

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

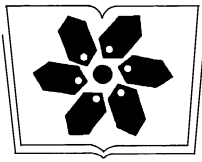
Acta Ecologica Sinica



第33卷 第1期 Vol.33 No.1 **2013**

中国生态学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 33 卷 第 1 期 2013 年 1 月 (半月刊)

目 次

前沿理论与学科综述

- 生态整合与文明发展..... 王如松 (1)
- 干旱半干旱区坡面覆被格局的水土流失效应研究进展 高光耀,傅伯杰,吕一河,等 (12)
- 城市林木树冠覆盖研究进展 贾宝全,王 成,邱尔发,等 (23)
- 环境质量评价中的生物指示与生物监测 Bernd Markert,王美娥,Simone Wünschmann,等 (33)
- 水溶性有机物电子转移能力及其生态效应 毕 冉,周顺桂,袁 田,等 (45)

个体与基础生态

- 凋落物和增温联合作用对峨眉冷杉幼苗抗氧化特征的影响 杨 阳,杨 燕,王根绪,等 (53)
- 不同浓度 5-氨基乙酰丙酸(ALA)浸种对 NaCl 胁迫下番茄种子发芽率及芽苗生长的影响
..... 赵艳艳,胡晓辉,邹志荣,等 (62)
- 缺镁胁迫对纽荷尔脐橙叶绿素荧光特性的影响 凌丽俐,彭良志,王男麒,等 (71)
- 松嫩草地 66 种草本植物叶片性状特征..... 宋彦涛,周道玮,王 平,等 (79)
- 花蜜中酚类物质对群落中同花期植物传粉的影响..... 赵广印,李建军,高 洁 (89)
- 桉树枝瘿姬小蜂连续世代种群生命表..... 朱方丽,邱宝利,任顺祥 (97)

种群、群落和生态系统

- 蒙古栎地理分布的主导气候因子及其阈值 殷晓洁,周广胜,隋兴华,等 (103)
- 河静黑叶猴果实性食物组成、选择及其对种子的扩散作用..... 阮海河,白 冰,李 宁,等 (110)
- 2010 秋季东海今生颗石藻的空间分布 靳少非,孙 军,刘志亮 (120)
- OPRK1 基因 SNP 与梅花鹿日间行为性状的相关性 吕慎金,杨 燕,魏万红 (132)
- 鄱阳湖流域非繁殖期鸟类多样性 邵明勤,曾宾宾,徐贤柱,等 (140)
- 人工巢箱条件下两种山雀鸟类的同域共存机制 李 乐,张 雷,殷江霞,等 (150)
- 桉-栎不同混合比例凋落物分解过程中土壤动物群落动态 李艳红,杨万勤,罗承德,等 (159)
- 三峡库区生态系统服务功能重要性评价 李月臣,刘春霞,闵 婕,等 (168)

景观、区域和全球生态

- 黄土高原小流域不同地形下土壤有机碳分布特征 李林海,郜二虎,梦 梦,等 (179)
- 海岸带地理特征对沉水植被丰度的影响..... 吴明丽,李叙勇,陈年来 (188)
- 玛纳斯河流域扇缘带不同植被类型下土壤物理性质 曹国栋,陈接华,夏 军,等 (195)

资源与产业生态

- 农田开垦对三江平原湿地土壤种子库影响及湿地恢复潜力 王国栋,Beth A Middleton,吕宪国,等 (205)
- 漫溢干扰过程中微地形对幼苗定居的影响 安红燕,徐海量,叶 茂,等 (214)
- 黑龙江流域夏玉米产量提升限制因素 徐丽娜,陶洪斌,黄收兵,等 (222)
- 黑龙江省药用植物根际土壤真菌多样性 慕东艳,吕国忠,孙晓东,等 (229)

桑沟湾养殖生态系统健康综合评价 傅明珠,蒲新明,王宗灵,等 (238)

城乡与社会生态

基于“OOAO 原则”的罗源湾生态质量状况综合评价 吴海燕,吴耀建,陈克亮,等 (249)

四十里湾营养状况与浮游植物生态特征 李 斌,白艳艳,邢红艳,等 (260)

生态足迹深度和广度:构建三维模型的新指标 方 恺 (267)

中国东西部中小城市景观格局及其驱动力 齐 杨,邬建国,李建龙,等 (275)

研究简报

南海陆坡沉积物细菌丰度预测 李 涛,王 鹏 (286)

浑善达克沙地榆树疏林幼苗更新空间格局 刘 振,董 智,李红丽,等 (294)

光 and 不同打破种子休眠方法对紫茎泽兰种子萌发及幼苗状态的影响 姜 勇,李艳红,王文杰,等 (302)

学术争鸣

关于植物群丛划分的探讨 邢韶华,于梦凡,杨立娟,等 (310)

期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 316 * zh * P * ¥90.00 * 1510 * 35 * 2013-01



封面图说:外来入侵物种紫茎泽兰——紫茎泽兰约于 20 世纪 40 年代由缅甸传入中国云南南部后迅速蔓延,现已在云南、贵州、四川、广西、重庆、湖北、西藏等省区广泛分布和危害,并仍以每年大约 30 km 的速度扩散。紫茎泽兰为多年生草本或亚灌木,号称“植物界杀手”。其对环境的适应性极强,疯长蔓延,能极大耗损土壤肥力。它的植株能释放多种化感物质,排挤其他植物生长而形成单优种群,它破坏生物多样性,威胁到农作物、畜牧草甚至林木,且花粉能引起人类过敏性疾病等,目前尚无有效治理对策。

彩图提供:陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites. chenjw@ 163. com

DOI: 10.5846/stxb201110081467

李涛, 王鹏. 南海陆坡沉积物细菌丰度预测. 生态学报, 2013, 33(1): 0286-0293.

