

若尔盖高原湿地不同退化阶段的 土壤细菌群落多样性

唐杰 徐青锐 王立明 丁祥 汤博 吴俐莎 冯甦 孙群 杨志荣 张杰*

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 四川 成都 610064)

摘要: 采用传统分离培养和基于 16S rDNA 的变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)方法,研究了若尔盖高原湿地不同退化阶段土壤类型(泥炭土、沼泽土、草甸土、风沙土)和土壤深度(0-20 cm、20 cm-40 cm、40 cm-60 cm)中微生物的数量、细菌群落结构及其多样性。结果表明:微生物数量总体上不仅随着土壤类型的改变而减少(泥炭土>草甸土>沼泽土>风沙土),也随着土壤深度的增加而递减(0-20 cm>20 cm-40 cm>40 cm-60 cm)。细菌群落结构受土壤类型的影响比土壤深度大。细菌群落多样性大体上随土壤类型的变化而减少(泥炭土>风沙土>草甸土>沼泽土),而在土壤深度方面无明显的递变趋势。另外,微生物总数与土壤有机质、全氮和 pH 显著相关,而细菌群落多样性与土壤 pH 呈极显著负相关性。回收 DGGE 图谱中 10 个优势条带进行测序分析,结果显示,其中 7 个鉴定为 γ -Proteobacteria (γ -变形菌纲),1 个鉴定为 α -Proteobacteria (α -变形菌纲),其余 2 个属于 Bacteroidetes (拟杆菌门),说明 Proteobacteria (变形菌门)为若尔盖湿地土壤中的优势细菌类群。

关键词: 若尔盖, 湿地退化, 土壤细菌群落, PCR-DGGE

Soil bacterial community diversity under different stages of degradation in zoige wetland

TANG Jie XU Qing-Rui WANG Li-Ming DING Xiang TANG Bo WU Li-Sha
FENG Su SUN Qun YANG Zhi-Rong ZHANG Jie*

(Key Laboratory of Bio-resources and Bio-environment, Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: Both culture-dependent and culture-independent methods, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) based on the sequence of 16S rDNA, were used to examine the microbial quantity, bacterial community structure and diversity in different soil types (Peat soil, Swamp soil, Meadow soil and Sandy

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2007BAC18B02, 2007BAC18B03); 四川省应用基础项目(No. 2007J13-077)

*通讯作者: Tel: 86-28-85418810; 信箱: zhangjfy@scu.edu.cn

收稿日期: 2010-12-22; 接受日期: 2011-02-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

soil) and soil depths (0–20 cm, 20 cm–40 cm and 40 cm–60 cm) under different stages of degradation in Zoige Wetland. Experimental results showed that total microbial quantity decreased with the soil types (Peat soil>Meadow soil>Swamp soil>Sandy soil) and declined with soil depths (0–20 cm>20 cm–40 cm>40 cm–60 cm). Bacterial community structure was affected by soil type more primarily than by soil depth. Bacterial community diversity generally declined with soil types (Peat soil>Sandy soil>Meadow soil>Swamp soil). However, no significant tendency was found for the soil depth. In addition, the total microbial quantity was strongly correlated with organic matter, total nitrogen and pH, and bacterial community diversity exhibited significant negative correlation with pH. Ten bands were excised from the DGGE gel and re-amplified for 16S rDNA sequencing. Based on the sequencing results, seven bands can be identified as related to γ -Proteobacteria, one close to α -Proteobacteria, and the other two belong to Bacteroidetes. These results provide evidence that Proteobacteria are the domain bacterial communities in the soil of Zoige Wetland.

Keywords: Zoige, Wetland degradation, Soil bacterial community, PCR-DGGE

湿地是介于陆地和 水体之间、兼有水陆特征的过渡性生态系统,也是维系地球表层生物多样性和生态平衡的重要生态系统^[1]。若尔盖湿地位于全球气候变化最为敏感的地区之一——青藏高原东部,是我国独有的青藏高原湿地的重要组成部分。因为该区域对全球气候变化和人类干扰具有高度的敏感性,所以被认为是研究全球生物多样性和人类干扰影响的理想场所。据有报道以来,若尔盖湿地从 20 世纪 60 年代开始退化,在 70 年代过后由于受到多种因素的影响如:气温升高、降水减少、过度放牧、开沟排水和农业开垦等,退化程度更加严重。如何处理好经济发展与环境保护的关系在这个地区显得尤为重要,因为若尔盖湿地具有调节水资源平衡、稳定流域内的生态平衡等重要作用,所以它的生态意义远大于其经济功能,在我国湿地中占有不可替代的地位^[2-6]。

土壤微生物是湿地生态系统的重要组成部分,在湿地系统的物质循环和能量流动过程中发挥着关键作用,它们的结构和功能通常作为反映土壤质量和肥力的指标^[7]。而土壤退化加速了湿地土壤水分蒸发、降低了湿地植被覆盖度、改变了土壤的理化性质^[5,8],进而影响了湿地生态系统微生物的多样性。

目前,有关土壤退化对湿地土壤微生物多样性影响的研究鲜有报道,尤其是运用微生物分子生态

的方法研究湿地微生物多样性的报道更少。因此,本实验通过可培养的方法对不同退化阶段土壤类型、深度下的细菌、真菌、放线菌等微生物进行计数,并以扩增土壤细菌 16S rDNA 目的片段和变性梯度凝胶电泳(DGGE)相结合的方法,探讨湿地土壤退化过程中微生物数量和细菌群落结构变化,以期从微观的角度来评价土壤退化对土壤微生物多样性的影响,为若尔盖高原湿地生态系统的管理、恢复、稳定和发展提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

