

Study on the Characteristics of Soil Microbial Community Structure in Alpine Desertification Grassland

Yunxu Peng, Song Bai

College of Chemistry & Environment Protection Engineering, Southwest Minzu University, Chengdu Sichuan
Email: songbai1240@126.com

Received: Oct. 2nd, 2019; accepted: Oct. 23rd, 2019; published: Oct. 30th, 2019

Abstract

Process on the alpine grassland degradation has a great effect on soil ecosystem due to the climate change and humans activities. At present, the physical, chemical and biological characteristics of the soil in the alpine desertification grassland have been studied so far, and the attention to the soil microbial characteristics is less, especially the understanding of the characteristics of the soil microbial community and the distribution of the microbial diversity in the sandy grassland. In this study, alpine sandy grassland on the eastern margin of Qinghai-Xizang Plateau was selected as the research object; using Illumina high throughput sequencing technique, the 16S rRNA V3-V4 area was applied to sequence the sandy soil, and the characteristics of microbial diversity and community structure in sandy soil were studied. The results showed that there were 25 phylums, 54 classes, 99 orders, 197 families, 340 genuses, 653 species, and 1331 OTUs in the tested soil of study area. Among them, there were three dominant bacteria with more than 10% proportion, among which *Actinobacteria* accounted for the highest (29.34%), and the *Proteobacteria* accounted for 26.75%; *Acidobacteria* represented 16.43% of the total. At the genus level, the dominant genus is *norank_c_Acidobacteria*. All in all, the soil microbial diversity in sandy land was low and soil desertification has an inhibitory effect on microorganisms in soil.

Keywords

Soil Desertification, Microorganism, High Throughput Sequencing, Community Structure Characteristics

高寒沙化草地土壤微生物群落结构特征研究

彭云煦, 柏松

西南民族大学化学与环境保护工程学院, 四川 成都
Email: songbai1240@126.com

摘要

气候变化与人为活动引起的高寒草地退化对草地土壤生态系统产生了重要影响。迄今对高寒沙化草地土壤的物理、化学和生物学特性研究较多, 而对土壤微生物特性的关注较少, 特别是对沙化草地土壤微生物群落结构特征和微生物多样性分布特征的了解尚不深入。为此, 本研究选择青藏高原东缘高寒沙化草地为研究对象, 采用Illumina高通量测序分析技术, 选择16S rRNA V3-V4区对沙化草地土壤进行测序分析, 研究沙化土壤中微生物多样性和群落结构特征。结果表明: 研究区供试土壤细菌有25门, 54纲, 99目, 197科, 340属, 653种, 1331OTUs。其中组内占比含量超过10%的优势菌门共有3个门类, 其中放线菌门Actinobacteria占比最高, 为29.34%。其次为变形菌门Proteobacteria, 占26.75%, 最后为酸杆菌门Acidobacteria, 占16.43%, 在属水平上的优势菌属为酸杆菌属norank_c Acidobacteria。总体而言, 沙化草地土壤中微生物多样性总体不高, 草地沙化过程对土壤中的微生物可能产生了抑制作用。

关键词

土壤沙化, 微生物, 高通量测序, 群落结构特征

Copyright © 2019 by author(s) 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

我国草地面积 4 亿公顷, 占国土总面积 41.6%, 被誉为国土半壁河山的“绿色屏障”, 承载着保持水土、涵养水源、防沙固沙等重要的生态功能。高寒草地占青藏高原总面积的 30%, 是青藏高原地区的主要植被类型。近年来, 受气候变化和人类活动的双重影响, 高原地区的高寒草地沙化趋势加剧, 对区域的生态安全构成了潜在威胁。当前, 国内外在高寒沙化草地的防沙治沙, 人工植被恢复, 沙化地土壤功能改善与提升等方面开展了大量研究, 尤其关于沙化草地土壤与植被相互关系及互作机制的研究报道日益增多。大量研究报道显示, 沙化草地退化过程对草地根际土壤容重[1]、孔隙度、团聚体含量和稳定性[2]、土壤养分循环[3]、土壤酶活性[4]、微生物数量和活性[5]等各种物理、化学及生物学特性均有不同程度的影响。

