沙漠微生物群落功能多样性分析

王晓蕾[1]，张 琇[1,2]，周云锋[1]，杜彦龙[1]

(1. 北方民族大学 生物科学与工程学院，宁夏 银川 750021；2. 国家民委发酵酿造工程生物技术重点实验室，宁夏 银川 750021)

摘 要：以宁夏回族自治区沙坡头地区的沙漠微生物群落为研究对象，采用 Biolog 方法研究了已固定沙丘结皮(J_1)及结皮下层(J_2)，半流动沙丘上层(L_1)和下层(L_2)中微生物群落的功能多样性。结果表明，J_1 的微生物群落活性最高，J_2 的微生物群落次之，再次为 L_2 的微生物群落，最后为 L_1 的微生物群落；J_1，J_2，L_1 和 L_2 的微生物群落对羧酸类、聚合物类和氨基酸类碳源的利用表现一致，对糖类、胺/氨类和双亲化合物类碳源的利用表现不同；利用 ECO 板上 31 种碳源进行主成分分析得出，PC_1，PC_2 和 PC_3 特征值的贡献率为分别为70.16%，19.23%，10.61%。研究结果表明：(1) 经过固沙后的微生物群落活性明显高于半流动沙漠微生物群落的活性；(2) 微生物群落结构上的差异致使其对 6 类碳源的利用方式不同；(3) 主成分分析表明沙漠微生物群落对羧酸类、糖类和氨基酸类碳源的利用最高，主要利用碳源有 22 种。

关键词：Biolog；沙漠；微生物群落；功能多样性

文献标识码：A **文章编号**：1000-288X(2012)03-0091-05 **中图分类号**：Q93

An Analysis on Diversity of Microbial Community Function in Desert

WANG Xiao-lei[1], ZHANG Xiu[1,2], ZHOU Yun-feng[1], DU Yan-long[1]

(1. *College of Biological Science and Engineering, North Ethnics University, Yinchuan, Ningxia* 750021, *China*; 2. *Key Laboratory of Fermentation, Brewing Engineering and Biotechnology, State Nationalities Affairs Commission, Yinchuan, Ningxia* 750021, *China*)

Abstract: Taking the microbial communities in the Shapotou deserted area of Ningxia Hui Autonomous Region as a research object, function diversity of microbial communities from fixed dunes crust(J_1), sub fixed dunes crust(J_2), semi-mobile dunes(L_1) and sub semi-mobile dunes(L_2) were studied using Biolog method. Results showed that physiological action of J_1 microbial community was the highest, followed by J_2, L_2 and L_1 in turn. J_1, J_2, L_1 and L_2 had the same performance in utilization of carboxylic acids, polymers and amino acid, but were different in utilization of sugar, amine/ammonia and parent compounds. The characteristic value contributions of PC_1, PC_2 and PC_3 were 70.16%, 19.23% and 10.61%, respectively. It can be concluded that (1) microbial community activity in fixed desert was significantly higher than that in mobile desert; (2) the differences of microbial community structure may result in the utilization of six types of carbon sources in different ways; (3) by principal component analysis, the utilization of acid, sugar and amino acid by desert microbial community was highest and carbon sources utilized were as many as 22 types.

Keywords: **Biolog; desert; microbial community; function diversity**

沙漠微生物在沙漠生态系统的养分循环、系统稳定性以及沙漠固定化中都起到了非常重要的作用[1-4]，因此沙漠微生物是沙漠生态系统中极其重要和最为活跃的部分。沙漠微生物群落是由沙漠中多个微生物种群所组成的，它的群落结构和多样性可以敏感地反映沙漠的生态功能和沙漠的环境变化，同时它也是沙漠生态环境恢复的最先锋者。因此对沙漠微生物群落进行功能多样性研究可以为控制和优化沙漠微生物群落结构提供理论依据。沙坡头地区以沙漠生态治理闻名于世，目前对其水分、温度等物理性质研究较多，而针对沙漠微生物活性和功能多样性的研究相对较少。

