

文章编号: 1674-5566(2018)05-0728-11

DOI:10.12024/jsou.20180102197

滴水湖表层水体细菌多样性特点初步探究

黎谢飞^{1,2}, 王永杰^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要:上海市浦东新区滴水湖自建成后,围绕滴水湖水体质量的研究很多,但是滴水湖水体总体细菌多样性特点的研究尚未见报道。本研究结合 16S rRNA 基因变性梯度凝胶电泳、16S rRNA 基因宏基因组学分析的方法来初步探究滴水湖表层水体细菌的多样性特点,以及滴水湖中粪便污染指示菌、致病菌、条件致病菌和水体富营养化典型菌等的存在性和分布情况。研究结果可以说明滴水湖表层水体在采样期内的细菌多样性:(1)5 个水体样品共获得 428 个 OTU,属于 17 个细菌门,39 个纲,81 个目,130 个科,191 个属,282 个种。(2)湖水中以放线菌门(Actinobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、浮霉菌门(Planctomycetes)为优势门,占总序列数的 97%。(3)在宏基因组中没有检测到水体粪便污染指示菌等相关的序列,在属的水平没有发现沙门氏菌属(*Salmonella*)、链球菌属(*Streptococcus*)等致病菌或条件致病菌,只有极少量的序列属于志贺氏菌属(*Shigella*, 0.1%)。滴水湖表层水体中蓝藻主要为聚球藻属(*Synechococcus*),没有发现富营养化水体中容易出现的水华蓝藻的序列。可知滴水湖表层水体的细菌多样性特点与淡水湖泊典型细菌多样性特点类似,湖水中没有检出水体污染菌,目前也没有证据表明有蓝藻暴发导致水华的倾向。

关键词: 16S rRNA 基因; 变性梯度凝胶电泳; 宏基因组; 滴水湖表层水体; 细菌多样性; 水体污染菌

中图分类号: X 172 **文献标志码:** A

滴水湖又名芦潮湖,是在上海市浦东新区尚未成陆的海滩填海造陆开挖的一座人工湖,位于东海之滨。滴水湖水源的水质较差,总体为 V 类^[1],因而导致滴水湖生态系统也随之较为脆弱,水体呈富营养化^[2]。从 2004 年起,研究者围绕着滴水湖水体中的抗生素、重金属、多氯联苯以及氮、磷营养盐等污染物,浮游植物和浮游藻类等进行了大量的研究^[3-7]。胡文婷等采用变性梯度凝胶电泳(Denatured Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)、Biolog EcoPlate™ 检测等传统方法,研究了滴水湖湖水及其引水河道沉积物中的微生物^[8]。然而,全面地反映滴水湖中微生物群落结构的研究还是未见报道。

本研究中,我们结合 DGGE^[9] 和高通量测序^[10] 的方法,在宏基因组层面初步探究滴水湖中细菌的多样性,为滴水湖中全面的微生物多样性

研究提供数据基础。同时,探寻滴水湖中粪便污染指示菌^[11] [总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)],致病菌,条件致病菌[沙门氏菌属(*Salmonella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、粪链球菌(*Enterococcus faecalis*)]和水体富营养化典型菌^[12] [鱼腥藻属(*Anabeana*)、水华束丝藻(*Aphanizomenon flosaquae*)、微囊藻属(*Microcystis*)等]等的存在性和分布情况,为合理治理滴水湖,保护滴水湖提供数据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 湖水样品的采集

湖水样品于 2017 年 7 月采集于上海市浦东新区滴水湖的 7 个港口及桥梁下方^[3, 7-8, 13] (图 1):西岛连接桥(121°55'27" E, 30°53'55" N)、绿丽港(121°65'26" E, 30°54'15" N)、青祥港

收稿日期: 2018-01-05 修回日期: 2018-05-15

基金项目: 国家自然科学基金(31570112)

作者简介: 黎谢飞(1991—),男,硕士研究生,研究方向为环境病毒学。E-mail: xiefeili.edu@gmail.com

通信作者: 王永杰, E-mail: yjwang@shou.edu.cn

(121°55'53" E,30°54'39" N)、蓝云港(121°56'31" E,30°54'39" N)、紫飞港(121°56'58" E,30°54'15" N)、赤风港(121°56'48" E,30°52'29" N)、橙和港(121°55'53" E,30°53'18" N)和黄日港(121°55'25" E,30°53'42" N),分别命名为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8。每个采样点用水样采集器和无菌采样瓶采集水下 1.5 m 深湖水 500 mL,现场测定水样温度等参数后置于带冰袋保温箱中带回实验室,4 °C 短暂冷藏^[14](表 1)。

1.2 湖水样品总 DNA 提取

将 500 mL 湖水用无菌玻璃滤器(F502000,上海生工)和真空泵(Millipore WP6122050, Germany)过滤 0.22 μm 滤膜(MF-Millipore GSWP04700, Germany)后将滤膜置于无菌培养皿中,于 -20 °C 冰箱冻藏。提取总 DNA 时,利用无菌剪刀和镊子将膜剪碎置入离心管,然后采用 Fast DNAspin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA)

土壤 DNA 提取试剂盒提取总 DNA,具体操作步骤见说明书。提取到的 DNA 经酶标仪(BioTek, USA)测定浓度和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整程度后,置于 -20 °C 冻藏备用^[14]。

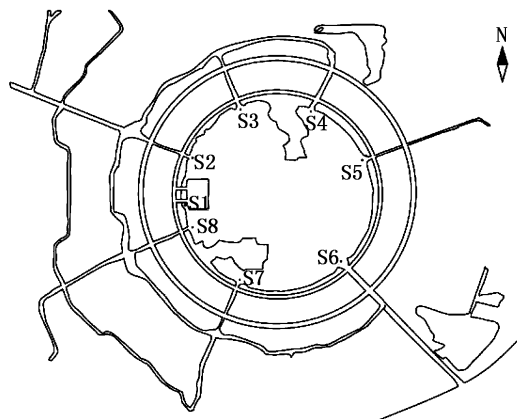


图 1 滴水湖湖水样品采集点分布图

Fig. 1 Location of sampling site in Dishui Lake

表 1 滴水湖湖水样品理化条件信息

Tab. 1 Physical and chemical conditions information of water samples in Dishui Lake

