

紫云英根际微生物碳源利用多样性研究

倪才英^{1*}, 曾珩², 黄玉源³, 简敏菲¹, 朱笃¹

(1. 江西师范大学 鄱阳湖湿地与流域研究教育部重点实验室, 南昌 330022; 2. 江西省土地开发整理中心, 南昌 330002; 3. 仲恺农业工程学院, 广州 510225)

摘要: 为探究绿肥根际调控效果的原因, 采用碳素利用法-BIOLOG生态版, 分析紫云英根际微生物种群结构和功能多样性。结果表明: 紫云英根际土壤微生物总活性比非根际高, 其主要贡献者是以氨基酸、糖类、酯类和醇类四大碳源为生的微生物, 而与以磷酸盐、羧酸和胺类为碳源的微生物关系不大。进一步分析发现: 紫云英根际产生了以 α -酮丁酸、2-羟基安息香酸、4-羟基安息香酸、D-半乳糖醛酸、 α -环式糊精、D-木糖、 β -甲基-D-葡萄糖、D-甘露醇和L-精氨酸作为碳源的新微生物种群, 完全抑制了以 γ -羟基丁酸和苯乙基胺为碳源的微生物种群活性; 根分泌物抑制了以D-苹果酸、衣康酸和肝糖为碳源的微生物活性, 而对以D-化纤二糖、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、丙酮酸甲酯、吐温40、吐温80、L-苯基丙氨酸、L-天门酰胺和腐胺为碳源的微生物有促进作用, 但对以D-氨基葡萄糖、 α -D-乳糖和1-赤藻糖醇为碳源的微生物活性无显著影响; 另外, 即使是以同一类物质为碳源的微生物种群, 在紫云英根际的表现也不完全一样, 如以D-乳酸 γ -内酯和L-丝氨酸为碳源的可快速培养微生物受到抑制, 可慢速培养的微生物活性则有提高, 而以甘氨酸基-L-谷氨酸为碳源的微生物的表现正好与之相反。

关键词: 重金属污染; 土壤; BIOLOG; 种群结构; 多样性

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0614-07

Functional diversity of microbial community in bulk and rhizosphere soil of *Astragalus sinicus*

NI Cai-Ying^{1*}, ZENG Heng², HUANG Yu-Yuan³,
JIAN Min-Fei¹, ZHU Du¹

(1. Key Laboratory of Poyang Lake Wetland and Watershed Research, Ministry of Education, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; 2. Land Development and Consolidation Center of Jiangxi Province, Nanchang 330002, China; 3. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: This paper, by utilizing BIOLOG Eco-microplates, makes an analysis on the structural and functional diversity of microbial population in order to explore the rhizosphere effectiveness of green manure (*A. sinicus*) in enhancing phytoremediation. The finding is that the microbes of rhizosphere soil are generally more active than those of bulk soil. Such result has little to do with microbes whose carbon sources are phosphate, carboxylic and amines. Instead, the result attributes mainly to microbes whose carbon sources come from amino acids, glucide, FAT and alcohols. It's also found in the further research that, while the growth of microbes utilizing carbon sources (γ -Hydroxybutyric Acid and Phenylethyl-Amine included), is suppressed, new microbes emerge in rhizosphere soil, namely, α -Ketobutyric Acid, 2-Hydroxy Benzoic Acid, 4-Hydroxy Benzoic Acid, D-Glucosaminic Acid, α -Cyclodextrin, D-Xylose, β -Methyl-D-Glucoside, D-Mannitol and L-Arginine; that while Rhizosphere secretions of *A. sinicus* inhibit microbes utilizing D-Malic acid and Itaconic Acid and Glycogen as carbon sources, it promotes other microbes utilizing D-Cellobiose, N-Acetyl-D-Glucosamine, Pyruvic Acid

收稿日期: 2008-09-12 修回日期: 2009-02-23

基金项目: 国家“973”子项目(2005CCA05100); 江西省重点科技攻关项目([2006]188号)[Supported by the State Key Basic Research and Development Program(973)of China(2005CCA05100); Key Technologies Research and Development Program of Jiangxi Province(2006-188)]

作者简介: 倪才英(1968-), 女, 江西余江人, 博士, 教授, 主要从事环境污染毒理及其修复研究, (E-mail) ncy1919@yahoo.com.cn.

* 通讯作者 (Author for correspondence)

Methyl ester, Tween 40, Tween 80, L-Phenylalanine, L-Asparagine and Putrescine as carbon sources, and has no effect on microbes utilizing D-Glucosaminic acid, α -D-Lactose, and Γ -Erythritol as carbon sources. Another finding of the study is that even microbes derived from the same carbon source may perform differently at rhizosphere of *A. sinicus*. To illustrate, the growth of microbes feeding on D-Talactonic Acid, γ -Lactone and L-Serice is largely inhibited at first but be promoted in later; likewise, microbes that utilized Glycyl-L-Glutamic Acid as carbon sources perform just the opposite to general conception. A possible conclusion is that the population structure and liveness of microbes of the *A. sinicus* rhizosphere may contribute to the absorption of the heavy metals in the soil and the growth of accumulators.

