厌氧土壤灭菌不同添加物对日光温室土壤性质及微生物群落的影响

张 宁，董先勤，周 婷，郭雨浓，马小龙，周建斌，陈竹君

（西北农林科技大学资源环境学院，农业部西北植物营养与农业环境重点实验室，陕西 杨凌 712100）

摘要：厌氧土壤灭菌（ASD）作为替代化学农药熏蒸灭菌技术在各地逐渐推广，但不同土壤类型、不同添加物厌氧土壤灭菌效果具有较大差异，田间条件下明确当地不同添加物厌氧灭菌对土壤性质及微生物群落效应，为日光温室绿色环保的土壤灭菌方法提供科学依据。结果表明：（1）除添加碳酸氢铵（AB）处理外，其他处理均可以显著降低 0—20 cm 土层电导率（*EC*），但仅灌水不添加物料（CK）处理 20—40 cm 土层 NO_3^-—N 和 *EC* 显著增加，且 AB 处理显著增加 0—20 cm 土层 NH_4^+—N 及 20—40 cm 土层 NO_3^-—N；添加鸡粪（CM）处理 0—20 cm 土层 NH_4^+—N 极显著增加，NO_3^-—N 极显著降低，*EC* 显著降低，土壤有机质、全氮和有效养分亦显著增加。（2）添加鸡粪（CM）显著降低细菌丰富度和均匀度，但土壤中植物促生菌（PGPR）芽孢杆菌属（*Bacillus*）及假单胞菌属（*Pseudomonas*）的相对丰度极显著增加。对真菌群落，不同处理真菌丰富度和均匀度与处理前差异均不显著，但添加碳酸氢铵（AB）、木醋液（PS）和鸡粪（CM）处理病原菌—镰刀菌属（*Fusarium*）的相对丰度均显著降低；同时，鸡粪（CM）处理有益属曲霉属（*Aspergillus*）丰度显著增加。（3）综合土壤理化性质、细菌和真菌群落变化，鸡粪作为有机碳源添加厌氧土壤灭菌效果较好，既可以厌氧灭菌同时也腐熟鸡粪，且各地原料来源方便，可同时实现化肥农药双减。

关键词：日光温室；厌氧土壤灭菌；添加物；土壤性质；微生物群落

中图分类号：S153 **文献标识码**：A **文章编号**：1009-2242(2019)05-0197-08

DOI：10.13870/j.cnki.stbcxb.2019.05.029

Effects of Different Amendments for Anaerobic Soil Disinfestation on Soil Properties and Microbial Community in Solar Greenhouse

ZHANG Ning, DONG Xianqin, ZHOU Ting, GUO Yunong,

MA Xiaolong, ZHOU Jianbin, CHEN Zhujun

(*Key Laboratory of Plant Nutrition and the Agri-environment in Northwest China, Ministry of Agriculture, College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi* 712100)

Abstract: Anaerobic soil disinfestation (ASD) as an alternative chemical fumigation of soil, has been gradually popularized in various places. However, effects of ASD is dependent on types of soil and amendments added. A field experiment was conducted to study the effects of ASD with different amendments on soil properties and microbial community, which would provide a scientific basis for environmentally friendly soil disinfestation method in solar greenhouse. The results showed that (1) the treatments except for ammonium bicarbonate treatment (AB) significantly decreased soil *EC* in 0—20 cm soil layer, but only irrigation without amendments (CK treatment) significantly increased soil *EC*, NO_3^-—N in 20—40 cm soil layer. AB treatment significantly increased NH_4^+—N in 0—20 cm soil layer and NO_3^-—N in 20—40 cm soil layer. And the addition of chicken manure (CM treatment) significantly increased the NH_4^+—N, pH, organic matter, total nitrogen and available nutrients, and significantly decreased the accumulation of NO_3^-—N and *EC* in 0—20 cm soil layer. (2) CM treatment significantly decreased soil bacterial richness and evenness. However, the relative abundance of plant growth-promoting bacteria (PGPR), *Bacillus* and *Pseudomonas* increased significantly. For the fungal community, the diversity and abundance of fungi in different treatments were not significantly different from those of before treating. However, the relative abundance of *pathogen-Fusarium* in

收稿日期：2019-04-03

资助项目：国家重点研发计划项目（2018YFD0201300）；杨凌示范区科技计划项目（2016NY-08）；陕西省农业专项（2016）

第一作者：张宁（1992—），女，硕士研究生，主要从事厌氧土壤灭菌改良日光温室退化土壤研究。E-mail：1732685849@qq.com

通信作者：陈竹君（1964—），女，副教授，博士生导师，主要从事土壤养分利用和土壤生态研究。E-mail：zjchen@nwsuaf.edu.cn

AB, PS and CM treatment decreased significantly. The relative abundance of deneficial *Aspergillus* of CM treatment significantly increased. (3) Considering soil physical, chemical and microbial properties, chicken manure as an organic carbon source, had more positively effects of disinfestation, not only increased its decomposition, but also easy to get. Meanwhile, the application of chicken manure would be helpful for implementing double reduction of fertilizer and pesticides.

Keywords: solar greenhouse; anaerobic soil disinfestation; amendments; soil properties; microbial community

日光温室集约化种植轮作时间有限,在单一或近缘作物连续种植下极易导致作物土传病害和根结线虫等连作障碍的发生,严重影响作物的产量和品质[1-2]。我国是全球设施栽培面积最大的国家,特别是以日光温室为代表的高投入高强度栽培方式发展迅速,至 2017 年我国日光温室面积已达 210 万 hm^2,成为我国北方地区蔬菜的重要生产方式。与此同时,我国是世界上作物土传病害发生率最高和最严重的国家[3-4]。化学土壤熏蒸剂进行土壤灭菌是最常用的控制土传病虫害的方法,也取得了良好的效果,但随着人们对其带来的环境和健康问题的关注,寻求相对绿色环保的土壤灭菌方法成为研究者关注的热点问题。

