



巨菌草不同生长时期对砒砂岩地区土壤理化性质及细菌群落结构的影响

梅兰^{1,2}, 黄在兴^{1,2}, 宋昭昭^{1,2}, 贾雨雷^{1,2}, 苏德伟², 林辉², 林占熿^{2*}

¹福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

²国家菌草工程技术研究中心, 福建 福州 350002

摘要:【目的】揭示巨菌草种植前及其不同生长时期对砒砂岩地区土壤基本理化性质及细菌群落结构的影响, 为更好应用巨菌草改良砒砂岩地区土壤提供理论依据。【方法】运用 Illumina MiSeq 高通量测序技术, 在门、属水平上比较砒砂岩地区巨菌草不同生长时期对土壤细菌结构及多样性的影响。【结果】巨菌草种植后, 三块样地的含水量在巨菌草分蘖期最低, 在成熟期达到最高, 土壤有机含量有所增加, 土壤 pH 值变化不明显。细菌菌群结构: 各样地的土壤细菌在巨菌草种植前及其生长的四个时期, 门水平上的优势菌群均为放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*); 在属水平上, 含量最高的是未分类(*unidentified*)的细菌。Alpha 多样性及群落组成丰度分析表明, 三块样地种植巨菌草后, 其细菌多样性和物种丰度均比种植前高, 农田地土壤细菌多样性和物种丰度在巨菌草拔节期达到峰值, 在分蘖期土壤细菌数量最大, 比种植前土壤细菌数量高出 8 倍多, 达 2.09×10^7 CFU/g 干土, 山顶地土壤细菌多样性和物种丰度在巨菌草分蘖期达到峰值, 河滩地土壤细菌多样性在巨菌草苗期达到峰值, 其丰富度在拔节期达到最大。【结论】砒砂岩地区土壤细菌群落结构在巨菌草不同生长时期相似, 巨菌草能明显促进砒砂岩地区土壤细菌菌群多样性和丰富度, 能有效提高土壤有机质含量, 但砒砂岩地区各样地土壤细菌多样性、数量和有机质含量达到峰值的时期不同。

关键词: 巨菌草, 土壤细菌, 群落结构, 高通量测序

砒砂岩被称之为“地球生态癌症”, 主要分布在内蒙古的准旗、伊旗、东胜、达旗及陕西省神木、府谷县的皇甫川、窟野河、清水川等流域,

是黄河粗泥沙的主要来源^[1-2]。黄河问题的实质是泥沙问题, 想要解决黄河的泥沙问题就要重视砒砂岩地区的水土流失问题, 如何治理砒砂岩成为

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201504412); 福建菌草生态产业协同创新攻关课题(JCXTGG22); 水利部技术示范项目(SF-201603); 福建农林大学科技发展基金项目(KF2015112)

*通信作者。Tel/Fax: +86-591-83789223; E-mail: lzjuncao@163.com

收稿日期: 2018-12-25; 修回日期: 2019-07-02; 网络出版日期: 2019-07-26

国家、科学界非常重视的问题,先后在砒砂岩地区开展了相关科研和治理,对于揭示砒砂岩地区水土流失的复杂机理、实施科学防治起到了积极作用^[3]。砒砂岩区土层营养匮乏,土壤含水量低,植被难以复原,植物“柔性坝”只能在砒砂岩侵蚀的沟底部进行种植,而对于坡面和沟坡的水土流失并不能达到理想的治理效果^[4]。因此,需要找到一种先锋植物在砒砂岩地区改良土壤,促进微生物多样性及物质循环,将生态效益、经济效益和社会效益紧密结合起来,在恢复生态的同时也获得经济效益和社会效益。

巨菌草(*Pennisetum* sp.)是被子植物门单子叶植物纲禾本科狼尾草属,于1983年由福建农林大学林占熿研究员从非洲引入中国,目前可以适应我国的气候环境^[5-6]。巨菌草植株高大直立、丛生,株高一般为3-5 m,根系十分发达,分蘖能力强,年产鲜草可达200 t/hm²以上^[7]。有研究表明巨菌草能明显提高荒坡地和沙质荒漠化土壤微生物群落功能多样性、土壤肥力和有机质含量,产生一定的生态正效益,已是多种生态脆弱区生态综合治理的先锋植物^[8-10]。也有研究表明巨菌草粗蛋白和多糖含量较高,可作为牛、羊、鸭、鸡等牲畜的饲料并能够提高肉质,带动畜牧业发展,经济效益明显^[11-13]。

土壤中的微生物种类众多,土壤是微生物最好的生存载体,为微生物的生存和发展提供了一个大环境,其数量和分布因土壤类型、土壤的含水量、pH值、有机质含量及季节等因素的影响而有所差异^[14-15]。目前对农田、林地和草地的土壤微生物菌群多样性研究较多,研究内容主要集中在土层深度、季节变化以及地域分布对它们数量和种类的影响,而对砒砂岩地区的土壤微生物研

究甚少,巨菌草对砒砂岩地区的土壤基本理化性质及细菌多样性影响的研究则更是空白。

土壤中微生物数量巨大、群落结构复杂,现在的技术无法对所有的序列进行测序,第一代Sanger测序读取序列长,准确率高,能根据测到的全长16S rRNA基因序列注释到种,但是其缺点是测序通量较低,大规模测序成本高^[16]。Illumina MiSeq高通量测序技术,一般每个样品可以测定40000-60000个序列数,覆盖深度大,对物种多样性的分析非常有利^[17]。本研究采用Illumina MiSeq测序技术,能够更加深入、全面地分析砒砂岩地区土壤细菌多样性,探究巨菌草种植对细菌群落组成的影响。

1 材料和方法

1.1 实验区概况

项目试验区位于黄土高原丘陵沟壑区皇甫川流域——内蒙古自治区鄂尔多斯市准格尔旗暖水乡圪秋沟村,地理坐标为北纬39°46'-39°77',东经110°40'-110°68',此处为典型的砒砂岩区,覆沙、覆土、裸露三种类型并存,该区水土流失异常强烈,严重恶化了砒砂岩区的生态和农牧业生产环境,土地生产力低,农牧业经济落后,群众生活贫困。从20世纪80年代至今,该区是国家重点治理和科学界关注与研究的热点区域。

