

文章编号:1001-5132 (2010) 01-0007-06

太湖水华过程中微生物群落的动态变化

冯 胜¹, 李定龙¹, 秦伯强²

(1.江苏工业学院 环境与安全工程学院, 江苏 常州 213016;

2.中国科学院 南京地理与湖泊研究所, 江苏 南京 210008)

摘要: 通过对水华过程的原位观测, 运用分子生物学手段对太湖藻类水华过程中微生物的动态变化进行了跟踪测定, PCR-DGGE 分析结果显示, 水华过程中, 水体中细菌的种群结构发生了较大变化, 细菌的种类和数量都有明显改变; 荧光直接计数水华过程中细菌数量变化表明: 在 5~10 月份水华发生过程中, 水体中细菌总量呈逐渐上升趋势($R^2=0.836$); 运用 MPN 法, 对磷分解细菌分析表明, 水华发生前期水体中磷分解细菌的数量变化不明显, 而在水华后期数量有显著增加趋势。

关键词: 水华; PCR-DGGE; 细菌数量

中图分类号: X172

文献标识码: A

无论是海洋沿岸还是淡水水域, 由于陆源营养物质(N、P)的大量排放, 浮游植物大量爆发的现象已经非常普遍^[1]。藻类爆发极大地改变了生态系统的结构和功能^[2]。由于初级生产力的剧增而导致整个食物网结构的改变, 使得水生生态系统中 C、N、P 等物质的循环途径发生了转移, 进而影响了整个水环境状况^[3]。水体中异养细菌与水环境有着密切的联系, 它们在物质的生物地球化学循环和能量传输过程中的作用是无庸置疑的, 其数量及种群结构的变化与水体类型、有机物含量、微生物的拮抗作用等因素密切相关。目前在生态学和环境科学领域, 关于水体微生物尤其是水生生态系统中微生物的多样性及其在生态系统中作用的研究越来越受到重视; 而传统的平板分离培养方法在研究环境微生物多样性时存在较大的缺陷, 原因是环境中可分离出的微生物种类仅占环境微生物种

类总数的 1% 以下^[4], 这种分离培养方法不能很好地反映水体微生物多样性的原始状态^[5]。

分子生物学技术如 PCR-DGGE, 使得研究人员能够在分子水平上对环境微生物多样性进行研究^[6-7]。由于环境中微生物的 16 SrDNA 基因序列的可变区碱基顺序有很大的差异, 所以水体中不同微生物的 16 SrDNA 基因的 V₃ 区的扩增 DNA 片段在 DGGE 中能够分离。根据电泳条带的多寡及浓密程度可以初步辨别出样品中微生物种类和数量的多少, 粗略分析水体中微生物的多样性特征。

针对太湖梅梁湾藻类长期爆发的现象, 作者选择中国科学院太湖生态系统观测站栈桥为固定观察点, 采用 PCR-DGGE 技术对水体中细菌在水华过程中的变化进行了研究, 采用荧光直接计数法测定了水体细菌的生物量, 并运用传统分离培养的方法对解磷细菌数量进行了测定, 为水华发

收稿日期: 2009-06-16.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 中科院知识创新方向性项目(KZCX2-YW-419); 国家自然科学基金(40573062); 江苏工业学院基金(ZMF09020013)。

第一作者: 冯 胜(1975 -), 男, 河南南阳人, 博士, 主要研究方向: 环境微生物. E-mail: shfeng@jpu.edu.cn

生机制做了一些探索性的研究。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

在中科院太湖生态系统研究站栈桥上定点采样,气温较低水华产生不明显的春秋季节,每半月采样1次,夏季高温时约每10d采样1次。自2006年5月1日起,连续采样至2006年10月15日,每天上午9时定时采样,采集水深约0.5m。用表面荧光记数的水样注入经酸浸泡,清洗干净,预先灭菌的玻璃瓶中,加入无颗粒甲醛(甲醛浓度2%),带回实验室4℃保存。用于基因组DNA提取的水样,放入带有冰块的保温箱中运回实验室后-20℃保存至分析;其他水样用预先洗干净的塑料瓶采集,放入带有冰块的保温箱运回实验室后立即测定。

