

DOI: 10.20103/j.stxb.202311132457

关健飞, 曹阳, 徐鸿嘉. 不同冻融阶段表层季节冻土细菌群落结构和功能解析. 生态学报, 2024, 44(13): 5726-5734.

Guan J F, Cao Y, Xu H J. Analysis of bacterial community structure and functions in seasonally frozen soil in different phases of the freeze-thaw cycle. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(13): 5726-5734.

不同冻融阶段表层季节冻土细菌群落结构和功能解析

关健飞*, 曹 阳, 徐鸿嘉

牡丹江师范学院历史与文化学院, 牡丹江 157000

摘要: 冻土微生物对预测冻土和气候之间潜在反馈机制至关重要。为明确不同冻融阶段对冻土细菌群落的影响, 揭示冻土性质变化与细菌群落之间的响应关系, 选择黑龙江典型季节冻土表层土为研究对象并进行理化性质测定, 采用 16S rRNA 高通量测序技术分析细菌群落结构和功能组成, 通过冗余分析等方法探究土壤理化性质与细菌群落结构和功能之间的相关关系。结果表明: (1) 不同冻融阶段对土壤 pH 和总磷含量影响不显著, 完全冻结期土壤中机质和总氮含量显著高于冻融循环期 ($P < 0.05$)。 (2) 共获得 OTU 序列 985111 条, 属于 42 个菌门, 优势菌门中, 放线菌门 (Actinobacteria) 相对丰度在完全解冻期显著高于冻融循环期和完全冻结期 ($P < 0.05$), 变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 相对丰度在不同冻融阶段未表现出显著性差异。不同冻融阶段对细菌 Alpha 多样性和 Beta 多样性影响显著, 其中冻融循环期显著增加了细菌群落的多样性, 完全冻结期则使 Beta 多样性发生显著变化。此外, 完全冻结期对细菌丰度之间的正相关性以及群落的稳定性影响较大。 (3) 细菌群落功能共 5418 种, 分属于 6 大类, 其中新陈代谢功能占比最大, 不同冻融阶段平均值占比 75% 以上。一级功能在完全冻结期和完全解冻期之间均具有显著性差异 ($P < 0.05$)。具有显著性差异的二级功能中, 几乎均在完全冻结期和完全解冻期之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。 (4) 土壤有机碳 (SOC)、总氮 (STN)、总磷 (STP) 是影响细菌群落结构组成和功能的主要环境因子, pH 影响不显著。综上所述, 不同冻融阶段 (特别是完全冻结期) 对细菌群落结构组成和功能具有显著影响, 这种影响的变化与土壤性质 SOC、STN、STP 呈现显著正相关或负相关关系, 研究结果为进一步研究气候变暖背景下黑龙江省季节冻土微生物的响应机制提供科学依据。

关键词: 季节冻土; 高通量测序; 土壤理化性质; 细菌群落

Analysis of bacterial community structure and functions in seasonally frozen soil in different phases of the freeze-thaw cycle

GUAN Jianfei*, CAO Yang, XU Hongjia

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

Abstract: Microorganisms in frozen soil play a crucial role in predicting the potential mechanism of response between the frozen soil and climate. This study was envisaged to reveal the influence of different stages of the soil freeze-thaw process on the bacterial community in frozen soil and analyze the response of the bacterial community to the dynamics of the frozen soil properties. We determined the physiochemical properties of the topsoil from typical seasonally frozen ground in Heilongjiang Province. 16s rRNA high-throughput sequencing was performed to analyze the bacterial community structure and function. The correlation between the physicochemical properties of the soil and the bacterial community structure and function were investigated using redundancy analysis. The results showed that: (1) Different stages of the soil freeze-thaw process exhibited an insignificant impact on the soil pH and total phosphorus. The soil organic matter and total nitrogen during

基金项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (1451ZD003); 国家自然科学基金面上项目 (42271196); 牡丹江师范学院国家级课题培育项目 (GP2021004)

收稿日期: 2023-11-13; **网络出版日期:** 2024-04-25

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

complete freezing were significantly higher than those during the transition stage ($P < 0.05$). (2) A total of 985111 reads were obtained and clustered into operational taxonomic units (OTUs) belonging to 42 phyla. Among the dominant phyla, the relative abundance of Actinobacteria during the complete thaw was significantly higher than that during the transition and complete freezing stages ($P < 0.05$). The relative abundance of Proteobacteria, Acidobacteria, and Chloroflexi did not differ significantly across the stages of the freeze-thaw process. The alpha diversity and beta diversity of the bacterial community varied significantly in the different stages of the freeze-thaw process. The bacterial community diversity was considerably increased during the transition stage, while the β -diversity changed dramatically during complete freezing, compared with other stages. Furthermore, complete freezing had a greater impact on the positive correlation between the abundance of the bacterial phyla and the bacterial community stability. (3) A total of 5418 pathways of the bacterial community were identified and clustered into 6 categories. It was observed that the metabolic pathways accounted for the greatest proportion, that is, over 75% on average in all stages of the freeze-thaw process. All of the primary pathways varied significantly between the complete freezing and the complete thaw stages ($P < 0.05$). Nearly all of the significantly differential primary pathways varied dramatically between the complete freezing and the complete thaw stages ($P < 0.05$). (4) Soil organic carbon (SOC), total nitrogen (STN) and total phosphorus (STP) were found to be the major environmental factors influencing the bacterial community composition and structure, while soil pH had an insignificant effect. To conclude, different stages of the freeze-thaw process (especially the complete freezing stage) had a significant influence on the bacterial community structure and function. The intensity of influence was either positively or negatively correlated with the soil physicochemical properties, such as SOC, STN, and STP. The findings provide valuable clues to understand the response mechanism of the bacterial community in seasonally frozen ground in Heilongjiang in the context of global warming.

