

# 湖光岩玛珥湖可培养浮游细菌的 BOX-PCR 图谱及生物多样性分析

纪建达 吴灶和\* 曾永辉 董亭亭 鲁义善 简纪常

(广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 广东海洋大学水产学院 广东 湛江 524025)

**摘要:** 玛珥湖是一类具有独特地质构造特征的火山口湖泊, 目前国内外对玛珥湖内微生物多样性的研究还鲜有报道。为了解具有典型玛珥特征的湖光岩湖泊中可培养浮游细菌的种群资源特征, 采用盒式 PCR (BOX-PCR) 筛选技术, 通过通用贫营养和原位湖水培养基研究在冬夏两季各水层内获得的可培养细菌种群的差异。结果表明: 不同培养基在不同水层上表现的细菌数量的变化相一致, 为夏季的 5 m>1 m>13 m, 冬季的 1 m>5 m>13 m, 变形菌占据优势地位, 其它为放线菌、厚壁菌和拟杆菌; 两类培养基上所获培养菌 BOX-PCR 图谱的多样性相似, 但菌群结构不同; 而细菌多样性在季节上的变化表现为冬季高于夏季, 这与相关湖泊内细菌微生物多样性在夏季会发生减少的特点相似; 相同季节同一水层上不同培养基上获得的培养菌门类不同, 表明此类通用性培养基在培养该环境微生物中的局限。研究的结果为探讨此类型湖泊微生物多样性与环境的关系及分离该环境下特定微生物菌株提供参考。

**关键词:** 湖光岩, 玛珥湖, 细菌多样性, 可培养性, BOX-PCR

## BOX-PCR profiling and biodiversity analysis of cultured bacteria in Huguangyan maar lake

Ji Jian-Da WU Zao-He\* ZENG Yong-Hui DONG Ting-Ting LU Yi-Shan  
JIAN Ji-Chang

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524025, China)

**Abstract:** Maar Lake is a unique type of lake in geological structures, and little is known about microbial diversity in various Maar Lakes worldwide. In order to understand the community structures of culturable bacteria in Huguangyan Lake, a typical Maar lake in South China, BOX-PCR was introduced as a screening technique for bacterial isolates that were obtained from three water depths in winter and summer through the general R2A plates and *in situ* lake-water agar medium. The results indicated that

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No. 30900045)

\* 通讯作者: Tel/Fax: 86-759-2339319; ✉: wuzh@gdou.edu.cn  
收稿日期: 2010-12-29; 接受日期: 2011-03-01

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

the changes of bacterial abundance were consistent along water column and on the two types of medium: 5 m>1 m>13 m for summer and 1 m>5 m>13 m for winter, with *Proteobacteria* as the dominant bacteria followed by *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroides*. BOX-PCR profiles for cultured bacteria on both mediums were similar, but their community structures were not identical. The bacterial diversity was higher in winter than that in summer, in consistent with the trends found in other similar primitive lakes. Our results show that using different media may have different limitations in cultivating microbes from natural environments. This study may contribute to the understanding of significant relationship between microbial diversity and environmental characteristics in unique Maar Lakes and to the isolation of novel functional bacteria.

**Keywords:** Huguangyan, Maar lake, Bacterial diversity, Culture-dependent, BOX-PCR

玛珥是一种低平火山类型, 其内多充水成湖, 即玛珥湖。玛珥由于其形成的特殊喷发作用, 其湖泊与一般湖泊相比特点突出<sup>[1]</sup>。世界上最典型的两处玛珥湖分别位于德国和我国境内, 即雷琼地区的典型玛珥湖——湖光岩。它是一类原生态的火山口湖, 其独特的地质和水文环境<sup>[2]</sup>在形成和保存高分辨率气候环境记录方面具有独特的优势。目前国际上对玛珥湖的研究主要集中在纹层年代学、沉积学、地球化学等学科领域。如欧洲玛珥湖钻探计划所取得的一系列研究成果, 显示出其在过去全球气候变化研究方面的巨大潜力<sup>[3]</sup>。国内外的这类研究都是基于湖泊地质与气候环境方面的内容, 对玛珥湖内微生物多样性的报道还很少<sup>[4-5]</sup>。

一般来说, 水生微生物群落不仅数量巨大, 而且种类丰富、生态功能各异, 在自然水体的物质循环、能量流动、生态平衡以及环境的净化等方面扮演着重要的角色。过去几十年, 随着分子生物学技术和手段在环境微生物领域的应用<sup>[6]</sup>, 揭示了环境中存在着大量尚未获得培养的微生物, 特别是相关 PCR 技术和 16S rRNA 数据库的共同发展, 使得水环境中的自然细菌种类、数量及生理活性的原位测定得以实现, 大量未能培养的微生物陆续被发现。

但迄今的研究结果表明, 水生生态系统中水体微生物如淡水微生物的可培养率为 0.25%, 海水微生物的可培养率为 0.001%–0.100%, 这就导致自然界中的绝大多数微生物仍不被人们所认识<sup>[7]</sup>。另一方面, 基于人们对于微生物在生态系统中的生态地位、功能等的逐步认清和环境修复等方面的现实需要, 获得众多有益纯系菌株的愿望已刻不容缓。因

而, 微生物纯培养技术作为微生物研究的基石一直受到研究者的足够重视。

位于广东省湛江市的湖光岩玛珥湖世界地质公园环境保护较好, 尚未受到人类活动的影响, 目前对该湖泊水体中微生物资源的分布知之甚少。本文基于湖光岩的营养条件<sup>[4]</sup>选择了贫营养类的通用培养基 R2A 和使用过滤后的湖光岩原位湖水配置的琼脂培养基进行富集培养, 目的是在一定程度上减轻培养基的营养条件在培养细菌上的影响, 以获取更为全面的细菌资源; 并结合 BOX-PCR 带型分析技术来阐明这一典型玛珥湖水层中浮游细菌多样性及其冬、夏季节上的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集: 于 2009 年 7 月 30 日和 2009 年 12 月 24 日分别采集了最深水体所在位置的 3 个水层处(1 m、5 m 和 13 m)的水样, 表 1 和图 1 分别展示了采样位点的地理位置 S 和部分水文条件。

| 表 1 样品的水文条件                                    |           |      |      |            |      |      |
|--|-----------|------|------|------------|------|------|
| Table 1 Parts of hydrologic features of sample |           |      |      |            |      |      |
| 参数<br>Parameters                               | 2009.7.30 |      |      | 2009.12.24 |      |      |
| 透明度<br>Transparency (m)                        | 4.1       |      |      | 3.2        |      |      |
| 水层<br>Waterlayer (m)                           | 1         | 5    | 13   | 1          | 5    | 13   |
| 温度<br>Temperature (°C)                         | 31.2      | 31.1 | 28.6 | 19.8       | 19.6 | 19.2 |
| pH 值<br>pH value                               | 8.07      | 8.28 | 7.28 | 7.74       | 7.58 | 7.82 |

