

# Effect of Conversion from Natural Meadow Grassland to Farmland on the Structure of Soil Bacterial Community in Horqin Sandy Land

Jing Liu, Mengting Chen, He Ren, Nianlong Jing, Guangyang Yu, Chengyou Cao\*

College of Life and Health Sciences, Northeastern University, Shenyang Liaoning  
Email: \*caochengyou@163.com

Received: May 4<sup>th</sup>, 2017; accepted: May 21<sup>st</sup>, 2017; published: May 26<sup>th</sup>, 2017

---

## Abstract

To investigate how soil bacterial communities respond to the change during conversion from natural meadow grassland to farmland, and the relationship between bacterial community and soil properties, we detected the shifts in diversities and compositions of soil bacterial communities as well as the relative abundance of dominant bacterial taxa with the high throughput IlluminaMiSeq sequencing technique from natural grassland, 7-yr farmland, and 50-yr farmland in Horqin Sandy Land. We found that land-use change resulted in the significant changes in soil physical and chemical properties with the distinct decreases in soil organic matter and total N contents and the increase in soil conductivity. Soil bacterial community structure was affected by land-use change, with the significant change in relative abundance of dominant bacterial populations. However, species composition of bacterial community remained unchanged. Soil properties had important effects on the structure of soil bacterial community. *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Thaumarchaeota*, and *Nitrospirae* were the dominant taxa in the Horqin area.

## Keywords

Horqin Sandy Land, Soil Bacterial, Community Structure, High Throughput Sequencing

---

## 科尔沁沙地草甸草地开垦农田对土壤细菌群落结构的影响

刘 静, 陈梦婷, 任 和, 景年龙, 于广洋, 曹成有\*

\*通讯作者。

东北大学生命科学与健康学院, 辽宁 沈阳  
Email: caochengyou@163.com

收稿日期: 2017年5月4日; 录用日期: 2017年5月21日; 发布日期: 2017年5月26日

## 摘要

选择天然草甸草地及开垦农田后7年和50年样地, 采用IlluminaMiSeq高通量测序的方法研究了草甸草地利用方式改变后, 土壤细菌群落结构的变化特征及与土壤理化性质的关系。结果表明, 天然草地开垦农田对土壤理化性质有显著影响, 有机质和全N含量迅速下降, 电导率提高。*Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Thaumarchaeota*和*Nitrospirae*是本地区的优势菌群。草地利用方式改变对土壤细菌群落结构有显著影响, 引起优势菌群相对优势度改变, 但对物种组成没有显著影响。土壤理化性质对细菌群落结构的形成有重要作用。

## 关键词

科尔沁沙地, 土壤细菌, 群落结构, 高通量测序

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

土壤微生物是陆地生态系统中最活跃的成分, 担负着分解动、植物残体的重要使命, 推动着土壤的物质转化和能量流动。微生物对生存的微环境十分敏感, 土壤微生物多样性代表着微生物群落的稳定性, 是土壤生态机制及土壤胁迫对微生物群落影响的反映指标, 可作为土壤生态系统变化的预警指标[1]。不同土地利用方式下, 由于植被种类和轮作制度、物质组成、水分和小气候状况、施肥管理等方面的明显差异, 回归土壤的枯枝落叶和根系分泌物不同, 导致土壤的物理、化学及生物学性状均有明显不同, 从而对微生物多样性可能产生不同的影响[2]。了解土地利用变化背景下土壤微生物多样性的变化特点, 对于制订科学合理的土壤管理措施具有重要的实践意义。目前关于土地利用方式变更条件下土壤肥力性状动态变化的研究取得了大量成果[3] [4] [5]。然而, 由于研究方法的局限, 关于土地利用方式对土壤微生物群落结构的影响方面的研究开展得还不够深入。

