

滨海化工园区海域沉积物古菌多样性及其影响因素研究

黄 备, 王婕妤, 魏 娜, 母清林, 罗韩燕

(浙江省舟山海洋生态环境监测站, 浙江 舟山 316021)

摘 要: 古菌在海洋生物圈中起着极其重要的作用, 影响着海洋生态系统碳、氮、硫和铁等元素的循环。海洋沉积物中拥有大量古菌, 对它们的分布和多样性调查是了解其生态功能的前提和基础。采用 Illumina MiSeq PE300 宏基因组高通量测序技术, 以浙江省椒江化工园区附近海域沉积物为研究对象, 开展古菌群落进行调查。在 8 个站位中鉴定得到古菌共 11 门 37 科 52 属。从门水平上看, 奇古菌门 (Thaumarchaeota) 在多数站位均表现出明显优势, 其相对丰度占总数的 49%。其它较为丰富的门类包括泉古菌门 (Crenarchaeota)、广古菌门 (Euryarchaeota)、Woesearchaeota 等。从属水平上看, *Nitrosopumilus* 是最主要的优势菌属, 其相对丰度占总数的 48%。本次调查发现调查海域沉积环境存在较明显的空间异质性, 一定程度上对古菌群落结构造成了影响。镉、铅、砷、铬、汞等重金属与一些古菌门类存在着显著相关。

关键词: 宏基因组; 高通量测序; 海洋沉积物; 古菌群落

中图分类号: Q938.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2019)00-0001-07

Study on sedimental archaeal diversity and its correlation with environmental factors in Coastal Chemical Industry Park

HUANG Bei, WANG Jie-yu, WEI Na, MU Qin-ling, LUO Han-yan

(Zhejiang Provincial Zhoushan Marine Ecological Environmental Monitoring Station, Zhoushan 316021, China)

Abstract: Archaeal community plays an extremely important role in marine biosphere and affects the cycling of carbon, nitrogen, sulfur, iron, and other elements in marine ecosystems. There are a large number of archaea in marine sediments. The investigation on their distribution and diversity lays the basis of understanding their ecological functions. In this study, the sediments of Jiaojiang Chemical Industry Park of Zhejiang Province were sampled, and metagenomic analysis based on the Illumina MiSeq PE300 high throughput sequencing platform was applied to investigate the Archaea community. A total of 52 genera, 37 families, and 11 phyla of Archaea were detected from the sediments. Thaumarchaeota was the most predominant phylum, accounting for 49% of the total abundance, followed by Crenarchaeota, Euryarchaeota, and Woesearchaeota. *Nitrosopumilus* was the most abundant group at genus level, accounting for 48% of the total abundance. Obvious spatial heterogeneity was found in marine sedimental environment in the study area, which might have an impact on the archaeal community structure. Cadmium, lead, arsenic, chromium, mercury and other heavy metals were significantly correlated with certain archaeal phyla.

Key words: metagenomics; high throughput sequencing; marine sediment; archaeal community

收稿日期: 2019-02-27, 修订日期: 2019-05-07

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFC1401603); 国家自然科学基金面上项目 (51678003, 51678334); 浙江省环保厅科研项目 (2018A022, 2017A011, 2016A012, 2013A020)

作者简介: 黄 备 (1969-), 男, 浙江杭州人, 高工, 长期从事海洋生态环境及海洋生态质量评价研究, E-mail: bighb@163.com

海洋沉积物是地球上面积最大、最复杂的微生物栖息地。海洋环境中绝大多数微生物都是处于未可培养的状态,影响了对环境微生物的深入研究^[1]。在众多的微生物中只有不到 1% 的微生物能够通过培养的方法分离出来^[2]。因此,需要结合现代生物技术方法才能更客观且全面地反映微生物群落结构的真实信息。之前,古菌被认为只存在于热泉、盐湖和深海热液等极端环境中^[3]。随着高通量测序技术的发展,自然界大量未培养古菌被发现^[4]。

