

三峡库区小江流域消落区土壤微生物多样性

邱 权 陈雯莉

华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 采用平板稀释分离培养法和 BIOLOG-ECO 微平板法对三峡库区小江流域消落区的土壤微生物数量和代谢多样性进行了研究。结果表明:可培养微生物数量随沿程变化较为明显,同时受到时间变化影响;5 个采样点微生物利用单一碳源的能力随时间的变化逐渐增大;大多数采样点微生物群落的丰富度和优势度不随时间变化且采样点之间的丰富度和优势度差异不明显,随时间的变化个别采样点微生物群落的均匀度受到了影响且不同采样点之间差异较明显;主成分分析结果显示 5 个采样点土壤微生物在利用碳源方式上有差异。

关键词 三峡库区;消落区;微生物多样性;平板稀释分离培养法;BIOLOG-ECO 法

中图分类号 S 182 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0015-06

2009 年三峡工程正式启用后,根据调度方案,坝前水位在 145~175 m 之间变化,形成 221.5 亿 m³防洪库容的同时,水库周边形成面积达 302 km²的消落区。三峡水库消落区地处库区陆域和水域的过渡带,因水库水位涨落幅度大、逆自然洪枯变化,具有季节性淹水湿地生态系统特征。由于该消落区湿地生态系统尚处于发育期,环境不稳定,生物组成及群落结构简单,生态调节功能低,是三峡工程后续工作必须解决的主要生态环境问题之一,因此消落区的生态环境问题为国内外所关注。

小江为三峡重庆库区长江北岸的一级支流(30°49′~31°41′ N, 107°56′~108°54′ E),上游位于重庆市开县境内,下游位于云阳境内,在云阳县双江镇汇入长江,干流全长 182.4 km,其中库区部分长

117.5 km,小江流域面积 5 172.5 km²,其中消落区面积为 48.02 km²,占库区消落区总面积的 15.9%,是三峡库区消落区面积最大的支流^[1]。

本研究在三峡库区小江流域消落区设置 5 个采样地(渠口、养鹿、高阳、黄石、双江),采用平板稀释分离培养法^[2]和 BIOLOG-ECO 微平板法^[3]分析小江流域消落区土壤中可培养微生物的数量以及微生物代谢多样性,探讨小江流域消落区由于逆季节的水位涨落对土壤微生物多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2010 年 3—9 月从小江上游至下游,依次设立渠口(Ⅰ)、养鹿(Ⅱ)、高阳(Ⅲ)、黄石(Ⅳ)和双江(Ⅴ)

表 1 采样站点基本情况

Table 1 Basic information of investigation sites

站点 Site	名称 Name	纬度 Latitude	经度 Longitude	坡度/(°) Slope	土壤类型 Soil type
Ⅰ	渠口(位于开县)	N31°08.726′	E108°30.433′	30	黄壤土 Yellow soil
	Qukou(Located in Kaixian County)				
Ⅱ	养鹿(位于云阳县)	N31°05.764′	E108°35.059′	22	黄壤土 Yellow soil
	Yanglu(Located in Yunyang County)				
Ⅲ	高阳(位于云阳县)	N31°05.159′	E108°40.080′	21	紫色土 Purple soil
	Gaoyang(Located in Yunyang County)				
Ⅳ	黄石(位于云阳县)	N31°00.671′	E108°42.480′	30	紫色土 Purple soil
	Huangshi(Located in Yunyang County)				
Ⅴ	双江(位于云阳县)	N30°57.155′	E108°39.140′	27	紫色土 Purple soil
	Shuangjiang(Located in Yunyang County)				

收稿日期: 2012-05-19

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07104-003-04)

邱 权, 硕士研究生, 研究方向: 土壤微生物学. E-mail: taoqi1986918@126.com

通讯作者: 陈雯莉, 博士, 教授. 研究方向: 微生物学. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

