

阿哈湖深层水中微生物和硫酸还原菌数量及群落结构空间变化*

王明义^{1,2} 梁小兵^{1**} Tae Seok Ahn³ In Seon Kim³ Jong Hyun Nam³ 魏中青¹ 张伟¹

(¹中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002; ²山东省威海市立医院检验科, 山东威海 264200; ³Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chunchan, 200-701, Korea)

摘要 采用荧光原位杂交法分析了贵州阿哈湖深层水环境中总微生物、真细菌和硫酸盐还原菌数量。结果表明:该湖水中微生物总量为 1.6×10^7 个 $\cdot L^{-1}$, 真细菌占微生物总量的 52.9%, 且微生物总量和真细菌数量垂直变化无明显差异。随着水体深度的增加, 活性微生物数量增加, 且微生物的群落结构更加复杂。阿哈湖深层水体中有一定数量的硫酸盐还原菌存在。

关键词 水环境; 荧光原位杂交; 真细菌; 硫酸盐还原菌; 空间变化

中图分类号 Q938.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2007)11-1898-03

Spatial distribution of microbes and sulfate-reducing bacteria in deep aquatic environment of Aha Lake. WANG Ming-yi^{1,2}, LIANG Xiao-bing¹, Tae Seok Ahn³, In Seon Kim³, Jong Hyun Nam³, WEI Zhong-qing¹, ZHANG Wei¹ (¹State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; ²Department of Clinic, Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, Shandong, China; ³Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chunchan, 200-701, Korea). *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(11):1898-1900.

Abstract: The study with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on the total amount of microbes and that of sulfate-reducing bacterium (SRB) in the deep aquatic environment of Aha Lake in Guizhou Province of China showed that the total amount of microbes in the deep aquatic environment was 1.6×10^7 ind $\cdot L^{-1}$, 52.9% of which were eubacteria. No obvious difference was observed in the vertical distribution of the amounts of total microbes and eubacteria, but the quantity of active microbes was larger and the microbial community was more complex with increasing water depth. There existed a definite amount of SRB in the deep aquatic environment.

Key words: aquatic environment; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); eubacteria; sulfate-reducing bacteria; spatial distribution.

1 引言

淡水湖泊深层水环境是多种微生物共同参与物质交换频繁的重要小生境。淡水湖泊通过营养物质的输入、外界环境条件的改变等来影响深层水环境中微生物数量和群落结构的变化, 同时微生物可以通过同化、异化作用和改变环境条件来影响微量元素的分布、转化, 从而对淡水湖泊水质的变化也有着

重要的影响。近年来随着水质季节性恶化事件的出现(白占国等, 1995; Lovley & John, 2000), 人们逐渐重视水环境微生物在地球化学循环中的作用及由此产生的环境效应(Ledin & Pedersen, 1996; Bernd *et al.*, 2000)。硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)是一类严格厌氧菌, 其在代谢活动中可以利用硫酸盐作为电子受体而产生高浓度的 H_2S 。该类微生物在硫元素的地球化学循环、有机物质降解以及重金属的转化和迁移中起着重要作用(Castro *et al.*, 2000; King *et al.*, 2000; Eileen *et al.*, 2003)。

贵州阿哈湖是一季节性缺氧的中型人工湖, 兼

* 国家自然科学基金项目(40473050, 40173038)和 NSFC/KOSEF 国际合作资助项目(00510502)。

** 通讯作者 E-mail: liangxiaobing@vip.skleg.cn

收稿日期: 2006-12-12 接受日期: 2007-07-17

具蓄水、供水和防洪功能,其集水区域分布有大量的中小煤矿,每年有大量的酸性坑废水排入,水体 Fe、Mn 和硫酸盐异常富集(汪福顺等,2003)。分析阿哈湖深层水环境微生物以及硫酸盐还原菌数量变化,为该湖泊污染治理以及微生物在重金属界面地球化学循环中作用的研究,提供相关生物学信息。

2 材料方法

2.1 样品采集

于2006年6月使用Niskin采样器,从18 m深度开始按1 m间距采集贵州阿哈湖水深22 m处的深层湖水,共采集5个样品(编号为Aha06101—Aha06105),样品立即用4%多聚甲醛进行固定。

2.2 主要试剂和仪器

多聚甲醛(Sigma,美国);明胶(Oxiod,美国);丫啶橙(Sigma,美国);DAPI(Sigma,美国);荧光显微镜(Olympus,日本)。

2.3 荧光探针

采用EUB338和SRB385寡核苷酸探针,5'端Cy3标记(表1)(Enric *et al.*,1998),由上海生物工程技术有限公司合成。

表1 16S rRNA 探针的靶细菌种属和探针序列
Tab.1 Target site and sequence of 16S rRNA probes

探针名称	序列(5' - 3')	检测的微生物
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	真细菌
SRB385	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	δ群 <i>Proteobacteria</i> 的硫酸盐还原菌

