

研究报告

基于 MiSeq 测序分析新疆泥火山土壤细菌群落多样性

杨娟 郝志成 张亚平*

(石河子大学生命科学学院 新疆 石河子 832003)

摘要:【目的】以新疆乌苏泥火山土壤为研究对象,了解泥火山细菌群落结构及其时空动态变化。【方法】选择泥火山4种不同生境土壤在4、7、11月份采样,应用Illumina MiSeq测序技术测定泥火山土壤细菌的16S rRNA基因V3–V4变异区序列,分析乌苏泥火山不同生境土壤细菌群落组成。【结果】泥火山土壤细菌在97%的相似水平下共得到OTU个数为29 005,在细菌门水平上共有38种细菌类群,Proteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes为优势菌群,在属水平上共有72种细菌类群,其中含量最高的是未分类细菌;多样性分析表明生境D的丰度指数和多样性指数最高,将泥火山细菌群落多样性与理化因子结合分析,发现其多样性随着土壤养分的增加而基本降低,说明物种多样性指数与理化因子之间呈负相关关系;OTU水平的分析表明生境A的群落组成在时空动态上没有显著差异,其样品群落组成较为相似,而生境C的物种组成差异较大。【结论】相比较于传统方法,MiSeq测序能够更全面解析环境样品中微生物多样性,揭示了乌苏泥火山群蕴含着丰富的微生物资源,这将为深入研究泥火山生态系统奠定基础,为合理利用和开发泥火山微生物资源提供指导。

关键词: 泥火山, 优势菌群, MiSeq 测序, 细菌群落

Analysis the diversity of soil bacterial community from mud volcano in Xinjiang using MiSeq sequencing

YANG Juan HAO Zhi-Cheng ZHANG Ya-Ping*

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

Abstract: [Objective] In order to study soil bacterial community diversity and space-time analysis, we chose Usu mud volcano in Xinjiang province as the research object. [Methods] We selected four different soil habitats to take samples in April, July, November, 2014. The Illumina MiSeq sequencing with 16S rRNA V3-V4 variable region was adopted to analyze the bacterial community structures of Usu mud volcano in Xinjiang province. [Results] A total number of 29 005 operational taxonomic units (OTUs) were obtained from mud volcano soil under the similarity level of 97%. For phyla level, we have got 38 groups of bacterial that the Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes were the dominant groups. For genus level, we have got 72 groups, but the most

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30860001)

***Corresponding author:** E-mail: zyp@shzu.edu.cn

Received: December 30, 2015; **Accepted:** March 08, 2016; **Published online** (www.cnki.net): November 04, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30860001)

***通讯作者:** E-mail: zyp@shzu.edu.cn

收稿日期: 2015-12-30; **接受日期:** 2016-03-08; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-11-04

abundant genera were unclassified. Diversity index showed that the type D has a higher abundance effect and diversity index. Compared with the bacteria community diversity and physicochemical property, we found that bacteria diversity was decreased with the increasing of soil fertility, which shows negative correlations between bacteria diversity and physicochemical property. The results of PCA and heat map indicated that the community composition of type A has no significant variation with space-time dynamic changes, but type C is opposite. **[Conclusion]** Compared with traditional method, Illumina MiSeq sequencing can provide a more comprehensive understanding of microbial diversity in the environmental samples and these results reveal clues that it is possible to contain abundant microbial resources, and it lays the foundation of studying ecosystem of mud volcano and provides guidance for exploitation and utilization of microbial resources more reasonably in Usu mud volcano.

Keywords: Mud volcano, Main flora, MiSeq sequencing, Bacteria community

泥火山是由泥浆形成的,只因它的喷发形式和喷发后形成的堆积物在外形上与火山有些相似,因此称其泥火山^[1]。新疆乌苏具有亚洲最大的泥火山群,其特殊的环境是研究微生物资源的最佳场所^[2]。土壤微生物是土壤的重要组成部分,土壤微生物群落的变化在一定程度上可以反映土壤质量的变化趋势^[3],而细菌是土壤中最丰富、分布最广泛的微生物类群^[4],广泛参与土壤营养物质循环过程^[5-6]。传统的土壤微生物培养方法存在着耗时、工作量大的缺点,并且自然界微生物多是未培养的,从而导致无法全面解释微生物群落结构。近年来,随着高通量测序技术的不断发展^[7-9],人们对土壤中微生物的研究日渐深入^[10],它被广泛应用于环境微生物菌群结构与演替规律研究,其中,Illumina 公司开发的 MiSeq 方法避免了通量低、准确率低、操作复杂等问题^[11],与 454 焦磷酸测序相比,通量更高,操作简便、成本更低,更适合分析环境中群落结构多样性^[12]。本研究通过 Illumina MiSeq 测序技术分析新疆乌苏泥火山微生物的群落结构,这将为深入研究泥火山生态系统奠定基

础,为合理利用和开发泥火山微生物资源提供指导。

1 材料与方法

1.1 生境概况

乌苏泥火山位于新疆天山北麓乌苏市南约 40 km 白杨沟镇东南约 2 500 m 处,属于天山北坡山前丘陵地带,四周群山环抱,属大陆干旱气候,空气干燥,降雨稀少,夏季炎热,光照充足,年均降水 158 mm,平均气温 7.3 °C,其环境条件较为特殊。本课题以泥火山口为参照,选取具有代表的 4 种不同生境(命名为 A、B、C、D)为研究对象,各个生境基本情况见表 1。