5 个站点进行取样。根据地形条件在每个站点设置 1 个监测样地,宽 30 m,在采样地内分别选 3 个 1 m×1 m 样方,间距 10 m 左右。采集完样方内的所有植物样品后,用取土钻取表层(0~20 cm)土壤样品,装入封口袋,低温保存。土壤样本采集及保存按照《土壤环境监测技术规范(HJ/T166—2004)》的要求进行。

1.2 方 法

1)平板稀释分离培养法。分别采用牛肉膏-蛋白胨培养基、高氏 I 号培养基和马丁孟加拉红培养基对土样中可培养的细菌、放线菌以及真菌进行平板稀释分离培养。

2)BIOLOG-ECO 微平板法。先将土壤样品放置于 28℃培养箱预培养 12 h 左右,称取 5 g 土壤加入到装有 45 mL 灭菌的磷酸缓冲液(PBS,称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄、0.24 g KH₂PO₄,用 HCl 调 pH 至 7.4,定容至 1 L,115℃下灭菌 20 min 制得)中。28℃摇床 180 r/min 振荡 10 min,冰浴 1 min。然后取上清液 3 mL 加入 27 mL 灭菌的磷酸缓冲液中混匀,如此重复 3 次,振荡均匀即为 1:1 000 提取液。最后将稀释 1 000 倍的菌液加入 BIOLOG-ECO 微平板中,每孔加 125 μL。将接种的 BIOLOG-ECO 微平板于 28℃培养,每 12 h 测 1 次数据,并在酶标仪上进行测定,波长为 595 nm。

3)数据统计与分析方法。BIOLOG 数据的多样性分析采用 Shannon-Wiener、Simpson、McIntosh 3 个指数^[4-5];另外,用 AWCD(average well color development)反映土壤微生物的代谢活性,AWCD 是衡量微生物利用单一碳源的重要指标^[6]。

计算公式分别为:

- (1)Shannon-Wiener 指数: $H' = -\sum P_i \ln P_i$;
- (2)Simpson 指数: $1/D = \sum n_i(n_i - 1)/N$;
- (3)McIntosh 指数: $U = \sqrt{\sum(n_i^2)}$;
- (4)AWCD= $\sum(C-R)/31$;

以上各式中, P_i 代表每孔光密度除以所有孔光密度的和; $n_i = C_i - R$, C_i 是每孔的光密度, R 是板内控制孔的光密度, n 是底物数量(ECO 板, $n = 31$)^[4]。

BIOLOG 数据主成分分析前要先对 BIOLOG 数据标准化^[5]。由于本研究采用的是 BIOLOG-ECO 微平板,当培养时间超过 72 h 后表现为真菌的增长,菌丝会干扰光密度的测量,故主成分分析采

用 72 h 时的数据。

试验数据的统计与分析使用 SPSS 16.0 for Windows 和 Excel 2003 软件进行,绘图应用 Sigma Plot 10.0 软件。

2 结果与分析

2.1 平板稀释分离培养法结果

平板稀释分离培养法测定结果显示细菌的稀释度为 $10^{-5} \sim 10^{-4}$,放线菌的稀释度为 $10^{-4} \sim 10^{-3}$,真菌的稀释度为 $10^{-3} \sim 10^{-2}$,整体上表现出细菌数量>放线菌数量>真菌数量,符合一般土壤微生物三大菌群的规律。

1)微生物数量随沿程变化。2010 年小江流域消落区上游(渠口)到下游(双江)各站点土壤微生物分布情况见图 1。细菌变化范围为 $(4.69E+06) \sim (8.05E+06)$ cfu/g,放线菌总数变化范围为 $(4.39E+06) \sim (6.32E+06)$ cfu/g,真菌总数变化范围为 $(1.24E+05) \sim (3.10E+05)$ cfu/g。总菌数以高阳站点最高,双江、渠口次之。细菌和放线菌总数以渠口最高,双江次之,其他站点差别不大。真菌数量较少,其中渠口站点最多,黄石站点最少。结果表明:可培养微生物总量在小江中游段即高阳最高,中下游段黄石最少,其他 3 个站点三类微生物总量相差不大。