以物理方法与化学方法结合创造厌氧环境进行土壤灭菌的方法尤为人们关注,这种厌氧土壤灭菌方法(anaerobic soil disinfestation, ASD),也称生物土壤灭菌(biological soil disinfestation, BSD)或强还原土壤灭菌法(reductive soil disinfestation, RSD)[5-7],具有广谱性的特点,不仅可以杀死土传细菌和真菌类病原菌,对植物根结线虫也有致死效果,并且成本相对较低,在国内外一些地区的应用取得了良好的效果[1,5,8-9]。厌氧土壤灭菌方法采用的主要技术为向土壤添加易分解的有机物料,然后灌水覆盖塑料膜,密封 3~6 周,灭菌所需时间的长短取决于土壤温度和添加的碳源种类及施用量[10-11]。其主要原理是易分解的有机物质为微生物生长繁殖提供碳源并快速消耗土壤氧气,厌氧微生物则在低氧条件下继续分解有机物质,在短时间内创造强烈的土壤厌氧状况,达到杀灭土传病原菌的目的。其机理包括:土传病原菌多是好氧微生物,强厌氧环境可致死好氧病原菌;其他可能的机理还包括,在厌氧环境下有机物料分解可能产生有毒有害物质,如氨、有机酸、醇类及挥发性物质等可杀灭病原菌[11-12];此外,微生物群落结构发生了变化,厌氧环境下可能产生的一些厌氧菌如杆菌等可以对抗病原菌[2]。厌氧灭菌添加的有机物种类很多,包括作物秸秆、麦麸、绿肥、畜禽粪便等[1,5],原则上易分解的有机物料均可施用。我国日光温室栽培化肥农药过量使用问题突出,近年来,随着我国到 2020 年化肥和农药使用量零增长行动方案的实施,厌氧土壤灭菌作为替代化学农药熏蒸灭菌技术在各地基层普遍推广(基层推广人员和农户将其称为“高温闷棚”)[13-15],但能够完整深入说明添加物及其特定条件(土壤类型、不同添加物)下作用效果的田间试验数据相对较少,且机理尚不完全清楚[16],造成生产中对技术的采用程度差别巨大。如有采用仅灌水厌氧[17],有些则施加大量碳酸氢铵后灌水厌氧[18],或添加的有机物料成本高不易获取等。为此,本文在温室田间条件下,比较了较为普遍采用的仅灌水、添加碳酸氢铵及国外文献中多施加鸡粪等不同物料厌氧灭菌对黄土高原地区日光温室土壤性质及微生物群落的影响,以期明确不同添加物厌氧土壤灭菌的效应,为日光温室土壤灭菌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验于 2017 年 7 月 18 日至 8 月 10 日在杨凌示范区大寨镇设施栽培基地 381 号温室进行。土壤类型为塿土。供试温室土壤耕层理化性状为:有机质含量为 26.96 g/kg,全氮含量为 2.09 g/kg,铵态氮(NH_4^+—N)含量为 22.8 mg/kg,硝态氮(NO_3^-—N)含量为 438 mg/kg,有效磷含量为 313.6 mg/kg,速效钾含量为 1 091 mg/kg,pH 为 7.60,电导率 *EC* 为 972 μS/cm。试验温室种植 7 年,土传病虫害等连作问题较严重,主要有根腐、茎腐、茎基腐、枯萎等多种病害。

1.2 试验处理

试验设 4 个处理:(1)对照(CK),不添加物料仅灌水;(2)碳酸氢铵(AB),添加量为 250 kg/(667 m^2);(3)烟碱型木醋液(PS,陕西亿鑫生物能源科技开发有限公司提供),添加量为 120 kg/(667 m^2);(4)鸡粪(CM,来自杨凌区集约养殖场),添加量为 3 000 kg/(667 m^2);其中碳酸氢铵为当地农户的平均用量,鸡粪添加量为当地农户基肥施用有机肥的平均量,各物料养分含量见表 1。将物料均匀施入土壤表面后,立即翻耕土壤 20 cm,使物料与土壤混匀。并且在每个小区 15 cm 土层处安置 HOBO Data Loggers 温度记录仪,每隔 30 min 记录 1 次土壤温度,然后灌水使 40 cm 深土层土壤达到饱和含水量,之后在土壤表面覆盖塑料膜,最后密封大棚直至试验结束。不同处理小区田间

随机排列,每小区面积为 8.5 m^2,小区间开沟用塑料膜隔离,每个处理重复 3 次。

表 1　供试添加物养分含量

物料	有机碳/(g·kg^{-1})	全氮/(g·kg^{-1})	速效磷/(mg·kg^{-1})	速效钾/(mg·kg^{-1})
碳酸氢铵	0	177.00	0	0
木醋液	28.29	16.36	1.86	181
鸡粪	226.50	27.17	3735.00	28486

1.3　样品采集及分析

样品采集:厌氧灭菌处理前采集整个试验区 0—20,20—40 cm 土层多点混合样;处理结束后采集各小区 0—20,20—40 cm 土层多点混合样。

样品分析:测定了土壤电导率 *EC*、pH、有机质、全氮、NH_4^+—N、NO_3^-—N、有效磷以及速效钾,并对 0—20 cm 土壤鲜样细菌 16SrDNA(V3—V4 区)及真菌 ITSrDNA(2 区)进行高通量测序分析。其中,*EC* 采用 DDS—11A 型电导率仪测定(土水比为 1∶5);pH 采用酸度计测定(土水比为 1∶2.5);有机质采用重铬酸钾外加热法测定;全氮采用凯氏定氮法测定;鲜样用 1 mol/L 氯化钾溶液浸提—流动分析仪测定 NH_4^+—N 和 NO_3^-—N;有效磷采用 0.5 mol/L 碳酸氢钠溶液浸提—钼锑抗比色—紫外分光光度计测定;速效钾采用 1 mol/L 醋酸铵浸提—火焰光度计测定[19]。土壤微生物群落结构的分析测定:将样品送至深圳市恒创基因科技有限公司进行 Illumina MiSeq 测序。