近几十年来, 我国有 600 万  $\text{hm}^2$  天然草地被开垦为农田[6], 而且农业化比重日益增高, 生态环境发生了急剧变化。加之人们更多地看重短期经济效益而忽视长远生态效益, 使草甸草地退化明显, 成为我国北方农牧交错带沙漠化强烈发展的地区, 制约着该地区经济和社会的发展。科尔沁沙地(草地)历史上曾经为湖泊众多、水草丰美的疏林草原景观, 是传统的宜牧地区, 目前草地垦荒现象也十分普遍。本研究在科尔沁沙地选取典型草甸草地和不同开垦年限的农田为对象, 采用高通量测序的方法, 研究草甸草地开垦为农田后, 土壤细菌多样性及群落结构的变化特征, 分析土壤细菌群落结构和土壤理化性质的关系, 以期对土壤质量评价和草甸草地的管理提供科学依据。

## 2. 研究区概况及研究方法

### 2.1. 研究区概况

研究区位于科尔沁沙地西部翁牛特旗乌兰敖都地区(43°02'N, 119°39'E)。地形属于河湖相冲积盆地, 这里沙地起伏, 坨甸相间, 为广阔的沙地景观, 沙地和甸子地呈东西排列。该地区属温带大陆性半干旱气候, 气候干燥, 风沙大且频繁。年均风速  $4.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , 每年起风沙日数 200 天以上。年平均降水 340.5 mm, 多集中在 7~8 月, 年蒸发量 2500 mm 左右。年平均温度  $6.4^\circ\text{C}$ , 无霜期 130 多天。其原生植被属于森林向草原的过渡类型, 为蒙古植物区系、华北植物区系和长白植物区系的交接地带, 其中分布最广、种类最多的是蒙古植物区系植物。目前原生植被已被破坏殆尽, 大部分已演变为沙生植被和草甸植被。草甸植被一般分布于丘间低地和连片甸子地上, 由于土壤和水分条件相对较好, 植物种类较为丰富, 生物量较高, 在生产中常常作为基本打草场使用, 同时也做为冬季和早春放牧场。每年 4~10 月围封禁牧, 打完牧草后 10 月~次年 4 月进行冬季放牧。但随着人口和牲畜数量的迅速膨胀, 对打草场的利用强度不断增强, 大面积打草场被开垦为农田。草场内土壤类型主要有碱化草甸土、盐土和碱土等。

### 2.2. 样地设置、样品采集及实验室分析

样品在中国科学院应用生态研究所乌兰敖都荒漠化试验站固定试验地内采集。选择天然草甸草地(打草场)、毗邻的开垦 7 年农田和开垦 50 年农田为研究对象。每种土地利用方式分别设  $20 \text{ m} \times 20 \text{ m}$  样地 3 个(3 次重复), 每个样地随机布设 20 个取样点, 分别采集 0~10 cm 的土壤样品。每个样地土壤样品分成 2 份, 一份风干后用于测定理化性质, 另一份装于密闭自封袋, 取回后于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存, 用于 DNA 提取。

土壤有机质采用重铬酸钾氧化法测定; 全 N 采用半微量凯氏定 N 法; 速效 N 采用碱解扩散法测定; 全 P 采用钼锑抗比色法; 有效 P 采用  $\text{NaHCO}_3$  提取法; 土壤水分含量采用烘干法; pH 和电导率分别采用 pH 计和电导仪测定[7]。

### 2.3. 土壤基因组 16S rDNA 高通量测序

取 0.3 g 新鲜土壤, 用 DNA 提取试剂盒(天根)提取土壤总 DNA。采用带条码引物 341F 和 805R 扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应液(50  $\mu\text{L}$ )组成是:  $10 \times \text{buffer}$  5  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 10 ng, dNTP (10 mM) 0.5  $\mu\text{L}$ , 341F 和 805R 引物(50  $\mu\text{M}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , Taq 酶( $5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 加去离子水补足体积。热循环程序如下:  $94^\circ\text{C}$  3 min;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $45^\circ\text{C}$  20 s,  $72^\circ\text{C}$  30 s, 共 5 个循环;  $94^\circ\text{C}$  20 s,  $55^\circ\text{C}$  20 s,  $72^\circ\text{C}$  30 s, 共 20 个循环; 最后,  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。按照说明书, 采用琼脂糖回收试剂盒纯化 PCR 产物, 回收产物用 Qubit 2.0 定量。使用 QIIME(9.1)软件分析原始序列, 并进行质量过滤。去除长度小于 200 bp、平均质量分数  $< 25$  和嵌合体后, 最后得到的序列用于 OTU 分析。采用 UPARSE 软件(7.1)对序列进行聚类(序列相似性设为 97%), 然后用 RDP classifier (Ribosomal Database Program)贝叶斯算法对代表性 OTU 序列进行物种分类学分析[8]。使用 Mothur 软件(1.21.1)分析丰富度, 并计算 Alpha 多样性指标, 包括香农指数(Shannon Index)、ACE 指数、Chao 指数等。Bray-Curtis 差异指数用于计算样品间相似性矩阵, 并使用 PCoA 分析比较样品间相似性。采用 MeV version 4.2 进行热图分析。

