

河道水体黑臭前后微生物种群变化研究

王鹏¹, 刘梅¹, 翁益松², 郑海宏³, 孙静亚^{1*} (1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江舟山 316022; 2. 舟山市水利勘测设计院, 浙江舟山 316000; 3. 舟山市润润环保能源科技有限公司, 浙江舟山 316000)

摘要 [目的]探究河道水体黑臭前后微生物群落的变化,为河道水体黑臭机制研究提供依据。[方法]对河道水体黑臭前、黑臭中、黑臭后的水质进行高通量测序,进行微生物多样性分析。[结果]微生物多样性分析结果表明,确定水中引起黑臭变化的硫酸盐还原菌优势菌种为狭义梭菌属严格芽孢杆菌、产气荚膜梭菌、甲苯单胞菌属、伯克氏菌属、马赛菌属等优势种群,并得出关键致黑致臭微生物种群 *Clostridium sensu stricto* 1,这一菌种在黑臭水体中的数量约 20 000 cell/mL 以上,占比 64.09%,为黑臭核心微生物种,致黑臭微生物种群 *Clostridium sensu stricto* 1 为狭义梭菌属严格芽孢杆菌属类,具有硫酸盐还原功能,是主要的硫酸盐还原菌种群。[结论]硫酸盐还原菌 *Clostridium sensu stricto* 1 在河道黑臭过程中起到关键作用。

关键词 河道水体;黑臭;微生物多样性;硫酸盐还原菌

中图分类号 X172 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)22-0047-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.22.016



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Change of Microbial Population before and after Black and Odorous in River Water

WANG Peng¹, LIU Mei¹, WENG Yi-song² et al (1. College of Marine Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022; 2. Zhoushan Water Conservancy Survey and Design Institute, Zhoushan, Zhejiang 316000)

Abstract [Objective] The research aimed to explore the changes of microbial community before and after the black and odorous in river water, and to provide the basis for the study on the mechanism of black and odorous in river water. [Method] High flux sequencing and microbial diversity analysis were carried out on the water quality of the river water before, in and after the black and odorous. [Result] The results of microbial diversity analysis indicated that the dominant species of sulfate-reducing bacteria that determined the change of black odorous in water were *Clostridium narrowly strict bacillus*, *Clostridium perfringens*, *Toluenomonas*, *Burkholderia* and *Massilia*. And the key black odor-causing microbial population *Clostridium sensu stricto* 1 was derived, the amount of this strain in black odorous water was about 20,000 cells/mL or more, accounting for 64.09%, which was a black odor core microbial species, and the black odorous microbial population *Clostridium sensu stricto* 1 was *Clostridium narrowly strict bacillus*. It had a sulfate reducing function and was the main sulfate reducing bacteria population. [Conclusion] Sulfate-reducing bacteria *Clostridium sensu stricto* 1 plays a key role in the black and odorous process of river.

Key words River water body; Black odorous; Microbial diversity; Sulfate-reducing bacteria (SRB)

硫酸盐还原菌是一种典型的厌氧微生物,通常简称 SRB,一般存在于地下、土壤、黑臭河道水体等缺氧环境中,硫酸盐还原菌的主要作用就是能够还原硫酸盐和亚硫酸盐,产生 H_2S ^[1-2]。硫酸盐还原菌所具有的硫酸盐还原功能是导致其细菌所在的水体环境或其他厌氧环境产生黑臭的主要原因之一,它利用各种有机物为电子供体,使硫酸盐作为电子受体,在厌氧硫酸盐还原过程中,持续消耗有机物,使之持续性为硫酸盐、硫酸根离子或其他含硫物质离子提供电子,还原硫酸根离子、亚硫酸根离子产生硫化氢、硫脲等一类含硫物质^[3-4],使硫酸盐还原菌所存在环境恶臭,并在同步还原过程中使环境中存在的致黑因子如铁锰等离子还原为低价离子,如硫化亚铁与硫化锰等,使所存在的环境变黑。该研究通过分析河道水体在黑臭过程中微生物种群的变化,揭示硫酸盐还原菌在水体黑臭中的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料 黑臭河底泥选自于某城市已发生黑臭的河道底泥,祛除可见不同类杂质后冷藏保存。培养基选用硫酸盐选择性培养基(Postgate 培养基)。

