2018年度重庆市出版专项基金资助栏目

DOI:10.11721/cqnuj20190518

三峡地区资源环境生态研究

重庆长寿湖秋季底泥微生物多样性分析。

但言1,沈子伟2,余凤琴1,张 闯1,倪朝辉2,陈元坤1,李 燕1

(1. 重庆市水产科学研究所, 重庆 401120

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所 农业部长江中上游渔业资源环境科学观测实验站, 武汉 430223)

摘要:【目的】了解重庆长寿湖秋季底泥微生物多样性。【方法】通过 16S rRNA 基因扩增和测序分析了 2017 年 9 月长寿 湖野猫岩、板桥、两河口、同心、堤坝等 5 个监测点底泥微生物的多样性和种类结构。【结果】汇流的微生物丰度比支流的 更大,堤坝的微生物丰度最大;微生物组成与小区域内环境相关,板桥和同心微生物组成相似;长寿湖底泥中变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、浮霉菌门(Planctomycetes)等微生物较为丰富,主要参与 C,N,S 及重金属元素的循环;环境因子中 Pb 和 Cr 的含量明显影响长寿湖底泥中微生 物群落结构。【结论】长寿湖底泥微生物组成受周边环境、重金属等污染因子影响较大,底泥中参与 C,N,S 等污染物代谢 的菌群活跃,污染情况不容忽视。

关键词:长寿湖;底泥;微生物结构;16S rRNA;重庆

中图分类号:X835

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)05-0080-06

底泥是水生植物固定的基质和底栖生物生长繁殖的场所,也是水体的重要组成部分和环境污染物长期聚集处。人类活动、农业生产及垃圾废物的不合理处置造成大量重金属进入水体,并通过沉积和物理化学反应富集 在底泥,进而严重损坏水体生态系统的健康。

长寿湖位于重庆市长寿区境内,地理坐标为北纬29°50′~30°04′、东经107°15′~107°25′。水域面积60 km², 总库容1.027×10°m³,是西南地区最大的人工湖泊^[11]。目前对长寿湖的研究主要包括鱼类在营养物质循环中 的作用^[1-3]、浮游生物多样性^[4-5]、重金属^[6-8]及营养盐研究^[9-10]等,尚未见长寿湖底泥微生物群落的相关研究。本 研究利用宏基因组测序技术,收集2017年9月份长寿湖底泥样品,对底泥中微生物群落组成特征及微生物与环 境因子的交互作用进行分析,以期为长寿湖的水环境保护和污染状况评估提供依据。

1 材料与方法

1.1 采样点布设

根据长寿湖水域情况将采样点布设于入水口、出水口、湖中心等具有代表性的位点。选择野猫岩、板桥、两河口、同心、堤坝等5处作为监测点,其中野猫岩、板桥为入水口,堤坝为出水口,两河口、同心为湖中心(封二彩图1)。

1.2 样品采集

于 2017 年 9 月展开对长寿湖底泥样品的采集。采用彼得森抓斗式采泥器(型号 KH0201,规格 1 L),用已灭 菌一次性医用压舌板去除外围底泥,无菌采集中心无污染底泥至 5 mL 规格的 PE 管,-20 ℃条件保存备用。

1.3 基因组提取、16S rDNA 扩增和测序

样品基因组 DNA 提取、16S rDNA 基因扩增和测序,由诺和致源公司(北京)进行。具体分析方法与参考文

* 收稿日期:2019-07-03 修回日期:2019-08-23 网络出版时间:2019-09-26 11:24
 资助项目:国家自然科学基金(No. 31901183);农业部长江中上游渔业资源环境科学观测实验站开放课题(No. 2016ESOF-02);农业部物种品种资源保护费(渔业)项目(No. 171721301354052175)
 第一作者简介:但言,男,高级工程师,研究方向为水生动物微生态,E-mail:435896207@qq.com
 网络出版地址;http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165. N. 20190926.1123.002.html

