

吕明姬, 汪杰, 范铮, 等. 2011 滇池浮游细菌群落组成的空间分布特征及其与环境因子的关系 [J]. 环境科学学报, 31(2): 299-306

L M J Wang J Fan Z *et al* 2011 The spatial variations of bacterioplankton community composition in Lake Dianchi and their relation to environmental factors [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 31(2): 299-306

滇池浮游细菌群落组成的空间分布特征及其与环境因子的关系

吕明姬¹, 汪杰², 范铮³, 黄艺^{1*}

1 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871

2 北京大学深圳研究生院环境与能源学院, 深圳 518055

3 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083

收稿日期: 2010-06-10 修回日期: 2010-08-12 录用日期: 2010-08-26

摘要: 为探讨滇池湖体浮游细菌群落组成的空间分布特征, 并找出影响浮游细菌群落组成分布的主要影响因子, 通过 16S rRNA 末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 分析手段研究了滇池湖体夏季由北向南 9 个采样点浮游细菌的群落结构. 结果表明, 9 个采样点共得到 52 个不同的片段 (T-RFs), 且每种片段至少代表一种细菌. 各采样点浮游细菌群落的组成不同, 并且优势菌也发生了变化, 但 9 个采样点的 Shannon-Weiner 指数和均匀度指数都较低, 说明滇池的生态环境已很脆弱. 通过聚类 (Cluster) 和多维尺度 (MDS) 分析浮游细菌群落的空间分布发现, 水质情况相似的采样点其浮游细菌群落组成也相似, 并且可将 9 个采样点的浮游细菌群落组成为 4 类. 典型相应分析 (CCA) 结果表明, 氨氮 ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$)、总氮 (TN)、硝氮 ($\text{NO}_3^- - \text{N}$)、叶绿素 a (Chl a) 对浮游细菌的分布影响最大, 其次为 pH 和温度.

关键词: 浮游细菌; 16S rRNA-T-RFLP; 空间差异; 环境因子; 滇池

文章编号: 0253-2468(2011)02-299-08 中图分类号: X524 文献标识码: A

The spatial variations of bacterioplankton community composition in Lake Dianchi and their relation to environmental factors

LÜ Mingji¹, WANG Jie², FAN Zheng³, HUANG Yi^{1*}

1 College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871

2 School of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055

3 College of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083

Received 10 June 2010 received in revised form 12 August 2010 accepted 26 August 2010

Abstract Lake Dianchi is in a serious eutrophication state. However, the water quality varies spatially in the lake. In order to explore the spatial distribution of bacterioplankton community compositions (BCCs), as well as to identify the key factors that affect the distribution of BCCs, 9 surface water samples were investigated along the trophic gradient in the summer of 2009 by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). In total, fifty-two terminal restriction fragments (T-RFs) were detected in all samples. The nine samples had different bacterial compositions and predominant types. But the Shannon-Weiner diversity indices and evenness in all the samples were low, which indicated that the ecological status of Lake Dianchi was fragile. Multidimensional scaling (MDS) analysis indicated that the samples that scattered closely had similar water qualities, verified by cluster analysis using UPGMA (unweighted pair-group method using averages). Meanwhile, the BCCs of 9 samples could be divided into four clusters. The result of canonical corresponding analysis (CCA) also illuminated the environmental factors affecting the BCC, among which $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, total nitrogen, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ and Chl a were the most influential factors, though, pH and temperature also had a certain influence.

Keywords bacterioplankton; 16S rRNA-T-RFLP; space difference; environmental factors; Lake Dianchi

1 引言 (Introduction)

浮游细菌不仅数量巨大, 而且在有机物降解及

营养物循环过程中具有重要作用, 是水生态系统的重要组成部分 (Muylaert *et al*, 2002; Wei *et al*, 2008). 另外, 在水生态系统中, 微生物对外部环境

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (No. 2008ZX07526-002-06)

Supported by the National Key Technologies R & D Program on Water Pollution Control and Management of China (No. 2008ZX07526-002-06)

作者简介: 吕明姬 (1985-), 女, E-mail: lumingji@live.cn; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: yhuang@pku.edu.cn

Biography: LÜ Mingji (1985-), female, E-mail: lumingji@live.cn; * Corresponding author, E-mail: yhuang@pku.edu.cn

的变化非常敏感 (Paerl *et al.*, 2003). 因此, 作为对外部环境变化最灵敏的响应, 浮游细菌群落组成的改变能在一定程度上反映该水环境的状态. 目前, 越来越多的研究开始关注浮游细菌与环境因子之间的关系 (Donner *et al.*, 1996; Lindström, 2001; Liu *et al.*, 2009). 但是, 由于浮游细菌与环境因子之间的关系较为复杂, 大多研究至今仍处于摸索阶段 (Vieira *et al.*, 2008). 同时, 针对严重富营养化湖泊内浮游细菌群落与环境因子之间关系的研究报道也相对较少.

滇池位于昆明市西南, 属断陷构造湖泊, 是云贵高原湖面积最大的淡水湖. 近年来, 由于城市化进程的飞速发展, 大量含有高浓度氮、磷等营养物的污染物排入滇池, 使得整个湖泊的富营养化问题十分严重. 尽管如此, 滇池内不同湖区的水质情况却不尽相同. 研究发现, 由南至北, 滇池的富营养水平不同 (Xing *et al.*, 2005; Cai, 2009).