1.2 样品采集

以 4 种不同生境(A、B、C、D)为研究对象,取样时间为 2014 年 4、7、11 月,以正方形 5 点取样法在样地内设置样方,草本采用 1 m×1 m 的样方,5 次重复;灌木采用 5 m×5 m 的样方,3 次重复。每个点取样量大体一致,去除土样里的植物根系和砾石,然后将重复的土样混合均匀,做好标记装入灭菌封口聚乙烯袋,低温保存带回实验室。

表 1 泥火山不同生境样地基本情况

Table 1 General conditions of different habitats in mud volcano

生境类型 Habitat types	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Altitude (m)	备注 Remarks column
A	84°40'20"	44°18'00"	1 300	主要为一些零星灌木丛
B	84°23'00"	44°11'00"	1 275	泥火山口周围,几乎没有植被
C	84°22'10"	44°13'00"	1 100	一些矮小的禾本科、藜科植物等
D	84°29'20"	44°17'00"	762	一些多年生莎草科杂草,例如梭梭草等,地表较干旱,缺水

将土样分成两份,一份在室内风干,将风干土分别过 1 mm 和 0.15 mm 筛子,用于理化因子的研究;一份放入 -20°C ,用于后续分子方面的研究。最终,混合后的土壤样品共 12 个,根据采样季节不同,分别标记为 A4、A7、A11, B4、B7、B11, C4、C7、C11, D4、D7、D11。

1.3 主要试剂和仪器

引物,上海生工合成;PCR 和酶反应体系中 DNA 磁珠法回收纯化试剂盒,志昂生物科技有限公司。PCR 仪,安捷伦科技有限公司;电泳仪和电泳凝胶成像系统,北京君意东方电泳设备有限公司。

1.4 研究方法

1.4.1 土壤理化性质的测定:土壤含水量采用烘干测定法;pH 和电导率采用 pH 电导率仪;根据水土比 2.5:1 和 5:1 进行测定;有机质采用重铬酸钾容量法-外加热法测定;土壤全磷采用 $\text{HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$ 法测定;土壤全氮采用半微量凯氏法测定;全钾含量测定采用 NaOH 熔融-火焰光度计法^[13]。

1.4.2 土壤微生物基因组 DNA 的提取:DNA 的提取采用美国(MOBIO PowerSoil DNA Isolation Kit)强力土壤 DNA 提取试剂盒。

1.4.3 土壤细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增:采用细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区的通用引物(336F: 5'-GTACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'; 806R: 5'-GTGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增泥火山土壤细菌 16S rRNA 基因片段。50 μL PCR 反应体系:DNA 模板 1 μL ,正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL ,dNTPs (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 4 μL ,10 \times Pyrobest Buffer 5 μL ,Pyrobest DNA Polymerase (2.5 U/ μL) 0.3 μL ,ddH₂O 35.7 μL 。PCR 程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,共 25 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将 PCR 产物用 1% (质量体积比)的琼脂糖凝胶进行检测,参照电泳初步定量结果,使用 Qubit 荧光定量系统对 PCR 产物进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求,根据精确定量结果进行相应比例的混合。随后进行 MiSeq 文库构建,Illumina 上机测序。

1.5 数据处理

通过 COPE 软件 (Connecting Overlapped Pair-End, V1.2.3.3),对于 Illumina 测序的测序结果进行分析,去掉测序质量不好的序列,并对序列长度进行筛选,删掉长度小于 200 bp 的序列,根据 Barcode 将序列确定为本样品的序列,并去除 Barcode 和引物序列,最终得到有效的序列文件。在 0.97 相似度下利用 Qiime (V1.8.0)软件将其聚类为用于物种分类的 OTU (Operational taxonomic units) 统计各个样品每个 OTU 中的丰度信息,OTU 的丰度初步说明了样品的物种丰富程度。

利用 QIIME 软件计算样品包括 Chao1^[14]指数、Shannon^[15]指数和 Simpson 指数^[16]的 Alpha 多样性值,其中 Chao1 指数表示群落丰富度,其值越高表示群落物种的丰富度越高;而 Shannon 指数和 Simpson 指数可以反映样品的多样性程度,其值越高表示群落物种的多样性越高;经过 UniFrac 算法利用系统进化的信息来比较样品间的物种群落差异,进行 Beta 多样性(Beta diversity)分析;通过 SPSS 17.0^[17]软件进行细菌多样性与环境因子的相关性分析。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质测定结果及分析

由表 2 可知,不同生境土壤理化性质存在显著性差异($P<0.05$),pH、含水量、电导率、有机质、全磷、全氮和全钾的含量波动范围分别为 7.41–10.20、2.72%–33.56%、0.12–7.97 ds/m、9.88–163.91 g/kg、0.33–1.06 g/kg、0.57–15.12 g/kg 和 3.24–6.27 g/kg。其中除了 pH、电导率,在 4 种生境中,生境 C 的含水量、有机质、全磷、全氮和全钾含量最高;生境 D 的全氮、全磷、全钾含量相对较低;从时空动态变化方面看,pH、含水量、有机质(除了生境 C)的变化趋势均是 4 月份最高;全磷的变化趋势均是 11 月份含量最高,7 月份最低;全氮的变化趋势(除了生境 A)是 11 月份含量最高;全钾的变化趋势均是 4 月份最高。

表 2 不同生境土壤理化性质测定
Table 2 The results of physical and chemical property from different habitat soil