献[12]相同。

1.4 测序数据和分析

采用诺和致源公司线上平台对获得数据进行分析,主要内容包括 OTU (Operationnal taxonomic unit)聚 类、物种分类、相对丰度、多样性、主成分分析 PCA(Principal component analysis)、典型相关分析 CCA(Canonical correlation analysis)等。

2 结果

2.1 底泥微生物多样性分析

表1显示:长寿湖底泥样品 Shannon 指数为4.95~8.55, Simpson 指数为0.88~0.98,反 映出各样品的均匀度较好,微生 物群落多样性较高。此外样品 的 Chao 1 指数为1 954~2 890, ACE 指数为2 034~3 191,表 明其中的微生物群落相对丰度 较大。

2.2 微生物群落组成

长寿湖底泥中优势微生物门类有:变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、浮霉菌门(Planctomycetes)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Ac-idobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、广古菌门(Euryarchaeota)和绿弯菌门(Chloroflexi),所占比例分别为 39.6%,15.9%,15.0%,7.5%,3.0%,2.0%,1.9%,1.7%,1.7%和1.3%。各采样点微生物具体组成如封二彩 图 2 所示。

40

2.3 微生物群落的空间分布

长寿湖底泥微生物的 PCA 分析结果如图 3 所示: 图中的点代表各样品,样品在图上距离与样品相似程 度呈负相关关系。从该图可以看出,板桥和同心微生 物群落较为相似,与其他 3 个样品的差异较大。

2.4 微生物种类丰度聚类分析

在属水平对长寿湖底泥中微生物种类进行物种丰富热度图分析,具体结果如封三彩图4所示。由该图可知,长寿湖底泥中的优势微生物有:Sulfuricurvum属、狭义梭菌属(Clostridium sensu stricto 12)、鞘氨醇单胞菌属(Sphingomonas)、小纺锤状菌属(Fusibactor)、极地单胞菌属(Polaromonas)、脱氯单胞菌属(Dechloromonas)、Sulfurovum属、牦牛瘤胃菌(Proteiniclasticum)、Methanoregula 属、Desulfatiglans属、甲烷绳菌属(Methanolinea)和短真杆菌群(Eubacterium-brachy-group)。





2.5 环境因子关联分析

测定长寿湖底泥中的重金属含量(表 2),分析重金属对各采样点微生物结构的影响。经 CCA 分析(图 5), 发现两个主成分贡献率分别为 25.91%和 63.71%,表明底泥物种和重金属含量之间关系可靠。进一步分析可 知:长寿湖底泥中 Cu,Pb,Cr 和 Cd 是影响底泥中微生物结构的主要环境因子,Pb 和 Cr 的含量是显著影响微生 物群落结构的因子;大坝采样点受到 Cr、Pb 和 Cu 三者共同影响,而板桥采样点受到 Cd 的影响最大(图 5)。

81

Tab. 1 Analysis of microbial diversity index									
采样点	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao 1 指数	ACE 指数					
野猫岩	8.07	0.97	2 890	3 191					
板桥	4.95	0.88	1 954	2 034					
两河口	7.65	0.95	2 818	2 898					
同心	6.86	0.94	2 729	2 885					
堤坝	8.55	0.98	2 568	2 248					

两河口

表 1 微生物多样性指数分析

3 讨论

3.1 各采样点微生物组成分析

通过微生物群落多样性分析,发现大坝微 生物丰度大于其他几个采样点的丰度,且汇流 微生物的丰度明显大于支流微生物的丰度,这 与张旭^[13]的研究结论相同。板桥和同心底泥 中微生物多样性组成相似,这两处采样点处于 长寿湖东岸,主要为农业区域,与主要生活区域 西岸(野猫岩)、南岸(堤坝)表现出明显的微生 物多样性组成差异。这也与张旭^[13]的研究结 论一致。

