

DGGE 分析东江流域农村饮用水源中微生物多样性及其与环境因子相关性

宋巍^{1,2} 安德荣¹ 刘雪² 李良生³ 朱红惠⁴ 朱昌雄^{2*}

- (1. 西北农林科技大学 植物保护学院 陕西 杨凌 712100)
- (2. 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所 北京 100081)
- (3. 惠州市水产科学技术研究所 广东 惠州 516007)
- (4. 广东省科学院微生物研究所 广东 广州 510070)

摘要: 为评价东江流域农村饮用水源中微生物多样性及其与环境因子的相关性, 分别采集了集中式供水井、塘坝型水井、猪场附近水井、普通村落水井、水库水 5 种水样, 进行基因组总 DNA 的提取和主要理化指标的测定, 运用 DGGE 技术分析各水样总 DNA 的 PCR 产物。UPGMA 聚类分析 DGGE 指纹图谱结果表明, 相同类型水样的微生物群落结构相似性较高, 聚集到一个分支上; 典型相关性分析(CCA)结果表明, 水体中总磷(TP)和总氮(TN)的浓度与微生物群落结构的关联度最高, 即磷和氮两种生命过程的基本元素对微生物群落影响最大; 序列分析表明农村饮用水源中微生物群落结构丰富, 包含了螺旋体门(*Spirochaetes*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)5 个门的细菌, 且每类水样拥有各自的优势菌。

关键词: 农村饮用水源, 微生物多样性, 变性梯度凝胶电泳

Changes in Bacterial Community Structure of Drinking Water in Dongjiang River Valley, Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Fingerprint and Its Relationships with Environment Factors

SONG Wei^{1,2} AN De-Rong¹ LIU Xue² LI Liang-Sheng³
ZHU Hong-Hui⁴ ZHU Chang-Xiong^{2*}

- (1. College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)
- (2. Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, CAAS, Beijing 100081, China)
- (3. Huizhou Fisheries Science and Technology Research Institute, Huizhou, Guangdong 516007, China)
- (4. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: In order to study the correlation between microbial diversity and the pollution degrees of the rural

drinking water in Dongjiang River basin. Five types of drinking water of this basin were collected, and fifteen water samples of five types of drinking water of this basin had been collected from reservoir, centralized water supply wells, wells in the vicinity of pig farms, wells nearby embankment and wells in villages. The six (physical, chemical, and biological) property indices of water samples were tested, at the same time, the DGGE analysis was done. The results of PCR-DGGE fingerprint indicated that bacterial richness of these drinking water samples were high, and different samples in fingerprint were different distinctively. The UPGMA dendrogram of sample basis on DGGE fingerprints showed the structure of different types of bacteria in drinking water in rural communities is obvious differences. And the results of CCA showed that the concentration of phosphorous has the largest relevance to the community structure of bacteria in water samples, followed by the concentration of nitrogen in the water. Ten typical bands were excised and sequenced. The sequences obtained were affiliated with *Spirochaetes*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*.

Keywords: Rural drinking water, Microbial diversity, DGGE

全国首次农村饮用水调查结果显示超标率达 44.36%，其中因菌落总数和总大肠菌群所引起的水质超标率为 25.92%，这说明目前造成农村饮用水超标的主要因素是微生物超标，因此对水体微生物群落结构研究已经迫在眉睫。

现今对水体微生物多样性的研究已有很多报道，主要集中在湖泊、河流、海洋等对象。本文借鉴前人的经验运用聚合酶链式反应——变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)^[1]分析水源中微生物的群落结构随时空变化的规律，采用典型对应分析^[2](Canonical correlation analysis, CCA)的方法分析了水样中微生物群落结构与环境因子的相关性，试图找出水源中微生物多样性与其受污染程度的关联，为评价饮用水源的生态情况寻找新的途径。