Li T, Wang P. Prediction of bacterial species richness in the South China Sea slope sediments. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(1): 0286-0293.

南海陆坡沉积物细菌丰度预测

李 涛^{1,2}, 王 鹏^{1,*}

(1. 同济大学海洋地质国家重点实验室, 上海 200092; 2. 广州海洋地质调查局, 广州 510760)

摘要: 分别利用参数模型和无参数估计法预测南海陆坡沉积物柱 MD05-2896 中的细菌丰度。基于非培养的 PCR-RFLP 的 16S rRNA 基因分子技术, 扩增了沉积物柱中的细菌 16S rRNA 基因序列, 并构建 16S rRNA 基因文库。系统发育分析表明 16S rRNA 基因文库中, 大多数序列属于 17 个已知的“门”。分别以 99%、97%、90% 和 80% 序列一致性作为分类单元分界点, 将 16S rRNA 基因序列组群为分类单元。使用逆高斯分布模型、对数正态分布模型、负二项式分布模型、帕雷托分布模型、双指数分布模型以及 ACE、ACE-1 等估计方法预测不同分类单元分类水平下的细菌丰度。结果表明在“种”级分类水平上, 负二项式分布为最优估计模型, 估计细菌丰度为 244 ± 10 (SE)。不过, 受实验条件的限制, 该估计值可能偏低。

关键词: 细菌; 物种丰度; 南海; 沉积物

Prediction of bacterial species richness in the South China Sea slope sediments

LI Tao^{1,2}, WANG Peng^{1,*}

1 State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China

2 Guangzhou Marine Geological Survey, Guangzhou 510760, China

Abstract: Two families of statistical approaches, parametric models and nonparametric estimates, were developed and used to predict bacterial species richness in core MD05-2896 collected from the South China Sea during the Chinese-French joint MARCO POLO/IMAGES 147 cruise (chief operator Yvon Balut). MD05-2896 (08°49.50'N, 111°26.47'E) was an 11.03 m long core collected from the SCS south slope, where the water depth is 1 657 m. A total of twelve microbial subsamples were collected from the top to the bottom of the core at intervals of 1 m. For each sample, we extracted the bulk DNA and amplified the bacterial 16S rRNA gene sequences. All of the bacterial 16S rRNA gene sequences were used to construct a 16S rRNA gene library. A total of 194 unique phylotypes were identified based on the phylogenetic analysis, most of which clustered into 17 phyla that belong to Planctomycetes, Proteobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Spirochaetes, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Bacteroidetes, Deferribacteres, Nitrospirae, and candidate divisions OP1, OP3, OP8, OP11, JS1, WS3, and TM6. All sequences were grouped into Operational Taxonomic Units (OTUs) based on 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, and 80% similarity cut-off values. Sequences were aligned using the CLUSTALW software, after which the sequence similarity was calculated and the sequences were grouped into OTUs using the unweighted pair group method. These frequency data were then analyzed by parametric models and coverage-based nonparametric estimates, ACE and ACE-1, respectively. Because nonparametric estimates usually underestimate the species richness, this study focused on application of parametric models. Five models, including the inverse Gaussian, log normal, negative binomial, Pareto and 2-mixed exponential, were adopted to fit asymptotically with the OTU's frequency data and predict the species richness. The parametric models were implemented step by step according to the procedures

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (2007CB815904); 国家自然科学基金项目 (40510487, 41276125)

收稿日期: 2011-10-08; **修订日期:** 2012-11-18

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: pengwang@tongji.edu.cn

described by Hong et al. , and the best fitted model was selected for the final parametric analysis. At the level of 99% rRNA sequence similarity, our data were best described by the 2-mixed exponential distribution model, which estimates the richness at 326 ± 40 (SE). At the level of 97% rRNA sequence similarity, the negative binomial distribution model describes our data best with an estimated richness of 244 ± 10 (SE). At the level of 95% rRNA sequence similarity, the negative binomial distribution model best described the data and estimated the richness at 220 ± 6 (SE). At the level of 90% rRNA sequence similarity, the 2-mixed exponential distribution model best described the data and estimated the richness at 127 ± 4 (SE). At the level of 80% rRNA sequence similarity, the Pareto distribution model described the data best and estimated the richness at 62 ± 4 (SE). The 99%, 97%, 95%, 90%, and 80% rRNA gene sequence similarities were adopted to identify bacterial strain, species, genera, families/classes, and phyla, respectively. Accordingly, core MD05-2896 contains at a minimum of 326 ± 40 (SE) bacterial strains, 244 ± 10 (SE) bacterial species, 62 ± 4 (SE) bacterial phyla, 127 ± 4 (SE) bacterial families/classes, and 220 ± 6 (SE) bacterial genera. However, these numbers are conservative because of the limitations associated with laboratory experiments, such as coextracted interfering substances including humic and fulvic acids, and PCR bias.

