

## 新疆艾比湖湿地博乐河入口处土壤细菌多样性分析

韩晶 胡文革\* 王艳萍 武菲 张晓红 王翠华

(石河子大学 生命科学学院 新疆 石河子 832003)

**摘要:**【目的】了解新疆艾比湖湿地国家级自然保护区非培养土壤细菌群落组成及多样性。【方法】采用非培养法直接从湿地土壤提取总DNA进行16S rRNA基因扩增,构建细菌16S rRNA基因克隆文库。使用*Msp* I和*Afa* I限制性内切酶对阳性克隆进行16S rRNA基因扩增片段的限制性酶切分析(Amplified rDNA restriction analysis, ARDRA),挑取具有不同双酶切图谱的克隆进行测序,序列比对并构建16S rRNA基因系统发育树。【结果】从土壤细菌的16S rRNA基因文库中随机挑取75个不同谱型的克隆子,共得到58个OTUs,系统发育归类为8个细菌类群:绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrob)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)。其中,变形菌门为第一优势菌群,拟杆菌门为第二优势菌群,两者约占总克隆的65%。【结论】艾比湖湿地博乐河入口处土壤细菌多样性丰富,且存在一定数量的潜在微生物新种。

**关键词:** 细菌多样性, 16S rRNA基因克隆文库, 艾比湖湿地, 限制性酶切分析

## Bacterial diversity in Bole river entrance soil of Ebinur Lake wetland, Xinjiang by 16S rRNA gene sequence analysis

HAN Jing HU Wen-Ge\* WANG Yan-Ping WU Fei ZHANG Xiao-Hong  
WANG Cui-Hua

(College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

**Abstract:** [Objective] In order to investigate bacteria diversity and community composition in Bole river entrance soil of the Ebinur Lake wetland National Nature Reserve, Xinjiang. [Methods] Total DNA was directly extracted from the soil of the Ebinur Lake wetland Bole river entrance using the culture independent method. 16S rRNA gene was amplified using bacterial primer set Eubac27F and Eubac1492R. 16S rRNA gene clone library was constructed. Positive clones were identified by amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) using *Msp* I and *Afa* I, and unique rDNA pattern clones were sequenced, analysed, and then the phylogenetic tree was constructed. [Results] Seventy-five different clones of Macrorestriction Map was classified into 58 operational taxonomic units (OTUs), which were associated with 8 phyla by phylogenetic analysis, including Chloroflexi, Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31160026); 石河子大学高层次人才科研启动资金专项项目(No. RCZX201010)

\*通讯作者: ✉: hwg-t@163.com

收稿日期: 2014-02-20; 接受日期: 2014-04-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-08

Verrucomicrob and Gemmatimonadetes. Among them, the most abundant phyla was Proteobacteria, followed by Bacteroidetes, accounting for about 65% of the total clones. **[Conclusion]** The bacterial diversity is abundant in the Ebinur Lake wetland Bole river entrance soil, and exist a certain amount of new unknown taxon in this environment.

**Keywords:** Bacterial diversity, 16S rRNA gene clone library, The Ebinur Lake wetland, Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)

湿地是地球上水陆相互作用形成的独特生态系统,是重要的生存环境和自然界极富生物多样性的生态景观之一<sup>[1]</sup>。干旱区内陆湿地是区域内的稀有景观,对维护干旱区生态平衡起着不可估量的作用<sup>[2]</sup>,其是干旱区气候变迁的指示器,对内陆河流域生态与环境状况的反应都极为敏感,是干旱区水分循环的重要环节。内陆湖泊是干旱区自然和人类经济活动系统中的最后一个环节,其生物和生态系统最早对人类活动的干扰作用做出反应,第一个抗争者也是第一个受害者<sup>[3]</sup>。湖泊湿地环境的恶化,最直接的影响就是湖泊湿地及湖周其它类型湿地的退化。

艾比湖湿地是新疆最大的湖泊湿地,也是干旱区内陆河流域河流终端型湖泊湿地的典型代表。艾比湖湿地以湖泊湿地为主,集湖泊湿地、河流湿地和沼泽湿地于一体,且其地理区位与生态区位十分特殊,湖面积涨消引发的湿地生态系统的动态演替过程已经成为艾比湖流域生态环境改善与恶化的晴雨表。近半个多世纪以来,艾比湖流域内人口增多,社会经济快速发展,对水资源的需求量日益增加,注入艾比湖的地表径流量迅速减少,部分入湖径流出现断流,水面急剧萎缩,引发了一系列严重的生态环境问题,造成了不可估量的危害<sup>[4-10]</sup>。

为此,通过对艾比湖三大支流之一的博乐河入湖口处土壤样品进行研究,可以比较充分地了解土

壤中微生物的群落状况,为评估湿地土壤环境状况提供参考。但现有的关于艾比湖湿地微生物多样性的研究结果几乎都是建立在对可培养微生物研究基础上的,由于常规培养法的种种限制因素,培养微生物仅仅反映出自然状态的极少部分。所以,本文直接从土壤中提取总DNA,构建细菌16S rRNA基因克隆文库,较全面了解其群落组成和多样性特点,为艾比湖湿地微生物生态学研究及生态环境修复提供有价值的基础资料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料采集:** 2012年7月,在新疆艾比湖湿地博乐河入口处与河道呈水平方向设置5个采样点(表1),并以垂直土层0-35 cm采等量土样,将5个样点的样品混匀,装入乙烯袋中,用手提式冰箱运回实验室后-20℃保存备用。

