

青藏高原不同生境土壤细菌群落结构特征及其与环境的关系

程亮^{1,3,4},王信^{2,3},郭青云^{1,3,4}

(1.青海大学农林科学院植物保护研究所,青海 西宁 810016;2.青海大学农林科学院土壤肥料研究所,青海 西宁 810016;

3.青海省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室,青海 西宁 810016;

4.青海省农业有害生物综合治理重点实验室,青海 西宁 810016)

摘要:为了解土壤微生物在青藏高原的分布状况及环境依赖特点,对青藏高原5种不同类型的土壤微生物群落结构、组成及其与环境关系进行了研究。通过高通量测序技术研究青藏高原不同生境土壤细菌的组成和多样性,共获得1 463 157条16S rRNA基因序列。各样品中可操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs)在4 344~5 764之间。土壤样品中细菌以变形菌门(35.5%)、放线菌门(20.4%)、酸杆菌门(12.5%)、拟杆菌门(7.3%)、绿弯菌门(6.1%)和厚壁菌门(5.3%)为主,其中变形菌门最为丰富。在变形菌门中,α-变形菌纲是第一大纲,占有45.9%的OTUs,其后是γ-变形菌纲和β-变形菌纲。Person相关性分析和RDA分析表明,土壤含水量、有机碳含量与钾含量对细菌群落分布起主要作用。

关键词:细菌群落;高通量测序;微生物-环境关系;青藏高原

中图分类号:S154.3 文献标志码:A

Relationship of soil bacterial community composition from different ecosystems on Qinghai-Tibet Plateau with environment factors

CHENG Liang^{1, 3, 4}, WANG Xin^{2, 3}, GUO Qing-yun^{1, 3, 4}

(1. Plant Protection Institute, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China;

2. Soil and Fertilizer institute, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China;

3. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China;

4. Key Laboratory of Agricultural Integrated Pest Management in Qinghai Province, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: To evaluate the distribution and the environmental dependence of soil microbes in arid land, we studied the composition and diversity of microbial communities in soils from different ecosystems on Qinghai-Tibet Plateau along with relevant environmental factors. The composition and diversity of Qinghai-Tibet Plateau soil bacteria were investigated by the high-throughput sequencing. Totally, 1 463 157 partial 16S rRNA gene sequences were obtained. These sequences revealed great amount of operational taxonomic units (OTUs), that is, 4 344~5 764 OTUs in soil samples. There were mainly Proteobacteria(35.5%), Actinobacteria(20.4%), Acidobacteria(12.5%), Bacteroidetes(7.3%), Chloroflexi(6.1%), and Firmicutes(5.3%), which had the largest number of Proteobacteria. And Alpha-proteobacteria with 45.9% of all OTUs was the most abundant class of Proteobacteria, followed by Gammaproteobacteria and Betaproteobacteria of this phylum. Pearson correlation and redundancy analysis revealed that soil moisture, total organic carbon, and soil potassium content had significant effect on soil bacterial community distribution.

Keywords: bacterial community; high-throughput sequencing; microorganism-environment relationships; Qinghai-Tibet Plateau

收稿日期:2017-05-13

修回日期:2018-05-14

基金项目:青海省科技计划项目基础研究计划(2015-ZJ-705);青海大学中青年科研基金项目(2015-QNY-2)

作者简介:程亮(1978-),男,河南林州人,硕士研究生,研究方向为农业微生物资源利用。E-mail:liangcheng1979@163.com

通信作者:郭青云(1965-),女,河南开封人,硕士生导师,主要从事保护性耕作、农田杂草综合治理方面的研究。E-mail:guoqingyunq@163.com

21世纪以来,由于全球生态环境的破坏、自然资源的不可再生耗损以及因此而造成的生物多样性的丧失,使得微生物多样性的研究在环境监测^[1]、新能源和新资源开发^[2]、遗传研究^[3]和物种多样性保护^[4]等方面起着越来越重要的作用。同时,土壤微生物多样性在土壤生态系统养分循环和安全调控中也发挥着重要作用^[5]。开展土壤微生物多样性的研究,不仅能了解土壤微生物生态中起重要作用的微生物类群,还可以预测其在土壤养分变化中的功能。

青藏高原在漫长的地质发育和自然演替过程中,不仅形成了其特殊的高寒草原和草甸生态系统,还具有沙漠、湿地及多种森林类型的自然生态系统。这些特殊的地理环境蕴含着丰富的微生物资源,是宝贵的生物种质资源库。鉴于此,近些年来,针对青藏高原这一特殊地理环境的微生物多样性研究越来越多,其研究方向主要集中于土壤^[6]、冰川^[7-8]、冻土区^[9]、高寒草甸^[10-11]和湖泊^[12]等环境下微生物的多样性及其与相应环境间的相互关系。

近年来微生物多样性的研究逐渐由传统的培养方法,向免培养的分子生物学技术转变,如DNA的指纹图谱、分子杂交、克隆文库测序、高通量测序(Pyrosequencing)、稳定同位素探测(Stable isotope probing,SIP)、基因芯片(Gene chip)以及转录组学(Transcriptomics)等技术。利用这些先进的分子生物学技术,极大地提高了微生物多样性的研究水平。

在本研究中,选取青藏高原青海地区不同样点土壤作为研究对象,采用 Illumina Miseq 高通量测序方法,在分析土壤细菌群落丰度和多样性的基础

上,对土壤细菌群落结构与土壤环境的相关性进行分析,试图为预测环境因子对土壤微生物多样性的影响和响应提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

研究区域位于青藏高原东北部,属于典型的大陆性干旱半干旱气候,辐射强烈,日照多,气温低,积温少,气温随高度和纬度的升高而降低。年总辐射量值高达585.8~753.1 kJ·cm⁻²,冬季平均积雪厚度为10~40 cm,>10℃的年积温为1 100~2 901.1℃,全年日照2 300~3 600 h,年蒸发量>2 000 mm。