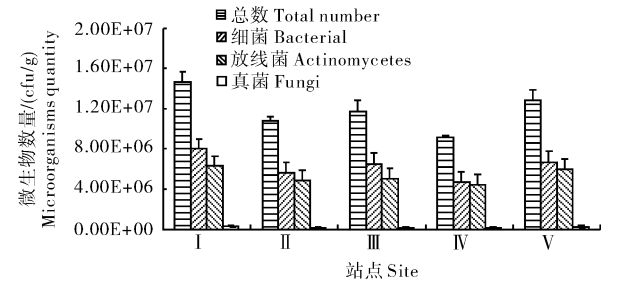


图 1 小江消落区沿程各站点土壤微生物的分布
Fig.1 The distribution of soil microorganisms along Xiaojang fluctuating zone

2)5 个采样点微生物数量随时间变化。5 个采样点土壤微生物总量随着时间的变化出现逐渐升高的趋势并达到稳定,具体表现为从 3 月到 6 月微生物总量持续上升,6 月、8 月和 9 月微生物总量维持稳定,8 月时微生物总量达到最大。细菌数量变化范围为 $(2.12E+06) \sim (8.59E+06)$ cfu/g,放线菌数量变化范围为 $(1.32E+06) \sim (6.85E+06)$ cfu/g,真菌数量变化范围为 $(1.13E+05) \sim (3.44E+05)$ cfu/g。

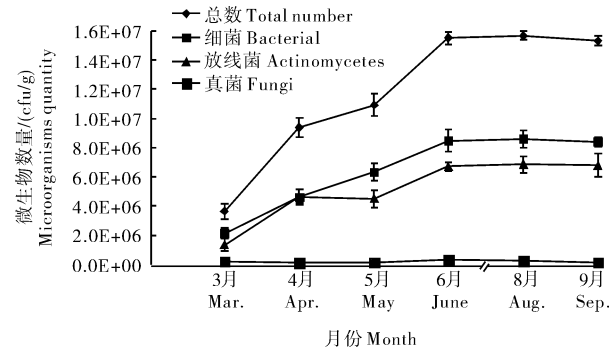


图 2 小江消落区 5 个采样点不同月份土壤微生物数量的分布

Fig. 2 The distribution of the soil microorganisms quantity in Xiaojiang fluctuating zone by month

2.2 BIOLOG-ECO 微平板法结果

1) 消落区土样微生物利用碳源动力学特征。5 个采样地样品 AWCD 值随时间变化结果如图 3 所示, 5 个采样地点样品随时间的变化的 AWCD 值

均是 6 月和 8 月变化基本一致, 8 月的 AWCD 值比 6 月略大。4 月 AWCD 值上升缓慢并且其值比 6 月和 8 月要低, 最终达到平台期时的值也比 6 月和 8 月略小。5 个采样点 AWCD 值最终达到平台期时均在 1.71~1.75 之间。结果表明 5 个采样点利用单一碳源的能力均是 8 月略大于 6 月, 4 月最小。表明 5 个采样点各自利用单一碳源的能力相似。

2) 消落区土壤微生物多样性指数。笔者所采用的 3 种多样性指数反映了微生物群落功能多样性的不同侧面。其中 Shannon-Wiener 指数可以表征土壤微生物群落丰富度, Simpson 指数用来评估微生物群落优势度, McIntosh 指数可以反映土壤微生物群落均匀度^[7]。