收稿日期：2011-11-15 **修回日期**：2012-01-19

资助项目：宁夏自治区高等学校研究生教育创新计划项目“研究生创新培养模式的构建”；北方民族大学引进人才计划项目；北方民族大学研究生创新实验项目“宁夏沙漠生物结皮功能多样性研究”

作者简介：王晓蕾(1983—)，女(汉族)，宁夏回族自治区银川市人，硕士研究生，研究方向为生物资源与利用。E-mail：xiechuyan@yahoo.com.cn。

通信作者：张琇(1977—)，男(汉族)，宁夏回族自治区盐池县人，博士，副教授，从事微生物资源开发与利用研究。E-mail：zhangxiu101@yahoo.com.cn。

目前研究微生物功能多样性的方法有 Biolog-ECO 技术[5]和基于微生物功能基因组学的研究方法;前者可以简单而快速反映微生物群落活性水平以及微生物群落功能多样性[6-7],后者的研究还正在处于起步阶段。因此本实验采用 Biolog-ECO 技术,从沙漠微生物群落总活性,沙漠微生物群落对 6 类碳源的利用以及沙漠微生物群落主要利用碳源这三个方面来研究沙坡头地区沙漠微生物群落功能多样性[8-9]。本研究旨在为沙漠地区的退化治理提供微生物学依据,为沙漠地区生物防沙治沙工程奠定前期基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验地区概况及实验样品

本研究实验地点位于宁夏回族自治区中卫市,腾格里沙漠东南缘的沙坡头地区(104°57′E,37°27′N,海拔高度 1 310～1 350 m)。该地区属温带草原化荒漠;地貌为高大的格状沙丘,相对高度在 15～20 m 之间;年均降水量为 186.2 mm,夏秋(5—9 月)雨量占到全年降雨量 80.6%,年潜在蒸发量 3 007 mm;年平均气温 9.7 ℃,平均风速为 2.8 m/s,每年出现风沙天气 122 d。持水量仅 3.34%～3.96% ,凋萎含水率为 0.6%,天然降水是沙漠土壤水分的主要补给来源。

选取沙坡头麦草方格固沙区人工固沙地,上层结皮部样品 J_1(0—1 cm),结皮下层样品 J_2(10—12 cm)和半固定沙丘上层样品 L_1(0—1 cm)和下层样品 L_2(10—12 cm),按 S 型路线选择 10 处,组成 1 个土样。样品除去动植物残体等杂质,四分法去除多余土样,装入密封袋,立即置于冰盒中运回实验。装入无菌小纸袋,于 2 h 内放入 4 ℃的低温冰箱中保存。并尽快进行 Biolog 分析。

1.2 实验材料与仪器

实验试剂由 Biolog 公司生产,华粤企业集团有限公司提供。主要仪器有 Biolog MICROSOFT 全自动微生物鉴定分型系统;Biolog 电动八孔移液器;人工气候箱;超净工作台;摇床。

1.3 实验方法

微生物群落代谢活性和功能多样性采用 Biolog-ECO 方法进行测定。先称取相当于 10 g 烘干沙土质量的 4 ℃保存的沙土样品,置于 250 ml 的三角瓶中,加入 90 ml 的无菌生理盐水进行稀释;将此悬液在 200 r/min摇床上振荡分散 30 min,之后静置 3～5 min,再将 Biolog-ECO 板预热到 30 ℃,使用八孔移液器将土悬稀释液按每孔 150 μL 接种于 ECO 板的 96 孔中,对照孔内加入 150 μL 无菌水。接种好的微平板放到铺有 6 层保持一定湿度纱布的塑料饭盒中,以防止微平板鉴定孔中的菌悬液挥发。同时塑料饭盒用保鲜膜包裹,保鲜膜上用无菌注射针头扎若干个小眼,以保证微生物的培养所需要的氧气。将 ECO 板放到 30 ℃恒温避光培养 6 d,每隔 24 h 用 Biolog-ECO 板读数器读取培养板在 590 nm 波长时的吸光值。

