

水葫芦根际细菌群落结构多样性分析

郑李军 傅明辉*

(广东工业大学 轻工化工学院 广东 广州 510006)

摘要:【目的】了解水葫芦根际细菌群落结构。【方法】运用末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)技术分析富营养化水体中水葫芦根际和水葫芦近、远水样的细菌群落特征及多样性,结合克隆文库技术和培养法分析根际的细菌种群类型。【结果】同一时期水葫芦根际细菌多样性(Shannon-Weiner 指数 H' 或 Simpson 指数 D)更高,水葫芦近水样次之,远水样最小。10 月份的细菌多样性高于 5 月份的。通过水葫芦根际细菌的克隆文库可知变形杆菌门(Proteobacteria)是水葫芦根际细菌的主要类群,占总群体的 65.1%,包括噬菌弧菌(*Bacteriovorax* sp.)、*Dechloromonas* sp.、*Leptothrix* sp.、红螺菌科(Rhodospirillaceae)、*Rhodoferax* sp. 和红环菌科(Rhodocyclaceae)等。T-RFLP 图谱显示 159 bp 为最大优势菌,247 bp 为第二大优势菌,对照克隆文库及培养结果分析 247 bp 属于 γ -Proteobacteria,159 bp 为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)。【结论】水葫芦根际细菌的群落结构丰富,不同时段水葫芦根际细菌的丰度略有变化,主要类群为变形杆菌门。

关键词: 末端限制性片段长度多态性, 克隆文库技术, 富营养化水体, 水葫芦根际细菌

Analysis of the diversity of bacterial community structure in the rhizosphere of *Eichhornia crassipes*

ZHENG Li-Jun FU Ming-Hui*

(Faculty of Light Industry and Chemical Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: [Objective] To investigate the bacterial community structure in the rhizosphere of *Eichhornia crassipes*. [Methods] Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technique was used to analyze the characteristics and diversity of bacterial community in the rhizosphere of *E. crassipes* and the water samples near and far from it. Clone library technique and culturing method were also used to identify bacteria in the rhizosphere of *E. crassipes*. [Results] The bacterial community diversity (Shannon-Weiner diversity index H' or Simpson diversity index D) in the rhizosphere of *E. crassipes* was the most abundant. The second and the third were that near and far from the rhizosphere of *E. crassipes* respectively. The bacterial community diversity in October was higher than that in May. According to the clone library of the bacteria in rhizosphere of *E. crassipes*,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21177029)

*通讯作者: ✉: mhfgd@126.com

收稿日期: 2015-01-30; 接受日期: 2015-06-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-26

the dominant bacteria group was Proteobacteria (65.1%), including *Bacteriovorax* sp., *Dechloromonas* sp., *Leptothrix* sp., Rhodospirillaceae, *Rhodospirillum* sp. and Rhodocyclaceae, etc. T-RFLP profiles revealed that the dominant bacteria was 159 bp, and the second dominant bacteria was 247 bp. 247 bp was identified as γ -Proteobacteria and 159 bp was belonged to Proteobacteria according to the result of the clone library and culture method. **[Conclusion]** This research indicates that the bacterial community diversity in the rhizosphere of *E. crassipes* was abundant, and its abundancy changed slightly in different period. The dominant bacterial community in the rhizosphere of *E. crassipes* was Proteobacteria.

Keywords: Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), Clone library technique, Eutrophic water, Rhizosphere bacteria of *E. crassipes*

水葫芦(*Eichhornia crassipes*), 又名凤眼莲, 为多年生热带浮水草本植物, 具有极强的繁殖能力^[1]和清除水体污染物的作用^[2], 这些水体污染物包括重金属、氮素、磷等。水葫芦对这些污染物的清除作用不仅来自于水葫芦本身, 水葫芦的根际微生物也起到了十分重要的作用。Jayaweera 等^[3]实验表明, 水葫芦根际细菌生物膜对 Fe 的氧化与沉淀的影响虽然不显著, 但存在一定的作用; Jayaweera 等^[4]研究显示, 水葫芦对废水中磷清除的重要机制是其吸收作用和根部的吸附作用, 而对氮的清除不仅包括自身的吸收作用, 同时根际微生物的反硝化作用也是一个关键的作用机制。张鸿等^[5]研究了水葫芦、水芹人工湿地对东湖污水中氮磷的净化率, 结果表明除了植物本身可以直接吸收含氮、磷化合物外, 其根际微生物也可促进氮、磷的释放和转化, 从而提高净化率, 其中水葫芦对氨氮的去除高于水芹。

目前国内外对水葫芦根际微生物的研究甚少, 且研究的方法大多限于传统培养方法和微生物计数法, 而自然界中绝大多数微生物无法通过分离纯化的方法在人工培养基上生长^[6]。本研究采用传统培养法、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)和克隆文库测序相结合的方法分析水葫芦根际细菌的群落结构, 以期了解水葫芦根际细菌群落多样性与富营养化水体环境的关系, 为进一步研究和利用水葫芦净化富营养化水体奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 采样: 试验样品取自广州大学城广东工业大学生活西区与生活东区之间的河涌, 河水流动性小, 几乎为静态水。培养法和克隆文库的样品取自水葫芦根部。T-RFLP 法样品分为三部分: 目标样品: 用已灭菌的剪刀剪下的水葫芦根部(R); 对照样品 1: 水葫芦根际近水样(WN); 对照样品 2: 水葫芦根际远水样(WF)。其中, 近水样、远水样分别是距离水葫芦根部约 5 m 和 10 m 取得的。

