

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第39卷 第1期

Vol.39 No.1

2018

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

2006~2015年北京市不同地区 O ₃ 浓度变化	王占山, 李云婷, 安欣欣, 李倩, 孙乃迪, 王步英, 潘锦秀 (1)
南京北郊黑碳气溶胶的来源解析	肖思略, 于兴娜, 朱彬, 何稼祺, 吕睿, 沙丹丹 (9)
电镀厂周边大气 PM ₁₀ 中重金属季节性分布特征及生态风险评价	赵珍丽, 赵委托, 黄庭, 程胜高, 余葱葱, 尹伊梦 (18)
广西玉林市大气 PM ₁₀ 和 PM _{2.5} 中有机碳和元素碳污染特征分析	黄炯丽, 陈志明, 莫招育, 李宏姣, 杨俊超, 刘慧琳, 毛敬英, 梁桂云, 张达标, 吴熊平, 郝爽 (27)
青岛近海及黄渤海大气气溶胶中不同形态氮磷质量浓度及组成特征	张瑞峰, 祁建华, 丁雪, 谢丹丹 (38)
大气环境分区管理: 以广东省为例	杨柳林, 李敏辉, 廖程浩, 曾武涛, 张晖, 张永波 (49)
基于高分影像的城市黑臭水体遥感识别: 以南京为例	温爽, 王桥, 李云梅, 朱利, 吕恒, 雷少华, 丁萧蕾, 苗松 (57)
基于 SWAT 模型的流域河道硝酸盐 δ ¹⁵ N 和 δ ¹⁸ O 模拟	王康, 冉宁, 林忠兵, 周祖昊 (68)
程海流域非点源污染负荷估算及其控制对策	陈学凯, 刘晓波, 彭文启, 董飞, 黄智华, 冯顺新, 王若男 (77)
陆浑水库饮用水源地水体中金属元素分布特征及健康风险评价	余葱葱, 赵委托, 高小峰, 程胜高, 谢地, 马鹏途 (89)
天津供水系统中抗生素分布变化特征与健康风险评价	张新波, 宋姿, 张丹, 刘楠楠, 李楠, 温海涛 (99)
西南丘陵区村镇典型供水水源有机物分布特征及对饮水水质的影响	王琼, 李乃稳, 李磊, 李龙国, 苟思, 杨凌肖 (109)
北京市地下水有机氯和有机磷农药健康风险评价	陈卫平, 彭程伟, 杨阳, 吴玉梅 (117)
黄河岸边土壤中类二噁英类多氯联苯污染现状及风险	姚宏, 卢双, 张旭, 裴晋, 鲁垠涛 (123)
淹水落干下三峡水库消落带土壤无机磷形态转化特征	周健, 李春辉, 张志永, 胡红青, 万成炎, 胡莲, 潘晓洁 (130)
磷酸盐对铁锰复合氧化膜去除地表水中氨氮的影响	卓瑞双, 黄廷林, 张瑞峰, 文刚 (137)
K ₂ S ₂ O ₈ 强化 g-C ₃ N ₄ 薄膜电极光电催化降解 Cu(CN) ₂ 并同步回收 Cu	党聪哲, 李一兵, 王彦斌, 赵旭 (145)
以 HKUST-1 为模板制备铜氧化物活化过一硫酸氢钾降解罗丹明 B	蒲嘉懿, 万金泉, 王艳, 马邕文, 武书彬 (152)
氨化松香基交联聚合树脂对水中诺氟沙星的吸附性能	马亚红, 黄婉婷, 刁开盛, 李鹏飞, 谭学才, 董慧岭, 覃方夸, 雷福厚, 刘绍刚 (161)
铁锰泥除砷颗粒吸附剂对 As(V) 的吸附去除	曾辉平, 吕赛赛, 杨航, 尹灿, 曹瑞华, 王艳菊, 李冬, 张杰 (170)
水铁矿及其胶体对砷的吸附与吸附形态	马玉玲, 马杰, 陈雅丽, 雷梅, 郭华明, 翁莉萍, 李永涛 (179)
阳(阴)离子复配修饰两性磁性膨润土的表面特征差异及对苯酚吸附的影响	任爽, 孟昭福, 王腾, 张洋, 田凯, 刘伟, 闫东旭 (187)
典型城市污水中对羟基苯甲酸酯的污染特征	赵雪, 张子峰, 祝富杰, 李一凡, 马万里 (195)
水力停留时间对活性炭生物转盘处理污水的影响	许雯佳, 成小英 (202)
环丙沙星对膜生物反应器运行效能的影响及其去除特性	戴琦, 刘锐, 舒小铭, 张永明, 陈吕军 (212)
AAO 工艺低氧条件下的运行及其模拟	曹特特, 王林, 李咏梅 (219)
磷酸盐对亚硝化系统的抑制及恢复	顾澄伟, 陈方敏, 李祥, 张程锦 (227)
碳源对污水处理厂 SAD 工艺小试的影响	李冬, 赵世勋, 王俊安, 朱金凤, 关宏伟, 张杰 (232)
容积负荷对 ABR-MBR 工艺反硝化除磷性能的影响	吕亮, 尤雯, 韦佳敏, 吴鹏, 沈耀良 (239)
DNBF-O ₃ -GAC 组合工艺深度脱除氮磷及代谢产物	钟丽燕, 郝瑞霞, 王卫东, 万京京, 朱晓霞 (247)
交替好氧/缺氧运行模式对生物脱氮效能及活性污泥胞外聚合物的影响	孙洪伟, 陈翠忠, 吴长峰, 赵华南, 于雪, 方晓航 (256)
纳米零价铁对升流式颗粒污泥床反硝化性能的影响	周丰, 王翻翻, 钱飞跃, 黄慧敏, 沈耀良, 周建民 (263)
高含固污泥厌氧消化中 Fe/S 及 pH 对原位抑硫效率影响及其交互作用	韩芸, 曹玉芹, 卓杨, 王晓飞, 韩雅婷, 彭党聪 (269)
浑河流域贮存污泥成分特征及演变规律分析	刘甜甜, 崔崇威, 赫俊国, 唐建 (276)
去除城市生活污泥中有机络合态金属强化其厌氧生物制气	卢怡清, 许颖, 董滨, 戴晓虎 (284)
污泥飞灰中重金属不同浸出方法比较及综合毒性评价	王丰, 李润东, 李彦龙, 赵云斌, 杨天华 (292)
初冬时期闽江河口区养殖塘排水后的 CH ₄ 和 N ₂ O 通量日变化特征	杨平, 谭立山, 黄佳芳, 何清华, 全川 (300)
3 种土壤改良剂对河套灌区玉米田温室气体排放的影响	武岩, 红梅, 林立龙, 刘梅, 刘宇杰 (310)
有机氮替代比例对冬小麦/夏玉米轮作体系作物产量及 N ₂ O 排放的影响	侯苗苗, 吕凤莲, 张弘毅, 周应田, 路国艳, Ayaz Muhammad, 黎青慧, 杨学云, 张树兰 (321)
拔节期水稻光合碳输入的动态变化及其对施氮的响应: ¹³ C-CO ₂ 脉冲标记	陈珊, 祝贞科, 袁红朝, 王久荣, 彭佩钦, 葛体达, 吴金水 (331)
陕北黄土丘陵区不同土地利用方式下土壤碳剖面分布特征	兰志龙, 赵英, 张建国, 李会杰, 司炳成, 焦瑞, Muhammad Numan Khan, Tanveer Ali Sial (339)
不同地表条件下生物炭对土壤氮挥发的影响	邹娟, 胡学玉, 张阳阳, 陈窈君, 王向前, 刘扬 (348)
秸秆与生物炭还田对土壤团聚体及固碳特征的影响	徐国鑫, 王子芳, 高明, 田冬, 黄容, 刘江, 黎嘉成 (355)
县域尺度土壤铜的有效性及相关影响因素评估	李锦芬, 瞿明凯, 刘刚, 黄标 (363)
基于改进 LUR 模型的区域土壤重金属空间分布预测	曾菁菁, 沈春竹, 周生路, 陆春峰, 金志丰, 朱雁 (371)
沈北新区土壤中多环芳烃污染特征及源解析	李嘉康, 宋雪英, 魏建兵, 王颖怡, 李玉双, 郑学昊 (379)
磷酸盐、腐殖酸与粉煤灰联合钝化处理模拟铅镉污染土壤	赵庆圆, 李小明, 杨麒, 陈灿, 钟振宇, 钟宇, 陈飞, 陈寻峰, 王祥 (389)
控源及改良措施对稻田土壤和水稻镉累积的影响	封文利, 郭朝晖, 史磊, 肖细元, 韩晓晴, 冉洪珍, 薛清华 (399)
典型土壤双季稻对 Cd 吸收累积差异	李欣阳, 龙坚, 王树兵, 陈齐, 董霞, 蒋凯, 侯红波, 彭佩钦, 廖柏寒 (406)
松花江上游夹皮沟金矿开采区芦苇叶片汞分布特征	张曼胤, 李梦洁, 崔丽娟, 王贺年, 郭子良, 徐卫刚, 魏圆云, 杨思, 肖红叶 (415)
硝酸盐对土壤反硝化活性及厌氧降解的影响	代军帅, 左小虎, 王明霞, 姚炎红, 周志峰 (422)
长期施肥对稻田土壤微生物量、群落结构和活性的影响	王伟华, 刘毅, 唐海明, 孙志龙, 李宝珍, 葛体达, 吴金水 (430)
海洋沉积物中硫酸盐还原菌和硫酸化菌群落分析方法的比较	张玉, 米铁柱, 甄毓, 陈烨, 付璐璐, 王勋功 (438)
鄱阳湖微囊藻毒素时空分布格局及其与理化及生物因子的关系	袁丽娟, 廖旦根, 张莉, 张大文, 罗林广, 刘聚涛 (450)
畜禽粪便中多重耐药细菌及耐药基因分布特征	张昊, 王盼亮, 杨清香, 俞宁 (460)
烟气净化工艺和焚烧炉类型对生活垃圾焚烧灰灰性质的影响	章骅, 于思源, 邵立明, 何晶晶 (467)

海洋沉积物中硫酸盐还原菌和硫氧化菌群落分析方法的比较

张玉^{1,2,3}, 米铁柱^{1,2,3}, 甄毓^{1,2,3*}, 陈烨^{2,3,4}, 付璐璐^{2,3,4}, 王勋功^{1,2,3}

(1. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 266100; 2. 海洋环境与生态教育部重点实验室, 青岛 266100; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室, 青岛 266071; 4. 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

摘要: 硫酸盐还原菌(sulfate-reducing prokaryotes, SRP)和硫氧化菌(sulfur-oxidizing prokaryotes, SOP)在硫的生物地球化学循环中发挥着极为重要的作用. 本文以 SRP 作为高丰富度多样性菌群代表, 针对于 SRP 所共有的异化型亚硫酸盐还原酶(dissimilatory sulphite reductase, DSR)中的 β 亚基基因(*dsrB*), 通过克隆文库技术、454 高通量测序技术和 Illumina 高通量测序技术对其群落特征进行比较分析. 结果表明, Illumina 高通量测序技术优于 454 高通量测序技术和克隆文库技术, 特别在低丰度物种的检测方面, Illumina 高通量测序技术具有明显优势. 以 SOP *soxB* 基因(~750 bp)作为较长基因片段的代表, 分别采用 454 高通量测序技术和 Illumina 单端高通量测序技术对 SOP 群落组成和多样性信息进行比较分析, 结果表明, 454 高通量测序技术在读长上的优势并未体现出来, 而 Illumina 单端高通量测序技术优于 454 高通量测序技术.

