

蓝藻水华对湖泊细菌群落 结构的影响

李化炳 著



科学出版社

蓝藻水华对湖泊细菌群落 结构的影响

李化炳 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

细菌是经典食物网与微食物网的连接者,在水生生态系统物质循环中具有极其重要的地位。在蓝藻水华占优势的湖泊生态系统中,大量的物质和能量由蓝藻合成后被细菌分解、利用。蓝藻水华的暴发势必对湖泊细菌的群落结构组成产生影响。然而,有关该方面的研究极其缺乏。本书借助多种微生物生态学技术,通过野外调查和原位围隔实验相结合,探讨不同环境(有氧、缺氧、厌氧)、不同微囊藻生物量下细菌群落结构的变化及其恢复情况,以期了解细菌群落结构对蓝藻水华的响应及其机制,为阐明蓝藻水华稳定态系统维持机制提供理论基础。

本书可供浮游植物生态学、环境微生物生态学、水生生物学等研究领域的人员和高等院校师生参考、阅读。

图书在版编目(CIP)数据

蓝藻水华对湖泊细菌群落结构的影响/李化炳著. —北京:科学出版社, 2018.9

ISBN 978-7-03-058614-8

I. ①蓝… II. ①李… III. ①蓝藻纲-藻类水华-影响-湖泊-细菌-群落生态学 IV. ①Q949.22②Q939.108

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 199370 号

责任编辑:周 丹 沈 旭/责任校对:彭 涛

责任印制:张克忠/封面设计:许 瑞

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京画中画印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年9月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2018年9月第一次印刷 印张: 7 1/2

字数: 151 000

定价: 99.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

近年来, 由于湖泊富营养化所导致的蓝藻(尤其是微囊藻)水华频繁发生, 蓝藻水华引起的生态灾害机制急需阐明。细菌(尤其是异养细菌)连接着经典食物网与微食物网, 在水生生态系统生物地球化学循环中具有极其重要的地位。在蓝藻水华占优势的湖泊生态系统中, 大量的物质和能量由蓝藻合成后被细菌分解、利用。了解细菌群落结构对蓝藻水华的响应及其机制, 对于阐明蓝藻水华稳定态系统维持机制和揭示湖泊生物群落结构灾变具有重要意义。然而, 有关该方面的研究严重匮乏。

为此, 本书在回顾蓝藻水华引发的生态灾害、蓝藻水华与湖泊细菌的关系以及分子生物学技术在湖泊细菌群落结构组成研究中的应用的的基础上, 借助细菌计数、T-RFLP、PCR-DGGE 和 16S rDNA 克隆文库技术, 探讨了细菌群落结构对微囊藻水华的响应及其恢复情况, 并以太湖易发生蓝藻水华尤其是微囊藻水华的北部湖区——梅梁湾为研究对象, 进行每月一次、为期一周年的监测, 深入探讨自然水体中细菌群落结构的变化与水体理化环境因子以及浮游藻类生物量的变化关系; 设置不同规格的原位围隔、模拟不同生物量的蓝藻水华, 对水华堆积消退过程中细菌群落结构的变化及恢复情况进行监测; 跟踪监测太湖藻源性湖泛发生过程中细菌的群落结构变化, 探讨浅水湖泊发生湖泛时细菌群落结构变化与水华微囊藻生物质的分解吸收以及水体臭味物质的释放之间可能存在的关系。

本书基于我在中国科学院南京地理与湖泊研究所攻读博士及工作期间的研究成果整理而成。感谢吴庆龙研究员在研究的选题立题、实验设计到具体实验、结果分析中的悉心指导, 本书的出版离不开他的鼓励和支持。感谢研究所邢鹏研究员在野外采样、室内分析、数据处理中给予的帮助。感谢研究所刘正文研究员、李宽意研究员、陈非洲研究员、关保华老师、曾巾老师、汤祥明老师在实验过程中给予的良好建议和帮助。感谢边园琦、向燕、范献方、王娜、田伟、刘庆、任丽娟、何聃、赵璧影等在实验以及写作工程中给予的大力帮助。在研究进行过程中, 我有幸参加了吴庆龙研究员主持的国家重点基础研究发展计划(973计划)、国家自然科学基金面上项目、中国科学院知识创新工程重要方向项目以及江苏省自然科学基金创新者攀登项目, 上述项目为本书相关研究提供了资金支持。最后

