

## 研究报告

## 黑曲霉菌剂不同处理对西瓜根际细菌群落及土壤理化性质的影响

赵娟, 刘霆\*, 张涛涛, 董丹, 秦文韬, 张高鹏

北京市农林科学院植物保护研究所, 北京 100097

赵娟, 刘霆, 张涛涛, 董丹, 秦文韬, 张高鹏. 黑曲霉菌剂不同处理对西瓜根际细菌群落及土壤理化性质的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2468-2480.

ZHAO Juan, LIU Ting, ZHANG Taotao, DONG Dan, QIN Wentao, ZHANG Gaopeng. Effect of different treatments of *Aspergillus niger* agent on the rhizosphere bacterial community and soil physicochemical properties of watermelon[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2468-2480.

**摘要:** 【背景】针对我国设施栽培西瓜土传病害发生严重、土壤理化性质劣变等问题, 探究微生物菌剂对西瓜根际土壤微生物群落调控及土壤营养改良的作用。【目的】研究黑曲霉菌剂不同处理方式对设施栽培西瓜根际细菌多样性、群落结构及土壤理化性质的影响。【方法】通过高通量测序分析黑曲霉菌剂不同处理对西瓜根际土壤细菌多样性和群落结构的影响; 采用分析化学方法测定西瓜根际土壤理化性质并解析驱动西瓜根际细菌群落动态变化的主要理化因素。【结果】黑曲霉菌剂(Y)、氨基寡糖素水剂(A)及黑曲霉菌剂与氨基寡糖素水剂配施(YA)处理, 细菌  $\alpha$  多样性指数如 Chao1、ACE 和 Shannon 等较对照均有所增加; 不同处理西瓜根际优势细菌在门水平包括变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)等, 其中 *Proteobacteria* 相对丰度最高, 依次为 A (28.26%)>Y (26.74%)>YA (22.61%); 黑曲霉菌剂处理西瓜根际土壤芽单胞菌科(*Gemmatimonadaceae*)和类诺卡氏菌科(*Nocardioidaceae*)相对丰度较对照明显提高到 4.06%和 2.43%, 氨基寡糖素水剂处理中根际土壤假单胞菌属(*Pseudomonas*)丰度显著提高( $P<0.05$ ), 不同处理组微枝形杆菌属(*Microvirga*)相对丰度较对照均有所提高; 黑曲霉菌剂单独或与氨基寡糖素水剂配施处理, 西瓜根际土壤全氮、全磷及速效磷含量明显提高; 冗余分析(redundancy analysis, RDA)表明, 土壤 pH、全氮、速效磷、速效钾与西瓜根际细菌群落结构具有显著相关性( $P<0.05$ ); Spearman 相关性分析表明, 根际假单胞菌科相对丰度与土壤全氮、全磷、速效磷、速效钾呈显著或极显著正相关。【结论】黑曲霉菌剂在设施栽培西瓜种植中单独或与氨基寡糖素水剂配施处理, 具有提高西瓜根际土壤细菌多样性、增加

资助项目: 北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20200110, KJCX20200426); 北京市乡村振兴项目(BJXCZX20221229)

This work was supported by the Innovative Capacity Construction of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (KJCX20200110, KJCX20200426) and the Beijing Rural Revitalization Project (BJXCZX20221229).

\*Corresponding author. E-mail: lting11@163.com

Received: 2022-08-18; Accepted: 2022-10-10; Published online: 2022-11-14

有益菌群相对丰度、改良土壤理化性质从而提高土壤肥力的作用, 该结果为黑曲霉菌剂产品开发及在设施栽培西瓜种植中合理应用提供了科学依据。

关键词: 黑曲霉菌剂; 微生物多样性; 高通量测序; 土壤肥力; 西瓜

## Effect of different treatments of *Aspergillus niger* agent on the rhizosphere bacterial community and soil physicochemical properties of watermelon

ZHAO Juan, LIU Ting<sup>\*</sup>, ZHANG Taotao, DONG Dan, QIN Wentao, ZHANG Gaopeng

Institute of Plant Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

**Abstract:** [Background] In view of the serious soil borne diseases and deteriorative soil physicochemical properties in protected cultivation of watermelon, we explored the effect of microbial agent on rhizosphere microbial community and soil nutrients of watermelon. [Objective] To study the effect of different treatments of *Aspergillus niger* agent on rhizosphere bacterial diversity and community structure, as well as soil physicochemical properties of watermelon. [Methods] Through high-throughput sequencing, we analyzed the effect of *A. niger* agent inoculation alone (Y), amino oligosaccharin water aqua (root irrigation) alone (A) or the combination of the two treatments (YA), on the rhizosphere soil bacterial diversity and community structure of watermelon. Analytical chemistry methods were used to detect the soil physicochemical properties and elucidate the main driving factors of their dynamic changes. [Results] The bacterial  $\alpha$  diversity indexes of Chao 1, ACE and Shannon indices increased in Y, A, and YA treatments compared with those in the control. The dominant bacterial phyla in the rhizosphere soil of watermelon consisted of *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Chloroflexi*, and *Acidobacteriota*, among which, *Proteobacteria* was the most abundant, with relative abundance in the order of A (28.26%)>Y (26.74%)>YA (22.61%). The relative abundance of *Gemmatimonadaceae* and *Nocardioidaceae* increased to 4.06% and 2.43% in Y treatment, respectively, while the relative abundance of *Pseudomonas* was obviously improved under A treatment ( $P<0.05$ ). The relative abundance of *Microvirga* rose in all the three different treatments in comparison with that of the control. The content of soil total nitrogen, total phosphorus, and available phosphorus significantly elevated in Y and YA treatments. RDA suggested the significant correlation of bacterial community structure with soil pH, total nitrogen, available phosphorus, and available potassium ( $P<0.05$ ), and Spearman correlation analysis suggested the significant or highly significant positive correlation of relative abundance of *Pseudomonadaceae* with the total nitrogen, total phosphorus, available phosphorus, and available potassium. [Conclusion] Application of *A. niger* agent alone or in combination with amino oligosaccharin water aqua in watermelon under protected cultivation can improve bacterial diversity, abundance of beneficial bacteria, soil physicochemical properties, and soil

fertility. The findings lay a basis for the development of microbial agent with *A. niger* and the rational application in watermelon cultivation.