生境类型 Habitat types	月份 Months	pH	含水量 Moisture (%)	电导率 Electric Conductivity (ds/m)	有机质 Organic matter (g/kg)	全磷 Total P (g/kg)	全氮 Total P (g/kg)	全钾 Total K (g/kg)
A	4	8.00±0.06b	13.78±0.94a	0.17±0.02a	76.40±1.83b	0.39±0.03a	3.32±0.28b	5.55±0.55a
	7	7.80±0.20b	2.72±0.29a	0.12±0.01a	38.36±1.15b	0.35±0.03a	1.92±0.06b	4.01±0.03a
	11	7.71±0.17ab	8.74±0.32a	0.16±0.01a	45.23±0.65b	0.91±0.01ab	3.31±0.09b	3.24±0.12a
B	4	10.20±0.02d	22.05±0.01b	2.74±0.20c	16.44±0.44a	0.50±0.03b	0.82±0.02a	6.27±0.13b
	7	7.91±0.06b	22.05±0.01b	4.50±0.68b	14.85±3.00ab	0.43±0.01b	0.74±0.15ab	5.18±0.07c
	11	7.91±0.06b	18.92±0.27b	7.97±0.05c	11.50±0.42a	0.85±0.03a	1.08±0.06a	3.26±0.17a
C	4	7.60±0.07a	33.56±3.33c	1.70±0.15b	133.89±4.79c	0.39±0.01a	6.69±0.23c	5.29±0.18a
	7	7.41±0.06a	22.03±2.18c	1.08±0.14a	163.91±14.04c	0.33±0.03a	8.20±0.70c	4.45±0.13b
	11	7.41±0.06a	24.06±3.56b	0.56±0.03b	112.65±2.32c	1.06±0.03c	15.12±0.39c	5.06±0.04b
D	4	9.00±0.06c	8.52±0.39a	1.32±0.13b	15.85±0.52a	0.39±0.02a	0.95±0.14a	5.85±0.18b
	7	8.38±0.07c	2.82±0.15a	1.23±0.27a	11.47±2.19a	0.33±0.01a	0.57±0.11a	5.08±0.04c
	11	8.38±0.06c	7.72±0.17a	4.33±0.21d	9.88±0.51a	0.97±0.02bc	1.08±0.05a	3.53±0.08a

注：表中数据为平均数±标准误。同一指标中不同字母表示平均数的差异，在 $P<0.05$ 时达到显著水平。

Note: Data in the table are mean±SE. Different small letters in the same row mean significant difference at 0.05 level among treatments.

2.2 土壤样品测序结果及取样深度验证

通过对泥火山土壤细菌 V3-V4 区测序，12 个样品原始序列条数为 302 439，过滤掉低质量的序列后，有效序列的总数为 287 467。根据 Barcode 标签进行样品序列拆分，在对初始序列进行去冗余处理后，获得 16S rRNA 基因 Unique Reads，并在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU (Operational taxonomic units)，统计得到各个样品在不同 OTU 中的丰度信息，12 个样品共产生 29 005 个 OTU，平均测序读长在 420–480 bp 之间。每个样品的有效序列数量如表 3 所示。

稀释曲线 (Rarefaction) 反映了样品的取样深度，可以用来评价测序量是否足以覆盖所有类群。从稀释曲线 (图 1) 中可知，12 个样品稀释曲线有一些基本趋于平缓，例如样品 C11，曲线已趋于平缓，即再增大数据量对 OTU 的发现也没有影响，可以说样本 C11 的 OTU 的覆盖度已达到饱和；而有一些仍未进入饱和状态，例如样品 A4、C4，说明随着测序量的增加可能会发现新的细菌种系。

表 3 12 个样品的序列信息

Table 3 Sequence information of 12 samples				
生境类型 Habitat types	Raw tags	Clean tags	Reads	OTUs
A4	14 410	10 073	8 899	1 717
A7	20 882	20 282	15 470	3 102
A11	19 181	17 061	13 708	2 642
B4	21 236	19 794	18 436	988
B7	23 430	23 305	21 834	1 708
B11	26 153	23 605	21 850	1 754
C4	15 973	15 973	11 284	1 600
C7	25 466	24 650	16 786	3 024
C11	56 415	56 261	55 074	2 265
D4	28 157	27 512	23 494	4 643
D7	25 635	24 989	20 188	2 941
D11	25 501	23 962	20 643	2 621

2.3 细菌群落的多样性分析

2.3.1 Alpha 多样性分析：Alpha 多样性指数是对单个样品中物种多样性的分析。由表 4 可知，从生境类型来看，生境 D 的平均 Chao1 指数 3 666.25 和平均 Shannon 指数 9.65 最高；生境 A 的平均 Simpson 指数 0.99 最高；最低的是生境 C，Simpson 值 0.86。从季节变化方面看，OTU 数、丰度指数

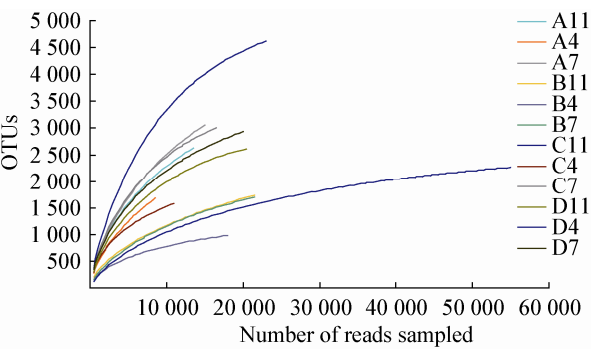


图 1 相似度为 97%条件下各土壤样品的稀释曲线
Figure 1 Rarefaction curves of each soil sample at cutoff level of 3%