Key Words: bacteria; species richness; the South China Sea; sediment

自然界中存在的微生物可能多达上百万种^[1],然而,它们中的大多数没有被观测到甚至没有被检出,这些微生物的存在只能根据预测来推断;不过,这种预测也仅仅是基于猜测,以目前的技术还无法完全检测出生物多样性(本文仅讨论微生物种数或丰度)全貌。基于非培养的 rRNA 技术是研究环境微生物多样性最有效的工具^[2],16S rRNA 克隆文库相比其他研究手段能更多地揭示群落多样性信息,基于 16S rRNA 克隆文库对微生物丰度的预测更能趋近于客观真实,在土壤、水体、潮间带等环境中的细菌丰度的估计得到了广泛应用^[3]。

从已发表的文献来看,常用于预测物种丰度的方法主要有两大类:参数模型法和非参数估计法。共有 5 种参数模型:逆高斯分布、对数正态分布、负二项式分布、双参数(形状+标尺)帕雷托分布、双指数分布等,Hong 等基于 Maple 软件开发出相应的计算程序^[3],供研究使用。基于丰度覆盖估计法(ACE)以及适用于高异质种群的 ACE-1 法是两种用得较多的非参数估计法,基于此算法,Chao 等开发 SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation) 软件^[4]免费下载使用。

为防止估计模型的选择不当对估计值可靠性的影响,本文综合使用了以上参数模型法和非参数估计法共 7 种方法对来自南海陆坡的一沉积物柱中的细菌丰度进行估算,并通过比较各种方法与观测数据的吻合程度,找到最佳估计。此外,由于单一样品 16S rRNA 基因文库规模较小,不能全面反映细菌的多样性,本文从该沉积物柱不同深度采集 12 个微生物样品来构建细菌 16S rRNA 基因文库。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2005 年 5 月 15 日—6 月 8 日 IMAGES147 航次获得的深海沉积物柱 MD05-2896,采样点位于南海陆坡区的南沙珊瑚礁台地西部边缘($08^{\circ}49.50'N$, $111^{\circ}26.47'E$,水深 1 657 m)。采用无扰动箱式采泥器采集沉积物柱,总长 11 m,从表层到底层以 1 m 等间距采样,共 12 个微生物样品,船上于 $-20^{\circ}C$ 下保存,运回实验室后储存于 $-80^{\circ}C$ 。

1.2 PCR 扩增、RFLP 分析与系统发育树的构建

12 个微生物样品各称取 5 g,采用 Zhou 抽提法^[5]分别提取总 DNA,使用细菌 16S rRNA 通用引物 Eubac 27F 和 Eubac 1492R 进行 PCR 扩增^[6]。PCR 扩增得到的片断经纯化后克隆到 pMD-18T (TaKaRa) 载体上,并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取阳性转化子,利用 PCR 扩增引物重新扩增插入片断。使用内切酶 *Msp* I (Fermentas) 切割,分析电泳带型,挑选不同带型克隆子测序,并统计不同带型的克隆子数,将序列提交

到 RDP II (ribosomal database project) 数据库,利用 CHECK-CHIMERA 检验,去除不合理序列。应用 BLASTN 程序 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 搜索相似性序列,采用 ClustalX (Version 1.8) 进行比对分析,通过 PAUP (Version 4.0b10)^[7] 构建系统发育树,使用 Neighbor-Joining 建树方法,选择 Jukes-Cantor 进化距离。细菌 16S rRNA 基因序列在 Genbank 核苷酸数据库中的接受号为 EU048662—EU048694 和 EU385666—EU385826。

1.3 参数模型的建立

利用 CLUSTALW 软件对沉积物柱 MD05-2896 细菌 16S rRNA 序列进行序列比对分析,计算序列相似性,以 99%、98%、97%、95%、90% 和 80% 的序列一致性作为分界标准,根据 OS clustering 程序的算法 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/OC/oc.html>),利用无加权组群方法对序列进行聚类分析,将群组定义为“分类单元”(OTU),计算每个分类单元中的出现次数,即分类单元中的 16S rRNA 序列数。将分类单元出现次数依次从小到大排列,统计出现次数相同的分类单元个数。以分类单元出现次数和对应的分类单元个数的频次作为进一步分析的基础数据。

参数模型通过对样品数据进行拟合,构建相应的物种丰度分布模型,预测群落中未观测到的物种数^[8]。首先区分统计意义上“丰富的”和“稀有的”分类单元。选取一个适当的右截点(τ),当分类单元出现次数 $>\tau$ 时,则为“丰富的”;当分类单元出现次数 $<\tau$ 时,则为“稀有的”。然后利用文献^[3]提供的 5 种参数模型方法进行估计。通过比较不同的估计方法,得出最合理的估计值。选取的标准有:(1)拟合优度(GOF)检验:自然拟合优度(naïve GOF)和渐进拟合优度;(2)能得到有生物学意义的标准差;(3)使用物种频率观测数据的最大限度值(即最大的右截点)。

无参数估计法采用“标记释放回捕法”(MRR)^[9],认为被再次观测到的物种(“回捕”)与仅观测到一次的物种能达到均衡,即在多样性高的群落中,物种被再次观测到的几率较小,数量丰富的物种仅能被观测到一次;相反在一个多样性很低的群落,数量丰富的物种被再次观测到的几率则较高。该类方法基于“丰富的”物种和“稀少的”物种的相对丰度,来建立估算公式,并利用标准差检验。本文利用 SPADE 软件^[4]中提供的 2 种方法对细菌丰度进行估计。

由于非参数模型估计一般会低估微生物多样性;因此,本文主要讨论参数模型对细菌丰度的估计。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因文库细菌多样性

