

梭梭和柽柳土壤微生物多样性初步分析^①

杨瑞红^{1,2,3}, 赵成义^{2*}, 王新军³, 马亚丽¹

(1 新疆教育学院, 乌鲁木齐 830043; 2 中国科学院新疆生态与地理研究所, 乌鲁木齐 830011; 3 新疆农业大学, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 直接从沙漠土壤中提取混合微生物 DNA, 利用 Illumina 测序平台, 对 16S rDNA 进行测序和分析。结果表明: 荒漠植被土壤微生物数量很少, 生物活性极弱, DNA 提取难度大; 沙漠植被土壤细菌多样性丰富, 所有测得细菌分属到 23 个门和 316 个属, 其中还存在一定数量的微生物新种, 部分测得代表新属和种的序列提交 GenBank, 获得序列号 (KT984242~KT984249); 不同沙漠土壤样品微生物群落有相似性, 但也有较明显的差异, 其差异与土壤理化因子等因素有关: 如土壤含水量与酸杆菌和变形菌的分布相关; 相对于空地, 梭梭和柽柳群落土壤独有的迷踪菌门(Elusimicrobia)与固氮菌密切相关; 梭梭的土壤环境 pH 明显高于柽柳土壤环境这决定了它们不同的优势种; 土壤微生物生物量碳的大小不能反映微生物量的种类多少, 但可以反映微生物数量的多少。

关键词: 梭梭; 柽柳; DNA 提取; 土壤微生物多样性; 系统发育分析

中图分类号: Q938

自 20 世纪 50 年代以来, 生物多样性与生态系统稳定性的关系一直是生态学中重点讨论的理论问题之一。在荒漠生态系统中, 关注重点多集中在地上生态系统; 而对地下生态系统, 尤其是对微生物多样性与系统稳定性关系的研究尚重视不够。2000 年, *Nature* 在第 406 期推出以“Ecology Goes Underground”为题的封面文章^[1], 标志着地下生态系统开始成为生物多样性研究的关注点。事实上, 植被退化导致根系代谢产物变化, 直接影响土壤微生物生态环境, 而土壤中微生物又维持着土壤与植被的养分平衡, 有着重要的交互作用^[2-3], 这种作用的互馈关系对整个荒漠生态系统功能有重要意义^[4]。所以, 对荒漠微生物学的研究是认识流沙固定过程和沙地生态系统发育稳定性的重要内容之一^[5]。但是荒漠植被土壤环境的极端性和大多数土壤微生物难以培养与过程土壤生物学机制认识的薄弱已成为认识固沙过程中土壤微生物和土壤养分循环的瓶颈, 这种认识的薄弱不仅表现在对特定荒漠生态系统研究积累的不足, 而且表现在理论和方法上仍处于探索阶段。国内外开展关于荒漠生态系统土壤微生物的研究集中在: 土壤微生物量的变化、种类的变化、动态变化等过程^[6-8]。随着分子技术、电子显微镜和土壤样品测定分析技术的发展,

人们对土壤微生物组成和多样性的认识也更为深入, 不断开展了荒漠土壤微生物分子实验的研究^[9-10]。Chanal 等^[11]分析了非洲南突尼斯沙丘的微生物多样性, 尽管环境非常恶劣但是却发现较高的微生物多样性。Subramanya 等^[11]用实时定量 PCR 对比研究了印度荒漠中沙丘、干旱、半干旱等 6 种土样的微生物多样性, 共得到 1 240 种微生物。从维诺格拉德斯基时代的纯培养方法到现在免培养的分子生物学方法的高通量测序等技术的进步为更加准确地揭示土壤微生物多样性组成提供了支撑。但目前, 国内外研究结论中关于荒漠生态系统土壤微生物特征有其地域的限制性^[12]。

为此, 本研究选择沙漠优势种群梭梭、柽柳土壤为研究对象, 直接提取总 DNA 进行高通量测序, 对细菌多样性进行分析, 较全面了解其群落组成和多样性特点, 为退化生态系统的恢复和重建提供土壤微生物学方面的理论数据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

本研究在古尔班通古特沙漠南缘进行调查。该沙漠面积达 4.88 万 km², 为中国第二大沙漠。沙丘类型呈固定、半固定、流动状态, 以梁窝状和树枝状沙

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB429905)和国家自然科学基金项目(41301205、2014211B014)资助。

* 通讯作者(zcy@ms.xjb.ac.cn)

作者简介: 杨瑞红(1980—), 女, 新疆人, 副教授, 博士研究生, 主要研究方向为荒漠土壤生态与微生物学。E-mail: yangruihong99@163.com

垄为主,长度 0.1~10 km,沙丘大多南北走向,沙垄西坡缓而长,东坡短且陡。研究区远离海洋,为温带干旱荒漠气候,稳定积雪日数 100~160 天,最大积雪深度多在 20 cm 以上,全年降水量仅在 70~150 mm 之间,冬春两季降水约占总量的 30%~45%。全年日照总数为 2 600~3 100 h,≥10℃ 积温 3 267~3 661℃,潜在年蒸发量 2 000~2 800 mm。年平均气温 5~5.7℃,极端最低气温小于 -40℃,极端最高温度 40℃ 以上。春夏季为风季,最大风速 20 m/s,地下水 13 m 左右。该沙漠沙丘表面植被覆盖度可达 15%~50%,物种丰富度相对较高,灌木种类多,藜科植物在多样性组成中具有明显的优势地位。沙漠中小半灌木、半乔木群落广泛分布,代表植物有梭梭(*Haloxylon ammnodendron*)、柽柳(*Tamarix ramosissima*)、心叶驼绒藜(*Ceratocarpus ewersmanniana*)、琵琶柴(*Reaumuria soongorica*)、羽毛三芒草(*Aristida pennata*)、沙拐枣(*Calligonum mongolicum*)、角果藜(*Ceratocarpus arenarius*)等^[13]。

1.2 样品的采集及处理

2014 年 10 月在古尔班通古特沙漠南缘(44°22'20.01"N, 87°55'06.11"E)15 年以上生的梭梭、柽柳及丘间空地采集土样,根据植被类型、土层的不同,共选择了 3 个具有代表性的样地作为对照和处理(表 1)。随机在样方中四角及中部分别选取土壤样,从地表向下分层 0~20 cm 和 20~40 cm 取土样混匀分析。取土壤样品密封带回实验室进行土壤理化性质和分子生物实验分析。

