

刘建丽, 赵吉, 武琳慧. 乌梁素海湖滨湿地硫酸盐还原菌种群分布[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(2): 358–363.

LIU Jian-li, ZHAO Ji, WU Lin-hui. Abundance and diversity of sulfate-reducing bacteria in littoral wetland of Wuliangsuhai[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(2): 358–363.

乌梁素海湖滨湿地硫酸盐还原菌种群分布

刘建丽, 赵吉, 武琳慧*

(内蒙古大学环境与资源学院, 呼和浩特 010021)

摘要: 采用克隆文库构建和实时定量 PCR 技术, 对乌梁素海湖滨湿地小河口陆向演化芦苇沉积物、湖滨沼泽水葱沉积物、湖滨碱蓬盐碱化草甸土壤、湖岸白刺荒漠化土壤等环境中硫酸盐还原菌(Sulfate reducing bacteria, SRB)多样性及其丰度进行了研究。结果显示: 上述沉积物和土壤环境中硫酸盐还原菌功能基因 *apsA* 丰度存在显著差异, 每克土壤中基因丰度(拷贝数)分别为 1.34×10^7 、 8.07×10^5 、 5.27×10^6 和 2.37×10^4 ; 系统发育树分析表明, 硫酸盐还原菌属于变形杆菌门(Proteobacteria)中的五个科, 分别为 Acidithiobacillales、Desulfurella、Chromatiales、Desulfovibrionaceae 和 Desulfobacteriaceae, 其中 Chromatiales、Desulfovibrionaceae 和 Desulfobacteriaceae 为优势菌群。沉积物和土壤环境中硫酸盐还原菌群落及 *apsA* 基因丰度存在显著差异, 硫酸盐还原菌多样性与土壤总盐量、含水率及硫酸盐浓度之间存在显著相关($P < 0.05$)关系。

关键词: 湖滨湿地; 硫酸盐还原菌; 群落结构; 功能基因 *apsA*

中图分类号: X52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2016)02-0358-06 doi:10.11654/jaes.2016.02.021

Abundance and diversity of sulfate-reducing bacteria in littoral wetland of Wuliangsuhai

LIU Jian-li, ZHAO Ji, WU Lin-hui*

(College of Environment & Resources of Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

Abstract: Abundance and diversity of sulfate-reducing bacteria(SRB) in sediments and soils from landward transect of Wuliangsuhai were investigated using clone library construction and real-time quantitative PCR (q-PCR) techniques. The abundance of *apsA* gene was significantly different among four studied samples. It was 1.34×10^7 , 8.07×10^5 , 5.27×10^6 , and 1.34×10^7 copies per gram of sample for landward evolved *Phragmites australis* sediments, lakeside *Scirpus validus* Vah sediments, lakeside *Suaeda salsa* salinized meadow soil, and lakeshore desertified *Nitraria tangutorum* soil, respectively. Phylogenetic tree analysis showed that SRB communities in Wuliangsuhai consisted of five families. They were Acidithiobacillales, Desulfurella, Chromatiales, Desulfovibrionaceae and Desulfobacteriaceae in the Proteobacteria phylum. Among them, Chromatiales, Desulfovibrionaceae and Desulfobacteriaceae were dominant. The diversity of SRB was closely correlated with total water soluble salt, moisture content, and sulfate content($P < 0.05$).

Keywords: littoral wetland; sulfate-reducing bacteria(SRB); community structure; functional gene *apsA*

乌梁素海作为典型的浅草型湖泊湿地, 在调节周围气候、维持生物多样性等方面起着至关重要的作用。

收稿日期: 2015-09-18

基金项目: 国家自然科学基金项目“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); 内蒙古自然科学基金“蒙古高原湿地参与甲烷循环微生物群落结构与功能研究”(2012MS0610)

作者简介: 刘建丽(1988—), 女, 山西吕梁人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: lj12489@sina.com