1 材料和方法

1.1 样品的采集

本研究采集了东江流域 5 种不同类型的农村饮用水源，每种类型水样设 3 个平行共 15 个样，采样点具体分布如表 1 所示。水样的采集和保存按照《地表水环境质量标准》(GB3838-2002)进行，水样采集 24 h 内测定其理化指标，同时用微孔滤膜过滤富集^[3]菌体以供 DGGE 实验使用。

1.2 理化指标的测定

参考《生活饮用水标准》(GB5749-2006)中关于农村集中分散式供水检测项目，结合东江流域农村饮用水实际污染现状^[4,5]，确定其中 7 项理化指标作为评价项目：温度(T)、pH、COD、氨氮(NH₃-N)、总氮(TN)、总磷(TP)、硝酸盐氮(NO₃-N)。水样的理

表 1 采样点分布
Table 1 Distribution of the sampling sites

水样类型 Samples' types	编号 No.	经纬度 Latitude and longitude
集中式供水井 Centralized water supply wells	J1	N23°00.034' E114°17.433'
	J2	N23°00.909' E114°16.559'
	J3	N23°02.126' E114°16.908'
塘坝型水井 Wells nearby fish-pond	T1	N23°01.933' E114°16.365'
	T2	N23°01.835' E114°16.491'
	T3	N23°01.930' E114°16.531'
猪场附近水井 Wells in the vicinity of pig farms	Z1	N23°35.057' E114°35.989'
	Z2	N23°35.253' E114°35.570'
	Z3	N23°35.166' E114°35.396'
普通村落水井 Ordinary village wells	P1	N23°05.317' E114°13.124'
	P2	N23°05.379' E114°13.139'
	P3	N23°05.311' E114°12.746'
水库水 The reservoir water	S1	N23°43.286' E114°38.458'
	S2	N23°04.521' E114°14.196'
	S3	N23°13.317' E114°19.122'

化指标测定方法均参照《生活饮用水标准检验方法》(GB/T5750)操作。

1.3 样品基因组总 DNA 的提取和 PCR 扩增

所取水样先用定量滤纸过滤，再用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤，将滤膜尽量剪碎置于 10 mL 离心管中，-20℃ 保存，用于后续实验。

总 DNA 的提取方法采用 CTAB 法，稍加修正：往离心管加入 900 μL STET 缓冲溶液，涡悬混合，100 μL 溶菌酶(100 mg/mL)，室温放置 0.5 h，然后置 94℃ 水浴 1 min，加入 10% SDS 至终浓度 0.5%，120 μL NaCl 溶液(5 mol/L)，1/10 体积的 CTAB/NaCl 溶液，65℃ 保温 1 h，酚/氯仿抽提去蛋白；取水层，

加入 1/10 体积的乙酸钠(2 mol/L)和 2 倍体积的冷 100%乙醇, 混匀, -20°C 放置 1 h 或过夜; 13000 r/min 离心 10 min, 弃乙醇, 70%乙醇清洗, 50 μ L TE 重悬沉淀, -20°C 保存备用。

以提取的基因组总 DNA 作为模板, 使用特异性引物 GC-357F 和 518R^[1]对细菌 16S rDNA V3 区进行扩增, 片段长度约为 220 bp~230 bp(包括 GC 夹子), PCR 反应体系(50 μ L)组成是 10 \times Buffer (含 Mg²⁺) 5 μ L, 引物 1 和 2(10 μ mol/L)各 1 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 加去离子水补齐 50 μ L。采用降落 PCR^[6]策略, 程序如下, 94°C 5 min; 前 20 个循环为 94°C 30 s, 65°C~55°C 30 s (其中每个循环降低 0.5°C), 72°C 40 s; 后 10 个循环为 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 40 s; 72°C 延伸 20 min^[7], 1.0%琼脂糖电泳检测。

