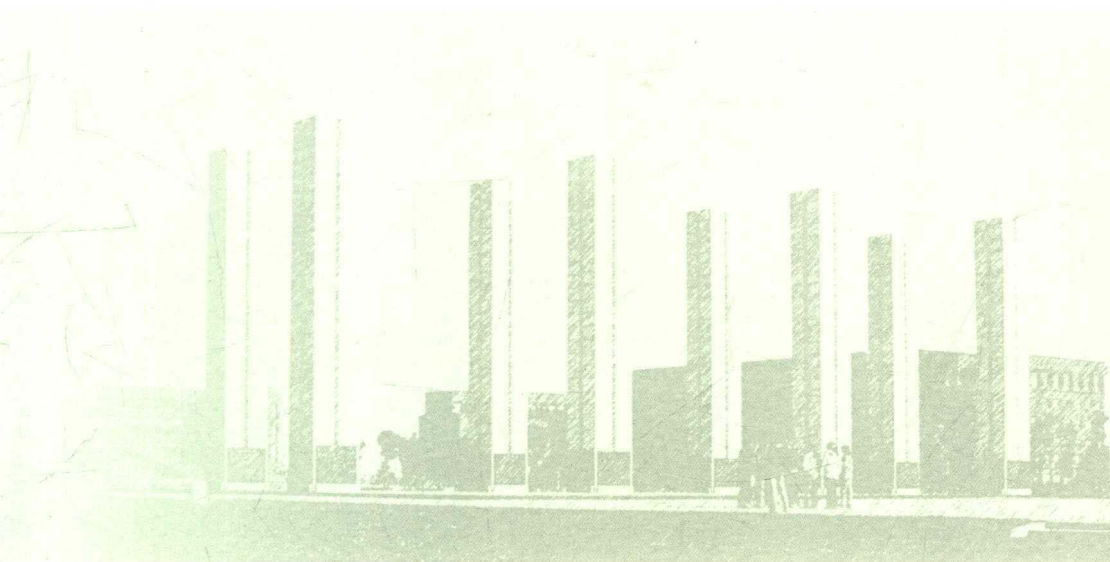


HUANAN BINHAI XIAOLIUYU SHUIWEN JIEMIAN GUOCHENG ZHONG DE WEISHENGWU SHIKONG BIANHUA

华南滨海小流域水文界面过程中的微生物时空变化



黄小兰 著

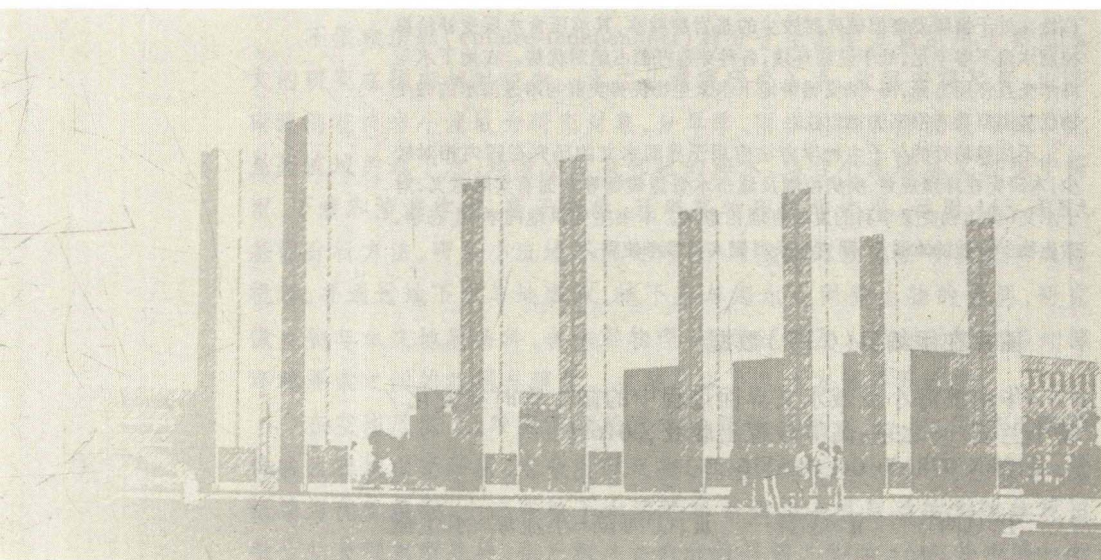
THE TEMPORAL AND SPATIAL VARIATION
OF MICROORGANISM IN HYDROLOGICAL
INTERFACE PROCESS OF SMALL COASTAL
WATERSHEDS IN SOUTH CHINA