* 通信作者: 武琳慧 E-mail: happyleis@sina.com

近年来大量农灌退水和工业及生活污水的排入, 导致水体呈现重度富营养化^[1]。大型水生植物异常生长, 湖泊周围土壤盐碱化现象严重, 而且湖泊沼泽化趋势明显, 水体生境受到破坏, 水生态系统良性循环受阻^[2]。面对乌梁素海湿地严重的水体富营养化及土壤盐碱化等问题, 探究该环境中微生物群落结构变化及其多样性是目前研究热点之一。

硫酸盐还原菌(Sulfate reducing bacteria, SRB)的存在代表了厌氧环境的发生, 其种群数量的多少一

定程度上反映了厌氧程度的高低。水体富营养化及土壤盐碱化极易导致水体深层溶解氧降低和土壤结块,形成还原状态有机物无机化不完全,硫酸盐还原形成硫化氢气体,因此硫酸盐还原菌种群数量多少在一定程度上有指示作用^[3]。随着生物学技术的不断发展,研究发现 SRB 形态各异、营养类型多样,在厌氧及微氧环境中都可以将硫化物作为电子受体进行新陈代谢^[4-6]。但乌梁素海湖滨湿地环境中 SRB 功能菌群的分布和基因丰度目前知之甚少,硫酸盐还原菌功能基因 *apsA* 能够编码腺苷酰硫酸还原酶的 α -亚基(α -subunit of adenosine-5'-phosphosulfate reductase reductase),该酶能将 SO_4^{2-} 还原为 SO_3^{2-} ^[7],在硫循环过程中起主导作用。故本研究通过克隆文库构建和实时定量 PCR 技术分子手段,对乌梁素海湖滨湿地陆向分布梯度上 SRB 群落结构及功能基因 *apsA* 丰度进行研究,探究在沉积物和土壤环境中的 SRB 的多样性分布及丰度变化,旨在为研究乌梁素海湿地生态与环境提供理论基础,为湿地生态系统生物评估及生物修复提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 研究区概况及样品采集

研究区乌梁素海($108^{\circ}43' \sim 108^{\circ}57'E$, $40^{\circ}46' \sim 41^{\circ}03'N$)是内蒙古高原干旱区最典型的浅草型湖泊,它的形成与黄河主流改道有关,是国际关注的湿地生态系统生物多样性的重点保护区之一。研究区属典型的温带大陆性季风气候,年均降雨量为 215 mm,平均气温 6.6°C ,水生植物共 6 科 6 属 11 种,植被类型包括:挺水植物芦苇(*Phragmites communis*)、宽叶香蒲(*Typhaphalatifolia*);沉水植物菹草(*Potamogetonerispus*)、龙须眼子菜(*Potamogeton pectinatus*)和藻类;陆生植物以碱蓬和白刺为主^[1]。小河口作为接纳来自总排干、通济渠和八排干等农灌退水和工业及生活污水的污水口,水体富营养化程度明显,且周边土壤盐碱化及荒漠化现象严重。因此,以乌梁素海湿地小河口为研究区域,按照该区域沉积物、盐碱化及荒漠化的地域分布特征设置一条陆向分布样带,选择具有代表性的 4 种类型植物土壤:湖中芦苇沉积物($108^{\circ}54'649''E$, $40^{\circ}46'367''N$)、湖滨沼泽水葱(*Scirpus validus Vahl*)沉积物($108^{\circ}56'692''E$, $40^{\circ}456'861''N$)、湖滨碱蓬(*Suaeda salsa*)盐碱化草甸土壤($108^{\circ}56'682''E$, $40^{\circ}56'863''N$)和湖岸白刺(*Nitraria tangutorum*)荒漠化土壤($108^{\circ}56'682''E$, $40^{\circ}56'863''N$),分别采集周围表

层土样(0~20 cm),相应标记为 A1、A2、A3、A4,每个样点按照“S”型分别设置三个平行样。样点分布示意图如图 1 所示。土壤理化性质的测定主要是根据《土壤农化分析实验教材》^[8]和《土壤·水·植物理化分析教程》^[9]。

样品内外做好标记后用封口袋密封,立即用冰袋保鲜,带回室内分别混匀并分装,分别于 -20°C 和 -80°C 保存。 -20°C 样品用于土壤理化性质的测定, -80°C 样品用于分子生物学分析。



