

不同干扰方式对喀斯特生态系统土壤细菌 优势类群—变形菌群落的影响*

陈香碧^{1,2,3} 苏以荣^{1,3†} 何寻阳^{1,3} 覃文更⁴ 魏亚伟^{1,2,3}
梁月明^{1,3} 吴金水¹

(1 中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态重点实验室,长沙 410125)

(2 中国科学院研究生院,北京 100049)

(3 中国科学院环江喀斯特农业生态试验站,广西环江 547100)

(4 广西木论国家级自然保护区,广西环江 547100)

摘要 以喀斯特原生林为对照,运用 16S rRNA 基因的 PCR-RFLP 和测序技术对该区不同人为干扰方式下土壤细菌的群落结构进行了分析。结果显示 4 个样地中变形菌占总克隆子数的 41.3%,是研究区土壤中的优势细菌类群。与原生林地相比较,受人为干扰的生态系统土壤中变形菌明显减少,自然恢复地、农耕地和放牧+冬季火烧草地减少了 30.2%~47.4%。自然恢复地、放牧+冬季火烧草地与原生林地土壤中变形菌的 4 个亚群丰度分布关系一致,均为 α -> δ -> β -> γ -变形菌,而农耕地则为 δ -> α -> β -> γ -变形菌,说明自然恢复和放牧+冬季火烧草地对喀斯特土壤变形菌的恢复作用有限,而对变形菌 4 个亚群之间的分布关系有明显的正效应,尤其是自然恢复地中 α -变形菌得到了很好的恢复,较农耕地增加了 130%。四个样地中,占总克隆子数 16.5% 的克隆子被归类为根瘤菌目,且以原生林地最多,是 3 个干扰样地的 1.6~3.7 倍。基于以上研究结果,未来可考虑种植本土固氮植物结合接种相应的固氮微生物作为恢复喀斯特退化生态系统的措施之一。

关键词 喀斯特;人为干扰;16S rRNA;变形菌

中图分类号 S154.3; Q938.1 文献标识码 A

喀斯特地区是世界上主要的生态脆弱带之一,环境和生态学家们已将“喀斯特”作为世界性的难题予以关注^[1]。我国是世界上喀斯特面积最大、分布最广的国家。在人地矛盾尖锐的喀斯特山区,人为干扰直接影响着喀斯特生态系统的演变过程。由于喀斯特独特的地质背景加上生存型经济发展阶段不合理的土地开发方式使该区域生态环境不断恶化,土地石漠化^[2],导致喀斯特严重缺水、缺土,自然灾害频繁发生。已有研究表明,喀斯特山区耕作、毁林开荒、刈割、过度开垦、火烧、过度放牧等人为干扰严重影响了土壤肥力^[3]、土壤种子库的组成与分布^[4]、植被群落演替^[5]、植被物种多样性^[6]等。

土壤中栖息着各种各样的生物,这些生命有机

体以及它们产生的特殊的酶对喀斯特生态系统的演进有着极其重要的作用^[7]。土壤微生物可以敏感地指示气候和土壤环境条件的变化,是最早用于反映土壤质量的指标之一^[8]。肥沃的土壤一般具有良好的生物活性和稳定的微生物种群组成^[9]。作为土壤微生物的重要组成成分,一些细菌能与植物形成共生体,为植物生长提供营养,并增加土壤肥力^[10],而一些细菌则在植物凋落物的降解、土壤养分循环、土壤理化性质的改善中起着重要作用。近年来,随着人们对土壤微生物重要生态学意义的认识不断加深,对土壤微生物多样性的研究日益增多^[11-12]。对西南喀斯特生态系统微生物多样性的研究表明,喀斯特地区严重的人为干扰造成的植被退化,影响了土壤微生物多样性和群落结构^[13-14]。

* 中国科学院知识创新重要方向项目(KSCX2-YW-436, KZCX2-YW-JC403)、国家自然科学基金面上项目(30970538)和国家科技支撑计划项目(2011BAC09B02, 2009BAD6B08)共同资助

† 通讯作者, E-mail: yrsu@isa.ac.cn

作者简介:陈香碧(1982—),女,博士研究生,主要从事土壤环境生态和微生物分子生态学研究

收稿日期:2010-10-12;收到修改稿日期:2011-01-05

但对喀斯特区域不同人为干扰方式下优势细菌类群的具体变化情况尚未报道。

本文运用 16S rRNA 基因的克隆技术,以桂西北喀斯特原生林地作为对照,研究 3 种不同人为干扰方式下土壤细菌优势类群的群落结构,旨在发掘喀斯特生态系统中优势细菌类群与人为干扰协同变化的规律,为构建喀斯特退化生态系统恢复技术体系提供参考,并为喀斯特相关微生物资源的研究、保护、开发和利用提供一定的基础资料。

1 材料与方法

1.1 研究区概况与样品采集

研究区位于桂西北环江毛南族自治县(24°44′~25°33′N,107°51′~108°43′E),属中亚热带季风气候区,年均气温 16.5~19.9℃,年均降雨量为 1389 mm,具有典型喀斯特地貌。于 2007 年 11 月,在研究区选取了由棕色石灰土发育的 1 个原生植被对照样地(KPF,样地描述见文献[14])及 3 个干扰生态系统的样地:自然恢复地(KNR,位于环江县古周村,曾为玉米-大豆/玉米-红薯轮作地,现已退耕