2.4 荧光原位杂交法对阿哈湖深层水环境总微生物、真细菌和硫酸盐还原菌数量的分析

2.4.1 样品预处理 取1 ml样品用直径25 mm GTP滤膜过滤后,1 ml PBS洗涤3次后,0.5 ml 50%,80%和99.5%乙醇分别洗涤,每次3 min,风干。

2.4.2 原位杂交 湿盒中适量加入杂交缓冲液(EUB探针杂交缓冲液0.9 mol·L⁻¹ NaCl,20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,0.01% SDS,20% formamide;SRB探针杂交缓冲液0.9 mol·L⁻¹ NaCl,20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,0.01% SDS,35% 甲酰胺),将包被有明胶的玻璃片放于湿盒中,膜放于玻璃片上。25 ng·μl⁻¹探针4 μl和杂交缓冲液20 ul混匀后,滴加于膜上,38℃ 90 min;取出膜放入洗涤液中50℃ 20 min(EUB探针洗涤液0.18 mol·L⁻¹ NaCl,20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,0.01% SDS,5 mmol·L⁻¹ EDTA;SRB探针洗涤液0.40 mol·L⁻¹ NaCl,20 mmol·L⁻¹ Tris-

HCl,0.01% SDS,5 mmol·L⁻¹ EDTA),水洗膜,风干;0.01 mg·ml⁻¹的DAPI 40 μl复染,避光15 min,水洗,风干。

2.4.3 镜检 将膜放于油镜下观察。在EUB探针和SRB探针杂交的实验中,采用WG滤光片,计数发红色荧光的菌体分别为真细菌和硫酸盐还原菌数目;采用WU滤光片,计数发蓝色荧光的菌体即为总微生物数。每个样品均平行分析3次,取均值。

2.5 丫啶橙染色对湖水微生物活性的测定

取1 ml样品加入3滴0.1%丫啶橙溶液,染色3 min,苏丹黑B染色的直径0.2 μm滤膜过滤,水洗1次,风干。Olympus油镜下计数,滤光片为WB。丫啶橙与DNA结合后菌体发绿色荧光,和RNA结合后菌体发红色荧光。观察菌体为黄色或红色示该细菌为活性状态,而绿色为非活性状态,分析样品中活性微生物所占数量。每个样品均平行分析3次,取均值。

3 结果与分析

3.1 湖水中微生物总量和真细菌数量变化

图1~图2表明,阿哈湖从18~22 m深层湖水中微生物总数(1.43~1.91)×10⁷个·ml⁻¹,平均为1.60×10⁷个·ml⁻¹,随水深垂直变化不明显。真细菌数量(8.38~8.61)×10⁶个·ml⁻¹,平均为8.47×10⁶个·ml⁻¹,垂直变化亦不明显,真细菌占微生物总量的52.9%。

3.2 不同深度湖水中硫酸盐还原菌数量变化及其形态特征

阿哈湖18和19 m深度湖水中未检出硫酸盐还原菌,20 m深度开始有检出(3.14×10²个·ml⁻¹),且硫酸盐还原菌数量垂直变化明显,即随着水体深度的增加而数量增高,至22 m深度硫酸盐还原菌数

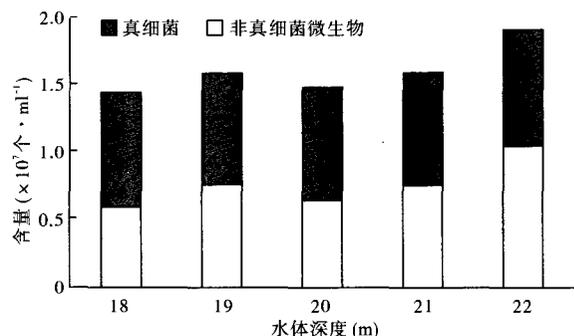


图1 阿哈湖深层水环境总微生物和真细菌数量
Fig.1 Quantity of microbes and bacteria in the deep aquatic environment of Aha Lake