基于此, 本文应用末端限制性酶切片长度多态性分析 (T-RFLP) 手段, 对滇池内不同湖区水体中浮游细菌群落组成进行研究, 探讨浮游细菌群落组成的空间分布差异. 同时, 通过典型相应分析 (CCA) 研究浮游细菌群落的组成与环境因子的关系, 以期找出影响浮游细菌群落组成分布的关键因子, 为富营养化水体的生态环境修复提供基础信息和理论依据.

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 样品采集

2009年8月, 于滇池草海 (D1和D2) 和外海 (D3~D9) 采集实验样品, 共9个样点, 分别为断桥 (D1)、草海中心 (D2)、灰湾中 (D3)、罗家营 (D4)、观音山西 (D5)、观音山东 (D6)、白鱼口 (D7)、海口西 (D8)、滇池南 (D9) (图1). 于每个样点 (距水面0.2~0.3m处) 取1.6L表层水, 分装在4个已灭菌的玻璃瓶中, 其中两瓶用于测定各项水质指标, 另外两瓶用于T-RFLP研究. 所取水样立刻运往实验室, 于4℃黑暗保存, 且所有样品都在一周内进行分析.

2.2 DNA提取

400mL水样经0.22μm微孔滤膜过滤后, 将截留有微生物的滤膜于-20℃保存. 在超净台用灭菌的剪刀将滤膜剪成碎片装入离心管中, 采用上海申能博彩试剂盒提取过滤后水样中的总DNA, 具体方

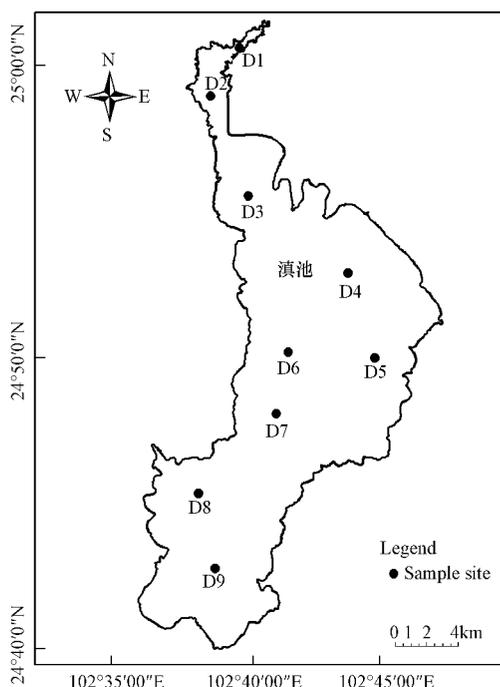


图1 采样点布图

Fig. 1 Map of the sample sites

法参照试剂盒产品说明书. 每个样品所采的两瓶水样 (每瓶含水样400mL) 平行提取DNA.

2.3 16S rRNA片段的PCR扩增和T-RFLP分析

用于T-RFLP分析的引物为细菌通用引物27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和1492r (5'-GGTACCTGTGTTACGACTT-3'), 正向引物27f的5'端用FAM荧光素标记. 采用25μL的PCR反应体系: 12.5μL 2×Taq PCR Master Mix (天根公司), 2μL合成的正反引物 (赛百盛公司), 3μL DNA模板, 5.5μL ddH₂O. 反应条件如下: 94℃预变性5min; 94℃变性30s; 55℃退火30s; 72℃延伸90s, 共30个循环; 最终72℃延伸5min. 对于一个样点, 分别以上述2个DNA提取产物为模板进行PCR扩增, 且每个模板都设6个PCR重复, 以降低PCR的偏好性和假象. 9个样点共设108 (2×6×9) 个PCR体系.

PCR扩增产物用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测. 然后, 将6个PCR产物混合, 按照天根纯化试剂盒的操作步骤对混合产物进行纯化, 纯化后的产物采用限制性内切酶Hae III (赛百盛公司) 进行酶切, 反应体系如下: 3μL限制性内切酶, 3μL缓冲液, PCR产物15μL. 酶切后, 65℃水浴灭活15min. 酶切产物送至上海基康公司进行测定. 每个样点最后得到2个T-RFLP图谱.

2.4 T-RFLP图谱预处理

对于每个图谱, 去掉荧光强度低于 100RFU 和长度小于 50bp 的片段, 将剩下片段的峰面积进行标准化处理, 并去除相对丰度小于 1% 的片段, 将长度小于 1bp 的片段并在一起, 将每个样点的两个 T-RFLP 图谱进行比对, 去掉只在一个图谱中出现的片段。

2.5 水质指标的测定

现场测定水温 (T), 其他水质指标, 如溶解氧 (DO)、溶解有机碳 (DOC)、总氮 (TN)、总磷 (TP)、氨氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、硝氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、叶绿素 a (Chla)、透明度 (SD) 的测定都参照国家环保部的标准方法 (GB 3838-2002)。

2.6 数据分析

将 T-RFLP 的数据转换成 1~0 矩阵 (1 表示有, 0 表示无)。利用 SPSS16.0 中的聚类分析工具 (Classify-hierarchical Analysis), 采用非加权配对算术平均法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages UPGMA) 对各采样点的浮游细菌群落组成进行聚类分析, 以 Jaccard 系数表示样点间的相似系数。