1.2 主要仪器与培养基

主要仪器:分析天平、水浴锅、紫外可见分光光度计、隔水式恒温培养箱、PCR仪、凝胶成像系统、电泳仪、分析天平、生化培养箱。

培养基:牛肉膏3 g,蛋白胨10 g, NaCl 5.0 g,琼脂18 g,蒸馏水1 L, pH 7.0-7.2。

1.3 土样采集与处理

当年4月初在三块试验地种植巨菌草,并分别在巨菌草种植前(4月初)、苗期(5月中旬)、分蘖期(7月初)、拔节期(8月中旬)、成熟期(10月)在三块试验地进行取样。按照“随机”、“等量”、“多点混合”的原则,在各试验区沿S形随机选取10个点,将地表1 cm左右的表层土壤清除掉,在0–20 cm深度处等量采集土壤,取得的土壤放置在干净塑料布上以清除杂物,用四分法对角取两份混合放在塑封袋里,一个混合样品在1 kg左右,附上标签,注明采样地点、时间。

土壤样品收集完毕后带回实验室,将部分土样置于阴凉通风处风干处理,风干后过筛处理用于土壤理化性质的分析;另一部分置于4 °C冰箱中用于土壤微生物数量的测定;少量土样置于–80 °C超低温冰箱,用于高通量测序分析。

1.4 土壤基本理化性质的测定

1.4.1 土壤含水量测定:称取10 g土壤样品于铝盒中,在105±2 °C烘干至恒重时的失重,即为土壤样品所含水分的质量。

1.4.2 有机质测定:采用低温外加热重铬酸钾氧化比色法^[18]。

1.4.3 pH测定:用pH计测定(土水比为1:2.5)。

1.5 土壤可培养细菌的测定

称取10 g土壤样品,放入装有90 mL无菌水的锥形瓶中,置于摇床上室温振荡20 min,充分混合土样与水分,使土壤中的微生物细胞能够充分分散,此为10⁻¹土壤悬液。吸取1 mL 10⁻¹悬液于9 mL无菌水中,反复吹吸混匀,制成10⁻²土壤悬液。以此类推,将悬液逐步稀释至10⁻⁶浓度。

用无菌移液枪吸取50 μL浓度为10⁻⁶–10⁻⁴的

土壤悬液,用三角涂布棒均匀涂抹于琼脂表面。每个稀释度重复5次,放入30 °C恒温箱中培养3 d。

按照公式(1)计算细菌数。

细菌数(CFU/g)=

$$\frac{\text{菌落平均数} \times \text{稀释倍数} \times 20 \times \text{鲜土重}}{\text{干土重}} \quad (\text{公式 1})$$

1.6 DNA 提取及 Illumina MiSeq 高通量测序

不同时期的土壤样品分别标记,如山顶土壤样品为SZ(种植前)、SM(苗期)、SF(分蘖期)、SB(拔节期)、SC(成熟期)。其他两块样地以此类推进行标记。

1.6.1 土壤基因组 DNA 提取:DNA的提取采用Mobio Powersoil DNA soil Isolation Kit土壤DNA试剂盒。

1.6.2 Illumina MiSeq 高通量测序:各样品选取细菌16S rRNA基因序列V3–V4区,DNA样本送至北京奥维森基因科技有限公司,利用Illumina Miseq PE300高通量测序平台测序。细菌16S rRNA基因序列V3–V4扩增引物为336F(5'-GTACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和806R(5'-GGACTACNNGGG TATCTAAT-3')。PCR反应体系如表1所示。

表 1. PCR 反应体系

Table 1. PCR reaction system

Reagent composition	Volume
DNA sample	X (30 ng)
Forward Primer (5 μmol/L)	1 μL
Reverse Primer (5 μmol/L)	1 μL
BSA (2 ng/μL)	3 μL
2×Taq PCR MasterMix	12.5 μL
ddH ₂ O	7.5-X μL
Total	25 μL

PCR 反应程序为 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 55 °C 50 s, 72 °C 45 s; 72 °C 7 min, 4 °C 保存。扩增 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测阳性后, 用 Illumina MiSeq 高通量测序技术平台进行序列测序。

1.7 数据分析

基于 MiSeq 测序得到的双端序列数据, 对测得的 fq 数据进行过滤处理, 过滤质量较低的序列, 根据 PE 测序的 overlap 关系将成对的序列拼接成一条序列。通过归类操作, 以相似性为依据将序列归类成许多小组, 对序列进行随机抽样, 以构建 rarefaction curve 分析测序数据量合理性; 通过作稀释性曲线, 检测样品的测序深度情况。采用 RDP Classifier 算法对 OTU 代表序列进行比对分析, 并在界、门、纲、目、科、属、种水平上注释其群落的物种信息。以 Alpha 多样性指示细菌群落的丰度和多样性, 以 Chao1 指数估计群落中的 OTU 数目, 用 UniFrac 进行 beta 多样性分析以检测群落之间的物种多样性^[19], 以 Shannon 来估算样品中微生物多样性。采用 Microsoft Excel 整理数据, 采用 DPS 和 SPSS18.0 软件进行差异性分析, 采用 GraphPad Prism 绘图。

2 结果和分析

2.1 巨菌草不同时期对砒砂岩地区土壤基本理化性质的影响

2.1.1 土壤含水量变化: 由图 1 可知, 在三块样地中, 农田地和河滩地的含水量先降低再增加, 农田地在巨菌草成熟期时土壤含水量达到峰值, 是种植前的 2.09 倍。三块样地在巨菌草分蘖期以后土壤含水量均呈增加的趋势, 山顶地的土壤含水量比种植前增加了 1.35 倍。

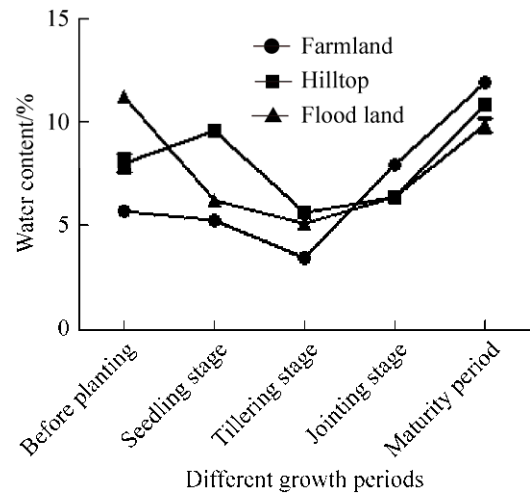


图 1. 不同生长时期巨菌草土壤含水量的变化

Figure 1. The change of water content in the soil at different growth stages of *Pennisetum* sp..

