

贵州喀斯特地区土壤细菌群落结构特征及变化

刘兴^{1,2,3}, 王世杰^{1,3,*}, 刘秀明^{1,3}, 黄天志^{1,2,3}, 李勇^{1,2,3}

(1. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院普定喀斯特生态系统观测研究站, 贵州 普定 562100)

摘要:为探明贵州喀斯特不同植被演替群落下的土壤细菌群落结构及变化特征, 本文利用高通量测序技术对5个主要植被演替群落(稀灌草丛、藤刺灌丛、灌木林、乔灌过渡林、乔木林)的根际(竹叶椒)、非根际土壤细菌群落结构及环境因子进行了分析研究。结果表明:贵州喀斯特高原土壤细菌类群主要为变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和浮霉菌门(*Planctomycetes*), 其相对丰富度分别为43.35%、12.97%、7.53%、7.12%、6.19%、5.35%、5.05%, 未分类类群占7.36%。样品中检测到了较低丰度的广古菌门和泉古菌门。随植被群落演替, 根际土壤中变形菌门、厚壁菌门和浮霉菌门丰度逐渐增加; 非根际土壤中酸杆菌门和疣微菌门丰度随植被演替逐渐减小。贵州喀斯特高原土壤细菌的影响因子大小为土壤有机碳、土壤总氮、含水量、电导率等, 其中土壤有机碳和土壤总氮有显著性影响。

关键词:土壤细菌; 高通量测序; 植被演替; 根际; 喀斯特

中图分类号: S154 文献标识码: A 文章编号: 1672-9250(2015)05-0490-08 doi: 10.14050/j.cnki.1672-9250.2015.05.002

土壤和植被是喀斯特生态环境中最为敏感的自然环境要素^[1], 植被恢复能改善土壤质量, 是解决喀斯特环境问题的重要前提和关键。而土壤微生物是土壤中最活跃的部分, 是生态系统中能量流动和物质循环的重要推动者, 被称为地球关键元素生物地球化学循环过程的引擎^[2]。土壤微生物深刻地影响早期演替阶段植被的分布格局及其后的演替过程^[3], 同时, 微生物主要以植物分泌物和动植物残体为食, 植物物种组成及群落结构反过来能明显改变土壤微生物特性。由此可见, 土壤微生物-植物-土壤质量形成了共演替体系^[4]。据文献记载, 1 g 干重农田土壤就含有数百万个细菌, 几十万个真菌孢子和几万个原生动物和藻类。土壤中原核生物的种类和数量最多, 所含有的 N、P 与陆生植物相当^[5], 并且土壤细菌较为敏感, 环境因子的细小变化, 都会引起其多样性和数量的改变^[6]。因此, 对土壤细菌群落区系和空间分异规律及其与生态功能关系的认识具有十分重要的理论和实际意义^[7]。贵州是世界三大喀斯特集中区之一的东亚

喀斯特片区中心, 喀斯特分布面积大, 人口密度大, 人为活动强烈, 石漠化程度高, 生态系统遭到破坏后的植被群落从稀灌草丛逐步恢复到乔木林, 为了解不同恢复阶段的土壤微生物沿植被类型的变化提供了一个理想的系统。

目前, 已有少量研究对土壤微生物活性^[8-10], 土壤微生物量空间格局^[11-12]、时间动态^[13-14], 土壤微生物群落功能代谢^[15-17]等方面进行了调查、研究, 部分研究也报道了土壤微生物种群数量和比例^[4, 18-19], 但这些研究采用的方法主要是传统微生物培养法以及 PCR-DGGE、克隆文库等方法, 信息不够全面, 难以全面地、整体性地掌握土壤微生物群落结构特征及其功能。新一代高通量测序技术 2005 年问世, 具有通量高、灵敏度好、可重复性强、无需克隆直接测序等优点, 避免了传统培养方法研究微生物多样性造成信息丢失的缺陷, 因而被认为是土壤微生物多样性研究更好的方法^[20]。基于此, 本研究利用 Illumina Miseq 高通量测序平台, 以普定县为具体研究对象对贵州高原喀斯特植被演替群

收稿日期: 2015-03-16; 改回日期: 2015-04-23

基金项目: 国家重大科学研究计划项目(2013CB956700); 国家自然科学基金创新群体项目(40721002); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA05070400); 国家自然科学基金项目(41203063)。

第一作者简介: 刘兴(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物地球化学。E-mail: liuxing@mail.gyig.ac.cn.

* 通讯作者: 王世杰(1966—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为环境地球化学。E-mail: wangshijie@vip.skleg.cn.

落土壤细菌多样性和群落结构特征变化及其受控因子进行调查和分析研究,旨在为土壤生物地球化学循环过程及其机制的剖析奠定基础,同时为自然恢复管理及人工修复提供科技支撑。

1 研究区域与方法

1.1 研究区概况

研究区域位于贵州省中西部普定县境内,属于典型的喀斯特高原地貌区。海拔 1 042~1 846 m,属亚热带高原季风湿润气候,年均气温 15.1 °C,年均降水量 1 378 mm,岩石主要为三叠系灰岩及白云岩,土壤以石灰土和黄壤为主。区域内局部地区为亚热带常绿落叶阔叶混交林,林木生长在暴露于地表的石沟、石缝、石槽、土面等微地形中。但是,大部分地区由于不合理的土地利用,原生林已退化,经过多年的恢复演替成稀灌草丛、藤刺灌丛、灌木林、乔灌过渡林和乔木林,森林覆盖率为 15%~20%,基岩裸露率(没有植被覆盖情况下岩石出露的面积占土地面积的百分率)为 30%~80%,从整体来看,属轻度石漠化区。本研究的 5 个研究样地位于中国科学院普定喀斯特生态系统观测研究站后寨河流域监测研究区,研究区内有喀斯特植被不同恢复演替阶段的植物群落,从稀灌草丛、藤刺灌丛、灌木林到乔灌过渡林再到乔木林,构成了具有代表性的完整演替序列。