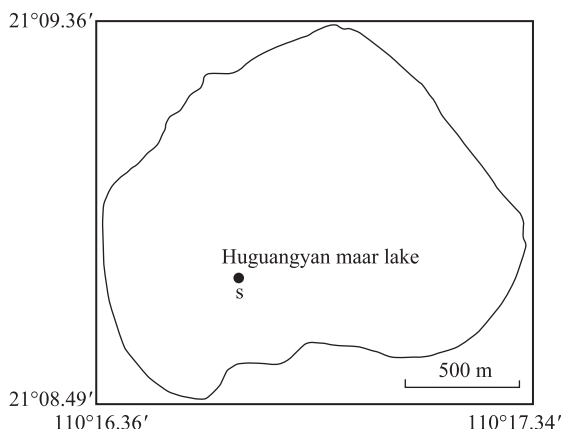


图1 采样地点

Fig. 1 Sampling site

**1.1.2 样品的处理:** 用 Niskin 采水器采集各位点水样 5 L, 立即带回实验室进行下一步操作。首先将各水样依次用 3  $\mu\text{m}$  滤膜(Millipore 公司)过滤, 过滤的体积如表 2 所示。

表 2 实验过滤的体积  
Table 2 Volume of filtered-water sample

| 水层<br>Waterlayer (m) | 3 $\mu\text{m}$ 过滤体积<br>Filtrate volume (mL) |     |
|----------------------|--|-----|
|                      | 夏季   | 冬季  |
| 1                    | 650  | 650 |
| 5                    | 650  | 650 |
| 13                   | 400  | 650 |

## 1.2 获取纯培养体

**1.2.1 培养基:** (1) 贫营养型培养基 R2A<sup>[8]</sup> (g/L): 酵母浸出物 0.50, 胰蛋白胨 0.25, 蛋白胨 0.25, 酪蛋白酸水解物 0.50, 葡萄糖 0.50, 可溶性淀粉 0.50,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, 丙酮酸钠 0.30,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.30, 琼脂 15.00。

(2) 经 3  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后的湖光岩水样 100 mL 与 1.5 g 琼脂配制的培养基。配置好后置高压蒸汽灭菌锅中在  $1 \times 10^5$  Pa 下灭菌 20 min, 最后取出倒平皿 (直径 9 cm), 包扎、放置 4  $^\circ\text{C}$  下备用。

**1.2.2 获取纯培养菌落:** 将 3  $\mu\text{m}$  过滤后的各个水层的 50–60  $\mu\text{L}$  新鲜水样直接涂布于上述两类培养基上。在培养的过程中, 观察各个水层的菌落数量

的变化情况; 并对培养基上的菌落经过数次划线转移以获得单克隆的纯培养。平板置于 4  $^\circ\text{C}$  备用, 同时制备甘油终浓度为 20% 的液体营养物并置于 -80  $^\circ\text{C}$  长期保存。所有的细菌均按照菌落不同大小、形状、颜色等基本形态随机挑选。

## 1.3 可培养细菌 16S rRNA 基因的测序

**1.3.1 碱裂解法提取细菌基因组 DNA:** 具体操作如下: 在 R2A 固体培养基上划线富集培养随即挑取的各个单菌落; 吸取 100  $\mu\text{L}$  0.05 mol/L NaOH 溶液于灭菌的 200  $\mu\text{L}$  PCR 管中, 并将各个富集培养的单克隆刮入管内, 混合后 95  $^\circ\text{C}$  水浴处理 15 min; 14 000 r/min 离心 2 min, 取 1  $\mu\text{L}$  作为 PCR 反应的模板。

**1.3.2 BOX-PCR 反应及带型分析:** (1) 纯系细菌基因组 DNA 的 BOX-PCR 反应。为快速筛选出相同的纯培养菌株, 将获得的纯系细菌基因组 DNA 经过 BOX-PCR 反应后比较电泳图谱。BOX-PCR 的反应程序如下<sup>[9]</sup>: 95  $^\circ\text{C}$  2 min; 94  $^\circ\text{C}$  30 s, 92  $^\circ\text{C}$  30 s, 50  $^\circ\text{C}$  1 min, 65  $^\circ\text{C}$  8 min, 35 个循环; 65  $^\circ\text{C}$  16 min。反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 GoldView 染色。

(2) BOX-PCR 带型的分析。获得的各纯系菌株 BOX-PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳的程序为常温遮光, 70 V, 电泳时间为 180 min 至 210 min。将凝胶用 GDS-8000 凝胶图像分析仪拍照后, 人工比较电泳条带数量和相似性分析, 初步选出具有相同条带的菌株。

**1.3.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增:** 具有代表性的纯培养细菌基因组 DNA 的 16S rRNA 基因扩增, 使用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[10]</sup>, 分别对应于大肠杆菌 16S rRNA 基因的 8–27 和 1 492–1 501。

反应产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 GoldView 染色。

**1.3.4 测序与同源性分析:** (1) 将阳性克隆子送样上海生工生物技术有限公司测序。对获得的核酸序列用核酸数据库计划(RDP)的 Classifier 工具确

认了所有序列的系统发育归属, 采用 80% 为默认置信 阈 值 (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)。(2) 在 NCBI 数据库中通过 BLAST 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)获得目的序列与数据库中的最同源序列, 采用 ClustalX 1.8 软件进行序列匹配排列<sup>[11]</sup>, 然后通过 MEGA 4.0 软件<sup>[12]</sup>建进化树构建它们之间的初步关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 平板培养菌数量及空间分布的分析

从图 2 和图 3 看出, 水样经数天培养后, 培养菌数量表现出不同的空间变化。在夏季, R2A 培养基上细菌数量由多到少依次为 5 m、1 m 和 13 m; 在冬季, 则为 1 m>5 m>13 m。实验的过程中也发现, 不同培养基在不同水层上表现的细菌变化基本相同, 一般是在培养前 1 至 2 d 为白色菌落, 然后依次出现黄色、桔黄色、粉色等。

### 2.2 纯系菌株 BOX-PCR 带型分析

本次实验采用的两类培养基 R2A 培养基和湖水琼脂培养基, 在夏冬季节总共挑取了 340 个纯菌株, 经 BOX-PCR 带型分析及成功扩增出的 16S rRNA 基因, 选取了 280 株代表菌株用于测序分析。其中在夏季 R2A 培养基上(R-水层-编号)有 76 条, 夏季湖水琼脂培养基上(shui-水层-编号)有 83 条; 冬季 R2A 培养基上(dR-水层-编号)有 63 条, 冬季湖水琼脂培养基上(dS-水层-编号)有 58 条。

