

乌江渡水库沉积物风干和过筛处理与原始沉积物中微生物群落的差异比较分析

徐韬¹ 陈晨² 杨飞² 田楼² 杨阳²¹

(1. 贵州师范大学材料与建筑工程学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

【摘要】: 本研究对乌江渡水库的沉积物细菌群落进行风干和过筛处理, 旨在比较不同处理后沉积物与原始细菌群落结构的差异, 从而为以后此类样品的处理提供理论依据。结果显示乌江渡水库沉积物中细菌的优势类群主要为变形菌门(Proteobacteria), 包括 γ -Proteobacteria, Δ -Proteobacteria 和 α -Proteobacteria。其群落结构在风干和过筛处理后有一定程度的改变, 表现为优势类群相对丰度的变化。此外, 多样性指数和基因功能差异不显著。然而风干和过筛处理之间群落结构无显著差异。因此推测: 风干和过筛处理中沉积物失水的过程是造成其中细菌群落结构变化的主要因素。本研究建议对水体沉积物微生物的研究应该直接使用原始保存的样品进行 DNA 提取, 从而保存沉积物中原始微生物群落的特征。

【关键词】: 高原峡谷型水库 沉积物细菌群落 高通量测序 风干和过筛

【中图分类号】: S143.58 **【文献标识码】:** A **【文章编号】:** 1003-6563(2022)03-0075-06

0 引言

湖泊微生物作为食物网重要的组成成分, 发挥着重要的作用。水库中的沉积物是水库内源污染源^[1]。表层沉积物是微生物聚居和进行物质代谢和循环的主要场所和介质, 微生物通过同化分解等代谢过程来影响沉积物中甚至水体中的营养盐及污染物的分布、转化和利用等。细菌在微食物网中对物质和能量的循环起着关键的作用。沉积物细菌种类丰富, 代谢活性高, 且对环境变化响应迅速, 因此, 水体沉积物微生物群落可以作为水环境变化和演替的重要指标, 对了解水环境的营养和污染状态有重要作用^[2]。目前, 已有大量对湖泊/水库沉积物微生物群落的研究, 然而, 对贵州省内云贵高度的湖泊/水库中水体和沉积物微生物群落结构、分布还远远不够^[3,4,5]。云贵高原湖泊区是中国五大湖区最小的湖区^[6], 相对于平原水体, 高原湖泊/水库相对独立, 对气候变化敏感, 且对人为的干扰更加敏感。高原水体中蕴含着大量的微生物资源, 因此, 对其中微生物群落的研究能够帮助我们更清楚地认识贵州省内高原水库中微生物的群落特征, 从而进一步了解水体的营养状态和物质循环机制。

传统微生物的研究离不开微生物的分离和培养, 然而自然界中, 尤其是水体中的绝大部分微生物很难在实验室被培养^[7]。随着技术的发展, 对沉积物微生物群落的研究主要基于测序的手段开展, 包括扩增子测序和宏基因组测序等技术。测序技术为从群

作者简介: 徐韬(1986-), 男, 硕士, 主要研究方向为环境工程。杨阳(1985-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为水域生态学。

基金项目: 国家自然科学基金(32060270); 贵州省留学人才择优资助项目([2020]09号); 贵州师范大学博士启动项目(11904/0519078)

落水平了解水体微生物的生态特征打开了新篇章^[8,9]。然而, 研究中对沉积物样品的采集和处理存在不同, 有的研究选择于采样时直接保存沉积物待 DNA 提取^[10,11,12,13,14], 有的研究则进行风干过筛处理后再进行 DNA 提取^[15,16]。那么, 原始沉积物和风干过筛处理后的沉积物中微生物群落是否有较大的差异呢? 造成这些差异的原因是什么呢? 本研究选取乌江渡水库 4 个采样点的沉积物, 分别进行风干处理和风干后过筛处理, 对处理后和原始的沉积物进行 16SrRNA 测序, 在初步了解乌江渡水库沉积物微生物群落结构的基础上, 进一步比较分析风干和过筛处理对沉积物细菌群落结构的差异, 从而为沉积物微生物样品的处理提供了数据支持和依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

