

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(6):736-743; 4 June 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

海南东寨港红树林不同植被土壤微生物群落结构比较

任健^{1#}, 阎冰^{1 2#}, 洪葵^{3*}

¹华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

²广西红树林保护重点实验室, 广西红树林中心, 北海 536007

³武汉大学药学院, 武汉 430071

摘要:【目的】比较不同植被下红树林土壤细菌和古菌的多样性及群落结构, 认识红树林土壤微生物资源多样性。【方法】直接提取红树林土壤总 DNA, 采用细菌通用引物 27F/1492R 和古菌通用引物 Arch21F/Arch958R 进行 PCR 扩增, 构建细菌和古菌 16S rRNA 基因文库, 对海南东寨港自然保护区秋茄林、无瓣海桑林和无红树林裸滩土壤的细菌和古菌多样性和群落结构进行分析和比较。【结果】3 种土壤样品的细菌类群包括变形细菌门(Proteobacteria)等 16 个类群, 其中变形细菌门(Proteobacteria)与绿屈挠菌门(Chloroflexi)是优势类群; 古菌包括 6 个嗜泉古菌界(Crenarchaeota)类群和 7 个广域古菌界(Euryarchaeota)类群, 分别以 Marine Benthic Group C、Marine Benthic Group D 为优势类群。多样性指数(H')和物种丰富度指数(Schao1)表明, 本地种秋茄林下土壤细菌和古菌的多样性指数最高, 外来种无瓣海桑显著低于秋茄林, 甚至明显低于相邻无红树林裸滩沉积物; 不同植被下土壤细菌和古菌群落结构存在显著差异, 秋茄林土壤微生物群落结构和无红树林裸滩沉积物更相似。【结论】红树林土壤微生物类群丰富, 不同植被下土壤细菌和古菌多样性和群落结构存在显著差异。

关键词: 红树林土壤, 细菌, 古菌, 多样性, 菌群结构

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)06-0736-08

红树林是位于热带与亚热带海洋潮间带独特的高产湿地生态系统^[1], 是覆盖世界热带、亚热带 60% - 75% 海岸线的生态关键区, 在维护生物多样性等方面有特殊的功能^[2]。有关红树林生态系统微生物的研究包括微生物物种多样性, 生物活性物质多样性及环境修复功能等^[3-4]。与其它海岸带生态环境相比, 红树林生态系统拥有较高的微生物多样性^[5-7], 高于无红树林覆盖区^[6]。红树林微生物包含了固氮、溶磷、硫还原、厌氧光合、产甲烷等功能类

群和众多产药用次级代谢产物的放线菌类群^[1, 8-11], 且绝大多数是未培养的微生物类群, 显示出在红树林研究开发微生物资源的潜力^[12-13]。

人类经济活动尤其是近海养殖和旅游业的发展, 造成了红树林覆盖面积急剧萎缩。目前红树林的保护和恢复已受到各国政府和民间组织的高度重视, 红树林引种、造林、次生林改造、退化生态系统恢复等方面的研究已陆续展开^[14]。海南东寨港国家级自然保护区是中国第一个红树林保护区, 自 1986 年起开始了

基金项目: 国家自然科学基金(30560005)

* 通信作者。Tel: + 86-27-68752442; E-mail: k1022@163.net

作者简介: # 并列第一作者。任健(1986-), 男, 江苏江宁人, 硕士研究生, 主要从事微生物资源与生态研究, E-mail: renjian86@126.com;

阎冰(1966-), 男, 湖北宜昌人, 研究员, 主要从事红树林生态研究, E-mail: gxybing@tom.com

收稿日期: 2012-01-04; 修回日期: 2012-03-14

试验林计划。张瑜斌等^[15]曾对东寨港红树林土壤微生物进行了培养水平的微生物数量初步研究。

微生物多样性和群落结构与红树林生产力和稳定性直接相关,对维护红树林生态健康起着重要作用^[4,16]。本研究通过分子生态学手段,比较了细菌和古菌多样性及其群落结构在东寨港红树林本地种秋茄 (*Kandelia candel*)、引进种无瓣海桑 (*Sonneratia apetala*) 和无红树林裸滩样品中的差异,有助于认识红树林土壤微生物资源多样性及群落结构类型,为红树林保护和恢复提供微生物学方面的依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

pGEM-T 载体与 PCR 产物纯化试剂盒 (Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System) 购自美国 Promega 公司;土壤 DNA 提取试剂盒 (FastPrep[®] SPIN Kit for Soil) 购自美国 Q-BIOgene 公司;dNTP, 牛血清蛋白,核酸内切酶 *Msp* I、*Afa* I 购自大连宝