2.1.2 土壤有机质含量变化: 如图 2 所示, 在三块样地中, 巨菌草不同生长时期的土壤有机质均高于种植前期。河滩地和山顶地的土壤有机质变化趋势一致: 先增加再减少随后又增加。农田地在巨菌草拔节期时有机质含量达到最大值, 比种植前增加了 3.82 倍, 河滩地在巨菌草分蘖期时有

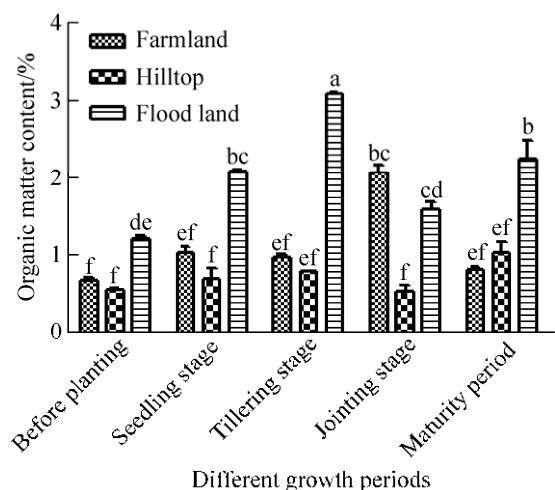


图 2. 不同生长时期巨菌草土壤有机质含量的变化

Figure 2. The change of organic matter in the soil at different growth stages of *Pennisetum* sp. The significant difference ($P < 0.05$) between the organic matter contents of different soils is indicated by the letters a, b, c, d, e, or f.

机质含量达到最大值, 比种植前增加了 1.98 倍; 而山顶地则在巨菌草成熟期时有机质含量最大, 比种植前提高了 36.83%。由此可以看出, 巨菌草的种植提高了三块样地土壤的有机质含量。

2.1.3 土壤 pH 值变化: 由图 3 可知, 三块样地在巨菌草的不同生长时期其土壤 pH 均偏碱性, 呈微弱变化, 山顶地和河滩地土壤 pH 先增加再降低随后又增加, 两块样地在巨菌草苗期时土壤 pH 最高, 而农田地的土壤 pH 则是先降低再增加, 在分蘖期时农田地的 pH 最低。

2.1.4 土壤可培养细菌数量变化: 细菌在土壤微生物中是量最多的, 参与有机质的分解、氨化作用等。由图 4 可以看出, 三块样地的土壤细菌量在巨菌草生长期均高于种植前期, 且差异显著 ($P < 0.05$), 说明土壤细菌的数量与巨菌草的生长有关。

不同样地巨菌草土壤细菌数量的变化: 农田地在巨菌草分蘖期时土壤细菌数量最高, 比种植

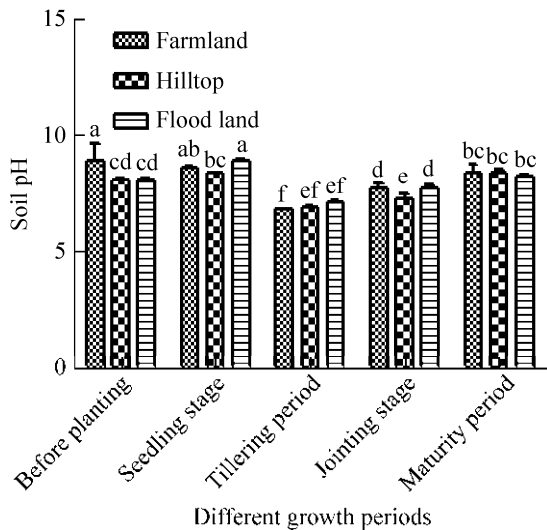


图 3. 不同生长时期巨菌草土壤 pH 的变化
Figure 3. The change of soil pH at different growth stages of *Pennisetum* sp. The significant difference ($P < 0.05$) between the pH of different soils is indicated by the letters a, b, c, d, e or f.

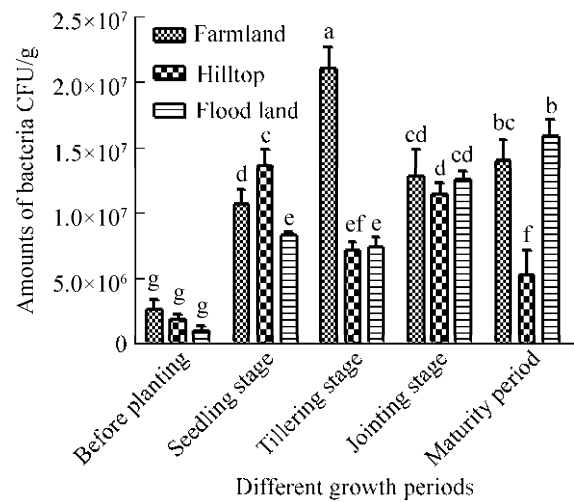


图 4. 不同生长时期巨菌草土壤细菌量的变化
Figure 4. The change of the amounts of bacteria in the soil at different growth stages of *Pennisetum* sp.. The significant difference ($P < 0.05$) between the number of culturable bacteria of different soils is indicated by the letters a, b, c, d, e, f or g.

前土壤细菌数量高出 8 倍多, 达 2.09×10^7 CFU/g 干土。山顶地和河滩样地土壤细菌的变化趋势均是先增加后降低, 但山顶地在巨菌草拔节期时土壤数量高于成熟期。

2.2 测序数据统计与测序质量分析

本研究对 3 块样地 5 个时期的土样, 进行 Illumina MiSeq 高通量测序, 每个样品 3 个生物学重复, 共获得 1864170 条序列, 过滤掉低质量的序列, 优化后得到 1739089 条序列。统计各个样品在不同 OTU 中的丰度信息, 如表 2 所示, 15 个土壤样品共产生 36920 个 OTU, 平均测序读长为 400–440 bp。

2.3 土壤细菌群落多样性分析

2.3.1 Alpha 多样性分析: 如表 3 所示, 本研究中 Coverage 指数均超过了 90%, 说明测序结果可以反映所测样本中细菌的真实情况。对 15 个样本采用 Shannon 指数进行分析, 在巨菌草的不同生

表 2. 样品序列数统计表

Table 2. Sequence data statistics of samples

Samples ID	Raw tags	Clean tags	Percent after optimization/%	OTU
HZ	141243	135971	96.27	2277
HM	147552	142049	96.27	2281
HF	73096	66578	91.08	1596
HB	74502	68448	91.87	2667
HC	92284	83888	90.90	1201
NZ	106626	100577	94.33	2928
NM	85281	79680	93.43	2678
NF	86197	75513	87.61	2347
NB	75572	69450	91.90	2658
NC	105351	96860	91.94	2541
SZ	227926	210491	92.35	2782
SM	151595	144690	95.45	2540
SF	126636	116654	92.12	2974
SB	166498	156766	94.15	2736
SC	203811	191474	93.95	2714
合计	1864170	1739089	93.29	36920

H: Floodland, N: Farmland, S: Hilltop, Z: Before planting *Pennisetum* sp., M: Seedling stage, F: Tillering stage, B: Jointing stage, C: Maturity period; For example, HZ stands for Flood land before planting *Pennisetum* sp.