Key words: heavy metal pollution; soil; BIOLOG; population structure; diversity

紫云英(*Astragalus sinicus*)具有固氮能力,是优质豆科绿肥,多用在双季稻田中,秋季套播于晚稻田,作早稻的基肥,用以培肥地力,补充氮源,维持土壤养分平衡,促进水稻增产增收,保障土壤的可持续利用。但如今农田污染愈来愈普遍,一些污染物对紫云英的生长发育产生不良影响乃至毒害作用(倪才英等,2003;刘永厚等,1993;陈秀华等,2005)。如何在污染的农田里种好紫云英,并利用它的固氮优势让它在土壤污染治理中发挥作用,作者曾进行过尝试性研究,即将紫云英作为土壤植物修复技术中的诱导调控措施。结果证明紫云英与(超)积累植物共种植,不但可提高积累植物的重金属提取量,增强修复效果,也可促进共种植植物的生长(Ni等,2004),不过其机理尚不清楚。作物根际土壤微生物是土壤生态系统中最活跃的组分;是土壤生态系统中物质循环和能量流动的主要参与者,担负着土壤中C、N、P和S循环的“推进器”和土壤养分植物有效性的“转换器”等多方面功能(Preston,2002);也是土壤重金属生物有效性的一个重要影响因素之一(申为宝等,2008)。那么重金属污染土壤种植紫云英后,其微生物群落是否变化,这些变化对土壤重金属植物提取的影响是什么?这些都是研究其机理必须弄清楚的问题。为此,本文将采用已被广泛运用于土壤环境微生物的代谢功能多样性研究(Zak等,1994;Pennanen,1998;杨元根等,2003;杨元根,2004;Liao等,2002)的BIOLOG生态测试盘,从土壤微生物利用单一碳源能力的角度阐明紫云英根际土壤微生物的种群结构与功能多样性,为进一步研究紫云英调控的活化机理奠定基础。

提取有效铜含量 $206.61 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的盆钵中,每钵 8 株,基肥为 KH_2PO_4 和 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$,用量 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ N and P; 生长期追肥 2 次,用量同基肥。整个生育期水分管理一致。试验设两组——种植紫云英与不种植,每组 4 次重复。收获时取两组中各重复的混合样进行土壤微生物群落结构分析。

1.2 仪器设备

BOILOG 仪, ECO 盘。

1.3 实验方法

称取 7 g 湿土(相当于 5 g 干重,含水率 35%左右)于盛有 45 mL 无菌蒸馏水的干净三角瓶中,得 10^{-1} 土壤悬液。振荡 30 mins, 混匀,静置片刻后取上清液 5 mL 于 45 mL 无菌水中,得 10^{-2} 稀释液,振荡 5 mins 后,重复以上步骤,稀释至 10^{-3} 。用 BIOLOG 专用枪取 $1250 \mu\text{L}$ 分别放于 ECO 盘的 96 个孔中,在 25°C 培养箱中培养。4 h 读本底值 1 次,以后每 12 h 读 1 次,读到不再变色为止。

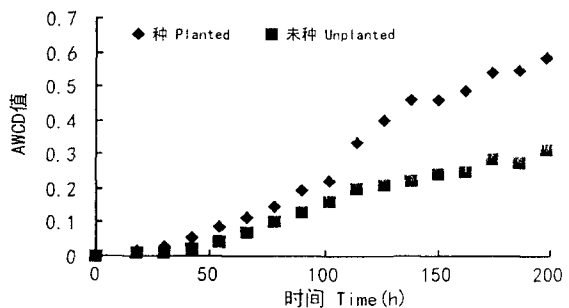


图 1 不同培养时间的土壤微生物活性
Fig. 1 Total activity of soil microorganism under different culture times

1 材料和方法

1.1 盆栽试验

紫云英种子于室内育苗至 2~3 片叶时移栽于装土(取自铜冶炼厂附近,为重金属污染土,DTPA

2.1 结果

2.1.1 根际微生物总活性 在 BIOLOG 生态版方法中土壤微生物的活性常用碳源平均颜色变化率(AWCD 值)来表示。由图 1 看出,种植紫云英土壤(根际)与不种植紫云英土壤(非根际)(下同)微生物

总活性均随着培养时间的延长而增强,根际始终比非根际活性高,但在前 100 h(约 4 d)内这种差异不明显,100 h 以后差异逐渐拉大,到近 200 h 时,根际土壤微生物活性是非根际土的 2 倍。说明紫云英根际有增强土壤微生物活性的作用,这与根际分泌物大都是小分子有机物,可作为碳源被微生物利用有关。这种总活性表示的是 31 种碳源的总利用情况,为进一步了解在 31 种碳源中哪一类物质对提高微生物活性贡献最大,可将这 31 种碳源按所含功能团的不同划分成羧酸、氨基酸、胺类、磷酸盐、糖类、酯

