

DOI: 10.5846/stxb201909011811

关健飞,曹阳.黑龙江省表层冻土细菌群落结构组成和功能特征.生态学报,2020,40(14):4929-4941.

Guan J F, Cao Y. Bacterial community structure analysis of surface frozen soil in Heilongjiang Province. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(14): 4929-4941.

黑龙江省表层冻土细菌群落结构组成和功能特征

关健飞*, 曹 阳

牡丹江师范学院历史与文化学院, 牡丹江 157000

摘要:冻土是气候变化的敏感区,冻土中细菌对于预测冻土和气候之间的潜在反馈机制至关重要,研究冻土区土壤中细菌的多样性和种群结构将有助于及时检测环境变化并采取有效的应对措施。以黑龙江省表层冻土为研究对象,运用 Illumina MiSeq 高通量测序分析技术,系统分析黑龙江表层冻土细菌群落结构组成和功能特征,探究影响因素。结果表明,得到的 785640 条原始序列可划分为 30 个门,109 个纲,209 个目,326 个科,512 个属,598 个种。优势菌门主要包括 Proteobacteria、Actinobacteria、Acidobacteria、Chloroflexi、Bacteroidetes、Verrucomicrobia,在 $P < 0.01$ 水平上,Proteobacteria 与 Actinobacteria、Chloroflexi 极显著负相关,与 Acidobacteria 极显著正相关,Actinobacteria 与 Acidobacteria 极显著负相关,与 Chloroflexi 极显著正相关,Acidobacteria 和 Chloroflexi 之间则无显著相关性。属水平上,Aetherobacter 属在各样本之间显著性差异最大,Flavobacteriu 属和 Burkholderia 属,Microtholunatus 属和 Massilia 属之间呈现显著负相关。RDA 多元回归分析发现,土壤 pH 是影响细菌群落结构组成的最主要因子,门水平上与 Crenarchaeota、Verrucomicrobia、Thermi 呈极显著正相关,与 Elusimicrobia 呈极显著负相关;属水平上,与 Arthrobacter 属、Blastococcus 属、Chelatococcus 属在 $P < 0.001$ 水平上呈现显著正相关。基于细菌基因组的 16S rRNA 序列对菌群代谢功能进行预测发现,细菌群落主要代谢功能表现在膜转运功能、氨基酸代谢功能以及碳水化合物代谢功能三方面。黑龙江省区域尺度范围内,表层冻土中细菌群落结构分异主要受土壤理化性质影响,而土壤利用方式对微生物群落结构影响不显著。

关键词:冻土;细菌群落;功能基因

Bacterial community structure analysis of surface frozen soil in Heilongjiang Province

GUAN Jianfei*, CAO Yang

School of History and Culture, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157000, China

Abstract: Frozen soil is sensitive to climatic change. The bacteria in the frozen soil are critical to the prediction of the potential feedback mechanism between the frozen soil and the climate. Studies on the diversity and community structure of bacteria in the frozen soil are conducive to monitoring the environmental changes and taking effective measures. This study aimed to analyze the bacterial community structure of the surface frozen soil of Heilongjiang Province. The Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology was used to systematically investigate the structural composition and functional characteristics of the bacterial community of the surface frozen soil and explore the influencing factors. The results demonstrated that the obtained 785,640 raw sequences involved 30 phyla, 109 classes, 209 orders, 326 families, 512 genera, and 598 species. The dominant bacterial phyla included mainly the Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, and Verrucomicrobia. The Proteobacteria extremely significantly negatively correlated with Actinobacteria and Chloroflexi, but extremely significantly positively correlated with Acidobacteria ($P < 0.01$). The Actinobacteria extremely significantly negatively correlated with Actinobacteria, but extremely significantly positively

基金项目:黑龙江省教育厅基本业务费项目(1353MSYYB026)

收稿日期:2019-09-01; 修订日期:2020-04-28

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: bangeshiji@126.com

correlated with *Chloroflexi*. No significant correlation was found between *Acidobacteria* and *Chloroflexi*. At the genus level, *Aetherobacter* showed the largest significant differences between various samples. The significantly negative correlations were observed between *Flavobacterium* and *Burkholderia* and between *Microtholus* and *Massilia*. The multiple regression by redundancy analysis (RDA) demonstrated that the soil pH was the primary factor affecting the structural composition of the bacterial community. Furthermore, at the phylum level, the soil pH extremely significantly positively correlated with Crenarchaeota, Verrucomicrobia, and Thermi, and extremely significantly negatively correlated with Elusimicrobia. At the genus level, the soil pH significantly positively correlated with *Arthrobacter*, *Blastococcus*, and *Chelatococcus* ($P < 0.001$). Based on the 16S rRNA sequence of bacterial genome, the following three main metabolic functions of the bacterial community were predicted: membrane transport function, amino acid metabolic function, and carbohydrate metabolic function. Within the regional range of Heilongjiang Province, the structural differentiation of the bacterial community in the surface frozen soil was primarily determined by soil physicochemical properties, but not significantly affected by the soil utilization pattern.

Key Words: frozen soil; bacterial community; functional genes

受全球气候变化影响,中国平均气温变化趋势与全球变化趋势一致,而东北地区气温升温幅度高于全国的平均升温幅度^[1],是增温最快的地区之一^[2]。东北多年冻土区是欧亚大陆多年冻土区的南缘地带,冻土赋存条件脆弱,热稳定性差,易受气候和外界环境变化的影响,生态系统敏感性强^[3]。位于东部季风区北部的黑龙江省纬度位置偏北,受强大的西伯利亚、蒙古高压影响形成严寒的大陆性气候,形成和发育创造了不同类型的冻土和冻土特征。黑龙江省多年冻土分布于 47°30'—53°33'N,分为三个亚区,分别为大兴安岭北部大片多年冻土亚区、大兴安岭中部大片岛状多年冻土亚区以及大、小兴安岭岛状-稀疏岛状多年冻土亚区;其余地区为季节性冻土区^[4]。

冻土,一般是指温度在 0℃ 或 0℃ 以下,并含有冰的各种岩土和土壤。冻土作为一种温度敏感和易变的地质体,是气候变化的敏感区,气候变化是影响冻土的重要因素,微生物对于预测冻土和气候之间的潜在反馈机制至关重要^[5-6]。微生物作为冻土生态系统中的重要角色扮演者,是其内部多种功能联通的生态群体^[7]。冻土微生物在冻土生物地球化学循环中(如土壤碳氮循环、温室气体排放等)具有重要的作用^[8-10],且在一定程度上能够指示全球气候变化。在全球气候变暖的背景下,研究冻土微生物群落特征及其与环境因子变化的关系逐渐成为当前热点研究领域^[11]。微生物的种群结构和遗传进化对环境条件变化敏感,研究不同冻土区土壤中微生物的多样性和种群结构将有助于及时检测环境变化并采取有效的应对措施^[12]。环境因子被认为是影响微生物群落发生变化的主要驱动力^[13],如土壤 pH^[14]、气候条件^[15]、有机质含量^[16]等都可以在一定程度上影响微生物群落的组成和分布。

土壤微生物数量巨大、结构复杂,传统的微生物培养计数仅仅能够分离培养 1% 的微生物,很难全面、准确的解析土壤微生物的结构组成和多样性变化规律^[17-19]。随着分子生物学技术的不断发展,高通量测试分析技术作为微生物群落的有效研究手段,被广泛的应用在土壤微生物研究领域,其中包括物种的多样性、丰富度、种内/种间相互作用、对环境变化响应等方面的研究^[20-21]。本研究以黑龙江省表层冻土样品为研究对象,通过高通量分子测序手段,分析黑龙江省表层冻土细菌群落组成和分子生态网络特征,预测群落功能,探究环境因素、利用方式对于黑龙江表层冻土微生物群落空间异质性的影响。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

