

人工杨树林对长江中游芦苇滩地土壤细菌多样性影响的研究*

严 炎¹ 孙启祥² 韦朝领^{1**}

1. 安徽农业大学茶与食品科技学院/资源与环境学院, 合肥 230036; 2. 中国林业科学院林业研究所, 北京 100091

摘要 以长江中游芦苇滩地为研究对象, 利用微生物分离培养计数方法和 PCR-DGGE 技术重点研究了人工杨树林对芦苇滩地土壤细菌种群的影响。结果表明: 与芦苇地相比, 人工杨树林根际土、根表土和 0—10 cm 土层中的氮、速效磷和总有机碳的含量都明显降低; 人工杨树林下根际土中的微生物数量都比芦苇地的低, 而其根表土中则是细菌、真菌数量低于芦苇地, 放线菌比芦苇地高; 就 4 种功能细菌来说, 人工杨树林根际土的纤维素菌、反硝化菌、硝化细菌和氨氧化细菌的数量则比芦苇地低, 而根表土中除了氨氧化细菌外, 其他 3 种功能细菌含量又比芦苇地的高。4 种功能细菌数量在不同的土壤剖面中的分布也各不相同: 在 0—10 cm 土层中, 人工杨树林的纤维素菌和氨氧化细菌的数量高于芦苇地, 而其余 2 种功能菌则低于芦苇地; 在 10—25 cm 土层中, 人工杨树林的纤维素菌和硝化细菌含量低于芦苇地, 反硝化菌的含量却高于芦苇地, 而氨氧化菌含量相同; 在 25—60 cm 土层中, 除了纤维素菌, 其他 3 种功能细菌含量都是人工杨树林低于芦苇地。通过系统进化树分析发现, 滩地中普遍存在的细菌类群为 α 变形菌纲、 β 变形菌纲和硝化螺旋菌纲, 而人工杨树林和芦苇地的根表土、根际土和 0—10 cm 土层均存在各自专有的细菌种群, 表明人工杨树林对芦苇滩地土壤中细菌种群产生了一定的影响。

关键词 人工杨树林 长江中游 芦苇滩地 细菌多样性 PCR-DGGE

滩地作为连接河流水体和内陆生态系统的交错地带, 具有显著的边缘效应, 对周边环境的变化也相当敏感^[1-3], 是地球上极其独特的生态系统类型。长江滩地包括江滩、洲滩、湖滩 3 种类型, 其中江滩由于生态环境季节性变化大, 江水水样变化不定, 加上开放性的状态, 是血吸虫的中间宿主——钉螺的主要孳生环境^[4], 加上传统的灭螺方法收效甚微, 钉螺大量孳生, 给血吸虫病的防治带来极大困难。我国在江河滩地方面的研究起步较晚, 但随着近年来对其重要性认识的逐步加深, 对江河滩地治理保护的重视程度也越来越高, 特别是生长芦苇的滩地受到了极大的关注。随着“以林为主, 灭螺

防病, 综合治理和开发滩地”的林业血防生态工程建设的实施, 很多沿江的芦苇滩地上形成了成片以杨树为主的人工林, 从而改善了滩地的生态环境, 抑制钉螺孳生^[5,6]。

土壤微生物作为江河滩地生态系统的重要组成部分, 控制着土壤生态系统的许多过程, 行使的功能包括: 有机物料的分解, 土壤生物地球化学循环, 土壤结构的形成, 污染物的脱毒等^[7], 其中土壤微生物群落多样性对土壤化学特性的变化非常敏感, 其微生物多样性指数可作为衡量土壤质量及评价土壤生态系统可持续性的生物学指标^[8]。而随着江淮人工杨树林的形成, 滩地植被与以前相比发生了很

2009-05-20 收稿, 2009-07-07 收修改稿

* 国家“十一五”林业科技支撑计划(批准号: 2006BAD03A15)子课题和安徽省优秀青年科技基金(批准号: 08040106840)资助项目

** 通信作者, E-mail: weichl@ahau.edu.cn

大的变化,其凋落物和根系分泌物输入土壤后改变了滩地土壤的理化性质,进而影响原先芦苇滩地微生物的多样性。

目前对滩地生物多样性的研究包括生物多样性现状描述、多样性指标计算以及生物多样性影响分析,如陈义群等研究了4年生杨树人工林对芦苇滩地草本植物群落物种多样性的影响^[9];吴立勋等研究了洞庭湖滩地人工杨树林与草本植物物种多样性关系^[10];崔丽娟等研究了安庆沿江滩地在进行人工造林后其植物群落多样性所发生的变化^[11]。这些研究表明人工造林后增加了滩地湿地环境的异质性,进而明显增加了滩地草本植物群落的物种多样性。此外,还有许多相关研究集中在林地的植被演替、滩地条件下杨树本身的生长与生理生化变化等方面^[12-14],但是有关人工杨树林对滩地土壤微生物多样性研究鲜有报道,尤其是运用微生物分子生态的方法研究滩地微生物多样性的报道更少。因此,研究人工杨树林对长江芦苇滩地土壤微生物多样性的影响,对揭示长江芦苇滩地生态系统中微生物分子多样性特征和环境因子之间的关系,明确导致江河滩地生态系统脆弱和稳定的微生物功能类群差异具有重要意义。

综上所述,本研究通过可培养的方法对人工杨树林和芦苇两种植被下的细菌、真菌、放线菌以及硝化细菌、反硝化细菌、纤维素菌和氨氧化菌等功能细菌进行计数,并以16S rDNA的PCR和变性梯度凝胶电泳(DGGE)相结合,重点探讨在“抑螺防病林”的构建过程中芦苇滩地土壤中微生物数量和细菌种群结构的变化,以期从微观的角度来评价人工杨树林构建后对土壤微生物多样性的影响,并为滩地人工杨树林生态系统的科学利用与管理、提高该系统的稳定、可持续发展和找寻与抑制钉螺滋生有关的微生物因子提供一定的参考。

1 研究地区与研究方法

1.1 研究区域概况

本研究的采样地点选在长江中游湖南省岳阳市君山区段。该区具有典型的亚热带湿润季风气候特征,春季多雨、秋季多旱、冬季严寒。年平均气温16.5—17.0℃,高于10℃的年活动积温在5254.1—