类、醇类 7 大类。

2.1.2 根际微生物对 7 大类碳源的利用 由图 2 可看出,根际与非根际土壤微生物对 7 大类碳源的利用均随培养时间的延长而增加,根据根际与非根际增加速率的不同,将 7 大类碳源分成 2 组。氨基酸、糖类、酯类、醇类为一组,这一组总趋势是根际微生物利用明显强于非根际微生物,并随培养时间的延长,增强幅度加大。不过这四类碳源的利用情况仍有不同,氨基酸的利用在前 4 d 内,根际低于非根际,4 d 以后,根际显著高于非根际,这说明在紫云

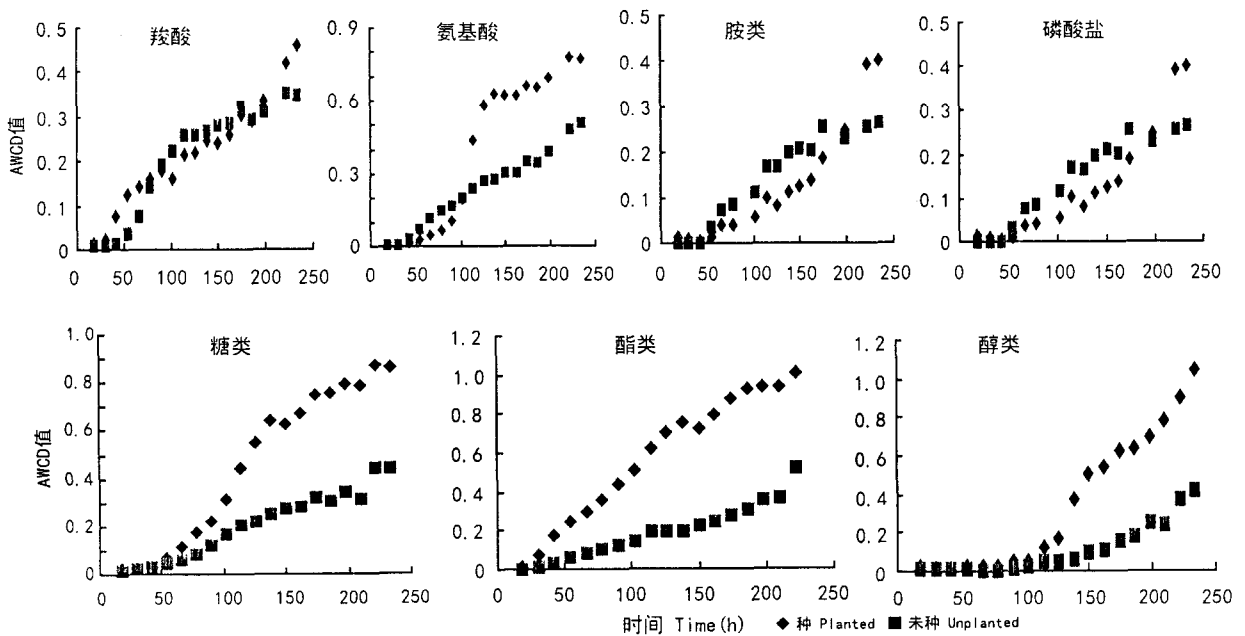


图 2 不同培养时间的土壤微生物对 7 大类碳源利用情况

Fig. 2 Utilization of 7 groups of substrates by microorganisms in heavy metals contaminated soil under different culture times

英根际环境中,能利用氨基酸的可快速培养微生物活性低于非根际,4~10 d 内可培养微生物活性高于非根际;糖类的利用在 2 d 以后开始,根际与非根际微生物对糖利用的差异随时间的增加逐步增大;微生物对酯类的利用比较早,1 d 以后根际与非根际的差异即显现出来,并随时间的增加差异愈来愈显著;而醇类的利用情况与前三者均有较大差异,在培养的前 4 d 内,无论是根际微生物还是非根际微生物对醇类物质都没有利用,第 5 天开始,根际微生物对醇的利用逐渐增强,而非根际增加较慢,两者差异迅速增大,6 d 以后根际与非根际差异基本稳定在同一水平。所以紫云英根际效应对增强微生物利用氨基酸、糖类、酯类、醇类的效果是明显的,而对另一组碳源(含磷酸盐、羧酸和胺类)利用的影响不大。

从图 2 中看到,根际微生物与非根际微生物对这三类碳源的利用基本无显著差异。这说明紫云英根际有使能利用氨基酸、糖类、酯类、醇类的微生物活性增强或数量增加的效果。因为各大类碳源中均含有 2 种以上的同类物质,哪种物质在该类碳源中的作用最大,哪种物质的作用不明显,甚至有反作用,需进一步对各种碳源进行分析。