Key Words: seasonally frozen soil; high-throughput sequencing; soil physical and chemical properties; bacterial community

冻土作为一种特殊的地质体,一般是指温度在 0°C 或 0°C 以下并含有冰的各种岩土和土壤^[1]。随着全球气候变暖,我国多年冻土面积日益减少,东北冻土区更是出现了南界北移、活动层厚度显著增加、森林植被分布发生变化等现象^[2-3]。以往的研究中,研究者更多聚焦在永久冻土和多年冻土上,认为它们对于气候变化响应更敏感^[4-5],而对区域性的季节冻土变化关注较少。事实上,与永久冻土和多年冻土相比,季节性冻土(冬季冻结,夏季融化)分布范围更广,并含有大量的土壤养分和微生物资源^[6]。Luo 等^[7]研究发现气候变暖同样会导致季节冻土出现冻结期缩短、融化期延长、范围萎缩等现象,因此,全球气候变暖背景下季节性冻土的研究与永久冻土和多年冻土同等重要。

冻土微生物是冻土生态系统物质循环和能量转化的积极参与者和敏感响应者^[8-9],在维持土壤结构和功能方面发挥重要作用^[10-11],是预测冻土和气候之间潜在反馈机制的重要生物性指标^[12-13]。特别是细菌群体,它们具有自我繁殖和组织的能力,在稳定条件下能够较长时间维持稳定,但对于一些小的扰动则会做出迅速的反映^[14]。不同冻融阶段,冻土水热条件不同,微生物群落结构和功能存在差异^[15-17]。研究表明冻融过程可引起季节冻土(特别是表层土壤)中水分、有机物、pH 等因素的周期性变化^[9,12],这些变化将进一步影响微生物的生长和代谢过程。Lipson 等^[18]则发现冻结期通过低温胁迫细胞裂解、解冻后微生物活性增强等机制改变冻土微生物群落,微生物群落的改变可能对生态系统产生重大影响^[19-20]。季节冻土的变化是一个复杂的过程,不同冻融阶段土壤性质变化与微生物群落之间的响应关系并未有统一的结论。

黑龙江省,介于北纬 $43^{\circ}26' - 53^{\circ}33'$,东经 $121^{\circ}11' - 135^{\circ}05'$,其北部的冻土类型主要为多年冻土和季节冻土。多年冻土分布于 $47^{\circ}30' - 53^{\circ}33'\text{N}$,属欧亚大陆多年冻土区的南缘地带,其余地区均为季节冻土区^[21]。本研究以黑龙江省典型季节冻土表层土壤为研究对象,分别在不同冻融阶段(完全解冻期、冻融循环期和冻结期)进行土壤样品采集,系统分析不同冻融阶段土壤性质的变化与微生物群落结构组成和功能之间的响应

关系,为气候变暖背景下黑龙江省季节冻土微生物的响应机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

本研究以黑龙江典型季节冻土表层土(0—20 cm)为研究对象,设置4块实验样地5 m×3 m(北纬46°34′42.64″,东经123°16′30.23″),分别命名为Site A、Site B、Site C和Site D。为排除植物干扰,4块样地均未种植任何植物,且春季开始至第一次采样期间,人工去除杂草幼苗,并于2020年8月(完全解冻期,TP)、2020年11月(冻融循环期,FTP)和2021年1月(完全冻结期,FP)进行土壤样品采集,每块样地每次随机采样3个重复,整个实验过程共采集土壤样品36份,于密封袋中,一部分室内风干用于土壤性质的测定,另一部分则干冰运输,完成细菌群落高通量测序分析。

1.2 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);有机碳的测定采用重铬酸钾氧化-分光光度法(HJ 615—2011);全氮的测定采用半微量开氏法(NY/T 53—1987);总磷的测定采用氢氧化钠碱融-钼锑抗比色法(NY/T 88—1988)。

1.3 高通量测序

采用E.Z.N.A.[®] soil DNA Kit提取土壤样品中的细菌总DNA,应用NanoDrop2000进行DNA纯度和浓度检测,采用琼脂糖凝胶电泳法进行DNA完整性检测(1%琼脂糖胶,5V/cm,20 min)。对于可变区片段的扩增,采用16S rRNA基因的V3—V4区引物338F(5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′)和806R(5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′)来完成。PCR反应体系(20 μL)为4 μL的5×FastPfu Buffer,2 μL的2.5 mmol/L dNTPs,0.8 μL的Forward Primer(5 μmol/L),0.8 μL的Reverse Primer(5 μmol/L),0.4 μL的FastPfu Polymerase,0.2 μL的BSA,10 ng的Template DNA,ddH₂O补至20 μL。PCR反应条件为95℃预变性3 min;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℃,保存待用。PCR产物的回收使用2%琼脂糖凝胶,利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit进行纯化,Tris-HCl洗脱,2%琼脂糖电泳检测。利用QuantiFluo[™]-ST进行检测定量。利用Illumina公司的Miseq PE300平台对测序样本进行双端测序,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,本部分委托深圳微生太科技有限公司完成。