20 年以上,草本层植被丰富,覆盖度 >99%,枯枝落叶层厚 1~3 cm,优势植物为五节芒(*Miscanthus floridulus*)、类芦(*Neyraudia reynaudiana*)、莠竹(*Microstegium nodosum*)、白茅(*Imperata cylindrica*)、农耕地(KMS,位于环江县古周村,近年来耕作制度为玉米-大豆/玉米-红薯轮作,耕种年限 >100 年)和放牧+冬季火烧草地(KGB,样地描述见文献[14])。每个样地中随机设置 3 块面积为 10 m×10 m 的小样地(3 个重复样品),每个小样地按五点混合法采集表层(0~20 cm)土样约 1 kg,混匀。用四分法分取约 150 g 土,用灭菌锡箔包好放入灭菌布袋,立即投入液氮速冻,带回实验室经冷冻干燥、磨细分装后,置于 -70℃ 保存用于微生物 DNA 提取;剩余土样,按相同方法分取一部分置于 4℃ 用于微生物生物量分析,另一部分风干、磨细后用于土壤理化性质测定。同时,每个样地分别按“S”型采集 4 个原状土样(0~20 cm),每个原状土 2~3 kg,装入防挤压盒子带回实验室,风干至含水量约为田间持水量的 20% 时,沿土壤缝隙将土剥开至 10~12 mm 土块,继续风干,保存,采用湿筛法测定土壤各粒径水稳定性团聚体含量。土壤基本理化性质见表 1。

表 1 不同样地土壤的基本理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of the different soils

样地编号 Sample code	有机质 Organic matter (g kg ⁻¹)	全氮 Total N (g kg ⁻¹)	碱解氮 Alkali-hydrolyzable N (mg kg ⁻¹)	微生物 生物量碳 MBC (mg kg ⁻¹)	微生物 生物量氮 MBN (mg kg ⁻¹)	pH (H ₂ O)	团聚体(湿筛) Aggregate (Wet sieving method) (g kg ⁻¹)					
							>5	5~2	2~1	1~0.5	0.5~0.25	<0.25
							mm	mm	mm	mm	mm	mm
KPF	94.8a	5.9a	369.3a	1996a	343.0a	7.3a	345.4b	349.7a	84.3a	51.5b	32.5c	136.5c
KNR	26.3b	1.6b	72.0b	476.9b	58.7b	7.1a	665.7a	115.8b	35.0b	27.8c	25.5c	130.2c
KMS	12.3b	1.0b	20.0b	171.8b	23.4b	7.0a	0c	49.7c	50.6b	90.6a	183.5a	625.6a
KGB	18.0b	1.2b	44.4b	390.9b	49.8b	6.0b	341.0b	83.4b	70.7a	86.0a	120.1b	298.9b

注: KPF: 原生林地; KNR: 自然恢复地; KMS: 农耕地; KGB: 放牧+冬季火烧草地; 下同。表中同列相同字母表示差异未达显著水平($p > 0.05$, 邓肯法) Note: KPF: Primeval forest soil; KNR: Naturally restored land; KMS: Cropland; KGB: Grazing grassland with annual burning in winter; the same as below. Values within a column with the same letter are not significant in difference ($p > 0.05$, Duncan's method)

1.2 DNA 提取和质量检测

采用改进的 SDS-GITC-PEG 法提取土壤微生物总 DNA,操作步骤详见文献[14]。用核酸蛋白测定仪(Eppendorf)检测所得 DNA 的浓度和质量。以 A_{260}/A_{280} 衡量蛋白质污染程度(值在 1.7~1.8 之间较好), A_{260}/A_{230} 衡量腐殖酸污染程度(值在 1.7~2.0 之间较好)。

1.3 16S rRNA 片段的扩增、克隆、酶切和测序

以土壤微生物总 DNA 为模板,运用细菌通用引

物 27F 和 1487R 扩增 16S rRNA 基因片段(约 1.5 kb)。以 PGEM-T 载体将 16S rRNA 基因片段克隆至大肠杆菌中,经蓝白斑筛选,各样品选 200 个阳性克隆的 PCR 产物用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Hae* III 进行酶切,操作步骤详见文献[14]。随机选择具有相同酶切图谱(被认为是同一个可操作分类单元, OTU^[15])的克隆子中的一个为代表进行测序。

1.4 土壤细菌多样性指标计算方法

以双酶切产生的图谱及克隆子数量为基础数

据分析细菌群落多样性。以 Shannon-Wiener 指数 (H) 表征群落多样性^[16], 以 Evenness 指数 (E) 表征群落的均匀度^[17]。计算公式为: $H = - \sum_{i=1}^s \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$,

$E = H / \ln S$ 。

式中, S 为 16S rDNA 的 OTU 总数; n_i 为第 i 种 OTU 的克隆子数; N 为总克隆子数 200。

1.5 DNA 序列分析及系统发育树的构建方法

从各 OTUs 中随机抽取一个克隆子, 以 Sp6 和 T7 为引物进行基因双向测序(上海生工生物工程公司完成)。所得序列运用 DNAMAN 4.0 软件进行拼接和编辑, 然后与 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 和 Ribosomal Database Project 9.0 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu>) 中分类确定的 16S rRNA 基因序列进行比较, 按相似性为 97%、95%、92%、91% 和 80% 分别确定种、属、科、目和门(群)的规则对序列进行遗传分类^[18]。将序列与 GenBank 中相似性较高的已知序列用 Clustal X 1.8 进行多重比对, 结果用 Mega 4.0 邻接

法构建 16S rRNA 基因系统发育树。本研究所获得的 16S rRNA 基因序列已提交 GenBank 数据库, 序列登录号为: EU881088 ~ EU881358。

1.6 数据处理

运用 SPSS 13.0 软件对样地的土壤基本理化性质作 t 检验。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物总 DNA 的提取效果及细菌群落多样性分析

从各样地中提取的微生物总 DNA 片段大小约为 23 kb。DNA 得率以 KPF 样地最高, 为 $17.54 \pm 2.04 \mu\text{g g}^{-1}$, 是其他 3 个样地 DNA 得率的 2 ~ 2.6 倍(表 2), 间接说明 KPF 样地中微生物数量最多。总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 值表明, 从 4 样地中提取的 DNA 几乎无蛋白质污染, 但均受到一定程度的腐殖酸污染, 其中以 KPF 污染较轻。

表 2 土壤微生物总 DNA 提取效果及细菌群落多样性

Table 2 Extraction of total soil microbial DNA and diversity of bacterial community

