

应用 T-RFLP 技术分析滇池污染水体的细菌群落

史青¹, 柏耀辉², 李宗逊³, 冯传平¹, 温东辉^{2*}

(1. 中国地质大学(北京)水资源与环境学院, 北京 100083; 2. 北京大学环境科学学院, 北京 100871; 3. 云南昆明市环境科学研究院, 昆明 650032)

摘要: 为确定重富营养化湖泊——滇池水体的主要细菌类型与种群结构, 本研究运用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术分析了滇池水体9个样点的细菌群落特征及多样性. 对各样本的T-RFLP谱图进行聚类分析, 结果表明不同地理位置的污染物浓度差异可能是造成细菌群落差异的主要原因. 研究同时结合克隆文库技术对各样本T-RFLP谱图中的末端限制性片段(T-RFs)进行了分析, 通过建立T-RFs长度与细菌种属的对应关系, 确定这9个样点的优势菌组成主要为 *Pseudomonas* 属、*Aphanizomenon* 属和 *Rhodobacter* 属.

关键词: 滇池; 细菌群落; 多样性; 优势菌; T-RFLP 技术

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)06-1786-07

Analysis of Bacterial Community in the Polluted Water of Dianchi Lake by Using T-RFLP Technique

SHI Qing¹, BAI Yao-hui², LI Zong-xun³, FENG Chuan-ping¹, WEN Dong-hui²

(1. School of Water Resource and Environmental Science, China University of Geosciences (Beijing), Beijing 100083, China; 2. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; 3. Kunming Institute of Environmental Science, Kunming 650032, China)

Abstract: In order to assess the dominant microbial communities in the polluted water of the Dianchi Lake, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technique was used to analyze the characteristics and diversity of bacterial communities in nine sites. Clustering analysis based on the T-RFLP profiles showed that the bacterial community structures varies considerably, which may be caused by the pollutant variation at different geographic locations. According to the further analysis of T-RFLP profiles with clone library technique, the dominant bacteria groups in nine sites represented by distinctive terminal restriction fragments (T-RFs) were identified as genera of *Pseudomonas*, *Aphanizomenon* and *Rhodobacter*.

Key words: Dianchi Lake; analysis of bacterial community; diversity; dominant bacteria; T-RFLP

滇池是我国云贵高原上最大的淡水湖泊之一, 流域面积2 920 km². 其水质从20世纪70年代起, 随着工业化和人类活动的影响逐渐恶化为劣V类^[1], 成为我国污染最严重的第三大湖泊, 对当地的经济、农业、人民生活等均产生了严重影响^[2]. 因而, 对滇池的环境保护与水质防治是一项紧迫任务. 研究表明水体富营养化是导致滇池水质恶化的主要原因之一^[3]. 目前对滇池水环境状况的研究方法主要有定性描述法、计算机模型模拟法、3S技术、野外调查法、指数评价法、监测法、物理法、问卷调查法等^[4], 但是大多复杂并且需要耗费大量的时间、精力、人力和物力. 为快速获取细菌群落结构的重要信息, 更好地认识了解滇池水污染中的优势微生物群落及其多样性, 为今后滇池水污染的治理提供理论基础, 本实验采用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析技术, 对滇池水样的细菌群落多样性进行研究. 目前该技术对滇池微生物群落特征及其结构分析的研究

还鲜见报道.

T-RFLP技术是研究微生物多样性的一种新兴的分子生物学方法^[5], 不依赖于培养即可进行群落分析^[6]. 这种技术可有效地用于微生物菌种鉴定、群落的对比和多样性分析^[5,7]. 由于T-RFLP技术具有快速、高度的可重复性、良好的可操作性, 能够产生大量的可操作单元(OTUs), 并可与适当的数据库建立直接联系并可与适当的数据库建立直接联系^[8], 快速准确地得到有关微生物的重要信息^[9-14], 评估菌株间微妙的基因差别, 而且能深刻地揭示微生物群落的结构和功能^[15], 所以近年在土壤和水生生态系统的评价与研究中已经得到了广泛的应用^[11,12,14].