古菌生物群落结构的研究是了解其生态功能的前提和基础,认识和理解古菌的代谢和生态学功能需要我们首先对它们的分布和多样性进行调查和分析。由于对古菌分离培养需要的条件不是十分清楚,因此需要借助不同的研究方法对古菌进行研究。常用的研究方法主要包括原位研究、脂类结构研究、克隆文库的构建、指纹图谱技术和高通量测序技术。其中高通量测序技术因其获得数据量大,运行成本相对较低,理论上可以测出样品中全部的微生物。目前被广泛应用于各种环境微生物群落的研究中^[5]。已有国内外学者开展了相关的调查研究,如 Swan 等研究了加利福尼亚 salton sea 沉积物中古菌和细菌群落对环境梯度的不同响应;张慧珍等调查了辽河口沉积物中古菌多样性和分布特征;陈明明等调查了海水养殖区沉积物中古菌群落结构和空间分布特征^[6-8]。但采用高通量测序手段针对滨海化工园区附近海域沉积物,开展古菌多样性调查并分析环境因子对其影响的研究报道目前并不多见。

椒江是浙江省第三条大河,拥有浙江省第三大港—海门港,是中国经济发展最为迅速的地区之一。沿海地区有数个滨海化工园区,现有医化企业 33 家。椒江河口为山溪性强潮河口。台州湾潮滩宽阔、平坦,水质营养盐丰富,底质细软、以粘土质粉砂为主,岛屿众多,是良好的水产养殖场所,其外侧就是著名的大陈渔场。

本文采用基于 IlluminaMiSeq PE300 高通量测序平台对化工园区附近海域沉积物古菌群落进行了全面深入的调查。应用多种统计软件等群落分析工具,对海域微生物群落与环境因子的

潜在联系进行了深入研究。分析微生物群落的结构和空间差异,发掘其与多种环境因子的潜在联系,探索受人类活动影响剧烈的我国东部沿海,古菌群落的组成特征和分布规律及其与多种环境因子的相关性。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在化工园区海域设置了 8 个海域生态监测站位 C0~C7(图 1),2018 年 4 月利用专业海洋调查船“浙海环监”号,用静力式采泥器采集各站位沉积物。取表层(5 cm)泥样于灭菌的 10 mL 冻存管中,-20℃ 冷冻保存于调查船上,带回实验室后保存于-80℃ 超低温冰箱中。

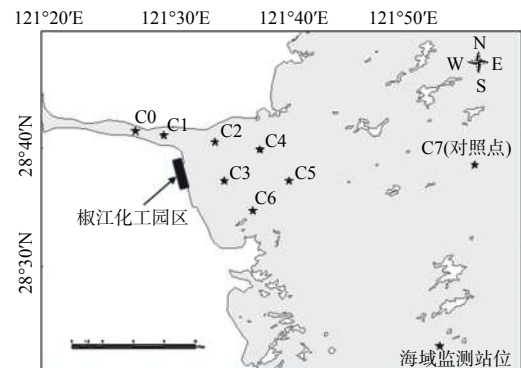


图 1 海域采样站位

Fig. 1 Sampling sites of marine area

1.2 总 DNA 提取

各站位样品总 DNA 采用 TIANGEN TIANamp Soil DNA Kit 试剂盒提取,按标准流程操作,具体步骤参照文献^[9]。

1.3 测序文库构建与测序

测序样品交由杭州晶佰生物科技有限公司按照 16S 宏基因组测序标准流程构建古菌 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区测序文库并进行相应的质量控制,应用 Illumina MiSeqPE300 测序平台完成序列测定。参考相关文献确定引物序列为: Forward primer: TGYCAGCCGCCGCGG-TAA; Reverse primer: YCCGGCGTTGAVTCC-AATT^[10]。

1.4 测序数据分析

质量控制:原始测序数据需要运用 Flash、cutadapt 等多种软件进行一系列的处理程序,具

体操作方法参照文献^[9]。

生物信息学分析: 经预处理获得的序列, 使用 DESeq 软件包随机抽取 30000 条以平衡取样和测序深度差异, 应用 mothur 软件按 97% 序列相似度划分 OTU (Operational Taxonomic Unit)。

统计分析: 对获取的 OTU 及种类组成数据, 结合环境因子, 应用 Heatmap 软件绘制基于 Pearson 相关系数的热图; 应用 R 语言进行主成分 (PCA) 分析并绘制 PCA3D 图, 展示微生物群落的结构和空间差异; 应用 Past 软件进行典型关联 (CCA) 分析, 发掘其与环境的潜在联系。

