

DOI: 10.5846/stxb201807051469

戴良香,康涛,慈敦伟,丁红,徐扬,张智猛,张岱,李文金.黄河三角洲盐碱地花生根层土壤菌群结构多样性研究.生态学报,2019,39(19): - .
Dai L X, Kang T, Ci D W, Ding H, Xu Y, Zhang Z M, Zhang D, Li W J. Comparison of the microbial community in the rhizosphere of peanuts between saline-alkali and non-saline soil at different soil depths and intercropping cultivation in the Yellow River Delta. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(19): - .

黄河三角洲盐碱地花生根层土壤菌群结构多样性研究

戴良香¹, 康 涛², 慈敦伟¹, 丁 红¹, 徐 扬¹, 张智猛¹, 张 岱^{3,*}, 李文金^{2,*}

¹ 山东省花生研究所, 青岛 266100

² 泰安市农业科学院, 泰安 271000

³ 河北农业大学植物保护学院, 保定 071001

摘要:花生属豆科固氮作物,具有较强的抗旱耐盐性,土壤微生物在盐碱土生态系统中具有重要的生态功能。本研究以花生平作、花生/棉花间作为对象,通过 16S rRNA 基因克隆文库技术分析了黄河三角洲滨海盐碱地花生旺盛生长期不同含盐量盐碱地和非盐碱地 0—40cm 根层非培养土壤微生物群落组成及其多样性,分析了盐碱地花生根层土壤细菌群落与非盐碱地花生根层土壤细菌群落的差异,为揭示盐碱地花生根层土壤微生物的多样性以及土地利用变化与生态环境效应间的关系奠定基础。利用免培养技术直接从土壤样品提取总 DNA,针对细菌基因组 16S rRNA 基因的 V3 高变区进行 PCR 扩增;利用焦磷酸测序的方法对 V3 高变区 PCR 产物进行高通量测序,并对测序数据进行生物信息学分析。结果表明,(1)黄河三角洲滨海盐碱土较高含盐量土壤中根层土壤微生物种类、优势种群数量和群落功能多样性较非盐碱土较为丰富。(2)盐碱土花生平作或花生//棉花间作两种种植方式基本不影响二者 0—40cm 根层土壤微生物优势类群;不同土壤类型和种植模式下,花生和棉花根层土壤中优势菌群均为变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*) 4 种菌群,其总丰度为 80%—90%。非盐碱土中花生根层的酸杆菌门(*Acidobacteria*)丰度是盐碱土壤中的 3 倍以上,嗜热油菌纲(*Thermoleophila*)和放线菌纲(*Actinomycetales*)丰度远高于各种盐碱土壤花生平作和花生//棉花间作两种植模式下的花生根层土壤;非盐碱土平作花生 0—40cm 土层中 *Rubellimicrobium*, *Pontibacter* 和 *Lamia* 细菌则显著缺失。(3)土壤类型对土壤微生物菌群类型影响较大,聚类分析表明,10 个土壤样本依据土壤含盐量高低和根系分布深度聚为 3 类,即非盐碱土壤归为 1 类,盐碱土壤根系密集分布层 0—20cm、20—40cm 各归为 1 类。

关键词:土壤微生物群落;16S rRNA 基因;系统发育分析

Comparison of the microbial community in the rhizosphere of peanuts between saline-alkali and non-saline soil at different soil depths and intercropping cultivation in the Yellow River Delta

DAI Liangxiang¹, KANG tao², CI Dunwei¹, DING Hong¹, XU yang¹, ZHANG Zhimeng¹, ZHANG Dai^{3,*}, LI wenjin^{2,*}

¹ Shandong Peanut Research Institute, Qing dao, 266100, China

² Taian Academy of Agricultural Sciences, Taian, Shandong, 271000, China

³ Agricultural University of Hebei, Baoding, 071000, China

Abstract: The peanut or groundnut (*Arachis hypogaea* L.) is an important nitrogen fixing legume worldwide, which is strongly drought and salt resistant. Soil microbiomes play an important ecological role in the saline-alkaline soil ecosystem.

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD0201000);山东省现代农业产业技术体系创新团队岗位专家(花生)(SDAIT-04-06);山东省农业科学院创新工程(CXGC2019B)

收稿日期:2018-07-05; 网络出版日期:2019-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: qinhdiao@126.com; adaiadai1987@163.com

Many factors could shape the rhizosphere microbiome, but the effects of soil salinity, intercropping patterns, and soil depth on the composition of bacterial communities for peanuts are largely unknown. In this study, to compare and analyze the difference in rhizosphere bacterial communities between saline-alkali and non-saline soil, the soil in which the peanuts were grown, under single cropping and intercropping, were used as experimental materials. The different soil bacterial community compositions and diversities from 0—40 cm soil of saline-alkali and non-saline land in the saline-alkali coastal areas of the Yellow River Delta were analyzed using 16 s rRNA gene clone library technology. Thus, our study has laid a solid foundation for further functional investigation into the diversity of soil rhizosphere microbiomes from different soil types and the relationship between land use change and ecological environmental effects. The total DNA was extracted from the soil samples using free culture technology, and PCR amplification was performed on the high variation area of V3 in the 16S rRNA gene of the bacterial genome. Pyrosequencing was used to analyze the high variation area of V3, and a bioinformatics analysis was performed to further analyze the sequencing data. All analyzed samples were characterized by diverse bacterial communities, and the relative proportions of phylum, family, and genus. The results showed: (1) Rhizospheres grown in saline-alkali soils contained more bacterial diversity, dominant species, and community functional diversity than non-saline grown ones. (2) Single cropping or intercropping patterns appeared to not affect the dominant bacterial communities in the 0—40 cm rhizosphere soil. *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, and *Acidobacteria* were significantly abundant rhizosphere microbiomes in all soil types, and accounted for more than 80%—90% of the community. In addition, the abundance of *Acidobacteria* in non-saline soils were more than three times of these in saline-alkali land, and *Thermoleophilia* and *Actinomycetales* were more abundant in non-saline soil than those in single cropping and intercropping of saline-alkali land. However, *Rubellimicrobium*, *Pontibacter*, and *Lamia* were relatively less in the 0—40 cm soil of signaling cropping non-saline land. (3) Soil types appeared to affect the types of microbiomes in the rhizospheres. All the samples were largely divided into three classes: non-saline land, 0—20 cm, and 20—40 cm rhizospheres according to the soil salinity and depth of root distribution by clustering analysis.

