

PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中 微生物群落结构多样性研究

赵兴青, 杨柳燕*, 陈 灿, 肖 琳, 蒋丽娟, 马 喆, 朱昊巍, 于振洋, 尹大强

(污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210093)

摘要: 采用 PCR-DGGE 分子指纹图谱技术比较南京市玄武湖、莫愁湖和太湖不同位置的表层沉积物微生物群落结构, 研究结果表明, 三湖泊沉积物微生物的 16S rDNA 的 PCR 扩增结果约为 626 bp, 为 16S rDNA V3~V5 区特异性片段。玄武湖和莫愁湖表层沉积物中大约有 20 种优势菌群, 且同一湖泊不同采样点 DGGE 图谱的差异性不大, 细菌群落结构具有较高的相似性, 而太湖样品 DGGE 条带的数目和位置表现出明显差异, 且不同采样点图谱的差异性较大。三湖泊除具有特征性的微生物种属外, 还分布约 5 个相同的细菌种群, 可能与沉积物的理化性质和水生植被的影响相关。对 DGGE 图谱中 7 条主带进行回收、扩增和测序, 结果显示其优势菌群具有不同的序列组成, 其中 5 个序列与 Genbank 中已登录的细菌种群的同源性 $\geq 99\%$, 2 个序列的同源性为 96% 和 93%, 其中 2 个相似的细菌类群目前尚未获得纯培养。

关键词: 沉积物; 微生物多样性; 变性梯度凝胶电泳 (DGGE); 16S rDNA; 序列测定

文章编号: 1000-0933(2006) 11-3610-07 **中图分类号:** Q938 **文献标识码:** A

Study on the microbial diversity in lake sediments by the method of PCR-DGGE

ZHAO Xing-Qing, YANG Liu-Yan*, CHEN Can, XIAO Lin, JIANG Li-Juan, MA Zhe, ZHU Hao-Wei, YU Zhen-Yang, YIN Da-Qiang (State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China). Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(11): 3610~3616.

Abstract: As a new technique for DNA fingerprinting, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) can be used for microbial diversity analysis in environmental samples. In this study, PCR-DGGE was applied to analyze the microbial communities in lake sediments. Sediment samples from seven locations in three lakes were collected and their genomic DNA was directly extracted. The DNA yield of sediments of Lake Xuanwu and Lake Mochou was high (10 μ g/g), while that of sediments in Lake Taihu was relatively low. After DNA purification, the 16S rRNA genes (V3 to V5 region) were amplified with two universal primers (F341GC and R907). These amplified DNA fragments were separated by parallel DGGE.

The DGGE profiles indicate different bands' patterns for different samples. There are five common bands in all lake sediment samples, which indicate that there are similarities among the populations of microorganisms that exist in all lake sediments. But, the specific bands in sediment samples indicate that the microbial communities in different lakes are different. The DGGE profiles of Lake Xuanwu and Lake Mochou are very similar and about twenty types of microorganisms are identified in the sediment samples of both lakes. These results suggest that the sediment samples of these two city lakes (Xuanwu, Mochou) have similar microbial communities. However, the DGGE profiles of sediment samples in Lake Taihu are significant different from these two lakes.

基金项目: 国家“973”资助项目(2002CB412307); 国家重大水环境专项资助项目(2002AA601011); 国家自然科学基金资助项目(40371102)

收稿日期: 2006-04-12; **修订日期:** 2006-07-12

作者简介: 赵兴青(1974~), 女, 江苏高邮人, 博士生, 主要从事环境微生物生态学。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yangly@nju.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by National “973” Project, China (No. 2002CB412307); National “863” Project, China (No. 2002AA601011); The National Natural Science Foundation of China (No. 40371102)

Received date: 2006-04-12; **Accepted date:** 2006-07-12

Biography: ZHAO Xing-Qing, Ph. D. candidate, mainly engaged in environmental microbial ecology.