若尔盖高原湿地的主体位于四川省阿坝藏族羌族自治州的红原县和若尔盖县,其范围为 101°30' E–103°30' E, 32°20' N–34°00' N, 平均海拔约 3 500 m,是世界上典型的高原湿地,也是我国面积最大的高原泥炭沼泽集中分布区。气候为大陆性高原气候,主要特点为:长冬短夏、霜冻期长、干湿季分明,年平均降水量为 650 mm–750 mm,年平均气温 0.7 °C–1.1 °C。区内植物以沼泽植被和草甸植被为主^[9]。近年来,由于湿地退化越来越严重,土壤类型也发生了相应的退化演替,其演替序列为“原生型土壤(泥炭土和沼泽土)→过渡型土壤(草甸土)→退化型土壤(风沙土)”^[8],从而最终导致若尔盖高原湿地系统的生态功能衰退。

1.2 土样采集

样品于2009年9月采自若尔盖高原湿地(图1), 选择具有代表性的四种不同土壤类型(泥炭土、沼泽土、草甸土、风沙土)的样区, 每种土壤类型设3个重复样区(表1)。每个样区随机确定5个样点, 每个样点按0 cm–20 cm、20 cm–40 cm和40 cm–60 cm 分层采集土样, 将相同层次土样充分混合作为一个样品。用无菌手套采完土样后立即装入已灭菌的封口聚乙烯袋, 迅速放入冰盒保存, 并及时运回实验室进行分析。采集回的土壤样品分成3个部分: 一部分用于测定土壤理化性质的进行风干处理; 另一部分用于微生物分离培养及计数的放入4℃进行保存; 剩余部分用于土壤DNA提取的样品置于–20℃保存。

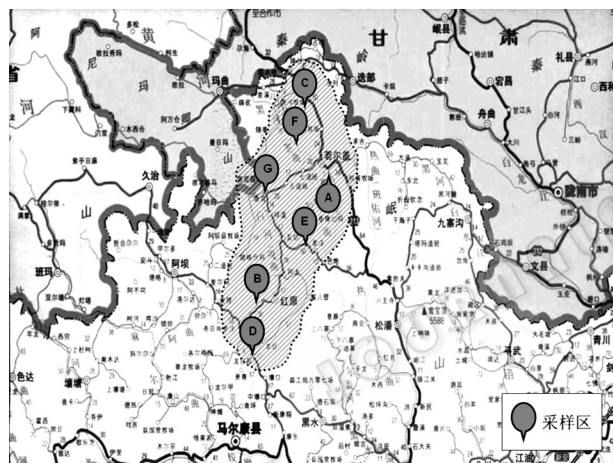


图1 土样采集区分布图

Fig. 1 Distribution of soil sampling sites

注: A: 斑佑; B: 月亮湾; C: 花湖; D: 龙日坝; E: 日干乔; F: 向东牧场; G: 唐克。

Note: A: Banyou; B: Yueliangwan; C: Huahu; D: Longriba; E: Riganqiao; F: Xiangdong pasture; G: Tangke.

1.3 土壤理化性质测定

土壤含水量测定采用烘干法; pH值采用酸度计法; 有机质用重铬酸钾容量法; 全氮用凯氏定氮法; 全磷采用钼锑钒比色法; 全钾采用火焰光度计法。

1.4 土壤微生物的分离和计数

细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基、放线菌采用高氏1号培养基、真菌采用马丁氏-孟加拉红培养基, 均用平板稀释法分别对其进行计数。

土壤类型 Soil type	样区 Site	经纬度 Longitude and Latitude	海拔 Altitude (m)
泥炭土 Peat soil	斑佑	N: 33°34'07" E: 103°02'01"	3 499
	月亮湾	N: 32°46'49" E: 102°30'59"	3 466
	花湖	N: 33°56'09" E: 102°49'45"	3 410
沼泽土 Swamp soil	花湖	N: 33°54'57" E: 102°49'02"	3 392
	龙日坝	N: 32°28'22" E: 102°22'31"	3 519
	日干乔	N: 33°06'25" E: 102°38'33"	3 501
草甸土 Meadow soil	花湖	N: 33°55'04" E: 102°48'58"	3 393
	龙日坝	N: 32°26'11" E: 102°22'38"	3 537
	向东牧场	N: 33°37'31" E: 102°52'31"	3 406
风沙土 Sandy soil	向东牧场	N: 33°38'41" E: 102°50'16"	3 436
	唐克	N: 33°32'19" E: 102°43'33"	3 433
	唐克	N: 33°32'20" E: 102°43'35"	3 440

