

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (5) :616 - 626; 4 May 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140477

肇庆星湖湿地放线菌多样性

薛冬^{1,2,3}, 赵国振¹, 赵海泉², 姚青³, 朱红惠^{1*}

¹广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070

²安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 210095

³华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642

摘要: 【目的】了解肇庆星湖湿地放线菌多样性及其与底泥理化性质的关系。【方法】应用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-density gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 技术对星湖湿地 10 个样点放线菌群落进行研究, 根据 DGGE 图谱及克隆测序结果对其物种多样性进行分析, 并结合样点理化性质对其空间分布特征进行分析。【结果】通过 PCR-DGGE 指纹图谱发现各样品放线菌物种丰富度 (S)、多样性指数 (H') 和均匀度指数 (J') 均有所不同。对不同样点放线菌群落相似性进行比较, 发现它们的相似性系数存在着一定的关系, 相邻样点间相似性较高。对 DGGE 优势条带进行回收、克隆、测序, 显示优势类群主要分布于类诺卡氏菌科 (Nocardioideae)、链霉菌科 (Streptomycetaceae)、小单孢菌科 (Micromonosporaceae)、微球菌科 (Micrococaceae)、纤维素单胞菌科 (Cellulomonadaceae) 和原小单孢菌科 (Promicromonosporaceae)。典型对应分析结果表明, 星湖湿地放线菌群落结构变化的主要影响因子为底泥水溶性碳 (WSOC) 和速效磷 (A-P)。【结论】肇庆星湖湿地蕴含着大量的放线菌资源, 具有较高的物种多样性, 需要进一步挖掘这些新资源。

关键词: 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳, 放线菌群落, 典型对应分析

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 05-0616-11

具有“地球之肾”美誉的湿地, 和森林、海洋组成了地球三大生态系统, 全球湿地面积 570 万平方公里, 约占陆地面积的 6%, 但却为地球上 20% 的物种提供了生存环境^[1], 具有不可替代的生态功能。健康的湿地生态系统, 是国家生态安全体系的重要组成部分, 也是实现经济与社会可持续发展的重要基础。

湿地是位于陆生生态系统和水生生态系统之间的过渡性地带, 其土壤常年浸泡在水体之中, 具有独特生态功能, 研究显示生存于湿地的微生物数量庞大而又不失特色^[2], 并且放线菌作为一个重要类群广泛存在于多种湿地环境中^[3-4]。截至 2010 年, 已有 33500 多种微生物产生的活性物质被报道, 其中约有 13700 种是由放线菌产生^[5], 可见, 放线菌依然

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31300011); 广东省科技基础条件建设项目 (2013B060400043); 广东省科学院优秀青年科技人才基金项目 (rcj201301); 广东省微生物研究所南粤微生物优秀人才培养基金项目

* 通信作者。Tel: +86-20-87686803; Fax: +86-20-37656628; E-mail: zhuhh@gdim.cn

作者简介: 薛冬 (1991 -), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物多样性研究。E-mail: xue_dong_kevin@126.com

收稿日期: 2014-10-09; **修回日期:** 2014-12-10

是目前开发微生物药物潜力最大的一类菌种资源。面对数量庞大的微生物,利用传统的微生物纯培养研究方法,不能全面地反应样点微生物群落特征,容易遗漏大量不可培养微生物的群落特征信息。因此采用免培养技术,直接从土壤中提取总 DNA,分析其 16S rRNA 的序列多态性,从而反映微生物种群组成,可以有效克服传统纯培养研究方法的不足,揭示更加客观真实的微生物群落组成特征。

位于广东省肇庆市的星湖湿地公园,现有湖泊面积 650 多公顷,湿地岩溶地貌景观独特,湖中有七座溶岩山峰错落分布,是我国亚热带最具典型性和代表性的岩溶湖泊湿地。关于星湖生态系统研究始于 1996 年张琦等对星湖浮游生物进行的初步研究^[6];近年来随着旅游业的迅速发展,星湖水质受到越来越多的关注,陈学年和郭玉娟对星湖水生植被演化与水环境的关系进行了探讨^[7];陈学年等对星湖鱼类区系及其特点展开了详细的调查^[8];但目前有关星湖湿地放线菌群落研究未见报道。

本研究以星湖湿地底泥为研究对象,采用 PCR-DGGE 指纹图谱技术分析底泥放线菌物种多样性及其空间分布特征;并结合样品理化数据,采用典型对应分析方法(Canonical correspondence analysis, CCA)开展二者关系探讨;以期为我们认知星湖湿地底泥放线菌群落分布特征及其影响因素提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 样品的采集

于 2013 年 10 月,从广东肇庆星湖湿地湖心及周围湖盆 10 个样点使用自制柱状采样器采取底泥样品(样点地理位置如图 1 所示),其中 1 号取样点位于居民区附近,8 号样点位于季节性湖泊。取样深度为 50 cm - 150 cm,样品采集后装于无菌采样袋,运抵实验室后分别保存在 4℃ 和 -20℃ 冰箱。



图 1. 样点地理位置信息

Figure 1. Geographic information of the sampling sites.