生物工程有限公司;*Taq* DNA 聚合酶购自 MBI 公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术服务公司合成;测序工作由中国人类基因组南方中心完成;核酸提取仪 (FastPrep[®] FP220, Q-Biogene);电泳仪 (DYPC-31D 型,北京六一仪器厂);PCR 仪 (Mastercycle Gradient, Eppendorf);凝胶成像分析系统 (FluorChem[®] 5500, Alpha);核酸蛋白测定仪 (Biophoto meter, Eppendorf)。

1.2 土壤样品的采集

3 种土壤样品于 2004 年 10 月 18 日采集。3 样地均位于潮沟边中潮地带,无瓣海桑林和无红树林裸滩相连,在潮沟的东侧,秋茄林在潮沟的西侧,3 采样点呈三角形,直线距离无瓣海桑林和无红树林裸滩间约 300 m,无瓣海桑林和秋茄林间约 500 m,秋茄林和无红树林裸滩间约 700 m,(图 1)。

5 点取样法采集 0 cm - 30 cm 深度的土壤并充分混匀。采集的土样保存于无菌塑料袋,迅速置于冰上,于当天运回实验室速冻存于 -70℃ 备用。

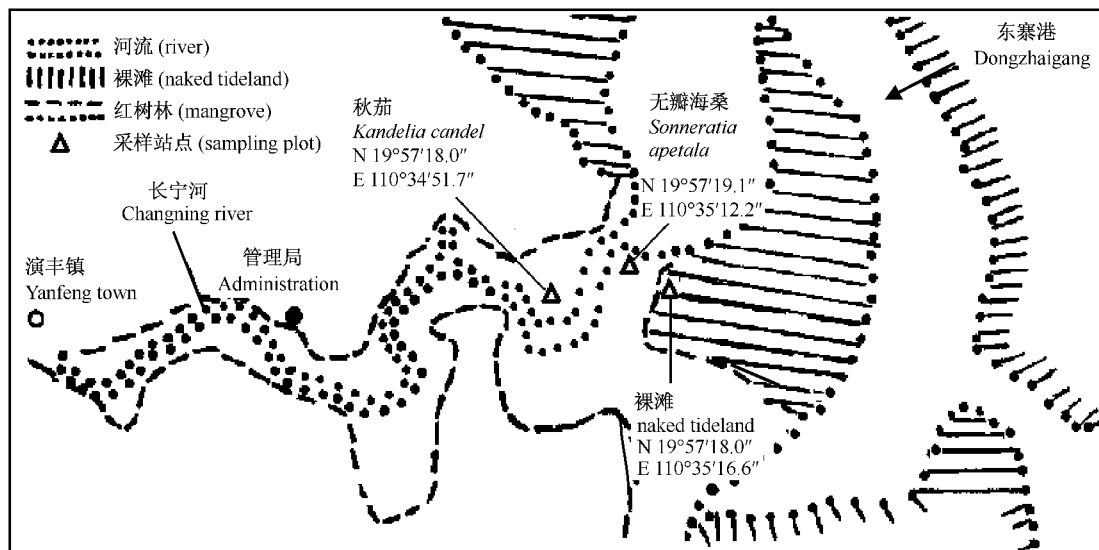


图 1 土壤采样位点分布示意图

Fig. 1 Geographic distribution of various soil sampling sites.

1.3 土壤理化性质测定

采用文献[17]中的方法测定土壤理化性质,由中国热带农业科学院橡胶研究所土化室完成。

1.4 土壤总 DNA 的提取

土壤总 DNA 提取采用试剂盒。核酸提取仪速度 $5.5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$,击打时间 45 s。每份样品同时平行提取 3 份,将所有提取的 DNA 混合并测定含量。

1.5 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与克隆文库构建

1.5.1 PCR 扩增 采用细菌通用引物 27F/1492R 和古菌通用引物 Arch21F/Arch958R 分别对土壤总 DNA 进行 PCR 扩增:DNA 模板 50 - 100 ng,引物各 20 pmol/L, $4 \times$ dNTP (各 2.5 mmol/L) 5 μL , MgCl_2 2.5 mmol/L, $10 \times$ PCR 缓冲液 5 μL , BSA300 ng/mL, *Taq* 酶 (5 U) 0.2 μL ,加 ddH₂O 至 50 μL 。扩增条

