

密云水库不同季节细菌群落多样性

王晓丹¹, 翟振华¹, 赵 爽¹, 戴育华², 王景仕³, 赵守彦³, 李艳红^{1,*}

(1. 首都师范大学生命科学院, 北京 100037; 2. 北京市水务局, 北京 100038; 3. 北京市密云水库管理处, 北京 101512)

摘要: 为加强对密云水库水体状况的全面了解, 对 2006 年 11 月到 2007 年 11 月不同季节水体中的微生物进行了研究。用流式细胞仪技术和 LB 固体培养基培养测定了水体中的细菌数目; 利用 PCR-DGGE 技术对水体细菌的多样性和相似性进行分析。结果表明, 细菌数目随季节变化有所不同, 但利用流式细胞仪测定的每毫升水体细菌的数目基本上均为 10^4 数量级, 而培养得到的细菌菌落数为 $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml, 基本符合国家饮用水源的卫生标准。细菌的多样性指数也表现出随季节变化的规律, 冬季 (2006-11 和 2007-11) Shannon-Weaver 多样性指数较低, 为 3.0 左右; 春季 (2007-04) 开始增大, 至夏季 (2007-07) 时可高达 3.3068; 秋季 (2007-09) 又减小到 3.1246。另外, 密云水库细菌的优势类群有 β -Proteobacteria、Actinobacteria、*Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides* (CFB) 类群和 Cyanobacteria。这些资料有望为以后进一步从微生物角度评价水质提供参考。

关键词: 密云水库; 细菌数目; 细菌多样性; 优势种群

文章编号: 1000-0933 (2009) 07-3919-09 中图分类号: Q945 文献标识码: A

The bacterial diversity in different seasons of Miyun Reservoir

WANG Xiao-Dan¹, ZHAI Zhen-Hua¹, ZHAO Shuang¹, DAI Yu-Hua², WANG Jing-Shi³, ZHAO Shou-Yan³, LI Yan-Hong^{1,*}

¹ College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China

² Beijing Water Authority, Beijing 100038, China

³ Beijing Administration Office of Miyun Reservoir, Beijing 101512, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(7): 3919 ~ 3927.

Abstract: In this study, we evaluated the bacterial populations in Miyun Reservoir in different seasons from Nov. 2006 to Nov. 2007 to determine the overall water quality of the reservoir. The bacterial counts in water samples collected from the reservoir were determined by flow cytometry and by culture in LB medium. In addition, the bacterial diversity and dominant groups were also evaluated by PCR-DGGE. The results revealed that the bacterial counts were different according to the season, but that the average counts, which were determined to be 10^4 per ml by flow cytometry and $10^2 \sim 10^3$ CFU per ml by culture in LB medium, were below the national standards for resource water. In addition, determination of the bacterial Shannon-Weaver diversity index revealed that the diversity also varied by season. Specifically, diversity was very low in winter (approximately 3.0 in November 2006 and 2007), but increased to as high as 3.3068 in the spring and summer (April and July, 2007), after which it began to decrease, with a value of 3.1246 being observed in autumn (September 2007). Furthermore, the dominant groups of bacteria observed in Miyun Reservoir included β -Proteobacteria, Actinobacteria, *Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides* (CFB) phylum and Cyanobacteria. Taken together, the results of this study will help to understand future changes in the water quality of Miyun Reservoir.

Key Words: Miyun Reservoir; microbe counts; bacterial diversity; dominant groups

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (5062003)

收稿日期: 2008-04-19; 修订日期: 2009-02-12

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liyh@mail.cnu.edu.cn

密云水库位于北京燕山群峰中的潮、白河上游,其控制流域面积约为 15788 km²,总库容 43.75 × 10⁸ m³,最大水深为 45 m^[1],是北京市最主要的地表饮用水水源地,其水质和水量直接关系到首都人民生活、经济发展和社会稳定。近年来,北京市经济增长速度加快,人口不断增加,北京成为严重资源型缺水的特大城市;另外近几年国内学者对密云水库水环境的调查表明库区水体有向富营养化发展的趋势^[1~4]。鉴于当前面临的紧迫形势,北京市正从各方面加强对密云水库水资源状况的监测和控制。

水体是一个复杂的生态系统,里面的生物不仅有大量的浮游植物和浮游动物,还有很多的微生物。由于微生物具有很强的降解和转化污染物的能力,因而在水体中起着举足轻重的作用,水质的好坏与微生物的数量及种类也有非常密切的关系。然而由于大部分微生物体积很小,难以利用传统的培养方法从形态学上进行全面的分析鉴定,当前人们对密云水库水体中浮游生物的研究多集中在浮游植物及浮游动物上,而对水体中微生物的系统研究极少,只是对水样中大肠菌群和细菌总数及一些典型病原菌的检测^[2],而有关水体中细菌的多样性及主要的群落结构未见报道。

