

ICS 07.100

CCS A 40

团 体 标 准

T/ACEF 195—2025

湖库沉积物微生物多样性检测分析规程

Code of Procedures for Detecting and Analyzing Microbial Diversity in Lake and
Reservoir Sediments

2025-04-18 发布

2025-04-18 实施

中 华 环 保 联 合 会 发布

目 次

1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 工作程序	2
5 采样点布设	2
6 样本采集	2
7 转运与储存	2
8 检测与分析	3
9 检测报告	5
附录 A （资料性）采样器操作方法	6
附录 B （资料性）采样信息登记表	10
附录 C （资料性）沉积物微生物形态学分析前处理方法	11
附录 D （资料性）激光共聚焦显微镜获取微生物形态图像处理步骤	12
附录 E （资料性）代谢指纹技术可测定碳源种类	13
附录 F （资料性）代谢指纹技术测定沉积物微生物代谢活性前处理流程	14
附录 G （资料性）代谢指纹技术测定沉积物微生物代谢活性检测流程	15
附录 H （资料性）沉积物微生物代谢活性数据处理与分析流程	16
附录 I （资料性）沉积物 DNA 提取方法	17
附录 J （资料性）高通量测序流程	18
附录 K （资料性）微生物物种和功能注释流程	19
附录 L （资料性）沉积物微生物种群多样性和丰富度数据处理与分析流程	21

前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分:标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件为首次发布。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由西安建筑科技大学、中华环保联合会水环境治理专业委员会提出。

本文件由中华环保联合会归口。

本文件主编单位：西安建筑科技大学。

本文件参编单位：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、中国科学院南京地理与湖泊研究所、宁夏环境科学研究院（有限责任公司）、广州尚广环保科技有限公司、水利部中国科学院水工程生态研究所、中华环保联合会水环境治理专业委员会。

本文件主要起草人：张海涵、陈娟、李玉英、柴蓓蓓、王春霞、杨军、刘涛、刘祥、马奔、王洵、刘韩、李奕璇、门志高、牛富、董淑萍、赵中华、王英超、徐国胜、赵媛、张俊芳、李伟。

湖库沉积物微生物多样性检测分析规程

1 范围

本文件规定了湖库沉积物微生物多样性检测分析的工作程序、采样点布设、样本采集、样本转运与储存、检测与分析 and 检测报告等。

本文件适用于湖泊和水库沉积物微生物多样性检测分析。

2 规范性引用文件

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

GB/T 43628	空气中病原微生物宏基因组测序鉴定方法
HJ 493	样品保存和管理技术规定
HJ 494	水质 采样技术指导
SN/T 3509	实验室样品管理指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

湖库沉积物 **Lake-reservoir sediments**

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

3.2

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

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

3.3

微生物多样性 **Microbial diversity**

微生物分类、物种数量、物种构成等的微生物种群多样性。

3.4

代谢指纹技术 Metabolic fingerprinting techniques

基于不同底物诱导下的代谢响应模式，测算环境样本中微生物群落代谢功能多样性的技术。

4 工作程序

湖库沉积物微生物多样性工作程序宜包括采样点布设、样本采集、样品转运与储存、检测与分析 and 检测报告，工作程序如图 1 所示。

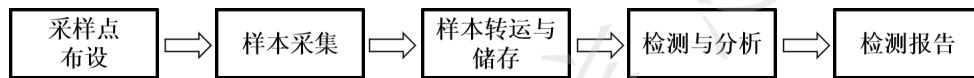


图 1 湖库沉积物微生物多样性工作程序

5 采样点布设

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

5.2 采样区域内，采样点选择应符合下列规定：

- a) 应采集湖泊和水库入口和出口，大坝岸和中间位置；
- b) 采集样品应按周边环境确定，宜采集湖泊和水库距工厂和农业地区较近的岸边；
- c) 采样点应根据湖库深度合理选择；
- d) 以上点位确定后，可在采样稀疏的地方适当增加点位，湖库布点宜均匀。

