

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (5) :598 – 606; 4 May 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140354

乌梁素海富营养化湖泊湖滨湿地过渡带细菌群落结构的高通量分析

李靖宇^{1,3,4,5}, 杜瑞芳^{1,3}, 赵吉^{1,2*}

内蒙古大学,¹ 环境与资源学院,² 内蒙古自治区环境污染控制与废物资源化重点实验室,³ 生命科学学院, 内蒙古呼和浩特 010021

北方民族大学,⁴ 生物科学与工程学院,⁵ 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: 【目的】揭示乌梁素海富营养化湖泊湖滨湿地沉积物与土壤过渡带细菌群落的组成、丰度以及多样性变化, 结合土壤理化因子探讨其对细菌群落结构的影响。【方法】采用湿地土壤总 DNA 提取方法提取沉积物和土壤总 DNA, 对细菌群落的 16S rRNA 基因的 V1-V3 区进行高通量测序, 分析各样品中细菌群落结构的组成、丰度以及多样性指标; 土壤理化性质采用标准方法测定, 分析其对细菌群落结构的驱动作用。【结果】富营养化湖泊湖滨湿地水陆过渡带的芦苇沼泽沉积物、碱蓬群落盐碱化土壤和白刺群落荒漠化土壤中, 细菌群落组成和各类群细菌的相对丰度差异较大, 门水平上的细菌类群主要有 Proteobacteria、Bacteroidetes、Chloroflexi、Actinobacteria、Planctomycetes 和 Gemmatimonadetes, 细菌群落多样性指数随陆向分布依次在增高, 门水平上 Proteobacteria 和属水平上 *Sulfurimonas* 对湖泊退化演化敏感; 环境因子最佳子集为总磷、水溶盐总量和铵态氮的组合对整个细菌群落结构的影响最为明显, 相关系数最高 ($R = 0.8857$), Mantel 检验结果表明这种相关关系为显著相关 ($P = 0.037$)。【结论】乌梁素海富营养化湖泊湖滨湿地过渡带细菌群落结构差异较大, *Sulfurimonas* 属在乌梁素海富营养化湖泊沉积物的生物地球化学循环中扮演着重要的角色, 应在以后的研究中得到更多的关注。

关键词: 富营养化湖泊, 湖滨湿地, 沉积物, 细菌群落结构, 空间异质性

中图分类号: X172 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 05-0598-09

土壤微生物多样性在维持湿地生态系统健康方面发挥着重要的作用^[1], 参与许多生物学过程, 如养分循环、植物营养、疾病抑制、水体净化以及土壤结构维护^[2]。这些细菌类群受到生物与非生物因子的影响, 比如植被^[3]、土壤性质^[4-5]、土壤结构^[6]、土地利用方式^[7-9]、pH^[10]、光梯度^[11]、环境扰

动^[12]、氮素以及淹水条件^[13]。土壤的这种物理、化学以及生物的异质性为微生物多样性的维持提供了广泛的生境^[5]。来自于市政与工业过多的营养物质排放造成水体中无机物和有机物的富集, 特别是大量元素氮磷可利用性的增加导致水体富营养化。这个过程不仅促进了藻类与大型植物生物量的不断

基金项目: 国家自然科学基金 (31160129, 31460212); 北方民族大学引进人才科研启动项目 (44/4400302502)

* 通信作者。Tel: +86-471-4991676; E-mail: ndzj@imu.edu.cn

作者简介: 李靖宇 (1986 -), 男, 内蒙古包头人, 博士研究生, 从事环境微生物学研究。E-mail: lijingyu1986@126.com

收稿日期: 2014-07-08; **修回日期:** 2014-09-08

积累并在腐烂过程中大量消耗水体中的氧气, 导致水体底部以及沉积物产生厌氧条件, 而且严重影响了底栖生物群落的分布、丰度、多样性以及生理状态^[14]。为了了解这些环境中微生物的多样性, 基于克隆文库测序的评估在快速增加^[15]。尤其是第二代测序技术的快速发展, 其本身的技术优势在揭示微生物基因信息方面远远超出了克隆文库所涵盖的信息量, 正是这种前所未有的能够更加真实反映环境中微生物组成的技术的应用极大的推动了人们对微生物生态学的认识^[16]。

目前, 针对蒙古高原乌梁素海富营养化湖泊及其演化过程中形成的芦苇沼泽、碱蓬盐化草甸和白刺荒漠区沉积物土壤生境中细菌群落的组成、丰度、多样性以及空间异质性成因的报道极少, 本文采用高通量测序技术并结合土壤理化性质对以上提出的科学问题进行了深入探讨。