**1.1.2 艾比湖湿地博乐河入口处土壤样品理化性质:** 土壤含水量测定采用105℃烘干比重法;pH测定采用电位法,使用PHS-3C型酸度计测定;盐度测定采用电导法测定,使用DJ-320电导仪测定;有机质含量测定用重铬酸钾容量法——外加热法;碱解氮含量用碱解扩散法测定;速效磷含量测定采用碳酸氢钠浸提——钼锑抗比色法测定;速效钾含量用乙酸铵浸提——火焰光度法测定<sup>[11-12]</sup>。样品设

表1 博乐河入口处采样点基本信息  
Table 1 The basic information of sampling sites in the Bole river entrance

Wetland type	Sampling sites	Longitude/Latitude	Height (m)	Main vegetation
河流型湿地 Riverine wetlands	B-1	44°51'42.25"N, 082°41'33.21"E	186	芦苇草甸为主,并
	B-2	44°51'42.59"N, 082°41'27.55"E	190	分布少量柽柳、盐
	B-3	44°51'46.45"N, 082°41'22.20"E	192	角草、盐节木等
	B-4	44°51'48.39"N, 082°41'17.09"E	190	
	B-5	44°51'49.60"N, 082°41'11.10"E	188	

置 3 个重复, 取其平均值。

**1.1.3 主要仪器和试剂:** PCR 仪、离心机, 德国 Eppendorf 公司; PCR 纯化试剂盒、PCR 试剂、PGM-T 载体, 购于 Tiangen 公司; *Msp* I 和 *Afa* I 限制性内切酶, 购于 TaKaRa 公司。

**1.2 土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库的构建**

**1.2.1 土壤总 DNA 提取和纯化:** 总 DNA 提取采用玻璃珠-SDS 结合法<sup>[13-16]</sup>, 用氯仿抽提纯化回收。

**1.2.2 细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增:** 采用细菌通用引物: Eubac27F :5'-AGAGTTTGATCCTGGCTG GCTCAG-3'; Eubac1492R :5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3'。25  $\mu$ L PCR 反应体系: 2 $\times$ PCR mix (含 *Taq* 酶) 10  $\mu$ L, 模板(土壤 DNA) 10 ng, 无菌 ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L, 10 mmol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 50 s, 47  $^{\circ}$ C 50 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 共 28 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。

**1.2.3 细菌 16S rRNA 基因克隆文库的构建及阳性克隆的筛选:** PCR 产物经 PCR 试剂盒纯化后与 PGM-T 载体连接, 连接产物转化入 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 蓝白斑筛选及白斑菌落 PCR 电泳检测, 将含有目的片段的阳性克隆子保存在 96 孔板中, 并放于 -80  $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.3 ARDRA 分析**

**1.3.1 ARDRA 酶切分析:** 用 PGM-T 通用引物 T7 和 SP6 对挑取的阳性克隆子进行扩增, *Msp* I 和 *Afa* I 限制性内切酶双酶切。20  $\mu$ L 酶切体系: 10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ L, 10 U/ $\mu$ L *Msp* I (或 *Afa* I) 1  $\mu$ L, PCR 纯化物 5  $\mu$ L, Mill-Q Water 12  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 酶切 4 h, 65  $^{\circ}$ C 水浴 20 min 终止酶切反应。酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。借助 Photoshop 软件, 分析产物经酶切后的谱型, 计算每个谱型出现的频率, 将具有不同谱型的克隆子进行测序。

**1.3.2 克隆文库分析:** 采用文库覆盖度 Coverage C 评价构建文库对环境微生物多样性的体现程度 ( $C=1 - n_1/N$ ,  $N$  为所分析的克隆总数,  $n_1$  为仅有 1 个克隆的操作分类单位数)。

采用 Rarefaction 曲线评估所构建的文库是否较好地反映了环境微生物多样性。

采用 Shannon 指数 ( $H' = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$ ,  $P_i = n_i/N$  式中,  $N$  为所分析的克隆总数,  $n_i$  为第  $i$  个 OTU 所代表的克隆数) 评价文库所代表的环境微生物的多样性。

**1.4 系统发育分析及核酸序列收录号**

根据 ARDRA 分型结果, 随机挑取 75 个不同双酶切普型的阳性克隆子送华大基因测序<sup>[17]</sup>。在 GenBank 数据库中用 BLAST 进行检索和同源性比较, 使用 Mothur 软件和 Bellerophon 在线分析所得序列中可能的嵌合体和其他的异常二级结构并剔除。将获得的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank, 获得 70 条有效测序序列且在数据库中注册序列号为 KF964575-KF964644。利用 Clustal X 程序进行序列比对分析, 并用 MEGA 5.2 软件对对比序列采用最小相邻法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树, Bootstrap 检验系统树, 自展数为 1 000。

