

民勤绿洲退耕区次生草地演变过程中土壤微生物生态机理研究

王理德^{1,2,3,4*}, 王梓璇^{1,2}, 闫沛迎^{1,3#}, 吴春荣^{1,2,4}, 韩生慧^{1,2}, 吴昊¹, 陈思航¹, 郭春秀^{1,4}

¹甘肃省治沙研究所, 甘肃 兰州

²甘肃省河西走廊森林生态系统国家定位观测研究站, 甘肃 武威

³甘肃民勤荒漠草地生态系统国家野外观测研究站, 甘肃 民勤

⁴甘肃省荒漠化与风沙灾害防治国家重点实验室培育基地, 甘肃 武威

收稿日期: 2023年10月1日; 录用日期: 2023年11月1日; 发布日期: 2023年11月9日

摘要

干旱绿洲区耕地大面积退耕后,不采取任何农业管理措施,则易形成荒漠草原或漠境草原,可能导致次生草地向裸露化或沙漠化发展,不利于绿洲生态系统的安全与稳定。土壤微生物多样性是衡量生态系统功能恢复与维持的敏感而关键指标,直接影响土壤生产力,关乎生态系统结构和功能的稳定性。因此,从微生物学角度出发,研究不同年限退耕区次生草地土壤微生物多样性、功能菌群及其变化机理显得尤为重要。本项目拟采用时空替代法和现代分子生物学技术,结合土壤理化特性、土壤酶活性及50多年的气象、水文、植被、风蚀等资料,对民勤绿洲不同年代(1年至50多年)退耕区次生草地土壤微生物的结构多样性、功能多样性和遗传多样性进行测定和系统分析,阐明民勤绿洲退耕区次生草地土壤微生物变化规律及其与植被、土壤因子的相关性,探讨土壤微生物功能菌群在次生草地演变过程所起的作用,为开发微生物资源和保护荒漠绿洲退耕区次生草地及生态系统修复提供理论依据。

关键词

土壤, 生物多样性, 微生物结构, 功能与演替, 民勤绿洲, 宏基因组测序

Study on the Soil Microecological Mechanism during the Evolution of Secondary Grassland in the Returned Farmland Area of Minqin Oasis

Lide Wang^{1,2,3,4*}, Zixuan Wang^{1,2}, Peiyang Yan^{1,3#}, Chunrong Wu^{1,2,4}, Shenghui Han^{1,2}, Hao Wu¹, Sihang Chen¹, Chunxiu Guo^{1,4}

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 王理德, 王梓璇, 闫沛迎, 吴春荣, 韩生慧, 吴昊, 陈思航, 郭春秀. 民勤绿洲退耕区次生草地演变过程中土壤微生物生态机理研究[J]. 世界生态学, 2023, 12(4): 385-391. DOI: 10.12677/ije.2023.124047

¹Gansu Provincial Desertification Control Research Institute, Lanzhou Gansu

²National Positioning Observation and Research Station of Forest Ecosystem in the Hexi Corridor, Wuwei Gansu

³National Field Observation and Research Station of Desert Grassland Ecosystem, Minqin Gansu

⁴Gansu Province State Key Laboratory of Desertification and Sandstorm Prevention and Control Cultivation Base, Wuwei Gansu

Received: Oct. 1st, 2023; accepted: Nov. 1st, 2023; published: Nov. 9th, 2023

Abstract

After a large area of cultivated land in arid oasis areas is returned to farming, without taking any agricultural management measures, it is easy to form desert steppe or desert steppe, which may lead to the development of secondary grassland to nudity or desertification, which is not conducive to the safety and stability of the oasis ecosystem. Soil microbial diversity is a sensitive and key indicator for measuring the restoration and maintenance of ecosystem functions. It directly affects soil productivity and is related to the stability of ecosystem structure and function. Therefore, from the perspective of microecology, it is particularly important to study the soil microbial diversity, functional flora and their change mechanisms in secondary grassland areas of different years. This project plans to use the spatiotemporal substitution method and modern molecular biology technology, combined with soil physical and chemical characteristics, soil enzyme activity and more than 50 years of meteorological, hydrological, vegetation, wind erosion and other data, to return farmland to Minqin Oasis in different years (from 1 year to more than 50 years ago). To measure and systematically analyze the structural diversity, functional diversity and genetic diversity of soil microorganisms in the secondary grassland area of Minqin Oasis, clarify the change patterns of soil microorganisms in the secondary grassland area of Minqin Oasis and its correlation with vegetation and soil factors, and explore the soil microbial diversity. The role of microbial functional flora in the evolution of secondary grassland provides a theoretical basis for the development of microbial resources and the protection of secondary grassland and ecosystem restoration in desert oasis returned farmland areas.

