

解析评价

DOI:10.3969/j.issn.1674-6732.2022.02.010

三峡库区不同沉积土微生物多样性分析

程飞¹, 张潇雪¹, 胡武静¹, 肖国生¹, 吴应梅¹, 杜慧慧^{1,2*}

(1. 重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆 404120; 2. 三峡库区可持续发展研究中心, 重庆 404120)

摘要:三峡库区微生物的变化影响淡水生态系统功能的发挥及人类健康,为探究三峡库区万州段不同沉积土微生物群落的多样性,于2018年3月对万州二桥两岸不同土样进行微生物调查,采用烘干法和重铬酸钾容量法对沉积土理化性质进行分析,采用平板稀释涂布法分析可培养微生物的数量,使用16S rDNA基因测序和构建系统进化树对沉积土微生物的群落组成及多样性进行评价。结果表明,不同沉积土的有机质含量存在差异,微生物数量表现为细菌>放线菌>真菌。通过生物信息学分析发现细菌多为假单胞菌属和不动杆菌属。为三峡库区的环境污染提供预警,对未来三峡库区生态环境的合理利用和治理具有重要意义。

关键词:三峡库区;沉积土;微生物多样性;系统发育树

中图分类号:Q938.2

文献标志码:A

文章编号:1674-6732(2022)02-0058-05

Microbial Diversity of Different Sedimentary Soils in the Three Gorges Reservoir Area

CHENG Fei¹, ZHANG Xiao-xue¹, HU Wu-jing¹, XIAO Guo-sheng¹, WU Ying-mei¹, DU Hui-hui^{1,2*}

(1. College of Biological and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China;
2. Research Center for sustainable development of the Three Gorges Reservoir Region, Chongqing 404120, China)

Abstract: The changes of microorganisms in the Three Gorges Reservoir area affect the function of freshwater ecosystems and human health. In March 2018, a microbiological investigation was conducted on different soil samples on both sides of the Wanzhou Second Bridge. The drying method and the potassium dichromate volumetric method were used to analyze the physical and chemical properties of the soil, the plate dilution coating method was used to analyze the number of cultivable microorganisms, the composition and diversity of soil microbial communities were analyzed by 16S rDNA gene sequencing and phylogenetic trees. The results show that there are differences in the organic matter content of different sedimentary soils, and the number of micro-organisms ranks in the sequence of bacteria > actinomycetes > fungi. Bioinformatics analysis found that the bacteria were mostly *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Therefore, this study provides an early warning for environmental pollution in the Three Gorges Reservoir area and will play an important role in the rational use and management of the ecological environment in the Three Gorges Reservoir area in the future.

Key words: The Three Gorges Reservoir Area; Sedimentary soil; Microbial diversity; Phylogenetic tree

三峡工程的运行承载着长江中下游的防洪与生态安全。三峡大坝建成以来,其水环境中的物理、化学和生物等因素均有一定程度的改变^[1],对三峡库区的生态和水文环境造成深远影响^[2]。三峡水库作为一种特殊水库生态系统^[3],带动着库区经济、城镇化、工业化的发展,人为干预及三峡工程的运行对库区环境均造成直接影响。水环境微

生物作为水生生态系统的主要参与者,不仅参与重要的生物化学反应,而且在水生食物网中具有关键性作用,而水位的波动可能会影响微生物群落在生物化学反应中的作用。因此,水体微生物以数量大、种类多和适应能力强等备受关注^[4]。水生环境的变化影响着库区微生物,进而影响着淡水生态系统功能的发挥和人类健康^[5]。研究该区域微生

收稿日期:2021-08-12;修订日期:2021-12-20

基金项目:重庆市科技局联合实施项目(cstc2018jcyjAX0770);重庆市教委青年项目(KJQN201801216)

作者简介:程飞(1994—),男,在读博士,主要从事环境微生物研究。

* 通讯作者:杜慧慧 E-mail:duhuihui2010@163.com

物群落组成,可为监测库区环境变化和水生生态功能提供重要的数据支撑。

水域中的底泥是物质迁移和转化的场所,而泥沙携带大量的污染负荷累积到底泥中,对三峡水库和长江水质构成潜在危害^[6]。底栖微生物群落结构的变化是衡量水体环境变化和演替的标志,同时底泥中的微生物也会影响水环境质量^[7]。因此,研究三峡库区腹地万州段微生物群落结构和多样性,有助于全面了解三峡库区水生态系统与水环境质量状况。现采集三峡库区万州段不同沉积土样品,结合生物信息学分析该区段微生物数量及物种多样性,为致病菌的筛选及防治提供数据参考,也为库区生态环境的合理利用和治理奠定基础。