1.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

使用美国 Bio-Rad 公司的 Dcode Universal Mutation Detection System 电泳系统进行变性梯度凝胶电泳。使用 10%的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:双丙烯酰胺=37.5:1), 选用的变性剂梯度为 30%~60% [100%的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40%(V/V)的去离子甲酰胺], 上样量为 25 μ L PCR 浓缩产物。运行条件: 1 \times TAE[40 mmol/L Tris, 40 mmol/L 冰乙酸, 1.0 mmol/L EDTA(pH 8.0)]电泳缓冲液中, 恒温 60°C, 30 V 跑 30 min, 150 V 跑 6 h。

电泳完毕后, 用 ddH₂O 漂洗凝胶, 再用 5%的 Goldview 核酸 I 型染料染色 30 min, 在 Image Quant 350(GE health)成相系统下拍照。

1.5 优势条带切胶回收、测序

对不同类型水样中优势条带标记后进行切胶回收, 捣碎加入 TE(pH 8.0) 4°C 浸泡过夜, 离心后取上

清作为 PCR 的模板进行扩增, 反应程序和体系同上, 所用引物为 357F (不带 GC 夹子)和 518R。PCR 产物送上海英俊生物技术有限公司测序。测序结果进行 Blast 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 获得相似性最高典型菌株。

1.6 数据分析

1.6.1 DGGE 电泳图谱分析: 使用 Quantity one V4.6(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。

1.6.2 水样中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), 研究各个水样中微生物多样性与其理化指标的相关性。分析过程中去除了相对含量小于 1%和只出现过 1 次的条带, 水样的理化指标进行了标准化^[8]处理。

2 结果与分析

2.1 样品理化指标结果分析

本实验所检测水样的理化指标如表 2 所示, 水样温度受采样当日气温的影响很大, 维持在 22 左右; pH 除集中式供水井井水维持在弱碱性水平外, 其它水样均呈酸性; 塘坝型水井井水和猪场附近水井井水在氨氮、总氮、总磷均较其它水样偏高, 超出了地表水作为饮用水水源的限值。

2.2 样品基因组总 DNA 的提取和 PCR 扩增结果

采集的 15 个水样均使用改良的 CTAB 法进行了基因组总 DNA 的提取, 用 1%的琼脂糖电泳检测, 结果显示每个样品在约 23 kb 的地方均有条带出现,

表 2 东江流域农村饮用水理化值
Table 2 Physico-chemical characterization of the drinking water samples in Dongjiang River Basin

项目 Items	集中式供水井 Centralized water supply wells			塘坝型水井 Wells nearby fishpond			猪场附近水井 Wells in the vicinity of pig farms			普通村落水井 Ordinary village wells			水库水 The reservoir water		
	J1	J2	J3	T1	T2	T3	Z1	Z2	Z3	P1	P2	P3	S1	S2	S3
Temperature (°C)	20.73	21.55	23.00	22.45	21.03	22.35	21.41	21.46	21.23	23.05	23.06	22.01	21.33	25.55	26.47
pH	7.57	7.27	7.12	5.50	6.27	6.31	6.62	6.55	6.26	6.02	6.42	5.64	7.04	6.92	6.91
COD (mg/L)	41.00	11.00	10.00	10.00	6.00	44.00	10.00	10.00	10.00	10.00	42.00	4.00	2.00	35.00	4.00
NH ₃ -N (mg/L)	0.46	0.41	0.46	1.49	2.20	1.45	0.27	0.11	2.71	0.09	0.05	0.08	0.09	0.77	0.37
TN (mg/L)	0.92	0.88	0.99	1.83	4.21	2.00	2.20	3.16	3.13	1.71	1.62	2.41	0.39	0.65	0.61
TP(mg/L)	0.09	0.03	0.08	0.07	0.08	0.14	0.03	0.02	0.02	0.03	0.07	0.05	0.03	0.07	0.02
NO ₃ -N (mg/L)	0.16	0.17	0.19	0.07	3.72	0.24	0.88	1.15	0.05	0.80	0.69	1.16	0.15	0.00	0.13

这说明每个样品都已经获得了较完整水体微生物的基因组总 DNA, 因为每个水样中微生物的多寡不一, 一些样品的条带亮度不够, 但已经满足作为 PCR 扩增的模板的要求。

