

宁夏贺兰山东麓贫营养土壤中细菌多样性

马悦, 赵辉, 徐春燕, 赵亚兰, 苏建宇

(宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:以宁夏贺兰山东麓荒漠贫营养土壤为研究对象,采用 PCR-DGGE 技术,对土壤中细菌群落和多样性进行了研究。结果表明:不同采样环境土壤中细菌群落组成及多样性存在一定差异,其优势种群均为未培养细菌,且多数分类地位未知。土壤细菌多样性指数和微生物生物量与土壤有机质含量和含水量呈极显著相关($P<0.01$),有机质含量和含水量是影响贫营养土壤中微生物种类和数量组成的重要因素。

关键词:荒漠土壤;贫营养细菌;PCR-DGGE;细菌多样性

中图分类号:S 154.38⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0157-04

有机质含量不足 2% 的土壤、水体等环境称为贫营养环境。自然界绝大多数自然环境属贫营养环境,如海洋中有机质含量仅为 0.35~70 mg/L,湖泊为 0.1 mg/L。土壤生态环境中,由于地上植被生产力不高使得土壤缺乏可利用性营养物质的现象也越来越普遍^[1-5]。在贫营养土壤环境中,微生物是其中最为活跃的生物因素,其生命活动影响着土壤的结构和肥力,决定了土壤的理化条件。因此,贫营养土壤中微生物的种类和数量组成已引起越来越多的生态学家和环境学家的关注。

由于传统分离方法只能培养出自然界中 0.1%~10% 的微生物^[6],加之贫营养微生物生长缓慢,营养要求特殊^[4],因而很难被分离和培养。近年来,随着分子生物学技术的发展,变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)等 DNA 指纹图谱技术为土壤微生物多样性研究提供了新的手段。与传统方法相比, DGGE 法具有不需要培养、检测极限低、检测速度快且经济、结果准确可靠及可同时检测多种微生物等优点,近年来被广泛应用于土壤微生物多样性分析中。

宁夏贺兰山东麓位于银川平原的西部边缘,受自然环境和人为因素影响较大,为特殊的贫营养环境。现针对宁夏贺兰山东麓荒漠贫营养土壤中细菌组成及多样性进行研究和分析,以期荒漠化土壤的生态修复提供基础数据。

第一作者简介:马悦(1987-),女,回族,硕士研究生,研究方向为环境微生物学。E-mail:1046637201@qq.com.

责任作者:苏建宇(1968-),男,博士,教授,现主要从事微生物资源开发与利用等研究工作。E-mail:su_jy@nxu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260023)。

收稿日期:2015-05-25

1 材料与方法

1.1 试验材料

土壤样品采集于宁夏银川贺兰山东麓(北纬 38°40'~38°41',东经 105°58'),选择相隔 1 km 的 3 个无人涉足、无苔藓、地衣和高等植物生长的地点,分别在岩石周围、裸露地表和丘陵阳坡(分别编号为 1、2、3)以 3 点取样法,垂直采取 1~20 cm 深度的土壤,每点取样量大体一致。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤样品处理 土样用 16 目圆孔筛除石头颗粒杂质,装入灭菌的封口聚乙烯袋中,放入带有冰块的保温箱中带回实验室,4℃ 保存。

1.2.2 16S rDNA V3 区扩增 采用 OMEGA 公司的 Soil DNA Kit(D5625-01)提取土壤微生物基因组。用 1% 的琼脂糖电泳检测提取的 DNA。采用细菌通用引物 357F-GC 和 517R^[7]进行 16S rDNA V3 区扩增。PCR 反应体系:Go Taq Green Master Mix (2× Green Go Taq Reaction Buffer, pH 8.5 400 μmol/L dNTP、3 mmol/L MgCl₂) 25 μL,上游引物(10 μmol/L)2 μL,下游引物(10 μmol/L)2 μL,模板 DNA 3 μL,用 ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应采用降落 PCR 策略:94℃ 预变性 5 min,前 24 个循环为 94℃ 45 s,65~59℃ 1 min,72℃ 45 s(其中每隔一个循环退火温度下降 0.5℃),然后 94℃ 45 s,53℃ 1 min,72℃ 45 s,最后在 72℃ 下延伸 5 min。由于贫营养土壤中 DNA 含量较低,故 PCR 扩增时,以第一次 PCR 的扩增产物作为模板再次进行 PCR,以增加其产物特异性,用做后续 DGGE 检测的样品。

