DOI: 10.5846/stxb201506181232

任庆水,马朋,李昌晓,秦红,杨予静.三峡库区消落带两种草本植被土壤细菌群落多样性.生态学报,2016,36(11): - .

Ren Q S, Ma P, Li C X, Qin H, Yang Y J. Evaluation of bacterial diversity under different herb vegetation types in the hydro-fluctuation zone of the Three Gorges Reservoir in China. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(11):

三峡库区消落带两种草本植被土壤细菌群落多样性

任庆水,马 朋,李昌晓*,秦红,杨予静

西南大学生命科学学院,三峡库区生态环境教育部重点实验室,重庆 400715

摘要:在三峡库区消落带植被重建区域,选取两种人工草本植被一牛鞭草与狗牙根(处理组),并以裸地土壤为对照,研究植被修复与重建对土壤细菌群落多样性的影响。本研究采用分子生物学 T-RFLP 技术,分别于 2012 年 7 月(T1)、2013 年 7 月(T2)及 2014 年 7 月(T3)进行原位取样,对消落带人工植被牛鞭草、狗牙根及裸地土壤细菌群落多样性进行了研究。结果表明:(1)除 HhaI 酶切结果中,物种因素对消落带土壤细菌 Shannon-Wiener 指数(H)、时间因素对土壤细菌 Simpson 指数(D)无显著影响外,采用两种酶切之后(HhaI 酶、MspI),物种、时间、以及两者的交互作用均对三峡库区消落带土壤细菌群落多样性指数产生显著影响;(2)HhaI 酶切后人工植被土壤丰度与裸地相比显著升高,此外,两种酶切结果均表明,人工植被土壤细菌群落多样性指数与裸地相比更加稳定。(3)植被类型、取样时间不同,土壤中的优势片段种类与丰度均不相同;(4)CCA分析结果表明三峡库区消落带土壤细菌群落多样性与化学性质关系密切。研究表明牛鞭草与狗牙根栽植后土壤细菌群落多样性指数的更加稳定,三峡库区进行植被恢复与重建值得肯定。

关键词:T-RFLP;三峡库区;消落带;植被修复;细菌群落多样性

Evaluation of bacterial diversity under different herb vegetation types in the hydro-fluctuation zone of the Three Gorges Reservoir in China

REN Qingshui, MA Peng, LI Changxiao*, QIN Hong, YANG Yujing

Key Laboratory for the Eco-Environment of the Three Gorges Reservoir Region of the Ministry of Education, school of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: To better understand the growth condition of vegetation, our study was conducted to explore the dynamics of the soil bacterial community in the hydro-fluctuating zone of the Three Gorges Reservoir (TGR) region in China. In July (2012, 2013, and 2014). We collected and compared soil samples from under two plant species (Hemarthria compressa and Cynodon dactylon) and bare soil. We characterized bacterial community diversity using the terminal – restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) molecular method, and also investigated soil chemical properties. Our results show that (1) bacterial diversity was significantly influenced by plant species, time, and their interaction, regardless of which enzyme was used for digestion (HhaI or MspI); however, species for the Shannon-Wiener index (H) and time for the Simpson index (D) when digested by HhaI did not significantly influence bacterial diversity. (2) The richness index (S) of the planted vegetation was significantly higher than in bare areas. In addition, the S, H, D, and evenness (E) indices were more stable for bacterial communities under planted vegetation than bare areas. (3) Vegetation and sampling times influenced the types and relative abundance of predominant terminal restricted fragments in our study. (4) CCA (canonical correspondence analysis) analysis showed that long fragments were more concentrated, especially around nitrogen and phosphorus, and soil bacterial diversity had a close relationship with chemical properties, such as nitrogen, phosphorus and organic matter. In conclusion, two different enzymes were used to explore the diversity of the soil bacterial

基金项目:重庆市林业重点科技攻关项目(渝林科研 2015-6);国家科技部国际合作专项(2015DFA90900);重庆市基础与前沿研究计划重点项目(CSTC2013JJB00004);中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2013A011);重庆市研究生科研创新项目(CYS2015068)

收稿日期:2015-06-18; 修订日期:2015-11-30

^{*}通讯作者 Corresponding author.E-mail: lichangx@ swu.edu.cn

community in the TGR region, and their digestion maps, analyzed by synthesis, illustrate that our analysis results are objective. Furthermore, the results indicate that vegetation type and soil chemical properties affect diversity in the soil bacterial community. However, in the fluctuation zone of the TGR, the bacterial diversity indices became more stable after revegetation, which confirms that planted revegetation can improve soil bacterial diversity; in addition, bacterial diversity was affected by soil chemical properties (N, P, OM).

Key Words: T-RFLP; the Three Gorges Reservoir Area; hydro-fluctuation zone; revegetation; bacterial community diversity

消落区是指因水体水位季节性涨落使土地周期性淹没和出露成陆地形成的水陆衔接地带^[1]。三峡工程竣工后,水库实施冬蓄夏排的反季节水位调度管理方式,形成垂直落差达 30 m 的三峡库区消落带^[2-3]。在该消落带特殊的水文变化下,植被退化严重,物种多样性低^[4],消落带中优势物种退化^[5],进而导致生态系统水土保持功能和自身修复能力的下降,引起土壤侵蚀、土地退化等问题^[6]。植被具有固持水土^[7]、提高土壤肥力^[8]、降低水土污染等作用,因此进行三峡库区的生态修复,在库周进行植被重建十分必要。已有研究表明,扁穗牛鞭草(Hemarthria compressa)、狗牙根(Cynodon dactylon)可以适应水淹及干旱环境,被列为三峡库区消落带人工植被构建的优良物种^[9-10]。

