
# 环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心

■ 出版 科学出版社

2019

Vol.40 No.3

第40卷 第3期

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第40卷 第3期
2019年3月15日

# 目 次

Eco-Environmental Knowledge Web
环 境 科 学
Environmental Science
第40卷 第3期 2019年3月
Vol. 40, No. 3 Mar., 2019

# 丹江口库区表层浮游细菌群落组成与 PICRUSt 功能预测分析

张菲[1], 田伟[2], 孙峰[1], 陈彦[3], 丁传雨[1], 庞发虎[1], 姚伦广[1], 李玉英[1], 陈兆进[1*]
(1. 南阳师范学院农业工程学院, 南水北调中线水源区水安全河南省协同创新中心, 南阳 473061; 2. 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042; 3. 南阳师范学院生命科学与技术学院, 南阳 473061)

**摘要**: 浮游细菌是水生生态系统的重要组成部分, 是水体中氮素生物地球化学循环的主要驱动力. 本研究于2016年5月采集丹江口库区库心和渠首2个生态位点表层水样, 采用16S rDNA Miseq高通量测序技术研究其群落组成, 发现其主要由变形菌门、放线菌门、拟杆菌门等12门、139属细菌组成, 渠首样品浮游细菌群落多样性高于库心样品. PICRUSt功能预测分析表明, 浮游细菌涉及氨基酸运输和代谢、转录、能量产生和转换等24个基因功能家族, 表现出功能上的丰富性. 其中35个参与氮代谢的KO(表示通路)中库心高于渠首为20个, 渠首高于库心的为15个. 两样品中检测到涉及固氮作用(*nifH*)、硝化作用(*hao*)、反硝化作用(*narG*、*nirK*、*norB*、*nosZ*)、氮同化还原及异化还原作用(*nasA*、*narB*、*napA*、*nirA*、*nirB*、*nrfA*)参与氮循环的关键基因相对丰度. 综合基因功能家族预测基因拷贝数和氮循环相关基因丰度分析, 丹江口库区库浮游细菌氮代谢能力整体趋势为库心高于渠首. 本研究从细菌群落组成、功能角度初步分析了丹江口库区不同生态位点氮循环的差异, 为丹江口水库水环境保护提供了参考依据.

**关键词**: 浮游细菌; 细菌群落组成; 高通量测序; PICRUSt 功能预测; 氮代谢
**中图分类号**: X172; X524 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2019)03-1252-09 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201806122

# Community Structure and Predictive Functional Analysis of Surface Water Bacterioplankton in the Danjiangkou Reservoir

ZHANG Fei[1], TIAN Wei[2], SUN Feng[1], CHEN Yan[3], DING Chuan-yu[1], PANG Fa-hu[1], YAO Lun-guang[1], LI Yu-ying[1], CHEN Zhao-jin[1*]
(1. Collaborative Innovation Center of Water Security for Water Source Region of Mid-route Project of South-North Water Diversion of Henan Province, School of Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China; 2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China; 3. School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

**Abstract**: Bacterioplankton are important components of aquatic ecosystems, and play a crucial role in the global biogeochemical cycle of nitrogen. In this study, surface-water samples were collected from Kuxin (the center of Danjiangkou Reservoir) and Qushou (the Middle Route of the South-to-North Water Diversion Project's canal head) in the Danjiangkou Reservoir in May 2016. Total DNA was isolated, and high-throughput sequencing was performed to analyze the community structure and diversity of bacteria. Phylogenetic analyses of 16S rDNA sequences showed that bacterial communities included species from 12 major phylogenetic groups. The predominant phylogenetic groups included Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Cyanobacteria, and Verrucomicrobia. The microbial biodiversity of Danjiangkou Reservoir bacterioplankton was greater in water samples from Qushou than in those from Kuxin. PICRUSt (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states) was used to determine the metabolic and functional abilities of the observed bacterial communities. Our results revealed a wide genetic diversity of organisms involved in various essential processes, such as Amino acid transport and metabolism, Transcription, Energy production and conversion, and Carbohydrate transport and metabolism. Thirty-five metabolic pathways involving nitrogen were detected. Key genes impacting the nitrogen cycle were detected in both the Kuxin and Qushou samples, and these encoded enzymes involved in nitrogen fixation (*nifH*), nitrification (*hao*), denitrification (*narG*、*nirK*、*norB*、*nosZ*), and assimilatory and dissimilatory nitrogen reduction to ammonia (*nasA*、*narB*、*napA*、*nirA*、*nirB*、*nrfA*). Copy numbers of 16S rRNA genes of each detected phylotype of Danjiangkou Reservoir bacterioplankton were uniformly higher in water samples from Kuxin than in water samples from Qushou. Our analyses of differences in nitrogen abatement potential between water samples, based on bacterial community composition and function, provide a foundation for setting water environmental protection policies in the Danjiangkou Reservoir.

**Key words**: bacterioplankton; bacterial community structure; high-throughput sequencing; PICRUSt analysis; nitrogen metabolism

**收稿日期**: 2018-06-12; **修订日期**: 2018-09-02
**基金项目**: 国家自然科学基金项目(51879130, 41601332, U1704124); 河南省科技攻关计划项目(172102110259, 182102110468); 河南省教育厅高等学校重点科研项目(16A210012); 河南省南水北调中线水源区水生态安全创新型科技团队专项(17454)
**作者简介**: 张菲(1992~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向主要为环境微生物学, E-mail: 2609332376@qq.com
* 通信作者, E-mail: Zhaojin_chen@163.com

浮游细菌是水生生态系统的重要组成部分，其可通过同化、异化等代谢过程来影响该生态系统中的物质循环、污染物释放等生物地球化学循环过程[1~3]. 丹江口水库作为南水北调中线工程核心水源区，其水质状况直接关系到受水区居民的饮水安全. 长期监测表明，由于存在农业面源、村镇生活污水等污染，造成丹江口库区总氮超标[4,5]. 有研究表明，微生物介导的氮代谢是地球氮循环的主要驱动力[6,7]. 高通量测序技术能高通量得到特定的 DNA 片段，全面地展示生物群落的组成结构[8]. 针对丹江口库区浮游细菌，目前本课题组和其他研究者已采用高通量测序技术（high throughput sequencing）技术等方法开展了相关研究，初步探究了其群落组成和影响因素[5,9~11]，但目前针对其功能，特别是氮循环过程中细菌群落组成和功能研究较少开展[12]. 同时，之前关于的高通量测序分析主要关注于细菌群落结构（$\alpha$ 和 $\beta$ 多样性），研究细菌群落组成、分布特征及其影响因素等，对其功能研究开展较少[9,13~17]. 基于高通量测序的 PICRUSt（phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states）功能预测分析相较于宏基因组研究，更方便快捷、成本也更低，同时预测效果可靠性较高[18]，目前该方法已在湖泊、海洋微生物研究中得到良好的应用[19~23]. 本课题组已成功采用 PICRUSt 软件预测丹江口库区表层沉积物[24]和库滨带[25]细菌功能，但目前丹江口库区浮游细菌功能研究尚未开展.