关键词: 硫酸盐还原菌; 硫氧化菌; 高通量测序; 克隆文库; 沉积物

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2018)01-0438-12 DOI: 10.13227/j.hjxx.201705054

Analysis of Sulfate-Reducing and Sulfur-Oxidizing Prokaryote Community Structures in Marine Sediments with Different Sequencing Technologies

ZHANG Yu^{1,2,3}, MI Tie-zhu^{1,2,3}, ZHEN Yu^{1,2,3*}, CHEN Ye^{2,3,4}, FU Lu-lu^{2,3,4}, WANG Xun-gong^{1,2,3}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Qingdao 266100, China; 3. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 4. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Sulfate-reducing prokaryotes (SRP) and sulfur-oxidizing prokaryotes (SOP) play vital roles in the sulfur cycle. The SRP community was used to represent a microbial community with high richness and diversity. The 454 pyrosequencing, Illumina high-throughput sequencing, and traditional clone library methods that target the dissimilatory sulfite reductase β subunit gene (*dsrB*), which encodes a key enzyme in the sulfate reduction pathway, were used to compare the differences in SRP community characteristics. Comparative analyses suggested that Illumina high-throughput sequencing was a more appropriate method for SRP (high richness and diversity) community studies. The SOP *soxB* gene (~750 bp) was used as a representative of the long-sequence segment. The 454 pyrosequencing and Illumina high-throughput sequencing methods were used to compare the differences in SOP community characteristics. The results revealed that 454 pyrosequencing did not reflect its advantage of a longer read length; whereas, the Illumina high-throughput sequencing with more numerous and shorter sequence reads was more suitable when the *soxB* gene was used to investigate the community composition and diversity of SOP.

Key words: sulfate-reducing prokaryotes (SRP); sulfur-oxidizing prokaryotes (SOP); high-throughput sequencing; clone library; sediments

海洋沉积物是集化学物质和微生物于一体的特殊生态环境, 广阔的海域面积为微生物提供重要的栖息地, 微生物的分布和代谢活动也影响着沉积物中碳、氮、硫等生源要素的生物地球化学循环. 其中硫酸盐还原菌(sulfate-reducing prokaryotes, SRP)和硫氧化菌(sulfur-oxidizing prokaryotes, SOP)是推动海洋硫循环的主要微生物. 异化型亚硫酸盐还原酶(dissimilatory sulphite reductase, DSR)在 SRP 的硫酸盐还原过程中起着关键的催化作用, 其 β 亚基

基因(*dsrB*)是广泛用于环境样品中 SRP 分子检测的标记基因^[1~4]; *soxB* 基因是硫化物氧化过程中的关键基因, 广泛分布于 SOP 菌群中^[5], 且已被用于

收稿日期: 2017-05-07; 修订日期: 2017-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(41521064, 41620104001); 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室项目; 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生态与环境科学开放基金项目(KLMES201601)

作者简介: 张玉(1987~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为海洋环境生态学, E-mail: zhangyu201413@163.com

* 通信作者, E-mail: zhenyu@ouc.edu.cn

多种生境中 SOP 群落信息的研究^[6~9]。

20 世纪 90 年代,相对简便易行的 Sanger 测序成为第一代测序技术的代表,以此为基础逐步发展起来的聚丙烯酰胺凝胶(DGGE)技术和克隆文库技术在微生物分子生态学研究得到了广泛应用。随着测序技术的不断发展,以 Roche 454 和 Illumina 测序平台为主的新一代测序技术(next generation sequencing, NGS),又称为高通量测序技术,因其通量高、成本低、准确度高等特点,已迅速发展成为微生物生态学研究的主要方法,极大拓宽了环境微生物研究的深度和广度^[10~14]。

尽管高通量测序技术在测序通量方面具有明显的优势,但这一技术的出现并不完全排斥第一代测序技术。比较分析不同技术方法的优劣,是合理进行微生物分子生态学研究的基础。近年来,已陆续有研究者采用 454 高通量测序技术、Illumina 高通量测序技术和传统分子生物学技术(克隆文库与 DGGE 技术)对人类粪便^[15]、土壤^[16]、油田^[17]、泥炭藓^[18]、生物滤池^[19]、烟叶表面^[20]、白酒^[21,22]等环境中的微生物群落结构进行了分析,比较了不同研究方法在微生物群落结构分析中的适用性,结果表明高通量测序技术能够更加全面和准确地反映环境中微生物群落信息。此外,贺惠等(未发表数据)通过克隆文库、454 和 Illumina 高通量测序技术研究了海洋沉积物中多样性水平较低的氨氧化细菌群落组成和多样性,并对 3 种技术方法所得结果进行比较分析,结果表明 3 种测序方法从优到劣依次为 Illumina 高通量测序技术、454 高通量测序技术、克隆文库技术。整体而言,上述研究均是针对于基因片段较短或多样性水平较低的某种微生物群落(如氨氧化细菌)进行的研究。而不同研究方法在多样性水平较高和基因片段较长的功能菌群群落信息研究中的适用性却未见报道。

在以往的研究中,根据 *dsrB* 基因序列分析,SRP 群落可划分成 647 个 OTUs^[1],与其它微生物类群如氨氧化细菌相比,SRP 的物种丰富度和多样性水平相对较高^[23]。而 SOP 种类繁多,功能各异,分布广泛,且在系统发育和生理代谢方面也具有较高的多样性^[24],与氨氧化细菌相比,SOP 同样属于高多样性水平类群。*SoxB* 基因作为多数 SOP 类群的标记基因,其 PCR 扩增片段长度通常为 750 bp^[5],与目前常用于高通量测序的基因片段相比,*soxB* 基因片段相对较长。

本研究以 *dsrB* 和 *soxB* 为目的基因,分别采用克

隆文库技术、454 高通量测序技术和 Illumina 高通量测序技术研究东海表层沉积物中 SRP 和 SOP 群落组成、多样性,比较不同测序技术在分析 SRP 和 SOP 菌群特征中的优劣,以期环境中高多样性微生物类群的分子生态学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与保存

于 2011 年 7 月底至 8 月初乘“润江”号科研考察船对东海海域进行调查,用箱式采泥器采集沉积物样品,采样站点为 S31(122.55°E,29.56°N),见图 1。样品采集后,刮取表层 4 cm 样品,分装于无菌密封袋中,并保存在 -80℃ 用于基因组 DNA 提取。

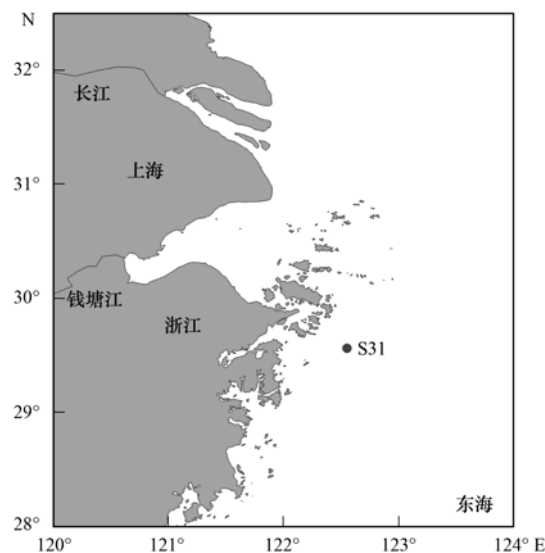


图 1 东海海域表层沉积物采样站位

Fig. 1 Sampling site of surface sediments from the East China Sea

1.2 沉积物微生物基因组 DNA 提取

将沉积物解冻混匀后,利用 DNA 抽提试剂盒 PowerSoil® DNA Isolation Kit(MOBIO,美国)提取总 DNA,并将得到的 DNA 保存于 -20℃ 冰箱。

1.3 克隆文库构建及生物信息学分析

1.3.1 克隆文库构建

将提取的基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板,使用引物 *DSR*-p2060F(5'-CAA CAT CGT YCA YAC CCA GGG)和 *DSR*-4R(5'-GTGTAG CAG TTA CCG CA)^[25] 扩增 *dsrB* 基因,长度约 380 bp。PCR 反应条件为:94℃/10 min; 94℃/30 s, 55℃/40 s, 72℃/1 min, 35 个循环; 72℃/10 min。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,并用 DNA 胶回收试剂盒(宝生物,大连)纯化目标产物。采用 pMD18-T vector Kit(宝生物,大连)进行连接,并转化入大肠

杆菌(*Escherichia coli*)Trans 5 α 感受态细胞,克隆在 Luria-Bertani 培养基上培养。

通过蓝白斑方法筛选出阳性克隆后,用通用引物 M13F(-47)和 M13R(-48)进行菌落 PCR,1% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小,将随机挑选的含有正确插入片段的 100 个克隆子送去测序(华大基因,北京)。

1.3.2 生物信息学分析

将得到的序列首先提交到 GenBank 数据库,利用在线检测工具 VecScreen 检测嵌合体,用 Mothur 软件将去除嵌合体后的有效序列按照大于或等于 90% 的相似性归类到同一 OTU,筛选出每个 OTU 的代表序列,并生成稀释曲线,计算克隆文库的 Chao1、Shannon 和覆盖度指数。

