

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2013.04.001

太湖梅梁湾不同深度沉积物中细菌群落结构组成

赵大勇¹,孙一萌¹,方超¹,刘鹏¹,曾巾²,王猛¹,黄睿¹

(1.河海大学水文水资源学院,江苏南京 210098;
2.中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室,江苏南京 210008)

摘要:为研究湖泊沉积物不同深度处的细菌群落结构组成和多样性,选取太湖梅梁湾作为采样点,应用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术比较湖泊不同深度沉积物样品中细菌群落的结构组成及其多样性。结果表明:太湖沉积物中细菌具有丰富的多样性,细菌种类和相对丰度与当前已有的可培养细菌研究结果一致。细菌群落结构随着沉积物深度的增加呈现一定的变化规律,相邻近的沉积物分层中细菌群落结构的相似度较高;随着沉积物深度的增加,沉积物中优势菌属发生了一定的变化;表层沉积物与底层沉积物的细菌群落结构相差较大。鉴于氧含量随着沉积物深度的增加而逐渐减少,可以推断氧含量的变化是造成湖泊沉积物中细菌群落结构与多样性差异的主要原因。另外,表层沉积物中的生物扰动也是可能的原因。

关键词:湖泊沉积物;沉积物深度;细菌群落结构;T-RFLP技术;太湖梅梁湾

中图分类号:X17;X524 文献标志码:A 文章编号:1000-1980(2013)04-0283-05

Vertical distribution of bacterial community composition in sediments of Meiliang Bay in Taihu Lake

ZHAO Dayong¹, SUN Yimeng¹, FANG Chao¹, LIU Peng¹, ZENG Jin², WANG Meng¹, HUANG Rui¹

(1. College of Hydrology and Water Resources, Hohai University, Nanjing 210098, China;
2. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: To investigate the vertical distribution and diversity of bacterial community composition in the sediments of Taihu Lake, sediment samples were collected from Meiliang Bay in Taihu Lake. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technology was used to analyze the bacterial community composition and diversity in sediment samples of different depths. High bacterial diversities were observed in the sediments of Taihu Lake, and the bacterial species and relative abundance were found to be consistent with those in previous reports based on the culture-dependent method. Additionally, different T-RFLP patterns were observed for samples collected at different depths. Bacterial community compositions derived from those nearby samples showed greater similarities. The dominant bacterial groups varied at different depths. Moreover, the bacterial community compositions of the top and the bottom sediments showed great differences. Dissolved oxygen decreased with the increase of the depth of sediments, which shows that the variation of dissolved oxygen was the main cause of the differences in bacterial community compositions and diversity. Bioturbation induced by the submerged macrophytes and zoobenthos may be another cause.

Key words: lake sediment; sediment depth; bacterial community structure; T-RFLP technology; Meiliang Bay in Taihu Lake

浅水湖泊水域较广阔,水深较浅,风浪扰动大,湖泊沉积物与水体物质交换频繁^[1]。以往的研究表明,

浅水湖泊沉积物是湖泊营养物质来源的一个主要方面^[2-4]。微生物作为沉积物中物质循环和转化的核心参与者,可以通过同化、异化等作用来影响沉积物中的营养盐及金属元素的分布和转化^[5],对湖泊中的物质循环和水体自净具有不可替代的作用^[5-6]。2002年,Haglund等^[7]研究发现湖泊沉积物中细菌的代谢能力远高于水体中浮游细菌的代谢能力。因此,研究湖泊沉积物中的微生物群落结构组成对于阐明营养元素在湖泊生态系统中的循环过程具有重要意义。

太湖是我国东部一个大型的浅水湖泊,梅梁湾是其各湖区中水污染较严重的区域。目前,大部分研究着重于沉积物中氮^[8]、磷^[9]、硫^[10]等元素及其化合物的形态变化分析或微生物与环境因子的相互关系^[5,11-12],极少关注沉积物中微生物的多样性。少数研究如周丽华等^[13]、戴欣等^[14]利用基于培养的方法研究太湖沉积物中可培养细菌的多样性^[15]。然而,在环境样品中能用现有技术培养的微生物仅占微生物总数的0.01%~10.0%^[16],难以客观揭示环境样品中的微生物多样性。1997年,Liu等^[17]首先应用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术研究微生物的多样性。与其他指纹图谱技术相比,T-RFLP技术具有更高的灵敏度和重复性^[18]。目前,关于采用T-RFLP技术分析土壤^[19]或活性污泥^[20]中微生物多样性的研究均有报道,但对湖泊不同深度沉积物中微生物多样性的研究在国内还很少。

