

夏季太湖梅梁湾水体中细菌的群落结构

徐超,张军毅*,朱冰川,宋挺,黄君,吴蔚
(无锡市环境监测中心站,江苏 无锡 214121)

摘 要:利用高通量测序技术,选择 16S rRNA V6 区作为目标片段,对夏季太湖梅梁湾水体中的细菌群落结构进行了分析,结果表明,共产生了 101 427 条优质序列,细菌为 100 935 条,占 99.5%;在蓝藻暴发期间,共检测到 14 门,55 属,610 个操作分类单位。优势门类为蓝藻门(39.7%),放线菌门(27.2%)和变形菌门(23.4%),微囊藻属(21.0%)和聚球藻属(15.9%)为主要优势种。

关键词:高通量测序;群落结构;16S rRNA;太湖

中图分类号:X832 文献标识码:B 文章编号:1674-6732(2015)01-0037-04

Extensive Profiling of a Bacterial Community during Summer in Meiliang Bay, Lake Taihu

XU Chao, ZHANG Jun-yi*, ZHU Bing-chuan, SONG Ting, HUANG Jun, WU Wei
(Wuxi Environmental Monitoring Central Station, Wuxi, Jiangsu 214121, China)

Abstract: In order to explore the prokaryotic community during summer in Meiliang Bay, Lake Taihu, we performed high-throughput sequencing of the 16S rRNA genes V6 hypervariable regions. The results showed that a total of 101 427 quality reads (bacterial reads 100 935, 99.5%) were obtained. Bacteria were found belonging to 14 phyla, 55 genera, and 610 OTUs. At the phylum level, the bacterial community composition was predominated by *Cyanobacteria* (39.7%), *Actinobacteria* (27.2%), *Proteobacteria* (23.4%). At the genus level, *Microcystis* (21.0%) and *Synechococcus* (15.9%) was the most abundant genus.

Key words: High-throughput sequencing; Community structure; 16S rRNA; Lake Taihu

2007 年无锡市发生“供水危机”之后,太湖不但成为国际关注的焦点,更是成为大型浅水富营养化湖泊研究的典范^[1-12]。近年来,蓝藻水华的持续暴发和最大聚集面积有冬季后移的倾向,表明蓝藻水华监测及其治理的复杂性和艰巨性。

细菌在微食物网的能量流动和物质循环起着关键性作用,在全球性水体富营养化进程中,随着摄食食物链的变细与变短,以及微生物环的持续增粗,细菌在湖泊生态系统中的地位和作用显著增加。目前基于营养盐、气象等研究蓝藻水华暴发的很多^[2,13-17],而基于细菌来探索蓝藻水华暴发机制的并不是很多^[18-19]。

现利用高通量测序技术,研究蓝藻水华暴发期间的细菌多样性和群落结构,以期为后续研究蓝藻水华和细菌的相互关系、以及探索蓝藻水华的暴发机制提供参考。

1 研究方法

1.1 样本采集及其 V6 区扩增

样品采自 2013 年 8 月 23 日太湖梅梁湾,取 2 L 表层水样,用 0.22 μm 微孔滤膜富集,后立即 -20 ℃ 冷冻。回实验室后即进行 DNA 提取,采用 E. Z. N. A. ® Water DNA Kit (OMEGA, USA)。用 Nano Drop ND 1000 (Thermo Scientific, DE, USA) 进行定量分析。V6 目标区的扩增,共 27 个循环,反应条件如下。预变性:94 ℃, 5 min,变性:94 ℃, 30 s,退火:50 ℃, 30 s,延伸:72 ℃, 30 s,最后 72 ℃, 5 min。为了避免引物扩增的偏向性,采用针对细菌 16S rRNA 的融合引物。上游引物:967F - PP 5' - CNACGCGAAGAACCTTANC - 4', 967F - UC1 5' - CAACGCGAAAAACCTTACC - 4', 967F -

收稿日期:2014-10-11;修订日期:2014-12-23
基金项目:江苏省环境监测科研基金资助项目(1320)。
作者简介:徐超(1986—),女,助理工程师,硕士,主要从事水域生态学研究。
* 通讯作者:张军毅 E-mail:blocksharon@163.com

UC2 5′ – CAACGCGCAGAACCTTACC – 4′, 967F – UC4 5′ – ATACGCGARGAACCTTACC – 4′, 967F – AQ 5′ – CTAACCGANGAACCTYACC – 4′。下游引物: 1046R 5′ – CGACAGCCATGCANCACCT – 4′, 1046R – PP 5′ – CGACAACCATGCANCACCT – 4′, 1046R – AQ1 5′ – CGACGGCCATGCANCACCT – 4′。