Keywords

Soil, Biodiversity, Microbial Structure, Function and Succession, Minqin Oasis, Metagenomic Sequencing

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

甘肃民勤地处石羊河流域下游，西、北、东三面被腾格里沙漠和巴丹吉林沙漠包围，是中国西北风沙线上的“桥头堡”，前国务院总理温家宝曾 12 次批示“决不能让民勤成为第二个罗布泊”，习近平总书记指示“确保不让民勤成为第二个罗布泊”，可见该地区生态环境治理工作的重要性和迫切性。在历史上，民勤地区曾是植被茂密[1]，建国以来，石羊河上游农业生产规模不断扩大，流入下游绿洲区内的水量急剧减少[2]，下游地区为了维持原有的生产规模，不得不过量开采地下水来满足灌溉需水[3]，导致天然植被死亡、尾间湖沼干涸、盐碱化和沙漠入侵等，造成土地大面积弃耕而撂荒[4]。再加上近年来政

府“关井压田”和退耕政策，使退耕区的面积又有所增加[5]。这部分退耕区次生草地是草原向荒漠过渡的一类十分脆弱的旱生化草原生态系统[6]，如果不及时保护，易形成恶性循环，使次生草地土壤生态系统遭到破坏[7] [8]。因此，如何保护与合理利用石羊河流域下游绿洲退耕区次生草地，促进该地区生态环境的保护、修复和改善是亟待解决的新课题。

次生草地的演化不仅仅是地表植被的演替，更与土壤的变化尤其是土壤微生态的变化具有密切联系[9]。植被演替是次生草地土壤性质变化的直接原因，而土壤性质的变化也必然引起植被退化，二者互为因果[10]。侯扶江和南志标等认为草地演化退化不仅是地表植被和土壤的变化，也是这2个子系统耦合关系的丧失和系统相悖所引起的[11]。

在植被演替和土壤变化的过程中，土壤微生物是最敏感、最活跃的成分[9]，土壤微生物多样性是土壤系统功能的重要特征及度量生态系统功能恢复与维持的关键指标[12]，也是植物与土壤间联系的载体，能敏感的指示土壤理化性状的变化，其高低直接影响着土壤生产力，可用来准确及时的反映土壤质量，关乎生态系统结构和功能的稳定性[13] [14]。所以，保护与合理利用退耕区次生草地，不但要了解植被生长状况和土壤理化特性，还必须在系统研究不同年代退耕区次生草地土壤微生物多样性的基础上，特别研究其功能菌群的变化规律，才能制定出相应的管理方案与对策。

本项目在该地区选取地域相近、成土母质相同、气候水分等环境条件相同或相近，但退耕年限不同的次生草地为演变序列样地作为研究对象，利用多种现代生物技术，从结构多样性、遗传多样性以及功能多样性三个层面进行综合研究，在此基础上，研究其功能菌群的变化规律，为次生草地的保护、合理利用及生态环境的保护、修复、改善提供理论依据。

2. 项目研究方法

2.1. 项目研究内容

1) 民勤绿洲不同年代退耕区次生草地植被群落及物种多样性特征：选取地域相近、成土母质相同、气候水分等环境条件相同或相近，但退耕年限不同(1a、2a、4a、8a、13a、20a、30a 及 40a)的次生草地为演变序列样地作为研究对象，调查样方内植物的种类、高度、冠幅、个体数以及调查样地的地理位置、海拔高度等，采用重要值、Margalef 丰富度指数、Simpson 和 Shannon-Wiener 多样性指数、Pielou 均匀度指数对不同年代退耕区次生草地植被群落特征及物种多样性进行分析。

