ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第38卷 第4期

Vol.38 No.4

2017

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

双奖期刊

环境科学
(HUANJING KEXUE) ENVIRONMENTAL SCIENCE
第38卷 第4期
2017年4月15日

目 次

西宁近郊大气氮干湿沉降研究 …… 许稳,金鑫,罗少辉,冯兆忠,张霖, 潘月鹏,刘学军(1279)
兰州春夏季 PM_{10} 碳组分昼夜变化特征与来源分析 …… 马丽,余晔,王博,赵素平,李刚(1289)
海南三亚大气颗粒物中水溶性无机离子浓度及其粒径分布特征 …… 王璐,刘子锐,温天雪,苗红妍,王跃思(1298)
2015年北京城区大气 $PM_{2.5}$ 中 NH_4^+、NO_3^-、SO_4^{2-} 及前体气体的污染特征 …… 丁萌萌,周健楠,刘保献,王焱,张博韬,石爱军,杨懂艳,常淼(1307)
北京市某垃圾焚烧厂周边大气二噁英污染特征及暴露风险 …… 齐丽,任玥,刘爱民,黄业茹,赵震,王江,李泓(1317)
北京和保定地区大气细颗粒物中可培养细菌的种群特征 …… 胡亚东,马安周,吕鹏翼,张扬,庄国强(1327)
基于实时交通数据的南京市主次干道机动车排放特征分析 …… 李笑语,吴琳,邹超,张意,毛洪钧,荆博宇(1340)
过渡金属掺杂对镧锡烧绿石催化碳烟燃烧性能的影响 …… 李曦峰,孙宇琦,王仲鹏,牟宗刚,崔兆杰(1348)
南水北调中线北京段水质状况分析 …… 徐华山,赵磊,孙昊苏,任玉芬,丁涛,常帅,王海东,李淼,果钊(1357)
三峡前置库汉丰湖试运行年水文水质变化特征 …… 杨兵,何丙辉,王德宝(1366)
基于偏最小二乘模型的河流水质对土地利用的响应 …… 李琳琳,张依章,唐常源,郑磊,孟伟,卢少勇,敦宇(1376)
抚仙湖夏季热分层时期水温及水质分布特征 …… 王琳杰,余辉,牛勇,牛远,张有林,刘倩, 吉正元(1384)
千岛湖溶解氧与浮游植物垂向分层特征及其影响因素 …… 俞焰,刘德富,杨正健,张佳磊,徐雅倩,刘晋高,严广寒(1393)
高通量测序技术研究辽河真核浮游藻类的群落结构特征 …… 王靖淇,王书平,张远,林佳宁,高欣,臧小苗,赵茜(1403)
三门湾近海有机污染对浮游细菌群落的影响 …… 戴文芳,郭永豪,郁维娜,熊金波(1414)
沉积物-水界面氮的源解析和硝化反硝化 …… 金赞芳,龚嘉临,施伊丽,金漫彤,李非里(1423)
广州南沙红树林湿地水体和沉积物中有机氯农药的残留特征 …… 丁洋,黄焕芳,李绘,罗杰,郑煌,孙焰,杨丹,张原,祁士华(1431)
太湖西岸河网沉积物中重金属污染特征及风险评价 …… 边博,周燕,张琴(1442)
锁磷剂对杭州西湖底泥磷释放的控制效果 …… 朱广伟,李静,朱梦圆,龚志军,许海,杨桂军,张运林,秦伯强(1451)
超滤处理东江水不可逆膜污染物的识别和活性炭对其吸附去除 …… 杨海燕,王灿,鄢忠森,李冬平,赵焱,瞿芳术,梁恒,徐叶琴,李圭白(1460)
UV/SPS 降解水中三氯生的效能及动力学 …… 李青松,李学艳,姚宁波,骆靖宇,李国新,陈国元,高乃云(1467)
真空紫外-亚硫酸盐法降解 PFOS 影响因素 …… 韩慧丽,王宏杰,董文艺(1477)
g-C_3N_4 协同光催化还原 Cr(Ⅵ)及氧化磺基水杨酸 …… 李莉莉,陈翠柏,兰华春,刘菲,安晓强(1483)
锆改性硅藻土吸附水中磷的研究 …… 范艺, 王哲, 赵连勤, 吴德意(1490)
3种常规消毒方法对磺胺类抗性基因削减效果的比较 …… 郑吉,周振超,陈芳,陈涛,魏媛媛,韩玥,陈红(1497)
典型生活污水处理工艺对雌激素效应的去除 …… 张秋亚,马晓妍,王晓昌,游猛(1506)
SRT 对酵母-SBR 处理油脂废水稳定性的影响 …… 吕文洲,张树林,乔宇祥,刘英(1513)
分散染料 neocron black(NB)的生物降解特性 …… 杨波,丁凤友,徐辉,李方,田晴,马春燕(1520)
多聚磷酸盐激酶基因在污水生物除磷中的功能 …… 南亚萍,周国标,袁林江(1529)
生物膜短程硝化系统的恢复及其转化为 CANON 工艺的过程 …… 付昆明,周厚田,苏雪莹,王会芳(1536)
厌氧氨氧化反应器脱氮性能及细菌群落多样性分析 …… 曹雁,王桐屿,秦玉洁,韩彬,任君怡(1544)
内环境调节层对厌氧生物反应器填埋场中氮转化的影响 …… 何正坤,宋博宇,朱南文,董军(1551)
矿化垃圾中Fe(Ⅲ)还原耦合 CH_4 厌氧去除特性 …… 王立立,何婷,龙焰,刘常宝(1558)
应用铅锶同位素示踪研究泉州某林地垂直剖面土壤中重金属污染及来源解析 …… 孙境蔚,于瑞莲,胡恭任,苏光明,王晓明(1566)
畜禽粪便有机肥中重金属在土壤剖面中积累迁移特征及生物有效性差异 …… 何梦媛,董同喜,茹淑华,苏德纯(1576)
山东省农田土壤多环芳烃的污染特征及源解析 …… 葛蔚,程琪琪,柴超,曾路生,吴娟,陈清华,朱祥伟,马东(1587)
江汉平原典型土壤环境中有机磷农药的分布特征及影响因素 …… 王建伟,张彩香,潘真真,廖小平,刘媛,吕幽,汤蜜(1597)
基于生物有效性的农田土壤磷素组分特征及其影响因素分析 …… 蔡观,胡亚军,王婷婷,袁红朝,王久荣,李巧云,葛体达,吴金水(1606)
秸秆还田对外源氮在土壤中转化及其微生物响应的影响 …… 陈珊,丁咸庆,祝贞科,王娟,彭佩钦,葛体达,吴金水(1613)
生物炭输入对城郊农业区农田地表反照率及土壤呼吸的影响 …… 张阳阳,胡学玉,邹娟,张迪,陈威,王向前,陈窈君,刘扬(1622)
淹水水稻土消耗 N_2O 能力及机制 …… 王玲,邢肖毅,秦红灵,刘毅,魏文学(1633)
不同污水处理工艺非二氧化碳温室气体的释放 …… 李惠娟,彭党聪,刘文博,姚倩,卓杨(1640)
施用不同污泥堆肥品对土壤温室气体排放的影响 …… 杨雨洽,易建婷,张成,陈宏,木志坚(1647)
不同镉水平下纳米沸石对土壤 pH、CEC 及 Cd 形态的影响 …… 迟荪琳,徐卫红,熊仕娟,王卫中,秦余丽,赵婉伊,张春来,李彦华,李桃,张进忠,熊治庭,王正银,谢德体(1654)
不同作物对外源硒动态吸收、转运的差异及其机制 …… 彭琴,李哲,梁东丽,王梦柯,郭璐(1667)
褪黑素对水稻幼芽镍胁迫的缓解作用 …… 刘仕翔,黄益宗,罗泽娇,黄永春,蒋航(1675)
不同形态磺胺类药物在根-土界面的空间分布及毒性评价 …… 金彩霞,司晓薇,王万峰,王春峰,王子英,张琴文,王婉(1683)
三峡库区消落带沉积物对鱼体富集汞的影响 …… 孙松, 李楚娴, 张成, 王永敏, 王定勇(1689)
重庆市居民头发重金属富集特征及相关性分析 …… 何明靖,李琦,王登祥,赵佳渊,杨婷(1697)
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 …… 杨浩,张国珍,杨晓妮,武福平,赵炜,张洪伟,张翔(1704)
石墨烯掺杂聚苯胺阳极提高微生物燃料电池性能 …… 黄力华,李秀芬,任月萍,王新华(1717)
美国污染场地清理的风险评估简介及政策制定 …… 容跃(1726)
《环境科学》征稿简则(1505) 《环境科学》征订启事(1682) 信息(1339, 1459, 1612)

高通量测序技术研究辽河真核浮游藻类的群落结构特征

王靖淇[1,2,3],王书平[2,3],张远[2,3]*,林佳宁[2,3],高欣[2,3],臧小苗[1,2,3],赵茜[2,3]

(1. 辽宁大学环境学院,沈阳 110036; 2. 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室,北京 100012; 3. 中国环境科学研究院流域水生态保护技术研究室,北京 100012)

摘要: 真核浮游藻类在河流生态系统中发挥着重要生态功能,本研究对辽河水环境样本的 18S rRNA 基因的 V4 可变区进行 454 焦磷酸测序,对获得的 OTU 代表性序列进行物种注释. 比较注释后的生物种类信息与光学显微镜观察结果的异同,并将 OTUs 的代表性序列与 NCBI 中真核浮游藻类的 18S rRNA 基因序列进行系统发育分析,此外研究了真核浮游藻类群落结构特征及其环境影响指标. 研究共获得约167 901条 18S rRNA 基因 V4 可变区的高质量序列,注释为 424 个 OTUs,涵盖了 134 种真核浮游藻类 OTUs. 与光学显微镜鉴别结果类似,高通量测序结果以硅藻门和绿藻门为优势类群,此外检测到轮藻门、隐藻门、定鞭藻门和金藻纲等显微镜观察结果中未有的类群. 系统发育分析可在门这一分类阶元对隐藻门和甲藻门聚类,并将隐藻门在属水平进行聚类和区分,甲藻门可以在部分科或属水平聚类和区分. RDA 结果显示,氨氮、活性磷和硝态氮是影响真核浮游藻类群落结构特征最重要的环境因子. 本研究为认识辽河水环境中真核浮游藻类的多样性、群落结构及其环境影响因子提供了新的视角,同时也预示着高通量测序技术在辽河流域浮游植物监测和水环境质量指示中的应用潜力.