1 材料和方法

1.1 样点位置和样品采集

乌梁素海(40°47′-41°03′N, 108°43′-108°57′E)系黄河改道后形成的牛軋湖, 是内蒙古高原西部

干旱区最典型的浅水草型湖泊, 也是全球范围内荒漠半荒漠地区极为少见的具有生物多样性和环境保护等多功能的大型草型湖泊, 为地球上同一纬度最大的自然湿地。湖区位于内蒙古自治区巴彦淖尔市乌拉特前旗境内, 现有水域面积 333.48 km²。农田退水是该湖最主要的补给水源, 受河套灌区农田退水的影响, 近 10 年来乌梁素海富营养化进程加剧^[17]。乌梁素海已成为以大型水生植物过量生长为表征的重度富营养化草型湖泊, 目前腐烂水草正以每年 9-13 mm 的速度在湖底堆积, 成为世界上沼泽化速度最快的湖泊之一, 正向芦苇沼泽→碱蓬盐化草甸→白刺荒漠方向演化^[18]。

土壤样品按以上演化梯度取样: A 样点(沉积物)取自于乌梁素海主湖区芦苇(*Phragmites australis*)生长区; B 样点(沉积物)取自于芦苇(*Phragmites australis*)生长的沼泽区; C 样点(土壤)取自岸边湿地碱蓬(*Suaeda glauca*)生长的盐化草甸区; D 样点(土壤)取自于白刺(*Nitraria tangutorum* Bobr)生长的荒漠区。采用 S 型 5 点取样法, 取样深度为 0-10 cm。将土样保鲜带回实验室冷冻保存, 用于后续分子生物学分析, 理化性质数据见表 1。

表 1. 沉积物和土壤样品的基本理化性质

Table 1. Physical and Chemical Properties of soil samples

| Sample | A | B | C | D |
|---|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Organic carbon (g/kg) | 11.82 ± 4.40 ^{ab} | 7.99 ± 0.94 ^{ab} | 3.73 ± 0.67 ^a | 12.93 ± 7.81 ^b |
| Total nitrogen (g/kg) | 1.07 ± 0.35 ^{ac} | 0.69 ± 0.20 ^{bc} | 0.32 ± 0.05 ^b | 1.33 ± 0.30 ^a |
| Total phosphorus (g/kg) | 0.78 ± 0.17 ^b | 0.57 ± 0.02 ^{ac} | 0.47 ± 0.02 ^a | 0.66 ± 0.06 ^{bc} |
| Total water soluble salt (g/kg) | 9.11 ± 3.72 ^{ab} | 7.11 ± 0.29 ^a | 13.65 ± 2.24 ^b | 20.46 ± 4.30 ^c |
| pH | 8.04 ± 0.13 ^a | 8.61 ± 0.13 ^{bd} | 9.25 ± 0.10 ^c | 8.69 ± 0.04 ^d |
| NH ₄ ⁺ -N (mg/kg) | 3.39 ± 0.57 ^a | 1.95 ± 0.19 ^b | 0.91 ± 0.01 ^c | 1.34 ± 0.37 ^{bcd} |
| K ⁺ (g/kg) | 0.15 ± 0.04 ^{ac} | 0.15 ± 0.01 ^{ac} | 0.21 ± 0.02 ^b | 0.15 ± 0.01 ^c |
| Na ⁺ (g/kg) | 8.33 ± 3.19 ^a | 7.25 ± 2.57 ^a | 18.57 ± 2.93 ^b | 26.72 ± 8.38 ^b |
| Ca ²⁺ (g/kg) | 1.36 ± 0.31 ^a | 0.32 ± 0.00 ^{bc} | 0.21 ± 0.04 ^c | 1.11 ± 0.06 ^a |
| Mg ²⁺ (g/kg) | 3.03 ± 0.75 ^a | 1.30 ± 0.24 ^b | 1.55 ± 0.05 ^b | 0.82 ± 0.37 ^b |
| Cl ⁻ (g/kg) | 5.50 ± 1.35 ^a | 5.97 ± 0.22 ^a | 15.10 ± 1.81 ^b | 14.50 ± 4.28 ^b |
| SO ₄ ²⁻ (g/kg) | 7.49 ± 2.15 ^a | 3.80 ± 2.35 ^a | 4.75 ± 1.04 ^a | 7.32 ± 4.34 ^b |
| CO ₃ ²⁻ (g/kg) | 0.00 ± 0.00 ^a | 0.08 ± 0.12 ^a | 0.50 ± 0.10 ^b | 0.08 ± 0.13 ^a |
| HCO ₃ ⁻ (g/kg) | 0.56 ± 0.12 ^a | 0.67 ± 0.04 ^a | 1.09 ± 0.87 ^a | 0.96 ± 0.08 ^a |

Lowercase letters represent significantly different at $P < 0.05$.