图 1 乌梁素海采样点示意图

Figure 1 Sampling locations in Wuliangsuhai

1.2 样品 DNA 的提取及 PCR 扩增

采用 FastDNA[®] SPIN Kit For Soil 试剂盒(MP BIO, USA)提取总 DNA。扩增引物^[10]为 APS7-F: 5'-GGGYCTKTCCGCYATCAAYAC-3' 和 APS8-R: 5'-GCACATGTCGAGGAAGTCTTC-3', 片段大小为 900 bp。PCR 反应体系: $10\times\text{Buffer}$ 2.5 μL , dNTPs ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.0 μL , 上下游引物 ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1.0 μL , TransTaq-T ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , DNA 模板 1 μL , 加 ddH₂O 至终体积 25 μL 。PCR 扩增条件: 95°C , 5 min; 94°C , 30 s; 56°C , 30 s; 72°C , 1 min, 35 个循环; 72°C , 10 min。DNA 纯化回收试剂盒对 PCR 扩增产物纯化回收。

1.3 硫酸盐还原菌克隆文库的构建

本研究选取 APS7-F 和 APS8-R 引物对硫酸盐还原菌功能基因 *apsA* 的保守片段进行扩增, 采用

菌落 PCR 方法鉴定阳性克隆子。将鉴定好的阳性克隆子接种于 LB/AMP 液体培养基中,37 ℃过夜培养。菌液保存,送华大基因测序,引物为 M13R Forward Primer 和 M13F Reverse Primer(注:引物为 *pEASY*®-T1 载体试剂盒自带)。

1.4 实时定量分析

Illumina Eco™ 实时荧光定量 PCR 仪用于定量分析,引物^[11]RH1-aps-F:5'-CGCGAAGACCTKATCTTC-GAC-3'和 RH2-aps-R:5'-ATCATGATCTGCCAGCG-GCCGGA-3'用于样品的定量扩增,片段大小为 190 bp。SYBR® Premix Ex Taq™ II (TRAN,BEIJING)试剂用于定量分析。经优化后的 SYBR® Green I 检测反应体系:SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×)10.0 μL,上下游引物(10 mmol·L⁻¹)各 0.8 μL,DNA 模板 0.5 μL,加 ddH₂O 至 20 μL。反应条件:预变性 95 ℃ 30 s,35 个循环 PCR 反应扩增(95 ℃ 15 s,63 ℃ 31 s)。溶解曲线分析条件为 95 ℃ 15 s,63 ℃ 15 s,95 ℃ 15 s。

1.5 数据处理及分析

本研究获得的序列均已通过 Sequenin 软件整理并提交,获取登录号为:KP337769-KP337883。

运用 DOTUR 软件对序列在相似性 97% 的基础上进行可分类单元操作(Operational taxonomic units,简称 OTU),同时获得 Rarefaction 等指数。选取代表性的克隆序列,与 NCBI 在线数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行比对,选择覆盖度和相似度都比较高的序列作为参考序列,通过 Cluster W 对齐序列,再用 MEGA 5.2 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 基质环境基本性质

四个样点土壤性质各不相同,数据表明(表 1):有机碳、总氮和总磷的含量在 A3 样地含量最低;水溶性盐总量按照演化梯度总体上呈上升趋势;四个样

表 1 土壤样品的基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of soil samples

样点	A1	A2	A3	A4
有机碳/g·kg ⁻¹	11.82	7.99	3.73	12.93
总氮/g·kg ⁻¹	1.07	0.69	0.32	1.33
总磷/g·kg ⁻¹	0.78	0.57	0.47	0.66
水溶性盐总量/g·kg ⁻¹	9.11	7.11	13.65	20.46
pH	8.04	8.61	9.25	8.69
硫酸根/g·kg ⁻¹	7.49	3.80	4.75	7.32
含水率/%	51.00	51.38	20.53	5.88