表 1 试验样地基本状况
Table 1 Basic conditions of tested plots

地点	植被种类	深度(cm)	编号
沙丘间梭梭植株下	梭梭、角果藜、猪毛菜、	0~20	M01
	尖喙牻牛儿苗等	20~40	M03
平地柽柳植株下	白茎卷蒿、骆驼刺、	0~20	M05
	角果藜	20~40	M07
沙丘间空地	虫实、猪毛菜、尖喙牻牛儿苗	0~20	M09

1.3 主要试剂和仪器

土壤样品的 DNA 用 OMEGA 的土壤 DNA 试剂盒提取。Tag DNA 聚合酶和 pGEM_T Easy Vector 载体购自 Promega 公司;蛋白酶 K 购自 Merck 公司;T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;PCR 引物由上海 Genecore 公司合成;其他试剂购自 Sigma 等公司。

1.4 土壤样品理化因子测定

土壤含水量测定采用 105℃ 烘干比重法;土样过 0.25 mm 筛,采用重铬酸钾氧化外加加热法和凯氏法测

定土壤全碳和氮;采用蒸馏水浸提土壤测定 pH;用交流测量法测定电导率。有效磷含量测定采用碳酸氢钠浸提,钼锑抗比色法测定;速效钾含量用乙酸铵浸提火焰光度法测定。采用氯仿熏蒸法测定土壤微生物量碳。提取样品设置 3 个重复,取其平均值。

1.5 DNA 的提取

参考国内外相关报道^[14],结合沙漠土壤样品本身的特殊性质,我们建立了一套有效提取沙漠土壤样品混合基因组 DNA(也叫元基因组 DNA)的方法:取新鲜的室温过筛后的土样 10 g,用 50 ml 蒸馏水充分混合摇匀溶解,1 000 g 离心 10 min,弃去沉淀,再用蒸馏水溶解,12 000 g 离心 10 min 弃去上清,用 5 ml TE 缓冲液悬浮沉淀。取上述处理的沙土样品 1 ml,加入 DNA 抽提液 5 ml(Tris_HCl 100 mmol/L, EDTA 50 mmol/L,十二烷基肌氨酸 2%),用振荡器充分混匀;加入 50 mg/ml 蛋白酶 K 100 μl,液氮中速冻 5 min,然后 65℃ 水浴溶解 10 min,重复 3 次;再使用 DNA 试剂盒提取,最后以 75% 乙醇洗涤 2~3 次,干燥,溶解于适量的 TE 缓冲液。

1.6 PCR 扩增、克隆、测序与多样性分析

根据细菌 V3+V4 区设计引物, F: ARACTYCT ACGGRAGGCWG, R: GACTACNVGGGTATCTAA TCC,进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库。对测得序列进一步分析,通过 OTU 的丰度文件,挑选出各分类学水平上丰度最高的 OTU 的序列作为该分类学水平的代表序列,使用 Mothur 软件进行多序列比对产生距离矩阵,采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。通过构建物种的进化树,可以更深一步了解特定环境下物种的进化关系。进化树中枝长的长短表示进化距离的差异。系统关系越近的物种,在进化树中距离越近。

2 结果与分析

2.1 土样性质分析

土壤类型为沙地,土壤基本情况见表 2。从表中可以看出,土壤 0~20、20~40 cm 平均含水量和土壤平均有机碳含量、有机质含量、有效氮含量、pH 及平均电导率有明显的差异。平均含水量 0~20 cm 土层低于 20~40 cm 土层;有机质含量、有效磷、有效氮等 0~20 cm 土层明显高于 20~40 cm 土层;梭梭土样养分稍高于柽柳土样,梭梭的土壤环境明显比柽柳土壤环境偏碱性;地表 0~20 cm 土样养分明显高于 20~40 cm 土样的养分;空地的养分明显少于梭梭活株和柽柳的活株;土壤微生物生物量碳梭梭土样最高,空间地的土样最小。

表 2 不同固沙植被土壤样品养分平均含量情况
Table 2 Soil physical and chemical properties under different sand-binding vegetation

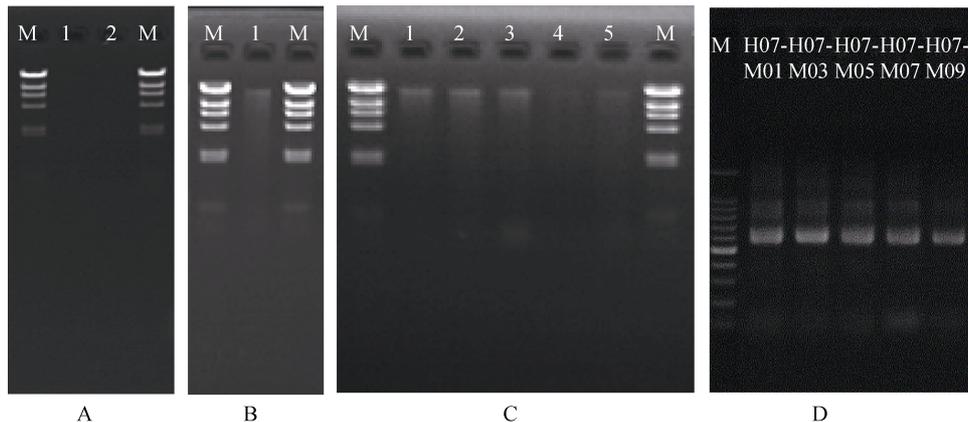
样地	pH (1:5)	电导率 (mS/cm)	有机质 (g/kg)	全 N (g/kg)	全 P (g/kg)	全 K (g/kg)	土壤微生物量碳 ($\mu\text{g/g}$)	含水量 (g/kg)
M01	8.79 \pm 0.46 a	0.344 \pm 0.08 b	4.52 \pm 0.26 a	0.317 \pm 0.05 a	0.541 \pm 0.09 a	14.21 \pm 1.24 b	777.19 \pm 30.91 a	11.3 \pm 0.4 b
M03	9.27 \pm 0.57 a	0.341 \pm 0.07 b	2.03 \pm 0.34 b	0.142 \pm 0.02 c	0.590 \pm 0.11 a	15.04 \pm 1.33 a	171.99 \pm 15.32 c	19.0 \pm 0.5 a
M05	7.43 \pm 0.38 b	0.805 \pm 0.08 a	4.11 \pm 0.56 a	0.228 \pm 0.03 b	0.458 \pm 0.08 ab	13.31 \pm 1.25 c	336.56 \pm 18.34 b	10.7 \pm 0.4 b
M07	7.75 \pm 0.36 b	0.360 \pm 0.04 b	1.23 \pm 0.15 c	0.091 \pm 0.01 c	0.394 \pm 0.08 b	13.92 \pm 1.18 b	183.05 \pm 13.44 c	25.1 \pm 0.7 a
M09	8.13 \pm 0.44 b	0.131 \pm 0.05 c	1.62 \pm 0.18 c	0.323 \pm 0.03 a	0.512 \pm 0.12 a	13.46 \pm 1.27 c	108.78 \pm 11.11 c	1.25 \pm 0.6 b