1.2 理化性质的测定

有机碳测定依据标准 NY/T 1121.6-2006, 总氮测定依据标准 NY/T 53-1987, 总磷测定依据标准 NY/T 88-1988, 水溶盐总量依据标准 NY/T

1121.16-2006, pH 测定依据标准 NY/T 1121.2-2006, 硝态氮测定采用紫外分光光度法, 铵态氮测定采用靛酚蓝比色法, K⁺测定依据标准 LY/T 1251-1999, Na⁺测定依据标准 LY/T 1251-1999, Ca²⁺测定

依据标准 LY/T 1251-1999, Mg^{2+} 测定依据标准 LY/T 1251-1999, Cl^{-} 测定依据标准 LY/T 1251-1999, SO_4^{2-} 测定依据标准 LY/T 1251-1999, CO_3^{2-} 测定依据标准 LY/T 1251-1999, HCO_3^{-} 测定依据标准 LY/T 1251-1999。

1.3 样品基因组总 DNA 提取

采用 Li 等 (2013) 报道的方法提取沉积物土壤总 DNA^[19], 具体步骤如下: (1) 取 0.5 g 左右沉积物或土壤样品于装有玻璃珠的 2 mL 离心管中, 加入 600 μ L DNA 提取缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, 1.5 mol/L NaCl, 和 1% CTAB, pH 8.0), 300 μ L 重铬酸钾溶液 (0.05 mol/L), 涡旋 30 s; (2) 加入 100 μ L 20% SDS, 涡旋 3 min, 65 $^{\circ}$ C 温育 10 min; (3) 加入 100 μ L 氯化钾溶液 (3 mol/L), 用手剧烈震荡; (4) 取上清 1000 μ L, 加等体积酚:氯仿:异戊醇, 轻轻颠倒混匀数次, 12000 \times g 离心 5 min; (5) 取上清 900 μ L 于 1.5 mL 离心管中, 加入 0.6 倍体积异丙醇, 冰浴 10 min, 离心 5 min; (6) 弃上清, 用 50 μ L 超纯水或 ddH₂O 溶解即可用于后续分析。多数情况下, 到此提取完成; 但步骤 (5) 如果出现沉淀 (不论什么颜色), 需跳过步骤 (6), 从步骤 (7) 开始。 (7) 弃上清, 加 700 μ L 沉淀溶解液 (0.43 mol/L 冰醋酸, 0.43 mol/L 醋酸钠, 和 0.17 mol/L NaCl, pH 4.6), 用 100 μ L 移液器吹吸数次, 直到沉淀溶解, 加入 0.6 倍体积异丙醇, 冰浴 10 min, 离心 5 min; (8) 弃上清, 用 50 μ L 超纯水或 ddH₂O 溶解沉淀即可用于后续分析。

1.4 16S rRNA V1-V3 区高通量测序

1.4.1 V1-V3 区 PCR 扩增与测序: 反应体系: 2.0 μ L 2.5×10^{-3} mol/L dNTPs, 1.0 μ L 0.5×10^{-5} mol/L 27F 引物 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1.0 μ L 0.5×10^{-5} mol/L 533R 引物 (5'-TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'), 4.0 μ L $5 \times$ FastPfu 缓冲液, 10 ng 模板以及 0.4 μ L Fast Pfu Polymerase, 最后加 ddH₂O 到 20 μ L。引物对 27F 和 533R 合成 5' 带有 FLX Titanium 接头的融合引物, A 样品的接头引物为 5'-ATCTCTCGTA-3', B 样品的接头引物为 5'-ATGCTACGTC-3', C 样品的接头引物为 5'-ATGTGACTAC-3', D 样品的接头引物为 5'-CACGAGACAG-3'。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。获得的 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 使用

AXYGEN 公司的 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物, Tris-HCl 洗脱; 使用 Promega 公司的 QuantiFluorTM-ST 蓝色荧光定量系统进行检测。按每个样品的测序量比例混合, 利用罗氏公司的 454 FLX Titanium 测序仪完成序列分析。

1.4.2 测序数据分析: 在测序试验中, 采用多个样品平行测序的方法, 即多个样品混合测序。各样品中的序列均引入了一段标示其样本来源信息的 barcode 标签序列。因此, 仅当原始序列中含有完整的 barcode 标签序列时, 该序列才被认为有效序列。有效序列可以直接用于后续的生物信息学分析。如需更高质量和更精准的生物信息分析结果, 应对有效序列进行去杂。在试验过程中, 测序产物含有非特异性扩增片段, 利用特异性引物信息将其去除; 过长序列末端的质量会降低, 通过检测 3' 端接头和引物, 去除序列尾部的低质量序列; 序列中含有模糊碱基 (ambiguous)、单碱基高重复区 (homologous) 以及长度过短的序列, 将这些序列纳入分析会降低分析质量, 因此修剪、去除 (trim) 此部分序列, 得到供精准分析的优化序列。在此基础上, 进行 OTU (Operational Taxonomic Units) 的分析。生物信息分析中, 测序得到的每一条序列来自一个菌。要了解一个样品测序结果中的菌种、种属等信息, 需要对序列进行归类操作 (cluster)。通过归类操作, 将序列相似性达到 97% 归为一个 OTU。使用 mothur 软件 (http://www.mothur.org/wiki/Main_Page) 提取非重复序列, 降低分析中间过程冗余计算量; 与 silva 库 (<http://www.arb-silva.de/>) 中的 aligned (16S/18S, SSU) 核糖体序列数据库比对; 使用 UCHIME 方法检测并去除 Chimeric 序列; 计算比对对齐后的序列间 uncorrected pairwise 距离; 使用最远邻近法聚类生成 OTU。然后计算多样性指数 Chao1、Ace、Shannon 以及 Simpson 指数。