2.1.3 根际微生物对各碳源的利用情况 由图 3 看出,紫云英根际使腐胺的利用在培养后期(7 d 后)增强,在培养前期影响不大,使苯乙基胺的利用降低至近于零。这说明可利用苯乙基胺的微生物(细菌)在紫云英根际受到抑制。与胺类总效应(根际无影响)相比,总效应掩盖了各种胺的真实利用情况。图 4 的结果表明,根际与非根际土壤微生物对两种磷

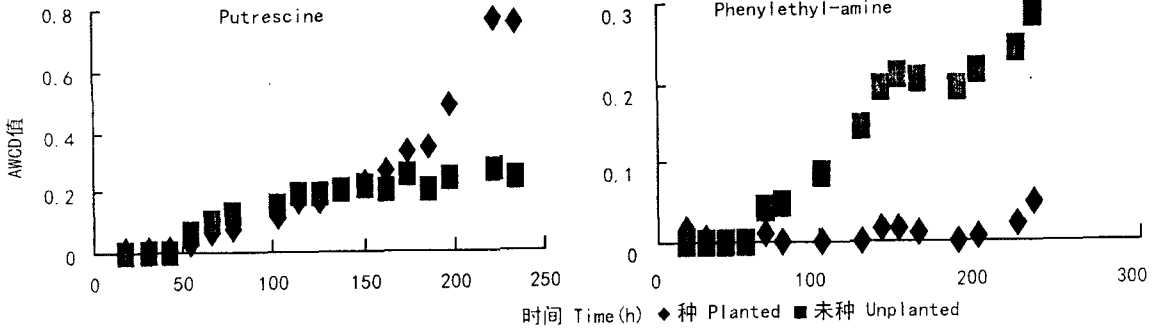


图 3 土壤微生物对 2 种胺类物质的利用

Fig. 3 Utilization of 2 groups of amines by microorganisms (with or without plant)

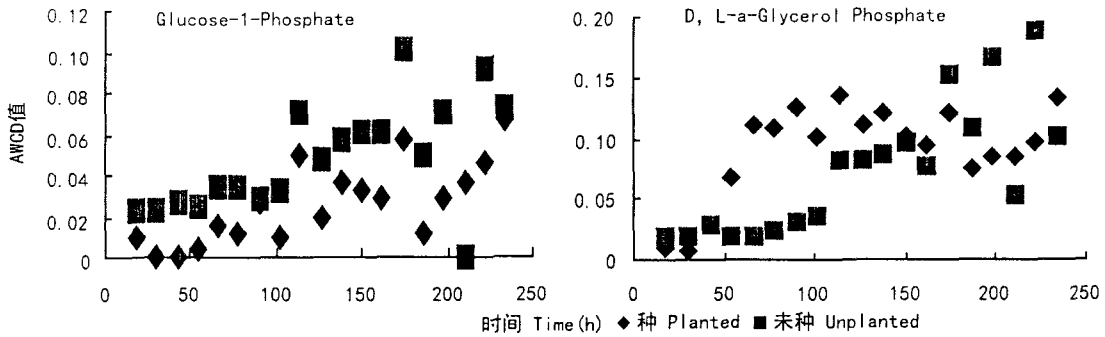


图 4 土壤微生物对 2 种磷酸盐的利用

Fig. 4 Utilization of 2 groups of phosphates by microorganisms (with or without plant)

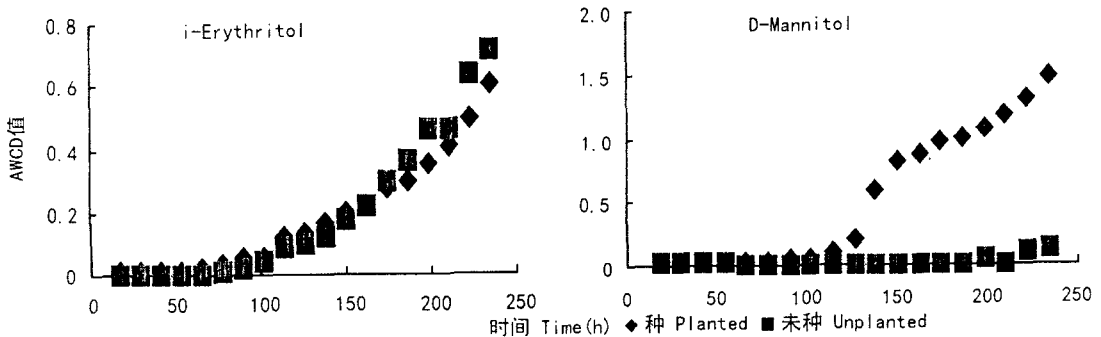


图 5 土壤微生物对 2 种醇类物质的利用

Fig. 5 Utilization of 2 groups of mellows by microorganisms (with or without plant)