以 97% 序列相似性作为代表型的分界标准,1 329 条细菌 16S rRNA 基因序列分别属于 190 个系统发育型,系统发育分析结果表明这些系统发育型主要来自 17 个已知的类群(“门”):浮霉状菌(Planctomycetes)、变形杆菌(Proteobacteria)、绿屈挠杆菌(Chloroflexi)、放线菌(Actinobacteria)、螺旋体(Spirochaetes)、疣微菌(Verrucomicrobia)、酸杆菌(Acidobacteria)、拟杆菌(Bacteroidetes)、铁还原杆菌(Deferribacteres)、硝化螺菌(Nitrospirae)以及 candidate division OP1、OP3、OP8、OP11、JS1、WS3、TM6。细菌 16S rRNA 基因克隆子数和代表型数在细菌“门”中的分布见表 1。

2.2 利用模型预测的结果

以 99%、98%、97%、95%、90%、80% 序列相似性作为分类单元的分界,利用无加权组群方法对 1 329 条细菌 16S rRNA 基因序列进行聚类分析,分别组群成 212、194、190、168、115、和 50 个分类单元。利用参数模型来估算分类单元丰度值,结果见表 2。

从结果来看(表 2),参数模型得到的预测值一般高于非参数估计法,应从参数模型中寻找最佳估计。Hong 等认为应优先考虑与观测数据拟合程度最好的模型,如果存在多个模型与观测数据的拟合程度都较好,则比较他们的标准差^[3],得到最优模型,本文也依此寻找最佳估计。从本研究数据来看,出现次数较少(<5 次),尤其出现次数为 1 次的分类单元个数最多,它们是群落的主体;模型拟合的结果是否与观测数据吻合,关键是出现次数小于 5 次的分类单元个数的预测值是否接近观测值。结果表明当分类单元分界为 99% 和

表 1 沉积物柱 MD05-2896 克隆子在细菌“门”中的分布

Table 1 Bacterial phyla detected among sequenced clones in sediment core MD05-2896

	门 Phyla	代表型个数 Number of phylotypes	克隆子个数 Number of clones
1	变形杆菌 (Proteobacteria)		
	Alpha	5	142
	Delta	22	200
	Gamma	1	13
2	浮霉菌 (Planctomycetes)	52	318
3	绿屈挠杆菌 (ChloroFlexi)	13	79
4	OP1	1	16
5	OP3	15	116
6	OP8	8	69
7	OP11	11	55
8	JS1	3	106
9	WS3	2	10
10	TM6	2	11
11	放线菌 (Actinobacteria)	3	36
12	螺旋体 (Spirochaetes)	4	40
13	疣微菌 (Verrucomicrobia)	5	33
14	酸杆菌 (Acidobacteria)	7	47
15	拟杆菌 (Bacteroidetes)	3	8
16	铁还原杆菌 (Deferribacteres)	2	18
17	硝化螺菌 (Nitrospirae)	2	11
18	未知门 (Unclear affiliation)	29	181
合计 Total		190	1509

以 97% 序列相似性作为代表型的分界

表 2 沉积物柱 MD05-2896 中细菌的丰度

Table 2 Bacterial richness of the core MD05-2896

分类单元 界线 Operational taxonomic units boundary	统计量 Statistic	样品丰度 的观测值 Sample's richness detected	样品丰度的估计值 Estimate of the total samples' richness						
			参数模型 Parametric model					无参数估计 Nonparametric estimators	
			逆高斯分布 Inverse Gaussian	对数正 态分布 Log Normal	负二项 式分布 Negative Binomial	双指数分布 2-mixed Exponential	帕雷托分布 Pareto	ACE	ACE-1
99%	分类单元 个数	212	244	246	300	326	283	255	267
	标准差 (SE)		9	10	88	40	10	12	17
	原始拟合优度		0.043	0.03	0.447	0.483	0.015	NP	NP
	渐进拟合优度		0.242	0.0214	0.637	0.867	0.177	NP	NP
	右截点 (τ)		18	18	21	36	9	18	18
98%	分类单元 个数	194	219	221	248	273	251	229	238
	标准差 (SE)		8	8	10	27	9	10	15
	原始拟合优度		0.074	0.058	0.023	0.271	0.039	NP	NP
	渐进拟合优度		0.364	0.345	0.125	0.942	0.311	NP	NP
	右截点 (τ)		18	18	12	30	10	18	18
97%	分类单元 个数	190	214	216	244	256	244	223	232
	标准差 (SE)		7	8	10	23	9	10	15
	原始拟合优度		0.107	0.086	0.009	0.486	0.017	NP	NP
	渐进拟合优度		0.174	0.165	0.092	0.987	0.239	NP	NP

续表

		样品丰度的估计值 Estimate of the total samples' richness							
分类单元 界线 Operational taxonomic units boundary	统计量 Statistic	样品丰度的 观测值 Sample's richness detected	参数模型 Parametric model					无参数估计 Nonparametric estimators	
			逆高斯分布 Inverse Gaussian	对数正 态分布 Log Normal	负二项 式分布 Negative Binomial	双指数分布 2-mixed Exponential	帕雷托分布 Pareto	ACE	ACE-1
95%	右截点 (τ)		18	18	11	25	10	18	18
	分类单元 个数	168	183	183	220	250	162	191	196
	标准差 (SE)		4	6	6	33	9	8	10
	原始拟合优度		0	0	0	0.005	0	NP	NP
	渐进拟合优度		0	0	0	0.806	0	NP	NP
90%	右截点 (τ)		5	6	8	46	6	10	10
	分类单元 个数	115	124	124	149	127	162	129	132
	标准差 (SE)		3	3	9	4	9	6	9
	原始拟合优度		0.001	0.001	0.001	0.006	0	NP	NP
	渐进拟合优度		0	0	0	0.003	0	NP	NP
80%	右截点 (τ)		5	5	7	6	6	10	10
	分类单元 个数	50	54	54	61	54	62	55	56
	标准差 (SE)		3	2	5	2	4	4	5
	原始拟合优度		0.104	0.103	0.009	0.112	0.548	NP	NP
	渐进拟合优度		NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP
	右截点 (τ)		5	5	8	5	7	10	10