利用 SPSS16.0 中的度量工具 (Scale Analysis), 采用多维度尺度 (Multidimensional Scaling MDS) 法将各样点浮游细菌群落组成的空间分布在二维图上可视化。MDS 中, 一般采用压力系数及 RSQ (R-square) 来评定所得到的多维构形与实际数据之间的适合度。压力系数越小或 RSQ 越大, 表示适合度越高。根据 Kruskal (1964) 提出的判断标准, 当压力系数 ≥ 0.20 时, 适合度为不良 (poor), $0.10 \sim 0.20$ 时, 为可 (fair); $0.05 \sim 0.10$ 时, 为良 (good); $0.025 \sim 0.05$ 时, 为优 (excellent); ≤ 0.025 时, 为完全 (perfect)。

应用 CANOCO 4.5 分析各样点浮游细菌群落与环境因子之间的关系。用 Forward Selection 选出方差贡献率最大的环境因子, 并采用 Monte Carb

Permutation Test 检验 CCA 的分析结果是否可靠。

常采用物种多样性与均匀度指数来描述生态群落物种数多寡和个体分布情况, 本文以 OTU 为单位进行群落多样性指标的统计分析, 主要包括物种丰度 (S)、Shannon-W einer 指数 (H')、均匀度指数 (E),

计算公式如下:

$$H' = - \sum_i^s P_i \ln P_i \quad (1)$$

$$E = \frac{H'}{\ln S} \quad (2)$$

式中, S 表示 T-RF 个数, 即物种丰度; P_i 表示某个峰的峰面积占总峰面积的比例, $P_i = N_i / N$, 其中, N_i 指某个峰的峰面积, N 指总峰面积。由于本实验有两个 T-RFLP 平行, 因此, 峰面积是预处理后两个图谱中相应峰面积的平均值。

3 结果 (Results)

3.1 不同样点的水质参数

从表 1 可以看出, 滇池处于碱性状态, 但草海的 pH 值低于外海。DO、DOC、 T 在 9 个采样点间的变化趋势不明显。草海中 SD、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的平均值分别为 41 cm 、 0.283 mg L^{-1} , 外海中的平均值分别为 46 cm 、 0.044 mg L^{-1} , 但二者在草海和外海中的变化不大。其他因子, 如 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TP、TN、Chla 在草海中的平均浓度分别是外海的 22.58、7.85、6.93、2.99 倍, 且以上 4 个因子在草海和外海中的变化也较大。草海中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TP、TN 在断桥 (D1) 中的浓度是草海中心 (D2) 的 1.69、1.19、1.48 倍, Chla 在草海中心 (D2) 中的浓度是断桥 (D1) 的 1.29 倍。外海中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 在海口西 (D8) 中的浓度是观音山东 (D6) 的 2.16 倍, TP 在观音山西 (D5) 中的浓度是滇池南 (D9) 的 3.71 倍, TN 在海口西 (D7) 中的浓度是滇池南 (D9) 的 1.66 倍, Chla 在灰湾中 (D3) 中的浓度是海口西 (D8) 的 3.59 倍。

表 1 各采样点处水样的理化参数

Table 1 The physical and chemical properties of the water samples

样点编号	测点名称	$T / ^\circ\text{C}$	pH	DO / (mg L^{-1})	$\text{NH}_4^+\text{-N} /$ (mg L^{-1})	TP / (mg L^{-1})
D1	断桥	24.4	8.14	6.47	9.248	1.250
D2	草海中心	25.2	8.42	6.72	5.471	1.050
D3	灰湾中	24.5	9.87	6.86	0.314	0.181
D4	罗家营	24.7	9.78	6.42	0.285	0.088
D5	观音山西	25.1	9.85	6.72	0.264	0.267

续表

样点编号	测点名称	$T / ^\circ\text{C}$	pH	DO / (mg L^{-1})	$\text{NH}_4^+ - \text{N} /$ (mg L^{-1})	TP / (mg L^{-1})
D6	观音山东	26.2	9.76	6.14	0.259	0.171
D7	白鱼口	27.2	9.56	6.41	0.301	0.133
D8	海口西	26.8	9.59	6.67	0.560	0.113
D9	滇池南	25.5	9.64	6.38	0.299	0.072

样点编号	测点名称	TN / (mg L^{-1})	Chla / (mg L^{-1})	$\text{NO}_3^- - \text{N} /$ (mg L^{-1})	DOC / (mg L^{-1})	SD /cm
D1	断桥	13.8	0.217	0.282	16.8	42
D2	草海中心	9.30	0.279	0.285	15.2	40
D3	灰湾中	1.92	0.122	0.040	17.7	42
D4	罗家营	1.31	0.072	0.040	17.7	44
D5	观音山西	1.88	0.105	0.060	15.5	50
D6	观音山东	1.68	0.119	0.045	16.7	46
D7	白鱼口	2.14	0.065	0.050	17.7	48
D8	海口西	1.44	0.034	0.040	14.8	46
D9	滇池南	1.29	0.064	0.036	14.8	46