## 2 结果与分析

**2.1 艾比湖湿地博乐河入口处土壤理化性质**

本实验所测得土壤理化性质如表 2 所示。根据全国第二次土壤普查养分分级标准, 艾比湖湿地博乐河入口处土壤有机质、速效磷为二级, 碱解氮为四级, 速效钾为一级, 故艾比湖湿地博乐河入口处土壤养分含量属于中等偏上水平。pH 维持在 8.89 左右, 土壤呈碱性。在一定浓度范围内, 溶液的含盐量与电导率成正比, 因此, 该样地为中度盐土, 水溶性盐含量较高。

**2.2 16S rRNA 基因文库的 ARDRA 分析**

采用 T7 和 SP6 引物对湿地土壤细菌 16S rRNA 基因文库中的阳性克隆进行菌落 PCR, 以验证插入片段大小在 1 500 bp 左右 (图 1)。经 *Msp* I 和 *Afa* I 限制性内切酶双酶切后, 分析计算谱型和频率。随机挑 75 个具有不同 ARDRA 谱型 (图 2、3) 的阳性克隆子测序。通过对所获得的序列进行相似性分析 (序列相似度 97% 归类为同一个 OTU 并选取其中 1 个为代表序列) 和 Chimera 检查, 去除嵌合体后共获得 58 个 OTUs (101 个克隆子), 代表了 70 条有效序列 (121 个克隆子), 其中有 43 个为单个克隆的 OTU。

Soil No.	Conductivity (ms/cm)	pH	Soil organic matter (g/kg)	Water content (%)	Alkali-hydrolyzable nitrogen (mg/kg)	Available phosphorus (mg/kg)	Available potassium (mg/kg)
A-1	7.14	8.87	32.27	20.98	66.51	23.43	478.84
A-2	7.10	8.97	31.20	19.40	68.03	22.75	479.85
A-3	6.98	8.82	33.35	19.40	67.72	23.68	480.87
Mean	7.07	8.89	32.27	19.93	67.42	23.29	479.85

注: A-1、A-2、A-3 为样地的 3 个平行样品。

Note: A-1, A-2 and A-3 are the three parallel samples of the sampling sites.

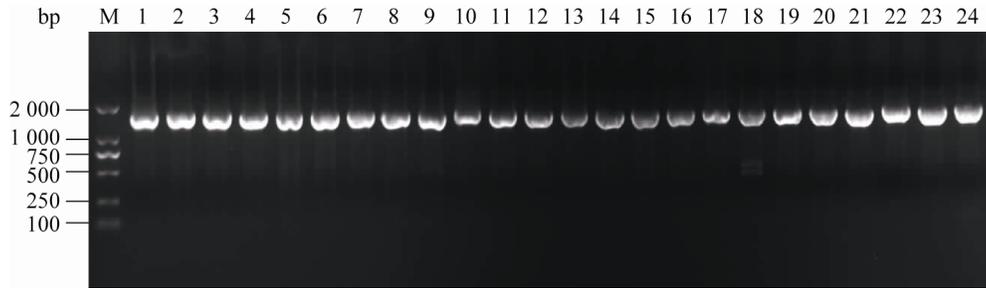


图 1 艾比湖湿地土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库阳性克隆 PCR 部分结果

Figure 1 Partial results of positive clone of bacterial 16S rRNA gene clone library from the Ebinur Lake soil

Note: M: DS™ 2000.

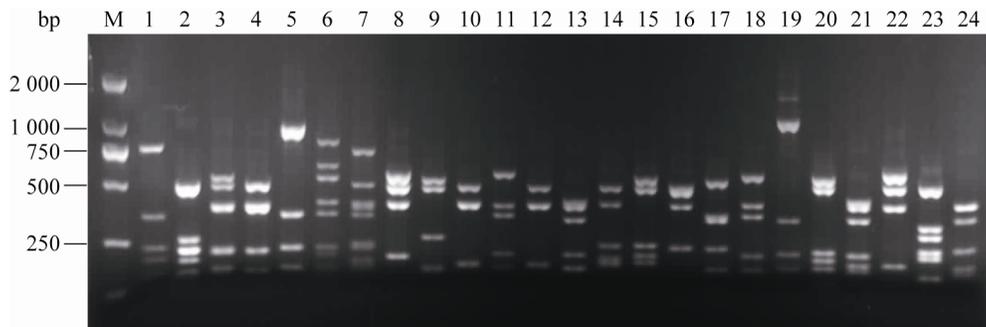


图 2 艾比湖湿地土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库的 rDNA 扩增片段 Afa I 酶切部分电泳图

Figure 2 Partial results of Afa I restriction patterns of amplified rDNA of bacterial 16S rRNA gene clone library from the Ebinur Lake soil

Note: M: DS™ 2000.



图 3 艾比湖湿地土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库的 rDNA 扩增片段 Msp I 酶切部分电泳图

Figure 3 Partial results of Msp I restriction patterns of amplified rDNA of bacterial 16S rRNA gene clone library from the Ebinur Lake soil

Note: M: DS™ 2000.

