

玛珥湖好氧不产氧光合细菌 *pufM* 基因 DNA 和 mRNA 的定量及多样性分析

陈晓洁¹ 曾永辉¹ 简纪常¹ 鲁义善¹ 吴灶和^{1,2*}

(1. 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)

(2. 仲恺农业工程学院 广东 广州 510000)

摘要: 【目的】湖光岩玛珥湖是一类特殊的火山口湖,它完全封闭,地质年代久远,尚未受人类活动的剧烈影响,孕育着丰富而特殊的微生物种群。好氧不产氧光合细菌(AAPB)是以其在有氧情况下能行使光合功能而定义的一类专性异养细菌,其生理生态特征独特,进化年代久远,在水生生态系统的上层水体中广泛分布。目前,AAPB在玛珥湖水体中是否有分布仍是未知。【方法】构建和比较夏季湖水 1 m、5 m、12 m 三个水层的总 DNA 和总 RNA 的 AAPB 光合中心合成的关键基因 *pufM* 的 6 个克隆文库,并结合定量 PCR 技术,分析了不同水层 AAPB 的分布、系统发育多样性及其在总细菌中的比重。

【结果】6 个文库覆盖率和稀释曲线显示样本初步揭示了各水层优势 AAPB 类群的多样性。BLAST 核苷酸同源性介于 80%–93%;多样性指数表明,湖光岩表层和底层多样性相当,中间层最低,总 RNA 的多样性高于总 DNA。系统发育分析结果表明,OTU21–24 所含的序列(占总序列的 49.43%)与 β -变形细菌的进化距离最接近,是湖光岩玛珥湖的优势 AAPB 菌群。定量 PCR 结果显示 1 m 水层中 AAPB 在总细菌中的比重最高,可达 38.06%;而 5 m 水层中 AAPB 所占的比重最低,仅为 0.85%;12 m 为 9.54%。【结论】湖光岩玛珥湖孕育着丰富而多样的 AAPB 类群。

关键词: 湖光岩, 玛珥湖, 好氧不产氧光合细菌, *pufM*, 多样性, 荧光定量 PCR, 系统发育分析

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 30900045)

*通讯作者: Tel: 86-759-2339319; 信箱: wuzh@gdou.edu.cn

收稿日期: 2012-02-15; 接受日期: 2012-04-17

Genetic diversity and quantification of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Huguangyan Maar Lake based on *pufM* DNA and mRNA analysis

CHEN Xiao-Jie¹ ZENG Yong-Hui¹ JIAN Ji-Chang¹

LU Yi-Shan¹ WU Zao-He^{1,2*}

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

(2. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: [Objective] Maar lake is a special type of Crater Lake. Huguangyan Maar Lake was formed about 140 k–160 k years ago, fully closed, and has not yet been affected by human activities, where abundant and novel microbial species might dwell as reported previously. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria (AAPB) is a functional bacterial group with long evolution history in Earth possessing unique physiological and ecological characteristics. To date, our knowledge about AAPB distribution in Maar Lake is still blank. [Methods] Here, by constructing and analyzing six clone libraries of the photosynthetic reaction center *pufM* gene from total DNA and RNA, respectively, with 1 m, 5 m, and 12 m water layers in Huguangyan Maar Lake, and combining quantitative Real-time PCR, we studied AAPB's distribution, phylogenetic diversity and the proportion in the total bacteria in different water layers. The results of coverage value and rarefaction curves of six libraries showed that AAPB diversity was sampled well for the purpose of revealing the diversity of main AAPB groups in each water layer. [Results] BLAST analysis showed that *pufM* sequences in Maar Lake were 80%–93% similar to public sequences. Diversity index indicated that the AAPB diversity in surface and deep layers was similar, whereas diversity in the intermediate layer was lowest. In view of total RNA and DNA data, *pufM* RNA diversity was higher than that of DNA. Phylogenetic and statistical analysis revealed that 49.43% sequences are fell into the OTUs 21–24 which were closely related to β -proteobacteria and represent dominated AAPB groups. Quantitative PCR results showed that the percentage of AAPB in total bacteria in 1 m water layer reached a highest value of 38.06%, whereas only 0.85% and 9.54% in 5 m and 12 m, respectively. [Conclusion] Huguangyan Maar Lake is occupied by rich and diverse AAPB groups.

Keywords: Huguangyan Maar Lake, Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, *pufM* diversity, Q-PCR, Phylogenetic analysis

玛珥是一种独特的火山类型, 它具有一系列独有的特征: 形成于水汽或岩浆水汽喷发作用;

在地表下形成深切到围岩的圆形或近圆形的低平火山口, 并被一个低矮的火山碎屑环包围; 火

山喷出的沉积物多出现基浪构造、层理构造等;多充水成湖,即玛珥湖(Maar Lake)^[1]。玛珥湖和普通湖泊差异很大,而且也不同于普通的火山口湖,常孕育着非常特殊的生命类群。世界上最典型的两处玛珥湖分别位于德国和我国境内,即位于广东湛江的湖光岩玛珥湖。该湖泊也是我国四大火山口湖之一,它形成于约14万-16万年前的火山爆发,是一类原生态的火山口湖,在古生物学、地球化学和环境演化方面已展示出极为重要的研究价值^[2]。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^[3]。目前国内外对玛珥湖内微生物多样性还较少报道^[4-5]。我们小组前期基于纯培养的工作表明变形细菌占据优势地位,其次为放线菌、厚壁菌和拟杆菌^[6],对湖光岩中功能菌群的研究很少涉及。