高等教育出版社

HUANAN BINHAI XIAOLIUYU SHUIWEN JIEMIAN GUOCHENG ZHONG DE WEISHENGWU SHIKONG BIANHUA

江西师范大学博士文库专项资助成果
国家自然科学基金资助项目（项目批准号：41561002）

华南滨海小流域水文界面过程中的微生物时空变化



黄小兰 著

THE TEMPORAL AND SPATIAL VARIATION
OF MICROORGANISM IN HYDROLOGICAL
INTERFACE PROCESS OF SMALL COASTAL
WATERSHEDS IN SOUTH CHINA

高等教育出版社·北京

内容简介

华南滨海花岗岩小流域地下水流过程中因为人类活动的影响体现出微生物类群有所差异。虽然随着深度的增加,温度和压力的改变,原始继承性活性有机碳在逐渐消耗而减少,但微生物仍然生长旺盛且种群多样。在地下水与河道水交互作用方面,浅层潜水与地表非饱和带联系密切,受地表水与雨水补给,一般为氧化环境,其中微生物特性与下游河道水相似。处于花岗岩破碎带的基岩裂隙水,其相应的微生物特征与上游河道水有较大的相似性。处于裂隙发育但破碎层较少的基岩裂隙水,其承压含水层受补给源控制水量不够丰足,处于还原环境,各种芽孢杆菌占绝对优势。在地下水与海水交互作用方面,海-陆交错带地下水微生物优势类群与附近海水的微生物优势类群具有很高的相似性。

不依赖培养的分子生物学方法应用于界面水文的研究在国内相对较少,本研究在环境规划、疾病控制及城市水资源规划等方面有实际意义,对于水文-微生物交叉学科的发展有理论意义。本书主要供地理学、生态学、微生物学专业的本科生、研究生及科研人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

华南滨海小流域水文界面过程中的微生物时空变化 / 黄小兰著. --北京:高等教育出版社,2016.7
ISBN 978-7-04-045376-8

I. ①华… II. ①黄… III. ①海滨-小流域-水生微生物-研究-南方地区 IV. ①Q938.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 093950 号

策划编辑 柳丽丽 责任编辑 柳丽丽 封面设计 李卫青 版式设计 于 婕
插图绘制 杜晓丹 责任校对 刘 莉 责任印制 毛斯璐

出版发行	高等教育出版社	网 址	http://www.hep.edu.cn
社 址	北京市西城区德外大街 4 号		http://www.hep.com.cn
邮政编码	100120	网上订购	http://www.hepmall.com.cn
印 刷	北京鑫丰华彩印有限公司		http://www.hepmall.com
开 本	787mm×1092mm 1/16		http://www.hepmall.cn
印 张	9		
字 数	140 千字	版 次	2016 年 7 月第 1 版
购书热线	010-58581118	印 次	2016 年 7 月第 1 次印刷
咨询电话	400-810-0598	定 价	49.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 45376-00

不依赖培养(culture-independent)的分子生态学方法应用于界面水文的研究在国内相对较少。本文从微观研究入手,放眼宏观尺度,以华南滨海花岗岩小流域为研究对象,分旱季、雨季采集天然流域与城镇化显著流域的地下水、地表水以及邻近的海水,结合小流域水文过程中降雨、下渗和渗滤作用、离子交换、迁移等物理化学作用,运用 16S rRNA 基因分析方法,研究小流域不同时间、不同空间的微生物特征及其成因机理,并通过地下水与地表水、地下水与海水之间微生物的异同,研究微生物与水文地质条件、含水层物理-化学过程及人类活动影响等外部环境要素之间的协同与演化。主要从以下几个方面展开研究。

在空间尺度上,华南滨海花岗岩小流域地下水上、中、下游三组井的微生物均以变形菌、未命名微生物(candidate division) OPx、古菌、放线菌为优势类群,小流域地下水流过程中因为人类活动的影响体现出微生物类群有所差异,在三组井共有优势类群的同时,上游井组微生物优势类群还有拟杆菌和硝化螺旋菌,中游井组另有真杆菌和酸杆菌为优势类群,下游井组中微生物优势类群还有拟杆菌。在地下水井的不同深度,微生物群落结构的分析表明,垂向空间维度水样中的变形菌均占微生物种属的 30% 以上,但不同的含水层中也表现出微生物群落有所差异,尽管随着深度增加,温度、压力改变,原始继承性活性有机碳在逐渐消耗而减少,但微生物仍然生长旺盛且种群多样。