样品多样性指数方差分析结果如表 2 所示。Shannon-Wiener 指数除了渠口 6 月样品显著高于其他样品外, 其他样品之间均无显著性差异, 且同一

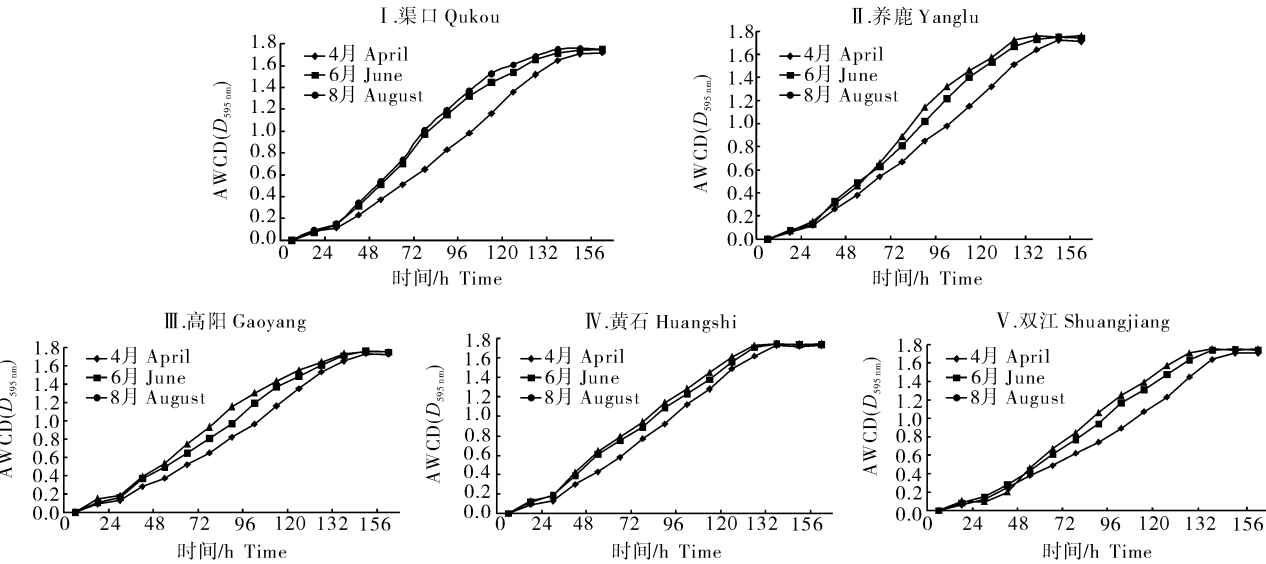


图 3 各采样点土样 AWCD 变化图

Fig. 3 The AWCD change of the 5 soil samplings

表 2 样品多样性指数方差分析¹⁾

Table 2 Sample diversity index analysis of variance

站点 Site	Shannon-Wiener			Simpson			McIntosh		
	4 月 April	6 月 June	8 月 August	4 月 April	6 月 June	8 月 August	4 月 April	6 月 June	8 月 August
I	3.43±0.03 a	3.38±0.03 b	3.42±0.00 a	50.95±0.61 b	50.38±0.34 b	50.92±0.13 b	12.47±0.19 c	10.85±0.29 e	12.40±0.26 d
II	3.43±0.03 a	3.41±0.03 a	3.42±0.02 a	50.26±0.44 b	60.25±1.05 a	50.33±0.42 b	14.37±0.08 a	9.78±0.06 e	13.42±0.09 bc
III	3.41±0.03 a	3.43±0.03 a	3.42±0.04 a	50.37±0.35 b	50.35±0.48 b	50.37±0.29 b	8.84±0.09 f	7.96±0.07 f	8.58±0.08 f
IV	3.43±0.03 a	3.43±0.02 a	3.42±0.02 a	49.54±0.86 b	50.32±0.34 b	50.30±0.43 b	14.16±0.25 ab	13.93±0.02 ab	12.17±0.18 d
V	3.43±0.03 a	3.41±0.03 a	3.42±0.03 a	50.36±0.36 b	50.31±0.41 b	50.38±0.37 b	13.52±0.10 b	10.69±0.61 d	13.65±0.17 ab

1) 表中不同字母间表示有显著性差异(P<0.05) The different letters indicated significant difference in the table(P<0.05).