件:94℃ 5 min;94℃ 50 s,52℃ 50 s,72℃ 2 min (细菌)/1.5 min(古菌) 25 次循环;72℃ 10 min。同时对 PCR 产物进行 Reconditioning PCR,以消除异源双链^[18]。每个样品同时做 5 个平行的 PCR 反应。

1.5.2 克隆文库构建 将所有 PCR 反应产物混合用纯化试剂盒纯化,与 pGEM®-T Vector 连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,进行蓝白斑筛选。

1.6 16S rRNA 基因扩增片段的限制性酶切分析 (ARFLP)、测序及多样性指数分析

用通用引物 T7/SP6 对初筛克隆子进行菌落 PCR 扩增,验证插入片段。各文库分别挑取 240(秋茄)、80(无瓣海桑)、80(裸滩)个克隆子进行 ARFLP 分析。分别用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Afa* I 对菌落 PCR 产物进行酶切,不同谱型的克隆子选取 1 个进行测序。用 Bellerophon^[19] 在线分析文库中可能的嵌合体 (Chimeria),对获得的序列通过 DNAMAN (version 5.0) 比对,相似性 $\geq 97\%$ 视为同一基因型 (Phylotype),归入 1 个 OTU。

采用覆盖率 Coverage C^[20]、Shannon-Wiener index (H')、 $S_{\text{chao1}}^{[21]}$ 及 Sorensen similarity index^[22] 分别评价文库的细菌和古菌的多样性、物种丰富度及群落相似性。

1.7 类群与系统发育分析

各 OTU 选取 1 条代表序列,在线 (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) 分析各序列所

代表的类群,同时用 Blast search 找出各序列在 GenBank 数据库中最相似的参照序列,一起用 Clustal X 比对,并用 Bioedit 校正。采用 MEGA 软件 (version 4.0),依据 Neighbor-Joining 法及 Kimura 2-parameter matrix 模型构建系统发育树,Bootstrap 检验,自展数为 1000。

1.8 GenBank 登录号

本研究所获得的 16S rRNA 序列提交 GenBank 数据库,登录号分别为 DQ811792-DQ811955, DQ363752-DQ363847, EF125379-EF125540。

2 结果

2.1 红树林土壤样品理化性质

3 个样品的部分理化性质见表 1。从表 1 可以看出 3 个样地间土壤理化性质有较大差异。红树林样地土壤呈酸性,相邻无红树林裸滩沉积物呈中性。土壤粒径大小无红树林裸滩 > 无瓣海桑林 > 秋茄林。盐度变化不大,约为海水盐度的 1/4 - 1/3。元素含量变化幅度大小依次为 N、C、P、K。各样地土壤含有较丰富的有机质,含量高低秋茄林 > 无瓣海桑林 > 无红树林裸滩。全磷含量较低,介于 0.108% - 0.251%,无红树林裸滩沉积物中全磷含量最高。K 元素的含量较丰富,介于 1.11% - 1.55%。

表 1 红树林土壤理化性质

Table 1 Physicochemical characteristics of mangrove soil samples

Code of sample	size size of grain (%)			Sanility (%)	pH	Organic matter (%)	Total N (%)	Total P (%)	Total K (%)
	<0.002 mm	0.02 - 0.002 mm	>0.02 mm						
naked tideland	13.2	18.4	68.4	8.2	7.4	1.81	0.051	0.251	1.11
<i>Sonneratia apetala</i>	18.7	21.8	59.5	7.8	5.2	2.11	0.069	0.108	1.55
<i>Kandelia candel</i>	22.6	31.4	46.0	10.9	4.5	4.22	0.148	0.152	1.23

2.2 土壤总 DNA 提取,文库构建与多样性指数

无红树林裸滩、无瓣海桑林与秋茄林土壤总 DNA 得率分别为 5.6、5.2、13.7 μg DNA/g 干土。

分别构建了 3 样地土壤细菌和古菌 16S rRNA 基因文库。覆盖率、多样性指数 (H') 和物种丰富度

指数 (S_{chao1}) 的计算结果表明细菌的多样性比古菌高 3 样地间各指数均以秋茄林最高,无瓣海桑林最低 (表 2)。虽然秋茄林土壤细菌文库测序的克隆数远大于其它两个文库,覆盖率仍然低于 50%,说明秋茄林土壤细菌多样性非常高。