在时间尺度上,从较短的时间尺度看,地下水环境波动与微生物群落变化不大,但在长时间尺度上,地下水环境随着下垫面的变化而变化,其中的微生物也在不断地适应与演化。坡面汇流及雨季淋溶可带来充沛的溶解有机物以及营养盐,可为细菌生长提供充足营养,因此,微生物在季节尺度上(旱季与雨季)有些变化,但是在短时间尺度上变化甚微。受短时间人类活动干扰的中山大学珠海校区小流域基本保持原生态,只是处于校区中心地段的小流域中游有随环境变异的特征,也还是大同而小异。受长时间人类活动干扰的唐家社区则发生了较大的变异,属于微生物鼻祖的古菌已经未见分布,在海洋沉积物中常见的未命名微生物 OPx 系列也没有检测到,而是与地下水环境响应,出现了

铁还原菌、成团泛菌、噬纤维菌等许多人类活动扰动特征明显的微生物类群。

16S rRNA 基因系统发育分析表明,小流域微生物除少数克隆子存在归属错位的现象之外,大部分克隆子与基因库中相似度最高的参照序列归属在一起,由于出自同一小流域,微生物的主要类群比较接近,但是各自的微生物多样性比较丰富,表现出的序列归属与序列比对分析统计出的分类结果有较好的一致性。不过,界面水文交互作用、人类活动的干扰都将影响微生物的进化,从滨海地下水浅水层到大约 20 米深的含水层,总的微生物类群保持基本一致,但也有些微生物群体发生了垂直的或者水平的变异。表明微生物的多样性和群落结构会随不同地理时空的物理化学差异而适应与演化。总体上,水中化学离子浓度受雨水稀释效应影响而降低,小流域的优势微生物一致性较高,不受稀释效应影响。因此,微生物差异分析的 16S rRNA 基因法,可与当前常用的物理化学方法互为补充以辨识界面水文的交互作用,且具有一定的优势。

在地下水与河道水交互作用方面,浅层潜水与地表非饱和带(土壤)联系密切,受地表水(河道)与雨水补给,一般为氧化环境,其中微生物特性与下游河道水相似;处于花岗岩破碎带的基岩裂隙水,其略带承压的含水层为主要联系通道与上游河道水交互,相应的微生物特征与上游河道水有较大的相似性,且微生物多样性指数值和稀释曲线也较为接近;处于裂隙发育但破碎层较少的基岩裂隙水,其承压含水层受补给源控制水量不够丰足,地下水位比较平稳,处于还原环境,各种芽孢杆菌占绝对优势,而其他微生物种群较少。在复杂的地表地下微循环水流系统中,微生物多样性或优势群落分布特征揭示河道水与地下水交互作用显著,微生物与水文地质环境互为响应。

在地下水与海水交互作用方面,海-陆交错带地下水微生物优势类群与附近海水的微生物优势类群具有很高的相似性,一方面反映其含水层跟海水有“连通”,与课题组之前进行的海潮潮汐及同位素研究表明的海水的“连通”作用相一致。另一方面,随着城市化进程的加快,海-陆交错带生境越来越容易受到人类活动的影响和污染,经过长期的演进,存在着大量降解有机物细菌,有助于海-陆交错带生态系统中碳氮良性循环,对人类进行环境污染的生物防治具有重要意义。

感谢国家自然科学基金资助项目(项目批准号:41561002)的支持和资助!感谢江西师范大学研究生院对本书出版给予的大力支持!感谢我的研究生郭娅姗和张婷在书稿格式修改上做出的努力,感谢高等

教育出版社的柳丽丽编辑付出的辛勤劳动!

不管是宏观世界还是微观王国,均需要我们克服困难和障碍,为探究科学而静心钻研,鉴于学识和经验所限,书中难免有错误或者不足之处,欢迎海内外同行给予批判与匡正。

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 研究背景及意义	1
1.1.1 研究背景	1
1.1.2 研究意义	2
1.2 国内外研究进展	3
1.2.1 小流域水文界面过程研究	3
1.2.2 分子生物学方法的研究进展	5
1.2.3 小流域地下水与微生物相互作用的研究进展	9
1.2.4 人类活动影响下的水体微生物研究	10
1.3 研究内容与技术路线	12
1.3.1 研究内容	12
1.3.2 技术路线	12
第 2 章 研究区概况	14
2.1 自然地理概况	15
2.1.1 地形、地貌	15
2.1.2 气候特征	15
2.1.3 生物资源	16
2.2 水文地质背景	17
2.2.1 地质构造	17
2.2.2 河流水系	19
2.2.3 地下水补给、径流、排泄条件	19
2.3 社会经济发展概况	20
2.3.1 行政区划	20
2.3.2 人口现状	20
2.3.3 经济发展与土地利用	20
第 3 章 研究方法	22
3.1 材料	22
3.1.1 细胞株与质粒	22
3.1.2 试剂	22