表中的黑体数值代表最佳估计值。表中缩写 NA 代表不可用;NP 代表无法计算

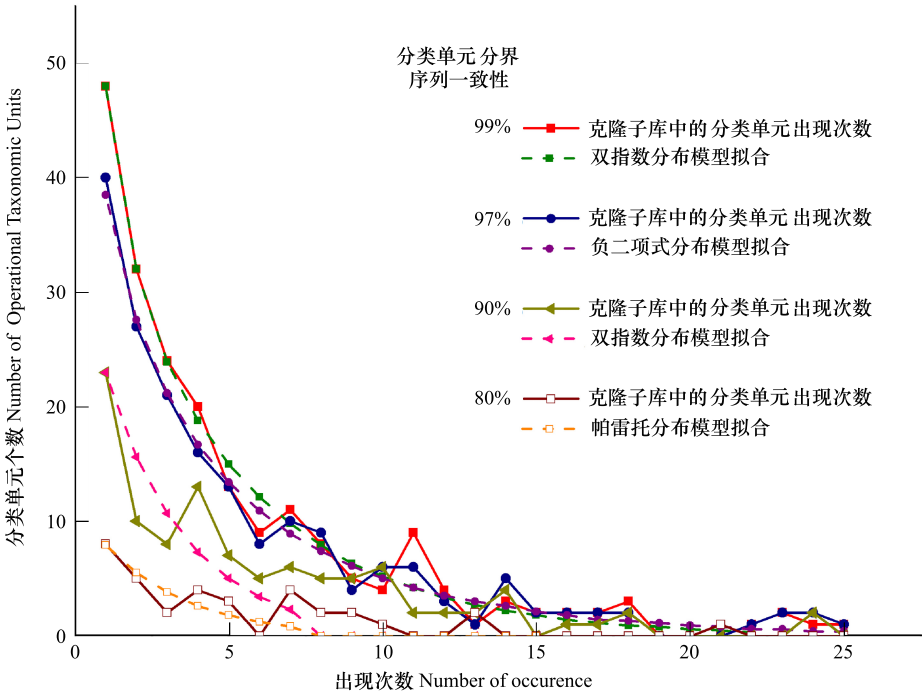


图 1 细菌克隆子库中的分类单元频率分布及参数模型拟合

Fig.1 Frequency distribution of OTUs in the bacterial library versus parametric model's fitted values

90% 序列一致性时,双指数分布为最佳估计模型,估计值分别为 326 ± 40 (SE) 和 127 ± 4 (SE);当分类单元分界为 98% 和 80% 序列一致性时,帕雷托分布为最佳估计模型,估计值分别为 251 ± 9 (SE) 和 62 ± 4 (SE);当分类单元分界为 97% 和 95% 序列一致性时,负二项式分布为最佳估计模型,估计值分别为 244 ± 10 (SE) 和 220 ± 6 (SE)。图 1 显示了以 99%、97%、90% 和 80% 序列一致性为分类单元分界标准,最优分布模型估计的分类单元出现次数及对应的分类单元个数与实际数据的拟合情况。从图上看,分类单元个数预测与实际值较吻合,尤其是出现次数较少的分类单元个数的预测与实际数据基本一致,选取的模型符合对细菌丰度的估计。

目前,利用 16S rRNA 基因序列对细菌“种”的划分还存在较大争议,1% 和 3% 的序列差异都被用于“种”的定义,较合理的办法是以 1% 序列差异作为菌株分类标准,以 3% 作为“种”的分类标准^[3],在此标准下,估计约 326 ± 40 (SE) 个菌株, 244 ± 10 (SE) 个种。

细菌的“属”、“科”/“纲”和“门”等分类单元很难通过 16S rRNA 基因序列的差异来准确划分,已有文献分别将 5%、10% 和 20% 的序列差异作为以上各分类单元的界限^[10-12]。依此推断沉积物柱 MD05-2896 中细菌群落大约包括 62 ± 4 (SE) 个“门”, 127 ± 4 (SE) 个“科”/“纲”和 220 ± 6 (SE) 个“属”。

3 讨论

3.1 细菌丰度估计的可靠性

从已发表的文献来看,来自不同环境的样品,对细菌丰度的估计值相差很大,如耕地或重金属污染的土壤中细菌丰度估计值为 300—1 500^[8, 13];而未开发土壤中的细菌丰度的估计值则高达 6 000—10 000^[14],甚至达到 500 000^[15]。16S rRNA 基因技术从环境样品中检出的细菌一般只有几十种,最多不过几百种,不同环境中细菌丰度是否有如此大的差别? Hong 等认为环境中细菌丰度不应有如此大的差别,这些估计值并不可靠,原因在于研究者选择了错误的模型^[3],但该观点并未获得证实。

