

## 研究报告

## 辽宁盘锦三角洲翅碱蓬根系及内生细菌群落多样性

田锐 于子超 李作扬 王绪磊 王斌\*

(大连海洋大学 辽宁省高校海洋生物资源可持续利用重点实验室 辽宁 大连 116023)

**摘要:**【目的】翅碱蓬(*Suaeda heteroptera*)是一种典型的盐碱指示物,对重金属和石油污染的盐碱土壤有一定的修复作用,但是关于翅碱蓬根系与根系内生微生物之间的关系、微生物的多样性以及根系微生物在生物修复中所起作用的研究较少。本文以盘锦“红海滩”的翅碱蓬为例,研究翅碱蓬根系及根系内生细菌菌群种类和结构。【方法】通过传统的培养方法和非培养的高通量测序方法对翅碱蓬根系土壤样品、根系附着物样品以及根系匀浆样品中微生物群落多样性进行分析。

【结果】传统方法共分离得到 67 株细菌,选择代表菌 28 株,根据其形态特征和生理生化特征,结合 16S rRNA 基因序列比对进行鉴定,它们分别属于盐单胞菌属(*Halomonas*)、海细菌属(*Marinobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、副球菌属(*Paracoccus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、游动球菌属(*Planococcus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、刘志恒菌属(*Zhihengliuella*)等。利用高通量测序技术对样品进行多样性分析,其中根系附着物样品的菌群丰度和多样性最高,依次分别为根系土壤样品和根系匀浆样品。3 个样品中有效序列群落结构可分为 12 个门,包括酸杆菌门(*Acidobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿菌门(*Chlorobi*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、蓝菌门(*Cyanobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、螺旋体门(*Spirochaetes*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)。根系匀浆样品中蓝菌门为优势门类,占整个菌群的 42%,变形菌门为次优势类群,占 33%。变形菌门在根系附着物样品中为优势门类,占 46%,拟杆菌门为次优势门类,占 16%。根系土壤样品中拟杆菌门为优势门类,占整个菌群的 37%,次优势类群为变形菌门,占 20%。【结论】翅碱蓬根系和内生菌具有丰富的多样性,其根系微生物可能会在重金属和石油污染土壤的生物修复中起一定的修复作用。

**关键词:** 翅碱蓬, 根系微生物, 多样性

**Foundation item:** National Marine Public Welfare Research Project (No. 201305002, 201305043); The Project of Marine Ecological Restoration Technology Research to the Penglai 19-3 Oil Spill Accident (No. 201422)

\*Corresponding author: Tel: 86-411-84762692; E-mail: wangbin@dlou.edu.cn

**Received:** July 16, 2015; **Accepted:** October 20, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 10, 2015

**基金项目:** 国家海洋公益性行业专项项目(No. 201305002, 201305043); 蓬莱 19-3 油田溢油事故海洋生态修复技术研究项目(No. 201422)

\*通讯作者: Tel: 86-411-84762692; E-mail: wangbin@dlou.edu.cn

**收稿日期:** 2015-07-16; **接受日期:** 2015-10-20; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-11-10

## Diversity of endophytic and rhizospheric bacteria of *Suaeda heteroptera* Kitag from Panjin Delta in Liaoning Province

TIAN Rui YU Zi-Chao LI Zuo-Yang WANG Xu-Lei WANG Bin\*

(Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China)

**Abstract:** [Objective] *Suaeda heteroptera* Kitag which is a typical saline indicator plant has the function of restoring the saline-alkali soil polluted by heavy metals and oil. But little was known about the relationship between its root and endophytic microorganisms, microbial diversity and the function of rhizospheric microorganisms in bioremediation. In this study, we determined the diversity and structure of the endophytic and rhizospheric bacteria of *Suaeda heteroptera* Kitag from delta area in Panjin Liaoning Province. [Methods] The bacterial diversity in rhizosphere soil, root homogenate and root attachments of *Suaeda heteroptera* Kitag was analyzed by traditional culture methods and high-throughput sequencing. The selected strains were identified by morphological observation and analysis of 16S rRNA gene sequences and physio-biochemical characteristics. [Results] Sixty-seven strains were isolated from these three samples with traditional methods, and twenty-eight strains among them were selected as the representative strains. The results showed that the strains were mainly affiliated with the genus *Halomonas*, *Marinobacterium*, *Bacillus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Planococcus*, *Serratia* and *Zhihengliuella*. High-throughput sequencing analysis showed that these three samples with highest bacterial diversity were, in order, root attachments, rhizosphere soil and root homogenate. In total, twelve phyla were identified from these samples, which were Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes and Verrucomicrobia. Bacteria assemblage was dominated by Cyanobacteria (42%) and Proteobacteria (33%) in root homogenate. Proteobacteria (46%) and Bacteroidetes (16%) were the predominant phyla in root attachments. Bacteroidetes (37%) and Proteobacteria (20%) were the predominant phyla in rhizosphere soil. [Conclusion] The diversity of endophytic and rhizospheric bacteria of *Suaeda heteroptera* Kitag is high, which suggests that the bacteria in this environment may play a role in the bioremediation of saline-alkali soil polluted by heavy metals and oil.

**Keywords:** *Suaeda heteroptera* Kitag, Rhizosphere microbia, Diversity

植物根系具有丰富的微生物多样性。Yu 等<sup>[1]</sup>对桑树的根系微生物、Kukla 等<sup>[2]</sup>对黑麦草内生菌、张萌萌等<sup>[3]</sup>对紫花苜蓿根际土壤微生物进行了研究，均发现植物根系和根系内生菌具有丰富的微生物多样性。根系微生物有助于植物对养分的吸收，也刺激植物根际分泌更多分泌物，为根系微生物提供充足的营养，不仅促进植物生长，同时增加了根系微生物的活性和数量<sup>[3]</sup>。根系微生物在土壤重金属及石油烃污染的修复中也起着一定的作用<sup>[4]</sup>。翅碱蓬(*Suaeda heteroptera*)属于藜科碱蓬属，一年生草本植物，一般生于海滨、湖边、荒漠等处的盐碱荒地上，是一种典型的盐碱指示植物<sup>[5]</sup>。翅碱蓬长