衷心感谢科学出版社周丹编辑在书稿出版、校对过程中付出辛勤的劳动。由于分子生物学技术发展迅速的特性，本书相关研究仍然有诸多需要深化的地方，尤其是细菌功能对蓝藻水华的响应研究需要运用微生物基因组学、转录组学、蛋白组学等新的分子生物学技术不断深入探索。此外，由于我的学识、水平、时间有限，书中难免存在一些不当甚至错漏之处，恳请广大读者不吝赐教。

李化炳

2018年春于南京九华山麓

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 问题的提出	2
1.2 分子生物学技术在湖泊细菌群落结构组成研究中的应用	3
1.2.1 克隆文库分析法 (clone library profiling)	4
1.2.2 遗传指纹图谱技术 (genetic fingerprinting)	4
1.2.3 分子杂交技术 (molecular hybridization techniques)	6
1.3 研究思路、技术路线和章节安排	6
1.3.1 研究思路	6
1.3.2 研究技术路线	7
1.3.3 章节安排	7
第 2 章 梅梁湾蓝藻水华暴发过程中浮游细菌群落结构多样性的研究	9
2.1 蓝藻水华的暴发对细菌群落结构组成存在潜在影响	9
2.2 研究方法	10
2.2.1 样品的采集和预处理	10
2.2.2 样品的处理	11
2.2.3 细菌基因组 DNA 的提取	11
2.2.4 细菌群落结构的 T-RFLP 分析	12
2.3 研究结果	14
2.3.1 理化指标的季节变化	14
2.3.2 浮游藻类群落结构组成的季节性变化	18
2.3.3 T-RFLP 分析浮游细菌群落结构的变化	19
2.3.4 多元统计分析	21
2.4 讨论	24
2.4.1 梅梁湾浮游藻类群落组成的时空差异及其原因	24
2.4.2 梅梁湾浮游细菌群落组成的时空差异及其原因	25

2.5 小结	26
第3章 微囊藻水华堆积、分解过程中湖泊细菌群落结构多样性的实验研究	27
3.1 相关研究进展	27
3.2 研究方法	28
3.2.1 实验设计	28
3.2.2 样品的采集和预处理	28
3.2.3 理化指标的测定	29
3.2.4 细菌计数	29
3.2.5 细菌基因组 DNA 的提取	30
3.2.6 细菌群落结构的 T-RFLP 分析	30
3.2.7 克隆建库、测序、系统进化分析、确定 T-RFs 所属细菌菌群	30
3.2.8 统计分析	32
3.3 研究结果	32
3.3.1 理化指标的变化	32
3.3.2 细菌数量的变化	34
3.3.3 T-RFLP 分析浮游细菌群落结构的变化	34
3.3.4 T-RFLP 分析附着细菌群落结构的变化	36
3.3.5 系统发育分析、确定 T-RFs 所属细菌菌群	37
3.3.6 细菌群落结构变化与环境因子间的相关分析	47
3.4 讨论	49
3.4.1 水华微囊藻分解过程中细菌数目和群落结构组成的变化	49
3.4.2 水华微囊藻分解过程中放线菌成为优势种群	50
3.4.3 水华微囊藻堆积、分解过程中军团菌大量出现	51
3.5 小结	51
第4章 微囊藻水华干扰后浮游细菌群落结构的恢复性研究	52
4.1 微囊藻水华干扰后浮游细菌群落结构的恢复性研究的重要性	52
4.2 研究方法	53
4.2.1 实验设计	53
4.2.2 样品的采集和预处理	53
4.2.3 样品的处理	54
4.2.4 浮游细菌基因组 DNA 的提取	55