### 2.4. 典型对应分析(CCA)

采用 CANOCO 4.5 软件分析土壤理化性质和细菌群落结构的关系, 采用 CanoDraw 4.0 生成 CCA 分析图。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 草地开垦农田对土壤理化性质的影响

单因素方差分析表明,天然草地开垦为农田后,土壤理化性质发生了显著变化。土壤全氮、有机质、显著下降,电导率显著增加,而全P和速效N含量变化未达到显著水平(表1,  $P < 0.05$ )。经过一元线性回归分析,速效P含量与开垦时间呈现显著的线性关系( $P < 0.05$ ),表明速效P的含量随开垦时间呈现显著增加趋势。天然草地土壤有机质含量较高达到4.45%,而开垦7年后迅速下降,下降幅度达到46%。其主要原因是草地开垦农田后,土壤受到强烈扰动,土壤呼吸加剧,加速了有机质分解的进程。有机质含量的快速下降,也影响到其他全量和速效养分的变化。土壤电导率也表现出显著增加的趋势,说明草地开垦农田后会加剧土壤盐碱化进程。

#### 3.2. 16S rDNA 测序结果和多样性指数

通过对9个样品进行高通量测序,共获得66072个OUT,每个样品包含6114-7735个OUT(表2)。农田50年样地的OUT数量低于其他两个样地。采用Mothurs对ACE,Chao,and Shannon等 $\alpha$ 多样性指数进行了计算。其中天然草地ACE、Chao指数高于其他两个样地,其他指数在各样地之间未表现出明显差异。采用PCoA分析对样品间的相似性进行了比较(图1)。PCoA显示天然草地、7年农田和50年农田各自三个重复样品聚在一组,表明了不同样地之间微生物群落结构的差异。

#### 3.3. 草地开垦农田对细菌群落结构的影响

采用RDP classifier对每个OUT的代表性序列进行物种分类学分析。测序结果共划分30个门,682个科,1197个属,1729个种。30个门中相对优势度 $>1\%$ 的主要包括: *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Thaumarchaeota* 和 *Nitrospirae*, 占全部OTU的95.07%~97.16%(图2)。 *Proteobacteria* 和 *Acidobacteria* 在天然草地中占绝对优势,平均相对优势度分别为29.4%和31.8%。开垦为农田后这两个优势菌的相对优势度显著下降,7年农田为22.8%和18.8%,50年农田分别为21.3%和20.1%。 *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes* 和 *Planctomycetes* 的相对优势度则伴随着草地垦荒出现显著下降趋势。优势菌的显著变化对微生物群落的结构和功能将产生重要影响。

#### 3.4. 草地开垦农田对细菌优势属的影响

在属水平,草地开垦为农田也造成细菌群落结构发生一定的影响,主要体现优势属的相对优势度出现此消彼长的特点,但基本组成未发生变化,未出现新种出现和原有种消失的情况。如 *Blastocatella*, *Sphingomonas*, *Acidobacteria\_bacterium* 和 *Chryseolinea* 在天然草地中的相对优势度分别为2.43%,2.50%,2.09%和1.00%,而在7年农田中则下降为1.95%,1.18%,0.60%和0.32%,在50年农田中分别为1.53%,1.67%,1.19%和0.30%。与此相反,一些在天然草地中相对优势度较低的属,开垦农田后优势度大幅度提高。如 *Pontibacter*, *Flavisolibacter*, *Adhaeribacter*, *Nocardioides* 和 *Massilia* 的相对优势度在天然草地中仅为0.17%~0.69%,而在7年农田和50年农田样地中分别提高到1.00%~3.65%和1.29%~2.18%(图3)。

