

稻田土壤微生物群落多样性研究进展

罗鑫^{1,2}, 张海燕², 刘明元³, 邵彪^{1*} (1. 南通市产品质量监督检验所, 江苏南通 226002; 2. 常州市环境监测中心, 江苏常州 213001; 3. 常州龙环环境科技有限公司, 江苏常州 213022)

摘要 综述了土壤微生物多样性常用的研究方法, 阐述了稻田土壤微生物多样性的影响因素以及目前研究进展, 并对未来的研究方向进行了展望。

关键词 稻田土壤; 微生物群落; 多样性
中图分类号 S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)21-0042-02

Study Review on Microbial Community Diversity in Paddy Soils
LUO Xin^{1,2}, ZHANG Hai-yan², LIU Ming-yuan³ et al (1. Nantong Products Quality Supervision and Inspection Institute, Nantong, Jiangsu 226002; 2. Changzhou Environmental Monitoring Center, Changzhou, Jiangsu 213001; 3. Changzhou Environmental Science and Technology, Changzhou, Jiangsu 213022)

Abstract This paper introduced the commonly used research methods of soil microbial diversity; it also summarized the recent progress in studies of paddy soil microbial communities and discussed the directions of future research.

Key words Paddy soil; Microbial community; Diversity

水稻是我国第一大粮食作物, 稻田土壤生态系统的稳定是保障水稻健康生长、提高产量的基础, 对水稻耕种的持续发展具有重要作用。1 g 土壤中微生物约有 100 亿个^[1], 包括原生动物、放线菌、真菌和细菌等^[2], 这些微生物群落虽然渺小, 但在生态系统中起着不可忽视的作用, 土壤中有有机质分解、养分运转等均得益于微生物群落的作用, 并有研究表明它们的存在可以降低植物病害并促进农业的增产^[3]。然而, 耕种方式的改变和农药的频繁使用影响稻田土壤微生物群落的多样性, 进而对土壤氮磷含量以及土壤环境质量产生影响。近年来有关水稻田土壤微生物群落多样性及其在生态系统中发挥的作用已有较多研究。笔者综述了土壤微生物群落多样性的研究方法, 阐述了稻田土壤微生物多样性的影响因素, 并对未来的研究方向进行了展望。

1 稻田土壤微生物多样性的研究方法

土壤微生物多样性的研究对象包括土壤生态系统中所有微生物种类、拥有的基因及微生物与环境之间的多样化程度^[4]。长期以来, 关于微生物多样性的研究层次问题一直存在多种解释, 普遍认为应从 3 个层次上综合表述, 即物种多样性、遗传物质多样性和生理功能多样性。土壤微生物的物种多样性是指土壤生态系统中微生物的物种丰度, 遗传多样性是指物种所具有的各类遗传物质和信息, 分别是微生物多样性的直接表现形式和本质反映^[4]。功能多样性是指土壤微生物所具备的能力及实现过程, 土壤中有有机物的分解利用、氮磷等营养元素释放和传递等都属于此范畴^[4]。微生物多样性的研究方法可以分为两大类: 一类是传统的培养和分离方法, 主要通过稀释和固体培养基实现微生物的分离; 另一类是生物指示分子鉴定法, 通过磷脂脂肪酸、RNA 或 DNA 等指示分子的特征来分析微生物生态多样性^[5]。

传统微生物培养方法是利用含各种营养成分的培养基对微生物进行培养, 根据微生物在固体培养基上形成的菌落形态不同来区分种类, 根据菌落计数来统计物种数量。此种方法在现代生物技术未兴起时对土壤微生物起到了初略了解的作用, 然而其缺点非常明显, 培养条件的不同对结果的影响很大, 工作量繁重, 并不能真实地反映土壤微生物的群落结构和多样性, 因为环境中仅有 1%~10% 的微生物^[6-7]可以被培养, 即传统培养法反映的仅是土壤中能在特定培养条件下生存的这部分微生物的信息, 因此传统培养法很少用来反映土壤微生物多样性。

虽然传统培养法在微生物多样性方面没有优势, 但在某些特定功能微生物的驯化和筛选方面具有不可替代的作用而被广泛应用。通过设定微生物的培养环境, 在培养过程中将不需要的菌类淘汰, 得到具有一定功能的菌类, 这就是微生物的驯化和筛选。王晓等^[8]利用传统培养法从土壤中筛选出一株能够降解毒死蜱的细菌, 纯化后鉴定为侧芽孢杆菌 (*Bacillus laterosporus*), 并在纯培养条件下对该菌降解能力进行研究。顾挺等^[9]等利用传统培养法从稻田土壤中筛选出纤维素降解菌, 以期对秸秆降解提供帮助。