提取的水样基因组总 DNA 直接进行 TD-PCR 扩增, 电泳检测结果显示 15 个样品均已扩出, 且亮度、纯度都较好, 未出现非特异性扩增, 通过与 Marker DL5000 对比, 可知其片段大小在 230 bp 左右, 说明 PCR 扩增效果良好, 得到了目的条带。

2.3 DGGE 指纹图谱分析

DGGE 电泳结果如图 1 所示, 由图可知东江流域农村饮用水源中的微生物丰富度非常高, 不同类型水样的 DGGE 带谱在条带的数量、位置及条带的亮度上均存在较大的差异。15 个水样中共检测到 42 种不同的条带, 各样品检测到的条带数为 12~23 个, 平均为 17.7 个条带。进一步的分析发现只有 14 个(约占总数的 33%)条带在超过 1/2 的样品中出现, 有 10 个条带只出现在少于 2 种类型的水样中。通过 UPGMA 算法对各个水样进行聚类分析, 生成系统进化树, 如图 2 所示。15 个水样分成了 6 个族群, 除个别水样外, 相同类型的水样均聚集到同一个分支下, 具体为集中式供水井 J1、J2、J3 号样为一分支, 猪场附近水井 Z1、Z2、Z3 号样为一分支, 它们两两之间相似性系数都达到了 50%以上; 塘坝型水井的 T2 和 T3 号样、普通村落水井的 P2 和 P3 号样, 水库水的 S2 和 S3 号样各为一个分支, 且相互间的相似性系数超过 60%; S1 和 P1 另为一支, 相似性系数较低。

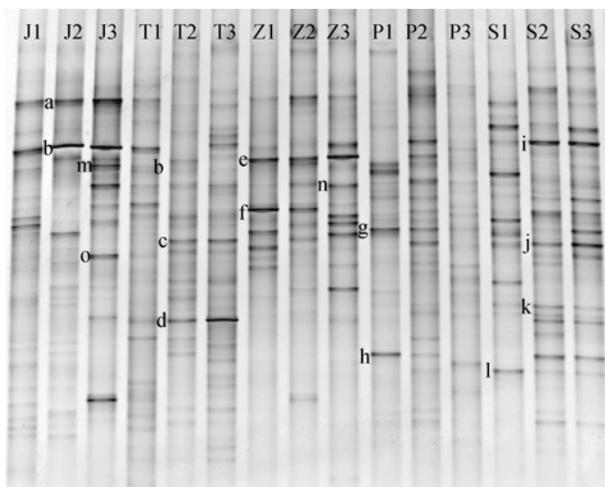


图 1 15 个农村饮用水样 DGGE 指纹图谱
Fig. 1 DGGE fingerprint of 15 drinking water samples in Dongjiang River Basin

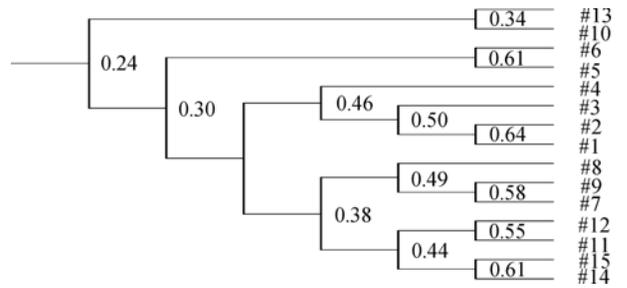


图 2 15 个农村饮用水样聚类分析图
Fig. 2 Cluster analysis of 15 drinking water samples in Dongjiang River Basin

Note: 1, 2, 3: J1, J2, J3; 4, 5, 6: T1, T2, T3; 7, 8, 9: Z1, Z2, Z3; 10, 11, 12: P1, P2, P3; 13, 14, 15: S1, S2, S3.

