

湖北清江和尚洞滴水微生物群落 随空间和季节的变化

赵锐¹, 王红梅^{1*}, 刘倩瑛¹, 曾翠平²

1. 中国地质大学生物地质与环境地质实验室, 湖北武汉 430074

2. 北京大学地球与空间科学学院, 北京 100871

摘要: 为了考察现代微生物群落对环境因子的响应关系及其在古气候重建中的应用潜力, 利用微生物学传统的培养计数、荧光染色总菌计数和 BIOLOG 的 ECO 微平板等技术对湖北省清江和尚洞内不同地点的滴水由内至外进行了空间和季节性的动态监测, 4 个滴水点由内向外编号依次为 1D、3D、4D 和 5D。结果证实湖北清江和尚洞洞穴滴水中存在一定数量的微生物。不同样点微生物的代谢活性不同, 1D 样品中的微生物群落代谢活性最高, 3D 表现出与 1D 相似的代谢特征, 但平均颜色变化率(AWCD; 微生物对碳源的利用程度, 颜色变化率越高, 表明微生物代谢越旺盛)较 1D 小, 4D 和 5D 样品在接种 24 h 后平均颜色变化率(AWCD)基本保持不变。对微生物代谢较为旺盛的 1D、3D 两个样品中不同时间内微生物群落的多样性指数进行分析, 表明洞穴滴水中微生物多样性相对稳定, 随采样季节的变化不大。相对于 3D、1D 的 4 个不同季节(采样时间)微生物群落对碳源种类的利用上存在一定差异。1D 水样在 2006 年秋季(2006 年 11 月份)、2007 年春季(2007 年 5 月)和 2009 年夏季(2009 年 7 月份)微生物群落利用碳源种类上比较接近, 而在 2008 年初秋(2008 年 9 月)碳源利用种类与前三者的差异明显。与 1D 相比, 3D 的 4 个不同采样时间的滴水微生物群落的主成分 1 和主成分 2 的得分系数比较接近, 群落碳源代谢功能多样性差别不大。这种变化可能反映了不同季节滴水中可溶有机质成分(DOC)的变化及微生物群落成分的变化, 暗示了微生物群落结构变化在指示气候变化应用中的巨大潜力。但微生物群落多样性与代谢功能多样性与气候因子之间的关系尚需深入研究。

关键词: 喀斯特洞穴; 气候变化; 微生物学; 群落多样性。

中图分类号: Q938

文章编号: 1000-2383(2010)06-0899-09

收稿日期: 2009-12-15

Spatial and Seasonal Variations of Microbial Communities in Dripping Water from the Heshang Cave, Central China

ZHAO Rui¹, WANG Hong-mei^{1*}, LIU Qian-ying¹, ZENG Cui-ping²

1. Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology of Ministry of Education, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

2. School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract: Dripping water was seasonally collected from several sites (denoted as site 1D, 3D, 4D and 5D toward the cave entrance respectively) inside the oligotrophic Heshang cave, Central China, to detect the metabolic activities of microbial communities in response to rainfall and temperature. Viable counting method, the DAPI staining technique as well as Biolog Eco microplates were exploited for microbial counting and metabolic changes of microbial communities. Results confirm the existence of microbes in the dripping water though the microbial biomass is as low as that in the deep sea water column. The metabolic activities of microbial communities varied with sites as indicated by the average well color development (AWCD) values in Biolog ECO microplates. Microbes in site 1D showed the strongest metabolic activities followed by those in site 3D. Microbial communities in the sites near the cave entrance, such as site 4D and site 5D, however, displayed the weakest metabolic activities as shown by the invariant AWCD values after 24-hour incubation. Similar microbial diversity indices were observed between different sites such as site 1D and site 3D, and even among different seasons. This indicates the presence of a fairly stable mi-

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-08-0831); 中央高校基本科研经费项目(Nos. CUG09103, CUGL100502); 湖北省杰出青年基金(No. 2008CDB373)。

作者简介: 赵锐(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事地球微生物学的研究。E-mail: 471496555@163.com。

* 通讯作者: 王红梅, wanghmei04@163.com

crobial diversity in the dripping water, probably due to the oligotrophic condition in the cave. However, the carbon utilization pattern of microbial communities in site 1D differed greatly among seasons; the pattern in Sept. 2008 is distinguishable from those in other sampling periods. The seasonal variation in carbon utilization might arise from the seasonal changes of dissolved organic matter or the changes in the flow rate of dripping water. Noticeably, such kind of seasonal variation in the carbon utilization was not reproduced in site 3D. Yet we need further investigations to determine the relationship between the changes in microbial community and the climate factors such as temperature and rainfall.

Key words: karst cave; climate change; microbiology; community diversity.

目前洞穴堆积物在过去全球气候变化研究中已经显示出巨大潜力,人们利用洞穴沉积物的沉积特征、物质成分和同位素组成等地球化学指标在重建过去气候和环境变化方面取得了重要进展(Baker *et al.*, 1993; 李彬等, 2000; 秦小光等, 2000; Wang *et al.*, 2001; 胡超涌等, 2002). 而洞穴石笋则因为时间跨度大、敏感程度高、蕴含丰富的古气候信息,在第四纪研究中具有重要意义,近年来国内外学者也取得了丰硕的研究成果(Hu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). 但是,在石笋古气候的记录中,对来自生物界的气候指标的研究上一直很薄弱. 对分子化石的研究发现,保存在石笋中来自生物体的痕量类脂物指标可以灵敏地反映气候变化,而其中部分类脂物则来自于微生物,且其他类脂物也呈现出微生物改造的迹象(谢树成等, 2005; Pu *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007). 因此开展洞穴中微生物的研究对于揭示洞穴石笋中有机物的来源、微生物在石笋形成中的作用以及微生物对其他有机物的改造等具有重要价值(赵晓玲等, 2007).

