惠州西湖沉水植被修复对浮游细菌群落结构的影响

毛 杰[1],邢 鹏[2],刘正文[1,2]

(1. 暨南大学水生生物研究所,广东 广州 510632;
2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所,江苏 南京 210008)

摘要:沉水植被修复是湖泊修复的一项重要手段,浅水型富营养化湖泊惠州西湖实施了沉水植被修复后,水质得到了显著改善。以细菌16sRNA基因通用引物进行PCR扩增后,采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对惠州西湖已修复和未修复的子湖浮游细菌多样性进行分析。结果显示,进行沉水植被修复的子湖中,细菌的Pielou和Shannon-Wiener指数都显著高于未修复的子湖。表明沉水植物修复不仅可以改善水质,同时还可以提高浮游细菌的多样性。

关键词:浮游细菌;沉水植被修复;惠州西湖

中图分类号:Q145 **文献标志码**:A **文章编号**:1674-3075(2011)03-0026-06

浅水湖泊存在草型湖泊和藻型湖泊2种不同的稳定状态,前者表现为沉水植被占优势、浮游植物生物量较少、水质清澈、透明度高、氮磷等营养盐较低和生态系统多样性高;后者表现为浮游植物占优势、沉水植被较少、水体浑浊及生物多样性低(Scheffer et al,1993);因此,沉水植被修复是浅水型富营养化湖泊水质修复的关键。广东惠州西湖在经过多年的生态修复后(种植沉水植物为主),水质有了很明显的改善,浮游植物和浮游动物等重要群落均发生了变化(陈光荣等,2007;杨姣等,2009)。浮游细菌是湖泊生态系统的重要组成部分,对系统的物质循环和能量流动起到重要的作用,浮游细菌的群落结构变化受到众多环境因子(如水温、营养盐等)和其他生物因素的影响(Kisand & Noges,2004)。水生植被对浮游细菌群落结构有重要的影响,草型湖泊水体中的溶解性有机碳(DOC)来源主要是水生植被分泌的有机物,而DOC的供给会直接影响到浮游细菌的代谢活动(Kritzberg et al,2006);此外,水生植物和藻类之间光照和营养盐等的竞争、水生植物的化感作用和控制水体再悬浮等方面都会对浮游细菌群落结构产生影响(Mulderij et al,2006)。郭亮等(2010)通过模拟试验研究了再悬浮与浮游细菌群落结构的关系,发现再悬浮对浮游细菌多样性有较大的影响;Wu等(2007a)对太湖不同湖区浮游细菌群落结构的研究发现,高等水生植物、透明度和叶绿素a是影响浮游细菌群落结构的主要因子。惠州西湖是热带浅水湖泊,部分子湖进行了以沉水植被构建为主的生态系统修复,沉水植被覆盖率和透明度等都有了很大的提高,营养盐及叶绿素a等显著降低,这种修复是否会影响浮游细菌群落结构尚未见报道。

传统研究细菌的方法是分离培养,而这种手段只能获得不到1%的自然环境中的细菌类群(Amann et al,1995)。近年来,随着从环境中提取微生物DNA方法的不断改进,分子生物学技术在分析微生物群落方面取得了较大的发展(Zhou et al,1996;Pace,1997)。DGGE电泳图谱分析可以了解浮游细菌群落结构的组成和优势种的遗传信息(Lindstrom,2000;Kent et al,2004)。目前,有不少学者使用该方法研究淡水湖泊中细菌群落组成的基因多样性(冯胜等,2007;邢鹏等,2007)。本文采用DGGE的方法,比较了惠州西湖已修复与未修复子湖浮游细菌群落结构的不同,旨在了解和研究沉水植被修复对湖泊细菌群落结构的影响。

1 材料和方法

1.1 采样位点

惠州西湖属热带浅水型城市富营养化湖泊,由南湖、丰湖、平湖、鳄湖和菱湖组成,面积1.48 km^2,平均深度1.6 m。为修复水质,惠州西湖部分子湖

收稿日期:2011-01-07

基金项目:国家水专项(2008ZX07211-003);惠州市政府环保项目和广东省科技计划项目(2002C31611);惠州西湖浮游细菌群落结构动态变化(11609319);草型/藻型湖泊底栖细菌群落结构及其对碳源利用的比较研究(21310033)联合资助。