6 样本采集

6.1 采样前，应对无菌自封袋编号，对冰箱提前预冷；并检查采样仪器完整性；应按 HJ 494 的规定执行，采集和盛放样品的设备均应杀毒灭菌。

6.2 采样应根据定位仪确定的经纬度信息在已确定的采样地点采样。

6.3 采样的同时应对周围环境拍照；测量采样点处水深并记录；合理选择采样器采集沉积物，采样器操作方法见附录 A，采集的沉积物应放进已经标记好的无菌自封袋封存。

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

7 样品转运与储存**7.1 转运**

分装后的沉积物样品，应存放至温度 0°C 的便携式冰箱或干冰转运。

7.2 储存

a) 储存应按 HJ 493 和 SN/T 3509 的规定执行；

- b) 用于微生物形态学及代谢活性分析样品应储存于-20℃的低温冰箱中；
- c) 用于微生物种功能与种群结构分析样品应储存于液氮或-80℃超低温冰箱中。

8 检测与分析

8.1 微生物形态学分析

8.1.1 分析项目

分析项目应包括下列内容：

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

8.1.2 分析流程

- a) 沉积物微生物形态学分析前处理方法可参照附录 C。
- b) 沉积物微生物形态学分析流程如图 2 所示。采用激光共聚焦显微镜获得微生物形态图像，处理步骤见附录 D。

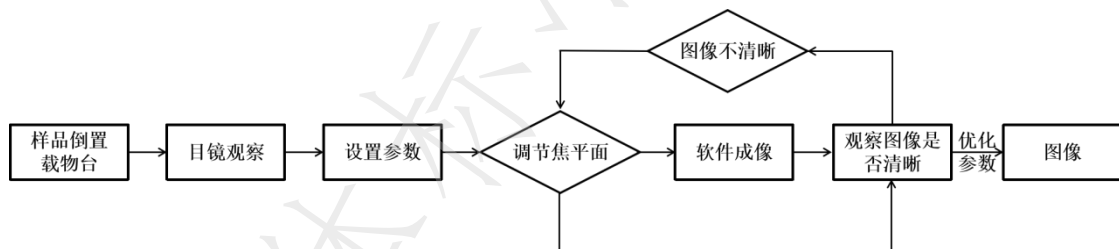


图 2 沉积物微生物形态学分析流程图

8.1.3 数据处理与分析

数据处理与分析应采用 AutoQuant 等图像处理软件对获得的显微镜图像处理与后续分析。

8.2 微生物代谢活性分析

8.2.1 分析项目

微生物代谢活性测定宜采用代谢指纹技术。识别沉积物中微生物对碳源的利用能力，碳源种类见附录 E。

8.2.2 测定流程

- a) 代谢指纹技术测定流程如图 3 所示。

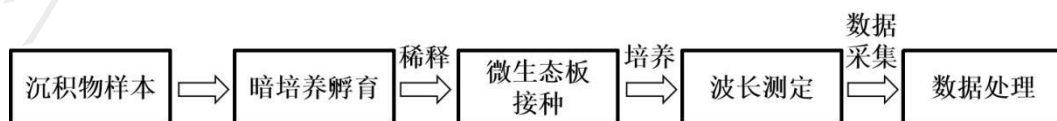


图 3 代谢指纹技术测定流程

- b) 前处理时，宜对沉积物进行暗培养提取培养液，培养液稀释处理后接种至微生物板。

前处理流程见附录 F。

c) 将接种培养液的微生态板连续暗培养并测定光密度, 检测流程见附录 G。

8.2.3 数据处理与分析

数据处理与分析时, 应计算微生态板每孔平均颜色变化率 ($AWCD$) 用于评估微生物碳源代谢活性, 并计算香农 (Shannon) 指数和辛普森 (Simpson) 指数评估微生物群落功能丰富度及评估微生物群落功能优势度指数。数据处理与分析流程见附录 H。

