

# 上海市内不同水质的河道春季浮游 细菌群落结构分析

姜彩虹 张美玲\* 陶琰洁 禹娜 陈立侨

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

**摘要:** 2008年4月采集上海市城郊结合地区的4条河道午潮港、横港、朝阳河和曹杨环浜的水样,测定水样的相关理化数据,计算水环境质量综合指数;提取水样中浮游细菌的总DNA,进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析;并对水体中的可培养浮游细菌的数量进行测定。结果表明,污染严重的河道浮游细菌的生物量较高,而多样性明显偏低,河道不同采样点的微环境影响浮游细菌的组成,河道中浮游细菌的组成与生物量的变化与水环境质量密切相关。

**关键词:** 河道, 细菌群落, 多样性, 相似性

## Bacterial Community Structure in Four Different Rivers of Shanghai in Spring

JIANG Cai-Hong ZHANG Mei-Ling\* TAO Yan-Jie YU Na CHEN Li-Qiao

(College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract:** In April of 2008 water samples were collected from four different rivers, which were Wuchao gang River, Henggang River, Chaoyang River and Caoyanghuanbang River. During the sampling the physical and chemical parameters were measured. The abundance and the diversity of the bacteria of these four rivers were studied. The results showed that the population level increased in the more severely polluted river while the bacterial diversity decreased; the bacterial community structure was also affected by the different ecological conditions of each sampling spot. The bacterial composition and abundance was closely related to the water quality in the river.

**Keywords:** River, Bacterial community, Diversity, Similarity

上海市内河道众多,但是随着工业的发展,生活污染负荷的增加,很多河道的水体黑臭现象严重。近年来,经过上海市政府及相关部门的清理和集中整治,市中心城区的大多数河道水质已经有了明显的改善,但是由于河道水体还没有完全建立健康的

生态系统,很多河道还需要定期补给某些微生物,复合酶及强化植物生长来维持水体生态系统的稳定<sup>[1]</sup>。

微生物是水生生态系统的重要组成部分,对污染物的降解,物质的循环、迁移、转化及生态系统

的修复起着非常重要的作用, 而微生物的组成变化对水环境质量也起到明显的指示作用, 因此了解不同污染状况的河道中微生物的结构组成情况对于评价河道水质恢复状况、帮助进一步建立健康稳定的水生生态系统非常必要。

目前越来越多的研究人员开始关注水生生态系统, 尤其是湖泊系统中环境因子与微生物群落变化的相互关系<sup>[2]</sup>, 但是对于城市河道方面的研究还比较有限, 本研究采用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)指纹图技术对上海市城郊结合地区 4 条河道在春季的浮游细菌组成情况进行分析, 并初步探讨河道水体微生物组成与水质情况的关系, 以期对河道水体的进一步整治提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 水样采集

2008年4月18日, 对位于普陀区和长宁区内午潮港、横港、朝阳河和曹杨环浜 4 条河道进行水样采集, 每条河道设置两个采样点, 具体采样位置见表 1。采样使用特制采水器, 对于水深大于 1 m 的河道采集水下 1 m 水样, 对于水深不足 1 m 的河道采集水下 0.8 m 或 0.5 m 的水样。将水样灌入事先高温灭菌的采样瓶中, 在溢流状态下旋紧瓶盖, 使瓶

内尽量不含空气。采样时同步测定水样的温度( $W_t$ )、溶解氧(DO)、总溶解固体(TDS)、pH、氨氮( $\text{NH}_3 - \text{N}$ )、磷酸盐( $\text{PO}_4 - \text{P}$ )、硝态氮( $\text{NO}_3 - \text{N}$ )和亚硝态氮( $\text{NO}_2 - \text{N}$ )等理化指标, 理化指标的测定主要依据《地表水环境质量标准》(GB 383822002)。

本研究涉及 8 个采样点, 其中 1、2 号采样点分布在午潮港上, 该河道为砌石普通驳岸, 以沉积淤泥为底, 具少量水生植物; 3、4 号分布于横港上, 该河道为缓坡、阶梯复合驳岸, 其中 4 号采样点位于生活小区内, 采样时, 水体臭味明显; 5、6 号分布在朝阳河上, 该河道砌、石驳岸, 以石块为底, 罕有水生高等植物; 曹杨环浜是经过治理以后, 水生生态系统相对较好的河道, 该河道水体清澈, 以砌、石驳岸, 以沉积淤泥为底, 河道中有鱼类及丰富的沉水植物; 7 号采样点位于曹杨环浜的主河道区, 8 号采样点同样位于曹杨环浜, 但是该采样点处于河道一端的蓄水池内, 所以 7、8 两点的理化环境有一定的差异。