1.2 样品理化性质分析

样品 pH 值采用便携式 pH 计 PHS-3C(上海)进

行测定,水土比为 2.5 : 1,振荡 30 min 后测定 pH 值。

有机碳 (TOC) 和水溶性碳 (WSOC) 的测定采用重铬酸钾外加热法, 然后使用全自动 C/N/S Vario EL/micro cube 元素分析仪 (德国 Elementar 公司) 进行测定; 速效钾 (A-K) 采用浸提-火焰光度法进行测定^[9]。

碱解氮 (A-N) 的测定采用碱解扩散法^[10] 进行测定; 速效磷 (A-P) 采用盐酸氟化铵浸提-钼锑抗比色法^[11] 进行测定。

1.3 样品总 DNA 提取及放线菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增

样品总 DNA 提取采用 HiPure Soil DNA Kits (Magen) 进行提取、纯化。

PCR 扩增首先采用 27F/1492R^[12] 引物进行, 50 μL PCR 反应体系: 1 × Buffer (含 2.0 mmol/L MgCl₂), dNTP 200 μmol/L, 引物各 0.2 μmol/L, Taq 酶 2.5 U, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 补足 50 μL。扩增程序: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 90 s, 循环 35 次; 72℃ 10 min。上述扩增产物稀释 50 倍作为第二次扩增的模板, 引物使用放线菌特异性引物 S-C-Act-0235-a-S-20/S-CAct-0878-a-A-19^[13], 将 GC 夹子加入到正向引物用于 DGGE 分析^[14]。50 μL PCR 反应体系: 1 × Buffer (含 2.0 mmol/L MgCl₂), dNTP 200 μmol/L, 引物各 0.2 μmol/L, Taq 酶 2.5 U, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 补足 50 μL; 扩增程序: 95℃ 5 min; 94℃ 1 min, 58℃ 45 s, 72℃ 1 min, 循环 35 次; 72℃ 10 min, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 扩增产物的 DGGE 分析及克隆测序

采用 Bio-Rad 公司的 D-Code 突变检测系统对样品进行 DGGE 分析。

使用梯度胶制备装置, 制备变性剂浓度从 45% 到 70% (100% 的变性剂为 7 mol/L 尿素, 40% 去离子甲酰胺混合物) 的聚丙烯酰胺凝胶 8% (丙稀酰胺: 双丙稀酰胺 = 37.5:1)。待胶完全凝固后, 点样, 70V 恒定电压下, 60℃ 恒温, 电泳 14 h。电泳完毕后, 用超纯水冲洗胶, 然后将胶放进含 1% Goldview 的染液中, 置于摇床染色 30 min 后, 使用 Gel Doc EQ (Bio-Rad Laboratories, USA) 全自动多功能凝胶成像分析系统分析样品电泳条带并拍照。

选取代表性条带 (图 2 所示), 用洁净手术刀将目标条带完整的切下并装入 1.5 mL 离心管中, 备用。DGGE 条带中目标 DNA 的回收参照分子克隆

实验指南 2 版^[15]: 用 ddH₂O 漂洗切胶条带 1 次, 后加入 50 μL ddH₂O, 用枪头将凝胶压碎, 于 4℃ 存放过夜, 以浸泡液为模板进行 PCR 扩增 (所用引物 S-C-Act-0235-a-S-20/S-CAct-0878-a-A-19, 不含 GC 夹子), 扩增程序同上。纯化后的 PCR 产物与 pUCm-T 载体 (上海生工) 连接, 并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 挑取阳性克隆子送华大生物技术有限公司进行测序。

序列经 NCBI 在线工具 VecScreen 去除载体序列后, 将有效序列在 NCBI 数据库中进行比对, 将同源性最高序列定为参照菌株, 相似性 ≥ 97% 的序列视为同一序列型 (sequence type), 使用 Mega 5.0 软件进行序列比对, 比对采用 Kimura 2-parameter model 模型计算进化距离, 邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统进化树, 同时运用最大似然法和最大简约法构建系统树进行系统进化树稳定性检验。

1.5 DGGE 图谱分析及 CCA 分析

采用 Quantity One 分析软件分析电泳条带的数目及亮度, 评估不同样品放线菌群落多样性和丰富度。

用 Sorenson 配对比较相似性系数 (pairwise similarity coefficient, Cs), 比较不同样品 DGGE 指纹图谱的相似性。

$C_s = 2j / (a + b)$ 。其中 a、b 表示两个比较对象中的 DNA 条带数目, j 表示 a 和 b 中相同的条带数量。

Shannon-Wiener 多样性指数 (H'), 物种丰度 (S), Simpson 指数 (D), Pielou 均匀度指数 (J') 被用来比较各个样品的细菌多样性, 性指数 (H') 主要基于物种数量反映生态环境中的物种多样性, 均匀度指数 (J') 反映物种的分配情况。公式如下:

$$H' = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

$$D = 1 / \sum_{i=1}^s (P_i)^2$$

$$J' = - \sum_{i=1}^s (P_i \ln P_i) / \ln S = H' / \ln S$$

其中, P_i 是某个样品中单一条带的强度在该样品中的所有条带总强度中所占的比率, S 是某个样品中所有条带数目总和。

采用 CANOCO for windows (V4.5) 软件 (Microcomputer Power, USA) 分析样品理化因子与放线菌群落结构变化的相关性。

2 结果和分析

2.1 样品理化性质测定

样品理化性质如表 1 所示。沉积物的 WSOC 含量和 TOC 含量呈正相关 ($R = 0.997, P = 0.000$)；碱解氮的含量在 3 号样品达到最大 (243.6 mg/kg)，在 9 号样品最低 (33.6 mg/kg)，A-N 在空间排布上

无明显规律，相邻样点间差距较小。对理化性质使用 SPSS 21.0 进行主成分分析 (PCA) 得出结果如图 2 所示。PCA 分析结果显示样品 1-7 和 10 聚集在一起，表明其具有一定的相似性；而样品 8 和样品 9 各分散在一边。PCA 分析中 PC1 (90.28%) 和 PC2 (8.02%) 累计方差贡献为 98.30%，能反映样本的大部分信息，表明通过 PCA 分析可以较好的比较不同样品理化因子分布特征。

表 1. 理化因子分布特征

Table 1. Physicochemical factors of Xinghu Wetland

Sample	pH	$c(\text{TOC}) /$ (g/kg)	$c(\text{WSOC}) /$ (mg/kg)	$c(\text{A-N}) /$ (mg/kg)	$c(\text{A-P}) /$ (mg/kg)	$c(\text{A-K}) /$ (mg/kg)
1	7.52	6.96	55.97	45.20	5.23	41.10
2	7.27	20.38	159.31	202.20	1.55	130.20
3	7.20	23.63	193.76	243.60	1.72	73.20
4	6.95	22.07	176.54	171.00	2.46	79.80
5	7.52	30.34	223.90	175.80	2.43	114.00
6	7.80	17.62	99.03	95.60	2.73	73.70
7	7.70	9.13	81.81	88.40	2.23	44.90
8	7.32	4.22	38.75	190.50	2.13	92.70
9	5.73	16.41	81.81	33.60	4.96	46.90
10	6.64	19.85	116.25	99.00	3.85	59.80