Furthermore, the DGGE profiles of sediment samples in different locations in Lake Taihu are also very different, which suggests that the microbial communities in Lake Taihu are more diversified than those in Lake Xuanwu and Lake Mochou. The differences in microbial diversity may be caused by the different environmental conditions, such as redox potential, pH, and the concentrations of organic matters, etc.

Seven major bands of 16S rDNA genes fragments from DGGE profiles of sediment samples were further eluted from gel, reamplified and sequenced. The sequences of these fragments were compared with the database in GeneBank (NCBI). The results indicate that five sequences share 99 % ~ 100 % homology with known sequences (*Bacillus* and *Brevibacillus*, uncultured bacteria), while the other two sequences share 96 % ~ 93 % homology with known sequences (*Acinetobacter* and *Bacillus*).

These results indicate that the PCR-DGGE technique combined with sequences determination is a feasible and efficient method for microbial community analysis in sediment samples.

Key words: sediment; microbial diversity; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 16S ribosome DNA (16S rDNA); sequence

变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术最先由 Fischer 和 Lerman 提出并用于 DNA 突变检测,1993 年 Muzer 将该技术首次应用于微生物生态学研究,现在该技术在微生物群落多样性和种群动态监测中得到广泛使用^[1]。这种方法基于从样品中直接提取微生物群落的基因组 DNA,选择对大多数细菌和古生菌的 16S rDNA 基因都能有效扩增的引物对其进行 PCR 扩增,然后对 PCR 产物采用 DGGE 进行分离,最后通过鉴定得出自然环境中微生物群落多样性的信息。目前采用 PCR-DGGE 方法分析土壤或活性污泥中微生物多样性均有报道^[2~4],但对天然湖泊沉积物的细菌群落的多样性研究还未见报道。

在湖泊生态系统中,微生物对物质循环和能量流动发挥着巨大的作用,为了有效研究微生物的作用就必须对其群落进行分析,而采用传统的分离培养方法,不足以得到丰富的微生物多样性信息。本研究采用从玄武湖、莫愁湖和太湖沉积物中直接提取微生物总 DNA,然后通过 DGGE 指纹图谱来分析湖泊表层沉积物中微生物群落结构的差异性,结合条带回收、扩增、序列测定,从而了解不同湖泊和相同湖泊不同位点的微生物群落结构的多样性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 湖泊沉积物样品 于 2005 年 12 月份分别采集南京市玄武湖、莫愁湖和太湖的表层沉积物样品,采集后的样品立即冷藏带回实验室,于 - 20 °C 冰箱保存。7 个样品依次标记为:1 #、2 # (玄武湖不同位置两点), 3 #、4 # (莫愁湖不同位置两点), 5 # (太湖梅梁湾生态系统试验区内 N 31°30'306", E 120°13'370"), 6 # (太湖梅梁湾生态系统试验区外 N 31°30'181", E 120°125'66"), 7 # (太湖贡湖湾 N 31°23'767", E 120°19'471") (图 1)。

1.1.2 仪器及设备 台式冷冻离心机 5417R (德国 Eppendorf);超纯水 (Millipore);凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad);梯度 PCR 仪 (美国 Bio-Rad);基因突变检测仪 (美国 Bio-Rad);水平电泳仪 (美国 Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 的提取和测定 将 5 g 左右的沉积物样品加入 13.5 ml 提取缓冲液 (0.1 mol/L PBS (pH 8.0), 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris base (pH 8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1.0 % CTAB) 和 50 μl 蛋白酶 K (10 mg/L),

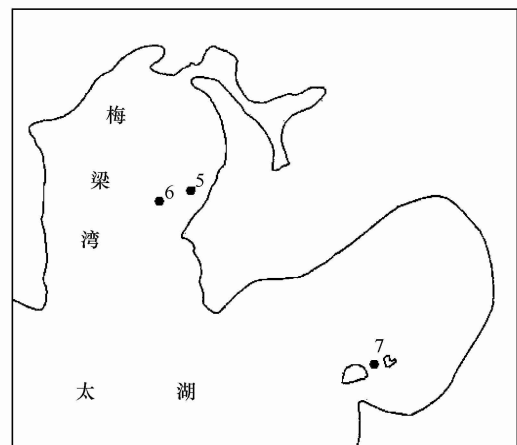


图 1 太湖沉积物样品采集点位置

Fig. 1 The sediment samples stations in Lake Taihu

GeneBank 数据库中用 BLAST 进行检索和同源性比较。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取和纯化