样品 Samples	采样地点 Sampling site	可溶性固形物含量 /(mg/L) TDS	电导率/(m·s) Cond	盐度 Sal	温度/°C Temperature	pH
S1	121°55'27" E 30°53'55" N	840	1 684	0.8	25.7	8.68
S2	121°65'26" E 30°54'15" N	856	1 715	0.9	26.6	8.67
S3	121°55'53" E 30°54'39" N	850	1 704	0.9	26	8.71
S4	121°56'31" E 30°54'39" N	905	1 810	0.9	26.4	8.75
S5	121°56'58" E 30°54'15" N	876	1 754	0.9	26.4	8.8
S6	121°56'48" E 30°52'29" N	844	1 694	0.9	26.1	8.74
S7	121°55'53" E 30°53'18" N	700	1 413	0.7	27.2	8.68
S8	121°55'25" E 30°53'42" N	880	1 762	0.9	27.1	8.83

1.3 16S rRNA 基因 V3 区 PCR-DGGE

总 DNA 稀释后作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 25 μL Taq mix, 19 μL ddH₂O, 正反向引物(带 GC 夹子 357F: CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGCA CGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG;518R: ATTA CCGCGCTGCTGG)各 2 μL, DNA 模板 2 μL。PCR 反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 45 s, 56 °C

45 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 10 min。凝胶电泳检测 PCR 产物后,取 20 μL PCR 产物进行 DGGE,反应条件: 8% 的聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为 40% ~ 60% (100% 的变性浓度包含 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺), 60 °C 变性温度, 60 v 电压 16 h (Bio-Rad, USA)。后用 20 μL 的 1×SYBR Green I (Solarbio, Beijing, China) 染色 20 min, 放入凝胶成像系统 (Bio-rad, USA)

成像获取胶图^[15]。然后采用 QuantityOne (Version 4.6.2) 进行指纹图谱分析了解湖水样品中细菌多样性异同^[16], 初步确认滴水湖各采样点的细菌多样性特点。

1.4 16S rRNA 基因 V3-V4 区高通量测序及分析

根据 DGGE 指纹图谱分析的结果, 选择代表性样品进行高通量测序(上海美吉生物)。样品总 DNA 经质量检测后, 对合格的样品进行细菌 16S rRNA 基因 V3 + V4 区(338F-806R)文库建立, 然后在 Illumina Miseq 平台测序, 获取滴水湖 16S rRNA 基因宏基因组。MiSeq 平台测序得到的是双端序列数据, 首先根据 PE reads 之间的 overlap 关系(最小 overlap 长度为 10 bp, overlap 区允许的最大错配比率为 0.2), 将成对的序列拼接成一条序列, 同时对序列的质量和拼接的效果进行质控过滤(过滤序列尾部质量值 20 以下的碱基, 设置 50 bp 的窗口, 如果窗口内的平均质量值低于 20, 从窗口开始截去后端碱基, 过滤质控后 50 bp 以下的序列, 去除含 N 碱基的序列), 并根据序列首尾两端的 barcode 和引物序列区分样品得到有效序列(barcode 允许的错配数为 0, 最大引物错配数为 2), 并校正序列方向, 即为优化数据。

1.5 细菌多样性分析

质控后的优质序列进行可操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU)聚类得到可进行后续分析的 OTU。然后将 OTU 中代表序列与 Silva 等数据库比对进行分类学分析, 获取滴水湖 16S rRNA 基因宏基因组的细菌种类、相对数量等信息。具体分析如下: 先采用 Qiime 平台以及 RDP Classifier 对优化序列提取非重复序列, 去除没有重复的单序列, 然后按照 97% 相似性对非重复序列(不含单序列)进行 OTU 聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 的代表序列。为了得到每个 OTU 对应的物种分类信息, 采用 RDPclassifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 并分别在各个分类学水平: 域(domain), 界(kingdom), 门(phylum), 纲(class), 目(order), 科(family), 属(genus), 种(species)统计各样本的群落组成。利用 Muthur

软件进行多样性指数(Ace, Chao, Shannon, Simpson)计算及聚类分析, 用 R 语言工具绘制相关图表。

1.6 样品间关系分析

为了获得 5 个样品间在不同水平上细菌的分类关系以及丰度关系, 选择对相应水平上对应的序列进行进化分析, 构建系统发生进化树。经过筛选后, 首先使用 FastTree (Version 2.1.3) 软件, 对科水平上的序列根据最大似然法(Maximum-Likelihood)构建进化树, 然后使用 R 语言作图绘制进化树, 使结果通过进化树与 reads 丰度组合图的形式呈现。

为了探究进行测序的 5 个样品之间的相似性和差异关系, 对样品距离矩阵进行聚类分析, 构建样品层级聚类树。首先通过统计学中的距离对样品间细菌的丰度分布差异程度进行量化分析, 使用 Bray-Curtis 算法计算两两样本间距离, 获得距离矩阵, 用于后续进一步的 beta 多样性分析和可视化统计分析, 然后在 OTU 水平采用 average-linkage 聚类法对距离矩阵进行层级聚类获得层次聚类树^[17]。

