

密云水库入库河流水体总细菌和反硝化菌群落组成与结构

李 垒¹, 孟庆义¹, 叶 飞², 王 雨²

(1.北京市水科学技术研究院, 北京 100048;

2.中国科学院重庆绿色智能技术研究院, 水库水环境重点实验室, 重庆 400714)

摘要:研究密云水库入库河流水体中总细菌和反硝化菌的群落组成与差异性, 为水库的安全管理与水质保障提供基础数据和科学依据。选择对密云水库水质影响最大的 5 条入库河流(潮河、白河、清水河、对家河和白马关河), 对水体中的总细菌和氮循环功能微生物反硝化菌进行了聚合酶链式反应(PCR)扩增与高通量测序分析。5 条入库河流中全细菌主要隶属于 6 个门, 而以 Proteobacteria(变形菌门)为优势种群; 反硝化菌在门水平的分布则相对简单, 主要以 Proteobacteria 和少量 Deferribacteres(脱铁杆菌门)构成。不同入库河流全细菌的群落结构具有空间差异, 其中水文特征较为接近的白河和潮河全细菌群落结构具有较高相似性, 与其他 3 条入库河流群落差别较大; 水体中全细菌的 Shannon 多样性和 Chao1 丰富度均表现出较高水平。氮磷污染较重的对家河和潮河反硝化菌群落结构比较类似, 其他 3 条入库河流之间则相对分散; 对家河全细菌和反硝化菌的多样性和丰富度表现出较低水平。清水河水体中的全细菌和反硝化菌群落结构都较少受到已分析的环境因子影响, 可能与该河道的人工改造有关。河流水体中全细菌以及关键功能微生物群落特征受到河流的水文、形态和理化指标的综合影响, 可以作为水体环境与生态状况的重要指示项目, 在今后的水库水环境保护与管理中应予以重视。

关键词:总细菌; 反硝化菌; 群落结构; 密云水库

中图分类号:Q938, X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2018)06-0044-08

河流水体中广泛分布着各类微生物, 营养类型多样、种类繁多、代谢极为活跃, 在有机物的降解、生源要素的转化等方面发挥关键作用(Fuhrman J A, 2009)。40% 的河流水质难以达到水环境标准是由微生物所致(James E & M Joyce, 2004)。目前已知的氮素生物地球化学循环过程主要由微生物催化完成(Jetten M S M, 2008)。其中, 水体中氮素的生物去除主要通过反硝化过程完成, 反硝化细菌也成为氮循环过程的重要模式微生物, 常被用以指示生境中氮循环过程的活性与强度(Tiedje J M, 1988; Reddy K W et al, 1989; Burgin & Hamilton, 2007)。河流水体微生物的研究表明, 微生物在河流中的群落特征与所处环境的污染程度密切相关, 其中有机质和氮磷营养元素的分布不均衡、外界环境条件的差异性造成微生物群落不同的主要原因(赵荫薇等, 2013)。另一方面, 微生物的活动也可以

影响水体营养物质的分布及转化, 因而河流生态系统中微生物群落结构也可以成为水环境变化和演替的重要标志(朱亮等, 2013)。

密云水库是北京最大的地表饮用水水源地, 目前库区大部分水质指标常年保持在地表水 II 类标准, 而总氮指标在 III 类左右(北京市水务局, 2017)。密云水库蓄水量主要有 3 种补给途径: 上游河流汇入、降雨补给和南水北调水源回补, 其中入库河流的水量最大, 其水质状况是影响密云水库水环境质量的主要因素之一。目前, 对于密云水库入库河流水体微生物特征的监测集中于理化指标的分析(北京市水务局, 2017), 水体微生物特征的分析相对匮乏。

对微生物的研究不管是监测范围(原媛等, 2007)还是技术手段(王敏等, 2016)都无法与水体理化指标的研究水平相比。本文通过高通量测序对密云水库入库河流水体中总细菌和反硝化菌的群落组成与差异性进行分析, 同时结合水体理化性质进一步研究水体中微生物群落结构与环境因子之间的关联, 探讨水体微生物群落所指示的环境压力, 为密云水库的安全管理与水质保障提供基础数据和科学依据。

收稿日期: 2017-11-10 修回日期: 2018-10-09

基金项目: 北京市自然科学基金(J150001); 北京市优秀人才培养资助青年骨干个人项目(2014765000432G189)。

作者简介: 李垒, 1980 年生, 男, 高级工程师, 主要从事生态水文学研究。E-mail: ll@bwsti.com

通信作者: 王雨。E-mail: wangyu@cigit.ac.cn

1 材料与方法

1.1 采样点布设与样品采集

依照密云水库主要入库河流的水量和污染特征,本研究选择对水库水环境影响最大的 5 条河流,分别是潮河、白河、清水河、对家河和白马关河,在入库河口进行水样采集(图 1)。潮河和清水河位于密云水库东北方向,而白马关河、白河和对家河位于水库的西北方向。其中潮河和白河流域面积广,入库水量较大;白马关河、对家河和清水河流域面积相对较小,入库水量小。

