微生物学报 Acta Microbiologica Sinica 2018, 58(4): 584-597 http://journals.im.ac.cn/actamicrocn DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20170413



水圈微生物--元素地球化学循环

Microbiome in the Hydrosphere and Related Elemental Geochemical Cycling

三峡库区水体中硫氧化菌的群落多样性

储巧玲,杨渐,蒋宏忱*

中国地质大学(武汉), 生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北 武汉 430074

摘要:【目的】探究三峡库区干流和支流水体硫氧化菌群落组成和多样性及其与水体理化性质的相关性。 【方法】于 2017 年 3 月在三峡库区支流和干流共选取 9 个采样点,测量各采样点水体理化参数,针对 水体样品的 soxB 基因进行系统发育分析、聚类分析和多样性分析,并分析水体理化性质与硫氧化菌群 落组成和多样性的相关性。【结果】克隆文库分析显示,本研究的三峡库区水体样品中硫氧化菌分属于 α-Proteobacteria 和 β-Proteobacteria 纲,其中 β-Proteobacteria 的硫氧化菌是群落构成主体,在干流和支 流的采样点中相对丰度均高于 95.6%。聚类分析和主坐标分析(PCoA)显示,各支流采样点之间以及支流 样点和其对应干流样点之间的硫氧化菌群落构成差异较大,而干流采样点间硫氧化菌群落构成差异较 小。Mantel 检验结果显示,硫氧化菌群落组成与水体的温度、盐度、溶氧量、藻含量和 pH 等理化参数 呈显著(P<0.05)相关。Pearson 相关性分析显示硫氧化菌的群落多样性与藻含量和 DIC 呈现显著负相关。 【结论】三峡库区支流和干流水体中硫氧化菌主要由 β-Proteobacteria 纲构成,库区干流水体中硫氧化 菌群落构成较为相似,而不同支流水体中的硫氧化菌群落构成差异较明显,并且支流和对应干流交汇处 的水体中硫氧化菌群落组成差异明显,水体理化性质是导致这一差异的重要原因之一。

关键词:三峡水库,硫氧化菌,硫循环, soxB 基因

硫元素是地球上最丰富的化学元素之一,是 构成生命体所必需的元素^[1]。自然界中的硫元素主 要以单质硫、还原性无机硫化合物、含硫矿物和 有机硫化合物等形式存在。这些含硫物质的价态 分布范围为-2 价至+6 价^[2]。在自然生态环境中, 生物和物理化学过程均能导致硫元素的价态转 换。其中,生物过程在推动硫元素地球化学循环 方面起关键作用^[3-4]。

微生物是生态系统的重要组成部分。它们在 自然界分布广泛,种类繁多,数量巨大,是构成 生态系统结构的基础^[5-6]。同时,微生物在推动硫 的地球化学循环过程中发挥着重要作用^[7]。它们能 利用环境中含硫化合物作为电子受体或供体进行 氧化或还原代谢,并将硫元素的价态进行转化,

基金项目: 国家自然科学基金(41672331); 中央高校基本研科业务费专项(CUGQYZX1730) *通信作者。Tel: +86-27-67883452; Fax: +86-27-67883451; E-mail: jiangh@cug.edu.cn 收稿日期: 2017-08-22; 修回日期: 2017-11-08; 网络出版日期: 2017-11-28

从而影响环境中的硫元素地球化学循环^[8]。硫氧化 菌就是这样一类的微生物。它们能将低价态含硫 物质(H₂S、S、SO₃²⁻、S₂O₃²⁻等)氧化成更高价态的 硫化合物,最终形成硫酸盐(SO₄²⁻)^[2]。硫氧化菌主 要通过 SOX 酶系统完成硫氧化过程,该系统包含四 种周质蛋白 SoxXA、SoxYZ、SoxB 和 Sox(CD)₂^[9-10]。 其中,编码 SoxB 蛋白酶的关键基因 *sox*B 被广泛 应用于调查环境样品中硫氧化菌群落多样性,如 深海热液口^[11]、盐碱湖泊^[12]和工业废水^[13]等。上 述研究发现硫氧化菌群广泛分布于各种自然环境 (包括极端热、盐环境),并且它们的群落组成受控 于环境条件^[12,14]。

三峡工程是我国重要的水利水电工程。三峡 大坝建成后,形成了正常蓄水深度175m、总库容 393×10⁸m³、回水长度660km的三峡水库。库区 水系发达,有支流100余条,流域面积大于100km² 的支流38条^[15]。由于支流和干流在空间分布和周 围环境特征上的差异,导致它们水体理化性质明 显不同^[16-17]。这些理化参数差异进一步导致支流 水体微生物群落结构进入干流后发生显著变化, 并进而造成生态系统功能的改变^[18]。硫氧化菌作 为生态系统中重要的功能微生物群落,它们在推 动库区水体硫元素地球化学循环方面作用关键。 然而,目前对于库区干流和支流水体的硫氧化菌 群落组成和多样性情况及其与水体理化参数的相 关性仍不清晰。因此,本研究将通过分析 soxB 基 因多样性,揭示三峡库区支流和干流中硫氧化菌 的群落组成和多样性,并初步探讨其与环境参数 的相关性。

1 材料和方法

1.1 采样点分布

本研究于 2017 年 3 月在三峡库区共选取 9 个 采样点(干流 5 个点,支流 4 个点,图 1)。4 个支 流分别为百岁溪、九畹溪、沙镇溪、神农溪,在 每条支流距离河口约 2 km处选取一个点作为采样



图 1. 采样点位置 Figure 1. Sampling locations.

