

松花湖水体中不同空间分布的细菌群落结构分析

李玉华¹, 许其功², 赵越¹, 李强¹, 魏自民^{1*}, 赵昕宇¹

(1.东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 2.中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012)

摘要:为了研究松花湖水体中微生物群落结构的多样性,采用聚合酶链式反应-变性凝胶梯度电泳(PCR-DGGE)对水体垂向空间分布的细菌进行了多样性分析。把每一个条带看作一个分类操作单位(OUT),表明水体细菌的微生物群落结构随着湖泊深度变化呈现显著的差异,其中S1和S2位点微生物群落单元(OUT)数高于其他位点。UPGMA聚类分析DGGE指纹图谱表明,水体不同深度的微生物群落结构之间相似性和动态性存在明显差异。微生物群落单元数与环境因子之间响应关系的典型对应分析(CCA)证实,水深(SH)、pH、温度(Wt)和溶解氧(DO)等环境因子与微生物群落多样性指标之间存在显著相关性,水深(SH)、温度(Wt)的变化是微生物群落结构变化的主要原因。

关键词:微生物多样性;PCR-DGGE;环境因子;空间分布

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)04-0764-07 doi:10.11654/jaes.2013.04.016

Bacterial Community Structure in Different Spatial Distribution of Songhua Lake

LI Yu-hua¹, XU Qi-gong², ZHAO Yue¹, LI Qiang¹, WEI Zi-min^{1*}, ZHAO Xin-yu¹

(1.College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2.State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: In order to study the diversity of microbial community structure in Songhua Lake, PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) technology is employed to study the bacterial community structure in the different spatial distribution. Each strip as a operational taxonomic unit (OUT), suggested that bacterial microbial communities with water depth change will have a significant difference, microbial community unit (OUT) numbers higher than other sites in S1 and S2. The Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) dendrogram of sample basis on DGGE fingerprints showed water microbial community diversity presents significant spatial difference, there have similar and dynamic in the different depths of water. Canonical correspondence analysis (CCA) was applied to further investigate the relationships between OTU composition and the environmental factors. The first two CCA ordination axes suggested that the bacterial community composition was primarily correlated with the variables of depth of water (SH), temperature (Wt), and dissolved oxygen (DO). The change of depth of water (SH) and temperature (Wt) were the main reason for the change of microbial community structure.

Keywords: microbial diversity; PCR-DGGE; environmental factors; spatial distribution

松花湖位于东经 126°41'~127°18', 北纬 42°58'~43°48', 地处吉林省东部山地的西侧, 松花江上游, 该湖系丰满大坝建成后形成的深水湖泊。松花湖属于温带大陆性季风气候, 其基本特点是四季分明, 冬季漫长而严寒。湖区由于受水面宽、山多林密等条件的影

响, 其气候兼具湖泊、谷地和森林气候的复合特征, 该湖除发电外, 还发挥了防洪、农田灌溉、城市与工业用水、航运、养鱼、旅游等多种功能^[1]。

水体浮游细菌是湖泊食物网的重要组成部分, 对淡水水体生态系统的物质循环和能量流动起着重要的作用, 它们主要参与有机物的分解并把有机物矿化成能被植物用来进行初级生产的无机化合物^[2-3]。综合以往报道, 我国湖泊微生物多样性的研究主要集中在南方地区(以太湖等湖泊为主), 且大多数湖泊属于浅水湖泊, 对深水湖泊特别是东北地区湖泊微生物多样

收稿日期: 2012-07-18

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07106-001)

作者简介: 李玉华(1985—), 男, 山东费县人。

E-mail: yuhuaxiaohuag@126.com

* 责任作者: 魏自民 E-mail: weizm691120@163.com

性研究较少^[4-6]。由于我国湖泊流域自然地理区域分异特征明显,不同区域湖泊营养物、生物学特性对其富营养化水平的影响也存在一定的差异性,基于此,以东北典型湖泊松花湖作为研究对象。松花湖属于大型深水湖泊,平均水深 35 m,平均温度 13 ℃。水体深度和温度变化对微生物群落结构垂直分布有重要影响,本次采样季节为秋季,并对水体 pH、溶解氧、BOD₅ 等理化指标进行测定,分析水体中微生物群落结构的时空分布规律,阐明其与水质参数的互动关系,为深水湖泊微生物多样性研究提供参考。