然而, 以往针对高寒草地的研究主要集中于草地沙化现状调查、沙化成因分析、沙化草地植被恢复和重建等宏观方面, 从微观层面开展的系统研究十分有限。沙化草地土壤是由于长期以来过度放牧, 生态破坏等原因累积形成的, 是多方面原因综合作用的终产物, 具有区别于其它土壤退化类型的鲜明特点。土壤微生物作为土壤环境中大多数生理生化反应的主要参与者, 对土壤的性状、结构和功能起着重要的改善和提升作用。土壤微生物既能保护植物根系和减少病原菌和虫害的入侵, 又能提升土壤的生态功能并保持土壤生态系统保持平衡。因此, 系统研究草地退化过程中土壤微生物多样性的变化特征, 有助于深入了解草地退化对土壤微生物的影响。

目前, Illumina 测序分析技术是土壤微生物多样性研究领域应用最广泛的测序技术之一。通过该分析方法, 可以从土壤样本中直接获取土壤微生物的 DNA 并进行数据文库的构建与测序, 再通过对比已有的细菌数据库, 进一步利用测序数据分析土壤微生物群落, 从而直观地展示微生物群落的复杂程度和多样化程度。

为此, 本研究拟以青藏高原东缘高寒沙化草地土壤为分析对象, 通过高通量测序手段对沙化地土壤

微生物群落特征进行分析, 以期深入了解沙化草地土壤的微生物多样性特征, 为揭示沙化土壤中土壤微生物对草地退化过程的适应机理提供科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 样品采集

本研究中供试沙化土壤取至四川省阿坝藏族羌族自治州若尔盖县辖曼镇, 地处四川盆地北部, 若尔盖县境西部, 西隔黄河与甘肃省相望, 距若尔盖县城约 50 公里。采样点地理坐标 N33°30'18.03", E102°27'53.30"。研究区气候年均温度在 1°C~3°C, 年均降雨量约 650 mm。降雨量 80%集中于 5~8 月, 冻土深度可达 50 cm 以下。在 2018 年 8 月在研究区单个样地内选取 3 块 10 cm × 10 cm 采样点, 采集沙化土壤样品, 去除肉眼可见的小石块和植物根部, 置于冰袋中冷藏, 至 -20°C 下保存, 供试土壤样品送至测序公司开展土壤 DNA 测序项目分析。

2.2. 高通量测序

沙化草地土壤样品的测序分析过程如下: 首先利用 MP bio 公司的土壤 DNA 提取试剂盒 FastDNA® Spin Kit for Soil 对土壤样本的 DNA 进行提取, 再利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测抽提 DNA; 然后于 V3-V4 测序区域选择对应的引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGACTCHVGGGTWTCTAAT-3'), 再进行扩增与产物的纯化, 此后参照电泳定量结果, 将 PCR 产物用蓝色荧光定量系统定量检测后按每个样本测序量的要求, 在含 4 μL 5 × FastPfu 缓冲液、2 μL 2.5 mm dNTPs、0.8 μL 引物(5 μM)、0.4 μL FastPfu 聚合酶和 10 ng 模板 DNA 的三份 20 μL 混合物中进行相应比例混合。最后构建相对应的 PE 文库并进行相应的 Illumina 测序分析[6]。本次测序选择对照 silva128/16s-bacteria (Release128 <http://www.arb-silva.de>)数据库, 以获得土壤微生物群落的组分情况。

2.3. 分析方法

利用 FLASH 和 Trimmomatic 软件可对原始测序样本进行数据统计并对数据进行除杂和优化。对于 OTU 分析来说, 可根据不同的相似度水平, 选择相应软件平台对所有序列进行 OTU 划分。通常情况下, 对 97% 相似水平下的 OTU 进行生物信息统计分析[7] [8] [9]。Alpha 多样性则利用 Mothur 算法计算不同随机抽样下的 Alpha 多样性指数, 再利用 R 语言绘制稀释曲线图[10] [11]。对于细菌群落结构组分占比的饼形图, 基于对比细菌数据库后的数据表, 利用 R 语言工具进行作图。