1.4　数据处理

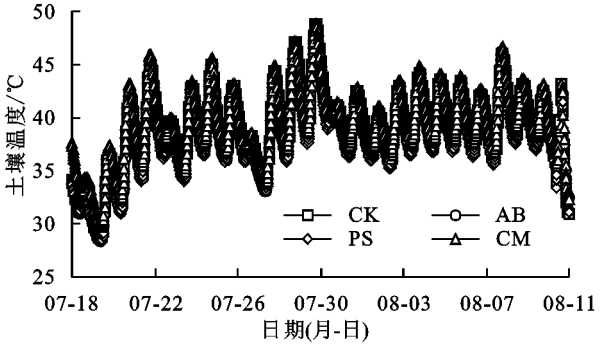
采用 Microsoft Excel 2007 软件进行数据分析,用 SAS 软件进行统计分析。

2　结果与分析

2.1　厌氧土壤灭菌不同添加物对土壤理化性质的影响

2.1.1　*厌氧土壤灭菌不同添加物对土壤温度的影响*　厌氧土壤灭菌期间土壤温度在 28.7～48.9 ℃(图 1),平均温度为 39.6 ℃。不同处理土壤平均温度 CM＞CK＞AB＞PS,不同处理间无显著差异,CK、AB、PS、CM 各处理土壤温度高于 45 ℃的累积时间分别为 22,18,15,27.5 h,CM 处理在一定程度升高了土壤温度并增加了土壤高温时长。

2.1.2　*不同处理对土壤 pH、EC 的影响*　不同处理 0—20 cm 土层 pH(表 2)显示,添加鸡粪 CM 处理的土壤 pH 显著高于其他处理和处理前(IT)土壤,其他处理与处理前(IT)土壤 pH 无显著差异,且施加碳酸氢铵(AB)处理的土壤 pH 显著低于其他处理;20—40 cm 土壤 pH 除 CK 处理较 IT 显著降低外,其余处理 pH 较 IT 相比差异不显著。土壤电导率(*EC*)变化表明,CK、PS、CM 处理 0—20 cm 土层 *EC* 较处理前均显著降低,AB 处理较处理前无差异,20—40 cm 土壤厌氧灭菌后各处理的 *EC* 均升高,其中 CK 处理升高显著,这与厌氧处理大量灌水引起表层盐分向下迁移有关。



注:土层深度为 0—15 cm。

图 1　厌氧土壤灭菌处理期间土壤温度动态变化

表 2　厌氧土壤灭菌不同添加物处理土壤 pH、*EC*

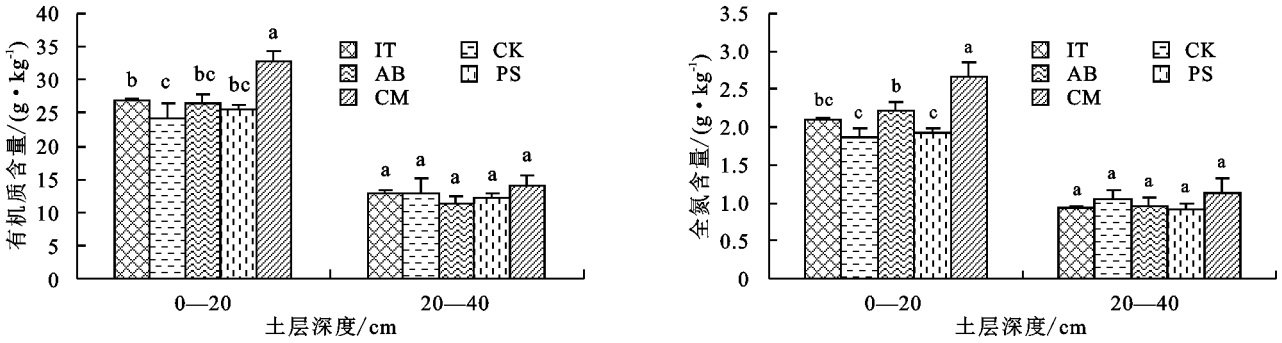
处理	pH		*EC*/(μS·cm^{-1})	
	0—20 cm	20—40 cm	0—20 cm	20—40 cm
处理前 IT	7.60±0.01bc	7.78±0.02a	972±65a	545±32b
不添加物料 CK	7.67±0.06b	7.45±0.14b	744±95b	726±84a
碳酸氢铵 AB	7.56±0.06c	7.70±0.03a	1140±170a	677±39ab
木醋液 PS	7.69±0.06b	7.74±0.03a	732±140b	631±20ab
鸡粪 CM	8.10±0.02a	7.82±0.04a	703±37b	598±145ab

注:表中数据为平均值±标准差;同列不同小写字母表示各处理间差异显著($p<0.05$)。下同。

2.1.3　*厌氧灭菌不同处理对土壤有机质、全氮含量的影响*　由图 2 可知,厌氧土壤灭菌后 0—20 cm 土壤有机质含量变化表明,较厌氧灭菌前(IT)相比,CK 处理显著降低,主要由于 CK 未添加物料形成的厌氧环境弱,部分好氧微生物依然存活,使土壤中原有的有机质矿化分解有机质含量降低;CM 处理显著升高,AB、PS 处理与 IT 无显著性差异。土壤全氮含量变化显示,CM 处理 0—20 cm 土壤全氮含量显著升高。处理前后 20—40 cm 土层及各处理间土壤有机质及全氮含量均无差异。

2.1.4　*厌氧灭菌不同处理对土壤 NH_4^+—N、NO_3^-—N、有效磷及速效钾含量的影响*　不同处理土壤矿质态氮(NH_4^+—N+NO_3^-—N)含量(表 3)表明,与 PS 处理前相比,0—20 cm 土层,AB、CM 处理土壤 NH_4^+—N 含量极显著增加,NO_3^-—N 含量则表现为 CM 处理极显著降低。在 20—40 cm 土层,CM 处理 NH_4^+—N 含量亦显著增加,CK、AB 处理土壤 NO_3^-—N 含量较 IT 显著增加,PS、CM 处理 NO_3^-—N 含量与 IT 差异不显著。

有效磷含量变化显示,仅 CM 处理 0—20 cm 土层有效磷含量显著增高,其余处理土壤有效磷含量均无显著差异。土壤速效钾变化为 0—20 cm 土层 CM 处理显著增加,CK、AB、PS 处理显著降低。20—40 cm 土层各处理有效磷、速效钾含量之间差异均不显著。



