

外来种互花米草盐沼土壤微生物 16S rRNA 特征分析

——以江苏省潮间带为例*

周虹霞^{1,2}, 刘金娥^{1,3}, 钦佩^{1**}

(1. 南京大学生命科学院, 江苏 南京 210093; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204;
3. 南京师范大学地理科学学院, 江苏 南京 210093)

摘要: 通过对互花米草盐沼和对应光滩的土壤微生物 16S rRNA 的特征检测, 分析了外来种互花米草的侵入对潮间带生态系统土壤微生物多样性的影响。试验中采集了江苏滨海不同季节光滩与互花米草 (*Spartina alterniflora*) 盐沼的土壤, 直接提取法分离得到其中的土壤微生物 DNA, 并采用 Sepharose 4B 吸附柱对 DNA 进行纯化, 有效地去除了腐殖酸, 得到纯度较高的 DNA 样品模板。通过选取特异引物扩增 16S rRNA 基因序列, 得到了较清晰的结果: 有差异的 16S rRNA 扩增片断通过 DGGE 被分开, 形成可见条带; 不同的样品由于其中的微生物多样性的差异, 扩增出的条带数量及其在凝胶上的相对位置都有一定的差异。结果显示: 互花米草盐沼与光滩的土壤微生物群落多样性皆较低, 二者在互花米草生长初期其土壤微生物群落结构具有一定的相似性。但总体来说, 外来种互花米草的种植较明显地改变了滩涂的土壤微生物群落结构; 此外, 滩涂土壤微生物群落随着季节的变化而发生了较大的改变。

关键词: 土壤微生物多样性; 16S rRNA; DGGE; 外来种; 互花米草盐沼

中图分类号: S 154.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)06-0799-07

Effects of an Alien Species (*Spartina alterniflora* Loisel) on 16S rRNA Profiles of Soil Microbial of Inter-tidal Ecosystem at Jiangsu Coastal Region, China

ZHOU Hong-xia^{1,2}, LIU Jin-e^{1,3}, QIN Pei¹

(1. Life Science School, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

2. Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

3. Geography Science School, Nanjing Normal University, Nanjing 210093, China)

Abstract: *Spartina alterniflora*, an introduced species vegetating on inter-tidal flats from the eastern coast of the United States, has become a hot topic focusing on its invasion to local species in the coastal zone of China. Impacts of *S. alterniflora* to soil microbial diversity in Jiangsu coastland was discussed by the result of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of polymerase chain reaction-amplified (PCR) 16S rDNA fragments in soil samples of *Spartina* salt marsh and mudflat. At each study site, fifteen plots were sampled to provide the sediment characteristics along the tidal flats in different seasons. The total bacterial DNA from the two studied soils was extracted directly, and the DNA was purified by Sepharose 4B absorbent column for wiping off the humus. 16S rDNA of bacteria from the two soils were amplified and were separated by DGGE. The samples got different DGGE bands because of the difference of microbial diversity in the two environments. DGGE profiles of the PCR productions

收稿日期: 2006-02-18

* 基金项目: 国家自然科学基金(NSFC 30470326); 江苏省自然科学基金(JSNSF 20050307)。 ** 通讯作者
作者简介: 周虹霞(1973-), 女, 上海人, 博士, 主要从事植物多样性保护和入侵生态学研究。

were compared by similarity analysis. The results suggested that the soil microbial diversity in these two environments were not high. And, the two kind of soil samples got similar microbial community structure in spring time. As a whole, the microbial community components in inter-tidal zone differed with seasonal variety. And *S. alterniflora* has obviously changed the microbial community components when being introduced to Jiangsu coastal inter-tidal zone.

Key words: alien species; *Spartina* salt marsh; soil microbial diversity; 16S rRNA; DGGE

互花米草 (*Spartina alterniflora*) 具有消浪缓流^[1]和促进沉积物沉积^[2]作用,为海滨湿地的保护和生态修复提供了先锋植物种质资源。我国于 1979 年引进该物种,目前江苏沿海受互花米草掩护的标准海岸线已达 410 km^[3]。但同时另一些地区的海滨滩涂生态系统,该物种的生长影响了本地物种的生存,造成了负面效应。这种典型的“两面性”引起了学术界的广泛关注和热烈争论,关于该植物对入侵地的生物多样性、海岸带生态系统过程及功能的影响研究迫在眉睫。