**Keywords:** *Aspergillus niger* agent; microbial diversity; high-throughput sequencing; soil fertility; watermelon

西瓜(*Citrullus lanatus*)是盛夏佳果, 富含氨基酸、维生素等多种营养物质, 我国是世界上最大的西瓜生产国和消费国。随着设施栽培规模化发展, 西瓜枯萎病、根结线虫病等土传病害发生频繁, 土壤理化性质劣变, 严重影响西瓜产业健康可持续发展<sup>[1]</sup>。随着市场对西瓜品质和产量需求的激增, 杀菌剂、杀线剂、化学肥料等大量使用造成病原菌抗药性、土壤养分失衡等系列问题, 寻求能够有效降低化肥农药用量、环境友好且符合可持续发展要求的绿色防病增产措施, 是设施栽培西瓜产业健康发展亟待解决的问题。微生物菌剂是指将有益或拮抗活性菌株发酵后制成的微生物活菌制剂, 具有不易产生耐药性、不污染环境及无药物残留的优点, 在作物病害防控、增产提质方面具有广阔的应用前景。

根际微生物是紧密附着于植物根系土壤中的微生物, 在促进植物生长、抑制土传病害中发挥关键作用<sup>[2]</sup>。根际微生物群落动态变化受土壤理化性质影响, 同时也是评价植物根际土壤质量的重要生物学指标。研究表明, 一些微生物菌剂对作物的防病增产效果与其对植物根际微生物群落的调控作用有关<sup>[3]</sup>。高通量测序技术的快速发展为揭示植物根际微生物群落结构特征提供了良好的技术手段<sup>[4]</sup>。马慧媛等<sup>[5]</sup>发现施用以哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)为有效成分的微生物菌剂能够促进茄子营养生长并增加茄子产量, 同时该菌剂具有改善土壤营养状况、提高土壤微生物多样性的作用。宋以玲等<sup>[6]</sup>指出复合微生物菌剂处理棉花植株能够提高土壤细菌和放线菌数量、降低根际土壤真菌数量, 同时提高土壤脲酶等活性

及土壤有效养分和有机质含量, 从而改善根际微环境。

黑曲霉(*Aspergillus niger*)广泛分布于土壤、植物中, 具有多种活性强大的酶系, 一些黑曲霉菌株具有产草酸、柠檬酸活性从而应用于植物根结线虫生物防治<sup>[7]</sup>。课题组前期筛选出一株对根结线虫具有明显毒杀效果的黑曲霉菌株 Y61<sup>[8]</sup>, 以该菌株为有效成分研制的微生物菌剂能够有效降低田间西瓜根结线虫病发生率和病情指数, 同时具有明显的促生增产作用。目前围绕生防真菌制剂对植物根际微生物群落和土壤理化性质影响的报道相对较少。本文通过解析黑曲霉菌剂不同处理对设施栽培西瓜根际土壤细菌群落结构和土壤理化性质的影响, 探究其发挥生物功能的潜在根际土壤微生态机制, 以期在黑曲霉菌剂有效应用和设施西瓜高效栽培提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

黑曲霉菌剂, 有效成分含量  $2.0 \times 10^8$  分生孢子/g, 由北京市农林科学院植物保护研究所研制, 已登记微生物肥料[微生物肥(2018)准字(4191)号]。菌剂功能菌株为黑曲霉(*Aspergillus niger*) Y61, 由北京市农林科学院植物保护研究所生防微生物研究室分离保藏。将斜面上活化好的菌株 Y61 接种于马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)液体培养基<sup>[9]</sup>, 28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h 后, 按照 8%接种量转接于固态发酵培养基, 28 °C 培养 8 d。待产孢充足后, 将固体发酵产物室温晾干, 粉碎过 80 目筛获得菌剂。其中固态发酵培

培养基为麸皮与棉籽壳以 6:4 的质量比混合, 含水量为 60%, 袋装量 250 g/袋。

氨基寡糖素水剂, 有效成分含量 1%, 北京中植科华农业技术有限公司。

供试西瓜品种“京美 10K”, 北京京研益农种业科技有限公司。

土壤 DNA 提取试剂盒(FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit for Soil), MP Biomedicals 公司; 胶回收试剂盒, Thermo Fisher 公司。NanoDrop 2000 紫外可见微量分光光度计, Thermo Fisher 公司; CHN 元素分析仪, Elementar 公司; 台式高速冷冻离心机, Sigma 公司; PCR 扩增仪, ABI 公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。

## 1.2 试验设计

试验地点位于北京市大兴区青云店镇西瓜种植基地, 试验设计包括 4 组: 未进行任何处理作为对照(CK)、黑曲霉菌剂穴施(Y)、氨基寡糖素水剂灌根(A)、黑曲霉菌剂穴施+氨基寡糖素水剂灌根(YA)。西瓜种子消毒处理后常规穴盘育苗, 两叶一心期移栽至大棚。黑曲霉菌剂穴施在西瓜幼苗移栽前按照 4 g/株进行, 氨基寡糖素水剂灌根处理在移栽后采用氨基寡糖素水剂 500 倍稀释液按照 100 mL/株进行。每组处理一个试验区, 包含 3 个重复小区, 每个小区 3 垄, 每垄 1 行 12 株西瓜, 垄间距 60 cm, 垄宽 50 cm, 株间距 50 cm, 设保护行。起垄时施加鸡粪作为底肥, 常规化管理。

## 1.3 样品采集

在西瓜移栽 45 d 选择不同处理代表性植株进行西瓜根际土壤样品采集, 去除地表土壤后将西瓜连根挖起, 抖落与根系松散结合的土壤后, 采用无菌毛刷收集与根系紧密结合的土壤作为根际土壤样品。所有样品装在无菌密封袋及时运回实验室并分为 2 份: 一份置于-80 °C 冰箱保

存, 用于土壤细菌高通量测序; 另一份自然风干过筛后用于土壤理化指标测定。

## 1.4 土壤理化性质测定

土壤理化性质测定参考《土壤农化分析》<sup>[10]</sup>进行。其中土壤 pH 采用 pH 计测定; 土壤含水率采用烘干法测定; 土壤总有机质含量采用重铬酸钾-外加热法测定; 土壤全氮含量采用凯氏定氮法通过 CHN 元素分析仪测定; 土壤全磷含量采用钼锑抗比色法通过紫外可见分光光度计测定; 土壤全钾含量通过火焰光度计法测定; 土壤速效磷采用 0.5 mol/L 碳酸氢钠浸提-钼锑比色法测定; 土壤速效钾采用 1 mol/L 醋酸铵浸提-火焰原子光度计法测定; 土壤铵态氮和硝态氮采用 2 mol/L 氯化钾浸提-全自动流动注射分析仪检测。

## 1.5 根际土壤细菌高通量测序分析

采用 FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit for Soil 按照说明书提取根际土壤样品基因组 DNA, 通过 NanoDrop 2000 紫外可见微量分光光度计检测 DNA 浓度和纯度, 采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。采用引物对 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区<sup>[11-12]</sup>。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 5 $\times$ FastPfu buffer 4  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 正、反向引物(5  $\mu$ mol/L)各 0.8  $\mu$ L, FastPfu DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 4  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。经检测合格的 PCR 产物由上海美吉生物医药科技有限公司进行 Illumina MiSeq 上机测序。原始序列文件采用 QIIME 1.9.1 进行分析和质控。使用 USEARCH 软件对高质量序列在 97%相似度水平下进行分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)聚

类分析,明确对应的物种分类信息。

## 1.6 数据处理

利用 Mothur 软件分析细菌群落  $\alpha$  多样性指数,包括物种丰富度、覆盖度和多样性等。通过主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)检测不同处理细菌群落结构差异。通过冗余分析(redundancy analysis, RDA)和 Spearman 相关性分析明确土壤理化性质与细菌群落结构及优势种群相关性。使用 Microsoft Excel 2007 与 SPSS 19.0 软件对各指标进行单因素方差分析(ANOVA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑曲霉菌剂不同处理对西瓜根际土壤理化性质的影响