样地编号 Sample code	DNA 浓度 DNA concentration($\mu\text{g g}^{-1}$)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	OTUs 数量 Number of OTUs	多样性指数 (H) Diversity index	均匀度指数 (E) Evenness index
KPF	17.54 ± 2.04	1.86 ± 0.01	1.55 ± 0.03	80	4.113	0.939
KNR	8.20 ± 1.63	1.83 ± 0.01	1.08 ± 0.03	66	3.975	0.949
KMS	8.62 ± 1.63	1.87 ± 0.01	1.04 ± 0.06	70	3.985	0.938
KGB	6.76 ± 0.95	1.85 ± 0.01	1.02 ± 0.02	55	3.690	0.921

各克隆库中 OTUs 数量和 Shannon-Wiener 多样性指数 (H) 均以 KPF 样地最高 (80、4.113), KGB 样地最低 (55、3.690), KNR 和 KMS 样地居中, 分别为 66、3.975 和 70、3.938。均匀度指数 (E) 在 4 个样地中差异不大, 为 0.921 ~ 0.949。

2.2 变形菌系统发育分析

4 个克隆库中总共用于酶切分析的 800 个克隆子、271 个 OTUs 被归类为 12 个类群(门), 其中 330 个克隆子、102 个 OTUs 属于变形菌 (*Proteobacteria*), 占总克隆子数的 41.3%。其余被归类为酸杆菌 (*Acidobacteria*, 28.0%), 浮霉菌 (*Planctomycetes*, 10.6%) 及其他类群 (20.1%) (数据未列出)。可见, 变形菌是该研究区土壤中的优势细菌类群。其中, 以 KPF 样地中变形菌最多, 占该克隆库的 58.0%, 其次为 KMS (40.5%) 和 KNR (36.0%), 最少的为 KGB (30.5%) (图 1)。即, 与原生林地相比

较, 受人为干扰的生态系统土壤中变形菌明显减少, 自然恢复地、放牧 + 冬季火烧草地和农耕地分别减少了 37.9%、47.4% 和 30.2%。其中, α -变形菌的变化趋势是一致的, 分别减少了 31.3%、40.3% 和 70.1%; β -变形菌和 δ -变形菌在自然恢复地和放牧 + 冬季火烧草地中呈减少趋势, 而在农耕地中则呈增加趋势; γ -变形菌在 4 个样地中分布均较少, 以农耕地相对较多; 放牧 + 冬季火烧草地土壤中 4 个变形菌亚群数量均较原生林地减少。与农耕地比较, 自然恢复地经过 20 年自然恢复作用, 变形菌不但没有增加, 反而略有减少, 这是因为在自然恢复过程中 β -变形菌和 δ -变形菌的急剧减少 (分别减少了 83.3% 和 38.2%), 但 α -变形菌得到了很好的恢复 (增加了 130%)。有意义的是, 自然恢复地、放牧 + 冬季火烧草地与原生林地中变形菌的 4 个亚群分布关系一致, 均为 $\alpha \rightarrow \delta \rightarrow \beta \rightarrow \gamma$ -变形菌, 而农耕地则为 $\delta \rightarrow \alpha \rightarrow \beta \rightarrow \gamma$ -变形菌。

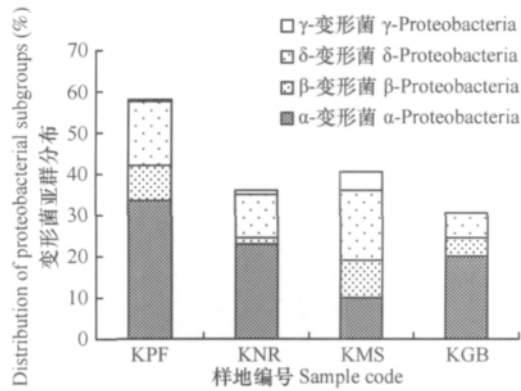


图1 四样地中变形菌亚群占各克隆库的比例

Fig. 1 Proportion of the four subgroups of proteobacteria in each soil sample

2.2.1 α-变形菌 总体上 4 个样地中 α-变形菌占总克隆子数的 21.4%, 是变形菌中的优势细菌亚群。以 KPF 样地中 α-变形菌最多, 占该克隆库总克隆子的 33.5%, KMS 最少 (10.0%), KNR 和 KGB 样地差异不大, 分别为 23.0% 和 20.0% (图 1)。

该研究区内 76.3% 的 α-变形菌被进一步归类为根瘤菌目 (占四个样地总克隆子数的 16.5%), 以原生林地和放牧 + 火烧草地较多, 分别占各克隆库 α-变形菌的 88.1% 和 90.0%。其余属于 α-变形菌的克隆子与 GenBank 数据库中已有的序列相似性 < 91%, 无法确定其“目”以下的分类 (表 3), 且从进化树上也可看出, 没有已知序列与“Unclassified α-变形菌”聚类在一起 (图 2)。4 样地中, 56.1% 属于根瘤菌目的克隆子被归类为生丝微菌科, 其中以 KPF 和 KGB 样地最多, 分别含 29 和 28 个克隆子 (表 3)。少数克隆子 (2~7 个) 被归属于叶杆菌科、红螺菌科、甲基孢囊菌科和慢生根瘤菌科, 且均只出现在其中某一个或几个样地中。此外, 在根瘤菌目中, 有 33.3% 的克隆子无法确定其“科”以下的分类。此外, 部分克隆子以高置信度 (bootstrap 值) 和 > 95% 的相似性可被鉴定至“属”地位, 如: KPF 样地中, 编号为 118、069、156 和 131 分别与 *Inquilinus* sp.、*Devosia* sp.、生丝微菌属 (*Hypomicrobium* sp.) 和土微菌属 (*Pedomicrobium* sp.) 聚类在一起; KMS 样地中, 编号为 026、163、181 和 136 分别与中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium* sp.)、生丝微菌属、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium* sp.) 和红游动菌属 (*Rhodoplanes* sp.) 聚类在一起; KGB 样地中, 编号为 180、106 分别与甲基弯菌 (*Methylosinus trichosporium*——一类甲烷氧化菌)、红游动菌属 (*Rhodoplanes* sp.) 聚类在一起 (图 2)。