黑龙江省,介于北纬 43°26'—53°33',东经 121°11'—135°05',是气候变化导致气温升高幅度最明显的地区之一。全省年平均气温多在 -5℃—5℃ 之间,由南向北降低,大致以嫩江、伊春一线为 0℃ 等值线。无霜冻

期全省平均介于 100—150 d 之间,终霜冻在 4 月下旬至 5 月上旬结束。年降水量全省多介于 400—650 mm 之间,中部山区多,东部次之,西、北部少。其北部的多年冻土属欧亚大陆多年冻土区的南缘地带,冻土类型主要为多年冻土和季节性冻土。

1.2 采样点布设及样品采集

本研究以黑龙江省表层(0—20 cm)冻土为研究对象,全省区域内共设置采样点 19 个(如图 1 所示),于 2019 年 5 月 1—4 日期间完成土壤样品采集。各采样点处设置 10 m×10 m 样地,四角及对角线交点处分别进行表层土壤样品的采集,去除杂物、细跟等杂物后充分混匀,置于密封袋中,带回实验室后,一部分-80℃保存用于高通量测试分析,一部分常温风干用于土壤理化性质测定。

1.3 研究方法

1.3.1 土壤微生物群落测定

采用 E. Z. N. A.® soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U. S.) 提取土壤总 DNA,应用 NanoDrop2000 进行 DNA 纯度和浓度检测,DNA 完整性检测采用琼脂糖凝胶电泳法(1%琼脂糖胶,5V/cm,20min)。采用 16S rRNA 基因的 V3-V4 区引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 和 907R (5'-CCGTC AATTCMTTTRAGTTT-3') 对高变区片段进行扩增。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 3min;27 次循环(95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s);72℃ 延伸 10 min,至 10℃。20 μL 反应体系为 4 μL 的 5×FastPfu Buffer,2 μL 的 2.5 mM dNTPs,0.8 μL 的 Forward Primer(5 μM),0.8 μL 的 Reverse Primer(5 μM),0.4 μL 的 FastPfu Polymerase,0.2 μL 的 BSA,10 ng 的 Template DNA,补 ddH₂O 至 20 μL。使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化,Tris-HCl 洗脱,2%琼脂糖电泳检测。利用 QuantiFluor™-ST 进行检测定量。根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩增片段构建文库,利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序,委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.3.2 土壤理化性质测定

土壤含水率的测定采用真空烘箱法(NY 525-2012/5.6);pH 的测定采用电位法(NY/T 1377-2007);有机质的测定采用重铬酸钾滴定法(NY/T 1121.6-2006);全氮的测定采用半微量开氏法(NY/T 53-1987);全磷的测定采用氢氧化钠碱融-钼锑抗比色法(NY/T 88-1988);全钾的测定则采用火焰光度法(NY/T 87-1988);硝态氮采用连续流动分析仪法进行测定(LY/T 1228-2015);有效磷采用钼锑抗比色法(NY/T 1121.7-2014),其中酸性土壤使用氟化铵-盐酸作为浸提剂,碱性土壤使用碳酸氢钠作为浸提剂;速效钾则使用乙酸铵浸提,火焰光度计测定(NY/T 889-2004/3.10)。每个土壤样品测三次取平均值记录,结果如表 1 所示。

1.4 数据分析

采用 Illumina MiSeq 平台对测序样本进行双端测序。高通量测试结果分析过程主要是参照 Qiime2 文档中名为 "Atacama soil microbiome tutorial" 的教程来完成(<https://docs.qiime2.org/2019.1/>)。原始序列通过质控、去噪、拼接及去嵌合体,形成 OTU。选取代表性 OTU 序列,与核糖体 RNA 数据库(Greengenes Database 13_8 版本[按 99%序列相似性聚类])进行比对获得物种注释信息。

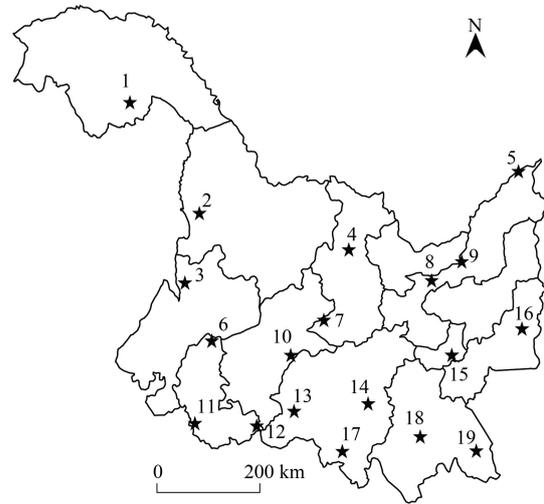


图 1 采样点分布

Fig.1 Sample sites distribution

图中★号代表采样点,数字为各采样点编号

表 1 各采样点土壤理化性质均值($n=3$)Table 1 Average value of soil physical and chemical properties at each sample site ($n=3$)

采样点 Sample sites	经纬度 Longitude and latitude	含水率 Water content/%	pH	有机质 Organic matter/ (g/kg)	总氮 Total nitrogen/ (g/kg)	总磷 Total phosphorus/ (g/kg)	全钾 Total potassium/ (g/kg)	硝态氮 Nitrate nitrogen/ (mg/kg)	有效磷 Available phosphorus/ (mg/kg)	速效钾 Available potassium/ (mg/kg)	碳氮比 C/N ratio	氮磷比 N/P ratio
1	51°40'32"N, 124°24'31"E	39.6	5.31	149	3.31	0.397	3.56	11.1	85.7	45.2	26.11	8.34
2	49°29'28"N, 125°33'57"E	2	7.75	89.6	3.46	6.56	3.32	14.2	91	268	15.02	0.53
3	48°22'41"N, 124°42'32"E	5.8	6.73	78.5	4.4	2.48	3.71	109	294.7	663	10.35	1.77
4	48°06'37"N, 129°15'11"E	49.1	6.22	155	6.27	1.57	4.74	225	91.4	261	14.34	3.99
5	48°21'49"N, 134°18'31"E	23.8	6.35	68.7	3.18	1.37	2.65	43.7	37.4	185	12.53	2.32
6	47°16'15"N, 125°02'25"E	10.4	8.65	30.7	1.39	0.545	3.79	8.98	12.3	106	12.81	2.55
7	47°04'11"N, 128°04'12"E	16.7	6.04	67	3.18	2	3.54	47.1	117.1	135	12.22	1.59
8	47°07'26"N, 131°07'25"E	16.1	6.8	34.5	1.74	0.934	2.33	13.7	29.8	191	11.50	1.86
9	47°15'11"N, 132°02'48"E	5.1	7.28	82.3	3.33	1.35	5.14	47.2	63.4	193	14.34	2.47
10	46°38'57"N, 126°58'33"E	27.4	7.49	30.8	1.53	0.805	5.11	12.7	36.4	141	11.68	1.90
11	45°57'2"N, 124°05'39"E	1.6	7.23	43.1	2	0.661	4.18	6.57	21.5	163	12.50	3.03
12	45°37'30"N, 125°37'57"E	8.1	7.93	30.4	1.88	1.17	3.67	18.5	8.1	137	9.38	1.61
13	45°41'33"N, 126°40'23"E	12.2	7.38	16.7	1.22	0.402	4.3	7.89	5	76.2	7.94	3.03
14	45°25'59"N, 128°33'58"E	23.4	6.66	43.8	1.97	0.865	3.47	19.3	7	64.8	12.90	2.28
15	45°46'10"N, 131°0'35"E	20.9	7.74	64.6	3.07	1.53	3.62	17.3	71	287	12.21	2.01
16	45°46'15"N, 132°57'14"E	21	7.02	62.8	2.84	2.95	3.36	58.1	66.8	145	12.83	0.96
17	44°46'25"N, 127°35'39"E	10.9	6.34	64.7	3.78	2.63	3.79	88.9	405.8	318	9.93	1.44
18	44°35'52"N, 129°35'55"E	3.9	8.2	22.4	1.04	1.65	3.62	7.24	17.2	97	12.49	0.63
19	44°02'15"N, 130°50'43"E	13.1	7.25	31	1.7	0.636	5.18	21	10.9	119	10.58	2.67