乌江渡水库位于乌江流域, 是西南地区重要的水系之一。乌江渡水库地处贵州省息烽县和遵义县交界处, 是乌江干流第十一个梯级电站的第六级, 为典型的峡谷型水库。该水库属于季节性调水, 总库容 23 亿 m^3 , 平均水深 154m, 水库总面积 48 km^2 。乌江流域的水库均有不同程度的水产养殖, 因此, 其水体沉积物中有不同程度的营养盐和重金属聚集^[17]。该水库平均水力滞留时间为 30~135 天(丰水期和枯水期)。

于 2021 年 5 月在乌江渡水库设置 4 个采样点, 分布为江口(JK)、漩塘(XT)、息烽河(XF)和偏岩河(PY)(图 1)。采样点选取在干流与支流的交汇处, 沿着乌江流域分布。采用抓斗式采泥器采集沉积物样品, 收集表层(0~5cm)的沉积物, 于冰盒中保存, 每个采样点抓取 3 次, 混合后成为 1 个样品, 每个样品分成 3 份, 1 份直接保存为原始沉积物, 1 份自然风干 5 天后冻存(dried), 另 1 份自然风干 5 天后过 100 目筛后冻存(filtered)。

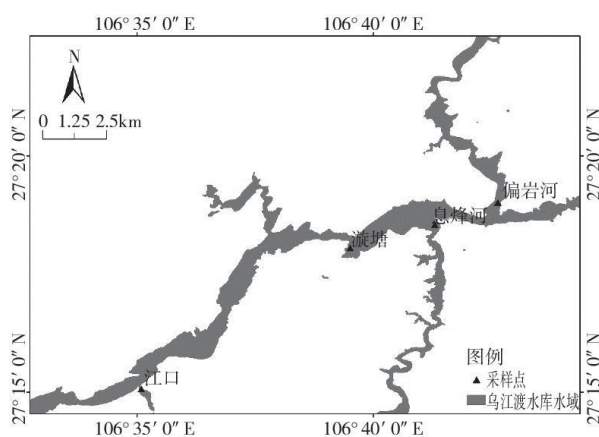


图 1 乌江渡采样点地理位置分布图

1.2 沉积物 DNA 提取和测序

用 ALFA-seq Advanced Soil DNA kit 试剂盒进行基因组 DNA 提取后, 利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性和纯度, 利用 NanoDrop One 检测 DNA 浓度和纯度。以基因组 DNA 为模板, 选择 515F 和 806R 引物对 16Sv4~v5 区域进行 PCR 扩增。按照 NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina 标准流程进行建库, 之后使用 Illumina HiSeq2500 平台对构建的扩增子文库进行 PE250 测序。

1.3 数据分析

测序数据通过 paired-end read 数据过滤和拼接获得原始拼接序列，用 Mothur 软件进行质量过滤后得到有效的拼接片段 (CleanTags)。用 usearch 软件对所有样品的全部 cleantags 进行聚类，以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTU。为了有效地后序分析，利用 Qiime 从每个 OTU 所属的序列中，抽取出出现频数最高的序列来代表相应的 OTU。利用 Qiime 中的 assign_taxonomy.py 脚本和 RDPClassifier 方法，将每个 OTU 的代表序列与 Greengenes 数据库进行比对获得物种注释信息，从而得出所有序列物种来源。利用 PICRUST 软件，基于 OTU 的物种注释和丰度信息，将 KEGG 数据库中已有基因组的原核生物 16SrRNA 序列与 SILVA 数据库中 16SrRNA 序列进行关联，然后将 KEGG 数据库已有的原核物种基因组进行序列。

用 R 软件进行后续数据处理，主要包括计算群落多样性指数 (OTU 数目、Simpson 指数、Shannon 指数、均匀度指数、Chao1 和 ACE) 和 Bray-Curtis 距离。方差分析 (ANOVA) 用于比较不同处理直接细菌群落多样性指数的差异，运用 PCoA 排序方法研究不同处理细菌群落的相似性，ANOVA 和 PCoA 使用 “vegan” 程序包进行^[18]。

2 结果与分析

2.1 沉积物微生物群落组成

在原始沉积物中，4 个采样点共检测到 5869-6210 个 OTUs，风干或过筛处理后分别检测到 6359-6488 个和 6186-6414 个 OTUs。在门水平上，原始、风干和过筛后沉积物的微生物群落中，变形菌门 (Proteobacteria) 为主要优势类群，相对丰度均大于 30%，其相对丰度在风干和过筛后有一定程度的降低。绿弯菌门 (Chloroflexi) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 的相对丰度在风干和过筛处理后升高，成为次优势类群。其次在风干和过筛处理组为拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌门 (Actinobacteria)，而在原始沉积物中为 Bacteroidetes 和硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)。Actinobacteria 在风干和过筛后其相对丰度从 3.5% 升高至 7.5% 和 7.8% (图 2)。