1.4 数据分析

ECO 板上的 96 个孔为 3 组重复,每 32 个孔为一组,除对照孔内加有无菌水以外,其他 31 孔分别是 31 种不同的碳源,这 31 种碳源分为 6 大类,Biolog-ECO 板上 31 种碳源的分布和分类如表 1 和表 2 所示。微生物群落的代谢活性用每孔颜色平均变化率(average well color development,AWCD)来描述,也就是平均吸光度,其计算公式如下:

$$AWCD=\sum(C_i-R)/31$$

式中:C_i——各反应孔在 590 nm 下的光密度值;R——ECO 板对照孔 A_1 的光密度值,Biolog 生态板的碳源数目为 31。C_i-R 小于零的孔,计算中记为零,即:$C_i-R\geqslant 0$。

采用培养 96 h 的 Biolog 检测数据进行沙漠微生物群落的主成分分析[10]。所用数据用 Microsoft Excel 2003 和 DPS 软件系统处理,所有数据为 3 次重复的平均值。

表 1 Biolog-ECO 板上 31 种碳源的空间分布

编号	1	2	3	4
A	水	β-甲基-D-葡萄糖苷	D-半乳糖酸 γ-内酯	L-精氨酸
B	丙酮酸甲酯	D-木糖	D-半乳糖醛酸	L-天冬酰胺酸
C	吐温 40	I-赤藓糖醇	2-羟基苯甲酸	L-苯丙氨酸
D	吐温 80	D-甘露醇	4-羟基苯甲酸	L-丝氨酸
E	α-环式糊精	N-乙酰-D 葡萄糖胺	γ-羟丁酸	L-苏氨酸
F	肝 糖	D-葡糖胺酸	衣康酸	甘氨酰-L-谷氨酸
G	D-纤维二糖	1-磷酸葡萄糖	α-丁酮酸	苯乙胺
H	α-D-乳糖	D,L-α-磷酸甘油	D-苹果酸	腐 胺

注:Bioklog-ECO 板上有 32 个孔,数字 1,2,3,4 分别为其横向编号; 字母 A—H 分别为其纵向编号。

表 2　Biolog-ECO 板碳源分类

培养基类别	Biolog-ECO 板	培养基类别	Biolog-ECO 板
碳水化合物类	A_2,B_2,C_2,D_2,E_2,G_1,G_2,H_1	羧酸类	A_3,B_3,C_3,D_3,E_3,F_2,F_3,G_3,H_3
氨基酸类	A_4,B_4,C_4,D_4,E_4,F_4	胺 类	G_4,H_4
聚合物类	C_1,D_1,E_1,F_1	酚类化合物类	B_1,H_2

2　结果与讨论

2.1　不同沙漠微生物群落全部碳源利用动力学特征

平均颜色变化率(或称平均吸光度)是反映微生物活性的一个重要指标,它在一定程度上反映了土壤中微生物种群的数量和结构特征。AWCD 值越大,表明微生物密度越大,活性越高;反之,微生物密度越小,活性越低。

由图 1 可以看出,在培养初期(0—24 h),AWCD 值很小,说明 24 h 内碳源基本未被利用,样品微生物活性均相对较低;温育 24 h 后 J_1,J_2,L_1,L_2 的 AWCD 值均开始升高;J_1 的 AWCD 值随着培养时间的延长呈现逐渐增加的趋势;而 J_2 的 AWCD 值则随着培养时间的延长,呈现出稳定的趋势;在培养至 72 h之前,L_1 的 AWCD 值略高于 L_2 的 AWCD 值,而在培养了 72 h 以后,L_1 的 AWCD 值的增长趋势趋于稳定,L_2 的 AWCD 值却开始有较为明显的上升趋势。总体表现为:$J_1>J_2>L_2>L_1$。