目前对牛鞭草及狗牙根的研究主要集中在水分胁迫条件下根系酶活性变化[11-12],水淹条件对两种植被存活及恢复生长的影响[13],及二者的光合特性等方面[14-15]。但牛鞭草、狗牙根植被构建后,对土壤中微生物,尤其是对占微生物总数 70%—80%、多样性最丰富[16]的细菌群落多样性的深入研究还少见报道。而土壤地上部分与地下部分相互作用、相互影响,土壤的形成发育势必会影响到地上植被的生长状况,如土壤的理化、微生物性质均会直接或间接作用于库区植物群落,其中,土壤细菌群落是土壤中最活跃的组分之一,它们参与土壤形成[17]、有机质分解、养分转化和循环[18-19]等,通过影响土壤理化性质、生物学特性及其变化过程而调节土壤质量[20-21],其新陈代谢产物影响着植物的生长吸收和利用,为更好了解植被生长状况,我们对土壤中细菌群落多样性进行了分析。末端限制性片段长度多态性分析(Terminal restriction fragment length polymorphism,T-RFLP),是在 PCR 技术和 RFLP 技术基础上发展起来的微生物群落分析技术,这种技术克服了传统培养方法的局限性,重复性好,分析精度较高,可以利用网上数据进行资源共享[22-24],被成功用于不同环境中细菌群落多样性研究[25]。其中,限制性内切酶的选择是影响群落分析结果的重要因素[26],不同的内切酶产生的 T-RF 数目、大小均存在差异[27-28],影响对研究结果的分析。Hha I 和 Msp I 两种限制酶应用广泛且效果较好,本研究采用上述两种酶进行分析,并将两种酶切结果及图谱进行综合比较,利于提高检出效率。

该技术在土壤微生物方面已被广泛应用,如根据甲烷氧化菌的相关基因设计引物,研究稻田土壤甲烷氧化菌群落的多样性^[29];利用 T-RFLP 技术分析土壤微生物群落结构特征与动态变化^[30];分析美国西南部 4 种不同性质土壤中的微生物群落等^[31],然而该技术在三峡库区消落带中用以研究微生物群落的多样性还少见报道。因此,本研究以三峡库区消落带(重庆忠县汝溪河流域)为研究区域,选取牛鞭草与狗牙根 2 种植被类型,采用分子生物学 T-RFLP 技术(1)研究植被修复与重建对土壤细菌群落多样性的影响;(2)分析人工植被修复土壤和裸地土壤化学性质与细菌群落的相关性,为深入探究消落带土壤细菌群落的变化规律,了解三峡库区消落带植被修复与重建对土壤微生物菌群多样性的影响提供参考。

1 研究地点与方法

1.1 研究区概况

本研究区域位于三峡库区重庆忠县境内的汝溪河流域,位于重庆市中部(107°32′—108°14′E,30°03′—30°35′N),与万寿、石柱、丰都相接壤,距离忠县城区32 km,远离重庆主城区(图1)。该地区属亚热带东南季风气候,季节分明,降雨充沛,年均降雨量1200 mm;光照充足,日照率29%,日照时数为1327.5 h;年均气温

19.2℃。该区域土壤主要为石灰性紫色土,土壤熟化程度较低,水土流失、土层侵蚀现象严重。

为进行三峡水库库岸带植被修复,课题组于 2012年 3—4月在重庆忠县石宝镇汝溪河流域构建植被生态修复示范基地,基地内土壤质地、肥力状况基本一致。在 160m—170m 海拔区间栽植扁穗牛鞭草(Hemarthria compressa)、狗牙根(Cynodon dactylon)等物种,所选岸坡样地平均坡度为 26°,岸坡上接受光照辐射强度大致相同,土壤预热条件基本一致,每种植被类型下的采样面积约为 150 m²,植被覆盖率为 80%。取样时,植被生长状况良好。

1.2 样品采集与土壤化学性质测定

据水位在忠县汝溪河流域的变化及植被生长情况, 分别于 2012 年 7 月(T1)、2013 年 7 月(T2)以及 2014 年 7 月(T3)进行野外取样调查。

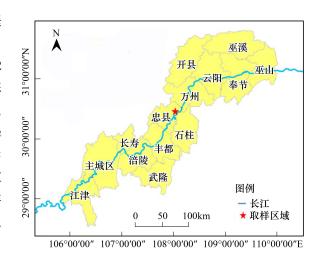


图 1 研究区域 Fig.1 Research region

采样时在海拔 160m—170m 中间地带划定 S 形取样带。取样时,在 S 形样带内划定取样样方,每种植被类型随机设置 3 块 5m×5m 样地,每个样地内按梅花形设置 5 个重复取样点,去除表层地被物后,采集 0—20cm 土层的原状土壤样品,采用 IQ150 土壤原位 pH 计(IQ Scientific Instruments, Inc., San Diego, CA, USA)测定土壤 pH。同时选取试验区域内相同海拔段的无植被裸地土壤作为对照,取样方法同上。另外,将每个样地的土壤样品按四分法混合,冷冻运输带回实验室以备生化性质分析。

土壤样品分为两部分,一部分于-80℃冰箱贮存用于细菌群落分析,剩余土壤样品自然条件风干,研磨过筛(2 mm 和 0.25 mm),用于其他土壤化学性质的测定。土壤有机质(OM)测定采用重铬酸钾外加热法;土壤全氮(TN)含量测定采用元素分析仪测定(Elementar Vario EL, Germany);土壤碱解氮(AN)含量测定采用碱解-扩散法;土壤全磷(TP)、速效磷(AP)含量测定采用钼锑抗比色法;全钾(TK)、速效钾(AK)含量测定采用原子吸收光谱仪(AA800, PE Inc., USA)。

1.3 基于 T-RFLP 的细菌群落结构分析

1.3.1 土壤 DNA 提取

本研究土壤总 DNA 提取采用 UltraClean[™] Soil Isolation DNA Kit(购于美国 MOBIO 公司),操作步骤按照使用说明书进行。提取的总 DNA 经 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,然后将总 DNA 置于-20℃保存备用。