#### 3.5. 土壤理化性质对细菌群落结构的影响

采用CCA分析了土壤有机质、全N、全P、速效N、速效P、pH、含水率、电导率与土壤细菌微生物群落结构(属水平)的相互关系,结果见图4。图4表明,土壤理化性质与细菌群落结构有密切关系,其中土壤有机质和全N对天然草地影响最大,短期耕作(7年农田)受pH和电导率影响最大,而长期耕作条

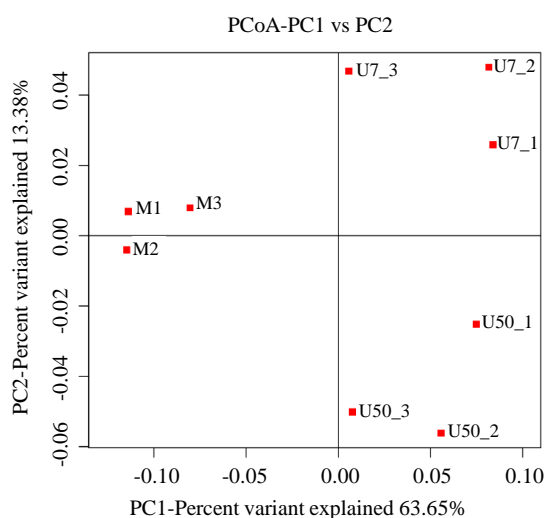
**Table 1.** Soil physical and chemical properties of different samples  
**表 1.** 不同样地土壤理化性质

指标	天然草地	7年农田	50年农田	<i>P</i>	<i>F</i>
全N (g·kg <sup>-1</sup> )	0.085 ± 0.002c	0.017 ± 0.007a	0.058 ± 0.004b	163.79	<0.001
有机质(g·kg <sup>-1</sup> )	4.445 ± 1.072b	2.068 ± 0.221a	3.824 ± 0.588b	8.850	0.016
全P (g·kg <sup>-1</sup> )	0.067 ± 0.005a	0.030 ± 0.002a	0.073 ± 0.033a	4.351	0.068
速效P (mg·g <sup>-1</sup> )	5.314 ± 0.931a	14.01 ± 1.986b	28.34 ± 11.87c	8.349	0.018
速效N (mg·g <sup>-1</sup> )	2.240 ± 0.285a	2.402 ± 1.507a	1.866 ± 1.090a	0.192	0.830
含水量(%)	13.11 ± 2.495a	13.81 ± 0.934a	13.25 ± 2.633a	0.087	0.917
pH	8.67 ± 0.200b	8.74 ± 0.151c	7.95 ± 0.128a	17.831	0.003
电导率(μs·cm <sup>-1</sup> )	86.90 ± 6.329a	350.2 ± 60.75c	196.0 ± 53.88b	23.735	0.001