注：同列数据小写字母不同表示不同样地间差异显著($P < 0.05$)。

2.2 土样微生物基因组 DNA 提取及 16S rDNA 的 PCR

从 0.5 ~ 10 g 的土样中提取 DNA,发现提取 DNA 难度较大,不仅含量偏少,而且 DNA 质量也不好。当土壤样品经过冷冻处理后提取 DNA 会出现降解(图 1A),而常温保存提取 DNA 效果较好(图 1B,1C)。

对 DNA 提取后经过电泳图分析有无主带和降解情况,测得 OD260/280 和 OD260/230 来判断所有样品检测结果合格为止。以总 DNA 为模板和设计的引物进行一次 PCR 扩增(图 1D)。利用 AMPure XP 磁珠对 PCR 产物进行纯化。然后定量和均一化形成测序文库。



(图 C 1、2、3、4、5 泳道分别代表 M01、M03、M05、M07、M09)

图 1 固沙植被土壤细菌总 DNA 和 16S rDNA 的 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Amplification of bacterial 16S rDNA and bacterial total DNA from sand-binding plant soil

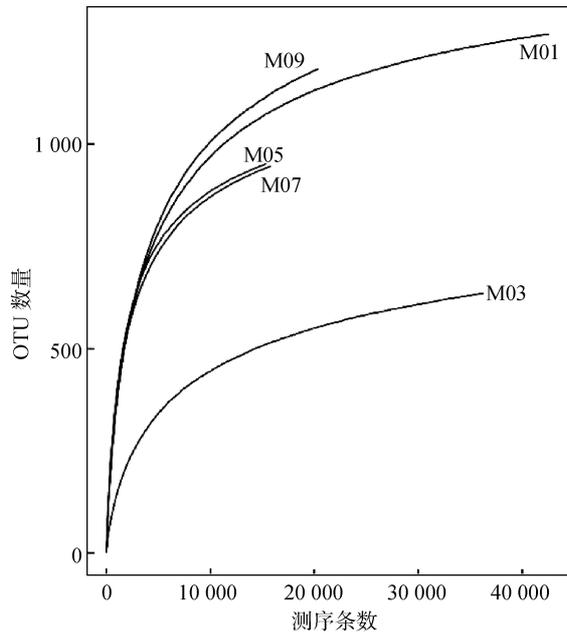
2.3 测序深度评估

对构建的文库进行高通量测序(IlluminaMiSeq 测序平台)得到原始图像数据文件,经碱基识别(Base Calling)分析转化为原始测序序列(Sequenced Reads),结果以 FASTQ(简称为 fq)文件格式存储,其中包含测序序列(reads)的序列信息以及其对应的测序质量信息。对原始测序序列进行过滤,去除带接头(adapter)的 reads 和低质量的 reads 得到高质量的 reads,再利用 Mothur(version 1.34.4, <http://www.mothur.org/>)软件^[15],依据 Needleman-wunsch 算法将原始的双端 Reads 拼接成一条序列即 Raw Tags,进行一系列的去冗余处理和优化后所有样品共得到 Clean Tags 条 13 0429 条序列。为了便于进行物种多样性分析将 Clean Tags 聚类为 OTU。利用 Mothur 软件以平均邻近聚类算法(Average neighbor clustering algorithm)在

0.03(或 97% 的相似度)水平下对 Clean Tags 进行 OTU 的聚类,并统计获得 OTU 的个数。依据每个 OTU 至少被测序到所有序列的 0.005% 次的原则,对获得的 OTU 进行过滤^[16],5 个样品最终共产生 1 703 个 OTU(表 3)。采用对测序序列进行随机抽样的方法,以抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构建曲线(图 2),即稀释性曲线^[17],它可以用来比较测序数量不同的样本物种的丰富度。稀释性曲线图中,当曲线趋向平坦时,说明测序数量合理,更多的数据量对于发现新的 OTU 贡献很小,反之则表明继续测序还可能产生较多新的 OTU。因此,通过作稀释性曲线,可以对测序深度进行评估。从图 4 可以看出克隆数几乎可以较全面地反映微生物的多样性。覆盖度(Coverage C) 64.5% 从理论上讲能反映环境中超过一半的微生物。

表 3 样品 OTU 和序列测定统计
Table 3 The statistics of OTU and sequencing

BMK_ID	M01	M03	M05	M09	M07	总数
OTU 总数	635	1 269	952	1 184	946	1 703
测序条数	36 295	42 574	15 362	20 382	15 816	130 429



(横坐标：随机抽取的测序条数；纵坐标：基于该测序条数聚类得到的 OTU 数量)

图 2 固沙植被土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库 Rarefaction 曲线

Fig. 2 Rarefaction curves of 16S rRNA gene in clone library of soil bacteria under different sand-binding vegetation

