

云南洱海沉积物中硫酸盐还原菌的时空分布特征

张 伟^{1,2},张丽丽^{2,3}

(1. 贵州师范学院 地理与旅游学院,贵阳 550018; 2. 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 550081; 3. 中国科学院大学,北京 100049)

摘 要: 利用 PCR 扩增和荧光原位杂交方法分析了云南洱海沉积物中硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB) 类群和数量的时空分布特征。结果表明 秋季沉积物中检测出四个 SRB 类群(脱硫肠菌属、脱硫叶菌属、脱硫球菌属-脱硫线菌属-脱硫八叠菌属和脱硫弧菌属-脱硫微菌属) ,而春季沉积物中只检测出三个类群(脱硫肠菌属、脱硫叶菌属和脱硫球菌属-脱硫线菌属-脱硫八叠菌属)。相比春季 秋季沉积物检测出来的 SRB 类群具有更大的分布范围,同时,检测出的 SRB 类群主要分布在沉积物上部;从数量上来看 秋季沉积物 SRB 数量高于春季沉积物。上述结果指示秋季沉积物环境条件更适于 SRB 群落。此外 相比洱海秋季,洱海春季沉积环境溶解氧含量较高,且温度较低,这可能导致脱硫弧菌属-脱硫微菌属在洱海春季沉积物中处于不可育状态,由于其活性低而无法检测。

关键词: 硫酸盐还原菌; 时空分布; PCR 扩增; 荧光原位杂交; 洱海

中图分类号: Q178 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-9250(2016)02-0177-08 **doi:** 10.14050/j.cnki.1672-9250.2016.02.005

在过去十几年,由于工业和城市废(污)水的输入,世界范围内许多湖泊都经历了明显的水质退化过程,表现为从贫营养水平向中营养或富营养水平转变^[1]。近年来,云南洱海湖泊水质也有明显的退化趋势^[2-3],早在上世纪90年代已引起科学家的关注^[4-5]。洱海水质在1950s属于贫营养水平,1992年至2001年期间保持在中营养水平,目前处于中营养向富营养湖泊的过渡阶段^[6-7]。营养盐污染负荷增加引起了洱海藻类数量的急剧增加,2013年洱海全湖藻类均值达到 1.3×10^7 cells/L,比1992年藻类数量增加了12.3倍^[8-9]。研究表明,营养盐输入水平的增加和水体富营养化将导致湖泊水体趋向于还原环境^[10],这可能刺激湖泊的硫酸盐还原过程,进而影响湖泊碳、氮、磷、铁等元素的循环^[11]。磷通常是限制湖泊第一生产力的一个关键因素,富营养化湖泊沉积物中硫酸盐还原与磷释放的关系已引起学者的关注^[12-13]。但目前来看,硫酸盐还原与湖泊富营养化之间的内在联系还有待深入理解。例如,富营养化可能改变湖泊底栖微生物群落组成,但对硫酸盐还原以及沉积物中硫化物积累过程的影响还不清楚;此外,考虑到硫化物的毒性可能抑

制底栖生物的群落重建,硫酸盐还原及随后的硫化物积累对富营养化湖泊恢复的重要性还有待系统评估^[1,11]。

硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)是一大类厌氧菌,不同的SRB类群具有不同的生理生化和系统发育特征^[14]。由于这些生理生化和系统发育的多样性,SRB栖息于不同的环境介质,其驱动的硫酸盐异化还原对碳和硫的耦合循环起着重要作用^[15]。另外,硫酸盐还原反应伴随有机质降解,这能降低环境的酸度,并且生成的硫化物可以和溶解态金属离子结合形成不溶性金属沉淀,所以SRB在受营养盐和重金属污染的水体和沉积环境的生物修复方面也发挥重要作用^[16-21]。然而,SRB分布受环境因子如 SO_4^{2-} 浓度、有机质含量、温度、溶解氧水平以及局部小生境微生物群落组成的影响^[22],因此,要探究硫酸盐还原过程与湖泊水质变化之间的内在联系,有必要分析SRB的时空分布情况。本文利用PCR扩增和荧光原位杂交技术(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)分析了云南洱海沉积物中SRB的类群和数量的时空分布特征。

