

不同空间位点沉积物理化性质与微生物多样性垂向分布规律

赵兴青^{1,2}, 杨柳燕¹, 尹大强^{1*}, 王汝成², 陆现彩², 秦伯强³

(1. 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093; 2. 南京大学地球科学与工程学院, 内生金属矿床成矿机制研究国家重点实验室, 南京 210093; 3. 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

摘要:运用化学分析方法和 PCR-DGGE 技术从沉积物化学及基因角度对太湖不同空间位点沉积柱理化性质(pH、Eh)、营养盐(TN、TP、OM)及微生物多样性的垂向分布及相关性进行研究. 结果表明, 沉积物 Eh 在水-土界面处于轻度还原状态, 表层下, 随沉积深度的增加迅速下降, 还原性逐渐增强. 沉积物 pH 在整个剖面上变化幅度不大, 在 7.2~7.8 变动. 沉积物中含有丰富的营养盐, 总氮和总磷最高含量分别为 2.436 mg/g 和 0.731 mg/g, 其剖面分布特征表明, 沉积物表层总氮和总磷含量远高于底层, 其含量随深度增加而降低. 沉积物有机质含量在 15 cm 以上变化幅度较大, 随着沉积深度的增加, 有机质含量明显减少. 沉积物中微生物群落结构显示了明显的空间分布多样性差异. 三位点 TN 与 OM 之间均存在显著的相关性, 但理化指标与营养盐以及微生物群落多样性指标之间不存在显著的相关性.

关键词:沉积物; 微生物多样性; 变性梯度凝胶电泳(DGGE); 16S rDNA; 垂向分布; 物化性质; 空间分布

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)12-3537-09

Vertical Distribution of Physicochemical Characteristics and the Microbial Diversity in Different Spatial Sediments Samples in Lake Taihu

ZHAO Xing-qing^{1,2}, YANG Liu-yan¹, YIN Da-qiang¹, WANG Ru-cheng², LU Xian-cai², QIN Bo-qiang³

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. State Key Laboratory for Mineral Deposits Research, School of Earth Sciences and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 3. Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: The physicochemical characteristics, nutritions and the microbial community diversity of sediment core samples of three different space locations in the Lake Taihu were studied by fumigation-digestion and PCR-DGGE analysis respectively. The results indicated that below the surface of sediments Eh declined rapidly with increase of sediment depth and it was under anaerobic condition except the top layer of sediment. pH value changed slightly in the profile of sediments, which ranged from 7.2 to 7.8. TN and TP concentrations in sediments of Lake Taihu were high, and the maximum concentrations reached 2.436 mg/g and 0.731 mg/g, respectively. Their vertical profiles showed that TN and TP concentrations in surface sediments were much higher than in deeper layers and decreased with the increase of the depth of sediment layers. OM concentrations declined rapidly at the top 15 cm of sediment layers. There were prominent difference spatially in microbial diversity and the comparability and dynamics of community structure between different sediment samples of different space locations and different depth. The little significant correlation at $\alpha \leq 0.05$ level was observed between the Eh, pH, percentage organic matter, TN concentration and TP concentration and microbial community structure diversity index except of TN concentration and percentage organic matter.

Key words: sediment; microbial diversity; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 16S rDNA; vertical distribution; physicochemical characteristics; spatial distribution

湖泊沉积物是一个各种微生物参与的、物质发生频繁交换的、具有高度生物活性的特殊环境. 营养物质的持续输入、外界环境条件的改变等因素是造成环境微生物群落变化的主要原因^[1,2]. 有机质的微生物降解是湖泊生源物质得以再生的主要途径, 构成了常见的碳循环、硫循环、氮循环等^[3]. 微生物的活动可以通过同化、异化作用和改变环境条件来影响理化性质、营养盐及金属元素的分布、转化等^[1]. 过去的研究主要侧重于沉积物的地球化学组成, 如重金属、营养盐、水动力条件等. 沉积物中微生物的

群落结构及作用是当前新兴的研究热点.

以往对微生物的研究多建立在传统的富集、分离、培养基础上^[4], 然而, 大量的研究已经指出, 环境中绝大多数的微生物通过传统的方法是能够分离和培养的^[5,6], 很多微生物在沉积物环境中生活的游

收稿日期: 2007-11-02; 修订日期: 2008-06-04

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB412307); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601011); 江苏省自然科学基金项目(BK2005082)

作者简介: 赵兴青(1974~), 女, 博士后, 主要研究为环境微生物生态学, E-mail: nju_zhaoxq@163.com

* 通讯联系人, E-mail: yindq@nju.edu.cn

刃有余,但是在实验室条件下却不能被培养^[7,8].变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术最先由 Fischer 等^[9]提出并用于 DNA 突变检测,1993 年 Muyzer 等^[10]将该技术首次应用于微生物生态学研究,现在该技术在微生物群落多样性和种群动态监测中得到广泛使用. DGGE 分离技术可以克服和弥补传统培养技术的不足与测定的偏差,从而更精确和全面地探索微生物群落结构及其在自然环境中的作用.因此了解沉积物中微生物的分布,对全面了解太湖水域中元素的地球化学循环有积极意义.

为了了解沉积物不同营养水平湖区沉积物中微生物多样性变化特征,准确地评价不同湖区沉积物中微生物多样性,选择太湖东北部营养水平和生态类型不同的 2 个湖区:太湖北部的梅梁湾(藻型)、太湖东北部的贡湖湾(草型向藻型过渡)为研究区域,初步分析了沉积物中有机碳、总磷、总氮以及 pH、Eh 和微生物的垂向空间变化特征,并探讨其相关性,以期为全面了解湖泊沉积物中微生物及营养盐分布规律及其相互关系提供参考.