1.2 试验方法

1.2.1 微生物取样。为探究黑臭过程水中微生物多样性的变化,将河水按照 5% 体积比接种污泥,取 3 组样品进行分析。第 1 组为黑臭前,第 2 组为黑臭中,是培养 3 d 后取样,第 3 组为黑臭后,是培养 7 d 后取样。

1.2.2 测序流程。Illumina 测序的内容包括基因组 DNA^[5] 提取,设计并合成引物接头,PCR 扩增及产物纯化,PCR 产物定量和均一化,Illumina PE 300 文库制备,Illumina 高通量测序^[6]。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA^[7]。

1.2.3 基因组 DNA 抽提、PCR 扩增。将 3 组样品利用 OmegaBiotek 公司的 D5625-Soil-DNA 试剂盒完成基因组 DNA 提取^[8],利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA,随后送至上海元莘生物公司进行 DNA 文库构建,采用 PE250 测序平台完成 Illumina 测序,测序区域为 515F-907R,PCR 扩增所用正向引物为 515F:5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3',反向引物为 907R:5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3';全部样本按照正式试验条件进行,每个样本 3 个重复,将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司) 切胶回收 PCR 产物,Tris_HCl 洗脱;2% 琼脂糖电泳检测^[9]。

PCR 采用 TransStart Fastpfu DNA Polymerase,20 μ L 反应体系:5 \times FastPfu Buffer 4.0 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L,Forward Primer (5 μ mol/L) 0.8 μ L,Reverse Primer (5 μ mol/L)

基金项目 舟山市科技计划项目(2016C41006,2018C21012);浙江省公益技术应用研究计划项目(2016C33054)。

作者简介 王鹏(1994—),男,湖南澧县人,硕士研究生,研究方向:水污染控制技术。* 通信作者,教授,硕士生导师,从事水污染与固废处理技术研究。

收稿日期 2019-04-28

0.8 μL , FastPfu Polymerase 0.4 μL , Template DNA 10 ng, 补 ddH₂O 至 20 μL 。

PCR 反应参数:a.1 \times (5 minutes at 95 $^{\circ}\text{C}$),b.27 \times (30 seconds at 95 $^{\circ}\text{C}$;30 seconds at 55 $^{\circ}\text{C}$;45 seconds at 72 $^{\circ}\text{C}$),c.10 minutes at 72 $^{\circ}\text{C}$,10 $^{\circ}\text{C}$ until halted by user。

1.2.4 荧光定量。参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司)^[10]进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。

1.2.5 生物信息分析。OTU 聚类是在系统发生学或群体遗传学研究中,为了便于进行分析,人为给某一个分类单元(品系,属,种,分组等)设置的同一标志^[11]。OTU 聚类(operational taxonomic units)使用:Usearch vesion 7.1(<http://drive5.com/uparse/>)软件平台对测序结果进行修剪、筛选、匹配和分析。要了解一个样本测序结果中的菌种、菌属等数目信息,就需要对序列进行归类操作(cluster)。通过归类操作,将序列按照彼此的相似性分归为许多小组,一个小组就是一个 OTU。可根据不同的相似度水平,对所有序列进行 OTU 划分,通常对在 97%的相似水平下的 OTU 进行生物信息统计分析^[11]。

分析步骤如下:对优化序列提取非重复序列,便于降低分析中间过程冗余计算量,去除没有重复的单序列,按照 97%相似性对非重复序列(不含单序列)进行 OTU 聚类,在聚类过程中去除嵌合体,得到 OTU 的代表序列。将所有优化序列 map 至 OTU 代表序列,选出与 OTU 代表序列相似性

在 97%以上的序列,生成 OTU 表格^[11]。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果鉴定胶图 从图 1 可以看出,样品(Lane 1-3)在 500 bp 大小处有一条明亮的带,与目的基因的大小一致,表明目的基因可能成功扩增得到。后续的测序结果表明,该 500 bp 大小处片段的序列与目的基因的序列一致,表明目的基因成功扩增(重组质粒成功构建)。