点土壤 pH 值均大于 8.0,偏碱性;硫酸根的含量介于 3.80~7.49 g·kg⁻¹ 之间;土壤含水率在陆向分布样带上呈下降趋势。

2.2 硫酸盐还原菌群落多样性

阳性克隆子测序后,共获得了 121 条有效序列。在给定的 98% 的相似水平上将所有获得的序列通过 Dotur 软件来进行 OTU 的分类,共分为 34 个 OTUs。Rarefaction 分析表明,本研究所获得 SRB 的生物信息在种水平上,还不能完全地代表真实环境中硫酸盐还原菌的多样性,说明这些样品中还包含着更多的有待于进一步挖掘的硫酸盐还原菌,增加取样量可能会得到更大的多样性,见图 2。Shannon 和 Simpon 多样性指数表明,克隆文库 A3 的多样性最高,而 A4 的多样性最低。

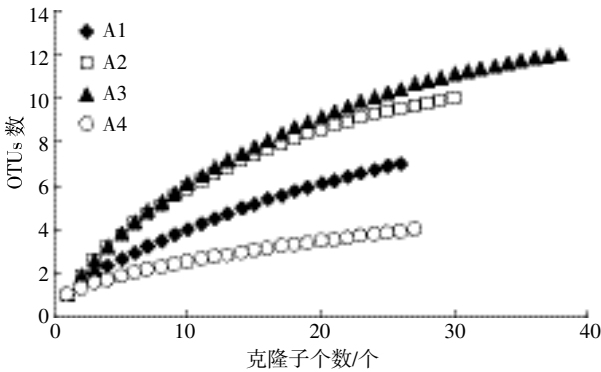


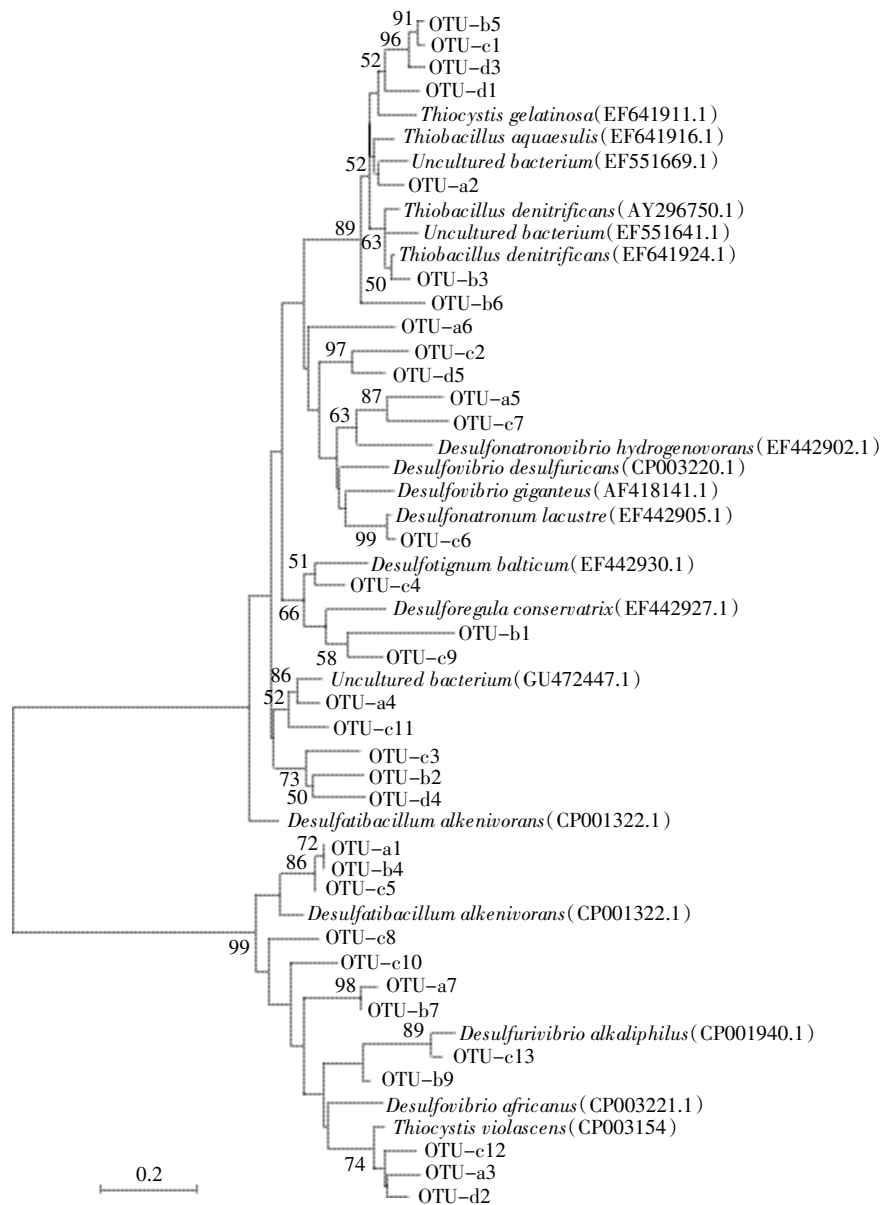
图 2 *apsA* 序列 Rarefaction 曲线

Figure 2 Rarefaction curves of *apsA* gene sequence

本研 究 所 得 到 的 SRB *apsA* 序 列 分 布 于 5 个 科 (图 3):Chromatiaceae、Acidithiobacillales、Desulfovib-
rionaceae、Desulfobacteriaceae 和 Desulfurella,Desul-
fobacteriaceae 科是主要的分布菌群。Acidithiobacil-
lales 属于 Gammaproteobacteria(γ-变形菌纲),其他四
个科都属于 Deltaproteobacteria(δ-变形杆菌纲)。然而
还有大部分序列没有高度相似的可培养 SRB *apsA* 序
列作参考,推测各样点中可能存在新的硫酸盐还原菌
种群。

2.3 硫酸盐还原菌功能基因 *apsA* 丰度

采用实时定量 PCR 技术对四个样地中 SRB 功
