

张变华,靳东升,郜春花,等. 不同方法分析工矿复垦区不同植物根际微生物多样性的比较[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):223-226.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.051

不同方法分析工矿复垦区不同植物根际微生物多样性的比较

张变华¹,靳东升²,郜春花²,郜雅静²,李建华²

(1.忻州师范学院,山西忻州 034000; 2.山西省农业科学院农业环境与资源研究所,山西太原 030031)

摘要:以山西古交屯兰工矿复垦区为研究对象,从不同植物种植、不同耕作制度的视角出发,将传统分析与现代技术分析相结合,分析比较工矿复垦区植物根际微生物的多样性,旨在为提高工矿区复垦的土壤质量提供理论依据。传统分析结果表明,豆科植物根际微生物细菌与放线菌的数量要高于禾本科植物,毛苕子根际细菌、放线菌数量与 Shannon 多样性指数均高于其他植物,在大豆—玉米—玉米轮作制度下,大豆根际细菌、放线菌数量与 Shannon 多样性指数高于玉米—大豆—大豆轮作制度下玉米根际的相应指标。用 16S rDNA V3 ~ V4 区操作分类单元(operational taxonomic units,简称 OTU)进行不同植物根际细菌 α 多样性分析,发现自然恢复土壤的 Chao1 丰富度高于种植植物的土壤,与种植植物根际土壤微生物的群落结构截然不同,连种毛苕子根际与玉米—大豆—大豆轮作制度下的玉米根际土壤具有丰度较低的相似性微生物属,大豆与苜蓿的根际微生物具有相似的亲缘性。

关键词:工矿复垦区;植物根际;微生物多样性;Shannon 多样性指数

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0223-04

土壤微生物是维持土壤活性的重要组成部分,参与有机质分解、养分转化和循环等多种生化过程,其多样性是评价土壤环境质量的重要生物学指标^[1]。矿区复垦土壤具有有机质含量低、团聚体少、微生物活性差的特点,然而提高矿区复垦土壤质量可以缓解我国人均耕地少、质量差的现状,并保持农业可持续发展。根际是连接植物、土壤和微生物的纽带,植物根系通过分泌物、脱落物与植物残体等影响根际土壤微生物群落代谢与种群结构,进而改变根际土壤环境^[2]。了解不同植被类型根际土壤的理化及微生物学特性,可以直接或间接反映植被对土壤的改良作用及植被恢复的生态效果。当前国内外的相关研究主要集中在根际与非根际土壤理化性质、土壤微生物多样性、土壤酶活性等方面^[3-5],目前仅有少量学者在工矿区开展了不同植物根际的评价研究^[6-11],对于山西工矿复垦区不同植物根际生物学性质的相关研究较少。因此,将山西省古交屯兰矿区复垦地作为试验区,研究在种植不同植物的条件下根际土壤微生物多样性特点具有重要意义,可以为土壤质量改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验区位于山西省古交屯兰工矿复垦区,于 2014 年开始

收稿日期:2017-12-05

基金项目:国家重点联合基金子课题(编号:U1710255-6);山西省农业科学院省政府重点工作项目(编号:YCX2017D2501);忻州师范学院院级课题(编号:sk201407)。

作者简介:张变华(1976—),女,山西偏关人,硕士,讲师,主要从事矿区复垦与生态重建研究。E-mail:sxdxbh@126.com。

通信作者:靳东升,硕士,副研究员,主要从事矿区复垦与生态重建研究。E-mail:sxdxjds@126.com。

复垦,试验时为复垦第 4 年,该区年均气温为 9.5 °C,平均降水量为 460 mm,为温带大陆性气候,乡土作物为玉米、大豆。本试验设置 5 个小区,分别为大豆—玉米—玉米轮作区、玉米—大豆—大豆轮作区、连作苜蓿区、连作毛苕子区、自然恢复区。2017 年,在大豆—玉米—玉米轮作区种植大豆,在玉米—大豆—大豆轮作区种植玉米。

1.2 材料与方法

土样采集。在 2017 年 9 月在各试验区内选择大小差不多的大豆 15 株,玉米 5 株;对于种植苜蓿、毛苕子与自然恢复的小区,划定 1 m × 1 m 区域采集样品,设 3 次重复。采用抖落法^[12]抖掉大块土壤,用毛刷轻轻地将根上 0 ~ 5 mm 的土壤刷下作为根际土,收集在无菌塑料袋中,再放入装有冰袋的保温箱内,带回实验室立即进行化验,不能进行及时化验的放入 -80 °C 冰箱中保存。