### 1.2 水质评价

采用环境质量综合指数  $P$  来评价水质受污染的程度, 具体计算方法为:

$$P = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n P_i,$$

$$P_i = \frac{C_i}{S_i},$$

表 1 采样点具体位置  
Table 1 Distribution of sampling sites

样点 Sampling number	地点 Sampling site	经度 Longitude	纬度 Latitude
S1	午潮港(福泉路新潮路交叉口段) Wuchao gang River (The Junction of Fuquan road and Xinchao road)	31°12.238' N	121°21.434' E
S2	午潮港(金庭庄园会所段) Wuchao gang River (Jinting hotel)	31°12.145' N	121°21.238' E
S3	横港(富水路水泉路交叉口段) Henggang River (The Junction of Fushui road and shuiquan road)	31°16.298' N	121°24.435' E
S4	横港(真金路中环锦园内) Henggang River (Zhonghuan garden)	31°16.493' N	121°23.853' E
S5	朝阳河(丹巴路梅岭北路交叉口段) Chaoyang River (The Junction of Danba road and north Meiling road)	31°14.688' N	121°23.132' E
S6	朝阳河(丹巴路武宁路交叉口段) Chaoyang River (The Junction of Danba road and Wuning road)	31°14.870' N	121°23.199' E
S7	曹杨环浜(花溪路枫桥路交叉口段) Caoyanghuanbang River (The Junction of Huaxi road and Fengqiao road)	31°14.520' N	121°24.185' E
S8	曹杨环浜(杨柳青路枣阳路交叉口段) Caoyanghuanbang River (The Junction of Yangliuqing road and Zaoyang road)	31°14.313' N	121°23.905' E

式中： $C_i$ 为污染物浓度值； $S_i$ 为相应类别的标准值； $P_i$ 为单项污染指数； $P$ 为综合污染指数； $n$ 为参与评价的项目数。以《地表水环境质量标准(GB 3838-2002)》中的Ⅳ类水质标准作为评价标准。若 $P \leq 1.0$ ，则表示水质基本合格，若 $1.0 < P \leq 2.0$ ，则表明水质受到污染，若 $P > 2.0$ 则表明水质受到严重污染。

### 1.3 河道浮游细菌总数计数

对于每个样本进行3个稀释梯度分析，将定量水样接种于牛肉膏蛋白胨培养基平板上于37℃培养24 h，统计每个样品中所含有的细菌总数，统计结果以科学计数法表示。

### 1.4 河道微生物总DNA的提取

在无菌条件下取1000 mL水样用定性滤纸(8 μm)过滤除去样品中的悬浮颗粒，收集滤液，滤液通过聚碳酸酯膜(0.2 μm, Millipore)真空抽滤，将1/2张滤膜取出剪成碎片装入2 mL的研磨管中，每管加入0.3 g氧化锆研磨珠(Zirconium beads, 直径0.1 mm)，及500 μL 0.05 mol/L的磷酸钾缓冲液(Potassium phosphate buffer, pH 7.0)，17 μL蛋白酶K(20 mg/mL)和67 μL SDS(10%)，振荡离心，55℃度水浴1 h，随后加入67 μL苯酚(Phenol, pH 8.0)，用DNA研磨匀质器(Mini-Bead-Beater-8, Biospec Products, USA)击打60 s，加入700 μL氯仿异戊醇(24:1)，上下颠倒混匀后，15000 g离心10 min，取上清，加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1, V/V/V)上下颠倒、混匀、离心(15000 g, 10 min)，取上清，加入1/10体积的NaAc及加入0.6倍体积的异丙醇，沉淀2 h，离心(15000 g, 30 min)后去上清液，将DNA溶于20 μL无菌双蒸水中，加入2 μL Rnase A(20 mg/mL) 37℃消化20 min。DNA置于-20℃保存，用于后续分析。

