

## 巢湖西半湖北岸湖滨带蓝藻堆积处细菌多样性初步研究

宣淮翔<sup>1</sup>, 安树青<sup>2</sup>, 孙庆业<sup>1\*</sup>, 刘梅<sup>1</sup>

(1. 安徽大学资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230039;

2. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210093)

**摘要:** 采用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法, 研究了巢湖西半湖北岸湖滨带蓝藻堆积处不同深度层次的细菌多样性。利用直接法提取了蓝藻堆积处3个不同深度层次样品(A层0~2 cm、B层2~10 cm、C层10~20 cm)中的细菌总DNA, 并进一步构建各层细菌的16S rDNA克隆文库。结果表明, 蓝藻堆积处各层细菌的Margalef丰富度指数( $d_{Ma}$ )、Shannon-Wiener指数( $H$ )和Simpson指数( $D$ )均伴随深度的增加而减小。系统发育树分析显示, 各层的细菌优势类群主要归属于厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria); 且随深度层次的增加, 归属于变形菌门的细菌比例减少, 而归属于厚壁菌门的细菌比例增加; 在A层样品中存在少量归属于蓝藻门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、螺旋体门(Spirochaetes)类群的细菌; 在C层样品中也存在少量归属于拟杆菌门(Bacteroidetes)类群的细菌。研究结果在一定程度上揭示了蓝藻堆积腐烂过程中细菌多样性和种类组成的变化。

**关键词:** 蓝藻堆积处; 细菌多样性; 限制性片段长度多态性; 巢湖西半湖北岸湖滨带

**中图分类号:** Q 145<sup>+</sup>.2; Q 938.1

**文献标志码:** A

蓝藻水华作为世界范围内淡水富营养化的热点问题, 目前主要集中于研究水华的发生机制及危害控制, 而有关水华消失的过程, 人们了解得很少。事实上, 水华蓝藻堆积分解消亡的过程对环境有很重要的影响<sup>[1]</sup>。

巢湖是一个大型浅水型湖泊, 水体富营养化严重, 每年夏季水华蓝藻大量暴发。由于受主导风向影响, 广阔湖区生长繁殖的蓝藻被不断地输送并堆积到西半湖的湖滨带。蓝藻堆积腐烂分解过程中, 释放的有机质和营养元素, 可能会引起湖滨带水体中水生生物的资源竞争和群落演替, 从而使水体生态系统发生动态变化<sup>[2]</sup>。蓝藻腐烂后下沉还会增强底栖生物的消化能力, 引起水生生物食物网传递链的改变<sup>[3]</sup>。在细菌等微生物的作用下, 死亡藻细胞被降解并导致水体溶氧急剧下降, 使水生生物大量窒息死亡, 从而造成严重

的经济损失<sup>[4]</sup>。

以往针对环境中细菌组成的研究主要是通过纯培养的方法, 但是水体中的微生物只有0.1%~1.0%是可被培养的<sup>[5]</sup>, 故仅用纯培养手段并不能真实地反映微生物的群落结构及变迁。近年来, 大量基于分子生物学的技术应用到微生物群落结构的研究中。限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)目前已广泛应用于水生环境中细菌群落结构的研究<sup>[6]</sup>。

本实验基于细菌16S rDNA克隆文库的构建和限制性片段长度多态性分析, 通过对巢湖西半湖北岸湖滨带蓝藻堆积处不同垂直深度蓝藻腐烂物中的细菌群落结构进行研究, 揭示了水华蓝藻腐烂分解过程中细菌多样性及优势类群的变化, 不仅为水华蓝藻分解过程提供了微生物学信息, 同时也为蓝藻腐烂物中未知菌的微生物资源化利

收稿日期: 2011-05-17

修回日期: 2011-09-20

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究发展计划项目(2008CB418004)

通讯作者: 孙庆业, E-mail: sunqingye1964@yahoo.com.cn

用提供基础理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

于2009年8月在巢湖西半湖北岸湖滨带的蓝藻富集区,使用柱状采样器,在蓝藻堆积处采样区,随机选取6个采样点,分别采集20 cm柱形原状样品,立即在0~2 cm(A层)、2~10 cm(B层)、10~20 cm(C层)处采用无菌方法等体积采样,每层6点混匀后作为该层待测样品,冷藏带回实验室,于-20℃冰箱保存,进行分析。