3.2 浮游细菌群落结构分析

研究发现, 9个样点中共发现 52种不同的 T-RFs。由于每个片段至少代表一种细菌, 表明滇池内至少有 52种不同的细菌。其中, 8种长度 (69、70、163、194、196、225、260和 290bp) 的片段分布较为广泛, 在至少 8个采样点中都被检出。但是, 各采样点中检测到的片段种类均较少, 种类最多的为观音山东 (D6), 有 27种不同的片段。灰湾中 (D3) 和滇池南 (D9) 所含片段种数最少, 都仅有 16种片段。

表 2 各采样点中不同片段所代表的优势菌分布情况

Table 2 The distribution of different dominant bacteria at the sample sites

取样点	片段总数	优势片段长度 /bp
断桥	25	69, 218, 227, 237
草海中心	23	69, 70, 196, 227, 237
灰湾中	16	69, 70, 213, 237, 260, 301
罗家营	23	69, 70, 260
观音山西	25	217, 260
观音山东	27	69, 237, 260, 301
白鱼口	26	69, 70, 181, 223, 260
海口西	22	69, 70, 223, 260
滇池南	16	69, 181, 260, 290

另外, 每个采样点的优势菌也不尽相同。断桥 (D1) 及草海中心 (D2) 虽然都属于草海, 但二者的优势菌已发生了明显变化, 在断桥, T-RF 为 218bp 的浮游细菌是优势菌, 在草海中心却被 T-RF 分别为 70 和 196bp 的浮游细菌所代替。外海的情况也相似, 最近的 2 处采样点——观音山东 (D6) 和观音山西 (D5), 只有一种共有的优势菌片段 (260 bp)。

根据 T-RFLP 数据分析各采样点浮游细菌种群的基因多样性, 结果如图 2 所示。从图 2 可以看出, 9 个采样点的 Shannon-Wiener 多样性指数普遍偏低。其中, 罗家营 (D4) 最高, 滇池南 (D9) 最低, 分别为 2.761、1.9123。均匀度指数跟多样性指数一致, 罗家营 (D4) 最高, 为 0.8808。滇池南 (D9) 最低, 为 0.6897。但是, 多样性指数和均匀度指数并没有随着地理位置 (由北向南) 的变化而表现出明显的上升或下降规律。

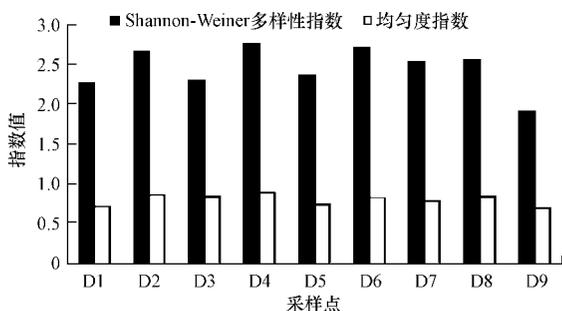


图 2 各采样点浮游细菌种群的基因多样性分析

Fig. 2 Analysis of the gene diversity of bacterioplankton communities

3.3 浮游细菌群落组成空间分布分析

为了进一步研究滇池内浮游细菌群落组成的空间分布差异, 对已转换成 0~1 矩阵的 T-RFLP 数据进行聚类分析和 MDS 分析, 结果见图 3 和图 4。由图 3 可知, 9 个采样点中, D4 和 D5 间的相似性系数最大, 为 0.79。因此, D4 和 D5 首先聚在了一起, 这可能由于 D4 和 D5 的地理位置最近, 且水质情况最相似, 但值得注意的是, D1 与 D2 的地理位置也较

近,但 D1和 D2间的相似性系数却较低,只有 0.33。不仅如此, D1与其他 8个采样点的相似性系数都低于 0.35, D2与其他 8个点的相似性系数都低于 0.45, D1和 D2同时与 D9的相似性系数最低。根据图 3,在相似性系数有跳跃变化处,可将 9个样点分为 4类, D1、D2、D9各为一类, D3、D4、D5、D6、D7、D8为一类。

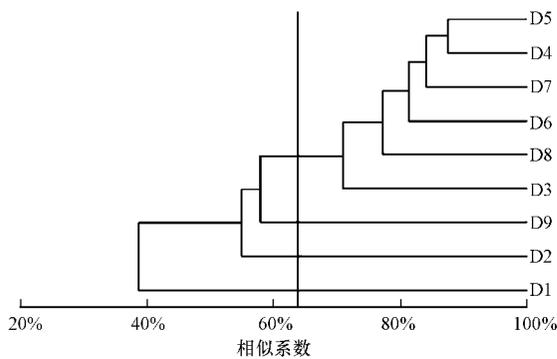


图 3 浮游细菌群落组成聚类分析

Fig 3 Cluster analysis of bacterioplankton community compositions by UPGMA

通过 MDS分析,可将 9个采样点浮游细菌群落组成的空间分布可视化(图 4)。其中,压力系数和 RSQ 值分别为 0.05416和 0.9913,说明可以通过二维图来反映各采样点间浮游细菌群落的相似性。在图 4中不存在位置完全重合的样点,即不存在种群组成完全相同的样品,因此,浮游细菌种群的基因组成存在不同程度的时空变化。同时,各样点间在二维图中的相对距离也可反映所对应的浮游细菌群落组成的相似程度,因此,根据各样点间的相对距离,也可将 9个采样点分为 4类,且这一分类结果与聚类分析的结果一致。

