

# 基于 *pufM* 基因的乌梁素海富营养化湖区好氧不产氧光合细菌系统发育多样性分析

何一平<sup>1</sup> 曾永辉<sup>2</sup> 袁博<sup>1</sup> 刘惠荣<sup>1</sup> 冯福应<sup>1\*</sup>

(1. 内蒙古农业大学生命科学学院应用与环境微生物研究所 内蒙古 呼和浩特 010018)  
(2. 广东海洋大学水产学院 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 湛江 524025)

**摘要:** 好氧不产氧光合细菌(AAPB)的多样性在海洋中已经广泛研究,但在富营养化湖泊中却研究甚少。通过构建和分析 AAPB 光合中心合成中的关键基因 *pufM* 克隆文库,以期揭示乌梁素海富营养化湖区 AAPB 分布及其系统发育多样性,探讨其在富营养化湖泊中的功能和作用。对乌梁素海红圪卜湖区水体文库中的 52 个克隆子进行分析,产生了 28 个 OTU,文库覆盖度达到 71.4%,反映出文库有较好的代表性。同源性和系统发育分析结果表明,乌梁素海红圪卜湖区 AAPB 有较高的多样性,与我们之前所发现的同一湖区总细菌多样性较低形成鲜明对比。所获得的序列分属 7 个亚群,即  $\gamma$ -Proteobacteria (44.2%, 含 Group-1, -2 和 -3 共 3 个亚群)、 $\beta$ -Proteobacteria (21.2%)、Rhodobacter-like (7.69%)及 2 个未知亚群 unknown Group-1 (21.2%)和 Group-2 (5.77%)。其中  $\gamma$ -Proteobacteria 占到总克隆的 44.2%,在低盐的乌梁素海环境中出现高比例的  $\gamma$ -Proteobacteria 之前并未见类似报道,并且乌梁素海中存在一些可能是富营养化湖泊特有的 AAPB。这表明 AAPB 可能在富营养化湖泊生态系统的维持和稳定中有重要作用。

**关键词:** 好氧不产氧光合细菌, *pufM*, 群落结构, 系统发育分析, 多样性

## Phylogenetic Diversity of Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria in Eutrophic Zone of Lake Ulansuhai Based on Gene *pufM*

HE Yi-Ping<sup>1</sup> ZENG Yong-Hui<sup>2</sup> YUAN Bo<sup>1</sup> LIU Hui-Rong<sup>1</sup> FENG Fu-Ying<sup>1\*</sup>

(1. Institute for Applied & Environmental Microbiology of Life Sciences College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)  
(2. Guangdong Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524025, China)

**Abstract:** The diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria (AAPB) has been well examined in marine habitats, but that in eutrophic lake are little known. Gene *pufM* is related to biosynthesis of photosynthetic reaction center and is widely used in diversity analysis of AAPB. This study constructed

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30760004); 内蒙古自治区自然科学基金项目(No. 200711020304); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(No. NJ06106); 内蒙古农业大学博士科研启动基金项目(No. BJ06-50), 创新项目(No. NDPYTD2010-3)

\* 通讯作者: Tel: 86-471-4309240; 邮箱: forefeng@hotmail.com  
收稿日期: 2010-01-26; 接受日期: 2010-06-09

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

and analyzed *pufM* gene library, to reveal the distribution and phylogenetic diversity of AAPB and discuss their role of AAPB in eutrophic zone of Lake Ulansuhai. 52 clones of the library were obtained, analyzed and clustered into 28 operational taxonomic units (OTUs). Coverage analysis showed that the library coverage value was of 71.4%, which indicated that the clone library could provide a fine inventory of AAPB diversity in the lake. Phylogenetic and statistical analysis of clone library revealed a higher AAPB diversity in the lake, which has a sharp contrast with lower total bacteria diversity of the same lake according to our previous study. Sequences obtained in this study belonged to seven subgroups, namely  $\gamma$ -*Proteobacteria* (44.2%, including Group-1, -2 and -3),  $\beta$ -*Proteobacteria* (21.2%), *Rhodobacter*-like (7.69%) and unknown Group-1 (21.2%) and Group-2 (5.77%). Higher proportion of  $\gamma$ -*Proteobacteria* in lower salinity lake like Ulansuhai, has not been reported before. Some unique AAPB ecotypes were probably related to eutrophic lake habitat. This suggested that AAPB play an important role in maintenance and stability of eutrophic lake ecosystems.

