

不同季节洱海沉积物硫酸盐还原菌类群与含量及分布变化

王明义, 梁小兵, 郑娅萍^①, 赵由之, 张伟, 魏中青

(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)

摘要: 目的 分析洱海沉积物硫酸盐还原菌类群与含量和分布的变化, 为研究该区域环境污染物的迁移转化提供相应的生物学信息。方法 分别采用 PCR 和荧光原位杂交法分析洱海沉积物硫酸盐还原菌类群和含量。结果 春、秋季节洱海沉积物中共检出脱硫肠菌属、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 4 个类群的硫酸盐还原菌, 其中脱硫弧菌-脱硫微菌属只在秋季沉积物中检出; 春季的硫酸盐还原菌为 $(0.19 \pm 0.25) \times 10^4$ 个·g⁻¹, 从悬浮层至 18 cm 深度均有检出; 而秋季为 $(9.95 \pm 12.21) \times 10^4$ 个·g⁻¹, 从悬浮层至 26 cm 深度均有检出, 二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 洱海沉积物硫酸盐还原菌类群较为丰富, 脱硫弧菌属-脱硫微菌属在春季沉积物中可能为不可育状态; 硫酸盐还原菌类群分布复杂, 每一类群均具有季节和分布的差异和优势性; 秋季含量显著高于春季且分布更深; 洱海沉积物中可能存在硫酸盐还原菌 6 个类群以外的硫酸盐还原菌。

关键词: 洱海; 沉积物; 硫酸盐还原菌; 类群; 分布

中图分类号: R123.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-5248(2007)01-0027-04

近几年由于化石燃料使用量增加使洱海湖区大气污染日趋严重, 同时流域侵蚀作用亦显著加强^[1]。且由于农用化肥、畜禽养殖和农业水土流失引起的污染, 使洱海水质由贫营养化过渡到中营养化, 并向富营养化发展。硫酸盐还原菌是一类代谢活动中可以利用硫酸盐作为电子受体并产生高浓度 H₂S 的严格厌氧菌。该类微生物除参与有机物厌氧降解等重要的生物地球化学过程, 还在汞的甲基化和苯类的降解等环境毒性污染物的生物迁移转化中起着重要作用^[2]。研究洱海沉积物硫酸盐还原菌类群和含量的时空变化, 可以为该区域酸雨和重金属等环境污染物的迁移转化提供相关的生物学信息, 但至今未见有关洱海沉积物硫酸盐还原菌研究的报道。本文利用 PCR 和荧光原位杂交法分别对洱海春秋季节不同深度沉积物硫酸盐还原菌类群和含量进行了检测, 并分析了其类群、含量和分布的变化规律。

1 材料与方法

1.1 样品采集 分别于 2005 年 5 月和 9 月采集洱海开阔深水区的湖泊沉积物。柱长均为 27 cm。厌氧条件下, 按 1 cm 距离将沉积物柱芯分样, 并封存于高压灭菌的采样管中, 迅速带至实验室进行分析。

1.2 硫酸盐还原菌培养基 含有乳酸 2.5 mL, Na₂SO₄ 1.0 g, NH₄Cl 1.0 g, CaCl₂ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, 酵母膏 1.0 g, L-半胱氨酸 0.6 g, 0.1% 刃天青 1 mL, FeSO₄ 2.5 g。

1.3 沉积物硫酸盐还原菌富集和富集液 DNA 提取 接种 0.1 g 沉积物于含有 30 mL 硫酸盐还原菌液体培养基中, 32 °C 厌氧条件下富集培养 5 d 至培养基变为黑色, 采用酚-氯仿法提取 DNA。

1.4 PCR 扩增 按参考文献[3], 选用依据硫酸盐还原菌 6 个类群 16 SrDNA 基因保守区而设计的 6 对特异性 PCR 引物, 分别应用于硫酸盐还原菌 6 个类群的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 10 × Buffer 5 μL, 25 mM MgCl₂ 5 μL, 10 pmol·μL⁻¹ 引物 2 μL/each, 2.5 mM dNTP 混合液 4 μL, 1 U·μL⁻¹ Taq DNA 聚合酶 2 μL, 50 ng·μL⁻¹ DNA 模板 4 μL, 灭菌去离子