收稿日期: 2015-07-06; 改回日期: 2015-09-07

基金项目: 中国博士后基金项目(2015M572503); 贵州省自然科学基金(黔科合J字[2014]2135); 贵州师范学院博士基金项目(13BS023)。

第一作者简介: 张伟(1980-),男,博士,副教授,主要研究方向为环境地球化学。E-mail: zhangwei8086@163.com。

1 材料与方法

1.1 研究区和样品采集

洱海(25°35′~25°58′N, 100°05′~100°17′E)是云贵高原上最大的断陷湖,洱海湖区受亚热带季风气候控制,多年平均降水量为1 060 mm,年均温15℃。洱海流域面积为2 656 km²,平均水深10.5 m,最大水深20.9 m。流域岩石以沉积岩和变质岩为主,主要是碳酸盐岩类、砂岩类和片麻岩类^[23]。受碳酸盐岩和亚热带季风气候控制的影响,洱海湖水呈弱碱性(pH 8.0~8.5),盐度较低,主要阳离子浓度排序为Ca²⁺>Mg²⁺>Na⁺>K⁺,主要阴离子浓度排序为HCO₃⁻≥SO₄²⁻≥Cl⁻。

用重力式无扰动沉积物采样器于2012年4月22日和10月10日在洱海湖心位置(25°48′26.20″N, 100°11′04.34″E)收集春季和秋季洱海沉积物样品^[24](表1),采集的沉积物柱有清晰的沉积物-水界面。沉积物柱上部0.5 cm呈现黄褐色粗颗粒状,代表水体的悬浮层,指示水体颗粒物的悬浮沉积过程,0.5 cm以下有约1.0 cm厚浅灰色的含不规则矿物结核的亚扩散层,再往下至约10 cm深度沉积物呈黑色,其中掺杂一些棕褐色的斑点,11~20 cm深度为灰黄色沉积物,20 cm以下深度以黑色沉积物为主。沉积物柱在6~15 cm深度范围有气泡出现,反映了湖泊沉积环境早期成岩过程中的有机质分解。沉积物柱现场在自制氮气手套箱(持续通N₂)中用灭菌的离心管按1 cm间隔取样,沉积物-水界面的样品也同步收集。

表1 洱海春季和秋季采集的沉积物样品的描述
Table 1 Descriptions of sediment cores collected from Lake Erhai in spring and autumn

样品编号	春季	秋季
采样日期(YY/MM/DD)	12/04/22	12/10/10
水深/m	14	14
沉积物柱长/cm	25	26

1.2 环境参数分析

洱海水体温度、pH值和溶解氧含量用便携式水质参数仪(WTW, pH3210/Cond 3210,德国)现场分析。

1.3 SRB类群的PCR扩增

1.3.1 参考菌株

利用分子生物学方法对SRB的16SrDNA特异

性序列进行分析,可将主要的SRB分为6个类群^[25]:脱硫肠菌属(类群1)(*Desulfotomaculum*, DFM)、脱硫叶菌属(类群2)(*Desulfobulbus*, DBB)、脱硫杆菌属(类群3)(*Desulfobacterium*, DBM)、脱硫细菌属(类群4)(*Desulfobacter*, DSB)、脱硫球菌属-脱硫线菌属-脱硫八叠菌属(类群5)(*Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*, DCC-DNM-DSS)和脱硫弧菌属-脱硫微菌属(类群6)(*Desulfovibrio-Desulfomicrobium*, DSV-DMB)。本研究中将以下菌株作为6个SRB类群的阳性控制菌株,分别为:*Desulfotomaculum nigrificans* NCIMB 8395(类群1);*Desulfobulbus propionicus* DSM 2032(类群2);*Desulfobacterium autotrophicum* DSM 3382(类群3);*Desulfobacter curvatus* DSM 3379(类群4);*Desulfovibrio desulfuricans* DSM 642(类群5);*Desulfosarcina variabilis* DSM 2060(类群6)。大肠杆菌*E. coli* ATCC 8099作为阴性控制菌株^[22]。

1.3.2 DNA提取与纯化

取0.1 g沉积物样品溶解在500 μL灭菌去离子水,于1.5 mL离心管中12 000 rpm离心10 min,弃上清,加入1 000 μL STE(0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA)。随后沉积物DNA用FastDNA SPIN kit(Bio101)试剂盒提取和纯化,用同样的方法提取参考菌株的DNA。提取出来的DNA样本进行含量和纯度分析。将DNA标本用TE稀释100倍,以TE缓冲液作为空白调零,利用紫外-可见分光光度仪测定样品的OD₂₆₀和OD₂₈₀。根据1 OD₂₆₀相当于50 ng/μL DNA计算出各个样品DNA含量,并将其稀释至50 ng/μL。同时计算出OD₂₆₀/OD₂₈₀比值介于1.8~2.0为合格。