### 2.3 克隆文库覆盖度分析

以 58 个 OTUs 和代表的克隆子数绘制 Rarefaction 曲线(图 4)。Coverage  $C$  和 Shannon 指数( $H'$ )分别是 64.5%和 3.74。从 Rarefaction 曲线中可以看出克隆数不足以较全面的反映微生物的多样性。覆盖度(Coverage  $C$ ) 64.5%从理论上讲能反映环境中超过一半的微生物。

### 2.4 细菌 16S rRNA 基因系统发育学分析

通过 GenBank BLAST 比对, 本研究所获得的 58 个 OTUs 与相似序列的相似率处于 92%–99%, 且多数属于非培养型的, 说明文库中大多数属于尚未纯化分离的菌株。将测序中代表主要细菌类群的 58 个 OTUs 的 16S rRNA 基因序列(70 条)与数据库中具有最高相似性的菌株或克隆的序列经比对分析后构建系统进化发育树(图 5)。系统发育树表明 58 个 OTUs 归为 8 个细菌类群: 绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrob)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)。其中, 变形菌门为优势菌群占整个文库的 33.0%; 其次是拟杆菌门约占克隆文库的 32.0%, 厚壁菌门约占总数的 12.0%, 其余各门所占的比例较少(表 3)。

**2.4.1 变形菌门(Proteobacteria):** 第一优势群落是变形菌门, 包含了 26 个(37.1%)序列类型, 40 个(33.0%)克隆数和 24 个(38.6%) OTUs。其中, 在变形细菌 24 个 OTUs 中, 6 个 OTUs 属于  $\gamma$ -变形细菌, 4 个属于  $\delta$ -变形细菌, 14 个属于  $\alpha$ -变形细菌。在  $\gamma$ -变形细菌中, B12 (KF964578)属于不动杆菌属(*Acinetobacter*) , 与 1 个约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*, AB859672)的相似性为 99%; C72 (KF964633)属于盐单胞菌属(*Halomonas*) , 与 1 个来源于盐碱土和盐湖纯化分离的中度嗜盐菌株(NR\_044397)相似性为 98%; 其余 4 个最相似序列均为非培养的, 相似度在 95%–99%。在  $\alpha$ -变形细菌中, B83 (KF964603)属于红杆菌科

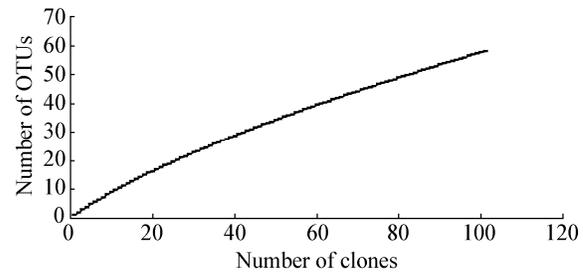
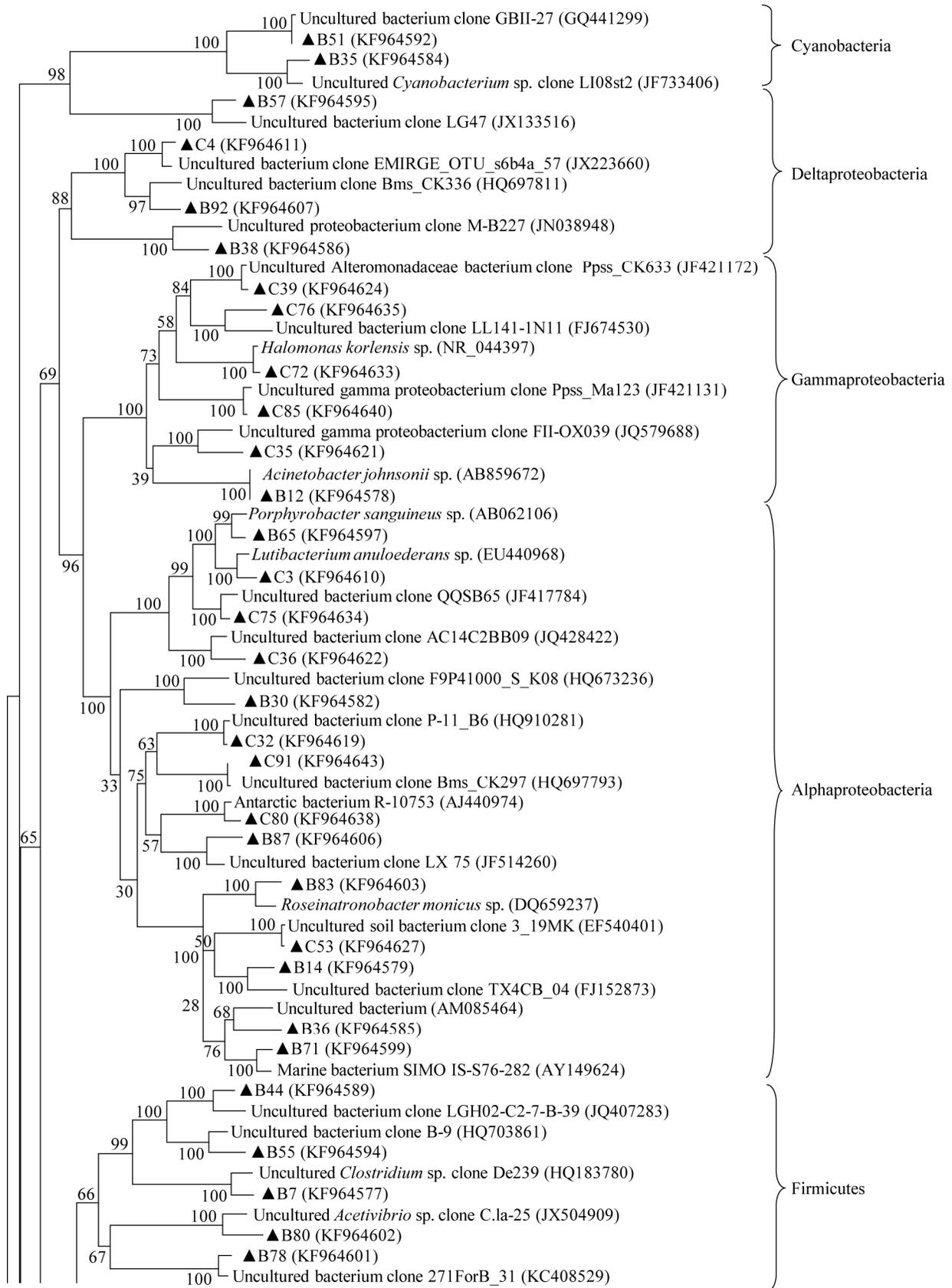