1.3.2 PCR 扩增

PCR 扩增采用通用引物扩增细菌 16S rRNA,正向引物为 63F(5′- CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3′),且正向引物 5′端用 6-FAM 进行荧光标记,反向引物为 1389R(5′- ACGGGCGGTGTGTACAAG-3′)。 PCR 引物由深圳华大基因公司合成并标记。 PCR 扩增体系为 50μ L,包括:模板 2μ L,正反向引物各 0.5μ L,Taq PCR Mastermix 25μ L,补充 ddH_2O 至 50μ L。设置两个重复。 PCR 反应条件:95℃,5min。 30 个循环为:94℃,1min;56℃,1min;72℃,2min;2℃ 冬延伸 10min。 PCR 产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测特异性。扩增产物混合后(共 100μ L)用 PCR 纯化试剂盒纯化,操作步骤按说明进行。 Taq PCR Mastermix 和 PCR 纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3.3 T-RFLP 试验

末端荧光标记的 PCR 纯化后产物用限制性内切酶 HhaI 、 MspI (购自上海生工生物有限公司)酶切,反应体系 $30\mu L$, DNA 300ng, 37% 下消化 3h; 升温至 65% 将酶灭活 20min 以终止反应。酶切产物送至上海 Invitrogen 生命技术公司(Life Technologies)进行基因扫描,得到 T-RFLP 图谱。

4 生态学报 36卷

1.4 统计分析

统计分析前,删除大小在 50bp 以下且相对峰面积小于 1%的片段。以 T-RFLP 图谱中限制性片段 (Terminal Restriction Fragment, T-RF)为一个 OTU,以该 T-RF 的相对峰面积作为对应的 OTU 的丰度。T-RF 相对峰面积通过公式 $Ap = n_i / N \times 100\%$ 计算 $(n_i$ 为图谱中单个 T-RF 的峰面积,N 为所有峰面积的总和),并计算以下多样性指数:

物种丰度 S=图谱中峰的总数

Shannon-Wiener 指数(*H*)

$$H = -\sum_{i=1}^{s} P_i \cdot \ln P_i$$

Simpson 指数(D):

$$D = 1 - \sum_{i=1}^{s} (P_i)^2$$

均匀度指数(E):

$$E = H/(\ln S)$$

其中, P_i 为某个峰的峰高占总峰高的比例。

利用 Phylogenetic Assignment Tool (PAT, http://mica.ibest.uidaho.edu/pat.php)对 T-RFs 进行定性分析。

采用重复测量方差分析(Repeated-measures ANOVA)分析物种、时间因素及二者交互作用对土壤细菌群落多样性的影响;采用单因素方差分析(One-way ANOVA)分析相同物种不同取样时间多样性指数的显著性差异,用 Duncan 检验法检验每个指标在不同用地类型间的差异性(α=0.05);用典范对应分析(CCA)检验土壤细菌与土壤化学性质的关系。研究采用 SPSS 17.0 软件和 Canoco 4.5 进行数据分析,用 Origin 8.6 和 Cano Draw for Windows 4.5 软件制图。

2 结果与分析

2.1 三峡水库消落带土壤细菌群落多样性指数重复度量方差分析

对土壤细菌群落的多样性指数进行重复度量方差分析表明, Hha I 酶切结果中,物种因素对消落带土壤细菌 Shannon-Wiener 指数(H)、时间因素对土壤细菌 Simpson 指数(D) 无显著影响(P>0.05,表 1)。除上述结果外,物种、取样时间、以及两者的交互作用均对三峡库区消落带土壤细菌群落多样性指数产生显著(P<0.05,表 1)或极显著(P<0.01,表 1)影响。

表 1 土壤细菌群落多样性指数的重复度量方差分析

| Table 1 | Repeated measures | ANOVA table fo | r diversity indice | s of the soil bacteria | l community |
|---------|-------------------|----------------|--------------------|------------------------|-------------|
| | | | | | |

| 酶 | 多样性指数 _ Diversity indices | 物种 Species | | 时间 Time | | 物种*时间 Species * Time | |
|--------|------------------------------|------------|------|---------|------|----------------------|------|
| Enzyme | | F | P | F | P | \overline{F} | P |
| HhaI | S | 44.06 | 0.00 | 2.3 | 0.04 | 4.87 | 0.02 |
| | Н | 1.53 | 0.25 | 20.59 | 0.00 | 8.81 | 0.00 |
| | D | 5.06 | 0.02 | 1.92 | 1.83 | 9.04 | 0.00 |
| | E | 38.7 | 0.00 | 134.87 | 0.00 | 22.63 | 0.00 |
| MspI | S | 64.14 | 0.00 | 22.54 | 0.00 | 5.74 | 0.00 |
| | Н | 31.03 | 0.00 | 8.53 | 0.04 | 4.6 | 0.01 |
| | D | 3.68 | 0.05 | 5.59 | 0.02 | 0.3 | 0.04 |
| | E | 11.11 | 0.00 | 6.56 | 0.01 | 16.56 | 0.00 |

S: 丰度指数(Richness index), H: 香农指数(Shannon Wiener index), D: 辛普森指数(Simpson), E: 均匀度指数(Evenness index)

2.2 三峡水库消落带土壤细菌群落多样性指数变化

两种人工植被土壤细菌群落多样性指数变化与裸地相比不尽相同。由 HhaI 酶切后土壤细菌多样性指数

变化可知(图 2a),裸地土壤的物种丰度在 T1 与 T2 时存在显著差异,香农指数、均匀度指数均在 T1 与 T3 时存在显著差异;与之相反,人工植被类型下,无论是牛鞭草还是狗牙根,其土壤细菌群落多样性指数在三次取样时均无显著差异存在。此外,研究还发现,人工植被实生土壤下的物种丰度显著高于裸地土壤(P < 0.05)。

