

牛山湖浮游生物群落 DNA 指纹结构与理化因子的关系*

吴利^{1,2}, 余育和^{1**}, 张堂林¹, 冯伟松¹, 颜庆云^{1,2}, 龚迎春^{1,2}, 宋晓红^{1,2}

(1: 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

(2: 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 对牛山湖 5 个站点的浮游生物群落 DNA 多态性进行了 RAPD 指纹和 PCR-DGGE 指纹分析, 并探讨了其与理化因子的关系。结果如下: 1) 从 40 条随机引物中筛选出 9 条引物, 共获得 93 条谱带, 多态率为 58%; 各站点所得谱带平均为 67 条, 其中 I 站最少, 为 61 条, V 站最多, 为 74 条; 2) PCR-DGGE 指纹图谱共含 102 条谱带, 其中原核生物 56 条, 真核生物 46 条, 谱带总数以 III 站、IV 站和 V 站较多, I 站和 II 站较少; 3) II 站的总磷、叶绿素、化学耗氧量、硬度及电导率最高; 各站点间溶解氧和 pH 差异较小。相似性聚类分析表明, 浮游生物群落 DNA 指纹将 5 个站点划分为两支, I 站和 II 站聚为一支, III 站、IV 站和 V 站聚为另一支, 理化因子将 I 站、III 站、IV 站和 V 站聚为一支, II 站单独聚为一支。研究表明牛山湖浮游生物群落 DNA 指纹结构与理化因子具有一定的相关性, 并且与环境主要限制因子总磷的含量是密切相关的。因此, 浮游生物群落级水平 DNA 分析能简便、准确、迅速地反映水质状况, 这方面资料的积累可以为建立一种基于分子生物学简便而灵敏的水环境评价体系提供科学依据。

关键词: 浮游生物; RAPD; PCR-DGGE; DNA 指纹; 理化因子; 牛山湖

Relationship between DNA fingerprinting structure of plankton community and physico-chemical factors in Lake Niushan

WU Li^{1,2}, YU Yuhe^{1**}, ZHANG Tanglin¹, FENG Weisong¹, YAN Qingyun^{1,2}, GONG Yingchun^{1,2} & SONG Xiaohong^{1,2}

(1: *Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P.R.China*)

(2: *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P.R.China*)

Abstract: Plankton are considered good indicators of water quality because they are highly sensitive to the environmental variation in their short life spans. However, traditional studies on plankton community constructure have depended on taxonomic identification which has historically been a difficult task. Recently, different fingerprinting techniques have been developed and applied successfully to analyze the community structure of bacterial and picoplankton. However, little is known to the whole plankton community. In this study, we analyze DNA polymorphism of plankton communities in five different sampling stations of Lake Niushan by RAPD and PCR-DGGE and explore the relationship between DNA fingerprinting structure of plankton communities and environmental physico-chemical factors. The results were: (i) 9 of 40 screened random primers used in the study amplified a total of 93 observable bands, 58 of which were polymorphic; the mean number of amplified bands at different sampling stations was 67, and station V had the maximum number (74) and station I had the minimum number (61); (ii) a total of 102 bands (56 of 16S rDNA bands and 46 of 18S rDNA bands) were detected by PCR-DGGE, station III, IV, and V had more bands, station I and II had few band; (iii) total phosphorus (TP), chlorophyll-a, chemical oxygen demanded (COD), hardness, and conductance rate at station II were the highest; dissolved oxygen (DO) and pH value were not obviously different among five stations. Based on physico-chemical factors,

* 国家自然科学基金项目(30570240, 30490232)和国家“973”计划(2002CB412308)联合资助。2007-05-16 收稿; 2007-08-22 收修改稿。吴利, 女, 1981 年生, 硕士研究生; E-mail: wuliliu@ihb.ac.cn.

** 通讯作者; E-mail: yhyu@ihb.ac.cn.

station I, III, IV, and V were grouped into a cluster, station II grouped into a single cluster. Based on RAPD markers and PCR-DGGE markers, five sampling stations can be grouped into two clusters: station I and II were grouped into a cluster, and station III, IV, and V were grouped into the other cluster. In conclusion, the DNA fingerprinting structure of plankton community was closely related to total phosphorus (TP). DNA based community level analysis is a fast, easy, accurate method to reflect the water quality, and such data accumulation will play an important role in constructing one easy and sensitive molecular system for water quality assessment.