收稿日期: 2010-08-05; 修订日期: 2010-09-20

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07102-002-01); 国家自然科学基金项目(51008003)

作者简介: 史青(1987~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境工程与环境生物学, E-mail: shiq_250@sohu.com

* 通讯联系人, E-mail: dhwen@pku.edu.cn

本研究通过对滇池 9 个样点进行的基于 T-RFLP 图谱的微生物群落聚类和克隆文库分析,同时参考 NCBI 数据库,确定了样本中可能存在的优势微生物群落,即 *Pseudomonas* 属、*Aphanizomenon* 属和 *Rhodobacter* 属,与前人的研究一致,并且该技术具有更直观、快捷和全面地认识某一污染状况下的滇池微生物多样性特征的优势。

1 材料与方法

1.1 采样

本研究分析的样本于 2010 年 1 月采自云南省滇池。按照边缘分区的采样原则,分别对滇池北部的草海和南部的的外海边缘地区采样,采样点的分布如图 1 所示。其中 1~4 号点为草海,5~9 号点为外海。每个样点取水体表层 0~20 cm 处的水样约 200 mL 左右,用 0.2 μm 微孔过滤收集菌体,立即提取 DNA。

1.2 总 DNA 提取

运用环境样本总 DNA 提取试剂盒 V212(上海博彩,K717)提取各样品的总 DNA,经 0.8% (质量分数)琼脂糖凝胶中电泳分离鉴定,都有明亮条带出现。提取的 DNA 放置在 -20°C 温度条件下保存。

1.3 PCR 扩增

对细菌 16S rRNA 基因进行扩增,选用的细菌通用引物为^[16]:27F(相对于大肠杆菌 16S rRNA8~27):5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';1492R(1492~1513):5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'。

其中 27F 的 5'端用 FAM 荧光素标记。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 为 50 μL 的反应体系,其中有 25 μL Taq HS 酶(TaKaRa,日本),22 μL ddH₂O,1 μL 引物 27F,1 μL 引物 1492R 和 1 μL DNA 模板。反应在 0.2 mL PCR 管(AXYGEN,美国)中进行。将上述试剂依次加入试管,混匀后立即将 PCR 管放入 PCR 热循环仪(Thermo P \times 2,美国)中。PCR 扩增程序设置条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,共 30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖(质量分数)凝胶电泳进行分离。然后用纯化试剂盒 QIA quick PCR Purification Kit(QIAGEN,德国)进行切胶纯化。

1.4 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析

采用 *Rsa* I(NEB,美国)对纯化后的 PCR 产物进行酶切。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温浴 3~5 h。然后在 65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温浴 20 min 使酶失活。随后将酶切产物送至上海



采样点经纬度:1号($25^{\circ}00'53.3''\text{N}$, $102^{\circ}39'10.0''\text{E}$), 2号($24^{\circ}58'51.8''\text{N}$, $102^{\circ}37'51.2''\text{E}$), 3号($24^{\circ}59'43.8''\text{N}$, $102^{\circ}38'57.5''\text{E}$), 4号和5号($24^{\circ}57'43.1''\text{N}$, $102^{\circ}38'42.0''\text{E}$), 6号($24^{\circ}50'29.6''\text{N}$, $102^{\circ}39'49.8''\text{E}$), 7号($24^{\circ}41'06.8''\text{N}$, $102^{\circ}38'05.6''\text{E}$), 8号($24^{\circ}52'33.0''\text{N}$, $102^{\circ}46'36.2''\text{E}$), 9号($24^{\circ}54'25.7''\text{N}$, $102^{\circ}45'01.1''\text{E}$)

图 1 滇池取样的样点分布示意

Fig. 1 Plan view of the sampling sites in Dianchi Lake

基康生物技术有限公司进行基因扫描(GeneScan),得到 T-RFLP 图谱。T-RFLP 谱图用 GeneMap (Version 3.7) 程序进行分析,选择的内标为 GS500liz。舍去 <50 bp 和 >500 bp 的片段。对于细菌,由于相对数量过小的限制性末端片段(T-RFs)不会对群落的特性产生明显的影响^[5,17,18],故在本分析中舍去了相对数量 <1% 的 T-RF,然后分别计算图谱中每一个峰的峰面积与所有峰总面积的比值,将每个 T-RF 所占的百分比作为权重导入 SPSS 15.0 软件,聚类方法选择组间平均距离法,距离选择平方欧氏距离,做出聚类分析图。