能基因 *apsA* 丰度进行检测(图 4),结果显示四个样
地(A1、A2、A3、A4)中硫酸盐还原菌功能基因 *apsA*
丰度存在显著差异,每克土样中 *apsA* 拷贝数分别为:
1.34×10⁷、8.07×10⁵、5.27×10⁶ 和 2.37×10⁴。因为 *apsA*
是硫酸盐还原酶 α-亚基的编码基因,在每个细胞内
仅有一个拷贝^[12],所以本实验测定的 *apsA* 丰度能够



采用 Maximum Composite Likelihood 模型构建, Bootstrap 值为 10 000, 采用 Bootstrap 对进化树的可信度进行检验

本图只选取可信度百分比在 50 以上的序列

图 3 基于硫酸盐还原菌功能基因 *apsA* 的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree based on functional *apsA* gene of sulfate-reducing bacteria

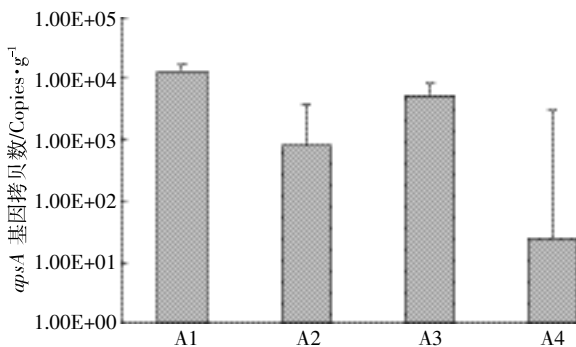


图 4 定量 PCR 分析功能基因 *apsA* 拷贝数

Figure 4 Copy number of functional gene *apsA* in four samples

确切地反映实际环境中硫酸盐还原菌的丰度。*apsA* 丰度的最大值出现在 A1, 其后依次为 A3、A2 和 A4。

2.4 乌梁素海湿地土壤理化性质与 SRB 多样性的相关性分析

以 SRB 在优势菌群的相对丰度为参数, 通过 SPSS 软件计算 Pearson 相关系数, 分析土壤理化性质对 SRB 多样性的影响(表 2)。发现 *Desulfobacteriaceae* 科的相对丰度与土壤总盐量及含水率之间存在显著相关($P < 0.05$), 与其他理化性质相关性不显著; *Desulfurella* 与硫酸盐浓度存在显著相关, 与其他理化

