



学校代码：10481
学 号：2020086000078
密 级：不保密
分 类 号：X853

南陽師範學院

硕士学位论文

丹江口水库不同深度浮游细菌组成、功能
及其驱动因素研究

专业学位类别 工程硕士

专业学位领域 生物与医药

学 生 姓 名 张玮玮

导 师 姓 名 陈兆进 副教授

 辛小康 高级工程师

完 成 时 间 2023 年 10 月

**A Thesis Submitted to
Nanyang Normal University for Master Degree**

**Composition, function and driving factors of
planktonic bacteria at different depths in
Danjiangkou Reservoir**

By Weiwei Zhang

Supervisor: Prof. Zhaojin Chen; SN ENGR. Xiaokang Xin

October 2023

南阳师范学院 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下完成的，所有数据真实可靠。研究工作所取得的成果和相关知识产权属南阳师范学院所有。除已注明部分外，论文中不包含其他人已经发表过的研究成果，也不包含本人为获得其它学位而使用过的内容。对本文的研究工作提供过重要帮助的个人和集体均已在论文中明确说明并致谢。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名： 张玮玮 签名日期： 2023年11月25日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解南阳师范学院有权保留并向国家有关部门或机构递交本论文的印刷本和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权南阳师范学院可以将学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用于本授权书）

本学位论文属于：

保密，在 年解密后适用本授权书。

不保密。

作者签名： 张玮玮

导师签名： 陈北进

签名日期： 2023年11月25日

签名日期： 2023年11月25日

导师组成员

陈兆进	副教授
李玉英	教授
辛小康	高级工程师
李百炼	院士
刘宪亮	教授
Nicola Fohrer	教授

目 录

摘 要	I
Abstract	IV
第一章 引言	1
1.1 丹江口水库概况	1
1.2 分层型湖库水体特点	1
1.3 浮游细菌特征	3
1.4 宏基因组学在细菌领域中的应用	3
1.5 浮游细菌和水质的相关性研究	4
1.6 技术路线	5
1.7 本课题的研究来源与主要内容	6
第二章 丹江口水库水体理化性质分析及评价	7
2.1 材料与方法	7
2.1.1 采样点概况	7
2.1.2 样品采集和理化性质的测定	9
2.2 结果与分析	9
2.3 讨论	14
第三章 丹江口水库分层型水体浮游细菌群落组成季节变化及关联分析	15
3.1 材料与方法	15
3.1.1 丹江口水库样品采集及理化指标检测	15
3.1.2 浮游细菌总 DNA 提取	15
3.1.3 宏基因组测序分析	15
3.2 结果与分析	16
3.2.1 浮游细菌群落组成分析	16

3.2.2 不同分层型水体浮游细菌物种组成比较分析	19
3.2.3 不同分层型水体浮游细菌物种组成差异分析	21
3.2.4 不同分层型水体浮游细菌群落与环境因子关联分析	28
3.3 讨论	31
3.3.1 丹江口水库浮游细菌群落组成	31
3.3.2 浮游细菌群落与环境因子的响应	32
第四章 丹江口水库分层型水体浮游细菌功能预测分析	34
4.1 材料与方法	34
4.1.1 丹江口水库样品采集及理化指标检测	34
4.1.2 浮游细菌总 DNA 提取	34
4.1.3 宏基因组测序分析	34
4.2 结果与分析	35
4.2.1 浮游细菌群落 COG 功能预测结果分析	35
4.2.2 浮游细菌群落 KEGG 功能预测结果分析	49
4.2.3 浮游细菌群落氮磷循环基因功能预测结果分析	73
4.3 讨论	78
4.3.1 浮游细菌群落 COG 功能不同季节分层变化	78
4.3.2 浮游细菌群落 KEGG 功能不同季节分层变化	79
4.3.3 浮游细菌群落氮磷循环基因功能分层变化	80
第五章 总结	82
5.1 结论	82
5.2 创新点与展望	84
5.2.1 创新点	84
5.2.2 展望	84

参考文献	85
攻读硕士学位期间取得的研究成果	93
致 谢	94

丹江口水库不同深度浮游细菌组成、功能及其驱动因素研究

摘 要

浮游细菌是水生生态系统的重要组成部分，对物质循环和能量流动起着关键作用。为全面探究丹江口水库不同季节分层型水体中浮游细菌群落组成、基因功能及其与理化指标之间的相关性分析，本研究对 2021 年 10 月、2022 年 3 月及 2022 年 7 月丹库中 5 个典型的生态点位 45 个样品，采用宏基因组学技术探究浮游细菌群落组成、基因预测、功能分析以及代谢通路等信息，进一步探究丹江口水库由水深变化引起的理化性质垂向差异导致的浮游细菌群落组成及功能的垂直分布特征。主要结论如下：

1. 丹江口水库三次水质监测表明水库水温（WT）随季节变化明显，夏季水温最高，春季比秋季水温低。2022 年 3 月和 7 月水体温度均表现出明显的热分层现象。水体酸碱度（pH）整体稳定，保持偏碱性水质。溶解氧（DO）层化现象明显，表层水体中含量最高，整体呈现出随着水深的增加逐渐降低的趋势。氧化还原电位（ORP）与电导率（Cond）受到季节与采样位点的影响，2022 年 3 月 ORP 值与 Cond 值呈现出随着水深的增加逐渐增加的趋势。库区水体除总氮外，各生态点位不同分层水体各项水质指标基本达到 I 或 II 类水标准要求，库区水质整体较好。

2. 变形菌门（Proteobacteria）和放线菌门（Actinobacteria）是三次采样的优势类群，其他优势类群在不同季节发生变化。三次测序结果比较发现夏季物种多样性明显高于春秋两季，且在不同季节分层型水体中浮游细菌分布情况表现出一定的规律性。醋杆菌门（Acidobacteria）、绿弯菌门（Chloroflexi）、浮霉菌门（Planctomycetes）和硝化螺旋菌门（Nitrospirae）随着水体深度增加占比逐渐增加。蓝细菌门（Cyanobacteria）随着水体深度增加占比逐渐降低，在底层水体中丰度占比最低。冗余分析发现 2021 年 10 月蓄水水位达到 170m 水体在垂直方向环流剧烈无显著影响因素，2022 年 3 月 WT、叶绿素 a（Chl a）、DO、ORP 以及 2022 年 7 月硝态氮（NO₃⁻-N）是影响丹江口水库不同分层水体浮游细菌群落结构变化的重要理化指标（P<0.05）。不同采样时间及不同水深变化导致理化指标的改变是丹江口水库不同季节分层型水体群落组成差异的重要影响因素，形成了各水体样本不同群落组成特征以及不同的优势物种。

3. COG 功能注释显示丹江口水库不同季节分层型水体中均存在新陈代谢、未知功能、细胞过程和信号传导及信息贮存和处理四大类功能，2021 年 10 月与 2022 年 3

月四大类功能占比接近，2022年7月未知功能占比显著下降，其余三大功能占比均显著提高。三次采样分别注释到20个、23个和25个功能组，表现出功能基因的多样性与丰富性，前两次功能未知（Function unknown. 简称S，下同）占比最高，2022年7月氨基酸转运代谢（Amino acid transport and metabolism. E）占比最高。三次采样不同分层水体中均存在显著差异的是次级代谢物生物合成、转运和代谢（Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism. Q）。氨基酸转运代谢，细胞壁/膜/被膜的生物合成（Cell wall/membrane/envelope biogenesis. M），碳水化合物转运代谢（Carbohydrate transport and metabolism. G），脂肪转运代谢（Lipid transport and metabolism. I），翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白（Posttranslational modification, protein turnover, chaperones. O），翻译、核糖体结构和生物合成（Translation, ribosomal structure and biogenesis. J）呈现出夏季明显高于春秋的趋势；复制、重组和修复（Replication, recombination and repair. L）呈现出夏季明显低于春秋的趋势。不同季节分层水体中物种与COG功能贡献度结果显示，不同种群在不同季节表、中及底层水体中贡献度占比各不相同，结果反映出在不同时期不同水深丹江口水库浮游细菌功能基因存在明显变化。2021年10月蓄水水位达到170m水体在垂直方向环流剧烈无显著影响因素，2022年3月总溶解性固体物质（TDS）、高锰酸盐指数（ COD_{Mn} ）和Cond，7月WT和 NO_3^- -N是影响不同分层型水体浮游细菌COG功能变化的显著因素（ $P < 0.05$ ）。不同季节分层型水体中COG功能有所差异，既与各季节理化性质变化有关又与三次采样浮游细菌优势类群结构发生变化有关。

4. KEGG功能注释表明丹江口水库不同季节分层型水体样本中 pathway level 1均获得6条代谢通路，pathway level 2均获得46条代谢途径，pathway level 3在2021年10月、2022年3月和7月发现代谢途径为426条、420条、426条，各季节表中底层水体中共有的分别为415条、417条、419条。共有的代谢途径表现出不同季节分层型水体其代谢途径的多样性与丰富性，特有的代谢途径表现出其代谢途径的特异性。总体呈现出随着季节的变更，新陈代谢中三级代谢途径数量降低、遗传信息处理中三级代谢途径数量逐渐增多的趋势。冗余分析发现2021年10月蓄水水位达到170m水体在垂直方向环流剧烈，削弱了环境因子对不同分层水体KEGG功能变化的影响，无显著影响因素；2022年3月DO和 COD_{Mn} 及2022年7月 NO_3^- -N是影响丹江口水库水体浮游细菌KEGG功能变化的重要指标。丹江口水库不同季节分层型水体中浮

游细菌参与 KEGG 功能最大贡献度的物种存在差异, 且不同代谢途径中的基因与酶存在差异, 既与各季节理化性质变化有关又与三次采样浮游细菌优势类群结构发生变化有关。

5. 宏基因组学分析表明丹江口水库浮游细菌参与生物固氮、硝化作用、反硝化作用、异化硝酸盐还原作用等氮循环过程, 涉及 *gltB*、*glnA*、*gltD*、*gdhA*、*NRT*、*ureC* 等 39 个氮循环功能基因。参与有机磷矿化、无机磷溶解、调节、多聚磷酸盐合成等磷循环过程, 涉及 *pstS*、*ppx-gppA*、*glpQ*、*ppk1*、*ppnK* 等 54 个氮循环功能基因。垂直分布是影响氮、磷循环功能基因组成和丰度的主要因素, 表层和底层氮磷循环功能基因组成有所差异, 整体丰度高于中层样品。丹江口水库水深变化引起的理化性质 (WT、ORP、DO、Chla 等) 垂向差异导致浮游细菌功能呈明显的垂直分布特征。

关键词: 丹江口水库; 浮游细菌; 宏基因组; 分层型水体; 氮磷循环

Composition, function and driving factors of planktonic bacteria at different depths in Danjiangkou Reservoir

Abstract

Plankton bacteria account for the majority of the biomass of aquatic ecosystems and play a key role in the material cycle and energy flow. In order to comprehensively explore the relationship between plankton community composition, gene function and physicochemical indexes in stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in different seasons, 45 samples from 5 typical ecological sites in Dankou reservoir in October 2021, March 2022 and July 2022 were analyzed. Metatenomics technology was used to explore the composition, gene prediction, function analysis and metabolic pathway of plankton bacteria community, and further explore the vertical distribution characteristics of plankton bacteria community composition and function caused by vertical differences in physical and chemical properties caused by changes in water depth in Danjiangkou Reservoir. The main conclusions are as follows:

1. The three water quality monitoring of Danjiangkou Reservoir shows that the water temperature (WT) of the reservoir changes obviously with the seasons, the water temperature is the highest in summer, and the water temperature in spring is lower than that in autumn. The water temperature in March and July 2022 showed obvious thermal stratification. The overall pH of the water body is stable, and the water quality is alkaline. The stratification of dissolved oxygen (DO) is obvious, and the content of DO is the highest in surface water, and it gradually decreases with the increase of water depth. redox potential (ORP) and conductivity (Cond) are affected by seasons and sampling sites, and ORP and Cond values in March 2022 show a trend of gradual increase with the increase of water depth. In addition to total nitrogen, the water quality indexes of different stratified water bodies at each ecological point basically meet the requirements of Class I or II water standards, and the water quality in the reservoir area is generally good.

2. Proteobacteria and Actinobacteria were the dominant groups sampled three times, while other dominant groups changed in different seasons. Compared with the three sequencing results, it was found that the species diversity in summer was significantly

higher than that in spring and autumn, and the distribution of planktic bacteria in stratified water bodies in different seasons showed certain regularity. The proportions of Acidobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes and Nitrospirae gradually increased with increasing water depth. The proportion of Cyanobacteria decreased gradually with the increase of water depth, and the abundance of Cyanobacteria was the lowest in the bottom water. Redundancy analysis found that there was no significant influence factor on the severe vertical circulation of water when the water storage level reached 170m in October 2021. WT, Chla, DO and ORP in March 2022, and NO_3^- -N in July 2022 were important physicochemical parameters affecting the changes of plankton bacterial community structure in different layers of water bodies in Danjiangkou Reservoir ($P < 0.05$). The change of physical and chemical indexes caused by different sampling time and different water depth is an important factor affecting the difference of stratified water community composition in different seasons in Danjiangkou Reservoir, which forms different community composition characteristics and different dominant species of water samples.

3. COG functional annotations show that the stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in different seasons all have four major functions: metabolism, poorly characterized, cell processes and signaling, information storage and processing. The proportion of the four major functions in October 2021 and March 2022 is close to each other, and the proportion of poorly characterized in July 2022 is significantly reduced. The proportion of the other three functions has been significantly improved. Three samples were annotated to 20, 23 and 25 functional groups, respectively, showing the diversity and richness of functional genes, with the highest proportion of unknown function in the first two samples and the highest proportion of Amino acid transport metabolism in July 2022. Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism showed significant differences among different stratified water bodies sampled three times. Amino acid transport and metabolism, Cell wall/membrane/envelope biogenesis, Carbohydrate transport and metabolism, Lipid transport and metabolism, Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, Translation, ribosomal structure and biogenesis showed significantly higher trend in summer than in spring and autumn. Replication,

recombination and repair showed a trend that summer was significantly lower than spring and autumn. The results showed that the functional genes of planktonic bacteria in Danjiangkou reservoir changed significantly in different periods. The results of functional contribution of species and COG in stratified water bodies in different seasons show that the contribution proportion of different populations in surface, middle and bottom water bodies in different seasons is different, and the results reflect that there are obvious changes in functional genes of plankton bacteria in Danjiangkou reservoir in different periods and different water depths. Redundancy analysis found that there was no significant influence factor on the severe vertical circulation of water when the water storage level reached 170m in October 2021. In March 2022, TDS, COD_{Mn} and Cond, and in July WT and NO₃⁻-N were significant factors affecting the functional changes of plankton bacteria in different stratified water bodies (P<0.05). The difference of COG function in stratified water bodies in different seasons is related to the change of physicochemical properties in different seasons and the change of dominant group structure of planktonic bacteria sampled three times.

4. KEGG functional annotation showed that in stratified water samples from Danjiangkou Reservoir in different seasons, 6 metabolic pathways were obtained by pathway level 1 and 46 metabolic pathways were obtained by pathway level 2. pathway level 3, 426, 420 and 426 metabolic pathways were found in October 2021, March 2022 and July 2022, and 415, 417 and 419 metabolic pathways were found in the bottom water of each season, respectively. The common metabolic pathways showed the diversity and richness of metabolic pathways in stratified water in different seasons, and the unique metabolic pathways showed the specificity of metabolic pathways. With the change of seasons, the number of tertiary metabolic pathways in metabolism decreased and the number of tertiary metabolic pathways in genetic information processing gradually increased. Redundancy analysis found that in October 2021, water with water storage level reaching 170m had severe vertical circulation, which weakened the influence of environmental factors on KEGG function changes in different stratified water bodies, and there were no significant influencing factors. DO and COD_{Mn} in March 2022 and NO₃⁻-N in

July 2022 are important indicators affecting the functional changes of planktic bacteria KEGG in Danjiangkou Reservoir. In the stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in different seasons, there were differences in the species of plankton that contributed the most to KEGG function, and there were differences in genes and enzymes in different metabolic pathways, which were related to the changes of physical and chemical properties in different seasons and the changes in the structure of dominant groups of plankton bacteria sampled three times.

5. Metagenic analysis showed that plankton in Danjiangkou Reservoir participated in biological nitrogen fixation, nitrification, denitrification, nitrate reduction and other nitrogen cycle processes, involving 39 nitrogen cycle genes such as *gltB*, *glnA*, *gltD*, *gdhA*, *NRT*, *ureC*, etc. It is involved in organic p mineralization, inorganic p solubilization, regulation, polyphosphate synthesis and other phosphorus cycle processes, involving 54 nitrogen cycle functional genes such as *pstS*, *ppx-gppA*, *glpQ*, *ppk1*, *ppnK*, etc. Vertical distribution is the main factor affecting the composition and abundance of nitrogen and phosphorus cycling functional genes. The composition of nitrogen and phosphorus cycling functional genes in surface and bottom layer is different, and the overall abundance is higher than that in middle layer. The vertical differences of physical and chemical properties (WT, ORP, DO, Chla, etc.) caused by water depth change in Danjiangkou reservoir lead to the obvious vertical distribution characteristics of plankton function.

Key words: Danjiangkou reservoir; Planktonic bacteria; Metagenome; Stratified water body; Nitrogen and phosphorus cycle

第一章 引言

1.1 丹江口水库概况

作为南水北调中线工程核心水源区的丹江口水库，位于汉江上游，由河南省内的丹江库区以及湖北省内的汉江库区两大库区组成^[1-2]，是国家一级水源保护区。丹江口水库由 1973 年建成的丹江口大坝下闸蓄水后形成，年平均入库水量为 394.8 亿立方米，水源 90%来源于汉江，10%来源于支流丹江^[1]，水库最深达 80 多米，水面最宽处 20 多千米，最窄处不足 300 米，是汉江自然调蓄水库，被誉为“亚洲天池”^[2]。2013 年丹江口大坝加高后，大坝从 162 米增加到 176.6 米，可蓄水高度从 157 米上升到 170 米，丹江口水库水域面积将达 1022.75 平方公里，蓄水量达 290.5 亿立方米，新增淹没区域 307.7 km²，其中农田淹没面积接近 26 万亩^[3]。

南水北调中线工程全长 1432 公里，实现了借南方之水，解北方之渴，“南北共饮一江水”的梦想。中线工程运行后，库区水位整体抬高改变了水体流向，汉江水流向丹库进而流入中线干渠，保证中线调水工程稳定进行。2014 年 12 月，中线一期工程通车，从南阳市淅川县陶岔渠首一路自流经豫、冀、津、京四省到北京颐和园团城湖，年均向京津和华北地区供水 95 亿吨，供水区域面积 15.5 万平方公里，惠及沿线 1.5 亿人，兼顾了生产、生活、生态用水，有效缓解了我国北方地区缺水的严峻形势。

2021 年 10 月 10 日 14 时，丹江口水库蓄水达到 170 m，这是丹江口大坝加高后首次达到 170 米，为汉江蓄洪防旱、调节区域气候、丰富生物多样性奠定了良好基础^[4]。近年来，丹江口水库受到较大扰动，库体发生明显变化、库区水位升高，处于水生生态系统重建的过程。常年水源区水质监测结果除总氮外，其余指标均符合地表水国家 II 类以上标准^[5]，因此对其进行持续的水质和生态状况监控是十分必要的。

1.2 分层型湖库水体特点

天然流动的水体因为时间及空间分布不均匀，很难满足人们对水量的需求，随着生产力的发展，许多水利工程应运而生。拦河截江、筑坝蓄水，高坝大库在一定程度上满足了人们对水资源的需求。与天然水体不同的是高坝大库水体往往具有高水深、缓流速、长停留的特点，在太阳辐射及热力学流动等多种因素的作用下，导致水体的物理、化学、生物性质发生改变，引起湖库水体的热分层。由于温度变化的影响，水

体垂直方向温度分布不均匀引起湖库水体分层和对流,在夏季水体上层热下层凉的状况,称为水体的“正分层”。在冬季由于受到冷空气的影响,水体下层热上层凉的状况,称为水体的“逆分层”。对于湖库水体的季节性热分层,主要是指随着季节的更替水体由同温混合状态向分层状态的周期性演变过程。

郑莹莹等^[6]2018年对台州市长潭水库的热分层结构、水质响应特征及形成机制进行研究,结果显示长潭水库全年为单循环混合模式,亚深型水库特殊的分层结构对于水体中 DO、pH 和叶绿素 a 的垂直方向变化产生了一定的影响。闫苗苗等^[7]分析李家河水库水质指标发现浮游细菌群落结构垂向演替与水质之间存在偶联关系,在 8 月份热分层期时,水体 pH、DO 和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 随深度变化均逐渐降低 ($P < 0.001$); 变形菌门和放线菌门在不同水层均为优势门类,其相对丰度之和达 50%以上,绿菌门和浮霉菌门的相对丰度随着水深增加发生显著变化;李家河水库的细菌群落结构垂向分布差异显著,且随着水深的增加,细菌群落分布更均匀并趋于多样性。王禹冰等^[8]通过对北京市密云水库秋季分层特征及细菌群落垂直变化进行研究,揭示水体热分层对水库水质及细菌群落有较大的影响:①密云水库水体温跃层在水深 20~30 m 处,水温范围为 15~19°C,聚类分析将 7 个采样水层划分为好氧区和缺氧区两类,WT、DO、pH、Cond、氨氮、硝态氮、亚硝态氮及总氮均表现出明显的垂向分布特征;②冗余分析结果显示,上下层水体的 DO、pH、电导率、氨氮、硝态氮和亚硝态氮存在较为明显的垂向变化,是影响密云水库细菌群落结构垂直分布的主要环境因子;③浮游细菌数量随水深变化的波动较为明显,说明密云水库秋季水体细菌群落分布存在显著的分层现象。

湖库水体是我国居民饮用水的重要地表水源。在分层状态下,水体由上到下被划分为变温层、温跃层及等温层的分层结构。由于温跃层的存在会阻碍水体中溶解氧的传递^[8],底层水体中水生生物的呼吸作用、微生物氧化分解作用以及沉积物矿化降解作用,会逐渐形成缺氧环境。在缺氧条件下,水体中的厌氧微生物分解释放硫化氢、甲烷等气体,沉积物中的氨氮、锰等污染物等加速释放,导致水体恶化,进而引起一系列的水质问题。在不同年份、不同季节里其分层特性包括水温分层、溶解氧分层、化学性质分层、水体微生物分层等,会有较大的差异。因此,分层型湖库水体是水环境保护研究的重点内容,针对丹江口水库不同深度浮游细菌群落组成的差异分析及其驱动因素未见报道,对其进行持续的水质监测是十分有必要的。

1.3 浮游细菌特征

湖库水体中分布着数量庞大、种类繁多的微生物，在域水平上分为细菌、真菌、真核生物、病毒及未知分类物种。细菌菌群主要是由附着细菌和浮游细菌两大类组成，两者在功能上存在一定差异。浮游细菌是指水体中营浮游生活的原核生物类群，主要包括自养细菌、异养细菌及古细菌。自养细菌可以依靠光合作用和化能合成作用获得能源，而异养细菌主要是利用水体中现有的有机物，总体上异养细菌的数量要比自养细菌的数量多得多。尽管绝大多数的浮游细菌个体大小只有0.2~2微米，但是它们在湖库水生生态系统中参与有机物降解、营养物质循环、污染物释放等过程，维持生态系统的功能和进程。

浮游细菌是水生生态系统的重要组成部分，在生态系统的组分中，它既是生产者又是消费者还是分解者。作为生产者，它能够将其他生物无法吸收的无机物转换成有机物进行“二次生产”，进而被微型原生动物、微型食植动物及桡足类浮游动物摄食进入传统的食物链。作为消费者，它可以利用水体中的有机物进行异养生长。作为分解者，它具有降解有机物质的能力，能将生物营养转化过程中遗失的颗粒有机物和可溶有机物分解利用，使其返回到再循环中。因此，浮游细菌在水生生态系统的物质循环以及能量流动过程中发挥重要作用^[9]。

水体中浮游细菌群落结构的构成，不仅会受到土地地域差异及人类活动影响，而且还会受到水位变化的影响。因此了解浮游细菌群落组成的多样性、功能的差异性及其在环境变化过程中所做出的复杂反应，对治理和保护水生态系统具有深远意义。

1.4 宏基因组学在细菌领域中的应用

湖库水体及沉积物中存在着数量巨大的微生物，浮游细菌作为绝对优势种群参与水生生态系统中的物质循环、能量转换以及信息传递^[9]，但因其个体微小、敏感度高，超过99%的微生物不能依靠传统的培养和分离方法获得，极大地限制了人们对它的研究。随着测序技术以及数据分析技术的发展^[10]，一种对生境中全部微生物进行研究而又不依赖是否可培养的新方法，宏基因组学应运而生^[11]。该组学技术以其独特的优势，可使研究者掌握样品中更加全面的信息，更可使占生境中99%的不可培养微生物得以被人类所认知。

近年来，宏基因组学在微生物生态学中得到了广泛的应用，其操作简单，可得到大量数据，能更全面的获得物种组成及基因功能信息，在水体、土壤及生物样本中得

到广泛应用。张雷^[12]对山东荣成和河南三门峡大天鹅胃肠道菌落多样性、结构和功能进行了系统的研究,结果表明,大天鹅粪便微生物中优势菌群为厚壁菌门(41.1%)、变形菌门(22.9%)、蓝细菌门(11.5%)、拟杆菌门(8.7%);对其代谢通路进一步研究发现这些优势菌群具有降解纤维素类多糖物质、碳水化合物及蛋白质的功能,能适应其多样性的饮食结构。辛瑞瑞^[13]发现在酸性矿山废水中,嗜酸菌中有关硫代谢的基因相对较多,硫代硫酸盐硫转移酶在营养或能量限制条件下的生存竞争中发挥着重要作用。张起畅等^[14]采用宏基因组技术对东寨港红树林生态系统微生物在氮、磷、硫等代谢循环中的功能特点进行研究,结果显示红树林生态系统具有极高微生物多样性,淤泥生境的微生物多样性低于水体;亚硝酸盐的微生物代谢循环主要发生在水体生境中,微生物对磷的富集作用和硫化化合物的氧化还原代谢主要发生在淤泥生境中。众多研究表明宏基因组学能够深入的探究细菌的群落结构及基因功能。

针对丹江口水库浮游细菌的研究之前更多关注群落组成和影响因素,对于功能预测方面本课题组已成功采用基于扩增子测序的PICRUSt技术分析丹江口库区表层沉积物^[15]、库滨带^[16]细菌功能以及丹江口库区表层水体^[17,18]浮游细菌功能。目前,宏基因组学技术分析丹江口库区浮游细菌功能尚未报道,本研究以功能基因筛选及测序分析为手段,进一步掌握物种组成、物种丰度、功能注释、基因预测、代谢通路,为探明库区浮游细菌群落组成和功能提供有效帮助。

1.5 浮游细菌和水质的相关性研究

浮游细菌细胞结构简单,繁殖速度极快,对外界环境刺激特别敏感,有较强的感应能力,是水生生态系统中重要的指示生物^[2]。通过研究浮游细菌在水生生态系统中的群落组成和功能特性,可有效地保护水体的生态学功能^[2,15]。通过对水体中的各种影响因素的综合分析,可以为制定各种水生生态系统中的浮游细菌评估指标提供非常有效的参考。

为了解鄱阳湖中微生物群落组成情况,郭秋平^[19]对河湖交错带进行分析,结果表明变形菌门(41.2%)和拟杆菌门(20.7%)为优势物种。冗余分析表明 TP 与拟杆菌门、变形菌门、放线菌门呈显著相关。Aguirre-Garrido 等^[20]通过 PCR-DEGG 技术、高通量测序技术、平板分离培养等方法对墨西哥 Crater 湖的细菌群落进行研究,结果显示该湖泊中嗜盐及耐盐的微生物占主导地位,沉积物中的微生物多样性明显高于水体中。张建等^[21]对鄱阳湖交错带重金属对微生物群落结构影响的研究显示该区域细菌

主要有变形菌门（58.31%）、放线菌门（13.63%）、拟杆菌门（9.69%）和疣微菌门（1.33%）组成，微生物群落的多样性会受到环境因子的共同作用而呈现出不同的变化趋势。大量研究表明，浮游细菌群落结构与其营养状态之间存在明显的相关性^[22]。其在水体中的理化性质、富营养化程度、营养结构的复杂性、不同生物之间的相互作用等都会对其群落结构产生较大的影响^[2, 23, 24]。

1.6 技术路线

针对丹江口水库不同深度水体中浮游细菌群落组成及功能的研究亟待开展的现状，本研究选取了丹江口水库 5 个典型生态点位，采用宏基因组学技术对不同季节的表层、中层和底层水体中浮游细菌进行分析，以获得群落组成结构、功能基因信息和基因功能，为理解其地球化学循环机制奠定基础。以期探明丹江口水库不同深度水体中浮游细菌群落之间及其与理化因子间的相互作用，全面深入的对比丹江口水库不同深度的浮游细菌群落组成及其基因功能进行研究。具体技术路线如下图所示：

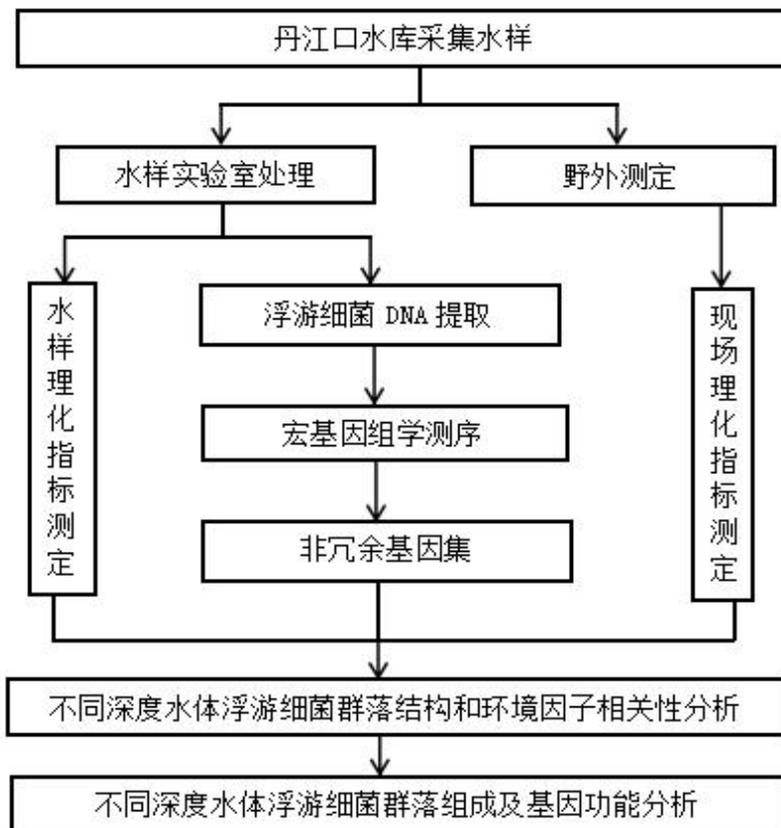


图 1-1 技术路线

Fig.1-1 Structure of the thesis

1.7 本课题的研究来源与主要内容

自 2014 年 12 月南水北调中线工程通水以来,丹江口水库及中线干渠水源均保持在 II 类及以上水平,我国华北地区缺水问题得到很好的解决。中线工程通水近十年,华北地区实现水资源自给,为中原城市带、京津冀协同发展等重要战略的落实提供强大的支撑。中线工程丹江口水库的水质安全直接关系到受水区民众的生命健康,必须继续加大对其进行监测,以确保其水质的安全^[2, 25]。

近年来,各国学者对水质的监测日益重视^[26]。目前,采用高通量测序技术对 16 S rDNA 片段进行测序分析,得到了水体中的浮游细菌群落组成、它们之间的演化关系以及与环境因子的相关性分析等信息^[25,27-30]。陈兆进等^[31]对丹江口水库枯水期的 5 个典型生态点位浮游细菌组成及其影响因素进行研究,但研究的广度及范围仍有一定的局限性。因此,由南阳师范学院南水北调中线水源区协同创新中心和南阳市生态环境监测中心联合选题,在南水北调水源区水安全保障技术与河南省高等学校学科创新引智基地省级平台项目支持下开展相关研究。本实验的研究内容主要包括:对丹江口水库不同季节的表层、中层和底层水体中浮游细菌群落进行分析,以获得群落组成结构、功能基因信息和基因功能,为理解其地球化学循环机制奠定基础。以期探明丹江口水库浮游细菌群落之间及其与理化因子的相互作用,进一步探明丹江口水库不同深度的浮游细菌群落组成及其基因功能,为水源区生态系统的安全提供有力保障。

第二章 丹江口水库水体理化性质分析及评价

浮游细菌结构简单，对外界刺激特别敏感，研究表明水体中浮游细菌易受到生物和非生物因素的影响，比如时空的分布^[32]、pH^[33]、WT^[34]、氮磷等营养元素^[34, 35]以及水体富营养状态^[36, 37]等。因此，水体中浮游细菌群落组成以及多样性的改变可以反映出水体中理化因子的改变。丹江口水库作为南水北调中线工程重要水源地，其水质安全备受社会各界关注，同时水质变化对丹江口水库不同分层水体中浮游细菌群落组成也具有重要影响，因此对丹江口水库水体水质进行监测与评价显得尤为重要。本实验于 2021 年 10 月、2022 年 3 月和 2022 年 7 月采集丹江口水库 5 个典型生态点位表、中、底层的水体样本，进行理化指标的检测评价。

2.1 材料与方法

2.1.1 采样点概况

本实验根据丹江口水库所处的地理位置，共选取位于河南省南阳市淅川县丹库的五个生态点位，分别为丹库库区的库心（K）、南水北调中线工程的取水口上游 100m 处的渠首（Q）、丹江支流和灌河支流在丹库交汇处的黑鸡嘴（H）、轮渡及渔船停靠的码头宋岗（S）及丹江口水库丹库和汉库的交界处台子山（T），具体地理位置分布和人为干扰情况如图 2-1 和表 2-1 所示。根据生态点位的实际水深，将不同采样点划分为表层、中层、底层三层。根据库区的自然地理及降水特征，分别于 2021 年 10 月、2022 年 3 月、2022 年 7 月对丹江口水库 5 个生态点位进行三次样品采集。总采集 45 个样本进行宏基因组学分析。