期生活在高盐、高 pH 等特殊环境，其生境微生物在翅碱蓬根系土壤以及根系中形成了各种代谢水平和分子水平的适应机制，同时也存在与其他物种间的协同或拮抗等相互作用机制<sup>[6]</sup>。翅碱蓬生存环境的极端性、特殊性和多样性可能促使其根系微生物群落经过长期适应形成了丰富的物种多样性。目前关于翅碱蓬以及根部环境微生物的研究较少，何洁等<sup>[7]</sup>和朱鸣鹤等<sup>[8]</sup>分别报道过重金属对翅碱蓬生长及抗氧化酶活性的影响以及对环境重金属的耐受性。高乃媛等<sup>[9]</sup>报道了石油烃对翅碱蓬生理特性的影响以及添加石油烃降解菌后对其根际环境石油污染物的降解情况，王新新等<sup>[10]</sup>对大庆油田盐碱

化土壤生长翅碱蓬的根围细菌多样性进行过研究,同时从中分离到耐盐石油烃降解菌株。植物根围是土壤-植物-微生物相互作用的一个特殊区域,根际微生物在有机污染物的植物修复过程中起着重要作用<sup>[11-12]</sup>。目前,有关翅碱蓬根系与根系内生微生物之间的关系、不同地域翅碱蓬根系微生物的多样性以及根系微生物在生物修复中所起的作用仍有很多需要深入研究的地方。本文通过传统分离纯化和非培养的高通量测序对盘锦“红海滩”的翅碱蓬根系及根系内生细菌菌群种类和结构进行研究,该研究将为探讨翅碱蓬根系与其根系微生物之间的关系、进一步揭示微生物在翅碱蓬生物修复中的作用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集及处理:**翅碱蓬样品采自辽宁省盘锦市三角洲“红海滩”,将翅碱蓬及其根系土壤用不锈钢小铲一同拔起放入聚乙烯袋子中,24 h内带回实验室对样品进行处理。将翅碱蓬根系附着土壤抖落收集为样品 T,即为根系土壤样品;用无菌海水冲洗已抖落附着土壤的翅碱蓬根系3遍,收集冲洗水为样品 S,即为根系附着物样品;将经无菌海水冲洗的翅碱蓬根系用70%乙醇浸泡5 min除去表面残留微生物,取出后用无菌海水冲洗3次,取1 mL最后一次冲洗的无菌海水涂布在2216E平板上培养过夜,观察无菌落生长后,将翅碱蓬根系1 g剪碎放入无菌研钵中,加入10 mL无菌水,充分研磨取上清液设为样品 G,即为根系匀浆样品。每个样品分为两部分,一部分用于传统平板培养分离和纯化,另一部分提取总DNA进行高通量测序。

**1.1.2 培养基:**2216E培养基(g/L):蛋白胨5,酵母膏1,磷酸高铁0.01,加陈海水煮沸后,调pH 7.6-7.8,  $1 \times 10^5$  Pa高压蒸汽灭菌20 min;固体培养基添加琼脂粉20 g/L。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**70%乙醇,天津市科密欧化学试剂有限公司;TIANamp Bacteria DNA Kit,

北京天根生化科技有限公司;API ZYM、API 20NE,上海甘和生物科技有限公司。恒温培养箱,上海市跃进医疗器械一厂;SW-CJ-2FD 型洁净工作台,恒自仪器厂;恒温水浴锅,常州澳华仪器有限公司;显微镜,日本奥林帕斯公司;LDZM-60KCS 立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;电子精密天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;可调万用电陶炉,广东顺德忠臣电器有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 微生物的分离纯化:**分别将3个样品用无菌海水进行梯度稀释,各取0.1 mL涂布于2216E平板上,25 °C培养24 h。根据菌落和菌体形态挑取不同形态单菌落于2216E平板进行纯化,每株菌分别纯化3代后转接2216E斜面备用。

**1.2.2 生理生化测试及系统发育分析:**将纯化后的菌株分别在2216E平板进行划线,放置于25 °C培养24 h后,观察菌落形态并挑取单菌落进行革兰氏染色油镜检查。并利用API ZYM和API 20NE试剂条对其进行生理生化特性鉴定。最后将纯化的菌株送至上海生工生物工程有限公司进行16S rRNA基因测序,将测序结果输入EzBioCloud数据库中,进行在线同源性比对。采用MEGA 5.0软件中的Neighbor-Joining方法构建系统进化树,自展值(Bootstrap value)取1 000。

**1.2.3 环境样品DNA的提取、PCR扩增及测序:**将3个样品分别用TIANamp Bacteria DNA Kit进行总DNA提取。采用16S rRNA基因V4+V5区通用引物907R (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')和515F (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')进行PCR扩增。扩增体系:正反向引物(10  $\mu$ mol/L)各2  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP mix 4  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L Taq DNA Polymerase 1  $\mu$ L, 模板DNA 2  $\mu$ L, Sterilized ddH<sub>2</sub>O补足至50  $\mu$ L。PCR条件如下:95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 27个循环; 72 °C 10 min。PCR扩增产物样品送上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序,首先对

PCR 产物进行纯化与定量, DNA 双末端修复并富集同时构建文库并测序, 对所测得序列进行数据优化和统计, 最后进行生物信息学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 翅碱蓬根系及内生可培养细菌的多样性