### 1.2 蓝藻堆积处样品微生物总DNA提取

等量称取所采集的各层鲜重样品约0.5 g,分别放入2 mL EP管中,采用直接提取法提取蓝藻堆积处样品中微生物总DNA。具体操作步骤参照ZHOU等<sup>[7]</sup>的方法并做适当改进,改进之处在于细胞裂解过程中将环境样品于液氮和65℃水浴中反复冻融3次,之后加入纤维素酶、蜗牛酶、溶菌酶和蛋白酶K(终浓度分别为6、3、1和1 mg/mL),37℃酶解1 h。得到总DNA的粗提液,置于-20℃保存。用1%的琼脂糖凝胶电泳检查提取DNA模板的质量和片段大小。

### 1.3 细菌16S rDNA片段的PCR扩增

使用扩增细菌16S rDNA的通用引物27F和1492R,27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(E. coli bases 8 to 27),1492R:5'-CGGCTACCTTGTACGACTT-3'(E. coli bases 1 507 to 1 492)。细菌16S rDNA基因的PCR扩增反应体系为50 μL: ddH<sub>2</sub>O 37.5 μL,10×PCR Buffer(containing 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>)5 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,10 pmol/L的上、下游引物各2 μL,Taq酶(5 U/μL)0.5 μL,模板1~10 ng。扩增条件为94℃预变性3 min;94℃变性1 min,56℃退火40 s,72℃延伸1 min,30个循环;最后72℃延伸10 min。

### 1.4 克隆文库的构建

将扩增得到的16S rDNA片段先用Wizard plus SV Minipreps DNA凝胶纯化系统(Promega corporation, USA)进行纯化,然后用TA克隆试剂盒pEASY-T1-Vector(Transgen产品)构建克隆文库。目的DNA片段的浓度与T载体浓度之比为3:1,在25℃下连接10 min。

采用蓝白斑筛选的克隆方法,将连接了目的片段的T载体转入E. coli DH5α感受态细胞后,

涂到含有X-Gal和IPTG并混有100 μg/mL氨苄青霉素的LB固体平板上,37℃过夜培养,14~16 h后可见白色和少量蓝色菌落形成。用灭菌的牙签挑取白色有效菌落放入LB液体培养基中摇菌,取菌液作为模板DNA进行M13-47、M13-48 PCR扩增实验。引物序列为M13-47:5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', M13-48:5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'。PCR反应的程序:94℃3 min;94℃1 min,55℃30 s,72℃1 min,30个循环;72℃10 min。

### 1.5 RFLP分析

将基于M13引物的PCR产物用限制性内切酶Hha I消化(37℃3 h;80℃20 min)。酶切DNA片段用2.5%的琼脂糖凝胶电泳分离,经染色和凝胶成像系统拍照后,所得DNA带型图谱在GIS凝胶分析软件辅助下,进行人工比较分析。以基因片段多态图谱为基础进行聚类,聚合到一起的具有相同图谱的克隆需要用第2种限制性内切酶Rsa I进行消化(37℃3 h;80℃20 min)与电泳分离。当第二次所获得的基因图谱仍然相同时,则认为它们是相同的基因型。每一个基因型作为一个分类操作单位(operational taxonomic unit, OTU)或称为唯一基因型<sup>[8]</sup>。

### 1.6 序列测定及其分析

在RFLP初步分析的基础上,选择部分RFLP谱带出现2次以上的克隆及部分单一克隆交由生物工程(上海)有限公司进行基因测序。测序结果在RDP(ribosomal database project)数据库中Classification进行比对确定分类,然后将鉴定的序列在GenBank数据库中使用Blastn工具进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),选择与目的基因序列同源性最高的16S rDNA序列作为参照近缘序列。利用MEGA 4.0(<http://www.megasoftware.net>)软件,基于其中邻接(Neighbour-Joining, NJ)法,构建细菌系统进化树。系统进化树各分支的置信度经重抽样法(Bootstrap)1 000次重复检测<sup>[9]</sup>。

