

DOI: 10.5846/stxb201805141055

水燕, 徐增洪, 刘国锋. 不同土壤深度对宁夏石嘴山盐碱地细菌菌群多样性的影响. 生态学报, 2019, 39(10): - .
Shui Y, Xu Z H, Liu G F. Effect of depth on bacterial diversity in saline-alkali soil in Shizuishan region in Ningxia. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(10):

不同土壤深度对宁夏石嘴山盐碱地细菌菌群多样性的影响

水 燕^{1,2}, 徐增洪^{1,2}, 刘国锋^{1,2,*}

1 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081

2 南京农业大学 无锡渔业学院, 无锡 214081

摘要: 宁夏自治区是我国受到土壤次生盐渍化危害的重点区域, 然而对该地区盐碱化形成机制及影响因素的研究资料较少。在宁夏石嘴山地区采集土壤样本, 采用基于 16S rRNA 的 PCR-DGGE 技术对不同深度土壤的细菌群落多样性和优势种群进行分析, 以期从土壤生态角度探索该地盐渍化成因及改良措施。带谱相似性和 UPGMA 聚类结果表明, 表层 ($D < 20$ cm) 土壤和底层 ($D > 80$ cm) 土壤样本中细菌菌群相似程度较高; 而中间层 ($20 \text{ cm} < D < 80 \text{ cm}$) 土壤样本中细菌菌群相似程度很低。多样性指数分析显示, 随着地层深度的增加, 菌落的丰富度和多样性均趋于下降; 而均匀程度变化幅度不大。对其中 5 个优势条带进行测序比对的结果表明, 该地区土壤可识别优势细菌菌群为变形细菌门 Proteobacteria 和拟杆菌门 Bacteroidetes, 但大部分条带未可识别。上述结果表明该地区盐碱土壤中的细菌菌群多样性程度较高, 且优势菌群不尽相同; 土壤深度与细菌菌落多样性在一定程度上存在线性关系, 推测可能与土壤含水量有关, 但需要更多数据支撑。旨在为进一步深入研究次生盐渍化土壤的形成机制以及影响因素提供理论参考。

关键词: 盐碱地; 次生盐渍化; 16S rRNA; PCR-DGGE; 菌落多样性

Effect of depth on bacterial diversity in saline-alkali soil in Shizuishan region in Ningxia

SHUI Yan^{1,2}, XU Zenghong^{1,2}, LIU Guofeng^{1,2,*}

1 Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

2 Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: As a key area affected by secondary soil salinization in China, there is limited relevant research data on the formation mechanisms, as well as their influencing factors, in the Ningxia Autonomous Region. In this study, soil samples were collected at various soil depths in the Shizuishan area, Ningxia. A 16S rRNA-related PCR-DGGE technique was used to analyze bacterial diversity and dominant populations at different depths to explore the causes of salinization and its improvement measures from the perspective of soil ecology. Results from band similarity and UPGMA clustering indicated that the degree of bacterial diversity in the surface ($D < 20$ cm) and bottom ($D > 80$ cm) layers were similar and relatively high, whereas it was low in the middle layer ($20 \text{ cm} < D < 80 \text{ cm}$). The diversity indices analysis demonstrated that with increasing depth, the degree of richness and diversity tended to decline; whereas the degree of uniformity did not change considerably. Sequence comparison of five clones showed that the most predominant bacterial communities in this region

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2016ZD0604); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费(2017JBFM13)

收稿日期: 2018-05-14; 网络出版日期: 2018-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: Liugf@ffrc.cn

were Proteobacteria and Bacteroidetes, whereas the remaining bands were not identified. The results of this study indicated that the degree of microbial diversity in saline-alkali soil in this area is very high, and the predominant bacterial flora is not the same. Generally, the bacterial diversity showed a linear relationship with depth, which is possibly related to the soil moisture content. However, more profound and in-depth data is needed to support this study. This study aimed to provide a theoretical reference for further in-depth study on secondary salinized soil formation mechanisms and their influencing factors.

Key Words: saline-alkali soil; secondary salinization; 16S rRNA; PCR-DGGE; bacterial diversity

土壤盐渍化(盐碱化)与次生盐渍化是土地退化的主要形式,也是生态环境的一种恶化现象,是一个世界性的难题。我国是土壤盐渍化危害最为严重的国家,盐碱土地资源总额约为 10^8hm^2 ,尤其是西北地区的甘肃、宁夏、新疆等省区都不同程度发生盐渍化危害^[1]。土地盐碱化问题与人类活动,尤其是农业灌溉,密切相关。据统计,全世界约有 55% 的土地分布在干旱及半干旱气候带,这些地区雨量稀少,干旱地区年降雨量一般不足 250 mm^[2]。发展灌溉是促使这些地区农业发展的一项重要手段。然而因过量施用化肥及不合理的灌溉管理措施而形成的土壤次生盐渍化的问题,也成为当今农业发展的主要障碍之一^[3]。国内外学者在探究引起土壤次生盐渍化的原因方面做了大量研究工作,因研究侧重点的不同对次生盐渍化形成的主要原因存有不同的观点。部分学者认为对于干旱地带的大多数灌区来说,土壤次生盐渍化的形成和发展是由于不合理的灌溉,用水不当抬高了地下水位,加之强烈的蒸发而引起土壤盐渍化^[4]。

宁夏回族自治区位于西北地区东部、黄河中上游,地处中温带半干旱、干旱区,降水稀少(平均年降水量 292 mm),蒸发强烈(水面蒸发量 1296 mm),当地水资源总量为 1117 亿 m^3 ,仅占全国水资源总量的 0.1%^[5]。近年来,引黄灌区的土壤盐渍化问题受到了宁夏自治区的高度关注^[6]。银川地区盐碱地已占总耕地面积的 49% 以上,土壤盐碱化已成为影响宁夏农业生产的重要问题之一。现阶段学者对宁夏银川平原盐碱地研究较多,并取得了一定的成果。例如:倪细炉等^[7]对盐碱植物抗盐性进行综合评价,得出 4 种植物抗盐能力依次为白刺>甘肃怪柳>黄花补血草>芨芨草的结论。张永宏等^[8]指出应用控制灌溉是宁夏引黄灌区盐碱地水稻比较适宜的灌溉管理模式。简而言之,目前大部分研究主要集中在甘肃盐碱地土壤性质和地面植物生长特性、灌溉模式等方面,对探索次生盐渍化土壤的形成机制以及人类干预因素对盐渍化土壤的利弊研究报道很少。