2 结果

2.1 PCR-DGGE

为了筛选出高通量测序的代表性样品, 首先对 8 个采样点的湖水样品进行 DGGE 指纹图谱分析。从图 2a 中可以看出, S1、S2、S3、S4、S5 和 S7 六个样品的条带分布情况和明亮程度非常相似, 表明这 6 个样品的优势菌多样性很大程度上相似; S6 和 S8 两个样品的条带则与其余 6 个样品有区别, 同时这两个样品之间的条带分布和明亮程度也有不同。从图 2b 可以看出, 8 个样品中, 以 S4 为标准, 其他 7 个样品细菌多样性与 S4 的相似性分别为 S5 92.1%, S7 88.9%, S2 88.5%, S3 88.3%, S1 79.6%, S6 74.8%, S8 72.8%。结果表明, 8 个样品之间的细菌多样性的相似性很高, 最低的达到了 72.8%。这个结果说明滴水湖周边水体样品采集点之间的细菌多样性具有较高的相似度, 我们采集的这些点的水体样品中细菌多样性在一定程度上能够反映滴水湖表层水体细菌多样性在这个时间段的特点。

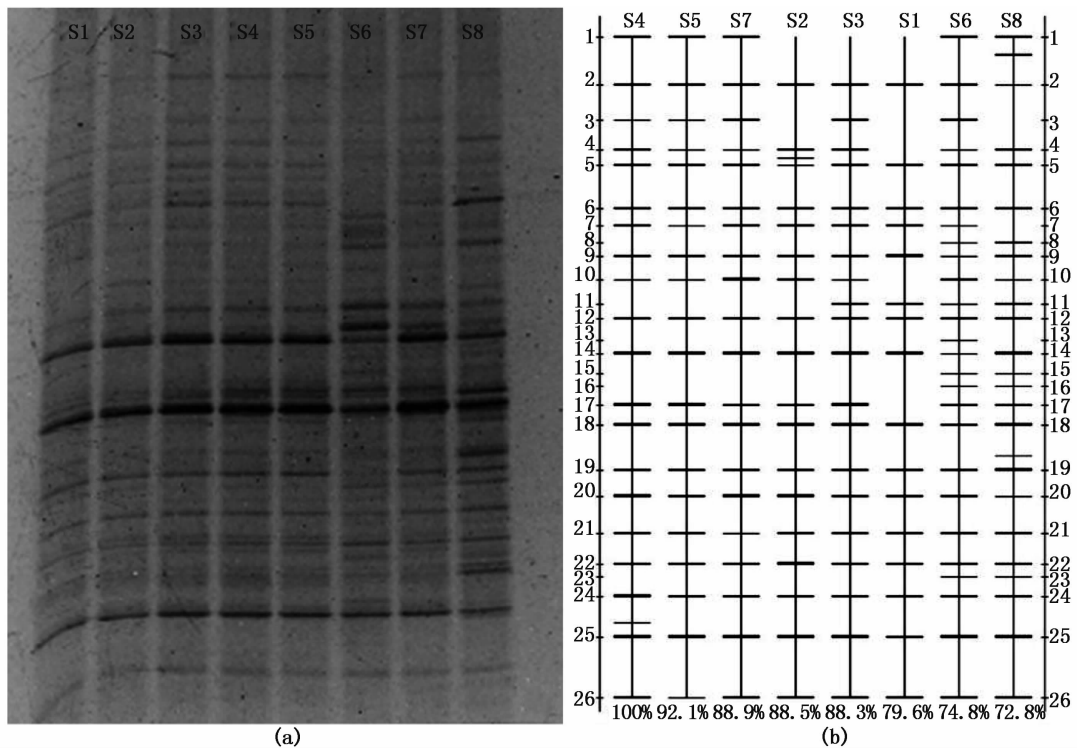


图2 滴水湖湖水样品 S1-S8 16S rRNA 基因 V3 区 DGGE 胶图及指纹图谱分析
 Fig.2 DGGE Gel picture and finger print of DSL water samples

2.2 测序结果及 OTU 聚类结果分析

根据 DGGE 结果,我们从 8 个样品中选出了 5 个进行高通量测序,获得滴水湖水体样品 16S rRNA 基因的宏基因组序列,从宏基因组角度研究滴水湖中细菌的多样性特点。如表 2 所示,总共得到了 170 028 × 2 条序列,总碱基数为 102 356 856 bp。经过序列拼接和质控后得到了 170 028 条优化序列,优化碱基数为 74 208 002 bp,优化序列平均长度为 436 bp。S1、S5、S6 和

S7 四个样品都得到了 3 万多条优质序列,而 S8 则得到了 4 万多条优质序列,测序量达到了实验设计目标。同时,各个样品的序列平均长度均为 430 bp 左右,序列的长度区间在 300 至 500 bp,说明测序的质量是可靠的。经统计,质量控制后得到的优质序列有 99.98% 的序列长度分布在 420 至 460 bp 区间内,这与 V3-V4 区产物长度 460 bp 接近,说明测序的长度比较完整。

表 2 滴水湖湖水样品 16S rRNA 基因 V3-V4 区高通量测序数据统计
 Tab.2 Sequencing data of 16S rRNA gene V3-V4 from DSL water samples

样品 Sample	序列数 Reads	碱基数/bp Base number	平均长度/bp Average length	最小长度/bp Min length	最大长度/bp Max length
S1	30 094	13 051 704	434	289	478
S5	30 570	13 321 687	436	396	500
S6	34 685	15 195 020	438	395	459
S7	31 149	13 586 219	436	318	479
S8	43 530	19 053 372	438	268	498

如表 3 所示,自纲以下,虽然 5 个样品在同等级分类水平上的物种丰富度呈 S5 最多、S6 最少,其他 3 个样品相差不多的趋势,但各个样品的

OTU 数量在相同分类水平上相差不大。这个结果初步说明,虽然 5 个样品中的物种丰富度有一定差别,但整体上还是一致的。图 3 显示,5 个样

品的 OTU 分别都有 300 ~ 400 种,其中有 266 种为 5 个样品共有,80 种为 4 个样品共有,3 个样品共有的则有 47 种,2 个样品共有的有 27 种,单独在 1 个样品中存在的只有 8 种。说明在 OTU 水平上,5 个样品之间有 62% 的 OTU 是共有。若算上 4 个样品之间共有的 OTU,共有的 OTU 则达到了 81%,进一步说明了 5 个样品在物种丰富度上存在着一致性。