随着近年分子生物学技术的发展,一些技术如变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)^[5]、荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)、末端限制性片段长度多态性技术(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)等,主要通过基因水平上利用微生物 16S rDNA 序列的变化来判断微生物间的系统发生关系^[6~8],已经被广泛应用到检测微生物群落的遗传多样性上^[9,10],鉴定出了一些不可培养的微生物。本研究通过将普通的培养方法和分子生物学方法相结合,在了解密云水库单位水体细菌数目的基础上,对 2006~2007 年不同季节水体中细菌的多样性及主要的群落结构进行了分析,以期较为全面的了解水体中微生物的动态变化,为进一步更好地了解密云水库的水体状况奠定基础。

1 研究材料

以北京市密云水库为研究对象。取样点分别设在白河主坝(E 116°49'49", N 40°28'34")、潮河主坝(E 116°57'52", N 40°26'53")和金沟(E 116°58'28", N 40°30'22")。白河和潮河主坝水深为 20~30 m,分表、中和下 3 层取样;金沟处水较浅,仅取表层。分别于 2006 年 11 月,2007 年 4 月,2007 年 7 月,2007 年 9 月和 2007 年 11 月在各样点采用取水器取水样 1000 ml(分别标记为 06-11, 07-04, 07-07, 07-09 和 07-11, 具体取样信息见表 1)放入无菌瓶中,迅速将样品经 2000 目筛网过滤后立即用于后续研究。每样品设 3 个平行样。

表 1 本研究取样位点信息

Table 1 The information of sampling sites in this research

取样地点 Sampling site	取样深度 Sampling depth(m)					水温 Water temperature(C)				
	06-11	07-04	07-07	07-09	07-11	06-11	07-04	07-07	07-09	07-11
白河主坝	表层 Surface	0.5	0.5	0.5	0.5	11.5	8	26.5	24.5	12
	中层 Middle	14	12	9	13	11	6	22.5	20.5	11.5
	下层 lower	28	24	18	24	9.5	5	12	10	10
潮河主坝	表层	0.5	0.5	0.5	0.5	12.1	10	27	25	12.1
	中层	12	12	14	11	12	9	19.5	18	12
	下层	23	24	27	23	10	6	11.5	14	10
金沟	表层	0.5	0.5	0.5	0.5	11.7	9	27.5	24.5	12

2 研究方法

2.1 流式细胞仪测定单位体积样品中微生物的数目

取 100 μl 待测样品加入核酸染料 Syto16(Molecular Probes)0.2 μl,黑暗条件下于室温放置 20 min 后加入到绝对计数管(TruCount tube, BD, USA)中,并流入经无菌水校准的流式细胞仪(FACSAria, 美国 BD)计数^[10]。记录的参数包括获取的细胞总数和 Beads 的获取数,最后计算出 3 个平行样品中微生物数目的平均值。样品中微生物细胞数目的计算公式:细胞数目(个/ml) = 获取细胞数 × Beads 总量 / (Beads 获取数 × 样本量)。式中,绝对计数管的 Beads 总量为 49348。

2.2 培养法测定细菌菌落数目

细菌的培养采用 LB 固体培养基,加入放线菌酮(25 $\mu\text{g/ml}$) (Merck) 来抑制真菌的生长。样品稀释为不同浓度梯度,分别为原液、稀释 10 倍、稀释 100 倍、稀释 1000 倍。每个梯度取 50 μl 样品涂布于平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 48h。观察记录菌落的数量,最后计算出各样品中细菌的平均菌落数(CFU/ml)。

2.3 PCR-DGGE 方法分析细菌的多样性

2.3.1 基因组 DNA 的提取

取样品各 1000 ml,用 0.22 μm 的微孔滤膜在真空抽滤泵(AP-9908S,天津奥特赛恩斯仪器有限公司)作用下将微生物收集到滤膜上。然后将滤膜剪碎分别置于 Matrix E Tube 中(Q-Biogene),采用 Bio101 Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒(Q-Biogene)提取样品的 DNA,并用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3.2 PCR 扩增

采用细菌 16S rDNA 的 V3 区特异性扩增引物:GC338F(CGC CCG CCG CGC CCC CGC CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC ACT CCT ACG GGA GGC AGC)^[11,12] 和 530R(GTA TTA CCG CGG CTG CTG)对样品的 DNA 进行扩增。50 μl PCR 反应体系:5 μl 10 $\times$ PCR buffer,2.5 mmol/L dNTP,10 $\mu\text{mol/L}$ GC 338F,10 $\mu\text{mol/L}$ 530R,DNA 提取物 50 ng,1.25 U Taq 酶,用 ddH₂O 补足至 50 μl 反应体系。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;30 个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。并用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 的效果。