1.5 克隆文库的建立及其 T-RFLP 分析

为解析和确认上述 9 个样点的 T-RFLP 指纹图

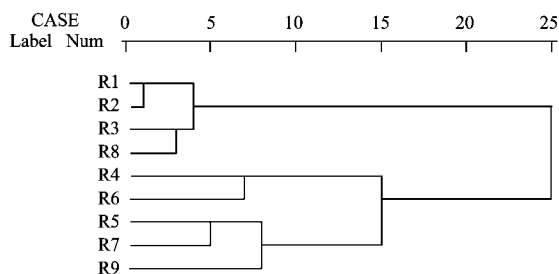
谱中各种不同的 T-RF 究竟代表哪些微生物,又对污染物浓度最高的 1 号和 5 号样本(已测得其氨氮和亚硝氮含量最高)单独建立了克隆文库,再对每个特异性克隆(相似度 < 97%)进行 T-RFLP 分析。

克隆文库的具体操作步骤为:利用无荧光标记的 27F 和 1492R 引物对 1 号和 5 号样品的 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物经 Qiaquick gel extraction kit 切胶纯化后连接至质粒载体 pGEM-T easy Vector (Promega, 美国),重组质粒通过热击法转化到 *E. coli* JM109 中,步骤可参见试剂盒说明书。取 0.1 mL 转化后的产物均匀涂布于含有 IPTG、X-gal 和 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基中。在 37°C 的温度条件下培养 12 ~ 16 h 后,挑取白色的阳性克隆子进行测序。通过对这些克隆序列与 GenBank 中的核酸数据库进行序列比对分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),则可以确定与数据库中最相似的菌种名称。克隆文库建立之后,再次对各特异性克隆进行酶切,方法同 1.4 节,这样就可以根据将 T-RF 长度与序列信息相结合从而推测滇池样品中优势细菌的属性。

2 结果与讨论

2.1 对 1 ~ 9 号样本的聚类分析

对 1 ~ 9 号样本 PCR 产物的 T-RFLP 谱图进行聚类分析,可通过聚类分析的结果判断不同取样位置的微生物群落结构的相似程度。得到结果如图 2 所示。



R1 ~ R9 分别代表经过 *Rsa* I 酶切的第 1 ~ 9 号样本,横坐标表示 9 个样品之间的相关系数

图 2 基于 T-RFLP 图谱的聚类分析

Fig. 2 Dendrogram of hierarchical cluster analysis based on the T-RFLP profiles

由图 2 中可以看出,其中 R1、R2、R3 和 R8 聚为一组,表明它们的种群比较接近,并且与其他 6 个样本的距离较远,这可能是因为相似污染物在此处相对富集。R4 和 R6 样本的种群结构相似度比较高,

R5、R7、R9 的种群结构比较相似。另外, R5 ~ R9 这几个样本都分布在外海,并且通过海埂大坝与草海相分隔开,故而它们的微生物群落在聚类分析中都显示出比较高的相似性。

2.2 对 1 号和 5 号样本纯克隆 T-RFLP 结果分析

将 1 号和 5 号样本的克隆产物用 *Rsa* I 进行酶切,可以得到每一个纯菌中的末端片段(表 1)。在表 1 中,以普通数字编号的纯菌片段来自 1 号样本,而以 w 开头编号的纯菌片段来自 5 号样本。根据克隆文库所得到的基因序列,可以在 NCBI 网站上进行比对,并根据其相似程度确定菌株的属种(表 1)。

以表 1 中所列 T-RFs 长度与 NCBI 数据库已知菌的对应关系为基准,对 9 个样点样品的 T-RFLP 图谱中的 T-RFs 进行分析,得到不同 T-RFs 相对应的细菌种属,如图 3 所示。

从图 3 中可以看出, R1、R2 样本均有 6 个显著的峰值(相峰面积 > 1% 的 T-RF), R3 中有 9 个, R4 中有 10 个, R5 中有 14 个, R6 中有 4 个, R7 中有 22 个, R8 中有 5 个,而 R9 中有 25 个。这 9 个样本中都包含的优势片段是长度为 153 bp 的 T-RF。另外,各个系统还含有一些独有的 T-RF 片段。