### 1.5 水体中优势菌的扩增及DGGE分析

扩增河道浮游细菌的16S rRNA基因的V3区，扩增所用的引物P2, P3，参考Muyzer等人的文献报道<sup>[3]</sup>，PCR扩增体系为：25 μL PCR反应体系中包含2.5 mmol/L的dNTPs 2 μL，10 × PCR反应缓冲液2.5 μL，25 pmol/μL的引物各0.5 μL，0.625 U的Taq DNA聚合酶，无菌双蒸水补足25 μL。采用Touch down PCR程序<sup>[3]</sup>。电泳检测条件为1%的琼脂糖凝胶，UVI凝胶成像系统(UVItect, Cambridge, UK)检测并记录结果。

PCR产物通过变性梯度凝胶电泳进行分析

(Bio-Rad, Hercules, Calif.)，实验采用8%聚丙烯酰胺凝胶，所用的变性梯度范围为30%~55% (100%变性剂对应7 mol/L尿素和40%去离子甲酰胺)。电泳缓冲液为1×Tris-acetate-EDTA (TAE, pH 8.4)。电泳在200V电压、60℃条件下运行200 min，电泳结束后用SYBR green (Amresco, Solon, Ohio)染色。

### 1.6 图谱的统计分析

利用Quantity I对DGGE胶上的条带进行数字化，标注出每个泳道里各条带的位置与亮度，采用非加权配对算数平均法(Unweighted pair group method with arithmetic averages, UPGMA)聚类对不同采样点浮游细菌组成的相似性进行分析。

DGGE图谱中每一条带可以看作是一个操作分类单位(Operational taxonomic unit, OTU)，条带数可以反映微生物的种类数，条带数越多表明生物多样性越丰富，条带的亮度则反映微生物的丰度，条带越亮，表示该种属微生物的数量越多，所以根据每条泳道内的DGGE条带数目和条带的峰高，评价群落微生物组成的加权多样性指标(Weighted diversity)。加权多样性的具体计算方法为：采用Shannon-Weaver公式，即 $H' = -\sum P_i \ln P_i$ ，式中 $P_i = n_i/N$ ， $n_i$ 是样品中第*i*条带的亮度， $N$ 为所有条带亮度的和。 $P_i$ 是第*i*条带的亮度 $n_i$ 与所有条带亮度和的比例，在本研究中 $n_i$ 代表一个泳道的第*i*条DGGE条带的亮度， $N$ 为此泳道所有DGGE条带的亮度。若一个生态系统中，微生物的种类越多，种类之间均匀性越高，则加权多样性指数的值越高。

## 2 实验结果

### 2.1 采样点理化环境

本研究中8个采样点的理化数据测定结果及环境质量综合指数见表2。以2个采样点的理化数据的均值代表河道的理化环境，结果表明在4条河道中，只有曹杨环浜的氨氮值到达地表水Ⅳ类质量标准，所有的河道均呈磷含量超标，其中横港的磷污染最为严重。环境质量综合指数的结果表明，4条河道均有不同程度的污染，其中，横港的水环境综合质量指数 $P$ 值最高，污染程度最严重，而曹杨环浜的 $P$ 值最低，且小于2，说明水质受到轻微污染，在所研究的4条河道中，曹杨环浜的水质最优。

### 2.2 不同采样点的浮游细菌总数

对4条河道的8个采样点的浮游细菌总数进

表 2 各采样点理化指标  
Table 2 Mean values of chemical and physical parameters

采样点 Sampling sites	温度 $W_t$ (°C)	pH	溶解氧 DO (mg/L)	总溶解固体 TDS (mg/L)	氨氮 $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/L)	磷酸盐 $\text{PO}_4\text{-P}$ (mg/L)	硝态氮 $\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/L)	亚硝态氮 $\text{NO}_2\text{-N}$ (mg/L)	环境质量综合指数 $P$
S1	17.7	8.1	1.5	899	4.5	2.1	0.046	0.014	2.57
S2	17.9	7.9	4.1	891	7.2	1.7	0.114	0.037	
S3	19	7.7	0.8	889	2.3	5.2	0.01	0.011	7.03
S4	18	7.9	1.7	907	6.3	7	0.057	0.018	
S5	17.7	8.1	9	874	4.1	2.1	0.377	0.241	3.96
S6	17.5	8.2	9.9	822	3.6	1.7	0.267	0.28	
S7	17.5	7.7	5.1	589	0.11	0.7	0.533	0.027	1.66
S8	17	7.7	6.2	478	0.59	0.3	0.547	0.034	