基金项目: 国家自然科学基金资助项目课题 (No. 40473050; 40173038)
NSFC/KOSEF 资助项目课题 (No. 00510502)

作者简介: 王明义 (1973-), 男, 硕士研究生。从事微生物和肿瘤分子生物学方面研究。

① 贵阳医学院生物化学与分子生物学教研室

水 26 μL , 反应总体积为 50 μL 。PCR 循环均为 30 个循环, 退火温度为 52 ~ 58 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 荧光原位杂交实验所用寡核苷酸探针 本实

验根据参考文献[4]介绍的技术方法, 选用与硫酸盐还原菌特异性结合的寡核苷酸探针 SRB 385 和阴性对照探针 NON 338(表 1), 进行 5' 端 Cy3 标记。

表 1 16 SrRNA 探针的靶细菌种属和探针序列

探针名称	序列(5' - 3')	靶位点
SRB 385	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	16 SrRNA 385 ~ 402
NON 338	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	Negative control

1.6 样品预处理和固定 取适量沉积物均匀地涂布于多聚-L-赖氨酸包被的玻璃片上, 空气干燥 20 ~ 30 min; 于 4% 多聚甲醛磷酸酸盐缓冲液中室温固定 20 min, PBS(pH 7.4) 洗涤 5 ~ 10 min, Milli-Q 超纯水洗涤 5 ~ 10 min, 空气干燥; 50%、80% 和 96% 乙醇固定 3 min, 空气干燥。

1.7 原位杂交反应与镜检 27 μL 荧光原位杂交缓冲液和 3 μL 探针(25 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 混匀, 并点到样品上, 46 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 2 h; 50 $^{\circ}\text{C}$ 洗涤缓冲液中洗涤 30 min, Milli-Q 超纯水中漂洗, 空气干燥, 封片。

1.8 荧光显微镜观察和计数 采用 Leica DM/RXA 荧光显微镜和 Quantimet-600HR 自动荧光显影计数系统进行计数。

1.9 主要试剂和仪器 PCR 引物和寡核苷酸探针分别由华美生物有限公司和上海生工生物工程技术服务有限公司合成; PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司); 75S02580 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); Leica DM/RXA 荧光显微镜(德国 Leica 公司); Quantimet-600HR 自动荧光显影计数系统(德国 Leica 公司)。

2 结果

2.1 洱海沉积物硫酸盐还原菌类群和分布变化

春季在洱海沉积物检出 3 个类群硫酸盐还原菌(即脱硫肠菌属、脱硫叶菌属和脱硫球菌属 - 脱硫线菌属 - 脱硫八叠菌属), 从悬浮层到 15 cm 深度的沉积物中均有分布。其中脱硫肠菌属分布于 10 cm、12 ~ 14 cm 深度, 脱硫叶菌属分布于悬浮层 ~ 15 cm 深度, 脱硫球菌属 - 脱硫线菌属 - 脱硫八叠菌属则分布于 4 ~ 7 cm 和 9 cm 深度; 秋季在洱海沉积物检出 4 个类群硫酸盐还原菌(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), 从悬浮层到 25 cm 深度的沉积物中均有分布。其中脱硫肠菌属分布于 8 ~ 18

cm、20 cm 深度, 脱硫叶菌属分布于 1 ~ 20 cm 深度; 脱硫球菌属 - 脱硫线菌属 - 脱硫八叠菌属广泛分布于悬浮层 ~ 12 cm、14 ~ 19 cm 和 21 ~ 23 cm 深度; 脱硫弧菌属 - 脱硫微菌属亦分布于悬浮层 ~ 14、16 ~ 19、21 ~ 25 cm 深度。