目前，PICRUSt 功能预测分析在丹江口库区浮游细菌功能研究中未见报道，其与高通量测序技术结合分析，将为探明库区浮游细菌群落组成和功能提供重要帮助. 因此，本研究选取丹江口库区库心和渠首 2 个生态点位，采用 16S rDNA MiSeq 高通量测序技术研究表层浮游细菌群落组成，结合 PICRUSt 分析预测浮游细菌功能，重点分析氮循环相关基因表达情况，通过微生物学角度分析丹江口库区不同位点氮的循环差异，以期为丹江口水库水环境保护提供参考依据.

## 1　材料与方法

### 1.1　样品采集与理化指标测定

根据丹江口水库的地理位置特征和人类活动影响程度，选取属于河南省南阳市的丹江库区库心（样品编号为 K，坐标为 32°45′06.16″N 和 111°34′45.09″E）和渠首（样品编号为 Q，位于陶岔渠首大坝取水口上游，坐标为 32°40′02.76″N 和 111°37′47.12″E）[5,9]. 参照文献[26]于 2016 年 5 月用柱状采水器采集表层（深度 50 cm）水样 2 L，所有点位均取平行样 3 组（分别用 K1、K2、K3 和 Q1、Q2、Q3 表示库心和渠首样品 3 组平行样品）. 600 mL 水样用于提取细菌总 DNA，置于预先灭菌容器中存于冰盒，运回实验室后进行检测分析，剩余水样用于水质指标测定. 参照文献[26]测定水样 pH 值、总氮（TN）、氨氮（$NH_4^+$-N）、总磷（TP）、化学需氧量（COD）、高锰酸盐指数、溶解氧（DO）、透明度（SD）以及叶绿素 a 含量（Chla）等理化指标.

### 1.2　样品总 DNA 提取

600 mL 表层新鲜水样经 20 μm 筛绢预过滤，以除去大型浮游植物和浮游动物. 预过滤后的水样经 0.22 μm 无菌微孔滤膜（Pall Life sciences，Mumbai，India）过滤，用以收集浮游细菌，将滤膜剪碎置于 50 mL 无菌离心管中. 按照 Omega Water DNA Kit（Omega，USA）的说明，提取水体中的样品总 DNA.

### 1.3　高通量测序

采用细菌通用引物 338F 和 806R 对 16S rRNA 基因的 V3～V4 区进行 PCR 扩增，扩增的反应条件为：94℃，5 min；30×（94℃，30 s；54℃，30 s；72℃，45 s）；72℃，10 min. 扩增体系（20 μL）为：5×FastPfu Buffer 4 μL、2.5 mmol·L$^{-1}$ dNTPs 2 μL、Forward Primer（5 μmol·L$^{-1}$）0.8 μL、Reverse Primer（5 μmol·L$^{-1}$）0.8 μL、FastPfu Polymerase 0.4 μL、DNA 模板 10 ng[5,16]. 采用上海美吉生物医药科技有限公司的 MiSeq PE300 测序仪（Illumina Inc，San Diego，CA，USA）进行序列测定.

### 1.4　数据分析

#### 1.4.1　高通量数据分析

将 Illumina MiSeq 测序得到的下机数据（Raw Data）经处理后得到 Tags 序列，与数据库（Gold database）进行比对，检测嵌合体序列，并最终去除其中的嵌合体序列，得到最终的有效数据（Effective Tags）. 采用 QIIME（quantitative insights into microbial ecology）进行生物信息学分析，根据序列的相似度，将序列归为多个 OTU（operational taxonomic unit）[27]. 为了得到每个 OTU 对应的物种分类信息，采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析，并在各个分类水平统计每个样品的群落组成. 比对分类使用 SILVA 数据库[28]. 选取相似度在 97% 条件下的 OTU 生成预期的稀释曲线[29]. 利用 UPGMA 聚类分析进行细菌群落分布、聚类分析. 采用 STAMP 软件[30]比较分析不同样品细菌群落结构的差异（$P<0.05$ 显著性差异和 $P<0.01$ 极显著差异）.

### 1.4.2 PICRUSt 功能预测分析

功能和代谢途径预测采用 PICRUSt 软件进行分析，利用 QIIME 获得的 closed OTU-table 与 COG、KEGG 数据库进行比对，获得不同的数据库功能预测信息，具体分析步骤基于在线分析平台（http://picrust.github.io/picrust/）[18].

## 2 结果与分析

### 2.1 丹江口库区水质理化性质

2016 年 5 月对丹江口水库库心、渠首的理化监测结果表明各水体的水质总体较好，除 TN 和高锰酸盐指数其他各项指标符合《地表水环境质量标准》（GB 38382-2002）Ⅰ类水标准要求（表 1）. 库心、渠首样品 TN 均超过 0.90 mg·L$^{-1}$，为Ⅲ类地表水标准. 库心、渠首样品高锰酸盐指数均超过 3.00 mg·L$^{-1}$，为Ⅱ类地表水标准. 长期监测表明，丹江口水库水质总体较好，符合《地表水环境质量标准》（GB 38382-2002）Ⅱ类（饮用水源）标准，但存在农业面源、工业废水以及村镇生活污水等污染，其中 TN 明显超标[4,5]，本实验监测结果与上述结果一致.