1 材料与方法

1.1 湖泊沉积物样品

于 2006 年 7 月在太湖选取 3 个采样点采集沉积物样品,3 组样品依次标记为: S1 (梅梁湾生态系统试验区内 N 31°30'306", E 120°13'370"), S2 (梅梁湾生态系统试验区外 N 31°30'181", E 120°12'66"), S3 (贡湖湾 N 31°23'767", E 120°19'471"). 沉积物样品柱用自制采泥器采取,长约 50 cm,采集现场密封好带回实验室.分析采用上密下疏的原则,0~12 cm 按 3 cm 间隔取样,12~20 cm 按 4 cm 间隔取样,20~45 cm 按 5 cm 间隔取样,未扰动的样品柱先用于 Eh 和 pH 值测定,然后切分为不同深度,每样分为 2 份,一份用于冷冻干燥后分析营养盐含量,一份立即于 -20℃ 冰箱保存,待进一步分子生物学分析.

1.2 仪器及设备

台式冷冻离心机 5417R (德国 Eppendorf); 超纯水 (Millipore); 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad); 梯度 PCR 仪 (美国 Bio-Rad); 基因突变检测仪 (美国 Bio-Rad); 水平电泳仪 (美国 Bio-Rad).

1.3 Eh、pH 值、总氮、总磷和有机质测定

新鲜沉积物的 Eh 和 pH 值采用铂电极-去极化法测定^[11]. 沉积物总氮和总磷用碱性过硫酸盐联合测定^[12],有机质分析采用重铬酸钾氧化外加热法进

行测定 (GB 9834-88).

1.4 基因组总 DNA 的提取

针对沉积物环境样品的特殊性,根据已报道的土壤 DNA 提取技术^[13,14]加以改进.将 5 g 左右的沉积物样品加入 13.5 mL 提取缓冲液 [0.1 mol/L PBS (pH 8.0), 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris base (pH 8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1.0% CTAB] 和 50 μ L 蛋白酶 K (10 mg/L), 在 37℃、225 r/min 振荡 30 min 后,加入 1.5 mL 20% 的 SDS, 然后 65℃ 水浴加热 2 h (每隔 15 min 轻轻摇动 1 次). 将上述样品处理液以 5000 r/min 离心 10 min 后收集上清液,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 混匀,离心 5 min,将上清液转入另一只离心管中,加入 1:1 的氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提上清液,9000 r/min 离心 5 min 后,在上清液中加入 0.6 倍体积异丙醇,4℃ 过夜沉淀,12000 r/min 离心 15 min,弃上清液,70% 冰乙醇清洗 2 次,无菌风吹干,用 100 μ L TE 缓冲液溶解沉淀得到总 DNA 的粗提液,置于 -20℃ 保存.

基因组总 DNA 的纯化采用上海生工的玻璃珠 DNA 胶回收试剂盒 (产品号: SK111) 对沉积物样品的基因组 DNA 粗提液进行了纯化.

1.5 基因组 DNA 的 PCR 扩增

引物的选择参照文献^[15]. PCR 扩增对象为 16S rDNA, 它的序列分别为: 上游引物 F₃₄₁ 为 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 下游引物 R₉₂₆ 为 (5'-CCGTCGAATTCCTTTGAGTTT-3), GC 发卡结构^[16] (5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGG GGC-3'), 扩增产物片段长约 620 bp 左右.上述引物由上海英俊生物技术有限公司合成提供.

50 μ L 的 PCR 反应体系组成如下: 20 ng 的模板、20 pmol 正反向引物、200 μ mol/L dNTP、5 μ L 的 10 × PCR buffer (不含 MgCl₂)、1.5 mmol/L 的 MgCl₂、2U 的 ExTaq DNA 聚合酶和适量的双蒸水补足 50 μ L. PCR 所用 dNTP、Taq DNA 聚合酶等均购自大连宝生物技术有限公司.

PCR 反应采用 touchdown 降落 PCR 策略^[17], 即: 预变性条件为 94℃ 5 min, 前 20 个循环为 94℃ 1 min, 65~55℃ 1 min 和 72℃ 3 min (其中每个循环后复性温度下降 0.5℃), 后 10 个循环为 94℃ 1 min, 55℃ 1 min 和 72℃ 3 min, 最后在 72℃ 下延伸 8 min, 4℃ 保存. PCR 反应的产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后于 -20℃ 保存备用.

1.6 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳分析

采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统

对 PCR 反应产物进行分析.使用梯度胶制备装置,制备变性剂浓度从 30% ~ 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物) 的 6% 聚丙烯酰胺凝胶,其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增^[18].待胶完全凝固后,将胶板放入装有 1 × TAE (40 mmol/L Tris 碱, 20 mmol/L 冰醋酸, 1 mmol/L Na₂EDTA) 电泳缓冲液的装置中,在每个加样孔中加入含有 5:1 的 6 × 溴酚蓝二甲苯氰溶液的 PCR 样品 20 ~ 30 μL.

在 100 V 的恒定电压下, 60℃ 恒温下电泳 10 h. 电泳完毕后,将凝胶在 EB 中染色 20 ~ 30 min^[19],再用 ddH₂O 浸洗胶片 2 次,每次 5 min,以洗去胶片表面溶液.

用凝胶成像分析系统分析染色后的凝胶,观察每个样品的电泳条带并拍照.观察各个样品的 PCR 产物经 DGGE 分离后的电泳图谱照片,采用 Quantity One 分析软件 (Bio-Rad) 分析沉积物样品中电泳条带的数目和灰度来评估不同深度层湖泊沉积物样品的微生物群落的多样性和丰富度.根据各样品在 DGGE 图谱中的表现用香农-威纳指数 (Shannon-Weiner index) 来计算其群落多样性^[20], $H = - \sum P_i \lg P_i$, 式中, H 为垃圾样香农-威纳指数, P_i 为第 i 条带灰度占该样品条带总灰度的比率.