3.2 底泥微生物群落结构多样性分析

厚壁菌门细菌在污水和废物厌氧处理系统 中较为常见并起到十分重要的作用。厚壁菌门 细菌在长寿湖底泥中是优势种,说明长寿湖受 污染情况不乐观^[13]。浮霉菌门中一些与氮的 转化相关的菌属又被称为厌氧氨氧化菌,在厌 氧条件下它们能利用亚硝酸盐氧化铵离子生成 氮气,对全球氮循环具有重要意义,也是污水处 理中重要的细菌。长寿湖进水至出水采样点底 泥微生物中浮霉菌门细菌的占比不断上升,说 明沉积物中亚硝酸盐、铵离子浓度随之升高,氮 源污染加重。拟杆菌门是常见于人和动物体内 且大量存在的条件致病菌,能利用葡萄糖、纤维

	Tab. 2	Heavy m	$mg \cdot kg^{-1}$			
采样点	Pb	Cd	Cr	Cu	As	Hg
野猫岩	17.7	0.2	13	31.42	5.53	78.6
板桥	24.9	1.4	27	21.81	5.95	68.7
两河口	23.6	0.4	28	22.82	9.61	64.3
同心	19.0	1.7	23	26.09	8.72	66.2
堤坝	57.1	0.8	57	32.14	9.26	73.5

表 2 底泥重金属含量





二糖及淀粉等糖类物质产酸。拟杆菌门在野猫岩采样点底泥的微生物中所占比例相对较高,说明人类活动影响 较大。放线菌门可以吸收营养物质,对水体有一定的净化作用^[14]。拟杆菌门、厚壁菌门、酸杆菌门及放线菌门广 泛参与产生甲烷过程。硝化螺旋菌门属于硝化细菌,可以将亚硝酸盐氧化成硝酸盐,两河口采样点底泥微生物 中的硝化螺旋菌门所占比例最高,说明此处硝化作用较其他几个采样点而言最为活跃。酸杆菌门、硝化螺旋菌 门、绿弯菌门等关键细菌类群在长寿湖 5 个采样点底泥微生物中的占比存在一定的差异,而此类细菌可以作为 衡量水质情况的生物表现^[15],因此这 5 处水质情况可能存在一定的差异。

长寿湖5个采样点样品中,基于属水平上的微生物主要有酸杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门、浮霉菌 门和变形菌门,它们在C,N,S及重金属的元素循环过程中表现活跃。Sulfuricurvum 属能够还原硫酸盐,常见 于硫酸盐废水处理过程,起到去除硫酸盐的效果^[16]。2004年 Inagaki等人^[17]在取自冲绳海槽的沉淀物中分离出 具有硫酸盐氧化功能的嗜温的化能自养的 Sulfurovum 属菌株,它们以单质硫或硫代硫酸盐为电子供体,以氧或 硝酸盐为电子受体自养生存。这类微生物在同步脱硫反硝化过程中起着举足轻重的作用。Desuifatigian 属是 一种硫酸盐还原菌^[18],通常以有机化合物和氢为电子供体,在富含相对低分子量的有机物(如短链脂肪酸)和硫 酸盐的环境中常见^[19]。本研究中,这3类细菌以较高的丰度存在,揭示长寿湖底泥中硫化物污染物的浓度可能 较高^[3]。梭菌属微生物中 Fe-氢酶在产氢、产甲烷有较高的催化活性,闫苗章^[20]发现,不同地区水稻土中梭菌属 Fe-氢酶基因拷贝数存在差异,但差异有限,都在每1g土含1×10⁵~1×10⁶个拷贝的范围内,可见梭菌属在土 壤和底泥的产氢、产甲烷过程中发挥重要作用。Methanoregula 属及甲烷绳菌属均为产甲烷菌,在有机厌氧降解 过程中参与最后反应,甲烷气体是它们能量代谢的主要终产物^[21]。鞘氨醇单胞菌属在地球上分布及为广泛,在 各种水体、土壤、大气以及极端环境中都有该属存在的踪迹。鞘氨醇单胞菌属具有利用各种简单分子、降解复杂 有机物的能力,部分菌株可通过细胞膜上的高分子通道与大质粒降解高分子有机污染物^[22]。鞘氨醇单胞菌在含 N 工业废水、生活污水的短程硝化-反硝化多 N 以及在受污染的水源水中也有一定的作用^[23]。Dechloromonas 是一种反硝化细菌,能以硝酸根为电子受体进行反硝化反应,是好氧颗粒污泥技术中的关键菌株^[24]。