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

点,分别记为 B1、B2、B3、B4,在每条支流与 干流交汇处选择一个点作为干流点,分别记为 M1、M2、M3、M4、M5。

1.2 样品采集

根据《水质采样技术规程》(SL 187-96),在 每个采样点使用采水器采集表层水(约 0.5 m 处) 0.5-1.0 L, 并使水样通过直径为 45 mm、孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜(Whatman, 英国), 过滤完成 后将带有微生物量的滤膜装入 1.5 mL 无菌离心管 中,放置于干冰中保存,然后运往中国地质大学(武 汉)地质微生物实验室,保存于-80°C冰箱,用于后 续分析。另收集上述步骤滤液(约 40 mL)于 50 mL 采样瓶中,用于检测水体中主要阴阳离子浓度。 根据《含藻水给水处理设计规范》(CJJ 32-89)采集 表层水样1L于圆柱形沉降桶,向其中加入15mL 鲁哥氏液(Lugols solution)固定藻类细胞,自然沉 降 24 h 后用于检测藻类含量。采集 40 mL 表层水 样通过预先使用马弗炉高温灼烧的直径为 45 mm、 孔径为 0.7 μm GF/F 玻璃纤维膜(Whatman, 英国), 将滤液保存于棕色玻璃瓶中, 然后加入约 50 µL 浓磷酸,用于测量水体中溶解有机碳(DOC)的浓 度。采集表层水样装满 50 mL 棕色玻璃采样瓶(瓶 中不留气泡), 加入 100 µL 饱和氯化汞溶液, 用于 测量水体中溶解无机碳(DIC)的浓度。另采集2份 50 mL 表层水样装入棕色玻璃瓶中, 使用硫酸酸 化至水体 pH<2,分别用于测量水体中总氮(TN) 和总磷(TP)浓度。完成样品采集后,对所有离心 管和采样瓶作好样品号及相关测试参数的标记, 如"2017年3月三峡 M1 TN"。

1.3 水体理化参数测试

现场测量水体理化参数,包括水体 pH

(SX711,上海三信仪表,中国)、水体温度 (TEMP)(SX711,上海三信仪表,中国)、光照强度 (TES-1335, TES, 中国台湾)、水体浊度(TURB)(HI 98703, HANNA instruments, 美国)、电导率 (COND1)和总溶解固体(TDS)(SX713,上海三信仪 表,中国)。使用 ICS600 离子色谱仪(Thermo Fishier,美国)测量水体中主要的阴阳离子(Cl⁻、 SO₄²⁻、Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺)。盐度表示为以上 6种离子浓度的总和。根据碘量法测量水体中溶解 氧量^[19], 使用碳氮分析仪(multi N/C 2100, Analytic Jena,德国)检测水体中 DOC 浓度。根据双指示剂 中和法测量水体中的 DIC 浓度^[20],根据磷钼蓝光 度法测量水体中的 TP^[21], 根据碱性过硫酸钾消解 紫外分光光度法测量水体中的 TN^[22]。将野外采集 的藻类计数样品(自然沉降后的沉淀物)定容至 30-50 mL, 取 0.1 mL 滴入血球计数板, 在 10×40 的显微镜下进行镜检计数[23-24]。

1.4 主要仪器和试剂

Bio-Rad T100[™] PCR 仪(Bio-Rad, 美国), Bio-Rad Gel Doc XR 凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国), ICS600 离子色谱仪(Thermo Fishier, 美国), Eppendorf 5417 R 高速台式离心机(Eppendorf, 德 国), Fast DNA Soil-Direct Kit (MP BIO, 美国), Axy Prep DNA Gel Extraction Kit (Axy-gen,美国), pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, 美国)。

1.5 DNA 提取和 PCR 扩增

使用 Fast DNA Soil-Direct Kit (MP BIO,美国) 提取样品总 DNA,所有操作参照说明书,以提取 的总 DNA 为模板,采用引物 710F (5'-ATCGGYCA GGCYTTYCCSTA-3')与 1184R (5'-MAVGTGCCGT TGAARTTGC-3')^[25]进行 soxB 基因 PCR 扩增,扩 增条件参照文献[1]。PCR 产物采用 1%琼脂糖凝 胶电泳检测,并在紫外灯下观察,切取目标条带 (约 500 bp)。使用 Axy Prep DNA Gel Extraction Kit (Axy-gen,美国) 纯化回收目标条带 PCR 产物。

1.6 克隆文库构建和系统发育分析

克隆文库构建方法参照文献[26]。将上述纯化 回收的 PCR 产物连接到 pGEM-T 载体上(Promega, 美国),并转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 将转化后的细胞均匀涂布到含有 100 µg/mL 氨苄 青霉素, 80 µg/mL的 X-Gal (5-溴-4-氯-3-吲哚基 -β-D-半乳糖苷)和 0.5 mmol/L IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)的 LB 平板上, 37 ℃ 过夜。针对每 一个采样点建立1个克隆文库,共9个克隆文库 (M1, M2, M3, M4, M5, B1, B2, B3, B4), 在每个克隆文库中,随机挑选大约50个阳性克隆 子, 然后进行 RLFP (restriction fragment length polymorphism,限制性片段长度多态性)分析^[27]。 根据每一种 RLFP 带型,挑选出一个代表克隆子 送至上海生工武汉测序部进行测序。测序产生的 原始序列使用 BioEdit 进行修剪, 修剪后的序列 需通过 BLASTx 在 NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www. ncbi.nlm.nih.gov)网站上进行比对,并选取有效的 soxB 序列。分类操作单元(即 operational taxonomic unit, 简称为 OTU)以 98% 的序列相似性进行划分。 OTU 划分使用 Mothur v1.34.1 软件(Furthest neighbor 方法)^[25,28]。

选取每个 OTU 的代表性序列,将其翻译成氨 基酸序列,并与 NCBI 网络数据库中的同源氨基 酸序列进行比对。根据比对结果,选取相似性最 高的同源氨基酸序列作为参考序列,使用 BioEdit v7.0.9.0 软件^[29]中 Clustal W 将参考序列和代表氨基酸序列对齐并修剪整齐后,导入 MEGA v5.2 软件使用最大似然法(JTT 模型)构建系统发育树,迭代运算1000次。此研究中测定的克隆序列均已经递交至GenBank中,登录号为 MF464113-MF464184。