1.1.2 主要试剂与仪器: DNA 提取试剂盒(Power Soil[®] DNA Isolation Kit)购于美国 MO BIO 公司; DNA 纯化试剂盒(Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0)和 pMD19-T Vector 购于日本 TaKaRa 公司; 高速冷冻离心机(KDC-160HR)购自科大创新股份有限公司中佳分公司; 引物由 Invitrogen 广州分公司合成; 其余 PCR 试剂购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 其他各种化学药品为进口或国产分析纯。

1.2 水葫芦根际样品中可高效降解氮素细菌的培养

1.2.1 培养基^[7]: 富集培养基(g/L): 乙酰胺 2.0, NaOH 1.6, MgSO₄·7H₂O 0.05, KH₂PO₄ 8.2, KCl 0.5, CuSO₄·5H₂O 0.000 5, CaSO₄·2H₂O 0.000 5, ZnSO₄·7H₂O 0.000 5, FeCl₃·6H₂O 0.000 5, pH 7.2。纯化培养基(g/L): NH₄Cl 0.382, 乙酸钠 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.05, K₂HPO₄ 0.2, NaCl 0.12, MnSO₄·4H₂O 0.01, FeSO₄ 0.01, pH 7.2。

1.2.2 操作方法: 取新鲜采集的水葫芦根须约 10 g 加入到盛有 150 mL 硝化细菌无机盐基础培养基三角瓶中, 28 °C、150 r/min 摇床培养数日。将富集培养得到的细菌用蒸馏水稀释至一定倍数 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 每个稀释倍数涂布 3 个平板, 37 °C 培养 2–3 周, 再挑取长势较好的平板, 采用平板划线法将菌种接至新的培养基, 至少纯化 3 代后进行菌种鉴定。

1.2.3 菌种鉴定方法: 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 8F 和 1492R 进行菌落 PCR, PCR 反应体系(25 μ L): 模板为挑取细菌的单个菌落, 10 \times Taq buffer 2.5 μ L, 引物 8F (10 μ mol/L) 1 μ L, 引物 1492R (10 μ mol/L) 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其特异性, 之后将产物送至 Invitrogen 广州分公司进行测序(双脱氧测序法)。

1.3 样品总 DNA 的提取

利用 5 点取样法对每种样品进行采集, 然后将每种样品的 5 个样品混合成一个样品, 以保证所采集样品的代表性。对于根际样品, 用无菌水充分冲洗所采集到的水葫芦根部, 得到悬浊液 500 mL, 利用津隆水系微孔过滤膜(直径 50 mm, 孔径 0.45 μ m) 进行抽滤(对照样品为水样, 可直接进行抽滤), 将抽滤后得到的滤膜在超净工作台中剪碎后置于 DNA 提取试剂盒所提供的 PowerBead Tube 中, 每个 PowerBead Tube 中的样品约为 0.25 g, 漩涡振荡 15 min 以使样品混匀, 再根据试剂盒说明书的方法提取总 DNA。提取的总 DNA 经过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, -20 °C 保存。

1.4 PCR 扩增

以细菌 16S rRNA 基因为目的基因进行 PCR 扩增, 采用细菌的通用引物^[8]: 8F-FAM (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGTTACCTTG TTACGACTT-3'), 其中 8F

的 5'端用 FAM 荧光素标记。

PCR 反应体系(25 μ L): 模板 DNA 1 μ L, 10 \times Taq buffer 2.5 μ L, 引物 8F-FAM (10 μ mol/L) 1 μ L, 引物 1492R (10 μ mol/L) 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其特异性, 并且用 DNA 纯化试剂盒纯化。

1.5 FAM 荧光标记的 16S rRNA 基因的限制性酶切

利用限制性内切酶 *Hha* I 对已纯化的 PCR 产物进行酶切, 酶切反应体系(20 μ L): DNA 12 μ L, Buffer 2 μ L, *Hha* I 酶 1 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L。将体系置于 37 °C 恒温水浴 2 h。加入 2 μ L 终止试剂 (10 \times Loading buffer)终止酶切反应, 将酶切产物送至 Invitrogen 广州分公司进行基因扫描(GeneScan), 得到 T-RFLP 图谱及其相关数据。

1.6 T-RFLP 分析

1.6.1 多样性指数分析: 根据 *Hha* I 酶切得到的 T-RFLP 图谱中末端限制性片段数(T-RFs)、峰高 (Height)和峰面积(Peak area)等信息, 通过以下公式计算各项多样性指数:

Shannon-Weiner 多样性指数^[9]:

$$H' = -\sum(P_i) \log_2 P_i;$$

Simpson 指数^[10]: $D = 1 - \sum(P_i)^2$;

均匀度指数^[9]: $E = H/H_{\max}$, $H_{\max} = \log_2(S)$;

其中, P_i 是相对峰面积, 即各个峰面积占总峰面积的比值; S 是丰富度指数, 即 T-RFs 的个数, 或称 OTU (分类操作单元)。

1.6.2 6 个样品的聚类分析: 运用 NTSYS-pc 2.1 软件^[11]对各个样品的 T-RFLP 图谱采用 UPGMA (非加权组平均法)聚类方法进行了聚类分析。