3.1.3	培养基	23
3.1.4	主要仪器	23
3.1.5	实验所用主要溶液	24
3.1.6	引物	25
3.1.7	样品	26
3.2	方法	27
3.2.1	水样微生物总 DNA 提取	27
3.2.2	16S rDNA 的扩增及产物纯化	27
3.2.3	16S rRNA 基因的 T 载体连接	28
3.2.4	连接产物的转化 (含感受态细胞的制备)	28
3.2.5	阳性克隆筛选	28
3.2.6	ARDRA 分型	29
3.2.7	16S rRNA 序列的 RFLP 分析	29
3.2.8	序列比对和系统发育分析	29
3.2.9	文库分析	30
3.2.10	文库保存	30
第 4 章	小流域地下水微生物空间变化与机理研究	31
4.1	微生物水平空间变化分析	31
4.1.1	水样微生物总 DNA 提取	31
4.1.2	16S rRNA 基因克隆文库的分析	31
4.1.3	16S rRNA 基因系统发育树的构建	32
4.2	水平空间变化机理分析	36
4.2.1	地下水水质	36
4.2.2	地下水化学离子类型	37
4.2.3	微生物类群的分布及其对水环境的响应	39
4.3	微生物垂向空间变化分析	41
4.3.1	样品采集	41
4.3.2	微生物总 DNA 的提取结果	42
4.3.3	PCR 扩增和基因组文库的建立	42
4.3.4	ARDRA 分析	42
4.3.5	基因系统发育分析	43
4.3.6	微生物群落的垂向变化	48
4.4	垂向空间变化机理分析	50
4.5	小结	51
第 5 章	小流域地下水微生物时间变化与机理研究	53
5.1	短时间尺度微生物变化分析	53

5.1.1 旱季与雨季微生物类群比较	53
5.1.2 年度之间微生物类群比较	55
5.2 短时间尺度微生物 16S rRNA 基因演化分析	57
5.2.1 旱季与雨季微生物的基因系统发育分析	57
5.2.2 年度间微生物的基因系统发育分析	60
5.3 小流域主要离子变化分析	63
5.4 不同下垫面流域微生物变化分析	64
5.4.1 人类活动轻微扰动下的微生物特征	65
5.4.2 人类活动显著扰动下的微生物特征	66
5.5 长时间尺度微生物 16S rRNA 基因演化分析	67
5.6 小结	70
第 6 章 地下水与地表水微生物的差异及其成因机理	71
6.1 微生物类群与多样性分析	71
6.1.1 微生物优势类群	71
6.1.2 微生物多样性分析	74
6.1.3 系统发育分析	75
6.2 成因机理分析	83
6.2.1 水文地质成因	83
6.2.2 化学离子成因	86
6.3 小结	87
第 7 章 地下水和海水微生物的环境适应与演化	89
7.1 入海通量分析	89
7.2 海水对地下水影响分析	90
7.3 地下水与海水微生物系统发育分析	92
7.3.1 水样微生物总 DNA 提取	92
7.3.2 16S rDNA 序列的 PCR 扩增和纯化	93
7.3.3 系统发育树的分析	93
7.4 微生物优势类群及其成因	96
7.5 小结	97
第 8 章 结论与展望	99
8.1 主要结论	99
8.2 主要创新点	101
8.3 不足之处	102
8.4 展望	102