图 4 显示了部分 BOX-PCR 的电泳结果。在实验过程中, 以 340 株纯系菌株的碱裂解基因组产物为模板进行 BOX-PCR 反应后, 通过 UVP 凝胶成像系统生成电泳图, 依据手工操作, 筛选相关 BOX-PCR 电泳图内具有相同条带的菌株, 并在这类相同菌株中选择 1 株作为代表菌株, 进入测序分析阶段。从图 5 看出, 两类培养基上获取的培养菌 BOX-PCR 图谱在相同季节的多样性相似。

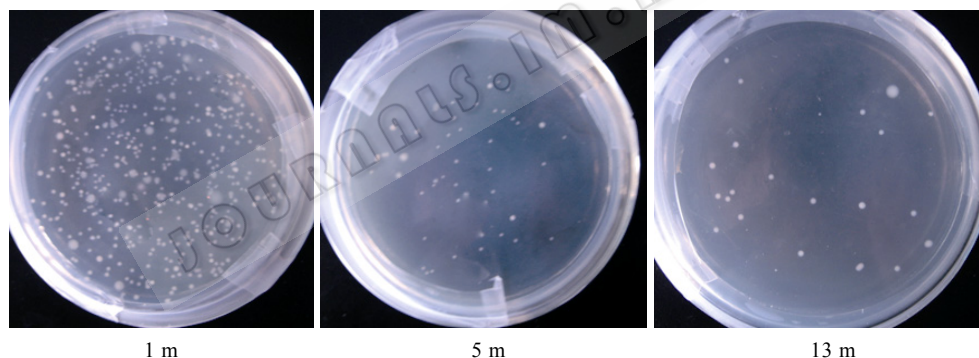


图 2 冬季 R2A 培养基上的菌落变化(经培养 2 d 后)

Fig. 2 Differences in winter isolates on R2A medium (Culturing after 2 days)

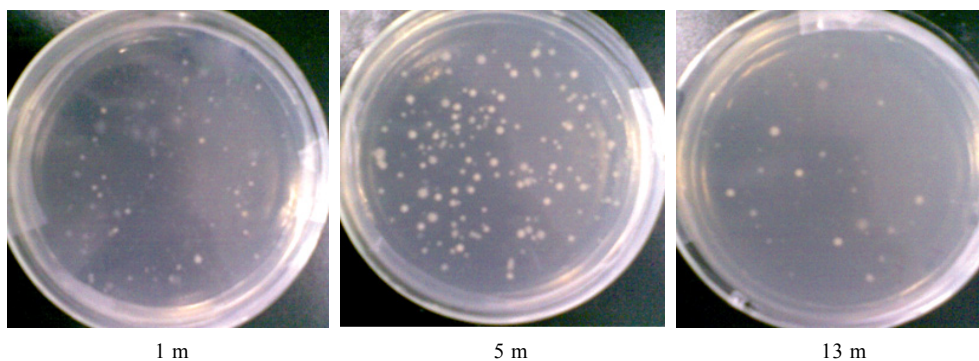


图 3 夏季 R2A 培养基上的菌落变化(经培养 2 d 后)

Fig. 3 Differences in summer isolates on R2A medium (Culturing after 2 days)



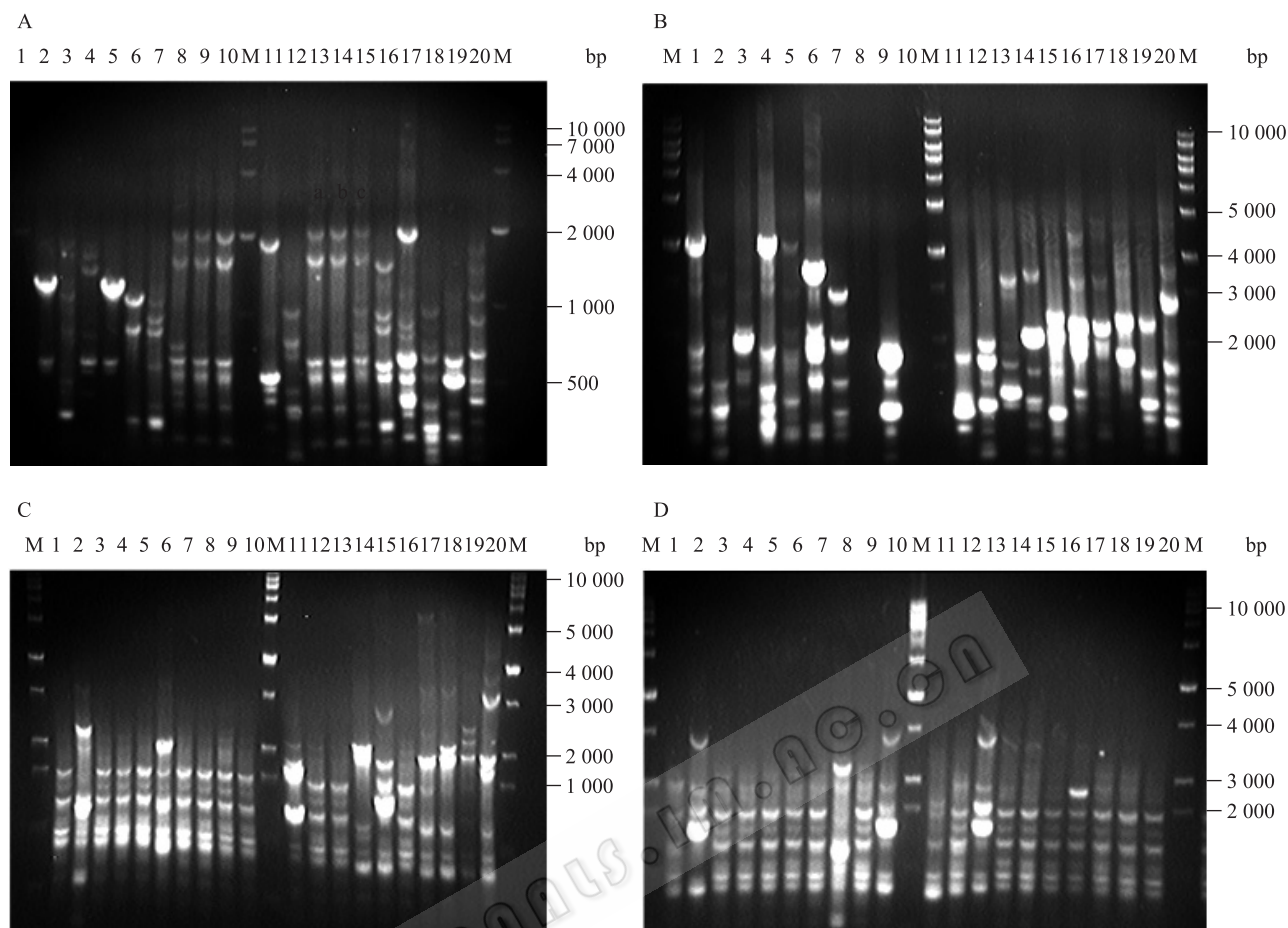


图 4 不同季节细菌菌株 BOX-PCR 部分分离图谱

Fig. 4 BOX-PCR profiles for a part of the strains from samples in different seasons

注: A: 1 m 夏季 R2A 培养基上 1-20 号菌株; B: 1 m 夏季湖水琼脂培养基上 1-20 号菌株; C: 1 m 冬季 R2A 培养基上 1-20 号菌株; D: 1 m 冬季湖水琼脂培养基上 1-20 号菌株; M: 分子量标准(宝生物).