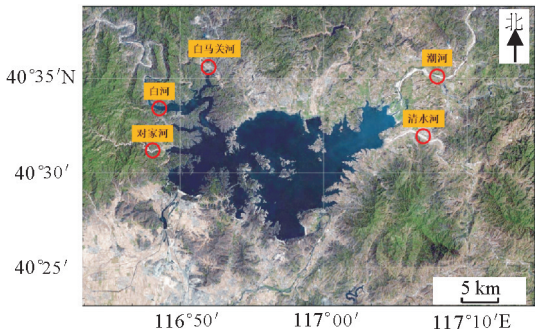


图 1 入库河流采样断面分布

Fig.1 Location of the five tributary sampling stations

水样采集日期为 2016 年 4 月 19 日。根据入库河流水质和水文的日变化规律,白天 5 个时段自 8 时开始每隔 3h 采集 1 次,夜晚 0 时与 5 时各采样 1 次。每次采集水样 500 mL 并设置 3 个平行样,分别分析其理化指标性质;所有时段所采集样品进行混合后作为一个混合样进行分子生物学分析。

1.2 理化指标测试方法

pH、温度和溶解氧(DO)采用 YSI 水质速测仪现场测定。其他指标均采用《地表水环境质量标准》(GB3838-2002),其中总磷采用钼酸盐比色法,总氮和硝酸盐氮采用过硫酸钾氧化法,亚硝态氮采用重氮偶合法,氨氮采用纳氏试剂法,叶绿素 a 采用丙酮溶解比色法,高锰酸盐指数采用酸性高锰酸钾氧化法,总有机碳(TOC)采用燃烧氧化法,全盐量采用重量法,总碱度采用酸碱指示剂滴定法,总硬度采用乙二胺四乙酸二钠滴定法,氯离子采用硝酸银滴定法。

1.3 分子生物学分析

水样使用 0.22 μm 的醋酸纤维素微孔滤膜抽滤后,采用 Omega 水样 DNA 提取试剂盒(OMEGA, USA)参照操作说明提取水样基因组 DNA。提取的基因组 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,并用 NanoVue Plus(GE,UK)超微量紫外分光光度

仪检测基因组 DNA 浓度。

针对细菌 16S rRNA 基因的 V3 - V4 高变区和反硝化菌的功能基因 nosZ 基因,分别使用带有 Barcode 信息的引物对 338F(5'-ACTCCTACGG-GAGGCAGCAG-3')/806R (5'-GGACTACH-VGGGTWTCTAAT-3')(Mori H F et al, 2013)和 nosZ-F (5'-CGYTGTTCMTTCGACAGCCAG-3')/nosZ-R (5'-CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA-3')(Rosch C et al, 2002)进行扩增。聚合酶链式反应(PCR)的 50 μL 体系为:10 $\times$ Pyrobest buffer (Takara, Japan) 5 μL , dNTPs (2.5 mM) 4 μL , Pyrobest DNA Polymerase (Takara, Japan) (2.5 U) 0.3 μL , 正反向引物(10 μM) 各 2 μL , 稀释 DNA 模板 2 μL , 双蒸水补足至 50 μL 。扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ (16S rRNA 基因) 或 53 $^{\circ}\text{C}$ (nosZ 基因) 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 共 25 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN, USA) 纯化后用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluorTM-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega, USA) 进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合后通过 Illumina Miseq 平台进行测序(奥维森基因科技,北京)。

1.4 数据分析

测序完成后,根据每个样品引物上的 Barcode 信息,识别原始序列,去除 Barcode 信息及引物序列。采用 Trimmomatic 软件(version 0.30)对得到的原始数据进行质量控制,过滤掉低质量的序列和短序列。根据 PE reads 之间的 overlap 关系,使用 FLASH 软件(Magoc T & S L Salzberg, 2011)将成对 reads 拼接成一条序列。根据不同测序数据类型选用不同的参考数据库用 USEARCH 软件(<http://drive5.com/usearch/features.html>)去除拼接好的序列的嵌合体,通过 Mothur(version v.1.30.1)去掉长度较小的 tags。通过 Uclust 软件(Edgar R C, 2010)将序列在 97% 的相似度下进行聚类,得到物种分类独立操作单元(OTU)。随后,基于 OTU 采用 Mothur(version v.1.30.1)分析样品的 α 多样性和群落结构。群落物种组成(热图)和相似性分析(PCoA)使用 R 语言的 vegan 包进行分析和作图。利用 CANOCO 5 软件分析群落组成和环境变量之间的关系。

