

DOI: 10.5846/stxb201902140261

于少鹏, 史传奇, 胡宝忠, 丁俊男, 孟博, 杨春雪. 古大湖湿地盐碱土壤微生物群落结构及多样性分析. 生态学报, 2020, 40(11): 3764-3775.

Yu S P, Shi C Q, Hu B Z, Ding J N, Meng B, Yang C X. Analysis of microbial community structure and diversity of saline soil in Gudahu Wetland. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(11): 3764-3775.

古大湖湿地盐碱土壤微生物群落结构及多样性分析

于少鹏, 史传奇, 胡宝忠*, 丁俊男, 孟博, 杨春雪

哈尔滨学院黑龙江省寒区湿地生态与环境研究重点实验室 哈尔滨湿地研究院, 哈尔滨 150086

摘要:以黑龙江省古大湖湿地原生、林地、耕地及湖岸盐碱土壤微生物为研究对象,基于高通量测序方法,分析 4 种生境类型条件下土壤细菌和真菌群落结构及多样性。结合土壤理化指标,进一步分析影响微生物群落多样性的环境因子。结果表明:细菌群落中变形菌门的相对丰度值最高,真菌群落中为子囊菌门。同一生境细菌群落多样性具有相似性,而真菌具有一定的差异;不同生境间两者均具有差异。耕地土壤和林地土壤的细菌群落多样性接近,但与湖岸土壤真菌的更相近。前两者中细菌群落多样性较高,其次为原生土壤,而湖岸土壤中的最低。耕地土壤与湖岸土壤真菌群落多样性较高,原生土壤较低,而林地土壤中最低。与真菌相比,细菌的群落多样性受土壤环境因子影响更大,其中 pH 值、含水量对土壤细菌和真菌群落多样性均具有显著影响。

关键词:古大湖湿地;盐碱土壤;细菌;真菌

Analysis of microbial community structure and diversity of saline soil in Gudahu Wetland

YU Shaopeng, SHI Chuanqi, HU Baozhong*, DING Junnan, MENG Bo, YANG Chunxue

Harbin University, Heilongjiang Province Key Laboratory of Cold Region Wetland Ecology and Environment Research, Harbin Institution of Wetland Research, Harbin 150086, China

Abstract: The original, woodland, cultivated land and lakeshore saline soil microbe of Gudahu wetland in Heilongjiang Province was selected as study object. Using the high-throughput sequencing method, we analyzed soil bacterial and fungal community structure and diversity of the four habitat types. Combining soil physicochemical index, the impact of soil environmental factor on the microbe community diversity was further analyzed. The results showed that Proteobacteria was with the highest relative abundance value in bacterial communities and Ascomycota had the highest relative abundance value in fungal communities. The bacterial community diversities were similar while the fungal were different in the same habitat; however, each of them was different in different habitats. The cultivated land soil bacterial community diversity was similar to that of woodland soil, but was closer to that of lakeshore soil. Cultivated land soil and woodland soil were with higher bacterial community diversity, followed by original soil, Lakeshore soil was with the lowest bacterial community diversity. Cultivated land soil and lakeshore soil had higher fungal community diversity, followed by original soil and woodland soil. Comparing to fungi, the diversity of bacterial community was more affected by soil environmental factors, and both pH value and moisture could significantly influence the bacterial and fungal community diversities.

Key Words: Gudahu wetland; saline soil; bacteria; fungi

基金项目:哈尔滨市科技局优秀学科带头人项目(2017RC2017XK015004);黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1155G30);哈尔滨学院青年博士科研启动基金项目(HUDF2017210)

收稿日期:2019-02-14; **网络出版日期:**2020-03-31

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: bzhu@neau.edu.cn

黑龙江省湿地类型多样,湖泊湿地面积为 35.60 万 hm^2 , 占全省湿地面积的 6.92%。其中永久性咸水湖是湖泊湿地主要类型之一,占全省湖泊湿地的 36.94%^[1]。主要分布于松嫩平原沉降盆地中心低洼处,如大庆、安达、肇源、杜尔伯特地区。万忠娟等^[2]认为盐碱湖泊湿地是因地质地貌、气候、水文等自然因素及修路、堤防、水库工程等人为了干扰,导致低洼地排水不畅而形成。盐碱湿地土壤养分含量低,透气性差,植物、土壤微生物多样性均不高^[3-4],尤其是原生盐碱土壤中,微生物群落多样性低于次生盐碱土壤和农田土壤^[3]。微生物参与土壤有机质分解、养分矿化及土壤团聚体形成,对土壤环境质量具有指示作用^[5-6]。其多样性易受到 pH 值的影响^[7-8],盐碱程度不同是造成微生物优势群落差异的原因之一^[9],通常 pH 值升高抑制微生物生长,导致其群落多样性下降^[10-11]。此外,Yan 等^[12]提出土壤含水量对微生物的影响也十分显著,含水量变化可改变氧气含量,调节微生物种类、活性及生长。植物与微生物之间存在着密切的关系^[13],不同土地利用方式植被类型有所不同,进而产生微生物群落及功能多样性差异^[14-15],特别是在盐碱土壤中,两者协同分布,共同进化^[16-17]。

古大湖湿地是松嫩平原湖泊湿地中永久性咸水湖的典型代表,周边耕地、放养畜禽形成干扰,使土壤环境处于受威胁状态。因此,本研究对 4 种不同生境类型条件下的盐碱土壤进行采样,分析土壤细菌和真菌的群落多样性差异及其影响因素,为我国东北寒区盐碱湿地生物多样性现状的研究提供基础数据,并为其盐碱湿地土壤保护与合理利用及退耕还湿工作提供参考依据和理论指导。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

古大湖国家湿地公园(以下简称“古大湖湿地”)位于黑龙江省安达市境内,松嫩平原中部,地理坐标为 125°28'06"—125°34'34" E,46°19'31"—46°23'58" N,东至肇东市宣化乡繁荣村行政边界,西至青肯泡乡和羊草镇交汇处,北至青肯泡乡东大山村,南与蓄水堤坝相邻。东西长 8.0 km,南北宽 8.2 km,总面积 4850.1 hm^2 。气候干旱,降雨稀少。湿地以盐碱土壤为主,属东北地区典型的内陆平原湖泊-沼泽复合型湿地。包括古大湖大部分湖区,以及草本沼泽和沼泽化草甸湿地,湿地率为 99.1%。周边分布人工林和小面积的耕地。

1.2 样品采集

4 种生境类型样品采集于 2017 年 9 月。原生土壤(Original soil, OS)、林地土壤(Woodland soil, WS)、耕地土壤(Cultivated land soil, CS)和湖岸土壤(Lakeshore soil, LS)样品均取自于距地表 0—20 cm 处,各生境类型条件下重复 3 次,每次取 5 个小样点(2 m×2 m 范围内于 4 个顶点及中心点取样),去除石块和植物根系等杂质,每份取 200 g,将 5 份小样点土壤充分混匀,取 5 g 装入 TinyGene 生物科技(上海)公司土壤样本活菌保存液中。依次做好标记,所有土壤样品低温保存带回实验室。分别记录样品采集地地理坐标、海拔及主要植物种类(表 1)。