笔者以太湖梅梁湾湖区沉积物为研究对象,应用T-RFLP技术研究不同深度沉积物中细菌的多样性,旨在更好地认识不同深度沉积物中细菌的群落结构组成,为进一步研究细菌在太湖营养物质循环中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与准备

采样时间为2011年8月,采样点位于太湖梅梁湾(图1)。梅梁湾是太湖北部的一个湖湾,位于无锡市中心西南10 km处,湖湾南北长12~17 km、宽7~10 km、面积129.3 km²。目前,太湖梅梁湾水域营养化程度长期处于超富营养化水平。

采样点S位于太湖梅梁湾湖区中心(31°28′16″N,120°10′20″E)。使用柱状采泥器(德国HYDRO-BIOS),采集长30 cm、直径11 cm的沉积物样品。分离时用活塞自下而上将泥柱推出,并将泥样每1 cm分1层,共13个样本,泥样编号分别记为:0-1(表示该样品为0~1 cm深度的沉积物,以下类似),1-2,⋯,12-13。同时采集2个平行沉积物柱状样,将同一深度层的平行样品混合。混合后的样品置于冰上冷藏,运回实验室。同时,用采水器采集水面下0.5 m处的水样2 L,置于冰上冷藏,运回实验室用于理化指标分析。



图1 太湖采样点位置示意图
Fig. 1 Sketch map sampling locations in Taihu Lake

1.2 水体理化指标分析

水体pH应用便携式pH计(PHB-4,上海雷磁)在采样现场测定,水样经0.22 μm滤膜过滤后,用流动注射仪(San++, SKALAR, Netherlands)测定水样总氮(TN)、总磷(TP)、氨氮(NH₄⁺)、硝氮(NO₃⁻)和亚硝态氮(NO₂⁻)。

1.3 样品总DNA的提取与PCR扩增

取0.3 g真空冷冻干燥(ALPHA1-2,德国CHRIST)后的沉积物样品,采用Zeng等^[21]应用于沉积物的DNA提取方法进行DNA提取。PCR扩增反应采用细菌通用引物对27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和926r(5'-CCGTCAATTCCTTTGAGT TT-3'),前者5'端采用Cy5-N-羟基琥珀酰亚胺酯荧光标记。PCR反应体系和循环条件参照Zeng等^[21]的方法进行。PCR扩增产物采用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 T-RFLP分析

用绿豆酶30℃消化PCR产物30 min。用PCR产物纯化试剂盒(爱思进生物技术(杭州)有限公司)纯化消化后的产物。然后,用限制性核酸内切酶Hha I(Takara, Otsu, Japan)37℃消化3 h,之后使用CEQ8000(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)核酸片段分析仪对酶切产物进行T-RFLP分析。分析中只考虑长度介于60~600 bp(bp表示该片段所具有的碱基数,下同)的末端限制性片段,即T-RF,以及相对丰

度超过 1% 的片段。分别计算细菌群落的 Shannon-Weaver 指数(H')、Simpson 指数(D)和 Pielou 指数(J),用它们反映沉积物中细菌的多样性。计算公式如下:

$$H' = - \sum_{i=1}^n P_i \ln P_i \quad D = \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad J = \frac{H'}{\ln S}$$

式中: P_i ——峰面积占总面积的比例; S ——T-RF 数。

利用聚类分析软件 PRIMER5 (Primer-E, Warwick, UK) 分析不同样品间细菌群落结构的相似性。

2 结果与讨论

2.1 梅梁湾水环境参数

梅梁湾采样点 S 处水体的基本理化参数如下: $\text{pH} = 7.25$, $\rho(\text{TN}) = (0.65 \pm 0.07) \text{ mg/L}$, $\rho(\text{TP}) = (0.04 \pm 0.005) \text{ mg/L}$, $\rho(\text{NH}_4^+) = (0.17 \pm 0.02) \text{ mg/L}$, $\rho(\text{NO}_3^-) = (0.18 \pm 0.026) \text{ mg/L}$, $\rho(\text{NO}_2^-) = (0.01 \pm 0.001) \text{ mg/L}$ 。可以看出,梅梁湾湖区水体中的 TN 质量浓度在 0.65 mg/L 左右、TP 质量浓度在 0.04 mg/L 左右,达到了富营养化的水平。