**Keywords:** Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, *pufM*, Community composition, Phylogenetic analysis, Diversity

好氧不产氧光合细菌(Aerobic anoxygenic photosynthesis bacteria, AAPB) 是在有氧条件下以有机物、硫化物或氨等作为供氢体, 通过细菌叶绿素捕获光能进行光合作用但并不释放氧气的一类原核生物。AAPB 广泛分布于各种环境, 包括海洋和热泉<sup>[1]</sup>、河流河口<sup>[2]</sup>以及内陆湖<sup>[3]</sup>。其生物量占整个微生物群落的比例, 在海洋中约为11%<sup>[1]</sup>, 在河口中最高可达34%<sup>[2]</sup>, 而在一些高山湖泊中的比例甚至超过了50%<sup>[3]</sup>。Beaty<sup>[4]</sup>提出 AAPB 的光合能力有利于在寡营养环境中提升竞争力, 这意味着 AAPB 的丰度和多样性会随环境中营养丰富程度的提高而降低, 反之亦然。世界上营养最贫乏的南太平洋海沟中的 AAPB 达到了24.2%<sup>[5]</sup>。而 Jiang<sup>[6]</sup>的研究结果表明, AAPB 在营养相对贫乏的西藏盐湖中丰度较高但多样性较低。可见, AAPB 与环境中的营养关系还不确定。目前, 在对海洋 AAPB 生态学粗略了解的基础上, 微生物学家的注意力正转向淡水湖泊、河流和土壤, 这些环境最有可能和人类产生直接的相互作用<sup>[7]</sup>。另外, 相对于海洋等高含盐环境, 人们对富营养化碱性湖泊中 AAPB 分布和多样性的研究与认识严重不足。富营养化湖泊中 AAPB 的多样性和丰度是否低于海洋的, 与营养程度有何关系? 是否存在特定的富营养化湖泊生态类型的 AAPB? 是否有特殊 AAPB 与偏碱性高原草型浅水湖泊相联系? 基于这些问题, 本文通过构建和分析富营养化湖泊乌梁素海 *pufM* 基因文库, 揭示 AAPB 系统发育多样性, 初步探讨富营养化环境中 AAPB 的分布特征及特殊生态类型与环境因素相关情况, 进而为富营养化水

体生态环境的修复提供理论依据。

乌梁素海(40°47'–41°03' N, 108°43'–108°57' E) 位于内蒙古西部巴盟乌拉特前旗, 湖面海拔 1018.79 m, 现有水域面积约 293 km<sup>2</sup>, 属浅水湖(平均水深约 1.0 m, 最深约 2.5 m), 是黄河流域最大的湖泊, 是地球上同纬度地区最大的自然湿地(已列入世界湿地公约)。近些年来由于河套灌区大量施用化肥, 农田退水把大量的无机营养盐带进乌梁素海, 加上部分工业废水的排放, 使乌梁素海成为世界上典型的重度营养化的草型湖泊<sup>[8]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及环境参数

实验样品采自乌梁素海富营养程度较高的红圪卜湖区(HGB site)<sup>[9]</sup>, 采样时间为 2008 年 11 月 15 日, 以自制采样瓶采集远离岸边和航道湖区表层水(10 cm–20 cm), 样品置于低温(4°C)保温箱中并迅速运回实验室处理。采集样品一部分用于 AAPB 多样性分析, 另一部分用于反映水质情况的铵态氮(NH<sub>3</sub>-N)、硝态氮(NO<sub>3</sub>-N)、总氮(TN)、总磷(TP)、硫化物(S)、化学需氧量(COD<sub>Mn</sub>)、溶解有机碳(DOC)和叶绿素 a (Chl a)的分析测定。叶绿素 a 的测定采用分光光度计法<sup>[10]</sup>; 总磷的测定采用钼酸铵分光光度法(GB 11893-89); 总氮的测定采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(GB 11894-89); 氨态氮的测定采用水杨酸-次氯酸盐光度法(GB 7841-87); 硝酸盐氮的测定采用酚二磺酸光度法(GB 7840-87); 硫化物的测定采用对氨基二甲基苯胺光度法(GB/T

16489-1996); COD 的测定采用重铬酸盐法(GB11914-8)<sup>[10]</sup>。

## 1.2 样品处理及总 DNA 的提取

将采集水样先用 10  $\mu\text{m}$  孔径的滤膜(所有滤膜均为美国 Millipore 公司生产,直径 45 mm)预过滤,然后再过滤到 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜上,过滤 150 mL 水样,将过滤好的滤膜用铝箔纸包好,经液氮速冻后放入  $-70^{\circ}\text{C}$  保存直至分析<sup>[11]</sup>。总 DNA 提取用酶解和冻融结合的提取方法,参考 Ausubel 等<sup>[12]</sup>进行。随后对提取到的 DNA 用凝胶回收试剂盒(北京中科瑞泰)按操作手册进行纯化。