1.2 样地选择和样品采集

2014 年 8 月在普定站后寨河流域监测研究区内选取 5 个演替阶段的植被群落,分别在稀灌草丛、藤刺灌丛和灌木林选取 200 m²、乔灌过渡林和乔木林选取 300 m²的样方作为实验调查的样地,在不同演替群落的样地中采集竹叶椒根际土壤和非根际土壤。竹叶椒(*Zanthoxylum planispinum*),又名野花椒,花椒属落叶灌木或小乔木,是区域石灰性土壤的适生种、优势种。根际土壤的采集方法:在每个演替群落内选择 2~3 棵代表性竹叶椒根系(生长在 0~20 cm 厚度的土层内),以树木根基为原点,沿树木根系向外辐射生长的方向采集根表面上 10 mm 以内的土壤进行混合,即根际混合土样^[21]。非根际土壤的采集是在竹叶椒根际区域外的表层土壤(尽可能没有其他植被)。采集的样品分为两份,一份带回实验室自然风干进行土壤理化性质分析;一份装入已灭菌的封口聚乙烯袋,迅速放入冰盒中带回实验室保存于-20 °C 冰箱用于土壤总 DNA 提取,另保存部分于-80 °C 冰箱备用。

1.3 实验方法

1.3.1 土壤理化测试

将各土壤样品经粉碎过 100 目筛后,用元素分析仪(PE2400-II)测定土壤有机碳(TOC)、土壤总氮(TN)百分含量。土壤有机碳测量前先用质量体积比为 1:2.5 的 1 mol/L HCl 处理浸泡至无气泡产生,去离子水洗至中性,烘干再次研细。土壤交换性钙、镁和速效钾含量用乙酸铵浸提-ICP-OES 法测试,土壤总磷(TP)、pH 和土壤电导率(EC)测定参照《土壤农业化学常规分析方法》。

1.3.2 土壤 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

土壤细菌总 DNA 的提取采用土壤 DNA 提取试剂盒 E. Z. N. A. ® Soil DNA Kit,称取 0.5 g 新鲜土样,先用 1~2 mL 1×PBS 离心洗去根系或凋落物等杂物,然后按照说明书的流程进行土壤总 DNA 的提取。

土壤细菌 16S rDNA 的 V3-V4 高突变区 PCR 采用低偏差扩增测序 LEA PCR (Low-Error Amplicon Sequencing PCR) 方法进行扩增。扩增引物采用:融合 341F 引物:5'-CCTACACGACGCTCTTC-CGATCTN(barcode)CCTACGGGNGGCWGCAG-3'和融合 805R 引物:5'-GACTGGAGTTCCTTG-GCACCCGAGAATTCCAGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'(barcode 为高通量测序时区分各样品所加 7 个碱基的唯一编码序列标记,下同)。PCR 扩增体系包括:模板 DNA 50 ng,5 μL 10Xbuffer,0.5 μL dNTP(10 mmol/L),10 ng 土样总 DNA,0.5 μL Bar-PCR primer F(50 μmol/L),0.5 μL Primer R(50 μmol/L),0.5 μL Plantium Taq(5 U/μL),加水至 50 μL。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,45 °C 退火 20 s,65 °C 延伸 30 s,5 个循环,二次扩增 94 °C 变性 20 s,55 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 30 s,20 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。回收并定量 PCR 产物,纯化后等纳克混合,使用 Illumina Miseq 高通量测序平台测序(由上海生工协助完成)。

1.4 数据处理

高通量测序的结果分析^[22-23]:首先对数据进行预处理,采用 Flash 软件融合双末端序列,然后通过添加的 barcode 将序列拆分回归到相应样品,并对序列进行预处理和质量控制,去除引物序列、短片段、低复杂度序列、低质量序列。然后进行序列分析;使用 RDP-II Classifier(原核微生物)和 silva(真核微生物)数据库将序列进行遗传分类;采用基于序

列相似度的方法将序列进行 OTUs (operational taxonomic unit, 可操作分类单元) 聚类。最后, 应用 mothur software (http://www.mothur.org/wiki/Sogin_ata_analysis) 对 OTUs 进行生态学分析: Alpha 多样性分析, 计算各种物种多样性指数, 衡量样本物种多样性, 包括稀释曲线 (rarefaction curve)、覆盖度 (coverage estimator)、Shannon 指数、物种丰富度指数 Chao1 和 ACE 等。Beta 多样性分析用来比较多组样本之间的差别度量, 将代表性序列比对参考核心 16S rDNA 序列, 根据多序列队列构建代表性序列为节点的进化树, 利用 Unifrac 算法计算样本距离、样本聚类、样本 PCOA。另外, 土壤细菌群落与环境因子的相关性分析在 Canoco 5 中进行。

2 结果

2.1 土壤理化性质

不同演替群落的土壤理化性质存在较大差异 (表 1): pH 范围在 5.92~7.35 之间, 根际土 pH 均低于非根际土, 随着群落演替进展, 总体表现出增加趋势, 但是在不同样品间未达到显著性差异; EC 与 pH 变化相反, 总体随演替进展而减小; TOC、TN 含量为 40.79~130.07 g/kg、2.64~8.43 g/kg, 随着植被群落演替根际土壤的大小顺序为乔木林 > 灌木林 > 乔灌过渡林 > 藤刺灌丛 > 稀灌草丛, 非根际土壤整体呈现先增加后有所减小最后趋于平缓的变化, 灌木林与其它演替群落有显著性差异。根际土壤与非根际土壤的理化性质也存在着一定的差异性: 除稀灌草丛外, 根际土壤 TOC、TN 均高于非根际土壤, 随着演替群落发展, 根际效应越显著, 乔木林根际富集率达到 115.9%、98.8%。交换性 Ca 随演替进展先增加后减小的变化, 在乔灌过渡林含量最大, 除乔木林外根际含量大于非根际; 交换性 Mg 随演替进展呈增加变化趋势, 但乔灌过渡林含量低于灌木林, 根际与

