

太湖沉积物中的可培养细菌: I. 细菌多样性初步分析*

周丽华¹, 陈士超³, 邓志瑞², 陈沁², 郑乐平¹, 刘志学^{3**}

(1: 上海大学环境与化学工程学院, 上海 200444)

(2: 上海大学生命科学学院, 上海 200444)

(3: 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要: 采用牛肉膏培养基培养, 从不同深度的太湖沉积物中共分离得到 603 个菌落形态不同的菌株, 通过数值分析比较了 40 个形态表征性状, 以不加权平均连锁聚类(UPGMA)的方式进行族群归类, 在 0.75 水平上可分成 4 个聚类群和 51 个亚群. 从 51 个亚群中各随机选取一个菌株, 测定其 16SrDNA 部分序列(约 540bp)并据此进行分析, 表明这些菌株分别属于 Firmicutes、Actinobacteria、 γ -Proteobacteria 这三大类群, 与数据库中已知的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、迪茨菌属(*Dietzia*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌具有很高的相似性. 其中迪茨菌属在国内淡水湖泊沉积物中为首次报道.

关键词: 太湖; 沉积物; 可培养细菌; 数值分类; 多样性

Culturable bacteria in the sediment of Lake Taihu (I): primary analysis of bacterial diversity

ZHOU Lihua¹, CHEN Shichao³, DENG Zhirui², CHEN Qin², ZHENG Leping¹ & LIU Zhixue³

(1: School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, P.R.China)

(2: School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, P.R.China)

(3: School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, P.R.China)

Abstract: The sediment samples collected from the different sites of the Lake Taihu, 2006 were cultured on traditional nutrient medium. 603 bacteria strains were separated with 40 different morphological features, and were grouped into 4 clusters and 51 subclusters at the level of 0.75 with numerical classified based on the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) algorithm. Based on the partial sequences of 16SrDNA (540bp) analysis, the bacteria strains sample chosen from each subclusters randomly were ranked into Firmicutes, Actinobacteria and γ -Proteobacteria three groups, and closely related to *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Dietzia* and *Pseudomonas* genera. The *dietzia* genera was reported in the sediment of freshwater lake in China for the first time.

Keyword: Lake Taihu; sediment; culturable bacteria; numerical taxonomy; diversity

湖泊沉积物的环境效应是水环境研究的重点之一, 所关注的主要问题包括沉积物“源”、“汇”转换的时空变化^[1], 对污染物的吸附和沉积, 以及水-土界面的营养盐、污染物释放通量等^[2-3]. 除温度、pH 值、溶解氧(DO)、氧化还原电位(ORP)、水动力等物化因素之外^[1,4-5], 沉积物和上覆水体组成的二相结构界面间, 存在一个复杂的生物相^[6]. 微生物由于本身的特点, 在其中占有不可或缺的地位, 在湖泊的物质循环和水体自净化能力维持中具有非常重要的作用^[7-9]. 因此, 其种群结构及其生态功能、季节性变化特征与污染物迁移转化相关性等问题的阐明, 对于研究湖泊生态系统维持、修复和环境综合治理具有重要意义.

* 国家自然科学基金项目(40573063)资助. 2008-04-21 收稿; 2008-06-04 收修改稿. 周丽华, 女, 1983 年生, 硕士研究生;
E-mail: lily-zhou-1983@hotmail.com.

** 通讯作者; E-mail: liuzhixue@163.com.

近年来,国内外对湖泊沉积物中微生物多样性的研究主要包括两个层面:应用传统培养法不断发现可培养微生物^[10-11],进而描述其细胞和群体特性;应用免培养分析法展示其包括未培养微生物在内的更为广泛的核酸分子多样性^[12-13].

太湖是我国淡水湖泊中位于第三、长江三角洲最大的湖泊,在区域经济和社会发展中具有举足轻重的地位.近20年来,太湖的水质和生态条件迅速恶化,北部湖区蓝藻水华时常暴发,而且有逐年扩大的趋势,东部湖区则面临沼泽化的危险^[14].对于太湖水体和沉积物中微生物的研究越来越受到人们的重视,太湖中浮游细菌与浮游藻类季节变化的相关性、微生物在内源性污染物释放中的作用、沉积物中微生物多样性研究方法以及细菌随沉积物深度多样性变化等均有报道^[15-21].值得注意的是:太湖中浮游藻类季节变化可能是导致浮游细菌种群季节变化的主要原因^[16-17].此外,发现表层沉积物中磷化氢与无机磷细菌呈显著正相关,而与有机磷细菌则没有明显的相关性^[18].然而,对于太湖沉积物中细菌的种群结构多样性以及季节性变化与太湖水质和生态系统的关系尚不够明确.

本文采用传统培养法与16SrDNA部分序列分析相结合的方法,对太湖沉积物中的可培养细菌进行了分离和初步分析.旨在为研究这些细菌在不同取样点、不同深度和不同季节的分布规律奠定基础,为研究细菌分布与太湖水体各种环境因子变化的关系提供线索.同时也为培养法和非培养法的结合提供案例.