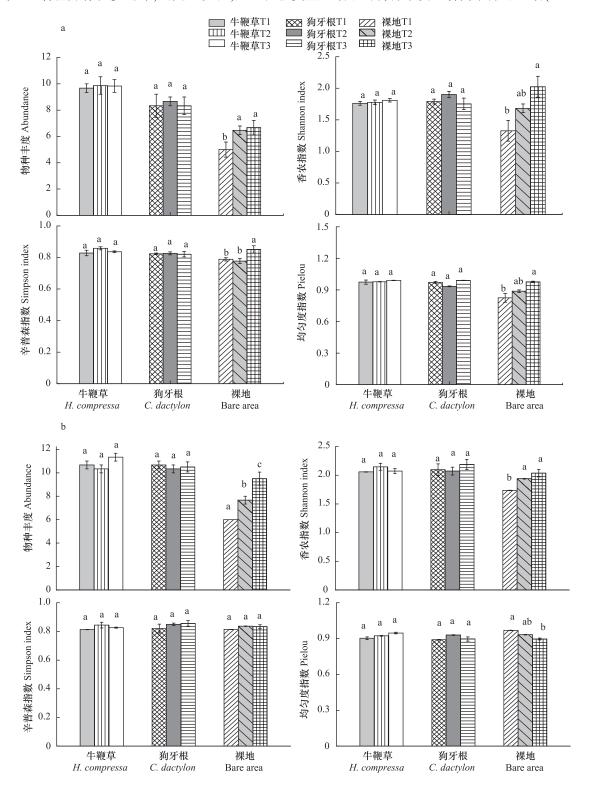


图 2 不同取样时间土壤细菌群落多样性指数变化

Fig.2 Variation of bacteria diversity in different time

与 Hha I 类似, MspI 酶切结果(图 2b)表明, 裸地的物种丰度、香农指数、均匀度指数在三次取样中存在显

著差异,其中裸地土壤的物种丰度在T1与T2时存在显著差异,香农指数、均匀度指数均在T1与T3时存在显著差异。而人工植被类型下土壤细菌多样性指数无显著改变。

2.3 三峡水库消落带土壤细菌群落优势种群丰度变化

每一个 T-RF 至少代表数据库中的一种细菌,因此 T-RF 的多样性,也代表了细菌种类的多样性。如图所示,柱状堆叠图分别表示不同时间采样下,人工植被与裸地土壤中优势片段的种类与相对丰度。从 T-RFLP 分析图谱中可知,经 HhaI 酶切共得到 25 个优势末端限制性片段(图 3a),经 MspI 酶切共得到 21 个优势末端限制性片段(图 3b)。图 3a HhaI 酶切结果显示,473bp等 T-RFs 在土壤中普遍存在,而其相对丰度则在不同人工植被及裸地土壤中不尽相同;与之类似,MspI 酶切之后,101、110bp T-RFs 也在土壤中普遍存在。然而,不同植被类型下,优势片段的种类与丰度均不同,且随时间呈现不同的变化趋势。例如,经 HhaI 酶切牛鞭草土壤中 167bp(可能为 Pseudomonas)、181bp(可能为 Bacillus 芽孢杆菌属),狗牙根实生土壤中 147bp(可能为 Bacillus 芽孢杆菌属),328bp(可能为 Pseudomonas 假交替单胞菌属),335bp(可能为 Pseudomonas 假单胞菌);以及经 MspI 酶切牛鞭草土壤中 90bp(可能为 Aeromonas 气单胞菌),112bp(可能为 Pseudomonas) 在三次取样时其相对丰度持续降低或消失;另有部分优势物种在 T1、T2、T3 三次取样时相对丰度呈现先下降后上升的趋势。

2.4 三峡水库消落带土壤细菌群落多样性与土壤养分的关系

土壤细菌群落种类与土壤养分含量息息相关,然而土壤养分含量究竟如何影响土壤细菌群落尚不清楚, 三次取样时土壤化学性质均值如下(表 2)。本研究采用典范对应分析(CCA)对消落带土壤细菌群落进行排序,结果如图所示。用 HhaI 酶切得到的数据进行分析可知,排序轴 CC1 解释了群落结构和物种变化信息量的 46.4%,排序轴 CC2 解释了 27.1%,两轴共解释了全部信息的 73.5%(图 4a)。同样,MspI 酶切数据分析结果可知,排序轴 CC1 解释了群落结构和物种变化信息量的 29.1%,排序轴 CC2 解释了 15.8%,两轴共解释了全部信息的 43.9%(图 4b)。两种酶切之后,较大酶切片段分布相对集中,且主要分布在 N、P 周围;此外,HhaI 酶切之后 304bp(可能代表的微生物为 Rhizobiales)、335bp(可能代表的微生物为 Rhizobium)均在 AN 周围分布;MspI 酶切之后 365bp(可能代表的微生物为 Azorhizobium caulinodans (D11342))、396bp(可能代表的微生物为 Rhizobium; Sinorhizobium)、400bp(可能代表的微生物为 Rhizobium; Sinorhizobium)、455bp(可能代表的微生物为 Azorbacter)也分布集中在 AN、TN 或 OM 周围,由此可见土壤细菌群落与土壤氮素含量存在较好的相关性。

表 2 土壤化学性质

| 植被类型 Vegetation types | pH pH value | 有机质含量 OM content/ (g/kg) | 碱解氮含量 AN content/ (mg/kg) | 有效磷含量 AP content/ (mg/kg) | 速效钾含量 AK content/ (mg/kg) | 全氮含量 TN content/ (g/kg) | 全磷含量 TP content/ (g/kg) | 全钾含量 TK content/ (g/kg) |
|--------------------------|----------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 牛鞭草 H. compressa | 6.82±0.25 | 15.28±0.86 | 61.42±1.29 | 1.49±0.11 | 52.40±2.08 | 0.70 ± 0.11 | 0.52±0.11 | 24.84±0.74 |
| 狗牙根 C.dactylon | 7.08±0.18 | 12.86±0.68 | 63.86±4.17 | 1.66±0.26 | 52.83±0.14 | 0.82 ± 0.12 | 0.99 ± 0.04 | 28.54±1.1 |
| 裸地 Unplanted soil | 7.12±0.11 | 11.17±0.74 | 75.43±4.65 | 1.33 ± 0.07 | 63.27±1.13 | 0.84 ± 0.02 | 0.71 ± 0.04 | 23.80±1.36 |

Table 2 The soil chemical properties

3 讨论

微生物群落能够直接作用于植物根系,可以通过腐殖质分解来改变土壤养分的矿化速率及其空间分布, 影响土壤理化性质,改变植物根际的激素状况,从而间接地影响植物生长发育、调控群落结构^[32-33],因此对土 壤微生物群落进行调查,可为评估地表植被的生长状况以及土壤的退化程度提供量化指标^[34-35]。