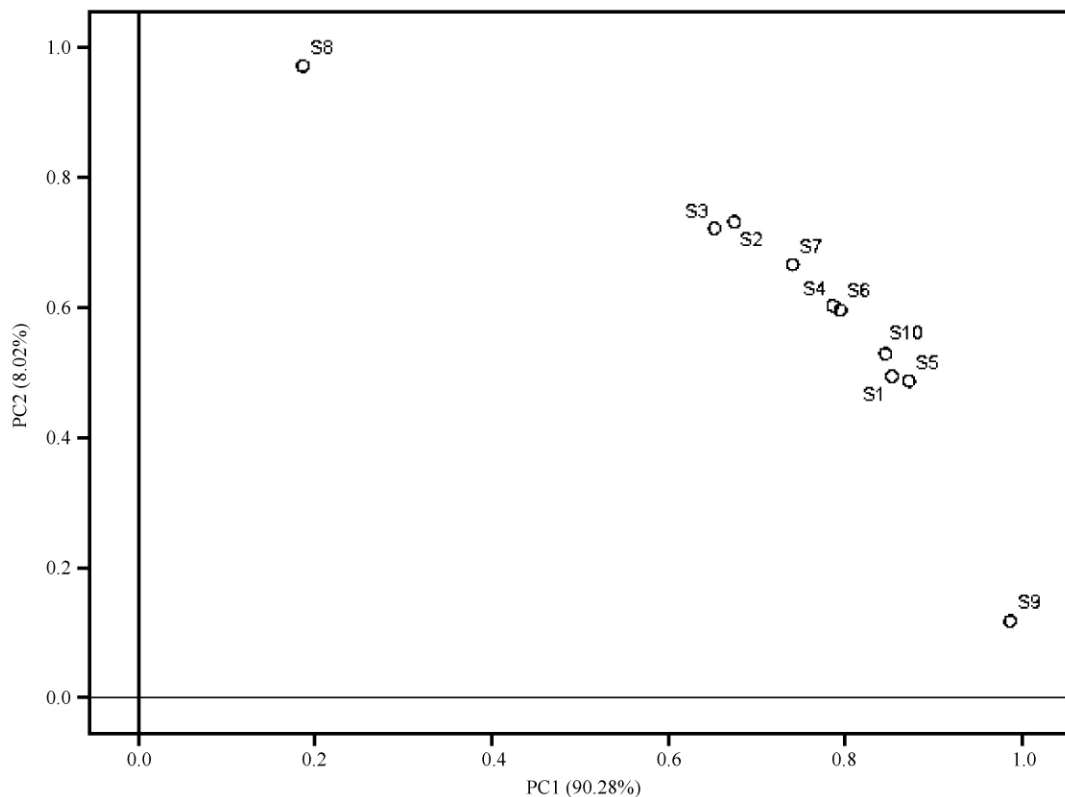


图 2. 理化性质 PCA 分析

Figure 2. PCA analysis of physical and chemical properties.

2.2 湿地样品 PCR-DGGE 图谱分析

对湿地样品的 PCR 产物进行 DGGE 分析, 结果如图 3 所示。各样品 PCR 产物经 DGGE 分离后共得到 49 条不同位置的条带, 每个样品可分离到 11 -

24 个放线菌条带, 其中条带数目最少的是 6 号样品 (11 条), 最多的是 8 号样品 (24 条)。从模拟图中可以看出, 10 个样品有 3 个共有条带, 编号分别为 26、38、45, 对应切胶的条带分别是 B19、B31、B34。

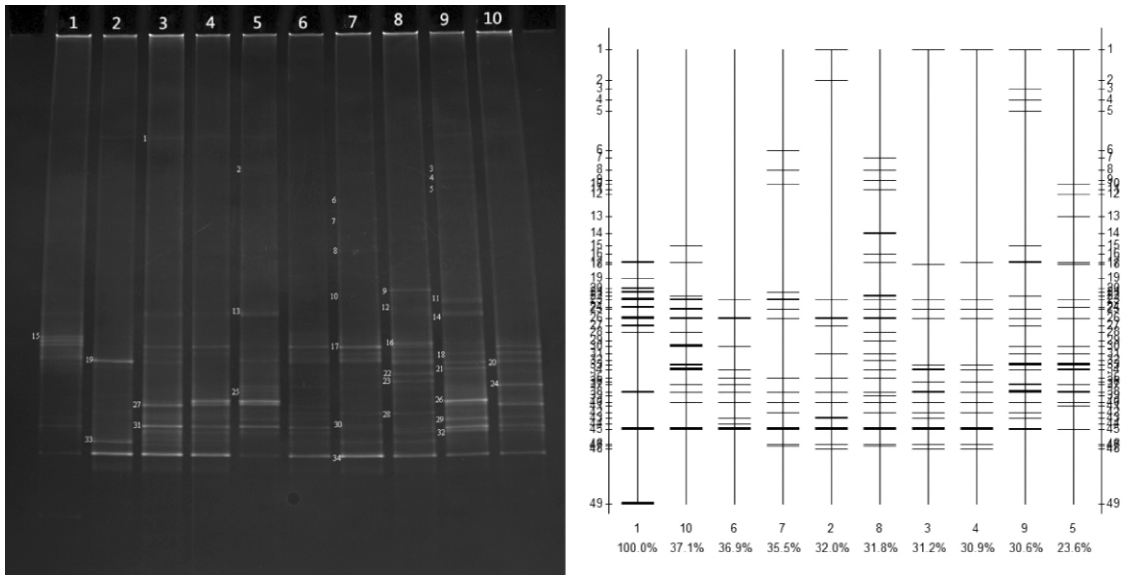


图 3. 湿地底泥不同样点放线菌 DGGE 指纹图谱

Figure 3. The actinobacterial DGGE fingerprints of Wetland sediments at different stations. A: DGGE picture; B: DGGE bands simulation diagram, the percentage is the degree of similarity based on the first lane as the standards.