1.5 统计分析

理化数据使用 SPSS 16.0 进行处理与分析, 各样品间的平均值差异采用 one-way ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。CCA (Canoco for Windows 4.5) 用来分析环境因子对微生物群落结构的影响, 其中土壤理化数据作为环境变量, 微生物群落在门水平上的相对丰度数据作为物种数据。使用 R 语言中的 BioEnv 程序筛选影响微生物群落结构的最佳环境因子子集。然后, 使用 Mantel-Carlo

检验了所有环境因子组成的矩阵以及最佳环境因子组成的矩阵对整个微生物群落结构以及微生物在每个门水平上的影响是否显著。

2 结果和分析

2.1 土壤理化性质

富营养化湖泊(A样品)及其演化过程中形成的芦苇沼泽(B样品)、碱蓬盐化草甸(C样品)和白刺荒漠区(D样品)沉积物土壤理化性质见表1。有机碳在4个样品中没有显著差异,除了C样品与D样品之间;总磷与总氮含量较低,且各样品之间基本不存在显著差异;水溶盐总量各样品之间存在显著差异,按照演化方向,4个样品基本呈现出逐步升高的趋势;pH值都偏碱性;硝态氮没有检测出来;铵态氮在富营养化湖泊中显著高于芦苇沼泽、碱蓬盐化草甸以及白刺荒漠区的沉积物土壤,但后3种土壤的铵态氮没有显著差异;八种离子(K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、

Mg^{2+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^-)中, Na^+ 和 Cl^- 含量都是在富营养化湖泊沉积物土壤和芦苇沼泽沉积物之间没有显著差异,在碱蓬盐化草甸和白刺荒漠区土壤之间没有显著差异,但前者(都是淹水条件下的沉积物)与后者(都没有被淹水)之间存在显著差异,且这两种离子的含量比其他6种离子的含量高。

2.2 细菌群落结构的组成、丰度与多样性

高通量测序在4种沉积物土壤样品中共获得有效序列26875条,平均长度为446 bp,A样品包含3032条(908个OTUs),B样品包含3483条(1818个OTUs),C样品包含5799条(2659个OTUs),D样品包含8027条(3937个OTUs)。

多样性指数Chao1、Ace、Shannon以及1/Simpson的结果表明从富营养化湖泊(A样品)到芦苇沼泽(B样品)、碱蓬盐化草甸(C样品)和白刺荒漠区(D样品)的4个样品中,多样性指数在逐渐增高(表2)。

表2. 4个不同样品细菌群落的丰度和多样性指数

Table 2. Richness and diversity index of bacterial community for four different samples

| Sources | A | | B | | C | | D | |
|------------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| Reads | 3032 | | 3483 | | 5799 | | 8027 | |
| OTUs | 908 | | 1818 | | 2659 | | 3937 | |
| Distance | 0.03 | 0.1 | 0.03 | 0.1 | 0.03 | 0.1 | 0.03 | 0.1 |
| Coverage% | 78 | 85 | 63 | 76 | 70 | 83 | 67 | 82 |
| Chao1 | 2692 | 1537 | 4810 | 2899 | 6296 | 3451 | 9717 | 4838 |
| ACE | 4553 | 2732 | 7943 | 4652 | 9942 | 4729 | 15384 | 6709 |
| 1/Simpsons | 8.37 | 4.44 | 385 | 199 | 527 | 253 | 1172 | 340 |
| Shannon | 4.59 | 3.66 | 6.98 | 6.45 | 7.32 | 6.67 | 7.79 | 7.04 |

在门水平上,4个样品的优势类群均为Proteobacteria,从A到D的相对含量依次为78.89%、49.93%、48.03%和44.4%。其中, ϵ -proteobacteria是A的优势分类单元,相对含量为62.83%; δ -proteobacteria是B的优势分类单元,相对含量为18.72%; γ -proteobacteria是C的优势分类单元,相对含量为15.64%; α -proteobacteria是D的优势分类单元,相对含量为22.62%。在属的水平上,*Sulfurimonas*是A、B和C的优势分类单元,相对含量分别为56.5%、7.21%和5.19%;在D中优势地位不明显。特别是*Sulfurimonas*这个分类单元值得关注,从湖泊沉积物(A)很高的相对含量(56.5%)到荒漠化土壤(D)较低的相对含量(1.59%),下降明显。说明在属的水平上,这类群

的微生物在湖泊演化过程中有着很好的响应,见图1。

2.3 环境因子对细菌群落结构的影响

CCA分析结果见图3。第1排序轴与第2排序轴解释度分别为58%和23.4%。与第1排序轴相关性高的理化性质有水溶盐总量($R = -0.891$)、pH值($R = -0.6391$)、铵态氮($R = 0.8421$)、 Na^+ ($R = -0.9356$)、 Mg^{2+} ($R = 0.8179$)、 Cl^- ($R = -0.8932$)和 HCO_3^- ($R = -0.8443$);与第2排序轴相关性高的理化性质有有机碳($R = 0.9196$)、总氮($R = 0.9174$)、总磷($R = 0.9204$)、 Ca^{2+} ($R = 0.996$)、 SO_4^{2-} ($R = 0.9488$)和 CO_3^{2-} ($R = -0.6763$)。样品B和样品C距离较近,较为相似,与样品A和样品D距离较远(图2)。