3.3 环境因子对微生物结构的影响

微生物组成结构明显受环境因子的影响,但主要影响因子由于所处环境的不同也不尽相同^[25]。张旭^[13]在 研究受铜矿污染的湖泊时发现,Cr 是微生物群落结构的主要影响因子,而另一停产矿区附近湖泊样点受到 pH, S和 As 的共同作用影响。目前影响底泥微生物群落的环境因素主要集中在营养物质如 C,N,S,P等,这些物质 的循环对微生物的种类和群落多样性产生决定性作用。底泥中重金属抑制微生物光合作用、呼吸作用及酶的活 性等,进而限制微生物的种类和数量。

此外,黄艺等人^[26]在滇池流域生态健康评价评级中构建了以浮游细菌多样性为分类单元的浮游细菌生物完整性指标体系(BP-IBI)。张旭^[13]以细菌生物完整性指数(MM-IBI)对宁波三江口流域健康水平进行了分析。这些研究表明,水环境质量与变化跟微生物群落组成结构有密切的交互关系,微生物多样性可作为水生态环境敏感性生物指标。因此,开展长寿湖底泥微生物组成研究,并进行微生物指标和环境因子关联分析评价,可以为长寿湖底泥污染防治及水环境保护提供数据支撑。

参考文献:

[1] 谢青,徐勤勤,王永敏,等.三峡水库与长寿湖水库鱼类碳、
 氯稳定同位素特征及营养级的比较[J].湖泊科学,2019,31
 (3):837-845.

XIE Q, XU Q Q, WANG Y M, et al. Stable isotope value and trophic position of fishes in Three Gorges reservoir and Chang- shou reservoir[J]. Journal of Lake Sciences, 2019, 31(3):837-845.

[2] 李晓洁,唐敏,李云,等. 鲢鳙在长寿湖水生态系统氮磷循 环中的作用[J]. 淡水渔业,2018,48(3):40-46.

LI X J, TANG M, LI Y, et al. Role of silver carp and bighead on nitrogen and phosphorus cycle of aquatic ecosystem in Changshou lake[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 31(3): 837-845.

[3] 李晓洁. 生态放养鲢鳙在长寿湖水生态系统氮磷循环中的 作用[D]. 重庆:西南大学,2018.

LI X J. Effects of ecological stocking silver carp and bighead carp on nitrogen and phosphorus cycle of aquatic ecosystem in Changshou lake[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.

- [4] 闫苏苏,雷波,刘朔孺,等. 长寿湖浮游植物功能群季节变 化及影响因子[J].水生态学杂志,2018,39(3):52-60.
 YAN S S,LEI B,LIU S R,et al. Seasonal variation of phytoplankton functional groups in Changshou lake and relevant environmental factors[J]. Journal of Hydroecology, 2018,39(3):52-60.
- [5] 雷波,刘朔孺,张方辉,等. 三峡水库上游长寿湖浮游藻类的季节变化特征及关键环境影响因子[J]. 湖泊科学,2017, 29(2):369-377.

LEI B, LIU S R, ZHANG F H, et al. Seasonal phytoplank-

ton dynamics and its relationship with key environmental factors in Lake Changshou, upper reaches of the Three Gorges reservoir[J]. Journal of Lake Sciences, 2017, 29(2): 369-377.

[6] 余凤琴,陈元坤,但言,等.长寿湖水体及底泥中重金属的 空间分布及污染评价[J].西南师范大学学报(自然科学 版),2017,42(11):119-123.

YU F Q, CHEN Y K, DAN Y, et al. On spatial distribution and evaluation of heavy metals in water and sediments at Changshou lake[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition), 2017, 42(11):119-123.

