

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(10):1116–1128; 4 October 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.003

乌梁素海湖滨湿地细菌群落结构多样性

杜瑞芳^{1,2}, 李靖宇^{1,2,4,5}, 赵吉^{2,3*}

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

⁴ 北方民族大学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】了解乌梁素海湖滨湿地水陆过渡带细菌群落结构及多样性变化, 探讨富营养化湖泊湿地基质条件对细菌群落结构的影响。【方法】应用变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术, 分析和比较了依陆向分布的 4 个水陆过渡带样点的湿地细菌群落结构多样性, 采用典型对应分析 (CCA) 探讨了湿地基质因子对细菌多样性的影响。【结果】DGGE 图谱显示依湖泊水体沉积物 (S-1) → 湖滨芦苇沼泽沉积物 (S-2) → 湖滨碱蓬盐化草甸土壤 (S-3) → 岸上白刺荒漠土壤 (S-4), 4 个样点的条带数依次减少, 对应菌群结构及多样性变化显著; 多样性指数分析结果显示, Shannon-Wiener 指数 (H)、均匀度 (E)、丰富度 (S) 以及 Simpson 指数 (D_s) 均显示依陆向分布逐步下降的规律, 即: S-1 > S-2 > S-3 > S-4。序列比对结果显示, 沉积物及土壤细菌分属于变形菌门 (78.6%)、酸杆菌门 (7.1%)、拟杆菌门 (14.3%) 这 3 个细菌类群, 优势菌门为变形菌门, 而变形菌门又分为 5 个亚群, 其中 ϵ 变形菌纲为优势亚群; CCA 结果表明, 图中各条带对应物种的分布受铵态氮、总氮、有机碳、水溶盐总量、氯离子以及钾离子影响最大。【结论】乌梁素海富营养化湖泊的水陆过渡带湿地细菌群落结构存在较大差异, 富营养化相关基质因子对细菌多样性影响较大。这为研究富营养化湖泊湿地水陆过渡带的细菌结构多样性及空间异质性提供了科学依据。

关键词: 乌梁素海湿地, 富营养化湖泊, 变性梯度凝胶电泳 (DGGE), 细菌多样性, 群落结构

中图分类号: X172 **文章编号:** 0001-6209(2014)10-1116-13

湿地系统作为陆地生态系统和水生生态系统之间的重要过渡区, 具有保持物种多样性、控制物质能量交换、净化水质等多重生态服务功能^[1]。乌梁素海系黄河改道后形成的牛轭湖, 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湖泊, 为地球上同一纬度最大的自然

湿地^[2]。湖泊富营养化日益成为一个全球性的水环境污染问题, 在我国 131 个主要湖泊中, 已达富营养程度的湖泊有 67 个, 占 51.2%。湖泊富营养化的发生导致湖泊生态系统结构和功能退化, 进而导致湖滨湿地的退化^[3-4]。受到河套灌区退水的影响, 近 10 年来乌梁素海富营养化进程加剧, 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

基金项目: 国家自然科学基金“蒙古高原沼泽化湿地甲烷及氨氧化菌的空间异质性与环境功能性研究”(31160129), 科技部“973 计划”前期课题“内蒙古高原湿地土壤微生物功能群及其多样性与生态系统功能研究”(2009CB125909)

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

作者简介: 杜瑞芳 (1989-), 女, 内蒙古包头人, 硕士研究生, 从事环境微生物学研究。E-mail: duruifang1989@163.com

收稿日期: 2013-12-29; **修回日期:** 2014-03-20

营养化草型湖泊。目前,腐烂水草正以每年 $9\text{mm} - 13\text{mm}$ 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^[5]。

土壤微生物是湿地生态系统的重要组成部分,土壤微生物在湿地元素循环和物质转化、能量流动以及系统稳定性维持等方面具有重要作用^[6]。土壤与地球上其他环境相比拥有最多样化的细菌群落组成^[7],且土壤细菌的群落组成和多样性受到生物和非生物因素的广泛影响,如植被类型、碳可利用性、养分供应、土壤含水量以及土壤 pH 值等^[8]。由于微生物在湿地生物地球化学过程具有重要作用,并能对环境扰动做出迅速响应,微生物也被用作湿地评估的重要指标^[9]。因此,细菌群落组成的变化可能是富营养化湖泊环境最敏感的指标之一^[10]。目前对于富营养化湖泊微生物的研究多集中于水体和沉积物,就水陆过渡带湿地土壤细菌群落研究的报道较少。湖泊富营养化导致的湿地退化可能会使水体沉积物及湖滨土壤中的细菌群落对此作出响应。因此,本文采用免培养的变性梯度凝胶电泳技术,通过对 16S rRNA 基因 V3 区序列进行分析,比较了乌梁素海湖滨水陆过渡带不同植被下细菌群落多样性的变化,并结合环境因子对细菌群落结构差异进行分析,试图探究富营养化条件下湖泊湿地微生物群落的空间异质性以及主要环境驱动因子。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

主要试剂: 丙烯酰胺,甲酰胺,甲叉双丙烯酰胺 (Sigma-Aldrich Company), 尿素,过硫酸铵 (Amresco Company), pEASY-T1 Cloning Kit, Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell (TransGen Biotech)。

主要仪器: HC-2062 高速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司), Vortex-Genle[®] 涡旋仪 (Mbio Laboratories Inc), MutiGeneThermaleyler (Labnet International, Inc), NanoDrop[®] ND-1000 紫外-可见光分光光度计 (Nano-Drop Technologies Inc), DcodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc)。

1.2 样点位置和样品采集

本次试验采集乌梁素海水陆过渡带不同植被下表层沉积物或土壤样品 (0 - 10 cm), 具体位置见图 1, 采样方式为 5 点采样法。主湖区水体沉积物取自样点 S-1, 地理位置 $N 40^{\circ}57'511''$, $E10 8^{\circ}55'352''$, H1013 m; 湖滨芦苇 (*Phragmites australis*) 沼泽区沉积物取自样点 S-2, 地理位置 $N40^{\circ}56'861''$, $E108^{\circ}56'692''$, H 1016 m; 碱蓬 (*Suaeda glauca*) 生长的湖滨盐碱化草甸区土壤取自样点 S-3, 地理位置 $N 40^{\circ}56'763''$, $E 108^{\circ}56'882''$, H 1018 m; 白刺 (*Nitraria tangutorum Bobr*) 生长的岸上荒漠区土壤取自样点 S-4, 地理位置 $N40^{\circ}56'263''$, $E10 8^{\circ}57'682''$, H 1018 m。采集后的样品迅速放入无菌保鲜袋中, -20°C 保存。

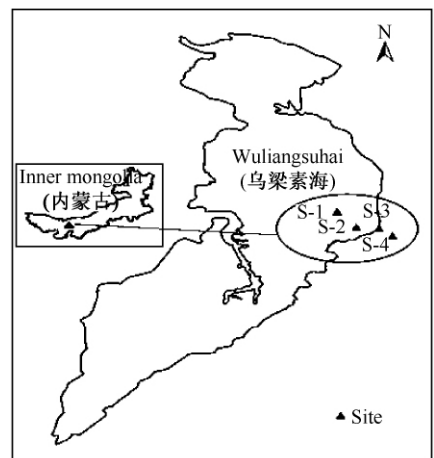


图 1. 采样点地理位置

Figure 1. Geographical position of study plots.