1.2 样地设置与数据采集

2015年8月在5种不同类型的土壤分布区域选择样点,包括耕地土壤区域的乐都蒲台、大通朔北、湟源申中、贵德河西和德令哈5个地点,山地草甸土区域的大通北川河、拉脊山、橡皮山、黑马河和倒淌河5个地点,灰褐土区域的群加和哈里哈图2个地点,黑钙土区域的湟中李家山、海晏和西海镇3个地点,灰漠土区域的茶卡、尕海和柯柯3个地点。在每个分布地点随机选择代表性样地,共18个样地,每个样地分别设置3个10 cm×10 cm样方为重复,每个样方间隔约10 m;去掉土壤上层枯枝落叶等杂物后,在每个样方内用直径4.5 cm取土器采集表层15 cm深度的土样,混合后约1 000 g分别装入自封袋并做标记,保存于4℃的冰盒,带回实验室,然后过2 mm的筛子,样品分装2份,1份置于4℃冰箱用于测定土壤的理化性质,另1份置于-70℃低温冰箱中用于土壤DNA基因组提取。土壤样地概况见表1。

表1 研究区各土壤样地环境因子概况

Table 1 Environmental variables in soil samples in the study area

样地 Plot	海拔 Elevation /m	土壤含水量 Soil moisture /%	pH 值 pH values	有机碳含量 Total organic carbon/(g·kg ⁻¹)	总氮 Total N (g·kg ⁻¹)	P /(g·kg ⁻¹)	K /(g·kg ⁻¹)	盐含量 Salt (g·kg ⁻¹)	碳氮比 C:N
群加 Qunjia(QJ)	3049	46.97	8.43	7.81	0.09	0.18	2.52	1.1	89.8
哈里哈图 Halihatu(HLHT)	3499	31.05	7.55	1.49	0.14	0.59	2.24	5.5	10.52
倒淌河 Daotanghe(DTH)	3396	34.91	8.02	7.52	0.09	0.16	2.62	4.4	81.71
拉脊山 Lajishan(LJS)	3802	37.45	8.30	6.50	0.07	0.16	2.43	1.4	91.51
大通北川河 Datongbeichuanhe(DT)	3674	42.71	8.33	7.17	0.09	0.18	2.24	0.8	82.4
黑马河 Heimahe(HMH)	3298	40.19	8.16	11.47	0.1	0.2	2.71	1.4	112.43
橡皮山 Xiangpishan(XPS)	3815	38.16	8.17	7.47	0.11	0.18	2.71	0.8	72.53
海晏 Haiyan(HY)	2992	37.49	8.32	7.52	0.09	0.18	2.52	0.8	83.52
西海镇 Xihai(XH)	3126	35.16	8.26	5.58	0.07	0.14	2.52	1.4	84.55
湟中李家山 Huangzhonglijashan(HZ)	2730	29.46	8.34	12.72	0.14	0.18	2.52	0.8	90.86
乐都蒲台 Leduputai(LD)	2146	36.18	8.24	11.66	0.12	0.18	2.43	0.8	97.97
德令哈 Delhi(DLH)	2945	26.74	8.07	6.55	0.08	0.16	2.25	2.6	80.85
湟源申中 Huangyuanshenzhong(HYSZ)	2960	34.16	8.36	10.42	0.12	0.19	2.61	0.8	86.1
大通朔北 Datongshuobei(DTSB)	2550	37.54	7.86	12.85	0.15	0.16	2.42	2.6	88.61
贵德河西 Guidexi(GDHX)	2231	12.46	8.18	9.71	0.21	0.11	2.42	0.8	46.02
尕海 Gahai(GH)	2871	19.28	8.55	1.69	0.03	0.11	2.16	1.1	58.21
茶卡 Caka(CHK)	3124	9.54	7.69	8.96	0.12	0.29	2.24	2.4	74.07
柯柯 Keke(KK)	2963	9.31	7.88	3.71	0.033	0.16	2.16	4.2	115.81

1.3 土壤主要理化性质的测定

土壤 pH 值采用电位法测定;土壤含水量采用烘干法测定;土壤有机碳采用重铬酸钾氧化外加热法;总氮采用半微量凯氏定氮法;总磷采用高氯酸溶液—钼锑抗比色法测定^[13];土壤钾用醋酸浸提—火焰光度法^[13]。

1.4 土壤 DNA 基因组提取和测序

将每个样点的土壤样品解冻、混匀后,各取 2 份等量(0.5 g)的样品进行 DNA 提取。这 2 份样品在后续试验中相互独立,为 2 份重复,以便检验测序结果的一致性。样品使用 OMEGA Soil DNA Kit(Qiagen Inc., USA)试剂盒提取 DNA, 使用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Inc., USA) 测定 DNA 的浓度和纯度。利用引物 319F(ACTCCTACGGAGGCAGCAG)与 806R(GGACTTACHVGGGTWTCTAAT)扩增其 V3–V4 区基因片段。修饰后的引物含有不同的 Barcode 以区分不同的样品。PCR 反应体系为 25 μL:2 μL DNA 样品,0.125 μL Ex Taq 酶,2.5 μL 10×Ex Taq Buffer,2 μL dNTPs,引物各 1 μL,添加适量无菌水使体系达 25 μL。PCR 反应扩增条件为:94℃,5 min;34×(96℃,30 s;55℃,30 s;72℃,60 s);72℃,10 min。获得的 PCR 产物进行琼脂糖电泳,使用琼脂糖回收试剂盒(cat: SK8131)回收,回收产物用 Qubit 2.0 定量混匀,送往 Macrogen Inc. (Seoul, Korea) Illumina MiSeq 250PE 平台测序。