注:图柱上方不同小写字母表示相同土层不同处理间差异显著($p<0.05$)。

图 2 添加不同物料对土壤有机质、全氮的影响

表 3 添加不同物料处理对土壤 NH_4^+—N、NO_3^-—N、有效磷及速效钾含量的影响 单位:mg/kg

土层深度/cm	处理	NH_4^+—N	NO_3^-—N	有效磷	速效钾
0—20	处理前 IT	22.80±12.69C	437.96±7.84AB	313.57±5.60b	1091.00±8.89b
	不添加物料 CK	4.65±1.03C	312.16±81.02AB	281.47±36.26b	867.00±103.43c
	碳酸氢铵 AB	253.81±92.46B	453.13±126.54A	294.88±26.14b	872.00±92.92c
	木醋液 PS	4.13±0.62C	290.46±51.87B	283.01±12.93b	820.00±52.05c
	鸡粪 CM	684.49±109.88A	12.29±18.43C	389.84±32.76a	1422.00±52.05a
20—40	处理前 IT	3.69±0.33b	226.89±11.76b	73.76±3.15a	275.33±15.09a
	不添加物料 CK	3.33±0.18b	328.57±33.55a	80.51±23.79a	289.78±76.98a
	碳酸氢铵 AB	4.31±0.83b	315.22±35.92a	71.45±26.25a	260.22±56.00a
	木醋液 PS	3.35+0.35b	289.25±35.22b	59.69±20.62a	236.33±74.18a
	鸡粪 CM	24.92±8.50a	225.16±60.08b	112.17±46.95a	290.00±31.92a

注:同列不同大写字母表示相同土层不同处理间差异极显著($p<0.01$);同列不同小写字母表示相同土层不同处理间差异显著($p<0.05$)。下同。

2.2 厌氧土壤灭菌对土壤微生物群落多样性及结构的影响

2.2.1 *土壤微生物多样性变化* α—多样性指数 Shannon 指数、observed_species 指数以及 *PD* 指数代表含义有所不同,其中 Shannon 指数反映微生物群落的多样性及群落个体分配上的均匀性,observed_species 指数是样品中实际测得的 OTU 数量来衡量丰富度,*PD* 是基于系统发生树来计算的系统发育指数,这些指数越大,表明样品中物种的多样性及丰富度越高。从厌氧土壤灭菌各处理细菌、真菌群落的 α—多样性指数(表 4)可以看出,对于土壤细菌群落,添加鸡粪(CM)处理 Shannon、Observed_species 以及 *PD* 指数较处理前均极显著降低,其余处理间无显著差异。土壤真菌群落不同多样性指数结果存在差异,Shannon 指数显示各厌氧灭菌处理土壤真菌群落多样性较处理前土壤呈增加趋势,其中 CK 处理显著增加;observed_species 及 *PD* 指数则显示,CM 处理较 CK 处理土壤真菌群落多样性显著降低,其他处理间差异不显著。

2.2.2 *土壤细菌群落组成和相对丰度分析* 所有处理土壤细菌共归于 365 个属,其中处理前(IT)土壤中含 286 个属,CK 含 301 个属,AB 含 269 个属,PS 含 269 个属,CM 含 277 个属,处理前后共有属有 188 个。与 IT 相比,AB、PS、CM 处理中细菌微生物属水平种类降低,说明厌氧土壤灭菌添加物料降低了细菌微生物属水平上的多样性。

表 4 不同添加物处理土壤细菌、真菌群落的 α—多样性指数

微生物	处理	Shannon	observed_species	*PD*
细菌	处理前 IT	8.87±0.52A	1646±170A	90.76±8.40A
	不添加物料 CK	8.47±0.09A	1626±37A	89.36±0.79A
	碳酸氢铵 AB	7.80±0.12A	1437±84A	79.75±5.51A
	木醋液 PS	8.41±0.05A	1525±30A	84.96±3.12A
	鸡粪 CM	6.16±1.00B	954±172B	57.31±7.54B
真菌	处理前 IT	2.67±0.16b	153±11ab	46.87±3.34ab
	不添加物料 CK	3.99±0.06a	166±18a	51.08±7.45a
	碳酸氢铵 AB	3.49±0.72ab	149±8ab	43.11±4.13ab
	木醋液 PS	3.42±0.16ab	167±11a	50.20±4.51ab
	鸡粪 CM	3.45±0.81ab	136±10b	41.24±2.83b

注:同列不同大写字母表示不同处理间细菌 α—多样性指数差异极显著($p<0.01$);同列不同小写字母表示不同处理间真菌 α—多样性指数差异显著($p<0.05$)。

对厌氧土壤灭菌处理前后已分类的相对丰度前 10 的优势细菌属进行分析(表 5)。IT 中优势属为鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*,4.31%),亚优势属为 *Chryseolinea*(3.02%),其余主要为芽孢杆菌属(*Bacillus*,2.38%)、*Gaiella*(1.22%)、溶杆菌属(*Lysobacter*,1.14%)等。CK 处理中,优势属为 *Chryseolinea*(7.74%),亚优势属为鞘脂单胞菌属(4.51%),其余主要为芽孢杆菌属(4.05%)、特吕珀菌属(Truepera,2.24%)、*Steroidobacter*(1.13%)等。AB

处理中,优势属为 *Chryseolinea*(7.56%),亚优势属为芽孢杆菌属(6.41%),其余主要为特吕珀菌属细菌(4.73%)、鞘脂单胞菌属(3.19%)、膨胀芽孢杆菌属(*Tumebacillus*,2.71%)等。PS 处理中,优势属为 *Chryseolinea*(6.89%),亚优势属为鞘脂单胞菌属(5.99%),其余主要为芽孢杆菌属(3.66%)、特吕珀菌属(2.16%)等。CM 处理中,优势属为芽孢杆菌属(23.42%),亚优势属为假单胞菌属(*Pseudomonas*,19.92%),其余主要为 *Hydrogenispora*(6.23%)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*,4.47%)、*Imperialibacter*(3.21%)等。较 IT 相比,CM 处理土壤中植物促生菌(PGPR)—芽孢杆菌属及假单胞菌属[20]的相对丰度分别增加了 9.84,23.71 倍,且差异均达极显著水平($p<0.01$);在 AB、PS 处理中,芽孢杆菌属较 IT 分别增加了 2.69,1.54 倍,假单胞菌属较处理前相比均降低,但差异均不显著。