1.3.3 PCR扩增

DNA纯化后,用针对6个SRB类群特异性16S rDNA序列设计的引物进行PCR扩增^[25]。采用PCR热启动程序,共包含30个循环(循环条件见表2)。每个PCR反应管(50 μL)包含5 μL 10×PCR缓冲液,5 μL MgCl₂(25 mmol/L),上下游引物各2 μL(10 pmol/μL),4 μL dNTP(2.5 mmol/L),2 μL Taq聚合酶(1 U/μL),4 μL DNA模板(50 ng/μL)和26 μL灭菌去离子水至50 μL。每次PCR均以SRB 6个类群参考菌株DNA提取物为阳性对照,大肠埃希菌(ATCC 8099)DNA提取物为阴性对照。PCR扩增产物用1.5%(w/v)琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像仪中分析并拍照。通过与DNA marker比

表2 6个SRB类群的PCR循环条件

Table 2 The PCR reaction conditions for six SRB groups

硫酸盐 还原菌	预变性		变性		退火		延伸		最后一次延伸	
	温度/℃	时间/min	温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/min
类群1	95	5	95	60	55	60	72	90	72	5
类群2	95	5	95	30	52	30	72	90	72	7
类群3	94	5	94	45	52	40	72	50	72	5
类群4	95	5	95	60	55	60	72	60	72	5
类群5	94	5	94	50	58	45	72	50	72	7
类群6	95	5	95	60	52	60	72	60	72	5

对,以待测样品和阳性对照有特异性目的片段出现,而阴性对照无特异性目的片段出现,判断为待测样品中有该类群SRB存在。

1.4 荧光原位杂交技术分析SRB数量

1.4.1 寡核苷酸探针

本研究中所用的检测SRB的探针为SRB385(序列为:5' CGG CGT CGC TGC GTC AGG 3')^[26],阴性对照探针为NON338(序列为:5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC 3')^[27],同一样品杂交细胞计数结果由SRB385探针计数的信号减去NON338探针计数的信号为最终结果。上述探针由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,采用5'端Cy3标记。

1.4.2 参考菌株

阳性控制菌株为*Desulfobulbus propionicus* DSM 2032,阴性控制菌株为*E. Coli* ATCC 8099。

1.4.3 样品预处理与固定

取0.1 g新鲜沉积物样品加入适量PBS(0.13 mol/L NaCl, 7 mmol/L Na₂HPO₄, 3 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.2)中,漩涡震荡器震荡混匀,10000 rpm离心10 min,弃去上清液,重复2~3次;随后加入适量PBS(pH7.2)稀释至2 g。样品混匀后,取0.1 g均匀涂布于多聚赖氨酸包被的玻片上(每个样品平行制备6张片子),空气干燥20~30 min;4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中室温固定20 min,PBS(pH7.2)洗涤5~10 min,Milli-Q超纯水洗涤5~10 min,空气干燥;湿盒中2 mg/mL溶菌酶32℃处理10 min,PBS(pH7.2)洗涤5~10 min,Milli-Q超纯水洗涤5~10 min,空气干燥;分别用50%、80%和96%乙醇固定3 min,空气干燥。

1.4.4 荧光原位杂交反应与镜检

取27 μL荧光原位杂交缓冲液(0.9 mol/L NaCl 20 mmol/L Tris-HCl 5 mmol/L EDTA 0.01% SDS 25%甲酰胺 pH 7.2)和3 μL探针(25 ng/μL)混匀,并点到样品上,湿盒中46℃杂交2 h;洗涤缓

冲液(54 mmol/L NaCl 20 mmol/L Tris-HCl 0.01% SDS 5 mmol/L EDTA pH 7.2)50℃洗涤30 min,Milli-Q超纯水中漂洗,空气干燥,封片。用Nikon Eclipse 80i落射荧光显微镜进行SRB镜检,计数发红色荧光的菌体为SRB。采用Nikon NIS Elements AR荧光成像分析软件进行拍照和计数。

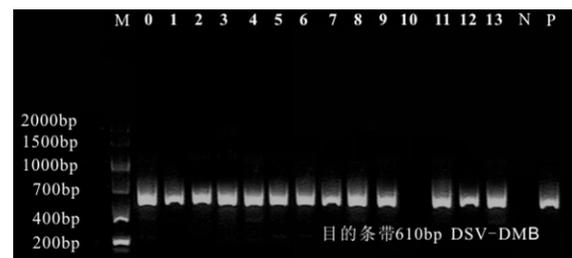
1.4.5 自发荧光

沉积物中有大量的自发荧光物质,波长主要在520~580 nm,自发荧光物质可能是纤维性或颗粒状物,在光学显微镜下无原核生物的菌体形态^[28]。观察时如果怀疑为自发荧光物质,可以根据荧光的颜色和普通光学显微镜下进一步观察发光物的形态来进行鉴别,以减少特异性荧光检测的干扰。