2 结果与讨论

2.1 沉积物理化性质

沉积物的氧化还原电位 (Eh) 高低能表示其氧化还原强度的状态,它对化合物和矿物的形成或分解发挥重要作用.在湖泊沉积物中影响氧化还原的因素主要有湖水中溶解氧对沉积物的复氧作用、pH 值、有机质含量及其分解过程中微生物的耗氧量^[21].图 1(a) 反映了沉积物氧化还原电位的垂直变化过程.可以看出,三位点水-土界面处于轻度还原状态.在表层下, Eh 随沉积深度的增加迅速下降,还原性逐渐增强,到 10 ~ 15 cm 附近 Eh 值基本稳定,之后随深度的进一步增加, S2、S3 位点 Eh 基本稳定, S1 位点的 Eh 呈现“之”型分布曲线.分析其原因在于表层在水土界面复氧而氧化,由于表层有机质含量高,沉积物中的有机质主要来源是城市污水中的悬浮颗粒以及自源或外源的死亡藻类碎屑,极易分解,需要大量的氧,随沉积深度增加沉积物中供氧出现不足,因此电位急剧下降,沉积物很快进入还原状态,在 15 cm 左右处出现最低电位值,沉积物在 15

cm 左右深度处的低氧化还原状态,反映在此深度处存在大量的厌氧和兼性厌氧细菌,在该层有着活性极高的缺氧降解和反硝化等微生物作用,之后电位升高,主要是有机质减少和微生物活动减弱的缘故.太湖 3 个采样点沉积物垂向剖面 Eh 平均值为 S1 < S2 < S3, S1 位点还原性最强,这与三位点分属于不同富营养湖区、营养盐溶度、污染状况以及水文特征有关.

沉积物剖面的低氧化还原状态分布的不同,反映了不同沉积深度存在着有机质的多少以及微生物活动强弱的差异.沉积物氧化还原电位对磷酸盐的形态和释放存在较大的影响,还原条件对磷营养盐的释放具有促进作用,是影响内源释放控制的重要因素.这种 Eh 值随深度先下降后上升的变化也表明了沉积物物理性质的特异性.

沉积物 pH 的垂直分布与 Eh 略有差异. pH 值影响化合物和矿物的形成与分解,对元素的迁移或富集有一定的影响.因此, pH 值是湖泊环境的另一个重要指标.图 1(b) 数据表明,不同湖区 pH 值变化各不相同,但就整体而言,沉积物 pH 在整个剖面变化不大,在 7.2 ~ 7.8 变动,呈中性偏弱酸性或弱碱性.在表层 0 ~ 5 cm, S2、S3 位点 pH 值随沉积深度迅速升高,之后,随深度的进一步增加, pH 基本稳定. pH 的上低下高式分布,主要因为表层有机质含量高,分解所产生的二氧化碳及有机酸等使其 pH 值下降,随着深度增加有机质含量减少,矿化作用也减弱,因而 pH 值稍有回升^[21]. S1 位点 pH 值随沉积深度增加而降低,之后,随深度的进一步增加, pH 缓慢升高.这反映了太湖不同湖区 pH 垂向分布特征的多变性.

沉积物总氮含量是反映营养状况和污染程度的双重指标.由图 2(a) 可见, S1、S2 采样点沉积物中总氮剖面分布特征相似,表层总氮含量较高,在 1.2 ~ 2.4 mg/g 之间,在 20 cm 以上,随深度的增加总氮含量显著下降.按照西太湖平均沉积速率 0.41 mm/a^[22] 计, 20 cm 大致代表 500 a 左右,那时属我国明朝,农业比以往有很大的发展,太湖流域是重要的农耕区,由于农肥的使用而使总氮开始增加,这与范成新等^[23] 的结论比较吻合.对比不同采样点发现, S1 在整个剖面总氮均高于 S2 位点,两者同时高于 S3 点. S1 点剖面自上而下总氮一直呈降低趋势, S2 点除个别起伏外,总的来说,总氮含量也是随深度增加呈明显下降趋势, S3 点随深度增加先降低再升高,然后再降低的变化趋势,比较三点的总氮变化幅

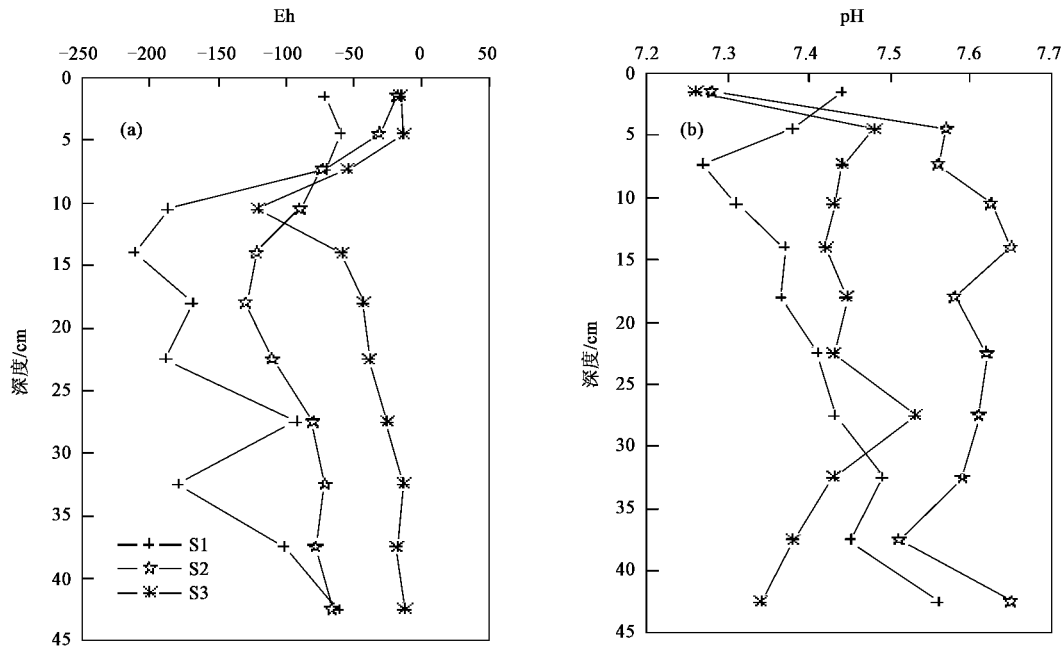


图 1 三位点沉积物柱样中 Eh、pH 垂向变化

Fig.1 Vertical characteristics of Eh and pH in three sediment samples of Lake Taihu