5529.2℃之间,极端低温为-13.7℃,极端最高气温为39.3℃;年平均降水量1200.7—1414.6 mm,年均相对湿度80%左右;年无霜期263.7—276.6 d,年日照时数在1644.3—1813.8 h。滩地土壤为近代河湖冲积物沉淀发育而成的湖潮土,土层深厚,肥力较高,植被多繁茂^[15]。

1.2 研究方法

1.2.1 样品的采集与处理 2008年6月在长江中游湖南省岳阳市君山区段的芦苇江滩地(29°31′23.9″N, 112°55′39.3″E),在同一高程与同一类型土壤上,选择3年生人工杨树林以及自然生长的芦苇地作为取样地点,并从表层开始按照0—10 cm、10—25 cm和25—60 cm分三层分别采取,每个样点相同层次的土样混合在一起。样品采集采用随机多点取样法。采样前,除去地表植被和枯枝落叶,然后铲除表面1 cm左右的表土,以避免地面微生物与土样混杂。

分别取3龄杨树和芦苇根系,抖落掉大块土,用无菌镊子小心刮下附在根系上的土壤,即为根际土,而将其中的根系表层所带的土壤作为根表土。

对用于微生物计数和DGGE分析的土样,采样的全过程保持无菌操作,即用无菌手套采完土样后立即装入灭菌的封口聚乙烯袋,迅速放入冰盒保存,并及时运回实验室进行分析。采集回来的样品分三类处理保存:(i)用于微生物分离培养及计数的土壤样品于4℃保存;(ii)用于土壤DNA提取的样品置于-20℃保存;(iii)用于土壤理化性质分析的土样按四分法自然风干和过筛。

1.2.2 土壤微生物的分离和计数 细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基;放线菌采用改良高氏1号培养基,并以0.1 g·L⁻¹重铬酸钾作为细菌和霉菌的抑制剂;真菌采用孟家拉红培养基,并加以1 mL 30 μg·mL⁻¹的链霉素作为细菌抑制剂。此外,纤维素分解菌、硝化细菌、反硝化细菌和氨氧化细菌则均采用各自对应的选择性培养基进行分离培养^[16-18]。

细菌、真菌、放线菌和纤维素分解菌采用平板稀释法分别对其进行计数,而硝化细菌、反硝化细菌以

及氨氧化细菌则采用液体培养基, MPN(最大可能计数法)计数^[19-21]. 所有样品以 1:10 比例进行梯度稀释, 设 3 个重复, 其中细菌稀释梯度为 10^{-3} — 10^{-5} , 放线菌为 10^{-1} — 10^{-4} , 其余采用 10^{-1} — 10^{-3} 的稀释梯度, 并于 28—30℃ 培养. 细菌、真菌在第 2—5 天内观察记录; 放线菌、纤维素菌在第 4—7 天内观察记录; 氨氧化细菌、硝化细菌和反硝化细菌则在第 15—20 天内观察记录. 以 3 次计算结果的平均值为测定值, 所有数据都通过测定各自的土壤含水量换算为每克烘干土的含量.

1.2.3 土壤理化分析 土壤水分及物理性质测定均在样品采集后 7 d 内完成. 将土壤样品表面的植物残体和可见的石子剔除, 自然风干, 研磨、过筛, 测定各化学性质指标. 土壤含水量采用烘干法, 即经 105℃ 烘干至恒重后测量, pH 则在采样现场采用比色法测定.

土壤有机碳则在 550℃ 的马弗炉里烘 7 h, 通过干烧法来计算^[22]. 土壤溶解性有机碳(SDOC)则分别用冷水和热水浸提土壤溶液后, 采用 COD 测量的方法进行测定. 而土壤总氮采用凯氏定氮法测定, 总磷则采用 NaOH 熔融法, 此外铵态氮和硝态氮以及速效磷也均参考土壤理化分析的方法测定^[23-25].

土壤微生物量碳(SMBC)用氯仿熏蒸抽提法测定, 采用 $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 氧化 $FeSO_4$ 滴定, 微生物的生物量碳计算所用转换系数 K 为 0.35^[26].

1.2.4 土壤 DNA 的提取 为减少土壤腐殖质等杂物干扰, 采用修正的 Zhou 等^[27] 提取土壤 DNA 的方法: 称取土壤样品 0.5 g, 并与 130 μ L 的 DNA 提取缓冲液(100 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, pH8.0, 100 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, 100 mmol \cdot L⁻¹ Na_3PO_4 pH8.0, 1.5 mol \cdot L⁻¹ NaCl, 1% CTAB)混合, 然后在 -80℃ 和 37℃ 下反复冻融 2 次后加入 10 μ L 蛋白酶 K(10 mg \cdot mL⁻¹)和 150 μ L 的 20% SDS, 随即于 65℃ 水浴 2 h 后常温下离心, 将上清液转移到新的 2 mL 离心管中. 再次向剩余的沉淀加入 450 μ L 提取缓冲液和 50 μ L 20% 的 SDS, 涡旋 10 s, 重复上述操作. 将收集的全部上清液与等体积的饱和酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)混合, 离心, 吸取水相转移至另一个 2 mL 离心管中, 再以 0.6 倍体积的

异丙醇 4℃ 沉淀过夜, 室温下 14000g 离心 20 min, 收集沉淀. 最后用预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 将所得的 DNA 重悬于灭菌的超纯水中, 进行核酸定量(NanoDROD-ND1000, 美国)和电泳检测后置于 -20℃ 备用.

1.2.5 PCR 扩增 扩增的上、下游引物分别为 GC-341 f(5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')和 907 r(5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3')^[28,29]. 将每个样品提取的总 DNA 进行适当稀释, 然后分别取 60 ng 的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 反应体积为 50 μ L, 其中上、下游引物浓度分别为 0.2 μ mol/L, dNTP 浓度为 200 μ mol/L, 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}), 2.5 个单位的 *Taq* DNA 聚合酶(Takara). PCR 扩增采用 Touch-down 方法, 其程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 56—51℃ 退火 30 s (每 2 个循环下降 1℃, 至 51℃), 72℃ 延伸 1 min, 共 10 个循环, 最后为 94℃ 变性 1 min, 51℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 共 25 个循环结束后在 72℃ 下延伸 7 min^[30]. 扩增反应结束后取 3 μ L PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳(1.0%)进行检测. 此外, 为了增加微生物多样性, 每个样品同时进行 3 个扩增反应, 混合后用于下一步的 DGGE 分析.

