

李永双,范周周,国辉,等.菌剂添加对不同树种根际土壤微生物及碳酸钙溶蚀的影响[J].中国岩溶,2020,39(6):854-862.  
DOI:10.11932/karst20200606

# 菌剂添加对不同树种根际土壤微生物 及碳酸钙溶蚀的影响

李永双<sup>1</sup>,范周周<sup>1</sup>,国辉<sup>1</sup>,周金星<sup>2</sup>,彭霞薇<sup>1</sup>

(1.北京林业大学生物科学与技术学院,北京100083;2.北京林业大学水土保持学院,北京100083)

**摘要:**本实验通过对云南省建水地区植被根际土壤中高产碳酸酐酶(CA)的微生物进行分离筛选和溶蚀效应的测定,将溶蚀效果较好的菌株制成菌悬液进行盆栽实验,探究该菌株对不同树种根际土壤微生物代谢活性和碳酸钙类岩石溶蚀效应的影响。结果表明:从根际土壤中筛选到一株能够高产CA,且具有较强溶蚀效果的沙雷氏菌,施加该菌剂的处理组显著增加了土壤微生物数量,提高微生物的代谢活性和多样性,并加速碳酸钙类岩石的溶蚀。本研究旨在为今后岩溶区生态恢复过程中植物树种的选择与微生物菌剂的联合应用提供一种技术手段,为岩溶地区生态系统的治理提供一定的理论支持。

**关键词:**根际土壤;菌剂添加;代谢活性;碳源利用;碳酸钙溶蚀;沙雷氏菌

**中图分类号:**X172 **文献标识码:**A

**文章编号:**1001-4810(2020)06-0854-09 **开放科学(资源服务)标识码(OSID):**



## 0 引言

岩溶地区在土壤形成过程中受很多因素的干扰,主要的影响因素包含非生物因素(湿度、pH等)及生物因素(植被、微生物等)<sup>[1]</sup>。岩石风化是一种自然现象,可以加速岩溶地区的土壤形成,但在人为因素的干扰下,岩溶地区面临着水源漏失、耕地瘠少、土地生产效率低,旱涝灾害频发等生态环境问题<sup>[2-3]</sup>。为改善生态环境,目前主要采取人工恢复与自然恢复相结合的方式防止水土流失,但忽略了成土方式及成土速率等方面对生态恢复的影响。微生物在岩石风化的过程中起着至关重要的作用,影响岩石风化过程。微生物分泌的碳酸酐酶(CA)对维持生物体的生理过程是必不可少的,如酸碱平衡、呼吸作用和

钙化作用等<sup>[4-5]</sup>,同时CA能够加快碳酸钙类岩石的溶蚀<sup>[6]</sup>,促进土壤的形成。

相关研究发现:细菌、真菌、放线菌均对岩石有较强的溶蚀作用,但是,不同类群的微生物对石灰岩的溶蚀效果不同<sup>[7]</sup>;在混菌模式下,可培养微生物可以加速碳酸钙类岩石的溶蚀效应<sup>[8]</sup>。但目前对于产CA菌株的研究多数仅局限于室内实验,有关菌株应用于盆栽实验的报道很少。因此,本文从促进碳酸钙类岩石成土、提高微生物活性的角度出发,以云南省建水县不同林地土壤为研究对象,通过对土壤中可培养微生物的分离、纯化获得高产CA的菌株,利用盆栽模拟实验探究菌株对不同树种土壤微生物数量、微生物代谢活性及代谢多样性、以及溶蚀效应的影响。

基金项目:国家自然科学基金项目(31971729);国家重点研发计划项目(2017YFC0505500,2017YFC0505504)

第一作者简介:李永双(1993-),硕士研究生,主要研究方向:资源与环境微生物。E-mail:15754366120@163.com。

通信作者:彭霞薇(1974-),博士,副教授,主要研究方向:资源与环境微生物。E-mail:xiaweipeng@163.com。

收稿日期:2019-06-29

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 供试土壤

供试土壤取自云南省建水县岩溶地区桉树、云南松和栎树三种林地。选取距离森林边缘1 000 m处,受外界干扰较小,且树木长势一致的区域设置样地,按“S”型取样,取样前每个取样点先剔除表面枯枝落叶和石头等杂物,取0~20 cm土层,每个样点取土1~2 kg,多点取样后混合为一个土样,用于盆栽试验。根际土壤的取样方法如下:在样地内,分别选择5株胸径大致相同、坡向一致的树木作为采样点,取样时去除表层土壤,挖取距离植物根系1 cm以内的土壤,充分混匀土壤样品,过筛装入灭菌的自封袋内,放置于便携式移动小冰箱中带回实验室,于4 ℃冰箱保存,用于产CA菌株的分离、筛选。

#### 1.1.2 制备培养基

细菌选用LB培养基;放线菌选用高氏一号培养基;真菌选用PDA培养基。

#### 1.1.3 植被品种

大叶桉树(*Eucalyptus robusta* Smith)、云南松(*Pinus yunnanensis*)、栎树(*Quercus* Linn)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 菌株的筛选

对取自云南省建水县岩溶地区桉树、云南松和栎树的根际土壤,采用10倍梯度递减稀释的方法,将土壤悬浮液稀释至 $10^{-5}$ ,然后将不同浓度的土壤悬浮液分别涂布于LB、高氏一号、PDA三种不同培养基上进行培养<sup>[9]</sup>。分离后的菌株采用96孔板显色方法进行产CA菌株的初筛<sup>[10]</sup>,即在每个小孔中加入100  $\mu$ L 1%溴麝香草酚蓝试剂和pH为8.2的巴比妥缓冲液的混合液、50  $\mu$ L菌液和150  $\mu$ L冰冷的CO<sub>2</sub>饱和水,记录每个菌株加入CO<sub>2</sub>饱和水后从蓝色变成黄色的时间。变色时间越短,表明CA活性越强。选取CA活性较高的菌株,进行复筛(即将筛选出来的菌株制成菌悬液施加到含有溶蚀片的体系中)测定其溶蚀效应。选定溶蚀效应较高的菌株进行盆栽实验。