2) 民勤绿洲不同年代退耕区次生草地土壤理化、微生物数量、微生物生物量及土壤酶活性特征：调查民勤绿洲不同年代退耕区次生草地土壤理化性质和土壤水分及土壤微生物和酶活性，了解退耕区次生草地土壤特性变化规律，以及植被与土壤因子之间的相关性和内在联系。

3) 民勤绿洲不同年代退耕区次生草地土壤微生物多样性及变化规律以及土壤微生物与植被、环境因子间的互作机理：对民勤绿洲不同年代退耕区次生草地土壤微生物结构多样性、功能多样性和遗传多样性进行系统测定和分析，结合地域特征、气象资料、水文资料解读退耕区次生草地土壤微生物多样性及其变化规律，探讨土壤微生物功能菌群在次生草地演变过程中所起的作用及其驱动机制。

2.2. 项目实施方法

1) 样地布设与植被调查：2017年10月，走访调查当地农户和查阅西渠镇煌辉村与志云村退耕土地使用记录采用空间替代时间的方法，集中连片的退耕地上，选择植物生长均匀、微地形差异较小，并且土壤没有因自然因素而导致地形的变迁或因人为因素而引起的土壤物质再分配的地段，分别选择退耕年限为1a、2a、4a、8a、13a、20a、30a 及 40a 和未开垦的荒漠草地作为对照设置 100 m × 100 m 的 9 个典型样地，用 GPS 定位，样地面积为 1 hm² (100 m × 100 m)，每个样地内选 5 个 10 m × 10 m 的样方(调查

植被), 调查样方内植物的种类、高度、冠幅、个体数以及调查样地的地理位置、海拔高度等, 并在每个样地中以 S 形方法布设 5 个土样采集点, 做好标记。

2) 土壤样品的采集: 2018 年 9 月 19~20 日, 在每个样地内布设的 5 个土样采集点, 挖土壤剖面, 分 0~20 cm 和 20~40 cm 两层采集土壤样品, 将同样地同一土层的 3 个土样混合均匀后, 用四分法将土样分两份, 一份装入无菌袋中封存, 做好标记, 并放入装有冰块保温箱中带回实验室, 去除植物根系和杂物, 将土样随机分成 3 份, 分别置于室温、4℃、-20℃及-80℃ (冷冻干燥后), 用于土壤微生物和酶活性的测定和土壤总基因组 DNA 提取及高通量测序分析。另 1 份风干后用于土壤理化性质测定。

3) 植被重要值及物种多样性计算方法。

计算灌木层和草本层各物种重要值, 计算公式如下[15]:

$$IV = (RHI + RCO + RFE) \times 100\% \quad (1)$$

式中: IV 表示重要值; RHI 表示相对高度; RCO 表示相对盖度; RFE 表示相对频度。

相对高度 = (某种植物的高度/全部植物的总高度) × 100%

相对盖度 = (某种植物的盖度/全部植物的总盖度) × 100%

相对频度 = (某种植物的频度/所有种的总频度) × 100%

选择 Shannon 多样性指数、Simpson 优势度指数、Pielou 均匀度指数、Margalef 丰富度指数等对植物群落进行多样性测量计算。计算公式分别为[15]:

Shannon 多样性指数:

$$H = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i; \quad (2)$$

Simpson 优势度指数:

$$C = \sum_{i=1}^s \frac{N_i(N_i - 1)}{N(N - 1)}; \quad (3)$$

Pielou 均匀度指数:

$$E = \frac{H}{\ln S}; \quad (4)$$

Margalef 丰富度指数:

$$D_{MG} = \frac{S - 1}{\ln N}; \quad (5)$$

Pi 是频度, Ni 是第 i 个物种的个体数, S 是物种数量, N 是所有物种的总个体数。

4) 土壤测定方法。

A. 土壤物理性质的测定

土壤水分: 恒温箱烘干法; 土壤容重: 环刀法; 土壤机械组成: 马尔文 2000 激光粒度仪测定; 土壤 pH 值: 用 pH 仪(PHS-3S)测定。

B. 土壤化学性质的测定

土壤有机碳采用重铬酸钾氧化外加热法; 土壤全氮采用凯氏蒸馏法; 速效钾采用原子吸收分光光度法; 土壤速效磷采用氢氧化钠溶液 - 钼锑抗比色法; 土壤土壤有机质: 重铬酸钾 - 硫酸外加热法。

