

ICS 13.020

CCS A 01

团 体 标 准

T/ACEF 0**—20**

湖库沉积物功能微生物多样性监测规程

Code of Procedures for monitoring functional microbial diversity in lake and
reservoir sediments

（征求意见稿）

2024-□□-□□发布

2024-□□-□□实施

中 华 环 保 联 合 会 发布

湖库沉积物微生物多样性监测规程

1 范围

本文件规定了湖库沉积物微生物多样性监测的工作程序、采样点布设、样本采集、转运与保存、监测与分析 and 监测报告等。

本文件适用于湖泊和水库沉积物微生物多样性监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 17378.7 海洋监测规范 第7部分：近海污染生态调查和生物监测

GB/T 32725 实验室测定微生物过程、生物量与多样性用土壤的好氧采集、处理及贮存指南

GB/T 34224 生物产品中功能性微生物检测

GB/T 34656 海洋沉积物间隙生物调查规范

GB/T 39792.2 生态环境损害鉴定评估技术指南 环境要素 第2部分：地表水和沉积物

GB/T 43628 空气中病原微生物宏基因组测序鉴定方法

HJ 442.4 近岸海域环境监测技术规范 第四部分 近岸海域沉积物监测

HJ 493 样品保存和管理技术规定

HJ 494 水质 采样技术指导

SN/T 2632 微生物菌种常规保藏技术规程

SN/T 3509 实验室样品管理指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 湖库沉积物 Lake-reservoir sediments

湖泊与水库中由地表水体携带并沉于水体底部，形成底泥状的黏土、泥沙、有机质及矿物的混合物。

3.2 深水沉积物采样器 Deep water sediment sampler

利用筒体自身重力下降至采样位后，通过提升开闭拉绳控制阀体上升，打开筒体阀口，湖库水底泥水界面处的水和泥进入采样器中，松开开闭拉绳，阀体因重力作用下沉，关闭阀口，完成采样过程的采样器。

3.3 微生物 Microorganism

微生物是一类生物的统称，包括细菌、病毒、真菌等在内，涵盖了有益跟有害的众多种类。

3.4 微生物多样性 Microbial diversity

微生物种群多样性，主要体现于微生物系统分类、物种数量、物种构成等。

3.5 代谢指纹技术 Metabolic fingerprinting techniques

基于不同底物诱导下的代谢响应模式，测算环境样本中微生物群落代谢功能多样性的一种方法，可应用 BIOLOG 板检测。BIOLOG 板上小孔中分别装有不同的碳源和四唑类显色物质，微生物群落可以利用不同种类的碳源进行代谢，以代谢过程产生的自由电子与四唑类显色物质发生颜色反应的吸光度差异为基础，表示微生物对碳源的利用程度。

4 工作程序

湖库沉积物微生物多样性工作程序宜包括采样点布设、样本采集、样品保存与转运、样品监测与分析，流程如图 1 所示。



图 1 湖库沉积物微生物多样性工作程序

5 采样点布设

5.1 采样区域宜通过文献调研和现场踏勘等方式，按研究区域概况、湖库基本信息确定。

5.2 采样区域内，采样点选择应符合下列规定：

- a) 湖泊和水库入口和出口，应采集大坝岸和中间位置；
- b) 采集样品应按周边环境确定，宜采集湖泊和水库距工厂和农业地区较近的岸边；
- c) 取样点可根据深度选择；

d) 以上点位确定后, 可在湖库示意图上稀疏的地方适当增加点位, 点位在湖库布点宜均匀。

6 样本采集

样本采样宜符合下列规定:

a) 采样前, 使用防水记录笔对无菌聚乙烯自封袋编号, 对冰箱提前预冷; 并检查采样仪器完整性; 将盛放采集样品的密封袋使用紫外灯杀毒灭菌;

b) 将准备好的材料器材搬运到船只上, 根据定位仪确定的经纬度信息在已确定的采样地点采样;

c) 采样的同时应对周围环境拍照; 使用米尺测量采样点处水深并记录, 选择抓斗式滤水采泥器、彼得逊抓斗式采泥器、分层箱式采泥器、重力柱状采泥器等湖库沉积物采样器采集沉积物, 采样器见附录 A, 将采集的沉积物放进已经标记好的无菌聚乙烯自封袋后封存;