#### 1.2.2 菌株的鉴定

将筛选出溶蚀较高的菌株进行16S rRNA鉴定。利用试剂盒提取菌株基因组DNA,通过PCR技术扩增代表菌株的16S rRNA序列<sup>[11]</sup>,然后将获得的序列在NCBI数据库中进行BLAST同源性比对,以获取同源性较高的相邻属的16S rRNA基因序列,运用Alignment Explorer程序进行多序列同源性分析,最后通过Phylogeny构建系统发育树。

#### 1.2.3 盆栽实验的设置

将每种供试土壤置于塑料盆中,对应种植健康的大叶桉树、云南松和栎树的幼苗。塑料盆的口径为29.6 cm,每个盆装5 kg供试土壤。植株生长期按照常规栽培进行定期浇水管理,实验在北京林业大学苗圃日光温室中进行。每种植被共设置3种处理:处理1,施入菌悬液(浓度为 $1 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>)200 mL;处理2,施入灭活菌悬液200 mL;处理3,施入培养基200 mL,每种处理三次重复(每种重复8株幼苗),共9种处理。幼苗移栽成功后,将直径约为4 cm、厚度为4 mm的溶蚀片称重并灭菌后分别埋入3种植被根际土壤附近(距离土壤表面3 cm处),然后分别进行不同的添加处理,每隔1个月处理1次,共添加3次,溶蚀片于4月20日埋入土壤,实验历时4个月。

#### 1.2.4 指标测定

土壤理化性质的测定参照《土壤农化分析》<sup>[12]</sup>中的测试方法:含水率(Water content, WC)采用烘干法,pH值采用酸碱计法,电导率(Electrical conductance, EC)采用电导率仪法,有机质(Organic matter, OM)采用重铬酸钾热稀释法,全氮(Total nitrogen, TN)采用凯氏定氮法,全磷(Total phosphorus, TP)采用氢氧化钠熔融-钼锑抗比色法,速效钾(Available potassium, AK)采用醋酸铵法。通过平板计数法对土壤微生物数量(细菌数量:Bacterial number, BN;放线菌数量:Actinomycetal number, AN;真菌数量:Fungi number, FN;微生物总数:Microbial count, MC)进行统计;微生物多样性采用Biolog平板法进行测定;溶蚀率采用称重法进行计算<sup>[13]</sup>:溶蚀率=试片溶蚀量/试片原重 $\times 100\%$ 。

### 1.3 数据处理

实验数据采用Excel 2009进行统计,SPSS 21.0进行差异性分析,Origin Pro 8.5进行作图设计,MEGA 7进行系统发育树的构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选

本实验通过培养基的分离筛选,共筛得 103 株菌,为探究菌株产 CA 的活性,通过显色法进行初筛,筛选出 53 株菌株具有产 CA 能力。为进一步明确菌株的溶蚀效果,选定 4 株产 CA 活性较强的菌株(KS256, KS281, KS288, KS289),通过测定溶蚀片的溶蚀率来进一步明确菌株对碳酸钙类岩石的溶蚀效应。实验结果表明:所选的 4 株菌株对碳酸钙类岩石的溶蚀能力存在显著性差异(图 1),其中菌株 KS289 的溶蚀效率最高,为 0.574%;四株混合菌液对碳酸钙类岩石的溶蚀效应为 0.500%,两个处理组间的差异不显著。依据简单、高效、便捷的原则,选定菌株 KS289 为代表菌株,作为下一步实验的研究对象。

### 2.2 菌株 KS289 的鉴定

通过对该菌株 16S rRNA 序列全长的测序,与 NCBI 数据库中已有菌株进行 Blast 同源性比对后,构建系统发育树,得知菌株 KS289 与粘质沙雷氏菌(*Ser-*

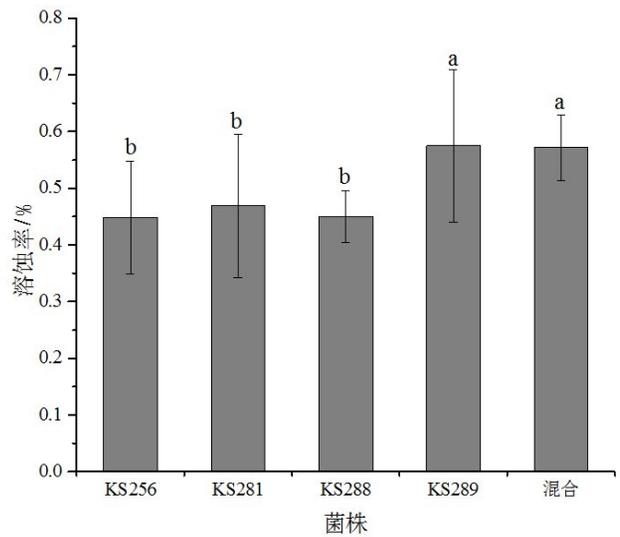


图 1 菌株溶蚀效应的测定

Fig. 1 Measurement of dissolution effect of bacterial strain

*ratia marcescens*) 有 99% 及以上的同源性,并在系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近(图 2)。因此初步鉴定 KS289 为沙雷氏菌属细菌。Vicente 等<sup>[14]</sup>指出粘质沙雷氏菌能够抵抗不良环境,稳定定殖于植物根部环境,对外来生物和有机化合物有较好的耐受性,并且能够以苯乙酸为碳源。