2.2.2 β-变形菌 所有克隆子中, 5.9% 属于 β-

变形菌, 以 KPF 和 KMS 较高, 分别占各克隆库的 8.5% 和 9.0%, 其次为 KGB (4.5%), 最少为 KNR (1.5%) (图 1)。

所有属于 β-变形菌的克隆子被归类为伯克氏菌目、亚硝化单胞菌目和“Unclassified β-变形菌” (表 3)。其中, 伯克氏菌目最为常见, 不均匀分布于 4 个克隆库中, 且被分类为 *Incertae sedis* 5、丛毛单胞菌科、产碱杆菌科、伯克氏菌科。4 克隆库中, 均有 1~2 个克隆子无法确定“目”分类情况。KMS 样地中, 有 10 个克隆子属于亚硝化单胞菌目下的亚硝化单胞菌科。由进化树可看出, KPF 样地中, 编号为 105、020 和 190 分别属于纤毛菌属 (*Leptothrix* sp.)、丛毛单胞菌属 (*Comamonas* sp.) 和德克斯氏菌属 (*Dexia* sp.); KMS 样地中, 编号为 209、112 和 084 分别属于丛毛单胞菌属、*Ramlibacter* sp. 和 *Paucimonas* sp.; 编号为 KGB-078 的克隆子属于 *Ramlibacter* sp. (图 3)。

2.2.3 δ-变形菌 4 个样地中 δ-变形菌占总克隆子数的 12.3%, 其中, 以 KMS 样地最多, 占该克隆库的 17.0%, 其次为 KPF 和 KNR, 分别占各克隆库总数的 15.5% 和 10.5%, 最少为 KGB (6.0%) (图 1)。

δ-变形菌被分类为黏球菌目和除硫单胞菌目, 其中以黏球菌目在各样地中数量丰富 (表 3)。黏球菌目中, 大部分克隆子属于多囊菌科, 占有 δ-变形菌的 38.8%, 且在 4 样地中均有分布, 以 KMS 样地最丰富; KPF 样地中有 8 个克隆子属于孢囊杆菌科, 而在其他样地中未发现此类细菌。KMS 样地中, 有 2 个克隆子属于除硫单胞菌目。进化树上 (图 3) 显示, KPF-056、KMS-144、KMS-068 和 KGB-089 分别与 *Anaeromyxobacter* sp.、地杆菌属 (*Geobacter* sp.)、纤维堆囊菌 (*Polyangium cellulorum*) 和 *Byssophaga* sp. 聚类在一起。占总 δ-变形菌 45.9% 的克隆子, 无法确定其“目”分类, 且在进化树上, 它们聚类为同一簇 (图 3)。

2.2.4 γ-变形菌 KPF、KNR 和 KMS 样地中分别有少数克隆子属于 γ-变形菌, 其中以 KMS 样地较多, 占该克隆库的 4.5%, 而 KGB 样地中未检测到 γ-变形菌 (图 1)。

KNR 和 KMS 样地中分别有 2 个和 4 个克隆子属于黄色单胞菌目下的黄色单胞菌科和军团菌目下的柯克斯体科 (表 3)。其余 γ-变形菌无法确定“目”的详细分类地位。从图 3 可看出, KPF-019、KMS-169 和 KNR-002 分别与 *Steroidobacter denitrificans*、贝氏柯克斯体 (*Coxiella burnetii*)、溶杆菌属 (*Lysobacter* sp.) 聚类在一起。

表 3 四样地中分类地位为“目”和“科”的细菌分布情况

Table 3 Distribution of bacteria sorted by order and family in classification in the four soils

亚群 Sub-group	目 Order	科 Family	克隆子数 Number of clones				
			KPF	KNR	KMS	KGB	
α -变形菌 α -Proteobacteria	根瘤菌目 <i>Rhizobiales</i>	叶杆菌科 <i>Phyllobacteriaceae</i>	6		1		
		生丝微生物科 <i>Hyphomicrobiaceae</i>	29	8	9	28	
		甲基孢囊菌科 <i>Methylocystaceae</i>	1		1	3	
		慢生根瘤菌科 <i>Bradyrhizobiaceae</i>			2		
		Unclassified	23	13	3	5	
	红螺菌目 <i>Rhodospirillales</i>	红螺菌科 <i>Rhodospirillaceae</i>	5			2	
		Unclassified	3	25	4	2	
		β -变形菌 β -Proteobacteria	伯克氏菌目 <i>Burkholderiales</i>	Incertae sedis 5	1	1	4
			丛毛单胞菌科 <i>Comamonadaceae</i>	3		2	5
			产碱杆菌科 <i>Alcaligenaceae</i>	4			
伯克氏菌科 <i>Burkholderiaceae</i>				1			
δ -变形菌 δ -Proteobacteria	亚硝化单胞菌目 <i>Nitrosomonadales</i>	亚硝化单胞菌科 <i>Nitrosomonadaceae</i>			10		
		Unclassified	1	2	1	2	
		黏球菌目 <i>Myxococcales</i>	孢囊杆菌科 <i>Cystobacteraceae</i>	8			
			多囊菌科 <i>Polyangiaceae</i>	8	4	21	5
			Unclassified		4	1	
	除硫单胞菌目 <i>Desulfuromonadales</i>	地杆菌科 <i>Geobacteraceae</i>			2		
		Unclassified	15	13	10	7	
		γ -变形菌 γ -Proteobacteria	黄色单胞菌目 <i>Xanthomonadales</i>	黄色单胞菌科 <i>Xanthomonadaceae</i>		2	
			军团菌目 <i>Legionellales</i>	柯克斯体科 <i>Coxiellaceae</i>			4
			Unclassified	1		5	