4.2.5	浮游细菌群落结构 PCR-DGGE 分析	55
4.2.6	克隆文库的构建、构建系统进化树	56
4.2.7	统计分析	56
4.3	研究结果	57
4.3.1	各围隔中理化环境因子的变化	57
4.3.2	PCR-DGGE 分析的浮游细菌群落结构变化	59
4.3.3	16 S rDNA 克隆文库分析的浮游细菌群落结构变化	61
4.3.4	浮游细菌群落与环境因子的相关分析	67
4.4	讨论	68
4.4.1	高存量蓝藻水华堆积、分解、消退过程中水体理化环境因子的变化	69
4.4.2	高存量蓝藻水华堆积、分解过程中浮游细菌群落结构的变化	69
4.4.3	高存量蓝藻水华消退后浮游细菌群落结构的恢复性分析	70
4.5	小结	71
第 5 章	藻源性湖泛发生过程中细菌群落结构组成研究	72
5.1	引言	72
5.2	研究方法	73
5.2.1	样点设置和样品采集	73
5.2.2	细菌基因组 DNA 的提取	74
5.2.3	细菌群落结构的 T-RFLP 分析	74
5.2.4	克隆文库的构建	74
5.2.5	阳性克隆的筛选、测序	75
5.2.6	序列分析、构建进化树、确定 T-RFs 所属细菌菌群	75
5.2.7	统计分析	75
5.3	研究结果	76
5.3.1	藻源性湖泛发生过程中水体理化因子变化	76
5.3.2	藻源性湖泛发生过程中细菌群落多样性指数的变化	78
5.3.3	T-RFLP 分析浮游细菌群落结构的变化	79
5.3.4	T-RFLP 分析附着细菌群落结构的变化	82
5.3.5	系统发育分析、确定 T-RFs 所属细菌菌群	83
5.4	讨论	92

5.4.1	太湖藻源性湖泛发生过程中水体理化环境因子的变化	92
5.4.2	太湖藻源性湖泛发生过程中水体细菌群落结构组成	93
5.4.3	太湖藻源性湖泛发生过程中水体细菌群落结构的空间异质性	94
5.5	小结	94
参考文献		96

第1章 绪 论

湖泊富营养化是指湖泊水体中由于营养盐的增加而导致藻类和水生植物生产力（或者是光合作用速率）的增加、水质下降等一系列的变化，从而使水的可利用性受到影响的现象（OECD, 1982）。

近几十年来，随着人口的增加、工农业的发展，大量生产、生活废水进入江河，使得我国湖泊富营养化问题日趋严重。根据杨桂山等（2010）在 2007~2010 年对我国东部平原湖区、东北平原与山地湖区和云贵高原湖区 138 个面积大于 10km^2 湖泊水质的调查显示，138 个湖泊中有 85.4% 的湖泊超过了富营养化标准，其中达到重富营养化标准的占 40.1%。而湖泊富营养化的重要表征就是蓝藻的过度繁殖引起水华。