Key Words: Microbial Community; 16S rRNA gene; phylogenetic analysis

黄河三角洲位于我国山东省,东经 118°07—119°18,北纬 36°55—38°12,是黄河在利津县以下以及向下冲积而成的扇形三角洲。黄河三角洲不仅有大量的物种资源,而且土地、矿产、温光等自然资源也很丰富^[1-2]。但生态环境相对脆弱,盐渍化土地面积高达 18 万 hm²,严重影响了该区域经济的可持续发展以及农业开发前景^[3],探讨治理机理和开发途径对盐渍化土地的开发利用具有指导性意义。

土壤盐碱化是世界性难题,由于土壤有机质含量、酸碱度、水分及土壤母质的不同,与此环境相适应的土壤微生物种类各异。以往对盐碱地土壤微生物的研究主要集中在耐盐碱微生物的分离、盐碱极端微生物的生态特征、不同植物群落土壤微生物的时空动态和区系特征^[4-5]、湿地土壤不同深度层次微生物特征^[6-7]、微生物量与土壤酶^[8]、不同植物群落土壤养分与微生物活性以及不同改良措施及植被对盐碱地土壤微生物的影响效果等方面^[9-11],关于黄河三角洲地区土壤微生物多样性研究多集中在米草^[12]、柽柳^[13]、白蜡、刺槐、臭椿林地^[14]、碱蓬、茵陈蒿、白茅、芦苇^[15]等耐盐碱或盐生草本、灌木和乔木类植物,有关盐碱土壤种植粮油经类作物尤其是花生根层土壤微生物数量、种群结构、优势菌群以及盐胁迫与土壤微生物活动之间的生态关系的研究鲜见报道,为此,本试验以黄河三角洲滨海盐碱土为对象,利用焦磷酸高通量测序技术直接从土壤中提取总 DNA,构建细菌 16SrRNA 基因克隆文库,对黄河三角洲盐碱地花生旺盛生长期根层土壤微生物的菌群结构进行分析,旨在为进一步了解盐碱土壤微生物的多样性、结构、功能与演化等问题,以及维护盐碱地生态系统的稳定平衡提供土壤微生物方面的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点选择

试验地点分别设置在山东省花生研究所莱西试验田和东营市不同地理位置的利津县汀罗镇毛坨村和垦利县青坨村,莱西市地处东经 120°12′—120°40′,北纬 36°34′—37°09′,东营市为东经 118°07′—119°10′,北纬 36°55′—38°10′。莱西试验田土壤类型为潮土,东营市利津县汀罗镇毛坨村和垦利县青坨村的土壤类型均为盐化潮土。

1.2 试验设计

田间条件下,以非盐碱土壤平作花生田为对照,设置不同含盐量土壤花生平作、花生/棉花间作两种种植方式,花生播种日期均为 5 月 10 日,田间管理均同于一般高产花生田和棉花田。

土壤含盐量差异以东营市不同地理位置的利津县汀罗镇毛坨村和垦利县青坨村两处不同含盐量土壤为试材,以山东省花生研究所莱西试验田的中等肥力非盐碱土壤为对照。于花生生长旺盛期(荚果膨大期、8 月 13 日)分别采集各种植方式下,花生根层和棉花根层 0—20cm、20—40cm 的土壤样本。

1.3 土样采集

于花生荚果膨大期(2015/8/13),同时分别采集不同试点花生根层(距花生、棉花主根 10—15cm 处)0—40cm 的多点混合土壤样本(表 1)。土壤样品采集方法采用“S”型 5 点混合样本法,分别采集各处理 0—20cm、20—40cm 的土壤样本,将每个样点同一层次的土样混合均匀后,立即装入无菌袋中,置于-20℃冰箱保存备用。

表 1 供试土壤样品性状与处理
Table 1 Characteristics and treatment of soil samples for test

样品编号 No.	土层深度 Soil depth/cm	采样地点 Sampling site	种植方式 Planting method	采样位置 Sampling location	土壤含盐量 Salt contents in soil/(g/kg)	有机质含量 OM/(g/kg)	全氮 Soil total nitrogen content/(g/kg)	速效氮 Soil available nitrogen content/(mg/kg)	速效磷 Soil available phosphorus content/(mg/kg)	速效钾 Soil available potassium content/(mg/kg)	pH	阳离子交换量 CEC cmol(+)/kg
HSh1	0—20	东营毛坨	花生单作	花生根层	5.27	6.57	0.542	52.54	9.71	111.47	8.6	7.56
HSh2	20—40				4.45	4.14	0.415	39.34	7.82	99.26	8.4	7.21
HSh3	0—20	东营青坨	花生单作	花生根层	3.99	11.2	0.982	67.24	14.62	86.34	8.4	6.78
HSh4	20—40				4.26	7.63	0.698	52.13	9.08	72.17	8.2	6.89
HSh5	0—20	青岛莱西	花生单作	花生根层	0.59	12.75	1.311	88.63	30.84	146.32	7.3	10.89
HSh6	20—40				0.67	9.13	0.962	74.36	15.43	130.21	7.2	11.25
HSh7	0—20	东营毛坨	花生/棉	花生根层	5.27	6.57	0.542	52.54	9.71	111.47	8.6	5.27
HSh8	20—40		花间作		4.45	4.14	0.415	39.34	7.82	99.26	8.4	7.21
HSh9	0—20	东营毛坨	花生/棉	棉花根层	5.27	6.57	0.542	52.54	9.71	111.47	8.6	5.27
HSh10	20—40		花间作	棉花根层	4.45	4.14	0.415	39.34	7.82	99.26	8.4	7.21

1.4 土壤 DNA 提取

收集所得土壤样品利用 OMEGA 土壤总 DNA 提取试剂(OMEGA soil DNA kit)盒进行提取。所得 DNA 采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop2000 分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度。

1.5 16srRNA 文库构建及高通量测序

稀释后的基因组 DNA 利用引物 340F: CCTACGGGNBGCASCAG 以及 805R: GACTACNVGGGTATCTAATCC 对 16srRNA 基因的 V3-V4 区进行扩增。扩增程序如下:95℃预变性 3min;30 个循环包括(95℃,30sec;50℃,30sec;72℃,60sec);72℃,7min。PCR 产物使用 1.5%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测;根据 PCR 产物浓度进行等浓度混样,充分混匀后使用 0.5×TBE 浓度 1.5%的琼脂糖胶电泳纯化