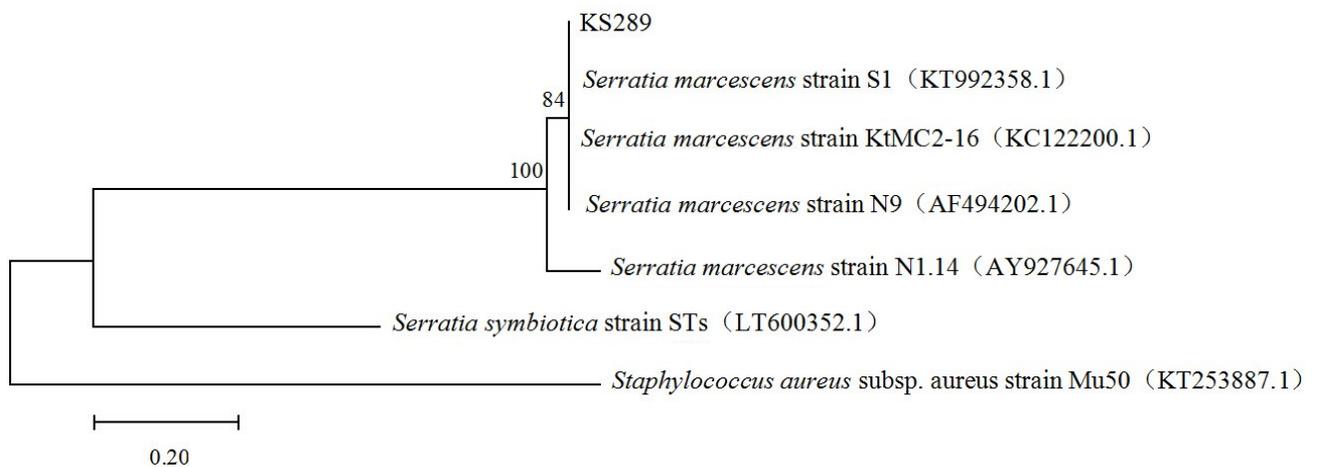


图 2 KS289 菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequence of strain KS289

### 2.3 理化性质的测定

表 1 可看出,土壤 pH 为 5.40~5.99,整体呈现弱酸性环境。土壤 OM 是土壤肥力的基础体现,OM 的含量在种植桉树和栎树的土壤中表现为:培养基>灭活菌液>菌液处理,在云南松中不同处理的含量表现为灭活菌液>培养基>菌液处理。在树种相同的情况

下,TN 含量的最大值分别出现在桉树灭活菌液处理、云南松菌液处理、栎树菌液处理。EC 的最大值均出现在灭活菌液的处理,且云南松灭活菌液的处理 EC 值最大,为 79.40  $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;AK 的含量各树种间差异显著,在相同处理当中,栎树>云南松>桉树。TP 含量各处理间差异显著,在桉树和栎树中施加菌液处理的 TP 含量最低,而在云南松中施加菌液处理的 TP 含

量最高。实验结果表明:各处理均显著提高了土壤 EC 值,且最大值均出现在灭活菌液处理中;施加菌液的处理相对于其他处理,降低了土壤中的 OM 值;在

同一处理不同树种之间可以看出施加菌液的处理中,云南松的 TN 和 EC 要高于桉树和栎树;其他指标也均存在不同程度的差异,但差异变化规律不明显。

表 1 盆栽土壤基本理化性质的测定

Table 1 Measurement of basic physical and chemical properties of potted soil

土壤类型	WC/%	pH	OM/g·kg <sup>-1</sup>	TN/g·kg <sup>-1</sup>	TP/g·kg <sup>-1</sup>	AK/mg·kg <sup>-1</sup>	EC/μS·cm
EA	22.71±3.67a	5.47±0.00c	61.83±3.49bc	3.28±0.20ab	0.06±0.00d	36.54±0.11h	44.25±0.21ef
EI	22.11±4.14a	5.60±0.13bc	63.23±4.11ab	3.93±0.03a	0.17±0.01c	43.79±0.20e	52.45±1.63d
EM	23.19±4.04a	5.82±0.04ab	67.22±2.19a	3.06±0.12bc	0.17±0.01c	33.63±0.06i	41.60±0.85ef
PA	17.90±0.85b	5.56±0.01b	59.21±1.57bc	3.34±0.07b	0.33±0.01ab	39.23±0.03g	48.95±1.48e
PI	17.52±2.02b	5.40±0.08c	62.93±1.27ab	2.95±0.19de	0.19±0.02c	45.26±0.05d	79.40±0.42a
PM	24.88±3.15a	5.52±0.06bc	62.84±2.23ab	2.76±0.17e	0.30±0.01ab	40.26±0.12f	69.45±2.33b
QA	21.52±0.26a	5.96±0.16b	56.12±2.69d	3.24±0.09ab	0.05±0.00d	65.02±0.15a	27.65±0.64g
QI	22.44±2.81a	5.85±0.10b	57.61±0.73cd	3.07±0.10bc	0.15±0.01c	62.49±0.13b	64.55±0.78c
QM	22.44±1.93a	5.99±0.10b	62.71±1.45ab	3.06±0.16bc	0.37±0.02a	60.66±0.17c	49.85±1.20de