1.4 454 高通量测序及生物信息学分析

1.4.1 454 高通量测序

分别使用带 barcode 的特异引物 DSR-p2060F/DSR-4R(引物序列同上)和 SoxB693F(5'-ATC GGN CAR GCN TTY CCN TA)/SoxB1445B(5'-CAT GTC NCC NCC RTG YTG)^[26] 扩增 *dsrB*(~380 bp)和 *soxB*(~750 bp) 基因。PCR 反应条件为:98℃/5 min; 98℃/30 s,55℃/40 s,72℃/1 min,32 个循环;72℃/7 min。使用 1.5% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并使用胶回收试剂盒(Axygen, AP-GX-250)对 PCR 产物进行纯化,然后将 PCR 纯化产物稀释、等量混合。文库制备完成且检测合格后使用 Roche 454 GS FLX + 测序仪对 *dsrB* 和 *soxB* 基因进行扩增子高通量测序(派森诺生物科技有限公司,上海)。

1.4.2 数据质控及分析

使用 QIIME (Version 1.9.0) 对原始序列进行质量过滤。将含模糊碱基、引物错配、碱基质量得分小于 20 及长度较低的序列等予以剔除,得到高质量序列。使用 Uparse 在 90% 序列相似度下对 *dsrB* 和 *soxB* 基因高质量序列进行 OTU 聚类,并选取每个 OTU 的代表序列。使用 QIIME 计算每个样品的 Chao1、Shannon 和覆盖度指数,并绘制稀释曲线。

1.5 Illumina 高通量测序及生物信息学分析

1.5.1 Illumina 高通量测序

以基因组 DNA 为模板,分别使用带 barcode 特异性引物和高效高保真的酶及酶和缓冲液(Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer, New England Biolabs)对 *dsrB* 基因和 *soxB* 基因进行扩增(扩增引物同上)。PCR 反应条件为:

98℃/1 min; 98℃/10 s, 50℃/30 s, 72℃/30 s, 30 个循环; 72℃/5 min。将 PCR 产物等浓度混合后使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测,并使用胶回收试剂盒(GeneJET, Thermo Scientific)进行纯化。使用建库试剂盒(NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit)进行文库构建。文库检测合格后,使用 Illumina HiSeq PE250 进行上机测序(诺禾致源生物信息科技有限公司,北京)。由于 Illumina 平台所得序列有效长度通常在 400 bp 以内,而本文所使用 *soxB* 基因的引物扩增序列长度较长(~750 bp),因此本研究仅对该基因两端的序列进行测序,并不对两端序列进行拼接,并将该测序过程定义为 Illumina 单端高通量测序。

1.5.2 数据拼接、质控及分析

根据 *dsrB* 和 *soxB* 基因的 barcode 序列和 PCR 扩增引物序列拆分下机数据,去除引物及 barcode 序列后使用 FLASH(V1.2.7)对 *dsrB* 基因的双端序列进行拼接。利用 Qiime 对拼接后的 *dsrB* 基因序列和未经拼接的 *soxB* 基因的两端序列分别进行质控。将碱基质量得分小于 20 的序列及片段长度较低的序列等予以剔除,得到高质量序列。使用 Uparse 在 90% 序列相似度下对 *dsrB* 和 *soxB* 基因高质量序列进行 OTU 聚类,并选取每个 OTU 的代表序列。使用 QIIME 计算每个样品的 Chao1、Shannon 和覆盖度指数,并绘制稀释曲线。

1.6 基因序列登录号

将高通量测序所得 *dsrB* 和 *soxB* 基因序列上传至 NCBI Sequence Read Archive(SRA)数据库,登录号分别为 SRP101534(*dsrB*)、SRP101417(*soxB*/HiSeq)和 SRP077086(*soxB*/454)。克隆文库测序所得 *dsrB* 基因序列提交至 GenBank 数据库,登录号为 KC567991 ~ KC568065。

2 结果与分析

2.1 硫酸盐还原菌(SRP)群落结构分子多样性研究技术的比较

2.1.1 硫酸盐还原菌(SRP)群落多样性的比较

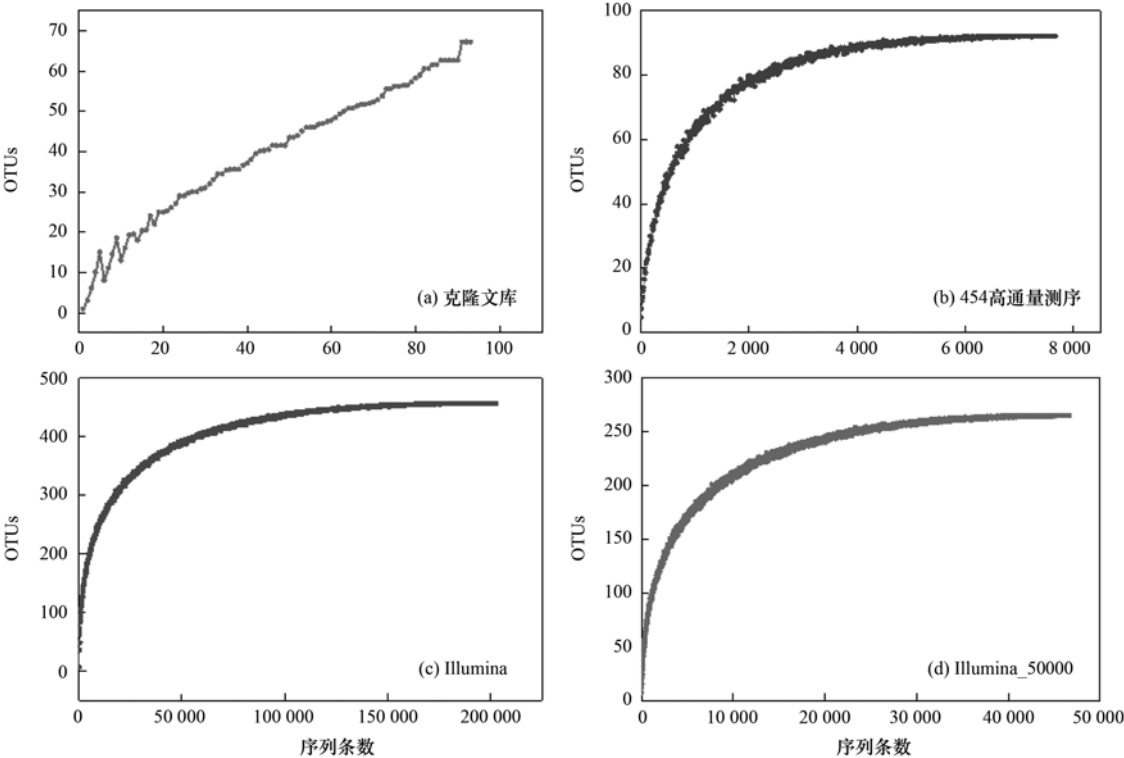
本研究运用 3 种测序技术对 SRP 群落多样性及其组成进行研究。由于本研究中 Illumina 测序平台所获序列条数远高于目前常用测序通量(5 万条序列),因此从 Illumina 高通量测序所得序列中随机抽取 5 万条序列作为原始数据,与上述 3 种方法所得序列同时进行比较分析。由表 1 可知,高通量测序技术所获序列条数远高于克隆文库技术,这为充

分揭示环境中 SRP 群落信息奠定了基础. 进一步分析发现,随着测序通量的增加,检测到的 OTU 数随之增加,SRP 群落丰富度 (Chao1) 和多样性指数 (Shannon) 也随之增加. 与此类似,王勋功等(未发表数据)对长江口邻近海域沉积物微生物群落的比较分析及 Huse 等^[27]在对人类粪便样品微生物群落的研究中也发现,随着序列条数的增加,OTU 数随之增加. 此外,对不同研究方法所得覆盖度(表 1)

和样品稀释曲线(图 2)进行分析可知,454 和 Illumina 高通量测序技术所得覆盖度值高达 100% 且稀释曲线[图 2(b)~2(d)]已趋于饱和,说明测序数量足够,能够较全面反映样品中 SRP 群落的多样性水平,而克隆文库技术所得覆盖度为 79.57% 且稀释曲线[图 2(a)]仍处于上升阶段,说明该测序深度仅涵盖了样品中的部分 SRP 类群,不足以全面反映该样品中 SRP 群落的多样性水平.

表 1 不同研究方法所得 SRP 多样性及序列信息

Table 1 Information for the sequences and diversity of SRP obtained from high-throughput sequencing and the traditional clone library						
研究方法	高质量序列条数	平均序列长度/bp	OTU 个数	Chao1 指数	Shannon 指数	覆盖度/%
克隆文库	93	~350	33	67	2.99	79.57
454 高通量测序	8114	~338	92	92	3.11	100.00
Illumina(50000)	50000	~334	265	265	4.32	100.00
Illumina 高通量测序	210844	~334	457	457	4.51	100.00



(a) 克隆文库技术所得稀释曲线; (b) 454 高通量测序技术所得稀释曲线; (c) Illumina 高通量测序技术测序通量为 210 844 时所得稀释曲线; (d) Illumina 高通量测序技术测序通量为 50 000 时所得稀释曲线

图 2 不同研究方法所得硫酸盐还原菌菌群稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curves of the SRP community obtained from high-throughput sequencing and the traditional clone library

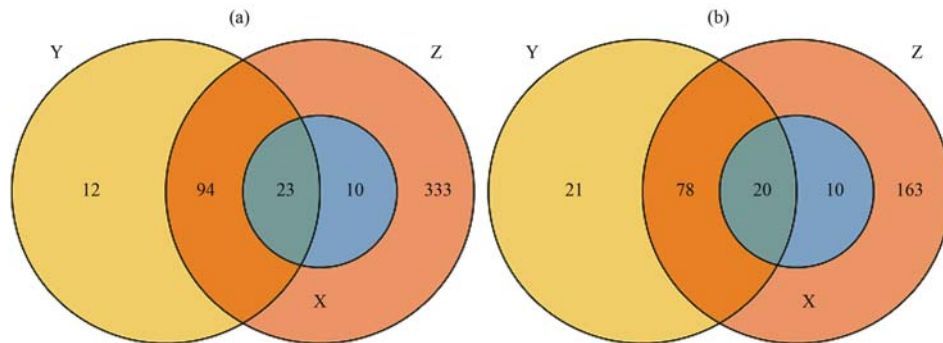
2.1.2 硫酸盐还原菌(SRP)群落组成的比较

将克隆文库技术、454 高通量测序技术和 Illumina 高通量测序技术(210844)所得 *dsrB* 基因序列合并,按照 90% 相似性进行 OTU 聚类,并利用 Venn 图分析不同研究技术所得 OTUs 之间的关系[图 3(a)]. 此外,本研究从 Illumina 高通量测序所