1.5 细菌 DGGE 分析

1.5.1 土壤总 DNA 提取: 采用美国 MP Biomedical 公司的 Fast DNA SPIN Kit for Soli 试剂盒, 按操作说明对土壤进行总 DNA 的提取与纯化。然后用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 16S rDNA V6–V8 区的 PCR 扩增: 以提取的总 DNA 为模板, 用细菌通用引物: 954f-GC (5'-GC-clamp-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3')及 1369r (5'-GCCCCGGAACGTATTACCG-3')进行扩增, 上游引物 5'端有 40 bp GC 夹 (5'-CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCCCGCCC C-3')^[10]。为减少非特异性扩增, 采用降落 PCR 法。反应体系为 50 μL: 10×*Ex-Taq* buffer 5 μL (TaKaRa), MgCl₂ 4 μL (25 mmol/L), dNTPs 4 μL (2.5 mmol/L), 上、下游引物各 1 μL, *Ex-Taq* DNA 聚合酶 0.25 μL (5 U/μL) (TaKaRa), 模板 1 μL (5 mg/L), 加超纯水至 50 μL。反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 61℃–56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 10 个循环(其中每个循环退火温度降低 0.5℃); 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 25 个循环; 72℃ 10 min。所得 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.5.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)及图像分析: 利用 Dcode™ Universal Mutation Detection System 系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)对 PCR 反应产物进行分离。从每个样品 PCR 产物中取 200 ng DNA 加入到 6% 的聚丙烯酰胺凝胶中, 凝胶

的变性范围为 40%–60% (100%变性相当于 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺)。电泳条件为: 在温度 60 °C 和电压 85 V 下, 电泳 11 h; 电泳缓冲液为 1×TAE。电泳完毕后, 经 SYBR green I (1:10 000 稀释)染色 45 min, 超纯水脱色后, 用 Bio-Rad 公司的凝胶成像系统进行拍照, 并用图形分析软件 (Quantity One 4.5, Bio-Rad)对凝胶图像进行分析。使用 Shannon- Weaver 指数(H)和丰富度(S)评价土壤细菌群落多样性。其计算公式为:

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

式中 S 为某一泳道的条带总数, p_i 为泳道中某一条带的强度同泳道中所有条带强度的比值。

1.5.4 DGGE 条带切胶测序分析: 根据 DGGE 图谱, 挑选一些共有或特有的优势条带, 用无菌手术刀片把选定的条带从凝胶上切割下来, 随即浸泡于 50 μ L 超纯水中, 并置于 4 °C 过夜。用所得的浸提液作为模板进行 PCR 扩增, 引物分别为不含 GC 夹的 954f 和 1369r, PCR 反应体系和扩增程序与之前的相同。得到的 PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒 (Omega) 进行纯化后与克隆载体 (pGEM-T) 连接, 得到的阳性克隆送上海英俊有限公司测序。将测序结果在 GenBank 数据库中进行比对分析, 找出相似序列, 使用 MEGA 4.0 软件绘制系统进化

树。将 16S rDNA 序列上传到 NCBI 数据库中, 序列号为 HM639767–HM639776。

1.5.5 统计分析: 数据分析采用 Microsoft Excel 和 SPSS 13.0 软件进行, 土壤理化性质与土壤微生物总数、土壤细菌群落多样性指数之间进行相关性指数分析。

2 结果与分析

2.1 不同土壤类型、深度的土壤理化性质

土壤样品的理化性质如表 2 所示, 在本研究样区内不同类型、深度间的土壤理化性质存在着明显的差异。土壤含水量、有机碳和全氮的含量随着土壤类型的变化而降低(泥炭土>沼泽土>草甸土>风沙土), 即在泥炭土中含量最高而在风沙土中含量最低。另外, 土壤有机碳和全氮的含量随着土壤深度的增加而降低, 而含水量除了在沼泽土中呈以上趋势外, 在其他 3 种土壤类型(泥炭土、草甸土、风沙土)中随土壤深度的增加而升高。土壤 pH 值在 6.31–8.51 的范围内随土壤类型的变化而升高(泥炭土<风沙土<草甸土<沼泽土), 但在土壤深度方面无明显的变化趋势。土壤全磷在风沙土中含量最低, 而全钾在草甸土中的含量明显高于其它土壤类型, 二者在土壤深度方面也无明显的变化趋势。

表 2 不同土壤类型、深度中土壤理化性质比较

Table 2 Comparison of the soil physicochemical properties in different soil types and depths

土壤类型 Soil type	深度 Depth (cm)	含水量 Water content (%)	pH	有机质 Organic matter (g/kg)	全氮 Total nitrogen (g/kg)	全磷 Total phosphorus (g/kg)	全钾 Total kalium (g/kg)
泥炭土 Peat soil	0–20	57.94±0.33	6.53±0.04	46.29±1.80	2.23±0.02	0.55±0.01	3.64±0.06
	20–40	59.17±0.51	6.62±0.00	41.84±1.05	2.15±0.03	0.51±0.01	2.45±0.06
沼泽土 Swamp soil	40–60	68.92±0.39	6.31±0.02	36.55±2.04	2.05±0.03	0.56±0.01	0.51±0.05
	0–20	50.91±0.77	8.46±0.12	32.66±0.94	1.58±0.02	0.49±0.01	4.28±0.04
	20–40	50.80±1.94	8.42±0.05	29.53±1.11	1.40±0.02	0.54±0.01	1.20±0.01
草甸土 Meadow soil	40–60	43.77±0.55	8.51±0.12	26.31±0.81	1.29±0.02	0.48±0.00	1.40±0.05
	0–20	40.25±1.00	8.28±0.08	28.56±1.74	1.45±0.02	0.55±0.00	8.46±0.02
	20–40	40.82±1.22	8.31±0.08	25.30±0.35	1.20±0.02	0.53±0.00	7.09±0.05
风沙土 Sandy soil	40–60	45.92±2.13	8.26±0.28	23.01±1.18	1.10±0.04	0.55±0.01	13.13±0.22
	0–20	7.58±0.21	7.19±0.01	3.42±0.04	0.18±0.00	0.21±0.01	8.46±0.05
	20–40	8.01±0.07	7.57±0.03	3.04±0.20	0.14±0.01	0.23±0.00	8.29±0.13
	40–60	8.61±0.35	7.97±0.03	2.60±0.32	0.11±0.01	0.23±0.01	9.30±0.07

注: 表中数据为平均数±标准误差, $n=3$ 。

Note: Data in the table are $\bar{x}\pm s$, $n=3$.