土壤微生物作为生态系统中的分解者,推动着生态系统的能量流动和物质循环。目前对微生物多样性在生态系统中的分布及其功能了解还不够多^[4,5],对于不同种类的微生物在生态系统功能中究竟起到何种作用,土壤微生物多样性的改变在多大程度上会影响生态系统能量和物质的流动等问题尚无明确答案。但由于微生物多样性能够快速反映生态系统过程的变化,在受干扰的系统中其变化模式可作为生态系统功能的敏感指示者^[6]。

长期以来土壤微生物的深入研究受限于手段落后已是不争的事实^[7],常规调查方法的局限性,造成了人们全面了解和深入研究土壤微生物多样性的主要障碍。DNA 的多样性是生物多样性的本质内容,已有研究表明土壤中微生物群落基因多样性要比实际上能分离出来的群体水平上的表型多样性高 200 倍^[8]。在微生物的遗传图谱分析中 rRNA 被认为是分析微生物进化关系的首要生物大分子,在微生物的系统发育研究方面应用较广;此外 rRNA 分析亦较多应用于微生物群落多样性分析^[9-14]。变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳 (DGGE) 是一种利用相同大小双链 DNA 片段由于序列不同存在解链行为差异而进行的电泳分离方法^[15,16]。基于 16S rRNA 的 DGGE 分析土壤微生物

多样性的方法结合了 PCR 技术的高效、变性梯度凝胶电泳的高分辨率和已有对 16S rRNA 序列结构和进化规律的知识积累。

笔者采用 DGGE 技术,通过对江苏省沿海潮间带互花米草盐沼和对应的光滩土壤微生物 16S rRNA 特征的比较,从分子角度分析了互花米草在江苏海岸带的侵入对当地生态系统中土壤微生物多样性的影响,为进一步研究外来种互花米草对我国沿海地带的生态、社会和经济影响,并对其进行合理有效的管理提供基础依据。

1 方法

1.1 样地概况和取样设置

江苏省海岸带处于暖温带向北亚热带过渡地区^[17],以季风气候为主。年平均降雨量 850 ~ 1 000 mm,冬季平均气温 -1.5 ~ 2.5°C,夏季平均气温 26.5 ~ 27.5°C。所选互花米草盐沼位于大丰县海岸,并以如东县海岸潮间带光滩为对照。

大丰县海岸线 112 km,土壤以粉砂淤泥质为主,互花米草盐沼充分发育,海岸带沉积速率高;如东县海岸线 103.3 km,目前仅其小洋口岸段潮间带保留有无植被光滩。本研究中互花米草盐沼位于大丰王港垦区,33°17'N,120°45'E,该区于 1989 年种植互花米草,随着互花米草向海方向逐年生长不断对其进行围垦,目前的互花米草盐沼为 4 年生的草滩;潮间带光滩位于如东小洋口凌洋垦区,32°36'N,120°59'E;二者相距 79 km。

在所选样地内按向海梯度(高潮带、中潮带、低潮带)设置 1 m × 1 m 小样方各 15 个(图 1),小样方间距 500 ~ 1 000 m;分别于 2002 年 10 月、12 月,2003 年 4 月、7 月在每个样方内取 2 ~ 20 cm 深的土壤样品约 100 g,装入封口袋,带回实验室于 -20°C 保存,备用。