8.3 微生物功能与种群结构分析

8.3.1 分析项目

a) 高通量测序: 应识别沉积物中微生物群落组成, 评估微生物种群丰富度和均匀度。

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

8.3.2 测定流程

a) DNA 提取: 沉积物样品宜开展 DNA 提取。沉积物 DNA 提取方法可参照附录 I。

b): 宜按荧光定量、文库构建、测序和物种注释与评估进行, 高通量测序流程见附录 J。

c) 宏基因组测序: 应按 GB/T 43628 的规定执行, 物种和功能注释流程见附录 K。

8.3.3 数据处理与分析

数据处理与分析时, 应采用乔伊 (Chao1)、基于丰度的覆盖估计值 (ACE)、香农 (Shannon) 和辛普森 (Simpson) 指数反映沉积物微生物种群多样性和丰富度。数据处理与分析流程见附录 L。

9 检测报告

检测报告可按表 1 填写。

表 1 _____ 湖（库）沉积物微生物多样性检测报告

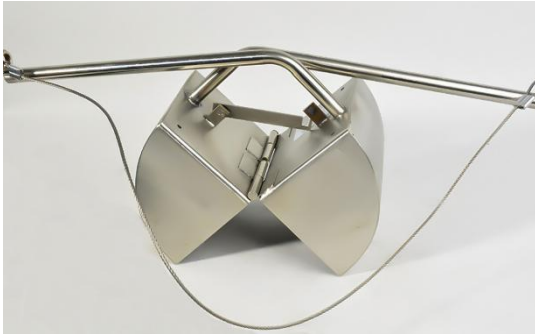

检测指标		采样点 1	采样点 2	采样点 3	采样点 4	采样点 5	采样点 6
采样点经度							
采样点纬度							
采样点深度 (m)							
微生物代谢活性分析	每孔平均颜色变化率 <i>AWCD</i>						
	Shannon 指数						
	Simpson 指数						
微生物功能与种群结构分析	Chao1 指数						
	ACE 指数						
	Shannon 指数						
	Simpson 指数						
	优势物种 1						
	优势物种 2						
	优势物种 3						
检测结论及建议:							

现场检测人:

计算人:

校核人:

附录 A
(资料性)
采样器操作方法

采样器	采集沉积物深度	特点	操作方法	示意图
彼得森抓斗式采泥器	0~5 cm	优点：操作简便； 缺点：不能滤去采集到的多余水分；只能采集表层的沉积物；对沉积物有扰动。	a) 野外工作时，首先把取样抓斗和绳子拉好； b) 将取样抓斗打开，再打开的同时，将挂钩扣上，取样抓斗不紧闭； c) 通过绳子慢慢地将采样器放入水中，当到湖（库）底时，轻松一下绳子、抓泥斗脱钩； d) 用力拉起取样抓斗，抓斗自动关闭，在关闭的同时将湖（库）底沉积物采入取样抓斗中；然后上提得到沉积物样品。	
抓斗滤水式采泥器	0~5 cm	优点：可去除采集沉积物过多的水分；操作简便； 缺点：只能采集到表层的沉积物；对沉积物有扰动。	a) 重排列将直径 10~12 mm 的提升用缆绳系在脱钩器一端的卸扣上，用脱钩器上的钩勾住连杆交接件顶部扣件，提起绳子，此时采泥器展开； b) 将采泥器展开放入水中，自然下沉，采泥器沉到水底时，抖动绳子，让挂钩松开钩住的钢丝绳； c) 双手往上提采样绳子，此时采泥器开口闭合，将采泥器提出水面，提起两侧的拉杆张开采泥器，倒出沉积物，收集沉积物样本。	

