

# 利用高通量测序对三江平原小叶章湿地土壤细菌多样性的研究<sup>①</sup>

隋 心<sup>1,2,3,4</sup>, 张荣涛<sup>1,2,3</sup>, 钟海秀<sup>1,2,3</sup>, 许 楠<sup>1,2,3</sup>, 王继丰<sup>1,2,3</sup>,  
刘应竹<sup>1,2,3</sup>, 袁海峰<sup>1,2,3</sup>, 倪红伟<sup>1,2,3\*</sup>

(1 黑龙江省科学院自然与生态研究所, 哈尔滨 150040; 2 湿地与生态保育国家地方联合工程实验室, 哈尔滨 150040;

3 黑龙江省湿地与恢复生态学重点实验室, 哈尔滨 150040; 4 东北林业大学, 哈尔滨 150040)

**摘 要:** 利用黑龙江省科学院自然与生态研究所三江平原野外实验研究站内 3 个不同小叶章生态类型湿地土壤样品, 直接提取土壤微生物总 DNA, 应用 Miseq 测序技术对 16S rDNA 进行序列测定和分析。结果表明: 不同小叶章湿地土壤细菌群落结构发生了显著变化, 土壤细菌多样性和丰富度随着土壤含水率的增加而降低。草甸化湿地和沼泽化草甸湿地优势种群为酸杆菌, 变形菌次之; 沼泽化湿地优势种群为变形菌, 酸杆菌次之。土壤含水率的增加减少了酸杆菌的分布, 而增加了变形菌的分布。16S rDNA heatmap 分析则表明, 湿地水位的变化对酸杆菌和变形菌的群落结构影响最大。

**关键词:** 16S rDNA; 湿地; Miseq

**中图分类号:** Q938

土壤微生物是陆地生态系统中有机物的主要分解者和转化者, 参与土壤碳氮循环等生物地球化学过程以及土壤矿化过程, 通过改变土壤的物理化学和生物学特性, 对有机物的分解转化、养分的转化和供应具有重要的主导作用。土壤微生物在生态系统物质养分循环中具有十分重要的意义<sup>[1]</sup>, 推动着生态系统能量和物质循环, 维系生态系统正常运转, 土壤微生物种类组成和群落结构在很大程度上决定着土壤的生物活性。因此, 通过土壤微生物结构变化特征研究, 预测生态系统的结构与功能越来越受到关注<sup>[2-5]</sup>。

近年来, 运用不同方法对土壤微生物多样性进行的研究越来越多, 其中土壤微生物以细菌的种类和数量最多<sup>[6]</sup>, 细菌多样性的研究受到广泛关注。随着分子生物学的快速发展, 对环境中微生物的研究方法已经跳出了传统的实验室纯培养限制。宏基因组(Metagenome)(也称微生物环境基因组 Microbial Environmental Genome, 或元基因组)。是由 Handelsman 等<sup>[7]</sup> 1998 年提出的新名词。它包含了可培养的和不可培养的微生物的基因, 目前主要指

环境样品中的细菌和真菌的基因组总和。宏基因组学(Metagenomics)作为分子生态学发展的典型技术策略, 能够从环境样本中直接获得总 DNA 进行文库构建、测序<sup>[8]</sup>, 在整体水平解析微生物群落结构, 尽可能真实地揭示原位环境中微生物群落的复杂性和多样性<sup>[9]</sup>, 在土壤微生物多样性研究中显示出强大的功能<sup>[10]</sup>, 在植被根际细菌群落、水域底泥及其他极端/特殊环境中细菌群落等方面被广泛应用<sup>[10-14]</sup>。Miseq 是 2011 年 Illumina 公司新开发的第二代高通量测序平台, 利用索引策略和重叠的 2×150 bp 读数, 每次运行产生 1 000 Mb 以上的数据, 而且成本较低。采用 Illumina 高通量测序仪进行土壤宏基因组的研究, 较传统的单克隆等技术具有明显的通量优势和极高的分辨率。

三江平原沼泽湿地是我国湿地面积最大、类型最齐全的地区之一, 由于人类活动的影响, 湿地面积由 1949 年的  $534.5 \times 10^4 \text{ hm}^2$  减少到  $148.16 \times 10^4 \text{ hm}^2$ <sup>[14]</sup>, 湿地生态系统结构与功能不断发生变化, 目前研究主要集中在植物群落变化<sup>[15]</sup>、温室气体排放<sup>[16]</sup>和营养