1.5 海域底质环境监测

海域底质生态环境监测内容包括: 粒度、石油类、汞、砷、铜、镉、铅、锌、铬、有机碳、硫化物、总氮和总磷等。监测采样和分析方法按《海洋监测规范》(GB17378-2007) 和《海洋调查规范》(GB12763-2007) 进行, 并全程实施了质量控制。

2 结果与讨论

2.1 海域环境因子

按 1.5 描述的方法开展研究海域底质环境调查, 其中主要因子监测结果如表 1。

表 1 主要环境因子监测结果

| 项目 | 最小值 | 最大值 | 均值 | 方差 |
|-----------------------|-------|-------|-------|---------|
| 铬/ $\times 10^{-6}$ | 45.9 | 54.5 | 50.7 | 9.03 |
| 石油类/ $\times 10^{-6}$ | 0.5 | 44.2 | 10.5 | 199.24 |
| 砷/ $\times 10^{-6}$ | 9.0 | 16.6 | 13.7 | 4.98 |
| 铜/ $\times 10^{-6}$ | 23.9 | 38.8 | 32.6 | 25.86 |
| 镉/ $\times 10^{-9}$ | 78.50 | 104.0 | 93.59 | 96.15 |
| 汞/ $\times 10^{-6}$ | 0.07 | 0.11 | 0.09 | 0.0 |
| 铅/ $\times 10^{-6}$ | 22.6 | 28.7 | 26.6 | 3.43 |
| 有机碳/(%) | 0.41 | 1.75 | 0.71 | 0.17 |
| 硫化物/ $\times 10^{-6}$ | 0.4 | 6.1 | 1.6 | 3.57 |
| 总氮/ $\times 10^{-6}$ | 660 | 1190 | 765.3 | 30400.2 |
| 总磷/ $\times 10^{-6}$ | 531 | 608 | 577.4 | 946.6 |
| 粒度/ ϕ | 5.66 | 6.38 | 6.17 | 0.07 |

从表 1 可以发现, 各测点沉积物环境因子差异较大, 特别是总氮、总磷、石油类、镉等参数在各测点间波动很大。利用 Past 软件, 根据各测点的环境因子监测结果进行聚类分析, 结果如图 2

所示。8 个测点中 C1、C3~C6 这 5 个测点沉积物环境条件相对比较接近, C0、C2 和 C7 与它们有一定的差异, 其中 C0 与其它各点相差较大。这与各测点的地理位置有关, C0 位于椒江上游, 属于地表水河流水体, C7 位于相对外侧的海域, 而 C2 位于椒江入海处, 咸淡水交汇。

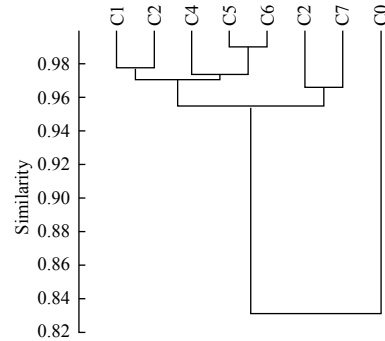


图 2 各测点沉积物主要环境因子聚类分析

Fig. 2 Clustering of main environmental factors in study area

2.2 海域沉积物微生物群落

2.2.1 序列统计

本研究共获研究海域 8 个站位沉积物的古菌原始序列 289218 对 (pair-end reads), 经质量控制和序列优化, 筛选出高质量序列, 各站位优化序列数介于 31313~36042 条之间, 序列平均长度为 422 bp。考虑到各站位测序数据差异较大, 进行了进一步随机抽样将数据标准化, 以平衡采样误差对后续分析的影响。原始序列通过预处理, 按 97% 序列相似度进行划分, 共得到 OTU 数量为 14617, 其详细分布见表 2。

表 2 海域沉积物微生物序列信息统计

Tab.2 Summary of sequence information of marine sediment microbes

| 站位 | 原始序列 | 优化序列 | 序列长度 | 可操作分类单位 (OTUs) |
|----|-------|-------|------|----------------|
| C0 | 36174 | 35574 | 418 | 1797 |
| C1 | 36513 | 35112 | 426 | 1776 |
| C2 | 38245 | 35740 | 429 | 1224 |
| C3 | 35468 | 33685 | 422 | 1927 |
| C4 | 37010 | 36042 | 420 | 2137 |
| C5 | 36396 | 34902 | 419 | 1605 |
| C6 | 36619 | 34805 | 421 | 2146 |
| C7 | 32793 | 31313 | 418 | 2005 |