通讯作者:刘正文。E-mail:zliu@niglas.ac.cn

作者简介:毛杰,1986年生,男,硕士研究生,主要从事水环境与生态修复研究。E-mail:maojie2005@163.com

开展了以沉水植被为主的湖泊修复工程示范，本次试验采样点分别设在已修复的示范区（1 个点）、南湖（2 个点：南清和南中）及未修复的平湖（1 个点），湖形示意见图 1。

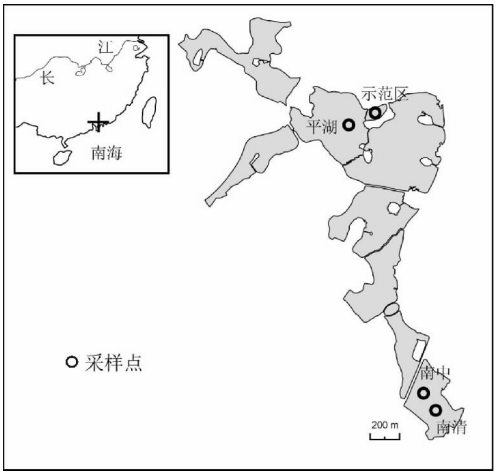


图 1　惠州西湖采样点的分布示意

Fig. 1　Distribution of sampling stations in Huizhou West Lake

1.2　采样方法和样品处理

用 5 L 采水器取水下 0.5 m 的表层水样，尽快带回试验室。水样先用 5 μm 的滤膜过滤去除大型藻类和浮游动物等，待抽滤完成，记录抽滤体积，将滤膜收集到物质的一面向内，用镊子对折滤膜 2 次，整个滤膜呈原始大小的 1/4，装入事先灭好菌的 2 mL离心管中，-20℃保存。滤液再用 0.2 μm 聚碳酸酯滤膜抽滤至滤膜水的下滴速度慢于 1 滴/min 为止，记录抽滤体积，同样的方法保存滤膜，留做浮游细菌基因组 DNA 提取。常规理化指标按照标准方法测定（金相烂和屠春瑛，1990）。

1.3　样品总 DNA 的提取

浮游细菌样品的总基因组 DNA 的提取及纯化方法参考 Kjorstin 等（2004）。

1.4　浮游细菌组成和多样性的 PCR-DGGE 分析

采用细菌 16SrDNA 的通用引物进行 PCR 扩增反应，分别是 F341（5′-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′）和 R907（5′-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3′）以及 1 个 GC 夹（5′-CGCCCGCCGCGCCCCGCGC-CCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3′）加在 F341 的 5′端，形成 GC-F341。使用 25 μL 反应体系，其中包含 10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、2.5 mM $MgCl_2$、0.25 mM dNTPs、0.2 mM 引物、5UTaq-酶（TaKaRa）和 1 μL 提取的细菌基因组 DNA。采用 Touchdown 反应程序，共 35 个循环，反应条件如下：96℃变性 5 min，94℃变性 45 s，62～55℃每循环下降 0.2℃、退火 45 s，72℃延伸 1 min 30 s，循环 34 次；最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳，Goldview 染色检测 PCR 反应扩增效果。

变性梯度凝胶电泳采用美国 CBS 公司电泳仪（DGGE-2001），由梯度混合器制作浓度 6% 的聚丙烯酰胺变性胶，选用的变性剂梯度为 55%～75%（由 0% 变性胶和 100% 变性剂混合得到，其中 100% 变性胶中含有 7 mol/L 尿素和体积分数 40% 去离子甲酰胺）。电泳缓冲液为 1 × TAE（20 mmol/L Tris，10 mmol/L acetate，0.5 mmol/L EDTA，pH 8.0）。60℃恒压 100 V，电泳 16～18 h。DGGE 胶用 SYBR GREEN I（1∶10 000 稀释，Molecular Probe Inc）染色 15～30 min，使用 Bio-Rad 全自动多功能凝胶成像分析系统拍照。

1.5　数据处理

使用 Gel-Pro 4.5（Media Cybernetics，USA）对 DGGE 电泳照片进行分析，比较各条带电泳的迁移位置和相对含量，并对不同月份各点样品之间进行聚类分析。使用 Primer 计算浮游细菌种群的 Shannon-Wiener 和 Pielou 指数，其中 Shannon-Wiener 指数反映物种的丰富度，Pielou 指数则是物种均一性的度量指标。使用 SPSS16.0 对 DGGE 图谱分析得到的各项指数进行 t 检验分析。使用 Origin Lab 对不同月份和采样点的部分理化指标进行图形分析。