表 5　不同添加物处理中主要细菌属相对丰度的变化

单位:%

细菌属名	处理前 IT	不添加物料 CK	碳酸氢铵 AB	木醋液 PS	鸡粪 CM
Chryseolinea	3.02b	7.74a	7.56a	6.89a	0.54b
Bacillus	2.38b	4.05b	6.41b	3.66b	23.42a
Truepera	0.55b	2.24b	4.73a	2.16b	0.42b
Sphingomonas	4.31a	4.51a	3.19ab	5.99a	0.60b
Tumebacillus	1.13ab	0.95ab	2.71a	0.85b	0.12b
Steroidobacter	0.72b	1.13a	1.10a	1.11a	0.14c
Gaiella	1.22a	0.69abc	0.53bc	0.81ab	0.19c
Streptomyces	0.83a	0.70a	0.60a	0.86a	0.66a
Lysobacter	1.14a	0.75a	1.03a	0.95a	0.12a
Pseudomonas	0.84b	0.38b	0.28b	0.37b	19.92a
Aciditerrimonas	0.86a	0.31b	0.29b	0.36b	0.04b
Methylohalomonas	0.98a	0.62ab	0.80a	0.68ab	0.03b
Paenibacillus	0.07b	0.11b	0.19b	0.10b	4.47a
Imperialibacter	0.01b	0.01b	0.02b	0.01b	3.21a
Hydrogenispora	0.01b	0.01b	0.01b	0.02b	6.23a

注:同行中不同小写字母表示各处理间差异显著($p<0.05$)。下同。

2.2.3　土壤真菌群落组成和相对丰度分析　所有处理土壤真菌微生物共归于 152 个属,其中 IT 含 78 个属,CK 含 55 个属,AB 含 85 个属,PS 含 73 个属,CM 含 76 个属,处理前后共有属有 37 个属。与 IT 相比,CK、AB、PS、CM 真菌微生物属水平种类均降低。

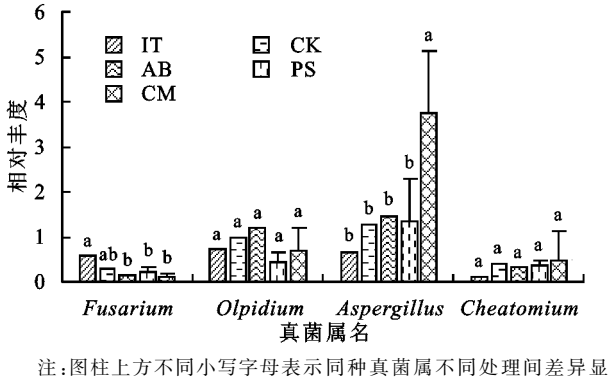
对厌氧土壤灭菌处理前后已分类的相对丰度前 10 的优势真菌属进行分析(表 6)。IT 中优势属为腐质霉属(*Humicola*,43.34%),亚优势属为棒囊壳属(*Corynascus*,32.54%),其次为 *Remersonia*(3.26%)、枝顶孢霉属(*Acremonium*,1.14%)、被孢霉属(*Mortierella*,0.94%)。在 CK、AB、PS、CM 处理中,优势菌属均为棒囊壳属,相对丰度分别为 36.13%,44.47%,43.65%,47.76%;亚优势菌属均为腐质霉属,相对丰度分别为 15.33%,11.58%,18.00%,9.21%;其余主要真菌属主要包括 *Remersonia*、被孢霉属、枝顶孢霉属、曲霉属(*Aspergillus*)、油壶菌属(*Olpidium*),还有少量相对丰度在 1%以下的真菌属以及尚未分类的真菌属。以上结果表明棒囊壳属和腐质霉属在厌氧灭菌处理前后的真菌群落结构中均占主导地位,并且与处理前相比,厌氧灭菌后各处理中腐质霉属相对丰度显著降低。

表 6　不同添加物处理中主要真菌属相对丰度的变化

单位:%

真菌属名	处理前 IT	不添加物料 CK	碳酸氢铵 AB	木醋液 PS	鸡粪 CM
Corynascus	32.54a	36.13a	44.47a	43.65a	47.76a
Humicola	43.34a	15.33b	11.58b	18.00ab	9.21b
Chrysosporium	0.09*a*	0.25*a*	0.11*a*	0.44*a*	1.12*a*
Remersonia	3.26*a*	7.44*a*	6.84*a*	7.84*a*	8.33*a*
Acremonium	1.14*a*	2.97*a*	1.64*a*	1.77*a*	1.82*a*
Fusarium	0.58*a*	0.27*ab*	0.15*b*	0.20*b*	0.10*b*
Microascus	0.09*b*	0.07*b*	0.16*b*	0.05*b*	1.68*a*
Chaetomium	0.12*a*	0.41*a*	0.31*a*	0.35*a*	0.47*a*
Aspergillus	0.65*b*	1.28*b*	1.45*b*	1.35*b*	3.75*a*
Emericella	0.27*a*	1.11*a*	0.79*a*	0.68*a*	0.48*a*
Madurella	0.57*a*	0.24*a*	0.26*a*	0.26*a*	0.17*a*
Myriococcum	0.81*a*	0.03*a*	0.27*a*	0.03*a*	0.38*a*
Guehomyces	0.16*b*	0.60*a*	0.35*ab*	0.25*b*	0.67*a*
Olpidium	0.73*a*	0.97*a*	1.18*a*	0.44*a*	0.67*a*
Mortierella	0.94*b*	4.57*ab*	8.35*a*	5.16*ab*	3.12*ab*

分析厌氧灭菌前后有益真菌属及病原真菌属相对丰度的变化。由图 3 可知,较 IT 相比,添加物料的 AB、PS、CM 处理中病原菌—镰刀菌属(*Fusarium*)[21]的相对丰度显著降低,分别降低了 74.14%,65.52%,82.76%;PS、CM 处理中病原菌属—油壶菌属(*Olpidium*)[22]的相对丰度较 IT 降低,但无显著差异。厌氧灭菌处理后有益属曲霉属(*Aspergillus*)[23-24]及毛壳菌属(*Chaetomium*)[25]的相对丰度均增加,其中 CM 处理中曲霉属相对丰度较 IT 显著升高,升高了 5.77 倍;其余处理中这 2 种有益属较 IT 均无显著差异。表明厌氧灭菌不仅能降低土壤中病原菌属的相对丰度,如镰刀菌属、油壶菌属等,也可以提高曲霉属、毛壳菌属等有益菌的相对丰度。