1.3 实验方法

1.3.1 土壤微生物群落结构测定

采用 MIO-BIO PowerSoil DNA Isolation Kit 分别对 12 个土壤样品进行 DNA 抽提。采用两步 PCR 扩增方法,第一步采用 50 μL 反应体系:5×Buffer 10 μL ,dNTP(10 mmol/L)1 μL ,Phusion 超保真 DNA 聚合酶 1 U, F/R 特异引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL (细菌 16S V4-V5 区片段扩增采用特异引物 515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3',926R 5'-CCGTCAATTCMTTGTAGTTT-3';真菌 ITS1 片段扩增采用特异引物 ITS1 F 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3',ITS1 R 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'),DNA 模板 5-50 ng, ddH₂O 补至 50 μL 。利用 ABI 9700 PCR 仪扩增目的片段,程序为:94℃ 2 min;94℃ 30 s,56℃(细菌)/50℃(真菌)30 s,72℃ 30 s,共 25(细菌)/33(真菌)个循环;72℃ 5 min,10℃ 保温。将产物进行胶回收后作为模板进行第二步 PCR 扩增,采用 40 μL 反应体系:5×Buffer 8 μL ,dNTP(10 mmol/L)1 μL ,Phusion 超保真 DNA 聚合酶 0.8 U, F/R 特异引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,DNA 模板 5 μL ,dd H₂O 补至 40 μL 。PCR 扩增程序为:94℃ 2 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共 8 个循环;72℃ 5 min,10℃ 保温。将第二步 PCR 产物用 2%(质量体积

比)的琼脂糖凝胶进行电泳,采用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒进行回收,FTC-3000™ real-time PCR 仪进行定量,均一化混匀后,NGS Illumina MiSeq 2×300 bp 平台高通量测序。

表 1 古大湖湿地 4 种生境类型盐碱土壤样品采样信息

Table 1 Saline soil samples information of 4 habitat types in Gudahu wetland

生境类型 Habitat type	样品 Sample	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude/m	主要植被 Dominant plants
OS	OS1	125°32'46.64" E	46°23'41.81" N	147.1	碱蓬 (<i>Artemisia anethifolia</i>)、碱蒿
	OS2	125°30'09.85" E	46°16'41.31" N	146.3	(<i>Suaeda glauca</i>)、碱地肤 (<i>Kochia scoparia</i> var. <i>sieversiana</i>)
	OS3	125°28'21.04" E	46°20'19.08" N	151.0	
WS	WS1	125°28'57.95" E	46°23'34.05" N	147.7	小叶杨 (<i>Populus simonii</i>)、委陵菜
	WS2	125°28'08.24" E	46°22'51.29" N	146.6	(<i>Potentilla chinensis</i>)、
	WS3	125°28'29.05" E	46°23'03.57" N	145.3	羊草 (<i>Leymus chinensis</i>)
CS	CS1	125°28'55.54" E	46°23'18.33" N	145.2	玉米 (<i>Zea mays</i>)、
	CS2	125°28'46.94" E	46°23'14.54" N	145.2	龙葵 (<i>Solanum nigrum</i>)、
	CS3	125°28'56.38" E	46°23'24.72" N	145.1	稗 (<i>Echinochloa crusgalli</i>)
LS	LS1	125°30'22.84" E	46°23'53.81" N	142.7	芦苇 (<i>Phragmites australis</i>)、
	LS2	125°29'03.69" E	46°23'11.10" N	141.8	萎蒿 (<i>Artemisia selengensis</i>)、
	LS3	125°31'27.09" E	46°19'06.55" N	142.2	全叶马兰 (<i>Kalimeris integrifolia</i>)

OS: 原生土壤 Original soil; WS: 林地土壤 Woodland soil; CS: 耕地土壤 Cultivated land soil; LS: 湖岸土壤 Lakeshore soil

1.3.2 土壤理化性质测定

参考鲍士旦^[18]土壤分析方法,对 12 个土壤样品进行理化性质测定,每个样品重复 3 次。土壤 pH 值采用 pH 仪(上海雷磁 PHS-3C)测定《NY/T1121.2—2006 土壤检测》;土壤含水量 (Moisture, M) 采用烘干法测定;土壤总有机碳 (Total organic carbon, TOC) 含量测定采用重铬酸钾容量法-外加加热法《NY/T1121.6—2006 土壤检测》;土壤全氮 (Total nitrogen, TN) 含量测定采用半微量凯氏定氮法《NY/T53 土壤全氮法(半微量开氏法)》;土壤碱解氮 (Alkali-hydrolyzable nitrogen, AN) 含量测定采用碱解扩散法《碱解扩散法 LY/T 1229—1999》;土壤全磷 (Total phosphorous, TP) 含量测定采用 HClO₄-H₂SO₄法《NY/T88 土壤全磷测定法》;土壤有效磷 (Available phosphorous, AP) 含量测定采用钼锑抗比色法《HJ704—2014 碳酸氢钠提取-钼锑抗比色法》;土壤速效钾 (Available potassium, AK) 含量测定采用火焰光度计法《NY/T 889—2004 乙酸铵提取-火焰光度法》。

1.4 数据处理

测序分别得到 12 个土壤细菌、真菌样品的 PE reads,根据 Barcode 区分每个样品后,对序列进行质控和过滤,删去长度小于 200 bp 的序列。去除 Barcode 和引物序列,获得土壤细菌和真菌有效序列,根据 overlap 关系进行序列拼接,再次将拼接后的序列进行质控和过滤,最终得到细菌、真菌优化序列。在 97% 相似度水平下将优化序列聚类为用于物种分类的操作分类单位 (Operational taxonomic units, OTU),统计各土壤样品中每个 OTU 的相对丰度信息,利用 Office Excel 2010 绘制门和属水平的群落结构柱状图。利用 Mothur v 1.39.5 软件分析各样品微生物群落多样性,包括 Ace 指数、Chao 1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数,并利用 SPSS 17.0 进行 Duncan 多重比较,分别分析 4 种生境类型各指数间差异显著性。利用 R 软件中 vegan 程序包,在 OTU 水平上计算 12 个样品之间的 Bray-cutis 距离 (Bray-cutis dissimilarity, d^{BCD}),pheatmap 程序包进行作图,分析 4 种生境类型土壤样品间微生物群落差异性。利用 SPSS 17.0 进行 Duncan 多重比较,分析 4 种生境类型各项土壤理化指标间差异显著性。利用 Canoco for Windows 4.5 对 12 个样品的 OTU 相对丰度矩阵做去趋势对应分析 (Detrended correspondence analysis, DCA),根据结果中梯度长度在第一轴上的值,选择典范对应分析 (Canonical correspondence analysis, CCA) 或冗余分析 (Redundancy analysis, RDA),分析土壤理化指标对细菌、真菌群落多样性的影响,土壤理化指标解释量显著性检验利用 Monte Carlo 置换检验方法,置换次数为 999。并利用 CanoDraw for windows 进行作图。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物样品测序结果

在 97% 的序列相似度水平上, 通过对序列进行质控和过滤, 共获得细菌、真菌 OTU 数分别为 2971 个、934 个, 细菌种数大于真菌。由图 1 可知, 绝大多数样品的稀疏曲线趋于平缓, 如 LS 细菌、LS 真菌、CS 真菌样品, 即再增大测序深度也不会增加新的 OTU 数量, 说明该样品的 OTU 覆盖度已达到饱和, 能够反映古大湖湿地盐碱土壤微生物群落结构组成。而 CS 细菌、WS 真菌样品等的稀疏曲线仍有上升趋势, 尚未达到饱和状态, 说明随着测序深度的增加可能会发现新的细菌和真菌类群。同时可知, CS 样品中产生的细菌和真菌 OTU 数目均相对较多。