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470019、31370426、31170462)、黑龙江省科学院青年创新基金重点资助项目、黑龙江省科学院学科(专业)团队创新能力提升专项-湿地全球变化生态学项目(2014ST05)、黑龙江省湿地与恢复生态学重点实验室课题研究项目(PS13H04)和黑龙江省科研机构创新能力提升专项计划项目(YC2014D007)资助。

\* 通讯作者(nihongwei2000@163.com)

作者简介: 隋心(1982—), 男, 黑龙江拜泉人, 博士, 实习研究员, 主要从事生态学方向研究。E-mail: xinsui\_cool@126.com

物质循环<sup>[17]</sup>。湿地土壤微生物在维护湿地生态系统的结构与功能方面具有重要作用,国外部分学者<sup>[18-19]</sup>研究了湿地土壤微生物活性特征及群落结构变化,探讨了湿地土壤微生物在湿地生态系统的作用。目前,三江平原湿地土壤微生物多样性特征鲜有报道,特别是不同类型小叶章湿地土壤微生物多样性变化缺乏系统研究。小叶章(*Deyeuxia angustifolia*)是三江平原沼泽湿地的主要优势物种之一,分布广泛。因此,通过选取不同类型湿地土壤,研究了小叶章湿地土壤微生物的群落组成与结构变化,旨在探讨三江平原小叶章湿地土壤微生物结构变化特征,揭示三江平原湿地土壤质量变化规律,为三江平原湿地保护提供科学依据,并为我国湿地保护与管理提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

研究区域选在三江平原典型沼泽湿地分布区——黑龙江省科学院自然与生态研究所三江平原湿地生态野外实验站内。本区海拔 55~65 m,属温带湿润半湿润季风气候,年平均气温 1.9℃,年平均降雨量 550~600 mm,无霜期 125 天左右,试验场内有大面积的季节性积水的小叶章沼泽化草甸。

1.2 样品采集

在实验站内选择 3 块 5 m×5 m 代表样地:沼泽化小叶章湿地、草甸化小叶章湿地以及沼泽化草甸小叶章湿地。于 2014 年 6 月采集土壤样品,土壤样品为混合土样,用直径为 4 cm 的土钻按混合采样法采集 0~20 cm 土层,每个土样由 5~8 个采集点的土壤混合,用四分法取适量于土袋中,迅速带回实验室。去除土样中的植物和动物残体等杂质,混合均匀后一部分保存在 -80℃,用于分析土壤细菌群落结构。另一部分风干、磨细过 100 目筛和 1 mm 筛,用于测定土壤理化性质。

1.3 土壤微生物总 DNA 的提取

采用 MOBIO12888-power extraction for soil 试剂盒,称取 0.25 g 新鲜土壤,按照说明书的提取步骤进行。将提取得到的土壤微生物总 DNA 溶解于 100 μl

去离子水中,取 5 μl 的 DNA 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测(0.5×TAE 缓冲液),分析 DNA 的完整性和相对浓度。

1.4 土壤细菌的 16S rDNA 基因测序

土壤总 DNA 送到上海美吉生物医药科技有限公司进行 Miseq 高通量测序。细菌 16s rDNA 扩增引物采用通用引物(8F/533R)。

1.5 数据处理

1.5.1 有效序列和优化序列数据统计 采用多个样品平行测序的方法,所以各样品中的序列均引入了一段标示其样本来源信息的 barcode 标签序列及前引物(forward primer)序列。本次分析根据 barcode 标签序列和前引物序列筛选出有效序列后,将测序接头与 barcode 序列去除,并对处理后的有效序列进行数据统计。

为了得到更高质量及更精准的生物信息分析结果,应对有效序列进行去杂。丢弃长度短于 150 bp、含有模糊碱基、引物碱基含 2 个以上错配的序列,即得到优化序列,之后对优化序列进行数据统计。

