

乌梁素海浮游细菌群落结构及其对富营养化因子的响应

张胜男^{1Δ} 赵吉睿^{1,2Δ} 张晓军¹ 李畅游³ 王瑞刚¹ 冯福应^{1*}

(1. 内蒙古农业大学 生命科学学院 应用与环境微生物研究所 内蒙古 呼和浩特 010018)

(2. 天津市环境监测中心 天津 300191)

(3. 内蒙古农业大学 水利与土木建筑工程学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【目的】揭示乌梁素海浮游细菌的群落结构及其对富营养化环境因子的响应,认识乌梁素海浮游细菌多样性,以丰富微生物与富营养化关系的理论。【方法】提取水体浮游细菌总DNA,利用细菌通用引物对63F/1387R进行PCR扩增,构建小口、沙尖北和红圪卜3个湖区16S rRNA基因克隆文库;以典型对应分析(CCA)方法解析浮游细菌群落结构对环境因子的响应。【结果】各湖区中富营养化程度最重的红圪卜位点细菌多样性、丰富度及均匀度最高,而富营养化程度最轻的小口位点细菌多样性、丰富度及均匀度最低。Proteobacteria、Bacteroidetes和Actinobacteria为水体中优势类群。 α -、 γ -、 δ -Proteobacteria, Actinobacteria及Bacteroidetes等菌群丰度随着水体的富营养化程度改变而有显著的变化。各湖区皆存在许多可能具有污染物降解及驱动生源要素循环能力的细菌类群。CCA分析表明TN、 NH_4^+ 、 NO_3^- 和COD等水体指标对浮游细菌群落结构组成的影响较大。此外,乌梁素海水体内未知细菌类群很多;且不同于一般淡水生态系统,乌梁素海中存在9.6%的轻度嗜盐碱性细菌。【结论】乌梁素海水体中浮游细菌多样性较高,细菌群落结构复杂、其类群组成与富营养化因子紧密相关。

关键词: 乌梁素海, 富营养化, 16S rRNA, 细菌群落结构

Planktonic bacterial community structure and its response to eutrophic factors in Lake ULanSuHai

ZHANG Sheng-Nan^{1Δ} ZHAO Ji-Rui^{1,2Δ} ZHANG Xiao-Jun¹ LI Chang-You³
WANG Rui-Gang¹ FENG Fu-Ying^{1*}

(1. Institute of Applied & Environmental Microbiology of Life Sciences College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)

(2. Tianjin Environmental Monitoring Center, Tianjin 300191, China)

(3. Water Conservancy and Civil Engineering College of Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Objective] To investigate the planktonic bacterial community structure in Lake ULanSuHai and reveal its response to eutrophic factors. [Methods] DNA of total planktonic bacteria

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30760004); 内蒙古农业大学创新团队项目

*通讯作者: Tel: 86-471-4309240; ✉: forefeng@hotmail.com

Δ并列第一作者

收稿日期: 2013-07-30; 接受日期: 2013-09-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

was extracted and used as template in the PCR amplification with bacterial universal primer pair 63F/1387R, and then PCR products were subjected to constructing 16S rRNA gene clone libraries of 3 different eutrophication level lake area, XK, HGB and SJB. Canonical correlation analysis (CCA) assay was applied to reveal the responses of bacterial community to eutrophication. **[Results]** The highest eutrophication level lake area-HGB has the highest diversity, richness and evenness, whereas XK of lowest eutrophication has the lowest diversity indexes. Proteobacteria, bacteroidetes and actinobacteria were dominant bacterial groups in Lake ULanSuHai. Abundances of α -, γ -, δ -proteobacteria, actinobacteria and bacteroidetes were varied greatly with the shifts of eutrophic levels. A lot of functional microbes with the probable ability degrading pollutants and cycling biogenic elements were detected in all sampled lake areas. Moreover, CCA analysis suggested that TN, NH_4^+ , NO_3^- and COD had the most influence on planktonic bacterial community composition. Besides, there were plenty of unknown groups in Lake ULanSuHai. Some slightly alkaphilic and halotolerant bacteria were detected and they accounted for 9.6% of total bacteria in Lake ULanSuHai. **[Conclusion]** The diversity of planktonic bacteria is high in Lake ULanSuHai, and the community structure is complex and its composition is closely correlated with the eutrophic level of the lake waterbody.

Keywords: ULanSuHai, Eutrophication, 16S rRNA, Bacterial community structure

水体富营养化,是指含有氮、磷等营养盐类的污水大量排放到湖泊、河口等缓流水中,使得水体中某些小的浮游植物、原生动物或细菌大量繁殖和生长,在一定的环境条件下发生突发性增殖和聚集,致使水质恶化的现象^[1]。在富营养化水体中,细菌是复杂有机物和矿质元素转化的最重要贡献者^[2],其多样性研究对于了解富营养化水生生态系统尤为重要^[3]。而探究影响细菌群落结构组成的主要生态环境因子也是相关研究者一直以来关注的焦点之一^[2-3]。基于DGGE指纹图谱的研究表明,富营养化的太湖中细菌群落结构与碳、氮和磷等营养因子关联度较大^[4]。Zeng等^[5]研究表明大型植物种类对浅的淡水湖泊细菌群落组成有重要的影响,并且其影响作用随季节及与植株的距离而变化。Van der Gucht等^[6]指出地方环境因子远大于空间距离对细菌群落结构的影响。

乌梁素海(40°47′-41°03′N, 108°43′-108°57′E)位于内蒙古西部巴盟乌拉特前旗,是黄河流域最大的湖泊,属浅水湖(平均水深约1.0 m),风力扰动频繁、没有明显分层现象^[7]。由于河套灌区大量施用化肥,农田退水把大量的无机营养盐带进乌梁素海,以及工业废水的排入,使其成为地球上高纬度高原地区典型的重度富营养化草型湖泊^[7-8]。而有关高纬度高原富营养化浅水草型湖泊细菌群落结

构的报道较少,其与营养因子之间的关系更加缺乏。并且,河套地区水分蒸发量巨大,而降水相对较少和缺乏低盐分淡水补给,以致乌梁素海盐碱化趋势明显^[8]。这使得乌梁素海更具有了有别于太湖等淡水湖泊的特殊性,而其细菌群落结构组成是否也比较特殊,以及细菌群落结构与富营养化因子之间的关系究竟如何也更加值得关注。