1.7 克隆文库的建立及阳性克隆子的筛选和测序

为了确认和分析水葫芦根际样品的 T-RFLP 图谱中各个不同的限制性片段(T-RFs)代表何种微生

物,对10月份的水葫芦根际样品(RO)建立了克隆文库(通过T-RFLP图谱分析知其细菌多样性指数最高)。

克隆文库建立的具体步骤如下:采用无荧光标记的引物8F和1492R对水葫芦根际样品的DNA进行PCR扩增,扩增后的产物由DNA纯化试剂盒Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0切胶纯化后连接到载体pMD19-T Vector上,然后通过热击法将重组质粒转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。再取120 μ L转化产物均匀地涂布在含有100 μ L IPTG (10 mmol/L)、20 μ L的X-gal (50 000 g/L)和100 mg/L的Amp (氨苄青霉素) LB固体培养基中,在37 $^{\circ}$ C培养12–16h后进行蓝白斑筛选,随机挑取白色克隆子,利用特异性引物RV-M和M13-47对插入片段进行菌落PCR扩增筛选。将阳性克隆子送至Invitrogen广州分公司进行测序,将所测定的序列与GenBank核酸数据库进行相似性比对,可确定与数据库中最相似的菌种的名称。通过序列处理在线工具包(SMS)对每个阳性克隆子的序列进行Hha I

酶切位点分析,再结合T-RFLP图谱中的各个T-RF长度,可推测出各个T-RF所代表的微生物。SMS网址为:<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>。

2 结果与分析

2.1 水葫芦根际样品细菌的培养结果

从水葫芦根际样品中培养分离共得到3株细菌,均为不动杆菌(16S rRNA基因序列不同),将序列提交至NCBI获取登录号,如表1所示。

分离纯化得到的3个菌株Y11-5、Y12-5和Y13-3在培养基上均呈现为淡黄色菌落,菌落光滑,边缘整齐,在28 $^{\circ}$ C培养箱中能够较好地生长,经革兰氏染色显示其均为革兰氏阴性菌。

2.2 基于T-RFLP图谱的细菌群落多样性分析

根据Hha I酶切得到T-RFLP图谱的相关数据,分别计算6个样本(5月份水葫芦根际样品RM;10月份水葫芦根际样品RO;5月份水葫芦根际近水样WNM;10月水葫芦根际近水样WNO;5月水葫芦根际远水样WFM;10月份水葫芦根际远水样WFO)的多样性指数如表2所示。

表1 水葫芦根际样品细菌培养结果

Table 1 The results of bacterial culture in the rhizosphere of *E. crassipes*

编号 Serial number	16S rRNA 基因序列登录号 16S rRNA gene accession number	拉丁名 Latin name	中文名 Chinese name	相似度 Similarity (%)	相似序列登录号 Similar sequence accession number
Y11-5	KR110100	<i>Acinetobacter</i> sp.	不动杆菌	99	EU841482.1
Y12-5	KR110101	<i>Acinetobacter</i> sp.	不动杆菌	99	EF203410.1
Y13-3	KR110102	<i>Acinetobacter</i> sp.	不动杆菌	99	KJ416382.1

表2 基于T-RFLP图谱的细菌群落多样性分析

Table 2 Analysis of bacterial community diversity based on T-RFLP profiles

多样性指数 Diversity index	RM	RO	WNM	WNO	WFM	WFO
OTU	20	26	10	22	3	11
Diversity <i>H'</i>	4.07	4.41	3.16	4.24	1.22	3.22
Diversity <i>D</i>	0.93	0.95	0.87	0.94	0.48	0.87
Evenness <i>E</i>	0.94	0.93	0.94	0.95	0.77	0.93

根据水葫芦根际及其近、远水样的细菌多样性指数(Shannon-Weiner 指数 H' 或 Simpson 指数 D)可以说明: 在同一时间段内, 水葫芦根际具有更丰富的细菌群落多样性, 水葫芦近水样次之, 远水样多样性最小。此外, 不同的时间或季节会影响水葫芦根际细菌多样性。在这 3 个样品中, 5 月份的细菌群落多样性均比 10 月份的低。从均匀度指数 E 来看, 水葫芦根际及近水样细菌群落均匀性较高, 而

远水样的均匀性较低。

根据 T-RFLP 图谱(图 1), 可以观察到水葫芦根际的优势细菌主要有: 5 月份(134、156、159、161、162、236、239、247 bp), 10 月份(158、159、161、244、247 bp)。其中 159 bp 为绝对优势菌, 无论 5 月还是 10 月, 其峰高依然最大。其次是 247 bp, 5 月份和 10 月份都保持在一个较高的峰值, 而变化最显著的是 134 bp 和 236 bp, 5 月份其峰值较高,