1.2 样品的分析

1.2.1 样品浓缩

在无菌条件下取500mL水样用定性滤纸(8μm,47mm,millipore)过滤,除去样品中的悬浮颗粒,收集滤液,滤液通过聚碳酸酯膜(0.22μm,47mm,millipore)真空抽滤,然后用无菌缓冲液冲洗2次。将滤膜取出剪成碎片装入1.5mL的离心管中-80℃保存。

1.2.2 样品总DNA的提取

将离心管在室温下解冻,在其中加入30μL新鲜的溶菌酶溶液,37℃温育1h(160r·min⁻¹)后,加入500μL SDS(10%)溶液和10μL蛋白酶K(20mg·mL⁻¹),接着温育2h。随后加入200μL的5mol·L⁻¹ NaCl上下颠倒混匀后加入预热到65℃的100μL CTAB溶液,并在65℃下温育50min。初提的DNA中加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)上下颠倒、混匀、离心(12000g,10min),取上清液加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)上下颠倒、混匀、离心(12000g,30min),取上清液加入0.6倍体积的异丙醇常温沉淀1h,离心(16000g,20min)后去上

清液,将DNA溶于30μL无菌水,加入1.5μL RNaseA(20mg·mL⁻¹)37℃消化20min。DNA提取液的测定,使用酶标仪(Tecan.com)对提取的DNA粗提液样品进行测定(OD₂₆₀/OD₂₈₀),计算所得样品DNA产量和纯度。

1.3 水样中细菌16SrDNA的PCR扩增

使用16SrDNA V₃区通用引物F341(5'CCTACG GGA GGC AGC AG 3')和R518(5'ATT ACC GCG GCT GCT GG 3')从水样基因组总DNA中扩增16SrDNA V₃区基因片段,PCR扩增体系和程序参考文献[8],于热循环仪上进行反应(PTC-200, MJ Research公司)。为使扩增产物能在DGGE上更好地分离,1个40bp的GC夹子(CGCCCCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCACGG GGG G)加在F341 5'端。PCR反应体系:10×PCR buffer(含25mmol·L⁻¹ MgCl₂)5μL,引物F341GC和R518各15pmol,dNTPs 2.5pmol,约25ng的基因组DNA,Taq酶5μL,milli-Q水至50μL。用降落PCR方法,反应参数:94℃预变性4min;94℃变性1min,65℃退火1min,然后以每一循环降低1℃进行10个循环,72℃延伸1min,最后以55℃退火进行23个循环;72℃延伸10min。

1.4 V₃区扩增片段变性梯度凝胶电泳(DGGE)

基因组总DNA 16SrDNA V₃区扩增片段通过变性梯度凝胶电泳(DGG1102,C. B. S SCIENTIFIC.com)分离来研究微生物群落多样性。聚丙烯酰胺的变性梯度范围为35%~55%,DNA扩增产物上样量约为200ng,150V,1×TAE缓冲液中电泳600min。电泳完毕后用SYBR green I(1×TAE,1:10000)染色30min,通过UVI成像系统成像。