BIOLOG 的 ECO 微平板是通过测试环境微生物群落对多种单一碳源的利用程度来反映微生物群落水平的生理图谱(Garland and Mills, 1991; Garland, 1996). 传统的微生物培养方法耗时长,且只能分离和培养环境样品中不到 1% 的微生物,对微生物群落特征的整体研究存在明显不足. 而 BIOLOG 方法则从群落代谢特征水平对环境样品中的微生物群落特征进行研究,体现了更加简洁和快速的优势(Grove *et al.*, 2004).

BIOLOG 的 ECO 微平板是将 96 孔的微平板分成平行的 3 组,每组的第一个孔(A1)作为空白对照,装有四氮唑染料和纯水,不含任何碳源,其余的孔除装有四氮唑染料外,还装有各不相同的单一碳源底物. 三组微孔碳源的排列顺序完全相同. 当环境样品微生物群落被接种到微平板中培养后,如果它们能够利用孔中唯一碳源进行代谢,发生的氧化还原反应中的电子转移能使四氮唑染料由无色变为紫

色. 根据每孔颜色变化程度可以反映微生物对 31 种不同单一碳源的利用能力的高低(胡可和王利宾, 2007).

目前, BIOLOG 微平板法已经被国内外的学者应用到多种不同环境的微生物群落研究中,包括土壤(Garland and Mills, 1991; Garland, 1996)、盐水、荒漠土(Zak *et al.*, 1994)、草地(Zak *et al.*, 1994)、淡水(Garland and Mills, 1991; Sala *et al.*, 2006)、沉积物(Fredrickson *et al.*, 1991)、活性污泥(Guckert *et al.*, 1996)和海水(Hollibaugh, 1994)等. 但将该方法应用到洞穴滴水这种营养相对贫瘠的环境中的研究尚未见报道. 滴水中的微生物可能与石笋的形成有直接关系,并且可能对保存在石笋中的生物标志化合物具有重要贡献或重要的改造作用. 然而,人们对微生物在石笋形成过程中的作用、对包埋在石笋里类脂物的贡献以及类脂物对古气候的指示意义还知之甚少(Zhao *et al.*, 2007). 因此开展洞穴滴水微生物群落的研究对揭示微生物在石笋乃至洞穴生态系统中的地位以及微生物对气候变化的响应等方面具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 样品的采集

滴水样品采自湖北省清江流域和尚洞. 该区地处亚热带,属季风性山地湿润气候,年均降水和气温分别为 1 400 mm 和 16~17 °C. 和尚洞洞口高程 205 m,洞长大约 250 m,宽 10~30 m,发育于寒武纪三游洞群. 选取的 4 个滴水点中,1D 位于洞尾部石莲花处,3D 与 1D 相距 20 m,位于已被摘除的 HS-4 石笋基座处(黄咸雨等, 2007). 具体采样点位置参考 Zhao *et al.* (2007).

在采集滴水样品前,采样用的溶液瓶、漏斗都经过高温蒸汽灭菌. 采集过程配戴一次性手套,滴水样品采集后迅速置于 4 °C 保温箱中保存. 回实验室后,取 100 mL 水样经福尔马林(浓度为 36%)固定,用

于荧光染色后滴水微生物总量的观察,福尔马林的终浓度为 2%(V/V)。

1.2 微生物分析方法

1.2.1 可培养微生物菌落数量测定

分别采用牛肉膏蛋白胨培养基、马丁氏培养基和高氏一号培养基对细菌、真菌和放线菌进行室内培养,并对形成的单菌落进行统计,三者相加得到滴水中可培养微生物总数。

1.2.2 滴水中微生物总量的统计

微生物染色采用吡啶橙染色法(Acridine orange),具体步骤如下(Hobbie *et al.*, 1977):(1)将孔径为 0.2 μm 的黑色聚碳酸酯膜放在抽滤器上,装好,灭菌备用;(2)将 10 mL 的样品与 2 mL 的吡啶橙染液(工作液浓度为 1 g/L)在灭菌的烧杯中混匀,静置 3 min,在负压 50 kPa 下滤去染液;(3)用过滤除菌水将烧杯壁冲洗 2 次,再将染料抽干;(4)卸下抽滤器,用镊子将滤膜移至洁净的载玻片上,于滤膜中央加一滴无自发荧光浸润油,盖上盖玻片,轻压以使油分散并除去气泡;(5)镜检,随机计数 25 个视野的细菌数,每个视野细菌数一般以 30~50 为宜。

1.2.3 滴水微生物功能多样性

采用 BIOLOG-ECO 微平板法对滴水中微生物功能多样性进行分析。将 BIOLOG-ECO 微平板从冰箱中取出,预热到 25 $^{\circ}\text{C}$ 。将水样加入到微平板中,每孔 150 μL ,每个样品 3 次重复。将接种的 BIOLOG-ECO 微平板放在保湿的容器中,并置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养。分别于 0、24、48、72、96、120、144 和 168 h 在 BIOLOG MicroStation (BIO-TEK Instruments INC, USA) 读数仪上读取每孔的吸光度值。测定波长分别为 590、750 nm。