第 I 类(D1)和第 II 类(D2)的两个样点都处于草海,最靠近城市,水质情况最差,氮、磷营养物的浓度也最高。一些 T-RFs(包括 52、64、183、216、218、281、318、326、375、401、403、406、620 bp)所代表的细菌是草海所特有的,这些特有细菌的出现,以及 T-RFs为 218、196、227、237bp 的细菌仅在 D1和 D2处成为优势菌,在一定程度上是对草海高污染情况的响应。

第 III、IV 类(D3~ D8、D9)的 7个样点位于滇池的湖体内部,即外海。尽管湖体内部面积较大,但污染情况相似。对应于草海,湖体内部也出现了独有的 T-RFs,包括 60、136、157、178、208、215、222、223、234、258、264、266、278、283、301、325、385、627 bp,

且 T-RFs为 260bp 的细菌在外海中所有采样点都是优势菌,这在一定程度上是对外海相对低污染水平的响应。

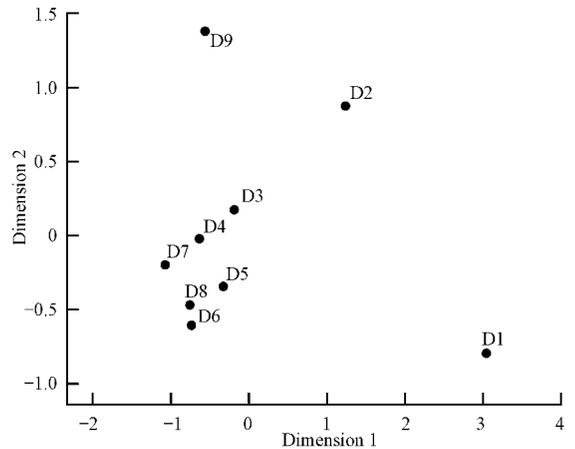


图 4 浮游细菌群落组成的空间分布的 MDS 二维图

Fig 4 Two-dimensional MDS map of bacterioplankton community compositions

3.4 浮游细菌群落组成与环境因子的相关分析

Monte Carlo Permutation Test 结果显示,选出的 6个环境因子 (NH_4^+-N 、TN、 NO_3^--N 、Chla、pH 和温度)与第一排序轴 (AX1) ($p < 0.05$)及全部排序轴 ($p < 0.05$)均呈显著的相关关系。典型相应分析 (CCA) 的前 4 轴解释了 75.4% 的物种方差和 87.5% 的物种-环境方差,表明 CCA 的分析结果是可靠的,能较好地反映 6个环境因子与浮游细菌组成变化的关系(表 3),同时也说所选出的 6个环境因子可以解释环境因子与浮游细菌的关系。4 个特征轴中,第一排序轴 (AX1) 的特征值最大 (0.471),明显高于其他 3 个排序轴,因此,环境因子沿 AX1 轴的变化对浮游细菌的分布影响最大。同时,AX1 轴反映的细菌基因组成与环境因子的相关系数最高 (0.999),浮游细菌种类与环境因子(物种-环境)的累计方差百分数为 43.4%。

表 3 各采样点浮游细菌群落组成与环境因子关系的 CCA 分析结果

Table 3 The CCA results between environmental factors and the bacterioplankton communities

排序轴	特征值	r	累计方差百分数	
			物种	物种-环境
AX1	0.471	0.999	37.4%	43.4%
AX2	0.245	0.995	56.9%	66.0%
AX3	0.137	0.928	67.8%	78.6%
AX4	0.096	0.972	75.4%	87.5%
总特征值	1.259			

注: r 表示 6个环境因子与各排序轴的相关系数。

在 CCA 双轴图中 (图 5), 用箭头表示水质指标, 箭头连线的长度表示浮游细菌的分布与该环境因子相关系数的大小, 箭头连线与排序轴的角度表示该环境因子与水质污染状况相关系数的大小, 箭

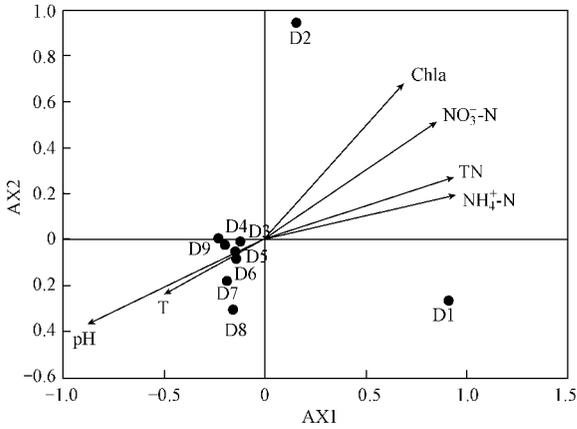


图 5 滇池内各采样点与环境因子的 CCA 双轴图 (↑ 表示环境因子, ● 表示样点)
 Fig 5 CCA ordination biplot between sample sites and environmental factors in Lake Dianchi (↑ environmental factors, ● sample sites)