注:同列数据后标有不同小写字母表示不同处理间的差异显著性(p<0.05),下同。EA—桉树菌液 EI:桉树灭活菌液 EM—桉树培养基 PA—松树菌液 PI—松树灭活菌液 PM—松树培养基 QA—栎树菌液 QI—栎树灭活菌液 QM—栎树培养基。下同。

### 2.4 可培养微生物数量测定

土壤中部分微生物不但可以促进营养物质的循环,还可以加速碳酸钙类岩石的溶蚀。利用平板计数法测定不同处理可培养微生物的数量。从表 2 中可以看出,在同一处理中,微生物数量由高到低均依次为放线菌>细菌>真菌;当树种相同时,施加菌液处理的细菌数量显著大于施加灭活菌液以及培养基的处理。在桉树的三个处理中,施加菌液处理的放线菌数量与施加灭活菌液处理差异不显著,但显著大于施加培养基处理。云南松和栎树处理中放线菌的

最大值均出现在施加菌液的处理中,分别为 1.85×10<sup>5</sup> cfu·g<sup>-1</sup>、2.68×10<sup>5</sup> cfu·g<sup>-1</sup>。比较真菌的数量,云南松各处理间存在显著性差异,桉树和栎树各处理间差异不显著,并且云南松施用菌液的处理数量最大,大约是施加灭活菌液处理的 4.2 倍、培养基的 2.4 倍。比较微生物数量的总数,可以发现桉树、云南松、栎树的最大值均出现在施加菌液的处理中,并且栎树微生物总数>桉树微生物总数>云南松微生物总数。实验结果表明:施加菌液可以促进土壤微生物数量的增多,尤其是细菌的数量。

表 2 土壤可培养微生物数量的测定

Table 2 Measurement of culturable microorganisms in soil

土壤类型	BN/×10 <sup>5</sup> cfu·g <sup>-1</sup>	AN/×10 <sup>5</sup> cfu·g <sup>-1</sup>	FN/×10 <sup>2</sup> cfu·g <sup>-1</sup>	MC/×10 <sup>5</sup> cfu·g <sup>-1</sup>
EA	2.07±0.11a	2.30±0.14b	7.50±1.6b	4.38±0.25a
EI	0.48±0.04de	2.36±0.06b	7.20±0.42b	2.84±0.01cd
EM	0.59±0.06d	1.62±0.03d	7.20±0.42b	2.22±0.03e
PA	1.50±0.04b	1.85±0.21c	19.80±1.4a	3.37±0.25b
PI	1.11±0.12c	1.44±0.08de	4.70±0.14c	2.56±0.04d
PM	1.19±0.06c	1.80±0.05c	8.35±0.07b	3.00±0.00c
QA	1.90±0.08b	2.68±0.05a	4.15±0.64c	4.60±0.13a
QI	0.41±0.08de	1.77±0.04c	3.50±0.43c	2.18±0.12e
QM	0.34±0.02e	1.29±0.02e	3.30±0.28c	1.63±0.01f

注:表中字母代表意义同表 1。BN—细菌数量 AN—放线菌数量 FN—真菌数量 MC—微生物总量

## 2.5 微生物多样性的测定

### 2.5.1 土壤微生物利用碳源动力学分析

每个小孔的平均吸光度变化率(AWCD)表征微生物群落碳源利用率,反映土壤微生物代谢活性、种群数量及结构特征,是土壤微生物利用单一碳源能力的重要指标<sup>[15-16]</sup>。菌液的施加对三种植被根际土壤微生物群落碳源代谢活性的影响结果如图3所示:随着培养时间的延长,微生物利用碳源量呈逐渐增加的趋势,在观测周期内的AWCD持续升高,其中云南松土壤中施加菌液的碳源利用效果最高,显著大于同种植被灭活菌液及培养基的处理。在桉树各处理中,施加菌液对碳源的利用率开始高于施加灭活的菌液和培养基处理,最后培养基处理略高于施加菌液的处理,灭活的菌液对碳源的利用率最低。而栎树对碳源的利用率表现为灭活的菌液>菌液>培养基处理。在同一时间,各处理间AWCD值存在差异,说明不同处理的土壤微生物对碳源利用率和菌株在不同树种根际的土壤的定殖效果存在差异。

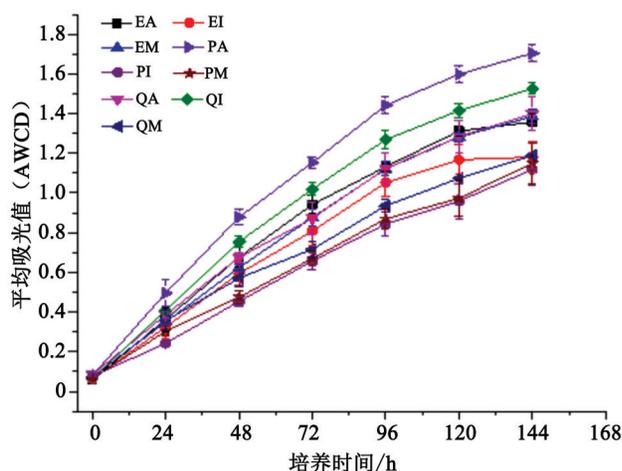


图3 土壤微生物利用碳源动力学分析

Fig. 3 Dynamic analysis of carbon sources used by soil microorganism

### 2.5.2 土壤微生物多样性和均匀度指数比较分析

从表3可以看出,施加菌液及其各自代谢产物处理的云南松根际土壤的微生物多样性指数(Shannon)、优势度指数(Simpson)和均匀度指数(Pielou)<sup>[16]</sup>均大于其施加灭活菌液和培养基的处理,且施加菌液>施加灭活菌液>施加培养基处理;桉树、栎树的处理各指标指数的差异不显著,栎树施加灭活菌液的指数>施加菌液>培养基的处理,桉树施加菌液与培