1.3 数据统计和分析方法

滴水微生物总数运用下列公式计算:

$$B = \frac{N_a \times S}{S_f \times (1 - 0.02) \times V}$$

式中: B 代表样品含菌数(cell/L); N_a 是各视野平均菌数(个); S 是滤膜实际过滤面积(mm^2); S_f 是显微镜视野面积(mm^2); V 代表过滤样品量(L);0.02 为加入 36%~40% 甲醛固定样品总体积的比例。不同时刻微生物对碳源利用的总体情况用平均颜色变化率(average well color development, AWCD)表示,某时刻微平板内平均颜色变化率的计算公式为(Glimm *et al.*, 1997):

$$AWCD = \frac{\sum_{i=1}^{31} (C-R)}{31}$$

式中: C 是所测得除对照孔外的 31 个反应孔的吸光度; R 是对照孔 A1 的吸光度。

微生物群落功能多样性的分析采用主成分分析法(PCA)。由于微生物接种密度可能影响统计分析结果(Garland, 1996; Konopka *et al.*, 1998),因此在本文分析中,对采集的吸光度数据进行标准变换得到 R_{st} ,之后进行 PCA 分析(Haack *et al.*, 1994):

$$R_{st} = \frac{(C-R)}{AWCD}$$

多样性指数采用 Shannon-Wiener 多样性指数(H)(Franklin *et al.*, 2001):

$$H = - \sum (P_i \times \ln P_i)$$

其中 $P_i = (C-R) / \sum (C-R)$ 。

统计分析用 SPSS 13.0 for Windows 软件进行,绘图应用 Origin Pro 8 软件进行。

2 结果与讨论

2.1 滴水中可培养微生物与微生物总数

1D 和 3D 水样的荧光计数结果显示,和尚洞洞穴滴水中的确存在一定数量的微生物,微生物总数分别为 $7.668 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 和 $2.628 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ (表 1),与深海水体中的微生物的总数 $8 \times 10^3 \sim 9 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ (Karner *et al.*, 2001; Cowen *et al.*, 2003) 相当,但相对于正常海水如波罗的海、北海和地中海东北部等海域的微生物数目 $1.21 \times 10^6 \sim 1.23 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ (Zweifel and Hagstrom, 1995) 来讲,至少存在 2 个数量级的差别,这与洞穴滴水中可溶有机质含量较低、营养缺乏密切相关,也可能与较长时间的淋滤作用有关。

洞穴是一种贫营养环境,微生物总量极低(Barton *et al.*, 2006)。和尚洞石笋和上覆土壤以及滴水中脂肪酸的研究表明,滴水中的微生物主要是上覆土壤微生物经大气降雨的淋滤作用带入(黄咸雨等, 2007),由水文地球化学示踪分析得出此过程

表 1 湖北清江和尚洞滴水微生物计数结果

Table 1 Total microbial counts in dripping waters of Heshang cave, Hubei

样品号	琼脂平板计数 (CFU · mL ⁻¹)	荧光染色计数 (Cells · mL ⁻¹)	可培养比率 (%)
2008.09 1D	4.85×10^2	7.668×10^4	0.63
2008.09 3D	2.18×10^2	2.628×10^4	0.83

消耗时间为 0~40 d(周运超等, 2004). 淋滤过程中的水—土壤和水—岩相互作用以及滴水营养物质的匮乏等均会使滴水里的微生物大量减少. Chelius and Moore(2004)研究了美国 Wind 洞穴中古菌和细菌的多样性, 通过与其他环境中微生物序列的对比, 他认为洞穴沉积物中的细菌大部分是通过流水从异地带来的. 因此洞穴滴水中微生物数量较少可能与大气降水经过长时间的淋滤作用后到达洞穴有关.

对比 2008 年 9 月的 1D 和 3D 水样中可培养微生物总数和水样中原始微生物的总数(表 1), 可以发现 1D 可培养微生物的数量和荧光染色显示的微生物总数都明显高于 3D, 但二者的可培养率均低于 1%. 这与其他环境中可培养微生物的比例大致相当.

Faegri *et al.* (1977)对土壤微生物群落用荧光显微镜检出的细菌数是用培养基培养得到的细菌数的 100~1 000 倍. Amann *et al.* (1995)应用荧光原位杂交技术(FISH)估计, 生物膜(biofilm)和活性污泥中大约 80%~99%的微生物种不可培养或未能得到培养(Amann *et al.*, 1995). 尽管有研究尝试设计合适的培养基在实验条件下最大程度地恢复土壤微生物的多样性(Balestra and Misaghi, 1997; Mitsui *et al.*, 1997), 但在典型农业土壤中可培养的微生物只有不到 0.1%(Atlas and Bartha, 1993).

2.2 滴水微生物利用碳源的动力学特征

平均颜色变化率(AWCD)是反映微生物代谢活性, 即利用单一碳源的能力重要指标(Zabinski and Gannon, 1997).

各滴点的微生物群落利用碳源的动力学特征有明显差异(图 1a). 1D 滴水样品中的微生物群落代谢活性最高, 在监测时间内, AWCD 值不断升高, 表明微生物代谢活性不断增强, 利用碳源量逐步增加.

3D 表现出与 1D 相似的代谢特征, 但除了 2009 年 7 月样品外, 3D 平均颜色变化率总体比 1D 低. 4D 和 5D 样品在 24 h 后平均颜色变化率(AWCD)基本保持不变, 所利用的碳源总量没有明显上升(图 1a). 不同滴点的微生物群落利用碳源能力的差异可能与不同样品单位体积内的微生物生物量有关. 单位体积内微生物数目越多, 对碳源的利用越高. 3D 单位体积内微生物总数较 1D 少, 反应在碳源利用上就是 AWCD 较 1D 低. 而 4D、5D 单位体积内的微生物数目可能更少.

另外, 在对同一滴水点不同季节的样品进行比较分析后(图 1b, 1c), 1D 滴点中 2008 年 9 月的滴水微生物群落的利用碳源速率最高, 明显高于其他 3 个季节, 其他 3 个季节的利用碳源的速率比较接近; 3D 滴点中 2009 年 7 月的滴水微生物群落利用碳源的速率最大, 2006 年 11 月的样品次之, 2007 年 5 月和 2008 年 9 月的最小. 同一样品不同季节微生物群落不同的碳源利用情况可能反映了组成微生物群落的菌种的季节性变化以及滴水性质(可溶有机质)的季节性变化.