## 1.3 PCR 扩增及文库构建

*pufM* 为编码光反应中心小亚基的一个基因,作为不产氧光合作用的标记基因,近来被广泛用于环境 AAPB 的多样性分析<sup>[13]</sup>。本文选用 *pufM* 引物 *pufM*\_uniF: 5'-GGNAAYTNTWYTAYAAAYCCNTTYCA-3'; *pufM*\_uniR: 5'-YCCATNGTCCANCKCCARAA-3'<sup>[13]</sup>, PCR 反应体系: 0.5  $\mu\text{L}$  DNA 模板(约 50 mg/L), 0.1  $\mu\text{L}$  Ex-*Taq* 酶, 2  $\mu\text{L}$  扩增 Buffer, 1.6  $\mu\text{L}$  dNTPs (2.5 mmol/L), 引物(20  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  终浓度为 1.5 mmol/L, 补水使总体积至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  1 min,  $48^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,目的条带约为 190 bp。如此扩增 10 管并混合 PCR 产物,以降低单次扩增的偏好性。混合后的 PCR 产物经凝胶回收纯化试剂盒纯化备用。将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体(大连宝生物)上,然后转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布培养,构建成文库。

## 1.4 测序与系统发育分析

从文库中随机挑选了 52 个阳性克隆送上海生物工程有限公司(Sangon)测序。序列用 NCBI 数据库的 BLASTx 程序与数据库中进行相似性比对搜索,选择参比序列。以 Kimura\_2 模型计算进化距离、以邻接法(Neighbor-joining, NJ) MEGA 软件构建系统发育树<sup>[14]</sup>, 自举值为 1000。序列已全部提交 GenBank 注册,登录号为 GU458804-GU458855。

## 1.5 多样性指数分析

序列对于可操作的分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)的聚类分析使用软件 DOTUR (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>)完成。统计了以下参数: Taxa, 以 6% 的核酸差异作为

分类标准时的 OTU; Individual, 文库中筛选出来的总的阳性序列数目; 覆盖率(Coverage), 覆盖率 =  $1 - (N/\text{Individual})$ ,  $N$  为整个文库中只出现一次的克隆子数目; 多样性指数(Shannon 和 Dominance), 反映物种多样性, Shannon-Weaver ( $H'$ )是一个综合物种丰度和各物种的相对比例这两方面因素的一个多样性指数。Dominance 表示某种生物在群落中所占的优势程度。其计算公式分别为  $H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$ ,

$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$ , 其中  $P_i = \frac{n_i}{N}$ ,  $P_i$  为每个分类单元代表克隆数占有总分析克隆数的比例,  $S$  为总 OTU 数,  $n_i$  为第  $i$  种 OTU 的克隆数,  $N$  为总克隆数; 均匀度指数(Evenness), 反映了群落中不同物种多度分布的均匀程度, 其计算公式为  $E = H'/H_{\max}$ ,  $H_{\max}$  为最大 Shannon 指数, 大小为  $\log_2(S)$ ,  $S$  同上所指; Margalef 指数, 可反映物种的丰富度, 其计算公式为  $d_{\text{Ma}} = (S-1)/\ln N$ ,  $S$ 、 $N$  同上所指。

## 2 结果与分析

### 2.1 环境参数

环境参数分析结果表明, 所研究乌梁素海湖区 pH 值为 8.22, 碱性程度接近碱水湖的 pH ( $> 9.0$ ), 碱性较强; 水温为  $5.4^{\circ}\text{C}$ , 水深 0.75 m 为浅水湖区。湖水中 TN 含量 1.45 mg/L, TP 含量 0.45 mg/L, 超过国际上对富营养化的界定水平(TN  $> 1.2$  mg/L, TP  $> 0.11$  mg/L); 硫化物(S)为 0.23 mg/L, 氨氮( $\text{NH}_3\text{-N}$ )为 0.68 mg/L, 硝酸盐氮( $\text{NO}_3\text{-N}$ )为 0.68 mg/L, 化学需氧量( $\text{COD}_{\text{Mn}}$ )为 108 mg/L, 溶解有机碳(DOC)为 86.9 mg/L。我们测定所得叶绿素 a 浓度为 21.5  $\mu\text{g/L}$ , 低于一般富营养化湖泊的水平( $> 78$   $\mu\text{g/L}$ )。