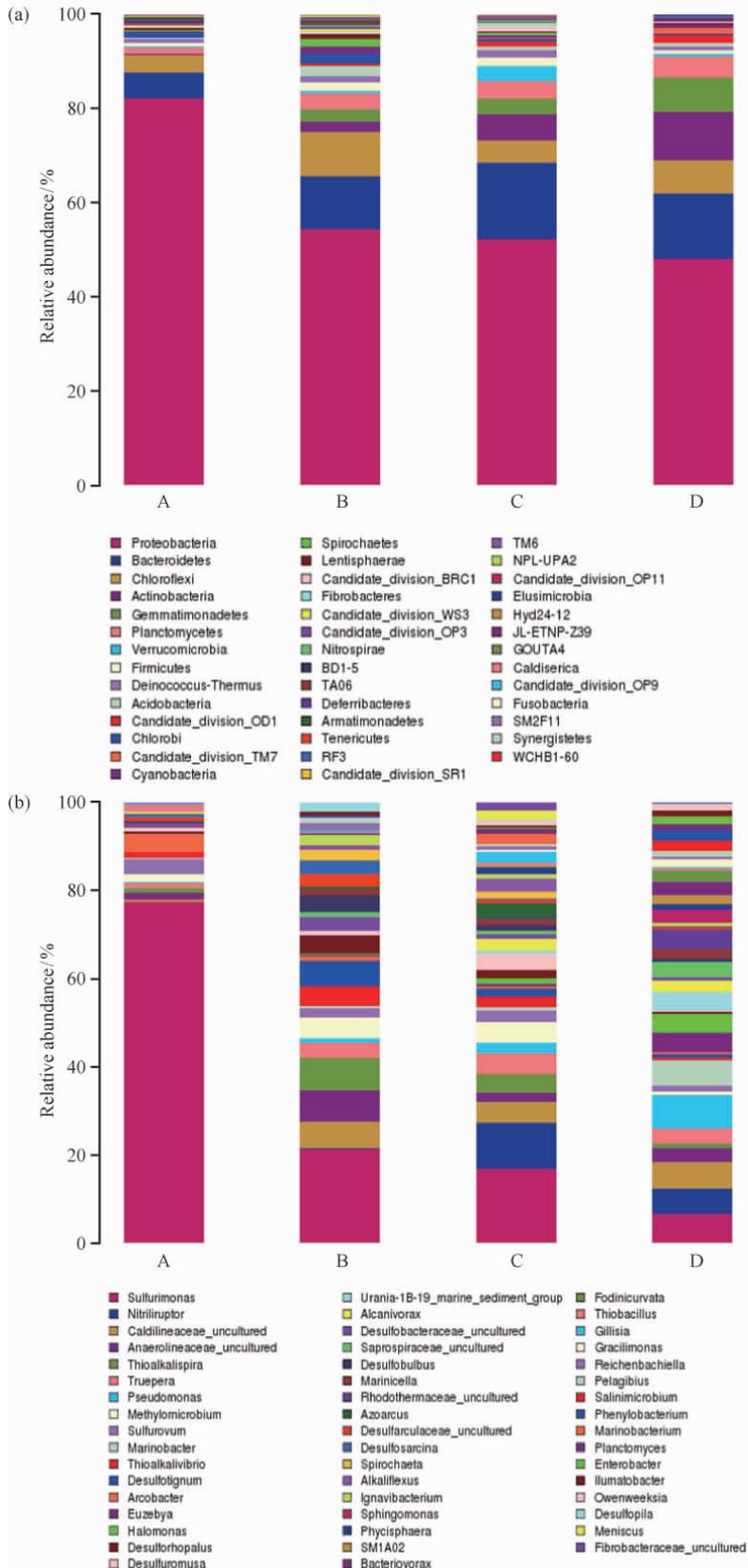


图 1. 4 个样地细菌群落在门水平 (a) 和属水平 (b) 上的组成和相对丰度

Figure 1. Bacteria composition and relative abundance of four samples at phylum level (a) and genus level (b).

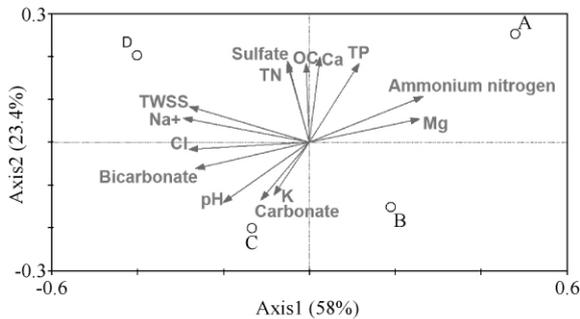


图 2. 细菌群落与环境因子的典型对应分析

Figure 2. CCA analysis of sampling sites, soil factors and bacterial community.