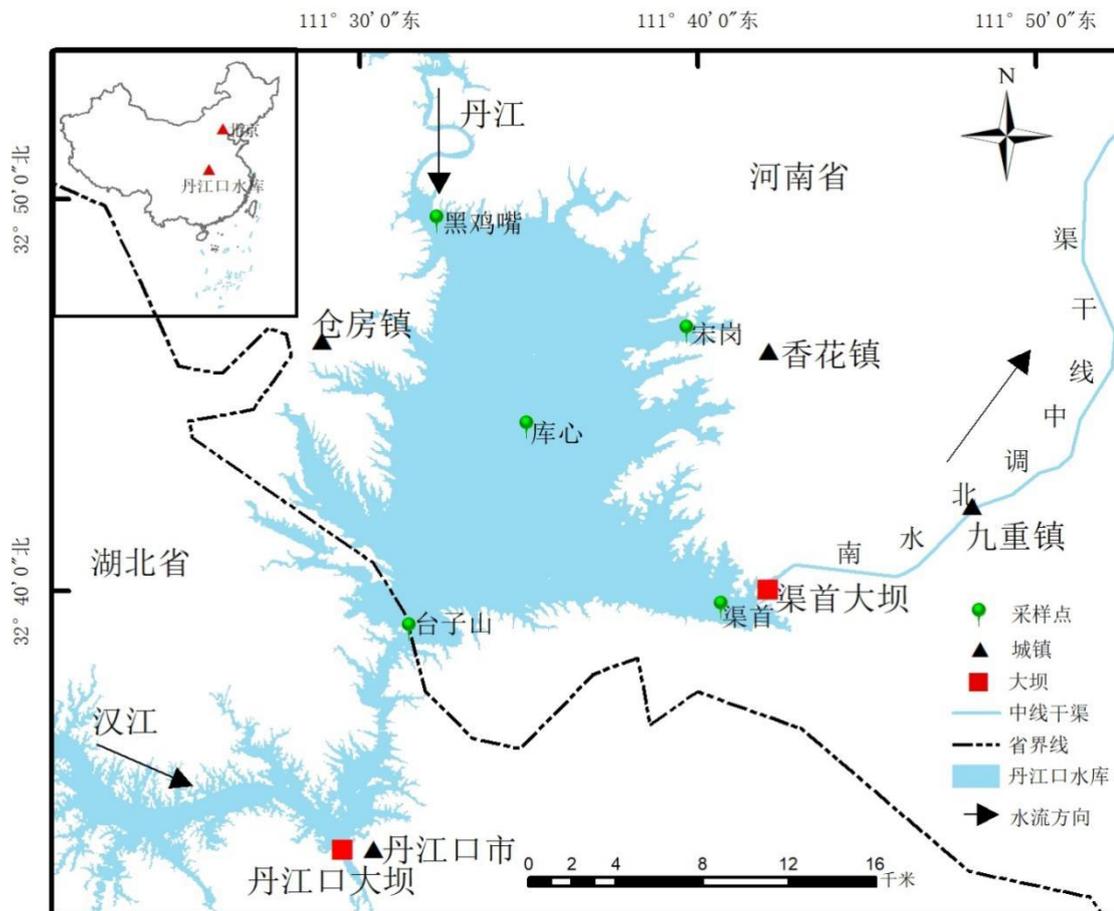


图 2-1 各样品采集点的分布
Fig.2-1 Distribution of each sample collection point

表 2-1 采集点分布和人为干扰情况

Table 2-1 Location of the sample sites and human interference of Danjiangkou reservoir

样品	样品编号	人为干扰情况
库心	K	无
渠首	Q	重度人为干扰，陶岔渠首大坝取水口上游 100m
宋岗	S	重度人为干扰，有居民点、轮渡码头
黑鸡嘴	H	中度人为干扰，有居民点，上游支流汇入
台子山	T	轻度人为干扰，为丹江库区与汉江库区分界线

2.1.2 样品采集和理化性质的测定

对丹库五个生态点位用柱状采水器进行水体样品采集，依据采样点实际水深，将不同取样点样品划分为表层、中层、底层三层。其中，将采集水深 0.5m 处样品定为表层水；采集水体-底泥交界处以上约 2m 处样品定为底层水；中层水则根据取样点实际水深，具体取样深度约为取样点水深的二分之一。不同分层水体样本理化性质中的酸碱度 (pH)、水温 (WT)、电导率 (Cond)、氧化还原电位 (ORP)、总溶解性固体物质 (TDS)、溶解氧 (DO) 通过多参数水质测定仪 (YSI Inc, Yellow Springs, OH, USA) 现场测定，透明度 (SD) 使用塞氏盘法现场测定。各不同分层水体样本采集 10L 立即装入提前消毒的灭菌容器内，低温避光带回实验室，参考《水和废水监测分析方法》(第四版)^[38]进行测定总有机碳 (TOC)、总氮 (TN)、高锰酸盐指数 (COD_{Mn})、铵氮 (NH₄⁺-N)、总磷 (TP)、硝氮 (NO₃⁻-N) 和叶绿素 a (Chla) 等理化指标。

2.2 结果与分析

2021 年 10 月、2022 年 3 月及 2022 年 7 月三次采集的 5 个生态点位不同分层水体样品理化指标参数如下：

2021 年 10 月 WT 的变化范围是 20.80~23.70℃，黑鸡嘴底层水样水温最低，库心表层水样的水温最高；2022 年 3 月 WT 的变化范围是 10.50~19.53℃，黑鸡嘴底层水样水温最低，黑鸡嘴表层水样的水温最高；2022 年 7 月 WT 的变化范围是 11.90~31.30℃，库心底层水样水温最低，宋岗表层水样的水温最高。比较结果表明丹江口水库 WT 随季节变化明显，春季的水温比秋季低。2022 年 3 月渠首 (Q)、宋岗 (S)、台子山 (T)、库心 (K)、黑鸡嘴 (H) 五个生态点位均表现出“正分层”现象。2022 年 7 月，表底温差最大值达到 18.8℃，表层水温均接近全年最高值，其中宋岗 (S) 表层水体温度为 31.3℃。

2021 年 10 月 DO 的变化范围是 0.82~7.88 mg/L，对于五个生态点位的不同分层水体，除台子山 (T) 底层水体 DO 值最高，其余生态点位均是表层水体 DO 值最高；2022 年 3 月 DO 的变化范围是 8.88~12.35 mg/L，对于五个生态点位的不同分层水体，均表现为表层水体 DO 值最高，中层次之、底层最低的趋势，且比上次采样溶解氧明显升高；2022 年 7 月 DO 的变化范围是 3.29~9.31 mg/L，除台子山 (T) 底层水体 DO 值最高，其余生态点位均是表层水体 DO 值最高，且比上次采样溶解氧明显下降；综

合三次采样发现溶解氧最高的时间出现在 2022 年 3 月。

2021 年 10 月 SD 的变化范围是 3.2~5.6m, 2022 年 3 月 SD 的变化范围是 3.2~5.2m, 2022 年 7 月 SD 的变化范围是 2.8~4.5m。2022 年 7 月 SD 值明显低于其他季节。丹江口水库不同季节水体 pH 基本偏碱性。

2021 年 10 月 Cond 的变化范围是 286.00~1269.00 S/m, 2022 年 3 月 Cond 的变化范围是 228.33~272.00 S/m, 2022 年 7 月 Cond 的变化范围是 188.00~342.00S/m。2021 年 10 月电导率值明显高于其他季节。

2021 年 10 月 ORP 的变化范围是-148.33~85.87mv, 2022 年 3 月 ORP 的变化范围是 160.73~281.03mv, 2022 年 7 月 ORP 的变化范围是 21.63~142.20mv。ORP 数值为正值显示水体具有一定的氧化性, ORP 数值为负值显示水体具有一定的还原性。2021 年 10 月宋岗 (S) 底层、库心 (K) 中层和底层、黑鸡嘴 (H) 中层的水体具有一定的还原性, 其余点位水体水体均具有一定的氧化性。2022 年 3 月 ORP 值明显高于其他季节。

2021 年 10 月 TP 的变化范围是 0.006~0.022 mg/L, 2022 年 3 月 TP 的变化范围是 0.005~0.066mg/L, 2022 年 7 月 TP 的变化范围是 0.012~0.023mg/L。

2021 年 10 月 COD_{Mn} 的变化范围是 2.27~6.65mg/L, 2022 年 3 月 COD_{Mn} 的变化范围是 2.23~4.37mg/L, 2022 年 7 月 COD_{Mn} 的变化范围是 0.53~5.41mg/L。

2021 年 10 月 TN 的变化范围是 0.67~2.16 mg/L, NH₄⁺-N 的变化范围是 0.07~0.15 mg/L, NO₃⁻-N 的变化范围是 0.33~1.56 mg/L; 2022 年 3 月 TN 的变化范围是 0.81~2.88 mg/L, NH₄⁺-N 的变化范围是 0.01~1.46 mg/L, NO₃⁻-N 的变化范围是 0.65~1.64 mg/L; 2022 年 7 月 TN 的变化范围是 1.09~1.87mg/L, NH₄⁺-N 的变化范围是 0.07~0.23 mg/L, NO₃⁻-N 的变化范围是 0.71~1.55 mg/L。结果表明丹江口水库的氮营养源含量偏高, 存在一定的生态风险。

2021 年 10 月 TOC 的变化范围是 0.73~6.79 mg/L, 2022 年 3 月 TOC 的变化范围是 0.17~0.81 mg/L, 2022 年 7 月 TOC 的变化范围是 0.33~1.01 mg/L, 2021 年 10 月, 除台子山 (T) 底层水体中 TOC 值为 6.79 mg/L, 其余点位不同分层水体 TOC 值略高于其他季节。

2021 年 10 月 TDS 的变化范围是 185.67~245.33 mg/L, 2022 年 3 月 TDS 的变化范围是 151.33~176.67 mg/L, 2022 年 7 月 TDS 的变化范围是 152.00~222.33 mg/L。2022

年 3 月 TDS 值略低于其他季节。

2021 年 10 月 Chla 的变化范围是 1.19~3.84 mg/m³, 2022 年 3 月 Chla 的变化范围是 0.45~8.58 mg/m³, 2022 年 7 月 Chla 的变化范围是 0.18~6.53 mg/m³。

三次采样理化结果表明丹江口水库 WT 和 DO 随季节及水体的不同分层变化明显; ORP 与 Cond 受到季节和采样点位置的影响, 春季的 ORP 值大于其他季节、秋季的 Cond 值大于其他季节; 水体 pH 整体稳定, 保持偏碱性水质; TP 的含量较低; 总氮及氮营养盐的含量偏高, 具有一定生态风险。

表 2-2 现场测定理化指标
Table 2-2 Physical and chemical indexes were measured on site

样本	SD (m)	WT (℃)	ORP (mv)	pH	DO (mg/L)	Cond (S/m)	TDS (mg/L)	
2021年10月	Q-B	5.6	23.27	76.90	7.92	7.43	319.33	206.00
	Q-Z	5.6	22.40	77.77	7.88	7.32	323.33	209.67
	Q-D	5.6	22.20	85.87	7.83	6.52	327.67	212.67
	S-B	4.7	23.50	14.77	7.92	7.56	337.33	210.33
	S-Z	4.7	22.40	6.80	7.73	7.02	328.67	213.00
	S-D	4.7	22.10	-131.67	7.38	2.42	350.00	227.33
	T-B	3.7	23.00	74.30	7.94	7.76	931.00	200.00
	T-Z	3.7	22.60	77.50	7.86	7.47	958.00	204.67
	T-D	3.7	22.93	84.47	7.81	7.88	855.00	185.67
	K-B	5.2	23.70	10.30	7.96	7.61	351.67	245.33
	K-Z	5.2	22.60	-18.33	7.75	6.97	286.00	215.67
	K-D	5.2	21.70	-148.33	7.41	0.82	328.00	214.00
	H-B	3.2	23.10	15.70	7.92	7.48	881.00	195.33
	H-Z	3.2	22.07	-13.27	7.63	5.36	1269.00	209.67
	H-D	3.2	20.80	8.23	7.77	2.78	1070.00	228.33
2022年3月	Q-B	4.3	14.90	231.97	8.66	12.35	260.00	169.00
	Q-Z	4.3	11.43	271.30	8.64	10.68	264.67	171.33
	Q-D	4.3	10.63	281.03	8.46	8.92	272.00	176.00
	S-B	3.2	17.00	246.00	8.10	11.67	260.33	169.00
	S-Z	3.2	11.00	251.60	8.02	10.50	267.33	174.00
	S-D	3.2	10.67	255.30	7.97	9.22	272.00	176.67
	T-B	5.2	17.40	211.87	8.77	11.73	251.33	163.00
	T-Z	5.2	11.43	245.50	8.62	10.05	264.67	170.67
	T-D	5.2	10.70	254.20	8.47	9.56	270.33	176.00
	K-B	4.0	18.23	238.20	8.70	11.59	265.00	171.33
	K-Z	4.0	11.63	247.27	8.41	9.57	270.67	175.00
	K-D	4.0	10.70	263.07	8.15	8.88	270.67	176.00
	H-B	3.3	18.30	235.83	8.31	11.96	260.67	169.33
	H-Z	3.3	11.10	238.77	7.62	10.62	268.67	173.67
	H-D	3.3	10.50	241.03	7.74	9.07	270.00	174.67
2022年7月	Q-B	3.5	29.70	139.20	8.33	8.97	275.67	179.33
	Q-Z	3.5	20.23	118.83	7.87	8.39	298.33	192.67
	Q-D	3.5	17.90	125.87	8.29	6.18	295.67	193.33
	S-B	3.0	31.30	92.80	9.04	8.95	279.00	180.00
	S-Z	3.0	20.13	108.20	8.41	7.43	188.00	152.00
	S-D	3.0	24.10	133.57	8.78	6.71	282.33	183.00
	T-B	4.0	29.90	96.90	8.80	7.65	302.00	192.33
	T-Z	4.0	16.27	142.20	8.21	6.02	306.67	199.00
	T-D	4.0	20.33	94.57	8.71	8.17	291.33	189.00
	K-B	4.5	30.73	93.93	8.88	7.71	310.22	197.67
	K-Z	4.5	12.40	102.83	8.57	6.98	320.67	208.00
	K-D	4.5	11.90	92.73	8.79	6.18	299.00	192.67
	H-B	2.8	30.70	71.00	9.03	9.13	295.00	186.67
	H-Z	2.8	15.07	47.90	8.32	3.29	342.00	222.33
	H-D	2.8	12.37	21.63	8.68	5.91	307.00	199.00

表 2-3 室内测定理化指标
Table 2-3 Physical and chemical indexes were measured in laboratory

样本	COD _{mn} (mg/L)	TP (mg/L)	TN (mg/L)	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	TOC (mg/L)	Chla (mg/m ³)	
2021年10月	Q-B	2.86	0.014	1.22	0.08	0.78	0.88	3.64
	Q-Z	2.78	0.014	1.02	0.10	0.70	1.10	2.38
	Q-D	2.69	0.006	2.16	0.07	1.10	0.95	1.19
	S-B	2.53	0.013	1.83	0.09	1.33	0.86	1.20
	S-Z	2.53	0.012	2.04	0.07	1.56	1.04	1.54
	S-D	2.53	0.017	2.04	0.11	1.24	1.02	1.96
	T-B	2.27	0.016	1.95	0.07	1.14	0.73	2.52
	T-Z	2.69	0.007	1.89	0.08	1.48	1.07	2.02
	T-D	2.36	0.013	1.50	0.15	1.11	6.79	2.92
	K-B	2.86	0.010	0.76	0.10	0.51	0.89	3.09
	K-Z	3.54	0.018	2.12	0.15	0.56	1.16	3.84
	K-D	2.69	0.018	1.89	0.09	1.37	1.02	1.63
	H-B	2.53	0.010	0.67	0.14	0.58	0.90	2.98
	H-Z	2.36	0.014	0.77	0.09	0.33	0.94	1.56
	H-D	6.65	0.022	2.11	0.12	1.51	1.05	2.30
2022年3月	Q-B	3.05	0.028	2.20	0.06	1.31	0.18	5.86
	Q-Z	3.38	0.042	1.10	0.05	0.83	0.25	3.71
	Q-D	2.89	0.019	0.81	0.11	0.65	0.18	2.98
	S-B	3.05	0.005	2.65	1.46	1.46	0.20	4.04
	S-Z	2.56	0.047	2.22	0.16	1.41	0.19	2.17
	S-D	2.56	0.033	2.82	0.08	1.64	0.18	1.83
	T-B	4.37	0.057	2.03	0.07	1.17	0.23	8.58
	T-Z	2.72	0.019	2.88	0.13	1.41	0.19	1.73
	T-D	2.23	0.028	1.62	0.12	0.96	0.17	0.45
	K-B	2.72	0.047	1.61	0.19	1.08	0.18	2.82
	K-Z	2.47	0.057	0.89	0.01	0.79	0.18	1.14
	K-D	2.39	0.061	2.70	0.12	1.49	0.19	0.89
	H-B	2.89	0.014	1.82	0.27	1.11	0.23	7.60
	H-Z	2.64	0.019	2.35	0.11	1.38	0.17	2.39
	H-D	3.71	0.009	2.54	0.07	1.47	0.20	1.03
2022年7月	Q-B	0.99	0.016	1.25	0.11	1.19	0.41	2.90
	Q-Z	1.22	0.019	1.40	0.22	1.25	0.40	3.23
	Q-D	1.83	0.023	1.65	0.23	1.52	0.33	3.08
	S-B	1.45	0.020	1.19	0.12	1.10	0.48	1.61
	S-Z	1.30	0.021	1.41	0.17	1.23	0.34	0.79
	S-D	1.30	0.020	1.55	0.13	1.39	0.43	0.67
	T-B	1.37	0.015	1.28	0.11	0.79	0.42	2.05
	T-Z	1.14	0.012	1.77	0.18	0.87	0.38	1.82
	T-D	1.37	0.017	1.76	0.10	1.43	0.40	1.97
	K-B	1.30	0.020	1.40	0.07	1.10	0.57	3.19
	K-Z	0.53	0.015	1.66	0.17	1.46	0.51	3.15
	K-D	1.14	0.020	1.64	0.18	1.55	0.44	3.33
	H-B	1.98	0.017	1.09	0.19	1.00	0.49	6.53
	H-Z	5.41	0.013	1.11	0.10	0.89	0.53	0.18
	H-D	1.90	0.021	1.60	0.20	1.44	0.51	1.34

2.3 讨论

实验结果分析可知,丹江口水库 WT 随季节变化明显,春季比秋季水温低,与之前的研究基本一致^[2,18]。2021 年 8 月以来,汉江流域遭遇秋季大洪水,降水导致丹江口水库蓄水水位达到 170m。2021 年 10 月水体竖向对流与垂直环流剧烈,各生态位点不同分层水体水温差异较小,垂向温差最大仅为 2.3℃。每年 12 月至次年 4 月为丹江口水库的枯水期,降水量明显减少。2022 年 3 月太阳辐射逐渐增强,库区表层水体吸收大部分热量但底层水体升温较慢,不同生态位点水体中形成明显的“正分层”现象。2022 年 7 月,表底层水体温差最大值达到 18.8℃,表层水体接近全年最高,宋岗(S)表层水温最高为 31.3℃。2022 年 3 月及 7 月水体均表现出明显的热分层现象。DO 作为湖库水体重要理化指标,是维系良好水质的最关键条件之一,分析溶解氧的层化机理可有效反映出水生态的状况^[39]。有研究表明,水体中的溶解氧垂向分布主要受浮游植物、水体分层、水温层化以及季节影响,垂向分层不稳定^[40]。综合三次采样 DO 值均呈现出表层水体最高,除 2021 年 10 月黑鸡嘴(H)、22 年 7 月台子山(T)和黑鸡嘴(H),其余生态位点 DO 值均呈现出随着水深的增加逐渐降低的趋势。ORP 与 Cond 受到季节与采样点位的影响,2022 年 3 月春季的 ORP 值明显高于其他季节、2021 年 10 月秋季的 Cond 值明显高于其他季节。在 2022 年 3 月 ORP 值和 Cond 值呈现出随着水深的增加逐渐增加的趋势。COD_{Mn} 的变化范围为 0.53~6.65mg/L,最高值出现在 2021 年 10 月黑鸡嘴(H)底层水体,最低值出现在 2022 年 7 月库心(K)中层水体。DO 与 COD_{Mn} 具有较强的相关性,是衡量水质的关键指标。它们代表着五个生态位点不同分层水体受到有机物污染的程度^[28],对水体中浮游细菌群落结构有着重要的影响^[41-42]。水体 pH 整体稳定,保持偏碱性水质。TP 含量较低,总氮及氮营养盐的含量偏高。虽然 TN 在国家地表水断面考核中不参评,但其含量超标对于水体环境仍然存在生态危害^[43]。研究表明丹江口库区存在农业面源及城镇生活污水的污染^[44],分析发现总氮含量超标为宋岗(S)、台子山(T)及黑鸡嘴(H)等人为干扰较多的生态点位。结果表明,丹江口水库整体水质较好,不同季节不同生态位点水质变化较大。具体表现为 2021 年 10 月水质较好的采样点为库心(K),2022 年 3 月和 2022 年 7 月水质较好的采样点均为库心(K)与渠首(Q)。

第三章 丹江口水库分层型水体浮游细菌群落组成季节变化及关联分析

丹江口水库作为人工加高的深水型水库，其垂直方向上温度、光照、溶解氧、氮磷营养盐含量以及其流速、流量等具有显著差异，对浮游细菌群落组成可能产生显著影响。目前已开展表层浮游细菌群落组成的相关研究^[17,45-46]，但垂向环境因子变化对细菌群落结构的影响过程尚不明确。本章对不同季节不同分层型水体样本浮游细菌群落组成结构及其与水质理化指标的相互作用开展研究，进一步探明不同深度水体浮游细菌群落的时空变化规律。

3.1 材料与方法

3.1.1 丹江口水库样品采集及理化指标检测

丹江口水库不同分层型水体样品采集及理化指标检测参照第二章 2.1.1 和 2.1.2。

3.1.2 浮游细菌总 DNA 提取

取 1.5 L 表层、中层和底层水样经 0.22 μm 无菌醋酸纤维素滤膜（Solarbio Life Sciences, China）过滤，放置于无菌离心管中，根据 Omega Water DNA Kit（Omega, USA）操作指导手册，从水体中提取出总 DNA。将提取得到的浮游细菌总 DNA 通过微量紫外线光谱仪（Nano Drop ND-1000, Wilmington, DE, USA）测定 DNA 浓度和纯度。

3.1.3 宏基因组测序分析

采用 HiSeq2000 测序平台对水样进行宏基因组学测序。将测序平台上得到的原始序列用 Fastp (v0.20.0) (<https://github.com/OpenGene/fastp>) 软件对其进行质控，剪切掉数据中的低质量 reads，获得高质量序列结果。采用 MEGAHIT v1.1.2 软件进行序列组装。使用 Prodigal v2.6.3 (<https://github.com/hyattpd/Prodigal>) 对拼接结果中的 contig 进行 ORF 预测。选择核酸长度大于等于 100bp 的基因，并将其翻译为氨基酸序列。用 CD-HIT 软件 (<http://www.bioinformatics.org/cd-hit/>) 进行聚类（默认参数为：90% identity、90% coverage），每个类取最长的基因作为代表序列，构建非冗余基因集。针对 SOAPaligner 比对后的信息，统计基因在各个样本中的丰度信息。使用 BLASTP (BLAST Version 2.2.28+, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将非冗余基因集与 NR 数据库进行比对（BLAST 比对参数设置期望值 e-value 为 $1e-5$ ），并通过 NR 数据库对应的分类学信息得到物种注释结果，然后使用物种对应的基因丰度总和计算该物种的丰度。

3.2 结果与分析

3.2.1 浮游细菌群落组成分析

2021年10月结果显示,丹江口水库不同分层样品浮游细菌在门水平上丰度占比比较高的种群为变形菌门(Proteobacteria, 占比32.57%~60.05%,下同)、放线菌门(Actinobacteria, 12.05%~26.87%)、浮霉菌门(Planctomycetes, 2.30%~10.84%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 3.35%~9.96%)、疣微菌门(Verrucomicrobia, 1.87%~8.29%)、醋杆菌门(Acidobacteria, 1.54%~9.34%)、绿弯菌门(Chloroflexi, 1.03%~9.51%)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus, 0.03%~18.15%)、蓝细菌门(Cyanobacteria, 0.51%~4.43%)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae, 0.15%~2.23%)。变形菌门和放线菌门为该季节的优势种群,不同种群在不同分层水体中丰度占比并不相同。变形菌门在中层水体中丰度占比最低,异常球菌-栖热菌门在表层水体中丰度占比最高,浮霉菌门和疣微菌门在表层水体中丰度占比最低、底层次之、中层最高,拟杆菌门在中层水体占比最高、底层最低,蓝细菌门在底层水体中丰度占比最低,醋杆菌门、硝化螺旋菌门和绿弯菌门丰度占比呈现出随着水深的增加而增加的趋势。

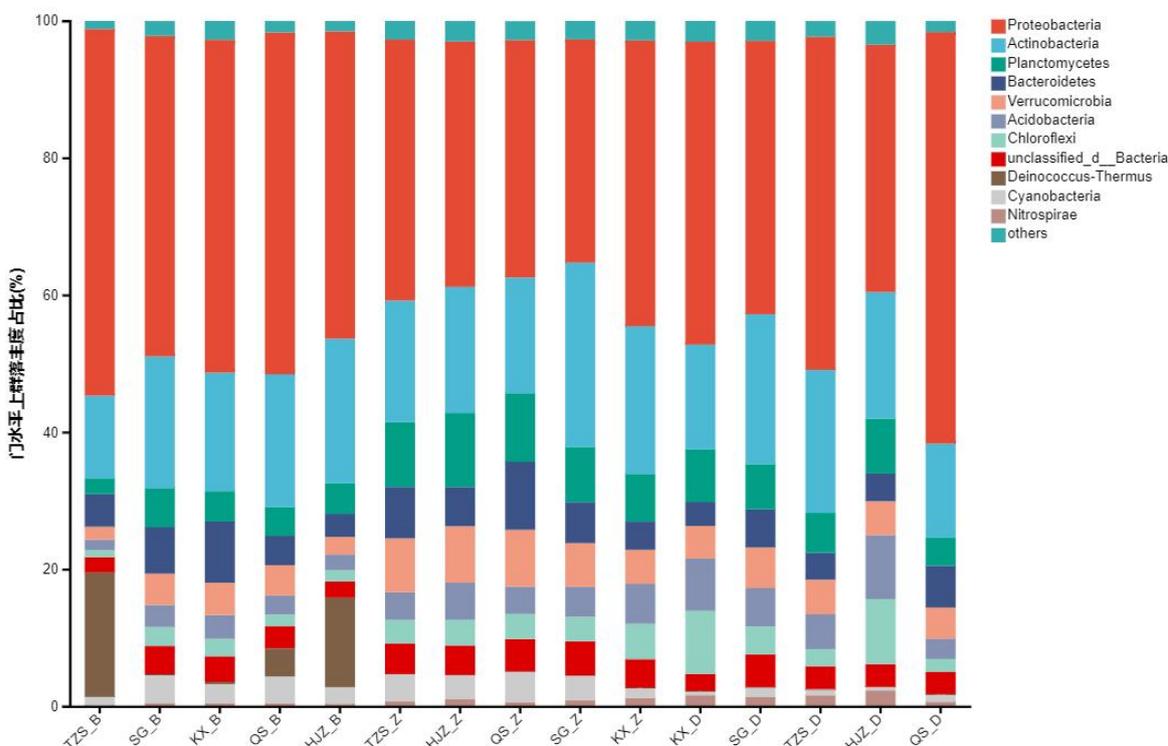


图 3-1 2021 年 10 月丹江口水库门水平上不同分层水体浮游细菌群落组成

Fig3-1 Composition of plankton bacterial communities in different layers of water at the Phylum level of Danjiangkou reservoir in October 2021

2022年3月结果显示,丹江口水库不同分层样品浮游细菌在门水平上丰度占比较高的种群为变形菌门(占比29.01%~36.18%,下同)、放线菌门(20.60%~32.18%)、拟杆菌门(5.89%~29.21%)、疣微菌门(1.95%~10.20%)、绿弯菌门(0.99%~10.26%)、浮霉菌门(0.60%~9.67%)、醋杆菌门(1.21%~4.06%)、蓝细菌门(0.49%~1.47%)、硝化螺旋菌门(0.04%~1.17%)。变形菌门和放线菌门是该季节的优势种群,在不同分层水体中物种丰度分布相对均匀。拟杆菌门在不同分层水体中丰度占比明显提高,表层水体中丰度占比最高、底层最低,疣微菌门在表层水体中丰度占比最低、中层最高,绿弯菌门、硝化螺旋菌门、醋杆菌门和浮霉菌门丰度占比呈现出随着水深的增加而增加的趋势。

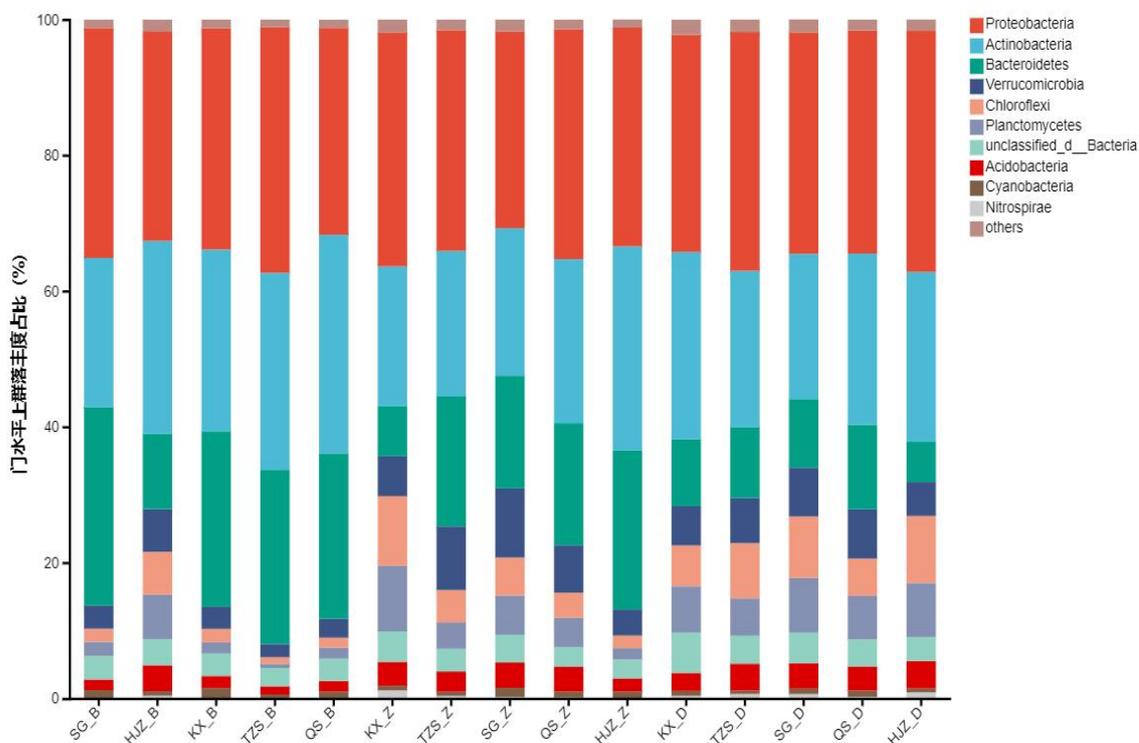


图 3-2 2022年3月丹江口水库门水平上不同分层水体浮游细菌群落组成

Fig3-2 Composition of plankton bacterial communities in different layers of water at the Phylum level of Danjiangkou reservoir in March 2022

2022年7月结果显示,丹江口水库不同分层样品浮游细菌在门水平上丰度占比较高的种群为变形菌门(占比22.45%~37.86%,下同)、放线菌门(19.92%~34.76%)、拟杆菌门(6.79%~13.04%)、浮霉菌门(5.26%~10.59%)、疣微菌门(4.51%~11.37%)、绿弯菌门(0.97%~11.79%)、蓝细菌门(0.90%~9.05%)、醋杆菌门(2.90%~4.22%)、硝化螺旋菌门(0.02%~2.96%)。变形菌门和放线菌门为该季节的优势种群,不同种群在不同分层水体中占比并不相同。拟杆菌门在表层水体中丰度占比最低,疣微菌门在中层水体中丰度占比最低,浮霉菌门、硝化螺旋菌门和绿弯菌门丰度占比呈现随着水深的增加而增加的趋势,蓝细菌门丰度占比呈现出随着水深的增加而降低的趋势。

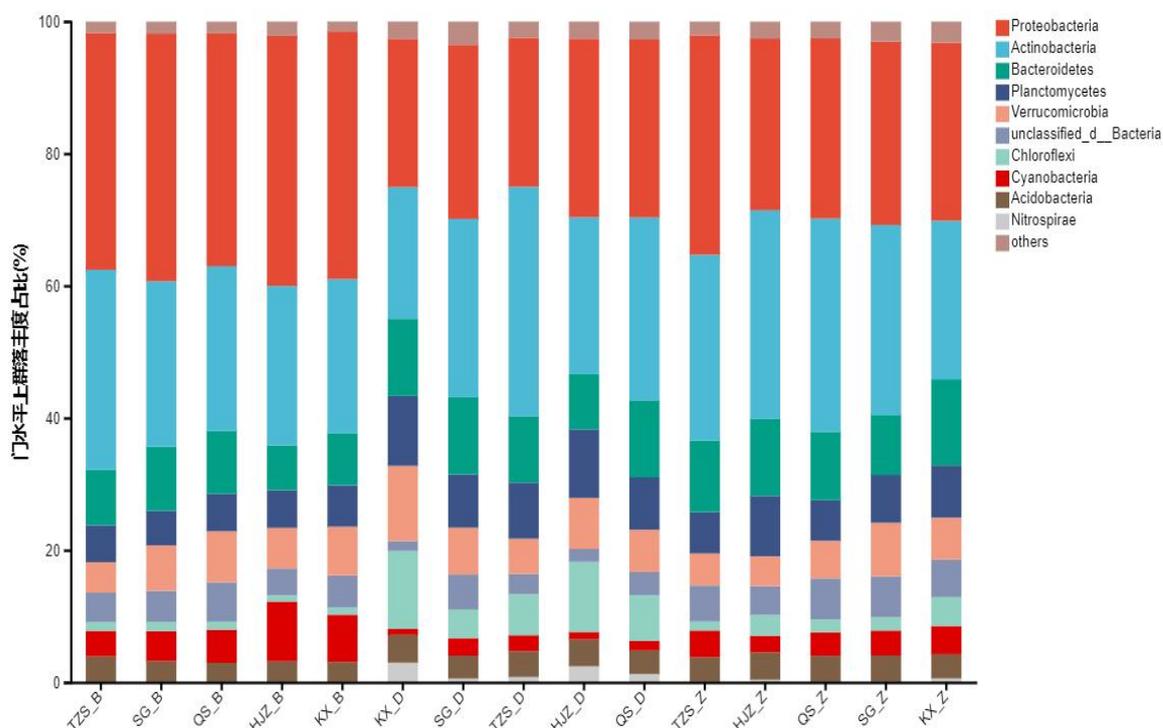


图 3-3 2022 年 7 月丹江口水库门水平上不同分层水体浮游细菌群落组成

Fig3-3 Composition of plankton bacterial communities in different layers of water at the Phylum level of Danjiangkou reservoir in July 2022

3.2.2 不同分层型水体浮游细菌物种组成比较分析

主坐标分析（principal co-ordinates analysis, PCoA）是一种用于直观展示水体样本相似性或差异性的可视化分析方法。相似性分析(Analysis of similarities, ANOSIM)是一种用来检验组间差异是否显著大于组内差异的非参数检验方法。为探究不同季节丹江口水库的表层、中层、底层水体中的浮游细菌群落组成，本研究采用主坐标分析（PcoA）和相似性分析（ANOSIM）来判别不同分层水体之间的差异大小，进而判断出对不同分层水体样本的研究分析具有意义。

2021年10月结果如图可以看出，PC1贡献率为58.68%，PC2贡献率为14.65%，表层水体样本主要聚集于图右上侧，中层水体样本主要聚集于图左侧，底层水体样本主要聚集于左下侧。沿PC1轴方向不同水层水体区分不明显，沿PC2轴方向不同水层水体组成有所差异。ANOSIM分析结果表明组间差异大于组内差异且可信度高，结果显示表层与中层和底层，中层和底层的差异P值为0.004、0.039、0.022，进而判断不同分层水体样本差异达到显著水平。

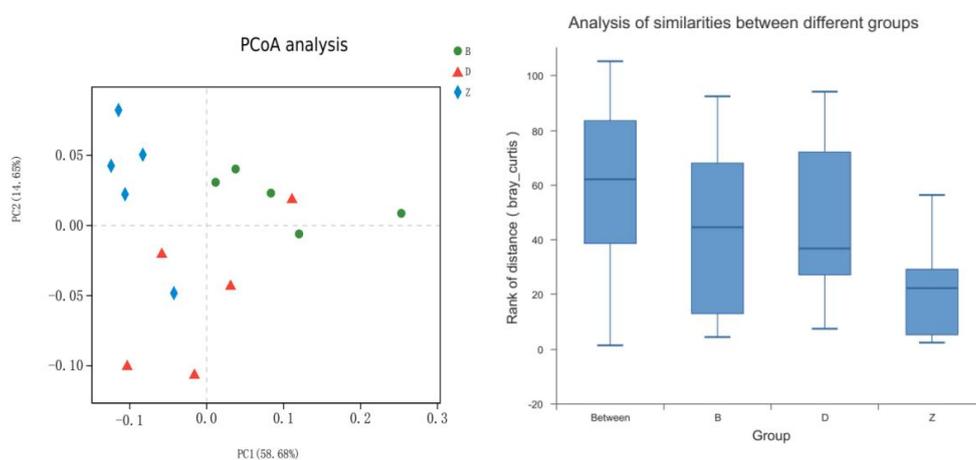


图 3-4 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体主坐标分析和相似性分析

Fig3-4 Principal co-ordinates analysis and similarity analysis of different stratified water bodies in Danjiangkou Reservoir in October 2021