传统微生物培养和分离方法所能鉴定的微生物只占环境微生物总数的 0.1%~10%,严重限制了微生物生态学和环境学科的研究,而利用分子生物学聚合酶链式反应——变性凝胶梯度电泳(PCR-DGGE),基于它在区别微生物不同种群及其多样性特点上的优势,能够很好地分析微生物的多样性及其变化,克服了传统微生物培养方法研究微生物多样性的缺陷,可获取更加丰富的微生物多样性信息^[7-8]。

1 材料与方法

1.1 样品的采集和预处理

样品于 2011 年 10 月 25 日采自吉林松花湖,沿途由上游到下游分为 7 个位点,其 GPS 定位数据和位点分布采样点位如图 1 所示,采样点经纬度如表 1 所示。每个采样点分上、中、下 3 个垂直层次,上层水样采集深度为 0.5 m、中层 16 m、下层 30 m 左右(下层深度不同位点略有变化,详见表 2),然后用 0.22 μm 滤膜过滤后储存在-80 ℃的冰箱中。

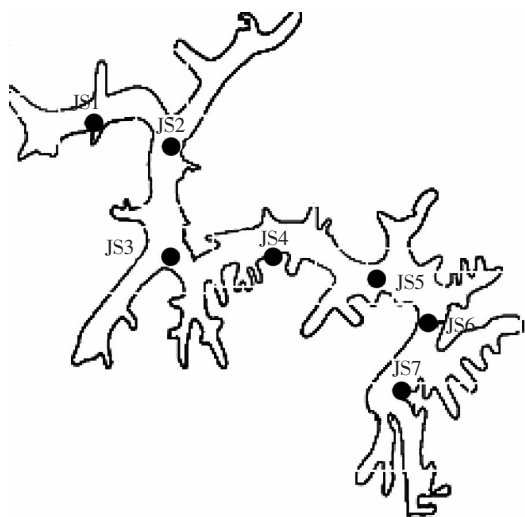


图 1 采样点位图

Figure 1 Map showing sampling sites of lakes

表 1 采样点的经纬度

Table 1 The longitude and latitude of sampling sites

点位	东经	北纬
JS1	126°42'20.2"	43°41'53.1"
JS2	126°46'32.3"	43°42'00.0"
JS3	126°47'40.5"	43°39'27.0"
JS4	126°51'47.3"	43°39'04.1"
JS5	126°54'56.2"	43°38'56.0"
JS6	126°55'36.4"	43°37'54.8"
JS7	126°55'00.0"	43°36'29.0"

1.2 理化指标测定

对水样的温度(Wt)、pH、溶解氧(DO)、叶绿素 a (Chla)、BOD₅ 和水深(SH)7 个水质参数进行测定。测定法参照《水和废水监测分析方法》^[9]。

1.3 DNA 提取

参照 ZHOU J Z 等^[10]方法并作了改进,将滤膜剪碎于 5 mL 的灭菌管中,加入 0.8 mL DNA 提取液和 20 μL 的蛋白酶 K。放摇床上 220 r·min⁻¹ 振荡 20 min,37 ℃水浴 30 min。水浴后加入 20%的 SDS 溶液 480 μL,65 ℃水浴 2 h。6500 r·min⁻¹ 离心 5 min,将上清液转移至新的离心管中,用等体积的碱性饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。将上清液转移至干净离心管,加等体积氯仿/异戊醇(24:1)。转移上清液至 1.5 mL 离心管,加预冷的无水乙醇并于-20 ℃放置 1 h 以上。4 ℃、14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 弃上清液,70%预冷的乙醇漂洗两次。弃上清液后加 80 μL 的 TE 溶解。取 5 μL 的 DNA 粗提溶液进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测,剩余样品于-20 ℃保存。

1.4 基因组 DNA 的 PCR 扩增和变性凝胶梯度电泳(DGGE)

将提取后的基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板,采用大多数细菌的 16S rDNA V3 区特异性序列 341f/534r 进行扩增^[11-12],其上游引物 341f(CCTACGGAG GCAGCAG)、下游引物 534r(ATTACCGCGGCTGCTGG)由上海生工合成,其中正向引物 5'端连接有 GC 夹板(CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGCGGGGGGCAC GGGGGG)。PCR 反应体系为^[13]:10 mmol·L⁻¹ 正反向引物各 1 μL,10×Taq Buffer 5 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTP 溶液 1 μL,25 mmol·L⁻¹ 的 MgCl₂ 4 μL,2.5 U·L⁻¹ 的 TaqDNA 聚合酶 0.5 μL,模板 DNA 2 μL,无菌去离子水补足至 50 μL。扩增条件:采用降落式(Touchdown)PCR,94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1 min,63 ℃退火