为了找到环境因子对整个细菌微生物群落结构

表 3. 不同环境因子组合与细菌群落结构的相关关系

Table 3. The relationship between different combination of environmental variables and bacterial community

| Different combination of environmental factors | Bacterial community based-on pyrosequencing data of 16S rRNA at phylum level |
|--|--|
| $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ | $R = 0.7714$ |
| Total phosphorus + $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ | $R = 0.7714$ |
| Total phosphorus + Total water soluble salt + $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ | $R = 0.8857$ |
| Total phosphorus + Total water soluble salt + pH + $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ | $R = 0.8857$ |
| Organic carbon + Total phosphorus + Total water soluble salt + pH + $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ | $R = 0.7143$ |
| Organic carbon + Total nitrogen + Total phosphorus + Total water soluble salt + pH + $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ | $R = 0.4857$ |

3 讨论

农田退水导致乌梁素海富营养化进程加剧^[17], 腐烂水草在湖底不断堆积。富营养化正在导致水中缺氧区域的扩大, 硫酸盐还原菌在厌氧矿化有机物过程中伴随着硫化氢的产生, 从而对高等生物产生毒害作用^[20]。在缓解硫化氢毒害作用方面, 最初分离于深海热液口生态系统的化能自养 ϵ -proteobacteria 类群被认为在硫循环中起着重要的作用, 此类群微生物在这种生态系统中占有优势地位且多样性高^[21]。在乌梁素海湖泊沉积物中, 发现了 ϵ -proteobacteria 类群的存在, 且相对丰度很高, 在属的水平 *Sulfurimonas* 占了总微生物群落的 72.07%, 这个属主要以 S 单质、硫化物、 H_2 作为电子供体, 以硝酸盐、亚硝酸盐或 O_2 作为电子受体^[22], 耦合了反硝化过程和还原态硫化物的氧化过程^[20], 最终以 N_2O 和 N_2 的形式生成产物。*Sulfurimonas* 的相对丰

的影响, 使用 BioEnv 程序进行了不同环境因子组合对整个微生物群落结构的分析, 结果见表 3。环境因子最佳子集为总磷、水溶盐总量和铵态氮的组合, 其对整个细菌群落结构的影响最为明显, 相关系数最高 ($R = 0.8857$); 环境因子子集总磷、水溶盐总量、pH 值和铵态氮的组合与整个细菌群落结构组成的相关系数为 0.8857; 环境因子子集总磷和铵态氮的组合与整个细菌群落结构组成的相关系数为 0.7714; 单个环境因子铵态氮与整个细菌群落结构组成的相关系数为 0.7714; 环境因子子集有机碳、总磷、水溶盐总量、pH 值和铵态氮的组合与整个细菌群落结构组成的相关系数为 0.7143。

度很高说明此沉积物中存在着反硝化以及还原态硫化物氧化的生物化学反应过程, 也间接说明该样品黑臭的成因可能是硫化氢浓度过高造成的。*Desulfuromusa*、*Desulfarculaceae* _ uncultured、*Desulfobacteraceae* _ uncultured 和 *Desulfosarcina* 的存在可能与硫化氢的产生有关。在湖泊演化方向上, 芦苇沼泽、碱蓬盐化草甸和白刺荒漠区沉积物土壤中 *Sulfurimonas* 的相对丰度在逐渐降低, 同时伴随着其他微生物类群的出现, 多样性指数呈现出逐渐增高的趋势。特别是在白刺荒漠区土壤中微生物类群最多, 优势种不明显, 各类群相对含量没有明显差异。在乌梁素海湖泊遭受富营养化作用的影响下, 湖泊沉积物微生物群落形成了优势类群, 与该沉积物特殊的微生态环境密切相关, 可以作为该生态系统的指示类群, 并为分离纯化高效的还原态硫化物的氧化菌种提供了良好的生境。