Note: A: Strain 1-20 from R2A medium of sample in summer; B: Strain 1-20 from filtered-water-agar medium of sample in summer; C: Strain 1-20 from R2A medium of sample in winter; D: Strain 1-20 from filtered-water-agar medium of sample in winter; M: Molecular maker (TaKaRa).

### 2.3 纯系菌株的 16S rRNA 基因序列分析

使用通用引物 1492r 和 Eub27f 扩增上述 280 株菌株的 16S rRNA 基因片段, 测序后获取的成功序列为 249 条, 其中夏季有 132 条, 冬季有 115 条。部分结果如图 5 所示。

将获得的序列用 RDP Classifier 工具进行归属分析。结果表明, 获取的全部序列覆盖了 RDP 数据库中的 4 个细菌门类, 共 39 个属(夏季 23 个属, 冬季 29 个属), 见表 3。其中夏季 R2A 培养基和湖水琼脂培养基分别含有 17 个和 18 个属, 冬季则分别为 19 个和 21 个属。默认的分类置信度为 80%。从

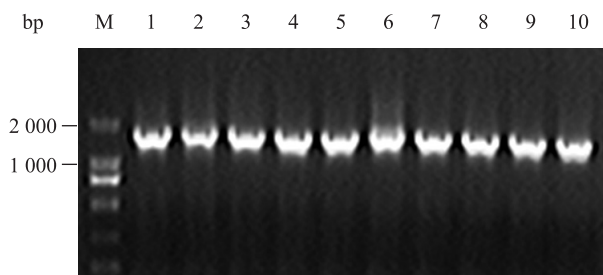


图 5 冬季 1 m、5 m 部分菌株 16S rDNA 基因扩增产物 (约 1 500 bp)

Fig. 5 Amplified products of 16S rDNA from parts of strains in winter samples

注: 1-5: 1 m 水层菌株; 6-10: 5 m 水层菌株; M: Marker 2000.

Note: 1-5: Strains of 1 m samples in winter; 6-10: Strains of 5 m samples in winter; M: Marker 2000.

表 3 可培养的代表菌株 16S rDNA 基因序列 RDP Classifier 的归类结果  
Table 3 Taxonomical hierarchy of 16s rRNA gene sequences of the representative cultured bacteria based on RDP classifier analysis

| 代表性的 OUT<br>Representatives of OTU | 克隆数<br>Clone number | RDP 属<br>RDP genus                 |                    |
|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|--------------------|
|                                    |                     | 属 Genus                            | 置信度 Confidence (%) |
| Bacteroidetes                      |                     |                                    |                    |
| dR1-22                             | 2                   | Chryseobacterium                   | 100                |
| dR13-8                             | 1                   | Mucilaginibacter                   | 100                |
| dR5-12                             | 1                   | Flavobacterium                     | 100                |
| dS13-11                            | 3                   | Elizabethkingia                    | >99                |
| Actinobacteria                     |                     |                                    |                    |
| shui1-22                           | 1                   | Unclassified_Corynebacterineae1    | 96                 |
| shui5-21                           | 1                   | Unclassified_Microbacteriaceae     | 100                |
| shui13-28                          | 1                   | Aeromicrobium                      | 100                |
| dR13-9                             | 1                   | Leucobacter                        | 100                |
| dR5-13                             | 5                   | Microbacterium                     | 78                 |
| dS5-23                             | 1                   | Nocardioides                       | 100                |
| dS5-24                             | 1                   | Agrococcus                         | 100                |
| dS13-27                            | 1                   | Unclassified_Promicromonosporaceae | 100                |
| Firmicutes                         |                     |                                    |                    |
| R1-13                              | 3                   | Staphylococcus                     | 100                |
| R13-7                              | 1                   | Unclassified_ "Bacilli"            | 84                 |
| R13-10                             | 5                   | Bacillus                           | >98                |
| dR1-20                             | 2                   | Unclassified_Bacillaceae           | >87                |
| dR13-16                            | 1                   | Lysinibacillus                     | 100                |
| Betaproteobacteria                 |                     |                                    |                    |
| R1-24                              | 2                   | Ralstonia                          | 100                |
| shui5-6                            | 1                   | Methyloversatilis                  | 100                |
| shui13-15                          | 1                   | Aquabacterium                      | 94                 |
| dR5-25                             | 1                   | Curvibacter                        | 100                |
| dR13-13                            | 1                   | Alcaligenes                        | 100                |
| dR13-15                            | 4                   | Pelomonas                          | >93                |
| Gammaproteobacteria                |                     |                                    |                    |
| R1-17                              | 1                   | Unclassified_Enterobacteriaceae    | 100                |
| R5-8                               | 5                   | Stenotrophomonas                   | 100                |
| R5-28                              | 49                  | Acinetobacter                      | 100                |
| R13-19                             | 27                  | Pseudomonas                        | >88                |
| R13-30                             | 3                   | Rheinheimera                       | 100                |
| shui13-6                           | 1                   | Unclassified_Moraxellaceae         | 83                 |
| shui13-10                          | 1                   | Pseudoxanthomonas                  | 100                |
| dR1-6                              | 2                   | Unclassified_Pseudomonadaceae      | 100                |
| dR1-11                             | 1                   | Alkanindiges                       | 90                 |
| dS5-26                             | 1                   | Unclassified_ Gammaproteobacteria  | 83                 |
| dS13-3                             | 1                   | Aeromonas                          | 100                |
| dS13-16                            | 1                   | Serratia                           | 100 (待续)           |

