

# 《湖库沉积物功能微生物多样性监测规程》 编制说明

《湖库沉积物功能微生物多样性监测规程》编制组

二〇二四年十一月

# 目 次

1 工作简况 .....	1
2 标准制定必要性、编制依据、编制原则 .....	1
3 主要工作过程 .....	3
4 国内外相关标准研究 .....	5
5 同类工程现状调研 .....	6
6 主要技术内容及说明 .....	9
7 标准实施的环境效益与经济技术分析 .....	10
8 标准实施建议 .....	10
9 征求意见处理情况说明（送审稿） .....	11
10 技术审查工作情况说明（报批稿） .....	11

# 《湖库沉积物功能微生物多样性监测规程》编制说明

## 1 工作简况

### 1.1 任务来源

本任务来源于中华环保联合会。为准确监测湖库沉积物功能微生物多样性，指导管理部门评估湖库生态系统的营养状况，明确湖库生态系统的生态功能，制定水质生态修复技术方案，实现湖库绿色化、高效化管理，中华环保联合会于2024年1月下发了关于《湖库沉积物功能微生物多样性监测规程》团体标准(中环联字〔2023〕11号)的标准编制任务。

### 1.2 协作单位

本标准编写主要由本文件起草单位：西安建筑科技大学、河海大学、南阳师范学院、河北工程大学、中国科学院城市环境研究所。

## 2 标准制定必要性、编制依据、编制原则

### 2.1 制定必要性和重要意义

饮用水水源地保护是饮用水安全保障中最重要的一环，其水质状况直接关系到供水区人民群众的身体健康。我国水资源存在水质差、资源短缺、资源时间空间分布不合理等问题。而近些年由水源地污染引发的饮用水安全事件，给居民的生产生活造成一定程度的影响。因此，湖库水体污染的改善和修复水源水质是我国亟需解决的问题。

造成湖库水体富营养化的主要因素是外源污染和内源污染。外源污染是工农业废水的大量排放和生活污水的地表径流共同造成的；内源污染是指底泥中的污染物向外释放造成水体污染及底泥污染导致的底栖生态系统破坏的现象。近年来，随着我国对水资源保护的重视以及水源污染防治措施的实施，使得湖库水体的外源污染得到有效控制，而沉积物的内源释放成为水体污染的主要原因。

湖库沉积物中的微生物在湖库生态系统中起着举足轻重的作用。是湖库水生态环境的营养物质的主要分解者和能量储存者，具有重要的营养转化和循环作用，特别是湖库中的氮、磷等元素的循环起着至关重要的作用。污染物流入水体后在物理或化学方式作用下由水相转入固相，沉积物中功能微生物富集并降解污染物，从而形成复杂的群落结构。因此，通过监

测湖库沉积物中微生物多样性有利于评估湖库生态系统的生态功能和营养状况。

湖库沉积物环境复杂，样本的采集易受污染。现行的中华人民共和国环境保护标准 HJ 494—2009 水质采样技术指导规定沉积物可用抓斗、采泥器或钻探装置采集。抓斗式采样器主要用于采集沉积物表层混合样品，采样过程中会对水体-沉积物界面强烈扰动，不但破坏了沉积物原有分层，还会使表层沉积物在采样过程中发生再悬浮，与界面处上覆水混合，改变沉积物特性。管式采样器可用于沉积物柱状样品采集，该类采样器主要工作原理为通过重力作用使具有取样刀口下缘的取样管插入沉积物中，依靠负压和取样管底部较为密实的沉积物样品与取样管管壁之间的摩擦力将取样管取出水体。该类采样器用于含水率较大质地较软沉积物时，由于缺少封堵装置，取样可靠性差，成功率降低；用于含水率小较密实沉积物时，取样管插入沉积物深度有限，取样量较少。现有改进的具有封堵装置的管式沉积物采样器，大多结构较复杂，封堵装置起作用的时间不好控制，取样可靠性有限。且现有管式采样器由于需要手柄或连接杆操作，对于水深较大（> 5 m）的湖库难以适用。现行标准规定的沉积物采样设备难以满足日益复杂、精细的沉积物微生物检测分析。