2.3.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

PCR 反应产物采用 Bio-Rad 公司 DcodeTM 的基因突变检测系统进行分析,变性剂浓度范围选择为 30% ~ 60%。电泳条件为电压 130 V,60 $^{\circ}\text{C}$,电泳 7 h,电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE(pH 约为 8.5)。电泳结束后将凝胶进行银染(Sigma)^[13],将染色后的凝胶用紫光 100 扫描仪扫描,Quantity One 4.31(Bio-Rad Company)软件分析 DGGE 的指纹图谱。最后计算样品细菌群落的多样性指数,并对群落相似性进行聚类分析。细菌 Shannon-Weaver 多样性指数: $H = - \sum P_i \ln P_i$, P_i 为第 i 条带灰度占该样品总灰度的比率^[14];细菌群落相似性聚类分析主要根据 DGGE 图谱中每个样品不同条带的强度和迁移率,按照 Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages (UPGMA)算法对每个样品的条带图谱进行细菌群落相似性聚类分析^[15]。

2.4 优势群落的分析

将 DGGE 凝胶上的特征条带在超净工作台内切下,迅速转移到无菌的微量离心管中,加入 10 μl 灭菌的去离子水,60 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡后,吸取 2 μl 作为模板进行 PCR 扩增。再按常规方法将纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体(TAKARA Co.)连接、转化及蓝白斑筛选^[16]。随机挑取 3 个阳性克隆,进行序列测定(由上海生物工程有限公司完成),序列采用 DNASTar 软件中的 EditSeq 编辑,并人工校对后登录到 GenBank。将序列利用 Clustal W^[17] 比对后,以 *Thermoproteus tenax* 16S rDNA 序列(Accession No. M35966)作为外类群,采用 MEGA 3.1 软件中的邻接法(Neighbor joining,NJ)法,根据 Kimura 遗传距离构建进化树^[18],重复计算(Bootstraps)1000 次。

3 结果

3.1 单位体积水体微生物数目随季节变化

利用流式细胞仪的测定结果表明,2006 年 11 月至 2007 年 11 月各样品点单位体积水体微生物的数目多为 10⁴ 数量级,基本表现出随季节而变化的规律(表 2)。多数样品冬季(2006-11)和春季(2007-04)微生物数目基本接近;夏季(2007-07)开始增多,呈逐渐上升的趋势;秋季(2007-09)继续增多,达到四季中的最大值。到 2007 年 11 月,又回落到与 2006 年 11 月基本接近的水平;从不同水层来看,同一位点的表层和中层的微生物数目随季节变化的趋势较明显并且变化幅度较大,而下层变化的幅度相对较小。此外,同一季节不同取样点间也有差异,基本表现为白河略多于潮河,而金沟居于二者之间。

表 2 不同季节微生物细胞的总数目 (个/ml)

Table 2 The total microbe counts of different sampling sites in different seasons (Numbers/ml)

时间 Time	白表 Bai surface	白中 Bai middle	白下 Bai lower	潮表 Chao surface	潮中 Chao middle	潮下 Chao lower	金表 Jin surface
2006-11	5.2×10^4	5.5×10^4	4.4×10^4	2.7×10^4	2.2×10^4	3.4×10^4	4.8×10^4
2007-04	1.0×10^5	1.8×10^4	4.3×10^4	2.2×10^4	2.4×10^4	3.1×10^4	4.1×10^4
2007-07	5.8×10^4	6.4×10^4	4.4×10^4	4.7×10^4	4.5×10^4	3.1×10^4	3.6×10^4
2007-09	9.2×10^4	2.17×10^5	5.2×10^4	6.2×10^4	7.6×10^4	7.1×10^4	7.4×10^4
2007-11	4.8×10^4	5.0×10^4	3.0×10^4	1.8×10^4	2.2×10^4	2.6×10^4	3.7×10^4

利用 LB 固体培养基对水体样品细菌培养的结果表明(表 3):白河主坝、潮河主坝和金沟 3 个取样点培养出的细菌菌落数多为 $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml,其中冬季(2006-11)时培养出的细菌菌落数目最多,春季(2007-04)时骤然减少;夏季(2007-07)又开始增多,到秋季(2007-09)时,基本维持相对稳定的数值;2007 年 11 月得到的细菌菌落数与 2006 年 11 月的结果基本吻合,再次达到较高水平。

表 3 不同季节不同取样点培养的细菌数目 (CFU/ml)

Table 3 The counts of culturable bacterial community of different sampling sites in four seasons(CFU/ml)

时间 Time	白表 Bai surface	白中 Bai middle	白下 Bai lower	潮表 Chao surface	潮中 Chao middle	潮下 Chao lower	金表 Jin surface
2006-11	0.91×10^3	1.83×10^3	9.55×10^3	1.00×10^3	0.49×10^3	3.43×10^3	1.20×10^3
2007-04	1.23×10^3	—	—	—	—	—	—
2007-07	3.31×10^3	0.46×10^3	3.36×10^3	0.22×10^3	0.35×10^3	0.14×10^3	0.24×10^3
2007-09	0.60×10^3	0.38×10^3	0.31×10^3	1.01×10^3	0.48×10^3	0.87×10^3	0.58×10^3
2007-11	0.96×10^3	1.87×10^3	9.53×10^3	0.98×10^3	0.49×10^3	2.83×10^3	2.10×10^3