1.5 其他理化参数的测定

水温用温度计测定;总氮、总磷用紫外分光光度计测定,叶绿素用90%丙酮萃取荧光分光光度法测定^[9];DOC用美国产的1020A型TOC仪测定。

1.6 数据处理

实验数据均由SPSS 11.5统计软件处理。

表 1 2006 年太湖站栈桥观测采样频度及测试项目

测试项目	5 月		6 月		7 月			8 月			9 月		10 月	
	1 日	15 日	1 日	15 日	1 日	10 日	20 日	1 日	10 日	20 日	1 日	15 日	1 日	15 日
水温/	17.5	20.5	23.5	29.7	31.2	33.5	31.5	30.3	31.6	28.5	25.5	23.6	20.3	16.5
pH	7.9	8.1	7.8	7.8	8.0	7.9	8.2	8.4	8.6	8.1	8.0	7.3	7.5	7.8
溶解氧/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6.8	6.4	7.6	7.3	6.7	8.1	8.5	5.7	6.4	8.6	7.2	6.9	8.5	6.6
叶绿素/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	21.8	16.4	12.1	18.1	20.7	27.3	30.3	35.2	43.8	53.1	36.3	31.4	28.6	26.1
总氮/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.2	2.8	3.7	4.3	2.9	3.6	2.3	2.1	1.9	1.5	2.6	2.4	3.5	3.3
总磷/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.24	0.23	0.26	0.25	0.32	0.35	0.33	0.26	0.15	0.11	0.36	0.45	0.39	0.32
细菌数量/($\times 10^5$ 个 $\cdot\text{L}^{-1}$)	4.3	4.7	6.1	4.9	3.7	5.8	5.6	5.3	7.4	5.7	6.2	7.3	7.5	7.8
解磷菌量/($\times 10^3$ 个 $\cdot\text{L}^{-1}$)	0.7	1.3	0.6	0.9	1.1	11.5	1.8	1.6	0.35	2.8	11.9	4.4	11.8	0.4
颗粒有机质/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	11.8	11.5	7.9	9.6	5.3	10.8	7.2	6.7	15.2	10.7	16.6	21.5	27.3	30.6
DOC/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	5.8	6.2	5.6	5.7	6.8	6.3	5.9	7.8	11.6	13.7	17.2	19.3	25.5	27.1

2 结果与分析

2.1 水华过程中水质的变化

2.1.1 氮、磷营养盐变化

充足的养分是微囊藻生长繁殖的前提条件, 水华过程中水体总氮、总磷的变化见图 1. 自 2006 年 5 月起所测定的水体总氮、总磷含量均处于相当高的水平, 水体中氮含量平均 $2.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 而且在 9、10 月份时有显著上升的趋势, 这是由于该时期水中藻类分解产生大量的营养盐进入水体. 水体中磷的含量平均 $0.26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 9 月中旬有突然上升现象, 但随后又逐渐下降.

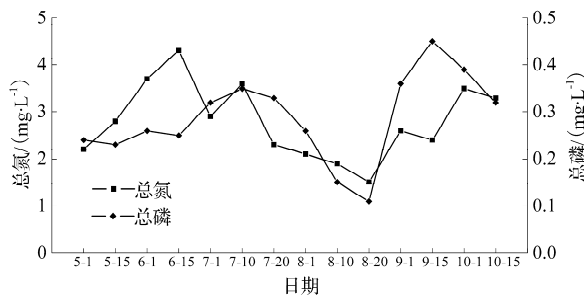


图 1 水华过程中水体总氮、总磷的变化

2.1.2 叶绿素的变化

叶绿素含量的高低体现了藻类生物量的多少, 对太湖站栈桥边水体叶绿素含量的测定结果(图 2)表明, 在 6、7 月份水体中藻类的数量呈稳定增加趋势; 随着温度的不断上升, 在 8、9 月份水体叶绿素含量在高位波动, 且幅度较大; 8 月初水体的叶

绿素含量较低($<40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 而 8 月 20 日的值则高达 $53.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明这一时期正是太湖水华产生的高峰期.

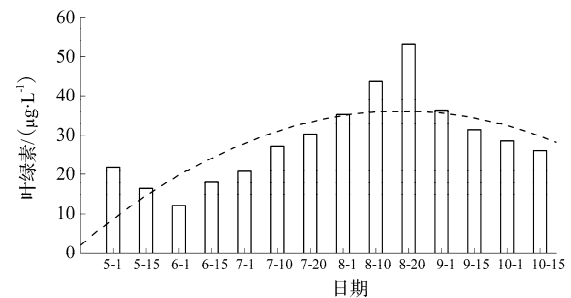


图 2 水华过程中水体叶绿素的变化

2.1.3 水体中细菌的变化

微生物的分解作用是水生生态系统中物质循环的主要推动者, 藻类大量生长所需的碳、氮、磷等元素离不开水体细菌的分解和矿化作用, 尤其是生物活性的供给, 更离不开微生物的作用. 在水华发生过程中, 水体中细菌总量呈现逐渐上升的趋势, 而磷分解细菌数量在水华初期变化不大, 在水华密度较大的 7、8 月份波动较大, 水华发生后