1 研究方法

1.1 仪器与试剂

仪器:隔水式智能恒温培养箱(GHP-9080,上海一恒科学仪器有限公司);超净工作台(SW-SJ-2F,青岛明博环保科技有限公司);电子天平(FA1004,上海良平仪器仪表有限公司);高压灭菌锅(2540MK,山东博科再生医学有限公司);聚合酶链式反应仪(Proflex 3x32 ABI,美国赛默飞世尔科技公司);细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)。

试剂:无水乙醇(分析纯);低熔点琼脂糖(A8350-100g);溴酚蓝(B8120-5g);溴化乙锭(EB)核酸染料(G5560);50×电泳缓冲液(50×TAE, T1060)、DNA Marker 试剂 D2000 DNA Ladder(M1060);牛肉膏蛋白胨培养基(G8270-500g);马丁肉汤琼脂培养基(LA4810);高氏 I 号培养基(LA7000)。以上试剂均购自北京索莱宝科技有限公司,根据《微生物学实验》^[8]附录配制及灭菌。

1.2 样品采集

于 2018 年 3 月 23 日在三峡水库万州段长江二桥两岸的 4 个采样点进行沉积土的采集,其中二桥南为新区,人口较少,而二桥北为万州老城区,人口较密集,样品点位信息见表 1。用灭菌后的专用采土器以多点混合法采集 0~20 cm 处的沉积土,分别装入灭菌广口瓶,封口,6 h 内冰袋低温带回实验室,4℃保存备用。

表 1 沉积土样品点位信息

点位编号	点位名称	纬度	经度
T4	二桥南岸边	30°49'22"N	108°24'25"E
T5	二桥南水下 10 m	30°49'22"N	108°24'24"E
T6	二桥北岸边	30°49'47"N	108°24'10"E
T7	二桥北水下 10 m	30°49'45"N	108°24'13"E

1.3 沉积土理化性质分析

将采集的沉积土取一部分风干、过筛备用。用 pH 计测定沉积土的 pH 值,烘干法测定沉积土的含水率,重铬酸钾容量法测定土样的有机质含量^[9]。

1.4 微生物群落测定

微生物培养:称取土样 10 g 放入装有 90 mL 无菌水的锥形瓶中,加入无菌玻璃珠,充分振荡 30 min,得到 10^{-1} 菌悬液,10 倍倍比稀释,依次稀释到 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 共 6 个梯度,每个稀释度设置 3 个重复。细菌使用牛肉膏蛋白胨培养基于 37℃ 培养 24 h,放线菌使用高氏 I 号培养基于 28℃ 培养 3~5 d,真菌使用马丁肉汤琼脂培养基于 28℃ 培养 2~3 d。

沉积土中微生物数量的计数^[10]:每 1g 沉积土中微生物的数量 = 平板菌落数 / (稀释度 × 菌液量)。根据菌落的大小、颜色和形态等挑取单个菌落纯化后,采用甘油冻存和牛奶冻存 2 种方法于 -80℃ 冰箱中保藏菌种。

1.5 细菌 16S rDNA 全序列的测定

将分离纯化后的细菌进行 16S rDNA 序列测定。使用细菌提取基因组试剂盒提取纯化后细菌的基因组,以细菌通用引物 27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 和 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') 利用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增各菌的 16S rDNA 区序列^[11],扩增片断长度大约是 1.5 kb PCR 产物,PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.6 进化树构建

将细菌 16S rDNA 序列提交至美国国家生物信息中心 (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行核酸氨基酸序列相似性比较分析,选取相似度 99% 以上的物种进行命名,使用多序列比对 Clustal W 法进行多序列比对,使用 MAGEX10.1.8 软件以邻接法构建系统进化树,自举法 1 000 次检测进化树的可靠性。

2 结果与分析

2.1 不同沉积土理化性质

不同沉积土理化性质见表 2。由表 2 可见,水上、水下土样的 pH 值、有机质、有机碳和含水率均存在差异。不同沉积土的 pH 值均呈弱碱性。水下沉积土(T5、T7)有机质、有机碳含量以及含水率均高于水上沉积土(T4、T6)。沉积土理化性质的差异可能对微生物的数量造成一定的影响。