图 4 艾比湖湿地土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库 Rarefaction 曲线

Figure 4 Rarefaction curves generated for 16S rRNA gene in clone library from the Ebinur Lake soil

(Rhodobacteraceae), 与 1 个嗜盐碱叶绿素细菌(DQ659237)相似性为 98%; B65 (KF964597) 属于紫杆菌属(*Porphyrobacter*) , 与 1 种包含叶绿素可降解联苯的需氧细菌(AB062106)的相似性为 99%; B71 (KF964599)属于 *Palleronia* , 与海洋细菌 SIMO IS-S76-282 (AY149624) 相似性为 98%; C3 (KF964610)属于赤杆菌属(*Erythrobacter*) , 与 1 个源于印度洋深海细菌(EU440968)的相似性为 98%; C80 (KF964638)属于德沃斯氏菌属(*Devosia*) , 与 1 个纯化分离南极湖泊的细菌(AJ440974)相似性为 99%; 其余 10 种 OTUs 最相似序列均为非培养, 其相似度为 92%–99%。在  $\delta$ -变形细菌中, 4 种 OTUs 最相似序列均为非培养, 相似度为 95%–99%, 代表序列为 B38 (KF964586)、B57 (KF964595)、C4 (KF964611)和 B92 (KF964607)。

**2.4.2 拟杆菌门(Bacteroidetes):** 拟杆菌门是另一个优势群落, 包含了 19 个(27.1%)序列类型, 39 个(32.0%)克隆数和 11 个(15.7) OTUs。4 个 OTUs 归类于黄杆菌纲(Flavobacteria) , 其中 B18 (KF964580)属于黄杆菌科的 *Salagentibacter* , 与 1 种源于白令海峡浮游细菌(GQ452870)相似性为 99%; 其余 3 个 OTUs 最近相识序列均为非培养。6 个 OTUs 归类于鞘脂杆菌纲(Sphingobacteria) , 其最相似序列均为非培养, 相似度为 93%–99%。C17 (KF964614)在拟杆菌门下未分类, 其相似性最近的序列(HQ703873)为非培养, 相似度为 99%。