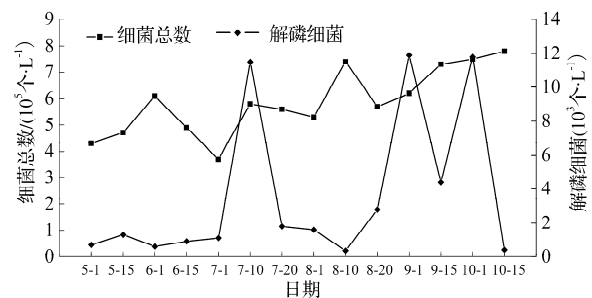


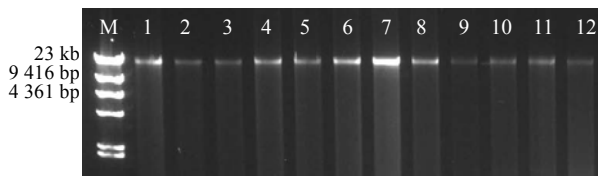
图 3 水华过程中水体细菌数量的变化

期(9、10月份), 呈明显的增加趋势(图3).

2.2 水体中细菌群落多样性的变化

2.2.1 水体中细菌 DNA 的分离

水华过程中, 直接从水体中细菌体内抽提的 DNA 通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果见图 4. 电泳结果显示所得到的细菌 DNA 满足下一步 PCR 扩增的要求.



1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 分别代表 5 月 1 日、5 月 15 日、6 月 1 日、6 月 15 日、7 月 1 日、7 月 10 日、7 月 20 日、8 月 1 日、8 月 10 日、8 月 20 日、9 月 1 日、10 月 1 日(下图同)

图 4 水体中细菌基因组 DNA 图谱

2.2.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增

各水体样品 DNA 的 PCR 扩增效果表明, 采用对大多数细菌和古细菌的 16 SrDNA 基因 V₃ 区有特异性的引物对(F341-GC 和 R518)对各水样的微生物的基因组 DNA 进行特异性扩增, 均可得到较理想的效果(图 5). 由图 5 可知, 经 PCR 扩增反应, 可获得各水体样品中微生物的 16 SrDNA 基因 V₃ 区的长约 500 bp 片段; 说明所用的扩增引物以及 PCR 条件比较适宜, 得到了理想的结果. 将各样品的扩增产物作为变性梯度凝胶电泳(DGGE)的样品, 可以作为分离和鉴别各水体样品的各种微生物种类的依据.

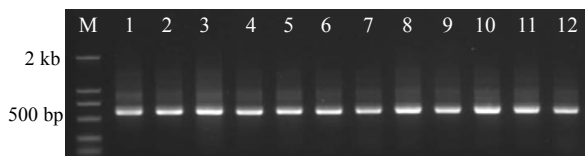


图 5 水华过程中水体细菌 16 SrDNA 的 PCR 扩增图谱

2.2.3 PCR 产物的 DGGE 分析

水华发生过程中各水体样品的 PCR 产物的 DGGE 图谱如图 6 所示, 水华过程中水体样品经过 DGGE 分离均可得到数量不同的电泳条带, 且各条带的亮度和迁移率各不相同.

根据 DGGE 具有对相同大小而不同 DNA 序列

的片段分离原理, 可以得知在太湖水华发生的各时期水体中微生物样品的 DNA 的 PCR 产物中含有不同的指纹条带, 说明细菌群落结构和种群数量存在明显差异.