1.2.6 变性梯度凝胶电泳(DGGE) 采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统(DCode Universal Detection System)对 PCR 反应产物进行分离. 从每个样品的 PCR 扩增产物中取 800 ng DNA 加入到 6% 的聚丙烯酰胺凝胶中, 凝胶的变性范围为 45%—70%. 电泳条件为: 在温度 60℃ 和电压 70 V 下, 电泳 16 h; 电泳缓冲液为 0.5 \times TAE. 电泳完毕后, 经 SYBR green I(1:10000 稀释)染色 50 min, 再用超纯水脱色 15 min, 最后用 Bio-Rad 公司的凝胶成像系统(Gel Doc 2000)进行拍照.

1.2.7 DGGE 胶条带的统计与分析 用 Quantity One 软件系统(Bio-Rad)分析 DGGE 条带. 在每个样品泳道上, 只有当条带的光密度大于该泳道上最亮条带的 5% 才作为统计条带. Shannon 指数可以作为比较细菌种群多样性的参数, 其计算原理是, 把

每一个单独的条带看做一个单独菌群，并且该条带的密度等于该菌种的丰度^[31]。我们用 H 代表 Shannon 指数，利用以下公式进行计算： $H = - \sum P_i \ln P_i$ ^[32]，其中 P_i 是指在 DGGE 图谱中条带的相对吸光强度，即 $P_i = n_i / N$ ，其中 n_i 指根据迁移率由小到大排列第 i 条带的吸光峰值， N 指相同泳道内所有条带的吸光峰值之和。

1.2.8 差异条带的序列解析 根据 DGGE 图谱，分别挑选亮度较强的公共条带和差异较大的条带，然后用无菌手术刀片从凝胶上把选定的条带切割下来，随即浸泡于 $50 \mu\text{L}$ $1 \times \text{TE}$ 缓冲液 (pH 8.0)，并置于 4°C 冰箱约 8 h。用所得的浸提液作为模板进行 PCR 扩增，用于扩增的上、下游引物分别为不含 GC 缺子的 341 f (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') 和 907 r，反应体系的体积为 $50 \mu\text{L}$ ，组成与上述相同。PCR 扩增程序为： 94°C 预变性 5 min， 94°C 变性 1 min， 51°C 退火 1 min， 72°C 延伸 3 min，共 25 个循环，最后在 72°C 下延伸 7 min。将 PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒 (TaKaRa) 进行纯化后与克隆载体 (pMD 18-T) 连接，然后转化大肠杆菌 DH5 α 进行培养，再通过蓝白斑筛选，挑选阳性克隆送上海生工有限公司测序。

1.2.9 系统进化树的构建 从 DGGE 凝胶中分离出的条带经测序后，在 GenBank 数据库中使用 BLASTn 进行比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，选择与目的基因序列同源性最高的 16S rDNA 序列作为参照序列，然后利用 Clustal-X 1.8 软件排列目标序列和参照序列^[33]，最后利用 MEGA4.0 (<http://www.Megasoftware.net>) 软件中的邻接法构建进化树^[34]，系统进化树各分枝的置信度经重

抽样法 (Bootstrap) 1000 次重复检测。

2 结果与分析

2.1 人工杨树林对滩地土壤理化性质的影响

由图 1 可见，人工杨树林根际土的铵态氮、硝态氮和速效磷的含量均低于芦苇根际土，其中以铵态氮为甚，比芦苇根际土低 84.7%，而速效磷降低幅度最小，为 55.0%。

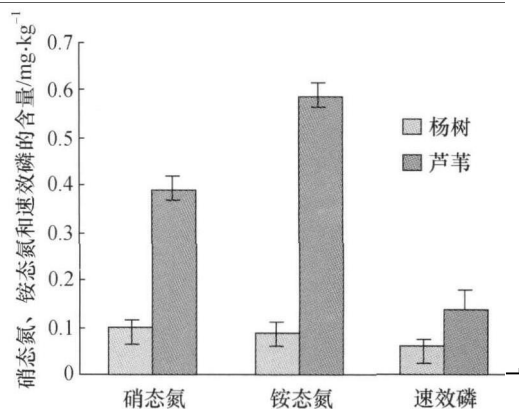


图 1 人工杨树林和芦苇根际土硝态氮、铵态氮和速效磷含量的比较

此外，我们还选取人工杨树林和芦苇地的三个土壤剖面分别对铵态氮、硝态氮以及速效磷的含量进行比较，结果发现 (图 2) 三者含量在 0—10 cm 土层均为人工杨树林较芦苇地低，但降低幅度不同，具体表现为人工杨树林 0—10 cm 土层的硝态氮、铵态氮和速效磷含量比芦苇地分别降低 91.0%，89.5% 和 63.1%；而对于人工杨树林 10—25 cm 和 25—60 cm 土层来说，其铵态氮都要高于芦苇地，而硝态氮和速效磷均比芦苇地低，且速效磷的降低幅度要小于硝态氮。

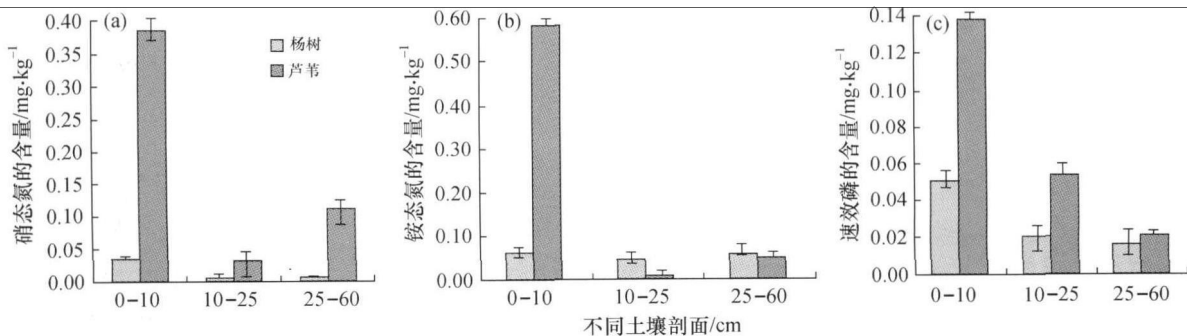


图 2 人工杨树林与芦苇地下土壤剖面中的硝态氮 (a)、铵态氮 (b) 和速效磷 (c) 的含量比较

滩地人工杨树林还改变了土壤的碳含量,从图3可知,人工杨树林根际土的总有机碳比芦苇的根际土低40.6%,同样对于根际土的溶解有机碳而言,也是人工杨树林的低于芦苇地,但是对于根际土微生物量碳(SMBC)来说,则是人工杨树林高于芦苇地,高出幅度达86.6%(图4).