2.2 洱海沉积物硫酸盐还原菌含量和分布变化

春季洱海沉积物硫酸盐还原菌质量分数为 $(0.19 \pm 0.25) \times 10^4$ 个 $\cdot\text{g}^{-1}$, 其分布特点: 从悬浮层至 18 cm 深度均有检出, > 19 cm 深度无检出。表现为悬浮层、5 cm 和 8 cm 深度有较小的谷值, 3 cm、6 cm 和 11 cm 深度有较高的峰值, 其中 11 cm 深度形成的峰较宽。秋季洱海的沉积物硫酸盐还原菌质量分数为 $(9.95 \pm 12.21) \times 10^4$ 个 $\cdot\text{g}^{-1}$, 从悬浮层至 26 cm 深度均有检出, > 27 cm 深度无检出。表现为悬浮层、5 cm、12 cm 和 22 cm 深度形成较小谷值, 7 和 12 cm 深度有较高峰值, 其中 7 cm 深度形成的峰较宽(图 1, 2)。采用随机区组设计的方差分析方法比较春、秋季洱海沉积物硫酸盐还原菌含量, 秋季明显地高于春季($P < 0.01$)。

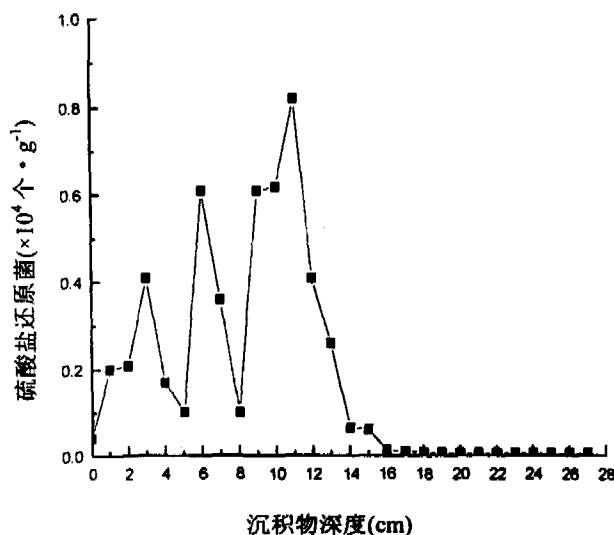


图 1 洱海春季沉积物硫酸盐还原菌质量分数

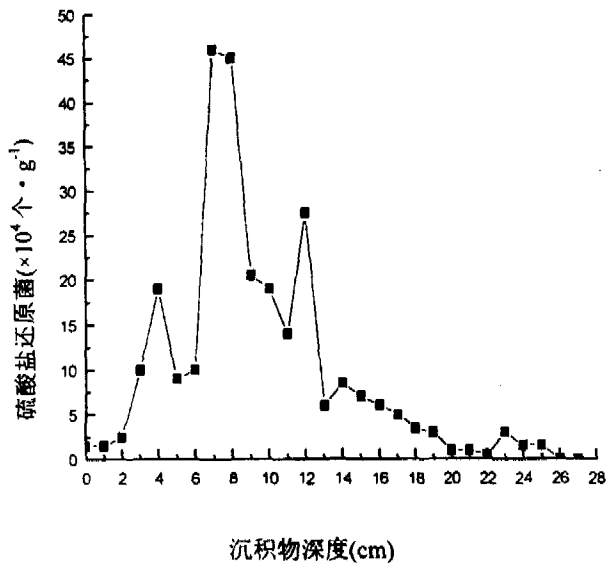


图2 洱海秋季沉积物硫酸盐还原菌质量分数

3 讨论

3.1 洱海沉积物硫酸盐还原菌类群及其分布变化规律 洱海沉积物硫酸盐还原菌类群分布较为丰富,春、秋2个季节洱海沉积物中共有4个类群硫酸还原菌存在,未被检出的类群为脱硫细菌属和脱硫杆菌属。有资料表明脱硫杆菌属主要存在海洋^[5],存在淡水湖泊洱海中的可能性较小。环境中很多微生物可以随着环境的变化而处于不可育状态^[6],处于该状态的微生物通常无繁殖活性,含量非常低,其机制还不完全明了。相对于春季,秋季洱海沉积物多了1个脱硫弧菌属-脱硫微菌属,表明该类群硫酸盐还原菌在春季洱海沉积物中可能为不可育状态。其原因可能是由于沉积物诸多环境因素或者微生物群落结构发生了改变,导致该类群在环境中不能繁殖而处于不可育状态,但其具体机制有待进一步研究。洱海沉积物硫酸还原菌不同的类群垂直分布是不相同的,不同深度具有类群的差异性和优势性,即不同类群分布于不同的深度,分布深度相对连续。此外不同季节类群的垂直分布亦有着较大的差异,秋季沉积物中各类群的分布均较春季广,春季>16 cm深度无硫酸盐还原菌任意类群,而秋季则>26 cm深度无硫酸盐还原菌类群。

3.2 洱海沉积物硫酸盐还原菌含量及其分布变化规律 利用荧光原位杂交法测定洱海沉积物硫酸盐还原菌的质量分数,春季高峰为 10^3 个 \cdot g⁻¹,而秋季可达 10^5 个 \cdot g⁻¹,文献报道海洋沉积物中硫酸盐还原