表 2 沉积土理化性质

点位编号	pH 值	ω (有机碳)/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ω (有机质)/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	含水率/%
T4	7.22 ± 0.02	7.25 ± 0.01	12.52 ± 0.01	20.16 ± 0.05
T5	7.60 ± 0.04	11.01 ± 0.09	18.98 ± 0.06	47.43 ± 0.19
T6	7.11 ± 0.01	7.10 ± 0.01	12.25 ± 0.01	16.10 ± 0.09
T7	7.67 ± 0.05	14.42 ± 0.11	24.85 ± 0.03	43.07 ± 0.15

2.2 沉积土中微生物的数量

不同点位沉积土中微生物的数量分布情况见图 1。由图 1 可见,不同沉积土中细菌、放线菌和真菌的数量存在差异,而 T4、T6 和 T5、T7 样品中微生物的数量差异较小。细菌、放线菌和真菌的数量分别为 7.05 ~ 7.59 \log^{10} CFU/g, 4.77 ~ 4.98 \log^{10} CFU/g, 3.28 ~ 3.49 \log^{10} CFU/g。沉积土微生物总数表现为:细菌 > 放线菌 > 真菌。长江二桥南、北两岸水上和水下的真菌和放线菌的数量没有明显差异。

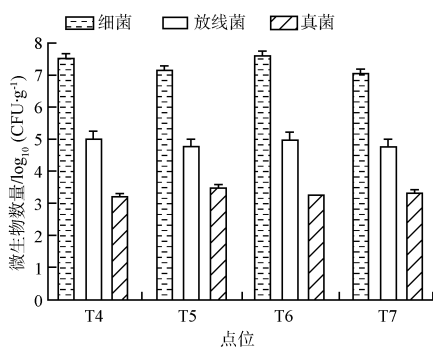


图 1 不同沉积土样品中微生物的数量分布

2.3 分子鉴定与系统进化分析

从不同沉积土分离的细菌中,选取菌落形态、大小、颜色等差异明显的 31 株进行 16S rDNA 鉴定。将所测序列提交至 NCBI,进行 Blast 比对,选取相似度和覆盖度 > 99% 进行物种命名。T4、T6 中分离的细菌多为假单胞菌属 (*Pseudomonas*), T5

样品中分离的细菌多为未培养微生物 (Uncultured bacterium clone), 有 7 株。T7 中分离的细菌种类较多,有不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、贪铜菌属 (*Cupriavidus*) 和芽孢杆菌 (*Bacillus*)。随后构建菌株系统进化树见图 2,图中进化树上的数字表示该分支的置信度,数值越大越可信,物种后的大写字母和数字代表分离株。

由图 2 可见, T5 底泥分离的细菌多聚为一枝,为未培养微生物 (Uncultured bacterium clone) 的不同分离株。而 T4 和 T6 样品中分离的多为假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 聚为一枝。T7 底泥中细菌的种类多,分属不同的分支中。由此可知,万州二桥北的沉积土样品中的细菌种类多,可能与人类活动有关。二桥南属新区,城镇人口相对较少,且江岸地势较陡直,人类活动较少;而江北属人口密集区、有大量排污口、江岸平缓、有较多大湾回水区、人类活动较频繁。

3 结论

通过采集三峡库区万州段南、北两岸 4 个不同沉积土样品,发现不同沉积土的有机质含量存在差异,结合微生物数量和分子生物学鉴定分析得到,不同沉积土样品中微生物数量表现为细菌 > 放线菌 > 真菌,且优势细菌为假单胞菌属和不动杆菌属。

4 讨论

沉积土中微生物能够敏感地反映沉积土中生态系统的微小变化,微生物可通过自身代谢活动影响沉积土-水生生态系统的物质循环,同时也在环境保护方面发挥重要的作用^[12-13]。水体沉积物中含有的污染物,如重金属、微生物等,再次被悬浮会增加水体有害物质的浓度,影响水质^[14]。微生物多样性是反映该群落结构变化的关键指标,而研究土壤微生物群落结构的变化是研究土壤质量和环境变化的重要依据^[15]。随着人口的增长和经济的发展,越来越多的工农业废水排放至水库等水生系统中,从而导致微生物的沉积、水体富营养化等。细菌群落的组成和多样性会随水质的变化而变化^[16],直接影响库区各种物质和能量的代谢,尤其对环境敏感的微生物。细菌结构的变化不仅与环境有关,还与水库周边地区和支流的微生物种群有关^[17]。另外,微生物的组成和丰富度与沉积土深