1.7 数据分析

soxB 基因克隆文库的覆盖度使用公式 C=1-n/N 计算(其中 C 为覆盖度,即 Coverage,n 为文库中只出现一次的克隆数量,N 为该文库克 隆总数)。稀释曲线(rarefaction curve)分析、聚类 分析、Mantel 检验、克隆文库多样性指数分析以 及主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA) 均使用 PAST (http://folk.uio.no/ohammer/past/)软 件。另使用 SPSS 22.0 分析硫氧化菌群落多样性指 数与环境变量的 Pearson 相关性。

2 结果和分析

2.1 水体理化性质

9 个采样点的水体温度范围为 13.8-16.6 ℃, pH 范围为 8.1-9.3,盐度范围为 154.1-167.9 mg/L, TN 的浓度范围为 2.4-4.0 mg/L, TP 的浓度范围为 0.1-0.2 mg/L。主要理化参数和离子浓度如表 1 所示。

2.2 soxB 基因克隆文库分析

本研究共筛选 406 个有效克隆子,属于 72 个 OTU。其中,M1、M2、M3、M4、M5、B1、B2、 B3、B4 分别具有 15、13、15、12、10、13、11、 7、18 个 OTU (表 2)。9 个 *sox*B 基因克隆文库的 覆盖度范围为 91%–100%。饱和曲线分析显示各 克隆文库用于分析的克隆数量达到或接近饱和 (图 2)。α-多样性指数(Chao-1、Shannon -Weaver's、 Simpson's diversity index)分析结果如表 2 所示。

Table 1.	Geography and geochemical parameters of water in the Three Gorges Reservoir (TGR)								
Sample site	M1	M2	M3	M4	M5	B1	B2	B3	B4
GPS location	110°58.8′/	110°50.8′/	110°40.1′/	110°21.5′/	110°18.0′/	110°57.0′/	110°51.0′/	110°37.3′/	110°19.5′/
(E/N)	30°52.1′	30°53.0′	31°00.1′	31°03.3′	31°01.0′	30°53.7′	30°51.5′	30°58.6'	31°04.7′
Water temperature/ °C	14.3	14.4	14.4	15.1	13.8	16.6	15.7	16.6	16
Conductivity/ (µs/cm)	400.0	395.0	362.0	372.0	369.0	396.0	414.0	370.0	334.0
DO/(mg/L)	21.7	20.3	23.3	23.7	23.7	27.3	22.3	26.0	30.7
Algae content/ (10 ⁷ cell/mL)	2.26	2.88	2.84	3.02	2.76	3.39	3.61	3.8	1.72
Flow velocity/ (cm/s)	4.9	1.7	6.9	12.6	11.9	3.6	13.1	15.2	11.4
TDS/(mg/L)	260.0	280.0	243.0	250.0	248.0	300.0	279.0	248.0	224.0
pН	8.1	8.1	8.2	8.1	8.2	8.6	8.3	8.7	9.3
Water chemical para	meters/(mg/L	L)							
TN	3.4	3.4	3.4	3.5	4.0	3.8	3.9	3.4	2.4
ТР	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
DOC	6.3	6.1	6.0	30.4	4.9	3.6	5.5	6.7	25.4
DIC	96.0	124.8	124.8	121.6	128	112	121.6	118.4	96.0
Salinity	167.4	164.2	166.1	167.9	167.9	161.8	166.5	159.8	154.1
Concentration of maj	jor ions/(mg/	L)							
\mathbf{K}^+	2.6	2.4	2.4	2.5	2.4	2.3	2.4	2.3	2.2
Na ⁺	20.8	18.0	18.3	18.5	18.3	18.1	18.1	16.0	15.9
Ca ²⁺	45.7	46.5	47.2	47.7	47.7	45.8	48.3	48.1	41.1
Mg^{2+}	11.3	11.4	11.6	11.6	11.6	11.0	11.6	11.0	11.4
SO4 ²⁻	53.4	53.0	53.2	54.1	54.3	51.5	52.5	52.7	57.0
Cl	22.7	22.4	22.8	23.2	23.1	22.9	22.9	19.8	20.1

表1. 采样点信息及地球化学参数

表 2. 三峡库区 9 个克隆文库的多样性指数

Clone libraries	M1	M2	M3	M4	M5	B1	B2	B3	B4
Library size (No. of clones)	47	47	45	40	45	43	49	39	51
Coverage/%	91	94	96	95	98	91	98	100	94
No. of observed OTUs	15	13	15	12	10	13	11	7	18
Chao-1	17.0	13.8	15.2	12.2	10.0	14.2	11.0	7.0	18.4
Shannon-Weaver's diversity index	2.5	2.4	2.6	2.3	2.1	2.1	2.2	1.6	2.7
Simpson's diversity index	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9

系统发育分析显示三峡库区水体的硫氧化菌 群 落 主 要 分 属 于 β-Proteobacteria 和 α-Proteobacteria 两个纲。在 β-Proteobacteria 纲中, 主要包括 Limnohabitans 、 Curvibacter 、

Pseudorhodofeax Ottowia Leptothrix `` Thiobacillus Lautropia Cupriavidus 和 Polaromonas 共计9个属;在α-Proteobacteria 纲中, 主要包括 Enhydrobacter、Pseudorhodoplanes 和



图 2. 三峡库区 9 个克隆文库的稀释曲线 Figure 2. Rarefaction curves of the nine *soxB* gene clone libraries retrieved from the TGR water samples.