1 材料和方法

1.1 采样位置及样本处理

根据太湖沉积物的分布特征及污染状况^[14],选取梅梁湾西(31°24'25"N; 120°08'45"E)、贡湖湾(31°25'03"N; 120°20'50"E)和梁溪河(31°32'23"N; 120°13'08"E)3个采样点,分别于冬(2006年1月)、春(2006年4月)、夏(2006年7月)、秋(2006年10月)用SBR-1型便携式沉积物-界面水采样器对沉积物取样4次.采样柱以5mm厚度分层切割,顺序编号后分装入无菌离心管,置4℃冰箱保存备用.

1.2 实验方法

1.2.1 细菌的培养及分离纯化 准确称取沉积物样本0.02g,加入1ml无菌生理盐水中混匀作为原液.原液依次按照 10^{-1} 、 10^{-2} 浓度梯度进行倍比稀释,分别接种于含有1.5%琼脂粉的牛肉膏固体培养基上,37℃倒置培养48h,根据菌落特征^[22]进行初步分类.挑取形态不同的单菌落划线分离,反复3次获得菌落形态完全一致的纯株,制备甘油管-80℃冻存,同时接种于牛肉膏斜面培养基上4℃保存.

1.2.2 细菌显微镜形态观察 取纯化的细菌进行涂片,并进行革兰氏染色,在Leica DMA II显微镜下对细菌的菌体形态进行观察并拍照记录.

1.2.3 数值分类 参照文献^[22]进行细菌的表型特征描述,并将结果按表1进行编码后输入计算机,去除全同性状,然后用DPS软件采用不加权平均连锁聚类方式(UPGMA),得出树状图.

1.2.4 细菌16SrDNA分析 根据数值分类结果,从各亚群中随机选取1个菌株进行液体振荡培养,用DNA提取试剂盒(Axygen)提取细菌基因组总DNA为模板,利用细菌16SrDNA通用引物341f(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和907r(5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3')使用Eppendorf PCR仪进行PCR扩增.反应体系(50μl)中含有10×buffer 5μl,25mmol/L MgCl₂ 4μl,10mmol/L dNTP混合液1μl,20pmol/L引物各1μl,Tag聚合酶1μl,模板DNA 1μl.反应程序如下:94℃ 5min→(94℃ 1min,55℃ 45s,72℃ 1min)×30 cycles→72℃ 10min. PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,按照Axygen DNA凝胶回收试剂盒说明书回收目的条带,交上海英骏生物技术有限公司测序,测序长度540bp左右,包含细菌16SrDNA的V3至V6高变区^[17].

1.2.5 细菌系统进化分析 测定的序列用BLAST在GenBank数据库中对所测序列进行相似性搜索,获取相关菌株的16SrDNA序列作为参照.用Clustal X程序^[23]按照最大同源性原则进行比对排序.采用MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件包根据Kimura两参数法^[24]计算进化距离,用Neighbor-Joining法^[25]构建系统进化树,自展数(bootstrap)为100.