<p>分层箱式采泥器</p>	<p>0~2 cm</p>	<p>优点：对沉积物原样扰动小；采样量少； 缺点：操作较为繁琐，只能采取表层沉积物。</p>	<p>a) 重排列将绳子系在挂钩的另一端孔，然后将挂钩钩住两边的钢丝绳，用双手提起采泥器，此时采泥器展开； b) 将采泥器展开放入水中，自然下沉，等沉到水底，抖动下绳子，让挂钩松开钩住的钢丝绳； c) 双手提采样绳子，此时采泥器活页将关闭，将采泥器提出水面，提起两侧的钢丝绳，把沉积物倒出，收集沉积物样本。</p>	
<p>重力柱状采泥器</p>	<p>可采取任意深度采集器</p>	<p>优点：可采集多层沉积物，操作简便； 缺点：对沉积物的扰动较大。</p>	<p>a) 当取样器进入水中时，透明树脂玻璃管顶端的塑料阀门打开，确保水自由流过取样器管； b) 柱状采泥器可通过用手推或自身重力插入采样底部； c) 当采到样品时，将取样器从沉积物中取出，在上升过程中，取样器顶端的阀门由于水压作用关闭。向上移动产生真空作用，使得样品保留在管中而不损失； d) 当取样器从水中取出后，通过活塞将沉积物样本取出。</p>	

<p>沉积物采集器</p>	<p>可采取任意深度采集器</p>	<p>优点：可根据需求采集不同深度的沉积物，对沉积物的扰动比较小； 缺点：操作较为繁琐。</p>	<p>a) 依据需求将一定数量的配重 4 安装于采样器筒体 1 上的配重座 12 上； b) 依次放入采样器阀体 2、弹簧 7 和限位件弹簧片 3，并将弹簧片和采样器筒体 1 紧固连接，通过侧向螺钉连接弹簧片和筒体 1； c) 将升降拉绳 5 与耳状环 11 连接，将开闭拉绳 6 与采样器阀体 2 的导向杆 23 连接； d) 拉紧开闭拉绳 6，将采样器放入水中，并缓缓下降至采样器不再继续下降，在采样器重力作用下，湖库水底泥水界面处的水和泥进入采样器中，完成采样过程； e) 松开开闭拉绳 6，向上提升降拉绳 5，采样器阀体 2 在自身重力和弹簧 7 的作用下闭合阀口 13，通过升降拉绳 5 将采样器缓缓提出水面，收集沉积物样本。</p>	
---------------	-------------------	------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

附录 B
(资料性)
采样信息登记表

采样湖库名称:		采样日期:			采样当日天气及气温:	
采样点名称	采样点 1	采样点 2	采样点 3	采样点 4	采样点 5	采样点 6
采样经度						
采样纬度						
采样深度						
采样指标 1						
采样指标 2						
采样指标 3						
采样指标 4						
采样指标 5						
采样指标 6						

附录 C

(资料性)