本研究对各样品的 S 、 H' 和 J' 等进行了综合分析, 结果如表 2 所示。不同样品 H' 和 J' 值存在差异, 其中, 8 号样品的多样性指数最高, 指数为 2.66, 2 号样品最低, 指数为 1.81; 丰富度指数 8 号样品最高为 24, 6 号样品最低为 11; 均匀度 1 号样品最高为 0.97, 2 号样品均匀度最低为 0.71。

表 2. 样品的物种丰富度 (S)、多样性指数 (H') 和均匀度指数 (J')

Table 2. Richness (S), Shannon-wiener Index (H') and Evenness (J')

Sample	H'	D	J'	S
1	2.42	0.90	0.97	12
2	1.81	0.76	0.71	13
3	2.19	0.83	0.81	15
4	2.01	0.79	0.76	14
5	2.39	0.87	0.83	18
6	1.85	0.79	0.77	11
7	1.97	0.78	0.75	14
8	2.66	0.90	0.84	24
9	2.61	0.91	0.87	20
10	2.36	0.89	0.89	14

2.3 湿地各样点底泥放线菌群落结构相似性 (C_s) 分析

在 DGGE 指纹图谱中, 不同样品共有条带数目的多少, 可以反映不同样品之间放线菌群落相似性。通过计算群落相似性系数可以得到群落之间放线菌种类差异的信息, 表 3 列出了不同样品之间共有条带数和相似性结果。从表中可以看出, 各样品间的放线菌群落相似性系数不尽相同, 3 号样品和 4 号样品的相似度最高, 达 77.7%, 说明这两个样品的微生物群落结构相似程度比较高, 而 5 号样品和 8 号样品的相似度最低, 为 18.2%。通过 UPGMA 算法对不同样点放线菌群落结构相似性进行聚类分析, 结果如图 4 所示, 由图可知当 C_s 小于 0.4 时, 底泥样品分为 3 大族: 1 号样品单独为一族, 5、9 和 10 号样品为第二族, 其余样品为第三族。不同样品比较, 相邻样品放线菌群落相似性较高, 聚类位置相近。

表 3. 样品的相似性系数分析及共有条带数

Table 3. Similarity coefficient of actinobacterial community in Xinghu Wetland sediments at different stations

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		5	4	5	6	4	4	6	5	5
2	0.320		9	8	7	6	7	8	9	5
3	0.312	0.502		12	9	6	8	9	9	8
4	0.309	0.468	0.777		9	7	8	10	10	9
5	0.236	0.200	0.497	0.405		8	6	8	10	10
6	0.369	0.605	0.658	0.629	0.387		6	7	7	8
7	0.355	0.570	0.523	0.572	0.216	0.664		11	6	6
8	0.318	0.474	0.403	0.445	0.182	0.521	0.525		10	10
9	0.306	0.260	0.411	0.384	0.668	0.381	0.227	0.259		11
10	0.371	0.321	0.456	0.427	0.430	0.514	0.362	0.412	0.444	

The lower left half is similarity coefficient, the upper right half is the total number of bands.

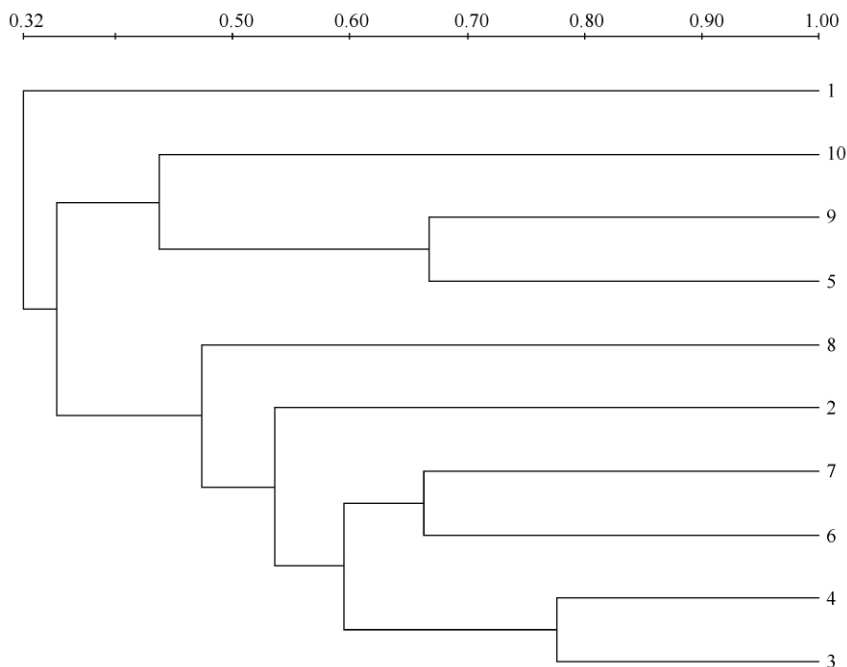


图 4. 湿地各样点底泥样品细菌群落结构相似性的聚类分析

Figure 4. Cluster analysis of Wetland sediments actinobacterial community composition at different stations.