3.2 细菌多样性指数及细菌群落的相似性随季节而变化

提取不同季节样品的总 DNA,利用 DGGE 胶对 16S rRNA 基因 V3 区扩增产物进行分离,所得指纹图谱(图 1)表明,在同一季节,不同位点不同深度样品的变性梯度凝胶电泳中均出现了多条带,体现了细菌具有丰富的多样性;其中大部分主带在所有样品中均有出现,但不同样品之间也存在一些差异,主要表现为总条带的数目以及各个条带的灰度存在差异。不同季节,同一位点同一深度的条带数目和灰度也有差别。由此说明,不同的季节和取样深度均对水体中细菌群落结构有影响。

针对 DGGE 图谱计算细菌的 Shannon-Weaver 多样性指数,综合分析表明(图 2),冬季(2006-11)库区水体的平均 Shannon-Weaver 多样性指数较低,为 2.9803 左右;春季(2007-04)有所增大,可达 3.1805;夏季(2007-07)继续增大,约为 3.3068。而秋季(2007-09)Shannon-Weaver 多样性指数有减小的趋势,平均为 3.1246;到 2007 年 11 月,样品细菌的多样性指数总体表现为再次降低,达 3.0138 左右。

对每个样品的图谱进行细菌群落多样性的聚类分析,结果如图 3。2006 年 11 月(图 3a),白河主坝、潮河主坝、金沟 3 个不同取样点细菌群落的相似性仅为 26%;白河主坝和潮河主坝 3 个不同深度样品的细菌群落分别聚在一起,相似性分别为 33% 和 41%,金沟与潮河主坝样品的群落结构更为接近,相似性为 35%;2007 年 4 月(图 3b) 7 月(图 3c)和 9 月(图 3d),3 个不同取样点细菌群落的相似性均高于 40%;金沟与潮河主坝中层和下层样品的群落结构高达 52% 以上;白河主坝不同深度样品间细菌群落结构相似性较高,潮河主坝表层样品与白河主坝表层的相似性也高达 60% 左右;2007 年 11 月(图 3e),3 个不同取样点样品之间细菌群落结构差异变大,相似性仅为 20%,基本与 2006 年 11 月的数值相近。由此可见,冬季(2006-11 和 2007-11)取样位置对细菌群落结构的影响较大;春季(2007-04)、夏季(2007-07)和秋季(2007-09)3 个不同取样点的细菌群落相似性较高,水深对细菌群落相似性的影响逐步表现明显。