好氧不产氧光合异养细菌(Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, AAPB)是一类由细菌叶绿素(Bchl_a)介导的好氧不产氧光合机制的承担者。这类功能菌群具有众多独特的生理生态特征,如专性好氧;营光合作用但生长不完全依赖于光。AAPB不能完成光合自养功能,依靠呼吸消耗有机底物来维持其生长代谢,光能仅作为其异养代谢的能量补充^[7],大约可提供细胞所需总能量的20%;同时,光可以使细胞吸收有机物质的效率翻番^[8]。AAPB对重金属的氧化还原能力使其在生物除污方面也有着巨大的潜力,对研究细菌光作用的起源与进化也具有重要的意义^[9]。AAPB生态学的报道最早来自于Kolber等^[10],他们首次研究了AAPB在世界海洋的分布,同时揭示了AAPB在海洋表层的广泛存在。Kolber等^[11]发现AAPB仅分布于大洋真光层,并在上层海洋具有很高的丰度,可占有原核微生物类群的

11%。这一惊人的丰度引发了科学家们极大的兴趣,随后引发了大量海洋AAPB相关的报导。这些报导^[12-17]所研究的地点覆盖了几乎所有主要的海域。在青藏高原的咸水湖泊中也有报导它们的分布,其在总原核细胞中的比重约为1.57%-5.35%^[18]。

相比咸水生态系统,对AAPB在淡水生态系统中的生态地位和功能的研究极为有限。内蒙古的富营养化的乌梁素海红圪卜湖区AAPB也有较高的多样性,与他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^[19]。对欧洲大部分淡水湖泊进行的研究发现淡水湖泊中AAPB的形态多样性不同于海水^[20]。在德国东北部10个不同营养型的湖泊进行的研究显示,AAPB多样性受湖水pH、腐殖物质的影响较大^[21]。对原生态的淡水湖泊中AAPB群落的物种组成和变化规律的研究未见报道,AAPB在不同的环境中如何适应和进化仍然是个谜。这些信息对充分认识AAPB在整个水生生态系统中的地位和作用是很重要的补充,也有助于更好的了解AAPB光合系统的起源和进化。

本文以近年来被广泛应用于环境AAPB多样性分析的基因*pufM*为目标构建文库。该基因编码光反应中心的小亚基蛋白,数据库庞大,便于系统比较分析各环境中AAPB多样性的差异。我们构建、分析并比较了1 m、5 m、12 m三个水层的总DNA和总RNA的*pufM*基因克隆文库,结合定量PCR的技术,揭示出夏季湖光岩玛珥湖中不同水层AAPB的分布特征及其系统发育多样性组成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集:湖光岩(21°9'N, 110°17'E)是经多次平地火山爆炸、深陷而形成的玛珥湖。湖

体面积约 2.3 km², 湖深约 446 m, 其中火山泥沉积物 >400 m, 水深 >20 m。于 2011 年 6 月 20 日上午 9 时采集了最深水体所在位置的 3 个水层 (1 m, 5 m, 12 m) 的水样, 现场测的透明度为 6.7 m。图 1 (等深线引用文献[22])五角星处为采样位置。

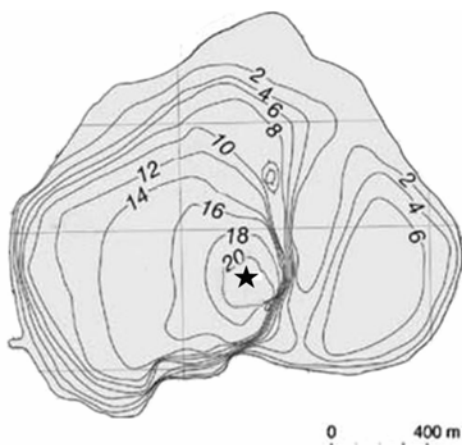


图 1 采样地点

Fig. 1 Sampling site

1.1.2 样品的处理: 采集各位点水样 10 L, 立即带回实验室进行处理。混合均匀后, 用 8 层纱布粗滤, 然后用 3 μm 滤膜预过滤, 再用 0.22 μm 滤膜过滤水样获得总浮游细菌样本。将过滤好的 0.22 μm 滤膜装入灭过菌的离心管内, 并放入 -80 °C 速冻保存直至分析。

1.2 提取总浮游细菌 RNA 和 DNA

1.2.1 总 RNA 的提取: 在超净台上用无菌无 RNase 的手术剪将滤膜剪成小碎片, 装入 50 mL 的离心管中; 向管中加入 5 mL 抽提混合液(75 份 50 mmol/L 乙酸钠、10 mmol/L EDTA 和 4 份 10% SLS 十二烷基肌氨酸钠混合, 调节 pH 为 4.5), 涡旋振荡后将离心管放入 -80 °C 处理 40 min, 再转入 37 °C 水浴 10 min, 冻融 2-3 次。加入 5 mL 饱和酚(pH 4.5±0.2)涡旋振荡后 4 °C 离心 20 min; 将水相移入新的 15 mL 无 DNase、RNase 的离心管中, 向水相中加入 0.1 倍体积的 2 mol/L 乙酸钠

(pH 4.5), 混匀后再加入等体积的氯仿, 振荡混匀后在 4 °C 离心 10 min, 将水相移入新的 15 mL 离心管中, 加入等体积 100% 异丙醇, 于 -20 °C 过夜; 在 4 °C 离心 45 min, 收集 RNA 沉淀。加入 1 mL 70% 冰乙醇洗涤沉淀, 并将液体全部转移到 1.5 mL EP 管中, 4 °C 离心 30 min, 干燥沉淀 10 min, 加 30 μL Grade water 或 0.1% DEPC 处理水溶解 RNA, 室温放置 45 min 溶解后移至 -80 °C 保存。