2.4 DGGE 条带基因片段的克隆测序及系统进化发育分析

在 DGGE 条带中,选取其中 34 个强度较亮的主条带(如图 3)进行切胶回收、PCR 扩增和克隆测序,测序的结果在 NCBI 去载体后,在数据库中用 BLAST 进行检索和进行同源性比较。从 DGGE 图谱中主条带的测序结果可以确定条带所代表的菌群分类地位,34 条优势带的基因片段序列与 GeneBank 中细菌序列相似性如表 4 所示,从这些 DGGE 带谱所代表的微生物种类可以确定不同湿地底泥中所含细菌群落的优势菌群的组成。采用邻接法 (Neighbour-joining) 构建系统进化树如图 5。从 DGGE 条带克隆测序分析得到 6 个科 9 个属的类

群,这 6 个科为链霉菌科 (Streptomycetaceae)、小单孢菌科 (Micromonosporaceae)、类诺卡氏菌科 (Nocardiodaceae)、微球菌科 (Micrococaceae)、纤维素单胞菌科 (Cellulomonadaceae) 和原小单胞菌科 (Promicromonosporaceae); 9 个属为链霉菌属 (*Streptomyces*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*)、大理石雕菌属 (*Marmoricola*)、纤维杆菌属 (*Cellulomonas*)、白蚁菌属 (*Isoptericola*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、浮游放线菌属 (*Actinoplanes*)、多形态孢菌属 (*Polymorphospora*)。在 34 条带中,链霉菌属占据了主要地位(占 50.0%),其次是小单孢菌属(占 14.7%)、拟诺卡氏菌属(11.76%)。其中在 8 号样

品中含有的稀有属最多,其中节杆菌属、浮游放线菌属、纤维杆菌属为其特有。系统发育树聚为四大族,其中微球菌科(Micrococaceae)、纤维素单胞菌科(Cellulomonadaceae)和原小单胞菌科(Promicromonosporaceae)聚在一个大族,它们都属于微球菌亚目(Micrococccineae)。

表 4. DGGE 优势条带克隆基因片段序列的比对结果

Table 4. Alignment of DGGE sequenced clone to its most-similar GenBank sequence

Band	Closest match	Similarity /%
B1	<i>Nocardioides dubius</i>	96
B2	<i>Streptomyces parvulus</i>	99
B3	<i>Streptomyces wuyuanensis</i>	99
B4	<i>Streptomyces glaucescens</i>	99
B5	<i>Streptomyces lannensis</i>	97
B6	<i>Nocardioides mesophilus</i>	99
B7	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	98
B8	<i>Marmoricola bigeumensis</i>	98
B9	<i>Arthrobacter equi</i>	99
B10	<i>Nocardioides mesophilus</i>	98
B11	<i>Streptomyces coerulescens</i>	99
B12	<i>Actinoplanes ferrugineus</i>	99
B13	<i>Streptomyces levis</i>	100
B14	<i>Streptomyces coerulescens</i>	99
B15	<i>Marmoricola bigeumensis</i>	98
B16	<i>Marmoricola bigeumensis</i>	98
B17	<i>Nocardioides mesophilus</i>	98
B18	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	99
B19	<i>Streptomyces guanduensis</i>	98
B20	<i>Streptomyces artemisiae</i>	98
B21	<i>Streptomyces chartreusis</i>	99
B22	<i>Cellulomonas denverensis</i>	96
B23	<i>Isoptericola hypogeus</i>	99
B24	<i>Streptomyces mahuensis</i>	96
B25	<i>Streptomyces parvulus</i>	99
B26	<i>Streptomyces minutiscleroticus</i>	98
B27	<i>Streptomyces caelestis</i>	99
B28	<i>Streptomyces cyaneus</i>	99
B29	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	97
B30	<i>Polymorphospora rubra</i>	99
B31	<i>Streptomyces chartreusis</i>	100
B32	<i>Streptomyces carpinensis</i>	99
B33	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	100
B34	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	99

2.5 放线菌群落结构与环境因子之间关系

使用 CANOCO4.5 软件对放线菌群落多样性指数与样品物种之间的相关性进行典型对应分析(CCA),典型对应分析的结果显示(如表 5),4 个排序轴中 AX1 的特征值最大(0.478);同时 AX1 轴反映的放线菌群落结构组成与环境特征参数的相关系数最高(0.996),放线菌群落结构组成与环境特征参数的累计变化率达到 32.3%。总体上,放线菌群

落结构组成在 4 个轴的累计变化率 85%,表明底泥放线菌群落组成与环境因子变化具有较好的相关性。CCA 分析得到的双标图如图 6 所示。环境因子用箭头表示,箭头所处的象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性,箭头连线长度代表该环境因子与样本分布相关程度的大小,而箭头连线间的夹角代表环境因子间的相关性大小。WSOC、A-P 及 TOC 是影响放线菌群落主导环境因子,相比较 pH 的影响相对较小。样品 2、3、4、6、7 聚在一起;样品 1、5、9、10 聚为一类;样品 8 单独一类。

3 讨论

本研究首次通过 PCR-DGGE 技术分析了星湖湿地底泥放线菌物种多样性分布特征,通过对不同样品的 DGGE 图谱分析,其不同样品中均含有 11 - 24 条特异性条带(图 3),说明在星湖湿地底泥中放线菌群落多样性较高。其中 8 号样品含有 24 条特异性条带,可能的原因是 8 号样点在水陆交错地,大量的陆生微生物冲刷沉降到底泥中;其次 8 号采样地有大量的水杉,其根系代谢活动的产物有利于微生物的群落活动;同时其落叶也为微生物提供了很大的营养促使微生物群落结构复杂和物种多样性较高,这与 Stottmeister 等^[16-18]的研究结果一致。

DGGE 指纹图谱能够直观地反映湿地底泥放线菌组成成份的变化,但如果想要进一步了解放线菌群落结构的组成,就需要对 DGGE 条带进行切胶回收测序。通过对湿地底泥放线菌各样品 DGGE 的优势条带进行克隆测序,这些条带序列对应的同源性最高的放线菌群分别属于这 6 个科分别为链霉菌科、小单胞菌科、类诺卡氏菌科、微球菌科、纤维素单胞菌科、原小单胞菌科,其中链霉菌科和小单胞菌科在淡水湖泊环境中是优势种,与之前报道的相一致^[19]。这也为今后对湿地可培养放线菌提供了分离依据,通过设计适当的培养方法对高频率出现的菌株进行抑制,从而更好的挖掘发现新资源。