注:图柱上方不同小写字母表示同种真菌属不同处理间差异显著($p<0.05$)。

图 3　不同处理对主要病原真菌属及有益真菌属相对丰度的影响

3 讨 论

3.1 厌氧土壤灭菌对土壤性状的改良作用

厌氧土壤灭菌(ASD)是以创造厌氧环境杀灭有害病原菌,厌氧还原条件不仅改变了土壤微生物群落,土壤中碳、氮转化过程也会发生变化。从处理前后土壤有机质和全氮含量变化看,添加鸡粪均显著提高了 0—20 cm 土层土壤有机质和全氮含量,这与鸡粪本身碳氮含量及鸡粪添加量高有关。ASD 处理期间由于缺乏氧气及硝化细菌活性受限而限制了土壤的硝化作用,还可能在处理过程中厌氧条件下 NO_3^- 发生反硝化作用产生 N_2 和 N_2O,含 NO_3^- 高的日光温室土壤在 ASD 处理时大量灌水情况下还可能发生 NO_3^- 淋溶,因此,ASD 处理对盐分以 NO_3^- 为主的土壤具有减少盐渍化的作用。朱同彬等[26]在室内培养条件下研究了蔬菜地土壤添加不同量黑麦草处理对硝态氮及氮素气体释放的影响,结果表明,强烈还原环境使硝态氮迅速反硝化为 N_2 和 N_2O 逸出土壤,当有机物料添加量足够大时,积累的硝态氮可在 1～2 天内下降至仅可检测的水平。

本研究结果表明,AB 和 CM 处理 0—20 cm 土层 NH_4^+－N 含量显著增加,这是由于 AB 处理碳酸氢铵中给土壤加入 NH_4^+,CM 处理由于施加的有机质矿化中氨化作用在好气和嫌弃条件下均可进行,而硝化作用在厌氧条件下受到抑制,使添加鸡粪(CM)处理土壤累积了大量 NH_4^+－N;CK、PS、CM 处理 0—20 cm 土层 NO_3^-－N 含量均显著降低,特别是添加鸡粪处理降到很低(由处理前 437 mg/kg 降至 12 mg/kg),结合 20—40 cm 土层 NO_3^-－N 含量变化,可以看出,不同处理降低 0—20 cm 土层 NO_3^-－N 含量的机理不同,CK 处理降低 0—20 cm NO_3^-－N 主要由于 0—20 cm 土层 NO_3^-－N 淋溶到下层 20—40 cm,使下层 NO_3^-－N 含量显著增加;PS、CM 处理对 0—20 cm 土层 NO_3^-－N 的去除是可能由于硝态氮迅速反硝化为 N_2 和 N_2O 逸出土壤,因此,虽然同样灌水,但下层 20—40 cm 未增加;施加碳酸氢铵处理则由于无外源有机碳的施入,虽然也灌水使土壤氧气降低,但无易分解的有机物质为细菌繁殖提供碳源并快速消耗土壤氧气,在部分氧气存在下碳酸氢铵中 NH_4^+ 发生硝化转化为 NO_3^-－N,因此在淋溶作用下 20—40 cm 土壤 NO_3^-－N 增加,0—20 cm 土层由于硝化作用 NO_3^-－N 未减少,同时施加碳酸氢铵还显著增加 0—20 cm 土层 NH_4^+,NH_4^+ 随着厌氧结束转化为 NO_3^-－N,增加土壤盐分。同时,也应该看到,如果温室土壤累积大量 NO_3^-－N,仅灌水去除是暂时的,淋溶到下层的 NO_3^-－N 也可能再上升到耕层;添加鸡粪厌氧灭菌可去除土壤原有累积的 NO_3^-－N,但鸡粪中有机质矿化转化的大量 NH_4^+ 随着厌氧结束,硝化作用又会很快转化为 NO_3^-－N。因此,要达到改善土壤性状(去除 NO_3^-)和灭菌双重效果,添加易分解有机物的 C/N 不能太小,且加入量不能太大。

3.2 厌氧土壤灭菌对土壤微生物群落的影响

土传病害引起的连作障碍问题的实质是土壤微生物群落结构及活性失衡,导致病原菌繁殖带来的障碍问题。厌氧土壤灭菌过程中能形成厌氧及高温环境,在这种环境下微生物分解有机碳源产生有机酸、氨气、硫化氢等有毒有害物质以及锰和铁等低价金属离子活性增加等[11-12],并且土壤理化性质也发生变化,这不仅可以抑制或杀灭病原菌,而且很可能会导致土壤微生物群落结构发生变化。有研究[9]表明,ASD 处理对土壤微生物数量不一定发生显著的影响,但群落组成会出现很大的变化。大田和温室试验研究[5,7]均发现,ASD 处理前后细菌种群发生了明显变化,处理后较处理前厚壁菌门显著增加,其包括梭状芽胞杆菌和杆菌。ASD 处理后真菌群落也表现出一些种群增加,其中包括所有放线菌和木霉菌。这些增加的细菌和真菌被认为可以和土传病原菌产生拮抗而抑制病原菌。蔡祖聪等[16]在我国南方地区的研究表明,土壤淹水及添加有机物料对于土壤中可培养细菌数量无显著影响,但显著降低土壤中可培养放线菌和真菌的数量。Momma 等[27]以乙醇、麦麸作为碳源研究厌氧土壤灭菌的效果,结果表明,添加乙醇及麦麸均能降低番茄枯萎病致病菌－尖孢镰刀菌的数量。可见,由于厌氧灭菌实施的土壤及环境条件及添加物性质不同,灭菌的结果具有差异性。