从图 1 中还可以看出,沙漠微生物群落代谢的 AWCD 值随时间变化曲线存在较明显的适应期、对数期和稳定期等阶段。可能由于监测时间不是足够长,衰亡期表现不明显。

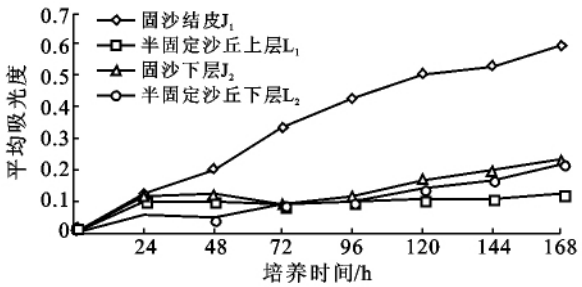


图 1　沙漠微生物在 Biolog-ECO 板上的平均吸光度值(AWCD)动态

2.2　沙漠微生物对不同类型碳源的利用强度

Biolog-ECO 微平板的碳源包括羧酸类、聚合物类、糖类、双亲化合物、氨基酸和氨/胺类。沙漠微生物群落对单一种类碳源利用的平均吸光值随培养时间的变化见图 2。不同沙漠样品中微生物群落对羧酸类、聚合物类和氨基酸类碳源的利用表现一致:$J_1>J_2>L_2>L_1$;对糖类的利用表现为:$J_1>L_2>J_2>L_1$;对胺/氨类碳源的利用表现为:$J_1>L_1>J_2>L_2$;对双亲化合物类碳源的利用表现为:$J_1>L_1>L_2>J_2$。沙漠微生物群落对 6 类碳源的利用方式的不同,可能是由于微生物群落中存在的微生物种类结构的不同所致。这反映了沙漠微生物在数量和群落结构上的差异。

