

## 固氮、解磷复合菌剂对小麦根际土壤细菌群落的影响

贺国强<sup>1</sup> 陈三凤<sup>2\*</sup>

(1. 北京市农业技术推广站, 北京 100029;

2. 中国农业大学 生物学院/农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要** 为研究固氮芽孢杆菌、固氮巨大芽孢杆菌、解磷假单胞菌、巴西固氮螺菌组成的复合菌剂对小麦根际土壤细菌群落多样性的影响,通过构建16S rRNA克隆文库及采用核糖体DNA扩增片段酶切分析(ARDRA)的方法,以文库库容值(C)、Rarefaction曲线(R)对克隆文库进行评价。系统发育分析表明,对照及菌剂处理样品均检测到酸杆菌门、变形菌门、浮霉菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、疣微菌门、放线菌门和芽单胞菌门8个细菌类群,并且优势菌群均为变形菌门和酸杆菌门。接种菌剂后小麦根际土壤检出了绿弯菌门、蓝藻门、产水菌门和硝化螺旋菌门,而梭杆菌门未被检出。假单胞菌属由1.59%增加至21.28%。芽孢杆菌属由未检出增至3.05%。两样品中均未检出固氮螺菌属。多样性分析表明,接种菌剂后,小麦根际土壤细菌多样性指数和丰富度指数均提高。因此,接种菌剂对小麦根际土壤细菌类群的组成及所占比例有较大影响。

**关键词** 菌剂;根际土壤;细菌群落;16S rRNA基因;核糖体DNA扩增片段酶切分析(ARDRA)

中图分类号 Q 938

文章编号 1007-4333(2015)05-0081-08

文献标志码 A

## Influence of nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacterial agents on bacterial community in wheat rhizosphere soil

HE Guo-qiang<sup>1</sup>, CHEN San-feng<sup>2\*</sup>

(1. Beijing Agricultural Technology Extension Station, Beijing 100029, China;

2. College of Biological Sciences/State Key Laboratory of Agricultural Biotechnology,  
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** The impact of inoculation with bacterial communities (*Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas alcaligene* and *Azospirillum brasilense*) in rhizospheric soil of wheat was assessed by constructing a 16S rRNA gene clone library, conducting amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), using coverage value (C) and Margalef richness index (R) as evaluated index. Phylogenetic analysis revealed that a total of eight bacterial groups including Acidobacteria, Proteobacteria (including  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria), Planctomycetes, Firmicutes, Nitrospirae, Bacteroidetes, Verrucomicrobia and Gemmatimonadetes were existed in both inoculated soil and control soil. The dominant bacterias were Proteobacteria and Acidobacteria in both soil samples. Bacterias belong to Chloroflexi, yanophyta, Aquificae and Nitrospirae excluding Fusobacteria were found in the inoculated treatment. Bacterias belong to *Pseudomonas* were increased from 1.59% to 21.28%, and bacterias belonging to *Bacillus* were increased from 0 to 3.05%, while bacterias belong to *Azospirillum* were not detected in both samples. Diversity analysis showed that soil bacterial Shannon index and Margalef richness index were promoted after inoculation. In conclusion, the inoculation significantly affected the composition of bacterial communities in wheat rhizosphere soil.

**Key words** bacterial agents; rhizosphere soil; community composition; 16S rRNA genes; amplified ribosomal DNA restriction analysis

收稿日期: 2014-12-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划 863 项目(2013AA102802-04)

第一作者: 贺国强, 农艺师, 主要从事微生物分子研究, E-mail: heguoqiang1984@126.com

通讯作者: 陈三凤, 教授, 主要从事微生物固氮研究, E-mail: chensf@cau.edu.cn

根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是一类定植于植物根部,能够促进植物生长或增强植物对病害、虫害抗性的细菌<sup>[1]</sup>。PGPR具有固氮、解磷、生防和促生作用,与作物品质、产量密切相关<sup>[2-6]</sup>,在促进作物增产;减少化肥用量<sup>[7]</sup>,防止土壤板结,保护生态及减少农药用量,保证农业绿色安全方面具有广阔前景。