1.5 生物信息分析与数据处理

根据 Barcode 序列拆分各样品数据,然后截取 Barcode 和引物的序列使用 FLASH 进行拼接;高通量序列数据使用 QIIME 进行数据处理;运用 CD-HIT-OTU 软件对所有样品的全部有效数据进行聚类,以 97% 的一致性(Identity)将序列聚类成为操作分类单元 OTUs(Operational taxonomic units),筛选 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 代表序列。用 RDP Classifier (Version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) 方法与以 Greengenes 数据库(<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>)对 OTUs 代表序列进行物种注释分析,在不同分类水平上统计各样的群落组成,并对 OTUs 进行丰度和 α 多样性指数分析。选取 Chao1 和 Ace 指数反映微生物丰富度,用 Simpson 和 Shannon 指数反映微生物多样性。冗余分析(Redundancy analysis, RDA)能同时结合物种组成和环境因子计算,直观地把环境因子、物种、样方同时表达在排序

轴的坐标平面上。排序图中箭头所处象限,代表着环境因子与排序轴间的正负相关性;箭头连线的长度代表着各环境因子对排序轴的贡献,即环境因子与排序轴相关性的大小;彼此间的关系则反映为箭头的方向和夹角;各样地在坐标平面内的位置反映了不同样地(群落)的生态学特性。排序轴间的相关性可以说明排序图反映物种多样性随着环境因子变化的趋势。RDA 通过 CANOCO Version 5.0 分析软件及 CANODRAW Version 5.0 作图软件完成。Pearson 系数分析土壤细菌群落多样性(系统发育多样性和 OTUs 数量)与土壤因子的相关性。

2 结果与分析

2.1 多样性指数分析

青藏高原青海地区不同土壤细菌 16S rDNA 通过高通量测序,总共获得 1 463 157 条有效序列,所得样品序列数目平均数量在 81 286 左右,样品 OTUs 数量在 4 344~5 764 之间,相应文库覆盖率为 84.8%~93.9%,说明本研究中各样品文库包含了大多数细菌类群,基本能反映样品内生细菌群落结构组成。分别计算了 18 个样地总体的 4 个微生物多样性指数(图 1)。ACE 指数和 Chao1 指数表明, GH 和 DT 样地微生物类群多样性和丰富度最小,QJ 和 HLHT 最高,18 个样地土壤微生物 Shannon 和 Simpson 指数值的总体趋势表现一致,LJS 和 DT 样地物种多样性和均匀度较低,其它样地起伏较大。总体来看,不同样地的微生物丰富度越大,多样性、均匀指数也越大。因此,各多样性指数表现出较强的异质性,不同样地差异明显。

2.2 细菌群落结构分析

土壤细菌类群如图 2 所示,土壤样品中主要优势类群(相对丰度>5%)为 Proteobacteria、Actinobacteria、Acidobacteria、Bacteroidetes、Chloroflexi 和 Firmicutes 6 个门,这些细菌占总细菌类群相对丰度的 87.1% 以上;其次 Gemmatimonadetes、Verrucomicrobia、Planctomycetes、Nitrospirae、Cyanobacteria、Elusimicrobia、Chlorobi、Armatimonadetes 这些门类群相对丰度较少($\geq 0.1\%$),但仍可以在大多数土壤样品中鉴定发现;除此之外,一些稀有细菌门也被鉴定发现,同时,Archaea 中的一些 Euryarchaeota 和 Crenarchaeota 门也被发现。如图 3 所示,在 Proteobacteria 门中,Alphaproteobacteria 是第一纲,占该门的 45.9%,其后是 Gammaproteobacteria 和 Betaproteobacteria,分别占 29.0% 和 13.5%。Actinobac-

teria 门中, Actinobacteria 纲是第一大纲, 占该门的 49.5%, 其后是 Thermoleophilia 和 Acidimicrobiia, 分别占 18.1% 和 17.2%。 Acidobacteria 门中 Acidobacteria-6 和 Chloracidobacteria 两个纲均占 38.4%。

从图 2 中可以观察到 18 个样品中, 不同样品之间细菌群落组成中不同菌群的比例是不同的, 以 GH 和 CHK 样品中属于 Actinobacteria 的菌群比例最高, 分别达到 30.6% 和 29.2%; 而 DT 样品中属于 Actinobacteria 的菌群比例最低, 仅 6.9%, DT 样品中属于 Proteobacteria 的菌群比例最高, 达到 46.8%, 该门的菌群在 18 个样品中所占的比例 $\geq 27.1\%$; GH 样品中 Acidobacteria 的菌群比例最低, 仅 3.5%。 Firmicutes 在 LJS、GDHX 和 DT 样品中所占的比例分别为 28.3%、19.0% 和 10.9%。

从“纲”这一分类层次来看(图 3), 可以看出 18 个样品中, 以 LD 样品中属于 Acidobacteria-6 的菌群比例最高, 达到 9.5%; 而 GH 样品中属于该纲分支的菌群比例最低, 仅 1.4%。而 GH 样品中 Chloracidobacteria 的菌群比例最低, 仅 0.7%; Alphaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria 在 18 个样品中菌群比例分布规律与门水平一样。

2.3 细菌群落多样性与环境因子之间的关系

为探讨土壤细菌 α 多样性与土壤因子的关系, 对土壤细菌 α 多样性(系统发育多样性和 OTUs 数量)与土壤 pH 值、含水量、有机碳等 9 个土壤因子做相关性分析。表 2 表明土壤含水量、土壤钾含量、

有机碳含量、氮含量与细菌物种丰富度和系统发育多样性有极强的相关性($P < 0.05$)。土壤含水量与细菌物种丰富度和系统发育多样性呈负相关, 其相关系数分别为 -0.578 和 -0.475。土壤钾含量与细菌物种丰富度和系统发育多样性呈负相关(相关系数为 -0.529 和 -0.558), 土壤有机碳和总氮含量与细菌物种丰富度呈正相关(相关系数为 0.547 和 0.499), 与系统发育多样性呈负相关(相关系数为 -0.548 和 -0.529), 其它土壤因子与细菌物种丰富度和系统发育多样性之间相关性未达显著性水平($P > 0.05$)。