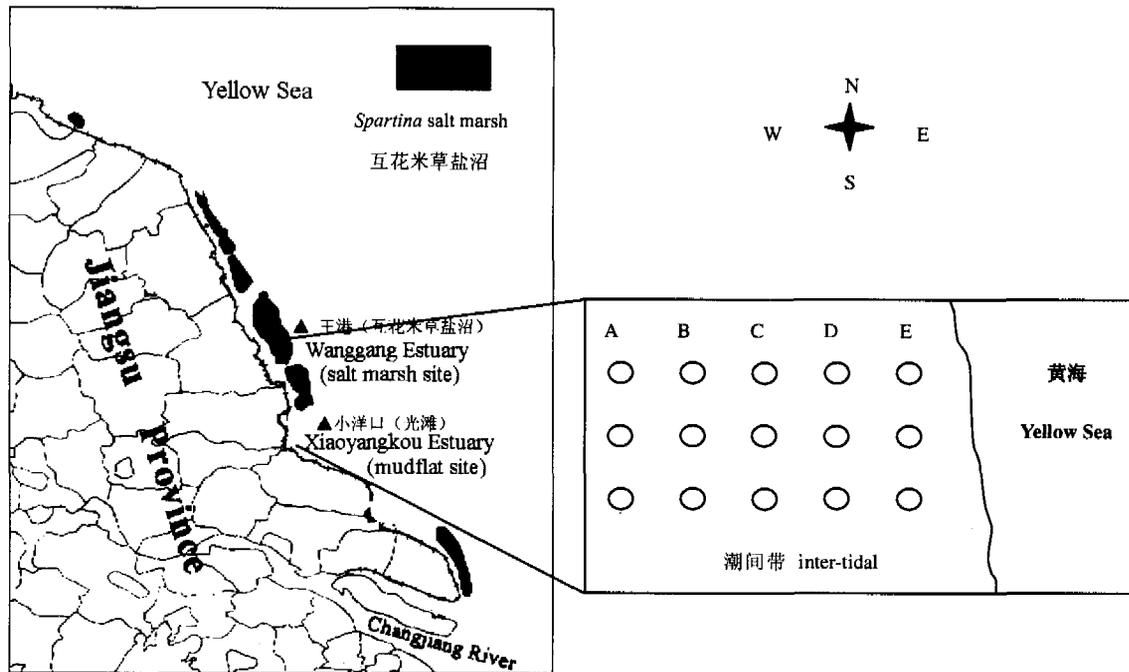


图1 江苏滨海潮间带互花米草盐沼与无植被光滩取样位置及向海梯度小样方设置

Fig. 1 The location of the *Spartina* salt marshes and mudflats sampled at Jiangsu, China and the sampling scheme along the inter-tidal area

1.2 材料和方法

1.2.1 土壤样品

取备用土壤样品,按如下方式进行混合:10月份、4月份,每样地按向海方向,取3个梯度(高潮

带、中潮带、低潮带)分别混合,并作一总的混合样;12月份和7月份仅作总的混合样。样品设置编号如表1所示。

表1 实测样品编号设置

Tab. 1 No. of soil samples used

	2002年10月 Oct. 2002	2002年12月 Dec. 2002	2003年4月 Apr. 2003	2003年7月 July 2003
光滩 mudflat	1,2,3,4	10	11,12,13,14	20
互花米草盐沼 <i>Spartina</i> salt marsh	5,6,7,8	9	15,16,17,18	19

注:1,2,3;5,6,7;11,12,13;15,16,17 分别为不同样地按向海梯度混合的样品;4,8,9,10,14,18,19,20 分别为各样地所有样品的混合样。

Note: 1,2,3;5,6,7;11,12,13;15,16,17 respectively stand for soil samples which mixed according to the grads along the seaward direction in *Spartina* salt marsh and in mudflat; 4,8,9,10,14,18,19,20 respectively stand for the soil samples which mixed all the samples from each quadrat in *Spartina* salt marsh and in mudflat.

1.2.2 土壤 DNA 样品提取与纯化

土壤 DNA 样品提取采用直接裂解法^[18,19]:称取 1 g 混匀后的土样,加入 2 mL 0.12 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 8.0), 150 r/min 振荡 15 min, 6 000 g 离心 10 min;弃去上清,重复以上操作 1 次;加入 2 mL 溶菌酶溶液 [15 mg/mL 溶菌酶, 0.15 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Na₂EDTA, pH 8.0], 37 °C 水浴温育 30 min;加入 2 mL 裂解液 (0.15 mol/L NaCl, 10% SDS), 65 °C 温育 2 h;样品经过 3 次冻融 (-20 °C / 65 °C),以完全释放细胞中的 DNA;加

入 2 mL 0.1 mol/L Tris - HCl (pH 8.0) - 饱和酚,小心倒转,得到乳浊液;于 6 000 g 离心 10 min;收集 3 mL 上层水相,加入 1.5 mL 饱和酚和 1.5 mL 氯仿:异戊醇(24:1, V/V)溶液,混合;取 2.5 mL 上一步所得到的提取产物,等体积加入 2.5 mL 氯仿:异戊醇 (24:1, V/V) 溶液, 12 000 g, 离心 10 min;取水相 2 mL,加入 2 mL 冰冷异丙醇, -20 °C 过夜;过夜提取物于 12 000 g 离心 15 min, 28 °C 烘干,得到土壤 DNA 粗提物。

