFAs 丰度较高，是 4 年农田根区土壤微生物的主要成分。与对照相比，4 年生农田栽培人参根区土壤微生物的磷脂脂肪酸的摩尔浓度与 3 年生相似均有增加的趋势，尤其是代表真菌微生物的磷脂脂肪酸 18:2ω9 的显著增加，也从土壤微生物的角度解释了为什么人参忌连作的现象。

通过对不同年生农田栽参根区土壤磷脂脂肪酸的研究发现 i15:0，a15:0，16:1ω9c，16:0 4 种脂肪酸是其主要构成成分。

2.2 农田栽培人参不同年生根区土壤 PLFA 的变化特征

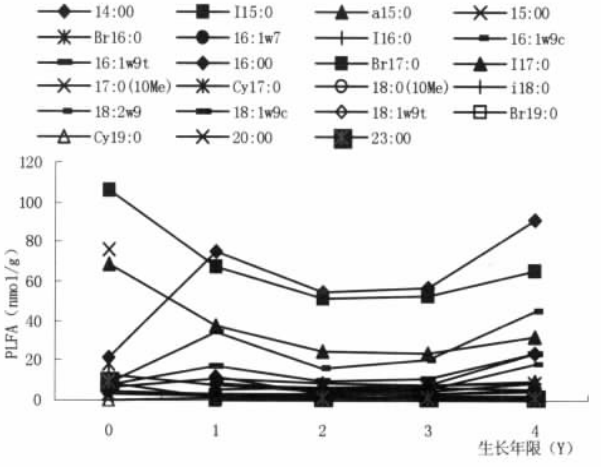


图 2 不同年生农田栽参土壤磷脂脂肪酸变化趋势

2.3 农田栽培人参根区土壤微生物群落主成分分析

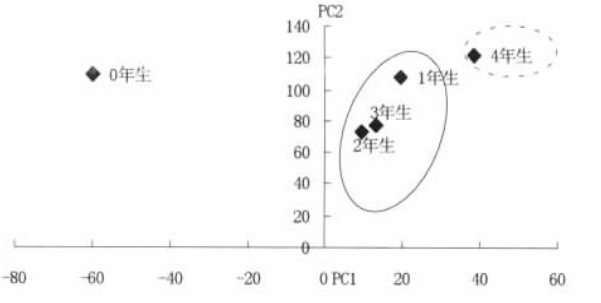


图 2 不同年生农田栽参土壤磷脂脂肪酸变化趋势

农田栽参土壤中磷脂脂肪酸数量随人参生长

年限延长发生变化,代表细菌的脂肪酸 i15:0、16:0 和 a15:0 的量在逐年增多,代表真菌的 16:1w9c 和 16:1w9t 的量也逐年增多。

对不同年生农田栽参土壤磷脂脂肪酸进行主成分分析，第一、第二主成分累计贡献率为 99.32%,其中第一主成分贡献率为 76.33%。以脂肪酸 i15:0、a15:0 和 16:0 对第一主成分中贡献率较高,贡献率分别为 0.468、0.403 和 0.645,第二主成分中脂肪酸 14:00 和 16:1w9c 贡献率较高。

从主成分分析图中可以看出，不同年生农田栽参土壤微生物群落大致可以分为 3 个区域 :对照、1,2,3 年生农田栽参和 4 年生农田栽参。可以看出，农田栽参土壤微生物群落 (i15:0、a15:0 和 16:0)在逐年增加,产生明显的种群差异。

2.4　农田栽培人参根区土壤微生物量的变化特征

表 2　农田栽参土壤微生物生物量

	0	1	2	3	4
总生物量	368.29	292.03	202.75	213.52	350.35
放线菌	6.95	5.82	6.6	5.67	8.98
真菌	7.17	30.54	21.62	22.65	47.52
细菌	354.17	255.67	174.53	185.2	293.85

从对农田栽参根区土壤总微生物量的研究发现,与对照相比总生物量有减少趋势,不同年生总生物量的变化趋势是 1 年生高于 2、3 年生而低于 4 年生,2 年生根区土壤总生物量最低，微生物组成简单,含量降低,是人参生长不稳定的阶段,结合对野山参和林下参根区土壤微生物量的变化研究结果发现，农田栽参根区土壤微生物结构和生物量的变化趋势不同于野山参和林下参，存在较大的差异。

不同年生农田栽参根区土壤放线菌量的变化特征是 1、2、3 年生低于对照,4 年生高于对照但增加或降低的幅度并不明显，放线菌占有总生物量的比率以 2 年生最高 3.21%，高于 3 年生的 2.6%和 4 年生的 2.56%,2、3、4 年生放线菌的比率逐渐降低。