关键词:18S rRNA;高通量测序;真核浮游藻类;多样性;群落结构

中图分类号: X171 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2017)04-1403-11 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201609133

Community Structure Characteristics of Eukaryotic Planktonic Algae in Liaohe River Through High-throughput Sequencing

WANG Jing-qi[1,2,3], WANG Shu-ping[2,3], ZHANG Yuan[2,3]*, LIN Jia-ning[2,3], GAO Xin[2,3], ZANG Xiao-miao[1,2,3], ZHAO Qian[2,3]

(1. College of the Environment, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 3. Laboratory of Riverine Ecological Conservation & Technology, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: Eukaryotic phytoplankton plays an important ecological function in river ecosystem. The 18S rRNA gene V4 variable region of the environmental samples in Liaohe river was sequenced by using 454 pyrosequencing technology. The reprehensive sequences of OTUs were annotated, and then the OTUs list was compared to the species list obtained by microscope observation. The phylogenetic tree was constructed based on the reprehensive sequences of OTUs and 18S rRNA genes of eukaryotic phytoplankton algae obtained from GenBank. The community structure characteristics of eukaryotic phytoplankton and its environmental impact indicators were further studied. In this study, we got 167 901 high-quality sequences of 18S rRNA gene V4 region. These sequences were annotated to 424 OTUs, including 134 eukaryotic algae. The results of the high-throughput sequencing showed that bacillariophyta and chlorophyta were the dominant groups of the total phyla. The high-throughput sequencing also revealed the presence of Charophyta, Cryptophyta, Haptophyta and Chrysophyceae which were not observed by optical microscope. The phylogeny analysis clustered the Cryptophyta and Pyrroptata at phylum level. The different genera of Cryptophyta and part of families or genera of Pyrroptata were clustered and distinguished by phylogeny analysis. The results of RDA showed that NH_4^+-N, PO_4^{3-}-P and NO_3^- were the most important environmental factors that affected the community structure. This study provided a new perspective to understand the diversity, community structure and influence factors of eukaryotic phytoplankton in Liaohe river. The study also indicated that high-throughput sequencing has great application potential in investigation of phytoplankton and the water environment quality assessment in Liaohe river.

Key words:18S rRNA; high-throughput sequencing; eukaryotic planktonic algae; diversity; community structure

辽河流域(东经 116°30′~125°47′,北纬 38°43′~45°00′之间)位于我国东北地区南部,流经吉林、辽宁、河北省和内蒙古自治区的部分市域,全流域面积 21.9×10^4 km^2. 该流域由两个水系所组成: 一为东、西辽河,于福德店汇流后为辽河干流,经双台子河由盘山入海;另一为浑河、太子河,于三岔河汇合后经大辽河由营口入海. 真核浮游藻类在辽河流域分布极为广泛,大多为光合自养的单细胞藻类,其群落的特定组成是反映诸如营养盐输入、全球气候

收稿日期: 2016-09-18; **修订日期**: 2016-11-23

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07501-001-04)

作者简介: 王靖淇(1990~),男,硕士研究生,主要研究方向流域水生态保护技术,E-mail:wangjingqi0315@163.com

* 通信作者,E-mail:zhangyuan@craes.org.cn

变化以及人类活动影响等环境变化的敏感指标[1]. 国内曾有人研究了辽河流域真核浮游藻类的群落分布特征及其对水质的评价[2~7],这些研究均需要借助显微镜观察藻细胞的形态学特征以确定种类. 对真核浮游藻类的种类鉴定需要非常丰富的分类学经验,基于形态特征精确鉴定到种甚至需要借助扫描电子显微镜等高分辨率的仪器. 在研究中由于鉴定错误而误导生态评价结果的状况也时有发生[8].

基于高通量测序技术的 DNA 宏条形码研究使得评估环境样品的生物多样性及复杂的群落结构成为可能[9]. 目前用于真核浮游藻类的 DNA 条形码基因包括核基因 ITS、18S rRNA 基因和 28S rRNA 基因,叶绿体 *rbcL* 基因,线粒体 *cob* 基因等[10~13]. 其中一些分子标记已被用于 DNA 宏条形码研究,例如 18S rRNA 基因的 V4 区或 V9 区,28S rRNA 基因的 D2/D3 区, *rbcL* 基因等[14~16]. Amaral-Zettler 等[17]通过设计两对引物扩增出 18S r RNA 基因的 V9 可变区,利用高通量测序技术成功得到了海洋原生生物的组成结构,验证了高通量技术在生物群落组成中的可行性. Zimmermann 等[18]采用形态学和 18S rRNA V4 区的宏条形码技术,对奥德拉河和尼萨河的源头到河口不同采样点的硅藻物种多样性和丰度进行了比较,发现宏条形码技术更能反映环境样品中的生物多样性,并提出了环境样品中物种鉴别的技术流程.

本研究采集了辽河干流 12 个采样点的表层水样,对水环境样品的 18S rRNA 基因 V4 可变区进行高通量测序,注释得到的 OTUs 与光学显微镜观察的结果进行比较分析. 本研究的主要目标是:①比较高通量测序技术与显微镜观察在研究真核浮游藻类多样性和群落结构特征方面的异同;②评估 18S rRNA 基因的 V4 可变区在真核浮游藻类不同分类阶元进行系统发育构建的有效性;③揭示影响该区域真核浮游藻类群落结构特征的重要环境因子. 本研究结果可以为在辽河流域开展水环境中浮游植物监测以及水生态系统健康评价提供参考和借鉴.

1 材料与方法

1.1 样品采集

研究组于 2015 年 9 月期间在辽河干流采集水样,共采集 12 个点位样品,如图 1 所示,表层水采自水体 0.5m 深. 水温(T)、总溶解固体(TDS)和电导率(EC)数据由 YSI 水质分析仪(Horiba)测量. 在各样点采集的水样(2 L),置于低温保温箱中(4℃),于 48 h 内带回实验室,根据标准方法[19],测定以下水化指标:氨氮(NH_4^+-N)、活性磷(PO_4^{3-}-P)、硝态氮(NO_3^-)、总磷(TP)、总氮(TN)和总碳(TC). 浮游真核藻类样品的采集是在每个采样点的 3 个不同生境的等体积水混合,使用纱绢对所采集水样进行预过滤除去浮游动物和较大颗粒物质,用 0.45 μm 孔径的聚碳酸酯膜(Millipore 公司)过滤采集的水样,过滤时保持压力小于 0.03 MPa,过滤时间限制在 2 h 内,过滤体积为 2 L;过滤好的膜装在冻存管中并液氮保存,送实验室进一步处理;光学显微镜观察的真核浮游藻类的种类和数量来自 2013 年 9 月的采集资料.

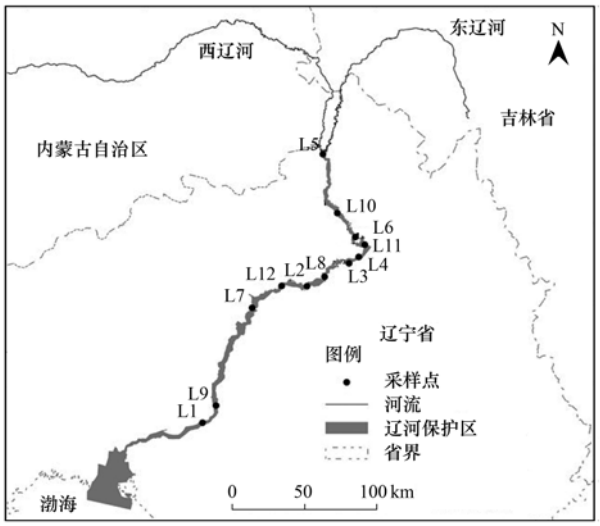


图 1 辽河干流水样采集点分布示意

Fig. 1 Location map of sampling sites in Liaohe River

1.2 DNA 提取,454 文库制备及焦磷酸测序

根据 Yuan 等[20]的方法提取环境样品总 DNA,结合使用酶、DNA 裂解液和 FastPrep-24 细胞破碎仪的方法裂解和破碎样品. 选取 euk-F:5′-GGCAAGTCTGGTGCCAG-3′,euk-R:5′-GACTACGACGGTATCTRATCRTCTTCG-3′作为真核浮游藻类第一轮 PCR 扩增的引物[21]. PCR 的反应条件为:95℃ 2 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,共 23 个循环,最后 72℃终延伸 7 min. 在设计第二轮 PCR 引物时,在引物 euk-F 的 5′端加上 10 bp 的区分不同样本的标签,并在正反向引物的 5′端引入焦磷酸测序的正反向引物. 使用 DNA 胶回收试剂盒(Takara 公司)对 PCR 产物进行纯化,纯化后的 PCR 产物使用 dsDNA 定量检测试剂盒(Promega 公司)进行定量,通过 QC-PCR 及 Agilent 2100 生物分析仪分析 PCR 产物的质量. 按照等摩尔比将不同样品的 PCR 产物混合并进行乳液 PCR,构建高通量测序文库. 使用

Roche 454 高通量基因测序系统 GS FLX + (厦门大学海洋基因组学平台)对文库进行测序.