为进一步探讨细菌丰度估计值的可靠性,本文与 Hong 等的研究结果进行了比较。本文与 Hong 等的基础数据都来自 16S rRNA 基因文库,并采用了完全相同的估计模型,但得到细菌“种”数的估计值却相差很大。造成差异的原因可能与样品本身或构建的文库质量等因素有关。

从估计的结果来看,本文对细菌“种”数的估计值与观测值相差不大,都为 10^2 量级,而且对采自西沙海槽的沉积物柱 MD05-2902 中的细菌丰度预测值为 179 ± 9 (SE),也只达到 10^2 量级;然而, Hong 等细菌物种数量的估计值约为观测值的 10 倍左右,为 10^3 量级^[3]。利用分布模型估计细菌丰度的原理是利用分类单元出现次数的频率分布对观测值拟合,得出各参数值,进而估计未检出分类单元个数。在频率分布曲线上表现为:曲线左端越陡,利用模型预测次数为 0 (未检出) 的分类单元个数则越多,预测值与观测值差别越大。Hong 样品的细菌克隆文库中绝大多数分类单元出现次数只有 1,即样品中绝大多数分类单元被再次观测到的几率小,出现次数为 1 的分类单元个数远大于出现次数为 2 (被再次观测) 的分类单元个数,频率分布曲线左端很陡,表明样品中存在大量未检测出的分类单元,估计值就远大于观测值。本文研究样品的细菌克隆文库有较多的分类单元出现次数大于 1,频率分布曲线左端相对较缓(图 1);利用分布曲线预测未检出的分类单元个数较少,即分类单元被再次观测到的几率很高,遗漏的分类单元数量则较少,因而估计值接近观测值。

3.2 细菌丰度估计的影响因素

影响细菌丰度估计值可靠性的因素主要有两个:首先是估计模型的选择,不同的估计模型得到的结果可能有较大的差异;其次是用于估计的基础数据,而这种基础数据是通过实验手段来获取的,数据质量主要取决于对实验技术的评价。

3.2.1 估计方法

目前,对参数模型和非参数估计法孰优孰劣存在较大的争议^[9],即便只使用参数模型,存在如何选择模型的困惑。

对参数模型而言,很难建立一个足够大的微生物多样性数据库来支持模型的使用和对各模型中的分布参数进行赋值。因为没有经验值,只能通过理论上推断最佳模型。但不同的学者对最佳模型的选取标准完全

不同。Curtis 等认为细菌群落具有高动态性,增长随意,群落分布符合对数正态分布^[14];不过 Jeon 指出当出现次数为 1 的分类单元占很高比例时,逆高斯分布模型对微生物丰度有较好的估计^[16];Hong 等认为并不存在一个普遍适用的模型^[3],只能通过综合利用各种模型来以增加估计的可靠性。

非参数估计法完全依赖于分类单元相对丰度的估计,在调查微生物多样性的过程中难免出现取样偏差;此外,非参数估计法提供的是一个更小范围分类单元多样性,即只从观察到的分类单元中获取信息,与参数模型不同,非参数估计法不能给出分类单元相对丰度的假想分布,容易忽略了那些“稀少的”分类单元,导致对微生物丰度的低估。

3.2.2 实验技术

就实验本身而言,任何实验都无法检测自然界中的全部微生物。基于 16S rRNA 基因的 PCR-RFLP 方法也不例外,同样会造成对生物多样性的低估,该技术影响微生物多样性低估的主要因素是克隆文库的规模和实验偏差。

(1) 克隆文库的规模

克隆文库并非越大越好,因为哪怕构建最大的克隆文库,也不能穷尽所有的微生物。不过,如果克隆文库选取过小,则会丧失部分物种多样性信息。文库要达到何种规模,才能满足完全反映多样性的要求? 稀疏分析^[13]以及克隆文库的覆盖度 C 值^[17]能提供判断依据。使用 Analytic Rarefaction 软件对本文研究的 12 个样品分别绘制 16S rRNA 基因克隆文库稀疏曲线(图 2),从图上可以看出,所有稀疏曲线在克隆子数达到 100 后趋于平缓,部分达到平台期。从表层往下,C 值分别为 89%、90%、93%、92%、79%、92%、87%、79%、85%、97%、77% 和 83%,这些样品的克隆文库的 C 值多数在 90% 左右或大于 90% 以上。综合稀疏分析和覆盖度计算结果,细菌 16S rRNA 基因克隆文库能大致反映微生物多样性。

(2) 实验偏差

实验过程中的偏差主要表现在总 DNA 的损耗、PCR 扩增效率以及 PCR 偏嗜性。

环境样品总 DNA 的提取,无论是物理裂解,化学裂解,还是生物裂解,在提取过程中都会引起 DNA 的损耗。如物理裂解造成片断 DNA 的物理剪切;化学裂解法不能完全去除腐殖酸、色素和重金属等杂质;抽提后残余的苯酚等会影响 PCR 的扩增效率^[18]。

PCR 的偏嗜性主要表现在:(1)PCR 扩增过程中,模板浓度过低会引起模板的随机扩增^[18],高 GC 含量的模板比低 GC 含量的模板扩增效率低^[19],低 GC 含量模板更易于扩增,结果扩增产物中低 GC 含量 DNA 偏多。(2)目前通用的 16S rRNA 基因引物扩增范围并不能完全覆盖所有目标类群^[18],尤其是针对深海环境中的微生物,据 Webster 等的估计,27F 和 1492R 引物分别覆盖自然界中全部细菌的 72.9% 和 16.3%^[18];不过,Webster 的观点可能过于保守,目前还很难找到替代的通用引物,更别说针对深海环境的通用引物。