C. 土壤酶的测定

脲酶活性采用靛酚蓝比色法; 磷酸酶活性采用磷酸苯二钠比色法; 蔗糖酶性采用 3,5-二硝基水杨酸

比色法；过氧化氢酶活性采用高锰酸钾滴定法。

D. 土壤微生物量的测定：土壤微生物量采用氯仿熏蒸培养法测定[9]。

土壤微生物量碳(SMBC)：采用 $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 外加热法测定。

计算公式为：

$$SMBC(mg/kg) = (Ec - Ec_0) / kEc \quad (6)$$

土壤微生物量氮(SMBN)：采用凯氏定氮法测定。

计算公式为：

$$SMBN(mg/kg) = (En - En_0) / kEn \quad (7)$$

土壤微生物量磷(SMBP)：采用钼蓝比色法测定。

计算公式为：

$$SMBP(mg/kg) = (Ep - Ep_0) / kEp \quad (8)$$

式中： E_c 、 E_n 和 E_p 为熏蒸土壤提取液中有机碳、全氮和磷含量， E_{c0} 、 E_{n0} 和 E_{p0} 未熏蒸土壤提取液中有机碳、全氮和磷含量， kEc 、 kEn 和 kEp 为校正系数，分别是 0.38、0.54 和 0.40。

E. 土壤微生物多样性测定

土壤总 DNA 提取：使用 Fast DNA® Spin Kit for Soil 试剂盒，根据产品操作手册提取样品基因组 DNA。完成基因组 DNA 抽提后，利用 NanoDrop2000 检测 DNA 纯度，利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。基因组 DNA 样品用干冰保藏后立即送往上海美吉生物科技有限公司进行测序分析。

宏基因组测序：采用 Quanti Fluor TM-ST 蓝色荧光定量系统，对回收产物进行定量检测。然后构建插入片段为 300 bp 的 Paired-End(PE)文库，经过 Qubit 定量和文库检测合格后，进行高通量测序，测序平台为 Miseq。

测序序列统计与质控：应用统计学的方法，对所测序列进行统计和质控，可以从宏观上直观地反映出样本的文库构建质量和测序质量。

测序数据拼接组装：主要有多重混合拼接(Multiple_Megahit 或 Multiple_IDBA_UD)：利用 IDBA-UD 最大化利用测序数据，进行多重混合拼接组装。单拼 Megahit：利用 Megahit 软件针对不同测序深度序列进行组装。单拼 SOAPdenovo2：利用软件 SOAPdenovo2，使用 Meta Gene 对拼接结果中的 contigs 进行 ORF 预测。选择核酸长度大于等于 100 bp 的基因，并将其翻译为氨基酸序列，获得各样本的基因预测结果统计表。环境中所有基因的整体信息可以通过构建一个非冗余基因集用 CD-HIT 软件进行聚类(默认参数为：95% identity、90% coverage)，每个类取最长的基因作为代表序列，构建非冗余基因集，从而可以探究不同样本之间的共性和差异。

物种注释：使用 BLASTP 将非冗余基因集与 NR 数据库进行比对(BLAST 比对参数设置期望值 e-value 为 $1e-5$)。

5) 数据处理：试验数据经 Excel 2013 整理，再利用目前国际上通用软件 AMOS、DPS、ENVI-IDL、SAS、NeuroSolutions 进行数据分析。

3. 项目成果

依托本项目总计发表科研论文 14 篇，其中 SCI 论文 2 篇，中文核心期刊 10 篇；申报国家专利 10 项，其中发明专利 2 项，均已授权。此外，项目组主要成员获甘肃省林草局科技奖励 1 项，协助培养博士研