在分子生物学技术发展的带动下, 微生物研究技术得到了很大提升, 能够从分子水平上揭示土壤微生物种类和遗传物质多样性, 磷脂脂肪酸法 (phospholipid fatty acid, PLFA)、基于 PCR 的分子生物学技术克服了传统分离方法的局限性, 能够较全面地反映微生物的多样性而被广泛应用于土壤微生物群落多样性研究中。PLFA 技术是利用细胞膜磷脂脂肪酸的种类和数量来辨别微生物多样性的方法。磷脂脂肪酸是细胞膜磷脂的重要组成部分, 不同生物的细胞膜含有特异的磷脂以及磷脂脂肪酸^[10-11], PLFA 在微生物体内具有较好的稳定性, 但微生物死后能够迅速被降解^[10], 因此通过分析土壤中 PLFA 的种类和含量, 可以反映特定微生物群落的存在及丰度。PCR-DGGE 技术是在对土壤中微生物 DNA 提取的基础上进行的, 通过 DNA 序列扩增、梯度电泳等技术将

基金项目 南通市科技项目 (HS2013057)。
作者简介 罗鑫 (1986—), 女, 江苏南通人, 工程师, 硕士, 从事环境微生物与环境监测研究。* 通讯作者, 高级工程师, 博士, 从事食品质量与安全分析。
收稿日期 2018-05-05

不同 DNA 以条带的形式区分开,以检测到条带的数量和丰度来表示群落结构和多样性。林黎等^[12]利用 PLFA 技术对崇明岛稻田不同围垦年代的微生物多样性进行研究,通过比较总微生物、总细菌、革兰氏阳性、阴性菌的磷脂脂肪酸含量,发现微生物数量与土壤营养含量呈正相关。宋亚娜等^[13]运用 PCR-DGGE 技术结合 DNA 测序分析氮肥对稻田 nirS 型反硝化细菌群落结构和丰度的影响,结果发现施用氮肥后群落多样性指数提高。

然而,PLFA 法和 PCR-DGGE 技术并不是万能的,在分析微生物多样性时并不能作为一个绝对指标。PLFA 法也有自身的局限性,不同属甚至不同科微生物的脂肪酸图谱可能发生重叠,因此该方法最多仅能鉴定到微生物的属,不能详细地确定微生物的具体种。PCR-DGGE 技术分析的主要对象是菌落数量达到一定优势的种群^[14],样品 DNA 提取不完全、PCR 扩增产生的误差,都会影响土壤微生物群落分析结果。另外,尽管这些方法提供了大量的遗传物质信息,但不能提供充足的微生物功能方面的信息,很难利用这些信息将微生物群落与其功能联系起来。

BIOLOG 平板法是一种从微生物利用碳源多样性的角度研究其功能多样性的方法,它通过微生物对 BIOLOG 板中 95 种不同单一碳源利用能力来评价某一样品微生物群落功能多样性。章家恩等^[15]利用 BIOLOG 平板法研究了放鸭对稻田土壤微生物群落功能多样性的影响,结果表明稻田土壤微生物群落的碳源利用能力提高。近年来,还有一些新技术被应用于土壤微生物多样性的研究,如微生物放射技术(microradioautography)、稳定性同位素技术(stable isotope probing, SIP)、微生物功能基因芯片技术(functional gene microarray)等^[16],他们各有自己的优点和缺陷,因此,可以结合多种方法来研究稻田土壤微生物多样性以及生物群落功能多样性。

2 稻田土壤微生物多样性的影响因素

1 g 农田土壤中含有的细菌达数百万,真菌和原生动物也达几十万,水稻田土壤含水量大,根系密集,更有利于微生物的栖息,造成微生物多样性非常丰富。土壤微生物多样性与土壤环境密切相关,不同的地区和气候,不同的耕种方式都会影响微生物组成。罗青等^[17]对福建省稻田土壤微生物多样性进行研究,结果发现不同地区和同一地区表土与根际土中细菌和固氮菌的组成有较大差异,且固氮菌的地区多样性更明显。影响稻田土壤微生物多样性的因素很多,可分为自然因素和人为因素两大类,自然因素有土壤类型、植被形态、气候和水分等。人为因素主要是人类在耕种时部分改变了土壤性质而影响微生物多样性,主要包括施肥、农药的应用、耕作方式等。