2.2 不同土壤类型、深度的土壤微生物数量

由表 3 可以看出, 在若尔盖退化湿地四种不同土壤类型中, 细菌、放线菌数量和微生物总数的变化趋势表现为泥炭土>草甸土>沼泽土>风沙土, 而真菌的数量有着不同的变化趋势, 表现为沼泽土>草甸土>泥炭土>风沙土; 在 3 种不同土壤深度方面, 土壤微生物数量有着明显的垂直分布规律, 即 0–20 cm 的表层土中的微生物数量是最多的, 并随着土层加深而呈现微生物数量减少的趋势。从 3 大类微生物菌群数量来看, 细菌占绝对优势, 放线菌其次, 真菌数量最少。

表 3 不同土壤类型、深度中土壤微生物数量的比较
Table 3 Comparison of the soil microbial quantity in different soil types and depths

土壤类型 Soil type	深度 Depth (cm)	土壤微生物数量($\times 10^4$ CFU/g 干土) Soil microbial quantity ($\times 10^4$ CFU/g dry soil)			
		细菌 Bacteria	真菌 Fungi	放线菌 Actinomycetes	总数 Sum
泥炭土 Peat soil	0–20	292.96 \pm 10.60	0.41 \pm 0.07	129.10 \pm 3.44	422.47
	20–40	188.19 \pm 14.51	0.16 \pm 0.01	116.52 \pm 4.00	304.87
沼泽土 Swamp soil	0–20	81.61 \pm 3.58	1.67 \pm 0.09	9.74 \pm 1.03	93.02
	20–40	17.78 \pm 0.68	0.70 \pm 0.09	2.94 \pm 0.26	21.42
草甸土 Meadow soil	0–20	67.57 \pm 1.90	0.91 \pm 0.09	10.23 \pm 1.23	78.71
	20–40	34.72 \pm 2.77	0.21 \pm 0.02	8.55 \pm 0.28	43.48
风沙土 Sandy soil	0–20	31.24 \pm 4.51	0.12 \pm 0.02	4.79 \pm 0.70	36.15
	20–40	15.55 \pm 2.49	0.06 \pm 0.02	3.34 \pm 0.79	18.95
	40–60	5.64 \pm 1.20	0.04 \pm 0.01	0.87 \pm 0.16	6.55

注: 表中数据为平均数 \pm 标准误差, $n=3$ 。

Note: Data in the table are $\bar{x}\pm s$, $n=3$.

2.3 不同土壤类型、深度的土壤细菌群落结构多样性

2.3.1 DGGE 图谱分析: 通过 DGGE 实验, 得到 12 个土壤样品的 16S rDNA V6–V8 区指纹图谱 (图 2A), 条带的数量代表土壤中的细菌种群数量, 条带的亮暗反映细菌数量的多少。从图中可以看出, 在背景中出现了一些很亮的条带、一些稍弱的条带、以及很多模糊的条带, 表明土壤中细菌种类十分丰富、结构非常复杂。不同土样间具有许多共同的条带, 说明这些供试土壤之间可能存在一些共

有的细菌类型, 然而这些公共条带的强度也不相同, 表明这些细菌在含量上有所不同。各样品中, 强度高的条带在泳道中的迁移率各不相同, 说明每个样品细菌的优势种群各不一样。这些结果都表明, 若尔盖湿地不同退化阶段土壤细菌具有丰富的种群多样性, 同时还说明不同样品的细菌种群结构有所不同。

聚类分析(图 2B)结果表明, 样品按 4 种不同的土壤类型(风沙土: 10、11、12; 沼泽土: 4、5、6; 草甸土: 7、8、9; 泥炭土: 1、2、3)分成 4 个不同的簇, 说明不同土壤类型间的细菌群落结构差异性较大, 并且土壤类型是细菌群落结构最显著的影响因素。而相同土壤类型不同深度间的相似性较高但也存在一定的差异, 说明土壤深度对土壤细菌群落结构也有一定的影响作用。

2.3.2 土壤细菌群落多样性指数: 电泳图谱中条带的多少可直观地反映样品细菌种群的遗传多样性, 而多样性指数是研究群落物种数和个体数的综合指标。根据电泳图谱中每个条带的强度, 对各样品中的细菌多样性指数(H)、丰富度(S)指标进行了分析(表 4)。结果表明, 在所有处理中 Shannon-Weaver 指数随着土壤类型而发生变化, 其变化趋势为泥炭土>风沙土>草甸土>沼泽土; 而在土壤深度方面, 除沼泽土中最高多样性指数出现在 20 cm–40 cm 土层外, 其它土壤类型都出现在 0–20 cm 的土层中。其中最高值为泥炭土 0–20 cm 土层的 3.91 \pm 0.02, 最低值为沼泽土 40 cm–60 cm 土层的 2.98 \pm 0.01。