3. 结果与分析

3.1. 测序数据质量分析

对比细菌 16S rRNA V3-V4 区的测序分析, 3 个土壤样品获得的原始序列数累计达 324,352, 其序列平均长度为 438.4 bp。其中优化序列数达到 162,176 条, 大于 34,000 条, 表明选取的样本测序效果较好, 能够提供优质和有效的数据, 以满足后续物种多样性及丰度的功能分析, 结果见表 1。

Table 1. High throughput sequencing data

表 1. 高通量测序数据

| 样本名称 | 原始序列 | 优化序列 | 原始碱基数 | 优化碱基数 |
|--------|---------|---------|------------|------------|
| 沙化土壤样品 | 324,352 | 162,176 | 97,630,152 | 71,101,661 |

稀释曲线主要反映样本测序数据量的合理性, 选取 97% 相似程度的 OTU 水平, 利用 Mothur 算法计

算其不同随机抽样下的 Alpha 多样性指数, 最后绘制成曲线。其中, 采用 Alpha 多样性指数中的 Shannon 指数算法并制图。稀释曲线如图 1 所示。由图 1 可见, 在所测定的 3 个样品当中, 在测序数量 1300 以前 Shannon 指数值随着测序数据量的增加呈迅速趋势, 而当测序数据量达到 5000 左右时, 增长幅度放缓, 稀释曲线曲线呈现平坦, 测序数量大于 10,000 后 Shannon 指数值已没有明显增加, 说明该测序数据足够大, 可以满足后续的分析要求。

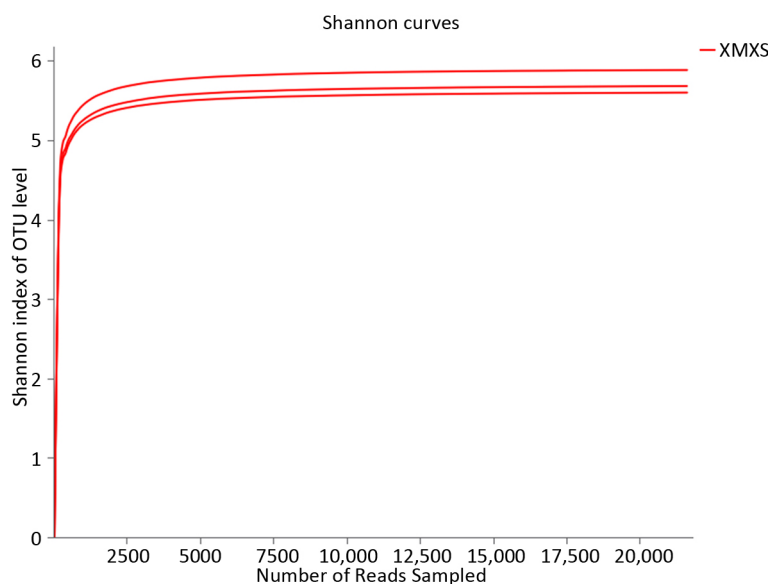


Figure 1. Rarefaction curve

图 1. 稀释曲线

3.2. 细菌群落组成分析

沙化土壤样品经检测得到有细菌 25 门, 54 纲, 99 目, 197 科, 340 属, 653 种, 1331OTUs。因门水平能大概区分样品中的细菌群落组分分布所以选择门水平进行分析。由图 2 门水平细菌群落组分分布饼图可知, 样本中组分比例大于 10% 的优势菌门有 3 种。全体组分中占比最大的为放线菌门 *Actinobacteria*, 其组分含量高达 29.34%, 其次为变形菌门 *Proteobacteria* 和酸杆菌门 *Acidobacteria*, 其组分占比含量分别为 26.75% 和 16.43%。这 3 种菌门的占比之和高达 72.52%, 在沙化土壤样品中占有主导地位。在剩下的菌门当中除 *Chloroflexi* (9.65%) 和 *Firmicutes* (9.6%) 以外其余组分含量均小于 5%, 所占比例较低。其余菌门按组分含量从大到小依次为: 芽单胞菌门 *Gemmatimonadetes* (4.57%), 硝化螺旋菌门 *Nitrospirae* (1.25%), 拟杆菌门 *Bacteroidetes* (1.19%), others (1.22%)。