2022年3月结果如图可以看出，PC1贡献率为63.57%，PC2贡献率为14.97%，表层水体样本主要聚集于图右侧，中层水体样本主要聚集于图下侧，底层水体样本主要聚集于左上侧。沿PC2轴方向不同水层水体区分不明显，沿PC1轴方向不同水层水体组成有所差异。ANOSIM分析结果表明组间差异大于组内差异且可信度高，结果显示表层与中层和底层，中层和底层的差异P值为0.004、0.016、0.011，进而判断

不同分层水体样本差异达到显著水平。

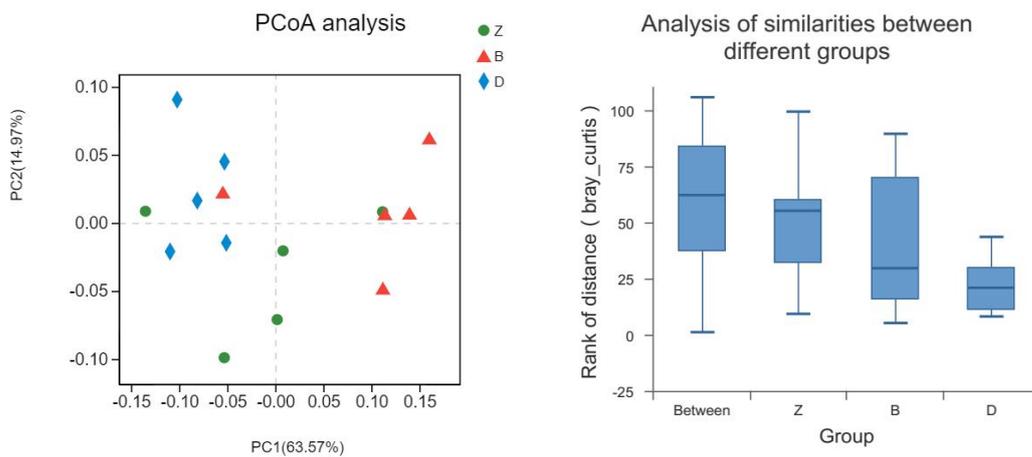


图 3-5 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体主坐标分析和相似性分析

Fig3-5 Principal co-ordinates analysis and similarity analysis of different stratified water bodies in Danjiangkou Reservoir in March 2022

2022 年 7 月结果如图可以看出，PC1 贡献率为 58.82%，PC2 贡献率为 19.78%，表层水体样本主要聚集于图右上侧，中层水体样本主要聚集于图右下侧，底层水体样本主要聚集于左侧。沿 PC2 轴方向不同水层水体区分不明显，沿 PC1 轴方向不同水层水体组成有所差异。ANOSIM 分析结果表明组间差异大于组内差异且可信度高，结果显示表层与中层和底层，中层和底层的差异 P 值为 0.004、0.004、0.016，进而判断不同分层水体样本差异达到显著水平。

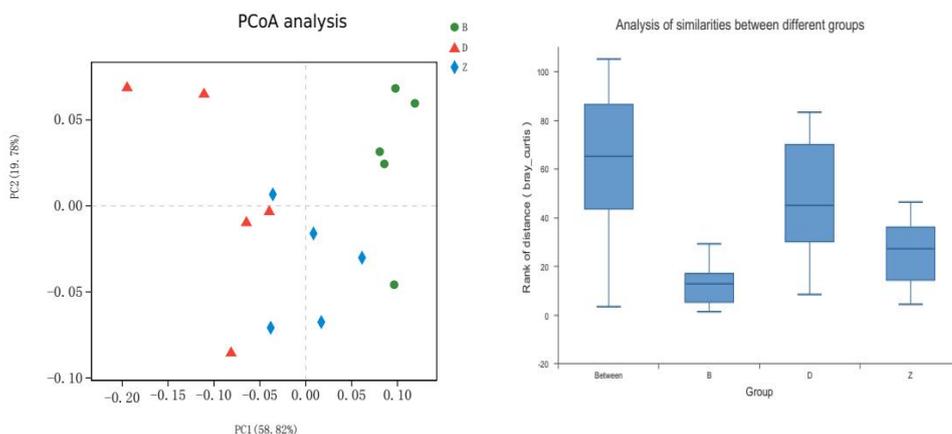


图 3-6 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体主坐标分析和相似性分析

Fig3-6 Principal co-ordinates analysis and similarity analysis of different stratified water bodies in Danjiangkou Reservoir in July 2022

综上所述表明，不同季节分层型水体样本浮游细菌群落结构差异达到显著水平。

3.2.3 不同分层型水体浮游细菌物种组成差异分析

为进一步确定不同分层水体样品中浮游细菌群落组成的丰富度差异，我们采用 LefSe 软件进行分析。检测出具有显著差异的类群及其在不同分层水体样品中的差异一致性，并且采用 LDA（线性判别分析）来估算浮游细菌各组分丰度对差异效果的影响。结果以饼形图呈现，由内到外的圈依次表示门、纲、目、科；绿色、蓝色、红色分别代表表层、中层和底层水体样品；不同颜色扇形的面积表示在该范围内的浮游细菌均有差异。

2021 年 10 月结果显示，丹江口水库浮游细菌群落共 9 门、14 纲、17 目、17 科存在显著差异。在门分类学水平上，表层水体样本中有 2 个变形菌门 (Proteobacteria)、异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus)，中层有 3 个绿弯菌门 (Chloroflexi)、醋杆菌门 (Acidobacteria) 和硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)，底层有 4 个浮霉菌门 (Planctomycetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和 unclassified_d_Bacteria 的浮游细菌群落存在显著差异。在科分类学水平上，表层水体样本中有 6 个变形菌门的红杆菌科 (Rhodobacteraceae)、着色菌科 (Chromatiaceae)、莫拉氏菌科 (Moraxellaceae) 和丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae)、unclassified_c_Betaproteobacteria、异常球菌-栖热菌门的 Deinococcaceae，中层水体样本中有 4 个醋杆菌门的 unclassified_p_Acidobacteria、绿弯菌门的 unclassified_p_Chloroflexi、变形菌门的红螺菌科 (Rhodospirillaceae)、硝化螺旋菌门的 Nitrospiraceae，底层水体样本中有 7 个浮霉菌门的 Planctomycetaceae 和 unclassified_p_Planctomycetes、聚球藻科 (Synechococcaceae)、疣微菌门的 unclassified_p_Verrucomicrobia 和 Verrucomicrobia_subdivision_3、变形菌门的 unclassified_p_Proteobacteria、unclassified_d_Bacteria 存在显著差异。

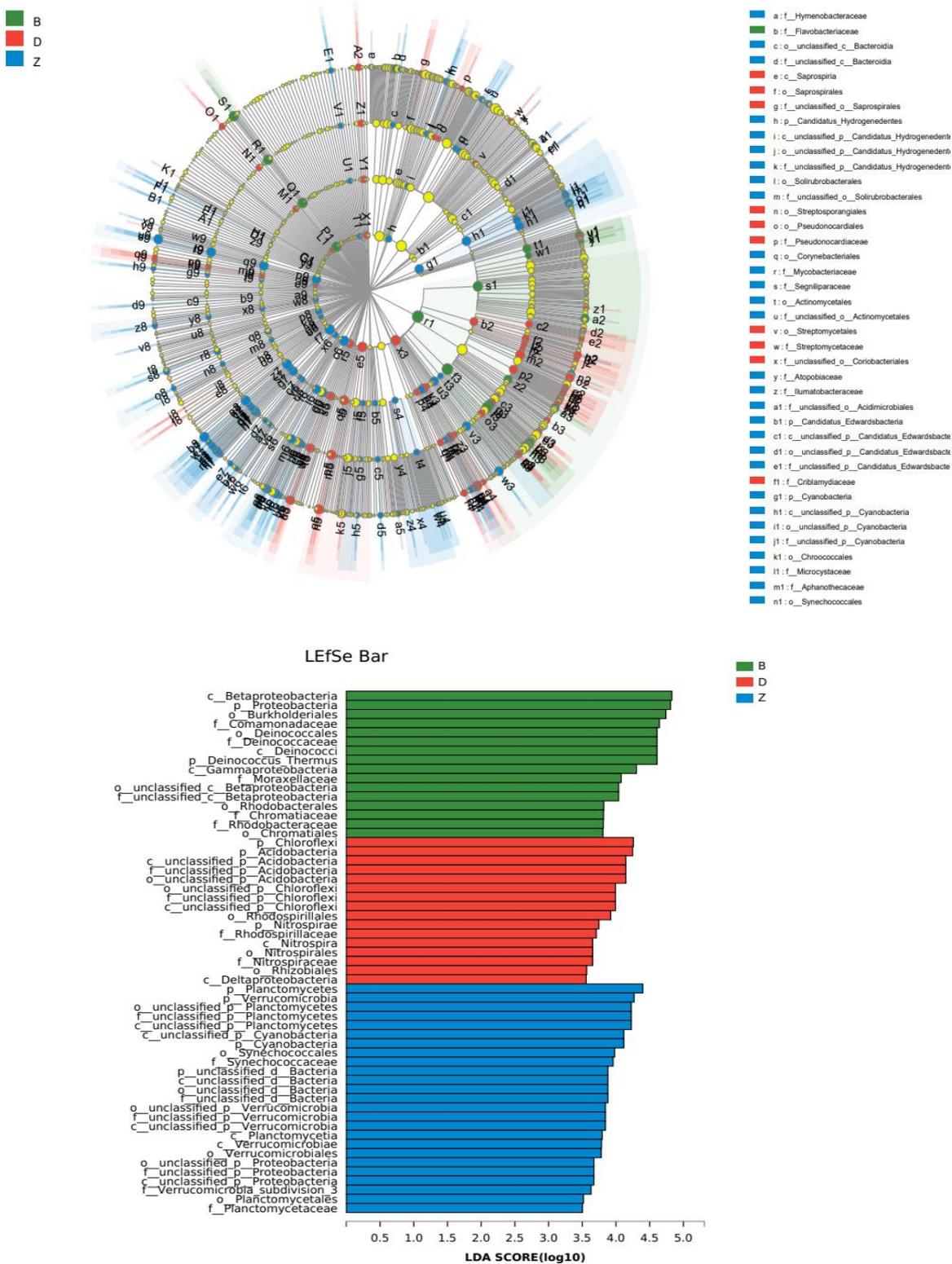


图 3-7 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体 LefSe 多级物种差异判别分析
 Fig3-7 Discriminant analysis of LefSe multilevel species difference in different stratified water bodies in Danjiangkou Reservoir in October 2021

2022年3月结果显示,丹江口水库浮游细菌群落共3门、12纲、16目、16科存在显著差异。在门分类学水平上,表层水体样本中有1个拟杆菌门,中层有1个疣微菌门,底层有1个浮霉菌门存在显著差异。在科分类学水平上,表层水体样本中有8个拟杆菌门的Flavobacteriaceae、藏红花黄色线菌科(Crocinitomicaceae)、unclassified_c_Flavobacteriia、噬几丁质菌科(Chitinophagaceae)、微杆菌科(Microbacteriaceae)、unclassified_c_Chitinophagia、Candidatus_Nanopelagicaceae和unclassified_o_Flavobacteriales,中层有2个unclassified_c_Opitutae和疣微菌门的unclassified_p_Verrucomicrobia,底层水体样本中有6个unclassified_p_Proteobacteria、绿弯菌门的unclassified_p_Chloroflex、变形菌门的unclassified_c_Alphaproteobacteria和unclassified_c_Gammaproteobacteria和浮霉菌门的unclassified_p_Planctomycetes和unclassified_c_Phycisphaerae(菲西芬氏菌纲)存在显著差异。

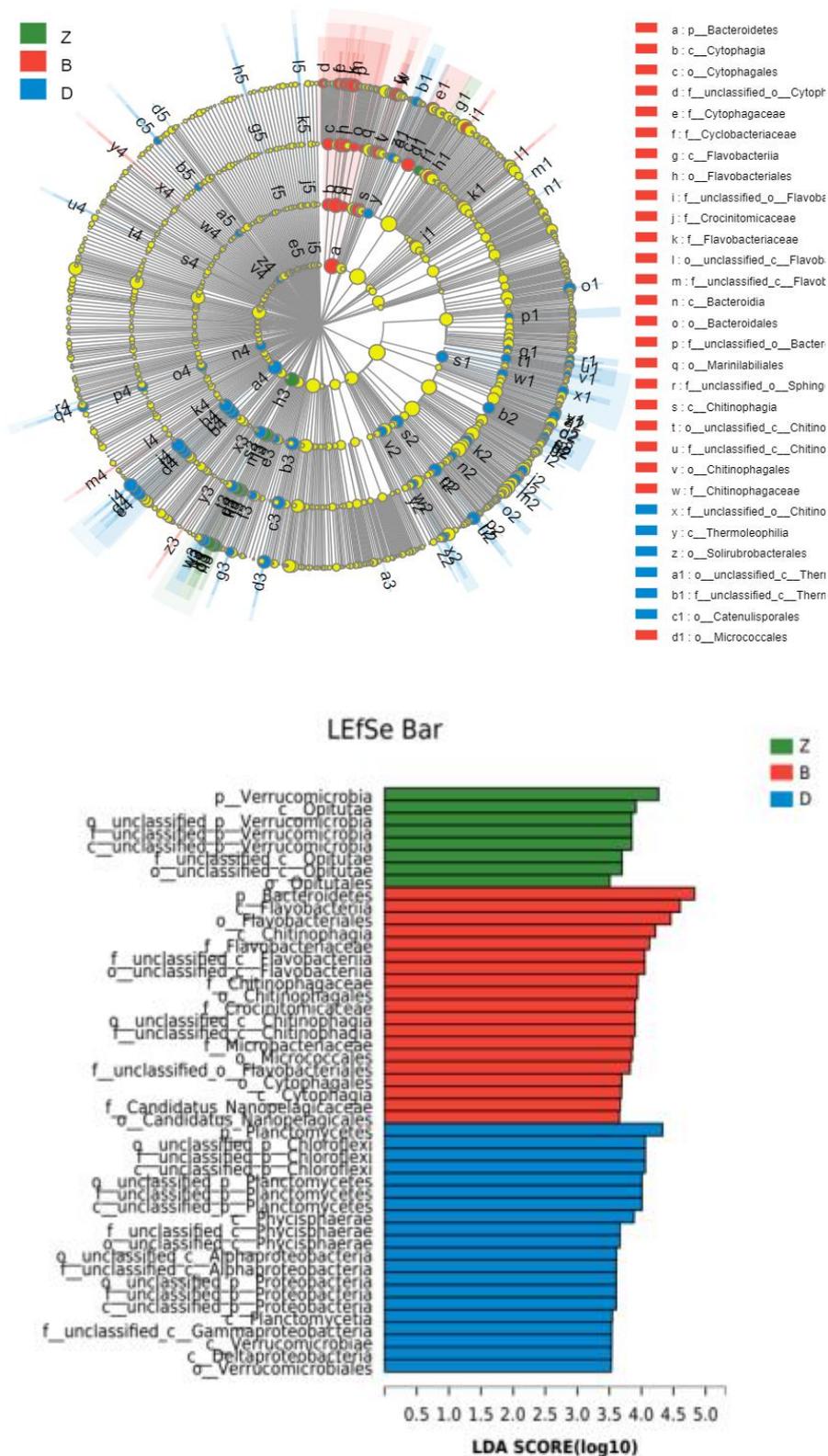


图 3-8 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体 LefSe 多级物种差异判别分析
 Fig3-8 Discriminant analysis of LefSe multilevel species difference in different stratified water bodies in Danjiangkou Reservoir in March 2022

2022年7月结果显示,丹江口水库浮游细菌群落共7门、13纲、22目、27科存在显著差异。表层水体样本中有2个变形菌门、蓝细菌门,中层有2个拟杆菌门、unclassified_d_Bacteria,底层有3个绿弯菌门、硝化螺旋菌门、浮霉菌门存在显著差异。在科分类学水平上,表层水体样本中有10个变形菌门的伯克霍尔德里氏菌科(Burkholderiaceae)、微杆菌科(Microbacteriaceae)、unclassified_o_Pelagibacterales、unclassified_p_Proteobacteria、蓝细菌门的unclassified_p_Cyanobacteria、醋酸杆菌门的醋酸菌科(Acetobacteraceae)、Prochlorococcaceae、unclassified_c_Betaproteobacteria unclassified_c_Gammaproteobacteria、和聚球藻科(Synechococcaceae),中层有1个unclassified_d_Bacteria,底层有16个绿弯菌门的unclassified_p_Chloroflexi、unclassified_c_Anaerolineae、厌氧绳菌科(Anaerolineaceae)、变形菌门的丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)、浮霉菌门的unclassified_p_Planctomycetes、拟杆菌门的噬几丁质菌科(Chitinophagaceae)和藏红花黄色线菌科(Crocinitomicaceae)、硝化螺旋菌门的Nitrospiraceae、疣微菌门的unclassified_c_Opitutae、Verrucomicrobia_subdivision_3和Opitutaceae、放线菌门的Ilumatobacteraceae、unclassified_c_Acidimicrobiia、出芽菌科(Gemmataceae)和酸微菌科(Acidimicrobiaceae)、Candidatus_Nanopelagicaceae存在显著差异。

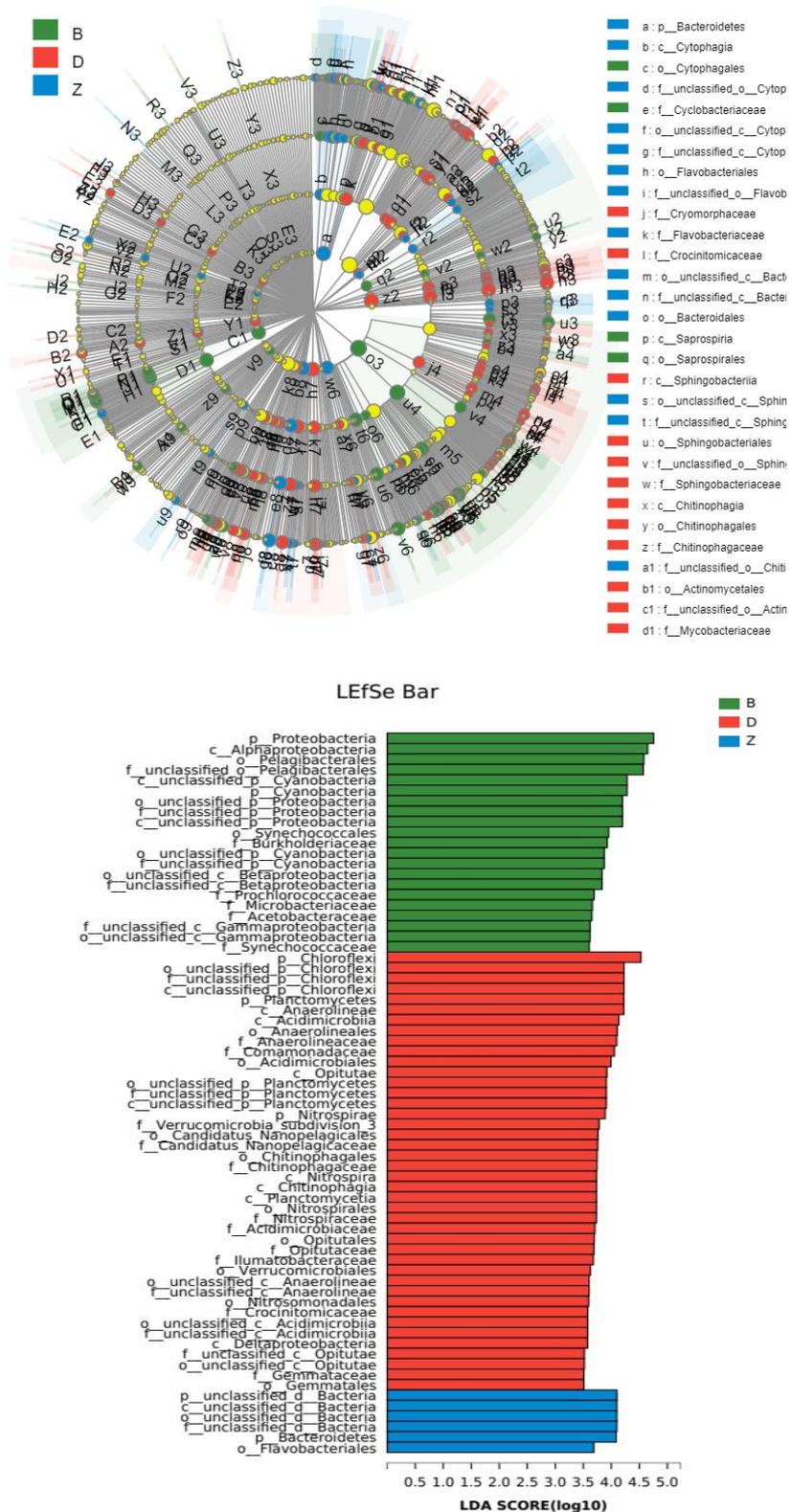


图 3-9 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体 LefSe 多级物种差异判别分析
 Fig3-9 Discriminant analysis of LefSe multilevel species difference in different stratified water bodies
 in Danjiangkou Reservoir in July 2022

物种差异结果显示丹江口水库不同季节浮游细菌类群丰度有所差异，2022年7月>2021年10月>2022年3月。丹江口水库不同分层水体浮游细菌类群丰度有所不同，中层水体在各个分类学水平上存在差异较少。2021年10月在门分类学水平上表层、中层、底层分别有2门、3门、4门存在显著差异，在科分类学水平上分别有6科、4科、7科存在显著差异；2022年3月在门分类学水平上表层、中层、底层分别有1门、1门、1门存在显著差异，在科分类学水平上分别有8科、2科、6科存在显著差异；2022年7月在门分类学水平上表层、中层、底层分别有2门、2门、3门存在显著差异，在科分类学水平上分别有10科、1科、16科存在显著差异。

3.2.4 不同分层型水体浮游细菌群落与环境因子关联分析

通过 VIF (Variance inflation factor, 方差膨胀因子) 分析, 进行环境因子筛选, 参数设置为 10, 剩余相互作用较小的物理量; 利用冗余分析 (RDA, Redundancy analysis) 对丹江口水库不同分层水体中浮游细菌在门分类学水平上的群落变化与水体理化指标之间的相互关系进行分析, 讨论不同分层水体中浮游细菌群落结构变化的主要影响因素。

结果显示, 2021 年 10 月 Axis_lengths 中 DCA1 值为 0.95, 利用 RDA 进行后续分析, WT ($R^2=0.233$, $P=0.206$)、ORP ($R^2=0.137$, $P=0.437$)、Cond ($R^2=0.194$, $P=0.260$)、TDS ($R^2=0.149$, $P=0.378$)、 COD_{Mn} ($R^2=0.104$, $P=0.364$)、TP ($R^2=0.058$, $P=0.742$)、TN ($R^2=0.045$, $P=0.785$)、 NH_4^+-N ($R^2=0.024$, $P=0.897$)、 $NO_3^- -N$ ($R^2=0.027$, $P=0.852$)、TOC ($R^2=0.098$, $P=0.320$)、Chla ($R^2=0.065$, $P=0.662$)。其中 NH_4^+-N 、 COD_{Mn} 、 $NO_3^- -N$ 、TDS、ORP、Chla、WT 与第一排序轴高度相关, TOC、TN、TP、Cond 与第二排序轴高度相关。

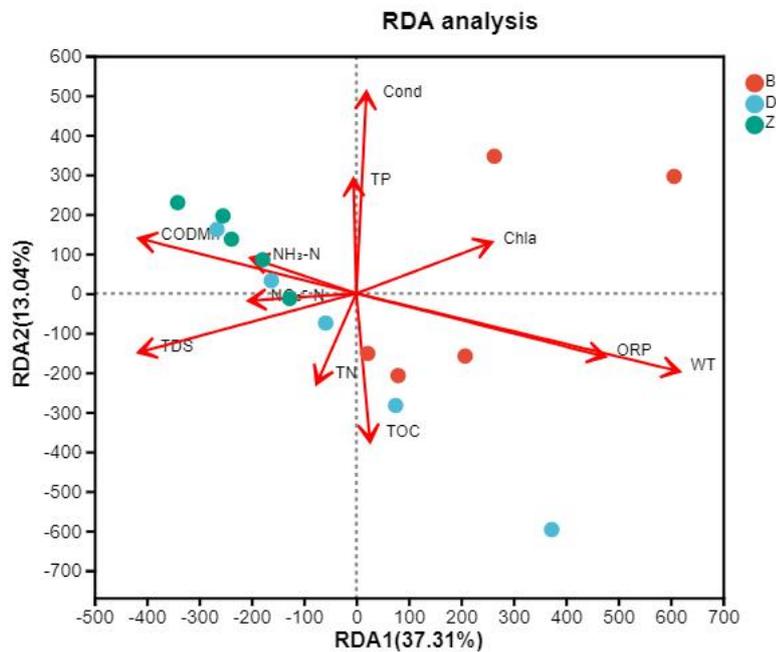


图 3-10 2021 年 10 月丹江口水库浮游细菌物种与环境因子 RDA 分析

Fig3-10 Analysis of planktonic bacteria species and environmental factors RDA in Danjiangkou Reservoir in October 2021

2022年3月 Axis_lengths 中 DCA1 值为 0.73，利用 RDA 进行后续分析，WT ($R^2=0.401$, $P=0.028$)、ORP ($R^2=0.332$, $P=0.006$)、pH ($R^2=0.102$, $P=0.533$)、DO ($R^2=0.602$, $P=0.035$)、 COD_{Mn} ($R^2=0.221$, $P=0.230$)、TP ($R^2=0.007$, $P=0.946$)、 NH_4^+-N ($R^2=0.339$, $P=0.029$)、 $NO_3^- -N$ ($R^2=0.015$, $P=0.914$)、TOC ($R^2=0.022$, $P=0.874$)、Chla ($R^2=0.405$, $P=0.001$)。其中 pH、 NH_4^+-N 、WT、Chla、 COD_{Mn} 、TOC、 $NO_3^- -N$ 、ORP、DO 与第一排序轴高度相关，TP 与第二排序轴高度相关。WT ($R^2=0.401$, $P=0.028$)、DO ($R^2=0.602$, $P=0.035$)、ORP ($R^2=0.332$, $P=0.006$)、Chla ($R^2=0.405$, $P=0.001$) 是影响丹江口水库不同分层水体浮游细菌群落结构变化的重要理化指标 ($P<0.05$)。

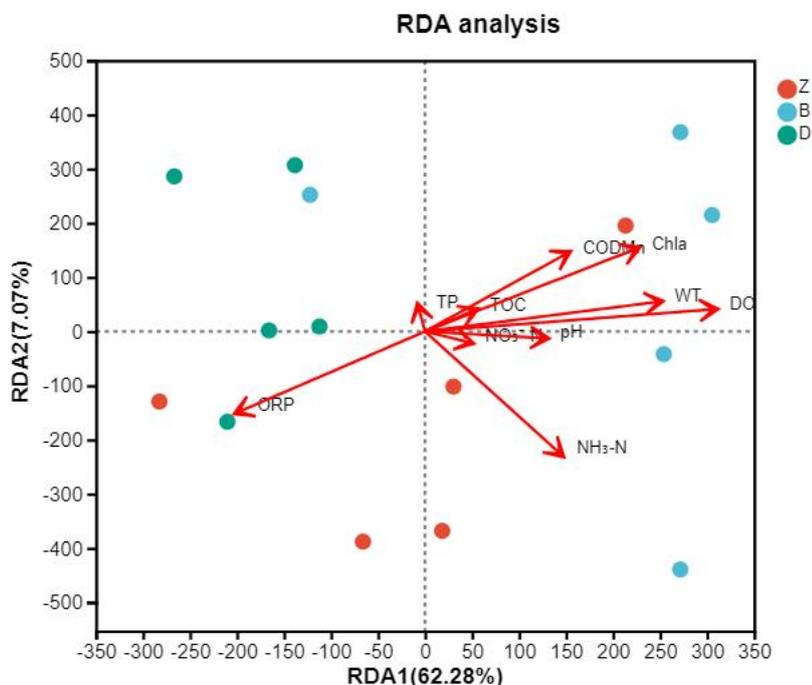


图 3-11 2022 年 3 月丹江口水库浮游细菌物种与环境因子 RDA 分析
Fig3-11 Analysis of planktonic bacteria species and environmental factors RDA in Danjiangkou Reservoir in March 2022

2022年7月 Axis_lengths 中 DCA1 值为 0.79，利用 RDA 进行后续分析，ORP ($R^2=0.063$, $P=0.712$)、pH ($R^2=0.295$, $P=0.130$)、DO ($R^2=0.309$, $P=0.086$)、Cond ($R^2=0.006$, $P=0.970$)、TP ($R^2=0.097$, $P=0.534$)、TN ($R^2=0.379$, $P=0.056$)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($R^2=0.148$, $P=0.394$)、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ ($R^2=0.660$, $P=0.004$)、TOC ($R^2=0.197$, $P=0.269$)、Chla ($R^2=0.259$, $P=0.169$)。其中 Cond、TN、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、DO、ORP 与第一排序轴高度相关，TP、TOC、pH、Chla 与第二排序轴高度相关。 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ ($R^2=0.660$, $P=0.004$) 是影响丹江口水库不同分层水体浮游细菌群落结构变化的重要理化指标 ($P<0.05$)。

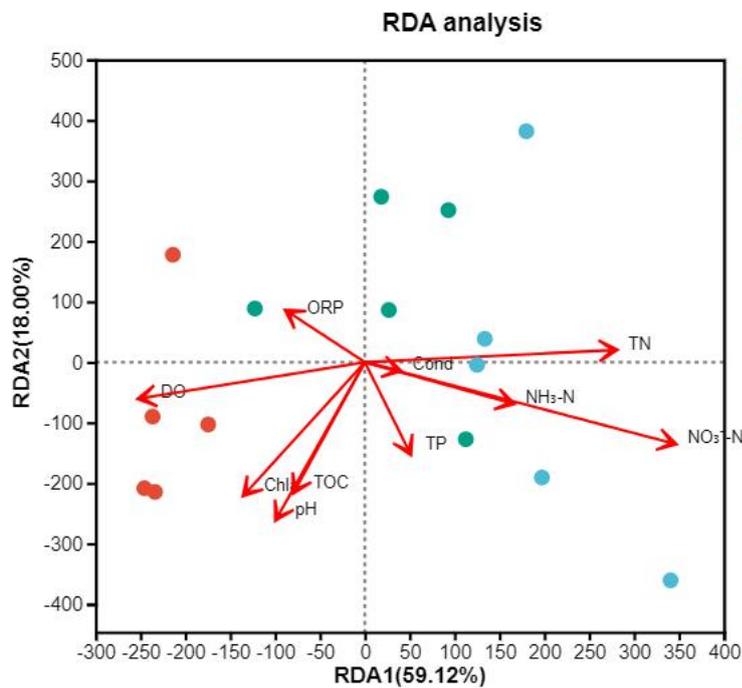


图 3-12 2022 年 7 月丹江口水库浮游细菌物种与环境因子 RDA 分析

Fig3-12 Analysis of planktonic bacteria species and environmental factors RDA in Danjiangkou Reservoir in July 2022

3.3 讨论

3.3.1 丹江口水库浮游细菌群落组成

浮游细菌是丹江口水库水生生态系统的重要组成部分，在有机物降解、营养物质的循环、污染物的释放等方面发挥着巨大的作用。丹江口水库作为南水北调中线工程重要的水源地，利用现代分子技术对其水体中浮游微生物的研究已逐步开展，特别是浮游细菌的研究^[15-18,31]，但是缺乏跨年度的长期研究以及对不同生态点位不同深度水体的分层研究。

针对丹江口水库三次采样的结果分析可知，各季节理化指标存在较大差异，因不同物种对环境的响应程度不同，导致微生物群落组成发生季节性变化。已有研究显示，由于理化性质的改变使得水体中浮游生物的组成发生改变^[47-48]。丹江口水库水体中大部分浮游细菌在时间、空间上具有良好的环境适应性，但其不同的物种相对丰度又存在一定的差异性。2021年10月浮游细菌群落主要是由149门814科3325属组成，2022年3月浮游细菌群落主要是由148门813科3256属组成，2022年7月浮游细菌群落主要是由160门992科3981属组成。与Liu等^[49]利用常规分离培养技术发现的3个门17个属，比较显示采用高通量测序技术可以获得更多的浮游细菌群落组成。变形菌门和放线菌门是三次采样的优势类群，但其余优势类群逐渐发生了变化。放线菌门在2021年10月丰度较低、在2022年3月和2022年7月丰度较高，异常球菌-栖热菌门在2021年10月丰度最高，拟杆菌门在2022年3月丰度最高、在2021年10月丰度最低，蓝细菌门、浮霉菌门、硝化螺旋菌门2022年3月丰度最低，疣微菌门在2022年7月丰度最高。丹江口水库浮游细菌群落组成与湖泊水体中典型的浮游细菌群落组成相似，这些浮游细菌大都归属为Proteobacteria、Cyanobacteria、Bacteroidetes、Actinobacteria和Verrucomicrobia等^[50-51]。从三次高通量测序物种注释结果比较分析，发现春季的物种多样性明显低于夏秋季，且在不同季节不同分层水体中浮游细菌分布情况表现出一定的规律性。醋杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门和硝化螺旋菌门丰度占比呈现出随着水深的增加而增加的趋势。蓝细菌门丰度占比呈现出随着水深的增加而降低的趋势。物种差异结果显示丹江口水库不同季节浮游细菌种群丰度有所差异，发现春季丰度差异明显低于夏秋季。不同分层水体浮游细菌类群丰度有所不同，中层水体在各个分类学水平上存在差异较少。门分类学水平上，2021年10月变形菌门、异常球菌-栖热菌门在表层，绿弯菌门、醋杆菌门、硝化螺旋菌门在中层，

浮霉菌门、疣微菌门、蓝细菌门在底层水体存在显著差异；2022年3月拟杆菌门在表层，疣微菌门在中层，浮霉菌门、绿弯菌门在底层水体中存在显著差异，2022年7月变形菌门、蓝细菌门在表层，拟杆菌门在中层，绿弯菌门、硝化螺旋菌门、浮霉菌门在底层水体中存在显著差异。

3.3.2 浮游细菌群落与环境因子的响应

研究表明，浮游细菌的群落组成受到时空的分布^[32]、pH^[33]、WT^[34]、氮磷等营养元素^[34, 35]以及水体富营养状态^[36, 37]的影响。丹江口水库正常蓄水位由157 m提升至170 m，深度的增加会引起环境因子的变化，从而影响浮游细菌的组成。浮游细菌群落与理化因子的相关性分析采用冗余分析是最方便快捷的，三次采样分析发现，2021年10月降水导致水体竖向对流和垂直环流剧烈，削弱环境因子对不同分层型水体浮游细菌群落结构变化的影响；2022年3月WT、DO、ORP、Chla以及2022年7月NO₃⁻-N是影响丹江口水库不同分层水体浮游细菌群落结构变化的重要理化指标（P<0.05）。不同采样时间及不同水深变化导致理化指标的改变是丹江口水库不同季节分层型水体群落组成差异的重要影响因素，形成了各水体样本不同群落组成特征以及不同的优势物种。