2 结果

2.1 入库河流水质特征

5个入库河流断面的水质监测结果(表1)表明,对家河断面的水质pH值、叶绿素a水平高于其他4个入库河流断面。对氮磷相关指标的分析可以发现,对家河断面水质的营养物质浓度在5个采样点中也呈现最高水平,例如总磷浓度为0.64 mg/L、总氮浓度为8.7 mg/L、硝态氮浓度为6.7 mg/L、亚硝态氮浓度为0.16 mg/L,表明该河流污染浓度较高。潮河入库断面各项指标呈现出较高水平,总氮浓度7.3 mg/L、硝态氮浓度为5.0 mg/L、亚硝态氮浓度为0.04 mg/L,此3项指标均仅次于对家河;氨态氮浓度为0.23 mg/L,在5个采样点中处于最高水平。碳、盐度和碱度等指标在各采样点之间并未表现出明显差异。从各河流水质指标来看,对家河和潮河2个入库河流存在较为明显的受污染特征。

2.2 全细菌与反硝化菌生物多样性特征

5个采样点水样进行高通量测序后分别获得了35 947~65 033条全细菌16S rRNA基因的有效序列,以97%的相似度进行OTU划分之后,分别获得了187~332个OTUs。经过计算其每个点的覆盖度(Good's coverage)都在99%以上,表明所得序列能够较真实反映样本的总体多样性水平。针对反硝化菌nosZ基因的高通量测序分别获得了28 558~48 574条有效序列,以97%的相似度进行OTU划分之后,分别获得了542~726个OTUs,每个样点的覆盖度都在98%以上,同样说明现有序列可以较好地反映各个样本的多样性水平。

基于样品最低序列数把所有样品抽平到同一序列水平后,以此计算出各个样品的 α 多样性指数(表2)。多样性分析的结果可以发现潮河和白河水体中全细菌的Shannon多样性和Chao1丰富度均表现出较高水平,高于另外3个采样点。反硝化菌nosZ基因的生物多样性总体上高于全细菌16S rRNA基因,其中潮河反硝化菌的多样性Shannon指数要高于其他4个样点,但是白马关河的反硝化菌的丰富度Chao1指数最大。对家河采样点在氮磷相关的理化指标上表现出较高的水平,但其全细菌和反硝化菌的丰富度表现出较低水平;除了反硝化菌的多样性高于白马关河和清水河,其全细菌的多样性也是5个采样点中最低的。

表1 入库河流主要水质指标特征
Tab.1 Water quality parameters for each of the five tributaries

水质指标	入库河流				
	对家河	白河	白马关河	潮河	清水河
pH	10.3	9.7	9.6	9.5	9.9
温度/℃	11.9	11.7	9.7	13.0	13.9
溶解氧/mg·L ⁻¹	5.6	6.5	7.8	7.7	7.6
总磷/mg·L ⁻¹	0.64	0.04	0.02	0.02	0.04
总氮/mg·L ⁻¹	8.7	2.4	2.4	7.3	1.2
硝氮/mg·L ⁻¹	6.7	1.5	2.3	5.0	0.7
亚硝氮/mg·L ⁻¹	0.16	0.02	0.01	0.04	0.02
氨氮/mg·L ⁻¹	0.05	0.14	0.08	0.23	0.11
叶绿素a/mg·m ⁻¹	9.3	8.3	5.9	4.3	7.5
高锰酸盐指数/mg·L ⁻¹	1.4	1.4	2.0	1.3	1.7
总有机碳/mg·L ⁻¹	1.8	1.5	1.9	1.2	1.6
全盐量/mg·L ⁻¹	203	246	454	345	226
总碱度/mg·L ⁻¹	132	157	196	182	202
总硬度/mg·L ⁻¹	118.6	207.4	338.2	289.5	223.3
氯离子/mg·L ⁻¹	13.4	15.1	23.9	35.1	10.7

表2 基因序列信息与生物多样性指标

Tab.2 Sequence number and diversity of bacterial 16S rRNA gene and the denitrifying bacteria nosZ gene

目的基因	样品	有效序列数/个	OTUs/个	Good's 覆盖度/%	Chao1 丰富度指数	Shannon 多样性指数
细菌 16S rRNA	对家河	35947	187	99.8	230	3.81
	潮河	65033	332	99.9	352	6.15
	白马关河	41216	284	99.9	310	5.00
	白河	36994	347	99.9	361	6.16
	清水河	31368	272	99.8	325	5.50
nosZ 基因	对家河	37703	580	99.0	713	6.13
	潮河	47317	657	98.8	778	6.66
	白马关河	45693	717	98.4	904	5.65
	白河	28558	726	98.8	850	6.35
	清水河	48574	542	99.2	635	5.07