度发现, S2 > S1, 两者同时大于 S3 位点, 这是因为 S1、S2 属于梅梁湾湖区, 是典型富营养化湖区, 而所在贡湖湾的 S3 位点, 属于草型向藻型湖泊过渡, 相比污染要轻些, 总氮含量明显偏低很多, 水质也比前者好; 同时 S2 位点的变化幅度大于 S1 位点, 是因为太湖为浅水型湖泊, 表层沉积物极易受到风浪的扰动, S2 位点处于湖心位置, 相对较靠岸的 S1 位点, 湖心开阔区更易受到风浪作用的影响, 间隙水中以及吸附于底泥颗粒上的分子态 NH_3 在底部湖流运动及再悬浮作用下, 更易进入上复水体, 部分经物理挥发逸出水面进入大气, 较大程度降低了表层底泥中 TN 的含量. 各个采样点总氮在剖面自上而下逐渐减少, 说明太湖沉积物氮负荷逐年加重, 反映湖泊初级生产力的大幅提高加速了湖泊的富营养化.

磷是湖泊沉积物的另一个主要营养元素, 也是反映湖泊污染程度的重要指标. 与总氮相比, 沉积物总磷剖面分布特征较为复杂, 从上部向下部呈“S”形变化. 磷的复杂变化跟不同形式磷的存在有关. 实验表明, 沉积物中的磷向水体释放的主要来自铁磷^[24], 而太湖底质中又多以铁磷为主^[25], 因此, 对于太湖这样的浅水湖, 底泥磷的释放能力是较强的.

3 个采样点剖面中总磷含量在 0.15 ~ 0.9 mg/g 之间(图 2). 不同采样点间比较发现, S1 > S3 > S2, 3 个采样点总磷的含量变化与总氮的含量变化不是很一致. 3 个采样点总磷含量在表层 0 ~ 7.5 cm 之间随深度增

加总磷含量急剧下降, 在 7.5 ~ 15 cm 之间随深度增加总磷含量急剧增加, 在 15 ~ 22.5 cm 之间总磷含量又减少, 在 22.5 ~ 32.5 cm 之间总磷含量再次升高, 之后, S1、S2 位点变化不大, S3 降低再升高.

沉积物总磷的空间差异, 与其所处的地理位置有关. S1、S2 位于梅梁湾, S3 位于贡湖湾, 远离人群居住区, 但此处湖水较浅, 四周都是农田. S1、S3 相对靠岸, 陆源输入使得沉积物中营养盐含量偏高造成沉积物中总磷含量较高. 由此可见, 工业废水、农业生产和生活污水的排入是造成沉积物营养盐含量偏高的一个重要因素. S2 远离湖岸, 由于大风浪频繁的扰动, 经常性发生再悬浮而与上覆水交换以及渗透交换的间隙水深度要大于风浪扰动小的 S1、S3 湖区. 同时夏季 S3 湖区大量沉水植被的生长, 植被残体和根茎也是导致磷含量升高的一个因素.

沉积物有机质含量高低也是内源污染的一个重要指标. 底泥中的有机质的生物降解将消耗水体中大量的溶解氧, 造成水体缺氧, 同时有机质的生物降解又释放出大量的氮、磷营养盐使水体持续在较高的营养盐水平. 在光合作用中, 碳、氮和磷是藻类生长的决定因素之一, 因此, 在污染湖泊的治理和修复中, 有效降低底泥中的有机质含量与减少和控制氮、磷营养盐的浓度具有同等重要的地位.

沉积物中有机质的来源主要有水体自养生物的合成和陆源的输入, 是生物活动的能量基础. 沉积物

中有机质含量在不同位点有差异.图2(c)显示 S1 位点沉积物中有机质含量最高,其次为 S2 位点,S3 位点最低.从样品分析看,沉积物 15 cm 以上有机质含量变化较大,随着沉积物深度的增加,有机质含量明显减少,其原因是表层含有大量浮游藻类残体,动物粪便以及外源有机质的输入,15 cm 以下含量变化

减缓;同时表层生物量大,扰动剧烈,15cm 后基本处于厌氧状态,微生物量降低,活动变弱,降解也减慢.相对于 S2、S3 点,S1 点有机质、氮磷营养盐含量高,由于生物的分解作用使得沉积物缺氧,导致氧化还原电位更低,这与前面氧化还原电位的测定结果相一致.

