

不同营养化湖/库沉积物中细菌群落差异分析

屈建航^{1,2} 曹书娟¹ 袁红莉^{1*}

(1. 中国农业大学 生物学院,北京 100193; 2. 河南工业大学 生物工程学院,郑州 450001)

摘要 以富营养化官厅水库(北京)和天然 Rupa 湖(尼泊尔)沉积物为对象,使用 16Sr DNA 克隆文库的分子生态学方法,鉴定并比较了其中的细菌群落结构。分析表明:二者 pH 及各形态磷含量参数差异显著。在细菌组成上,二者的主要种群均为变形杆菌门,且均以 β -变形杆菌纲为主(比例高于 50%),但 Rupa 湖沉积物中以 α -变形杆菌纲次多,而官厅水库沉积物以 γ -变形杆菌纲次多,2 个样品中 δ -变形杆菌的含量均相对较少。其他种群组成上,官厅水库沉积物中绿弯菌纲(9.21%)含量高于 Rupa 湖(1%),并特有芽单胞菌纲(12.2%)、放线菌纲(1.3%)和芽孢杆菌纲(0.8%)。而 Rupa 湖沉积物中特有的种群为螺旋菌纲(2%)、绿菌纲(1%)、梭菌纲(1%)和疣微菌纲(0.3%)。官厅水库和 Rupa 湖沉积物均含有少量的酸杆菌纲细菌。

关键词 水资源; 细菌群落; 沉积物; 富营养化

中图分类号 Q 938.2

文章编号 1007-4333(2011)01-0049-05

文献标志码 A

Bacterial community structure of sediment from different trophic lake/reservoir

QU Jian-hang^{1,2}, CAO Shu-juan¹, YUAN Hong-li^{1*}

(1. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract Bacterial communities of sediments from Guanting Reservoir (Beijing) and Rupa Lake (Nepal) were studied using method of 16S rDNA clone library. In the sediments, pH and concentration of total phosphorus and phosphorus fractions were obviously different. Bacterial communities of the two samples were both dominant by phylum of Proteobacterium, in which the percentage of β -proteobacterium was highest ($>50\%$). The second dominant bacteria cluster of sediment from Rupa Lake is α -Proteobacterium, other than γ -Proteobacterium in that from Guanting Reservoir. δ -Proteobacterium in both samples was much less. In sediment from Guanting Reservoir, percentage of Chloroflexi (9.21%) was much higher than that of Rupa Lake (1%), and Gemmatimonadetes (12.2%), Acidobacteria (1.3%) and Bacilli (0.8%) were peculiar. Sediment of Rupa Lake is peculiar of Spirochaetes (2%), Chlorobi (1%), Clostridia (1%) and Verrucomicrobiae (0.3%). There were less Actinobacteridae in sediment of Guanting Reservoir and Rupa Lake.

Key words water resource; bacterial community; sediment; eutrophication

水体富营养化严重威胁我国乃至全球的水体资源。目前我国水体富营养化严重,2007 年中国环境公报显示,28 个国控重点湖(库)中,水质为 V 类及劣 V 类的,分别高达 17.9% 和 39.9%。监测的 26 个湖

(库)中,重度富营养化的 2 个,占 7.7%;中度富营养的 3 个,占 11.5%;轻度富营养的 9 个,占 34.6%^[1]。

富营养化具有缓慢、难以逆转的特点,成为当今世界面临的最主要的水污染问题之一^[2],越来越引

收稿日期: 2010-04-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070105); 江苏省太湖水污染治理科技专项项目(BK2007741); 国家青年基金项目(31000065)

第一作者: 屈建航,讲师,博士,主要从事环境微生物、微生物工程学研究。Email: qjh_bata@163.com

通讯作者: 袁红莉,教授,主要从事环境微生物学研究, E-mail: hlyuan@cau.edu.cn

起研究者的关注。目前公认的富营养化是由于适宜温度、缓流的水流状态、总磷和总氮等营养盐重组,导致的浮游藻类大量繁殖。不同水域会发生不同程度的富营养化,但其主要影响因素是一致的^[3]。温度是大气气候的自然结果,而水流状况受天然地理环境制约,所以控制富营养化主要体现在对营养盐的控制上,并多以磷(P)为限制性因素。一般来说,总磷浓度达到 0.03 mg/L,水体即处于富营养化状态^[4]。

沉积物是水体系统的污染物汇和源^[5],其中的 P 含量往往超出上覆水许多倍,因而在水体系统外源 P 污染得以控制的情况下,沉积物中内源 P 的释放构成了难以消退的水体富营养化的潜在内因。所以,水-沉积物间、尤其在水-沉积物界面上 P 的物质循环,成了研究热点和关键之一。