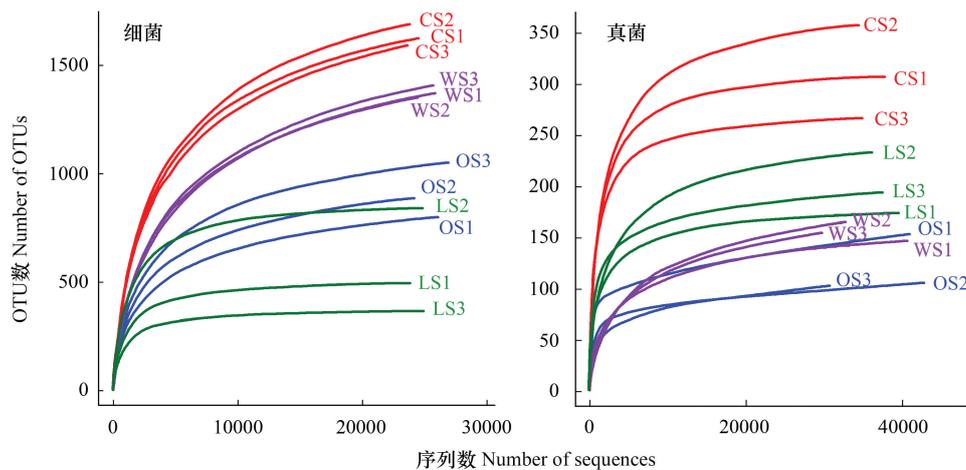


图 1 古大湖湿地盐碱土壤细菌和真菌样品在 97% 水平上的稀疏曲线

Fig.1 Rarefaction curves of saline soil bacterial and fungal samples in Gudahu wetland at cutoff level of 97%

OS: 原生土壤 Original soil; WS: 林地土壤 Woodland soil; CS: 耕地土壤 Cultivated land soil; LS: 湖岸土壤 Lakeshore soil; OTU: 操作分类单位 Operational taxonomic units

2.2 土壤微生物群落结构组成分析

2.2.1 细菌群落结构组成

依据 12 个土壤样品细菌门水平分布柱状图 (图 2), 共得到 17 个细菌类群 (不包括相对丰度小于 0.5% 的类群), 相对丰度值最高的为变形菌门 (Proteobacteria), 在 4 种生境类型中的平均值分别为 26.97% (OS)、25.66% (WS)、31.56% (CS) 和 59.63% (LS), 其中 LS3 中相对丰度高达 69.36%。其余前几个细菌门的相对丰度值由高至低依次为酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 等。

在细菌属分类水平上共得到 57 个类群 (不包括相对丰度小于 0.5% 的类群, 图 2), 变形菌门的未分类细菌属相对丰度值最高, 除 LS 相对较低外, 其余 3 种生境类型条件下相对丰度值均高于 70%, OS1 中相对丰度值高达 87.37%。LS 中除变形菌门的未分类细菌属之外, 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、*Aliihoeflea*、盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和海洋杆菌属 (*Pelagibacterium*) 分别占总量的 23.15%、30.21%、15.73% 和 17.86%。

2.2.2 真菌群落结构组成

根据真菌门水平分布柱状图 (图 3), 共得到 8 个真菌类群 (不包括相对丰度小于 0.5% 的类群), 其中子囊菌门 (Ascomycota) 相对丰度值最高, 在 OS1、OS2、CS 和 LS 中相对丰度值均高于 45%, LS3 中达到 76.42%。其次为担子菌门 (Basidiomycota), OS3 和 WS 中的相对丰度值均大于 85%, WS2 中高达 92.88%。其余真菌类群相对丰度值较低, 同时具有未分类真菌门存在。

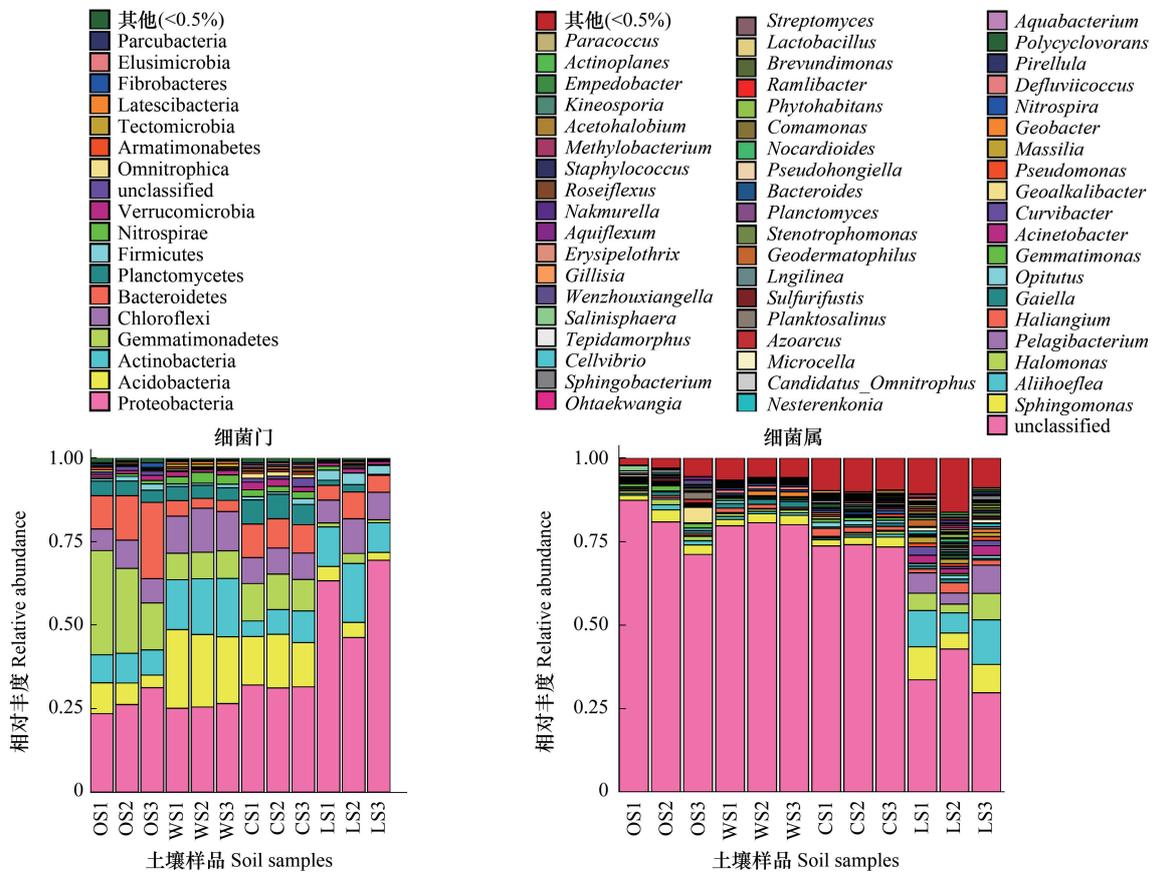


图 2 古大湖湿地盐碱土壤细菌门和属群落结构组成

Fig.2 Saline soil bacterial phylum and genus community structure composition of Gudahu wetland

在真菌属水平柱状图上可以看出(图 3),共得到 85 个真菌类群(不包括相对丰度小于 0.5%的类群),以子囊菌门的未分类真菌属相对丰度值最高,集中表现在 OS1、CS 和 LS 中,其值均接近 50%。WS2 和 WS3 中相对丰度值较高的是担子菌门的滑锈伞属(*Hebeloma*),其值分别为 91.53%、82.78%,同门的丝膜菌属(*Cortinarius*) 在 WS1 中相对丰度值为 85.97%, OS3 中同门的鬼伞属(*Coprinopsis*) 相对丰度值达 81.17%,但这 3 个属在其余样品中比例均极低。