不同年生农田栽培人参根区土壤细菌的变化趋势与总生物量完全相似,随着细菌数量的减少,总生物量在减少,细菌数量增加,总生物量增加,2 年生最低,3、4 年生逐渐增加,但均低于对照。也说明了在利用磷脂脂肪酸法测定土壤微生物群落结构时应用代表细菌特征的 16:0 的量来表示总生物量是可行的。

不同年生农田栽培人参根区土壤真菌的变化趋势亦与微生物总量的变化趋势一致，但与对照不同，对照中真菌占总生物量的比率是 1.9%,1 年生增加到 10.45%,2 年生 10.66%,3 年生 10.60%,4 年生 13.56%,可见随着栽参年限的增加,真菌的占有量不断增加,且增加幅度明显,这充分说明了栽培人参后土壤的微生物群落结构发生了很大的变化,与对照土壤的微生物群落结构完全不同。

3　讨　论

3.1　农田栽培人参根区土壤微生物群落结构的研究是对农田栽参土壤生物特性研究的完善和补充,为农田栽参土壤生物改良提供理论指导,具有较大的生产意义；通过应用磷脂脂肪酸方法研究农田栽培人参土壤微生物群落特征，克服了以往在人参土壤微生物的研究上采用的传统培养法的诸多不足，提供了较为准确的土壤微生物结构状况,对于生产指导意义重大。

3.2　不同年生农田栽参根区土壤微生物的多样性研究结果表明,在农田栽培人参生长过程中,根区土壤微生物的种类和量上都发生了很大的变化,随着农田栽培人参的生长,根系的代谢作用对根区土壤的酸碱度、养分状况会有一定的影响作用,导致微生物的组成在量上发生变化,2 年生人参根区微生物的磷脂脂肪酸种类变化较为明显，对人参的生长影响较大，生产上 2 年掉苗现象严重，可能与其根区土壤微生物的群落结构变化有一定的联系。

3.3　从对农田栽培人参根区土壤的细菌、放线菌及真菌变化情况的分析发现，土壤微生物总量的变化趋势与细菌的变化趋势相一致，应用代表细菌 C16:0 的量来表示总生物量是具有一定的科学依据的。从对不同年生农田栽培人参根区真菌的变化趋势发现,1、2、3、4 年生根区土壤真菌占总生物量的比率分别为 10.45%、10.66%、10.69%和 13.56%,呈现逐渐增加的趋势,显著高于对照的 1.9%。这一结果与我们对野山参和林下参根区土壤微生物群落结构的研究结果完全不同，由于在人参生长过程中多数病害的发生是由于真菌的感染导致的[16],真菌的增加是老参地土壤性状变劣的主要原因[17-18]。可见农田栽培人参土壤微生物的结构变化是朝着不利于人参生长的方向发展的，我们应根据土壤的微生物群落变化特征进行科学合理的改土，才能从根本上解决目前困扰农田栽参的老大难问题。

参考文献：

[1] 张亚玉 . 论人参种植业发展途径[J] . 安徽农业科学,2008,36

(20) :8653- 8656 .
[2] 王永明 . 实行林下栽培野山参开辟人参种植新途径[J] . 中药研究与信息,2003,5(10) :25- 27 .
[3] 任一猛,王秀全,赵 英 . 农田栽参土壤的改良与培肥研究[J] . 吉林农业大学学报,2008,30(2) :176- 179 .
[4] 郝绍卿 . 吉林栽参地区主要土壤生态及理化性状的探讨[J] . 特产研究,1988(3) :19- 22 .
[5] 薛振东,魏汉莲,庄敬华 . 有机肥改土对农田土壤结构及人参质量的影响[J] . 安徽农业科学,2007,35(20) :6190- 6191 .
[6] 白容霖,张慧丽,曲力涛 . 施用鹿粪对参地土壤改良效果的研究[J] . 特产研究,2000(3) :26- 28 .
[7] 于得荣,赵寿经,曹秀英,等 . 农田土壤与高产人参腐殖土的理化性状对比研究[J] . 土壤学报,1990(2) :228- 232 .
[8] 贾书刚,王淑平,窦 森 . 栽培人参对床土化学性质的影响[J] . 吉林农业大学学报,1999(2) :134- 136 .
[9] 窦 森,张晋京,江 源 . 栽参对土壤化学性质的影响[J] . 吉林农业大学学报,1996,18(3) :67- 73 .
[10] 蔡荟梅,臧爱香,夏 春,等 . 西洋参产量与土壤肥力·微生物和酶活性关系的研究[J] . 安徽农业科学,2007,35(26) :8267- 8268 .
[11] 宋晓霞,张亚玉,王英平,等 . 人参与西洋参土壤脲酶活性对比研究[J] . 特产研究,2008,30(2) :33- 35 .
[12] White D C, Stair JO, Ringelberg D B. Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis[J]. Journal ofIndustryMicrobiology, 1996, 17: 185- 196 .
[13] Zelles L,Bai Q Y,Beck T.Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils[J] . Soil Biology&Biochemistry,1992,24(4):3172323 .
[14] Salomonová S,Lamacǒ vá J,Rulí k M,et al.Determination of phospholipid fatty acids in sediments [J] . Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium: Chemica,2003,42:39- 49 .
[15] BardgettR D, LovellR D, HobbsP J,etal. Sesaonal changes in soilmicrobial communities along a fertility gradientof temperate grasslands [J] . Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31: 1021- 1030 .
[16] 白容霖,刘学敏,刘伟成 . 吉林省人参根腐病病原真菌种类的研究[J] . 植物病理学报,1999,29(3) :285- 285 .
[17] 李世昌,刘梅娟,卢凤勇,等 . 栽参对土壤微生物生态及土壤酶活性的影响[J] . 生态学报,1983,3(1) :29- 34 .
[18] 张镇媛,陈 珊,夏红梅,等 . 不同土壤栽参后对土壤分解微生物生态和有机质的分解作用 [J] . 东北师大学报自然科学版,1993(2) :95- 99 .