表 4 样品的 Alpha 多样性指数 Table 4 The Alpha diversity index of the sample				
生境类型 Habitat types	OTUs	Chao1 指数 Chao1 index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
A4	1 717	3 011.260	8.689	0.989 5
A7	3 102	4 182.282	9.789	0.997 1
A11	2 642	3 394.613	9.709	0.997 1
B4	988	1 118.684	6.326	0.956 7
B7	1 708	1 978.086	6.503	0.947 3
B11	1 754	2 052.854	7.622	0.985 5
C4	1 600	2 133.440	8.929	0.993 1
C7	3 024	3 380.447	9.879	0.996 9
C11	2 265	1 987.890	3.885	0.587 1
D4	4 643	4 956.987	10.239	0.993 1
D7	2 941	3 420.772	9.592	0.995 6
D11	2 621	2 621.000	9.114	0.993 0

Chao1、多样性 Shannon 和 Simpson 指数均是 7 月份最高，依次是 2 694、3 240.40、88.94、0.98。

2.3.2 Beta 多样性分析: Beta 多样性(Beta diversity)分析是用来比较一对样品在物种多样性方面存在的差异大小。UniFrac 是通过系统进化的信息来比较样品间的物种群落差异，其计算结果可以作为一种衡量 Beta 多样性的指数，它考虑了物种间的进化距离，该指数越大表示样品间的差异越大。由图 2 可知，基于 UniFrac 的加权和非加权的主坐标分析发现其第一主成分、第二主成分和第三主成分的贡献率分别为 39%、21%和 12%，20%、14%和 12%，

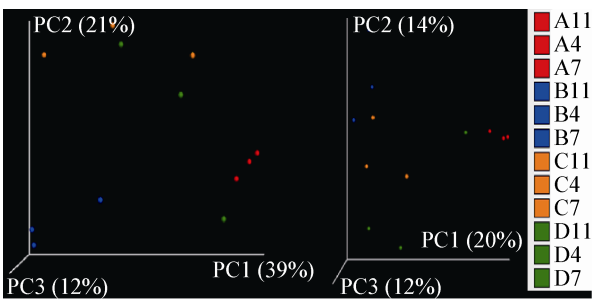


图 2 Beta 多样性的主坐标分析(PCoA)图
Figure 2 Principal coordinate analysis (PCoA) scores plot of beta diversity

生境 A、生境 B、生境 C、生境 D 之间明显有分离的现象，但又存在一定的交叉。这种现象说明，有些分类操作单元(OTU)在不同生境之间均存在，但含量不同。其中明显可以看出生境 A 的 4 月、7 月、11 月份的 3 个样品聚集在一起，说明其组成较为相似，也就是说生境 A 的微生物群落在季节动态变化方面并无太大差异。

2.3.3 细菌多样性与理化因子的相关性分析: 从表 5 可看出，Chao1 指数、Shannon 指数均与含水量呈极显著负相关关系，与全磷呈显著负相关关

表 5 土壤细菌群落多样性指数与理化因子的相关性分析 Table 5 Correlation analysis between the soil bacterial community diversity indexes and physicochemical factor			
理化性质 Physicochemical properties	Chao1 指数 Chao1 index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
pH	-0.108	-0.02	0.567
含水量 Water content	-0.821**	-0.889**	-0.891**
电导率 Electrical conductivity	-0.464	-0.373	0.227
有机质 Organic matter	-0.150	-0.280	-0.924**
全磷 Total phosphorus	-0.609*	-0.642*	-0.612*
全钾 Total potassium	-0.515	-0.508	-0.329
全氮 Total nitrogen	-0.177	-0.307	-0.938**

注：*：显著相关($P<0.05$)；**：极显著相关($P<0.01$)。
Note: *: Significant level for $P<0.05$; **: Significant level for $P<0.01$.

系; Simpson 指数与含水量、有机质、全氮均呈极显著负相关关系, 与全磷呈显著负相关关系。总体来看, 土壤细菌多样性指数与理化因子之间呈负相关关系, 且均与含水量、全磷相关性较高。

2.4 样品群落组成分析

2.4.1 细菌门分类水平的比较: 根据图 3, 在门分类水平上共得到 38 种细菌类群, 在这些样本中含量最高的门是变形菌门(Proteobacteria), 在 4 类生境中相对丰度分别为 22.27%、45.58%、72.44%、32.74%, 其次是放线菌门(Actinobacteria)相对丰度分别为 44.52%、19.16%、41.12%、22.21%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度分别为 11.54%、7.98%、3.59%、7.73%, 而其他菌类比例相对较低, 例如芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)等。这表明在泥火山土壤细菌中, 变形菌门、放线菌门、拟杆菌门为三大优势菌群, 而其他细菌类群为非优势菌群。

2.4.2 细菌属分类水平的比较: 根据图 4, 在属分类水平上共得到 72 种细菌类群, 其中含量最高的

是未分类细菌, 在 4 类生境中相对丰度分别为 81.38%、74.34%、81.55%、64.12%; 其次是 Other、*Halomonas* (盐单胞菌属)、*Kaistobacter*、*Rhodoplanes* (红游动菌属)、*Pseudomonas* (假单胞菌属)、*Streptococcus* (链球菌属)、*Rubrobacter* (红色杆菌属)、*Staphylococcus* (葡萄球菌属)等, 这些菌属的丰度比例相对较低。