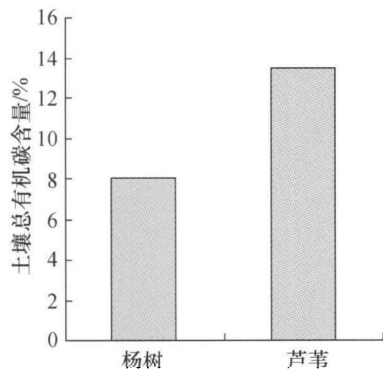


图3 人工杨树林与芦苇根际土总有机碳的比较

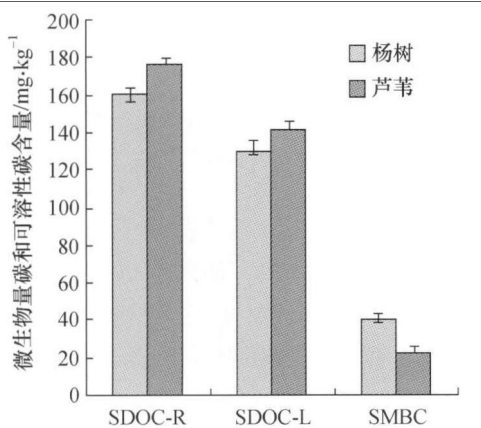


图4 人工杨树林与芦苇根际土微生物量碳和可溶性碳的比较

SDOC-R、SDOC-L和SMBC分别代表热水浸提土壤溶解性碳、冷水浸提土壤溶解性碳和微生物量碳

此外我们测得杨树下的土壤pH值为6.0,而芦苇中为6.5,可见pH略有降低,但是杨树种植后却显著降低了土壤中的含水量,我们测得杨树下的土壤含水量为22.5%,而芦苇下的则为35.85%.

2.2 人工杨树林对滩地土壤微生物数量的影响

挑取各菌种菌落生长数在30—300之间的平板进行计数,结果见表1.由此表可以看出,人工杨树林下根际土中的细菌、真菌和放线菌的数量均低于芦苇地,但是对于根表土来说略有不同,表现为

人工杨树林的细菌和真菌的数量低于芦苇地,而放线菌的数量高于芦苇地.进一步地分析发现,人工杨树林根际土和根表土的细菌数量都显著低于芦苇地,分别低了56.9%和88.8%.由此可见滩地人工杨树林对芦苇滩地细菌、真菌与放线菌的数量产生了较大的影响.

表1 人工杨树林与芦苇根际土与根表土微生物数量比较^{a)}

(单位: $\times 10^4$ 个 \cdot g⁻¹ 干土)

不同植被	细菌	真菌	放线菌
根际土 人工杨树林	2.74 \pm 0.06	0.96 \pm 0.13	0.46 \pm 0.04
根际土 芦苇地	63.6 \pm 0.86	11.1 \pm 0.09	6.67 \pm 0.38
根表土 人工杨树林	72.00 \pm 0.75	9.00 \pm 0.53	12.20 \pm 0.48
根表土 芦苇地	640.00 \pm 0.86	56.00 \pm 0.67	8.00 \pm 0.45

a) 表中数值为平均值 \pm 标准偏差, $n=3$, 表2和表3同.

对土壤细菌中主要的4种功能细菌数量分布的比较表明(表2),人工杨树林根际土中的4种功能细菌均比芦苇地的低,其中以反硝化细菌为甚,其在人工杨树林中的数量仅是芦苇地的2.9%;对根表土来说,除氨氧化细菌外,人工杨树林的纤维素菌、反硝化菌和硝化细菌的数量却比芦苇地的高,其中纤维素菌的数量是芦苇地的5.9倍.

表2 人工杨树林与芦苇根际土与根表土功能细菌的数量比较

(单位: $\times 10^2$ 个 \cdot g⁻¹ 干土)

不同植被	纤维素菌	反硝化菌	硝化细菌	氨氧化菌
根际土 人工杨树林	1.69 \pm 0.11	0.63 \pm 0.37	0.78 \pm 0.23	0.11 \pm 0.45
根际土 芦苇地	17.00 \pm 0.52	21.92 \pm 0.32	6.99 \pm 0.56	11.90 \pm 0.71
根表土 人工杨树林	10.04 \pm 0.71	78.0 \pm 0.56	1.60 \pm 0.07	4.80 \pm 0.29
根表土 芦苇地	1.70 \pm 0.66	28.0 \pm 0.43	1.12 \pm 0.12	6.40 \pm 0.09

此外,我们又具体分析了两种植被下的不同土层剖面的4种功能菌的分布情况,结果表明(表3):在0—10cm土层中,人工杨树林的纤维素菌和氨氧化细菌的数量高于芦苇地,而其余2种功能菌则低于芦苇地,其中硝化细菌数量差异最大,具体表现为芦苇地的是其10.8倍,而差异最小的为纤维素菌,仅高出芦苇地的28%;在10—25cm土层中,人工杨树林的纤维素菌和硝化细菌含量分别低于芦苇地的25%和82.7%,反硝化菌的含量则高于芦苇

地的4.2倍,而氨氧化菌含量没有差别;在25—60 cm土层中,除了纤维素菌,其他3种功能细菌含量都是人工杨树林低于芦苇地。

表3 人工杨树林与芦苇地不同土壤剖面中的功能细菌数量比较 (单位: $\times 10^2$ 个 \cdot g⁻¹ 干土)

土壤剖面	不同植被	纤维素菌	反硝化菌	硝化细菌	氨氧化菌
0—10 cm	人工杨树林	0.25±0.08	1.00±0.61	0.08±0.09	0.09±0.08
	芦苇地	0.18±0.07	1.25±0.05	0.86±0.19	0.03±0.03
10—25 cm	人工杨树林	0.12±0.14	0.59±0.08	0.17±0.09	0.09±0.38
	芦苇地	0.16±0.21	0.14±0.10	0.98±0.30	0.09±0.19
25—60 cm	人工杨树林	0.09±0.06	0.06±0.03	0.09±0.06	0.08±0.03
	芦苇地	0.08±0.04	0.25±0.16	0.50±0.15	0.09±0.12

