

## 微生物菌剂拌土对玉米农田土壤细菌群落多样性的影响

沙月霞<sup>1</sup>, 王晨曦<sup>2</sup>, 邢敏<sup>1</sup>, 王佳娟<sup>2</sup>, 李明洋<sup>1</sup>, 沈瑞清<sup>1\*</sup>

(1. 宁夏农林科学院植物保护研究所, 宁夏银川 750011; 2. 宁夏大学生命科学院, 宁夏银川 750004)

**摘要** 为明确微生物菌剂拌土对玉米农田土壤细菌群落多样性的影响。对玉米农田土壤细菌的总 DNA 提取后, 采用微生物多样性测序技术对玉米农田土壤细菌的 16S rRNA 基因进行了序列测定, 分析了 2 种微生物菌剂拌土后玉米农田土壤细菌群落多样性和结构特征。微生物菌剂 M1 和 M2 拌土增加玉米农田土壤中全磷、硝态氮、有效磷和速效钾的含量; 对玉米土壤细菌群落多样性有一定程度的影响, 丰富度增加, 多样性和均匀度降低, 检测样本序列数量和细菌群落的 OTU (operational taxonomic units) 数量显著增加; 对土壤细菌群落组成有影响, 变形菌门 (Proteobacteria) 的丰度下降, 放线菌门 (Actinobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 的丰度增加, 优势菌属放线菌和芽孢杆菌的丰度增加; 降低了土壤中引起人类疾病、参与细胞转化的微生物丰度, 增加了参与代谢通路的微生物丰度。微生物菌剂拌土会影响玉米农田土壤细菌群落多样性和结构组成, 改善土壤营养, 增加有益微生物的丰度, 进而改善玉米农田生态环境。

**关键词** 多样性; 土壤细菌群落; 微生物菌剂; 高通量测序; 微生物生态学

中图分类号 S154.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)05-0138-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.05.039



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Effect of Clay Treated by Microbial Agents on Soil Bacterial Community Diversity of Maize Field

SHA Yue-xia<sup>1</sup>, WANG Chen-xi<sup>2</sup>, XING Min<sup>1</sup> et al (1. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750011; 2. School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750004)

**Abstract** To understand the microbial diversity of soil bacterial community of maize field treated by microbial agents on clay. High-throughput sequencing technology was adopted to study the microbial community structure and composition of soil bacteria in maize field. DNA of the microbial community of soil bacteria in the maize field was extracted. The bacterial 16S rRNA gene hypervariable region V5-V7 was detected by high-throughput sequencing technologies. The contents of soil physicochemical indexes including total phosphorus, nitrate nitrogen, available phosphorus, rapidly available potassium was increased after maize field treated by microbial M1 and M2 on clay, respectively. In addition, the soil bacterial community diversity of maize field was influenced in some random, richness index was higher, diverse and evenness index were lower, and sequence and operational taxonomic units number of samples were increased. The abundance of Proteobacteria was reduced, and the abundance of Actinobacteria and Firmicutes were increased. What's more, the abundance of the dominant bacteria genus containing Actinomycetes and *Bacillus* were improved evidently. The abundance of soil bacteria which could cause human disease and participate cell transformation was reduced, and that of soil bacteria participating metabolic pathway was higher. The soil bacterial community diversity and structure could be influenced after maize field treated by microbial agents on clay, in addition to enhance soil nutrition, increase abundance of beneficial microorganism, and then improve the ecological environment of maize field.

**Key words** Diversity; Soil bacterial community; Microbial agent; High-throughput sequencing technology; Microbial ecology

土壤微生物参与土壤物质循环和能量流动, 是土壤有机物质的重要分解者和对农田土壤生态环境至关重要的生物活性因子, 对环境影响非常敏感<sup>[1]</sup>。土壤微生物群落是土壤生态系统的重要组成部分, 是衡量和评价土壤质量的指标之一<sup>[2-3]</sup>。土壤微生物群落多样性、丰富度与均匀度可以保证土壤生态环境的稳定性, 提高土壤抵抗环境恶化的缓冲能力<sup>[4-5]</sup>。开展黄河灌区土壤微生物群落多样性和结构研究, 对于实现黄河流域生态系统可持续发展具有重要的生态意义。

玉米是重要的粮食作物、饲料作物和工业原料, 由于种植模式、气候变化、化学肥料与农药、土壤盐渍化以及干旱等因素的影响, 玉米农田土壤中病原菌的数量日积月累, 土传病害的危害日益加重<sup>[6-7]</sup>。土壤微生物中病原菌的数量和活性对农业生产中的农艺措施或者生物制剂的投入响应敏感<sup>[8-9]</sup>。微生物菌剂施用能够改善土壤的营养状况, 提高土