1.5.2 OTU-based 分析 对所有样品进行 OTU 生成并对 OTU 进行生物信息统计分析。将优化序列选取长度大于 350 bp 的序列并截齐后与 silva 库比对(silva108 版)后对序列进行聚类。聚类分析使用的软件为 mothur 和 chopseq (<http://www.mothur.org/wiki/Main—Page>)。

1.5.3 细菌群落多样性分析 细菌群落物种的丰富度(richness)和多样性(diversity)分别用 Chao1 和 Shannon 指数表示,测序深度指数用 Coverage 表示。

1.5.4 群落结构分析 将优化序列根据 silva 库中的参考序列对 OTU 进行种属鉴定。在门(phylum)的水平上做样品群落分布柱状图,比较 3 个土样中的菌落分布情况。

2 试验结果

2.1 不同湿地类型土壤理化性质的变化特征

由表 1 可以得出:在不同的湿地类型土壤中,土壤含水率的变化规律为沼泽化草甸湿地<草甸湿地<沼泽湿地;土壤 pH、有机碳、速效磷、速效钾则表

表 1 不同湿地类型下的土壤理化性质的比较  
Table 1 The physical and chemical properties of the soils from different wetland's types

| 样点             | pH   | 有机碳(g/kg) | 速效磷(mg/kg) | 速效钾(mg/kg) | 土壤含水率(%) |
|----------------|------|-----------|------------|------------|----------|
| 沼泽化草甸小叶章湿地(K0) | 5.85 | 49.61     | 22.51      | 211.35     | 65       |
| 草甸小叶章湿地(K1)    | 5.63 | 46.53     | 21.76      | 208.37     | 85       |
| 沼泽小叶章湿地(K2)    | 5.39 | 44.12     | 19.86      | 106.40     | 210      |

现为沼泽化草甸湿地>草甸湿地>沼泽湿地，随着土壤含水量的增加，以上各指标均呈下降趋势。

2.2 不同湿地类型土壤细菌多样性指数

通过比较 DNA 序列的相似性，将相似性大于 98% 的序列归为同一种可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)<sup>[20]</sup>。对不同生态类型小叶章湿地

土壤细菌 16s rDNA 多样性指数进行分析(表 2)，K0、K1、K2 的 Shannon 指数分别为 5.26、5.22、5.19，丰富度指数分别为 745、740、709，随着土壤含水率的逐渐增加，细菌的多样性和丰富度均有所降低。这表明不同生态类型湿地土壤细菌的结构存在差异，且不同湿地土壤细菌的群落结构变化规律不同。

表 2 不同生态类型小叶章湿地土壤样本中细菌丰富度和多样性指数  
Table 2 Diversity indices of bacteria in the soils from different ecological types of *Deyeuxia angustifolia* wetlands

| 样点 | OTU | Ace 指数 | Chao 指数 | Shannon 指数 | Simpson 指数 |
|----|-----|--------|---------|------------|------------|
| K0 | 683 | 762    | 745     | 5.26       | 0.012 9    |
| K1 | 636 | 743    | 740     | 5.22       | 0.013 1    |
| K2 | 660 | 707    | 709     | 5.19       | 0.015 6    |

2.3 不同湿地类型土壤细菌 16s rDNA 序列分析

将测序所得 16s rDNA 序列在 Genbank 中进行比对，得到不同生态类型小叶章湿地细菌的分类(表 3)，可以看出 K0 和 K1 小叶章湿地优势种群为酸杆菌(*Acidobacteria*)，分别占总测序数的 53% 和 52%，K2 小叶章湿地中的优势种群为变形菌(*Proteobacteria*)，占总测序数的 62%。变形菌(*Proteobacteria*)在 K0 和 K1 分布中仅次于酸杆菌门(*Proteobacteria*)，在 K0 和 K1 中也有大量的分布，分别占总克隆数的 22% 和 26%，酸杆菌(*Acidobacteria*)在 K2 分布中仅次于变形菌(*Proteobacteria*)，占总克隆数的 10%。随着