1.3　数据处理

生物信息学分析应用 QIIME (quantitative insights into microbial ecology)软件对获得的原始序列过滤分析,存在简并碱基、低质量得分、嵌合体以及短于 150 bp 的噪声序列均被剔除. 然后用 QIIME 软件对高质量序列在相似性≥97% (默认为种水平的相似度)的划分标准上进行最佳分类单元(operational taxonomic unit, OTU)的划分. 根据 NCBI nr 数据库中的 18S rRNA 基因序列,通过 BLAST,在 80% 的相似性阈值对得到的 OTU 的代表性序列进行分类学上的注释.

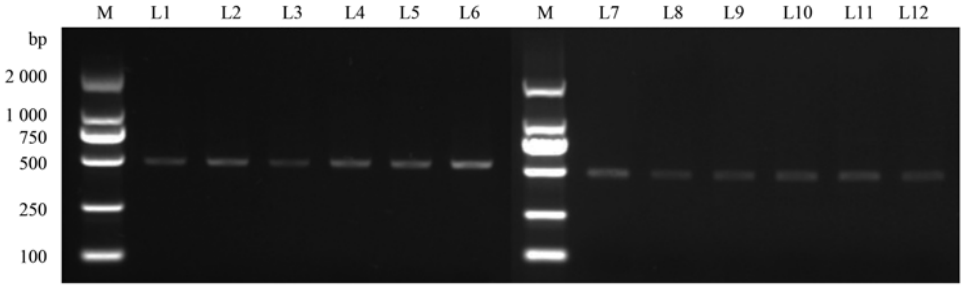
使用 Mothur 软件分析真核浮游藻类群落的 α 多样性指数(Chao1 指数、Ace 指数、Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数)[22~24]. 本研究得到的 OTUs 的代表性序列,结合 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore)中下载的代表物种序列,使用 ClustalX 2.0 对序列进行比对后,运用 MEGA 7.0 软件中的临接法(neighbor-joining, NJ),结合 iTOL(interactive tree of life)程序[25]构建系统发育树. 使用 Bootstrap 法(重复1 000次)对系统发育树进行评估.

统计学分析对不同采样点的真核浮游藻类相对多度数据进行除趋势对应分析(detrended correspondence analysis, DCA),发现矩阵第一轴的梯度长度 <2,即不同点位真核浮游藻类群落结构特征与水环境因子具有线性相关关系. 选择冗余分析(redundancy analysis, RDA)计算其相关性,通过 Canoco5.0 软件和蒙特卡罗筛选检验分析藻类群落结构与水环境因子的相关性.

2　结果与分析

2.1　测序数据分析及多样性指数

不同样品的 18S rRNA 基因 V4 可变区的第一轮 PCR 扩增产物如图 2 所示,所扩增的基因片段条带单一,长度约为 500 bp,并且不同采样点的电泳条带的亮度较为一致.



M:Marker

图 2　不同样品中 18S rRNA 基因 V4 可变区第一轮 PCR 产物电泳图

Fig. 2　Agarose gel electrophoresis of PCR products for 18S rRNA gene V4 variable region in different samples

测序共获得 18S rRNA 基因 V4 可变区的 785 554 条原始序列,对其过滤分析后,共得到 167 901个高质量序列,不同样品的序列数为4 590 ~ 49 841. 将序列进行随机抽样,所抽到的序列数代表的 OTU 数目构建稀释性曲线,如图 3 所示,各个样本的稀释性曲线趋于平缓,表明测序数据趋于饱和,测序深度已足够反映样品中的所有 OTU 信息[26]. 所有样本中有 11.9% 的序列不能注释,剩余的 147 959条序列注释为 424 种 OTU,去掉代表原生动物、真菌和真核生物的不能注释的 OTUs,得到注释为 134 种真核浮游藻类的 OTU.

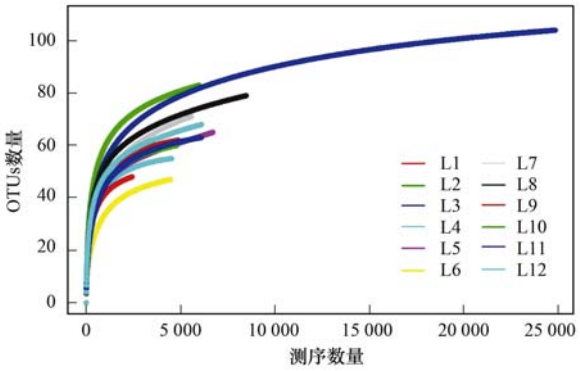


图 3　不同样本中 OTUs 稀释曲线

Fig. 3　Rarefaction curves of OTUs in different samples

对各采样点的丰富度和多样性指数进行分析,如表 1 所示. Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数表示个体分布的均匀度,各物种之间个体分配越均匀,值就越大,如果每一个体都属于不同的物种,则指数就最高,本研究中指数越高表示文库中 OTUs 分布越不均匀,Shannon-Wiener 多样性指数的变化范围是 1.87 ~ 2.94, Simpson 指数的范围是0.740 9 ~ 0.891 8,表明各样品间 OTUs 数目的分布差异不

大;Chao1 指数和 ACE 指数是估计群落中含 OTU 数目的指数,表示物种的丰富度,值越大代表物种总数越多. ACE 指数的变化范围是 46 ~ 105, Chao1 指数的变化范围是 46.6 ~ 106.25, Chao1 指数和 ACE 指数最小值的点位均为 L6,该点位出现的种类数为 47 种,也为各采样点最小,最大值出现的点位分别为 L5 和 L3,种类数分别为 65 种和 104 种,点位 L3 和 L5 的藻类种类数多于 L6 点.

表 1 不同采样点真核浮游藻类的多样性指数

Table 1 Diversity indices of eukaryotic planktonic algae in different sampling sites

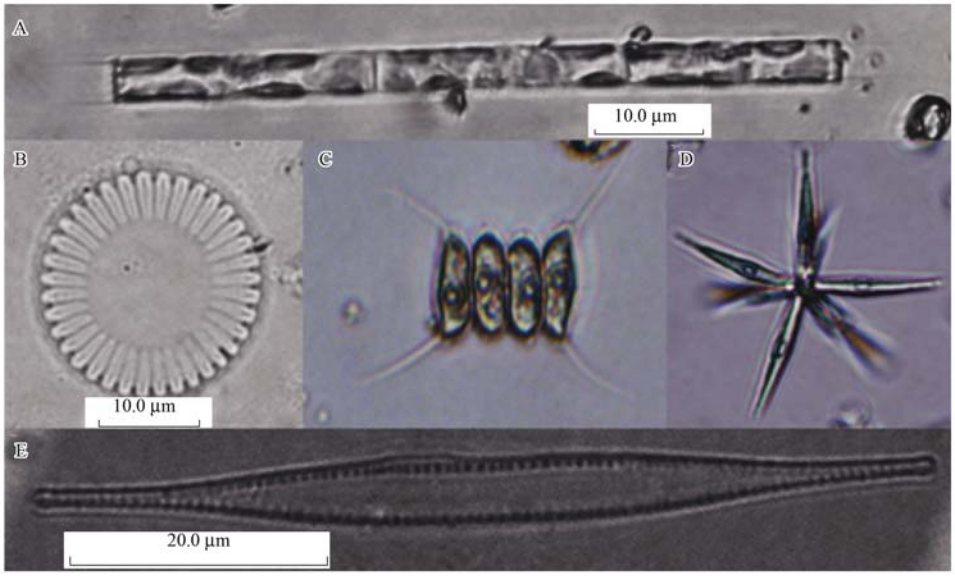
采样点	ACE 指数	Chao1 指数	Shannon-Wiener 指数	Simpson 指数
L1	62	63.12	2.37	0.779 2
L2	81	82.08	2.94	0.891 8
L3	105	106.25	2.48	0.819 2
L4	56.86	57.33	2.39	0.835 5
L5	95	133.99	2.34	0.825 8
L6	46	46.6	1.87	0.740 9
L7	85.6	91.12	2.59	0.866 1
L8	88.75	91.07	2.66	0.863 0
L9	51	52.5	2.38	0.803 5
L10	64.5	65.9	2.57	0.864 3
L11	65.62	66.5	2.23	0.809 5
L12	80.75	87.16	2.71	0.882 9

2.2 真核浮游藻类的多样性和群落结构分析

对所得到的 OTUs 序列进行物种注释后发现,12 个采样点的真核浮游藻类多样性丰富,涵盖了 7 门 134 种,不等鞭毛门(Heterokontophyta)34 种,占总种类数的比例为 25.4%,其中金藻纲(Chrysophyceae)23 种;硅藻门(Bacillariophyta)24 种,比例为 17.9%;绿藻门(Chlorophyta)24 种,比例为 17.9%;隐藻门(Cryptophyta)18 种,比例为 13.4%;甲藻门(Pyrroptata)17 种,比例为 12.7%;轮藻门(Charophyta)13 种,比例为 9.7%;定鞭藻门(Haptophyta)4 种,比例为 2.9%. 高通量测序结果中,12 个采样点的占优势类群的核心 OTU 略有不同,其中采样点 L4 的核心 OTU 是 Chlorophyta Trebouriophyceae other,采样点 L3 和 L8 的核心 OTU 是 Chlorophyta Chlorophyceae other,其他点位的核心 OTU 均为硅藻纲的 *Chaetoceros* sp..