为进一步了解单个环境因子对土壤中某些优势细菌菌群相对丰度的影响, 对两者做了 Pearson 相关性分析, 结果如图 4 所示, 青藏高原地区一些优势细菌菌群相对丰度与单个环境因子的相关性差异较大。土壤酸杆菌门(Acidobacteria)的相对丰度与土壤有机碳($r = 0.473, P = 0.047$)、钾含量($r = 0.600, P = 0.008$)和含水量($r = 0.674, P = 0.003$)呈显著正相关性, 随着有机碳含量、钾和含水量的提高, 相对丰度显著升高(图 4A, 4B, 4C)。而绿弯菌门(Chloroflexi)的相对丰度与土壤含水量($r = -0.525, P = 0.025$)呈显著负相关性, 随着土壤含水量的升高, 相对丰度显著下降(图 4D)。放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度与土壤盐含量($r = 0.548, P = 0.019$)呈正显著相关性, 随着土壤含盐量的提高, 相对丰度显著升高(图 4E)。

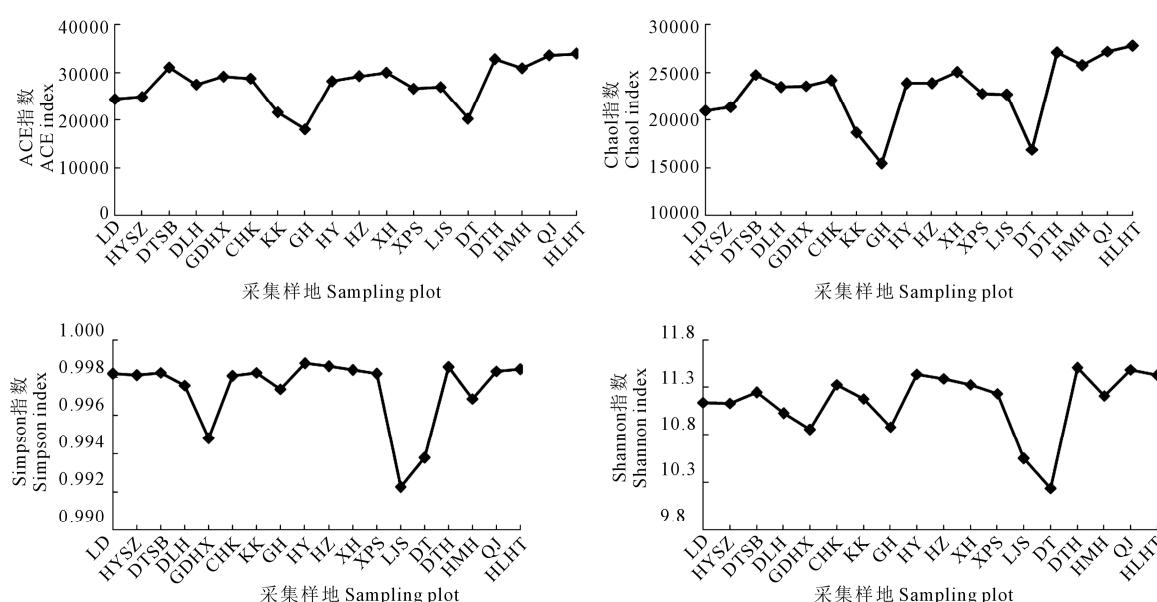


图 1 青海高原 18 个样地土壤微生物的多样性指数

Fig.1 Diversity indices of 18 soil microbes in Qinghai Plateau

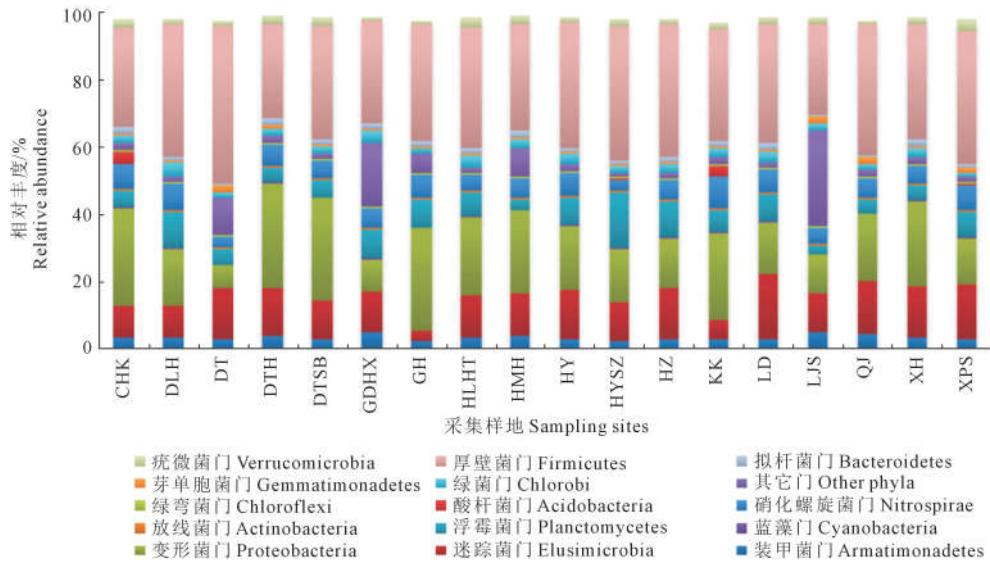


图2 青藏高原18个土壤样品中基于门分类的主要优势细菌类群丰度图

Fig.2 Relative abundance of the dominant bacterial phyla in the 18 soil samples

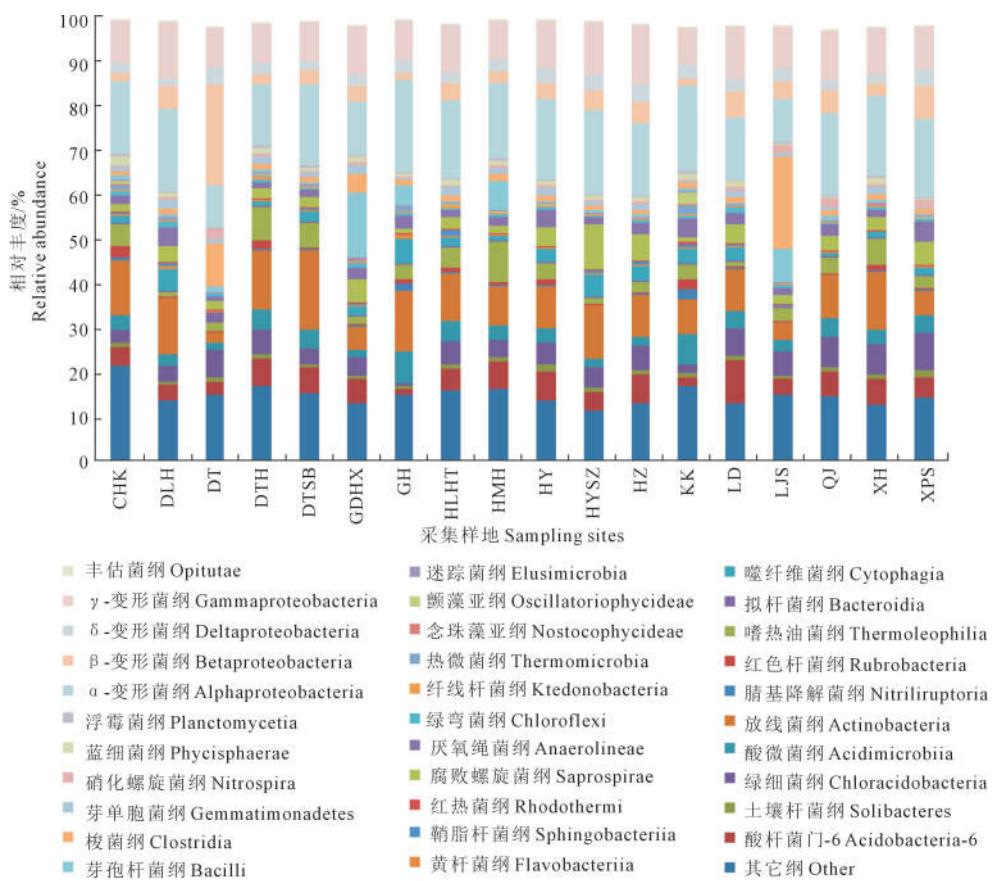


图3 青藏高原18个土壤样品中基于纲分类的主要优势细菌类群丰度图