Proteobacteria 在各组中均为优势类群，主要包括 γ -Proteobacteria, Δ -Proteobacteria 和 α -Proteobacteria。其中， γ -Proteobacteria 为主要优势类群，分别占比 19%、16.6% 和 16.1%，在原始沉积物中，第二优势类群为 Δ -Proteobacteria (10.8%)，这一类群在风干处理组和过筛处理组中相对丰度降低， α -Proteobacteria 的相对丰度为 5.3%、5.5% 和 5.7%。Chloroflexi 中厌氧绳菌纲 (Anaerolineae) 的相对丰度从原始沉积物中的 7.4% 升高至 12.9% 和 11.4%。

Proteobacteria-	36.7	30.2	30.2	Gamma proteobacteria; Proteobacteria-	19	16.6	16.1
Chloroflexi-	9.7	15.2	13.6	Anaerolineae; Chloroflexi-	7.4	12.9	11.4
Acidobacteria-	9.7	11	9.7	Deltaproteobacteria; Proteobacteria-	10.8	7.6	7.8
Bacteroidetes-	7.2	7.3	6.6	Bacteroidia; Bacteroidetes-	5.6	5.7	6.8
Actinobacteria-	3.5	7.5	7.8	Alphaproteobacteria; Proteobacteria-	5.3	5.5	5.7
Planctomycetes-	6.3	5.5	5.8	Actinobacteria; Actinobacteria-	1.8	5.1	5
Nitrospirae-	7.5	4.7	5	Thermodesulfobionia; Nitrospirae-	4.5	2.5	3
Thaumarchaeota-	1.3	1.3	2.4	Subgroup_6; Acidobacteria-	2.9	3.4	3.1
Gemmatimonadetes-	1.2	1.5	1.2	Planctomycetacia; Planctomycetes-	2.7	2.4	2.9
Verrucomicrobia-	1.2	1.3	1.5	Phycisphaerae; Planctomycetes-	2.4	2.2	2
	control	dried	filtered		control	dried	filtered

图 2 各处理组沉积物微生物群落优势类群 (门水平和纲水平) 相对丰度 (control: 原始沉积物; dried: 风干沉积物; filtered: 过筛沉积物)

选取 5 类门水平和纲水平优势细菌进行方差分析，结果表明，不同优势细菌在原始沉积物、风干和过筛沉积物中存在显著性差异。将风干和过筛两组处理进行对比，在门水平和纲水平上，优势细菌差异均不显著 ($p > 0.05$)。

表 1 不同处理沉积物中优势细菌相对丰度方差分析

分类	优势细菌	差异 P 值 (三组处理)	差异 p 值 (风干和过筛处理)
门水平	Proteobacteria	0.004*	0.94
	Chloroflexi	0.19	0.24
	Acidobacteria	0.34	0.14
	Bacteroidetes	0.39	0.32
	Actinobacteria	0.001*	0.84
纲水平	γ -Proteobacteria	0.10	0.54
	Anaerolineae	0.10	0.22
	Δ -Proteobacteria	<0.001*	0.53
	Bacteroidia	0.48	0.36
	α -Proteobacteria	0.90	0.57

2.2 沉积物微生物群落多样性比较

风干处理后微生物 OTU 数目、Chao1 指数和 ACE 指数增多，原始沉积物中 OTU 数目最少。Simpson、Shannon 指数和均匀度指数无较大差异。ANOVA 检测结果显示各个采样点之间的多样性指数差异不显著 ($p>0.1$) (图 3)。