2.3 土壤微生物群落多样性指数分析

由表 2 可知,土壤细菌丰富度与多样性指数均与 OTU 数目变化一致,其中 CS 细菌群落的平均 Chao 1 指数(1858.438)、平均 Ace 指数(1824.495)、平均 Shannon 指数(6.372)及平均 Simpson 指数(0.9957)数值相对最高。方差分析结果表明,平均 Chao 1 指数和平均 Ace 指数中,CS 与 WS 的差异不显著,但与 OS 差异达到极显著,且 OS 与 LS 差异同样达到极显著,说明其 CS 与 WS 丰富度接近,大于 OS 和 LS,而 LS 最低。平均 Shannon 指数中,CS 与 WS 差异不显著,与 OS 差异显著,只与 LS 达到差异极显著,CS 与 LS 平均 Simpson 指数差异达到显著,说明 LS 的多样性最低。

土壤真菌丰富度及多样性比较结果可知(表 2),CS 样品的平均 Chao 1 指数(317.963)、平均 Ace 指数(319.676)、平均 Shannon 指数(4.324)及平均 Simpson 指数(0.9737)的值最高。方差分析结果表明,CS 平均 Chao 1 指数与其他 3 种生境类型达到显著差异,与 WS 达到极显著差异;CS 平均 Ace 指数与其余 3 种生境类型的差异达到极显著,而 3 者的两个平均指数差异不显著,说明 CS 丰富度最高。CS 平均 Shannon 指数与 LS 接近,与 OS、WS 差异极显著,而 WS 显著低于 OS。平均 Simpson 指数中,WS 最低,与 OS 差异显著,而与 CS、LS 达到极显著差异。说明 CS 与 LS 真菌群落多样性接近,且相对较高,其次为 OS,而 WS 真菌多样性最低。

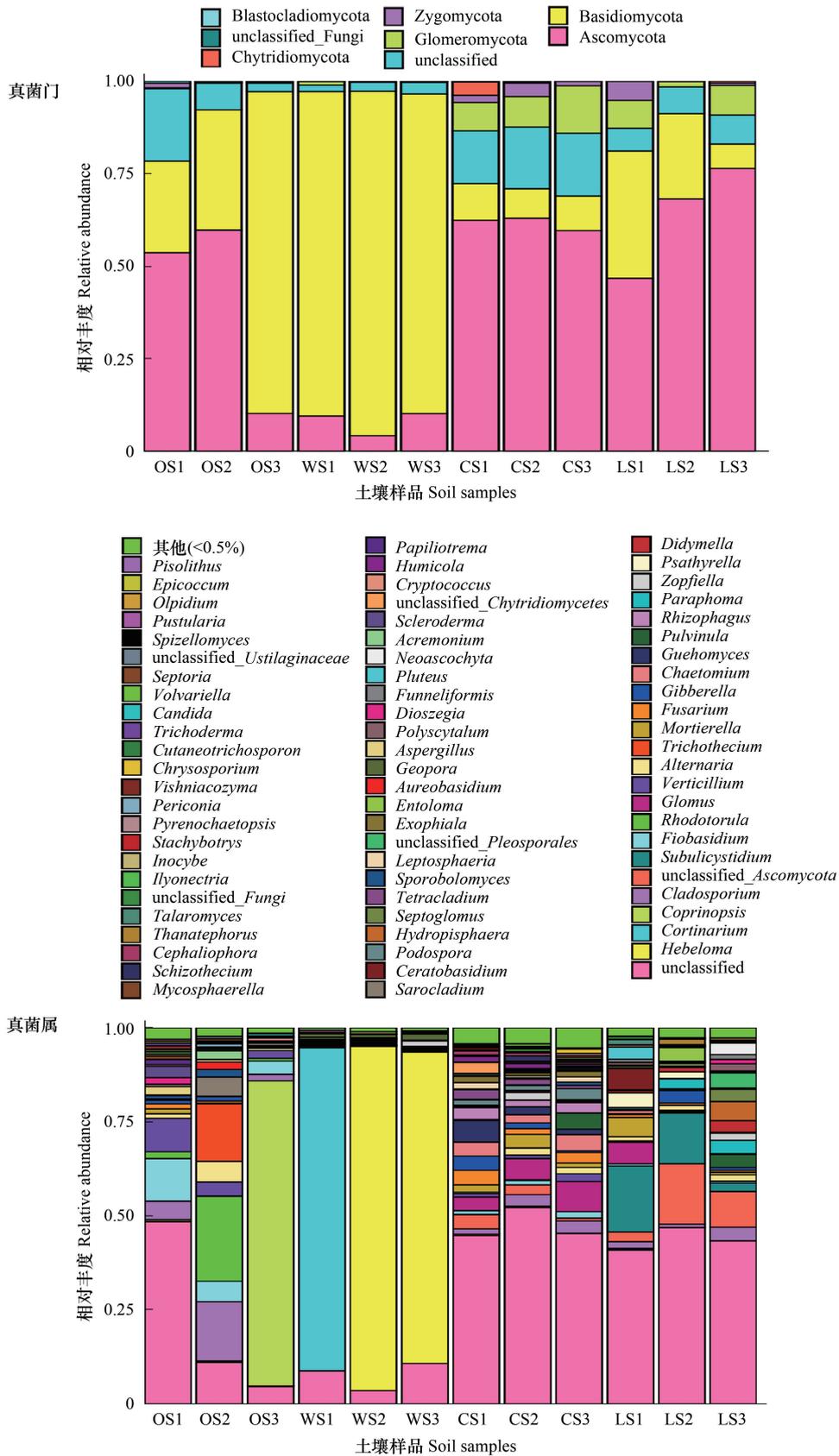


图3 古大湖湿地盐碱土壤真菌门和属群落结构组成

Fig.3 Saline soil fungal phylum and genus community structure composition of Gudahu wetland

表 2 古大湖湿地 12 个盐碱土壤样品微生物丰富度和群落多样性指数

Table 2 Microbial richness and community diversity indexes of twelve saline soil samples in Gudahu wetland

样品 Sample	OTUs		Chao 1 指数 Chao 1 index		Ace 指数 Ace index		Shannon 指数 Shannon index		Simpson 指数 Simpson index	
	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	细菌 Bacteria	真菌 Fungi
OS1	800	154	937.368	270.548	902.820	205.231	5.179	3.430	0.9806	0.9286
OS2	887	106	1042.038	179.422	993.159	163.750	5.478	2.786	0.9892	0.8870
OS3	1054	103	1182.880	153.727	1179.472	184.250	5.685	1.111	0.9921	0.3404
OS Mean	914	121	1054.095bB	201.233bAB	1025.151bB	184.410bB	5.447bcAB	2.442bBC	0.9873abA	0.7186aAB
WS1	1370	147	1614.800	160.592	1577.438	166.250	5.885	0.940	0.9928	0.2602
WS2	1352	165	1558.751	193.210	1563.631	204.056	5.849	0.616	0.9927	0.1633
WS3	1406	155	1658.621	179.349	1625.124	182.790	5.935	1.159	0.9935	0.3691
WS Mean	1376	156	1610.724aA	177.717bB	1588.731aA	184.365bB	5.890abAB	0.905cC	0.9930aA	0.2642bB
CS1	1623	308	1845.922	312.853	1796.566	315.800	6.371	4.283	0.9958	0.9735
CS2	1690	368	1897.340	368.021	1882.470	366.118	6.426	4.351	0.9959	0.9741
CS3	1589	237	1832.053	273.016	1794.450	277.111	6.318	4.339	0.9956	0.9736
CS Mean	1634	304	1858.438aA	317.963aA	1824.495aA	319.676aA	6.372aA	4.324aA	0.9957aA	0.9737aA
LS1	495	175	528.000	181.623	510.138	184.750	4.719	3.291	0.9699	0.9126
LS2	841	233	870.563	246.022	853.685	247.526	5.673	3.289	0.9894	0.9229
LS3	369	195	394.091	212.667	381.556	216.000	4.209	3.859	0.9535	0.9604
LS Mean	568	201	597.551cC	213.437bAB	581.793cC	216.092bB	4.867cB	3.480abAB	0.9709bA	0.9320aA