Rhodovulum 共计 3 个属(图 3)。

β-Proteobacteria 是干流和支流采样点的主要 硫氧化菌群落,在每个克隆文库中的相对丰度均 高于 95.6% (图 4)。然而,在属级别上,干流采样 点之间和支流采样点之间,以及支流样点和其对 应的干流样点之间的硫氧化菌群落组成却有显著 差异(图 4)。在干流中, Limnohabitans 属和 Ottowia 属的硫氧化菌存在于所有 5 个采样点中, Limnohabitans 属的硫氧化菌在 M1、M2、M5 点 的相对丰度分别达到 46.8%、61.7%和 33.3%, Ottowia 属的硫氧化菌在 M3、M5 点的相对丰度分 别达到 32.6%和 28.9%。专性化能自养型细菌 Thiobacillus 存在于 M2、M3、M4、M5 这 4 个干 流点,相对丰度范围为 2.2%-11.8%。Leptothrix 和 Enhydrobacter 是干流中特有的属,前者仅存于 M3 点, 且相对丰度为 2.2%, 后者仅存于 M5 点, 相对丰度为 4.4%。在支流中, Limnohabitans 属和 Ottowia 属的硫氧化菌同样存在于所有4个采样点 中, Limnohabitans 属的硫氧化菌在 B2 和 B4 点中

则达到了 57.1%和 60.4%。而 Ottowia 属的硫氧化 菌在 B2 点的相对丰度达到 32.7%,在支流的其他 点均低于 13%。在干流中广泛分布的 Thiobacillus 属的硫氧化菌,却只存在于支流中的 B4 点,且相 对丰度仅占 3.8%。Polaromonas 的硫氧化菌只存 在于支流中,在 B4 中的相对丰度达到 24.5%。另 外,Rhodovulum 和 Pseudorhodoplanes 也是支流中 特有的属,均仅存在于 B4 点且相对丰度均为 1.9%。在 9 个采样点中,均有部分硫氧化菌属于 未归类的硫氧化菌,其相对丰度占 3.8%–38.5%。 另外,在 9 个采样点中均没有发现 Chlorobia、 γ-Proteobacteria 纲的硫氧化菌。

2.3 统计分析

聚类分析的结果显示,5个干流样点分枝聚在 同一总枝上,但是支流4个采样点分枝较为分散, 并且支流采样点与其对应干流点不在同一分枝 (图 4)。根据主坐标分析(PCoA)显示,第一主坐标 (PCo-1)和第二主坐标(PCo-2)分别具有 25.2%和 20.6%的解释量,PCoA的点状图(图 5)显示,库区 干流硫氧化菌群落组成较为相似,而支流点之间 以及支流点和对应干流点硫氧化菌的的群落组成 差异较明显,这与聚类分析的结果总体上相似。 Mantel 检测结果显示,硫氧化菌群落组成与温度、 盐度、溶氧量、藻含量、pH 均具有显著(P<0.05) 相关性(表 3)。

α-多样性指数(Chao-1、Shannon-Weaver's diversity index)与环境变量的 Pearson 相关性分析结果显示,丰富度指数 Chao1 与 DIC 浓度(r=-0.671, P<0.05)呈显著负相关,藻含量与丰富度指数 Chao-1 和 Shannon 指数均呈负相关,相关系数分别高达-0.810 和-0.805。



图 3. soxB 基因编码的氨基酸序列系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree constructed by amino acid sequence translated from the *soxB* gene sequences in nine clone libraries. Maximum likelihood tree showing the phylogenetic relationships of the deduced SoxB protein sequences translated from the *soxB* gene clone sequences obtained in this study and their closely related sequences from the GenBank database. The numbers following OTU are employed to distinguish OTUs. The scale bar indicates the expected number of changes per homologous position. Bootstrap values of (1000 replicates) >50% are shown. The SoxB amino acid sequence from *Aquifex aeolicus* was used as outgroup.

actamicro@im.ac.cn



图 4. 三峡库区 9 个 sox B 基因克隆文库聚类分析和群落组成情况

Figure 4. Cluster analysis and community compositions of the nine *sox*B gene clone libraries retrieved from the TGR water samples.





3 讨论

本研究发现三峡库区水体硫氧化菌群主要以 β-Proteobacteria 为主。该研究结果进一步验证了 前人的研究结论:在淡水水体中 β-Proteobacteria 的硫氧化菌占主导地位,而在咸(盐)水体中硫氧化 菌群落主要由 α-Proteobacteria 构成^[3,12,30]。值得注

表 3. 三峡库区水样中硫氧化细菌群落与环境参数 Mantel 检验分析结果

Table 3. Results of Mantel tests between sulfur-oxidizing bacterial population composition and environmental conditions of the TGR water samples

Physico-chemical parameter	R	Р
Water temperature	0.344	0.023
Conductivity	0.011	0.471
DO	0.411	0.042
Alga content	0.511	0.009
Salinity	0.397	0.048
Flow velocity	-0.076	0.657
TDS	0.351	0.070
рН	0.458	0.033
TN	0.158	0.359
TP	0.037	0.564
DIC	0.008	0.420
DOC	0.277	0.168

意的是本研究发现 *Limnohabitans* 属硫氧化菌在 支流和干流样点中广泛存在。*Limnohabitans* 属于 β- Proteobacteria^[31-32],它们广泛分布于淡水生态 系统^[33]。*Limnohabitans* 具有极强的环境应变能 力^[34-35]和快速生长繁殖和底物摄取的能力^[36-37]。 另外, *Limnohabitans* 属微生物还可以利用藻类衍 生物作为唯一碳源维持生长,这是 *Limnohabitans* 区别于其他硫氧化菌,在水生生态系统中占据优势的重要原因^[32]。