1.2.2 总 DNA 的提取: 将提取 RNA 中 50 mL 离心管所剩余的中间层和有机层中加入 5 mL 1 mol/L 的 Tris-base (pH 0.5), 混匀后置于 4 °C, 放置时间在 40-180 min, 4 °C 离心 15 min, 将上层水相移到新的 15 mL 离心管中; 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1, V/V)混匀, 4 °C 离心 15 min, 将水相移入新的离心管; 加入 90 μL 2 mol/L 乙酸钠和 2.5 倍体积冰乙醇, -20 °C 沉淀过夜; 收集和洗涤沉淀方法同总 RNA。

1.2.3 1st-strand cDNA 合成: 将提取的总 RNA 用 DNase I (TaKaRa)按操作手册进行处理, 除去总 RNA 中的基因组 DNA 干扰。再用 Reverse Transcriptase M-MLV (TaKaRa)按操作手册合成 cDNA 的第一条链。

1.3 PCR 扩增及文库构建

本文选用 *pufM* 引物 *pufM*-557f: 5'-CGCAC CTGGACTGGAC-3'; *pufM*-750r: 5'-CCCATGGT CCAGCGCCAGAA-3'。PCR 反应体系: DNA 模板(约 50 mg/L) 0.5 μL, Easy-Taq 酶(5 U/μL) 0.4 μL, Easy-Taq buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 3 μL, 引物(20 μmol/L)各 0.3 μL, 补水使总体积至 50 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °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 193 bp。PCR 产物经凝胶回收试剂盒(上海生工 UNIQ-10 柱式)纯化备用。将纯

化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa)上,然后转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布培养,构建文库。

1.4 测序与系统发育分析

从文库中随机挑选 30 个阳性克隆送上海美吉生物测序部测序。序列用 NCBI 数据库手动去掉载体,应用 BLASTn 程序与数据库中进行相似性比对搜索,选择最同源的前 3 条序列为参比序列。采用 ClustalX 2 软件进行序列多重比对,然后以 Kimura-2 模型计算进化距离,以邻接法(Neighbor-Joining, NJ) MEGA 4.0 软件构建系统发育树。24 个单一 OTU 各选一条序列提交 GenBank, 登录号为 JN712788–JN712811。

1.5 荧光定量 PCR

采用 16S rRNA 序列引物 16S rRNA f: 5'-AA CGCGAAGAACCTTACC-3', 16S rRNA r: 5'-AA GGGTTGCGCTCGTTAC-3'。荧光定量 PCR 反应体系: 2 μ L 模板(10 倍稀释), 上下游引物各 1 μ L, 2 \times TransStart Green qPCR SuperMix 12.5 μ L, 补水使总体积至 25 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 30 s。反应完成后应用 iQTM5 Optical System Software 软件(Version 2.0, Bio-Rad)进行数据分析,通过 Delta Ct 法获得 *pufM* 基因和 16S rRNA 拷贝数的比值 p 。AAPB 比重= $p \times$ 单个细菌基因组内 16S RNA 基因的平均拷贝数 \times 100%。

pufM 基因为单拷贝,而不同细菌内含有的 16S rRNA 操纵元拷贝数差别很大,目前的研究结果显示,从 1–15 个不等^[24]。为较为准确的评估 AAPB 在总细菌中的丰度,我们参考 16S rRNA 基因拷贝数数据库(rRNDB, <http://rrndb.mmg.msu.edu>)的数据进行了校正。rRNDB 数据库统计了 1 128 个细菌基因组中的 16S rRNA 基因拷贝数,平均值为 4.17。我们剔除了拷贝数大于等于 7 的细菌,因为它们均为致病性医学菌株,在玛

珥湖中的分布可能性很低。这些细菌总数为 221 个,总计 2 031 个拷贝。剔除后获得的 16S rRNA 基因拷贝数平均值为 2.95 个/基因组。

1.6 多样性指数和样品聚类分析

通过 MOTHUR (http://www.mothur.org/wiki/Main_Page)软件对序列进行可操作的分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)的聚类分析,以 Cutoff=0.03 的分类标准划分 OTU。并用 GenoDive 软件(<http://genodive.org/>)计算出多样性相关指数: Effective number of genotypes (eff)、Genotypic diversity (div)、Evenness (eve)、Shannon-wiener (shw)、Corrected shannon-wiener (shc)、Uncorrected genotypic diversity (diu)。覆盖率(Coverage)运用公式: $cov=1-(N/Individual)$ 计算, N 为整个文库中只出现一次的克隆子数目; Individual 为文库中筛选出来的总的阳性序列数目。稀释曲线运用 POST 软件计算, Excel 绘图。各水层所含的 OTU 相似树由 NTsys 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 多样性指数分析

按水层和模板来源,共构建了 6 个克隆文库,分别为 1 m、5 m、12 m 总 DNA 样品中的 *pufM* 基因文库(1 mD、5 mD、12 mD)和 1 m、5 m、12 m 总 RNA 样品中的 *pufM* 基因文库(1 mR、5 mR、12 mR),并随机在各文库中挑选 30 个克隆子,一共分析了 180 个 *pufM* 克隆子,测序后总共获得了 176 条序列。克隆文库所采样品的覆盖率在 76%–89%之间,覆盖度较高,从稀释曲线(图 2)也可看出 AAPB 的多样性采集较为充分,虽然未能完全获得 *pufM* 基因的多样性,但各文库可以用于评估 AAPB 优势类群的多样性。经 GenoDive 软件计算得出各文库多样性指数如表 1 所示。