显微镜观察结果中的裸藻门(Euglenophyta)在高通量测序结果中未观察到. 显微镜观察共鉴定出真核浮游藻类 4 门 63 种,其中硅藻门 32 种,占总种类数的比例为 50.8%;绿藻门 23 种,比例为 36.5%;裸藻门 7 种,比例为 11.1%;甲藻门 1 种,比例均为 1.6%. 镜检结果中,采样点 L1、L2、L4、L5、L6、L9 和 L12 出现数量最多的物种分别是齿牙栅藻 *Scenedesmus denticulatus*、梅尼小环藻 *Cyclotella meneghiniana*、小片菱形藻 *Nitzschia frustulum*、小环藻 *Cyclotella* sp.、针形菱形藻 *Nitzschia acicularis*、韦氏藻 *Westellopsis* sp. 和集星藻 *Actinastrum hantzschii*. 采样点 L3、L7 和 L10 数量最多的种类是颗粒直链藻 *Melosira granulata*,采样点 L8 和 L11 数量最多的种类是四尾栅藻 *Scenedesmus quadricauda*. 显微镜观察结果中丰度最高的 5 个物种是颗粒直链藻 *Melosira granulata*、梅尼小环藻 *Cyclotella memeghiniana*、四尾栅藻 *Scenedesmus quadricauda*、针形菱形藻 *Nitzschia acicularis* 和集星藻 *Actinastrum hantzschii*(如图 4).

浮游硅藻、浮游绿藻、浮游甲藻和不等鞭毛类均是淡水生态系统中的重要初级生产力,12 个采样点的高通量测序结果中可能包含的浮游硅藻种类有:*Synura petersenii*、*Mallomonas* sp.、*Chaetoceros* sp.、*Skeletonema* sp.、*Thalassiosira* sp.、*Aulacoseira ambigua* 及其近缘种等. 浮游绿藻种类有:*Tetraselmis* sp.、*Carteria* sp.、*Chlamydomonas* sp.、*Chloromonas* sp.、*Desmodesmus* sp.、*Golenkinia* sp.、*Neochlorosarcina* sp.、*Pseudopediastrum boryanum*、*Radiococcus* sp.、*Wislouchiella planctonica*、*Nephroselmis* sp.、*Pedinomonas* sp.、*Amphikrikos* sp. 及其近缘种等. 浮游甲藻的种类有:*Gymnodinium* sp.、*Gyrodinium* sp.、*Alexandrium* sp.、*Ceratium* sp.、*Lingulodinium polyedrum*.、*Gymnodinium* sp.、*Diplopsalis lenticula*、*Peridinium* sp. 及其近缘种等. 高通量测序结果注释得到而显微镜未观察到的轮藻门、隐藻门、定鞭藻门和金藻纲的信息如表 2 所示.



A. 颗粒直链藻 *Melosira granulata*；B. 梅尼小环藻 *Cyclotella memeghiniana*；C. 四尾栅藻 *Scenedesmus quadricauda*；D. 集星藻 *Actinastrum hantzschii*；E. 针形菱形藻 *Nitzschia acicularis*

图 4　显微镜观察藻类照片

Fig. 4　Microscopic images of algae

表 2　轮藻门、隐藻门、定鞭藻门、金藻纲的物种注释

Table 2　Species annotation of Charophyta, Cryptophyta, Haptophyta and Chrysophyceae

门类	OTU	注释名	OTU	注释名
轮藻门	denovo1936	Liliopsida Other	denovo1470	*Penium* sp.
	denovo575	Zygnematales Other	denovo2049	*Spirogyra maxima*
	denovo1330	*Chaetosphaeridium globosum*	denovo558	*Tortitaenia alpina*
	denovo696	*Closterium gracile*	denovo181	*Spirotaenia* sp.
	denovo1833	*Closterium* sp.	denovo1656	*Zygnematales* sp.
	denovo867	*Liliopsida* sp.	denovo385	Magnoliophyta other
	denovo304	other		
隐藻门	denovo1477	*Chroomonas pauciplastida*	denovo1249	*Cryptomonas* sp. 2
	denovo2174	*Katablepharis* sp.	denovo678	*Cryptomonas* sp. 3
	denovo2084	*Cryptomonas obovoidea*	denovo1431	*Chroomonas* sp. 1
	denovo993	*Cryptomonas reflexa*	denovo2272	*Chroomonas* sp. 2
	denovo1745	Cryptophyceae Other1	denovo2071	Kathablepharidae Other1
	denovo1088	Cryptophyceae Other2	denovo1366	Kathablepharidae Other2
	denovo2761	*Rhodomonas* sp. 2	denovo112	*Teleaulax* sp. 2
	denovo903	*Rhodomonas* sp. 1	denovo1516	Cryptomonadales Other
	denovo1757	*Goniomonas amphinema*	denovo424	*Leucocryptos* sp.
金藻纲	denovo1836	Chrysophyceae Other1	denovo1259	Chrysophyceae Other6
	denovo2397	Chrysophyceae Other2	denovo101	Chrysophyceae Other7
	denovo1232	Chrysophyceae Other3	denovo976	Chrysophyceae Other8
	denovo1407	Chrysophyceae Other4	denovo2401	Chrysophyceae Other9
	denovo207	Chrysophyceae Other5	denovo446	Chrysophyceae Other10
	denovo2241	*Paraphysomonas* sp. 2	denovo2570	Chrysophyceae Other11
	denovo660	*Paraphysomonas* sp. 3	denovo1336	Ochromonadales Other
	denovo2361	*Dinobryon* sp.	denovo754	*Ochromonas* sp. 2
	denovo1352	*Ochromonas* sp. 1	denovo44	*Ochromonas* sp. 3
	denovo2739	*Paraphysomonas* sp. 1		
定鞭藻门	denovo878	*Pleurochrysis* sp.	denovo982	Prymnesiales Other
	denovo2562	*Chrysochromulina* sp.	denovo1087	Other

高通量测序结果和显微镜观察结果比较发现，这两种方法的结果在群落组成上存在相同点，如图

5 所示,均以硅藻门和绿藻门为优势类群. 高通量测序结果发现,硅藻门和绿藻门的丰度在比例上分别占 28.70% 和 46.20%,甲藻门、轮藻门、隐藻门、定鞭藻门、不等鞭毛门和甲藻门的丰度在比例上分别占 0.48%、0.05%、17.51%、3.93% 和 3.12%. 而显微镜观察结果中的硅藻门和绿藻门的丰度在比例上分别占 51.54% 和 39.90%,裸藻门和甲藻门的丰度在比例上分别占 7.59% 和 0.97%.

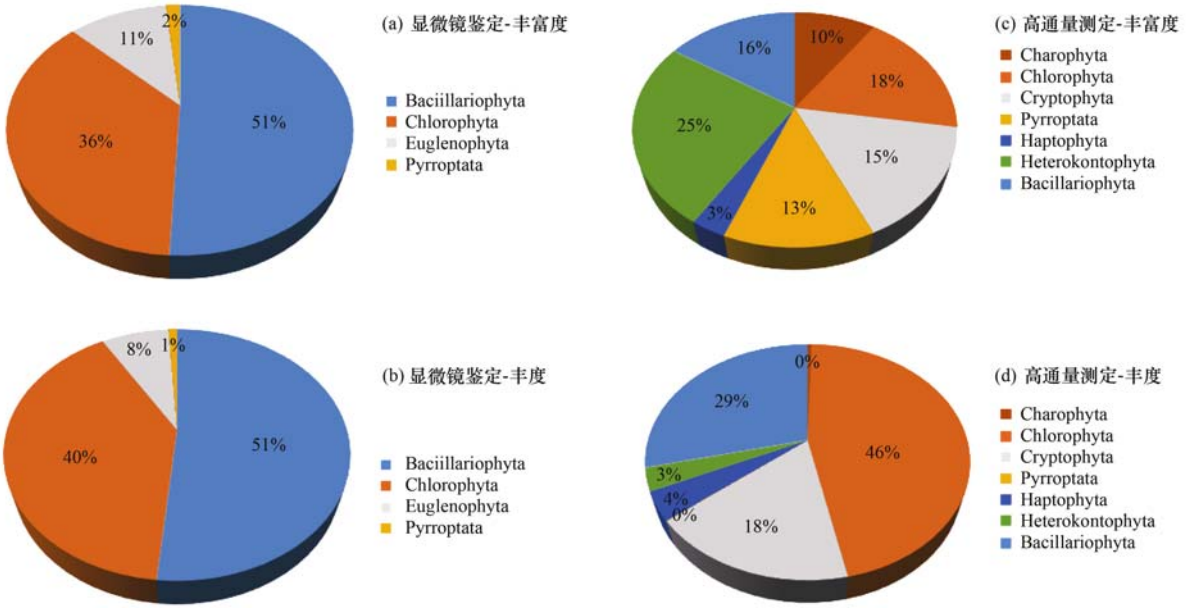


图 5 基于高通量测序和显微镜观察比较真核浮游藻类多样性及群落组成

Fig. 5 Comparison of eukaryotic planktonic algae diversity and community composition based on high-throughput sequencing and microscopic observation

2.3 真核浮游藻类的系统发育分析

采用邻接法,将高通量测序结果注释得到的 OTUs 代表性序列以及从 NCBI 下载的真核浮游藻类 18S rRNA 基因序列构建系统发育树,结果如图 6 显示,18S rRNA 基因的 V4 区可以在门这一较高分类阶元对隐藻门和甲藻门进行聚类,但是对于其他 5 个门而言,18S rRNA 基因的 V4 区序列并未按照物种的实际分类情况进行聚类.