Alpha 多样性以及 Beta 多样性的分析主要用 qiime2 diversity 插件完成。Alpha 多样性指数用于评估样本本身的多样性程度, Beta 多样性指数用于评估样本之间的微生物群落结构差异性^[22]。使用了冗余分析方法 (RDA) 揭示微生物群落与相关环境因子之间的潜在关联。基于样本中主要微生物物种相对丰度, 使用共现网络分析 (Co-occurrence analysis) 计算斯皮尔曼等级相关系数用于了解物种之间的关联。应用 PICRUS2 软件预测微生物群落可能的功能组成^[23]。

2 结果与讨论

2.1 细菌群落结构分析

2.1.1 测试数据分析

黑龙江表层冻土 19 个采样土壤中共得到原始序列 785640 条, 随机抽取有效序列, 构建 Alpha 多样性稀释曲线 (Rarefaction Curve) (图 2), 各样本曲线趋于平缓, 继续增加测序深度已无法再检测到大量新的 OTU, 表明测序结果足够反映各土壤样本中细菌的多样性。基于反距离权重插值方法, 对门分类水平上每个样品的序列数目占总序列数的比例进行插值分析发现, 黑龙江省表层冻土细菌序列数目占总序列数的比例自西向东呈现下降趋势。

2.1.2 细菌群落组成分析

黑龙江省表层冻土检测到的细菌 OTUs 可划分为

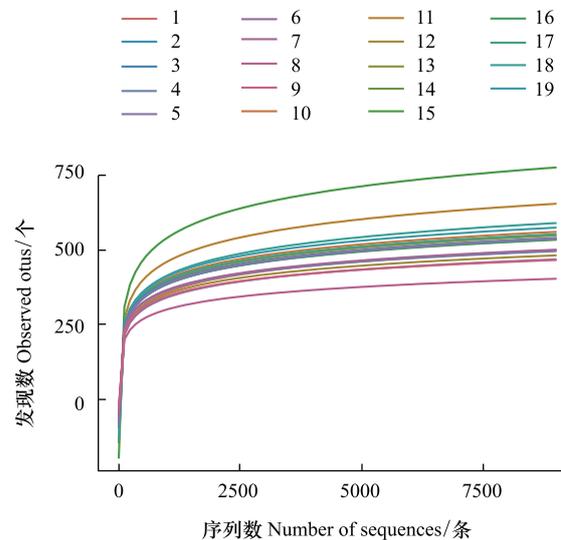


图 2 各样本 Alpha 多样性稀释曲线

Fig.2 Alpha rarefaction curve for each sample

30 个门, 109 个纲, 209 个目, 326 个科, 512 个属, 598 个种, 其中优势菌门主要包括变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)。Proteobacteria 相对丰度在 49.81% 至 22.01% 之间, 采样点 1 处相对丰度最高。Actinobacteria 相对丰度在 45.33%—11.02% 之间, 采样点 1 处相对丰度最低。Acidobacteria 相对丰度在 17.83%—5.54% 之间, Chloroflexi 相对丰度在 11.44%—0.73% 之间, 该四类菌门相对丰度之和均占各样本中细菌相对丰度的 70% 以上 (图 3), 该四类优势细菌门, 在 $P < 0.01$ 水平上, Proteobacteria 与 Actinobacteria、Chloroflexi 极显著负相关, 与 Acidobacteria 极显著正相关, 相关系数分别为 -0.748 、 -0.573 、 0.281 。Actinobacteria 与 Acidobacteria 极显著负相关, 与 Chloroflexi 极显著正相关, 相关系数分别为 -0.633 和 0.052 。Acidobacteria 和 Chloroflexi 之间则无显著相关性。

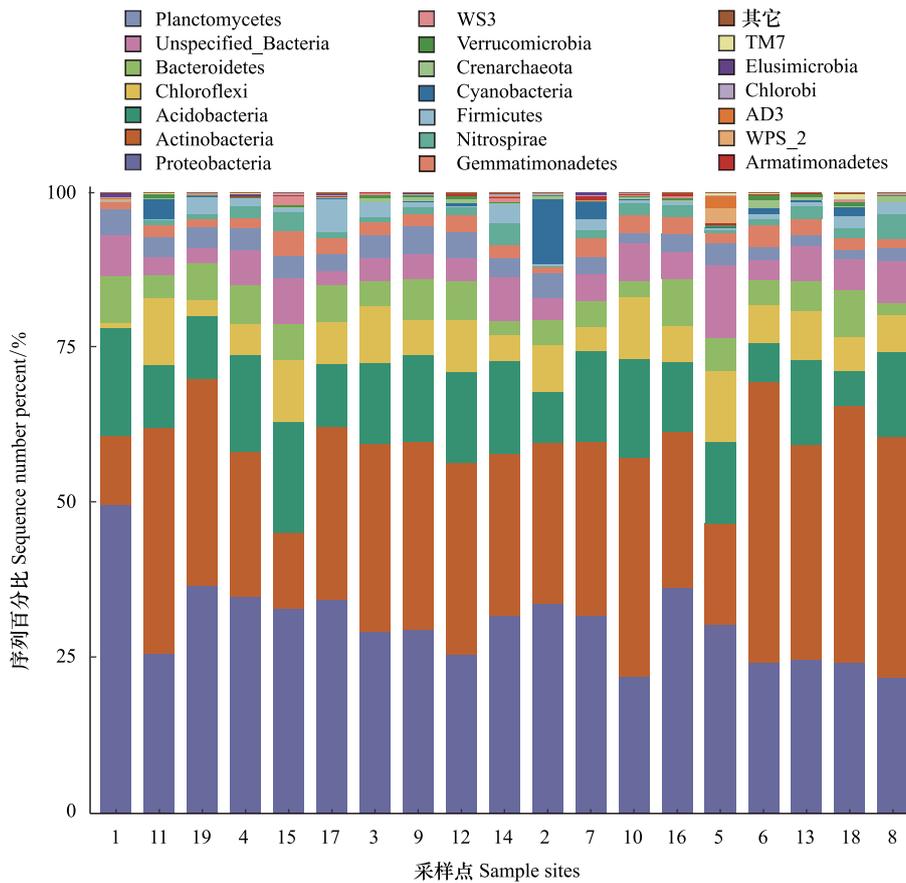


图 3 各个样本在门水平的物种相对分布

Fig.3 Relative distribution of each sample at the phylum level

主要属水平上细菌物种相互作用网络如图 4 所示, 圆圈代表一个物种, 大小代表其相对丰度, 不同的颜色代表不同的物种门分类, 圆圈之间的线条代表这两个物种间的相关性显著 (校正错误发现率的秩相关的 P 值小于 0.05), 线条颜色红色代表正相关, 蓝色代表负相关, 线条越粗, 相关系数绝对值越大。大部分菌属之间的相关性均为显著正相关, 只有 *Flavobacteriu* 属和 *Burkholderia* 属, *Microclunatus* 属和 *Massilia* 属之间呈现显著负相关。对样品间具有显著性差异的属水平上物种进行 ANCOM (Analysis of composition of microbiomes) 分析, 该方法专门用于比较物种在组间的显著性差异, 其中 W 值越高, 代表该物种在组间的差异显著性越高, clr 值越高代表相对丰度差异越大。 *Aetherobacter* 在各样本之间差异最大 ($W = 83, clr = 16.58$), 其次为 *Planctmyces* ($W = 16, clr = 4.39$) 和 *Constrictibacter* ($W = 2, clr = 8.46$) (图 5)。