2.3 人工杨树林对滩地细菌多样性的影响

2.3.1 土壤细菌菌群 DGGE 图谱的比较分析 通过 DGGE 实验,得到 10 个土壤样品细菌菌群的 16S rDNA 基因 V3—V5 区指纹图谱(图 5)。从图谱中的条带分布可以看出,条带分散在整图谱中,说明所选择的电泳条件可以将条带区分开。

根据 DGGE 的原理,每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或操作分类单位 (operational taxonomic unit, OTU) 相对应^[34,35]。从 DGGE 图谱中能够看出,条带 3 分布在所有样品中,而条带 1 分布于除了芦苇根表土的其他所有样品中,条带 2 存在于除芦苇根际土和根表土的其他所有样品中。而在地下 0—10 cm 的土层中,条带 12 和 14 仅出现在芦苇地(图 5 的(a)与(d)),在地下 10—25 cm 土层中,条带 7, 10 和 11 仅在人工杨树林中出现(图 5 的(b)与(e)),而对于地下 25—60 cm 土层,条带 7 与 11 仅出现在人工杨树林,条带 16 和 17 仅出现在芦苇地(图 5 的(c)与(f));对于根际土来说,两者的差异表现为条带 13 仅出现在人工杨树林,而条带 5, 14 和 21 仅出现在芦苇地(图 5 的(g)与(h));而对于根表土,主

要表现在条带 19 和 24 只出现在人工杨树林,条带 22 和 23 只出现在芦苇地(图 5 的(i)与(j))。

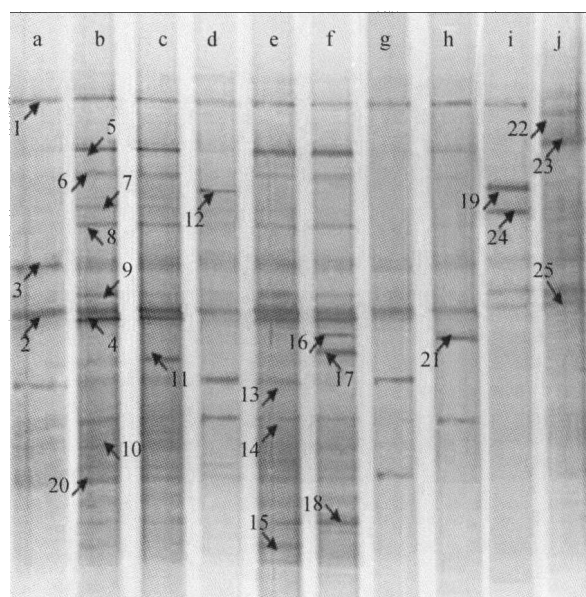


图 5 人工杨树林与芦苇地不同土壤样品中细菌 16S rDNA 片段的 DGGE 图谱

(a)–(c) 分别代表人工杨树林地下 0—10 cm, 10—25 cm 和 25—60 cm 土层; (d)–(f) 分别代表芦苇地地下 0—10 cm, 10—25 cm 和 25—60 cm 土层; (g), (h) 分别代表人工杨树林和芦苇根际土; (i), (j) 则分别代表人工杨树林和芦苇的根表土

2.3.2 土壤细菌菌群多样性的比较分析 Shannon 指数(Shannon index)分析(图 6)表明,对于根表土和根际土来说,人工杨树林与芦苇地的差异较大,如人工杨树林根际土的 Shannon 指数高出芦苇地 15.2%,其根表土则比芦苇地低 27.0%。而在同一土层,二者的 Shannon 指数大小差异较小,如在 0—10 cm 土层中,人工杨树林的比芦苇地的低 2.1%,在 10—25 cm 和 25—60 cm 土层中,则是人工杨树林分别高于芦苇地 5.0%和 3.2%。

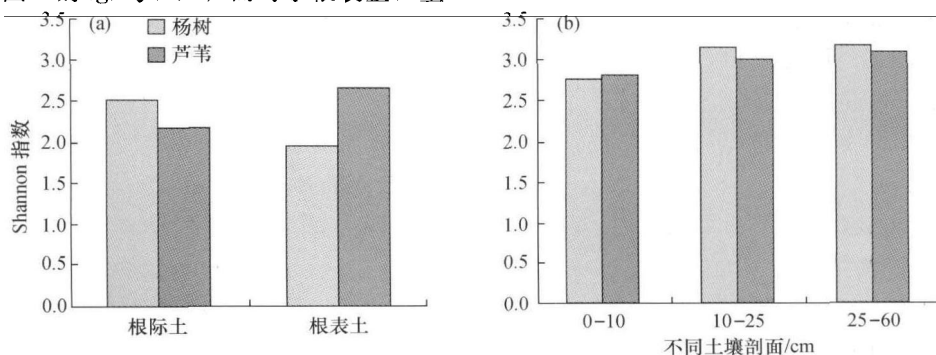


图 6 人工杨树林与芦苇地不同土壤样品中细菌多样性的 Shannon 指数比较 (a) 为根际土与根表土的比较; (b) 为不同土壤剖面的比较

2.3.3 土壤细菌遗传多样性的系统进化树比较分析 我们将以上 DGGE 凝胶中有代表性的 25 个条带进行测序后,得到了 25 个对应的 16S rDNA 部分