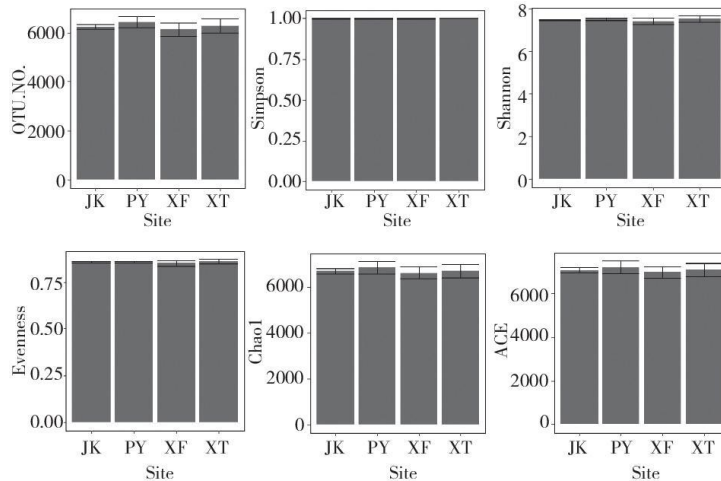


图 3 乌江渡水库各采样点多样性指数 (JK:江口;PY:偏岩;XF:息烽;XT:漩塘)

2.3 沉积物微生物群落结构和功能比较

原始沉积物微生物群落异质性较高，4 个采样点微生物群落差异较大，而风干和过筛之后的沉积物中微生物群落在图中分布

集中，而原始沉积物群落分布范围较大，相互之间有一定的距离(图 4)。PerMANOVA 检验结果显示，除了种水平上群落结构差异不显著($p=0.34$)，其他分类水平(包括：属、科、目、纲)上风干和过筛处理后微生物群落结构有显著差异($p<0.01$)。基于不同的分类水平的数据进行 NMDS 排序分析，排序图中风干和过筛处理后的沉积物微生物群落较原始微生物群落更为集中。韦恩图结果显示三组处理沉积物微生物群落有共同 OTU154 个，原始沉积物、风干和过筛处理后沉积物微生物群落特有 OTU，分别为 80 个、66 个和 67 个(图 5)。

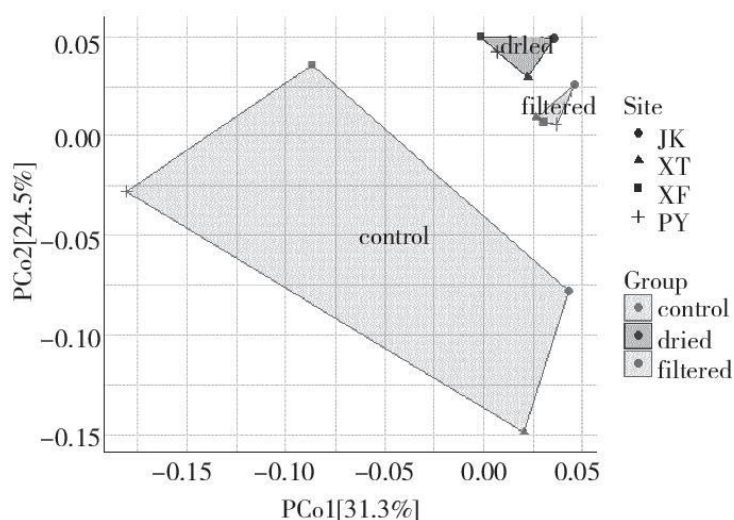


图 4 沉积物微生物群落排序(Control:原始沉积物;dried:风干沉积物;filtered:过筛沉积物)

将各个采样点原始、风干和过筛后的沉积物微生物群落进行比较分析，计算 Bray-Curtis 距离发现，在种属水平上，XF 站点群落结构差异最大，而在门、纲、目和科水平上，PY 站点群落差异最大(图 6)。

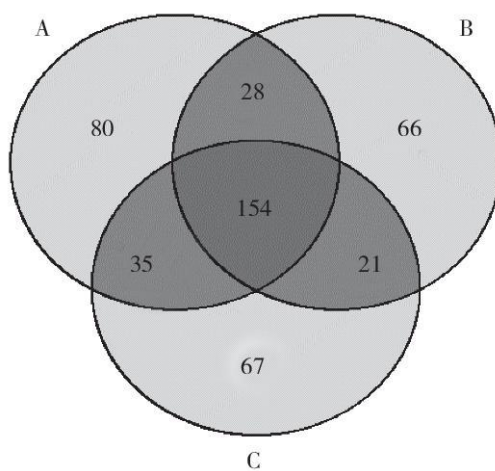


图 5 不同处理沉积物微生物 Venn 图(A:原始沉积物;B:风干沉积物;C:过筛沉积物)