2.4 细菌多样性分析

通过 Mothur 软件，将 OTU 中包含的 51% 以上的 Clean Tags 都注释为同一物种，达不到 51% 的标准，则在上一个物种分类等级再进行 OTU 对应物种分析，把序列相似性大于 99% 的归结为同一个细菌的序列。结合每个 OTU 内所含的 Clean Tags 和物种组成信息，可得到各分类学水平上每个物种的相对丰度(表 4 为门水平上的丰度)。发现测得序列可代表 23 个门，74 个纲，131 个目，218 个科，316 个属细菌。其中在属水平上，有 148 个为已知的属，178 个为无类别(unclassified)的属；科水平上，121 个为已知的科，97 个为无类别的科；目水平上，95 个为已知的目，36 个为无类别的目；纲水平上，67 个为已知纲，7 个为无类别的纲；门水平上，22 个已知门，未知的门有 25 种 OTU。得到主要细菌类群有(表 4)：绿弯菌门(*Chloroflexi*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、衣原体门(*Chlamydiae*)、绿细菌门(*Chlorobi*)、迷踪菌

表 4 固沙植被土壤细菌门水平丰度统计
Table 4 Statistics of Phylum_community (%)

门分类学水平	M01	M03	M05	M07	M09	梭梭	柺柳	空地	总丰度
酸杆菌门(<i>Acidobacteria</i>)	5.05	4.21	0.88	3.90	6.13	4.44	1.97	6.14	4.03
放线菌门(<i>Actinobacteria</i>)	34.44	49.1	6.22	37.51	35.68	45.10	24.67	35.69	36.58
拟杆菌门(<i>Bacteroidetes</i>)	5.40	4.67	64.55	13.8	4.36	5.21	42.71	4.37	16.56
衣原体门(<i>Chlamydiae</i>)	0.00	0.019	0.00	0.00	0.00	0.014	0.00	0.00	0.004
绿细菌门(<i>Chlorobi</i>)	0.00	0.002	0.022	0.034	0.085	0.00	0.026	0.085	0.029
绿弯菌门(<i>Chloroflexi</i>)	13.87	9.13	1.18	8.53	9.37	10.4	3.83	9.37	8.41
蓝藻门(<i>Cyanobacteria</i>)	0.114	0.012	0.00	0.015	0.039	0.039	0.005	0.039	0.036
迷踪菌门(<i>Elusimicrobia</i>)	0.044	0.031	0.00	0.020	0.00	0.034	0.007	0.00	0.019
纤维杆菌门(<i>Fibrobacteres</i>)	0.067	0.012	0.00	0.039	0.013	0.033	0.014	0.013	0.026
厚壁菌门(<i>Firmicutes</i>)	1.76	1.37	0.463	1.11	1.37	1.47	0.695	1.37	1.21
芽单胞菌门(<i>Gemmatimonadetes</i>)	4.55	4.12	1.08	3.42	3.73	4.23	1.92	3.73	3.37
硝化螺旋菌门(<i>Nitrospirae</i>)	0.468	0.132	0.27	0.16	0.072	0.223	0.23	0.072	0.22
浮霉菌门(<i>Planctomycetes</i>)	3.52	0.629	0.21	1.15	1.60	1.41	0.55	1.59	1.42
变形菌门(<i>Proteobacteria</i>)	22.9	27.31	24.08	28.1	32.7	24.17	21.94	32.7	25.05
螺旋体门(<i>Spirochaetes</i>)	0.00	0.005	0.00	0.088	0.065	0.003	0.032	0.065	0.032
栖热菌门(<i>Thermi</i>)	0.70	0.061	0.13	0.407	0.124	0.235	0.228	0.124	0.284
TM6, TM7, WS2, FBP, GN02, OD1	1.60	0.758	0.52	0.99	2.12	0.987	0.69	2.12	1.20
无类别	1.80	2.07	0.38	0.70	2.50	1.99	0.49	2.50	1.49

门(*Elusimicrobia*)、纤维杆菌门(*Fibrobacteres*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、螺旋体门(*Spirochaetes*)、栖热菌门(*Thermi*)等。从表 4 可以看出,总的来说,放线菌门为优势菌群占所测的菌类 36.58%;其次是变形菌门约占所测的菌类 25.05%,拟杆菌门约占总数的 16.56%,其余各门所占的比例较少。从土壤层和植被上看,不同土样各门类也有所不同,在柽柳土壤中优势菌群依次为:拟杆菌门、放线菌门、变形菌门,在梭梭植被土壤中优势菌群依次为:放线菌门、变形菌门、绿弯菌门。在空地土壤优势菌群依次为:放线菌门、变形菌门、绿弯菌门,这与梭梭土样比较接近。

将测序中代表主要细菌类群的 OTUs 的 16S rRNA 基因序列与数据库中具有最高相似性的菌株或克隆的序列经比对分析后构建系统进化发育树(图 3)。由图 3 可以看出不同门细菌之间的系统发育关系。第一优势菌放线菌门(*Actinobacteria*)分布在 74 个明确分类地位的属中,除了优势菌链霉菌(*Streptomyces*)外,还发现了拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、疣孢菌属(*Verrucosipora*)、喜冷杆菌属(*Cryobacterium*)、异壁放线菌属(*Actinoalloteichus*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、普氏菌属(*Prauserella*)、链单孢菌属(*Streptomonospora*)、贫养杆菌属(*Modestobacter*)、放线产孢菌属(*Actinomycetospora*)、芽生球菌属(*Blastococcus*)等稀有放线菌属,还有 29 种在属水平上未归类无明确分类地位的属,4 个在科水平上未归类,2 个在目水平上未归类,1 个在纲水平上未归类。拟杆菌门(*Bacteroidetes*)分布在 23 个属中,有黄杆菌属(*Flavobacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、地杆菌属(*Pedobacter*)、噬纤维菌目的嗜寒嗜碱的 *Rhodonellum* 属等已确定分类地位的属,还有 20 种在属水平上未归类。第二优势菌变形菌门(*Proteobacteria*)里除了优势菌 α -变形细菌生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)外,还发现了不动杆菌(*Acinetobacter*)、蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、厌氧螺菌属(*Anaerobiospirillum*)、代尔夫特菌属(*Delftia*)等共 110 个属,其中 52 个在属水平上未归类的潜在新属;有 63 个科,其中有 20 个在科水平上未归类;有 35 个目类,其中有 5 个在目水平上未归类;3 个明确分类的纲,有一个在纲水平上未归类。厚壁菌门(*Firmicutes*)中包括 15 个明确分类地位的属,如梭状芽孢杆菌纲(*Clostridia*)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、杆菌属(*Lysinibacillus*)、颤螺旋菌属(*Oscillospira*)等,还有另外 2 个在属水平