2.3.3 DGGE 条带的测序分析: 为了更加深入的了解土壤中的主要优势菌群, 将优势条带切胶分离并测序, 共得到 Band A–J (图 2A)共 10 个条带, 测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对(表 5), 结果显示, 所有序列与 GenBank 数据库中的相似度在 97%以上。从 DGGE 优势条带的系统进化树(图 3)中可以看出, 挑选的条带主要分为 3 大类群, 包括 α -Proteobacteria (α -变形菌纲)、 γ -Proteobacteria (γ -变形菌纲)和 Bacteroidetes (拟杆菌门), 其中 γ -Proteobacteria (γ -变形菌纲)为土壤中的优势类群, 10 个条带中有 7 个(Band B, C, D, F, G, H, I)属于这一类群, 1 个(Band A)属于 α -Proteobacteria (α -变形菌

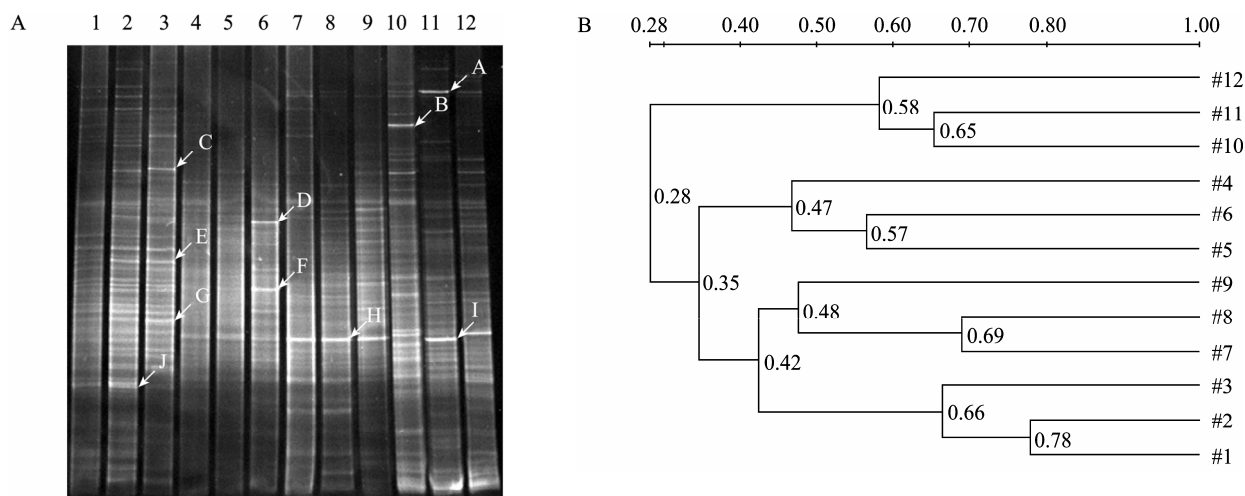


图2 土壤样品 16S rDNA 扩增片段的 DGGE 图谱(A)和聚类分析图(B)

Fig. 2 DGGE patterns (A) and UPGMA dendrogram (B) of 16S rDNA fragments amplified with DNA from soil samples

注: 1-3: 泥炭土(0-20 cm, 20 cm-40 cm, 40 cm-60 cm); 4-6: 沼泽土(0-20 cm, 20 cm-40 cm, 40 cm-60 cm); 7-9: 草甸土(0-20 cm, 20 cm-40 cm, 40 cm-60 cm); 10-12: 风沙土(0-20 cm, 20 cm-40 cm, 40 cm-60 cm)。字母标记条带被切取测序。

Note: 1-3: Peat soil (0-20 cm, 20 cm-40 cm, 40 cm-60 cm); 4-6: Swamp soil (0-20 cm, 20 cm-40 cm, 40 cm-60 cm); 7-9: Meadow soil (0-20 cm, 20 cm-40 cm, 40 cm-60 cm); 10-12: Sandy soil (0-20 cm, 20 cm-40 cm, 40 cm-60 cm). Alphabetic marked bands were excised for sequencing.

表4 土壤细菌群落多样性指数
Table 4 Soil bacterial community diversity index

土壤类型 Soil type	Shannon-Weaver 指数(H) Shannon-Weaver index (H)			丰富度(S) Richness (S)		
	0 cm-20 cm	20 cm-40 cm	40 cm-60 cm	0 cm-20 cm	20 cm-40 cm	40 cm-60 cm
泥炭土 Peat soil	3.91±0.02	3.69±0.04	3.45±0.04	43±1.15	46±2.13	42±1.15
沼泽土 Swamp soil	3.04±0.06	3.05±0.02	2.98±0.01	24±0.58	27±0.58	27±1.73
草甸土 Meadow soil	3.21±0.02	3.12±0.06	3.19±0.04	34±0.33	30±1.73	34±1.15
风沙土 Sandy soil	3.44±0.02	3.17±0.01	3.19±0.01	39±0.58	38±1.73	35±0.58

注: 表中数据为平均数±标准误差, n=3.

Note: Data in the table are $\bar{x} \pm s$, n=3.