Fig.3 Relative abundance of the dominant bacterial classes in the 18 soil samples

表2 土壤细菌群落多样性和土壤理化性质之间的Pearson相关性
Table 2 The Pearson correlation between bacterial diversity and soil characteristics

变量 Variable		海拔 Elevation/m	酸碱度 pH	总有机碳 /(g·kg ⁻¹) Total organic carbon /(g·kg ⁻¹)	钾含量 /(g·kg ⁻¹) K content /(g·kg ⁻¹)	含盐量 Salt content /(g·kg ⁻¹) Soil moisture /%	含水量 Soil moisture /%	总氮量 /(g·kg ⁻¹) Total N /(g·kg ⁻¹)	碳氮比 C/N	磷含量 P content /(g·kg ⁻¹)
系统发育多样性 Phylogenetic diversity(PD)	r	-0.120	0.241	-0.548*	-0.558*	-0.122	-0.475*	-0.529*	0.071	-0.391
Phylogenetic diversity(PD)	P	0.635	0.336	0.038	0.031	0.630	0.046	0.046	0.779	0.108
OTUs 数量 OTUs number	r	-0.308	-0.327	0.547*	-0.529*	0.155	-0.578*	0.499*	0.007	0.084
OTUs 数量 OTUs number	P	0.214	0.185	0.044	0.024	0.540	0.012	0.048	0.978	0.741

注: * 表示显著相关性($P<0.05$)。下同。

Note: * indicate significant correlations ($P<0.05$). The same below.