虽然 Chlorobia 纲和 γ-Protobacteria 纲的硫氧 化菌是淡水环境广泛分布的硫氧化菌类型^[3,38-39], 但在本研究中未发现与之相似的硫氧化菌序列。 Chlorobia 纲的硫氧化菌都是严格厌氧的细菌^[7], 多发现于富硫化物水体、深海热液喷口、海口和 海湾等沉积中^[40-42],而本研究所取的水样,都来自 于表层水,采样点的溶氧量范围为 20.3–30.7 mg/L (表 1),因此, Chlorobia 纲的硫氧化菌难以在表层 水体中发现。另外,γ-Proteobacteria 纲的硫氧化 菌绝大部分是紫色硫细菌,这类细菌广泛分布于 硫化物丰富并有光的厌氧环境中如海洋、富含硫 化物中性或碱性、高盐的极端环境中,如热泉喷 出物^[3,43]。库区表层水体虽然光照充足,但是溶氧 充足,因而并不适宜 γ-Proteobacteria 纲硫氧化菌 的生存。

微生物对于栖息地具有选择性,它们在各自 栖息的环境中生存进化,形成了与各自环境相适 应的群落特征。在本研究结果中,库区干流硫氧 化菌群落组成较为相似,而支流中硫氧化菌群落 组成差异较明显。这可能与环境因素有关,三峡 大坝的建成后,由于大坝的拦截作用使库区水环 境更加类似于湖泊相,表层水体理化性质更加具 有均一性^[44];而支流周边环境差异较大,例如, 沿岸山体的高度、森林的茂盛程度、外源输入到 水体中的物质的差异,都会影响水环境条件^[45-46], 进而影响浮游细菌的群落组成。水体理化性质的 变化往往导致细菌种群内部发生基因型演替,即 不同环境条件下,细菌种群由不同基因型的细菌 构成,这种基因型的变化使种群构成呈现截然不 同的外部特征^[47]。在本研究中,支流和对应干流 交汇点的环境特征也表现出一定的差异,主要体 现在水体的温度、盐度、藻含量、pH。因此,支 流与对应干流交汇点的硫氧化菌的群落组成具有 一定的差异。前人对三峡支流香溪河中的细菌群 落组成的研究也发现,与碳、氮、硫循环相关的 功能基因在支流回水区和干流河口区具有较大的 差异,造成细菌群落组成差异的一个重要原因是 水体理化性质的空间分布不均匀性^[48-49]。

温度是影响微生物群落组成的关键环境因 子。不同细菌有其最适的生长温度,有研究表明, 水温的变化与浮游细菌的群落组成变化显著相 关,应用温度指标可以将冬季和夏季浮游细菌群 落区分开来,因此提出水温是触发浮游细菌群落 季节变化的重要环境驱动力^[50]。也有学者认为温 度对土壤微生物群落组成也具有一定的影响^[51], 产生这些影响的原因可能是温度与细菌的基质供 给耦合,在一定范围内通过影响细菌对溶解有机 质的利用,从而改变了细菌的群落组成^[52]。

细菌生长也需要合适的酸碱环境,不同 pH 条 件对细菌具有一定的选择性,一项针对威斯康星 州 30 个湖泊的细菌群落的调查中显示,细菌群落 组成和 pH 显著相关^[53],在对下水道混凝土腐蚀过 程中(pH 值下降)硫氧化菌的群落演替的一项研究 发现,硫氧化菌的优势种属由 *Thiothrix* sp.、 *Thiobacillus plumbophilus、Thiomonas intermedia* 逐渐演变成嗜酸性的 *A. Thiooxidan*,因此推测出 混凝土表面的 pH 变化是硫氧化菌发生群落演替 的重要原因之一^[54]。pH 对细菌群落组成的影响主 要是通过影响细菌对营养物的吸收、胞外酶的产 生和分泌来实现的^[51]。关于盐度,前期有很多研 究已经表明,高盐水体中 α-Protobacteria 占主导 地位,而在淡水水体中 β-Protobacteria 占主导地 位^[55]。不同种群的硫氧化菌对于盐度变化的响应 各异,因此盐度也是影响微生物群落组成的重要 因素。

除此之外,温度、盐度、pH 还能通过影响水 库中藻类的生长,间接影响硫氧化菌的群落组 成^[56-59],这是由于藻类能在光合作用过程中释放 细胞可利用的有机碳,不同种群细菌对这类有机 碳的利用能力有所不同,使得这一环境变量对细 菌种群具有一定的选择性。例如在本研究中广泛 分布于9个采样点的 Limnohabitans 对藻类衍生物 较强的利用能力使其在 9 个采样点的硫氧化菌中 占据重要的地位^[32]。藻类还可以通过呼吸作用释 放 CO₂,降低水体的 pH,从而影响硫氧化菌的群 落组成^[59]。Pearson 相关性分析结果显示,三峡库 区硫氧化菌的多样性与藻含量和 DIC 呈负相关。 藻类生物量的增加会影响水体有机物组成、溶氧 量和 pH, 敏感细菌种类个体数量减少或者消失, 形成优势种,多样性降低^[60]。溶解无机碳(DIC)作 为藻类的碳源,其浓度的增加可能会影响藻类繁 殖,导致藻类生物量的增加^[61];不仅如此,DIC 浓度的增加会使水体的 pH 升高,间接导致敏感种 群数目的减少和消失[62]。

4 结论

(1) 三峡库区水体硫氧化菌群落组成主要以 β-Protobacteria 为主; (2) 库区干流硫氧化菌群落 组成较为相似,而不同支流硫氧化菌群落组成差 异较明显,并且支流和对应干流交汇点的硫氧化 菌群落组成存在明显差异;(3) 支流和干流采样点 中硫氧化菌群落组成与水体的温度、pH、盐度、 藻含量显著相关;(4) 支流和干流采样点中硫氧化 菌种群多样性与藻含量和 DIC 呈显著负相关关系。