养基处理的Shannon多样性指数变化一致,施加灭活的菌液各指标指数最低。实验结果表明:菌液的施加在不同程度上增加了云南松根际土壤的物种优势度及物种均匀度。

表3 微生物多样性指数的测定

Table 3 Measurement of microbial diversity indexes

	多样性指数	优势度指数	均匀度指数
EA	1.44±0.01ab	0.9614±0.00ab	0.4199±0.00ab
EI	1.42±0.01cd	0.9579±0.00cd	0.4121±0.00cd
EM	1.44±0.00ab	0.9615±0.00ab	0.4199±0.00ab
PA	1.46±0.00a	0.9633±0.00a	0.4243±0.00a
PI	1.44±0.01ab	0.9612±0.00ab	0.4206±0.01ab
PM	1.43±0.01bc	0.9595±0.00bc	0.4163±0.00bc
QA	1.41±0.01cd	0.9584±0.00cd	0.4117±0.00cd
QI	1.42±0.02cd	0.9597±0.00bc	0.4148±0.00bd
QM	1.40±0.01d	0.9562±0.00d	0.4090±0.00d

注:表中字母代表意义同表1。

### 2.5.3 微生物对31种碳源的利用能力

Biolog平板可以显示土壤微生物群落对31种碳源(大致可分为6大类,分别是糖类、氨基酸类、酸类、聚合物类、酚类、胺类)的利用能力<sup>[17]</sup>,从图4中可以看出,不同处理对31种碳源的利用能力存在差异。桉树和云南松施入菌液的处理与培养基的处理相比,根际微生物对糖类的利用情况发生显著性变化,分别升高了26.48%、30.98%。施入灭活菌液的处理组较培养基处理组提高22.89%、23.09%;栎树施加菌液的处理较施加灭活菌液的处理无显著性变化,但施入菌液的处理较培养基处理显著提高了微生物对酚类化合物的利用。实验结果表明:微生物菌液的施加可以显著调节对 $\beta$ -Methyl-D-Glucosid、D,L- $\alpha$ -GlycerolPhosp、L-Phenylalanine和4-Hydroxy Benzoic碳源的利用率( $P<0.05$ );灭活菌液也存在调节功能,可能是因为灭活菌体的内部物质影响了土壤微生物的代谢活动。

## 2.6 溶蚀率的测定

采用称重法比较实验前后溶蚀试片质量的失重率。从图5可以看出,在4个月的实验周期内,当树种相同时,施加菌液的溶蚀效应显著大于施用灭活菌液及培养基的处理组,桉树、云南松、栎树施加菌液处理的溶蚀率最高,分别为1.13%、1.29%、0.80%,是灭活菌液处理的1.45、1.37、1.19倍,是培