三次重复的平均值，同一行不同小写字母表示差异显著。

**Table 2.** MiSeq sequencing results and diversity estimates  
**表 2.** MiSeq 测序结果和多样性估计

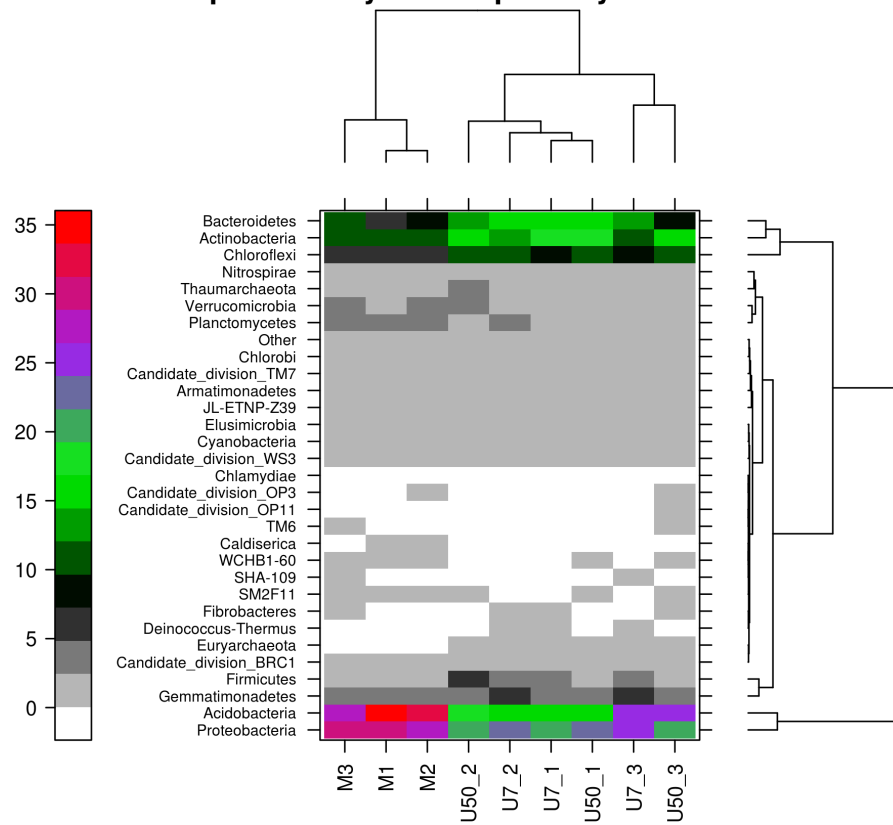
样地	Total OTUs	ACE	Chao	Shannon	Coverage
天然草地-1	7298	6600	6345	10.15	0.94
天然草地-2	7735	6695	6491	10.39	0.94
天然草地-3	7691	7259	6988	10.62	0.93
平均值	7575	6851	6608	10.39	0.94
农田 7 年-1	6926	6331	6152	10.60	0.95
农田 7 年-2	8466	6255	6147	10.69	0.95
农田 7 年-3	7616	6542	6353	10.60	0.94
平均值	7669	6376	6217	10.63	0.95
农田 50 年-1	6114	6499	6286	10.49	0.94
农田 50 年-2	6825	6438	6236	10.46	0.94
农田 50 年-3	7401	6726	6555	10.55	0.94
平均值	6780	6554	6359	10.50	0.94



**Figure 1.** PCoA analysis of soil bacterial community structure of different sites. M: natural grassland; U7: 7-year upland; U50: 50-year upland (the same as below)

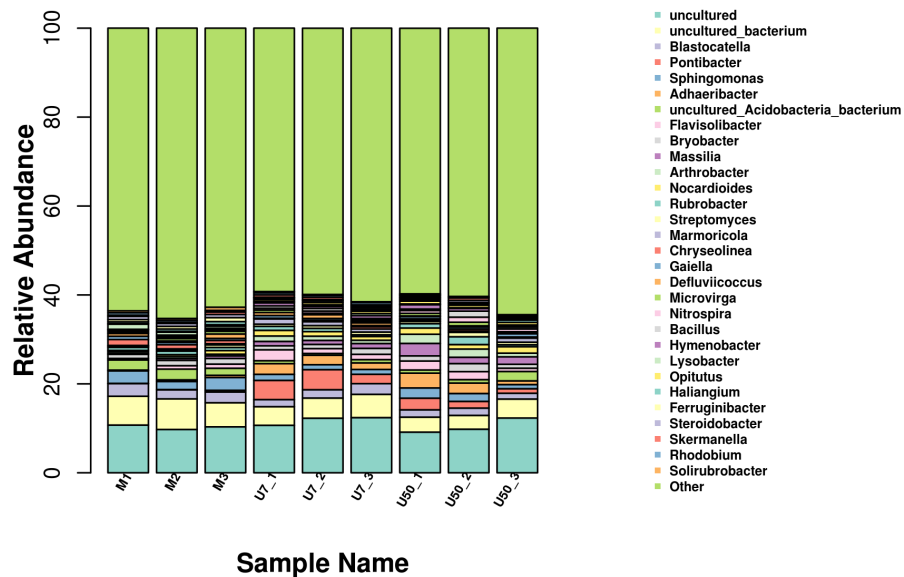
**图 1.** 不同样地细菌群落结构的 PCoA 分析。M: 天然草地; U7: 7 年农田; U50: 50 年农田(下同)