1 m 水层的 DNA 和 RNA 文库的均匀度都在 0.5 上下浮动(表 1),表明 1 m 水层中所含 *pufM* 种

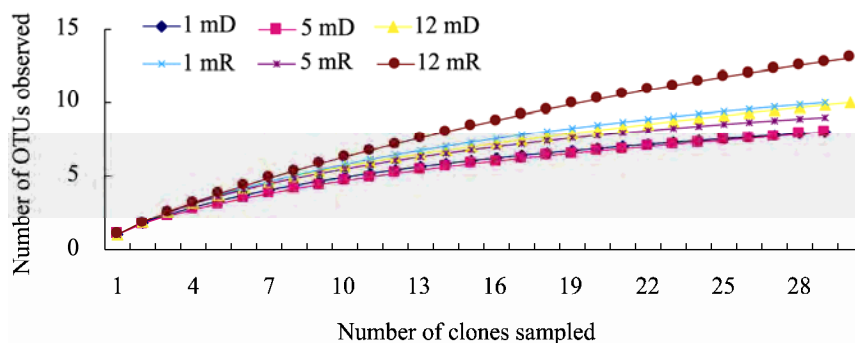


图 2 各文库的稀释曲线分析

Fig. 2 Rarefaction analysis of six clone libraries (on 3% nucleotide sequence difference)

表 1 6 个克隆文库 AAPB 多样性指数

Table 1 Index diversity of AAPB from six clone libraries

Clone library	OTU	cov (%)	eff	div	eve	shw	shc	diu
1 mD	8	89.65	3.81	0.76	0.48	0.72	0.81	0.74
5 mD	8	86.21	3.20	0.71	0.40	0.67	0.78	0.69
12 mD	9	83.33	5.06	0.83	0.56	0.80	0.90	0.80
1 mR	10	86.21	4.98	0.83	0.50	0.84	0.96	0.80
5 mR	9	89.65	4.98	0.83	0.55	0.81	0.91	0.80
12 mR	13	76.67	5.11	0.83	0.39	0.92	1.11	0.80

类分布较均一, 5 m、12 m 水层的 DNA 和 RNA 4 个文库中各类 *pufM* 所占比重不一。将总 DNA 文库和总 RNA 文库的 shw 指数比较, 可知总 RNA 文库较总 DNA 文库中 *pufM* 基因的更多样。div、diu 指数反映出总 RNA 文库 *pufM* 基因的多样性丰富, 而总 DNA 文库中的 *pufM* 基因种类不均匀, 但优势种的地位突出。3 个不同水层的文库间也有差异。5 m 水层所含有的 AAPB 多样性程度不及 1 m (表层) 和 12 m (近底层) 两个水层的多样性丰富。

2.2 群落组成、同源性和系统发育多样性分析

将 6 个文库总共 176 条序列, 分别以 Cutoff=0.03 作为分界阈值来划分 OTU, 共划分 24 个 OTU。各文库划分 OTU 情况见表 1。通过 BLASTn 找到在 GenBank 数据库中与之最同源的序列和同源序列的来源(表 2), 从表 2 中可知所得序列与数据库中序列的同源性在 80%–93% 之间,

并且大部分同源序列来自于不可培养的细菌, 而这些细菌基本来自河口或是富营养的湖泊等, 仅有少数的来自海洋。

24 个 OTU 在各文库中分布(表 3), 可以看出划分到 OTU21 的序列最多共有 66 条占全部序列的 37.5%; 依次分别为 OTU12、OTU9 占全部序列的 15.9% 和 13.6%。这 3 组 OTU 所含的 AAPB 类群为湖光岩的优势菌, 并且仅在这 3 个 OTU 中都分布有 6 个文库的克隆子。1 m 水层的两个文库总共占 15 个 OTU、5 m 水层的占 12 个, 12 m 水层的所占的 OTU 最多 17 个。总 DNA 总共 15 个 OTU, 总 RNA 占 17 个 OTU。12 mD 文库中有 4 个特异性较高的克隆子分别独自形成了 1 个 OTU。而仅 5 mD 文库中没有如此的克隆子, 均分布在克隆数大于 1 的 OTU 中。除 OTU5 外 5 m 水层不含其他独立于 1 m 和 12 m 的 OTU 种类。9 个 OTU 仅在总 RNA 的 3 个文库中出现, 6 个

表 2 *pufM* 代表序列同源性分析及序列来源环境的比较
Table 2 Homology analysis and comparison of source habitat of representative *pufM* sequences