现行标准规定的沉积物采样方法难以满足日益复杂、精细的沉积物微生物检测分析。此外，微生物多样性的分析技术主要包括：基于培养和分离传统方法；基于生物指示分子磷脂脂肪酸手段；利用分子生物学方式来分析微生物生态多样性和微生物群落变化。然而，国内外尚无明确的标准对湖库微生物的检测方法和分析手段进行规定。因此，迫切需要制定一种新标准规范湖库沉积物微生物种群的采样、运输、检测流程。

鉴于以上情况，本标准提出一套基于深水沉积物采样器、荧光原位杂交技术、定量聚合酶链式反应（quantitative polymerase chain reaction, qPCR）技术、BIOLOG 指纹代谢图谱技术、高通量测序技术和宏基因组测序技术的湖库沉积物功能微生物多样性的监测规程。本规范涉及技术可实现稳定运行，国内外暂无同等技术标准。

## 2.2 编制依据

### 2.2.1 政策法律依据

《中华人民共和国环境保护法》

《中华人民共和国水污染防治法》

《中华人民共和国水法》

《城镇排水与污水处理条例》

## 2.2.2 技术依据

GB/T 34656-2017 海洋沉积物间隙生物调查规范

GB/T 34224-2017 生物产品中功能性微生物检测

GB/T 39792.2-2020 生态环境损害鉴定评估技术指南 环境要素 第2部分：地表水和沉积物

GB17378.7-2007 海洋监测规范 第7部分：近海污染生态调查和生物检测：采泥器

GB/T 43628-2023 空气中病原微生物宏基因组测序鉴定方法

GB/T 32725-2016 实验室测定微生物过程、生物量与多样性用土壤的好氧采集、处理及贮存指南

DB4112/T 309-2022 水质无人机采样技术规程

DB13/T 5605-2022 河湖沉积污染物释放性试验规程

HJ494-2009 水质采样技术指导

HJ 442.4-2020 近岸海域环境监测技术规范 第四部分 近岸海域沉积物监测

SN/T 2632 微生物菌种常规保藏技术规程

## 2.3 编制原则

### 1) 规范性原则

本标准按照 GB/T 1.1-2020 有关规定，确定标准的结构和内在关系，标准条文层次的划分符合 GB/T 1.1 的规定。

### 2) 统一性原则

本标准的编写和表达方式在三个方面实现统一：一是标准结构的统一，即标准中的章、条、段、表、图和附录的排列顺序与 GB/T1.1 的要求统一；二是文体的统一，即类似的条款由类似的措辞来表达，相同的条款由相同的措辞来表达；三是术语的统一，即同一个概念使用同一个术语，每一个术语尽可能只有唯一的含义。

## 3 主要工作过程

### 3.1 成立标准制订编制组

2024年1月任务下达后，项目承担单位下西安建筑科技大学即成立标准制订编制组（以下简称编制组）。编制组初步拟定了标准制订的原则、工作目标、工作内容和路线，讨论了在标准过程中可能遇到的问题、标准定位及侧重点，并根据标准编制任务，制定了详细的标准编制计划与任务分工。

### 3.2 查询国内外相关标准和文献资料、编制大纲及草案

2024年1月~2月，编制组根据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》(国环规科技〔2017〕1号)、《环境监测分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2020)等相关规定，检索、查询和收集国内外相关标准和文献资料，对现有关于湖库水体和沉积物采样方法、监测手段、研究进展以及存在的问题进行了调研，在整理借鉴的基础上进行归纳和总结，对方法中涉及的样品采集、采样保存与转运以及分析方法等的确定和选择等主要内容进行了初步的探讨和总结，确定了监测技术规程的技术路线和主要研究内容。

### 3.3 编制开题论证报告及标准草案

2024年2月~2024年3月，编制组根据拟定的技术路线，开展了湖库沉积物功能微生物采集、活性检测、种群结构检测等相关实验研究，并在此基础上编写了开题论证报告及标准草案。

### 3.4 召开专家指导审查会

2024年4月，邀请行业内相关专家进行了标准方向、内容和规划等方面的审查，并提出了标准草案相关修改意见。2024年5月，邀请专家对团体标准制定流程及相关要求进行深度解析，标准主编人员汇报标准编制进度、修改情况及待解决的问题，专家对存在的问题提出可行性建议。