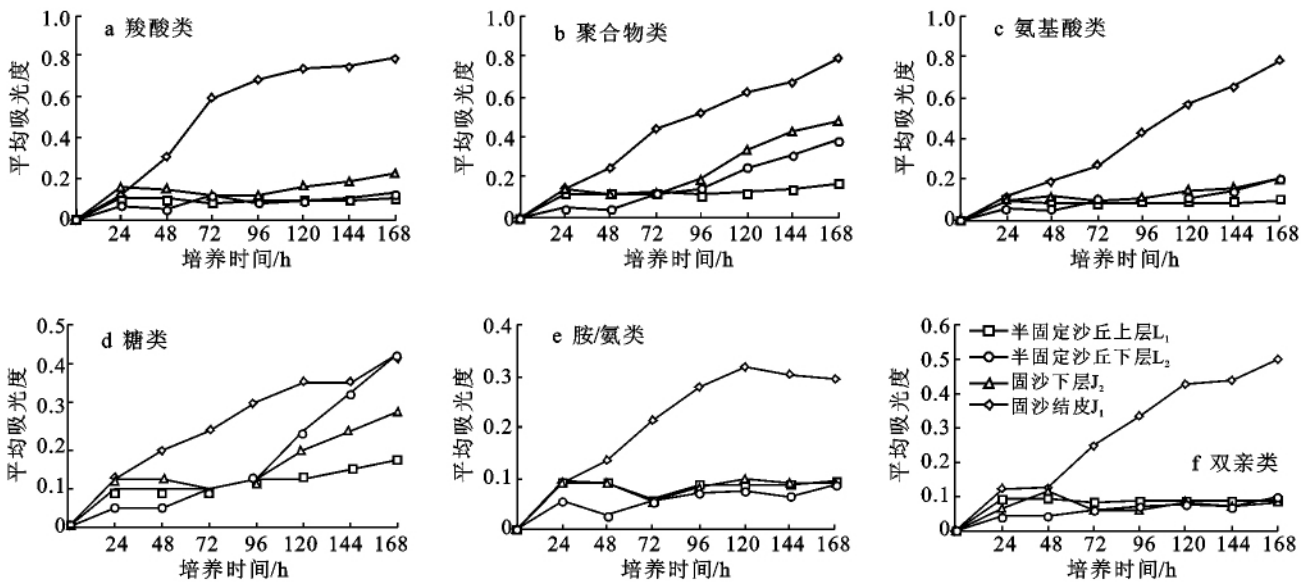


图 2　沙漠微生物分别对 6 大类碳源的利用

2.3 沙漠微生物群落多样性的主成分分析

主成分分析(PCA)是把多个因素化为少数几个综合因素的一种统计分析,可以将不同沙漠微生物群落对 31 种碳源利用的多元向量变换为互不相关的 6 类碳源主元向量空间中,用点的位置直观地反映出沙漠微生物群落功能多样性变化,用来解释微生物群落对碳源利用的多样性。采用培养至 96 h 的实验数据进行主成分分析。数据矩阵包括 4 行代表 4 个实验样品,31 列代表生态板上分布的 31 种不同的碳源物质。结果表明,一共提取了 3 个主成分,累计贡献率达 100%,包含了全部变异信息。其中第 1 主成分(PC_1)、第 2 主成分(PC_2)和第 3 主成分(PC_3)分别占总贡献率的 70.16%,19.23%,10.61%。利用第 1,2 主成分将微生物群落划分为 3 个功能(图 3)类群,J_1 为一类,J_2 和 L_1 为一类,L_2 为同一类。说明 J_1 微生物群落生理活性有了较大提升,J_1 和 L_1 微生物群落活性随环境变化趋于缓慢上升,L_2 微生物群落生理活性相对比较低。

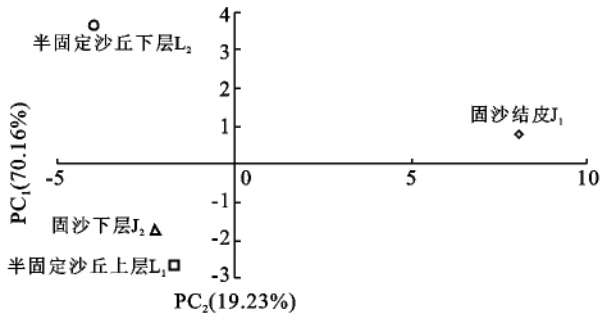


图 3 沙漠微生物功能多样性的主成分分析

影响第 1 主成分(PC_1)的碳源是 D-半乳糖酸 γ-内酯、L-精氨酸、丙酮酸甲酯、D-半乳糖醛酸、L-天冬酰胺酸、吐温 40、2-羟基苯甲酸、吐温 80、L-苯丙氨酸、D-甘露醇、4-羟基苯甲酸、L-丝氨酸、N-乙酰-D 葡萄糖胺、肝糖、D-葡糖胺酸、衣康酸、甘氨酰-L-谷氨酸、1-磷酸葡萄糖、α-丁酮酸、D,L-α-磷酸甘油、D-苹果酸、腐胺;影响第 2 主成分(PC_2)的主要碳源是 β-甲基-D-葡萄糖苷;影响第 3 主成分(PC_3)的主要碳源是 D-木糖、苯乙胺。I-赤藓糖醇对第 2 和第 3 主成分均有影响;L-苯丙氨酸和 α-环式糊精对第 1 和第 3 主成分均有影响;其它碳源则不被利用。

第 1 主成分(PC_1)利用氨基酸类有 6 种,糖类有 3 种,羧酸类有 8 种,胺类有 1 种,双亲化合物类有 2 种,聚合物有 4 种;第 2 主成分利用糖类有 2 种;第 3 主成分利用氨基酸类有 1 种,糖类有 2 种,胺类有 1 种,聚合物类有 1 种。对主成分起分异作用的主要碳源类别分别是羧酸类、糖类和氨基酸类碳源,说明这 4 个微生物群落利用碳源的效率存在差异,利用的主要碳源种类是这 8 种羧酸类化合物、7 种糖类和 7 种氨基酸类,共 22 种碳源(表 3)。