水温（WT）是影响不同季节分层型水体浮游细菌群落组成最主要的环境因子，它能够改变水体中氮磷等营养物质循环和浮游细菌群落组成^[52]，温度是影响浮游细菌生长繁殖的重要环境因子，细菌内部酶的活性决定了其新陈代谢的能力，在一定温度范围内酶的活性与温度成正比^[53]。Li等^[54]研究发现当水温低于14℃时，温度对浮游细菌的调控作用超过了其他影响因素，是影响细菌分布的主要因素。丹江口水库2022年3月表层水样温度高于14℃，中层和底层水温均低于14℃，浮游细菌组成受水温影响显著。有小娟等^[55]发现WT是影响象山港海域微生物群落特征的主要环境因子。Chla是影响丹江口水库2022年3月各生态位点不同分层水体浮游细菌群落结构变化的重要理化指标，在水体垂直分层上Chla的浓度具有一定的差异性与波动性，随着水体深度的增加其含量逐渐降低。Chla含量最高是2022年3月台子山（T）表层水体为8.58 mg/m³，其次是3月黑鸡嘴（H）表层水体含量为7.60 mg/m³，且具有较大的波动范围。不同生态点位表层水体中具有较大的Chla的浓度，与表层水体光照充足、光合作用较强有关^[56-57]。对2022年7月水样结果分析可知，温度较高的季节里，分层型湖库水体温度垂直结构的形成与维持限制了水体垂向的交流，使得表

层水体中所含有的溶解氧 (DO) 不易穿透到底层水体, 进而导致中层及底层水体中 DO 浓度相对较低。Cyanobacteria (蓝细菌门) 广泛分布于自然界中, 能够进行光合作用并且释放出氧气, 不同深度水体中蓝细菌门丰度变化与 DO 值呈现出正相关, 不同季节不同生态点位表层水体中蓝细菌门丰度最高也对应 DO 值含量最高的特征, 与杜蕾等^[58]研究达里诺尔湖夏季浮游细菌群落垂向变化特征结论相符。其次, 夏季水体温跃层 (水体垂直温度变化大于或等于 $0.2^{\circ}\text{C}/\text{m}$) 形成后, 湖库底部沉淀物中会释放出营养盐很难到达表层水体, 而且表层水体中有机物碎屑及浮游微生物的遗体残骸不断向中、底层水体沉降, 因此, 不同采样位点底层水体中 TP、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 值相对较高, 与周天旭等^[56]研究抚仙湖分层期水体理化因子在垂向存在差异结论类似。

丹江口水库氮磷元素超标是库区重要的环境问题^[59-60], 各季节不同生态点位水体中总氮 (TN) 变化范围为 $0.67\sim 2.88\text{mg/L}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 变化范围为 $0.01\sim 1.46\text{mg/L}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 变化范围为 $0.33\sim 1.64\text{mg/L}$, 总磷 (TP) 的变化范围为 $0.005\sim 0.066\text{mg/L}$ 。对不同季节库区水体氮磷含量分析, 呈现出春、秋季氮磷含量明显多于夏季的特征。丹江流域存在农业面源的污染、村镇生活污水排放等问题, 是氮磷超标的主要原因。谢斌等^[61]和高春梅等^[62]研究发现, 不同季节各种形式的无机氮是从湖库底部沉积物向水体中扩散, 这种迁移方式会不断增加水体中各营养盐的含量, 直接或间接对水体中的浮游细菌群落结构产生影响。Chen 等^[63]对太湖各地区的浮游生物进行研究表明水体中的总磷含量与浮游生物含量两者存在极高相关性。大量研究表明 TN 和 TP 是影响微生物生长的重要环境因素^[64]。浮游细菌群落组成与理化因子 Spearman 相关性分析结果显示表层水体中浮游细菌放线菌门与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 显著负相关, 中层水体中蓝细菌门与 TN 显著正相关, 底层水体中浮霉菌门、硝化螺旋菌门等与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 显著正相关, 变形菌门、异常球菌-栖热菌门等与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 显著负相关, 厚壁菌门等与 TP 显著正相关。这些浮游细菌参与生物固氮等 7 个氮循环途径以及有机磷酸化等 6 个磷循环途径, 驱动水体中氮磷元素的生物地球化学循环^[65-67], 为进一步研究丹江口水库不同分层型水体中浮游细菌氮磷循环基因垂直分布特征提供参考。

第四章 丹江口水库分层型水体浮游细菌功能预测分析

针对丹江口库区表层沉积物^[15]和库滨带^[16]细菌的功能预测以及库区不同生态点位表层^[17,18]浮游细菌的功能预测,本课题组及其他研究者已通过 PICRUSt 软件开展了相关研究。目前,针对丹江口水库浮游细菌群落结构及基因功能分析和氮磷循环过程中浮游细菌群落组成及其功能的研究开展较少,本研究采用宏基因组学技术对丹江口水库不同分层型水体中浮游细菌群落进行基因功能注释、基因预测、代谢通路以及氮磷循环基因表达情况等分析,以期深入探究细菌的群落结构和基因功能,为丹江口水库环境保护提供参考依据。

4.1 材料与方法

4.1.1 丹江口水库样品采集及理化指标检测

丹江口水库不同分层型水体样品采集及理化指标检测参照第二章 2.1.1 和 2.1.2。

4.1.2 浮游细菌总 DNA 提取

浮游细菌总 DNA 提取参照第三章 3.1.2。

4.1.3 宏基因组测序分析

采用 HiSeq2000 测序平台对水样进行宏基因组学测序。将测序平台上得到的原始序列用 Fastp (v0.20.0) 软件对其进行质控,剪切掉数据中的低质量 reads,获得高质量序列,采用 MEGAHIT v1.1.2 软件进行序列组装。对拼接结果进行 ORF 基因预测,对预测结果进行聚类,建立非冗余基因集。使用 DIAMOND (<https://github.com/bbuchfink/diamond>) 将非冗余基因集序列与 egg NOG 数据库进行比对(参数: blastp; E-value $\leq 1e-5$),获得基因对应的 COG (Clusters of orthologous groups of proteins, 直系同源蛋白簇),使用 COG 对应的基因丰度总和计算其丰度。将非冗余基因集与 KEGG 基因 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) 数据库进行比对,得出各处理组在各层级中相对丰度的分析结果。宏基因组下机数据基于 KEGG 数据库和已发表的文献资料信息,构建了氮循环 (50 个 KOs) 和磷循环 (53 个 KOs) 标记基因集。通过从 KEGG 功能注释结果中提取上述信息,基于 RPKM 丰度计算方法,进行功能组成分析、差异分析和相关性分析。

4.2 结果与分析

4.2.1 浮游细菌群落 COG 功能预测结果分析

4.2.1.1 不同分层型水体浮游细菌 COG 功能组成分析

COG 功能注释结果共包括四个大类：新陈代谢（Metabolism）、未知功能（Poorly Characterized）、细胞过程和信号传导（Cellular Processes and Signaling）以及信息贮存和处理（Information Storage and Processing）。将 COG 四个大类进一步细化功能注释，可以分成 26 个功能组：RNA 加工修饰（RNA processing and modification. 简称 A，下同），染色质结构和动力学（Chromatin structure and dynamics. B），能量生成和转换（Energy production and conversion. C），细胞周期控制、细胞分裂和染色体分裂（Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning. D），氨基酸转运代谢（Amino acid transport and metabolism. E），核苷酸转运和代谢（Nucleotide transport and metabolism. F），碳水化合物转运代谢（Carbohydrate transport and metabolism. G），辅酶转运和代谢（Coenzyme transport and metabolism. H），脂肪转运代谢（Lipid transport and metabolism. I），翻译、核糖体结构和生物合成（Translation, ribosomal structure and biogenesis. J），转录（Transcription. K），复制、重组和修复（Replication, recombination and repair. L），细胞壁/膜/被膜的生物合成（Cell wall/membrane/envelope biogenesis. M），细胞运动（Cell motility. N），翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白（Posttranslational modification, protein turnover, chaperones. O），无机离子转运代谢（Inorganic ion transport and metabolism. P），次级代谢物生物合成、转运和代谢（Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism. Q），主要功能预测（General function prediction only. R）、功能未知（Function unknown. S），信号转导机制（Signal transduction mechanisms. T），胞内转运、分泌和小泡运输（Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport. U），抵御机制（Defense mechanisms. V），胞外结构（Extracellular structures. W），动员组：噬菌体原、转座子（Mobilome: prophages, transposons. X）、核酸结构（Nuclear structure. Y）、细胞骨架（Cytoskeleton. Z）。

2021 年 10 月 COG 功能注释结果显示，丹江口水库不同分层型水体样本中均包含四个大类，其中占比最高的均为新陈代谢（表、中和底层占比为 37.86%、36.90%、37.77%，下同），其次是未知功能基因（28.09%、29.72%、28.55%）、细胞过程和信号传导（18.00%、17.84%、18.27%）及信息贮存和处理（16.04%、15.40%、15.54%）

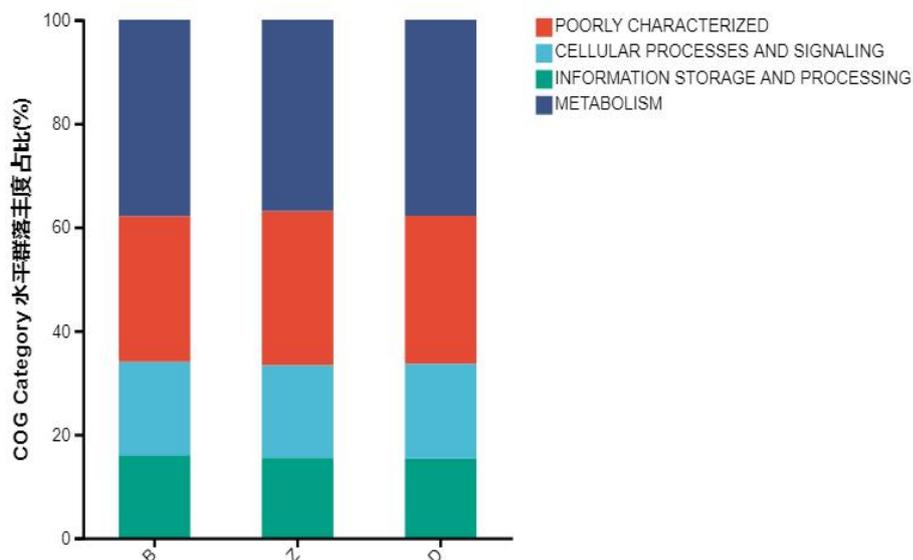


图 4-1 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 功能组成分析

Fig4-1 Functional composition analysis of planktonic bacteria COG in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2021

丹江口水库不同分层水体样品中均检测出 20 个功能组，对排名前十的功能组进行分析，其中占比最高的功能为功能未知，在表、中和底层的占比分别为 27.71%、29.34%、28.16%，说明仍有大量功能未知的基因等待挖掘。相对丰度较高的功能还包括氨基酸转运代谢（表、中和底层占比分别为 9.13%、8.93%、9.23%，下同），能量生产和转换（6.72%、6.68%、6.98%），复制、重组和修复（6.00%、6.17%、5.87%），细胞壁/膜/被膜的生物合成（5.71%、5.93%、5.89%），翻译、核糖体结构和生物合成（5.78%、5.89%、5.75%），无机离子转运代谢（5.08%、4.97%、4.99%），碳水化合物转运代谢（5.18%、4.89%、4.95%），翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白（4.14%、4.07%、4.05%）和脂肪转运代谢（3.64%、3.44%、3.60%）。

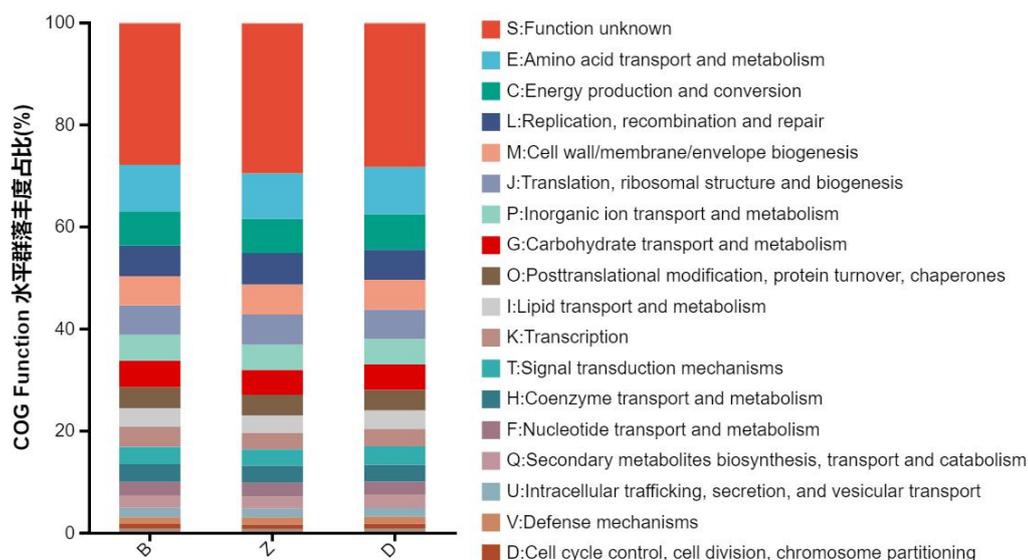


图 4-2 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 代谢功能组成分析

Fig4-2 Analysis on the metabolic function composition of planktonic bacteria COG in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2021

2022 年 3 月 COG 功能注释结果显示，丹江口水库不同分层水体样本中均包含四个大类，其中占比最高的均为新陈代谢（表、中和底层占比为 37.22%、37.39%、37.58%，下同），其次是未知功能基因（28.78%、28.78%、28.46%），细胞过程和信号传导（17.14%、17.34%、17.43%）及信息贮存和处理（16.86%、16.49%、16.53%）。

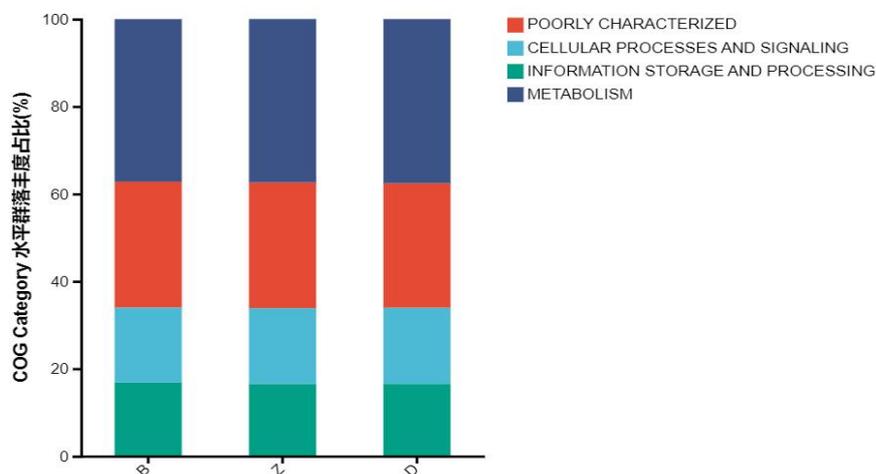


图 4-3 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 功能组成分析

Fig4-3 Functional composition analysis of planktonic bacteria COG in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in March 2022

丹江口水库不同分层水体样品中均检测出 23 个功能组，对排名前十的功能组进行分析，其中占比最高的功能为功能未知，在表、中和底层占比分别为 28.48%、28.44%、28.12%，说明仍有大量功能未知基因等待挖掘。相对丰度较高的功能还包括氨基酸转运代谢（表、中和底层占比分别为 9.17%、9.13%、9.27%，下同），翻译、核糖体结构和生物合成（6.96%、6.77%、6.66%），能量生产和转换（6.69%、6.75%、6.87%），细胞壁/膜/被膜的生物合成（6.36%、6.34%、6.30%），复制、重组和修复（6.23%、6.17%、6.34%），碳水化合物转运代谢（5.02%、5.00%、4.98%），无机离子转运代谢（4.43%、4.57%、4.49%），翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白（4.13%、4.08%、4.05%），脂肪转运代谢（3.56%、3.69%、3.68%）。

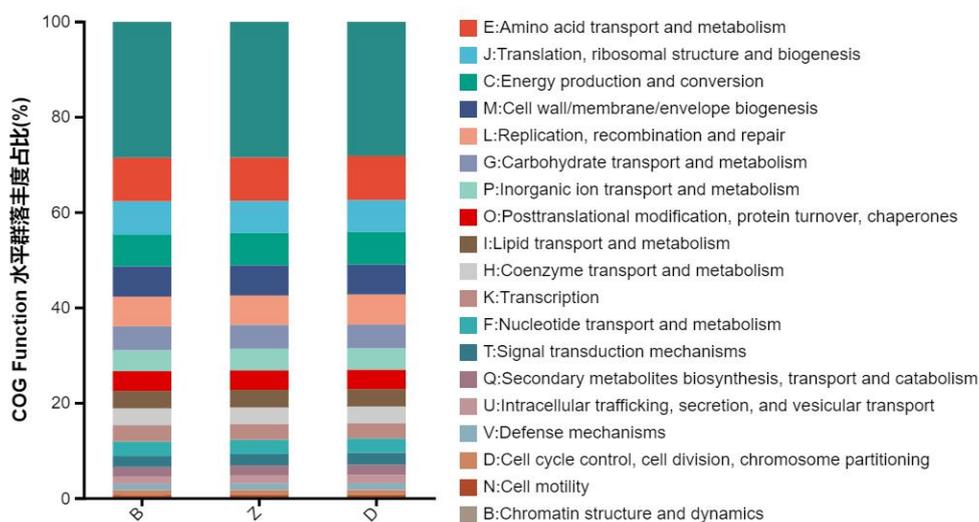


图 4-4 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 代谢功能组成分析

Fig4-4 Analysis on the metabolic function composition of planktonic bacteria COG in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in in March 2022

2022 年 7 月 COG 功能注释结果显示，丹江口水库不同分层水体样本中均包含四个大类，其中占比最高的均为新陈代谢（表、中和底层占比为 45.06%、44.50%、44.34%，下同），其次是细胞过程和信号传导（24.51%、24.89%、25.55%）、信息贮存和处理（20.18%、19.82%、18.62%）及未知功能基因（10.25%、10.78%、11.49%）。

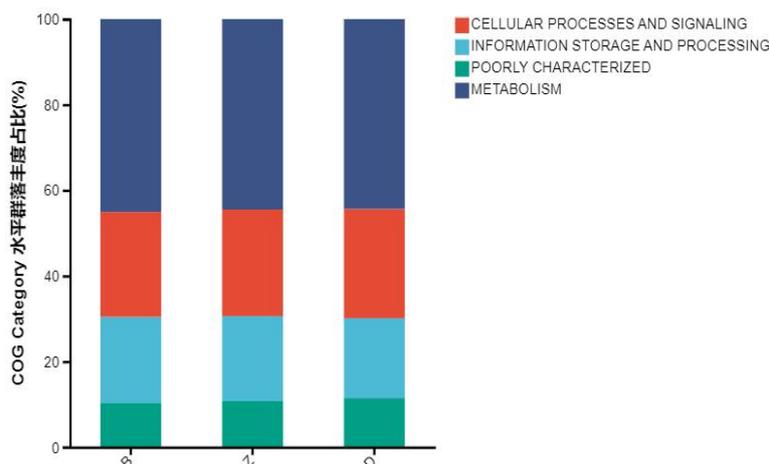


图 4-5 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 功能组成分析

Fig4-5 Functional composition analysis of planktonic bacteria COG in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in July 2022

丹江口水库不同分层水体样品中均检测出 25 个功能组，对排名前十的功能组进行分析，其中占比最高的功能为氨基酸转运代谢，在表、中和底层的占比分别为 10.14%、9.82%、9.75%。相对丰度较高的功能还包括翻译、核糖体结构和生物合成（表、中和底层占比分别为 9.79%、9.30%、8.58%，下同），细胞壁/膜/被膜的生物合成（7.68%、7.76%、7.92%），主要功能预测（7.09%、7.50%、8.04%），能量生产和转换（7.20%、6.85%、6.67%），辅酶转运和代谢（6.80%、6.40%、6.20%），碳水化合物转运代谢（6.22%、6.39%、6.47%），复制、重组和修复（5.76%、5.93%、5.46%），脂肪转运代谢（5.23%、5.34%、5.55%），翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白（5.33%、5.31%、5.18%）。

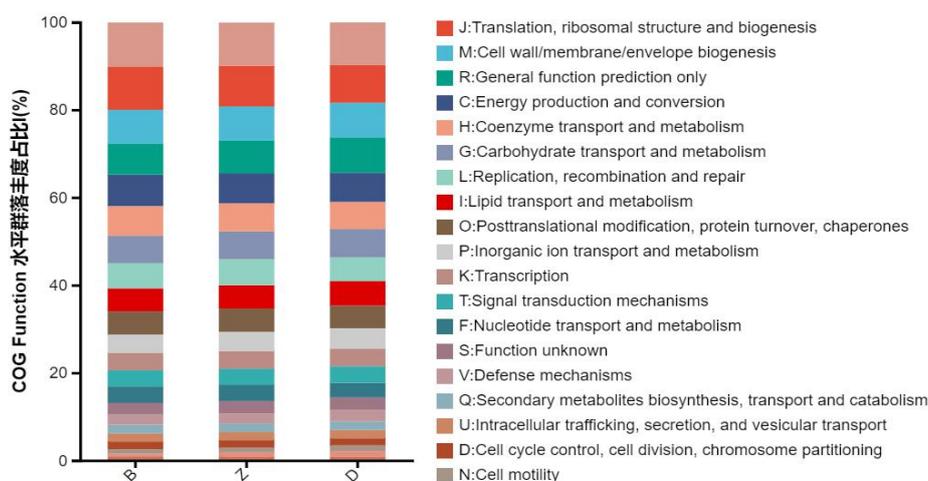


图 4-6 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 代谢功能组成分析

Fig4-6 Analysis on the metabolic function composition of planktonic bacteria COG in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in in July 2022

4.2.1.2 不同分层型水体浮游细菌 COG 功能差异分析

多组比较分析运用统计学方法根据得到的 reads 丰度数据，对不同水体样本微生物群落之间功能进行假设性检验，评估功能差异的显著性水平，获得不同水体样本间具有显著性差异功能。2021 年 10 月结果显示，在不同分层水体中 COG 功能有所差异。其中存在显著性差异的功能有功能未知，复制、重组和修复，脂肪转运代谢，转录，次级代谢物生物合成、转运和代谢，胞内转运、分泌和小泡运输，细胞骨架；存在极显著性差异的功能有能量生成和转换。

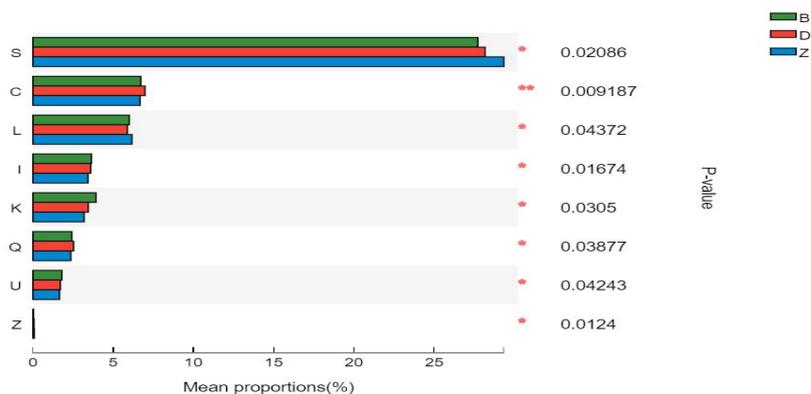


图 4-7 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 功能差异分析

Fig4-8 Differential analysis of COG metabolic function of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2022

2022 年 3 月结果显示，在不同分层水体中存在显著性差异的功能有翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白，次级代谢物生物合成、转运和代谢，胞内转运、分泌和小泡运输，抵御机制，细胞运动。

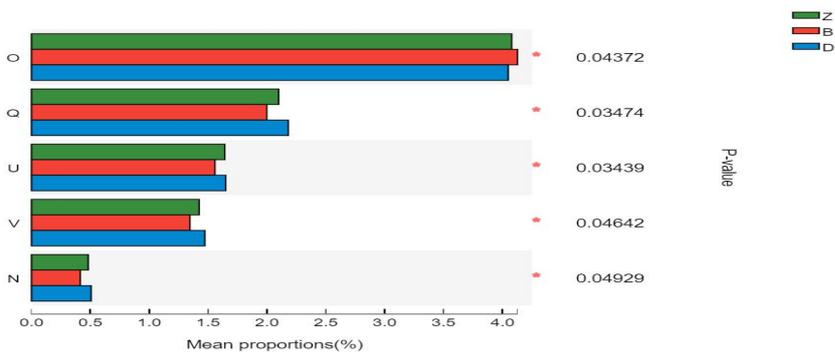


图 4-8 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 功能差异分析

Fig4-8 Differential analysis of COG metabolic function of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in March 2022

2022年7月结果显示,在不同分层水体中存在显著性差异的功能有复制、重组和修复,功能未知,抵御机制,次级代谢物生物合成、转运和代谢,细胞运动;存在极显著差异的功能有翻译、核糖体结构和生物合成,功能预测,能量生成和转换,辅酶转运和代谢,碳水化合物转运代谢,脂肪转运代谢,翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白,无机离子转运代谢,核苷酸转运和代谢,细胞周期控制、细胞分裂和染色体分裂。

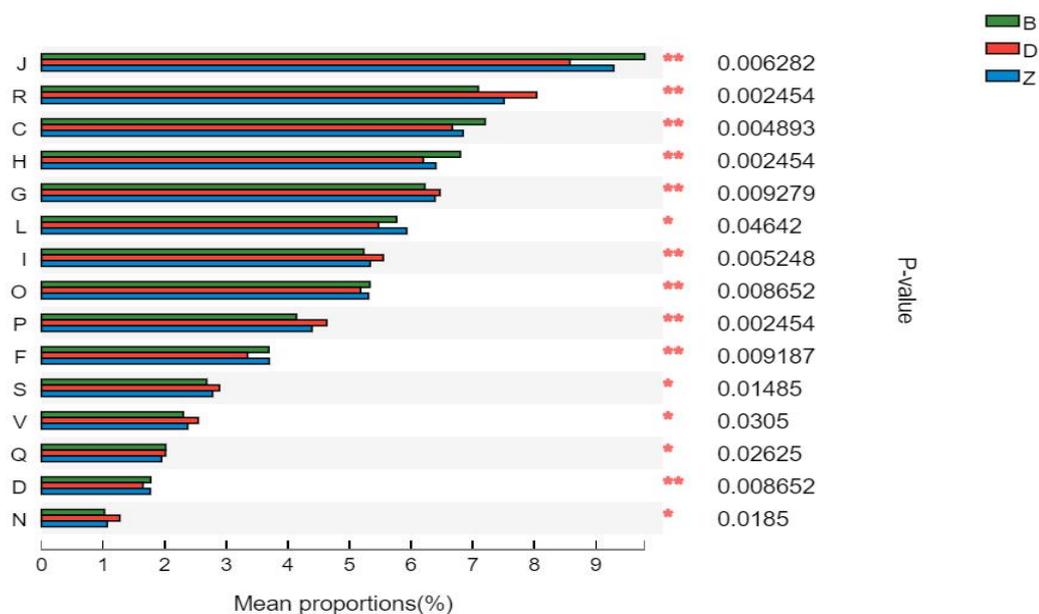


图 4-9 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 功能差异分析

Fig4-9 Differential analysis of COG metabolic function of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in July 2022

4.2.1.3 不同分层型水体浮游细菌 COG 功能与环境因子关联分析

将方差膨胀因子 (VIF) >10 的变量剔除后, 进行 RDA 分析探讨 COG 功能与环境因子之间关系, 讨论丹江口水库不同分层型水体中浮游细菌 COG 功能变化的主要影响因素。

2021 年 10 月结果显示, 不同分层型水体中 COG 功能组成存在差异性: 表层水体样本主要聚集在图下侧, 中层水体样本主要聚集在图右上侧, 底层水体样本主要聚集在图左侧。Axis_lengths 中 DCA1 值为 0.101, 利用 RDA 进行后续分析。环境因子对浮游细菌 COG 功能变化的贡献率为 51.64%, 其中第一排序轴解释了 42.27%, TDS ($R^2=0.149$, $P=0.378$)、 NO_3^- -N ($R^2=0.027$, $P=0.852$)、TN ($R^2=0.045$, $P=0.785$)、Cond ($R^2=0.194$, $P=0.260$)、 NH_4^+ -N ($R^2=0.024$, $P=0.897$)、Chla ($R^2=0.065$, $P=0.662$)、TOC ($R^2=0.098$, $P=0.320$) 与第一排序轴高度相关; 第二排序轴解释了 9.37%, WT ($R^2=0.233$, $P=0.206$)、ORP ($R^2=0.137$, $P=0.437$)、 COD_{Mn} ($R^2=0.104$, $P=0.364$)、TP ($R^2=0.058$, $P=0.742$) 与第二排序轴高度相关。

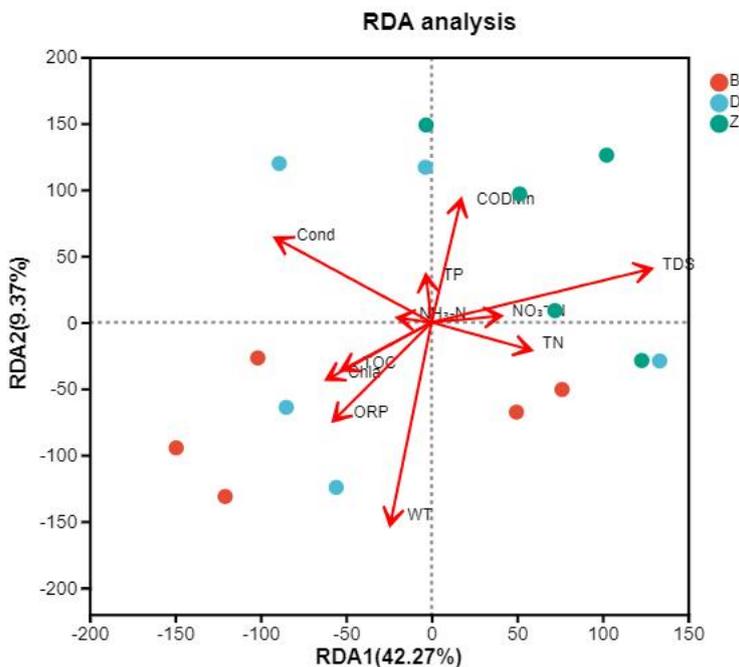


图 4-10 2021 年 10 月丹江口水库不同分层型水体浮游细菌 COG 功能与环境因子的冗余分析

Fig4-10 Redundancy analysis of COG function and environmental factors of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2021

2022年3月结果显示，不同分层型水体中COG功能组成存在差异性：表层水体样本主要聚集在图左侧，中层水体样本主要聚集在图中部，底层水体样本主要聚集在右中侧。Axis_lengths中DCA1值为0.072，利用RDA进行后续分析。环境因子对浮游细菌COG功能变化的贡献率为83.06%，其中第一排序轴解释了73.33%，WT ($R^2=0.2933$, $P=0.137$)、Chla ($R^2=0.2626$, $P=0.167$)、 COD_{Mn} ($R^2=0.506$, $P=0.007$)、TOC ($R^2=0.1000$, $P=0.572$)、TDS ($R^2=0.6066$, $P=0.007$)、Cond ($R^2=0.5602$, $P=0.011$)、ORP ($R^2=0.3721$, $P=0.061$)与第一排序轴高度相关；第二排序轴解释了9.73%，DO ($R^2=0.1296$, $P=0.443$)、pH ($R^2=0.2212$, $P=0.215$)、TP ($R^2=0.0373$, $P=0.771$)、TN ($R^2=0.0386$, $P=0.778$)、 NO_3^- -N ($R^2=0.0202$, $P=0.878$)、 NH_4^+ -N ($R^2=0.2439$, $P=0.16$)与第二排序轴高度相关。 COD_{Mn} 、Cond和TDS是影响2022年3月不同分层型水体浮游细菌COG功能变化的显著因素 ($P<0.05$)。

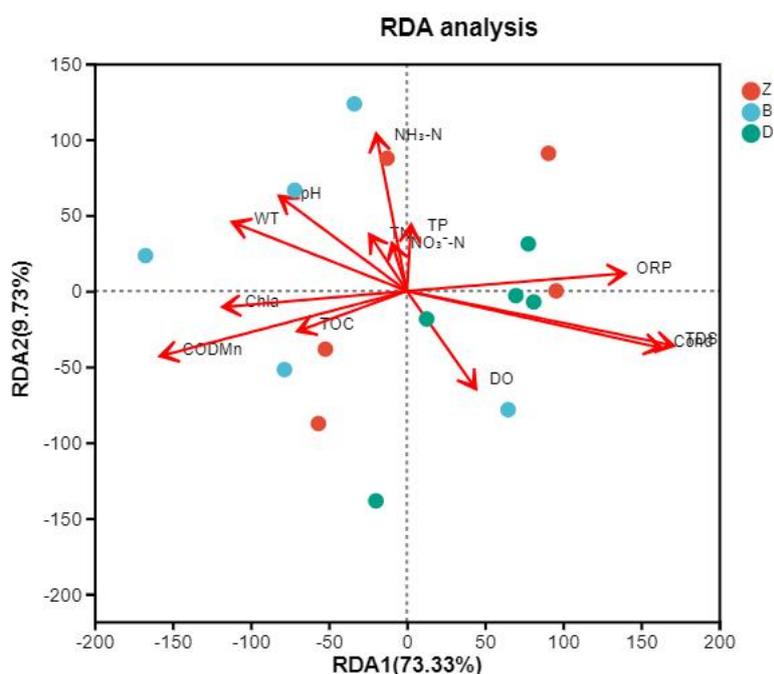


图 4-11 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 功能与环境因子的冗余分析

Fig4-11 Redundancy analysis of COG function and environmental factors of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in March 2022

2022年7月结果显示，不同分层型水体中 COG 功能组成存在差异性：表层水体样本主要聚集在图左上侧，中层水体样本主要聚集在右上侧，底层水体样本主要聚集在右下侧。Axis_lengths 中 DCA1 值为 0.132，利用 RDA 进行后续分析。环境因子对浮游细菌 COG 功能变化的贡献率为 85.05%，其中第一排序轴解释了 71.70%，WT ($R^2=0.6098$, $P=0.003$)、DO ($R^2=0.2557$, $P=0.178$)、Chla ($R^2=0.0608$, $P=0.696$)、TOC ($R^2=0.0336$, $P=0.815$)、pH ($R^2=0.2337$, $P=0.192$)、TDS ($R^2=0.2856$, $P=0.1$)、Cond ($R^2=0.2508$, $P=0.147$)、TN ($R^2=0.3767$, $P=0.065$)、 NO_3^- -N ($R^2=0.6907$, $P=0.002$)、 NH_4^+ -N ($R^2=0.1834$, $P=0.308$) 与第一排序轴高度相关；第二排序轴解释了 13.35%， COD_{Mn} ($R^2=0.0113$, $P=0.962$)、TP ($R^2=0.0606$, $P=0.675$)、ORP ($R^2=0.2875$, $P=0.149$) 与第二排序轴高度相关。WT 和 NO_3^- -N 是影响 2022 年 7 月不同分层型水体浮游细菌 COG 功能变化的显著因素 ($P<0.05$)。