30 s,每个循环降 1 ℃,经过 10 个循环后,退火温度降至 53 ℃,72 ℃延伸 1 min,94 ℃变性 1 min,53 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,25 个循环,72 ℃终延伸 10 min,最后 4 ℃保温。PCR 扩增产物采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

DGGE 条件参考 Ferrism 等^[14]的实验并进行了改进,采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 产物进行电泳分离,DGGE 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性梯度 35%~60%,电泳缓冲液为 1×TAE,电压 100 V,60 ℃条件下电泳 10 h,电泳结束后用 SYBR Green I (1:10 000)染色 30 min,用 UVP 凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.5 数据分析

1.5.1 DGGE 电泳图谱分析

使用 Quantity oneV4.5 (美国 Bio-Rad) 软件对 DGGE 电泳图谱进行分析,将 DGGE 图谱中包含的信息进行量化处理,以二进制的格式输出。再进行 UPGMA 聚类分析不同样品间细菌群落结构的相似性^[15]。DGGE 图谱中每一条带可以看作是一个操作分类单位(Operational taxonomic unit,OTU),条带数可以反映微生物的种类数,条带数越多表明生物多样性越

丰富,条带的亮度则反映微生物的丰度,条带越亮,表示该种属微生物的数量越多,所以根据每条泳道内的 DGGE 条带数目和条带的峰高,用香浓-维纳指数(Shannon-Wiener index)来计算细菌物种多样性^[16],其计算原理是把每一个单独的条带看作一个单独菌群,并且该条带的强度看作该菌群的丰富度。

$$H=-\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i, p_i=N_i/N$$

式中: P_i 为第 i 条带灰度占该样品总灰度的比率, H 为样品中微生物的香浓-维纳指数, S 为丰富度, N 为样品条带总强度。

1.5.2 微生物多样性与环境因子的相关性分析

运用生物统计学软件 Canoco for windows (Version 4.5) 对 DGGE 图谱量化后的数据进行典型对应分析(CCA),研究各水样中微生物多样性与其理化指标的相关性,水样的理化指标进行标准化处理。

2 结果与讨论

2.1 采样点水环境状况

采样从下游到上游共布设 7 个位点,每个位点分 3 个层次取水样。结果如表 2 所示,取样点平均水深

表 2 各采样点水质参数
Table 2 Mean values of water quality parameters

点位	pH	BOD ₅ /mg·L ⁻¹	Wt/℃	DO/mg·L ⁻¹	水深 SH/m	Chla/mg·L ⁻¹
S1 上	8.21	1.84	14.9	6.71	0.5	5.71
S1 中	8.04	1.48	13.4	6.20	16	5.21
S1 下	7.87	1.89	12.0	6.66	32	4.89
S2 上	7.88	1.79	15.0	6.71	0.5	4.75
S2 中	7.78	1.59	14.1	6.40	16	4.70
S2 下	7.73	1.23	12.6	6.66	30	4.31
S3 上	7.84	1.95	14.7	7.07	0.5	2.93
S3 中	7.92	2.15	13.8	7.12	16	4.30
S3 下	7.83	1.51	12.2	6.68	30	3.48
S4 上	7.80	1.95	14.4	7.07	0.5	5.60
S4 中	7.92	1.89	13.4	6.91	16	5.34
S4 下	7.96	2.25	12.5	7.07	35	5.02
S5 上	7.82	1.84	14.5	6.91	0.5	3.69
S5 中	7.85	1.13	13.9	6.76	16	2.08
S5 下	7.89	2.05	12.7	7.01	28	2.11
S6 上	7.88	2.15	14.3	7.22	0.5	2.81
S6 中	7.95	2.05	12.9	7.17	16	2.48
S6 下	8.12	2.00	12.6	6.91	26	2.31
S7 上	7.88	2.10	14.5	7.01	0.5	2.46
S7 中	7.88	2.05	13.1	6.86	16	2.28
S7 下	7.65	1.84	12.6	6.66	29	1.88