土壤含水率的增加，土壤细菌从酸杆菌(*Acidobacteria*)为主要群落类型转变为以变形菌(*Proteobacteria*)为主的群落结构。土壤含水率增加后，酸杆菌(*Acidobacteria*)减少了 40%，而变形菌增加了 31%。此外，K0 中细菌种类超过 5% 还包括浮霉菌(*Planctomycetes*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)，占总测序数的 6% 和 5%。K1 中细菌种类超过 5% 还包括浮霉菌(*Planctomycetes*)和硝化螺旋菌(*Nitrospirae*)，占总测序数的 7% 和 5%。而 K2 细菌种类超过 5% 的还包括厚壁菌(*Firmicutes*)和拟杆菌(*Bacteroidetes*)，占总测序数的 9% 和 5%。

表 3 3 种湿地类型土壤细菌 16S rDNA 序列分析  
Table 3 Sequence analysis of 16S rDNA in the soils from three wetland types

| 种类                            | K0     |       | K1    |       | K2     |       |
|-------------------------------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|
|                               | 克隆数    | 比例(%) | 克隆数   | 比例(%) | 克隆数    | 比例(%) |
| <i>Acidobacteria</i>          | 5 766  | 53    | 4 611 | 51    | 1 741  | 10    |
| <i>Proteobacteria</i>         | 2 336  | 22    | 2 294 | 26    | 10 802 | 62    |
| <i>Chloroflexi</i>            | 556    | 5     | 239   | 3     | 738    | 4     |
| <i>Bacteria_norank</i>        | 169    | 2     | 84    | 1     | 680    | 4     |
| <i>Planctomycetes</i>         | 697    | 6     | 618   | 7     | 215    | 1     |
| <i>Bacteroidetes</i>          | 186    | 2     | 224   | 3     | 1 574  | 9     |
| <i>Nitrospirae</i>            | 426    | 4     | 441   | 5     | 32     | 0     |
| <i>Firmicutes</i>             | 23     | 0     | 22    | 0     | 879    | 5     |
| <i>Gemmatimonadetes</i>       | 158    | 1     | 137   | 2     | 37     | 0     |
| <i>Chlorobi</i>               | 165    | 2     | 90    | 1     | 216    | 1     |
| <i>Verrucomicrobia</i>        | 25     | 0     | 36    | 0     | 22     | 0     |
| <i>Candidate_division_OP8</i> | 2      | 0     | 3     | 0     | 191    | 1     |
| 其他                            | 307    | 3     | 156   | 2     | 290    | 2     |
| 总数                            | 10 816 | 100   | 8 955 | 100   | 17 417 | 100   |

土壤微生物还包括 *Bacteria\_norank*、绿菌(*Chlorobi*)、*Candidate\_division\_OP8*、疣微菌(*Verrucomicrobia*)、芽单胞菌(*Gemmatimonadetes*)。他们在 K0、K1 和 K2

3 个样地中分布均比较少，各类细菌占总测序数的比例都小于 5%。另外，K0、K1 和 K2 3 个样地中均有 ≥2% 的细菌在 Genbank 中没有被明确地分类，属于

未分类的菌。

与 K0 和 K1 相比, K2 对酸杆菌数量分布的影响最大。从表 3 可以看出, K2 酸杆菌分别比 K0 和 K1 减少了 43% 和 41%。变形菌的影响仅次于酸杆菌, 与 K0 和 K1 相比, K2 的变形菌增加了 40% 和 36%。另外, 浮霉菌、厚壁菌、拟杆菌受土壤含水率的影响也比较大。与 K0 和 K1 相比, 土壤含水率增加后,

K2 的浮霉菌减少了 5% 和 6%, 而厚壁菌增加了 5%, 拟杆菌则分别增加了 7% 和 6%。

## 2.4 群落结构分析

在属的水平上对样品和样品所含菌属进行聚类, 对聚类后的各样品中不同 OTU 所含序列的丰度作出 heatmap (图 1), 该图能够反映出在菌属水平上各样品细菌群落结构的差异性。