因此,本研究通过构建和分析16S rRNA基因克隆文库并结合典型对应分析方法,比较分析了乌梁素海不同富营养化水平的湖区浮游细菌群落结构,探讨了群落结构对富营养化因子的响应。这将有助于认识富营养化水体浮游细菌多样性及群落结构类型,丰富微生物与富营养化关系的理论,为微生物监测富营养化水体生态环境变化及其保护和修复提供基础信息和依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集和水体指标参数测定

于2008年11月分别采集乌梁素海红圪卜(HGB)、小口(XK)和沙尖北(SJB)3个湖区(采样点见图1)表层(10-20 cm)样品,之后将样品置于4℃保温箱中并迅速运回实验室处理。参考国家标准^[9]测定样品水质参数,如叶绿素a(Chl a)、总磷(TP)、总氮(TN)、化学需氧量(COD)、氨态氮(NH_4^+)、硝酸盐氮(NO_3^-)。

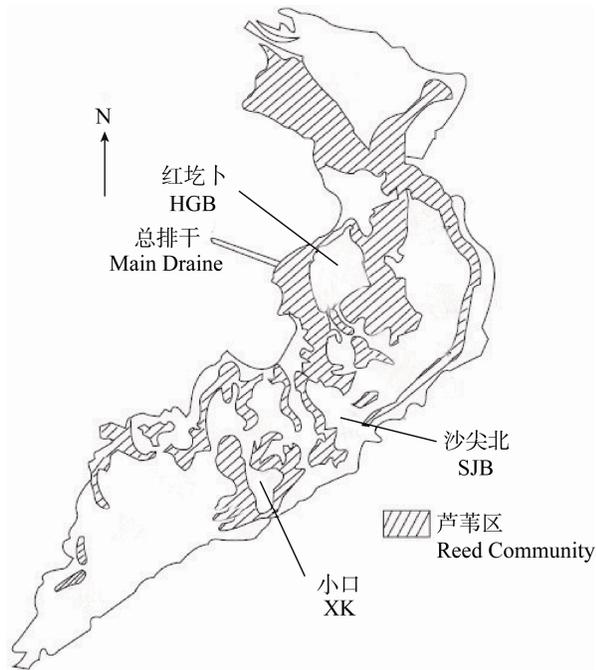


图1 乌梁素海采样点位置

Figure 1 Sampling sites of Lake UlanSuHai

1.2 浮游细菌收集

取水样 150 mL, 先以 10 μm 孔径滤膜(所有滤膜均为美国 Millipore 公司生产, 直径 45 mm)预过滤, 然后以 0.22 μm 的滤膜过滤收集浮游细菌, 将此滤膜置-70 °C 保存备用。

1.3 浮游细菌总 DNA 提取、PCR 扩增及克隆文库的构建

浮游细菌总 DNA 提取参考 Boström 等的方法^[10]。以提取的总 DNA 作为 PCR 扩增模板, 用细菌 16S rRNA 的通用引物 63F (5'-CAGGCC TAACACATGCAGTC-3')和 1387R (5'-GGGCGG WGTGTACAAGGC-3')进行扩增。PCR 反应体系: 0.5 μL DNA 模板(约 50 ng/μL), 0.1 μL rTaq 酶 (5 U/μL), 2 μL 10×Buffer, 1.6 μL dNTPs (20 mmol/L), 引物(20 μmol/L)各 0.2 μL, 补水使总体积至 20 μL。PCR 反应采用 Touch Down 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 65 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 20 个循环, 且每个循环退火温度下降 0.5 °C; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 10 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行

检测, 目的条带在 1.4 kb 左右。如此扩增 10 管并混合 PCR 产物, 以降低单次扩增的偏好性。混合后的 PCR 产物经凝胶回收纯化试剂盒(北京中科瑞泰)纯化备用。克隆文库构建: 将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体(TaKaRa)上, 之后以 42 °C 热激法转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 涂布培养。

1.4 测序及系统发育分析

从每个文库中随机挑选 80-100 个阳性克隆送上海生物工程有限公司(Sangon)测序。测序所得序列首先用 Mallard 1.02 软件检测并去除可能的嵌合体(Chimeria), 之后对序列进行多重比对后使用软件 DOTUR, 以 97% 作为截止值(Cutoff)划分可操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)。然后在各 OTU 中选取 1 条代表序列, 运用 RDP 数据库的 Classifier 功能分析各序列所归属的代表类群, 同时用 BLASTn search 找出各序列在 GenBank 数据库中最相似的参比序列, 以 Kimura-2 模型计算进化距离, 以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树^[11]。所得序列已全部提交至 GenBank、登录号为 KF023573-KF023634、KF052081-KF052086。

1.5 多样性指数及种群相关性分析

物种多样性与均匀度指数显示群落中种数多寡及个体分布情形。按照 Hill 等^[12]的方法对所得 OTU 结果进行群落多样性相关指标的统计分析, 计算 Shannon-Wiener 指数(H')、Simpson 指数(D)、均匀度指数(E_H)和 S_{Chao1} 指数。Shannon-Wiener 和 Simpson 指数反映物种多样性, 公式为:

$$H' = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s P_i^2$$

$P_i = n_i/N$, P_i 为每个 OTU 所代表克隆数占所有总分析克隆数的比例, S 为 16S rRNA 的总 OTU 数, n_i 为第 i 种 OTU 的克隆数, N 为总克隆数。

均匀度指数反映了群落中不同物种的多度分布的均匀程度, 其计算公式为: $E_H = H'/H_{\text{max}} = H'/\ln S$ 。

H_{\max} 为最大 Shannon 指数, 大小为 $\log_2 S$, S 为 16S rRNA 序列的总 OTU 种类数。

S_{Chao1} 指数能够反映物种的丰富度, 公式为: $S^* = S + (a^2/2b)$ 。计算公式中 S^* 代表预测的 OTU 总个数, S 是样本中实际所得的 OTU 数, a 是只含 1 个克隆子的 OTU 的个数, b 是含 2 个克隆子 OTU 的个数。

文库覆盖度, 用于评估所构建的文库对环境微生物多样性的体现程度, 其计算公式为 $C = 1 - nl/N$, nl 为仅包含 1 个克隆的 OTU, N 为总克隆数。

2 结果与分析

2.1 各项水体参数

样品水质参数分析结果(表 1)表明, 乌梁素海水体 pH 值在 8.22–8.75 之间, 呈弱碱性, 氮磷营养水平较高, 超过了国际上对富营养化的界定水平(总氮 TN > 1.0 mg/L, 总磷 TP > 0.11 mg/L)。叶绿素 (Chl a) 浓度为沙尖北位点最高(16 mg/L), 小口位点最低(3.87 mg/L)。可见, 红圪卜(HGB)、沙尖北(SJB)和小口(XK) 3 个采样位点水体富营养化水平明显不同: HGB 已为重度富营养化, SJB 次之, XK 富营养化程度最低。