蓝藻水华暴发将引起一系列的环境和健康问题。首先，蓝藻水华可引起水体缺氧，使鱼类等水生生物大量死亡，严重时可引发“湖泛”，导致整个系统生态功能和渔业及旅游业等服务价值的丧失。其次，藻类堆积后腐烂分解还可导致局部水域水质的严重恶化，危及供水安全。例如，1990 年太湖梅梁湾暴发的蓝藻水华导致无锡市 112 家工厂停产，居民饮用水供应困难；2007 年 5 月底，因蓝藻水华暴发导致无锡市主要自来水厂停产，严重干扰区域的生产和生活，影响社会稳定，引起国内外的极大关注，对生态文明与和谐社会建设产生重大不利影响。再次，蓝藻水华对人类健康具有潜在的危险，许多蓝藻与多种细菌菌群有密切联系（Maruyama et al., 2003; Grossart et al., 2005, 2006），这些细菌中不乏某些病原微生物，例如嗜肺军团杆菌（*Legionella pneumophila*）（Tison et al., 1980）、霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）（Ferdous, 2009）。另外，蓝藻水华还会造成水体的“二次污染”，如蓝藻在生长和衰亡过程中分泌的异味化合物或毒素等可严重影响饮用水及水产品的品质，造成严重的经济损失，还会引起水生和一些陆生动物中毒，并可能危及人类健康。可见，蓝藻水华在湖泊中的频繁暴发已经成为一种“灾害”。不幸的是，由富营养化所致的蓝藻水华在各地频繁暴发，其中以长江流域的太湖、巢湖和滇池等湖泊最为突出。由此引起的一系列问题，引起了世人的普遍关注。然而，目前针对蓝藻水华的研究主要聚焦于其发生机理，而对其产生灾害的机理尚不清楚。

1.1 问题的提出

湖泊细菌是指水体中营浮游和附着生活的原核生物类群，主要包括自养和异养细菌及古细菌，其中异养细菌是微食物网（microbial food loop）的主要组成者（Azam et al., 1983）。细菌个体虽然微小，但它们在水生生态系统生物地球化学循环以及生态系统的健康和维持等过程中发挥着不可替代的作用（Cotner and Biddanda, 2002; Wu et al., 2007a）。细菌既是消费者，又是生产者。作为消费者，细菌可以分解和利用水生生态系统中的有机物获得能量，维持系统的物质循环；作为生产者，它们能够利用真核藻类所无法吸收的可溶性有机质，将之转化为颗粒有机物进行“二次生产”，被微型食植动物（主要是原生动物的鞭毛虫和纤毛虫）所摄取（Azam et al., 1983; Cole et al., 1988; Toolan et al., 1991）。水体中细菌的生存及生命活动决定着其中食物链基本环节的发展，其群落结构和功能的改变将影响水生生态系统的物质循环和能量流动。在蓝藻水华占优势的湖泊生态系统中，大量的物质和能量由蓝藻合成后被细菌（主要为异养细菌）分解、利用，了解细菌群落结构对蓝藻水华的响应及其机制是阐明蓝藻水华稳定态系统维持机制和揭示湖泊细菌群落结构灾变的关键基础。

影响细菌群落组成的环境因子多种多样，主要可分为非生物因子和生物因子。

在水生生态系统中，非生物因子单独或多个因子联合作用于细菌，这些因子包括：①水温（Yannarell and Triplett, 2004; Lindström et al., 2005）；②pH（Lindström et al., 2005; Schauer et al., 2005; Yannarell and Triplett, 2005; Wever et al., 2005; Newton et al., 2006, 2007; Taipale et al., 2009; Schauer and Hahn, 2005）；③溶解氧（DO）（Allgaier and Grossart, 2006a）；④溶解性有机碳（DOC）（Eiler and Bertilsson, 2004, 2007; Eiler et al., 2003; Pinhassi and Berman, 2003; Kolmonen et al., 2004; Zeder et al. 2009; Hutalle-Schmelzer and Grossart, 2009; Hutalle-Schmelzer et al., 2010; Jezberová et al., 2010）；⑤营养水平（Schauer et al., 2005; Lindström, 2000; Yannarell and Triplett, 2004; Kritzberg et al., 2006; Allgaier and Grossart, 2006b; Eiler and Bertilsson, 2004; Haukka et al., 2006; Kolmonen et al., 2004）；⑥盐度（Wu et al., 2006）；⑦地理区域差异（Yannarell and Triplett, 2005）；⑧原位紫外线强度（Warnecke et al., 2005）；⑨水体滞留时间（water retention time）（Lindström et al., 2005, 2006）；⑩沉积物再悬浮（Wu et al., 2007a）。