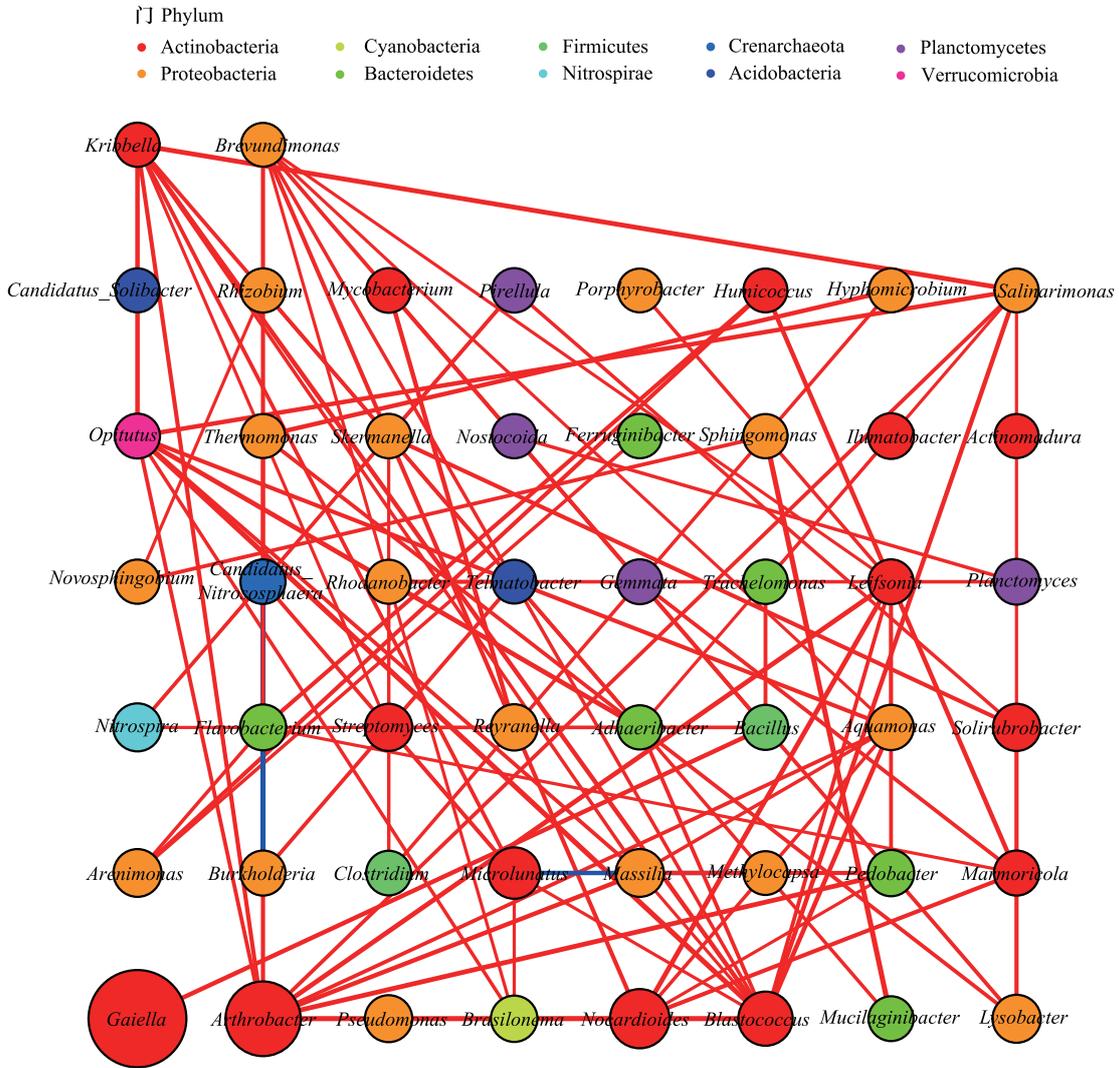


图 4 主要属水平上细菌物种相互作用网络图

Fig.4 Network diagram of bacterial species interactions at the main genus level

2.1.3 细菌群落多样性分析

Alpha 多样性指数用于样品中物种多样性的分析, chao1 指数是用来反映物种丰富度的指标, Simpson 和 Shannon 指数分析用于样品的物种多样性, 除上面所说物种丰富度的涵义外, 还指所有物种个体数目的分配的均匀程度。黑龙江省表层冻土细菌多样性 chao1 指数在 768.6 至 368.0 之间, 其中采样点 15 处的指最大, 其次为采样点 11 和 18 处; 而采样点 8 处 chao1 多样性指数最低, 其次为采样点 9 处。Simpson 指数和 Shannon 指数在采样点 15 处值均为最大, 分别为 0.997 和 9.13, 而采样点 18 处最小, 分别为为 0.986 和 8.18。表明采样点 15 处细菌丰富度较高, 物种分布均匀度较好, 而采样点 18 处虽然细菌丰富度较高, 但均匀度较差。Beta

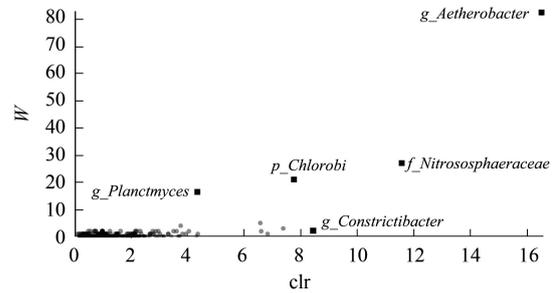


图 5 物种属水平分类的 ANCOM 丰度比较结果

Fig.5 Comparison of ANCOM abundance results for genus classification

在 ANCOM 分析中, W 值是一个衡量组间差异显著性的统计量 (类似 F 值, t 值), 横坐标 clr 值代表组间样品丰度的差异程度

多样性指数是对不同样品间的微生物群落构成进行比较分析,Bray Curtis 距离是生态学上反应群落之间差异性最常用的指标,其值越小,表示这两个样品在物种多样性方面存在的差异越小。采样点 1 与其他样点之间 Bray Curtis 距离值均大于 0.87,与采样点 12 处差异性最大,为 0.99;采样点 10 和 13 处距离值为 0.53,差异最小。

