

黄晗,唐源英,陈祉潇,等. 16S rRNA 测序技术在饮用水全流程微生物多样性研究的应用[J]. 净水技术, 2021, 40(7): 5-11, 132.

HUANG H, TANG Y Y, CHEN Z X, et al. Application of 16S rRNA sequencing technology in research of whole process of microbial diversity in drinking water[J]. Water Purification Technology, 2021, 40(7): 5-11, 132.



扫码试试?

16S rRNA 测序技术在饮用水全流程微生物多样性研究的应用

黄 晗¹ 唐源英¹ 陈祉潇¹ 李伟英^{1,2} 周 为^{1,2,*}

(1. 同济大学环境科学与工程学院, 上海 200092; 2. 长江水环境教育部重点实验室<同济大学>, 上海 200092)

摘 要 饮用水中微生物与人类健康息息相关。16S rRNA 基因序列具有的普遍性及保守性, 被越来越多地应用于饮用水水质全流程微生物多样性及群落结构研究。文中简要介绍了 16S rRNA 基因测序技术的发展历程, 并基于 16S rRNA 基因测序技术在饮用水中的研究成果, 探讨了全流程水环境条件与水中微生物多样性的相互关系。结果表明, 水源水质、水处理工艺、供水管网条件均导致末梢水中的生物多样性差异, 其中, 水源水质与末梢水微生物种群结构密切相关, 水处理工艺和供水管网特性对末梢水中微生物种群丰度影响较大。研究结果为高品质饮用水生物安全保障提供了新思路。

关键词 16S rRNA 测序技术 饮用水 微生物多样性 影响因素

中图分类号: TU991.0 文献标识码: A 文章编号: 1009-0177(2021) 07-0005-08

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2021.07.002

Application of 16S rRNA Sequencing Technology in Research of Whole Process of Microbial Diversity in Drinking Water

HUANG Han¹, TANG Yuanying¹, CHEN Zhixiao¹, LI Weiyong^{1,2}, ZHOU Wei^{1,2,*}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China;

2. Key Laboratory of Yangtze Aquatic Environment, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract Microorganisms in drinking water is closely related to human health. For its conservatism and the universality of existence, more applications of 16S rRNA gene sequences were gradually done in research of microbial diversity and community structure in full-scale drinking water distribution system. The development of 16S rRNA gene sequencing technology was briefly introduced. Based on the research results of 16S rRNA gene sequencing technology in drinking water, the relationship between water environmental conditions and microbial diversity in the whole process was discussed. The results showed that source water quality, water treatment processes and water supply network characteristics could result in differences in biological diversity of tap water, of which source water quality determines the structure of microorganism in tap water, while water treatment processes and water supply network characteristics determine the abundance of microorganism in tap water. Results provide a new sight on the security of high quality drinking water.

Keywords 16S rRNA sequencing technology drinking water microbial diversity influence factor

饮用水的安全对人体的健康十分重要, 不安全

的饮用水可能会导致严重的急性或慢性的水传播疾病^[1], 对人类健康构成威胁。研究表明, 饮用水中存在的微生物(如病原微生物)可能会导致介水疾病的传播^[1-4]。因此, 饮用水水质微生物安全的研究具有重要意义。

传统的细菌分类标准基于细菌的形态和生理特性, 在进行鉴定时需对细菌纯培养后再从形态学、免疫学和生理生化特性等方面进行分类, 但该方法的

[收稿日期] 2020-12-16

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(51979194); 大学生创新创业训练计划项目

[作者简介] 黄晗(1999—), 男, 研究方向为环境科学。电话: 18721979536; E-mail: 1754116@tongji.edu.cn。

[通信作者] 周为(1989—), 女, 博士后, 研究方向为饮用水水质保障与提升技术。电话: 13437129278; E-mail: Wei_Zhou@tongji.edu.cn。

细菌培养时间较长、灵敏度较低以及鉴定的特异性不足,且无法检测水中活的但不可培养的细菌(viable but non-culturable bacteria, VBNC)^[5-7]。近年来随着分子生物学技术的发展,以16S rRNA为代表的基因测序技术逐渐被应用于饮用水微生物多样性的研究。本文将基于16S rRNA基因的特点、分析技术及其基本原理的发展进程,从水源水质、水处理工艺以及供水管网特性等方面探讨其对末梢水中微生物多样性的影响,总结了饮用水全流程对末梢水微生物多样性影响的特点,为建立水质与微生物多样性的关系提供参考依据,为其在饮用水中微生物检测的广泛应用提供支撑,最后对该技术在饮用水微生物多样性研究的应用进行了展望。