表 3 滴水湖湖水样品 16S rRNA 基因宏基因组优质序列 OTU 聚类结果

Tab. 3 Information of DSL 16S rRNA gene metagenome OUT clustering

样品 Sample	S1	S5	S6	S7	S8	总计 Total
域 Domain	1	1	1	1	1	1
界 Kingdom	1	1	1	1	1	1
门 Phylum	16	16	16	16	16	17
纲 Class	35	38	35	37	35	39
目 Order	76	78	72	78	75	81
科 Family	118	122	115	119	115	130
属 Genus	174	178	167	166	170	191
种 Species	249	263	233	246	246	282

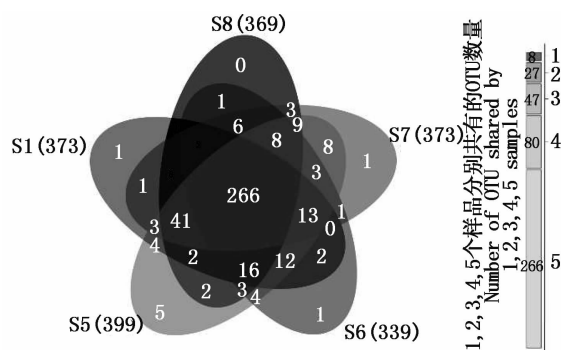


图 3 滴水湖湖水样品 16S rRNA 基因宏基因组 OTU 共有情况韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of OTU shared between different samples

2.3 多样性分析

香农曲线图中,S1、S5、S6、S7、S8 这 5 个样品所代表的曲线在约 3 000 条序列处趋平(图 4a),说明本次的测序中,各个样品的测序量足够大,可以反映样本中绝大多数的微生物多样性信息。稀释性曲线图中,S7 和 S1 在 20 000 条序列处接近趋平,S5 和 S6 在 25 000 处接近趋平,S8 在 30 000 条序列处接近趋平,说明 30 000 条测序量合理,更多的测序量只会产生少量的物种(图 4b)。这表明,本次测序数据量足够大,满足本次的研究需求。泛物种分析发现,随着样品数的增加,总 OTU 数先是增加较快,后渐渐趋平,最后达到 428 这个总数(图 4c),说明这 5 个样品里所包含的细菌可以代表滴水湖中绝大部分的细菌,同时在种的水平上滴水湖中的细菌是很丰富的。核心物种分析证实,随着样品数的增加,代表核心物种的 OTU 数量在降低,占总数的四分之一左右(图 4d),说明这 5 个采样点的湖水中细菌的丰度有一定的区别。

如表 4 所示,5 个样品的文库覆盖率在 99.7% 以上,说明获得的 OTU 能反映所研究的滴水湖湖水样品的细菌群落组成。Ace 等指数显示,5 个样品之间的物种丰富度和多样性有一定的差异但并不明显:物种种类 S5 > S7 > S8 > S1 > S6,多样性 S8 > S1 > S7 > S6 > S5。这表明,这些样品可以代表滴水湖的细菌多样性特点。

OTU 水平样品关系层级聚类树分析表明,虽然 5 个样品可以被分为 S1、S5、S6 和 S7、S8 三个组,但是 5 个样品间的距离实际上都很小,最大不超过 0.22(图 5)。结果说明了 5 个样品之间多样性虽存在差异但非常小,这也说明 5 个样品之间的细菌多样性是基本一致的,可以代表滴水湖的细菌多样性。

表 4 滴水湖湖水样品中细菌多样性指数

Tab. 4 The diversity index of bacteria in DSL water samples

样品 Sample	覆盖值/% Coverage	细菌多样性指数 Bacteria diversity indices			
		Ace	Chao	Shannon	Simpson
S1	99.823	394.448 2	394.666 7	4.178 465	0.039 063
S5	99.893	410.703 5	410.206 9	4.572 05	0.025 254
S6	99.845	366.795 2	359.526 3	4.246 377	0.030 927
S7	99.767	401.569	412.2	4.210 893	0.038 61
S8	99.856	395.305 3	395.756 8	3.707 763	0.056 179