表 2 不同样地土壤细菌/古菌 16S rRNA 基因文库的多样性指数

Table 2 Diversity index of bacterial/archaeal 16S rRNA gene clone libraries from different sample sites

Site	No. of clones	No. of phylotypes	Coverage C/%	Shannon-wiener index (H')	Species richness (S_{chao1})
<i>Kandelia candel</i>	233/397	164/96	48.1/91.7	4.966/4.152	445.6 \pm 53/130 \pm 12.6
<i>Sonneratia apetala</i>	72/132	45/38	56.9/91.7	3.604/3.304	141.1 \pm 35.6/46.6 \pm 5.6
Naked tideland	67/134	44/47	50.8/85.8	3.691/3.586	225.5 \pm 65.2/63.4 \pm 8.1

2.3 不同样地间土壤细菌群落结构比较

3个样品的土壤细菌类群包括变形细菌门(Proteobacteria)、绿屈挠菌门(Chloroflexi)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)、浮霉菌门(Planctomycetales)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、硝化螺旋菌门(Nitrospira)、梭杆菌门(Fusobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、Candidate division OP11、Candidate division WS3、Candidate division OP8和Candidate division TM6共16个门,其中Proteobacteria与Chloroflexi是优势类群。这16个门都存在于秋茄林土壤中,而无瓣海桑林土壤和裸滩沉积物中均只存在其中的8个门,如图2所示。

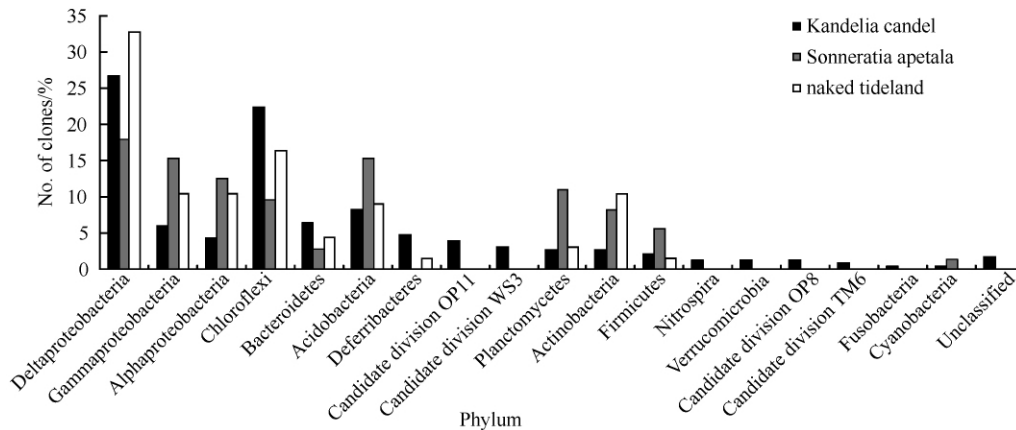


图2 不同样地土壤间细菌群落结构的比较

Fig. 2 Comparison of bacterial community structure of different sampled sites.

硫还原菌作为有机物的主要分解者普遍存在于红树根际和林下土壤^[1]。在秋茄林土壤中检测到硫还原菌(脱硫叶菌属(*Desulfobulbus*)、硫球菌属(*Desulfococcus*)、脱硫杆菌属(*Desulfobacterium*)、互营杆菌属(*Syntrophobacter*)、脱硫橄榄状菌属(*Desulfobacca*)等)占细菌克隆的16%。无瓣海桑林土壤中硫还原菌含量相对较低,占细菌克隆的8%。可培养绿屈挠菌是一类厌氧光合菌,以硫化物为供氢体,胞外积累硫。在秋茄林土壤中绿屈挠菌的比例高达22%,在裸滩沉积物中为16.4%,而在无瓣海桑林土壤中仅为9.7%。绿屈挠菌在秋茄林土壤中的高丰度分布表明它们执行着某些重要的生态功能。结合红树林富含硫的特性,推测在秋茄林土壤中绿屈挠菌在硫循环中也起着重要的作用。