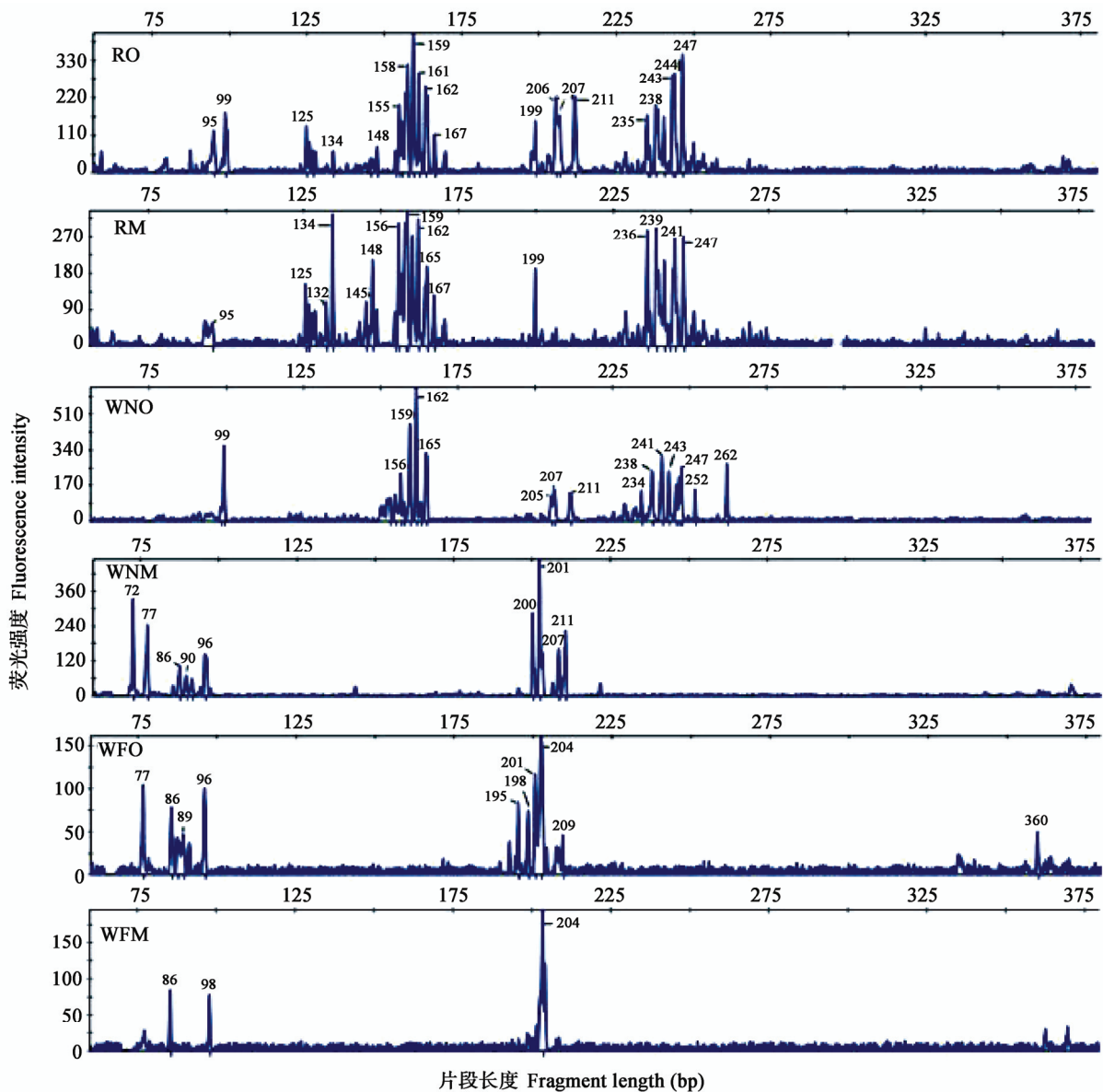


图 1 水葫芦根际、近水样和远水样 5 月份与 10 月份的 *Hha* I 酶切 T-RFLP 图谱

Figure 1 T-RFLP profiles of rhizosphere of *Eichhornia crassipes* and the water samples near and far from it in May and October with *Hha* I digestion

是优势菌之一,而到了10月份其峰值明显降低。

10月份近水样中,162 bp 为优势菌,在5月份未检测到其存在,而在水葫芦根际样品中162 bp 均存在一个较高的峰高值(Height): RO 为 254, RM 为 315,但均低于 WNO (641)。常会庆等^[12]研究发现,水葫芦的分泌物可对一些微生物生长产生抑制作用,如亚硝化菌和硝化菌;162 bp 所代表的细菌在根际有可能受到根际分泌物的抑制,表现为峰值较低。在5月份近水样中,201 bp 为优势菌,但在10月份几乎未检测到该峰信号。在水葫芦根际远水样中,其优势菌是204 bp,10月份的细菌多样性明显比5月份高,与根际样品比对不存在共同的种群。

2.3 6个样本的聚类分析

通过对以上6个样本的 T-RFLP 图谱的聚类分析,可以判断水葫芦根际及水葫芦近、远水样细菌群落结构的相似程度,聚类分析结果如图2所示。从图2可以看出,10月份水葫芦根际样品(RO)、

5月份水葫芦根际样品(RM)和10月份水葫芦近水样(WNO)聚为一类,其余样品聚为另一类。其中RO与RM比较相似,说明不同时段水葫芦根际细菌群落结构虽然存在变化,但其群落结构相似度仍高于水葫芦近、远水样样品。

10月份水葫芦近水样(WNO)与根际样品(RO和RM)聚为一类,而5月份水葫芦近水样(WNM)与水葫芦远水样(WFO和WFM)更相似,说明水葫芦近水样的细菌群落结构随时间的转移变化较大,如图2所示,10月份水葫芦近水样(WNO)在6个样本的聚类分析中处于中间态,即其与根际样品和远水样品的相似性均保持一定距离(但与根际样品相似性较高),而5月份近水样(WNM)则与远水样聚为一类,原因可能是近水样处于水葫芦根际与远水样之间的一个特殊环境,10月时其受水葫芦根际环境影响较大,此时水葫芦生长较旺盛,根际分泌物更多而影响近水样;反之,5月份时受远水样影响