1.4 统计分析方法

使用Microsoft Excel、SPSS、Origin 2021等软件对基本数据进行处理和作图分析。细菌群落Alpha多样性采用Chao1指数、Shannon指数、Simpson指数进行差异性检验和评价,其中Chao1指数和Shannon指数用来衡量土壤样品中细菌群落的丰富度,Simpson指数用来衡量土壤样品中细菌群落的均匀度。Beta多样性基于Bray Curtis距离进行PCoA差异分析。采用单因素方差分析不用冻融阶段各样本中细菌组成和功能之间是否存在显著性差异。线性判别分析(LEfSe)从纲到属水平上不同组间具有显著差异的特征微生物,LDA阈值设置为4。基于样本间物种的相对丰度进行Spearman分析并获得物种之间的相互关系(包括正相关和负相关),相关系数P值设置为小于0.05,群落结构稳定性采用网络拓扑结构中的节点度(Degree)和接近中心性(Closeness Centrality)2个指标进行评价,指标数值越大,在稳定群落结构中的作用越大。采用PICRUSt2预测16S扩增子群落功能信息。使用冗余分析(RDA)揭示微生物群落结构和功能与相关环境因子之间的潜在关联。

2 结果与分析

2.1 不同冻融阶段土壤理化性质的变化

不同冻融阶段土壤理化性质变化情况如表1所示。不同冻融阶段,土壤pH和总磷含量变化差异不显著。土壤含水率在FTP(13.43±1.18)显著高于TP(9.38±3.70)和FP(11.06±1.96)($P<0.05$)。土壤有机质含

量在 FP (3.43 ± 0.62) 显著高于 TP (2.62 ± 0.44) 和 FTP (2.40 ± 0.30) ($P < 0.05$)。FP (0.18 ± 0.04) 土壤总氮含量显著高于 FTP (0.14 ± 0.02) ($P < 0.05$)。

表 1 不同冻融阶段土壤性质

Table 1 Soil properties under different freeze-thaw stages

土壤性质 Soil properties	完全解冻期 TP	冻融循环期 FTP	完全冻结期 FP
土壤 pH Soil pH	$7.99 \pm 0.28a$	$8.01 \pm 0.14a$	$8.04 \pm 0.33a$
土壤含水率 MC Soil moisture content/%	$9.38 \pm 3.70b$	$13.43 \pm 1.18a$	$11.06 \pm 1.96b$
土壤有机碳 SOC Soil organic carbon/(g/kg)	$2.62 \pm 0.44b$	$2.40 \pm 0.30b$	$3.43 \pm 0.62a$
土壤总氮 STN Soil total nitrogen/(g/kg)	$0.16 \pm 0.04ab$	$0.14 \pm 0.02b$	$0.18 \pm 0.04a$
土壤总磷 STP Soil total phosphorus/(g/kg)	$0.11 \pm 0.04a$	$0.10 \pm 0.03a$	$0.12 \pm 0.04a$

TP: 完全解冻期 Complete thawing period; FTP: 冻融循环期 Freeze-thaw cycle period; FP: 完全冻结期 Complete freeze period

2.2 不同冻融阶段细菌群落的变化

2.2.1 细菌 Alpha 多样性和 Beta 多样性的变化

不同冻融阶段细菌 Alpha 多样性指数 (Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数) 变化情况如图 1 所示, 从完全解冻期 (TP) 到冻融循环期 (FTP) 再到完全冻结期 (FP), Alpha 多样性指数均呈现先升高再降低的趋势。完全解冻期 (1030.2) 和完全冻结期 (1155) Chao1 指数低于冻融循环期 (1379.3) 且具有极显著差异 ($P < 0.001$)。完全解冻期 (9.29) 和完全冻结期 (9.46) Shannon 指数分别在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平上显著低于冻融