(上接第 31 页)

表 4 不同金正大控释尿素掺混比例处理植株和籽粒吸氮量

处 理	植株含氮量 (%)	植株干物重 (kg/hm²)	植株吸氮量 (kg/hm²)	籽粒含氮量 (%)	籽粒干物重 (kg/hm²)	籽粒吸氮量 (kg/hm²)	植株 + 籽粒 (kg/hm²)
(CRU100%)	0.633 3	6 094.8	38.60	1.138 8	7 155.20	81.48	120.1
(CRU70%+PU30%)	0.799 3	6 512.4	52.05	1.145 9	5 856.60	67.11	119.2
(CRU50%+PU50%)	0.796 8	6 793.2	54.13	1.197 2	5 922.82	70.91	125.0
(CRU30%+PU70%)	0.637 1	6 259.6	39.88	1.180 6	6 309.82	74.49	114.4
(PU100%)	0.585 4	7 002.8	40.99	1.166 8	6 223.82	72.62	113.6
不施氮肥	0.515 5	3 888.0	20.04	1.074 4	2 820.80	30.31	50.4

表 5 金正大控释尿素与普通尿素配合施用对水稻氮素利用率的影响

处 理	养分吸收量 (kg/hm²)			利用率(%)
	植株	籽粒	植株 + 籽粒	
(CRU100%)	38.60	81.48	120.1	46.5
(CRU70%+PU30%)	52.05	67.11	119.2	45.9
(CRU50%+PU50%)	54.13	70.91	125.0	49.8
(CRU30%+PU70%)	39.88	74.49	114.4	42.7
(PU100%)	40.99	72.62	113.6	42.1
对照(不施氮肥)	20.04	30.31	50.4	-

3 结 论

3.1 50%控释尿素 +50%普通尿素处理的水稻穗数和穗粒数最多、千粒重最重，综合性状好于其它处理。

3.2 施用氮肥各处理的水稻产量极显著的好于不施氮肥的处理，相对增产 125.7%，施氮各处理间水稻产量差异不显著。50%控释尿素 +50%普通尿素处理比 PU100%处理，相对增产达 5.3%，为最佳混配处理。

3.3 施用控释尿素可提高水稻氮肥利用率，增加幅度为 0.6%～7.7%。不同配比各处理中，控释尿素 50%+ 普通尿素 50%处理氮素利用率最高，30%普通尿素 +70%处理氮素利用率最低。

3.4 控释肥的缓释、控释、长效特点，往往不能满足初期水稻对养分的需求。控释肥与速效肥合理搭配施用，可以相互取长补短，既满足各生育期玉米对养分的需求，又提高肥效、减少环境污染。

参考文献：

[1] 杜昌文，周健民 . 控释肥料的研制及其进展 [J] . 土壤,2002(3):127- 133 .
[2] 邵 蕾,张 民,王丽霞 . 不同控释肥类型及施肥方式对肥料利用率和氮素平衡的影响[J] . 水土保持学报,2006,20(6):115- 119 .
[3] 邵 蕾,王丽霞,张 民,等 . 控释肥类型及氮素水平对氮磷钾利用率的影响[J] . 水土保持报,2009,23(4):115- 119 .