由于沉积物样品中化学组分复杂,能否成功提取目标 DNA 片段以及提取效率的高低直接影响后续 PCR-DGGE 分析。从 7 个沉积物样品中提取的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳检验(图 2),均得到一条清晰条带,通过 Quantity One 分析软件分析总 DNA 片段大小约为 23 kb 左右^[10],与细菌基因组的大小相同。因此,所提 DNA 属于比较完整的细菌基因组 DNA。由图 2 可见,玄武湖和莫愁湖沉积物 4 个样品的电泳条带的亮度强于太湖 3 个样品,说明在相同的实验条件下,不同湖泊沉积物中细菌基因组 DNA 的提取量是有差异的(表 1)。玄武湖和莫愁湖沉积物 4 个样品中 DNA 得率较高,为 10 μg/g 左右,而太湖 3 个样品的 DNA 得率相对较低。

由于沉积物样品中腐殖酸、黏土矿物以及其它离子的存在都会不同程度地影响沉积物中微生物样品的 DNA 的提取效率和 DNA 纯度,而少量的腐殖质等杂质常常是后续 PCR 扩增的抑制剂^[11~13],因此,在进行 PCR 反应之前,必须对粗提液进行纯化。虽然沉积物样品的基因组 DNA 经纯化后有较大损失,但纯化后的基因组 DNA 样品中腐殖质等 PCR 反应抑制剂的含量可明显降低,从而为后续的 PCR 反应提供了有利条件。

从 A_{260}/A_{280} (核酸/蛋白) 和 A_{260}/A_{230} (核酸/腐殖质)^[14] 的比值来看,不同地点沉积物样品中 DNA 纯度各不相同。玄武湖和莫愁湖样品的 A_{260}/A_{280} 比值较大,同时 A_{260}/A_{230} 比值也较大,说明玄武湖和莫愁湖 4 个样品中 DNA 含量相对较高,而腐殖质含量相对较低,具有较高的纯度。由此可见,采用相同方法得到样品 DNA 的提取量和纯度受湖泊沉积物的类型、湖泊理化性质和水体生物量丰富程度等影响。

2.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增

以等量的沉积物样品纯化后的基因组 DNA 为模板,采用对大多数细菌和古生菌的 16S rDNA 基因 V3~V5 区的通用引物 (GC-F₃₄₁/R₉₀₇),对每个湖泊沉积物样品的基因组 DNA 进行扩增,在引物 F₃₄₁ 的 5' 端添加 GC 发夹结构后,PCR 扩增产物将在 DGGE 电泳中部分解链,扩增出的不同微生物 DNA 就能被完全分离。三个湖泊沉积物的 7 个样品的基因组 DNA

的 PCR 扩增结果如图 3 所示,经 PCR 扩增后获得的三个湖泊沉积物样品微生物的 16S rDNA 基因片段大小约为 626 bp,是 16S rDNA V3~V5 区特异性片段。因此,采用 touchdown 降落式 PCR 扩增策略,提高了样品的扩增特异性。

2.3 沉积物中微生物群落结构多样性

对上述各个样品的扩增产物进行 DGGE 分析,可以分离出数目不等、位置各异的电泳条带,从而能够鉴别不同湖泊沉积物样品中微生物群落结构的差异和生物多样性。根据 DGGE 能分离长度相同而序列不同 DNA 的原理,每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或操作分类单位 (Operational taxonomic unit, OTU) 相对应,