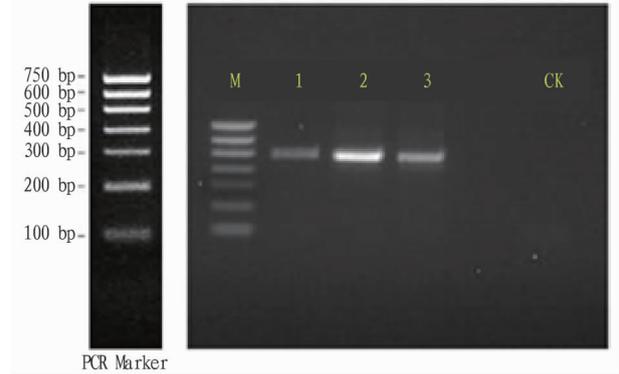


图 1 电泳初步定量鉴定胶图

Fig.1 Preliminary quantitative identification of gel map by electrophoresis

2.2 多样性分析结果 多样性分析结果中(表 1),各指数表现相似性水平为 0.97,样品有效,黑臭前 OTU 数值(486)与黑臭中 OTU 数值(678)差别较大,黑臭中样品丰度大于黑臭前样品,原因推测在黑臭产生过程中有同源相似性微生物大量繁殖。

表 1 水体黑臭不同阶段微生物多样性变化规律

Table 1 Variation of microbial diversity in different stages of black and odorous water body

阶段 Stage	Reads	OTU	Chao	Coverage	Shannon	Simpson
黑臭前 Before black and odour	32 107	486	493(489,503)	0.998 474	3.38(3.36,3.4)	0.080 8(0.079 3,0.082 2)
黑臭中 In black and odour	31 642	678	682(679,689)	0.998 704	2.73(2.7,2.76)	0.318 0(0.312 0,0.323 9)
黑臭后 After black and odour	33 823	522	526(523,533)	0.998 699	2.55(2.53,2.58)	0.309 3(0.304 1,0.315 2)

注:Reads 表示被分入所有 OTU 中的总优化序列数;OTU 表示此次试验中该样本优化序列划分得到的 OTU 数目;Chao、Coverage、Shannon、Simpson 分别表示各个指数

Note:Reads indicates the total number of optimized sequences that are assigned to all OTUs;OTU indicates the number of OTUs obtained by dividing the optimized sequence of the sample in this test;Chao,Coverage,Shannon,and Simpson respectively represent the indices

2.3 PCoA 分析 PCoA 分析,即主坐标分析(principal coordinates analysis),也是一种非约束性的数据降维分析方法,可用于研究样本群落组成的相似性或差异性^[10]。黑臭中的样品群落结构组成基于 79.85%的变异系数与其他 2 个样品显著不同,黑臭前与黑臭后样品基于 PC2(20.15%)分离,3 个样品微生物菌落组成存在差异性。

2.4 群落结构组成 水体黑臭 3 个阶段的样品经过预试验后确认 PCR 产物目的条带大小正确,浓度合适^[5],可进行后续微生物多样性测序试验;以门、纲、目、科、属 5 个水平的群落组成^[10-11]如表 2 所示。

如图 3 所示,黑臭前优势门 Proteobacteria 占比 95.7%,在样品中为主要微生物群落,但在黑臭暴发期间,微生物 Proteobacteria 大量减少,微生物 Firmicutes 成为优势门,占比