上无归类的属。绿弯菌门(*Chloroflexi*)中有厌氧绳菌纲(*Anaerolineae*)、热微菌纲(*Thermomicrobia*)、绿弯菌纲(*Chloroflexi*)、爬管菌目(*Herpetosiphonales*)等明确分类地位的纲和目,而大部分都是在科和属水平上未归类的(*unclassified*)、无明确分类地位的共 23 个。绿菌门(*Chlorobi*)、衣原体门(*Chlamydiae*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)等包含 OTU 数量极少就不再罗列。本研究分析获得的菌类大部分都属于好气性细菌,极个别是厌氧性细菌,说明好气细菌的数量多于厌氧细菌的数量,但也有可能是厌氧细菌的 DNA 相对好气细菌 DNA 比较难获得导致的。获得 OTU 中有与多种来源各环境如土壤、沙漠、火山、湖泊、海洋等的非培养菌类和分离获得菌株有极高的相似性。例如有与来源于盐碱土和盐湖纯化分离的中度嗜盐菌株(NR_044397)相似性为 98%;有与从沙漠公园里分离得到的噬纤维细菌科的 *Pontibacter* 属的 *Pontibacter soli* sp. 新种同源性达到 99%^[18]。在未归类(*unclassified*)的 OTU 中其相似序列大部分为非培养菌类。这些序列尚难确定其分类地位,可能是代表新属和种的序列,说明固沙植被土壤存在一定数量的潜在微生物新种。这表明沙漠土壤中蕴含着丰富的未培养微生物资源,可以为开发和利用极端环境微生物资源提供参考。

3 讨论

土壤植被可改变土壤结构与环境,不同植物与土壤微生物的互馈效应有所不同。所以,固沙植被土壤与空地土壤微生物有明显的差异。从表 4 可以看出空地没有而梭梭和柽柳群落独有的细菌门为衣原体门(*Chlamydiae*)和迷踪菌门(*Elusimicrobia*)。文献报道迷踪菌门(*Elusimicrobia*)与固氮菌密切相关且大部分属于厌氧细菌^[19],所以在表层和空地里没有获得该门的 DNA 序列。图 4 纵坐标代表相对丰度,横坐标代表梭梭土样、柽柳土样和空地土样,用不同的颜色代表不同科和纲。可以看出梭梭、柽柳和空地样品的物种和丰度有明显的差异。梭梭的土壤环境 pH 明显高于柽柳土壤环境,导致其优势菌群有所不同。有研究^[20]证明放线菌具有喜热耐碱的特性,喜欢在偏碱性环境中生长,因而在碱性较强的梭梭土壤中放线菌数量占优势,而在接近中性的柽柳土壤中拟杆菌占优势。

不仅不同植被的土壤样品有差异,即使是同种植被土样不同土层其样品也有明显的差异。在门和科的水平上对样品和样品所含菌种类进行聚类,对聚类后的各样品中不同 OTU 代表的门和科所含序列的丰度作出 heatmap(图 5)。用颜色变化来反映菌群的丰度信

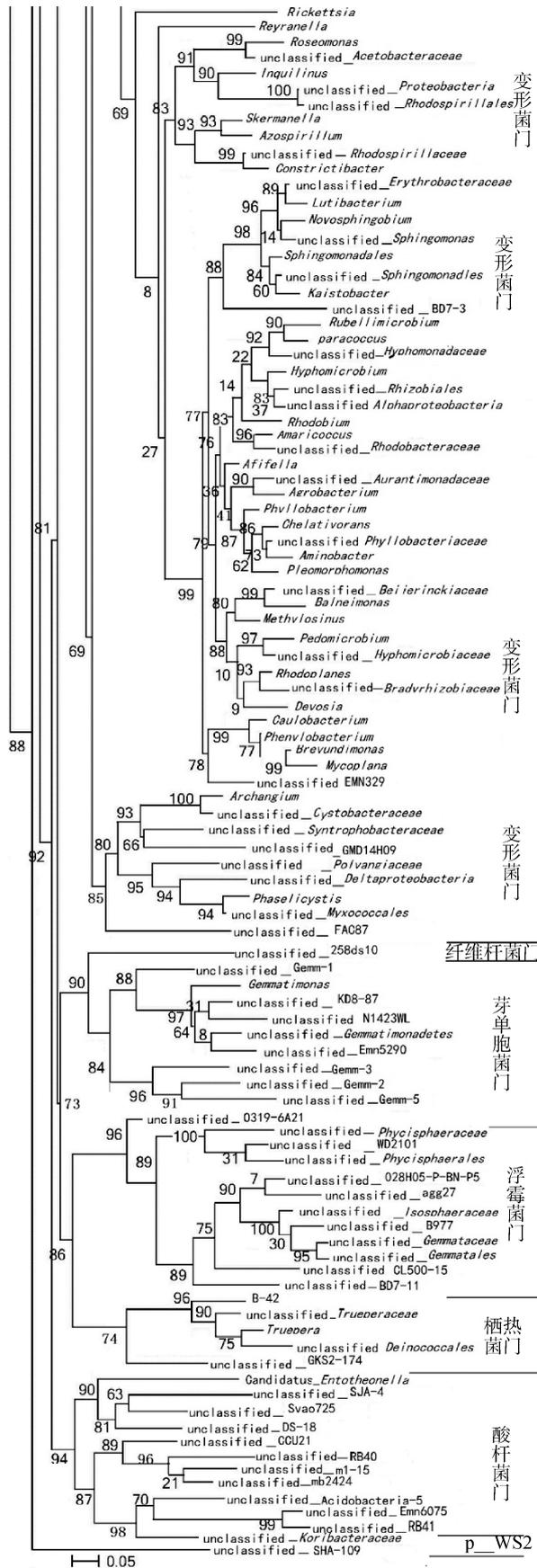


图 3 物种系统进化树——OTU 在属分类学水平上的系统进化树(图中每个叶节点对应一个 OTU)
 Fig. 3 Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA gene clone library from soil under sand-binding vegetation