水生生态系统中放线菌作为沉积物细菌群落重要组成部分,环境因子对其群落结构变化有着重要影响^[20]。本研究中其理化性质,除 9 号样品外,样品 pH 总体中性偏碱,这与之前报道的星湖湿地理化性质相符^[21]。根据对 DGGE 每个条带的相对含量计算得到的放线菌群落香农多样性指数在空间位

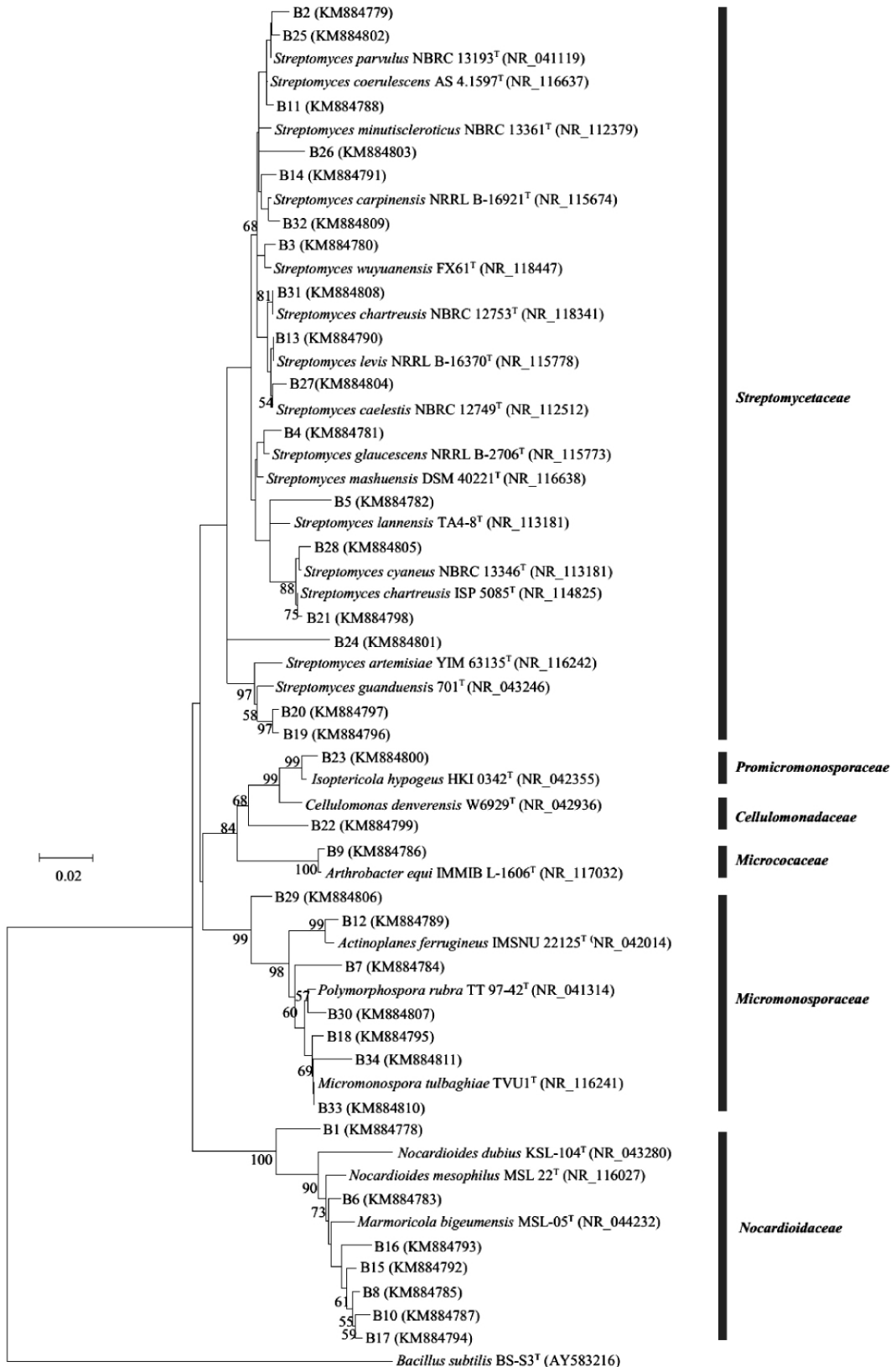


图 5. 放线菌克隆序列进化树

Figure 5. Phylogenetic tree of the clone bands and their relatives in *Actinobacteria* of the domain Bacteria. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in Genbank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The sequence of *Bacillus subtilis* BS-S3^T was used as the outgroup. Bar, 2% sequence divergence.

表 5. 星湖湿地放线菌群落 CCA 分析统计信息

Table 5. Summary statistics for the four axes of CCA performed on actinobacterial community of Xinghu Wetland

Axes	1	2	3	4
Eigenvalues	0.478	0.359	0.264	0.156
Species-environment correlations	0.996	0.987	0.923	0.887
Cumulative percentage variance of species-environment relation	32.3	56.6	74.4	85.0

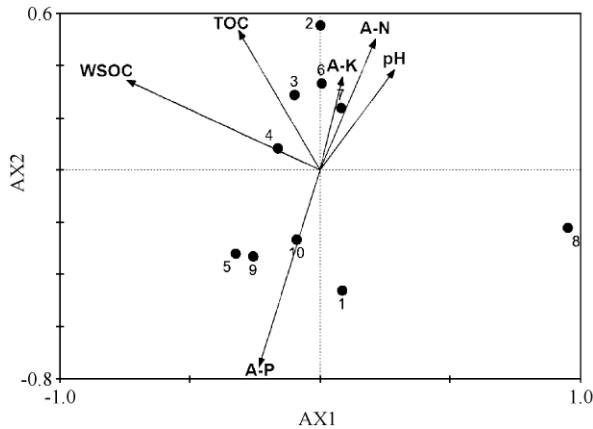


图 6. 理化数据与放线菌群落结构变化的典型对应分析

Figure 6. Results from the CCA of physicochemical parameters constrained to actinobacterial community composition.