**表 1 各样品主要理化参数**

Table 1 Physical and chemical properties of the samples

| 样品 | pH 值 | 高锰酸盐指数 /mg·L$^{-1}$ | TN /mg·L$^{-1}$ | $NH_4^+$-N /mg·L$^{-1}$ | TP /mg·L$^{-1}$ | COD /mg·L$^{-1}$ | Chla /mg·m$^3$ | SD /m | DO /mg·L$^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 库心 | 8.50 ± 0.02 | 3.46 ± 0.01 | 0.96 ± 0.01 | 0.069 ± 0.009 | 0.02 | 11.60 ± 0.10 | 2.13 ± 0.06 | 5 | 9.17 ± 0.06 |
| 渠首 | 8.70 ± 0.01 | 3.81 ± 0.01 | 0.91 ± 0.01 | 0.041 ± 0.005 | 0.02 | 13.97 ± 0.25 | 2.42 ± 0.03 | 2.99 ± 0.01 | 7.50 ± 0.03 |

### 2.2 不同样品浮游细菌群落结构分析

#### 2.2.1 高通量测序结果及多样性的评估

高通量测序结果表明，样品平均测序序列条数为25 582，样品的文库覆盖率（good's coverage）高于 99.50%，在测序条数达到20 000条以上时稀释性曲线趋向平稳，表明测序数据量合理，能够代表物种的丰富度. 采用群落丰富度指数 Chao1 和 Ace、群落多样性指数 Shannon 指数、Simpson 指数和文库覆盖率等对丹江口库区浮游细菌群落进行评估，结果表明样品具有丰富的群落组成，其群落多样性均较高（表 2）. 综合 Sobs、丰富度指数 Chao1 和 Ace 以及多样性指数 Simpson、Shannon、文库覆盖率，渠首样品浮游细菌群落多样性高于库心样品.

**表 2 不同样品浮游细菌多样性评估表**

Table 2 Estimation of rhizobacteria community diversity in different samples

| 样品 | 序列条带数 | Sobs 指数 | Shannon 指数 | Simpson 指数 | Ace 指数 | Chao 1 指数 | 覆盖率/% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 库心 | 27 098 ± 4 940 | 355 ± 29 | 4.13 ± 0.09 | 0.027 9 ± 0.002 7 | 426 ± 23 | 437 ± 37 | 99.70 ± 0.05 |
| 渠首 | 24 067 ± 2 212 | 404 ± 82 | 4.13 ± 0.17 | 0.028 8 ± 0.003 4 | 508 ± 107 | 510 ± 101 | 99.56 ± 0.12 |

#### 2.2.2 细菌群落组成及 Beta 多样性分析

高通量测序结果表明，库心和渠首样品浮游细菌主要由 12 个门组成，包括变形菌门（Proteobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、厚壁菌门（Firmicutes）、蓝菌门（Cyanobacteria）、疣微菌门（Verrucomicrobia）等. 属于变形菌门、放线菌门、拟杆菌门的序列总和占全部序列的 84.10% ~93.50%，这些细菌为优势种群（图 1）. 对其他分类单元细菌进行分析，库心样品包含 9 门、21 纲、42 目、61 科、83 属，渠首样品包含 10 门、20 纲、40 目、56 科、73 属，表现出群落组成的丰富性（图 2）.

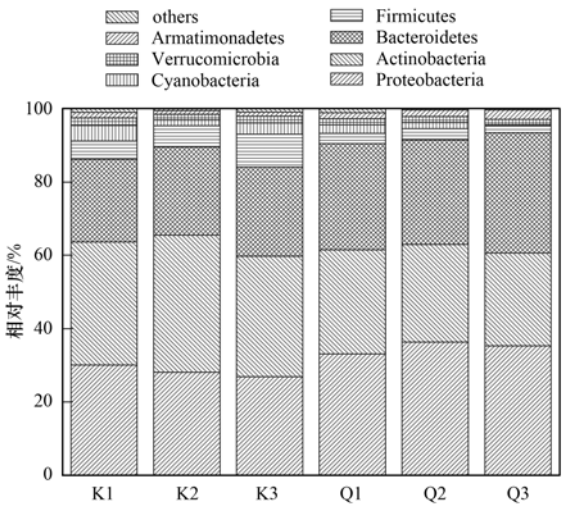



**图 1 不同样品门水平上物种相对丰度分布**

Fig. 1 Relative read abundance of bacterioplankton phyla in community structures of different samples

基于 unweighted unifrac 的 UPGMA 聚类分析能描述不同样品间群落差异，如果两个样品距离较近，表示这两个样品的物种组成较相似. 丹江口库区浮游细菌群落的 UPGMA 聚类分析（OTUs 水平）结果如图 3 所示. 在 0.09 的相似性水平上，库心和渠首样品分为 2 大组，结果表明不同生态位点样品浮游细菌群落结构有所差异.

#### 2.2.3 不同样品差异细菌分析

为了研究丹江口库区不同生态位点浮游细菌群

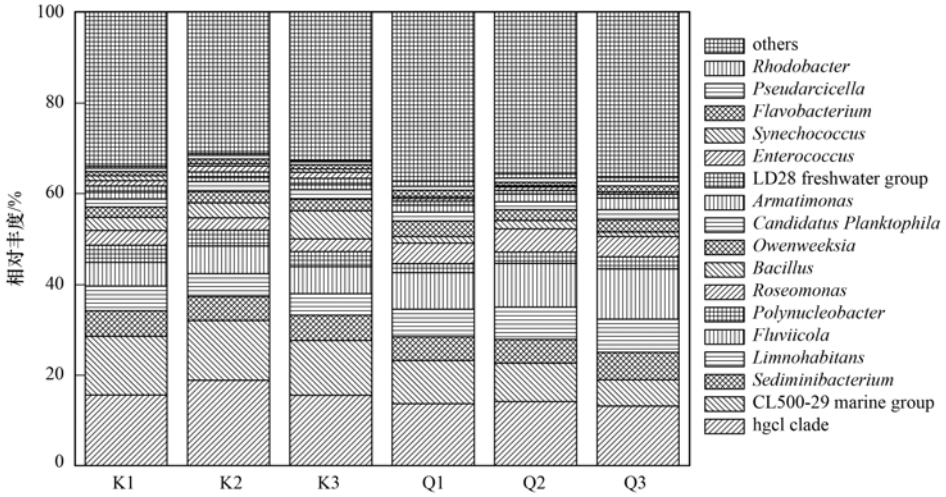



**图 2　不同样品门属水平上物种相对丰度分布**

Fig. 2　Relative read abundance of bacterioplankton genera in the community structures of different samples