- [7] XING Z L,ZHAO T T,BAI W Y,et al. Temporal and spatial variation in the mechanisms used by micro-organisms to form methylmercury in the water column of Changshou lake[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 160:32-41.
- [8] 白薇扬,张成,唐振亚,等. 长寿湖水库垂直剖面不同形态 汞的季节变化特征及其影响因素[J]. 环境科学,2015,36
 (10):3649-3661.
 BAIWY,ZHANGC,TANGZY,et al. Seasonal variations in vertical profile of Hg species and the influential factors in Changshou reservior[J]. Environmental Science,2015,36
 (10):3649-3661.
- [9] 高进长,龙翼,张信宝,等. 长寿湖水库沉积物有机碳的垂 直变化特征[J]. 水土保持研究,2016,23(5):80-84.
 GAO J C,LONG Y,ZHANG X B, et al. Characteristics of vertical variation of organic carbon in the sediment of Changshouhu reservoir, China[J]. Research of Soil and Water Conservation, 2016,23(5):80-84.

[10] 刘淑容.重庆长寿湖氮磷污染状况分析[J].资源节约与环保,2013(11):83-84.

LIU S R. Analysis of nitrogen and phosphorus pollution in Changshou lake[J]. Resources Economization and Environmental Protection, 2013(11):83-84.

- [11] 杨志敏,熊海宁,张晟,等. 重庆市长寿湖富营养化评价及 氮磷平衡研究[J].水土保持学报,2005,19(2):73-75.
 YANG Z M,XIONG H N,ZHANG S, et al. Assessment of eutrophication and balance of N and P in Changshou reservoir[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2005,19(2):73-75.
- [12] 但言,沈子伟,余凤琴,等. 嘉陵江合川段秋季微生物多样 性研究[J]. 淡水渔业,2019,49(6):3-8.
 DAN Y,SHEN Z W,YU F Q,et al. The research on microbial diversity of Hechuan reach for Jialing river in autumn[J]. Freshwater Fisheries,2019,49(6):3-8.
- [13] 张旭. 淡水水体底泥微生物群落特征及微生物指标评价研究[D]. 上海:上海大学,2016.
 ZHANG X. Microbial community characteristics and microbial indicators evaluation study in fresh water sediment [D]. Shanghai: Shanghai University,2016.
- [14] 宋兆齐,王莉,刘秀花,等. 云南和西藏四处热泉中的厚壁 菌门多样性[J]. 生物技术,2015,25(5):481-486.
 SONG Z Q, WANG L, LIU X H, et al. Diversities of Firmicutes in four hot springs in Yunnan and Tibet[J]. Biotechnology,2015,25(5):481-486.
- [15] 成敏铃.基于高通量测序的东湖不同富营养化区域细菌 群落结构研究[D].武汉:华中农业大学,2017. CHENG M L. Bacterial community structure in different eutrophic areas of Donghu lake on high throughput sequencing [D] Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [16] 张建. 碱度和碳源对硫酸盐废水处理效能的影响及机制 研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2010.

ZHANG J. The performance of sulfate wastewater treatment and mechanism on the impact of alkalinity and carbon source[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.

- [17] INAGAKI F, TAKAI K, NEALSON K H, et al. Sulfurovum lithotrophicum gen. nov. sp nov. a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the epsilon-Proteobacteria isolated from Okinawa trough hydrothermal sediments[J]. International Journal of Systemmatic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54:1477-1482.
- [18] ROBADOR A, MULLER A L, SAWICKA J E, et al. Activity and community structures of sulfate-reducing microorganisms in polar, temperate and tropical marine sedi-

ments [J]. Official Journal of the International Society of Microbial Ecology, 2016, 10:796-809.