35 m, 温度 13 ℃, 最深处位于 1 号点(丰满大坝附近), 水深为 75 m。随着水体深度的增加, 水中的 W_t 和 DO 呈下降趋势, pH 变化略成碱性, S3、S4、S5 和 S6 的 pH 增加, 因为温度降低, 由水电离出的氢离子和氢氧根离子的浓度都会降低, 造成 pH 升高, 而 S1 和 S2 的 pH 稍微下降, 但是变化不大, 可能是该位点地处下游, 水体流动慢, 与沉积物中的各种物质释放有关。表层光照时间长, 有利于浮游植物的生长, 叶绿素 a 含量高, 叶绿素 a 在不同位点具有差异性, 松花湖下游含量要高于上游, 最高和最低含量相差 2.5 倍, 主要是因为上游水体流动较快, 不利于浮游植物生长造成的。

2.2 DGGE 指纹图谱分析

DGGE 电泳结果表明(图 2), 松花湖水体中微生物丰富度非常高, 不同位点垂向空间微生物多样性变化较大。根据 DGGE 能够将长度相同但序列不同的 DNA 分开的原理, 把每一个条带看作一个分类操作单位(OUT), 可以看出 DGGE 带图在条带数量、位置以及灰度上存在较大差异。松花湖中优势菌落达到 18 种以上: 条带 1 在中上层出现频率较高, 仅下层水样 S1 下和 S7 下两个位点未出现; 条带 2、3、4、7 主要出现在 S2、S3、S4、S5 等位点, 而条带 12 仅在 S2 中属于优势菌群; 条带 4 出现在 S3 上、S4 上、S5 上、S3 中、S4 中、S5 下和 S6 下; 条带 11、14、17、18 仅在个别位点出现。以上结果表明, 松花湖不同空间水体含有不同的优势菌群, 其中 S1 和 S2 位点微生物群落单元(OUT)数高于其他位点, 因为其位于松花湖的下游, 人口密度相对较大, 还有水体流动性的原因, 造成各种营养盐下游要高于上游。Aaike Dewever 等^[17]对 Tangadyika 深水湖泊细菌群落结构的水平变化情况研究结果表明, 水平方向上细菌群落多样性的变化与水体的营养水平和浮游植物生物量存在明显关系。松花湖平均每个位点至少有 15 个条带、5 个优势菌群, 上层菌落少于中下层, 湖泊细菌的微生物多样性随着湖泊深度的变化会发生显著的差异, 随着深度的增加, 条带数目呈增加趋势, 有的条带消失, 也有新条带出现。本文结论与 Shaheen B. Humayoun 等^[18]研究结果相似, 不同深度的湖泊微生物多样性, 下层水样比上层水样高。一般来说, 下层水样的细菌微生物多样性更为丰富, 这可能是由于湖底缺氧、低温所造成的^[19]。

通过 UPGMA 算法对 21 个水样进行了聚类分析(图 3), 松花湖水体 7 个点位的上、中、下 3 层细菌 DGGE 条带种类和分布表现出了明显的差异。利用聚

类分析可以将 21 个水样分成 7 个族群, 其中 S4 中和 S4 下的细菌群落相似性为 79%, 两者与 S4 上的相似性为 73%; S6 上和 S6 中的细菌群落相似性为 60%, S6 下与 S3 下属于同一族群; 而 S7 位点 3 个层次微生物群落分布在不同的族群, 其他点位与其类似, 说明不同深度的微生物群落结构之间相似性和动态性存在差异。这是因为松花湖属于大型深水湖泊, 下游有丰满大坝, 水体交换慢, 且采样季节为秋季, 降雨量少, 所以在水体流速很小的情况下, 水体环境条件在一段时间内的相对稳定(利于小生境的形成)对形成特定的细菌群落是很有利的, 即营养水平的差异等造成了不同位点细菌群落结构的差异^[20]。

通过对图 4 香浓-维纳指数(Shannon-Wiener index)的分析发现, 在同一位点微生物条带数随深度增加而增加, 其中大部分以下层水样香浓指数最高, 且以 S1 下香浓指数 2.37 和 S2 下香浓指数 2.47 为最高, 这与 DGGE 图谱分析结果相同。仅在个别位点(如 S6 下和 S7 下的香浓指数分别为 2.03 和 1.87)要低于中层和上层水样, 但并不能说明这两个位点菌落数要比上层低。这是因为 Shannon-Wiener index 综合了环境中物种数量的丰富度和各物种的相对比例, 其不仅与电泳条带数有关, 还与条带的灰度强弱以及条带的分布有关^[21]。