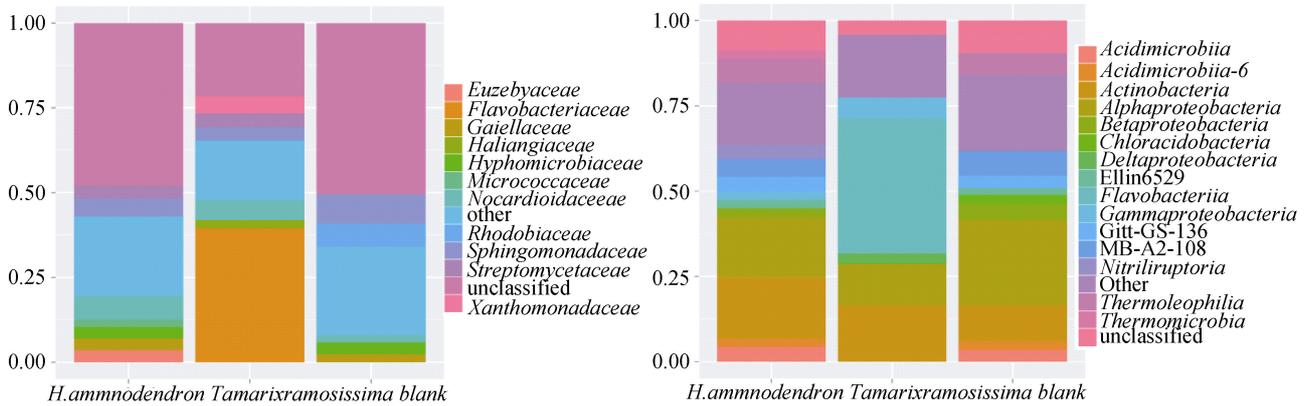
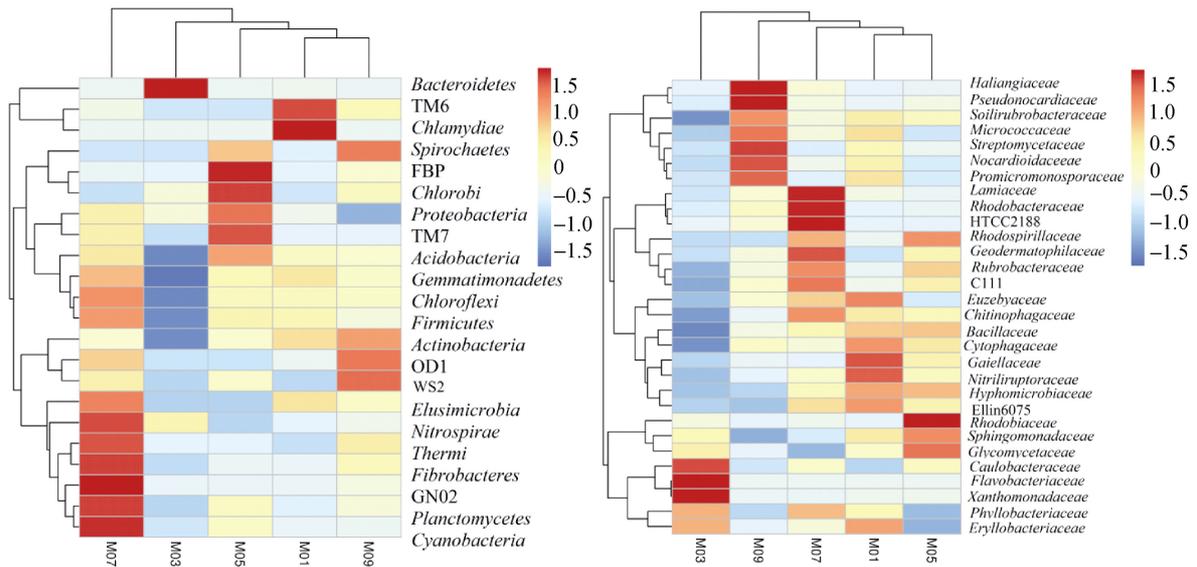


图 4 样品科和纲水平上的物种丰度

Fig. 4 Abundances of sample Family and Class levels



(右上角图例为物种相对丰度值颜色梯度，由蓝色到红色表示相对丰度由低到高)

图 5 样品门和科水平物种 Heatmap 图

Fig. 5 Heatmap of sample Family and Class levels

息,可以直观地将菌群丰度值用定义的颜色深浅表示出来,颜色越深表示相对丰度越高,颜色越浅丰度越低。从图 5 可以看出在天然荒漠不同灌丛沙土和不同土壤层的土样土壤微生物的组成整体变化具有很大的相似性,都可以分为 5 大枝,有一定的共性。在不同土样的群落结构中,变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)的序列总和占全部序列的大部分,这些微生物在其他相关研究的土壤中也曾被报道为优势菌群^[21-22]。这表明尽管取样地点与研究目的不同,但是处于相同生境中微生物类群具有相似性。

但由于环境因子的差异,沙土覆盖植被和土壤深浅的变化的过程中,各种微生物受到了不同程度的影响。每种细菌的丰度有明显的差异。图 5 中如:放线菌门 (*Actinobacteria*)的相对含量从 6.72% (BL) 上升至 57%;未分类门的含量也变化明显不同,其中,

M05 样品中的未分类门含量最多。到了种水平物种分析,通过对 5 种样品的 OTU 进行了统计制得 Van 图(图 6),可以看出 5 个样品即具有相同的物种又具