PCR 产物,割胶回收目标条带。产物纯化试剂盒使用 QIAGEN 公司的 MinElute 胶回收试剂盒。最后使用 HiSeq2500 进行 250PE 测序。

1.6 生物信息学分析

测序得到的原始数据(Raw Data),存在一定比例的干扰数据(Dirty Data),为了使信息分析的结果更加准确、可靠,使用 SOAPdenovo 对原始数据进行拼接、过滤,得到有效数据(Clean Data)。

然后基于有效数据进行 OTUs(Operational taxonomic units)聚类 and 物种分类分析,并将 OTU 和物种注释结合,从而得到每个样品的 OTUs 和分类谱系的基本分析结果。再对 OTUs 进行丰度、多样性指数等分析,同时对物种注释在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。最后在以上分析的基础上,可以进行一系列的基于 OTUs、物种组成的聚类分析,PCoA 和 PCA 统计比较分析,挖掘样品之间的物种组成差异,并结合环境因素进行关联分析。

2 结果与分析

2.1 样本的有效序列数据量和物种丰度统计

表 2 看出,供试样本序列条数在 1716596—2863616 间,HSh6 样品序列条数最小,HSh4 样品最大,10 个样本的序列条数和有效序列条数总和分别为 21617593、16497920。在样品相似度为 0.97 的情况下进行多样物种丰度统计,21617593 条序列中有 16497920 条序列相似性标准匹配到参考数据库,共分为 21736 个 OTUs,样品中物种分布的均匀度为 76.32%。

表 2 土壤样本的有效序列统计

Table 2 Statistics results of effective sequences for ten soil samples

样本 Sample	序列条数 Number of sequences	平均长度 Average length	有效序列条数 Number of sequences	样本 Sample	序列条数 Number of sequences	平均长度 Average length	有效序列条数 Number of sequences
HSh1	2711148	147.7781	2050516	HSh7	2124037	146.1088	1658917
HSh2	2690541	148.9583	1914100	HSh8	1872477	146.468	1454283
HSh3	2090194	146.6363	1649279	HSh9	1822998	146.7011	1388186
HSh4	2809336	148.9284	2060354	HSh10	1863616	147.4135	1394952
HSh5	1916650	146.4963	1552399	Total	21617593	147.35306	16497920
HSh6	1716596	148.0418	1374934				

2.2 Alpha 多样性分析

表 3 所示,10 个样本的 goods_coverage 测序深度指数均在 99.83%以上,估计群落中 OTUs 个数的 chao1 和 ACE 菌群丰富度指数分别在 11461.02—15167.3 和 11317.56—15010.0 间,Shannon 多样性指数为 9.01—10.29,Simpson 指数均大于 0.9932,PD whole_tree 指数为 181.32—254.29,Observed_species 指数均在 9050 个以上。除 HSh1 样品的 Shannon 多样性指数相对最大外,HSh2 样品的 chao1 和 ACE 菌群丰富度指数、Simpson 指数、PD_whole_tree 指数和 Observed_species 指数均最高,而 HSh5 和 HSh6 样品中 chao1 和 ACE 菌群丰富度指数、Shannon 指数、Simpson 指数、PD_whole_tree 指数和 Observed_species 指数均较小。可见,黄河三角洲滨海盐碱土壤中无论是花生平作还是花生/棉花间作的种植方式,花生、棉花 0—40cm 根层土壤微生物种类和优势种群的数量丰富,土壤微生物群落功能多样性较非盐碱土壤花生根层微生物群落丰富,尤以土壤含盐量较高的花生平作种植方式下 HSh1 和 HSh2 样本更为丰富。

2.3 盐碱地土壤花生根层微生物群落结构分析

2.3.1 在门级别的菌落结构分析

图 1 可以看出,无论是不同盐碱程度土壤还是不同种植方式,花生、棉花根层土壤微生物类群从门水平上均可归为 11 个菌门,其中以变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和酸

杆菌门(*Acidobacteria*)等4种为主要菌群,其总丰度占80%—90%,并尤以变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)相对丰度最大,二者丰度高达70%—80%。但盐碱土与非盐碱土两土壤类型间,其土壤微生物主要优势类群丰度在门水平上存在差异,花生和棉花间作种植方式基本不影响二者0—40cm根层土壤微生物优势类群。HSh3、HSh4、HSh5、HSh6和HSh8土壤样品中变形菌门(*Proteobacteria*)丰度较低,在26%—31%间,以HSh4最低;HSh1、HSh2和HSh9样品中变形菌门(*Proteobacteria*)丰度较高,在39%—43%间,且以HSh1中最高。放线菌门(*Actinobacteria*)的丰度值以HSh3、HSh4、HSh7和HSh8土样较高,在43%—50%间,其余土样的丰度值相近,均在32%—40%间。HSh5、HSh6两样本酸杆菌门(*Acidobacteria*)丰度为16%—20%,显著高于其他8个土壤样本的3%—8%,但其绿弯菌门(*Chloroflexi*)丰度仅为2%—4%,显著低于其他样本。HSh3、HSh4、HSh5、HSh6样本的厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度较高且HSh4样本的丰度达12%以上,是其余样本丰度的3—6倍。青岛莱西非盐碱土壤0—40cm花生根层酸杆菌门(*Acidobacteria*)丰度值远高于其他土壤根层样本,但绿弯菌门(*Chloroflexi*)丰度明显低于其他土壤样本。

表3 土壤样本多样性分析指数

Table 3 Analysis of soil samples diversity index

样本 Sample	goods_cover	Chao1	ACE	shannon	simpson	PD_whole_tree	observed_species
HSh1	0.998758	14742.19	14646.16	10.28939	0.99747	240.3792	12140
HSh2	0.998618	15167.30	15010.00	10.06734	0.99694	254.2856	12550
HSh3	0.998562	12984.01	12861.86	9.70221	0.99445	216.5552	10404
HSh4	0.998725	14496.95	14148.00	9.63288	0.99461	234.6009	11508
HSh5	0.998573	11461.02	11317.56	9.00983	0.99322	181.3245	9050
HSh6	0.998302	12730.14	12515.34	9.77441	0.99583	198.8082	10130
HSh7	0.998650	12742.46	12632.72	9.81843	0.99563	213.1567	10446
HSh8	0.998341	13240.50	13083.32	9.74712	0.99450	217.7642	10649
HSh9	0.998335	13069.32	12955.76	10.15951	0.99716	218.7934	10703
HSh10	0.998302	13314.23	13175.68	10.04322	0.99613	225.3842	10873