序列,并在 GenBank 中进行同源性分析表明,它们与已报道的参比序列最大同源性在 93%—100%之间(表 4)。

表 4 挑选条带的序列与 GenBank 比对的最相似序列信息比较

DGGE 条带	片段长度(bp)	分类群	GenBank 登录号	亲缘最近的系统发育关系	同源性/%
1	551	<i>β-proteobacteria</i>	GQ118891	<i>Uncultured bacterium D3T_134</i> (EF443976)	99
2	544	<i>Nitrospirae</i>	GQ118892	<i>Uncultured Nitrospirae bacterium</i> (EF447064)	99
3	546	<i>α-proteobacteria</i>	GQ118893	<i>Uncultured Hyphomicrobiaceae</i> (EF01919)	100
4	587	<i>γ-proteobacteria</i>	GQ118894	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i> (AY921959)	99
5	543	<i>α-proteobacteria</i>	GQ118895	<i>Uncultured bacterium</i> (AY328784)	99
6	569	<i>Chloroflexi</i>	GQ118896	<i>Uncultured Chloroflexi bacterium</i> (EF032772)	99
7	559	<i>Acidobacteria</i>	GQ118897	<i>Uncultured Holophaga sp.</i> (AJ519388)	97
8	543	<i>Chloroflexi</i>	GQ118898	<i>Uncultured Chloroflexi bacterium</i> (EF464632)	97
9	566	<i>γ-proteobacteria</i>	GQ118899	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i> (AY922165)	99
10	551	<i>Acidobacteria</i>	GQ118900	<i>Uncultured Holophaga sp.</i> (AJ519367)	98
11	548	<i>β-proteobacteria</i>	GQ118901	<i>Uncultured beta proteobacterium</i> (EF664333)	98
12	544	<i>α-proteobacteria</i>	GQ118902	<i>Uncultured Nitrobacter sp.</i> (EF434838)	99
13	566	<i>β-proteobacteria</i>	GQ118903	<i>Uncultured beta proteobacterium</i> (EF662608)	98
14	526	<i>Actinobacteria</i>	GQ118904	<i>Uncultured sheep mite bacterium</i> (AF290481)	94
15	567	<i>Firmicutes</i>	GQ118905	<i>Uncultured bacterium clone 9V95</i> (DQ664106)	93
16	543	<i>α-proteobacteria</i>	GQ118906	<i>Uncultured bacterium</i> (FM201140)	99
17	610	<i>Chloroflexi</i>	GQ118907	<i>Uncultured Chloroflexi bacterium</i> (EF651079)	98
18	607	<i>Acidobacteria</i>	GQ118908	<i>Uncultured Acidobacteriales bacterium</i> (EU449709)	99
19	541	<i>β-proteobacteria</i>	GQ118909	<i>Gallionella sp. enrichment culture.</i> (FJ391503)	97
20	608	<i>β-proteobacteria</i>	GQ118910	<i>Uncultured bacterium</i> (AM949482)	96
21	604	<i>β-proteobacteria</i>	GQ118911	<i>Uncultured beta proteobacterium</i> (EF664333)	98
22	560	<i>Bacteroidetes</i>	GQ118912	<i>Uncultured Flexibacter sp.</i> (DQ279370)	98
23	551	<i>Acidobacteria</i>	GQ118913	<i>Uncultured Holophaga sp.</i> (AJ519367)	98
24	541	<i>Nitrospirae</i>	GQ118914	<i>Uncultured Nitrospirae bacterium</i> (EF019559)	99
25	549	<i>γ-proteobacteria</i>	GQ118915	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i> (EF664293)	98

基于目标序列和参比序列的比较构建了进化树(图 7),从图中可见所挑选的条带主要分为 7 大分类群,包括变形菌(*α-proteobacteria*、*β-proteobacteria*和*γ-proteobacteria*)、放线菌(*Actinobacteria*)、拟杆菌(*Bacteroidetes*)、酸杆菌(*Acidobacteria*)、厚壁菌(*Firmicutes*)、绿弯菌(*Chloroflexi*)和硝化螺旋菌(*Nitrospira*),其中变形菌群占分离条带的比例最高,达到 52.0%;其次是酸杆菌,占 16.0%;而所占比例最少的为放线菌、拟杆菌和厚壁菌群,仅各占总分离条带的 4.0%。进一步分析发现,

DGGE 图谱中的 3 条主条带 1、2 和 3 分别属于 *β-proteobacteria*、*Nitrospirae* 和 *α-proteobacteria*,由此可知这 3 种菌群为试验分析样品土壤中普遍存在的细菌种群;而杨树根表土中分离出的条带 19 和 24 分别属于 *β-proteobacteria* 与硝化螺旋菌(*Nitrospira*)菌群,但在芦苇根表土中没有出现,同样芦苇根表土中分离出的差异条带 22 和 23 分别属于 *Bacteroidetes* 和 *Acidobacteria* 两个菌属,在人工杨树林中没有出现,说明滩地人工杨树林对芦苇滩地土壤中细菌种群产生了一定的影响。