2.2 细菌群落功能预测

基于 PICRUS1 的原理对菌群代谢功能进行预测,结果如图 6 所示。微生物群落功能在组间差异不明显,每个样品中的菌群主要呈现 20 种代谢功能,其中膜转运功能基因、氨基酸代谢功能基因、碳水化合物代谢功能基因所占的相对比例较高,在每个样品中这三种功能基因均达到 10% 以上。其次为复制和修复功能基因、能量代谢功能基因,相对比例在 5%—7% 之间。其他功能基因,如信号转导、脂类代谢等相对比例均在 5% 以下。

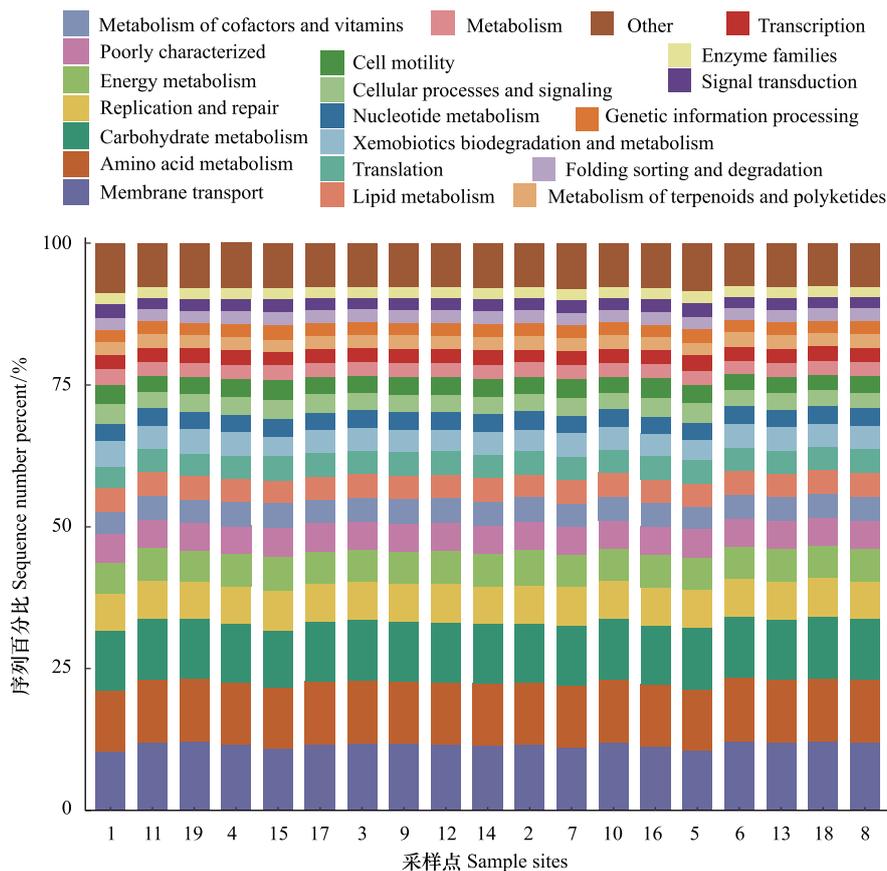


图 6 微生物群落功能预测组成柱形图

Fig.6 Microbial community function prediction composition diagram

2.3 细菌群落与土壤理化性质相关性分析

为反映细菌与环境因子之间的关系,先进行 DCA 分析,最大轴的值小于 4,进行 RDA 多元回归分析,进而得到显著影响细菌分布的环境驱动因子。门水平上(图 7,图 8),pH 是影响细菌群落结构组成的最主要因子,与 Crenarchaeota、Verrucomicrobia、Thermi 呈极显著正相关,与 Elusimicrobia 呈极显著负相关,与 Actinobacteria、Cyanobacteria 呈显著正相关,与 Proteobacteria、AD3 呈显著负相关。其次分别为 OM、C/N、WC。在 $P < 0.001$ 水平上,OM 与 Actinobacteria 呈现负相关性,与 Elusimicrobia 呈正相关性。属水平上,pH 同样是最为主要的影 响因子,其次为 WC、TP、OM、C/N,与这些主要环境因子具有显著相关性的菌属如图 9 和图 10 所示。追踪细菌种属关系分析发现,pH 与 Actinobacteria 门的 *Arthrobacter* 属、Cyanobacteria 门的 *Blastococcus* 属、

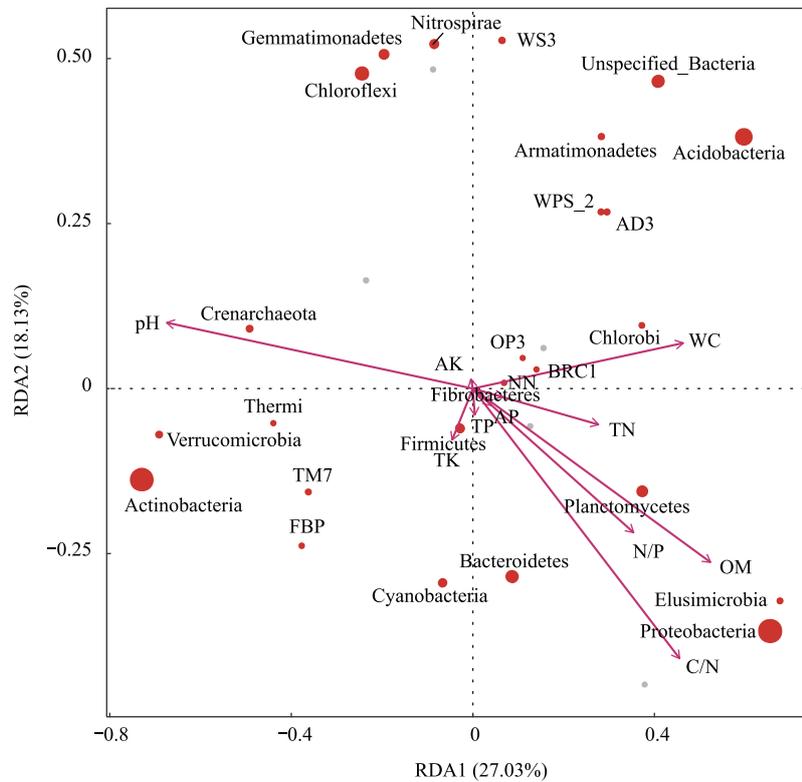


图7 RDA 排序图(门水平)

Fig.7 RDA sort diagram (phylum)

Proteobacteria 门的 *Chelatococcus* 在 $P < 0.001$ 水平上显著正相关。Kribbella 属 (Proteobacteria 门) 和 *Granulicella* 属 (Actinobacteria 门) 则在 $0.001 \leq P < 0.01$ 水平上与 pH 分别呈现显著正相关和负相关。*Microtholunatus* 属 (Actinobacteria 门) 和 *Microtholunatus* 属 (Proteobacteria 门) 则在 $0.01 \leq P < 0.05$ 水平上与 pH 分别呈现显著负相关和正相关。

2.4 利用方式对细菌群落分异影响分析

黑龙江省区域内共设置的 19 个采样点分属于五种利用类型土壤, Group1 为森林-林地土壤 ($n = 5$), Group2 为菜园-果园土壤 ($n = 5$), Group3 为农田土壤 ($n = 5$), Group4 为城区绿地土壤 ($n = 5$), Group5 为居民区土壤 ($n = 4$), Alpha 多样性以及 Beta 多样性在各组之间均无显著差异。选取细菌物种绝对丰度前 20 的菌门进行聚类分析, 研究不同样品间的相似性, 结果如图 11 所示, 19 个采样点被聚为 6 类, 每类中均包括不同利用方式的土壤样品, 表明利用方式不是影响黑龙江省表层冻土细菌群落结构的主要因素。