1 16S rRNA 基因测序技术的发展历程

基因测序技术的发展进程集中于近50年(图1)。基于由Sanger和Coulson开创的链终止法以及1976年—1977年Maxam和Gibert提出的DNA测序的化学降解法,Sanger于1977年完成了噬菌体ΦX174全基因组测序,发明了双脱氧链终止法,即

第一代测序(first-generation sequencing)方法。第一代测序的主要特点是测序读长可达1 000 bp,准确性高达99.999%,然而,其存在测序成本高、通量低等方面的缺点,严重影响了其真正大规模的应用^[8-10]。2005年,经过不断的技术开发和改进,产生了以Roche公司的454技术、Illumina公司的Solexa技术和ABI公司的Solid技术为标志的第二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)。与第一代Sanger测序相比,第二代具有通量高^[11]、测序快等优势,大幅降低了测序成本,扩大了基因组学研究的规模^[12]。然而,第二代测序技术仍然存在读长较短、价格昂贵的缺点。2008年之后,PacBio公司的单分子实时(single molecule real time, SMRT)测序技术和Helicos Biosciences公司的Heliscope遗传分析系统即第三代测序技术被相继发明。与前两代相比,其最大的特点就是读长较长、成本较低、速度快、无需进行PCR扩增,但仍然存在准确性不高的缺点,目前未能在饮用水配水流程的微生物多样性研究中较为广泛地应用。第四代测序技术以Oxford Nanopore Technologies公司的纳米孔测序技术为代表。四代测序技术的优缺点及部分平台如表1与表2所示。

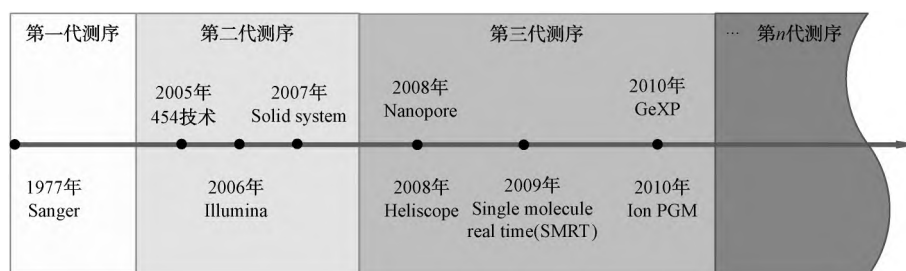


图1 测序技术的发展进程

Fig.1 Development Course of Sequencing Technology

表2中的测序平台和测序仪器均来自国外的生物公司,目前,在我国的饮用水微生物多样性分析领域,依然主要使用这些设备和相应的技术。在基因测序设备几乎被国外垄断的局面下,我国也在通过自主研发、联合研发以及收购国外公司的方式发展本国的基因测序设备^[27],如华因康开发的基因测序仪HYK-PSTAR-IIA、中科紫鑫的测序仪BIGIS-4等。在基因测序设备研发上我国已取得一些成效,部分仪器在一些测序结果的准确性和稳定性上可以与国外仪器相当^[28]。但是目前基于国内设备和技术的研究较少,其在饮用水微生物中的应用也较少,

暂时无法进行更全面的分析。

2 16S rRNA 基因测序在饮用水中的应用

2.1 16S rRNA 在水源微生物多样性的研究应用

地表淡水(如湖泊、河流等)中的饮用水水源随着人口增加和城市化进程的建设,受污水、有毒化学物质、营养物质以及由此产生的有害水华的影响,水源水质污染加剧,增加了饮用水处理工艺的难度与成本。水源水质的优劣对后续处理后水中微生物的存在水平及其多样性影响较大。

表 1 16S rRNA 测序技术
Tab.1 16S rRNA Sequencing Technology

	第一代测序	第二代测序	第三代测序	第四代测序
测序原理	双脱氧链终止法	边合成边测序	单分子测序	纳米孔测序
读长	长	较短	长 ^[13]	长
通量	低	高	高 ^[13]	高
耗时	长	短	短 ^[13]	短
优点	读长长、准确率高 ^[14]	通量高、速度快、产量高、分析自动化	读长长、测序时间短	读长长、高通量、低成本、测序时间短、数据分析较简便
缺点	通量低、耗时长等	读长较短 ^[14] 、部分情况会引入错误或错误率增加 ^[12,15-16] 等	准确率较低等	准确率较低等
相对成本	高 ^[14]	较低 ^[14]	低 ^[17]	低
应用举例	基于短 DNA 序列的进化分类学 ^[18] 、野生动物进化史研究 ^[19] 、生物多样性评估及其影响因素 ^[20]	动物肠道微生物群落 ^[21] 、细菌和真菌分布及多样性 ^[22]	基因组组装 ^[23] 、进化生物多样性 ^[24]	蛋白质和肽检测 ^[25] 、离子、DNA、RNA、肽、蛋白质、聚合物和大分子等的分析 ^[26]