不同小写字母间代表差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母间代表差异极显著 ($P < 0.01$). OTU: 操作分类单位 Operational taxonomic units

2.4 土壤微生物群落多样性差异分析

基于 Bray-cutis 距离 (表 3), 在 OTU 水平上利用物种有无及其相对丰度信息进行 4 种生境类型土壤样品微生物群落多样性相似性分析, 蓝色越深代表差异性越小, 相似性越大, 而红色越深表示差异性越大, 相似性越小。如图 4 中, OS 与其余 3 种生境类型的土壤细菌群落多样性具有差异 ($d^{BCD} > 0.7$), 甚至 OS1 与 LS 几乎没有相似性 ($d^{BCD} > 0.9$), 而相比之下, CS 与 WS 最近 ($d^{BCD} < 0.6$)。可以看出, 不同生境类型土壤细菌群落多样性具有一定的差异。在同一生境类型条件下, 不同采样点间具有相似性, 特别是在 WS 中较为显著 ($d^{BCD} < 0.25$)。

表 3 古大湖湿地 12 个盐碱土壤样品微生物 OTU 水平 Bray-cutis 距离矩阵

Table 3 Microbial Bray-cutis dissimilarity matrix (OTU level) of twelve saline soil samples in Gudahu wetland

	OS1	OS2	OS3	WS1	WS2	WS3	CS1	CS2	CS3	LS1	LS2	LS3
OS1	0	0.729	0.875	0.988	0.976	0.980	0.921	0.889	0.871	0.924	0.948	0.909
OS2	0.325	0	0.866	0.989	0.983	0.986	0.939	0.894	0.889	0.929	0.949	0.925
OS3	0.499	0.368	0	0.989	0.983	0.987	0.950	0.936	0.924	0.945	0.971	0.957
WS1	0.823	0.768	0.760	0	0.974	0.958	0.941	0.937	0.935	0.966	0.977	0.957
WS2	0.815	0.762	0.753	0.249	0	0.162	0.969	0.967	0.972	0.975	0.976	0.979
WS3	0.810	0.749	0.741	0.231	0.187	0	0.967	0.954	0.970	0.948	0.979	0.970
CS1	0.865	0.832	0.802	0.564	0.589	0.582	0	0.494	0.614	0.852	0.821	0.848
CS2	0.855	0.814	0.786	0.518	0.545	0.534	0.211	0	0.476	0.801	0.827	0.787
CS3	0.848	0.791	0.768	0.505	0.533	0.519	0.332	0.289	0	0.849	0.889	0.807
LS1	0.926	0.864	0.867	0.755	0.758	0.745	0.778	0.756	0.756	0	0.673	0.807
LS2	0.916	0.853	0.856	0.754	0.766	0.756	0.730	0.707	0.719	0.513	0	0.589
LS3	0.933	0.873	0.875	0.818	0.806	0.802	0.841	0.821	0.821	0.383	0.552	0

表中左下方为土壤样品细菌 OTU 水平的 Bray-cutis 距离矩阵, 右上方为土壤样品真菌 OTU 水平的 Bray-cutis 距离矩阵

如图 4, 各生境类型间土壤真菌群落多样性的相似性均较小, 同一生境类型条件下不同采样点间也存在

一定的差异。WS2 与 WS3 具有较高的相似性($d^{BCD} = 0.162$),最先被分出,说明两者在物种组成及相对丰度上与其余生境类型间存在较大差异。WS1 与 WS2、WS3 具有差异性($d^{BCD} > 0.95$),处于不同分支。相比之下,CS 与 LS 关系最近,但两者相似度并不高(d^{BCD} 接近 0.8)。因此,生境类型和采样点差异对真菌群落多样性均具有较大的影响。

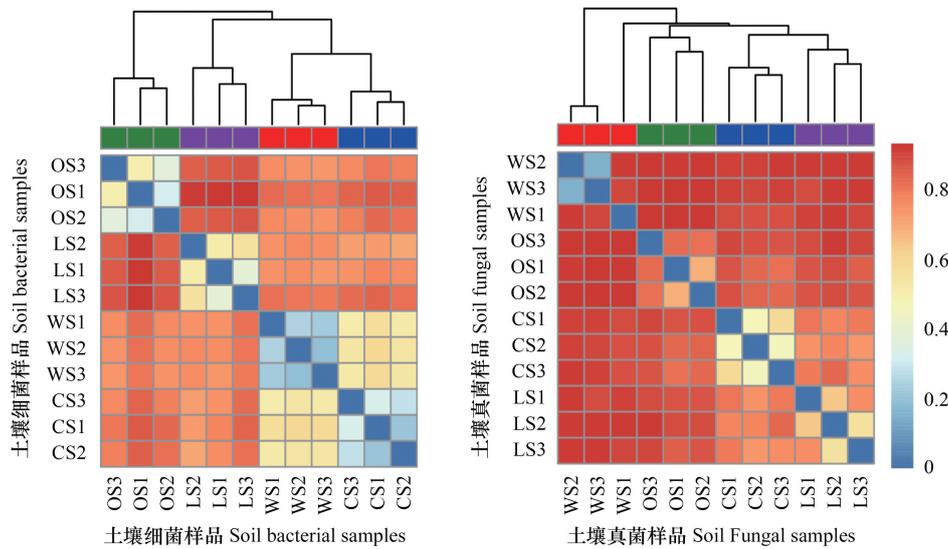


图 4 古大湖湿地盐碱土壤细菌与真菌群落多样性差异分析热图

Fig.4 Difference analysis heatmap of saline soil bacteria and fungi community diversity of Gudahu wetland

2.5 土壤环境因子及其对微生物群落多样性的影响分析

2.5.1 土壤理化指标测定结果

古大湖湿地以盐碱土壤为主,4 种生境类型条件下(表 4),OS 的 pH 值最高,与其余 3 种生境类型土壤达到极显著差异。OS 与 CS 含水量接近,均低于 LS,而相比之下,WS 在秋季含水量最低。CS 的土壤养分含量中,除 AN 与 OS、TP 与 WS 的接近之外(差异不显著),TOC((32.97 ± 3.03) g/kg)、TN((4.06 ± 0.24) g/kg)、AP((80.39 ± 1.68) mg/kg)及 AK((333.32 ± 27.26) mg/kg)含量均最高,具有极显著差异,而 LS 中的 6 项土壤养分含量均处于较低水平。

表 4 古大湖湿地 4 种生境类型土壤样品理化指标

Table 4 Physicochemical indexes of four habitat type soil samples in Gudahu wetland