2 结果与讨论

2.1 6个SRB类群的时空分布

从沉积物样品中扩增出4个SRB类群(图1和表3),即脱硫肠菌属、脱硫叶菌属、脱硫球菌属-脱硫线菌属-脱硫八叠菌属和脱硫弧菌属-脱硫微菌属。脱硫杆菌属和脱硫细菌属没有检出。不同的SRB类群有不同的时空分布。脱硫肠菌属主要分布在沉积物中部,脱硫叶菌属主要分布在上层和中



目的条带为610bp, M为DNA标志物, 0~13代表沉积物深度(cm), N代表阴性控制, P代表阳性控制

图1 洱海秋季沉积物样品中脱硫弧菌属-脱硫微菌属的PCR扩增代表图

Fig.1 Representative PCR amplifications for *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* in autumn sediment of Lake Erhai

表3 洱海春季和秋季沉积物中SRB类群的分布

Table 3 Distributions of SRB groups in sediments of Lake Erhai in spring and autumn

深度 /cm	DFM		DBB		DBM		DSB		DCC-DNM-DSS		DSV-DMB	
	春季	秋季	春季	秋季	春季	秋季	春季	秋季	春季	秋季	春季	秋季
0												
1			+	+						+		+
2			+	+						+		+
3			+	+						+		+
4				+					+	+		+
5			+	+					+	+		+
6			+	+					+			+
7			+	+					+	+		+
8		+	+	+						+		+
9		+	+	+					+	+		+
10	+	+	+	+						+		+
11		+		+						+		+
12	+	+	+	+						+		+
13	+	+	+	+								+
14	+	+	+	+						+		+
15	+	+	+							+		
16		+	+	+						+		+
17		+	+	+						+		+
18		+		+						+		+
19				+						+		+
20		+		+								
21										+		+
22										+		+
23										+		+
24												+
25												
26												

注: DFM 代表脱硫肠菌属; DBB 代表脱硫叶菌属; DBM 代表脱硫杆菌属; DSB 代表脱硫细菌属; DCC-DNM-DSS 代表脱硫球菌属-脱硫线菌属-脱硫八叠菌属; DSV-DMB 代表脱硫弧菌属-脱硫微菌属。

层沉积物中,脱硫球菌属-脱硫线菌属-脱硫八叠菌属在春季沉积物样品中主要分布在上层,在秋季沉积物样品中主要分布在上层和下层。脱硫弧菌属-脱硫微菌属在秋季沉积物样品中分布广泛。

本研究洱海沉积物中检测的SRB类群与贵州阿哈湖沉积物中检测的SRB类群具有相似的结果,并且两个湖泊沉积物中每个检测出来的SRB类群的垂直分布也相似^[22]。然而,具有相似地质和气候特征的贵州红枫湖沉积物中SRB类群的检测结果不同于洱海和阿哈湖^[29]。红枫湖沉积物中检测出脱硫杆菌属、脱硫细菌属、脱硫球菌属-脱硫线菌属-脱硫八叠菌属和脱硫弧菌属-脱硫微菌属。洱海沉积物中SRB类群主要分布在20 cm以上深度,而红枫湖沉积物中SRB类群主要分布在7 cm以上深度。

SRB类群及其深度变化与 SO_4^{2-} 浓度和有机碳源类型及其可利用性(作为电子供体)密切相关^[30-31]。红枫湖是贵阳市的饮用水源地,来自工业

和城市废水的污染相对较少,因此 SO_4^{2-} 浓度和有机质含量相对较低^[29]。洱海和阿哈湖受到过量工业和城市废水的污染, SO_4^{2-} 和有机质含量均高于红枫湖^[22]。Icgen and Harrison^[32]发现脱硫弧菌属菌株能够适应的 SO_4^{2-} 和有机质含量范围较大,而脱硫球菌属菌株在有机质含量低而 SO_4^{2-} 浓度不受限制的环境更具竞争优势。据此分析,洱海、阿哈湖和红枫湖沉积物中均检测出脱硫球菌属-脱硫线菌属-脱硫八叠菌属和脱硫弧菌属-脱硫微菌属,指示这两个SRB类群在较大的 SO_4^{2-} 和有机质含量范围中具备更大的竞争优势。另外,洱海和阿哈湖沉积物中这两个SRB类群分布范围更为广泛,指示这两个SRB类群在洱海和阿哈湖沉积物中的活性高于红枫湖。而脱硫杆菌属和脱硫细菌属在低 SO_4^{2-} 含量环境中更具竞争优势^[32],这可能是这两个SRB类群能够在红枫湖沉积物中检测出来的原因之一^[29]。