应用 Sepharose 4B 吸附柱去除所提 DNA 中腐

殖酸及其它杂质^[20]:将 1 mL 塑料注射器前端以洁净玻璃棉封堵,用吸管填充 Sepharose 4B,1 100 g 离心 2 min,继续装填直至 Sepharose 4B 紧密装填于柱中,并保证柱长在 4 cm 左右;装填好的吸附柱用 TE (20 mmol/L Tris - HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 缓冲液清洗 2 次;DNA 粗提物溶于 100 μ L TE 缓冲液,加到吸附柱上,1 100 g 离心 5 min,收集过柱样品。

1.2.3 PCR 扩增

PCR 反应采用仅正向引物不同的两对引物^[21](由上海生工生物工程技术有限公司合成):正向引物:P63f:(5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GCG GGG GCA CGG GGG G CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC - 3');P338f:(5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G ACT CCT ACG GCA GGC AGC AG - 3');反向引物:P518r:(5' - ATTAC-CGCGGCTGCTGG - 3')。

取 2 μ L 土壤 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增反应,反应体积 50 μ L^[22]:dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, BSA (8 μ g/ μ L) 2.5 μ L, 正向引物 P63f (或 P338f) (25 μ mol/L) 1 μ L, 反向引物 P518r (50 μ mol/L) 0.5 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, MgCl₂ (50 mmol/L) 1.5 μ L, 重蒸水 36.25 μ L。反应参数^[22]:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 92 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应于 PE 2400 PCR 仪 (Perkin Elmer 公司产品) 中进行。

1.5% 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增效果 (80 V, 1 h), 以 DL 2000 (Takara 公司产品) 作为分子量参照。

1.2.4 DGGE

采用 Bio-rad 公司 Dcode 系统对 PCR 反应产物进行分离。对于 P63f 与 P518r 的扩增产物, 凝胶浓度为 6%, 变性梯度 40% ~ 80%; 对于 P338f 与 P518r 的扩增产物则选用胶浓度为 8%, 变性梯度 30% ~ 60%, 以期最佳分辨效果。

取 PCR 产物 15 μ L 上样。20 V 预电泳 20 min 后调大电压。对 P63f 与 P518r 的扩增产物采用 65 V, 15 h; 而对 P338f 与 P518r 的扩增产物则采用 50 V, 15 h。于每块胶上分别设置 3 个分子量标记 (DL 2000), 将样品隔开。

电泳结束后, 凝胶于 SYBR Green I (1:10 000) 中染色 30 min, 以 Bio-rad 公司的凝胶成像系统 Gel

Doc EQ Gel Documentation System 观测结果。

2 结果与分析

2.1 土壤样品总 DNA 的提取和纯化

采用直接法提取互花米草盐沼和光滩土壤的细菌总 DNA, 所有粗提样品皆呈现为棕褐色, 这是由于滨海滩涂土壤中含有不同程度的腐殖酸, 而该物质对 PCR 扩增反应具有抑制作用^[23], 因此在 PCR 反应前必须对土壤样品的 DNA 粗提物进行纯化。在预备实验中, 发现即使是品质较好的土壤 DNA 提取试剂盒 (如 Qbiogene 公司的 FastDNA SPIN kit for Soil), 也无法保证对土壤中的腐殖酸进行有效去除, 这将极大地影响随后的 PCR 扩增反应。笔者采用 Sepharose 4B 吸附柱对用常规方法分离的 DNA 进行纯化, 有效地解决了这一问题, 为后续的 PCR 反应提供了纯度较高的 DNA 样品模板。

2.2 PCR 产物检测结果

试验采用两对引物对 16S rRNA 进行扩增, 以期获得较多的多态性条带。由于产物检测结果均类似, 因此只显示部分电泳结果 (图 2)。引物 P63f 与 P518r 的预期扩增片段长度为 474 bp, P338f 与 P518r 的预期扩增片段长度为 236 bp。结果显示反应产物未见有非特异扩增, 且条带大小与预期相吻合。