2.2 基于 T-RFLP 的细菌群落结构分析

2.2.1 细菌多样性分析

根据 T-RFLP 图谱中 T-RF 数、种类和丰度,分别计算各样品细菌的多样性指数(图 2)。结果显示:13 个样品的 Shannon-Weaver 指数、Simpson 指数均有显著的差异,各层底泥之间有较明显的波动,Pielou 指数则没有显著的差异,基本稳定在 0.72 ~ 0.87 之间。其中编号为 12-13 样品的细菌多样性指数与其他样品差异较显著,其 Shannon-Weaver 指数为所有样品中最低的,这表明 12 ~ 13 cm 深度样品的细菌多样性不明显,沉积物各层样品的 Shannon-Weaver 指数、Simpson 指数均在一定范围内波动,但也显示了其细菌多样性存在一定差异。

2.2.2 细菌群落结构分析

长度为 62 bp, 85 bp, 86 bp, 87 bp, 88 bp, 89 bp, 90 bp, 91 bp, 93 bp, 95 bp, 96 bp, 97 bp, 135 bp, 138 bp, 142 bp, 159 bp, 166 bp, 246 bp, 288 bp, 463bp 的 T-RF 在多个样品中有较高的相对丰度。例如:长度为 62 bp 的 T-RF 在 7 个样品中的相对丰度都超过了 5%;长度为 87 bp 的 T-RF 在 8 个样品中的相对丰度都超过了 5%;长度为 86 bp, 95 bp, 96 bp 的 T-RF 在 5 个样品中的相对丰度都超过了 5%。长度为 61 bp 的 T-RF 主要集中在柱状沉积物上半部分的样品中,而长度为 131 bp 的 T-RF 主要出现在柱状沉积物下半部分的某些样品中。

聚类分析表明:一些相临近深度的样品相似度较高(图 3),样品 2-3 和 3-4、样品 8-9 和 9-10、样品 4-5 和 6-7、样品 10-11 和 5-6 均具有较高的相似性,可分别聚为一支。样品 0-1 与其他样品差异性最大,相似度只有 30% 左右,可推知表层沉积物中细菌群落结构组成与其他样品存在明显差异。

2.3 T-RF 定性推断

通过与数据库(如 Phylogenetic Assignment Tool (PAT) (<http://secure.limnology.wisc.edu/trflp/>)) 比对,可以鉴定特定长度的 T-RF 片段所对应细菌的分类地位。笔者通过 PAT 数据库比对,发现本研究得到的 T-RF 所代表的细菌属于拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)等。在 T-RFLP 分析结果中具有较高相对丰度的 T-RF,如,62 bp 及 86 bp 均属于 α -变形菌纲,表明在太湖沉积物中 α -变形菌纲为优势菌,这与戴欣等^[14]关于湖泊沉积物中可培养细菌的研究结果一致。

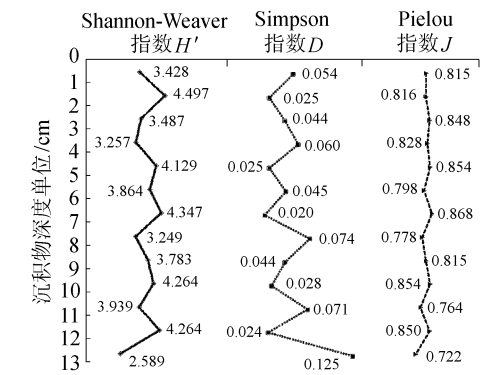


图 2 梅梁湾不同深度沉积物中细菌多样性指数
Fig. 2 Bacterial diversity indices of sediments at different depths of Meiliang Bay in Taihu Lake

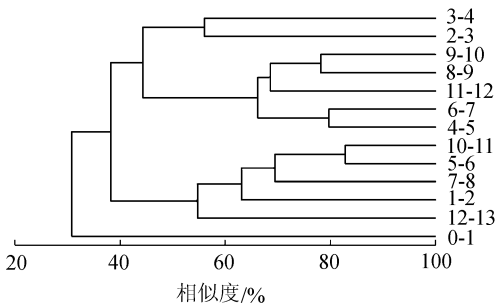


图 3 沉积物不同样品的 T-RFLP 结果聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis of T-RFLP pattern derived from different sediment depths

在不同深度的湖泊沉积物中,存在着不同的优势菌。在沉积物表层,长度为 63 bp, 93 bp 和 209 bp 的 T-RF 具有较高丰度。PAT 数据库对比结果显示,与 63 bp T-RF 最相近序列为玫瑰色盐水球菌 (*Salinicoccus roseus*), 厚壁菌门, 好氧, 具有嗜盐特性^[22]; 与 209 bp T-RF 最相近序列为草酸无色菌 (*Achromatium oxaliferum*), 无色硫杆菌属, γ -变形菌纲, 是淡水湖泊沉积物中最常见的菌种之一, 在湖泊硫循环中发挥着重要作用, 为严格好氧菌^[23]。而在深层沉积物中, 长度为 88 bp 和 96 bp 的 T-RF 则具有较高丰度。PAT 数据库对比结果显示, 与 88 bp T-RF 最相近序列为生脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*), α -变形菌纲, 固氮螺菌属, 其在严格控氧条件下有很好的固氮作用^[24]; 与 96bp T-RF 最相近序列为 *Bacillus arsenicoselenatis*, 芽孢杆菌属, 能够氧化 As^{3+} , 在砷的生物地球化学循环中起到重要作用^[25]。