参考文献

- Canfield DE, Kristensen E, Thamdrup B. The sulfur cycle. Advances in Marine Biology, 2005, 48: 313–381.
- [2] Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeie A, Fischer J. Prokaryotic sulfur oxidation. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(3): 253–259.
- [3] 谭小琴.珠江水体硫氧化细菌多样性及其硫代谢途径研究. 华南理工大学硕士学位论文,2016.
- [4] Lens PNL, Kuenen JG. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science* and Technology, 2001, 44(8): 57–66.
- [5] Ford BJ. Microbe Power: Tomorrow's Revolution. New York: Stein & Day Pub, 1976.
- [6] Suess E. Effects of microbe activity. *Nature*, 1988, 333(6168): 17–18.
- [7] 罗剑飞. 硫氧化菌群落结构分析及其特性研究. 华南理工 大学博士学位论文, 2011.
- [8] 李少能.南大西洋深海硫氧化细菌的分离鉴定与多样性初步分析.福建农林大学硕士学位论文,2012.
- [9] Mever B, Kuever J. Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using aprA as functional marker gene. *Applied* and Environmental Microbiology, 2007, 73(23): 7664–7679.
- [10] Mever B, Imhoff JF, 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. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(12): 2957–2977.
- [11] Huber JA, Butterfield DA, Baross JA. Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(3): 393–409.
- [12] Yang J, Jiang HC, Dong HL, Wu G, Hou WG, Zhao WY, Sun YJ, Lai ZP. Abundance and diversity of sulfur-oxidizing bacteria along a salinity gradient in four Qinghai-Tibetan Lakes, China. *Geomicrobiology Journal*, 2013, 30(9): 851–860.
- [13] Aguilar JRP, Cabriales JJP, Vega MM. Identification and characterization of sulfur-oxidizing bacteria in an artificial wetland that treats wastewater from a tannery. *International Journal of Phytoremediation*, 2008, 10(5): 359–370.
- [14] Zhang S, Yan L, Chen ZB. Geographical distribution of sulfur-oxidizing bacteria. *Journal of Heilongjiang Bayi*

Agricultural University, 2017, 29(2): 68–73. (in Chinese) 张爽, 晏磊, 陈志宝. 硫氧化菌的地域分布特征. 黑龙江八 一农垦大学学报, 2017, 29(2): 68–73.

[15] Huang YN, Ji DB, Long LH, Liu DF, Song LX, Su QQ. The variance analysis of characteristics and blooms of the typical tributaries of the Three Gorges Reservoir in spring. *Resources* and Environment in the Yangtze Basin, 2017, 26(3): 461–470. (in Chinese)

黄亚男,纪道斌,龙良红,刘德富,宋林旭,苏青青.三峡 库区典型支流春季特征及其水华优势种差异分析.长江流 域资源与环境,2017,26(3):461-470.

[16] Zhu AM, Hu JX, Li SX, Zhou LF, Liang YG. Phytoplankton diversity and water quality in the main stream and tributaries of Three Gorges Reservoir region of Yangtze River during dry seasons. *Journal of Lake Sciences*, 2013, 25(3): 378–385. (in Chinese)

朱爱民, 胡菊香, 李嗣新, 周连凤, 梁友光. 三峡水库长江 干流及其支流枯水期浮游植物多样性与水质. 湖泊科学, 2013, 25(3): 378-385.

- [17] 冉祥滨.三峡水库营养盐分布特征与滞留效应研究.中国 海洋大学博士学位论文,2009.
- [18] Bernhard AE, Colbert D, McManus J, Field KG. Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52(1): 115–128.
- [19] Liang XL, Pan ZQ, Wang AP, Yao XX, Liu LJ, Zhou T. Determination of dissolved oxygen in water by iodometric method. *Chemical Analysis and Meterage*, 2008, 17(2): 54–56. (in Chinese)
 梁秀丽, 潘忠泉, 王爱萍, 姚旭霞, 刘立君, 周彤. 碘量法

测定水中溶解氧. 化学分析计量, 2008, 17(2): 54-56.

 [20] Liu ZK. Determination of carbonate and bicarbonate content in mixed alkali—double mixed indicator method. *Journal* of *Zhengzhou University(Engineering Science)*, 1981, (1): 120–126. (in Chinese)

刘镇琨. 混合碱中碳酸根和碳酸氢根含量的测定——双混 合指示剂法. 郑州工学院学报, 1981, (1): 120–126.

[21] Chen W, Zeng GN, Zhou Y, Yu J, Long H, Huang C, Peng JP. Determination of phosphorus in seaweed by molybdenum blue spectrophotometry. *Marine Environmental Science*, 2009, 28(S1): 79–82. (in Chinese)

陈委, 曾淦宁, 周燕, 余骏, 龙华, 黄城, 彭建平. 磷钼蓝

光度法测定海藻中磷的含量.海洋环境科学,2009,28(S1): 79-82.

- [22] Xiao YD. Alkaline potassium persulfate digestion UV spectrophotometric method for determination of total nitrogen in water by the method of. *Guangdong Chemical Industry*, 2012, 39(4): 165–166, 135. (in Chinese)
 萧玉端. 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定水中总氮的方法探讨. 广东化工, 2012, 39(4): 165–166, 135.
- [23] Qian KM, Liu X, Chen YW. A review on methods of cell enumeration and quantification of freshwater phytoplankton. *Journal of Lake Sciences*, 2015, 27(5): 767–775. (in Chinese) 钱奎梅,刘霞,陈宇炜. 淡水浮游植物计数与定量方法. 湖 泊科学, 2015, 27(5): 767–775.
- [24] Sun X, Wang HR, Yang ZW, Yin J. Comparison of three methods for measuring biomass of algae. Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army, 2012, 30(5): 350–351. (in Chinese)
 孙欣, 王华然,杨忠委,尹静. 三种藻类生物量测定方法比较. 解放军预防医学杂志, 2012, 30(5): 350–351.
- [25] Tourna M, Maclean P, Condron L, O'Callaghan M, Wakelin SA. Links between sulphur oxidation and sulphur-oxidising bacteria abundance and diversity in soil microcosms based on *soxB* functional gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(3): 538–549.
- [26] Jiang HC, Dong HL, Yu BS, Lv G, Deng SC, Berzins N, Dai MH. Diversity and abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Qinghai Lake, Northwestern China. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26(3): 199–211.
- [27] Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(1): 39–50.
- [28] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Holister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied* and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [29] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Proceedings of the Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41:

95-98.