表 2 16S rRNA 部分测序平台
Tab.2 16S rRNA Sequencing Platform

测序平台名称	测序仪类型	关键技术	时间/运行	最大读长	通量/运行	读数/运行
Applied Biosystems	3730XL 基因测序仪	双脱氧链终止法	1 h	700 bp	0.067 Mb	—
Roche 454	GS FLX Titanium XL+	焦磷酸测序	23 h	1 000 bp	700 Mb	1×10 ⁶
Illumina	MiSeq Series	边合成边测序技术	4~55 h	2×300 bp	540 Mb~15 Gb	1×10 ⁶ ~25×10 ⁶
	MiniSeq System	双通道	4~24 h	2×150 bp	1.65~7.5 Gb	7×10 ⁶ ~25×10 ⁶
	HiSeq 4000 System	图案化流动槽	<1.0~3.5 d	2×150 bp	105~1 500 Gb	2.1×10 ⁶ ~5.0×10 ⁹
	NextSeq Series	双通道	12~30 h	2×150 bp	16.25~120 Gb	1.3×10 ⁸ ~4.0×10 ⁸
ABI & Life Tech	SOLiD 5500xl	连接酶法	6 d	2×60 bp	90 Gb	—
PacBio	Sequel II System	单分子实时测序技术	<30 h	9~13 kb	—	2×10 ⁶
Oxford Nanopore	PromethION	纳米孔测序技术	10 min	100 kb	>1 Tb	—

葛英亮等^[29]使用 Illumina MiSeq 对水源水水样中病毒基因组进行测序,与数据库进行比对获得基因数据,分析了饮用水源水中病毒的多样性,可为水体中病毒的检测提供理论上的参考依据。张明露等^[30]采用基于 16S rRNA 的焦磷酸测序技术,对丹江口水库水和北京地区 4 个水源水总微生物进行了分析,结果显示丹江口水库水和北京地区水源水细菌群落的差异大,且 pH、氨氮等对水样中细菌群落影响较大。Gomez-Alvarez 等^[31]研究了地下水与地表水对供水管网中微生物多样性的影响,多变量分析表明两区域之间存在显著差异,多样性指数研究表明地表水源供水管网中的微生物群落多样性比地下水源的高,且包含更多的与当地微生物群共存的远缘物种,源水水质参数可能是群落结构差异的主

要原因。

Mukherjee 等^[32]使用基于 16S rRNA 基因的焦磷酸测序方法,对西半球中部高原农村地区水源和末梢水进行了研究,结果显示水源水与末端水中的细菌群落显著不同,且水源中致病菌可能会影响龙头水水质,而龙头水与水源细菌群落的差异性也说明净水工艺和供水管网对用水水质的影响。

不同水源水中的微生物的优势菌群存在差异。张明露等^[30]对丹江口水库和北京地区两个水源水的测序结果表明,3 类样本的优势菌群不同,北京地区两水源水样为 α 变形菌纲、 β 变形菌纲和蓝藻纲,而丹江口水库水样中优势菌群为硝化螺旋菌纲等。Mukherjee 等^[32]的水样组成显示,硬壁菌门较丰富,其次是变形杆菌和拟杆菌。水源类型和不同水源水

的混合比例也会影响某些类群的丰度和比例^[33-34]。此外,水源水中有机物对饮用水全流程系统乃至龙头水中微生物多样性也存在较大影响,如青霉素-G^[35]、丙吡胺^[36]、抗生素^[37]等有机物的存在会抑制水中细菌群落的活动,导致水样中细菌总数与丰度下降。

2.2 16S rRNA 在水处理工艺中微生物多样性的研究应用

饮用水微生物的有效净化是预防介水传染病及其传播的重要环节。细菌群落组成与条件致病菌的出现存在潜在联系^[38]。饮用水处理厂或配水过程中遇到的问题可能会导致条件性致病菌(如分支杆菌、铜绿假单胞菌、嗜肺军团菌等)的扩散^[39-40]。饮用水微生物的有效灭活是预防介水传染病及其传播的重要环节。