壤养分, 还可以调节土壤微生物群落结构及多样性<sup>[10]</sup>。Chen 等<sup>[11]</sup>采用棘孢木霉菌 (*Trichoderma asperellum*) 颗粒剂在播种前与化肥混合施入土壤, 对玉米茎腐病防效显著。冯帅<sup>[12]</sup>研究发现接种施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) A1501 能够显著影响玉米根际土壤细菌群落和固氮菌群落结构。程扬等<sup>[13]</sup>研究发现土壤中施加 5 t/hm<sup>2</sup> 的秸秆生物炭对玉米根际和非根际土壤微生物群落结构和生态功能影响显著, 主要影响微生物群落代谢、遗传和信息传递等过程。已有的研究主要集中于木霉菌、假单胞菌等对玉米田土壤细菌群落结构的影响, 芽孢杆菌为功能菌的复合微生物菌剂对玉米农田土壤细菌群落多样性的研究较少。该研究不仅探索了芽孢杆菌为功能菌的复合微生物菌剂拌土对玉米农田土壤细菌群落结构的影响, 还探索了复合微生物菌剂对土壤营养的改善效果。笔者采用高通量测序技术, 研究微生物菌剂拌土对宁夏玉米农田土壤细菌群落的物种组成、群落多样性及结构的影响, 为进一步探讨土传病害的防控与农田土壤的微生物生态功能研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试验地概况** 试验地点是宁夏回族自治区石嘴山市惠农区庙台乡 (106.70° E, 39.20° N)。土壤类型为潮土, 地下水位较高, 盐碱较重, 有机质平均含量为 (16.70±3.77) g/kg,

**基金项目** 国家重点研发专项 (2017YFD0201606); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2018BBF02018-06)。

**作者简介** 沙月霞 (1974—), 女, 宁夏平罗人, 副研究员, 博士, 从事植物病害生物防治及微生物生态学。\* 通信作者, 研究员, 博士, 从事植物病害综合防治技术研究。

**收稿日期** 2020-07-17

有效磷平均含量为(26.70±17.30) mg/kg,速效钾平均含量为(199.90±66.87) mg/kg。

**1.2 试验材料** ①微生物菌剂 M1,包括枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)HR15、萎缩芽孢杆菌(*B. atrophaeus*)HR37 和贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)HR55 按照 1:1:1 比例的混合发酵液 15 L、腐殖酸 2.75 kg、硫酸钙 160 g<sup>[14]</sup>、硫酸锌 80 g<sup>[15]</sup>、硫酸亚铁 80 g、硫酸钾 80 g<sup>[16]</sup>,载体分别为羊粪 30 kg。②微生物菌剂 M2,将 M1 的载体更换为鸡粪有机肥(包含有机碳 25.5%、氮 1.63%、磷 1.54%、钾 0.85%)约 30 kg。③微生物菌剂对照 MCK,其功能菌是枯草芽孢杆菌和酵素菌 BYM(由细菌、放线菌和真菌三大类 30 多种有益菌和生物酶组成的功能团),枯草芽孢杆菌≥1 亿个芽孢/g,酵素菌≥5 亿/g,由雷邦斯生物技术(北京)有限公司,载体是水溶性腐殖酸≥55%。④化学农药对照是 20%噁霉灵可湿性粉剂+生根粉,由深圳诺普信农化股份有限公司生产。玉米品种是济玉 901 号。

**1.3 微生物菌剂田间拌土的方法** 2019 年 4 月 11 日在宁夏回族自治区惠农区庙台乡东永固村种植玉米(未用过种衣剂),种植前将微生物菌剂 M1、M2、微生物对照药剂(MCK)均匀撒施在农田土壤表面,施用量为 600 kg/hm<sup>2</sup>,20%噁霉灵可湿性粉剂+生根粉混合液(ES)均匀喷施到土壤表面,所有试验小区均使用旋耕机旋耕,旋耕深度为 20 cm 左右。田间试验设计 5 个处理:CK 是空白对照;M1 是载体为羊粪的微生物菌剂 M1;M2 是载体为鸡粪有机肥的微生物菌剂 M2;ES 是化学农药对照[20%噁霉灵可湿性粉剂+生根粉(4~6 g/m<sup>2</sup>)];MCK 是微生物菌剂对照。每个试验小区面积是 200 m<sup>2</sup>,小区随机排列,小区之间用田埂分隔,每个处理 4 个重复。试验期间不施用其他杀菌剂,正常进行杀虫剂、农艺措施和水肥管理。

**1.4 微生物菌剂拌土对玉米农田土壤理化性质的影响** 玉米乳熟期(7 月 22 日)采用取土器(直径为 6 cm,长度为 20 cm)采集农田土壤(距离植株 15 cm,深度为 0~20 cm),土壤样本采用干冰带回实验室,一部分土壤样品送上海美吉桑格生物医药有限公司检测土壤微生物群落多样性,另一部分土壤样本检测土壤 pH、有机碳、有机质、全氮、全磷、硝态氮、有效磷、速效钾等理化指标。

土壤样品基本理化参数(全氮、全磷、pH 等)采用常规方法测定:土壤 pH 采用 ZLJC/YQ-025 型 pH 计测定,全氮采用凯氏定氮法测定,有效磷采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比法测定,全磷采用碱熔法测定,速效钾采用乙酸铵浸提-火焰光度法测定,土壤有机质采用重铬酸钾容量法-外加加热法测定,土壤硝态氮采用紫外分光光度法测定。每个样品 3 个重复,数据为平均值±标准误。

**1.5 基因组 DNA 抽提** 提取各个处理的土壤样本基因组总 DNA,然后利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。

**1.6 PCR 扩增** 细菌扩增引物为 338F:5'-barcode-CTCCTACGGGAGGCAGCA-3',806R:5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3',对细菌 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行