盐碱土壤0—20cm花生根层和棉花根层土壤中,变形菌门(*Proteobacteria*)丰度均高于20—40cm土层中,其余优势菌群在土壤类型和不同作物根层0—40cm土层间分布差异不明显。不同土壤类型间的优势菌群丰度存在较大差异,中度盐碱土以变形菌门(*Proteobacteria*)丰度值较高,轻度盐碱土和非盐碱土花生根层以放线菌门(*Actinobacteria*)丰度较高,酸杆菌门(*Acidobacteria*)主要分布于非盐碱土壤的花生根层。

2.3.2 在纲和目级别的菌落结构分析

图2A可以看出,无论是不同含盐量的盐碱土壤还是非盐碱土壤,其细菌主要有 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、酸微菌纲(*Acidimicrobiia*)、厌氧绳菌纲(*Anaerolineae*)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)、嗜热油菌纲(*Thermoleophilia*)、 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)、纤维粘网菌纲(*Cytophagia*)和芽孢杆菌纲(*Bacilli*)等10种菌群,此10种菌群在盐碱土壤中的丰度为80%左右,在非盐碱土壤中的丰度略低为70%;两类土壤中均以 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)和放线菌纲(*Actinobacteria*)的丰度较高,二者占40%—55%;非盐碱土壤花生根层中的嗜热油菌纲(*Thermoleophilia*)的丰度高于盐碱土壤3倍以上,其 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)和酸微菌纲(*Acidimicrobiia*)均明显低于盐碱土壤花生、棉花根层3倍以上;高含盐量盐碱土壤的平作花生根层和花生//棉花间作的花生及棉花根层的芽孢杆菌纲(*Bacilli*)均明显低于非盐碱土壤。

由图2B可知,放线菌目(*Actinomycetales*)是盐碱地花生平作和花生//棉花间作方式下二者根层土壤中的主要优势菌群,其丰度在20%—32%,而非盐碱土壤中仅为15%—20%;其次为根瘤菌目(*Rhizobiales*),其在各类型土壤、不同种植方式下的花生根层和棉花根层均在5%—14%;盐碱土壤中的酸微菌目(*Acidimicrobiales*)

高于非盐碱土壤的 5 倍以上,但其中 *Gaiellales* 菌目低于非盐碱土壤的 5 倍以上;红螺菌目 (*Rhodospirillales*) 在各类型土壤中几乎无差异,均占 5% 左右;鞘脂单胞菌目 (*Sphingomonadales*) 在花生//棉花间作种植方式下明显升高,相对丰度在 5% 左右,而其余类型土壤样品中仅占 2%—3%;其余诸如假单胞菌目 (*Pseudomonadales*)、红杆菌目 (*Rhodobacterales*)、土壤红杆菌目 (*Solirubrobacterales*)、黏球菌目 (*Myxococcales*) 等菌群在不同类型盐碱土壤和非盐碱土壤间丰度优势差异不大,其相对丰度总和不足 10%。

2.3.3 在科级别的菌落结构分析

由图 3 可知,不同类型盐碱土壤和非盐碱土壤花生根层、花生//棉花间作的棉花根层,土壤微生物菌群在科级别的优势菌群差异主要表现在类诺卡氏菌科 (*Nocardioideaceae*)、生丝微菌科 (*Hyphomicrobiaceae*)、红螺菌科 (*Rhodospirillaceae*)、鞘脂单胞菌科 (*Sphingomonadaceae*) 和放线菌科 (*gaiellales*) 等 5 种微生物类群,其中,非盐碱土壤中的类诺卡氏菌科 (*Nocardioideaceae*) 显著低于盐碱土壤的 5 倍以上,而其