2.3 水体中全细菌与反硝化菌群落组成结构

所得序列比对之后在门水平上进行分类可以发现,所得全细菌序列至少分属于6个门,分别是

Proteobacteria(变形菌门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)、Cyanobacteria(蓝藻门)、Actinobacteria(放线菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)和 Verrucomicrobia

(疣微菌门)(图 2)。5 个样品中,每个样品都以 Proteobacteria 为优势门,且相对丰度差别不大,分别为 52.8%(对家河)、53.7%(白河)、47.1%(白马关桥)、53.5%(潮河)和 48.5%(清水河)。其中对家河和白马关河样品中 Bacteroidetes 的相对丰度比较接近(分别为 42.7%和 43.1%),明显高于另外 3 个样品(18.0%~24.5%)。另外,Cyanobacteria

序列在白马关河中的相对丰度最低,仅为 0.7%,明显低于其他 4 个样品;Actinobacteria 在对家河中较少,显著低于在其他样品中的比例(5.1%~14.9%)。反硝化菌在门水平的分布则相对简单,主要以 Proteobacteria 和少量 Deferribacteres(脱铁杆菌门)构成,且 5 个样品中最优势门类均为 Proteobacteria,相对丰度为 71.0%~87.0%。

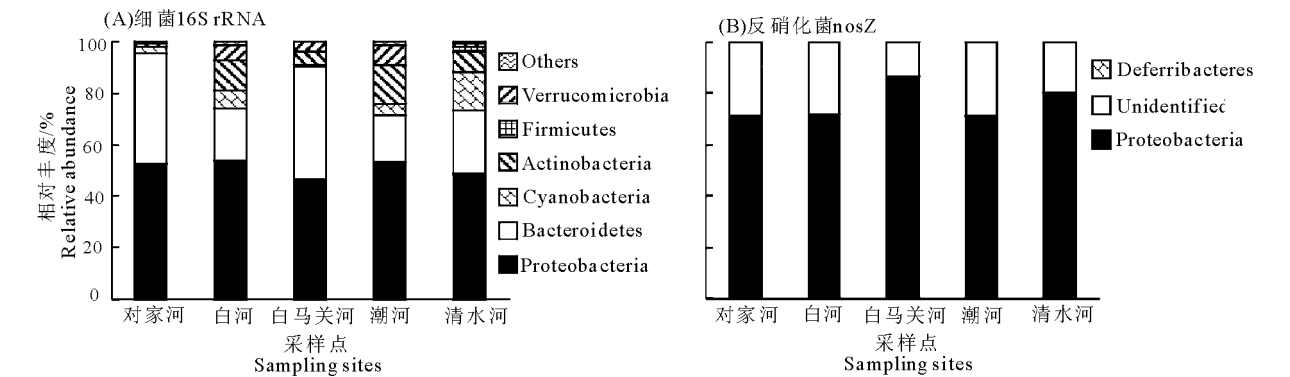


图 2 水体细菌在门水平的组成

Fig.2 Relative abundances of total bacteria and denitrifying bacteria at the phylum level for each tributary

在科水平对所得序列进行比对和分析,总体上全细菌群落组成中分布最为广泛的是 Comamonadaceae(丛毛单胞菌科),隶属于变形菌门;其次是同属于变形菌门的 Rhodobacteraceae(红细菌科)(图 3)。各个采样点在科水平的优势群落略有不同,其

中对家河中相对丰度前 3 的科类为 Cyclobacteriaceae(圆杆菌科)、Comamonadaceae 和 NS11-12 marine group(未培养科属),其相对丰度分别为 24.4%、23.7%和 13.6%;白马关河中相对丰度前 3 的科类为 Comamonadaceae、Flavobacteriaceae(黄