生境类型 Habitat type	pH	M/%	TOC / (g/kg)	TN / (g/kg)	AN / (mg/kg)	TP / (g/kg)	AP / (mg/kg)	AK / (mg/kg)
OS	8.68±0.17aA	11.75±1.50bBC	12.39±2.25cC	0.43±0.04bBC	48.54±3.33aA	0.16±0.01bB	0.75±0.10cC	141.99±8.07bB
WS	7.65±0.21cC	8.00±1.03cC	19.01±2.40bB	0.53±0.04bB	39.64±1.66bB	0.23±0.02aA	4.68±0.75bB	157.19±16.62bB
CS	7.52±0.17cC	14.01±1.62bB	32.97±3.03aA	4.06±0.24aA	53.02±3.09aA	0.26±0.02aA	80.39±1.68aA	333.32±27.26aA
LS	8.17±0.15bB	23.04±2.62aA	3.92±0.27dD	0.17±0.03cC	32.82±3.31cB	0.13±0.01bB	1.48±0.40cC	134.33±5.75bB

表中数据为平均值±标准差,不同小写字母间代表差异显著($P < 0.05$),不同大写字母间代表差异极显著($P < 0.01$)。pH: pH 值 pH value; M: 含水量 Moisture; TOC: 总有机碳 Total organic carbon; TN: 全氮 Total nitrogen; AN: 碱解氮 Alkali-hydrolyzable nitrogen; TP: 全磷 Total phosphorous; AP: 有效磷 Available phosphorous; AK: 速效钾 Available potassium

2.5.2 土壤理化指标与微生物群落多样性关系分析

依据细菌、真菌样品 OTU 相对丰度矩阵,得到 DCA 结果中梯度长度在第一轴上的值分别为 3.858 和 6.798,本研究中均选择 CCA。图 5 中土壤细菌群落多样性与 8 项理化指标相关性分析,第一、二排序轴分别解释总物种变量的 28.1%、21.6%,pH 值($P < 0.01$)与第一排序轴成正相关,相关系数为 0.7518,解释总理化

指标的 27.93%,对 OS 细菌群落多样性的影响程度最高。M($P < 0.01$)与第二排序轴相关系数为 0.7977,LS 细菌群落多样性受 M 的影响程度最大。其余 6 个理化指标主要影响 CS、WS 细菌群落多样性,而两者样品分布集中,即受各理化指标影响程度相当。各土壤理化指标的影响程度均达到极显著水平($P < 0.01$),表明古大湖湿地盐碱土壤细菌多样性对土壤环境因子敏感。

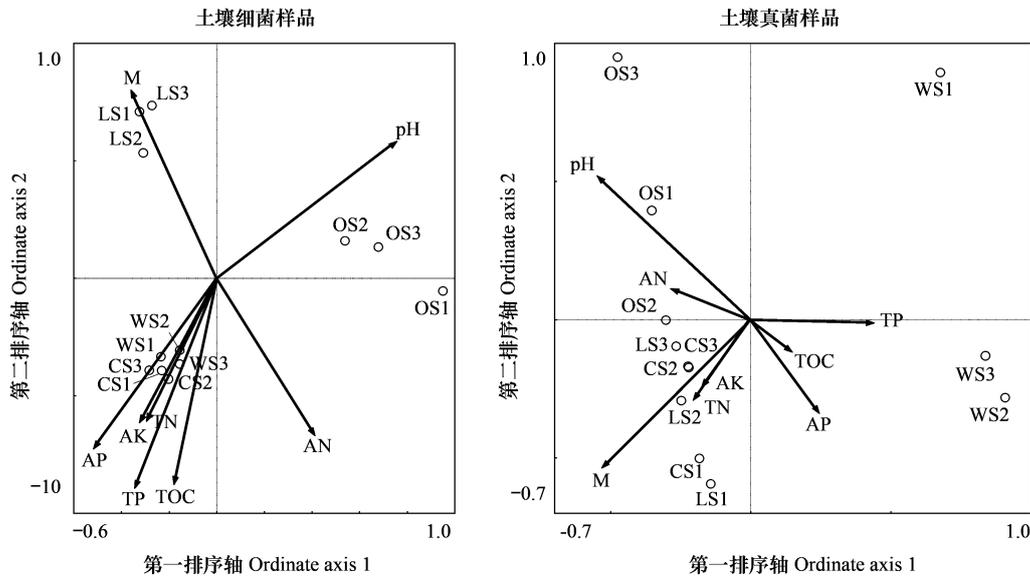


图 5 古大湖湿地盐碱土壤理化指标和细菌与真菌群落多样性的典范对应分析

Fig.5 CCA between saline soil physicochemical indexes and bacterial/fungal community diversity of Gudahu wetland

图 5 中土壤真菌群落多样性与理化指标的相关性分析,第一、二排序轴的解释量均较低,仅占总物种变量的 15.4%、13.8%。同一生境类型的不同样品在第一排序轴上分布接近,但第二排序轴上分布散乱,在一定程度上反映出古大湖盐碱土壤真菌群落多样性在不同采样点间差异较大。8 个土壤理化指标中,pH 值($P < 0.01$)、M($P < 0.05$)分别可以解释总环境变量的 18.07%和 17.97%,与第一排序轴均成负相关,相关系数分别为-0.5487 和-0.5320。pH 值对 OS 真菌群落多样性影响最大,而 M 对 LS、CS 及 OS 真菌群落多样性均有影响,影响程度大于 WS。其余理化指标对真菌群落多样性的影响不显著($P > 0.05$),说明古大湖盐碱土壤真菌群落多样性对土壤环境因子敏感程度低。

3 讨论

3.1 古大湖湿地盐碱土壤微生物群落结构特征

盐碱土壤微生物中细菌的种类及数量上常处于绝对优势^[19],且细菌的生长和繁殖能力常优于真菌^[20]。同样,在古大湖湿地盐碱土壤中细菌种数大于真菌。古大湖湿地盐碱土壤细菌组成包括变形菌门、酸杆菌门、放线菌门等,原生土壤中芽单胞菌门占有一定的比例,但与其他湿地土壤常见细菌门水平组成的报道^[3, 21-23]差异不大,说明古大湖湿地土壤细菌特有性程度低。变形菌门在不同环境中广泛分布,适应能力强^[24-25],同样广泛存在于以盐碱土壤为主的古大湖湿地中。该门的鞘氨醇单胞菌属具有去除难降解污染物的能力^[26],*Aliihoeflea* 可去除水体砷污染^[27],盐单胞菌属和海洋杆菌属同样见于水体中,均具有重要的生态功能^[28-29],在古大湖湖岸土壤中多见,具有深入研究的必要。酸杆菌门在自然环境中同样十分常见,但多难以培养,可以降解植物纤维素等大分子聚合物^[30]。本研究发现酸杆菌门主要存在于林地土壤中,可能与木本植物落叶中含大量纤维素有关。