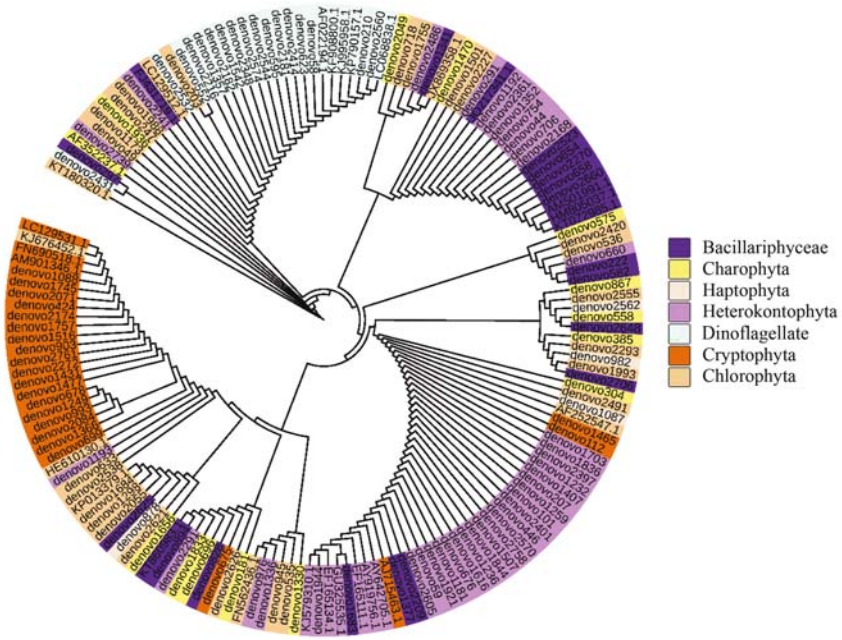


图 6 基于邻接法构建的真核浮游藻类的系统发育分析

Fig. 6 Phylogenetic tree for the eukaryotic planktonic algae based on Neighbor-Joining method of 18S rRNA gene

利用高通量测序结果注释得到的隐藻门的 OTUs 以及从 NCBI 下载的隐藻门 18S rRNA 基因序列，采用邻接法进行系统发育分析，结果如图 7 所示，可以在较低的分类阶元分别对隐藻门的 *Goniomonas* 属、*Cryptomonas* 属、*Chroomonas* 属、*Rhodomonas* 属及 *Katablepharid* 属进行聚类和区分. 由表示不同 OTU 丰度情况的热图（图 7）所示，deovo2071（注释为未培养的 katablepharid）和 denovo1745（注释为 Cryptophyceae Other1）的 18S rRNA 基因的拷贝数远高于隐藻门中其他种类该基因的拷贝数.

采用邻接法，将高通量测序结果注释得到的甲藻门的 OTUs 代表性序列及从 NCBI 下载的甲藻门 18S rRNA 基因序列进行系统发育树构建，结果如图 8 所示，可以将部分 OTUs 在科或属水平上进行区分和聚类，例如，Suessiaceae 科、*Perdinium* 属和 *Alexandrium* 属各自明显聚为一支. 由表示不同 OTU 丰度情况的热图（图 8）所示，deovo58（注释为 Suessiaceae other）、denovo2181（注释为 Peridiniales Other）、denovo2544（注释为 Gymnodinium Other）和 denovo2414（注释为 Symbiodinium Other）的 18S rRNA 基因的拷贝数，远高于甲藻门中其他种类该基因的拷贝数.

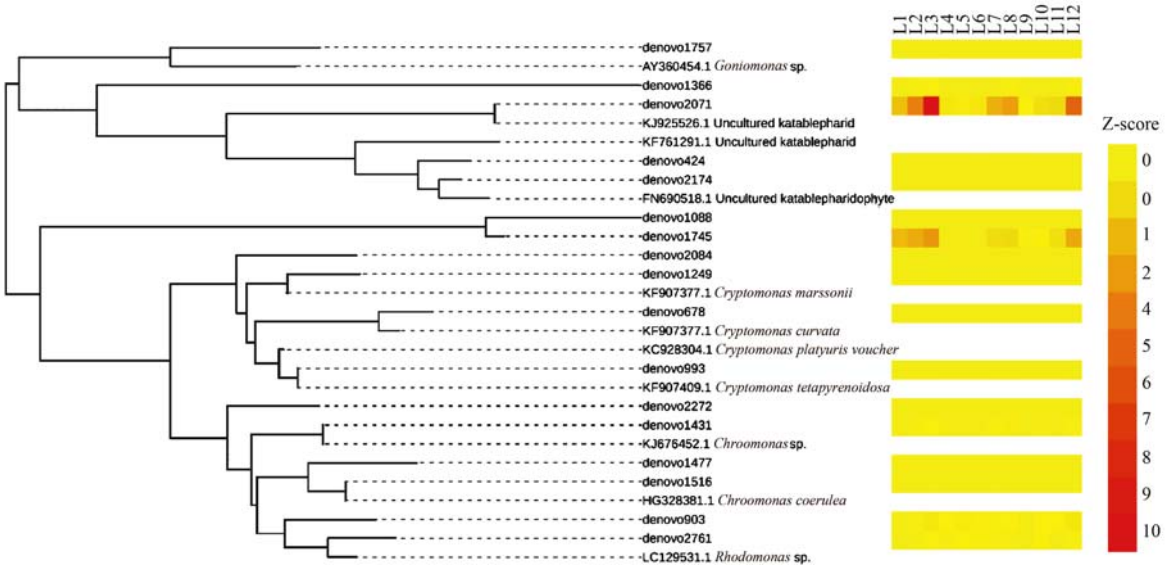


图 7　隐藻门的系统发育分析及各 OTU 的丰度情况

Fig. 7　Phylogenetic tree for Cryptophyta and the abundance of various OTUs

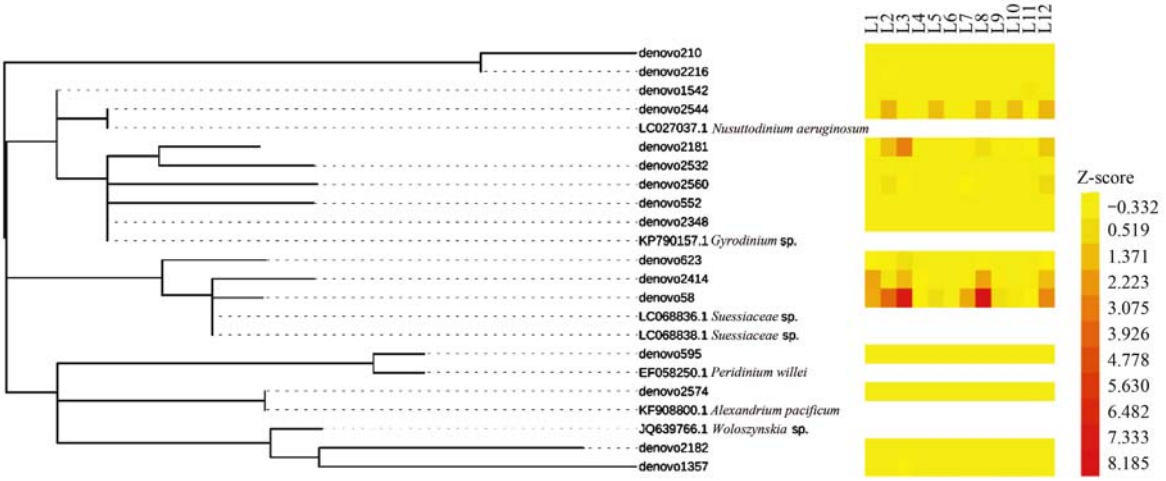


图 8　甲藻门的系统发育分析及各 OTU 的丰度情况

Fig. 8　Phylogenetic tree for Pyrroptata and the abundance of various OTUs

在门这一分类阶元并不能将硅藻门的 OTUs 聚为一支，硅藻门的 OTUs 在图 6 所示的系统发育树上较为分散. 鉴于 18S rRNA 基因 V4 区曾用于系统发育构建，本研究将高通量测序结果注释得到的硅藻门的 OTUs 以及从 NCBI 下载的硅藻门 18S rRNA 基因序列，采用邻接法构建系统发育树，其在纲这一

分类阶元即不能有效区分和聚类. 总之,18S rRNA 基因的 V4 区可以将本研究中的隐藻门在属水平上有效聚类和区分,甲藻门可以在部分科或属水平聚类和区分,尚存在误差.