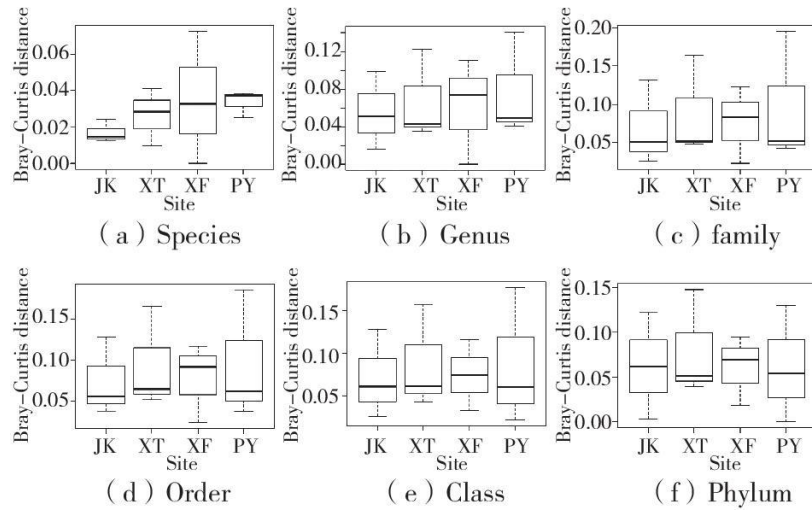


图 6 各采样点原始、风干和过筛后沉积物中微生物不同分类水平上群落 Bray-Curtis 距离(a. Species:种;b. Genus:属;c. Family:科;d. Order:目;e. Class:纲;f. Phylum:门;JK:江口;PY: 偏岩;XF: 息烽;XT: 漩塘)

不同处理沉积物微生物群落 16S 基因预测功能进行比较, 结果显示, 16S 基因功能预测注释主要为代谢相关基因, 其次为基因信息处理相关(图 7)。三组处理直接预测功能基因相对丰度无显著差异, 其中功能集中在以碳水化合物代谢、氨基酸代谢和辅助因子及维生素代谢相关的基因(图 7b)。

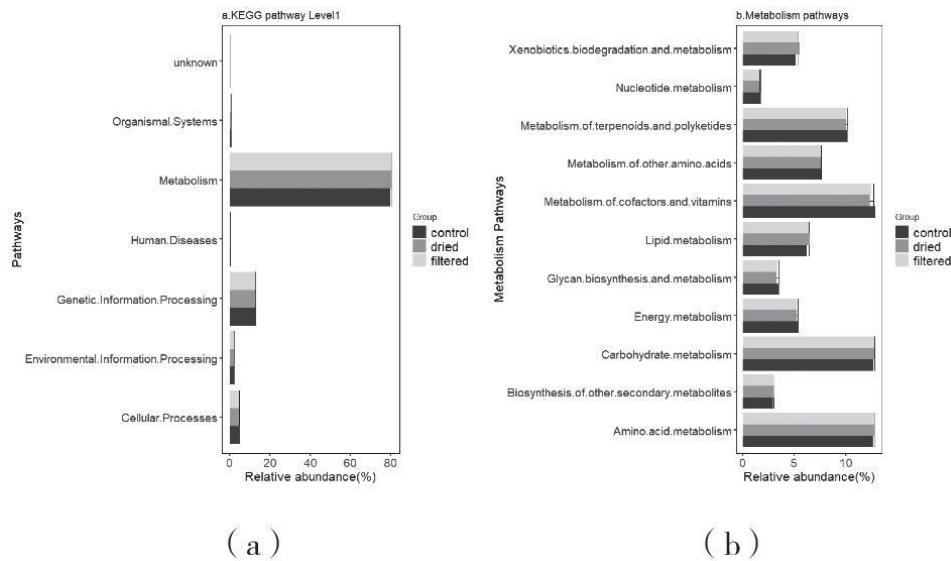


图 7 基因功能注释 KEGG 基因相对丰度

3 讨论

3.1 乌江渡水库沉积物细菌群落特征

湖泊/水库沉积物中主要优势类群包括变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门等^[19], 这与本研究的结果一致。