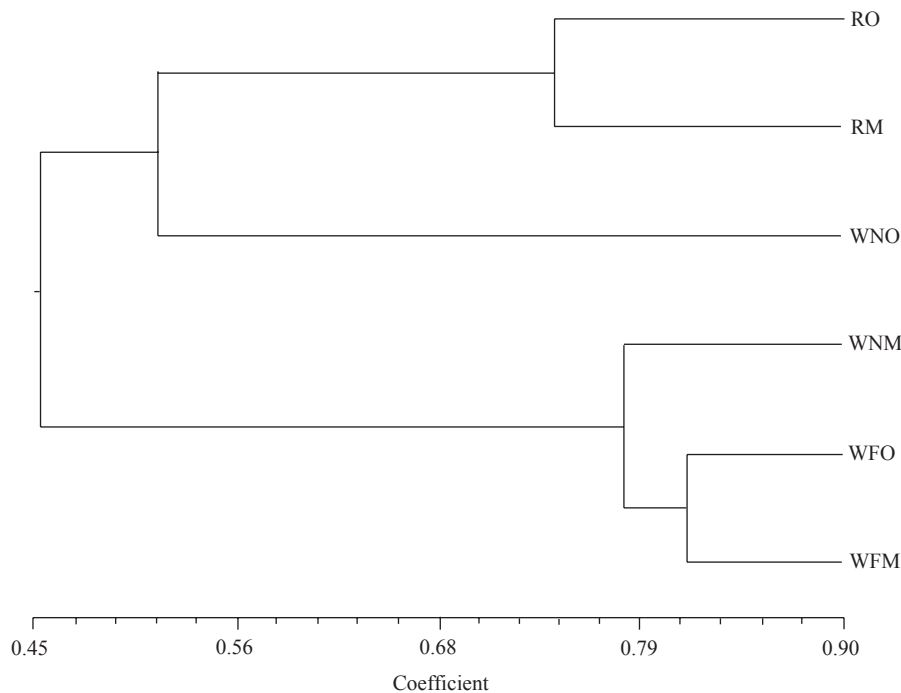


图2 基于 T-RFLP 图谱的 UPGMA 聚类分析

Figure 2 UPGMA dendrogram of hierarchical cluster analysis base on the T-RFLP profiles

注: 经过 *Hha* I 酶切的6个样本; 横坐标表示样本之间的相关系数。

Note: The six samples according to *Hha* I digestion; The horizontal axis represents the correlation coefficient between the samples.

更大。

2.4 6个样品优势菌的丰度分析及其根际效应

从6个样品中挑选出五大优势菌(WFM除外, 其T-RFLP图谱只有3个峰), 分别计算它们的丰富度指数(Simpson指数 D), 结果如表3所示。

从表3可以看出, 无论是5月份还是10月份, 水葫芦根际样品的优势菌丰富度都是最大的; 近水样由于受到根际效应的一些影响, 虽然与根际样品优势菌丰富度相比较低, 但是相差不是很大; 而远水样优势菌的丰度明显低于根际样品和近水样, 即从远水样、近水样到根际, 根际效应是不断增强的, 特别是在5月份, 根际样品优势菌丰富度显著高于远水样, 显示出很强的根际效应。

2.5 水葫芦根际样品克隆文库与 T-RFLP 图谱的对应分析

对水葫芦根际样本(RO)的PCR产物建立了克隆文库, 随机挑取共88个白色克隆子, 菌落PCR筛选后得到68个阳性克隆子, 经Hha I酶切分型后选取43个阳性克隆子进行测序, 将所得序列提交到GenBank数据库进行序列比对(BLAST), 并根据序列的相似度确定菌株名称。应用序列处理在线工具包(SMS)将这些序列逐个进行Hha I酶切分析, 得到每个序列的末端限制性片段(T-RF)的长度。所得结果见表4, 其中的登录号为GenBank登录号。

样品RO的克隆文库测序结果与其T-RFLP分析对比, 可知优势菌属为159 bp所代表的菌属, 但在克隆文库中未得到酶切片段为159 bp的克隆子,

而从该样品中培养分离得到的一个菌株(Y11-5)的Hha I酶切片段长度恰为159 bp。Y11-5(培养)经NCBI序列比对可知其为Acinetobacter sp. (不动杆菌), 相似度为99%, 推断159 bp可能为该菌属。样本中第二大优势菌247 bp与 γ -Proteobacteria (T-59)相似度为93%。99 bp与Opitutus sp. (88%)较相似, 199 bp可能为Pelomonas puraquae (95%), 205 bp与Leptothrix sp. (90%)较相似, 207 bp则对应若干个菌株, 有Leptothrix sp.、Rhodoferax sp.和Rhodocyclaceae; 244 bp尚不确定其种属。此外, 克隆文库所得到的Methylobacillus sp.、Rhodobacter sphaeroides (球形红杆菌)、Spartobacteria、Sphaerotilus natans (浮游球衣菌)、Dyadobacter fermentans、Silanimonas mangrovi和Prolixibacter sp.等未在T-RFLP图谱中找到对应的峰。

该克隆文库含有43个克隆子, 经过RDP数据库中的Classifier分析可知, 其中28个克隆子属于变形菌门(Proteobacteria), 有5个菌株属于拟杆菌门(Bacteroidetes), 属于酸杆菌门(Acidobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)的均有3个克隆子, 只有一个克隆子属于Hydrogenedentes, 3个克隆子属于未分类细菌。其中占大多数的变形菌门中, 3株属于 α -变形菌纲(α -Proteobacteria), 13株属于 β -变形菌纲(β -Proteobacteria), 8株属于 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria), 4株属于 δ -变形菌纲(δ -Proteobacteria)。培养分离得到的不动杆菌属Y11-5属于 γ -Proteobacteria。

表3 基于T-RFLP图谱的6个样品优势菌的丰度分析
Table 3 Analysis of richness of dominated bacteria in six samples based on T-RFLP profiles

样品 Sample	October		May	
	优势菌代表片段 Representative fragments of dominant bacteria (bp)	D	优势菌代表片段 Representative fragments of dominant bacteria (bp)	D
RO	159、247、158、244、162	0.794		
WNO	159、162、99、165、247	0.786		
WFO	204、201、77、96、195	0.745		
RM			159、134、158、244、239	0.787
WNM			201、72、77、211、207	0.782
WFM			204、86、98	0.484