随着研究的深入,根际促生菌作为接种菌剂回接对作物根系微生物的作用成为热点。而认识接种菌剂对与农作物相关的细菌群落和土壤状态的影响是理解接种物如何影响作物生产力的一个决定性步骤。研究表明,在土壤中接种拮抗微生物等将对土壤化学性质、土壤微生物活性和微生物群落结构造成直接或间接的影响<sup>[8]</sup>,从而影响土壤生态系统的功能发挥和结构稳定。在固氮菌肥的研究中,固氮芽孢杆菌以其抗逆性强、分布范围广及可分泌生物生长促进物质而引起本实验室开发生物固氮菌肥的极大研究兴趣。先前的研究表明具有固氮、解磷、生防和促生功能的复合菌肥作为接种物可以促进小麦、玉米种子的萌发并可提高其田间产量<sup>[9-10]</sup>。固氮芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)、固氮巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、解磷假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)和巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)是目前研究较多的植物促生微生物之一,关于其促生及生防效果研究较多<sup>[11-14]</sup>。康贻军等<sup>[15]</sup>通过 DGGE 指纹图谱分析研究表明植物根际促生菌 *Pseudomonas chlororaphis* RA6 和 *Bacillus pumilus* WP8 接种豇豆,除 WP8 浸种处理外,菌剂浸种及拌土处理的土壤微生物群落多样性和对照均发生明显的变化。刘方春等<sup>[16]</sup>将筛选出的 1 株根际促生细菌(PGPR)以发酵鸡粪(DC)为吸附载体制成 PGPR 生物肥(PF)使用到土壤中表明能够提高可培养微生物数量,提高根际土壤中微生物多样性,有效改善冬枣根际土壤的微生态环境。Beatriz 等<sup>[17]</sup>研究认为桉木幼苗接种一种地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheni*)悬液改变了根际微生物群落从而可以促进植物生长。

土壤中的根际促生菌并非单独发挥作用,往往是一些具有固氮、解磷等功能的菌类的集合。因此,复合菌剂的开发和研究显得尤为迫切。而关于其作为复合菌剂使用对根际土壤细菌群落多样性特征影响的研究尚不多见。本试验研究复合菌剂田间接种小麦的根际土壤细菌群落的变化,旨在从微观水平

为阐明复合菌剂对小麦的促生、增产作用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试冬小麦品种为轮选 987。所用菌株:芽孢杆菌(*Bacillus sp.*) W6;巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) C4;假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*) S20;巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*) Yu62 由农业生物技术国家重点实验室(本实验室)自土壤中分离得到。

### 1.2 试验处理

田间试验于北京市顺义区大孙各庄镇东华山村进行。试验所选地块地势平整,土壤肥力中等,地力较均衡。底肥选用二胺,用量为 450 kg/hm<sup>2</sup>。田间试验共分 2 个处理:等量清水(施用量 15 t/hm<sup>2</sup>)作为对照(CK);清水(施用量 15 t/hm<sup>2</sup>)添加 W6、C4、Yu62 和 S20 等比例复配(4 种菌液分别为 1.0×10<sup>6</sup>、1.2×10<sup>6</sup>、2.0×10<sup>6</sup> 和 1.1×10<sup>7</sup> cfu/mL)(D)。每个处理小区设 3 个重复,每个小区 20 m<sup>2</sup>,处理小区随机分布。小麦于当年 10 月 8 日播种,第 2 年 3 月进入返青期,在小麦起身期采用根部浇施的方式进行菌剂接种。于小麦成熟期进行土壤取样。按 5 点取样法在每个处理中选取 5 株小麦植株,先去掉 0~5 cm 的表土,轻轻抖掉根系外围土,用毛刷刷轻轻刷粘附在根表面的土壤作为根际土,用无菌的封口袋包扎密封,置于冰盒中带回实验室,置于-80℃储存备用。

### 1.3 主要试剂及仪器

PCR 试剂、pEASY-T1 载体、*Alu I* 和 *BsuR I* 限制性内切酶以及 DNA 纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.4 研究方法

#### 1.4.1 土壤细菌总 DNA 的提取与纯化

用土壤 DNA 提取试剂盒(UltraClean® DNA Isolation kit, MO BIO)提取土壤细菌总 DNA,提取的粗 DNA 用 DNA 纯化试剂盒进行纯化,提取和纯化方法均按照操作说明进行。

#### 1.4.2 16S rDNA 的 PCR 扩增

选用细菌通用引物 27 F 和 1492 R 扩增样品总 DNA 的 16S rDNA 片段。

20 μL PCR 反应体系为:10×Taq 酶反应 Buffer 2.0 μL, dNTP Mixture (10 nmol/μL) 0.5 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.3 μL, 引物 27 F 和