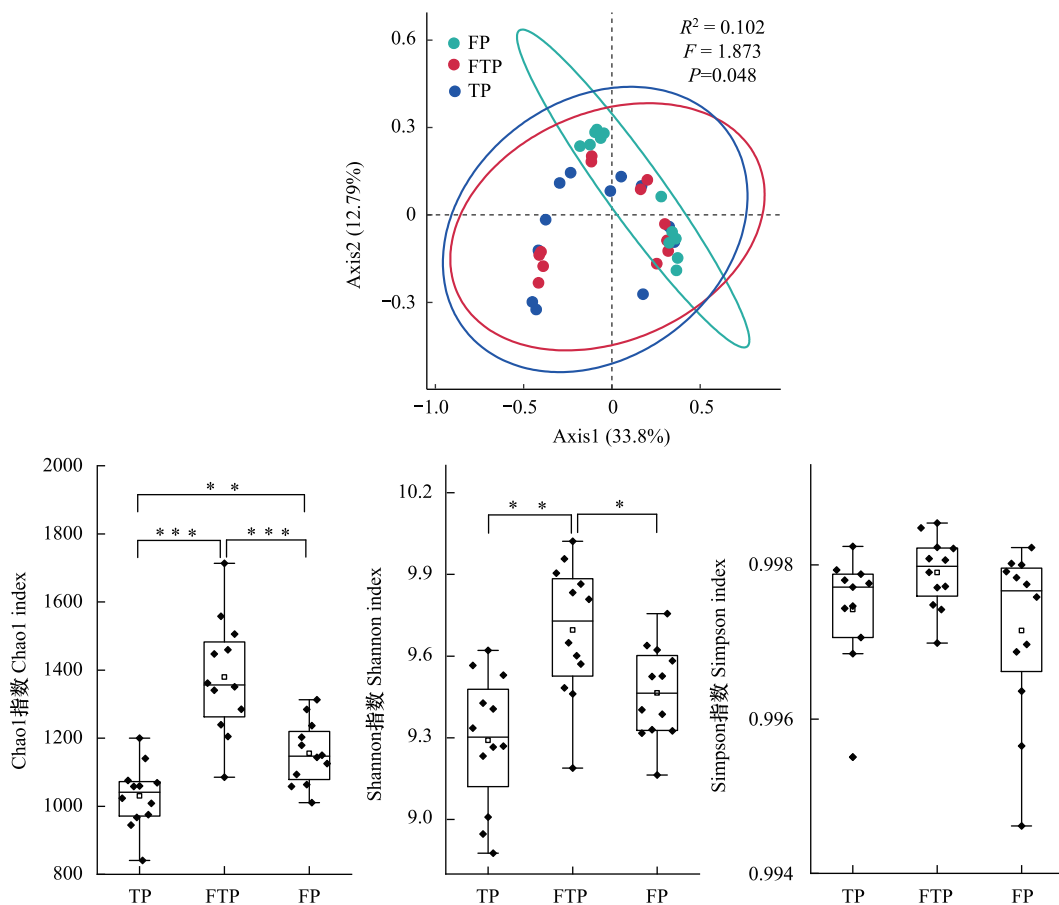


图 1 不同冻融阶段细菌 Alpha 多样性指数和 Beta 多样性

Fig.1 Alpha diversity index and Beta diversity in different freeze-thaw stages

TP: 完全解冻期; FTP: 冻融循环期; FP: 完全冻结期; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

循环期(9.70)。Simpson 指数在冻融循环期虽然有高于完全解冻期和完全冻结期的趋势,但均未达到显著水平。不同冻融阶段细菌群落 Beta 多样变化差异如图 1 所示,第一主成分(Axis.1)对样品差异的贡献值为 33.8%,第二主成分(Axis.2)贡献值为 12.7%,不同冻融阶段置换多元方差分析结果显示 $P < 0.05$,其中 TP 与 FTP 之间细菌群落差异 P 值为 0.512,FTP 和 FP 之间 P 值为 0.05,TP 与 FP 之间 P 值为 0.022。以上结果表明不同冻融阶段对细菌 Alpha 多样性和 Beta 多样性影响显著,其中冻融循环期显著增加了细菌群落的丰富度;完全冻结期与完全解冻期相比,Beta 多样性发生显著变化。

2.2.2 细菌群落组成的变化

高通量测序共得到细菌 OTU 序列 985111 条,属于 42 个菌门,选择 top10 菌门进行分析(图 2),结果表明:放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)在不同冻融阶段相对丰度(平均值)均大于 10%,其中放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度(平均值)在 TP (40.17%)显著高于 FTP (33.49%)和 FP (32.09%)。变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)虽然相对丰富较高,但在不同冻融阶段未表现出显著性差异。厚壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、拟杆菌门(Bacteroidetes)在不同冻融阶段相对丰度(平均值)在 1%—10%之间,厚壁菌门(Firmicutes)在 FP (11.29%)相对丰度平均值显著高于 TP (5.12%)和 FTP (5.03%),芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)在 FTP (5.80%)显著高于 TP (4.21%),硝化螺旋菌门(Nitrospirae)则在 TP (3.54%)和 FP (1.89%)之间存在显著性差异。疣微菌门(Verrucomicrobia)和浮霉菌门(Planctomycetes)在不同冻融阶段平均相对丰度均在 1%以下且差异不显著。LEfSe 进一步分析从纲到属水平不同冻融阶段具有显著差异的特征细菌类型结果表明(图 2),与其它两个时期相比,完全冻结期(FP)存在不同水平上显著差异特征类群,主要包括 Bacilli 纲、Actinobacteria 纲和 Alphaproteobacteria 纲、Bacillales 目、Bacillaceae 科、Bacillus 属。

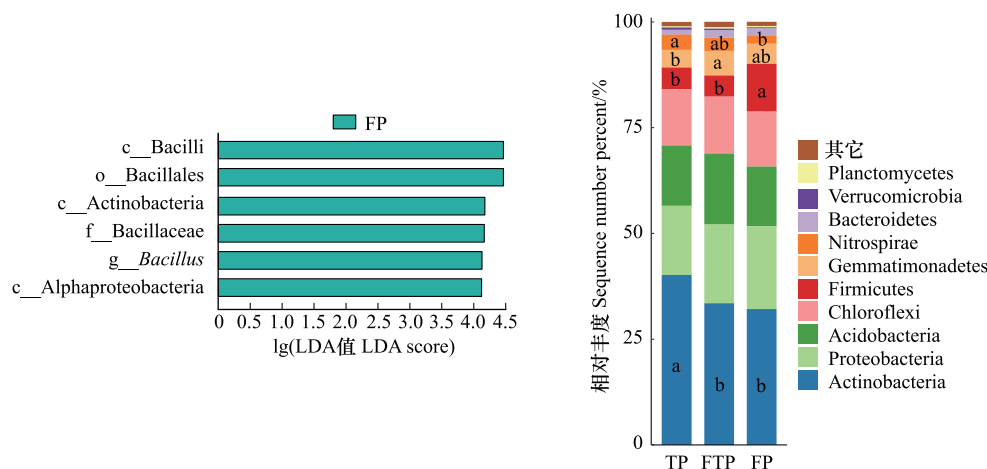


图2 门水平细菌群落组成(相对丰度前十位)和显著差异类群

Fig.2 Composition of bacterial community at the phylum level (top 10) and significantly different groups