### Top taxonomy heatmap at Phylum level

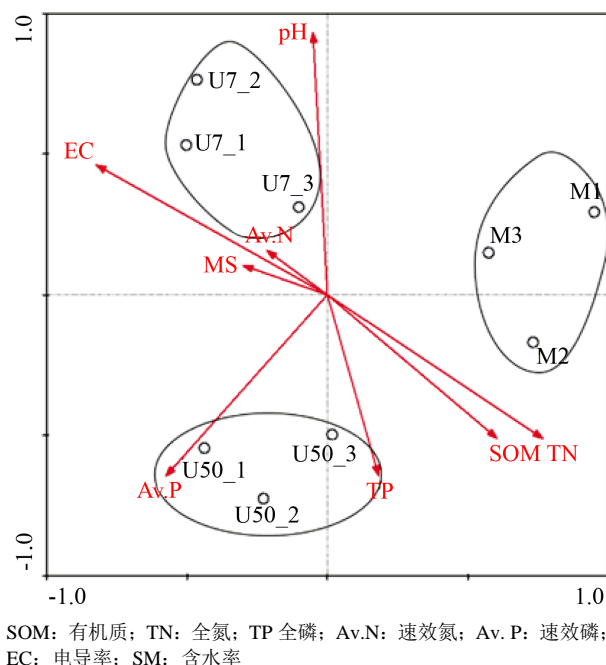


**Figure 2.** The relative abundance of dominant phyla in different sites  
**图 2.** 不同样地细菌优势门相对优势度

### Top taxonomy distribution at Genus level



**Figure 3.** The relative abundance of dominant genera in different sites  
**图 3.** 不同样地细菌优势属相对优势度



**Figure 4.** CCA analysis between the structure of bacterial community and soil environmental factors

**图 4.** 土壤细菌群落结构与环境因子的 CCA 分析

件下(50 年农田)全 P 和速效 P 对细菌群落结构影响最大。根据 CCA 分析,也可以将所有样品分为三个簇,与 PCoA 的分析结果一致。

#### 4. 讨论

地面植被类型和土壤性质(如土壤类型、养分状况、含盐量、pH 等)对微生物群落结构有显著影响[9] [10]。在本研究中,7 年生农田和 50 年农田均是由天然草地开垦而来。天然草地被开垦为农田后,经过翻耕作业,植被遭到彻底破坏。这个过程强烈地改变了土壤理化性质和微生物生物活性以及有机质的分解速度[11],导致土壤有机质和全 N 含量大幅度下降(表 1)。同时变化幅度较大的是土壤电导率大幅度提高,说明草地垦荒可加剧土壤的盐渍化进程。其主要原因是,植被破坏后导致地面蒸发量加大,地下水携带盐分沿土壤毛细管可达到地表层,本地区干旱少雨,盐分逐渐积累在土壤表层[12]。土壤理化性质的变化是导致土壤微生物群落结构变化的直接原因。一些文献也报道了土壤利用方式改变和施肥可导致土壤性质和微生物群落结构的改变[13] [14] [15]。PCoA 和 CCA 分析证明了草地利用方式改变后,土壤微生物群落结构产生明显分异,并随着耕作时间的延长,群落结构也出现逐渐变化的特点(图 2, 图 4)。

高通量测序及后续的物种分类学分析表明,天然草地开垦为农田后,不同样地的优势菌组成并未改变,但不同优势菌的相对优势度发生了此消彼长的特点。因此微生物群落结构的变化不表现为种类组成的差异,而主要体现在优势种群的数量比例变化上。Jangid 等(2011)的研究表明[16],土壤微生物群落的物种组成主要取决于土地利用的历史,而植被类型和土壤性质对其影响较小。Suleiman 等(2013)也报道土地利用历史对土壤微生物群落结构有重要影响,因为土壤中可能大量存在与土壤类型无关,而且对环境变化不敏感的物种[17]。本研究的结构与以上文献报道一致,表明在相同土壤类型的条件下,土地利用方式的改变对土壤微生物群落的物种组成没有显著影响,而显著改变土壤优势菌的相对优势度。因此,天然草地利用方式变化对土壤微生物群落的影响主要体现在数量的变化。