PCR 扩增,引物由上海美吉生物医药科技有限公司设计合成,测序区域合成带有 barcode 的特异引物。PCR 正式试验采用 20 μL 反应体系:10×PCR Buffer 2.0 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL,5.0 μmol/L 正向引物 0.8 μL,5.0 μmol/L 反向引物 0.8 μL,rTaq Polymerase 0.2 μL,BSA 0.2 μL,Template DNA 10 ng,补 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。PCR 扩增条件:95 °C 3 min;循环数×(95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 45 s);72 °C 10 min,10 °C 直到反应结束。第一轮扩增引物:799F-1392R 27 cycles,退火 55 °C。第二轮扩增引物:799F-1193R 13 cycles,退火 55 °C。

对第二轮 PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收 PCR 产物,Tris-HCl 洗脱;2%琼脂糖电泳检测。将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司)进行检测定量,之后进行相应比例的混合。混合后的产物用 Illumina 公司的 Miseq 2×300 平台测序。

**1.7 数据处理与分析** 高通量测序得到的原始数据进行质量控制和软件拼接,过滤掉低质量的序列。将有效序列相似性≥97%序列聚类成为分类单元(operational taxonomic units)。运用 R 软件进行 OUT 分类等级的相对丰度统计,再用 QIIME 软件进行单样品组成分析,计算样品的 Coverage、Chao、Shannon 指数等<sup>[14-16]</sup>。Shannoneven 值数值越大,说明群落均匀度越低。Shannon 值越大,说明群落多样性越高。Coverage 是覆盖度指数,表征微生物样本序列的检测概率,数值越高表明检测出的序列概率越高,能够反映样本中微生物的真实情况。Chao 为丰富度指数,数值越大丰富度越高。利用 QIIME 和 Ggplot 2 软件进行 PCoA 分析,ANOSIM 中的 statistic( $R=-1\sim+1$ )越接近于 1 表示各处理组之间的差异大于组内的差异,如果 R 值比较小表示处理组之间和组内没有差异。P 值如果小于 0.05,说明检测值的可信度较高。通过 Tax4Fun 软件对 16S RNA 基因序列进行基于 Silva 数据库的 KEGG 功能注释。

统计分析采用 DPS 17.10 软件,显著性分析采用单因素方差分析中的最小极差法(least significant ranges, LSD)( $P\leq 0.05$ ),数值为 3 次重复的平均值±标准误。

## 2 结果与分析

**2.1 微生物菌剂拌土对玉米农田土壤理化性质的影响** 微生物菌剂拌土对玉米农田土壤理化性质的影响见表 1。由表 1 可知,与空白对照相比,4 组处理均可以增加土壤中有机碳和有机质含量,对玉米农田土壤其他营养指标影响趋势不一致。微生物菌剂 M2 可以增加土壤中全氮、全磷、硝态氮、有效磷和速效钾的含量,微生物菌剂 M1 增加土壤中全磷、硝态氮、有效磷和速效钾的含量,噁霉灵可湿性粉剂 ES 处理组降低土壤中硝态氮、全氮和速效钾的含量,增加全磷和有效磷含量。

**2.2 检测样本序列统计** 对 5 个处理的 15 个样本进行了 16S rRNA 基因测序分析,原始数据经过拼接和过滤后得到 797 948 条优质序列。不同拌土处理获得不同的序列数量,M2(59 237)>MCK(54 503)>M1(53 611)>CK(50 464)>ES

(48 168)。一般将相似水平在 97% 的序列进行 OTU 聚类, 统计所有样本 OTUs 的丰度信息。检测样本优质序列的长度主

要分布在 401~440 bp, 其中在 401~420 bp 序列数量最多为 465 960 条(图 1)。

表 1 微生物菌剂拌土对玉米农田土壤理化性质的影响

Table 1 The effect of clay treated by microbial agents on soil physical-chemical properties of maize field

处理 Treatment	有机碳 Organic carbon g/kg	pH	有机质 Organic matter g/kg	全氮 Total nitrogen g/kg	全磷 Total phosphorus g/kg	硝态氮 Nitrate nitrogen mg/kg	有效磷 Available phosphorus mg/kg	速效钾 Rapidly available potassium mg/kg
CK	9.57±0.43 c	8.30±0.00 a	16.47±0.28 b	1.10±0.01 a	0.96±0.02 a	15.85±0.52 bc	31.70±0.27 b	204.67±1.39 b
MCK	10.30±0.12 b	8.23±0.15 a	17.73±0.22 b	0.98±0.01 b	0.87±0.01 b	12.30±0.27 bc	26.00±1.29 b	190.33±2.34 b
M1	11.27±0.20 ab	8.10±0.00 b	19.43±0.36 ab	1.10±0.01 a	1.02±0.03 a	34.26±4.04 a	34.93±3.47 a	223.67±1.87 a
M2	12.07±0.10 a	8.15±0.17 b	20.83±1.67 a	1.13±0.01 a	1.01±0.05 a	19.33±0.33 b	36.70±0.27 a	228.67±1.32 a
ES	11.57±0.39 ab	8.20±0.11 a	20.03±0.65 a	1.07±0.01 ab	0.99±0.05 a	16.25±0.51 bc	34.17±0.77 a	199.33±5.38 b

注: 同列不同小写字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant difference between different treatments at 0.05 level