2　结果

2.1　浮游细菌 PCR-DGGE

采用细菌 16S rDNA 特异性引物下 F341（带 GC 夹）和 R907 对浮游细菌 DNA 基因组进行 PCR 扩增，获得大约 600 bp（含 GC 夹）的片段（见图 2）。

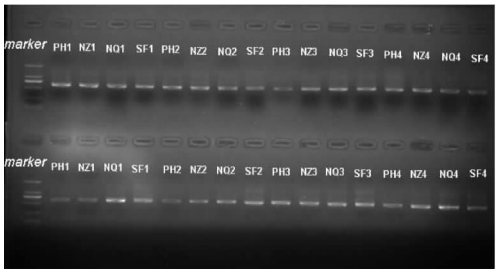


图 2　PCR 扩增细菌 16S rDNA 片段

（PH－平湖，NZ－南中，NQ－南清，SF－示范区；1、2、3、4 代表 2009 年 12 月、2010 年 2 月、2010 年 4 月和 2010 年 6 月）

Fig. 2　PCR amplified bacterial partial 16S rDNA sequence

（PH denotes Pinghu, NZ denotes Nanzhong, NQ denotes Nanqing, SF denotes Shifanqu; 1, 2, 3, 4 respectively denote Dec. 2009, Feb. 2010, April 2010 and June 2010）

将PCR产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析,结果发现16个样品的条带因地点而异,且相差很大,而相同点的不同月份的样品之间仅平湖变化较大(见图3)。

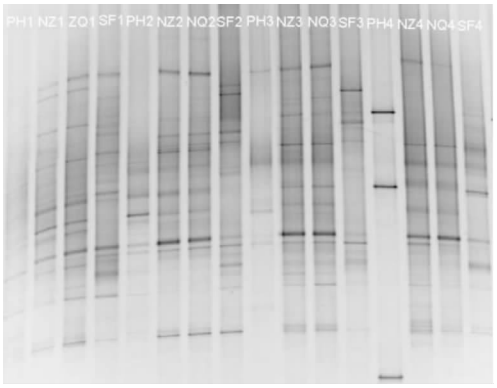


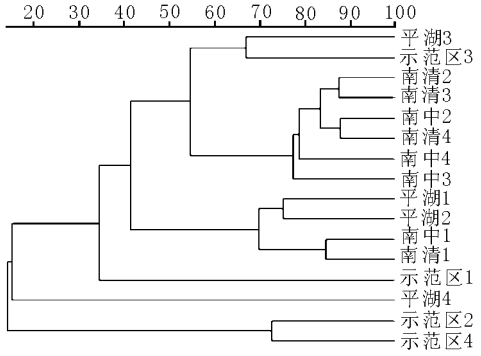
图3 浮游细菌种类组成的DGGE分析

(PH-平湖,NZ-南中,NQ-南清,SF-示范区;1、2、3、4代表2009年12月、2010年2月、2010年4月和2010年6月)

Fig. 3 Bacterioplankton community composition analyzed by DGGE

(PH denotes Pinghu, NZ denotes Nanzhong, NQ denotes Nanqing, SF denotes Shifanqu; 1, 2, 3, 4 respectively denotes Dec. 2009, Feb. 2010, April 2010 and June 2010)