前人的研究证明, 无论是滴水的化学性质还是微生物的种类均存在季节性的变化. 对湖北清和尚洞的长期观测表明, 不同季节的洞穴内温度能响应洞外大气温度的变化, 但由于洞穴的“缓冲作用”存在一定的滞后性和非均匀性(何璐瑶等, 2008). 而洞穴滴水水文地球化学季节变化与外界气候变化也有密切关系. 对芙蓉洞内 2 个观测点水样的 pH、电导率和其中一个滴水点 Ca、Mg 等离子体的对比分析发现, 芙蓉洞滴水的地球化学过程主要受季节变化特别是大气降雨的影响比较大(王昕亚等, 2007). 北京石花洞滴水中的 Mg/Ca 比值存在明显季节变化, 旱季较低而雨季较高, 但在雨季初期出现较大的波

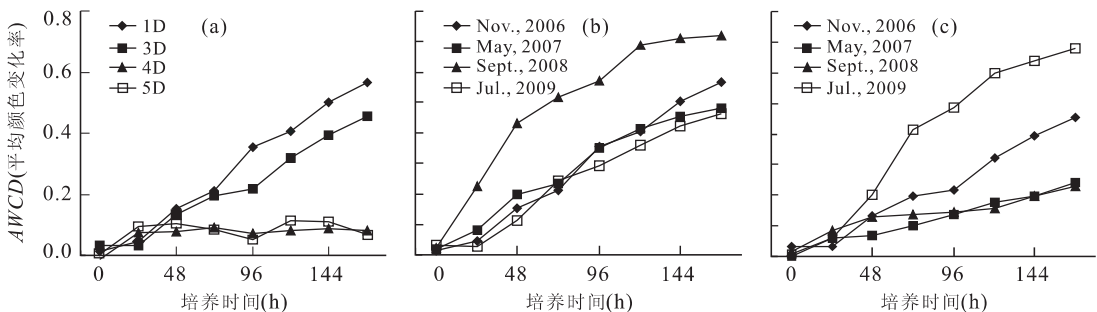


图 1 和尚洞滴水微生物群落利用碳源的平均颜色变化率随培养时间的变化

Fig. 1 Changes of average well color development with incubation times of the dripping waters in Heshang cave

a. 2006 年 11 月不同滴点微生物群落碳源代谢特征; b. 不同季节 1D 滴水微生物群落碳源代谢特征; c. 不同季节 3D 滴水微生物群落碳源代谢特征

动(王新中等,2005).和尚洞滴水中的天然荧光物质的研究表明,主要荧光物质富里酸的荧光强度与季节降水有一定的相关性,可以作为岩溶水的示踪剂(贾苒等,2007).

有关洞穴滴水可培养微生物的报道很少,Laiz *et al.* (1999)报道了西班牙 Altamira 洞穴内滴水可培养细菌,发现好氧细菌总数存在季节性变化,在二月份达到最大.其中革兰氏阳性菌主要为芽孢杆菌属,占 27.3%,低于其在沉积物和土样中所占的比例.在革兰氏阴性菌中,气单胞菌属最多,其次依次为不动杆菌、肠杆菌属和假单胞菌属.而 Zhao *et al.* (2007)对和尚洞滴水可培养微生物的研究发现,滴水中可培养微生物中细菌数量居多,且优势种具有季节性变化,这也为群落碳源代谢利用方式的季节性变化提供了直接证据.

2.3 滴水微生物群落功能多样性的主成分分析

BIOLOG-ECO 微平板中有 6 类 31 种碳源(10 种糖类、6 类氨基酸、2 种胺类、7 种羧酸、4 种聚合物和 2 种酚类),其中 10 种碳源同时含 C 和 N 等营养元素,2 种碳源同时含有 C 和 P,其他碳源只含有 C (Sala *et al.*, 2006).对微生物群落利用碳源的情况进行主成分分析,可以了解不同滴水微生物群落功能的综合差异和相似情况(Haack *et al.*, 1995).

对同一滴水点的不同季节的微生物群落功能多样性,选用 BIOLOG-ECO 微平板上培养 48 h 测定点的 OD590 值的数据进行主成分分析(PCA),结果表明,在 1D 中,第 1 主成分(PC1)对群落的贡献远远大于第 2 主成分(PC2),分别占变异总量的 47.91%和 13.15%(图 2a),因此根据 PC1 可以比较各滴水微生物群落功能的异同.组成第 1 主成分的主要有 α -环式糊精、D-木糖-i-赤藓糖醇、D-葡萄糖氨基酸、2-羟基苯甲酸、衣康酸、 α -丁酮酸、甘氨酸-L-谷氨酸和苯乙胺.2006 年 11 月样品和 2007 年 5 月样品在 PC1 上的得分系数比较接近,可以认为两个群落的代谢多样性相似,2009 年 7 月样品与二者差别不大,而 2008 年 9 月样品的代谢多样性与上述三者差异明显.总之,1D 的微生物群落利用糖类最多,其次是羧酸,利用较少的是氨基酸.