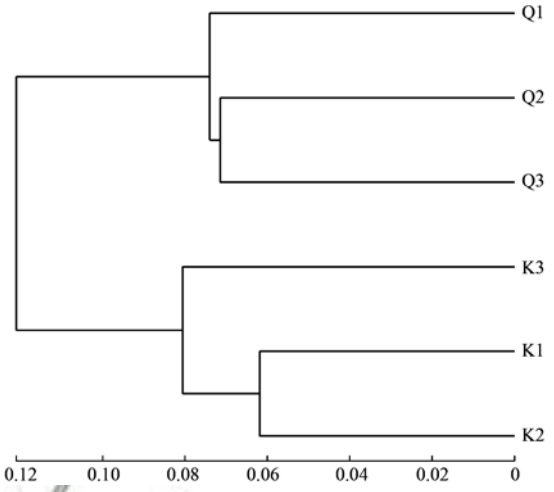



**图 3　不同样品 UPGMA 聚类**

Fig. 3　UPGMA clusters of different bacterioplankton communities

落的差异，笔者采用 STAMP 软件[30]在 $P<0.05$ 显著性水平对门和属分类单元进行了分析，结果如图 4 所示. 在门的水平上，占群落主要组成的变形菌门、放线菌门和拟杆菌门存在显著差异[图 4(a)]. 其中变形菌门和拟杆菌门在渠首样品中平均占比为 34.95% 和 30.15%，显著高于库心样品的 28.43% 和 23.70%. 放线菌门在库心样品平均占比为 34.67%，显著高于渠首样品的 26.82%. 在属的水平上，共有 25 个属的细菌存在差异(STAMP 分析时去除 unclassified 的细菌)，主要分布于变形菌门(17 个属)、厚壁菌门(4 个属)、拟杆菌门(2 个属)和放线菌门(2 个属)[图 4(b)]. 其中库心显著高于渠首样品有 9 个属，为变形菌门的 *Polynucleobacter*[库心平均占比(K，下同)4.85%，渠首平均占比(Q，下同)3.49%]、LD28 freshwater group (K：1.84%，Q：1.22%)、*Candidatus_Cryptoprodotis*(K:0.06%，Q:0.00%)、*Candidatus_Hepatincola*(K:0.02%，Q:0.00%)，厚壁菌门的 *Enterococcus*(K：1.75%，Q：0.87%)、*Lactococcus*(K:0.78%，Q:0.36%)、*Alkaliphilus*(K：0.34%，Q:0.11%)、*Oceanobacillus*(K:0. 14%，Q:0.05%)和放线菌门 CL500-29 marine group(K:17.57%，Q:11.54%). 渠首样品属水平显著库心样品的有 16 个属，为变形菌门的 *Piscinibacter*(K:0.00%，Q:0.02%)、OM60_NOR5_clade(K：0.00%，Q:0.03%)、*Caulobacter*(K：0.02%，Q：0.07%)、*Sulfuritalea*(K:0.00%，Q:0.07%)、*Dechloromonas*(K:0.00%，Q:0.06%)、BD1-7 clade(K：0.00%，Q:0.08%)、*Silanimonas*(K:0.00%，Q：0.10%)、*Inhella*(K:0.01%，Q:0.12%)、*Rheinheimera*(K:0.10%，Q:0.22%)、*Aeromonas*(K:0.01%，Q:0.16%)、*Rhodobacter*(K：0.54%，Q：1.40%)、*Roseomonas*(K:4.03%，Q:6.84%)、*Limnohabitans*(K：7.05%，Q：10.02%)，拟杆菌门的 *Pseudarcicella*(K：1.06%，Q：1.40%)、*Fluviicola*(K:7.94%，Q:13.94%)和放线菌门的 *Dietzia*(K:0.00%，Q:0.01%).

## 2.3　PICRUSt 功能预测分析

### 2.3.1　功能基因家族组成

为了获得丹江口库区不同位点浮游细菌的功能，本研究采用 PICRUSt 软件[18]进行菌群预测分析. 基于 COG(clusters of orthologs groups)数据库预测的结果表明，除核结构功能基因家族(nuclear structure)缺失之外，另外 24 个基因功能家族均具有数值(图 5). 其中氨基酸运输和代谢(amino acid transport and metabolism)、转录(transcription)、能量产生和转换(energy production and conversion)、碳水化合物的运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism)、细胞壁/细胞膜/膜结构的生物合