虽然基于 16S rRNA 基因的 PCR-RFLP 方法会低估环境中微生物多样性,但却是目前最成熟的方法,对微生物丰度的预测也多基于由该方法所获取的多样性数据。随着技术的发展,16Sr DNA-DGGE(变性凝胶电泳)、宏基因组文库中的数据也将逐渐用于估计环境样品中微生物的丰度,对 PCR-RFLP 方法进行进一步的验证。

总之,本文对南海陆坡沉积物柱细菌丰度进行最优估计估计,以 97% 序列一致性作为“种”的划分标准,

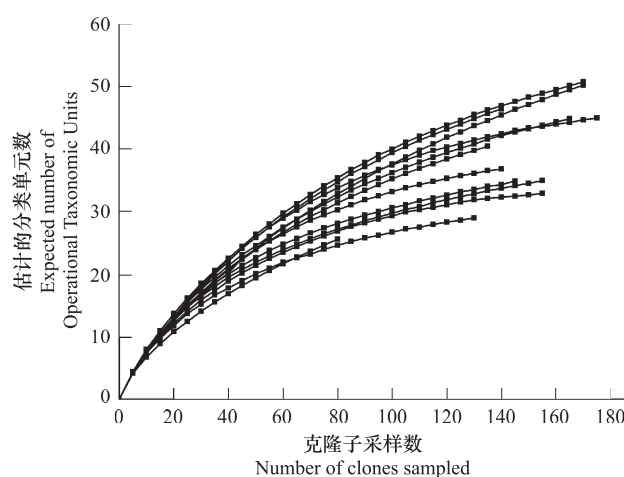


图 2 细菌 16S rRNA 基因克隆文库稀疏曲线

Fig. 2 Rarefaction curves of bacterial 16S rRNA gene library

从上到下依次为:8m,7m,4m,6m,2m,11m,3m,surface,1m,9m,10m 和 5m

负二项式分布模型最优,估计细菌的种数为 244 ± 10 (SE),鉴于 16S rRNA 基因的 PCR-RFLP 实验技术会低估细菌的多样性,该值可能偏低。

References:

- [1] Tiedje J M. Microbial diversity: of value to whom? ASM News, 1994, 60: 524-525.
- [2] Olsen G J, Lane D J, Giovannoni S J, Pace N R, Stahl D A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annual Review of Microbiology, 1986, 40(1): 337-365.
- [3] Hong S H, Bunge J, Jeon S O, Epstein S S. Predicting microbial species richness. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(1): 117-122.
- [4] Chao A, Shen T J. Program SPADE (Species Prediction and Diversity Estimation). Program and user's guide Available from: <http://chao.stat.nthu.edu.tw>.
- [5] Zhou J Z, Davery E, Figure J B, Rivkina E, Gilichinsky D, Tiedje J M. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA. Microbiology, 1997, 143(12): 3913-3919.
- [6] DeLong E F. Archaea in coastal marine environments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(12): 5685-5689.
- [7] Swofford D L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. 0. Sinauer Associates; Sunderland, Massachusetts, 1999.
- [8] Hughes J B, Hellmann J J, Ricketts T H, Bohannon B J M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4399-4406.
- [9] Bohannon B J M, Hughes J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(3): 282-287.
- [10] Schloss P D, Handelsman J. Status of the microbial census. Microbiology and Molecular biology Reviews, 2004, 68(4): 686-691.
- [11] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. Journal of Bacteriology, 1998, 180(18): 4765-4774.
- [12] Sait M, Hugenholtz P, Janssen P H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. Environmental Microbiology, 2002, 4(11): 654-666.
- [13] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177.
- [14] Curtis T P, Sloan W T, Scannell J W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(16): 10494-10499.
- [15] Dykhuizen D E. Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria? Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 25-33.
- [16] Jeon S O, Bunge J, Stoeck T, Barger K J A, Hong S H, Epstein S S. Synthetic statistical approach reveals a high degree of richness of microbial eukaryotes in an anoxic water column. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(10): 6578-6583.
- [17] Lee S M, Chao A. Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models. Biometrics, 1994, 50(1): 88-97.
- [18] Webster G, Newberry C J, Fry J C, Weightman A J. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55(1): 155-164.
- [19] Wintzingerode F V, Göbel U B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 21(3): 213-229.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol.33 ,No.1 January ,2013(Semimonthly)

CONTENTS

Frontiers and Comprehensive Review

- Integrating ecological civilization into social-economic development WANG Rusong (1)
- The effect of land cover pattern on hillslope soil and water loss in the arid and semi-arid region: a review
..... GAO Guangyao, FU Bojie, LÜ Yihe, et al (12)
- The status and trend on the urban tree canopy research JIA Baoquan, WANG Cheng, QIU Erfa, et al (23)
- Bioindicators and Biomonitoring in Environmental Quality Assessment
..... Bernd Markert, WANG Mei'e, Simone Wünschmann, et al (33)
- Electron transfer capacities of dissolved organic matter and its ecological effects ... BI Ran, ZHOU Shungui, YUAN Tian, et al (45)