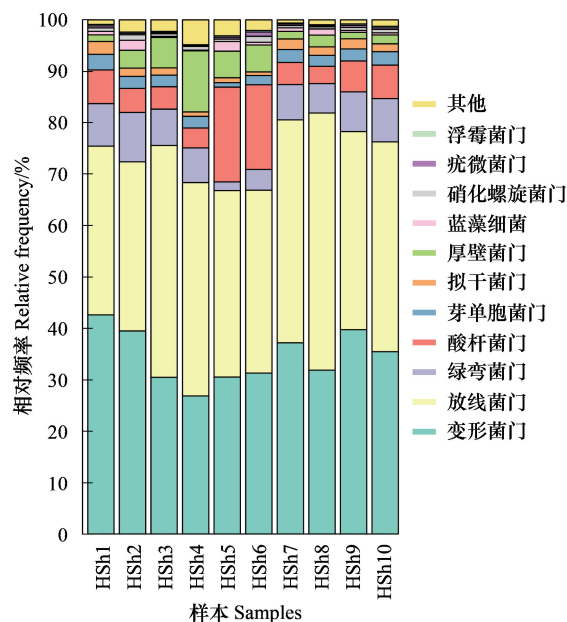


图 1 各样本在门水平的菌落结构柱状图

Fig.1 Histogram of microflora structure from ten samples at the level of phylum

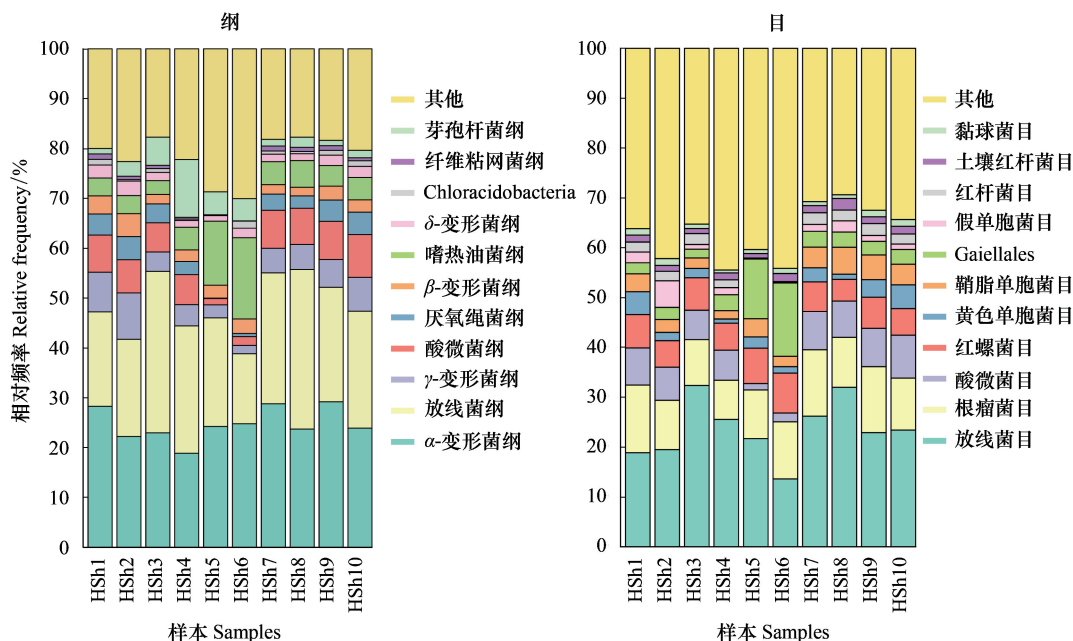


图 2 土壤样本在纲、目级别的菌落结构柱状图

Fig.2 Histogram of microflora structure from ten samples at the level of class and order

放线菌科 (*gaiellales*) 远高于盐碱土壤的 5 倍以上,红螺菌科 (*Rhodospirillaceae*) 略高于盐碱土壤的 2 倍左右,其余诸如黄单胞杆菌科 (*Xanthomonadaceae*)、中华杆菌科 (*Sinobacteraceae*)、假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*)、布鲁氏菌科 (*Brucellaceae*)、放线菌目的小单胞菌科 (*Micromonosporaceae*)、链霉菌科 (*Streptomycetaceae*) 等 6 种土壤微生物菌群相对丰度总和在 10% 左右。可见盐碱土壤花生根层土壤中放线菌科 (*gaiellales*) 的相对丰度显著降低,而类诺卡氏菌科 (*Nocardioideaceae*) 的相对丰度显著增加。

2.3.4 在属级别的菌落结构分析

图 4 可见,无论是花生平作、还是花生//棉花间作,盐碱土壤花生根层和棉花根层土壤微生物种类、优势种群数量和群落功能多样性在属级别较非盐碱土壤丰富,主要为鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、红游动菌属(*Rhodoplanes*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、红平红球菌(*Rhodococcus*)等,盐碱土壤样品中除嗜酸细菌类群如 *Candidatus Koribacter*、*Actinomadura*、*Phycococcus* 和 *Candidatus Solibacter* 丰度较低外,其余类群均较丰富。而非盐碱土壤样品中 *Rubellimicrobium*、*Lamia*、*Pontibacter*、*Inquilinus* 菌群丰度极低外, *Steroidobacter*、*Lysobacter*、*Actinomadura*、*Pseudochrobactrum*、*Afifella* 和 *Catenuloplanes* 均较低,且 *Candidatus Solibacter* 丰度显著高于盐碱土。非盐碱土壤 0—40cm 土层中均未发现 *Rubellimicrobium* 属和 *Pontibacter* 属细菌,且 0—20cm 土层中无 *Lamia* 属细菌。盐碱土花生根层土壤微生物在属水平上更为丰富。

2.4 Beta 多样性分析

由图 5 可知,主成分 1(PC1)可以解释所有变量方差的 47.02%,主成分 2(PC2)可以解释所有变量方差的 11.55%,前两个主成分共解释了总变异的 58.57%,第 3 至第 10 主成分的方差贡献率较小,均低于 10.0%,尤其第 10 主成分的方差贡献率接近 0(图 6C)。表明不同来源的 10 个土壤样品在 PC1 和 PC2 上均存在明显的空间分异,10 个土壤样品的土壤微生物群落可明显分为 3 簇:HSh5、HSh6 样品聚为一簇,HSh2 和 HSh4 聚为一簇,其余 HSh1、HSh3、HSh7、HSh8、HSh9 和 HSh10 为一簇((图 5A))。HSh5、HSh6 样本与其他样本的相似度差异较大,其与第一、二主成分均为正相关关系,而其余盐碱土花生//棉花根层土壤微生物类群均与第二主成分相关性较高,其中,HSh3、HSh5、HSh7 和 HSh9 土壤微生物菌群与第二主成分为正相关关系,HSh1、HSh2 和 HSh4 土壤微生物菌群则与第二主成分为负相关关系((图 5D))。表明,土壤类型对土壤微生物类群类型影响较大,10 个土壤样本依据土壤含盐量高低和根系分布深度聚为 3 类,即非盐碱土壤归为 1 类,盐碱土壤根系密集分布层 0—20cm、20—40cm 各归为 1 类,花生//棉花间作下的花生或棉花根层不影响其土壤微生物菌群类型。OTU 丰度聚类仅与土壤类型和盐碱土壤根系密集分布层深度有关,而与其花生//棉花间作下的花生或棉花根层无关。

3 讨论

盐度和碱度是影响不同盐碱程度盐碱土壤中微生物群落结构的显著因素,土壤电导度(EC)和 pH 对盐碱土壤细菌群落结构的影响力最大,极端盐碱土壤中分布着大量的喜盐碱细菌,非耐盐碱细菌不占有优势^[16-19]。盐碱地土壤细菌具有丰富物种、遗传和发育系统多样性,不同盐碱程度土壤中的主要细菌为耐盐碱的细菌菌株,并且均是耐硫酸盐的细菌。变形菌纲(α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲和 δ -变形菌纲)是盐碱土壤的主要类群,其余依次是放线菌门、拟杆菌门、酸杆菌门、浮霉菌门、绿弯菌门、芽单胞菌门、厚壁菌门和疣微菌门,*Marinobacter*、*Halomonas* 和 *Pseudomonas* 这些嗜盐菌普遍存在于盐碱土中^[16-19]。天津滨海盐碱土壤细菌以乳杆菌属、芽孢杆菌属为主,放线菌以链霉菌属占优势,真菌以青霉菌属为主^[20]。本试验条件下,土壤类型、含盐量高低均影响 0—40cm 根层土壤微生物活性、菌落结构、功能类群和根层土壤微生物群落多样性。黄河三角洲滨海盐碱土壤中花生//棉花间作种植方式下,花生和棉花根层土壤微生物种类和优势种群的数