续表 3

|                       |    |                                  |     |
|-----------------------|----|----------------------------------|-----|
| Alphaproteobacteria   |    |                                  |     |
| shui5-22              | 13 | Rhizobium                        | >97 |
| R1-18                 | 1  | Unclassified_Rhizobiales         | 99  |
| R5-6                  | 11 | Sphingobium                      | 100 |
| R1-27                 | 1  | Unclassified_Rhizobiales         | 100 |
| R1-30                 | 5  | Blastobacter                     | >82 |
| R5-23                 | 2  | Paracoccus                       | >99 |
| R13-4                 | 12 | Bosea                            | 100 |
| R13-5                 | 1  | Unclassified_Alphaproteobacteria | 96  |
| R13-12                | 16 | Sphingomonas                     | >81 |
| shui1-1               | 30 | Brevundimonas                    | >90 |
| shui1-23              | 1  | Unclassified_Rhizobiales         | 99  |
| shui5-8               | 9  | Xanthobacter                     | >84 |
| shui5-25              | 6  | Caulobacter                      | 100 |
| shui13-3              | 1  | Unclassified_Rhizobiales         | 100 |
| shui13-11             | 1  | Unclassified_Rhizobiales         | 99  |
| Unclassified_Bacteria |    |                                  |     |
| R5-21                 | 1  | Unclassified_Bacteria            | 96  |

RDP 数据分析和 16S rRNA 序列分析结果(图 6)发现,变形菌出现在不同季节及不同水层中,并占据着主要地位,这与一般湖泊内浮游细菌的种类和结构相似,通常以变形菌门作为优势类群<sup>[13-14]</sup>,其次有放线菌、厚壁菌和拟杆菌等;其所占比例大于 76%,这一数值与一些原生态湖泊的研究结果相似<sup>[15]</sup>。从季节的变化情况看,变形菌和厚壁菌所占比例随着夏季(87.9%、6.8%)和冬季(84.6%、2.6%)的变化呈现下降趋势,并且水层越深变形菌下降的幅度越大(表层到底层: 89.1%/88.6%, 90.7%/87%, 83.7%/77.8%);而放线菌则呈上升趋势(夏季 3.8%,冬季 6.0%)。

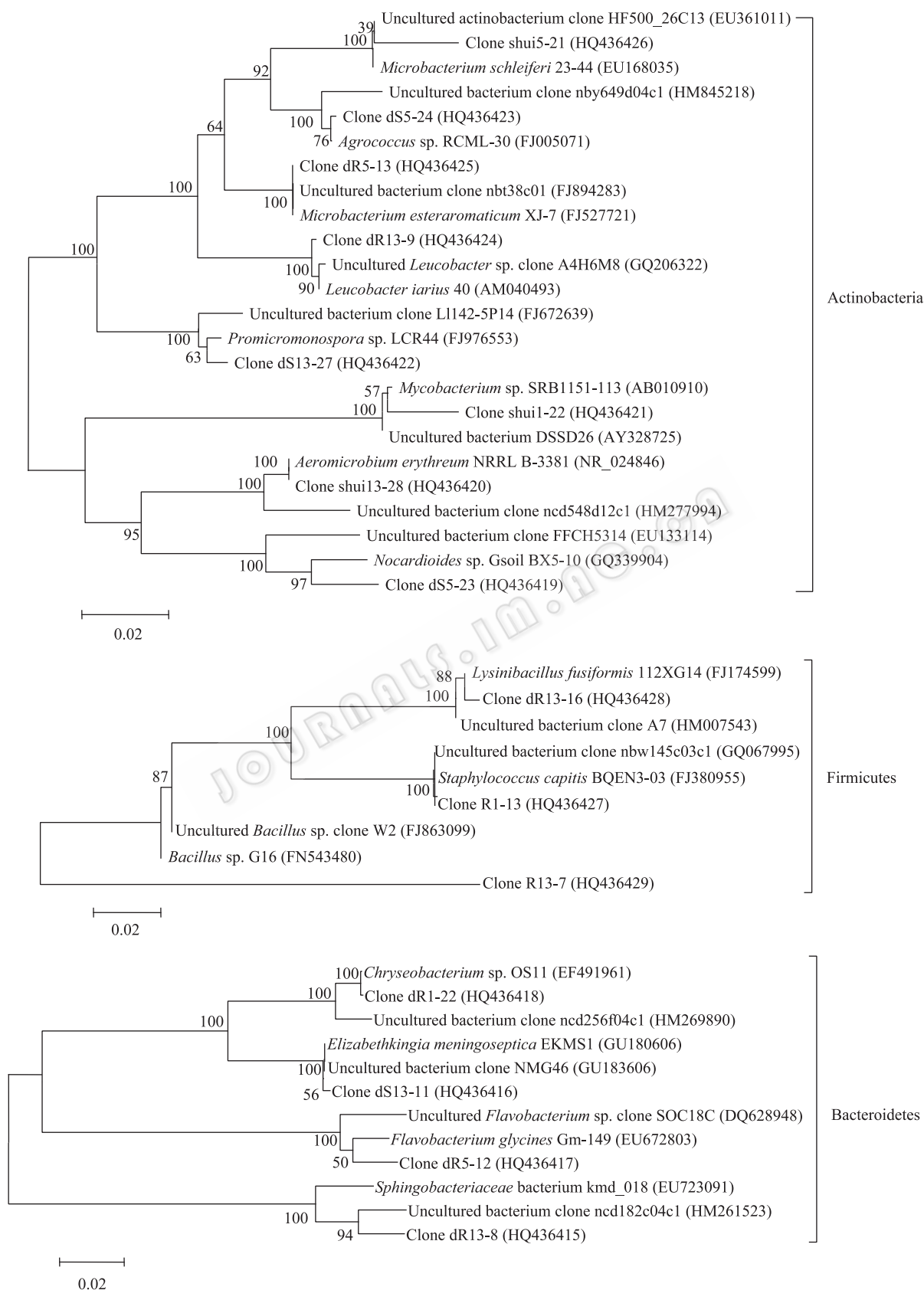
2.4 纯系菌株的系统发育分析

以 NJ 法(MEGA 4.0 软件)构建了可培养浮游细菌 16S rRNA 序列的系统发育树(图 6)。结果显示,38 条湖光岩浮游细菌 16S rRNA 所属的门类代表了实验已提取出的 249 条序列,其中 7 条序列(HQ436429、HQ436438、HQ436439、HQ436442、HQ436451、HQ436452)与 GenBank 中已有的细菌同源性最高不到 90%。图中显示的 16S rRNA 基因系统发育树将环境水样的浮游细菌分为:放线菌、