d) 对采集点照片、采样点地点、样品编号、采样深度、采样日期、采样信息、采样数量和水体深度记录并保存, 采样信息登记表见附录 B。

7 转运与保存

7.1 微生物形态学及代谢活性分析样品转运及储存

7.1.1 分装后的沉积物样品, 应存放至温度 0℃ 的便携式冰箱或干冰转运。

7.1.2 沉积物样品应储存于 -20℃ 的低温冰箱中。

7.2 微生物种群结构样品转运及储存

7.2.1 分装后的样品, 应存放至温度 0℃ 的便携式冰箱或干冰转运。

7.2.2 沉积物样品应储存于液氮或 -80℃ 超低温冰箱中。

8 监测与分析

8.1 微生物形态学分析

8.1.1 分析项目

微生物形态特征宜包括细胞形状、大小、颜色、细胞壁结构等。宜使用高分辨率显微镜观察微生物细胞和胞内含物、鞭毛或胞外结构等结构细节。应观察不同染料标记的微生物探针在显微镜下的颜色, 保存不同微生物的染色图像及其叠加图, 描述沉积物样品中微生物的形态、结构和数量以及在样品中的相对位置。

8.1.2 分析流程

8.1.2.1 沉积物微生物形态学分析前处理方法可参照附录 C。

8.1.2.2 沉积物微生物形态学分析流程如图 2 所示。将制好的样品倒放在激光共聚焦显微镜

载物台上，根据标记探针引物的特性在电脑上设置相应参数，调节焦平面，在显微镜下清晰观察样品，依次设置激光通道、物镜放大倍数、激光强度、图像分辨率、增益和负背景，并将结果显示到电脑软件上成像。

8.1.2.3 观察目镜下微生物染色情况时，应包括染色区域、位置以及对应的染料，根据实验要求可观察一种或多种微生物分布情况，通过调节物镜倍数还可观察到微生物形态结构，输出图像。

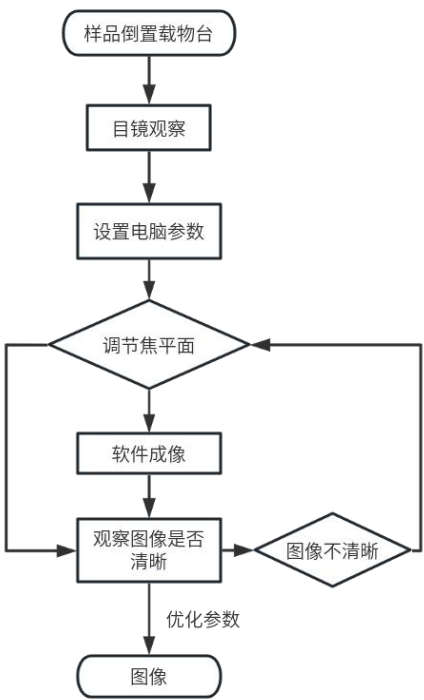


图 2 沉积物微生物形态学分析流程图

8.1.3 数据处理与分析

数据处理与分析时，应将显微镜观察获得的图像导入 AutoQuant 图像处理软件，选择 slice viewer 查看共聚焦仪器软件下的参数信息，设置不同通道参数，点击 apply，点击 3D 反卷积，设置参数，选择 Adaptive PSF，然后点击 all 进行校准，其他应按默认，开始反卷积，反卷积完成，查看图像，可进一步对每个通道图像调整，将优化的图像保存为 lsm 格式。

8.2 微生物代谢活性分析

8.2.1 分析项目

微生物代谢活性测定宜采用代谢指纹技术。

8.2.2 测定流程

8.2.2.1 前处理

前处理时，应取湿重为 1 g 新鲜沉积物用 9 mL 无菌 0.05 M 磷酸缓冲液稀释，经暗培养振荡培养 30 min 后，在超净工作台对暗培养液进行梯度稀释，随后将稀释后沉积物样本转移至灭菌水槽中，通过移液枪转接到微生态板。

8.2.2.2 代谢指纹技术测定流程

代谢指纹技术测定流程如图 3 所示。应使用电子移液枪将悬浮液接种至 BIOLOG 板后，在暗培养箱培养 240 h。间隔 12 或 24 h，应用 BIOLOG 系统的微平板读数器，测定 BIOLOG 板在 590 nm 及 720 nm 波长下的光密度值（optical density，OD 值），完成数据的采集、存储与导出。