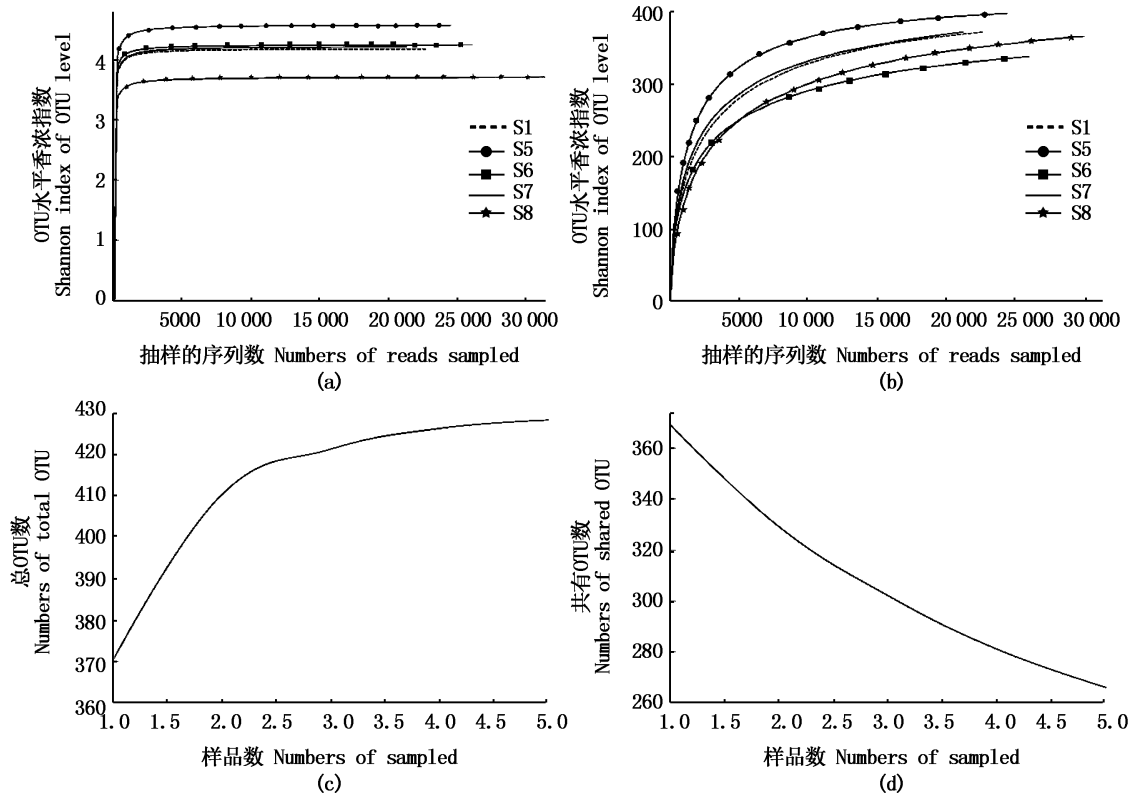


图 4 滴水湖湖水样品 16S rRNA 基因宏基因组多样性分析:
 香农曲线 (a), 稀释性曲线 (b), 泛物种分析曲线 (c) 和核心物种分析曲线 (d)
 Fig. 4 Shannon-winner curve (a), Rarefaction curve (b), Pan analysis (c)
 and Core analysis (d) of high throughput sequencing results

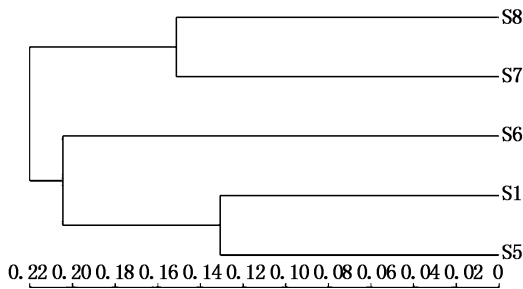


图 5 OTU 水平样品关系层级聚类树
 Fig. 5 Hierarchical clustering tree on OTU level

表 5 中包含了 5 个样品中相对丰度排名前十的各个属的分布信息。可以看出,这些属的细菌在湖水样品中的占比达到了 61% ~ 82%,在丰度上属于优势菌属。同时可以观察到十个属水平的分类中,只有聚球藻属 (*Synechococcus*), 黄杆菌属 (*Flavobacterium*), 变性菌属 (*Limnohabitans*) 和土壤杆菌属 (*Sediminibacterium*) 的分类信息是精确的,而其他的则是没有精确分类信息的,这使得分析过程无法准确描述这些结果,所以本文

中主要在门和科的水平分析湖水样品中细菌的分类特点,种和属的水平则主要讨论了我们关注的一些分类。分析表明,样品间细菌在科的水平上多样性相似。虽然物种的均匀度有一定差异,但是各个科的细菌的相对丰度变化非常小 (图 6),说明了虽然是位于滴水湖 5 个不同的采样点,但微生物的物种多样性基本一致。5 个样品中的细菌在科的水平主要是鱼孢菌科 (*Sporichthyaceae*)、酸微生物科 (*Acidimicrobiaceae*)、丛毛单胞菌科 (*Comamonadaceae*)、黄杆菌科 (*Flavobacteriaceae*)、噬几丁质菌科 (*Chitinophagaceae*)、螳螂杆状体科 (*Cryomorphaceae*)、红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 以及蓝细菌门 (*Cyanobacteria*) 下两个未分级的科,占 OTU 总数的 70.08% ~ 87.11%,虽然在丰度上存在着一定差异,但差异性较小,说明这些科的细菌是滴水湖中的主要细菌种群。

表 5 各湖水样品中相对丰度前十的细菌属的情况信息
Tab. 5 Information of Top10 genus in each water samples

门 (Phylum)	科 (Family)	属 (Genus)	S1	S5	S6	S7	S8
放线菌门 (Actinobacteria)	鱼孢菌科 (Sporichthyaceae)	hge I clade	18.41%	11.26%	17.16%	13.00%	10.91%
蓝细菌门 (Cyanobacteria)	norank Cyanobacteria	norank Cyanobacteria	18.32%	18.88%	1.73%	15.81%	9.52%
蓝细菌门 (Cyanobacteria)	Family I	聚球藻属 (<i>Synechococcus</i>)	12.05%	4.76%	0.82%	9.74%	14.65%
放线菌门 (Actinobacteria)	酸微菌科 (Acidimicrobiaceae)	CL500-29 marine group	8.71%	6.72%	8.54%	4.36%	3.33%
拟杆菌门 (Bacteroidetes)	黄杆菌科 (Flavobacteriaceae)	黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>)	5.17%	9.24%	18.46%	8.51%	28.23%
变形菌门 (Proteobacteria)	丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae)	变性菌属 (<i>Limnohabitans</i>)	3.01%	3.13%	5.54%	11.18%	9.74%
放线菌门 (Actinobacteria)	鱼孢菌科 (Sporichthyaceae)	unclassified Sporichthyaceae	2.48%	1.41%	3.86%	3.83%	2.83%
变形菌门 (Proteobacteria)	红杆菌科 (Rhodobacteraceae)	unclassified Rhodobacteraceae	1.77%	2.03%	3.72%	1.94%	1.98%
拟杆菌门 (Bacteroidetes)	噬几丁质菌科 (Chitinophagaceae)	沉积小杆菌属 (<i>Sediminibacterium</i>)	1.77%	1.95%	3.28%	0.41%	0.38%
变形菌门 (Proteobacteria)	丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae)	unclassified Comamonadaceae	1.61%	1.73%	1.96%	2.51%	1.12%
总计 Total			73.30%	61.12%	65.07%	71.29%	82.69%