盐碱土壤条件不利于真菌生长^[10],相比于前人报道^[20, 31-32]的非盐碱土壤真菌种类数量,本研究原生土壤

中从总体上偏低。古大湖湿地盐碱土壤真菌门水平种类组成与其他盐碱湿地^[33-34]相近,特有性程度低。真菌可参与分解纤维素、树胶、木质素及多糖和蛋白质等有机物,在腐殖质的形成过程中发挥重要的作用^[35],提高盐碱土壤的质量^[36]。绝大多数已知真菌属于子囊菌门与担子菌门,两者关系密切,前者中未分类物种数量非常多^[37]。在本研究中,土壤真菌在属水平上存在未分类类群,绝大多数属于子囊菌门,说明古大湖湿地盐碱土壤中具有发掘真菌新种的潜力。担子菌门的鬼伞属为大型真菌,多数种具有食用、药用价值^[38],偶见于古大湖湿地原生土壤中,而滑锈伞属、丝膜菌属多出现在林地土壤中,可与木本植物形成共生菌根,增强木本植物抗性^[39-40]。纪焱等^[41]研究表明不同植被恢复方式和同一恢复方式条件下土壤真菌种类差异不大,但数量上具有差异性。本研究结果同样表明,在考虑相对丰度时,真菌群落多样性在不同生境类型及同一生境不同采样点间均具有差异,在一定程度上反映出土壤真菌种类集中于几个大类群,但相对丰度上受生境类型的影响较大。

3.2 古大湖湿地盐碱土壤微生物群落多样性

土壤微生物群落多样性常受季节变化的影响^[22, 24],季节变化引起土壤盐分及水质改变,进而影响到微生物活性,使其群落多样性发生动态变化^[42]。张巍和冯玉杰^[10]认为松嫩平原土壤微生物群落多样性一般在8月达到最大值。邵璐和姜华^[33]提出秋季温度、水分等良好的气候条件下适宜真菌的生长发育,但在不同季节优势群落一般是稳定的。本实验对秋季土壤微生物群落结构及多样性进行了分析,对于不同时期的比较还有待于进一步研究。

植物与土壤环境因子相互作用,影响土壤微生物群落多样性^[14, 35],其中 pH 值对土壤微生物种类及数量影响程度最为显著^[34, 17],具有最佳的指示作用^[8, 43],在以盐碱土壤为主的古大湖湿地 4 种生境类型中表现更为明显。原生土壤 pH 值高于其他 3 种生境类型,达到极显著水平,主要分布碱蓬、碱蒿、碱地肤等耐盐碱植物,伴生物种稀少,细菌群落相对独立,多样性偏低。除原生土壤外,其他 3 种生境类型土壤均在不同时期、不同程度上受到人为干扰。耕地土壤受耕种、施肥等影响,pH 值、含水量及土壤养分含量均适宜作物生长,同时微生物群落丰富度及多样性随之增高。古大湖湖岸利用湖底泥沙修筑堤坝,导致湖岸土壤呈砂质,植被种类较单一,细菌丰富度及多样性均最低。此外,土壤含水量过高或过低均不利用细菌生长^[12, 44],湖岸土壤受季节性的水位变化影响,导致细菌多样性进一步降低。古大湖湿地土壤细菌对土壤理化指标敏感,湖岸土壤养分含量低,不利于细菌生存,而林地土壤理化指标与耕地土壤的接近,两者细菌群落多样性差异不显著。

真菌和细菌代谢底物有所不同,真菌抵抗环境胁迫的能力比细菌更强^[45]。本研究中发现土壤真菌多样性只受到 pH 值和含水量的显著影响,且含水量对湖岸土壤真菌群落多样性影响最大,适宜的土壤含水量有利于提高真菌群落多样性,过高或过低的含水量均会影响真菌的生存和繁殖^[46-47]。因此,在土壤养分含量对真菌群落多样性影响不显著的情况下,相比于原生土壤过高的 pH 值和林地土壤秋季过低的含水量,湖岸土壤真菌群落多样性较高。此外,林地土壤真菌群落组成过于单一,均匀度差导致其真菌群落多样性低于原生土壤。

3.3 古大湖湿地退耕还湿植被修复

盐碱土壤处于脆弱的生态状况下,极易进一步退化^[10]。植被恢复既可改良盐碱土壤^[48],也可改善已退化湿地的土壤环境,提高植物和土壤微生物的多样性^[23]。在古大湖国家湿地公园周边耕地实施退耕还湿过程中,既要考虑土壤理化性质,同时也要参考土壤微生物群落结构差异,这对于选何种植被进行退耕还湿工作具有重要的指导意义。通过对 4 种生境类型土壤微生物群落结构及多样性的研究可知,耕地土壤与林地土壤的细菌群落相近,与湖岸土壤的真菌群落相近,但与原生土壤细菌及真菌群落均有差异。林地植被能够提高微生物多样性和土壤肥力^[8, 49-50],恢复土壤生态。因此在保护古大湖湿地生物多样性的前提下,且考虑湖岸植被对水需求量的限制因素,建议优先增加林地面积,以防止退耕后的土壤逐渐退化。

4 结论

黑龙江省古大湖湿地原生土壤、林地土壤、耕地土壤及湖岸土壤中,细菌群落包括变形菌门、酸杆菌门、放

线菌门等,真菌群落由子囊菌门、担子菌门等组成。耕地土壤与林地土壤中细菌群落多样性较高,其次为原生土壤,湖岸土壤的最低。耕地土壤与湖岸土壤真菌群落多样性较高,原生土壤的偏低,林地土壤中的最低。同一生境类型条件下细菌群落多样性具有相似性,而真菌存在一定的差异;不同生境类型条件下细菌、真菌的相似性均较低。其中原生土壤细菌群落多样性与其余 3 种生境类型的差异较大,而林地土壤真菌群落多样性具有一定的特殊性。耕地土壤细菌群落多样性和林地土壤的接近,但其真菌的与湖岸土壤更相近。pH 值、含水量对土壤细菌、真菌均有显著的影响,土壤细菌群落多样性对土壤环境因子非常敏感,而真菌对土壤环境因子敏感程度低。本文揭示了古大湖湿地盐碱土壤微生物群落结构及多样性在不同生境类型条件下的差异,为古大湖湿地盐碱土壤保护与合理利用提供参考依据,并为其退耕还湿工作提供理论指导。

参考文献 (References):