### 1.7 群落结构计算方法<sup>[10]</sup>

文库的库容(coverage, C)计算公式为

$$C = 1 - \frac{n}{N}$$

式中,N代表16S rDNA文库总克隆数,n代表在文库中仅出现一次的OTU的数量。

Shannon-Wiener 指数( $H$ )的计算公式为

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i, \quad P_i = \frac{n_i}{N}$$

Simpson 指数( $D$ )的计算公式为

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s P_i^2$$

Margalef 物种丰富度指数( $d_{Ma}$ )的计算公式为

$$d_{Ma} = \frac{S - 1}{\ln N}$$

式中, $S$ 为 16S rDNA 的 RFLP 总类型数, $n_i$ 为第  $i$  种 16S rDNA 的 RFLP 类型克隆数, $N$ 为总克隆数。

## 2 结果

### 2.1 蓝藻堆积处样品微生物基因组 DNA 的提取和细菌 16S rDNA 片段的扩增

本研究中采取直接提取法提取蓝藻堆积处各层细菌基因组 DNA,三层样品均提取获得 DNA,大小约为 23 kb(图 1),与细菌基因组的大小相近,能够满足后续分子生物学试验。

以样品基因组 DNA 作为模板,采用细菌通用引物 27F 和 1492R,对其 16S rDNA 全长进行 PCR 扩增。扩展长度约 1.5 kb(图 2),以该产物进行 16S rDNA 克隆文库的构建。

### 2.2 克隆文库中 16S rDNA 片段的 RFLP 分析

16S rDNA 是原核生物核糖体 16S rRNA 的编码基因。由于其在进化过程中的高度保守并具有种属特异性,现已成为菌种鉴定的一个基本指标。通过建立蓝藻堆积处各层微生物 16S rDNA

的克隆文库对微生物多样性进行分析。取菌液作为 DNA 模板,以 M13-47、M13-48 为引物对,进行插入目的片段的 PCR 扩增。采用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两种限制性内切酶消化插入的扩增产物,获得酶切指纹图谱(图 3)。

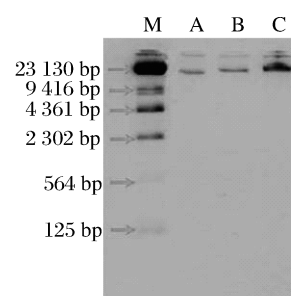


图 1 提取的蓝藻堆积处微生物基因组 DNA (M, $\lambda$ -*Hind* III marker)

Fig. 1 Total community DNA of microbial genome extracted from Cyanobacterial accumulation

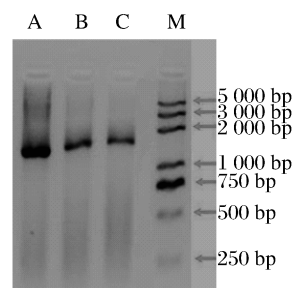


图 2 PCR 扩增的蓝藻堆积处细菌 16S rDNA (M,Marker D2000 Plus)