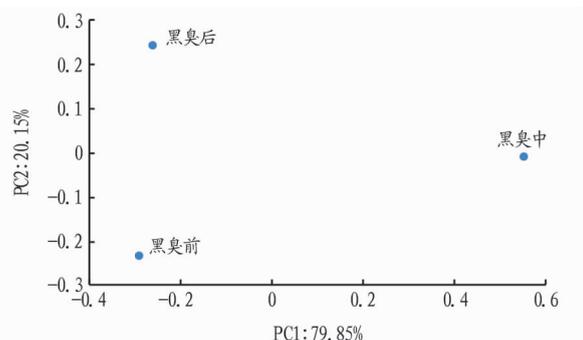


图 2 水体黑臭不同阶段 PCoA

Fig.2 PCoA diagram of different stages of black and odorous water body

74.3%,在黑臭之后,Proteobacteria 逐渐升高成为优势门,可知在整个黑臭时间段内,Firmicutes 门先升高后逐渐减少,那么 Firmicutes 是影响黑臭的关键门,属类水平中可以发现,在黑臭前 Pseudomonas 的占比为 77.81%,但在黑臭暴发期间,Clostridium sensu stricto 1 属成为优势属,占比 64.09%,在黑臭后,Clostridium sensu stricto 1 属减少,可知在黑臭期间关键微生物属为 Clostridium sensu stricto 1(严格厌氧芽孢杆菌属 1)。

2.5 核心基因组 Heatmap 分析 Heatmap 是用颜色变化来反映二维矩阵或表格中的数据信息^[12],它可以直观地将数据值的大小以定义的颜色深浅表示出来。常根据需要将数据进行物种或样本间丰度相似性聚类,将聚类后数据表示在 Heatmap 图上,可将高丰度和低丰度的物种分块聚集,通过颜

色梯度及相似程度来反映多个样本在各分类水平上群落组成的相似性和差异性^[11]。图 4 所示,对比黑臭期间 3 个不同阶段,黑臭中阶段的微生物 Clostridium sensu stricto 1、Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia、Tolomonas、Massilia 等大量繁殖,在热图中显示明显,在黑臭前显示不明显,为劣势微生物属,但在水体发生黑臭时,这几类微生物属大量繁殖,在热图所示黑臭中其百分比明显,为优势微生物属,但在黑臭后除 Tolomonas(甲苯单胞菌属)外,其他优势菌属逐渐凋亡。

2.6 核心微生物菌种 如表 3 所示,黑臭暴发期间关键优势微生物属种 Clostridium sensu stricto 1 在黑臭中的数量约 20 000 以上,占比 64.09%,Fuchs 等^[13]在探究产气荚膜梭菌

表 2 水体黑臭 3 个阶段群落水平

Table 2 Community level in three stages of black and odour in water

阶段 Stage	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
黑臭前 Before black and odour	Proteobacteria 95.7; Bacteroidetes 0.85; Actinobacteria 0.85	Gammaproteobacteria 87.02; Alphaproteobacteria 7.67; Deltaproteobacteria 1.0; Bacteroidia 0.72; Actinobacteria 0.69	Pseudomonadales 77.89; Betaproteobacteriales 8.16; Rhizobiales 2.55; Caulobacteriales 2.46; Sphingomonadales 2.24	Pseudomonadaceae 77.81; Burkholderiaceae 6.95; Caulobacteraceae 2.46; Sphingomonadaceae 2.24; Xanthobacteraceae 1.29	Pseudomonas 77.81; Ralstonia 3.21; Acidovorax 2.77; Caulobacteraceae; Unclassified 2.33; Sphingomonas 1.95
黑臭中 In black and odour	Firmicutes 74.3; Proteobacteria 23.9; Fusobacteria 1.4; Bacteroidetes 0.5	Clostridia 73.45; Gammaproteobacteria 23.69; Fusobacteriia 1.42; Bacteroidia 0.45; Bacilli 0.32	Clostridiales 73.45; Aeromonadales 15.19; Betaproteobacteriales 7.35; Fusobacteriales 1.42; Pseudomonadales 0.67; Enterobacteriales 0.44; Bacteroidales 0.44	Clostridiaceae 1 72.23; Aeromonadaceae 15.19; Burkholderiaceae 7.28; Leptotrichiaceae 1.42; Lachnospiraceae 1.20	Clostridium sensu stricto 1, 64.09; Tolomonas 14.86; Clostridium sensu stricto 12, 3.87; Burkholderia - Caballeronia - Para- burkholderia 3.85; Massilia 3.38; Clostridium sensu stricto 10 1.95
黑臭后 After black and odour	Proteobacteria 81.16; Bacteroidetes 8.37; Firmicutes 3.87	Gammaproteobacteria 72.05; Bacteroidia 7.74; Alphaproteobacteria 6.76; Clostridia 3.26; Spirochaetia 2.93; Deltaproteobacteria 2.35; Sericytochromatia 1.79	Betaproteobacteriales 50.79; Pseudomonadales 13.28; Aeromonadales 7.78; Bacteroidales 7.68; Rhodospirillales 6.26; Clostridiales 3.26	Rhodocyclaceae 42.26; Pseudomonadaceae 13.28; Burkholderiaceae 8.50; Aeromonadaceae 7.78; Magnetospirillaceae 6.26; Bacteroidaceae 4.63	Dechlorobacter 19.4; Dechloromonas 15.4; Pseudomonas 13.28; Burkholderia - Caballeronia - Para- burkholderia 7.71; Tolomonas 7.40; Magnetospirillum 6.26; Bacteroides 4.63