表 3 Biolog-ECO 板上碳源在各主成分上的载荷值

对应微孔	碳源底物	主成分 1	主成分 2	主成分 3
A_1	水	—	—	—
A_2	β-甲基-D 葡萄糖苷 L	—	0.749 3	—
A_3	D-半乳糖酸 γ-内酯	0.982 8	—	—
A_4	L-精氨酸	0.975 0	—	—
B_1	丙酮酸甲酯	0.986 5	—	—
B_2	D-木糖	—	—	0.521 5
B_3	D-半乳糖醛酸	0.981 4	—	—
B_4	L-天冬酰胺酸	0.984 8	—	—
C_1	吐温 40	0.978 7	—	—
C_2	I-赤藓糖醇	—	0.804 4	0.588 2
C_3	2-羟基苯甲酸	0.954 7	—	—
C_4	L-苯丙氨酸	0.757 6	—	0.587 6
D_1	吐温 80	0.954 2	—	—
D_2	D-甘露醇	0.984 5	—	—
D_3	4-羟基苯甲酸	0.981 2	—	—
D_4	L-丝氨酸	0.983 1	—	—
E_1	α-环式糊精	0.606 2	—	0.707 8
E_2	N-乙酰-D 葡萄糖胺	0.992 7	—	—
E_3	γ-羟丁酸	—	—	—
E_4	L-苏氨酸	—	—	—
F_1	肝 糖	0.795 5	—	—
F_2	D-葡糖胺酸	0.987 7	—	—
F_3	衣康酸	0.993 0	—	—
F_4	甘氨酰-L-谷氨酸	0.996 5	—	—
G_1	D-纤维二糖	—	—	—
G_2	1-磷酸葡萄糖	0.881 1	—	—
G_3	α-丁酮酸	0.555 5	—	—
G_4	苯乙胺	—	—	0.870 0
H_1	α-D-乳糖	—	—	—
H_2	D,L-α-磷酸甘油	0.998 8	—	—
H_3	D-苹果酸	0.960 0	—	—
H_4	腐 胺	0.994 5	—	—

3 结 论

早期对沙坡头地区沙漠的研究主要集中在土壤微生物学特性以及理化性质上[11-14],近几年来又研究了沙坡头人工固沙植被土壤水分空间异质性,沙坡头生物结皮发育特征,对地表蒸发影响以及对土壤水文过程的调控作用[15-18],并且对该地区的苔藓植物区系及其繁殖和生长特性进行了研究[19-20]。

本项目是在前辈对沙坡头地区研究的基础上,通

过 Biolog-ECO 板对该地区固沙结皮和结皮下层,流沙上层和流沙下层中的微生物群落的生物活性和功能多样性进行了比较研究。结果显示,在气候条件基本一致的前提下,已进行固沙的沙漠微生物群落和半流动沙漠的微生物群落代谢活性和功能多样性存在较为明显的差异。经过固沙的沙漠微生物对碳源的利用程度高;流动沙漠的微生物群落对碳源的利用相对较低,导致这种差异的主要因素可能包括:植物种类组成、植物残体、根系分泌物和土壤有机物等。说明经过固沙后沙漠表面有少量植被覆盖使得沙漠表面光照适宜,外界干扰少,沙漠结构比较稳定,水分涵养好,为沙漠微生物栖息提供环境相对更为稳定的场所,因此更适合于微生物群落的发展,所以其微生物群落的活性相对较高,这与邵玉琴[1]对结皮中微生物生物量和数量的研究相一致。

本研究还表明,4 种不同采样来源沙漠微生物群落的碳源利用类型出现不同,但是它们主要利用的碳源种类为羧酸类化合物、糖类和氨基酸类。利用 ECO 板上 31 种碳源作 PCA 主成分分析,第 1 主成分特征值的贡献率为 70.16 %,第 2 主成分特征值的贡献率为 19.23%。由此说明影响沙漠微生物多样性的主要因素可能与碳源物质的来源,植物的根系分泌物等因素有密切关系。