生物因子包括:①原生动物(鞭毛虫、纤毛虫)(Güde, 1979; Jürgens et al., 1994; Hahn et al., 1999; Jürgens and Stolpe, 1995; Šimek et al., 2001a, 2001b, 2005; Pernthaler et al., 2004; Wu et al., 2004; Comte et al., 2006; Grossart et al., 2008);②浮游植物(Eiler and Bertilsson, 2004; Sala et al., 2005; Eiler and Bertilsson, 2007; Salcher et al., 2010; Zeder et al., 2009; 邢鹏等, 2007);③浮游动物(Bonecker and Aoyagui, 2005; Sanders and Wickham, 1993; Jürgens et al., 1994);④病毒(Thingstad and Lignell, 1997; Fuhrman, 1999; Fuhrman and Schwalbach, 2003);⑤大型沉水植物(Wu et al., 2007b)。

藻类水华与湖泊细菌群落结构具有密切的关系。Eiler 和 Bertilsson (2004)在对瑞典四个湖泊蓝藻水华暴发期间湖泊微生物群落结构组成的研究中发现,即使湖泊水体理化因子相似,细菌的群落结构也因水华藻类的不同而异,暗示蓝藻水华与细菌间具有一定的种特异性关系。在对太湖的研究中,研究者们发现蓝藻水华发生过程中,水体中细菌的群落结构和数量均发生着剧烈地变化,表明它们与蓝藻水华之间具有密切的关系(Wu et al., 2007b; 邢鹏等, 2007)。Eiler 和 Bertilsson (2007)发现在富营养化湖泊蓝藻暴发时黄杆菌门(Flavobacteria)的群落结构组成及其在浮游细菌中的相对含量均发生了变化。类似地, Salcher 等(2010)发现放线菌门(Actinobacteria)的相对含量在硅藻(*Asterionella formosa*)水华暴发时急剧增大。可见,关于蓝藻水华对水体细菌的影响研究主要集中于蓝藻水华暴发期间的菌-藻关系,目前还无法解释蓝藻水华胁迫下细菌群落结构灾变的关键过程与机理。

蓝藻水华可能通过以下途径影响细菌群落结构组成:①大量藻体聚集形成群体,造成水体光照、透明度下降,藻体的生长代谢引起水体溶解氧、pH 及氧化还原电位的变化(de Figueiredo et al., 2006; Mozelaar and Stal, 1994);②水华过程中,藻体通过光合作用合成以及藻体分解产生大量不同粒径和浓度的颗粒状、胶状及溶解性有机物(Alldredge et al., 1993);③聚集藻体为细菌提供附生环境以避免其被捕食,并增强细菌吸收营养物质的能力(Worm and Søndergaard, 1998);④藻类产生的生物毒素对某些细菌的生存造成抑制(Ferreira et al., 2001)。

1.2 分子生物学技术在湖泊细菌群落结构组成研究中的应用

早期的环境微生物多样性研究主要是依靠传统的微生物培养技术,进行富集培养和分离纯化等方面的工作。然而,由于培养条件与自然条件的差异,实际上

培养所得到的只是自然环境中的少部分菌种：可培养的细菌约占细菌总数的0.1%，淡水约占0.25%，土壤约占0.3%，活性污泥占1%~15%(Amann et al., 1995)。而且培养基中营养物质的浓度往往远高于其自然状况的浓度，其结果是在新的选择压力下适应富营养条件的菌种快速增值成为优势种，自然条件下的优势种往往被取代，细菌群落结构发生变化，这种方法无法比较真实地提供环境微生物多样性的信息。自20世纪80年代以来，随着分子生物学技术的迅速发展，分子生物学技术开始被广泛应用于微生物群落结构分析，使微生物生态学理论更加接近其自然本质。

1.2.1 克隆文库分析法 (clone library profiling)