头所处的象限则表示该水质指标与水质污染状况相关系数的正负. 由图 5 可知, 所选出的 6 个环境因子中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、Chla 与 AX1 正相关, 相关系数都较大, 分别为 0.9653、0.9547、0.8493、0.6960, pH、温度 (T) 与 AX1 负相关, 相关系数为 -0.8853、-0.4948, 说明沿着第一排序轴的正方向, 营养水平逐渐升高. 9 个样点在第一排序轴上的分布情况也可看出各采样点的营养情况, 与表 1 的结果一致. D1 和 D2 分散在图 5 的最右侧, 说明这两个点的营养水平最高, 差异较大, 而其他 7 个采样点分布在图的左侧, 且较为集中, 说明其营养水平相对较低, 差异不大, 其中, D9 采样点分布在图的最左侧, 营养水平最低 (图 5). 而物种的分布情况也表明各个采样点的浮游细菌群落组成不同. 从图 6 可以明显地看出, 浮游细菌在各采样点中的分布是有差异的. 如 T-RFs 为 52、64、37、318、401、406bp 的细菌只在 D1 中发现, 而 T-RFs 为 197、216、249bp 的细菌 (即 T197、T216、T249) 是 D2 所独有的, 且大多数的细菌种类主要分布在图 6 的左侧.

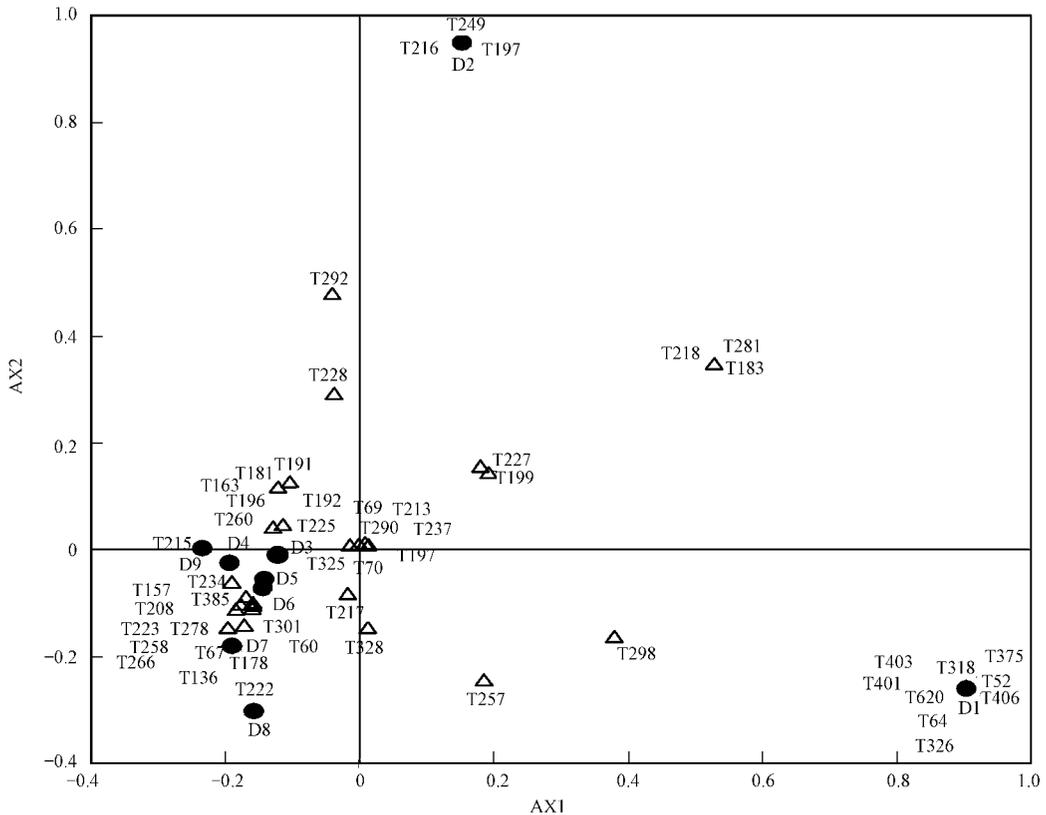


图 6 滇池内各采样点与浮游细菌物种的 CCA 双轴图 (△ 表示片段长度 (T-RF), ● 表示样点)

Fig 6 CCA ordination biplot between sampling sites and bacterioplankton species in Lake Dianchi (△ terminal restriction fragments (T-RFs), ● sample sites)

4 讨论 (Discussions)

利用传统的分离培养方法来揭示微生物的群落结构存在很多局限性, 如不同微生物的培养条件不同, 培养和筛选操作较为复杂等, 使得能分离培养的微生物种类数仅占环境中总微生物的 1% 左右 (Amann *et al.*, 1995). 而本研究应用 T-RFLP 这种不依赖于培养, 且基于 16S rRNA 的分子生物学方法可弥补传统分离培养方法的不足, 从而更全面地了解环境中微生物的群落结构. 另外, 由于 DNA 的提取及 PCR 扩增过程的偏好性 (Farrelly *et al.* 1995) 等都会对 T-RFLP 图谱产生影响, 因此, 本研究对于每个采样点都平行设置两个 T-RFLP 重复, 每个 DNA 模板平行设置 6 个 PCR 重复.