得 *dsrB* 基因序列中随机抽取 5 万条序列作为原始数据,与克隆文库技术和 454 高通量测序技术所得 *dsrB* 基因序列合并,按照上述分析方法同时进行比较分析[图 3(b)]. 两种研究结果均表明,Illumina 高通量测序技术所得 OTUs 信息均能完整覆盖克隆文库技术所检测到的所有 OTUs,并能覆盖 82% 以

上 454 高通量测序技术所检测到的 OTUs. Illumina 测序通量为 210844 时, Illumina 和 454 高通量测序技术各自独有的 OTUs 个数分别是 333 和 12 个; Illumina 测序通量为 5 万时, Illumina 和 454 高通量测序技术各自独有的 OTUs 个数分别是 163 和 21 个; 进一步分析中发现所有独有 OTU 的相对丰度均小于 1%. 由此可见, 两种测序深度下, Illumina 高通量测序技术能够检测到更多的 SRP 类群, 特别是

低丰度 SRP 类群. 此外, Illumina 测序通量为 210844 时[图 3(a)], 3 种研究方法所检测到的 OTUs 共有 23 个, 且其丰度所占比例分别是 82.02% (克隆文库)、78.37% (454)、57.35% (Illumina_210844); Illumina 测序通量为 5 万时, 3 种研究方法所检测到的 OTUs 共有 20 个, 且其丰度所占比例分别是 81.40% (克隆文库)、78.15% (454)、57.95% (Illumina_50000).



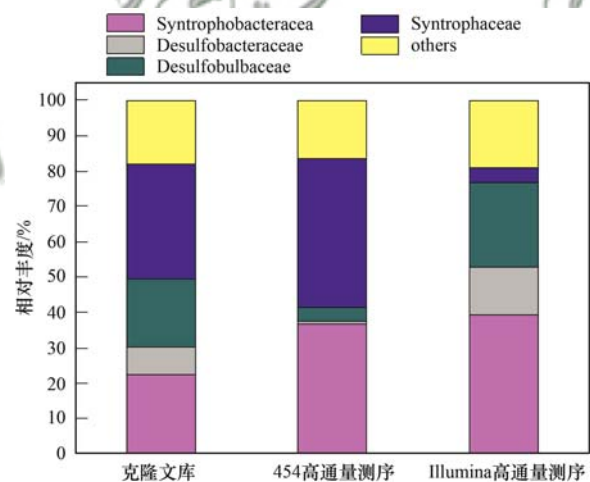
所用研究方法为克隆文库技术、454 高通量测序技术和 Illumina 高通量测序技术, 其中(a)、(b)中 Illumina 高通量测序技术的测序通量分别为 210844 和 50000; X: 克隆文库技术; Y: 454 高通量测序技术; Z: Illumina 高通量测序技术

图 3 不同研究方法所得 OTUs 分布 Venn 图

Fig. 3 Venn graph of OTUs obtained from high-throughput sequencing and the traditional clone library

分别筛选出 3 种研究方法所得优势 OTUs 类群[将高通量测序所得序列丰度低于 1% 的 OTU 及克隆文库所得序列数低于 2 (即相对丰度低于 2.25) 的 OTU 归为 others], 并将这些优势类群 OTU 的代表序列与已知 SRP 进行比对及注释, 进一步分析不同研究方法所得 SRP 群落组成差异. 在科分类水平上(图 4), 3 种测序技术的结果均表明该研究海域 SRP 优势类群为互营杆菌科 (Syntrophobacteraceae)、互营菌科 (Syntrophaceae)、Desulfobulbaceae、脱硫杆菌科 (Desulfobacteraceae), 但不同研究方法所得优势类群的相对丰度并不一致.

在 OTU 水平上(表 2), 克隆文库技术检测到的主要优势类群分别是 OTU1 (21.35%) 和 OTU90 (20.22%), 其中 OTU1 在 454 高通量测序技术和 Illumina 高通量测序技术的结果中也是主要的优势菌群, 且相对丰度分别高达 36.57% (454) 和 35.00% (Illumina). 但 OTU90 在两种高通量测序技术中所检测到的丰度均小于 1%, 说明克隆文库技术可能高估了该类群丰度. 对于高通量测序技术中所检测到的一些主要类群, 如 OTU5、OTU9、OTU16、OTU09、OTU18、OTU19、OTU42、OTU41 和 OTU45 在克隆文库技术中并未检测到, 这可能是



others: 将高通量测序所得序列相对丰度低于 1% 的 OTU 及克隆文库所得序列数低于 2 (即相对丰度低于 2.25) 的 OTU 归为 Others

图 4 科分类水平上 SRP 的相对丰度分析

Fig. 4 Relative abundance of SRP at the family level

由于该技术的测序通量较低, 测序结果存在一定的随机性, 从而不能准确反映 SRP 群落组成及丰度状况. 此外, 454 和 Illumina 高通量测序技术所检测到的 SRP 菌群也存在一定差异, 如在 454 高通量测序技术中检测到的部分 SRP 优势类群, 如 OTU10 (33.28%)、OTU41 (1.90%)、OTU19 (1.81%), 在

表 2 OTU 分类水平上 SRP 群落组成的相对丰度分析¹⁾

OTU	community structure at the OTU level		
	相对丰度/%		
	克隆文库	454 高通量测序	Illumina 高通量测序
OTU1	21.35	36.57	35.00
OTU90	20.22	0.09	0.03
OTU3	6.74	0.04	5.64
OTU22	5.62	0.12	0.75
OTU12	4.49	0.05	0.79
OTU2	3.37	—	9.84
OTU4	3.37	—	3.49
OTU11	3.37	0.03	0.71
OTU28	3.37	—	0.44
OTU10	2.25	33.28	0.21
OTU48	1.12	0.03	4.25
OTU6	1.12	2.62	3.46
OTU21	1.12	0.09	1.93
OTU7	1.12	—	1.63
OTU8	1.12	0.05	1.50
OTU29	1.12	1.31	0.21
OTU37	1.12	1.37	0.12
OTU5	—	0.01	2.69
OTU9	—	0.03	2.28
OTU16	—	0.19	2.19
OTU109	—	0.58	1.48
OTU18	—	0.78	1.16
OTU19	—	1.81	0.43
OTU42	—	1.43	0.30
OTU41	—	1.90	0.14
OTU45	—	1.10	0.12
others	17.98	16.45	19.21

1) “—”, 未检测到(相对丰度为 0); others: 将高通量测序所得序列相对丰度低于 1% 的 OTU 及克隆文库所得序列数低于 2 (即相对丰度低于 2.25) 的 OTU 归为 others

Illumina 高通量测序技术中也有发现,但所检测到的相对丰度均小于 1%; 在 Illumina 高通量测序技术中检测到的主要 SRP 类群(OTU2、OTU4、OTU28 和 OTU7)则在 454 高通量测序技术并未检测到。

2.2 硫化菌(SOP)群落分子多样性研究技术的比较

2.2.1 硫化菌(SOP)群落多样性的比较

针对 SOP 的关键功能基因 *soxB*, 通过 454 和 Illumina 单端高通量测序技术对 SOP 群落组成及多样性进行比较分析。不同研究方法所得 SOP 群落多样性及序列信息如表 3 所示。454 高通量测序技术所得序列长度明显高于 Illumina 单端高通量测序技术,而 Illumina 单端高通量测序技术的测序通量远高于 454 高通量测序技术,且其所检测到的 SOP 丰富度及多样性指数也均高于 454 高通量测序技术。由不同测序平台所得的稀释曲线(图 5)及覆盖度可知,两种测序技术均能完整有效地反映出样品中 SOP 的多样性信息。

2.2.2 硫化菌(SOP)群落组成的比较

将 OTUs 代表序列与 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库进行比对注释,并将两种研究方法检测到的 SOP 类群进行比较分析(表 4),结果表明 Illumina 单端高通量测序方法所检测到的 SOP 类群更广泛。分析不同研究方法所获序列的物种注释结果发现(图 6),在 454 高通量测序结果中,26.6% 的 OTUs(丰度为 47%)获得了注释信息;在 Illumina 单端高通量测结果中,前端序列(read1)中 12.9% 的 OTUs(丰度为 32.7%)获得了注释信息,末端序列(read2)中 12.3% 的 OTUs(丰

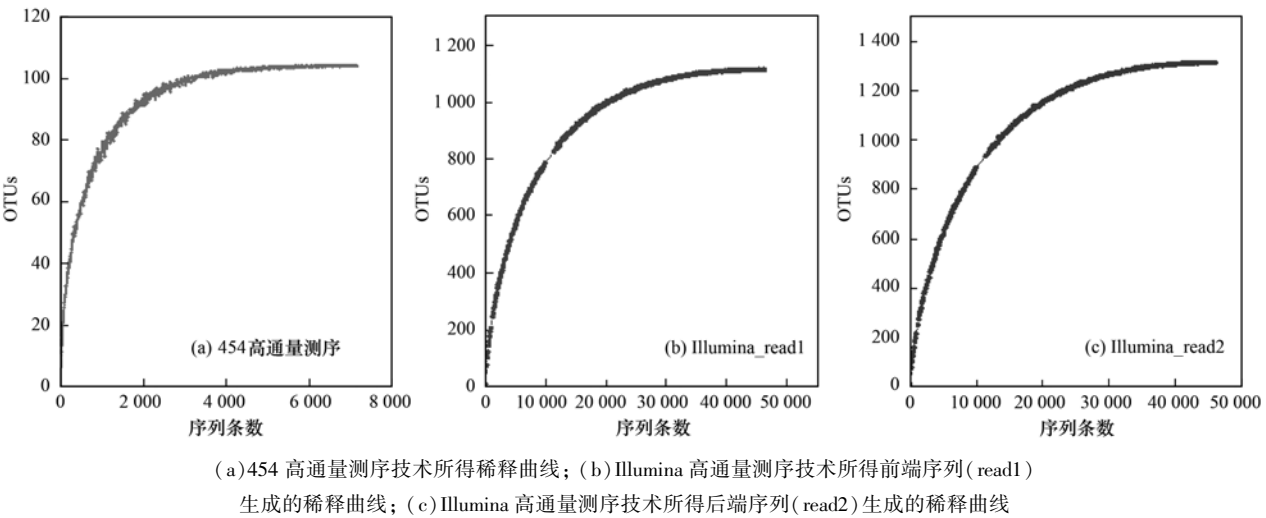


图 5 不同研究方法所得硫化菌群落稀释曲线

Fig. 5 Rarefaction curves of the SRP community obtained from high-throughput sequencing and the traditional clone library