微生物是自然界物质循环的主要推动力,水体污染程度、P 的物质循环与微生物群落间相互影响。研究不同营养化程度水体的界面沉积物中微生物群落结构的差异,有助于为揭示富营养化的生物作用机制提供依据。当前的界面沉积物中微生物群落的研究,有单独对寡营养或富营养水体的,也有针对同一湖区不同营养化位点的^[6]。本研究以富营养的官厅水库(北京)和天然湖泊 Rupa 湖(尼泊尔)界面沉积物为对象,在研究其 P 物质形态的组成基础上,通过分子生态学方法鉴定其细菌群落结构,并进行比较分析,以期水-沉积物界面上微生物群落与 P 的相互关系研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 沉积物样品

官厅水库沉积物样品取自永定河入口处(N40°21.445',E115°31.563'),采用重力冷冻钻孔技术采集 10 cm 直径的柱状沉积物样品,冰箱运至实验室并保存于-20℃,切割表层沉积物使用。采用同样的方法,采集 Rupa 湖(N27°47.241',E 83°32.442')表层沉积物样品,该湖地处尼泊尔热带雨林地区,受人为因素干涉较少,为纯天然无污染带。

1.2 沉积物理化性质测定

pH 测定:将沉积物样品混匀并冷冻干燥后,以 $m(\text{沉积物}) : V(\text{dH}_2\text{O})$ 为 1 : 2.5 的比例悬浮于 dH_2O 中,使用上海雷磁 pH 计对上清液进行 pH 测定。

沉积物中各形态磷:使用顾益初等提出的石灰性土壤无机磷分级方法^[7],将沉积物中无机磷的形态分为 $\text{Ca}_2\text{-P}$ 、 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 、 Al-P 、 Fe-P ,对沉积物样品连

续提取,以钼锑抗分光光度法对上清液进行测定。总磷使用高氯酸-硫酸消化法测定^[8]。有机磷通过灼烧法测定^[9]。

1.3 沉积物样品 16S rDNA 克隆文库的构建

采用化学裂解法^[10]直接提取沉积物样品的总 DNA,使用试剂盒纯化后,用以作为 PCR 的模板。以细菌 16S rDNA 通用引物 P1(5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3')和 P2(5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'),PCR 扩增样品的 16S rDNA,以 reconditioning PCR^[11]减少偏差。试剂盒纯化后,将 16S rDNA 片段连接于 pGEM-T easy vector(Promage 公司),热激转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂布 LB/Amp/X-Gal/IPTG 平板,挑取白色克隆,T7/SP6 引物扩增插入片段,对阳性克隆进行甘油保存。

1.4 酶切分型及文库评估

对扩增获得的阳性片段,分别使用 *Hinf* I (TaKaRa 公司)和 *Csp*6 I (Fermentas)2 种限制性内切酶进行酶切分型鉴定,酶切产物进行 25 g/L 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色拍照后,使用 Gelcompar II 软件对电泳图谱进行聚类分析^[12]。2 种酶切带型均一致的,认为是一个 16S rDNA 基因型。用覆盖值(Coverage value)^[13]评估所建基因文库对样品中生物多样性的体现,以沙龙指数(Shannon-Wiener 指数)评价样品中微生物的多样性^[14]。

1.5 克隆文库的测序及统计

对克隆文库中的每个 16S rDNA 基因型所对应的酶切电泳条带,单独进行 Gelcompar 软件聚类分析,聚类图谱以 70% 相似性进行分群,每一群内挑选代表克隆进行 16S rDNA 插入片段的核苷酸序列测定,并测定文库中含克隆子较多的优势基因型。进行 GenBank BLAST 序列比对。

下载相关序列,使用 MEGA 3.1 软件^[15]进行系统发育树构建,以确定其系统发育分类地位。统计每群中所含有的克隆数量,计算其所占文库中全部克隆的比例,进而对样品中各种类群微生物所占的比例进行统计。

2 结果与分析

2.1 沉积物 P 含量

分别对官厅水库和 Rupa 湖沉积物进行 P 含量及 pH 测定,结果显示(表 1):严重富营养化的官厅水库沉积物 pH 8.00,偏碱性,而 Rupa 湖沉积物为

表 1 官厅水库与 Rupa 湖沉积物样品的 pH 和磷含量特征

Table 1 pH and phosphorus content of sediment from Guanting Reservoir and Rupa Lake

mg/kg

沉积物来源	pH	总磷	Ca ₂ -P	Ca ₈ -P	Al-P	Fe-P	Org-P
官厅水库	8.00	992.74	30.10	35.09	29.28	109.33	63.52
Rupa 湖	6.80	485.24	33.70	4.37	0	291.27	253.12