置上也不具明显的变化趋势(如表 2),整体表现为样点距离近的样品间群落差异小(如图 4)。然而通过 UPGMA 算法及 CCA 分析对不同样点放线菌群落结构相似性进行聚类分析发现放线菌群落在空间分布上还是存在明显的演替格局。5 号样点和 6、7 号样点相离较远,通过分析其理化性质差距较大,导致理化性质差距大可能由于 5 号采样点处于宾馆附近。然而 5 号样点和 9 号样点聚在一起,通过分析其样点位置极其理化性质都不相近,笔者猜测可能是由于环境因子等互作产生相似的微生物群落,具体还有待下一步研究。

近年来,很多学者对星湖湿地水质及其水生动植物进行了大量的研究。陈光荣等人的调查表明星湖水体呈富营养化^[22];孔义军等也证实了星湖湿地公园水质趋于富营养化^[23]。一般认为,微生物在治理水体富营养化具有不容忽视的作用^[24]。放线菌是水体中广泛分布的优势微生物种群,可能在水体富营养化修复中具有重要作用。早在 1962 年, Safferman 等发现 213 株放线菌中的 90% 对蓝藻具有强烈的溶藻活性^[25]; Choi 等筛选到一株放线菌 (*S. neyagawaensis*) 可以有效抑制在水华的发生^[26]。郑小伟等筛选到一株具有溶藻活性的灭毒素链霉菌,此链霉菌不仅对球形棕囊藻具有强烈的溶藻活性,还对盐

生杜氏藻和自养小球藻不同程度的抑制作用^[27]。本文对星湖湿地放线菌多样性进行的初步研究表明, WSOC、A-P 及 TOC 是影响放线菌群落的主要环境因子^[28]。因此,关于星湖湿地水体放线菌与湿地水体富营养化的关系还有待进一步的研究。

致谢:感谢肇庆星湖风景名胜区管理处为我们采集样品提供的无私帮助与支持。

参考文献

- [1] Wang Y, Jia L. Study on the evaluation index system and methods in the key area of ecological protection. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36 (9): 3863-3864. (in Chinese)
王莹,贾良清. 生态保护关键区评价指标体系与方法研究——以安徽省为例. *安徽农业科学*, 2008, 36 (9): 3863-3864.
- [2] Douterelo I, Goulder R, Lillie M. Soil microbial community response to land-management and depth, related to the degradation of organic matter in English wetlands: Implications for the in situ preservation of archaeological remains. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44: 219-227.
- [3] He J, Zhang D, Xu Y, Zhang X, Tang S, Xu L, Li W. Diversity and bioactivities of culturable marine actinobacteria isolated from mangrove sediment in Indian Ocean. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (10): 1195-1202. (in Chinese)
何洁,张道锋,徐盈,张晓梅,唐蜀昆,徐丽华,李文均. 印度洋红树林沉积物可培养海洋放线菌多样性及其活性. *微生物学报*, 2012, 52 (10): 1195-1202.
- [4] Svetlana N. Dedysh. Cultivating uncultured bacteria from northern wetlands: knowledge gained and remaining gaps. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 1-15.
- [5] Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 2012, 65: 385-395.
- [6] Zhang Q, Chen J, Ji S. Studies on planktonic rotifers and its relationship with water quality in Xing Lake, Zhaoqing City, Guangdong Province. *Ecologic Science*, 1997, 16