滇池水样中的细菌群落是一个不断变化的群体,其种群的数量、种类、分布等都会受到外界环境条件的影响,并因此直接导致所得到的 T-RFLP 谱图有所差别。光照、温度、盐度和污染物等环境因素是影响水体中微生物种群结构的几个最主要的环境因素^[19]。本研究的 9 个样点均位于滇池周边的浅水地带,在光照与温度、盐度和水深条件等方面没有明显的差别,因此,导致这些样点间微生物种群结构差别的主要原因可能是不同的污染物和局部环境的差异。从图 3 中可以看出, R1 ~ R4 这 4 个样本在滇池的位置非常接近,都分布在草海的沿岸,其 T-RFLP 谱图差别很小。R1 和 R2 的谱图尤为相似,与上述 R1 与 R2 在聚类分析中具有相似的种群结构符合得较好。从图 1 和图 3 中可以看出,由于 R4 靠近海埂大坝,周围多种水生植物发育,故与 R1 ~ R3 这 3 个样本的差别较大。研究表明,一般在污染程度高的水体中微生物种群多样性较低^[20]。草海附近由于村落聚集并且靠近工业污染源,湖滨带底泥的有机质^[21]以及沉积物中的重金属如 Cu、Zn 等都远远高于外海^[22]。所以从 T-RFLP 谱图中也可以看出, R1 ~ R4 的谱图所显示的微生物群落相对较少,明显少于外海的 5 个样本。相反,另外 5 个样本都分布在外海,地理位置相隔较远,谱图大都比较复杂,相互间

表 1 克隆文库的比对结果及其 T-RFLP 分析

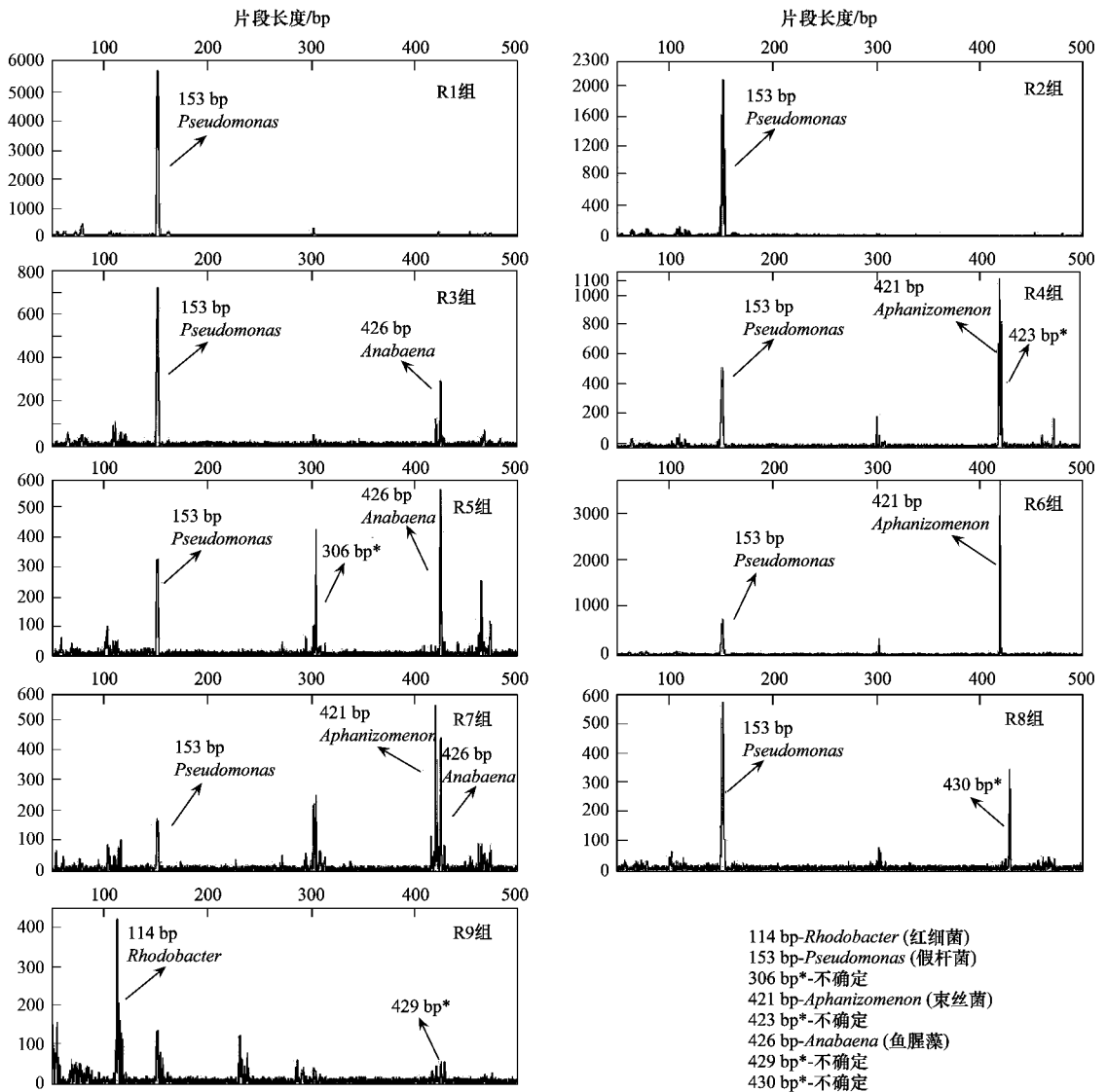
Table 1 T-RFLP results with closest match of 16S rRNA sequences of the samples