对 3D 的 4 个不同季节的滴水微生物群落代谢多样性经主成分分析表明(图 2b),由于第 1、2 主成分分别占总变异的 84.89%和 7.28%,第 1 主成分(PC1)对群落的贡献明显大于第 2 主成分(PC2),因此根据各碳源在 PC1 上的荷载值可以比较各滴水微生物群落功能的异同.从图中可以得出,4 个不同

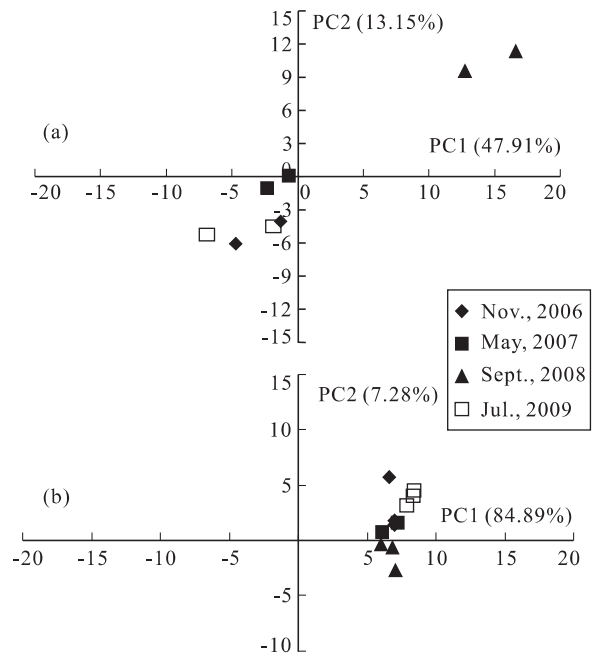


图 2 和尚洞滴水微生物群落碳源代谢主成分分析

Fig. 2 Principle analysis of carbon metabolism of microbial communities in dripping waters in Heshang cave

a. 不同季节的 1D 滴水微生物群落; b. 不同季节的 3D 滴水微生物群落

季节的滴水微生物群落在主成分 1 和主成分 2 的得分非常接近(图 2b),说明 3D 的滴水微生物群落代谢多样性基本保持稳定.

从 31 种碳源在两个主成分上的荷载值可得,除 D-木糖、4-羟基苯甲酸和衣康酸外,其他 28 种碳源均集中在第 1 主成分上,决定了主成分 1 的分异,而影响主成分 2 的碳源恰好是上述 3 种碳源.上述结果表明,3D 滴水微生物群落对 BIOLOG-ECO 的碳源利用比较均匀,没有任何明显的倾向.

微生物的代谢功能的多样性主要与滴水中微生物的组成有关,1D 中的微生物更易于利用糖类,其次是羧酸,再次是氨基酸.而 3D 中微生物对 ECO 微平板中的 6 类碳源的利用则比较均匀,不存在优先性,表明利用各类碳源的微生物种类齐全.

值得注意的是,2008 年 9 月的样品中,1D 微生物群落代谢功能明显不同于其他 3 个季节,这可能与滴水的速率有关.据报道(Genty and Deflandre, 1998),滴速与每滴水的体积之间存在一定的联系,当滴速在 1.1~48.6 d/min 之间时,每滴水的体积基本恒定,约为 0.14 mL;当滴速小于 1.1 d/min 时,每滴水的体积增加,函数关系为 $y = -0.0024x + 0.4089$;而当滴速大于 48.6 d/min 时,每滴水的体积会减小,函数关系为 $y = -0.0002x + 0.2373$.2009 年 8 月 1D 的滴速为

100 d/min,那么每滴水的体积则为 0.26 mL,结合每分钟的滴数,计算出该滴点的单位时间内的水流量就是 25.73 mL/min,远远大于同时期 3D 的单位时间水流量 2.8 mL/min.单位水流量的增加,一方面能够对水中的微生物起到稀释作用;另一方面也会对非饱和和带水的含量造成一定的影响,从而对微生物的种类尤其是亲水性和疏水性不同的微生物,形成一定的选择作用(Gargiulo *et al.*, 2008),进而导致微生物群落代谢功能的变化.但由于可能存在裂隙或者碳酸钙的重新溶解等因素,Baldini *et al.* (2006)认为单位流水量较大的滴点(>2 mL/min)并不适合中—高精度的古气候纪录的研究.而和尚洞 3D 点的滴速平均为 13 d/min(Hu *et al.*, 2008),因此平均单位流水量为 1.82 mL/L,而位于该处的 HS-4 石笋则能够分辨年际的古气候变化,与 Baldini *et al.* (2006)认为的单位流量在 0.1~2.0 mL/min 的滴点能够提供季节性气候变化的结论相吻合.

2.4 滴水微生物多样性指数分析

Shannon-Wiener 指数可以代表群落物种丰富度,而 Simpson 指数较多反映了群落中最常见的物种(Magurran, 1988),物种丰富度通常被用来比较微生物群落的多样性.对 1D 和 3D 在 2006 年 11 月、2007 年 5 月、2008 年 9 月以及 2009 年 7 月 4 个不同时间的水样中微生物多样性进行计算,本研究选了培养时间为 48 h 的微平板吸光度值计算 Shannon-Wiener 指数进行多样性分析可知,1D 和 3D 的 4 个不同季节样品的多样性指数非常接近,均在 2.7~3.1 之间(图 3),差别不大.经单因素方差分析, $F=1.325$, $P(\text{sig.})=0.332>0.05$,因此 1D 不同季节的样品中微生物群落的物种多样性差异不显著(置信区间为 95%).而 3D 的 $F=3.103$, $P(\text{sig.})=0.098>0.05$,因此,3D 不同季节样品间的多样性也不存在显著性差异.

不同采样点同一季节的样品之间多样性指数也很接近,由单因素方差分析可得,2006 年 11 月、2007 年 5 月、2008 年 9 月和 2009 年 7 月 4 个季节的 1D、3D 样品间的 $P(\text{sig.})$ 值均大于 0.05,分别为 0.375、0.299、0.303 和 0.476,说明和尚洞内同季节的 2 个采样点的滴水微生物群落物种多样性不存在显著性差异.