Keywords: Plankton; RAPD; PCR-DGGE; DNA fingerprinting; physico-chemical factors; Lake Niushan

从生态学观点出发, 生物与环境的统一是生物与环境相互作用的结果, 水环境决定了生物种群或群落结构特征; 反之, 生物的个体、种群或群落的变化, 可以客观反映出水体质量的变化规律. 据上述原理, 生物应用于水体水质监测有效、科学, 且具有化学监测不可替代的作用^[1]. 浮游生物(Plankton)指能在水域中营自由漂流生活的生物, 它们在水体生态系统中的物质转化和能量流动等方面发挥着极其重要作用^[1-3]. 由于浮游生物个体小、结构简单、生活世代短等特点, 能够灵敏反映水体环境变化, 因此, 它们的群落结构与功能的变化直接或间接地反映着水质的状况及其发展趋势. 然而, 由于浮游生物形态简单, 缺乏明显的外部特征, 致使传统的形态鉴定技术已经不能满足人们对浮游生物的进一步认识. 与传统的分类方法相比, 分子方法可以直接对环境样品进行分析而不需经人工培养, 并可以同时多个样品甚至是历史样本进行快速的分析; 更为重要的是它便于进行标准化, 因此不同研究间具有很好的可比性. 余育和等^[4]探索了DNA指纹分析在群落级生命系统应用的可行性. 颜庆云等在此基础上对武汉东湖和洞庭湖浮游生物群落DNA指纹与理化因子之间的关系进行了分析^[5-7]. 本研究在前人研究基础上, 结合RAPD技术和PCR-DGGE技术揭示长江中下游典型草型湖泊牛山湖浮游生物群落DNA多态性、探索其群落结构并分析它们与环境理化因子的相关关系, 以期从分子水平阐释环境压力对浮游生物群落结构的影响.

1 材料与方法

1.1 样品采集

采样设在长江中下游草型湖泊牛山湖, 2006年11月1日在牛山湖设置5个站点(图1). 用25号(网孔64 μ m)浮游生物网捞取表层水样于50ml塑料瓶中, 水样充分混匀后取1.2ml转入1.5ml离心管中, 8000转/min离心10min, 弃上清并用灭菌双蒸水清洗以除去黏附在浮游生物体表面的水溶性物质和水样中的杂质.

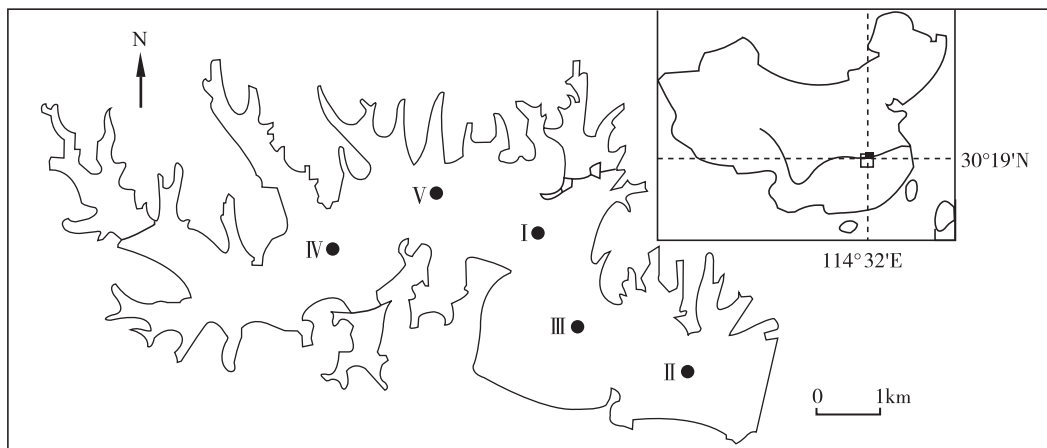


图1 牛山湖站点分布

Fig.1 Distribution of sampling stations in Lake Niushan

1.2 理化指标的测定

理化因子的测量参照《水环境分析方法标准工作手册》和《环境监测技术规范》规定的方法.