Fig. 2 16S rDNA of bacteria amplified from Cyanobacterial accumulation

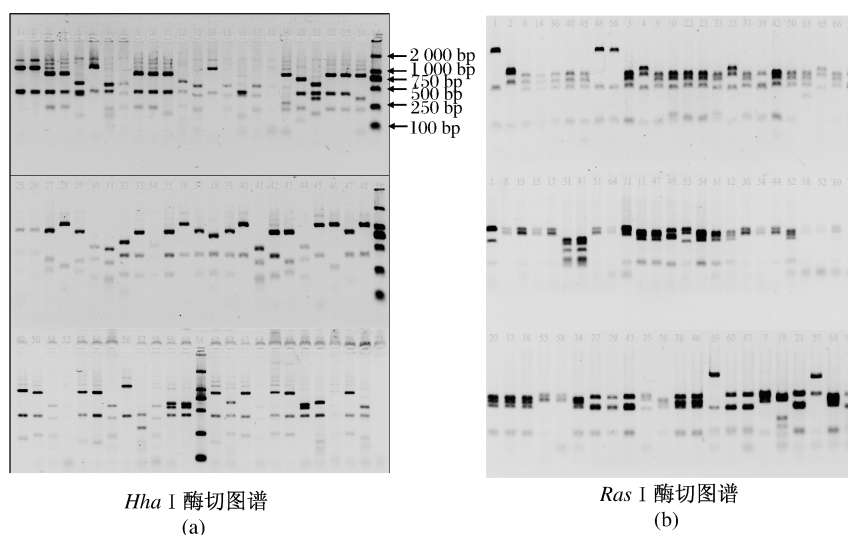


图 3 C 层部分克隆 16S rDNA PCR-RFLP 扩增产物酶切图谱

Fig. 3 16S rDNA PCR-RFLP fingerprints of part of layer C clone library digested by restriction enzymes

这两种酶皆为4碱基限制性内切酶,酶切位点特异性高。它们的酶切位点包括了GC和AT位点。在16S rDNA片段中酶切频率高,酶切片段丰富,在操纵分类单元OTU分类上精确有效<sup>[11]</sup>。

### 2.3 克隆文库的库容值

克隆文库的库容值表征样品中微生物种类的覆盖度,在蓝藻腐烂物各层均建立了120个克隆

的酶切指纹图谱,文库的库容值分别为80.8%、87.5%和89.2%(表1)。这表明库容值较大,文库的覆盖程度较高,文库具有较好的代表性,生物多样性信息丰富。通过表1可以看出,克隆文库的丰富度越高,库容值越小,说明该环境中可能存在更多的微生物种类。通过3层的多样性指数比较可以发现,伴随着层次深度的增加,多样性指数逐渐减少,即表明细菌的种类组成逐渐降低。

表1 16S rDNA克隆文库酶切类型的多样性

Tab. 1 Diversity of restriction endonuclease types in 16S rDNA clone library

层次 layers	OTUs 数量 number of OTUs	库容值/% Coverage (C)	Shannon 多样性指数 Shannon-Wiener index (H)	Simpson 指数 Simpson index (D)	Margalef 丰富度 Margalef richness ( $d_{Ma}$ )
A层 layer A	51	80.8	3.671	0.967	10.443
B层 layer B	32	87.5	2.832	0.902	6.475
C层 layer C	27	89.2	2.689	0.894	5.431

### 2.4 序列测定分析与系统发育树构建

通过分析酶切图谱,从各层代表性的OTU中随机挑取1个克隆子进行测序,每层测序克隆分别为51、32、27个,测定的16S rDNA插入片断长度约1500 bp。由表1可知A层的OUT分型最多,本研究将其测定的序列与其近缘种序列,利用MEGA 4.0软件包构建细菌系统进化树(图4)。从系统进化树中可以看出,A层文库代表的细菌类群在厚壁菌门、蓝藻门、放线菌门、浮霉菌门、螺旋体门以及变形菌门中皆有分布,具有丰富的多样性。其中在厚壁菌门中主要包含3个科,分别为梭菌科(Clostridiaceae)、丹毒丝菌科(Erysipelothrichaceae)和韦荣氏菌科(Veillonellaceae);而在变形菌门中主要 $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 $\beta$ -变形菌纲(Betaproteobacteria)和 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)3个纲。

各层测序结果在RDP(ribosomal database project)数据库中Classification进行比对分析发现,蓝藻堆积处各层的细菌优势类群均属于厚壁菌门和变形菌门;且随深度层次的增加,归属于变形菌门的细菌比例减少,而归属于厚壁菌门的细菌比例增加;在A层样品中存在少量归属于蓝藻门、放线菌门、浮霉菌门、螺旋体门类群的细菌;在C层样品中也存在少量归属于拟杆菌门类群的细菌(图5)。

由图5可以看出,各层归属于变形菌门的细菌类群细分在各纲的种类和数量存在较大差异。 $\gamma$ -变形菌纲仅在A存在; $\alpha$ -变形菌纲和 $\beta$ -变形菌纲在各层中均检测到,其中 $\alpha$ -变形菌纲的数量伴随着深度的增加而减小,而 $\beta$ -变形菌纲的数量随深度的增加先减小后增大。