另一方面,土壤是土壤微生物的生存寄居场所,由于土壤有机质含量酸碱度水分及土质的不同,与此环境相适应的土壤微生物种类也千差万别。在同一地区不同地层的土壤微生物种类和数量也不一样。盐碱土壤微生物群落研究对于加强盐生植物资源的开发和利用、改良盐碱土壤等方面具有十分重要的意义。然而由于缺乏适宜盐渍化土壤环境条件下微生物的分离和培养方法,对盐渍化生态环境下土壤微生物类群的研究至今仍然很少,盐渍化生态环境下微生物资源的开发与利用研究更是少之又少。

基于 16S rRNA 的聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE)是一种重要的研究微生物群落多样性的方法^[9-10]。本研究以宁夏回族自治区石嘴山地区低洼池塘区域盐渍化土壤为研究对象,利用 PCR-DGGE 技术分析不同深度土壤细菌类群多样性及优势种群,研究结果将为盐碱环境下土壤微生物资源分布和研究提供重要的理论依据。

1 研究区域和样品采集

本研究区域位于宁夏回族自治区石嘴山市大武口地区星海镇石嘴山兰泰养殖合作社,该地分布有低洼池塘,底层土壤性质为典型的硫酸盐型盐碱土,pH 值为 8.7—9.3。为达到农户增收并改良土壤环境的目的本养殖合作社于 2013 年引进大宗淡水鱼池塘养殖技术。地理坐标为 $38^\circ 54' 20''$ — $38^\circ 55' 25'' \text{N}$ 之间, $106^\circ 21' 31''$ — $106^\circ 21' 43'' \text{E}$ 之间。石嘴山市属于温带大陆性气候,降水量最大时期为 7 月份,约为 24 mm。

于 2016 年 7—9 月份对盐碱样地进行土壤样品采集。随机选取 3 个样点(S1、S2 和 S3,图 1)、每个样点

进行分层采集,从 0—20 cm、20—40 cm、40—60 cm、60—80 cm 4 个地层深度按五点采样法采集土壤样品。以表层混合土(control surface soil, CS)、底层混合土(control hybrid soil, CH)和植物根际土(control rhizosphere soil, CR)作为对照组。将土壤样品放在便携式冰盒中带回实验室,放在-20℃冰箱保存,用于 DGGE 分析。

2 研究方法

2.1 土壤样品的理化性质测定

土壤样品基本理化参数(含水量、烧失量、孔隙度、总氮、总磷、pH 值等)采用常规方法测定:土壤 pH 值的测量选用上海雷磁 PHS-3C 型 pH 计测定;总氮(total nitrogen, TN)、总磷(total phosphorus, TP)采用浓 H₂SO₄消煮-比色法测定;烧失量(loss on ignition, LOI)即将在 105—110℃烘干的原料在 1000—1100℃灼烧后失去的重量百分比。土壤孔隙度由孔隙度测定仪(贝士德仪器,北京)测定;每个样品有 2 个重复,取其平均值。

2.2 土壤 DNA 的提取

采用 Fast DNA™ SPIN Kit For Soil 提取样品基因组 DNA,操作方法按说明书进行。提取的 DNA 经 Thermo NanoDrop 2000 进行核算质量与浓度检测。

2.3 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

以样品基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 扩增样品 16S rRNA 高变区序列。GC-338 F: 5'-CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGG CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', 518 R: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'; 338 F: 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'。PCR 扩增体系(50 μL)为: 10×PCR buffer 5 μL; dNTP Mixture(2.5 mM)3.2 μL; ExTaq(5 U/μL)0.4 μL; GC-338 F(20 μM)1 μL; 518 R(20 μM)1 μL; 模板 DNA 50 ng; 补 ddH₂O 至 50 μL。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,55℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;最终 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物采用 OMEGA 公司 DNA Gel Extraction Kit 纯化回收。扩增结果用 2%的琼脂糖凝胶进行检测。PCR 仪为 Biometra 公司生产的 T-gradient,凝胶成像仪为 Bio-Rad 公司的 Gel-Doc2000 凝胶成像系统。

2.4 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)及图谱分析

取 10 μL PCR 的产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析。采用变性梯度为 35%—55%、浓度为 7%的聚丙烯酰胺凝胶在 1×TAE 缓冲液中 150 V 60℃ 下电泳 5 小时。电泳完毕后采用银染法染色,简要步骤如下: 1)固定液(乙醇 50 mL 和冰醋酸 2.5 mL,定容至 500 mL)固定 15 min;2)Milli-Q 纯水清洗、20 s 和 2 min 各一次;3)银染液(硝酸银 1g 和 37% 甲醛 0.75 mL,定容至 500 mL)染色 15 min;4)Milli-Q 纯水清洗、20 s 和 2 min 各一次;5)显色液(氢氧化钠 7.5 g 和 37% 甲醛 2.5 mL,定容至 500 mL)显色 5—7 min;最后用终止液(乙醇 50 mL 和冰醋酸 2.5 mL 定容至 500 mL)终止反应。

图谱分析采用 Bio-Rad 公司的凝胶定量软件 Quantity One 4.6.5 对样品条带分析^[11]。依据戴斯系数 Cs (Dice Coefficient)计算个附着基样品间的相似性,对相似性结果用非加权组平均法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means,UPGMA)进行聚类分析。