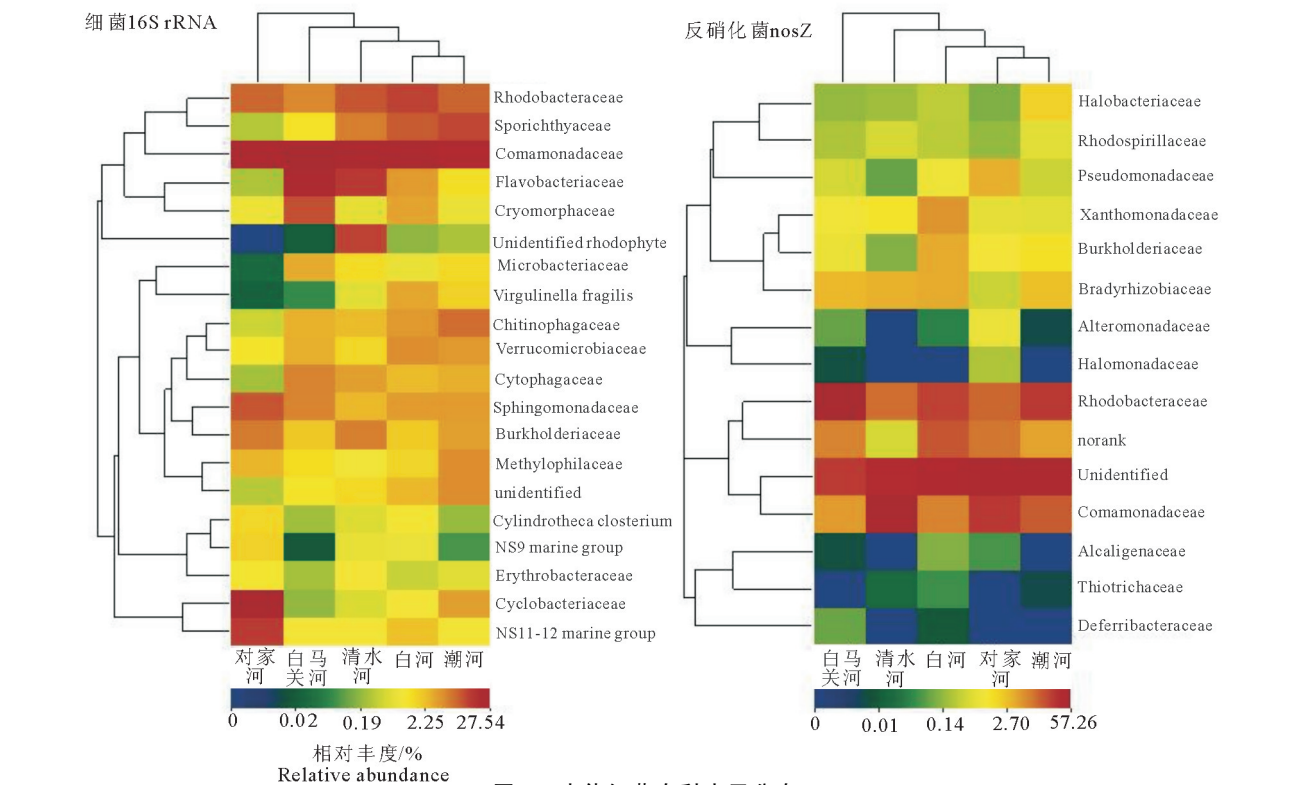


图 3 水体细菌在科水平分布

Fig.3 Relative abundance of total bacteria and denitrifying bacteria at the family level for each tributary

杆菌科)和 Cryomorphaceae(蟑螂杆状体科),其相对丰度分别为 27.5%、22.6%和 10.4%;清水河中相对丰度前 3 的科类为 Comamonadaceae、Flavobacteriaceae 和 unidentified rhodophyte(红藻),其相对丰度分别为 21.8%、14.1%和 12.0%;白河中相对丰度前 3 的科类为 Comamonadaceae、Rhodobacteraceae 和 Sporichthyaceae(鱼孢菌科),其相对丰度分别为 23.3%、12.4%和 9.1%;潮河中相对丰度前 3 的科类为 Comamonadaceae、Sporichthyaceae 和 Rhodobacteraceae,其相对丰度分别为 20.4%、11.7%和 8.4%。

反硝化菌的群落结构相对简单(图 3),相对丰度最多的组无法归类于现有的已知科属,即图中所示的 Unidentified 组。除了白马关河和清水河,另外 3 个样品中相对丰度最大的科类均为 Unidentified 组;Rhodobacteraceae 科在白马关河中的相对丰度最大,达到 57.3%;而其在白河(21.8%)和潮河(25.7%),对家河(12.8%)和清水河(11.1%)中的相对丰度差别不大。清水河中 Comamonadaceae 的相对丰度最大(49.3%),在对家河中的相对丰度也较高(24.9%)。

2.4 水体中全细菌与反硝化菌群落差异性分析

为了分析不同样本间全细菌与反硝化菌的群落结构的差异性,基于 Weighted Unifrac 距离的 PCoA 分析对 5 个地点的群落结构进行了计算(图 4)。白河和潮河的全细菌群落结构具有较高相似性,二者距离较近,其他 3 个地点在图中的分布则相对比较分散,未呈现出明显规律。针对反硝化菌的分析有类似分布特征,不同的是对家河和潮河的反硝化菌群落结构比较类似,其他 3 个地点之间则相对比较分散,分别分布在不同区域。结果表明 5 个研究地点间的全细菌和反硝化菌群落具有不同的分布规律与差异性。