不同处理条件下西瓜根际土壤理化性质如表 1 所示,黑曲霉菌剂穴施(Y)、氨基寡糖素水剂灌根(A)及黑曲霉菌剂与氨基寡糖素水剂配施(YA)处理能够不同程度地改变土壤理化性质。其中 Y 处理土壤全氮和铵态氮含量较对照明显提高 28.1%和 41.2%,A 处理土壤全氮、全磷和速效磷含量显著提高 36.5%、18.5%和 28.2%,YA 处理土壤有机质、全氮、全磷、速效磷较对照显著提高( $P<0.05$ )。不同处理之间土壤全钾、硝态

氮和 pH 无显著差异。同时 YA 处理的土壤有机质、全氮、全磷、速效磷和速效钾显著高于 Y 处理( $P<0.05$ )。说明黑曲霉菌剂单独使用或与氨基寡糖素水剂配施处理均能有效改善土壤理化性质,提高西瓜根际土壤肥力。

### 2.2 黑曲霉菌剂不同处理对西瓜根际土壤细菌多样性和群落组成的影响

#### 2.2.1 高通量测序数据及根际细菌多样性分析

通过 16S rRNA 基因扩增子测序,从本研究 12 个西瓜根际土壤样品中获得有效序列 837 618 条。OTU 聚类结果显示,获得的 5 513 个细菌 OTU 分属于 40 门 137 纲 328 目 496 科 889 属。稀释曲线(rarefaction curve)平缓而且测序覆盖率均达 97%以上,表明测序结果足够反映当前样本细菌群落的真实信息。由表 2 得知,3 组处理细菌总 OTU 数量较对照均有所增加。同时上述 3 组处理与对照相比,细菌  $\alpha$  多样性指数如 Chao1、ACE 和 Shannon 等均有不同程度增加(表 2),但整体上未表现出统计学差异。

#### 2.2.2 根际细菌群落组成及优势种群丰度

三组不同处理西瓜根际土壤细菌群落组成如图 1 所示。门水平上的优势细菌主要为变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、绿

表 1 黑曲霉菌剂不同处理对西瓜根际土壤理化性质的影响

Table 1 Effect of different treatments of *Aspergillus niger* agent on the rhizosphere soil physicochemical properties of watermelon

处理 Treatments	有机质 Organic matter (g/kg)	全氮 Total nitrogen (g/kg)	全磷 Total phosphorus (g/kg)	全钾 Total potassium (g/kg)	速效磷 Available phosphorus (mg/kg)	速效钾 Available potassium (mg/kg)	硝态氮 Nitrate nitrogen (mg/kg)	铵态氮 Ammonium nitrogen (mg/kg)	pH
CK	25.82±2.18b	0.96±0.06c	1.08±0.09c	17.90±1.96a	85.07±7.10b	196.90±12.16ab	1.06±0.18a	0.34±0.07b	7.63±0.59a
Y	23.35±1.75b	1.23±0.07b	1.13±0.06bc	16.38±1.70a	98.48±11.46b	177.00±13.80b	1.17±0.14a	0.48±0.09a	7.44±0.52a
A	26.53±1.63b	1.31±0.08ab	1.28±0.13ab	18.53±1.55a	109.10±11.18a	225.75±21.19a	1.02±0.13a	0.38±0.03ab	7.53±0.41a
YA	30.31±2.22a	1.44±0.12a	1.37±0.05a	19.47±1.62a	117.82±13.19a	209.78±18.33a	1.00±0.04a	0.35±0.04b	7.51±0.62a

CK、Y、A、YA 分别代表对照、黑曲霉菌剂处理、氨基寡糖素处理、黑曲霉菌剂和氨基寡糖素配施处理。TC: 有机质; TN: 全氮; TP: 全磷; TK: 全钾; AP: 速效磷; AK: 速效钾;  $\text{NO}_3^-$ -N: 硝态氮;  $\text{NH}_4^+$ -N: 铵态氮。表中数据为平均值±标准差( $n=3$ ); 同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

CK, Y, A, YA represented the control, *Aspergillus niger* agent, amino oligosaccharin, *Aspergillus niger* and amino oligosaccharin, respectively. TC: Total organic matter; TN: Total nitrogen; TP: Total phosphorus; TK: Total potassium; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium;  $\text{NO}_3^-$ -N: Nitrate nitrogen;  $\text{NH}_4^+$ -N: Ammonium nitrogen. The values were mean±standard deviation ( $n=3$ ); Different lowercase letters in the same column indicated significant differences between samples ( $P<0.05$ ).

表 2 黑曲霉菌剂不同处理对西瓜根际细菌 OTU 数量与  $\alpha$  多样性指数的影响Table 2 Effect of different treatments of *Aspergillus niger* agent on the rhizosphere soil bacterial OTU numbers and alpha diversity indices of watermelon

处理	OTU 数量	Chao1 指数	ACE 指数	香农指数	辛普森指数	覆盖率
Treatment	OTU number	Chao1 index	ACE index	Shannon index	Simpson index	Coverage (%)
CK	2 998.67±280.82a	3 818.87±332.13a	3 863.66±318.26a	6.72±0.23a	0.003±0.001a	97.20±0.20a
Y	3 072.33±229.25a	4 110.74±111.21a	4 090.93±174.09a	6.88±0.18a	0.003±0.001a	97.00±0.10a
A	3 129.00±106.06a	4 007.39±302.17a	3 998.71±302.85a	6.79±0.20a	0.003±0.000a	97.10±0.20a
YA	3 121.67±60.70a	4 049.18±83.66a	4 050.11±64.74a	6.89±0.15a	0.003±0.000a	97.10±0.00a