### 2.2 多样性指数分析

PCR 扩增得到 *pufM* 片段长度约 190 bp, 对此片段构建基因文库并随机选取文库中的 52 个克隆子, 产生了 28 个 OTU。文库覆盖率为 71.4%, 覆盖度较高, 文库可用于评估 AAPB 多样性。经计算得出, Dominance、Shannon、Evenness 和 Margalef 值都较高, 分别为 0.9467、3.1425、0.6537 和 6.8333。Shannon-Weaver 高于内陆湖泊洱海和嘎海的 1.42 和 0.49<sup>[6]</sup>。说明富营养化的 HGB 湖区 AAPB 有较高的多样性, AAPB 种群很丰富, 还存在明显的优势类群。

## 2.3 群落组成和系统发育多样性

我们在 28 个 OTU 中分别从每个 OTU 中取了一个代表序列, 通过 BLASTn 分析其在 GenBank 数据库中最同源序列和最同源序列所处的环境(表 1)。代表序列与处于同一 OTU 中的其他序列同源性分析结果基本一致, 故在 BLAST 和系统发育分析时只列出了代表序列。由表 1 可见, Group-1、-6 为优势类群, 各占全部克隆的 21.2%; 而 Group-3 次之, 占 19.2%; Group-2 类群所占比例最小, 仅为 5.77%。另外, 表 1 所列同源序列来源环境分析表明, 乌梁素海中 *pufM* 主要与河口、海洋和富营养化湖泊中的序列相似。

将最同源序列及不产氧光合细菌主要属的代表作为参比序列, 以 NJ 法构建了系统发育树(图 1)。由图 1 可见, 本研究的多数序列未能与参比序列归为一簇, 而是各自形成独立的簇。*pufM* 蛋白系统发育树(结果未列出)显示两种系统发育树的拓扑结构基本相同。由系统发育树可将所有序列归为 7 个亚群: 其中之一为  $\alpha$ -3 *Proteobacteria* 类中的 *Rhodobacter-like* 亚群, 以及 6 个其他亚群。其中有 4 条 *pufM* 序列属于 *Rhodobacter-like* 亚群, 占到总克隆的 7.69%, 形成 2 个 OTU。

结合同源性(表 1)和系统发育(图 1)以及 DOTUR 分析结果, Group-3、-4、-5 三个亚群与  $\gamma$ -*Proteobacteria* 有较高相似性, 在发育树上形成 3 个分支, 故 Group-3、Group-4 和 Group-5 三个亚群可能属于  $\gamma$ -*Proteobacteria*, 3 个亚群共含有 13 个 OTU, 占总克隆数的 44.2%。Group-6 亚群与  $\beta$ -*Proteobacteria* 进化距离较为接近, 因此将其归为  $\beta$ -*Proteobacteria*, 占全部克隆的 21.2%。Group-1 和 Group-2 两个亚群与可培养的纯系进化距离都比较大, 将它们归入 2 未知类群, 占到总克隆的 27%。令人奇怪和感兴趣的是, Group-1 类群未包含任何一个参比序列, 而其序列全部是来自本研究的序列。说明乌梁素海存在大量稀有未被培养类群, 且 AAPB 多样性很高。