表 3 不同研究方法所得硫化菌群落多样性及序列信息

Table 3 Information regarding the sequences and diversity of SOP obtained from high-throughput sequencing and the traditional clone library

研究方法	高质量 序列条数	平均序列 长度/bp	OTU 个数	Chao1 指数	Shannon 指数	覆盖度 /%
454 高通量测序	12100	~551	104	104	4.46	100.00
Illumina 单端高通量测序 (read1)	54555	~222	1114	1114	6.14	100.00
Illumina 单端高通量测序 (read2)	53883	~222	1314	1314	6.22	100.00

表 4 不同研究方法所得硫化菌群落信息汇总

Table 4 Taxa information for SOP using different methods

研究方法	门	纲	目	科	属	种
454 高通量测序	4	7	12	16	24	25
Illumina 单端高通量测序 (read1)	4	7	19	30	65	83
Illumina 单端高通量测序 (read2)	4	6	19	31	66	83

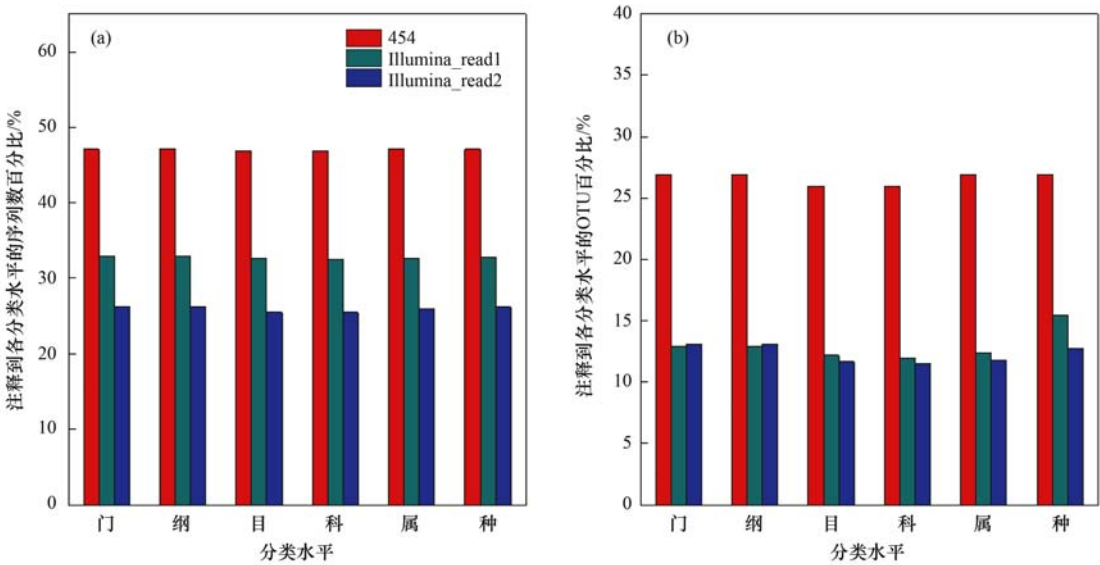


图 6 不同分类水平上获得注释信息序列数和 OTU 个数百分比

Fig. 6 Percentage of OTUs and abundance at different taxonomic levels

度为 25.9%) 序列获得了注释信息. 此外, 两种研究方法所得绝大多数序列 (53.0% ~ 74.1%) 均未获得注释信息, 并且未得到注释信息的序列既包含丰度较高的优势类群也包含丰度较低的稀有类群.

如图 7 所示, 在门分类水平上, 两种研究方法均检测到变形菌门 (Proteobacteria)、绿菌门 (Chlorobi)、螺旋体门 (Spirochaeta) 和绿弯菌门 (Chloroflexi) 这 4 个门类, 其中变形菌门相对丰度最高 (20.15% ~ 30.06%), 其它门类相对丰度均较低. 变形菌门是由 α -Proteobacterium、 γ -Proteobacterium 和 β -Proteobacterium 所组成 (图 8), 其中 α -Proteobacterium 在 454 高通量测序结果中的丰度远高于其在 Illumina 高通量测序结果中的丰度, 与此相反, γ -Proteobacterium 在 454 高通量测序结果中的丰度远低于其在 Illumina 高通量测序结果

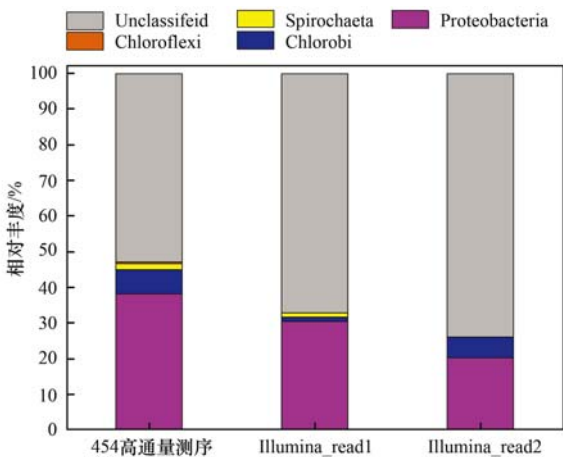


图 7 门分类水平上物种相对丰度

Fig. 7 Relative abundance of species at the phylum level

中的丰度.

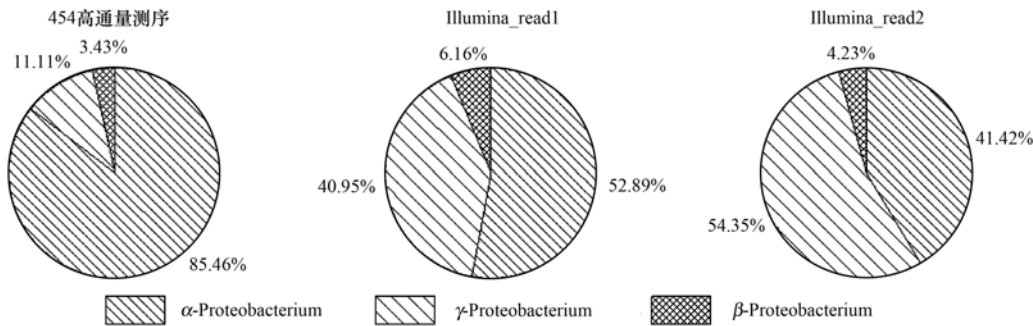


图8 变形菌门纲分类水平上物种相对丰度分布

Fig. 8 Relative abundance of Proteobacteria at the class level

在科分类水平上,本研究将相对丰度大于1%的SOP类群定义为优势类群,低于1%的定义为低丰度类群^[28].对454和Illumina单端高通量测序所得到的科分类水平上SOP优势类群进行分析(表5),结果表明Illumina单端高通量测序结果read1中检测到的优势类群最为丰富(7个),且

454高通量测序技术所检测到的优势类群(5个)在Illumina单端高通量测序结果read1中均有发现,但Illumina单端高通量测序结果read2中所检测到优势类群最少(2个),且与454高通量测序检测结果以及Illumina高通量测序结果read1差异均较大.

表5 不同研究方法所得硫化菌优势科信息汇总

454 高通量测序		Illumina 单端高通量测序 (read1)		Illumina 单端高通量测序 (read2)	
SOP 类群	丰度/%	SOP 类群	丰度/%	SOP 类群	丰度/%
Bradyrhizobiaceae	27.90	Bradyrhizobiaceae	7.62	Chromatiaceae	6.46
Chromatiaceae	9.90	Chromatiaceae	2.44	Rhodobacteraceae	1.18
Rhodobacteraceae	3.57	Rhodobacteraceae	1.20		
Spirochaetaceae	1.71	Spirochaetaceae	1.23		
Comamonadaceae	1.11	Comamonadaceae	1.47		
		Rhizobiaceae	5.34		
		Xanthobacteraceae	1.51		

对454和Illumina单端高通量测序所得到的SOP类群进行OTU水平上的比较分析,同时将相对丰度大于1%的OTUs定义为优势类群,低于1%的OTUs统一用others表示,结果发现454高通量测序共检测到16个优势类群,是全部OTUs的15.24%,相对丰度为83.93%;Illumina单端高通量测序所检测到的优势类群分别为12个(read1)和13个(read2),分别占全部OTUs的1.08%(read1)和0.99%(read2),相对丰度分别为63.90%(read1)和64.08%(read2).此外,绝大多数丰度较高的OTUs未获得注释信息,且两种研究方法所得优势OTUs的分类存在差异(图9).