酸盐的利用规律均不明显,差异亦不显著。这可能与磷酸盐碳源孔易长真菌影响读数有关。不过微生物对磷酸盐利用的总趋势是随培养时间的增加,利用程度提高。由图 5 看出,紫云英根际对 i-赤藻糖醇的利用无影响,而对 D-甘露醇的利用有增强作用。说明紫云英根际中能利用甘露醇的微生物增加了或活性提高了。醇类总效应中根际与非根际的差异主要由甘露醇的利用引起。由图 6 看出,氨基酸

类总效应图中(图 1)根际微生物利用能力后期增强主要是由 L-精氨酸、L-天门酰胺酸和 L-苯基丙氨酸引起,前期减弱由 L-丝氨酸造成,L-苏氨酸与甘氨酸酰基-L-谷氨酸的贡献不大。由图 7 看出,吐温 40 和吐温 80 对酯类总效应贡献最大,丙酮酸甲酯的作用次之,D-乳酸 γ -内酯的前期利用对总效应有负作用,后期利用有促进作用。由图 8 看出,除肝糖有负作用和 α -D-乳糖无影响外,其它(D-化纤二糖、 α -环

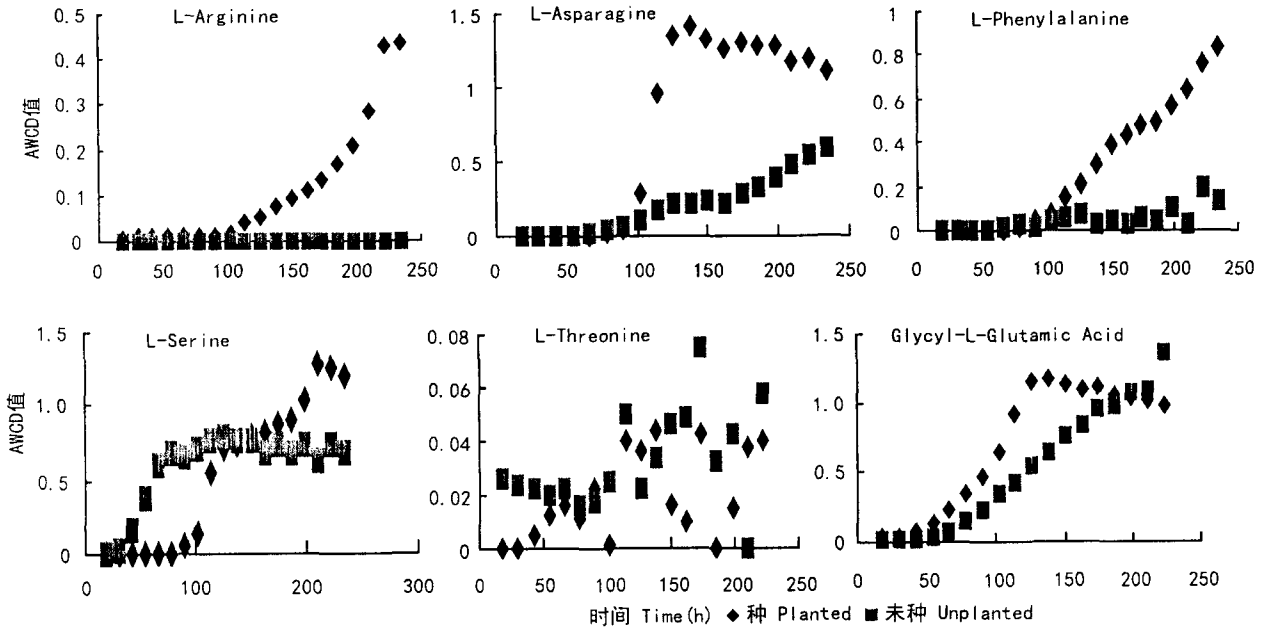


图 6 土壤微生物对 6 种氨基酸的利用
 Fig. 6 Utilization of 6 groups of amino acids by microorganisms (with or without plant)

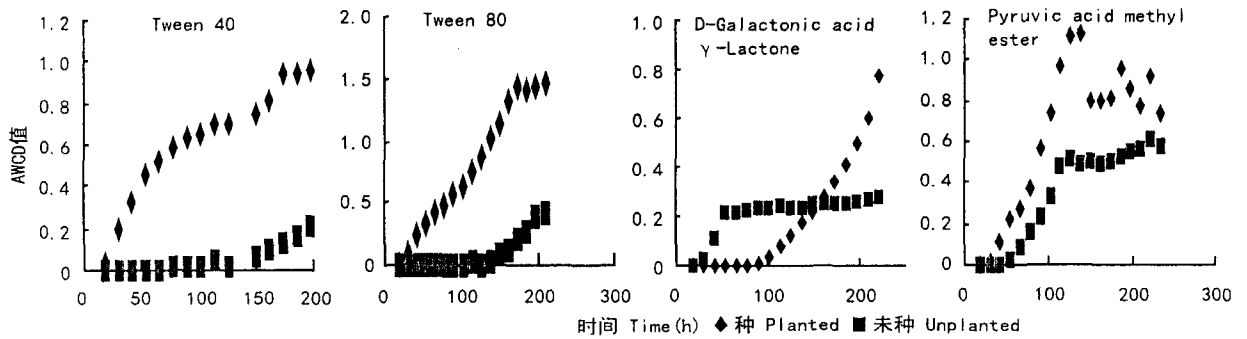


图 7 土壤微生物对 4 种酯类物质的利用
 Fig. 7 Utilization of 4 groups of esters by microorganisms (with or without plant)