1.2.6 细菌多样性分析 定义当16SrDNA序列相似性小于97%时视为不同的分类单元^[26],按照下式计算样

表 1 细菌聚类分析特征
Tab.1 The clustering analytical characteristic table of bacteria

| 序号 | 性状项 | 描述—编码 |
|----|------------|--|
| 1 | 形状 | 杆状—0; 圆形—1; 弧形—2; 卵圆形—3; |
| 2 | 长轴 | 直—0; 弯曲—1; |
| 3 | 长 | 数值 单位: μm |
| 4 | 宽 | 数值 单位: μm |
| 5 | 长宽比 | 数值 |
| 6 | 侧面 | 平行—0; 膨胀—1; 凹陷—2; |
| 7 | 两端 | 圆形—0; 平直—1; 尖—2; |
| 8 | 排列 | 单个—0; 成对—1; 链状—2; 单球状—3; 双球状—4; 链球状—5; 四联球状—6; 八叠球状—7; 葡萄球状—8; |
| 9 | 孢子有无 | 有—0; 无—1; |
| 10 | 孢子形状 | 椭圆形—0; 圆形—1; 卵圆形—2; |
| 11 | 孢子位置 | 中生—0; 端生—1; |
| 12 | 孢子是否引起细胞膨大 | 膨大—0; 不膨大—1; |
| 13 | 革兰氏染色 | 阳性—0; 弱阳性—1; 阴性—2; 弱阴性—3; |
| 14 | 染色效果 | 均匀—0; 不规则—1; 单极—2; 两极—3; 珠状—4; 条纹状—5; |
| 15 | 大小 | 数值 单位: mm |
| 16 | 形状 | 圆形—0; 椭圆形—1, 不规则—2; 丝状—3; 根状—4; |
| 17 | 边缘 | 完整—0; 波状—1; 裂片状—2; 钝齿状—3; 锯齿状—4; 纤毛状—5; 卷曲—6; 流体—7; 弥散—8; |
| 18 | 中央表面 | 光滑—0; 波状—1; 麻脸—2; 粗糙—3; 细的颗粒—4; 中等的颗粒—5; 粗的颗粒—6; 环状—7; 条纹状—8; 乳突状—9; |
| 19 | 边缘表面 | 光滑—0; 波状—1; 麻脸—2; 粗糙—3; 细的颗粒—4; 中等的颗粒—5; 粗的颗粒—6; 环状—7; 条纹状—8; 乳突状—9; |
| 20 | 中央隆起 | 扁平—0; 弥散状—1; 隆起—2; 凸透镜状—3; 垫状—4; 脐突状—5; 凹陷—6; |
| 21 | 边缘隆起 | 扁平—0; 弥散状—1; 隆起—2; 凸透镜状—3; 垫状—4; 脐突状—5; 凹陷—6; |
| 22 | 质地 | 均匀的—0; 无定形—1; 细的颗粒—2; 中等的颗粒—3; 粗的颗粒—4; 丝状的—5; 卷曲的—6; |
| 23 | 颜色均一 | 是—0, 否—1 |
| 24 | 中央颜色 | 无色—0; 白色—1; 乳白色—2; 黄色—3; 乳黄色—4; 桔黄色—5; 红色—6; 桔红色—7; 紫红色—8; 褐色—9; 灰色—10; 绿色—11; |
| 25 | 边缘颜色 | 无色—0; 白色—1; 乳白色—2; 黄色—3; 乳黄色—4; 桔黄色—5; 红色—6; 桔红色—7; 紫红色—8; 褐色—9; 灰色—10; 绿色—11; |
| 26 | 透明度 | 透明—0; 半透明—1; 不透明—2; |
| 27 | 密度 | 奶油状—0; 胶质—1; 脆的—2; 粘质—3; 膜状—4; 水渍状—5; 基内生长—6; |
| 28 | 乳化性 | 易—0; 难—1; |
| 29 | 生长程度 | 不生长—0; 弱生长—1; 中度生长—2; 丰富生长—3; |
| 30 | 浊度 | 不浑浊—0; 轻度浑浊—1; 中度浑浊—2; 高度浑浊—3; |
| 31 | 质地 | 匀质—0; 颗粒状—1; 絮状—2; |
| 32 | 沉淀有无 | 有—0; 无—1; |
| 33 | 沉淀量 | 轻度—0; 中度—1; 大量—2; |
| 34 | 沉淀质地 | 粉状—0; 颗粒—1; 絮状—2; 膜状—3; 胶质—4; |
| 35 | 沉淀振荡分散 | 完全分散—0; 不完全分散—1; |
| 36 | 表面生长 | 有—0; 无—1; |
| 37 | 表面生长形式 | 绕试管壁环状生长—0; 表面形成膜—1; |
| 38 | 表面生长状况 | 光滑—0; 有颗粒—1; 粗糙—2; |
| 39 | 表面振荡分散 | 完全分散—0; 不完全分散—1; |
| 40 | 气味 | 有—0; 无—1 |

本的Shannon-Wiener's多样性指数 H (以下简称Shannon多样性指数)^[27]:

$$H = -\sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i$$

式中, S 为分类单元数目, P_i 为属于分类单元 i 的个体在全部个体中的比例.

2 结果与分析

2.1 可培养细菌数目

太湖3个采样点的12根沉积物采样柱共分为591个分层样本, 从中培养、分离得到了不同表型特征的细菌603株. 图1展示部分细菌单菌落.

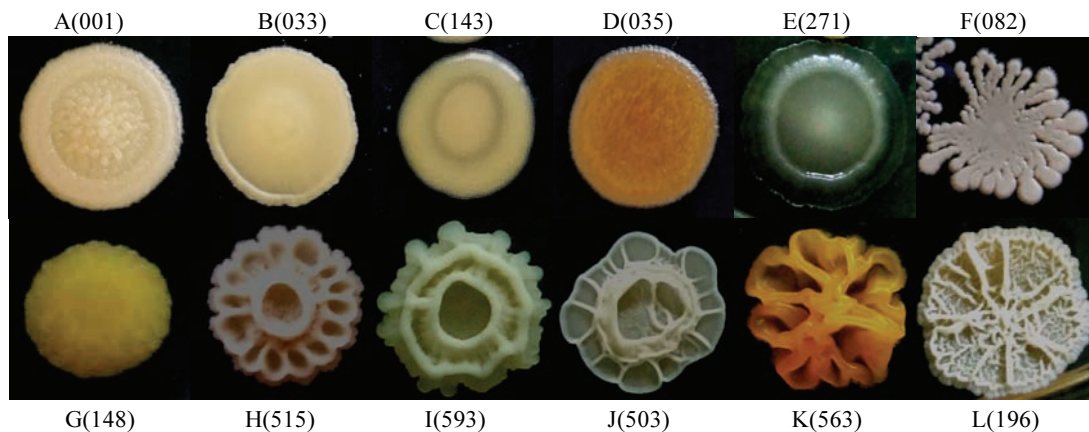


图1 培养48h的部分菌落实体显微镜照片(显示菌落的形态差异, 未显示菌落大小; 括号中为菌株号)