1492 R 各 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 10 ng, 用无菌双蒸水补足 20  $\mu\text{L}$  体系。

16S rDNA 扩增条件采用 touch-down PCR 程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, (每 1 个循环降低 0.5  $^{\circ}\text{C}$ , 降到 55  $^{\circ}\text{C}$ ), 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化。

#### 1.4.3 细菌 16S rDNA 克隆文库的构建及阳性克隆筛选

将回收获得的 16S rDNA 基因片段通过 pCNS-T Cloning Kit 试剂盒连接到 pCNS-T 载体上, 转化进入 *E. coli* JM109 高感受态细胞, 将转化产物涂布到含有氨苄青霉素 (Ampicillin) IPTG/X-Gal 的 LB 培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16~24 h, 每个样品挑取 300 个白色克隆子, 采用菌落 PCR 的方法, 用引物 M13F 和 M13R 扩增外源插入片段, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测筛选阳性克隆, 构建基因克隆文库。

#### 1.4.4 ARDRA 分析

将鉴定为阳性的 PCR 产物用限制性内切酶 *Alu* I 和 *Bsu*R I 进行双酶切。反应体系为: PCR 反应产物 4  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  NE 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , *Alu* I (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , *Bsu*R I (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 双蒸水补足至 20  $\mu\text{L}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 3~4 h。2% 琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段, 凝胶成像系统拍照并使用 GelCompar II 软件析酶切图谱。

#### 1.4.5 16S rDNA 测序及系统发育分析

根据酶切谱型的不同将所有的阳性克隆分成若干个操作分类单元 (OTU), 统计操作分类单元的种类和各操作分类单元所含阳性克隆的数量, 每个 OTU 类型挑选 1~2 个代表克隆进行测序 (由北京博迈德生物技术有限公司完成)。序列的拼接及相似性分析使用 DNAMAN、MEGA3.1<sup>[18]</sup> 软件或在线分析工具 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) 与 RDP/GenBank 中的已知序列进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 比对以确定其发育地位。每条序列均选取与其相似性最高的序列, 使用软件 Clustal X 1.83 进行多重比对, 最后用 MEGA 4.0 中的邻接法 (Neighbour-Joining) 构建 16S rDNA 系统进化树。

#### 1.5 数据处理

以覆盖率 (Coverage, C) 评价所构建克隆文库的库容, 计算公式为:  $C = [1 - (n1/N)] \times 100\%$ 。其

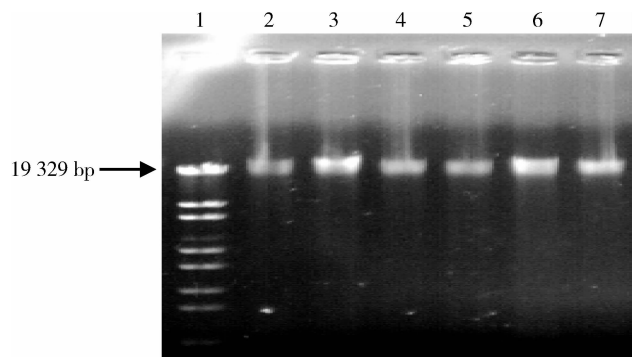
中:  $N$  为 16S rDNA 克隆文库的总克隆数;  $n1$  为在 16S rDNA 克隆文库中仅出现 1 次的操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU) 的数量。统计每个样品的 OTU 有多少个克隆, 然后使用 Analytic Rarefaction 软件绘制 Rarefaction Curve 曲线。Coverage 值理论上表示了细菌 16S rDNA 文库中所包含的微生物的种类 (基因型) 占样品中全部微生物的比例。

以 Rarefaction 曲线<sup>[19]</sup> 分析库容是否达到分析要求。Rarefaction 曲线使用 aRarefactWin 程序 (<http://www.uga.edu/~strata/software/Software.html>) 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤细菌总 DNA 提取及 16S rRNA 而定扩增结果