表2 乌梁素海湿地土壤理化性质与SRB多样性的相关性
Table 2 Correlation coefficients between soil physic-chemical properties and SRB relative abundance in Wuliangsu wetland

项目	TN	TP	TWSS	pH	SO ₄ ²⁻	MC
Chromatiaceae	0.699	0.181	0.909	0.089	0.538	-0.800
Acidithiobacillales	-0.173	-0.055	-0.753	-0.267	-0.621	0.739
Desulfovibrionaceae	-0.719	-0.664	0.194	0.758	-0.252	-0.393
Desulfobacteriaceae	-0.264	0.120	-0.965*	-0.453	-0.480	0.963*
Desulfurella	-0.705	-0.585	-0.706	0.272	-0.952*	0.542

注:* 在 0.05 水平(双侧)上显著相关;TN-总氮 Total nitrogen;TP-总磷 Total phosphorus;TWSS-总盐量 Total water soluble salt;MC-含水率 Moisture content。

参数相关性不显著。

3 讨论

硫酸盐还原菌在土壤、海洋沉积物、淹水稻田土壤、河流、湖泊及一些泥沼等自然环境中分布广泛,主要属于 Proteobacteria、Nitrospirae、Firmicutes、Thermodesulfobacteria 和 Euryarchaeota 门。目前参与硫酸盐还原过程的微生物主要有革兰氏阳性/阴性硫酸盐还原细菌或古菌,还有部分能将含氮有机物分解为氨并将有机物脱硫后形成 H₂S。

功能基因 *apsA* 定量分析显示,乌梁素海湖滨湿地陆向分布带不同植被下,每克沉积物和土壤样品中 *apsA* 基因丰度为 $2.37 \times 10^4 \sim 1.34 \times 10^7$ 个拷贝。根据图3的定量结果,A1 功能基因 *apsA* 丰度最大(SO₄²⁻浓度 $7.49 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),A4 功能基因 *apsA* 丰度最小(SO₄²⁻浓度 $7.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),可以看出硫酸盐浓度并不是唯一影响 *apsA* 基因丰度的因素。

本研究所获得的 SRB 属于变形杆菌门(Proteobacteria)中的五个科:Acidithiobacillales、Desulfurella、Chromatiales、Desulfovibrionaceae 和 Desulfobacteriaceae,其中 Chromatiales 是变形菌门下的一类能够进行光合作用的细菌。研究发现硫酸盐还原菌可以与光营养型微生物共生,硫在这种共生关系中起着电子载体的作用^[13]。Desulfovibrionaceae 和 Desulfobacteriaceae 都属于革兰氏阴性嗜温不产芽孢型的变形菌门 δ -变形菌纲,最早分离的 SRB 也属于这一类群,与 ϵ -变形菌关系最近,主要分布于淡水、淡咸水或海水下的污泥或沉积物中,且多数菌株含氢化酶,部分菌株可以利用乙酸和 CO₂ 作碳源,通过氢的氧化和以 SO₄²⁻ 作末端电子受体来获取能量,少数菌株还有生物固氮能力^[14]。湖区沉积物中的硫酸盐还原菌优势菌群

为 Desulfovibrionaceae 和 Desulfobacteriaceae,而在退水区及荒漠化样点中优势菌群为 Chromatiales。初步推测,随着湿地的横向演化,使得湖心与湖岸生态系统产生差异,进而导致各自环境中硫酸盐还原菌类群的差异性,土壤总盐量、含水率及硫酸盐浓度可能是造成这一现象的主导因素($P < 0.05$)。研究发现在淹水稻田土壤环境中,*Synthrophobacter*、*Desulforhabdus* 和 *Desulfobacterium* sp. 为优势物种,盐沼环境中由于 Cl⁻ 和 SO₄²⁻ 的地球化学性质相似,常利用二者的摩尔比对硫酸盐还原菌进行定性及半定量推测,导致 SRB 的多样性较高^[15-16]。硫酸盐还原菌对生态环境扰动所做出的快速响应,通过调查环境中 SRB 的群落结构,对湿地、矿山废水污染及油藏等环境的管理及评估,治理 SRB 引起的生物腐蚀都有一定的意义。