Fig.1 Picture of some colonies in the sediment of Lake Taihu

2.2 数值分类结果与分析

根据个体形态特征和培养特征对603株细菌进行数值分类的结果见图2. 在0.75水平分成4个聚类群, 在0.60水平上分为51个亚群. 其中, 聚类群THA包括300株菌, 占分离菌株总数的49.8%, 菌落形态差异较大, 菌体多为杆状、单个排列、革兰氏阳性. 此聚类群可分为19个亚群, 其中THA1、THA2、THA4和THA15亚群所包含的菌株数均大于30, 是该聚类群的优势亚群; 聚类群THB共包括155株菌, 占分离菌株总数的25.7%, 该聚类群由14个亚群组成, 其中THB6和THB8亚群为优势群, 占该聚类群菌株数的58%. 该类群形态表征差异较大, THB6亚群菌落多为圆形、隆起、灰白色. 菌体多为链状排列, 能产生引起细胞膨大的椭圆形芽孢, 革兰氏阳性; THB8亚群菌落多为扁平灰白色, 边缘波状或锯齿状, 表面褶皱并且很不透明. 细胞多为杆状、单个排列、长宽比较大, 革兰氏弱阴性. 聚类群THC包括147株菌, 菌落形态多变, 以球菌和短杆菌为主, 成对排列、革兰氏阳性. 占分离菌株总数的24.4%, 可分为17个亚群, 其中THC1亚群的菌株数占该聚类群菌数的44.9%; 聚类群THD仅包括THXJ-148号菌株一株菌, 在牛肉膏培养基上菌落为黄色、圆形、隆起(图1G), 其细胞特征为革兰氏阳性, 球状细胞, 比其它菌大2-4倍, 多聚生长, 可明显区别于其它菌株.

2.3 系统发育分析

依据16SrDNA序列, 用NJ法构建系统发育树(图3)的结果表明, 测序的51株细菌分属厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和γ-变形菌纲(γ-Proteobacteria)三大类群, 分别与数据库中已知的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、迪茨菌属(*Dietzia*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等属中细菌的16SrDNA具有较高相似性. 其中, 属于Firmicutes类群的为44株, 大多数在系统学上与*Bacillus*属关系密切(97%-100%), 2株与*Paenibacillus*属关系密切(99%); Actinobacteria类群包括6株细菌, 其中, 2株与*Micrococcus*属关系密切(99%和100%), 2株与

Dietzia属相似(99.8%), 2株与*Artribacter*属相似(99%和100%). γ -Proteobacteria类群仅发现1株(THXJ-092), 与*Pseudomonas*属相似性为99%.