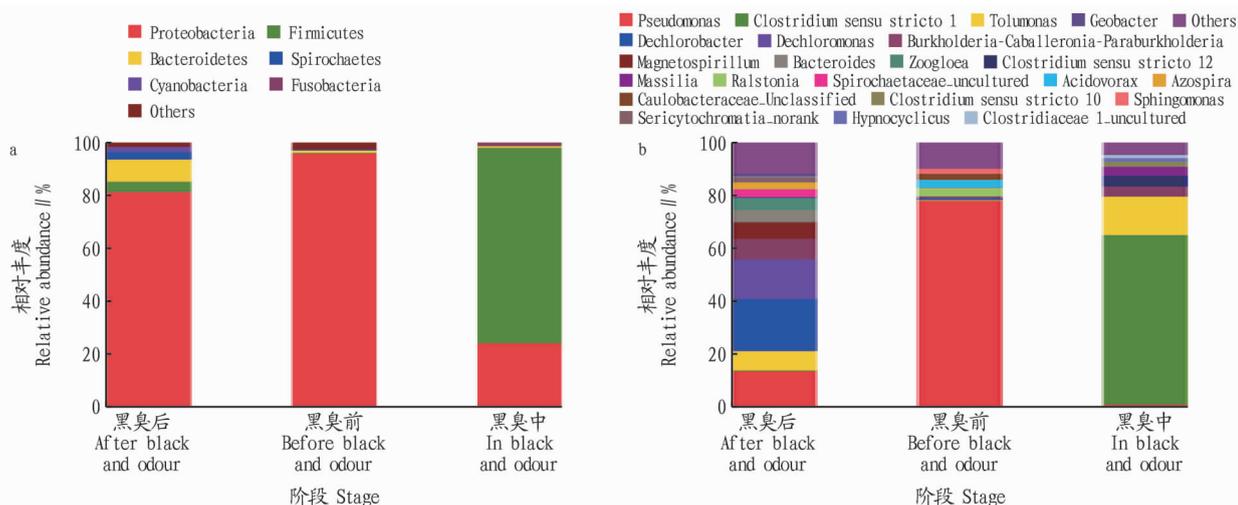


图 3 黑臭水不同阶段群落门(a)和属(b)的结构组成

Fig.3 The structural composition of the phylum (a) and genus (b) in different stages of black and odorous water