通过构建群落样品总基因组 DNA 的文库，分析文库中标记序列的类型和出现频率，可以得到微生物群落组成的分析数据。在 probeBase (<http://www.microbial-ecology.de/Probebase/>) (Loy et al., 2007)、RDP II (Ribosomal Database Project II, <http://rdp.cme.msu.edu/html/>) (Cole et al., 2003, 2005)、European Molecular Biology Laboratory (EMBL, <http://www-ebi.ac.uk/embl>)、National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、DNA Data Bank of Japan (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) 等数据库中已经登录了大量来自不同生物的核酸序列。从样本中提取总 DNA，选择合适的目的基因（例如 16S rDNA）进行 PCR 扩增，建立基因数据库，通过网上序列比对分析 16S rDNA 片段系统发育关系，对微生物进行分类鉴定。虽然构建克隆文库工作量大、成本高，但是，如果分析的克隆数目足够多，可以比较完整地了解微生物群落的基本构成特征。该方法适合于对微生物群落组成进行“人口普查式”的研究，但不适合对微生物群落结构变化进行动态跟踪研究。结合遗传指纹图谱技术 (genetic fingerprinting) 则可以弥补该技术的不足。

1.2.2 遗传指纹图谱技术 (genetic fingerprinting)

目前用于微生物群落结构分析的指纹图谱技术很多，比较常用的有针对细菌 16S rDNA 序列高变区的变性梯度/温度梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis/temperature gradient gel electrophoresis, DGGE/TGGE) (Muyzer et al., 1993)、限制性酶切片段多态性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、末端限制性酶切片段长度多态性分析 (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) (Liu et al., 1997)、随机引物扩增多态性分析 (random

amplified polymorphic DNA, RAPD) 和单链构象多态性分析 (single strand conformation polymorphism, SSCP) (Stach et al., 2001) 等, 其中 DGGE 和 T-RFLP 使用的最为普遍。

DGGE 的原理是用相同的引物对不同样本 DNA 段进行 PCR 扩增所得的产物虽然长度相似, 但它们的 GC 含量及序列信息却不尽相同, 因此它们的解链条件就有所差异。双链 DNA 的解链与否以及解链程度严重影响其在聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速率。当双链 DNA 分子在含梯度变性剂 (尿素、甲酰胺) 的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳时, 其在凝胶上的位置就会因遗传信息的不同而异, 形成相互分开的图谱。理论上, 只要选择的电泳条件如变性剂梯度、电泳时间、电压等足够精细, 有一个碱基差异的 DNA 片段都可被分开。用 DGGE 进行微生物生态学研究时, 为了使目的序列能够完全解链, 在 PCR 扩增目的片段时, 可以在某一引物的 5' 端人为加一段约 30~50 个碱基的 GC 序列, 称之为 GC 夹 (GC-clamp)。当加了 GC 夹后, DNA 片段在电泳过程中完全解链, DNA 片段中基本上每个碱基上的序列差异都能被区分开来 (Myers et al., 1985)。由于 DGGE 法不依赖限制性酶切, 从而能够保证目标 DNA 的完整性, 分离所得的目标 DNA 片段经纯化后可直接用来测序。目前, 该技术是环境微生物学中被普遍接受的研究方法之一。然而, DNA 的染色技术灵敏性相对较低, 造成 DGGE 法的灵敏度较低。与可以使用内标法的末端限制性酶切片段长度多态性分析 (T-RFLP) 相比, DGGE 的另一个缺陷是没有合适的分子量标准物, 使得不同批次电泳的样品之间难以进行比较。