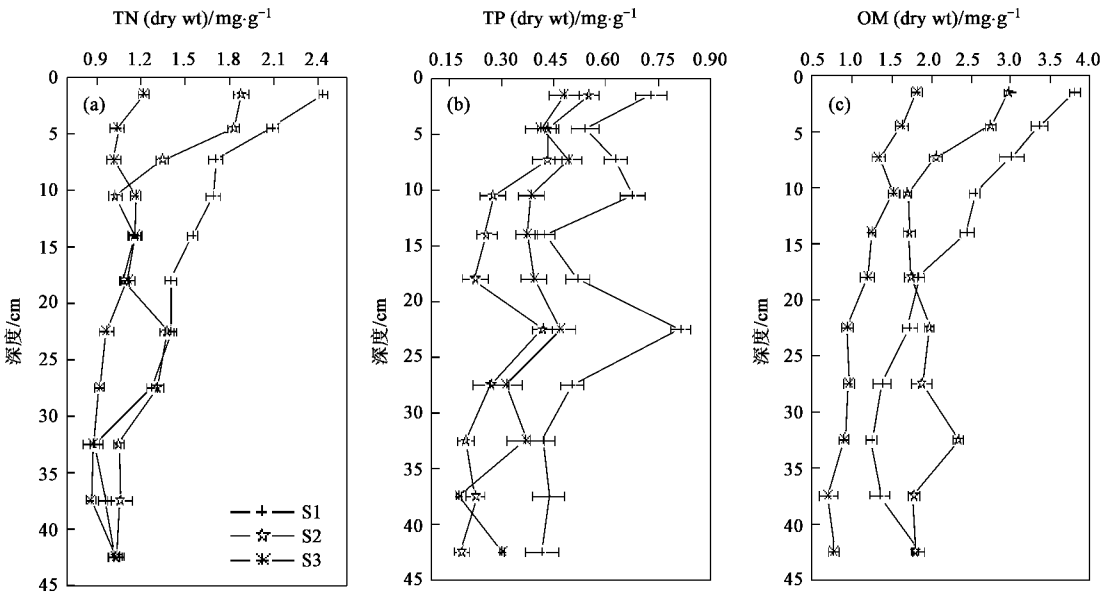


图 2 三位点沉积物柱样 TN、TP 和 OM 垂向变化

Fig.2 Vertical characteristics of TN,TP and organic matter in three sediment samples of Lake Taihu

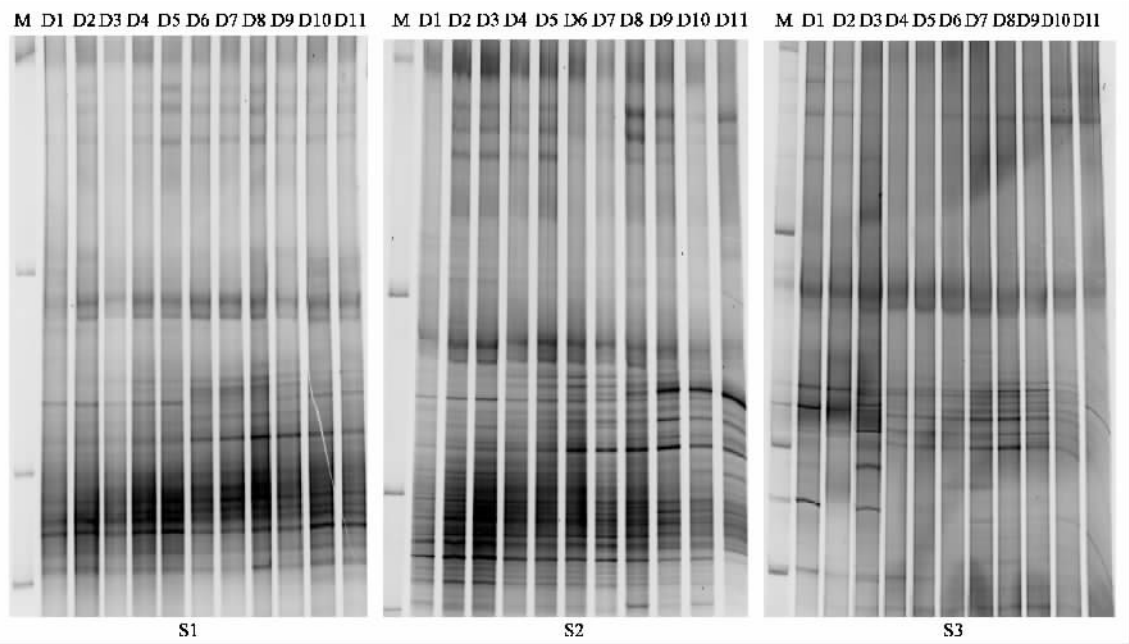
2.2 沉积物中微生物群落结构的 16S rDNA 的 DGGE 结果

对沉积样品同时进行总 DNA 提取、纯化,得到总 DNA 的长度均在 23 kb 左右,采用对大多数细菌 16S rDNA 基因具有特异性的引物对 F₃₄₁-GC 和 R₉₀₇ 进行 PCR 扩增,都得到了长度约为 686 bp 左右的 DNA 片段,对上述各个样品的扩增产物进行 DGGE 分析,可以分离出数目不等、位置各异电泳条带,从而鉴别不同湖区以及不同沉积深度样品中微生物群落结构的差异和生物多样性.根据 DGGE 能分离长度相同而序列不同 DNA 的原理,每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或操作分类单位 (operational taxonomic unit, OTU) 相对应,条带数越多说明生物多样性越丰富,条带染色后的荧光强度则反映该细菌的丰富度,条带信号越灰,表示该种属的数量越多.从而反映湖泊沉积物中微生物的种类和数量^[26-29].

从图 3 可以看出,不同沉积深度样品微生物群落结构和种群数量不同.沉积物上、中、下层微生物多样性表现出明显的空间差异性.随着沉积物深度

的增加,条带数目先增加后减少,既有某些种群的消亡,也有新种群的增强,优势种群的功能地位处于动态变化中.不同深度沉积物样品之间存在共同 OTU 和各自的特征 OTU.利用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行相似性分析也显示(图 4),相邻的沉积深度样品之间群落结构较类似,相似性 Cs 值较高,随着沉积深度距离增加,相似性 Cs 值差异也增大.图谱相似性分析显示,在 25 cm 深度左右相似性系数 Cs 值降低明显,聚类分支改变,微生物群落结构变化大,揭示了群落结构在此深度发生明显的转变和过渡.