因此,洞穴滴水微生物群落的多样性指数的季节性变化不明显,说明微生物群落在洞穴滴水这样一个贫营养环境中多样性相对稳定.滴水中微生

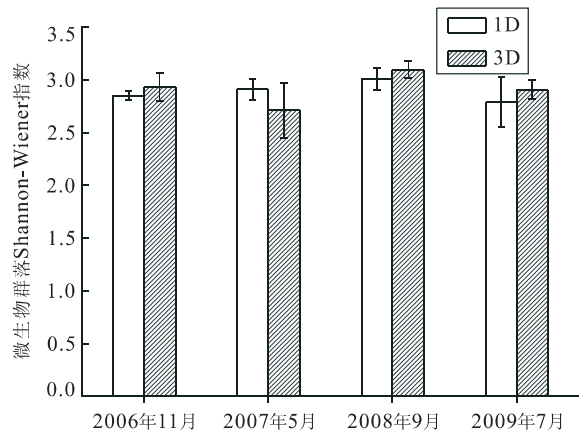


图 3 和尚洞 1D 和 3D 不同季节滴水中的微生物群落多样性指数

Fig. 3 Diversity indices of microbial communities in 1D and 3D in different seasons in Heshang cave

物群落物种多样性不随外界季节变化,保持相对稳定状态,这可能与洞穴物理化学条件密切相关.

洞穴环境对其内的微生物群落组成具有重要影响.洞穴内环境黑暗潮湿、温度稳定,在这样一个营养条件相对贫瘠的环境中,仍有多种微生物生存.藻类通常只能生活在弱光或微光的洞穴门坎处,而在洞穴深部,由于光合作用受到限制,只能生活一些异养生物(如真菌、细菌等)和一些化能自养生物(如铁细菌、硫细菌等)(冉景丞和陈会明, 1998). Laiz *et al.* (1999)对西班牙 Altamira 洞穴研究发现,旧石器时代壁画上的微生物组成与其洞穴顶部岩石上的微生物有很大不同,认为主要是由洞穴内外的物理化学条件差异造成的(Laiz *et al.*, 1999).洞穴中生长的微生物包括古细菌、细菌、藻类、真菌和放线菌.如在西班牙北部 Altamira 洞穴内的放线菌就多达 350 种(Groth and Saiz-Jimenez, 1999). Altamira 洞穴内湿度高,温度稳定且相对较低,滴水 pH 值近中性.这些条件都适合于在洞内滴水中大量发现的 *Bacillus* 和 *Pseudomonas* 的生存,而不是洞外发现的大量异养细菌的生存(Laiz *et al.*, 1999).和尚洞温度、pH、电导率等各种物理化学条件较为稳定,适合组成相对固定的微生物群落的生存.

3 结论

通过对湖北省清江和尚洞洞穴滴水微生物总量计数和可培养微生物的计数证实滴水中确实存在一定数量的微生物,数量大致与深海海水中的微生

物相当,但远远低于正常海水中微生物的数量。

BIOLOG-ECO 的测试结果显示,不同滴点微生物群落碳源代谢能力不同,且同一点不同季节微生物群落碳源代谢能力也不同,这可能与单位体积内微生物数量及滴水内可溶有机质的季节性变化有关;不同滴点微生物碳源代谢的多样性也不同,1D 滴水微生物群落利用碳源的季节性差异明显,碳源的利用上具有明显的倾向性;而 3D 的微生物在碳源利用方式上没有季节性变化,且对各类碳源的利用没有倾向性。这一方面反映了不同样品间微生物组成的差异,另一方面也可能与滴水中可溶有机质的成分或者滴速相关;此外,尽管微生物群落代谢碳源的能力或成分具有季节性变化,但微生物群落的多样性在洞穴这样一个贫营养环境中却保持稳定。微生物群落代谢功能的季节性变化暗示了微生物群落结构变化在指示气候变化应用中的巨大潜力。但微生物群落多样性与代谢功能多样性与气候因子之间的关系尚需进一步研究。

References

- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1): 143—169.
- Atlas, R. M., Bartha, R., 1993. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Benjamin-Cummings Press, CA.
- Baker, A., Smart, P. L., Edwards, R. L., et al., 1993. Annual growth banding in a cave stalagmite. *Nature*, 364: 518—520. doi: 10. 1038/364518a0
- Baldini, J. U. L., McDermott, F., Fairchild, I. J., 2006. Spatial variability in cave drip water hydrochemistry: implications for stalagmite paleoclimate records. *Chemical Geology*, 235(3—4): 390—404. doi: 10. 1016/j. chemgeo. 2006. 08. 005
- Balestra, G. M., Misaghi, I. J., 1997. Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 30(2): 111—117. doi: 10. 1016/S0167—7012(97)00056—0
- Barton, H. A., Taylor, N. M., Lubbers, B. R., et al., 2006. DNA extraction from low-biomass carbonate rock: an improved method with reduced contamination and the low-biomass contaminant database. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1): 21—31. doi: 10. 1016/j. mimet. 2005. 10. 005
- Chelius, M. K., Moore, J. C., 2004. Molecular phylogenetic analysis of archaea and bacteria in Wind cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21: 123—134. doi: 10. 1080/01490450490266389
- Cowen, J. P., Giovannoni, S. J., Kenig, F., et al., 2003. Fluids from aging ocean crust that support microbial life. *Science*, 299(5603): 120—123. doi: 10. 1126/science. 1075653
- Faegri, A., Torsvik, V. L., Goksoyr, J., 1977. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biology & Biochemistry*, 9(2): 105—112. doi: 10. 1016/0038—0717(77)90045—1
- Franklin, R. B., Garland, J. L., Bolster, C. H., et al., 2001. Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 702—712. doi: 10. 1128/AEM. 67. 2. 702—712. 2001
- Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L., Zachara, J. M., et al., 1991. Physiological diversity and distributions of heterotrophic bacteria in deep cretaceous sediments of the Atlantic coastal plain. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2): 402—411.
- Gargiulo, G., Bradford, S. A., Simunek, J., et al., 2008. Bacteria transport and deposition under unsaturated flow conditions: the role of water content and bacteria surface hydrophobicity. *Vadose Zone Journal*, 7(2): 406—419. doi: 10. 2136/vzj2007. 0068
- Garland, J. L., 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 28(2): 213—221. doi: 10. 1016/0038—0717(95)00112—3
- Garland, J. L., Mills, A. L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8): 2351—2359.
- Genty, D., Deflandre, G., 1998. Drip flow variations under a stalactite of the Pèrè Noel cave (Belgium): evidence of seasonal variations and air pressure constraints. *Journal of Hydrology*, 211(1—4): 208—232. doi: 10. 1016/S0022—1694(98)00235—2
- Glimm, E., Heuer, H., Engelen, B., et al., 1997. Statistical comparisons of community catabolic profiles. *Journal of Microbiological Methods*, 30(1): 71—80. doi: 10. 1016/S0167—7012(97)00046—8
- Groth, I., Saiz-Jimenez, C., 1999. Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal*, 16: 1—8. doi: 10. 1080/014904599270703