1.3 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, Ca^{2+} 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。

1.4 样品基因组总 DNA 的提取

沉积物及土壤总 DNA 的提取采用玻璃珠-氯化钙-SDS 法^[11]。每个样品重复提取 3 次微生物总 DNA^[12]，采用 Nanodrop-ND1000 测浓度，之后混合用于后续试验。

1.5 细菌 16S rDNA V3 区扩增

采用巢式 PCR 对目的基因进行扩增，细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACCTGTTACGACTT-3')^[13] 扩增 4 个土样总 DNA 中细菌的 16S rDNA 片段，扩增体系: 10 × Buffer 2.5 μL, 模板 DNA 1 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL) 0.2 μL, dNTP (2.5 mmol/μL) 2 μL, 引物 27F 和引物 1492R (10 pmol/μL) 各 1 μL, 补水至 25 μL。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 80 s, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。对 V3 区扩增采用的是特异性引物 GC-F338 和 R518^[14]，反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增片段大小约 191bp。扩增产物用 1.5% (W/V) 的琼脂糖凝胶电泳检测质量，之后用于变性梯度凝胶电泳。

1.6 变性梯度凝胶电泳

采用 Bio-Rad 公司的 Dcode™ Universal Mutation Detection System 分离第二轮带 GC 夹的 PCR 产物，变性剂梯度为 30% -60%，聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%，变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增。电泳条件: 在 60℃, 200V 运行 4 h。电泳结束后，置于提前准备好的电泳缓冲液中，待胶变凉后，EB 染色 10 min, 脱色 15 min。完毕后用凝胶成像分析系统 (SYNGENE G:BOX) 照相。所得图像用 Bio-Rad 的 Quantity One 软件进行分析。切取 DGGE 图谱的优势条带于 1.5 mL 离心管中，加 30 μL 的 ddH₂O 中 4℃ 浸泡过夜，取 1 μL 作为模板进行一次无 GC-夹子的 PCR 扩增，反应条件如 1.5。用 DGGE 检查回收条带的纯度和分离情况。

1.7 克隆测序及系统发育树构建

PCR 产物与 pEASY-T1 克隆载体 (TransGen Biotech) 连接，转化到 pEASY-T1 phage-resistant 感受态细胞，挑取白色阳性克隆接种到 LB 液体培养基中，37℃ 摇菌过夜，用引物 M13-R, M13-F 进行菌落 PCR，用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小后，菌液送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

通过克隆测序，获得的 DGGE 条带所代表的基

因序列，应用 CLC 软件进行序列分析，将所得正确长度的序列用 Blast 程序与 NCBI 基因库中的序列进行比对，得到亲缘关系最近的序列，采用 Cluster W 软件进行序列的多重比对，采用 MEGA5.2 的 N-J 法，Bootstrap 值 10000，Maximum Composite Likelihood^[15] 模型构建系统发育树。

1.8 DGGE 图谱多样性和典型对应分析

DGGE 图谱采用 Quantity One 软件分析，根据条带的强度和位置，将不同泳道通过 UPGMA 算法进行聚类，计算各个样品的多样性指数，香农-威纳指数 (Shannon-Wiener, H)、均匀度 (Evenness, E)、丰富度 (Richness, S)、Simpson 指数 (D_s)，计算公式如下: $H = -\sum (P_i) (\log_2 P_i) = -\sum (N_i/N) \log_2 (N_i/N)$; $E = H/H_{max}$, $H_{max} = \log_2 (S)$; $D_s = 1 - \sum P_i^2$ 。

其中, p_i 是土壤样品中单一条带的强度在该样品所有条带总强度中所占的比率, N_i 代表单一条带的峰面积, N 代表所有峰的总面积, N_i 为第 i 条带的峰面积, S 是某个土壤样品中所有条带数目总和, H 为式 (1) 中求得的 Shannon-Wiener 指数; S 为丰富度, 即每一泳道的条带数目。

将 Quantity one 软件导出的各个泳道的所有条带的数字化结果用 CANOCO for Windows 4.5 软件进行典型对应分析 (CCA)。

2 结果和分析

2.1 水陆过渡带细菌多样性分析

2.1.1 DGGE 电泳图谱分析: 图 2 为 DGGE 图谱, 4 个样点 PCR 产物经 DGGE 分离后, 得到了数目、亮度、位置均不同的条带。条带越多, 则表明细菌群落多样性高, 条带强度越亮表示对应条带代表细菌数量多, 迁移位置不同则代表不同的细菌种属。每个样点设有 3 个重复。由左至右, 分别为样点 S-1、S-2、S-3 和 S-4。其中湖泊水体沉积物 (样点 S-1) 检出 10 条, 湖滨芦苇沼泽沉积物 (样点 S-2) 检出 9 条, 湖滨碱蓬盐碱化土壤 (样点 S-3) 检出 8 条, 岸上白刺荒漠化土壤 (样点 S-4) 检出 5 条。相同位置条带合并后, 4 个样点共检出 19 条位置不同的条带。

图 2 中检测到的 19 条带, 选取 14 个特征条带 (A-N) 测序。不同样点的优势条带根据条带亮度和迁移速率的差异作如下分类: (1) 4 个样点共有条带: 条带 A、B 为 4 个不同土壤样点共有条带, 表明对应细菌种类为 4 个样点普遍存在的, 其中条带 A

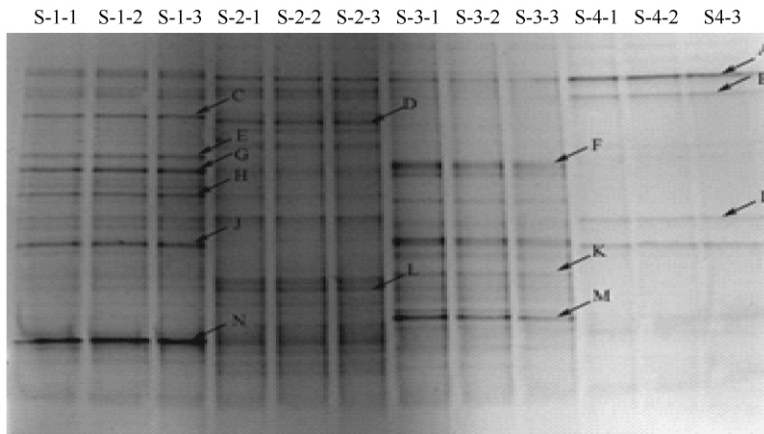


图 2. 水陆过渡带各样点的细菌 DGGE 指纹图谱

Figure 2. DGGE fingerprint of four sites in land-water transition zone.