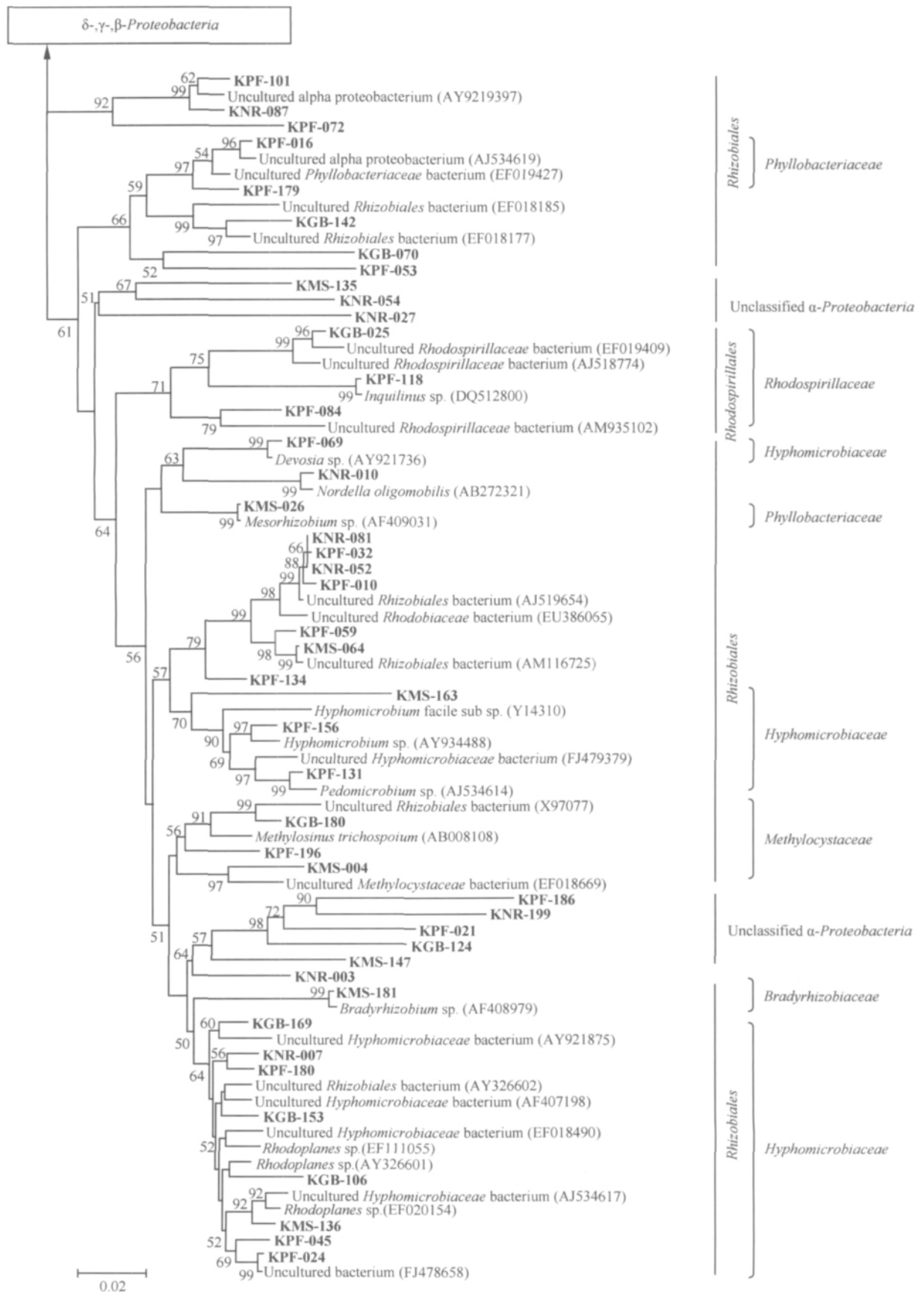


图2 基于喀斯特土壤细菌 16S rRNA 基因序列构建的 α -变形菌的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees of α -Proteobacteria plotted based on 16S rRNA gene sequences in the Karst soils