3 讨论

土壤中的细菌群落通常由相似的优势菌门组成, 包括 Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia 和 Chloroflexi 等^[24-25], 这些菌门在冻土中也常作为优势菌门被检出^[8]。王艳发等^[26]对青藏高原冻土细菌群落结构研究发现, Proteobacteria、Actinobacteria 作为优势菌门在冻土层中被检出。有研究表明, Actinobacteria 更加适应低温环境^[27], Proteobacteria 在冻土在活动层具有一个很高的比例^[28]。程亮等^[29]研究发现, 除了 Actinobacteria、Proteobacteria 之外, Acidobacteria、Bacteroidetes、Chloroflexi 同样在青藏高原冻土中具有较高的丰富度。韩睿等^[30]对青海果洛地区冻土中微生物进行测试分析发现 Bacteroidetes 和 Proteobacteria 为优势菌门。本研究中, 黑龙江表层冻土优势菌门同样为以上菌门, 且优势程度明显。属水平上, *Aetherobacter* 是革兰氏阴性变形菌, 广泛存在于土壤环境介质中, 其富产二级代谢物, 被成为自然界天然产

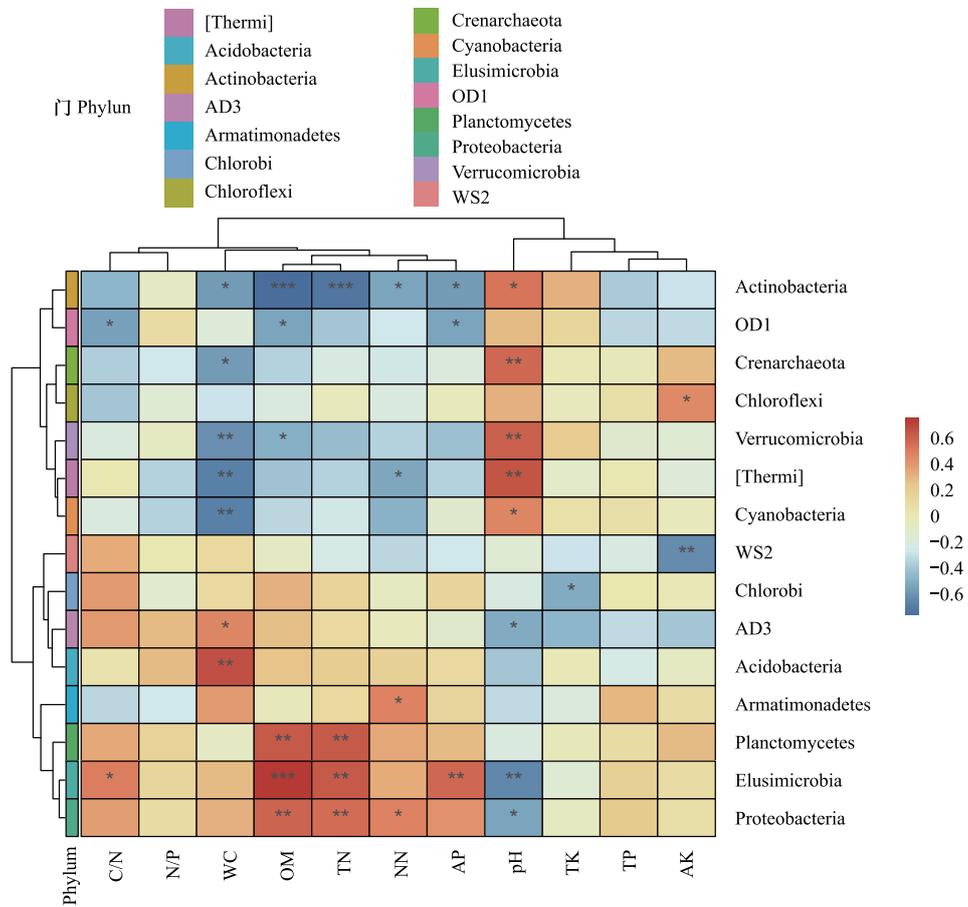


图 8 门水平细菌与理化性质相关性热图

Fig.8 Heatmap of the correlation between bacteria and physical and chemical properties at phylum level

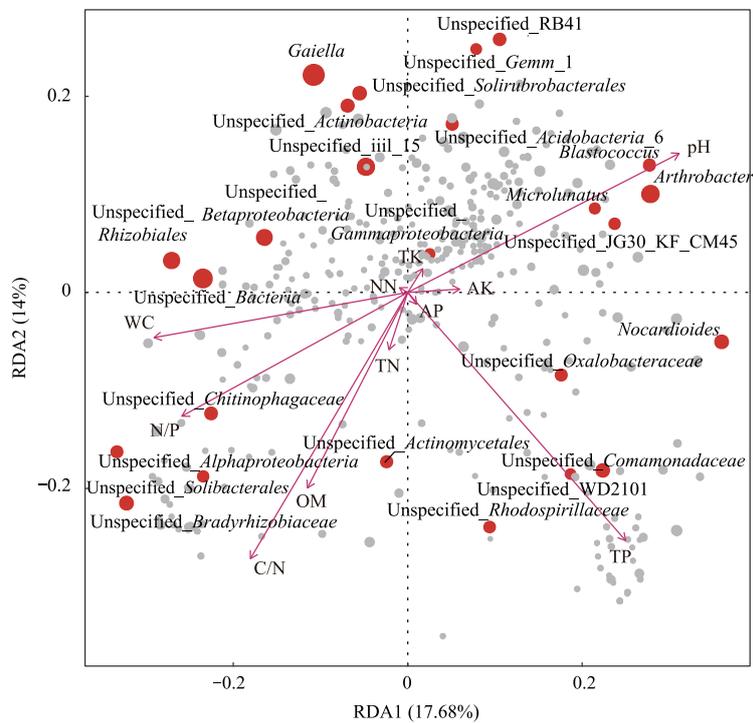


图 9 RDA 排序图(属水平)

Fig.9 RDA sort diagram (genus)

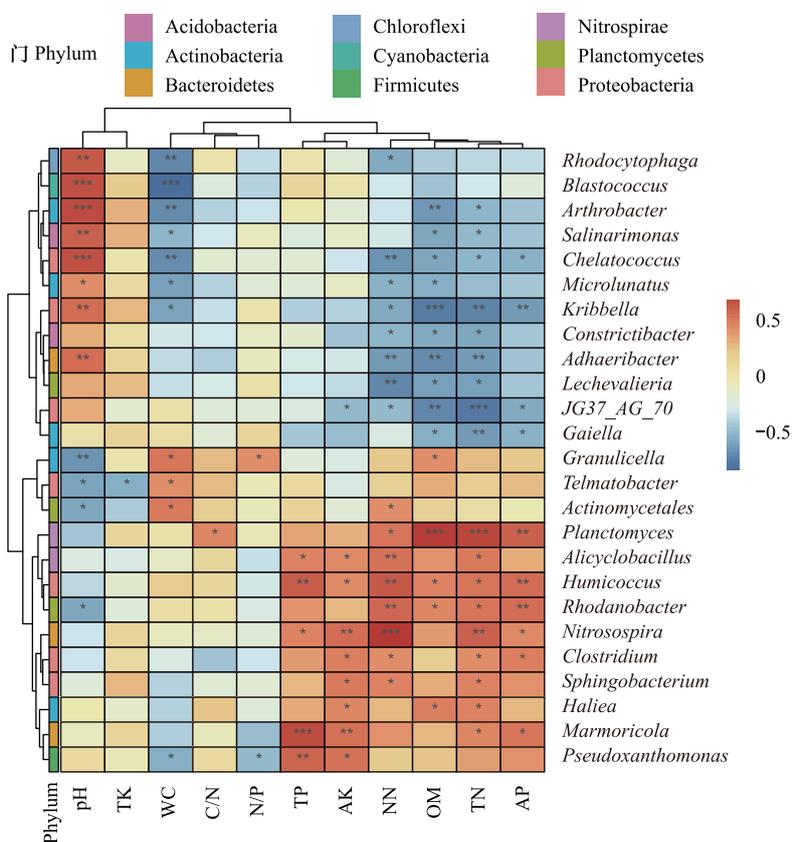


图 10 属水平细菌与理化性质相关性热图

Fig.10 Heatmap of the correlation between bacteria and physical and chemical properties at genus level