长时期中, 河滩地土壤细菌多样性表现为 HM>HB>HC>HF>HZ, 苗期比种植前提高了 75.72%。农田地细菌多样性表现为 NB>NM>NZ>NC>NF, 拔节期比种植前期高 9.29%。山顶地细菌多样性表现为 SF>SB>SZ>SM>SC, 分蘖期细菌多样性指数最高, 比种植前期高 5.62%。随着巨菌草的生长, 砒砂岩地区样地的土壤细菌多样性均有所上升, 且在巨菌草生长时期的前期其土壤细菌多样性均大于种植前, 说明种植巨菌草能够增加土壤细菌的多样性。

Chao1 指数反映物种丰富度, Chao1 值越大, 说明细菌总数越多。在巨菌草生长的不同时期, 河滩地土壤细菌丰富度表现为 HB>HM>HC>HF>HZ, 拔节期比种植前高 1.35 倍。农田地细菌丰富度表现为 NB>NF>NM>NC>NZ, 但拔节期细菌丰富度比种植前高 25.06%。山顶地的细菌丰富度表现为 SF>SM>SB>SZ>SC, 巨菌草分蘖期的细菌丰

表 3. 样品的 Alpha 多样性指数

Table 3. The Alpha diversity index of soil samples

Sample ID	Chao1	Goods coverage/%	Observed species	PD whole tree	Shannon
HZ	1179.5172	99.11	790	98.9774	5.1654
HM	2594.8745	98.40	2197	277.9349	9.0769
HF	2253.6680	98.26	1461	137.7156	6.8544
HB	2766.8102	98.11	2215	180.3802	8.9273
HC	2519.1110	98.31	1978	223.6992	8.3202
NZ	2546.5540	98.36	2133	204.7398	8.7679
NM	2915.1105	98.16	2415	191.4860	9.4391
NF	3026.4634	97.61	2223	180.5858	8.0441
NB	3184.6675	97.98	2669	216.0488	9.5829
NC	2802.8206	97.94	2189	199.3970	8.1628
SZ	2591.6852	98.29	2054	167.5348	8.8033
SM	2803.1133	97.99	2114	203.5996	8.8009
SF	2993.1202	97.96	2425	188.4756	9.2982
SB	2780.9529	97.91	2023	181.0532	8.7300
SC	2446.0442	98.17	1782	143.9429	8.4029

H: Floodland, N: Farmland, S: Hilltop, Z: Before planting *Pennisetum* sp., M: Seedling stage, F: Tillering stage, B: Jointing stage, C: Maturity period; For example, HZ stands for Flood land before planting *Pennisetum* sp.

富度是最高的, 比种植前细菌丰富度高 15.49%。在巨菌草的生长期中, 土壤细菌丰富度均比种植前要高。农田地的平均 Chao1 指数 2895.1232 较其他两块样地高, 说明农田地的细菌丰富度较高。

2.3.2 Beta 多样性分析: PCA 即主成分分析, 其结果(图 5)显示, 第一成分的差异贡献值是 30.52%, 第二成分的差异贡献值是 18.9%。其中山顶地的样品之间距离较近, 说明山顶地种植巨菌草后土壤细菌群落组成变化不大。三块样地样本距离较远, 说明不同的样地土壤细菌群落组成有明显差异。农田地的苗期、分蘖期和拔节期样本(NM、NF、NB)距离较近, 成熟期(NC)与以上三个时期样品有一定的距离, 而种植前(NZ)距离这四个时期的样品均较远, 说明巨菌草的种植对土壤细菌群落组成产生了影响。在河滩地中, 种植前(HZ)和其他四个时期样品间的距离较远, 并且每个时期的样品之间均有一定的距离, 说明巨菌草种植

前后细菌菌群组成差异大, 每个时期的土壤细菌群落组成也有差异。山顶地苗期(SM)、分蘖期(SF)、拔节期(SB)和成熟期(SC)的样品聚集在一起, 说明这四个时期的样品 OTU 组成有相似的地方, 种植前(SZ)与它们距离较远, 说明 SZ 的 OTU 组成与其他时期样品相差较大。总之, PCA 分析能够很好地呈现细菌群落在巨菌草不同生长时期的变化。

2.4 土壤细菌群落组成分析

2.4.1 细菌在门水平上的群落组成: Illumina MiSeq 高通量测序获得的数据在 97%相似水平上进行分类。从门的分类水平上看, 由图 6 可知, 在 3 块样地的 5 个时期中, 放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)相对丰度较大, 其相对丰度之和在 15 个土壤样品中均占到细菌总量的 60% 以上。在所有土壤样品中, 优势菌门为放线菌门(*Acidobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadees*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*), 共占细菌总数量的 80% 以上, 它们的相对丰度分别为 18.24%–50.19%、17.9%–46.37%、0.96%–26.97%、0.35%–10.52%、1.59%–9.42%、0.23%–8.22%、0.3%–6.06%。分析各样品中主要的优势菌门发现, 种植巨菌草使土壤中细菌群落的组成发生变化, 其中, 在河滩地中, 绿弯菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门、酸杆菌门在巨菌草生长期的各个时期均比种植前的相对丰度要高, 绿弯菌门、芽单胞菌门相对丰度在拔节期比种植前分别增加了 11 倍、19.35 倍, 拟杆菌门相对丰度在分蘖期比种植前增加了 2.32 倍, 酸杆菌门在苗期比种植前增加了 14.33 倍。在农田地中, 变形菌门的相对丰度在拔节期比种植前增

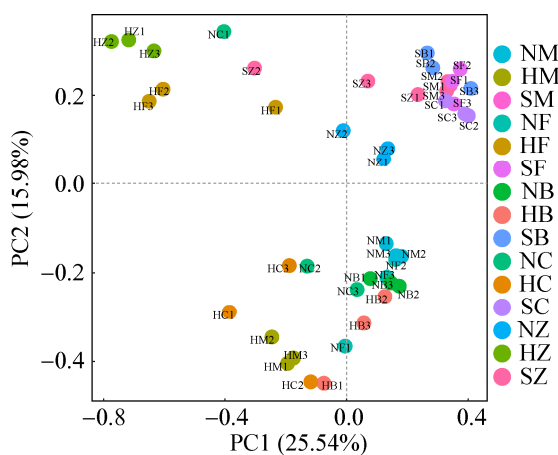


图 5. 不同样本细菌群落组成 PCA 分析

Figure 5. PCA analysis of bacterial community composition in different samples. H: Floodland, N: Farmland, S: Hilltop, Z: Before planting *Pennisetum* sp., M: Seedling stage, F: Tillering stage, B: Jointing stage, C: Maturity period; For example, HZ stands for Flood land before planting *Pennisetum* sp.