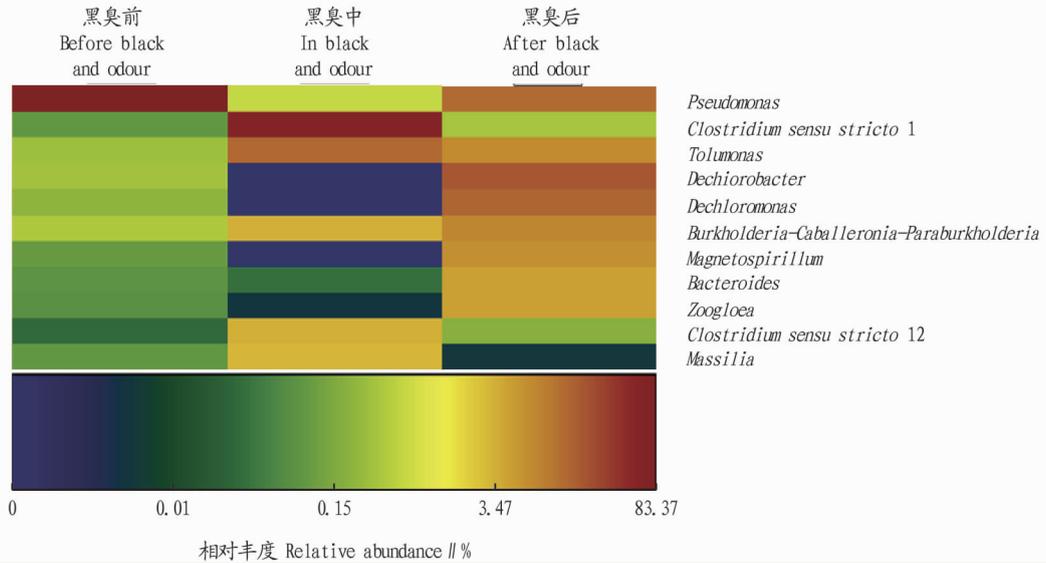


图4 水体黑臭时核心微生物属热图

Fig.4 Heat map of core microorganisms in black and odorous water

对产生硫化氢的研究中提到 *Clostridium sensu stricto* 属的产气荚膜梭菌能够还原硫酸根离子产生 H_2S 气体。Takahashi 等^[14]在硫酸盐还原富集培养物分离得到的梭状芽孢杆菌证明了狭义梭菌属为硫酸盐还原菌, Laishley 等^[15]在研究亚硫酸盐还原中提到狭义梭菌属能还原亚硫酸盐产生含硫气体等。Achá 等^[16]在探究大型植物外菌株汞甲基化和硫化氢中提到了甲苯单胞菌属 (*Tolumonas*) 能够还原硫酸根离子产生 H_2S ; Giri 等^[17]与 Kumar 等^[18]在研究挥发性有机硫化物与伯克氏菌相互关系时证明 *Burkholderia* 菌属有硫酸盐还原并产生含硫气体的功能。

2.7 系统发育树 系统发育树^[19]在生物学中用来表示物种之间的进化关系。在进化树上每个叶子结点代表一个物种,

如果每一条边都被赋予一个适当的权值,那么2个叶子结点之间的最短距离就可以表示相应的2个物种之间的差异程度^[20]。如图5所示优势种群系统发育进化树中12个菌种来源于核心优势属类,抽取各种种群关键基因序列构建进化树,菌株 *Tolumonas osonensis* strain OCF 7 与菌株 *Aeromonadaceae bacterium* 13012 自比值在95以上,可以证明这2株菌可能是一个祖先进化而来,存在相同的基因功能,同理 *Bacterium H4* 与 *Tolumonas auensis* strain DSM 9187 亲缘度较高,存在相同的基因功能。*Burkholderia* 与 *Massilia* 菌类亲缘度同样较高,存在相同的基因功能。*Clostridiales bacterium* AU537, *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 同样存在相同基因功能。

表3 水体黑臭核心微生物菌种

Table 3 Core microbial strain of black and odorous water body

序号 No.	优势属 Dominant genera	OTU ID	黑臭后 After black and odour		黑臭前 Before black and odour		黑臭中 In black and odour	
			个数 Number	百分比 Percentage %	个数 Number	百分比 Percentage %	个数 Number	百分比 Percentage %
1	狭义梭菌属芽孢杆菌1	<i>Clostridium sensu stricto</i> 1	116	0.37	27	0.09	20 279	64.09
2	甲苯单胞菌属	<i>Tolumonas</i>	2 342	7.40	94	0.30	4 645	14.68
3	梭菌属严格芽孢梭菌属 杆菌12	<i>Clostridium sensu stricto</i> 12	60	0.19	7	0.02	1 223	3.87
4	伯克氏菌属	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	2 439	7.71	126	0.40	1 218	3.85
5	马赛菌属	<i>Massilia</i>	1	0.00	26	0.08	1 068	3.38