Other:所有其他门相对丰度之和;Planctomycetes:浮霉菌门;Verrucomicrobia:疣微菌门;Bacteroidetes:拟杆菌门;Nitrospirae:硝化螺旋菌门;Gemmatimonadetes:芽单胞菌门;Firmicutes:厚壁菌门;Chloroflexi:绿弯菌门;Acidobacteria:酸杆菌门;Proteobacteria:变形菌门;Actinobacteria:放线菌门;c__Alphaproteobacteria:变形菌纲;g__Bacillus:芽孢杆菌属;f__Bacillaceae:芽孢杆菌科;c__Actinobacteria:放线菌纲;o__Bacillales:芽孢杆菌目;c__Bacilli:芽孢杆菌纲;LDA:线性判别分析 Linear discriminant analysis;LDA 值(LDA SCORE)分布柱状图统计的是组间具有统计性差异的类群,若图中某一组消失则表示此组中并无差异显著类群

细菌群落网络分析结果如表 2 所示。与 TP 和 FTP 相比,FP 细菌物种之间正相关关系数量(41)下降趋势明显,而三个时期物种之间的负相关关系数量变化趋势不明显。此外,不同时期细菌群落的节点度均值和接近中心性均值均呈现从 TP 到 FTP 再到 FP 下降的趋势。以上结果表明完全冻结期对细菌群落的组成、菌

种之间的正相关性以及群落的稳定性影响较大。

表 2 不同冻融阶段细菌群落网络分析

Table 2 Analysis of bacterial community network in different freeze-thaw stages

网络分析参数 Network analysis parameters	完全解冻期 TP	冻融循环期 FTP	完全冻结期 FP
显著正相关关系数量 Number of significant positive correlations	68	65	41
显著负相关关系数量 Number of significant negative correlations	38	41	37
节点度(均值) Degree(Mean value)	5.89	5.58	5.2
接近中心性(均值) Closeness Centrality(Mean value)	16.50	15.61	12.89

2.2.3 细菌群落功能的变化

对群落功能分析共得到 5418 种功能,分属于代谢通路的新陈代谢(Metabolism, M)、遗传信息处理(Genetic Information Processing, GIP)、细胞过程(Cellular Processes, CP)、人类疾病(Human Diseases, HD)、生物体系统(Organismal Systems, OS)和环境信息处理(Environmental Information Processing, EIP)6 大类功能。其中新陈代谢功能占比最大,平均值在 75%以上,呈现 TP 显著高于 FTP 和 FP 的趋势($P<0.05$);其次为遗传信息处理功能,平均占比 10%左右;其余功能均在 6%以下,所有功能在 TP 和 FP 之间均具有显著性差异($P<0.05$)。对每类功能下的二级功能进行差异性分析,结果表明(图 3),具有显著性差异的二级功能中,只有 Cell growth and death 在 TP 和 FP 阶段无显著性差异,其余二级功能在这两个阶段均具有显著性差异($P<0.05$)。

2.4 土壤性质与细菌群落结构组成和功能的相关性分析

对段土壤性质与细菌群落结构组成和功能进行相关性分析,冗余分析(RDA)分别解释了群落组成和功能 77.93%和 87.95%的总方差,SOC、STN、STP 是影响细菌群落结构组成和功能的主要环境因子。pH 影响不显著。如表 3 所示,群落组成方面,放线菌门(Actinobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、疣微菌门(Verrucomicrobia)与 SOC、STN、STP 在不同程度上呈现显著负相关关系,而变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)则在不同程度上与 SOC、STN、STP 呈显著正相关关系。群落功能方面,Cellular Processes、Environmental Information Processing、Human Diseases、Organismal Systems 与 SOC、STN、STP 呈显著($P<0.01$)或极显著($P<0.001$)正相关关系,而 Genetic Information Processing 则呈极显著负相关关系($P<0.001$)。

表 3 土壤性质与群落结构组成和功能的相关性

Table 3 The correlation between soil properties and community structure composition and function

群落结构组成和功能 Community structure composition and function	土壤有机碳 SOC/(g/kg) Soil organic carbon	土壤总氮 STN/(g/kg) Soil total nitrogen	土壤总磷 STP/(g/kg) Soil total phosphorus
放线菌门 Actinobacteria	-0.546 ***	-0.673 ***	-0.680 ***
变形菌门 Proteobacteria	0.517 ***	0.678 ***	0.698 ***
绿弯菌门 Chloroflexi	0.356 *	0.459 **	0.573 ***
厚壁菌门 Firmicutes	0.680 ***	0.682 ***	0.612 ***
硝化螺旋菌门 Nitrospirae	-0.682 ***	-0.800 ***	-0.814 ***
拟杆菌门 Bacteroidetes	0.417 *	0.593 ***	0.635 ***
疣微菌门 Verrucomicrobia	-0.380 *	-0.490 **	-0.560 ***
浮霉菌门 Planctomycetes	0.501 **	0.625 ***	0.577 ***
细胞过程 Cellular Processes	0.480 **	0.498 **	0.439 **
环境信息处理 Environmental Information Processing	0.661 ***	0.701 ***	0.672 ***
遗传信息处理 Genetic Information Processing	-0.614 ***	-0.643 ***	-0.610 ***
人类疾病 Human Diseases	0.539 ***	0.616 ***	0.605 ***
生物体系统 Organismal Systems	0.540 **	0.517 ***	0.503 **