纯菌编号	T-RF 长度/bp	GenBank 数据库中最相似菌种(登录号)	相似度/%
2	154	<i>Musa acuminata</i> (EU017026)	96
5	303	<i>Flavobacterium</i> sp. WB 3. 3. 27 (AM177617)	99
6	447	<i>Nostoc</i> sp. 'Azolla cyanobiont' (AY742450)	98
8	153	<i>Pseudomonas</i> sp. SCSWA09 (FJ461426)	98
11	75	<i>Thiothrix</i> sp. (EU884111)	97
12	68	<i>Acinetobacter</i> sp. GG2 (GQ245971)	90
16	454	<i>Leadbetterella byssohila</i> strain 4M15 (AY854022)	93
18	423	<i>Nostoc</i> sp. 'Azolla cyanobiont' (AY742450)	99
21	443	<i>Rheinheimera chironomi</i> strain K19414 (DQ298025)	98
22	420	<i>Rhodiferax ferrireducens</i> (AF435948)	88
23	462	<i>Limnohabitans</i> sp. LI2-55 (AJ964892)	88
24	308	<i>Rhodobacter</i> sp. Cr4-37 (GU441681)	88
27	423	<i>Runella</i> sp. P. slu-06 (AB249681)	93
28	474	<i>Gamma proteobacterium</i> SUWAF013 (AB447550)	97
33	220	<i>Aeromonas salmonicida</i> strain CIP 57. 50 (FJ936134)	96
34	435	<i>Flavobacterium</i> sp. WB3. 4-22 (AM934663)	87
36	304	<i>Achromatium</i> sp. JD13 (AF129551)	87
39	304	<i>Musa acuminata</i> (EU017026)	97
43	304	<i>Sufflavibacter maritimus</i> strain P43 (EU880515)	89
45	426	<i>Anabaena oscillarioides</i> BO HINDAK 1984/43 (AJ630428)	93
48	308	Uncultured <i>Sphingobacteria</i> bacterium clone ADK-SGh02-93 (EF520603)	92
50	218	<i>Rheinheimera</i> sp. G3DM-27 (EU037278)	98
52	309	<i>Cytophaga</i> sp. An36 (AJ551174)	89
57	305	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen CC99 (EF492067)	89
58	114	<i>Rhodobacter</i> sp. EMB 174 (DQ413163)	97
59	474	<i>Gamma proteobacterium</i> SUWAF013 (AB447550)	94
60	100	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> (AJ784892)	85
w1	304	<i>Flavobacterium</i> sp. ARSA-108 (GU295968)	99
w2	421	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (AJ293126)	99
w5	155	<i>Alterococcus agarolyticus</i> strain ADT3 (AF075271)	94
w7	465	<i>Pseudomonas</i> sp. 7-1 (AF521651)	92
w9	474	<i>Gamma proteobacterium</i> SUWAF013 (AB447550)	97
w10	77	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone 131754 (AY922231)	88
w11	104	<i>Candidatus Aquirestis calciphila</i> (AJ786341)	99
w26	437	<i>Cryptomonas ovata</i> plastid gene (AB073109)	96
w32	426	<i>Stephanodiscus minutulus</i> (AY221720)	99
w38	44	planctomycete str. 535 (AJ231176)	95
w39	466	<i>Zoogloea</i> sp. EMB 62 (DQ413151)	89
w40	118	<i>Alpha proteobacterium</i> A0839 (AF236002)	100
w42	115	Uncultured <i>Sphingobacteria</i> bacterium clone ADK-GRe02-47 (EF520591)	94
w43	275	<i>Luteolibacter algae</i> (AB331894)	93
w44	297	<i>Sporocytophaga</i> sp. 4v (FJ372724)	87
w50	423	<i>Cryptophyta</i> sp. CR-MAL01 (EU123323)	96
w55	444	<i>Gamma proteobacterium</i> NEP68 (AB212806)	92