表4 样品(RO) 16S rRNA 基因克隆文库比对结果与 T-RFLP 分析
Table 4 T-RFLP results with closest match of 16S rRNA gene sequences of the sample (RO)

克隆子编号 Clone number	T-RF 长度 T-RF length (bp)	最相似菌种 The most similar strain (GenBank)	相似度 Similarity (%)	相似序列登录号 Similar sequence accession number	克隆子序列登录号 Clone sequence accession number
T1	82	<i>Bacteriovorax</i> sp.	89	AY294221.1	KR110057
T2	199	<i>Pelomonas puraquae</i>	95	AB698673.1	KR110058
T3	99	<i>Opitutus</i> sp.	88	KJ721192.1	KR110059
T4	93	<i>Bacteriovorax</i>	89	EF092446.2	KR110060
T5	93	<i>Terriglobus</i> sp.	96	KF241163.1	KR110061
T9	205	<i>Leptothrix</i> sp	90	HM76966.1	KR110062
T11	177	Uncultured bacterium	97	FJ437883.1	KR110063
T12	86	Uncultured bacterium	97	GQ472368.1	KR110064
T14	67	Uncultured bacterium	90	FJ936884.1	KR110065
T15	570	<i>Methylobacillus</i> sp.	97	JX079398.1	KR110066
T16	513	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	92	EU882155.1	KR110067
T17	556	Spartobacteria	91	AB245342.1	KR110068
T19	400	<i>Dyadobacter fermentans</i>	96	JQ291593.1	KR110069
T22	61	Uncultured bacterium	93	JF703389.1	KR110070
T24	207	<i>Leptothrix</i> sp.	96	HM76966.1	KR110071
T26	1 303	Uncultured bacterium	96	AB630519.1	KR110072
T27	360	Acidobacteria	97	JN038943.1	KR110073
T29	570	Betaproteobacteria	99	JN038752.1	KR110074
T30	115	<i>Sphaerotilus natans</i>	97	KJ147073.1	KR110075
T31	197	Rhodocyclaceae	97	KF554507	KR110076
T38	1 089	<i>Ohtaekwangia</i> sp.	96	JX114449.1	KR110077
T40	207	<i>Rhodoferax</i> sp.	99	JN679198.1	KR110078
T41	61	Uncultured bacterium	85	JX105604.1	KR110079
T43	82	<i>Perlucidibaca</i> sp.	94	KF891388.1	KR110080
T44	67	Sphingobacteria	97	JN679070.1	KR110081
T45	513	Rhodospirillaceae	97	KC172318.1	KR110085
T46	563	<i>Thauera aromatica</i>	94	AF229881.1	KR110083
T47	175	<i>Dechloromonas</i> sp.	99	JF808880.1	KR110084
T49	244	Uncultured bacterium	91	HQ118319.1	KR110085
T50	88	Uncultured bacterium	95	AB930685.1	KR110086
T52	61	Steroidobacter	99	HQ132420.1	KR110087
T53	566	Uncultured bacterium	90	FJ437785.1	KR110088
T55	64	<i>Silanimonas mangrovi</i>	88	NR_117571.1	KR110089
T56	203	<i>Aquincola tertiaricarbonis</i>	97	JX094174.1	KR110090
T57	37	Sorangiiineae	93	FJ889275.1	KR110091
T58	572	Gammaproteobacteria	99	EU801093.1	KR110092
T59	247	Gammaproteobacteria	93	EU979081.1	KR110093
T60	67	Gammaproteobacteria	97	JN038741.1	KR110094
T62	79	<i>Coxiella burnetii</i>	89	CP000890.1	KR110095
T64	207	Betaproteobacterium	98	AF236004.1	KR110096
T65	207	Rhodocyclaceae	99	EU266786.1	KR110097
T67	1 370	Uncultured bacterium	91	JF697383.1	KR110098
T68	92	<i>Prolixibacter</i> sp.	98	JQ723616.1	KR110099
Y11-5	159	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	EU841482.1	KR110100

3 讨论

通过本研究的实验结果可知, 水葫芦根际细菌的群落结构丰富, 在 5 月份和 10 月份, 其群落多样性均高于水葫芦近水样及远水样。有研究^[13-14]指出植物的不同生长阶段可影响其根部生理状态, 且可改变根分泌物的质量与数量, 这些根际分泌物有利于绝大多数微生物的生长。本研究中, 水葫芦是一种浮游水生植物, 其根际的分泌物会随着水体的流动而影响到水葫芦根际的周围水体, 且距离水葫芦越远的水体其所受影响越小, 因此各个样品的细菌多样性呈现出: 水葫芦根际>水葫芦近水样>水葫芦远水样。这与其他研究者对水生或湿地等植物根际微生物群落多样性的结果一致。项学敏等^[15]研究了芦苇和香蒲的根际微生物特性, 结果显示该两种植物的根际效应十分明显, 其根际微生物数量明显高于非根际的微生物数量。陆开宏等^[16]对富营养化水中粉绿狐尾藻(*Myriophyllum aquaticum*)和喜旱莲子草(*Alternanthera philoxeroides*)的根际微生物群落特征研究后发现, 在不同时期这两种水生植物的根际微生物数量均高于水体中微生物的数量。此外, 在不同的季节, 水葫芦根际之间细菌多样性也存在差异, 10 月份水葫芦根际细菌多样性高于 5 月份(Shannon-Weiner 多样性指数 $H'_{RO}=4.41>H'_{RM}=4.07$)。这可能是由于水葫芦 10 月长势更好, 其根际分泌物比 5 月份的多。此外, 除了水葫芦根际分泌物对细菌的群落结构产生影响以外, 其中水体的质量也是影响微生物群落结构的因素, 如水体中重金属离子的污染。李淑英等^[17]对重金属胁迫对微生物生长的影响进行了研究, 结果发现, 低浓度的重金属离子(Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Pb^{2+})对一些微生物的生长具有促进作用, 而高浓度则抑制微生物的生长。本研究中采集的样品所在的河涌附近无工业区, 河水污染受重金属或其他有机污染物影响较小, 水葫芦根际细菌的群落结构主要受根系分泌物与水体中氨氮浓度的影响。