## 3 讨论

本研究采用PCR-RFLP方法分析了巢湖西半湖北岸湖滨带蓝藻堆积处不同垂直深度蓝藻腐烂物的细菌多样性及群落结构组成。各层克隆文库的库容值较高,表明构建的克隆文库能够比较完整地反映湖滨带蓝藻堆积处细菌群落组成。酶切分析及克隆测序表明,蓝藻堆积处各层的细菌优势类群均属于厚壁菌门和变形菌门。此结果与蒋建林等<sup>[12]</sup>在研究沼气池厌氧活性污泥微生物群落多样性组成时所检测到的优势细菌类群相似。

厚壁菌门细菌在蓝藻堆积处大量存在,不难理解。因为它们广泛分布在各种厌氧环境中,如各种厌氧生物反应器中<sup>[13]</sup>,它们可以降解蛋白质、碳水化合物等许多复杂的有机大分子。变形菌门细菌在3个文库中都占了很大的比例,多样性高,在本研究中主要以 $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲细菌为优势菌群,这与蒋建林等<sup>[12]</sup>研究结果不同,他们检测到沼气池厌氧活性污泥中归

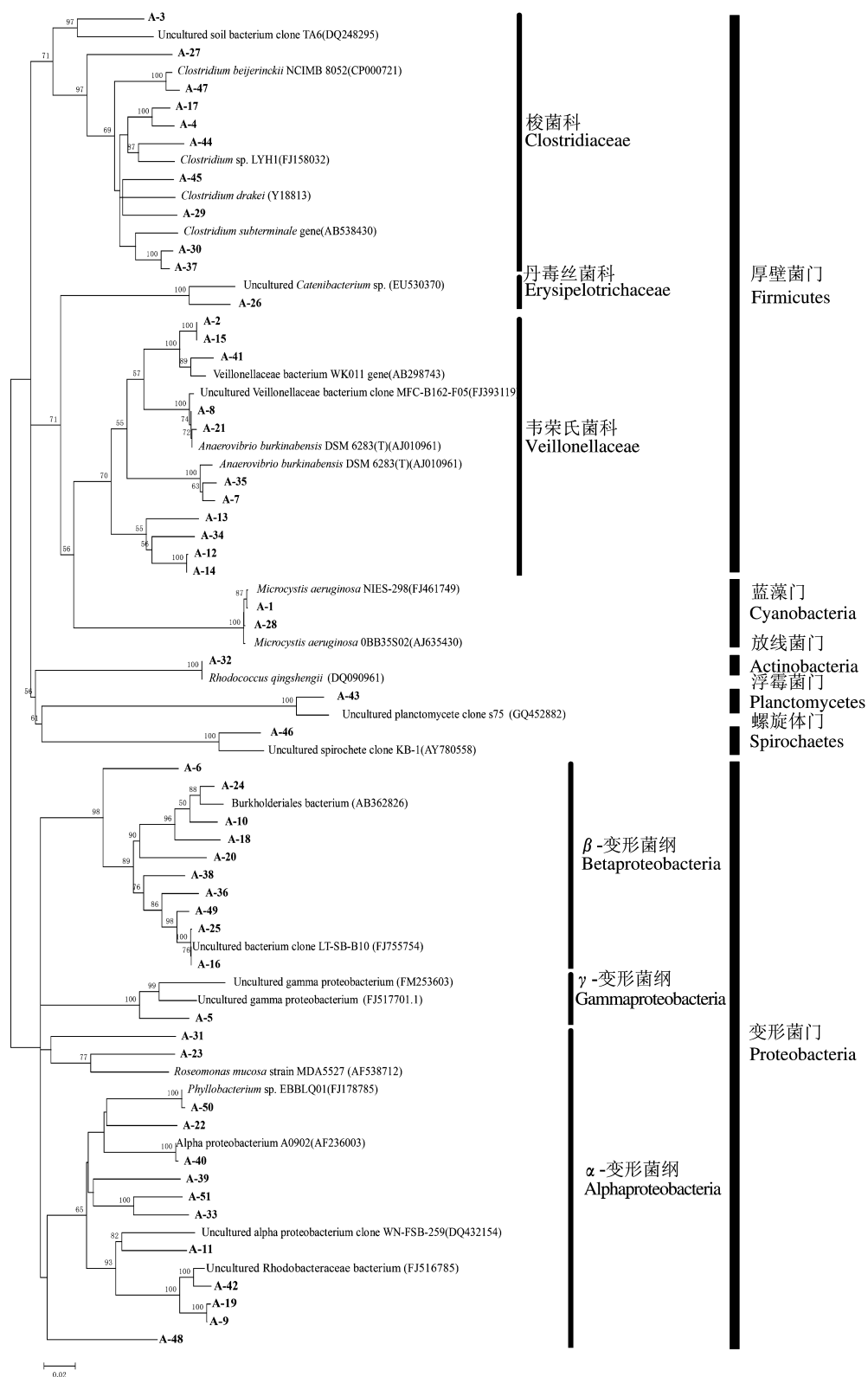


图 4 基于 A 层细菌克隆文库中部分 16S rDNA 序列构建的系统进化树

测序引物为 M13F、M13R

Fig. 4 Phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences retrieved from the clone library of layer A OTUs were sequenced with primer M13F and M13R

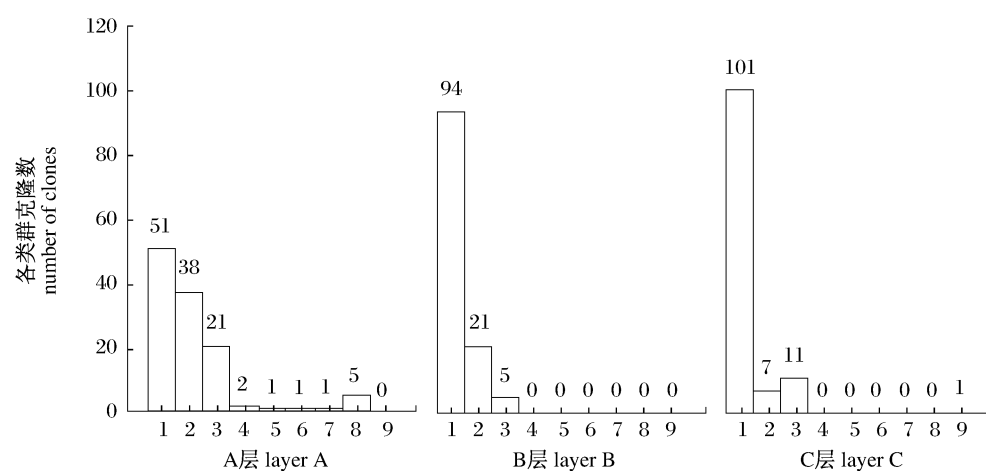


图5 蓝藻堆积处不同层次样品中微生物群落结构的分布情况