从湖泊沉积物过渡到荒漠区土壤的过程中, 细菌群落发生了较大的变化, 无论是物种组成还是相对丰度。在门水平上的分析表明, 这种变化与 3 种

理化因子显著相关,即水溶盐总量、总磷和铵态氮。湖泊沉积物与芦苇沼泽两个样品都处于淹水状态之下,水溶盐总量基本一致,而碱蓬盐化草甸处于湿润状态但没有淹水,即芦苇沼泽向白刺荒漠区过渡的区域,水溶盐总量高于前两个样品,到白刺荒漠区的土壤中水溶盐总量显著高于前面3种样品,可能是由于水分增发导致盐分聚集于表层土壤的原因。而碱蓬盐化草甸区样品中水溶盐总量低于荒漠区土壤,可能是与碱蓬对盐分的吸收有关。伴随着盐度的逐渐增加,嗜盐微生物从无到有,前两个样品没有检测到该类群微生物,而在后两个样品中呈现增高的趋势(*Halomonas*, 0.92%到2.85%)。4种土壤中 Na^+ 含量、 Cl^- 含量和 SO_4^{2-} 离子含量较高, Na^+ 的增加是造成该类土壤碱化加重的主要因素,影响土壤的渗透性^[23]。高盐生态系统中生活着有活性的多种多样的微生物群落^[16]。对高盐生态系统的研究可以促进我们对极端环境的了解,有利于新物种及具有生物技术应用潜力的酶的发现^[16]。目前,对高盐生态系统的研究主要集中于水生群落结构、“微生物席”以及高盐的土壤或沉积物^[16]。每年排入乌梁素海的总氮为1088.59 t,总磷为65.75 t^[16]。氮磷是水生以及陆生生态系统的限制性营养元素^[24]。氮磷水平的增加主要是因为化肥的使用以及市政和工业废水排放造成的^[17,24]。乌梁素海湖泊沉积物以及芦苇沼泽、碱蓬盐化草甸和白刺荒漠区沉积物土壤微生物生态系统中,氮磷已经不是限制性营养元素,从而导致富营养化程度不断加剧。Kuramae等^[5]对荷兰的6种不同土地利用方式(包括落叶阔叶林、松树林、天然草原、常规耕地、有机耕地和牧场)对细菌群落结构的影响分析,结果表明土地利用方式对细菌微生物群落结构的影响不明显,磷的含量是主要的影响因子。Kuramae等^[24]报道在中性pH值的条件下,不同年代白垩草原土壤微生物群落结构的重要驱动因子是磷,这些研究结果与本文的结果一致。在微生物群落水平上,表现出磷对细菌群落结构组成和相对丰度的重要影响。目前,氮的输入主要来源于人类活动,比自然陆地的来源高出30%,是100年前人类活动氮输入的10倍^[26]。氮源的快速增加所导致的环境问题越来越引起人们的重视,氮的增加对生态系统产生了广泛的影响,包括生物地球化学循环、温室气体的排放^[27]、湖泊的富营养化^[24]等。微生物在这些过程

中起着重要的作用。氮的输入对乌梁素海富营养化湖泊整体细菌微生物群落结构影响的研究报道较少,本文通过高通量测序获得了大量的有效序列来描述细菌的群落结构组成和相对丰度。Ramirez等^[27]通过高通量测序研究了氮肥对土壤细菌群落结构的持续影响,结果表明细菌群落结构对氮的增加有较好的响应,群落结构沿着氮的梯度发生了变化。因此,可以通过对微生物群落结构的深入研究为富营养化湖泊中氮磷元素的生物地球化学循环提供重要线索,筛选重要的功能代谢菌种,为开发微生物工程菌治理富营养化提供重要数据。

参考文献

- [1] Hartmana WH, Richardson CJ, Vilgalys R, Bruland GL. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (46):17842-17847.
- [2] Filip Z. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2002, 88 (2):169-174.
- [3] Weinert N, Piceno Y, Ding GC, Meincke R, Heuer H, Berg G, Schloter M, Andersen G, Smalla K. Phylochip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 75 (3):497-506.
- [4] Hansel CM, Fendorf S, Jardine PM, Francis CA. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (5):1620-1633.
- [5] Kuramae EE, Yergeau E, Wong LC, Pijl AS, van Veen JA, Kowalchuk GA. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79 (1):12-24.
- [6] Schutter ME, Sandeno JM, Dick RP. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 34 (6):397-410.
- [7] da C Jesus E, Marsh TL, Tiedje JM, de S Moreira FM. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal*, 2009, 3:1004-1011.
- [8] Wang BZ, Zhang CX, Liu JL, Zeng XW, Li FR, Wu