OTU 序号 OTU No.	代表克隆 Representative clone	克隆数 Clone number	登录号 Accession No.	相似度 Similarity (%)	来源 Source	环境 Habitat
OTU1	JN712791	2	AY064410.1	85	<i>Roseococcus thiosulfatophilus</i>	NA
OTU2	JN712789	1	EU191396.1	90	Uncultured bacterium	Delaware estuary
OTU3	JN712788	1	FJ589126.1	86	Uncultured bacterium	Eutrophic lakes
OTU4	JN712790	1	AY234384.1	87	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	NA
OTU5	JN712793	1	FJ589120.1	88	Uncultured bacterium	Eutrophic lakes
OTU6	JN712792	1	FJ589128.1	93	Uncultured bacterium	Eutrophic lakes
OTU7	JN712796	1	FJ589120.1	91	Uncultured bacterium	Eutrophic lakes
OTU8	JN712803	2	EU930068	89	<i>Roseobacter</i> sp. BS90	NA
OTU9	JN712802	24	FJ589120.1	88	Uncultured bacterium	Eutrophic lakes
OTU10	JN712795	1	FJ589093.1	91	Uncultured bacterium	Eutrophic lakes
OTU11	JN712799	10	FJ623715.1	85	Uncultured marine bacterium	Pearl River estuary
OTU12	JN712798	28	FJ623671.1	85	Uncultured marine bacterium	Pearl River estuary
OTU13	JN712800	1	AM162719.1	84	Uncultured bacterium	Eutrophic brackish lagoon
OTU14	JN712794	1	EU196298.1	88	Arctic spring bacterium sp. CP26	Cold perennial springs of the high arctic
OTU15	JN712801	1	EU191568.1	89	Uncultured bacterium	Delaware estuary
OTU16	JN712797	1	FJ589111.1	92	Uncultured bacterium	Eutrophic lakes
OTU17	JN712807	7	FJ618993.1	90	Uncultured bacterium	Arctic Ocean
OTU18	JN712805	2	EU191456.1	86	Uncultured bacterium	Delaware estuary
OTU19	JN712804	2	EU191564.1	86	Uncultured bacterium	Delaware estuary
OTU20	JN712806	1	FJ619026.1	84	Uncultured bacterium	Arctic Ocean
OTU21	JN712809	66	GU079557.1	81	Uncultured prokaryote	Particle-rich estuary
OTU22	JN712808	2	AY178005.1	80	Uncultured proteobacterium	Permanently frozen Antarctic lake
OTU23	JN712810	7	AM162728.1	80	Uncultured bacterium partial mRNA	Eutrophic brackish lagoon
OTU24	JN712811	12	GQ468979.1	83	Uncultured bacterium	Mediterranean Sea

OTU 仅在总 DNA 的 3 个文库中出现。通过各文库 OTU 的分布相似系数绘制相似树(图 3)。12 m 水层内部 DNA 和 RNA 差异最大, 其次为 1 m 水层, 而 5 m 水层 DNA 和 RNA 间 AAPB 类群分布最为接近。

通过代表序列和参比序列比对, 并以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树。系统发育分析表明, 24 个 OTU 中的代表序列在系统发育树

上分别归入 7 个不同的簇, 分别为 α -1 Proteobacteria Rhodospirillales like、 α -6 Proteobacteria Rhizobiales like、 β -Proteobacteria I、Unknown group I、 α -4 Proteobacteria Sphingomonadales like、 β -Proteobacteria II、Unknown group II, 他们代表了 7 个细菌亚群(图 4)。其中 β -Proteobacteria II 占总克隆数的 49.43% 为优势菌群, 其次为 α -4 Proteobacteria Sphingomonadales

表 3 6 个文库中的序列在 24 个 OTU 中的分布
Table 3 Sequences distribution in 24 OTU

OTU	1 m		5 m		12 m		Total
	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA	
1	—	—	—	1	—	1	2
2	—	—	—	—	1	—	1
3	—	—	—	—	—	1	1
4	—	1	—	—	—	—	1
5	—	—	—	1	—	—	1
6	1	—	—	—	—	—	1
7	—	—	—	—	1	—	1
8	1	—	1	—	—	—	2
9	5	2	3	2	9	3	24
10	1	—	—	—	—	—	1
11	2	—	1	3	2	2	10
12	4	4	4	8	6	2	28
13	—	1	—	—	—	—	1
14	—	—	—	—	—	1	1
15	—	1	—	—	—	—	1
16	—	—	—	—	—	1	1
17	—	2	1	2	1	1	7
18	—	1	—	—	—	1	2
19	—	—	1	—	—	1	2
20	—	—	—	—	1	—	1
21	13	11	15	9	6	12	66
22	—	—	—	—	2	—	2
23	2	2	—	1	—	2	7
24	—	4	3	2	1	2	12
	29	29	29	29	30	30	176

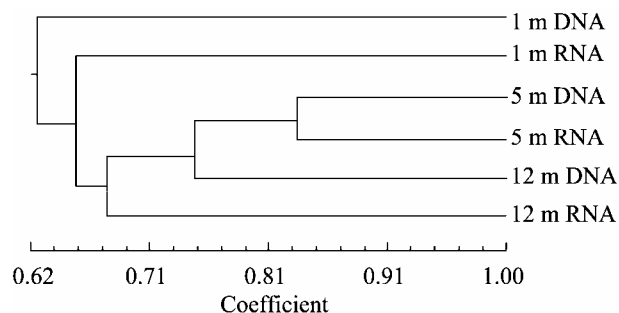


图 3 根据 24 个 OTU 在各个文库中的分布情况获得的相似树

Fig. 3 The similarity tree based on 24 OTU distributed in six clone libraries

like 和 α -6 Proteobacteria Rhizobiales like 分别为 22.16%、15.91%。

2.3 荧光定量分析

应用 iQTM 5 Optical System Software 软件, 将各水层的 16S rRNA 基因作为参照基因, 采用 Delta Ct 法进行目标基因 *pufM* 的荧光定量分析。计算出各水层中 AAPB 在浮游总细菌中的比重(图 5)。1 m 水层中 AAPB 所占比重最大为 38.06%, 而 5 m 水层中 AAPB 所占的比重最低仅为 0.85%, 12 m 为 9.54%。