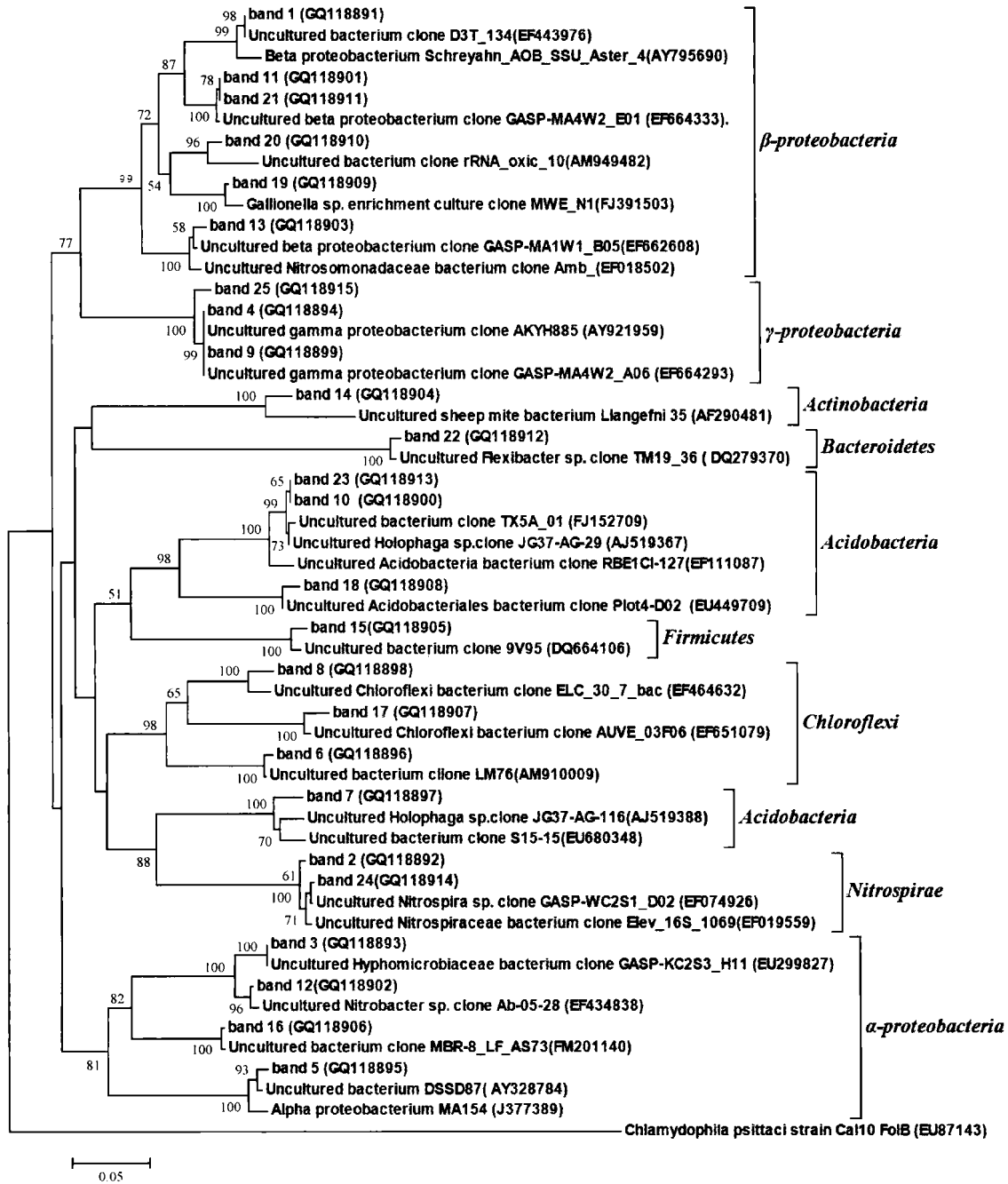


图 7 人工杨树林和芦苇地土壤中分离出的 DGGE 条带测序得到的系统进化树

进化树的拓扑形状采用 neighbor-joining 方法构建；以 *Chlamydomophila psittaci* (EU871432) 为外类群；分枝上的数字为 1000 次 bootstrap 分析所得的值大于 50%；线段 0.05 代表进化距离

3 讨论

已有研究表明，不同的植被可以引起土壤理化性质及土壤细菌多样性和群落组成的变化^[35,36]，甚至森林类型的差异都可以导致土壤微生物群落结构

的不同^[37]。近 10 年来，长江中游芦苇滩地进行了杨树人工林营造，而原先的芦苇属强阳性植物，必须在充足的阳光下才能正常生长，在芦苇地栽植杨树后，随着杨树的生长、郁闭度的增大，生态环境逐年改变，芦苇即随之衰退，出现林下植被的演

替,从而改变了原先芦苇滩地土壤的理化性质。如杨树作为一个速生树种,对水肥的需求是很大的,而实验结果也发现杨树林土壤中的含水量有明显降低的趋势;人工杨树林根际土的有机碳含量低于对照的芦苇地,主要是因为像芦苇之类的草本植被根系盘结,在浅层土壤中有有机质含量相对较高;凋落物和有机质的输入产生差异,也影响了土壤养分元素储量的格局,而微生物在土壤生态系统平衡中起着重要作用,最终也必然会影响土壤微生物的分布情况。本研究表明,长江中游芦苇滩地种植人工杨树林后,与自然生长的芦苇相比,根际土、根表土和0—10 cm土壤中的碳、氮、磷的含量以及土壤中的含水量都显著降低了(图1—3)。同时我们通过微生物的分离培养计数发现,人工杨树林的根际土和根表土的细菌、真菌的数量都比芦苇地的低很多(表1);从4种功能细菌比较来看,仅是人工杨树林根表土中的纤维素菌、硝化细菌和反硝化菌的数量较芦苇地高(表2),而人工杨树林对地下不同土层的功能细菌的影响并不一致(表3),0—10 cm的土层中人工杨树林的纤维素菌和氨氧化细菌的数量高于芦苇地,在10—25 cm土层中则是反硝化菌的数量高于芦苇地,而在25—60 cm土层中又是纤维素菌的数量高于芦苇地。但是仅就根际土而言,芦苇地中的微生物数量普遍比人工杨树林的多,可能与其根际土壤中的氮素含量较高有关。

DGGE是目前环境微生物分子生态中研究微生物多样性的一种重要技术和方法,但是实际应用时并不那么简单,影响DGGE分析结果的因素很复杂,如不同环境样品DNA提取的效率、纯度、PCR扩增所采用的引物、变性梯度凝胶电泳条件及条带的回收效率等对实验结果都产生很大的影响^[38],所以在实验中需要通过对比实验来优化PCR的反应条件,以减少对后续DGGE实验的干扰。本研究的实验初期,引物的加入量各为0.5 μL ,得到的PCR产物电泳检测结果显示目标条带下方出现十分明显的引物二聚体,后续实验结果证明,使用该PCR产物进行DGGE,得到的图谱效果也很差,背景模糊,干扰现象严重。随后,引物的加入量减少至0.25 μL ,并且又加入了占整个反应体系5%的DMSO以增强引物的特异性。这一调整,使得目标条带下方的杂条带明显减少。此外,如果提取

得到的总DNA的模板量过低,PCR反应也不会成功,因而确定最适的DNA模板浓度也是优化PCR反应体系的重要步骤。为确定DNA模板的最适浓度,我们利用核酸定量仪将每个样品提取的总DNA的浓度定量,然后分别进行适当稀释,经过多次PCR检测后最终选取含量为60 ng左右的DNA作为模板的最适量,这对于后面得到比较理想的DGGE结果也起到了关键作用。但是,由于提取到的环境微生物的DNA量毕竟有限,必须进行PCR扩增才能做电泳,而扩增时由于竞争性抑制作用会引起偏好性,为尽量消除这一影响,我们最后将三管平行的PCR产物用适量乙醇沉淀浓缩后再继续进行DGGE实验。

在进行DGGE扩增环境样品时,选择合适的16S rDNA区段的引物非常重要,最常用的是V3区(341f-518r)引物,因为这对扩增的片段相对较短,在进行PCR和DGGE时比较容易,然而带来的另外一个问题就是由于扩增的片段较短,获得的序列信息就少,后续分析得到的差异细菌群落系统进化关系信息不可靠。而选择扩增长片段的引物虽然获得条带的序列信息较多,但是给前期的PCR扩增和DGGE实验带来很大困难,同时获得多样性条带又少^[39]。基于此,本文选用的V3—V5引物扩增片段大小适中,约580 bp,从而兼顾了对细菌多样性和系统进化分析,能够更加准确地反映细菌群落差异信息。