2.3 水体中微生物多样性与环境因子响应关系

松花湖水体微生物种群、水质数据典型对应分析

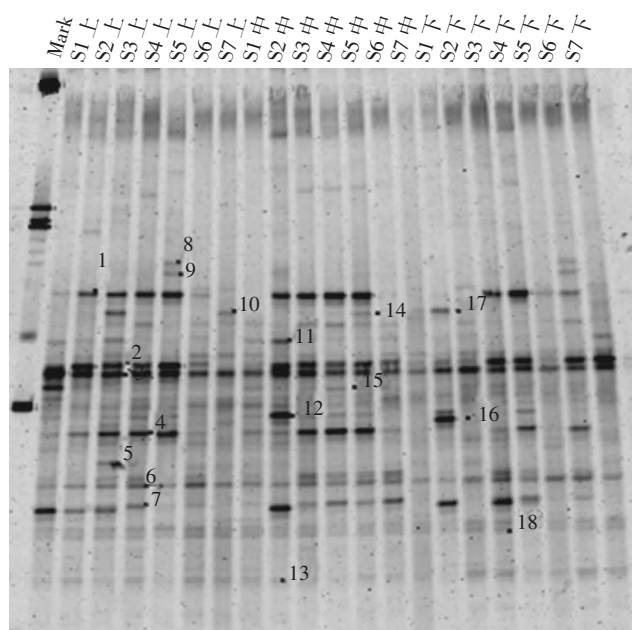


图 2 松花湖水体细菌 DGGE 凝胶电泳图像
Figure 2 DGGE profile of bacteria produced from different sample in Songhua Lake