所示菌群在岸上白刺荒漠化土壤中丰度最高。(2) 部分样点共有条带: 条带 H 在湖泊水体沉积物和芦苇沼泽中均有, 对应菌种在湖泊水体沉积物中丰度更高; 条带 N 在湖泊水体沉积物及湖滨芦苇沼泽沉积物中共有, 但所代表菌种在湖泊水体沉积物中丰度最高; 条带 G 除岸上白刺荒漠化土壤外均含有, 其中对应细菌种属在湖泊水体沉积物中丰度最高; 条带 I 除湖滨碱蓬盐碱化土壤外, 均含有此类细菌种属; 条带 J 除湖滨芦苇沼泽沉积物外均含有; 条带 L 湖滨芦苇沼泽沉积物和湖滨碱蓬盐碱化土壤均有, 在湖滨芦苇沼泽沉积物中丰度更高。(3) 唯一样点特有条带: 条带 C、E 为湖泊水体沉积物所特有; 条带 D 为湖滨芦苇沼泽沉积物所特有; 条带 F 为湖滨碱蓬盐碱化土壤所特有; 条带 K、M 为所湖滨碱蓬盐碱化土壤特有。

从图中可以明显看出从样点 S-1 到样点 S-4 条带数目明显减少。直观的反映出沿着水陆过渡带, 细菌群落的多样性发生显著变化。不同样点间具有许多相同位置的条带, 说明这些土壤之间存在一些共有的细菌种类。但亮度存在差异, 表明该条带对应种属的细菌丰度上存在差异。湖泊水体沉积物(样点 S-1) 条带数量多, 表明细菌群落结构组成丰富, 多样性高。湖滨芦苇沼泽沉积物(样点 S-2) 条带数量上与 S-1 相近, 但亮度较弱, 表明条带对应种属细菌的丰度相对下降。而且在 4 个样点中二者共有条带数最多(共 7 条)。湖滨碱蓬盐碱化土壤(样点 S-3) 和岸上白刺荒漠化土壤(样点 S-4) 与湖泊水体沉积物(样点 S-1) 和湖滨芦苇沼泽沉积物(样点 S-2) 相比条带数量有较大程度的下降。岸上白刺荒

漠化土壤(样点 S-4) 细菌群落结构最简单的, 多样性最低。

2.1.2 相似性和聚类分析: 应用 Quantity one 软件对图谱各泳道识别, 得到识别的所有条带分布及强度示意如图 3 所示。图中对各泳道的条带进行分析, 以 S-3-3 为基准, 计算出不同泳道间的相似性系数, 依据 UPGMA 算法对不同泳道进行聚类分析(见图 4)。

同一样点 3 个重复间相似性系数相近, 其中岸上白刺荒漠化土壤 S-3-3 与 S-3-1 和 S-3-2 重复之间的相似性最高为 93.3% 和 92.3%, 而不同样点间细菌群落结构组成的相似性很低(15.3% - 42.6%)。结果表明水陆过渡带微生物群落结构存在较大差异。如图 4 所示, 各样点 3 个重复聚为一类, 表明试验的重复性好。其中 S-1 和 S-2 聚为一簇表明湖泊水体沉积物和湖滨芦苇沼泽沉积物细菌群落结构较为相似; S-3 和 S-4 聚为一簇表明湖滨碱蓬盐碱化土

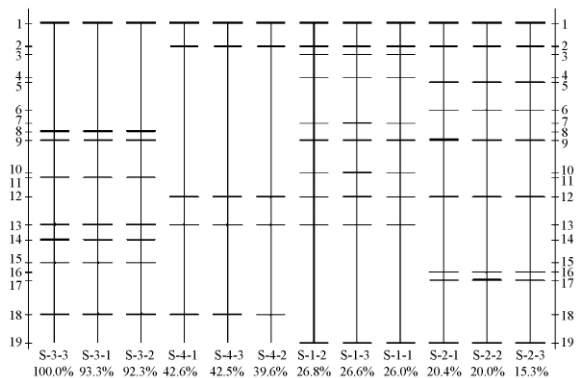


图 3. DGGE 条带分布及强度示意图

Figure 3. DGGE types distribution and intensity image.

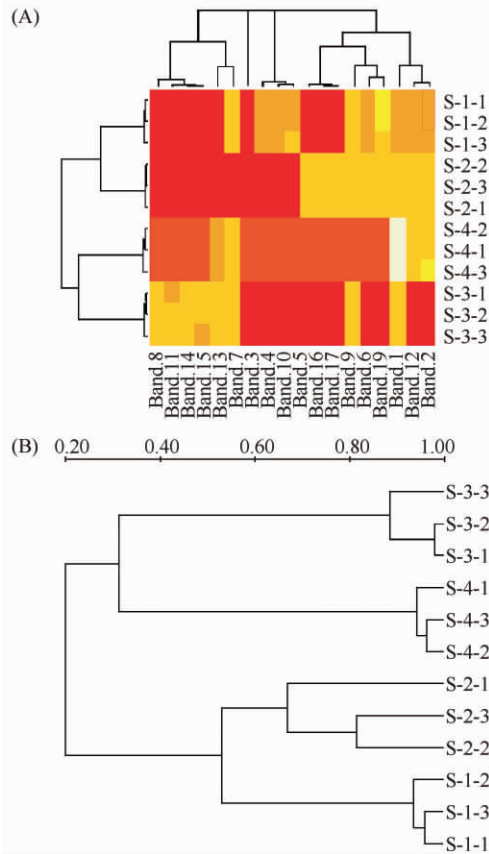


图 4. 湖滨水陆过渡带沉积物及土壤样点的 heatmap 分析 (A) 及 UPGMA (B) 聚类分析

Figure 4. Heatmap (A) and UPGMA (B) analysis of four sites in land-water transition zone. Samples are labeled by their site. Each sample has three repetitions. The heatmap plot (A) depicts the relative percentage of each bacterial family (variables clustering on the X-axis) within each sample (Y-axis clustering), and clustered the matrix heatmap by similar color patterns grouped. The relative values for bacterial family are depicted by color intensity. Samples in UPGMA analysis (B) are grouped into clusters according to the similarity coefficient indicated in the upper of the figure.

壤与岸上白刺荒漠化土壤细菌群落结构较为相似。热图聚类分析结果与 UPGMA 聚类结果一致,推测土壤类型对细菌群落结构存在较大的影响。

2.1.3 多样性指数分析:将每个样点的 DGGE 图谱的条带多少以及条带密度进行数字化,导出的结果用于多样性分析,最终获得不同样点的丰富度 (S)、均匀度指数 (E)、香农指数 (H) 及辛普森指数 (D_s), 结果见表 1。多样性指数和丰富度沿着陆向分布逐渐减小,即湖泊水体沉积物 > 湖滨芦苇沼泽沉积物 > 湖滨碱蓬盐碱化土壤 > 岸上白刺荒漠化土壤。其中,湖泊水体沉积物(样点 S-1)中各项值均为最

大,表明该环境条件下微生物群落结构的丰富度和多样性最高,可能与水分及营养充分有关;而岸上白刺荒漠化土壤各项指数均最低。

2.2 16S rRNA 基因的系统发育分析

图 2 中选取 14 个特征条带测序,测序结果经 Blast 比对后获得最相似菌株及其序列,见表 2。去除载体后的目标序列上传至 GenBank 数据库,登录号为 KF726854–KF726867。

应用在线分类工具 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifierServlet>) 对 14 条目的序列进行基于贝思叶法的 rRNA 基因分类^[16]。结果显示 14 条序列主要属于 3 大类群,见图 5。其中优势菌门为变形菌门 (Proteobacteria, 78.6%);另两个细菌类群所占比重较少,分别为拟杆菌门 (Bacteroidetes, 14.3%) 和酸杆菌门 (Acidobacteria, 7.1%)。而变形菌门主要包括了 5 个亚群, α -Proteobacteria (18.2%)、 β -Proteobacteria (9.1%)、 γ -Proteobacteria (18.2%)、 δ -Proteobacteria (18.2%)、 ϵ -Proteobacteria (27.3%) 以及部分分类地位不明确的细菌类群占 9.1%。其中 ϵ 变形菌纲为优势亚群。