- [30] Kirchman DL, Dittel AI, Malmstrom RR, Cottrell MT. Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnology and Oceanography*, 2005, 50(5): 1697–1706.
- [31] Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(1): 14–49.
- [32] Šimek K, Kasalický V, Zapomělová E, Horňák K. Alga-derived substrates select for distinct betaproteobacterial lineages and contribute to niche separation in *Limnohabitans* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(20): 7307–7315.
- [33] Šimek K, Kasalický V, Jezbera J, Jezberová J, Hejzlar J, Hahn MW. Broad habitat range of the phylogenetically narrow R-BT065 cluster, representing a core group of the betaproteobacterial genus *Limnohabitans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(3): 631–639.
- [34] Alonso C, Zeder M, Piccini C, Conde D, Pernthaler J. Ecophysiological differences of betaproteobacterial populations in two hydrochemically distinct compartments of a subtropical lagoon. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4): 867–876.
- [35] Šimek K, Horňák K, Jezbra J, Nedoma J, Vrba J, Straškrábová V, Macek M, Dolan JR, Hahn MW. Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(9): 1613–1624.
- [36] Salcher MM, Pernthaler J, Zeder M, Psenner R, Posch T. Spatio-temporal niche separation of planktonic Betaproteobacteria in an oligo-mesotrophic lake. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8): 2074–2086.
- [37] Horňák K, Jezbera J, Nedoma J, Gasol JM, Šimek K. Effects of resource availability and bacterivory on leucine incorporation in different groups of freshwater bacterioplankton, assessed using microautoradiography. *Aquatic Microbial Ecology*, 2006, 45(3): 277–289.
- [38] Yang SP, Lin ZH, Cui XH, Lian JK, Zhao CG, Qu YB. Current taxonomy of anoxygenic phototrophic bacteria—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(11): 1562–1566. (in Chinese)

杨素萍,林志华,崔小华,连建科,赵春贵,曲音波.不产 氧光合细菌的分类学进展.微生物学报,2008,48(11): 1562-1566.

- [39] Jackson SA, Kennedy J, Morrissey JP, O'Gara F, Dobson ADW. Pyrosequencing reveals diverse and distinct sponge-specific microbial communities in sponges from a single geographical location in Irish waters. *Microbial Ecology*, 2012, 64(1): 105–116.
- [40] Beatty JT, Overmann J, Lince MT, Manske AK, Lang AS, Blankenship RE, van Dover CL, Martinson TA, Plumley FG. An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(26): 9306–9310.
- [41] Overmann J, Cypionka H, Pfennig N. An extremely low-light adapted phototrophic sulfur bacterium from the Black Sea. *Limnology and Oceanography*, 1992, 37(1): 150–155.
- [42] Ward DM, Ferris MJ, Nold SC, Bateson MM. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(4): 1353–1370.
- [43] Kampf C, Pfennig N. Capacity of chromatiaceae for chemotrophic growth. Specific respiration rates of *Thiocystis* violacea and Chromatium vinosum. Archives of Microbiology, 1980, 127(2): 125–135.
- [44] Liu CQ, Wang FS, Wang YC, Wang BL. Responses of aquatic environment to river damming——from the geochemical view. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2009, 18(4): 384–396. (in Chinese)
 刘丛强,汪福顺,王雨春,王宝利. 河流筑坝拦截的水环境 响应——来自地球化学的视角. 长江流域资源与环境, 2009, 18(4): 384–396.
- [45] Hill WR, Ryon MG, Schilling EM. Light limitation in a stream ecosystem: responses by primary producers and consumers. *Ecology*, 1995, 76(4): 1297–1309.
- [46] Kiffney PM, Richardson JS, Bull JP. Responses of periphyton and insects to experimental manipulation of riparian buffer width along forest streams. *Journal of Applied Ecology*, 2003, 40(6): 1060–1076.
- [47] Xing P, Kong FX, Gao G. Phylogenetic diversity and seasonal variation of bacterioplankton communities in Lake Taihu. *Journal of Lake Science*, 2007, 19(4): 373–381. (in Chinese)

邢鹏,孔繁翔,高光.太湖浮游细菌种群基因多样性及其 季节变化规律.湖泊科学,2007,19(4):373-381.

- [48] Jasti S, Sieracki ME, Poulton NJ, Giewat MW, Rooney-Varga JN. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 3483–3494.
- [49] Pearce DA. The structure and stability of the bacterioplankton community in Antarctic freshwater lakes, subject to extremely rapid environmental change. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 53(1): 61–72.
- [50] Kan JJ, Crump BC, Wang K, Chen F. Bacterioplankton community in Chesapeake Bay: Predictable or random assemblages. *Limnology and Oceanography*, 2006, 51(5): 2157–2169.
- [51] Hu YL, Wang SL, Yan SK. Research advances on the factors influencing the activity and community structure of soil microorganism. *Chinese Journal of Soil Science*, 2006, 37(1): 170–176. (in Chinese)
 胡亚林, 汪思龙, 颜绍馗. 影响土壤微生物活性与群落结构因素研究进展. 土壤通报, 2006, 37(1): 170–176.
- [52] Kirchman DL, Rich JH. Regulation of bacterial growth rates by dissolved organic carbon and temperature in the Equatorial Pacific Ocean. *Microbial Ecology*, 1997, 33(1): 11–20.
- [53] Yannarell AC, Triplett EW. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 227–239.
- [54] Okabe S, Odagiri M, Ito T, Satoh H. Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 971–980.
- [55] Jiang HC, Dong HL, Yu BS, Liu XQ, Li YL, Ji SS, Zhang CL. Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(10): 2603–2621.
- [56] Chen Z, He D, Ren LJ. The potential impacts of temperature and nutrient levels on freshwater bacterioplankton community structure. *Journal of Nanjing University*(*Natural Sciences*),

2016, 52(4): 590-600. (in Chinese)

陈祯,何聃,任丽娟.温度和营养盐水平对淡水浮游细菌 群落结构的潜在影响.南京大学学报(自然科学),2016, 52(4):590-600.