分别将 3 个样品涂布在 2216E 固体培养基上进行可培养细菌的分离和纯化, 共分离纯化得到 67 株细菌。其中根系土壤样品中分离到 22 株; 根系匀浆样品在样品处理过程中, 其表面无菌生长, 所分离的菌株可认为是根系内生菌, 分离到 16 株; 根系附着物样品分离 29 株。归纳其中形态特征重叠菌株后, 再与土壤分离菌株比较, 仅获得 1 株形态特征不同的 S1 菌株, 根据所有分离菌株菌落形态和显微镜下形态归纳选出代表菌 28 株进行鉴定。根据菌株的形态特征和生理生化特征, 结合 16S rRNA 基因序列比对对纯化的菌株进行鉴定, 结果表明: 这 28 株细菌分别属于盐单胞菌属(*Halomonas*) (2/28)、海细菌属(*Marinobacterium*) (3/28)、芽孢杆菌属(*Bacillus*) (5/28)、副球菌属(*Paracoccus*) (2/28)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (2/28)、游动球菌属(*Planococcus*) (1/28)、沙雷氏菌属(*Serratia*) (1/28)、刘志恒菌属(*Zhihengliuella*) (4/28)等, 详见表 1。结果表明翅碱蓬根系及内生的可培养细菌具有丰富的多样性。16S rRNA 基因序列系统(图 1)发育分析结果表明, 实验所分离的菌株可分为 4 大类群, 在类群 1 中, T2 和 T8 属于盐单胞菌属, G7 属于 *Salinicola*, G6 和 G6-1 属于 *Kushneria*, T12、T21 和 T16 属于海细菌属, G8 属于产微球茎菌属(*Microbulbifer*), G13 和 G1 属于假单胞菌属, S1 属于沙雷氏菌属(*Serratia*)。类群 2 中包括 G10 和 T20, 属于副球菌属。在类群 3 中, T15-1、T19、T19-1 和 T18 属于芽孢杆菌属, T17 和 G5 属于游动球菌属。在类群 4 中, T6、T9 和 T3 属于链霉菌属(*Streptomyces*), G9 属于节杆菌属(*Arthrobacter*), G4、G11-1、G12 和 T14 属于刘志恒菌属。在类群 1 中, T12 和 T21 与 *Marinobacterium nitratreducens*

CN44 (T)最为相似, 但是二者单独成簇, 是否为新的分类单元有待进一步研究; 在类群 3 中, T15-1、T19、T19-1、T18 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*), 它们虽然同属于一个属, 但 T15-1、T19 和 T19-1 在系统发育树中以较高的自展值形成了新的分支, 暗示了该属中也可能有新的分类单元的存在。最特殊的是 G1 菌株, 它在系统发育树中单独成簇, 它的 16S rRNA 基因序列与 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *piscium* JF3835 的相似性最高, 仅为 90.70%。该菌株的分类地位有待进一步确定, 可能为新物种。

### 2.2 利用高通量测序方法对样品微生物多样性的分析

#### 2.2.1 翅碱蓬根系及内生细菌群落 OTU 及多样性分析:

利用 PCR 方法扩增细菌 16S rRNA 基因 V4+V5 区基因并对其进行高通量测序, 由稀释性曲线图(图 2)可知, 3 个样品稀释性曲线趋向平坦、指数达到饱和, 说明本研究中 3 个样品测序数据量合理, 测序量足以覆盖 3 个样品的菌群组成, 测序结果分别代表了 3 个样品中微生物的真实情况。为了解样品测序结果中的菌种、菌属等数目信息, 需要对序列进行归类操作, 通过归类操作, 将序列按照彼此的相似性分归为多个分类单元, 1 个分类单元就是 1 个 OTU, 按照 97%相似性归并为 1 个 OTU。翅碱蓬根系匀浆样品(G)共获得 11 123 条有效序列, 测序覆盖率为 99.8%, 得到 139 个 OTUs; 翅碱蓬根系附着物样品(S)共获得 17 090 条有效序列, 测序覆盖率为 99.7%, 可归为 402 个 OTUs(表 2); 根系土壤样品(T)共得到 10 307 条有效序列, 序列覆盖率为 99.6%, 归并后得到 369 个 OTUs。3 个样品中具有相同的 OTUs 个数为 80(图 3), 根系匀浆样品和根系附着物样品共有的 OTUs 个数为 109, 根系匀浆样品和根系土壤样品共有的 OTUs 个数为 86, 根系附着物样品和根系土壤样品共有 339 相同的 OTUs, 根系匀浆样品、根系附着物样品、根系土壤样品特有 OTUs 个数分别为 24、34 和 24。以上结果表明, 翅碱蓬根系土壤及根系附着物中的微生物种类较其根系内生的微生物种类丰富。

表1 分离代表菌株的形态特征  
Table 1 Morphological characteristics of the isolated strains

| 菌株<br>Strains | 菌落特征<br>Colony characteristics (48 h)  | 细胞形态<br>Cell shape | 革兰氏染色<br>Gram stain | 最相近菌种<br>Closest strain | 模式菌登录号<br>Accession No. | 相似度<br>Similarity (%) |
|---------------|--|--------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| T2            | Smooth margin, non-transparent, oyster white convex, about 1.5 mm diameter         | Short rhabditiform | —                   | <i>Halomonas</i>        | EF613112                | 97.98                 |
| T3            | Irregular margin, grey white fluff, red back side, about 2 mm diameter             | Mycelioid          | +                   | <i>Streptomyces</i>     | AB184300                | 100                   |
| T6            | Smooth margin, oyster white, drying surface, flat, about 3 mm diameter             | Mycelioid          | +                   | <i>Streptomyces</i>     | AJ781362                | 99.21                 |
| T8            | Smooth margin, sub-transparent, faint yellow, about 2 mm diameter                  | Short rhabditiform | —                   | <i>Halomonas</i>        | X92417                  | 97.06                 |
| T9            | Irregular margin, non-transparent, yellow, about 2 mm diameter                     | Mycelioid          | —                   | <i>Streptomyces</i>     | AJ781362                | 99.57                 |
| T12           | Smooth margin, non-transparent, oyster white, slightly convex, about 2 mm diameter | Rhabditiform       | —                   | <i>Marinobacterium</i>  | EU573965                | 97.58                 |
| T14           | Regular smooth margin, non-transparent, oyster white, about 2 mm diameter          | Rhabditiform       | —                   | <i>Zhihengliuella</i>   | DQ372937                | 99.86                 |
| T15-1         | Smooth margin, non-transparent, pink, about 1 mm diameter                          | Rhabditiform       | +                   | <i>Bacillus</i>         | AF483625                | 98.57                 |
| T16           | Smooth margin, slightly convex, non-transparent, oyster white, about 2 mm diameter | Rhabditiform       | —                   | <i>Marinobacterium</i>  | EU573965                | 98.68                 |
| T17           | Regular margin, sub-transparent, light yellow, about 2 mm diameter                 | Rhabditiform       | +                   | <i>Bacillus</i>         | AF541966                | 99.19                 |
| T18           | Smooth margin, sub-transparent, faint pink, about 3 mm diameter                    | Rhabditiform       | +                   | <i>Bacillus</i>         | AF483625                | 98.84                 |
| T19           | Smooth margin, non-transparent, pink, about 2 mm diameter                          | Rhabditiform       | +                   | <i>Bacillus</i>         | AF483625                | 98.98                 |
| T19-1         | Smooth margin, sub-transparent, pink, about 1 mm diameter                          | Rhabditiform       | +                   | <i>Bacillus</i>         | AF483625                | 99.01                 |
| T20           | Regular margin, slightly convex, non-transparent, faint pink, about 1 mm diameter  | Globular           | —                   | <i>Paracoccus</i>       | EU660389                | 96.88                 |
| T21           | Smooth margin, convex, sub-transparent, oyster white, about 1 mm diameter          | Rhabditiform       | —                   | <i>Marinobacterium</i>  | EU573965                | 97.85                 |
| G1            | Regular margin, non-transparent, white, tip size                                   | Rhabditiform       | —                   | <i>Pseudomonas</i>      | FJ168539                | 90.70                 |
| G4            | Regular margin, non-transparent, white, about 1.5 mm diameter                      | Rhabditiform       | —                   | <i>Zhihengliuella</i>   | DQ372937                | 99.58                 |
| G5            | Smooth margin, slightly convex, faint orange, about 2 mm diameter                  | Globular           | +                   | <i>Planococcus</i>      | AJ493659                | 99.52                 |
| G6            | Smooth margin, non-transparent, pink, about 1 mm diameter                          | Rhabditiform       | +                   | <i>Kushneria</i>        | AF251143                | 98.01                 |
| G6-1          | Smooth margin, non-transparent, white, about 0.5 mm diameter                       | Rhabditiform       | +                   | <i>Kushneria</i>        | AF251143                | 98.33                 |