2.1 耕种措施对稻田土壤微生物多样性的影响 耕种措施能够直接改变土壤物理和化学性质,从而明显改变土壤微生物群落多样性。郭梨锦等^[18]采用 PLFA 技术对稻田表层土壤微生物群落结构和多样性进行研究,结果得到 21 种不同的磷脂脂肪酸,表明秸秆还田有利于增加表层土壤微生物的

种类和数量以及短期免耕能够改变微生物群落结构。卜元卿等^[19]直接提取水稻土和红壤细菌总 DNA,对 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析,结果显示稻秸原位还田后的土壤样品 DGGE 条带增多,说明稻秸还田能够增加土壤微生物群落的多样性。陈晓娟等^[20]采用 PLFA 法研究不同耕种方式对土壤微生物群落结构的影响,结果表明水稻田中真菌及革氏阴性菌的相对含量明显高于其他地,水旱轮作地中革氏阳性菌的相对含量也偏高。稻田土壤微生物多样性与水稻根际的有机物丰富程度有很大关系,秸秆还田为微生物提供了丰富的有机质,免耕或少耕减少了土壤中稳态微生物团体被破坏的概率,从而可以提高微生物群落多样性。

2.2 施肥对稻田土壤微生物多样性的影响 水稻的根际效应与水稻生长有密切关系,肥料的施入会改变土壤组成和水稻根际环境,从而直接或间接地改变稻田土壤微生物群落结构。肥料为土壤中增添了大量可利用碳源,大大刺激了土壤中微生物的生长,从而提高其多样性。袁红朝等^[21]采用 PCR 和 16S rRNA 测序技术,研究 3 种长期施肥制度对湖南某地稻田土壤细菌和古菌群落结构及数量的影响,结果表明土壤中的细菌主要为变形菌、酸杆菌、绿弯菌,古菌则为泉古菌和广古菌,施肥增加了群落多样性。

2.3 农药对稻田土壤微生物多样性的影响 为铲除虫害病害保障水稻产量,农药是必不可少的,然而农药的利用率低,大部分农药流失在环境中,造成环境污染和生态破坏,也很大程度上影响水稻田土壤微生物多样性。农药的影响也因农药的种类、浓度不同而不同,研究表明高浓度杀菌剂、除草剂、杀虫剂均能抑制微生物活性,引起群落结构变化,破坏生态平衡,而低浓度农药则有一定刺激作用,各种农药中杀菌剂对微生物数量和群落结构影响较大^[5]。张雯雯等^[22]研究了不同浓度农药(吡啶磺隆)对水稻田土壤微生物群落功能多样性的影响,结果显示高浓度会降低微生物的碳源利用能力,低浓度表现为促进作用,随时间延长抑制和促进作用逐步消失。张仕颖等^[23]研究了丁草胺对水稻田真菌、好氧细菌、放线菌、氮循环细菌等微生物的影响,结果表明,丁草胺可以降低水稻田微生物群落的碳源利用能力。

3 结论与展望

土壤微生物是土壤生态系统的重要组分,在土壤质量和植物健康方面发挥着重要作用。丰富多样的微生物种类不仅是维持稻田土壤生态的重要因素,更是提高水稻产量和质量的重要保障。土壤微生物与其所处的环境相互影响,环境条件的改变可以影响微生物的多样性群落结构,微生物群落形成规模后同样可以一定程度地改变环境。探索稻田土壤微生物种群结构、分布规律,研究各种因素对其产生的影响,对深入了解各种养分在水稻土壤体系中的传递与转化、解决农药残留造成的稻米安全问题和环境污染等具有重要意义。

目前,对于水稻土壤微生物多样性的研究主要集中在两方面,一方面是人为活动对水稻土壤微生物多样性的影响,包括施肥、灌溉、农药应用等;另一方面是某些功能微生物多

(下转第 47 页)