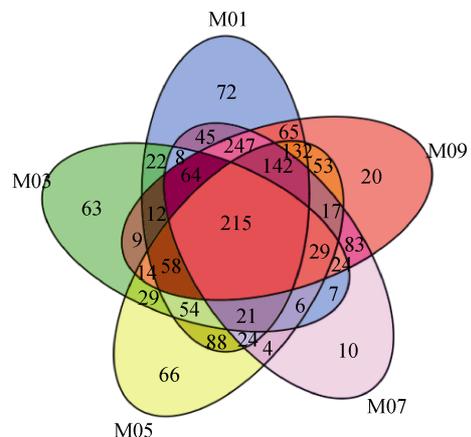


图 6 样品 OTU Van 图

Fig. 6 Sample OTU Van map

有自己特有的物种, 5 个样品有 215 种相同的物种, 每个样品又具有自己特有的物种, 其中, M01、M05、M03 具有 60 种以上自己独有的物种。

自然界中可以影响土壤微生物群落多样性的因素很多, 如植被类型、土壤结构、化学组成、气候变化等^[23-25]。郝金娥^[26]以退化草地土壤微生物为研究对象, 得出微生物生物量碳与细菌和微生物总数量相关性极显著。本研究表明土壤微生物生物量碳土壤表层(0~20 cm)高于下层(20~40 cm), 这与前人^[27]研究结果一致, 即微生物生物量碳最大值都出现在 0~10 cm 土层, 土壤微生物具有一定的垂直分布规律, 因为 0~10 cm 土层植被根系发达、土壤透气性较高, 这一土层为微生物提供了生长空间与绝大部分的营养物质, 相比较深的土层, 这一土层微生物大量繁殖, 活性最高。然而随着土壤层次的加深, 植物根系分布减少、土壤透气性降低, 这都不利于微生物通过吸收植物营养或固定大气中的 CO₂ 来维持其生命活动所需。而从本研究结果可以看出土壤表层微生物总量较高, 但微生物种类不一定最大, 这个结论有待进一步研究。有结果表明沙漠土壤植被水分情况的变化可导致土壤和沉积物中含氧量的变化, 进而影响微生物的群落组成^[28]。也有研究表明水分含量对于决定湿地微生物群落结构十分重要^[29], 我们的研究结果与此一致。本研究测得表层土壤水分低于深层土壤, 获得的 OTU 数量也是表层土壤低于深层土壤, 说明在土壤表层微生物的种类略多于深层(20~40 cm)土壤。在对湿地土壤细菌多样性的研究中^[30], 得出土壤含水量的增加减少了酸杆菌的分布, 而增加了变形菌的分布, 我们的研究结果中也可以看出相似的趋势。

本研究测得序列经过与已发表的序列比对发现除了与已经有明确分类地位且可以培养的细菌具有很近的同源关系, 还与一些未培养细菌和没有分类地位的菌同源关系很近。分析得到丰富的细菌多样性与通过传统培养细菌法在沙漠土壤中分离得到种类数量较多的微生物具有相似性^[31-32], 得到的菌类数量涵盖了 Ajar 在印度的北喜马拉雅山脉西部寒冷的沙漠土壤里收集获得的全部代表种类(4 个门 31 个属 82 个种的 232 个分离菌)^[33]。通过分类分析获得的种类大部分属好气性细菌, 群落结构具有普遍性, 即与目前已经获得的土壤微生物群落结构相似, 但又有其独特的菌类, 比如栖热菌门(*Thermi*)。在黄河三角洲土壤微生物群落结构对盐生植被演替的响应研究时, 邢平平^[34]将异常球菌-栖热菌门(*Thermi*)的出现作为土壤环境恶化的标志类群, 说明此门细菌是适应土壤缺水 and 营养而产生的菌类, 它普遍存在于沙漠土壤和贫

瘠的土壤中。

值得注意的是, 由于胁迫带来的选择压力可以促进初始群落迅速进化。本研究中样本间的差异除了已知的菌属外, 还有很多不明确的菌属未知种类, 说明本土样品微生物群落有很多潜在的新的未知微生物种类, 其功能特性还有待于进一步开发。由于研究的局限, 很多迅速进化的菌群还未得到认知, 所以极端环境带来的迅速进化可能是微生物群落的结构和功能对特定胁迫尤其是长期胁迫产生抵抗力和恢复力的重要机制^[35]。这也可能是沙漠植被维持沙漠生态系统稳定性的重要机制之一。

4 结论与展望

通过本研究得到以下结论: 荒漠植被土壤微生物数量较一般土壤少, 生物活性极弱, DNA 提取难度大; 沙漠植被土壤细菌多样性丰富, 所有测得细菌分属到 23 个门和 316 个属, 还存在一定数量的潜在微生物新种; 土壤理化因子等因素导致样品分析结果有较明显的差异, 如土壤含水量与酸杆菌和变形菌的分布相关; 相对于空地, 梭梭和柽柳群落土壤独有的迷踪菌门(*Elusimicrobia*)与固氮菌密切相关; 梭梭的土壤环境 pH 明显高于柽柳土壤环境决定了它们不同的优势种; 土壤微生物生物量碳的大小不能反映微生物生物量的种类多少, 但可以反映微生物数量的多少等。

本研究通过高通量测序针对固沙植物群落土壤微生物群落进行了研究, 其成果为植被恢复和荒漠化控制提供了宝贵的参考资料, 但仍有一些问题需要进一步探讨, 如对于固沙植物群落深层土壤微生物的研究和微生物功能数量与土壤养分和植被的关系, 如何使用更多手段和方法用来研究土壤微生物群落对环境胁迫的抵抗力和恢复力等, 需要再进一步研究。而且, 特定的长期胁迫的环境带来的微生物迅速进化下样品含有大量未知菌群, 这可能为认识沙漠土壤生态系统稳定性另辟蹊径。

参考文献:

- [1] Copley J. Ecology goes underground[J]. Nature, 2000, 406: 452-454
- [2] Abbott L K, Tang C X, Reuter D. Soil-plant-microbe interactions from microscopy to field practice[J]. Plant Soil, 2011, 348: 1-5
- [3] Stroud J L, Paton G I, Semple K T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: Implications for biodegradation and bioremediation[J]. Appl. Microbiol., 2007, 102: 1 239-1 253