3.3 密云水库水体的优势细菌

将不同季节水样的细菌 DGGE 图谱的部分条带标记后随机选取 3 个克隆测序(图 2),大部分条带只得到

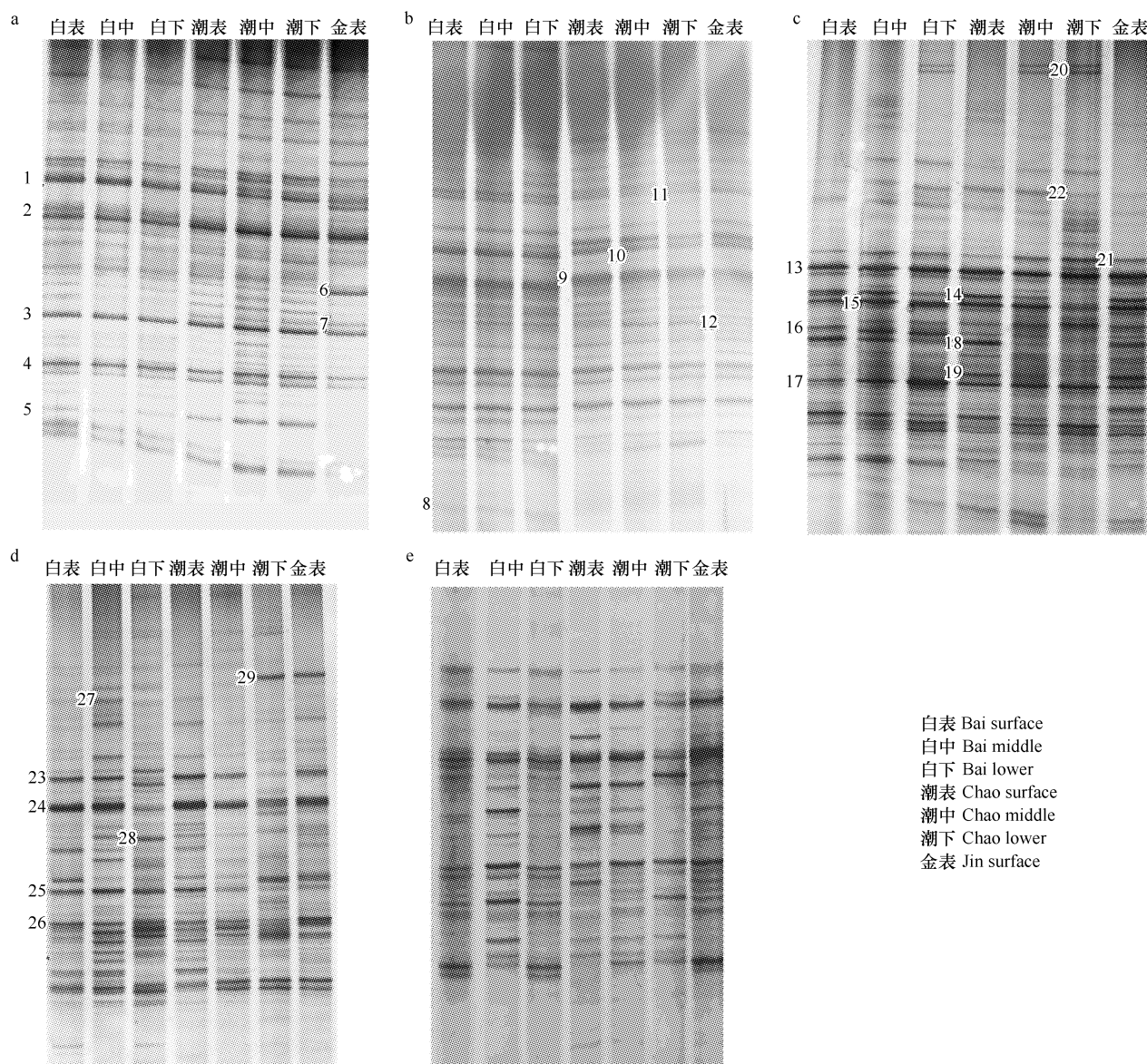


图1 不同季节细菌群落 DGGE 分离图谱

Fig.1 DGGE Profiles of the bacterial communities from samples in different seasons

a: 2006 年 11 月样品;b: 2007 年 4 月样品;c: 2007 年 7 月样品;d: 2007 年 9 月样品;e: 2007 年 11 月样品

一种序列结果,部分条带得到 2~3 种结果。将序列登录到 GenBank(登录号 FJ390416~FJ390461,序列克隆号的第一个数字与图 2 切胶条带的序数相同,后一个数字表示来自该目标带的序列)后,进行系统发育树分析发现(图 4):2006 年 11 月样品中选择的 1~4 条带为所有样品共有,它们分别与 β -Proteobacteria、Actinobacteria、*Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides* (CFB) 和 Cyanobacteria 类群的细菌同源性较高,因此这 5 个菌群是 2006 年 11 月密云水库水体中的优势菌群;条带 5、6 和 7 是样品的部分差异带,它们分别与 Actinobacteria 和 β -Proteobacteria 类的细菌相似性较高,因此,尽管不同取样点总的优势细菌类群是相同的,但含有的具体种属及比例可能会不同;将 2007 年 4 月的部分差异条带分别标记为 8~12(图 2)。结果表明:8 号和 9 号条带为白河主坝所特有的条带,它们与 β -Proteobacteria 类群的细菌同源性较高,10 号和 11 号带分别与 Cyanobacteria 和 CFB 类群细菌同源性较高,并且只出现于潮河主坝和金沟,12 号条带仅仅出现于金沟,与 Actinobacteria 的同源性较高;2007 年 7 月选择 10 条强度较高的条带(图 2)所代表的细菌分别与 α -

Proteobacteria, Actinobacteria, β -Proteobacteria, CFB、Firmicutes 和 γ -Proteobacteria 类群的细菌序列同源性较高(图4),表明这个时期细菌的种类较丰富;2007 年 9 月样品的 DGGE 图谱上选择了 7 条强度较高的条带(表6),它们的克隆分别与 β -Proteobacteria、Actinobacteria、Cyanobacteria 和 CFB 类群序列的同源性较高。由此可见,在不同季节检测出的密云水库的优势细菌类群均为 β -Proteobacteria、Actinobacteria、*Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides* (CFB) 类群和 Cyanobacteria,在夏季(2007-07)还检测到了 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 和 Firmicutes 等类群的细菌,但在不同季节或不同位点,某些类群细菌的具体种属或比例有所不同。