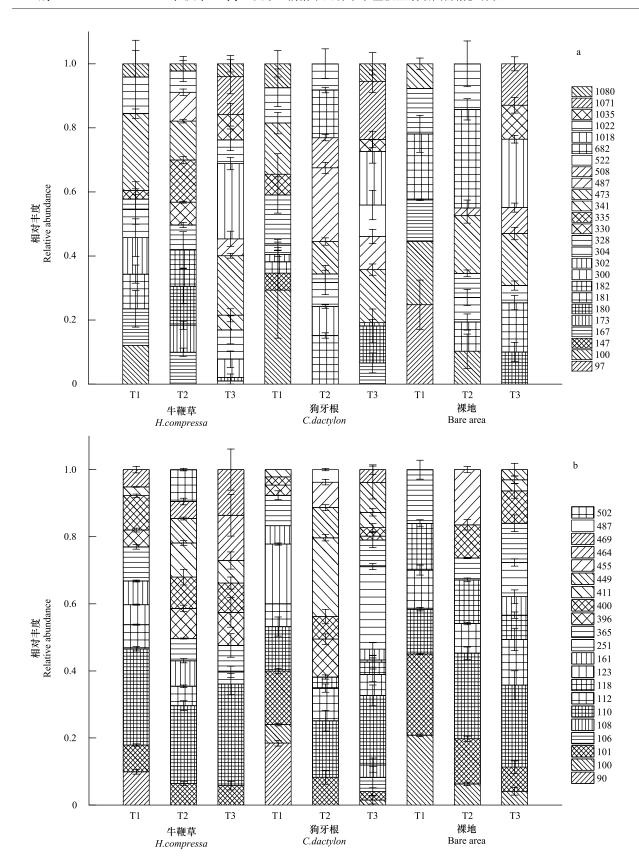


图 3 土壤细菌群落优势 T-RF 的相对丰度

Fig.3 Relative abundance of predominant T-RFs

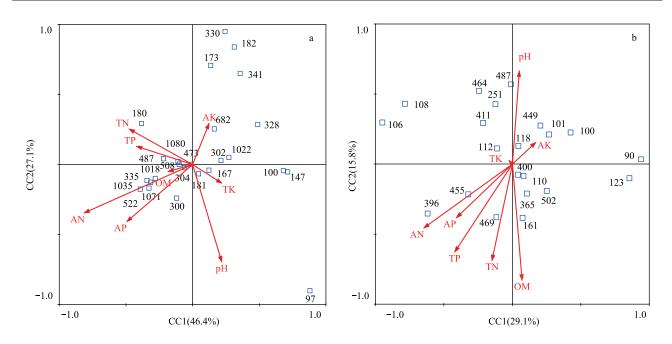


图 4 消落带土壤细菌群落 Hha I 酶切(a)与 Msp I 酶切(b)的 CCA 分析

Fig. 4 Canonical correspondence analysis of soil bacterial communities by HhaI (a) and MspI(b)

3.1 三峡水库消落带土壤细菌群落多样性指数重复度量方差分析

微生物群落多样性指数是反映物种丰富度和均匀度的综合指标,其变化能准确反映群落功能多样性总体的动态变化,但采用的多样性指数不同,研究结果也存在较大差异。其中物种丰度指数越大,群落物种丰度越高;Shannon 指数用于评估微生物的丰富度和均度,物种越多,分布越均匀,其值越大;Simpson 指数用于评估最常见种的优势度,辛普森指数越大,生物多样性越高;均匀度指数反映的是各物种个体数目分配的均匀程度。

HhaI 酶切结果中,物种因素对消落带土壤细菌 Shannon-Wiener 指数(H)、时间因素对土壤细菌 Simpson 指数(D)无显著影响(P>0.05,表 1),说明 HhaI 酶切后,牛鞭草与狗牙根两种植被类型下土壤细菌丰度与均匀度无显著差异,同时土壤中常见细菌种类的优势度不随时间发生显著改变;除上述结果外,物种、取样时间、以及两者的交互作用均对三峡库区消落带土壤细菌群落多样性指数产生显著(P<0.05,表 1)或极显著(P<0.01,表 1)影响,可能是由于人工植被栽植之后,土壤固持水土能力增加,维持了土壤团聚体结构,进而影响到土壤细菌群落结构及生物量,增强了细菌群落多样性^[36]。尤其是狗牙根与牛鞭草地上部分生长量大,可以为细菌生长提供大量凋落物;同时,两种植物其匍匐生长、根系发达,于库区土壤表层密集生长,植被凋落物和死亡的根等为土壤中的细菌提供了能量来源,均会对细菌多样性指数产生重要影响^[37]。

3.2 土壤细菌群落多样性指数

微生物群落多样性指数是反映物种丰富度、优势度以及均匀度的综合指标,多样性指数的变化可以反映群落功能多样性的动态变化^[38]。*Hha*I 酶切后人工植被土壤细菌群落丰度显著高于裸地土壤,牛鞭草与狗牙根的土壤细菌群落丰度与裸地相比,分别增加 62%和 40%,这可能归结于人工栽植牛鞭草与狗牙根之后,其根系向周围环境释放出各类有机、无机物质,这些分泌物为细菌提供重要的能量物质,促进细菌群落繁殖^[39-40],增加了群落多样性;此外,根系分泌物还可以通过改变土壤 pH 值、氧化还原电位等间接影响微生物群落多样性^[41]。

有研究表明,根际是植物与土壤接触的重要界面,植物根系可以释放不同的分泌物,促进根系形成稳定而独特的微生物区系^[42]。因此,人工栽植牛鞭草与狗牙根之后土壤细菌群落多样性指数在三次取样时无显著改变,而裸地土壤丰度、香农指数、均匀度指数在不同取样时间内存在显著差异,其原因可能是由于人工植被