个采样点的样品在不同月份之间也无显著性差异,表明 5 个采样点大部分样品中的微生物丰富度差异不明显,同一采样点微生物丰富度随时间的变化也不明显。

除了养鹿 6 月样品 Simpson 指数显著高于其他样品外,其他样品 Simpson 指数之间均无显著性差异,且同一采样点样品 Simpson 指数之间也无显著性差异。结果表明 5 个采样点大部分样品中的群落优势度差异不明显,同一采样点中微生物的优势群落不随时间而变化。

渠口和养鹿地区 4 月、6 月和 8 月的 McIntosh 指数之间均存在显著性差异。高阳地区 4 月、6 月和 8 月之间 McIntosh 指数均不存在显著性差异。黄石地区 4 月和 6 月之间 McIntosh 指数无显著性差异,而 8 月与 4 月和 6 月均存在显著性差异。双江地区 4 月和 8 月没有显著性差异,而 6 月与 4 月和 8 月存在显著性差异。结果表明:5 个采样点之间微生物群落的均匀度差异明显。高阳地区微生物群落的均匀度不随时间变化,渠口和养鹿采样点微生物群落优势度受到时间的影响,黄石和双江 2 个采

样点微生物的群落优势度分别在 8 月和 6 月有变化。

3) 消落区土壤微生物群落代谢主成分(PCA)分析。选取 5 个采样地点 4 月、6 月和 8 月土样分别进行主成分(PCA)分析。在进行主成分分析时,提取了 2 个主成分因子,即主成分 1(PC1)和主成分 2(PC2)。2 个主成分因子可以占到总变异的大部分,能代表提取数据的大部分信息,是变异的主要来源^[8]。

4 月土样 2 个主成分因子占 76.7%,6 月占 55.8%,8 月占 55.7%。5 个采样点在不同月份的土壤微生物在 PC1 轴和 PC2 轴上的得分系数有很好的分离,即表明 5 个采样点的土壤微生物在利用碳源的方式上有明显差异。利用 PC1 和 PC2 可以将 4 月的土壤微生物群落划分为 2 个功能群类,将 6 月的土壤微生物群落划分为 4 个功能群类,将 8 月土壤微生物群落划分为 3 个功能群类。表明:4 月高阳和其他 4 个采样点在利用碳源方式上差异较大;6 月渠口和高阳一类,黄石、养鹿和双江各一类;在 8 月时渠口和黄石分为一类,高阳一类,养鹿和双江分为一类。

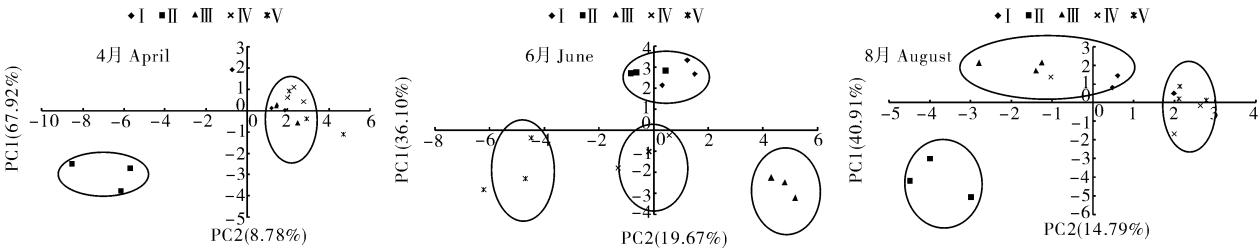


图 4 各采样点 4、6、8 月主成分分析

Fig. 4 Principal component analysis of five sampling points in April, June and August

BIOLOG-ECO 微平板中含有 31 种唯一碳源,大致可以分为 6 类:第一大类为碳水化合物类,约有 10 种;第二大类为氨基酸类及其衍生物,约有 6 类;第三大类为羧酸类,大致有 7 种;第四大类为胺类,约 2 种;第五大类为 4 种多聚物类;第六大类为 2 种芳香类^[9]。主成分分析中的载荷因子可反映不同土壤碳代谢的差异,绝对值越大表明该基质的影响越大。