1. 厚壁菌门; 2.  $\alpha$ -变形菌纲; 3.  $\beta$ -变形菌纲; 4.  $\gamma$ -变形菌纲; 5. 放线菌门; 6. 浮霉菌门; 7. 螺旋体门; 8. 蓝藻门; 9. 拟杆菌门。

Fig. 5 Distribution of microbial community in different layers of Cyanobacterial accumulation

1. Firmicutes; 2. Alphaproteobacteria; 3. Betaproteobacteria; 4. Gammaproteobacteria; 5. Actinobacteria; 6. Planctomycetes; 7. Spirochaetes; 8. Cyanobacteria; 9. Bacteroidetes.

属于变形菌门的微生物主要以  $\delta$ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 为主。樊景凤等<sup>[14]</sup> 在研究北戴河近岸沉积物中微生物多样性时发现,其样品中绝大部分 16S rDNA 序列属变形菌门类群,并且以  $\gamma$ -变形菌纲细菌占优势。而在本研究中,仅在 A 层检测到少量  $\gamma$ -变形菌纲类群存在。有研究表明, $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲细菌在冰川、富营养化湖泊、河口和水库等处均有发现;而  $\gamma$ -变形菌纲细菌多出现于沉积物中<sup>[15]</sup>,如戴欣等<sup>[16]</sup> 对太湖沉积物中可培养细菌的研究显示, $\gamma$ -变形菌纲细菌为普通培养基中分离获得的最优势细菌。