栽种之后,狗牙根与牛鞭草特异的根系分泌物促使土壤中形成了稳定的细菌群落区系,而裸地土壤由于无地表植被固持水土,因此土壤及土壤中的细菌均易随水分的涨落流动而发生迁移,从而造成裸地土壤细菌群落多样性变化较大。有学者采用 PCR-RFLP 技术研究土壤及上层植被与土壤微生物多样性的关系,验证了植物的分泌物可使得微生物获得更丰富的资源,同时植被覆盖保持土壤湿度更适于细菌群落的发展^[43],与本研究结果一致。此外,就人工植被土壤而言,栽植牛鞭草和狗牙根之后,实生土壤细菌群落多样性指数均未发生显著改变,从一个方面可以说明,在三峡库区消落带进行人工植被修复之后,土壤细菌群落多样性指数更加稳定。

3.3 土壤细菌群落优势种群相对丰度

消落带土壤中的细菌群落是一个不断变化的群体,其种群的数量、种类、分布等特征均会受到外界环境条件(如土壤水热状况、肥力条件以及植被类型)的影响,因此导致所得到的 T-RFLP 图谱有所差别[44-46]。在三峡库区消落带特殊的水文条件下,长时间水淹将导致土壤溶氧量减少,势必对土壤中的需氧、厌氧菌造成影响,同时水文条件可以通过影响土壤有机质以及氮磷含量改变细菌群落结构;此外,植被类型也是土壤细菌群落结构的主要影响因素之一。

细菌群落相对丰度的变化可以归结于土壤通气状况的改变,Bossio 认为^[47],土壤通气状况是影响细菌生命活动的因素之一。三峡水库冬蓄夏排,使库区消落带土壤长时间处于水淹状态,导致土壤通气性变差,成为土壤细菌生长的限制因子。研究结果表明,无论是 HhaI 还是 MspI 酶切片段,土壤中消失或减少的优势种属多为需氧生长型,在三次取样时其相对丰度持续降低或消失,由此推断可能是由于长期水淹造成厌氧环境,限制了细菌群落生长繁殖;但部分需氧生长的菌类在不同取样时间内相对丰度并未持续下降,而呈现下降后升高的趋势,可见,在外界环境不适时,细菌群落能够自发的调整其结构以适应外部环境的改变,从而保持长期健康的群落结构;少量厌氧生长菌类的消失可能是由于水分条件影响植被生长状态、土壤氧化还原电位及养分含量,间接对细菌生长造成影响;土壤养分含量以及细菌个体均可能随水分涨落在土壤孔隙间发生迁移,可能也是影响细菌群落在土壤中分布的原因之一。

植被对土壤细菌群落的影响,则可能是通过根系特定的分泌物选择根际周围的微生物而实现^[42]。研究发现,不同植被处理组细菌数量与类型均存在差异,这可能是由于根系分泌物的差异改变土壤细菌群落结构与功能,尤其是牛鞭草与狗牙根根系分泌物的组成、性质与凋落物存在差别,影响了细菌的生长代谢,使土壤中产生不同的细菌群落^[48-49]。

3.4 消落带细菌群落与土壤养分的关系

三峡库区消落带土壤细菌群落多样性是其环境因子的反映,植被多样性与微生物多样性关系密切,植物可以通过影响土壤的含水量、pH值、有机质含量及氮磷比等,间接作用于细菌群落,从而对细菌群落多样性产生效应^[50]。根据 T-RFLP 结果,进行土壤化学性质与土壤细菌群落相关性的典范对应分析(CCA)可知:较大T-RFs 主要集中 AN、TN、TP 周围,OM 周围也有分布。较大片段可能为土壤中藻类(如 Algicola、Rhodobacter、piroplasma、Microcystis等),由此可见水淹之后仍然有部分藻类存留在消落带土壤中,而藻类的过量繁殖是造成水华的主要原因^[51],如微胞藻(464bp、469bp)可引起水体的富营养化^[52],且分布在 TN 周围,这与研究发现的土壤 N、P 含量呈现升高趋势相一致。此外,根系分泌的有机酸可以提高难溶性磷的溶解性^[53],为土壤细菌提供能源,从而维持旺盛的细菌群落活性,而细菌活性的增加又促进了磷的活化^[54],也可能是磷含量增加的原因之一。

土壤细菌群落多样性与覆盖于土壤上的植物群落多样性及生产力相关。牛鞭草与狗牙根栽植之后,植被覆盖将改变土壤的水热状况,自身生长发育会使土壤物理环境得到改善,有利于土壤细菌生长^[43],导致一些参与土壤营养循环、改善土壤质地及防治植物病害的有益菌和功能菌迅速繁殖占据主导地位,成为三峡库区消落带优势菌群^[55]。*Hha*I 酶切产生的 147bp、180bp、181bp、182bp, *Msp*I 酶切产生的 90bp、110bp、118bp、161bp、455bp、464bp 可能代表 *Bacillus* 芽孢杆菌,是土壤中的一种优势菌,对外界有害因子抵抗力强,分布广

泛;Pseudomonas(假单胞菌)是土壤中常见的生防菌,也是三峡库区消落带的优势菌属,严格好氧,消落带土壤中假单胞菌的存在可以增加牛鞭草、狗牙根的抗性,并可以通过产生代谢物抑制有害微生物、帮助植被吸收养分^[56];土壤中的有机氮很难直接被植物吸收利用,在适宜条件下,经微生物固定^[57-58]、反硝化作用^[59]、细菌分解等成为植物可利用态,本研究中土壤中 *Rhizobium* 根瘤菌属(*Hha*I 酶切产生的 304bp、335bp, *Msp*I 酶切产生365bp、396bp、400bp)、*Azotobacter* 固氮菌(*Msp*I 酶切产生 112bp、455bp)均可固定空气中的氮气,为植物共生体及土壤提供氮源。由图 4 可知,除 365bp 分布在 OM 周围、112bp 分布于 TK 周围外,可固氮的菌属均在TN、AN 周围分布,可见上述细菌群落可能在土壤中以腐生菌状态存在,为植物生长提供氮素,这与土壤中 TN含量增加、AN含量减少相一致。