(待续)

| (续表)  |  |                    |   |                       |               |       |
|-------|--|--------------------|---|-----------------------|---------------|-------|
| G7    | Smooth margin, sub-transparent, faint yellow, about 1 mm diameter                                | Rhabditiform       | — | <i>Salinicola</i>     | EU056581      | 99.79 |
| G8    | Smooth margin, non-transparent, faint yellow, about 2 mm diameter                                | Globular           | — | <i>Microbulbifer</i>  | FR822983      | 97.98 |
| G9    | Smooth margin, non-transparent, oyster white, about 2 mm diameter                                | Short rhabditiform | — | <i>Arthrobacter</i>   | AJ609630      | 99.10 |
| G10   | Smooth margin, sub-transparent, faint yellow, about 2 mm diameter                                | Globular           | — | <i>Paracoccus</i>     | DQ923133      | 99.80 |
| G11-1 | Irregular margin, flat surface, slightly dry, non-transparent, oyster white, about 2 mm diameter | Rhabditiform       | — | <i>Zhihengliuella</i> | DQ372937      | 99.45 |
| G12   | Smooth margin, sub-transparent, faint yellow, slightly convex, about 1.5 mm diameter             | Rhabditiform       | — | <i>Zhihengliuella</i> | DQ372937      | 99.52 |
| G13   | Smooth margin, sub-transparent, white, tip size  | Rhabditiform       | — | <i>Pseudomonas</i>    | AB176954      | 99.22 |
| S1    | Smooth margin, convex, sub-transparent, red, about 1 mm diameter                                 | Globular           | — | <i>Serratia</i>       | DZ0503SBS1(T) | 99.37 |

注：G：根系匀浆样品；S：根系附着物样品；T：根系土壤样品。  
Note: G: Root homogenate sample; S: Root attachments sample; T: Rhizosphere soil sample.

**2.2.2 翅碱蓬根系及内生细菌群落丰度和多样性分析：**Chao 指数和 ACE 指数都是用来估计样品中所含 OTU 数目的指数，是生态学中估计物种总数的常用指数，但两者算法有所不同。样品的微生物群落丰度和多样性分析见表 2。3 个样品中根系附着物样品的 ACE 指数和 Chao 指数最高，分别为 424 和 430。根系匀浆样品和根系土壤样品的 ACE 指数和 Chao 指数分别为 156、160 和 379、384。Shannon 指数和辛普森指数用来估算样品中微生物多样性指数，其中 Shannon 值越大，说明群落多样性越高。而辛普森指数恰好相反。根系土壤样品的 Shannon 指数最高为 4.66，根系匀浆样品和根系附着物样品的 Shannon 指数分别为 2.19 和 4.39。辛普森指数最小的为根系土壤样品，说明其群落多样性最高。根系附着物样品次之，根系匀浆样品的群落多样性最小。以上结果表明，翅碱蓬根系附着物样品和根系土壤样品中的细菌群落物种数及多样性明显高于其根系内生环境中的细菌群落。

**2.2.3 翅碱蓬根系及内生细菌群落的结构和组成：**所测 3 个样品中占优势的细菌群落共分为 8 个门(图

4A)，包括放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝菌门(Cyanobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia)，8 个门类在 3 个样品中均有分布，但 3 个样品中各个门类所占比例有所差异。由图 4A 可以看出，根系土壤与根系附着物中的细菌群落组成非常相似，而二者与根系内生环境中的细菌群落组成差异明显。根系内生环境中细菌主要分属 5 个门，其中占优势的是蓝菌门和变形菌门，分别占整个菌群的 42.07%和 32.72%。变形菌门和拟杆菌门在根系附着物样品中和根系土壤样品中所占比例最高，在根系附着物样品中变形菌门占 29.89%，拟杆菌门占 16.33%，在根系土壤样品中变形菌门和拟杆菌门分别占 20.49%和 37.47%。

从属水平上可将此 3 个样品中的细菌归为 14 个属。由图 4B 可见，在属的水平上，根系匀浆样品的细菌群落组成比根系附着物样品和根系土壤样品简单，而根系附着物样品与根系土壤样品的细菌群落组成较为相似；3 种样品中都有大量未被鉴定