2.5 OTU 水平的分析

2.5.1 OTU 水平的 PCA 图: PCA (Principal component analysis) 分析, 即主成分分析, 是一种分析和简化数据集的技术。通过分析不同样品 OTU (97%相似性)组成可以反映样品的差异和距离, 如果两个样品距离越近, 则表示这两个样品的组成越相似。从图 5 可以看出, 第一成分的差异贡献值是 23.21%, 第二成分的差异贡献值是 15.35%, 其中生境 A 的 3 个样品距离最近, 说明生境 A 的 OTU 群落结构组成在季节动态方面是相似的, 这与 PCoA 分析的结果一致; 而生境 D 的这一组较为分散, 说明在季节变化方面 OTU 组成差异较大, 其中生境 C 和生境 D 距离较近, 说明两者在一部分 OTU 上有相似的组成成分。

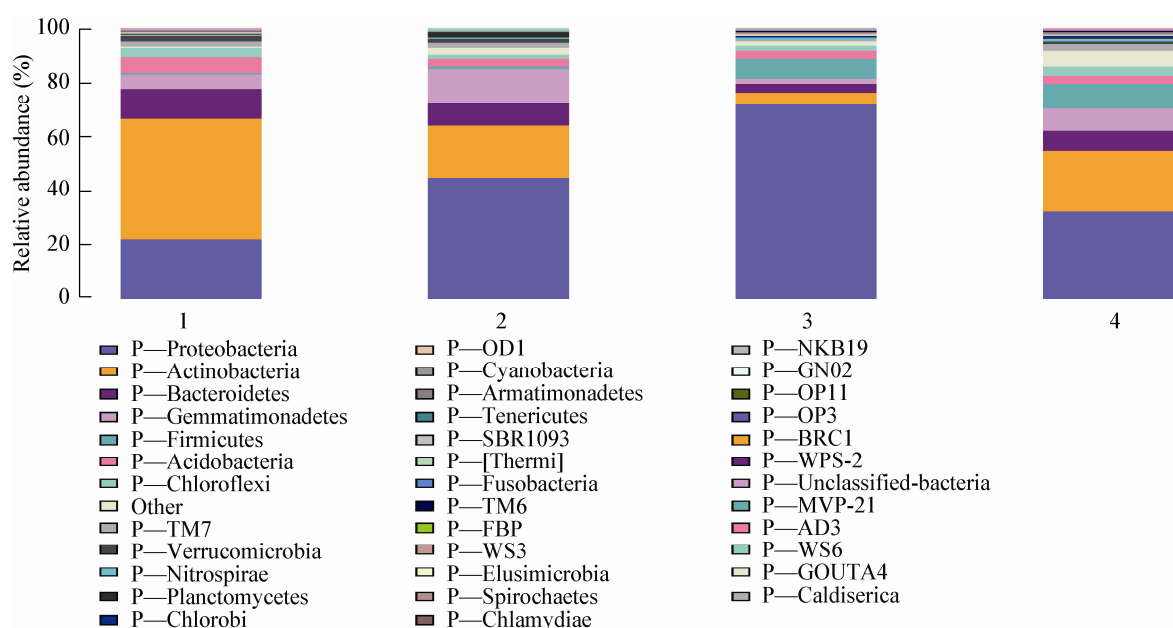


图 3 细菌门分类水平的比较

Figure 3 Comparison of bacteria groups at phylum level

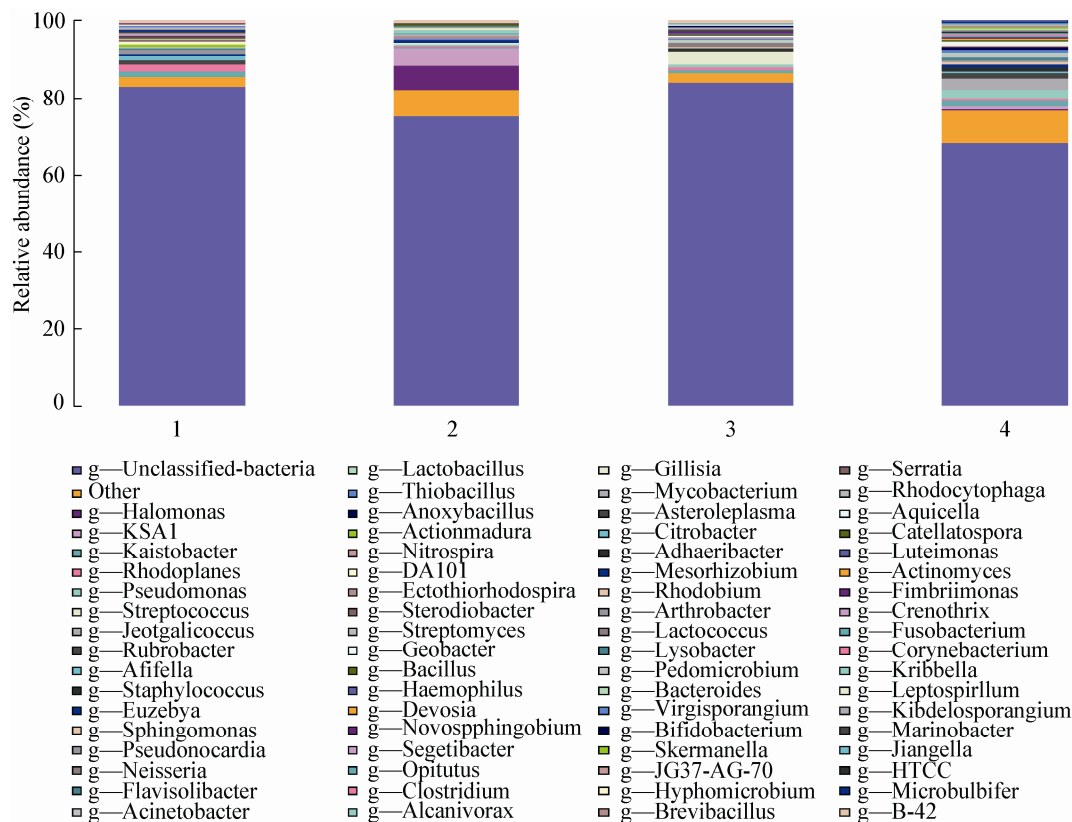


图 4 细菌属分类水平的比较
Figure 4 Comparison of bacteria groups at genus level

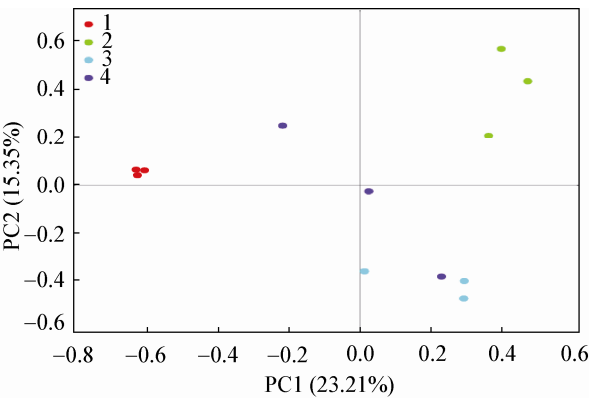