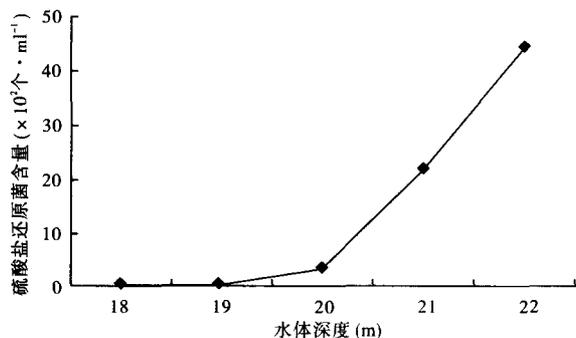


图2 阿哈湖深层水环境硫酸盐还原菌数量

Fig. 2 Quantity of SRB in the deep aquatic environment of Aha Lake

量可达 4.40×10^3 个 $\cdot \text{ml}^{-1}$ (图2)。镜下硫酸盐还原菌形态以球菌和球杆菌为主,且可见一定数量的螺形菌。

3.3 不同深度湖水中活性微生物的变化规律

阿哈湖浅层水环境中活性微生物数量较低,18 m 深度时活性微生物只占总微生物的 7.3%,且主要以球菌和杆菌为主;随着水体深度增加而活性微生物数量增高,至 22 m 深度时可达 83.2%,并出现了球菌、杆菌、弧菌和螺菌等多种形态(表2)。

表2 阿哈湖深层水环境活性微生物的百分数量(%)

Tab. 2 Active microbes in the deep aquatic environment of Aha Lake

水体深度 (m)	活性微生物
18	27.3
19	57.5
20	75.2
21	80.5
22	83.2

4 讨论

微生物在湖泊环境污染物质迁移转化以及微生物的地球化学循环中,实际上就是微生物通过生理活动过程与外界环境发生的相互作用来实现的。且不同的微生物在生理活动过程中会利用不同的微量金属元素(比如 Ca, V, Cr, Mn 等)作为必需元素,以完成自身的生理功能。在湖泊环境污染物质防治和微生物的地球化学行为研究中,除了分析湖泊水环境中微生物数量,对于微生物群落结构和活性探讨也有着重要的意义。通过荧光原位杂交分析贵州阿哈湖深层水环境的微生物,发现阿哈湖深层水环境中微生物数量和群落结构有着一定的规律:即阿哈湖深层水环境中微生物数量的较高(平均 10^7 个 $\cdot \text{ml}^{-1}$),且主要以真细菌为主,但同时存在一定量的其他微生物。表明,该环境微生物群落结构复杂,可

能存在一定数量的真核微生物和古生菌;尽管该环境中微生物和真细菌数量的垂直变化不明显,但随着深层的增加水体中活性微生物增多,同时深层水体中微生物的多形性更加明显,群落结构更加复杂。

硫酸盐还原菌数量是一类具有重要生态学意义的微生物,传统的观点认为该类微生物是严格的厌氧菌,故对湖泊中该类微生物的研究多集中在沉积物中(Enric *et al.*, 1998;高爱国等,2003)。有研究表明,湖泊深层水环境中存在一定数量的硫酸盐还原菌,但低于湖泊沉积物中该类微生物的数量(汪福顺等,2003)。且该类微生物有着明显的垂直变化,即随着水体深度的增加而数量增多。认为这主要与水环境和沉积物中含氧量、有机质和温度等环境因素的差异有关。此外,阿哈湖深层水环境中硫酸盐还原菌的类群多样性也较丰富,除了有球菌和球杆菌外,还有一定的螺菌存在,这与对该湖泊沉积物硫酸盐还原菌类群分析结果相一致。

参考文献

- 白占国, 吴丰昌, 万曦, 等. 1995. 百花湖季节性水质恶化机理研究. *重庆环境科学*, **17**(3): 10-14.
- 高爱国, 陈皓文, 孙海青. 2003. 北极沉积物中硫酸盐还原菌与生物地球化学要素的相关分析. *环境科学*, **23**(5): 619-624.
- 汪福顺, 刘丛强, 梁小兵, 等. 2003. 阿哈湖沉积物-水界面硫酸盐还原作用的微生物及其同位素研究. *第四纪研究*, **23**(5): 582.
- Bernd UN, Nowack GF, Rainer S. 2000. Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B. *Environmental Science and Technology*, **34**(13): 2749-2755.
- Castro HF, Williams NH, Ogram A. 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **31**: 1-9.
- Eileen BE, Francois MMM, Janina MB. 2003. Mercury methylation independent of the acetyl-coenzyme A pathway in sulfate-reducing bacteria. *Applied & Environmental Microbiology*, **69**: 5414-5422.
- Enric LB, Ramon RM, Amann RI. 1998. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Applied & Environmental Microbiology*, **64**(7): 2691-2696.
- King JK, Kostka JE, Frischer ME, *et al.* 2000. Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. *Applied & Environmental Microbiology*, **66**: 2430-2437.
- Ledin M, Pedersen K. 1996. The environmental impact of mine wastes-Roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. *Earth Science Reviews*, **41**: 67-108.
- Lovley DK, Coates JD. 2000. Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. *Current Opinion in Microbiology*, **3**: 252-256.

作者简介 王明义,男,1973年12月生,硕士研究生,主管检验师。研究方向为微生物分子生物学。E-mail: mingyi_wang@hotmail.com
责任编辑 王伟