附录 1：缩略词 104

附录 2：地下水 16S rRNA 基因的部分序列 106

附录 3：地表水 16S rRNA 基因的部分序列 109

附录 4：海水 16S rRNA 基因的部分序列 112

参考文献 115

致谢 132

第 1 章 绪 论

1.1 研究背景及意义

1.1.1 研究背景

联合国人口基金会发表的 2007 年《世界人口状况报告》显示,未来 30 年内,非洲和亚洲的城市人口将比目前增加 1 倍。人口密度的增长造成城市水环境的不断恶化,主要表现为超采漏斗扩展、海(咸)水入侵、地表水-地下水污染等问题^[1]。20 世纪 90 年代水循环的生物圈方面(Biospheric Aspects of Hydrological Cycle, BAHC)日益受到重视,水文过程中的生态效应也愈来愈受到关注^[2,3],生态效应影响到地表和地下水环境^[4,5],微生物是地下水环境中极其重要和活跃的部分^[6],与有机物分解、养分转化和循环等几乎所有的生命过程都相关^[7,8]。从生态系统的能量传递过程来说,不管是利用太阳能的正常生态系统还是利用地下热能和化学能的“黑暗”生态系统,最初从环境中摄取能量的生物主要是微生物,最后把能量从生物圈返回给环境的还是微生物^[9]。水文过程中的微生物研究也是国际生物多样性计划(DIVERSITAS)^[10]的基础工作之一,水文过程研究的物理、化学、生物三个方面是相辅相成的,微生物是控制和改造水循环系统物理化学性质演变的主要因素之一,各种物理化学成分的变化相应地也影响水中微生物的生存条件,导致微生物的形态、生理、遗传特性的改变,促使各类微生物不断演替。

到目前为止,水文界面过程中的微生物生态大部分仍然是未知的,主要是由于人工很难完全模拟其复杂的培养环境,无法建立微生物群落的结构及其功能(即代谢活动)之间的联系。这在一定程度上是传统微生物技术的局限性所造成的。基于核糖体 RNA(即 rRNA)基因系统发育框架发展起来的分子生物学技术(16S rRNA 基因分析)使得对不同生境中的微生物群落进行全面而快速的分析成为可能。16S rRNA 基因以其高度保守性、高信息量及与大多数生理、遗传标记一致,而成

为群落系统发育分析中使用最广泛的分子标记物^[11]。选择小流域,结合其水文过程中降雨、下渗和渗滤作用、离子交换、迁移等物理化学作用,运用 16S rRNA 基因分析方法,研究小流域不同时间、不同空间的微生物特征及其成因机理,并通过地下水与地表水、海陆之间微生物的异同,研究微生物与水文地质条件、含水层物理-化学过程及人类活动影响等外部环境要素之间的协同与演化,可以为防治水环境污染等应用研究提供决策依据。

在学科发展上,黄秉维先生曾提出水热平衡、化学元素地表迁移和生物地理群落等自然地理学的新方向。当今全球已知的生物物种约 210 万,已知的微生物只占极少数,其中微生物已知物种约 10 万,有超过 200 万的未知微生物尚待我们去探索。因此研究小流域水文界面过程中的微生物群落分布和结构模式具有广阔的空间。

1.1.2 研究意义

华南沿海是中国三大经济中心之一,过去 30 年城市化进程突飞猛进,城市和工业的发展导致废污水排放量日益增加,河流的水质污染日益严重,水资源与生态环境问题已成为阻碍该地区可持续发展的瓶颈之一。长期以来,华南沿海地区生产、生活用水水源主要为地表水,但近年来随着人口增加、城市化进程的加快以及经济建设的高速发展,季节性与水质型缺水也日益明显^[12],尤其是近十多年来,该地区的咸潮出现越来越频繁,持续时间增加,上溯范围越来越广^[13,14],严重影响周边城市的生活用水及工业用水安全。列入国家战略规划珠三角发展纲要,包含有“加大污染防治力度”和“加强生态环境保护”等与资源、环境相关的内容。地下水以其特有的调蓄功能与自然净化性能成为缓解缺水局势不可或缺的水源,也成为应对突发事件(如大面积河流污染、咸潮等)重要的战略储备水源,从而日益受到重视。合理解决珠三角地区不断出现的含水层及地表水污染问题,有效管理水资源,开展变化环境中水文界面微生物的群落结构分布、系统发育演化以及与水文地质背景的响应与耦合研究,对于珠江三角洲近海岸的渔业生产、红树林生态环境保护、民众用水安全等的健康持续发展意义重大。微生物是地球上最早出现的生命形式,它不仅是人类社会赖以生存和发展的基础,还提供了人类生存不可缺少的生物资源,构成了人类生存与发展的生物圈环境。微生物可利用不同的有机底物作为碳源和电子供体进行厌氧生长,通过对流域中不同时空的微生物多样性或优势种群的分析,可以深入研究地下水环境的演变机理,探讨与人类密切相关的诸如