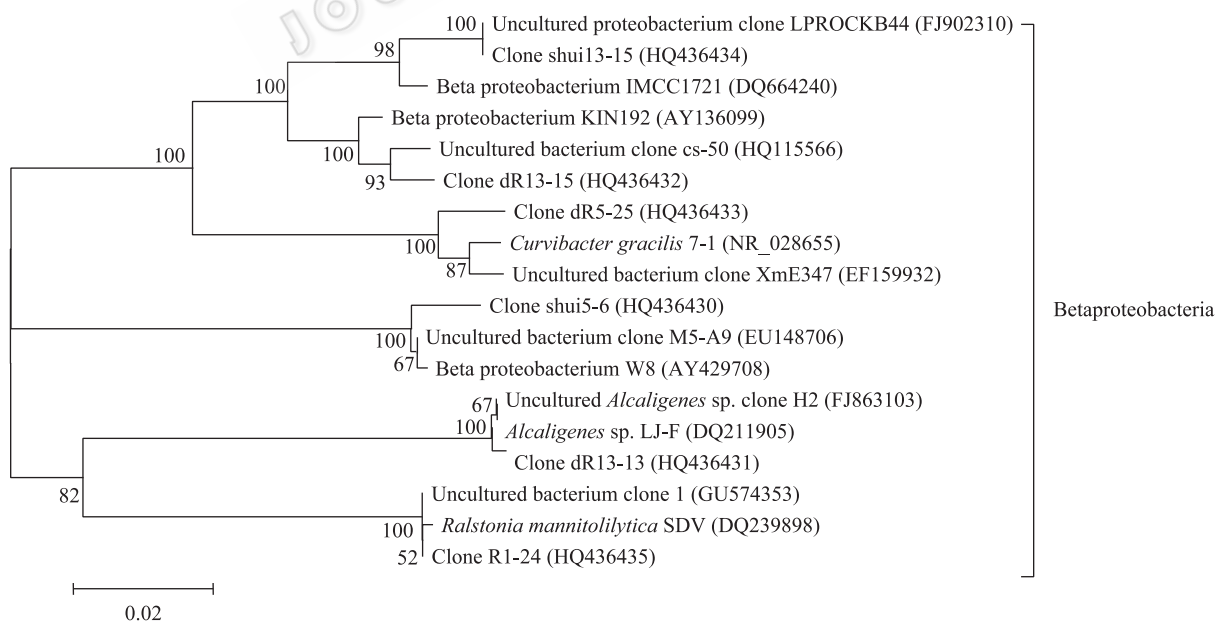
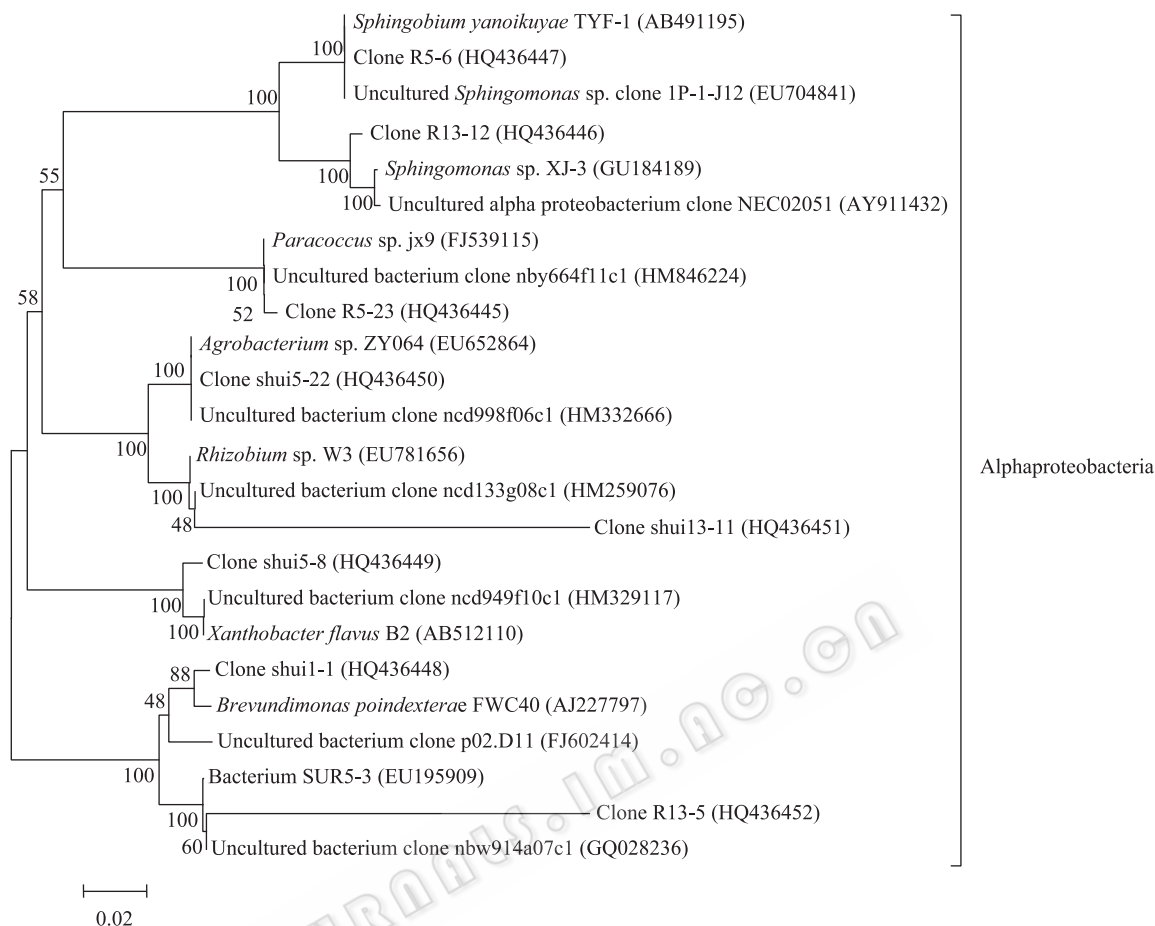
厚壁菌、拟杆菌、 $\alpha$ -变形菌、 $\beta$ -变形菌以及  $\gamma$ -变形菌。

3 讨论

玛珥湖因其特殊的湖泊结构及沉积物特点,湖泊沉积物中的火山灰保存着原始的形貌、原生沉积和成分特征,是记录环境气候条件的理想材料之一<sup>[2]</sup>,据此获得的相关研究成果已影响深远。比如,国内外学者通过湖光岩玛珥湖的地质分析揭示出末次冰消期的气候变化<sup>[16]</sup>,Negandank 等以 Lake Holzmaar 的部分纹层厚度序列的分析,阐述了太阳-气候的可能驱动机制<sup>[17]</sup>。这类研究成果都是与玛珥湖具备的完整纹层沉积物有着直接的关系。然而,玛珥湖的湖泊特点及其蕴含的各类完整的纹层沉积物不仅仅在气候研究上具有价值,在湖泊内原生态的特殊功能菌、微生物群落对沉积物的保护机制及古细菌的保存等方面,仍值得探讨。比如,丁燊等就曾在湖光岩玛珥湖中分离出对海洋溶藻弧菌具有明显抑制效果的拮抗菌<sup>[5]</sup>,这为进一步保护和充分挖掘湖光岩自有微生物提供了一定的科学依据。