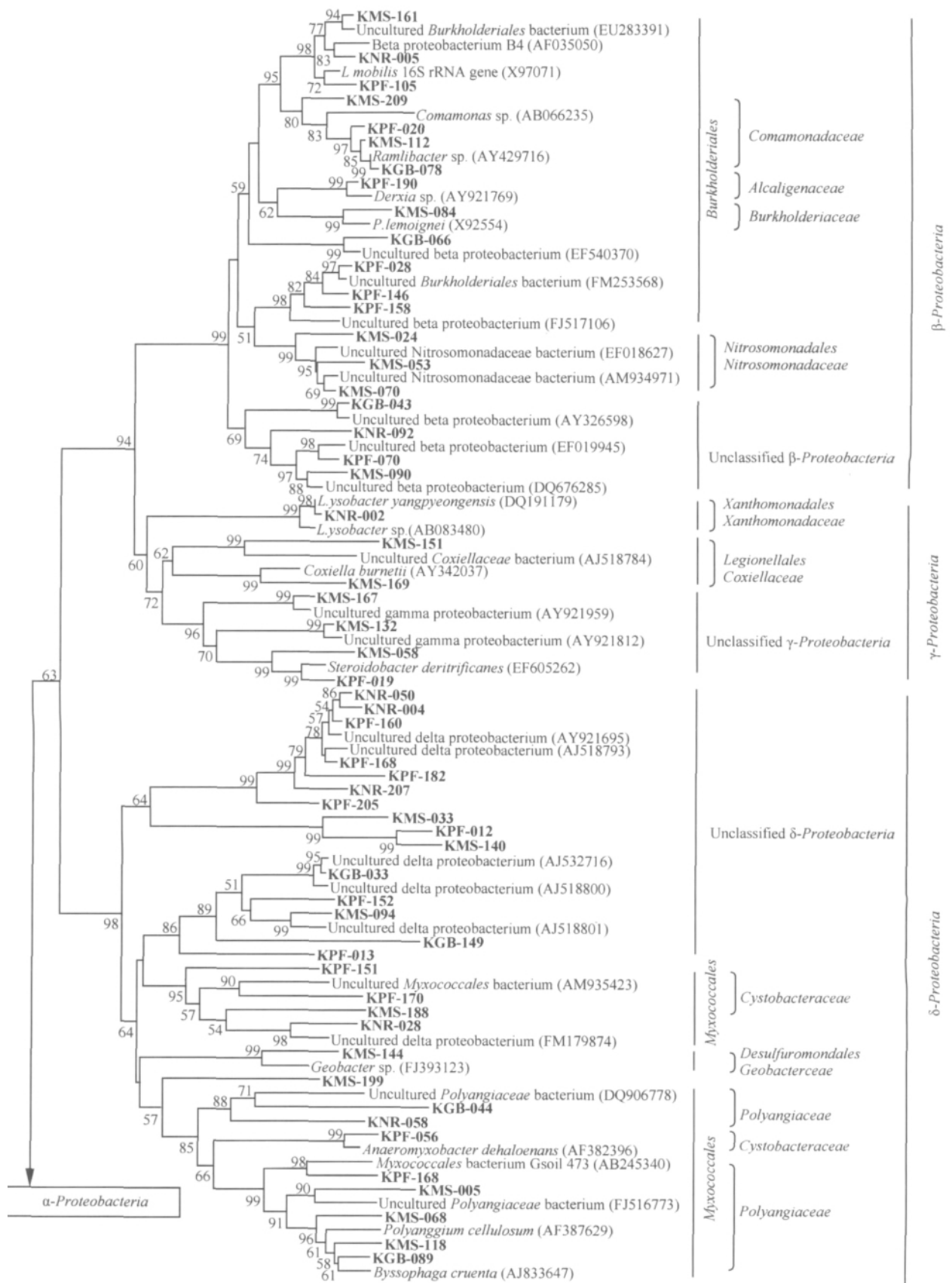


图3 基于喀斯特土壤细菌 16S rRNA 基因序列构建的 β-δ-和 γ-变形菌的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic trees of β-, δ- and γ-Proteobacteria plotted based on 16S rRNA gene sequences in the Karst soils

3 讨 论

与原生林地相比,不同人为干扰方式下喀斯特地区土壤细菌多样性发生了极大变化。其中,以放牧+冬季火烧对土壤细菌多样性影响最大,多样性最低。而与其他样地比较,长期农业耕种后经过20年自然恢复的土壤与农耕地土壤细菌多样性仍很相似,这与Upchurch等^[18]的研究结果一致。究其原因,一方面,研究区内喀斯特峰丛洼地的地貌单元相对封闭,生产方式落后,直至现在仍有部分采取耗竭耕作的方式,KNR样地就是20年前的农耕地抛荒地。这种农耕地一般为坡地,远离村庄,极少或不施肥,作物以利用土壤自身的肥力为主,当土壤肥力耗竭殆尽时便抛荒。喀斯特峰丛洼地农耕地土层薄,加之可溶性碳酸盐岩成土缓慢,土壤肥力被耗竭后自然恢复极其困难^[19]。在喀斯特峰丛洼地区域,这种耕作方式对土壤微生物类群及基因多样性的影响可能需要更长时间才能得到恢复^[20]。另一方面,据调查,喀斯特原生林地中动植物群落多样性较干扰、退化的样地高(结果待发表),研究表明动植物群落的多样性对微生物多样性产生正效应^[21]。

变形菌是研究区4种类型样地中分布最广、多样性最高的细菌类群。该结论与对贵州喀斯特溶洞中土壤细菌多样性的研究结果一致^[22]。与原生林地比较,人为干扰会使土壤变形菌明显减少。值得关注的是,自然恢复地、放牧+冬季火烧草地与原生林地之间变形菌的4个亚群分布关系极其相似。说明虽然自然恢复和放牧+冬季火烧对喀斯特土壤细菌优势类群(变形菌)总的恢复作用有限,但对变形菌4个亚群分布的恢复效果明显,且自然恢复大大增加了 α -变形菌的比例。这可能是土壤结构对栖息在其中的微生物群落结构产生了影响:自然恢复地、放牧+冬季火烧草地和原生林地的团聚体以大团聚体(>2 mm)占优势,而由于长期耕作对团聚体的破坏,使农耕地以小团聚体(<0.5 mm)为主(见表1);研究认为大颗粒土壤中 α -变形菌占优势,小颗粒土壤中以*Holophaga/Acidobacterium*为优势^[23]。此外,原生林地丰富的 α -变形菌还可能是由于其高营养状态的土壤(见表1)对 α -变形菌的正选择(r-对策)所引起^[24]。

研究发现4个样地中16.5%的克隆子被归类为根瘤菌目,且以原生林地最多,占该克隆库总数

的29.5%,是其他3个干扰样地的1.6~3.7倍。由于根瘤菌目下的根瘤菌能与许多植物在土壤中形成共生固氮体系,产生肥力岛效应,增加土壤肥力、促进土壤物质良性循环、改善土壤质地结构和增加土壤微生物活性从而改善土壤质量^[25-26]。此外,在生态恢复过程中,乡土固氮共生体因适应当地环境而更能发挥作用^[27]。基于以上几点,在喀斯特干扰生态系统中,土壤原有的固氮微生物群落遭到破坏,可考虑以接种喀斯特原有的固氮微生物(如原生林地中发现的*Devosia* sp. 和德克斯氏菌属,前者可与豆科植物共生形成根瘤而固氮^[28],后者自身具有固氮功能^[29])或研发施用相应的固氮微生物肥料,实现喀斯特退化生态系统的恢复。

在该研究区内,还发现了一些参与碳循环及其他元素循环的细菌,例如在4个样地中均发现4~21个克隆子属于多囊菌科,该“科”下的某些种能分解纤维素,如KMS-068属于纤维堆囊菌,它能降解纤维素,是一类分泌生物活性次生代谢产物较多的细菌类群,可作为一类筛选天然药物的新资源,是重要的药源菌^[30]。农耕地中发现2个克隆子属于地杆菌科,此类细菌是专性厌氧菌,它们能利用高分子量的有机化合物(如腐殖质),还能以 Fe^{3+} 、 Mn^{4+} 、 U^{4+} 、 Co^{3+} 、 Tc^{6+} 为电子受体,因而可用于金属或有机污染物的生物修复^[31]。原生林地中发现3个土微菌属的细菌,该类细菌具有氧化铁锰和脱硫作用^[32]。研究还发现一些微生物与动植物病原菌有较高的16S rRNA基因序列相似性,如:KMS-151和KMS-169分别与能引起人兽共患传染疾病——Q热^[33]的贝氏柯克斯体有87%和93%的相似性;KMS-084与人兽致病菌——鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia mallei*)^[34]的相似性达95%;KNR-002与能引起水稻白叶枯病的溶杆菌属相似性达95%^[35]。该发现对未来深入研究喀斯特动植物传染病的来源、传播途径等有一定的意义。