式糊精、D-木糖、β-甲基-D-葡萄糖和 N-乙酰基-D-葡萄糖胺)对糖类总效应中的根际微生物活性增强均有不同程度的贡献。其中 α-环式糊精、D-木糖和 β-甲基-D-葡萄糖的贡献最大,整个培养期间它们在非根际中均无利用,而在根际土壤中利用率很高。这说明紫云英根际产生了新的微生物种类,而这些种类能利用 α-环式糊精、D-木糖和 β-甲基-D-葡萄糖作为碳源。图 9 显示,根际对 D-氨基葡萄糖酸的利用没有影响,对 D-苹果酸、衣康酸和 γ-羟基丁酸的利用有负影响,对 α-酮丁酸、2-羟基安息香酸、4-羟基安息香酸和 D-半乳糖醛酸的利用从无到有,有促进以该四类羧酸为碳源微生物生长的作用。对 γ-羟基丁酸的利用从有到无,说明根际分泌物中有毒害以 γ-

羟基丁酸为碳源的微生物生长的物质存在。

3 讨论

通过以上结果分析,发现紫云英根际分泌物对微生物活性的影响很大。根际环境提高了微生物种群的总体活性(图 1),这与金剑等(2007)的结果相吻合。进一步的分析表明,紫云英根际主要促进了糖类、醇类、酯类、氨基酸类微生物的生长,这与张海涵等(2007)的结果相近,但与林瑞余等(2007)的结果相异。糖类、醇类、酯类、氨基酸类等物质都是小分子可溶性有机物,在土壤溶液中可充当络合剂,与金属铜离子发生配位反应,提高溶液中铜离子浓度,

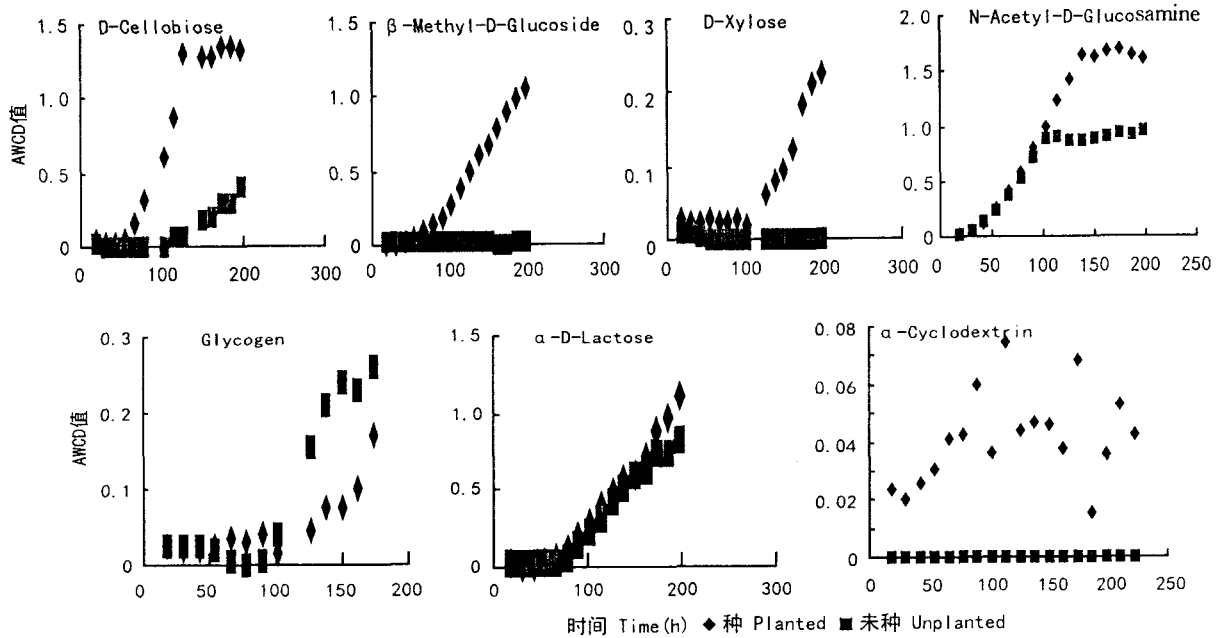


图 8 土壤微生物对 7 种糖类物质的利用
 Fig. 8 Utilization of 7 groups of carbohydrates by microorganisms (with or without plant)