1.3 DNA 提取

向浮游生物样品中加入 400 μ l 裂解液(0.5%SDS; 10mMTris-Cl, pH=8.0; 0.1M EDTA, pH=8.0; 蛋白酶 K, 10mg/mL), 于 53 $^{\circ}$ C 水浴过夜裂解后离心(8000 转/min, 10min)并将上清转入一新的离心管. 用常规的苯酚: 氯仿法抽提 DNA, 然后用 70%冷乙醇清洗, 干燥后溶于 TE 备用.

1.4 RAPD 扩增

以 I 站 DNA 为模板并以灭菌双蒸水作为阴性对照, 以 Operon 公司的 OPM、OPG 两组共 40 条引物中筛选出扩增条带清晰、结果稳定且多态性明显的 OPM-3、OPM-11、OPM-13、OPM-14、OPM-15、OPG-2、OPMG-10、OPG-13、OPG-18 共 9 条引物, 并对 5 个站点 DNA 样品进行 RAPD 扩增. 反应参照 Williams 等^[8], 并以正交法($L_9(3^4)$)型对反应体系中 DNA、dNTP、 Mg^{2+} 、Taq 酶及引物含量进行筛选. 确定 25 μ l 反应体系为: 40ng DNA (各模板量基本保持一致), 2.5 μ l 10 \times PCR buffer, 2.0 μ l 25mM Mg^{2+} , 1.0 μ l 2mM dNTP, 0.8 μ l 20 μ M 引物, 1.5U Taq 酶, 15.7 μ l 灭菌双蒸水. 经过对循环参数的优化选定, 在 Perkin ElmerTM9600PCR 仪上进行以下循环: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10min 后进行 45 次循环, 每次循环包括 94 $^{\circ}$ C 40s, 36 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min, 反应终止于 4 $^{\circ}$ C. 采用 1.5%琼脂糖凝胶检验 PCR 扩增产物, 并取像于 UVP 凝胶成像系统. RAPD 扩增至少重复两次, 稳定性好、分离清晰的谱带用于最终的数据分析.

1.5 16SrRNA 和 18SrRNA 扩增

1.5.1 基因组 DNA 的 PCR 扩增 用于扩增原核生物 16SrRNA 基因的特异性引物对为 F357GC (5'-CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCCGCCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 R518(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')^[9]. 用于扩增真核生物 18SrRNA 基因的特异性引物对为 F1427GC(5'-CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCCGCCCTCTGTGATGCCCTTAGATG TTCTGGG-3')和R1616(5'-GCGGTGTGTACAAAGGGCAGGG-3')^[10]. PCR反应采用50 μ l的反应体系, 其组分为: 5.0 μ l 10 \times PCR buffer, 4.0 μ l 25mM Mg^{2+} , 2.0 μ l 2mM dNTP, 1.6 μ l 10 μ M上下游引物, 3.0U Taq酶, 模板 DNA 154ng(原核生物)/62ng(真核生物)左右, 最后加灭菌双蒸水至 50 μ l. 经过对循环参数的优化选定, 在 Perkin ElmerTM9600PCR 仪上进行 PCR 扩增反应. 16SrRNA PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 前 10 个循环为 94 $^{\circ}$ C 0.5min, 67-58 $^{\circ}$ C 0.5min 和 72 $^{\circ}$ C 1min (其中每个循环后复性温度下降 1 $^{\circ}$ C), 后 20 个循环为 94 $^{\circ}$ C 0.5min, 57 $^{\circ}$ C 0.5min 和 72 $^{\circ}$ C 1min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min. 18S rRNA PCR 反应: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 前 10 个循环为 94 $^{\circ}$ C 0.5min, 69-60 $^{\circ}$ C 0.5min 和 72 $^{\circ}$ C 1min (其中每个循环后复性温度下降 1 $^{\circ}$ C), 后 18 个循环为 94 $^{\circ}$ C 0.5min, 59 $^{\circ}$ C 0.5min 和 72 $^{\circ}$ C 1min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min. 在每一组 PCR 扩增过程中, 设立阴性对照, 阴性对照中以双蒸水代替模板 DNA, 其他组分全部相同.