Hou 等^[41]为了了解饮用水处理系统中的细菌群落变化,采用 Illumina Hiseq 测序分析,在不同季节对华南某饮用水处理厂处理流程中的微生物群落进行了研究。结果表明,处理过程中放线菌、变形杆菌和硬壁菌的比例发生了较大的变化,放线菌的比例急剧下降,而处理水中的变形杆菌和硬壁菌的比例增加并占主导地位。氯化后细菌群落发生了显著变化,而出厂水中细菌群落的丰度相对稳定,不随季节变化。在包括出厂水在内的各个工艺流程的水中检测到一些条件致病菌,包括假单胞菌、不动杆菌、柠檬酸杆菌、分枝杆菌等,这表明饮用水的安全可能受到威胁,该结果为饮用水处理流程中微生物时空变化提供了材料。Wu 等^[35]采用液相色谱-质谱/质谱联用技术检测饮用水中青霉素-G 的含量,并采用聚合酶链反应和高通量测序技术(检测细菌 16S rRNA V3 和 V4 区基因),用 Illumina HiSeq2000 检测样品中细菌的多样性,并计算了各样品的多样性指数。结果表明,不同浓度的青霉素-G 对饮用水细菌群落的结构影响较大,添加青霉素-G 后,饮用水样品中细菌群落物种总数和丰度明显下降,但群落结构的数量和丰度并未随浓度的变化而变化。青霉素-G 能抑制饮用水中细菌群落的活动,降低饮用水中细菌的多样性。Potgieter 等^[42]使用 3 种连续的消毒策略(氯化、氯胺化和次氯酸化作用),在饮用水处理厂和分配系统中采集大量水样,通过 Illumina MiSeq 对 16S rRNA 基因的 V4 可变区进行测序来表

征细菌的群落组成,结果显示 α -和 β -变形杆菌在饮用水细菌群落中占主导地位,在氯胺化后 β -变形杆菌数量增加。除消毒过程对微生物多样性影响之外,软化^[43]、臭氧生物活性炭^[44]、混凝^[45]、过滤^[46]等均会对水中微生物多样性产生影响。

这些研究表明,饮用水处理厂的处理工艺(物理、化学、生物工艺)均会对水中的细菌群落产生一定影响。

2.3 16S rRNA 技术在管网系统微生物多样性变化的研究应用

经过处理厂净水系统后的出厂水,通过供水管网(drinking water distribution system, DWDS)运输到各用水点。DWDS 的微生物生态受多种因素影响,包括环境和工程因素以及影响生物膜、水环境和沉积物中细菌群落组成和结构的操作条件等^[47]。除了水中微生物的影响,出厂水也可能受到配水系统本身的影响,比如管道材料^[48-49]、管道腐蚀^[51]和松散沉积物的再悬浮^[47-51]等。

Huang 等^[52]使用了 Illumina 高通量测序和 454 焦磷酸测序两种方法对饮用水全流程的细菌毒性和毒性因子进行了分析,结果显示,经过氯气消毒后,细菌多样性下降,但经过管道分配运输后多样性上升,且饮用水中依然存在部分致病菌。研究认为,联合使用 Illumina 和 454 焦磷酸测序能够更全面地表征饮用水系统中的细菌毒性和毒性因子。

供水管网材质是影响末梢水微生物多样性的一个重要因素。Liu 等^[53]采用的焦磷酸测序方法,以 Roche 454 GS FLX 测序平台,分析了聚氯乙烯(PVC)和铸铁管道中的水以及生物膜中的微生物群落组成。结果显示,菌丝体和腐蚀相关细菌是 PVC 和铸铁生物膜中最具优势的细菌,而常见条件致病菌在不同材质管网中相对丰度不同,且不同材料表面上的细菌群落具有特定的细菌种群,不同管道材料(PVC 和铸铁)对微生物群落,特别是对细菌组成影响显著,多种微生物会在不同的管材上选择性繁殖。王薇等^[54]利用 Roche 454 GSFLX+测序仪进行测序,研究了灰口铸铁管、镀锌管和不锈钢复合管对供水管网生物膜微生物种群多样性的影响,灰口铸铁管生物膜种群多样性最高,镀锌管生物膜种群多样性相对较为单一,不锈钢复合管生物膜种群

多样性最低,不同管材生物膜细菌群落组成差异很大。Yu 等^[55]分析了管道材料铜、氯化聚氯乙烯、聚丁烯、聚乙烯、不锈钢、镀锌钢对生物膜形成潜力和微生物群落的影响,细菌 16S rDNA 片段的变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)显示,不同材料之间存在显著差异,管道材料不仅影响生物膜形成潜力,而且影响微生物多样性。Inkinen 等^[56]利用 16S rRNA 和 16S rRNA 基因测序,对铜和交联聚乙烯(PEX)饮用水管道生物膜在两种不同处理条件(额外消毒和磁化水处理)下的细菌群落变化。结果表明,管材对分枝杆菌的产生有一定的影响,对磁化水处理的铜管的细菌群落有影响,而对磁化水处理的 PEX 管的细菌群落影响不明显。值得一提的是,由于基于 DNA 的测序无法区分活细菌与死细菌,该研究同时构建了样本的 16S rDNA 和 16S rRNA 库,以便更好地研究细菌群落的活性。