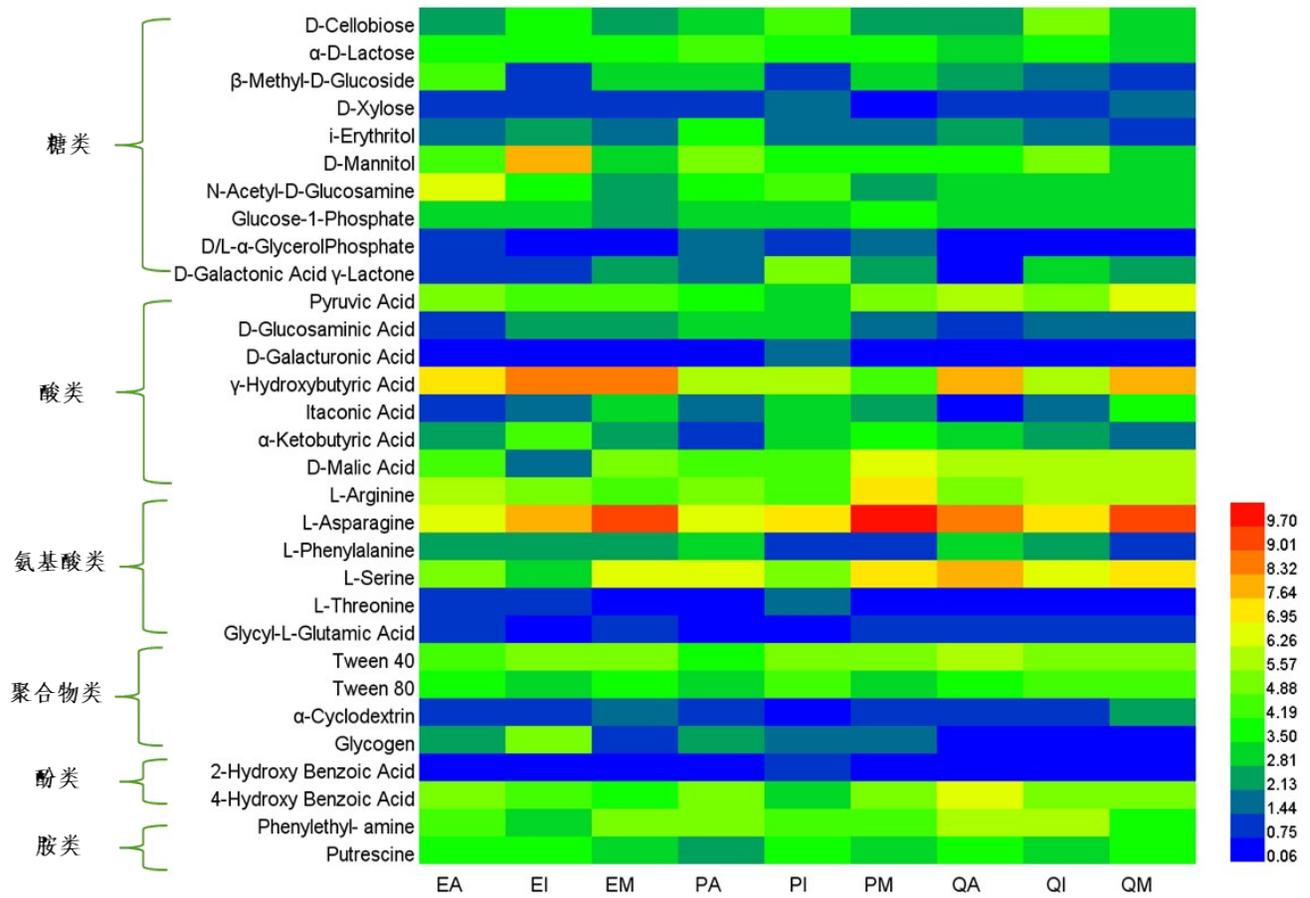


图 4 土壤微生物群落对 31 种碳源的利用能力

Fig. 4 Utilization capacity of soil microbial community to 31 carbon sources

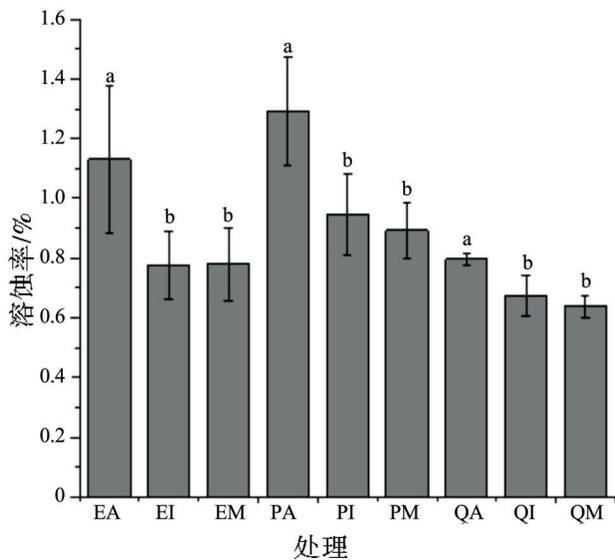


图 5 不同处理的溶蚀率

Fig. 5 Dissolution rates of different treatments

培养基处理的 1.45、1.45、1.25 倍。在施加菌液的不同树种处理中云南松的溶蚀效率最高。实验结果表

明:微生物菌液的施加能够显著提高碳酸钙类岩石的溶蚀效应。

### 2.7 相关性分析

通过对环境因子、微生物数量和溶蚀率进行皮尔逊相关系数分析,结果如表 4:溶蚀效率主要受 TN、EC、OM、AK、WC 和微生物数量的影响,其中溶蚀效率与 TN 和 BN 成正相关,与 OM、AN、FN 和 MC 成极显著正相关,与 EC 成负相关,与 AK 成显著负相关,与 WC 成极显著负相关。微生物数量也受到 pH、TN、TP、TN、OM 和 WC 等多种环境因子的影响。实验结果表明:土壤理化性质的改变影响着土壤微生物的数量,通过影响土壤微生物的丰度,影响碳酸钙类岩石的溶蚀率,影响着土壤的形成。

### 3 讨论

土壤微生物(细菌、真菌、放线菌)是评价土壤肥力的重要生物指标,微生物的种类越多,则微生物群

表4 环境因子、微生物数量和溶蚀率之间的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of environmental factors, microbial populations and dissolution rate

	karst rate	AK	pH	EC	TN	TP	OM	WC	BN	AN	FN
AK	-.440*										
pH	-0.009	-0.192									
EC	-0.066	0.116	.461*								
TN	0.063	-0.139	-0.364	-0.237							
TP	0.018	-0.099	0.354	.551**	-0.231						
OM	.629**	-0.203	-0.338	-0.269	-0.041	-.434*					
WC	-.599**	0.319	-.540**	-.386*	-0.049	0.021	-0.358				
BN	0.194	0.144	-.576**	-.467*	.525**	-.685**	.575**	-0.002			
AN	.690**	-.393*	-0.085	0.204	0.208	0.375	0.317	-.412*	0.046		
FN	.508**	-0.069	-.489**	-.392*	0.217	-.601**	.926**	-0.239	.841**	0.235	
MC	.593**	0.047	-0.29	-.575**	0.034	-0.212	-0.237	.785**	0.11	-.629**	-0.109

注:\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 表中字母代表意义同表1, 表2。

落结构越稳定;微生物数量越多,则土壤生物活性越强。同时,土壤微生物参与有机质分解、养分转化和循环等多种生化过程,其多样性是评价土壤环境质量的重要生物学指标<sup>[18]</sup>。在本试验中,不同处理影响土壤的基本理化性质。在树种相同的情况下,土壤OM最小值均出现在施加菌液的处理样本,可能的原因是:①由于施加菌液后,加快了土壤OM的降解速率,更有利于植被的吸收消耗;②施加菌液能够增加微生物数量,同时微生物能够促进土壤OM的分解,产生溶解有机碳(dissolved organic carbon, DOC)和CO<sub>2</sub><sup>[8]</sup>;TN含量的最大值出现在云南松施加菌液的处理,可能是由于菌株可以与植被根际稳定共生,加强了土壤微生物的固氮能力<sup>[13]</sup>;EC能够反映土壤中离子的总浓度,研究发现EC的最大值均出现在灭活菌液的处理,这可能是因为灭活的菌液中所有菌体组织被破坏,菌体内的物质渗出,从而使EC增大。在同一处理不同树种之间可以看出,施加菌液的处理中,云南松的TN和EC要高于桉树和栎树。可能是因为不同植物根系分泌物的成分与含量不同,植物根际微生物的功能代谢有差异<sup>[19-20]</sup>。一方面:不同植物根系的分泌物可以为微生物的生长发育提供不同的碳源、氮源等营养物质,进而影响微生物的代谢活动;另一方面:微生物的代谢活动的差异也会影响不同植物根系对营养物质的吸收及释放。