- [57] Winter C, Hein T, Kavka G, Mach RL, Farnleitner AH. Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a whole-river approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(2): 421–431.
- [58] Cao XY, Xu HM, Wang SC, Huang R, Shen F, He XW, Yu ZB, Zhao DY. Seasonal variation of bacterioplankton community structure and it's relationship with environmental factors of Mochou Lake and Zixia Lake in Nanjing. *Chemistry and Bioengineering*, 2016, 33(12): 19–26, 30. (in Chinese) 曹新益,徐慧敏,王司辰,黄睿,沈烽,何肖微,余钟波, 赵大勇.南京莫愁湖与紫霞湖浮游细菌群落结构的季节性 变化及其与环境因子的关系.化学与生物工程, 2016, 33(12): 19–26, 30.
- [59] Wang XL, Liu XT, Wu YJ. Analysis of water environment characteristics and purification ability of Honghu Lake Wetland in Jianghan Plain. *Journal of Wuhan University* (*Natural Science Edition*), 2003, 49(2): 217–220. (in Chinese) 王学雷,刘兴土,吴宜进. 洪湖水环境特征与湖泊湿地净 化能力研究. 武汉大学学报(理学版), 2003, 49(2): 217–220.
- [60] Dodds WK. Trophic state, eutrophication and nutrient criteria in streams. *Trends in Ecology & Evolution*, 2007, 22(12): 669–676.
- [61] Yang MX, Liu ZH, Sun HL, Yang R, Chen B. Organic carbon source tracing and DIC fertilization effect in the Pearl River: insights from lipid biomarker. *Earth and Environment*, 2017, 45(1): 46–56. (in Chinese)
 杨明星,刘再华,孙海龙,杨睿,陈波.基于生物标志物法 的珠江流域有机碳溯源及 DIC 施肥效应研究. 地球与环境, 2017, 45(1): 46–56.
- [62] Huang DJ, Qi SB, Yu XJ. Distribution characteristics of dissolved inorganic carbon in the Daya Bay in Spring. *Ecological Science*, 2012, 31(1): 75–79. (in Chinese) 黄道建, 綦世斌, 于锡军. 大亚湾春季溶解无机碳的分布 特征. 生态科学, 2012, 31(1): 75–79.

Diversity of sulfur-oxidizing bacteria in waters of the Three Gorges Reservoir, China

Qiaoling Chu, Jian Yang, Hongchen Jiang*

State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] To explore the composition and diversity of sulfur-oxidizing bacteria (SOB) community and its response to environmental variables in the mainstream and branches of the Three Gorges Reservoir (TGR). [Methods] A total of nine sampling locations were selected along the mainstream and branches of the TGR in March 2017. The physical and chemical parameters were measured on the sampled waters, followed by soxB gene-based phylogenetic analyses. The correlation analysis was performed between the physicochemical properties of the sampled waters and the composition and diversity of sulfur-oxidizing bacterial community. [Results] SOB in the collocted TGR waters belonged to α -Proteobacteria and β -Proteobacteria, with the latter being dominant (relative abundance was higher than 95.6% in the studied mainstream and branch samples). Cluster analysis and principal coordinate analysis (PCoA) showed that the branch samples are scattered with each other and with their corresponding mainstream sample, while the mainstream sample are relatively more centralized. The Mantel test showed that the SOB population composition was significantly (P < 0.05) correlated with the measured physicochemical parameters (i.e. water temperature, salinity, dissolved oxygen, algal content and pH) of the water samples. Pearson correlation analysis showed that the community diversity of sulfur-oxidizing bacteria was negatively correlated with algal content and dissolved inorganic carbon (DIC). [Conclusion] The SOB in the branch and mainstream TGR waters mainly belongs to the Proteobacteria. The composition of the SOB populations is similar among the mainstream samples, whereas the SOB population composition in the branch samples differs with each other and with their corresponding mainstream samples. This situation is mainly caused by the characteristic physical and chemical properties of the TGR waters.

Keywords: the Three Gorges Reservoir, sulfur-oxidizing bacteria, sulfur cycle, soxB

(本文责编:李磊)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-27-67883452; Fax: +86-27-67883451; E-mail: jiangh@cug.edu.cn Received: 22 August 2017; Revised: 8 November 2017; Published online: 28 November 2017



蒋宏忱,博士,中国地质大学(武汉)生物地质与环境地质国家重点实验室教授,2007 年 毕业于美国迈阿密大学,博士。2012 年入选教育部"新世纪优秀人才支持计划",2014 年 获国家优秀青年基金。现任中国微生物学会地质微生物专业委员会委员、Frontiers in Microbiology 副主编、《盐湖研究》和《微生物学报》编委。致力于盐湖和热泉等极端环 境的微生物生态及其相关的生源元素循环过程研究。先后主持了国家基金委重大研究计 划重点项目、国家优秀青年基金项目等重要课题,已在 Environmental Microbiology、 Applied and Environmental Microbology 等专业期刊发表科研论文 80 余篇。2015 年获中国 地质学会青年地质科技奖-银锤奖,2017 年获云南省自然科学二等奖。

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41672331) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (CUGQYZX1730)