2.2 多样性指数分析

3 个克隆文库经测序、去除嵌合体序列后共得到 217 个有效序列, 3 个湖区克隆文库的覆盖度为

65.2%–75.4%, 表明文库基本可代表细菌群落结构的组成。多样性分析表明, 3 个文库分别归为 30–44 个 OTU (表 2)。Simpson 指数、均匀度指数(E_H)和代表丰富度的 S_{Chao} 指数均以红圪卜湖区为最高, 小口湖区最低, 而 Shannon 指数则为红圪卜湖区最高, 沙尖北湖区最低。

2.3 细菌类群组成分析

在 80% 的置信度水平上, 以 RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) 对测序所得的 16S rRNA 基因序列进行了分类和文库类群组成分析。结果表明, 3 个文库总共包括 7 个类群(图 2): Actinobacteria, α -、 β -、 γ -、 δ -Proteobacteria, Bacteroidetes 和 Cyanobacteria, 其中 Proteobacteria 和 Bacteroidetes 为优势类群。这 7 个类群于小口湖区中均有存在, 而沙尖北和红圪卜湖区中均只存在 6 个类群, 都缺少 δ -Proteobacteria。Proteobacteria 在 3 个湖区细菌群落中都为第一优势类群, 占克隆数的 46.0%–61.5%, 其中亚类 α -和 β -Proteobacteria 的比例最高, γ -Proteobacteria 次之, δ -Proteobacteria 最少。但 Proteobacteria 各亚类在不同湖区所占比例有所不同: α -Proteobacteria 菌群在克隆文库中所占比例随着 3 个采样点富营养化程度的升高呈增加趋势(14.0%–36.8%); β -Proteobacteria 则随着

表1 乌梁素海各湖区水体环境参数
Table 1 Aquatic parameters of Lake ULanSuHai areas

Site	TN (mg/L)	TP (mg/L)	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	COD (mg/L)	Chl a (μ g/L)	pH	Water depth (m)
XK	1.48	0.069	0.45	0.090	66.7	42.6	8.75	0.75
SJB	2.20	0.153	0.76	0.093	66.8	58.4	8.30	1.20
HGB	4.87	0.247	0.84	0.158	87.5	44.3	8.22	0.70

表2 乌梁素海浮游细菌 16S rRNA 基因克隆文库的多样性指数
Table 2 Diversity indexes of 16S rRNA libraries of bacterioplankton in Lake ULanSuHai

Clone library	OTU	Coverage (C, %)	Shannon-Weiner (S)	Simpson	Evenness (E_H)	S_{Chao}
XK	33	71.3	2.28	0.28	0.839	71.6
SJB	30	75.4	2.21	0.23	0.893	70.0
HGB	44	65.2	2.79	0.35	0.914	138.0

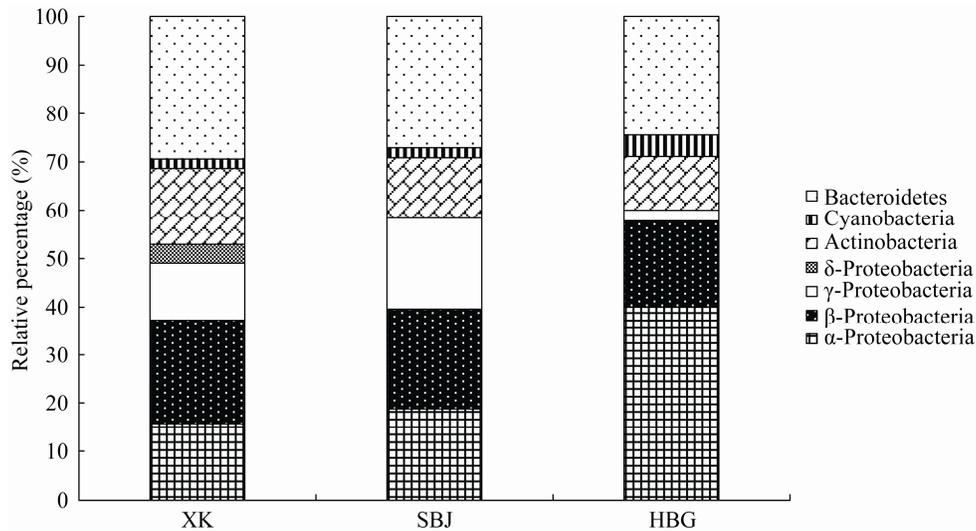


图2 乌梁素海浮游细菌群落组成

Figure 2 Bacterial community in Lake ULanSuHai

3个采样点富营养化程度的升高逐渐减少(22.8%–27.5%); δ -Proteobacteria仅出现在富营养化程度最低的小口湖区; γ -Proteobacteria在小口和沙尖北湖区较丰富,而在富营养化程度最重的红圪卜湖区中很少。Bacteroidetes在小口及沙尖北湖区均为第二优势菌群,在红圪卜湖区略低于第二优势类群—— β -Proteobacteria。而Cyanobacteria则在3个湖区内均为劣势菌群。