4 月土样经主成分载荷矩阵分析可知:第一主成分基本反映了碳水化合物类(除了 N-乙酰-D-葡萄糖胺和 D-半乳糖酸 γ -内酯)、氨基酸类(除了 L-苏氨酸)、芳香类、多聚物类、胺类和羧酸类(除了丙酮酸甲酯、衣康酸、 α -丁酮酸、D-半乳糖醛酸)六大类

碳源利用信息。第二主成分基本反映的是 D-半乳糖醛酸、衣康酸、N-乙酰-D-葡萄糖胺、L-苏氨酸 4 种碳源利用信息。PC1 和 PC2 均很少或几乎不利用的碳源有 D-半乳糖酸 γ -内酯、丙酮酸甲酯、 α -丁酮酸。

6 月土样经主成分载荷矩阵分析可知:第一主成分基本反映了碳水化合物类(除了赤藓糖醇)、氨基酸类(除了 L-苏氨酸)、多聚物类、羧酸类(除了 α -丁酮酸、衣康酸、D-半乳糖醛酸、丙酮酸甲酯)、胺类(除腐胺)和芳香类六大碳源利用信息,第二主成分基本反映的是碳水化合物类(除了 D-纤维二糖以外,刚好与 PC1 利用的碳水化合物类碳源相反)、D-苹果酸、丙酮酸甲酯、L-苯基丙氨酸和肝糖碳源。

PC1 和 PC2 均很少或几乎不利用的碳源有 β -甲基-D-葡萄糖苷、2-羟苯甲酸、D-葡萄糖胺、衣康酸、苯乙基胺、腐胺。

8月土样经主成分载荷矩阵分析可知:第一主成分基本反映了碳水化合物类(除了D-纤维二糖、D,L- α -磷酸甘油和D-半乳糖酸 γ -内酯等其余5种)、羧酸类(除了衣康酸和D-葡萄糖胺)、多聚物类(除了吐温-80)、氨基酸类和胺类(除了腐胺)六大类碳源利用信息,第二主成分基本反映的是D-纤维二糖、吐温-80、衣康酸、D,L- α -磷酸甘油和D-半乳糖酸 γ -内酯5种碳源。PC1和PC2均很少或几乎不利用的碳源有D-木糖/戊醛糖、2-羟苯甲酸、L-苯基丙氨酸、N-乙酰-D-葡萄糖胺、D-葡萄糖胺和腐胺6种碳源。

由主成分载荷矩阵分析结果可知,各采样点微生物在利用碳源的类型上是存在差异的。

3 讨 论

3.1 平板稀释分离培养法

平板稀释分离培养法是一种传统的实验技术,主要是用选择性培养基来培养样品中可培养的微生物,通过形态学观察和菌落形成单位计数来统计微生物的类型和数量。

笔者利用平板稀释分离培养法研究发现,随着时间的变化,采样点土壤中微生物的数量呈现上升趋势,在6月、8月和9月达到最大,分析原因可能是由于库区水位在3月刚下降,土壤刚暴露在空气中不久,以前长期处于被水淹没状态的土壤中微生物数量较少,例如一些好氧菌就很难在水中存活,所以3月土壤微生物数量最少。随着土壤暴露在空气中的时间越长,周围环境温度的升高,加之土壤微生物有自我修复功能,微生物在土壤中的活性逐渐升高,导致微生物数量随时间变化逐渐上升,到6月左右土壤微生物的数量逐渐达到稳定。本研究结果从另一方面也证实了淹水可能导致土壤中微生物数量的减少。但由于环境样品中的微生物一般只有0.001%~15%是可以培养的^[10],该方法有它固有的局限性,所以要客观全面地研究土壤微生物多样性必须结合其他方法进行。