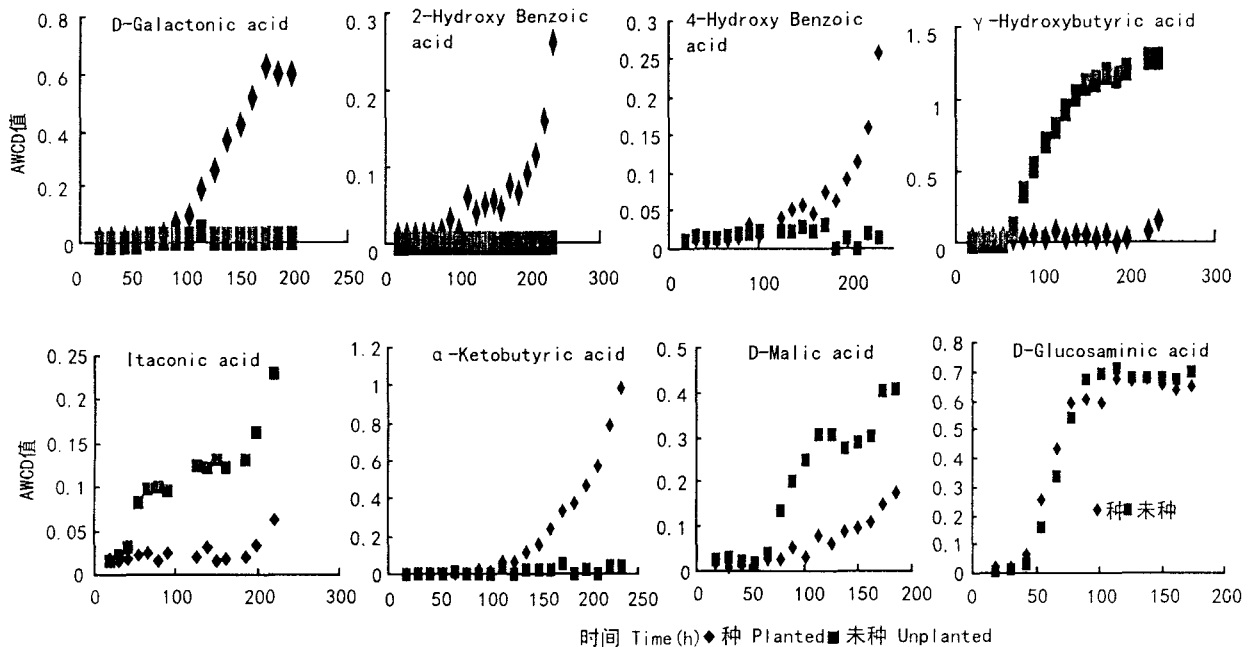


图 9 土壤微生物对 8 种羧酸的利用
 Fig. 9 Utilization of 8 groups of carboxylic acids by microorganisms (with or without plant)

增加土壤铜的生物有效性,这对提高(超)积累植物的提取效果是很有益的。

紫云英根际完全抑制了以 γ -羟基丁酸和苯乙基胺为碳源微生物的活性,说明紫云英根际分泌的某种物质对它们有毒性或 γ -羟基丁酸和苯乙基

胺产生了反应,使这类微生物无食而亡。另一方面紫云英根际有 9 种新微生物种群产生,说明紫云英根分泌物中有这些物质,起到了碳源的作用。在紫云英根际产生的 9 种新物质中, α -酮丁酸、2-羟基安息香酸、4-羟基安息香酸、D-半乳糖醛酸属于羧酸类

物质,不但可以提供配位体,还可以酸化土壤微环境,增加土壤重金属离子的溶出。 α -环式糊精、D-木糖、 β -甲基-D-葡萄糖、D-甘露醇和 L-精氨酸等物质也都是可溶性小分子物质,且每种物质至少可提供一个以上的配位基,这对促进土壤中重金属离子从固相进入液相,增强其生物活性都是非常有利的。

此外,我们发现即使利用同一种碳源的微生物种群,随着培养时间的不同,其表现也不相同,如以 D-乳酸-内酯, L-丝氨酸为碳源的微生物种群开始表现活性降低,其后表现活性增高,这说明根际分泌物在与微生物的交互作用过程中有可能发生变化,或微生物种类产生了变化,其中原因有待深入研究。