利用分子生物方法在湖泊环境中分离检测出能够产生孢子的脱硫肠菌属菌株的报道不多^[33]。

研究表明革兰氏阳性的 SRB 可能是地表下产硫细菌群落中占优势的 SRB 类群^[34]。本研究和王明义等^[22]对阿哈湖的研究指示脱硫肠菌属在沉积物厌氧环境中是重要的 SRB 类群。脱硫叶菌属菌株在海洋和淡水沉积物中广泛存在,它们能活跃地利用各种电子受体(如 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 等),降解不同的有机碳源^[35-36]。Okabe 等^[37]研究发现脱硫叶菌属在营养状况复杂的废水生物膜环境 SRB 种群中占据数量上的绝对优势。洱海沉积物中脱硫叶菌属的存在可能与洱海营养状况复杂有关,这又与洱海流域周边工农业和城市废水输入的较高的营养盐负荷有关。Purdy 等^[38]报道了不同的 SRB 类群适应于不同的有机碳源类型,如丙酸盐为电子供体有利于脱硫叶菌属存活,醋酸盐为电子供体则适合脱硫细菌属存活,这说明有机碳源的类型也是影响不同湖泊 SRB 类群分布的重要因素。

从季节分布来看,春季洱海沉积物中主要是脱硫叶菌属,而秋季主要是脱硫叶菌属、脱硫球菌属-脱硫线菌属-脱硫八叠菌属和脱硫弧菌属-脱硫微菌属。此外,秋季沉积物中检测到的 SRB 类群多于春季检测到的 SRB 类群,同时秋季沉积物中每个 SRB 类群的分布范围相比春季更加广泛,这些结果表明洱海秋季沉积环境更适于 SRB 类群生长和繁育。研究表明,自然生境中少于 1% 的总的原核生物数量能够获得纯培养,一个重要的原因是自然生境中很多微生物可以随着环境条件的变化而处于不可育状态^[39],处于该状态的微生物通常无繁殖活性,DNA 含量非常低,类似医学微生物的“可见不可育状态”,其机理还不清楚。据此分析,洱海秋季沉积物样品中检测到了脱硫弧菌属-脱硫微菌属,而春季沉积物样品中没有检出这个类群,指示脱硫弧菌属-脱硫微菌属在春季的沉积环境中可能处于不可育状

态,活性低以致无法检测出来。许多研究表明多数 SRB 是严格厌氧和嗜温的,包括脱硫弧菌属菌株^[22]。从表 4 可以看出,相比洱海秋季,春季沉积物-水界面溶解氧含量高而温度低(表 4),这可能导致脱硫弧菌属-脱硫微菌属在春季沉积环境中为不可育状态而无法检测^[22]。

表 4 洱海春季和秋季水体温度、pH 值和溶解氧含量
Table 4 Temperature, pH and dissolved oxygen of water samples from Lake Erhai

季节	温度/°C	pH 值	溶解氧/(mg/L)
春季	9.81	7.84	10.52
秋季	22.55	8.16	4.15

2.2 荧光原位杂交检测的 SRB 数量

荧光原位杂交 (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) 被广泛的用于分析自然生境中的 SRB 数量^[27,35,40]。本研究沉积物样品中与 SRB385 探针杂交的细胞可见明显的荧光信号,指示样品中丰富的 rRNA 含量。阳性控制菌株可见明显的荧光信号,而阴性控制菌株与 SRB385 探针不发生反应而没有荧光信号(图 2)。