对DGGE图谱进行聚类分析(见图4),发现南湖的2个采样点样品比较好地聚类在一起,而示范区和平湖的聚类效果不是很好,由于平湖和示范区的地理位置很近,而且可能存在部分的连通,导致出现了4月份的2点样品有较高的相似度,而已修复的2湖区(示范区和南湖)和未修复的平湖3个子湖采样点之间相似度较低,说明三者的浮游细菌群落结果存在着较大的差异。使用Primer分析DGGE图谱,得到不同湖区采样点各个月份的DGGE条带数、Shannon-Wiener和Pielou指数,可以看出进行过生态修复的南湖的2个点和示范区的各个指标都和未进行生态修复的平湖有着很大的差别,不同月份的南湖和示范区样品的平均DGGE条带数和Shannon-Wiener指数都显著高于平湖样品,说明南湖和示范区浮游细菌的多样性高于平湖,对其中的2点之间4个不同月份的3个指标均值(平均值=采样点4个月份值之和/4)进行t检验,发现进行了生态修复的南湖和示范区与未进行生态修复的平湖之间存在着显著的差异性,而都进行了生态修复的南湖和示范区之间不存在显著的差异性(见表1)。而对于同一点的不同月份的样品,除了南中之外(其各个月份的DGGE条带数和Shannon-Wiener指数变化不大),其他3个采样点的12月份样品的DGGE条带数和Shannon-Wiener指数均高于其他月份,可能和季节温度有一定的关系。平湖不同月份的DGGE条带数存在着很大的差别,说明平湖的生态系统很不稳定。



(1、2、3、4分别代表2009年12月、2010年2月、2010年4月和2010年6月)

图4 样品的聚类分析

(1, 2, 3, 4 respectively denotes Dec. 2009, Feb. 2010, April 2010 and June 2010)

Fig. 4 Cluster analysis of the samples

2.2 理化指标比较

图5为已修复的2区(南湖和示范区)和未经修复的平湖3湖区不同月份的叶绿素a、悬浮物和透明度指标比较。由图5可见,进行了沉水植被修复的南湖湖区和示范区水样中的叶绿素a和悬浮物浓度均显著高于未修复的平湖,而修复湖区的水体透明度均显著高于未修复的平湖,这些理化因子的巨大差别很可能对浮游细菌群落结构产生不同的影响。

表1 惠州西湖采样区的DGGE条带数、Pielou、Shannon-Wiener指数均值比较

Tab. 1 Comparison of mean of DGGE band number, Pielou, and Shannon-Wiener index in the Huizhou West Lake

采样区	平湖			南清			示范区		
	DGGE条带数	Pielou指数	Shanon-Wienner指数	DGGE条带数	Pielou指数	Shanon-Wienner指数	DGGE条带数	Pielou指数	Shanon-Wienner指数
平湖				0.012*	0.011*	0.047*	0.007**	0.007**	0.076
南清							0.319	0.381	0.415

注:* 表示差异性显著($P<0.05$),** 表示差异性极显著($P<0.01$)。

Notes: * indicates significant difference ($P<0.05$), ** indicates extremely significant diference ($P<0.01$).

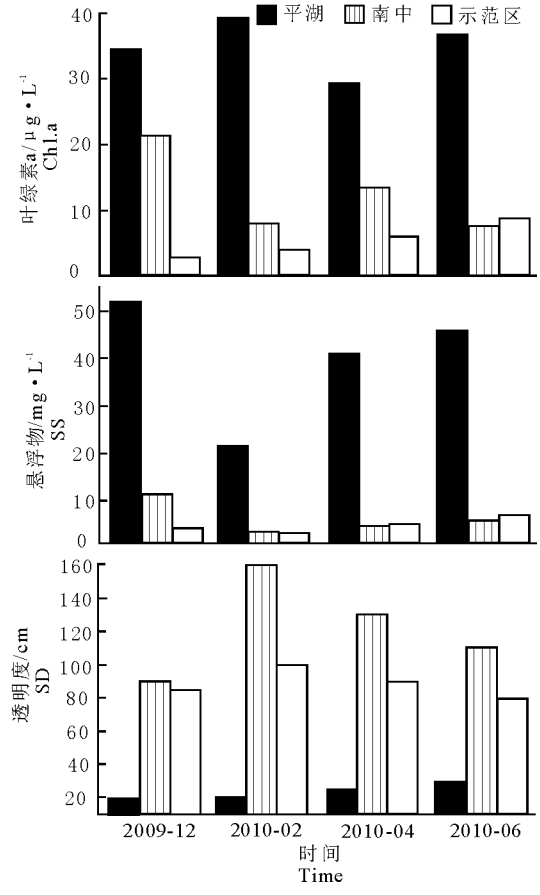


图 5　平湖、南湖和示范区的叶绿素 a、悬浮物和透明度比较

Fig. 5　Comparison of chlorophyll. a, suspended solids and transparency between Pinghu, Nanhu and Shifanqu