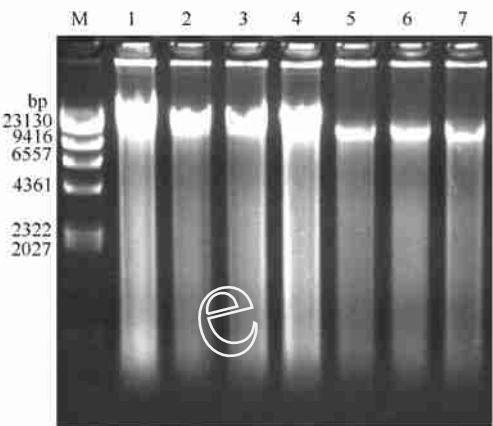


图 2 不同湖泊沉积物样品基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 2 Agarose gel (0.7 %) electrophoresis of genomic DNA of different lake sediment samples
1~7: 湖泊沉积物样品,下同 Lake sediment samples, the same below;
M: Hind III digested λ DNA marker

表 1 不同湖泊沉积物样品 DNA 的得率和 DNA 的纯度
Table 1 The yield and purity of DNA of different lake sediment samples

湖泊沉积物样品号 Lake sediment samples number	DNA 得率(μg/g 沉积 物样品) DNA yield (μg/g sediment samples)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1 #	12.63	1.74	1.72
2 #	11.58	1.67	1.67
3 #	10.42	1.46	1.34
4 #	11.25	1.52	1.63
5 #	3.94	1.0	1.37
6 #	2.87	1.6	1.37
7 #	3.05	1.07	1.28

条带数越多说明生物多样性越丰富,条带染色后的荧光强度则反映该细菌的丰富度,条带信号越亮,表示该种属的数量越多。从而反映湖泊沉积物中微生物的种类和数量。

采用凝胶图像分析系统对 DGGE 凝胶电泳的结果分析表明(图 4,图 5),7 个沉积物样品的 DGGE 图谱在条带的位置和数目均有一定的差异,玄武湖和莫愁湖表层沉积物中大致有 20 种优势细菌菌群,同一湖泊中不同采样点 DGGE 图谱的差异性不大,不同城市湖泊沉积物中细菌群落结构也具有较高的相似性。而太湖样品的 DGGE 条带数目和条带位置与玄武湖和莫愁湖有明显不同,并且太湖不同采样点样品的 DGGE 图谱的差异性也较大,说明不同区域相对稳定的微生物群落结构是不同的,其原因可能是由沉积物理化性质差异引起的(表 2)。

太湖水域宽广,受水文、风浪、船只航运、养殖、捕捞等自然和人类生产活动干扰非常剧烈,对沉积物中有机物氧化能力较强,同时外源性有机物输入较少,因此,微生物群落结构相对简单,而玄武湖和莫愁湖沉积物中有机物丰富,导致微生物群落结构复杂、多样性丰富。对于梅梁湾的 5# 和 6# 点而言,由于 5# 点在梅梁湾水质改善生态系统试验区内,相对比较靠岸,由于围隔的存在受风浪影响较小,并生长有部分水生植被,因此,5# 点的 DGGE 带谱条带较 6# 点多,说明试验区内的微生物的群落结构比区外要丰富,而 7# 贡湖湾采样点水生植被覆盖率较高,有较大面积的马来眼子菜单优势种分布,水体透明度较高,水质较好^[15]。在水生植被的环境下,水生植物的根系不仅能抗风浪的侵扰,保持沉积物的相对固定,同时根系活动的代谢产

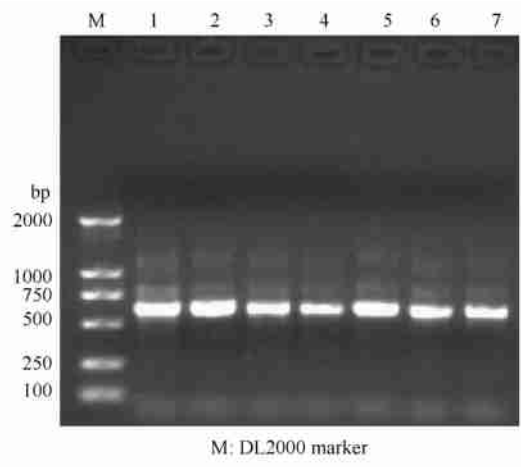


图 3 不同湖泊沉积物样品 16S rDNA 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel (2.0 %) electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA gene of different lake sediment samples