- [4] Cavagely M A, Robertson P. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem[J]. *Ecology*, 2000:1 402–1 414
- [5] 陈华癸. 土壤微生物学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 253–272
- [6] 赵丽莉, 李侠, 许冬梅. 盐池县草地沙漠化过程中土壤微生物的变化[J]. *西北农业学报*, 2013, 22(7): 187–192
- [7] Dose K, Bieger-Dose A, Ernst B, et al. Survival of microorganisms under the extreme conditions of the Atacama Desert[J]. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 2001, 31: 287–303
- [8] Vishnevetsky S, Steinberger Y. Bacterial and fungal dynamics and their contribution to microbial biomass in desert soil[J]. *J. Arid. Environ.*, 1997, 37(7): 83–90
- [9] Ziehr L. Microbial biodiversity along an arid watershed[D]. Lubbock: Texas Tech University, 1997
- [10] Chanal A, Chapon V, Benzerara K, et al. The desert of Tataouine: An extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria[J]. *Environ. Microbiol.*, 2006, 8: 514–525
- [11] Subramanya R, Yuki C, Donnabella C. et al. Pointing microbial diversity in soil, sand dune and rock substrates of the Thar Monsoon Desert, India[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2016, 56(1): 35–45
- [12] Saul-Tcherkas V, Steingerber Y. Temporal and shrub adaptaion affect on soil microbial functional diversity in a desert system[J]. *European Journal of Soil Science*, 2009, 60: 871–882
- [13] 钱亦兵, 张立运, 吴兆宁, 等. 新疆准噶尔盆地边缘部分地段生态环境特征[J]. *干旱区地理*, 2003, 26(1): 30–36
- [14] Ana-Maria T, Ioana M, Iulia C, et al. Comparison of total DNA extraction methods for microbial community form polluted soil original research[J]. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2015, 6: 616–622
- [15] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-cupported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 5(23): 7 537–7 541
- [16] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illuminaamplicon sequencing[J]. *Nature methods*, 2013, 10(1): 57–59
- [17] Amato K R, Yeoman C J, Kent A, et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouattapigra*) gastrointestinal microbiomes[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(7): 1 344–1 353
- [18] Dai J, Xu M B, Peng F, et al. *Pontibacter soli* sp. nov., isolated from the soil of a *Populus* rhizosphere in Xinjiang, China[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, 105(1): 65–72
- [19] Zheng H, Dietrich C, Radek R. *Endomicrobium proavitum*, the first isolate of *Endomicrobia* class. nov. (phylum *Elusimicrobia*)—an ultramicrobacterium with an unusual cell cycle that fixes nitrogen with a Group IV nitrogenase[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(1): 191–204
- [20] 李鑫, 张会慧, 岳冰冰, 等. 桑树–大豆间作对盐碱土碳代谢微生物多样性的影响[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(7): 1 825–1 831
- [21] Hollister E B, Engledow A S, Hammett A J, et al. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments[J]. *ISME J.*, 2010, 4(6): 829–838
- [22] Will C, Thurmer A, Wollherr A, et al. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2010, 76: 6 751–6 758
- [23] Truu M J, Juhanson J T. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands[J]. *Science of Total Environment*, 2009, 407: 3 958–3 971
- [24] Zhao Y J, Liu B, Zhang W G. An Effects of plant and influent C : N : P ratio on microbial diversity in pilot-scale constructed wetlands[J]. *Ecological Engineering*, 2010, 36: 441–449
- [25] 钟芳, 柴晓虹, 王国基, 等. 植被恢复方式对黄土丘陵区土壤理化性质及微生物特性的影响[J]. *中国沙漠*, 2014, 34(4): 1 064–1 072
- [26] 郝金娥. 江河源区不同植被演替阶段土壤微生物数量及微生物生物量碳的特性[D]. 西宁: 青海大学, 2010
- [27] 卢虎, 姚拓, 李建宏, 等. 高寒地区不同退化草地植被和土壤微生物特性及其相关性研究[J]. *草业学报*, 2015, 24(5): 34–43
- [28] 杨航宇, 刘艳梅, 王廷璞. 荒漠区生物土壤结皮对土壤酶活性的影响[J]. *土壤学报*, 2015, 52(3): 654–664
- [29] Tang Y S, Wang L, Jia J W, et al. Response of soil microbial community in Jiuduansha wetland to different successional stages and its implications for soil microbial respiration and carbon turnover[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43: 638–646
- [30] 隋心, 张荣涛, 钟海秀, 等. 利用高通量测序对三江平原小叶章湿地土壤细菌多样性的研究[J]. *土壤*, 2015, 47(5): 919–925
- [31] 罗明, 单娜娜, 文启凯, 等. 几种固沙植物根际土壤微生物特性研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2002, 8(6): 618–622
- [32] Hanna A L, Youssef H H, Amer W M, et al. Diversity of bacteria nesting the plant cover of north Sinai deserts, Egypt[J]. *Journal of Advanced Research*, 2013, 4:13–26
- [33] Yadav A N, Sachan S G, Verma P, et al. Prospecting cold deserts of north western Himalayas for microbial diversity and plant growth promoting attributes[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(6): 683–693
- [34] 邢平平. 黄河三角洲土壤微生物群落结构对盐生植被演替的响应[D]. 济南: 山东师范大学, 2013
- [35] 关统伟. 新疆罗布泊盐湖放线菌多样性及多相分类[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012

Phylogenetic Diversity Preliminary Analysis of *Haloxylon ammnodendron* and *Tamarix ramosissima* Soil Bacteria

YANG Ruihong^{1,2,3}, ZHAO Chengyi^{2*}, WANG Xinjun³, MA Yali¹

(1 *Xinjiang Education Institute, Urumqi 840043, China*; 2 *Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China*; 3 *Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China*)

Abstract: Microbiological mixed DNA (genomic DNA) was directly extracted from soil in the Gurbantunggut desert. Using Illuminamiseq sequencing platform, diversity of community structure was analyzed from the bacterial 16S rDNA. The research showed that: 1) Because of the low quantity of microbe in desert vegetation soil and the low activity, there were many difficulties in the DNA extraction; 2) In total, measured sequences belonged to 23 phyla and 316 genera, among them, some sequences were uncultured groups that had an uncertain affiliation, which had been submitted to the GenBank PEBL PDDBJ databases under accession numbers KT984242–KT984249. 3) There were some discrepancies between groups. The difference was affected by factors such as soil physical and chemical factors. The water content influenced the amount of *Proteobacteria* and *Acidobacteria*. The unique *Elusimicrobia* was the soil of plant *Haloxylon ammnodendron* and *Tamarix ramosissima*, which was closely related to the nitrogen fixing bacteria. The soil microbial biomass carbon could reflect the quantity of microorganism but not the types of microorganism.

Key words: *Haloxylon ammnodendron*; *Tamarix ramosissima*; DNA extraction; Microbiology diversity; Phylogenetic analysis