末端限制性酶切片段长度多态性分析 (T-RFLP) 是最近几年发展起来的一种微生物分析方法, 正被越来越多的微生物工作者所采用。T-RFLP 技术以分子系统学原理为基础, 综合运用了 PCR、限制性酶切、荧光标记和 DNA 序列分析等技术, 通过对特定核酸片段长度多态性的测定来分析微生物群落的结构和功能。该方法的主要原理是以提取的样品 DNA 为模板, 利用带有荧光标记的适宜引物对目的片段进行 PCR 扩增, 得到一端带有荧光标记的 PCR 产物, 再经限制性内切酶消化。由于核酸序列的差异, 不同细菌片段的酶切位点不同, 酶切后得到不同长度的限制性片段。其中, 末端带有荧光标记的片段 (T-RFs) 经电泳分离, 荧光检测后, 通过分析揭示样品种类、数量和种群大小等信息, 从而解析样品群落结构、功能及动态变化。相对于 DGGE/TGGE、SSCP 或 RAPD 等方法, 该方法具有更强的分析能力、分辨率高、重复性好等优点。此外, 结合克隆建库测序分析, 可以详细了解各 T-RFs 的分类地位, 进一步了解各样品的细菌群落结构组成。

在普通 PCR 基础上, 反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 也被用于环境样品的分析。RT-PCR 利用反转录酶, 将样品中的 mRNA 反转录为 DNA, 然后利用 DNA 分析方法进行研究, 可以检测环境样品中活体微生物生存状况和活性。

稳定同位素技术 (stable isotope probe technique, SIP) 的引入, 使得微生物工作者能够更好地了解细菌群落结构与其功能的联系 (Lu and Conrad, 2005; Lu et al., 2006)。其主要原理是首先向受试环境供应稳定同位素 (例如 ^{13}C) 标记的底物, 然后从环境样品中提取核酸, 提取的核酸通过超高速密度梯度离心分成标记 (例如 ^{13}C) 的重核酸和非标记的轻核酸 2 个组分, 针对获得的重核酸和轻核酸进行基因指纹分析, 确定“活跃”微生物种群 (含重核酸种群) 的系统分类地位, 从而进行分类和功能上的分析。然而, 该技术的灵敏度有待进一步改进。

1.2.3 分子杂交技术 (molecular hybridization techniques)

分子杂交技术包括膜杂交和原位杂交方法等。其原理是根据已知微生物不同分类级别上群落特异的 DNA 序列, 以末端带有荧光标记的特异寡聚 DNA 或 RNA 探针, 与环境基因组中 DNA 分子杂交, 检测该特异微生物群落的存在与丰度 (Glöckner et al., 1999)。与前面所介绍的其他方法相比, 该技术的特点是不需要对目标基因进行 PCR 扩增, 因此可以避免 PCR 过程中产生的误差。但是, 使用分子杂交技术的前提是要有已知种类的标记序列作为探针, 对于大量潜在的未知种类, 分子杂交方法则无法研究。

1.3 研究思路、技术路线和章节安排

1.3.1 研究思路

本书借助细菌计数、T-RFLP、DGGE 和 16S rDNA 克隆文库技术, 结合野外调查和原位围隔模拟实验, 通过比较不同环境、不同微囊藻水华生物量下湖泊细菌群落结构的变化, 以期了解水华微囊藻驱动下的湖泊细菌群落结构的灾变及其机制, 主要包括以下 3 个方面的内容: ①通过对梅梁湾的野外周年监测, 进一步分析蓝藻水华暴发过程中浮游细菌群落结构的变化及其与主要环境因子间的关系; ②通过设置野外原位围隔实验, 研究不同围隔规格、不同微囊藻生物量、不同堆积时间下, 细菌群落结构的变化及其与主要环境因子间的关系; ③通过野外监测分析藻源性“湖泛”发生过程中细菌群落结构的变化及其与主要环境因子间

的关系。

1.3.2 研究技术路线

本书围绕蓝藻水华驱动下的湖泊细菌群落结构的变化及其机理为中心, 结合传统方法和现代分子生物学方法, 首先探讨了自然水体(梅梁湾)有氧状况下、蓝藻暴发期间浮游细菌群落结构的变化; 其次研究了缺氧状况下、不同存量的水华微囊藻生物量在不同时间尺度下对细菌群落结构的影响; 最后探讨了厌氧状况下高存量的水华微囊藻生物量对细菌群落结构的影响(详细见图 1-1)。