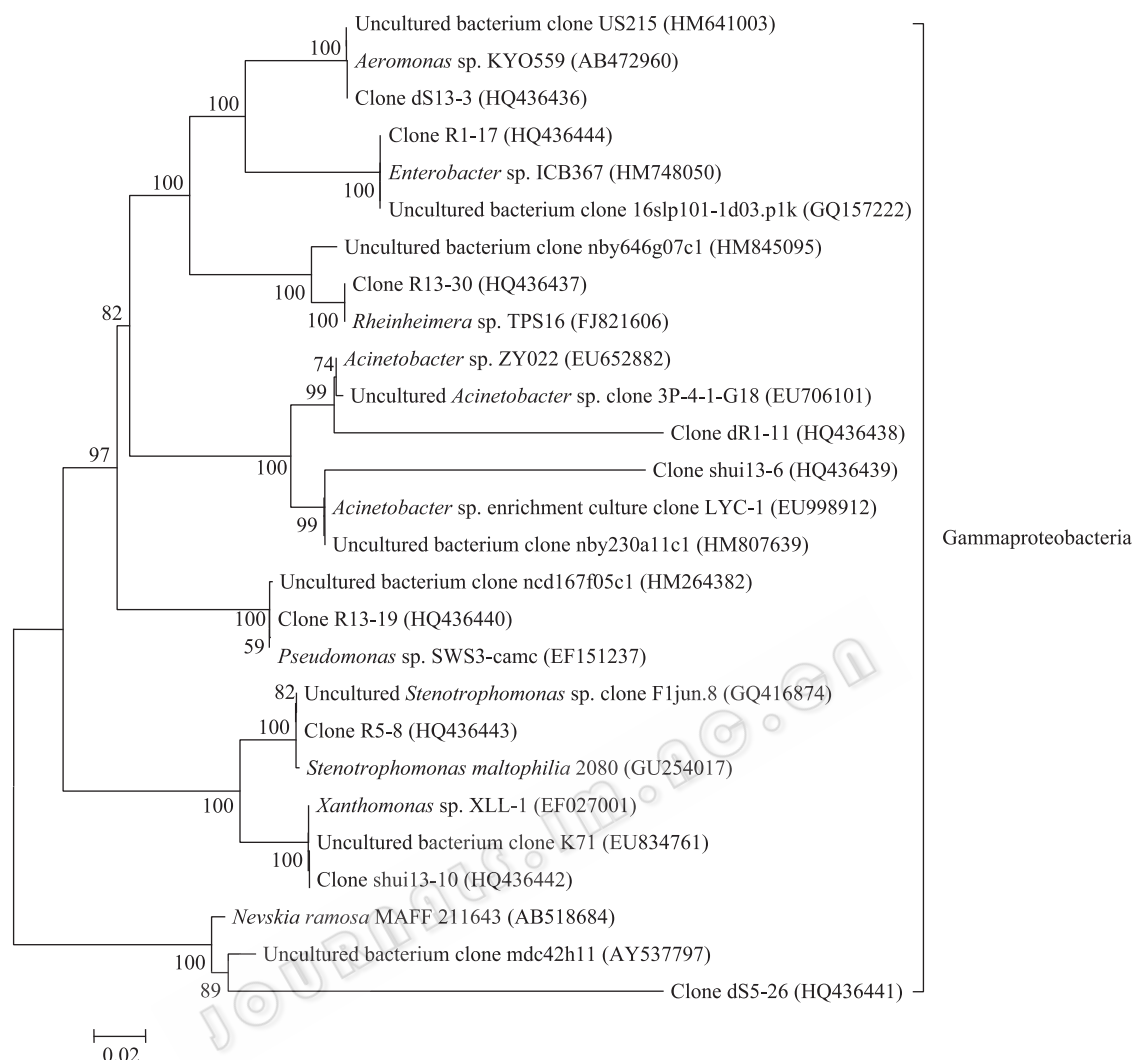


图 6 基于 16S rDNA 序列的湖光岩玛珥湖可培养菌多样性系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree reconstructed from 16S rDNA sequences of the culture bacteria from Huguangyan Maar lake

Note: The tree was evaluated by bootstrap analysis of the neighbor-joining method based on 100 replications. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Value of 1 000 bootstrap resamplings that supported the branching orders in each analysis is shown above or near the relevant nodes. Bar: 0.02 sequence divergence.

近年来,为了克服微生物的“不可培养性”,国内外研究学者在探索某类未培养微生物时,一般会根据微生物自身的生理特点、代谢产物等,通过改变培养基配方、培养方式等手段,从环境中分离得到该类微生物。Coates 等通过改变培养方式,在厌氧条件下分离出能完全氧化单环芳香化合物的细菌,定名为脱氯单胞菌(*Dechloromonas*, strains RCB)<sup>[18]</sup>。有些学者甚至通过采用一些非传统的方法分离出了部分未知微生物门类。比如 Santini 就采用非传统的生长底物来促进新型微生物的生长。他们

通过采用不同电子供体和受体,发现很多前所未知的生理型微生物<sup>[19]</sup>。这类非传统的方式潜在地拓宽了微生物资源的利用空间,为获取新的微生物资源奠定了一定的基础。

然而,到目前为止,湖光岩等同类玛珥湖内的微生物资源特征仍不太清楚,为了获得较为全面的微生物门类<sup>[20-21]</sup>,在综合微生物的一些特性,比如喜好“贫营养”基质<sup>[22]</sup>,以及该湖泊的水质特点<sup>[4]</sup>,我们采用了通用的贫营养培养基和直接过滤后的湖水配制的培养基来分离原位生长的微生物。有研究

表明, R2A 培养基在较洁净的水中分离微生物比营养琼脂培养基具有更好的灵敏度<sup>[20]</sup>; 并且通过降低培养基营养成分<sup>[21]</sup>, 采取添加原有环境中的少量生长因子<sup>[23]</sup>可提高微生物门类的分离数量。在我们的研究中也证实了这方面的内容, 实验发现 R2A 培养基上确实较原位湖水培养基生长的菌落多; 但从多样性内容来看, 后者显得更为丰富。

从自然环境中分离富集细菌后的一个重要环节是筛选出重复的菌落, 目前多用的方法主要是 16S rRNA 基因的 PCR-RFLP 分析。由于酶切位点的局限性和 16S rRNA 基因的高度保守, 该方法的分辨率一直非常有限。而 BOX-PCR 技术是一种广泛应用于微生物多样性研究的技术<sup>[24-25]</sup>, 技术优势明显, 可跳过引物设计所带来的问题, 或作为引物设计的着入点对微生物进行鉴定分析<sup>[26]</sup>。过去 Marta Tacao 等通过气单胞菌属内多个物种的分析证实了该技术分型的结果优于其他同类技术<sup>[27]</sup>。本实验在研究过程中分析了众多相同及相似条带, 结果表明所获得的微生物多样性分析结果详细和准确。比如图 4 中 1 m 夏季 R2A 培养基上菌株的电泳图, 序列分析的结果显示具有相同条带泳道 a、泳道 b 上的菌株为 *Staphylococcus* sp., 而仅有微小差异的泳道 c 上的菌株却为 *Agrobacterium* sp., 测序结果和 BOX-PCR 的结果得到很好的印证。