使用化学裂解法提取土壤样品 (CK、D) 的总 DNA, 经试剂盒纯化, 进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 表明土壤样品基因组 DNA 的纯化效果很好 (图 1)。使用紫外分光光度计分别检测 CK 和 D 样品。2 个样品 DNA 的  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  均大于 0.450, 表明提取的总 DNA 无蛋白的污染;  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  均小于 1.942, 表明总 DNA 样品没有 RNA 的污染。CK、D 样的总 DNA 质量浓度分别可达 0.675、0.390  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 土壤 DNA 产量分别为 108.0 和 62.4  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 说明基因组 DNA 提取效果很好。



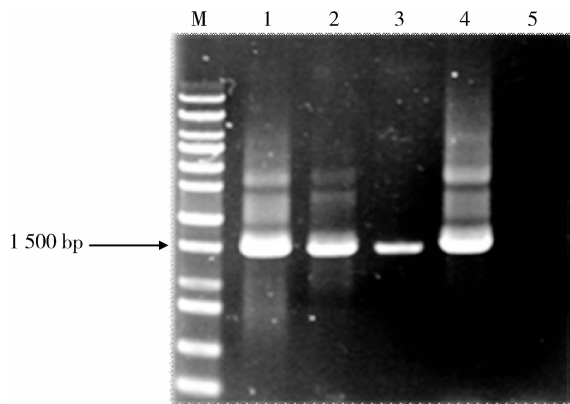
1 为  $\lambda$ -*Eco*T14 I digested DNA Marker; 2~4 依次为 CK 处理 3 个重复取样样品的总 DNA, 即 CK1、CK2、CK3; 5~7 依次为 D 处理 3 个重复取样样品的总 DNA, 即 D1、D2、D3。

1.  $\lambda$ -*Eco*T14 I digested Marker; 2-4. Total DNA of samples CK with 3 replications: CK1, CK2, CK3; 5-7. Total DNA of sample D with 3 replications: D1, D2, D3.

图 1 经纯化的土壤总 DNA 琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoresis of purified total soil DNA

以直接提取及纯化的土壤样品(CK、D)的总DNA为模板,经降落(Touch-down)PCR扩增获得约1500 bp的16S rDNA片段(图2),电泳检测表明以纯化后的总DNA扩增的片段条带专一,符合后续试验要求。



M为Hind III digested  $\lambda$  DNA Marker;1~2为分别以CK、D样品粗DNA为模板扩增结果;3为CK样经纯化所得的DNA为模板扩增的结果。4、5分别为阳性对照和阴性对照,其中阳性对照所用模板为菱镁矿总DNA。

M. Hind III digested  $\lambda$  DNA Marker. Lane 1 and 2 were amplified DNA used crude DNA samples of CK and D as template respectively. Lane 3 is amplified DNA used purified DNA samples of CK. Lane 4 and 5 were positive control and negative control, respectively. The positive control used magnesite total DNA as template.

图2 土壤总DNA 16S rDNA扩增的琼脂糖电泳图

Fig. 2 Agarose electrophoresis of amplification of total soil 16S rDNA

## 2.2 16S rDNA克隆文库的建立

样品16S rDNA扩增片段经纯化后,连接到pEASY-T1载体上并转化大肠杆菌感受态细胞,2组样品共随机挑选400个克隆子,利用通用引物M13R和M13F进行筛选后,样品CK、D分别获得166和179个阳性克隆子,其阳性克隆率分别为83%和89.5%。

## 2.3 ARDRA分析及系统发育分析

获得的阳性克隆经2种限制性内切酶Alu I和BauR I酶切后,土壤样品CK和T分别获得75和74个OTU类型,其中仅出现1次的OTU数量分别是36和35个,因此,其文库覆盖率C分别为78.3%和80.4%。2组样品的文库覆盖率均>70%,说明文库容量已足够,能够较全面反映土壤样品中细菌群落多样性(表1)。

对ARDRA分型获得的共149个OTUs中的

代表克隆子进行序列测定,所得序列在GenBank数据库中作对比分析,对比结果如表1所示。CK、D样品克隆序列与基因文库中已知序列相似性分别为89%~100%和91%~100%。2组样品中均出现一定量未知细菌,在GenBank数据库中未找到与之相似性较高的已知序列。而样品中其余序列均属于16个细菌类群:酸杆菌门(Acidobacteria)、 $\alpha$ -变形菌纲( $\alpha$ -proteobacteria)、 $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -proteobacteria)、 $\delta$ -变形菌纲( $\delta$ -proteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲( $\gamma$ -proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、厚壁菌门(Firmicutes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻门(Cyanophyta)、产水菌门(Aquificae)和放线菌门(Actinobacteria)。