由于喀斯特地质背景的特殊性,人为干扰使得生态恢复极其困难,并加速了喀斯特退化和石漠化的进程^[36]。因此,控制人为干扰和恢复生态是保护喀斯特关键。本研究从土壤微生物生态的角度入手,研究发现喀斯特干扰生态系统土壤的细菌多样性和优势细菌类群与原生林相比发生了明显的变化,自然恢复对优势细菌类群的恢复产生了正效应,并提出了相应的喀斯特生态系统恢复措施。因此,进一步工作将从在喀斯特退化生态系统中种植本土固氮植物并接种固氮微生物(施用固氮微生物

肥料)入手,研究其生态恢复效益。

参考文献

- [1] Legrand H E. Hydrological and ecological problems of Karst regions. *Science*, 1973, 179: 859—864
- [2] 李阳兵, 邵景安, 王世杰, 等. 岩溶生态系统脆弱性研究. *地理科学进展*, 2006, 25(5): 1—9. Li Y B, Shao J A, Wang S J, et al. A conceptual analysis of Karst ecosystem fragility (In Chinese). *Progress in Geography*, 2006, 25(5): 1—9
- [3] 吴海勇, 彭晚霞, 宋同清, 等. 桂西北喀斯特人为干扰区植被自然恢复与土壤养分变化. *水土保持学报*, 2008, 22(4): 143—147. Wu H Y, Peng W X, Song T Q, et al. Changes of soil nutrients in process of natural vegetation restoration in Karst disturbed area in northwest Guangxi (In Chinese). *Journal of Soil and Water Conservation*, 2008, 22(4): 143—147
- [4] 徐丽丽, 于一尊, 王克林, 等. 不同人为干扰方式对桂西北喀斯特草丛群落土壤种子库组成与分布的影响. *中国岩溶*, 2008, 27(4): 309—315. Xu L L, Yu Y Z, Wang K L, et al. Effects by different human disturbances on haddock community soil seed bank in northwest Guangxi Karst region (In Chinese). *Carsologica Sinica*, 2008, 27(4): 309—315
- [5] 曾馥平, 彭晚霞, 宋同清, 等. 桂西北喀斯特人为干扰区植被自然恢复 22 年后群落特征. *生态学报*, 2007, 27(12): 5110—5119. Zeng F P, Peng W X, Song T Q, et al. Changes in vegetation after 22 years' natural restoration in the Karst disturbed area in Northwest Guangxi (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(12): 5110—5119
- [6] 王永健, 陶建平, 张炜银, 等. 茂县土地岭植被恢复过程中物种多样性动态特征. *生态学报*, 2006, 26(4): 1028—1036. Wang Y J, Tao J P, Zhang W Y, et al. Dynamics of species diversity in vegetation restoration on Tudiling of Mao county, southwest China (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(4): 1028—1036
- [7] 袁道先, 蔡桂鸿. 岩溶环境学. 重庆: 重庆出版社, 1988. Yuan D X, Cai G H. *Karst environment* (In Chinese). Chongqing: Chongqing Press, 1988
- [8] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biol Fert Soils*, 1999, 29: 111—129
- [9] 孙波, 赵其国, 张桃林, 等. 土壤质量与持续环境 III. 土壤质量评价的生物学指标. *土壤*, 1997, 29(5): 225—234. Sun B, Zhao Q G, Zhang T L, et al. Soil quality and sustainable environment III. Biological indexes of soil quality assessment (In Chinese). *Soils*, 1997, 29(5): 225—234
- [10] 薛立, 吴敏, 徐燕, 等. 几个典型华南人工林土壤的养分状况和微生物特性研究. *土壤学报*, 2005, 42(6): 1017—1023. Xue L, Wu M, Xu Y, et al. Soil nutrients and microorganisms in soils of typical plantations in south China (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(6): 1017—1023
- [11] 展茗, 曹湊贵, 汪金平, 等. 稻鸭、稻鱼复合生态系统土壤微生物多样性特征分析. *土壤学报*, 2008, 45(6): 1079—1083. Zhan M, Cao C G, Wang J P, et al. Analysis of diversity of soil microbial community of the wetland rice-duck and rice-fish complex ecosystem (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(6): 1079—1083
- [12] 姚斌, 徐建民, 张超兰. 甲磺隆对土壤微生物多样性的影响. *土壤学报*, 2004, 41(2): 320—322. Yao B, Xu J M, Zhang C L. Effect of metsulfuron-methyl on microbial diversity in paddy soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(2): 320—322
- [13] 何寻阳, 王克林, 于一尊, 等. 岩溶区植被和季节对土壤微生物遗传多样性的影响. *生态学报*, 2009, 29(4): 1763—1769. He X Y, Wang K L, Yu Y Z, et al. The responses of soil microbial taxonomic diversity on vegetation communities and seasons in Karst area (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(4): 1763—1769
- [14] 陈香碧, 苏以荣, 何寻阳, 等. 喀斯特原生土壤与退化生态系统土壤细菌群落结构. *应用生态学报*, 2009, 20(4): 863—871. Chen X B, Su Y R, He X Y, et al. Bacterial community and structure of soil in primeval forest and degraded ecosystem in Karst region (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(4): 863—871
- [15] Zhou J Z, Xia B C, Huang H S, et al. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil Biol Biochem*, 2003, 35: 915—924
- [16] Krebs C J. *Ecological methodology*. 2nd ed. Menlo Park CA: Benjamin Cummings, 1998
- [17] Pielou E C. *Mathematical ecology*. New York: Wiley, 1977
- [18] Upchurch R, Chiu C Y, Everett K, et al. Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. *Soil Biol Biochem*, 2008, 40: 1294—1305
- [19] Knops J M H, Tilman D. Dynamics of soil nitrogen and carbon accumulation for 61 years after agricultural abandonment. *Ecology*, 2000, 81: 88—98
- [20] Drinkwater L E, Wagoner P, Sarrantonio M. Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature*, 2008, 396: 262—265
- [21] Zak D, Holmes W, White D, et al. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? *Ecology*, 2003, 84: 2042—2050
- [22] Zhou J P, Gu Y Q, Zou C S. Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou Province, southwest of China. *J Microbiol*, 2007, 45(2): 105—112
- [23] Sessitsch A, Weillharter A, Gerzabek M H, et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 4215—4224
- [24] Smit E, Leeflang P, Gommans S, et al. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2284—2291
- [25] Balachandar D, Raja P, Kumar K, et al. Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotech Mol Biol Rev*, 2007, 2: 49—57