2.5 数据分析

多样性指数是研究群落物种数和个体数以及均匀度的综合指标^[12]。DGGE 图谱采用 Quantity one 软件对每个样品的电泳条带数目、条带密度进行数字化分析,Shannon 指数(*H*)^[13]、丰度指数(*S*)和均匀度 Pielou



图 1 采样点分布图

Fig.1 The map of the sampling sites

指数(E)^[14]等指标被用来比较不同样品的多样性情况。 S 指数是某样品中所有条带数目总和,其它算法为:

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i = - \sum_{i=1}^s \left(\frac{N_i}{N} \right) \ln \left(\frac{N_i}{N} \right)$$

$$E = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\ln S}$$

式中, p_i 为样品中单一条带的强度在该样品所有条带总强度中所占的比率; N 为 DGGE 图谱单一泳道上所有条带的丰度; N_i 为第 i 条带的丰度。

测序结果采用 DNASTar 和 Cluster 软件进行序列分析,下载最相似的菌株序列作为系统发育树的参考序列。然后采用 MEGA 软件,Neighbor-joining 法构建系统发育树,自展数(bootstrap)为 1000。PCA 分析采用 canoco 软件进行。

所有数据均用软件 Excel 和 SPSS 19.0 软件用 Duncan 检验方法进行数据分析处理和差异显著性分析($P < 0.05$ 差异显著)。同列数据后具有相同字母者,表示在 0.05 水平上差异不显著。

2.6 条带的切胶、克隆和测序

根据 DGGE 图谱,挑选共有及特有的优势条带。在紫外灯下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 $^{\circ}$ C 过夜。用所得的浸提液作为模板用引物 338 F 和 518 R 进行 PCR 扩增,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,得到的阳性克隆子送往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。

3 结果与分析

3.1 土壤样品理化性质结果分析

本实验所测定土样的理化性质如表 1 所示,试验地区土壤的含水量在 5.59%—23.64% 之间,pH 维持在

表 1 采样点信息和样品理化性质

Table 1 Distribution of the sampling information and physics-chemical characterization

样品编号 Sample No. ¹	土壤深度 Depth/cm	含水量 MC/%	孔隙度 Porosity	总氮 TN/ (mg/g)	总磷 TP/ (mg/g)	烧失量 LOI/%	pH
1 [#] : S1-20		5.59e ^b	12.90e	0.39c	0.32b	3.65c	8.28b
2 [#] : S2-20	-20	18.8c	36.66bc	0.46a	0.33b	6.18a	7.98c
3 [#] : S3-20		19.62b	37.9b	0.32d	0.63a	2.74d	9.06a
4 [#] : S1-40		10.96de	23.54d	0.38c	0.27c	3.14c	8.03c
5 [#] : S2-40	-40	19.31b	37.43c	0.48a	0.34b	6.57a	8.22b
6 [#] : S3-40		20.71a	39.5a	0.15d	0.6a	1.06e	8.89b
7 [#] : S1-60		12.96d	27.1d	0.39c	0.28c	3.50c	8.29c
8 [#] : S2-60	-60	19.75b	38.1b	0.51a	0.35b	6.27a	8.23c
9 [#] : S3-60		23.64a	43.63a	0.2d	0.38b	1.27e	8.33b
10 [#] : S1-80		9.76d	21.29d	0.36c	0.35b	2.66d	7.93c
11 [#] : S2-80	-80	19.78b	38.14b	0.43b	0.34b	6.02b	8.04c
12 [#] : S3-80		21.28a	40.32a	0.44b	0.34b	3.36c	8.55b
13 [#] : CS	—	5.65e	13.03e	0.34c	0.35b	5.78bc	9.17a
14 [#] : CH	—	11.16d	23.89d	0.3c	0.36b	5.83b	9.04a
15 [#] : CR	—	10.72d	23.1d	0.5a	0.41b	3.27cd	8.27c

1 Sample No., 样品编号 sample number; MC, 含水量 moisture content; TN, 总氮 total nitrogen; TP, 总磷, total phosphorus; LOI, 烧失量 loss on ignition; CS, 表层混合土 control surface soil; CH, 底层混合土 control hybrid soil; CR, 植物根际土 control rhizosphere soil; b 同一列中的数值后字母不同表示该指标有显著差异 ($P < 0.05$)

7.98—9.06 之间,处于碱性水平。总磷含量在 0.27—0.63 mg/g 之间,总氮在 0.15—0.51 mg/g 之间,土样较为贫瘠,孔隙度差异较大。从不同土壤深度来看,各个深度(从地下 20 cm 到 80 cm)土壤样品的基本理化参数之间并不存在显著差异,然而不同采样点之间的差异较大,表明该地区土壤性质非常不均匀。其中表层土对照组的含水量非常低,pH 值较高,盐渍化程度较高;而根际土对照组的土壤理化指标与非根际土之间并没有显著差异,表明在该地区植物根际对盐渍化土壤的改良影响程度不大。

3.2 细菌 16S rRNA 的 PCR 扩增

经分光光度计检测提取后样品 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.78—1.95,说明提取的 DNA 质量良好,可以作为模板进行 PCR 反应。以 GC-338 F 和 518 R 为引物经巢式 PCR 后产物的电泳结果如图 2 所示,条带大小与细菌 16S rRNA-V3 区理论大小(约 234 bp)相同,且无非特异性扩增,可直接用于后续 DGGE 实验。