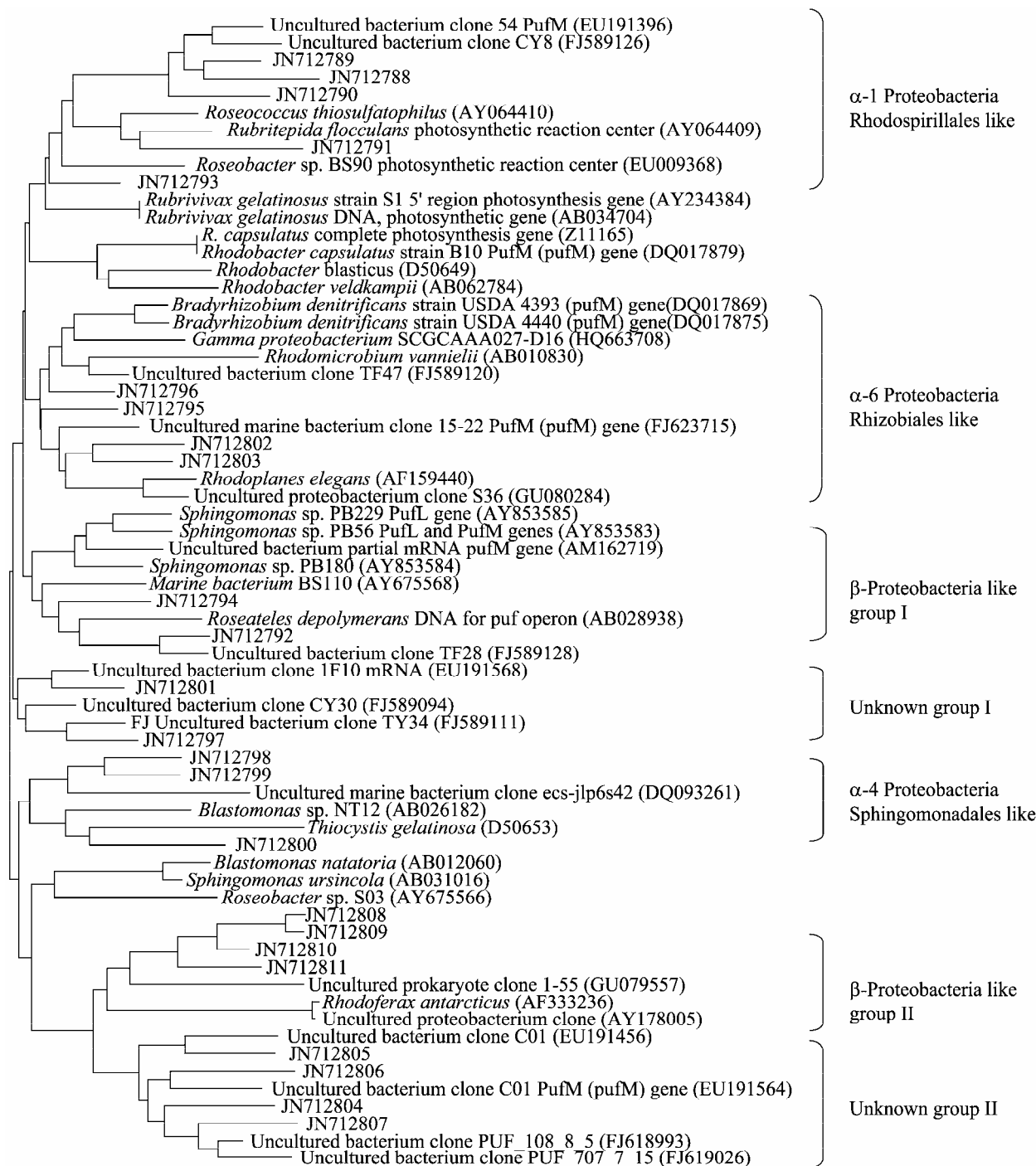


图4 湖光岩玛珥湖水环境 *pufM* 基因的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *pufM* sequences in Huguangyan Maar Lake

Note: The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on Neighbour-Joining analysis of 1 000 resampled datasets. Sequence numbers in parentheses are the GenBank accession numbers.