## 3 讨论

### 3.1 乌梁素海富营养化湖区水体 AAPB 多样性及其与环境的关系

本文基于 PCR 扩增的分子生物学方法构建和分析了乌梁素海富营养化湖区 AAPB 基因文库。虽然

分子生物学方法可能会高估环境中微生物的多样性, 但目前只能通过优化方法以降低偏好和假象的程度<sup>[15]</sup>。为此, 本研究中对可能的关键环节进行了优化, 如提取环境总 DNA 时采取了酶解和冻融结合<sup>[16]</sup>, 不同批次/管 PCR 产物混合后回收, 序列分析时去除嵌合体等方法<sup>[15]</sup>。结果表明, 该文库覆盖度大于 70%, 能代表所研究环境中 AAPB 多样性的基本情况, 并且其文库多样性指数、丰富度指数和均匀度指数数值都较高, 均高于高原湖泊青海湖、洱海和尕斯库勒湖<sup>[6]</sup>, 以及东海、北太平洋、东北太平洋、白令海<sup>[17]</sup>的相应指数。由此可见, 乌梁素海 AAPB 多样性较高, 特别是明显高于很多高盐环境。乌梁素海中 AAPB 高多样性的原因首先可能是与补给水源的多样化有关。乌梁素海库容约 3 亿  $\text{m}^3$ , 每年初春季节(大约在 4 月 15 日左右)会利用黄河凌汛间隙水补水 7000 万  $\text{m}^3$ , 此外她还接纳农田退水、工业污水及生活用水等, 因此, 乌梁素海中菌群受到强烈的河流和陆地等外源输入的影响。其次, 乌梁素海属于浅水湖<sup>[8]</sup>, 内蒙古高原经常性的风扰动可能会使沉积物中的 AAPB 释放到水体中, 从而使水体中 AAPB 多样性更加丰富。所以, 在比较不同环境(例如海洋和淡水湖泊)中 AAPB 甚至其他微生物多样性时, 应综合考虑多种环境因子的影响。无论原因如何, 乌梁素海中 AAPB 丰富的多样性至少提供了对过去关于多样性和营养关系推测(即认为多样性会随营养程度增高而降低<sup>[6]</sup>)的否定证据。因此, 我们推测在营养程度高的环境中 *puf* 等光合基因可能并不活跃, 营养浓度只是调控光合基因的表达水平而并不能决定携带菌在环境中是否存在或存在的多寡。

我们以前的研究<sup>[9]</sup>表明, 乌梁素海中总细菌的多样性受富营养化等因素的影响而较低, 太湖中也有类似情况<sup>[18]</sup>, 说明现在的乌梁素海生态系统已经比较脆弱。根据“生态保险理论”及后来的争论<sup>[19]</sup>, 生物多样性的降低预示着生态环境的恶化。然而, 本研究却揭示出乌梁素海中 AAPB 有较高的多样性, 这说明 AAPB 在诸如乌梁素海等受富营养化等污染严重的湖泊中具有重要的生态功能, 可能正是因为高多样性的 AAPB 等功能类群微生物的存在和发展, 才使得这些脆弱的生态系统得以维持。但是, 其作用机理和过程还有待进一步深入研究。

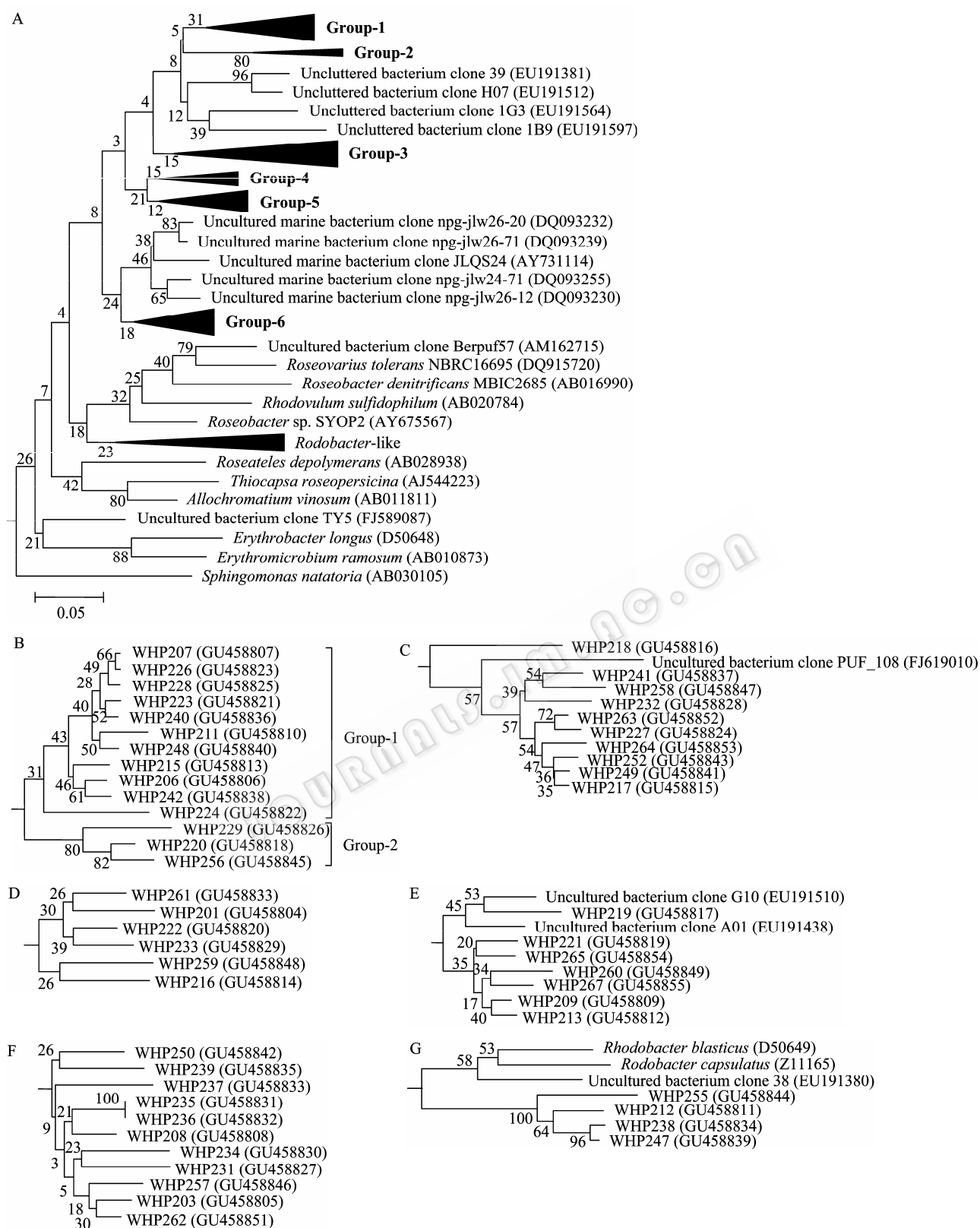
表 1 亚群 *pufM* 代表序列同源性分析及序列来源环境比较  
Table 1 Homology analysis and comparison of source habitat of representative *pufM* sequence