试验方法。(1)采用传统微生物培养法测定土壤微生物数量,细菌培养采用牛肉膏蛋白胨培养基,放线菌培养采用高氏改良培养基,真菌培养采用孟加拉红培养基。微生物数量以单位质量(g)干土中的菌落数表示。(2)称取 10 g 根际土壤,放入灭菌的、装有 90 mL 0.85% NaCl 的带玻璃珠的三角瓶中,在旋转式摇床上于 250 r/min 充分振荡 30 min,连续 2 次进行 10 倍稀释后,在 Biolog 生态微板的每个孔中加入 150 μ L 土壤接种液,放入 28 °C 培养箱中培养,用 Biolog 分析仪每隔 24 h 读取各孔的吸光度,连续测定 7 d。(3)16S rDNA 高通量测序,由上海派森诺生物公司对植物根际进行微生物组 DNA 提取、目标片段 PCR 扩增、产物回收纯化、荧光定量等,用 MiSeq 测序仪测定不同植物根际微生物 V3 ~ V4 区的操作分类单元(operational taxonomic units,简称 OTU)。

数据分析。用 Excel、SPSS 及 R 软件进行方差分析与聚类分析。

2 结果与分析

2.1 传统微生物培养结果

2.1.1 细菌培养结果 从图1可以看出,豆科植物毛苕子、苜蓿、大豆的根际细菌数量要高于禾本科植物玉米的根际细菌数量,毛苕子根际土壤的细菌数量最多,根际土壤细菌数量排序为毛苕子>大豆>自然恢复>苜蓿>玉米。

2.1.2 放线菌培养结果 从图2可以看出,豆科植物毛苕

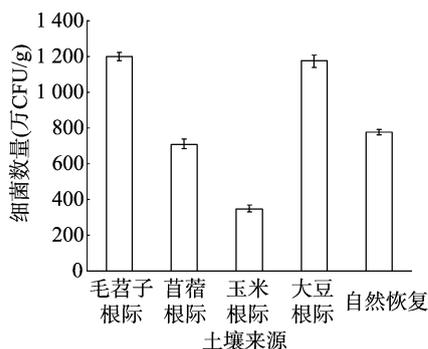


图1 不同植物的根际细菌数量

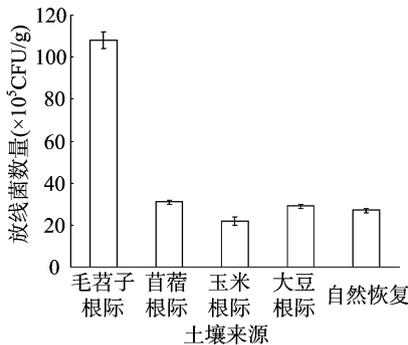


图2 不同植物的根际放线菌数量

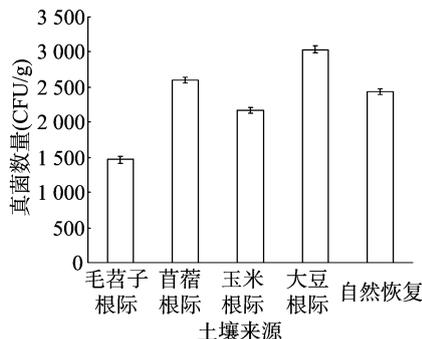


图3 不同植物的根际真菌数量

2.2 用 Biolog 生态微板分析微生物代谢功能的多样性

2.2.1 不同植物根际微生物群落土壤微生物的平均颜色变化率(AWCD)的动态变化 AWCD表示微平板孔中颜色的平均变化率,用来描述土壤微生物的代谢活性,计算公式如下: $AWCD值 = [\sum(C - R)]/95^{[13]}$ 。其中: C 是所测95个反应孔的吸光度, R 是对照孔的吸光度。

从图4可以看出,不同植物根际微生物群落的AWCD值随着培养时间的增加均呈现增长的趋势,土壤微生物群落利用碳源的能力逐渐增强。从接种到培养24h,各处理样品平均吸光度无明显变化,微生物几乎没有代谢碳源。在培养24h后的任何时间段,毛苕子的AWCD值最高,说明其碳源利用速率高,根际土壤微生物活性较高。在培养24~48h内,自然恢复(NR)的AWCD值要高于玉米、苜蓿,但是培养48h后,其利用的碳源量虽然在逐渐增加,但是增长缓慢,在培养72h后的任何时间段均低于种植其他植物的,且在培养72h后的任何时间点,植物根际的AWCD值均表现为毛苕子>大豆>苜蓿>玉米>自然恢复。