从分离出的微生物菌种发现, 两类培养基在不同季节及各个对应的水层中出现的生物多样性结构不同。说明该湖泊菌群的分布具有明显的季节性。通过对分离菌株 16S rRNA 基因片段的分析见(图 6), 湖光岩浮游细菌在对应科属中的同源性大部分大于 90%, 与其最同源的菌种也来源于各类生态环境; 在季节变化上, 夏季微生物的生物多样性低于冬季(见结果 2.3)。这一点与其它同类型的研究结果类似。比如, Yannarell 等曾分别对不同季节的富营养湖泊 Mendota、腐殖质湖泊 Crystal Bog 和贫营养湖泊 Crystal 进行了研究, 发现随着季节的变化, 3 个湖泊细菌群落的多样性会发生变化。在春秋两季, 湖泊细菌的群落组成相对比较稳定, 但在夏季却会发生较大的变化, 变化的特点就是细菌微生物多样性的

减少<sup>[28]</sup>; 但产生的原因不明。另外, 也有可能与浮游植物有着密切的关系<sup>[29]</sup>, 据分析, 湖光岩浮游植物的丰富度表现为夏季低于冬季<sup>[4]</sup>, 这基本与实验结果呈现出的多样性变化相同。此外, 在我们的研究结果中, 变形菌随着水层和季节的变化, 其比例的下降幅度变大。推测可能的原因是与种群特征、生境状况有关, 比如盐度<sup>[30]</sup>、嗜碱性<sup>[31]</sup>、深度<sup>[32]</sup>。但对于这方面的内容有待进一步的探讨。

本实验还分离到一部分序列的同源性小于 90%, 其有可能是代表尚未认知的门类。这部分菌种为 Shui13-6 (88%)、Shui13-11 (89%) 和 dS5-26 (84%)、R13-5 (87%)、R13-7 (83%) 和 dR1-11 (87%), 它们的同源性都不大于 90%。说明湖光岩作为一类原生态的湖泊, 蕴藏着丰富的尚未认知的新物种, 凸显玛珥湖具有重要的研究意义和潜在价值。

总之, 湖光岩作为一类典型的玛珥湖, 一类具有独特地质和水文特点的原生态火山口湖, 蕴含着丰富的微生物资源种群, 其物种组成、生物群落结构、生态功能等以及在适应湖光岩的地质特点上的内容值得继续探索和深入研究, 前景广阔。

致谢: 感谢湖光岩玛珥湖风景区管理局在采水许可、采样船只的使用方面对本项目的大力支持; 感谢张才学老师、易志全同学提供部分采样器材; 感谢协助现场采样工作的所有同学。

## 参 考 文 献

- [1] Büchel G. Maars of the Westeifel, Germany[J]. Lecture Notes in Earth Sciences, 1993, 49: 1-13.
- [2] 郭正府, 刘嘉麒, 储国强, 等. 湖光岩玛珥湖火山灰的成分及其来源[J]. 第四纪研究, 2002, 22(3): 266-272.
- [3] Zolitschka B, Negendank JFW. High-resolution records from European Lakes[J]. Quaternary Science Reviews, 1999, 18(7): 885-888.
- [4] 张才学, 孙省利, 谢少英, 等. 湖光岩玛珥湖的浮游植物[J]. 水生生物学报, 2008, 32(5): 620-630.
- [5] 丁燊, 简纪常, 吴灶和, 等. 湖光岩拮抗菌的研究[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(3): 380-384.
- [6] Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, 345(6270): 63-65.

- [7] Cowan DA. Microbial genomes-the untapped resource[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(1): 14-16.
- [8] 顾孔珍, 钱纯, 罗岳平. 用 R2A 培养基提高饮用水中细菌总数检出率[J]. 净水技术, 2004, 23(1): 42-44.
- [9] Oda Y, Wanders W, Huisman LA, et al. Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(7): 3467-3477.
- [10] O'Sullivan LA, Fuller KE, Thomas EM, et al. Distribution and culturability of the uncultivated 'AGG58 cluster' of the *Bacteroidetes* phylum in aquatic environments[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(3): 359-370.
- [11] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [12] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Brief Bioinform, 2008, 79(4): 299-306.
- [13] 孙超, 吴敏, 史锋. 新疆两湖细菌的非培多样性研究[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2008, 35(4): 448-454.
- [14] Pernthaler J, Glöckner FO, Unterholzner S, et al. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(11): 4299-4306.
- [15] 刘晓波, 康世昌, 刘勇勤, 等. 青藏高原纳木错湖细菌群落特征及其与高山湖泊的对比[J]. 冰川冻土, 2008, 30(6): 1041-1047.
- [16] 王文远, 刘嘉麒, Negendank J, 等. 热带湖光岩玛珥湖记录的末次冰消期东亚夏季风两步式的变化[J]. 科学通报, 2000, 45(8): 860-864.
- [17] Negendank JFW, Zolitschka B. Paleolimnology of European Maar Lakes[J]. Lecture Notes in Earth Sciences, 1993, 19(4): 481-482.
- [18] Coates JD, Cole KA, Chakraborty R, et al. Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2445-2452.
- [19] Santini JM, Sly LI, Schnagl RD, et al. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 92-97.
- [20] 白晓慧, 戈志坚, 邢一, 等. 两种培养基对饮水机出水中细菌总数的测定效果比较[J]. 中国环境监测, 2006, 22(6): 22-24.
- [21] Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, et al. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2391-2396.
- [22] 郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 504-507.
- [23] 岳秀娟, 余利岩, 李秋萍, 等. 自然界中难分离培养微生物的分离和应用[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 77-81.
- [24] Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, et al. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2572-2577.
- [25] 杨凤环, 李正楠, 姬惜珠, 等. BOX-PCR 技术在微生物多样性研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1282-1286.
- [26] Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria[J]. Genome Research, 1995, 5(4): 408-418.
- [27] Tacao M, Alves A, Saavedra MJ, et al. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp.[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2005, 88(2): 173-179.
- [28] Yannarell AC, Kent AD, Lauster GH, et al. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status[J]. Microbial Ecology, 2003, 46(4): 391-405.
- [29] 李福东, 张诚, 邹景忠. 细菌在浮游植物生长过程中的作用[J]. 海洋科学, 1996(6): 30-33.
- [30] Wu QL, Zwart G, Schauer M, et al. Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5478-5485.
- [31] 龚世杰, 吴兰, 李思光. 湖泊微生物多样性研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(4): 54-57, 74.
- [32] Humayoun SB, Bano N, Hollibaugh JT. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1030-1042.