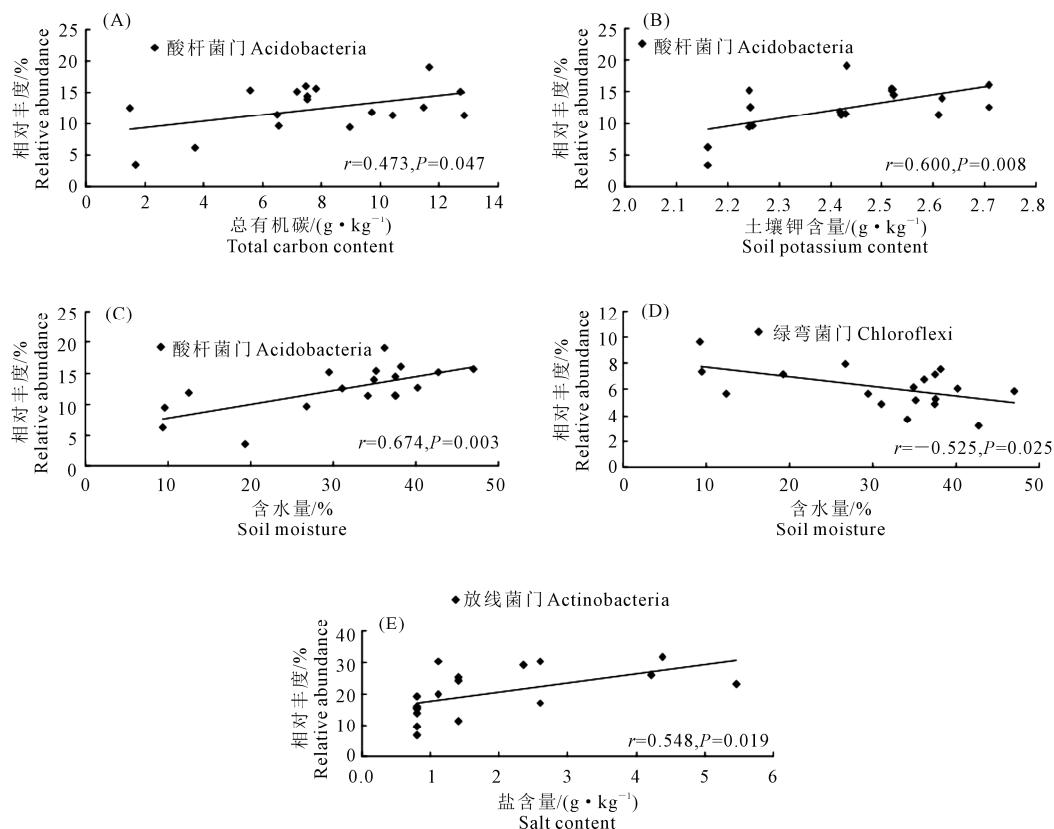


图4 优势细菌群落主要门类相对丰度与有机碳、钾含量、盐含量和含水量的相关性

Fig.4 The relationships between relative abundances of dominant bacterial groups and total C content, soil K content, salt content, soil pH and soil moisture

2.4 细菌群落与环境因子的关系

2.4.1 环境因子的RDA排序 从RDA各排序轴的特征值(表3)可以看出,第一、二轴之和占所有排序轴总特征之和(0.4996)的36.98%,可解释的物种及其分布信息的36.98%。由物种-环境关系累计解释量知,第一、二轴分别可以解释物种—环境关系46.62%和67.37%的信息。且第一、二排序轴的相关

性极小,仅为0.0245(表4)。由9个环境因子与排序轴之间的相关系数可以看出,土壤含水量、总碳和钾含量等3个环境因子与排序第二轴呈显著相关($P<0.05$)。随着第一排序轴数值的增大,土壤含水量、总碳和钾含量明显减小(呈负相关),酸碱度和盐含量与第一排序轴以及总氮与第二排序轴虽未达到显著相关,但相关系数也较大。

表3 RDA排序的特征值、梯度的长度及累积解释量

Table 3 Eigenvalues, lengths of gradient, cumulative percentage variances of species and of species-environment relationship of RDA ordination

排序轴 Axis	特征值 Eigenvalues	梯度的长度 Length of gradient	物种累积解释量/% Cumulative percentage variance of species	物种-环境关系累积解释量/% Cumulative percentage variance of species-environment relationship
第一轴 Axis1	0.2559	3.403	25.59	46.62
第二轴 Axis2	0.1139	1.823	36.98	67.37
第三轴 Axis3	0.0917	1.126	46.15	84.07
第四轴 Axis4	0.0381	1.150	49.96	91.02

表4 环境因子与排序轴之间的相关性分析

Table 4 Correlation analysis between environmental factors and ordination axes

排序轴 Axis	第一轴 Axis1	海拔 Altitude	含水量 Moisture	酸碱度 pH	总碳 TOC	总氮 TN	磷 P	钾 K	碳氮比 C/N	含盐量 Salt
第一轴 Axis1	1.000	-0.1809	0.2150	-0.5292	0.1324	-0.0124	-0.2649	-0.1080	0.0950	0.4143
第二轴 Axis2	0.0245	0.2141	-0.7049*	0.2591	-0.6104*	0.5266	0.2976	0.6133*	-0.1065	-0.2177

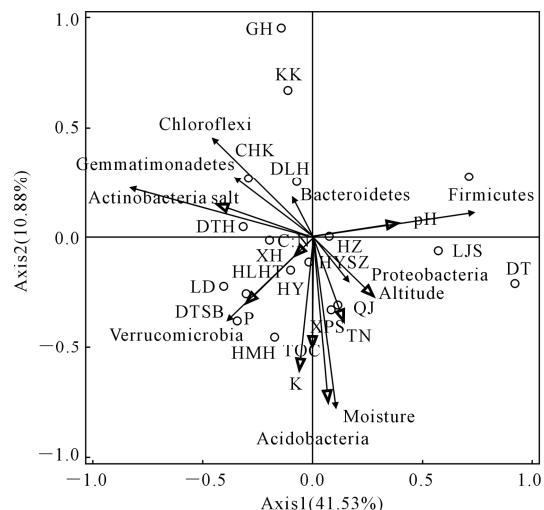
2.4.2 细菌群落的RDA排序 为进一步探明土壤理化因子与细菌群落结构的关系,对两者做冗余分析,结果如图5所示,所有环境变量对土壤细菌“菌纲”的种类和比例在所有样品中的分布变化总共具有52.41%的解释度。8个主要细菌属的变化与土壤含水量相关性最高,其次是K含量、TOC含量和TN含量。这4个环境因子矢量箭头之间夹角较小,可能具有协同效应。其中Verrucomicrobia、Acidobacteria和Proteobacteria与土壤含水量呈正相关,这些菌属的丰度随着土壤含水量的增加而增加,相反,Chloroflexi、Gemmatimonadetes、Actinobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes与土壤含水量之间呈负相关,这些菌属的丰度随着环境因子值的增加而减少。通过环境因子箭头长度可以看出土壤含水量、钾含量和土壤有机碳总量是决定样地微生物多样性变化规律的主要因素,而碳氮比的箭头长度最短,说明其与样地多样性关系不大,不成为影响样地微生物多样性变化的主要因素。由于采集样地分布范围很大,且相隔多个山系,海拔在试验样地微生物分布与多样性格局上的作用并不明显;pH值、钾、磷和有机碳含量是重要的土壤营养因子,在具体地段的微生物分布与多样性格局上作用较强,但仍受土壤含水量的制约。图5也反映了微生物多样性格局变化影响下微生物样地的分布格局,可以看出,样地沿主要因子变化方向上的分布相对较有规律,表明其受与第二轴相关性较大的环境因子影响较明显。在含盐量较高的GH、KK、CHK、DLH和DTH样地,微生物分布的主要优势群落有Chloroflexi、Gemmatimonadetes、Actinobacteria和Bacteroidetes,在磷含量较高的DTSB、LD、HLHT样地,微生物分布的主要群落有Verrucomicrobia。综合来看,RDA排序以第二轴为