差异也比较大,显示具有相对较高的微生物多样性。这表明因其环境条件有所不同,而直接导致了其群落间的明显差别。

值得注意的是,R1、R2、R3、R5 和 R8 样本中的最优势峰片段长度均为 153 bp,其所占的峰面积分别为 88.51%、89.97%、68.07%、26.62% 和 72.62%,对应为表 1 中的 8 号菌,可能属于

Proteobacteria (变形菌门)的 *Pseudomonas* 属(假单胞菌属),并且在 R1 ~ R9 的每一个样本中,都含有 153 bp 的片段,即 *Pseudomonas* 属。而 R4、R6 和 R7 样本中的最优势峰片段长度均为 421 bp,所占峰面积分别为 30.32%、59.61% 和 19.96%,可能对应为表 1 中的 w2 号菌,属 Cyanobacteria (蓝菌门)的 *Aphanizomenon* (蓝束丝蓝细菌属)。R9 的最优势峰

图3 9个样本的 *Rsa* I 酶切 T-RFLP 谱图Fig. 3 T-RFLP profiles of nine samples with *Rsa* I digestion

片段长为 114 bp, 所占的峰面积为 15.14%, 可能对应为表 1 中的 58 号菌, 属 Proteobacteria (变形菌门) 的 *Rhodobacter* 属 (红细菌属)。由此可见, *Pseudomonas*、*Aphanizomenon* 和 *Rhodobacter* 这 3 个属可能是本研究所检测的滇池 9 个样点中最为优势的菌属, 其中 *Pseudomonas* 和 *Rhodobacter* 同为变形菌门。

滇池水中的 *Aphanizomenon* 菌属在每年的 11 月出现, 到第 2 a 的 3、4 月消失; 在此期间该菌类大量生长繁殖, 往往是导致水华的优势菌群之一^[23], 该菌类数量巨大, 主要分布于草海的南部和外海的西部与南部, 本研究所获得的分析结果与前人研究基本一致^[24]。研究表明, *Aphanizomenon* 属不仅对滇

池中的其他微生物群类具有明显的胁迫作用^[25], 而且还可以产生麻痹性贝毒毒素 (PSP)、筒胞藻毒素和类毒素-a^[26] 等神经肌肉麻痹剂, 对人类和水生生物造成危害。这些毒素会导致四肢肌肉麻痹、头痛恶心等, 甚至呼吸停止^[27]。为检测滇池 *Aphanizomenon* 菌的毒性, 有研究将其注入小白鼠腹腔^[23], 结果发现小鼠肌肉颤动、痉挛, 最终因呼吸困难而死亡, 与 PSP 中毒极为相似, 故极可能为该菌所产生的 PSP 所致。筒胞藻毒素会抑制蛋白质的合成, 从而导致肝细胞死亡^[28]。类毒素-a 可致使肌肉极度兴奋而痉挛, 严重时可导致呼吸系统衰竭和窒息^[29]。由此可见, 滇池水体中的优势菌 *Aphanizomenon* 属是一种极富危害性的微生物类群之一, 应当积极加强其生态

与微生物功能的进一步研究,并采取相应的对策首先遏制其快速生长与大量发展。

Pseudomonas 也是滇池水中的一种优势菌属,并且在 R1 ~ R9 每一组样本中都可以检测到,表明该属可能是在滇池中广泛存在的菌属之一。有研究曾从滇池水体中分离获得了该菌属,并发现其对绿色微囊藻、惠氏微囊藻、念珠藻、颤藻、束丝藻、月芽藻、斜生栅藻等均有强烈的溶解作用,属溶藻细菌^[30]。利用溶藻细菌作为防治水华的一种可能的对策,已经引起越来越多的关注。前人的研究还发现,*Pseudomonas* 细菌还是水体中一种常见的、具有降解微囊藻毒素功能的微生物^[31]。因此该菌属的生物降解功能将有可能被用做为消除水体中微囊藻毒素的一个重要途径,但这种生物降解究竟能起到多少作用,目前还缺乏确切的数据^[32],需要进一步的深入研究与评估。从环境生物工程的角度分析,如果进一步的研究能够证明 *Pseudomonas* 菌属没有其它的危害性或潜在的副作用,则有可能通过促进这类细菌的发展,以菌治菌、达到降解滇池水污染中微囊藻毒素和防治水华的目的。