- (2): 27-31. (in Chinese)
- 张琦,陈菊芳,杞桑. 广东肇庆星湖浮游动物轮虫的调查及其与水质关系的研究. *生态科学*, 1997, 16(2): 27-31.
- [7] Chen X, Guo Y. Succession of aquatic vegetation in Lake Xiannv of Lake Xinghu, Zhaoqing City, Guangdong Province. *Journal of Lake Science*, 2005, 17(4): 334-339. (in Chinese)
- 陈学年,郭玉娟. 广东星湖仙女湖区水生植物的演变. *湖泊科学*, 2005, 17(4): 334-339.
- [8] Chen X, Guo Y, Wu G. Fish fauna and characteristic of Xinghu Lake in Guangdong. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(1): 29-33. (in Chinese)
- 陈学年,郭玉娟,吴国华. 广东星湖鱼类区系及其特点. *水生态学杂志*, 2010, 3(1): 29-33.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 1999, 30-109.
- [10] Guo B, Zhang L, Wang H, Yang A, Wang D, Qi Z. Comparison of two methods for mensurating soil hydrolysis nitrogen. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2007, 27(2): 40-43. (in Chinese)
- 郭彬,张黎明,王华,杨安福,王汀忠,漆智平. 两种测定土壤水解性氮的方法比较. *热带农业科学*, 2007, 27(2): 40-43.
- [11] Ye X, Tong J, Zhao Z. Detection of soil available phosphorus content by flow injection analysis method and Mo-Sb antispetrophotography method. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2011, 15(1): 160-164. (in Chinese)
- 叶祥盛,童军,赵竹青. 流动注射分析法与钼锑抗比色法分析土壤有效磷含量的比较. *河北农业科学*, 2011, 15(1): 160-164.
- [12] Wang J, Wu Y, Jiang H, Li C, Dong H, Wu Q, Soininen J, Shen J. High beta diversity of bacteria in the shallow terrestrial subsurface. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(10): 2537-2549.
- [13] Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 828-841.
- [14] Stevens H, Brinkhoff T, Rink B, Vollmers J, Simon M. Diversity and abundance of Gram positive bacteria in a tidal flat ecosystem. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(7): 1810-1822.
- [15] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 第3版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002: 426-429.
- [16] Wießner SU, Kusch A, Kappelmeyer P, Kästner U, Bederski M, Müller O, Moormann RA. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for waste water treatment. *Biotechnology Advances*, 2003, 22: 93-117.
- [17] Tanner CC. Plants as ecosystem engineers in subsurface flow treatment wetlands. *Water Science and Technology*, 2001, 44(11-12): 9-17.
- [18] Vacca G, Wand H, Nikolausz M, Kusch P, Kästner M. Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands. *Water Research*, 2005, 39(7): 1361-1373.
- [19] Jiang C, Xu L. Studies on actinomycete flora and resources in the plateau lakes in Yunnan. *Acta Microbiologica Sinica*, 1989, 29: 7-14. (in Chinese)
- 姜成林,徐丽华. 云南高原湖泊放线菌区系及资源的研究. *微生物学报*, 1989, 29: 7-14.
- [20] Zhang Y, Shen J, Wang J, Zhang S. Phylogenetic diversity and spatial heterogeneity of Actinobacteria communities in the surface sediments of the East Taihu Lake. *Ecological Science*, 2011, 30(1): 8-13. (in Chinese)
- 张勇,沈吉,王建军,张盛周. 东太湖表层沉积物放线菌群落结构多样性及其空间异质性. *生态科学*, 2011, 30(1): 8-13.
- [21] Zhu X, Pu Z. A factor analysis of the chemical characteristics of the water in Xinghu Lake. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2005, 1: 6-10. (in Chinese)
- 朱小娟,普智晓. 星湖水环境化学特征的主因子分析. *海洋湖沼通报*, 2005, 1: 6-10.
- [22] Chen G, Lei Z, Tan Z, Kang Y, Liu Z. Community characteristics of metazoan zooplankton in urban lakes of Guangdong province. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, 2010, 23(2): 5-10. (in Chinese)
- 陈光荣,雷泽湘,谭镇,康玉辉,刘正文. 广东省城市湖泊后生浮游动物的群落特征. *仲恺农业工程学院学报*, 2010, 23(2): 5-10.
- [23] Kong Y, Yang H, Lin S, Lei L, Han B. Eutrophication and phytoplankton community structure of Xinghu Lake, a shallow urban lake in south China. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2009, 15(2): 153-160. (in Chinese)
- 孔义军,杨浩文,林少君,雷腊梅,韩博平. 南亚热带城市浅水湖泊富营养化与浮游植物群落的时空特征: 以肇庆星湖为例. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(2): 153-160.
- [24] Zheng H, Zhou Q. Function of microorganism in bioremediation of eutrophic water. *Chinese Journal of Eco-*

Agriculture, 2009, 17 (1) : 197-202. (in Chinese)

郑焕春,周青.微生物在富营养化水体生物修复中的作用.中国生态农业学报,2009,17(1):197-202.

- [25] Safferman RS, Morris ME. Evaluation of natural products for algicidal properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 1962, 10 (4) : 289-292.
- [26] Choi H, Kim B, Kim J. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters. *Biological Control*, 2005, 33 (3) : 335-343.
- [27] Zheng X, Huang L, Zhang B, Zhang J, Yang X, Zheng T. Isolation and identification of a high algicidal

Actinomycete. *Journal of Xiamen University*, 2012, 51 (1) : 923-928. (in Chinese)

郑小伟,黄丽萍,张帮周,张金龙,杨小茹,郑天凌.一株高效抑藻放线菌的分离筛选及鉴定.厦门大学学报,2012,51(1):923-928.

- [28] Gao H, Liu L, Fang Z. Physicochemical properties and microbial diversity of superficial deposits of lakes in summer. *Journal of Hehai University*, 2011, 39 (4) : 361-366. (in Chinese)
- 高慧琴,刘凌,方泽建.夏季湖泊表层沉积物的理化性质与微生物多样性.河海大学学报,2011,39(4):361-366.

Actinobacterial diversity in Xinghu Wetland

Dong Xue^{1,2,3}, Guozhen Zhao¹, Haiquan Zhao², Qing Yao³, Honghui Zhu^{1*}

¹Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry-Province Joint Development), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology Guangzhou, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

²College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 210095, Anhui Province, China

³College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] The purpose of this study was to examine the relationship between the microbial community structure of soil actinomycetes and geochemical characteristics in Xinghu wetland sediments. [Methods] The diversity and composition of the actinobacterial community in sediments collected from 10 locations were studied using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Canonical correspondence analysis was carried out to examine the relationship between environmental variables and actinobacterial community composition. [Result] There were significant differences among the Shannon-wiener index, Richness and Evenness. Similarity analysis of actinobacteria communities in different station showed certain trends in similarity coefficients, and actinobacteria community structure similarity of the same transect was much higher than others. According to the results of sequence analysis of DGGE dominant bands belonged to the orders Nocardioidaceae, Streptomycetaceae, Micromonosporaceae, Micrococaceae, Cellulomonadaceae and Promicromonosporaceae. Canonical correspondence analysis showed that sediment water-soluble organic carbon and available phosphorus were identified as the key factor in regulating the variations of actinobacterial community composition. [Conclusion] Xinghu Wetland is the potential place for actinobacteria diversity. This study provides fundamental data for further studies of the underline mechanisms of structure microbial groups and the isolation of actinobacteria strains of interest.

Keywords: polymerase chain reaction density-gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), actinobacteria community structure, Canonical correspondence analysis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31300011), by the Guangdong Provincial Research Foundation for Basic Research (2013B060400043), by the Special Foundation for Young Scientists of Guangdong Academy of Sciences (rcjj201301) and by the Foundation for Young Scientists of Guangdong Institute of Microbiology

* Corresponding author. Tel: +86-20-87686803; Fax: +86-20-37656628; E-mail: zhuhh@gdim.cn

Received: 9 October 2014/ Revised: 10 December 2014