3 讨论

我们采集了滴水湖 2017 年 7 月 8 个点的湖水样品进行研究,结果表明 DGGE 可以作为高通量测序结合宏基因组方法研究细菌多样性的方法的预实验,进行了采样和高通量测序的 5 个采样点的水体中细菌多样性可以代表滴水湖表层水体在采样期间的细菌多样性。限于采样量以及采样时间上的问题,我们的结果说明了采样期间的细菌多样性在空间上的分布特点,但不足以说明滴水湖细菌多样性随时间变化的特点,所以我们的研究在于结合 PCR-DGGE 初步探究滴水湖表层水体细菌在一个时间段内的多样性特点,为全面、精确研究滴水湖细菌多样性做一个初步的探索:确认采样点、确立研究流程以及探寻研究过程中应该注意的问题等,还有为研究水体中其他微生物例如噬菌体等的多样性积累数据。全面的滴水湖水体细菌多样性可以在本文的基础上加大采样量以及跨时间跨季度采样来进行研究来获得。

在采集水样的时候,根据文献资料和滴水湖具体情况,我们选取了 8 个采样点,在进行了变性梯度凝胶电泳以及 DGGE 指纹图谱分析后,我们发现 S1、S2、S3、S4、S5、S7 六个样品的优势菌群相似性较高,而 S6、S8 与其他样品的相似性则稍小。为了减少在初步探究研究中的成本,在选择样品进行高通量测序时可以减少细菌多样性相似度较高的样品的数量,所以我们选取了相似度较低的全部样品 (S6、S8) 和部分相似度较高的样品 (S1、S5、S7),总共 5 个样品 (S1、S5、S6、S7、

S8)。而后面进行的高通量测序及后续宏基因组学分析时,发现这 5 个样品的关系很近,细菌的多样性一致。这个结果证明了 5 个湖水样品的细菌多样性能够说明研究采样期间滴水湖表层水体的细菌多样性特点,同时也证明了 DGGE 被用来作为高通量测序选择预实验的可行性。

ZWART 等通过随机克隆的方法对从不同淡水环境(湖泊和河流)中得到的 689 个细菌和 75 个质体的 16S rDNA 序列进行研究,发现典型的淡水细菌大都隶属于 α -、 β -、 γ -变形菌亚门 (Proteobacteria),蓝细菌门 (Cyanobacteria),拟杆菌门 (Bacteroidetes),放线菌门 (Actinobacteria) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia)^[18]。NEWTON 等结合前人的研究和最新的研究成果发现,湖泊生态系统变温层中共有 21 个典型的淡水细菌门类。除 ZWART 等已报道的 5 个优势门类外,其他的 16 个细菌门类仅约占所收集到的全部序列的 2.6%,包括:酸杆菌门 (Acidobacteria),绿菌门 (Chlorobi),绿弯菌门 (Chloroflexi),纤维杆菌门 (Fibrobacteres),厚壁菌门 (Firmicutes),梭杆菌门 (Fusobacteria),芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes),黏胶球形菌门 (Lentisphaerae),硝化螺菌门 (Nitrospira),浮霉菌门 (Planctomycetes),螺旋体门 (Spirochaetes),BRC1, OD1, OP10, SR1 和 TM7^[19]。

WU 等通过对克隆的 16S rRNA 基因进行测序研究太湖湖水 2004 年 3 月、5 月、7 月、9 月的细菌多样性^[20]。结果发现 7 月份的湖水中细菌群落组成最为多样,以放线菌门 (Actinobacteria),变形菌门 (Proteobacteria),拟杆菌门 (Bacteroidetes),