在各样地土壤中都检测到粘细菌

Proteobacteria 门在3样地土壤细菌群落中都为第一优势类群,占39%–52.4%基因型和36.9%–53.6%克隆,且都未发现 β -和 ε -Proteobacteria亚门,以 δ -Proteobacteria占比例最高, γ -Proteobacteria次之, α -Proteobacteria最少;但Proteobacteria各亚门在不同样地所占比例有所不同,秋茄林土壤和裸滩沉积物中 δ -Proteobacteria所占比例超过了 γ -Proteobacteria和 α -Proteobacteria的总和,而无瓣海桑林土壤中 δ -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria和 α -Proteobacteria比例相似。秋茄林土壤和裸滩沉积物中,Chloroflexi为第二优势类群,而无瓣海桑林土壤中,Acidobacteria为第二优势类群,其次为Planctomycetales和Chloroflexi,(图2)。

(*Myxobacteria*)秋茄林、无瓣海桑林、裸滩分别有5个、3个、3个基因型。在秋茄林检测到3个假单胞菌(*Pseudomonas*),2个噬纤维菌(*Cytophaga*),和1个产丙酸菌(*Propionigenium*)基因型,此类微生物在生物大分子降解中起重要作用。相关研究表明红树林土壤中参与氮源转化的细菌数量明显高于无红树覆盖的区域^[23]。本研究在秋茄林土壤分别检测到1个蓝细菌(*Cyanobacteria*)、4个硝化螺旋菌(*Nitrospira*)和1个生丝微菌(*Hyphomicrobium*)基因型;在无瓣海桑林土壤检测到1个中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*)基因型;在无红树林裸滩检测到1个弗兰克氏菌(*Frankia*)基因型。

2.4 不同样地间土壤古菌群落结构比较

3个土壤样品的古菌类群包括嗜泉古菌(*Crenarchaeota*)和广域古菌(*Euryarchaeota*),其中

Crenarchaeota 包含了 Marine Benthic Group A、B、C、Marine Group I 和 2 个尚不能确定分类地位的分枝 MSA-cluster-6 和 MSA-cluster-78 共 6 个类群, Euryarchaeota 包含了 Marine Benthic Group D、E、Marine Group IV、Rice Cluster I、III、产甲烷菌 (Methanogen (MA)) 和甲烷营养菌 (Anaerobic methane-oxidizing archaeon (ANME)) 共 7 个类群, 分别以 Marine Benthic Group C 和 D 为优势类群。在秋茄林、无瓣海桑林和无红树林裸滩土壤中分别发现了 11、12 和 8 个类群的古菌, (图 3)。从门的水平来看, 都包含 Crenarchaeota 和 Euryarchaeota, 以 Crenarchaeota 占绝对优势 (79.4% - 91.5% 克隆)。

Marine Benthic Group C 在秋茄林土壤和无红树林裸滩沉积物中均为第一优势类群, 分别占克隆的 44.9% 和 54.5%; 在无瓣海桑林土壤中为第二优势类群, 占克隆的 24.2%。Marine Group I 在无瓣海桑林土壤中为第一优势类群, 占克隆的 30.3%, 而在秋茄林土壤与无红树林裸滩中仅占 4.5% 和 0.7% 克隆。Candidate Group MSA cluster 6 在 3 个样地土壤中均占较高的比例 (11.3% - 20.9% 克隆), 在无红树林裸滩沉积物中为第二优势类群。

Marine Benthic Group D 在秋茄林土壤中为第二优势类群, 占 15.6% 克隆, 而在无瓣海桑林和裸滩中仅占 3.8% 和 3.7% 的克隆。Rice Cluster III 在秋

茄林土壤中占 5.7% 的克隆, 在无瓣海桑林占 1.5% 的克隆。Marine Benthic Group D 与 Rice Cluster III 2 个类群被认为是热原体及相关类群, 均为未可培养种类^[24]。在秋茄林土壤广域古菌中, 热原体及相关类群占了 89.7% 的克隆。典型的可培养热原体没有细胞壁, 在富含硫的酸性中温环境中生长旺盛, 利用分子硫进行硫呼吸, 产生大量的 H_2S ^[25], 由此推测, 在秋茄林土壤硫循环中热原体及相关类群也起着重要的作用。无瓣海桑林与秋茄林土壤明显不同, 仅有 5.3% 的克隆属于热原体及相关类群。

产甲烷菌 (MA) 利用 H_2 使 CO_2 还原生成甲烷, 对厌氧环境下有机物的分解起着十分重要的作用, 在红树林土壤中也大量存在^[26]。本研究中产甲烷菌仅在无瓣海桑林土壤中发现 (6.9% 克隆)。其它甲烷代谢相关类群中, Rice Cluster I 仅在秋茄林土壤中发现, 裸滩中未发现 Marine Benthic Group E, 秋茄林中未发现甲烷营养菌 (ANME)。无瓣海桑林 14.2% 的古菌与甲烷代谢相关, 而秋茄林土壤和裸滩沉积物中仅为 2% 和 2.2% (图 3)。