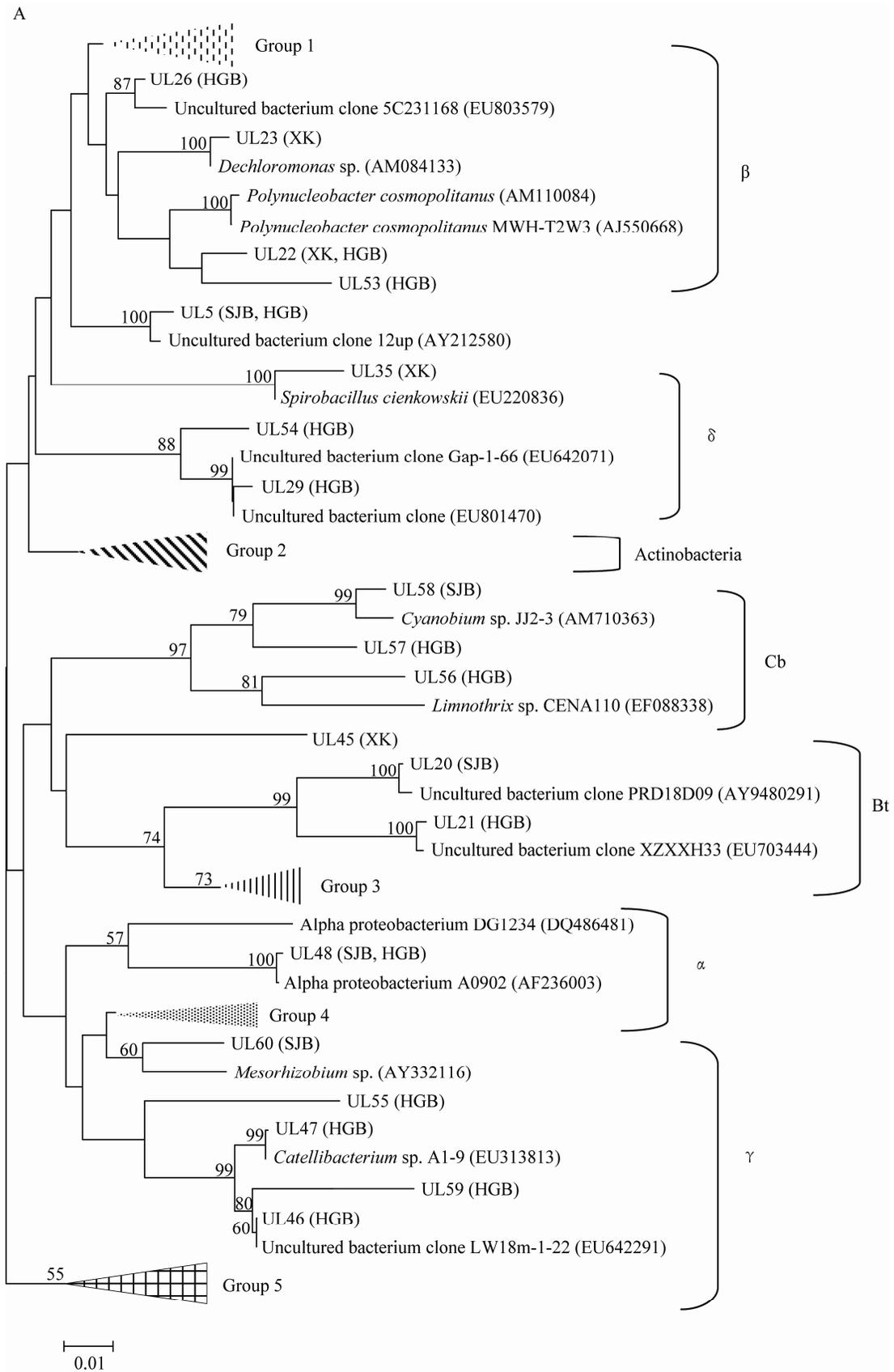
2.4 系统进化发育分析

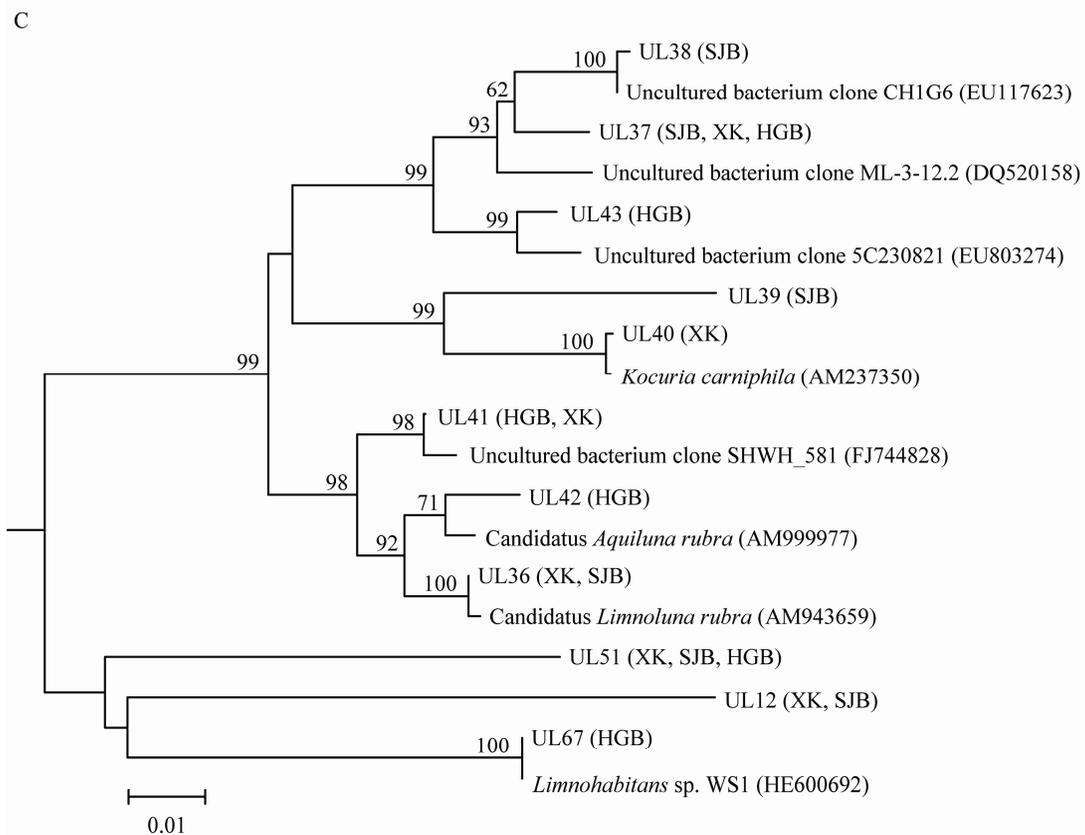
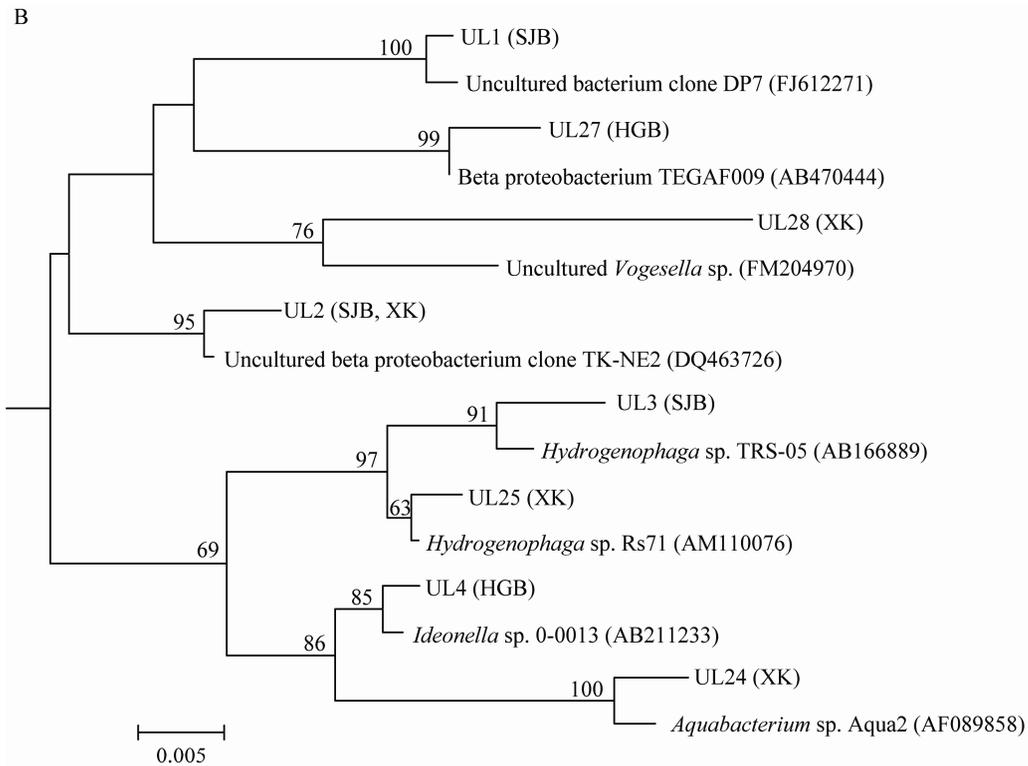
3个克隆文库共217条16S rRNA基因序列以97%截止值划分为76个操作分类单元(OTU)。系统发育分析结果(图3)表明:乌梁素海小口湖区33个OTU中,有19个OTU与GenBank中的未培养细菌同源性最高(90%–100%),而与已培养菌的同源性均低于85%;其余14个OTU与可培养菌属的同源性最高(96%–100%)。其中UL10(6个克隆)、25(4个克隆)、32(3个克隆)、34(3个克隆),分别与*Rheinheimera* sp. GR5、*Acinetobacter* sp. DG11、*Spirobacillus cienkowskii*和*Hydrogenophaga* sp. DG1192等具有参与水体N和P代谢^[13]、降解多环芳烃^[14]及对氨基苯磺酸^[15]等功能的菌属同源。它们占有该文库近20%的比例。