非根际间的差值随演替进展而逐渐减小。

2.2 土壤细菌测序序列和 α -多样性

本次实验得到 16S rDNA 共计 154 417 条原始序列, 质控后高质量的序列占 92.9%, 每个样品有 10 351~18 139 条高质量序列, 平均 14 350 条, 原核微生物序列主要分布在 415~420 bp 之间。高通量测序的数据分析一般将不同序列在同一相似水平下归类于同一操作分类单元, 本文样品中 OTU 数量是根据 97% 的序列相似性的分类信息来确定的。样品分别包括 41 517 个原核 OTU, 其中根际土壤中检测到 20 261 个原核 OTU (表 2)。在 0.03 的差异性水平下, 各样品的稀释曲线变化随 OTU 数增加趋于平缓 (数据未列出)。从表 2 可看出原核微生物测序深度指数即覆盖度在 75.27%~86.96% 之间。因此, 基于本实验的测序深度, 土壤中占主要优势的微生物均已得到分析, 比较真实地反映该研究区的微生物群落组成。

在 97% 相似性水平下, 随着植被恢复, 丰富度指数 ACE 在不同演替群落间呈现较大差异性。根际土壤原核微生物 ACE 指数有先增大后减小的变化, 在藤刺灌丛最大, 灌木林次之; 非根际土壤原核微生物 ACE 指数也在藤刺灌丛最高, 其变化范围为 10 085~16 985, 大于根际土壤的变化范围 (表 2)。非根际土壤原核微生物 shannon 多样性指数变化范围是 6.88~7.39, 在不同演替群落间存在较大差异; 根际土壤原核微生物 Shannon 多样性指数变化范围是 7.23~7.47, 灌木林略高于其它群落。

2.3 土壤细菌群落结构

样品所有序列门分类水平属于的 33 个类群, 其中处于优势门类的是 *Proteobacteria* (变形菌门)、*Acidobacteria* (酸杆菌门) 和 *Verrucomicrobia* (疣微菌门), 丰度分别占总序列数的 43.35%、12.97%、7.53%, 处于次优势序列是 *Actinobacteria* (放线菌

表 1 普定喀斯特地区 5 个演替序列群落土壤理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties of the five succession communities

类别	演替群落	pH	电导率 EC	含水量 W/%	总有机碳 TOC/(g/kg)	全氮 TN/(g/kg)	交换性钙 /(g/kg)	交换性镁 /(mg/kg)	速效钾 /(mg/kg)
根 际 土 壤	稀灌草丛	5.92	575	27.9	40.79	2.64	13.56	366.05	280.4
	藤刺灌丛	7.1	356	14.2	45.59	3.08	9.66	490.61	213.18
	灌木林	6.85	399	25.3	106.53	7.39	11.55	561.26	243.36
	乔灌过渡林	7.13	509	20.3	77.88	5.65	13.14	365.54	447.57
	乔木林	7.19	270	20.5	130.07	8.43	7.49	573.92	183.44
非 根 际 土 壤	稀灌草丛	6.88	380	23.6	40.79	3.09	6.46	205.8	196.75
	藤刺灌丛	7.35	150	12.3	44.41	2.83	8.93	294.51	195.76
	灌木林	7.01	280	23.1	68.66	5.42	11.13	343.83	242.68
	乔灌过渡林	7.19	256	16.4	46.2	3.79	11.14	290.13	338.33
	乔木林	7.32	252	18.8	60.24	4.24	8.35	583.39	368.3

表 2 样品中土壤细菌群落 α -多样性指数 (cut off=0.03)

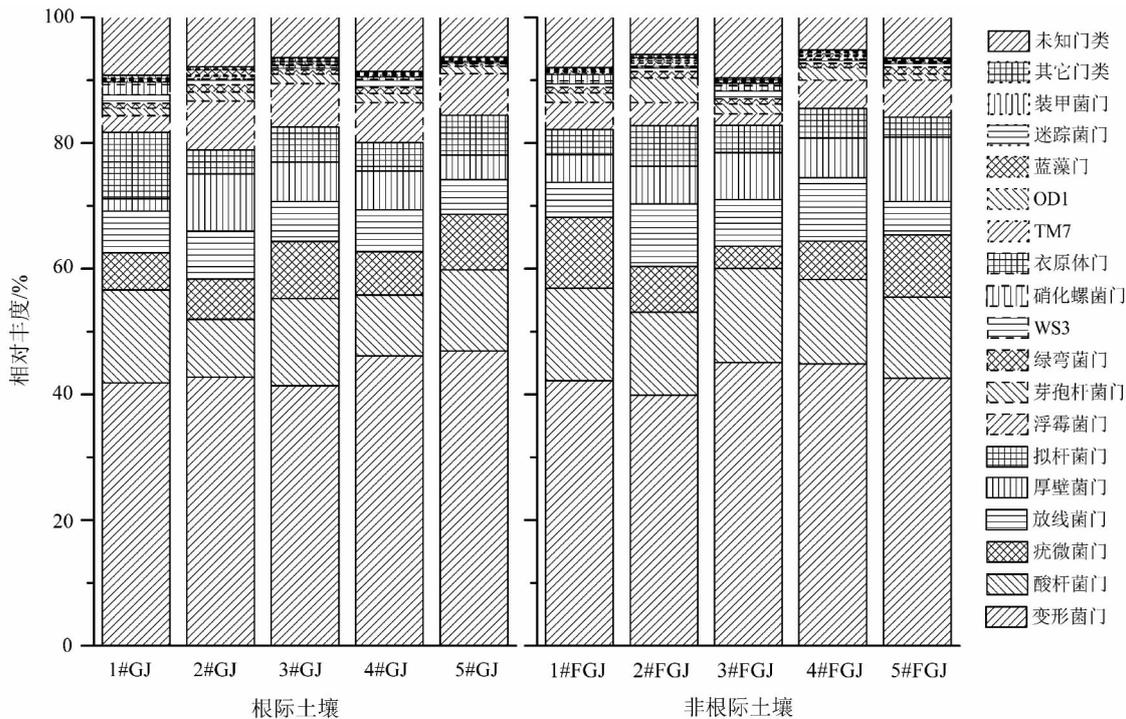
Table 2 The α -diversity index of soil microbial communities identified with 3% cut-off

