

小流域地下水流微生物空间差异分析

黄小兰^{1,2}, 陈建耀^{1*}, 谢丽纯¹, 付丛生¹, 周世宁³

(1. 中山大学地理科学与规划学院, 广州 510275; 2. 广西师范学院资源与环境科学学院, 南宁 530001; 3. 中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要:针对目前水文过程中微生物研究基本空白的现状, 选择了珠海市近海小流域地下水作采样分析, 运用不依赖培养 (cultured-independent) 的分子生物学分析技术, 构建 16S rRNA 基因文库, 研究小流域尺度下微生物的空间分布. 实验数据表明, 近海小流域地下水上、中、下 3 组井的微生物优势类群及其丰度既有相似的地方又有差别. 相似的是 3 组井均以变形菌、Candidate division OPx、古菌 (含泉古菌和广生古菌)、放线菌为优势类群, 而且变形菌均占了很大比例, 在 R、M、D 组井中分别为 23.21%、36.21%、28.84%; 不同的是 R 组井微生物优势类群还有拟杆菌和硝化螺旋菌; M 组井另有真杆菌和酸杆菌, D 组井中则以拟杆菌为优势类群. 从原核微生物 16S rRNA 基因系统发育树可以看出, 3 组井的微生物主要类群大同而小异, 各自的微生物多样性比较丰富, 3 组井的微生物优势类群变化佐证了微生物对地下水环境的生态系统功能有一定的指示作用.

关键词:小流域; 地下水; 微生物; 群落分布

中图分类号: X143 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)10-2299-06

Spatial Characteristics of Microbial Groups Associated with the Groundwater Flow in a Small Watershed

HUANG Xiao-lan^{1,2}, CHEN Jian-yao¹, XIE Li-chun¹, FU Cong-sheng¹, ZHOU Shi-ning³

(1. School of Geography and Planning, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. School of Resource and Environment Sciences, Guangxi Teachers Education University, Nanning 530001, China; 3. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Few reports of microbial groups associated with the groundwater flow system are available in China. 16S rRNA gene library was constructed by the cultured-independent approach to investigate gene sequences of microorganism in groundwater samples from the recharge (R), intermediate (M) and discharge (D) zones of an experimental watershed at Zhuhai campus of Sun Yat-sen University. Proteobacterium, Candidate division OPx, uncultured archaeon (uncultured Crenarchaeote and Euryarchaeote) and Actinobacterium are found predominant in all these three zones with the Proteobacterium accounting for 23.21%, 36.21%, and 28.84% in R, M, D zone respectively. The other predominant microbial groups were identified for varied zones, e. g. Eubacterium and Nitrospira in the R wells, Eubacterium and Acidobacterium in the M wells, and Bacteroidetes bacterium in the D wells. Linkages and potential evolution of microbial groups among three zones were examined by using the genetic neighbor-joining tree. Environmental adaptation along the groundwater flow contributes to the similarity and discrepancy of microorganism in term of the genetic tree, and the ecological functions of the microbial groups need further assessment.

Key words: small watershed; groundwater; microorganism; spatial characteristics

地下水流过程中的生态效应愈来愈受到关注^[1,2], 生态效应影响到地表和地下水环境^[3,4], 目前, 国内外学者致力于研究地下水环境的物理^[5]、化学过程^[6], 对生物过程的研究偏弱, 微生物是地下水环境中极其重要和活跃的部分^[7], 与有机物分解、养分转化和循环等几乎所有的地下水生命过程都相关^[8,9]. 地下水流过程中的微生物研究也是国际生物多样性计划 (DIVERSITAS)^[10] 和我国水利水文基础工作之一^[11], 本研究选择华南滨海典型区域——珠海市近海小流域进行地下水样品采集, 运用不依赖培养 (cultured-independent) 的分子生物学技术, 构建 16S rRNA 基因文库, 分析了小流域尺度

下微生物的群落分布异同, 进而考察了人类活动影响下地下水微生物与环境的响应, 探讨了地下水环境的演变机制^[12], 对增进全球碳、氮循环的认识有一定的理论意义^[13,14], 对饮水安全、养殖业发展、地方性疾病等民生问题有实际意义.