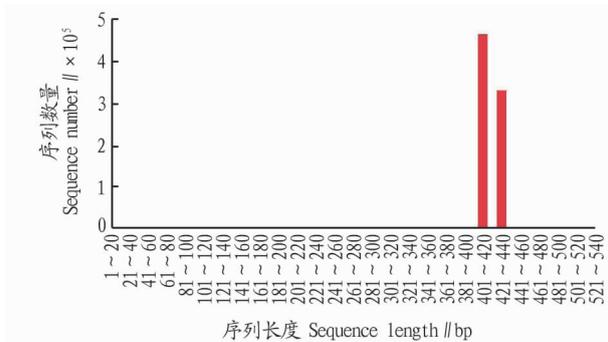


图 1 优质序列长度分布

Fig. 1 Length distribution of high quality sequences

2.3 玉米农田土壤细菌群落的共有和独有 OTU Venn 图一般可以比较不同检测样本中共有和独有的 OTU 数目。图 2 显示, 5 个处理样本中的 OTU 数量不同, MCK (4 695) > M1 (4 653) > M2 (4 396) > ES (4 238) > CK (4 351)。不同处理组的土壤细菌群落中既有共有 OTU 物种, 也有独有的 OTU。5 个处理相同的 OTU 有 2 704 个, M1 处理组独有的 OTU 数量为 266 个, M2 处理组独有 OTU 数量为 209 个, MCK 处理组独有 OTU 数量为 412 个, CK 处理组独有 OTU 数量为 208 个, ES 处理组独有 OTU 数量为 166 个。除共有和独有 OTU 外, 各处理之间有相同或相似的 OTU。

2.4 丰度等级曲线 Rank-Abundance 曲线用以分析细菌群落的物种丰富度和均匀度, 曲线的宽度反映了物种的丰富度, 宽度范围越大, 丰富度就越高; 曲线的形状反映了群落均匀度, 曲线越平缓, 均匀度越高; 曲线的下降趋势反映了物种的多样性, 下降趋势越平滑则物种多样性越高, 下降趋势快速陡然表明物种的多样性较低, 群落中的优势菌群所占比例较高。

图 3 显示, 微生物菌剂 M1 和 M2 样本的曲线跨度最大, 且重合多, 其他样本的曲线跨度较小, 说明 M1 和 M2 样本的丰富度最高, 而噁霉灵可湿性粉剂、微生物菌剂对照和空白对照样本的丰富度较低。5 组样本的曲线形状平缓、下降缓慢, 表明 5 组处理的群落多样性和均匀度都较高, 其中空白对照 CK 的曲线下降相对剧烈, 说明空白对照的群落多样性和均匀度低于其他样本。丰度等级曲线说明微生物菌剂拌土对土壤细菌群落的丰富度、多样性和均匀度有影响。

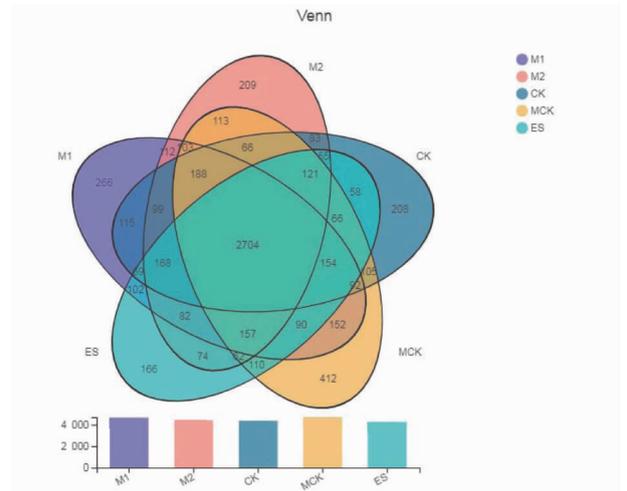


图 2 玉米农田土壤细菌群落的 Venn 分析

Fig. 2 Venn analysis of soil bacterial community in maize field

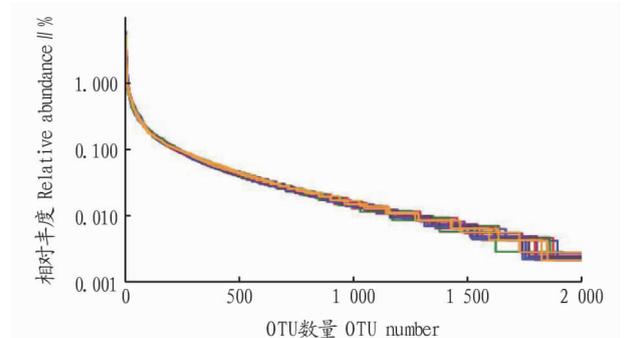


图 3 丰度等级曲线

Fig. 3 The abundance rank curve

2.5 微生物菌剂拌土对玉米农田土壤细菌群落多样性的影响

2.5.1 Alpha 多样性。采用 16S rRNA 基因测序技术对玉米农田土壤细菌群落多样性进行了分析, 明确微生物菌剂拌土对玉米农田土壤细菌群落多样性的影响, 微生物菌剂拌土对玉米农田土壤细菌群落多样性的影响见表 2。由表 2 可知, 检测样本的覆盖度均达 98% 以上, 说明检测结果基本反映了土壤样本中细菌群落多样性信息。各处理的土壤细菌群落丰富度指数有一定差异 ( $P < 0.05$ ),  $M1 > M2 > CK \approx MCK \approx ES$ 。微生物菌剂拌土后降低了土壤细菌群落多样性, 各处理之间

有一定差异 ( $P < 0.05$ ),  $CK > M1 \approx MCK \approx ES > M2$ 。微生物菌剂拌土对土壤细菌均匀度有一定影响 ( $P < 0.05$ ),  $CK \approx ES \approx MCK > M1 > M2$ 。试验结果证实,微生物菌剂拌土对玉米农田土壤细菌群落多样性具有一定程度的影响。