中性偏酸环境, pH 6.80, 差异显著, 显示 2 种环境条件下的沉积物理化性质上存在较大差异。

对沉积物中总磷及各形态磷含量的测定结果表明, 官厅水库沉积物中总磷含量高达 992.74 mg/kg, 而 Rupa 湖沉积物中的总磷含量只有 485.24 mg/kg, 比官厅水库沉积物几乎低了一半。官厅水库沉积物的 Ca₈-P 和 Al-P 含量高于 Rupa 湖, 而

Fe-P、Org-P 含量远低于 Rupa 湖。高总磷含量使得官厅水库沉积物构成了更丰富的潜在 P 源。

2.2 文库构建结果

对官厅水库和 Rupa 湖沉积物样品的 16S rDNA 克隆文库构建及库容统计, 结果表明(表 2): 分别对 300 个克隆进行分析, 各自筛选出 238 及 272 个阳性克隆, 16S rDNA 酶切分型结果分别为

表 2 官厅水库与 Rupa 湖沉积物样品 16S rDNA 克隆文库构建结果

Table 2 Characteristics of the 16S rDNA clone libraries from Guanting Reservoir and Rupa Lake

沉积物来源	所检测克隆	阳性克隆	16S rDNA 基因型数目	Coverage 值/%	沙龙指数
官厅水库	300	238	64	87.8	3.581
Rupa 湖	300	272	39	94.0	2.793

64 及 39 个基因型。2 个文库的覆盖值分别在 87.8% 和 94.0%, 表明所构建的文库库容, 能够用以体现实际样品中的细菌多样性。

如表 1 所示, 官厅水库沉积物中的细菌物种丰度高于 Rupa 湖沉积物。沙龙指数能够综合细菌丰度和细菌均度 2 个指标而体现微生物种群的多样

性, 结果表明: 官厅水库沉积物中细菌群落多样性高于 Rupa 湖。

2.3 沉积物样品中细菌种群组成及其差异

对 2 个样品的 16S rDNA 文库中的优势基因型进行测序和比对分析, 结果显示: 二者的优势细菌种群上存在一定差异(表 3)。

表 3 官厅水库与 Rupa 湖沉积物样品中优势菌种差异

Table 3 Differences of the dominant bacterial species of the sediment samples from Guanting Reservoir and Rupa Lake

优势顺序	官厅水库				Rupa 湖			
	基因频率 * / %	GenBank 中最接近物种	同源性 / %	所属纲	基因频率 / %	GenBank 中最接近物种	同源性 / %	所属纲
1	11.34	Uncultured beta Proteobacterium (AM849465)	98	Beta-proteobacteria (β-变形杆菌)	22.79	Uncultured Chloroflexi bacterium clone (AF529110)	86	Chloroflexi (绿弯菌)
2	8.82	Uncultured Thiobacillus sp. (AM167943)	95	Beta-proteobacteria (β-变形杆菌)	14.71	Janthinobacterium sp. (AY753304)	99	Beta-proteobacteria (β-变形杆菌)
3	7.56	Thiobacillus denitrificans (CP000116)	97	Beta-proteobacteria (β-变形杆菌)	12.13	Sphingomonas Aromaticivorans (AB025012)	96	Alpha-proteobacteria (α-变形杆菌)
4	6.30	Uncultured bacterium clone (EF590039)	96	Gemmatimonadetes (芽单胞菌)	6.99	Acinetobacter sp. (AM412158)	99	Gamma-proteobacteria (γ-变形杆菌)

续表

优势 顺序	官厅水库				Rupa 湖			
	基因频 率* /%	GenBank 中 最接近物种	同源性/ %	所属纲	基因频 率/ %	GenBank 中 最接近物种	同源性/ %	所属纲
5	5.46	Uncultured Thiotrichaceae Bacterium clone (EU266783)	98	Gamma- proteobacteria (γ -变形杆菌)	5.51	<i>Sphingomonas</i> <i>Yanoikuyae</i> (U37525)	99	Alpha- proteobacteria (α -变形杆菌)