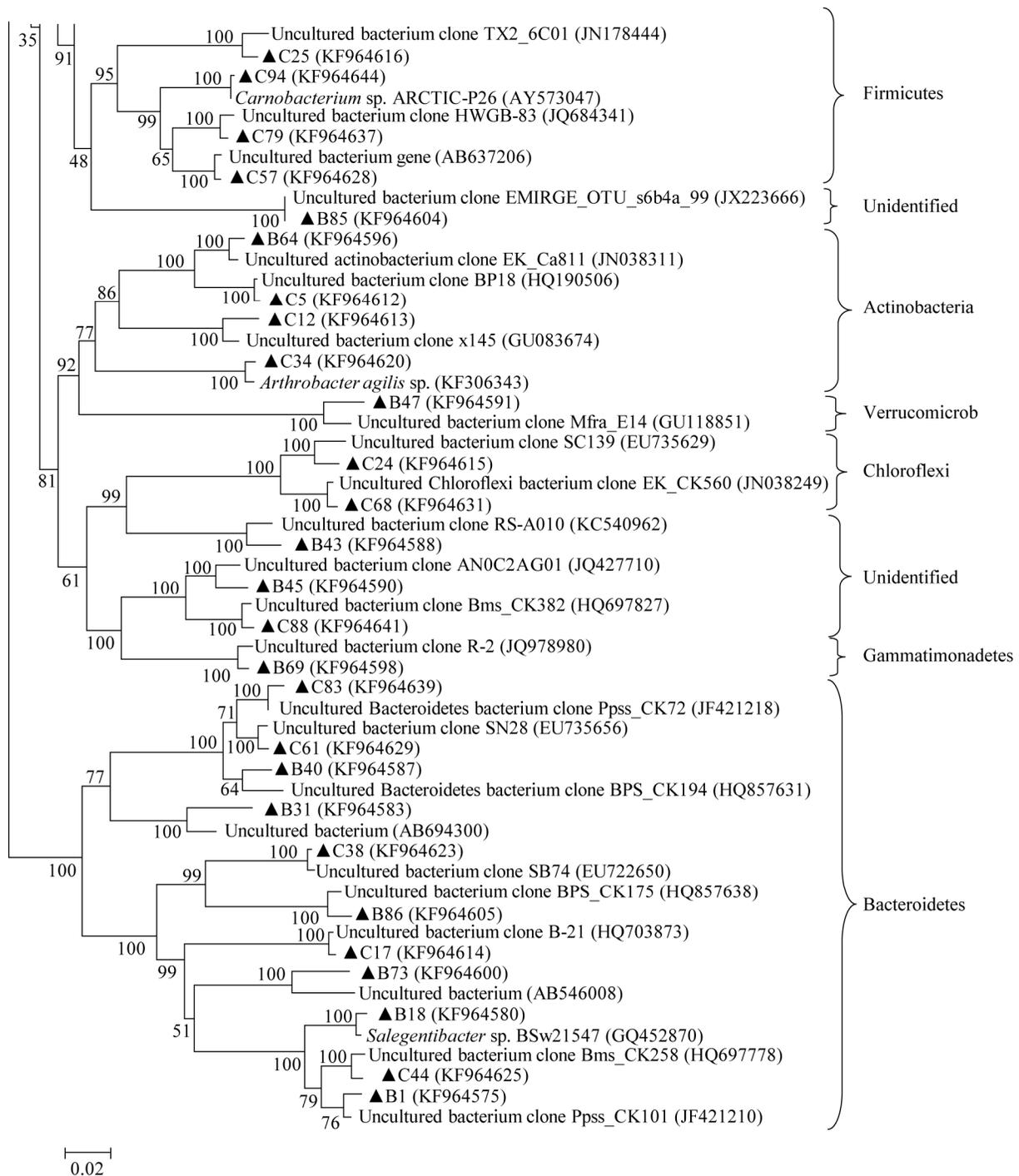


图5 艾比湖湿地土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA gene clone library from the Ebinur Lake soil

注：系统发育树采用邻接法构建；参考序列来自 GenBank 数据库；分支上的数值表示经 1 000 次计算后的置信度值；比例尺表示遗传距离；文库中的克隆序列用黑三角表示。

Note: Phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method. Reference sequences were chosen from GenBank database. Numbers at branching points refer to bootstrap values after 1 000 times calculation. Scale indicates genetic distance. Black triangles represent clone sequences in the library.

表 3 艾比湖湿地土壤细菌 16S rRNA 基因克隆序列所属类群分布  
Table 3 Distribution of bacterial 16S rRNA gene sequences cloned from the Ebinur Lake soil

Bacterial division	Number of clones (%)	Number of sequence type (%)	OTUs (%)
Chloroflexi	12 (10.0)	4 (5.7)	2 (3.4)
Cyanobacteria	2 (2.0)	2 (2.9)	2 (3.4)
Proteobacteria	40 (33.0)	26 (37.1)	24 (38.6)
Firmicutes	15 (12.0)	9 (13.0)	9 (12.9)
Actinobacteria	5 (4.0)	4 (5.7)	4 (5.7)
Bacteroidetes	39 (32.0)	19 (27.1)	11 (15.7)
Verrucomicrob	1 (1.0)	1 (1.4)	1 (1.7)
Gemmatimonadetes	1 (1.0)	1 (1.4)	1 (1.7)
Unidentified	6 (5.0)	4 (5.7)	4 (5.7)
Total	121 (100)	70 (100)	58 (100)

**2.4.3 厚壁菌门(Firmicutes):** 厚壁菌门包括 9 个 OTUs, 其中含有 5 个属于梭状芽孢杆菌纲(Clostridia), 4 个属于杆菌纲(Bacilli)。在梭状芽孢杆菌纲中相似度最近的序列均为非培养, 相似度为 96%–99%。在杆菌纲(Bacilli)中, C94 (KF964644) 为肉杆菌科的 *Carnobacterium*, 与北极地区细菌 (AY573047) 相似度为 99%。其余, C25 (KF964616) 属于环脂酸芽孢杆菌科 (Alicyclobacillaceae) 的 *Tumebacillus*; C57 (KF964628) 属于芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 的杆菌 (*Bacillus*); C79 (KF964637) 属于球菌科 (Planococcaceae)。

**2.4.4 放线菌门(Actinobacteria):** 放线菌门包含 4 个 OTUs, 均属于放线菌纲(Actinobacteria)。其中, C12 (KF964613) 为 *Nitriliruptor*; C34 (KF964620) 属于节细菌属 (*Arthrobacter*)。4 个 OTUs 最相似序列均为非培养, 相似度为 96%–99%。