不同细菌类群在2组样品中的所占的比例有较大差别。对照样品中优势菌为变形菌门(33.33%)和酸杆菌门(19.05%),而样品D优势菌则为变形菌门(48.09%)和酸杆菌门(28.24%)。2组样品的变形菌门均包含 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -变形菌,但所占比例有较大不同。例如 $\gamma$ -Proteobacteria为2组样品中的优势类群,在样品CK中含量为19.05%,在样品D中高达 $\gamma$ 31.3%。就 $\delta$ -变形菌纲而言,CK样品中其占4.76%,而样品D中其仅占0.76%(表1)。此外,2组样品中同一分类的细菌类群也在种属分布方面有所不同,尤其表现在 $\alpha$ -变形菌纲和 $\beta$ -变形菌纲。样品CK中 $\alpha$ -变形菌纲主要为鞘脂单胞菌属、Kaistia、Andersenella和柄杆菌属(Caulobacter),而在样品D中则为叶杆菌属(Phyllobacterium)、德沃斯氏菌属(Devosia)、未分类的根瘤菌属、未分类的红螺菌(Rhodospirillales)、未分类的鞘脂单胞菌(Sphingomonadaceae)及未分类的 $\alpha$ -变形菌。相较CK样品,在复合菌剂处理(样品D)中拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、放线菌门(Actinobacteria)所占的比例显著下降。梭杆菌门(Fusobacteria)在复合菌剂处理样品中并未出现,而出现了绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻门(Cyanophyta)、产水菌门(Aquificae)和硝化螺旋菌门(Nitrospirae)。

2组样品中的酸杆菌门、浮霉菌门、厚壁菌门、放线菌门、 $\gamma$ -变形菌纲和 $\delta$ -变形菌纲细菌多为未分

表1 样品土壤细菌 16S rDNA 克隆文库分析结果

Table 1 Bacterial 16S rDNA clone library

克隆子门(纲) 水平的鉴定 Phyla/Class identification of clones	样品编号* Sample No.	所占总克隆子 的比例/% Proportion of the total clones	克隆子详细鉴定结果 Detailed identification of clones
酸杆菌门 (Acidobacteria)	CK	19.05	Acidobacteria Gp6 (6.35%), Acidobacteria Gp10 (1.59%), Acidobacteria Gp4 (9.52%), Acidobacteria Gp7 (1.59%)
	D	28.24	Acidobacteria Gp6 (17.56%), Acidobacteria Gp4 (3.05%), Acidobacteria Gp3 (0.76%), Acidobacteria Gp25 (2.29%), Acidobacteria Gp11 (0.76%), Acidobacteria Gp10 (0.76%), Acidobacteria Gp7 (1.53%), unclassified Acidimicrobiales (0.76%), unclassified Microbacteriaceae (0.76%)
$\alpha$ -变形菌纲 ( $\alpha$ -proteobacteria)	CK	6.35	Sphingomonas (1.59%), Kaistia (1.59%), Anderseniella (1.59%), Caulobacter (1.59%)
	D	6.87	Phyllobacterium (0.76%), Devosia (1.53%), unclassified Rhizobiales (0.76%), unclassified Rhodospirillales (1.53%), unclassified Alphaproteobacteria (0.76%), unclassified Sphingomonadaceae (1.53%)
$\beta$ -变形菌纲 ( $\beta$ -proteobacteria)	CK	4.76	unclassified Betaproteobacteria (1.59%), unclassified Burkholderiales (1.59%), Nitrosospira (1.59%)
	D	8.39	Ralstonia (0.76%), Ramlibacter (0.76%), Pelomonas (0.76%), Herbaspirillum (0.76%), unclassified Burkholderiales (2.29%), unclassified Betaproteobacteria (3.05%)
$\gamma$ -变形菌纲 ( $\gamma$ -proteobacteria)	CK	19.05	Unclassified Pseudomonadaceae (4.76%), Pseudomonas (1.59%), unclassified Gammaproteobacteria (1.59%), unclassified Enterobacteriaceae (7.94%), unclassified Xanthomonadales (3.17%)
	D	31.3	Unclassified Gammaproteobacteria (2.29%), Pseudomonas (21.28%), Azomonas (0.76%), unclassified Pseudomonadaceae (0.76%), Steroidobacter (1.53%), unclassified Xanthomonadaceae (2.29%), Lysobacter (0.76%), Aquicella (0.76%)
$\delta$ -变形菌纲 ( $\delta$ -proteobacteria)	CK	4.76	Unclassified Deltaproteobacteria (1.59%), unclassified Sorangiineae (1.59%), Nannocystis (1.59%)
	D	0.76	Unclassified Deltaproteobacteria (0.76%)
拟杆菌门 (Bacteroidetes)	CK	7.94	Chitinophaga 1 (1.59%), unclassified Chitinophagaceae (3.17%), Flavisolibacter (1.59%), Terrimonas (1.59%), unclassified Cytophagaceae (1.59%), Adhaeribacter (1.59%)
	D	3.82	Flavisolibacter (3.82%)
疣微菌门 (Verrucomicrobia)	CK	7.94	Subdivision3 (7.94%)
	D	0.76	Spartobacteria (0.76%)
芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)	CK	6.35	Gemmatimonas (6.35%)
	D	1.53	Gemmatimonas (1.53%)
放线菌门 (Actinobacteria)	CK	6.35	Microclunatus (1.59%), Nocardioides (1.59%), Pimelobacter (1.59%), unclassified Solirubrobacteriales (1.59%)
	D	0.76	Actinobacterium (0.76%)