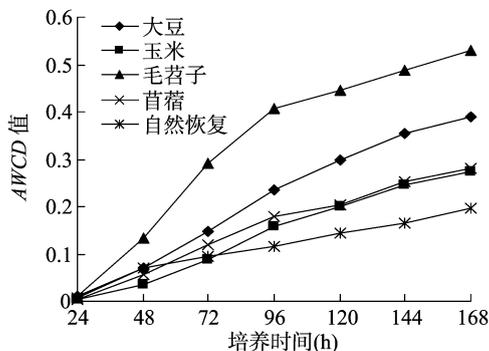


图4 不同植物根际微生物的AWCD值的动态变化

2.2.2 不同植物根际微生物多样性指数的差异 微生物多样性指数表征整个生态系统中土壤微生物群落利用碳源类型的多少,即功能多样性。表征土壤微生物代谢功能多样性的指标为土壤微生物香农-维纳指数 H' 、Shannon多样性指数

子、苜蓿、大豆的根际放线菌数量要高于禾本科植物玉米的根际放线菌数量,但是苜蓿、玉米、大豆与自然恢复的根际放线菌数量相差不多,根际放线菌数量排序为毛苕子>苜蓿>大豆>自然恢复>玉米。

2.1.3 真菌培养结果 从图3可以看出,豆科植物苜蓿、大豆的根际真菌数量要高于禾本科植物玉米的根际真菌数量,也高于自然恢复的,连种毛苕子的根际真菌数量最少,各个条件下的真菌数量排序为大豆>苜蓿>自然恢复>玉米>毛苕子。

H' 、McIntosh均一度指数 U 和 Simpson优势度指数 $D^{[14]}$,计算公式见表1。

表1 土壤微生物群落功能多样性指数计算方法

多样性指数	计算公式	变量解释
香农-维纳指数	$H' = -\sum P_i \ln P_i$	P_i 表示第 <i>i</i> 孔的吸光度占总吸光度的比例
多样性指数(H)	$H = H'/\ln s$	s 为颜色变化的孔的数量
均一度指数(U)	$U = \sqrt{(\sum n_i^2)}$	n_i 为第 <i>i</i> 孔的相对吸光度
优势度指数(D)	$D = 1 - \sum P_i^2$	同上

本研究采用96h的数据来分析计算土壤微生物多样性指数,由表2可见,工矿区不同植物根际土壤微生物群落的优势度指数(D)均无显著差异,毛苕子根际土壤微生物群落Shannon指数 H 与均一度指数 U 显著高于其他植物($P < 0.05$),且根际土壤微生物群落香农-维纳指数 H' 也高于自然恢复与禾本科植物玉米。自然恢复的均一度指数与Shannon指数 H 最低,与玉米、苜蓿的香农-维纳指数 H' 均无显著差异,但是显著低于轮作大豆根际土壤微生物群落的香农-维纳指数 H' ($P < 0.05$),说明该矿区自然恢复的土壤微生物利用碳源的能力较差,代谢功能差,活性较低。而毛苕子根际土壤利用碳源的能力最强,活性最高。不同轮作制度下大豆与玉米相比大豆根际土壤活性较强,利用碳源能力高于玉米根际,在工矿复垦初期豆科与禾本科植物轮作与连作豆科植物对土壤微生物群落结构的影响不同。

2.2.3 16S rDNA 根际细菌 α 多样性分析 微生物群落 α 多

表2 不同植物根际微生物群落多样性指数

小区	H 值	D 值	U 值	H' 值
大豆	0.56 ± 0.01b	0.93 ± 0.03a	1.89 ± 0.01b	2.87 ± 0.09a
玉米	0.44 ± 0.01bc	0.92 ± 0.01a	1.48 ± 0.11c	2.65 ± 0.17b
毛苕子	1.02 ± 0.12a	0.93 ± 0.01a	3.42 ± 0.28a	2.81 ± 0.21a
苜蓿	0.53 ± 0.02b	0.90 ± 0.03a	1.75 ± 0.17b	2.61 ± 0.08b
自然恢复	0.34 ± 0.03c	0.91 ± 0.02a	1.11 ± 0.05c	2.63 ± 0.15b