*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$

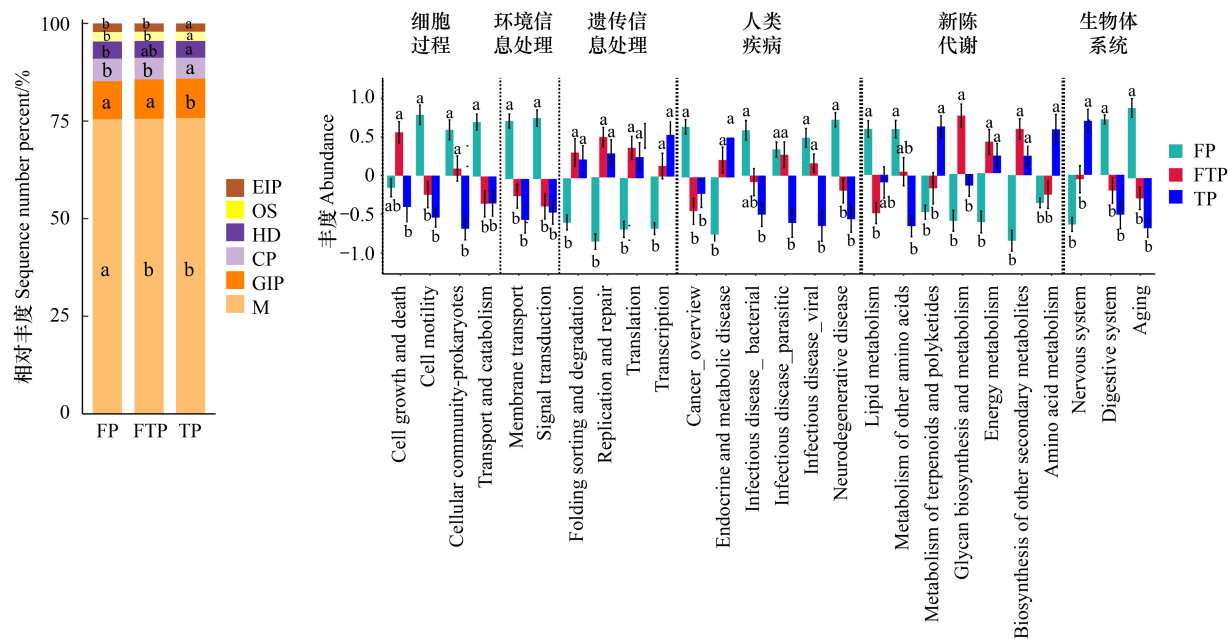


图3 不同冻融阶段细菌群落功能变化

Fig.3 Changes in bacterial community function during different freeze-thaw stages

EIP:环境信息处理 Environmental Information Processing; OS:生物体系统 Organismal Systems; HD:人类疾病 Human Diseases; CP:细胞过程 Cellular Processes; GIP:遗传信息处理 Genetic Information Processing; M:新陈代谢 Metabolism; Cell growth and death:细胞生长与死亡; Cell motility:细胞运动; Cellular community - prokaryotes:细胞群落-原核生物; Transport and catabolism:运输和分解代谢; Membrane transport:运输和分解代谢; Signal transduction:信号转导; Folding sorting and degradation:折叠分拣和降解; Replication and repair:复制和修复; Translation:翻译; Transcription:转录; Endocrine and metabolic disease:内分泌代谢疾病; Infectious disease_ bacterial:传染病_细菌; Infectious disease_ parasitic:传染病_寄生虫; Infectious disease_ viral:传染病_病毒; Neurodegenerative disease:神经退行性疾病; Lipid metabolism:脂质代谢; Metabolism of other amino acids:其他氨基酸的代谢; Metabolism of terpenoids and polyketides:萜类化合物和聚酮类化合物的代谢; Glycan biosynthesis and metabolism:甘氨酸的生物合成和代谢; Energy metabolism:能量代谢; Biosynthesis of other secondary metabolites:其他次生代谢产物的生物合成; Amino acid metabolism:氨基酸代谢; Nervous system:神经系统; Digestive system:消化系统; Aging:老化

3 讨论

本研究结果表明(表1)冻结期土壤中有机碳含量和总氮含量显著高于其它阶段,分析原因是由于季节冻土的冻融过程自地表向下进行,完全冻结期的表层土,一方面阻止了空气中氧气的渗透,抑制土壤呼吸作用和有机质的分解^[22],另一方面土壤微生物活性在低温冻结状态下受到抑制,有机碳分解减少,氮素矿化-固持周转速率降低^[23—25],从而导致完全冻结期冻土中有机碳和总氮含量较高。本研究未发现不同冻融阶段土壤 pH 发生显著变化(表1),与现有研究结果不一致。李琳慧等^[26]研究发现冻融作用能够使土壤 pH 值降低,刘亚红等^[27]研究表明冻结温度越高,pH 降低幅度越大。分析原因是由于自然条件下的短期的冻融过程不足以显著改变土壤的 pH,这与实验室高频率、高幅度模拟的冻融过程得到的结论不同。本研究中土壤含水率在冻融循环期显著高于完全解冻期,一方面是由于夏季采样时间段降水量较少,另一方面是由于夏季温度较高促进了表层土壤中水分的蒸发。