表 2 微生物菌剂对玉米农田土壤细菌群落多样性的影响

Table 2 The effect of microbial agents on soil bacterial community diversity of corn field

处理 Treatment	丰富度指数 Chao index	多样性指数 Shannon index	盖度 Coverage %	均匀度指数 Shannon even index
CK	3 014.00±1.24 b	6.64±0.44 a	0.98 a	0.83±0.65 a
M1	3 242.00±0.84 a	6.63±0.21 ab	0.98 a	0.82±0.34 ab
M2	3 102.00±0.56 ab	6.51±0.13 b	0.98 a	0.81±0.22 b
MCK	3 014.00±0.66 b	6.61±0.52 ab	0.98 a	0.83±0.54 a
ES	3 086.00±1.20 b	6.61±0.63 ab	0.98 a	0.83±1.34 a

注:同列不同小写字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant difference between different treatments at 0.05 level

**2.5.2 Beta 多样性。**采用主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA 分析) 比较不同处理微生物群落差异。土壤细菌群落 PCoA (图 4) 的前 2 个主坐标轴解释了 41.99% 的群落差异,其中轴 I 和轴 II 分别是 27.62% 和 14.37%,微生物菌剂对照 MCK 和 M2 分布在不同象限,与空白对照 CK 相距较远,说明微生物对照菌剂和 M2 拌土会改变土壤细菌群落结构。微生物菌剂 M1、噁霉灵可湿性粉剂 (ES) 处理组和空白对照的土壤细菌群落距离较近,说明这 2 组处理对玉米农田土壤细菌群落多样性有一定程度的影响,但还可能存在其他影响因素。样本分组相似性分析 (analysis of similarities, ANOSIM) 结果显示,5 组样本之间的  $R$  值只有 0.262 2,说明处理组间差异与组内差异之间没有差异 ( $P > 0.05$ )。  $P$  值为 0.015 说明该检测结果可信度比较高,能够显示组间和组内的差异。

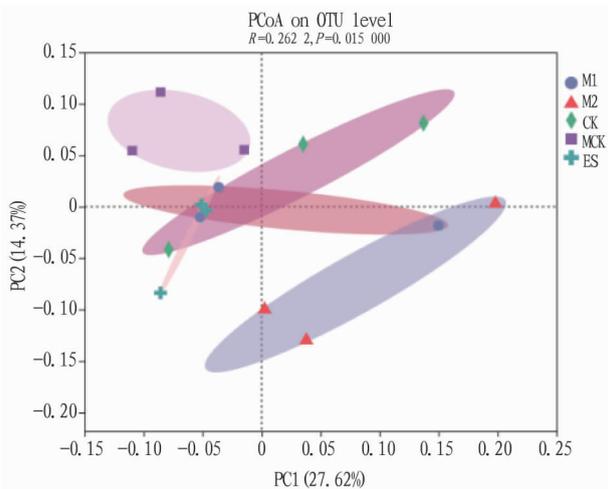


图 4 微生物菌剂拌土后玉米农田土壤细菌群落的 PCoA 分析

Fig. 4 Principal co-ordinates analysis (PCoA) of soil bacterial community of corn field treated by microbial agents on clay (OTU level)

**2.6 微生物菌剂拌土对玉米农田土壤细菌群落结构组成的影响**

**2.6.1 门水平上的群落构成。**图 5 显示玉米农田土壤中的

细菌门主要包含变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、芽单孢菌门 (Gemmatimonadetes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)。拌土处理组样本的放线菌门、酸杆菌门和厚壁菌门的相对丰度高于空白对照,其中微生物菌剂 M1 和 M2 的放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门的丰度最高。空白对照样本的变形菌门和芽单孢菌门相对丰度高于其他样本,噁霉灵可湿性粉剂拌土的样本中变形菌门的丰度最低,酸杆菌门的丰度最高。说明微生物菌剂拌土会影响玉米农田土壤细菌门水平上的群落组成。

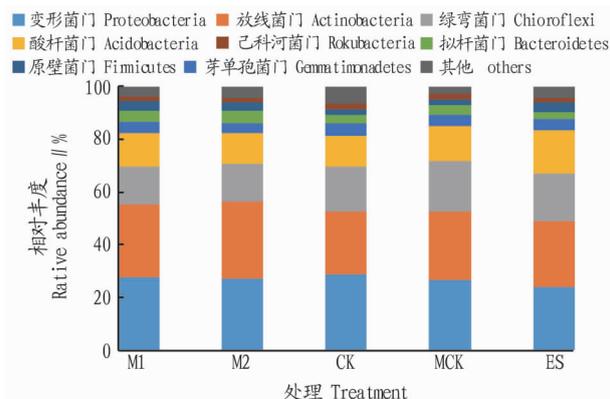


图 5 门水平的玉米农田土壤细菌群落组成

Fig. 5 Bacterial community composition of maize soil at phylum level

**2.6.2 属水平上的群落构成。**样本测序结果中不能分类的细菌属比例较大,图 6 显示玉米农田土壤中可以分类的相对丰度  $> 1.0\%$  的优势细菌属主要包括鞘氨醇单孢菌属 (*Sphingomonas*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioideis*)、大理石雕菌属 (*Marmoricola*)、*Gaiella* 和芽孢杆菌属,其中节杆菌属、类诺卡氏菌属、大理石雕菌属和 *Gaiella* 都属于放线菌门,鞘氨醇单孢菌属于变形菌门,芽孢杆菌属于厚壁菌门。空白对照样本的 *Gaiella* 丰度高于其他处理,但节杆菌属、类诺卡氏菌属、大理石雕菌属和芽孢杆菌属的相对丰度低于其他样本。微生物菌剂 M1 和 M2 拌土处理的样本中节杆菌属、类诺卡氏菌属、大理石雕菌属、*Gaiella* 和芽孢杆菌属的丰度高于其他样本,M2 样本的鞘氨醇单孢菌属丰度最高。