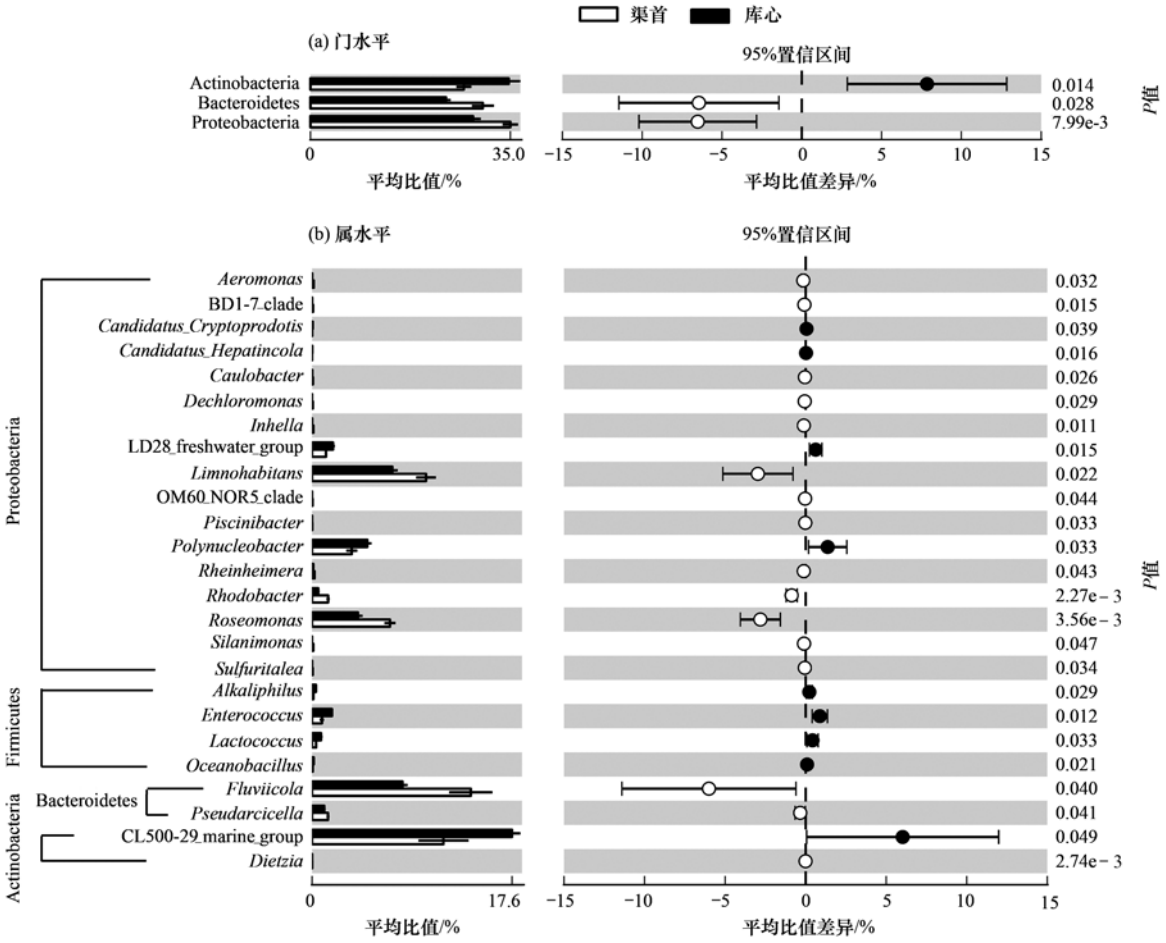



**图 4 不同样品门和属水平上差异细菌分布**

Fig. 4 Taxa with statistical differences at phylum and genus levels in different samples

成(cell wall/membrane/envelope biogenesis)、信号转导机制(signal transduction mechanisms)、无机离子转运与代谢(inorganic ion transport and metabolism)、翻译、核糖体结构和生物合成(translation, ribosomal structure and biogenesis)八大类功能基因家族为主要功能基因家族，占比之和为53.55% ~53.73%. 未能很好注释的基本预测功能家族(general function prediction only)和未知功能基因家族(function unknown)占比分别为8.32% ~8.49%和8.59% ~8.93%(图5). 除胞外结构

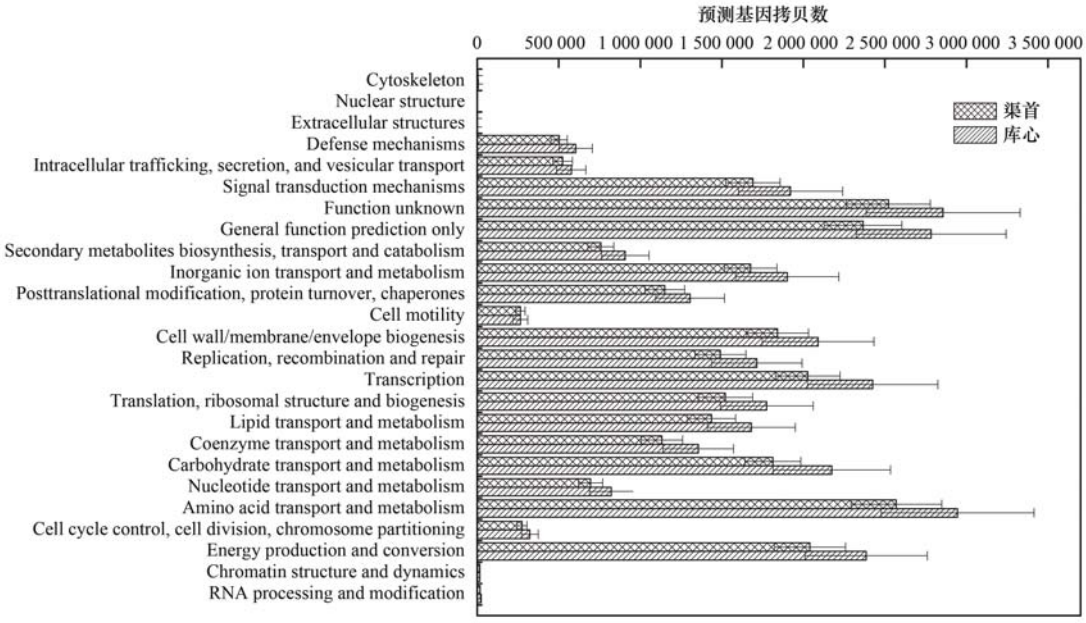



**图 5 不同样品浮游细菌 PICRUSt 功能预测**

Fig. 5 PICRUSt metabolic predictions of the bacterioplankton communities from different samples

(Extracellular structures)和细胞运动(Cell motility)之外，其他 22 个基因功能家族预测基因拷贝数均为库心样品高于渠首样品.

### 2.3.2　氮代谢相关基因分析

LeBrun 等[31]的研究表明，PICRUSt 能较为准确地预测功能基因的存在与否及其丰度，经过比较，准确性较微阵列分析(microarray analysis)更高. 因此，PICRUSt 可以用于分析丹江口库区氮循环相关基因分析. 为研究丹江口库区浮游细菌氮代谢相关基因，笔者将 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)数据库中参与氮代谢 60 个直系同源基因(KEGG orthology)与 PICRUSt 功能预测结果进行比对，挑出浮游细菌样品中具有预测基因拷贝数的氮代谢相关的 KO(表示通路)，结果如图 6 所示. 结果表明，KEGG 数据库中 60 个与氮代谢相关的 KO 中 35 个 KO 具有数值，表现出丰富的氮代谢能力. 从图 6 的氮代谢基因拷贝数聚类分析结果可以看出，库心和渠首样品各自生物学重复(K1 ~ 3 和 Q1 ~ 3)聚集于一起，表明具有较好的重复性，库心和渠首样品在聚类分析树中相互分开，表明不同位点样品氮代谢具有差异. 其中库心高于渠首的 KO 有 20 个，渠首高于库心的 KO 有 15 个(图 6).