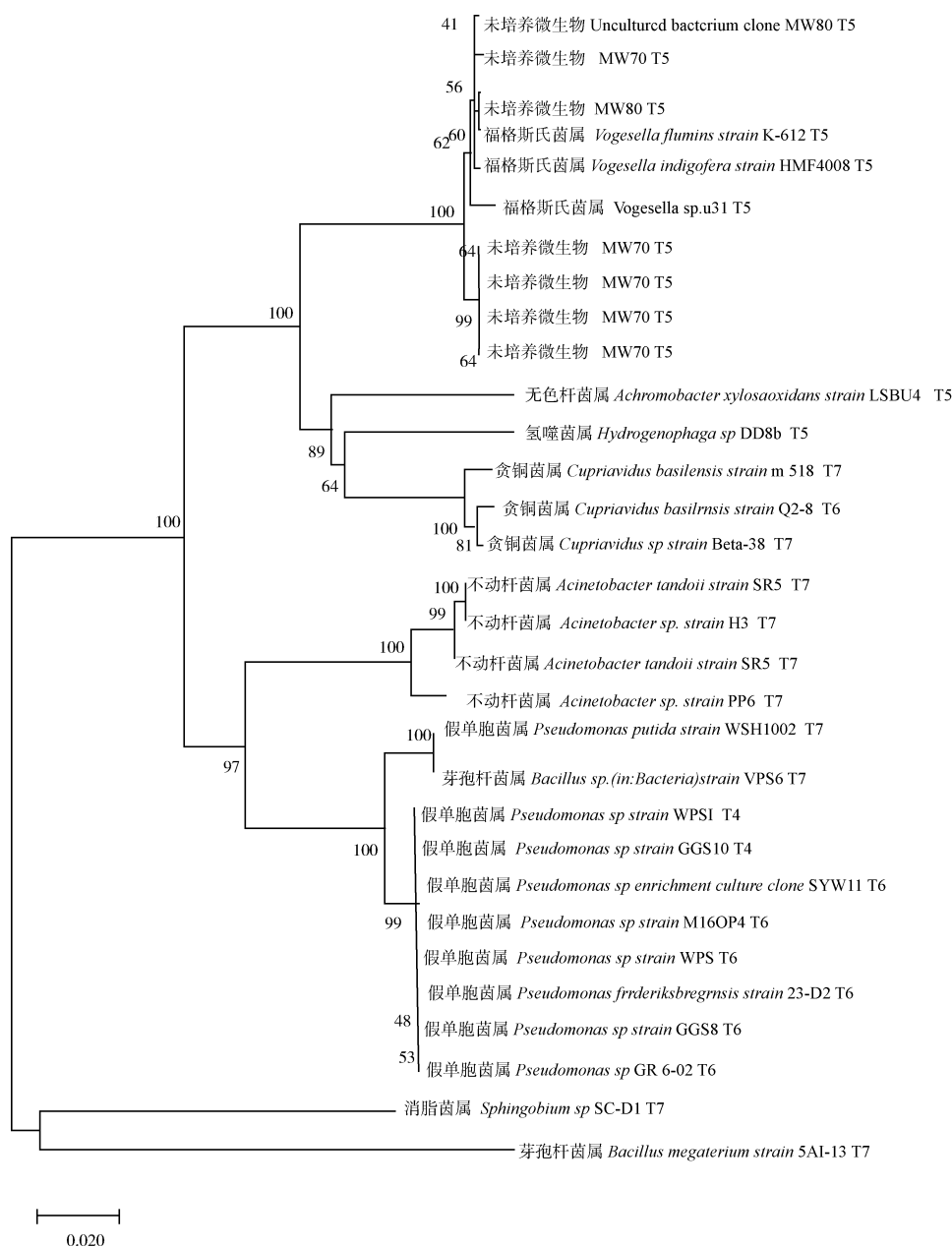


图 2 三峡库区可培养菌的系统进化树

度有关,江岸沉积土和沉积土的微生物也存在差异。常规的微生物培养方法只能检测出样品中最丰富的物种,但结合分子生物学技术能够尽可能有助于了解微生物多样性。

宏基因组测序和高通量基因芯片 (Geochip) 测序技术检测微生物信息量大,包含微量的细菌,是研究环境微生物群落的重要方法。通过 Alpha 多样性和 Beta 多样性分析发现,位于江北城镇人口密集的回水区的微生物丰度和多样性高于江南或