1.5.2 PCR 扩增产物的检测 反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.5.3 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析 DGGE 所用仪器为 INGENYphorU-2 system (INGENY International BV, Leiden, The Netherlands). 用于分离 16S rDNA 片段和 18S rDNA 片段 DGGE 电泳所用的胶浓度为 9%(w/v) 聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:双丙烯酰胺=37.5:1), 其线性梯度凝胶浓度范围为 40% 到 60% (100% 的变性剂中含有 7M 的尿素和 40% [v/v] 的去离子甲酰胺), 变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增, 上样量为 20 μ l 的 PCR 产物. 运行条件是: 在 1 \times TAE (40 mM Tris, 40 mM 冰乙酸, 1.0 mM EDTA [pH7.6]) 电泳缓冲液中, 60 $^{\circ}$ C 电泳 16h. 电泳完毕后, 将凝胶在 1 \times TAE (1 \times SYBR Gold) 中染色 30min. 将染色后的凝胶用 UVP 凝胶影像分析系统 (UVP Inc. CA, USA) 分析, 观察每个样品的电泳条带并拍照.

1.6 数据处理

根据 DNA Marker DL 2000 的指示位置估计各扩增片段大小. 运用 LabWorksTM 软件扫描分析 RAPD 和 PCR-DGGE 扩增图谱, 分别以 1、0 代表条带的有、无并输入 XLSTAT-Pro 2006 软件进行聚类分析. 站点间理化因子的相似性聚类通过 XLSTAT-Pro 2006 软件完成.

2 结果

2.1 理化数据分析

本实验所检测理化指标结果如表 1 所示. II 站的总磷 (TP)、叶绿素 (Chlorophyll a)、化学耗氧量 (COD)、

硬度(Hardness)及电导率(Conductance rate)最高;各站点间溶氧(OD)和 pH 差异较小. 按 OECD1982 年的标准, 依据总磷(TP)的含量, II 站为富营养型水平, I 站、III 站、IV 站和 V 站为中营养型水平.

表 1 牛山湖各站点理化值

Tab.1 Physico-chemical factors of each sampling station in Lake Niushan

站点	叶绿素 ($\mu\text{g/L}$)	pH	溶氧(OD) (mg/L)	化学耗氧量 (COD) (mg/L)	硬度 (dH)	总磷(TP) (mg/L)	电导率 (ms/cm)
I	3.822	8.21	8.5	2.272	4.333	0.026	0.174
II	9.282	8.44	8.3	2.464	4.808	0.037	0.193
III	3.276	8.01	7.6	2.176	4.333	0.022	0.175
IV	3.276	8.07	9.6	2.464	4.273	0.022	0.165
V	1.638	8.52	9.6	2.272	4.155	0.019	0.170

2.2 RAPD 扩增

以筛选的 9 条随机引物对 DNA 进行扩增, 共得到 93 条长度在 250-2000bp 的谱带, 其中 58% 的条带为多态性带. 引物 OPM-3 扩增的条带最少, 为 8 条; 引物 OPM-14 扩增的条带最多, 为 14 条, 引物 OPM-11、OPM-13、OPM-15、OPG-2、OPG-10、OPG-13 以及 OPG-18 均扩增出 9-12 条清晰明亮的谱带(表 2). 站点 I-V 获得的谱带数分别为 61、62、71、67 和 74 条(表 3), 其中 V 站最多, 而 I 站最少, 平均为 67 条. 各引物检测到的谱带数、特有条带和共有条带如表 3 示. 就每个多态位点而言, 多态性条带对站点的区分度并不高, 即有很多条带同时存在于多个站点.

表 2 9 条随机引物及其 RAPD 扩增结果

Tab.2 Nine random primers and their RAPD amplified results

引物	碱基序列(5'至 3')	谱带数	扩增片段大小(bp)	谱带多态率
OPM-3	GGGGGATGAG	8	400-1700	50%
OPM-11	GTCCACTGTG	11	400-1700	91%
OPM-13	GGTGGTCAAG	11	250-1100	73%
OPM-14	AGGGTCGTTC	14	270-1800	71%
OPM-15	GACCTACCAC	12	300-1500	58%
OPG-2	GGCACTGAGG	9	300-2000	44%
OPG-10	AGGGCCGTCT	9	350-1100	44%
OPG-13	CTCTCCGCCA	10	350-1500	60%
OPG-18	GGCTCATGTG	9	350-1200	33%
总计	----	93	250-2000	58%