- 安:山东农业大学,2009.
- [37] BURCHETT M D, PULKOWNIK A, GRANT C, et al. Rehabilitation of saline wetlands, Olympics 2000 site, Sydney (Australia)-I: Management strategies based on ecological needs assessment [J]. Marine pollution bulletin, 1999, 37(8/9/10/11/12): 515-525.
 - [38] TUCKER N I J, MURPHY T M. The effects of ecological rehabilitation on vegetation recruitment: Some observations from the Wet Tropics of North Queensland [J]. Forest ecology and management, 1997, 99(1/2): 133-152.
 - [39] 张宜辉, 王文卿, 林鹏. 短时间和长时间盐度对木槿幼苗生长及叶片膜脂过氧化作用的研究[J]. 水生生物学报, 2004, 28(2): 186-190.
 - [40] 齐曼·尤努斯, 李阳, 木合塔尔, 等. NaCl、Na₂SO₄ 胁迫对新疆大果沙枣种子萌发及生理特性的影响[J]. 新疆农业科学, 2006, 43(2): 136-139.
 - [41] 克热木·伊力, 买合木提·卡热. 盐胁迫对扁桃砧木叶片 SOD、POD、CAT 活性的影响[J]. 中国农学通报, 2005(专刊): 39-43.
 - [42] 黄河清, 甄霖, 闫惠敏. 土地系统的脆弱性及其恢复力建设[J]. 中国科学院院刊, 2009, 24(6): 649-654.
 - [43] TURNER B L II, KASPERSON R E, MATSON P A, et al. A framework for vulnerability analysis in sustainability science[J]. Proceedings of the academy of sciences of the United States of America, 2003, 100(14): 8074-8079.
 - [44] DANIEL D E, THAMS J. Water in desert ecosystem [M]. New York: Academic Press, 1981.
 - [45] KOVSHAR A F, ZATOKA A L. Localization and infrastructure of Preserves in the Arid Area of the USSR [J]. Problemy Osvoeniya Pustyn, 1991(3/4): 155-161.
 - [46] MUDRÁK O, FROUZ J, VELICHOVÁ V. Understory vegetation in reclaimed and unreclaimed post-mining forest stands [J]. Ecological engineering, 2010, 36(6): 783-790.
 - [47] 刘军, 张武文, 蓝登明, 等. 牙克石市五九煤矿土地利用及景观格局变化研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2015, 36(3): 70-77.
 - [48] ZÉGRE N P, MAXWELL A, LAMONTS. Characterizing streamflow response of a mountaintop-mined watershed to changing land use[J]. Applied geography, 2013, 39: 5-15.
 - [49] 张菁, 侯康, 李旭祥, 等. 基于 GIS 和 RS 的延安地区土地利用及生态脆弱性评价[J]. 测绘与空间地理信息, 2015, 38(6): 26-31.
 - [50] 汤万金, 刘平. 露天煤矿生态系统脆弱性评价方法研究[J]. 世界标准化与质量管理, 2003, 40(2): 33-37.
 - [51] 廖雪琴, 李巍, 侯锦湘. 生态脆弱性评价在矿区规划环评中的应用研究: 以阜新矿区为例[J]. 中国环境科学, 2013, 33(10): 1891-1896.
 - [52] AL-JENEID S, BAHNASSY M, NASR, et al. Vulnerability assessment and adaptation to the impacts of sea level rise on the Kingdom of Bahrain [J]. Mitig Adapt Start Glob Change, 2008, 13: 87-104.
 - [53] TRAN L T, KNIGHT C G, O'NEILL R V, et al. Fuzzy decision analysis for integrated environmental vulnerability assessment of the mid-Atlantic Regional [J]. Environmental management, 2002, 29(6): 845-859.
 - [54] CASTANED C, HERRERO J, CASTERAD M A. Landsat monitoring of playa-lakes in the Spanish Monger desert [J]. Journal of arid environments, 2005, 63(2): 497-516.
 - [55] 侯湖平, 张绍良, 闫艳, 等. 基于 RS、GIS 的徐州城北矿区生态景观修复研究[J]. 中国矿业大学学报, 2010, 39(4): 504-510.
 - [56] 李鹤, 张平宇, 程叶青. 脆弱性的概念及其评价方法[J]. 地理科学进展, 2008, 27(2): 18-25.
 - [57] 赵林, 王维, 张宇硕, 李瑞, 等. 东北振兴以来东北地区城市脆弱性时空格局演变[J]. 经济地理, 2014, 34(12): 69-77.
 - [58] FADDA S, FIORI M, MATZUZZI C. Developing rehabilitation design for the abandoned mine excavations in Central Sardinia, Italy [J]. International journal of mining, reclamation and environment, 2010, 24(4): 286-306.