2.4 水样中微生物群落结构与理化指标的相关性分析

运用典型对应分析(CCA), 将 DGGE 图谱的数字化结果和水样理化指标结合在一起分析, 结果概括于表 3。本文以温度(T)、pH、COD、氨氮(NH₃-N)、总氮(TN)、总磷(TP)、硝酸盐氮(NO₃-N)等 7 项理化指标来表征各个水样的水质情况, Monte Carlo permutation test 显示 7 个特征参数与 AX1 轴(P: 0.0470)及全部排序轴(P: 0.0490)均有显著的相关性。表 3 显示第 1 排序轴解释了样本中 14.8%的变异, 第 2 和第 3 排序轴分别解释了样本中 12.4%和 10.1%的变异, 前 4 个排序轴合并解释了 43.6%的样本总变异。虽然这一比例并不高, 但根据 Cauch 的解释, 物种数据信息中经常包含大量的噪音, 排序图虽然仅能解释一小部分总变异, 但其中也蕴涵丰富的信息^[9]。第 1 和第 2 排序轴的种-环境相关系数分别为 0.964 和 0.966, 这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。同时, 前 4 个排

表 3 典型对应性分析结果				
Table 3 Summary of the results of Canonical Correspondence analysis				
项目 Items	AX1	AX2	AX3	AX4
特征值 Eigenvalues	0.179	0.149	0.121	0.076
种-环境相关系数 Species-environment correlation	0.964	0.966	0.971	0.898
种累积百分比变化率 Cumulative percentage variance of species	14.8	27.2	37.3	43.6
种-环境累积百分比变化率 Cumulative percentage variance of species-environment	26.7	49.0	67.2	78.6

序轴种-环境累积百分率也高达 78.6%。

排序结果如图 3 所示, 水样中微生物群落结构主要与 TP、TN、NH₃-N 相关联, 其中 TN($r=0.2043$)与第 1 排序轴正相关, TP($r=-0.6822$)和 NH₃-N($r=-0.2492$)与第 1 排序轴负相关; TP($r=0.2135$)、TN($r=0.6498$)和 NH₃-N($r=0.6053$)与第 2 排序轴正相关。而水温 T 与微生物群落结构关联度最小, T 与第 1 和第 2 排序轴的相关系数分别为-0.0909 和 0.1978。

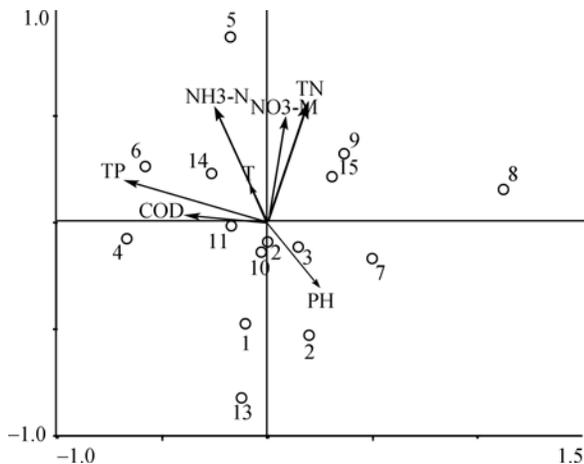


图 3 典型对应性分析图

Fig. 3 CCA biplots of the DGGE banding patterns and environmental variables

2.5 序列比对结果

将所得序列输入 GenBank, 用 Blast 程序进行相似性比较分析。具体结果如表 4 所示, 所有序列与数据库中 16S rDNA 序列的相似性在 95%~100%之间, 除去 C、J 和 G 外相似性都在 98%以上。获得的 10 条序列分别属于: 螺旋体门(*Spirochaetes*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*), 还有 C、F、I、L、M 等 5 条序列为未培养的微生物。