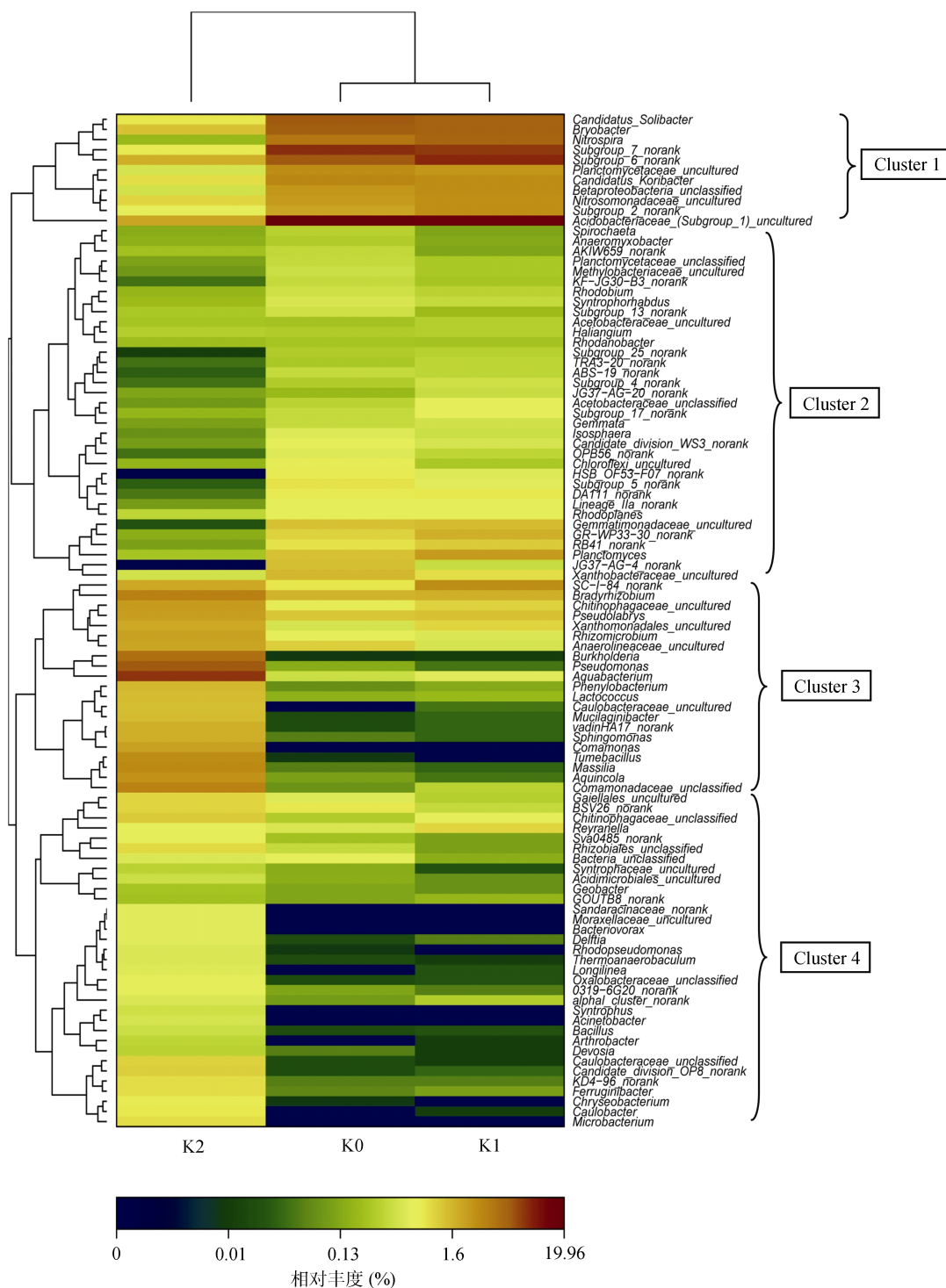


图 1 基于 16S rDNA 序列构建的热图

Fig. 1 Heatmap tree based on the 16S rDNA sequences

从图1可见,湿地土壤16S rDNA细菌的heatmap图可以划分为4个Cluster。菌属的丰度受到不同土壤含水率变化的影响,在所测得的菌属中丰度受土壤含水率变化影响最大的是 *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Bacteria\_norank*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*。在不同的小叶章湿地类型中,菌属丰度表现出较大的差异,如 *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, *Chlorobi*, *Nitrospirae* 在沼泽化草甸小叶章湿地(K0)与草甸化湿地(K1)要高于沼泽化小叶章湿地(K2),而 *Proteobacteria*, *Bacteria\_norank*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* 的丰度则表现为沼泽化小叶章湿地(K2)大于另外两种类型。