此外,一些用于碳素循环、氮素循环及分解作用等不同功能的细菌也在消落带土壤中发现,如降解纤维素的 Cellvibrio 纤维弧菌(HhaI 酶 330bp, MspI 酶切 449bp、455bp)属和 Aeromonas 气单胞菌属(HhaI 酶 182bp, MspI 酶 90bp),聚磷、固氮作用的 Arthrobacter 节杆菌属(HhaI 酶 473bp, MspI 酶 455bp),能够改良土壤质地、作为植物病害重要的生防因子之一的 Streptomyces 链霉菌(HhaI 酶 173bp、473bp,MspI 酶切 455bp)属等 [60]。有研究证实,绿硫细菌(MspI 酶切产生的 449bp、455bp、469bp)中的某些菌株具有酶促还原大气氮为氨的能力。

4 结论

不同的环境条件,诸如植被、土壤养分等均会对细菌群落多样性造成影响。在三峡库区消落带特定的水文条件下,与裸地土壤相比,HhaI 酶切后人工栽植牛鞭草与狗牙根的土壤细菌群落丰度显著增加,增加比例分别为62%和40%,且人工植物土壤细菌群落多样性指数与裸地相比也更加稳定;同时,CCA 分析结果表明三峡库区消落带土壤细菌群落多样性与化学性质关系密切,较大片段在消落带中存留可能引起土壤氮磷含量升高,而固氮菌与氮元素的紧密相关性,可能也是土壤全氮含量升高的诱因之一。

参考文献 (References):

- [1] Wantzen K M, Rothhaupt K O, Mörtl M, Cantonati M, Tóth L G, Fischer P. Ecological effects of water-level fluctuations in lakes: an urgent issue. Hydrobiologia, 2008, 613(1): 1-4.
- [2] Chen F Q, Xie Z Q. Reproductive allocation, seed dispersal and germination of *Myricaria laxiflora*, an endangered species in the Three Gorges reservoir area. Plant Ecology, 2007, 191(1): 67-75.
- [3] 康义,郭泉水,程瑞梅,洪明,金江群,王祥福. 三峡库区消落带土壤物理性质变化. 林业科学, 2010, 46(6): 1-5.
- [4] 刘维暐, 王杰, 王勇, 杨帆. 三峡水库消落区不同海拔高度的植物群落多样性差异. 生态学报, 2012, 32(17): 5454-5466.
- [5] 王晓荣,程瑞梅,肖文发,郭泉水,封晓辉,王瑞丽.三峡库区消落带水淹初期地上植被与土壤种子库的关系.生态学报,2010,30 (21):5821-5831.
- [6] 肖文发, 雷静品. 三峡库区森林植被恢复与可持续经营研究. 长江流域资源与环境, 2004, 13(2): 138-144.
- [7] Mukhopadhyay S, Joy V C. Influence of leaf litter types on microbial functions and nutrient status of soil: ecological suitability of forest trees for afforestation in tropical laterite wastelands. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(12): 2306-2315.
- [8] Maikhuri R K, Semwal R L, Rao K S, Singh K, Saxena K G. Growth and ecological impacts of traditional agroforestry tree species in central Himalaya, India. Agroforestry Systems, 2000, 48(3): 257-271.
- [9] 李强,丁武泉,朱启红,曹优明,蒋山泉.三峡库区泥、沙沉降对低位狗牙根种群的影响.生态学报,2011,06:1567-1573.
- [10] 谭淑端,朱明勇,党海山,王勇,张全发.三峡库区狗牙根对深淹胁迫的生理响应.生态学报,2009,29(7):3685-3691.
- [11] 桂世昌,杨峰,张宝艺,张新全,黄琳凯,马啸.水分胁迫下扁穗牛鞭草根系保护酶活性变化.草业学报,2010,19(5):278-282.
- [12] 李兆佳, 熊高明, 邓龙强, 谢宗强, 樊大勇. 狗牙根与牛鞭草在三峡库区消落带水淹结束后的抗氧化酶活力. 生态学报, 2013, 33(11): 3362-3369.
- [13] 王海锋,曾波,李娅,乔普,叶小齐,罗芳丽.长期完全水淹对4种三峡库区岸生植物存活及恢复生长的影响.植物生态学报,2008,32 (5):977-984.
- [14] 裴顺祥, 洪明, 郭泉水, 秦爱丽, 朱莉, 朱妮妮. 三峡库区消落带水淹结束后狗牙根的光合生理生态特性. 生态学杂志, 2014, 33(12): 3222-3229.
- [15] 陈灵鸷,杨春华,傅鲜桃,刘利芬.扁穗牛鞭草光合特性研究.四川农业大学学报,2008,25(4):484-488.