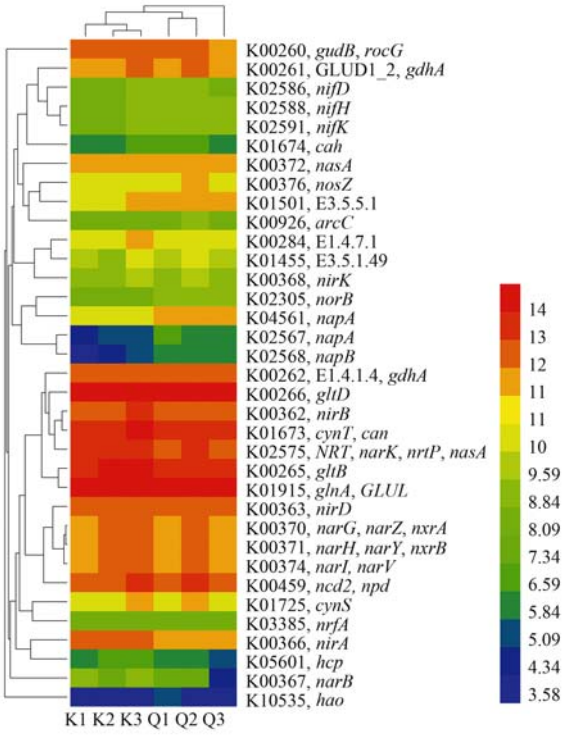
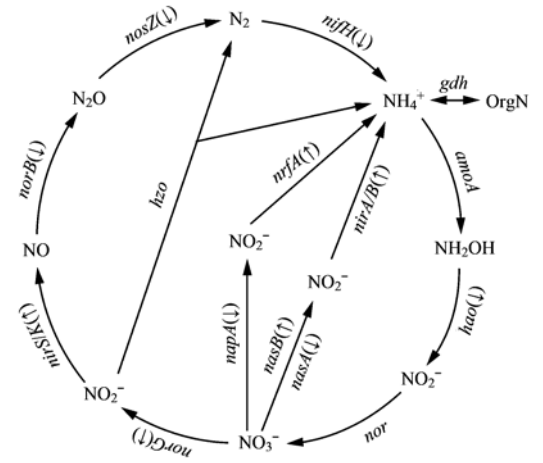



**图 6　氮代谢相关 KO 预测基因拷贝数热图**

Fig. 6　Heat map of nitrogen metabolism-related KO based on predicted gene copy

微生物介导的氮代谢是地球氮循环的主要驱动力，本研究重点比较分析不同位点浮游细菌氮循环(硝化、反硝化、氨化及固氮等过程)相关基因表达差异. 因此，将 35 个氮代谢相关 KO 中参与氮循环的关键基因筛选出，并进行统计归类，得到氮循环途径各类基因数量(图 7)[7]. 结果表明，PICRUSt 预测了部分氮循环关键基因的相对丰度，主要有固氮作用的固氮酶基因 *nifH*，硝化过程的羟胺氧化还原酶基因 *hao*，反硝化过程的硝酸还原酶基因 *narG*、亚硝酸还原酶基因 *nirK*、一氧化氮还原酶基因 *norB* 以及氧化亚氮还原酶的编码基因 *nosZ*，氮同化还原及异化还原作用过程中的硝酸盐同化还原酶基因 *nasA*、*narB* 和异化还原酶基因 *napA*、亚硝酸盐同化还原酶基因 *nirA*、*nirB* 和异化还原酶基因 *nrfA*[7,32]. 其中库心样品基因相对丰度高于渠首样品的有氮同化还原及异化还原作用过程中的 *nirA*、*nirB*、*narB* 和 *nrfA*，反硝化过程的 *narG*，硝化过程的 *nirK*. 渠首样品基因相对丰度高于库心样品的有固氮作用 *nifH*，硝化过程的 *hao*，氮同化还原及异化还原作用过程中的 *napA* 和 *nasA*，反硝化过程的 *nosZ* 和 *norB*(图 7).




↑(↓)表示库心样品该基因相对丰度较渠首样品升高(或降低)

**图 7　不同样品组间氮循环过程及其关键基因相对丰度差异[7]**

Fig. 7　Differences in relative abundances of the key functional genes related to N metabolism between Kuxin and Qushou samples

## 3　讨论

### 3.1　丹江口库区表层浮游细菌群落分析

浮游细菌是水生态系统的重要组成部分，研究其群落组成和功能对于管理和维护丹江口水库生态环境具有深远的意义[3]. 长期监测表明丹江口库区承载着较大的氮、磷负荷，其中 TN 明显超标[4,5]. 2016 年 5 月监测结果与上述结果一致，库心、渠首样品 TN 均超过 0.90 mg·L$^{-1}$，为Ⅲ类地表水标准. 高通量测序结果表明，丹江口库区库心和渠首样品具有丰富的群落组成，由变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门等 12 个门组成，渠首样品浮游细菌群落多样性高于库心样品. 微生物介导的氮代谢

是地球氮循环的主要驱动力，之前丹江口库区浮游细菌群落分析表明浮游细菌受到水体中 TN、$NH_4^+$-N影响[5]. 库心和渠首样品门和属的水平上差异分析表明，显著差异的细菌主要分布于变形菌门、放线菌门、拟杆菌门和厚壁菌门. 之前研究表明，水体中常见固氮菌 Clusters I 类群由大部分 α-、β-、γ-、δ-变形菌和蓝细菌/蓝藻(Cyanobacteria)等组成，同时氨氧化细菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB)主要包括 β-变形菌纲的亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)与亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)以及 γ-变形菌纲的亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)等组成[7]. 属水平上，变形菌门的 *Rheinheimera*、*Polynucleobacter*、*Dechloromonas*、*Rhodobacter*、*Limnohabitans*、*Rheinheimera*，拟杆菌门的 *Pseudarcicella*、*Fluviicola* 和放线菌门的 *Dietzia* 等 25 个属的细菌存在显著差异(图 4). 这些属的细菌中，*Rheinheimera* 在氮的固定[33]、*Polynucleobacter* 在溶解性有机物降解[34]、*Dechloromonas* 在亚硝酸盐还原为一氧化氮[35]、*Rhodobacter* 在有机氮复合物降解[36]、*Fluviicola* 在溶解性有机氮利用[37]、*Limnohabitans* 在硝酸盐还原[38]等氮的循环过程起到作用，影响水体中氮元素生物化学地球循环.