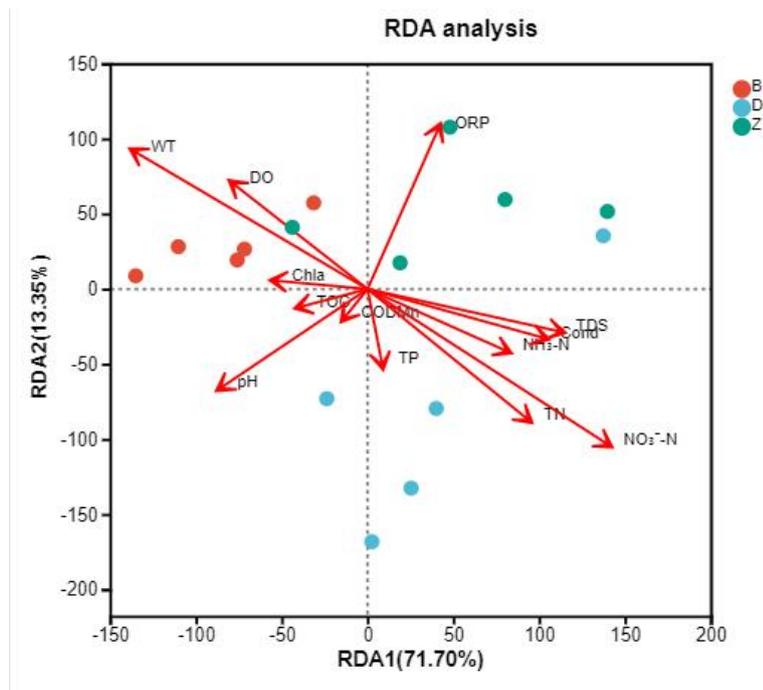


图 4-12 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 COG 功能与环境因子的冗余分析
Fig4-12 Redundancy analysis of COG function and environmental factors of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in July 2022

4.2.1.4 不同季节分层型水体物种与 COG 功能贡献度分析

2021 年 10 月物种与 COG 功能贡献度分析结果显示，总丰度排名前十的物种依次为变形菌门、放线菌门、浮霉菌门、疣微菌门、拟杆菌门、醋杆菌门、绿弯菌门、异常球菌-栖热菌门、蓝细菌门、unclassified_d_Bacteria 以及 others。总丰度排名前十的 COG 功能依次为功能未知，氨基酸转运代谢，能量生成和转换，复制、重组和修复，细胞壁/膜/被膜的生物合成，翻译、核糖体结构和生物合成，无机离子转运代谢，碳水化合物转运代谢，翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白，脂肪转运代谢。

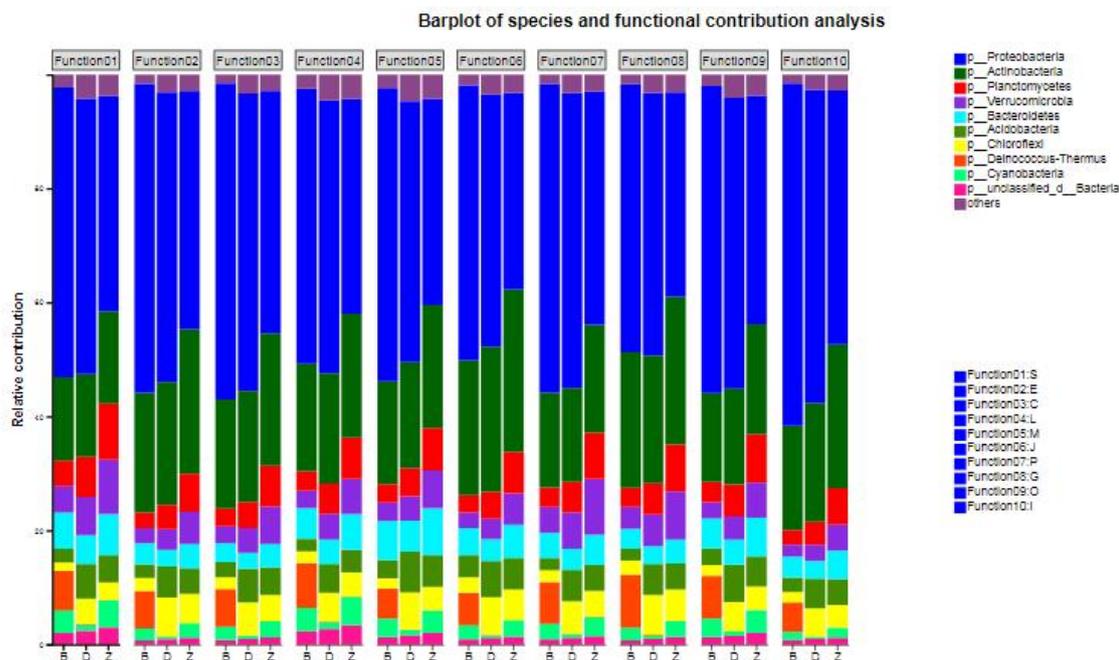


图 4-13 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌物种与 COG 功能贡献度分析

Fig4-13 Analysis of planktonic bacteria species and COG function contribution in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2021

总丰度排名前十的功能中，变形菌门的贡献度占比均最高，均呈现出表层占比最高、底层次之、中层最低的趋势。其中，在脂肪转运代谢功能中，表、底、中层水体中变形菌门贡献度占比为 60.02%、54.91%、44.56%；碳水化合物转运代谢功能中，在表、底、中层占比为 46.96%、46.03%、35.82%。总丰度排名前十的功能中，贡献度占比次之的物种为放线菌门，且贡献度均呈现出中层水体占比最高，表或底层水体次之的趋势；其中，在翻译、核糖体结构和生物合成功能中，中层水体中放线菌门贡献度占比 28.52%、表、底层占比为 23.66%、25.48%；在功能未知中，中层水体中占比为 16.13%、表、底层占比 14.57%、14.54%。浮霉菌门的贡献度均呈现出中层水体占比最高、底层次之、表层最低的趋势。疣微菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最

低、底层次之、中层最高的趋势。拟杆菌门的贡献度均呈现出中层水体占比最高、表层次之、底层最低的趋势。醋杆菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。绿弯菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。蓝细菌门的贡献度均呈现出表层水体占比次之、中层最高、底层最低的趋势。异常球菌-栖热菌门的贡献度在表层水体中占比最高，在中层和底层中较低。unclassified_d_Bacteria 的贡献度均呈现出表层水体占比最低、底层次之、中层最高的趋势。

2022年3月物种与COG功能贡献度分析结果显示，总丰度排名前十的物种依次为变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、疣微菌门、浮霉菌门、醋杆菌门、unclassified_d_Bacteria、蓝细菌门、硝化螺旋菌门以及 others。总丰度排名前十的COG功能依次为功能未知，氨基酸转运代谢，翻译、核糖体结构和生物合成，能量生成和转换，细胞壁/膜/被膜的生物合成，复制、重组和修复，碳水化合物转运代谢，无机离子转运代谢，翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白，脂肪转运代谢。

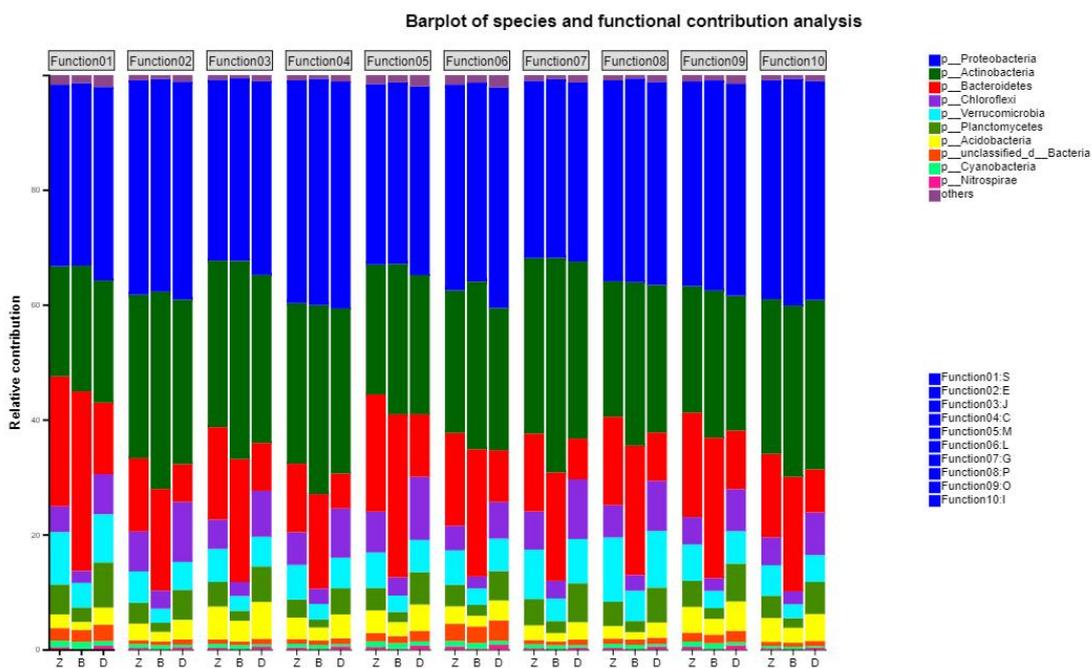


图 4-14 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌物种与 COG 功能贡献度分析
Fig4-14 Analysis of planktonic bacteria species and COG function contribution in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in March 2022

总丰度排名前十的功能中，变形菌门的贡献度占比均最高，且贡献度均呈现出底层水体占比最高，表层或中层次之的趋势。其中，在能量生成和转换功能中，底层水体中变形菌门贡献度占比 31.19%，表、中、底层占比为 31.11%、30.85%；在碳水化合物转运代谢功能中，底层水体占比为 39.51%，表、中层占比为 39.40%、38.78%。总丰度排名前十的功能中，贡献度占比次之的物种为放线菌门，且贡献度均呈现出表层水体占比最高，底层次之，中层最低的趋势。其中，在碳水化合物转运代谢功能中，表层水体中放线菌门贡献度占比 37.31%、底、中层占比 30.80%、30.54%；在功能未知中，表层水体占比 21.86%、底、中层占比为 21.26%、19.16%。拟杆菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最高、中层次之、底层最低的趋势。绿弯菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。疣微菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层最高、底层次之的趋势。浮霉菌门的贡献度均呈现出底层水体占比最高、中层次之、表层最低的趋势。醋杆菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层占比次之、底层占比最高的趋势。蓝细菌门的贡献度均呈现出表层与中层水体占比较高、底层最低的趋势。硝化螺旋菌门的贡献度在表层水体中最低，中层占比次之、底层占比最高的趋势。unclassified_d_Bacteria 的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层占比次之、底层占比最高的趋势。

2022 年 7 月物种与 COG 功能贡献度分析结果显示，总丰度排名前十的物种依次为变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、浮霉菌门、疣微菌门、绿弯菌门、醋杆菌门、蓝细菌门、硝化螺旋菌门、unclassified_d_Bacteria 以及 others。总丰度排名前十的 COG 功能依次为氨基酸转运代谢，翻译、核糖体结构和生物合成，细胞壁/膜/被膜的生物合成，功能预测，能量生成和转换，辅酶转运和代谢，碳水化合物转运代谢，复制、重组和修复，脂肪转运代谢，翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白。

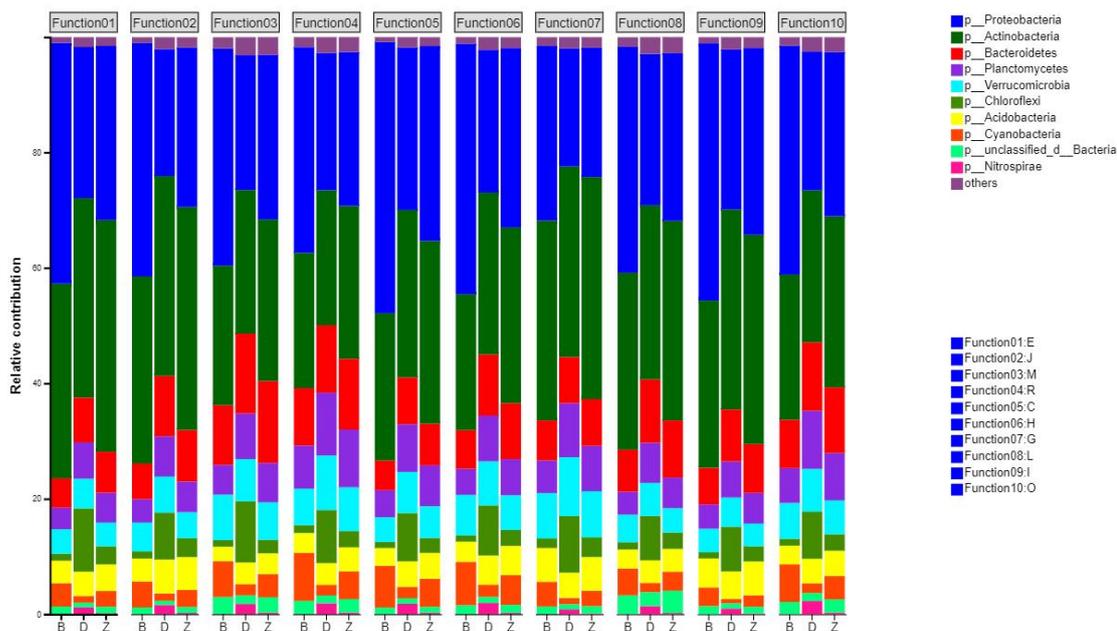


图 4-15 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌物种与 COG 功能贡献度分析
 Fig4-15 Analysis of planktonic bacteria species and COG function contribution in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in July 2022

总丰度排名前十的功能中，变形菌门的贡献度占比均最高，且贡献度均呈现出表层水体占比最高、中层次之、底层最低的趋势。其中，在能量生成和转换功能中，表层水体变形菌门贡献度占比 46.96%、中、底层占比为 33.74%、28.14%；在碳水化合物转运代谢功能中，表层水体占比 30.25%、中、底层占比为 22.41%、20.46%。总丰度排名前十的功能中，贡献度占比次之的物种为放线菌门，且贡献度均呈现出中层水体占比最高，表层或底层次之的趋势。其中，在氨基酸转运代谢功能中，中层水体中放线菌门贡献度占比 40.13%、表、底层占比为 33.72%、34.53%；在功能预测中，中层水体占比 26.48%、表、底层占比 23.43%、23.40%。拟杆菌门的贡献度均呈现出表层或中层水体占比较高，底层最低的趋势。浮霉菌门的贡献度均呈现出底层水体占比最高、中层次之、表层最低的趋势。疣微菌门的贡献度均呈现底层水体占比最高、中层或表层次之的趋势。绿弯菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。醋杆菌门的贡献度呈现出表层水体占比最低、中层和底层较高的趋势。蓝细菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最高、中层次之、底层最低的趋势。unclassified_d_Bacteria 的贡献度均呈现出中层水体占比最低、表层和底层较高的趋势。硝化螺旋菌门的贡献度在底层水体中最高，在中层和表层较低的趋势。

4.2.2 浮游细菌群落 KEGG 功能预测结果分析

4.2.2.1 不同季节分层型水体浮游细菌 KEGG 功能组成分析

KEGG pathway level 1 中共注释到六大类分别为有机系统 (Organismal Systems)、新陈代谢 (Metabolism)、人类疾病 (Human Diseases)、遗传信息处理 (Genetic Information Processing)、环境信息处理 (Environmental Information Processing)、细胞进程 (Cellular Processes)。

对丹江口水库不同分层型水体浮游细菌进行 KEGG 功能分析, 2021 年 10 月注释结果显示, 不同分层水体样品在 KEGG pathway level 1 功能水平上均包含六大类, 其中新陈代谢占比最高 (表、中和底层占比为 53.18%、53.76%、53.32%, 下同), 依次为遗传信息处理 (14.91%、15.93%、15.16%)、环境信息处理 (13.47%、12.12%、12.95%)、细胞进程 (9.78%、9.42%、9.90%)、人类疾病 (5.40%、5.50%、5.40%) 及有机系统 (3.27%、3.27%、3.27%)。

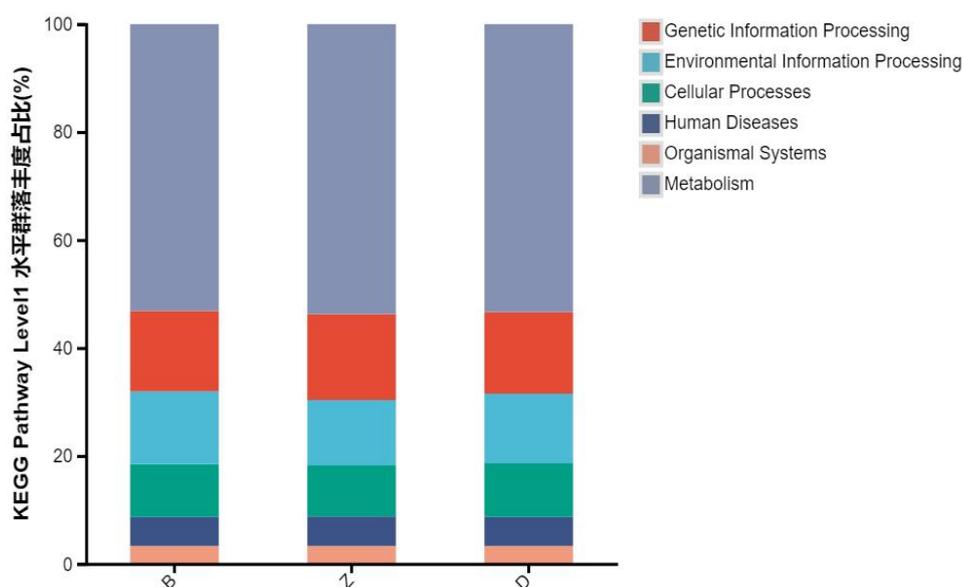


图 4-16 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌一级代谢通路组成分析

Fig4-16 Analysis of primary metabolic pathway composition of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2021

进一步对不同分层水体样品进行 KEGG Pathway level 2 功能水平分析, 了解在 Pathway level 1 层级下负责不同功能基因的丰度情况。结果显示: 新陈代谢基因可分为 12 类, 不同分层水体样本中含量最高的是全局和概览地图 (Global and overview maps), 在表、中和底层占比为 28.38%、28.61%和 28.42%; 排名靠前的依次为氨基

酸代谢 (Amino acid metabolism)、碳水化合物代谢 (Carbohydrate metabolism)、辅助因子和维生素代谢 (Metabolism of cofactors and vitamins)、能量代谢 (Energy metabolism)，这表明不同分层水体样品中大部分的基因都参与新陈代谢活动，来维持自身生命活动所需要的能量。遗传信息处理基因可分为 4 类，不同分层水体样本中含量最高的是 Translation (翻译)，在表、中和底层占比为 3.42%、3.69%和 3.49%；依次为复制和修复 (Replication and repair)、折叠、分类和降解 (Folding, sorting and degradation)，含量最低的为 Transcription (转录)。环境信息处理基因可分为 3 类，不同分层水体样本中含量最高的是膜运输 (Membrane transport)，在表、中和底层占比为 4.68%、3.99%和 4.29%；依次为信号转导 (Signal transduction)、信号分子和相互作用 (Signaling molecules and interaction)。细胞进程基因可分为 5 类，不同分层水体样本中含量最高的是细胞群落-原核生物 (Cellular community - prokaryotes)，在表、中和底层占比分别为 3.46%、3.21%和 3.36%；依次为细胞生长和死亡 (Cell growth and death)、细胞运动性 (Cell motility)、运输和分解代谢 (Transport and catabolism)，含量最低的为细胞群落-真核生物 (Cellular community - eukaryotes)。人类疾病可分为 12 类，不同分层水体样品中含量最高的是耐药性：抗菌 (Drug resistance: antimicrobial)，在表、中和底层占比分别为 1.02%、1.04%、1.04%；排名靠前的依次为传染病：细菌性 (Infectious disease: bacterial)、癌症：概述 (Cancer: overview)、内分泌和代谢疾病 (Endocrine and metabolic disease)、耐药性：抗肿瘤 (Drug resistance: antineoplastic)。有机系统可分为 10 类，不同分层水体样品中含量最高的是内分泌系统 (Endocrine system)，在表层、中层和底层的占比分别为 0.69%、0.68%、0.68%。排名靠前的依次为衰老 (Aging)、环境适应性 (Environmental adaptation)、免疫系统 (Immune system)、神经系统 (Nervous system)。

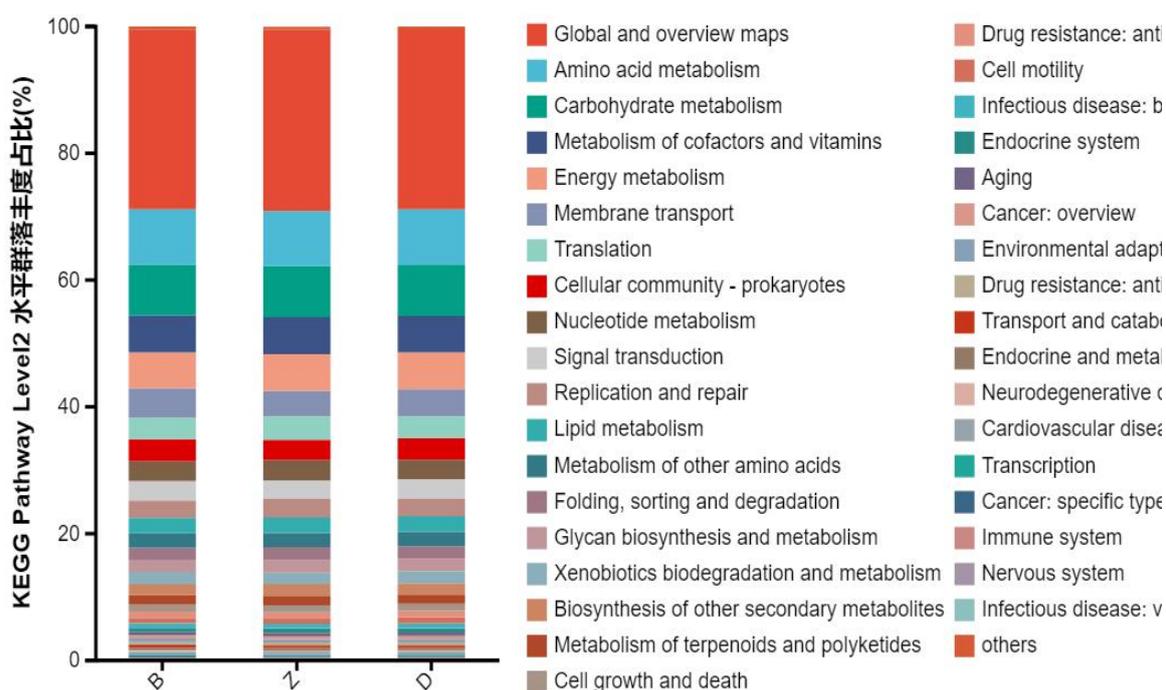


图 4-17 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌二级代谢通路组成分析

Fig4-17 Analysis of secondary metabolic pathway composition of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2021

进一步对不同分层水体样品进行 KEGG Pathway level 3 功能水平分析，了解不同功能基因的丰度情况。2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌群落中共发现 426 条三级代谢途径：表层、中层和底层共有的三级代谢途径为 415 条，仅表层和中层共有的 1 条是环境信息处理中的 ko04015 Rap1 signaling pathway，仅表层和底层共有的 1 条是有机系统中 ko04960 Aldosterone-regulated sodium reabsorption，仅中层和底层共有的 4 条分别是有机系统中 ko04664 Fc epsilon RI signaling pathway，新陈代谢中的 ko00905 Brassinosteroid biosynthesis、ko00331 Clavulanic acid biosynthesis、ko00073 Cutin, suberine and wax biosynthesis，底层特有的 5 条分别是人类疾病中的 ko05032 Morphine addiction，有机系统中的 ko04742 Taste transduction、ko04935 Growth hormone synthesis, secretion and action、ko04927 Cortisol synthesis and secretion、ko04962 Vasopressin-regulated water reabsorption。其中丰度最高的 25 条三级代谢途径为 ko01100 代谢途径（Metabolic pathways），ko01110 次生代谢物的生物合成（Biosynthesis of secondary metabolites），ko01120 不同环境中的微生物代谢（Microbial metabolism in diverse environments），ko01230 氨基酸的生物合成（Biosynthesis of amino

acids), ko01200 碳代谢(Carbon metabolism), ko02010 ABC 转运体(ABC transporters), ko02024 群体感应(Quorum sensing), ko02020 双组分系统(Two-component system), ko00230 嘌呤代谢(Purine metabolism), ko00190 氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation), ko03010 核糖体(Ribosome), ko00970 氨酰-tRNA 生物合成(Aminoacyl-tRNA biosynthesis), ko00630 乙醛酸和二羧酸代谢(Glyoxylate and dicarboxylate metabolism), ko00620 丙酮酸代谢(Pyruvate metabolism), ko00520 氨基糖和核苷酸糖代谢(Amino sugar and nucleotide sugar metabolism), ko00260 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(Glycine, serine and threonine metabolism), ko00240 嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism), ko00270 半胱氨酸和蛋氨酸代谢(Cysteine and methionine metabolism), ko00720 原核生物中的碳固定途径(Carbon fixation pathways in prokaryotes), ko00010 糖酵解/糖异生(Glycolysis / Gluconeogenesis), ko03440 同源重组(Homologous recombination), ko00250 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(Alanine, aspartate and glutamate metabolism), ko01210 2-氧代羧酸代谢(2-Oxocarboxylic acid metabolism), ko00020 柠檬酸循环(TCA 循环)(Citrate cycle (TCA cycle)), ko01212 脂肪酸代谢(Fatty acid metabolism)。

其中 ko02010 ABC 转运体 (ABC transporters) 和 ko02020 双组分系统 (Two-component system) 归为环境信息处理; ko02024 群体感应 (Quorum sensing) 归为细胞进程 (Cellular Processes); ko03010 核糖体 (Ribosome)、ko00970 氨酰-tRNA 生物合成 (Aminoacyl-tRNA biosynthesis) 和 ko03440 同源重组 (Homologous recombination) 归为遗传信息处理, 其余 19 条三级代谢途径均归为新陈代谢。

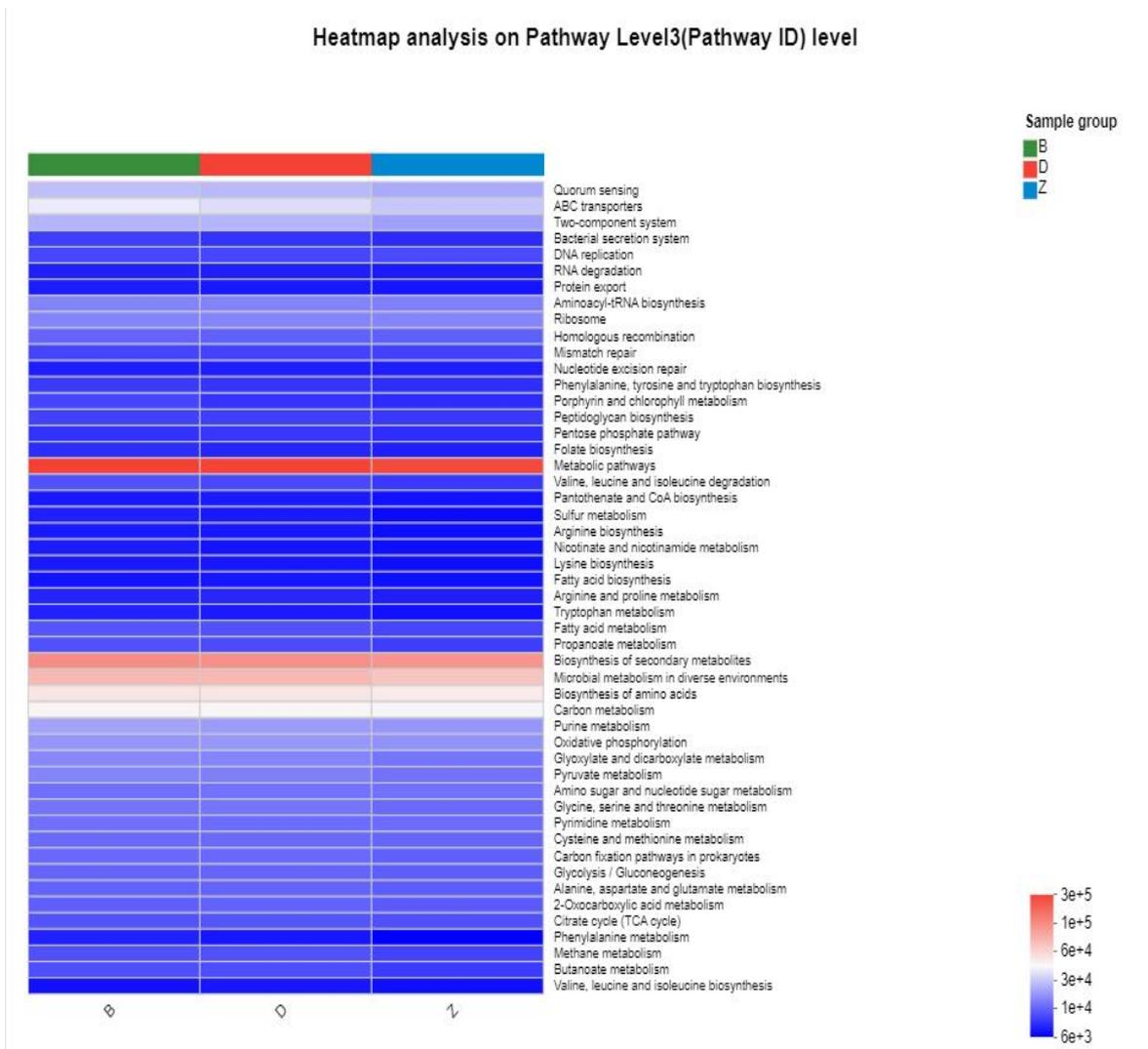


图 4-18 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌三级代谢通路组成分析

Fig4-18 Analysis of tertiary metabolic pathway composition of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2021

2022 年 3 月注释结果显示,不同分层水体样品在 KEGG pathway level 1 功能水平上均包含六个大类,其中新陈代谢占比最高(表、中和底层占比为 54.35%、54.36%、54.31%),依次为遗传信息处理(17.48%、17.15%、17.13%)、环境信息处理(11.25%、11.26%、11.15%)、细胞进程(8.17%、8.46%、8.58%)、人类疾病(5.53%、5.56%、5.58%)及有机系统(3.22%、3.22%、3.26%)。

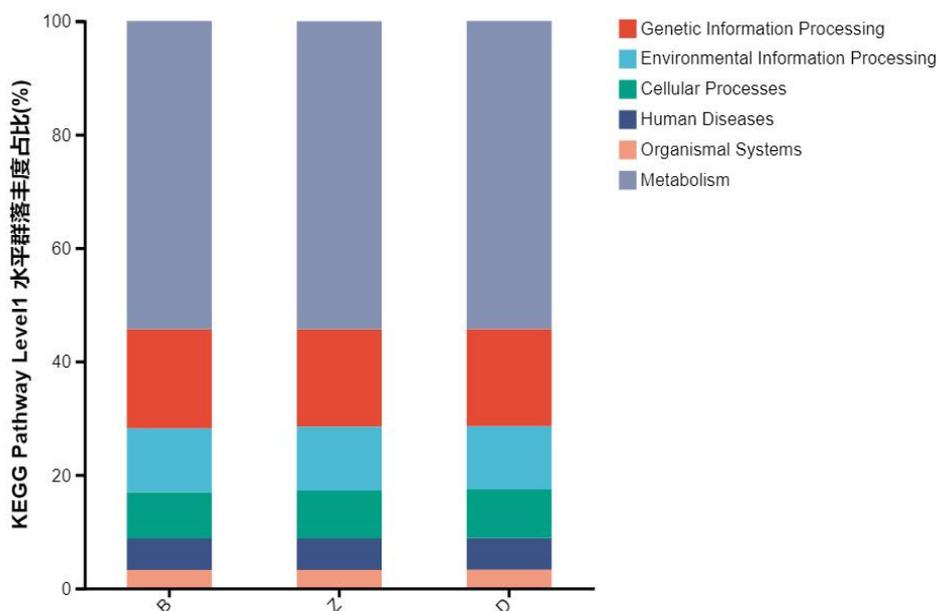


图 4-19 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌一级代谢通路组成分析
Fig4-19 Analysis of primary metabolic pathway composition of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in March 2022

进一步对不同分层水体样品进行 KEGG Pathway level 2 功能水平分析,了解在 Pathway level 1 层级下负责不同功能基因的丰度情况。结果显示:新陈代谢基因可分为 12 类,不同分层水体样本中含量最高的是全局和概览地图,在表、中和底层占比分别为 28.90%、28.88%、28.85%;排名靠前的依次为氨基酸代谢、碳水化合物代谢、辅助因子和维生素代谢、能量代谢,这表明不同分层水体样品中大部分的基因都参与新陈代谢活动,来维持自身生命活动所需要的能量。遗传信息处理基因可分为 4 类,不同分层水体样本中含量最高的是翻译,在表、中和底层占比分别为 4.28%、4.22%、4.17%;依次为复制和修复,折叠、分类和降解,含量最低的为转录。环境信息处理基因可分为 3 类,不同分层水体样本中含量最高的是膜运输,在表、中和底层占比分别为 3.80%、3.73%、3.67%;依次为信号转导、信号分子和相互作用。细胞进程基因可分为 5 类,不同分层水体样本中含量最高的是细胞群落-原核生物,在表、中和底

层占比分别为 2.69%、2.79%和 2.85%；依次为细胞生长和死亡，运输和分解代谢，细胞运动性，含量最低的为细胞群落-真核生物。人类疾病可分为 12 类，不同分层水体样品中含量最高的是耐药性：抗菌，在表层、中层和底层的占比分别为 1.03%、1.07%、1.06%；排名靠前的依次为传染病：细菌性，癌症：概述，内分泌和代谢疾病，耐药性：抗肿瘤。有机系统可分为 10 类，不同分层水体样品中含量最高的是内分泌系统，在表层、中层和底层的占比分别为 0.66%、0.66%、0.66%。排名靠前的依次为环境适应性，衰老，免疫系统，神经系统。

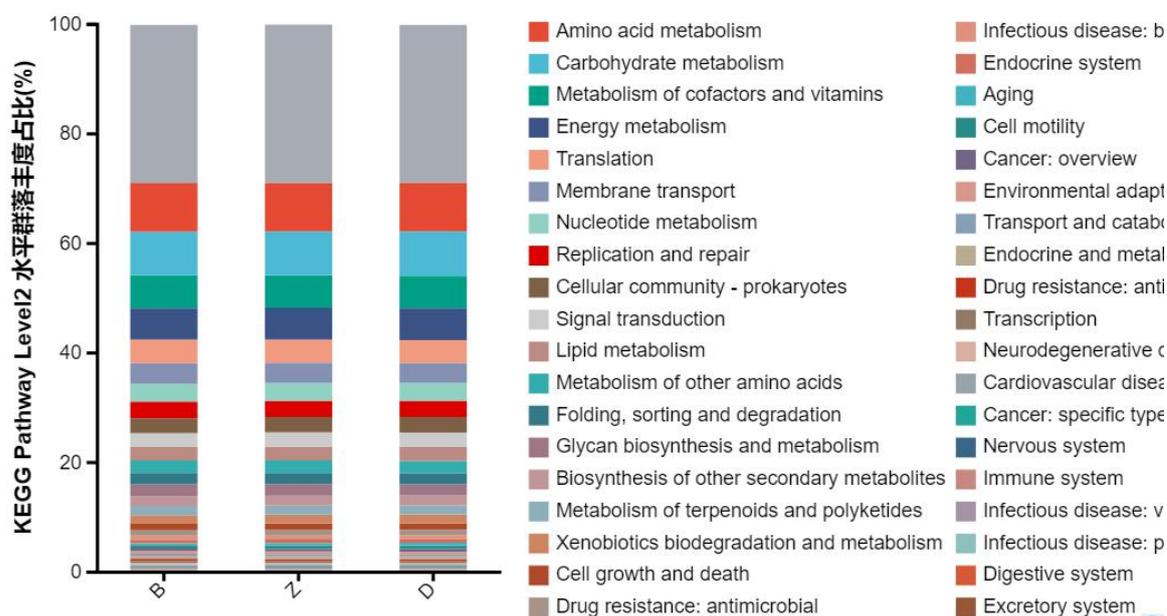


图 4-20 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌二级代谢通路组成分析

Fig4-20 Analysis of secondary metabolic pathway composition of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in March 2022