注: * 基因频率指对应基因型的克隆数占文库中用于 ARDRA 分析的阳性克隆总数的比例。

如表 3 所示,官厅水库和 Rupa 湖沉积物中的优势细菌类型均为变形杆菌纲,但官厅水库更以 β -变形杆菌纲为主,并含有部分 γ -变形杆菌纲。芽单胞菌纲细菌在官厅水库沉积物中含量也比较丰富。而 Rupa 湖中最优势的细菌为绿弯菌纲细菌,变形杆菌纲细菌除含有 β 和 γ -变形杆菌纲细菌以外, α -变形杆菌纲细菌也处于优势地位。

依据测序、系统发育树分析及克隆统计结果,官厅水库沉积物中整体微生物类群上含有 9 个纲,即 Alphaproteobacteria (α -变形杆菌纲)、Betaproteobacteria (β -变形杆菌纲)、Gammaproteobacteria (γ -变形杆菌纲)、Deltaproteobacteria(δ -变形杆菌纲)、Bacilli(芽孢杆菌纲)、Chloroflexi(绿弯菌纲)、Acidobacteria(放线菌纲)、Actinobacteridae(酸杆菌纲)和 Gemmatimonadetes(芽单胞菌纲)。而 Rupa 湖沉积物中含有 10 个细菌纲,即 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria、Deltaproteobacteria、Spirochaetes(螺旋菌纲)、Clostridia(梭菌纲)、Chloroflexi、Chlorobi(绿菌纲)、Actinobacteridae 和 Verrucomicrobiae(疣微菌纲)。2 个样品中均含有少量未能确定类群的基因型克隆。各类群的比例及其差异见图 1。

如图 1 所示,2 个沉积物样品中均以变形杆菌纲含量最高,其中以 Betaproteobacteria 居多,比例均高于 50%。但 Rupa 湖沉积物中以 Alphaproteobacteria 次多(19%),远远高于官厅水库沉积物(1.26%)。而官厅水库沉积物以 Gammaproteobacteria 次多,2 个样品中 Deltaproteobacteria 的含量均相对较少。而其他种群组成中,官厅水库沉积物中 Chloroflexi(9.21%)含量高于 Rupa 湖(1%),并特有 Gemmatimonadetes(12.2%)、Acidobacteria

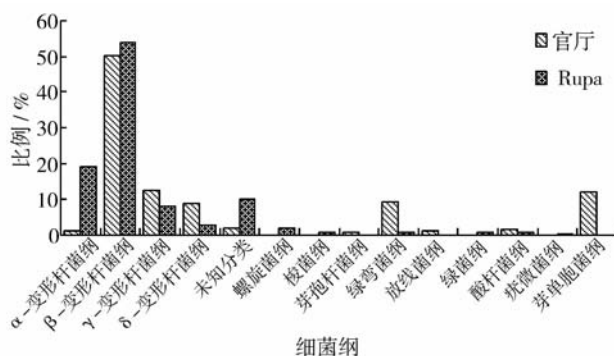


图 1 官厅水库和 Rupa 湖沉积物中细菌类群差异
Fig. 1 Differences of bacterial class in sediment from Guanting Reservoir and Rupa Lake

(1.3%)和 Bacilli(0.8%)。而 Rupa 湖沉积物中特有的种群为 Spirochaetes(2%)、Chlorobi(1%)、Clostridia(1%)和 Verrucomicrobiae(0.3%)。官厅水库和 Rupa 湖沉积物均含有少量的 Actinobacteridae 细菌。结果表明:富营养化的官厅水库和寡营养的尼泊尔 Rupa 湖沉积物中,细菌群落结构及组成上存在一定的一致性,但也具有明显的差异。表明水体污染程度、P 理化条件的差异影响着微生物种群组成。

3 讨论

微生物分子生态学为环境样品的微生物群落结构研究提供了不依赖于纯培养的有效途径。本研究使用 16S rDNA 克隆文库方法比较了富营养化与天然无污染水体界面沉积物中细菌群落结构差异。官厅水库^[16]是北京市大型水库之一,因水质污染严重,于 1997 被迫退出了北京市的饮水供水系统。本研究选取尼泊尔 Rupa 湖的天然水体系统作为对照。

富营养化的官厅水库沉积物中总磷含量是 Rupa 湖的近 2 倍,且处于略碱性环境条件。而天然

Rupa 湖沉积物中的总磷含量较低,且无机磷形态中以较稳定的 Fe-P 形态存在,表明其沉积物中内源磷含量及转化不及富营养化的官厅水库。细菌多样性结果表明:官厅水库沉积物中的细菌多样性高于 Rupa 湖,且二者在优势细菌类型及全部细菌种属组成上均存在较大差异。关于磷的分布情况与细菌多样性、群落结构之间的相互关系有待进一步研究。