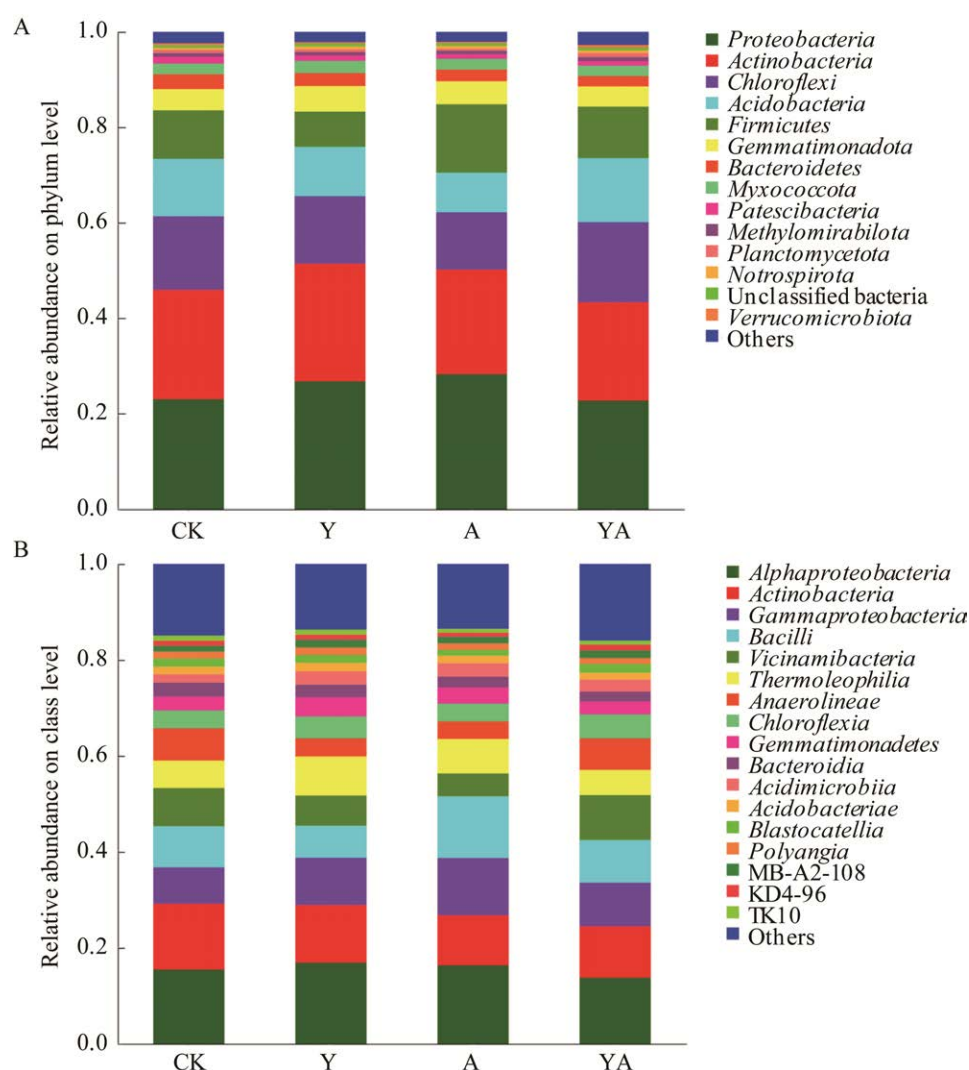
CK、Y、A、YA 注释同表 1; 表中数据为平均值±标准差( $n=3$ ); 同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )Notes on CK, Y, A, YA were the same as Table 1; The values were mean±standard deviation ( $n=3$ ); Different lowercase letters in the same column indicated significant differences between samples ( $P<0.05$ ).

图 1 黑曲霉菌剂不同处理西瓜根际细菌群落组成及相对丰度 A: 门水平. B: 纲水平.

Figure 1 Bacterial community composition and relative abundance in the rhizosphere soil of watermelon under different treatments of *Aspergillus niger* agent. A: Phylum level. B: Class level.

弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和芽单胞菌门(*Gemmatimonadota*), 总占比达 86.01%–87.23%。其中相对丰度最高的为 *Proteobacteria*, 在上述 3 组处理中所占丰度比例依次为 A (28.26%)>Y (26.74%)>YA (22.61%), 各组间差异不显著(图 1A)。不同处理西瓜根际土壤细菌在纲水平上的优势种群主要为  $\alpha$ -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)、 $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、芽孢杆菌纲

(*Bacilli*)、*Vicinamibacteria* 及嗜热油菌纲(*Thermoleophilia*) (图 1B)。

西瓜根际土壤中的优势细菌在科水平上主要为芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)、*Vicinamibacteraceae*、芽单胞菌科(*Gemmatimonadaceae*)、亚硝化单胞菌科(*Nitrosomonadaceae*)、小单胞菌科(*Micromonosporaceae*)、黄色杆菌科(*Xanthobacteraceae*)和假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)等(图 2A)。一些优势种群在

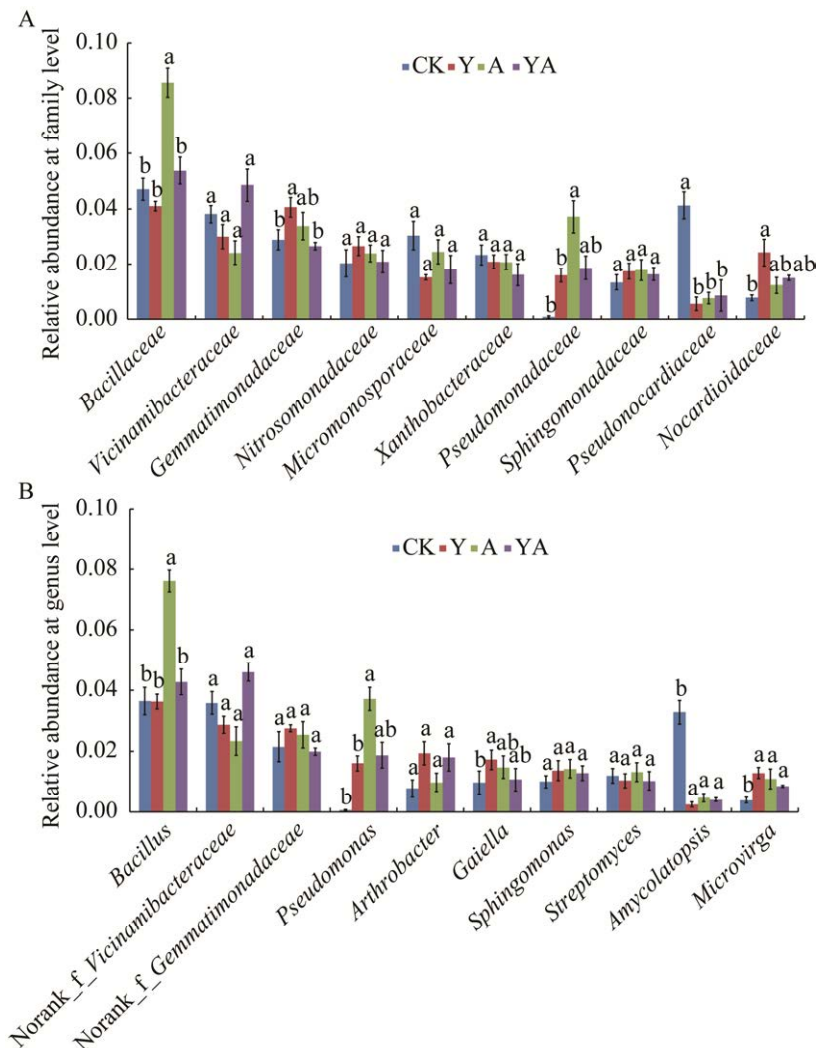


图 2 黑曲霉菌剂不同处理西瓜根际优势细菌相对丰度 A: 科水平. B: 属水平. 图中数据为平均值 $\pm$ 标准差( $n=3$ ); 柱状图上方不同小写字母表示对应优势细菌相对丰度在不同处理组差异显著( $P<0.05$ )

Figure 2 Relative abundance of the top 10 rhizosphere soil bacteria of watermelon under different treatments of *Aspergillus niger* agent. A: Family level. B: Genus level. The values were mean $\pm$ standard deviation ( $n=3$ ); Different lowercase letters on the top of the bar indicated significant differences of the relative abundance of the dominant bacteria among the samples ( $P<0.05$ ).