- Grove, J. A., Kautola, H., Javadpour, S., et al., 2004. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter. *Biochemical Engineering Journal*, 18(2): 111–114. doi:10.1016/S1369-703X(03)00182-7
- Guckert, J. B., Carr, G. J., Johnson, T. D., et al., 1996. Community analysis by Biolog; curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *Journal of Microbiological Methods*, 27(2–3): 183–197. doi:10.1016/S0167-7012(96)00948-7
- Haack, S. K., Garchow, H., Klug, M. J., et al., 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4): 1458–1468.
- Haack, S. K., Garchow, H., Odelson, D. A., et al., 1994. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7): 2483–2493.
- He, L. Y., Hu, C. Y., Cao, Z. H., et al., 2008. Correspondences of Heshang cave temperature to climatic change in Qingjiang, Hubei. *Carsologica Sinica*, 27(3): 273–277, 282 (in Chinese with English abstract).
- Hobbie, J. E., Daley, R. J., Jasper, S., 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5): 1225–1228.
- Hollibaugh, J. T., 1994. Relationship between thymidine metabolism, bacterioplankton community metabolic capabilities, and sources of organic matter. *Microbial Ecology*, 28(2): 117–131. doi:10.1007/BF00166800
- Hu, C. Y., Henderson, G. M., Huang, J. H., et al., 2008. Report of a three-year monitoring programme at Heshang cave, Central China. *International Journal of Speleology*, 37: 143–151.
- Hu, C. Y., Huang, J. H., Yang, G. Q., et al., 2002. Determination of trace dissolved silicon in a stalagmite from Qingjiang, Hubei, China, and its paleoclimatic significance. *Earth Science—Journal of China University of Geosciences*, 27(4): 453–455 (in Chinese with English abstract).
- Hu, K., Wang, L. B., 2007. Application of biology microplate technique to the study of soil microbial ecology. *Chinese Journal of Soil Science*, 38(4): 819–821 (in Chinese with English abstract).
- Huang, X. Y., Pu, Y., Cui, J. W., 2007. Distributions of fatty acids in the drip water at Heshang cave, Hubei Province and their ecological applications. *Quaternary Science*, 27(3): 401–407 (in Chinese with English abstract).
- Huang, X. Y., Pu, Y., Xie, S. C., et al., 2007. Distributions of microbial fatty acids in drip water, stalagmite and overlying soils in Heshang cave, Hubei Province. *Journal of China University of Geosciences*, 18 (Special issue): 366–367.
- Jia, R., Hu, C. Y., Qiu, H. O., et al., 2007. Natural fluorescent substance as tracer for karst groundwater: a case study on Heshangdong of Qingjiang, Hubei. *Carsologica Sinica*, 26(3): 262–265 (in Chinese with English abstract).
- Karner, M. B., DeLong, E. F., Karl, D. M., 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 409: 507–510. doi:10.1038/35054051
- Konopka, A., Oliver, L., Turco, R. F., 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology*, 35(2): 103–115. doi:10.1007/s002489900065
- Laiz, L., Groth, I., Gonzalez, I., et al., 1999. Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *Journal of Microbiological Methods*, 36(1–2): 129–138. doi:10.1016/S0167-7012(99)00018-4
- Li, B., Yuan, D. X., Lin, Y. S., et al., 2000. Research of oxygen isotope of rainfall, cave dripping water and modern carbonate and its significance in Guilin region. *Science in China (Series D)*, 30(1): 81–87 (in Chinese).
- Magurran, A., 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton NJ.
- Mitsui, H., Gorchach, K., Lee, H. J., et al., 1997. Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. *Journal of Microbiological Methods*, 30(2): 103–110. doi:10.1016/S0167-7012(97)00052-3
- Pu, Y., Huang, J. H., Huang, X. Y., et al., 2006. Acyclic alkanes in the soil over Heshang cave in Qingjiang, Hubei Province. *Journal of China University of Geosciences*, 17(2): 115–120. doi:10.1016/S1002-0705(06)60015-0
- Qin, X. G., Liu, D. S., Tan, M., et al., 2000. Characteristics of annual laminae gray level variations in a stalagmite from Shihua cave, Beijing and its climatic significance. *Science in China (Series D)*, 30(3): 239–248 (in Chinese).
- Ran, J. C., Chen, H. M., 1998. A survey of speleobiological studies in China. *Carsologica Sinica*, 17(2): 151–159 (in Chinese with English abstract).
- Sala, M. M., Pinhassi, J., Gasol, J. M., 2006. Estimation of bacterial use of dissolved organic nitrogen compounds in aquatic ecosystems using Biolog plates. *Aquatic Microbial Ecology*, 42: 1–5. doi:10.3354/ame042001