从图1可见,Cluster 1 主要包括浮霉菌、酸杆菌、硝化螺旋菌。不同类型的小叶章湿地使得细菌结构的分布发生了明显的影响。沼泽化小叶章湿地(K2)的细菌丰度最低,草甸小叶章湿地(K1)与沼泽化草甸小叶章湿地(K0)的细菌丰度较高。

Cluster 2 主要包括螺旋菌、变形菌以及一些未知的菌。从图1可见,沼泽化小叶章湿地(K2)的螺旋菌、变形菌等细菌丰度最低,草甸化小叶章湿地(K1)与沼泽化草甸小叶章湿地(K0)的细菌丰度较高。另外,与Cluster 1 相比,3 个小叶章湿地细菌的丰度要比Cluster 1 中的菌属丰度低。

Cluster 3 主要包括根瘤菌、拟杆菌、红假单胞菌、丛毛单胞菌。从图1可见,根瘤菌在3个湿地中的丰度不明显,但是拟杆菌、红假单胞菌、丛毛单胞菌在3个湿地中的丰度差异比较明显,沼泽化小叶章湿地(K2)中的丰度要大于草甸化小叶章湿地(K1)与沼泽化草甸小叶章湿地(K0)。

Cluster 4 主要包括放线菌、地杆菌、鞘脂单胞菌。从图1可见,放线菌、地杆菌、鞘脂单胞菌在沼泽化小叶章湿地(K2)中的分布要低于草甸化小叶章湿地(K1)与沼泽化草甸小叶章湿地(K0)。

从总体来看,与K0和K1相比,K2的土壤细菌群落结构和丰度变化比较大,这说明土壤含水率对土壤细菌结构的影响比较明显,这从图1可以明显看出来。另外,对于K0和K1 2 个小叶章湿地类型来看,二者的土壤含水率比较接近,土壤理化指标也比较接近(表1),所以,两个湿地类型的细菌群落结构和丰度都比较接近。

### 3 分析与讨论

多样性指数对于分析不同土壤的微生物群落结构是非常有效的方法,多样性指数越高则微生物群落

多样性越高,它由群落的多样性及群落的丰富度两部分组成<sup>[21-22]</sup>。本研究结果表明,不同小叶章湿地土壤细菌的群落结构发生了显著的变化,Shannon 指数和丰富度指数均呈现  $K0 > K1 > K2$  (表2),可见,随着土壤含水率的增加减少了细菌的多样性。大量研究表明,湿地土壤微生物主要与植物群落类型、土壤理化性质以及土壤含水率有关<sup>[23-24]</sup>。土壤类型的不同直接影响着土壤微生物的群落组成<sup>[25]</sup>。通过对小叶章湿地3种不同类型的土壤细菌群落结构多样性指数分析可知,同一季节,草甸化小叶章和沼泽化草甸小叶章湿地土壤的细菌群落结构的多样性指数均高于沼泽化小叶章湿地(表2),这表明不同小叶章湿地植被类型对于微生物的群落结构有重要的影响。在草甸化小叶章和沼泽化草甸小叶章湿地土壤中,较低的土壤含水量和较好的通气条件为土壤微生物创造了一个良好的微环境,形成较高的微生物多样性(表1、表2)。而在常年积水的沼泽化小叶章湿地土壤中,土壤的水文条件严重影响了土壤微生物的群落特征(表2)。这与徐惠风等<sup>[26]</sup>的研究结果一致。主要是由于较高的含水量降低了土壤的氧气含量,限制了需氧微生物对于有机质的降解,从而影响微生物的生长。

16S rDNA 序列分析表明(表3),草甸化小叶章湿地、沼泽化草甸小叶章湿地和沼泽化小叶章湿地的优势种群都是变形菌(*Proteobacteria*),分别占到了22%、26%、62%。这与刘峰等<sup>[27]</sup>的研究结果一致。另外,针对湿地土壤,刘绍雄等<sup>[28]</sup>研究发现:剑湖湿地土壤中,主要优势种群也是变形菌,这些研究都和本研究的结果相一致,表明湿地土壤样品中变形菌是优势种群。另外,序列分析表明(表3),3个不同类型的小叶章湿地土壤中有较多的酸杆菌(*Acidobacteria*)分布,沼泽化草甸湿地中占到53%,草甸化湿地占到51%,沼泽化湿地占到10%。这一结果与前人的一些研究相符合:即湿地土壤中变形菌和酸杆菌两个类群占主导地位<sup>[29-30]</sup>。较多的酸杆菌可能与弱酸性的土壤环境有关,实验发现本研究湿地土壤pH在5.3~5.9(表1),呈微弱酸性,有利于某些酸杆菌的生长。酸杆菌是新近分出的一类细菌,主要分布于湿地、海洋沉积物和活性淤泥等处<sup>[31]</sup>,大部分为不可培养的微生物。