图 5 基于 OTU 丰度的 PCA 分析
Figure 5 Principal component analysis based on OTU level

2.5.2 丰度较高的前 20 个 OTU heatmap 图: Heatmap 图通过颜色变化来反映二维矩阵或表格中的数据信息, 将高丰度和低丰度的物种分块聚集, 通过颜色梯度及相似程度来反映多个样品在各分

类水平上群落组成的相似性和差异性。图 6 是在属分类水平上 12 个样品的群落组成的 Heatmap 图, 每小格代表所在样品中某种属的相对丰度。颜色越红代表相对丰度越高。由图 6 可知, 在属分类水平上, *Shigella flexneri* (X96963) (0.006%–64.470%)、OTU116 (0.005%–14.010%)、*Halomonas* (AY268080)(0.02%–10.90%)、OTU130 (0.022%–10.850%)、*Pseudomonas* (AB021404) (0.011%–5.170%) 相对丰度较高。从群落组成上来看, 生境 A 的 7 月份和 11 月份组成相似; 生境 C 4 月份和生境 D 11 月份组成相似; 生境 B 的 4 月和 7 月组成相似; 生境 B11 月份和生境 D 的 7 月份组成相似, 说明不同样本之间有交叉, 且有相似之处。此外, 可以明显看到 heatmap 图中出现大面积的白色方块, 这是因为这些菌的含量非常低, 导致没有数值。