由于供试土样微生物在门水平上的变化明显, 所以进一步向更低分类学水平分析, 选择在属水平上进行分析。如图 3 所示, 各类菌属由多到少依次有 *norank_c_Acidobacteria* (8.14%)、*Bacillus* (6.08%)、*RB41* (5.04%)、*norank_c_KD4-96* (4.05%)、*unclassified_f_Micrococcaceae* (3.97%)、*norank_f_Gemmatimonadaceae* (3.88%)、*Bradyrhizobium* (3.06%)、*norank_o_Acidimicrobiales* (2.50%)、*Sphingomonas* (2.43%)、*Streptomyces* (1.98%)、*norank_f_Elev-16S-1332* (1.67%)、*Solirubrobacter* (1.62%)、*Roseiflexus* (1.34%)、*Sporosarcina* (1.33%)、*norank_f_Xanthobacteraceae* (1.25%)、*Nitrospira* (1.25%)、*norank_f_Nitrosomonadaceae* (1.24%)、*norank_c_Actinobacteria* (1.23%)、*Variibacter* (1.23%), 以及其他未命名的细菌组分占比 42.29%。其中, 绝大多数的菌属组分占比都小于 5%, 酸杆菌属属于样本中的优势菌属。对比门水平上的 3 种优势菌门, 其优势菌属也是优势菌门下的酸杆菌属。