本研究结果表明, 9 个样点的浮游细菌群落结构各不相同. 首先, 由于滇池水体污染严重, 导致某些只能在较干净水体中生存的细菌数量减少, 甚至消失, 因此, 各采样点中细菌种类都较少, 细菌种类最多的观音山东 (D6) 采样点中也只检测到 27 个 T-RFs. 由于每种细菌都有各自相对适宜的栖息地 (Wei *et al.*, 2008), 而各采样点的水质情况不同, 因此, 各采样点的优势菌种类也不同. 另外, 9 个采样点的细菌多样性指数虽没有表现出明显的规律, 但都偏低. 生态学理论认为, 大量生态位彼此交叉的种群处于优势时, 一个类群数量的改变会由另一类群来弥补, 这样的生态系统更稳定, 更能抵御外来干扰的冲击 (任南琪, 2000), 即生物多样性高的生态系统更稳定. 滇池浮游细菌的多样性低说明滇池水体富营养化严重, 生态环境已非常恶劣, 甚至可能已很脆弱. 冯胜 (2007) 等的研究表明太湖富营养湖区的浮游细菌多样性指数也较低.

通过聚类分析和 MDS 分析研究各样点的浮游细菌群落的空间分布时发现, 水质情况相似的采样点, 其浮游细菌群落的组成也相似. 其他一些研究也得到了类似的结论 (赵阳国等, 2007; Kostanjek *et al.*, 2005). 滇池草海和外海的水质相差较大, 是由以下两方面因素共同作用形成的. 首先, 滇池是云贵高原湖面积最大的浅水湖泊, 平均水深 5.3m, 水面积为 309.5 km². 其中, 草海仅占全湖面积的 3.6%, 外海却占全湖面积的 96.4%, 使得草海和外海的水体置换周期相差较大, 草海的水体置换周期短, 为 1~2 月 1 次, 而外海的水体置换周期长, 为 3~8 年 1 次. 另一方面, 草海和外海周围的土地利用

方式不同, 草海更靠近昆明市主城区, 无机盐营养盐超标是草海的主要污染问题, 且受城市纳污河流的点源污染影响较大, 而外海两岸主要是大面积的蔬菜和花卉, 主要表现为有机污染物污染且受地表径流的非点源污染影响较大. 因此, 本研究中 9 个采样点的水质明显不同, 且由北至南形成明显的营养梯度.

在各种水生态环境中, 溶解无机氮 (DN) 和溶解无机磷 (DIP) 是异养细菌重要的 N 源和 P 源, 因此, 异养浮游细菌的生长依赖于无机营养盐的数量和性质 (李云等, 2007). 但 CCA 分析结果表明, 无机营养盐中, 只有氮类无机营养物 (包括 NH₄⁺-N、TN、NO₃⁻-N) 成为影响浮游细菌分布的关键因子, 磷对浮游细菌群落组成的分布影响不大. 这可能是因为含磷洗涤剂 and 化肥的使用, 使污水中的磷含量较高, 另一方面, 虽然昆明市已在大力修建污水处理厂, 但由于更关注出水中氮的去除率, 且脱氮除磷在机理上有冲突, 往往造成脱氮与除磷此消彼长的结果 (杜炜锋等, 2003). 而目前出水中氮的去除率更受人们的关注, 经过处理的出水中磷浓度仍然较高. 因此, 流入滇池的污水中磷浓度较高, 致使氮素成为影响浮游细菌分布的限制性因素.

Chl_a 是表征藻类现存量的一个良好指标 (白洁等, 2009). Chl_a 浓度在 9 个采样点中普遍偏高, 说明水中微型藻较多. 由于本研究所取的水样是表层水 (20~30cm), 该水层的 Chl_a 浓度高意味着某些藻类已处于上浮积累阶段 (吕晋等, 2008). 藻生物量的积聚并已上浮, 说明滇池大部分水体可能正处于水华暴发期. 研究表明, 浮游细菌与浮游藻类的群落结构有密切的关系 (Lindström, 2001; Van Hemen *et al.*, 2008). Mulyaert (2000) 等研究了 4 个富营养化程度不同的浅水湖泊中的微食物网, 结果显示, 在富营养化程度严重的湖泊中, 细菌群落组成与浮游藻类的生物量显著相关. 藻类产生的有机物是浮游细菌的重要碳源, Doucette (1995) 研究发现, 藻类群落结构的变化使得其所分泌的有机物质也发生变化, 浮游细菌的种类也随之改变.

另外, 外海的 pH 值明显高于草海, 这也与 Chl_a 的变化有关. 因为藻类的呼吸作用将直接影响水中的 CO₂ 含量, 从而改变水体的 pH 值 (王学雷等, 2003), 从而间接影响浮游细菌群落组成的分布.

5 结论 (Conclusions)

1) 2009 年 8 月, 由北至南于滇池内布设 9 个采

样点,并检测各样点的 10 个环境因子,结果发现,各样点的水质情况不同,其中,草海样点(D1、D2)与外海样点(D3~D7)的水质差异较大,且主要表现在营养物质的浓度方面.通过 T-RFLP 分析发现,滇池水体仅有 52 种 T-RFs,各采样点中浮游细菌群落组成及优势菌也不尽相同,但多样性指数和均匀度指数并没有随着地理位置得变化表现出明显的变化规律.通过聚类分析和 MDS 分析发现,浮游细菌群落在滇池内形成了明显的空间差异,可将 9 个采样点中的浮游细菌群落分为 4 类.