系统进化树分析结果见图 5。结果表明条带 A 和 B 与 *Pseudomonas aeruginosa* 聚为一类,条带 D 与 Uncultured gamma proteobacterium 聚为一类;条带 I 与 *Shingopyxis sp.* 相似性较高达 99%,条带 J 与 *Sphingobium sp.* 相似性较高达 99%,属 α -Proteobacteria;条带 F 和 M 与 Uncultured Desulfotignum sp. 和 Uncultured sulfate-reducing bacterium 聚为一类,相似性分别为 95% 和 97%,属 δ -Proteobacteria;条带 H 与 Uncultured Bacteroidetes bacterium 相似性较高,为 94%;条带 C 和 G 与 Uncultured epsilon proteobacterium,聚为一类,相似性较高为 98%,均属 ϵ -Proteobacteria;条带 K 分类地位不明确,条带 L 和 N 分属 Acidobacteria 和 β -Proteobacteria。

2.3 环境因子对细菌群落结构的影响

由表 3 可以看出,各样点之间理化性质相差较大,湿地沿陆向分布上,总碳、总氮、总磷以及铵态氮的变化趋势都是先下降后上升。S-4 有机碳和总氮,总磷最高,S-3 有机碳、总氮、铵态氮、总磷均为最低,S-1 铵态氮、水溶性总盐、 SO_4^{2-} 最高。pH 值 4 个样点均在 8 以上,偏碱性,其中 S-3 湖滨碱蓬盐碱化土壤 pH 值最高。

表 1. 水陆过渡带各样点细菌群落多样性指数

Table 1. The values of diversity index for bacterial community of different sites in land-water transition zone

Sites	Shannon-Wiener index (H)	Evenness index (E)	Richness index (S)	Simpson index (D_s)
S-1	3.3049 ± 0.0072	1.0426 ± 0.0027	10 ± 0.0000	0.8974 ± 0.0011
S-2	3.1694 ± 0.0002	0.9999 ± 0.0000	9 ± 0.0000	0.8888 ± 0.0000
S-3	2.9945 ± 0.0010	0.9981 ± 0.0003	8 ± 0.0000	0.8740 ± 0.0002
S-4	2.2509 ± 0.0163	0.9694 ± 0.007	5 ± 0.0000	0.7789 ± 0.0050

表 2. DGGE 条带的 16S rRNA 基因的序列比对结果

Table 2. Analysis of 16S rRNA gene of DGGE bands

Band number	Closest relative and its accession number	Sequence similarity / %	Classification information	Abundance / %
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DQ103761.1	100		
B	<i>Pseudomonas resinovorans</i> HQ198585.1	98	γ-Proteobacteria	18.2
D	Uncultured gamma proteobacterium DQ837265.1	94		
C	Uncultured epsilon proteobacterium KF583375.1	98		
E	<i>Sulfuricurvum kujiense</i> CP002355.1	98		
G	Uncultured Sulfurimonas sp. KC545712.1	98	ε-Proteobacteria	27.3
F	Uncultured Desulfotignum sp. HQ332437.1	95		
M	Uncultured sulfate-reducing bacterium EU047541.1	97	δ-Proteobacteria	18.2
I	<i>Sphingopyxis</i> sp. AB235163.1	99		
J	<i>Sphingobium</i> sp. KF544948.1	99	α-Proteobacteria	18.2
N	<i>Thiobacillus denitrificans</i> sp. EU546130.1	99		
L	Uncultured Acidobacteria bacterium FJ517083.1	100	Acidobacteria	7.1
H	Uncultured Cytophaga sp. KC597205.1	94	Bacteroidetes	14.3
K	Uncultured bacterium. JF426277.1	96	Unclassified bacteria	9.1

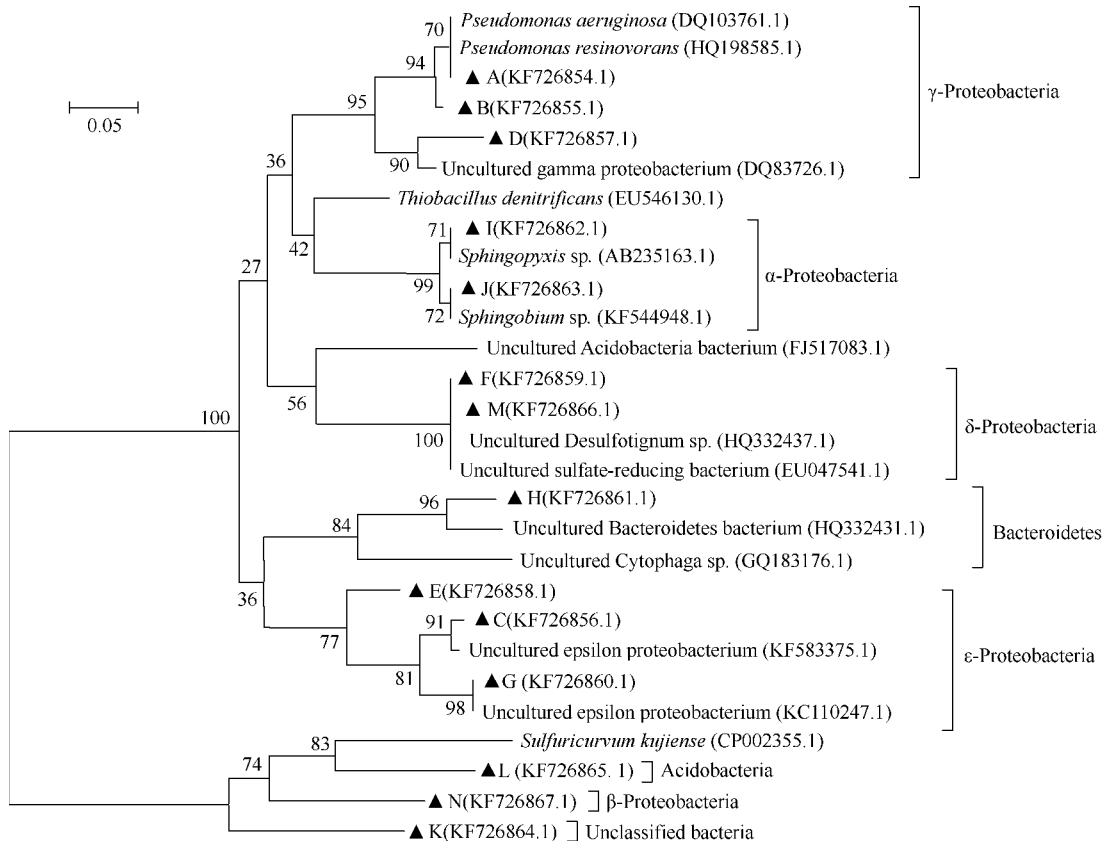


图 5. DGGE 优势条带的系统进化树

Figure 5. Phylogenetic tree of the dominant DGGE bands. "A-K" represents different band. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