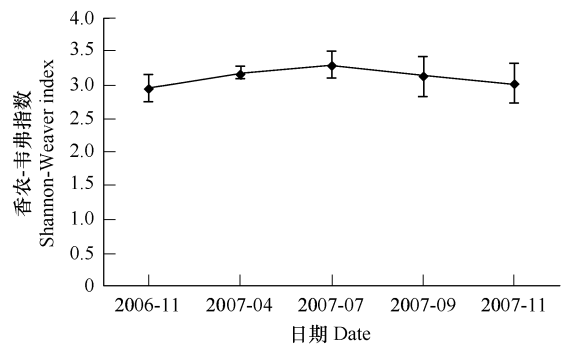


图2 不同季节样品中细菌的 Shannon-Weaver 多样性指数的动态变化

Fig. 2 Changes of Shannon-Weaver index (H) of bacteria in different seasons

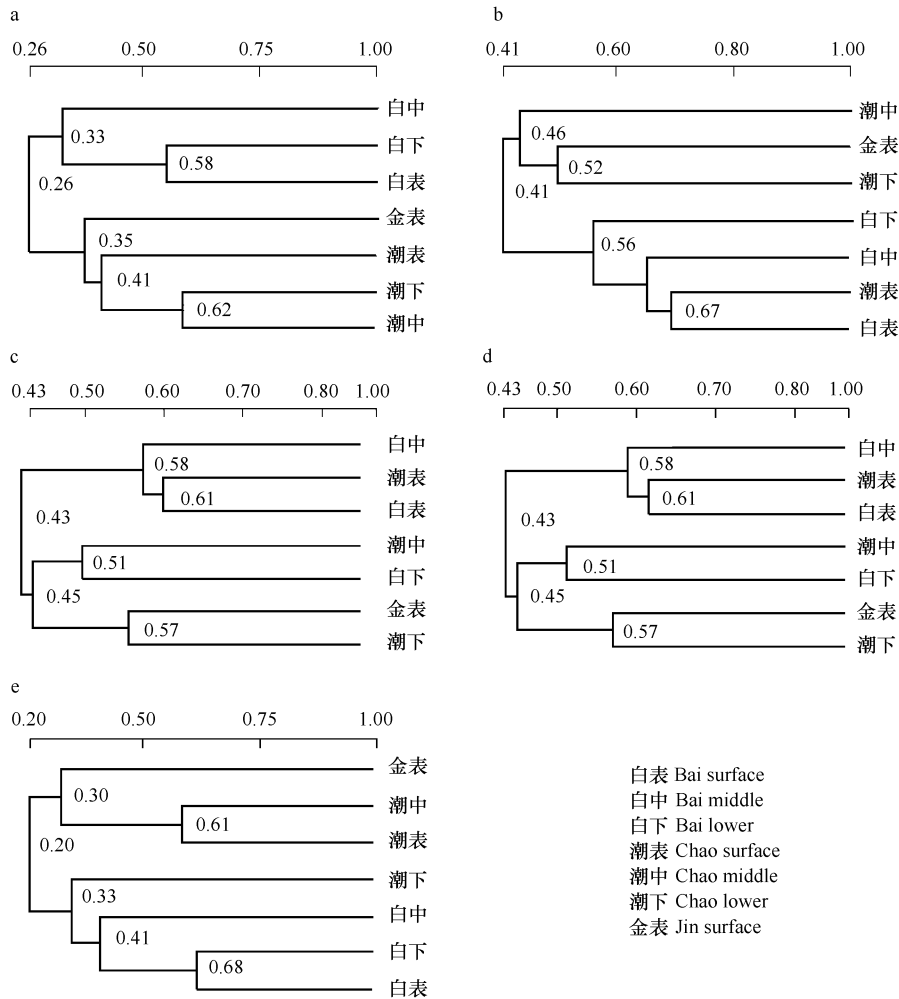


图3 不同季节样品中细菌群落相似性聚类分析

Fig. 3 The cluster analysis of bacterial communities in four seasons

a: 2006 年 11 月样品; b: 2007 年 4 月样品; c: 2007 年 7 月样品; d: 2007 年 9 月样品; e: 2007 年 11 月样品