3 讨论

以PCR为基础的DGGE和克隆文库技术是目前常用的微生物分子生态学研究手段,已经广泛应用于不同生境中SRP和SOP菌群的组成和多样性分析^[8,25,29-31],在一定程度上呈现了SRP及SOP菌

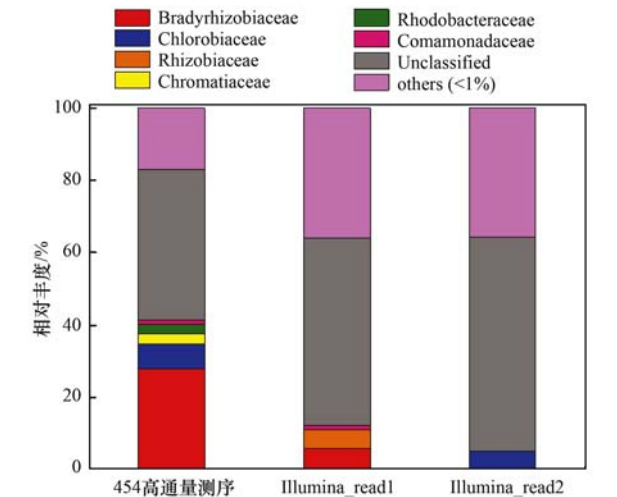


图9 硫化菌菌群在OTU水平上的相对丰度的分布

Fig. 9 Relative abundance of SOP at the OTU level

群的较高多样性及分布的广泛性.但由于克隆文库和DGGE技术所得序列条数通常在几十至一百多之间,使其对物种丰富度和多样性较高的SRP和SOP菌群的覆盖度较低,很难全面、真实地反映出

环境中 SRP 和 SOP 的群落信息. 如 Jiang 等^[32]对珠江口沉积物中 SRP 群落的垂直分布及多样性的研究发现,利用克隆文库技术所得表层沉积物中 *dsrAB* 基因的有效序列仅能覆盖 64% 的 SRP 类群; He 等^[33]和 Zhang 等^[34]对长江口表层沉积物中 SRP 群落结构的研究发现,通过克隆文库技术所获得的 *dsrB* 基因的有效序列条数分别能覆盖 73.49% ~ 87.76% 和 56% ~ 64% 的 SRP 类群. 与此类似, Yousuf 等^[35]对河口沉积物中 SOP 群落的研究发现,通过克隆文库技术所得的 *aprA* 基因和 *soxB* 基因的序列数分别能覆盖 67% ~ 75% 和 75% ~ 86% 的 SOP 类群. 454 和 Illumina 高通量测序技术所测序列条数通常在几千、甚至几万条以上,这为全面分析微生物群落信息提供了可能.

在本研究中,454 和 Illumina 高通量测序技术所获 *dsrB* 基因序列条数远远高于克隆文库技术所得的几十条序列,并且克隆文库技术覆盖度较低 (79.57%),而高通量测序技术覆盖度高达 100.00%. 此外,454 和 Illumina 高通量测序技术所检测到的 SRP 菌群的 OTUs 数、多样性指数及丰富度指数均高于克隆文库技术. 由此可见,克隆文库技术仅能揭示沉积物中部分 SRP 菌群的多样性信息,而高通量测序技术则能更加全面和准确地反映 SRP 多样性信息. 这一结果与以往研究结果相一致^[16,18,19]. 值得注意的是,对于一些多样性水平较低、群落组成相对简单的微生物类群如厌氧氨氧化细菌^[36,37]、氨氧化细菌^[38,39]而言,克隆文库技术仍是其群落组成和多样性研究的有效方法.

在本研究中,3 种研究方法所检测到的 SRP 优势类群在门及科分类水平上基本一致,而在 OTU 分类水平上差异较大,如克隆文库技术检测发现 OTU90 (20.22%) 是仅次于 OTU1 的优势类群,而在 454 和 Illumina 高通量测序技术的检测中的 OTU90 的相对丰度均小于 1%,说明克隆文库技术可能高估了该类群的丰度. 同时,对 454 和 Illumina 高通量测序技术中所检测到的一些主要类群,在克隆文库技术中并未检测到,这可能是由于后者的测序通量较低,且所获序列信息存在一定的随机性,从而使得部分 SRP 类群很难被检测到. 值得注意的是,在 Illumina 高通量测序中检测到的部分主要 SRP 类群在 454 高通量测序中并未检测到,同时在 454 高通量测序结果中检测到的 SRP 优势类群 OTU10 (33.28%) 在 Illumina 高通量测序中其丰度小于 1%. Huang 等^[40]利用 16S rRNA 基因的 454 和

Illumina 高通量测序技术对饮用水中潜在致病菌进行研究发现,454 高通量测序技术并没有检测到低丰度类群,而测序通量较高的 Illumina 高通量测序技术可以覆盖低丰度类群. 此外,克隆文库技术、454 高通量测序技术和 Illumina 高通量测序均是基于 PCR 扩增产物的测序,而 PCR 扩增过程也存在一定的偏好性,这可能也是导致 3 种研究方法之间差异的原因之一.

整体而言,Illumina 高通量测序技术所得 OTUs 信息能完整覆盖克隆文库技术所检测到的所有 OTUs,并能覆盖 82% 以上 454 高通量测序技术所检测到的 OTUs. Illumina 高通量测序技术所检测到的独有 OTUs 个数远高于 454 高通量测序技术,且所有独有 OTU 均为低丰度 (<1%) 类群. 由此可见,对于物种丰富度和多样性水平较高的 SRP 群落的研究,Illumina 高通量测序技术优于 454 高通量测序技术和克隆文库技术,特别在低丰度物种的检测方面具有明显优势.

454 和 Illumina 作为目前市场主流的高通量测序平台,两者各有其优点和不足之处. 在测序通量上,Illumina 高通量测序技术 (通常为 5 万条序列) 优于 454 高通量测序技术 (通常为 1 万条序列),而在测序读长上,454 高通量测序技术 (通常不高于 600 bp) 则优于 Illumina 高通量测序技术 (通常不高于 400 bp). 在本研究中,454 高通量测序技术所得 *soxB* 基因平均序列长度 (~551 bp) 是 Illumina 单端高通测序所得 *soxB* 基因片段长度 (~222 bp) 的 2 倍,而 Illumina 单端高通测序所得 *soxB* 基因序列条数是 454 高通量测序技术所得 *soxB* 基因序列条数的 4.5 倍. 相对较高的测序通量使得 Illumina 单端高通量测序技术所检测到的 SOP 的 OTUs 个数、丰富度及多样性指数也均高于 454 高通量测序技术,同时使得 Illumina 高通量测序方法所检测到的 SOP 类群更广泛.

本研究中,在门分类水平上,454 和 Illumina 单端高通量测序技术所检测到 SOP 类群相一致,变形菌门丰度最高 (20.15% ~ 30.06%),绿菌门、绿弯菌门和螺旋体门相对丰度均较低. 对科分类水平上 SOP 优势类群进行分析发现,Illumina 单端高通量测序结果 read1 中检测到的优势类群最为丰富,且 454 高通量测序技术所检测到的优势类群在 Illumina 单端高通量测序结果 read1 中均有发现,但 Illumina 单端高通量测序结果 read2 与 read1 及 454 高通量测序检测结果差异均较大. Claesson 等^[15]通过 454 和

Illumina 高通量测序技术对人体排泄物中细菌群落(16S rRNA 基因)组成进行比较分析发现,在门分类水平上两种研究方法的检测结果基本一致,而在属分类水平上两种研究方法的检测结果差异较大。此外,Claesson 等^[15]还发现细菌 16S rRNA 基因不同扩增区域对高通量测序结果影响要大于不同研究方法对高通量测序结果的影响。与此类似,在本研究中,*soxB* 基因片段的长度为 750 bp,基于不同研究方法所测基因片的平均长度可知,454 高通量测序技术所测 *soxB* 基因序列是前端 551 bp, Illumina 单端高通量测序技术所测 *soxB* 基因序列分别是前端 250 bp (read1) 和末端 250 bp (read2), 因此,454 高通量测序技术所得序列信息和 Illumina 单端高通量测序技术的前端序列信息(read1)相似性更高,因此在群落组成上也更相似。

总体而言,454 高通量测序技术在读长上的优势并未体现出来,而读长较短,通量较高的 Illumina 测序技术在分析 SOP 群落多样性及物种组成时要优于 454 高通量测序,而且 Illumina 高通量测序技术的前端序列信息(read1)要优于其末端序列信息(read2)。Maughan 等^[41]在利用 454 和 Illumina 高通量测序技术对囊胞性纤维症患者的痰样本中细菌群落信息进行比较分析发现,Illumina 高通量测序技术在物种注释方面要优于 454 高通量测序技术;Albertsen 等^[42]研究也表明 Illumina 高通量测序平台能够为研究功能基因提供更多的序列信息。此外,也有报道指出,尽管 454 高通量测序平台的测序读长较长,但其测序错误率是 Illumina 高通量测序平台的 10 倍^[43,44];且有研究表明,尽管 454 高通量测序技术所得基因序列片段较长,但该长片段包含有高保守性区域,而这些区域对微生物群落信息的研究并没有很大贡献^[41]。

4 结论

(1)基于克隆文库技术、454 高通量测序技术和 Illumina 高通量测序技术对高丰富度和高多样性 SRP 的群落组成及多样性进行比较分析发现,Illumina 高通量测序技术优于 454 高通量测序技术和克隆文库技术,特别在低丰度物种的检测方面 Illumina 高通量测序技术具有明显优势。

(2)以 SOP *soxB* 基因作为长片段基因代表,基于 454 高通量测序技术和 Illumina 单端高通量测序技术对 SOP 群落组成和多样性进行比较分析发现,454 高通量测序技术在读长上的优势并未体现出

来,而 Illumina 单端高通量测序技术优于 454 高通量测序技术,且 *soxB* 基因的 Illumina 高通量测序技术的前端序列信息(read1)要优于末端序列信息(read2)。

致谢:“润江”号调查船全体工作人员为调查工作提供了大量帮助和支持,特此致谢。

参考文献:

- [1] Müller A L, Kjeldsen K U, Rattei T, et al. Phylogenetic and environmental diversity of *DsrAB*-type dissimilatory (bi) sulfite reductases[J]. The ISME Journal, 2015, 9(5): 1152-1165.
- [2] Islamud-Din, El-Latif Hesham A, Ahmad A, et al. PCR-DGGE and real-time PCR *dsrB*-based study of the impact of heavy metals on the diversity and abundance of sulfate-reducing bacteria[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2014, 19(4): 703-710.
- [3] Pavlouli C, Oulas A, Vasileiadou K, et al. Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in a Mediterranean lagoonal complex (Amvrakikos Gulf, Ionian Sea) derived from *dsrB* gene[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2017, 79(3): 209-219.
- [4] Cui J, Chen X P, Nie M, et al. Effects of *spartina alterniflora* invasion on the abundance, diversity, and community structure of sulfate reducing bacteria along a successional gradient of coastal salt marshes in China[J]. Wetlands, 2017, 37(2): 221-232.
- [5] Meyer B, Imhoff J F, Kuever J. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria-evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(12): 2957-2977.
- [6] Kojima H, Watanabe T, Iwata T, et al. Identification of major planktonic sulfur oxidizers in stratified freshwater lake[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93877.
- [7] Tournier M, Maclean P, Condron L, et al. Links between sulphur oxidation and sulphur-oxidising bacteria abundance and diversity in soil microcosms based on *soxB* functional gene analysis[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 88(3): 538-549.
- [8] Thomas F, Giblin A E, Cardon Z G, et al. Rhizosphere heterogeneity shapes abundance and activity of sulfur-oxidizing bacteria in vegetated salt marsh sediments[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 309.
- [9] 于皓, 陈川, 张莉, 等. 溶解氧对碳氮硫共脱除工艺中微生物群落影响解析[J]. 环境科学, 2013, 34(6): 2368-2374. Yu H, Chen C, Zhang L, et al. Effect of dissolved oxygen on microbial community in simultaneous removal of carbon, nitrogen and sulfur process[J]. Environmental Science, 2013, 34(6): 2368-2374.
- [10] Zhu D C, Tanabe S H, Yang C, et al. Bacterial community composition of South China Sea sediments through pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e78501.
- [11] Jiang X T, Peng X, Deng G H, et al. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland[J]. Microbial Ecology, 2013, 66(1): 96-104.
- [12] 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.
- Yang H, Zhang G Z, Yang X N, *et al.* Microbial community structure and diversity in cellar water by 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. Environmental Science, 2017, **38**(4): 1704-1716.
- [13] 乔沙沙, 周永娜, 柴宝峰, 等. 关帝山森林土壤真菌群落结构与遗传多样性特征[J]. 环境科学, 2017, **38**(6): 2502-2512.
- Qiao S S, Zhou Y N, Chai B F, *et al.* Characteristics of fungi community structure and genetic diversity of forests in Guandi Mountains[J]. Environmental Science, 2017, **38**(6): 2502-2512.
- [14] 邸琰茗, 王广焯, 黄兴如, 等. 再生水补水对河道底泥细菌群落组成与功能的影响[J]. 环境科学, 2017, **38**(2): 743-751.
- Di Y M, Wang G X, Huang X R, *et al.* Effect of reclaimed water on bacterial community composition and function in urban river sediment[J]. Environmental Science, 2017, **38**(2): 743-751.
- [15] Claesson M J, Wang Q, O'Sullivan O, *et al.* Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions[J]. Nucleic Acids Research, 2010, **38**(22): e200.
- [16] 夏围围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价[J]. 微生物学报, 2014, **54**(12): 1489-1499.
- Xia W W, Jia Z J. Comparative analysis of soil microbial communities by pyrosequencing and DGGE [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, **54**(12): 1489-1499.
- [17] 伊丽娜. 新疆油田典型区块内源微生物菌群分析及功能菌群研究[D]. 廊坊: 中国科学院研究生院(渗流流体力学研究所), 2014.
- Yi L N. Analysis on indigenous microbial community and functional bacteria of typical block in Xinjiang Oilfield [D]. Langfang: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Porous Flow and Fluid Mechanics), 2014.
- [18] 向兴. 神农架大九湖泥炭湿地细菌和古菌多样性研究[D]. 武汉: 中国地质大学, 2015.
- Xiang X. Biodiversity of bacteria and archaea in Daijiuhu peatland, Shennongjia [D]. Wuhan: China University of Geosciences, 2015.
- [19] 蔡言安, 李冬, 毕学军, 等. 基于不同测序技术的生物群落结构及功能菌分析[J]. 中国环境科学, 2016, **36**(6): 1830-1834.
- Cai Y A, Li D, Bi X J, *et al.* Analysis of microbial community structure and functional bacteria in a biofilter with different sequencing technologies [J]. China Environmental Science, 2016, **36**(6): 1830-1834.
- [20] 龚俊, 刘玉配, 李媛媛. 烟叶表面微生物类群两种检测方法的比较研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2016, (3): 92-101.
- Gong J, Liu Y P, Li Y Y. Comparative analysis of microbial communities on tobacco leaves between clone library and high-throughput sequencing [J]. Journal of East China Normal University (Natural Science), 2016, (3): 92-101.
- [21] 陈玲, 袁玉菊, 曾丽云, 等. 16S rDNA 克隆文库法与高通量测序法在浓香型大曲微生物群落结构分析中的对比研究[J]. 酿酒科技, 2015, (12): 33-36, 40.
- Chen L, Yuan Y J, Zeng L Y, *et al.* 16S rDNA clone library vs. high-throughput sequencing method in the analysis of the microbial communities in Nongxiang Daqu [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015, (12): 33-36, 40.
- [22] 黄莹娜, 熊小毛, 胡远亮, 等. 基于 PCR-DGGE 和高通量测序分析白云边酒窖泥细菌群落结构与多样性[J]. 微生物学通报, 2017, **44**(2): 375-383.
- Huang Y N, Xiong X M, Hu Y L, *et al.* Bacterial community and diversity in pit mud of Baiyunbian liquor analyzed by PCR-DGGE and high-throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2017, **44**(2): 375-383.
- [23] 贺惠. 乳山湾邻近海域沉积物中好氧氨氧化微生物分子生态学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2016.
- [24] Ghosh W, Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, **33**(6): 999-1043.
- [25] Geets J, Borremans B, Diels L, *et al.* *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, **66**(2): 194-205.
- [26] Petri R, Podgorsek L, Imhoff J F. Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, **197**(2): 171-178.
- [27] Huse H M, Welch D B M, Sogin M L. The Science and Applications of Microbial Genomics [M]. Washington, DC: National Academies Press, 2012. 188-207.
- [28] Galand P E, Casamayor E O, Kirchman D L, *et al.* Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, **106**(52): 22427-22432.
- [29] Luo J F, Lin W T, Guo Y. Functional genes based analysis of sulfur-oxidizing bacteria community in sulfide removing bioreactor [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, **90**(2): 769-778.
- [30] Guan J, Zhang B L, Mbadinga S M, *et al.* Functional genes (*dsr*) approach reveals similar sulphidogenic prokaryotes diversity but different structure in saline waters from corroding high temperature petroleum reservoirs[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, **98**(4): 1871-1882.
- [31] 罗丽, 刘永军, 王晓昌. 石油集输系统中硫酸盐还原菌的分布和多样性[J]. 环境科学, 2010, **31**(9): 2160-2165.
- Luo L, Liu Y J, Wang X C. Distribution and diversity of sulfate-reducing bacteria in a crude oil gathering and transferring system [J]. Environmental Science, 2010, **31**(9): 2160-2165.
- [32] Jiang L J, Zheng Y P, Peng X T, *et al.* Vertical distribution and diversity of sulfate-reducing prokaryotes in the Pearl River estuarine sediments, southern China [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, **70**(2): 249-262.
- [33] He H, Zhen Y, Mi T Z, *et al.* Community composition and distribution of sulfate-and sulfite-reducing prokaryotes in sediments from the Changjiang estuary and adjacent East China Sea[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2015, **165**: 75-85.

- [34] Zhang Y, Zhen Y, Mi T Z, *et al.* Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria community in surface sediments from the adjacent area of Changjiang Estuary [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2016, **15**(1): 107-116.
- [35] Yousuf B, Kumar R, Mishra A, *et al.* Unravelling the carbon and Sulphur metabolism in coastal soil ecosystems using comparative cultivation-independent genome-level characterisation of microbial communities [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(9): e107025.
- [36] Fu B B, Liu J W, Yang H M, *et al.* Shift of anammox bacterial community structure along the Pearl Estuary and the impact of environmental factors [J]. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 2015, **120**(4): 2869-2883.
- [37] Hou L J, Zheng Y L, Liu M, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacterial diversity, abundance, and activity in marsh sediments of the Yangtze estuary [J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2013, **118**(3): 1237-1246.
- [38] Chen Y Y, Zhen Y, He H, *et al.* Diversity, abundance, and spatial distribution of ammonia-oxidizing β -Proteobacteria in sediments from Changjiang estuary and its adjacent area in East China Sea [J]. *Microbial Ecology*, 2014, **67**(4): 788-803.
- [39] He H, Zhen Y, Mi T Z, *et al.* Community composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea in sediments from the Changjiang estuary and its adjacent area in the East China Sea [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2016, **33**(5): 416-425.
- [40] Huang K L, Zhang X X, Shi P, *et al.* A comprehensive insight into bacterial virulence in drinking water using 454 pyrosequencing and Illumina high-throughput sequencing [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, **109**: 15-21.
- [41] Maughan H, Wang P W, Caballero J D, *et al.* Analysis of the cystic fibrosis lung microbiota via serial Illumina sequencing of bacterial 16S rRNA hypervariable regions [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e45791.
- [42] Albertsen M, Hansen L B S, Saunders A M, *et al.* A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal [J]. *The ISME Journal*, 2012, **6**(6): 1094-1106.
- [43] Glenn T C. Field guide to next-generation DNA sequencers [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2011, **11**(5): 759-769.
- [44] Luo C W, Tsementzi D, Kyripides N, *et al.* Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(2): e30087.