表1(续)

克隆子门(纲) 水平的鉴定 Phyla/Class identification of clones	样品编号* Sample No.	所占总克隆子 的比例/% Proportion of the total clones	克隆子详细鉴定结果 Detailed identification of clones
厚壁菌门 (Firmicutes)	CK	3.17	Unclassified Bacillales (1.59%), Tumebacillus (1.59%)
	D	3.05	Unclassified Bacillales (3.05%)
浮霉菌门 (Planctomycetes)	CK	1.59	Pirellula (1.59%)
	D	2.29	Pirellula (0.76%), unclassified Planctomycetaceae (0.76%), Planctomyces (0.76%)
梭杆菌门 (Fusobacteria)	CK	1.59	Fusobacterium (1.59%)
	D	0	—
绿弯菌门 (Chloroflexi)	CK	0	—
	D	3.05	Caldilinea (1.53%), Herpetosiphon (0.76%), unclassified Anaerolineaceae (0.76%)
蓝藻门 (Cyanophyta)	CK	0	—
	D	0.76	Chlorophyta (0.76%)
产水菌门 (Aquificae)	CK	0	—
	D	0.76	unclassified_Planctomycetaceae (0.76%)
硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)	CK	0	—
	D	0.76	Nitrospira (0.76%)
未知细菌 (Unclassified)	CK	12.70	Unclassified Bacteria (12.70%)
	D	6.11	unclassified Bacteria (6.11%)

注: \* CK 为对照土样; D 为施用复合菌剂处理土样, 下表同。“—”表示克隆子不在此门类中。

Note: \* CK represents the control soil sample; D represents the soil sample treated with compound fungus agent. The same is as the following table. “—” indicates that the clone is not included in this category.

类菌(表1)。2组样品中都含有很大比例的未知门类细菌, 其中样品 CK 含有 12.7%, D 样品中含有 6.11%。

## 2.4 细菌群落多样性分析

2组克隆文库多样性指数详见表2。从表中可

以看出, 样品 CK 和 D 中细菌群落均具有较丰富的多样性, 且接种复合菌剂的土壤样品(D)细菌群落多样性和丰富度均明显高于对照土壤(CK)。均匀度指数是指群落中各个种的多度或重要值的均匀程度, D 和 CK 的土壤细菌均匀度无差异。

表2 样品 CK、D 的土壤细菌多样性

Table 2 Species diversity of sample CK and D

样品编号 Sample No.	Shannon 指数 Shannon index ( <i>H</i> )	均匀度指数 Evenness index ( <i>E</i> )	丰富度指数 Richness index ( <i>R</i> )
CK	3.1	0.9	8.2
D	3.2	0.9	9.0

## 3 讨论

1) 本试验采用 ARDRA 分析的方法, 以未接种菌剂的小麦根际土壤为对照, 研究了复合菌剂接种

对小麦根际土壤细菌群落结构的影响, 发现 2 组土壤样品细菌群落均具有丰富的多样性。用 Shannon 多样性指数、Margalef 丰富度指数等分析细菌多样性发现, 接种复合菌剂后细菌多样性和丰富度均有