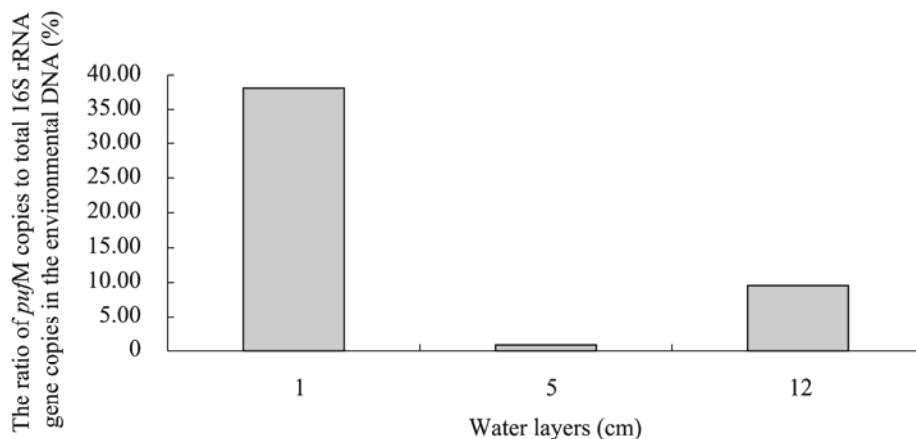


图 5 荧光定量 PCR 分析 AAPB 在总细菌中的比重

Fig. 5 AAPB percentage in total bacteria as shown by real-time PCR analysis

3 讨论

因为光反应中心复合物中的 *pufL-M* 亚基在所有的不产氧光合细菌中具有较高的保守性, 常被作为 AAPB 在海洋生态系统中遗传分布的标记基因^[25]。通过扩增 *pufM* 基因可以了解环境 DNA 样品中大部分 AAPB 的组成情况, 甚至可以发现一些新的 AAPB 种属。大部分微生物多样性的研究都建立在 DNA 的水平之上^[26], 但是 DNA 水平的研究只能反映环境中微生物整体的多样性, 不能反映出群落中微生物的生存能力、代谢活力以及生长力, 而总 RNA 直接与细菌的代谢、生长活性相关, 可以提供更全面的信息。因此, 本工作结合 DNA 水平和 RNA 水平的研究, 即总 DNA 和总 RNA 中 AAPB 的多样性, 更全面揭示出了该菌群在湖光岩玛珥湖中的分布特征。我们在 Markus G 等^[27]的实验基础上, 改进了实验方法, 成功得从环境样品中同时提取了总 DNA、RNA。对于提取的 RNA 进行严格的处理既保证不降解也不含任何 DNA 基因。实验结果表明, 总 RNA 中 *pufM* 基因的多样性高于总 DNA, 且含有 9 个特有的 OTU。说明在湖光岩水域中存在着十分活跃的 AAPB 类群, 这类 AAPB 生长快、代谢旺。

正如 Koblížek 所认为的, 尽管这类快速增长的 AAPB 细胞数量少, 但是作为水体中碳循环的动力做出了巨大的贡献^[28]。

根据各文库的相似系数来看, 12 m 水层内部 DNA 和 RNA 差异最大 (Coefficient value, CV=0.54), 其次为 1 m 水层 (CV=0.58), 而 5 m 水层 DNA 和 RNA 间 AAPB 类群分布最为接近, CV 值达到 0.83。DNA 结果反映的是 AAPB 群体中占优势的本底类群的多样性, 而 RNA 反映的是本底类群中那些占优势地位、参与生态系统能流运转最活跃的类群。表层水体 DNA 和 RNA 多样性间的显著差别有可能是因为表层水体更容易受到风、光强、UV 等环境参数变化的影响, 能适应这一变化的 AAPB 类群就能占据优势地位。而在底层水体中, 我们采样时发现颗粒物较多, 水体颜色偏暗, 表明其更多受到表层沉积物搅动的干扰; 同时, 底层水光线较弱, 同表层一样, 均不是 AAPB 最佳的生长环境, 使得 DNA 和 RNA 反映出的多样性呈显著差异。中层水体既能避开强 UV 辐射的影响, 也不受到底层沉积物的干扰, 环境条件稳定, 而优势类群均能活跃地表达 *pufM*, 参与到微食物链的循环中, 从而使 DNA 和 RNA 占优势的类群更类似。

我们同时比较了各水层间的相关系数。在 DNA 水平上, 5 m 和 12 m 较为接近(CV=0.79), 1 m 和 5 m 也较为接近(CV=0.71), 而 1 m 和 12 m 差异较大(CV=0.58)。在 RNA 水平上, 各水层间的相关系数和 DNA 完全结果一致, 5 m 和 12 m 最为接近(CV=0.75), 其次为 1 m 和 5 m (0.71), 而 1 m 和 12 m 差异较大(0.62)。各水层间 DNA 和 RNA 比较的结果与水体的物化性质相吻合, 表层和底层水体交换非常有限, 而 1 m 层和 5 m 层、5 m 层和 12 m 层都可以进行水体的交换, 使得两者间 AAPB 多样性分布有更多的重叠。同时也表明 AAPB 的多样性分布呈现出分层的模式, 各水层均存在着相适应的 AAPB 物种。

运用荧光定量 PCR 对湖光岩中各水层中所含有的 *pufM* 基因与 16S rRNA 基因进行相对定量分析。由于 16S rRNA 与 *pufM* 的拷贝数不同, 对分析数据进行了校正。结果表明, 3 个水层中 AAPB 在总细菌中的丰度差异十分明显。5 m 水层中 AAPB 在总细菌中的相对含量最低, 1 m 水层最高。通过实时定量 PCR 得到的 AAPB 丰度只是理论值。虽然这些 AAPB 都含有光合基因, 但是可能它们的光合基因只是在特定的环境条件下才表达, 所以定量 PCR 方法得到的 AAPB 丰度包括了具有 *puf* 基因但是不具备生理活性的那部分 AAPB^[29]。我们的数据显示表层水体 AAPB 比重可高达 38.06%, 这表明利用光能获得 ATP 很可能是水生生态系统中细菌类群常用的一种生态策略。我们正在进行的平板法分离 AAPB 的工作也证实了这一现象, AAPB 在普通异养培养基上很容易获得, 并且在总菌落数中有很高的比重。

各水层间 AAPB 丰度和多样性都有较大差异, 这一现象我们尝试从水体的混合角度进行了探讨。根据湛江 6 月的天气风云录可知, 从 1 日到采样当天湛江处于微风, 无持续风向。即风对水体的扰动作用不明显, 各水层的对流速度缓

慢, 对 AAPB 在各水层的分布影响不大。5 m 水层所占 OTU 个数不及 1 m 水层的 OTU 个数。这和 Zeng 等^[30]研究开放海域表层和弱光层 AAPB 多样性的结果一致, AAPB 在弱光层上的群体在表层都有发现, 但多样性不及表层且优势菌群突出。12 m 水层所占 OTU 个数最多, *pufM* 基因多样性丰富。可能是湖光岩 6.7 m 以下基本不透光, 且温度骤降, 温差较大, 部分细菌通过进化来适应环境, 使得 AAPB 多样性增加。其次湖光岩属于贫营养型湖泊^[4], 是一个封闭式的深水湖泊, 其营养物质的循环基本上是生态系统的内部循环, 外源性营养物质只在雨季才有少量的补充。玛珥湖在夏秋季水柱分层, 在冬春季水柱混合, 在夏季一些营养物质随着颗粒物的沉降不断地从表水层向深水层转移, 这可能导致了 12 m 水层 AAPB 的多样性高于其他两个水层。