土壤中巨大的微生物数量意味着微生物群落结构的复杂性。任何的技术都不可能对所有序列进行测序。本研究中采用Miseq技术对细菌16S rDNA序列测定的方法分析湿地土壤微生物群落结构,随机选择的克隆代表细菌群落中占统治地位的基因类型,已

经可以反映土壤细菌的种类和分布的概况,获得了很好的效果。

#### 参考文献:

- [1] 张永勇, 张光义, 夏军, 王红萍. 湿地污水处理机理的研究[J]. 环境科学与技术, 2005, 28(增刊): 165-167
- [2] Harris JA. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration[J]. European Journal of Soil Science, 2003, 54: 801-808
- [3] Schlöter M, Dilly O, Munch JC. Indicators for evaluating soil quality[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2003, 98(1): 255-262
- [4] Bossio DA, Fleck JA, Scow KM, Fujii R. Alteration of soil microbial communities and water quality in restored wetlands[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(6): 1 223-1 233
- [5] Lagomarsino A, Moscatelli MC, Di Tizio A, Mancinelli R, Grego S, Marinari S. Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a Mediterranean environment[J]. Ecological Indicator, 2009, 9(3): 518-527
- [6] 陈秀蓉, 南志标. 细菌多样性及其在农业生态系统中的作用[J]. 草业科学, 2002, 19(12): 34-38
- [7] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products[J]. Chemistry Biology, 1998, 5(10): R245-R249
- [8] 秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(4): 445-457
- [9] 李庆岗, 陶立高. 高通量测序技术及其在生命科学中的应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2012, 33(2): 25-28
- [10] 艾芳芳, 杨桦, 曲媛媛, 周集体, 李昂, 关晓燕, 苟敏. 宏基因组研究及其应用研究进展[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(12): 100-103
- [11] He ZL, Xu M, Deng Y, Kang S, Kellogg L, Wu L, Van Nostrand JD, Hobbie SE, Reich PB, Zhou J. Meta genomic analysis reveals a marked divergence in the structure of belowground microbial communities at elevated CO<sub>2</sub>[J]. Ecology Letter, 2010, 13(5): 564-575
- [12] Monteiro JM, Vollú RE, Coelho MRR, Fonseca A, Gomes Neto SC, Seldin L. Bacterial communities within the rhizosphere and roots of vetiver( *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) sampled at different growth stages [J]. European Journal of Soil Biology, 2011, 47(4): 236-242
- [13] Yu Y, Wang H, Liu J, Wang Q, Shen T, Guo W, Wang R. Shifts in microbial community function and structure along the successional gradient of coastal wetlands in Yellow River Estuary[J]. European Journal of Soil Biology, 2012, 49(3): 12-21
- [14] 侯梅锋, 何士龙, 李栋, 张洁, 赵云. 连云港海底底泥及青海湖底泥细菌多样性研究[J]. 环境科学, 2011, 32(9): 2 681-2 688
- [15] 汲玉河, 吕宪国, 杨青, 赵魁义. 三江平原小叶章群落近三十年的动态变化[J]. 生态学杂志, 2006, 25(11): 1 328-1 332
- [16] 宋长春, 王毅勇, 王跃思, 赵志春. 人类活动影响下淡水沼泽湿地温室气体排放变化[J]. 地理科学, 2005, 26(1): 82-86
- [17] 孙志高, 刘景双, 于君宝. 三江平原小叶章不同植物群落氮素的累积与分配[J]. 应用生态学报, 2009, 20(2): 277-284
- [18] Corstanje R, Reddy KR, Prenger JP, Newman S, Ogram AV. Soil microbial eco-physiological response to nutrient enrichment in a sub-tropical wetland[J]. Ecological Indicators, 2007, 7(2): 277-289
- [19] Alan LW, Reddy KR, Corstanje R. Patterns of heterotrophic microbial activity in eutrophic and oligotrophic peatlands[J]. European Journal of Soil Biology, 2009, 45(2): 131-147
- [20] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 69(10): 6 189-6 200
- [21] Harch BD, Meech W, Pankhurst CE, Correll RL. Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilization data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities[J]. Journal of Microbiological Methods, 1997, 30(1): 91-101
- [22] Staddon WJ, Duchesne LC, Trevors JT. Microbial diversity and community structure of postdisturbance forest soil as determined by soil-carbon source utilization patterns[J]. Microbial Ecology, 1997, 34(2): 125-130
- [23] Zhao YJ, Liu B, Zhang WG, Hu CW. An Effects of plant and influent C:N:P ratio on microbial diversity in pilot-scale constructed wetlands[J]. Ecological Engineering, 2010, 36(4): 441-449
- [24] Truu M, Juhanson J, Ttuu J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands[J]. Science of Total Environment, 2009, 407(13): 3 958-3 971
- [25] Berg G, Smalla K. Plantspecies and soil Type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 68(1): 1-13
- [26] 徐惠风, 刘兴士, 白军红. 长白山沟谷湿地乌拉苔草沼泽湿地土壤微生物动态及环境效应研究[J]. 水土保持学报, 2004, 18(3): 115-122
- [27] 刘峰, 王建波, 谢立红, 许修宏. 三江平原根际微生物群落结构研究[J]. 国土与自然资源研究, 2013(3): 93-95
- [28] 刘绍雄, 王明月, 王娟, 杨宇明, 廖福俊, 王金华, 熊智. 基于 PCR-DGGE 技术的剑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): 1 405-1 412
- [29] 陈会海. 三江湿地土壤微生物群落结构的多样性分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 1-60
- [30] 余悦. 黄河三角洲原生演替中土壤微生物多样性及其与土壤理化性质关系[D]. 济南: 山东大学, 2012: 1-133
- [31] Schabereiter GC, Saiz JC, Pnár G, Lubitz W, Rolfe S. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 211(1): 7-11