此外,在 A 层中检测到的放线菌门细菌,它们常见于土壤中,然而,此门中也包括了许多不同水生环境中不可培养细菌,此类细菌能广泛利用有机物降解的有机酸<sup>[17]</sup>。有研究称它可能是淡水浮游细菌中最丰富的种群之一<sup>[18]</sup>,在太湖沉积物中发现大量属于此门的可培养细菌<sup>[15]</sup>。使用通用引物构建的 16S rRNA 克隆文库中它们的数量或多样性会被低估<sup>[19]</sup>。因此,虽然 A 层文库中检测到属于该门的克隆子很少,但实际上有可能很多。拟杆菌门类群只在最深的 C 层发现了一个克隆 C-9,归属于 *Cytophagaceae* 属。JASPERS 等<sup>[20]</sup> 对富营养化湖泊的研究发现, *Cytophaga-Flavobacterium* 组的多样性在浮游植物增殖前后的快速转变是十分显著的。有研究表明,一种可

以裂解蓝藻细胞的 *Cytophaga* sp. 丰度与水华发生发展具有紧密关联<sup>[21]</sup>。因此拟杆菌门细菌可能和富营养化存在着某种潜在关系。此外,蓝藻门、浮霉菌门、螺旋体门等相关的序列只在 A 层有发现且所占比例较小,这可能与其对环境的选择有关,在国外富营养化水体中,浮霉菌门细菌占有一定比例<sup>[22]</sup>。

本研究利用 PCR-RFLP 指纹图谱、克隆文库和测序等方法,比较全面、准确地了解了与湖滨带堆积蓝藻腐烂分解相关的细菌群落结构。通过研究表明,蓝藻堆积处细菌的群落结构较复杂,多样性较高。在此基础上,我们还将进一步对其中古细菌、真菌等进行分析,进而为了解水华蓝藻腐烂分解过程提供微生物学信息,同时也为蓝藻腐烂物中未知菌的微生物资源化利用提供基础理论依据。

#### 参考文献:

- [1] AGUSTI S, ALOU E V A, HOYER M V, et al. Cell death in lake phytoplankton communities [J]. *Freshwater Biology*, 2006, 51(8): 1496-1506.
- [2] LLABRES M, AGUSTI S. Picophytoplankton cell death induced by UV radiation: Evidence for oceanic Atlantic communities [J]. *Limnology and Oceanography*, 2006, 51(1): 21-29.
- [3] STEAD R A, THOMPSON R J. The effect of the sinking spring diatom bloom on digestive processes

- of the cold-water Protobranch *Yoldia hyperborea* [J]. *Limnology and Oceanography*, 2003, 48 ( 1 ): 157 - 167.
- [ 4 ] SKEI J, LARSSON P, ROSENBER G R, *et al.* Eutrophication and contaminants in aquatic ecosystems [J]. *Ambio*, 2000, 29(4): 184 - 194.
- [ 5 ] AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiological Reviews*, 1995(1), 59: 143 - 169.
- [ 6 ] WHITBY C, EARL J, LANYON C, *et al.* The molecular diversity of the methanogenic community in a hypereutrophic freshwater lake determined by a PCR-RFLP [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97: 973 - 984.
- [ 7 ] ZHOU J Z, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 316 - 322.
- [ 8 ] 夏北成, ZHOU J, TIEDJE J M. 土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征 [J]. *生态学报*, 2001, 21 (4): 574 - 578.
- [ 9 ] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, 39: 783 - 791.
- [ 10 ] HILL T C J, WALSH K A, HARRIS J A, MOFFETT B F. Using ecological diversity measures with bacterial communities [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(1): 1 - 11.
- [ 11 ] MOYER C L, TIEDJE J M, DOBBS F C. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(7): 2501 - 2507.
- [ 12 ] 蒋建林, 周权能, 车志群, 等. PCR-RFLP 技术分析沼气池厌氧活性污泥细菌的多样性 [J]. *广西农业生物科学*, 2008, 27(4): 372 - 377.
- [ 13 ] CHOUARI R, PASLIER D L, DAEGELEN P, *et al.* Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7 (8): 1104 - 1115.
- [ 14 ] 樊景凤, 张兰, 陈吉平, 等. 北戴河近岸沉积物中微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析 [J]. *海洋环境科学*, 2008, 27(5): 409 - 413.
- [ 15 ] WOBUS A, BLEUL C, MAASSEN S, *et al.* Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46 ( 3 ): 331 - 347.
- [ 16 ] 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 [J]. *微生物学报*, 2005, 45(2): 161 - 165.
- [ 17 ] VON WINTZINGERODE F, GOBEL U B, SIDDIQUI R A, *et al.* *Salana multivorans* gen. nov. , sp. nov. , a novel actinobacterium isolated from an anaerobic bioreactor and capable of selenate reduction [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51 ( 5 ): 1653 - 1661.
- [ 18 ] SEKAR R, PERNTHALER A, PERNTHALER J, WARNECKE F, POSCH T. An improved protocol for the quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 ( 5 ): 2928 - 2935.
- [ 19 ] WARNECKE F, AMANN R, PERNTHALER J. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(3): 243 - 253.
- [ 20 ] JASPERS E, NAUHAUS K, CYPIONKA H, *et al.* Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36: 153 - 164.
- [ 21 ] RASHIDAN K K, BIRD D F. Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom [J]. *Microbial Ecology*, 2001, 41(2): 97 - 105.
- [ 22 ] TRUSOVA M Y, GLADYSHEV M I. Phylogenetic diversity of winter bacterioplankton of eutrophic Siberian reservoirs as revealed by 16S rRNA gene sequence [J]. *Microbial Ecology*, 2002, 44 ( 3 ): 252 - 259.