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

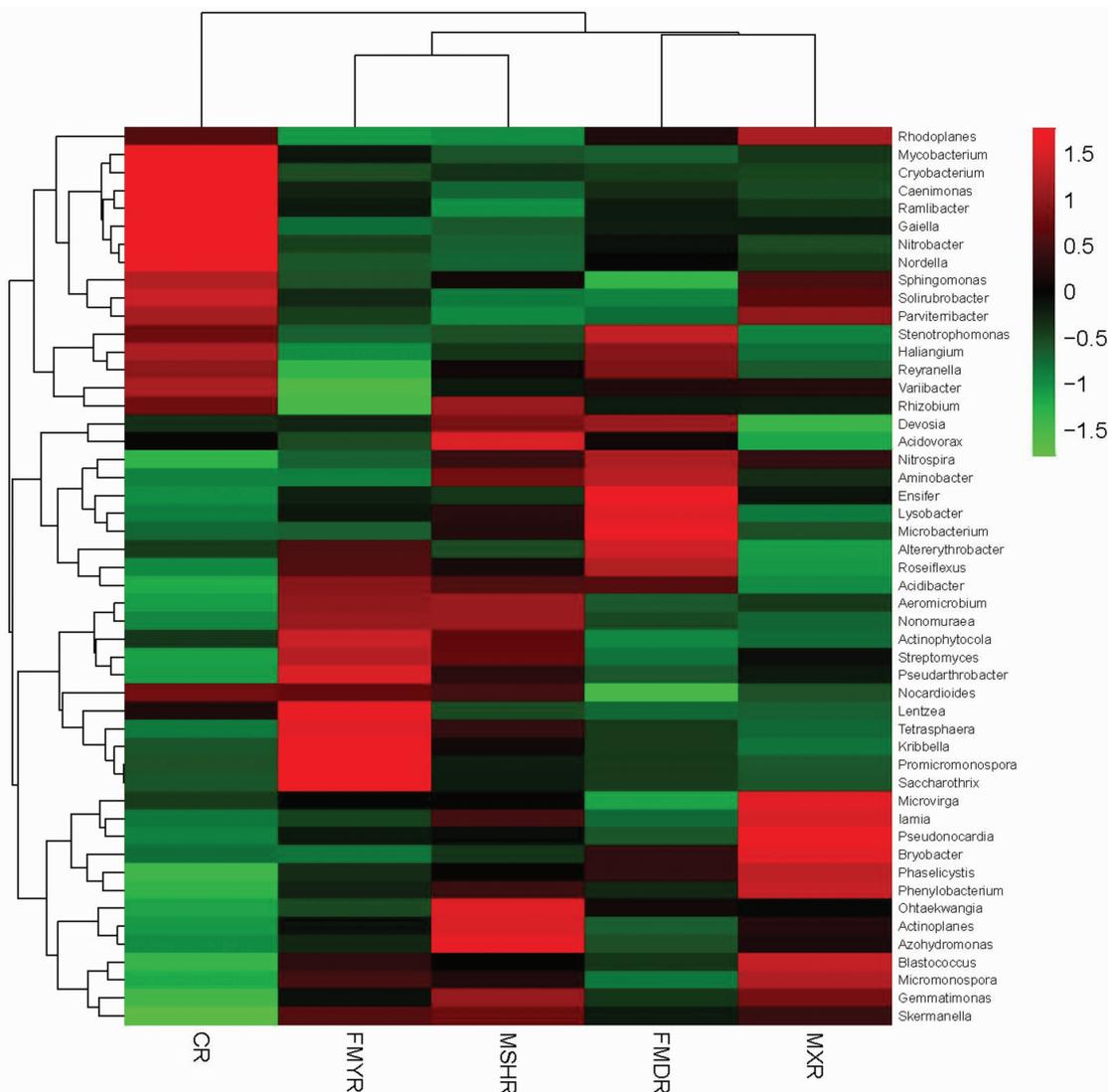
样性可以用多种指数来反映,本研究选用 Chao1 丰富度估计指数、Shannon 多样性指数。一般而言,Chao1 指数越大,表明群落的丰富度越高。Shannon 多样性指数综合考虑了群落的丰富度和均匀度。Shannon 指数越高,表明群落的多样性越高。从表 3 可以看出,自然恢复的根际土壤 Chao1 指数最大,轮作大豆根际土壤的 Chao1 指数最小,苜蓿根际土壤的 Shannon 指数最高,而轮作玉米根际土壤的 Shannon 指数最小。

根据样本间的相似程度对丰度排名前 50 位的属进行聚类并绘制热图,对高丰度和低丰度的分类单元加以区分,以颜色梯度反映样本之间的群落组成相似度。从图 5 可以看出,主要可以分为自然恢复与种植植物 2 类,其中种植植物类可