### 3.2 丹江口库区浮游细菌功能预测分析

微生物可以通过氨化作用、硝化作用、反硝化作用、固氮作用等将 $N_2$、无机氮化合物、有机氮化合物在自然界中相互转化，从而驱动地球氮元素的生物地球化学循环[6,7]. 丹江口库区面临 TN 超标的现状，了解丹江口库区氮循环过程中细菌群落组成和功能对丹江口水质保护具有重要意义. Dang 等[12]采用结合荧光定量 PCR 和高通量测序技术测定了丹江口库区表层沉积物中氨氧化细菌和氨氧化古菌基因丰度和分布. 针对丹江口库区浮游细菌氮循环过程中细菌群落组成和功能研究较少开展的现状，基于高通量测序的 PICRUSt 分析能很好满足研究的需要[31]. 董志颖等[19]采用 PICRUSt 功能预测分析过量氮输入对细菌群落代谢潜力的影响，发现氮输入在一定程度上影响了微宇宙中的固氮、硝化、异化硝酸盐还原、反硝化、异化硝酸盐还原到铵和同化硝酸盐还原途径的关键基因. 本论文对库心、渠首高通量测序结果进行 PICRUSt 功能预测分析，结果表明丹江口库区浮游细菌具有丰富的功能，其中 22 个基因功能家族预测基因拷贝数均为库心样品高于渠首样品，该结果与浮游细菌群落多样性分析相反. 氮代谢相关的 KO 分析表明，库心高于渠首的 KO 有 20 个，渠首高于库心的 KO 有 15 个. 接着对氮循环(硝化、反硝化、氨化及固氮等过程)基因进行分析，结果检测到涉及固氮作用(*nifH*)、硝化作用(*hao*)、反硝化作用(*narG*、*nirK* 等)和氮同化还原及异化还原作用(*nasA*、*narB* 等)等基因的相对丰度，这些基因在氮循环中起到关键作用[7,32]. 对不同位点氮循环关键基因相对丰度进行比较分析，发现库心高于渠首样品的有 6 个，主要涉及氮同化还原及异化还原作用(*nirA*、*nirB*、*narB* 和 *nrfA*,)、反硝化作用(*narG*)和硝化作用(*narG*)；渠首高于库心样品的有 6 个，主要涉及固氮作用(*nifH*)、硝化作用(*hao*)反硝化(*nosZ*, *norB*)氮同化还原及异化还原作用(*napA*、*nasA*). 结合基因功能家族预测基因拷贝数和氮循环相关基因丰度分析，丹江口库区库浮游细菌氮代谢能力整体趋势为库心高于渠首. 高通量测序技术结合 PICRUSt 功能预测分析在丹江口库区浮游细菌研究中应用，为探明库区浮游细菌群落组成和功能提供重要帮助.

## 4 结论

(1)本研究采用高通量测序的方法研究了丹江口库区库心和渠首两个生态位点浮游细菌群落组成，发现其主要由变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门等 12 个门 139 属细菌组成. 细菌群落分析表明不同位点群落组成有差异，在门的水平上变形菌门、放线菌门和拟杆菌门存在显著差异；在属的水平上，共有 *Rheinheimera*、*Polynucleobacter*、*Dechloromonas*、*Pseudarcicella*、*Fluviicola* 等 25 个属存在显著差异. 渠首样品浮游细菌群落多样性高于库心样品.

(2) PICRUSt 功能预测分析表明，浮游细菌涉及氨基酸运输和代谢、转录等 24 个基因功能家族，表现出功能上的丰富性. 结合基因功能家族预测基因拷贝数和氮循环相关基因丰度分析，丹江口库区浮游细菌氮代谢能力整体趋势为库心高于渠首.

**参考文献：**

[1] Hanson C A, Fuhrman J A, Horner-Devine M C, *et al*. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape [J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, **10**(7): 497-506.

[2] 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.

[3] 任丽娟, 何聃, 邢鹏, 等. 湖泊水体细菌多样性及其生态功能研究进展[J]. 生物多样性, 2013, **21**(4): 421-432.
Ren L J, He D, Xing P, *et al*. Bacterial diversity and ecological function in lake water bodies[J]. Biodiversity Science, 2013, **21**(4): 421-432.

[4] Chen P, Li L, Zhang H B. Spatio-temporal variations and source apportionment of water pollution in Danjiangkou Reservoir Basin, central China[J]. Water, 2015, **7**(6): 2591-2611.

[5] 陈兆进，丁传雨，朱静亚，等. 丹江口水库枯水期浮游细菌群落组成及影响因素研究[J]. 中国环境科学，2017，**37**(1)：336-344.
Chen Z J, Ding C Y, Zhu J Y, *et al*. Community structure and influencing factors of bacterioplankton during low water periods in Danjiangkou Reservoir[J]. China Environmental Science, 2017, **37**(1): 336-344.

[6] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, **16**(5): 263-276.

[7] 杨雪琴，连英丽，颜庆云，等. 滨海湿地生态系统微生物驱动的氮循环研究进展[J]. 微生物学报，2018，**58**(4)：633-648.
Yang X Q, Lian Y L, Yan Q Y, *et al*. Microbially-driven nitrogen cycling in coastal ecosystems[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, **58**(4): 633-648.

[8] van Dijk E L, Auger H, Jaszczyszyn Y, *et al*. Ten years of next-generation sequencing technology [J]. Trends in Genetics, 2014, **30**(9): 418-426.

[9] Gao W L, Chen Z J, Li Y Y, *et al*. Bioassessment of a drinking water reservoir using plankton: high throughput sequencing vs. traditional morphological method[J]. Water, 2018, **10**(1): 82.

[10] 陈兆进，陈海燕，李玉英，等. 南水北调中线干渠(河南段)浮游细菌群落组成及影响因素[J]. 中国环境科学，2017，**37**(4)：1505-1513.
Chen Z J, Chen H Y, Li Y Y, *et al*. Community structure and influencing factors of bacterioplankton in the Main cancel of the Mid-line Project of South-to-North Water Division in sections of Henan Province[J]. China Environmental Science, 2017, **37**(4): 1505-1513.