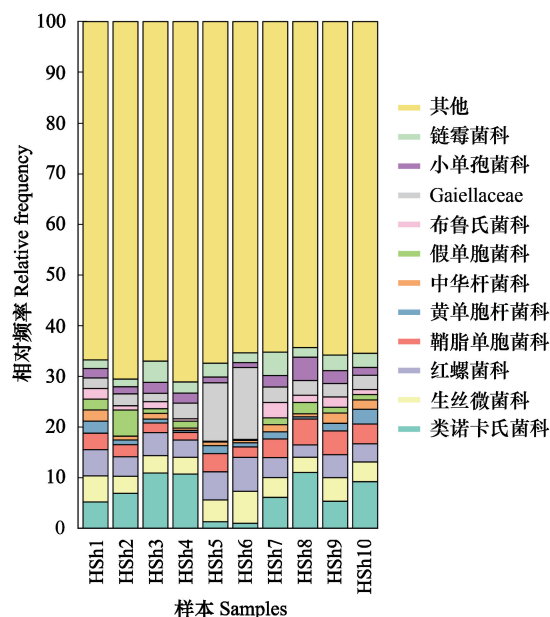


图 3 土壤样本在科级别的菌落结构柱状图

Fig.3 Histogram of microflora structure from ten samples at the level of family

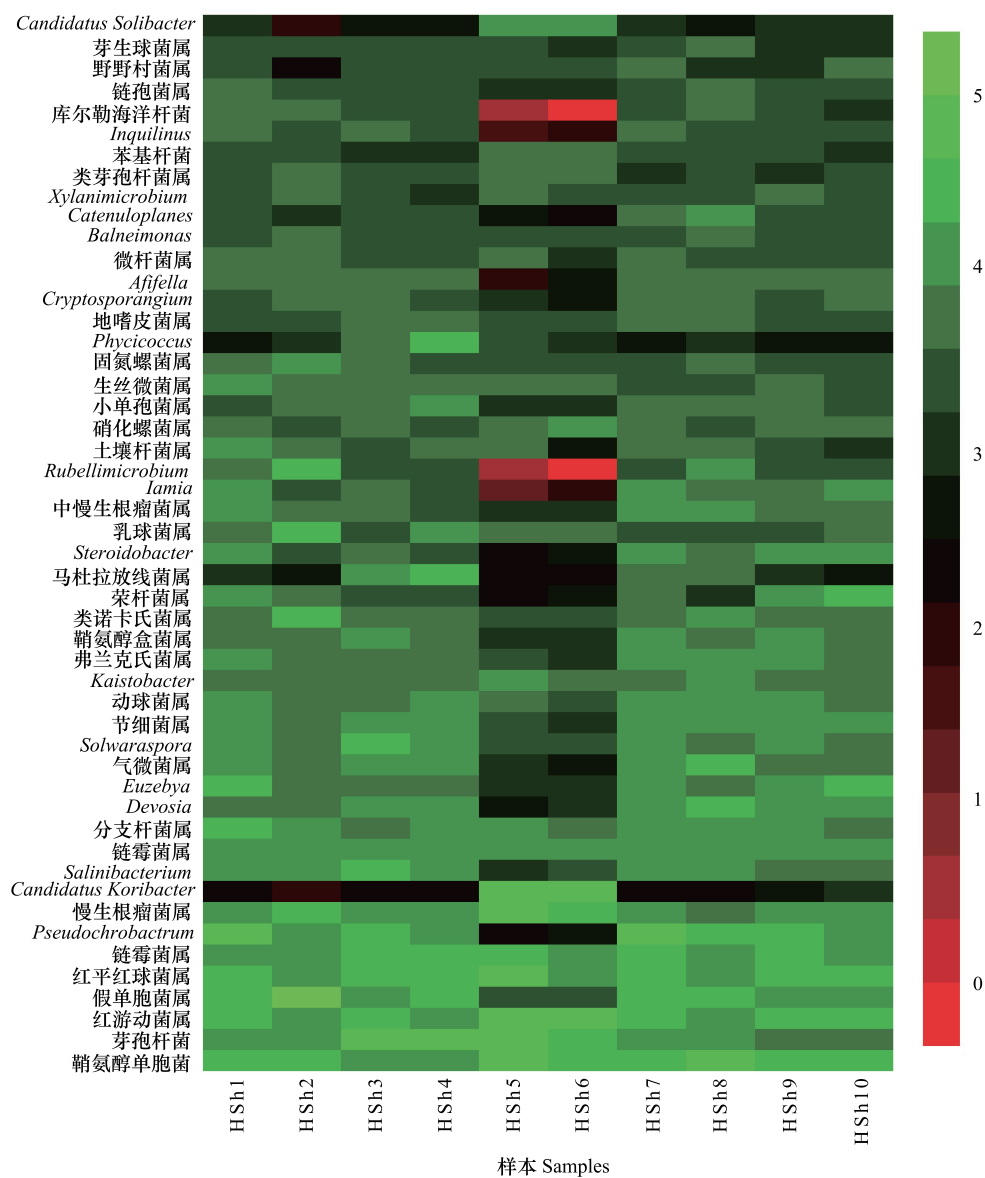


图 4 土壤样本在属级水平的菌落丰度变化图

Fig.4 Histogram of microflora structure from ten samples at the level of genus

量、群落功能多样性均较中等肥力非盐碱土壤平作花生根层微生物群落丰富,尤以较高含盐量土壤中更为丰富。

生物改良措施是通过种植植物,增加地表覆盖面积,减少地表水分蒸发,增加土壤根系数量及微生物活性,从而改善土壤理化性质。生物改良措施被认为是最具生态效益和经济效益的措施,同时也是国内外盐碱地治理的发展趋势之一。关于不同植被(植物)尤其是盐生植物对盐碱地微环境、植物生长季养分吸收等因子对土壤改良的响应已有较为系统的论述^[21],有关生物措施对盐碱土壤微生物群落结构的影响研究表明,松嫩草地不同植被覆盖下土壤微生物数量存在较大差异。羊草群落土壤细菌、真菌和放线菌数量较芦苇群落、虎尾草群落、碱茅群落、碱蓬群落以及盐碱裸地均有所提高^[22]。