在春季采集的沉积物样品中,SRB 主要分布在 0~20 cm,21~26 cm SRB 数量接近不可检测(图 3)。SRB 数量从不可检测到 18.43×10^4 cells/g 湿土范围之内变化,并且至少有 3 个峰值出现,分别在 3 cm、7 cm 和 11 cm 深度,SRB 数量的最高值出现在 11 cm。比较而言,在秋季采集的沉积物样品中,SRB 主要分布在 0~24 cm,25~26 cm 未检测到 SRB。SRB 数量从不可检测到 27.23×10^4 cells/g 湿土范围之内变化。秋季沉积物样品中 SRB 数量出现 4 个峰值,分别在 3 cm、6 cm、9 cm 和 13 cm 深度,SRB 数量的最高值出现在 9 cm。



a. 阳性控制菌株, b. 阴性控制菌株, c. 沉积物样品

图 2 洱海秋季沉积物样品与 SRB385 探针杂交的 SRB 细胞的荧光原位杂交代表图

Fig.2 Representative FISH analyses of SRB cells hybridized with probe SRB 385

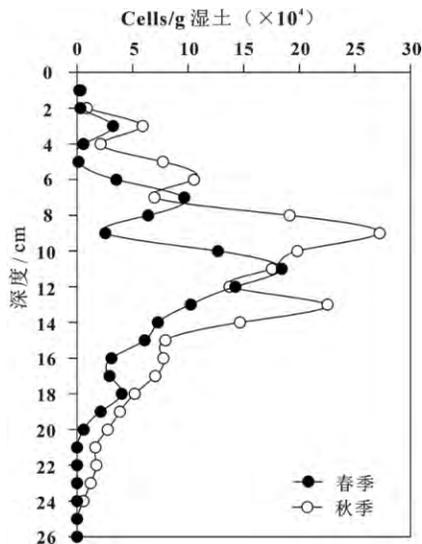


图3 洱海沉积物中SRB数量的时空分布

Fig.3 Vertical and temporal variation of SRB quantities in the sediments of Lake Erhai

沉积物中SRB数量的分布通常出现两个峰值,一个位于沉积物中有氧-缺氧的界面,一个位于沉积物中较深的还原层^[41-42]。Sass等^[43]认为SRB数量的不同峰值的分布可能代表了不同类群,因为从不同沉积深度分离出来的SRB细菌具有不同的基因多样性。基于上述分析,春季沉积物样品的两个明显的峰值(位于7 cm和11 cm)以及秋季的两个明显的峰值(位于6 cm和9 cm)可能反映了沉积物中好氧-缺氧界面和沉积物中较深的还原层位置。此外,秋季沉积物中出现4个峰值,可能对应4个SRB类群,而春季沉积物样品出现3个峰值则对应检测出来的3个SRB类群,这可能与脱硫弧菌属-脱硫微菌属在春季沉积环境中活性低为不可检测状态有关。

整体来看,洱海春季和秋季沉积物中SRB数量

的深度分布具有相似性,0~5 cm深度数量较低,5~13 cm深度SRB数量增加,13 cm以下深度SRB数量逐渐减少。表层沉积物SRB数量低可能与上层沉积物中溶解氧水平较高不利于SRB生存有关。深层沉积物SRB数量的减少可能与较低的有机碳和 SO_4^{2-} 含量有关。沉积物中出现的几个SRB峰值分布在3~13 cm深度范围,并且在沉积物大约6~15 cm深度范围有气泡出现,这说明硫酸盐还原和有机质分解主要发生在15 cm以上的深度范围。

本研究中SRB数量与阿哈湖沉积物SRB数量相当^[22]。洱海秋季沉积物中SRB类群和数量明显高于春季沉积物中SRB类群和数量。洱海沉积物中SRB数量的季节变化与波罗的海海湾沉积物中SRB数量的季节变化基本相符^[44],这可能与湖泊沉积物-水界面环境参数(如温度、溶解氧)的季节性差异有关^[45-46]。如本研究中表4所示,相比春季,秋季沉积物中一些环境参数(较高的温度和较低的溶解氧含量)更适于SRB生长和繁育。另外,SRB数量的最大峰值出现在不同深度,即春季沉积物中出现在11 cm,秋季沉积物中出现在9 cm,这指示沉积物中影响SRB群落变化的因素是复杂的。

3 结论

利用PCR扩增和FISH技术对洱海沉积物中SRB类群和数量的分析显示,SRB类群和数量分布具有明显的季节和垂直深度的差异,这种时空分布的差异可能与一些环境因子(如 SO_4^{2-} 含量、有机碳源种类及其可利用性、溶解氧水平、温度等)的季节和深度变化有关。总体来看,洱海秋季沉积物SRB类群和数量均多于春季沉积物样品,指示秋季沉积环境更适于SRB存活。此外,本研究指示脱硫弧菌属-脱硫微菌属在洱海春季沉积物样品中处于不可育状态,繁殖活性低以致无法检测。