4 结论

(1)紫云英根际土壤微生物总活性比非根际高;以氨基酸、糖类、酯类和醇类四大碳源为生的微生物在根际的活性显著高于非根际,以磷酸盐、羧酸和胺类为碳源的微生物在根际环境的活性与非根际相当。(2)紫云英根际产生了以 α -酮丁酸、2-羟基安息香酸、4-羟基安息香酸、D-半乳糖醛酸、 α -环式糊精、D-木糖、 β -甲基-D-葡萄糖、D-甘露醇和 L-精氨酸作为碳源新的微生物种群;而完全抑制了以 γ -羟基丁酸和苯乙基胺为碳源的微生物种群的活性。(3)紫云英根际分泌物对以 D-苹果酸、衣康酸和肝糖为碳源的微生物有抑制作用;对 D-化纤二糖、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、丙酮酸甲酯、吐温 40、吐温 80、L-苯基丙氨酸、L-天门酰胺和腐胺为碳源的微生物有促进作用;而对以 D-氨基葡萄糖、 α -D-乳糖和 β -赤藻糖醇为碳源的微生物活性无显著影响。(4)紫云英根际对能利用 D-乳酸 γ -内酯和 L-丝氨酸为碳源的可快速培养微生物有抑制,可慢速培养的微生物有促进作用,而对以甘氨酸-L-谷氨酸为碳源的微生物的影响正好与之相反。(5)BIOLOG 法对以 L-苏氨酸、磷酸盐为碳源的微生物计数效果不好。

参考文献:

Chen XH(陈秀华), Zhao B(赵斌). 2005. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on uptake of N, P and K by *Astragalus sinicus* in copper polluted soil(接种 AM 真菌对 Cu 污染土壤中紫云英吸收 N P K 的影响)[J]. *J Agro-environ Sci*(农业环境科学学报), **24**(3): 438-441

Jin J(金剑), Wang GH(王光华), Chen XL(陈雪丽), et al. 2007. Analysis of microbial community functional diversity in

rhizosphere of different soybean genotypes AT R1 stage using Biolog-ECO method(Biolog-ECO 解析不同大豆基因型 R1 期根际微生物群落功能多样性特征)[J]. *Soybean Sci*(大豆科学), **26**(04): 565-570

Liao M, Xie XM, Subhani A, et al. 2002. Combined effect of nutrient and pestmanagements on substrateutilization pattern of soil microbial population in hybrid rice cropping system[J]. *Pedosphere*, **12**(3): 219-228

Lin RY(林瑞余), Rong H(戎红), Zhou JJ(周军建), et al. 2007. Impact of rice seedling allelopathy on rhizospheric microbial populations and their functional diversities(苗期化感水稻对根际土壤微生物群落及其功能多样性的影响)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), **27**(9): 3 644-3 654

Liu YH(刘永厚), Huang XH(黄细花), Zhao ZJ(赵振纪), et al. 1993. Effects of Cu to nitrogen fixation and absorb nutrition of *Astragalus sinicus*(铜对紫云英固氮作用及养分吸收的影响)[J]. *Soils Fertilizers*(土壤肥料), **5**: 23-27

Ni CY, Shi JY, Luo YM, et al. 2004. "Co-culture engineering" for enhanced phytoremediation of metal contaminated soils [J]. *Pedosphere*, **14**(4): 475-482

Ni CY(倪才英), Chen YX(陈英旭), Luo YM(骆永明). 2003. Change of superficial shape and cell microstructure of milk-vetch (*Astragalus*) root under simulated Cu pollution in a red soil(红壤模拟铜污染下紫云英根表形态及其组织和细胞结构变化)[J]. *Chin J Environ Sci*(环境科学), **24**(3): 116-121

Pennanen T. 1998. Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, **27**: 291-300

Preston MJ, Boddy I, Randerson PF. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles a-critique[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, **42**: 1-14

Shen WB(申为宝), Yang HQ(杨洪强). 2008. Effects of earthworm and micro-organism on soil nutrient and heavy metal(蚯蚓和微生物对土壤养分和重金属的影响)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), **41**(3): 760-765

Teng Y(滕应), Huang CY(黄昌勇), Luo YM(骆永明), et al. 2004. Microbial activities and functional diversity of community in soils polluted with Pb-Zn-Ag mine tailings(铅锌银尾矿区土壤微生物活性及其群落功能多样性研究)[J]. *Acta Pedol Sin*(土壤学报), **41**(1): 113-119

Yang YG(杨元根), Liu CQ(刘丛强), Wu PD(吴攀登), et al. 2003. Soil heavy metal accumulation induced by local smelting and its microbial environmental effects in Hezhang County, Guizhou Province(贵州赫章土法炼锌导致的土壤重金属污染特征及微生物生态效应)[J]. *Geochemica*(地球化学), **32**(2): 131-138

Zak JC, Willing MR, Moorhead DL, et al. 1994. Functional diversity of microbial communities; a quantitative approach[J]. *Soil Biol Biochem*, **26**: 1 101-1 108

Zhang HH(张海涵), Tang M(唐明), Chen H(陈辉), et al. 2007. Microbial communities in *Pinus tabulaeformis* mycorrhizosphere under different ecological conditions(不同生态条件下油松菌根根际土壤微生物群落)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), **27**(12): 5 463-5 470