对不同位点沉积样品作 DGGE 图谱分析,从图 3 可见,条带数目和灰度差异明显,微生物的数量与群落结构具有明显的差异,S2 位点的沉积物样品条带数目和灰度明显高于其它两点.从图 4 来看,不同位点样品 DGGE 图谱聚类也有差异,S1 位点沉积样品 DGGE 图谱相似性 Cs 值在 50.8% ~ 85.9% 之间;S2 位点沉积样品 DGGE 图谱相似性 Cs 值在 33.1% ~ 76% 之间;S3 位点沉积样品 DGGE 图谱相似性 Cs 值在 27.9% ~ 60.9% 之间,不同位点样品的 Cs 值存



M. Marker; Lane D1.0 ~ 3 cm; D2.3 ~ 6 cm; D3.6 ~ 9 cm; D4.9 ~ 12 cm; D5.12 ~ 16 cm; D6.16 ~ 20 cm; D7.20 ~ 25 cm; D8.25 ~ 30 cm; D9.30 ~ 35 cm; D10.35 ~ 40cm; D11.40 ~ 45 cm

图3 沉积物柱样 S1、S2 和 S2 位点 DGGE 分离图谱

Fig.3 DGGE analysis of sediment core samples from Lake Taihu

在差异,由此可见不同位点群落结构之间的相似性和动态是不一致的.

三位点沉积物样品的 DGGE 图谱在条带的位置和数目有差异,分析原因是 S1 和 S2 位点沉积物属于同一湖区, DGGE 图谱具有较高的相似性. 而 S3 位点的 DGGE 条带数目和条带位置与 S1、S2 明显不同,说明不同区域相对稳定的微生物群落结构是不同的,其根本可能是由沉积物理化性质差异引起的. S1 和 S2 沉积物中有机物丰富,导致微生物群落结构复杂、多样性更丰富. 对于梅梁湾的 S1 和 S2 点而言,由于 S1 点在梅梁湾水质改善生态系统试验区,相对比较靠岸,由于围隔的存在受风浪影响较小,营养盐含量较高,还原性更强, S1 点的 DGGE 带谱条带较 S2 点少,说明微生物对富营养生境有一定的耐受性,一定的富营养对微生物有刺激作用,有利于条带增多和染色度增加,但富营养过重,则会对一些较敏感的生物类群产生抑制作用. S3 位点远离人类生产活动干扰,沉积物中氮、磷及有机质含量少,污染轻,采样点水生植被覆盖率较高,有较大面积的马来眼子菜优势种分布,水体透明度、水质好于梅梁湾湖区^[30],微生物群落结构相对简单. 在有水生植被的环境下,水生植物的根系不仅能抗风浪的侵扰,保持沉积物的相对固定,同时根系活动的代谢产物,也会有利于微生物的群落活动,因此,出现比较

明显的特征带,代表该采样点沉积物中细菌的特征种属. 根据图 1 ~ 图 3 分析,得出不同采样点理化性质和群落结构有较大差异,因此,沉积物环境条件的差异是导致优势微生物种属发生变化的重要条件,从而使微生物群落结构呈现较高的空间差异性.

DNA 条带丰富度简要表达了沉积物微生物群落的多样性,但它未反映群落相对多度的信息. Shannon-Weiner 指数是研究群落物种数及其个体数和分布均匀程度的综合指标^[31,32]. Shannon-Weiner 指数不仅跟条带数有关,而且与条带的强弱及分布也有一定关系. 图 5 列出了不同位点和不同沉积深度样品的微生物 Shannon-Weiner 指数. 可见,同一湖泊不同湖区(草型、藻型)以及相同湖区生态示范区内,沉积物微生物群落 Shannon-Weiner 指数均存在差异,其中,示范区外点微生物群落 Shannon-Weiner 指数高于示范区内点,贡湖湾采样点(S3)微生物群落 Shannon-Weiner 指数介于两者之间,这与条带数目变化趋势基本一致. 3 个采样点上层指数变化较大,指数之间差异也大,越到下层,指数值相差越小. 其中, S2 位点, Shannon-Weiner 指数随着沉积深度增加,指数值明显降低, S1 和 S3 两位点,表层 10 cm 变化幅度较大, 10 cm 以下,随沉积深度增加,指数值变化不明显. 3 个位点, Shannon-Weiner 指数的变化趋势不尽相同.