收稿日期: 2009-12-24; 修订日期: 2010-02-26

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (9251027501000021); 国家自然科学基金项目 (40571027); 中山大学后备重点课题项目 (2008-2009); 广东水利科技创新与推广项目 (2009 年度)

作者简介: 黄小兰 (1968 ~), 女, 博士研究生, 副研究员, 主要研究方向为城市化水环境效应, E-mail: huangxiaolanlan@163.com

* 通讯联系人, E-mail: chenjiyao@sysu.edu.cn

1 研究区概况

珠海市位于广东省南部,珠江出海口西岸,濒临南海,东与深圳、香港隔海相望,南与澳门陆路相通,北距广州 140 km,所属区域在北纬 $21^{\circ}43'31'' \sim 22^{\circ}29'14''$ 、东经 $113^{\circ}03'20'' \sim 114^{\circ}24'25''$ 之间。地貌类型多样,有山地、平原、湖泊和海洋。海岸线长 731 km,共有 146 个岛屿,素有“百岛之市”之称。珠海市是国家级的环境保护城市和生态园林城市,珠海市地处 2 103 ~ 1 841 mm 降雨量等值线范围内,雨水为地下水补给提供了充足来源,但因降雨在年内分配不均,导致地下水不同季节获得的补给量差异明显。丰水期补给量最大,枯水期补给量甚少。且由于一段地形、地貌、岩性风化程度及植被覆盖等情况,地下水获得的入渗补给也因地而异。此外,地表水入渗、周边基岩裂隙水的侧向补给、灌溉水的渗入补给,也是地下水补给源之一。珠海市地下水总的流向自西北向东南。本试验的小流域位于珠海市唐家湾中山大学珠海校区,流域从上游补给区至下游排泄区距离约为 2 km,共钻有 17 口井(见图 1),井深 5 ~ 34 m 不等。

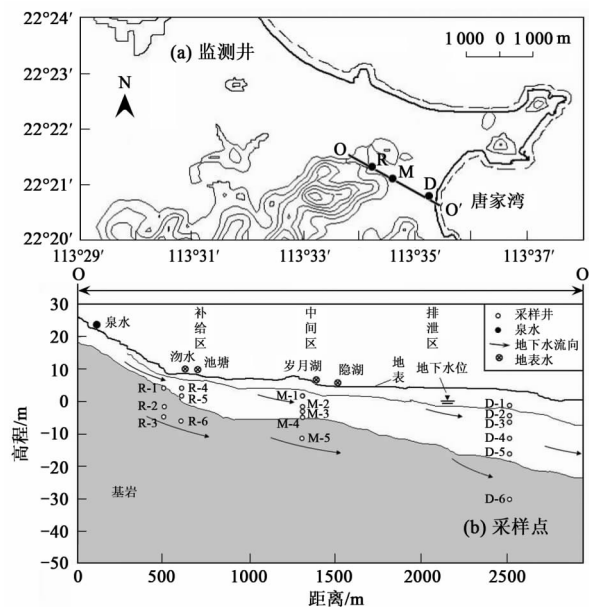


图 1 中山大学珠海校区断面监测井及采样点分布^[15]

Fig. 1 Location map of the groundwater sampling sites in Zhuhai Campus, Sun Yat-sen University and the profile from the recharge to the discharge zone

2 试验方法

2.1 样品采集

样品采集点分别选择了补给区:R-1-6;中间区:

M-1-5;排泄区:D-1-6 共 3 组井,用无菌聚乙烯瓶采集水样 2L/井,随即经 0.8 μm 和 0.22 μm 滤膜两级过滤后,将 0.22 μm 滤膜放入消毒后的冷冻存管中,于冰盒中保存,当天运回实验室 -20°C 以下保存备用。

2.2 水样微生物总 DNA 提取

将 R 组共 6 口井水样混做一个样处理, M 组共 5 口井混做一个样处理, D 组共 6 口井混做一个样处理,采取改进的玻璃微珠法^[16,17]提取水样总 DNA。粗提的总 DNA 中含有较多的杂质,为避免影响后续操作,样品采用美国 OMEGA 公司胶回收试剂盒纯化,置于 -20°C 保存备用。

2.3 PCR 扩增及 PCR 产物克隆

采用原核微生物 16S rDNA 扩增通用引物对^[18] Uni515f:5'-GTG YCA GCM GCC GCG CGG TAA-3' 和 Uni1406R:5'-TGAC GGG CGG TGT GTR CAA-3', PCR 扩增体系为 25 μL :取 1 μL 煮沸的 DNA 模板, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物各 0.5 μL , 12.5 μL Premix Taq 灭菌蒸馏水 10.5 μL 。同时以无菌蒸馏水为模板,设置空白对照。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 循环 35 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增完毕,配制 1.0% 的琼脂糖凝胶,取 4 μL PCR 产物检测扩增效果。通过凝胶电泳判断扩增片段的大小可以达到检测目的^[19]。采用 T-A 克隆方法将 PCR 产物与 PMD18-T 载体连接。