代表克隆 Representative Clone	克隆数 Clone number	登录号 Accession No.	相似度 Similarity (%)	环境 Habitat	亚群 Subgroup	比例 Proportion (%)
WHP206 (GU458806)	3	EU191512	87	Estuary	Group-1	21.2
WHP207 (GU458807)	7	EU191564	86	Estuary		
WHP224 (GU458822)	1	EU191438	88	Estuary		
WHP220 (GU458818)	2	EU191381	84	Estuary	Group-2	5.77
WHP229 (GU458826)	1	EU191456	86	Estuary		
WHP217 (GU458815)	4	FJ589087	81	Eutrophic lakes	Group-3	19.2
WHP227 (GU458824)	2	EU191597	84	Estuary		
WHP258 (GU458847)	2	EU191381	84	Estuary		
WHP218 (GU458816)	1	AM162715	83	Sediments of an eutrophic brackish lagoon	Group-4	11.5
WHP241 (GU458837)	1	FJ589087	81	Eutrophic lakes		
WHP201 (GU458804)	1	DQ093230	91	Ocean		
WHP222 (GU458820)	2	DQ093228	89	Ocean		
WHP261 (GU458850)	3	DQ093255	90	Ocean		
WHP260 (GU458849)	1	DQ093239	87	Ocean	Group-5	13.5
WHP267 (GU458855)	1	DQ093239	89	Ocean		
WHP209 (GU458809)	1	EU191510	92	Estuary	Group-6	21.2
WHP213 (GU458812)	3	AY731114	88	Ocean		
WHP219 (GU458817)	1	EU191510	89	Estuary		
WHP235 (GU458831)	2	DQ093232	92	Ocean		
WHP239 (GU458835)	1	DQ093247	91	Ocean		
WHP208 (GU458808)	1	DQ093255	94	Ocean		
WHP250 (GU458842)	2	AY731117	93	Ocean		
WHP257 (GU458846)	2	AY731109	90	Ocean		
WHP234 (GU458830)	1	DQ093255	91	Ocean		
WHP231 (GU458827)	1	DQ093230	91	Ocean		
WHP237 (GU458833)	1	DQ093247	89	Ocean	<i>Rhodobacter</i> -like	7.69
WHP238 (GU458834)	3	EU191380	85	Estuary		
WHP255 (GU458844)	1	AY675567	84	Ocean		