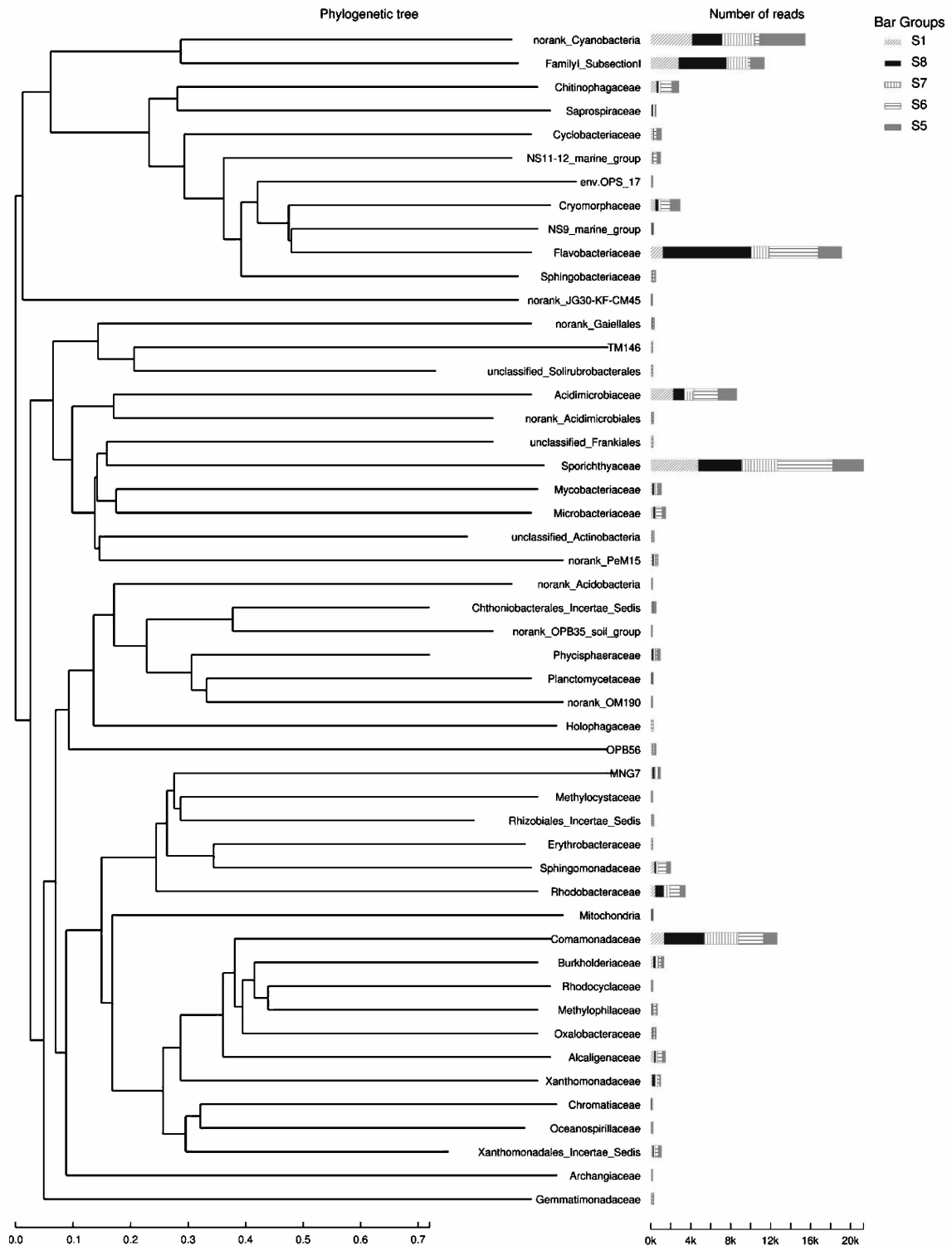


图6 系统发生进化树和各样品在科水平的序列丰富度
 Fig.6 Phylogenetic tree and number of reads on the family level

浮霉菌门 (Planctomycetes), 硝化螺菌门 (Nitrospira), 厚壁菌门 (Firmicutes), 酸杆菌门 (Acidobacteria), 绿弯菌门 (Chloroflexi), 绿菌门 (Chlorobi) (后5个门的丰度相对较低)。结合4

个月的结果分析表明, 主要以放线菌门 (Actinobacteri)、变形菌门 (Proteobacteria), 拟杆菌门 (Bacteroidetes), 浮霉菌门 (Planctomycetes), 疣微菌门 (Verrucomicrobia) 为主要菌门, 占细菌

总数的 88% ~ 100%, 这个结果与 ZWART、NEWTON 等的研究结果相符。而我们的结果分析发现, 在滴水湖中 S1、S6、S8 中放线菌门 (Actinobacteria)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 为优势门, 占微生物总数的 97% 左右, 在 S5 中, 放线菌门 (Actinobacteria)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、浮霉菌门 (Planctomycetes) 为优势门, 占微生物总数的 97.55%, 而在 S7 中, 放线菌门 (Actinobacteria)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、浮霉菌门 (Planctomycetes) 为优势门, 占微生物总数的 97.71%。与太湖细菌多样性相比, 可以发现在门的分类水平上两者主要细菌的类型相似, 为放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、浮霉菌门 (Planctomycetes); 区别在于滴水湖的优势门中有蓝细菌门而且占比还不小, 而太湖中没有, 原因是作者主要分析太湖中异养细菌所以去掉了蓝细菌门的信息。总的来说, 本文的研究结果与 ZWART、NEWTON 等的研究结果趋同, 表明虽然滴水湖是一座人工湖, 但湖水中细菌多样性与常见淡水湖泊中典型细菌多样性特点类似, 说明了滴水湖微生物群落较为成熟和稳定。

在滴水湖中没有观测到粪大肠菌群、大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 等水体污染指示菌的序列。对于一般的致病菌和条件致病菌, 在属的水平没有观测到沙门氏菌属 (*Salmonella*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 的序列, 只观测到了极少量的志贺氏菌属 (*Shigella*) 序列 (0.1%)。这说明了在宏基因组学研究水平, 滴水湖湖水基本没有受到水体污染菌污染。在滴水湖中没有发现粪便污染指示菌和常见致病菌以及条件致病菌, 但发现了少量的其他的可能性致病菌, 比如军团杆菌属 (*Legionella*)^[21] 占总 OTU 数的 0.20%; 奈瑟氏菌属 (*Neisseria*)^[22] 占总 OTU 数的 0.11%; 立克次氏体 (*Rickettsia*)^[23] 占总 OTU 数的 1.99%。说明在滴水湖中存在着致病菌致病的风险, 这可能对于在滴水湖周边的游客特别是参与水上项目的

游客存在着潜在的威胁。当然, 基于 16S rDNA 的数据没有准确预测滴水湖中致病菌的具体情况, 但是这些研究结果可以在更大范围内给出预警。后续的研究, 比如用致病菌特异性引物筛查、qPCR 等技术, 可以更精确的获取滴水湖中致病菌的分布等信息, 为这些致病菌的风险评估, 做出相应措施预防等工作奠定基础。在分析滴水湖中蓝藻多样性的时候, 发现宏基因组中蓝藻的序列主要为聚球藻属 (*Synechococcus*) 序列 (19.3% ~ 58.9% 以及无法分类的蓝藻序列 (33.6% ~ 58.8%)), 没有发现与水华相关的一些藻类的序列, 比如鱼腥藻属 (*Anabaena*)、水华束丝藻 (*Aphanizomenon flosaquae*)、微囊藻属 (*Microcystis*) 等。说明, 目前滴水湖没有蓝藻导致的水华的倾向和先兆。

参考文献:

- [1] 徐建官. 滴水湖水质现状及保护初探[J]. 环境监测管理与技术, 2010, 22(1): 64-66, 70.
XU J G. Situation and protection of water quality in Shanghai Dishui Lake [J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2010, 22(1): 64-66, 70.
- [2] 倪玮怡, 毕春娟, 王薛平, 等. 上海临港新城滴水湖生态系统健康评价[J]. 环境科学学报, 2014, 34(9): 2426-2433.
NI W Y, BI C J, WANG X P, et al. Ecosystem health assessment of the Dishui Lake in Lingang New Town, Shanghai [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2014, 34(9): 2426-2433.
- [3] 林青, 由文辉, 徐风洁, 等. 滴水湖浮游动物群落结构及其与环境因子的关系[J]. 生态学报, 2014, 34(23): 6918-6929.
LIN Q, YOU W H, XU F J, et al. Zooplankton community structure and its relationship with environmental factors in Dishui Lake [J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(23): 6918-6929.
- [4] 刘超, 毕春娟, 陶征楷, 等. 滴水湖沉积物中重金属季节变化及其潜在生态风险评价[J]. 城市环境与城市生态, 2016, 29(2): 38-42, 46.
LIU C, BI C J, TAO Z K, et al. Seasonal variation of heavy metals in surface sediment of the Dishui Lake and its potential ecological risk [J]. Urban Environment & Urban Ecology, 2016, 29(2): 38-42, 46.
- [5] 梅卫平, 阮慧慧, 吴昊, 等. 滴水湖水系沉积物中多环芳烃的分布及风险评价[J]. 中国环境科学, 2013, 33(11): 2069-2074.
MEI W P, RUAN H H, WU H, et al. Distribution and ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons

- in sediments from Dishui Lake water system [J]. *China Environmental Science*, 2013, 33(11): 2069-2074.
- [6] 江敏, 卢柳, 邢斌, 等. 滴水湖水体叶绿素 a 与水质因子的多元分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(3): 451-456.
- JIANG M, LU L, XING B, et al. Multianalysis between chlorophyll a and other environmental factors in Dishui Lake [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(3): 451-456.
- [7] 童琰, 徐春燕, 胡雪芹, 等. 滴水湖引水河段组合型生态工程春季对水体净化效果研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(6): 930-937.
- TONG Y, XU C Y, HU X Q, et al. Research of the ecological restoration results of the combined ecological project in Yinshui River, Dripping Lake in spring [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(6): 930-937.
- [8] 江敏, 胡文婷, 凌云, 等. 滴水湖沉积物中可培养优势微生物种群初探[J]. *生物学杂志*, 2011, 28(4): 57-60.
- JIANG M, HU W T, LING Y, et al. Preliminary study of cultivable dominant micro-organisms in sediment of Dishui lake [J]. *Journal of Biology*, 2011, 28(4): 57-60.
- [9] MUYZER G, DE WAAL E C, UITERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [10] RONDON M R, AUGUST P R, BETTERMANN A D, et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2541-2547.
- [11] SAVICHTCHEVA O, OKABE S. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives [J]. *Water Research*, 2006, 40(13): 2463-2476.
- [12] 谭香, 沈宏, 宋立荣. 三种水华蓝藻对不同磷浓度生理响应的比较研究[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(5): 693-699.
- TAN X, SHEN H, SONG L R. Comparative studies on physiological responses at phosphorus stress of three waterbloom-forming cyanobacteria [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(5): 693-699.
- [13] 江敏, 胡文婷, 吴昊, 等. 滴水湖及其引水河道沉积物中磷细菌的生态调查[J]. *生态科学*, 2011, 30(5): 480-485.
- JIANG M, HU W T, WU H, et al. Ecological study of phosphate solubilizing bacteria in sediment of Dishui Lake and its diversion rivers [J]. *Ecological Science*, 2011, 30(5): 480-485.
- [14] GONG C W, ZHANG W J, ZHOU X W, et al. Novel virophages discovered in a freshwater lake in China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016(5): 5
- [15] 陈小兵. 中华绒螯肠道核心菌群初探[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- CHEN X B. Core bacterial community associated with the intestinal tract of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [16] LIU X C, ZHANG Y, YANG M, et al. Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(1): 60-66.
- [17] SCHLAEPI K, DOMBROWSKI N, OTER R, et al. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in Arabidopsis thaliana relatives [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(2): 585-592.
- [18] ZWART G, CRUMP B C, KAMST-VAN AGTERVELD M, et al. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, 28(2): 141-155.
- [19] 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.
- [20] WU X, XI W Y, YE W J, et al. Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(1): 85-96.
- [21] HAMILTON K A, HAAS C N. Critical review of mathematical approaches for quantitative microbial risk assessment (QMRA) of *Legionella* in engineered water systems: research gaps and a new framework [J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2016, 2(4): 599-613.
- [22] UNEMO M, SHAFER W M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2014, 27(3): 587-613.
- [23] REIF K E, MACALUSO K R. Ecology of *Rickettsia felis*: a review [J]. *Journal of Medical Entomology*, 2009, 46(4): 723-736.

Preliminary exploration of bacterial diversity in surface water of Dishui lake, Shanghai

LI Xiefei^{1,2}, WANG Yongjie^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage & Preservation, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, Shandong, China)

Abstract: Dishui Lake(DSL) has received a great deal of attention since it built, there are many researches on the quality of water in it, but the research on the bacterial diversity overall was insufficient. Therefore, this study combined 16S rRNA gene denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), 16S rRNA gene metagenome and bioinformatic analysis to understand bacterial diversity and community structure in surface water of DSL, including water fecal pollution indicator bacteria, water eutrophication typical bacteria, pathogens and conditional pathogens. The results show that; bacterial diversity in these 5 water samples can represent it in surface water of DSL at sampling time. 428 OTUs have been clustered from 5 DSL water samples and belong to 17 phyla, 39 classes, 66 orders, 130 families, 191 genera and 282 species. Actinobacteria, Cyanobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia and Planctomycetes are six dominant phyla in these 5 samples and account for 97% of total bacterial sequences in these samples. Except for a few sequences of *Shigella* (0.1%), sequences of water fecal pollution indicator bacteria, Pathogens and conditional pathogens were not found in metagenome. In conclusion, the characteristics of bacterial diversity in surface waters of DSL are similar to those of typical freshwater lakes and there are no water-contaminating bacteria detected in the lake, and there is no tendency that blue algae will cause blooms.

Key words: 16S rRNA gene; DGGE; Metagenome; surface water of Dishui Lake; bacterial diversity; water pollution bacteria