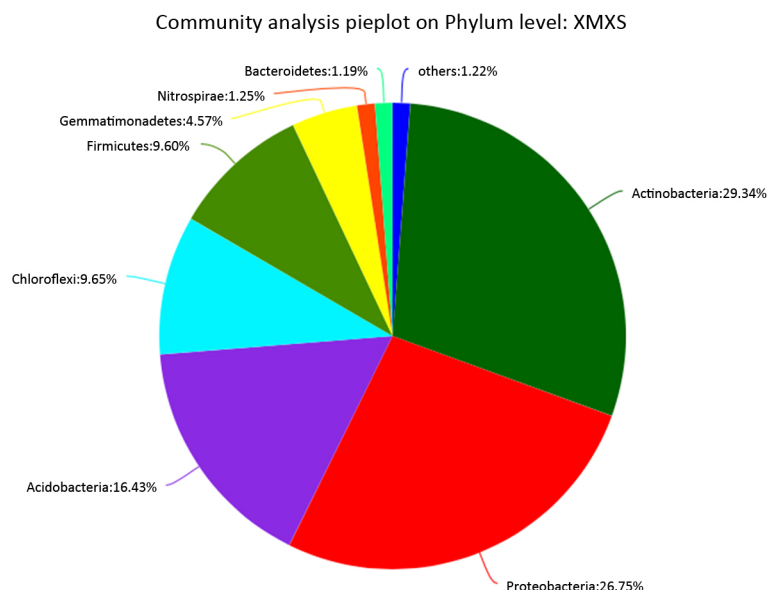


Figure 2. Bacterial community components at phylum level
图 2. 门水平上的细菌群落组分

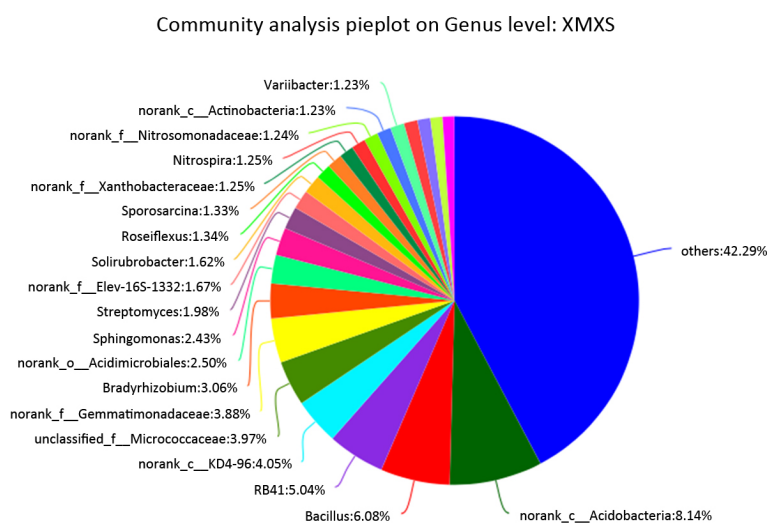


Figure 3. Bacterial community components at class level
图 3. 属水平上的细菌群落组分

3.3. 细菌群落的多样性分析

微生物群落多样性可根据分析序列数, 利用多样性指数来表示, 其表示方法包括物种的丰富度、多样性和盖度等。其中, 样本微生物群落丰富程度的高低可由 Sobs、Chao1、Ace 指数表示, 群落多样性大小由 Shannon、Simpson 指数表示, 群落盖度高低由 Coverage 指数表示。各项多样性指数分析结果见表 2。

Table 2. Analysis results of microbial community diversity index

表 2. 微生物群落多样性指数结果

| 样本名称 | 多样性指数 | | | | | |
|------|---------|------|-------|--------|----------|-------|
| | Sobs 指数 | 香农指数 | 辛普森指数 | Ace 指数 | Chao1 指数 | 覆盖率指数 |
| 供试土壤 | 1131.3 | 5.7 | 0.01 | 1256.2 | 1275.3 | 0.991 |

由表 2 分析数据可见, 在高寒沙化土壤中, Sobs、Ace、Chao1 指数是反应其群落丰富度, 其分析结果分别为 1131.3, 1256.2, 1275.3。由于微生物群落的丰富度随其指数数值的增加而增加, 且各项指数分析结果均小于 1300, 表明样本中群落丰富度较低。此外, 由表 2 可见, Simpson 数值为 0.01, 而指数数值越低, 说明群落多样性越低, Shannon 数值反之[12] [13] [14] [15]。Simpson 指数数值为 0.010, 说明供试土样的微生物多样性较低。此外, 群落覆盖率为 99.1%, 达到了 99% 以上, 表明微生物的物种信息基本得到了充分的体现, 分析结果可信度较高。

4. 讨论与结论

高通量测序平台为现今的研究提供了一个高准确性、高效率的途径, 让我们可以通过测定土壤中的 DNA 碎片, 从而深度了解土壤中微生物群落的结构组成。本文以沙化地土壤为研究对象, 运用高通量测序分子生物学技术和统计分析方法对土壤微生物多样性进行综合分析。本研究结果表明: 研究区土壤样本中分布多于 10% 的微生物菌门有 3 种, 分别为放线菌门 *Actinobacteria*、变形菌门 *Proteobacteria* 和酸杆菌门 *Acidobacteria*。在属分类水平上, 优势菌属为酸杆菌属 *norank_c_Acidobacteria*。供试土壤微生物群落的覆盖度较大, 但其丰富度与群落多样性较低。原因可能是土壤沙化过程影响了根际土壤的质量和根际微环境, 抑制了土壤微生物的生长和繁殖, 降低其微生物的多样性, 从而使其占比发生相应变化。