CONTENTS

Variation of O ₃ Concentration in Different Regions of Beijing from 2006-2015	WANG Zhan-shan, LI Yun-ting, AN Xin-xin, <i>et al.</i> (1)
Source Apportionment of Black Carbon Aerosol in the North Suburb of Nanjing	XIAO Si-han, YU Xing-na, ZHU Bin, <i>et al.</i> (9)
Seasonal Characteristics and Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in PM ₁₀ Around Electroplating Plants	ZHAO Zhen-li, ZHAO Wei-tuo, HUANG Ting, <i>et al.</i> (18)
Characteristics of Organic and Elemental Carbon in PM ₁₀ and PM _{2.5} in Yulin City, Guangxi	HUANG Jiong-li, CHEN Zhi-ming, MO Zhao-yu, <i>et al.</i> (27)
Concentrations and Compositions of Different Forms of Nitrogen and Phosphorus in Atmospheric Aerosols in the Qingdao Coastal Region and over the Yellow and Bohai Sea	ZHANG Rui-feng, QI Jian-hua, DING Xue, <i>et al.</i> (38)
Air Quality Subarea Management: A case study of Guangdong Province	YANG Liu-lin, LI Min-hui, LIAO Cheng-hao, <i>et al.</i> (49)
Remote Sensing Identification of Urban Black-Odor Water Bodies Based on High-Resolution Images; A Case Study in Nanjing	WEN Shuang, WANG Qiao, LI Yun-mei, <i>et al.</i> (57)
Simulation of Nitrate Isotopic ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$) by Coupling the Hydrology and Transport Processes Described by the SWAT Model	WANG Kang, RAN Ning, LIN Zhong-bing, <i>et al.</i> (68)
Estimation of and Control Strategies for Pollution Loads from Non-point Sources in the Chenghai Watershed	CHEN Xue-kai, LIU Xiao-bo, PENG Wen-qi, <i>et al.</i> (77)
Distribution Characteristics and Health Risk Assessment of Metals in Drinking Water Sources from the Luhun Reservoir	YU Cong-cong, ZHAO Wei-tuo, GAO Xiao-feng, <i>et al.</i> (89)
Distribution Characteristics and Health Risk Assessment of Antibiotics in the Water Supply System in Tianjin	ZHANG Xin-bo, SONG Zi, ZHANG Dan, <i>et al.</i> (99)
Organic Distribution Characteristics and Influence on Drinking Water Quality in the Typical Water Sources for Towns in the Southwest Hilly Area of China	WANG Qiong, LI Nai-wen, LI Lei, <i>et al.</i> (109)
Health Risk Evaluation of Organochlorine and Organophosphorous Pesticides in Groundwater in Beijing	CHEN Wei-ping, PENG Cheng-wei, YANG Yang, <i>et al.</i> (117)
Pollution Status and Risks of Dioxin-like Polychlorinated Biphenyls in the Soil of the Yellow River	YAO Hong, LU Shuang, ZHANG Xu, <i>et al.</i> (123)
Effects of Flooding and Drying on the Transformation of Soil Inorganic Phosphorus in the Water-Level-Fluctuating Zone of the Three Gorges Reservoir, China	ZHOU Jian, LI Chun-hui, ZHANG Zhi-yong, <i>et al.</i> (130)
Effect of Phosphate on the Ammonium Removal Performance of Iron-Manganese Co-oxide Film in Surface Water Treatment	ZHUO Rui-shuang, HUANG Ting-lin, ZHANG Rui-feng, <i>et al.</i> (137)
Enhanced Photoelectrocatalytic Oxidation of Cu(CN) ₃ ²⁻ and Synchronous Cathodic Deposition of Cu by Peroxydisulfate	DANG Cong-zhe, LI Yi-bing, WANG Yan-bin, <i>et al.</i> (145)
Using HKUST-1 as a Template for Copper Oxides Preparation to Activate Peroxymonosulfate for RhB Degradation	PU Jia-yi, WAN Jin-quan, WANG Yan, <i>et al.</i> (152)
Evaluation of Performance of an Aminated Rosin-based Resin for Adsorption of Norfloxacin from Aqueous Solutions	MA Ya-hong, HUANG Wan-ting, DIAO Kai-sheng, <i>et al.</i> (161)
Arsenic(V) Removal by Granular Adsorbents Made from Backwashing Residuals from Biofilters for Iron and Manganese Removal	ZENG Hui-ping, LÜ Sai-sai, YANG Hang, <i>et al.</i> (170)
Arsenic Adsorption and Its Species on Ferrihydrite and Ferrihydrite Colloid	MA Yu-ling, MA Jie, CHEN Ya-li, <i>et al.</i> (179)
Comparison of Amphoteric-Cationic and Amphoteric-Anionic Modified Magnetic Bentonites: Characterization and Sorption Capacity of Phenol	REN Shuang, MENG Zhao-fu, WANG Teng, <i>et al.</i> (187)
Pollution Characteristics of Parabens in Typical Sewage Wastewater	ZHAO Xue, ZHANG Zi-feng, ZHU Fu-jie, <i>et al.</i> (195)
Influence of Hydraulic Retention Time on the Treatment of Polluted River Water by an Activated Carbon Rotating Biological Contactor	XU Wen-jia, CHENG Xiao-ying, <i>et al.</i> (202)
Removal and Influence of Ciprofloxacin in a Membrane Bioreactor	DAI Qi, LIU Rui, SHU Xiao-ming, <i>et al.</i> (212)
Operation of the AAO Process Under Low Dissolved Oxygen Conditions and Its Simulation	CAO Te-te, WANG Lin, LI Yong-mei, <i>et al.</i> (219)
Inhibitory Effects of Phosphate and Recovery on a Nitrification System	GU Cheng-wei, CHEN Fang-min, LI Xiang, <i>et al.</i> (227)
Effect of Carbon Source on Lab-scale SAD Process in a Wastewater Treatment Plant	LI Dong, ZHAO Shi-xun, WANG Jun-an, <i>et al.</i> (232)
Effect of Volume Loading Rate (VLR) on Denitrifying Phosphorus Removal by the ABR-MBR Process	LÜ Liang, YOU Wen, WEI Jia-min, <i>et al.</i> (239)
Combined Process of DNB-F-O ₃ -GAC for Nitrogen and Phosphorus and Metabolite Advanced Removal	ZHONG Li-yan, HAO Rui-xia, WANG Wei-dong, <i>et al.</i> (247)
Influence of Operating Modes for the Alternating Anoxic/Oxic Process on Biological Nitrogen Removal and Extracellular Polymeric Substances of Activated Sludge	SUN Hong-wei, CHEN Cui-zhong, WU Chang-feng, <i>et al.</i> (256)
Effects of Nanoscale Zero-valent Iron (nZVI) on Denitrifying Performance of an Upflow Granular Sludge Bed Reactor	ZHOU Feng, WANG Fan-fan, QIAN Fei-yue, <i>et al.</i> (263)
Influence on Desulfurization Efficiency and Interactions of Fe/S and pH During H ₂ S in situ Depression of High Solid Anaerobic Digestion	HAN Yun, CAO Yu-qin, ZHUO Yang, <i>et al.</i> (269)
Analysis of Storage Sludge Composition Characteristics and Evolutionary Regularity in the Hunhe River Basin	LIU Tian-tian, CUI Chong-wei, HE Jun-guo, <i>et al.</i> (276)
Enhancement of Anaerobic Methane Production by Removal of Organic-bonding Metals from Sewage Sludge	LU Yi-qing, XU Ying, DONG Bin, <i>et al.</i> (284)
Comparison of Different Leaching Methods for Heavy Metals in Sludge Fly Ash and Comprehensive Toxicity Evaluation	WANG Feng, LI Run-dong, LI Yan-long, <i>et al.</i> (292)
Diurnal Variations of CH ₄ and N ₂ O Fluxes from the Drained Aquaculture Pond in the Minjiang River Estuary During Early Winter	YANG Ping, TAN Li-shan, HUANG Jia-fang, <i>et al.</i> (300)
Effects of Three Soil Amendments on Greenhouse Gas Emissions From Corn Fields in the Hetao Irrigation District	WU Yan, HONG Mei, LIN Li-long, <i>et al.</i> (310)
Effect of Organic Manure Substitution of Synthetic Nitrogen on Crop Yield and N ₂ O Emission in the Winter Wheat-Summer Maize Rotation System	HOU Miao-miao, LÜ Feng-lian, ZHANG Hong-tao, <i>et al.</i> (321)
Dynamics of Rice Photosynthesized Carbon Input and Its Response to Nitrogen Fertilization at the Jointing Stage: ¹³ C-CO ₂ Pulse-labeling	CHEN Shan, ZHU Zhen-ke, YUAN Hong-zhao, <i>et al.</i> (331)
Profile Distribution of Soil Organic and Inorganic Carbon Under Different Land Use Types in the Loess Plateau of Northern Shaanxi	LAN Zhi-long, ZHAO Ying, ZHANG Jian-guo, <i>et al.</i> (339)
Effect of Biochar on Ammonia Volatilization from Soils of Different Surface Conditions	ZOU Juan, HU Xue-yu, ZHANG Yang-yang, <i>et al.</i> (348)
Effects of Straw and Biochar Return in Soil on Soil Aggregate and Carbon Sequestration	XU Guo-xin, WANG Zi-fang, GAO Ming, <i>et al.</i> (355)
Assessment of the Availability of Soil Copper and Related Influencing Factors at a County Scale	LI Jin-fen, QU Ming-kai, LIU Gang, <i>et al.</i> (363)
Application of the LUR Model in the Prediction of Spatial Distributions of Soil Heavy Metals	ZENG Jing-jing, SHEN Chun-zhu, ZHOU Sheng-lu, <i>et al.</i> (371)
Pollution Characteristics and Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils of Shenyang North New Area	LI Jia-kang, SONG Xue-ying, WEI Jian-bing, <i>et al.</i> (379)
Passivation of Simulated Pb- and Cd-Contaminated Soil by Applying Combined Treatment of Phosphate, Humic Acid, and Fly Ash	ZHAO Qing-yuan, LI Xiao-ming, YANG Qi, <i>et al.</i> (389)
Distribution and Accumulation of Cadmium in Paddy Soil and Rice Affected by Pollutant Sources Control and Improvement Measures	FENG Wen-li, GUO Zhao-hui, SHI Lei, <i>et al.</i> (399)
Differences in Cd Accumulation in Typical Soils Under the Double Rice System	LI Xin-yang, LONG Jian, WANG Shu-bing, <i>et al.</i> (406)
Distribution Characteristics of Mercury in Reed Leaves from the Jiapiougou Gold Mine in the Songhua River Upstream	ZHANG Man-yin, LI Meng-jie, CUI Li-juan, <i>et al.</i> (415)
Effect of Nitrate Amendment on Soil Denitrification Activity and Anthracene Anaerobic Degradation	DAI Jun-shuai, ZUO Xiao-hu, WANG Ming-xia, <i>et al.</i> (422)
Effects of Long-term Fertilization Regimes on Microbial Biomass, Community Structure and Activity in a Paddy Soil	WANG Wei-hua, LIU Yi, TANG Hai-ming, <i>et al.</i> (430)
Analysis of Sulfate-Reducing and Sulfur-Oxidizing Prokaryote Community Structures in Marine Sediments with Different Sequencing Technologies	ZHANG Yu, MI Tie-zhu, ZHEN Yu, <i>et al.</i> (438)
Seasonal and Spatial Variations of Microcystins and Their Relationships with Physicochemical and Biological Factors in Poyang Lake	YUAN Li-juan, LIAO Qie-gen, ZHANG Li, <i>et al.</i> (450)
Distribution of Multidrug-Resistant Bacteria and Antibiotic-Resistant Genes in Livestock Manures	ZHANG Hao, WANG Pan-liang, YANG Qing-xiang, <i>et al.</i> (460)
Influence of Air Pollution Control (APC) Systems and Furnace Type on the Characteristics of APC Residues from Municipal Solid Waste Incinerators	ZHANG Hua, YU Si-yuan, SHAO Li-ming, <i>et al.</i> (467)