上游水体中微生物的多样性,推测该区域水体受外界影响较大,如废水排放,导致微生物的生长和繁殖高于其他区域^[18]。邓运佳^[19]通过分离鉴定出 9 种微生物与宏基因组分析微生物多样性结果一致。JIN 等^[20]采用培养法和 16S rRNA 测序分析发现污水处理厂中膨胀污泥的细菌群落中 γ -变形菌是该菌群的优势菌。因此,采用培养法和高通量测序法可以为微生物组成和多样性分析提供理论依据。在今后研究中,将结合分子生物学方法分析三峡库

区不同区域微生物多样性,以期为进一步研究三峡水库水生态环境的微生物多样性、生态健康状况、污染防控等提供可靠参考。

[参考文献]

- [1] YAN Q Y, BI Y H, DENG Y, et al. Impacts of the Three Gorges Dam on microbial structure and potential function[J]. Scientific Reports, 2015, 27(5): 8605.
- [2] 余伟钰, 冯灿, 杨渐, 等. 三峡库区水体中固氮微生物多样性及其影响因素[J]. 微生物学报, 2019, 59(6): 1127 - 1142.
- [3] 彭开达. 三峡库区香溪河浮游病毒时空分布及其感染特性研究[D]. 湖北: 湖北工业大学, 2018: 90.
- [4] 程景广, 于敏, 戴晓风, 等. 东太平洋结核区可培养细菌的多样性研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, 47(6): 42 - 52.
- [5] 马丽丽. 淡水生态环境中的浮游微生物检测及群落结构变化研究[D]. 天津: 南开大学, 2014: 148.
- [6] 赵媛莉, 张倩倩, 刘新华, 等. 三峡大坝对香溪河底栖微生物群落结构和多样性的影响[J]. 水生态学杂志, 2017, 38(3): 45 - 50.
- [7] 赵兴青, 杨柳燕, 尹大强, 等. 不同空间位点沉积物理化性质与微生物多样性垂直分布规律[J]. 环境科学, 2008(12): 3537 - 3545.
- [8] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- [10] 谭秋锦, 宋同清, 彭晚霞, 等. 峡谷型喀斯特不同生态系统的土壤微生物数量及生物量特征[J]. 生态学报, 2014, 34(12): 3302 - 3310.
- [11] 王德凯, 李颖, 王跃棠, 等. 荒漠草原中间锦鸡儿灌丛的土壤微生物多样性[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2018, 38(4): 43 - 49.
- [12] SCHULZ M, KOZERSKI H P, PLUNTKE T, et al. The influence of macrophytes on sedimentation and nutrient retention in the lower River Spree (Germany)[J]. Water Research, 2003, 37(3): 569 - 578.
- [13] QIN X S, HUANG G H, CHEN B, et al. An interval - parameter waste - load - allocation model for river water quality management under uncertainty[J]. Environ Manage, 2009, 43(6): 999 - 1012.
- [14] 余婷, 田野. 森林生态系统凋落物多样性对分解过程和土壤微生物特性影响研究进展[J]. 生态科学, 2020, 39(1): 213 - 223.
- [15] HARTMAN W H, RICHARDSON C J, VILGALYS R, et al. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(46): 17842 - 17847.
- [16] OKAIYETO K, NWODO U U, MABINYA L V, et al. Evaluation of flocculating performance of a thermostable bioflocculant produced by marine *Bacillus* sp. [J]. Environmental Technology, 2016, 37(13 - 16): 1829 - 1842.
- [17] MU H, LI M, LIU H, et al. Analysis of fish eggs and larvae flowing into the Three Gorges Reservoir on the Yangtze River, China[J]. Fisheries Science, 2014, 80(3): 505 - 515.
- [18] LEI Z, LI L, MENGNA L, et al. Temporal and spatial variations of bacterial community compositions in two estuaries of Chaohu Lake[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2020, 38(3): 745 - 758.
- [19] 邓运佳. 三峡水库万州段水体微生物多样性及其优势不动杆菌生态毒理研究[D]. 重庆: 重庆三峡学院, 2021.
- [20] JIN D C, WANG P, BAI Z H, et al. Analysis of bacterial community in bulking sludge using culture - dependent and - independent approaches [J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(11): 1880 - 1887.