2.5 水体全细菌与反硝化菌群落结构与环境因子关系

利用主成分分析(PCA)对水体全细菌和反硝化菌群落结构与环境变量之间的关系进行了解析,如图 5。影响全细菌和反硝化菌的环境因子有较大差别,仅有氨氮 1 个指标可以同时影响全细菌和反硝化菌的群落结构。

全细菌的群落结构主要受到 pH、总有机碳、氨氮和氯离子的影响;白河和潮河水体的全细菌群落结构与对家河和白马关河对环境因子具有不同的响应,而清水河水体全细菌的群落结构则较少受到所

分析的环境因子影响。

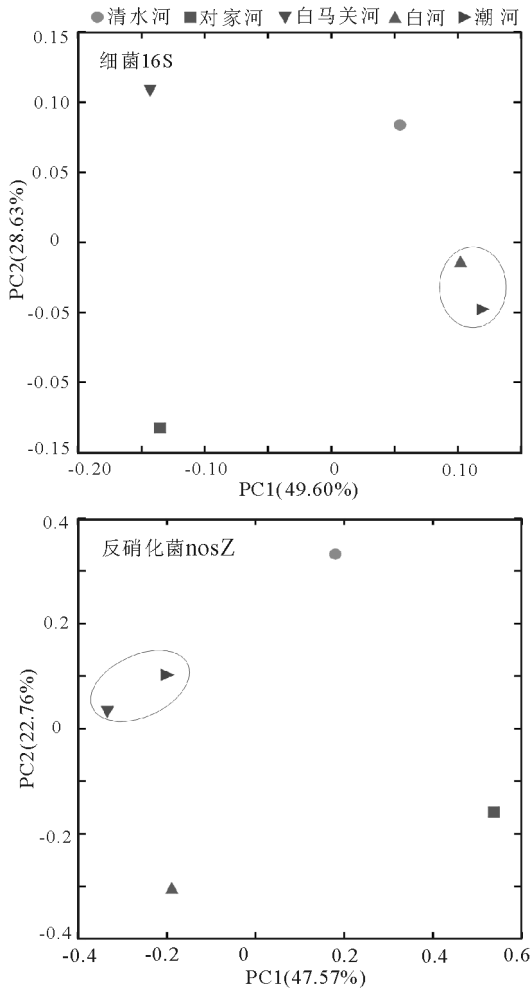


图 4 水样中细菌群落结构 PCoA 分析
Fig.4 PCoA analysis of total bacteria and denitrifying bacteria in the five tributaries

反硝化菌的群落结构主要受到水体溶解氧、叶绿素 a、总磷和氨氮的影响,对家河、白河和白马关河水体中的反硝化菌群落结构与潮河对于环境因子具有不同的响应。清水河水体中的反硝化菌群落结构也较少受到所分析的环境因子影响。

3 讨论

本文采用的高通量测序技术相比于以往研究中使用的磷酸脂肪酸(朱亮等,2013)、PCR-克隆文库(王敏等,2016)等技术具有更高的分辨率,所分析每个样品的序列覆盖度均在 98%以上,个别点可达 99.9%,表明高通量测序技术可较好地反应微生物群落的总体结构。以此为基础,结果进一步显示潮河和白河全细菌群落的多样性与丰富度为 5 个采样点中最高。潮河和白河水体的理化指标浓度在 5 条河流中并非最高,但潮河和白河却是 5 条入库河流