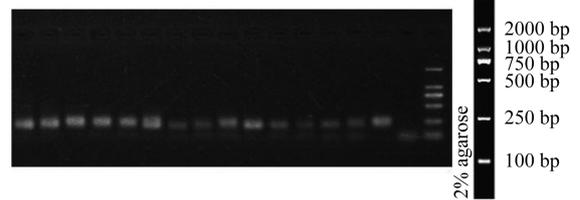


图 2 16S rRNA-V3 区电泳结果 M:DL 2000

Fig.2 The results of 16S rRNA-V3 region of bacteria M: L 2000

3.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)指纹图谱

对土壤样品的 DGGE 指纹图谱以及模式图进行了分析,结果如图 3 所示。理论上 DGGE 图谱中每一个条带代表一种微生物,条带的数目及灰度可以反映出细菌的种类及相对数量^[15]。由图可见,15 个盐碱地土壤样品的可分辨条带总数在 4—24 之间,其中 3#样品的可识别条带数量最多(24 条),4#、7# 和 13#样品的条带数量最少(4 条)。不同土壤样品的 DGGE 图谱在迁移率及条带灰度值方面均存在较大的差异,表明宁夏石嘴山地区盐碱地土壤中的微生物多样性丰富程度非常高,存在大量的细菌类群,并且土壤样品中细菌优势菌群不尽相同。并且,不同土壤间具有许多共同的条带,然而这些公共条带的强度也不相同,说明这些供试土壤之间可能存在一些共有的细菌类型,但是土壤微生物在 DNA 水平上有明显差异。

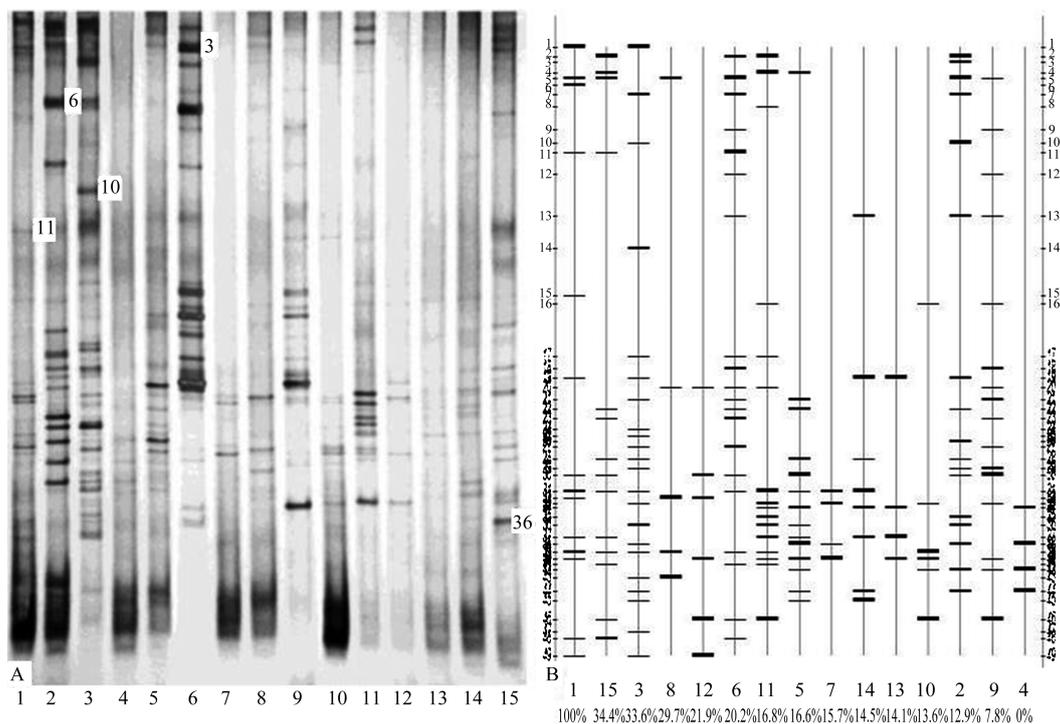


图 3 16S rRNA 变性梯度凝胶电泳图谱和模式图(由 Quantity One 4.6.2 软件生成)

Fig.3 PCR-DGGE profiles and its digitized patterns (by Quantity one 4.6.2 software) Numbers represent the bands excised

3.4 相似性与聚类分析

戴斯相似性系数 C_s 的大小可以体现出群落间细菌种群的差异,基于 DGGE 图谱的 0/1 矩阵计算的相似性矩阵如表 2 所示。从表中可以看出,样本之间 C_s 值在 0—43.6% 之间。13[#] 和 14[#] 样本作为对照组之间的 C_s 值最高,达到 48%;10[#] 和 12[#] 样本之间的相似性系数次之,为 43.6%,而这两个样本均来自于 -80 cm 的地层深度。以不同地层深度来比较,在 -20 cm 地层,1[#]、2[#] 和 3[#] 样本之间的相似性系数分别为 12.9%、33.6% 和 25.9%;在 -40 cm 地层,4[#]、5[#] 和 6[#] 样本之间的相似性系数分别为 31.5%、0 和 12.3%;在 -60 cm 地层,7[#]、8[#] 和 9[#] 样本之间的相似性系数分别为 0、4.6% 和 7.9%;而在 -80 cm 地层,10[#]、11[#] 和 12[#] 样本之间的相似性系数分别为 33.2%、43.6% 和 21.3%。这些结果表明,不同地层的样本之间的相似性差异非常大,大体上来说,在表层 ($D < 20$ cm) 土壤和底层 ($D > 80$ cm) 土壤样本之间的戴斯相似性系数较高,样本之间细菌种群的差异程度较低,而中间层 ($20 \text{ cm} < D < 80 \text{ cm}$) 土壤样本之间戴斯相似性系数较低,表明样本与样本间的细菌种群的差异度较高,多样性也较高。

对 PCR-DGGE 图谱获得的 0/1 矩阵进行的 UPGMA 聚类结果(图 4)显示。从图中可以看出 15 个样本聚为 2 个分支,4[#]、5[#]、13[#] 和 14[#] 样本作为第一分支;其余作为第二分支,并且两大分支之间的距离较远。而第二分支内部进一步聚为 2 个亚支。根据相似性和聚类结果可初步得出结论:相对于混合土壤样品中细菌群落多样性程度而言,不同地层深度土壤样品之间细菌群落多样性程度相对较高;而根际土壤样品中细菌群落多样性没有显著表现。