Autecology & Fundamentals

- Antioxidative responses of *Abies fabri* seedlings to litter addition and temperature elevation
..... YANG Yang, YANG Yan, WANG Genxu, et al (53)
- Effects of seed soaking with different concentrations of 5-aminolevulinic acid on the germination of tomato (*Solanum lycopersicum*)
seeds under NaCl stress ZHAO Yanyan, HU Xiaohui, ZOU Zhirong, et al (62)
- Influence of magnesium deficiency on chlorophyll fluorescence characteristic in leaves of Newhall navel orange
..... LING Lili, PENG Liangzhi, WANG Nanqi, et al (71)
- Leaf traits of 66 herbaceous species in Songnen grassland in Northeast China
..... SONG Yantao, ZHOU Daowei, WANG Ping, et al (79)
- Effects of nectar secondary compounds on pollination of co-flowering species in a natural community
..... ZHAO Guangyin, LI Jianjun, GAO Jie (89)
- The continuous life-table of *Leptocybe invasa* ZHU Fangli, QIU Baoli, REN Shunxiang (97)

Population, Community and Ecosystem

- Dominant climatic factors of *Quercus mongolica* geographical distribution and their thresholds
..... YIN Xiaojie, ZHOU Guangsheng, SUI Xinghua, et al (103)
- Fruit diet, Selectivity and Seed dispersal of Hatinh langur (*Trachypithecus francoisi hatinhensis*)
..... Nguyen Haiha, BAI Bing, LI Ning, et al (110)
- The distribution of living coccolithophore in East China Sea in autumn, 2010 JIN Shaofei, SUN Jun, LIU Zhiliang (120)
- The association of OPRK1 gene SNP with sika deer (*Cervus nippon*) diurnal behavior traits
..... LÜ Shenjin, YANG Yan, WEI Wanhong (132)
- Preliminary study on bird composition and diversity in Poyang Lake watershed during non-breeding period
..... SHAO Mingqin, ZENG Binbin, XU Xianzhu, et al (140)
- Coexistence mechanism of two species passerines in man-made nest boxes LI Le, ZHANG Lei, YIN Jiangxia, et al (150)
- Dynamics on soil faunal community during the decomposition of mixed eucalypt and alder litters
..... LI Yanhong, YANG Wanqin, LUO Chengde, et al (159)
- RS/GIS-based integrated evaluation of the ecosystem services of the Three Gorges Reservoir area (Chongqing section)
..... LI Yuechen, LIU Chunxia, MIN Jie, et al (168)

Landscape, Regional and Global Ecology

- The distribution of soil organic carbon as affected by landforms in a small watershed of gully region of the Loess Plateau
..... LI Linhai, GAO Erhu, MENG Meng, et al (179)
- Effects of coastal geographical characteristics on the abundance of submerged aquatic vegetation
..... WU Mingli, LI Xuyong, CHEN Nianlai (188)
- Analysis of soil physical properties under different vegetation types in the alluvial fan area of Manas River watershed
..... CAO Guodong, CHEN Jiehua, XIA Jun, et al (195)

Resource and Industrial Ecology

- Effects of farming on wetland soil seed banks in the Sanjing Plain and wetland restoration potential
..... WANG Guodong, Beth A Middleton, LÜ Xianguo, et al (205)

Effects of the microhabitats on the seedling emergence during the flooding disturbance	AN Hongyan, XU Hailiang, YE Mao, et al (214)
Analysis on the limiting factors to further improve yield of summer maize in Heilonggang River Valley	XU Lina, TAO Hongbin, HUANG Shoubing, et al (222)
Fungal diversity in rhizosphere soil of medicinal plants in Heilongjiang Province	MU Dongyan, LÜ Guozhong, SUN Xiaodong, et al (229)
Integrated assessment of mariculture ecosystem health in Sanggou Bay	FU Mingzhu, PU Xinming, WANG Zongling, et al (238)
Urban, Rural and Social Ecology	
The integrative assessment on ecological quality status of Luoyuan Bay based on ‘OOAO principle’	WU Haiyan, WU Yaojian, CHEN Keliang, et al (249)
Trophic state of seawater and ecological characteristics of phytoplankton in Sishili Bay	LI Bin, BAI Yanyan, XING Hongyan, et al (260)
Ecological footprint depth and size: new indicators for a 3D model	FANG Kai (267)
Landscape dynamics of medium- and small-sized cities in eastern and western China: a comparative study of pattern and driving forces	QI Yang, WU Jianguo, LI Jianlong, et al (275)
Research Notes	
Prediction of bacterial species richness in the South China Sea slope sediments	LI Tao, WANG Peng (286)
Spatial pattern of seedling regeneration of <i>Ulmus pumila</i> woodland in the Otindag Sandland	LIU Zhen, DONG Zhi, LI Hongli, et al (294)
Impacts on seed germination features of <i>Eupatorium adenophorum</i> from variable light stimulation and traditional dormancy-broken methods	JIANG Yong, LI Yanhong, WANG Wenjie, et al (302)
Opinions	
Discus for classification of plant association	XING Shaohua, YU Mengfan, YANG Lijuan, et al (310)

《生态学报》2013 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的生态学专业性高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,300 页,国内定价 90 元/册,全年定价 2160 元。

国内邮发代号:82-7,国外邮发代号:M670

标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报

(SHENGTAI XUEBAO)

(半月刊 1981 年 3 月创刊)

第 33 卷 第 1 期 (2013 年 1 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 33 No. 1 (January, 2013)

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	王如松	Editor-in-chief	WANG Rusong
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 90.00 元