- Wang, X. Y., Li, T. Y., Hu, R., et al., 2007. A preliminary geochemical study of the drip water in Furong cave of Chongqing. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 29(2): 122—126 (in Chinese with English abstract).
- Wang, X. Z., Ban, F. M., Pan, G. X., 2005. Temporal and spatial variation of cave dripwater geochemistry in Shihua cave, Beijing, China. *Quaternary Sciences*, 25(2): 258—264 (in Chinese with English abstract).
- Wang, Y. J., Cheng, H., Edwards, R. L., et al., 2001. A high-resolution absolute-dated Late Pleistocene monsoon record from Hulu cave, China. *Science*, 294(5550): 2345—2348. doi:10.1126/science.1064618
- Wang, Y. J., Cheng, H., Edwards, R. L., et al., 2008. Millennial- and orbital-scale changes in the East Asian monsoon over the past 224,000 years. *Nature*, 451, 1090—1093. doi:10.1038/nature06692
- Xie, S. C., Huang, J. H., Wang, H. M., et al., 2005. The paleoclimatic significance of fatty acid in stalagmites from Heshang cave, Qingjiang, Hubei Province. *Science in China (Series D)*, 35(3): 246—251 (in Chinese).
- Zabinski, C. A., Gannon, J. E., 1997. Effects of recreational impacts on soil microbial communities. *Environmental Management*, 21(2): 233—238. doi: 10.1007/s002679900022
- Zak, J. C., Willig, M. R., Moorhead, D. L., et al., 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology & Biochemistry*, 26(9): 1101—1108. doi:10.1016/0038-0717(94)90131-7
- Zhang, P. Z., Cheng, H., Edwards, R. L., 2008. A test of climate, sun, and culture relationships from an 1810-year Chinese cave record. *Science*, 322: 940—942. doi: 10.1126/science.1163965
- Zhao, X. L., Yang, X. F., Zeng, C. P., 2007. Review on geomicrobiological research in caves. *Geological Science and Technology Information*, 26(6): 47—52 (in Chinese with English abstract).
- Zhao, X. L., Zeng, C. P., Liu, Q., et al., 2007. Preliminary study on microbial communities in dripping waters of Heshang cave, Hubei Province, PR China. In: 12th International Symposium on Water-Rock Interaction (WRI-12), Kunming, Jul. 31-Aug. 05, 925—928.
- Zhou, Y. C., Wang, S. J., Xie, X. N., et al., 2004. Significance and dynamics of drip water responding to rainfall in four caves of Guizhou, China. *Chinese Science Bulletin*, 50(2): 154—161. doi:10.1360/04wd0274
- Zweifel, U. L., Hagstrom, A., 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6): 2180—2185.

附中文参考文献

- 何璐瑶, 胡超涌, 曹振华, 等, 2008. 湖北清江和尚洞洞穴温度对气候变化的响应. *中国岩溶*, 27(3): 273—277, 282.
- 胡超涌, 黄俊华, 杨冠青, 等, 2002. 湖北清江榨洞石笋中可溶硅的测定及其古气候意义研究. *地球科学——中国地质大学学报*, 27(4): 453—455.
- 胡可, 王利宾, 2007. BIOLOG 微平板在土壤微生态研究中的应用. *土壤通报*, 38(4): 819—821.
- 黄咸雨, 蒲阳, 崔景伟, 等, 2007. 湖北清江和尚洞洞穴滴水脂肪酸分布特征及其古生态意义. *第四纪研究*, 27(3): 401—407.
- 贾苒, 胡超涌, 邱海鸥, 等, 2007. 天然荧光物质作为岩溶地下水的示踪剂研究——以湖北清江和尚洞为例. *中国岩溶*, 26(3): 262—265.
- 李彬, 袁道先, 林玉石, 等, 2000. 桂林地区降水、洞穴滴水及现代洞穴碳酸盐氧碳同位素研究及其环境意义. *中国科学(D辑)*, 30(1): 81—87.
- 秦小光, 刘东升, 谭明, 等, 2000. 北京石花洞石笋微层灰度变化特征及其古气候意义——II. 灰度的年际变化. *中国科学(D辑)*, 30(3): 239—248.
- 冉景丞, 陈会明, 1998. 中国洞穴生物研究概述. *中国岩溶*, 17(2): 151—159.
- 王昕亚, 李廷勇, 胡蓉, 等, 2007. 重庆芙蓉洞洞穴滴水地球化学初探. *西南大学学报(自然科学版)*, 29(2): 122—126.
- 王新中, 班凤梅, 盘根兴, 2005. 洞穴滴水地球化学的空间和时间变化及其控制因素——以北京石花洞为例. *第四纪研究*, 25(2): 258—264.
- 谢树成, 黄俊华, 王红梅, 等, 2005. 湖北清江和尚洞石笋脂肪酸的古气候意义. *中国科学(D辑)*, 35(3): 246—251.
- 赵晓玲, 杨小芬, 曾翠平, 2007. 洞穴地球微生物研究进展. *地质科技情报*, 26(6): 47—52.
- 周运超, 王世杰, 谢兴能, 等, 2004. 贵州 4 个洞穴滴水对大气降雨响应的动力学及其意义. *科学通报*, 49(21): 2220—2227.