Rhodobacter (红细菌属)是本研究在滇池水中检测到的第 3 个优势菌属。但该菌属在过去有关滇池微生物种群的研究中很少报道,故而目前对它在滇池水体中的分布特征、主要微生物功能及其所反映水环境因素还缺乏了解。据已有的资料分析,该菌属是一种耐氨光合细菌,可降解硫化氢,并具有产生氢气的功能^[33]。从其微生物功能来看,该菌属可能还不是当前滇池水体中最有害的微生物菌种。

前人的调查研究认为,形成滇池水华的微生物主要是微囊蓝细菌属 (*Microcystis*) 和蓝束丝蓝细菌属 (*Aphanizomenon*),两者具有季节性交替的特点,在夏秋两季以前者占绝对优势^[24],危害极大。在本研究中,并没有检测到微囊藻属,反而以束丝藻属为最优势的菌属。造成这个差别的原因可能是采样时间在 1 月,处于水华发生的相对休眠期,滇池的温度为 10 ~ 15℃,这正是束丝藻属生长的最适宜条件。而当温度在 17℃ 以上时,则主要是微囊藻属繁盛并伴生水华^[23],其产生的微囊藻毒素对束丝藻有抑制作用。从这个特点分析,导致滇池每年 4 ~ 11 月水华频发的最重要条件可能是温度、营养盐的浓度和微囊藻的暴发。

除了上述的最优势菌属外,R3、R5 和 R7 这 3 个样本中较优势的 T-RF 为 426 bp,对应为表 1 中的 45 号和 w32 号菌,可能为 *Anabaena* 属或者

Stephanodiscus minutulus。R4 样本中较优势的 T-RF 为 423 bp,与表 1 中的 18、27 和 w50 号菌长度相似,故最可能为 *Nostoc* 属、*Runella* 属或者 *Rheinheimera* 属。R6 和 R7 样本中较优势的 T-RF 为 153 bp,对应为表 1 中的 8 号菌,属于 Proteobacteria (变形菌门)的 *Pseudomonas* 属。R8 中较优势的 T-RF 为 430 bp,R9 中较优势的 T-RF 为 429 bp,在表 1 中都没有找到相应的片段。这与样品间微生物种类的差异有关。

由上述分析可见,运用 T-RFLP 技术可以快速地检测到滇池水样中的微生物群落组成的信息,并且可以确认其中的优势菌群为蓝藻门和变形菌门。这一结果与前人的取得的认识基本一致^[3, 4, 24, 25, 29]。因此,T-RFLP 技术是一个比传统的可培养操作更为简便快捷、且比较准确的微生物群落分析手段。

3 结论

本研究利用 T-RFLP 技术分析了滇池草海和海外 9 个样点水体细菌种群的多样性特征。研究发现,滇池水体中细菌种类丰富,*Pseudomonas*、*Aphanizomenon* 和 *Rhodobacter* 为 3 个最优势的细菌菌属。其中 *Aphanizomenon* 可能是环境危害性最大的一种菌类,*Pseudomonas* 是有可能用于降解微囊藻毒素的一种菌类。不同地点的微生物种群结构差异较大,污染物分布不同可能是导致微生物种群差异的最重要因素。T-RFLP 技术可用于快速了解环境样本的微生物群落结构特征,通过与生物信息学等技术相结合,准确地得到这些群落的菌群信息,并检测出尚未被发现和描述的微生物种类。

参考文献:

- [1] 王红梅,陈燕.滇池近 20a 富营养化变化趋势及原因分析[J].环境科学导刊,2009,28(3):57-60.
- [2] 王丽芳,熊永强,吴丰昌.滇池的富营养化过程:来自结合态脂肪酸 C_{16:0} δ¹³C 的证据[J].湖泊科学,2009,21(4):456-464.
- [3] 彭张兴,张征,李坚.滇池污染状况及对策建议[J].环境科学与管理,2009,34(8):29-32.
- [4] 吕利军,王嘉学.滇池水体环境污染研究综述[J].水科学与工程技术,2009,(5):65-68.
- [5] 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.
- [6] 余素林,吴晓磊,钱易.环境微生物群落分析的 T-RFLP 技术及其优化措施[J].应用与环境生物学报,2006,12(6):861-868.