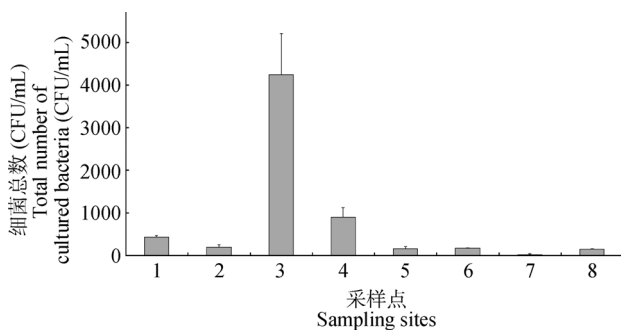


图 1 不同采样点浮游细菌总数的月度变化

Fig. 1 Bacterial abundance in different sampling sites

注: 1, 2: 午潮港的 2 个采样点; 3, 4: 横港的 2 个采样点; 5, 6: 朝阳河的 2 个采样点; 7, 8: 曹杨环浜的 2 个采样点。

Note: 1,2: From Wuchaogang River; 3,4: From Henggang River; 5,6: From Chaoyang River; 7,8: From Caoyanghuanbang River.

行统计, 不同河道的细菌量差异很大, 其中环境质量综合指数( $P$ )较高的横港的 2 个采样点的浮游细菌数量较大, 3 号采样点的浮游细菌总数高达  $4.25 \times 10^3$  CFU/mL, 表明在污染较严重的河道, 可培养浮游细菌的总数也较高, 而在水质较好的曹杨环浜中, 可培养浮游细菌总数相对较少, 其中, 7 号采样点的浮游细菌总数平均只有 29 CFU/mL, 该河道水体中有大量沉水植物, 在所研究的 4 条河道中是水质最优的。

### 2.3 河道浮游细菌组成的 DGGE 图谱及相似性分析

各采样点微生物组成的 DGGE 图谱见图 2, 各采样点的 DGGE 图谱条带丰富, 表明各采样点都具有丰富的细菌组成, 纵观所研究的 4 条河道, 不同的河道间没有共有的优势条带, 表明每个河道的微生物组成是相对独立的系统。根据 DGGE 图谱中条

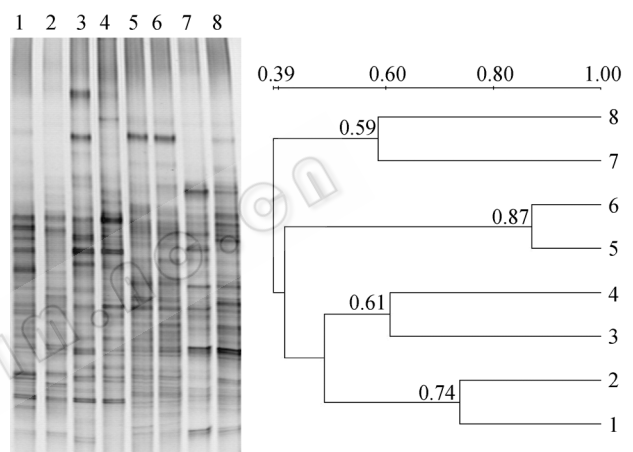


图 2 2008 年 4 月河道水体微生物组成的 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profiling of bacteria in water samples from different sites and the cluster analysis based on the DGGE pattern

注: 1, 2: 午潮港的 2 个采样点; 3, 4: 横港的 2 个采样点; 5, 6: 朝阳河的 2 个采样点; 7, 8: 曹杨环浜的 2 个采样点。

Note: 1,2: From Wuchaogang River; 3,4: From Henggang River; 5,6: From Chaoyang River; 7,8: From Caoyanghuanbang River.

带的亮度和位置, 通过 UPGMA 聚类分析对不同采样点浮游细菌组成的相似性进行分析, 结果表明同一河道的 2 个采样点之间的细菌组成相似性高于不同河道间的。其中,  $P$  值为 3.96 的朝阳河上的 2 个采样点 5、6 号之间的微生物组成相似性最高, 达 87%, 水质污染最严重的横港的 2 个采样点的微生物组成相似性为 61%, 虽然曹杨环浜的水质较优, 但是位于曹杨环浜的 2 个采样点的微生物组成差异很大, 相似性仅为 59%, 这主要是由于 2 个采样点所处的理化环境有差异造成的, 其中 7 号采样点位于主河道上, 而 8 号采样点则位于河道一端的蓄水