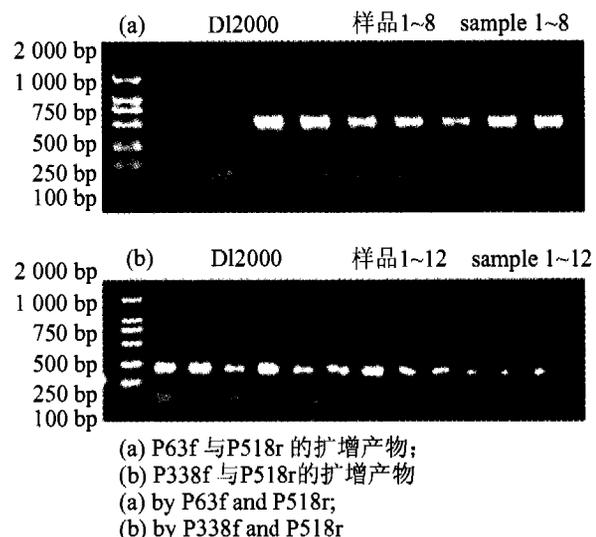


图 2 PCR 反应产物检测结果

Fig. 2 Agrose gel electrophoresis of PCR amplification of 16S rDNA from soil samples used

2.3 DGGE 结果 (16S rDNA 特征) 及数据分析

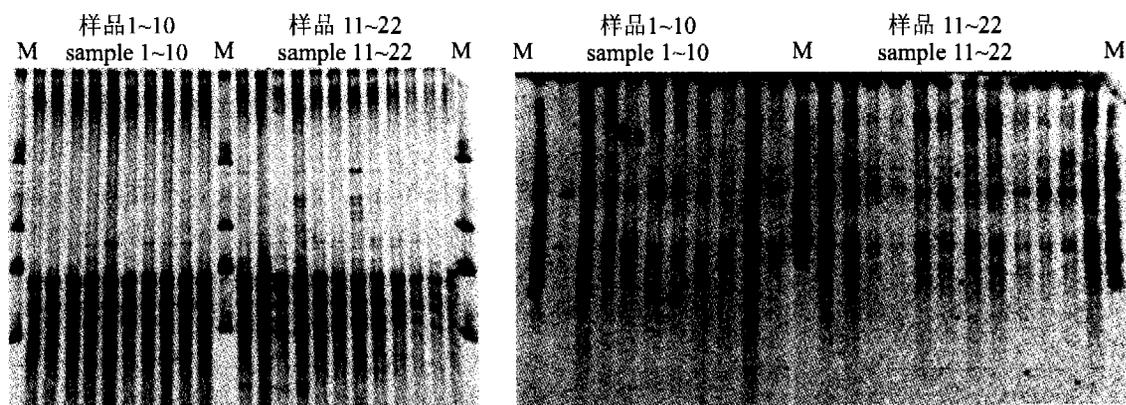
DGGE 结果如图 3 所示, 图中样品 21 和 22 为重复样品, 不计入结果计算; 对于同一模板, 经

P338f 与 P518r 扩增出的条带远多于另一对引物的扩增结果。

DGGE 图谱条带的丰富度显示了微生物群落的多样性程度,条带越丰富,则多样性越高。对胶上显示的明显可辨认条带进行了计数,于两块胶上共选择 16 个位置的条带。各样品在相应位置有条带记为 1,否则记为 0(表 2)。结果显示每个供试土壤样品经过 DGGE 都可以分离出数目不等的电泳条带,且各个条带的强度和迁移率各不相同。

从表 2 可见,沿着向海梯度所取的土壤样品,

其土壤微生物的变化并未显示出相应明显的梯度性;此外,取样季节的变化,伴随着土壤微生物多样性的相应变化:春季(4 月)土壤微生物相对活跃,条带较丰富,群落多样性程度相对较高,而其他季节土壤微生物群落的多样性相对较低;同时,不同季节土壤微生物群落结构发生着变化。虽然 DGGE 结果中的每一条条带可能是由不同细菌种群序列组成,可能会因此低估环境微生物的种群多样性^[24],但是从本试验的结果来看,不论光滩还是互花米草盐沼,其土壤微生物多样性皆不高。



(a) 样品为 P338f 与 P518r 的扩增产物,胶浓度 8%,变性范围 30%~60%;
 (b) 样品为 P63f 与 P518r 的扩增产物,胶浓度 6%,变性范围 40%~80%; M: marker, DL 2000
 (a) samples 1-22 stand for the results of 16S rDNA by P63f and P518r;
 gel concentration: 8%, denaturalization range: from 30% to 60%;
 (b) samples 1-22 stand for the results of 16S rDNA by P338f and P518r;
 gel concentration: 6%, denaturalization range: from 40% to 80%; M means marker DL 2000