- [16] 黄昌勇, 徐建明. 土壤学(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2010: 50-51.
- [17] 肖国生,胡廷章,唐华丽,杨俊年,李彦杰,郑克均,王启龙.三峡水库消落带淹没前后土壤微生物生态分布及优势菌群的鉴定.江苏农业科学,2011,39(4):493-496.
- [18] 周丽霞, 丁明懋. 土壤微生物学特性对土壤健康的指示作用. 生物多样性, 2007, 15(2): 162-171.
- [19] Miya R K, Firestone M K. Phenanthrene-degrader community dynamics in rhizosphere soil from a common annual grass. Journal of Environmental Quality, 2000, 29(2): 584-592.
- [20] 田耀华, 冯玉龙. 微生物研究在土壤质量评估中的应用. 应用与环境生物学报, 2008, 14(1): 132-137.
- [21] 王国惠, 于鲁冀. 细菌生理群的研究及其生态学意义. 生态学报, 1999, 19(1): 128-133.
- [22] 岳秀娟, 余利岩, 李秋萍, 魏玉珍, 关艳, 张月琴. 自然界中难分离培养微生物的分离和应用. 微生物学通报, 2006, 33(3): 77-81.
- [23] Prakash O, Pandey P K, Kulkarni G J, Mahale K N, Shouche Y S. Technicalities and Glitches of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). Indian Journal of Microbiology, 2014, 54(3): 255-261.
- [24] Dickie I A, FitzJohn R G. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi; a methods review. Mycorrhiza, 2007, 17(4); 259-270.
- [25] Nithya C, Pandian S K. Evaluation of bacterial diversity in Palk Bay sediments using terminal-restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP). Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167(6): 1763-1777.
- [26] 罗佳捷, 李丽立, 张彬. T-RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用. 中国畜牧兽医, 2009, 36(7): 75-78.
- [27] Egert M, Friedrich M W. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2555-2562.
- [28] Schütte U M E, Abdo Z, Bent S J, Shyu C, Williams C J, Pierson J D, Forney L J. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80 (3): 365-380.
- [29] Horz H P, Yimga M T, Liesack W. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of pmoA, mmoX, mxaF, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including pmoA-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4177-4185.
- [30] Osborn A M, Moore E R B, Timmis K N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environmental Microbiology, 2000, 2(1): 39-50.
- [31] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2943-2950.
- [32] 王邵军, 阮宏华. 土壤生物对地上生物的反馈作用及其机制. 生物多样性, 2008, 16(4): 407-416.
- [33] Kreuzer K, Bonkowski M, Langel R, Scheu S. Decomposer animals (Lumbricidae, Collembola) and organic matter distribution affect the performance of *Lolium perenne* (Poaceae) and *Trifolium repens* (Fabaceae). Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(12): 2005-2011.
- [34] 马朋,李昌晓,雷明,杨予静,马骏.三峡库区岸坡消落带草地、弃耕地和耕地土壤微生物及酶活性特征.生态学报,2014,34(4):1010-1020.
- [35] Rillig M C, Mummey D L. Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist, 2006, 171(1): 41-53.
- [36] 时鹏,高强,王淑平,张妍. 玉米连作及其施肥对土壤微生物群落功能多样性的影响. 生态学报, 2010, 30(22): 6173-6182.
- [37] 杨喜田,宁国华,董惠英,李有.太行山区不同植被群落土壤微生物学特征变化.应用生态学报,2006,17(9):1761-1764.
- [38] 车玉伶,王慧,胡洪营,梁威,郭玉凤. 微生物群落结构和多样性解析技术研究进展. 生态环境, 2005, 14(1): 127-133.
- [39] 牛红榜, 刘万学, 万方浩. 紫茎泽兰(Ageratina adenophora)入侵对土壤微生物群落和理化性质的影响. 生态学报, 2007, 27(7): 3051-3060.
- [40] 解文科, 王小青, 李斌, 林锦波, 郭丽丽, 孔斌. 植物根系分泌物研究综述. 山东林业科技, 2006, (5): 63-67.
- [41] 毕江涛, 贺达汉. 植物对土壤微生物多样性的影响研究进展. 中国农学通报, 2009, 25(9): 244-250.
- [42] Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science, 2012, 17(8): 478-486.
- [43] 夏北成. 植被对土壤微生物群落结构的影响. 应用生态学报, 1998, 9(3): 296-300.
- [44] 李玉强,赵哈林,赵学勇,张铜会,陈银萍.不同强度放牧后自然恢复的沙质草地土壤呼吸、碳平衡与碳储量.草业学报,2006,15(5): 25-31.
- [45] Davidson E A, Verchot L V, Cattânio J H, Ackerman I L, Carvalho J E M. Effects of soil water content on soil respiration in forests and cattle pastures of eastern Amazonia. Biogeochemistry, 2000, 48(1): 53-69.
- [46] 周萍, 刘国彬, 薛萐. 草地生态系统土壤呼吸及其影响因素研究进展. 草业学报, 2009, 18(2): 184-193.
- [47] Niemi R M, Vepsäläinen M, Erkomaa K, Ilvesniemi H. Microbial activity during summer in humus layers under Pinus silvestris and Alnus incana.

- Forest Ecology and Management, 2007, 242(2-3): 314-323.
- [48] Landi L, Valori F, Ascher J, Renella G, Falchini L, Nannipieri P. Root exudate effects on the bacterial communities, CO₂ evolution, nitrogen transformations and ATP content of rhizosphere and bulk soils. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(3): 509-516.
- [49] Broeckling C D, Broz A K, Bergelson J, Manter D K, Vivanco J M. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(3): 738-744.
- [50] 孟庆杰,许艳丽,李春杰,韩晓增,裴希超.不同植被覆盖对黑土微生物功能多样性的影响.生态学杂志,2008,27(7):1134-1140.
- [51] 徐宁,段舜山,李爱芬,刘振乾.沿岸海域富营养化与赤潮发生的关系,生态学报,2005,25(7):1782-1787.
- [52] 裴海燕, 胡文容. 藻类及其控制. 山东环境, 2001, (2): 36-37.
- [53] Tarafdar J C, Claassen N. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. Biology and Fertility of Soils, 1988, 5(4): 308-312.
- [54] 申建波, 张福锁, 毛达如. 根际微生态系统中的碳循环. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(2): 232-240.
- [55] Song F B, Han X Y, Zhu X C, Herbert S J. Response to water stress of soil enzymes and root exudates from drought and non-drought tolerant corn hybrids at different growth stages. Canadian Journal of Soil Science, 2012, 92(3): 501-507.
- [56] Kloepper J W, Leong J, Teintze M, Schroth M N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature, 1980, 286(5776); 885-886.
- [57] Groffman P M, Gold A J, Simmons R C. Nitrate dynamics in riparian forests; microbial studies. Journal of Environmental Quality, 1992, 21(4); 666-671.
- [58] Batlle-Aguilar J, Brovelli A, Luster J, Shrestha J, Niklaus P A, Barry D A. Analysis of carbon and nitrogen dynamics in riparian soils: model validation and sensitivity to environmental controls. Science of the Total Environment, 2012, 429: 246-256.
- [59] Harms T K, Wentz E A, Grimm N B. Spatial heterogeneity of denitrification in semi-arid floodplains. Ecosystems, 2009, 12(1): 129-143.
- [60] 李吉. 怀牛膝连作对根际土壤微生物群落结构和功能多样性的影响[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.