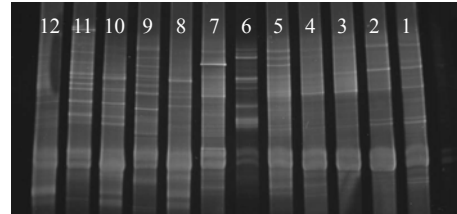


图 6 水华过程中水体细菌 16 SrDNA 的 DGGE 图谱

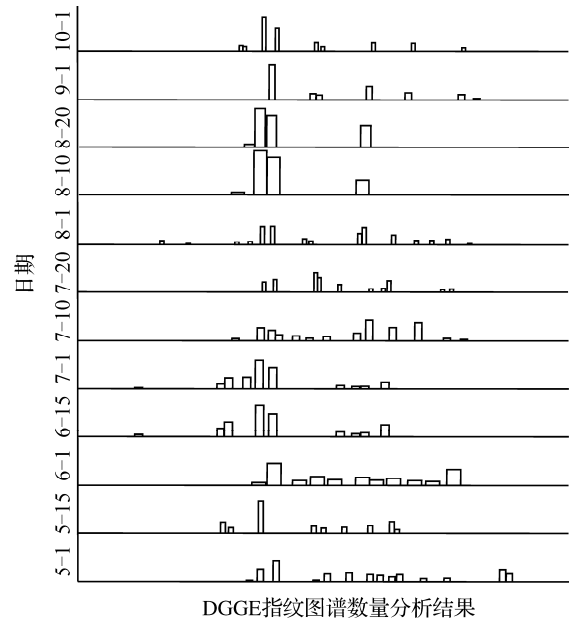


图 7 水华过程中水体细菌群落多样性的变化

DGGE 指纹图谱的条带越丰富说明水体中细菌群落的多样性越大, 条带的信号越强, 表示该种细菌的数量越多. 因此可以根据指纹信息确定水华过程中不同时期太湖水体中所含有的细菌种类及数量关系, 得出微生物群落多样性的信息. 通过软件对 DGGE 指纹图谱数量分析(图 7)发现, 在春季(5、6 月份), 水体中细菌优势种属为 12~15 个细菌类群, 随着水华的逐渐强盛, 8 月份水体中细菌种群多样性显著下降, 而该时期某些优势种含量却急剧增加; 9 月份之后, 水体中细菌的物种多样性又有所增加. 观测结果表明: 从 5 月到 10 月份的整个水华过程中, 细菌的多样性变化表现出与水华发生强度相反的特征.

3 讨论

水华发生过程是一个复杂的动态过程. 从水华生物的出现到形成水华, 牵涉到很多因素, 如水文气象^[10]、温度^[11]、光强^[12]、风浪^[13]等, 当然其前提是有充足的营养盐含量, 水华发生的根本是有充分的养分供应. 而正是由于细菌对有机质的分解矿化作用, 促进了水生生态系统中元素的循环.

3.1 细菌在水华过程中的作用

细菌为浮游生物提供无机氮, 在水体下层硝化细菌使氨态氮转化为硝态氮, 供浮游生物利用; 在上层好氧环境中, 细菌通过氨化作用产生的氨态氮, 是再生生产力的重要物质基础^[14]. 在实验过程中, 水体总氮及细菌含量在水华发生过程中的变化, 印证了水生生态系统中氮转化微生物对氮素循环的作用; 除了无机氮, 细菌还为藻类的生长提供无机磷. 磷是淡水湖泊浮游植物生长的主要限制因子^[15], 磷的主要来源是磷分解细菌的活动使有机(无机)磷酸盐再生, 进而增加了水体磷的含量. 水体受污染后所含的有机质及动植物残骸等, 经细菌分解后所产生的维生素类物质和微量有机成分(如嘌呤、嘧啶等核酸成分)可以促进浮游植物繁殖. 除此之外, 细菌还在铁锰等其他元素的生物地球化学循环中起着重要作用^[16].

3.2 浮游植物与细菌的关系

浮游植物与细菌量变化关系密切^[17], 研究表明大量的细菌所产生的某些代谢物质可能是赤潮发生的诱因. 此外, 细菌在分解有机质的过程中, 能够产生对某些藻类生长起抑制作用的有毒物质, 从而使另一些藻类生长旺盛, 成为优势种, 这样就有助于这些藻类的爆发性增殖形成赤潮. 对水华过程中细菌种群结构变化研究表明, 水体细菌的种类在 5 月到 10 月份水华发生过程中, 发生了显著的变化, 说明在淡水生态系统中, 也存在类似现象. 而且, 细菌数量在水华过程中表现出一定的变化规律, 随水体温度的升高, 浮游植物不断增加,

水体细菌的数量也呈逐步上升趋势; 在水华逐渐消亡的 9、10 月份之后, 水体细菌种类有显著升高的趋势, 这可能与这一时期大部分浮游植物开始分解, 水体有机质增加有关. 曾活水等^[18]对厦门港赤潮发生区微生物调查结果表明: 在赤潮发生前后, 该区域的细菌量比正常时期高出近 1 倍, 并且在赤潮发生的年份, 细菌量高于正常年份. 在研究中我们也证实了在淡水生态系统中, 微生物的种群结构与水华的发生存在相关关系. 细菌的分解作用为浮游植物的生长提供了充足营养元素, 同时, 浮游植物的分泌物与排泄物是细菌的食物, 藻类衰败之后, 为细菌的繁殖提供营养物质, 是细菌有机营养的主要来源.