**2.4.5 绿弯菌门(Chloroflexi):** 绿弯菌门包含 2 个 OTUs, 其最相似序列均为非培养, 相似度为 94%–98%, 代表性克隆子为 C24 (KF964615) 和 C68 (KF964631)。

**2.4.6 蓝藻门(Cyanobacteria):** 蓝藻门包含 2 个 OTUs, 其相似序列均为非培养, 相似度为 98%–99%, 代表性克隆子为 B35 (KF964621) 和 B51 (KF964592)。B35 和 B51 归类为硅藻门 (Bacillariophyta)。

**2.4.7 疣微菌门(Verrucomicrob):** 疣微菌门包含 1 个 OTUs, 其最相似序列为非培养, 相似度为 94%, 代表性克隆子为 B47 (KF964591)。

**2.4.8 芽单胞菌门(Gemmatimonadetes):** 芽单胞菌门包含 1 个 OTUs, 其最相似序列为非培养, 相似度为 97%, 代表性克隆子为 B69 (KF964598)。

**2.4.9 未确定分类(Unidentified):** 未确定分类包含 4 个 OTUs, 与其最相似序列均来自非培养, 且未确定分类地位, 相似度为 95%–99%, 代表性克隆子为 B43 (KF964588)、B45 (KF964590)、B85 (KF964604) 和 C88 (KF964641)。

### 3 讨论

通过构建并分析艾比湖湿地土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库, 明确了艾比湖湿地博乐河入口处土壤细菌主要优势群落特征, 变形菌门和拟杆菌门在整个群落中占优势 (OTUs 数中占 54.3, 分析克隆子总数占 65%)。这与刘绍雄等剑湖湿地湖滨带植物根际土壤微生物<sup>[18]</sup>、阎冰等的红树林土壤细菌<sup>[17]</sup>、关晓燕等辽东湾大凌河口湿地土壤微生物<sup>[19]</sup>、弗吉尼亚州山麓自然湿地<sup>[20]</sup>和智利的内海湿地<sup>[21]</sup>进行比较发现, 变形细菌通常为土壤细菌群落中优势菌群, 其中艾比湖湿地博乐河入口处土壤微生物变形细菌主要集中在  $\alpha$ -变形细菌, 剑湖湿地湖滨带植物根际土壤微生物变形细菌主要集中在  $\gamma$ -变形细菌, 红树林土壤微生物变形细菌主要

集中为  $\delta$ -变形细菌,弗吉尼亚州山麓自然湿地中  $\alpha$ -变形细菌亚群的相对丰度在不同样点之间变化,变化范围为 18%–52%,其余变形细菌亚群大约占到变形菌门整体的一半,且出现了艾比湖湿地博乐河入口处土壤中没有的  $\beta$ -变形细菌亚群,而智利内海湿地的生态类型较多,在 La Brava 湿地土壤中  $\alpha$ -变形细菌亚群为变形细菌群落中主要的类型,且存在艾比湖湿地中没有的  $\varepsilon$ -变形细菌亚群。从湿地微生物多样性结构组成上分析,我们可以看出不同的湿地环境对湿地微生物组成比例影响较大,艾比湖湿地呈碱性,其主要的优势群落为变形菌门,其次为拟杆菌门和绿弯菌门,弗吉尼亚州山麓自然湿地为典型的酸性土壤,其主要的优势群落为变形菌门,其次为酸杆菌门和拟杆菌门,智利内海 La Brava 湿地土壤中呈碱性,其主要优势菌群为变形菌门,其次为螺旋体门和疣微菌门,但同样呈碱性智利内海 Tebenquiche 湿地土壤其优势群落为拟杆菌门,其次为变形菌门和螺旋体门,上述实验结论充分说明了在不同土壤环境下变形菌门分布广泛,但其整个微生物群落结构组成又存在明显的区域差异性。

在目前的微生物分子生态学研究,对于 16S rRNA 基因一般分析 50–100 个阳性克隆子即可反映该环境样品中的优势微生物类群<sup>[22–25]</sup>。在本研究中虽然对文库中的 121 个克隆子进行了分析,但文库覆盖度(Coverage C)仅为 64.5%,表现出艾比湖湿地博乐入湖口处土壤细菌群落丰富的多样性。该文库中分析的 58 个 OTUs 在 GenBank 中最相似序列仅有 10 个为纯培养的,未培养的达到总 OTUs 的 82.6%,而且最相似序列与测序序列相似率<97%的序列有 20 个(约占 34.5%);4 个 OTUs 在细菌中未有任何分类,说明艾比湖湿地土壤中有一定数量的潜在细菌新种。值得注意的是,本研究的艾比湖湿地土壤与盐湖、南极洲湖泊和印度洋深海中,均有变形细菌门的克隆序列,说明该门具有嗜盐、抗极寒、抗高压的极端环境的特点,表现出极强的全球适应性和变异性。