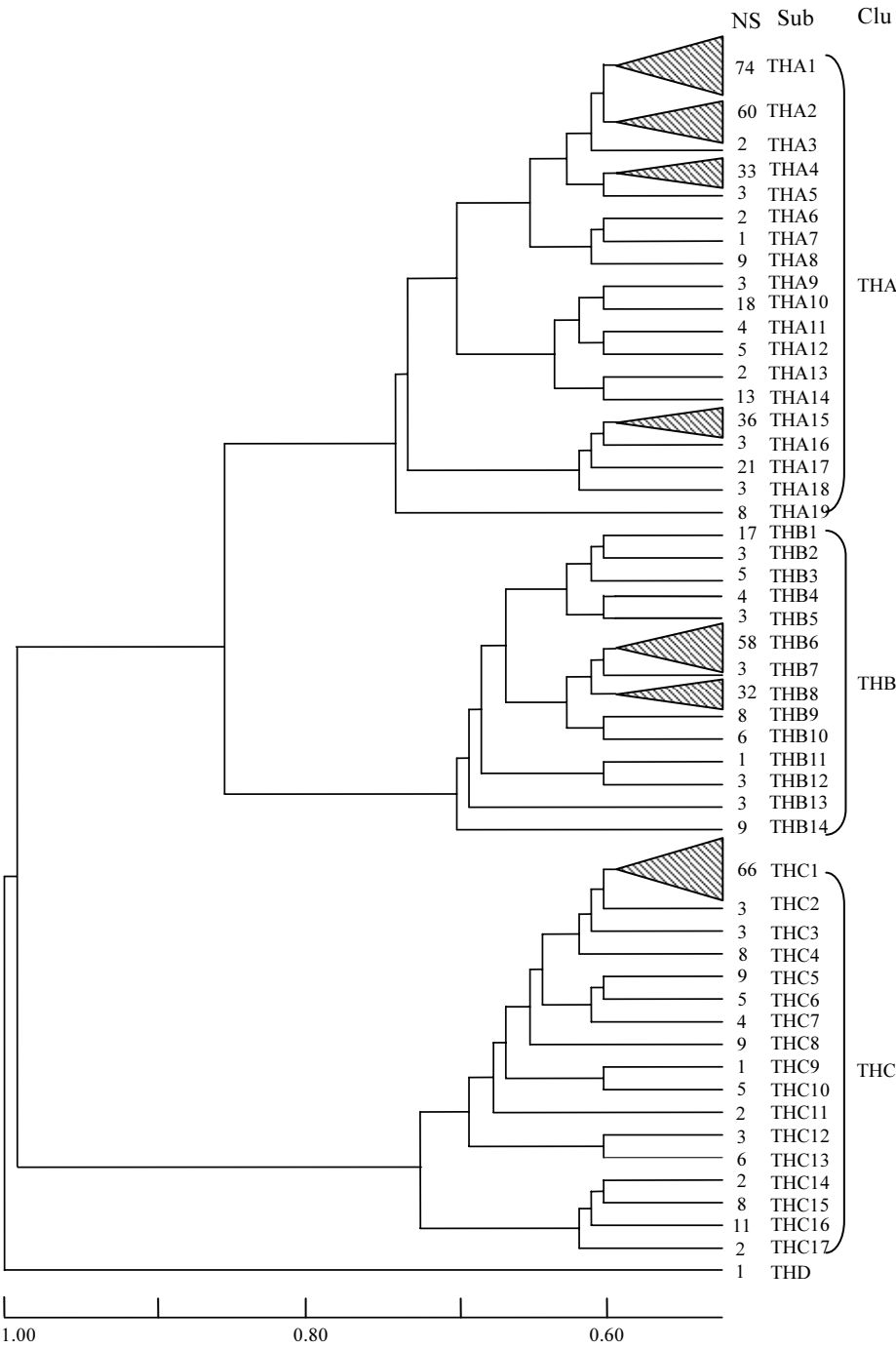


图2 数值分类聚类图
Fig.2 Dendrogram of numerical taxonomy
(NS=Number of Strains, Sub=Subcluster, Cl=Cluster)