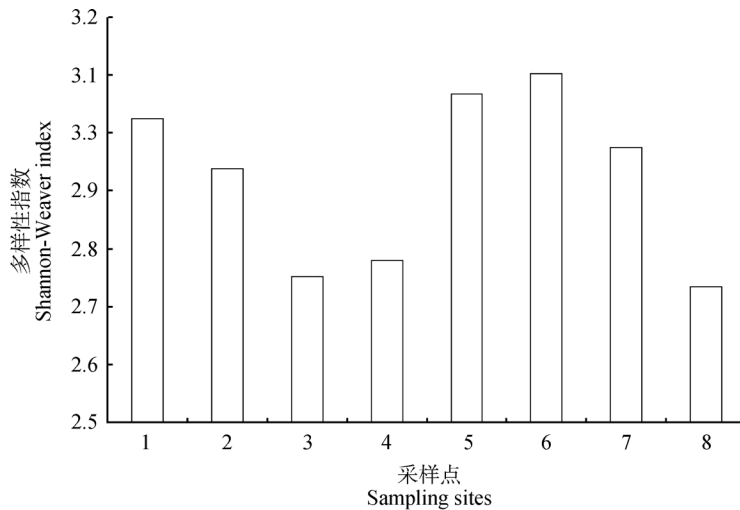


图3 不同采样点浮游细菌多样性分析

Fig.3 Bacterial diversity in different sampling sites

注: 1, 2: 午潮港的 2 个采样点; 3, 4: 横港的 2 个采样点; 5, 6: 朝阳河的 2 个采样点; 7, 8: 曹杨环浜的 2 个采样点.

Note: 1,2: From Wuchaogang River; 3,4: From Henggang River; 5,6: From Chaoyang River; 7,8: From Caoyanghuanbang River.

池内。结果表明, 虽然同一河道的 2 个采样点间的微生物组成相似性高于不同河道间的, 但是同一河道 2 个采样点的微生物组成相似程度与采样点的设置有关, 而与河道污染程度的相关性较小。

#### 2.4 河道微生物组成的多样性分析

根据 DGGE 图谱, 对每条河道的浮游微生物多样性进行评价, Shannon-Weaver 指数的结果表明, 8 个采样点的微生物多样性指数在 2.73~3.10 之间, 其中位于横港的 2 个采样点多样性指数较低, 说明在污染严重的河道微生物的多样性减少。多样性指数最高的采样点出现在朝阳河, 多样性指数分别达到 3.07 和 3.10。位于曹杨环浜的 2 个采样点的多样性指数差异较大, 其中 7 号采样点的 Shannon-Weaver 指数为 2.98, 而 8 号采样点仅为 2.73, 这说明采样点所处的环境不同, 水体中微生物的组成多样性也有差异。

### 3 讨论

本研究结果表明不同河道的可培养细菌总数差异很大, 横港的污染程度较高, 该河道的 2 个采样点(3、4 号)细菌总数较高, 这可能是该河道中藻类的分泌物及一些藻类残体为细菌的生长提供了丰富的养料, 而在位于曹杨环浜的 7 号采样点, 水体中有鱼类及蚌类, 这些生物对于藻类等浮游动物的捕食, 使得一些原生动物的捕食压力增加, 此

外, 由于 7 号采样点中有大量的沉水植物生长, 这些水生植物通过将水体营养盐进行吸收, 导致水体中营养物质含量降低, 从而也减少了细菌的生长<sup>[4]</sup>。有研究表明, 在寡营养水体中, 无机营养物质的含量可能是微生物生长的限制因素, 其中, 尤其以磷含量对水体中微生物数量的影响最为明显<sup>[5]</sup>, 而本研究中水体中细菌总数与  $PO_4\text{-P}$  的含量相关性为  $r=0.613(P=0.106)$ , 虽然有一定的正相关, 但是并不显著, 这可能是因为本研究所涉及的河道并不是寡营养的系统, 所以磷的含量不足以影响水体中浮游细菌的数量。

在本研究中曹杨环浜的水质在 4 条河道中是最优的, 但是 2 个采样点的多样性指数低于朝阳河, 这主要是每条河道的微生物群落都是一个独立的系统, 不同河道的微生物组成不同, 而横港的 2 个采样点所含有的微生物多样性最低, 这可能是由于该河道的环境质量综合指数最高, 污染非常严重, 水生生态系统恶化, 一些敏感细菌难以生存, 导致微生物的多样性下降<sup>[2]</sup>, 而在生态环境较好的河道中, 水体中微生物的多样性相对比较丰富。