- [26] Mitchell J S , Ruess R W. N_2 fixing alder (*Alnus viridis* spp. *fruticosa*) effects on soil properties across a secondary successional chronosequence in interior Alaska. *Biogeochemistry* , 2009 , 95: 215—229
- [27] Herrera M A , Salamanca C P , Barea J M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Appl Environ Microbiol* , 1993 , 59: 129—133
- [28] Rivas R , Willems A , Subba-Rao N S , et al. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with neptunia natans , an aquatic legume from India. *Syst Appl Microbiol* , 2003 , 26: 47—53
- [29] Halsalla D M , Gibson A H. Nitrogenase activity by diazotrophs grown on a range of agricultural plant residues. *Soil Biol Biochem* , 1989 , 21(8) : 1 037—1 043
- [30] Li Z F , Zhao J Y , Xia Z J , et al. Evolutionary diversity of ketoacyl synthases in cellulolytic myxobacterium Sorangium. *Syst Appl Microbiol* , 2007 , 30(3) : 189—196
- [31] Bin Y , Methé B A , Lovley D R. Computational prediction of conserved operons and phylogenetic footprinting of transcription regulatory elements in the metal-reducing bacterial family Geobacteraceae. *J Theor Biol* , 2004 , 230: 133—144
- [32] Braun B , Richert I , Szewzyk U. Detection of iron-depositing *Pedomicrobium* species in native biofilms from the Odertal National Park by a new , specific FISH probe. *J Microbiol Meth* , 2009 , 79(1) : 37—43
- [33] Waag D M. *Coxiella burnetii*: Host and bacterial responses to infection. *Vaccine* , 2007 , 25: 7 288—7 295
- [34] Ulrich R L , Ulrich M P , Schell M A. Development of a polymerase chain reaction assay for the specific identification of *Burkholderia mallei* and differentiation from *Burkholderia pseudomallei* and other closely related *Burkholderiaceae*. *Diagn Microb Infec Dis* , 2006 , 55: 37—45
- [35] Ji G H , Wei L F , He Y Q , et al. Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13—1. *Biol Control* , 2008 , 45: 288—296
- [36] 张殿发, 王世杰, 李瑞玲. 贵州省喀斯特山区生态环境脆弱性研究. *地理学与国土研究* , 2002 , 18(1) : 77—79. Zhang D F , Wang S J , Li R L. Study on the eco-environmental vulnerability in Guizhou Karst mountains (In Chinese) . *Geography and Territorial Research* , 2002 , 18(1) : 77—79

EFFECT OF HUMAN DISTURBANCE ON COMPOSITION OF THE DOMINANT BACTERIAL GROUP *PROTEOBACTERIA* IN KARST SOIL ECOSYSTEMS

Chen Xiangbi^{1,2,3} Su Yirong^{1,3†} He Xunyang^{1,3} Qin Wengeng⁴ Wei Yawei^{1,2,3}
Liang Yueming^{1,3} Wu Jinshui¹

(1 Key Laboratory of Subtropical Agriculture Ecology , Institute of Subtropical Agriculture , Chinese Academy of Sciences , Changsha 410125 , China)

(2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

(3 Huanjiang Observation and Research Station for Karst Ecosystems , Chinese Academy of Sciences , Huanjiang , Guangxi 547100 , China)

(4 Mulun National Nature Reserve of Guangxi , Huanjiang , Guangxi 547100 , China)

Abstract With a Karst primeval forest (KPF) set as check , effects of human disturbance on community structure of soil bacteria were analyzed using the 16S rRNA genes PCR-RFLP and sequencing techniques. Results show that *Proteobacteria* were the dominant bacterial group in all the four soils subjected to different patterns of human disturbance , primeval forest (KPF , free of disturbance) , naturally restored land (KNR) , cropland (KMS) and grassland disturbed by long-term grazing and burned annual in winter (KGB) , separately , accounting for 41. 3% of the total clone libraries. As compared to KPF , the proportions of *Proteobacteria* were decreased by 30. 2% ~ 47. 4% in disturbed soils (KNR , KMS and KGB) . Similar distributions of the subgroups of *Proteobacteria* were found among KPF , KNR and KGB , being in the order of $\alpha \rightarrow \delta \rightarrow \beta \rightarrow \gamma$ -*Proteobacteria* , but in KMS it was in the order of $\delta \rightarrow \alpha \rightarrow \beta \rightarrow \gamma$ -*Proteobacteria* , which indicate that the effects of natural restoration and grazing and burning in winter were limited on recovery of soil *Proteobacteria* , but obviously positive on distribution sequence of the four subphyla. In KNR , the subphylum of α -*Proteobacteria* was well restored , being 130% higher than in KMS. In the four soils , 16. 5% of the total clones were sorted into *Rhizobiales* , which was the highest in KPF , about 1. 6 to 3. 7 times higher than in the other three soils. Based on the above-described findings , it is concluded that planting of native nitrogen-fixing plants in combination with inoculation of native nitrogen-fixing microorganisms may be considered as one of the measures in future to restore degraded Karst ecosystems.

Key words Karst; Human disturbance; 16S rRNA; *Proteobacteria*