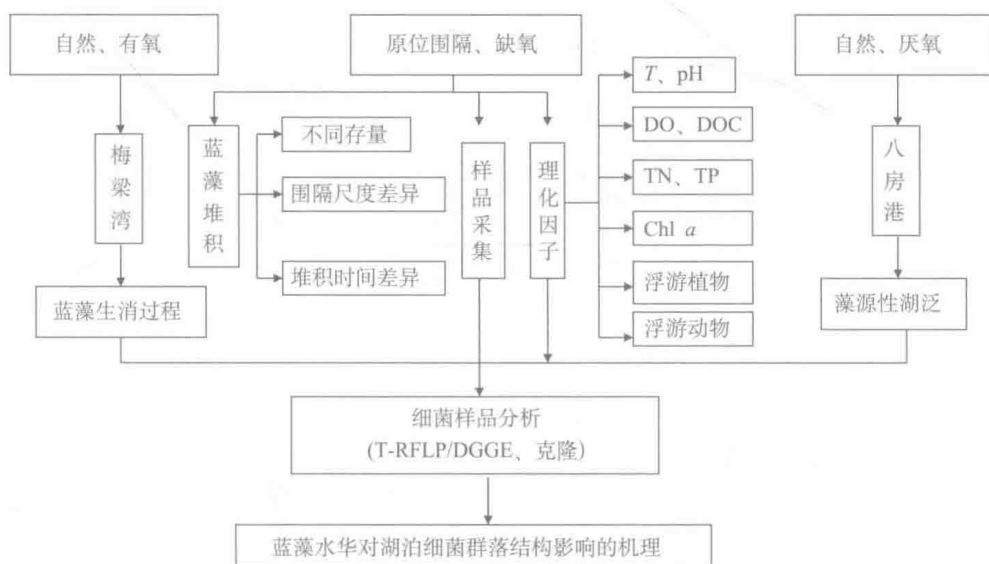


图 1-1 采取的研究技术路线图

T 为水体温度 (temperature); DO 为溶解氧 (dissolved oxygen); DOC 为溶解性有机碳 (dissolved organic carbon); TN 为总氮 (total nitrogen); TP 为总磷 (total phosphorous); $Chl a$ 为叶绿素 a (chlorophyll a)

1.3.3 章节安排

按照以上研究思路以及技术路线, 除绪论外, 本书共分 4 章。

第 2 章, 梅梁湾蓝藻水华暴发过程中浮游细菌群落结构多样性的研究。运用 T-RFLP (末端限制性酶切片长度多态性分析) 技术, 结合多样统计分析研究频繁发生蓝藻水华的湖区——梅梁湾内不同采样点浮游细菌群落与环境因子动态变化的相关性, 了解蓝藻水华暴发过程中影响浮游细菌群落结构变化的关键环境因子。

第 3 章, 微囊藻水华堆积、分解过程中湖泊细菌群落结构多样性的实验研究。

采用原位围隔实验系统模拟了微囊藻堆积、分解的过程,结合细菌计数、T-RFLP(末端限制性酶切片段长度多态性分析)和16S rDNA克隆文库技术监测了该过程中湖泊微生物群落结构的变化。

第4章,微囊藻水华干扰后浮游细菌群落结构的恢复性研究。设置了接近于自然水体的原位、无底大围隔(50m×180m)实验,结合PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)和16S rDNA克隆文库技术监测了微囊藻水华堆积、分解、消退过程中的浮游细菌群落的变化。

第5章,藻源性湖泛发生过程中细菌群落结构组成研究。针对2009年6月发生于太湖无锡宜兴近岸水域——八房港的黑水团区,通过现场水质监测、水样采集和室内T-RFLP、16S rDNA克隆文库等分析,以期揭示出细菌群落结构组成在该极端条件下的动态变化,为探明藻源性湖泛的形成机制及其对水体生态系统的影响提供理论依据。