本研究高通量测序结果显示,不同处理对土壤微生物群落结构及丰度的影响不尽相同,厌氧土壤灭菌过程中环境的变化可能是影响土壤微生物群落发生变化的重要因素。处理前较处理后相比,各分类水平主要微生物种类相似但相对丰度发生了变化。仅灌水及厌氧土壤灭菌添加物料均会降低土壤细菌、真菌群落的多样性,其中添加鸡粪(CM)对细菌群落结构的影响大,使细菌丰富度和均匀度均显著降低,且 CM 处理较处理前(IT)相比,土壤中植物促生菌(PGPR)芽孢杆菌属(*Bacillus*)及假单胞菌属(*Pseudomonas*)[20]的相对丰度极显著增加,说明 CM 处理对促进作物生长和减少作物病虫害[20]作用可能更明显。对于真菌群落,添加物料处理后真菌丰富度和均匀度与处理前差异均不显著,但添加物料的 AB、PS、CM 处理病原菌－镰刀菌属(*Fusarium*)[21]的相对丰度均显著降低,PS、CM 处理中病原菌属－油壶菌属

(*Olpidium*)[22]的相对丰度也有所降低;同时,厌氧灭菌处理后有益真菌属曲霉属(*Aspergillus*)丰度均增加,曲霉属所产生的一类非生命活动所必需的代谢产物能有效抑制早疫病[23]、根腐病[24]等 27 种病原菌的生长;此外,生防菌－毛壳菌属(*Chaetomium*)[25]相对丰度均增加,其中,CM 处理中曲霉属的丰度增加显著。厌氧土壤灭菌后土壤中有益微生物的增加也是厌氧灭菌抑制病原菌的机理之一,因为群落中有益微生物的增加可能会对一些病原菌产生拮抗作用,但仍需进一步的验证。有研究[21]表明,真菌群落中与土传病相关的主要有镰刀菌属、油壶菌属等,镰刀菌会造成植物的萎蔫死亡,是世界范围内的毁灭性植物病害,如引起植物的根腐、茎腐、茎基腐等多种病害,严重影响作物的产量和品质,油壶菌属可以传播植物病毒或者类似的病毒致病物[22]。Butler 等[8]以畜禽垃圾混合物(composted poultry litter,CPL)作为有机添加物 ASD 处理土壤并与溴甲烷熏蒸为对照,结果表明 ASD 处理和溴甲烷熏蒸番茄果实产量相近,无显著差异。Núñez-Zofío 等[28]以鲜羊粪＋干鸡粪、马粪＋干鸡粪及埃塞俄比亚芥颗粒＋白芥作为碳源,ASD 处理后辣椒疫病发病率分别降低了 65%,86%,93%。因此,综合细菌和真菌群落变化及前人研究结果,鸡粪作为有机碳源添加厌氧土壤灭菌效果较好,且原料来源方便充足,既可以腐熟鸡粪,又可以作为基肥替代化肥减少化肥的施用。

4　结 论

(1)仅灌水(CK)及添加木醋液(PS)、鸡粪(CM)处理土壤表层 *EC* 显著降低,且仅 CM 处理土壤 0—20 cm 土层 pH 显著升高,但 CK 处理 20—40 cm 土层 NO_3^-－N 和 *EC* 显著增加,添加碳酸氢铵(AB)处理 0—20 cm 土层 NH_4^+－N 及 20—40 cm 土层 NO_3^-－N 显著增加;CM 处理 0—20 cm 土层 NH_4^+－N 极显著增加,NO_3^-－N 极显著降低,*EC* 显著降低,土壤有机质、全氮和有效养分亦显著增加。

(2)厌氧土壤灭菌添加物不同对土壤微生物群落结构影响具有差异。对细菌群落,CM 处理显著降低细菌丰富度和均匀度,且土壤中植物促生菌(PGPR)芽孢杆菌属(*Bacillus*)及假单胞菌属(*Pseudomonas*)的相对丰度极显著增加,其他处理差异不显著。对真菌群落,不同处理真菌丰富度和均匀度与处理前差异均不显著,但 AB、PS 和 CM 处理病原菌－镰刀菌属(*Fusarium*)的相对丰度较处理前均显著降低,同时,厌氧灭菌处理后有益真菌属－曲霉属(*Aspergillus*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)相对丰度均增加,其中,CM 处理曲霉属的丰度增加显著。

(3)综合土壤理化性质、细菌和真菌群落变化,鸡粪作为有机碳源添加厌氧土壤灭菌效果较好,既可以厌氧灭菌同时也腐熟鸡粪,且各地原料来源方便,同时实现化肥农药双减。

参考文献:

[1] Gamliel A, Bruggen A H C V. Maintaining soil health for crop production in organic greenhouses[J]. Scientia Horticulturae, 2016, 208(4): 120-130.

[2] Bruggen A H C V, Sharma K, Kaku E, et al. Soil health indicators and Fusarium wilt suppression in organically and conventionally managed greenhouse soils [J]. Applied Soil Ecology, 2015, 86: 192-201.

[3] 蔡祖聪,黄新琦.土壤学不应忽视对作物土传病原微生物的研究[J].土壤学报,2016,53(2):305-310.

[4] 李天来,杨丽娟.作物连作障碍的克服——难解的问题[J].中国农业科学,2016,49(5):916-918.

[5] Rosskopf E N, Serrano-Pérez P, Hong J, et al. Anaerobic soil disinfestation and soil borne pest management [M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2015, 277-305.

[6] Huang X Q, Cui H L, Yang L, et al. The microbial changes during the biological control of cucumber damping-off disease using biocontrol agents and reductive soil disinfestation [J]. Biocontrol, 2017, 62: 97-109.

[7] Mowlick S, Yasukawa H, Inoue T, et al. Suppression of spinach wilt disease by biological soil disinfestation incorporated with Brassica juncea plants in association with changes in soil bacterial communities [J]. Crop Protection, 2013, 54: 185-193.

[8] Butler D M, Kokalis-Burelle N, Albano J P, et al. Anaerobic soil disinfestation (ASD) combined with soil solarization as a methyl bromide alternative: Vegetable crop performance and soil nutrient dynamics [J]. Plant and Soil, 2014, 378: 365-381.

[9] 黄新琦,温腾,孟磊,等.土壤快速强烈还原对于尖孢镰刀菌的抑制作用[J].生态学报,2014,34(16):4526-4534.