### 3.5 召开立项评审会

2024年6月13日，中华环保联合会组织召开了本项目立项评审会。专家委员会听取了编制汇报，经质询和讨论，通过了本项目的立项审查，并提出以下主要修改意见：

- (1) 标准内容章节目录名称调整：监测内容、项目、要求、方法、步骤、流程；
- (2) 标准名称中功能微生物缺少确切定义；
- (3) 参考现有监测规程框架结构修改全文；
- (4) 文本需进一步突显规程的创新性，与水源水质标准相关联；
- (5) 监测流程规程根据使用群体进行分类。

会后，编制组根据意见进一步对标准草案进行了完善，并对规程框架及文本格式进行了修改，并按照使用群体不同对监测规程进行分类。

### 3.6 召开专家组讨论会

2024年10月23日，中华环保联合会组织召开了专家组讨论会。专家委员会听取了标准编制汇报，经讨论，提出了以下主要修改意见：

- (1) 梳理湖库沉积物和微生物多样性等术语和定义；
- (2) 围绕沉积物和多样性等特色优化各章节内容，有现行标准的可直接引用；
- (3) 原第八章纳入附录，新增“监测报告”章节；
- (4) 按照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》

给出的起草规则修改标准条款格式。

审查专家组一致同意通过《湖库沉积物功能微生物多样性监测规程》团体标准草案稿技术审查，请编制组根据专家的具体意见尽快修改完善后形成征求意见稿。

会后，编制组根据专家修改意见对标准草案进行了进一步修改和完善，并对格式进行了修改。

### 3.7 召开征求意见稿技术审查会

2024年11月18日，中华环保联合会组织召开了本项目的征求意见稿技术审查会。专家组听取了标准编制组的汇报，经过质询、讨论，专家组通过了该标准征求意见稿的技术审查，并提出以下修改意见和建议：

- (1) 开会后补充；

会后，编制组按照专家意见对标准文本征求意见稿和编制说明进行了修改。

## 4 国内外相关标准研究

目前国内有关湖库沉积物的标准有：GB/T 34656-2017 海洋沉积物间隙生物调查规范、DB13/T 5605-2022 河湖沉积污染物释放性试验规程、HJ494-2009 水质 采样技术指导、DB4112/T 309-2022 水质 无人机采样技术规程等标准；有关功能微生物的标准有：GB/T 34224-2017 生物产品中功能性微生物检测；但还没有有关湖库沉积物功能微生物多样性监测方面的技术标准。

## 5 同类工程现状调研

### 5.1 西安市李家河水库沉积物酶活性和真菌种群结构空间异质性监测项目

#### 5.1.1 项目概况

李家河水库位于西安市的东南部灞河支流辋川河中游，是西安市第二大水源地。水库坝高 98.5 m，总库容 5690 万 m<sup>3</sup>，供水设计流量 3.2 m<sup>3</sup>/s，年平均供水量 5600 万 m<sup>3</sup>。李家河水库最大水深约 70 m，年平均水深 56 m，属于峡谷型水库，河槽覆盖沙卵砾石，库区河流呈 S 型趋势。雨季时期发生滑坡泥石流，携带污染物入库区，影响水质。李家河水库布置六个采样点，汇流处（LJH1、LJH2、LJH3）、引水塔（LJH4、LJH5）、坝前（LJH6），在 2017 年 8 月在李家河水库六个采样点采集泥样。利用采泥器采集表层沉积物，将采集的样品装入 100 mL 的离心管，立即带回实验室。将样品分为两部分处理，一部分用于测定酶活性和理化因子，另一部分于 -20°C 条件下保存，测定真菌群落多样性。

#### 5.1.2 项目检测状况总结

通过对李家河水库不同位点沉积物 V3-V4 区测序，样品的原始序列条数为 305821，对读子（reads）的质量进行质控过滤后有效序列的总数为 259533，Rank-abundance 曲线用来解释物种丰度和物种均匀度。物种丰富度排列大小 LJH1>LJH5>LJH6>LJH2>LJH4>LJH3，LJH3 的曲线最陡峭，表明物种分布最不均匀。