- YC, Lin XG, Xiong ZQ, Xu J, Jia ZJ. Microbial community changes along a land-use gradient of desert soil origin. *Pedosphere*, 2012, 22 (5) :593-603.
- [9] Yergeau E, Bokhorst S, Huiskes AHL, Boschker HTS, Aerts R, Kowalchuk GA. Size and structure of bacterial, fungal and nematode communities along an Antarctic environmental gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59 (2) :436-451.
- [10] Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA & Fierer N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40 (9) : 2407-2415.
- [11] Meadow JF, Zabinski CA. Prokaryotic communities differ along a geothermal soil photic gradient. *Microbial Ecology*, 2013, 65 (1) :171-179.
- [12] Allison SD, Martiny JBH. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (Supplement 1) :11512-11519.
- [13] Hamonts K, Clough TJ, Stewart A, Clinton PW, Richardson AE, Wakelin SA, O' Callaghan M, Condon LM. Effect of nitrogen and waterlogging on denitrifier gene abundance, community structure and activity in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83 (3) :568-584.
- [14] Meyer-Reil L, Köster M. Eutrophication of marine waters: Effects on benthic microbial communities. *Marine Pollution Bulletin*, 2000, 41 (1-6) :255-263.
- [15] Rappé MS, Giovannoni SG. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57:369-394.
- [16] Hollister EB, Engledow AS, Hammett AJM, Provin TL, Wilkinson HH, Gentry TJ. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *The ISME Journal*, 2010, 4:829-838.
- [17] Sun HM, He J, Lv CW, Gao XD, Fan QY, Xue HX. Nitrogen pollution and spatial distribution pattern of Wuliangsu Lake. *Geographical Research*, 2006, 25 (6) :1003-1012. (in Chinese)
孙惠民, 何江, 吕昌伟, 高兴东, 樊庆云, 薛红喜. 乌梁素海氮污染及其空间分布格局. 地理研究, 2006, 25 (6) : 1003-1012.
- [18] Sun HM, He J, Gao XD, Lv CW, Fan QY, Xue HX. Distribution of total phosphorus in sediments of Wuliangsu Lake. *Acta Sedimentologica Sinica*, 2006, 24 (4) :579-584. (in Chinese)
孙惠民, 何江, 高兴东, 吕昌伟, 樊庆云, 薛红喜. 乌梁素海沉积物中全磷的分布特征. 沉积学报, 2006, 24 (4) : 579-584.
- [19] Li J, Li B, Zhou Y, Xu J, Zhao J. A rapid DNA extraction method for PCR amplification from wetland soils. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52 (6) :626-633.
- [20] Grote J, Schott T, Bruckner CG, Glöckner FO, Jost G, Teeling H, Labrenz M, Jürgens K. Genome and physiology of a model Epsilonproteobacterium responsible for sulfide detoxification in marine oxygen depletion zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (2) :506-510.
- [21] Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, Sogin ML. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science*, 2007, 318 (5847) : 97-100.
- [22] Takai K, Suzuki M, Nakagawa S, Miyazaki M, Suzuki Y, Inagaki F, Horikoshi K. *Sulfurimonas parvalvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56 (8) :1725-1733.
- [23] Ma WC, Yu HB, Xi BD, Yao LH, Guo XJ. Parameters and characteristics of saline soils around Ulansuhai Nur. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5 : 696-702. (in Chinese)
马文超, 于会彬, 席北斗, 姚磊华, 郭旭晶. 乌梁素海湖滨带盐碱土碱化参数与特征分析. 环境工程学报, 2011, 5 (3) :696-702.
- [24] Conley DJ, Paerl HW, Howarth RW, Boesch DF, Seitzinger SP, Havens KE, Lancelot C, Likens GE. Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Ecology*, 2009, 323:1014-1015.
- [25] Kuramae EE, Gamper H, van Veen JA, Kowalchuk GA. Soil and plant factors driving the community of soilborne microorganisms across chronosequences of secondary succession of chalk grasslands with a neutral pH. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 77 (2) : 285-294.
- [26] Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland CC, Green PA, Holland EA, Karl DM, Michaels AF, Porter

JH, Townsend AR, Vöösmary CJ. Nitrogen cycles: past, present and future. *Biogeochemistry*, 2004, 70 (2) :153–226.

Fierer N. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology*, 2010, 91 (12) :3463–3470.

[27] Ramirez KS, Lauber CL, Knight R, Bradford MA. ,

High-throughput analysis of bacterial community of transition zone in littoral wetland of Wuliangshuai eutrophic lake

Jingyu Li^{1,3,4,5}, Ruifang Du^{1,3}, Ji Zhao^{1,2*}

¹ College of Environment & Resources, ²Inner Mongolia Key Laboratory of Environmental Pollution Control & Waste Resource Reuse,

³ College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, Inner Mongolia Autonomous Region, China

⁴ College of Biological Science&Engineering, Beifang University of Nationality,

⁵ key Laboratory of Fermentation, Brewing Engineering&Biotechnology, State Nationalities Affairs Commission, Yinchuan 750021, Ningxia Province, China

Abstract: [Objective] We studied soil bacterial community composition, abundance and diversity of transition zone along eutrophic lakeside wetland sediments and soils. [Methods] The total DNA was extracted according to the sediment DNA extraction. Then high-throughput pyrosequencing was used to detect soil bacterial community composition, abundance and diversity based on 16S rRNA gene. Soil physicochemical properties were tested to analyze its effects on bacterial community according to standard methods. [Results] The soil bacterial community composition and relative abundance were very different across transition zone in littoral wetland. Bacteria groups mainly include Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Actinobacteria, Planctomycetes and Gemmatimonadetes at phylum level. The diversity index of bacterial communities gradually increased according the land distribution, especially the phylum Proteobacteria and the genus *Sulfurimonas*. Correlation analysis indicated that the combination of total phosphorus, total water soluble salt and ammonium has the most significant effects on the whole bacterial community structure, and Mantel Test results indicated that the correlation was statistically significant ($R = 0.8857$, $P = 0.037$). [Conclusion] The bacterial community structure of transition zone is quite different in littoral wetland of Wuliangshuai eutrophic lake, where *Sulfurimonas* play potential important roles in biogeochemical cycles of sediments in Wuliangshuai Lake.

Keywords: Eutrophic Lake, Lakeside wetlands, Sediments, Bacterial community structure, Spatial heterogeneity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31160129, 31460216)

* Corresponding author. Tel: +86-471-4991676; E-mail: ndzj@imu.edu.cn

Received: 8 July 2014 / Revised: 8 September 2014