土壤微生物结构在不同冻融阶段趋于动态变化过程^[28]。细菌群落受控于冻融环境,对环境变化与胁迫能够做出快速反应,是土壤质量评价的重要指标。本研究结果表明不同冻融阶段细菌 Alpha 多样性和 Beta 多样性发生显著变化(图1),其中冻融循环期显著增加了细菌群落的 Alpha 多样性,完全冻结期使细菌群落 Beta 多样性发生显著变化。分析原因是由于短期的冻融循环过程使得土壤团粒体、植物和微生物残体破碎

化,增加了底物活性和养分有效性,使微生物活性增加,Alpha 多样性增加。但也有研究发现冻融循环过程能够降低细菌多样性^[29]或没有影响^[30]。而冻结期土壤温度过低,导致大量细菌死亡或休眠,只有部分耐低温细菌得以存活并维持一定的活性,是冻结期土壤中细菌 Beta 多样性与其它阶段差异显著的一个主要原因,并且本研究发现在完全冻结期土壤中物种正相关关系下降,群落稳定性也具有降低趋势(表 2)。

Actinobacteria、Proteobacteria、Acidobacteria、Chloroflexi 作为优势菌门,在冻土生态系统中被广泛的检出^[4,17]。Actinobacteria 对于转化有机质具有重要作用意义^[31],其能够促进土壤中养分的释放进而为其它微生物提供物质和能量,本研究中 Actinobacteria 从 TP 到 FTP 再到 FP 相对丰度具有降低的趋势,这与 Ren 等^[32]的研究结果一致。Proteobacteria、Acidobacteria、Chloroflexi 在不同冻融阶段表现出较好的稳定性,相对丰度变化不显著,研究发现 Proteobacteria、Acidobacteria、Chloroflexi 表现出较强的耐低温性^[33-35]。研究发现 Firmicutes 适合在零度以下的温度下活动^[36],本研究也发现 Firmicutes 在 FP 相对丰度显著高于 TP 和 FTP (图 2)。Gemmatimonadetes、Planctomycetes、Nitrospirae 相对丰度在不同冻融阶段占比较低,这与现有研究结果一致^[32]。不同冻土中 SOC、STN、STP 对细菌群落的影响现有研究报道较多,但结果却不尽相同。本研究结果显示 Actinobacteria、Nitrospirae、Verrucomicrobia 随着季节冻土表层总 SOC、STN、STP 含量的增加,相对丰度具有下降的趋势,而 Proteobacteria、Chloroflexi、Firmicutes、Bacteroidetes、Planctomycetes 则随着 SOC、STN、STP 含量的增加,相对丰度具有上升的趋势。

4 结论

不同冻融阶段对季节冻土理化性质的显著影响主要体现在有机碳和全氮含量上。冻融循环期显著增加了细菌 Alpha 多样性,完全冻结期则对细菌 Beta 多样性影响显著。不同冻融阶段(特别是完全冻结期)对细菌群落结构组成和功能均具有显著影响,这种影响变化与土壤性质 SOC、STN、STP 呈现显著正相关或负相关关系,本研究结果为进一步研究气候变暖背景下黑龙江省季节冻土微生物的响应机制提供科学依据。

参考文献(References):

- [1] 周幼吾. 中国冻土. 北京: 科学出版社, 2000: 1-2.
- [2] 何瑞霞, 金会军, 吕兰芝, 于少鹏, 常晓丽, 杨思忠, 王绍令, 孙广友. 东北北部冻土退化与寒区生态环境变化. 冰川冻土, 2009, 31(3): 525-531.
- [3] 赵丹丹, 刘家福, 刘吉平, 社会石. 东北寒区多年冻土退化的主要研究综述. 科学技术与工程, 2022, 22(30): 13151-13161.
- [4] Cao X A, Liu H M, Liu Y, Jing J, Wen L, Xu Z C, Liu X H, Liu D W, Zhuo Y, Wang L X. N₂O emission associated with shifts of bacterial communities in riparian wetland during the spring thawing periods. Ecology and Evolution, 2023, 13(3): e9888.
- [5] Baker C C M, Barker A J, Douglas T A, Doherty S J, Barbato R A. Seasonal variation in near-surface seasonally thawed active layer and permafrost soil microbial communities. Environmental Research Letters, 2023, 18(5): 055001.
- [6] Chen M, Yang Z L, Abulaizi M, Hu Y, Tian Y X, Hu Y P, Yu G L, Zhu X P, Yu P J, Jia H T. Soil bacterial communities in alpine wetlands in arid Central Asia remain stable during the seasonal freeze-thaw period. Ecological Indicators, 2023, 156: 111164.
- [7] Luo S Q, Wang J Y, Pomeroy J W, Lyu S H. Freeze-thaw changes of seasonally frozen ground on the Tibetan Plateau from 1960 to 2014. Journal of Climate, 2020, 33(21): 9427-9446.
- [8] Han C L, Gu Y J, Kong M, Hu L W, Jia Y, Li F M, Sun G J, Siddique K H M. Responses of soil microorganisms, carbon and nitrogen to freeze-thaw cycles in diverse land-use types. Applied Soil Ecology, 2018, 124: 211-217.
- [9] Ernakovich J G, Barbato R A, Rich V I, Schädel C, Hewitt R E, Doherty S J, Whalen E D, Abbott B W, Barta J, Biasi C, Chabot C L, Hultman J, Knoblauch C, Lau Vetter M C Y, Leewis M C, Liebner S, Mackelprang R, Onstott T C, Richter A, Schütte U M E, Siljanen H M P, Tas N, Timling I, Vishnivetskaya T A, Waldrop M P, Winkel M. Microbiome assembly in thawing permafrost and its feedbacks to climate. Global Change Biology, 2022, 28(17): 5007-5026.
- [10] Delgado-Baquero M, Trivedi P, Trivedi C, Eldridge D J, Reich P B, Jeffries T C, Singh B K. Microbial richness and composition independently drive soil multifunctionality. Functional Ecology, 2017, 31(12): 2330-2343.
- [11] Tao R, Li J, Yu S Q, Hu B W, Ling N, Chu G X. Abundant rather than rare fungi perform a vital role in maintaining the growth of continuous cropped cut chrysanthemum. European Journal of Soil Biology, 2023, 116: 103489.