不同位点沉积物真菌群落在多样性和丰富度上有显著差异，样品中真菌群落的覆盖度均可达到 99%，说明所分析的序列数量可以代表样本中的真菌多样性。在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU，6 个样品共产生 4168 个 OTUs，平均测序长在 201-250bp 之间。通过对 Chao1 指数对沉积物真菌丰度进行评估，LJH1 的 Chao1 指数最高，是 LJH3 的 1.24 倍，表明 LJH1 中真菌的丰度最大。通过对 Shannon diversity (H') 指数分析，最大值 LJH1 (H'=4.94) 和最小值 LJH3 (H'=4.37) 均出现在汇流区，表明 LJH1 真菌群落多样性最高，同时 LJH1 的 Simpson 指数最低 (D=0.0188)。

李家河水库沉积物真菌群落在门水平上，主要有子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota)，其中子囊菌门 (Ascomycota) 约占 1.97%~12.68%，担子菌门 (Basidiomycota) 约占 0.29~1.52%，另外有未分类真菌 (Unclassified) 大量存在，约占 84.77~97.12%。李家河沉积物中存在大量为分类真菌说明李家河水库生态系统为特殊生境，形成了特殊的真菌种类。

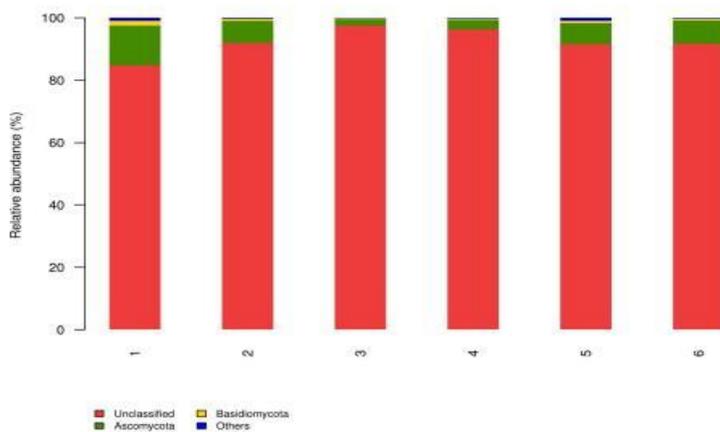


图 1 李家河水库沉积物门水平真菌种群结构

## 5.2 西安市金盆水库沉积物酶活性和细菌群落垂向演替监测项目

### 5.2.1 项目概况

金盆水库是西安市黑河引水系统的重要水源地，坐落于周至县境内，是峡谷深水型水库。金盆水库坝高达 129 m，黑河水库总库容 2.00 亿 m<sup>3</sup>，水质较好，流域周围地层以第四系松散岩层堆积，上游森林植被覆盖，兼有村镇散落分布。因此，大量泥沙和富含氮磷的污染物径流入库并沉积于库底。于主库区布置两个采样点 JP1、JP2，2018 年 3 月、2018 年 5 月、2018 年 7 月用柱状采样器在这两个点采集 25 cm 长的柱状沉积物，沉积物柱在现场 0~15 cm 按 3 cm 间隔分割，15~25 cm 按 5 cm 间隔分割，分割所得沉积物样品装入直径 11 cm 培养皿内置保温箱中存放，立即带回实验室进行检测。

### 5.2.2 项目检测状况总结

通过对金盆水库不同位点沉积物 V3-V4 区测序，样品原始序列条数为 606216，对读子 (reads) 的质量进行质控过滤后有效序列的总数为 579788。在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU，18 个样品共产生 504778 个 OTU，平均测序长在 351-400 bp 之间。对不同月份的 OTU 进行统计，7 月 (OTU = 181793) > 5 月 (OTU = 160434) > 3 月 (OTUs = 162551)，7 月 JP2 底部细菌数量最大，JP2 表层细菌数量最小，稀释曲线随 OTU 的变化趋缓。18 个沉积物样品细菌群落在多样性和丰富度上均有差异，样品中细菌群落的覆盖度均达到 96% 以上，通过对 *Chao* 1 指数对沉积物细菌丰度进行评估，除了 3 月 JP1 点中部 *Chao* 1 指数最高，底部沉积物的 *Chao* 1 指数高于中部和表层，表明沉积物底部的细菌丰度高于中部和表层。通过对 Shannon diversity (*H'*) 指数分析，最大值 *H'* 均出现在底部，然而表层和中部的 *H'* 差异性较小。随着分层的形成，表层和中部的 *H'* 差异越明显，7 月 JP2 的表层和底部差异显著，底部的 *H'* 是表层的 2 倍，而相同时期的 JP1 和 JP2 点的 *H'* 差异较小。OTUs 在基因文库中分布的均匀度可通过 Simpson 指数表示，除了 3 月 JP1 点中部 Simpson 指数显著高于