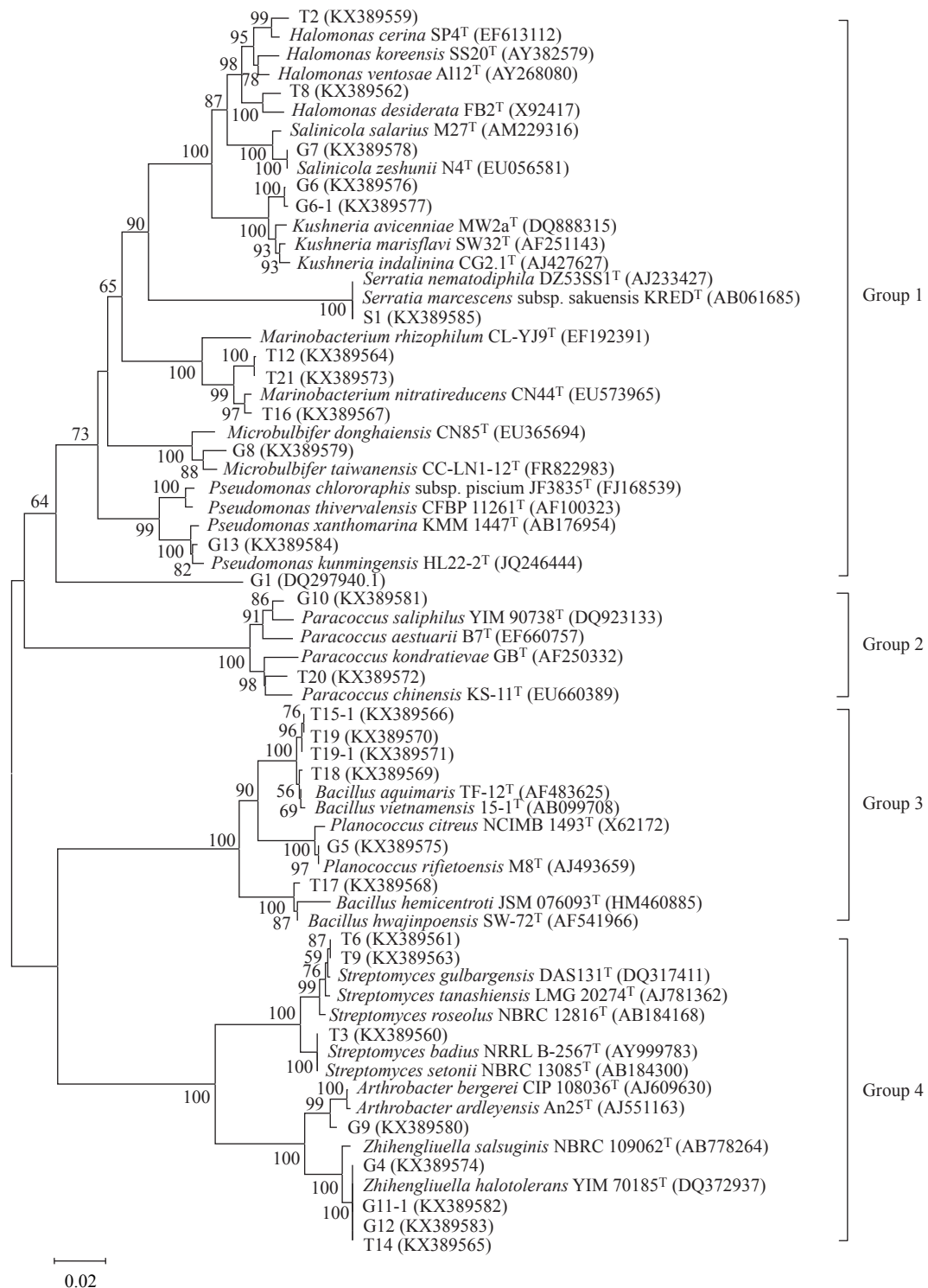


图1 分离菌株 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences

注: 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的序列登录号; 刻度 0.02 代表该长度下的进化距离; 分支点处仅显示大于 50% 的节点值。

Note: GenBank accession numbers are shown in parentheses; The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position; Bootstrap values higher than 50% are shown at branching points.



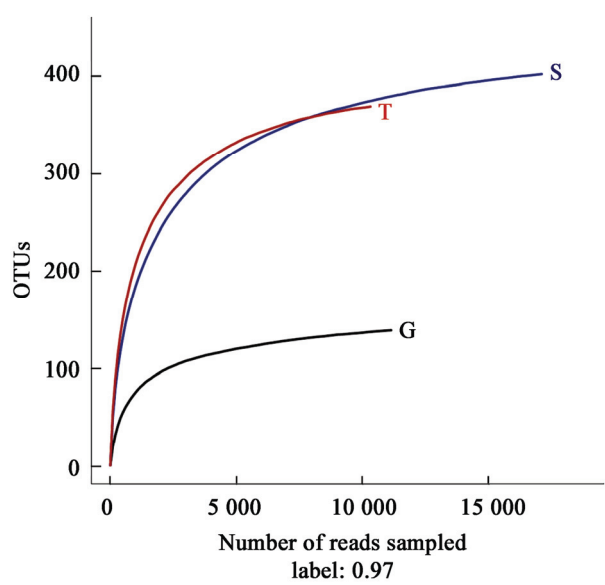


图2 稀释性曲线  
Figure 2 Rarefaction curve

注：G：根系匀浆样品；S：根系附着物样品；T：根系土壤样品。  
Note: G: Root homogenate sample; S: Root attachments sample; T: Rhizosphere soil sample.