表 3 各站点样品 RAPD 扩增结果 (1 代表有条带, 0 代表无条带)

Tab.3 RAPD amplified results of each sample (1 stands for bands, 0 stands for no bands)

	OPM-3(8)	OPM-11(11)	OPM-13(11)	OPM-14(14)	OPM-15(12)	OPG-2(9)	OPG-10(9)	OPG-13(10)	OPG-18(9)	总计 ^{b)}
I	11111101	01011101110	01111001000	00001111111111	011101110011	000011111	011101110	00101010101	011111111	61
II	10111110	10101101111	11110110110	10001111110010	011101111010	010011111	011101100	0010111111	011101110	62
III	11011111	11110101110	11111101010	00111111010000	111100111001	111111111	011111110	1111111101	111111110	71
IV	11011111	00101111101	11111111001	00110111010100	111100111010	110111111	111111100	1110110101	111101110	67
V	11011110	10101010110	11111100011	1110111110100	111110111110	111111111	011111111	1111101011	111101111	74
总计 ^{a)}	54255543	32424424542	45554423132	21324555351321	355512554142	342355555	155535531	3352543525	355525552	

a)表示各谱带在5个采样点出现的次数; b)表示各采样点的谱带数.

2.3 PCR-DGGE分析

共得到102条扩增谱带, 其中原核生物56条, 真核生物46条(图2). 原核生物5个站点共得到33-47条扩增谱带, 真核生物共得到21-40条扩增谱带(表4). 原核生物多态性位点为52%, 仅出现在一个站点的谱带占总谱带的14%, 真核生物多态性位点为63%, 仅出现在一个站点的谱带占总谱带的30%.

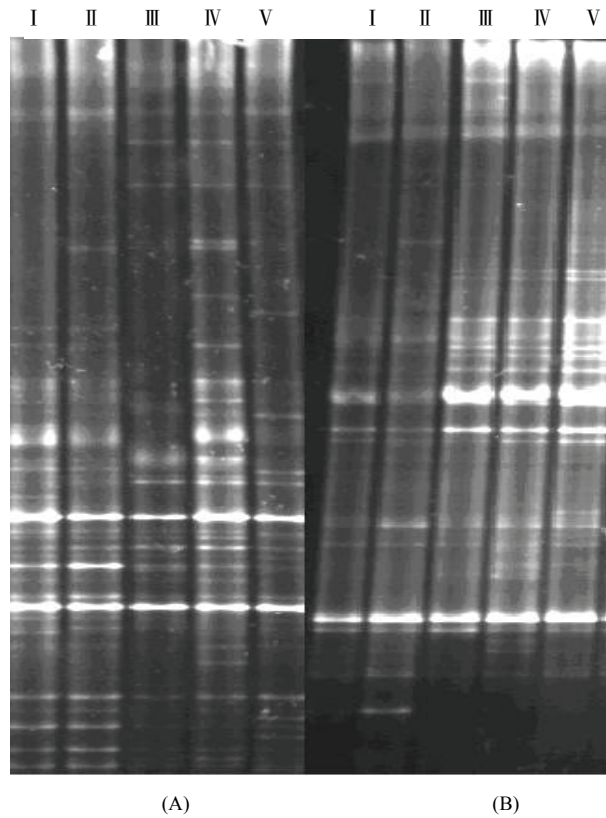


图2 原核生物群落 DNA(A)和真核生物群落 DNA (B)DGGE 分离图谱

Fig.2 DGGE profiles of prokaryotic community DNA (A) and eukaryotic community DNA (B)

表4 16S rDNA-DGGE与18S rDNA-DGGE扩增谱带

Tab.4 PCR-DGGE bands of the 16S rDNA and 18S rDNA

引物		I	II	III	IV	V	总带谱	特有带谱	共有带谱
F357GC	R518	41	43	33	47	40	56	8	27
F1427GC	R1616	22	21	32	30	40	46	14	17
总带谱		63	64	65	77	80	102	22	44

2.4 聚类分析

基于RAPD指纹和PCR-DGGE指纹分析的聚类结果表明5个站点可以分成2支: I 站和 II 站聚为一支, III 站、IV 站和 V 站聚为另一支(图3A和B); 对5个站点的理化指标值进行聚类分析, 结果显示: I 站、III 站、IV 站和 V 站聚为一支, II 站单独聚为一支(图3C).