2.4 群落结构特征的影响指标

用 CANOCO 5.0 软件分析不同真核藻类群落结构变化与氨氮(NH_4^+-N)、活性磷(PO_4^{3-}-P)、硝态氮(NO_3^-)、电导率(EC)、总磷(TP)、总氮(TN)、总碳(TC)、水温(T)和总溶解固体(TDS)共 9 个环境因子的相关性,如图 9 所示. DCA 的结果显示样品矩阵第一轴的梯度长度 <2, 因此本研究中的不同真核浮游藻类多样性与环境因子具有线性相关关系,选择冗余分析(RDA)计算其相关性,通过软件和蒙特卡罗筛选检验发现真核浮游藻类的群落结构变化和活性磷(PO_4^{3-}-P)、氨氮(NH_4^+-N)及硝态氮(NO_3^-)的浓度显著相关($P<0.05$). 前两轴的特征值分别为 0.247 8 和 0.175 4, 共解释了 42.32% 真核浮游藻类的多样性差异,活性磷是最主要的影响因子. 因而,活性磷、氨氮和硝态氮是影响辽河干流真核浮游藻类群落变化的主要因素.

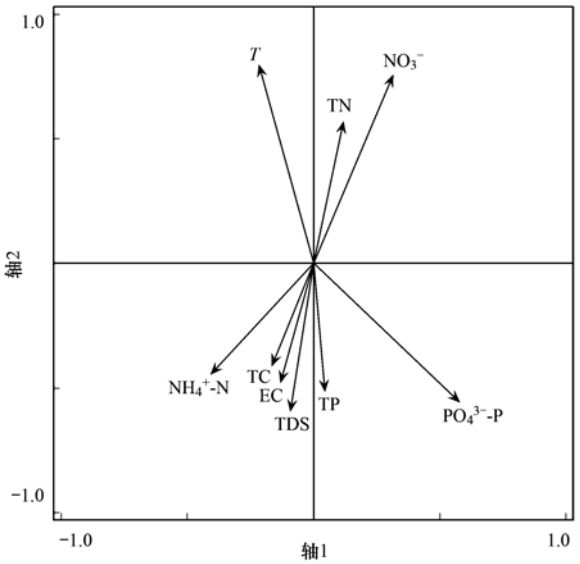


图 9 浮游藻类群落与水环境因子的 RDA 分析

Fig. 9 Redundancy analysis of species-environmental factors relationship

3 讨论

环境样品的高通量测序技术具备检测稀有的、个体小且易碎物种的潜力[27],其对生物多样性监测和量化已经被证明是可行的[24,28]. 目前辽河流域浮游真核藻类的研究主要建立在光学显微镜观察鉴定的基础上[2~7],本研究采用高通量测序技术对辽河干流的真核浮游藻类进行多样性和群落结构组成的研究,并与光学显微镜观察的结果进行比较,发现高通量测序技术对辽河真核浮游藻类多样性有极高的还原能力,得出 18S rRNA 基因的 V4 可变区对隐藻门和甲藻门的部分科/属进行系统发育构建的有效性,揭示出影响该区域真核浮游藻类群落变化的重要环境因子为氨氮、活性磷和硝态氮.

3.1 高通量测序技术对辽河真核浮游藻类多样性的揭示

18S rRNA 基因全长1 787 ~ 1 813 bp,由能反映物种间亲缘关系的保守区和能体现物种间差异的可变区交替排列组成,其中可变区序列总长 678 ~ 699bp. 当前用做真核浮游藻类宏条形码的 18S rRNA 基因主要集中在使用 V4 区和 V9 区这两个可变区,它们所得出的结果也存在差异. 相比于 18S rRNA 基因 V9 区(~150bp),18S rRNA 基因 V4 区序列较长,可以使分类鉴定更加可靠,系统发育分析也较为严格[17]. 本研究采用高通量测序技术,消除了对微型真核藻类分离的依赖,共得到167 901个高质量序列,利用 GenBank 中的 18S rRNA 基因序列还原出环境样本中 134 个 OTUs. 无论对 OTU 的物种注释还是系统发育分析都表明,高通量测序技术弥补了显微镜观察研究中丢失的大量物种信息,本研究提高了对真核浮游藻类监测的能力. 由于真核浮游藻类的种类极为广泛,并且数据库中缺乏某些种类的条形码基因序列,很难对环境序列准确定位[29]. 当前利用高通量测序对它们的研究主要注释到科或者属,因而本研究结果中只有 14.7% 的真核浮游藻类 OTU 可以被注释到种,62.2% 可以被注释到属.

3.2 辽河真核浮游藻类不同类群的丰度差异

本研究通过高通量测序和光学显微镜观察发现,无论从种类多样性比例,还是丰度比例,这两种方法的结果类似,得出辽河干流浮游真核藻类的优势群落是硅藻门和绿藻门. 李庆南等[2]于 2011 年 5 月和 8 月对辽河、太子河水系的浮游植物进行了野外调查,共鉴定出浮游植物 195 种,其中硅藻门种类最多,有 97 种; 绿藻门次之,共鉴定出 55 种;李芳芳等[3]在 2010 年对大辽河水系浮游植物群落结构和水质状况进行了调查,共鉴定出浮游植物 5 门 124 种或变种,其中以绿藻和硅藻为主,优势物种与本研究结果一致. 本研究共鉴定出真核浮游藻类 7 门 134 种,其中轮藻门、隐藻门、定鞭藻门和金藻纲,是辽河干流相同采样点从未采到过,可见本方法

可以监测到显微镜镜检方法检测不到的生物物种,弥补光学显微镜观察结果的不足. 光学显微镜观察结果中的裸藻门(Euglenophyta)在高通量测序结果中未找到,这可能与 18S rRNA 基因 V4 可变区引物的特异性有关,需要结合其他的条形码基因弥补丢失的信息. 至于隐藻门中 deovo2071 和 denovo1745,甲藻门中 deovo58、denovo2181、denovo2544 和 denovo2414 的 18S rRNA 基因较高的拷贝数,可能在一定程度上反映了这些种类较高的丰度,还需要进一步研究证实. 各个采样点占优势类群的 OTU 在高通量测序结果和显微镜观察结果中是不同的,这可能是由于所选择分子标记的普适性不足,或者许多本地种的 18S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中是不存在的,这也反映出构建本土淡水水生态系统中浮游植物的 DNA 条形码数据库的必要性.

3.3　18S rRNA 基因 V4 区对隐藻门和甲藻门进行系统发育构建的有效性

本研究通过高通量测序技术可以基本还原亲缘关系较远的各类真核浮游藻类的多样性. 本研究中使用的 18S rRNA 的引物可有效地扩增和区分复杂群落的不同的种类. 特别针对隐藻门和甲藻门,在系统发育关系上不仅能将它们各自在较高分类阶元上聚在一起,还具有一定的属区分能力. 目前多数研究将 18S rRNA 基因的 V4 可变区用作硅藻的宏条形码基因,例如,Zimmermann 等[18]研究发现,对 18S rRNA 基因 V4 区的高通量测序能有效区分硅藻的不同种,包括区分 *Sellaphora* 属中的混合种;Luddington 等[30]用 18S rRNA 基因的 V4 可变区对硅藻纲 3 个目进行研究,分析了 76 种硅藻的 272 个序列,验证了 18S rRNA 基因 V4 区作为硅藻条形码基因的可靠性. 本研究中通过重建系统发生关系验证了 18S rRNA 基因对隐藻门和甲藻门内的部分类群的区分具有更好的分辨力,但是对其他门类的分辨力较低,因此接下来采用多基因宏条形码技术可能是一个更合理的方案.

3.4　水环境因子对真核浮游藻类群落结构的影响

藻类是河流的初级生产者,进行光合作用时需要氮、磷作为基础的营养元素. 相关研究发现,河流中氮和磷的含量对着生藻类群落有着显著的影响:孟睿等[31]在 2011 年调查了长江中下游草型湖泊浮游植物群落,并对藻类群落结构特征和水环境因子进行分析,结果表明,总磷是影响长江中下游草型湖泊藻类群落结构的主要影响因子;苟婷等[32]为了解贝江浮游藻类的分布特征与水质状况,于 2013 年的枯水期和丰水期对浮游藻类群落结构的时空动态进行调查和分析,RDA 结果显示,显著影响浮游藻类群落结构的环境因子是氮磷营养盐. 这一现象在本研究中得到了验证,本研究表明(NH_4^+-N)、活性磷(PO_4^{3-}-P)、(NO_3^-)是影响辽河浮游藻类群落结构的重要影响因子,3 个环境因子总共解释了总体变量的 42.32%;与殷旭旺等[6,7] 2011 年和 2013 在辽河流域调查得到的结果一致.

本研究结果表明,运用基于 18S rRNA 基因的高通量技术揭示出的辽河环境样本中真核浮游藻类的多样性及群落组成,其结果可弥补光学显微镜观察结果的不足,在生物监测和水质评价方面有巨大的应用潜力. 当然,高通量测序技术在分析环境样品中生物群落组成时仍然存在一些不足,例如,真核浮游藻类细胞内的 SSU rRNA 基因的拷贝数在不同物种中的变化很大[33],需要建立基因序列拷贝数与生物量之间的关系;PCR 扩增的引物偏好性也会导致不同种类的丰度不同. 将来,建立针对辽河流域真核浮游藻类的条形码基因和标准操作流程,根据自己实验室已有研究的数据和 NCBI 等数据库的数据,采用高通量测序技术对条形码基因进行测序,从而在实现快速评估该区域的生物多样性、群落结构和水质评价中具有重要的意义.

4　结论

(1)在对辽河干流环境样本的浮游真核藻类研究中,高通量测序技术和光学显微镜观察的丰富度和丰度的结果类似,优势群落均是硅藻门和绿藻门,并且高通量测序技术弥补了光学显微镜观察中丢失的种类信息.