表5 DGGE 优势条带测序分析结果
Table 5 Sequencing results of the dominant DGGE bands

条带 Band	编号 Accession No.	菌株(编号) Closest relative (Accession No.)	相似性 Identity (%)
A	HM639767	Uncultured alpha proteobacterium (EF438230)	97
B	HM639768	Uncultured bacterium (EU815218)	98
C	HM639769	Uncultured bacterium (EU448730)	98
D	HM639770	<i>Shigella sonnei</i> (X80726)	99
E	HM639771	Uncultured Bacteroidetes bacterium (EU283366)	98
F	HM639772	<i>Shigella sonnei</i> (GU968164)	99
G	HM639773	Uncultured <i>Klebsiella</i> sp. (GU938598)	99
H	HM639774	Uncultured bacterium (EU694820)	98
I	HM639775	<i>Shigella</i> sp. (GU968176)	98
J	HM639776	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp. (AM934979)	99

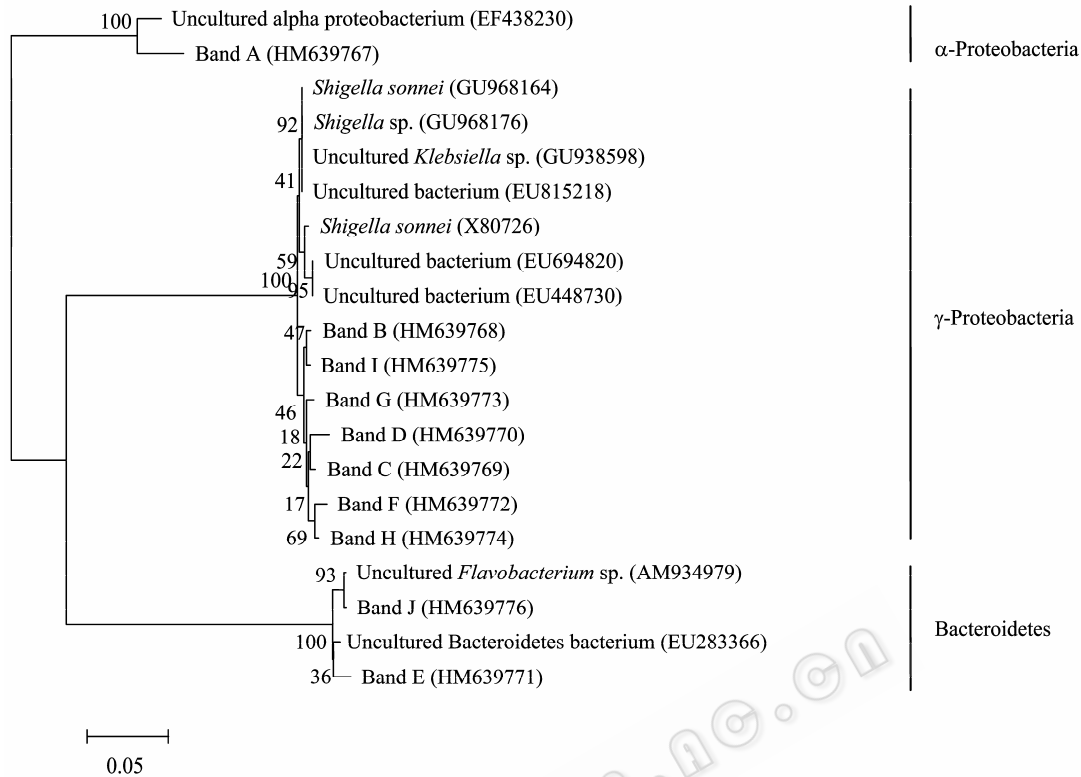


图3 DGGE 优势条带的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the dominant DGGE bands

Note: The tree was evaluated by bootstrap analysis of the neighbor-joining method based on 1000 replications. Sequences from the study are in boldface type. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Value of 1000 bootstrap resamplings that supported the branching orders in each analysis is shown above or near the relevant nodes. Bar: 0.05 sequence divergence.

纲), 其余 2 个(Band E、J)属于 Bacteroidetes (拟杆菌门)。进一步分析发现, DGGE 图谱中分别属于 γ -Proteobacteria 和 Bacteroidetes 的 4 个条带(C、G 和 E、J), 它们所代表的 4 种细菌类群是泥炭土中的优势类群; 条带 D、F 和 H 都属于 γ -Proteobacteria, 它们分别在沼泽土和草甸土中占优势地位; 而属于 α -Proteobacteria 的条带 A 和 γ -Proteobacteria 的条带 B、I 在风沙土中的亮度很强, 说明它们代表的细菌类群在风沙土中的含量很高。

2.4 土壤理化性质与土壤微生物总数、土壤细菌群落多样性指数之间的相关关系分析

统计分析结果表明, 一些土壤理化性质与土壤微生物总数、土壤细菌群落多样性指数之间存在着很好的相关性, 达到了显著性水平($P < 0.05$)或极显著性水平($P < 0.01$)。如: 微生物总数与土壤有机质和全氮分别呈现出($r = 0.712$, $P < 0.01$)和($r = 0.704$, $P < 0.05$)

的正相关性, 与土壤 pH 在 6.31–8.51 的范围内表现出($r = -0.691$, $P < 0.05$)显著负相关性, 即微生物总数随土壤有机质和全氮含量的增加而增加, 随土壤 pH 值的升高而降低。而土壤细菌群落多样性指数与土壤 pH 呈($r = -0.886$, $P < 0.01$)极显著负相关性, 即在 pH 值 6.31–8.51 的范围内细菌群落多样性指数随 pH 值升高而降低。

3 讨论

3.1 土壤理化性质对微生物数量和细菌群落多样性的影响

相关性分析结果表明土壤理化性质中有机质含量对微生物数量的影响非常显著。一些研究者也得出了相同的结论, Landgraf 等^[11]发现高有机质含量的土壤生态系统中往往伴随着高微生物数量。Anderson 等^[12]也发现土壤微生物数量与土壤有机质