菌质量分数可达到 10^7 个 \cdot g⁻¹^[7],本研究结果显示,洱海沉积物硫酸盐还原菌含量较海洋沉积物要低。这主要是由于海洋沉积物有较高浓度的硫酸盐,使其硫酸盐还原菌的含量要高淡水湖泊沉积物。秋季洱海沉积物硫酸盐还原菌含量要显著高于春季,且硫酸盐还原菌空间分布更广。同时不同季节出现了不同的含量高峰和低谷,秋季硫酸盐还原菌含量最高峰的沉积物深度相对上移。用PCR检测硫酸盐还原菌的类群时,春季洱海沉积物在16~18 cm深度和秋季洱海沉积物26 cm深度无任意6个类群的硫酸盐还原菌存在,而用荧光原位杂交法测定硫酸盐还原菌含量时,发现在上述沉积物深度均检测出硫酸盐还原菌。这主要是我们在采用PCR进行硫酸盐还原菌类群分析时,只涉及到硫酸盐还原菌的6个类群。采用荧光原位杂交法测定硫酸盐还原菌含量时,所用的SRB 385寡核苷酸探针还能与这6个类群之外的其他未知硫酸盐还原菌结合。实验结果提示,洱海沉积物中可能存在着硫酸盐还原菌6个类群以外的新的硫酸盐还原菌类群。

3.3 洱海沉积物硫酸还原菌类群和含量及其分布变化规律原因分析 与春季洱海沉积物硫酸盐还原菌类群和含量比较,秋季类群种类多,垂直分布广,含量多且最高峰的深度浅移,表明秋季洱海沉积物更适合硫酸盐还原菌的生长繁殖。这可能是由于大部分硫酸盐还原菌为中温性细菌^[8],此时沉积物温度要高于春季,同时夏季的大量降水给秋季洱海沉积物带入大量有机质,有利于硫酸盐还原菌的生长繁殖;此外硫酸盐还原菌属于严格厌氧菌,而秋季湖底相对缺氧更适合硫酸盐还原菌生长繁殖。以上诸多因素使沉积物中原来处于不可育状态的类群重新转入繁殖状态,同时使原来存在的类群发生迁移使其栖息地范围扩大。洱海沉积物不同的硫酸还原菌类群的垂直分布是不相同的,不同深度具有类群的差异性和优势性,且同时无论春季还是秋季洱海沉积物硫酸还原菌含量,在沉积物达到一定深度后均有减少的趋势。考虑这种变化可能与不同水深度的沉积物有机碳、有机氮和硫酸根的浓度等因素的不同有关,但具体原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈敬安,万国江,黄荣贵.洱海沉积物重金属地球化学相及其污染历史研究[J].地质地球化学,1998,26(2):1.
- [2] King JK, Kostka JE, Frischer ME, et al. Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments[J]. Appl Environ Microbiol,2000,