3 讨论

DGGE 指纹图谱中的 1 个条带被称作 1 个操作分类单元(Operational taxonomic units, OUTS), 在本文中 1 个 OUTS 代表 1 种细菌。在这里被识别的大部分条带(67%)只在不到一半的样品中出现, 但每种类型的饮用水源中均含有自己的优势条带, 如集中式供水井的条带 A、B, 塘坝型水井的条带 C、D, 猪场附近水井的条带 E、F, 普通村落水井的条带 G、H 和水库水的条带 I、J。经回收测序得知 15 个条带分属细菌的 5 个门, 这说明农村饮用水源中的微生物多样性程度很高, 且不同类型水样的微生物群落结构具有较高的差异性, 这一点在通过 UPGMA 算法的聚类分析的结果(图 2)中也得到了证明, 除了

表 4 DGGE 条带的近缘菌株
Table 4 Identities of DGGE bands

条带 Band	登录号 GenBank accession No.	近缘菌株名称 Closest relatives		相似度 Similarity (%)
		来源 Source	登录号 Accession No.	
A	FJ601375	<i>Leptospira interrogans</i> clone BEL08MA 1	DQ522190	100
B	FJ601389	<i>Rivularia</i> sp. IAM M-261 gene	AB325536	100
C	FJ601379	Uncultured bacterium gene, clone: HDBW-WB69	AB237732	95
D	FJ601380	<i>Betaproteobacterium</i> KIN192	AY136099	98
E	FJ601381	Uncultured <i>betaproteobacterium</i> clone HKTR14B-29	EU080978	100
F	FJ601382	Uncultured bacterium clone 2C229274	EU800997	98
G	FJ601383	Uncultured actinobacterium clone IWENVB5	EU091553	96
H	FJ601384	Uncultured actinobacterium clone FF1H9	EU117688	100
I	FJ601385	Uncultured bacterium clone 22 3	FJ415277	100
J	FJ601386	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone TH c204	EU373099	97
K	FJ601387	Uncultured actinobacterium clone E1B-E2-114	EF016820	93
L	FJ601388	Uncultured bacterium gene clone: ITKB-126	AB198809	88
M	FJ821016	Uncultured bacterium clone 2005-WD-1-091007	EU262341	100
N	FJ821018	<i>Enterobacter</i> sp. IPPW-31	FJ646662	100
O	FJ821020	<i>Klebsiella</i> sp. IPPW-21	FJ646652	100

T1、P1、S1 个别水样, 其余水样均按照类型的不同聚集在不同的分支下面, 且同类型的水样两两之间相似性程度都超过了 50%, 由此可见, 被调查区域农村饮用水源中微生物群落结构与环境因子是密切相关的, 但因为南方农村主要以地下水作为水源, 而水井作为一个相对孤立的体系, 有时也会出现同类型的水样间存在较大差异的特例。

这次调查的采样时期处于夏季, 水样温度受当时气温影响基本维持在 22 度上下, 集中式供水井属于深层地下水, 温度略低。除集中式供水井属于严格意义上的地下水, pH 为弱碱性外; 塘坝型水井、猪场附近水井、普通村落水井均属于浅层地下水, 水质呈酸性, 这是符合采样区域饮用水的特点^[5,10], 其中塘坝型水井最酸 pH=6.02±0.46; 水库水为地表水, 呈中性。对于 COD、氨氮(NH₃-N)、总氮(TN)、总磷(TP)、硝酸盐氮(NO₃-N)等营养指标, 从塘坝型水井、猪场附近水井采集的水样均偏高, 且大多数超出了地表水 III 类水标准, 不适合作为饮用水源。由此可见农业面源污染对其周边的饮用水源构成了污染威胁^[11,12]。