1.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE) Bio-Rad 公司 Dode™ Universal Mutation Detection System 进行 DGGE。

电泳条件为:变性梯度 50%~75%,PCR 产物上样量 40 μ L,60℃,160 V,1×TAE 电泳缓冲液下电泳 6.5 h, Gel-RedTM 染色 30 min。Bio-Rad 公司 Gel DOC 2000 凝胶成像系统拍照,Bio-Rad Quantity One 4.62 软件分析图谱。参考胡元森等^[8]的方法分离回收特异性优势目标条带送上海英潍捷基测序,测序结果在 GenBank 的 BLAST 中进行比对。

1.3 项目测定

土壤有机质含量采用重铬酸钾容量法测定^[9]。土壤含水量测定采用烘干法^[10]。微生物生物量测定采用总核酸法。称取 10 g 土壤样品放入 50 mL 无菌离心管中,加入 40 mL 无菌水,25℃充分震荡冲洗 20 min,室温 3 000 r/min 离心 3 min,离心后弃去上清液。加入 5 mL 10%的 TCA,充分震荡冲洗 20 min,室温 3 000 r/min 离心 3 min,离心后弃去上清液。加入 5 mL 10%的 TCA,沸水浴 30 min,室温 3 000 r/min 离心 3 min,离心后取 1 mL 上清液,用 10%的 TCA 稀释定容至 5 mL,260 nm 下测定 OD 值,以 OD₂₆₀ 值代表土壤微生物生物量。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 土壤有机质含量、含水量和生物量

由图 1、2、3 可以看出,3 份土样的有机质含量、含水量和生物量由高到低均为岩石周围>裸露地表>丘陵阳坡,其中有机质含量和生物量在不同样品间均差异显著($P<0.05$),含水量则为岩石周围土样水分含量相对较高,与裸露地表及丘陵阳坡差异显著($P<0.05$)。

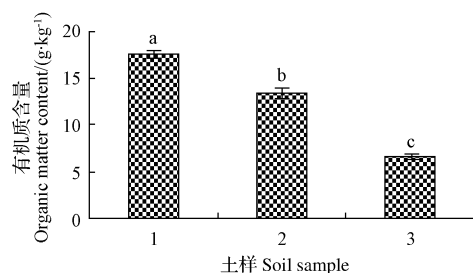


图 1 土壤有机质含量

Fig. 1 Soil organic matter content

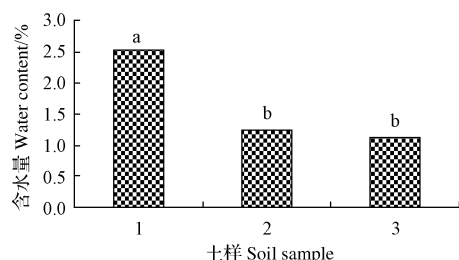


图 2 土壤含水量

Fig. 2 Soil water content

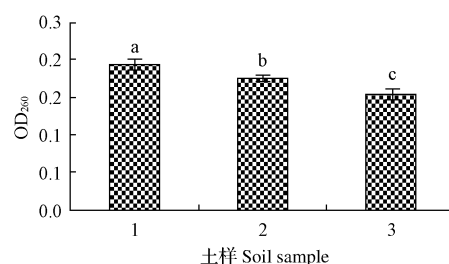
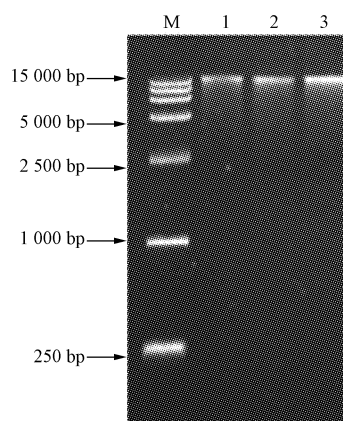