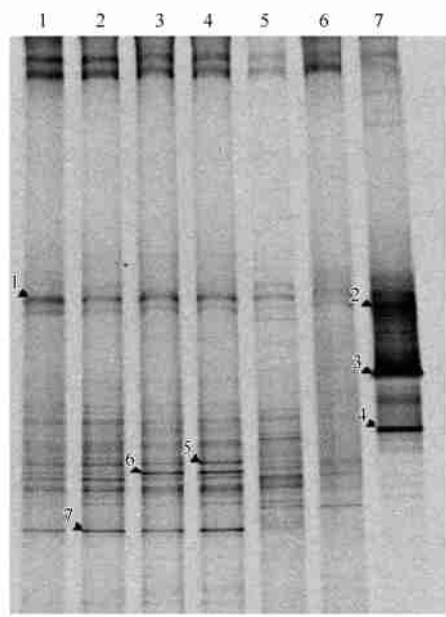


图 4 不同湖泊沉积物样品的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离图谱

Fig. 4 DGGE profile of different lake sediment samples

“▲”标记为挖胶回收条带 Major bands of 16S rDNA genes fragments were eluted from gel of DGGE

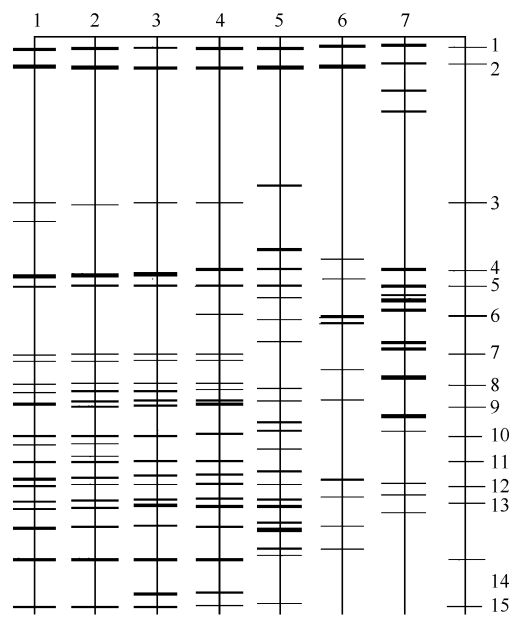


图 5 不同湖泊沉积物样品的变性梯度凝胶电泳(DGGE)示意图

Fig. 5 DGGE sketch map of different lake sediment samples

物,也会有利于微生物的群落活动,因此,出现比较明显的特征带,代表该采样点沉积物中细菌的特征种属。条带荧光强度较深表明该细菌在数量上较多。因此,有水生植被的湖泊沉积物微生物群落丰富度比无水生植被的要高,但是优势种群不一定多。

DGGE 图谱特征还表明,有 5 个左右的细菌种群在 3 个湖泊中都有分布,这些细菌属于生态幅比较广的基本微生物类型,在不同湖泊中都有存在。因此,这些条带的分布特征可以说明这 3 个湖泊沉积物中既有共同的微生物种类,也有自己独特的微生物种属,形成了各自特定生态位的群落结构。

从表 2 可见,玄武湖、莫愁湖与太湖理化性质有较大差异^[16,17]。玄武湖和莫愁湖有机质含量在 5 %~7 % 之间,而太湖有机质含量在 1.5 % 左右,有机质含量高的环境存在更多的生物种类,玄武湖和莫愁湖沉积物中总磷含量、pH 值明显高于太湖,1 # ~6 # 点样品的氧化还原电位值相近,而 7 # 点氧化还原电位值偏高,因此,沉积物环境条件的差异导致优势微生物种属发生变化,从而使微生物群落结构呈现较高的空间差异性。