含量呈显著正相关关系。同时,土壤全氮含量也是影响土壤微生物数量的重要因素。有研究者发现减少土壤中氮元素缺乏能够增加土壤微生物生长速率和数量,并且氮元素的有效循环在维持生态系统功能方面发挥着重大作用^[13]。另外,土壤 pH 能够对细菌群落多样性产生极显著的影响。许多研究证明,在多种生态系统中 pH 通常与细菌群落结构有很好的相关性^[14-15]。两方面的原因可以解释这种现象:(1) 因为每种细菌对生存环境要求的最适 pH 不同,所以即使 pH 发生细微的变化也会严重影响到细菌群落多样性。(2) pH 也可以通过影响土壤养分供应和植物根系分泌物数量、种类而间接影响细菌群落结构多样性。

3.2 土壤类型对微生物数量和细菌群落多样性的影响

利用传统分离培养法和分子生物学 PCR-DGGE 法对若尔盖高原湿地不同退化阶段土壤微生物数量和细菌群落多样性的分析结果表明,可培养微生物数量和细菌群落多样性在四种土壤类型中差异明显,都呈现出随着土壤类型的改变而变化的趋势,说明土壤类型对微生物数量和细菌群落多样性的影响很显著。此结果与其他人的研究结果相同,张崇邦^[16]等研究了天台山 8 种土壤类型的微生物区系,结果表明微生物数量、细菌生理群分布、组成和多样性与土壤类型关系密切。Xu 等^[17]运用 PCR-DGGE 研究了不同土壤类型对大豆根际细菌群落的影响,结果表明土壤类型能够决定大豆根际土壤细菌群落的多样性。Gelsomino 等^[18]比较了不同地理位置的土壤微生物 DGGE 图谱后指出,土壤类型是决定土壤微生物群落结构的主要因素,相同的土壤类型,土壤微生物群落结构也相似。造成此现象的原因一方面是不同的土壤具有不同的理化性质,如水分、养分、通气、温度和 pH 等;另一方面不同的土壤类型造成了地上不同的植物生长情况和根系分泌物数量、种类的变化,这些都是影响土壤微生物的重要因素。

3.3 土壤深度对微生物数量和细菌群落多样性的影响

本实验结果表明,可培养土壤微生物数量随土

壤深度的增加而减少,这与刘世贵等^[19]、Taylor 等^[20]的研究结果相同。因为有机质在表层土中的含量要高于下层,所以在有机质丰富的表层土壤中,微生物的数量多于养分贫瘠的下层。此外,土壤的通气性也是产生这种现象的原因,下层土壤紧实,通气性差,不能提供给微生物良好的生存和繁殖空间,许多好气性的微生物不能生存和繁殖,因此土壤微生物的数量大大减少。这种土壤微生物随深度增加而减少的特征,表明若尔盖高原湿地生态系统中,表层土壤是物质转化和能量流动最为活跃的层位。而细菌是土壤微生物的主要类群,它个体小、数量多、繁殖快,在物质能量循环中起着关键作用。国内外开展了很多关于土壤细菌群落垂直分布的研究,如李钧敏等^[21]分析了浙江省天台山次生灌丛群落不同土层土壤细菌群落多样性,结果显示多样性随着土层深度的增加而下降;张社奇等^[22]在研究黄土高原刺槐林地土壤微生物垂直分布时发现土壤细菌群落对深度的变化极为显著;Ekelund 等^[23]发现丹麦森林土壤细菌的多样性随着土层深度的增加而变化。造成这种现象的原因也可能是由于在不同层次的土壤中,水分、养分、通气、温度、pH 值等因子的差异及不同细菌的特异性,致使细菌在土壤中的垂直分布和多样性也是不均一的。

3.4 主要土壤细菌类群的分析

对优势 DGGE 条带进行测序后发现,变形菌(α -变形菌和 γ -变形菌)是主要类群。在所有测序条带中,变形菌占分析样品总量的 80%,还有少量的拟杆菌类细菌。许多类似的研究结果表明,变形菌是土壤中的主要群体。Nicomrat 等^[24]对美国西北部煤矿区土壤细菌进行研究,15 条 DGGE 条带测序后,93%的序列为变形菌。Tait 等^[25]对美国马萨诸塞州礁湖土壤细菌进行研究也发现,测序的 25 条条带序列中 72%为变形菌。Ahn 等^[26]发现湿地沉积物的细菌群落中有 60%的细菌种类为变形菌。Luka 等^[27]在对沼泽地中细菌群落结构和多样性的研究中发现,变形菌是优势菌群。而 Tomoya 等^[28]对日本中部的稻田土壤细菌进行研究也得到了类似结论。