3 结 论

a. 太湖梅梁湾沉积物中细菌具有丰富的多样性, 且细菌种类和相对丰度与之前已有的可培养细菌研究结果一致。

b. 细菌群落结构随着沉积物深度的变化呈现一定的变化规律。相邻近的沉积物分层细菌的群落结构相似度较高; 随着深度的增加, 沉积物中优势菌属发生了一定的变化; 表层沉积物与底层沉积物的细菌群落结构相差较大。

参考文献:

[1] 逢勇, 颜润润, 余钟波, 等. 风浪作用下的底泥悬浮沉降及内源释放量研究[J]. 环境科学, 2008, 29 (9) : 2456-2464. (PANG Yong, YAN Runrun, YU Zhongbo, et al. Suspension-sedimentation of sediment and release amount of internal load in Lake Taihu affected by wind[J]. Environmental Science, 2008, 29 (9) : 2456-2464. (in Chinese))

[2] NIXDORF B, DENEKE R. Why “very shallow” lakes are more successful opposing reduced nutrient loads[J]. Hydrobiologia, 1997, 342/343: 269-284.

[3] CHMIELEWSKI T J, RADWAN S, SIELEWICZ B. Changes in ecological relationships in a group of eight shallow lakes in the Polesie Lubelskie region (eastern Poland) over forty years[J]. Hydrobiologia, 1997, 342/343: 285-295.

[4] WETZEL R G L. Lake and river ecosystems[M]. third edition. London: Academic Press, 2001: 205-288.

[5] 曾巾, 杨柳燕, 肖琳, 等. 湖泊氮素生物地球化学循环及微生物的作用[J]. 湖泊科学, 2007, 19 (4) : 382-389. (ZENG Jin, YANG Liuyan, XIAO Lin, et al. Biogeochemical cycling of nitrogen in lakes and the role of microorganisms in conversion of nitrogen compounds[J]. Journal of Lake Sciences, 2007, 19 (4) : 382-389. (in Chinese))

[6] KARRASCH B, PARRA O, CID H, et al. Effect of pulp and paper mill effluents on the microplankton and microbial self-purification capabilities of the Biobío River, Chile[J]. Science of the Total Environment, 2006, 359 (1/2/3) : 194-208.

[7] HAGLUND A L, TORNBLOM E, BOSTROM B, et al. Large differences in the fraction of active bacteria in plankton, sediments, and biofilm[J]. Microbial Ecology, 2002, 43 (2) : 232-241.

[8] 张彦, 张远, 于涛, 等. 太湖沉积物及孔隙水中氮的时空分布特征[J]. 环境科学研究, 2010, 23 (11) : 1333-1342. (ZHANG Yan, ZHANG Yuan, YU Tao, et al. Spatial and temporal distribution of nitrogen species in sediment and interstitial waters of Taihu Lake[J]. Research of Environmental Sciences, 2010, 23 (11) : 1333-1342. (in Chinese))

[9] 周小宁, 姜霞, 金相灿, 等. 太湖梅梁湾沉积物磷的垂直分布及环保疏浚深度的推算[J]. 中国环境科学, 2007, 26 (5) : 445-449. (ZHOU Xiaoning, JIANG Xia, JIN Xiangcan, et al. Vertical profiles of phosphorus in the sediments of Meiliang Bay of Taihu Lake in China and calculation of environmental dredging depth[J]. China Environmental Science, 2007, 26 (5) : 445-449. (in Chinese))

[10] 尹洪斌, 范成新, 丁士明, 等. 太湖梅梁湾与五里湖沉积物活性硫和重金属分布特征及相关性研究[J]. 环境科学, 2008, 29 (7) : 1791-1796. (YIN Hongbin, FAN Chengxin, DING Shiming, et al. Distribution characteristic and correlation relationship of reactive sulfur and heavy metals in sediments of Meiliang Bay and Wuli Lake of Taihu Lake[J]. Environmental Science, 2008, 29 (7) : 1791-1796. (in Chinese))