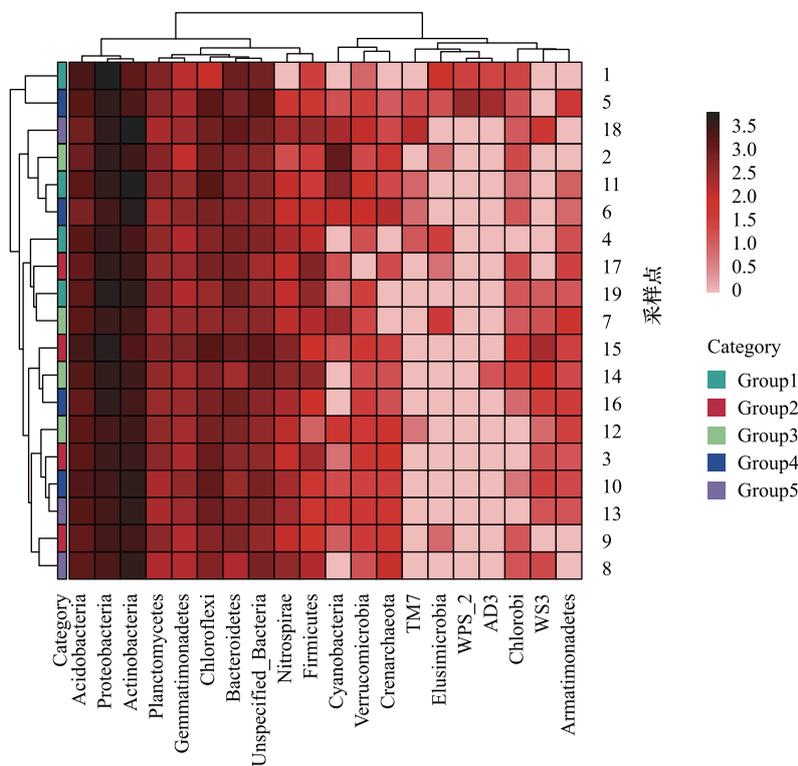


图 11 不同利用类型土壤种细菌门水平的分类热图

Fig.11 Classification heatmap of bacteria in different soil types

物制造工厂,本研究中发现的 Actinobacteria 门的 *Arthrobacter* 属在许多冻土中被查出,如北极、南极、青藏高原、天山等,并且可作为优势菌群进行培养^[11]。*Planctomyces* 类群普遍存在于冻土环境中,且该类群经长期低温诱导,已形成较为适应该类环境的生理特性。冻土中 *Flavobacteriu* 属和 *Burkholderia* 属, *Microtholunatus* 属和 *Massilia* 属之间呈现显著负相关性则未见相关报道。

研究表明,在不同空间尺度和生态系统的冻土中,pH 对细菌群落结构组成存在显著影响^[14,31]。一方面是由于土壤中的细菌最适生长 pH 值范围较窄^[32-33];另一方面是由于 pH 通过调节土壤养分的可利用性进而影响细菌群落结构^[34]。本研究中,黑龙江表层冻土 pH 在 5 至 9 之间,对细菌群落结构组成影响显著,与其他人研究结果一致^[35]。已有研究表明有机质含量显著影响冻土微生物群落结构^[36]。碳氮是冻土中微生物的主要营养物质,微生物作为冻土碳氮循环的重要参与者,土壤碳氮含量直接对其群落的活性与分解作用产生影响^[37-38],本研究中土壤 C/N 作为环境因素对于冻土微生物群落结构影响显著。冻土微生物数量与土壤水分含量呈现显著正相关^[39],而本研究中土壤水分含量对冻土微生物群落结构的影响同样呈现显著正相关关系。李昌明^[40]对青藏高原多年冻土区土壤微生物及其与环境关系的研究发现,冻土土壤理化因子中的土壤水分与养分一起控制着微生物群落丰度和组成,而冻土土壤 pH 值和 C/N 更多的调控着细菌群落的多样性,与本研究结果一致。

在对全球表层土壤微生物群落结构和功能进行研究分析发现,环境变化与细菌门水平组成上表现出强相关性,环境变量对土壤表层细菌结构及功能的影响更大^[41]。土壤中细菌群落之间的相似性更多地受到土壤性质的控制(特别是土壤 pH)。土壤利用^[42]、管理^[43]、种植模式^[44]对细菌群落结构的影响也是显著的。而在本研究中,黑龙江省区域尺度范围内,表层冻土中细菌群落结构分异主要受土壤理化性质影响,而土壤利用方式对微生物群落结构影响不显著。

4 结论

黑龙江省表层冻土优势菌门主要包括 Proteobacteria、Actinobacteria、Acidobacteria、Chloroflexi、Bacteroidetes、Verrucomicrobia。*Aetherobacter* 属在各样本之间显著性差异最大,*Flavobacteriu* 属和 *Burkholderia* 属, *Microtholunatus* 属和 *Massilia* 属之间呈现显著负相关。pH 是影响细菌群落结构组成的最主要环境因子。基于细菌基因组的 16S rRNA 序列对菌群代谢功能进行预测发现,细菌群落主要代谢功能表现在膜转运功能、氨基酸代谢功能以及碳水化合物代谢功能三方面。冻土表层土壤理化性质的差异性决定了黑龙江省区域尺度范围内土壤细菌群落结构的分异,而本研究中涉及的土壤利用方式对微生物群落结构影响不显著。

参考文献(References):

- [1] 丁一汇,戴晓苏. 中国近百年来的温度变化. 气象, 1994, 20(12): 19-26.
- [2] 高峰,王宝书. 全球变暖与东北地区气温变化研究. 海洋预报, 2008, 25(1): 25-30.
- [3] 陈珊珊,臧淑英,孙丽. 东北多年冻土退化及环境效应研究现状与展望. 冰川冻土, 2018, 40(2): 298-306.
- [4] 石剑,王育光,杜春英,王萍. 黑龙江省多年冻土分布特征. 黑龙江气象, 2003, (3): 32-34.
- [5] Todd-Brown K, Zheng B, Crowther T W. Field-warmed soil carbon changes imply high 21st-century modeling uncertainty. Biogeosciences, 2018, 15(12): 3659-3671.
- [6] Pendall E. Fast microbes regulate slow soil feedbacks. Nature Climate Change, 2018, 8(10): 859-860.
- [7] Layeghifard M, Hwang D M, Guttman D S. Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective. Trends in Microbiology, 2017, 25(3): 217-228.
- [8] Jansson J K, Taş N. The microbial ecology of permafrost. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(6): 414-425.
- [9] 倪永清,史学伟,郑晓吉,顾燕玲,徐宇丽,程国栋. 冻土甲烷循环微生物群落及其对全球变化的响应. 生态学报, 2011, 31(13): 3846-3855.
- [10] 刘光琇,马晓军,陈拓,安黎哲,王勋陵. 冻土微生物研究进展与意义. 冰川冻土, 2004, 26(2): 188-191.
- [11] 胡平,伍修锟,李师翁,刘光琇,张威,杨轩. 近 10a 来冻土微生物生态学研究进展. 冰川冻土, 2012, 34(3): 732-739.