在本研究中, 采用 T-RFLP 技术对 10 月份水葫

芦根际(RO)细菌的群落结构进行分析时共获得 26 个 OTU, 利用克隆文库技术对该样品进行测序分析后发现, 在获得的 43 个克隆子中, 有 9 个克隆子的限制酶切片段与 T-RFLP 图谱中的峰高对应。对应率比前人所做的相关研究略高。Park 等^[8]对西瓜的根际微生物进行了研究, 在测序的 23 个克隆子中, 只有 4 个克隆子的 *Hha* I 酶切片段与 T-RFLP 图谱对应, 其认为应该有更多细菌的代表峰出现在 T-RFLP 图谱中, 只不过峰面积和峰高太小而无法被识别。也有一些研究^[18-19]显示一些克隆子产生的 TRF 片段并未在 T-RFLP 图谱中出现。也有可能是 T-RFLP 方法自身带来的误差, 因为 T-RFLP 方法中, 丰度低于 1% 的片段难于扩增出来, 所用引物尽管是细菌中的通用引物, 但仍然可能在扩增时存在偏好, 即某些细菌片段更易扩增出来, 而一些细菌片段很难扩增出来。在本实验中, T-RFLP 图谱中出现的峰 159 bp (优势峰)并未在克隆文库中找到与之对应的克隆子, 而对该样品进行传统的平板划线法分离得到的一株不动杆菌(Y11-5)的酶切片段却与该优势峰对应, 这主要由于建库后测序的克隆子是随机挑取的, 挑取的过程中有可能漏挑, 造成偏差。此外, 水体与土壤中根际细菌的群落结构所受影响的因素是有差别的, 在水体中, 由于其流动性使得根际分泌物更容易扩散, 故与土壤中的根际效应相比, 水体中的根际效应会相对较弱, 但从本研究的 T-RFLP 实验中可以看到, 富营养化水体中水葫芦根际微生物仍然显示出较强的根际效应, 这也与水葫芦特殊的生长特性有关, 它虽然是水生浮游植物, 但其根须也较为发达, 通常根须上会附着大量的淤泥, 这也给根际分泌物的存储和细菌的附着生长提供了条件。

本研究中, *Acinetobacter* sp. 是水葫芦根际细菌中的最优势菌。*Acinetobacter* sp. 具有较好的冷适应性和极好的氨氮去除能力, Huang 等^[20]在冬季较为寒冷的中国东北地区分离并鉴定了一株 *Acinetobacter* sp., 研究显示其在 2 °C 下具有很强的

氨氮去除能力,在经过 36 h 的培养之后,氨氮去除率达到 66%,并以氨气为最终代谢产物,对其 *napA* 基因的研究表明具有好氧反硝化作用的能力。詹发萃等^[21]研究了凤眼莲根区异养细菌的群落特征与异养活性,其从根区分离出了 24 株优势菌,经鉴定有 10 个属,包括气单胞菌属、微球菌属、假单胞菌属等,在根区也分离到一株不动杆菌属。247 bp (T-59)是水葫芦根际的第二大优势菌,其与丰度较高的 244 bp (T49)均属于 γ -Proteobacteria; 207 bp 所代表的 4 个菌株(T24, T40, T64, T65), 199 bp 代表的菌株 T2 (*Pelomonas puraquae*), 205 bp 所代表菌株 T9 (*Leptothrix* sp.)均属于 β -Proteobacteria。 β -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria 中的氨氧化细菌在氨氧化作用中具有重要作用,能够有效降低氨氮浓度,如属于 β -Proteobacteria 的 *Nitrosomonas*, *Nitrosospora*, *Nitrosolobus* 和 *Nitrosovibrio* 菌属^[22-23], 属于 γ -Proteobacteria 的 *Nitrosococcus oceani*^[24]等。

细菌的非培养研究表明酸杆菌门 (*Acidobacteria*) 的多样性几乎与变形杆菌门 (*Proteobacteria*)一样丰富^[25],目前含有 26 个基于系统发生区分的亚群^[26]。疣微菌门(*Verrucomicrobia*)是新提出的一个细菌的分支,其广泛存在于环境,特别是土壤中,且群落结构丰富^[27]。在本研究中的水葫芦根际这样的特殊环境, *Acidobacteria* 与 *Verrucomicrobia* 仅占总群落的很小比例,而 *Proteobacteria* 占总群落的 65.1%,为水葫芦根际细菌的主要类群,其原因可能是大多数 *Proteobacteria* 具有氨氧化作用的功能或其可参与氮素的代谢和循环,使其在富营养化水体中的水葫芦根际环境下能够较好维持其生长。

4 结论

本研究应用 T-RFLP 与克隆文库技术分析了水葫芦根际细菌的群落结构,并对比了水葫芦近水样和远水样,发现水葫芦根际细菌更为丰富,且随着时间的变化其多样性略有变化,但其主要类群不变。变形杆菌门(*Proteobacteria*)是水葫芦根际细菌中的