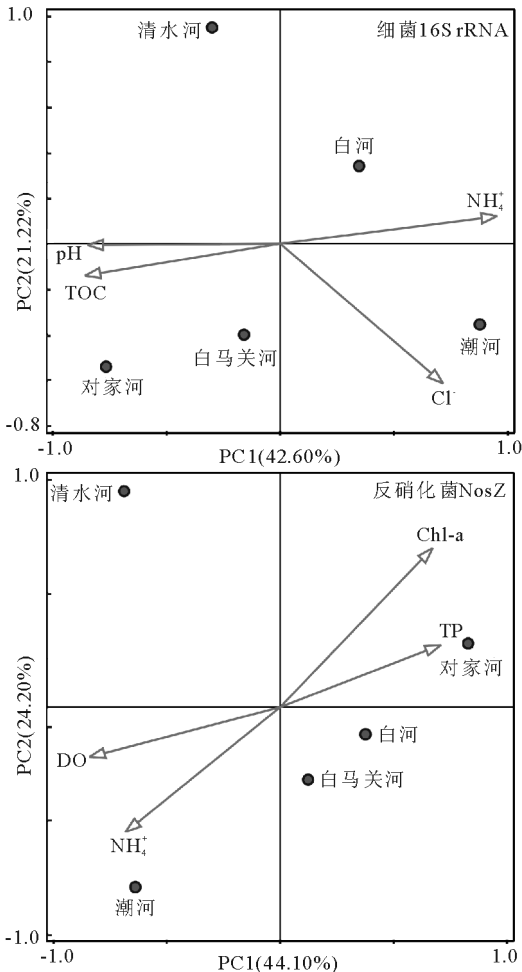


图 5 水样中细菌群落结构 PCA 分析
Fig.5 Principal component analysis (PCA) of the bacteria community structure and environmental parameters

中河面最宽、水量最大的 2 条河流,因此可以推测,河流浮游细菌中全细菌的生物多样性有可能取决于河流本身的水文特征(Lindström E S et al,2006),如河面宽度和水流水量,而非水中营养物质的多少。而反硝化菌的生物多样性水平高低则表现出与氮磷相关参数浓度相反的趋势,说明较高的营养物质含量有可能降低反硝化菌的生物多样性。

高通量测序除了更真实地反映了河流中浮游细菌的生物多样性,还揭示了更为具体和全面的种属分类信息。在所研究的 5 条入库河流中,存在比例最高的是 Proteobacteria 和 Bacteroidetes,这与前人在湖泊中的分析结果(寇文伯等,2015)较为一致,体现出了一般淡水水体的基本特点(任丽娟等,2013)。在科的水平上,全细菌和反硝化菌的群落组成具有一定的相似性,其中 Proteobacteria 的 Comamonadaceae 序列分布最多,值得注意的是 Comamonadaceae 经常成为活性污泥中的优势菌落(Tago Y &

A Yokota,2004);另一个优势菌群 Rhodobacteraceae 也在硫和碳的生物地球化学循环中发挥重要作用(Pujalte M J et al, 2014),表明河流水体可能受到临近污水排放的影响。在 5 条河流群落组成的差异性分析中,白河和潮河的全细菌群落结构较为相近,说明白河和潮河较大的水量不但可能增加水体全细菌的生物多样性,对其群落结构也会产生影响。而反硝化菌则呈现不同的趋势,对家河和潮河的反硝化菌群落结构比较类似。2 种微生物组群的差异性规律说明了河流水量可以影响全细菌的群落结构,而作为重要氮循环功能微生物,反硝化菌的群落结构则有可能受到其中营养物质含量的影响(Abell G C J et al, 2013)。

从水体微生物群落结构与理化性质的分析看,全细菌和反硝化菌的群落结构受到不同指标的影响,但是氨氮浓度对 2 个微生物组群均可形成较强影响。相比于硝态氮和总氮,虽然氨氮的浓度在 5 条河流中均处于较低水平,但氨氮通常是各种人为氮素污染的主要构成,说明人为的氮素污染可能是影响该 5 条入库河流水体中的微生物群落组成的最主要因素。此外,清水河入库区域的河床和岸坡均为硬砌结构,不同于其他 4 条河流的自然构造,且全年断流时间较长,因此,其浮游细菌中全细菌和反硝化菌的群落结构均与各项水质指标无显著相关关系,这说明河流的人工改造和调度也有可能影响水体的水环境状况及其相关的微生物特征(康丽娟等,2016)。

参考文献

北京市水务局, 2017. 北京市水务统计年鉴(2016)[M]. 北京: 中国水利水电出版社.
康丽娟, 曹勇, 付融冰, 等, 2016. 泵站放江对景观河道微生物指标的影响[J]. 水生态学杂志, 37(1): 47-52.
寇文伯, 黄正云, 张杰, 等, 2015. 鄱阳湖湖泊细菌群落组成及结构——以松门山为例 [J]. 生态学报, 35(23): 7608-7614.
任丽娟, 何聘, 邢鹏, 等, 2013. 湖泊水体细菌多样性及其生态功能研究进展[J]. 生物多样性, 21(4): 421-432.
王敏, 李玉仙, 常思博, 等, 2016. 密云水库水源水微生物群落解析[J]. 中国给水排水, 32(21): 63-65.
原媛, 汪善全, 竺建荣, 等, 2007. 密云水库微生物相变化对水质及嗅味的影响[J]. 环境科学研究, 20(6): 8-13.
朱亮, 孙凌宇, 储如花, 等, 2013. 城市纳污河流沉积物微生物群落结构特征[J]. 水科学进展, 24(1): 132-137.
赵荫薇, 蔡妙英, 钱兵, 等, 1986. 城市河流的微生物生态研