- [12] 李森, 冯海艳, 杨忠芳, 刘长征, 夏学齐, 王诚煜, 江丽珍, 蒋宏忱. 中国典型冻土区土壤可培养细菌多样性. 微生物学报, 2011, 51(12): 1595-1604.
- [13] Razanamalala K, Razafimbelo T, Maron P A, Ranjard L, Chemidlin N, Lelièvre M, Dequiedt S, Ramaroson V H, Marsden C, Becquer T, Trap J, Blanchart E, Bernard L. Soil microbial diversity drives the priming effect along climate gradients: a case study in Madagascar. *The ISME Journal*, 2018, 12(2): 451-462.
- [14] 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.
- [15] Zhou J, Troyanskaya O G. Probabilistic modelling of chromatin code landscape reveals functional diversity of enhancer-like chromatin states. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 10528.
- [16] Leff J W, Jones S E, Prober S M, Barberán A, Borer E T, Firn J L, Harpole W S, Hobbie S E, Hofmockel K S, Knops J M H, McCulley R L, La Pierre K, Risch A C, Seabloom E W, Schütz M, Steenbock C, Stevens C J, Fierer N. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(35): 10967-10972.
- [17] McCarthy C M, Murray L. Viability and metabolic features of bacteria indigenous to a contaminated deep aquifer. *Microbial Ecology*, 1996, 32(3): 305-321.
- [18] 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.
- [19] 韦应莉, 曹文侠, 李建宏, 张爱梅, 李小龙. 不同放牧与围封高寒灌丛草地土壤微生物群落结构 PLFA 分析. 生态学报, 2018, 38(13): 4897-4908.
- [20] 卢慧, 赵珩, 盛玉钰, 丛微, 王秀磊, 李迪强, 张于光. 基于高通量测序的两种高寒草甸土壤原核生物群落特征研究. 生态学报, 2018, 38(22): 8080-8087.
- [21] Knight R, Vrbanc A, Taylor B C, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, Gonzalez A, Kosciulek T, McCall L I, McDonald D, Melnik A V, Morton J T, Navas J, Quinn R A, Sanders J G, Swafford A D, Thompson L R, Tripathi A, Xu Z Z, Zaneveld J R, Zhu Q Y, Caporaso J G, Dorrestein P C. Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(7): 410-422.
- [22] Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. EMPERor: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience*, 2013, 2(1): 16.
- [23] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, McDonald D, Knights D, Reyes J A, Clemente J C, Burkepile D E, Vega Thurber R L, Knight R, Beiko R G, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821.
- [24] Tecon R, Or D. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(5): 599-623.
- [25] Zeng Q C, An S S, Liu Y, Wang H L, Wang Y. Biogeography and the driving factors affecting forest soil bacteria in an arid area. *Science of the Total Environment*, 2019, 680: 124-131.
- [26] 王艳发, 魏士平, 崔鸿鹏, 苏新, 祝有海, 卢振权, 胡非, 李来鹏, 张帅, 刘晖. 青藏高原冻土区土壤垂直剖面中微生物的分布与多样性. 微生物学通报, 2016, 43(9): 1902-1917.
- [27] Wilhelm R C, Niederberger T D, Greer C, Whyte L G. Microbial diversity of active layer and permafrost in an acidic wetland from the Canadian High Arctic. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(4): 303-315.
- [28] Zhou J Z, Davey M E, Figueras J B, Rivkina E, Gilichinsky D, Tiedje J M. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA. *Microbiology*, 1997, 143(12): 3913-3919.
- [29] 程亮, 王信, 郭青云. 青藏高原不同生境土壤细菌群落结构特征及其与环境的关系. 干旱地区农业研究, 2019, 37(1): 18-26.
- [30] 韩睿, 朱德锐, 陈来生, 封希媛, 刘静, 孙琦龙. 果洛地区冻土细菌群落的多样性分析. 青海大学学报, 2016, 34(4): 93-97.
- [31] Tian J, He N P, Hale L, Niu S L, Yu G R, Liu Y, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y, Gao Q, Zhou J Z. Soil organic matter availability and climate drive latitudinal patterns in bacterial diversity from tropical to cold temperate forests. *Functional Ecology*, 2018, 32(1): 61-70.
- [32] Rousk J, Bååth E, Brookes P C, Lauber C L, Lozupone C, Caporaso J G, Knight R, Fierer N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 2010, 4(10): 1340-1351.
- [33] Rosso L, Lobry J R, Bajard S, Flandrois J P. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 610-616.
- [34] Pan Y, Cassman N, de Hollander M, Mendes L W, Korevaar H, Geerts R H E M, van Veen J A, Kuramae E E. Impact of long-term N, P, K, and NPK fertilization on the composition and potential functions of the bacterial community in grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(1): 195-205.

- [35] Zhou J, Guan D W, Zhou B K, Zhao B S, Ma M C, Qin J, Jiang X, Chen S F, Cao F M, Shen D L, Li J. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in Northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 90: 42-51.
- [36] 孙弘哲, 马大龙, 臧淑英, 吴祥文. 大兴安岭多年冻土区不同林型土壤微生物群落特征. *冰川冻土*, 2018, 40(5): 1028-1036.
- [37] Bardgett R D, Freeman C, Ostle N J. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *The ISME Journal*, 2008, 2(8): 805-814.
- [38] Gamper H, Hartwig U A, Leuchtmann A. Mycorrhizas improve nitrogen nutrition of *Trifolium repens* after 8 yr of selection under elevated atmospheric CO₂ partial pressure. *New Phytologist*, 2005, 167(2): 531-542.
- [39] 王鹭, 董小培, 张威, 章高森, 刘光琇, 冯虎元. 不同深度冻土微生物数量特征及其与土壤理化性质的关系. *冰川冻土*, 2011, 33(2): 436-441.
- [40] 李昌明, 张新芳, 赵林, 程国栋, 徐世健. 青藏高原多年冻土区土壤需氧可培养细菌多样性及群落功能研究. *冰川冻土*, 2012, 34(3): 713-725.
- [41] Bahram M, Hildebrand F, Forslund S K, Anderson J L, Soudzilovskaia N A, Bodegom P M, Bengtsson-Palme J, Anslan S, Coelho L P, Harend H, Huerta-Cepas J, Medema M H, Maltz M R, Mundra S, Olsson P A, Pent M, Pölme S, Sunagawa S, Ryberg M, Tedersoo L, Bork P. Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, 2018, 560(7717): 233-237.
- [42] 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.
- [43] 刘爽, 王雅, 刘兵兵, 刘海龙, 刘勇. 晋西北不同土地管理方式对土壤碳氮、酶活性及微生物的影响. *生态学报*, 2019, 39(12): 4376-4389.
- [44] 杜思瑶, 于森, 刘芳华, 肖雷雷, 张洪霞, 陶军, 顾卫, 顾京晏, 陈茜. 设施种植模式对土壤细菌多样性及群落结构的影响. *中国生态农业学报*, 2017, 25(11): 1615-1625.