(2)通过构建系统发育树可以在门分类阶元对隐藻门和甲藻门聚类. 18S rRNA 基因 V4 可变区对隐藻门和甲藻门内的部分类群的区分具有较好的分辨力.

(3)影响辽河干流真核浮游藻类群落结构的主要环境因子是氨氮、活性磷和硝态氮.

致谢:感谢厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室林森杰教授与李凌高级工程师的实验指导与帮助.

参考文献:

[1] Eiler A, Drakare S, Bertilsson S, *et al*. Unveiling distribution patterns of freshwater phytoplankton by a next generation sequencing based approach [J]. PLoS One, 2013, **8**(1): e53516.

[2] 李庆南, 赵文, 殷旭旺, 等. 辽河太子河水系的浮游植物种

类多样性研究[J]. 大连海洋大学学报, 2011, **26**(4): 322-327.
Li Q N, Zhao W, Yin X W, *et al*. Phytoplankton diversity in Taizi River tributary in Liao River [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2011, **26**(4): 322-327.

[3] 李芳芳, 董芳, 段梦, 等. 大辽河水系夏季浮游植物群落结构特征及水质评价[J]. 生态学杂志, 2011, **30**(11): 2489-2496.
Li F F, Dong F, Duan M, *et al*. Phytoplankton community structure and water quality of Daliaohe river system in summer [J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, **30**(11): 2489-2496.

[4] 耿文华, 陈继淼, 冯剑丰, 等. 辽河浮游植物群落及生物多样性基准验证[J]. 中国环境科学, 2014, **34**(1): 239-245.
Geng W H, Chen J M, Feng J F, *et al*. Phytoplankton community and validation of phytoplankton biodiversity criteria in Liaohe River[J]. China Environmental Science, 2014, **34**(1): 239-245.

[5] 王宏伟, 陈莹, 张晓明, 等. 辽河太子河流域藻类植物群落结构及其季节变化[J]. 湖泊科学, 2013, **25**(6): 936-942.
Wang H W, Chen Y, Zhang X M, *et al*. The algal community structure and seasonal variation in Taizi River catchment, Liaohe River basin[J]. Lake Sciences, 2013, **25**(6): 936-942.

[6] 殷旭旺, 张远, 渠晓东, 等. 浑河水系着生藻类的群落结构与生物完整性[J]. 应用生态学报, 2011, **22**(10): 2732-2740.
Yin X W, Zhang Y, Qu X D, *et al*. Community structure and biological integrity of periphyton in Hunhe River water system of Liaoning Province, Northeast China [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, **22**(10): 2732-2740.

[7] 殷旭旺, 张远, 渠晓东, 等. 太子河着生藻类群落结构空间分布特征[J]. 环境科学研究, 2013, **26**(5): 502-508.
Yin X W, Zhang Y, Qu X D, *et al*. Spatial community structure of periphyton assemblages in the Taizihe River Basin [J]. Research of Environmental Sciences, 2013, **26**(5): 502-508.

[8] Morales E A, Siver P A, Trainor F R. Identification of diatoms (Bacillariophyceae) during ecological assessments: comparison between light microscopy and scanning electron microscopy techniques[J]. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 2009, **151**: 95-103.

[9] Zhan A, Hulák M, Sylvester F, *et al*. High sensitivity of 454 pyrosequencing for detection of rare species in aquatic communities[J]. Methods in Ecology and Evolution, 2013, **4**(6): 558-565.

[10] Ellegaard M, Godhe A, Härnström K, *et al*. The species concept in a marine diatom: LSU rDNA-based phylogenetic differentiation in *Skeletonema marinoi/dohrnii* (Bacillariophyceae) is not reflected in morphology[J]. Phycologia, 2008, **47**(2): 156-167.

[11] Wayne L R, Vandersea M W, Kibler S R, *et al*. Recognizing dinoflagellate species using ITS rDNA sequences[J]. Journal of Phycology, 2007, **43**(2): 344-355.

[12] Lin S J, Zhang H, Hou Y B, *et al*. High-level diversity of dinoflagellates in the natural environment, revealed by assessment of mitochondrial *cox*1 and *cob* genes for dinoflagellate DNA barcoding[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, **75**(5): 1279-1290.

[13] Stern R F, Andersen R A, Jameson I, *et al*. Evaluating the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a candidate dinoflagellate barcode marker[J]. PLoS One, 2011, **7**(8): e42780.

[14] de Vargas C, Audic S, Henry N, *et al*. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean[J]. Science, 2015, **348**(6237): 1261605.

[15] Hamsher S E, Evans K M, Mann D G, *et al*. Barcoding diatoms: exploring alternatives to COI-5P[J]. Protist, 2011, **162**(3): 405-422.

[16] Samanta B, Bhadury P. A comprehensive framework for functional diversity patterns of marine chromophytic phytoplankton using *rbc*L phylogeny [J]. Scientific Reports, 2016, **6**: 20783, doi: 10. 1038/srep20783.

[17] Amaral-Zettler L A, McCliment E A, Ducklow H W, *et al*. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes[J]. PLoS One, 2009, **4**(7): e6372.

[18] Zimmermann J, Glöckner G, Jahn R, *et al*. Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies[J]. Molecular Ecology Resources, 2015, **15**(3): 526-542.

[19] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[20] Yuan J, Li M Z, Lin S J. An improved DNA extraction method for efficient and quantitative recovery of phytoplankton diversity in natural assemblages[J]. PLoS One, 2014, **10**(7): e0133060.

[21] Bråte J, Logares R, Berney C, *et al*. Freshwater Perkinsea and marine-freshwater colonizations revealed by pyrosequencing and phylogeny of environmental rDNA[J]. The ISME Journal, 2010, **4**(9): 1144-1153.

[22] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al*. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(16): 5261-5267.

[23] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, *et al*. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(7): 5069-5072.

[24] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, *et al*. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere" [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, **103**(32): 12115-12120.

[25] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Bioinformatics, 2007, **23**(1): 127-128.

[26] 田地, 马欣, 李玉娥, 等. 利用高通量测序对封存 CO_2 泄漏情景下土壤细菌的研究[J]. 环境科学, 2013, **34**(10): 4096-4104.
Tian D, Ma X, Li Y E, et al. Research on soil bacteria under the impact of sealed CO_2 leakage by high-throughput sequencing technology[J]. Environmental Science, 2013, **34**(10): 4096-4104.

[27] Hajibabaei M, Shokralla S, Zhou X, *et al*. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos[J]. PLoS One, 2011, **6**(4): e17497.

[28] Meusnier I, Singer G A, Landry J F, *et al*. A universal DNA

mini-barcode for biodiversity analysis [J]. BMC Genomics, 2008, **9**: 214.

[29] 谢薇薇, 龚伊, 王志伟, 等. 利用流式细胞仪分选技术研究湖泊真核超微藻的遗传多样性[J]. 环境科学, 2013, **34**(4): 1485-1491.
Xie W W, Gong Y, Wang Z W, *et al*. Use of flow cytometric sorting to assess the diversity of eukaryotic picophytoplankton of lakes [J]. Environmental Science, 2013, **34**(4): 1485-1491.

[30] Luddington I A, Kaczmarska I, Lovejoy C. Distance and character-based evaluation of the V4 region of the 18S rRNA gene for the identification of diatoms (Bacillariophyceae) [J]. PLoS One, 2012, **7**(9): e45664.

[31] 孟睿, 何连生, 过龙根, 等. 长江中下游草型湖泊浮游植物群落及其与环境因子的典范对应分析[J]. 环境科学, 2013, **34**(7): 2588-2596.
Meng R, He L S, Guo L G, et al. Canonical correspondence analysis between phytoplankton community and environmental factors in Macrophtic lakes of the middle and lower reaches of Yangtze River [J]. Environmental Science, 2013, **34**(7): 2588-2596.

[32] 苟婷, 马千里, 许振成, 等. 贝江浮游藻类群落特征及富营养化风险分析[J]. 环境科学, 2015, **36**(3): 946-954.
Gou T, Ma Q L, Xu Z C, et al. Phytoplankton community structure and eutrophication risk assessment of Beijiang River [J]. Environmental Science, 2015, **36**(3): 946-954.