4 讨论

4.1 季节对细菌数目及细菌多样性的影响

综合分析利用流式细胞仪法和 LB 培养基培养得到的细菌数目,它们均随季节而变化,推测主要是由于

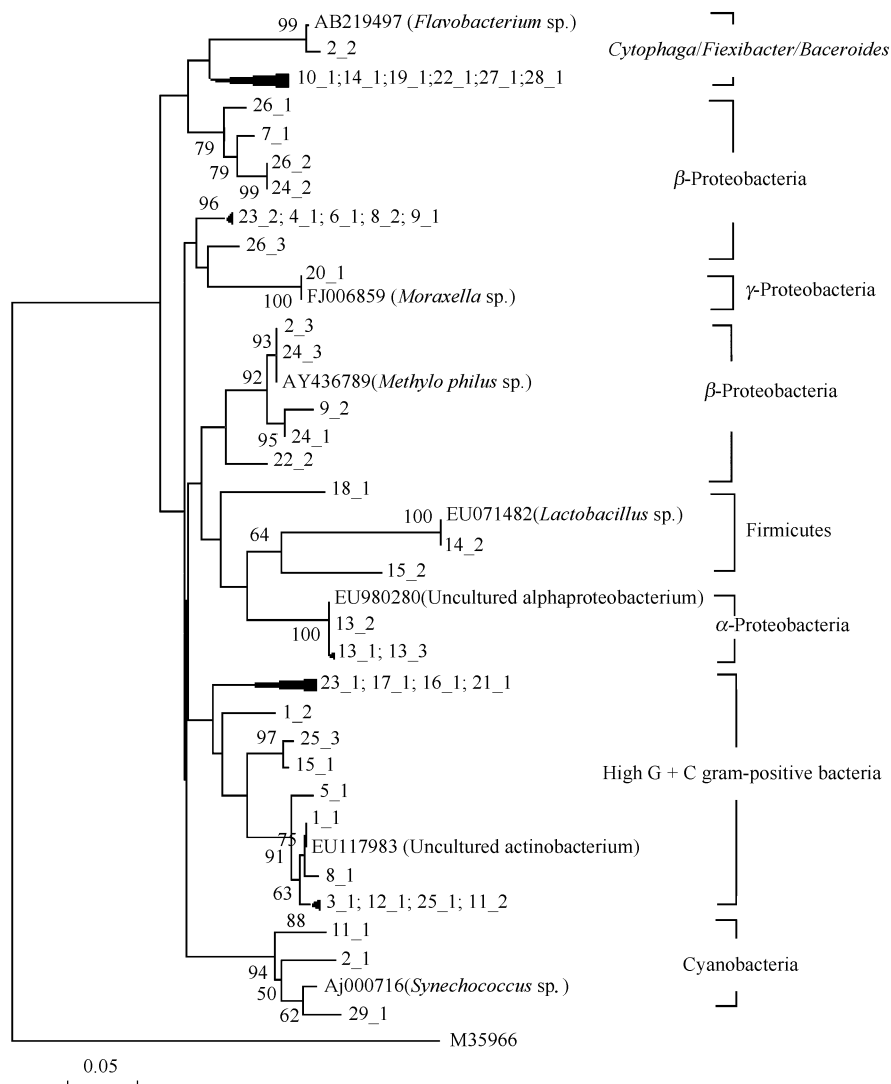


图4 NJ法构建的密云水库水体细菌16S rRNA基因的系统发育树

Fig. 4 The neighbor joining tree of 16S rDNA of bacteria derived from Miyun Reservoir

温度的变化引起的。冬季和春季的水温较低(表1),微生物繁殖能力较差,因而单位体积水体中微生物的数目较少。随着夏季(2007-07)气温升高,水温也迅速提高,大量微生物开始复苏并迅速繁殖,微生物数目开始增多;秋季(2007-09)微生物数目继续增多,最终达到四季中的最大值。2007年11月,随温度下降,不同取样点的微生物数目又开始下降。另外,同一位点的表层、中层的微生物数目随季节变化幅度较大,而下层随季节变化幅度较小,估计也与不同水层温度的变化不同有关。表1所示如白河主坝表层和中层4月与7月份的温差为16.5~18.5℃,下层的温差仅为7℃;潮河表层和中层4月与7月份的温差为10.5~17℃,下层的温差仅为5.5℃;但利用培养法对细菌的检测发现,尽管11月份水温很低,但2006年11月和2007年11月的样品培养得到的细菌菌落数却最高,对于这一现象还很难准确的解释。由此可以看出,培养得到的细菌群落仅为利用流式细胞仪检测得到的细菌群体的一部分,而且在不同季节所占的比例可能不同。另外温度的变化也引起细菌多样性的不同。2007年4月为解冻水体的逐渐升温时期,一些微生物类群随温度逐渐升高开始活跃,尽管它们的繁殖能力差,但其种类是增加的,因此细菌的多样性指数高于2006年11月的样品。2007年7月和9月水温的进一步升高不仅有利于微生物数目的增加,而且也有助于新的细菌种群出现,如蓝细菌、放线菌等细菌菌属(图4),最终导致夏季(2007-07)和秋季(2007-09)细菌的多样性高于春季(2007-04)和冬季(2006-11和2007-11)。

4.2 密云水库水体的细菌与水质

由于密云水库是北京市最重要的饮用水源,人们对其水质更加关注。目前国家对于生活饮用水水质的标准要求细菌总数不超过 100/ml,对水源水的标准要求不超过 1000/ml^[2],而对水库各位点培养出的细菌菌落数目基本在 100~1000/ml,基本符合水源地国家卫生标准的要求。因此从培养出的细菌总数方面,库区水质应该是安全的。

但目前关于水体中细菌的群落结构与水质之间的关系还没有明确的定论。本研究对各样品 DGGE 图谱优势条带的测序分析发现,四个季节水库样品细菌的优势类群均为 β -Proteobacteria、Actinobacteria、*Cytophaga*/*Flexibacter*/*Bacteroides* (CFB)类群和 Cyanobacteria,但不同季节各自所占的比例有所不同。由于没有相应的标准,虽然不能简单认定这些类群对水质的作用,但据报道这些类群的很多种属都对水体维持一个相对稳定的生物循环系统具有重要作用。例如 Cyanobacteria 的一些菌属如 *Synechococcus* sp. 等为光合微生物,它们进行光合作用合成的大部分有机质释放到水中^[19],另一些类群如 β -Proteobacteria、Actinobacteria 和 *Cytophaga*/*Flexibacter*/*Bacteroides* (CFB)的细菌可利用这些有机质一方面维持自身的生存,另一方面可变为颗粒性有机物库的一部分^[20]。其中大量的 β -Proteobacteria 的 *Methylophilus* sp. 等可利用厌氧环境中有机物降解后扩散的物质,还可利用氢气、氨、甲烷等物质^[21,22]。