官厅水库和 Rupa 湖沉积物中的细菌群落组成,均以变形杆菌门为主要细菌类群,这一结论与其他多数沉积物中细菌群落研究的相关报道一致^[17],表明这一类群在沉积物环境中存在的普遍性。其中 β -变形杆菌纲在官厅水库和 Rupa 湖沉积物中含量均高于其他变形杆菌纲,该类群包括很多种类好氧或兼性细菌,但也有些无机化能种类和光合种类,多数种类可在环境样品中发现,如废水或土壤中。 α -变形杆菌除了包括光合种类外,还有代谢氯化物种类,与植物共生的细菌(如根瘤菌)、与动物共生的细菌和致病菌立克次体目。官厅水库沉积物中所含有的 α -变形杆菌远远高于 Rupa 湖沉积物,可能其环境中更多的光照或动植物残体。官厅水库沉积物中绿弯菌纲含量高于 Rupa 湖沉积物,而绿弯菌纲属于绿弯菌门的一大类细菌,通过光合作用产生能量,但与其他光合细菌门具有不同的起源,兼性厌氧,光合作用下不产生氧气,不能固氮,类似于革兰氏阴性菌。与 Rupa 湖比较,官厅水库沉积物中特有芽单胞菌纲、放线菌纲和芽孢杆菌纲细菌。芽单胞菌门是一类革兰氏阴性细菌,基于 5 个来自于深海沉积物、土壤和生物除磷活性污泥的克隆的 16S rDNA 序列而得以划分^[18]。而放线菌主要能促使土壤中的动物和植物遗骸腐烂,芽孢杆菌纲细菌属于厚壁菌门,该菌门的大部分细菌能够抵抗极端环境。官厅水库沉积物中这几种特有的细菌类群,侧面显示其环境中高磷及高腐殖质含量。Rupa 湖沉积物中特有少量螺旋菌纲、梭菌纲、绿菌纲和疣微菌纲细菌。螺旋体形态特殊,多数营厌氧自由生活,而梭菌纲和芽孢杆菌纲同属于厚壁菌门;绿菌门细菌通常不活动(一个种具有鞭毛),其生存要求无氧环境和光;疣微菌门除被发现于土壤中之外,也存在于水生环境或者人类粪便中。富营养化官厅水库和天然 Rupa 湖沉积物中的细菌种群组成方面,有一定的相似性,但各自具有独特的细菌纲,表明水体系统营养化状况的不同,沉积物中磷含量、细菌群落结构上可能有所反映。

参 考 文 献

- [1] 环境保护部. 中国环境状况公报[R/BL]. 2007 (<http://www.mep.gov.cn/gzfw/xzxx>), 2009
- [2] 丰茂武, 吴云海. 国内外湖泊富营养化的防治对策与展望[J]. 广州环境科学, 2006, 21(4): 8-11
- [3] 尹真真. 国内外水体富营养化机理研究历史与进展[J]. 微量元素与健康研究, 2006, 23(3): 46-47
- [4] 汤卫华, 宋虎堂, 范志华. 水体富营养化的原因、危害及防治[J]. 天津职业院校联合学报, 2006, 2(8): 52-54, 72
- [5] 邓焕广, 陈振楼, 张兴正. 沉积物中磷的研究进展[J]. 广州环境科学, 2004, 19(1): 8-10
- [6] Wobus A, Bleul C, Maassen S. Microbial diversity and function characterization of sediments from reservoir of different trophic state[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 46: 331-347
- [7] 顾益初, 蒋柏潘. 石灰性土壤无机磷分级的测定方法[J]. 土壤, 1999, 2: 101-102, 110
- [8] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. 2 版, 北京: 中国环境科学出版社, 1990, 224-225
- [9] 南京农业大学主编. 土壤农化分析[M]. 2 版, 北京: 农业出版社, 1988, 82-83
- [10] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 316-322
- [11] Thompson J R, Marcelino L A, Polz M F. Heteroduplexes in mixed-template amplification: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR' [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30: 2083-2088
- [12] Vauterin L, Vauterin P. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms[J]. Eur Microbiol, 1992, 1: 37-41
- [13] Good I L. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. Biometrika, 1953, 40: 237-264
- [14] Molles M C. Ecology: concepts and applications (影印版)[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 306
- [15] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 4673-4680
- [16] 杜桂森, 王建行, 张为华, 等. 官厅水库水体营养化状况分析[J]. 湖泊科学, 2004, 16(3): 277-281
- [17] Bissett A, Bowman J, Burke C. Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 55: 48-56
- [18] Hugenholtz P, Tyson G W, Webb R I, et al. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure-culture representatives[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 411-419