## 5. 结论

1) 科尔沁天然草地开垦为农田后, 土壤理化性质发生显著变化, 有机质和全 N 含量迅速下降, 含盐量提高。

2) 天然草地开垦农田对土壤微生物群落结构有显著影响, 主要体现在优势种群的数量变化上, 而对物种组成没有明显影响。土壤理化性质对微生物群落结构的形成起重要作用。

3) *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Thaumarchaeota* 和 *Nitrospirae* 是本地区的优势菌群。

## 基金项目

国家重点研发计划项目(2016YFC0500803)。

## 参考文献 (References)

- [1] 任天志. 持续农业中的土壤生物指标研究[J]. 中国农业科学, 2000, 33(1): 68-75.
- [2] 李忠佩, 吴晓晨, 陈碧云. 不同利用方式下土壤有机碳转化及微生物群落功能多样性变化[J]. 中国农业科学, 2007, 40(8): 1712-1721.
- [3] 张萍, 刀志灵, 郭辉军, 等. 高黎贡山不同土地利用方式对土壤微生物数量和多样性的影响[J]. 云南植物研究, 1999, 31(11): 84-89.
- [4] 徐华勤, 章家恩, 冯丽芳, 等. 广东省不同土地利用方式对土壤微生物量碳氮的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(8): 4112-4118.
- [5] 苏永中, 赵哈林. 科尔沁沙地不同土地利用和管理方式对土壤质量性状的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(10): 1681-1686.
- [6] 旭日干, 主编. 李博文集[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [7] 林大仪. 土壤学实验指导[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004.
- [8] Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., *et al.* (2007) Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**, 5261-5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- [9] Zhang, Y., Cao, C.Y., Peng, M., *et al.* (2014) Diversity of Nitrogen-Fixing, Ammonia-Oxidizing, and Denitrifying Bacteria in Biological Soil Crusts of a Revegetation Area in Horqin Sandy Land, Northeast China. *Ecological Engineering*, **71**, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.07.032>
- [10] Mendes, L.W., Brossi, M.J.D., Kuramae, E.E., *et al.* (2015) Land-Use System Shapes Soil Bacterial Communities in Southeastern Amazon Region. *Applied Soil Ecology*, **95**, 151-160. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.005>
- [11] Su, Y., Zhao, H., Zhang, T., *et al.* (2004) Soil Properties Following Cultivation and Non-Grazing of a Semi-Arid Sandy Grassland In Northern China. *Soil & Tillage Research*, **75**, 27-36. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00157-0)
- [12] 曹成有, 蒋德明, 朱丽辉, 等. 科尔沁沙地草甸草场退化的原因与植物多样性变化[J]. 草业学报, 2006, 3(5): 18-26.
- [13] Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., *et al.* (2008) The Influence of Soil Properties on the Structure of Bacterial and Fungal Communities across Land-Use Types. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 2407-2415. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021>
- [14] Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Aanderud, Z., *et al.* (2013) Temporal Variability in Soil Microbial Communities across Land-Use Types. *ISME Journal*, **7**, 1641-1650. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.50>
- [15] Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., *et al.* (2015) Distinct Soil Microbial Diversity under Long-Term Organic and Conventional Farming. *ISME Journal*, **9**, 1177-1194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.210>
- [16] Jangid, K., Williams, M.A., Franzluebbers, A.J., *et al.* (2011) Land-Use History Has a Stronger Impact on Soil Microbial Community Composition than Aboveground Vegetation and Soil Properties. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 2184-2193. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.06.022>
- [17] Suleiman, A.K.A., Manoeli, L., Boldo, J.T., *et al.* (2013) Shifts in Soil Bacterial Community after Eight Years of Land-Use Change. *Systematic and Applied Microbiology*, **36**, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.007>