参 考 文 献

- [1] Holmer M, Storkholm P. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review [J]. *Freshwater Biology*, 2001, 46: 431-451.
- [2] 贾丽娟. 洱海北部流域有机固体废物氮磷污染及其控制对策研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2013.
- [3] 杨晓雪. 洱海总磷、总氮污染现状分析[J]. *云南环境科学*, 2006, 25(增刊): 113-115.
- [4] 潘红玺, 王云飞, 董云生. 洱海富营养化影响因素分析[J]. *湖泊科学*, 1999, 11(2): 184-188.
- [5] Guo H C, Liu L, Huang G H, et al. A system dynamics approach for regional environmental planning and management: A study for Lake Erhai basin[J]. *Journal of Environmental Management*, 2001, 61: 93-111.
- [6] 颜昌宙, 金相灿, 赵景柱, 等. 云南洱海的生态保护及可持续利用对策[J]. *环境科学*, 2005, 26: 38-42.
- [7] 杨桂山, 马荣华, 张路, 等. 中国湖泊现状及面临的重大问题与保护策略[J]. *湖泊科学*, 2010, 22(6): 799-810.
- [8] 陈建良, 胡明明, 周怀东, 等. 洱海蓝藻水华暴发期浮游植物群落变化及影响因素[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 24-28.

- [9] 朱荣, 王欢, 余得昭, 等. 2013年洱海水华期间微囊藻毒素和浮游植物动态变化[J]. 湖泊科学, 2013, 27(3): 378-384.
- [10] Wu F, Qing H, Wan G. Regeneration of N, P and Si near the sediment/water interface of lakes from southwestern China plateau[J]. Water Research, 2001, 35: 1334-1337.
- [11] Cook R B, Kelly C A. Sulphur cycling and fluxes in temperate dimictic lakes[A]. In Sulphur cycling on the continents. 1992 Scope[M]. Howarth R W, Stewart J W B, Ivanov M V(eds). John Wiley Sons Ltd, Washington, 1992: 145-188.
- [12] Nürnberg G K. Comment: Phosphorus budgets and stoichiometry during the open-water season in two unmanipulated lakes in the experimental lakes area, northwestern Ontario[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1996, 53: 1469-1471.
- [13] Kleeberg A. Interactions between benthic phosphorus release and sulfur cycling in lake Scharmützelsee(Germany) [J]. Water, Air and Soil Pollution, 1997, 99: 391-399.
- [14] Mubmann M, Ishii K, Rabus R, et al. Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(3): 405-418.
- [15] Hao O J, Chen J M, Huang L, et al. Sulfate-reducing bacteria[J]. Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology, 1996, 26: 155-187.
- [16] Franzmann P D, Robertson W J, Zappla L R, et al. The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface[J]. Biodegradation, 2002, 13: 65-78.
- [17] Kleikemper J, Pelz O, Schroth M H, et al. Sulfate reducing bacterial community response to carbon source amendments in contaminated aquifer microcosms[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 42: 109-118.
- [18] Janssen G M, Temminghoff E J. In situ metal precipitation in a zinc-contaminated, aerobic sandy aquifer by means of biological sulfate reduction[J]. Environmental Science and Technology, 2004, 38: 4002-4011.
- [19] Devereux R, Hines M E, Stahl D A. S cycling: Characterization of natural communities of sulfate-reducing Bacteria by 16S rRNA sequence comparisons[J]. Microbial Ecology, 1996, 32: 283-292.
- [20] Castro H F, Williams N H, Ogram A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 31: 1-9.
- [21] Garcia C, Moreno D A, Ballester A, et al. Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulfate-reducing bacteria[J]. Minerals Engineering, 2001, 14: 997-1008.
- [22] Wang M Y, Liang X B, Yuan X Y, et al. Analyses of the vertical and temporal distribution of sulfate-reducing bacteria in Lake Aha(China) [J]. Environmental Earth Sciences, 2008, 54: 1-6.
- [23] Wan G J, Bai Z G, Qing H, et al. Geochemical records in recent sediments of Lake Erhai: implications for environmental changes in a low latitude-high altitude lake in southwest China[J]. Journal of Asian Earth Sciences, 2003, 21: 489-502.
- [24] 王雨春, 黄荣贵, 万国江. SWB-1 型便携式湖泊沉积物-界面水取样器的研制[J]. 地球与环境, 1998, 1: 94-96.
- [25] Daly K, Sharp R J, McCarthy A J. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria[J]. Microbiology, 2000, 146: 1693-1705.
- [26] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59: 143-169.
- [27] Christensen H, Hansen M, Sørensen J. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 1753-1761.
- [28] Widdel F. Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria[A]. In Biology of Anaerobic Microorganisms[M]. New York: John Wiley & Sons. 1988: 469-585.
- [29] 梁小兵, 朱建明, 刘丛强, 等. 贵州红枫湖沉积物有机质的酶及微生物降解[J]. 第四纪研究, 2003, 23(5): 565-572.
- [30] Rzczycka M, Blaszczyk M. Growth and Activity of sulphate-reducing bacteria in media containing phosphogypsum and different sources of carbon[J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2005, 14: 891-895.
- [31] Wargin A, Olańczuk-Neyman K, Skucha M. Sulphate-reducing bacteria, their properties and methods of elimination from groundwater[J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2007, 16: 639-644.
- [32] Igen B. and Harrison S. Identification of population dynamics in sulfate-reducing consortia on exposure to sulfate[J]. Research in Microbiology, 2006, 157: 922-927.
- [33] Karmachuk O V, Pimenov N V, Yusupov S K, et al. Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake[J]. Azerbaijan. Microbiology, 2006, 75: 82-89.
- [34] Stahl D A, Fishbain S, Klein M, et al. Origins and diversification of sulfate-reducing respiring microorganisms[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 81: 189-195.
- [35] Purdy K J, Nedwell D B, Embley T M, et al. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 36: 165-168.
- [36] Li J H, Purdy K J, Takii S, et al. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in a freshwater lake sediment[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 28: 31-39.