2.2.2 微生物种类组成

按照 1.4 所描述的方法对研究海域沉积物进行扩增测序,共获 11 门 37 科 52 属。从门水平上看,奇古菌门(Thaumarchaeota)在多数站位表现出明显优势,其相对丰度占总数的 49%。其它较为丰富的门类包括泉古菌门(Crenarchaeota)、广古菌门(Euryarchaeota)、Woesearchaeota 及其它未分类的古菌门类等。各站位门类组成详见图 4。

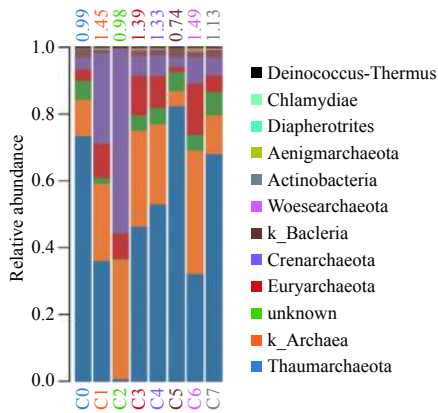


图 3 海域沉积物古菌种类组成(门水平)

Fig. 3 Archaeal species composition of sediments (phylum level)

由于古菌独特的生理代谢和功能特征,使其在海洋生态系统的物质和能量循环中起着关键作用。国内外学者已对不同类型的海洋沉积物古菌群落开展了研究。在菲律宾西南部的太平洋海域沉积物古菌群落研究中发现,泉古菌为沉积物古菌群落的优势种^[11]。张慧珍等的研究表明,辽河口沉积物中的优势菌群为奇古菌门,其相对丰度占总数高达 72.7%^[7]。Webster 等在珠江口的调查也得到类似的结果^[12]。陈明明等调查发现:浙江象山港网箱养殖区沉积物中泉古菌所占比例平均达 80.3%^[8]。

本研究结果与辽河口和珠江口的调查结果类似,这是由于辽河口、珠江口和台州湾同为当地主要河流入海口,沿岸地区人口众多、经济发达,沿海环境质量受人类活动严重,相似的自然地理环境,适应了类似的沉积物古菌群落结构。上述结果与海洋养殖区、太平洋深海等调查结果差异较大。由此可知,海洋沉积物中的古菌群落各不相同,与其所处环境密切相关。

从属水平上看, *Nitrosopumilus* 是最主要的优势菌属,其相对丰度占总数的 48%。其它主要种类还有 *Methanomassiliicoccus*、热变形菌纲(Thermoprotei)和广古菌门的未分类属等。各站位主要种属组成详见图 5。2005 年, Konneke 等在海洋砾石上分离纯化并得到了第一株氨氧化古菌(Amonia-oxidizing archaea, AOA),命名为 *Nitrosopumilusmaritimus*^[13]。2012 年, Pester 等对 AOA 进行了较为全面的系统发育分析,将 AOA 归为 5 个大的簇(cluster),分别 *Nitrosopumilu*, *Nitrososphaera*, *Nitrosocaldus*, *Nitrosotalea* 和 *Nitrososphaerasister*^[14]。其中 *Nitrosopumilus* 是一类环境适应能力很强的古菌,在我国黄东海、舟山群岛潮间带和我国南海外海沉积物中均是优势类群^[15-16]。本研究的结果证实在河口港湾 *Nitrosopumilus* 也是主要的优势菌属。

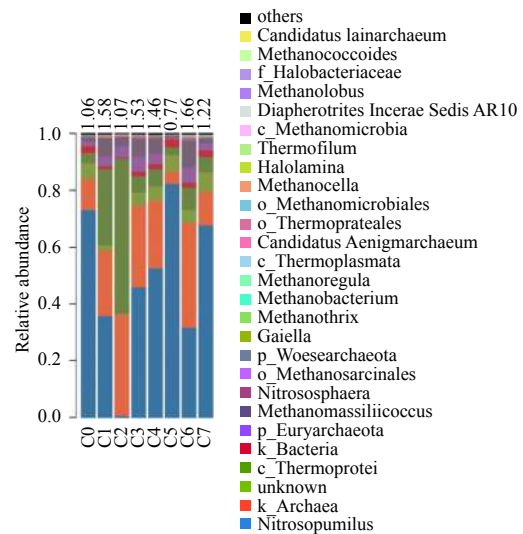


图 4 海域沉积物古菌种类组成(属水平)