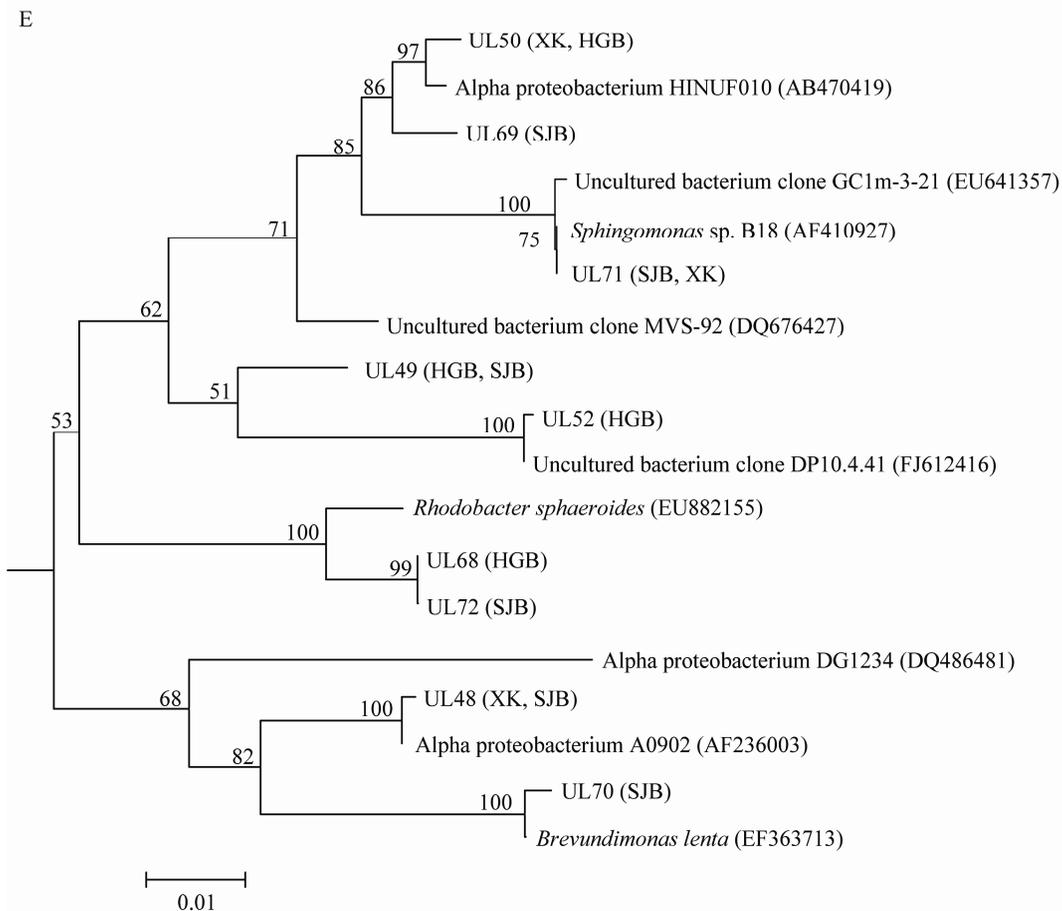
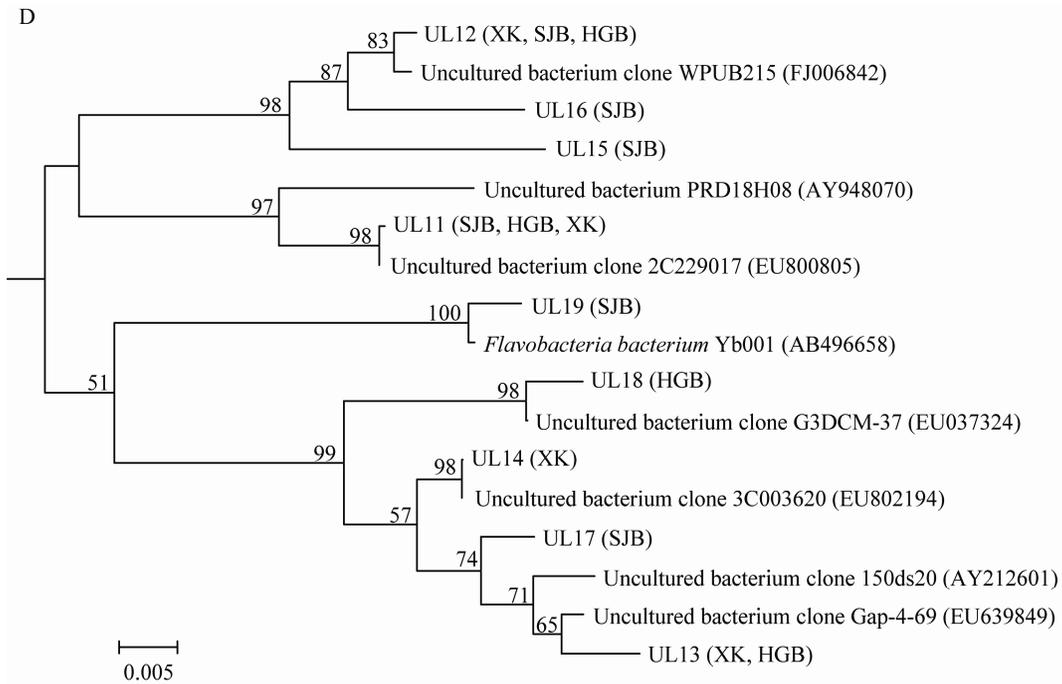
沙尖北湖区的30个OTU中,16个与GenBank中