界将所有微生物优势群落分为上下两大类群。第二轴上部微生物类群(GH、KK、CHK、DLH、DTH和GDHX)的主要环境特征为pH值、盐含量高,而土壤含水量、钾、氮、磷、有机碳总量低,可知这些样地土壤较干旱、含水量少,土壤贫瘠;而第二轴下部类型刚好与上部相反,其生境的pH值和含盐量相对较小,土壤营养较高,土壤相对湿润,含水量高,具体属于HMH、XPS、QJ、DT、LJS、DTSB和LD的样地。因此,RDA排序总体上反映了土壤含水量对微生物分布的影响。

3 结论与讨论

3.1 土壤细菌群落组成

土壤细菌是土壤微生物的主要组成部分,绝大多数土壤优势细菌种类基本相同,主要包括10个左



TOC: total organic carbon; TN: total nitrogen; C/N: carbon/nitrogen

图5 细菌群落与环境因子的冗余分析

Fig.5 RDA showing associations between environmental factor and bacterial class

右的细菌类群^[14-15]。Guan 等^[16]在青藏高原分析耕作田、高寒草甸和咸水湖 3 个主要生态系统土壤细菌群落结构差异发现主要优势菌群为变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、酸杆菌门和疣微菌门 5 个门类。Chu 等^[17]在青藏高原西北部研究表层土壤细菌群落结构发现放线菌门、 α -变形菌门、酸杆菌门、绿弯菌门和芽单胞菌门 5 大门类为研究区的优势类群。而 Yuan 等^[18]在念青唐古拉南面沿海拔梯度取样研究高山草原土壤细菌群落发现酸杆菌门、变形菌门、芽单胞菌门为研究范围内最主要的 3 个细菌门类。丛静等^[19]以神农架自然保护区土壤为试验样地,基于 16SrRNA 宏基因组测序数据分析表明土壤微生物群落结构差异显著性,土壤中丰富度最高的酸杆菌门、疣微菌门和浮霉菌门为主要优势菌类。

本研究对青藏高原 5 种土壤类型 18 个样点的土壤细菌群落结构进行了高通量分析,在较大尺度上对细菌群落丰度和多样性及其影响因子进行了研究。结果表明,采集的 18 个土壤样品中具有丰富的微生物群落结构多样性,主要有 50 大门类,变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinomycete)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi) 和厚壁菌门(Firmicutes) 等 6 大门类是主要的门类,占据整个细菌类群相对丰度的 87.1% 以上。大多数细菌门在 18 个土壤样品中相对稳定,其中几个门表现出相对丰度的变化,例如,来自灰漠土土壤样品 GH 和 CHK 中放线菌门的比例最高,分别达到 30.6% 和 29.2%;在山地草甸土土壤样本 DT 中放线菌门的比例最低,只有 6.9%,然而变形菌门的比例最高,达到 46.8%。

3.2 细菌群落结构与环境因子

就土壤微生物而言,多种生物和非生物因素(如植被^[20-22],土壤特性^[23-24],土壤质地^[25],土地利用^[26-27],地理距离^[27]和 pH 值^[28-30])均可影响其群落分布。不同地区和气候类型下陆地生态系统的自然变异和所受的人为干扰不同,因而可能导致土壤微生物群落的地理空间分异。土壤有机碳、氮素、磷素和钾素等是土壤主要的养分指标,其中碳是微生物生长的必需元素,是限制微生物生长的关键因子,而青藏高原青海地区属于极端干旱寒冷地区,土壤碳含量相对较低,营养物种相对匮乏,在其他环境因子如 pH 值、含水量、温度等差异不大的情况下,土壤含碳量的高低对微生物群落的分布就具有决定性的作用。在本研究中,不同采样地土壤细菌群落分布完全不同,Person 相关性分析和 RDA 分析发现,土壤含水量(SM)和有机碳含量(TOC)以及

钾含量与细菌群落分布最为显著相关,说明在青藏高原地区,土壤有机碳含量和含水量以及钾含量是影响细菌群落分布的主要环境因子,这与对南极土壤^[31-32]、加拿大北极冻土带^[33]和青藏高原北麓河段多年冻土细菌影响因素的研究结果^[7,9,34]基本一致。

土壤 pH 值不仅是细菌群落垂直分布的关键驱动因子之一,也强烈影响细菌微生物的多样性和群落组成。在本研究中,由于 18 个土壤样品的 pH 值差异相对较小,只有 1.00,所以不同土壤细菌群落组成和多样性与土壤 pH 值之间的相关性也较小,但是某些优势细菌门(Verrucomicrobia 和 Cyanobacteria)的相对丰度与土壤 pH 值呈显著相关。这和以前学者的研究有所不同^[7,27]。土壤微生物群落组成和多样性随海拔升高呈现明显的垂直分布模式,一般来说,微生物多样性随海拔的增加呈现递减或单峰模式^[15,35-36]。本研究区域处于海拔 2 146~3 815 m 之间,研究的尺度相对较大,海拔梯度对土壤细菌群落的多样性影响不明显,土壤细菌 Shannon 指数随海拔的增加变化不大,且各群落类型间差异不显著,细菌多样性未呈现明显的递减和单峰趋势。这与申聪聪等^[37]对长白山海拔 530~2 200 m 的土壤细菌群落的垂直分布及其驱动机制的研究结果一致。