[10] Liu L L, Kong J J, Cui H L, et al. Relationships of decomposability and C/N ratio in different types of organic matter with suppression of Fusarium oxysporum and microbial communities during reductive soil disinfestation [J]. Biological Control, 2016, 101: 103-113.

[11] Runia W T, Thoden T C, Molendijk L P G, et al. Unravelling the mechanism of pathogen inactivation during anaerobic soil disinfestation [J]. Acta Horticulturae, 2014, 1044: 177-193.

[12] Huang X Q, Wen T, Zhang J B, et al. Toxic organic acids produced in biological soil disinfestation mainly caused the suppression of Fusarium oxysporum f. sp. Cubense [J]. Biological Control, 2015, 60(1): 113-124.

[13] 董海龙,路平,张作刚,等.秸秆＋石灰氮＋X－20 菌肥＋

高温闷棚处理对根结线虫种群数量变化的影响[J].中国农业大学学报,2016,21(4):52-58.

[14] 陈传翔,杨巍,常义军,等.高温闷棚下不同处理对土壤理化性状的影响[J].长江蔬菜,2015(10):47-52.

[15] 顾志光,马艳,安霞,等.麦秸淹水处理对连作土壤性状和辣椒疫病田间防控效果的影响[J].农业环境科学学报,2014,33(9):1762-1769.

[16] 蔡祖聪,张金波,黄新琦,等.强还原土壤灭菌防控作物土传病的应用研究[J].土壤学报,2015,52(3):469-476.

[17] 李佳川,杨瑞平,张显.灌水高温闷棚处理对温室连作土壤理化性状变化的研究[J].北方园艺,2016(13):178-181.

[18] 徐明喜,马明,黄忠阳,等.高温闷棚下不同处理防控甜瓜连作障碍效果研究[J].长江蔬菜,2018(18):27-30.

[19] 鲍士旦.土壤农化分析[M].3 版.北京:中国农业出版社,2000.

[20] Valérie G, Antoun H, Tweddell R J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with Pseudomonas putida or Trichoderma atroviride: Possible role of indole acetic acid (IAA) [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(8):1968-1977.

[21] 张荣,姜子德,李敏慧,等.尖孢镰孢菌致病机理及相关致病基因研究进展[J].中国农学通报,2011,27(15):254-258.

[22] 蒋军喜,蔡祝南.植物病毒的真菌传播及传毒介体油壶菌研究进展[J].江西农业大学学报,2003,25(3):362-365.

[23] Li X J, Zhang Q, Zhang A L, et al. Metabolites from, *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with melia azedarach, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012,60(13):3424-3431.

[24] 申光辉,薛泉宏,张晶,等.草莓根腐病拮抗真菌筛选鉴定及其防病促生作用[J].中国农业科学,2012,45(22):4612-4626.

[25] Vannacci G, Harman G E. Biocontrol of seed-borne *Alternariaraphaniand A. brassicicola* [J]. Canadian Journal of Microbiology,1987,33:850-856.

[26] 朱同彬,张金波,蔡祖聪.淹水条件下添加有机物料对蔬菜地土壤硝态氮及氮素气体排放的影响[J].应用生态学报,2012,23(1):109-114.

[27] Momma N, Momma M, Kobara Y. Biological soil disinfestation using ethanol: Effect on Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici and soil microorganisms [J]. Journal of General Plant Pathology,2010,76(5):336-344.

[28] Núñez-Zofío M, Larregla, S, Garbisu C. Application of organic amendments followed by soil plastic mulching reduces the incidence of Phytophthora capsici in pepper crops under temperate climate [J]. Crop Protection,2011,30(12):1563-1572.

(上接第 196 页)

[26] 任璐璐,张炳学,韩凤朋,等.黄土高原不同年限刺槐土壤化学计量特征分析[J].水土保持学报,2017,31(2):339-344.

[27] 曹娟,闫文德,项文化,等.湖南会同 3 个林龄杉木人工林土壤碳、氮、磷化学计量特征[J].林业科学,2015,51(7):1-8.

[28] 马任甜.黄土高原刺槐、柠条人工林土壤—植物生态化学计量特征研究[D].陕西 杨凌:西北农林科技大学,2017.

[29] 周玮,周运超.北盘江喀斯特峡谷不同植被类型酶活性[J].林业科学,2010,46(1):136-141.

[30] 吴秀芝,阎欣,王波,等.荒漠草地沙漠化对土壤养分和胞外酶活性的影响[J].生态环境学报,2018,27(6):1082-1088.

[31] 宫欢欢,尤一泓,林勇明,等.不同林龄木麻黄纯林土壤酶活性与土壤养分研究[J].江西农业大学学报,2017,39(3):516-524.

[32] 王伟东,王渭玲,徐福利,等.秦岭西部中幼龄华北落叶松林地土壤养分与酶活性特征研究[J].植物营养与肥料学报,2015,21(4):1032-1039.

[33] Poeplau C, Bolinder M A, Kirchmann H, et al. Phosphorus fertilisation under nitrogen limitation can deplete soil carbon, stocks: Evidence from Swedish meta-replicated long-term field experiments [J]. Biogeosciences,2016,13(4):1119-1127.

[34] 万忠梅,宋长春.土壤酶活性对生态环境的响应研究进展[J].土壤通报,2009,40(4):951-956.

[35] Kivlin S N, Treseder K K. Soil extracellular enzyme activities correspond with abiotic factors more than fungal community composition [J]. Biogeochemistry, 2014,117(1):23-37.

[36] Weintraub S R, Wieder W R, Cleveland C C, et al. Organic matter inputs shift soil enzyme activity and allocation patterns in a wettropical forest [J]. Biogeochemistry,2013,114(1/3):313-326.

[37] Hao Y, Chang Q, Li L, et al. Impacts of landform, land use and soil type on soil chemical properties and enzymatic activities in a Loessial Gully watershed [J]. Soil Research,2014,52(5):453.

[38] 闫钟清,齐玉春,李素俭,等.降水和氮沉降增加对草地土壤微生物与酶活性的影响研究进展[J].微生物学通报,2017,44(6):1481-1490.