已有的未培养细菌相似性最高(93%–100%),其余14个OTU与已培养细菌的相似性最高(94%–100%)。该湖区包含有15个独有OTU,UL3(4个克隆)、6(3个克隆)分别与有着降解芳香族物质能力的*Hydrogenophaga* sp.及*Hydrocarboniphaga* sp.等菌属最同源;UL19(3个克隆)、38(2个克隆)则分别与富营养环境中分到的*Flavobacteria bacterium*和*Corynebacterium accolens*相近。

红圪卜湖区的44个OTU中的28个OTU与GenBank中已有的未培养细菌同源性最高(92%–100%)其余16个OTU与已培养细菌的相似性最高(93%–99%)。多样性最高的红圪卜湖区中包含有17个独有的OTU。其中UL4与*Ideonella* sp. 0-0013最相似(99%),该菌属有着参与N循环的能力^[16];UL33与能够参与芳香族物质降解功能的*Pseudomonas* sp. KM-B4有98%的相似性,UL47代表的6个克隆与具有降解农药等污染物能力^[17]的*Catellibacterium* sp. A1-9相近(95%),该菌在红圪卜湖区文库中占有近10%的比例;UL56(3个克隆)及UL67(2个克隆)分别与*Limnothrix* sp. CENA110相近(97%)和*Limnohabitans* sp. WS1HE近缘,该菌属为专性需氧异养菌,通过氧化硫代硫酸盐为硫酸盐来进行化能异养,可能会对水体的硫循环起重要作用^[18]。







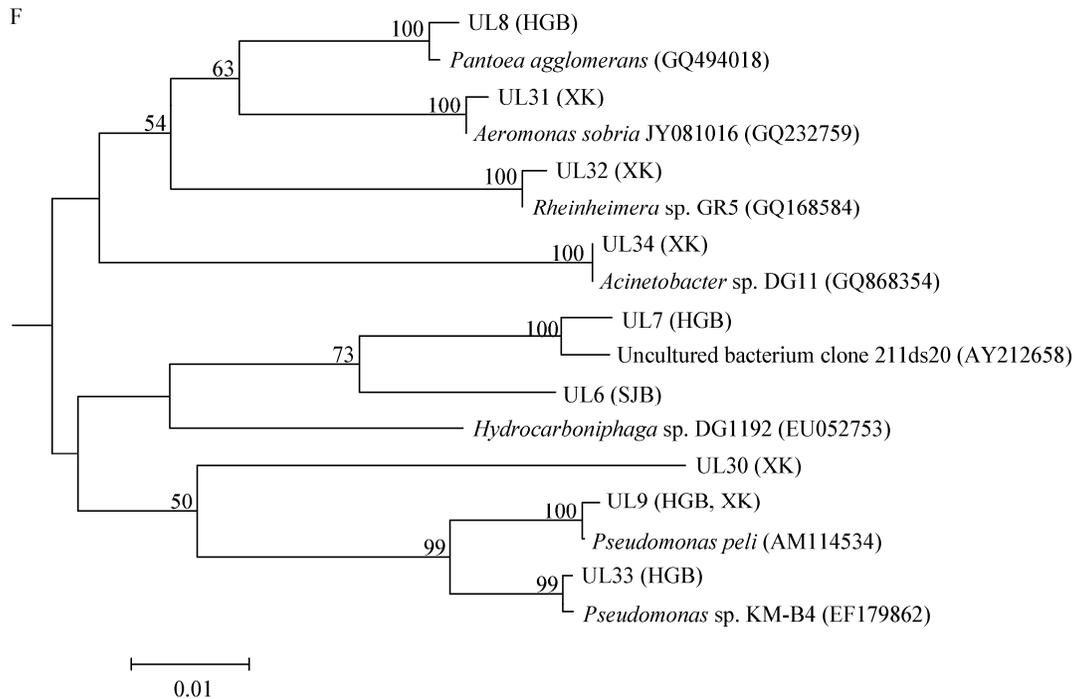


图3 乌梁素海浮游细菌16S rRNA系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from bacterioplankton in Lake UlanSuhai

注：图A中的 α 、 β 、 γ 、 δ 和Bt、Cb分别代表 α -、 β -、 γ -、 δ -Proteobacteria和Bacteroidetes、Cyanobacteria。自展值计算用N-J法经过1000次重排，计算值在50%以上的标记在相应的分支点上，进化距离标尺长度0.01和0.05分别代表每100个核苷酸中有1个和5个产生变异。

Note: A: All sequences; B to F: Group 1–5. In A, α , β , γ , δ , Bt and Cb are α -, β -, γ -, δ -proteobacteria, Bacteroidetes and Cyanobacteria, respectively. Numbers at the nodes indicates the levels of bootstrap support with at least 50%, and based on Neighbor-Joining analysis of 1000 resampled datasets. In the parenthesis are the abbreviations of sites from which the OTU was originated.