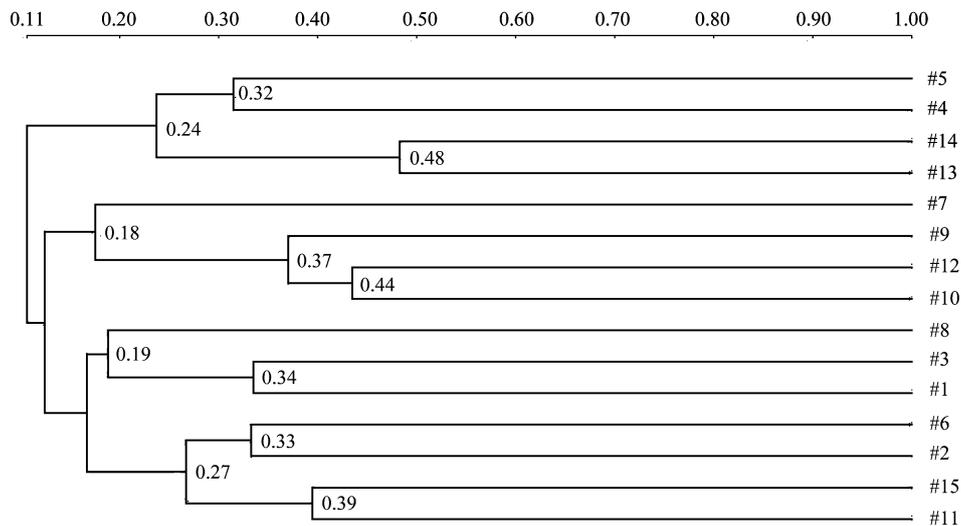


图 4 0/1 相似性矩阵的 UPGMA 聚类结果

Fig.4 The result of UPGMA clustering based on the 0/1 similarity matrix of the microbiota from samples

Dice Co-efficient 数值表示相似性大小;聚类图由软件 NTSYS 2.10e 绘制;UPGMA:非加权组平均法 unweighted pair group method with arithmetic means

3.5 多样性指数分析

多样性指数是利用数学统计方法测度群落中物种数、个体数量及各物种均匀程度等方面的常用参数。Pielou 指数(E 指数)用于测度群落中不同物种多度分布的均匀程度;Shannon 指数(H 指数)和丰度指数(S 指数)常用于评价群落的多样性,但前者能体现群落内种群数和种群间个体分配的均匀性^[16]。根据 DGGE 图谱中条带的数量与灰度计算各多样性指数结果如图 5 所示。从图中看出,各土壤样品之间丰度指数 S 指数在 8—17 之间,变化较大。然而大概来说,随着地层深度的增加, S 值逐步下降,虽在 -60 cm 地层深度丰度值减少较快,但变化幅度较小,显示土壤细菌菌群种类与地层深度之间呈负相关关系。Shannon 指数 H 值在 1.8—2.9 之间,变化趋势与 S 类似,表明多样性程度随着地层深度的增加逐渐降低。Pielou 指数 E 值在 0.903—0.956,变化幅度很小,表明各地层深度检测样本与对照组之间均匀程度较高。

表 2 戴斯系数 Cs 比较 PCR-DGGE 图谱的相似性矩阵

Table 2 The similarity matrix of the microbiota from PCR-DGGE 16S rRNA banding profiles by Cs index

2	12.9														
3	33.6	25.9													
4	0	24.6	4.6												
5	16.6	26.1	20.1	31.5											
6	20.2	33.3	14.4	0	12.3										
7	15.7	4.1	7.7	8.7	23.5	4									
8	29.7	10.2	8.1	0	0	16.6	0								
9	7.8	10.8	6.2	2.2	28.7	34.1	4.6	7.9							
10	13.6	4.2	6.7	8.1	13	2.9	32.5	19.3	32.9						
11	16.8	21.6	15.5	4.3	29.1	17.6	25.1	6.7	22.2	33.2					
12	21.9	4	6.4	0	19.1	9.7	15.8	22	41.2	43.6	21.3				
13	14.1	6	1.4	14.9	24.5	0	20	0	1.3	16.6	17.6	14.3			
14	14.5	23.4	15	26.2	29.5	7.3	10.7	0	1.5	0	24.7	0	48.3		
15	34.4	29.2	10.5	0	26.4	38.4	9.6	17.6	10.6	11.3	39.4	7.7	3.1	13.5	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	

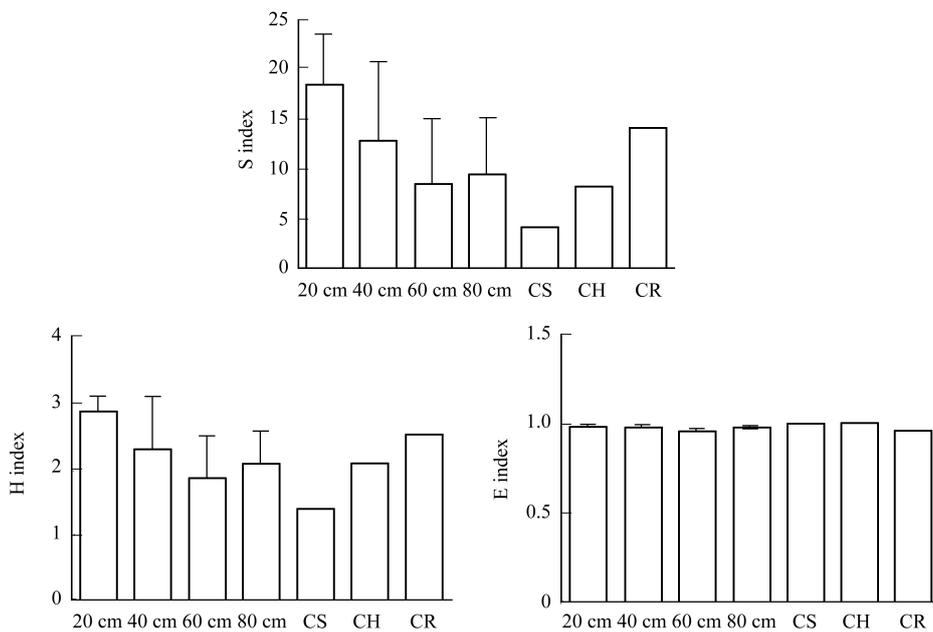


图 5 15 个土壤细菌微生物样品的多样性指数

Fig.5 The diversity index of bacteria among the samples

S index, 丰度指数 指条带数; H index, Shannon 指数 $H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = - \sum_{i=1}^S \left(\frac{N_i}{N} \right) \ln \left(\frac{N_i}{N} \right)$; E index, Pielou 均匀度指数 $E = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\ln S}$; CS,