通过比较施入菌液的处理与其它两种处理微生物的总数可以得出:施加菌液的处理显著提高了土壤微生物的数量,改变了土壤中微生物活性,进一步

提高了土壤中微生物的代谢活性。其中放线菌的数量大于细菌的数量,而真菌的含量相对最少,表明在此生境下是以放线菌为主的微生物类群。这与野外取样测定的结果一致<sup>[21]</sup>,可能是在弱酸性环境下,与细菌相比,放线菌有较强的生存能力<sup>[22]</sup>。通过土壤微生物利用碳源动力学分析图和土壤微生物群落对31种碳源的利用能力图可以得出:加入菌液后的桉树和云南松的AWCD变化幅度显著高于加入灭活的菌液和培养基的,并且加入菌液改变了土壤微生物对碳源的利用能力。这与张变华等<sup>[23]</sup>利用Biolog技术探究不同植物根际微生物利用碳源能力的结果一致。施加菌液的云南松AWCD变化幅度最大,利用碳源能力最强,微生物丰度也最高,这与高晓奇等<sup>[24]</sup>研究结果一致。分析原因可能是因为①云南松体内含有大量的CA,分泌到岩溶生境中能够稳定地发挥作用<sup>[25]</sup>;②云南松体内CA活性与林下土壤中CA活性存在极显著的相关性<sup>[26]</sup>,二者能够相互促进发挥作用。除此之外,种植云南松的土壤中CA活性高于种植桉树和栎树<sup>[21]</sup>,而土壤中CA的来源主要是植物根系和土壤微生物分泌,虽然还未见到这两类树木产CA的报道,但此实验说明桉树和栎树体内的CA的量较少或者不能在土壤中稳定地发挥作用。

通过比较碳酸盐类岩石的溶蚀效率,可以得出:施加菌液可以显著提高碳酸盐类岩石的溶蚀效率,分析原因如下:①菌液的生命活动过程产生的分泌物对碳酸盐类岩石的溶蚀具有促进作用<sup>[27]</sup>;②根际微生物降解有机残体过程中产生的CO<sub>2</sub><sup>[28]</sup>可增大难

溶性碳酸盐的溶解性,且代谢物质呈现酸性,为碳酸钙类岩石的溶蚀提供了必要条件;③微生物能够促进碳酸钙类岩石溶解<sup>[9]</sup>。

通过相关性分析可以得出:溶蚀效率与微生物数量成正相关,可能是因为微生物生命活动影响岩石的溶蚀效率,微生物数量的增多会促进溶蚀效率的提高;含水率与溶蚀效率成极显著负相关,与微生物数量成负相关,这可能是因为较高的含水率抑制了微生物活性,从而抑制了碳酸钙类岩石的溶蚀;TN与溶蚀效率成正相关,与微生物数量成正相关,可能是因为TN的增加给微生物提供了大量的养分,促进了微生物的生长繁殖,从而提高了溶蚀效率;溶蚀效率与OM成显著正相关可能是因为植被改善了土壤结构,产生了更多的OM,OM分解产生了大量的有机酸,使土壤的pH降低,进而大大地促进了碳酸钙类岩石的溶蚀作用<sup>[13]</sup>。这也是溶蚀效率和pH成负相关的原因。本实验中溶蚀效率和pH、WC、TN和OM的相关性与Wang C等<sup>[29]</sup>研究的结果一致。

## 4 结 论

(1)添加KS289菌剂可显著地增加根际土壤微生物的数量,提高土壤微生物的代谢活性,有利于土壤环境的改善。本实验为岩溶地区土壤改良提供了一种重要的技术方法;

(2)碳酸钙类岩石的溶蚀效率主要受到TN、EC、OM、AK、WC和微生物数量的影响,同时微生物数量也受到多种环境因子的影响,在以后的实验中可以尝试人为地改善环境因子来增强土壤微生物的活性,提高碳酸钙类岩石的溶蚀率,加速土壤形成。