Fig. 4 Archaeal species composition of sediments (genera level)

通过不同样品的主成分分析(principal component analysis)可反映样品间的差异和距离。利用 R 语言 Scatterplot 3D 软件包绘制各测点属水平上古菌群落 PCA3D 图(图 6),发现 8 个测点中 C3、C4 和 C6 比较接近,古菌群落较为相似;而 C0、C2 和 C7 这 3 个测点远离其余测点,群落结构比较独特。从图 5 可知,各测点古菌优势种类组成不尽相同,尤其是 C2 测点 c-Thermoprotei 占第一优势,其次是 k-Archaea,而

Nitrosopumilus 数量反而较少, 与其余测点差异较大。

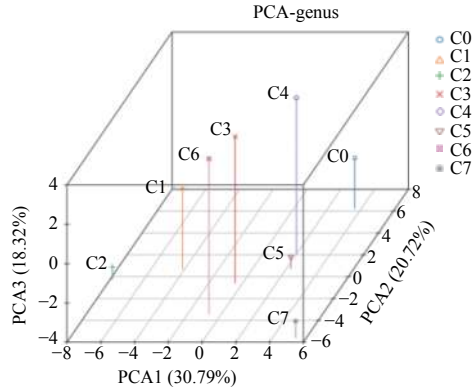


图 5 海域沉积物微生物群落主成分分析

Fig. 5 Principal Component Analysis of sediment microbial community

沉积物理化特征是决定古菌 (尤其是相关功能古菌) 的重要因素, 一般认为盐度、温度、营养盐、污染物等均是古菌群落结构的重要的影响因子^[17]。从图 2 可以发现研究海域沉积环境在小尺度上存在较明显的空间异质性, C0、C2 和 C7 测点的环境因子与其余测点差异较大。并且这种空间异质性一定程度上对古菌群落结构造成了影响。

2.2.3 微生物多样性

本研究采用 mothur 软件, 按 97% 序列相似水平计算 Chao1、Shannon 和 Simpson 多样性指数, 并根据 Coverage 计算结果评估测序深度 (表 3)。结果发现, 各站点总体菌群丰度指数 Chao1 指数较高, 均值为 3094, 各测点间有一定的差异, 尤

表 3 海域沉积物微生物多样性指数

Tab.3 Biodiversity of marine sediment microbes

| 站点 | Chao1指数 | Coverage指数 | Shannon指数 | Simpson指数 |
|----|---------|------------|-----------|-----------|
| C0 | 3160 | 0.94 | 4.77 | 0.81 |
| C1 | 2812 | 0.95 | 6.22 | 0.93 |
| C2 | 1496 | 0.97 | 6.5 | 0.96 |
| C3 | 3477 | 0.94 | 5.98 | 0.91 |
| C4 | 3623 | 0.93 | 5.93 | 0.89 |
| C5 | 3172 | 0.95 | 3.42 | 0.62 |
| C6 | 3479 | 0.93 | 6.79 | 0.95 |
| C7 | 3539 | 0.93 | 4.68 | 0.78 |
| 平均 | 3094 | 0.94 | 5.54 | 0.86 |

其是 C2 的 Chao1 指数相对较低, 群落丰度明显小于其它各测点。反映菌群多样性的 Shannon 指数平均为 5.54, Simpson 指数平均为 0.89, 显示出各站微生物多样性非常高, 且站位间差异较大。各站位测序深度指数 Coverage 平均为 0.94, 说明各样品文库的覆盖率较高, 样本中序列没有被测出的概率极低。

2.3 对环境因子的响应

为了直观反映沉积物古菌与环境因子之间的相关关系, 本研究应用 Past 软件, 对各测点数据进行多元回归分析。首先对各测点 OUT 数据进行 DCA 分析, 发现 DCA 第一轴长度为 3.3, 可以选择 RDA 或 CCA 分析^[18]。通过微生物门类多样性与环境因子的相关性进行分析发现, 在 CCA 排序图中, 第一轴和第二轴分别解释了总变异的 82.8% 和 16.5% (图 7), 这表明图中的各项环境因子在较大程度上能够解释沉积物微生物群落的变异。从图 7 可知, 镉、铜、砷、石油类、总磷和粒度对微生物门水平的群落分布具有较大影响。