乌江渡水库沉积物中的主要优势类群为 Proteobacteria, 其中主要包括 γ -Proteobacteria 和 Δ -Proteobacteria。这些微生物在水体有机物污染降解、碳循环和地球化学循环中起到重要作用。Proteobacteria 可能与底泥的各种营养盐及其生物化学过程有密切关系。大多数 Proteobacteria 在碳和氮代谢过程中具有重要作用, 尤其对于可降解的有机质具有很强的代谢能力, 在富营养化水体中常见。其中 α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria 中包含许多反硝化细菌, 能够进行自养或异养反硝化。Chloroflexi 为光能自养型细菌, 兼性厌氧, 也存在专性厌氧菌^[20], 可以在不同条件下生存, 其中多数种类与有机污染物降解有关。作为优势类群之一的绿弯菌, 可能在乌江渡水库的污染物降解方面起着重要作用。放线菌门在降解有机物过程中起着主要作用, 拟杆菌门主要参与湖泊中亚硝酸盐还原过程^[21]。

3.2 不同处理沉积物微生物群落比较

原始沉积物与风干和过筛处理后微生物群落比较发现, 其中主要优势类群一致, 但是其相对丰度发生了一定程度的变化。优势细菌 Proteobacteria 和 Actinobacteria 存在显著的丰度差异, 而其他优势类群, 包括 Chloroflexi, Acidobacteria, 和 Bacteroidetes 没有显著的丰度差异。在纲水平上, Δ -Proteobacteria 存在显著差异。Proteobacteria 是水体微生物群落的典型细菌类群^[22]。沉积物中 γ -变形菌和 Δ -变形菌在变形菌门中占主导地位, 这是因为该类群中有大量与氮、硫元素代谢相关的菌群, 与物质循环息息相关^[12]。厚壁菌门能促进植物残留物的降解, 其中的芽孢杆菌和梭菌适应性和繁殖力强, 能产生芽孢耐受风干研磨这类的环境压力^[23]。Acidobacteria (酸杆菌门) 生态幅较宽, 能够适应多种环境条件。

风干和过筛处理后沉积物微生物群落多样性改变, 但是其群落多样性指数差异不显著。该结果表明, 微生物群落组成上多样性并未发生显著的改变, 风干处理和过筛处理, 可以被视为一种环境选择因子, 改变了细菌群落中各个类群的相对丰度。面对环境胁迫各个菌门的响应有所不同, 这与不同类群细菌具有的生理特性相关。另一方面, 可能是由于扩增子测序, 有许多序列无法注释到目以上的分类水平。其次, 风干和风干后过筛处理两者之间差异较小。此外, 原始沉积物由于含水量较高, 表层沉积物与水体的物质交换频繁, 许多水体中的细菌也会出现在表层沉积物中。因此, 沉积物含水量是导致沉积物中微生物群落结构变化的主要环境因子。失水成为环境选择压力, 筛选出能够适应干旱条件的微生物种类, 同时对干旱敏感的细菌类群将被淘汰。细菌的孢子(厚壁菌门的内孢子、放线菌的外生孢子)被认为是细菌脱水耐性的机制^[24]。

乌江渡水库不同采样点沉积物细菌群落结构存在差异, 各个采样点沉积物不同处理后的差异大小也不同。息烽采样点(XF)位于息烽河口处, 附近有一座磷肥厂, 加上网箱养鱼投放的饵料等^[17, 25], 造成了息烽河水体营养盐浓度较高, 水质受到矿产污染影响较大。此外, 息烽河周围农村居民耕作使用农药化肥等随地表径流进入河流和水库, 与该水库水质营养化程度和污染状态的空间异质性有关。

乌江渡水库沉积物中微生物代谢基因主要集中在碳水化合物、氨基酸代谢方面。对不同处理后沉积物微生物群落 16S 基因功能预测发现, 风干和过筛处理并未对微生物群落 8 类生物代谢通路基因有显著影响。

4 结论

(1) 乌江渡沉积物细菌群落存在空间异质性, 不同地理位置沉积物群落结构存在差异, 这主要是由各处不同的环境条件决定的。

(2) 乌江渡沉积物细菌群落在风干和过筛处理后存在显著差异, 其中优势类群的相对丰度发生变化, 风干和过筛处理的脱水过程对其中的微生物造成胁迫, 进而导致群落结构的变化。风干和过筛处理二者之间的差异不显著。

(3) 风干和过筛处理并未导致沉积物细菌群落多样性和基因功能发生显著差异。

(4) 建议对水体沉积物微生物的研究使用原始沉积物进行 DNA 提取测序, 不推荐进行风干或者过筛处理。

参考文献:

- [1] 毛海芳, 河江, 吕昌伟, 等. 沉积物中微生物量与有机碳形态的相关性研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 31(4):961-968.
- [2] 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[J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71(4):2162-2169.
- [3] LIU Y, QU X, ELSER J J, et al. Impact of nutrient and stoichiometry gradients on microbial assemblages in Erhai Lake and its input streams[J]. Water, 2019, 11(8):1711.
- [4] SHEN M, LI Q, REN M, et al. Trophic status is associated with community structure and metabolic potential of planktonic microbiota in plateau lakes[J]. Frontiers in microbiology, 2019, 10:2560.
- [5] YANG M, SHI J, WANG B, et al. Control of hydraulic load on bacterioplankton diversity in cascade hydropower reservoirs, Southwest China[J]. Microbial ecology, 2020, 80:537-545.
- [6] 马荣华, 杨桂山, 段洪涛, 等. 中国湖泊的数量、面积与空间分布[J]. 中国科学: 地球科学, 2011, 4(3):394-401.
- [7] PRAKASH O, SHOUCHE Y, JANGID K, et al. Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2013, 97(1):51-62.
- [8] SUN X, GAO Y, YANG Y. Recent advancement in microbial environmental research using metagenomics tools[J]. Biodiversity science, 2013, 21(4):393-400.
- [9] 罗建桦, 陶晔, 邢鹏, 等. 湖泊微生物红基因组学研究进展[J]. 湖泊科学, 2020, 32(1):271-280.
- [10] 王松波, MCLAUGHLIN R W, 程国军, 等. 湖泊沉积物中氨氧化微生物的 amoA 基因数量[J]. 环境科学研究, 2013, 26(10):1088-1094.
- [11] 彭磊, 赵建伟, 张钰, 等. 城市富营养化湖泊沉积物微生物多样性季节性变化[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(6):1012-1018.
- [12] 黄媛, 方序, 褚文珂, 等. 杭州西溪湿地沉积物细菌的群落结构和多样性[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5):1202-1209.
- [13] 金笑, 寇文伯, 于昊天, 等. 鄱阳湖不同区域沉积物细菌群落结构、功能变化及其环境因子的关系[J]. 环境科学研究, 2017, 30(4):529-536.
- [14] HAN X, SCHUBERT C J, FISKAL A, et al. Eutrophication as a driver of microbial community structure in lake sediments[J]. Environmental microbiology, 2020, 22(8):3446-3462.

-
- [15]刘鹤, 孟婷, 王敏, 等. 水源地水库沉积物中营养盐与微生物群落空间分布特征[J]. 水土保持通报, 2016, 36(3):24-37.
- [16]许可宸, 张莉, 王圣端, 等. 基于菌藻对比培养方法的洱海沉积物溶解性有机氮生物有效性评价[J]. 环境科学研究, 2017, 30(6):874-883.
- [17]冯彩艳, 闫海鱼, 俞奔, 等. 网箱养鱼对水库水体甲基汞的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(6):1438-1446.
- [18]OKSANEN J, BLANCHET F G, KINDT R, et al. Vegan community ecology package: ordination methods, diversity analysis and other functions for community and vegetation ecologists[J]. R package ver, 2015:2-3.
- [19]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, 2016:99.
- [20]GRÉGOIRE P, FARDEAU M L, JOSEPH M, et al. Isolation and characterization of *Thermanaerotherrix daxensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium pertaining to the phylum “Chloroflexi”, isolated from a deep hot aquifer in the Aquitaine Basin[J]. Systematic and applied microbiology, 2011, 34(7):494-497.
- [21]KRAFT B, TEGETMEYER H E, SHARMA R, et al. The environmental controls that govern the end product of bacterial nitrate respiration[J]. Science, 2014, 345(6197):676-679.
- [22]NEWTON R J, JONES S E, EILER A, et al. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2011, 75(1):14-49.
- [23]阚靖博, 李丽娜, 曲东, 等. 淹水培养过程中水稻土细菌丰度与群落结构变化[J]. 生物多样性, 2014, 22(4):508-515.
- [24]STONE M M, KAN J, PLANTE A F. Parent material and vegetation influence bacterial community structure and nitrogen functional genes along deep tropical soil profiles at the Luquillo Critical Zone Observatory[J]. Soil biology and biochemistry, 2015, 80:273-282.
- [25]林丹, 林晶, 丁丽, 等. 乌江渡水库养殖鱼类汞及脂肪酸的组成特征[J]. 生态学杂志, 2018, 37(3):786-792.