DWDS 中的微生物群落具有很强的复杂性,是因其受到各种因素的联合影响。来自出厂水中携带的微生物和消毒副产物,分配系统的管材、生物膜、沉积物等,以及分配过程的水力条件、水龄(时间)、地点(空间)等均会对分配系统中的微生物群落造成影响,可能引起微生物多样性和群落结构的变化。Liu 等^[53]、Yu 等^[55]和 Inkinen 等^[56]的研究均表明了管材对于分配系统中微生物群落的选择性。

除管网材质外,时空变化亦是影响末梢水生物安全的重要因素。Wang 等^[57]研究了管网中不同水龄的 4 个样本,结果显示,随着水龄的增长,余氯逐渐减少,溶解有机质、细菌总数和细菌多样性增加。但是也有相反的报道,如 Hwang 等^[58]对 5 个地点的水样微生物群落的研究表明,采样地点和水龄(< 21.2 h)对大多数时间点样品的微生物组成无明显影响。Perrin 等^[59]研究巴黎 DWDSs 的细菌群落,结果表明,菌丝微杆菌和幽门杆菌是最具代表性的细菌属,细菌群落在空间上相当稳定,随着时间的推移略有波动。Roeselers 等^[60]从荷兰 32 个饮用水供水管网的不同地点收集水样,结果显示,出厂水的微生物群落结构与末梢水没有实质性差异,同一供水管网的特定群落展现出时间上的稳定性,同一供水管网内的末梢水样显示出非常相似的群落结构。

2.4 其他

除了上述水处理工艺、配水系统中生物膜和管材以及时间的影响之外,还有许多其他方面的对饮用水微生物的研究,例如水力条件^[61]、水化学因素^[62]等。Liu 等^[51]利用 Illumina MiSeq 进行 DNA 测序,确定了水源、处理水和配水系统在利用 Bayesian “SourceTracker”方法塑造龙头水细菌群落方面的比例贡献。

Douterelo 等^[63]研究了小流量、稳态流量和大流量水力条件对试验配水系统细菌群落结构和组成的影响,结果表明,在大流量水力条件下,细菌群落的物种丰富度和多样性有提高的趋势。

在对细菌群落多样性分析方面,与传统培养方法相比,高通量测序技术具备一定优势。Perrin 等^[59]研究了巴黎 4 个饮用水分配系统的细菌群落,比较了基于培养方法描述的细菌多样性和基于高通量测序方法描述的细菌多样性。结果表明,基于培养的方法所展现的细菌多样性,仅为基于高通量测序法的 1.3%~1.8%。仅小部分的细菌多样性能够被传统培养方法所鉴定。高通量测序法则显示高灵敏度的特点,使用高通量技术能够更准确地描述微生物群落的状态以及检测其内部和外部发生的干扰。

3 总结与展望

本文基于 16S rRNA 基因的特征,总结并分类分析了 16S rRNA 应用于饮用水的微生物多样性研究,包括源水水质、水处理流程、供水管网条件等因素对微生物多样性的影响。结果表明,水源条件、处理工艺、管网条件等均会对末梢水微生物群落多样性造成影响,其中,水源条件与末梢水微生物种群结构的相关性较大,处理工艺与管网条件对龙头水中微生物种群丰度的影响较大。

16S rRNA 测序技术为饮用水微生物多样性研究带来了极大的帮助,但仍存在一些问题,如仅采用 16S rRNA 分析无法对某些差异较小的细菌鉴定到种,基于 PCR 技术可能带来的污染和假阳性问题等。在此,对 16S rRNA 测序技术及饮用水微生物研究做出以下几点预测。

(1) 高通量测序技术的不断革新。NGS 的出现使得微生物基因研究的成本大幅度降低,试验时间大幅度缩短,带来了很好的经济和效率收益,加快推

动了微生物多样性的研究。Illumina 测序平台继推出 Hiseq、Miseq 之后,近几年新推出了 Novaseq 和 iSeq,以适应更多的需求。可通过改进文库构建^[64-65]和测序读长质量控制^[66-67]的方法来改善平台的数据分析,不断完善自身,降低错误率,提高应用能力。

(2) 不同研究技术的结合使用。为了更好地研究饮用水微生物,只使用单一的方法是不够的,因为任何方法都有其局限性,应当合理地结合使用不同的方法,以求对样本进行更全面的描述和理解。例如:研究量较少时,第一代 Sanger 测序依然是一种选择;需要较长读长时,单分子测序技术的应用则更适合;需要较高通量时,高通量测序技术则为较好的选择;为了对样品进行初步的筛选或评估,可以使用指纹图谱技术、荧光原位杂交技术进行微生物定量分析和群落结构分析等。