类别	根际土壤						非根际土壤					
	NO. reads	NO. O TUS	ACE index	Chao1 index	Shan non	Cove rage	NO. reads	NO. O TUS	ACE index	Chao1 index	Shan non	Cove rage
稀灌草丛	17 447	4 565	14 060	9 667	7.36	84.94	17 370	4 083	11 712	8 273	7.18	86.96
藤刺灌丛	11 198	4 143	18 183	10 728	7.37	75.27	18 139	5 376	16 985	11 361	7.39	82.24
灌木林	13 807	4 436	15 457	10 162	7.47	80.21	14 031	3 455	10 085	6 970	6.88	85.93
乔灌过渡林	10 351	3 708	14 426	9 035	7.33	76.93	14 228	4 364	16 308	10 602	7.28	80.74
乔木林	12 560	3 749	12 610	8 251	7.23	81.97	14 368	3 638	10 295	7 163	6.97	85.59

门)、*Firmicutes* (厚壁菌门) 和 *Bacteroidetes* (拟杆菌门) 以及 *Planctomycetes* (浮霉菌门), 其相对丰富度为 7.12%、6.19%、5.35%、5.05%, 这些门类细菌的序列数占总序列数的 94.9% (图 1)。所检测到的丰度较高的细菌门类在每个样品中都存在, 丰度较低 (<0.04) 的门类在某些样品不存在, 虽然其丰度较低, 但检测到微生物基数大, 这些微生物在土壤中仍有不小数量。样品细菌中仍有 7.36% 与 21.76% 的序列无法归入已知的细菌门和属。同时, 样品中检测到古菌基因序列, 包括 *Euryarchaeota* (广古菌门, 0.047%) 和 *Crenarchaeota* (泉古菌门, 0.01%)。

各样品变形菌门均是优势细菌类群 (占各自总

序列的 40% 左右)。从根际和非根际土壤菌群丰度的总体来看, 乔灌过渡林和乔木林的变形菌门的丰度明显高于演替前期的稀灌草丛和藤刺灌丛, 灌木林丰度居中。变形菌门中以 α -*proteobacteria* (α -变形菌纲, 15.06%) 丰度最高, α -变形菌纲的优势菌目是 *Rhizobiales* (根瘤菌目, 5.85%) 和 *Rhodospirillales* (红螺菌目, 3.44%)。根瘤菌目除了稀灌草丛外, 根际土壤中丰度明显高于非根际土壤。 δ -*Proteobacteria* (δ -变形菌纲) 丰度值也较高, 与 α -变形菌纲共占了变形菌门的 60%。酸杆菌门和放线菌门丰度在非根际土壤中大于根际土壤中, 酸杆菌门丰度在稀灌草丛中最高, 在非根际土壤中丰度较稳定,



1#GJ、2#GJ、3#GJ、4#GJ、5#GJ 为稀灌草丛、藤刺灌丛、灌木林、乔灌过渡林、乔木林根际土壤, 1#FGJ、2#FGJ、3#FGJ、4#FGJ、5#FGJ 为相应非根际土壤

图 1 喀斯特不同演替群落根际和非根际土壤细菌门的丰度及变化

Fig. 1 Changes in relative abundance of microbial phylum succession communities in the karst rhizosphere of *Zanthoxylum armatum* and non-rhizosphere soil

在根际土壤之间差异大,其丰度在2#GJ比1#GJ少了0.39倍。放线菌门在非根际土壤间差异较大,其丰度均大于1#GJ,4#FGJ,大了0.82倍。疣微菌门的相对含量从19.7%(藤刺灌丛云南旌节花)下降到3.54%(灌木林非根际),厚壁菌门相对含量从9.96%(乔木林非根际)下降至1.16%(乔木林云南旌节花),其下 *Bacillus*(芽孢杆菌属)的丰度,随着群落演替呈现先增加后减小的变化,稀灌草丛最低(非根际1.38%,根际0.6%),灌木林最高(非根际3.97%,根际2.48%),非根际均高于根际土壤(图2)。

在土壤微生物中,除了优势菌群之外,还有一些参与土壤养分循环、具有分解有害物质以及分泌抗生素等功能的细菌。拟杆菌门下的 *Cytophagaceae*(噬纤维细菌科)的丰度在根际土壤高于非根际土