表 3. 4 个样点基本理化性质

Table 3. Physical and Chemical Properties of four sampling sites

Physico-chemical properties	S-1	S-2	S-3	S-4
organic carbon (g/kg)	11.82	7.99	3.73	12.93
total nitrogen (g/kg)	1.07	0.69	0.32	1.33
total phosphorus (g/kg)	9.11	7.11	13.65	20.46
total water soluble salt	0.78	0.57	0.47	0.66
pH	8.04	8.61	9.25	8.69
$\text{NH}_4^+ -\text{N}$	3.39	1.95	0.91	1.34
K^+	0.15	0.15	0.21	0.15
Na^+	8.33	7.25	18.57	26.72
Ca^{2+}	1.36	0.32	0.21	1.11
Mg^{2+}	3.03	1.3	1.55	0.82
Cl^-	5.5	5.97	15.1	14.5
SO_4^{2-}	7.49	3.8	4.75	7.32
CO_3^{2-}	0	0.08	0.5	0.08
HCO_3^-	0.56	0.67	1.09	0.96

为了解释环境因子对微生物群落结构的影响,采用 Canoco 软件对水陆过渡带各样点细菌群落结构组成的差异性进行了典范对应分析。CCA 分析需要导入两组数据,将采集到的土壤各理化值进行数据预处理,作为环境数据;图 3 中识别的所有条带(共 19 条)的相对亮度值作为物种数据。得到的分析图中,环境因子用带有箭头的线段表示,箭头方向反应环境因子变化趋势,线段长度反应条带种类与环境因子关系的大小。而箭头与排序轴夹角的余弦值大小则反映与排序轴相关性的大小。

结果显示(图 6-A),前 3 个排序轴的特征值分别为 0.455、0.373 和 0.171,且物种-环境关系的累积分率为 100,说明排序图比较好地反映了样点与环境因子之间的关系。轴 1 与碳酸氢根离子正相关性最高(0.9617),氯离子、水溶性总盐、钠离子及钾离子也存在正相关性,与铵态氮负相关性最高(-0.7448)。轴 2 与总氮(0.8804)正相关性最高,与有机碳也存在较高相关性,与钾离子负相关性最高(-0.6472)。

图 6-B 中所示的条带,代表其对应的物种。由图可以直观的看出物种分布、群落分布、以及与环境变量间的关系,14 个理化因子对条带对应物种分布均有影响。细菌群落分布受铵态氮、总氮、有机碳、水溶性总盐、氯离子以及钾离子的影响较大。条带 3、4、5、6、10、16、17、19 对应物种偏好较高铵态氮,而这些条带主要分布于样点 S-1, S-2, 由图 6-A 可以发现 S-1、S-2 均受 $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 影响较大,再结合土壤理化性质表 3 可知 S-1, S-2 氨态氮较其他两个样点值高。同样,条带 8、11、4、15 对应物种则偏好高的

钾离子与碳酸根离子,主要分布于 S-3, 而 S-3 钾离子与碳酸根离子为 4 个样点最高。条带 13、18 对应

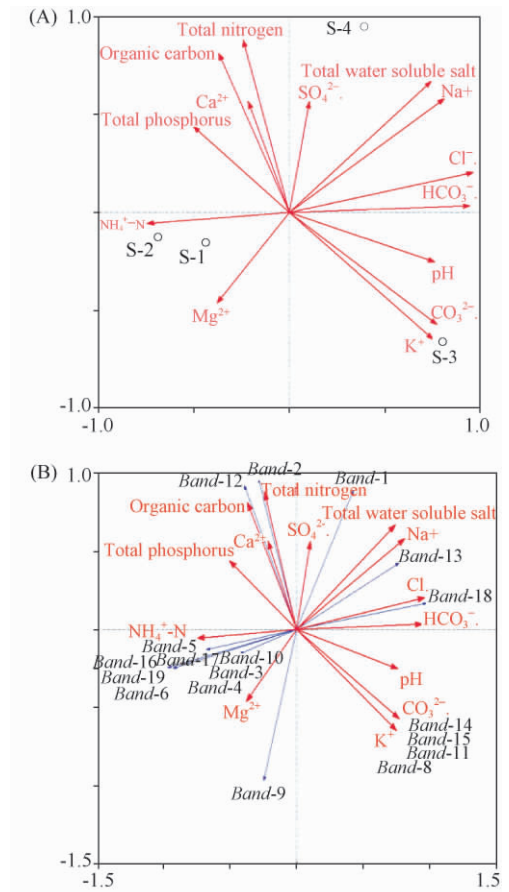


图 6. 研究样点 (A) 及细菌群落 (B) 与环境因子的典型对应性分析图

Figure 6. CCA ordination graph for study sites, DGGG banding patterns and environmental factors.

物种偏好高的钠离子和氯离子, 主要分布于样点 S-3, S-4, 这两个样点的钠离子和氯离子为 4 个样点最高。条带 1、2、12 对应物种偏好高的有机碳和总氮, 这些条带在 4 个样点中均有分布, 而 4 个样点的有机碳、总氮均较高。

3 讨论

3.1 湿地演化对细菌群落结构多样性的影响

湿地为独特的过渡性生态系统, 细菌在湿地的生物地球化学循环中起着重要的作用^[17]。本文对乌梁素海湿地湖滨水陆过渡带细菌多样性分析结果表明, 在湖泊水体沉积物→湖滨芦苇沼泽沉积物→湖滨碱蓬盐碱化土壤→岸上白刺荒漠化土壤陆向分布上, 各样点细菌群落结构存在较大差异, 多样性依次降低。湿地微生物研究中, 在地球化学中起关键作用的特定微生物群落指纹研究是很重要的内容^[18]。通过重点对水生环境样点 S-1 和陆生环境样点 S-3 的菌群进行了分析, 分离得到的不同样点的条带分属于不同的细菌类群, 特征条带代表的特征菌群反映了采样点环境的异质性。并且, 部分条带代表的菌种为功能菌株, 在碳、氮、硫的循环中起着重要作用, 部分为环境污染指示菌, 或在降解污染物方面具有重要作用。

样点 S-1 和 S-2 的样品均为沉积物, 由于环境的相似存在大量共有条带。多数化学污染物易与细颗粒沉淀形成层状沉积物, 富营养化的湖泊沉积物是化学污染的资源库, 其中栖息的细菌在多种化合物的分解循环中起重要作用, 对不良化合物的生物修复也已受到关注^[19]。本次试验检测到的优势菌群为 ϵ -Proteobacteria, 其对应条带 C、E、G 主要分布于样点 S-1 湖泊水体沉积物中, 其硫酸根离子含量高。条带 E 与 ϵ -Proteobacteria 的 *Sulfuricurvum kujiense* 同源性高达 98%, 为硫氧化细菌, 兼性厌氧, 专性化能自养, 可利用硫化氢、硫单质、硫代硫酸盐和氢气作为电子供体, 在厌氧条件下以硝酸盐作为电子受体^[20]。因此可以推测在样点 S-1, 即湖泊水体沉积物环境中存在大量硫化物。并且采样过程中, 样点 S-1 和 S-2 的沉积物黑臭, 采集时有大量气泡产生, 再次印证了这一猜测。条带 N 与脱氮硫杆菌最为相似, 脱氮硫杆菌是最常见的自养反硝化菌, 它可以同时去除硝酸盐和减少硫化物, 在处理矿