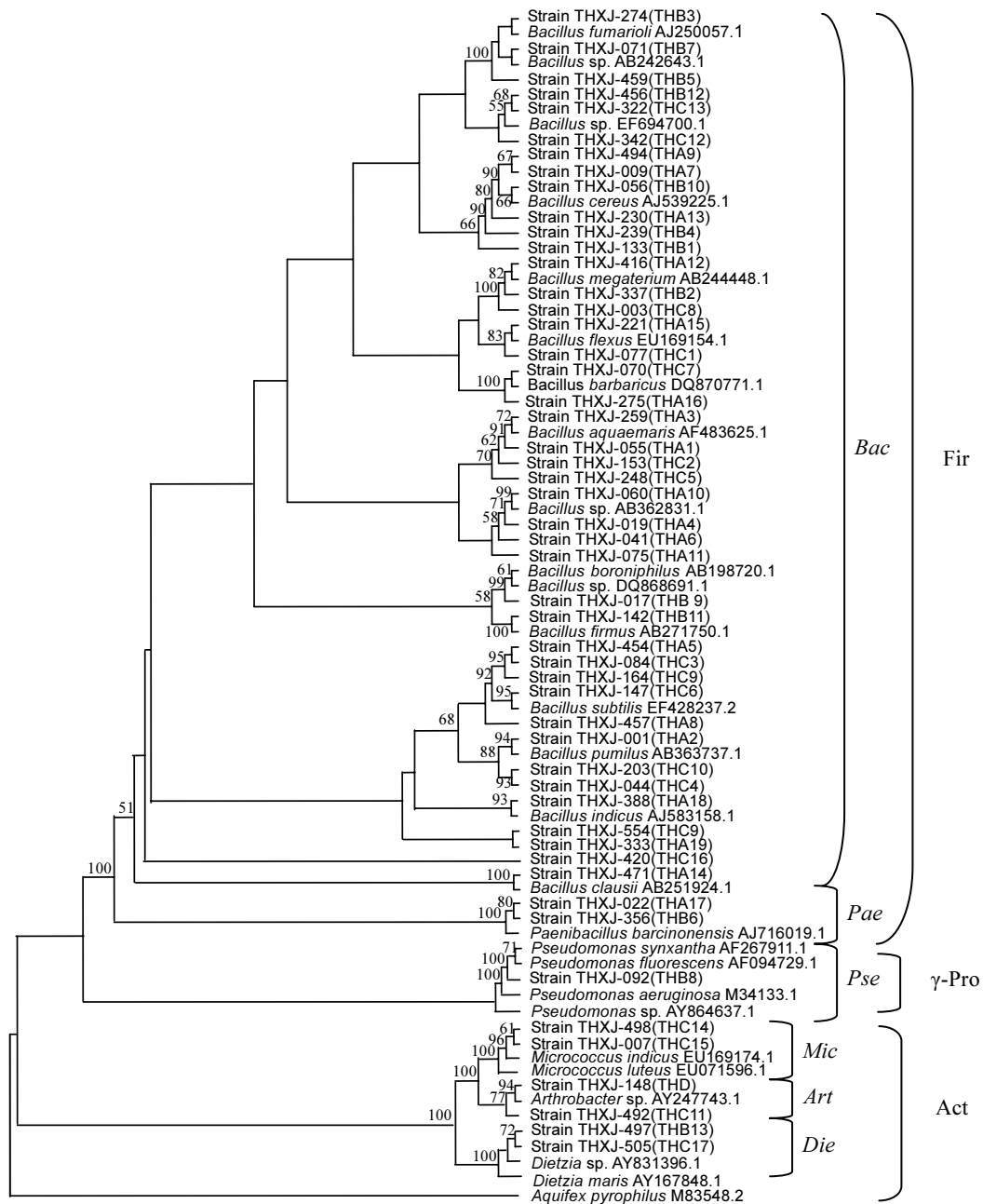


图3 基于51个菌株的16SrDNA序列构建的系统发育树(自展值标注在各分支上, 各分类群名称后的括号中标注该菌株所属的亚群编号)

Fig.3 Phylogenetic tree for fifty-one strains based on partial 16S rDNA gene sequences

The number above each branch is the bootstrap value (Fir= Firmicutes;

γ-Pro=γ-Proteobacteria; Act= Actinobacteria; Bac =*Bacillus*; Pae = *Paenibacillus*;

Pse = *Pseudomonas*; Mic = *Micrococcus*; Art = *Arthrobacter*; Die = *Dietzia*)

3 讨论

湖泊沉积物中细菌的代谢能力远高于水体中的浮游细菌^[28], 而代谢能力的高低取决于细菌的多样性构成。毫无疑问, 免培养分析已成为现代微生物多样性研究不可缺少的方法。然而, 可培养微生物约占环境样品中微生物总量的0.001%–15%, 沉积物中则只占0.25%^[11], 所以, 免培养法鉴定出的相当一部分是未培养的微生物种属, 有许多细菌只知其基因序列^[29], 而对其形态、生理生化、分类学地位及其应用或防治等诸多问题的深入研究, 还有赖于得到纯化的培养物。Amann^[30]和Pace^[31]等认为: 只要投入足够的时间和努力, 就没有培养不了的微生物, 建议加强纯培养研究, 以期更全面了解微生物的多样性和更好地利用这些自然资源^[32-33]。本研究采用培养法从太湖沉积物中共分离得到表征不同的细菌603株, 远高于戴欣等^[20]所报道的可培养细菌株数(164株), 具有更为丰富的形态多样性。但本研究得到的Shannon多样性指数为4.11, 略低于戴欣等的报道(普通培养基上4.29, 稀释培养基上4.36, 总和4.66); 本研究表明*Bacillus*属细菌为太湖沉积物中的优势菌群, 与戴欣和赵兴青等的报道一致, 但其占可培养细菌的比例更高, 占测序菌株的82%; 而在戴欣等的报道中另一优势菌群*Pseudomonas*属在本研究中仅发现一株。此外, α -Proteobacteria和 β -Proteobacteria这两个类群通常被认为是湖泊沉积物中可培养细菌的优势类群^[11,20,34], 尤其是 β -Proteobacteria类群菌被认为是富营养化湖泊沉积物中的重要组成菌^[13], 而在本研究中并未发现。造成这种差异的原因可能有: 1) 取样点不同。赵兴青等^[12,21]发现在太湖不同采样点和深度的沉积物中, 微生物群落结构多样性差异性较大, 可能是由沉积物理化性质差异引起的。上述差异也反映了太湖不同区域细菌分布的差异性; 2) 16SrDNA序列测定的菌株数较少。本研究仅依据形态学特征划分, 测定了51个代表性样本。由于所选菌株的随机性, 可能导致不同种类的部分细菌未被检测, 进一步增加测序量可能鉴定出更多的种类。