进一步对不同分层水体样品进行 KEGG Pathway level 3 功能水平分析，了解不同功能基因的丰度情况。2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌群落中共发现 420 条三级代谢途径：表、中和底层共有的三级代谢途径为 417 条，仅表层和中层共有的 1 条是有机系统中的 ko04961 Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption，仅中层和底层共有的 1 条是人类疾病中 ko05033 Nicotine addiction，表层特有的 1 条是新陈代谢中的 ko00999 Biosynthesis of various secondary metabolites - part1。其中丰度最高的 25 条三级代谢途径为 ko01100 代谢途径，ko01110 次生代谢物的生物合成，ko01120 不同环境中的微生物代谢，ko01230 氨基酸的生物合成，ko01200 碳代谢，ko02010 ABC 转运体，ko02024 群体感应，ko00190 氧化磷酸化，

ko03010 核糖体, ko00230 嘌呤代谢, ko00970 氨酰-tRNA 生物合成, ko02020 双组分系统, ko00520 氨基糖和核苷酸糖代谢, ko00240 嘧啶代谢, ko00630 乙醛酸和二羧酸代谢, ko00260 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, ko00620 丙酮酸代谢, ko00270 半胱氨酸和蛋氨酸代谢, ko00250 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, ko03440 同源重组, ko00720 原核生物中的碳固定途径, ko01210 2-氧代羧酸代谢, ko00010 糖酵解/糖异生, ko00020 柠檬酸循环 (TCA 循环), ko03030 DNA 复制。

其中 ko02010 ABC 转运体和 ko02020 双组分系统归为环境信息处理; ko02024 群体感应归为细胞进程; ko03010 核糖体、ko03030 DNA 复制、ko00970 氨酰-tRNA 生物合成和 ko03440 同源重组归为遗传信息处理, 其余 18 条三级代谢途径均归为新陈代谢。

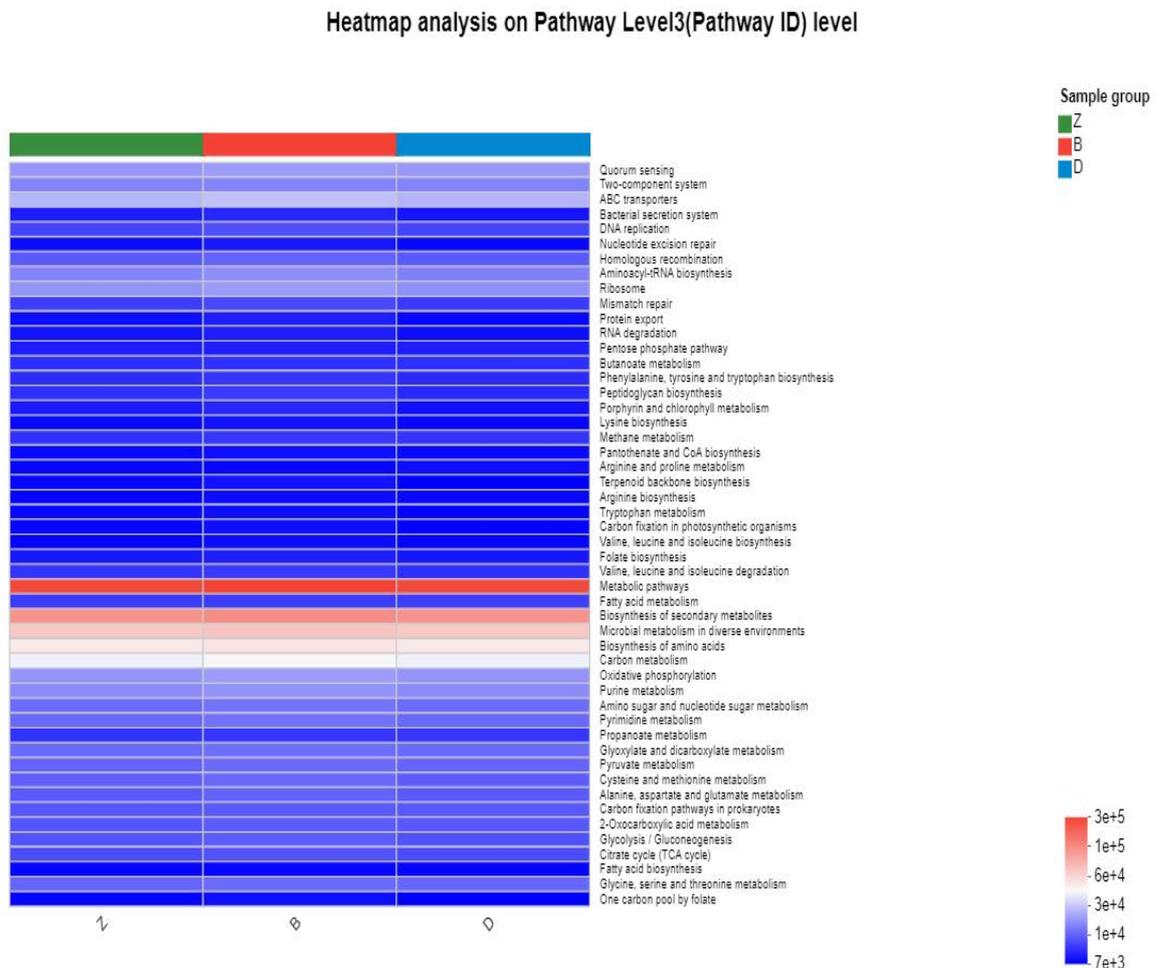


图 4-21 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌三级代谢通路组成分析

Fig4-21 Analysis of tertiary metabolic pathway composition of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in March 2022

2022 年 7 月注释结果显示,不同分层水体样品在 KEGG pathway level 1 功能水平上均包含六大类,其中新陈代谢占比最高(表、中、底层占比为 53.80%、53.43%、53.70%),依次为遗传信息处理(17.51%、17.46%、16.23%)、环境信息处理(11.08%、11.21%、11.51%)、细胞进程(8.69%、8.98%、9.69%)、人类疾病(5.57%、5.50%、5.34%)和有机系统(3.35%、3.42%、3.53%)。

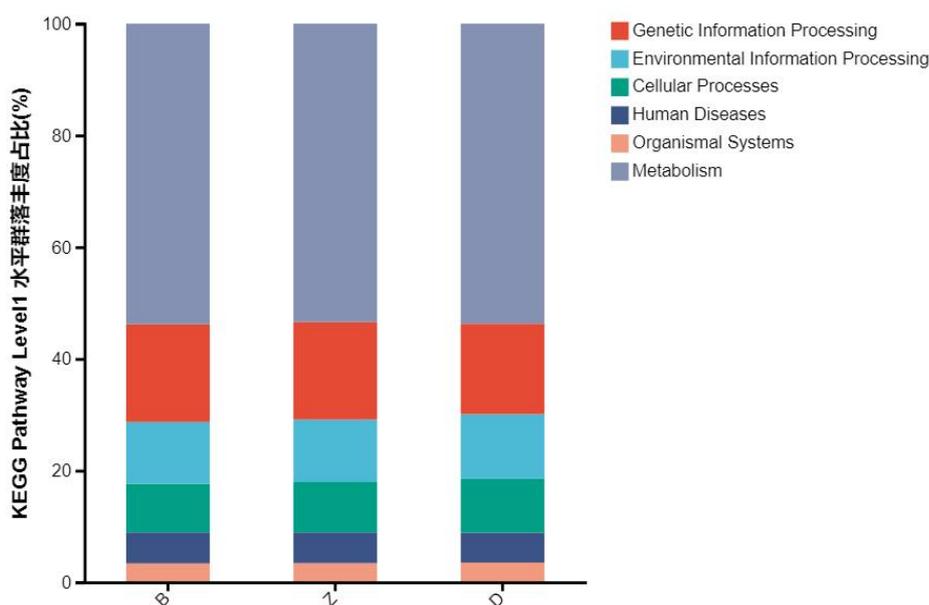


图 4-22 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌一级代谢通路组成分析

Fig4-22 Analysis of primary metabolic pathway composition of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in July 2022

进一步对不同分层水体样品进行 KEGG Pathway level 2 功能水平分析,了解在 Pathway level 1 层级下负责不同功能基因的丰度情况。结果显示:新陈代谢基因可分为 12 类,不同分层水体样本中含量最高的是全局和概览地图,在表、中和底层占比分别为 28.51%、28.41%和 28.40%;排名靠前的依次为氨基酸代谢、碳水化合物代谢、辅助因子和维生素代谢、能量代谢,这表明不同分层水体样品中大部分的基因都参与新陈代谢活动,来维持自身生命活动所需要的能量。遗传信息处理基因可分为 4 类,不同分层水体样本中含量最高的是翻译,在表、中和底层占比分别为 4.14%、4.06%和 3.86%;依次为复制和修复,折叠、分类和降解,含量最低的为转录。环境信息处理基因可分为 3 类,不同分层水体样本中含量最高的是膜运输,在表层、中层和底层占比分别为 3.63%、3.70%和 3.75%;依次为信号转导,信号分子和相互作用。细胞进程基因可分为 5 类,不同分层水体样本中含量最高的是细胞群落-原核生物,在表、

中和底层占比分别为 2.98%、3.09%和 3.32%；依次为细胞生长和死亡、细胞运动性、运输和分解代谢，含量最低的为细胞群落-真核生物。人类疾病可分为 12 类，不同分层水体样品中含量最高的是耐药性：抗菌，在表、中和底层占比分别为 1.02%、1.04%、1.04%；排名靠前的依次为传染病：细菌性，癌症：概述，心血管疾病（Cardiovascular disease）、内分泌和代谢疾病。有机系统可分为 10 类，不同分层水体样品中含量最高的是内分泌系统，在表、中和底层占比分别为 0.69%、0.68%、0.68%。排名靠前的依次为衰老、环境适应性、消化系统（Digestive system）、神经系统。

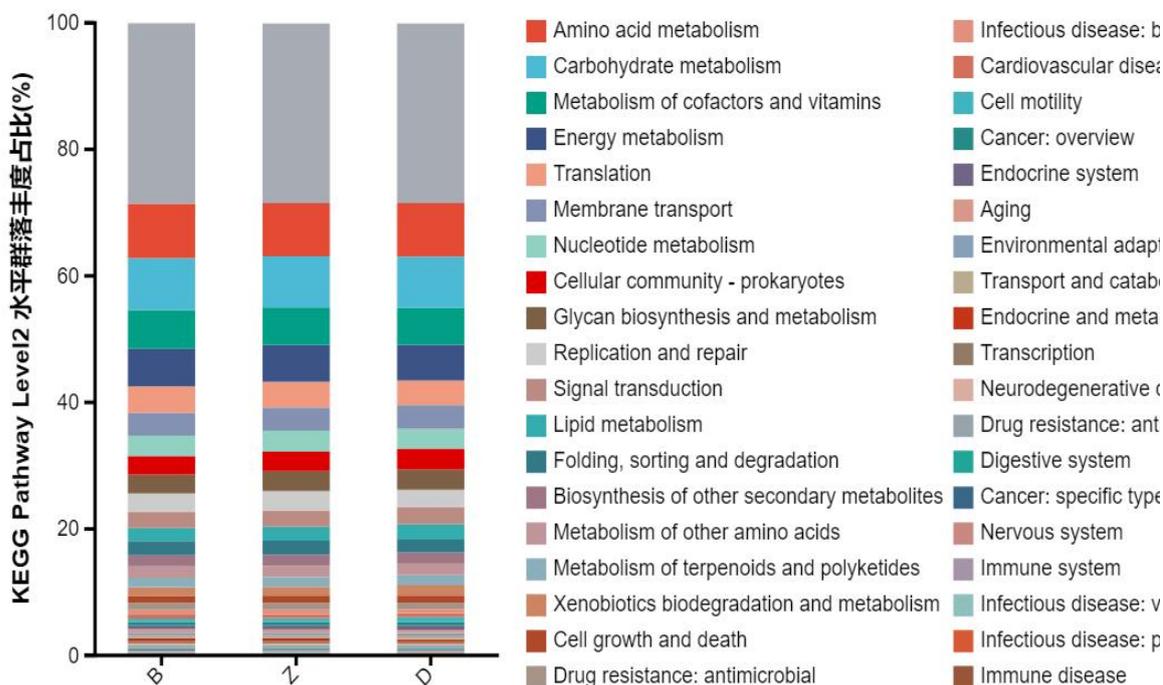


图 4-23 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌二级代谢通路组成分析

Fig4-23 Analysis of secondary metabolic pathway composition of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in July 2022

进一步对不同分层水体样品进行 KEGG Pathway level 3 功能水平分析，了解不同功能基因的丰度情况。2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌群落中共发现 428 条三级代谢途径：表层、中层和底层共有的三级代谢途径为 419 条，仅表层和中层共有的 2 条分别是有机系统中的 ko04742 Taste transduction 和人类疾病中的 ko05144 Malaria，仅中层和底层共有的 4 条分别是环境信息处理中 ko04015 Rap1 signaling pathway、人类疾病中的 ko05223 Non-small cell lung cancer、新陈代谢中的 ko00902 Monoterpenoid biosynthesis、有机系统中的 ko04640 Hematopoietic cell lineage，底层特有的 3 条分别是新陈代谢中的 ko00522 Biosynthesis of 12-, 14- and

16-membered macrolides、有机系统中的 ko04962 Vasopressin-regulated water reabsorption、有机系统中的 ko04744 Phototransduction。其中丰度最高的 25 条三级代谢途径为 ko01100 代谢途径，ko01110 次生代谢物的生物合成，ko01120 不同环境中的微生物代谢，ko01240 辅因子的生物合成，ko01230 氨基酸的生物合成，ko01200 碳代谢，ko02010 ABC 转运体，ko02024 群体感应，ko00190 氧化磷酸化，ko03010 核糖体，ko00230 嘌呤代谢，ko02020 双组分系统，ko00970 氨酰-tRNA 生物合成，ko00520 氨基糖和核苷酸糖代谢，ko00620 丙酮酸代谢，ko00260 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，ko00250 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，ko00270 半胱氨酸和蛋氨酸代谢，ko00010 糖酵解/糖异生，ko03440 同源重组，ko01210 2-氧代羧酸代谢，ko00720 原核生物中的碳固定途径，ko03030 DNA 复制，ko00020 柠檬酸循环（TCA 循环），ko03430 错配修复。

其中 ko02010 ABC 转运体和 ko02020 双组分系统归为环境信息处理；ko02024 群体感应归为细胞进程；ko03010 核糖体、ko03030 DNA 复制、ko03430 错配修复、ko00970 氨酰-tRNA 生物合成和 ko03440 同源重组归为遗传信息处理，其余 17 条三级代谢途径均归为新陈代谢。

Heatmap analysis on Pathway Level3(Pathway ID) level

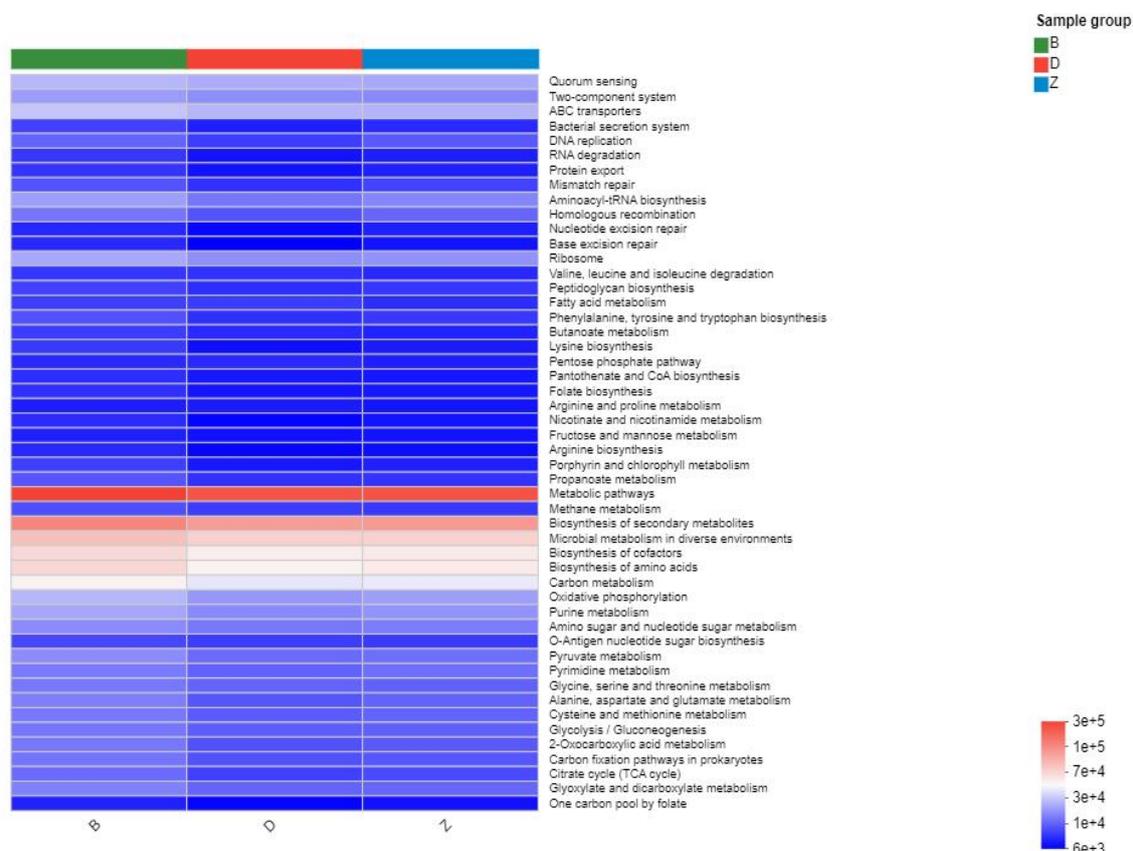


图 4-24 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌三级代谢通路组成分析
Fig4-24 Analysis of tertiary metabolic pathway composition of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in July 2022

4.2.2.2 不同季节分层型水体 KEGG 功能差异分析

在不同季节分层水体中，KEGG 功能有所差异。2021 年 10 月结果显示，在不同分层水体中存在显著性差异的功能为 ko01100 代谢途径，ko01110 次生代谢物的生物合成，ko01120 不同环境中的微生物代谢，ko02010 ABC 转运体，ko02024 群体感应，ko00190 氧化磷酸化，ko00970 氨酰-tRNA 生物合成，ko00520 氨基糖和核苷酸糖代谢，ko00720 原核生物中的碳固定途径，ko00250 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，ko00640 丙酸代谢（Propanoate metabolism），ko00650 丁酸代谢（Butanoate metabolism），ko03030 DNA 复制（DNA replication），ko00280 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解（Valine, leucine and isoleucine degradation）；在不同分层水体中存在极显著性差异的功能为 ko00630 乙醛酸和二羧酸代谢（Glyoxylate and dicarboxylate metabolism）。

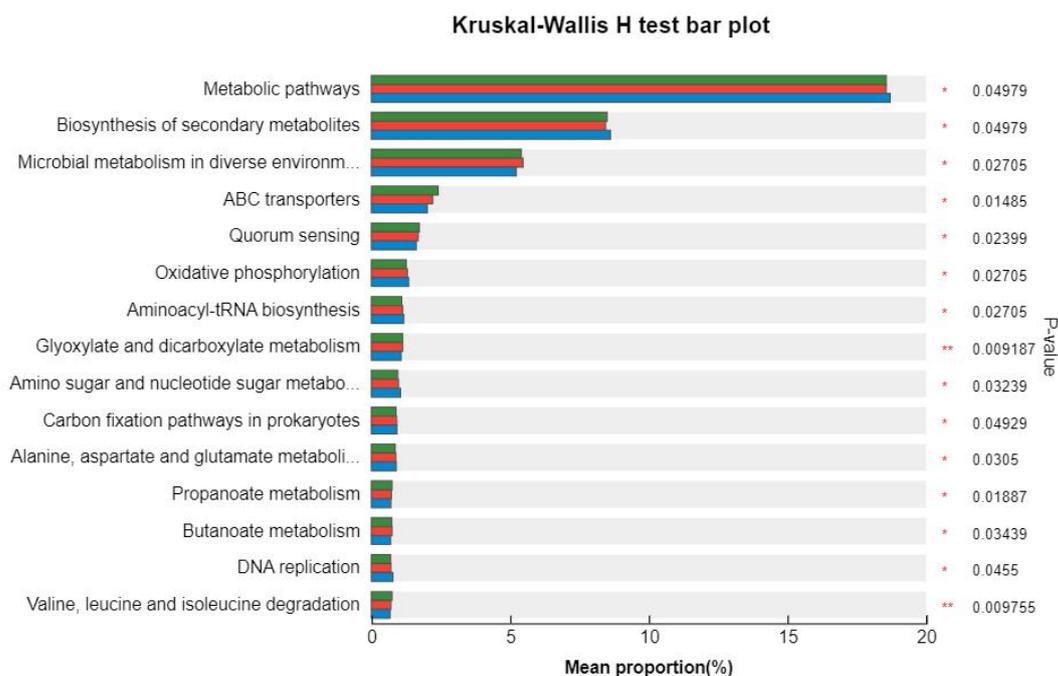


图 4-25 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 KEGG 功能差异分析

Fig4-25 Analysis of KEGG function difference of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2021

2022 年 3 月结果显示，在不同分层水体中存在显著性差异的功能为 ko01110 次生代谢物的生物合成，ko00640 丙酸代谢（Propanoate metabolism），ko00680 甲烷代谢（Methane metabolism），ko00550 肽聚糖的生物合成（Peptidoglycan biosynthesis），ko03070 细菌分泌系统（Bacterial secretion system），ko00860 卟啉与叶绿素代谢（Porphyrin and chlorophyll metabolism），ko03060 蛋白质输出（Protein export），ko00330 精氨酸和脯氨酸代谢（Arginine and proline metabolism），ko00900 萜类骨架生物合成（Terpenoid backbone biosynthesis），ko00061（脂肪酸的生物合成）Fatty acid biosynthesis，ko00760 烟酸和烟酰胺代谢（Nicotinate and nicotinamide metabolism），ko00130 泛醌及其它萜醌类化合物的生物合成（Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis），ko00983 药物新陈代谢-其他酶（Drug metabolism - other enzymes），ko01501 β -内酰胺抗药性 beta-Lactam resistance，ko00730 硫胺素代谢 Thiamine metabolism。

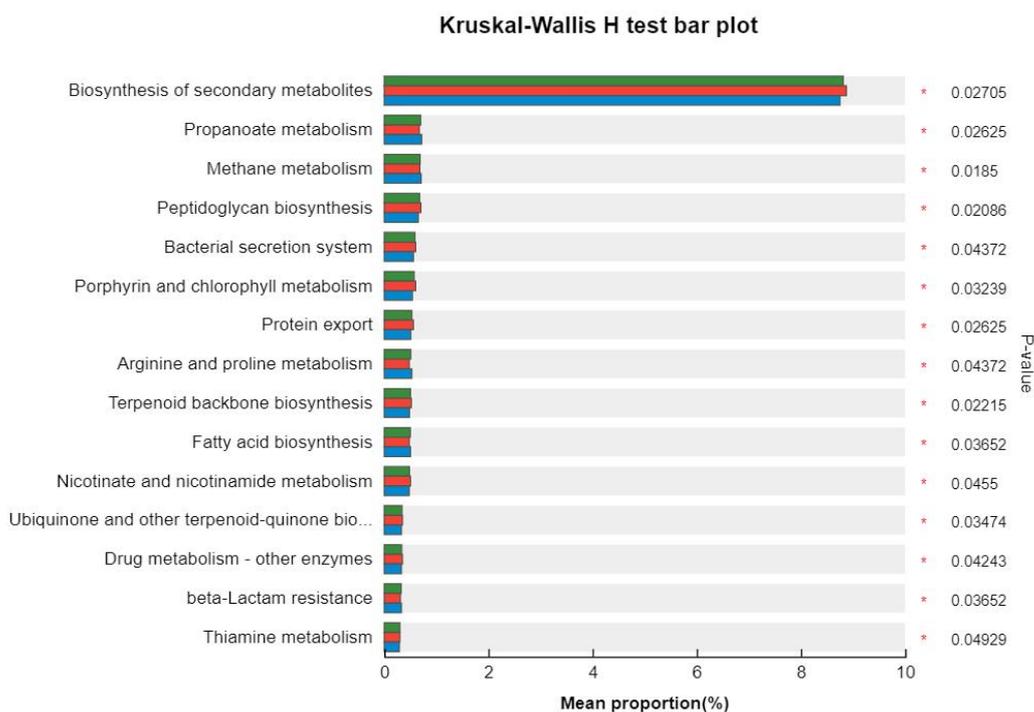


图 4-26 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 KEGG 功能差异分析
Fig4-26 Analysis of KEGG function difference of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in March 2022

2022 年 7 月结果显示，在不同分层水体中存在显著性差异的功能为 ko01200 碳代谢，ko02020 双组分系统，ko00970 氨酰-tRNA 生物合成，ko00520 氨基糖和核苷酸糖代谢，ko00240 嘧啶代谢；在不同分层水体中存在极显著性差异的功能为 ko01100 代谢途径，ko01110 次生代谢物的生物合成，ko01120 不同环境中的微生物代谢，ko01240 辅因子的生物合成（Biosynthesis of cofactors），ko01230 氨基酸的生物合成，ko02010 ABC 转运体，ko02024 群体感应，ko00190 氧化磷酸化，ko00230 嘌呤代谢，ko00620 丙酮酸代谢。

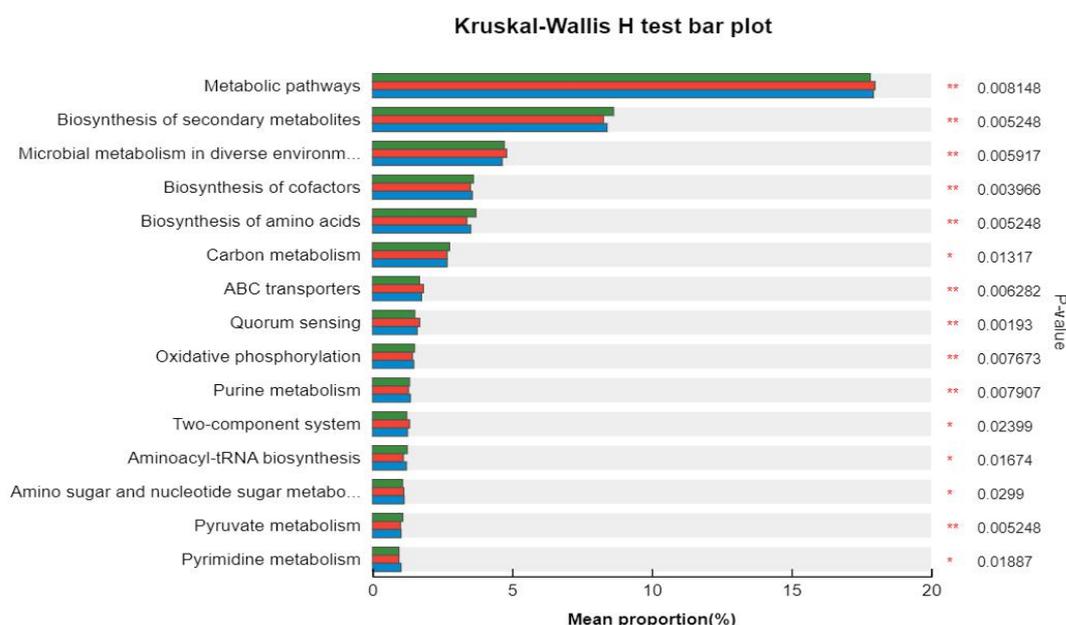


图 4-27 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌 KEGG 功能差异分析
 Fig4-27 Analysis of KEGG function difference of planktonic bacteria in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in July 2022

4.2.2.3 不同分层型水体浮游细菌 KEGG 功能与环境因子关联分析

将方差膨胀因子 (VIF) >10 的变量剔除后, 对不同分层型水体浮游细菌 KEGG Level 3 水平功能与水质理化指标进行 RDA 关联分析, 探究 KEGG 功能与每个环境因子变量之间的相关系数。

2021 年 10 月结果显示, 不同分层型水体中 KEGG 功能组成存在差异性: 表层水体样本主要聚集在图左下侧, 中层水体样本主要聚集在图右下侧, 底层水体样本主要聚集在图中部。Axis_lengths 中 DCA1 值为 0.148, 利用 RDA 进行后续分析。环境因子对浮游细菌 KEGG 功能变化的贡献率为 40.88%, 其中第一排序轴解释了 39.03%, WT ($R^2=0.133$, $P=0.418$)、Chla ($R^2=0.046$, $P=0.766$)、Cond ($R^2=0.020$, $P=0.881$)、ORP ($R^2=0.079$, $P=0.577$)、TDS ($R^2=0.164$, $P=0.333$)、TN ($R^2=0.005$, $P=0.962$)、COD_{Mn} ($R^2=0.042$, $P=0.736$) 与第一排序轴高度相关; 第二排序轴解释了 1.85%, TOC ($R^2=0.380$, $P=0.145$)、TP ($R^2=0.057$, $P=0.725$)、NO₃⁻-N ($R^2=0.056$, $P=0.718$)、NH₄⁺-N ($R^2=0.063$, $P=0.677$) 与第二排序轴高度相关。

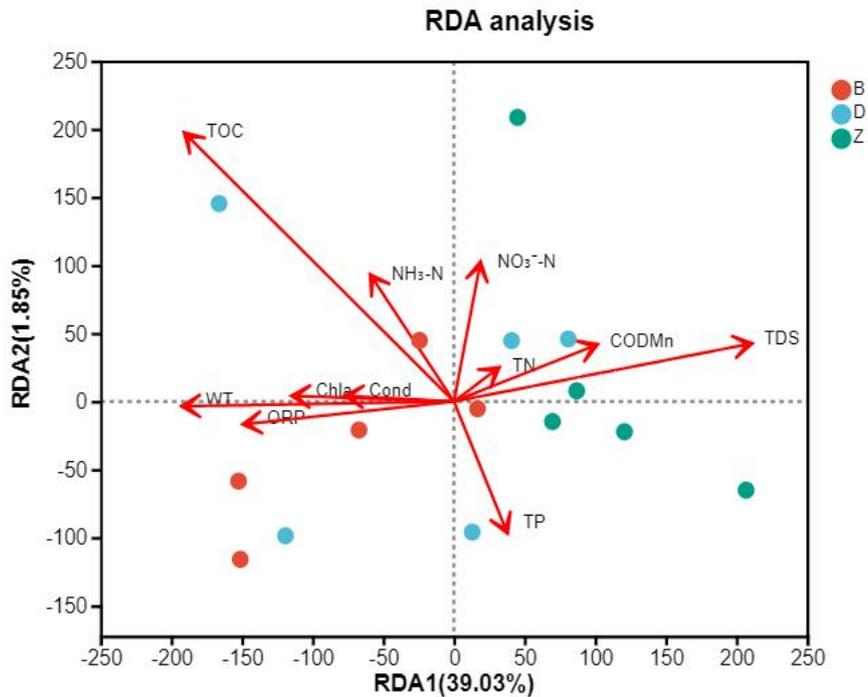


图 4-28 2021 年 10 月丹江口水库水体浮游细菌 KEGG 功能与环境因子关联分析
Fig4-28 Correlation analysis of planktonic bacteria KEGG function and environmental factors in Danjiangkou Reservoir in October 2021

2022年3月结果显示，不同分层型水体中KEGG功能组成存在差异性：表层水体样本主要聚集在图左上侧，中层水体样本主要聚集在图上部，底层水体样本主要聚集在右上侧。Axis_lengths中DCA1值为0.096，利用RDA进行后续分析。环境因子对浮游细菌KEGG功能变化的贡献率为72.65%，其中第一排序轴解释了71.77%，WT ($R^2=0.281$, $P=0.133$)、DO ($R^2=0.558$, $P=0.007$)、pH ($R^2=0.044$, $P=0.748$)、Chla ($R^2=0.333$, $P=0.084$)、 COD_{Mn} ($R^2=0.484$, $P=0.015$)、TOC ($R^2=0.099$, $P=0.537$)、TP ($R^2=0.026$, $P=0.853$)、ORP ($R^2=0.309$, $P=0.113$)与第一排序轴高度相关；第二排序轴解释了0.88%， NO_3^- -N ($R^2=0.049$, $P=0.712$)、 NH_4^+ -N ($R^2=0.115$, $P=0.454$)与第二排序轴高度相关。DO和 COD_{Mn} 是影响2022年3月不同分层型水体浮游细菌KEGG功能变化的显著因素 ($P<0.05$)。

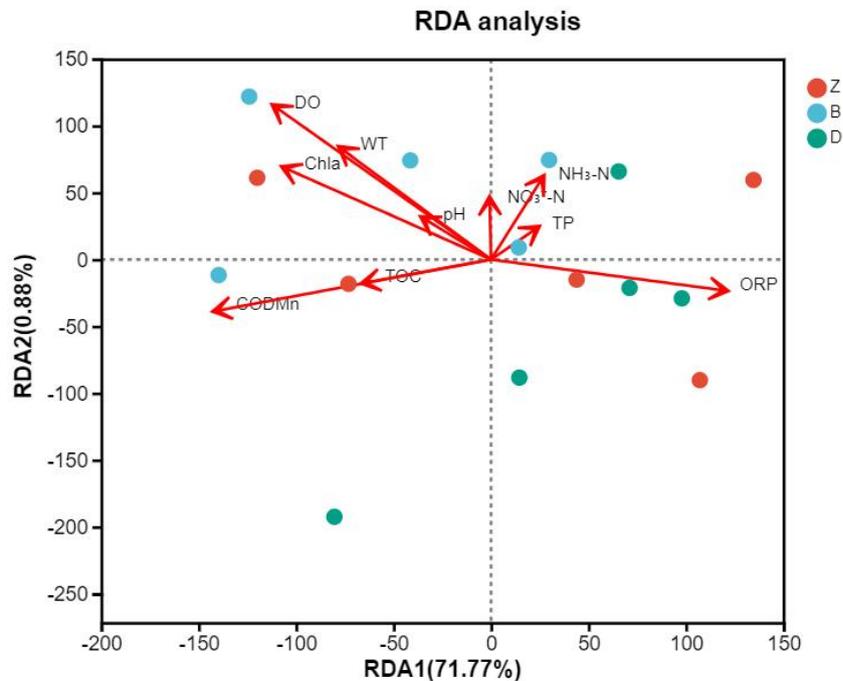


图 4-29 2022 年 3 月丹江口水库水体浮游细菌 KEGG 功能与环境因子关联分析
Fig4-29 Correlation analysis of planktonic bacteria KEGG function and environmental factors in Danjiangkou Reservoir in March 2022

2022年7月结果显示，不同分层型水体中KEGG功能组成存在差异性：表层水体样本主要聚集在图左上侧，中层水体样本主要聚集在图右上侧，底层水体样本主要聚集在右下侧。Axis_lengths中DCA1值为0.135，利用RDA进行后续分析。环境因子对浮游细菌KEGG功能变化的贡献率为86.73%，其中第一排序轴解释了85.89%，Chla ($R^2=0.080$, $P=0.631$)、pH ($R^2=0.263$, $P=0.156$)、TOC ($R^2=0.035$, $P=0.810$)、DO ($R^2=0.274$, $P=0.147$)、TN ($R^2=0.393$, $P=0.052$)、 NO_3^- -N ($R^2=0.652$, $P=0.005$)、 NH_4^+ -N ($R^2=0.184$, $P=0.276$)、与第一排序轴高度相关；第二排序轴解释了0.84%，TP ($R^2=0.047$, $P=0.763$)、Cond ($R^2=0.074$, $P=0.709$)、ORP ($R^2=0.279$, $P=0.136$)与第二排序轴高度相关。 NO_3^- -N是影响2022年7月不同分层型水体浮游细菌KEGG功能变化的显著因素 ($P<0.05$)。