DGGE结果的多样性指数分析显示,人工杨树林对芦苇滩地细菌多样性产生了一定的影响,而且对根表土和根际土的影响程度要大于地下土层,如人工杨树林根际土的Shannon指数高出芦苇地15.2%,其根表土则比芦苇地低27.0%,但是不同土层的Shannon指数相差仅在2.1%—5%之间(图6)。DGGE条带序列的进化树分析表明,在地下0—10 cm土层和根际土中,Actinobacteria类群仅出现在芦苇地,同样根表土中Bacteroidetes类群也仅出现在芦苇地中(图7);而其他细菌类群虽然人工杨树林和芦苇地的土壤环境中都有,但是以条带16、17、21和23所代表的菌群也仅出现在芦苇地,它们分属 α -proteobacteria、Chloroflexi、 β -proteobacteria和Acidobacteria类群,说明人工杨树林对这些细菌类群有明显的抑制作用,但是具体的机

制还有待进一步探究。

致谢 本论文实验过程中,得到安徽农业大学农学院马传喜教授和司红起博士所给予的在 DGGE 仪器上的支持和资源与环境学院的胡宏祥与余红梅博士在采样上的帮助,同时还得到安徽大学生命科学院的孙庆业教授在土壤理化分析上的指导,在此一并谢忱。

参 考 文 献

- 张旭东, 漆良华, 黄玲玲, 等. 山丘区土壤环境因子对钉螺 (*Oncomelania Snail*) 分布的影响. 生态学报, 2007, 6(27): 2460—2467
- Goll PH, Lemma A, Duncan J, et al. Control of schistosomiasis in Adwa, Ethiopia, using the plant molluscicide endod (*Phytolacca dodecandra*). Tropenmed Parasitol, 1983, 34(3): 177—183
- Boelee E, Laamrani H. Environmental control of schistosomiasis through community participation in a Moroccan oasis. Trop Med Int Health, 2004, 9(9): 997—1004
- 彭镇华. 林业生态工程与血吸虫病防治. 中国工程科学, 2001, 7(3): 12—16
- El-Sawy MF, Bassouny K, Magdoub AI. Biological combat of schistosomiasis: *Ambrosia martima* (damisissa) for snail control. J Egypt Soc Parasitol, 1981, 11: 99—117
- 秦建新, 谭子芳, 张春. 洞庭湖区江滩钉螺分布的环境因特征—基于RS/GIS的研究. 自然灾害学报, 2008, 17(4): 19—27
- 张崇邦, 金则新, 施时迪. 天台山不同林型土壤微生物区系及其商值(qMB, qCO₂). 生态学杂志, 2003, 22(2): 28—31
- Wolters V, Jergensen RG. Microbial carbon turnover in beach forest soils at different stages of acidification. Soil Biol Biochem, 1991, 23: 897—902
- 陈义群, 唐万鹏, 许业洲, 等. 长江滩地造林对湖北草本植物群落物种多样性的影响. 南京林业大学学报, 2004, 28(3): 89—92
- 吴立勋, 汤玉喜, 吴敏, 等. 洞庭湖滩地杨树造林与草本植物物种多样性研究. 湖南林业科技, 2005, 32(6): 9—15
- 崔丽娟, 张曼胤. 人类干扰对安庆沿江湿地植物多样性的影响. 林业科学研究, 2005, 18(4): 441—445
- 吴泽民, 孙启祥, 陈美工. 安徽长江滩地杨树人工林生物量和养分积累. 应用生态学报, 2001, 12(6): 806—810
- 胡兴宜, 唐万鹏, 刘学全. 长江滩地不同林龄杨树人工林植物群落物种多样性研究. 湿地科学与管理, 2006, 2(4): 24—27
- 刘广路, 范少辉, 张群, 等. 长江滩地 I-72 杨人工林生长特性研究. 林业科学研究, 2008, 21(2): 243—247
- 孙启祥, 张建锋, 吴立勋. 滩地杨树人工林抑螺效果与碳汇效应. 中国生态农业学报, 2008, 3(16): 701—706
- Zhao B, He SJ. Microbiology Experiment. Beijing: Science Press, 2002
- Cheng XS, Yang JQ. Effect of soil fumigation on soil microbe and nitrification. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2007, 15(6): 51—53
- 南京农学院. 土壤农化分析. 北京: 农业出版社, 1980, 39—83
- U. S. FDA(Edit). Bacteriological Analytical Manual, 2001
- 杨红艳, 龙秀娟, 李清华, 等. 硝化细菌富集培养及处理富营养化水体应用研究. 环境保护科学, 2007, 33(6): 50—52
- 陈中云, 闵航, 张夫道, 等. 4种重金属污染对稻田土反硝化细菌的影响. 中国环境科学, 2003, 23(3): 305—310
- 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000, 147—155
- 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999, 50—51
- 中国土壤学会. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000, 55—169
- 李冬林, 韩丽, 阮宏华, 等. 秦淮河河岸带土壤理化性质分析. 南京林业大学学报(自然科学版), 2008, 4(32): 17—22
- Sparling GP, West AW. Modification to the fumigation-extraction technique to permit simultaneous extraction and estimation of soil microbial C and N. Commun Soil Sci Plant Anal, 1988, 19: 327—344
- Zhou JZ, Mary AB, Jamesm T. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 316—322
- Riemaun L, Wingding A. Community dynamics of free-living and particle associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. Microb Ecol, 2001, 42: 274—285
- Muyzer G, De-Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695—700
- Kousuke I, Manabu F. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol, 2004, 67(8): 3753—3755
- Peng PQ, Zhang WJ, Tong C, et al. Soil C, N and P contents and their relationships with soil physical properties in wetlands of Dongting Lake floodplain. Chin J Appl Ecol, 2005, 16(10): 1872—1878
- Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 43: 1—11
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment ai-

- ded by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 24: 4876—4882
- 34 Sigler WV, Miniaci C, Zeyer J. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *J Microbiol Methods*, 2004, 57: 17—22
- 35 Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S, Bodrossy L, et al. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 5057--5065
- 36 Kuske CR, Ticknor LO, Miller ME, et al. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 1854—1863
- 37 Zheng H, Ouyang Z, Wang X, et al. Effects of regenerating forest cover on soil microbial communities: A case study in hilly red soil region, Southern China. *For Ecol Manage*, 2005, 217: 244—254
- 38 柴丽红, 崔晓龙, 彭 谦, 等. 青海两盐湖细菌多样性研究. *微生物学报*, 2004, 44 (3): 270—276
- 39 Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(8): 4800—4806