在本研究中, 依据16SrDNA序列的聚类结果与依据细菌形态的数值分类结果不完全一致, 如THXJ-148按照数值分类为一个单独的聚类群(THD), 但在依据16SrDNA序列的聚类结果中则与THC中的THXJ-492表现出较高的同源性。造成这种不一致的原因有: 数值分类法作为一种根据生物表型特征相似性的分类方法, 其聚类结构所表示的是一种表型关系, 并不能直接反映生物的系统发育关系; 此外, 在获取数值分类性状时, 很大程度上取决于观察者的主观判断, 会影响到分析结果; 最重要的是, 依据表型特征进行的数值分类能够体现出细菌的形态多样性, 可描述的细菌的表型性状越多、描述的信息越丰富, 得到的聚类结果就越可靠。在本研究中发现: 细菌的菌落形态具有非常丰富的多样性, 可能具有较强的种属特征, 而且随培养时间的不同具有一个动态的变化过程, 较难按照传统方法^[22]进行描述。在菌落形态描述中尤其如此。如图1G–1L, 菌落形态的表面变化极其丰富, 描述相当困难。说明现行的细菌表型分类指标需要进一步细化, 如: 将菌落边缘和中央的特性分别进行表述, 对于菌落表面的隆起或皱褶进行更为科学、详尽的描述, 可能还需要增加培养时间的尺度指标。

Actinobacteria类群在湖泊生态系统中普遍存在^[35-36], 其中, 微球菌属和节杆菌属是土壤、沉积物中最常见的细菌种类, 在本研究中也得到了证实。而且还发现了两个菌株THXJ-497和THXJ-505, 属于Actinobacteria类群的*Dietzia*属, THXJ-497和THXJ-505与*Dietzia maris*的16SrDNA序列相似性均达到99.8%, 但是其菌落和菌体形态特征却存在明显区别。这是该属存在于国内淡水湖泊沉积物中的首例报道。*Dietzia*属是1995年由Rainey^[37]等人命名的新属, 目前已发表*Dietzia maris*等 6个种。*Dietzia maris*多分布在海洋沉积物^[38-39]、碱湖上覆水^[40]和盐矿沉积中^[41], 具有降解烷烃和产生表面活性剂的能力^[38], 是一种革兰氏阳性致病菌, 可以导致菌血症^[42]、融合性网状乳头瘤^[43]等疾病, 对所在流域人畜饮用水安全存在潜在威胁。在本研究中, THXJ-497和THXJ-505这两个菌株在梅梁湾西沉积物中均有发现, 但分布的深度不同。前者发现于0.5、4.5、8.5、13、13.5、14.5cm分层样本中, 而后者则发现于18、18.5、19、19.5、20、21.5、22.5、23、24.5、26cm分层样本中。此外, THXJ-497在贡湖湾(8.5cm)、THXJ-505在梁溪河(20.5、21、25.5、26.5、27cm)也有分布。秦伯强等认为: 太湖污染物主要来自北部的无锡市和常州市, 通过河道排入太湖北部的五里湖与梅梁湾^[14], 因此上述两地的水质较南部差, 可能与本研究中发现这两株菌在梅梁湾分布较多有关。这两株致病菌的存在和分布与太湖中有机污染物的关系如何, 是否会对下游城市的

生物安全构成潜在威胁, 这些问题都值得高度关注和进一步深入研究. 目前, 本实验室正在对THXJ-497和THXJ-505的致病性进行探索, 对解决上述问题提供有益的线索.

致谢: 感谢上海大学环境与化学工程学院的钱显文、施晓燕、王敏杰等对采样及分样的协助, 感谢蔡兆晴、钱悦、汪寅、倪小琼、余雯丽、李婵娟、孙乐芸等对微生物培养和分离所做的工作, 特此致谢.