图 3 DGGE 分离结果

Fig. 3 DGGE analytical result of 16S rDNA fragments from the soil samples used

表 2 DGGE 条带数据统计结果

Tab. 2 Statistical results of DGGE bands

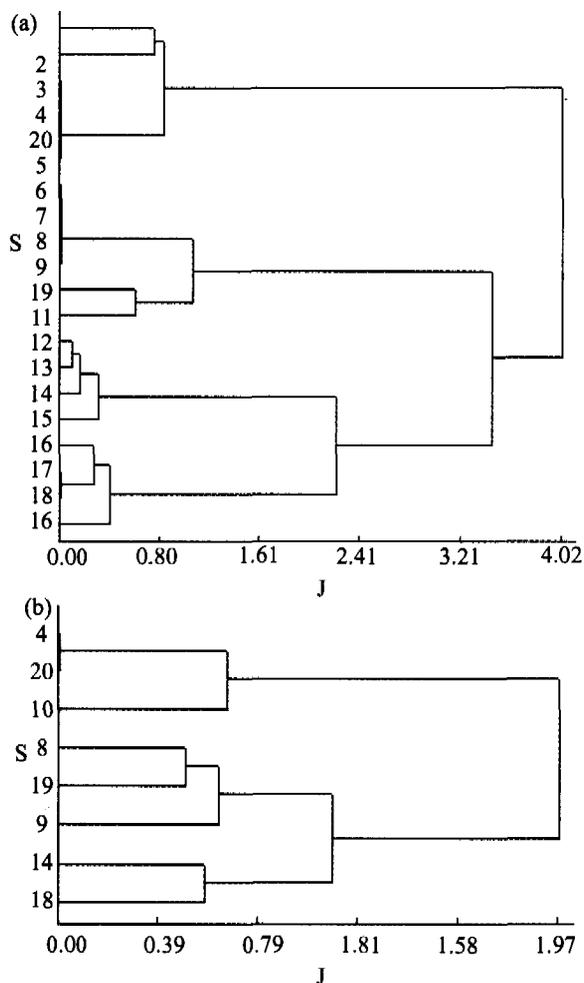
样品 samples	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	共计 total
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
8	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
9	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3
10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	4
11	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	11
12	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	10
13	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	9
14	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	10

(续表 2)

样品 samples	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	共计 total
15	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	8
16	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	7
17	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	10
18	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	10
19	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	3
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2

注:P, position, 表示胶上不同位置的条带

Note: P stands for the bands in the different position of the gel



(a) 所有样品; (b) 只包括混合样品。

S: 样品; J: Jaccard 系数

(a) include all the samples; (b) only mixed samples;

S means sample; J means Jaccard coefficient

图 4 系统聚类图

Fig. 4 Clustering result of the samples studied

对于条带结果笔者使用 DPS 数据处理系统 (3.01 专业版) 进行 0~1 数据系统聚类分析 (Jaccard 系数, 离差平方和法)。结果如图 4 所示: 不同季节不同样地被分为两大类, 其中光滩 10 月、12

月和 7 月的样品被聚为一大类; 另外互花米草盐沼 10 月的样品被很好的聚在一起, 也表明互花米草盐沼内部不同位置土壤微生物群落组成变化很小; 此外互花米草盐沼在 4 月的样品与光滩 4 月的样品表现出一定的相似性, 二者具有一些共同的条带, 如 P4, P6, P7, P8, P9 等, 说明在春季这两种生境均可能存在这几种条带所代表的微生物类型, 此时二者既有共同的微生物种类, 也有自己独特的微生物类型。根据聚类分析的结果, 可以看出互花米草盐沼的土壤微生物在 10 月、12 月和 7 月表现出较大的相似性, 而在 4 月, 其组成发生了相对较明显的变化, 光滩土壤微生物群落组成亦表现出相似的季节变化趋势。说明互花米草的生长, 包括其根际作用改变了滩涂微生物的生长环境, 从而造成了微生物群落的改变。

3 结论

对江苏滨海不同季节光滩与互花米草盐沼的土壤微生物 16S rRNA 特征进行了分析, 得到结论如下:

(1) 互花米草盐沼与光滩土壤微生物中有差异的 16S rRNA 扩增片段通过 DGGE 被分开, 形成可见条带; 不同的样品由于其中微生物群落多样性的差异, 扩增出的条带数量及其在凝胶上的相对位置都有一定的差异。可见 DGGE 能够比较直接的对不同土壤样品进行研究, 且研究结果能够很好的反映土壤微生物群体的多样性。

(2) 滩涂土壤微生物群落随着季节的变化而发生了较大的改变。

(3) 互花米草盐沼与光滩的土壤微生物群落多样性皆较低, 二者在互花米草生长的初期其土壤微生物群落结构具有一定的相似性。但总的来说, 外来种互花米草的种植较明显地改变了滩涂的土壤微生物群落结构。

致谢 感谢周军、吴学军、龚津平、杨扬、韩睿明和陆建明同学在野外取样过程中的帮助。

[参考文献]

- [1] KNUSTON P L, BROCHU R A, SEEELING W N, et al. Wave damping in *Spartina alterniflora* marshes[J]. *Wetlands*, 1982, 2: 87 - 104.
- [2] STUMPF R P. The processes of sedimentation on the surface of a salt marsh[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1983, 17:495 - 508.
- [3] 沈永明,刘咏梅,陈全站. 江苏沿海互花米草 (*Spartina alterniflora*) 盐沼扩展过程的遥感分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2002, 11(2):33 - 38.
- [4] GILLER K E, BEARE M H, LAVELLE P, et al. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function[J]. *Applied Soil Ecology*, 1997, 6:3 - 16.
- [5] PANKHURST C E, OPHEL K K, DOUBE B M, et al. Biodiversity of soil microbial communities in agricultural systems [J]. *Biodiversity and Conservation*, 1996, 5:197 - 209.
- [6] KENNEDY A C, SMITH K L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils [J]. *Plant and Soil*, 1995, 170:75 - 86.
- [7] OGRAM A. Discussion soil molecular microbial at age 20: Methodological challenges for the future [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 1499 - 1504.
- [8] TORSVIK V L, GOKSOYR J, DAAE F L. High diversity in DNA of soil bacteria[J]. *Applied Environment and Microbiology*, 1990, 56:782 - 787.
- [9] MARILLEY L, VOGT G, BLANC M, et al. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA [J]. *Plant and Soil*, 1998, 198: 219 - 224.
- [10] EDER W, LUDWIG W, HUBER R. Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrit Deep, Red Sea [J]. *Arch Microbiol*, 1999, 172: 213 - 218.
- [11] BURTON N P, NORRIS P R. Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: environmental rDNA analysis [J]. *Extremophiles*, 2000, 4: 315 - 320.
- [12] FANG H P, ZHANG T, LI Y. Characterization of an acetate - degrading sludge without intracellular accumulation of polyphosphate and glycogen [J]. *Wat Res.*, 2002, 36: 3211 - 3218.
- [13] DINNELL G O, GORRES H E. 16S rDNA methods in soil microbiology [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10:225 - 229.
- [14] 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 [J]. *Appl Environ Microbiol.*, 1996, 62:340 - 346.
- [15] FISHER S G, LERMAN L S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis [J]. *Cell*, 1979, 16:191 - 200.
- [16] LERMAN L S, FISCHER S G, HURLEY L, et al. Sequence-determined DNA separations [J]. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1984, 13:399 - 423.
- [17] 任美镔,许廷官,朱季文,等. 江苏省海岸带和海涂资源综合调查报告 [M]. 北京:海洋出版社,1985.
- [18] TSAI Y L, OLSON B H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(4): 1070 - 1074.
- [19] HARDWICK E O, YE W, MIRAN M A, et al. Temporal dynamics of three culturable γ - *Proteobacteria* taxa in salt marsh sediments [J]. *Aquatic Ecology*, 2003, 37:55 - 64.
- [20] JACKSON C R, HARPER J P, WILLOUGHBY D, et al. A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12):4993 - 4995.
- [21] BOON N, MARLE C, TOP E M, et al. Comparison of the spatial homogeneity of physio-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53:742 - 747.
- [22] EL F S, VERSCHUERE L, VERSTRAETE W, et al. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65:982 - 988.
- [23] TSAI Y L, BETTY H O. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58:2292 - 2295.
- [24] SCHABEREITER G C, SAIZ J, PINEAR G, et al. Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings [J]. *Environ. Microbiol.*, 2002, 7(4):392 - 400.