## 参考文献

- [1] 韩路,王海珍,于军.塔里木河上游不同植被类型土壤水文特性研究[J].水土保持学报,2013,27(6):124-129.
- [2] 中国科学院.关于推进西南岩溶地区石漠化综合治理的若干建议[J].中国科学院院刊,2003,18(3):489-492.
- [3] 熊平生,袁道先,谢世友.我国南方岩溶山区石漠化基本问题研究进展[J].中国岩溶,2010,29(4):355-362.
- [4] Tripp B C, Smith K, Ferry J G. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001,276(52):48615-48618.
- [5] Xie R, Xu W, Bao W, et al. Establishing a protein expression profile database for the normal human pituitary gland using two-dimensional high-performance liquid chromatography combined with LTQ-Orbitrap mass spectrometry[J]. Neural Regeneration Research, 2012,7(36):2922-2928.
- [6] Shen T, Li W, Pan W, et al. Role of bacterial carbonic anhydrase during CO<sub>2</sub> capture in the CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-carbonate system[J]. Biochemical Engineering Journal, 2017,123:66-74.
- [7] 申泰铭,邢必果,李为,等.不同种类微生物及其碳酸酐酶对CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-碳酸盐系统中碳酸盐岩的溶蚀作用[J].矿物岩石地球化学通报,2014,33(6):797-800.
- [8] 范周周,卢舒瑜,李志茹,等.岩溶与非岩溶地区不同林分根际土壤微生物对碳酸盐岩的溶蚀作用[J].应用与环境生物学报,2018,24(4):751-757.
- [9] 沈萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999:69-82.
- [10] 邓洁,李建宏,管章玲,等.一株产碳酸酐酶附生菌对铜绿微囊藻(Microcystis aeruginosa)生长的影响[J].湖泊科学,2012,24(3):429-435.
- [11] 刘娜,赵琳娜,张伟,等.16S rRNA基因序列、生化鉴定、质谱3类方法鉴定常见微生物的结果分析[J].食品安全质量检测学报,2019,10(1):68-72.
- [12] 鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [13] 李恩香,蒋忠诚,曹建华,等.广西弄拉岩溶植被不同演替阶段的主要土壤因子及溶蚀率对比研究[J].生态学报,2003,24(6):1131-1139.
- [14] Vicente, Cláudia S L, Nascimento F X, et al. Evidence for an opportunistic and endophytic lifestyle of the *bursaphelenchus xylophilus*-associated bacteria *serratia marcescens* PWN146 isolated from wilting *pinus pinaster* [J]. Microbial Ecology, 2016,72(3):669-681.
- [15] 田雅楠,王红旗. Biolog法在环境微生物功能多样性研究中的应用[J].环境科学与技术,2011,34(3):50-57.
- [16] 靳长青,李国旗,赵盼盼,等.围封对苦豆子群落多样性及土壤微生物的影响[J].北方园艺,2019(2):118-124.
- [17] 陈正培,熊建文,沈方科,等. Biolog-ECO技术及其应用研究进展[J].轻工科技,2018,34(6):97-98,156.
- [18] 杨海君,肖启明,刘安元.土壤微生物多样性及其作用研究进展[J].南华大学学报,2005,19(4):21-26,31.
- [19] Nayyar A, Hamel C, Lafond G, et al. Soil microbial quality associated with yield reduction in continuous-pea [J]. Applied Soil Ecology, 2009,43(1):115-121.
- [20] Mai K, Biswas B, Smith E, et al. Microbial diversity changes with rhizosphere and hydrocarbons in contrasting soils [J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2018,156:434-442.
- [21] 范周周,卢舒瑜,王娇,等.岩溶与非岩溶区不同林分根际土壤微生物及酶活性[J].北京林业大学学报,2018,40(7):55-61.
- [22] Duncan S H, Louis P, Thomson J M, et al. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota [J]. Environmental Microbiology, 2009,11(8):2112-2122.
- [23] 张变华,靳东升,郜春花,等.不同方法分析工矿复垦区不同

- 植物根际微生物多样性的比较[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(4):223-226.
- [24] 高晓奇, 肖能文, 叶瑶, 等. 基于Biolog-ECO分析长庆油田土壤微生物群落功能多样性特征[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(5):913-918.
- [25] 王晓丽, 曹子林, 和润喜, 等. 不同pH、温度和储藏因素对云南松针叶碳酸酐酶稳定性的影响[J]. 云南大学学报, 2016, 38(3):501-506.
- [26] 王晓丽, 曹子林, 和润喜, 等. 云南松根叶及林内土壤的碳酸酐酶活性分析[J]. 西南林业大学学报, 2016, 36(2):31-34.
- [27] Saleem M, Fetzer I, Harms H, et al. Trophic complexity in aqueous systems: bacterial species richness and protistan predation regulate dissolved organic carbon and dissolved total nitrogen removal[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, DOI:10.1098/rspb.2015.2724.
- [28] 王艳红, 于镇华, 李彦生, 等. 植物-土壤-微生物间碳流对大气CO<sub>2</sub>浓度升高的响应[J]. 土壤与作物, 2018, 7(1):22-30.
- [29] Wang C, Li W, Shen T, et al. Influence of soil bacteria and carbonic anhydrase on karstification intensity and regulatory factors in a typical karst area [J]. Geoderma, 2018, 313:17-24.

## Effects of microorganisms agent addition on soil microbes in different rhizosphere soils and calcium carbonate dissolution

LI Yongshuang<sup>1</sup>, FAN Zhouzhou<sup>1</sup>, GUO Hui<sup>1</sup>, ZHOU Jinxing<sup>2</sup>, PENG Xiawei<sup>1</sup>

(1. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. School of Soil and Water Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract** In this experiment, microorganisms with high-yield carbonic anhydrase (CA) in the rhizosphere soil of Ji-anhui county, Yunnan Province were isolated and screened, and the dissolution effect was measured. The strain with better dissolution effect was prepared into a suspension for pot experiment, permitting to explore the effects of microbial metabolic activities and dissolution effects of calcium carbonate rocks on rhizosphere soils of different tree species. The results show that a strain of *Serratia* can be screened from the rhizosphere soil with high-yield CA and strong dissolution effect. The treatment group applying the microbial agent significantly increases the number of soil microorganisms, enhances the metabolic activity and diversity of microorganisms, and accelerates the dissolution of calcium carbonate rocks. This study aims to provide technical means for the selection of plant species and the application of microbial agents in the ecological restoration process of karst areas in the future, and provide some theoretical support for the management of ecosystems in karst areas.

**Key words** rhizosphere soil, microbial agent addition, metabolic activity, carbon source utilization, calcium carbonate dissolution, *Serratia*

(编辑 张玲)