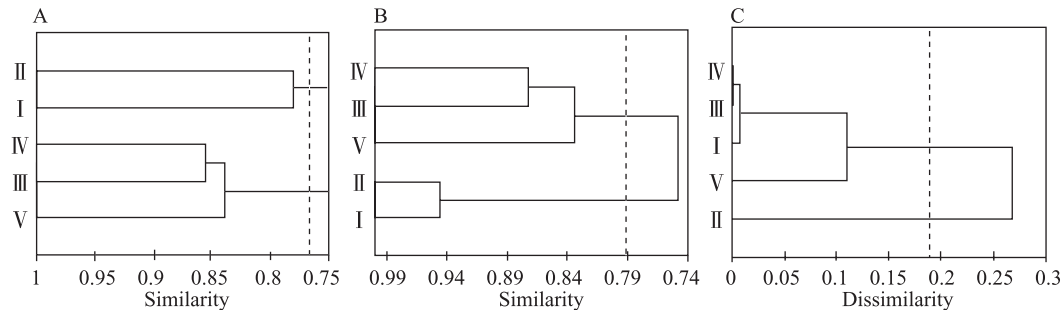


图3 牛山湖各站点浮游生物 DNA 指纹及理化因子的相似性聚类
(A: 基于 RAPD 标记; B: 基于 DGGE 标记; C: 基于理化因子)

Fig.3 The similarity clustering of the DNA fingerprinting of plankton community and physico-chemical factors from different sampling stations in Lake Niushan

3 讨论

随机引物扩增DNA 多态性指纹技术(RAPD)由于操作简便、实验成本低、且在模板DNA序列信息未知的情况下,通过较短的随机引物对整个群落进行描绘分析^[11]等独特的优点被广泛应用于遗传多样性的研究.变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)使用所有生物中保守的基因片段,能够高效、真实、稳定地反映生物群落遗传多样性和动态变化,现已被广泛用于自然环境中各种生物群落的遗传多样性研究^[12].然而,每种DNA 指纹技术都有其各自特殊的限制性. RAPD指纹缺点表现在易受外界因素影响,重复性较差; PCR-DGGE指纹局限性主要表现在不能对整个基因组进行扫描,只能分离较小的片段(500bp以下),较长的片段分离率下降.为减少RAPD指纹技术和PCR-DGGE指纹技术的限制性,充分发挥其优点,本文结合此两种指纹技术揭示了典型草型湖泊牛山湖浮游生物群落DNA 指纹结构,并进而探索了其与环境理化因子之间的关系.

为提高 RAPD 技术稳定性,本研究对 DNA、dNTP、Mg²⁺、Taq 酶、引物含量及 PCR 循环参数进行了优化,筛选出稳定性好、多态性高、条带清晰的 9 条引物,并进行两次以上重复扩增. RAPD 指纹和 PCR-DGGE 指纹图谱聚类结果吻合,并且均显示出 5 个站点间浮游生物群落遗传结构存在明显的表现差异.实验中获得的可分辨的谱带数均以 I 站和 II 站较少,而以 III 站、IV 站和 V 站较多,表明 III 站、IV 站和 V 站的浮游生物多样性高于 I 站和 II 站.理化因子的综合聚类与 DNA 指纹聚类均表明 II 站不同于 III 站、IV 站和 V 站,表明浮游生物群落 DNA 指纹结构与理化因子具有一定的相关性.颜庆云等^[5]发现洞庭湖浮游生物 DNA 指纹与泥沙含量是密切相关的.本研究中各站点浮游生物群落组成的差异可能归因于不同站点总磷含量的高低. II 站总磷的含量较高,水质处于富营养状态, III 站、IV 站和 V 站总磷的含量较低,水质处于中营养状态.一般认为,中等营养型湖泊中的生物种类较多,群落多样性较高,而在贫营养型或超富营养型湖泊,只能生存耐受性大的少数种类,群落结构简单,其多样性也低^[4].依据上述理论, II 站浮游生物多样性应低于其他站点,这与作者研究浮游生物群落 DNA 指纹结构与物种组成的关系(未发表)发现 II 站浮游生物种类较少, III 站、IV 站和 V 站种类较多的结果是一致的.磷是重要的生源要素,过量的磷促进浮游植物(包括有毒蓝藻)的生长而使水质恶化^[15].本研究 II 站总磷含量为五个站点中最高, I 站仅次 II 站,过量的磷促进第一优势种微囊藻 *Microcystis* sp.在 I 站和 II 站的大量发生,微囊藻细胞破裂后向水体中释放对浮游生物造成危害的藻毒素,从而降低了 I 站和 II 站浮游生物的物种多样性.