壤,稀灌草丛最高(0.62%),在藤刺灌丛最低(0.1%)。变形菌门下的 *Nitrosomonadales*(亚硝化单胞菌目)占总序列数的0.63%,其中 *Nitrosospira*(亚硝化螺菌属)占0.61%,在藤刺灌丛的非根际中最小,丰度0.35%,乔木林的根际土壤最大,丰度1.03%;*Nitrosospira*(硝化螺旋菌门)下的 *Nitrospirales*(硝化螺旋菌目)占0.4%,其中 *Nitrosospira*(硝化螺菌属)均为各样品硝化螺旋菌目的优势菌群,占总序列数的0.39%,非根际土壤中灌木林含量最高,根际土壤中稀灌草丛最高,其丰度变化范围较大,在0.04%~1.64%之间。在样品中,还检测到光合细菌(photosynthetic bacteria, PSB),如 *Chloroflexi*(绿弯菌门,0.83%)、*Cyanobacteria*(蓝藻门,0.19%)、*Chlorobi*(绿菌门,0.06%)。

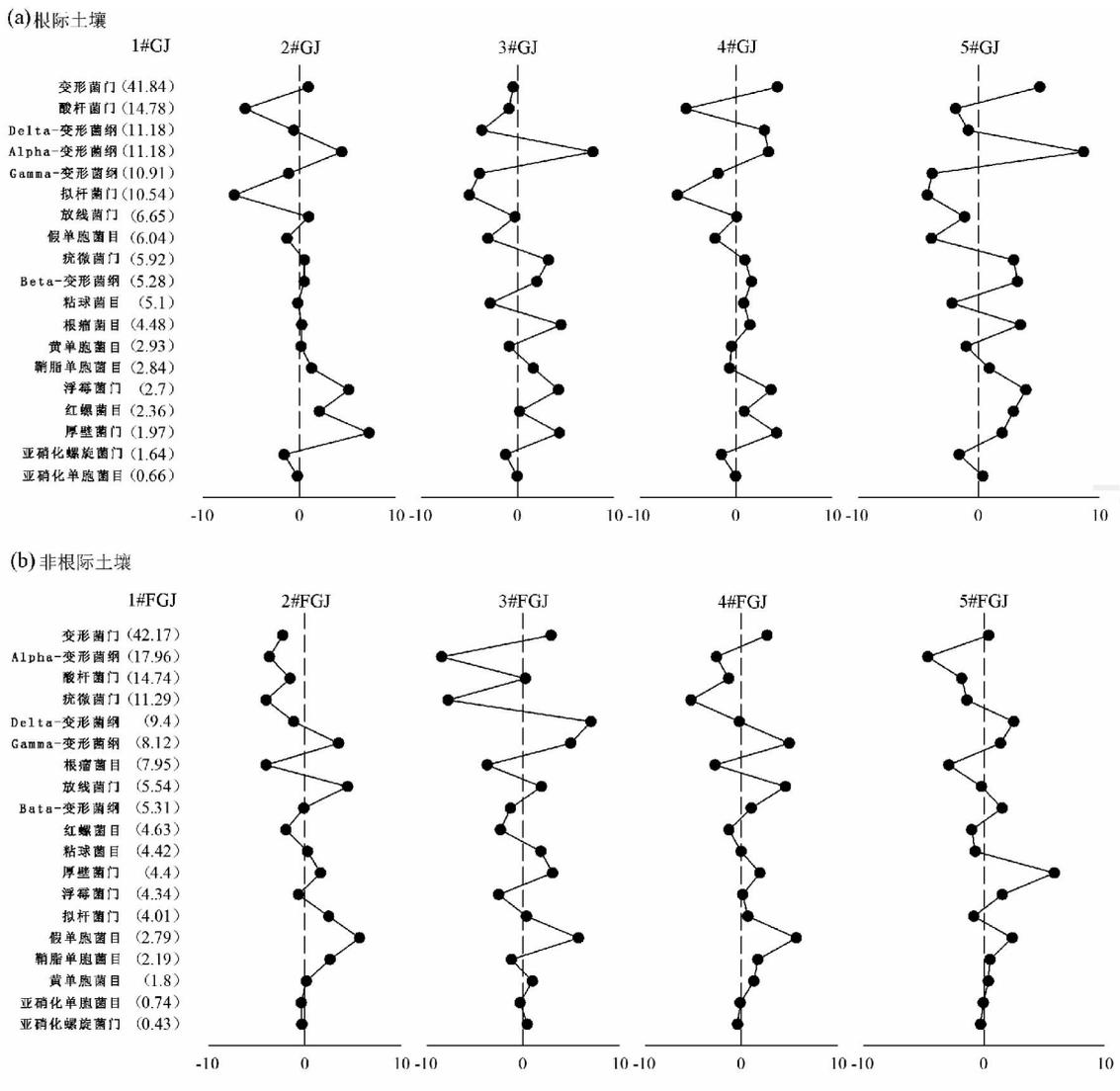


图2 不同演替群落根际与非根际土壤中细菌优势菌群和功能菌群的丰度变化(与稀灌草丛比)

Fig. 2 Changes in relative abundance of microbial phylotypes in succession communities comparing with shrub-meadow (CK)

2.4 土壤细菌群落相似性及其与环境相关性分析

用 Jaccard 指数算法比较多个样品的 OTU (0.03 相似水平) 差异及各 OTU 中含有的序列多少, 得到多个样品相似性树状图。根际样品中 2#GJ 和 4#GJ、3#GJ 和 5#GJ 分别聚为一丛, 其间聚类距离差别为 0.01, 与 5#FGJ 一起聚为一类。藤刺灌丛和乔灌过渡林相对聚集, 其余非根际样品间差异较大(图 3)。总体上, 不同演替群落的非根际土壤细菌群落结构相对聚集, 根际土壤则相对分散。