(3) 研究规模的不断扩大。目前,对饮用水微生物多样性的研究大都是集中于一个方面(如管材、时间、消毒剂等)、一项处理流程或者一段运输分配路径对饮用水微生物多样性的影响,且对单一方面的研究也只局限于某一小区域的样品分析。未来应当有更多的关于可能影响饮用水微生物的多种因素(饮用水处理全流程)的更大规模(市级供水管网、全国管网)的项目及研究,以便更深刻地了解饮用水微生物的各项特性,从而对其进行针对性的处理。

参考文献

- [1] DEDE C, CINAR N, PEKSEN S. Drinking water safety and health effects[J]. *Journal of Family Medicine*, 2014, 1(2): 1-2.
- [2] SANTOS B D L, SCHROEDER J L, SEVILLANO-RIVERA M C, et al. Emerging investigators series: Microbial communities in full-scale drinking water distribution systems-a meta-analysis[J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2016, 2(4): 631-644.
- [3] PROCTOR C R, HAMMES F. Drinking water microbiology—From measurement to management [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 33(12): 87-94.
- [4] COLLINS O C, GOVINDER K S. Stability analysis and optimal vaccination of a waterborne disease model with multiple water sources [J]. *Natural Resource Modeling*, 2016, 29(3): 426-447.
- [5] CHOWDHURY S. Heterotrophic bacteria in drinking water distribution system: A review[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012(10): 6087-6137.
- [6] 刘文强,贾玉萍,赵宏坤. 16S rRNA 在细菌分类鉴定研究中的应用[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(11): 15-18.
- [7] RAMAMURTHY T, GHOSH A, PAZHANI G, et al. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria[J]. *Frontiers in Public Health*, 2014, 2(103): 1-9. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00103.
- [8] SANGER F, NICKLEN S, COULSON A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(12): 5463-5467.
- [9] MAXAM A M, GILBERT W. A new method for sequencing DNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(2): 560-564.
- [10] 张小珍,尤崇革. 下一代基因测序技术新进展[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2016, 42(3): 73-80.
- [11] DIJK E L V, AUGER H, YAN J, et al. Ten years of next-generation sequencing technology[J]. *Trends in Genetics*, 2014, 30(9): 418-426.
- [12] SALK J J, SCHMITT M W, LOEB L A. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(5): 269-285.
- [13] 马东娜,张兴坦,钟伟民. 基因组二代测序数据与三代测序数据的混合校正和组装[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(4): 1547-1555.
- [14] 柳延虎,王璐,于黎. 单分子实时测序技术的原理与应用[J]. *遗传*, 2015, 37(3): 259-268.
- [15] BICKHART D M, ROSEN B D, KOREN S, et al. Single-molecule sequencing and chromatin conformation capture enable de novo reference assembly of the domestic goat genome [J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(4): 643-650.
- [16] WALL J D, TANG L F, ZERBE B, et al. Estimating genotype error rates from high-coverage next-generation sequence data[J]. *Genome Research*, 2014, 24(11): 1734-1739.
- [17] 曹晨霞,韩琬,张和平. 第三代测序技术在微生物研究中的应用[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2269-2276.
- [18] CHEN J M, ZHOU W W, JR N A P, et al. A novel multilocus phylogenetic estimation reveals unrecognized diversity in Asian horned toads, genus *Megophrys sensu lato* (Anura: Megophryidae) [J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2017(1): 28-43.
- [19] YUAN Z Y, ZHOU W W, CHEN X, et al. Spatiotemporal diversification of the true frogs (genus *Rana*): A historical framework for a widely studied group of model organisms [J]. *Systematic Biology*, 2016, 65(5): 824-842.
- [20] ZHOU W, JIN J, WU J, et al. Mountains too high and valleys too deep drive population structuring and demographics in a Qinghai-Tibetan Plateau frog *Nanorana pleskei* (Dicroglossidae) [J]. *Ecology & Evolution*, 2017, 7(1): 240-252.