- [7] 王洪媛, 管华诗, 江晓路. 微生物生态学中分子生物学方法及 T-RFLP 技术研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004, **24** (8): 42-47.
- [8] Osborn A M, Moore E R B, Timmis K N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics[J]. Environmental Microbiology, 2000, **2** (1): 39-50.
- [9] Braker G, Ayala-del-Rio H L, Devol A H, et al. Community structure of denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along redox gradients in pacific northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67** (4):1893-1901.
- [10] Inagaki F, Takai K, Komatsu T, et al. Profile of microbial community structure and presence of endolithic microorganisms inside a deep-sea rock[J]. Geomicrobiology Journal, 2002, **19** (6): 535-552.
- [11] Nusslein B, Chin K J, Eckert W, et al. Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel) [J]. Environmental Microbiology, 2001, **3** (7):460-470.
- [12] Takai K, Moser D P, DeFlaun M, et al. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67** (12): 5750-5760.
- [13] Konstantinidis K T, Isaacs N, Fett J, et al. Microbial diversity and resistance to copper in metal-contaminated lake sediment [J]. Microbial Ecology, 2003, **45** (2):191-202.
- [14] Vetriani C, Tran H V, Kerkhof L J. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69** (11): 6481-6488.
- [15] Marsh T L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products [J]. Current Opinion in Microbiology, 1999, **2** (3): 323-327.
- [16] Devereux R, Wilkinson S S. Amplification of ribosomal RNA sequences [M]. Netherlands: Molecular Microbial Ecology Manual, 2004. 509-522.
- [17] Mayrand P E, Corcoran K P, Ziegle J S, et al. The use of fluorescence detection and internal lane standards to size PCR products automatically [J]. Applied and Theoretical Electrophoresis, 1992, **3** (1): 1-11.
- [18] Ziegle J S, Su Y, Corcoran K P, et al. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci [J]. Genomics, 1992, **14** (4): 1026-1031.
- [19] 方海东, 段昌群, 何璐, 等. 环境污染对生态系统多样性和复杂性的影响[J]. 三峡环境与生态, 2009, **2** (3):1-4.
- [20] Laviea B, Nevoa E. Differential fitness of allelic isozymes in the marine gastropods *Littorina punctat* and *Littorina neritoides* exposed to the environmental stress of the combined effects of cadmium and mercury pollution[J]. Environment Management, 1987, **11**(3): 345-349.
- [21] 卢少勇, 金相灿, 张烨, 等. 滇池内湖滨带底泥的有机质分布规律[J]. 湿地科学, 2009, **7** (2):135-141.
- [22] 卢少勇, 焦伟, 金相灿, 等. 滇池内湖滨带沉积物中重金属形态分析[J]. 中国环境科学, 2010, **30** (4):487-492.
- [23] 刘永梅, 刘永定, 李敦海, 等. 滇池束丝藻水华毒性生物检测[J]. 水生生物学报, 2004, **28** (2):216-218.
- [24] 李原, 张梅, 王若南. 滇池的水华蓝藻的时空变化[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2005, **27** (3):272-276.
- [25] 陈开宁, 李文朝, 吴庆龙, 等. 滇池蓝藻对沉水植物生长的影响[J]. 湖泊科学, 2003, **15** (4):364-368.
- [26] Skulber M, Codd G. Toxic blue-green algae blooms in Europe: a growing problem[J]. AMBIO, 1984, **13**(4):244-247.
- [27] 刘智勇, 计融. 麻痹性贝类毒素研究进展[J]. 中国热带医学, 2006, **6** (2):138-142.
- [28] Sivonen K. Cyanobacterial toxins and toxin production [J]. Phycologia, 1996, **35** (6):12-24.
- [29] 肖丰富, 李文奇, 刘娜, 等. 富营养化水体中蓝藻毒素的危害及其控制[J]. 中国水利水电科学研究院学报, 2005, **3** (2): 117-123.
- [30] 史顺玉, 刘永定, 沈银武, 等. 细菌 DC₁₀ 的溶藻作用及环境因子对该作用的影响[J]. 中国科学 C 辑 生命科学, 2004, **34** (6):564-568.
- [31] Takenaka S, Watanabe M. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease [J]. Chemosphere, 1997, **34** (4): 749-757.
- [32] 宋立荣, 陈伟. 水华蓝藻产毒的生物学机制及毒素的环境归趋研究进展[J]. 湖泊科学, 2009, **21** (6):749-757.
- [33] 杨素萍, 赵春贵, 曲音波, 等. 光合细菌产氢研究进展[J]. 水生生物学报, 2003, **27** (1):85-90.