3.2 BIOLOG-ECO 微平板法

对消落区土壤微生物利用碳源动力学特征分析可知,5个采样点土壤微生物利用单一碳源能力随时间的变化为:8月>6月>4月,5个采样点之间利

用单一碳源的能力相差不大。结合平板稀释分离培养法的结果,发现随着时间的变化土壤中的微生物数量在不断增加,导致了利用单一碳源的能力越强。6月和8月的土壤中微生物数量达到了稳定期,所以6月和8月微生物利用单一碳源的能力相差不大。

多样性指数分析表明,Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数除个别地点差异较大以外,大多数采样点的差异不明显。在有些环境差异不明显的情况下,这些多样性指数并不能较敏感地区分样品的菌群差异^[11]。本研究中土样所处的环境差异不明显,也导致了5个采样点微生物多样性指数的差异不大。McIntosh 指数分析表明5个采样点之间微生物的均匀度差异明显,高阳地区微生物群落的均匀度不随时间变化,渠口和养鹿采样点微生物群落优势度受到时间的影响,黄石和双江两个采样点分别在8月和6月微生物的群落优势度有变化。

通过主成分分析,5个采样点在PC1和PC2数轴上有很好的分离,说明5个采样点在利用碳源的方式上是存在差异的。虽然从对动力学特征和多样性指数分析结果可以看出5个采样点的差异不大,但是主成分研究能显示对单一碳源的差异,原因可能在于动力学特征分析主要是着重于整体性研究,有些碳源能被另外一些可快速利用的碳源所替代,所以在整体动力学代谢上差别不大^[12]。

本研究表明,小江流域消落区土壤中微生物的数量由于水位涨落有所减少。微生物的群落代谢多样性受水位涨落影响不明显。

参 考 文 献

- [1] 杨启红,郑志伟,万成炎,等.三峡水库小江流域消落区土壤重金属的时空分布[J].水生态学杂志,2011,32(2):11-15.
- [2] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002.
- [3] ZHANG W, PARKER K M, LUO Y, et al. Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tall grass prairie[J]. Global Change Biology, 2005, 11: 266-277.
- [4] 田雅楠,王红旗. Biolog 法在环境微生物功能多样性研究中的应用[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(3): 50-57.
- [5] 郑华,欧阳志云,方治国,等. BIOLOG 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): 457-458.
- [6] ZABINSKI C A, GANNON J E. Effects of recreational impacts on soil microbial communities[J]. Environmental Management, 1997, 21: 233-238.
- [7] 向红,吕锡武,杨飞,等.水质净化生物滤池工艺的微生物群落特征及运行效果研究[J]. 环境科学, 2011, 32(4): 1194-1201.

[8] 林海明. 如何用 SPSS 软件一步算出主成分得分值[J]. 统计与信息论坛, 2007, 22(5): 15-17.

[9] 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: 2351-2359.

[10] TAMAKI H, SEKIGUCHI Y, HANADA S, et al. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow entropic lake by molecular and improved cultivation-based techniques [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71: 2162-2165.

[11] 王强, 戴九兰, 吴大千, 等. 微生物生态研究者基于 BIOLOG 方法的数据处理[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 817- 823.

[12] CLASSEN A T, BOYLE S I, HASKINS K E, et al. Community level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 44: 319-328.

Microbial community diversity of water-level-fluctuation zone of
Xiaojiang Watershed in Three Gorges Reservoir

QIU Quan CHEN Wen-li

College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China

Abstract Large water-level-fluctuation zone was formed after the impoundment of the Three Gorges Reservoir. The microbial diversity of this area could be greatly influenced by the water level fluctuation. The enumeration and BIOLOG-ECO methods were used to assess the microbial diversity in the water-level-fluctuation zone. Results showed that the quantity of cultured microorganisms was highly dependent on the position. The quantity of cultured microorganisms changed over time. The data of BIOLOG demonstrated clearly that the diversity index of most soil samples did not changed significantly. The soil microbes from different soil samples utilized different carbon sources, and their ability to utilize certain carbon sources increased with time.

Key words Three Gorges Reservoir; water-level-fluctuation zone; microbial diversity; dilution-plate isolation and culture method; BIOLOG-ECO method

(责任编辑: 张志钰)