主要类群, 占总群体的 65.1%, 然后依次是拟杆菌门(*Bacteroidetes*) 11.6%、酸杆菌门(*Acidobacteria*) 7%、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 7% 和 *Hydrogenedentes* 2.3%; 未分类细菌占 7%。其中,属于 *Proteobacteria* 的不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)是优势菌属。本研究是利用 16S rRNA 基因为目的基因对水葫芦根际细菌群落结构进行分析,要进一步了解水葫芦根际细菌降解与利用氨氮的情况,有待对其功能基因如 *amoA* 等进行进一步的研究。

参考文献

- [1] de Casabianca MLC. *Eichhornia crassipes*: Production in repeated harvest systems on waste water in the Languedoc Region (France)[J]. *Biomass*, 1985, 7(2): 135-160
- [2] Dinges R. Upgrading stabilization pond effluent by water hyacinth culture[J]. *Water Pollution Control Federation*, 1978, 50(5): 833-845
- [3] Jayaweera MW, Kasturiarachchi JC, Kularatne RKA, et al. Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands[J]. *Journal of Environmental Management*, 2008, 87(3): 450-460
- [4] Jayaweera MW, Kasturiarachchi JC. Removal of nitrogen and phosphorus from industrial wastewaters by phytoremediation using water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms)[J]. *Water Science and Technology*, 2004, 50(6): 217-225
- [5] Zhang H, Chen GR, Wu ZB, et al. The study on the relationship between N, P removing rates and the distribution of bacteria in two artificial wetlands[J]. *Journal of Central China Normal University (Natural Science Edition)*, 1999, 33(4): 575-578 (in Chinese)
张鸿, 陈光荣, 吴振斌, 等. 两种人工湿地中氮、磷净化率与细菌分布关系的初步研究[J]. *华中师范大学学报: 自然科学版*, 1999, 33(4): 575-578
- [6] Prosser JI. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms[J]. *Plant and Soil*, 2002, 244(1/2): 9-17
- [7] Lan JL, Liu B, Wang J, et al. A heterotrophic nitrification bacterium strain: China, CN103045520A[P]. 2013-04-17 (in Chinese)
蓝江林, 刘波, 王洁, 等. 一种异养硝化细菌菌株: 中国, CN103045520A[P]. 2013-04-17
- [8] Park S, Ku YK, Seo MJ, et al. The characterization of bacterial community structure in the rhizosphere of watermelon (*Citrullus vulgaris* SCHARD.) using culture-based approaches and terminal fragment length polymorphism (T-RFLP)[J]. *Applied Soil Ecology*, 2006, 33(1): 79-86
- [9] Margalef R. Information theory in ecology[J]. *General Systems*, 1958, 3: 36-71
- [10] Simpson EH. Measurement of diversity[J]. *Nature*, 1949, 163(4148): 688
- [11] Rohlf FJ. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1[M]. New York: Exeter Publication Ltd Setauket, 2000
- [12] Chang HQ, Ding XF, Cai JB. Effect of crude exudates of aquatic macrophytes on bacteria[J]. *Research of Soil and Water Conservation*, 2007, 14(4): 57-60 (in Chinese)
常会庆, 丁学峰, 蔡景波. 水生植物分泌物对微生物影响的研究[J]. *水土保持研究*, 2007, 14(4): 57-60

- [13] Dunfield KE, Germida JJ. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7310-7318
- [14] Houlden A, Timms-Wilson TM, Day MJ, et al. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65(2): 193-201
- [15] Xiang XM, Song CX, Li YS, et al. Microorganism features of typha latifolia and phragmites Australis at rhizosphere[J]. Environmental Protection Science, 2004, 30(4): 35-38 (in Chinese)
项学敏, 宋春霞, 李彦生, 等. 湿地植物芦苇和香蒲根际微生物特性研究[J]. 环境保护科学, 2004, 30(4): 35-38
- [16] Lu KH, Hu ZY, Liang JJ, et al. Characteristics of rhizosphere microbial community structure of two aquatic plants in eutrophic waters[J]. China Environmental Science, 2010, 30(11): 1508-1515 (in Chinese)
陆开宏, 胡智勇, 梁晶晶, 等. 富营养水体中2种水生植物的根际微生物群落特征[J]. 中国环境科学, 2010, 30(11): 1508-1515
- [17] Li SY, Ma YQ, Su YL, et al. Effect of heavy metal stress on microbial growth[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2012, 40(2): 90-94 (in Chinese)
李淑英, 马玉琪, 苏亚丽, 等. 重金属胁迫培养对微生物生长的影响[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(2): 90-94
- [18] Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2943-2950
- [19] Phelps CD, Kerkhof LJ, Young LY. Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 27(3): 269-279
- [20] Huang XF, Li WG, Zhang DY, et al. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature[J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 44-50
- [21] Zhan FC, Deng JQ, Xia YC, et al. Studies on community characteristics and heterotrophic activity of heterotrophic bacteria from root-zone of water hyacinth[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1993, 17(2): 150-156 (in Chinese)
詹发萃, 邓家齐, 夏宜琤, 等. 凤眼莲根区异养细菌的群落特征与异养活性的研究[J]. 水生生物学报, 1993, 17(2): 150-156
- [22] Head IM, Hiorns WD, Embley TM, et al. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(6): 1147-1153
- [23] Teske A, Alm E, Regan JM, et al. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria[J]. The Journal of Bacteriology, 1994, 176(21): 6623-6630
- [24] Trüper HG, de'Clari L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition"[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(3): 908-909
- [25] Ludwig W, Bauer SH, Bauer M, et al. Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 153(1): 181-190
- [26] Barns SM, Takala SL, Kuske CR. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment[J]. Applied Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1731-1737
- [27] Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(18): 4765-4774