的细菌存在。根系匀浆样品中包括 11 个属，其中优势菌属为乳球菌属(*Lactococcus*)，占比例最高为 18.71%，次优势菌属为肠球菌属(*Enterococcus*)，占比例为 2.93%。根系附着物样品中包含 14 个属，其中盐单胞菌属(*Halomonas*)占最大比例，为 8.13%；海杆菌属(*Marinobacter*)次之，占 6.54%。样品 T 中包含 13 个属，其中 *Gillisia* 占 9.29%，为最高比例；海杆菌属(*Marinobacter*)为次优势菌属，所占比例为 4.01%。以上结果表明，翅碱蓬根系土壤和根系附

着物中的细菌多样性较丰富且群落组成较为相似，各种细菌所占比例有所不同；而翅碱蓬根系内生环境中的细菌群落组成较前二者较为简单，细菌的物种多样性较低。

3 讨论

微生物群落多样性的研究方法主要分为两种，一种是先分离再纯化获得可培养的菌株，最后对其进行鉴定的传统培养方法，传统-分离法虽然简便、经济、容易普及，但局限性更大，无法准确描述环境微生态系统中真实微生物的状况。因为大多数细菌在实验室是不可培养的，于是便出现了第二种以分子生物学为基础的非培养法。最近几年发展形成的第二代测序技术即高通量测序技术为分析大规模样品的菌群结构提供了可能性，为识别菌群结构、研究群落间的差异和功能提供了良好契机<sup>[13]</sup>。高通量在微生物学中的另一个应用就是宏基因组，它是一种可以对样品中所有微生物进行研究的新方向。目前被广泛应用于海洋<sup>[14]</sup>、土壤<sup>[15]</sup>、人类肠道<sup>[16]</sup>等样品中微生物群落结构多样性的研究中。本研究通过两种不同方法对翅碱蓬植物根部细菌群落多样性进行分析，传统培养方法分离纯化得到代表菌 28 株，其中，翅碱蓬根系土壤中分离到 15 株，翅碱蓬根系匀浆分离的菌株为根系内生菌，得到 12 株，翅碱蓬根系附着物分离的大部分菌株与根系土壤中重叠，仅 1 株有别于其它，因此认为根系附着菌与根系土壤菌种类差异不大，仅有的这 1 株为何在土壤和根系内均未分离到的原因目前尚不清

表2 样品 T、G、S 细菌群落指数  
Table 2 Community indices of T, G, S samples

| 样品<br>Sample | 序列<br>Reads | 分类单元<br>OTUs | ACE 指数<br>ACE index | Chao 指数<br>Chao index | Shannon 指数<br>Shannon index | 辛普森指数<br>Simpson index | 覆盖率<br>Coverage (%) |
|--------------|-------------|--------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------|
| G            | 11 123      | 139          | 156                 | 160                   | 2.19                        | 0.249 5                | 99.8                |
| S            | 17 090      | 402          | 424                 | 430                   | 4.39                        | 0.031 8                | 99.7                |
| T            | 10 307      | 369          | 379                 | 384                   | 4.66                        | 0.022 6                | 99.6                |

注：G：根系匀浆样品；S：根系附着物样品；T：根系土壤样品。  
Note: G: Root homogenate sample; S: Root attachments sample; T: Rhizosphere soil sample.



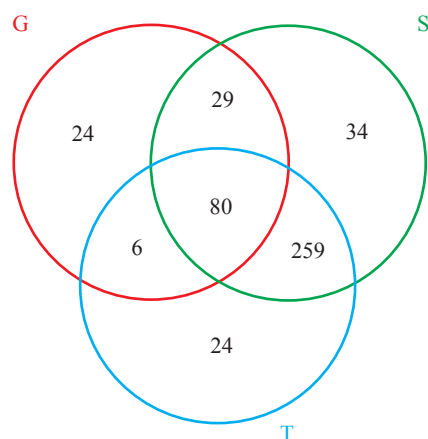


图3 OTU 分布 Venn 图

Figure 3 The Venn diagram of OTU distribution

注: G: 根系匀浆样品; S: 根系附着物样品; T: 根系土壤样品.

Note: G: Root homogenate sample; S: Root attachments sample; T: Rhizosphere soil sample.

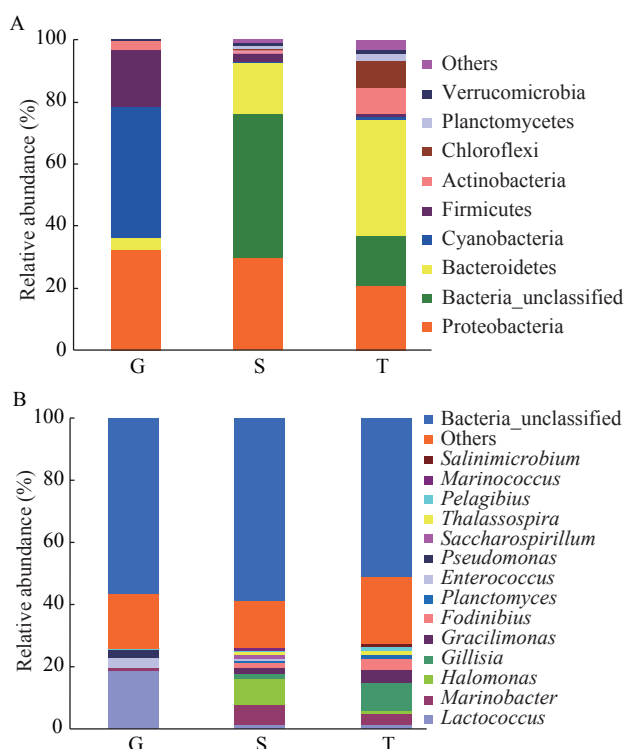


图4 不同样品在门、属水平的细菌相对丰度

Figure 4 Bacterial relative abundance of different samples in phylum (A) and genus (B) level

注: G: 根系匀浆样品; S: 根系附着物样品; T: 根系土壤样品.

Note: G: Root homogenate sample; S: Root attachments sample; T: Rhizosphere soil sample.