不同处理中相对丰度存在显著差异,如 Y 处理根际 *Gemmatimonadaceae* 和 *Nocardioidaceae* 相对丰度分别较对照从 2.89%和 0.79%明显提高到 4.06%和 2.43%, A 处理根际 *Bacillaceae* 相对丰度较对照从 4.70%显著提高到 8.57%, *Pseudomonadaceae* 从 0.08%显著提高到 3.72% ( $P<0.05$ )。在属水平上氨基寡糖素(A)处理芽孢杆菌属(*Bacillus*)相对丰度较对照从 3.64%显著提高到 7.61%,假单胞菌属(*Pseudomonas*)相对丰度较对照从 0.05%显著提高到 3.71%。同时发现 3 组处理微枝形杆菌属(*Microvirga*)相对丰度较对照均有所提高,而 *Amycolatopsis* 相对丰度明显降低(图 2B)。

## 2.3 黑曲霉菌剂不同处理西瓜根际土壤细菌群落结构

### 2.3.1 细菌群落结构相似性与差异性

通过主坐标分析(PCoA)来评估黑曲霉菌剂不同处理条件下西瓜根际细菌群落结构的相似性和差异性。结果表明,处理组与对照组在第一坐标轴上能够明显区分开,即对应的微生物群落组成结构存在显著差异(ANOSIM,  $P=0.015$ )。3 组处理西瓜根际细菌群落结构相似性较高,不能完全区分开(图 3)。各组处理重复样本距离相对较远,可能与菌群空间分布的复杂性和不均匀性有关。

### 2.3.2 土壤理化性质对根际细菌群落结构及优势种群的影响

为了研究不同处理土壤理化性质对根际细菌群落结构的影响,通过冗余分析(RDA)得到微生物群落在属水平与土壤因子的关系(图 4)。第 1、2 排序轴对土壤细菌群落变化的解释率为 32.43%和 18.37%,总解释率达 50.80%,说明该图能够反映西瓜根际土壤细菌群落结构与土壤理化因子之间的相关性。RDA 分析结果表明,

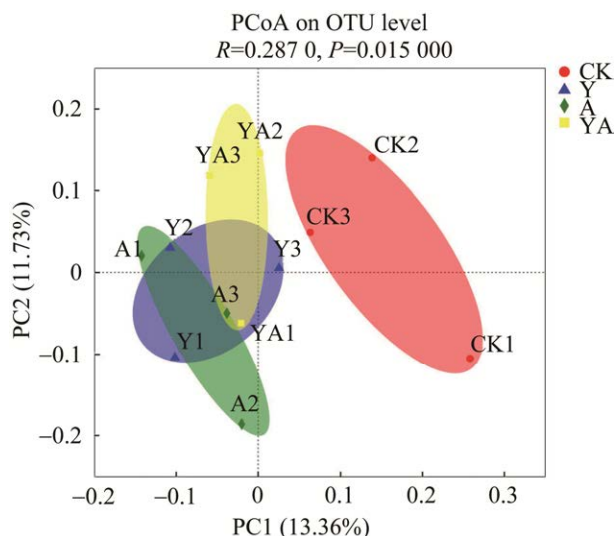


图 3 基于 PCoA 分析黑曲霉菌剂不同处理西瓜根际细菌群落结构差异

Figure 3 Community structure variance of the rhizosphere soil bacteria of watermelon under different treatments of *Aspergillus niger* agent based on PCoA analysis.

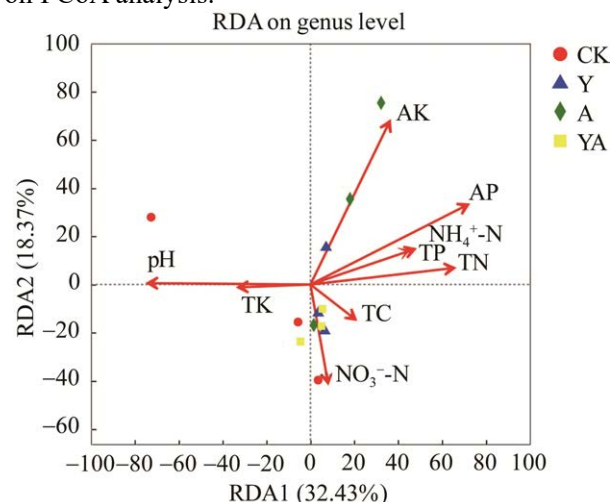


图 4 黑曲霉菌剂不同处理西瓜根际细菌群落结构与土壤理化性质关联分析 TC: 有机质; TN: 全氮; TP: 全磷; TK: 全钾; AP: 速效磷; AK: 速效钾;  $\text{NO}_3^-$ -N: 硝态氮;  $\text{NH}_4^+$ -N: 铵态氮. 下同  
Figure 4 Redundancy analyses of rhizosphere bacterial community structure and soil physicochemical properties of watermelon under different treatments of *Aspergillus niger* agent. TC: Total organic matter; TN: Total nitrogen; TP: Total phosphorus; TK: Total potassium; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium;  $\text{NO}_3^-$ -N: Nitrate nitrogen;  $\text{NH}_4^+$ -N: Ammonium nitrogen. The same below.



土壤中全氮(TN)、速效磷(AP)与西瓜优势细菌种群呈明显正相关,与土壤 pH 负相关。土壤 pH、速效磷(AP)含量与土壤细菌群落结构相关性最大,其次是全氮(TN)、全磷(TP)、铵态氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ),有机质(TC)和全钾(TK)的影响较小。

通过 Spearman 相关性热图评估土壤中科水平相对丰度前 30 优势细菌与土壤理化性质的相关性(图 5)。结果表明,芽单胞菌科(*Gemmatimonadaceae*)与全钾(TK)呈显著负相关( $r=-0.608$ ,  $P=0.036$ ),与铵态氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )呈显著

正相关( $r=0.690$ ,  $P=0.013$ )。假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)与全氮( $r=0.678$ ,  $P=0.015$ )、全磷( $r=0.694$ ,  $P=0.012$ )和速效钾( $r=0.615$ ,  $P=0.033$ )呈显著正相关,与速效磷呈极显著正相关( $r=0.762$ ,  $P=0.004$ )。类诺卡氏菌科(*Nocardioideae*)与铵态氮呈显著正相关( $r=0.690$ ,  $P=0.013$ ),与 pH 呈极显著负相关( $r=-0.724$ ,  $P=0.008$ )。微球菌科(*Micrococcaceae*)与 pH 呈显著负相关( $r=-0.668$ ,  $P=0.018$ )。优势菌群与土壤有机质具有相关性但未达到显著水平。