表层和底部，其余各样品均为表层>中部>底部，表明样品中的 OTUs 不均匀主要在表层。

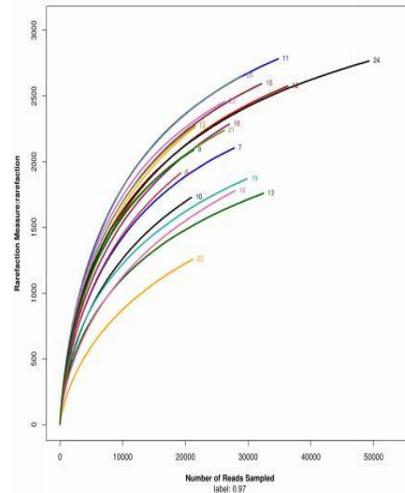


图 2 金盆水库沉积物细菌种群测序 Rank-abundance 曲线

金盆水库沉积物主要是以厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和绿弯菌门 (Chloroflexi) 为主。沉积物垂向分布结果表明, JP2 点的 3 月和 5 月底部细菌群落组成类似, 细菌丰度大小依次为厚壁菌门 (Firmicutes) > 拟杆菌门 (Bacteroidetes) > 变形菌 (Proteobacteria) > 绿弯菌门 (Chloroflexi) > 酸杆菌门 (Acidobacteria)。金盆水库沉积物表层细菌群落相似度高, 优势菌属为厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 不同时期以及不同采样点的细菌丰度在表层和中部略有差异, 表层和底部细菌群落结构差异较大。

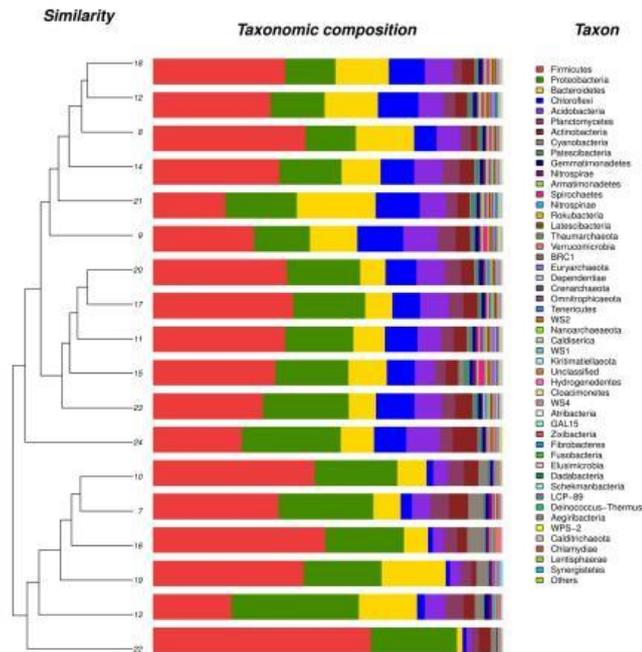


图 3 金盆水库沉积物细菌门水平种群结构

## 6 主要技术内容及说明

### 6.1 样品采集

利用新型深水沉积物采样器（图 4）采集湖库沉积物样本。该采样器利用筒体自身重力下降至采样水位后，通过提升开闭拉绳控制阀体上升，打开筒体阀口，湖库水底泥水界面处的水和泥进入采样器中，松开开闭拉绳，阀体因重力作用下沉，从而关闭阀口，完成采样。