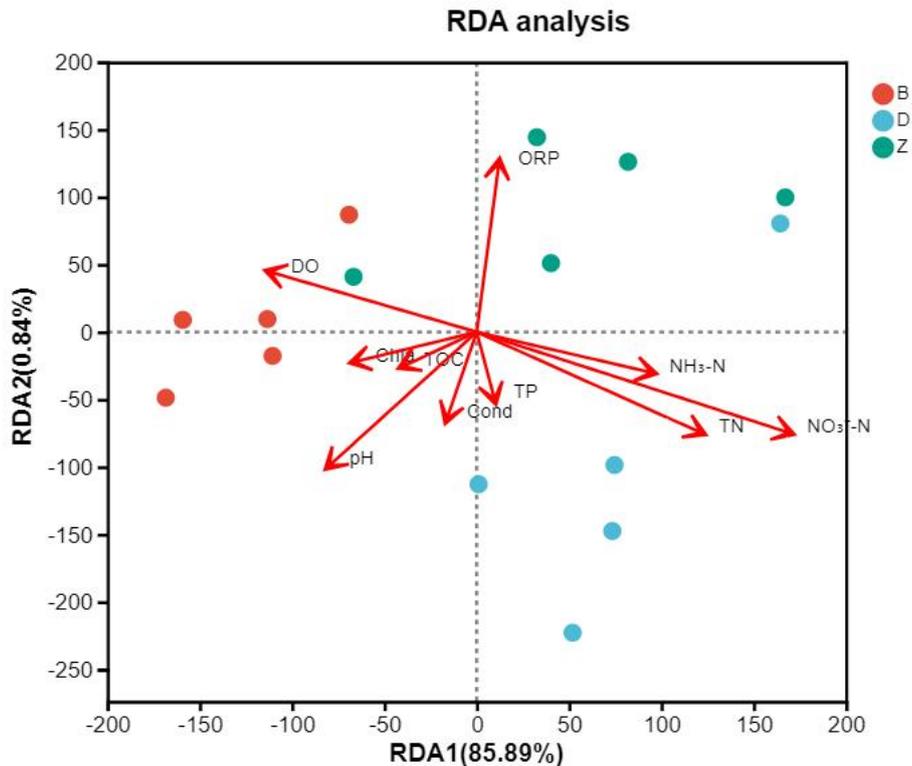


图 4-30 2022 年 7 月丹江口水库水体浮游细菌 KEGG 功能与环境因子关联分析
Fig4-30 Correlation analysis of planktonic bacteria KEGG function and environmental factors in Danjiangkou Reservoir in July 2022

4.2.2.4 不同季节分层型水体物种与 KEGG 功能贡献度分析

2021 年 10 月物种与 KEGG 功能贡献度分析结果显示,总丰度排名前十的物种依次为变形菌门、放线菌门、浮霉菌门、绿弯菌门、醋杆菌门、疣微菌门、拟杆菌门、异常球菌-栖热菌门、蓝细菌门、unclassified_d_Bacteria。在 KEGG Pathway level 2 功能水平下,总丰度排名前十的功能依次为: 新陈代谢中的全局和概览地图、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、辅助因子和维生素代谢、能量代谢,环境信息处理中的膜运输,遗传信息处理中的翻译,细胞进程中的细胞群落-原核生物,新陈代谢中的核苷酸代谢,环境信息处理中的信号转导。

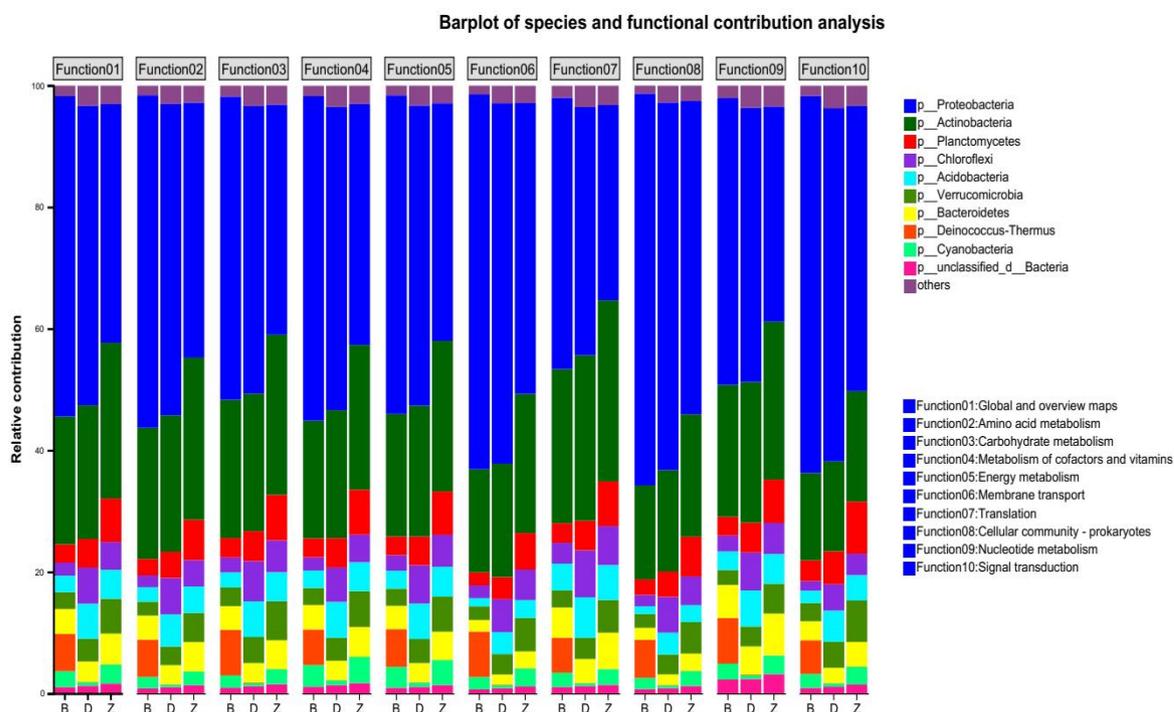


图 4-31 2021 年 10 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌物种与 KEGG 功能贡献度分析
Fig4-31 Analysis of planktonic bacteria species and KEGG function contribution in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in October 2021

总丰度排名前十的功能中,变形菌门的贡献度占比均最高,且贡献度均呈现出表层水体占比最高、底层次之、中层最低的趋势。其中,在细胞群落-原核生物功能中,变形菌门在表、中和底层水体中贡献度占比为 64.44%、51.52%、60.46%;在翻译功能中,表、中和底层占比为 44.62%、32.12%、40.82%。贡献度占比次之的物种为放线菌门,且均呈现出表层水体占比最低、底层占比次之、中层占比最高的趋势。其中,在翻译功能中,放线菌门在表、中和底层水体中贡献度占比为 25.36%、29.77%、

27.22%；在信号转导功能中，表、中和底层占比为 14.38%、18.15%、14.79%。浮霉菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、底层次之、中层最高的趋势。绿弯菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。醋杆菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。疣微菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、底层次之、中层最高的趋势。拟杆菌门的贡献度均呈现出中层水体占比最低、表层次之、底层最高的趋势。异常球菌-栖热菌门的贡献度在表层水体中最高，在中层和底层中较低。蓝细菌门的贡献度均呈现出底层水体占比最低、表层次之、中层最高的趋势。unclassified_d_Bacteria 的贡献度均呈现出表层水体占比最低、底层次之、中层最高的趋势。

2022年3月物种与KEGG功能贡献度分析结果显示，总丰度排名前十的物种依次为变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、疣微菌门、浮霉菌门、醋杆菌门、unclassified_d_Bacteria、蓝细菌门、硝化螺旋菌门。在KEGG Pathway level 2功能水平下，总丰度排名前十的功能依次为：新陈代谢中的全局和概览地图、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、辅助因子和维生素代谢、能量代谢，遗传信息处理中的翻译，环境信息处理中的膜运输，新陈代谢中的核苷酸代谢，遗传信息处理中的复制和修复，细胞进程中的细胞群落-原核生物。

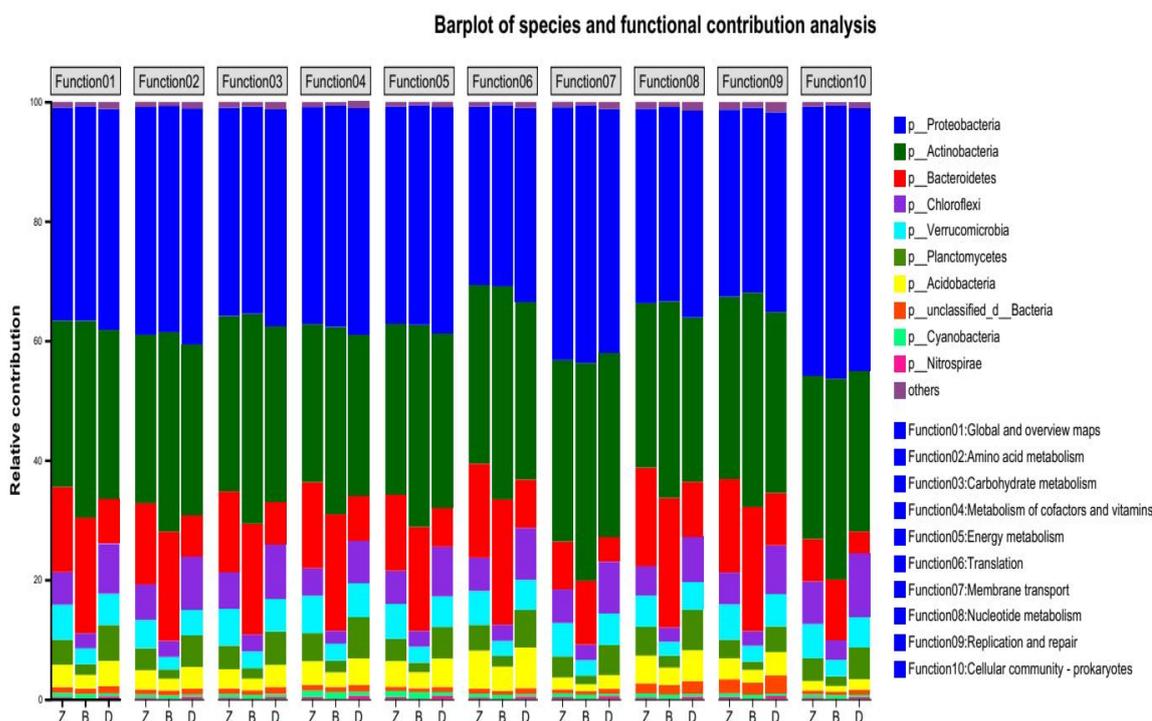


图 4-32 2022 年 3 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌物种与 KEGG 功能贡献度分析
Fig4-32 Analysis of planktonic bacteria species and KEGG function contribution in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in March 2022

总丰度排名前十的功能中，除了在翻译功能的中层水体中变形菌门和放线菌门的贡献度占比之和为 59.79%，其余均超过 60%。在膜运输功能中，表层水体中变形菌门和放线菌门贡献度占比之和为 79.51%、中层水体中二者贡献度占比之和为 72.67%、底层水体中二者贡献度占比之和为 71.52%。在翻译功能中，表层水体中变形菌门和放线菌门贡献度占比之和为 66.01%、中层水体中二者贡献度占比之和为 59.79%、底层水体中二者贡献度占比之和为 62.18%。总丰度排名前十的功能中，拟杆菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最高、中层水体次之、底层水体最低的趋势，在核苷酸代

谢功能中,拟杆菌门在表、中、底层水体中贡献度占比 21.69%、16.50%、9.24%。在细胞群落-原核生物功能中,拟杆菌门在表、中、底层水体中贡献度占比 10.16%、7.1%、3.67%。绿弯菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。疣微菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层最高、底层次之的趋势。浮霉菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。醋杆菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。unclassified_d_Bacteria 的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。蓝细菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最高、中层次之、底层最低的趋势。硝化螺旋菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。

2022 年 7 月物种与 KEGG 功能贡献度分析结果显示，总丰度排名前十的物种依次为放线菌门、变形菌门、拟杆菌门、浮霉菌门、疣微菌门、醋杆菌门、绿弯菌门、蓝细菌门、unclassified_d_Bacteria、硝化螺旋菌门。在 KEGG Pathway level 2 功能水平下，总丰度排名前十的功能依次为：新陈代谢中的全局和概览地图、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、辅助因子和维生素代谢、能量代谢，遗传信息处理中的翻译，环境信息处理中的膜运输，新陈代谢中的核苷酸代谢，细胞进程中的细胞群落-原核生物，新陈代谢中的聚糖生物合成与代谢。

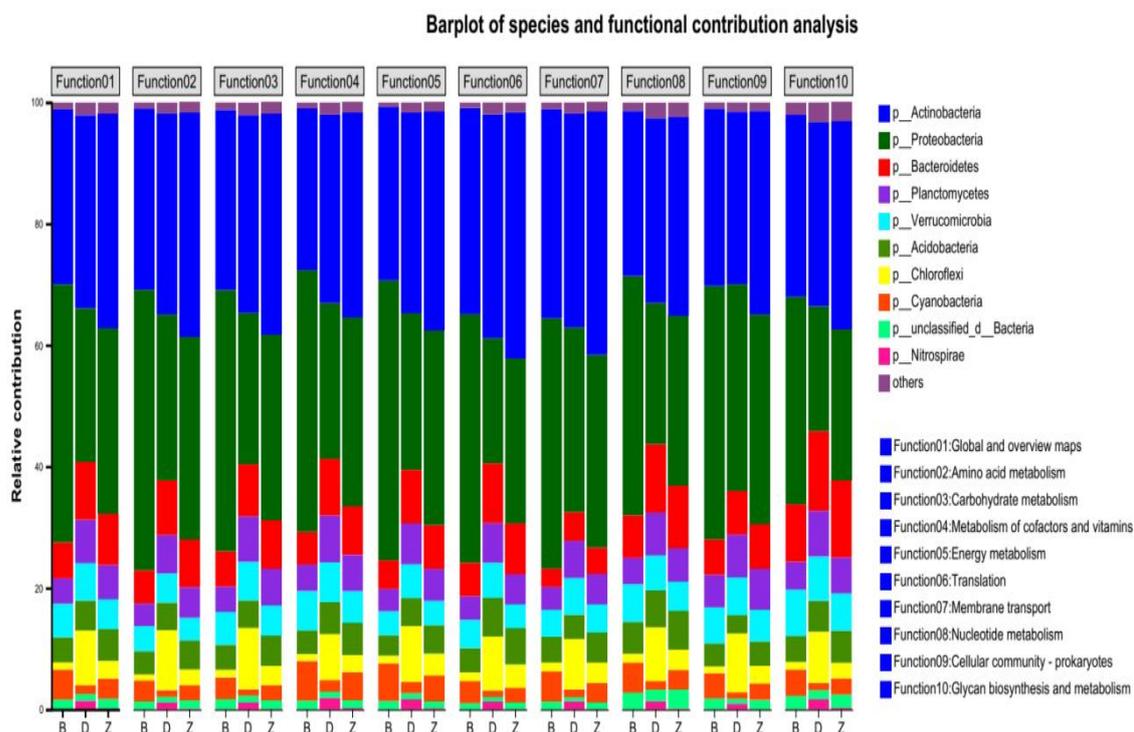


图 4-33 2022 年 7 月丹江口水库不同分层水体浮游细菌物种与 KEGG 功能贡献度分析
Fig4-33 Analysis of planktonic bacteria species and KEGG function contribution in different stratified water bodies of Danjiangkou Reservoir in July 2022

总丰度排名前十的功能中，放线菌门的贡献度占比均最高，且呈现出表层水体占比最低、底层次之、中层最高的趋势。其中，在翻译功能中，放线菌门在表、中和底层水体贡献度占比 33.94%、40.54%、36.86%；在辅助因子和维生素代谢功能中，表、中和底层占比为 26.66%、33.72%、31.05%。贡献度占比次之的物种为变形菌门，且均呈现出表层水体占比最高、中层次之、底层最高的趋势。其中，在氨基酸代谢功能中，变形菌门在表、中和底层水体贡献度占比为 46.21%、33.25%、27.31%；聚糖生物合成与代谢功能中，变形菌门在表、中和底层水体贡献度占比为 34.17%、24.86%、

20.55%。拟杆菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。浮霉菌门的贡献度基本呈现出中层水体占比最低、表层次之、底层最高的趋势。疣微菌门的贡献度基本呈现出中层水体占比最低、表层次之、底层最高的趋势。醋杆菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、底层次之、中层最高的趋势。绿弯菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层次之、底层最高的趋势。蓝细菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最高、中层次之、底层最低的趋势。unclassified_d_Bacteria 的贡献度均呈现出表层水体占比最高、中层次之、底层最低的趋势。硝化螺旋菌门的贡献度均呈现出表层水体占比最低、中层占比次之、底层占比最高的趋势。

4.2.3 浮游细菌群落氮磷循环基因功能预测结果分析

4.2.3.1 分层型水体浮游细菌氮磷循环功能基因组成与差异

本研究选取 2022 年 3 月不同生态点位分层型水体样本，采用宏基因组技术重点分析氮磷循环相关基因的表达情况，以期揭示丹江口水库浮游细菌垂直分布状况及其驱动因素，为丹江口水库水环境保护提供参考依据。

丹江口水库不同深度浮游细菌主要参与氮循环生物固氮过程 (nitrogen fixation)，以及生物脱氮过程中的硝化作用 (nitrification)、反硝化作用 (denitrification)、异化硝酸盐还原作用 (dissimilatory nitrogen reduction, DNRA)、同化硝酸盐还原作用 (assimilatory nitrogen reduction, ANRA)、氮转运 (nitrogen transport) 和有机氮代谢 (organic N metabolism) 7 个主要途径，涉及 *gltB*、*glnA*、*gltD*、*gdhA*、*NRT*、*ureC*、*narG/nxrA*、*nirB*、*nasA*、*nrtA*、*nrtC*、*nrtB* 等 39 个氮循环功能基因。宏基因组数据中筛选到的氮循环标记基因集，基于绝对丰度数据使用 z-score 进行丰度标准化处理。聚类分析主要分为 3 大类，表层样品的 QS-B、HJZ-B、TZS-B 和底层样品的 QS-D 聚集为一类，底层样品的 HJZ-D、TZS-D 和 KX-D 聚集为一类，其余样品聚为一类。从热图可知，表层样品 QS-B、HJZ-B、TZS-B 和底层样品 QS-D、HJZ-D、TZS-D、KX-D 基因丰度高于另外一大组，整体趋势为表层和底层氮循环功能基因丰度高于中层样品。其中表层样品 QS-B、HJZ-B、TZS-B 在有机氮代谢中 *gltB*、*gltD*、*gdhA*、*gdhB*、*glnA*、*ureB*、*ureC*、*ureA*，同化硝酸盐还原作用中 *nasA*、*nasB*，异化硝酸盐还原作用 *nirB*、*nirD* 基因丰度高于其他样品，硝化作用 *pmoA-amoA*、*pmoB-amoB*、*pmoC-amoC*、*hao* 基因丰度低于其他样品。底层样品 QS-D、HJZ-D、TZS-D、KX-D 在硝化作用中 *pmoA-amoA*、*pmoB-amoB*、*pmoC-amoC*、*hao*，反硝化作用中 *nirS*、*nirK*、*norB*、*norC*、*nosZ*、*narG/nxrA* 等，氮转运中 *NRT*、*nrtA*、*nrtB*、*nrtC*、*nrtD* 基因丰度高于中层样品，其中 QS-D 样品生物固氮过程中 *nifD*、*nifH*、*nifK*，反硝化作用 *nirS*、*norB*、*norC*、*nosZ*、*narG/nxrA*、*narH/nxrB*、*narI*、*napB*、*napC* 基因丰度为所有样品中最高；HJZ-D 样品硝化作用 *pmoA-amoA*、*pmoB-amoB*、*pmoC-amoC*、*hao*，反硝化作用 *nirK* 基因丰度为所有样品中最高。以上结果表明不同深度是影响氮循环功能基因组成和丰度的主要因素，表层和底层氮循环功能基因组成有所差异，整体丰度高于中层样品。

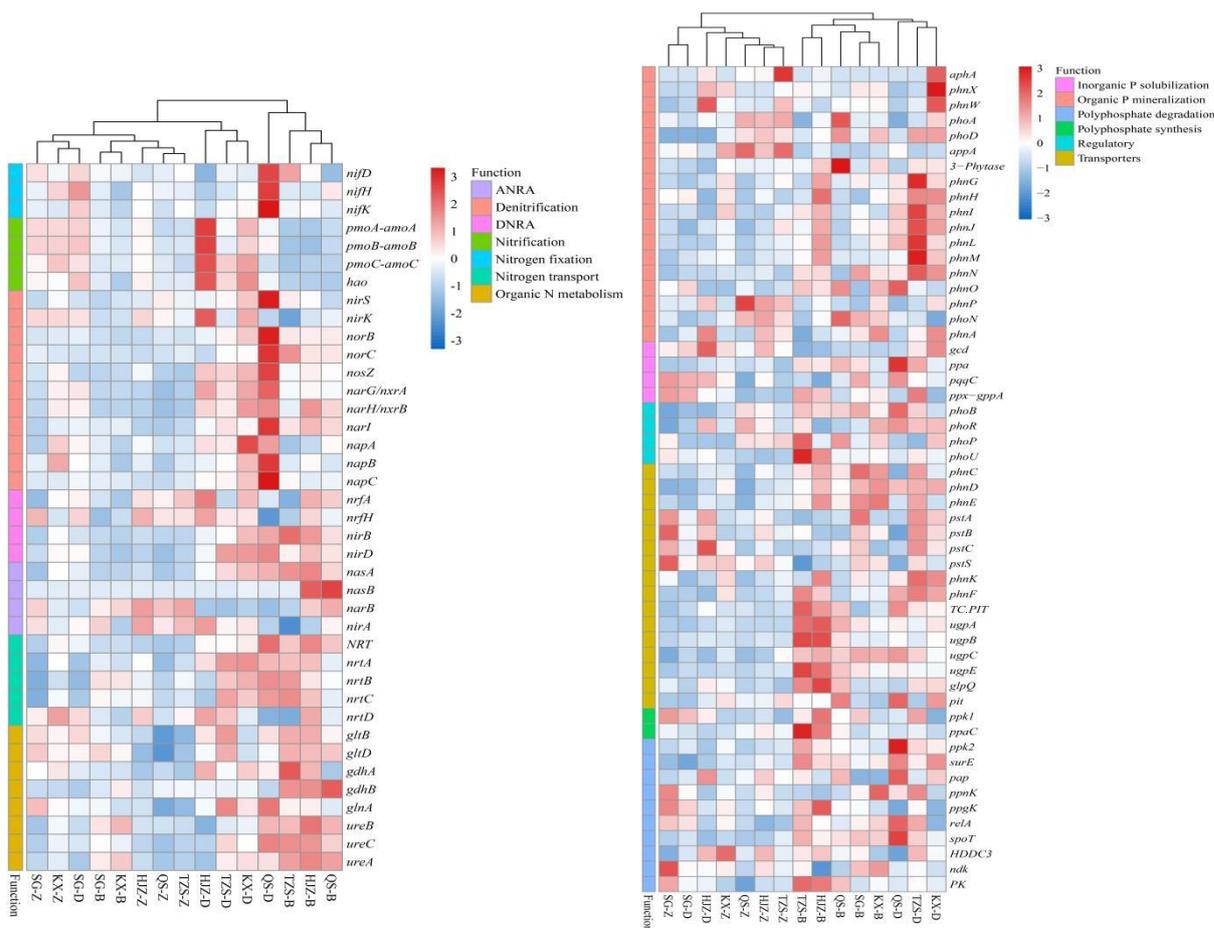


图 4-35 不同样品氮(a)、磷(b)循环功能基因 Heatmap 图

Fig.4-35 Heatmap showing the predicted functional genes related to the nitrogen (a) and phosphorus (b) cycles in bacterioplankton sample.

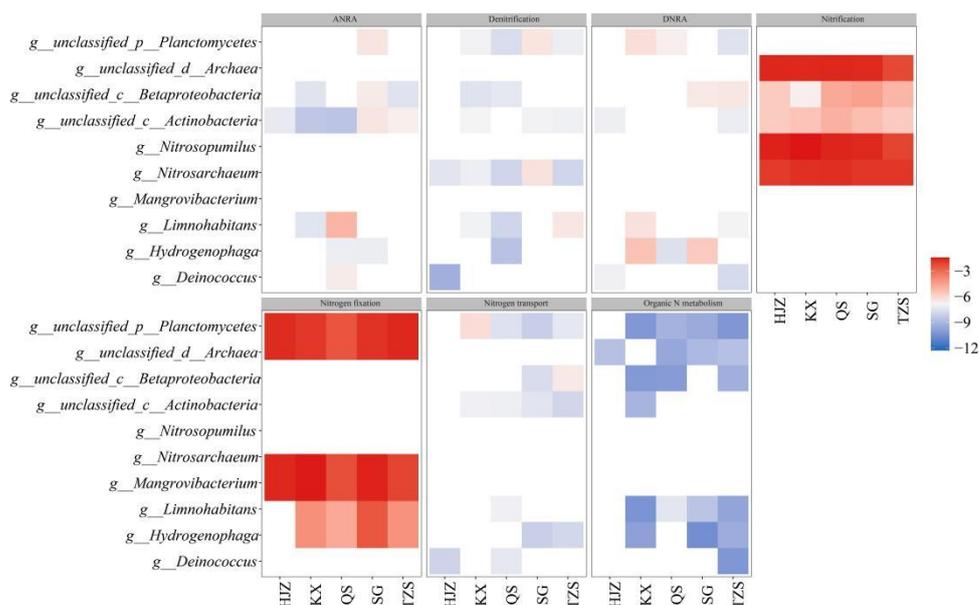
丹江口水库不同深度浮游细菌主要参与磷循环有机磷矿化（Organic P mineralization）、无机磷溶解（Inorganic P solubilization）、调节（Regulatory）、转运（Transporters）、多聚磷酸盐合成（Polyphosphate synthesis）、多聚磷酸盐降解（Polyphosphate degradation）等 6 个主要途径，涉及 *pstS*、*ppx-gppA*、*glpQ*、*ppk1*、*ppnK*、*relA*、*PK*、*pstA*、*pstC*、*pstB*、*phoU* 等 54 个磷循环功能基因。聚类分析结果与氮循环结果类似，聚集为 3 大类，底层样品 QS-D、TZS-D、KX-D 聚集为一类，表层样品 QS-B、TZS-B、HJZ-B、KX-B、SG-B 聚集为一类，其余样品聚为一类。从热图可知，表层所有样品和底层样品 QS-D、TZS-D、KX-D 基因丰度高于另外一大组，整体趋势为表层和底层磷循环功能基因丰度高于中层样品。其中底层样品 QS-D、TZS-D、KX-D 在有机磷矿化中 *phnG*、*phnH*、*phnI*、*phnJ*、*phnL*、*phnM*、*phnN*，转运中 *phnK*、*phnF*，多聚磷酸盐降解中 *ppk2*、*surE*、*pap* 基因丰度高于其他样品。表层样品在有机磷矿化中 *phnG*、*phnH*、*phnI*、*phnJ*、*phnL*、*phnM*、*phnN*、*phnO*，转

运中 *phnC*、*phnD*、*phnE*、*phnF*、*TC.PIT*、*ugpA*、*ugpB*、*ugpC*、*ugpE*、*glpQ*，调节中 *phoB*，多聚磷酸盐降解中 *ppk2*、*surE*、*relA*、*spoT* 基因丰度高于中层样品。以上结果表明不同深度是影响磷循环功能基因组成和丰度的主要因素，表层和底层磷循环功能基因组成有所差异，整体丰度高于中层样品。

4.2.3.2 与氮、磷循环相关的关键细菌物种组成

物种与氮、磷循环功能贡献度分析结果如图所示。在属水平上共筛选出奇异球菌属 (*Deinococcus*)、嗜氢菌属 (*Hydrogenophaga*)、*Limnohabitans*、*Nitrosarchaeum*、亚硝化侏儒菌属 (*Nitrosopumilus*) 等 10 种主要功能菌群在氮循环过程中贡献比例高。其中 *Nitrosarchaeum*、亚硝化侏儒菌属完全参与硝化作用；*Nitrosarchaeum*、红树林杆菌属 (*Mangrovibacterium*) 完全参与固氮过程，嗜氢菌属 (*Hydrogenophaga*)、*Limnohabitans* 参与除黑鸡嘴样点外的固氮过程；*Nitrosarchaeum* 完全参与反硝化作用；*Limnohabitans*、嗜氢菌属、奇异球菌属参与部分样点的固氮过程、异化硝酸盐还原作用、同化硝酸盐还原作用、氮转运和有机氮代谢。

在属水平上共筛选出 *Limnohabitans*、奇异球菌属 (*Deinococcus*)、棍状杆菌属 (*Clavibacter*) 等 10 种主要功能菌群在磷循环过程中贡献比例高。其中棍状杆菌属完全参与无机磷溶解、多聚磷酸盐降解、转运等磷代谢过程，*Limnohabitans* 参与除黑鸡嘴位点外的有机磷矿化、无机磷溶解等磷代谢过程，奇异球菌属参与黑鸡嘴样点多聚磷酸盐合成、多聚磷酸盐降解、转运等磷代谢过程。



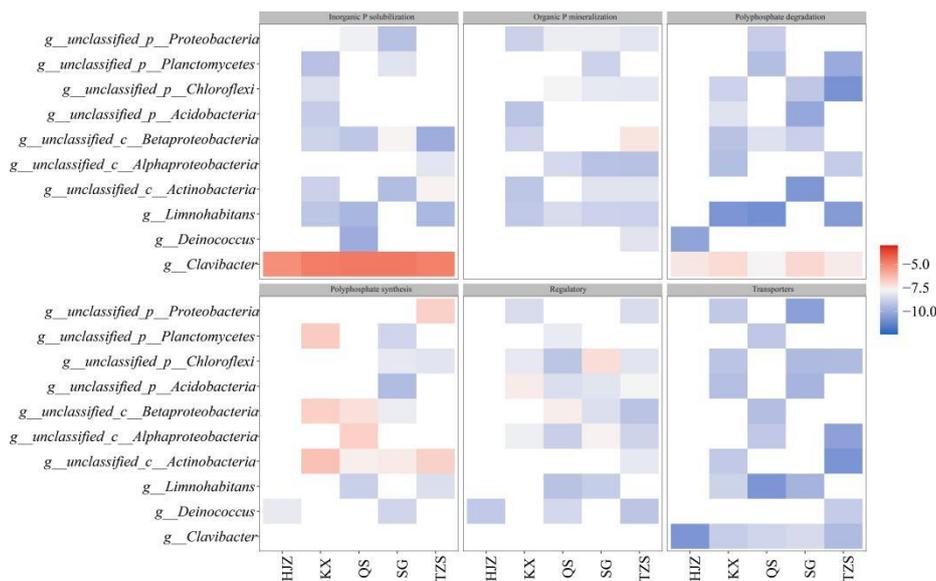


图 4-36 物种与氮(a)、磷(b)循环功能贡献度分析

Fig.4-36 Contribution of core functional microbes to the nitrogen (a) and phosphorus (b) cycle

4.2.3.3 氮磷循环功能基因驱动因素分析

将氮循环功能基因与水质理化指标进行相关性分析，结果如图所示。硝化作用 *pmoA-amoA*、*pmoB-amoB*、*pmoC-amoC*、*hao* 主要与 TDS、EC 呈显著正相关，与 pH、温度和 Chl a 呈显著负相关。反硝化作用 *narG/nxrA*、*napA*、*napB* 与 TDS、EC 呈显著正相关。温度、Chl a 与 *ureB*、*ureA* 显著正相关，与 *napA* 显著负相关。DO 与 *nifH*、*nirK*、*nrfH* 呈显著正相关，与 *napC*、*nrtB*、*nrtC*、*ureC*、*ureA* 呈显著负相关。TN、NO₃⁻-N 与 *nirA* 显著正相关，NH₄⁺-N 与 *pmoA-amoA*、*pmoC-amoC* 显著负相关。

磷循环功能基因与水质理化指标相关性分析结果如图所示，有机磷矿化中 *3-Phytase* 与 pH、温度显著正相关，*phnH* 与 COD_{Mn} 显著负相关，*phnJ* 与 NH₄⁺-N，*phnO* 与 pH 均显著正相关，DO 与 *phnI*、*hnJ*、*phnL*、*phnM*、*phnN* 显著负相关的同时，与 *appA* 显著正相关。无机磷溶解中 *gcd*、*pqqC* 与 pH、温度显著负相关的同时，与 TDS、EC 显著正相关。调节循环中 *phoP* 与 TDS、EC、COD_{Cr} 显著负相关。转运循环中 Chla、温度、pH、NH₄⁺-N、COD_{Cr} 与 *phnC*、*phnE*、*pstC*、*phnK*、*TC.PIT*、*ugpE* 等呈显著正相关，DO 与 *phnC*、*phnD*、*phnE*、*phnF*、*ugpA*、*ugpB*、*ugpC*、*ugpE* 均显著负相关。多聚磷酸盐合成中 *ppaC* 与 Chl a、温度显著正相关，与 TDS、EC 显著负相关。多聚磷酸盐降解中 *ppgK*、*spoT* 与 COD_{Cr}、pH 显著正相关，*ppk2*、*surE*、*pap*、*ppnK*、*spoT*、*HDDC3* 与 TOC、温度、PO₄³⁻-P、DO 显著负相关。

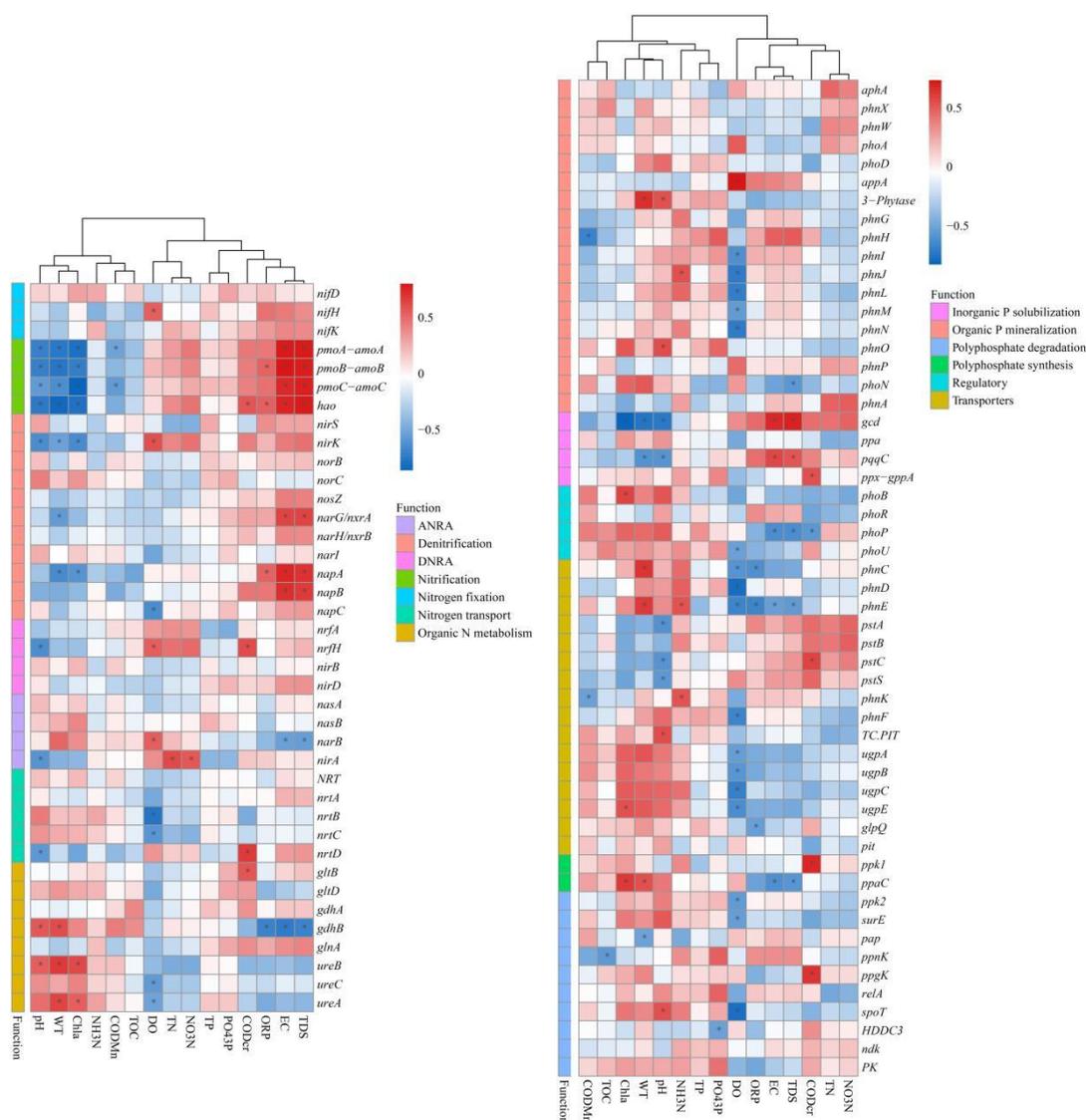


图 4-37 氮(a)、磷(b)循环功能基因与环境因子相关性分析热图

Fig.4-37 Heat map of Spearman correlation analysis of nitrogen (a) and phosphorus (b) cycle genes and physicochemical parameters.