对于RAPD而言, DNA模板作为PCR扩增的一个主要制约因素,在其他条件一致的情况下,只有当DNA的浓度达到一定值时才能获得相应的扩增谱带,相对优势的种类在对引物和反应底物竞争中获胜^[13].对于PCR-DGGE而言,不同序列的DNA片断可能会迁移至同一个位置^[14].无论RAPD指纹技术还是PCR-DGGE指纹技术都可能在种的水平上低估了生物群落遗传结构的多样性.因此要想更加全面和深入

了解浮游生物群落DNA指纹结构与理化因子的关系, 需要结合多种DNA指纹技术从时间和空间跨度上进行长期的研究。

综上所述, 浮游生物群落DNA指纹结构与环境主要限制因子是密切相关的。浮游生物群落级水平DNA分析能简便、准确、迅速地反映水质状况, 这方面资料的积累可以为建立一种基于分子生物学简便而灵敏的水环境评价体系提供科学依据。

4 参考文献

- [1] 郭沛涌, 沈焕庭, 刘阿成等. 长江河口浮游动物的种类组成、群落结构及多样性. *生态学报*, 2003, **23**(5): 892-900.
- [2] 林秋奇, 胡 韧, 段舜山等. 广东省大中型供水水库营养现状及浮游生物响应. *生态学报*, 2003, **23**(6): 1101-1108.
- [3] 许木启, 曹 宏, 贾沁贤等. 青藏高原柴达木盆地尕斯库勒湖浮游生物群落多样性特征的初步研究. *生物多样性*, 2002, **10**(1): 38-43.
- [4] 余育和, 张文静, 颜庆云. DNA指纹分析技术在群落级生命系统应用的可能性. *水生生物学报*, 2004, **28**(5): 457-463.
- [5] 颜庆云, 余育和, 冯伟松等. 洞庭湖浮游生物群落DNA指纹与理化因子的关系. *水生生物学报*, 2005, **29**(6): 601-605.
- [6] 颜庆云, 余育和, 张文静. 武汉东湖浮游生物群落DNA多态性与富营养化. *生态学报*, 2005, **25**(3): 461-465.
- [7] Yan QY, Yu YH, Feng WS *et al.* Genetic diversity of plankton community as depicted by PCR-DGGE fingerprinting and its relation to morphological composition and environmental factors in Lake Donghu. *Microb Ecol*, 2007, **54**(2): 290-297.
- [8] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 1990, **18**(22): 6531-6535.
- [9] Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNA. *Appl Environ Microb*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [10] Van Hannen EJ, Van Agterveld MP, Gons HJ *et al.* Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Phycol*, 1998, **34**(2): 206-213.
- [11] Franklin RB, Taylor DR, Mills AL. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *J Microbiol Methods*, 1999, **35**(3): 225-235.
- [12] 马悦欣, Holmstrom C, Webb J *et al.* 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物生态学中的应用. *生态学报*, 2003, **23**(8): 1561-1569.
- [13] Boon N, Marle C, Top EM *et al.* Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. *Appl Microbiol Biotech*, 2000, **53**(6): 742-747.
- [14] Vallaeyts T, Topp E, Muyzer G *et al.* Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microb Ecol*, 1997, **24**(3): 279-285.
- [15] 谢 平. 浅水湖泊内源磷负荷季节变化的生物驱动机制. *中国科学(D辑)*, 2005, **5**(增刊II): 11-23.