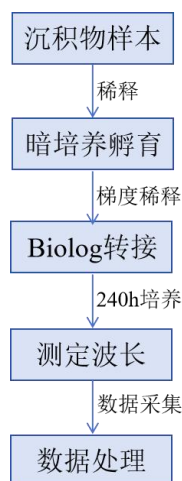


图 3 代谢指纹技术测定流程

8.2.3 数据处理与分析

数据处理与分析时，应计算 BIOLOG 每孔平均颜色变化率用于评估微生物碳源代谢活性，并计算香农（Shannon）指数和辛普森（Simpson）指数评估微生物群落功能丰富度及评估微生物群落功能优势度指数。宜采用下列公式计算：

a) 平均吸光度（AWCD）可表征微生物群落对碳源利用的总能力，宜采用下式计算：

$$AWCD = \frac{\sum (A_i - A_{A1})}{95}$$

式中：

A_i —第 i 孔的相对吸光度；

A_{A1} —A1 孔的相对吸光度。

b) Shannon 指数 H' 用于评估微生物群落功能的丰富度，宜采用下式计算：

$$H' = -\sum P_i \cdot \ln(P_i)$$

式中：

P_i —第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

c) Simpson 指数 D 用于评估微生物群落功能优势度指数，宜采用下式计算：

$$D = 1 - \sum \frac{A_i (A_i - 1)}{N(N-1)}$$

式中：

A_i —第 i 孔的相对吸光度；

N —相对吸光值总和。

8.3 微生物功能与种群结构分析

8.3.1 分析项目

8.3.1.1 高通量测序

高通量测序时，应识别沉积物中微生物群落组成，评估微生物种群丰富度和均匀度。

8.3.1.1 宏基因测序

宏基因测序时，应解析沉积物中微生物群落丰度和群落组成，鉴定沉积物中微生物基因组成及功能、相关代谢通路。

8.3.2 测定流程

8.3.2.1 DNA 提取

沉积物样品宜开展 DNA 提取。DNA 提取方法可参照附录 D。

8.3.2.2 高通量测序

高通量测序流程如图 4 所示。并按下列步骤执行：

a) 荧光定量。选择所需功能基因条带对提取 DNA 进行荧光定量 qPCR 分析。每个样本重复 3 次。将 PCR 产物用荧光定量系统检测定量，之后按每个样本测序量要求，进行相应比例混合。

b) Illumina 文库构建。通过 PCR 将 Illumina 接头序列添加至目标区域外端，使用凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物；Tris-HCl 缓冲液洗脱，2%琼脂糖电泳检测；氢氧化钠变性，产生单链 DNA 片段。

c) Illumina 测序。以 DNA 片段为模版、碱基序列为引物合成目标待测 DNA 片段，使芯片上 DNA 片段的另一端随机与附近的另外一个引物互补形成“桥”。PCR 扩增产生 DNA 簇并线性化为单链，加入 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP，用激光扫描反应板表面，读取每条模板序列第一轮反应聚合的核苷酸种类。重复操作，统计每轮收集到的荧光信号结果，获知模板 DNA 片段序列。

d) 物种注释与评估。Illumina 测序得到的 PE reads 根据 overlap 关系拼接，同时对序列质量进行质控和过滤，区分样本后进行 OTU 聚类分析和物种分类学分析。选出与 OTU 代表序列相似性在 99%以上的序列，生成 OTU 表格。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 99%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析，并分别在分类学水平统计样本的群落物种组成。



图 4 高通量测序流程

8.3.2.3 宏基因组测序

宏基因组测序流程如图 5 所示。并按下列步骤执行：

a) 基因组 DNA 提取与片段化。完成基因组 DNA 抽提后，利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。将基因组 DNA 片段化为 350 bp。

b) 构建 PE 文库。连接“Y”字形接头；使用磁珠筛选去除接头自连片段；利用 PCR 扩增进行文库模板富集；氢氧化钠变性，产生单链 DNA 片段。

c) 桥式 PCR。DNA 片段的一端与引物碱基互补，固定在芯片上；另一端随机与附近的另外一个引物互补，固定形成“桥”；PCR 扩增，产生 DNA 簇；DNA 扩增子线性化成为单链。