究生与硕士研究生各 1 名，项目的执行达到了申请时的预期目标。

本项目以民勤绿洲不同年代退耕区次生草地土壤微生物为研究对象，采用时空替代法和现代分子生物学测序技术，开展退耕区次生草地土壤微生物的结构多样性、功能多样性和遗传多样性系统分析。主要结论如下：

1) 研究区出现植物种 39 种，隶属 15 科 32 属，其中灌木植物 8 种，多年生草本 15 种，一年生草本 16 种，因受自然环境条件的影响，物种组成较为简单，很多种为单科单属。

2) 细菌是研究区土壤中的主要微生物类群，其次是放线菌，真菌最少；土壤微生物数量随退耕年限的延长，细菌及放线菌所占比例不同程度的减少，真菌变化规律不明显；土壤微生物量随土层深度的加深而逐渐降低，表聚现象明显；磷酸酶、蔗糖酶和脲酶活性表聚现象明显，且表现为退耕初期(0a-8a)显著高于退耕末期(13a-40a)。

3) 研究区次生草地土壤微生物数量、微生物量和土壤酶活性之间均存在不同程度的相关性，三者之间联系较密切，互相作用影响。

4) 研究区微生物群落门水平的优势微生物群落以 Actinobacteria、Proteobacteria、Chloroflexi 等为主，属水平以 Gemmatimonas、Chloroflexi、Acidobacteria 为主。

5) 研究区微生物群落宏基因组在不同功能类别水平上的功能组成(KEGG level-3)以 Carbon metabolism、Biosynthesis of amino acids、ABC transporters 为主。

6) 通过退耕地聚类谱系图可以推断出民勤绿洲退耕地土壤系统演变过程中，退耕 4a、8a 及 20a 分别是土壤质量发生重大变化的节点，退耕 4a 左右是民勤绿洲退耕地恢复治理的关键时期。本项目的实施能够为开发微生物资源和保护荒漠绿洲退耕区次生草地及生态系统修复提供理论依据。

4. 主要科技创新

1) 本研究区域特色明显，研究样地序列丰富(在相同或者相似条件下，有退耕 1 年到 50 多年的研究序列样地)，为本项目提供了理想的对比研究场所。

2) 所解决的问题是国家生态建设项目石羊河流域综合治理工程和干旱地区植被建设急需解决的科学理论问题，研究成果具有重要的理论和实践指导意义。

3) 本项目首次从“土壤-植被-微生物”的角度，应用现代分子生物学技术，对民勤绿洲退耕区次生草地土壤微生物多样性(结构多样性、遗传多样性和功能多样性)进行对比研究，并结合植被、土壤理化特性、土壤酶等相关指标及甘肃民勤荒漠草地生态系统国家野外科学观测研究站积累 50 多年的气象和水文等资料，系统研究土壤微生物与植被、土壤以及其它因子间的相关性，揭示了退耕区次生草地演变过程中土壤微生物变化规律及其主要驱动因素。

5. 成果推广应用

本项目根据民勤绿洲退耕区次生草地自然环境和地理条件，结合民勤绿洲退耕区次生草地演变过程中土壤微生物多样性特点及其变化规律，优化现有的生态修复技术和措施，在促进本地区生态环境修复的过程中，结合农户劳动资源，形成“土地-农户-产出”三方结合的生产体系。应用不同的人工配置模式促进退耕区次生草地植被恢复，改善地力条件，调控绿洲生态系统协调发展，有效防治退耕区次生草地的沙漠化和盐碱化，改善当地生态环境。为民勤绿洲边缘及同类地区退耕区次生草地的生态系统恢复和合理利用提供示范，形成干旱内陆河流域退耕区次生草地生态经济修复技术体系[16]。改变当地农业产业结构，形成新的经济增长点，增加农民收入；通过示范区的建设，起到带动和推广作用，促进区域经济和民生事业的发展。不光对民勤绿洲边缘退耕区次生草地具有重要的意义，也对干旱区退耕地的治