2) CCA 分析结果表明, $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 、 TN 、 $\text{NO}_3^- -\text{N}$ 、叶绿素 a(Chl a)、pH 和温度是影响滇池水体中浮游细菌群落组成的主要因子.滇池内的营养物质,特别是氮类营养物应引起重视.

责任作者简介:黄艺(1964—),女,副教授,博士,硕士生导师,主要从事环境生物学与环境生态学研究. E-mail: yhuang@pku.edu.cn

参考文献 (References):

- Amann R, Ludwig W, Schleifer K H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiological Reviews* 59: 143-169
- 白洁, 时瑶, 宋亮, 等. 2009. 黄海西北部浮游细菌生物量分布特征及其与环境因子的关系 [J]. *中国海洋大学学报*, 39(4): 592-596
- Bai J, Shi Y, Song L, *et al*. 2009. The relationship between the distribution characteristics and the environmental factors of planktonic bacteria biomass in Northwest Yellow Sea [J]. *Journal of Ocean University of China* 39(4): 592-596 (in Chinese)
- 蔡佳亮. 2009. 湖泊流域水生态功能分区研究 [D]. 北京: 北京大学. 39-50
- Cai J L. 2009. Regionalized classification of water-land coupling ecosystem function at lake watershed scale: theory, methodology and its application [D]. Beijing: Peking University. 39-50 (in Chinese)
- Doucette G J. 1995. Interaction between bacteria and harmful algae: a review [J]. *Natural Toxins* 3: 65-74
- Donner G, Schwarcz K, Hoppe H G, *et al*. 1996. Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines [J]. *Arch Hydrobiol Spec Issues Advanc Limnol* 48: 7-14
- 杜伟锋, 周增炎. 2003. 城市污水脱氮除磷结合工艺评述 [J]. *污染防治技术*, 16(4): 116-119
- Du W F, Zhou Z Y. 2003. Comments on processes for removal nitrogen and phosphorous in urban wastewater [J]. *Pollution Control Technology*, 16(4): 116-119 (in Chinese)
- 冯胜, 秦伯强, 高光. 2007. 细菌群落结构对水体富营养化的响应 [J]. *环境科学学报*, 27(11): 1823-1829
- Feng S, Qin B Q, Gao G. 2007. The response of the bacterial community to water eutrophication [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* 27(11): 1823-1829 (in Chinese)
- Farrelly V, Rainey F A, Stackebrandt E. 1995. Effect of genome size and m gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 61(7): 2798-2801
- Kruskal J B. 1964. Multi-dimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis [J]. *Psychometrika*, 29(1): 1-27
- Kostanjak R, Lapanje A, Drobone D, *et al*. 2005. Bacterial community structure analyses to assess pollution of water and sediments in the Lake Skodra/Skadar Balkan Peninsula [J]. *Environment Science Pollution Research* 12(6): 361-368
- 李云, 李道季. 2007. 长江口临近海域浮游细菌分布与环境因子的关系 [J]. *海洋通报*, 26(6): 9-18
- Li Y, Li D J. 2007. The relationship between the planktonic bacteria distribution and the environmental factors in the Yangtze River estuary [J]. *Marine Science Bulletin*, 26(6): 9-18 (in Chinese)
- Lindström E S. 2001. Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes [J]. *Microbiological Ecology*, 42: 598-605
- Liu Y Q, Yao T D, Zhu L P, *et al*. 2009. Bacterial diversity of freshwater alpine lake Puma Yunco on the Tibetan Plateau [J]. *Geomicrobiology Journal* 26: 131-145
- 吕晋, 邬红娟, 马学礼, 等. 2008. 武汉市湖泊蓝藻分布影响因子分析 [J]. *生态环境*, 17(2): 515-519
- Liu J, Wu H, Ji M, Xu L, *et al*. 2008. The analysis of cyanobacteria distributional impact factors in the lakes of Wuhan City [J]. *Ecological Environment* 17(2): 515-519 (in Chinese)
- Muytert K, Van DeGucht K, Bhemans N, *et al*. 2000. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 4740-4750
- Paerl H W, Dyble J M, Olander P H, *et al*. 2003. Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies [J]. *Microbiological Ecology*, 46: 233-246
- 任南琪. 2000. 污染控制微生物学 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社. 56-73
- Ren N Q. 2000. *Pollution Control Microbiology* [M]. Harbin: Harbin Institute of Technology Press. 56-73 (in Chinese)
- Van Hammen E J, Moonj W, Van Aelsterve H M P, *et al*. 1999. Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2478-2484
- Veira R P, Gonzalez A M, Cardoso A M, *et al*. 2008. Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment: Rio de Janeiro [J]. *Environmental Microbiology*, 10: 189-199
- 王学雷, 刘兴士, 吴宜进. 2003. 洪湖水环境特征与湖泊湿地净化能力研究 [J]. *武汉大学学报(理学版)*, 49(2): 217-220
- Wang X L, Liu X T, Wu Y J. 2003. Analysis of water environment characteristics and purification ability of Honghu Lake wetland in Jiangnan Plain [J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 49(2): 217-220 (in Chinese)
- Wei C L, Bao S M, Zhu X Y, *et al*. 2008. Spatio-temporal variations of the bacterioplankton community composition in Chaohu Lake, China [J]. *Process in Natural Science*, 18: 1115-1122