在黄河三角洲盐碱环境中种植一定种类的盐生植物,会提高微生物的种类、数量和种群变化,而且怪柳对微生物的影响较大,且耐盐细菌的比例显著下降,随着连续种植时间的增加,微生物总数的减少以及真菌数量的增加,细菌与真菌的比值显著变小,并且氨化细菌、自生固氮菌、硝化细菌和亚硝化细菌等生理类群微生物的数量也逐渐下降^[23]。马旭龙等^[24-25]研究结果表明,盐碱地种植油葵、甘草、锦鸡儿等植物可改善盐碱地根

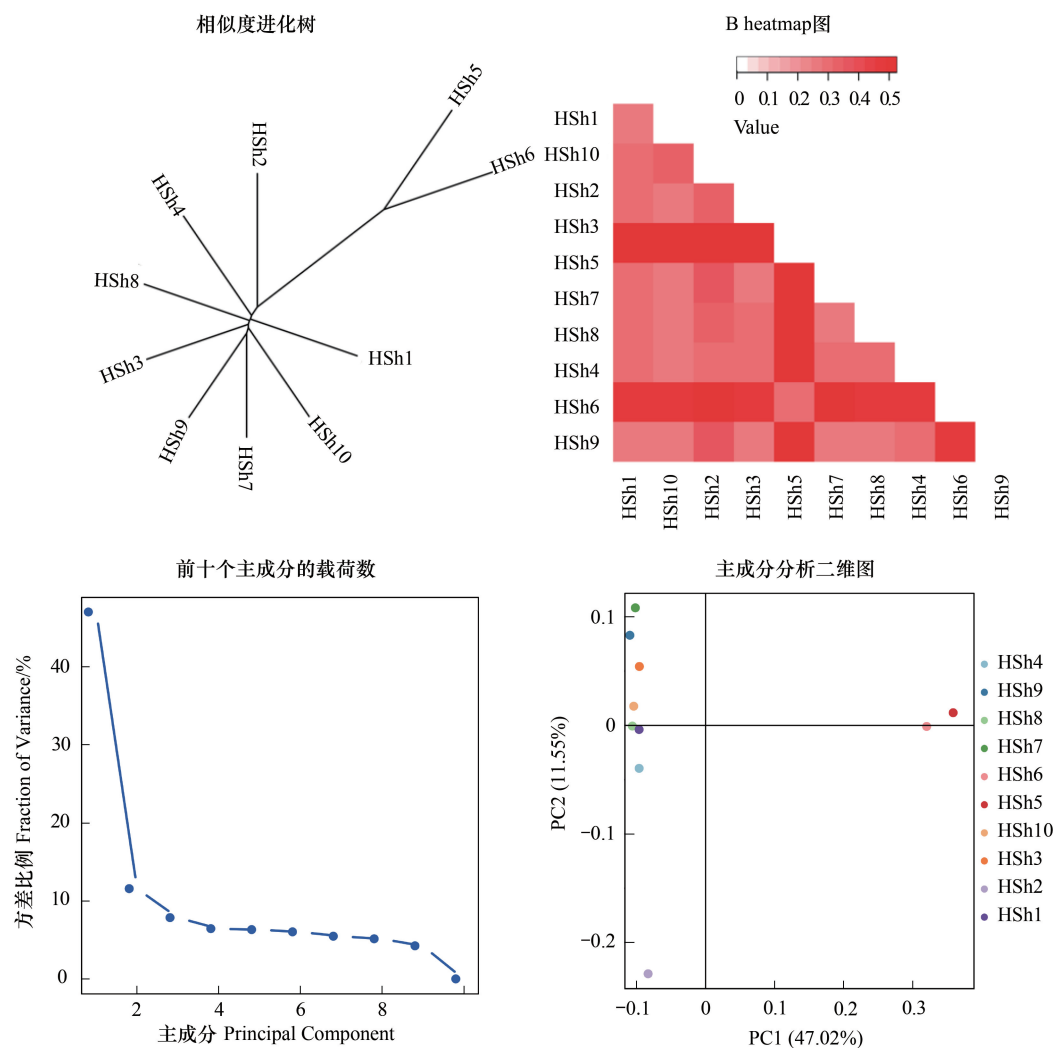


图5 土壤微生物主成分分析

Fig 5 Microbial principal component analysis

A 相似度进化树; B heatmap图; C 前十个主成分的载荷数; D 主成分分析二维图

际土壤微生物的群落组成,优化盐碱地微生物的群落结构,显著提高土壤微生物群落功能多样性,且不同植物品种对盐碱地微生物群落结构的作用存在差异,可筛选出更适宜改善盐碱地土壤质量的植物品种,也是盐碱地生态恢复的一项有效措施。不同含盐量的盐碱土和非盐碱土中,花生、棉花根层土壤微生物均以变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*)等4种菌群为优势菌群,其总丰度占80%—90%,尤以变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)相对丰度最大,二者高达70%—80%。盐碱土花生和棉花根层芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的丰度显著高于非盐碱土壤约2倍;非盐碱土壤花生根层酸杆菌门(*Acidobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度是盐碱土壤花生根层的3倍以上。盐碱土壤花生、棉花根层 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)和酸微菌纲/目(*Acidimicrobiia*)丰度是非盐碱土壤花生根层的3—5倍,而非盐碱土壤花生根层中的嗜热油菌纲(*Thermoleophila*)和*Gaiellales*菌目(*Thermoleophila*)的丰度是盐碱土壤3—5倍以上;盐碱土壤花生和棉花根层*Gaiellales*菌目低于非盐碱土壤的5倍以上,而酸微菌目(*Acidimicrobiales*)高于非盐碱土壤的5倍以上。类诺卡氏菌科(*Nocardioideaceae*)盐碱土壤中的丰度高于非盐碱土壤的5倍以上,而放线菌科(*gaiellales*)低于盐碱土壤的5倍以上;非盐碱土壤0—40cm土层中均未发现*Rubellimicrobium*属和*Pontibacter*属细菌,且0—

20cm 土层中无 *Lamia* 属细菌,与前人研究结果基本一致^[10,26-29]。本研究所选土壤类型虽均为潮土类,其所处地理位置基本相同,但土壤耕种历史和利用方式的差异,亦会影响本研究条件下的花生、棉花根层土壤微生物的菌群结构,加之,土壤样品的生物学重复少,其代表性可能有一定的局限性。因此,有关盐碱土花生根际土壤微生物活性、菌落结构、功能类群、与非盐碱土花生根际微生物群落多样性及功能的差异,以及发掘利用还有待深入研究。