楚。由于培养时所用培养基为海水培养基, 因此所筛选到的菌株均具有耐盐性。根据形态特征和生理生化特征, 结合 16S rRNA 基因序列对分离和纯化的菌株进行鉴定, 分别属于盐单胞菌属、海细菌属、芽孢杆菌属、副球菌属、假单胞菌属、游动球菌属、沙雷氏菌属、刘志恒菌属等。传统分离纯化培养方法在翅碱蓬根部分离得到的菌株与钮旭光等<sup>[6]</sup>分离的菌株有所不同, 仅假单胞菌属在其研究也有发现, 推测其原因可能与本文所研究翅碱蓬生境土壤的理化性质以及分离使用培养基与其不同有关。本文分离得到的刘志恒菌属(*Zhihengliuella*)是在翅碱蓬根系内生菌中首次发现, 刘志恒菌属<sup>[17]</sup>初次是在盐碱土里分离, 这也与本文采样环境盘锦三角洲土壤相似。王新新等<sup>[10]</sup>的研究表明大庆油田盐碱土壤翅碱蓬根系的优势菌为海杆菌属(*Marinobacter*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*), 并且认为同时获得的戈登氏菌属(*Gordonia*)、无色杆菌属(*Acromobacter*)、迪茨菌属(*Dietzia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)与翅碱蓬对环境石油污染物的降解密切相关, 本研究所采集的样品与王新新等<sup>[10]</sup>的研究地域不同, 大部分可培养细菌也不尽相同, 其中也分离得到芽孢杆菌属和假单胞菌属, 但是否具有降油性能还需要进一步研究。Mayak 等<sup>[18]</sup>认为, 与长期受逆境胁迫的植物关系紧密的细菌, 可能已经适应了逆境并且使宿主植物受益。本研究从翅碱蓬内生环境中分离的 12 株菌具有耐盐特性, 是否对翅碱蓬具有促生长作用还有待深入研究。而与根际促生细菌相比, 内生菌受土壤 pH、温度、湿度及其他土壤生物等环境影响较小<sup>[19]</sup>, 因此, 从翅碱蓬内生环境中分离的菌株与宿主的相互关系是今后研究的主要内容。

由于沿海滩涂的特殊生态环境, 可能存在较多未培养微生物, 因此在常规分离培养的同时, 本文首次利用高通量测序技术系统分析了翅碱蓬根系及内生环境细菌群落的多样性及组成, 以期较全面的了解翅碱蓬根系及其环境的细菌多样性。近期

Sun 等<sup>[20]</sup>在其研究中指出原核生物 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。因此在原核生物生态学研究, 基于 16S rRNA 基因的菌群多样性分析会引起一定程度的高估。同时认为对于经常用来进行焦磷酸测序的区域中, V4-V5 区域显示了最低的高估程度(约为 3.0%), 因此在原核生物分子生态学研究, 16S rRNA 基因的 V4-V5 区域更适合作为焦磷酸测序的目的片段。本研究正是采用 16S rRNA V4+V5 区基因作为目标片段进行测序并比对, 因此所进行的多样性分析其高估的程度应该较低。另外, Sun 等<sup>[20]</sup>在文中还提到对于嗜盐菌和一些极端微生物而言, 为适应环境的恶化其 16S rRNA 基因可出现变异的情况。翅碱蓬属于盐生植物, 同时对环境的污染具有较强的耐受性, 其根系不同生境的细菌是否存在这种变异? 并且这种变异对植物本身起到怎样的作用也是今后值得深入研究的问题。

本研究从翅碱蓬根系土壤、根系附着物、翅碱蓬根系匀浆中分别获得 10 307、17 090 和 11 123 条有效序列, 利用生物信息学对多样性指数和菌群丰度进行比较分析, 根系附着物中的菌群丰度和多样性明显高于根系内生环境, 但与根系土壤中的菌群丰度和多样性指数比较接近。从细菌群落组成上看, 根系内生的细菌群落组成较为简单, 推测这可能是由于根系内生环境及营养成分较简单、不易受外界环境影响造成的。根系土壤与根系附着物中的细菌群落组成和结构较复杂, 同时也比较相似。这可能是因为土壤环境及营养成分异常复杂, 导致了二者细菌群落的多样性与复杂性。而根系附着物与根系土壤紧密接触、密切联系, 从而导致二者相似性较高; 而根系土壤和根系附着物中都有自己特有的菌种, 这可能是由于根系和根系分泌物的作用导致两者微生物种类有所不同。Landi 等<sup>[21]</sup>和 Ziegler 等<sup>[22]</sup>通过添加葡萄糖和草酸模拟植物根系分泌物探究其对土壤中微生物的影响, 结果表明添加物对土壤微生物有刺激作用, 不仅会影响微生物的数量, 而且也会使微生物的种类有所增加。除了已知

的菌种外, 在这 3 种样品中, 未被分类的细菌都占了相当大的比例, 这说明在翅碱蓬根系及内生环境中仍然存在着大量的菌种资源有待人们发现、培养与深入研究。

随着对植物与微生物之间相互关系研究的加深, 可以发现植物与其根系微生物之间存在共生或互生的关系<sup>[23]</sup>。根系微生物与根系分泌物之间是相互作用的关系, 根系分泌物通过诱导的趋化来促进或抑制微生物的生长, 根系微生物通过改变植物代谢过程中细胞的渗透压、酶的活性以及其他成分与植物体相互作用。不同种类的微生物会专一性吸收根系分泌物中某些成分, 引起根系分泌物数量和量的变化<sup>[24]</sup>。宿主和内生菌在长期进化的过程中形成了稳定的互利共生关系<sup>[25]</sup>。钮旭光等<sup>[6]</sup>发现翅碱蓬体内高盐微环境中的微生物在与植物长期共同进化的过程中可能形成某些机制来缓解逆境对植物的胁迫, 认为盐生植物翅碱蓬体内的内生菌可望用于宿主耐盐性的提高及盐碱土壤的开发利用。刘世亮等<sup>[26]</sup>研究植物菌根真菌对苯并芘污染的降解, 发现菌根真菌对其降解有明显效果。因此, 对翅碱蓬根系及内生细菌群落多样性的分析, 将为探明根系微生物与植物根系之间的关系找到新的路径, 还为揭示根系微生物在重金属和石油污染土壤的生物修复中所起的作用提供新的思路。