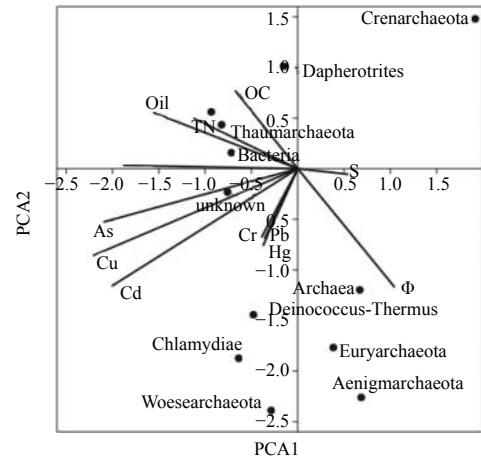


图 6 沉积物微生物组成与环境因子 CCA 排序

Fig. 6 CCA ordination of marine sediment microbes composition and environmental factors

计算微生物门类组成与环境因子间 Pearson 相关系数, 通过 *p* 值判断相关性是否显著 (<0.05) 或极显著 (<0.01), 结果见表 4, 金属铅和镉与异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus) 呈极显著相关, 金属铅、铬、镉、砷、汞和硫化物分别与 Woesearchaeota、Aenigmarchaeota、广古

菌门(Euryarchaeota)和异常球菌-栖热菌门呈显著相关。根据 Pearson 相关系数利用 heatmap 软件绘制热图(图 8),结果显示:广古菌与砷、铜、镉等重金属和总磷、奇古菌与铬、铅、汞和粒度等呈明显的负相关;异常球菌-栖热菌门与铬、铅、汞和石油类、Aenigmarchaeota 与铬、镉和砷、Woesearchaeota 与镉、铅和硫化物呈明显的正相关。

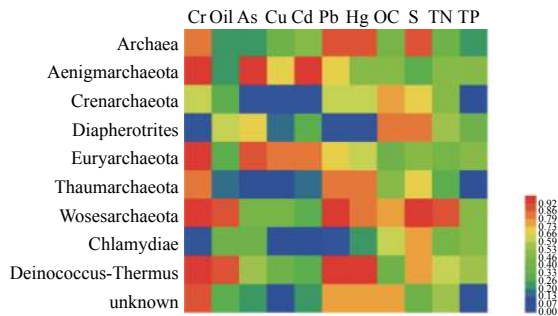


图 7 沉积物古菌组成与环境因子 Pearson 相关系数热图
Fig. 7 Pearson correlation of marine sediment microbes composition and environmental factors

已有研究表明,古菌群落结构主要受到环境因子的铵盐、pH、盐度、电导率、泥质含量、砂质含量的影响,营养盐和 pH 是造成养殖区域古菌群落结构区别于非养殖区域的主要因素^[7-8]。相对而言,有关古菌群落与沉积物重金属相关性的研究报道较少,且研究结论各有差异。Alyssa 等人调查了多种重金属对澳大利亚北部沿海沉积物中细菌与古菌群落的影响,发现热原体纲(Thermoplasmata)和甲烷杆菌纲(Methanobacteria)与镉、铝和镓浓度相关;甲烷微菌纲(Methanomicrobia)和盐杆菌纲(Halobacteria)与铜和铅浓度相关;异常球菌-栖热菌门与多种重金属浓度相关^[19]。但是 Toes 等人在研究受重金属污染的海洋沉积物对微生物多样性影响时发现,沉积物中重金属浓度对古菌群落结构的影响较小^[20]。本文的调查结果发现镉、铅、砷、铬、汞等重金属与一些古菌门类存在着显著相关。但由于古菌数量与环境因子相互影响的关系复杂,在不同的环境条件下,会产生不同的响应。而本文仅为一次调查的结果,若要彻底揭示我国沿海港湾古菌群落的组成特征和分布规律,并为生态环境评价和污染治理服务,还需要持续多次的现场调查及古菌与环境因子相互影响的机理研究。