4 结论

试验结果表明,黄河三角洲滨海盐碱土高含盐量土壤中根际土壤微生物种类、优势种群数量和群落功能多样性较非盐碱土壤丰富,尤以土壤含盐量较高土壤更为丰富。黄河三角洲滨海盐碱土中以变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*)等4种菌群为优势菌群,其总丰度占80%—90%。盐碱地花生//棉花间作影响二者根层微生物群落的组成,花生单作根层土壤厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度是花生//棉花间作花生根层的5—6倍,但间作条件下,花生根层土壤变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)丰度值均低于花生单作根层土壤丰度值5%左右。土壤类型对土壤微生物菌群类型影响较大,依据土壤含盐量高低和根系分布深度聚为3类,即非盐碱土壤归为1类,盐碱土壤根系密集分布层0—20cm、20—40cm各归为1类。盐碱土的培肥改良和作物增产与作物根际微生态环境密切相关,盐碱土根际微环境的改变与农艺措施的关系有待深入研究。

参考文献 (References):

- [1] 许学工,郭洪海,林辉平.黄河三角洲土地利用与土地覆被的质量变化.地理学报,2001,56(6):640-648.
- [2] 张辉,周德田,于美玲.基于“长三角”、“珠三角”经验开发黄河三角洲的思考.中国石油大学学报:社会科学版,2011,27(5):35-38.
- [3] 孙树芳.黄河三角洲新兴产业的发展战略.中国石油大学胜利学院学报,2011,25(3):77-81.
- [4] 姜华,毕玉芬,朱栋斌,周禾.恢复措施对云南退化山地草甸土壤微生物和酶活性的影响.草地学报,2008,16(3):256-261.
- [5] 王兵,刘国彬,薛蕙,纸坊沟流域撂荒地环境因子对植被变化的典范对应分析.草地学报,2010,18(4):496-502.
- [6] 刘芳,叶思源,汤岳琴,潼川清,木田建次,吴晓磊.黄河三角洲湿地土壤微生物群落结构分析.应用与环境生物学报,2007,13(5):691-696.
- [7] 赵先丽,周广胜,周莉,吕国红,贾庆宇,谢艳兵.盘锦芦苇湿地土壤微生物初步研究.气象与环境学报,2007,23(1):30-33.
- [8] 叶淑红,王艳,万惠萍,吉云秀,林学政,丁德文.辽东湾湿地微生物量与土壤酶的研究.土壤通报,2006,37(5):897-900.
- [9] 张祥霖,石盛莉,潘根兴,李恋卿,张旭辉,李志鹏.互花米草入侵下福建漳江口红树林湿地土壤生态化学变化.地球科学进展,2008,23(9):974-981.
- [10] 李凤霞,王学琴,郭永忠,许兴,杨建国,季艳清.宁夏不同类型盐渍化土壤微生物区系及多样性.水土保持学报,2011,25(5):107-111.
- [11] 田家怡,李甲亮,陈印平,李建庆,于祥.黄河三角洲外来入侵物种米草对底泥微生物群落的影响.海洋湖沼通报,2009,(4):157-162.
- [12] 宗美娟,张明才,宋百敏,王仁卿.黄河三角洲柽柳群落土壤微生物多样性//生物多样性保护与区域可持续发展——第四届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集.武汉:中国科学院生物多样性委员会,国家环境保护总局自然生态保护司,国家林业局野生动植物保护司,农业部科技教育司,国家海洋局环境保护司,2000.
- [13] 侯本栋,马风云,宋玉民,侯龙鱼,崔晓东.不同树种对土壤养分、酶活性与微生物影响的研究.江西农业大学学报,2006,28(5):734-738.
- [14] 张平.不同造林树种对盐碱地土壤理化性质的影响[D].泰安:山东农业大学,2014.
- [15] 王震宇,辛远征,李锋民,高冬梅.黄河三角洲退化湿地微生物特性的研究.中国海洋大学学报,2009,39(5):1005-1012.
- [16] 石伟.极端盐碱土壤细菌的分离筛选及抗盐特性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2011.
- [17] 李新,焦燕,代钢,杨铭德,温慧洋.内蒙古河套灌区不同盐碱程度的土壤细菌群落多样性.中国环境科学,2016,36(1):249-260.
- [18] 李新.不同盐碱程度盐碱土壤微生物多样性研究[D].呼和浩特:内蒙古师范大学,2015.
- [19] 牛世全,景彩虹,廖世齐,朱学泰,韩建山.河西走廊盐碱土细菌种群结构多样性的研究.西北师范大学学报:自然科学版,2013,49(2):90-95.
- [20] 孙佳杰,尹建道,解玉红,杨永利,舒晓武,刘保东.天津滨海盐碱土壤微生物生态特性研究.南京林业大学学报:自然科学版,2010,34(3):57-61.
- [21] 史文娟,杨军强,马媛.旱区盐碱地盐生植物改良研究动态与分析.水资源与水工程学报,2015,26(5):229-234.
- [22] 张唤.松嫩草地不同植被土壤微生物特性及其与植株生长的关系[D].长春:吉林农业大学,2016.
- [23] 范运梁.盐生植物对黄河三角洲微生物多样性的影响[D].济南:山东师范大学,2010.
- [24] 张旭龙,马森,吴振振,张志政,高睿,石灵玉.不同油葵品种对盐碱地根际土壤酶活性及微生物群落功能多样性的影响.生态学报,2017,37(5):1659-1666.
- [25] 吴振振,张旭龙,马森.栽培甘草对盐碱地土壤理化性质及微生物功能多样性的影响.农学报,2016,6(7):24-29.
- [26] 杜滢鑫,谢宝明,蔡洪生,唐璐,郭长虹.大庆盐碱地九种植物根际土壤微生物群落结构及功能多样性.生态学报,2016,36(3):740-747.
- [27] 陈为峰,史衍玺.黄河三角洲新生湿地不同植被类型土壤的微生物分布特征.草地学报,2010,18(6):859-864.
- [28] 刘玮琦,郭振川,杨宇红,谢丙炎.用16S rRNA基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性.微生物学报,2008,48(10):1344-1350.
- [29] 王静娅,王明亮,张风华.干旱区典型盐生植物群落下土壤微生物群落特征.生态学报,2016,36(8):2363-2372.