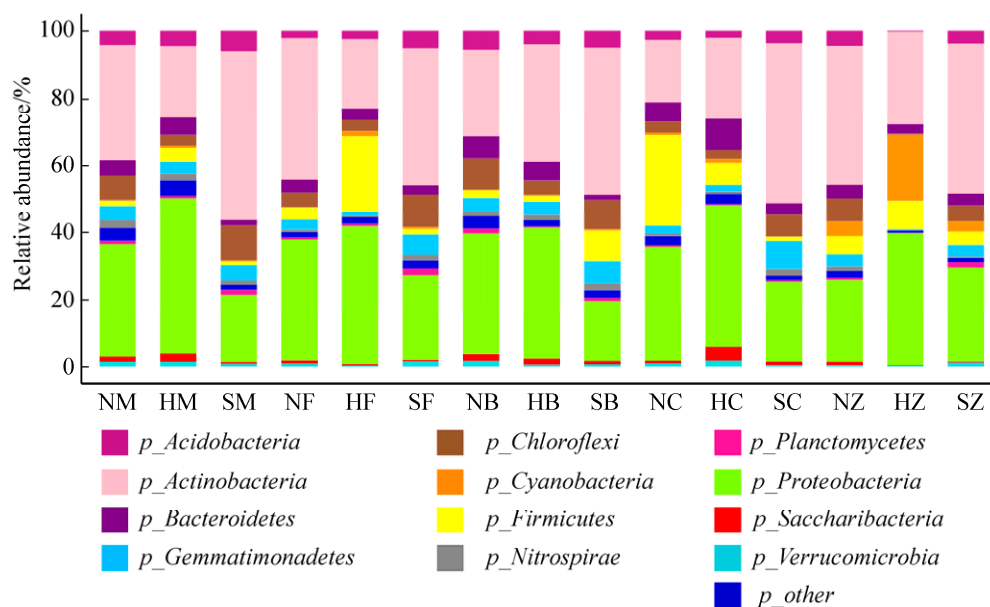


图 6. 门水平各样品菌群分布图

Figure 6. Frequency of phylum level in microbial communities from samples. H: Floodland, N: Farmland, S: Hilltop, Z: Before planting *Pennisetum* sp., M: Seedling stage, F: Tillering stage, B: Jointing stage, C: Maturity period; For example, HZ stands for Flood land before planting *Pennisetum* sp..

加了 47.21%。在山顶地中, 绿弯菌门的相对丰度在苗期比种植前增加了 1.19 倍, 芽单胞菌门在成熟期时比种植前增加了 1.32 倍。在种植前期, 三块样地样地中均检测到蓝细菌门(*Cyanobacteria*), 其相对丰度均高于巨菌草生长的任何时期, 在河滩地中蓝细菌门的相对丰度最高。

2.4.2 细菌在属水平上的群落组成: 由图 7 可知, 在属水平上, 除河滩地巨菌草种植前(HZ)土样, 非培养和未分类细菌在各样品的各个时期占绝对优势, 在河滩地土壤样本中, *Pseudarthrobacter*、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)三类菌属丰度较高, 巨菌草种植前(HZ)土壤中 *Bromustectorum* 菌属的相对丰度最高, 随着巨菌草的生长, 其丰度明显降低, 并且在 HZ 中未出现 *Pseudarthrobacter* 菌属, 种植巨菌草后其丰度有所增加, 在成熟期时丰度最大为 9.37%。在 HZ 中,

高温单胞菌属(*Thermomonospora*)的相对丰度是最高的, 为 11.17%。农田地样本中, *Pseudarthrobacter*、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、类诺卡氏属(*Nocardioideis*)、红球菌属(*Rhodococcus*)四类菌属丰度值较大, 嗜盐菌属(*Halocella*)和热微菌属(*Tepidimicrobium*)其变化趋势是一样的, 随着巨菌草的生长不断减少, 在分蘖期和拔节期时均未检测到, 但在成熟期时相对丰度达到最大, 分别为 13.98%、5.36%。马赛菌属(*Massilia*)和 *Bromustectorum* 在种植前期时相对丰度最高, 随着巨菌草的生长不断减少再增加, 成熟期的相对丰度分别比种植前降低了 6 倍、3.76 倍。而根瘤菌属(*Rhizobium*)在种植前相对丰度最低, 种植巨菌草后其丰度有所增加, 分蘖期时的相对丰度是种植前的 2.26 倍。在山顶地土壤样本中, *Pseudarthrobacter*、*Gaiella*、*Solorubrobacter*、嗜热光合细菌(*Roseiflexus*)、鞘脂单胞菌属