山污染的人工湿地也出现大量脱氮硫杆菌^[21]。此类菌在 S-1 湖泊水体沉积物丰度较高, 表明沉积物细菌群落对富营养化环境的应答机制。

样点 S-3 为季节性淹水区, 高盐分的水体漫灌后退水、蒸发, 造成了地面盐碱的浓缩。S-3 湖滨碱蓬盐碱化土壤特有条带条带 F、M 与硫酸盐还原性菌相似性较高。硫酸盐是淡水湿地微生物的化学限制条件, 它可能会引起毒性硫化物的产生。硫酸盐还原为硫化物是一种微生物介导的过程, 厌氧的硫酸盐还原微生物使用硫酸根作为末端电子受体为各种碳源的氧化提供能量。硫酸盐还原微生物 (sulfate-reducing organisms, SRM) 在缺氧条件下较为常见, 在有暂时氧气存在和干燥的环境下也可生存。由于时下许多河流及沿河地区富含硫酸盐, 造成 SMR 的非典型生境如漫滩、洪泛区中也存在大量此类菌群^[22-23]。湿地植物根际的 SRM 可能以不活泼的细胞和孢子存在, 执行产氢发酵的功能, 和耗氢的微生物互养, 使他们不依赖硫酸盐产生能量^[24]。也可能是在缺氧的根际周围进行硫化物到硫酸盐的再循环^[25]。Miletto 等在荷兰河漫滩的研究中发现高丰度的 SRM, 其群落结构呈现出依盐度和植物养分的分布。在研究洪水和潮汐影响盐沼土的试验中, 也观察到了较高丰度的 SRM。在另一个富营养化湿地的水甜茅根际 SRM 群落结构试验中, 含有硫酸盐的水注入刺激部分硫酸盐还原菌的生长从而导致细菌群落结构的改变^[26-27]。在佛罗里达大沼泽地北部地区, 同样由于受农业活动影响, 含有硫酸盐的农业径流及地下水输入于北方湿地土壤, 产生了一个养分梯度, 导致硫酸盐还原菌数目和硫酸还原速率在富营养化地区比在原始土壤高^[28]。因此推测, 硫酸盐还原微生物可能在乌梁素海湖滨碱蓬盐碱化土壤的元素循环过程扮演重要的角色。同时, 硫酸盐对细菌群落的结构有一定影响。

结果表明, 乌梁素海富营养化湿地的 4 个样点出现一些共有条带。条带 A 和 B 均与假单胞菌同源性较高, *Pseudoalteromonas* 为假单胞菌属。有研究表明, 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 是含油废水降解石油烃的优势菌属^[29], 并且分解芳香族环境污染物的关键酶也可从假单胞菌属分离, 还可以分离成为农药硫丹降解菌^[30]。因此, 推测乌梁素海可能受石油烃与农药的污染。其中, 条带 A 与铜绿假单胞菌同源性较高, 铜绿假单胞菌产绿脓素, 有脱氮作

用、反硝化作用,在自然界氮循环中起着重要作用^[31]。条带 B 相似菌株 *Pseudomonas resinovorans*, 可降解吡啶,其为环境污染物,具有致畸性和毒性^[32]。同时 *Pseudomonas resinovorans* 是聚羟基链烷酸酯 (Poly-hydroxyalkanoates, PHA) 的生产菌株。PHA 是可生物降解的聚合物,可替代以石油为基础的难降解的塑料^[33]。条带 J 与鞘氨醇杆菌最为相似,拥有多环芳烃降解能力,在生物修复中起着重要作用^[34]。因此,样点有可能受到多环芳烃物质的污染。条带 I 与筛选自日本自然土壤的鞘氨醇单胞菌 *Sphingopyxis sp.* 最为相似,可以降解纤维素^[35]。纤维素的微生物降解在自然界的碳循环中起着重要作用。近几十年来,纤维素分解菌已被广泛研究。在这些研究中,纤维素降解细菌在不同的环境中作用是不同的。与条带 H 最为相似的拟杆菌门的噬纤维菌属则在 pH 中性及富营养化生境的纤维素降解中起主导作用^[36]。条带 L 相似菌株酸杆菌门细菌在样点 S-1 湖泊水体沉积物和样点 S-3 湖滨碱蓬盐碱化土壤中出现,而且在细菌群落中所占比例最少 (7.1%),可能由于酸杆菌门主要在酸性条件下占主导地位,而乌梁素海湿地整体偏碱性 (pH > 8)。有关这一类细菌的研究多集中于分布研究,生态功能研究较少,但有部分研究表明其参与有机物的分解。有研究表明在泥炭藓泥炭土和腐烂的地衣中 *Acidobacteria* 丰度较高,*Acidobacteria* 在酸性泥炭中降解纤维素而且适应泥炭中的低氮环境,在杜鹃植物腐殖土中也存在高丰度的 *Acidobacteria*,它们耐受土壤中高浓度的酚次级代谢产物,利用含酚醛丰富的枯枝叶和蛋白质酚醛复合物作为氮源^[37]。

3.2 环境因子对湿地沉积物及土壤细菌群落的影响

微生物群落的空间异质性很大一部分可以归因于环境中的土壤理化性质及其梯度,各种生物因素与非生物因素影响微生物群落形成的尺度可能会非常不同,一些影响主要是体现在微观(如土壤密度、种内或种间竞争),而另一些较有影响力的体现在较大尺度(如降水、植被)。最近的研究发现土壤理化特性对微生物群落具有多尺度效应^[38]。唐杰等在若尔盖湿地土壤细菌 DGGE 图谱表明,由于不同退化阶段的土壤具有不同的理化性质,导致细菌群落的不同,地上不同植物的生长情况和根系分泌物数量、种类的变化,这些也都是影响土壤微生物的

重要因素^[39]。因此,我们发现土壤细菌群落结构和湿地的物理化学性质之间存在显著关联。

由 CCA 图可知各样点及各条带对应物种分布的主要驱动因子为铵态氮、总氮、有机碳、水溶盐总量、氯离子以及钾离子等。而在中国南方的另两大富营养化湖泊,即太湖和滇池,沉积物微生物的主要驱动因子分别为总磷、水温;水温、pH、有机或无机污染物^[40-41]。从 CCA 排序图中明显看出,铵态氮对样点 S-1 与 S-2 的沉积物样品影响较大。并且,两个样点理化性质也较为相似,铵态氮很高,其中 S-1 更高一些。在多数无氧沉积物中,这种形式的氮占主要地位^[31]。高氮的沉积物中微生物降解大量有机物导致氮的矿化。缺氧的条件下,另一个 NH_4^+ 来源是异化硝酸盐还原成铵。而且,氮的累积与硝酸盐还原程度及高 pH 条件相关,可能是由于高 pH 环境抑制亚硝酸盐还原酶。另一方面,氮和硫的循环可以相互作用,硝酸盐 (NO_3^-) 还原耦合于硫的氧化,消耗 NO_3^- 和生产 SO_4^{2-} 。此过程用于减轻有机物丰富底泥中有毒硫化物产生^[42]。此外,从 DGGE 图谱来看,样点 S-2 与 S-1 相比条带对应物种细菌丰度依土壤的退化梯度上条带对应物种依次减少。而且 S-1 和 S-2 存在与环境相适应的特征菌硫氧化菌和脱氮硫杆菌,进一步表明铵态氮对细菌群落的影响。样点 S-3 和 S-4 优势条带细菌可耐受高的水溶性总盐及盐离子环境,但细菌总条带数量较前两个样点少。有研究表明在盐度影响的土壤中,总细菌数与总可溶性盐类呈负相关^[43]。