[11] 王娜, 徐德琳, 郭璇, 等. 太湖沉积物微生物生物量及其与碳、氮、磷的相关性[J]. 应用生态学报, 2012, 23 (7) : 1921-1926. (WANG Na, XU Delin, GUO Xuan, et al. Microbial biomass and its correlations with carbon, nitrogen, and phosphorus in the sediments of Taihu Lake[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23 (7) : 1921-1926. (in Chinese))

[12] 王强, 耿金菊, 金红梅, 等. 太湖沉积物中微生物和磷化氢的时空分布及关系[J]. 中国环境科学, 2006, 26 (3) : 350-354. (WANG Qiang, GENG Jinju, JIN Hongmei, et al. Temporal and spatial distributions of microbes and phosphine in Lake Taihu

- sediments[J]. China Environmental Science, 2006, 26(3): 350-354. (in Chinese))
- [13] 周丽华, 陈士超, 邓志瑞, 等. 太湖沉积物中的可培养细菌(I): 细菌多样性初步分析[J]. 湖泊科学, 2009, 21(1): 27-35. (ZHOU Lihua, CHEN Shichao, DENG Zhirui, et al. Culturable bacteria in the sediment of Lake Taihu (I): primary analysis of bacterial diversity[J]. Journal of Lake Sciences, 2009, 21(1): 27-35. (in Chinese))
- [14] 戴欣, 王保军, 黄燕, 等. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 161-165. (DAI Xin, WANG Baojun, HUANG Yan, et al. Bacterial diversity in the sediments of Taihu Lake by using traditional nutrient medium and dilution nutrient medium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(2): 161-165. (in Chinese))
- [15] AKKERMAN A D L S, MIRZA M S, HARMSSEN J M H, et al. Molecular ecology of microbes: a review of principles, pitfalls and true progress[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 15: 185-194.
- [16] ROSE A C L, GARNIER S E, HARRY M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples[J]. Applied Soil Ecology, 2001, 18(1): 47-60.
- [17] LIU W T, MARSH T L, CHENG H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4516-4522.
- [18] 任南琪, 赵阳国, 高崇洋, 等. TRFLP 在微生物群落结构与动态分析中的应用[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2007, 39(4): 552-556. (REN Nanqi, ZHAO Yangguo, GAO Chongyang, et al. Terminal restriction fragment length polymorphism: a powerful technique for characterizing microbial community structure and dynamics[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2007, 39(4): 552-556. (in Chinese))
- [19] 葛芸英, 陈松, 胡兰, 等. 土壤细菌 DNA 提取及多样性分析的 T-RFLP 方法[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 131-136. (GE Yunying, CHEN Song, HU Lan, et al. A new method of soil bacterial DNA extraction and T-RFLP analysis for diversity[J]. Microbiology, 2008, 35(1): 131-136. (in Chinese))
- [20] 孙庆华, 柏耀辉, 赵翠, 等. DGGE、T-RFLP、LH-PCR 对两种活性污泥的微生物种群多样性分析的比较[J]. 环境工程学报, 2009, 3(8): 1365-1370. (SUN Qinghua, BAI Yaohui, ZHAO Cui, et al. Comparison of DGGE, T-RFLP and LH-PCR in the analysis of microbial community diversity for two kinds of activated sludges[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2009, 3(8): 1365-1370. (in Chinese))
- [21] ZENG Jin, YANG Liuyan, LIANG Yi, et al. Spatial distribution of bacterial communities in sediment of a eutrophic lake revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and multivariate analysis [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2008, 54(12): 1053-1063.
- [22] PRASAD M M, SEENAYYA. Shelf-life of ribbonfish (*Trichiurus haumela*) cured in salt with red halophilic bacteria (*Salinicoccus roseus*) and chemical preservatives[J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2009, 46(1): 41-45.
- [23] GLOCKNER F O, BABENZIEN H D, WULF J, et al. Phylogeny and diversity of *Achromatium oxaliferum*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1999, 22: 28-38.
- [24] DAVIA B S, CHRISTINE A S, JOHANNA D. Nitrogenase activity and nitrate respiration in *Azospirillum* spp[J]. Archives of Microbiology, 1979, 121(2): 141-145.
- [25] 洪斌. 微生物对砷的地球化学行为的影响: 暨地下水砷污染机制的最新研究进展[J]. 地球科学进展, 2006, 21(1): 77-82. (HONG Bin. Influence of microbes on biogeochemistry of Arsenic: mechanism of Arsenic mobilization in groundwater[J]. Advances in Earth Science, 2006, 21(1): 77-82. (in Chinese))