3　讨论

3.1　生态修复对浮游细菌生物多样性的影响

已实施生态修复工程的惠州西湖子湖（示范区和南湖）已转变为以大型水生植物为优势的清水态生态系统，而未修复的子湖仍是以浮游植物为优势的混水态生态系统。DGGE 结果显示，已修复的子湖细菌多样性显著高于未修复的子湖。Vander Gucht 等（2001）也发现了 2 种湖泊稳态下细菌群落结构的不同。本次研究表明，已进行生态修复的惠州西湖子湖沉水植物的生物量较大，营养盐、悬浮物和叶绿素 a 含量较修复前降低了很多，水体透明度大幅提高；未修复的子湖水体浑浊，存在大量的浮游植物和悬浮物质，水体透明度很低。结合图 5 中的相关数值显示，我们可以看到修复水体和未修复水体的各项参数存在着很大的差别，这些因子的变化在一定程度上会对浮游细菌群落结构产生重要的影响，而这些因子的改变在很大程度上均与是否存在沉水植物有关。

3.2　浮游植物对浮游细菌生物多样性的影响

沉水植物通过吸收水体中的营养盐、抑制沉积物营养盐释放等途径，降低水体的营养盐浓度。由于竞争和化感作用等，沉水植物还会抑制浮游植物的生长（雷泽湘等，2006）。已有研究证明，浮游植物群落可以显著地影响浮游细菌的生物多样性（Eiler & Bertilsson，2004）。由图 5 的叶绿素 a 数据可知，未修复的平湖叶绿素 a 值远远高于已进行沉水植被修复的南湖和示范区，在本研究的 2 类子湖之间，浮游植物的群落结构差异很大，平湖浮游植物的年均丰度是示范区的 71.8 倍，其组成中蓝藻最多，其次是隐藻、绿藻和硅藻，示范区则是隐藻占多数，其次是绿藻、甲藻和硅藻（陈亮等，2010）。这些浮游植物生物量和群落结构组成上的巨大差别可能是 2 类子湖浮游细菌多样性存在显著差异的重要原因之一。围格试验研究发现，异养细菌和浮游植物对无机营养盐存在着激烈的竞争（Joint et al，2002）；另外，在沉水植物降低营养盐和浮游植物生物量的过程中，自身释放的溶解性有机碳（DOC）对浮游细菌群落有调控作用（Rooney & Kalff，2003）。

3.3　沉水植物对浮游细菌生物多样性的影响

沉水植物的存在使得水体的悬浮物含量和透明度均发生变化，未进行沉水植被修复的子湖叶绿素 a 和悬浮物均远远高于进行了沉水植物修复的子湖。沉水植物通过稳定沉积物、抑制再悬浮和浮游植物的过度繁殖来提高水体透明度（Sand-Jensen & Borum，1991）。沉积物表层的一些细菌可以直接释放到水体中成为浮游细菌的一部分，水体中悬浮物质主要是一些来自底泥再悬浮产生的颗粒，这些悬浮的颗粒物质可以支持一定的浮游细菌生长，在一定程度上可能增加浮游细菌的多样性（Wu et al，2007b）。有研究表明，沉水植物可显著改变沉积物中细菌群落结构和生物量，从而对浮游细菌产生一定的影响（Karjalainen et al，2001）。

综上所述，DGGE 图谱分析结果显示，经过沉水植被修复的南湖和示范区的 Pielou 和 Shannon-Wiener 指数均显著高于未进行修复的平湖，而南湖和示范区之间不存在显著差异性，说明沉水植被修复不仅可以改善水质，也可以提高浮游细菌的生物多样性。

参考文献

陈光荣,刘娴,应文晔,等. 2007. 惠州西湖浮游动物群落对生态恢复的响应[J]. 安徽农业科学,35(6):1662 – 1663.

陈亮,张修峰,刘正文. 2010. 惠州西湖浮游植物群落对生态系统修复的响应[J]. 武汉植物学研究, 28(4):453 – 459.

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.

郭亮,邢鹏,蒋伟伟,等. 2010. 再悬浮对浮游细菌群落结构的影响[J]. 环境科学,31(8):1909 – 1917.

金相烂,屠春瑛. 1990. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京:中国环境科学出版社:143 – 207.

雷泽湘,徐德兰,黄沛生,等. 2006. 太湖沉水和浮叶植被及其水环境效应研究[J]. 生态环境,15(2):239 – 243.