- [21] HU X , GANG L , SHAFER A , et al. Comparative analysis of the gut microbial communities in forest and alpine musk deer using high-throughput sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology* , 2017 (8) : 1–12. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00572.
- [22] LI Q , ZHANG B , WANG L , et al. Distribution and diversity of bacteria and fungi colonizing ancient Buddhist statues analyzed by high-throughput sequencing[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation* , 2017 , 117: 245 – 254. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.01.018
- [23] QIUSHI L. High-accuracy de novo assembly and SNP detection of chloroplast genomes using a SMRT circular consensus sequencing strategy[J]. *The New phytologist* , 2014(4) : 1041–1049.
- [24] BLEIDORN , CHRISTOPH. Third generation sequencing: Technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research[J]. *Systematics & Biodiversity* , 2016 , 14(1) : 1–8.
- [25] ROBERTSON J W F , REINER J E. The utility of nanopore technology for protein and peptide sensing [J]. *Proteomics* , 2018 , 18(18) : 1–36.
- [26] FENG Y , ZHANG Y , YING C , et al. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology [J]. *Genomics , Proteomics & Bioinformatics* , 2015 , 13(3) : 4–16.
- [27] 李倩一,杜佳婷,王娟. 标准体系建设助力科技创新发展之国产高通量基因测序仪产业化[J]. *中国标准化* , 2017(9) : 102–106.
- [28] 钟宏彬. BGISEQ-500、Hiseq 4000 和 Hiseq X Ten 三个测序平台之间外显子测序数据比较分析[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [29] 葛英亮,于水利,时文歆. 应用 Illumina Miseq 测序分析饮用水水源水中病毒多样性 [J]. *食品科学* , 2018 , 39(2) : 287–292.
- [30] 张明露,刘文君,李翠萍,等. 南水北调中线水源水的细菌群落和致病菌分析 [J]. *给水排水* , 2015 , 41(6) : 32–36.
- [31] GOMEZ-ÁLVAREZ V , HUMRIGHOUSE B W , REVETTA R P , et al. Bacterial composition in a metropolitan drinking water distribution system utilizing different source waters[J]. *Journal of Water and Health* , 2014 , 13(1) : 140–151.
- [32] MUKHERJEE N , BARTELLI D , PATRA C , et al. Microbial diversity of source and point-of-use water in rural haiti—A pyrosequencing-based metagenomic survey [J]. *Plos One* , 2016 (11) : 1–16.
- [33] HOLINGER E P , ROSS K A , ROBERTSON C E , et al. Molecular analysis of point-of-use municipal drinking water microbiology[J]. *Water Research* , 2014 , 49(3) : 225–235.
- [34] PINTO A J , SCHROEDER J , LUNN M , et al. Spatial-temporal survey and occupancy-abundance modeling to predict bacterial community dynamics in the drinking water microbiome [J]. *MBio* , 2014 , 5(3) . DOI: 10.1128/mBio.01135–14.
- [35] WU Q , ZHAO X , PENG S , et al. Risk assessment and effect of penicillin-G on bacterial diversity in drinking water [J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* , 2018(1) . DOI: 10.1088/1755–1315/113/1/012156.
- [36] WU Q , ZHAO X , TIAN Q , et al. Effect of disopyramide on bacterial diversity in drinking water[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* , 2018 (1) . DOI: 10.1088/1755–1315/113/1/012144.
- [37] JIA S , SHI P , HU Q , et al. Bacterial Community Shift Drives Antibiotic Resistance Promotion during Drinking Water Chlorination[J]. *Environmental Science & Technology* , 2015 , 49(20) . DOI: 10.1021/acs.est.5b03521.
- [38] JI P , RHOADS W J , EDWARDS M A , et al. Impact of water heater temperature setting and water use frequency on the building plumbing microbiome[J]. *The ISME Journal* , 2017 , 11 (6) . DOI: 10.1038/ismej.2017.14.
- [39] LU J , STRUEWING I , YELTON S , et al. Molecular survey of occurrence and quantity of *Legionella* spp. , *Mycobacterium* spp. , *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in municipal drinking water storage tank sediments [J]. *Journal of Applied Microbiology* , 2015(1) : 278–288.
- [40] ASHBOLT N J. Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems [J]. *Current Environmental Health Reports* , 2015 , 2(1) : 95–106.
- [41] HOU L , ZHOU Q , WU Q , et al. Spatiotemporal changes in bacterial community and microbial activity in a full-scale drinking water treatment plant [J]. *Science of the Total Environment* , 2017 , 625: 449–459. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.301.
- [42] POTGIETER S , PINTO A , SIGUDU M , et al. Long-term spatial and temporal microbial community dynamics in a large-scale drinking water distribution system with multiple disinfectant regimes [J]. *Water Research* , 2018 , 139: 406–419. DOI: 10.1016/j.watres.2018.03.077.
- [43] ZHANG Y , OH S , LIU W T. Impact of drinking water treatment and distribution on the microbiome continuum: An ecological disturbance’s perspective [J]. *Environmental Microbiology* , 2017 , 19(8) : 3163–3174.
- [44] LI Q , YU S , LI L , et al. Microbial communities shaped by treatment processes in a drinking water treatment plant and their contribution and threat to drinking water safety [J]. *Front Microbiol* , 2017 , 8 (11) : 2465. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02465.
- [45] LIN W , YU Z , ZHANG H , et al. Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation[J]. *Water Research* , 2014 , 52(4) : 218–230.
- [46] QI W , LI W , ZHANG J , et al. Effect of biological activated carbon filter depth and backwashing process on transformation of biofilm community [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* , 2019 , 13(1) : 1–11.