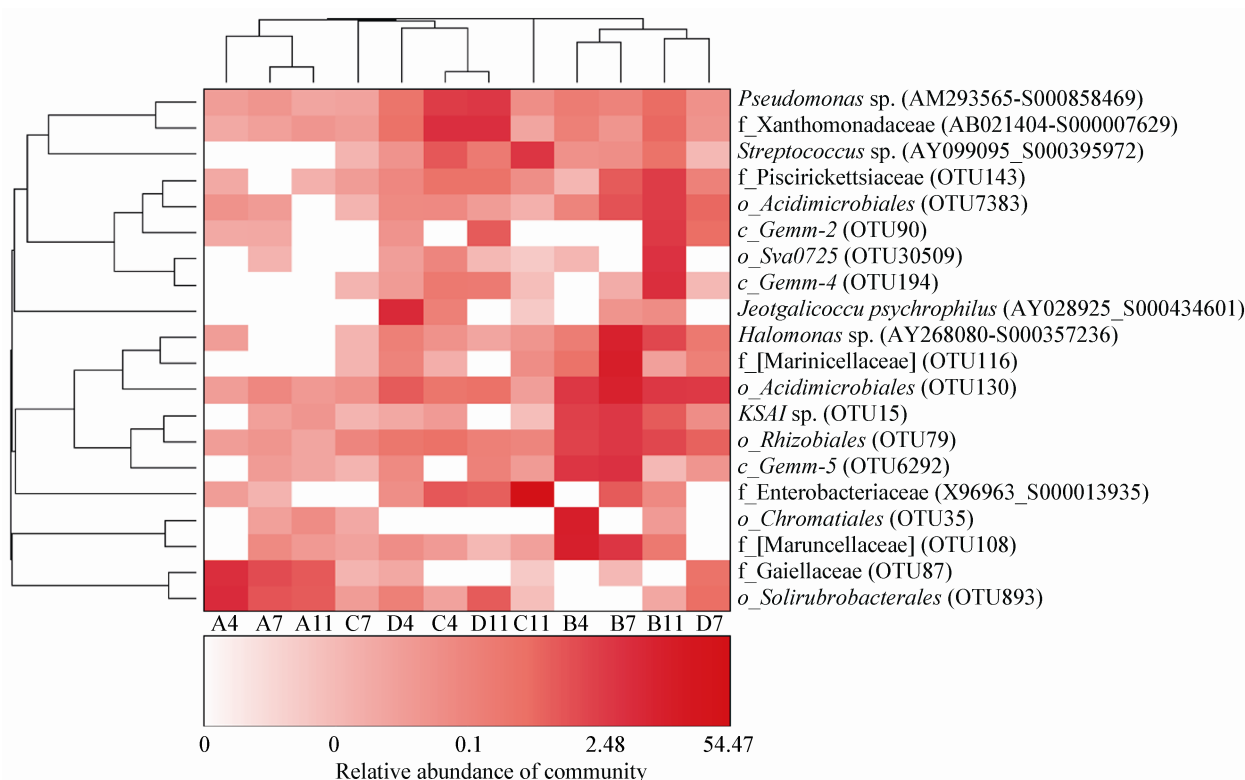


图 6 基于丰度比较高的前 20 个 OTU 的 Heatmap 图

Figure 6 Heatmap based on the top 20 OTU abundance of bacteria genera

3 讨论

本研究利用 Illumina MiSeq 测序技术通过对 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区的测序分析,成功检测了泥火山土壤细菌群落结构的多样性,获得了大量、全面且深入的菌群信息。12 个样品共获得有效序列的总数为 287 467,平均测序读长在 420–480 bp 之间。在 97%的相似度水平下共产生有效 OTU 个数为 29 005,通过与 RDP 数据库^[18]进行比对,在门水平上得到优势菌群均为 Proteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes,其中 Proteobacteria 的丰度最高,这与 Roesch 等^[19]对土壤微生物和 Zhang 等^[20]对污泥微生物群落的研究相一致;在属水平上,含量最高的是未分类细菌,这说明泥火山样品中蕴含着丰富的微生物资源,很多物种是我们现在还未知的,而这些未知的物种为我们探究物种的多样性提供了很好的资源。此外,还有一些功能菌属被检测出,例如, *Sphingomonas* (鞘氨醇单胞

菌属)是一类丰富的新型微生物资源,可用于芳香化合物的生物降解,该属菌株凭借自身的高代谢能力与多功能的生理特性,在环境保护及工业生产方面具有巨大的应用潜力,但是由于对鞘氨醇单胞菌的认识较晚,该菌的生态价值及经济价值很少被关注,对它的研究也停留在初级阶段^[21]。这一类菌属的发现可以为我们提供一个新思路,在后续研究中可以通过筛选新的培养基及分离程序,进一步研究可培养微生物及其功能,从而进一步发现有利用价值的资源。

MiSeq 测序结果通过丰度指数(Chao1)和多样性指数(Shannon、Simpson)反映了细菌的群落结构多样性,其中生境 D 的 Shannon 指数和 Chao1 指数最高,生境 B 和生境 C 相对较低;在土壤理化因子测定结果中,生境 C 的含水量、有机质、全磷、全氮和全钾含量最高,生境 D 的土壤养分(全氮、全磷、全钾)含量相对较低,并且通过细菌群落多样性

与理化因子的相关性分析, 结果表明泥火山细菌群落多样性随着土壤养分的增加而基本呈下降趋势, 说明了物种多样性指数与理化因子之间呈负相关关系, 这与陈芳^[22]的研究结果一致; 群落结构多样性与含水量、全磷的相关性较高, 说明泥火山微生物活动对磷循环有着很大的影响, 并且磷在生物遗传中也扮演着重要的角色, 是影响微生物多样性的一个重要因素, 这也曾在高慧琴等^[23]的研究中提及过。

OTU 水平的 PCA 分析表明, 除了生境 A 的群落组成在时空演替方面没有差异, 生境 B 和生境 C 的群落结构均受到了季节变化的影响, 尤其是生境 D, 其 3 个样品较为分散, 说明微生物群落结构的差异较大, 群落组成明显不同, 而生境 C 和生境 D 距离较近, 表明两者在一部分 OTU 上有相似的组成成分, 说明这两个生境之间群落组成有相似之处。而且, 在 Heatmap 图中, 也更进一步验证了 PCA 的结果, 并发现 *Shigella flexneri*、OTU116、*Halomonas*、OTU116、*Pseudomonas* 的相对丰度较高。

传统测序技术(Sanger 测序)由于其读长长、准确率高, 能根据测得的全长 16S rRNA 基因序列注释到种, 但 Sanger 测序通量较低, 大规模测序成本高, 操作复杂。Illumina MiSeq 高通量测序技术, 它能够产生大量 Reads, 一般每个样品可以保证测定 40 000–60 000 个序列数, 覆盖深度非常大, 对物种多样性的分析十分有利, 并且在一般规模实验中, 它的成本比率更易掌控^[24]。但是高通量测序读长短, 不可能将 16S rRNA 基因的 9 个可变区全部测序, 所以往往只选择 1–3 个可变区作为测序区域。自从 Woese 等将 16S rRNA 基因作为原核生物系统发育和分子生态学研究的经典标准以来^[25–26], 16S rRNA 基因便成了细菌群落结构分析常用的系统进化标记分子。然而, 由于发现该基因不同区域存在不同程度的异质性, 不同可变区的选择对菌群具有偏向性, 因而利用不同区域的序列进行高通量测序会造成不同程度的多样性高估, 而相