表 2 不同湖泊沉积物样品的理化性质

Table 2 The characteristic of different lake sediment samples						
湖泊沉积物样品号 Lake sediment samples number	总磷 TP (mg/g)	总氮 TN (mg/g)	有机质 OM (%)	氧化还原 电位 Eh (mv)	pH	
1	2.45	1.593	5.64	-39	8.13	
2						
3	1.534	1.652	6.29	-48	8.22	
4						
5	0.208	2.124	1.35	-40	7.16	
6	0.196	1.244	1.40	-44	7.39	
7	0.152	0.659	1.19	11	7.23	

表 3 DGGE 优势条带的基因片段序列的比对结果

Table 3 Comparison of genomic sequences in dominant DGGE bands by sequencing and BLAST analysis			
条带号 Band name	序列长度 Sequence size (bp)	Genbank 数据库中最相近的菌种名称(登录号)和相似性 Closest relative and alignment similarity (%)	临时登录号 Accession
Band 1	531	Uncultured Oxalobacteraceae bacterium (AY693820) (99 %)	1144071068-20022- 125994019090. BLASTQ1
		Uncultured marine eubacterium HspL82 (AF159664) (99 %)	
		Uncultured Duganella clone CTHB-18 (AF067655) (99 %)	
Band 2	581	Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus (AY568492) (96 %)	1144072064-19380- 150284866623. BLASTQ4
		Uncultured Acinetobacter sp. (DQ394933) (96 %)	
		Acinetobacter baumannii (AY738400) (96 %)	
Band 3	580	Bacillus sp. F26 (AF385082) (93 %)	1144073273-11636- 188624099785. BLASTQ4
		Bacillus cereus (DQ105976) (93 %)	
		Bacillus cereus (DQ234855) (93 %)	
Band 4	573	Bacillus pumilus (AY462205) (100 %)	1144073554-3052- 207719470367. BLASTQ4
		Bacillus sp. IIPON1 (DQ188940) (100 %)	
		Bacillus sp. CSP46 (AY505514) (100 %)	
Band 5	587	Uncultured bacterium (AY627584) (100 %)	1144074225-14545- 120450913017. BLASTQ1
		Uncultured bacterium (AY592756) (99 %)	
		Paenibacillus naphthalenovorans (AF353681) (99 %)	
Band 6	575	Bacillus pumilus (DQ234841) (100 %)	1144074654-25715- 69592922773. BLASTQ4
		Fuel tank bacterium S8 (AY803244) (100 %)	
		Bacillus sp. MF-23a1 (DQ180948) (100 %)	
Band 7	396	Brevibacillus agri (DQ166948) (100 %)	1144075044-22724- 123655835952. BLASTQ1
		Brevibacillus sp. R-12868 (AJ438305) (100 %)	
		Brevibacillus sp. S5-11 (AF530274) (99 %)	

2.4 DGGE 条带基因片段的测序分析

在 DGGE 分离后的条带中,选取其中 7 个荧光强度较亮的主条带进行切胶回收、重新 PCR 扩增和测序,测序的结果在 GeneBank 数据库中用 BLAST 进行检索和进行同源性比较。从 DGGE 图谱中主条带的测序结果可以确定条带所代表的菌群分类地位,7 条优势带的基因片段序列与 GeneBank 中细菌序列相似性如表 3 所示,从这些 DGGE 带谱所代表的微生物种类可以确定不同湖泊沉积物中所含细菌群落的优势菌群的组成。

一般认为 16S rDNA 序列同源性小于 98 %,可以认为属于不同种的细菌,如果同源性小于 93 %~95 %,则可以认为属于不同的属,因此,根据序列比较结果,除 Band 2 和 Band 3 所代表的菌株外,其余 5 株细菌与数据库中的已知细菌同源性超过 99 %,可以认为是同一种,分别属于革兰氏阴性球菌属(Acinetobacter)、芽孢杆菌属(Bacillus)和放线菌短杆菌属(Brevibacillus),另外,Band 1 和 Band 5 所属菌株与数据库中目前未获得纯培养