[33] Godhe A, Asplund M E, Härnström K, *et al*. Quantification of diatom and dinoflagellate biomasses in coastal marine seawater samples by real-time PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(23): 7174-7182.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 38 No. 4

Apr. 15, 2017

CONTENTS

Dry and Bulk Nitrogen Deposition in Suburbs of Xining City ····· XU Wen, JIN Xin, LUO Shao-hui, *et al.* (1279)

Day-Night Variation and Source Apportionment of Carbonaceous Aerosols in PM_{10} During Spring and Summer of Lanzhou ····· MA Li, YU Ye, WANG Bo, *et al.* (1289)

Characteristics of the Size Distribution of Water Soluble Inorganic Ions in Sanya, Hainan ····· WANG Lu, LIU Zi-rui, WEN Tian-xue, *et al.* (1298)

Pollution Characteristics of NH_4^+, NO_3^-, SO_4^{2-} in $PM_{2.5}$ and Their Precursor Gases During 2015 in an Urban Area of Beijing ····· DING Meng-meng, ZHOU Jian-nan, LIU Bao-xian, *et al.* (1307)

Pollution Characteristics of PCDD/Fs in Ambient Air and Exposure Risk Assessment Around a Municipal Solid Waste Incinerator in Beijing ····· QI Li, REN Yue, LIU Ai-min, *et al.* (1317)

Community Characteristics of Cultivable Bacteria in Fine Particles ($PM_{2.5}$) of Beijing and Baoding ····· HU Ya-dong, MA An-zhou, LÜ Peng-yi, *et al.* (1327)

Emission Characteristics of Vehicle Exhaust in Artery and Collector Roads in Nanjing Based on Real-time Traffic Data ····· LI Xiao-yu, WU Lin, ZOU Chao, *et al.* (1340)

Catalytic Combustion of Soot Particulates over Rare Earth Pyrochlore Oxides Doped with Transition Metals ····· LI Xi-feng, SUN Yu-qi, WANG Zhong-peng, *et al.* (1348)

Water Quality Analysis of Beijing Segment of South-to-North Water Diversion Middle Route Project ····· XU Hua-shan, ZHAO Lei, SUN Hao-su, *et al.* (1357)

Hanfeng Pre-reservoir Commissioning Time Variation Feature of the Hydrology and Water Quality in Three Gorges Reservoir ····· YANG Bing, HE Bing-hui, WANG De-bao (1366)

Modeling of Water Quality Response to Land-use Patterns in Taizi River Basin Based on Partial Least Squares ····· LI Lin-lin, ZHANG Yi-zhang, TANG Chang-yuan, *et al.* (1376)

Distribution Characteristics of Water Temperature and Water Quality of Fuxian Lake During Thermal Stratification Period in Summer ····· WANG Lin-jie, YU Hui, NIU Yong, *et al.* (1384)

Vertical Stratification Characteristics of Dissolved Oxygen and Phytoplankton in Thousand-Island Lake and Their Influencing Factors ····· YU Yan, LIU De-fu, YANG Zheng-jian, *et al.* (1393)

Community Structure Characteristics of Eukaryotic Planktonic Algae in Liaohe River Through High-throughput Sequencing ····· WANG Jing-qi, WANG Shu-ping, ZHANG Yuan, *et al.* (1403)

Effects of Coastal Organic Pollution on Bacterioplankton Community in Sanmen Bay ····· DAI Wen-fang, GUO Yong-hao, YU Wei-na, *et al.* (1414)

Nitrate Source Identification and Nitrification-denitrification at the Sediment-water Interface ····· JIN Zan-fang, GONG Jia-lin, SHI Yi-li, *et al.* (1423)

Residues of Organochlorine Pesticides (OCPs) in Water and Sediments from Nansha Mangrove Wetland ····· DING Yang, HUANG Huan-fang, LI Hui, *et al.* (1431)

Pollution Characteristics and Risk Assessment of Heavy Metals from River Network Sediment in Western Area of Taihu Lake ····· BIAN Bo, ZHOU Yan, ZHANG Qin (1442)

Efficacy of Phoslock® on the Reduction of Sediment Phosphorus Release in West Lake, Hangzhou, China ····· ZHU Guang-wei, LI Jing, ZHU Meng-yuan, *et al.* (1451)

Identification and PAC Adsorption of Foulants Responsible for Irreversible Fouling During Ultrafiltration of Dongjiang River Water ····· YANG Hai-yan, WANG Can, YAN Zhong-sen, *et al.* (1460)

Efficiency and Kinetics of Triclosan Degradation in Aqueous Solution by UV/Sodium Persulfate ····· LI Qing-song, LI Xue-yan, YAO Ning-bo, *et al.* (1467)

Influencing Factors on the Degradation of PFOS Through VUV-SO_3^{2-} ····· HAN Hui-li, WANG Hong-jie, DONG Wen-yi (1477)

Simultaneous Photocatalytic Reduction of Cr(Ⅵ) and Oxidation of SSA by Carbon Nitride ····· LI Li-li, CHEN Cui-bai, LAN Hua-chun, *et al.* (1483)

Modification of Diatomite by Zirconium and Its Performance in Phosphate Removal from Water ····· FAN Yi, WANG Zhe, ZHAO Lian-qin, *et al.* (1490)

Reducing Effect of Three Disinfection Technologies for Sulfonamides Resistance Genes ····· ZHENG Ji, ZHOU Zhen-chao, CHEN Fang, *et al.* (1497)

Removal of Estrogenic Effect by Typical Domestic Wastewater Treatment Processes ····· ZHANG Qiu-ya, MA Xiao-yan, WANG Xiao-chang, *et al.* (1506)

Effect of SRT on Stability of Yeast-SBR in Treating Oil-containing Wastewater ····· LÜ Wen-zhou, ZHANG Shu-lin, QIAO Yu-xiang, *et al.* (1513)

Degradation of the Disperse Dye Neocron Black(NB) by Biological Treatment ····· YANG Bo, DING Feng-you, XU Hui, *et al.* (1520)

Function of Polyphosphate Kinase Gene in Biological Phosphate Removal During the Wastewater Treatment Process ····· NAN Ya-ping, ZHOU Guo-biao, YUAN Lin-jiang (1529)

Short-cut Nitrification Recovery and Its Transformation into CANON Process in a Biofilm Reactor ····· FU Kun-ming, ZHOU Hou-tian, SU Xue-ying, *et al.* (1536)

Nitrogen Removal Characteristics and Diversity of Microbial Community in ANAMMOX Reactor ····· CAO Yan, WANG Tong-yu, QIN Yu-jie, *et al.* (1544)

Effect of Environment Adjustment Layers on Nitrogen Transformation in Anaerobic Bioreactor Landfills ····· HE Zheng-kun, SONG Bo-yu, ZHU Nan-wen, *et al.* (1551)

Characteristics of Anaerobic Methane Removal Coupled to Fe(Ⅲ) Reduction in Aged Refuse ····· WANG Li-li, HE Ting, LONG Yan, *et al.* (1558)

Assessment of Heavy Metal Pollution and Tracing Sources by Pb & Sr Isotope in the Soil Profile of Woodland in Quanzhou ····· SUN Jing-wei, YU Rui-lian, HU Gong-ren, *et al.* (1566)

Accumulation and Migration Characteristics in Soil Profiles and Bioavailability of Heavy Metals from Livestock Manure ····· HE Meng-yuan, DONG Tong-xi, RU Shu-hua, *et al.* (1576)

Pollution Characteristics and Source Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Agricultural Soils from Shandong ····· GE Wei, CHENG Qi-qi, CHAI Chao, *et al.* (1587)

Distribution Characteristics and Influencing Factors of Organophosphorus Pesticides in Typical Soil Environment of Jianghan Plain ····· WANG Jian-wei, ZHANG Cai-xiang, PAN Zhen-zhen, *et al.* (1597)

Characteristics and Influencing Factors of Biologically-based Phosphorus Fractions in the Farmland Soil ····· CAI Guan, HU Ya-jun, WANG Ting-ting, *et al.* (1606)

Effect of Straw Application on the Dynamics of Exogenous Nitrogen and Microbial Activity in Paddy Soil ····· CHEN Shan, DING Xian-qing, ZHU Zhen-ke, *et al.* (1613)

Effects of Biochar on Surface Albedo and Soil Respiration in Suburban Agricultural Soil ····· ZHANG Yang-yang, HU Xue-yu, ZOU Juan, *et al.* (1622)

N_2O Consumption Ability of Submerged Paddy Soil and the Regulatory Mechanism ····· WANG Ling, XING Xiao-yi, QIN Hong-ling, *et al.* (1633)

Non-CO_2 Greenhouse Gas Release from Different Biological Wastewater Treatment Processes ····· LI Hui-juan, PENG Dang-cong, LIU Wen-bo, *et al.* (1640)

Effect of Application of Sewage Sludge Composts on Greenhouse Gas Emissions in Soil ····· YANG Yu-han, YI Jian-ting, ZHANG Cheng, *et al.* (1647)

Effect of Nano Zeolites on pH, CEC in Soil and Cd Fractions in Plant and Soil at Different Cadmium Levels ····· CHI Sun-lin, XU Wei-hong, XIONG Shi-juan, *et al.* (1654)

Dynamic Differences of Uptake and Translocation of Exogenous Selenium by Different Crops and Its Mechanism ····· PENG Qin, LI Zhe, LIANG Dong-li, *et al.* (1667)

Alleviation Effects of Exogenous Melatonin on Ni Toxicity in Rice Seedings ····· LIU Shi-xiang, HUANG Yi-zong, LUO Ze-jiao, *et al.* (1675)

Forms Distribution and Ecotoxicity of Three Forms of Sulfonamides in Root-Soil Interface of Maize ····· JIN Cai-xia, SI Xiao-wei, WANG Wan-feng, *et al.* (1683)

Effect of Sediments on Bioaccumulation of Mercury in Fish Body in the Water-Level-Fluctuating Zone of the Three Gorges Reservoir Area ··· SUN Song, LI Chu-xian, ZHANG Cheng, *et al.* (1689)

Bioaccumulation and Correlation of Heavy Metals in Human Hairs From Urban and Rural Areas of Chongqing ····· HE Ming-jing, LI Qi, WANG Deng-xiang, *et al.* (1697)

Microbial Community Structure and Diversity in Cellar Water by 16S rRNA High-throughput Sequencing ····· YANG Hao, ZHANG Guo-zhen, YANG Xiao-ni, *et al.* (1704)

Performance Improvement of Microbial Fuel Cell with Polyaniline Dopped Graphene Anode ····· HUANG Li-hua, LI Xiu-fen, REN Yue-ping, *et al.* (1717)

Brief Introduction of Pollution Sites Remediation and Risk Assessment and Its Policy Making in United States ····· RONG Yue (1726)