所提高,这与以往研究结果相似。如刘方春等<sup>[16]</sup>研究表明,在干旱生境下接种蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)90 d后,核桃根际土壤细菌群落的 Margalef 指数和 Shannon 指数均显著提高。ARDRA 分析表明,2 组样品中优势菌群均为变形菌门和酸杆菌门。该研究结果与以往研究人员利用 16S rRNA 基因克隆文库的方法对土壤样品进行分析所获得的结果基本一致,认为变形菌门、酸杆菌门等是土壤中常见的细菌类群。例如 Schloss 等<sup>[20]</sup>利用 16S rRNA 基因序列研究农田土壤样品细菌的生态学分类,结果显示土壤样品细菌包括 7 个主要类群: Proteobacteria (48.6%)、Acidobacteria (15.3%) 等。张建萍等<sup>[21]</sup>应用 16S rRNA-RFLP 方法分析稻田土壤细菌的多样性,发现测得序列涵盖 4 种变形杆菌、酸杆菌、放线菌、绿屈挠菌、拟杆菌和浮游霉菌等 12 个类群,其中变形细菌所占比例最大(37.8%),其次为酸杆菌(16.2%)。

2) 固氮芽孢杆菌、固氮巨大芽孢杆菌、解磷假单胞菌和巴西固氮螺菌因其促生及生防效果成为目前研究较多的植物促生微生物<sup>[11-14,17]</sup>。本研究中接种的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) W6 和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) C4 属于厚壁菌门、芽孢杆菌纲和芽孢杆菌属;假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*) S20 属于变形菌门、 $\gamma$ -变形菌纲和假单胞菌属;巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*) Yu62 属变形菌门、 $\alpha$ -变形菌纲和固氮螺菌属。小麦施用这 4 种促生菌组成的菌剂后, $\gamma$ -变形菌纲所占的比例由 19.05% 增加至 31.3%,其中假单胞菌属(*Pseudomonas*) 由 1.59% 增加至 21.28%,可以推测与接种 *Pseudomonas alcaligenes* S20 关系密切。同时,厚壁菌门所占的比例由 1.59% 增加至 3.05%,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*) 在对照土壤中未检出,而在接种复合菌剂的土壤出占比例 3.05%,可以推测与接种 *Bacillus* sp. W6 和 *Bacillus megaterium* C4 有关。然而两样品中均未检出固氮螺菌属(*Azospirillum*)。研究表明,接入菌剂需与土壤中的土著微生物,包括细菌、真菌、放线菌等发生作用,或协同、或拮抗。同时,接入菌剂也受到接种机自身和非生物因素的影响,十分复杂<sup>[22]</sup>。因此,接种物可能受到类似的影响,在根际土壤中未取得优势。

3) 相较于对照处理(样品 CK),接种复合菌剂土壤(样品 D)中不同门类细菌所占比例发生较大变

化。其中变形菌门中  $\gamma$ -变形菌纲和  $\beta$ -变形菌纲所占比例明显提高,而  $\delta$ -变形菌纲菌群的数量则相对降低。这与 Schwieger 的研究一致。Schwieger 等研究田间施用中华根瘤菌 L33 对苜蓿根际细菌多样性的影响发现, $\alpha$ -变形菌纲的数量提高而  $\gamma$ -变形菌纲种群的数量降低<sup>[23]</sup>。 $\beta$ -变形菌纲中出现亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira*)。硝化螺旋菌属(*Nitrospira*) 是一类革兰氏阴性细菌,作为硝化细菌,可将亚硝酸盐氧化成硝酸盐,在土壤氮素循环中扮演重要角色,对植物生长有重要作用。 $\gamma$ -变形菌纲有很强的适应性,在不同环境中均有广泛分布,存在很多能够抑制植物致病菌的有益菌。如  $\gamma$ -变形菌纲中假单胞菌属(*Pseudomonas*) 比例增加,出现溶杆菌属(*Lysobacter*)、氮单胞菌属(*Azomonas*)。溶杆菌属(*Lysobacter*),是一种重要的生防细菌。该菌对多种植物病原真菌、卵菌、革兰氏阳性细菌以及线虫均具有显著的拮抗作用。氮单胞菌属好氧,但能在低氧压下生长,可以非共生固氮。此外,相较于对照样品,在复合菌剂处理样品中拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、放线菌门(Actinobacteria)所占的比例显著下降。梭杆菌门(Fusobacteria)在复合菌剂处理样品中并未检出,而检出了绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻门(Cyanophyta)、产水菌门(Aquificae)和硝化螺旋菌门(Nitrospirae)。推测小麦根际土壤细菌群落结构的变化,可能与接入的复合菌剂有关,其与土著微生物相互作用,或拮抗、或促进,彼此影响。但其相互的作用机理还需更加深入的研究。