表层混合土 control surface soil; CH, 底层混合土 control hybrid soil; CR, 植物根际土 control rhizosphere soil

3.6 主要电泳条带的序列测定和系统发生分析

DGGE 凝胶条带回收后,以 338 F 和 518 R 为引物进行 PCR 扩增,PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上,转化至 DH5 α 感受态细胞中,筛选阳性克隆测序。16S rRNA-V3 区特征片段经 DGGE 分离条带切割,共得到 37 条条带。将条带进行克隆测序,所得到的序列大小在 169—195 bp 范围内。在 GenBank 核酸数据库中

进行 BLASTN 序列比对显示其中 5 条条带分别归属于 2 个细菌类群:变形细菌门 Proteobacteria 和拟杆菌门 Bacteroidetes (表 3), 其中 4 条 (Band 6、3、36 和 11) 属于变形细菌门的 α 、 β 和 γ 亚门, 其余 32 条条带为未知菌种。

其中 S2 号采样点的 -20 cm 土壤深度样点 2# 的土壤样品回收条带 Band 6 的 DNA 序列与 *Marinobacter persicus* (NR_109110) 的序列相似性达 100%, 而这一条带也存在于 1#、6# 和 15# 土壤样品中, 说明此种细菌在各采样点中广泛分布; 6# 样品的回收条带 Band 3 与 γ -变形细菌门的 *Microbulbifer okinawensis* (NR_112917) 的序列相似性达 98%, 这一条带也存在 15#、8# 和 2# 样品中; 而 3# 土壤样品的回收条带 Band 10 与拟杆菌门 Bacteroidetes 的 *Marivirga sericea* (NR_112183) 序列相似性达 97%, 并没有在其它土壤样品中被检测到。

表 3 经 DGGE 分离获得的细菌 16S rRNA-V3 序列

Table 3 16S rRNA-V3 sequence similarities to closest relatives of DNA recovered from the respective bands in DGGE gels

条带编号 ^a Band No.	最相似菌株名称(登录号) ^b Closest Relatives (Accession No.)	最相似类群 Affiliation Phylum	相似度 Identity/%
条带 6 Band 6	<i>Marinobacter persicus</i> (NR_109110)	γ -proteobacteria	100
条带 3 Band 3	<i>Microbulbifer okinawensis</i> (NR_112917)	γ -proteobacteria	98
条带 10 Band 10	<i>Marivirga sericea</i> (NR_112183)	Bacteroidetes	97
条带 36 Band 36	<i>Kofteria flava</i> (NR_041981)	β -proteobacteria	91
条带 11 Band 11	<i>Tepidicaulis marinu</i> (NR_135865)	α -proteobacteria	80

a 条带编号与图 3 所示对应; b 仅列出最高匹配度序列及名称

采用 MEGA5 软件 Neighbor-joining 法构建系统发育树, 自展数 (bootstrap) 为 1000, 系统发育树如图 6 所示。

4 讨论

盐碱地形成与气候、地理条件、土壤质地、植物类型以及耕作管理等因素有关。近年来宁夏地区土地盐渍化程度加剧, 其中仅银川地区中度和重度盐渍土面积达到 4600 km², 占总面积的 50% 以上, 属于中度和轻度盐化土类型, 盐分呈表聚趋势。该地区土壤盐渍化的原因是多方面的。一方面该地属于干旱地区, 降水量小于蒸发量, 溶解在水中的盐分随土壤毛细管水蒸发作用而积聚在土壤表层, 使得表层土壤大量积盐; 另一方面该地地势较低, 地表和地下水运动使得水溶性盐随着水从高处流向低处, 在低洼地带滞留, 导致盐分积聚。土壤灌溉管理不当造成排水不畅等也进一步加剧了土壤盐渍化。

土壤微生物积极参与陆地生态系统中的物质循环及能量转化, 与土壤理化性质的环境条件密切相关, 是表征土壤肥力的重要指标之一。土壤微生物群落活性及其多样性不仅在很大程度上决定了生物地球化学循环、土壤有机质的周转及土壤肥力和质量, 也与耕作措施有关^[17]。土壤盐渍化不仅直接影响土壤中微生物活性, 而且通过改变土壤的部分理化性质来间接影响土壤微生物的生存环境, 导致土壤微生物种群、数量及活性均与健康土壤有较大的差别。土壤理化性质 (电导率、硝态氮、总盐) 对微生物的生长有很大的影响, 对表层土的影响远大于深层土。土壤中即使有机质含量丰富, 如果土壤盐渍化严重, 微生物仍不能正常生长。受土壤基本性质影响最大的是细菌和放线菌, 真菌对土壤盐渍化的适应性相对要强一些^[18]。土壤盐分升高, 造成土壤微生物渗透胁迫, 使土壤活性微生物种群数量降低, 导致活体微生物分泌酶的数量减少。一般来说, 细菌、放线菌数量与土壤全盐含量呈显著负相关关系, 细菌的数量与土壤有机质含量显著相关, 即土壤盐害程度