1.2 测序及其数据处理

采用 Illumina MIseq PE250 测序平台。数据分析可以包含以下流程。首先, 初步质量过滤: 步长为 1 的 5 bp 窗口从第一个碱基位置开始移动, 窗口中碱基平均质量 > Q20, 从第一个 < Q20 处截断序列, 序列长度 > 150; 然后, 用软件 Flash 连接通过质量过滤的序列。然后, 对连接上的序列通过 index 完全匹配得到每个样品的有效序列。其次, 去除嵌合体得到优质序列: 通过 mothur 软件中 uchime 的方法去除嵌合体序列。并通过 Qiime 以下规则进行第二次过滤: 5′端前引物检查, 允许最大错配数 1 去; 除模糊碱基数 > 0、单碱基高重复区 > 8 bp 以及长度 < 200 bp 的序列^[20]。最后, OTU 列表生成及注释, 及其过滤后的有效序列: 在 Qiime 中调用 uclust 的方法对优质序列按相似度 0.97 进行聚类, 选取每个类最长的序列为代表序列。然后再在 Qiime 中调用 RDP – classifie 的方法, 以 GG 数据库(13.5)的序列为训练集, 对 OTU 代表序列进行注释; 采用 blast 的方法对序列数据库进行比对, 获得每个 OTU 分类学信息。将原始 OTU 按照 0.005% 的标准进行精简以去除可信度较低的序列^[21–22], 所得数据进行下一步分析。

2 结果讨论

2.1 测序结果统计

Illumina Miseq PE250 测数的数据概要见表 1。

表 1 测序数据概要^①

项目(V6)	有效序列	优质序列	过滤序列
序列(条)/长度(bp)	119 641	104 834	101 427
去除滤/%	0.0	12.4	15.2

①有效序列为两端有效拼接后序列; 优质序列为去除嵌合体序列; 过滤序列为执行 0.005% 的过滤标准后过滤序列

由表 1 可见, 通过有效拼接、去嵌合体和过滤, 可以获得 101 427 条, 平均长度为 79 的序列(去除了引物)。执行 0.005% 的过滤标准, 去掉 < 6 以下

的序列后, 共总去掉了 18 214 条序列, 去除滤为 15.2%。注解结果中, 并未发现古细菌, 表明融合引物的特异性较好。仅发现了 492 条没有比对上的序列, 所占比列为 0.5%, 可见 V6 区对太湖夏季水体的细菌群落具有较好的识别力。

2.2 细菌群落特征

V6 区对于细菌物种的鉴定在门、纲、目、科、属、种等 6 个分类水平上表现出差异。在门水平上 100 935 条序列, 100.0% 可以注解, 但到了属水平上, 仅有 43.5% 序列可以注解。物种鉴定的效率是随着分类水平下降呈明显下降趋势, 见表 2。

表 2 各分类水平上的 OTUs、个数和序列数

细菌	门	纲	目	科	属	种
OTUs/个	610	608	569	455	183	11
数目/个	14	39	63	71	55	6
序列/条	100 935	100 858	97 228	91 533	43 857	423

由表 2 可见, 获得了 100 935 条过滤后的优质细菌序列, 隶属于蓝藻门, 39.7%; 放线菌门, 27.3%; 变形菌门, 23.4%; 疣微菌门 Verrucomicrobia, 2.5%; 绿菌门 Chlorobi, 2.2%; 拟杆菌门 Bacteroidetes, 2.1%; 绿弯菌门 Chloroflexi, 1.1%; 浮霉菌 Planctomycetes, 0.6%; 酸杆菌门 Acidobacteria, 0.5%; 芽单胞菌门 Gemmatimonadetes, 0.4%; 厚壁菌门 Firmicutes, 0.3%; 软壁菌门 Tenericutes, 0.01%; GN02, 0.01%; 装甲菌门 Armatimonadetes, 0.01% 等 14 门。其中, 优势门类为蓝藻门, 放线菌门和变形菌门, 合计 90.4%。蓝藻门在丰度方面占具明显优势, 这主要体现在水体中的微囊藻 Microcystis spp. (21.0%)。通过对同步浮游植物样本的显微镜观察分析, 微囊藻的优势度高达 95.4%。

14 门共鉴定了 610 个 OTUs。隶属于变形菌门, 42.5%; 蓝藻门, 16.6%; 放线菌门, 15.2%; 拟杆菌门, 9.5%; 疣微菌门, 4.8%; 浮霉菌, 3.6%; 绿菌门, 2.0%; 酸杆菌门, 2.0%; 绿弯菌门, 1.1%; 芽单胞菌门, 1.1%; 厚壁菌门, 1.1%; 软壁菌门, 0.2%; GN02, 0.2%; 装甲菌门, 0.2% 等 14 门。其中, 优势门类为蓝藻门, 放线菌门和变形菌门, 合计 74.3%。

在属水平上, 共鉴定 55 属, 183 个分类单元。其中值得关注的是微囊藻属 21 162 条序列, 12 个 OTUs 和聚球藻属 16 053 条序列, 22 个 OTUs。微