理具有重要的作用和广阔的应用前景，可以有效缓解环境压力，实现大地增绿、产业增效、农民增收、经济增涨的共赢目标。

6. 结语

本项目采用时空替代的方法，应用现代分子生物学技术，从微生态学入手，开展了民勤绿洲退耕区次生草地土壤微生物多样性及其功能菌群的研究，通过对民勤绿洲不同年限退耕区次生草地土壤微生物多样性指标在垂直及不同退耕年限尺度进行测定，系统解析退耕区次生地植被演替过程中土壤微生物多样性的变化，进一步耦合分析土壤理化性质、传统微生物指标、分子微生物指标之间的联系，阐明了民勤绿洲退耕区次生草地土壤微生物多样性的动态变化规律、过程，揭示了次生草地土壤微生物功能菌群的作用，对开发其中的微生物资源和保护退耕区次生草地具有重要的意义，为研究民勤绿洲及其相似地区次生草地修复与生态环境的治理提供科学理论依据。

基金项目

国家自然科学基金项目(31760709, 32360329); 甘肃省重点研发计划(21YF5FA038); 甘肃省自然科学基金(21JR7RA732)。

参考文献

- [1] 冯绳武. 民勤绿洲的水系演变[J]. 地理学报, 1963, 29(3): 241-249.
- [2] 王世金, 何元庆, 赵成章. 西北内陆河流域水资源优化配置与可持续利用[J]. 水土保持研究, 2008, 15(5): 22-29.
- [3] 李丁, 马金珠, 南忠仁. 民勤盆地地下水位下降特征与可持续利用评价[J]. 中国沙漠, 2004, 21(6): 734-739.
- [4] 刘恒, 钟华平, 顾颖. 西北干旱内陆河区水资源利用与绿洲演变规律研究[J]. 水科学进展, 2001, 12(3): 378-384.
- [5] 王理德, 姚拓, 何芳兰, 等. 石羊河下游退耕区次生草地自然恢复过程及土壤酶活性的变化[J]. 草业学报, 2014, 23(4): 253-261.
- [6] 赛胜宝. 内蒙古北部荒漠草原带的严重荒漠化及其治理[J]. 干旱区资源与环境, 2001, 15(4): 35-39.
- [7] 吕桂芬, 吴永胜, 李浩, 等. 荒漠草原不同退化阶段土壤微生物、土壤养分及酶活性的研究[J]. 中国沙漠, 2010, 30(1): 104-109.
- [8] Wang, L., Yao, T., Cheng, L., et al. (2016) Soil Chemical Properties and Biological Characteristics of Discontinued Farmland in the Downstream of Shiyang River. *Nature Environment & Pollution Technology*, **15**, 117-122.
- [9] 王理德, 何洪盛, 韩福贵, 等. 民勤绿洲不同退耕年限土壤微生物量的变化特性[J]. 生态与农村环境学报, 2022, 38(10): 1338-1346.
- [10] 王理德, 田青, 郭春秀, 等. 不同退耕年限干旱绿洲植被群落及灰棕漠土特性变化[J]. 土壤学报, 2021, 58(6): 1436-1447.
- [11] 侯扶江, 南志标, 肖金玉, 等. 重牧退化草地的植被、土壤及其耦合特征[J]. 应用生态学报, 2002, 13(8): 915-922.
- [12] Wang, L., Tian, Q., Wu, C., et al. (2021) Study on Soil Microorganism of Abandoned Land in Qingtu Lake in Different Years. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, **22**, 1408-1415.
- [13] Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., Van Der Putten, W.H. and Wall, D.H. (2014) Ecological Linkages between Aboveground and Belowground Biota. *Science*, **304**, 1629-1633. <https://doi.org/10.1126/science.1094875>
- [14] Zak, D.R., Holmes, W.E., et al. (2013) Plant Diversity, Soil Microbial Communities and Ecosystem Function: Are There Any Links. *Ecology*, **84**, 2042-2050. <https://doi.org/10.1890/02-0433>
- [15] 王理德, 宋达成, 李广宇, 等. 双龙沟矸石治理过程中植物群落演替及物种多样性研究[J]. 干旱区研究, 2023, 40(8): 1294-1303.
- [16] 王理德, 宋达成, 王梓璇, 等. 民勤退耕地修复模式选择及生态系统监测研究[J]. 土壤科学, 2022, 10(4): 165-171.