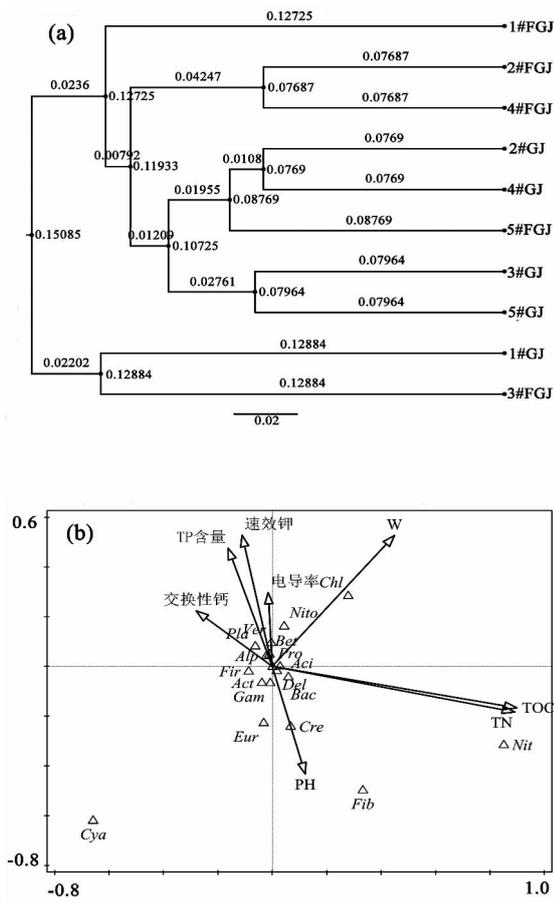
为进一步解释喀斯特地区不同演替群落中土壤细菌群落差异性和分布的驱动因子, 将高通量测序所得的丰度与土壤理化指标进行典范对应分析

(CCA)。经蒙特卡洛检验发现, 影响力大小为 TOC、TN、含水量、电导率、速效钾、TP、pH、交换性钙, 其中 TOC 和 TN 对土壤细菌的群落变化具有显著性的影响 ($p < 0.05$)。TOC、TN 和含水量与第一排序轴正相关, 第一轴解释了 48.2% 的变异; EC 和交换性钙等与第二排序轴正相关, 第二轴解释了 22.2%。 *Nitrospira*、 *Fibrobacteres*、 *Bacteroidetes*、 *Actinobacteria* 等的丰度与 TOC、TC 和 pH 等正相关; *Planctomycetes*、 *Beta proteobacteria*、 *Verrucomicrobia*、 *Alpha proteobacteria*、 *Firmicutes* 与 EC、交换性钙等正相关; *Nitrosomonadales* 丰度与 TOC、TN 相关性不大, 与 EC 正相关; *Chlamydiae* 与含水量显著正相关, 古菌界的广古菌门和泉古菌门丰度与 TOC、TN 相关性不大, 与 pH 正相关相关。

3 讨 论

3.1 土壤细菌优势菌群及功能菌群分布

普定喀斯特土壤中发现了细菌中的大多数门类, 其丰富度和多样性远大于同处亚热带湿润季风区的非喀斯特地区的神农架自然保护区森林土壤细菌^[24]、南方红壤区的土壤细菌^[22]。与多数研究结果一致, 变形菌门是土壤中最主要的细菌类群, 该类群的代谢活动是土壤中最主要的细菌活动。其中, 以 α -变形菌门丰富度最高, 且每一门内有许多系统发育类型的存在, 表明了喀斯特生境相对复杂, 能满足不同代谢类型变形细菌的生存。有研究发现酸杆菌门一般存在于营养比较匮乏的地方, 在营养充裕的农业耕作土壤中尤为稀少, 根际营养丰富的土壤要比大多数土壤中含有的酸杆菌门少的多。本研究结果与此类似, 随着群落正向演替, 酸杆菌门丰富度减小, 根际土壤酸杆菌门显著少于非根际土壤。变形菌门和酸杆菌门细菌数量的比率被认为可指示土壤营养状况, 在寡营养土壤中比率较低^[25], 本研究结果中, 这个比值在非根际显著低于根际土壤, 并且随着演替序列发展, 该值增大。放线菌门能够降解纤维素和几丁质, 是土壤养分供给的主要来源, 并且产生的体外孢子能够抵抗外界不利的环境条件, 使得它成为半干旱喀斯特土壤的优势菌群。厚壁菌门随着演替进展, 整体上出现变多的趋势。喀斯特地区不同演替植被下参与硝化作用的亚硝化单胞菌丰度大于硝化螺旋菌。另外, 样品检测到了光合细菌, 光合细菌在不同的自然条件下, 具有固氮脱氢、固碳氧化硫化物等多种功能。同时, 检测到含量相对较低的菌门在生态环境中有其重要的作用, 如 *Deinococ-*



(a) 群落相似性, (b) 相关性分析

Pro= 变形菌门, Alp=Alpha-变形菌纲, Del=Delta-变形菌纲, Gam= Gamma-变形菌纲, Bet= Beta-变形菌纲, Nito= 亚硝化单胞菌目, Aci= 酸杆菌门, Ver= 疣微菌门, Act= 放线菌门, Fir= 厚壁菌门, Bac= 拟杆菌门, Pla= 浮霉菌门, Nit= 硝化螺旋菌门, Eur= 广古菌门, Cya= 蓝藻门, Fib= 纤维杆菌门, Cre= 泉古菌门, Chl= 衣原体门。