邢鹏,孔繁翔,高光. 2007. 太湖浮游细菌种群基因多样性及其季节变化规律[J]. 湖泊科学,19(4):373 – 381.

杨姣,刘正文,张修峰,等. 2009. 广东惠州湖泊浮游植物群落对鱼类去除的响应[J]. 安徽农业科学,37(7):3193 – 3195.

Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews , 59 (1):143 – 169.

Eiler A, Bertilsson S. 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes[J]. Environmental Microbiology, 6 (12): 1228 – 1243.

Joint L, Henriksen P, et al. 2002. Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms[J]. Aquatic Microbial Ecology, 29: 145 – 159.

Karjalainen H, Stefansdottir G, Tuominen L, et al. 2001. Do submersed plants enhance microbial activity in sediment [J]. Aquatic Botany, 69:1 – 13.

Kent A D, Jones S E, Yannarell A C, et al. 2004. Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake [J]. Microbial Ecology, 48 (4):550 – 560.

Kisand V, Noges T. 2004. Abiotic and biotic factors regulating dynamics of bacterioplankton in a large shallow lake[J]. FEMS Microbiology Ecology, 50 (1):51 – 62.

Kjorstin H, Bostrom K S, Simu K, et al. 2004. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis[J]. Limnology and Oceanography, 2: 365 – 373.

Kritzberg E S, Langenheder S, Lindstrom E S. 2006. Influence of dissolved organic matter source on lake bacterioplankton structure and function implications for seasonal dynamics of community composition[J]. FEMS Microbiology Ecology, 56 (3):406 – 417.

Lindstrom E S. 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content [J]. Microbial Ecology, 40 (2):104 – 113.

Mulderij G, Smolders A P, Donk E. 2006. Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, Stratiotes aloides on natural phytoplankton[J]. Freshwater Biology,51:554 – 561.

Pace N R. 1997. A molecular viewer of microbial diversity and the biosphere[J]. Science,276:734 – 740.

Rooney N, Kalff J. 2003. Submerged macrophyte-bed effects on water-column phosphorus, chlorophyll a, and bacterial production[J]. Ecosystems, 6:797 – 807.

Sand-Jensen K, Borum J. 1991. Interactions among phytoplankton, periphyton and macrophytes in temperate freshwaters and estuaries[J]. Aquatic Botany, 41: 137 – 175.

Scheffer M, Hosper S H, Meijer M L. et al. 1993. Alternative equilibria in shallow lakes[J]. Trends Ecology Evolution, (8):275 – 279.

Vander Gucht K, Sabbe K, De Meester L, et al. 2001. Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes[J]. Environmental Microbiology, 3 (11):680 – 690.

Wu Q L, Chen Y, Xu K, et al. 2007a. Intra-habitat heterogeneity of microbial food web structure under the regime of eutrophication and sediment resuspension in the large subtropical shallow Lake Taihu, China[J]. Hydrobiologia, 581:241 – 254.

Wu Q L, Zwart G, Wu J, et al. 2007b. Submersed macrophytes play a key role in structuring bacterioplankton community composition in the large, shallow, subtropical Taihu Lake [J]. Environmental Microbiology,9 (11):2765 – 2774.

Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology,62 (2):316 – 322.

(责任编辑 万月华)

Impact of Submerged Vegetation Restoration on the Structure of Bacterioplankton in Huizhou West Lake

MAO Jie[1], XING Peng[2], LIU Zheng-wen[1,2]

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangdong Guangzhou 510632, China;
2. Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Jiangsu Nanjing 210008, China)

Abstract: Restoration of submerged vegetation in shallow eutrophic lake is an important method of lake restoration. Some areas of Huizhou West Lake has been successfully restored by planting submerged plants, and the water has been significantly improved. In order to study the impact of the submerged vegetation on bacterioplankton, bacterioplankton community composition was investigated in restored area and unrestored area in Huizhou West Lake. The diversity of bacterioplankton of the restored area and unrestored area were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), using the bacterial 16sRNA gene universal primer to do the polymerase chain reaction. The results showed that Pielou index and Shannon-Wiener index of the restored area were significantly higher than that of the unrestored area. This study indicates that submerged vegegtaion not only improve water quality, but also increase the diversity of bacterioplankton.

Key words: bacterioplankton; submerged vegetation restoration; Huizhou West Lake