沉积物微生物形态学分析前处理方法

- C.1 将载玻片置于盐酸乙醇溶液中浸泡清洗 30 min，取出在自然晾干。
- C.2 将晾干后的载玻片放入 0.01% 的多聚赖氨酸溶液中浸泡 5 min，取出后放入 60℃ 的烘箱烘干或室温晾干，使载玻片表面带有正电荷的赖氨酸涂层。
- C.3 定量吸取 1 mL 饱和含氧水孵育 15 天后的新鲜湖库沉积物，加入 3 mL 质量分数为 4% 多聚甲醛溶液，轻轻混匀后置于 4℃ 冰箱固定 3 h 以上或过夜。
- C.4 多聚甲醛固定后将样本在 6000 r/min 的条件下离心 2 min，移去上清液。
- C.5 加入 3 mL 磷酸盐缓冲溶液重悬沉积物，在 6000 g 的条件下离心 2 min，移去上清液，此步重复操作 3 次洗去多余的多聚甲醛溶液。
- C.6 加入 1 mL 无水乙醇/磷酸盐缓冲溶液 (v/v=1:1) 混合溶液重悬沉积物，随后放入 -20℃ 冰箱保存备用。
- C.7 取 3 μ L 固定后沉积物样品涂在预处理后的载玻片上并展开，在 46℃ 烘箱烘干使得样本粘附在载玻片上。
- C.8 随后将附着样本的载玻片依次浸入 50%、80%、96% 的乙醇溶液，每个梯度浸没 3 min，最后自然晾干。
- C.9 将探针用无菌水配置成浓度为 10 μ mol/L 并分装，荧光原位杂交前取分装好的探针溶液与荧光原位杂交缓冲液按体积比 1: 9 混合，使得探针的终浓度为 1 μ mol/L，用锡箔纸包好放入 46℃ 水浴锅中预热数分钟。
- C.10 将预热后的探针完全覆盖载玻片上的样本，并将载玻片迅速转移到杂交管，在 46℃ 下于黑暗潮湿中杂交 2-3 小时。
- C.11 提前将荧光原位杂交洗脱缓冲液预热到 48℃。
- C.12 待荧光原位杂交完成后，将载玻片快速放入 48℃ 预热后的洗脱缓冲液中，放入 48℃ 黑暗恒温烘箱中洗脱 30 min。最后在暗处用 4℃ 超纯水洗掉载玻片上多余盐分，并自然晾干。
- C.13 将风干后的载玻片用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 覆盖样本，在 4℃ 暗处染色 15 min，染色结束后用 4℃ 超纯水洗掉多余的 DAPI，暗室自然晾干。
- C.14 待样本自然风干后，用适量封片剂覆盖样本并盖上盖玻片。最后使用激光共聚焦显微镜成像观察。

附录 D

(资料性)

激光共聚焦显微镜获取微生物形态图像处理步骤

- D.1 将制好的样品置于激光共聚焦显微镜载物台上，根据标记探针引物的特性在电脑上设置相应参数，调节焦平面，在显微镜下清晰观察样品，依次设置激光通道、物镜放大倍数、激光强度、图像分辨率、增益和负背景，并将结果显示到电脑软件上成像。
- D.2 观察目镜下微生物染色情况时，应包括染色区域、位置以及对应的染料，根据实验要求可观察一种或多种微生物分布情况，通过调节物镜倍数还可观察到微生物形态结构，输出图像。

附录 E
(资料性)

代谢指纹技术可测定碳源种类

酸类	糖类	氨基酸类	酯类	醇类	胺类
D-半乳糖醛酸	D-木糖	L-精氨酸,	丙酮酸甲酯	I-赤藻糖醇	苯乙基胺
D-氨基葡萄糖 酸	α -D-乳糖	L-天冬酰胺酸	吐温 40	D-甘露醇	腐胺
2-羟苯甲酸	β -甲基 D-葡萄糖 糖苷	L-苯基丙氨酸	吐温 80	D,L- α -甘油	N-乙酰基-D-葡萄糖 胺
4-羟基苯甲酸	葡萄糖-1-磷酸 盐	L-丝氨酸	D-半乳糖酸 γ - 内酯		
γ -羟基丁酸 衣康酸	α -环状糊精 肝糖	L-苏氨酸 甘氨酸-L-谷氨 酸			
α -丁酮酸 D-苹果酸	D-纤维二糖				

附录 F

(资料性)

代谢指纹技术测定沉积物微生物代谢活性前处理流程

- F.1 取湿重为 1 g 新鲜沉积物用 9 mL 无菌 0.05 M 磷酸缓冲液稀释。
- F.2 经暗培养振荡培养 30 min 后，在超净工作台对暗培养液进行梯度稀释。
- F.1 将稀释后沉积物样本转移至灭菌水槽中，通过移液枪转接到微生态板。

附录 G

(资料性)

代谢指纹技术测定沉积物微生物代谢活性检测流程

- G.1 使用电子移液枪将悬浮液接种至微生态板后，在暗培养箱培养 240 h。
- G.2 间隔 12 或 24 h，应用微生态系统的微平板读数器，测定微生态板在 590 nm 及 720 nm 波长下的光密度值。
- G.3 完成数据采集、存储与导出。

附录 H

(资料性)

沉积物微生物代谢活性数据处理与分析流程

H.1 每孔平均颜色变化率 ($AWCD$) 可表征微生物群落对碳源利用的总能力, 宜按下式计算:

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

式中:

A_i —第 i 孔的相对吸光度;

A_{A1} —A1 孔的相对吸光度。

H.2 Shannon 指数 (H') 用于评估微生物群落功能的丰富度, 宜按下式计算:

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

式中:

P_i —第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

H.3 Simpson 指数 (D) 用于评估微生物群落功能优势度指数, 宜按下式计算:

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

式中:

A_i —第 i 孔的相对吸光度;

N —相对吸光值总和。

附录 I
(资料性)
沉积物 DNA 提取方法

1.1 仪器和材料

- a) 水浴锅;
- b) 最大离心力不小于 $12000 \times g$ 的小型高速离心机;
- c) 1.5 mL 离心管;
- d) 75%乙醇、无水乙醇、RNase A (10 mg/mL) ;
- e) 氯仿等。

1.2 提取方法

a) 称取 100~300 mg 的土壤, 加入 400 μL 65°C 预热的 Buffer SCL, 震荡混匀, 置于 65°C 水浴 5 min。

注: 每次使用前检查 Buffer SCL 是否出现沉淀, 如有沉淀, 于 65°C 溶解后使用。提前将水浴锅调至 65°C 备用。

b) 震荡混匀时应将管底的土壤震荡起来。样品较多时可适当延长水浴时间。

c) 需要得到无 RNA 的 DNA, 可在水浴后加入 20 μL 的 RNase A (10 mg/mL), 室温放置 2~5 min。

d) 12000 r/min 室温离心 3 min。吸取上清至一个干净的 1.5 mL 的离心管中。

e) 加入等体积 Buffer SP, 颠倒混匀, 冰浴 10 min。

f) 12000r/min 室温离心 3 min。吸取上清至干净的 1.5 mL 的离心管中。

g) 加入 200 μL 氯仿, 充分混匀, 12000r/min 离心 5 min。吸取上层水相至干净的 1.5 mL 的离心管中。

h) 加入 2 倍体积无水乙醇, 颠倒 5~8 次使之充分混匀, 室温放置 2~3 min。室温 10000 r/min 离心 5 min, 弃上清。

i) 加入 1 mL 75%乙醇, 颠倒漂洗 1~3 min, 10000r/min 离心 2 min, 弃上清。

j) 重复步骤。

k) 开盖室温倒置 5~10 min 至残留的乙醇完全挥发。

l) 得到的 DNA 用 50~100 μL TE Buffer (TE Buffer 为 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 溶解。提取的 DNA 可立即进行下一步实验或 -80°C 保存。

附录 J

(资料性)

高通量测序流程

J.1 荧光定量。选择所需功能基因条带对提取 DNA 进行荧光定量 qPCR 分析。每个样本重复 3 次。将 PCR 产物用荧光定量系统检测定量，之后按每个样本测序量要求，进行相应比例混合。

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

J.3 Illumina 测序。以 DNA 片段为模版、碱基序列为引物合成目标待测 DNA 片段，使芯片上 DNA 片段的另一端随机与附近的另外一个引物互补形成“桥”。PCR 扩增产生 DNA 簇并线性化为单链，加入 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP，用激光扫描反应板表面，读取每条模板序列第一轮反应聚合的核苷酸种类。重复操作，统计每轮收集到的荧光信号结果，获知模板 DNA 片段序列。

J.4 物种注释与评估。Illumina 测序得到的 PE reads 根据 overlap 关系拼接，同时对序列质量进行质控和过滤，区分样本后进行 OTU 聚类分析和物种分类学分析。选出与 OTU 代表序列相似性在 99%以上的序列，生成 OTU 表格。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 99%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析，并分别在分类学水平统计样本的群落物种组成。

附录 K

(资料性)