在相似性分析中, 我们也可以看到, 虽然同一条河道的 2 个采样点间的微生物组成相似性高于不同河道之间的, 但是, 如果同一河道的 2 个采样点所处的位置理化环境差异较大, 则 2 个采样点的微生物多样性差异也很大, 例如位于曹杨环浜的 7 号

和 8 号采样点, 这 2 个样点相距较远, 7 号位于主河道区而 8 号位于河道一端的蓄水池内, 这也提示在研究河道微生物时, 若河道所处环境较复杂, 应多设采样点, 才能全面反映水体的微生物组成。

在应用 DGGE/TGGE 技术分析微生物群落结构组成时有一定的缺陷, 例如 DGGE 一般只能分析 500 个碱基对以下的 DNA 片段, 因此得到的系统进化相关的信息就很少。另外 DGGE 图谱只能反映群落中占 1% 以上的种群<sup>[3]</sup>, 而系统中的弱勢种群就难以检测到, 但是该技术仍然是目前分析环境微生物组成变化的较理想的研究手段之一<sup>[6]</sup>。本研究在进行细菌计数时只考察了可培养浮游细菌的数量, 虽然不能全面的反映河道系统中细菌总量, 但是本研究的结果表明污染严重的河道中可培养浮游细菌的总量也相应增加, 这与研究者在研究湖泊系统时得出的结论有一致性<sup>[2]</sup>。

有研究表明太湖浮游细菌种群的多样性指数呈现显著的季节变化规律<sup>[7]</sup>, 本研究将水体微生物多样性指数与水体的理化环境做相关性分析可以发现, 水体微生物多样性与河道的 pH 存在显著正相关 ( $r=0.787, P<0.05$ ), 而多样性与温度的相关性并不明显, 这可能是由于本研究只考察了春季河道的微生物组成, 不同河道之间的温度变化幅度不大, 而有研究者在比较了太湖的浮游细菌藻类的结构关系后发现, 藻类的过度生长, 导致水体中 pH 的变化, 可能是细菌群落结构变化的主要诱因<sup>[8]</sup>。

横港的环境质量综合指数较高, 水体中营养物质的含量较高, 促进了某些微生物的大量繁殖和生长, 水体的微生物数量显著增加, 而该河道生态环境的恶化也使得微生物的多样性下降<sup>[2]</sup>, 说明水体的污染程度对于河道的微生物数量和多样性的影响较大; 若同一条河道所处的环境比较复杂, 则不同采样点的微生物组成也有差异, 说明河道微环境的

变化与微生物的组成直接相关; 由此可见, 水体中细菌群落的组成直接与水质相关, 城市河道的水污染治理, 不但要消除水体黑臭, 更要考虑水体中微生物生态环境的修复, 使水体具有自净能力, 成为良性循环系统。

致谢: 感谢上海交通大学微生物分子生态学与生态基因组学实验室在本论文实验过程中给予的帮助和支持。

## 参 考 文 献

- [1] 刘超, 禹娜, 陈立侨, 等. 上海市西南城郊河道春季的浮游生物组成及水质评价. 复旦学报, 2007, 46(6): 913-919.
- [2] 冯胜, 秦伯强, 高光. 细菌群落结构对水体富营养化的响应. 环境科学学报, 2007, 27(11): 1823-1829.
- [3] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3): 695-700.
- [4] 冯胜, 高光, 朱广伟, 等. 基于 16S rDNA-DGGE 和 FDC 技术对富营养化湖泊不同生态修复工程区细菌群落结构的研究. 应用与环境生物学报, 2007, 13(4): 535-540.
- [5] Toolan T, Wehr JD, Findlay S. Inorganic Phosphorus Stimulation of Bacterioplankton Production in a Meso-Eutrophic Lake. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(7): 2074-2078.
- [6] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127-141.
- [7] 邢鹏, 孔繁翔, 高光. 太湖浮游细菌种群基因多样性及其季节变化规律. 湖泊科学, 2007, 19(4): 373-381.
- [8] 邢鹏, 孔繁翔, 曹焕生, 等. 太湖浮游细菌与春末浮游藻类群落结构演替的相关分析. 生态学报, 2007, 27(5): 1696-1702.