由此可见,水体细菌群落结构的研究有待更加广泛、深入的进行,同时与水质的监测相结合,以期丰富有关的资料,为进一步全面了解水体水质的状况提供参考。

References:

- [1] Li H M, Meng F Y, Du G S, Liu X D, Liu J, Song F. Analysis on the phytoplankton and water quality in eastern and western Miyun Reservoir. *Journal of Lake Science*, 2007, 19(2):146–150.
- [2] Pan X C, Du G S, Wang R J, Jin X B, Liu X, Liu X D, Ge X L, Zhao J C. Analysis on status and trend of the planktonic algae and bacteria pollution for Miyun's Reservoir. *Environmental Monitoring in China*, 2002, 18(6): 28–30.
- [3] Du G S, Meng F Y, Li X D, Zhang W H, Wang J T, Wu D W. Water quality and development trend of Miyun Reservoir. *Environmental Science*, 1999, 20(2): 110–112.
- [4] Liu X, Du G S, Zhang H, Hua Z L, Liu J. Phytoplankton and nutrient degree of waterbody in Miyun Reservoir. *Research of Environmental Sciences*, 2003, 16(1): 27–29.
- [5] Muyzer G, Waal E C, Uittlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695–700.
- [6] Bernhard A E, Field K G. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, (4):1587–1594.
- [7] Katharine G. Field, Anne E. Bernhard, Timothy J. Brodeur. Molecular approaches to microbiological monitoring: Fecal source detection. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2003, 81:313–326.
- [8] Liu W T, Marsh T L, Cheng H. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 4516–4522.
- [9] Wang X D, Li Y H. Advances in studying water microbial ecology by molecular biological techniques. *Weishengwuxue Tongbao*, 2007, 34(4): 777–781.
- [10] Whiteley A S, Griffiths R I. Analysis of the microbial functional diversity within water-stressed soil communities by flow cytometric analysis and CTC+ cell sorting. *Journal of Microbiology Methods*, 2003, 54:257–267.
- [11] Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systemic Applied Microbiology*, 2001, 24(4): 610–617.
- [12] Gast R J, Dennett M R, Caron D A. Characterization of Protistan Assemblages in the Ross Sea, Antarctica, by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 4: 2028–2037.
- [13] Cairns M J, Murray V. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, 17: 915–17919.

- [14] Shannon C E, Weaver W. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana: 1949.
- [15] Pielou E C. An introduction to mathematical ecology. New York: John Wiley & Sons Inc, 1969. 82—212.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [17] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22 (22): 4673—4680.
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5(2): 5150—5163.
- [19] Garczarek L, Dufresne A, Blot N, Cockshutt AM, Peyrat A, Campbell DA, Joubin L, Six C. Function and evolution of the *psbA* gene family in marine *Synechococcus*: *Synechococcus* sp. WH7803 as a case study. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2008, 2(9): 937—953.
- [20] Lipson D A, Schmidt S K. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the colorado rocky mountains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2867—79.
- [21] Nijburg J W, Laanbroek H J. The influence of *Glyceria maxima* and nitrate input on the composition and nitrate metabolism of the dissimilatory nitrate-reducing bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 22 (1): 57—63.
- [22] Kisand V, Cuadros R, Wikner J. Phylogeny of Culturable Estuarine Bacteria Catabolizing Riverine Organic Matter in the Northern Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (1): 379—388.

参考文献:

- [1] 李慧敏, 孟凡艳, 杜桂森, 刘晓端, 刘静, 宋福. 密云水库东西库区的水质与浮游藻类分析. *湖泊科学*, 2007, 19(2): 146~150.
- [2] 潘小川, 杜桂森, 王瑞君, 金晓滨, 刘霞, 刘晓端, 葛晓立, 赵继昌. 密云水库浮游藻类和细菌污染现状及趋势分析. *中国环境监测*, 2002, 18(6): 28~30.
- [3] 杜桂森, 孟凡艳, 李学东, 张为华, 王建厅, 武殿伟. 密云水库水质现状及发展趋势. *环境科学*, 1999, 20(2): 110~112.
- [4] 刘霞, 杜桂森, 张会, 华振玲, 刘静. 密云水库的浮游植物及水体营养程度. *环境科学研究*, 2003, 16(1): 27~29.
- [9] 王晓丹, 李艳红. 分子生物学方法在水体微生物生态研究中的应用. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 777~781.