城市化、污染、赤潮、填海等问题,阐明流域系统中地下水从补给到排泄的水分运动与物质迁移过程,以及地表水-地下水-海水间的交互作用。华南滨海具有交错区生态系统特征,各种要素间的作用过程异常复杂,其水文界面过程中的微生物时空变化可对海陆的碳、氮循环增加新的认识。华南沿海地区人类活动影响十分显著,天然土壤、地下水中含有丰富的微生物,具有潜在的降解污染物的能力^[15],若能在本地体系中筛选出功能微生物并对其进行生物强化,可有效地应用于地下水的污染修复。通过小流域地下水与地表水的微生物差异及其成因探讨可以对饮水安全、养殖业发展、地方性疾病等民生问题提供决策支持,研究成果在环境规划、健康与疾病控制及城市水资源规划等方面有较广泛的实际意义。

以滨海小流域为研究对象,探讨海陆、地表-地下等水文界面过程的微生物时间空间变化,并从城市化过程分析其相应的变化规律,对于水文-微生物交叉学科的发展,具有重要的理论意义,对于探寻生命的起源也有一定的借鉴意义。

1.2 国内外研究进展

1.2.1 小流域水文界面过程研究

界面,可以通俗地理解为“面”状的“界”,本文所涵盖的水文界面是指海水与陆地水、地表水与地下水以及地下水与周边环境等交互界面所发生的一系列物质交换和能量转化过程,着重于研究微生物在水文界面过程中的时空变化并分析其相应的变化规律。从“小流域”尺度着手研究,可为相关的大尺度水文、水资源研究提供基础数据和基本理论支持。

海陆界面是海洋和陆地相互作用明显的地带,其延伸范围一般与潮汐、河口港湾、风暴潮、入海流量等有关。其中地下水入海量(submarine groundwater discharge, SGD)成为国际上的研究热点^[16~18],由于实际测定的困难,SGD在国内仅有个别的研究案例^[19,20],而在海水入侵的研究领域,我国学者主要在成因机理^[21,22]、数学模拟^[23,24]以及防治对策^[25]等方面展开。总而言之,国内开展海水与地下水相互作用研究的项目与成果报道相对较少。

地表水与地下水界面交互作用是降水-地表和地下径流补给-排泄的复杂过程,水的运动是多维的,通过土壤和植被的蒸发、蒸腾向上

运动成为大气水分,通过入渗向下运动可补给地下水,通过水平方向运动又可成为河湖水的一部分。地下水储量经过长年累月甚至上千年积蓄而成,水量交换周期长,循环极其缓慢。地下水和地表水的相互转换是研究水量关系的主要内容之一,地下水主要有降水入渗、灌溉水入渗、地表水入渗补给、越流补给和人工补给。在一定条件下,还有侧向补给。地下水的排泄主要有泉水、潜水蒸发、向地表水体排泄、越流排泄和人工排泄。地下水系统是生态系统的重要组成部分,其水流过程错综复杂,包括了地下水流经的介质,地下水各种物理化学成分和地表的天然通道等。相应地,地下水流系统中的补给区、中间过渡区、排泄区呈现不同的物理化学与生物特征。

地下水在自然系统的循环过程中,与其接触的岩石圈、生物圈和大气圈进行着极其复杂的物质、能量和信息交换,其中的微生物能通过降解沉积盆地中的有机碳^[26]获取能量和碳源,当 H_2 的氧化与各种电子受体的还原相耦合时,就会产生一定的能量^[27], H_2 的高扩散力使其很容易供给生存于地下岩石小孔隙中的微生物。在深层地下含水层产 H_2 的最重要的两种途径分别是有机物的分解和发酵^[28],第三种途径是通过基性、超基性岩石和流体之间反应产生的,这个过程即蛇纹石化,可以产生很强的还原环境和高浓度的 H_2 ,产生的 H_2 、 CH_4 和其他还原化合物为地表和地下环境自养微生物的碳固定提供了主要的化学能,可能就是早期生命进化过程中的主要能源。最近的几项研究^[29]揭示了 H_2 产生的第四种途径,即水经过辐射裂解产生 H_2 ,岩石中的 U、Th 和 K 元素在辐射衰减过程中,产生高能粒子从而裂解水产生 H_2 ^[30],这种辐射产生的 H_2 可以维持深井自养生物的新陈代谢活动^[31]。例如,氨氧化细菌($NH_3 \rightarrow NO_2^-$)和亚硝酸盐氧化细菌($NO_2^- \rightarrow NO_3^-$)是化能自养菌,它们能够利用氮化合物氧化所释放的能量,并固定二氧化碳,产生有机碳,自养氨氧化细菌和古菌的氨氧化作用是许多自然环境中重要的生命元素循环过程之一^[32]。