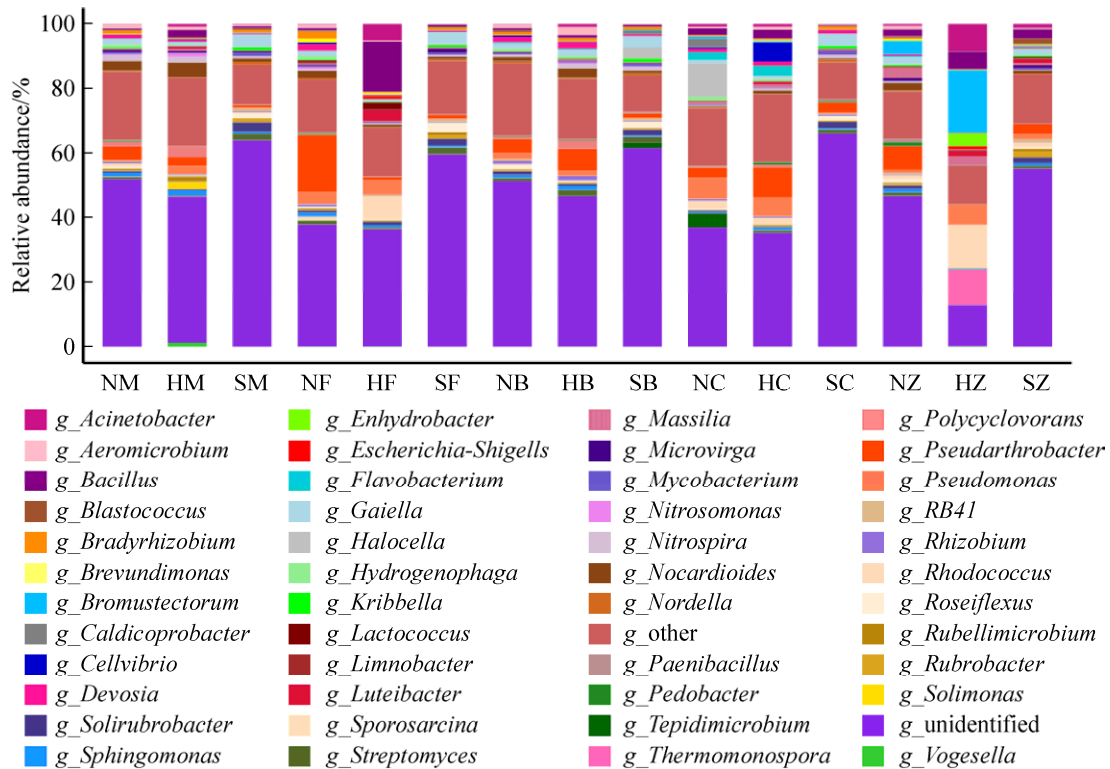


图 7. 属水平上各样品菌群分布图

Figure 7. Frequency of genus level in microbial communities from samples. H: Floodland, N: Farmland, S: Hilltop, Z: Before planting *Pennisetum* sp., M: Seedling stage, F: Tillering stage, B: Jointing stage, C: Maturity period; For example, HZ stands for Flood land before planting *Pennisetum* sp..

(*Sphingomonas*)五类菌属的丰度值较大,鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽球菌属(*Blastococcus*)四类菌属在种植前的相对丰度均是最高的,种植巨菌草后其相对丰度均有所减少。而中生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)的相对丰度随着巨菌草的生长不断增加,在成熟期时达到最大,比种植前提高了7.16倍。对图中土壤样品中主要微生物菌落种属分析发现,未归到任何种属的 other 占微生物总量的14.86%–25.77%,表明该序列成分较小无法获得其分类学信息,需要采用其他手段来进行鉴定。而未被分类到的属(unidentified),占微生物总量的12.38%–64.58%,这可能是由于数据库的限制所造成的。

3 讨论和结论

3.1 巨菌草对砒砂岩地区土壤基本理化性质的影响

土壤养分可以用来评价土壤质量,有机质含量的变化对土壤质量的好坏有直接影响^[20]。在三块样地中,土壤有机质在巨菌草生长的各个时期均高于种植前期,表明巨菌草的种植提高了土壤的有机质含量,对土壤肥力和土壤种植情况有积极的改良作用。钱寿福等^[21]的研究结果表明随着菊芋枝条增加而土壤含水量减少,本研究的三块样地土壤含水量在巨菌草生长分蘖期最低,这可能是由于巨菌草分蘖叶片数增加、蒸腾作用增强有关;分蘖期后呈明显上升趋势,在成熟期各样地含水量接近分蘖期的2倍。土壤pH在整个生长

期内变化趋势不是特别明显, 土壤酸碱度均呈偏碱性, 说明巨菌草对土壤 pH 影响不大, 这与闫慧等^[22]的研究结果相似。

3.2 巨菌草对砒砂岩地区土壤细菌群落结构及多样性的影响

本研究通过对 16S rRNA 基因序列的 V3-V4 可变区 Illumina MiSeq 测序分析, 检测了砒砂岩地区种植巨菌草后不同样地土壤细菌群落结构和多样性, 获得相对全面的细菌群落信息。通过与 RDP 数据库^[23]中的信息进行比对分析, 在门水平上的优势菌群是放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*), 放线菌门的相对丰度较高; 在属水平上, 含量最高的是未分类(*unidentified*)的细菌, 这说明砒砂岩地区样地土壤中蕴含着丰富的微生物资源, 还有很多物种是我们现在还未知的, 而这些未知的物种为我们探索物种多样性提供了宝贵的资源。

在河滩地种植巨菌草后, 土壤中 *Pseudarthrobacter*、类诺卡氏菌属(*Nocardioideis*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomanas*)的相对丰度有所增加。农田地中 *Pseudarthrobacter*、德沃斯氏菌属(*Devosia*)以及慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的相对丰度比种植前要高。在山顶地中, *Gaiella* 和中生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)的相对丰度比巨菌草种植前要高。研究结果表明, 种植巨菌草对砒砂岩地区河滩地、农田地和山顶地的细菌群落在属水平上的影响是不同的, 其中在河滩地种植巨菌草后丰度有所增加的类诺卡氏菌属多被应用于环境、污水治理、生物防护领域, 能够降解原油, 分解代谢甲硫代三嗪除草剂等物质^[24-25]。鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomanas*)是一种功能菌群, 其代谢机制能够耐受贫营养, 在自然界中有着极强的生

命力并且分布广泛, 该菌属的一些菌株还能够降解多环芳烃等高分子有机污染物^[26], 对于环境污染的治理有着广阔的应用前景。而在农田地丰度有所增加的德沃斯氏菌属(*Devosia*)与西瓜枯萎病的发病率呈显著负相关^[27], 这说明在农田地种植巨菌草对预防西瓜枯萎病有很好的应用前景; 具有固碳作用^[28]的慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)丰度也有所增加, 这表明种植巨菌草可通过增加固碳菌群丰度来促进农田地土壤碳循环。在山顶地丰度增加的已知菌属为中生根瘤菌属(*Mesorhizobium*), 其可与豆科植物形成具有固氮能力的根瘤^[29], 因此, 在山顶地种植巨菌草有利于根瘤的形成, 从而促进土壤的氮循环。砒砂岩地区土壤蕴含着丰富的微生物资源, 这些功能菌属类群的发现可以为我们科学规划使用不同类型的土壤提供一个新思路, 可以从内蒙古地区分布广泛的砒砂岩种深入挖掘有利用价值的资源。