(下 转 第 132 页)

- and bacterial communities) in drinking water distribution systems are conditioned by hydraulics and influence discolouration [J]. *Science of the Total Environment*, 2017(16): 571–580.
- [26] AMIN S A , GREEN D H , HART M C , et al. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009(40): 17071–17076.
- [27] KIM B H , RAMANAN R , CHO D H , et al. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2014 (10): 95–105.
-
- (上接第 11 页)
- [47] LIU G , ZHANG Y , KNIBBE W J , et al. Potential impacts of changing supply-water quality on drinking water distribution: A review [J]. *Water Research*, 2017 , 116: 135–148.
- [48] HONG W , SHELDON M , EDWARDS M A , et al. Effect of disinfectant , water age , and pipe materials on bacterial and eukaryotic community structure in drinking water biofilm [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014 , 48 (3): 1426–1435.
- [49] PREST E I , FREDERIK H , VAN L M C M , et al. Biological stability of drinking water: Controlling factors , methods , and challenges [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016 , 7(45): 1–24.
- [50] SUN H , SHI B , LYTLE D A , et al. Formation and release behavior of iron corrosion products under the influence of bacterial communities in a simulated water distribution system [J]. *Environ Science Process Impacts*, 2014 , 16(3): 576–585.
- [51] LIU G , ZHANG Y , MARK E V D , et al. Assessing the origin of bacteria in tap water and distribution system in an unchlorinated drinking water system by sourcetracker using microbial community fingerprints [J]. *Water Research*, 2018 , 138: 86–96.
- [52] HUANG K , 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.
- [53] LIU R , ZHU J , YU Z , et al. Molecular analysis of long-term biofilm formation on PVC and cast iron surfaces in drinking water distribution system [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014 , 26(4): 865–874.
- [54] 王薇,任红星,胡震超,等. 管材对供水管网生物膜微生物种群多样性的影响 [J]. *环境科学学报*, 2015 , 35(3): 699–704.
- [55] YU J , KIM D , LEE T. Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials [J]. *Water Science & Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 2010 , 61(1): 163–172.
- [56] INKINEN J , JAYAPRAKASH B , AHONEN M , et al. Bacterial community changes in copper and PEX drinking water pipeline biofilms under extra disinfection and magnetic water treatment [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018(2): 611–624.
- [57] WANG F , LI W Y , LI Y , et al. Molecular analysis of bacterial community in the tap water with different water ages of a drinking water distribution system [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2018 , 12(3): 6–6.
- [58] HWANG C , LING F , ANDERSEN G L , et al. Microbial community dynamics of an urban drinking water distribution system subjected to phases of chloramination and chlorination treatments [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012 , 78 (22): 7856–7865.
- [59] PERRIN Y , BOUCHON D , DELAFONT V , et al. Microbiome of drinking water: A full-scale spatio-temporal study to monitor water quality in the Paris distribution system [J]. *Water Research*, 2019 , 149: 375–385.
- [60] ROESELERS G , COOLEN J , PW V D W , et al. Microbial biogeography of drinking water: Patterns in phylogenetic diversity across space and time [J]. *Environmental Microbiology*, 2015 , 17(7): 2505–2514.
- [61] DOUTERLO I , SHARPE R , BOXALL J. Bacterial community dynamics during the early stages of biofilm formation in a chlorinated experimental drinking water distribution system: Implications for drinking water discolouration [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014(1): 286–301.
- [62] HOLINGER E P , ROSS K A , ROBERTSON C E , et al. Molecular analysis of point-of-use municipal drinking water microbiology [J]. *Water Research*, 2014 , 49: 225–235.
- [63] DOUTERLO I , SHARPE R L , BOXALL J B. Influence of hydraulic regimes on bacterial community structure and composition in an experimental drinking water distribution system [J]. *Water Research*, 2013 , 47(2): 503–516.
- [64] SHISHKIN A A , GIANNOUKOS G , KUCUKURAL A , et al. Simultaneous generation of many RNA-seq libraries in a single reaction [J]. *Nature Methods*, 2015 , 12: 323–327.
- [65] LEJZEROWICZ F , PAWLOWSKI J , ESLING P. Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015 , 43(5): 2513–2524.
- [66] SCHIRMER M , IJAZ U Z , D'AMORE R , et al. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015 , 43 (6): 37–52.
- [67] NELSON M C , MORRISON H G , BENJAMINO J , et al. Analysis , optimization and verification of Illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys [J]. *PloS One*, 2014 , 9 (4): e94249. DOI: 10.1371/journal.pone.0094249.