## 参 考 文 献

- [1] McMillan S. Promoting growth with PGPR [J]. Canadian Organic Grower, 2007, 4(3): 32-34
- [2] Akbari P, Ghalavand A, Sanavy A M M, et al. Comparison of different nutritional levels and the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the grain yield and quality of sunflower [J]. Australian Journal of Crop Science, 2011, 5(12): 1570-1576
- [3] Abbaspoor A, Zabihi H R, Movafegh S, et al. The efficiency of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of two varieties of wheat in salinity condition [J]. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 2009, 3(4): 824-828
- [4] Kavino M, Harish S, Kumar N, et al. Effect of chitinolytic

- PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa spp*) under field conditions[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 45(2):71-77
- Sadaghiani M H R, Barin M, Jalili F. The effect of PGPR inoculation on the growth of wheat[C]//International Meeting on Soil Fertility Land Management and Agroclimatology, Turkey. 2008:891-898
- [5] Kumar A, Maurya B R, Raghuvanshi R. Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L) [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2014, 3(4): 121-128
- [6] 夏铁骑, 朱学文, 吕爱国. 小麦根际细菌的互作效应及其对小麦生长的影响[J]. *河南农业科学*, 2009(5):53-55
- [7] Baris O, Sahin F, Turan M, et al. Use of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) seed inoculation as alternative fertilizer inputs in wheat and barley production[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2014, 45(18):2457-2467
- [8] Sang M K, Kim D K. Plant growth-promoting rhizobacteria suppressive to phytophthora blight affect microbial activities and communities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum* L) in the field[J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, 62: 88-97
- [9] 贺国强, 王磊, 邓志平, 等. 固氮·解磷菌剂对小麦种子萌发及田间小麦产量的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(7): 3875-3876
- [10] 贺国强, 邓志平, 刘展志, 等. 菌剂、沼液及其复配对玉米经济性状和产量的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2011, 16(4): 24-29
- [11] El-Katatny. Enzyme Production and Nitrogen Fixation by free, immobilized and coimmobilized inoculants of *Trichoderma harzianum* and *Azospirillum brasilense* and Their Possible Role in Growth Promotion of Tomato [J]. *Food Technol Biotechnol*, 2009, 48(2):161-174
- [12] Adesemoye A O, Torbert H A, Kloepper J W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers[J]. *Microb Ecol*, 2009, 58:921-929
- [13] Pikovskaya R I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species[J]. *Mikrobiologiya*, 1948, 17:362-370
- [14] Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat [J]. *Plant Soil*, 1999, 212:155-164
- [15] 康贻军, 沈敏, 王欢莉, 等. 两株 PGPR 对豇豆苗期生长及土著细菌群落的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(8):1537-1543
- [16] 刘方春, 邢尚军, 马海林, 等. 根际促生细菌 (PGPR) 对冬枣根际土壤微生物数量及细菌多样性影响[J]. *林业科学*, 2013, 49(8):75-80
- [17] Ramos B, Garcia J A L, Probanza A, et al. Alterations in the rhizobacterial community associated with European alder growth when inoculated with PGPR strain *Bacillus licheniformis* [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2003, 49(1):61-68
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004:150-163
- [19] Ravenschlag K, Sahm K. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65(9):3982-3989
- [20] Schloss P D, Handelsman J. Status of the microbial census[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68: 686-691
- [21] 张建萍, 董乃源, 余浩滨, 等. 应用 16S rDNA-RFLP 方法分析宁夏地区稻田土壤细菌的多样性[J]. *生物多样性*, 2008, 16: 586-592
- [22] 杜晓燕, 张富春, 张小勇. 影响微生物接种剂发挥作用的因素[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(5):815-819
- [23] Schwieger F, Tebbe C C. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*): Linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66:3556-3565

责任编辑: 苏燕