d) Illumina 测序。加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP，每次循环只合成一个碱基；用激光扫描反应板表面，读取每条模板序列第一轮反应聚合上去的核苷酸种类；重复操作，统计每轮收集到的荧光信号结果，获知模板 DNA 片段的序列。

e) 物种与功能注释。数据分析从下机原始序列开始，对原始序列进行拆分、质量剪切以及去除污染等优化处理。然后使用优化序列进行拼接组装和基因预测，对得到的基因进行 NR，eggNOG，KEGG 等物种和功能注释以及分类。对数据库选择可参照附录 E。使用 DIAMOND 软件 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/diamond/>) 将非冗余基因集与 NR 数据库 BLASTP 比对，并通过 NR 数据库对应的分类学信息数据库获得物种注释，然后使用物种对应的基因丰度总和计算该物种丰度，并在域 (Domain)、界 (Kingdom)、门 (Phylum)、纲 (Class)、目 (Order)、科 (Family)、属 (Genus)、种 (Species) 分类学水平上统计物种在样品中的丰度，构建相应分类学水平上的丰度谱 (abundance profile)。使用 DIAMOND 软件 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/diamond/>) 将非冗余基因集序列与 COG 数据库进行 BLASTP 比对，获得基因对应的直系同源蛋白簇 (COG, Clusters of orthologous groups of proteins)，然后使用 COG 对应的基因丰度总和计算该 COG 的丰度。



图 5 宏基因组测序流程

8.3.3 数据处理与分析

对统计得到的物种群落组成，宜采用乔伊（Chao1）、基于丰度的覆盖估计值（ACE）、香农（Shannon）和辛普森（Simpson）指数反映沉积物微生物种群多样性和丰富度。宜按下列公式计算：

a) Chao1 指数分析宜按下式计算：

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1-1)}{2(n_2+1)}$$

式中：

S_{chao1} —估计的物种数；

S_{obs} —实际观察到的物种数；

n_1 —只含有一条序列的物种数；

n_2 —只含有两条序列的物种数。

b) ACE 指数宜用来估计群落中物种数目的指数，宜按下列公式计算：

$$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_i}{C_{ACE}} R_{ACE}^2 \quad r_{ACE} < 0.08$$

$$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_i}{C_{ACE}} r_{ACE}^2 \quad r_{ACE} \geq 0.08$$

其中，

$$N_{rare} = \sum_{i=1}^{abund} i n_i$$

$$C_{ACE} = 1 - \frac{n_1}{N_{rare}}$$

$$R_{ACE}^2 = \max \left[\frac{S_{rare} \sum_{i=1}^{abund} i(i-1)n_i}{C_{ACE} N_{rare} (N_{rare} - 1)} - 1, 0 \right]$$

$$r_{ACE}^2 = \max \left[r_{ACE}^2 \left\{ 1 + \frac{N_{rare} (1 - C_{ACE}) \sum_{i=1}^{abund} i(i-1)n_i}{N_{rare} (N_{rare} - C_{ACE})} \right\}, 0 \right]$$

式中：

n_i —含有 i 条序列的物种数；

S_{rare} —含有或少于 $abund$ 条序列的物种数；

S_{abund} —多于 $abund$ 条序列的物种数；

$abund$ —优势物种的序列数阈值，默认 10。

c) Shannon 指数宜用来估算样本中微生物多样性指数之一，与群落多样性成正比，宜按下式计算：

$$H_{Shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

式中：

S_{obs} —实际观察到的物种数；

n_i —第 i 个物种数所含的序列数；

N —所有的序列数。

d) Simpson 指数宜用来估算样本中微生物多样性的指数，与群落多样性成反比，宜按下式计算：

$$D_{Simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

式中：

S_{obs} —实际观察到的物种数；

n_i —第 i 个物种所包含的序列数；

N —所有的序列数。

9 监测报告

完成检测与分析项目后，宜按表 1 填写监测报告。

表 1 监测报告

采样点 名称	采样点 深度/m	微生物代谢活性分析			微生物功能与种群结构分析						
		平均吸光度 <i>AWCD</i>	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	优势物种 1	优势物种 2	优势物种 3
采样点 1											
采样点 2											
采样点 3											

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/918053076111007032>