图 3 土壤细菌群落相似性及其与环境相关性分析

Fig. 3 Similarity of bacterial community structure between all samples and results from canonical correspondence analysis(CCA)

cus-Thermus、*Caldiserica*、*Aquificae*,能抵御较为苛刻的环境变化。

3.2 土壤细菌群落结构相似性及其与环境因子的关系

本研究发现,随着演替群落的发展,细菌丰富度和多样性呈先升高后降低最后趋于平缓的变化过程,且各样品间细菌群落结构差异较大,这与植被群落和土壤理化性质是显著相关的。通过细菌群落与土壤理化性质 CCA 分析发现,影响贵州喀斯特高原土壤细菌的环境因子影响力大小为 TOC、TN、含水量、电导率等,其中 TOC 和 TN 有显著性影响。总体上,不同演替群落的非根际土壤细菌群落结构相对聚集,根际土壤则差异较大,而且,随着植被的演替,根际土壤与非根际土壤细菌群落结构间的差异性逐渐减小,这可能是植物根际效应的影响。喀斯特植被群落的物种组成、林分密度、群落郁闭度发生变化显著提高^[26],林木根际分泌物为微生物提供了丰富的营养物质,根际也改善了微环境更有利于微生物繁殖;同时凋落物组成和量也发生变化^[27],它提供了较为丰富碳源、氮源并保持了土壤表层水分含量,这对土层较薄和干湿交替频繁的喀斯特生境来说无疑为微生物生长提供了有利条件。而在演替中后期,土壤细菌多样性出现减小变化,这可能与该阶段林木快速增长,争夺了土壤微生物生长所需养分,土壤中碳氮减少转移到地上部分,这与之前报道在茂兰喀斯特森林对土壤微生物量的研究结果一致^[13, 28]。群落演替后期,植物群落趋于稳定,土壤质量也相对稳定,土壤微生物群落多样性和结构便趋于稳定。大多数土壤中可利用有机碳的含量对微生物群落有一定的影响,而且充足的可溶性有机碳能够快速改变微生物的群落结构,尤其对那些竞争能力较强的微生物,能够快速吸收营养物质供其自身生长。土壤微生物研究中,pH 通常是研究其多样性变化的最佳指示因子之一,大量研究也报道了 pH 对微生物的分布规律存在着普遍的影响^[29-30]。

本次研究也表明,pH 对土壤微生物群落有显著性影响,但微生物种群对 pH 的响应是不同的,如土壤中酸杆菌门的丰度与 pH 值呈负相关,放线菌门的丰度与 pH 值呈正相关。

4 结 论

本研究通过 Illumina Miseq 高通量测序平台对贵州省普定县这一典型喀斯特不同演替群落中土壤细菌群落结构进行了系统研究。随着植被群落演替,土壤 pH 增大,TOC 和 TN 从 40.79 g/kg、2.64 g/kg 增长到 130.07 g/kg、8.43 g/kg,是土壤碳库、氮库逐渐累积的过程。喀斯特土壤中细菌包括了数据库中绝大多数的门类,主要细菌类群为变形菌门(43.35%)、酸杆菌门(12.97%)、疣微菌门(7.53%)、放线菌门(7.12%)、厚壁菌门(6.19%)、拟杆菌门(5.35%)和浮霉菌门(5.05%),未分类类群占 7.36%。另外,喀斯特地区发现了低丰度的古菌,如广古菌门和泉古菌门。随着植被群落的恢复演替,土壤细菌丰富度和多样性提高,各样品间细菌群落结构差异较大。土壤有机碳、土壤总氮、pH 和土壤含水量等是影响土壤细菌群落的重要影响因子。

本研究结果为深入认识我国喀斯特不同演替群落中土壤中微生物多样性特点,并进一步阐释微生物在土壤生物地球化学循环中的作用提供基础资料和参考。但核酸序列的存在并不一定意味着功能意义,土壤微生物生态作用仍有待进一步研究。最后,由于高通量测序在数据量上的优势,土样采集时已进行多点混匀,与目前国际上运用该技术的多数研究^[22, 30-31]类似,本研究中未对同一样品设置重复。虽然各样点的气候条件和土壤母质一样,但由于喀斯特生态系统高度的异质性,可能会造成同一演替群落内较大差异,这在以后应充分考虑样地的空间异质性,保证样品的代表性。

致 谢:感谢袁权博士对论文的指导和建议!

参 考 文 献

- [1] 王世杰,李阳兵,李瑞玲.喀斯特石漠化的形成背景、演化与治理[J].第四纪研究,2003,23(6):657-666.
- [2] 宋长青,吴金水,陆雅海,等.中国土壤微生物学研究 10 年回顾[J].地球科学进展,2013,28(10):1087-1105.
- [3] Kardol P, Cornips N J, van Kempen M M L, et al. Microbe-mediated plant-soil feedback causes historical contingency effects in plant community assembly [J]. Ecological Monographs, 2007, 77(2): 147-162.
- [4] 宋敏,邹冬生,杜虎,等.不同土地利用方式下喀斯特峰丛洼地土壤微生物群落特征[J].应用生态学报,2013,24(9):2471-2478.
- [5] 东秀珠,洪俊华.原核微生物的多样性[J].生物多样性,2001,9(1):18-24.
- [6] 杜玮超.松嫩草地植物群落土壤细菌遗传多样性研究[D].长春:吉林农业大学,2012.
- [7] 贺纪正,葛源.土壤微生物生物地理学研究进展[J].生态学报,2008,28(11):5571-5582.
- [8] 刘玉杰,王世杰,刘秀明,等.茂兰保护区小生境土壤微生物活性研究[J].地球与环境,2011,39(3):285-291.