[11] 张明露，刘文君，李翠萍，等. 南水北调中线水源水的细菌群落和致病菌分析[J]. 给水排水，2015，**41**(6)：32-36.

[12] Dang C Y, Liu W, Lin Y X, *et al*. Dominant role of ammonia-oxidizing bacteria in nitrification due to ammonia accumulation in sediments of Danjiangkou reservoir, China [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, **102**(7): 3399-3410.

[13] 丁传雨，郑远，任学敏，等. 能源植物修复土壤镉污染过程中细菌群落分析[J]. 环境科学学报，2016，**36**(8)：3009-3016.
Ding C Y, Zheng Y, Ren X M, *et al*. Changes in bacterial community composition during the remediation of Cd-contaminated soils of bioenergy crops [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, **36**(8): 3009-3016.

[14] Li Z, Lu L H, Guo J S, *et al*. Responses of spatial-temporal dynamics of bacterioplankton community to large-scale reservoir operation: a case study in the Three Gorges Reservoir, China [J]. Scientific Reports, 2017, **7**(1): 42469.

[15] Peter H, Sommaruga R. Shifts in diversity and function of lake bacterial communities upon glacier retreat [J]. The ISME Journal, 2016, **10**(7): 1545-1554.

[16] Chen Z J, Zheng Y, Ding C Y, *et al*. Integrated metagenomics and molecular ecological network analysis of bacterial community composition during the phytoremediation of cadmium-contaminated soils by bioenergy crops [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, **145**: 111-118.

[17] Chen Z J, Yuan J, Sun F, *et al*. Planktonic fungal community structures and their relationship to water quality in the Danjiangkou Reservoir, China[J]. Scientific Reports, 2018, **8**(1): 10596.

[18] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, *et al*. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nature Biotechnology, 2013, **31**(9): 814-821.

[19] 董志颖，洪慢，胡晗静，等. 过量氮输入对寡营养海水细菌群落代谢潜力的影响[J]. 环境科学学报，2018，**38**(2)：457-466.
Dong Z Y, Hong M, Hu H J, *et al*. Effect of excess nitrogen loading on the metabolic potential of the bacterial community in oligotrophic coastal water[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2018, **38**(2): 457-466.

[20] Bowman J S, Ducklow H W. Microbial communities can be described by metabolic structure: a general framework and application to a seasonally variable, depth-stratified microbial community from the coastal West Antarctic Peninsula[J]. PLoS One, 2015, **10**(8): e0135868.

[21] Zhang Y, Li J, Cheng X H, *et al*. Community differentiation of bacterioplankton in the epipelagic layer in the South China Sea [J]. Ecology and Evolution, 2018, **8**(10): 4932-4948.

[22] Ward C S, Yung C M, Davis K M, *et al*. Annual community patterns are driven by seasonal switching between closely related marine bacteria[J]. The ISME Journal, 2017, **11**(11): 2637.

[23] Xiong J B, Xiong S L, Qian P, *et al*. Thermal discharge-created increasing temperatures alter the bacterioplankton composition and functional redundancy[J]. AMB Express, 2016, **6**(1): 68.

[24] 阴星望，田伟，丁一，等. 丹江口库区表层沉积物细菌多样性及功能预测分析[J]. 湖泊科学，2018，**30**(4)：1052-1063.
Yin X W, Tian W, Ding Y, *et al*. Composition and predictive functional analysis of bacterial communities in surface sediments of the Danjiangkou Reservoir[J]. Journal of Lake Sciences, 2018, **30**(4): 1052-1063.

[25] 孙峰，田伟，张菲，等. 丹江口库区库滨带植被土壤细菌群落多样性及 PICRUSt 功能预测分析[J]. 环境科学，2019，**40**(1)：421-429.
Sun F, Tian W, Zhang F, *et al*. Composition and predictive functional analysis of rhizosphere bacterial communities in riparian buffer strips in the Danjiangkou Reservoir, China[J]. Environmental Science, 2019, **40**(1): 421-429.

[26] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京：中国环境科学出版社，2002.

[27] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, **7**(5): 335-336.

[28] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, *et al*. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Research, 2013, **41** (D1): D590-D596.

[29] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, *et al*. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, **75**(23): 7537-7541.

[30] Parks D H, Tyson G W, Hugenholtz P, *et al*. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles [J]. Bioinformatics, 2014, **30**(21): 3123-3124.

[31] LeBrun E, Kang S. A comparison of computationally predicted functional metagenomes and microarray analysis for microbial P cycle genes in a unique basalt-soil forest[J]. F1000 Research, 2018, **7**: 179.

[32] 王朱珺，王尚，刘洋荧，等. 宏基因组技术在氮循环功能微生物分子检测研究中的应用[J]. 生物技术通报，2018，**34**

(1): 1-14.
Wang Z J, Wang S, Liu Y Y, *et al*. The applications of metagenomics in the detection of environmental microbes involving in nitrogen cycle[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, **34**(1): 1-14.

[33] Thajudeen J, Yousuf J, Veetil V P, *et al*. Nitrogen fixing bacterial diversity in a tropical estuarine sediments[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, **33**(2): 41.

[34] Watanabe K, Komatsu N, Ishii Y, *et al*. Effective isolation of bacterioplankton genus *Polynucleobacter* from freshwater environments grown on photochemically degraded dissolved organic matter[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, **67**(1): 57-68.

[35] Horn M A, Ihssen J, Matthies C, *et al*. *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, $N_2O$-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, **55**: 1255-1265.

[36] Jetten M S M. The microbial nitrogen cycle[J]. Environmental Microbiology, 2008, **10**(11): 2903-2909.

[37] Orsi W D, Smith J M, Liu S T, *et al*. Diverse, uncultivated bacteria and archaea underlying the cycling of dissolved protein in the ocean[J]. The ISME Journal, 2016, **10**(9): 2158-2173.

[38] Zeng Y H, Kasalicky V, Šimek K, *et al*. Genome sequences of two freshwater betaproteobacterial isolates, *Limnohabitans* species strains Rim28 and Rim47, indicate their capabilities as both photoautotrophs and ammonia oxidizers [J]. Journal of Bacteriology, 2012, **194**(22): 6302-6303.

**HUANJING KEXUE** Vol. 40 No. 3
Environmental Science (monthly) Mar. 15, 2019

# CONTENTS