- [12] Perez-Mon C, Frey B, Frossard A. Functional and structural responses of Arctic and alpine soil prokaryotic and fungal communities under freeze-thaw cycles of different frequencies. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 982.
- [13] Yergeau E, Kowalchuk G A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(9): 2223-2235.
- [14] Layeghifard M, Hwang D M, Guttman D S. Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(3): 217-228.
- [15] Zhao Y D, Hu X. Seasonal freeze-thaw processes regulate and buffer the distribution of microbial communities in soil horizons. *CATENA*, 2023, 231: 107348.
- [16] Shi G X, Hou R J, Li T X, Fu Q, Wang J W, Zhou W Q, Su Z B, Shen W Z, Wang Y J. Effects of biochar and freeze thaw cycles on the bacterial community and multifunctionality in a cold black soil area. *Journal of Environmental Management*, 2023, 342: 118302.
- [17] Zong R, Wang Z H, Li W H, Ayantobo O O, Li H Q, Song L B. Assessing the impact of seasonal freezing and thawing on the soil microbial quality in arid Northwest China. *Science of the Total Environment*, 2023, 863: 161029.
- [18] Lipson D A, Schmidt S K, Monson R K. Carbon availability and temperature control the post-snowmelt decline in alpine soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(4): 441-448.
- [19] Feng X J, Nielsen L L, Simpson M J. Responses of soil organic matter and microorganisms to freeze-thaw cycles. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(8): 2027-2037.
- [20] Delgado-Baquerizo M, Eldridge D J, Ochoa V, Gozalo B, Singh B K, Maestre F T. Soil microbial communities drive the resistance of ecosystem multifunctionality to global change in drylands across the globe. *Ecology Letters*, 2017, 20(10): 1295-1305.
- [21] 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, 20(3): 32-34.
- [22] McGuire A D, MacDonald R W, Schuur E A, Harden J W, Kuhry P, Hayes D J, Christensen T R, Heimann M. The carbon budget of the northern cryosphere region. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2010, 2(4): 231-236.
- [23] 韩露, 万忠梅, 孙赫阳. 冻融作用对土壤物理、化学和生物学性质影响的研究进展. *土壤通报*, 2018, 49(3): 736-742.
- [24] 王丽芹, 齐玉春, 董云社, 彭琴, 郭树芳, 贺云龙, 闫钟清. 冻融作用对陆地生态系统氮循环关键过程的影响效应及其机制. *应用生态学报*, 2015, 26(11): 3532-3544.
- [25] Sijnsen H, Michelsen A, Holmstrup M. Effects of freeze-thaw cycles on microarthropods and nutrient availability in a sub-Arctic soil. *Applied Soil Ecology*, 2005, 28(1): 79-93.
- [26] 李琳慧, 李旭, 许梦, 王观竹, 于济通, 郭平. 冻融温度对东北黑土理化性质及土壤酶活性的影响. *江苏农业科学*, 2015, 43(4): 318-320.
- [27] 刘亚红. 冻融作用对土壤含水率、pH 值、电导率的影响. *山西科技*, 2010, 25(2): 78-79.
- [28] 丁慧慧, 陈文盛, 李江荣. 季节性冻融作用对土壤理化与微生物特征的影响研究. *四川林业科技*, 2023, 44(1): 10-16.
- [29] 刘利. 季节性冻融对亚高山/高山森林土壤微生物多样性的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
- [30] 蒲家慧, 姜楠, 隗英华, 陈利军. 冻融对温带土壤可溶性氮库、氮转化过程及细菌群落多样性的影响. *应用生态学报*, 2020, 31(9): 2893-2902.
- [31] Zong R, Tan M D, Han Y, Zou R H, Wang Z H. Changes in soil microbial community following the conversion of wasteland to cotton land in saline-sodic region of Northwest China. *Applied Soil Ecology*, 2022, 174: 104424.
- [32] Ren J S, Song C C, Hou A X, Song Y Y, Zhu X Y, Cagle G A. Shifts in soil bacterial and archaeal communities during freeze-thaw cycles in a seasonal frozen marsh, Northeast China. *Science of the Total Environment*, 2018, 625: 782-791.
- [33] Kielak A M, Barreto C C, Kowalchuk G A, van Veen J A, Kuramae E E. The ecology of acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 744.
- [34] Lazzaro A, Brankatschk R, Zeyer J. Seasonal dynamics of nutrients and bacterial communities in unvegetated alpine glacier forefields. *Applied Soil Ecology*, 2012, 53: 10-22.
- [35] Davis K E R, Sangwan P, Janssen P H. Acidobacteria, Rubrobacteridae and Chloroflexi are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(3): 798-805.
- [36] Hultman J, Waldrop M P, Mackelprang R, David M M, McFarland J, Blazewicz S J, Harden J, Turetsky M R, McGuire A D, Shah M B, VerBerkmoes N C, Lee L H, Mavrommatis K, Jansson J K. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. *Nature*, 2015, 521: 208-212.