(上接第 43 页)

样性的研究, 如与碳循环、氮循环、铁循环等相关的微生物。另外, 利用分子生物学技术表征某特定地区土壤微生物多样性方面也有较多研究。而对于水稻不同生长时期土壤中优势微生物的特征, 微生物在降解残留农药的作用机理, 土壤微生物群落多样性与其功能多样性的联系等方面的研究较少, 成为今后稻田土壤微生物群落的研究方向。

参考文献

- [1] ROSELLÓ-MORA R, AMAN R. The spieces concept for prokaryotes [J]. FEMS Microb Rev, 2001, 25(1): 39-67.
- [2] JACKINSON D S, LADD J N. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover [M]// PAUL E A, LADD J N. Soil biochemistry. New York: Marcel Dekker INC., 1981: 445-471.
- [3] 周结, 雷霆. 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望 [J]. 生物多样性, 2007, 15(3): 306-311.
- [4] 林先贵, 胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能 [J]. 土壤学报, 2008, 45(5): 892-900.
- [5] 付岩. 典型农药在稻田及周围水环境中对微生物群落的影响研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015: 8-12.
- [6] AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143-169.
- [7] WILSON M C, PIEL J. Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology [J]. Chemistry & biology, 2013, 20(5): 636-647.
- [8] 王晓, 楚小强, 虞云龙, 等. 毒死蜥降解菌株 *Bacillus latsprorus* DSP 的降解特性及其功能定位 [J]. 土壤学报, 2006, 43(4): 648-654.
- [9] 顾庭, 申卫收, 钟文辉. 稻秆纤维素降解菌的分离筛选和降解性能研究 [J]. 南京师范大学学报(工程技术版), 2011, 11(1): 73-79.
- [10] 杨翠云, 郭淑政, 刘琪, 等. 石油污染土壤微生物多样性的研究技术及进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(33): 16479-16482, 16553.
- [11] 陈承利, 廖敏, 曾路生. 污染土壤微生物群落结构多样性及功能多样性测定方法 [J]. 生态学报, 2006, 26(10): 3404-3412.
- [12] 林黎, 崔军, 陈学萍, 等. 滩涂围垦和土地利用对土壤微生物群落的影响 [J]. 生态学报, 2014, 34(4): 899-906.
- [13] 宋亚娜, 吴明基, 林艳. 稻田土壤 nifS 型反硝化细菌群落对氮肥水平的响应 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(9): 1818-1826.
- [14] MUYZER G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems [J]. Current opinion in microbiology, 1999, 2(3): 317-322.
- [15] 章家恩, 许荣宝, 全国明, 等. 鸭稻共作对土壤微生物数量及其功能多样性的影响 [J]. 资源科学, 2009, 31(1): 56-62.
- [16] 孔维栋, 朱永官, 傅伯杰, 等. 农业土壤微生物基因与群落结构多样性研究进展 [J]. 生态学报, 2004, 24(12): 2894-2900.
- [17] 罗青, 宋亚娜, 郑伟文. PCR-DGGE 法研究福建省稻田土壤微生物地区多态性 [J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(3): 669-674.
- [18] 郭梨锦, 曹贵, 张枝盛, 等. 耕作方式和秸秆还田对稻田表层土壤微生物群落的短期影响 [J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(8): 1577-1584.
- [19] 卜元卿, 黄为一. 稻秸对土壤细菌群落分子多态性的影响 [J]. 土壤学报, 2005, 42(2): 270-277.
- [20] 陈晓娟, 吴小红, 刘守龙, 等. 不同耕地利用方式下土壤微生物活性及群落结构特性分析: 基于 PLFA 和 MicroRespTM 方法 [J]. 环境科学, 2013, 34(6): 2375-2382.
- [21] 袁红朝, 吴昊, 葛体达, 等. 长期施肥对稻田土壤细菌、古菌多样性和群落结构的影响 [J]. 应用生态学报, 2015, 26(6): 1807-1813.
- [22] 张雯雯, 徐军, 董丰收, 等. 节啉磺隆对水稻田土壤微生物群落功能多样性的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(9): 1749-1754.
- [23] 张仕颖, 夏运生, 肖伟, 等. 除草剂丁草胺对高产水稻土微生物群落功能多样性的影响 [J]. 生态环境学报, 2013, 22(5): 815-819.

科技论文写作规范——文内标题

文章内标题力求简短, 一般不超过 20 字, 标题内尽量不用标点符号。标题顶格书写, 文内标题层次不宜过多, 一般不超过 4 级, 分别以 1; 1. 1; 1. 1. 1; 1. 1. 1. 1 方式表示。