3 结论与讨论

河道黑臭过程中微生物多样性分析表明,产生黑臭的硫酸盐还原菌具体的属种为狭义梭菌属严格芽孢杆菌、产气荚膜梭菌、甲苯单胞菌属、伯克氏菌属、马赛菌属等优势种群,并得出关键致黑致臭微生物种群 *Clostridium sensu stricto* 1, 这一菌种在黑臭水体中的数量约 20 000 cell/mL 以上,占比 64.09%,为黑臭核心微生物种。

致黑臭微生物种群 *Clostridium sensu stricto* 1 为狭义梭菌属严格芽孢杆菌属类,具有硫酸盐还原功能,利用水体中的硫化物充当电子受体,通过还原硫化物产生硫化氢等致臭物质,还原过程中产生的 S^{2-} 与自然水体中存在的 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 生成 FeS 、 MnS ,这一类含硫物质是关键的水体黑化污染物。对致河道水体发生黑臭变化的关键微生物种群进行研究为探究河道黑臭原因分析与河道黑臭治理提供理论基础。

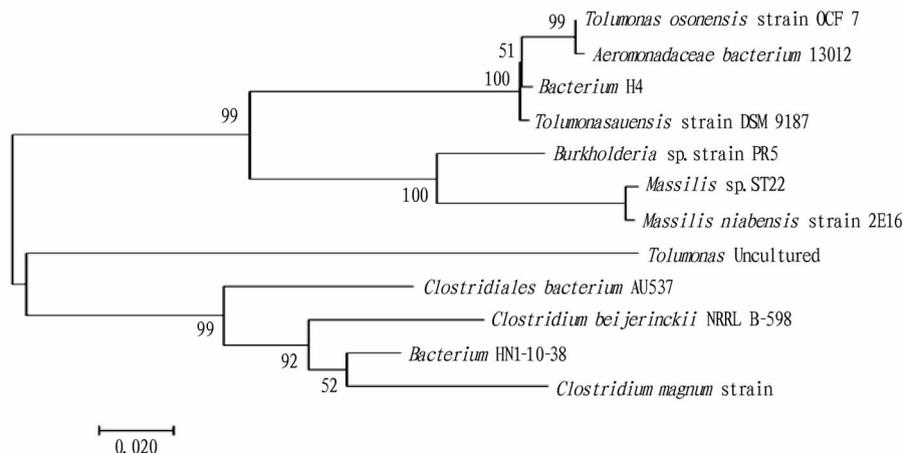


图 5 优势种群系统发育进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of dominant population

参考文献

- [1] 吴庆庆, 邱贤华, 熊贞晟, 等. 硫酸盐还原菌处理含硫酸盐有机废水的原理及其应用[J]. 安全与环境工程, 2015, 22(1): 90-96.
- [2] 范利萍, 张雪娇, 诸立. 硫酸盐还原菌在废水厌氧治理中的应用分析[J]. 资源节约与环保, 2015(11): 68.
- [3] 梁宇. 硫酸盐还原菌的生长因子的探讨[J]. 山西建筑, 2010, 36(30): 199-200.
- [4] 万海清, 苏仕军, 朱家骅, 等. 硫酸盐还原菌的生长影响因子及脱硫性能的研究[J]. 高校化学工程学报, 2004, 18(2): 218-223.
- [5] MORI H, MARUYAMA F, KUROKAWA K. VITCOMIC: Visualization tool for taxonomic compositions of microbial communities based on 16S rRNA gene sequences[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(1): 1-9.
- [6] 李彤彤, 李爱华. 应用高通量测序技术比较三种不同鱼肠道微生物的群落结构[C]//中国水产学会鱼病专业委员会 2013 年学术研讨会论文集摘要汇编. 海口: 海南大学海洋学院, 2013.
- [7] SARIA A, LUNDBERG J M. Evans blue fluorescence: Quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues[J]. Journal of neuroscience methods, 1983, 8(1): 41-49.
- [8] PHILIPPOT L, SPOR A, HÉNAULT C, et al. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil [J]. The ISME Journal, 2013, 7(8): 1609-1619.
- [9] QUINCE C, LANZEN A, DAVENPORT R J, et al. Removing noise from pyrosequenced amplicons[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 1-18.
- [10] WANG P P, SHI L P. Positive and negative sequence phasor extraction by particle swarm optimization algorithm for induction motor stator fault detection[J]. Electric power automation equipment, 2015, 35(2): 91-96.
- [11] 周晨, 张绍武, 陈伟. 微生物分类单元聚类算法比较研究[J]. 北京生物医学工程, 2014, 33(6): 591-597.