3.2 乌梁素海富营养化湖区水体 AAPB 类群及其与环境的

关系  
本研究所获得的乌梁素海富营养化湖区 *pufM* 序列分属 28 个 OTU。系统发育分析表明, 28 个 OTU 中的代表序列在系统发育树上分别落入 7 个不同的簇, 分别为 Group-1、-2、-3、-4、-5、-6 和 *Rhodobacter*-like, 他们代表了 7 个细菌亚群(图 1)。Zeng 等利用 DOTUR 软件研究分析 AAPB 属、种 *pufM* 序列之间的距离之后认为, 基于此 *puf* 序列距离进行种、属和门的分类的 Cutoff 值分别为 0.06、0.15 和 0.48<sup>[20]</sup>。同样经过 DOTUR 分析, 结果表明本研究中的 Group-6 与 AAPB 属 *Roseateles* sp.(*β-Proteobacteria*)间的进化距离(0.27) < 0.48,

Group-3 与 *Thiocapsa* sp.和 *Allochroma* sp. (*γ-Proteobacteria*)的进化距离为 0.33, Group *Rhodobacter*-like 与 *Rhodobacter* sp.的进化距离为 0.31, 而其他亚群与现有已分离培养细菌进化距离较远(0.33–0.70)。因此, 认为本研究中的 Group-6 (占全部克隆的 21.2%, 两个最优势菌群之一, 见表 1) 亚群属于 *β-Proteobacteria*, 而另一菌群 Group-3 (占了全部克隆的 19.2%)属于*γ-Proteobacteria*, 可能属于 *Thiocapsa* 或 *Allochroma*。Group *Rhodobacter*-like 虽然与 *Rhodobacter* 属的进化距离(0.31)大于 Zeng 等<sup>[20]</sup>建议的属水平上分类的 Cutoff 值(0.15), 但本研究的系统进化发育树(图 1)显示此亚群中的 WHP255、WHP212、WHP238 和 WHP247 很好地与

图 1 乌梁素海环境水体 *pufM* 基因的系统发育树Fig. 1 Phylogenetic tree of *pufM* gene sequences in Lake Ulansuhai water

Note: A: All sequences; B: Unknown group (Group-1, Group-2); C: Group-3; D: Group-4; E: Group-5; F: Group-6; G: Group *Rhodobacter*-like data in parentheses are the GenBank accession numbers. Numbers at the nodes indicates the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. The scale bar represents 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides. *Chloroflexus aurantiacus* severed as outgroup.

*Rhodobacter* spp. 聚在一起, 且没有包含任何其他属的菌种, 这说明应用 *pufM* 作属水平上分类的 Cutoff 值设置为 0.31 左右可能更为合适。但需要注意的是, 细菌之间光合基因存在有水平转移的可能<sup>[21]</sup>, 基于功能基因 *puf* 等和看家基因 16S rRNA 得出的分类和系统发育分析结果并不总是一致。结合 BLAST 结果分析, Group-4、-5 两个亚群与  $\gamma$ -*Proteobacteria* 有较高同源性(87%–92%), 因此, 认为 Group-4、-5 两个亚群属于  $\gamma$ -*Proteobacteria*。这样, 乌梁素海  $\gamma$ -*Proteobacteria* 所占比例高达 44.2%。由 DOTUR 结果显示, 所有的克隆序列均未达到在种分类水平上加以区分的进化距离(0.06)。这意味着乌梁素海中蕴藏着许多现在尚不为我们所知的 AAPB, 这些微生物资源或许具有值得我们努力发掘和保护的功能。

有研究表明盐度对 AAPB 群落组成结构有着重要的影响作用。AAPB 的构成随着盐度的增加  $\alpha$ -*Proteobacteria* 类群和  $\gamma$ -*Proteobacteria* 类群所占该环境 AAPB 类群的比重会相应的增加, 而  $\beta$ -*Proteobacteria* 类群的比重会减少<sup>[6]</sup>。在含盐高的水体中  $\alpha$ -*Proteobacteria* 类群和  $\gamma$ -*Proteobacteria* 类群的 AAPB 占大部分<sup>[2]</sup>, 如 Delaware 入海口有至少 50% 的克隆与  $\gamma$ -*Proteobacteria* 类群相似, 有氧海区  $\gamma$ -*Proteobacteria* 类群也占到 34.5%。淡水河流和淡水湖泊中的 AAPB 优势类群是  $\beta$ -*Proteobacteria* 类群<sup>[2]</sup>。而在线 BLASTn 分析, 本研究所获得的乌梁素海富营养化湖区 *pufM* 序列的最同源序列局限于河流入海口、海洋和富营养化湖泊。我们较容易理解较丰富的  $\beta$ -*Proteobacteria* 存在于属于淡水湖泊的乌梁素海之中。但是, 乌梁素海中  $\gamma$ -*Proteobacteria* 占全部 AAPB 的比例高达 44.2%, 之前并未见类似报道, 此结果有些令人费解。 $\gamma$ -*Proteobacteria* 类群的 AAPB 在乌梁素海中占绝对优势, 其原因之一可能是乌梁素海的弱盐碱性的影响, 其二可能是黄河中有关 AAPB 在乌梁素海中进一步的繁殖扩大。对与盐碱性的思考, 因乌梁素海地处河套土壤盐碱化严重的地区, 并且该湖水循环少、蒸发量大, 可能使得湖水盐碱性增加。pH 测定发现其湖水偏较强的碱性(> 8.7)。在盐度分析中, 使用了 HANA 便携盐度计(精度 0.1%)进行测定, 但是未有读数, 说明盐度很低。