图 3 土壤微生物量

Fig. 3 Soil microbial biomass

2.2 土壤总 DNA 提取

由图 4 可知,提取的土壤总 DNA 经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,获得了 15 000 bp 左右较完整的 DNA 条带,无明显拖带现象。



注:M 为 DL 1 500 Marker。

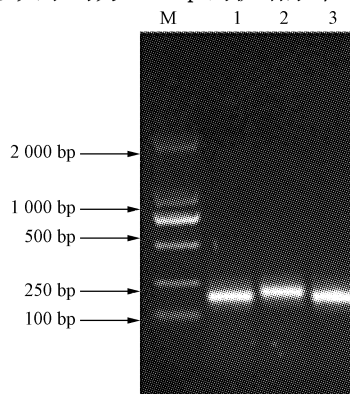
Note:M,DL 1 500 Marker.

图 4 土壤总 DNA 提取电泳图

Fig. 4 The profile of total DNA extracted from soil

2.3 16S rDNA V3 区片段扩增

以土壤总 DNA 为模板,进行 16S rDNA V3 区片段扩增,得到了大小约为 200 bp 的扩增条带(图 5),与理论



注:M 为 DL 2 000 Marker。

Note:M,DL 2 000 Marker.

图 5 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

Fig. 5 PCR amplified of 16S rDNA V3 fragments

值相符。扩增产物特异性好,可以作为 DGGE 的样品。

2.4 土壤细菌组成及多样性

2.4.1 DGGE 图谱及分析 由图 6 可知,不同土壤样品细菌群落及多样性均存在一定差异。DGGE 条带数的多少反映了样品中细菌的多样性,条带亮度则反映了该种细菌的数量。3 个样品的 DGGE 条带数从 13 条至 22 条不等,其中 1 号样品的条带数最多,说明岩石周围土壤中细菌的多样性高于裸露地表和丘陵阳坡。3 个样品中,a、b、c、d、e、f、g 分离带均有存在,且亮度相对较高,说明这 7 种细菌是该土壤环境中的基本种群,同时是该土壤环境中的优势菌种。3 个样品中各自存在一些特有条带,如土样 1 中 o、p 条带、土样 2 中 i 条带及土样 3 中 m 条带。

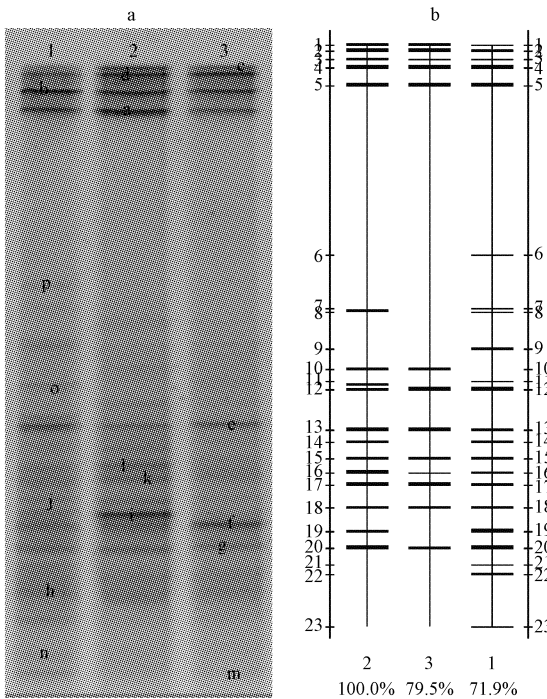


图 6 16S rDNA V3 区扩增片段 DGGE 结果(a)及电泳比较图(b)

Fig. 6 DGGE result of 16S rDNA V3 fragments (a) and electrophoretic comparison chart (b)