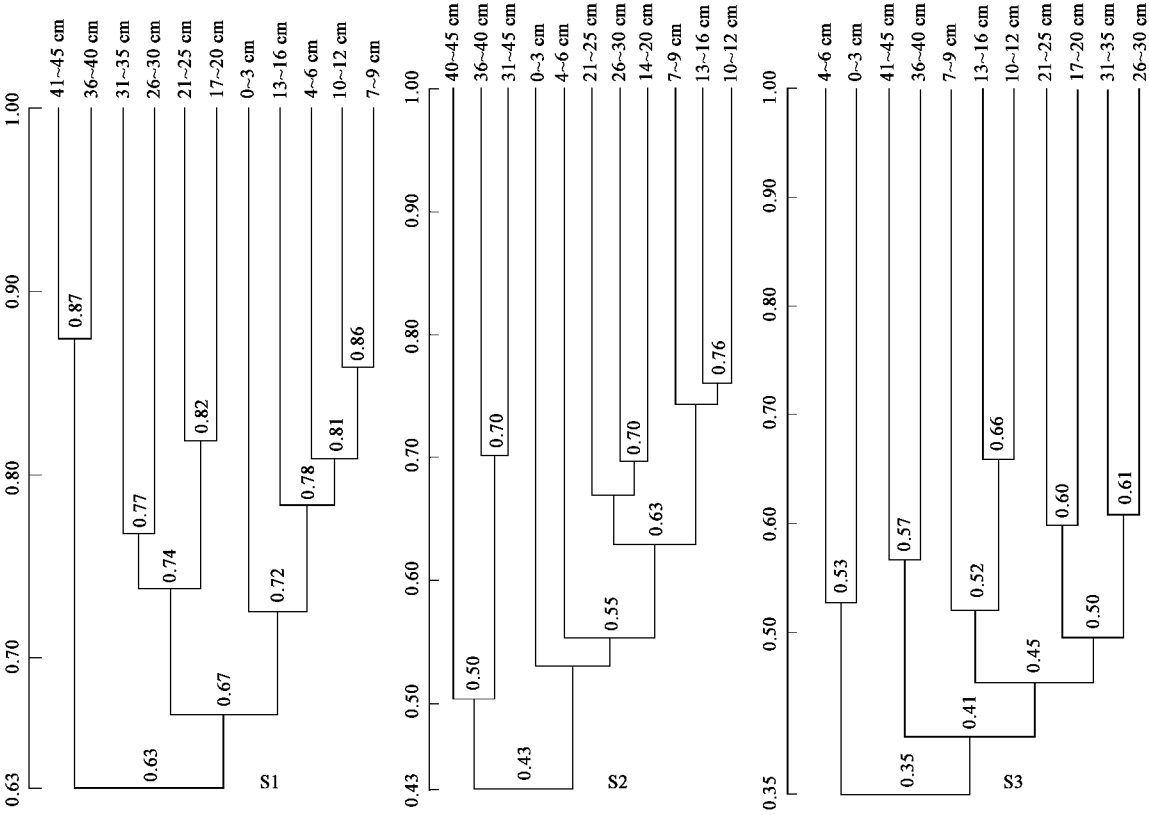


图 4 S1、S2 和 S3 位点 DGGE 图谱 UPGAMA 聚类分析
Fig.4 Clustering analysis of sediment core samples from Lake Taihu

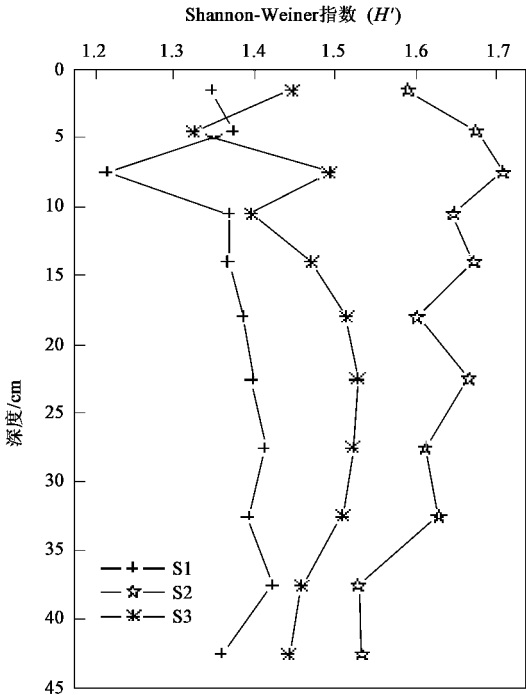


图 5 沉积物微生物群落的 Shannon-Weiner 指数
Fig.5 Shannon-Weiner index of microbial diversity of sediment

2.3 各因子相关性分析

为更好阐述不同湖区沉积物中理化指标以及营养盐对微生物群落多样性的影响,本实验用多元统计法,对理化指标、营养盐含量以及微生物群落多样性指标进行了多元相关分析.

由表 1~表 3 可见,三位点 TN 与 OM 之间都存在显著的相关性,分析原因可能是有机质和氮的变化趋势基本一致,微生物对有机质和氮的分解速率相当.三位点理化指标、营养盐含量与微生物群落多样性指标之间不存在显著的相关性,分析原因可能是微生物多样性是环境物理、化学和生物多方面共同作用的结果.

S1 位点除了总氮与有机质之间在 $p < 0.01$ 水平上存在显著的相关关系,其他各指标之间在 $p < 0.05$ 水平不存在显著相关关系.S2 位点 pH、Eh 以及 TN、OM 之间在 $p < 0.01$ 或 $p < 0.05$ 水平上存在显著的相关关系,S3 位点理化指标与营养盐之间在 $p < 0.01$ 或 $p < 0.05$ 水平上不存在显著的相关关系,但营养盐之间在 $p < 0.01$ 或 $p < 0.05$ 水平上存在显著的相关关系.这在一定程度上说明不同湖区生境

表 1 S1 位点沉积物参数 Pearson 相关性分析¹⁾

Table 1 Pearson correlations in sediment parameters of S1 samples in Lake Taihu						
	pH	Eh	TN	TP	OM	H'
pH	1					
Eh	0.213	1				
TN	-0.474	0.268	1			
TP	-0.423	-0.054	0.593	1		
OM	-0.435	0.371	0.947**	0.455	1	
H'	0.516	-0.330	-0.387	-0.246	-0.566	1

1) * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, 下同

表 2 S2 位点沉积物参数 Pearson 相关性分析

Table 2 Pearson correlations in sediment parameters of S2 samples in Lake Taihu						
	pH	Eh	TN	TP	OM	H'
pH	1					
Eh	-0.663*	1				
TN	-0.613*	0.686*	1			
TP	-0.150	0.153	0.363	1		
OM	-0.702*	0.834**	0.864**	0.227	1	
H'	0.258	-0.143	0.289	0.279	0.144	1

表 3 S3 位点沉积物参数 Pearson 相关性分析

Table 3 Pearson correlations in sediment parameters of S3 samples in Lake Taihu						
	pH	Eh	TN	TP	OM	H'
pH	1					
Eh	-0.201	1				
TN	-0.386	-0.461	1			
TP	-0.055	-0.213	0.511	1		
OM	-0.173	-0.311	0.782**	0.671*	1	
H'	0.111	0.110	-0.347	0.025	-0.528	1

的差异性,为全面了解太湖现状提供理论依据.