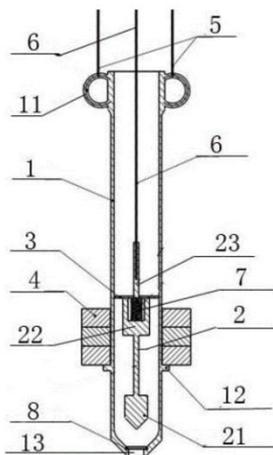


图 4 深水沉积物采样器

### 6.2 样品保存与转运

将采集沉积物样品存放于灭菌后的 50 mL 离心管中。用封口膜封存离心管后放置于存放有冰袋的储存箱中，于 3 h 内运送至实验室进行微生物分析，样品存于 4°C 冰箱中。

### 6.3 微生物数量分析

沉积物均质化取经过预处理并低温（4°C）暗存样品，以无菌水进行稀释处理：包括 1000 倍、2000 倍及 3000 倍 3 种稀释处理，加入少量曲拉通（最终浓度 0.1%）。将每种稀释处理样品用 280W 超声仪（AS10200BDT）分别进行 10 min 的超声浴。每种处理进行 3 个重复；DAPI 染色对于第 1 步中取得最佳均质化条件的样本，取 1mL 子样品，加入少量 DAPI 使染色剂。室温下暗室染色 30 min。制片及第一次计数将染色后样品过滤至 0.2 μm 的黑色聚碳酸酯膜上，并用少量无菌水洗涤。滤膜在载玻片上干燥 5 min，在荧光显微镜紫外光下计数（视野放大 400 倍）。随机选择 20 个视野以上，只计算清晰可见且为蓝光的细胞。褪色及第二次计数取 DAPI 染色并第一次计数后的膜，加入 1mL 60~70°C 异丙醇洗涤（1 min）。滤膜在载玻片上风干 5 min，在荧光显微镜紫外光下计数（视野放大 400 倍）。随机选择 20 个视野以上，只计算清晰可见且为蓝光的细胞。

## 6.4 微生物代谢活性分析

称取干重质量为 1 g 的新鲜沉积物，加入 9 mL 0.85% NaCl 无菌溶液，放置于摇床振荡（200 r/min）30 min；采用 10 倍稀释法，用 0.85% NaCl 的无菌溶液将其稀释至  $10^{-3}$  浓度的悬浮液；在无菌工作台上，并将稀释好的沉积物悬浮液接种到 ECO 板（EcoPlate™, BIOLOG, Hayward, CA, 美国）中，每孔 150  $\mu$ L，将接种的 ECO 板转移至聚乙烯箱中置于 28°C 暗箱培养，每隔 12 h 将 ECO 反应微平板读数器在 590 nm 处记录 1 次，连续培养 240 h。

## 6.5 微生物功能与种群结构分析

取 10 g 样品用于沉积物微生物种群高通量测序。样品 DNA 提取按 CTAB/SDS 方法，在 1% 琼脂糖上检测 DNA 浓度和纯度，用无菌水将 DNA 稀释到 1 ng/ $\mu$ L。采用细菌/真菌通用引物对转录间隔区进行 PCR 扩增。将 PCR 产物和缓冲液（含 SYB 荧光燃料）等量混合，用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测，选取 400 - 450 bp 之间的条带的样品。利用 GeneJET 凝胶回收试剂盒（赛默飞，美国）进行纯化。参照电泳初步定量结果，将 PCR 产物用 QuantiFluor™ -ST 蓝色荧光定量系统（Promega 公司）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。构建 PacBio 文库；进行 PacBio 测序。PacBio 数据下机后，使用仪器自带的 SMRTLINK (v9) 进行一致性 CCS 序列（circular consensus sequencing）的获得，CCS 序列的准确性达到 QV20（99% 准确率）水平。

## 7 标准实施的环境效益与经济技术分析

本标准的实施，将为湖库水体水质安全管理提供引领，对湖库水体-沉积物系统微生物安全监测与评估将产生深远影响，提高我国环境生态管理产业的核心竞争力；显著降低水体富营养化的风险，源源不断为我国提供高品质饮用水，助力打造优质水生态系统，提高公众对环境的满意度，形成良好的社会效应和环境效益。

## 8 标准实施建议

本标准发布后，可为湖库水质安全管理、湖库沉积物功能微生物监测提供技术依据。建议标准发布后，作为行业的一种推荐标准实施，在湖库管理部门、设计院、研究院等相关单位进行广泛宣贯。

9 征求意见处理情况说明

10 技术审查工作情况说明