## Preliminary study on bacterial diversity in the Cyanobacterial accumulation of lakefront at northern shore of west region of Chaohu Lake

XUAN Huai-xiang<sup>1</sup>, AN Shu-qing<sup>2</sup>, SUN Qing-ye<sup>1\*</sup>, LIU Mei<sup>1</sup>

(1. School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230039, China;

2. School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** Cyanobacterial bloom has been a hot issue and the microbial community is one of the important functional groups in the decomposition process of cyanobacteria accumulation. In this study, restriction fragment length polymorphism (RFLP) was applied to analyze the bacterial diversity of different depths in the cyanobacterial accumulation of lakefront at northern shore of west region of Chaohu Lake. The total DNA of the microorganisms from three different layers of cyanobacterial accumulation (Layer A: 0–2 cm, Layer B: 2–10 cm, Layer C: 10–20 cm) were extracted by the direct method. The DNA extracted was amplified using bacterial universal primers 27F and 1492R. PCR products were ligated into the pMD-18T Vector and ligations were transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  to construct 16S rDNA clone library of microbes in the cyanobacterial accumulation. 120 positive clones each layer from the library were screened and their 16S rDNA fragments were reamplified. The fragments were digested with *Hha* I and *Rsa* I respectively and their fingerprints were analyzed. The results showed that the layers from top to bottom include 51, 32, 27 restriction endonuclease types and the coverage (*C* value) of the clone library were 80.8%, 87.5%, 89.2%, respectively. Margalef indices ( $d_{Ma}$ ), Shannon-Wiener indices (*H*) and Simpson indices (*D*) all decreased with the depth increasing. Phylogenetic analysis suggested that the dominant bacteria in different layers of cyanobacterial accumulation belonged to Firmicutes and Proteobacteria. With the depth increasing, the species of Proteobacteria decreased, but those of Firmicutes increased. Some bacterial species in Layer A also belonged to Cyanobacteria, Actinobacteria, Planctomycete, and Spirochaetes. And some in Layer C belonged to Bacteroidetes. The results revealed the changes of bacterial diversity and species composition during the decomposition of cyanobacteria accumulation. This study on the bacterial diversity not only provided microbiology information for understanding the decomposition process of cyanobacteria accumulation, but also supplied the theoretical basis for using the resources of unknown bacteria in the cyanobacteria accumulation.

**Key words:** Cyanobacterial accumulation; bacterial diversity; restriction fragment length polymorphism (RFLP); lakefront at northern shore of west region of Chaohu Lake

**Corresponding author:** SUN Qing-ye. E-mail: sunqingye1964@yahoo.com.cn