Illumina MiSeq 测序结果通过丰度指数(Chao1 指数)和多样性指数(Shannon 指数)来反映砒砂岩样地土壤细菌的群落结构多样性, 在本研究中巨菌草种植后, 土壤细菌多样性和丰富度均增加, 其中 Chao1 指数在巨菌草生长的任何时期均比种植前要高, 在河滩地和农田地, 巨菌草在拔节期时 Chao1 指数是最高的, 而山顶地则在巨菌草分蘖期时最高, 说明该时期土壤中细菌群落是最丰富的。Shannon 指数在种植巨菌草后也有所上升, 说明巨菌草的种植提高土壤细菌的群落多样性。河滩地的 Shannon 指数和 Chao1 指数在三块样地中均是最低的, 说明在这三块样地中河滩地土壤细菌多样性和丰富度较低。

综上所述, 巨菌草能明显促进砒砂岩地区土壤细菌菌群多样性和丰富度, 能有效提高土壤有机质含量, 对土壤 pH 影响较小, 生态效益明显,

其应用前景广阔, 可作为砒砂岩地区土壤生态修复的先锋植物。

参考文献

- [1] Zhang JH, Xu LQ, Geng SH. Preliminary tests and study on construction methods of building dams on feldspathic sandstone. *Soil and Water Conservation in China*, 2002, (10): 31–32. (in Chinese)
张金慧, 徐立青, 耿绥和. 砒砂岩筑坝施工方法初步试验研究. *中国水土保持*, 2002, (10): 31–32.
- [2] Yao WY, Liu H, Liang ZS. A new approach to ecological restoration in Pisha sandstone area—an environment-friendly technique of anti-erosion and vegetation-promoting. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2018, 38(4): 118–124. (in Chinese)
姚文艺, 刘慧, 梁止水. 砒砂岩区生态恢复的新途径——一种环境友好型抗蚀促生技术. *水土保持通报*, 2018, 38(4): 118–124.
- [3] Wang YC, Wu YH, Min DA, Chang YZ, Zhang RJ. Investigation on measures for soil erosion in soft rock area. *The Global Seabuckthorn Research and Development*, 2007, 5(1): 39–44. (in Chinese)
王愿昌, 吴永红, 闵德安, 常玉忠, 张绒君. 砒砂岩区水土流失治理措施调研. *国际沙棘研究与开发*, 2007, 5(1): 39–44.
- [4] Dang XH, Gao Y, Wang J, Luo FM, Gao JL, Liu Y. Characteristics of root distribution of *Hippophae rhamnoides* L. and its improving effect on the forest soil on the ditch slope of soft sandstone area. *Science of Soil and Water Conservation*, 2012, 10(4): 45–50. (in Chinese)
党晓宏, 高永, 汪季, 罗凤敏, 高君亮, 刘阳. 砒砂岩沟坡沙棘根系分布特征及其对林下土壤的改良作用. *中国水土保持科学*, 2012, 10(4): 45–50.
- [5] Lin XS, Lin ZX, Lin DM, Lin H, Luo HL, Hu YP, Lin CM, Zhu CZ. Effects of different years of planting *Pennisetum* sp. on the plant-and insect diversity in *Pennisetum* sp. communities. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(10): 2849–2854. (in Chinese)
林兴生, 林占熿, 林冬梅, 林辉, 罗海凌, 胡应平, 林春梅, 朱朝枝. 不同种植年限的巨菌草对植物和昆虫多样性的影响. *应用生态学报*, 2012, 23(10): 2849–2854.
- [6] Lu QL, Tang LR, Lin WY, Huang B, Chen XR, Ou W, Lin ZX, Lin DM. Preparation and characterization of nano-crystalline cellulose from *Pennisetum sinense*. *Pratacultural Science*, 2013, 30(2): 301–305. (in Chinese)
卢麒麟, 唐丽荣, 林雯怡, 黄彪, 陈学榕, 欧文, 林占熿, 林冬梅. 巨菌草制备纳米纤维素及其表征. *草业科学*, 2013, 30(2): 301–305.
- [7] Lin XS, Lin ZX, Lin DM, Lin H, Luo HL, Hu YP, Lin CM, Zhu CZ. Assessment on salt resistance at seedling stage of 5 species of Juncao under NaCl stress. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2013, 42(2): 195–201. (in Chinese)
林兴生, 林占熿, 林冬梅, 林辉, 罗海凌, 胡应平, 林春梅, 朱朝枝. 5 种菌草苗期抗盐性的评价. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2013, 42(2): 195–201.
- [8] Liu FS, Lin H, Lin XS, Zheng D, Su DW, Lin ZX. Review on control and remediation of ecologically vulnerable area with *Pennisetum giganteum* sp. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2017, 45(7): 111–113. (in Chinese)
刘凤山, 林辉, 林兴生, 郑丹, 苏德伟, 林占熿. 巨菌草对生态脆弱区治理与修复的研究进展. *贵州农业科学*, 2017, 45(7): 111–113.
- [9] Lin DM, Lin ZX, Su DW, Zheng D, Lin H, Lin XS, Li J, Mei L. Effect of planting juncao on nutrients, enzyme activities and microorganisms of desertified soils. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2017, 46(5): 61–65. (in Chinese)
林冬梅, 林占熿, 苏德伟, 郑丹, 林辉, 林兴生, 李晶, 梅兰. 种植菌草对沙质荒漠化土壤养分、酶活性及微生物的影响. *河南农业科学*, 2017, 46(5): 61–65.
- [10] Lin XS, Lin ZX, Lin DM, Lin H, Luo HL, Hu YP, Lin CM, Zhu CZ. Effects of planting *Pennisetum* sp. (Giant juncao) on soil microbial functional diversity and fertility in the barren hillside. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(15): 4304–4312. (in Chinese)
林兴生, 林占熿, 林冬梅, 林辉, 罗海凌, 胡应平, 林春梅, 朱朝枝. 荒坡地种植巨菌草对土壤微生物群落功能多样性及土壤肥力的影响. *生态学报*, 2014, 34(15): 4304–4312.
- [11] Wang F, Song HF, Yan LW. JUNCAO feed application. *Nong Min Zhi Fu Zhi You*, 2016, (16): 95. (in Chinese)
汪飞, 宋虎平, 闫珑文. 菌草饲料化应用. *农民致富之友*, 2016, (16): 95.
- [12] Du SY, Chen PG. Feeding effect of *Pennisetum sinense* silage on beef cattle. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2018, 39(10): 31–32. (in Chinese)
杜森有, 陈朋刚. 巨菌草青贮饲料饲喂肉牛的研究. *畜牧与饲料科学*, 2018, 39(10): 31–32.
- [13] Gu LH, Liu QW, Xing MP, Lin DJ, Ye BG, Lin ZM. Analysis