- [12] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [13] FUCHS A R, BONDE G J. The availability of sulphur for *Clostridium perfringens* and an examination of hydrogen sulphide production [J]. J Gen Microbiol, 1957, 16(2): 330-340.
- [14] TAKAHASHI Y, SUTO K, INOUE C. Polysulfide reduction by *Clostridium* relatives isolated from sulfate-reducing enrichment cultures[J]. Journal of bioscience & bioengineering, 2010, 109(4): 372-380.
- [15] LAISHLEY E J, KROUSE H R. Stable isotope fractionation by *Clostridium pasteurianum*. 2. Regulation of sulfite reductases by sulfur amino acids and their influence on sulfur isotope fractionation during SO_3^{2-} and SO_4^{2-} reduction[J]. Canadian journal of microbiology, 1978, 24(6): 716-724.
- [16] ACHÁ D, PABÓN C A, HINTELMANN H. Mercury methylation and hydrogen sulfide production among unexpected strains isolated from periphyton of two macrophytes of the Amazon[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 80(3): 637-645.
- [17] GIRI B S, KIM K H, PANDEY R A, et al. Review of biotreatment techniques for volatile sulfur compounds with an emphasis on dimethyl sulfide [J]. Process biochemistry, 2014, 49(9): 1543-1554.
- [18] KUMAR A, DEWULF J, LUVSANJAMBA M, et al. Continuous operation of membrane bioreactor treating toluene vapors by *Burkholderia vietnamiensis* G4[J]. Chemical engineering journal, 2008, 140(1/2/3): 193-200.
- [19] 冯思玲. 系统发育树构建方法研究[J]. 信息技术, 2009(6): 38-40, 44.
- [20] 李雪玲, 姚一建. 基于 28S rDNA 序列构建耳属系统发育树[J]. 菌物学报, 2004, 23(3): 345-350.

(上接第 25 页)

色大果型的倍性杂交育种提供亲本选择。

参考文献

- [1] SUN C D, HUANG H Z, XU C J, et al. Biological activities of extracts from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.): A review [J]. Plant foods for human nutrition, 2013, 68(2): 97-106.
- [2] ZHANG X N, HUANG H Z, ZHAO X Y, et al. Effects of flavonoids-rich Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells[J]. Journal of functional foods, 2015, 14: 144-153.
- [3] ZHANG X N, LV Q, JIA S, et al. Effects of flavonoids-rich Chinese Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) fruit extract on regulating glucose and lipid metabolism in diabetic KK-A^m mice [J]. Food function, 2016, 7: 3130-3140.
- [4] 戚行江. 杨梅生态栽培[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2016: 1-22.
- [5] 国家技术监督局. 水果、蔬菜制品 可溶性固形物含量的测定——折射

仪法: GB 12295—1990[S]. 北京: 中国标准出版社, 1990.

- [6] 全国食品工业标准化技术委员会. 食品中总酸的测定: GB/T 12456—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [7] 胡静, 赵瑞峰, 施文庄, 等. 烟草中 9 种有机酸的梯度离子色谱法测定研究[J]. 分析测试学报, 2011, 30(10): 1171-1174.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 食品中蔗糖的测定: GB/T 5009.8—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的测定方法液相色谱示差折光检测法: GB/T 18932.22—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [10] 孙勃, 许映君, 袁高峰, 等. 花椰菜主要生物活性物质及其抗氧化能力分析[J]. 核农学报, 2010, 24(2): 330-335.
- [11] JIA Z S, TANG M C, WU J M. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals [J]. Food chemistry, 1999, 64(4): 555-559.
- [12] WANG J S, ZHAO Z Q, SHENG X G, et al. Influence of leaf-cover on visual quality and health-promoting phytochemicals in loose-curd cauliflower florets [J]. LWT—Food Science and Technology, 2015, 61(1): 177-183.