4.3 讨论

本实验探索丹江口水库浮游细菌群落组成和功能基因信息对深入揭示环境因子对微生物的复杂影响具有极其重要意义,但利用宏基因组学技术对不同分层型水体浮游细菌群落的功能注释、基因预测、代谢通路等研究甚少。应用功能性分析对不同环境条件下的微生物进行初步探索,有利于研究其作用及代谢机制^[16,17,68-71]。目前有大量的研究采用 PICRUSt 技术进行菌群预测分析, Verma 等^[72]对深海沉积物细菌群落进行研究,结果表明深海沉积物细菌功能主要包括代谢、环境信息处理、细胞进程等重要功能; Dang 等^[73]采用结合荧光 PCR 技术以及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的丰度和分布;董志颖等^[74]采用 PICRUSt 技术预测分析过量的氮输入在一定程度上影响了氮循环中的关键基因。相比于其他组学,宏基因组学利用高通量测序技术对水体中浮游细菌功能预测更加方便且准确性更高。

4.3.1 浮游细菌群落 COG 功能不同季节分层变化

COG 功能注释结果显示不同季节丹江口水库分层型水体中均存在新陈代谢、未知功能、细胞过程和信号传导及信息贮存和处理四大类功能。由于采样时间、采样点位和水体深度的不同而有所区别,2021 年 10 月与 2022 年 3 月四大类功能占比接近,2022 年 7 月未知功能在表、中、底层水体占比明显下降,其余三大功能占比均显著提高。进一步细化 COG 注释结果可以分成 26 个功能组,2021 年 10 月、2022 年 3 月和 7 月分别注释到 20 个、23 个和 25 个,表现出功能基因的多样性与丰富性,与吕锡斌等^[75]对赤水河流域浮游细菌功能预测结果相似。其中,氨基酸转运代谢,细胞壁/膜/被膜的生物合成,碳水化合物转运代谢,脂肪转运代谢,翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白,翻译、核糖体结构和生物合成呈现出夏季明显高于春秋的趋势;复制、重组和修复呈现出夏季明显低于春秋的趋势。结果反映出在不同时期丹江口水库浮游细菌功能基因存在明显变化,Cleary 等^[76]采用高通量测序技术对印度尼西亚的 Spermonde 群岛周边海水和沉积物中细菌群落进行研究,通过 PICRUSt 功能预测分析发现不同样品的细菌群落功能上存在较大差异。所以丹江口水库浮游细菌功能基因在不同季节、不同采样点位以及不同水体深度的变化可能与水体样本中的浮游细菌群落结构有关。

不同季节分层型水体中为 COG 功能参与贡献度较大的物种均为变形菌门及放线

菌门。变形菌门、放线菌门和蓝藻门在物质转化、水体净化、水质修复以及抗药性机制等领域发挥着重要的作用^[77-78]，这些细菌群落在夏秋季表层水体中占比较大，意味着夏秋季多种有机化合物在表层水体的滞留时间变长促进其生长繁殖，夏、秋季表层水体中氮营养盐相对含量较低或许是这些浮游细菌大量存在的效果，与郑施展等^[79]研究浙闽沿海生态牧场技术示范区浮游细菌群落和功能的时空变化结论相类似。不同季节分层型水体中 COG 功能有所差异，既与每个季节理化性质变化有关又与三次采样浮游细菌优势类群结构发生变化有关，这与林立安^[18]研究结论相一致。不同分层型水体浮游细菌 COG 功能与环境因子关联分析显示，2021 年 10 月汛期大量降水削弱了环境因子对不同分层型水体 COG 功能变化的影响，无显著影响因素；2022 年 3 月 TDS、COD_{Mn} 和 Cond，2022 年 7 月 WT 和 NO₃⁻-N 是影响不同分层型水体浮游细菌 COG 功能变化的显著因素（P<0.05）。

4.3.2 浮游细菌群落 KEGG 功能不同季节分层变化

KEGG 注释分析结果表明，丹江口水库不同季节分层型水体样本中 pathway level 1 均获得 6 条代谢通路，pathway level 2 均获得 46 条代谢途径，pathway level 3 在 2021 年 10 月、2022 年 3 月和 7 月发现各季节表、中和底层水体中共有的分别为 415 条、417 条、419 条。共有的代谢途径表现出不同季节分层型水体其代谢途径的多样性与丰富性，特有的代谢途径表现出其代谢途径的特异性，这与林立安^[18]研究结论相一致。在一级代谢途径中，不同分层型水体样品中超过 53% 的基因都参与新陈代谢活动来维持自身生命活动所需要的能量，呈现出春季明显高于夏秋季的趋势。二级代谢途径中对丹江口水库水体浮游细菌群落致病程度及对生物体系统影响进行了预测，结果显示不同季节水样中耐药性：抗菌及传染病：细菌性平均丰度较高，这表明丹江口水库水体环境中存在菌群耐药组和抗生素抗性基因且在人类患传染性疾病方面也存在一定风险；不同季节水样中细菌群落对生物体的内分泌系统存在较大影响，应加强预防。与 Wan T 等^[77]对渭河流域水体细菌群落的生态功能预测结果相似。

各季节注释到的代谢通路基本一致，但是这些代谢通路中所涉及到的基因丰度、酶丰度以及各代谢途径存在一定的差异。不同季节分层型水体中参与 KEGG 功能最大贡献度的物种存在差异，2021 年 10 月与 2022 年 3 月均为变形菌门，2022 年 7 月为放线菌门。不同季节分层型水体中 KEGG 功能组成有所差异，既与每个季节理化性质变化有关又与三次采样浮游细菌优势类群结构发生变化有关。KEGG 功能分析结

果与 COG 功能分析结果类似, 与罗芳等^[80]对三峡库区浮游细菌功能分析相一致。KEGG 功能与环境因子关联分析结果显示 2021 年 10 月降水导致丹江口水库蓄水 170m, 削弱了环境因子对不同分层水体 KEGG 功能变化的影响, 无显著影响因素, 2022 年 3 月 DO 和 COD_{Mn}, 2022 年 7 月 NO₃-N 是影响丹江口水库水体浮游细菌 KEGG 功能变化的重要指标。

4.3.3 浮游细菌群落氮磷循环基因功能分层变化

丹江口库区总氮相对含量较高是影响水质的主要风险因子, 磷元素作为我国大部分水库的限制性要素是水库富营养化控制的关键因子^[81]。对丹江口水库不同深度氮磷循环相关功能基因进行分析, 发现涉及生物固氮、硝化作用、反硝化作用等 7 个主要途径的 39 个氮循环功能基因, 与 Zhu 等^[82]预测的河流中氮循环功能基因组成类似; 发现涉及有机磷矿化、无机磷溶解等 6 个主要途径的 54 个氮循环功能基因, 表现出磷循环功能基因的多样性^[83], 与之前的 PICRUS2 预测的 41 个磷功能基因相比更为准确全面的分析了丹江口水库不同深度磷循环功能基因的组成^[67]。聚类分析发现不同深度是影响氮磷循环功能基因组成和丰度的主要因素, 表层和底层氮磷循环功能基因组成有所差异, 整体丰度高于中层样品。分析原因可能为表层为地表径流和大气氮沉降的主要汇入层, 底层距离沉积物较近, 沉积物中氮相对较高^[15,17,73]。不同深度样品在氮循环功能基因的丰度上有所差异, 表层样品有机氮代谢、异化硝酸盐还原作用中部分基因丰度高于其他样品, 底层样品在硝化作用、反硝化作用部分基因丰度高于其他样品。不同深度磷循环功能基因预测与氮循环基因随水深变化的趋势一致, 表层、中层和底层磷循环功能基因有所差异, 这与 Llorens-Marès 研究的高山深湖磷循环基因随深度呈现差异一致^[84]。分析表明驱动的因素主要为 DO、pH、WT、TDS、EC 和 Chla, 这些环境因子随深度增加含量降低或升高, 表明丹江口水库水深变化引起的理化性质垂向差异, 导致浮游细菌功能呈明显的垂直分布特征。

研究表明 *Nitrosopumilus* 和 *Nitrosarchaeum* 是长江流域中氨氧化古菌 (AOA) 的主要组成, 在氨氧化中起到重要作用^[85]。红树林杆菌属 (*Mangrovibacterium*) 是已报道具有固氮能力的微生物, 参与丹江口水库固氮过程^[86]。嗜氢菌属 (*Hydrogenophaga*) 是报的除了有脱氮功能外, 还对多种有机物具有良好的降解作用^[87]。*Limnohabitans* 作为淡水生态系统中常见的属, 可以存在于各种环境中, 可以捕获藻类来源的有机物质和参与氮磷循环^[88]。分析表明奇异球菌属 (*Deinococcus*)、嗜氢菌属

(Hydrogenophaga)、Limnohabitans、Nitrosarchaeum、亚硝化侏儒菌属(Nitrosopumilus)在丹江口水库氮循环过程中贡献比例高，起到主要作用。研究表明 Limnohabitans、奇异球菌属 (Deinococcus)、棍状杆菌属 (Clavibacter) 是已报道的磷循环微生物，分析表明这些微生物在丹江口水库磷循环过程中贡献比例高，起到主要作用^[67]。

第五章 总结

5.1 结论

针对丹江口水库浮游细菌群落结构与功能缺乏长期监测的现状,本文采用宏基因组学技术对不同季节丹江口水库表、中和底层水体的浮游细菌开展研究,分析了丹江口水库不同分层型水体浮游细菌群落组成的季节性差异变化,通过冗余分析(RDA)研究浮游细菌与环境因子之间的相关性;并对丹江口水库不同分层型水体的功能基因信息以及基因功能进行研究,揭示各季节不同分层型水体的 COG 功能、KEGG 功能以及氮磷循环基因的垂向分布及其驱动因素。研究结果如下:

(1) 丹江口水库三次水质监测表明库区水体除总氮外,各生态点位不同分层水体各项水质指标基本达到 I 或 II 类水标准要求,库区水质整体较好。

(2) 变形菌门和放线菌门是三次采样的优势类群,其余优势类群在不同季节发生变化。放线菌门在 2021 年 10 月丰度较低、在 2022 年 3 月和 2022 年 7 月丰度较高,异常球菌-栖热菌门在 2021 年 10 月丰度最高,拟杆菌门在 2022 年 3 月丰度最高、在 2021 年 10 月丰度最低,蓝细菌门、浮霉菌门、硝化螺旋菌门 2022 年 3 月丰度最低,疣微菌门在 2022 年 7 月丰度最高。从三次高通量测序结果比较分析,发现夏季物种多样性明显高于春秋两季,且在不同季节不同分层水体中浮游细菌分布情况表现出一定的规律性。醋杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门和硝化螺旋菌门丰度占比随着水深增加而增加的趋势,蓝细菌门丰度占比呈现出随着水深增加而降低的趋势。浮游细菌群落与理化指标的相关性分析采用冗余分析是最方便快捷的,三次采样分析发现,2021 年 10 月降水导致水体竖向对流和垂直环流剧烈,水体垂直方向基本掺混均匀,削弱环境因子对不同分层型水体浮游细菌群落结构变化的影响;2022 年 3 月 WT、DO、ORP、Chla 以及 2022 年 7 月 NO_3^- -N 是影响丹江口水库不同分层型水体浮游细菌群落结构变化的重要理化指标 ($P<0.05$)。不同采样时间及不同水深变化导致理化指标的改变是丹江口水库不同季节分层型水体群落组成差异的重要影响因素,形成了各水体样本不同群落组成特征以及不同的优势物种。

(3) COG 功能注释显示丹江口水库不同季节分层型水体中均存在新陈代谢、未知功能、细胞过程和信号传导及信息贮存和处理四大类功能,表现出功能基因的多样性与丰富性,前两次功能未知占比最高,2022 年 7 月氨基酸转运代谢占比最高,三次采样不同分层型水体中均存在显著差异的是次级代谢物生物合成、转运和代谢。不同

季节分层型水体中为 COG 功能参与贡献度较大的物种均为变形菌门及放线菌门，其在物质转化、水体净化等领域发挥着重要的作用，夏秋季有机化合物在表层水体的滞留时间变长促进其生长繁殖，表层水体中氮营养盐相对含量较低与其大量存在有关。2021 年 10 月降水导致丹江口水库蓄水 170m，无显著影响因素；2022 年 3 月 TDS、COD_{Mn} 和 Cond，2022 年 7 月 WT 和 NO₃⁻-N 是影响不同分层型水体浮游细菌 COG 功能变化的显著因素（P<0.05）。不同季节分层型水体中 COG 功能有所差异，既与各季节理化性质变化有关，又与三次采样浮游细菌优势类群结构发生变化有关。

KEGG 功能注释结果表明丹江口水库不同季节分层型水体样本中 pathway level 1 均获得 6 条代谢通路，pathway level 2 均获得 46 条代谢途径，pathway level 3 在 2021 年 10 月、2022 年 3 月和 7 月发现各季节表中底层水体中共有的分别为 415 条、417 条、419 条。共有的代谢途径表现出不同季节分层型水体其代谢途径的多样性与丰富性，特有的代谢途径表现出其代谢途径的特异性。其中，二级代谢途径对丹江口水库水体浮游细菌群落致病程度及对生物体系统影响进行了预测，表明水体环境中存在菌群耐药组和抗生素抗性基因且在人类患传染性疾病方面也存在一定风险；不同季节水样中细菌群落对生物体的内分泌系统存在较大影响，应加强预防。KEGG 功能与环境因子关联分析结果显示 2021 年 10 月降水导致丹江口水库蓄水 170m，削弱了环境因子对不同分层水体 KEGG 功能变化的影响，无显著影响因素，2022 年 3 月 DO 和 COD_{Mn}，2022 年 7 月 NO₃⁻-N 是影响丹江口水库水体浮游细菌 KEGG 功能变化的重要指标。丹江口水库不同季节分层型水体中浮游细菌参与 KEGG 功能最大贡献度的物种存在差异，且不同代谢途径中的基因与酶存在差异，既与各季节理化性质变化有关又与三次采样浮游细菌优势类群结构发生变化有关。

宏基因组学分析表明丹江口水库浮游细菌参与生物固氮、硝化作用、反硝化作用、异化硝酸盐还原作用等氮循环过程，涉及 *gltB*、*glnA*、*gltD*、*gdhA*、*NRT*、*ureC* 等 39 个氮循环功能基因。参与有机磷矿化、无机磷溶解、调节、多聚磷酸盐合成等磷循环过程，涉及 *pstS*、*ppx-gppA*、*glpQ*、*ppk1*、*ppnK* 等 54 个氮循环功能基因。垂直分布是影响氮、磷循环功能基因组成和丰度的主要因素，表层和底层氮磷循环功能基因组成有所差异，整体丰度高于中层样品。丹江口水库水深变化引起的理化性质（WT、ORP、DO、Chla 等）垂向差异导致浮游细菌功能呈明显的垂直分布特征。

5.2 创新点与展望

丹江口水库作为南水北调中线工程重要的水源地，自 2014 年 12 月 12 日通水以来有效缓解了我国北方地区严峻的缺水形势，因此，丹江口水库水质安全至关重要。通水至今，丹江口水库水生生态系统在重建过程中发生着怎样的变化，其物种组成与结构功能是否发生变化，一直缺乏长期的相关研究。浮游细菌作为水生生态系统重要组成部分，其发挥与维持生态作用是一个长期且连续的过程，因此本实验对丹江口水库不同季节分层型水体中浮游细菌群落的结构与功能进行了为期一年的研究。

5.2.1 创新点

(1) 采用宏基因组学技术对丹江口水库不同分层型水体浮游细菌群落进行研究，相对传统的培养分离方法以及 PICRUSt 技术来说，研究方法更为先进可靠、操作更为自动标准，预测效果更加准确科学，能够更加全面的获得丹江口水库浮游细菌群落组成、基因预测、功能分析以及代谢通路等信息。

(2) 近年来，基于浮游细菌群落以及功能代谢的研究主要集中在表层水体，对于不同季节表、中、底分层型水体的研究较少。不同采样时间及不同水深变化导致理化指标的改变是丹江口水库浮游细菌群落组成差异的重要影响因素，导致浮游细菌功能呈明显的垂直分布特征。本研究为初步探讨丹江口水库不同季节分层水体浮游细菌群落组成以及功能代谢提供了参考。

(3) 微生物群落内部之间以及微生物与环境因子之间错综复杂的关联性，一直以来是生态学研究的重点和难点问题。本研究以三次采样结果为研究对象采用冗余分析和相关性 Heatmap 图分析揭示物种、功能与环境因素之间的关系，为丹江口水库浮游细菌群落组成、功能及其影响因子的探究提供了帮助。

5.2.2 展望

(1) 本论文只针对 2021 年 10 月、2022 年 3 月及 7 月丹江口水库不同分层型水体浮游细菌进行了研究，仅有三个时间点及五个典型的生态点位，采样范围以及采样密度仍然偏低，要充分探明浮游细菌群落组成、功能及其在水质中的重要作用，需要进行长期且动态的有效监控。另外，本论文采样点只涉及到丹江口水库丹库，而对汉库以及南水北调中线干渠研究较少，需要进一步增大采样范围。

(2) 宏基因组学数据量大，本论文只是初步研究 COG 功能、KEGG 功能以及氮磷循环相关基因，后续需要深入探究丹江口水库浮游细菌群落结构与功能。

参考文献

- [1] 龚子乐. 老鹳河干流微型浮游生物群落结构变化及其水质特征研究 [D]. 南阳市; 南阳师范学院, 2021.
- [2] 郑保海. 丹江口水库浮游真核生物群落结构特征和驱动因素及水质驱动因子评价 [D]. 南阳市; 南阳师范学院, 2021.
- [3] 张乐群, 吴敏, 万育生, 南水北调中线水源地丹江口水库水质安全保障对策研究 [J]. 中国水利, 2018, 1: 44-47.
- [4] 丹江口水库首次实现 170m 满蓄目标 [J]. 中国防汛抗旱, 2021, 31(10): 4.
- [5] 朱媛媛, 田进军, 李红亮, 等. 丹江口水库水质评价及水污染特征 [J]. 农业环境科学学报, 2016, 35: 139-147.
- [6] 郑莹莹, 刘树元, 刘虹, 等. 亚深型水库水体季节性分层特征研究 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2021,36(2): 359-370.
- [7] 闫苗苗, 陈胜男, 黄廷林, 等. 分层型水库藻类垂向演替的水质与细菌种群调控 [J]. 环境科学,2020,41(7):3285-3296.
- [8] 王禹冰, 王晓燕, 庞树江, 等. 水库水体热分层的水质及细菌群落分布特征[J]. 环境科学,2019,40(6):2745-2752
- [9] 阴星望. 丹江口水库微生物群落特征及其与水质的关系研究 [D]. 南阳市; 南阳师范学院, 2019.
- [10] Kagami M, Amano Y, Ishii N. Community Structure of Planktonic Fungi and the Impact of Parasitic Chytrids on Phytoplankton in Lake Inba, Japan [J]. Microbial Ecology, 2012, 63(2): 358-368.
- [11] 罗建桦, 陶晔, 邢鹏, 等. 湖泊微生物宏基因组学研究进展 [J]. 湖泊科学 2020,32(1), 271-280.
- [12] 张雷. 基于宏基因组序列的大天鹅 (Cygnus cygnus) 胃肠道微生物多样性及功能研究. [D]. 威海市; 山东大学, 2019.
- [13] 辛瑞瑞. 不同酸性废水库中微生物群落季节变化及宏基因组学研究 [D]. 北京市; 中国地质大学, 2019.
- [14] 张起畅, 张文飞, 殷浩能, 等. 宏基因组测序分析东寨港红树林淤泥和水体微生物的多样性[J]. 基因组学与应用生物学 2020,39(1), 116-122.

- [15] 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(04): 1052-1063.
- [16] 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(01): 421-429.
- [17] 张菲, 田伟, 孙峰, 等. 丹江口库区表层浮游细菌群落组成与 PICRUSt 功能预测分析 [J]. 环境科学, 2019, 40(03): 1252-1260.
- [18] 林立安. 丹江口水库浮游细菌生物群落特征及其对理化因子的响应[D]. 南阳市; 南阳师范学院, 2022.
- [19] 郭秋平. 鄱阳湖河湖交错带丰水期微生物群落特征研究[D]. 江西师范大学硕士学位论文, 2017.
- [20] Toro, Nicolas, Martinez-Abarca, et al. Bacterial Diversity in the Soda Saline Crater Lake from Isabel Island, Mexico [J]. Microbial Ecology, 2016, 71(1): 68-77.
- [21] 张建, 黄小兰, 张婷, 等. 鄱阳湖河湖交错带重金属污染对微生物群落与多样性的影响[J]. 湖泊科学, 2018, 30: 640-649.
- [22] Gaedke U, Seifried A, Adrian R. Biomass Size Spectra and Plankton Diversity in a Shallow Eutrophic Lake [J]. International Review of Hydrobiology, 2004, 89(1): 1-20.
- [23] 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.
- [24] 唐静杰. 水生植物—根际微生物系统净化水质的效应和机理及其应用研究 [D]. 无锡市; 江南大学, 2009.
- [25] Wanli G, Zhaojin C, Yuying L, et al. Bioassessment of a Drinking Water Reservoir Using Plankton: High Throughput Sequencing vs. Traditional Morphological Method [J]. Water, 2018, 10(1): 82.
- [26] BoonFei T. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1027.
- [27] Simon M, López-García P, Deschamps P, et al. Marked seasonality and high spatial variability of protist communities in shallow freshwater systems [J]. The ISME

- Journal, 2015, 9(9): 1941-1953.
- [28] Sun Z, Li G, Wang C, *et al.* Community dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbes in an estuary reservoir [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6966.
- [29] Keck F, Millet L, Debroas D, *et al.* Assessing the response of micro-eukaryotic diversity to the Great Acceleration using lake sedimentary DNA [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3831.
- [30] Mcinnes A S, Laczka O F, Baker K G, *et al.* Live cell analysis at sea reveals divergent thermal performance between photosynthetic ocean microbial eukaryote populations [J]. *The ISME Journal*, 2019, 13:1374-1378.
- [31] 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(01): 336-344.
- [32] 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: 42469.
- [33] Xiong J-B, Liu Y-Q, Lin X-G, *et al.* Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau [J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14: 2457-2466.
- [34] F.A. Anders, R. Lasse, B. Stefan, Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Sea bacterioplankton communities [J]. *The ISME journal*, 2010, 4: 171-181.
- [35] J.B. Logue, S. Langenheder, A.F. Andersson, *et al.* Freshwater bacterioplankton richness in oligotrophic lakes depends on nutrient availability rather than on species-area relationships [J]. *The ISME journal*, 2012, 6: 1127-1136.
- [36] Dai W-F, Zhang J-J, Tu Q-C, *et al.* Bacterioplankton assembly and interspecies interaction indicating increasing coastal eutrophication [J]. *Chemosphere*, 2017, 177: 317-325.
- [37] Zhao D-Y, Shen F, Zeng J, *et al.* Network analysis reveals seasonal variation of cooccurrence correlations between Cyanobacteria and other bacterioplankton [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 573: 817-825.

- [38] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法第4版 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [39] 俞焰, 刘德富, 杨正健,等. 千岛湖溶解氧与浮游植物垂向分层特征及其影响因素[J]. 环境科学, 2017,38(4):1393-1402
- [40] 张莹莹, 张经, 吴莹, 等. 长江口溶解氧的分布特征及影响因素研究[J]. 环境科学, 2007,28(8):1649-1654.
- [41] Scholz M, Martin R J. Control of bio-regenerated granular activated carbon by spreadsheet modelling [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1998, 71(3): 253-261.
- [42] Jiang J-G, Shen Y-F. Development of the microbial communities in Lake Donghu in relation to water quality [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2007, 127(1): 227-236.
- [43] 赵爽, 倪兆奎, 黄冬凌, 等. 基于WQI法的鄱阳湖水质演变趋势及驱动因素研究[J]. 环境科学学报, 2020, 40(1): 179-187.
- [44] 王剑, 尹炜, 赵晓琳, 等. 丹江口水库新增淹没区农田土壤潜在风险评估 [J]. 中国环境科学, 2015, 35(1): 157-164.
- [45] Dang C, Xia Y, Zheng M, *et al.* Metagenomic insights into the profile of antibiotic resistomes in a large drinking water reservoir [J]. Environment International, 2020, **136**: 105449.
- [46] Chen Z-J, Xu G, Ding C-Y, *et al.* Illumina MiSeq sequencing and network analysis the distribution and co-occurrence of bacterioplankton in Danjiangkou Reservoir, China [J]. Archives of Microbiology, 2020, **202**: 859-873.
- [47] Callieri, Cristiana. Picophytoplankton in Freshwater Ecosystems:The Importance of Small-Sized Phototrophs [J]. Freshwater Reviews, 2008, 1(1): 1-28.
- [48] Lepère C, Domaizon I, Tab N, *et al.* Geographic distance and ecosystem size determine the distribution of smallest protists in lacustrine ecosystems [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 85(1): 85-94.
- [49] Liu Y, Singh P, Sun Y, *et al.* Diversity and biochemical features of culturable fungi from the coastal waters of Southern China [J]. AMB Express, 2014, 98(7):

3241-3255

- [50] Xu H, Zhao D, Huang R, *et al.* Contrasting Network Features between Free-Living and Particle-Attached Bacterial Communities in Taihu Lake[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 76: 303–313.
- [51] K. Haukka, E. Kolmonen, R. Hyder, *et al.* Effect of Nutrient Loading on Bacterioplankton Community Composition in Lake Mesocosms[J]. *Microbial Ecology*, 2006, 51: 137-146.
- [52] 肖利娟. 华南地区两座大型水库浮游植物群落与演替机制比较 [D]. 广州市; 暨南大学, 2011.
- [53] Vrede, K. Nutrient and Temperature Limitation of Bacterioplankton Growth in Temperate Lakes [J]. *Microbial Ecology*, 2005, **49**: 245-256.
- [54] Li WKW. Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface ocean waters [J]. *Limnol. Oceanogr*, 1998, **43**: 1746-1753.
- [55] 肖利娟, 李秋芬, 张艳, 等. 象山港内西沪港海域沉积环境细菌群落结构的时空变化及其主要环境影响因子 [J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(05): 742-749.
- [56] 郭诗君, 王小军, 韩品磊, 等. 丹江口水库叶绿素 a 浓度的时空特征及影响因素分析 [J]. *湖泊科学*, 2021, 33 (2): 366-376.
- [57] 牛远, 孔祥虹, 余辉, 等. 抚仙湖夏季热分层时期浮游植物空间分布特征 [J]. *生态学杂志*, 2016, 35(7): 1865-1871.
- [58] 杜蕾, 李文宝, 杨旭, 等. 达里诺尔湖夏季水体浮游细菌群落垂向变化特征差异 [J]. *地球科学*, 2020, 45(5): 1818-1829.
- [59] Li S, Gu S, Tan X, *et al.* Water quality in the upper Han River basin, China: The impacts of land use/land cover in riparian buffer zone [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 165: 317-324.
- [60] 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: 2591.
- [61] 谢斌, 张硕, 李莉, 等. 海州湾海洋牧场浮游植物群落结构特征及其与水质参数的关系 [J]. *环境科学学报*, 2017, 37(1): 121-129.

- [62] 高春梅, 朱珠, 王功芹, 等. 海州湾海洋牧场海域表层沉积物磷的形态与环境意义 [J]. 中国环境科学, 2015, 35(11): 3437-3444.
- [63] Chen M, Chen F, Yu Y, *et al.* Genetic diversity of eukaryotic microorganisms in Lake Taihu, a large shallow subtropical lake in China [J]. *Microbial Ecology*, 2008, 56(3): 572-583.
- [64] Luerling M, Faassen E J. Controlling toxic cyanobacteria: Effects of dredging and phosphorus-binding clay on cyanobacteria and microcystins [J]. *Water Research*, 2012, 46(5): 1447-1459.
- [65] Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, **16**: 263-276.
- [66] 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**(14): 633-648.
- [67] Chen Z-J, Liu Y-Q, Li Y-Y, *et al.* The Seasonal Patterns, Ecological Function and Assembly Processes of Bacterioplankton Communities in the Danjiangkou Reservoir, China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, **13**: 884765.
- [68] Sun D, Meng J, Xu E G, *et al.* Microbial community structure and predicted bacterial metabolic functions in biochar pellets aged in soil after 34 months - ScienceDirect [J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 100: 135-143.
- [69] Zhu S, Vivanco J M, Manter D K. Nitrogen fertilizer rate affects root exudation, the rhizosphere microbiome and nitrogen-use-efficiency of maize - ScienceDirect [J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 107: 324-333.
- [70] Iratxe Z. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. [J]. *mBio*, 2015, 2(6): e02527-02514.
- [71] Jiang L, Song M, Yang L, *et al.* Exploring the Influence of Environmental Factors on Bacterial Communities within the Rhizosphere of the Cu-tolerant plant, *Elsholtzia splendens* [J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 36302.
- [72] Verma P, Raghavan R V, Jeon C O, *et al.* Complex bacterial communities in the deep-sea sediments of the Bay of Bengal and volcanic Barren Island in the Andaman Sea [J]. *Marine Genomics*, 2016, 31: 33-41

- [73] 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.
- [74] 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*, 38(2): 457-466
- [75] 吕锡斌, 吴云成, 陈良强, 等. 赤水河流域浮游细菌群落特征及其与水质的关系 [J]. *环境科学学报*, 41(11): 4596-4605
- [76] Cleary D, Voogd N, Polónia A, *et al.* Composition and Predictive Functional Analysis of Bacterial Communities in Seawater, Sediment and Sponges in the Spermonde Archipelago, Indonesia [J]. *Journal of Sea Research*, 2017, 119(4): 37-53.
- [77] Wan T, He M-X, Ren J-H, *et al.* Environmental response and ecological function prediction of aquatic bacterial communities in the Weihe River basin [J]. *Environmental Science*, 2019, 40(8): 3588-3595.
- [78] 孟华旦尚, 薛翌, 郭小芳, 等. 西藏纳木错沿岸表层水体浮游细菌群落结构及生态功能预测 [J]. *冰川冻土*, 2023, 45(1): 254-266.
- [79] 郑施展, 周绶珩, 杨文, 等. 浙闽沿海生态牧场技术示范区浮游细菌群落和功能的时空变化 [J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 3024-3038.
- [80] 罗芳, 鲁伦慧, 李哲, 等. 基于宏基因组学的三峡库区重庆主城段水体浮游微生物群落的组成和功能分析 [J]. *三峡生态环境监测*, 2019, 4(3): 1-10.
- [81] Zhang H, Cao X, Huo S, *et al.* Changes in China's river water quality since 1980: management implications from sustainable development [J]. *npj Clean Water*, 2023, 6: 45.
- [82] Zhu J, Hong Y, Zada S, *et al.* Spatial Variability and Co-acclimation of Phytoplankton and Bacterioplankton Communities in the Pearl River Estuary, China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 02503.
- [83] McMahon KD, Read EK. Microbial Contributions to Phosphorus Cycling in Eutrophic Lakes and Wastewater [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2013, 67: 199-219.
- [84] Llorens-Marès T, Catalan J, Casamayor EO. Taxonomy and functional interactions in

- upper and bottom waters of an oligotrophic high-mountain deep lake (Redon, Pyrenees) unveiled by microbial metagenomics [J]. *Science of The Total Environment*, 2020, **707**: 135929.
- [85] Liu S, Wang H, Chen L, *et al.* Comammox *Nitrospira* within the Yangtze River continuum: community, biogeography, and ecological driversd [J]. *The ISME Journal*, 2020, **14**: 2488-2504.
- [86] Huang X-F, Liu Y-J, Dong J-D, *et al.* *Mangrovibacterium diazotrophicum* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a mangrove sediment, and proposal of *Prolixibacteraceae* fam. nov [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, **64**: 875-881.
- [87] 杨浩, 张国珍, 杨晓妮, 等. 16S rRNA 高通量测序研究集雨窖水中微生物群落结构及多样性 [J]. *环境科学*, 2017, **38**(4): 1704-1716.
- [88] Zheng L, Xing Y, Ding A, *et al.* Brownification of freshwater promotes nitrogen-cycling microorganism growth following terrestrial material increase and ultraviolet radiation reduction [J]. *Science of The Total Environment* 2022, **853**: 158556.

攻读硕士学位期间取得的研究成果

1. 张玮玮, 高珊珊, 李梦璐, 韩辉, Nicola Fohrer, Robert Costanza, 李玉英*, 陈兆进*. 丹江口水库浮游细菌和氮磷循环基因垂直分布特征及其驱动因素 [J]. 环境科学, 2024, DOI:10.13227/j.hjkx.202307255;

致 谢

时光荏苒，岁月如梭。行文至此，落笔为终。首先感谢南阳师范学院、南阳师范学院研究生处、生命科学与农业工程学院、水资源与环境工程学院的领导老师们给予我的指导和帮助！感谢南水北调中线水源区水安全河南省协同创新中心、河南省南水北调中线水源区流域生态安全国际联合实验室、南水北调中线水源区流域生态安全高等学校学科创新引智基地为本研究提供良好的实验环境。

衷心感谢我的导师陈兆进副教授、李玉英教授在三年的学习和实验中给予我的谆谆教诲，自 2020 年 9 月进入南阳师范学院学习以来，我的专业素养得到很大的提高。两位老师严谨的治学态度、务实的工作作风，激励着我在今后的工作生活中不断努力奋斗。感谢校外导师长江水资源保护科学研究所辛小康高级工程师，在专业实训时给予的指导！衷心感谢课题组的兄弟姐妹：李英军、邵洋、郑保海、张鋈、姚银磊、李晓琦、段莉阳、崔真真、秦明青、李梦璐、杨贺、刘泳岐、王鸿天等在丹江口水库野外采样、理化检测检测及数据统计整理等方面给予大力的指导与支持。衷心地感谢我的父母、爱人和孩子们，感谢你们在我求学路上给予的帮助与支持。

回首过往点滴，有太多的艰辛与汗水最终化为今日的硕果累累。唯愿我们一如既往、保持热爱，谨此向所有关心帮助我的人表示我最诚挚的感谢！

最后，向百忙之中评阅论文的各位专家教授致敬！

张玮玮

2023 年 10 月于南阳