在更低的分类等级上, 3 个样地间古菌群落结构差异明显, 如在 Marine Benthic Group C 中, MSA cluster 5 仅在秋茄林土壤中发现, 在无瓣海桑林中未发现 MSA cluster 4; 在 Marine Benthic Group B 中, MSA cluster 11 仅在裸滩中发现 (图 3)。

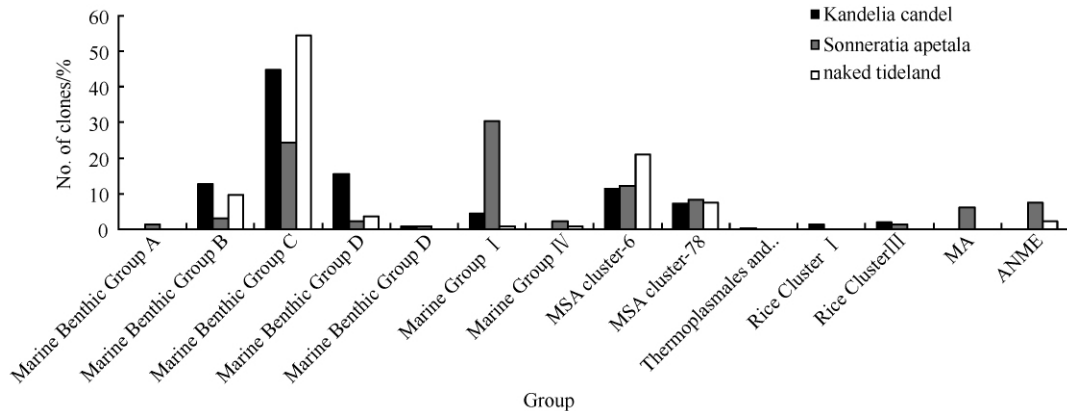


图 3 不同样地土壤间古菌群落结构的比较

Fig. 3 Comparisons of archaeal community structure of different sampled sites.

2.5 不同样地间微生物群落结构相似性分析

采用 Sorenson similarity index 评价不同样地土壤间细菌和古菌群落的相似性, (表 3)。细菌 16S rRNA 基因相似性指数极低, 由于所分析的克隆数仅能覆盖文库多样性约 50%, 所计算的相似性指数

不能很好地反映实际情况, 但结合群落结构比较的结果, 至少可以说明不同树种土壤的细菌群落并不比与邻近裸滩间更相似。古菌 16S rRNA 基因相似性指数也比较低, 以秋茄林与无瓣海桑间的相似性最低, 秋茄林与裸滩间的相似性最高, 即不同树种红

树林土壤间的古菌群落结构差异较与其相邻裸滩古菌群落结构差异更大。

表3 不同样地土壤间细菌/古菌群落相似性的比较
Table 3 pairwise comparisons of phylotype compositions of bacterial/archaeal 16S rRNA gene libraries from different sampled sites

Vegetation	Sorenson similarity index		
	<i>Kandelia candel</i>	<i>Sonneratia apetala</i>	naked tideland
<i>Kandelia candel</i>	1/1		
<i>Sonneratia apetala</i>	0.067/0.134	1/1	
naked tideland	0.058/0.252	0.067/0.141	1/1

3 讨论

红树植物秋茄为本地树种,是唯一广泛分布于中国所有红树林区的树种,具有代表性。无瓣海桑为引进树种,于1986年从孟加拉国引入东寨港红树林区,在裸滩上种植成林,和裸滩紧邻。微生物在生态系统物质能量循环中起着重要作用,其多样性和群落结构对维持生态系统生产力、稳定与健康具有重要意义。本研究采用了16S rRNA基因文库的方法对不同红树植被下的土壤细菌和古菌多样性和群落结构进行了比较和分析。虽然细菌16S rRNA基因文库覆盖率仅在48.1% - 56.9%之间,但多样性指数较高,在一定程度上体现了红树林土壤细菌较丰富的多样性,与先前的研究结果一致^[5-7],其中秋茄林土壤细菌多样性要显著高于无瓣海桑林与无红树林裸滩。古菌16S rRNA基因文库覆盖率在85.8% - 91.7%,已反映了文库中绝大部分的古菌多样性。细菌的多样性高于古菌,这与Kim^[27]对韩国Kaghwah岛潮间带沉积物的研究结果一致。