在小流域水循环过程中,雨水、地表水、土壤水、地下水进行着相互转化且周而复始的水文循环运动^[33]。国内外学者在土壤水与地下水^[34,35]、雨水与土壤水^[36,37]、地表水与地下水的相互作用^[38,39]等方面的研究取得了显著成果,随着多学科方法的综合应用及交叉研究的加强,微生物-水-岩相互作用将成为区域地下水地球化学研究的热点,其中物理、化学、生物的耦合作用尤为重要^[40]。当前的研究几乎涵盖了水循环过程中降水^[41]、截留^[42]、蒸发^[43]、下渗^[44,45]等数学模拟和物理过程,以及渗滤作用^[46]、污染物迁移^[47,48]、氯氟烃

(chlorofluorocarbons, CFCs)测年^[49]等化学过程,而生物过程研究的内容主要出现在综述性文章^[50]或者针对某种污染的生物修复^[51]方面,小流域地下水流系统的生物过程尤其是微生物作用过程的研究则较少且偏宏观。美国学者 Michael Y. Galperin 通过对 Richmond 矿井酸性废水微生物群落的分析为其他水环境的微生物群落研究提供了一个案例^[52],虽然对于在系统发育和生理学上更为复杂的微生物群落来说,对其中的 DNA 进行来源和功能分析会更加困难,但是这种方法还是可以借鉴到小流域水文界面过程中的微生物群落分析中去。地学研究所具有的综合性、系统性的特点决定了小流域水文界面过程中的微生物群落分布特征研究是一个重要的领域。

1.2.2 分子生物学方法的研究进展

真菌学家 Franz Unger 在 1850 年提出了微生物纯培养的理念,到 19 世纪 80 年代中期,各方面的事实表明,除了可培养的微生物,还有更广阔的资源——不可培养微生物未曾进入我们的研究视野。Grimes 等研究表明,利用平板计数和吡啶黄染色计数的结果竟然相差了 4 到 6 个数量级^[53]。“平板计数异常”现象证明了可培养微生物不能代表微生物世界,因此,不可培养微生物开始引起人们更多的注意,1985 年,Carl Woese 等研究表明核糖体 RNA 基因(rRNA gene)能够作为进化的计时器^[54],也促使 Pace 等人开创了微生物生态学上的一个新的分支^[55,56],他们直接对环境样品中微生物的 5S RNA 和 16S RNA 基因进行序列分析来描述这个环境中微生物的多样性,从而绕过了对这些微生物的培养步骤^[57,58]。后来,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的发展和能够利用设计的引物去扩增整个 rRNA 基因^[59],利用这项技术对多样性进行研究往往会发现微生物多样性程度更高,而且存在与可培养的种类在进化地位上具有明显分支的群体。近些年蓬勃发展的宏基因组技术使我们对微生物世界的了解和认识又向前迈进一步^[60,61],使我们能够在核酸水平上研究那些可培养和未培养的微生物,并从中寻找过去尚未获得的且具有开发利用价值的微生物资源。宏基因组学在微生物领域中取得了广泛的应用,最为成熟的两项应用是基于 16S rDNA 文库的微生物多样性分析和基于宏基因组文库的活性筛选。此外,宏基因组学还在很大程度上扩展了微生物代谢途径、新型质粒、可移动元件、基因组学以及群体感应(quorum sensing, QS)等方面的研究(图 1-1)。

随着分子生物学技术和生物信息学的进步,基于 16S rDNA 序列的

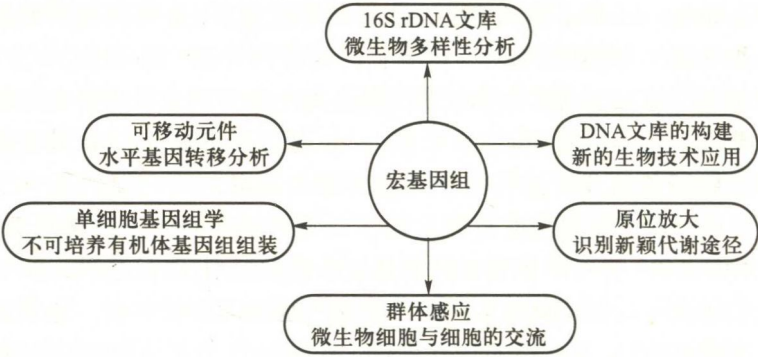


图 1-1 宏基因组学的应用^[62]