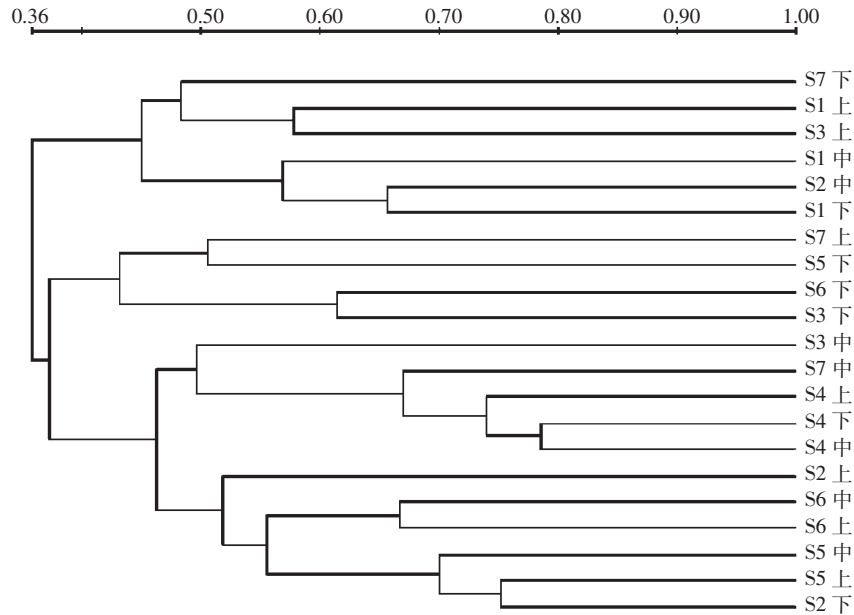


图 3 细菌 DGGE 图谱的聚类分析图

Figure 3 Clustering analysis for DGGE 21 waters in Songhua Lake

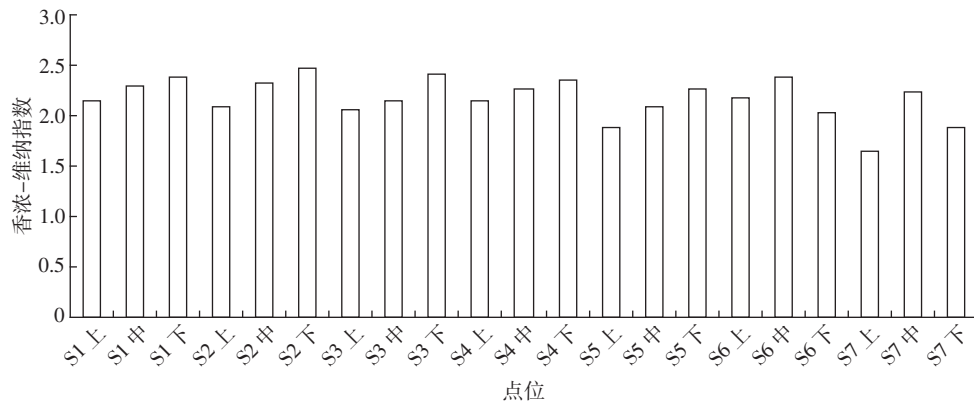


图 4 水样中微生物群落的 Shannon-Wiener index 指数

Figure 4 Shannon-Wiener index of microbiol water samples of lake Songhua Lake

(CCA)表明(表 3),微生物种群与环境因子之间具有较高的相关性。表 3 中每个轴所对应的特征值说明其能够解释微生物种群分布的能力,数值越大说明其越能解释菌群分布^[22],第一排序轴解释了样本中 31.7% 的变异,第二、三排序轴分别解释了 18.5% 和 12.0% 的变异,前 4 个排序轴合并解释了 73.4% 的样本总变异,说明各位点物种的变异率是相当高的,不同位点间的物种群落变化较大。第一、二排序轴的种-环境相关系数分别为 92.9% 和 91.2%,说明水样中微生物群落结构与环境因子间存在较强的关联。前 4 个排序轴-环境累计百分率也高达 73.2%。

DGGE 图谱的典型对应分析结果如图 5 所示。样本与环境因子可以在该图中直接体现出来,可直观

地看出群落分布和环境变量之间存在的关系,图中箭头所处的象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性,箭头连线间的夹角表示环境因子之间的相关性大小。结果表明 $Wt(r=0.348\ 0)$ 、 $pH(r=0.068\ 0)$ 、 $DO(r=0.027\ 3)$ 与第一排序轴呈正相关, $BOD_5(r=-0.249\ 7)$ 、 $SH(r=-0.308\ 7)$ 与第一排序轴呈负相关, $Wt(r=0.138\ 5)$ 、 $DO(r=0.163\ 5)$ 与第二排序轴呈正相关,其他指标呈负相关。因此对本次所取的不同空间 21 个样品中的所选环境指标来说,在随深度(SH)的变化过程中菌落组成与环境因子有明显的关联。深度对微生物群落关联度最大,其次是 Wt 、 pH 和 DO 。

松花湖是处于温带地区的大型深水湖,这样的湖称为“双循环湖”,由于变温层的形成,一年之内

表 3 典型对应分析结果

Table 3 Summary of the result of Canonical Correspondence Analysis

排序轴 Axes	AX1	AX2	AX3	AX4
特征值 Eigenvalues	0.317	0.185	0.120	0.112
种-环境相关系数 Species-environment correlation	0.929	0.912	0.907	0.802
种累积百分比变化率 Cumulative percentage variance of species/%	31.7	50.2	62.2	73.4
种-环境累积百分比变化率 Cumulative percentage variance of species- environment/%	26.6	45.3	58.0	73.2

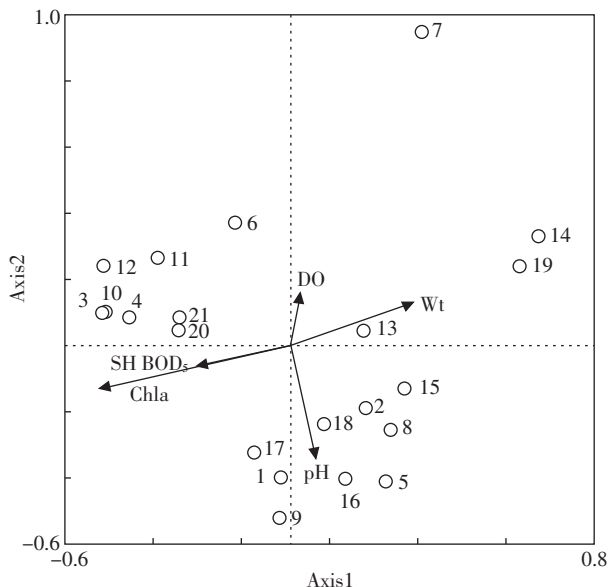


图 5 环境变量与 DGGE 揭示的物种区域多样性的 CCA 分析

Figure 5 Canonical correspondence analysis biplot of species regional differences revealed by DGGE fingerprints constrained to environmental variables