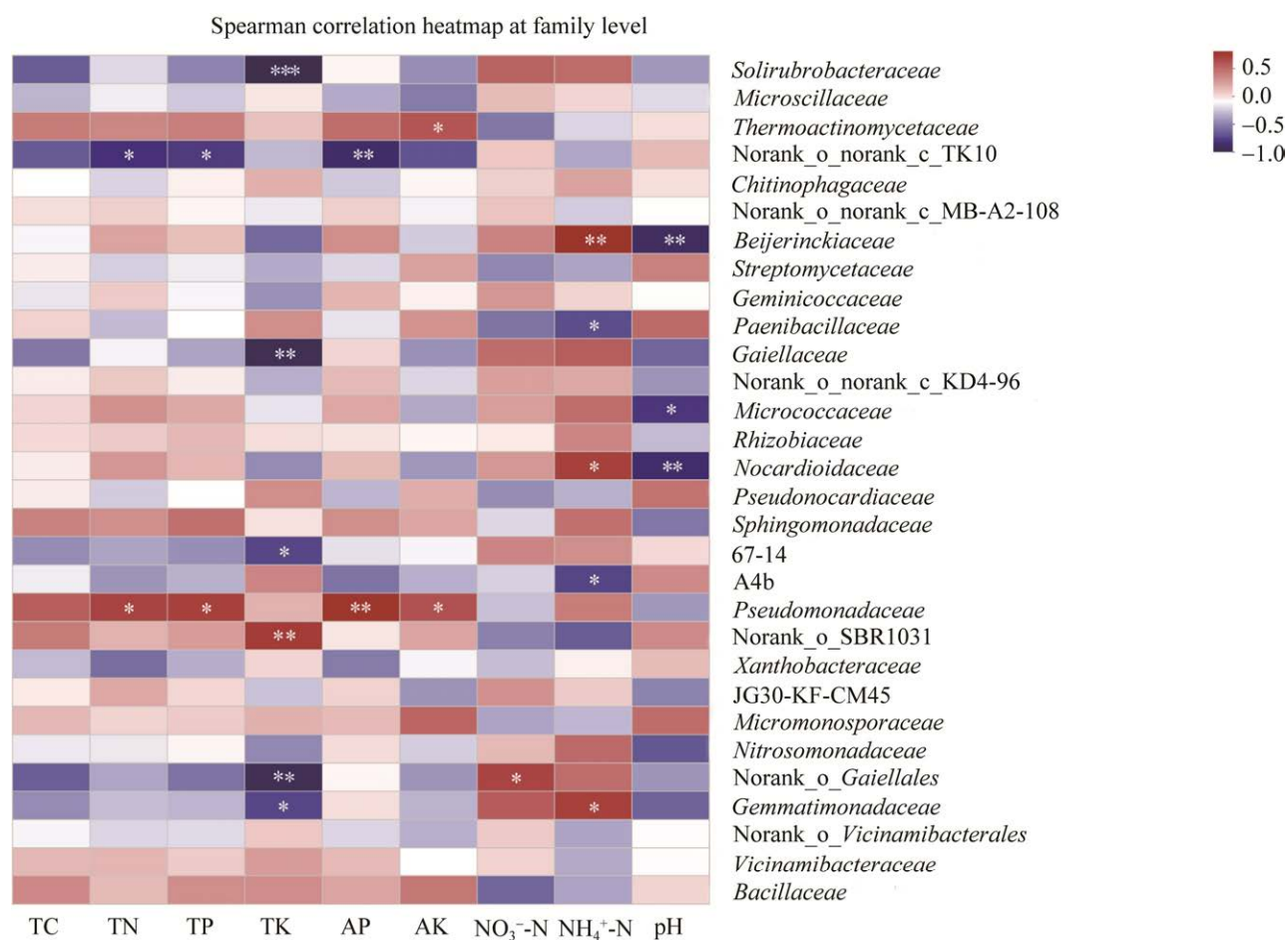


图 5 科水平西瓜根际优势细菌与土壤理化性质 Spearman 相关性分析

Figure 5 Spearman correlation analysis of the dominant rhizosphere bacteria at family level and soil physicochemical properties of watermelon. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

### 3 讨论与结论

根际是植物与外界环境进行物质与能量交换的主要场所,根际微生物群落与植物健康及抗病性密切相关<sup>[13]</sup>。高通量测序技术的飞速发展,为研究根际土壤微生物群落的物种组成、多样性及群落结构提供了先进方法和手段。微生物菌剂可通过有益微生物的生理代谢活动改善土壤微生物群落组成和整体活性,促进根际土壤养分转化及提高土壤肥力,从而维持植物健康生长并降低土传病害发生<sup>[14]</sup>。马慧媛等<sup>[5]</sup>报道指出以芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)和哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)为有效菌种的微生物菌剂处理能够提高茄子根际土壤细菌 Shannon 指数,降低 Simpson 指数,而 ACE 和 Chao1 指数差异不显著。肖蓉等<sup>[15]</sup>研究表明,抗重茬复合微生物菌剂施用后苹果园土壤细菌 OTU 总数和香农-威纳指数均提高。本研究表明,黑曲霉菌剂单独穴施或与氨基寡糖素配施处理,细菌总 OTU 数量以及 Chao1、ACE 和 Shannon 等细菌  $\alpha$  多样性指数均有不同程度增加,说明上述处理能够在一定程度上提高土壤细菌群落丰富度和多样性。氨基寡糖素是一种对环境友好的植物诱抗剂,具有降低病虫害、抗逆增产、提高植物品质及改良土壤微生态的效果<sup>[16]</sup>。目前已有氨基寡糖素对小麦、棉花等多种作物防病增产作用的报道<sup>[17]</sup>,但围绕氨基寡糖素对作物根际土壤微生物群落影响的报道相对较少。本研究发现,氨基寡糖素单独处理或黑曲霉菌剂与氨基寡糖素配施,西瓜根际土壤全氮、全磷、速效磷和速效钾等指标较对照明显增加,且芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等有益细菌相对丰度明显增加,说明黑曲霉菌剂与氨基寡糖素配施具有增加西瓜根际细菌多样性、提高有益细菌丰度以及增强西瓜根际土壤肥力的作用,为黑曲霉菌剂田间

应用方式提供了理论依据。

变形菌门(*Proteobacteria*)作为土壤细菌群落的一大类,在多种植物根际微生物中占优势,甚至具有最高丰度<sup>[18]</sup>。本研究发现,黑曲霉菌剂不同处理条件下,西瓜根际土壤细菌群落组成总体相似,在门水平上相对丰度最高的为变形菌门,这可能与其在根际环境中增长速度快有关,同时变形菌门一些菌株具有固氮功能,其丰度增加有利于土壤氮素的有效转化<sup>[19-20]</sup>。前期研究表明,微生物菌剂处理能够提高芽孢杆菌目(*Bacillales*)、噬纤维菌目(*Cytophagales*)、假单胞菌目(*Pseudomonadales*)丰度,且这些菌目中多数为有益菌<sup>[5]</sup>。Tao 等<sup>[21]</sup>也研究发现,生物有机肥能够刺激与植物抑菌相关的多种微生物菌群如假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)等生长繁殖,抵御病原菌对植物的侵染从而增强植物诱导抗病性。本研究发现一些优势种群在处理组和对照组中的相对丰度存在显著差异。例如,黑曲霉菌剂处理根际芽孢杆菌科和诺卡氏菌科相对丰度明显提高,氨基寡糖素处理组中假单胞菌在科水平和属水平上的相对丰度较对照显著提高,这些属中一些菌株常被认为是潜在有益细菌。