综上所述,青藏高原 18 个样点,土壤细菌最主要的 6 个优势门类为变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、绿弯菌门和厚壁菌门,土壤有机碳含量、土壤含水量和钾元素含量是驱动细菌群落结构和多样性主导因素,这些结果为预测微生物对环境变化的响应提供了基础。青藏高原的土壤微生物群落丰度和多样性是复杂的,本研究只对 18 个采样地点 5 种类型的土壤进行了调查分析,而对于其它土壤类型和生境的土壤微生物群落丰度和多样性特征还需进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] Winding A, Hundrake K, Rutgers M. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2005, 62(2): 230-248.
- [2] Jiang J, Yang B L, Lu H K, et al. Research on the bioactive substances of marine microorganisms[J]. Journal of Yunnan University (Natural Science Edition), 2004, 26(6A): 91-95.
- [3] Liu G X, Ma X J, Chen T, et al. Progress and significance of studies on microorganisms in permafrost sediments[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2004, 26(2): 188-191.
- [4] Li Y, Zheng C Y. The conservation of microbial species diversity and the collection of microbial resources[J]. Amino Acids and Biotic Resource, 2003, 25(3): 4-6.
- [5] Arias M E, Gonzalez-Perez J A, Gonzalez-Vila F J, et al. Soil health-

- a new challenge for microbiologists and chemists[J]. International Microbiology the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, 2005, 8(1): 13-21.
- [6] Li S L, Lin Q, Li X R, et al. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2012, 43(2): 627-634.
- [7] Chu H Y, Fierer N, Lauber C L, et al. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes [J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(11): 2998-3006.
- [8] Wu X K, Zhang W, Liu G X, et al. Bacterial diversity in the foreland of the Tianshan No.1 glacier, China[J]. Environmental Research Letters, 2012, 7(1): 14038-14046.
- [9] Zhang X F, Zhao L, Xu S J, et al. Soil moisture effect on bacterial and fungal community in Beilu River (Tibetan Plateau) permafrost soils with different vegetation types[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(4): 1054-1065.
- [10] Bai Y, Yang D Q, Wang J H, et al. Phylogenetic diversity of culturable bacteria from alpine permafrost in the Tibetan Mountain, north-western China [J]. Research in Microbiology, 2006, 157 (8): 741-751.
- [11] Djukic I, Zehetner F, Mentler A, et al. Microbial community composition and activity in different Alpine vegetation zones [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(2): 155-161.
- [12] Xiong J B, Liu Y Q, Lin X G, et al. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(9): 2457-2466.
- [13] 张甘霖,龚子同.土壤调查实验室分析方法[M].北京:科学出版社,2012;23-76.
- [14] Liu J J, Sui Y Y, Yu Z H, et al. High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2014, 70(2):113-122.
- [15] Shen C C, Xiong J B, Zhang H Y, et al. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2013, 57(00):204-211.
- [16] Guan X Y, Wang J F, Zhao H, et al. Soil bacterial communities shaped by geochemical factors and land use in less-explored area, Tibetan Plateau[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1):820.
- [17] Chu H Y, Sun H B, Tripathi B M, et al. Bacterial community dissimilarity between the surface and subsurface soils equals horizontal differences over several kilometers in the western Tibetan Plateau[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(5):1523-1533.
- [18] Yuan Y L, Si G C, Wang J, et al. Bacterial community in alpine grasslands along altitudinal gradient on the Tibetan Plateau [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 87(1):121-132.
- [19] 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.
- [20] Marschner P, Yang C, Lieberei R, et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(11): 1437-1445.
- [21] Kowalchuk G A, Buma D S, Boer W D, et al. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 81(1): 509-520.
- [22] Weinert N, Piceno Y, Ding G C, et al. Phylochip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 75(3): 497-506.
- [23] Hansel C M, Fendorf S, Jardine P M, et al. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1620-1633.
- [24] Wu T H, Dan O C, Graham J H, et al. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices[J]. Microbial Ecology, 2008, 55(2): 293-310.
- [25] Schutter M E, Sandeno J M, Dick R P. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems[J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 34(6): 397-410.
- [26] Kennedy N, Brodie E, Connolly J, et al. Impact of lime, nitrogen and plant species on fungal community structure in grassland microcosms[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(10): 780-788.
- [27] Yergeau E, Bokhorst S, Huiskes A H L, et al. Size and structure of bacterial, fungal and nematode communities along an Antarctic environmental gradient[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59(2): 436-451.
- [28] Lauber C L, Strickland M S, Bradford M A, et al. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(9): 2407-2415.
- [29] Lauber C L, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5111-5120.
- [30] Rousk J, Baath E, Brookes P C, et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil [J]. The ISME Journal, 2010, 4(10): 1340-1351.
- [31] Fierer N, McCain C M, Meir P, et al. Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals[J]. Ecology, 2011, 92 (4):797-804.
- [32] Chong C W, Pearce D A, Convey P, et al. High levels of spatial heterogeneity in the biodiversity of soil prokaryotes on Signy Island, Antarctica[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(4): 601-610.
- [33] Chu H Y, Neufeld J D, Walker V K, et al. The influence of vegetation type on the dominant soil bacteria, archaea, and fungi in a low arctic tundra landscape[J]. Soil Science Society of America Journal, 2011, 75(5):1756-1765.
- [34] Ge Y, Chen C R, Xu Z H, et al. Carbon/nitrogen ratio as a major factor for predicting the effects of organic wastes on soil bacterial communities assessed by DNA-based molecular techniques[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2010, 17(3): 807-815.
- [35] Bryant J A, Lamanna C, Morlon H, et al. Microbes on mountainsides: Contrasting elevation patterns of bacterial and plant diversity[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2008, 105(supplement 1):11505-11511.
- [36] Singh D, Takahashi K, Kim M, et al. A Hump-Backed trend in bacterial diversity with elevation on Mount Fuji, Japan[J]. Microbial Ecology, 2012, 63(2):429-4437.
- [37] Shen C C, Liang W J, Shi Y, et al. Contrasting elevational diversity patterns between eukaryotic soil microbes and plants[J]. Ecology, 2014, 95(11):3190-3202.