引自 Rajendhran and Gunasekaran, 2008

不依赖培养技术已成为近年来研究自然界原核微生物种群的一种分析手段^[63]被广泛应用到土壤^[64]、海洋^[65,66]、温泉^[67]、盐湖^[68~70]等环境的微生物多样性研究中,并发现了多种新的细菌与古菌类群。

1.2.2.1 系统发育多样性分析

基于 16S rDNA 文库的微生物多样性分析是宏基因组学在微生物生态学方面的一项重要应用,不同时间和空间的取样可以监测环境中微生物群落的动态变化,为宏观生态学的研究提供许多重要依据。由于人类通过纯培养认识的微生物种类极为有限,多样性分析过程中可以发现大量新种,有助于人类开发利用新的微生物资源。微生物多样性研究通常集中在以下几个水平:分类多样性 (taxonomic diversity)、功能多样性 (functional diversity)、遗传多样性 (genetic diversity) 和系统发育多样性 (phylogenetic diversity)^[71]。近年来随着对微生物多样性研究的深入,系统发育多样性研究逐渐占据了主导地位,它不仅克服了传统微生物分离培养的限制,而且提供了一种科学且简便的定量研究微生物多样性的方法。微生物系统发育多样性是指采用分子技术手段,根据系统发育理论,对微生物所包含的遗传信息进行相似性分析所得出的微生物多样性。它是以微生物群落种或种以上分类阶元的系统发育状况为标准,在序列分析基础上根据相似性分析进行归类。

环境基因组总 DNA 是环境中各种微生物基因组的混合物,它包括环境所有微生物组成的信息,但是由于基因组 DNA 过于复杂,不方便直接进行研究。因此我们通常通过研究基因组中的“生物标记 (bio-marker)”来研究环境微生物多样性。细菌的系统发育研究多集中在它的 rRNA 基因上,细菌的 rRNA 基因素有“细菌化石”之称。在构成原核生物的三种 rRNA (即 16S rRNA、23S rRNA 和 5S rRNA) 中,16S

rRNA 基因由于高度保守且被大量测序,目前对于原核微生物系统发育多样性研究是通过基于已建立的微生物 16S rRNA 基因序列数据库,分析样品 16S rRNA 基因序列多样性,确定微生物系统发育关系,并不断建立新的序列探针用以识别未知菌。这是因为:

- (1) rRNA 具有重要且恒定的生理功能;
- (2) 在 16S rRNA 分子中,既含有高度保守的序列区域,又有中度保守和高度变化的序列区域(图 1-2),因而它适用于进化距离不同的各类生物亲缘关系的研究;
- (3) 16S rRNA 分子量大小适中,便于序列分析;
- (4) rRNA 在细胞中含量高(约占细胞中 RNA 的 90%),也易于提取;
- (5) 16S rRNA 普遍存在于真核生物和原核生物中(真核生物中其同源分子是 18S rRNA),16S rRNA 基因变化比较缓慢而且在原核生物中不发生水平转移,因此序列之间的差异可以反映不同原核生物之间的进化关系^[72]。

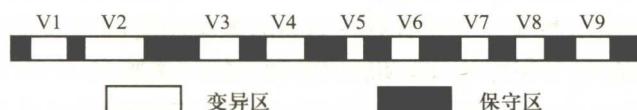


图 1-2 16S rRNA 基因结构模式图^[73]

此外,在 GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 RDP II (Ribosomal Database Project II, <http://rdp.cme.msu.edu/html/>)数据库中已经记载了大量不同原核生物的 16S rDNA 序列,因此知道 16S rDNA 序列信息后,可以在上述数据库中进行序列比对,找到这些序列相应微生物系统发育地位。同样我们用 PCR 的方法把环境中的所有 16S rRNA 基因收集到一起,然后用克隆建库的方法,分析每个克隆 16S rRNA 基因并进行比对,就可以判断该 16S rRNA 基因属于哪种类型的微生物,整个文库测序比对的结果就反映了环境微生物的组成。

1.2.2.2 不依赖培养(culture-independent)的分子生态学研究

对环境样品中微生物种群的数量、丰度以及分布的调查是微生物生态学的主要研究内容,而构建 16S rDNA 克隆文库是微生物分子生态学中用来调查环境中原核微生物组成最常用的方法之一。微生物分子生态学的发展,使得各种提取环境样品 DNA 的方法也陆续建立起来。由于样品本身的异质性、微生物的多样性及颗粒的黏附使得任何现存的方法都不能通用于所有的样品,而应根据环境特有的理化和生物学特性优化和发展出适宜的提取方法^[74]。目前从环境样品中分离核酸