2.4.2 土壤细菌多样性 由表 1 可知,3 个土样间 DGGE 图谱的相似性均高于 60%,其中土样 2 和土样 3 的相似性最大为 79.5%,土样 1 和土样 3 的相似性最小为 69.7%。由表 2 可知,土样 1 香农指数、均匀度指数和丰富度均最高,而土样 3 最低。

表 1 细菌 16S rDNA V3 区扩增片段 DGGE 的相似性矩阵

Table 1 The similarity matrix of 16S rDNA V3 fragments

样品编号 No.	1	2	3
1	100.0	71.9	69.7
2		100.0	79.5
3			100.0

表 2 样品细菌多样性、均匀度指数及丰富度

Table 2 Shannon-wiener index(H), evenness(E)and richness(S)of samples

样品编号 No.	香农-威纳多样性指数 H	均匀度指数 E	丰富度 S
1	3.013	0.975	22
2	2.801	0.969	18
3	2.484	0.968	13

2.4.3 土壤优势细菌组成 选择 DGGE 图谱中亮度明显较高的条带 a~p 进行切胶回收,对纯化后的 DNA 片段进行测序,测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对,结果见表 3。比对结果表明,所有回收条带的基因序列与 GenBank 中相应的 16S rDNA 序列的相似性均大于 95%。回收条带所对应的均为未培养细菌,其中条带 b 与 δ-变形菌纲(Delta proteobacteria)序列相似,条带 d 与小单孢菌属(*Micromonospora*)序列相似,条带 f 与新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium*)序列相似,条带 m 与酸微菌亚目(*Acidimicrobinea*)序列相似,条带 o 与放线菌目(*Actinobacterales*)序列相似,其余条带均属未鉴定微生物。

表 3 DGGE 测序比对结果

Table 3 Sequence alignment with blast

条带 Band	高度相似的序列 Similar sequence	收录号 Record No.	相似性 Similarity / %
a	Uncultured bacterium, clone B3	GU977200.1	99
b	Uncultured Delta proteobacteria clone IC28	JN697139.1	95
c	Uncultured bacterium, clone DGGE band R-GE34-40A38	HE586785.1	100
d	Uncultured <i>Micromonosporaceae</i> bacterium clone CNY_01707	JQ401570.1	98
e	Uncultured bacterium clone VR-12-72	GQ495565.1	100
f	Uncultured <i>Novosphingobium</i> sp. Clone DGGE band 31	HF546541.1	100
g	Uncultured bacterium clone YF406	KF037814.1	97
h	Uncultured bacterium clone MD2O4O3aO1	JN701144.1	100
i	Uncultured bacterium clone MONEDAS-MON3-C43	EU248658.1	99
j	Uncultured bacterium clone 9-920	KC554495.1	100
k	Uncultured bacterium clone MONEDAS-MON4-C15	EU248661.1	100
l	Uncultured bacterium clone Madera471	AY647426.1	98
m	Uncultured <i>Acidimicrobinea</i> bacterium clone C139500104	JX528992.1	99
n	Uncultured bacterium clone U_SA2_A03	FJ167023.1	99
o	Uncultured <i>Actinomycetales</i> bacterium clone CNY_01027	JQ401063.1	98
p	Uncultured bacterium clone GB7N87003GROL0	HM655078.1	95

2.5 土壤各指标间相关性分析

由表 4 可知,土壤细菌多样性指数和微生物生物量与土壤有机质含量和含水量均呈极显著相关($P < 0.01$),说明有机质含量和含水量是影响贫营养土壤中微生物种类和数量组成的重要因素。

表 4 土壤各指标相关性分析

Table 4 The correlation analysis between different soil index

指标 Index	多样性指数 Diversity index	生物量 Biomass
有机质	0.873 **	0.957 **
含水量	0.767 **	0.917 **

注: * 表示 0.05 水平差异性, ** 表示 0.01 水平的差异性。
Note: * stands for significant difference at 0.05 level; ** stands for significant difference at 0.01 level.