- [9] 龙健, 李娟, 江新荣, 等. 贵州茂兰喀斯特森林土壤微生物活性的研究[J]. 土壤学报, 2004, 41(4): 597-602.
- [10] 魏媛, 喻理飞, 张金池. 退化喀斯特植被恢复过程中土壤微生物活性研究——以贵州花江地区为例[J]. 中国岩溶, 2008, 27(1): 63-67.
- [11] 唐政, 李继光, 李慧, 等. 喀斯特土壤微生物和活性有机碳对生态恢复的快速响应[J]. 生态环境学报, 2014, 23(7): 1130-1135.
- [12] 刘璐, 宋同清, 彭晚霞, 等. 木论喀斯特自然保护区土壤微生物生物量的空间格局[J]. 生态学报, 2012, 32(1): 207-214.
- [13] 刘玉杰, 王世杰, 刘秀明, 等. 茂兰喀斯特植被演替中土壤微生物量碳氮研究[J]. 地球与环境, 2011, 39(2): 188-195.
- [14] 魏媛, 张金池, 俞元春, 等. 退化喀斯特植被恢复过程中土壤微生物活性的季节动态——以贵州花江喀斯特峡谷地区为例[J]. 新疆农业大学学报, 2009, 32(6): 1-7.
- [15] 魏媛, 张金池, 俞元春, 等. 退化喀斯特植被恢复对土壤微生物数量及群落功能多样性的影响[J]. 土壤, 2010, 21(2): 230-235.
- [16] 何寻阳, 苏以荣, 梁月明, 等. 喀斯特峰丛洼地不同退耕模式土壤微生物多样性[J]. 应用生态学报, 2010, 21(2): 317-324.
- [17] 冯书珍, 苏以荣, 秦新民, 等. 喀斯特峰丛洼地土壤剖面微生物特性对植被和坡位的响应[J]. 生态学报, 2013, 33(10): 3148-3157.
- [18] 王新洲, 胡忠良, 杜有新, 等. 喀斯特生态系统中乔木和灌木林根际土壤微生物生物量及其多样性的比较[J]. 土壤, 2010, 42(2): 224-229.
- [19] 鹿士杨, 彭晚霞, 宋同清, 等. 喀斯特峰丛洼地不同退耕还林还草模式的土壤微生物特性[J]. 生态学报, 2012, 32(8): 2390-2399.
- [20] 贺纪正, 袁超磊, 沈菊培, 等. 土壤宏基因组学研究方法与进展[J]. 土壤学报, 2012, 49(1): 155-164.
- [21] 刘方, 王世杰, 刘秀明, 等. 喀斯特石漠化区不同优势树种根际土壤有机碳及氮磷的变化[J]. 中国岩溶, 2011, 30(1): 59-65.
- [22] 袁超磊, 贺纪正, 沈菊培, 等. 一个红壤剖面微生物群落的焦磷酸测序法研究[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 138-149.
- [23] Wang S, Hou W, Dong H, *et al.* Control of temperature on microbial community structure in hot springs of the Tibetan Plateau [J]. PLoS One, 2013, 8(5): 1-14.
- [24] 丛静. 神农架自然保护区土壤微生物多样性研究[D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- [25] 陈香碧, 苏以荣, 何寻阳, 等. 喀斯特原生土壤与退化生态系统土壤细菌群落结构[J]. 应用生态学报, 2009, 20(4): 863-871.
- [26] 刘玉国, 刘长成, 魏雅芬, 等. 贵州省普定县不同植被演替阶段的物种组成与群落结构特征[J]. 植物生态学报, 2011, 35(10): 1009-1018.
- [27] 熊红福, 王世杰, 容丽, 等. 普定喀斯特地区不同演替阶段植物群落凋落物动态[J]. 生态学杂志, 2013, 32(4): 802-806.
- [28] 梁月明, 何寻阳, 苏以荣, 等. 喀斯特峰丛洼地植被恢复过程中土壤微生物特性[J]. 生态学杂志, 2010, 29(5): 917-922.
- [29] Buee M, Reich M, Murat C, *et al.* 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity [J]. New Phytologist, 2009, 184(2): 449-456.
- [30] 李晨华, 张彩霞, 唐立松, 等. 长期施肥土壤微生物群落的剖面变化及其与土壤性质的关系[J]. 微生物学报, 2014, 54(3): 319-329.
- [31] Yu Y, Wang H, Liu J, *et al.* Shifts in microbial community function and structure along the successional gradient of coastal wetlands in Yellow River Estuary [J]. European Journal of Soil Biology, 2012, (49): 12-21.

Compositional Characteristics and Variations of Soil Microbial Community in Karst Area of Puding County, Guizhou Province, China

LIU Xing^{1,2,3}, WANG Shijie^{1,3}, LIU Xiuming^{1,3}, HUANG Tianzhi^{1,2,3}, LI Yong^{1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550180, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Puding Karst Ecosystem Research Station, Chinese Academy of Sciences, Puding 562100, China)

Abstract: By using high-throughput pyrosequencing technique, this paper investigated the soil microbial abundances and community structure in 5 succession stages (sparse-shrub tussock, thorny shrub, shrub, shrub-tree transitional forest, and secondary forest) in the Puding karst area, central of Guizhou Province, China, and analyzed the main environmental factors affecting these changes. Results showed that in all the soil samples, prokaryote microbial was dominated with *Proteobacteria* (43.35%), *Acidobacteria* (12.97%), *Verrucomicrobia* (7.53%), *Actinobacteria* (7.12%), *Firmicutes* (6.19%), *Bacteroidetes* (5.35%), and *Planctomycetes* (5.05%), while unclassified was 20.65%. The few low abundance of *Euryarchaeota* and *Crenarchaeotawere* detected in the karst area soil. In *Zanthoxylum planispinum* rhizosphere soil, the abundance of *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Planctomycete* gradually increased with the vegetation succession. However, in the non-rhizosphere soil, the abundance of *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia* decreased from 14.74% to 12.92% and 11.29% to 6.11%, respectively. It was figured out that TOC, TN, soil water content, EC, available phosphorus content, pH and exchangeable calcium content were key factors affecting the microbial community in the karst soil, and TOC and TN were significantly different.

Key words: soil bacterial; high-throughput sequencing; vegetation succession; rhizosphere; karst