Group-1 和-2 的成员在进化树(图 1)中单独形成两簇, 而未和参比菌掺杂, 这可能是乌梁素海中存在的特殊菌群。还有, Group-3 中的 60% (4 + 1 + 1/10) *pufM* 序列最同源序列来自于富营养化湖泊, 尽管他们之间的同源性不是很高(81%–84%), 但这些序列与其他来源、特别是非富营养化环境 *pufM* 基因同源性更低(< 79%), 携带这些 *puf* 基因的 AAPB 可能是富营养化水体中特有的。对这些微生物数量和种类的分析, 将有助于从生物角度理解和监测水生生态系统环境变化。

## 参 考 文 献

- [1] Kolber ZS, Plumley FG, Lang AS, *et al.* Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science*, 2001, **292**(5566): 2492–2495.
- [2] Waidner LA, Kirchman DL. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake estuaries. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, **73**(12): 3936–3944.
- [3] Masin M, Nedoma J, Pechar L, *et al.* Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in temperate freshwater systems. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(8): 1988–1996.
- [4] Beatty JT. On the natural selection and evolution of the aerobic phototrophic bacteria. *Photosynthesis Research*, 2002, **73**(1/3): 109–114.
- [5] Lami R, Cottrell MT, Ras J, *et al.* High abundance of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the South Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(13): 4198–4205.
- [6] Jiang HC, Dong HL, Yu BS, *et al.* Abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes on the Tibetan plateau. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, **67**(2): 268–278.
- [7] Yurkov V, Csotonyi JT. New light on aerobic anoxygenic phototrophs, New York: Springer Science, 2009: 31–55.
- [8] Li CY, Gao RZ, Liu TX, *et al.* Study on the eutrophication synthetical evaluation and the season-year change in Ulansuhai lake. *Journal of Water Resources & Water Engineering*, 2005, **16**(2): 12–15.
- [9] 孙鑫鑫, 刘惠荣, 冯福应, 等. 乌梁素海富营养化湖区浮游细菌多样性及其系统发育分析. 生物多样性, 2009, **17**(5): 490–498.
- [10] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [11] Lovejoy C, Massana R, Pedrós-Alió C. Diversity and distribution of marine microbial eukaryotes in the Arctic

- Ocean and adjacent seas. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(5): 3085–3095.
- [12] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* Short protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons Inc, 2002: 52–87.
- [13] Beja O, Suzuki MT, Heidelberg JF, *et al.* Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature*, 2002, **415**(6872): 630–633.
- [14] Kumar S, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, **9**(4): 299–306.
- [15] Sipos R, Székely AJ, Palatinszky M, *et al.* Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, **60**(2): 341–350.
- [16] Frostegard A, Courtois S, Ramisse V, *et al.* Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, **65**(12): 5409–5420.
- [17] 胡耀华. 代表性海区好氧不产氧光合细菌的光合基因 (*pufM*) 生态分布特征. 厦门大学硕士学位论文, 2006.
- [18] Feng S, Qing BQ, Gao G. Response of bacterial communities to eutrophic water in Lake Taihu. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, **27**(11): 1823–1829.
- [19] MacCann KS. The diversity-stability debate. *Nature*, 2000, **405**(6783): 228–233.
- [20] Zeng YH, Chen XH, Jiao NZ. Genetic diversity assessment of anoxygenic photosynthetic bacteria by distance-based grouping analysis of *pufM* sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, **45**(6): 639–645.
- [21] Hu YH, Du HL, Zeng YH. Abundant presence of the  $\gamma$ -like proteobacterial *pufM* gene in oxic seawater. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, **263**(2): 200–206.

## 编辑部公告

### 中国科学院微生物研究所期刊广告部简介

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 E-mail 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

**提示:** 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>