此外，UL11、12、37、46及51这5个OTU在3个文库内占有约24%的比例，为3个湖区内共有的菌属，应该是乌梁素海水体内的稳定类群。UL11与淡水中模式菌 *Fluviicola taffensis* DSM^[19]最相近，而UL51所代表的5个克隆与放线菌中的典型菌属 *Candidatus Limnoluna rubra*^[20]近源，其余OTU则均与淡水环境中的不可培养菌最为相近。

2.5 浮游细菌与环境因子关系的CCA相关性分析

运用典型对应分析(CCA)分析了浮游细菌群落结构组成与环境理化参数之间的关系，结果(图4)表明：TN、 NH_4^+ 、 NO_3^- 和COD等水体指标对

细菌群落结构组成的影响最大；相比之下，其它环境参数与细菌群落结构的关联作用较小。第一方向轴上，在区域A中 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria和Cyanobacteria等菌群与水体TN、TP和 NO_3^- -N呈显著正相关，关联度分别为0.86、0.91和0.94；与COD、 NH_4^+ -N和Chl *a*的关联度则较低，分别为0.71、0.64和0.21；与pH则呈负相关。第二方向轴上，区域B中如 β -Proteobacteria、 δ -Proteobacteria、Actinobacteria、和Bacteroidetes等菌群与Chl *a*，COD和 NH_4^+ 等指标呈正相关，与COD、TN、TP等指标关联度较低(<0.4)，与pH及 NO_3^- -N则呈负相关。

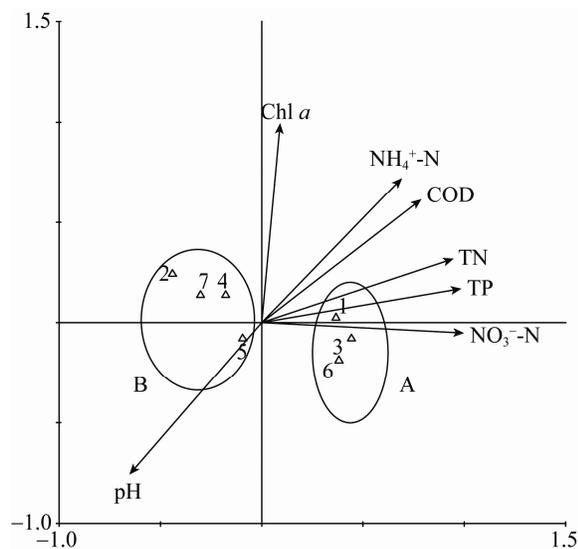


图4 水体微生物群落组成与环境因子相互关系的典型对应分析

Figure 4 Canoco corresponding analysis on relationship between water microbial composition an environmental paparameter

Note: 1: α -Proteobacteria; 2: β -Proteobacteria; 3: γ -Proteobacteria; 4: δ -Proteobacteria; 5: Actinobacteria; 6: Cyanobacteria; 7: Bacteroidetes. A, B indicated the labeled area respectively.

3 讨论

本研究中，乌梁素海是典型的草型湖泊^[8]，其 Chl *a* 浓度较低，且并未与富营养化程度呈现正相关性，说明其中微型藻类较少。另外，尽管在测定盐度时，盐度计读数为0‰，但乌梁素海水体确实存在盐碱化的趋势^[7]；而大量农田退水则会对乌梁素海水体造成农药污染。这些水质特点有别于典型的富营养化淡水湖泊如太湖等，预示了乌梁素海水体中微生物群落的特殊性。

本研究基于构建16S rRNA基因克隆文库的方法分析乌梁素海中不同富营养化程度湖区的浮游细菌群落结构组成。乌梁素海红圪卜湖区(HGB)富营养化程度最高，沙尖北(SJB)次之，小口(XK)最低； S_{Chao} 值、Shannon-Weiner指数及Evenness指数反映出红圪卜湖区浮游细菌多样性最高，分布最均匀。相较之下，红圪卜湖区浮游细菌多样性(S_{Chao} 值)高于同季节的(夏天，较高的温度)美国Lanier湖^[21]

与博斯腾湖^[22]，也高于低温季节的太湖^[2]，但低于同季节的太湖^[2]。这可能与温度是控制细菌多样性的主要因素有关^[23]。

呈弱咸水性的博斯腾湖中以 β -Proteobacteria类群为最多^[22]，而太湖以Actinobacteria类群为主^[4]，这是除Bacteroidetes外的另外两类典型的淡水湖泊细菌类群^[24]。乌梁素海中以 α -Proteobacteria为主(平均24.3%)，同时含有较高比例的 γ -Proteobacteria，这二者、特别是后者一般在典型淡水中相对较少。系统发育分析表明，乌梁素海盐度虽极低，但与盐碱环境中最近缘的16S rRNA序列的比例平均高达9.6%，例如有近缘的轻度嗜盐碱细菌如*Cyanobium* sp.、*Thioalkalispira* sp.、*Microaerophila* sp.、*Syntrophobacter* sp.、*Geosporobacter subterrenus*等，这是明显区别于其它典型淡水湖泊水体的独特的细菌群落特点。

Blanc等^[25]曾提出营养水平是影响微生物群落结构的重要因素之一。本研究表明，乌梁素海浮游细菌中的 α -Proteobacteria随富营养化程度提高而在总细菌中所占比例升高， γ -Proteobacteria类群在HGB中最少、在SJB和XK中的丰度相近，而其他类群如 β -Proteobacteria、Actinobacteria和Bacteroidetes的丰度在富营养化程度不同的3个湖区差异不很明显。但是，乌梁素海浮游细菌类群丰度随营养程度的变化与太湖和博斯腾湖等随营养盐变化趋势存在很大的差异， β -和 γ -Proteobacteria在后面的这些湖泊中的丰度会随营养盐水平升高而升高^[4,22]。而有趣的是，乌梁素海中 δ -Proteobacteria仅在营养水平最低的小口湖区中检测到，该类群可能耐受富营养化程度较低，其丰度的减少或甚至消失或可指示水体的富营养化污染程度加重。同时CCA分析也表明， α -Proteobacteria和Cyanobacteria的细菌数量会随营养水平升高而增加，可能是对营养水平的一种响应。此外，pH被认为是影响水体菌群结构的重要因素之一^[12,23]。本研究中，CCA分析表明各类群均与pH呈负相关。有研究^[26]指出，在营养水平较低的湖泊中Actinobacteria