3 讨论

荒漠化环境中,高等植物很难自然存活,以植树种草方式进行的荒漠化治理需要消耗宝贵的地下水资源。贫营养细菌适应于干旱贫瘠环境,是荒漠化土壤中最为活跃的生物因子,具有重要的生态学作用。有研究表明,在古尔班通古特沙漠中喷洒贫营养细菌培养物,能明显提高土层的全磷、全钾、有效氮和有效磷含量^[11];潘惠霞等^[12]从新疆古尔班通古特沙漠生物结皮的下层分离到一株可分泌大量胞外黏多糖的贫营养细菌,该菌的培养物喷洒于流沙表面后可形成一层具有粘结沙粒的细菌结皮,可防止沙漠流动,在改善和保护生态环境方面具有重要应用价值。

宁夏贺兰山为石质山地,植被覆盖度低,多岩石裸露,年蒸发量是降水量的5~6倍,空气干燥,土壤贫瘠,是典型的荒漠贫营养环境。研究结果表明,该地区土壤中细菌多样性较为丰富,但大多数属于未培养微生物,这与张伟等^[13]的研究结果一致。为了进一步阐明贫营养细菌在荒漠土壤中的生态学效应,筛选具有生态修复作用的微生物菌株,有必要对该环境中贫营养微生物的分离培养方法进行进一步的研究,得到有生态应用价值的微生物菌株,开发相应的微生物制剂及土壤生态治理的技术方法。

参考文献

[1] LI G B, YIN C Q, LIN Y B, et al. Artificial improvement of soil fertility in a regraded forest ecosystem by using municipal sewage sludge[J]. Chinese

Journal of Applied Ecology, 2002, 13(2): 159-162.

[2] LI Y, WANG Y B, LIU D Y. Investigation on the vegetation of copper tailing wasteland in Shizishan, Tongling, Anhui Province[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(11): 1981-1984.

[3] NIU S L, JIANG G M. Function of artificial grassland in restoration of degraded natural grassland and its research advance[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(9): 1662-1666.

[4] RAPPE M S, GIOVANNONI S J. The uncultured microbial majority[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 369-394.

[5] XIA H P, CAI X. Ecological restoration technologies for mined lands[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(11): 1471-1477.

[6] AMANN R I, LUDWIG W, SEHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in site detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiology Reviews, 1995, 59: 143-169.

[7] MUYZER G, WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymersase chain reaction amplified genes coding for 16 sRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.

[8] 胡元森, 刘亚峰, 吴坤, 等. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究[J]. 土壤通报, 2006, 37(1): 126-129.

[9] 沈宏, 曹志洪, 胡正义. 土壤活性有机碳的表征及其生态效应[J]. 生态学杂志, 1999, 18(3): 32-38.

[10] 刘春生, 杨守祥. 农业化学分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996.

[11] 张元明, 杨维康, 王雪芹, 等. 生物结皮影响下的土壤有机质分异特征[J]. 生态学报, 2005, 25(12): 3420-3425.

[12] 潘惠霞, 程争鸣, 张元明, 等. 寡营养细菌(*Oligotrophic bacteria*)及其固沙作用的研究[J]. 中国沙漠, 2007, 27(3): 473-477.

[13] 张伟, 朱艳蕾, 朱晓莹, 等. 新疆贫营养环境微生物数量及多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(2): 370-374.

Study on Bacterial Diversity in the Eastern Side of Ningxia Helan Mountain

MA Yue, ZHAO Hui, XU Chunyan, ZHAO Yalan, SU Jianyu

(College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking desert oligotrophic soil from eastern wide of Ningxia Helan Mountain as the research object, by using the way of PCR-DGGE, the community and diversity of soil bacteria were detected. The results showed that there were some differences in the bacteria community and diversity among soil samples which were collected from different sampling environment. All dominant populations of bacteria in soil samples were uncultured and classificatory position of most of them were unknown. Soil bacteria diversity index and microorganisms biomass are significantly correlated to soil organic matter and water content ($P < 0.01$). Organic matter and water content were important factors affecting the composition of microorganism's species and quantity in oligotrophic soil.

Keywords: desert soil; oligotrophic microorganism; PCR-DGGE; bacterial diversity