## Study on Bacterial Diversity of *Deyeuxia angustifolia* Wetland by Application of High-throughput Sequencing Technology in Sanjiang Plain

SUI Xin<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Rong-tao<sup>1,2,3</sup>, ZHONG Hai-xiu<sup>1,2,3</sup>, XU Nan<sup>1,2,3</sup>, WANG Ji-feng<sup>1,2,3</sup>,  
LIU Ying-zhu<sup>1,2,3</sup>, YUAN Hai-feng<sup>1,2,3</sup>, NI Hong-wei<sup>1,2,3\*</sup>

(1 Institute of Natural Resource, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150040, China; 2 National and Provincial Joint Engineering Laboratory of Wetlands and Ecological Conservation, Harbin 150040, China; 3 Key Laboratory for Wetland and Restoration Ecology in Heilongjiang Province, Harbin 150040, China; 4 Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** Wetland soil bacterial community structure was studied through 16S rDNA gene. The soil samples were collected from the three different ecological types of *Deyeuxia angustifolia* in the Sanjiang Plain field experiment station of the institute of natural ecology, Heilongjiang Academy Sciences. Total microbial DNA was directly extracted from three soil samples, and the 16S rDNA genes were sequenced and analyzed by Miseq molecular technology. The results showed that the bacterial community composition was changed significantly, both Shannon index and Chao's index decreased indicating bacterial diversity was decreased with increase in soil moisture content. *Acidobacteria* was predominated both in meadow wetland and paludification meadows wetland, followed by *Proteobacteria*. The *Proteobacteria* was predominated in paludification wetland, followed by *Acidobacteria*. The distribution of *Acidobacteria* was decreased and *Proteobacteria* increased with increasing soil moisture content. The heatmap tree based on the 16S rDNA sequences showed that wetland water level affected the structure of *Acidobacteria* and *Proteobacteria* greatly.

**Key words:** 16S rDNA; Wetland; Miseq