微生物是土壤养分转化和循环的动力,在土壤中增加具有特殊功能的微生物菌剂能够改善土壤营养状况<sup>[22]</sup>。马慧媛等<sup>[5]</sup>发现施用微生物菌剂对土壤全氮、碱解氮、速效磷和有效钾含量均有增加作用。肖力婷等<sup>[23]</sup>分析表明,微生物菌剂处理显著提高了蜜橘园根际土壤有机质含量,改善了土壤氮、磷、钾养分供应。本研究发现处理组土壤有机质、全氮、全磷、速效磷、速效钾和铵态氮等指标含量较对照均有不同程度提高,说明黑曲霉菌剂单独施用或与氨基寡糖素配施处理均能有效改善土壤理化性质、提高西瓜根际土壤肥力。土壤养分能够直接或间接影响土壤微

生物群落组成和作物健康,如土壤有机质、氮和磷含量高的生境更适合土壤细菌的生长,土壤细菌多样性也随之增加<sup>[24-25]</sup>。微生物群落组成和动态变化受多种土壤理化因素协同作用,其中土壤pH被认为是影响土壤细菌群落结构的主要因素<sup>[26]</sup>。林叶春等<sup>[27]</sup>研究表明,土壤pH和有机质含量是影响植烟土壤微生物群落结构变化的主要因素。徐接亮等<sup>[28]</sup>指出土壤pH和电导率是引起土壤细菌群落变化的主要因子。本研究发现西瓜根际细菌群落结构与土壤速效养分、有机质和pH具有显著相关性。

微生物菌剂施用已经成为目前改善土壤理化和生物性状、防治土壤生态环境污染、保障果蔬优质高产的重要措施。柳晓磊等<sup>[29]</sup>采用复合微生物菌剂和氨基酸水溶肥组合处理,发现香蕉土壤有效磷和速效钾含量极显著上升,罗氏菌属(*Rhodanobacter*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)物种丰度都明显升高,即对土壤理化性状和微生物具有明显的改良和改善作用。本研究在前期已明确黑曲霉菌剂具有促生增产及根结线虫防控作用的基础上,发现该菌剂单独施用或与氨基寡糖素配施可调节西瓜根际土壤细菌群落结构,提高根际细菌多样性,增加有益细菌如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)丰度,使得西瓜根际微生物群落朝健康、稳定的方向发展。相关研究结果能够为黑曲霉菌剂作用机理解析提供理论依据,并且为黑曲霉菌剂配施氨基寡糖素在实际生产中的应用提供参考,从而为保障西瓜产业高质量发展提供有效途径。

## REFERENCES

- [1] 常芳娟, 张贵云, 张丽萍, 吕贝贝, 刘珍, 范巧兰, 姚众. 生物熏蒸配施微生物菌剂对西瓜连作土壤真菌群落结构的影响[J]. 中国生态农业学报, 2022, 30(2): 248-257.  
CHANG FJ, ZHANG GY, ZHANG LP, LÜ BB, LIU Z, FAN QL, YAO Z. Effects of biological fumigation combined with microbial agents on fungi community structure in continuous watermelon cropping soil[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2022, 30(2): 248-257 (in Chinese).
- [2] LAROUSSE M, RANCUREL C, SYSKA C, PALERO F, ETIENNE C, INDUSTRI B, NESME X, BARDIN M, GALIANA E. Tomato root microbiota and *Phytophthora parasitica*-associated disease[J]. Microbiome, 2017, 5(1): 56.
- [3] 祝英, 彭轶楠, 巩晓芳, 张军, 王治业, 郭增祥, 马坤源, 周剑平, 杨晖. 不同微生物菌剂对当归苗生长及根际土微生物和养分的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(3): 511-519.  
ZHU Y, PENG YN, GONG XF, ZHANG J, WANG ZY, GUO ZX, MA KY, ZHOU JP, YANG H. Effects of different microbial agents on growth of *Angelica sinensis* and microorganism population and nutrients of rhizosphere soil[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2017, 23(3): 511-519 (in Chinese).
- [4] 赵帆, 赵密珍, 王钰, 关玲, 庞夫花. 基于高通量测序研究草莓根际微生物群落结构和多样性[J]. 土壤, 2019, 51(1): 51-60.  
ZHAO F, ZHAO MZ, WANG Y, GUAN L, PANG FH. Microbial community structures and diversities in strawberry rhizosphere soils based on high-throughput sequencing[J]. Soils, 2019, 51(1): 51-60 (in Chinese).
- [5] 马慧媛, 黄媛媛, 刘胜尧, 徐炳雪, 黄亚丽, 范凤翠, 贾振华, 宋水山. 微生物菌剂施用对设施茄子根际土壤养分和细菌群落多样性的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 140-150.  
MA HY, HUANG YY, LIU SY, XU BX, HUANG YL, FAN FC, JIA ZH, SONG SS. Effects of microbial agents on nutrient and bacterial community diversity in rhizosphere soil of eggplant cultivated in facilities[J]. Microbiology China, 2020, 47(1): 140-150 (in Chinese).
- [6] 宋以玲, 于建, 陈士更, 肖承泽, 李玉环, 苏秀荣, 丁方军. 复合微生物菌剂对棉花生理特性及根际土壤微生物和化学性质的影响[J]. 土壤, 2019, 51(3): 477-487.  
SONG YL, YU J, CHEN SG, XIAO CZ, LI YH, SU XR, DING FJ. Effects of complex microbial agent on cotton physiological characteristics, microorganism and physicochemical properties in rhizosphere soil[J]. Soils, 2019, 51(3): 477-487 (in Chinese).
- [7] LEE SI, LEE KJ, CHUN HH, HA S, GWAK HJ, KIM HM, LEE JH, CHOI HJ, KIM HH, SHIN TS, PARK HW, KIM JC. Process development of oxalic acid production in submerged culture of *Aspergillus niger* F22 and its biocontrol efficacy against the root-knot nematode