本研究对高寒沙化草地土壤的微生物多样性进行了初步分析, 但仅仅探讨了土壤微生物的多样性特征, 对研究沙化土体的优势微生物功能特征尚未开展深入研究。今后的研究工作应围绕以下几个方面的问题展开: 1) 对比研究不同沙化程度的高寒草地土壤微生物群落结构组成, 探求不同沙化程度对土壤微生物多样性特征的影响以及土壤微生物特征对草地沙化过程的响应机制[16]。2) 加强沙化草地根际土壤微生物学特性的研究, 特别是根际土壤微生物群落结构特征, 宏基因组和宏蛋白组等方面的研究, 这将有助于从微观层面解释沙化草地植被恢复的微生物学机制。3) 沙化地适生植物恢复对根际土壤微生物多样性及群落结构特征等方面影响的相关研究并不深入。例如, 在沙化草地植被恢复的不同阶段, 根际土壤微形态和微结构特征如何尚不清楚, 沙化草地适生植物根系分泌物对根际土壤微环境的影响也知之甚少, 亟需加强该方面的深入研究。4) 从沙化地适生植物的形态特征、光合生理生态等方面的变化特征入手, 深入探讨不同地域、不同类型沙化草地恢复植物的相关特征对根际土壤微生物群落结构特征及其生态功能的影响[17]。

基金项目

国家自然科学基金(31400419); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目资助(2019NYB10)。

参考文献

- [1] Huang, D., Wang, K. and Wu, W.L. (2007) Dynamics of Soil Physical and Chemical Properties and Vegetation Succession Characteristics during Grassland Desertification under Sheep Grazing in an Agro-Pastoral Transition Zone in Northern China. *Journal of Arid Environments*, **70**, 120-136. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.12.009>
- [2] 江仁涛, 李富程, 沈淞涛. 川西北高寒草地退化对土壤团聚体组成及稳定性的影响[J]. 水土保持研究, 2018, 25(4): 36-42.
- [3] 乔方. 科尔沁沙地南缘沙化土地治理区有林地土壤养分研究[J]. 内蒙古林业调查设计, 2017(6): 32+78-82.
- [4] 舒向阳, 胡玉福, 杨雨山, 等. 川西北草地沙化对土壤可溶性有机氮及酶活性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2018(1): 66-71.
- [5] 舒向阳, 胡玉福, 蒋双龙, 等. 川西北沙化草地植被群落、土壤有机碳及微生物特征[J]. 草业学报, 2016, 25(4): 48-57.
- [6] 金露. 竹茹多糖预防小鼠膳食诱导型肥胖及调节其肠道菌群的功效研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学,

2017.

- [7] 张文锋, 时红, 才硕, 武琳, 胡秋萍, 徐涛, 张昆. 不同灌溉和栽培方式对红壤性水稻土微生物群落结构及多样性的影响[J]. 江西农业学报, 2018, 30(3): 11-16.
- [8] 李博超. 辽河口沉积物反硝化相关功能基因丰度和多样性分析[D]: [硕士学位论文]. 大连: 大连海洋大学, 2017.
- [9] 刘丹. 质粒介导的喹诺酮抗性基因在环境污水中的分布及相关耐药肠道细菌的筛选[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东大学, 2014.
- [10] 李富华. 桑葚酚类化合物及其降血糖活性研究[D]: [博士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- [11] 刘相君. 耐铅锌菌群的鉴定及其去除铅锌特性研究[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 中南林业科技大学, 2017.
- [12] 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蔗草湿地土壤微生物群落多样性的季节变化[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(5): 718-727.
- [13] 周利. 饲料和水环境中抗生素的长期暴露对斑马鱼生理功能的影响[D]: [硕士学位论文]. 上海: 华东师范大学, 2017.
- [14] 汤丹娜. 硫磺/石灰石自养反硝化系统硝酸盐去除性能及 N_2O 产生规律研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 长安大学, 2017.
- [15] 刘恒源. 电流对生物—电化学反应反硝化工艺的影响机制[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国地质大学, 2018.
- [16] 苟燕妮, 南志标. 放牧对草地土壤微生物的影响[J]. 草业学报, 2015, 24(10): 194-205.
- [17] 张超. 黄土丘陵区根际微生物对退耕地植被恢复的响应[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国科学院研究生院, 2013.