根据水温的变化,在冬季前后出现两次全层混合。湖泊的水温状况及其分层现象,是引起湖水各种理化过程和动力现象的主要因素,对生物的新陈代谢和物质分解起着重要的作用,是水体生态系统的重要环境因子之一^[23]。由于风力的作用,水体表面发生混合,而下层则相对保持着原有的温度分布状况,在上、下层之间产生温度的急剧变化,出现不连续面,产生跃温层,使表层水沉落下来的浮游生物残骸、有机碎屑等进入并大量滞留跃温层。本次采样下层水样位于跃温层,从而导致下层的微生物菌落数最高。王霞等^[23]在研究松花湖跃温层对松花湖营养水平影响时发现,跃温层随着季节的变化发生变化,从春夏到秋冬,变温层随水体深度增加而加深,到秋季跃温层位置在 29~37 m,该位置是本次采样的下层位点。王晓丹等^[24]研究密云水库不同季节细菌群落多样性时发现温度对微生物的群落结构影

响较大。

BOD₅ 和叶绿素 a 与第一、二排序轴关联度最小,这两个指标在排序轴上呈负相关性,即与微生物群落相关性小,这两个指标主要受深度的影响,BOD₅ 和叶绿素 a 均呈下降趋势,表层光照时间长,有利于浮游植物的生长,叶绿素含量高,使其对营养物质消耗,从而使表层的细菌菌落要少。随着深度的增加,光照不足等造成 BOD₅ 和叶绿素 a (Chla) 含量下降,但由于深度增加营养物质更加丰富,从而微生物群落也明显增加,从而造成微生物群落的空间差异性。

3 结论

(1)通过 PCR-DGGE 图谱聚类分析和香浓-维纳指数发现松花湖水体中细菌群落多样性不同位点,其细菌群落的丰富度均较高,各个位点的特征性条带较多,从而降低了位点之间的相似性指数。水体中微生物群落结构显示了明显的水平方向分布多样性差异,松花湖下游位点的细菌多样性要高于上游。随着深度增加微生物群落呈增加趋势,由于跃温层的原因导致松花湖的下层水样菌落数要稍高于中层水样,各位点垂向分布的微生物群落结构之间相似性和动态性存在明显差异。

(2)通过典型对应分析(CCA)发现微生物群落与水深(SH)、pH、温度(Wt)和溶解氧(DO)呈显著相关性,对微生物群落构成起主要作用,水深和温度的变化是影响细菌群落结构的最主要因素,深度的变化造成其他指标的变化,从而对微生物群落结构产生重要影响,因此微生物多样性是环境、物理、化学和生物等多方面共同作用的结果。

本文主要探讨了水体深度和温度对微生物群落的影响,环境因子包含很多指标,仅利用 DGGE 技术研究微生物群落与环境因子的关系有一定局限性,随着分子生物学的发展,采用其他方法与其相结合可更加丰富湖泊微生物多样性信息,为湖泊生态系统提供支持。

参考文献:

- [1] 施云芬, 刘月华, 李英赞. 松花湖富营养化现状调查与评价[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(11): 4669-4671.
SHI Yun-fen, LIU Yue-hua, LI Ying-zan. Investigation and assessment of eutrophication of Songhua Lake [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(11): 4669-4671.
- [2] Christian Winter, Marie-Emmanuelle Kerros, Markus G. Seasonal and depth-related dynamics of prokaryotes and viruses in surface and deep waters of the northwestern Mediterranean Sea[J]. *Deep-Sea Research I*, 2009, 56(11): 1972-1982.
- [3] 宣淮翔, 安树青, 孙庆业. 太湖不同湖区水生真菌多样性[J]. 湖泊科学, 2011, 23(3): 469-478.
XUAN Huai-xiang, AN Shu-qing, SUN Qing-ye. Diversity of aquatic fungi indifferent areas of Lake Taihu[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2011, 23(3): 469-478.
- [4] 武婷婷, 生吉萍, 申琳. 微生物分子生态学技术在湖泊生物多样性研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(3): 62-65.
WU Ting-ting, SHENG Ji-ping, SHEN Lin. Application of microbial molecular ecology techniques in microbial diversity of lake[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(3): 62-65.
- [5] YE Wen-jin, TAN Jing, LIU Xiang-long. Temporal variability of cyanobacterial populations in the water and sediment samples of Lake Taihu as determined by DGGE and real-time PCR[J]. *Harmful Algae*, 2011, 10(5): 472-479.
- [6] 梁英娟, 罗湘南, 付红霞. PCR-DGGE 技术在微生物生态学中的应用[J]. 生物学杂志, 2007, 24(6): 58-60.
LIANG Ying-juan, LUO Xiang-nan, FU Hong-xia. Application of PCR-DGGE in microbial ecology[J]. *Journal of Biology*, 2007, 24(6): 58-60.
- [7] Phung N T, Lee J, Kang K H, et al. Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233(1): 77-82.
- [8] Ham J H, Yoon C G, Jeon J H, et al. Feasibility of a constructed wetland and wastewater stabilisation pond system as a sewage reclamation system for agricultural reuse in a decentralised rural area[J]. *Water Science & Technology*, 2007, 55(1): 503-511.
- [9] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 第四版, 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 244-248.
State Environmental Protection Administration. Water and wastewater monitoring and analysis methods[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 244-248.
- [10] ZHOU Ji-zhong, Mary Ann Bruns, James M Tiedje. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [11] Tateo Fujii, Shoko Watanabe, Masako Horikoshi, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial communities in funazushi, fermented crucian carp with rice, during fermentation[J]. *Food Science and Technology*, 2011, 77(1): 151-157.
- [12] Dong Xiu-li, Gudigopuram B Reddy. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(4): 1175-1182.
- [13] Cora Carrigg, Olivia Rice, Siobhán Kavanagh, et al. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(4): 955-964.
- [14] Ferris M J, Mu yzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 340-346.
- [15] Yannarell A C, Triplett E W. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 227-239.
- [16] 党秋玲, 刘驰, 席北斗. 生活垃圾堆肥过程中细菌群落演替规律[J]. 环境科学研究, 2011, 24(2): 236-240.
DANG Qiu-ling, LIU Chi, XI Bei-dou. Dynamic succession law of bacterial communities during domestic waste composting[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 24(2): 236-240.
- [17] Aaike D W, Koenraad M, KaUeen V G. Bacterial community composition in Lake Tanganyika: Vertical and horizontal heterogeneity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5029-5037.
- [18] Shaheen B, Humayoun, Nasreen Bano, et al. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic Soda Lake in California [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 1030-1042.
- [19] 蔡林林, 周巧红, 王川. 南淝河细菌群落结构的研究[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(3): 1-6.
CAI Lin-lin, ZHOU Qiao-hong, WANG Chuan. Bacterial community structure of Nanfei River[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 35(3): 1-6.
- [20] 龚世杰, 吴兰, 李思光. 湖泊微生物多样性研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(4): 54-55.
GONG Shi-jie, WU Lan, LI Si-guang. Studying on lake microbial diversity[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(4): 54-55.
- [21] 赵兴青, 杨柳燕, 尹大强. 不同空间位点沉积物理化性质与微生物多样性垂直分布规律[J]. 环境科学, 2008, 29(12): 3538-3542.
ZHAO Xing-qing, YANG Liu-yan, YIN Da-qiang. Vertical distribution of physicochemical characteristics and the microbial diversity in different spatial sediments samples in Lake Taihu[J]. *Environmental Sciences*, 2008, 29(12): 3538-3542.
- [22] YAN Qing-yun, YU Yu-he, FENG Wei-song, et al. Plankton community composition in the Three Gorges Reservoir region revealed by PCR-DGGE and its relationships with environmental factors[J]. *Journal of Environmental Science*, 2008, 20: 732-738.
- [23] 王霞, 吕宪国, 张学林. 松花湖富营养化现状及其影响因素分析[J]. 湿地科学, 2004, 2(4): 273-277.
WANG Xia, LÜ Xian-guo, ZHANG Xue-lin. Eutrophication aspect and effective factors analysis in Songhua Lake[J]. *Wetland Science*, 2004, 2(4): 273-277.
- [24] 王晓丹, 翟振华, 赵爽. 密云水库不同季节细菌群落多样性[J]. 生态学报, 2009, 29(7): 3924-3926.
WANG Xiao-dan, ZHAI Zhen-hua, ZHAO Shuang. The bacterial diversity in different seasons of Miyun Reservoir[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(7): 3924-3926.