## 参 考 文 献

- [1] Yu C, Hu XM, Deng W, et al. Changes in soil microbial community structure and functional diversity in the rhizosphere surrounding mulberry subjected to long-term fertilization[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 86: 30-40
- [2] Kukla M, Płociniczak T, Piotrowska-Seget Z. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth[J]. *Chemosphere*, 2014, 117: 40-46
- [3] Zhang MM, Ao H, Zhang JY, et al. Effects of planting years on functional diversity of carbon-metabolic microbial community in rhizosphere soils of alfalfa[J]. *Pratacultural Science*, 2014, 31(5): 787-796 (in Chinese)  
张萌萌, 敖红, 张景云, 等. 建植年限对紫花苜蓿根际土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. *草业科学*, 2014, 31(5): 787-796
- [4] Wang XL, Cao WP, Wang YM, et al. Application and development of rhizosphere microorganisms in environmental pollution control[J]. *Water Saving Irrigation*, 2013(6): 4-7 (in Chinese)  
汪孝岚, 曹文平, 汪银梅, 等. 根系微生物在环境污染治理

- 中的应用及其发展[J]. 节水灌溉, 2013(6): 4-7
- [5] Editorial Committee of Chinese Journal of Plant of Chinese Academy of Sciences. The Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 1979: 115-135 (in Chinese)  
中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 115-135
- [6] Niu XG, Han M, Song LC, et al. Identification of endophytic bacteria and preliminary research on their growth-promoting effect under salt stress in *Suaeda heteroptera* Kitag[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2011, 42(6): 698-702 (in Chinese)  
钮旭光, 韩梅, 宋立超, 等. 翅碱蓬内生细菌鉴定及耐盐促生作用研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(6): 698-702
- [7] He J, Gao YT, He X, et al. The effect of Zn and Cd on growth and antioxidant enzymes activity of *Suaeda heteroptera* Kitagawa[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(1): 312-320 (in Chinese)  
何洁, 高钰婷, 贺鑫, 等. 重金属 Zn 和 Cd 对翅碱蓬生长及抗氧化酶系统的影响[J]. 环境科学学报, 2013, 33(1): 312-320
- [8] Zhu MH, Ding YS, Zheng DC, et al. Accumulation and tolerance of Cu, Zn, Pb and Cd in plant *Suaeda heteroptera* Kitag in tideland[J]. Marine Environmental Science, 2005, 24(2): 13-16 (in Chinese)  
朱鸣鹤, 丁永生, 郑道昌, 等. 潮滩植物翅碱蓬对 Cu、Zn、Pb 和 Cd 累积及其重金属耐[J]. 海洋环境科学, 2005, 24(2): 13-16
- [9] Gao NY, Liu XB, Zhao XR. Influence of oil in soil on growth and physiological indexes of *Suaeda heteroptera* and plant-microbial remediation[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2013, 7(4): 1578-1582 (in Chinese)  
高乃媛, 刘宪斌, 赵兴茹. 石油烃对翅碱蓬生理特性的影响及植物-微生物联合降解[J]. 环境工程学报, 2013, 7(4): 1578-1582
- [10] Wang XX, Bai ZH, Jin DC, et al. Bacterial diversity and halotolerant petroleum-degrading bacteria of the rhizosphere of *Suaeda salsa* (L.) in petroleum-contaminated saline-alkali soil[J]. Microbiology China, 2011, 38(12): 1768-1777 (in Chinese)  
王新新, 白志辉, 金德才, 等. 石油污染盐碱土壤翅碱蓬根围的细菌多样性及耐盐石油降解菌筛选[J]. 微生物学通报, 2011, 38(12): 1768-1777
- [11] Kirkpatrick WD, White PM Jr, Wolf DC, et al. Petroleum-degrading microbial numbers in rhizosphere and non-rhizosphere crude oil-contaminated soil[J]. International Journal of Phytoremediation, 2008, 10(3): 208-219
- [12] Yateem A, Al-Sharrah T, Bin-Haji A. Investigation of microbes in the rhizosphere of selected trees for the rhizoremediation of hydrocarbon-contaminated soils[J]. International Journal of Phytoremediation, 2008, 10(4): 311-324
- [13] Chistoserdova L. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(10): 1351-1359
- [14] Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, et al. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea[J]. International Society for Microbial Ecology Journal, 2011, 5(10): 1571-1579
- [15] Xia WW, Zhang CX, Zeng XW, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. The ISME Journal, 2011, 5(7): 1226-1236
- [16] Passalacqua KD, Varadarajan A, Ondov BD, et al. Structure and complexity of a bacterial transcriptome[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(10): 3203-3211
- [17] Zhang YQ, Schumann P, Yu LY, et al. *Zhihengliuella halotolerans* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Micrococcaceae[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(5): 1018-1023
- [18] Mayak S, Tirosh T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(6): 565-572
- [19] Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19(1): 1-30
- [20] Sun DL, Jiang X, Zhou NY, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [21] Landi L, Valori F, Ascher J, et al. Root exudate effects on the bacterial communities, CO<sub>2</sub> evolution, nitrogen transformations and ATP content of rhizosphere and bulk soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(3): 509-516
- [22] Ziegler M, Engel M, Welzl G, et al. Development of a simple root model to study the effects of single exudates on the development of bacterial community structure[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 94(1): 30-36
- [23] Xia BC. Biodegradation of Environmental Pollutants[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 176 (in Chinese)  
夏北成. 环境污染物生物降解[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 176
- [24] Wang SG, Lin XG. Effect of mycorrhiza on bioremediation of polluted soil[J]. Rural Eco-environment, 2001, 17(1): 56-59 (in Chinese)  
王曙光, 林先贵. 菌根在污染土壤生物修复中的作用[J]. 农村生态环境, 2001, 17(1): 56-59
- [25] Yao LA, Hu ZB, Wang LL, et al. Research development of the relationship between plant endophyte and host[J]. Ecology and Environment, 2010, 19(7): 1750-1754 (in Chinese)  
姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(7): 1750-1754
- [26] Liu SL, Luo YM, Wu LH, et al. Remediation of Benzo [a] pyrene-contaminated soil through its co-metabolism with soil microbes[J]. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(2): 364-369 (in Chinese)  
刘世亮, 骆永明, 吴龙华, 等. 污染土壤中苯并[a]芘的微生物共代谢修复研究[J]. 土壤学报, 2010, 47(2): 364-369