- Meloidogyne incognita*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(3): 345-352.
- [8] 张涛涛, 董丹, 赵娟, 李永达, 刘霆. 两种微生物杀线剂联合噻唑膦对西瓜根结线虫病的防治效果[J]. 黑龙江农业科学, 2022, 2022(5): 50-53.
- ZHANG TT, DONG D, ZHAO J, LI YD, LIU T. Control effects of two bio-nematicides combined with fosthiazate on watermelon root knot nematode disease[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2022, 2022(5): 50-53 (in Chinese).
- [9] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版社, 2000.
- CHENG LJ, XUE QH. Experimental Techniques of Microbiology[M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2000 (in Chinese).
- [10] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000 (in Chinese).
- [11] MORI H, MARUYAMA F, KATO H, TOYODA A, DOZONO A, OHTSUBO Y, NAGATA Y, FUJIYAMA A, TSUDA M, KUROKAWA K. Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes[J]. DNA Research, 2014, 21(2): 217-227.
- [12] XU N, TAN GC, WANG HY, GAI XP. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure[J]. European Journal of Soil Biology, 2016, 74: 1-8.
- [13] HOU DD, WANG RZ, GAO XY, WANG K, LIN Z, GE J, LIU T, WEI S, CHEN WK, XIE RH, YANG XE, LU LL, TIAN SK. Cultivar-specific response of bacterial community to cadmium contamination in the rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Environmental Pollution, 2018, 241: 63-73.
- [14] ZHENG Y, CHEN F, WANG M. Use of *Bacillus*-based biocontrol agents for promoting plant growth and health[M]//Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012: 243-258.
- [15] 肖蓉, 孙海峰, 聂园军, 张春芬, 邓舒, 孟玉平, 王建斌, 曹秋芬. 复合微生物菌剂对重茬苹果园土壤细菌群落的影响[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 301-309.
- XIAO R, SUN HF, NIE YJ, ZHANG CF, DENG S, MENG YP, WANG JB, CAO QF. Effect of complex microbial agent on the soil bacterial communities in apple replanted orchard[J]. Microbiology China, 2016, 43(2): 301-309 (in Chinese).
- [16] 吴玉星, 王亚娇, 韩森, 栗秋生, 孔令晓. 氨基寡糖素与吡唑醚菌酯混用防治小麦白粉病的减施增效作用[J]. 农药, 2022, 61(6): 449-452, 464.
- WU YX, WANG YJ, HAN S, LI QS, KONG LX. Effect of reduced application of pesticides during the control of wheat powdery mildew by mixed use of amino-oligosaccharins and pyraclostrobin[J]. Agrochemicals, 2022, 61(6): 449-452, 464 (in Chinese).
- [17] 袁新琳, 李美华, 于丝丝, 崔燕华, 张银宝, 王兰. 5%氨基寡糖素诱导棉花抗枯黄萎病研究[J]. 中国棉花, 2016, 43(3): 15-18, 21.
- YUAN XL, LI MH, YU SS, CUI YH, ZHANG YB, WANG L. Cotton resistance induced by 5% amino-oligosaccharin to *Fusarium* wilt and *Verticillium* wilt[J]. China Cotton, 2016, 43(3): 15-18, 21 (in Chinese).
- [18] TAN L, GU SS, LI S, REN ZH, DENG Y, LIU ZH, GONG ZH, XIAO WJ, HU QL. Responses of microbial communities and interaction networks to different management practices in tea plantation soils[J]. Sustainability, 2019, 11(16): 4428.
- [19] DEANGELIS KM, BRODIE EL, DESANTIS TZ, ANDERSEN GL, LINDOW SE, FIRESTONE MK. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots[J]. The ISME Journal, 2009, 3(2): 168-178.
- [20] RING E, HÖGBOM L, JANSSON G. Effects of previous nitrogen fertilization on soil-solution chemistry after final felling and soil scarification at two nitrogen-limited forest sites[J]. Canadian Journal of Forest Research, 2013, 43(4): 396-404.
- [21] TAO CY, LI R, XIONG W, SHEN ZZ, LIU SS, WANG BB, RUAN YZ, GEISEN S, SHEN QR, KOWALCHUK GA. Bio-organic fertilizers stimulate indigenous soil *Pseudomonas* populations to enhance plant disease suppression[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 137.
- [22] 沈仁芳, 赵学强. 土壤微生物在植物获得养分中的作用[J]. 生态学报, 2015, 35(20): 6584-6591.
- SHEN RF, ZHAO XQ. Role of soil microbes in the acquisition of nutrients by plants[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(20): 6584-6591 (in Chinese).
- [23] 肖力婷, 杨慧林, 黄文新, 付学琴. 生草栽培对南丰蜜橘园土壤微生物群落结构与功能特征的影响[J]. 核农学报, 2022, 36(1): 190-200.
- XIAO LT, YANG HL, HUANG WX, FU XQ. Effects of grass cultivation on soil microbial community structure and functional characteristics in Nanfeng tangerine

- orchard[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(1): 190-200 (in Chinese).
- [24] DELGADO-BAQUERIZO M, REICH PB, KHACHANE AN, CAMPBELL CD, THOMAS N, FREITAG TE, ABU AL-SOUD W, SØRENSEN S, BARDGETT RD, SINGH BK. It is elemental: soil nutrient stoichiometry drives bacterial diversity[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(3): 1176-1188.
- [25] 何玉实, 何彤慧, 赵明涛, 陈向全, 崔乔. 鄂尔多斯台地盐沼滩地微生物群落与土壤条件分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 911-923.
- HE YS, HE TH, ZHAO MT, CHEN XQ, CUI Q. Microbial communities and soil conditions in the salt marshes of Ordos platform[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 911-923 (in Chinese).
- [26] 朱瑞芬, 刘杰淋, 王建丽, 韩微波, 申忠宝, 李达. 两种不同生境羊草根际土壤细菌群落多样性与环境因子的研究[J]. 草地学报, 2020, 28(3): 652-660.
- ZHU RF, LIU JL, WANG JL, HAN WB, SHEN ZB, LI D. Study on bacterial community diversity and environmental factors in rhizosphere soil of *Leymuschinensis*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2020, 28(3): 652-660 (in Chinese).
- [27] 林叶春, 李雨, 陈伟, 陈懿, 高维常, 和凤梅, 黄化刚, 潘文杰. 绿肥压青对喀斯特地区植烟土壤细菌群落特征的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2018(3): 161-167.
- LIN YC, LI Y, CHEN W, CHEN Y, GAO WC, HE FM, HUANG HG, PAN WJ. Effects of green manures on the bacterial community characteristics of the rhizosphere soil in flue-cured tobacco[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2018(3): 161-167 (in Chinese).
- [28] 徐接亮, 张风华, 李变变, 王家平, 程志博. 施肥对油莎豆根际微生物群落特性的影响[J]. 干旱区研究, 2021, 38(6): 1741-1749.
- XU JL, ZHANG FH, LI BB, WANG JP, CHENG ZB. Effect of fertilization on the characteristics of soil microbial community in the rhizosphere of *Cyperus esculentus* in the sandy area of Xinjiang[J]. Arid Zone Research, 2021, 38(6): 1741-1749 (in Chinese).
- [29] 柳晓磊, 齐钊, 闫臻, 徐敏, 陈剑山, 张曼丽, 骆娟, 熊睿, 程玉, 李阳, 何文娅, 李鹏, 汤华. 复合微生物菌剂与氨基酸水溶肥组合施用对香蕉土壤理化性质及微生物群落的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2019(1): 151-158.
- LIU XL, QI Z, YAN Z, XU M, CHEN JS, ZHANG ML, LUO J, XIONG R, CHENG Y, LI Y, HE WY, LI P, TANG H. Effects of compound microbial fertilizer and amino acid water-soluble fertilizer on physic-chemical properties and microbial community structures in banana soil[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2019(1): 151-158 (in Chinese).