各文库覆盖率相差不大,不同红树植被下土壤细菌和古菌多样性指数 H' 与 S_{chao1} 差异明显,两者都是秋茄林最高,其次为无红树林裸滩,无瓣海桑林。秋茄林土壤细菌在多样性和类群上要高于深圳福田红树林保护区与巴西Ilha do Cardoso红树林保护区^[6-7],可能东寨港秋茄林红树林区受到的人为扰动较小,微生物群落结构复杂,生态结构比较稳定。刘慧杰等发现红树林区细菌多样性高于相邻非红树林区细菌多样性^[13],王坤岳^[12]等发现红树品种是影响土壤微生物群落结构的因素。本次研究中无瓣海桑林下土壤微生物多样性低于相邻无红树裸

滩,从地理位置看,无瓣海桑林和裸滩更接近,而秋茄林土壤微生物群落结构和无红树林裸滩沉积物更相似,推测不同红树树种对微生物群落具有较强的选择性,无瓣海桑的种植在一定程度上导致样地微生物多样性的降低和群落结构的改变。各样地优势类群与功能类群如硫还原菌、绿屈挠菌、产甲烷菌等在多样性和群落结构上的差异表明本地种与引进种在生态系统水平上存有明显的差异,引进种群落要简单的多,新生成的生态系统的生态功能可能更为简单。

有研究表明无瓣海桑分泌的化感物质可抑制本土红树林的生长^[28]。也有学者认为无瓣海桑的引入,改善了林下土壤理化性质,提高了土壤肥力,促进本地树种生长,提高了红树林群落结构的复杂性和生物多样性^[29]。本研究则证实不同植被下微生物多样性和群落结构存在显著差异。考虑各种自然原因和人为活动的结果,2004年样品所反映的红树林土壤中的微生物多样性和种群与现今的情况可能有些差异,在随后的研究中可以进一步采用PCR-DGGE、基于高通量测序技术的宏基因组研究、荧光原位杂交等技术,深入开展无瓣海桑造林过程对林下土壤微生物多样性的影响及机制的研究。

参考文献

- [1] Holguin G, Vazquez P, Bashan Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and Fertility of Soils* 2001 33(4):265-278.
- [2] Zhang ZY, Su ZX, Zhang QY, Shen AY. The current status of world protection for mangrove forest. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 2003 21(3):261-269.
- [3] 蒋云霞, 郑天凌, 田蕴. 红树林土壤微生物的研究: 过去、现在、未来. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2006 46(5):848-851.
- [4] 曹启民, 郑康振, 陈耿, 陈桂珠. 红树林生态系统微生物学研究进展. *生态环境 (Ecology and Environment)*, 2008, 17(2):839-845.
- [5] Alongi DM. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microbial Ecology*, 1988, 15(1):59-79.
- [6] Liang JB, Chen YQ, Lan CY, Tam NFY, Zan QJ, Li NH. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. *Marine Biology* 2007, 150:739-747.