4 结论

(1) 水华发生过程中, 水体中细菌总量和磷分解细菌数量均呈上升趋势, 微生物数量的增加加速了水体生物活性营养物质的转化.

(2) 水体细菌多样性在水华过程中呈先减后增的趋势, 同时微生物的生物量和优势种群产生了一定的改变.

参考文献:

- [1] Morand P, Briand X. Excessive growth of macroalgae: A symptom of environmental disturbance[J]. *Bot Mar*, 1996, 39:491-516.
- [2] Raffealli D G, Raven J A, Pole L J. Ecological impact of green macroalgae blooms[J]. *Oceanogr Mar Biol*, 1998, 36:97-125.
- [3] Valiela I, McClelland J, Hauxwell J, et al. Macroalgal bloom in shallow estuaries: Controls and ecophysiological and ecosystem consequences[J]. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42:1 105-1 118.
- [4] Brock T D. The study of microorganisms in situ: Progress and problems[J]. *Symp Soc Gene Microbiol*, 1987, 41(3): 1-17.
- [5] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial

- cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143-169.
- [6] Maarit N R, Ilse H, Kaisa W, et al. Extration and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45(1):155-165.
- [7] Muyzer G, Waal E D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16 SrRNA[J]. *Appl Environ Microbil*, 1993, 59:695-700.
- [8] Muyer G, Smalla K. Application fo denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antoni Van Lereuwenhoek*, 2004, 73:127-141.
- [9] 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.
- [10] 高月香, 张永春. 水文气象因子对藻华爆发的影响[J]. *水科学与工程学报*, 2006, 2:10-12.
- [11] 陈宇炜, 高锡云. 西太湖北部微囊藻时空分布及其与光温等环境因子关系的研究[C]//蔡启铭. 太湖环境生态研究(一). 北京: 气象出版社, 1998:142-148.
- [12] 林毅雄, 韩梅. 滇池富营养化的铜绿微囊藻生长因素的研究[J]. *环境科学进展*, 1998, 6(3):82-87.
- [13] 朱永春, 蔡启铭. 风场对藻类在太湖中迁移影响的动力学研究[J]. *湖泊科学*, 1997, 9(2):152-158.
- [14] 郑天凌, 薛雄志, 李福东. 海洋微生物在环境生态中的作用[J]. *海洋科学*, 1994(3):35-38.
- [15] 蔡启铭, 高锡云. 太湖水质的动态变化及影响因子的多元分析[J]. *湖泊科学*, 1995, 7(2):97-100.
- [16] 黄邦钦, 徐鹏, 胡海忠. 单种及混合培养条件下 Fe、Mn 对赤潮生物塔玛亚历山大藻生长的影响[J]. *环境科学学报*, 2000, 5(20):537-541.
- [17] Ling Zhengtian. Studies on the role of marine bacteria biomass in the up welling ecosystem[J]. *Acta Sinica Oceanologica*, 1993(2):261-272.
- [18] 曾活水, 林燕顺, 姚瑞海. 厦门港赤潮发生区细菌量的分布特征[C]//厦门港赤潮调查研究论文集. 北京: 海洋出版社, 1993:60-65.

Dynamic Changes of Bacteria Community in Algale Blooming in Taihu Lake

FENG Sheng¹, LI Ding-long¹, QIN Bo-qiang²

(1.School of Environmental and Safety Engineering, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213016, China;

2.Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: In-situ observation of the course of bloom formation is conducted, and the bacteria dynamics during the microsystem bloom formation by molecule biological methods is derived. The analytical results of PCR-DGGE imply that the community composition of the aquatic bacteria varies during the blooming course, the biomass of bacterioplankton increases with the algae blooming ($R^2=0.836$) from May to October during which bloom occur. However, significant variation of the number of phosphorus-degrading bacteria is not noted at the beginning of blooming, but the trend of increasing can be found at the end of the bloom, indicating that after the decomposing of algae, the particulate organic phosphorus become the new nutrient matter for the metabolism of organic phosphorus-degrading bacteria.

Key words: bloom; PCR-DGGE; bacteria abundance

CLC number: X172

Document code: A

(责任编辑 史小丽)