根据系统发育树将湖光岩中所含有的 AAPB 菌群大致划分了 7 个亚群, 其中 β -Proteobacteria like group II 中所含的 4 个 OTU: OTU21–24, 共包含 87 条序列占总克隆的 49.43%, 为湖光岩的优势菌群。这与淡水河流和淡水湖泊中的 AAPB 优势类群是 β -Proteobacteria 类^[31]的研究结果相一致。湖光岩中还存在着两个未知亚群。同源性分析结果显示, 湖光岩中的 *pufM* 基因和海域、咸水湖、富营养化湖泊甚至南北极的冰泉中的 *pufM* 基因核酸序列的同源性差异都不大, 并且多在第 3 位密码子有差异, 使得该基因在蛋白水平的差异更小。这也显示出 *pufM* 基因是光合操纵子中的一个相对保守的基因, 它们在完全不同的环境下经历了亿万年的演化, 依然有着很高的同源性。

综上所述, 玛珥湖存在着丰富而多样的 AAPB 类群, 并活跃地参与到整个生态系统的代谢活动中, 它们在淡水生态系统中扮演着和海洋生态中同样重要的角色。同时, 玛珥湖作为一个

原生态的淡水湖泊, 很有可能孕育着全新的 AAPB 物种。

参 考 文 献

- [1] Büchel G. Maars of the Westefel, 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] 纪建达, 吴灶和, 曾永辉, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 988-999.
- [7] Yurkov VV, Beatty JT. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 695-724.
- [8] Yurkov V, Csotonyi JT. New Light on Aerobic Anoxygenic Phototrophs. New York: Springer Science, 2009: 31-55.
- [9] Rathgeber C, Beatty JT, Yurkov V. Aerobic phototrophic bacteria: new evidence for the diversity, ecological importance and applied potential of this previously overlooked group[J]. Photosynthesis Research, 2004, 81(2): 113-128.
- [10] Kolber ZS, Van Dover CL, Niederman RA, et al. Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean[J]. Nature, 2000, 407(6801): 177-179.
- [11] Kolber ZS, Plumley FG, Lang AS, et al. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean[J]. Science, 2001, 292(5566): 2492-2495.
- [12] Masín M, Zdun A, Ston-Egiert J, et al. Seasonal changes and diversity of aerobic anoxygenic phototrophs in the Baltic Sea[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2006, 45(3): 247-254.
- [13] Cottrell MT, Mannino A, Kirchman DL. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 557-564.
- [14] Sieracki ME, Gilg IC, Thier EC, et al. Distribution of planktonic aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria in the northwest Atlantic[J]. Limnology and Oceanography, 2006, 51(1): 38-46.
- [15] Zhang Y, Jiao NZ. Dynamics of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the East China Sea[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 61(3): 459-469.
- [16] Waidner LA, Kirchman DL. Diversity and distribution of ecotypes of the aerobic anoxygenic phototrophy gene, *pufM*, in the Delaware estuary[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13): 4012-4021.
- [17] Lami R, Cottrell MT, Ras J, et al. High abundances of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in the South Pacific Ocean[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(13): 4198-4205.
- [18] Jiang HC, Dong HL, Yu BS, et al. Abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes on the Tibetan plateau[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 67(2): 268-278.
- [19] 何一平, 曾永辉, 袁博, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1138-1145.
- [20] Mašín M, Nedoma J, Pechar L, et al. Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in temperate freshwater systems[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(8): 1988-1996.
- [21] Salka I, Čuperová Z, Mašín M, et al. Rhodospirillum-related *pufM* gene cluster dominates the aerobic anoxygenic phototrophic communities in German freshwater lakes[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(11): 2865-2875.

- [22] Mingram J, Schettler G, Nowaczyk N, et al. The Huguang maar lake—a high-resolution record of palaeoenvironmental and palaeoclimatic changes over the last 78,000 years from South China[J]. *Quaternary International*, 2004, 122(1): 85–107.
- [23] Rodrigues JLM, Aiello MR, Urbance JW, et al. Use of both 16S rRNA and engineered functional genes with real-time PCR to quantify an engineered, PCB-degrading *Rhodococcus* in soil[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 51(2): 181–189.
- [24] 周琳, 张杰. 群落分析中的16S rRNA 及其基因 16S rDNA 优化扩增[J]. *微生物学报*, 2010, 50(1): 7–14.
- [25] Allgaier M, Uphoff H, Felske A, et al. Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5051–5059.
- [26] Moter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 41(2): 85–112.
- [27] Weinbauer MG, Fritz I, Wenderoth KDF, et al. Simultaneous extraction from bacterioplankton of total RNA and DNA suitable for quantitative structure and function analyses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1082–1087.
- [28] Koblížek M, Mašín M, Ras J, et al. Rapid growth rates of aerobic anoxygenic phototrophs in the ocean[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(10): 2401–2406.
- [29] 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[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2006.
- [30] Zeng YH, Shen W, Jiao NZ. Genetic diversity of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in open ocean surface waters and upper twilight zones[J]. *Marine Biology*, 2009, 156(3): 425–437.
- [31] Waidner LA, Kirchman DL. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake estuaries[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, 73(12): 3936–3944.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。