- of the effect of *Pennisetum* sp feeding on Beijing duck. *China Poultry*, 2017, 39(12): 61–63. (in Chinese)
- 顾丽红, 刘圉炜, 邢漫萍, 林大捷, 叶保国, 林哲敏. 巨菌草饲喂北京鸭的效果分析. *中国家禽*, 2017, 39(12): 61–63.
- [14] 张腊梅. 肥料农药和重金属对紫色水稻土微生物特性的影响. 西南大学博士学位论文, 2007.
- [15] 王芬. 华西雨屏区不同植被类型土壤微生物及土壤酶活性研究. 四川农业大学硕士学位论文, 2013.
- [16] Chen ZB, Li B, Wang DK, Yu L, Xu SG, Ren Z, Jin S, Zhang YF, Peng SJ. Diversity of endophytic bacteria in walnut analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 31(5): 1129–1133. (in Chinese)
- 陈泽斌, 李冰, 王定康, 余磊, 徐胜光, 任祺, 靳松, 张永福, 彭声静. Illumina MiSeq 高通量测序分析核桃内生细菌多样性. *江苏农业学报*, 2015, 31(5): 1129–1133.
- [17] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 2012, 10(1): 57–59.
- [18] 姚俊新. 巨菌草对土壤微生物多样性及酶活性的影响. 福建农林大学硕士学位论文, 2013.
- [19] Jiang XT, Peng X, Deng GH, Sheng HF, Wang Y, Zhou HW, Tam NFY. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland. *Microbial Ecology*, 2013, 66(1): 96–104.
- [20] Wu YT, Schoenau JJ, Li FM, Qian PY, Zhang SQ, Malhi SS, Wang F. Concepts and relative analytical techniques of soil organic matter. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(4): 717–722. (in Chinese)
- 武天云, Schoenau JJ, 李凤民, 钱佩源, 张树清, Malhi SS, 王方. 土壤有机质概念和分组技术研究进展. *应用生态学报*, 2004, 15(4): 717–722.
- [21] Qian SF, Meng HJ. Effect of planting *helianthus tuberosus* on physical & chemical properties of soil on desertification land. *Protection Forest Science and Technology*, 2012, (1): 22–24, 38. (in Chinese)
- 钱寿福, 孟好军. 菊芋种植对沙化土地土壤理化性质的影响. *防护林科技*, 2012, (1): 22–24, 38.
- [22] Yan H, Wang MY. The influence of tree planting on soil physical and chemical properties. *Journal of Xuchang University*, 2016, 36(5): 125–129. (in Chinese)
- 闫慧, 王梦阳. 苗木种植对土壤理化性质的影响. *许昌学院学报*, 2016, 36(5): 125–129.
- [23] Wang Q, Garrity MG, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [24] Schippers A, Schumann P, Spröer C. *Nocardioides oleivorans* sp. nov., a novel crude-oil-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(4): 1501–1504.
- [25] Topp E, Mulbry WM, Zhu H, Nour SM, Cuppels D. Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3134–3141.
- [26] Hu J, He XH, Li DP, Liu Q. Progress in research of sphingomonas. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2007, 13(3): 431–437. (in Chinese)
- 胡杰, 何晓红, 李大平, 刘强. 鞘氨醇单胞菌研究进展. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(3): 431–437.
- [27] Tian C, Qiu T, Zhu FY, Xiao JL, Wei L, Liang ZH. Calcium oxide regulation of fusarium wilt and rhizosphere bacterial community. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2018, 44(6): 620–624. (in Chinese)
- 田程, 邱婷, 朱菲莹, 肖姬玲, 魏林, 梁志怀. 氧化钙对西瓜枯萎病及根际细菌群落的调控. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2018, 44(6): 620–624.
- [28] Zhang SS, Jin ZJ, Jia YY, Li Q. Community structure of CO₂-fixing soil bacteria from different land use types in karst areas. *Environmental Science*, 2019, 40(1): 412–420. (in Chinese)
- 张双双, 靳振江, 贾远航, 李强. 岩溶地区不同土地利用方式土壤固碳细菌群落结构特征. *环境科学*, 2019, 40(1): 412–420.
- [29] 车振明. 微生物学. 武汉: 华中科技大学出版社, 2008.

Effect of *Pennisetum* sp. and its different growth periods on physical-chemical properties and bacterial diversity in sandstone areas

Lan Mei^{1,2}, Zaixing Huang^{1,2}, Zhaozhao Song^{1,2}, Yulei Jia^{1,2}, Dewei Su², Hui Lin², Zhanxi Lin^{2*}

¹ College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

² China National Engineering Research Center of Juncao Technology, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] This study aimed to analyze the effect of *Pennisetum* sp. in different growth stage on soil physical-chemical properties and bacterial community structure, and provide a theoretical basis for better application of *Pennisetum* sp. to improve soil in Pisha sandstone area. [Methods] We used Illumina MiSeq sequencing to compare the effect of *Pennisetum* sp. in different growth stage on soil bacterial community structure. [Results] After planting *Pennisetum* sp., the water content of each plot was lowest in tillering stage and highest in maturity period. The soil organic content increased and soil pH did not change significantly. The dominant bacteria of every plot obtained at phylum level were *Actinobacteria* and *Proteobacteria*. At genus level, the highest abundance was unidentified. Bacterial diversity and species abundance in three sample plots were higher than those before planting *Pennisetum* sp. The soil bacterial diversity and species abundance of farmland were highest in jointing stage, the amount of bacteria was highest in tillering stage. The soil bacterial diversity and species abundance of hilltop were highest in tillering stage. The soil bacterial diversity of flood and was highest in seedling stage, the species abundance was highest in jointing stage. [Conclusion] The soil bacterial community structure in Pisha sandstone was similar in different growth stage of *Pennisetum* sp. *Pennisetum* sp. can obviously promote soil bacterial diversity and species abundance and improve soil organic matter content effectively. However, the soil bacterial diversity, amounts and organic matter content reached a maximum in different growth stage.

Keywords: *Pennisetum* sp., soil bacteria, community structure, high-throughput sequencing

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Forestry Public Welfare industry Research Project (201504412), by the Fujian JUNCAO Eco-industry Collaborative Innovation Research Project (JCXTGG22), by the Ministry of Water Resources Technology Demonstration Project (SF-201603) and by the Fujian Agriculture and Forestry University Science and Technology Development Fund Project (KF2015112)

*Corresponding author. Tel: +86-591-83789223; E-mail: lzxjuncao@163.com

Received: 25 December 2018; Revised: 2 July 2019; Published online: 26 July 2019