4 结论

乌梁素海湖滨湿地沉积物环境中硫酸盐还原菌群落多样性高于土壤环境中硫酸盐还原菌群落多样性,荒漠化土壤环境中群落多样性和 *apsA* 基因丰度都最低。土壤总盐量、含水率及硫酸盐浓度对 SRB 群落分布影响显著。

参考文献:

- [1] 李哲,王平. 乌梁素海的环境问题及对策[J]. 环境与发展, 2014, 26(1):96-98.
Li Zhe, Wang Ping. Environmental problems and solutions Wuliangsu wetland[J]. *Environment and Development*, 2014, 26(1):96-98.
- [2] Emadi M, Baghernejad M. Comparison of spatial interpolation techniques for mapping soil pH and salinity in agricultural coastal areas, Northern Iran[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2014, 60(9): 1315-1327.
- [3] Xiao H. Studies on bacteriology of coastal water in Bohai Bay and the application of bacteria on assessment of the quality of coastal environment[D]. Qingdao: China Ocean University, 2005.
- [4] Brioukhanov A, Pieulle L, Dolla A. Antioxidative defense systems of anaerobic sulfate-reducing microorganisms[J]. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2010(1):148-159.
- [5] Yu H, Chen C, Ma J, et al. Microbial community functional structure in response to micro-aerobic conditions in sulfate-reducing sulfur-producing bioreactor[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, 26(5): 1099-1107.
- [6] Pachiadaki M G, Lykousis V, Stefanou E G, et al. Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3):429-444.
- [7] Suzuki I. Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacil-*

- lus thiooxidans*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1965, 104(2):359–371.
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社, 2008.
BAO Shi-dan. Soil agro-chemical analysis[M]. Beijing:China Agriculture Press, 2008.
- [9] 张 韫. 土壤·水·植物理化分析教程[M]. 北京:中国林业出版社, 2011.
ZHANG Yun. Soil, water and plant physical and chemical analysis[M]. Beijing:China Forestry Publishing House, 2011.
- [10] Hiibel S R, Pereyra L P, Breazeal M V R, et al. Effect of organic substrate on the microbial community structure in pilot-scale sulfate-reducing biochemical reactors treating mine drainage[J]. *Environmental Engineering Science*, 2011, 28(8):563–572.
- [11] Xu X M, Fu S Y, Zhu Q, et al. Depth-related coupling relation between methane-oxidizing bacteria (MOBs) and sulfate-reducing bacteria (SRBs) in a marine sediment core from the Dongsha region, the South China Sea[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(24):10223–10230.
- [12] Aktas D F, Lee J S, Little B J, et al. Effects of oxygen on biodegradation of fuels in a corroding environment[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2013, 81:114–126.
- [13] 李永峰, 刘晓辉, 杨传平. 硫酸盐还原菌细菌学[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社, 2013.
LI Yong-feng, LIU Xiao-ye, YANG Chuan-ping. Sulfate reducing bacteria bacteriology[M]. Harbin:Northeast Forestry University Press, 2013.
- [14] 周德庆, 徐士菊. 微生物学词典[M]. 天津:天津科学技术出版社, 2005.
ZHOU De-qing, XU Shi-ju. Microbiology dictionary[M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 2005.
- [15] Stubner S. Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 57(2):219–30.
- [16] 陈庆强, 唐 媛, 杨 艳, 等. 长江口盐沼硫酸盐还原菌的分布特征与环境机制[J]. 沉积学报, 2012, 30(6):1088–1098.
CHEN Qing-qiang, TANG Yuan, YANG Yan, et al. Distribution pattern of sulfate-reducing bacteria and its environmental mechanism in the saltmarsh of the Yangtze estuary[J]. *Acta Sedimentologica Sinica*, 2012, 30(6):1088–1098.