关研究^[27]指出, 基因异质性趋向于集中在特殊的区域, V1 和 V6 区域的高估程度最高, V4 和 V5 区域则显示了最低的高估程度。因此, 在本实验中, 结合相关方面的文献选择了泥火山细菌 16S rRNA 基因的 V3–V4 可变区作为研究对象, 从而降低了泥火山细菌多样性分析的高估程度, 使得测序结果更加全面和准确。

参 考 文 献

- [1] Fan WP, Zheng LQ, Gong JH, et al. Forming of mud volcano and relation with hydrocarbon[J]. Tuha Oil & Gas, 2007, 12(1): 43-47 (in Chinese)
范卫平, 郑雷清, 龚建华, 等. 泥火山的形成及其与油气的关系[J]. 吐哈油气, 2007, 12(1): 43-47
- [2] Ma XL, Wang Y, Yang HM, et al. The bacterial diversity from mud volcano in Xinjiang by culture-independent approach[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(7): 3722-3728 (in Chinese)
马小龙, 王芸, 杨红梅, 等. 新疆泥火山细菌遗传多样性[J]. 生态学报, 2009, 29(7): 3722-3728
- [3] Lebrun JD, Trinsoutrot-Gattin I, Vincencas-Akpa M, et al. Assessing impacts of copper on soil enzyme activities in regard to their natural spatiotemporal variation under long-term different land uses[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2012(49): 150-156
- [4] Chen FL, Zhang K, Zheng H, et al. Analyzing the effect of mixed decomposition of conifer and broadleaf litters on soil microbial communities by using RCR-DGGE[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2011, 17(2): 145-150 (in Chinese)
陈法霖, 张凯, 郑华, 等. PCR-DGGE 技术解析针叶和阔叶凋落物混合分解对土壤微生物群落结构的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(2): 145-150
- [5] Tang J, Xu QR, Wang LM, et al. Soil bacterial community diversity under different stages of degradation in Zoige wetland[J]. Microbiology China, 2011, 38(5): 677-686 (in Chinese)
唐杰, 徐青锐, 王立明, 等. 若尔盖高原湿地不同退化阶段的土壤细菌群落多样性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(5): 677-686
- [6] Chen GH, Mi BB, Li Y, et al. The effect of transgenic cucumber with double strands RNA of mapk on diversity of rhizosphere bacteria[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(4): 1091-1097 (in Chinese)
陈国华, 弭宝彬, 李莹, 等. 转 mapk 双链 RNA 干扰表达载体黄瓜对根际土壤细菌多样性的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(4): 1091-1097
- [7] Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, et al. Performance comparison of bench top high-throughput sequencing platforms[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(5): 434-439
- [8] Yang SZ, Wen X, Jin HJ, et al. Pyrosequencing investigation into the bacterial community in permafrost soils along the China-Russia crude oil pipeline (CRCOP)[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52730
- [9] Liu B, Faller LL, Klitgord N, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e37919
- [10] Duan Z, Xiao W, Wang YX, et al. Application of 454 sequencing technique in microbial ecology[J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(5): 76-81 (in Chinese)
段墨, 肖炜, 王永鑫, 等. 454 测序技术在微生物生态学研究中的应用[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(5): 76-81

- [11] Po ka J, Rebecchi A, Pisacane V, et al. Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons[J]. Food Microbiology, 2015(46): 342-356
- [12] Nelson MC, Morrison HG, Benjamino J, et al. Analysis, optimization and verification of Illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94249
- [13] Bao SD. Soil Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 1981: 30-102 (in Chinese)
鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1981: 30-102
- [14] Chao AN. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, 11(4): 265-270
- [15] Hill MO. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences[J]. Ecology, 1973, 54(2): 427-432
- [16] Esty WW. The efficiency of Good's nonparametric coverage estimator[J]. The Annals of Statistics, 1986, 14(3): 1257-1260
- [17] Landau S, Everitt BS. A Handbook of Statistical Analyses Using SPSS[M]. Florida: Chapman & Hall, 2004
- [18] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267
- [19] Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity[J]. The ISME Journal, 2007, 1(4): 283-290
- [20] Zhang T, Shao MF, Ye L. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants[J]. The ISME Journal, 2012, 6(6): 1137-1147
- [21] Hu J, He XH, Li DP, et al. Progress in research of sphingomonas[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2007, 13(3): 431-437 (in Chinese)
胡杰, 何晓红, 李大平, 等. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 431-437
- [22] Chen F. Study on the relationship between Plant diversity and soil Properties in Mangshan Nature Reserve[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2011 (in Chinese)
陈芳. 莽山植物物种多样性及其土壤理化性质关系的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2011
- [23] Gao HQ, Liu L, Fang ZJ. Analysis of microbial diversity in Superficial deposit of lakes in Lixia River Area in Summer[EB/OL]. Beijing: China Science And Technology Papers Online, [2010-12-09]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201012-264> (in Chinese)
高慧琴, 刘凌, 方泽建. 里下河地区湖群夏季表层沉积物微生物多样性分析[EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线, [2010-12-09]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201012-264>
- [24] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59
- [25] Woese CR. Bacterial evolution[J]. Microbiological Reviews, 1987, 51(2): 221-271
- [26] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America, 1990, 87(12): 4576-4579
- [27] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intra-genomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969