的未知名的菌株之间也具有大于 99 % 的相似性。

3 结论

(1) 采用相同的分析方法得到沉积物样品 DNA 的提取量和纯度受湖泊沉积物的类型、湖泊理化性质和水体生物量丰富程度等影响。

(2) 玄武湖和莫愁湖表层沉积物中大约有 20 种优势菌群,且同一湖泊不同采样点 DGGE 图谱的差异性不大,细菌群落结构具有较高的相似性,而与太湖沉积物样品的 DGGE 条带数目和位置具有明显差异性,且太湖不同采样点的图谱也有较大的差异性。

(3) 三个湖泊除分布约 5 个相同的细菌种群以外,还具有特异性的微生物种属,可能与沉积物的理化性质和水生植被的影响相关。

(4) 对 DGGE 图谱中 7 个主条带进行回收、扩增和测序,结果显示其优势菌群具有不同的序列组成,其中 5 个序列与 Genbank 中已登录的已知细菌的同源性 $\geq 99\%$,分别属于革兰氏阴性球菌属 (*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和放线菌短杆菌属 (*Brevibacillus*),其中 Band 1 和 Band 5 所属菌株与数据库中目前未获得纯培养的未知名菌株之间也具有 99 % 以上的相似性。

References:

- [1] Muyzer G, Ellen C W, Andre G U. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain amplified reaction genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59:695~700.
- [2] Luo H F, Qi H Y, Xue K, *et al.* A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8):1570~1575.
- [3] Watanabe T, Asakawa S, Nakamura A, *et al.* DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 232:153~163.
- [4] Liu W T, Chan O C, Fang H P. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. *Water Research*, 2002, 36:3203~3210.
- [5] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:340~346.
- [6] Hemant J P, Kapley A, Moharikar A A, *et al.* A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(16):315~323.
- [7] Erik J, Van H, Gabriel Z, *et al.* Changes in Bacterial and Eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65:795~801.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- [9] Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8):4800~4806.
- [10] Zhou J, Mary B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:316~322.
- [11] Xia X, Bollinger J, Ogram A. Molecular Genetic Analysis of the Response of Three Soil Microbial Communities to the Application of 2,4-D. *Molecular Ecology*, 1995, 4:17~28.
- [12] Jacobsen C S, Rasmussen O F. Development and Application of a New Method to Extract Bacterial DNA from Soil Based on Separation of Bacteria from Soil with Cation-exchange Resin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 74:2458~2462.
- [13] Roose C L, Garnier S E, Harry M. Extraction and Purification of Microbial DNA from Soil and Sediment Samples. *Applied Soil Ecology*, 2001, 15:47~60.
- [14] Harry M, Gambier B, Bourezgui Y, *et al.* Evaluation of Purification Procedures for DNA Extracted from Organic Rich Samples: Interference with Humic Substances. *Analisis*, 1999, 27:439~442.
- [15] Yang L Y, Liang H T, Hu W P, *et al.* The Study on Natural Restoration of Aquatic Vegetation in the Northern Laksides, Lake Taihu. *Journal of Lake Sciences*, 2002, 14(1):60~65.
- [16] Xu H B, Lu X W, Yu Y, *et al.* Simulated study on nutritional ingredient release of Xuanwu lake sediment in Nanjing. *Environmental Chemistry*, 2004, 23(2):152~156.
- [17] Meng F D, Jiang X, Jin X C. Physical-Chemical Characteristics of the Sediments in Lakes from the Middle and Lower Reaches of the Yangze River. *Research of Environmental Sciences*, 2004, 17(appl.):24~29.

参考文献:

- [2] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用. *生态学报*, 2003, 23(8):1570~1575.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. *分子克隆实验指南*, 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] 杨龙元, 梁海棠, 胡维平, 等. 太湖北部滨岸区水生植被自然修复观测研究. *湖泊科学*, 2002, 14(1):60~65.
- [16] 徐洪斌, 吕锡武, 俞燕, 等. 玄武湖底泥营养物释放的模拟试验研究. *环境化学*, 2004, 23(2):152~156.
- [17] 孟凡德, 姜霞, 金相灿. 长江中下游湖泊沉积物理化性质研究. *环境科学研究*, 2004, 17(增刊):24~29.