大量文献资料表明,在年降水量低于 200 mm 的干旱沙漠地区,植物不能顺利存活,而沙坡头地区 1955—2009 年平均降水量为 188.2 mm,因此通过植树造林等传统方式对该区域的沙漠进行治理不可行。除非配置引水灌溉系统,这对于水资源奇缺的干旱荒漠地区来说是不可能的,这样既违反了自然规律,增加了不必要的浪费,同时也难以达到治沙目的,因此,顺应自然规律,在干旱沙漠通过人工培养种植微生物结皮以治理沙漠是值得研究的重要课题。

本实验的研究结果可以在今后人工培植微生物结皮时,根据不同环境需要,适当的优化和调整微生物群落所需要的碳源结构,用以诱导具有固沙功能的微生物繁殖并且加速沙漠微生物群落的演替速度,充分发挥微生物在沙漠化治理中的作用。

[参 考 文 献]

[1] 赵吉,邵玉琴. 草原沙地微生物结皮与固沙作用的研究[J]. 农业环境科学学报,2004,23(1):94-97.

[2] 吴楠,潘伯荣,张远明. 土壤微生物在生物结皮形成过程中的作用及生态学意义[J]. 干旱区研究,2004,21(4):444-445.

[3] Elsridge D J, Koen T B. Cover and floristics of microphytic soil crusts in relation to indices of landscap health [J]. Plant Ecology, 1998, 137(1):101-114.

[4] Zak C J, Michael R Willig, Daryl L Moorhead, et al. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach[J]. Soil Biology Biochemistry, 1994,26(9):1101-1108.

[5] 章家恩,蔡燕飞,高爱霞,等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述[J]. 土壤,2004,36(4):346-350.

[6] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles: a critique[J]. FEMS Microb. Ecol., 2002,42(1):1-14.

[7] 董立国,袁汉民,李生宝,等. 玉米免耕秸秆覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态环境学报,2010(2):444-446.

[8] 郑华,欧阳志云,方志国,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):456-461.

[9] 章家恩,蔡燕飞,高爱霞,等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述[J]. 土壤,2004,36(4):46-350.

[10] 王强,戴九兰,吴大千,等. 微生物生态研究中基于BIOLOG方法的数据分析[J]. 生态学报,2010,30(3):17-823.

[11] 陈祝春,张继贤,李定淑. 腾格里沙漠东南缘不同类型沙丘的微生物学特性[J]. 中国沙漠,1983,3(1):20-26.

[12] 陈祝春,李定淑. 固沙植物根际微生物对于沙土发育和流沙固定的影响[J]. 生态学杂志,1987,6(2):6-12.

[13] 李定淑. 流沙治理研究[M]. 银川:宁夏人民出版社,1991:86-100.

[14] 陈端文. 沙坡头地区沙丘人工植被区土壤性质的变化[J]. 中国沙漠,1981,1(1):41-48.

[15] 马风云,李新荣,张景光,等. 沙坡头人工固沙植被土壤水分空间异质性[J]. 应用生态学报,2006,17(5):789-795.

[16] 刘立超,李守中,宋耀选,等. 沙坡头人工植被区微生物结皮对地表蒸发影响的试验研究[J]. 中国沙漠,2005,25(2):191-196.

[17] 李守中,郑怀舟,李守丽,等. 沙坡头植被固沙区生物结皮的发育特征[J]. 生态学杂志,2008,27(10):1675-1679.

[18] 李守中,肖洪浪,罗芳. 沙坡头植被固沙区生物结皮对土壤水文过程的调控作用[J]. 中国沙漠,2005,25(2):228-233.

[19] 王世冬,白学良,雍世鹏. 沙坡头地区苔藓植物区系初步研究[J]. 中国沙漠,2001,21(3):244-250.

[20] 白学良,王瑶,徐杰. 沙坡头地区固定沙丘结皮层藓类植物的繁殖和生长特性研究[J]. 中国沙漠,2003,23(2):171-173.