- 66(6):2430.
- [3] Kristian D, Richard JS, Alan JM. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of Sulfate-Reducing Bacteria [J]. Microbiology, 2000, 146(6):1693.
- [4] Michael E, Britta H, Enrique LB, *et al.* The biogeochemistry, stable isotope geochemistry, and microbial community structure of a temperate intertidal mudflat: an integrated study[J]. Continental Shelf Research, 2000, 20:1749.
- [5] 马迪根 MT, 马丁克 JM, 帕克 J. (杨文博译). 微生物学[M]. 北京:科学出版社, 2001. 834-838.
- [6] Zweifel UL, A Hagstro m. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts)[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(4):2180.
- [7] 陈皓文. 海洋硫酸盐还原菌及其活动的经济重要性[J]. 黄渤海海洋, 1998, 16(4):64.
- [8] 赵宇华, 叶央芳. 硫酸酸盐还原菌及其影响因子[J]. 环境污染与防治, 1997, 19(5):41.

SEASONAL CHANGES IN GROUPS, QUANTITY, AND DISTRIBUTION OF SULFATE-REDUCING BACTERIA IN THE SEDIMENTS OF LAKE ERHAI

WANG Ming-yi, LIANG Xiao-bing, ZHENG Ya-ping, ZHAO You-zhi,
ZNANG Wei, WEI Zhong-qing

(State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the seasonal changes in groups, quantity, and distribution of sulfate-reducing bacteria(SRB) in Lake Erhai, so as to provide biologic information for the study of environmental pollutant transfer in that region. **Methods** SRB groups were analyzed by PCR and SRB quantity by fluorescence in situ hybridization(FISH). **Results** In the sediments of Lake Erhai, four SRB groups (Desulfotomaculum, Desulfobulbus, Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina, Desulfovibrio-Desulfomicrobium) were detected in both spring and autumn, but Desulfovibrio-Desulfomicrobium was detected only in autumn; In spring, the total count of SRB was $(0 \sim 0.85) \times 10^4 \cdot g^{-1}$, and SRB could be detected from the superficial suspension down to 18 cm of depth. In autumn, the total count was $(0 \sim 46.82) \times 10^4 \cdot g^{-1}$, and SRB could be detected from the suspension down to 26 cm of depth. The difference of SRB quantity between spring and autumn was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** SRB groups in the sediments of Lake Erhai are rather rich. Desulfovibrio-Desulfomicrobium may be uncultivable in spring. The distribution of SRB groups is complicated, and each group has its seasonal difference and predominance. SRB quantities in autumn is greater than that in spring, and it spreads deeper. Maybe there are other unknown SRB groups besides the six SRB groups in Lake Erhai.

KEY WORDS: Lake Erhai; sediment; sulfate-reducing bacteria(SRB); groups; distribution

(收稿日期:2006-04-14; 修回日期:2006-06-12)

~~~~~

## 国际性学会息

经青海省科技厅(2006)139号文批准,由青海大学、四川生殖卫生学院、西藏大学医学院、东方民族性学研究所联办的“第五届中国国际性学学术交流暨性保健品展示会”将于2007年8月10~14日在西宁市召开,15~16日在拉萨举行。

**征文范围及要求:**性文化,饮食文化与性,性文物,性社会,易经与性,婚姻家庭与性,性伦理,性心理,性法学,中医性学,生殖与性健康,男性学,女性学,性传播疾病防治,吸毒与性病及艾滋病,性健康

教育,性文明公约,性保健品的发展与管理,其他。论文不超过3000字;摘要500字内,中英文对照(详情查阅 www.Lugu-Lake.com)。来稿概不退。截稿日期2007年5月30日。会议评选中青年优秀论文。

来稿请寄:四川省西昌市明珠花园东方民族性学研究所阿海先生收。邮编615000。

电话/传真:0834-2171488;手机:13037771866

E-mail: AH1866@163.com

(收稿日期:2007-01-25)