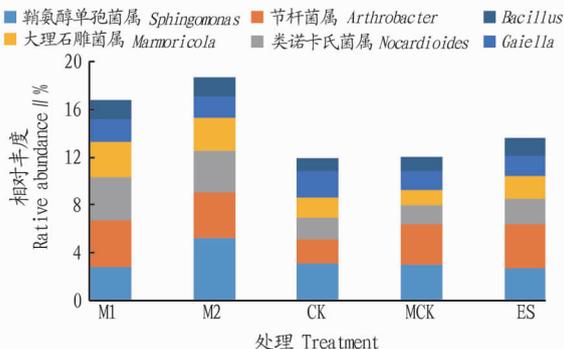


图 6 属水平的玉米农田土壤细菌群落组成

Fig. 6 Bacterial community composition of maize soil at genus level

噻霉灵可湿性粉剂样本的鞘氨醇单孢菌属丰度最低,节杆菌属、类诺卡氏菌属、大理石雕菌属、*Gaiella* 和芽孢杆菌属的丰度低于 M1 和 M2,但高于空白对照和 MCK。说明微生物菌剂拌土会影响玉米农田土壤细菌属水平上的群落构成。

**2.7 玉米农田土壤细菌群落的 Tax4Fun 功能预测** KEGG 数据库(kyoto encyclopedia of genes and genomes)用于系统分析检测样本的基因组信息和功能信息。表 3 表明,微生物菌

剂拌土后,玉米农田土壤中参与各种代谢通路、细胞转化、环境信息、有机系统以及引起人类疾病的微生物丰度发生了变化,但土壤中参与基因信息的微生物丰度没有变化。微生物菌剂 M1 和 M2 拌土降低了土壤中引起人类疾病、细胞转化的微生物丰度,提高了土壤中参与代谢通路的微生物丰度。Tax4Fun 结果说明微生物菌剂拌土会影响玉米农田土壤微生物群落的基础生命功能,从而改善了土壤的生态功能。

表 3 微生物菌剂拌土后玉米农田土壤细菌群落的 KEGG 代谢通路丰度

Table 3 KEGG metabolic pathway abundance of bacterial endophytic community in maize field treated by microbial agents on clay

处理 Treatment	细胞转化 Cellular transformation	环境信息 Environmental information	基因信息 Genetic information	人类疾病 Human diseases	新陈代谢 Metabolism	有机系统 Organismal systems
M1	0.032 8 ab	0.163 4 a	0.114 8 a	0.017 1 c	0.659 3 a	0.011 2 a
M2	0.033 1 ab	0.166 0 ab	0.114 6 a	0.016 9 c	0.657 1 a	0.010 9 ab
CK	0.035 5 a	0.169 8 a	0.114 5 a	0.017 6 ab	0.650 0 b	0.011 1 a
MCK	0.034 7 a	0.168 1 ab	0.116 4 a	0.017 2 c	0.654 9 ab	0.011 0 ab
ES	0.033 4 ab	0.165 9 ab	0.116 0 a	0.018 1 a	0.650 8 b	0.011 1 a

注:同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant difference between different treatments at 0.05 level

### 3 结论与讨论

土壤微生物具有重要的生态功能,参与土壤中有机质的分解和腐殖质的合成,促进土壤养分的转化和循环,提高土壤肥力<sup>[17]</sup>。土壤微生物的生物活性容易受到土壤理化性质、种植模式、植物种类等因素的影响<sup>[18-19]</sup>。土壤微生物群落的多样性反映了土壤生态机制和逆境胁迫对微生物群落的影响,在一定程度上可用作土壤生态系统稳定性和土壤质量健康的评价指标<sup>[20]</sup>。目前,有关芽孢杆菌为功能菌的复合微生物菌剂拌土对黄河流域的玉米农田土壤微生物群落组成及其多样性的影响尚未见报道。笔者首次采用高通量测序技术对微生物菌剂拌土后玉米农田土壤细菌群落及其多样性进行了研究。微生物多样性测序技术具有高通量、操作简便、快速、数据精确、成本低等特点。笔者采用 16S rRNA 测序技术对微生物菌剂 M1 和 M2 拌土对宁夏玉米土壤细菌群落多样性和结构特征的影响进行了研究,得出了噻霉灵可湿性粉剂、微生物菌剂对照、微生物菌剂 M1 和 M2 对玉米品种济玉 901 土壤细菌群落丰富度、多样性和均匀度以及所属的门分类水平上的相对丰度。测序结果表明,检测样本的细菌群落在目、科和属水平上仍有较大比例的微生物不能明确分类,但在门水平上获得比较明确的分类名称信息。估计与测序序列长度、测序区间、比对的数据库以及 16S rRNA 基因本身的局限性等有关。