3 结论

(1)三位点垂向 pH、Eh 分布差异明显,不同位点柱样 TN、TP 以及有机质含量及变化趋势不一致.除 S2 位点的总磷含量低于 S3 位点之外,藻型湖区 S1 和 S2 位点营养盐、沉积物还原性均高于草型湖区 S3 位点;相对于同一湖区的 S1 和 S2 两点,营养盐含量和沉积物还原性从沿岸向开阔湖心方向呈降低趋势.

(2)沉积物样品中微生物群落结构显示了明显的垂向空间分布多样性差异,相邻深度沉积深度群落结构相似性大,微生物群落结构在 25 cm 深度左右变化明显,群落结构在此深度发生明显的转变和过渡.

(3)不同湖区群落结构之间的相似性和动态是

不一致的,微生物群落结构呈现较高空间差异性.

(4)三位点 TN 与 OM 之间均存在显著的相关性,但理化指标、营养盐含量与微生物群落多样性指标之间不存在显著的相关性.

参考文献:

[1] 汪福顺,刘从强,梁小兵.湖泊沉积物-水界面铁的微生物地球化学循环及其与微量金属元素的关系[J].地质地球化学,2003,31(3):63-69.

[2] Koizumi Y, Takii S, Fukui M. Depth-related change in archaeal community structure in a freshwater lake sediment as determined with denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rRNA genes and reversely transcribed rRNA fragments [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2004, 48: 285-292.

[3] Aller R C, Hall P O J, Rude P D, *et al.* Biogeochemical heterogeneity and suboxic deagenesis in hemipelagic sediments of the Panama Basin [J]. Deep Sea Res, 1998, 45: 133-165.

[4] Akkerman A D L S, Mirza M S, Harmsen J M H, *et al.* Molecular ecology of microbes: A review of principles, pitfalls and true progress [J]. FEMS Microbiol Rev, 1994, 15: 185-1941.

[5] Amann R L, Ludwig W, Schleifer K H. Phlogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without eultiation [J]. Microbiol Rev, 1995, 59: 143-169.

[6] 郝春博,张洪勋,白志辉,等.酸性矿山废水区域沉积物中嗜酸菌多样性研究[J].环境科学,2006,27(11):2255-2260.

[7] Orphan V J, Taylor L T, Hafenbradl D, *et al.* Culture dependent characterization of microbial assemblages associated with high temperature petroleum reservoirs [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 700-711.

[8] Chan O C, Claus P, Casper P. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment[J]. Environ Microbiol, 2005, 7(8): 1139-1149.

[9] Fischer S G, Lerman L S. DNA fragments differing by single base-pair substitution are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80(6): 1579-1583.

[10] Muyzer G, Ellen C W, Andre G U. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain amplified reaction genes encoding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695-700.

[11] 金相灿,屠清瑛.湖泊富营养化调查规范[M].(第二版).北京:中国环境科学出版社,1990.102-122.

[12] 于天仁,王振权.土壤分析化学[M].北京:科学出版社,1988.

[13] Roose A C L, Garnier S E M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples [J]. Appl Soil Ecol, 2001, 18: 47-60.

[14] Gabriela F D, Alexandre S R, Lucy S A C, *et al.* Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community [J]. J Microbiol Meth, 1998, 32: 21-29.

[15] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a

- hot spring microbial mat community [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62**: 340-346.
- [16] Hemant J P, Kapley A, Moharikar A A, *et al.* A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants [J]. J Microbiol Meth, 2003, **52**(16): 315-323.
- [17] Erik J, Gabriel Z, Miranda P, *et al.* Changes in Bacterial and Eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with virus [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, **65**: 795-801.
- [18] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. (第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [19] Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerpring of microbial communities by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, **70**(8): 4800-4806.
- [20] 孙顺才, 黄漪平. 太湖 [M]. 北京: 海洋出版社, 1993. 199-230.
- [21] Müller A K, Westergaard K, Christensen S, *et al.* The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances [J]. Microb Ecol, 2002, **44**: 49-59.
- [22] 孙顺才, 伍贻范. 太湖形成演变与现代沉积作用 [J]. 中国科学 (B 辑), 1987, **16**(12): 1329-1339.
- [23] 范成新, 刘元波, 陈荷生. 太湖底泥蓄积量估算及分布特征探讨 [J]. 上海环境科学, 2000, **19**(2): 72-75.
- [24] 金相灿, 刘鸿亮, 屠清瑛, 等. 中国湖泊富营养化 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 31-50.
- [25] 金相灿. 中国湖泊水库环境调查研究 (1980-1985) [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 1-208.
- [26] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用 [J]. 生态学报, 2003, **23**(8): 1570-1575.
- [27] 邢薇, 左剑恶, 孙寓姣, 等. 利用 FISH 和 DGGE 对产甲烷颗粒污泥中微生物种群的研究 [J]. 环境科学, 2006, **27**(11): 2268-2272.
- [28] Sahm K, MacGregor B J, Jorgensen B B, *et al.* Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment [J]. Environ Microbiol, 1999, **1**: 65-74.
- [29] Urakawa H, Yoshida T, Nishimura M, *et al.* Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling [J]. Environ Microbiol, 2000, **2**: 542-554.
- [30] 赵兴青, 杨柳燕, 陈灿, 等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构的多样性研究 [J]. 生态学报, 2006, **26**(11): 1310-1316.
- [31] Felske A, Akkermans A D L. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils [J]. Microb Ecol, 1998, **36**: 31-36.
- [32] 殷峻, 陈英旭, 刘和, 等. 应用 PCR-DGGE 技术研究处理含氮废气的生物滤塔中微生物多样性 [J]. 环境科学, 2004, **25**(6): 11-15.