表 3 不同植物根际细菌微生物多样性指数比较

小区	Chao1 指数	Shannon 指数
大豆	1 945	9.60
玉米	2 141	8.99
毛苕子	2 217	9.46
苜蓿	2 880	9.62
自然恢复	2 884	9.34

以分为 2 类,自然恢复根际土壤中丰度较高的微生物属主要有 *Mycobacterium* (分枝杆菌属)、*Cryobacterium* (喜冷杆菌属)、*Caenimonas*、*Ramlibacter* (沙壤土杆菌属)、*Gaiella* (放线菌属)、



图中自上而下拉丁学名对应的中文名: 1—红动杆菌属; 2—分枝杆菌属; 3—喜冷杆菌属; 4—中文未命名; 5—沙壤土杆菌属; 6—放线菌属; 7—硝化菌属; 8—诺德氏菌属; 9—鞘氨醇单胞菌属; 10—土壤红杆菌属; 11—微土杆菌属; 12—寡养单胞菌属; 13—赭黄嗜盐囊菌属; 14—中文未命名; 15—变杆菌属; 16—根瘤菌属; 17—德沃斯氏菌属; 18—食酸菌属; 19—硝化螺菌属; 20—氨基杆菌属; 21—剑菌属; 22—溶杆菌属; 23—细杆菌属; 24—交替赤细菌属; 25—嗜热光合细菌; 26—酸杆菌; 27—气微菌属; 28—野野村菌属; 29—植物放线菌属; 30—链霉菌属; 31—假节杆菌属; 32—类诺卡氏属; 33—伦茨氏菌属; 34—四球菌属; 35—韩国生工菌属; 36—原小单孢菌属; 37—糖丝菌属; 38—微枝形杆菌属; 39—中文未命名; 40—诺卡氏菌属; 41—蕨杆菌属; 42—豆状囊菌属; 43—苯基杆菌属; 44—中文未命名; 45—游动放线菌属; 46—固氮变形菌属; 47—芽球菌属; 48—小单孢菌属; 49—芽单胞菌属; 50—斯克尔曼氏菌属

图5 不同植物根际细菌属聚类

Nitrobacter (硝化菌属)、*Nordella* (诺德氏菌属)。在轮作制度下,大豆与连种苜蓿相似的属主要有 *Variibacter* (变杆菌属)、*Rhizobium* (根瘤菌属)、*Ohtaekwangia*、*Lentzea* (伦茨氏菌属)与 *Gaiella* (放线菌属),但是丰度均不高;在玉米—大豆—大豆轮作制度下,玉米与连种毛苕子根际细菌群落的相似属主要有 *Pseudonocardia* (诺卡式菌属)、*Microvirga* (微枝形杆菌属)、*Aeromicrobium* (气微菌属)与 *Nonomuraea* (野野村菌属),丰度也不高。

3 结论与讨论

3.1 不同方法的优点及局限性

传统微生物培养分析法简单、快速、易操作,适用于测定具有特殊生理功能的微生物,然而有许多微生物无法培养,难以测定^[15-17];Biolog 分析主要通过研究对单一碳源底物利用能力的不同来鉴定微生物群落结构,有方便快捷、灵敏度高、分辨率强等优点^[18],可弥补其他方法无法获得微生物群体活性信息的不足^[19],但是培养条件的改变可能会引起微生物对碳底物实际利用能力的改变,从而造成一定的误差,同时目前标准数据库中菌种资料不完善,一些种类不能被准确鉴定,只能得到相似类群^[20-21];16S rDNA 高通量测序法主要通过提取微生物组总 DNA 并进行定量,扩增,纯化,测序,从而鉴定微生物菌群结构^[22],但是对于序列相同的不同细菌难以进行鉴定。

3.2 矿区不同植物根际微生物多样性差异

植物影响土壤环境,有研究表明,不同植物根系分泌物的成分与含量不同,植物根际微生物的功能代谢有差异^[23],因此不同植物对土壤微生物群落的影响不同^[24]。在本研究中,用传统培养法得到的结果表明,该工矿复垦区不同植物根际微生物数量不同,豆科植物根际微生物细菌、放线菌数量要多于禾本科植物,这可能与豆科植物本身具有较强的固氮能力相关。Biolog 技术分析表明,不同植物根际微生物利用碳源能力存在差异性,自然恢复可利用碳源的微生物活性最低,代谢功能最差,可能与复垦初期自然恢复土壤有机质含量低有关,而毛苕子根际微生物活性最高。16S rDNA 分析表明,自然恢复根际微生物与种植植物根际微生物差异大,且微生物丰度最高,但是多样性指数低于豆科植物,高于禾本科植物。