总的来说,以传统的可培养技术和细菌

16S rDNA 序列 DGGE 分析的非培养技术两者结合为基础的研究表明, 处于若尔盖高原湿地不同退化阶段的土壤理化性质、土壤类型和土壤深度都对土壤微生物数量、细菌群落结构和多样性产生了一定的影响, 此次结果为研究若尔盖地区微生物生态系统提供了重要的信息, 也为进一步恢复和利用该湿地资源奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 李禄康. 湿地与湿地公约[J]. 世界林业研究, 2001, 14(1): 1-7.
- [2] Yang YX. Ecological environment deterioration, mire degeneration and their formation mechanism in the zoige plateau[J]. Journal of Mountain Science, 1999, 17(4): 318-323.
- [3] 白军红, 欧阳华, 杨志锋, 等. 湿地景观格局变化研究进展[J]. 地理科学进展, 2005, 24(4): 36-45.
- [4] 沈松平, 王军, 游丽君, 等. 若尔盖沼泽湿地遥感动态监测[J]. 四川地质学报, 2005, 25(2): 119-121.
- [5] Dong ZB, Hu GY, Yan CZ, et al. Aeolian desertification and its causes in the Zoige Plateau of China's Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Environmental Earth Sciences, 2009, 59(8): 1731-1740.
- [6] Qiu PF, Wu N, Luo P, et al. Analysis of dynamics and driving factors of wetland landscape in Zoige, eastern Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Journal of Mountain Science, 2009, 6(1): 42-55.
- [7] 赵吉, 廖仰南, 张桂枝, 等. 草原生态系统的土壤微生物生态[J]. 中国草地, 1999(3): 57-67.
- [8] 田应兵, 熊明标, 宋光煜. 若尔盖高原湿地生态恢复过程中土壤有机质的变化研究[J]. 湿地科学, 2004, 2(2): 88-93.
- [9] 杨永兴. 若尔盖高原生态环境恶化与沼泽退化及其形成机制[J]. 山地学报, 1999, 17(4): 318-323.
- [10] Yu ZT, Mark M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4800-4806.
- [11] Landgraf D, Klose S. Mobile and readily available C and N fractions and their relationship to microbial biomass and selected enzyme activities in a sandy soil under different management systems[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2002, 165: 9-16.
- [12] Anderson TH, Domsch KH. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1989, 21(4): 471-479.
- [13] Liljeroth E, Bååth E, Mathiasson I, et al. Root exudation and rhizoplane bacterial abundance of barley (*Hordeum vulgare* L.) in relation to nitrogen fertilization and root growth[J]. Plant Soil, 1990, 127(1): 81-89.
- [14] Christopher DC. Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils[J]. Applied Soil Ecology, 2006, 31(1/2): 73-82.
- [15] Singh BK, Nunan N, Ridgway KP, et al. Relationship between assemblages of mycorrhizal fungi and bacteria on grass roots[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(2): 534-541.
- [16] 张崇邦, 金则新, 李均敏. 浙江天台山不同林型土壤环境的微生物区系和细菌生理群的多样性[J]. 生物多样性, 2001, 9(4): 382-388.
- [17] Xu YX, Wang GH, Jin J, et al. Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(5): 919-925.
- [18] Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Journal of Microbiology Methods, 1999, 38(1/2): 1-15.
- [19] 刘世贵, 葛绍荣, 龙章富. 川西北退化草地土壤微生物数量与区系研究[J]. 草业学报, 1994, 3(4): 70-76.
- [20] Taylor JP, Wilson B, Mills MS, et al. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(3): 387-401.
- [21] 李钧敏, 金则新, 张崇邦. 不同土层土壤细菌的遗传多样性及其与环境因子的相关性[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2006, 33(6): 695-701.
- [22] 张社奇, 王国栋, 田鹏, 等. 黄土高原刺槐林地土壤微生物的分布特征[J]. 水土保持学报, 2004, 18(6): 128-131.
- [23] Ekelund F, Ronn R, Christensen S. Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(4/5): 475-481.
- [24] Nicomrat D, Dick WA, Dopson M, et al. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treat-

- ing acid coalmine drainage[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(2): 312-321.
- [25] Tait E, Carman M, Sievert SM. Phylogenetic diversity of bacteria associated with ascidians in Eel Pond (Woods Hole, Massachusetts, USA)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2007, 342(1): 138-146.
- [26] Ahn C, Gillevet PM, Sikaroodi M. Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading[J]. Ecological Indicators, 2007, 7(4): 852-863.
- [27] Ausec L, Kraigher B, Mandic-Mulec I. Differences in the activity and bacterial community structure of drained grassland and forest peat soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(9): 1874-1881.
- [28] Matsuyama T, Nakajima Y, Matsuya K, et al. Bacterial community in plant residues in a Japanese paddy field estimated by RFLP and DGGE analyses[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(2): 463-472.

2011 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
10	第九届全国病毒学学术研讨会	中国微生物学会 病毒学专业委员会	9月	150	陕西 西安	梁华 010-58900644
11	第三届微生物资源学术研讨会	中国微生物学会 微生物资源专业委员会	9月	150	甘肃 兰州	阮志勇 13301101231
12	病原菌与宿主相互作用研讨会	中国微生物学会分析 微生物学专业委员会	9-10月	100	湖北 武汉	陈铁 tiechen2005@yahoo.com
13	第十九届全国生物固氮 学术研讨会	中国微生物学会农业 微生物学专业委员会	9-10月	100	四川 雅安	张忠明 zmzhang@mail.hzau.edu.cn
14	2011年中国微生物学会学术年 会暨第十次全国会员代表大会	中国微生物学会	10月	500	福建 福州	王旭 010-64807200
15	第十四次全国环境微生物 学术研讨会	中国微生物学会环境 微生物学专业委员会	11月	500	福建 厦门	朱建春 microb@njau.edu.cn
16	CBS-中国医学真菌学 高级培训班	中国微生物学会 真菌学专业委员会	11月	80	江苏 南京	刘维达 13605178767
17	全国酶工程学术研讨会	中国微生物学会 酶工程专业委员会	11月	150	广东 广州	金城 010-64807425
18	第五届芽胞杆菌 青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业 微生物学专业委员会	12月	50	湖北 武汉	孙明 027-87283455