基质因子是细菌群落结构组成及多样性的主要驱动因子。pH 及水分^[44]也是影响细菌群落多样性的重要因素。由于乌梁素海整体环境偏碱 (pH > 8),且 4 个样点之间 pH 较为相近,主要细菌群落均在碱性条件下生存。所以在 CCA 排序图上,pH 不是细菌群落差异的主要驱动因子。水文波动是湿地养分循环的重要特征,尤其是考虑到样点 S-3 季节性淹水的特殊性。土壤含水量,以及动态过程如干燥/湿润周期对了解湿地微生物的功能很重要。有研究表明在大多数情况下,土壤的干燥后湿润,能迅速提高土壤中的微生物的活性^[18]。样点 S-4 细菌对应条带数最少,推测与荒漠化土壤的水分低,盐分高有关。污染物(如金属)的水平也会对细菌群落产生影响^[45]。乌梁素海表层底沉积物 Cu、Cd、Hg 等重金属含量较高,其中,Cd 是生物活性最强、污染

最严重的金属, Hg 污染次之^[46]。

此外, 生物因素如原生动物、病毒、真菌等也对细菌群落结构及多样性存在影响。原生动物(如鞭毛虫和纤毛虫)一方面为细菌的捕食者, 另一方面将细菌包装为大的颗粒, 并且附着在其上加速沉积物养分循环^[47]。病毒则通过转导和溶源转换作用影响细菌的丰度和群落组成, 改变细菌遗传多样性^[48]。真菌和细菌协同参与湿地中植物凋落物的分解与矿化, 二者对底物, 空间的竞争也会产生拮抗作用^[49]。因此, 原生动物、病毒、真菌等微生物也会对细菌群落产生一定影响。

4 结论

乌梁素海湖滨湿地细菌群落结构多样性变化及其主要驱动因子分析表明, DGGE 图谱、多样性指数、系统发育分析以及 CCA 分析均揭示湖滨湿地水陆过渡带的细菌群落多样性存在显著变化, 呈现依陆向分布逐渐降低的规律。过渡带主要存在 3 大细菌类群, 分别为变形菌门 (78.6%)、酸杆菌门 (7.1%)、拟杆菌门 (14.3%), 优势类群为变形菌门, 优势亚群为 ϵ 变形菌纲。富营养化相关基质条件等指标对细菌群落结构变化特别是优势菌群的影响最大, 主要驱动因子为铵态氮、总氮、有机碳、以及水溶盐总量、氯离子、钾离子。这为研究富营养化湖泊湿地水陆过渡带的细菌结构多样性及空间异质性提供了科学依据。

参考文献

- [1] Yin C. The ecological function, protection and utilization of land/inland water ecotones. *Ecologica Sinica*, 1995, 15(3):331-335. (in Chinese)
尹澄清. 内陆水-陆地交错带的生态功能及其保护与开发前景. 生态学报, 1995, 15(3):331-335.
- [2] Sun H, He J, Lv C, Gao X, Fan Q, Xue H. 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.
- [3] Zhao Y, Deng X, Zhao J, Xi B, Lu Q. Progress on preventing controlling strategies of lake eutrophication in China. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(3):92-93. (in Chinese)
赵永宏, 邓祥征, 战金艳, 席北斗, 鲁奇. 我国湖泊富营养化防治与控制策略研究进展. 环境科学与技术, 2010, 33(3):92-93.
- [4] Han D, Yang Y, Yang Y, Li K. Recent advances in wetland degradation research. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(4):1294-1295. (in Chinese)
韩大勇, 杨永兴, 杨杨, 李珂. 湿地退化研究进展. 生态学报, 2012, 32(4):1294-1295.
- [5] Sun H, He J, Gao X, Lv C, Fan Q, Xue H. Distribution of total phosphorus in sediment 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.
- [6] Liu Y, Li F, Sun Q, Xie Y. Review on the study of soil microorganisms in wetland ecosystem. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(3):547-548. (in Chinese).
刘银银, 李峰, 孙庆业, 谢永宏. 湿地生态系统土壤微生物研究进展. 应用与环境生物学报, 2013, 19(3):547-548.
- [7] Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 2007(1):283-284.
- [8] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 2006, 103(3):626-631.
- [9] Sims A, Zhang Y, Gajaraj S, Brown PB, Hu Z. Toward the development of microbial indicators for wetland assessment. *Water Research*, 2013, 47:1711-1714.
- [10] Dillon JG, McMath LM, Trout AL. Seasonal changes in bacterial diversity in the Salton Sea. *Hydrobiologia*, 2009(632):49-64.
- [11] 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.
- [12] Guo Y, Wu C, Lin X, Zhong W, Ding W, Zhu J, Jia Z. Three successive extractions reduce quantification bias of microbial communities associated with incomplete DNA

- recovery in soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (7) : 894-901. (in Chinese)
- 郭贇, 吴宇澄, 林先贵, 钟文辉, 丁维新, 朱建国, 贾仲君. 3次连续重复提取DNA能较好反映土壤微生物丰度. *微生物学报*, 2012, 52 (7) : 894-901.
- [13] Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (8) :2461-2470.
- [14] Wu H, Zeng G, Liang J, Zhang J, Cai Q, Huang L, Li X, Zhu H, Hu C, Shen S. Changes of soil microbial biomass and bacterial community structure in Dongting Lake: Impacts of 50, 000 dams of Yangtze River. *Ecological Engineering*, 2013 (57) :72-78.
- [15] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10) :2731-2739.
- [16] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, Cole JR. Native Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (16) :5261-5267.
- [17] Hartman WH, Richardson CJ, Vilgalys R, Bruland GL. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (46) :17842-17847.
- [18] Gutknecht JLM, Goodman RM, Balsler TC. Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. *Plant and Soil*, 2006, 289 (1-2) :17-34
- [19] Sun M Y, Dafforn K A, Johnston EL, Brown MV. Core sediment bacteria drive community response to anthropogenic contamination over multiple environmental gradients. *Environmental Microbiology*, 2013, 15 (9) : 2517-2531.
- [20] Kodama Y, Watanabe K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54 (6) :2297-2300.
- [21] Shao MF, Zhang T, Fang HH. Sulfur-driven autotrophic denitrification: diversity, biochemistry and engineering applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88 (5) :1027-1042.
- [22] Rabus R, Hansen TA, Widdel F. Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. *The Prokaryotes*, 2006 (2) :659-768.
- [23] Jonkers HM, Koh IO, Behrend P, Muyzer G, de Beer D. Aerobic organic carbon mineralization by sulfate-reducing bacteria in the oxygen saturated photic zone of a hypersaline microbial mat. *Microbial Ecology*, 2005, (49) :291-300.
- [24] Muyzer G, Stams AJ. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2008 (6) :4414-54.
- [25] Heitmann T, Goldhammer T, Beer J, Blodau C. Electron transfer of dissolved organic matter and its potential significance for anaerobic respiration in a northern bog. *Global Change Biology*, 2007 (13) :1771-1785.
- [26] Miletto M, Loy A, Antheunisse A, Loeb R, Bodelier PLE, Laanbroek HJ. Biogeography of sulfate-reducing prokaryotes in river floodplains. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64 (3) : 395-406.
- [27] Miletto M, Loeb R, Antheunisse AM, Bodelier PL, Laanbroek HJ. Response of the sulfate-reducing community to the re-establishment of estuarine conditions in two contrasting soils: a mesocosm approach. *Microbial Ecology*, 2010 (59) :1091-20.
- [28] Castro H, Reddy KR, Ogram A. Composition and function of sulfate-reducing prokaryotes in eutrophic and pristine areas of the Florida Everglades. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (12) :6129-6137.
- [29] Yang M, Li L, Li C, Li G. Microbial community structure and distribution characteristics in oil contaminated soil *Environmental Science*, 2013, 34 (2) : 789-794. (in Chinese)
- 杨萌青, 李立明, 李川, 李广贺. 石油污染土壤微生物群落结构与分布特性研究. *环境科学*, 2013, 34 (2) : 789-794.
- [30] Arshad M, Hussain S, Saleem M. Optimization of environmental parameters for biodegradation of alpha and beta endosulfan in soil slurry by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104 (2) :3643-70.
- [31] Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 微生物学. 杨博文, 等译. 第八版. 北京: 科学出版社, 2000: 873-875.
- [32] Nam JW, Nojiri H, Noguchi H, Uchimura H, Yoshida, Habe H, Yamane H, Omori T. Purification and characterization of carbazole 1, 9a-dioxygenase, a three-component dioxygenase system of *pseudomonas*