- [19] HIGASHIOKA Y, KOJIMA H, WATANABE M, et al. Desulfatitalea tepidiphila gen. nov., sp. nov., a sulfate- reducing bacterium isolated from tidal flat sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63:761-765.
- [20] 闫苗章. 淹水培养过程中水稻土 Fe-氢酶微生物多样性及 丰度分析[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2013. YAN M Z. The diversity and abundance of Fe-hydrogenase microbe in paddy soil during flooding incubation[D]. Xianyang:Northwest Agricultural and Forestry University,2013.
- [21] 王保玉,刘建民,韩作颖,等.产甲烷菌的分类与研究进展
 [J].基因组学与应用生学,2014,33(2):418-425.
 WANG B Y,LIU J M,HAN Z Y,et al. Recent progress and classification of methanogens[J]. Genomics and Applied Biology,2014,33(2):418-425.
- [22] 胡杰,何晓红,李大平. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与 环境生物学报,2007,13(3):431-437.
 HU J,HE X H,LI D P. Progress in research of Sphingornonas[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology,2007,13(3):431-437.
- [23] 李正魁,周莉,王月明,等. 鞘氨醇单胞菌属菌株及其在水 处理中的应用:2011100440563[P].2012-12-12.
 LIZK,ZHOUL,WANGYM,et al. Sphingomonas strain and its application in water treatment: 2011100440563
 [P].2012-12-12.
- [24] 姚源,竺建荣,唐敏,等.好氧颗粒污泥技术处理乡镇污水应用[J].环境科学研究,2018,31(2):379-388.
 YAO Y,ZHU J R,TANG M, et al. Application of aerobic granular sludge technology on treatment of villages and towns sewage [J]. Research of Environmental Sciences, 2018,31(2):379-388.
- [25] WANG J J, SHEN J, WU Y CY, et al. Phylogenetic beta diversity in bacterial assemblages across ecosystems: deterministic versus stochastic processes [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013,7:1310-1321.
- [26] 黄艺,舒中亚.基于浮游细菌生物完整性指数的河流生态 系统评价:以滇池流域为例[J].环境科学,2013,34(8): 3010-3018.

HUANG Y, SHU Z Y. Bacterioplankton index of biotic integrity (BP-IBI): an approach for assessing river ecosystem health in Dianchi watershed[J]. Environmental Science, 2013, 34(8): 3010-3018.

Resources, Environment and Ecology in Three Gorges Area

The Analysis of Microbial Diversity in the Sediment of Changshou Lake of Chongqing in Autumn

DAN Yan¹, SHEN Ziwei², YU Fengqin¹, ZHANG Chuang¹, NI Zhaohui², CHEN Yuankun¹, LI Yan¹

(1. Chongqing Fishery Sciences Research Institute, Chongqing 401121;

2. Fishery Resources and Environmental Science Experimental Station of the Upper-Middle Reaches of

Yangtze River Ministry of Agriculture, Yangtze River Fishery Research Institute, CAFS, Wuhan 430223, China)

Abstract: [Purposes] To investigate the microbial diversity in the sediment of Changshou lake of Chongqing in autumn. [Methods] Sediment microbial diversity and species structure from 5 monitoring points of Yemaoyan, Banqiao, Lianghekou, Tongxin, and Diba in Changshou lake were analyzed by 16S rRNA gene amplification and sequencing in September 2017. [Findings] The results showed that the confluence was more abundant than the branch, Diba had the largest microbial abundance. The environment of Banqiao was similar with that of Tongxin. Meanwhile, the microbial compositions in sediment were similar from these two monitoring points. Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Verruciformis, and Trophomycete were abundant, mainly involved in the circulation of carbon, nitrogen, sulfur and heavy metal elements. In addition, the microbial community structure in sediment was influenced greatly by Pb and Cr. [Conclusions] The microbial composition of the bottom mud of Changshou lake was greatly affected by the surrounding environment, heavy metals and other pollution factors. The bacteria involved in the metabolism of C, N, and S were actively in the bottom mud. So the pollution situation couldn't be ignored.

Keywords: Changshou lake; sediment; microbial structure; 16S rRNA; Chongqing

(责任编辑 方 兴)



Fig. 1 The location of the sampling sites

Fig. 2 The composition of the main dominant microbial community structure in sediment



Fig. 4 Abundance clustering heat map of microbial species