微生物物种和功能注释流程

K.1 数据分析从下机原始序列开始，对原始序列进行拆分、质量剪切以及去除污染等优化处理。

K.2 使用优化序列进行拼接组装和基因预测，对得到的基因进行 NR, eggNOG, KEGG 等物种和功能注释以及分类。

K.3 数据库选择可参照表 K.1。使用 DIAMOND 软件 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/diamond/>) 将非冗余基因集与 NR 数据库 BLASTP 比对，并通过 NR 数据库对应的分类学信息数据库获得物种注释，然后使用物种对应的基因丰度总和计算该物种丰度，并在域 (Domain)、界 (Kingdom)、门 (Phylum)、纲 (Class)、目 (Order)、科 (Family)、属 (Genus)、种 (Species) 分类学水平上统计物种在样品中的丰度，构建相应分类学水平上的丰度谱 (abundance profile)。

表 K.1 数据库选择

数据库名称	数据库特点
NR (Non-Redundant Protein Database)	NR 数据库为非冗余蛋白质的氨基酸序列数据库，由 NCBI 创建并维护，内容全面，同时注释结果中包含物种信息，可作物种分类用。
COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins)	COG 数据库为 NCBI 开发的用于同源蛋白注释的数据库，将细菌、藻类和真核生物的 21 个完整基因组的编码蛋白，根据系统进化关系分类构建而成。通过鉴定蛋白与数据库比对，可预测蛋白质功能。
eggNOG (Evolutionary Genealogy of Genes: Non-supervised Orthologous Groups Database)	eggNOG 数据库为 NCBI 的 COG 数据库的扩展，收集全面的物种和蛋白序列数据。同样进行了同源基因聚类分析和对每个同源基因类的描述和功能分类。
CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes Database)	CAZy 数据库为关于能够合成或分解复杂碳水化合物和糖复合物的酶类的数据库资源，基于蛋白质结构域中的氨基酸序列相似性，将碳水化合物活性酶类归入不同蛋白质家族。CAZy 数据库中包含了碳水化合物酶类的物种来源、酶功能 EC 分类、基因序列、蛋白质序列及其结构等信息。
KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)	KEGG 数据库为整合了基因组、化学和系统功能信息的数据库。KEGG 数据库能够把从完整测序的基因组中得到的基因目录与更高级别的细胞、物种和生态系统水平的系统功能关联起来。
CARD (The Comprehensive Antibiotic Research Database)	CARD 数据库为抗性基因数据库，能够关联抗生素模块及其目标、抗性机制、基因变异等信息。

K.4 使用 DIAMOND 软件 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/diamond/>) 将非冗余基因集序列与 COG 数据库进行 BLASTP 比对, 获得基因对应的直系同源蛋白簇 (COG, Clusters of orthologous groups of proteins), 使用 COG 对应的基因丰度总和计算该 COG 的丰度。

全国团体标准信息平台

附录 L

(资料性)

沉积物微生物种群多样性和丰富度数据处理与分析流程

L.1 Chao1 指数分析宜按下式计算:

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

式中:

 S_{chao1} —估计的物种数; S_{obs} —实际观察到的物种数; n_1 —只含有一条序列的物种数; n_2 —只含有两条序列的物种数。

L.2 ACE 指数宜用来估计群落中物种数目的指数, 宜按下列公式计算:

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

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

其中,

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

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

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

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

式中:

 n_i —含有 i 条序列的物种数; S_{rare} —含有或少于 $abund$ 条序列的物种数; S_{abund} —多于 $abund$ 条序列的物种数; $abund$ —优势物种的序列数阈值, 默认 10。

L.3 Shannon 指数宜用来估算样本中微生物多样性指数, 与群落多样性成正比, 宜按下式计算:

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

式中:

S_{obs} —实际观察到的物种数；
 n_i —第 i 个物种数所含的序列数；
 N —所有的序列数。

L. 4 Simpson 指数宜用来估算样本中微生物多样性的指数，与群落多样性成反比，宜按下式计算：

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

式中：

S_{obs} —实际观察到的物种数；
 n_i —第 i 个物种所包含的序列数；
 N —所有的序列数。