- 究[J]. 微生物学报, 26(3): 12 - 17.
- Abell G C J, D J Ross, J P Keane, et al, 2013. Nitrifying and denitrifying microbial communities and their relationship to nutrient fluxes and sediment geochemistry in the Derwent Estuary, Tasmania [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 70(1): 63 - 75.
- Burgin A J, S K Hamilton, 2007. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems-A review of nitrate removal pathways [J]. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(2): 89 - 96.
- Edgar R C, 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 26(19): 2460.
- Fuhrman J A, 2009. Microbial community structure and its functional implications[J]. *Nature*, 459(7244): 193 - 199.
- James E , M Joyce, 2004. Assessment and Management of Watershed Microbial Contaminants [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34(2): 109 - 139.
- Jetten M S M, 2008. The microbial nitrogen cycle [J]. *Environmental Microbiology*, 10(11): 2903 - 2909.
- Lindström E S, M Forslund, G Algesten, et al, 2006. External control of bacterial community structure in lakes [J]. *Limnology and Oceanography*, 51(1): 339 - 342.
- Magoc T, S L Salzberg, 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 27(21): 2957 - 2963.
- Mori H, F Maruyama, H Kato, et al, 2013. Design and Experimental Application of a Novel Non-Degenerate Universal Primer Set that Amplifies Prokaryotic 16S rRNA Genes with a Low Possibility to Amplify Eukaryotic rRNA Genes [J]. *DNA Research*, 21(2): 217 - 227.
- Pujalte M J, T Lucena, M A Ruvira, et al, 2014. The Family Rhodobacteraceae[M]. Berlin Heidelberg: Springer.
- Reddy K, W Patrick J, C Lindau, 1989. Nitrification-denitrification at the plant root-sediment interface in wetlands [J]. *Limnology and Oceanography*, 34(6): 1004 - 1013.
- Rosch C, A Mergel, H Bothe, 2002. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid Forest Soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3818 - 3829.
- Tago Y, A Yokota, 2004. A floe-forming bacterium isolated from activated sludge [J]. *Journal of General & Applied Microbiology*, 50(5): 243 - 248.
- Tiedje J M, 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium[J]. *Biology of anaerobic microorganisms*, 717: 179 - 244.

(责任编辑 张俊友)

Microbial Community Structures of Total Bacteria and Denitrifying
Bacteria in the Tributaries of Miyun Reservoir

LI Lei¹, MENG Qing-yi¹, YE Fei², WANG Yu²

(1.Beijing Academy of Science and Technology, Beijing 100048,P.R.China;
2.Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy
of Sciences, Chongqing 400714,P.R.China)

Abstract: Miyun Reservoir is the largest surface drinking water source for Beijing City. Precipitation re-charge and water diversion from south to north contribute, but inflow from tributaries is the primary source of water to Miyun Reservoir and the primary determinant of reservoir water quality. The microbial community of rivers is an important indicator of water quality and ecological succession. To provide basic data and a scientific basis for reservoir management and water quality protection, we analyzed the community structure of the total bacteria and denitrifying bacteria in Miyun Reservoir tributaries by polymerase chain reaction (PCR) amplification and high throughput sequencing technology. Correlation of the microbi-al community with environmental parameters was examined using principal component analysis (PCA). On April 19, 2016, water samples for microbial analysis were collected from five tributaries (Chaohe Riv-er, Baihe River, Qingshui River, Duijia River and Baimaguan River) and physicochemical parameters for each sampling site were determined. The bacteria collected belonged primarily to six phyla (Proteobacte-ria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia), with absolute domi-nance by Proteobacteria in all five tributaries. Denitrifying bacteria sequences were in two phyla, Pro-teobacteria and a small fraction from Deferribacteres. The bacterial and denitrifying bacterial community structure presented obvious spatial variation. Baihe River and Chaohe River, with similar hydrological properties, displayed high similarity in bacterial composition and were very different from the other three rivers. The Shannon diversity and Chaol richness of the bacterial communities in Baihe River and Chaohe River were high, but low in Duijia River. Duijia River and Chaohe River, with high pollutant loading of N and P, exhibited similar compositions of denitrifying bacteria. PCA results indicate that pH, TOC, NH₃-N and Cl⁻ were the primary environmental parameters affecting the bacterial community, while DO, Chl-a, TP and NH₃-N were the primary environmental parameters affecting the denitrifying bacteria communi-ty. However, neither bacterial community correlated well with environmental variables in Qingshui River. The community structure of bacteria in the five tributaries is affected by a combination of hydrological and physicochemical properties and is a good indicator of water quality and trophic status. We recommend that bacterial monitoring be given more attention in reservoir management.

Key words: total bacteria; denitrifying bacteria; bacteria community structure; Miyun Reservoir