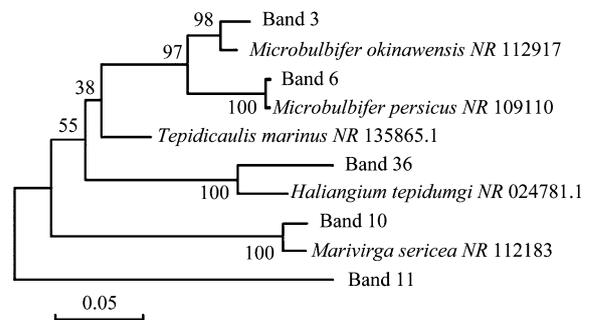


图 6 DGGE 图谱条带回收获得的 16S rRNA 系统进化树

Fig.6 Neighbour-joining phylogenetic tree of the 16S rRNA obtained from retrieved DGGE bands

越高,微生物数量越小。

当前对于宁夏地区盐渍化土壤菌群微生物的研究还相对较少,已有的研究表明在宁夏地区盐渍化土壤微生物群落中细菌占绝对优势,其次是放线菌和真菌^[19]。另有对宁夏典型盐渍化土样放线菌进行分离筛选的研究结果表明,具有特殊抑菌活性功能菌为链霉菌(*Streptomyces*),形态特殊菌为拟无枝酸菌(*Amycolatopsis*),耐盐菌株为诺卡氏菌(*Nocardia*),其他形态特殊菌株和耐盐菌株均为拟诺卡氏菌(*Nocardiopsis*)^[20]。而对宁夏地区不同类型盐渍化土壤的分析显示,土壤盐渍化程度不同与耐盐性放线菌比例直接相关。即重盐化土壤中分布的耐盐放线菌最多;其次为中度盐渍化、轻度盐渍化土壤,并且盐渍土壤中放线菌分为仅能在盐渍环境下才能良好生长的嗜盐性放线菌和对盐渍化的程度具有不同敏感度的耐盐性放线菌^[21]。另有学者从宁夏盐渍化土壤中分离出硫氧化细菌,经鉴定疑似为新种^[22]。

由于 PCR-DGGE 图谱能直观地反映出不同性质土壤细菌 16S rRNA 的多样性,即可在分子水平反映土壤细菌种群结构多样性,在土壤生态研究中被广泛应用。在 DGGE 指纹图谱中,不同位置的条带代表不同的细菌类群;而条带灰度值则反映出不同细菌类群相对量的多少。在不同泳道同一横向位置的不同条带一般被认为是同一个细菌类群。本研究从宁夏盐碱地土壤样品中提取基因组总 DNA,利用 PCR-DGGE 技术分析不同地层深度盐碱地中微生物的种群构成。从 DGGE 图谱上可以看出,宁夏石嘴山地区盐碱地土壤样品中可分离到 4—24 条不等的条带,说明该地区盐碱地土壤中存在丰富的微生物资源,并且多样性程度较高。从对照组来看,表层混合土(CS, 13[#]样本)含水量较低,土壤碱性强(pH>9.0),且相较于实验组在图谱条带数量上存在明显劣势,表明该地区表层土壤中盐分积聚明显,高碱性环境对大部分常规微生物造成胁迫导致其难以存活。与此相比,底层混合土壤(CH, 14[#]样本)和根际土壤(CR, 15[#]样本)的图谱条带丰富很多并且界限清晰可辨,说明底层土壤和根际土壤的生态环境在一定程度上要优于表层土壤。这一结果为宁夏地区盐碱地表层盐分沉积理论提供了部分依据。

一直以来,灌溉管理和低洼地区池塘养殖对于改良盐碱地土壤生态环境的影响都是学者们十分关注的问题。这些改良措施存在的利弊也在不断被评估。在本研究中,实验样本取自低洼池塘养殖多年的人工干预环境条件下,本研究结果在一定程度上能反映池塘养殖的改良措施对改善该地区土壤生态环境的作用和意义。实验结果表明,样本之间的相似性随着土壤深度的不同差异较大,在表层($D < 20$ cm)土壤和底层($D > 80$ cm)土壤样本之间的细菌种群的相似性相对较高(差异程度较低),而中间层(20 cm $< D < 80$ cm)土壤样本之间细菌种群的相似性较低,表明差异度较高,多样性也较高。而在同一土壤深度不同样品之间,其条带数量和灰度值差异很大,说明菌群多样性差异程度大。总体来说,随着土壤深度的增加,其土壤细菌菌群的丰度指数和多样性指数都在逐渐降低。但不同取样点的土壤性质对实验结果影响很大。

对此我们推测,上述结果可能跟土壤含水量有关。一般来说,土壤含水量的多少会影响蛋白质的流动性及土壤酶活性以及细胞膜的流动性,而这是土壤微生物能否存活的重要基础。而土壤含水量的变化与土壤环境特性及土壤深度之间存在非常复杂的关系。如对松嫩平原盐碱地土壤分析表明,大多数理化指标如 pH、土壤容重、有机碳含量、碱解氮含量、全氮含量、全磷含量、全钾含量出现随深度显著变化^[23]。而对青藏高原昆仑山垭口土壤的研究结果表明可培养细菌数量与多样性在一定程度上均与土壤深度呈负相关关系^[24]。这与当地的地貌和地质成因有很大的关系。在宁夏盐碱地区,由于地层地下水和表层灌溉等的交相作用,使得各深度土壤环境规律性相对较低,地域差异性也很大。在池塘表层区域($D < 20$ cm),由于养殖活动导致淤泥含水丰富,水中可溶性蛋白和浮游微生物移动扩散相对容易,使得采样点之间细菌菌群的相似性程度较高;随着地层深度的增加,土壤含水量相对减少使得水中物质和呼吸能量交换逐渐困难,土壤均一性逐渐降低,最终体现在细菌菌群上为各点之间相似性降低;在深度地层中($D > 80$ cm),土壤孔隙度相对提高,土壤间隙增大(但是含水量并没有显著变化),这或许是细菌菌群由于呼吸作用导致的相似性程度变高的一个考虑因素。然而,从实验方法上看,由于 PCR-DGGE 在分析土壤细菌多样性方面分辨率不高,基于 DGGE 带谱的相似性和 UPGMA 聚类分析结果会有较大偏差,使结果和结论的可信度较低。在后续研究中一方面可以有针对性地加