土壤 pH 与细菌群落多样性具有显著负相关性<sup>[18]</sup>,该研究证实微生物菌剂拌土处理组的土壤 pH 明显降低,但土壤细菌群落多样性明显增加。细菌喜欢生活在营养丰富、有机质易于分解的土壤环境中<sup>[20]</sup>。芽孢杆菌可以将土壤中植物难以吸收的营养元素转化为易吸收的营养物质,改善土壤的生态环境。该研究的 2 种复合微生物菌剂的功能菌是 3 种土壤来源的芽孢杆菌,拌土处理可以显著增加土壤中有机碳、有机质、硝态氮、有效磷、速效钾的含量,为土壤细菌的繁殖提供了丰富的营养环境,增加了细菌群落的物种丰富度和

均匀度,提高了土壤生态系统的稳定性。因此,评价微生物菌剂对土壤微生物群落的影响具有重要的生态学意义。

土壤细菌群落在门水平上的组成主要包括变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、酸杆菌门、厚壁菌门等,外源投入物对土壤细菌门的丰度影响显著。微生物菌剂 M1 和 M2 拌土后,玉米农田土壤细菌群落的变形菌门丰度下降,放线菌门的丰度增加,这与 Chen 等<sup>[11]</sup>、冯师<sup>[12]</sup>、吕宁等<sup>[19]</sup>的研究结果较为一致。关于细菌属水平的组成影响,该研究结果与前人的研究差异较大。采用微生物菌剂 M1 和 M2 拌土后,玉米农田土壤细菌群落中的优势菌属主要是放线菌属和芽孢杆菌属,显著增加了土壤中有益微生物的丰度。土壤中病原菌的数量及其生物学活性的增加会破坏土壤微生物群落的稳定性与和谐性,从而危害地上部植物的正常生长<sup>[6-7]</sup>。放线菌和芽孢杆菌可以产生多种抗菌活性物质和植物激素,可以抑制土壤中有害微生物的数量和危害,促进地上部植物生长,进而增强了土壤的生态服务功能<sup>[21]</sup>。

微生物群落多样性是否稳定会直接影响微生物的生态功能和整个生态系统。该研究中的微生物菌剂拌土后,参与各种代谢的微生物丰度明显增加,土壤中引起人类疾病的微生物丰度明显降低;噻霉灵可湿性粉剂处理后的玉米土壤微生物群落结构稳定性较差,土壤中引起人类疾病的微生物丰度增加。研究结果证实微生物菌剂拌土可以改变土壤微生物基本生命活性功能和代谢途径,从而改善土壤微生物对生态环境的调控效应,增强土壤的生态功能。

### 参考文献

- [1] RANJARD L, POLY F, NAZARET S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment[J]. Research in microbiology, 2000, 151(3): 167-177.
- [2] DEFOREST J L. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and L-DOPA[J]. Soil biology and biochemistry, 2009, 41(6): 1180-1186.

(下转第 146 页)

### 3 结论与讨论

丙硫菌唑是一种新型甾醇合成抑制剂类药剂,目前在我国的登记(含审批中)的作物有小麦、水稻、玉米、黄瓜、香蕉、葡萄等,防治病害以赤霉病、白粉病、灰霉病、叶斑病等为主,具有杀菌谱广、无交互抗性、高效增产等优点。特别是近几年小麦赤霉病防治形势日益严峻,丙硫菌唑的出现有助于缓解该病的防治压力,推广应用空间巨大。

丙硫菌唑纳米水性化制剂,利用纳米分散技术,把原药粒径做到了纳米量级。当农药粒径处于纳米尺寸时,具有明显的小尺寸优势,如相同质量农药的颗粒数增加了10亿个,比表面积增加了1000倍,有利于农药颗粒在靶标作物表面的附着、沉积、分散及滞留,提高农药利用率;有利于农药颗粒在靶标作物和防治对象体内的剂量转移,更好地发挥药效等。在该研究的所有处理中,丙硫菌唑纳米水性化制剂对小麦赤霉病的防效突出,不仅显著优于不同有效成分的其他农药品种,在减量前提下还优于有效成分相同的常规农药,充分彰显出纳米分散技术的先进性与有效性。

高效的农药制剂,结合高效的植保器械更能发挥出优势。现阶段,由于农村劳动力严重不足,我国农业生产实现全程机械化的进程加快。植保无人机以其作业速度快、效率高特点越来越受欢迎<sup>[13]</sup>。小麦赤霉病的发生与抽穗扬花期的天气,尤其雨水息息相关<sup>[14]</sup>,而在长江中下游地区,自小麦扬花至灌浆期,阴雨天气偏多,影响了农户在关键时期及时用药,增加了小麦赤霉病暴发的风险。植保无人机作业效率高,作业速度快,可弥补小麦赤霉病防治窗口期短、防治

压力大的不足。该研究利用植保无人机喷施纳米水性化制剂,对小麦赤霉病的防治效果突出,其中丙硫菌唑纳米水性化制剂相对最佳,表明将两者结合开展大面积防治具有较大可行性,可在今后加大试验示范力度,为大面积推广应用提供技术支撑。