3.3 将来的研究方向

本研究区处于工矿复垦初期,矿区生态环境恢复与耕地面积的增加是当地农业可持续发展的关键,在民生福祉的建设中意义重大,因此,需要多种方法与技术相结合并进行长期监测以关注矿区土壤质量的变化,为矿区生态建设提供理论依据。

参考文献:

[1] 杨海君,肖启明,刘安元. 土壤微生物多样性及其作用研究进展[J]. 南华大学学报(自然科学版),2005,19(4):21-26,31.
 [2] 陆雅海,张福锁. 根际微生物研究进展[J]. 土壤,2006,38(2):113-121.
 [3] 安韶山,李国辉,陈利顶. 宁南山区典型植物根际与非根际土壤微生物功能多样性[J]. 生态学报,2011,31(18):5225-5234.
 [4] 孟令军,耿增超,殷金岩,等. 秦岭太白山区 6 种中草药根际与非根际土壤化学性质及酶活性[J]. 应用生态学报,2012,23(10):

2685-2692.

[5] Adriaensen K, van der Lelie D, van Laere A, et al. A zinc - adapted fungus protects pines from Zinc stress[J]. New Phytologist, 2004, 161(2):549-555.
 [6] 滕应,黄昌勇,龙健,等. 复垦红壤中牧草根际微生物群落功能多样性[J]. 中国环境科学,2003(3):72-76.
 [7] 高婷. 矿区与非矿区艾蒿根部微生物数量比较研究[J]. 广东农业科学,2009(5):155-157.
 [8] 湛方栋,何永美,李元,等. 云南会泽废弃铅锌矿区和非矿区三种野生植物根际微生物研究[J]. 土壤通报,2010(2):337-341.
 [9] 杨期和,刘惠娜,李清华,等. 粤东铅锌尾矿区 3 种优势植物根际土壤微生物的活性研究[J]. 中国农学通报,2012,28(30):56-64.
 [10] 王义,李少朋,陈铸,等. 丛枝菌根真菌对采煤塌陷地玉米生长的影响[J]. 安徽农业科学,2013(30):12113-12115.
 [11] 侯颖. 采煤塌陷复垦初期土壤微生物及根际效应研究[J]. 广东农业科学,2013,40(15):72-75.
 [12] Riley D, Barber S A. Bicarbonate accumulation and pH changes at the soybean root - soil interface[J]. Soil Science Society of America Journal, 1969,33(6):905-908.
 [13] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community - level sole - carbon - source utilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991,57(8):2351-2359.
 [14] 时鹏,高强,王淑平,等. 玉米连作及其施肥对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报,2010,30(22):6173-6182.
 [15] 蔡燕飞,廖宗文. 土壤微生物生态学研究方法进展[J]. 土壤与环境,2002,11(2):167-171.
 [16] Louise M D, Gwyn S G, John H, et al. Management influences no soil microbial communities and their function in botanically diverse hay meadows of northern England and Wales[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000,32(2):253-263.
 [17] Zq H, Wei Z Y, Qin P. Contamination character analysis of filling reclaimed soil with fly ash in subsided land [J]. China Environmental Science, 2004,24(3):311-315.
 [18] 郑华,欧阳志云,方治国,等. BIOLÓG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J]. 土壤学报,2004,41(3):456-461.
 [19] Garland J L, Lehman R M. Dilution/extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999,30(4):333-343.
 [20] Medeiros P M, Fernandes M F, Dick R P. Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil [J]. Chemosphere, 2006,65(5):832-839.
 [21] 钟文辉,蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法[J]. 应用生态学报,2004,15(5):899-904.
 [22] 刘国华,叶正芳,吴为中. 土壤微生物群落多样性解析法:从培养到非培养[J]. 生态学报,2012,32(14):4421-4433.
 [23] Nayyar A, Hamel C, Lafond G, et al. Soil microbial quality associated with yield reduction in continuous - pea[J]. Applied Soil Ecology, 2009,43(1):115-121.
 [24] Harch B D, Correll R L, Meech W, et al. Using the Gini coefficient with BIOLÓG substrate utilisation data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities[J]. Journal of Microbiological Methods, 1997,30(1):91-101.