- [1] 国家林业局,中国湿地资源-黑龙江卷.北京:中国林业出版社,2015.
- [2] 万忠娟,于少鹏,王海霞,孙广友.松嫩平原内陆盐碱湿地的类型特征及分布规律.湿地科学,2003,1(2):141-146.
- [3] 牛世全,龙洋,李海云,达文燕,胡山,李渭娟,朱学泰,孔维宝.应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析河西走廊地区盐碱土壤微生物多样性.微生物学通报,2017,44(9):2067-2078.
- [4] 乔斌,黄维,何彤慧,苏芝屯,冯艳琼.宁夏震湖滩涂湿地盐生植物群落多样性与土壤盐碱度分析.西北植物学报,2018,38(2):324-331.
- [5] Singh K. Microbial and enzyme activities of saline and sodic soils. Land Degradation & Development, 2016, 27(3): 706-718.
- [6] Gandhi J K, Tatu K, Kamboj R D. A review of studies on bacterial and fungal diversity in wetland ecosystems. Research & Reviews: A Journal of Microbiology and Virology, 2018, 8(1): 25-38.
- [7] 李森森,马大龙,臧淑英,王璐璐,孙弘哲.不同干扰方式下松江湿地土壤微生物群落结构和功能特征.生态学报,2018,38(22):7979-7989.
- [8] Kaiser K, Wemheuer B, Korolkow V, Wemheuer F, Nacke H, Schöning I, Schrupf M, Daniel R. Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forests. Scientific Reports, 2016, 6: 33696.
- [9] Yousuf B, Sanadhya P, Keshri J, Jha B. Comparative molecular analysis of chemolithoautotrophic bacterial diversity and community structure from coastal saline soils, Gujarat, India. BMC microbiology, 2012, 12: 150.
- [10] 张巍,冯玉杰.松嫩平原盐碱化草原土壤微生物的分布及其与土壤因子间的关系.草原与草坪,2008,(3):7-11.
- [11] 汪顺义,冯浩杰,王克英,高子登,胡树文.盐碱地土壤微生物生态特性研究进展.土壤通报,2019,50(1):233-239.
- [12] Yan N, Marschner P, Cao W H, Zuo C Q, Qin W. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. International Soil and Water Conservation Research, 2015, 3(4): 316-323.
- [13] Zak D R, Holmes W E, White D C, Peacock A D, Tilman D. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? Ecology, 2003, 84(8): 2042-2050.
- [14] Drenovsky R E, Steenwerth K L, Jackson L E, Scow K M. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. Global Ecology and Biogeography, 2010, 19(1): 27-39.
- [15] 邓娇娇,朱文旭,周永斌,殷有,白雪娇,张华哲,张雨萌,秦胜金.不同土地利用模式对辽东山区土壤微生物群落多样性的影响.应用生态学报,2018,29(7):2269-2276.
- [16] 李岩,杨晓东,秦璐,吕光辉,何学敏,张雪妮.两种盐生植物根际土壤细菌多样性和群落结构.生态学报,2018,38(9):3118-3131.
- [17] Daffonchio D, Hirt H, Berg G. Plant-microbe interactions and water management in arid and saline soils/Lugtenberg B, ed. Principles of Plant-Microbe Interactions. Cham: Springer, 2015: 265-276.
- [18] 鲍士旦.土壤农化分析(第三版).北京:中国农业出版社,2000:30-109.
- [19] 周宁一.盐碱地微生物类群的多样性.微生物学通报,2012,39(7):1030-1030.
- [20] 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数量研究.土壤通报,2008,39(6):1376-1379.
- [21] 隋心,张荣涛,钟海秀,许楠,王继丰,刘应竹,袁海峰,倪红伟.利用高通量测序对三江平原小叶章湿地土壤细菌多样性的研究.土壤,2015,47(5):919-925.
- [22] 陈会海.三江湿地土壤微生物群落结构的多样性分析[D].哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [23] 邵颖,曹四平,刘长海,罗梦娇.基于高通量测序的南泥湾湿地土壤细菌多样性分析.干旱区资源与环境,2019,33(2):158-163.
- [24] 赵萌,印春生,厉成伟,钟胜财,于克锋,方淑波. MiSeq 测序分析围垦后海三棱藨草湿地土壤微生物群落多样性的季节变化.上海海洋大学学报,2018,27(5):718-727.

- [25] 李会荣, 俞勇, 曾胤新, 陈波, 任大明. 北极太平洋扇区海洋沉积物细菌多样性的系统发育分析. 微生物学报, 2006, 46(2): 177-183.
- [26] White D C, Sutton S D, Ringelberg D B. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. Current Opinion in Biotechnology, 1996, 7(3): 301-306.
- [27] Corsini A, Colombo M, Muyzer G, Cavalca L. Characterization of the arsenite oxidizer *Aliihoeflea* sp. strain 2WW and its potential application in the removal of arsenic from groundwater in combination with *Pf-ferritin*. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 108(3): 673-684.
- [28] 刘建, 李丹丹, 杨芳, 芮昊晨, 沈国平, 刘德立, 朱德锐. 一株积聚四氢嘧啶的青海湖盐单胞菌的分离及特性. 应用与环境生物学报, 2012, 18(6): 1049-1055.
- [29] Xu X W, Huo Y Y, Wang C S, Oren A, Cui H L, Vedler E, Wu M. *Pelagibacterium halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Pelagibacterium luteolum* sp. nov., novel members of the family *Hyphomicrobiaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(8): 1817-1822.
- [30] 魏志文, 李韵雅, 江威, 廖祥儒. 无锡地区常见树木根际土壤酸杆菌多样性. 生态学杂志, 2018, 37(9): 2649-2656.
- [31] 隋心, 张荣涛, 许楠, 刘赢男, 柴春荣, 王继丰, 付晓玲, 钟海秀, 倪红伟. 三江平原不同退化阶段小叶章湿地土壤真菌群落结构组成变化. 环境科学, 2016, 37(9): 3598-3605.
- [32] 杨立宾, 隋心, 朱道光, 崔福星, 李金博, 宋瑞清, 倪红伟. 大兴安岭兴安落叶松林土壤真菌群落特征研究. 中南林业科技大学学报, 2017, 37(12): 76-84.
- [33] 邵璐, 姜华. 辽宁碱蓬根际土壤真菌多样性的季节变化及其耐盐性. 生态学报, 2016, 36(4): 1050-1057.
- [34] 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.
- [35] 王芳, 图力古尔. 土壤真菌多样性研究进展. 菌物研究, 2014, 12(3): 178-186.
- [36] 杨海霞, 郭绍霞, 刘润进. 盐碱地生境中丛枝菌根真菌多样性与功能变化特征. 应用生态学报, 2015, 26(1): 311-320.
- [37] 王海英, 郭守玉, 黄满荣, Thorsten L H, 魏江春. 子囊菌较担子菌具有更快的进化速率和更高的物种多样性. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(8): 731-737, 765-772.
- [38] 周茂新, 文华安. 中国鬼伞属的研究现状//第八届海峡两岸菌物学学术研讨会论文集. 长春: 中国菌物学会, 2007: 10-14.
- [39] 李敏, 姚庆智, 魏杰, 闫伟. 丝膜菌属真菌研究进展. 食用菌学报, 2018, 25(3): 86-95.
- [40] 张敏. 中国球盖菇科滑锈伞属和脆锈伞属的分类及分子系统学研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [41] 纪垚, 王继华, 苑泽宁, 关键飞, 刘晨宇, 祝亚楠. 不同恢复方式对七星河湿地真菌群落多样性影响. 黑龙江大学工程学报, 2017, 8(1): 60-66.
- [42] Asghar H N, Setia R, Marschner P. Community composition and activity of microbes from saline soils and non-saline soils respond similarly to changes in salinity. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 47: 175-178.
- [43] Lauber C L, Hamady M, Knight R, Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15), 5111-5120.
- [44] 张琼琼, 黄兴如, 郭道宇. 基于 T-RFLP 技术的不同水位梯度植物根际细菌群落多样性特征分析. 生态学报, 2016, 36(14): 4518-4530.
- [45] 迟琦, 吴迪, 王月, 孙广玉. 小兴安岭森林湿地不同过渡带土壤微生物群落结构研究. 森林工程, 2018, 34(3): 6-13, 18.
- [46] 高玉峰, 贺字典. 影响土壤真菌多样性的土壤因素. 中国农学通报, 2010, 26(10): 177-181.
- [47] Brockett B F T, Prescott C E, Grayston S J. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 44(1): 9-20.
- [48] Ravindran K C, Venkatesan K, Balakrishnan V, Chellappan K P, Balasubramanian T. Restoration of saline land by halophytes for Indian soils. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(10): 2661-2664.
- [49] 秦红, 李昌晓, 任庆水. 不同土地利用方式对三峡库区消落带土壤细菌和真菌多样性的影响. 生态学报, 2017, 37(10): 3494-3504.
- [50] 杨文航, 任庆水, 李昌晓, 宋虹, 袁中勋, 马文超, 崔云凤, 王朝英. 三峡库区消落带落羽杉与立柳林土壤微生物生物量碳氮磷动态变化. 生态学报, 2019, 39(5): 1496-1506.