在浮游细菌中占有很大的比例(约60%),而本研究中Actinobacteria在3个位点中随着富营养化程度提升呈现略微下降趋势,说明该类群与营养水平存在负关联、但关联度不大。Cyanobacteria光合自养,分布极为广泛:Eiler等^[27]的研究发现,在较低营养水平的淡水湖中Cyanobacteria的比例>40%,也常是如滇池等富营养化淡水湖泊水华的元凶^[28]。而Cyanobacteria在乌梁素海中为劣势类群,这可能与该类群在水上植物-芦苇茂盛以及较强碱性水环境中生长受到抑制有关。

Sun等^[29]在对现有细菌和古生菌基因组中16S rRNA基因数据分析后指出,该基因存在基因组内异质性,以致基于该基因进行的微生物生态研究会高估环境中原核生物的多样性,尤其是针对该基因V6区或对细菌的Firmicutes类群和来自极端环境中的微生物,如嗜热和嗜盐菌分析时偏差可能会较大。本研究中所分析的乌梁素海在盐碱性上虽略高于典型的淡水湖,但仍属于淡水湖泊,其微生物组成也与淡水湖泊的更为相似。我们所分析的16S RNA基因片段为V1-V5区(小部分V1区),并不包括V6区。因此,本研究的估计可能会高于乌梁素海细菌真实的多样性,但推测并不会高太多(<5%),因此认为乌梁素海中具有较高的细菌多样性。此外,本研究的3个细菌16S rRNA基因克隆文库中平均有近80%的细菌与已培养菌的序列相似性皆低于93%,都为不可培养菌;甚至有近20%的细菌未能在科的水平上进行分类。这意味着乌梁素海水体中很多未知细菌是需要挖掘的新菌种,是一个潜在的新菌种资源宝库,其功能与特性需要进一步分析研究。

参 考 文 献

- [1] Moss B. Ecology of Fresh Waters: Man and Medium, Past to Future[M]. Oxford: Black well Scientific Publications, 1998.
- [2] Wu X, Xi WY, Ye WJ, et al. Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 61: 85-96.
- [3] Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, et al. Comparative analysis of bacteria diversity in freshwater sediment of a

- shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71: 2162-2169.
- [4] 吴鑫. DGGE 指纹图谱分析太湖富营养化水体中细菌群落结构的变化[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2007.
- [5] Zeng J, Bian YQ, Xing P, et al. Macrophyte species drive the variation of bacterioplankton community composition in a shallow freshwater lake[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(1): 177-184.
- [6] Van der Gucht K, Conttenie K, Muylaert K, et al. The power of species sorting: local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial range[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(51): 20404-20409.
- [7] 孙鑫鑫, 刘慧荣, 冯福应, 等. 乌梁素海富营养化湖区浮游细菌多样性及系统发育分析[J]. 生物多样性, 2009, 17(5): 490-498.
- [8] 杨志岩, 李畅游, 张生, 等. 内蒙古乌梁素海叶绿素 a 浓度时空分布及其与氮、磷浓度关系[J]. 湖泊科学, 2009, 21(3): 429-433.
- [9] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [10] Boström KH, Simu K, Hagström A. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis[J]. Limnology and Oceanography: Methods, 1998, 2: 365-373.
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular and Biological Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [12] Hill TJ, Walsh KA, Harris JA, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43: 1-11.
- [13] Rodrigues JL, Duffy MA, Tessier AJ. Phylogenetic characterization and prevalence of *Spirobacillus cienkowskii*, a red-pigmented, spiral-shaped bacterial pathogen of freshwater Daphnia species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1575-1582.
- [14] Romine MF, Stillwell LC. Complete sequence of a 184-Kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(5): 1585-1602.
- [15] Gan HM, Shahir S, Ibrahim Z, et al. Biodegradation of 4-aminobenzenesulfonate by *Ralstonia* sp. PBA and *Hydrogenophaga* sp. PBC isolated from textile wastewater treatment plant[J]. Chemosphere, 2011, 82(4): 507-513.
- [16] Coelho MRR, De Vos M, Carneiro NP, et al. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 279(1): 15-22.
- [17] Zhang J, Chen SA, Zheng JW, et al. *Catellibacterium*

- nanjingense* sp. nov., a propanil-degrading bacterium isolated from activated sludge, and emended description of the genus *Catellibacterium*[J]. International Journal of Systematic Evolution Microbiology, 2012, 62(3): 495-499.
- [18] Spring T, Kampf P. *Limnobacter thiooxidans* gen. nov. sp. nov., a novel thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from freshwater lake sediment[J]. International Journal of Systematic Evolution Microbiology, 2001, 51: 1463-1470.
- [19] O'Sullivan LA, Rinna J, Humphreys G, et al. *Fluviicola taffensis* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater bacterium of the family Cryomorphaceae in the phylum 'Bacteroidetes'[J]. International Journal of Systematic Evolution Microbiology, 2005, 55(5): 2189-2194.
- [20] Hahn WM. Description of seven candidate species affiliated with the phylum *Actinobacteria*, representing planktonic freshwater bacteria[J]. International Journal of Systematic Evolution Microbiology, 2009, 59(1): 112-117.
- [21] Oh S, Caro QA, Tsementzi D, et al. Metagenomic insights into the evolution, function, and complexity of the planktonic microbial community of Lake Lanier, a temperate freshwater ecosystem[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(17): 6000-6011.
- [22] 谢贵娟. 博斯腾湖细菌群落结构的时空异质性及其影响因素[M]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2012.
- [23] Lindström ES, Agterveld MP, Zwart G. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71: 8201-8206.
- [24] Newton RJ, Jones SE, Eiler A, et al. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria[J]. Microbiology Molecular Biology Review, 2011, 75(1): 14-49.
- [25] Blanc C, Sy M, Djigal D, et al. Nutrition on bacteria by bacterial-feeding nematodes and consequences on the structure of soil bacterial community[J]. European Journal of Soil Biology, 2006, 42(1): 70-78.
- [26] Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, et al. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA sequences from plankton of lakes and rivers[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2002, 28: 141-155.
- [27] Eiler A, Bertilsson S. Composition of freshwater bacterial communities associated with Cyanobacterial blooms in four Swedish lakes[J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(12): 1228-1243.
- [28] 谢国清, 李蒙, 鲁韦坤, 等. 滇池蓝藻水华光谱特征、遥感识别及爆发的气象条件[J]. 湖泊科学, 2010, 22: 327-336.
- [29] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity in 16S rRNA causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied Environmental Microbiology, 2013, 79: 5962-5969.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性，做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进，注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中，只有这样才能真正起到教与学的互动，促进高校生物学教学的发展，更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名课讲堂”版块，邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点，推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台，促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！