### 参考文献

- 钱恒伟,迟梦宇,黄金光.小麦赤霉病菌抗药性研究进展[J].中国植保导刊,2016,36(4):19-25.
- 吴福民,李华,刘才忠,等.小麦赤霉病防治药剂筛选结果初报[J].现代农药,2014,13(1):55-56.
- 史文琦,杨立军,冯洁,等.小麦赤霉病流行区镰刀菌致病种及毒素化学型分析[J].植物病理学报,2011,41(5):486-494.
- 张一宾,张烽.世界农药新进展[M].北京:化学工业出版社,2007.
- 徐建强,张勇,平忠良,等.河南省小麦赤霉病菌对戊唑醇的敏感性[J].麦类作物学报,2018,38(10):1255-1261.
- 宋阳阳,林杨,罗汉钢,等.湖北省小麦赤霉病菌对多菌灵、戊唑醇和咪唑胺的敏感性[J].农药学报,2016,18(6):724-728.
- 徐建强,刁兴旺,李恒,等.中国河南省小麦纹枯病菌对苯醚甲环唑及戊唑醇的敏感性[J].农药学报,2016,18(5):582-588.
- 周仁先.小麦赤霉病菌对常用杀菌剂的抗性研究[J].安徽农业科学,2018,46(21):152-154,174.
- 刘景松.小麦赤霉病研究进展[J].中国农村小康科技,2008(11):54-56.
- 龙春丽.10%丙硫菌唑悬浮剂防治水稻纹枯病田间药效试验报告[J].农家参谋,2019(8):83.
- 尹升,陈宏州,杨红福,等.咪唑胺与丙硫菌唑混剂对玉蜀黍赤霉菌的联合毒力及田间防效[J].江苏农业科学,2018,46(12):82-85.
- 王开峰,朱慧,范美娟.不同药剂处理对小麦赤霉病防治效果研究[J].现代农业科技,2017(23):90-91,101.
- 秦维彩.单旋翼植保无人机喷雾参数优化研究[D].镇江:江苏大学,2017.
- 郎翠合.豫北小麦赤霉病发生及防治方法分析[J].乡村科技,2017(13):70-71.
- ROLDÁN A, SALINAS-GARCÍA J R, ALGUACIL M M, et al. Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions[J]. Geoderma, 2005, 129(3/4): 178-185.
- 谭益民,何苑峰,郭文平.基于分子技术的土壤微生物多样性研究进展[J].中南林业科技大学学报,2014,34(10):1-9.
- 马海霞,张丽丽,孙晓萌,等.基于宏组学方法认识微生物群落及其功能[J].微生物学通报,2015,42(5):902-912.
- BAI R, WANG J T, DENG Y, et al. Microbial community and functional structure significantly varied among distinct types of paddy soils but responded differently along gradients of soil depth layers[J]. Frontiers in microbiology, 2017, 8:945-961.
- HOLLISTER E B, HU P, WANG A S, et al. Differential impacts of brassicaceous and nonbrassicaceous oilseed meals on soil bacterial and fungal communities[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 83(3):632-641.
- WATSON T T, NELSON L M, NEILSEN D, et al. Soil amendments influence *Pratylenchus penetrans* populations, beneficial rhizosphere microorganisms, and growth of newly planted sweet cherry[J]. Applied soil ecology, 2017, 117/118:212-220.
- BARBOSA L O, LIMA J S, MAGALHÃES V C, et al. Compatibility and combination of selected bacterial antagonists in the biocontrol of sisal bole rot disease[J]. BioControl, 2018, 63(4):595-605.
- 张美存,程田,多立安,等.微生物菌剂对草坪植物高羊茅生长与土壤酶活性的影响[J].生态学报,2017,37(14):4763-4769.
- CHEN J, DOU K, GAO Y D, et al. Mechanism and application of *Trichoderma* spp. in biological control of corn diseases[J]. Mycosystema, 2014, 33(6):1154-1167.
- 冯帅.固氮施氏假单胞菌 A1501-玉米根际联合固氮作用及其微生物群落分析[D].绵阳:西南科技大学,2014.
- 程扬,刘子丹,沈启斌,等.秸秆生物炭施用对玉米根际和非根际土壤微生物群落结构的影响[J].生态环境学报,2018,27(10):1870-1877.
- CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature methods, 2010, 7(5):335-336.
- KEMP P F, ALLER J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: What 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2):161-177.
- LU L, XING D F, REN N Q. Pyrosequencing reveals highly diverse microbial communities in microbial electrolysis cells involved in enhanced H<sub>2</sub> production from waste activated sludge[J]. Water research, 2012, 46(7):2425-2434.
- KOKALIS-BURELLE N, MCSORLEY R, WANG K H, et al. Rhizosphere microorganisms affected by soil solarization and cover cropping in *Capsicum annuum* and *Phaseolus lunatus* agroecosystems[J]. Applied soil ecology, 2017, 119:64-71.
- 陈坤,徐晓楠,彭靖,等.生物炭及炭基肥对土壤微生物群落结构的影响[J].中国农业科学,2018,51(10):1920-1930.
- 吕宁,石磊,刘海燕,等.生物药剂滴施对棉花黄萎病及根际土壤微生物数量和多样性的影响[J].应用生态学报,2019,30(2):602-614.
- DORAN J W, SARRANTONIO M, LIEBIG M A. Soil health and sustainability[J]. Advances in agronomy, 1996, 56:1-54.
- SHERIDAN C, DEPUYDT P, DE RO M, et al. Microbial community dynamics and response to plant growth-promoting microorganisms in the rhizosphere of four common food crops cultivated in hydroponics[J]. Microbial ecology, 2017, 73(2):378-393.

(上接第142页)