15 个水样 DGGE 图谱的典型对应排序结果如图 3 所示。在此二维排序图(Biplot)中, 样本与环境因子在同一个图上反映出来, 可以直观地看出群落分布、物种分布与环境变量之间的关系。环境因子用箭头表示, 箭头所处的象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性, 箭头连线长度代表该环境因子与样本分布相关程度的大小, 而箭头连线间的夹角代表环境因子间的相关性大小^[13]。Lindstrom 将这种统计学方法应用于 DGGE 指纹图谱的分析中, 从而来找寻微生物群落结构与环境因子的关系。在本文的研究中, 第 1 和第 2 排序轴的种-环境相关系数分别为 0.964 和 0.966, 这说明分析单元和所选的环境变量间存在着很强的相关性, 其中总磷(TP)对水样中微生物群落结构组成的关联作用最大, 关联作用其次的是总氮(TN)和氨氮(NH₃-N), 即氮元素。关联度再次的是硝酸盐氮(NO₃-N)、pH、COD 和温度(T)。Shiah 和 Ducklow 等的研究表明在春、秋、冬三季温度对水体中微生物群落结构影响很大, 使其呈现季节性变化^[14], 但本次实验采样时间为 2008 年的 5 月, 采样区域位于我国南方已进入夏季, 气温维持在一个较高的水平, 这时水体中的营养成分已代替

温度成为决定性因素, 氮、磷作为生命活动中的基本元素将直接作用于微生物的群落结构^[15]。这与 Rivkin 和 Anderson、及 Ovreas L 等的研究结果相似, 他们在对夏季淡水湖泊中微生物群落结构的研究中发现此时的限制因素是有机碳和无机营养物^[16,17]。由此我们得出结论水体中微生物的群落结构受到多种生物及非生物因子的调控, 环境因子空间分布的不均匀性是造成水体微生物群落结构存在差异的重要原因^[18,19], 从另一方面说对微生物群落结构的研究也为水体环境评价提供了重要的科学依据。

参 考 文 献

- [1] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 695-700.
- [2] Ter Braak CJF. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecol*, **67**: 1167-1179.
- [3] Mako Kawai, Eiichi Matsutera, Hisashi Kanda. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 699-704.
- [4] 袁继森. 东江流域水质污染与水环境保护对策. 惠州大学学报, 1999, **19**(4): 101-104.
- [5] 何昌云, 曲亚斌, 戴昌方. 广东省农村生活饮用水卫生状况调查. 华南预防医学, 2006, **32**(6): 15-18.
- [6] Don RH, Cox PT, Wainwright BJ. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 4008.
- [7] Hiroyuki Sekiguchi, Noriko Tomioka. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters*, 2001, **23**: 1205-1208.
- [8] Yannarell AC, Triplett EW. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(1): 227-239.
- [9] Gauch HG. Multivariate analysis in community ecology. UK: Cambridge University Press, 1982.

- [10] 许立凡. 广东农村饮用水卫生现状及改水对策. 广东行政学院学报, 2001, 13(6): 60-63.
- [11] 李庆成. 全国重点环境考核城市地下水污染概况与防治对策. 地下水, 1992, 14(1): 2-5.
- [12] 吕 耀. 苏南太湖流域农业非点源污染及农业可持续发展战略. 环境科学动态, 1998, (2): 1-4.
- [13] 张金屯. 数量生态学. 北京: 科学出版社, 2004, pp.157-162.
- [14] Shiah FK, Ducklow HW. Temperature regulation of heterotrophic bacterioplankton abundance, production, and specific growth rate in Chesapeake Bay. *Limnol Oceanogr*, 1994, 39: 1243-1258.
- [15] YAN Qingyun, YU Yuhe, FENG Weisong. Plankton community composition in the Three Gorges Reservoir Region revealed by PCR-DGGE and its relationships with environmental factors. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20: 732-738.
- [16] Rivkin RB, Anderson MR. Inorganic nutrient limitation of oceanic bacterioplankton. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42(30): 730-740.
- [17] Ovreas L, Bourne D, Sandaa RA. Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. *Aquat Microb Ecol*, 2003, 31: 109-121.
- [18] Jasti S, Sieracki ME, Poulton NJ. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 3483-3494.
- [19] Pearce DA. The structure and stability of the bacterioplankton community in antarctic freshwater lakes, subject to extremely rapid environmental change. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 53: 61-72.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名师名课”版块,原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿!欢迎对本栏目多提宝贵意见!