3 结 论

(1)椒江化工园区沉积物 8 个测站中共鉴定古菌和部分细菌 11 门 37 科 52 属。从门水平上看,奇古菌门表现出明显优势,其相对丰度占 49%。其它较为丰富的门类包括泉古菌门、广古菌门、Woesearchaeota 等。从属水平上看, *Nitrosopumilus* 是最主要的优势菌,其相对丰度占 48%。其它主要种类还有甲烷球形菌、热变形菌纲等。

(2)各测站古菌 Chao1 指数较高,均值为 3094; Shannon 指数平均为 5.54; Simpson 指数平均为 0.89,显示出各站微生物多样性非常高,各站位间差异较大。

(3)分析微生物门类组成与环境因子的相关性,结果发现广古菌与总磷、砷、铜、镉等重金属;奇古菌与铬、铅、汞和粒度等呈明显的负相关。异常球菌-栖热菌门与铬、铅、汞和石油类; Aenigmarchaeota 与铬、镉和砷; Woesearchaeota 与镉、铅和硫化物呈明显的正相关。

参考文献:

- [1] ARAKAKI A, SHIBUSAWA M, HOSOKAWA M, et al. Preparation of genomic DNA from a single species of uncultured magnetotactic bacterium by multiple-displacement amplification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(5): 1480-1485.
- [2] GANS J, WOLINSKY M, DUNBAR J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil[J]. *Science*, 2005, 309(5739): 1378-1390.
- [3] 李曙光,皮昀丹, ZHANG C L. 古菌研究及其展望[J]. *中国科学技术大学学报*, 2007, 37(8): 830-838.
- [4] LIPP J S, MORONO Y, INAGAKI F, et al. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments[J]. *Nature*, 2008, 454(7207): 991-994.
- [5] 邓 霏. 古菌研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(28): 11-14.
- [6] SWAN B K, EHRHARDT C J, REIFEL K M, et al. Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California Hypersaline Lake, the Salton Sea[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(3): 757-768.
- [7] 张慧珍,常永凯,陈泉睿,等. 辽河口沉积物中古菌和细菌群落结构分析[J]. *海洋学报*, 2018, 40(6): 113-130.
- [8] 陈明明,王少璞,韦 梦,等. 象山港网箱养殖区沉积物的古菌空间分布[J]. *生态学报*, 2014, 34(14): 4099-4106.

- [9] 黄备, 邵君波, 周斌, 等. 椒江口海域沉积物微生物群落及其对环境因子的响应[J]. 中国环境监测, 2017, 33(6): 87-94.
- [10] ANA C C, DANIEL F R, ADELAIDE A, et al. Denaturing gradient Gels electrophoresis and barcoded pyrosequencing reveal unprecedented archaeal diversity in mangrove sediment and rhizosphere samples[J]. *Appl Environ microbio*, 2012, 78(16): 5520-5528.
- [11] KARNER M B, DELONG E F, KARL D M. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean[J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 507-510.
- [12] WEBSTER G, O'SULLIVAN L A, MENG Y Y, et al. Archaeal community diversity and abundance changes along a natural salinity gradient in estuarine sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(2): 1-18.
- [13] KÖNNEKE M, BERNHARD A E, DE LA TORRE J R, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. *Nature*, 2005, 437(7058): 543-546.
- [14] PESTER M, RATTEI T, FLECHL S, et al. *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2): 525-539.
- [15] 于少兰. 黄东海泥质区沉积物氨氧化古菌和氨氧化细菌 *amoA*基因的空间分布[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015: 55-135.
- [16] CAO H L, HONG Y G, LI M, et al. Community shift of ammonia-oxidizing bacteria along an anthropogenic pollution gradient from the Pearl River Delta to the South China Sea[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(1): 247-259.
- [17] 龚骏, 宋延静, 张晓黎. 海岸带沉积物中氮循环功能微生物多样性[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 434-444.
- [18] SHEIK C S, MITCHELL T W, RIZVI F Z, et al. Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e40059.
- [19] CORNALL A, ROSE A, STRETEN C, et al. Molecular screening of microbial communities for candidate indicators of multiple metal impacts in marine sediments from northern Australia[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, 35(2): 468-484.
- [20] TOES A C M, FINKE N, KUENEN J G, et al. Effects of deposition of heavy-metal-polluted harbor mud on microbial diversity and metal resistance in sandy marine sediments[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 55(3): 372-385.