4 参考文献

- [1] Istvanovics V. Seasonal variation of phosphorous release from the sediments of shallow lake. *Water Research*, 1988, **22**(12): 1473-1481.
- [2] Kim LH, Choi E, Stenstrom MK. Sediment characteristics, phosphorus types and phosphorus release rates between river and lake sediment. *Chemosphere*, 2003, **50**: 53-61.
- [3] Qin BQ, Zhu GW. The nutrient forms, cycling and exchange flux in the sediment and overlying water system in lakes from the middle and lower reaches of Yangtze River. *Science in China(Series D, Supplement I)*, 2006: 1-13.
- [4] Henning SJ, Frede OA. Importance of temperature, nitrate, and pH for phosphate release from aerobic sediments of four shallow, eutrophic lakes. *Limnology Oceanography*, 1992, **37**(3): 577-589.
- [5] 王晓蓉, 华兆哲, 徐 菱等. 环境条件变化对太湖沉积物 P 释放的影响. *环境化学*, 1996, (1): 15-19.
- [6] 金相灿, 王圣瑞, 姜 霞. 湖泊水-沉积物界面三相结构模式的初步研究. *环境科学研究*, 2004, **17**: 1-5.
- [7] 曾 巾, 杨柳燕, 肖 琳等. 湖泊氮素生物地球化学循环及微生物的作用. *湖泊科学*, 2007, **19**(4): 382-389.
- [8] Karrasch B, Parra O, Cid H *et al.* Effect of pulp and paper mill effluents on the microplankton and microbial self-purification capabilities of the Biobío River, Chile. *Sci Total Environ*, 2006, **359**(1-3): 194-208.
- [9] 孔繁翔, 高 光. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考. *生态学报*, 2005, **25**(3): 589-594.
- [10] Tong Y, Lin GF, Liu FP *et al.* Comparison of microbial community between two shallow freshwater lakes in middle Yangtze basin, East China. *Chemosphere*, 2005, **60**: 85-92.
- [11] Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S *et al.* Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(4): 2162-2169.
- [12] Zhao XQ, Yang LY, Yu ZY *et al.* Characterization of depth-related microbial communities in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rRNA fragments. *J Environ Sci*, 2008, **20**: 224-230.
- [13] Wobus A, Bleul C, Maassen S *et al.* Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, **46**: 331-347.
- [14] 秦伯强, 罗淑慈. 太湖生态环境演化及其原因分析. *第四纪研究*, 2004, **24**(5): 561-568.
- [15] 冯 胜, 高 光, 秦伯强等. 太湖北部湖区水体中浮游细菌的动态变化. *湖泊科学*, 2006, **18**(6): 636-642.
- [16] 刑 鹏, 孔繁翔, 高 光. 太湖浮游细菌种群基因多样性及其季节变化规律. *湖泊科学*, 2007, **19**(4): 373-381.
- [17] 刑 鹏, 孔繁翔, 曹焕生等. 太湖浮游细菌与春末浮游藻类群落结构演替的相关分析. *生态学报*, 2007, **27**(5): 1696-1702.
- [18] 奚万艳, 吴 鑫, 叶文瑾等. 太湖梅梁湾水域蓝藻水华前与水华末期细菌群落结构的变化. *应用与环境生物学报*, 2007, **13**(1): 97-103.
- [19] 王 强, 耿金菊, 金红梅等. 太湖沉积物中微生物和磷化氢的时空分布及关系. *中国环境科学*, 2006, **26**(3): 350-354.
- [20] 戴 欣, 王保军, 黄 燕等. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性. *微生物学报*, 2005, **45**(2): 161-165.
- [21] 赵兴青, 杨柳燕, 陈 灿. PCR-DGGE技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究. *生态学报*, 2006, **26**(11): 3610-3616.
- [22] 杨苏声. 细菌分类学. 北京: 中国农业出版社, 1997: 15-18.
- [23] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.* The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 4876-4882.
- [24] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide

- sequences. *J Mol Evol*, 1980, **16**: 111-120.
- [25] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406-425.
- [26] McCaig AE, Glover LA, Prosser JI. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 1721-1730.
- [27] Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, **43**: 1-11.
- [28] Haglund AL, Tornblom E, Bostrom B *et al.* Large differences in the fraction of active bacteria in plankton, sediments, and biofilm. *Microbial Ecology*, 2002, **43**: 232-241.
- [29] Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 4765-4774.
- [30] Amann RL, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143-169.
- [31] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, **276**: 734-740.
- [32] Stackebrand E, Tindall BJ. Appreciating microbial diversity: rediscovering the importance of isolation and characterization of microorganism. *Environ Microbiol*, 2000, **2**: 9-10.
- [33] Miteva VI, Sheridan PP, Brenneley JE. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(1): 202-213.
- [34] Spring S, Schulze R, Overmann J *et al.* Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**: 573-590.
- [35] Aijaz AW, Venkata PS, Jay S *et al.* Molecular analyses of microbial diversity associated with Lonar soda lake in India: An impact crater in a basalt area. *Res in Microbiol*, 2006, **157**: 928-937.
- [36] Kathleen G, Tom V, Nele V *et al.* Characterization of bacterial communities in four freshwater lake differing in nutrient load and food web structure. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, **53**(2): 205-220.
- [37] Rainey FA, Klatte S, Kroppenstedt RM *et al.* *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov. formerly *Rhodococcus maris*. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, **45**: 32-36.
- [38] Erin AG, William F, Paul RJ. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediment. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(10): 3272-3282.
- [39] 刘真, 邵宗泽. 南海深海沉积物烷烃降解菌的富集分离与多样性初步分析. *微生物学报*, 2007, **47**(5): 869-873.
- [40] Joshi AA, Kanekar PP, Kellar AS *et al.* Cultivable bacterial diversity of alkaline Lonar Lake, India. *Microb Ecol*, 2008, **55**(2): 163-172.
- [41] 陈义光, 李汇明, 李沁元等. 一平浪盐矿古老岩沉积中可培养细菌的系统发育多样性研究. *微生物学报*, 2007, **47**(4): 571-577.
- [42] Amparo BT, Carmen GG, Fernando CS *et al.* *Dietzia maris* Bacteremia: Use of molecular techniques for accurate identification of actinomycetes. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2007, **29**(19): 148-149.
- [43] Amanda LJ, Roland JK, Sivakumar N *et al.* *Dietzia papillomatosis* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from the skin of an immunocompetent patient with confluent and reticulated papillomatosis. *J Syst Evol Microbiol*, 2008, **58**: 67-72.