大取样点的位置和数量,增加实验基数,有利于从数据中凝练规律,另一方面可以利用微生物高通量测序分析来进一步深入这项研究。

本研究对图谱中优势条带经切胶回收克隆测序结果显示,该盐碱地土壤中主要的优势种群分布在 2 个细菌类群:变形细菌门 *Proteobacteria* 和拟杆菌门 *Bacteroidetes*,此外还有 32 条优势条带序列属于未培养菌。变形菌门和拟杆菌门是构成土壤和污泥微生物群落的主要种群,本研究表明这两种微生物种类在盐渍化土壤环境中也有广泛分布^[16]。然而,大部分优势菌种尚未被鉴定的结果说明,这些优势菌株可能是目前尚且不能培养或者是难获得纯培养物的新种资源,这些菌株长期适应干旱、有机质缺乏、盐碱度较高的极端环境,最终成为优势菌株。对这些优势菌株展开研究不仅能进一步丰富地球微生物资源,而且对于盐碱地盐渍化土壤的改良和生态发展等方面的应用都具有重要的意义。

总而言之,本研究采用基于 16S rRNA 的 PCR-DGGE 技术对宁夏石嘴山地区低洼池塘不同深度土壤的细菌群落多样性和优势种群进行分析,研究结果在一定程度上暗示了该地区盐碱地的形成机制之一可能是表层低洼土壤的盐分堆积;并且人工养殖活动对于改善土壤生态环境具有一定积极作用。

参考文献 (References):

- [1] 王遵亲. 中国盐渍土. 北京: 科学出版社, 1993.
- [2] Szaboles I. 盐渍土是个世界性的问题//国际盐渍土改良学术讨论会论文集. 北京: 北京农业大学出版社, 1985.
- [3] 杜占宽. 河套灌区土壤次生盐碱化情况研究及改良措施. 内蒙古水利, 2009, (3): 63-64.
- [4] 苟宇波. 宁夏盐碱地不同改良模式对土壤理化性质和植物功能性状的影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2017.
- [5] 李茜, 孙兆军, 秦萍. 宁夏盐碱地现状及改良措施综述. 安徽农业科学, 2007, 35(33): 10808-10810, 10813-10813.
- [6] 王世荣, 王长军, 罗昀. 宁夏红寺堡扬黄灌区土壤次生盐渍化改良利用. 现代农业科技, 2009, (24): 274-274, 278-278.
- [7] 倪细炉, 岳延峰, 田英, 彭励, 沈效东. 4 种盐生植物抗盐能力的综合评价. 中国农学通报, 2010, 26(6): 138-141.
- [8] 张永宏, 尹志荣, 桂林国, 雷金银, 刘富华. 宁夏引黄灌区盐碱地水稻节水控灌抑盐效应. 节水灌溉, 2011, (7): 23-24.
- [9] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2(3): 317-322.
- [10] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法. 应用生态学报, 2004, 15(5): 899-904.
- [11] da Mota F F, Gomes E A, Paiva E, Seldin L. Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel *rpoB*-based PCR-DGGE method. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 53(2): 317-328.
- [12] 谢应忠. 生物多样性的生态学意义及其基本测度方法. 宁夏农学院学报, 1998, 19(3): 13-20.
- [13] Shannon C E. A mathematical theory of communication. The Bell System Technical Journal, 1948, 27(3): 379-423.
- [14] Pielou E C. Association tests versus homogeneity tests; their use in subdividing quadrats into groups. Vegetatio, 1969, 18(1/6): 4-18.
- [15] 郑贺云, 黎志坤, 李超, 张鲜姣, 胡建伟, 朱红惠. 新疆阿克苏地区盐碱地细菌类群多样性及优势菌群分析. 微生物学通报, 2012, 39(7): 1031-1043.
- [16] 汤玲娟, 石健, 范素素. PCR-DGGE 法分析细菌群落结构及多样性. 南通大学学报: 自然科学版, 2017, 16(1): 35-38.
- [17] 林先贵, 胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能. 土壤学报, 2008, 45(5): 892-900.
- [18] 李明, 孙兆军, 陈卫民, 张俊华. 宁夏地区盐渍化土壤微生物群落的研究现状及生物改良对其的影响. 安徽农业科学, 2014, 42(4): 1042-1044, 1046-1046.
- [19] Li M, Jiang L L, Sun Z J, Wang J Z, Rui Y C, Zhong L, Wang Y F, Kardol P. Effects of flue gas desulfurization gypsum by-products on microbial biomass and community structure in alkaline-saline soils. Journal of Soils and Sediments, 2012, 12(7): 1040-1053.
- [20] 李丽. 盐碱环境中放线菌多相分类及免培养研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [21] 来航线. 盐渍化极端生态环境条件下土壤微生物生态及放线菌资源[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [22] 白亚妮, 来航线, 温小玲, 李新平. 硫磺改良盐碱土的微生物效应研究. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(2): 153-157.
- [23] 魏晨辉, 沈光, 裴忠雪, 任蔓莉, 路嘉丽, 王琼, 王文杰. 松嫩平原盐碱地不同植物种植对土壤理化性质、肥力指标与根生长的影响及在不同土壤深度的表现差异. (2014-05-06). <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201405-66>. (引用日期:2018-9-30)
- [24] 张宝贵, 刘晓娇, 吴青柏, 刘光琇, 陈拓, 张威, 章高森, 伍修锟, 邓友生. 青藏高原昆仑山垭口不同深度土壤可培养细菌群落特征研究. 冰川冻土, 2016, 38(3): 776-784.