在原核微生物中 16S rRNA 基因往往同时存在

多个拷贝,而且拷贝之间的基因序列并不完全一致,所以,在原核微生物分子生态学研究中基于 16S rRNA 基因的群落多样性分析会引起一定程度的高估。中国科学院武汉病毒研究所周宁一等<sup>[26]</sup>通过对 16S rRNA 基因的拷贝数及基因组内部异质性做了详细的分析研究,发现 16S rRNA 基因存在异质性并且在不同区域异质性存在程度不同。本研究中由于所分析的克隆数总数偏少,每个序列所代表的平均克隆数均低于其提议的 3.61<sup>[26]</sup>,在 0.03 水平上(一致性为 97%归类为一个 OTU)除变形菌门、拟杆菌门和绿弯菌门外其余序列所属 OTU 大多仅有一个克隆子(表 3),而在此水平下由于 16S rRNA 基因的异质性对群落多样性的高估率为 5.8%<sup>[26]</sup>,故本研究中所分析的 58 个 OTUs 在实际环境下群落多样性 OTUs 应为 55,且 16S rRNA 基因异质性主要集中于文库中的优势群落。这可能是艾比湖湿地博乐河入口处盐碱环境下微生物适应其环境的策略,具有不同的拷贝数可在不同的环境下发挥其功能以提高其适应性。简言之,本研究中 16S rRNA 基因在不同群落类型中异质性程度不同,优势群落较高且对微生物群落结构及组成影响程度不大。

艾比湖湿地作为北疆地区重要的生态屏障,面对艾比湖湿地生态脆弱性现状及退化问题,本研究初次使用非培养法研究了艾比湖湿地土壤主要细菌群落及其结构组成,可为该区域的湿地土壤微生物状况准确预测提供科学数据,也可为当地政府制定生态恢复与重建方案提供参考。

## 参 考 文 献

- [1] 杨永兴. 国际湿地科学研究的主要特点、进展与展望[J]. 地理科学进展, 2002, 21(2): 111-120.
- [2] 李瑞, 张克斌, 刘云芳, 等. 西北半干旱区湿地生态系统植物群落空间分布特征研究[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(1): 6-13.
- [3] 胡汝骥, 姜逢清, 王亚俊, 等. 论中国干旱区湖泊研究的重要意义[J]. 干旱区研究, 2007, 24(2): 137-140.
- [4] 阎顺. 艾比湖及周边地区环境演变与对策[J]. 干旱区资源与环境, 1996, 10(1): 30-37.

- [5] 杨川德. 艾比湖流域水资源利用的环境效应[J]. 干旱区地理, 1990, 13(4): 45-50.
- [6] 杨云良, 阎顺, 贾宝全, 等. 艾比湖流域生态环境演变与人类活动关系初探[J]. 生态学杂志, 1996, 15(6): 43-49.
- [7] 袁国映. 艾比湖退缩及其对环境的影响[J]. 干旱区地理, 1990, 13(4): 62-67.
- [8] 苏颖君, 张振海, 包安明. 艾比湖生态环境恶化及防治对策[J]. 干旱区地理, 2002, 25(2): 143-148.
- [9] 吴敬禄, 林琳. 新疆艾比湖湖面波动特征及其原因[J]. 海洋地质与第四纪地质, 2004, 24(1): 57-60.
- [10] 李遐龄. 艾比湖生态环境综合治理和经济可持续发展的研究[J]. 干旱区资源与环境, 1997, 11(2): 28-36.
- [11] 杜森, 高祥照. 土壤分析技术规范[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [12] 史瑞和, 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 昆明: 农业出版社, 1988: 25-62.
- [13] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [14] 张瑞福, 曹慧, 崔忠利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 276-281.
- [15] 杜涛, 黄小毛, 侯明生, 等. 从土壤中提取 DNA 用于 PCR 扩增[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 1-5.
- [16] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态研究中总 DNA 的提取[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 854-860.
- [17] 阎冰. 红树林土壤细菌和古菌的16S rDNA 多样性研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2007.
- [18] 刘绍雄, 王明月, 王娟, 等. 基于 PCR-DGGE 技术的艾比湖湿地湖滨带土壤微生物群落结构多样性分析[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(7): 1405-1412.
- [19] 关晓燕, 韩家波, 王摆, 等. 辽东湾大凌河口湿地土壤微生物群落分析[J]. 生态环境学报, 2012, 21(6): 1063-1070.
- [20] Peralta RM, Ahn C, Gillevet PM. Characterization of soil bacterial community structure and physicochemical properties in created and natural wetlands[J]. *The Science of the Total Environment*, 2013, 443: 725-732.
- [21] Fariás ME, Contreras M, Rasuk MC, et al. Characterization of bacterial diversity associated with microbial mats, gypsum evaporites and carbonate microbialites in thalassic wetlands: Tebenquiche and La Brava, Salar de Atacama, Chile[J]. *Extremophiles*, 2014, 18(2): 311-329.
- [22] Barns SM, Fundyga RE, Jeffries MW, et al. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1994, 91(5): 1609-1613.
- [23] Ravensschlag K, Sahn K, Perntaler J, et al. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 3982-3989.
- [24] Kemp PF, Aller JY. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough?[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2004, 2(4): 114-125.
- [25] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environment: What 16S rDNA libraries can tell us[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(2): 161-177.
- [26] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969.