- resinovorans strain CA10. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12):5882-5890.
- [33] Lee JH, Ashby RD, Needleman D S, Lee KT, Solaiman DK. Cloning, sequencing, and characterization of lipase genes from a polyhydroxyalkanoate (PHA)-synthesizing *Pseudomonas resinovorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(4):993-1005.
- [34] Lal R, Dogra C, Malhotra S, Sharma P, Pal R. Diversity, distribution and divergence of lin genes in hexachlorocyclohexane-degrading sphingomonads. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(3):121-130.
- [35] Konno N, Habu N, Maeda I, Azuma N, Isogai A. Cellouronate (β -1, 4-linked polyglucuronate) lyase from *Brevundimonas* sp.. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 64(4):589-596.
- [36] Wu S, Wang G, Angert ER, Wang W, Li W, Zou H. Composition, Diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PLoS One*, 2012, 7(2):e30440.
- [37] Männistö MK, Kurhel E, Tirola M, Häggblom MM. Acidobacteria dominate the active bacterial communities of Arctic tundra with widely divergent winter-time snow accumulation and soil temperatures. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 84(1):47-59.
- [38] Krause S, Meima - Franke M, Hefting MM, Bodelier PL. Spatial patterns of methanotrophic communities along a hydrological gradient in a riparian wetland. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 86(1):59-70.
- [39] Tang J, Xu Q, Wang L, Ding X, Tang B, Wu I, Feng S, Sun Qun, Yang Z, Zhang J. Soil bacterial community diversity under different stages of degradation in zoige wetland. *Microbiology China*, 2011, 38(5):67-7686. (in Chinese)
唐杰, 徐青锐, 王立明, 丁祥, 汤博, 吴俐莎, 冯甦, 孙群, 杨志荣, 张杰. 若尔盖高原湿地不同退化阶段的土壤细菌多样性. *微生物学通报*, 2011, 38(5):677-686.
- [40] Bai Y, Shi Q, Wen D, Li Z, Jefferson WA, Feng C, Tang X. Bacterial communities in the sediments of Dianchi lake, a partitioned eutrophic waterbody in China. *PLoS One*, 2012, 7(5):e37796.
- [41] Shao KQ, Gao G, Qin B, Tang X, Wang Y, Chi K, Dai J. Comparing sediment bacterial communities in the macrophyte-dominated and algae-dominated areas of eutrophic Lake Taihu, China. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(4):263-272.
- [42] Gu C, Laverman AM, Pallud CE. Environmental controls on nitrogen and sulfur cycles in surficial aquatic sediments. *Frontiers in Microbiology*, 2012(3):45.
- [43] Ragab M. Distribution pattern of soil microbial population in salt-affected soils // Lieth H, Al-Masoon A A. Towards the Rational Use of High Salinity to Lerant Plants. Berlin: Springer Netherlands, 1993: 467-472.
- [44] Peralta AL, Matthews JW, Flanagan DN, Kent AD. Environmental factors at dissimilar spatial scales influence plant and microbial communities in restored. *Wetlands*, 2012, 32(6):1125-1134.
- [45] Cao YP, Green PG, Holden PA. Microbial community composition and denitrifying enzyme activities in salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(24):7585-7595.
- [46] Zhang X, Li C, Jia K, Zhang S, Shi X. Statistical analysis between heavy metals and nutrient elements in surface sediments of Wuliangshuai lake. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(9):1955-1960. (in Chinese)
张晓晶, 李畅游, 贾克力, 张生, 史小红. 乌梁素海表层沉积物重金属与营养元素含量的统计分析. *环境工程学报*, 2011, 5(9):1955-1960.
- [47] Gasol JM. Benthic flagellates and ciliates in fine freshwater sediments: Calibration of a live counting procedure and estimation of their abundances. *Microbial Ecology*, 1993, 25(3):247-262.
- [48] Williamson KE, Radosevich M, Wommack K E. Abundance and diversity of viruses in six delaware soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6):3119-3125.
- [49] Romani AM, Fischer H, Mille-Lindblom C, Tranvik LJ. Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: Differential extracellular enzyme activities. *Ecology*, 2006, 87(10):2559-2569.

Bacterial diversity in littoral wetland of Wuliangshuai lake

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

¹ College of Life Sciences; ² College of Environment & Resources; ³ Inner Mongolia Key Laboratory of Environmental Pollution Control & Waste Resource Reuse, 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 Hui Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to analyze the bacterial diversity of land-water transition zone in littoral wetland of Wuliangshuai Lake, and to study the effect of eutrophic substrate on the bacterial composition. [Methods] The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) with PCR-amplified 16S rDNA fragments was used to determine bacterial diversity, and the ordination technique of canonical correspondence analysis (CCA) was used to evaluate its effects on bacterial community composition. [Results] DGGE result shows that the microbial quantity decreased gradually from eutrophic lake sediment to desert soil. Diversity index analysis shows that the Shannon-Wiener index (H), Evenness index (E), richness index (S) and Simpson index (D_s) decreased gradually from water to land (eutrophic lake sediment > swamp sediment > saline soil > desert soil). Based on the sequencing results, there are 3 phyla in 4 samples, including Proteobacteria (78.6%), Acidobacteria (7.1%), Bacteroidetes (14.3%), Proteobacteria (52.6%) were dominant species, in which the Epsilon proteobacteria were predominant subgroup. The results of CCA suggest that that $\text{NH}_4 + \text{-N}$, total nitrogen, organic carbon, total soluble salt, Cl^- and $\text{K} +$ have most significant influenced the distribution of bands related species. [Conclusion] The bacterial community structure of transition zone in Wuliangshuai wetland differed significantly, and eutrophic relative factors had a strong impact on the bacterial community structure. This work presented a certain reference for the preliminary understanding of the bacterial composition and diversity and provided a scientific foundation for the research of spatial heterogeneity in this transition zone.

Keywords: Wuliangshuai wetland, eutrophic lake, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), bacterial diversity, community structure

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31160129) and by the State Key Development Program of Basic Research of China (2009CB125909)

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

Received: 29 December 2013 / Revised: 20 March 2014