囊藻属和聚球藻属序列分别占属水平的 21.0% , 15.9% , OTUs 分别占 6.6% ,28.4% 。

文献[23]通过 DGGE 的手段对中国富营养化湖泊,太湖和巢湖的细菌群落结构研究表明,在富营养化水平较高的地方,微囊藻占优势种,而在一些藻类生物量较低的地方聚球藻占优势种。除此之外,太湖水体蓝藻门还发现有拟浮丝藻属 *Planktothricoides*、束丝藻属 *Aphanizomenon*、细鞘丝藻属 *Leptolyngbya*、长胞藻属 *Dolichospermum*、颤藻属 *Oscillatoria* 和假鱼腥藻属 *Pseudanabaena* 等 6 个常见种类,与光学显微镜观察的结果一致,见表 3。

表 3 属水平上的种类明细^①

序号	类群	属	OTUs	reads
1	A	<i>Microcystis</i> *	12	21 162
2		<i>Synechococcus</i> *	52	16 053
3	B	<i>Xiphinematobacter</i>	5	900
4		<i>Dolichospermum</i> *	3	895
5		<i>Rubrivivax</i>	12	555
6		<i>Rhodobacter</i>	12	522
7		<i>Planktothricoides</i> *	2	460
8		<i>Limnohabitans</i>	6	413
9		<i>Methyloversatilis</i>	3	383
10		<i>Pseudanabaena</i>	2	381
11		<i>Gemmatimonas</i>	3	318
12		<i>Aquiluna</i>	3	190
13		<i>Segetibacter</i>	2	164
14		<i>Ruminococcus</i>	1	130
15		<i>Zymomonas</i>	2	113
16		<i>Pelomonas</i>	3	112
17		<i>Polynucleobacter</i>	1	107
18	C	<i>Leptothrix</i>	1	94
19		<i>Methylibium</i>	2	82
20		<i>Fluviicola</i>	5	68
21		<i>Rhodoplanes</i>	2	56
22		<i>Aphanizomenon</i> *	2	53
23		<i>Soehngenina</i>	1	49
24		<i>Gallionella</i>	2	45
25		<i>Syntrophomonas</i>	1	38
26		<i>Sediminibacterium</i>	3	37
27		<i>Polaromonas</i>	2	36
28		<i>Pseudomonas</i> *	3	32
29		<i>Opitutus</i>	2	31
30		<i>Tepidimonas</i>	2	28
31		<i>Leptolyngbya</i> *	2	25
32		<i>Desulfosporosinus</i>	1	24
33		<i>Hyphomonas</i>	3	24
34		<i>Limnobacter</i>	2	23
35		<i>Azospira</i>	1	22
36		<i>Chromobacterium</i>	1	21
37		<i>Saprospira</i>	1	21

续表				
序号	类群	属	OTUs	reads
38		<i>Thalassospira</i>	2	20
39		<i>Steroidobacter</i>	2	19
40		<i>Blastomonas</i>	1	13
41		<i>Cupriavidus</i>	1	13
42		<i>Leucobacter</i>	1	13
43		<i>Zoogloea</i>	1	13
44		<i>Delftia</i>	1	12
45		<i>Rhodoferax</i>	1	12
46		<i>Stenotrophomonas</i>	1	11
47		<i>Comamonas</i>	1	9
48		<i>Octadecabacter</i>	1	9
49		<i>Hirschia</i>	1	8
50		<i>C39</i>	1	7
51		<i>Pilimelia</i>	1	7
52		<i>Bryobacter</i>	1	6
53		<i>Flavobacterium</i>	1	6
54		<i>Oscillatoria</i> *	1	6
55		<i>Symbiobacterium</i>	1	6

① * 为蓝藻门;A 为高丰度(reads 数 >10 000) ;B 为中丰度(100 < reads 数 <10 000) ;C 为低丰度(reads 数 <100) 。

3 结 论

太湖蓝藻水华暴发期间,共检测到 14 门,55 属,610 个 OTUs。细菌群落结构特征较为明显,主要优势门类为蓝藻门(39. 7%),放线菌门(27. 2%)和变形菌门(23. 4%),3 门共计 90. 4%。在属水平上,微囊藻属(21. 0%)和聚球藻属(15. 9%)为主要优势种。此外,假鱼腥藻在微囊藻胶被中大量存在的现象也被证实。

[参考文献]

[1] GUO L. Doing battle with the green monster of Taihu Lake[J]. Ecology,2007,317(5842):1166.

[2] AKYUZ DE,LUO L,HAMILTON DP. Temporal and spatial trends in water quality of Lake Taihu,China;analysis from a north to mid-lake transect,1991-2011[J]. Environmental monitoring and assessment,2014,186(6):3891 – 3904.

[3] BAI X,DING S,FAN C,et al. Organic phosphorus species in surface sediments of a large, shallow, eutrophic lake, Lake Taihu, China[J]. Environmental pollution 2009, 157(8 – 9): 2507 – 2513.

[4] CAI HY,YAN ZS,WANG AJ,et al. Analysis of the attached microbial community on mucilaginous cyanobacterial aggregates in the eutrophic Lake Taihu reveals the importance of Planctomyce-tes[J]. Microbial ecology,2013,66(1):73 – 83.

[5] CHAO JY,GAO G,TANG XM,et al. Effects of wind-induced wave on organic aggregates physical and chemical characteristics in a shallow eutrophic lake(Lake Taihu) in China[J]. Environ-