- [37] Okabe S , Itoh T , Satoh H , *et al.* Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms [J]. *Applied Environmental Microbiology* , 1999 , 65: 5107–5116.
- [38] Purdy K J , Nedwell D B , Embley T M , *et al.* Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the occurrence and selection of sulfate-reducing bacteria in response to nutrient addition to sediment slurry microcosms from a Japanese estuary [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 1997 , 24: 221–234.
- [39] Zweifel U L , Hagström Å. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria(Ghosts) [J]. *Applied Environmental Microbiology* , 1995 , 61: 2180–2185.
- [40] Janvier M , Regnault B , Grimont P. Development and use of fluorescent 16S rRNA-targeted probes for the specific detection of *Methylophaga* species by in situ hybridization in marine sediments [J]. *Research in Microbiology* , 2003 , 154: 483–490.
- [41] Cypionka H , Widdel F , Pfennig N. Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress , and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 1985 , 31: 39–45.
- [42] Marschall C , Frenzel P , Cypionka H. Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria [J]. *Archives of Microbiology* , 1993 , 159: 168–173.
- [43] Sass H , Cypionka H , Babenzien H D. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 1997 , 22: 245–255.
- [44] Mudryk Z J , Podgórska B , Bolalek J. The occurrence and activity of sulphate-reducing bacteria in the bottom sediments of the gulf of Gdańsk [J]. *Oceanologia* , 2000 , 41: 105–117.
- [45] Pimenov N V , Rusanov I I , Karnachuk O V , *et al.* Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in Lake Shira(Khakasia) [J]. *Microbiology* , 2003 , 72: 221–229.
- [46] Bak F , Pfennig N. Sulfate-reducing bacteria in littoral sediment of Lake Constance [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 1991 , 85: 43–52.

Vertical and Temporal Distributions of Sulfate-reducing Bacteria in Sediments of Lake Erhai , Yunnan Province , China

ZHANG Wei^{1 2} , ZHANG Lili^{2 3}

(1. School of Geography and Tourism , Guizhou Normal College , Guiyang 550018 , China; 2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry , Institute of Geochemistry , Chinese Academy of Sciences , Guiyang 550081 , China; 3. University of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

Abstract: Vertical and temporal distributions of sulfate-reducing bacteria (SRB) in the sediments of Lake Erhai , Yunnan Province , China were analyzed based on evaluation of the presence and quantity of six main groups of SRB in sediments. Results show that four SRB groups (*Desulfotomaculum* , *Desulfobulbus* , *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* and *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*) presented in autumn , while only three groups (*Desulfotomaculum* , *Desulfobulbus* and *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*) were detected in spring. The distribution of each SRB group in sediments collected in autumn was wider than that collected in spring , and they were mainly found in the upper sediments in spring. They also showed a greater overall presence and quantity in autumn than in spring. These findings indicate that the environmental conditions of autumn are more suitable for SRBs. Furthermore , compared with that in the autumn of Lake Erhai , sediments in spring of Lake Erhai have relatively high dissolved oxygen contents and low temperature , which may result in the inactive status of *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* in the sediments and undetectable *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* due to its low activity.

Key words: sulfate-reducing bacteria; vertical and temporal distribution; PCR; FISH; Erhai