- [7] Dias ACF, Andreote FD, Rigonato J, Fiore MF, Melo IS, Araújo WL. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 98: 541-551.
- [8] 张瑜斌, 曹卉, 庄铁诚, 林鹏. 红树林固氮微生物研究进展. *海洋通报 (Marine Science Bulletin)*, 2003, 22(6): 79-82.
- [9] 龙寒, 向伟, 庄铁城, 林鹏. 红树林区微生物资源. *生态学杂志 (Chinese Journal of Ecology)*, 2005, 24(6): 696-702.
- [10] 林鹏, 张瑜, 邓爱英, 庄铁诚. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性. *海洋学报 (Acta Oceanologica Sinica)*, 2005, 27(3): 133-141.
- [11] Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Li J, Yao XS, Goodfellow Michael, Ruan JS. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 2009, 7: 24-44.
- [12] 王岳坤, 洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(2): 201-204.
- [13] 刘慧杰, 杨彩云, 田蕴, 林光辉, 郑天凌. 基于 PCR-DGGE 技术的红树林区微生物群落结构. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50(7): 923-930.
- [14] 张乔民. 我国热带生物海岸的现状与生态系统的修复与重建. *海洋与湖沼 (Oceanologia Etlimnologia Sinica)*, 2001, 32(4): 454-464.
- [15] 张瑜斌, 庄铁诚, 杨志伟, 林鹏. 海南东寨港红树林土壤微生物初探. *生态学杂志 (Chinese Journal of Ecology)*, 2001, 20(1): 63-64.
- [16] Sjöling S, Mohammed SM, Lyimo TJ, Kyaruzi JJ. Benthic bacterial diversity and nutrient processes in mangroves: impact of deforestation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2005, 63(3): 397-406.
- [17] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [18] Thompson JR, Marcelino LA, Polz MF. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic acids research*, 2002, 30: 2083-2088.
- [19] Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequence in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 2004, 20(14): 2317-2319.
- [20] Good IL. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40: 237-264.
- [21] Chao A. Estimating the population size for capture-recaptured data with unequal catchability. *Biometrics*, 1987, 43: 783-791.
- [22] Magurran AE. *Ecological Diversity and Its Measurement*. London: Chapman and Hall, 1996, 1-192.
- [23] Routray TK, Satapathy GC, Mishra AK. Seasonal fluctuation of soil nitrogen transforming microorganisms in Bhitarkanika mangrove forest. *Journal of Environmental Biology*, 1996, 17: 325-330.
- [24] Kemnitz D, Kolb S, Conrad R. Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(4): 553-565.
- [25] Segerer A, Langworthy TA, Stetter KO. *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from solfatara fields. *Systematic and Applied Microbiology*, 1988, 10: 161-171.
- [26] Lyimo TJ, Pol A, Op den Camp HJM. Methane emission, sulphide concentration and redox potential profiles in Mtoni mangrove sediment, Tanzania. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 2002, 1(1): 71-80.
- [27] Kim BS, Oh HM, Kang H. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *Journal of Microbiology*, 2005, 43: 144-151.
- [28] 曾雯珺, 廖宝文, 陈先仁, 粟娟, 马苏全, 管伟. 无瓣海桑与三种乡土红树植物混交的生态效应. *生态科学 (Ecological Science)*, 2008, 27(1): 31-37.
- [29] 张苇, 林广旋, 刘一鸣. 湛江红树林国家级自然保护区人工造林现状及造林技术探讨. *湿地科学与管理 (Wetland Science & Management)*, 2011, 7(1): 37-39.

Comparison of bacterial and archaeal community of mangrove soil under different vegetation in Dongzhaigang , Hainan Island

Jian Ren^{1#} , Bing Yan^{1 2#} , Kui Hong^{3*}

¹ College of Life Science and Technology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China

² Key Laboratory of Guangxi Mangrove Reserve & Guangxi Mangrove Centre , Beihai 536007 , China

³ Wuhan University School of Pharmaceutical Sciences , Wuhan 430071 , China

Abstract: [Objective] We compared bacterial and archaeal diversity and community structure of mangrove soil under different vegetation , and to reveal better understanding of microbial resources. [Methods] Bacterial and archaeal 16S rRNA gene libraries were constructed and analyzed for soils under *Kandelia candel* trees , *Sonneratia apetala* trees , and naked tideland , in Dongzhaigang Mangrove National Nature Reserve of Hainan Island. Template DNA was directly extracted from soil samples. PCR were amplified using primers 27F/1492R (bacterial) and Arch21F/Arch958R (archaeal). [Results] A total of 16 phyla dominated by Proteobacteria and Chloroflexi were detected in bacterial libraries , and 6 groups of Crenarchaeota and 7 groups of Euryarchaeota , predominated by Marine Benthic Group C and Marine Benthic Group D , respectively were found in archaeal libraries. Shannon-Wiener index (H') and S_{chaol} estimator indicated that soil microbial diversity under the introduced species *Sonneratia apetala* was much lower than indigenous species *Kandelia candel* , even lower than naked tidal flat sediment near mangrove. Distinct differences in microbial community structure under different vegetation were observed. Soil microbial community structure under *Kandelia candel* was much similar with that of naked tideland. [Conclusion] Mangrove soil contained rich population of bacteria and archaea; there existed distinct differences in mangrove soil microbial community structure and diversity among different vegetation.

Keywords: mangrove soil , bacteria , archaea , diversity , community structure

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30560005)

* Corresponding author. Tel: + 86-27-68752442; E-mail: K1022@163.net

#These authors contributed equally to this work.

Received: 4 January 2012/Revised: 19 March 2012