2.4 阳性克隆的检出及 RFLP 分析

随机挑取克隆子,用 M13 引物进行菌落 PCR 扩增反应,并通过琼脂糖凝胶电泳检测出阳性克隆子。PCR 采用 25 μL 体系,加入模板 1.0 μL , 30 个循环。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;然后进入循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。将得到的阳性克隆子 PCR 产物用 2 种内切酶 *Hae* III 和 *Msp* I 分别进行酶切。根据酶切图谱选择不同操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 的代表克隆子送上海生物工程技术公司进行 DNA 序列测定,同时根据公式 $C = 1 - n_1/N$ (N 代表分析的有效 16S rDNA 克隆数, n_1 则代表在 16S rDNA 克隆文库仅出现过一次的 OTU 的数量) 计算克隆文库的覆盖率 (coverage, C) 来反映文库的库容。

2.5 序列分析与进化树的建立

在 NCBI 网站上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 运用 VecScreen 在线检验工具去除载体序列,并通过 BLAST 程序在 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中进行相似性搜

索,选取相似性较高的为参照序列,运用 MEGA4.0 软件对序列进行裁减后构建系统进化树,经重复取样1 000次,进行 bootstrap 值分析,最后得到可信度最高的 1 株.

3 结果与分析

3.1 数据库接受号

地下水样微生物 16S rDNA 的部分序列在 GenBank 核苷酸数据库中接受号为 GU591560-

GU591573、 GU591549-GU591559、 GQ146443-GQ146456.

3.2 16S rRNA 基因克隆文库的分析

用覆盖率(*C*)来评估所构建的文库的微生物多样性.地下水 R、M、D 3 组井样品中微生物 16S rRNA 基因克隆文库的覆盖率分析结果如表 1.分析结果表明所构建的 3 个 16S rRNA 基因克隆文库均包含了 75% 以上的微生物多样性,符合构建文库的要求.

表 1 微生物 16S rRNA 基因文库分析结果

Table 1 Basics of microbial 16S rRNA gene library constructed from samples of three group in Zhuhai

水样	经过酶切的克隆数	有效克隆数	阳性克隆比率/%	OTUs	OTUs ¹⁾	克隆文库覆盖率/%
R	96	78	81.3	29	17	78.2
M	96	81	84.4	31	16	80.2
D	96	85	88.5	36	20	76.5

1) 在 16S rDNA 克隆文库仅出现过 1 次的 OTU 数量

3.3 样品中微生物的类群分析

通过在 NCBI 上进行 16S rRNA 基因序列的比对,得到克隆子最相似的 16S rRNA 基因序列及其所在的属.从微生物的类群多样性的分类统计结果中可以看到(表 2),3 组井的微生物优势类群及其丰度既有相似的地方又有差别.相同的 3 组井均以变形菌、Candidate division OPx、古菌(含泉古菌和广生古菌)和放线菌为优势类群,在 R、M、D 组井中变形菌分别占 23.21%、36.21%、28.84%;Candidate division OPx 分别占 10.72%、8.62%、13.46%;古菌分别占 21.43%、8.62%、23.08%;放线菌分别占 7.14%、12.07%、7.69%.不同的是 R 组井微生物优势类群还有拟杆菌和硝化螺旋菌,分别占 8.93%和 7.14%;M 组井则另有真杆菌和酸杆菌为优势类群,占 12.07%和 5.17%,D 组井中微生物优势类群还有拟杆菌,占 11.55%.同时,3 组井中同样是以变形菌作为被检测出的优势菌群,但是 R 和 D 水样中又以 β -变形菌为优势菌群;在水样 M 中则 α -变形菌为其中的优势菌群, β -、 γ -变形菌次之;并且 D 样中有检测出 δ -变形菌类群,而 R 和 D 水样中未检测到.

R 组井的微生物优势类群拟杆菌属于化能有机营养的专性厌氧杆菌,可代谢碳水化合物、蛋白胨或代谢中间产物,产生可检测的有机酸,这或许与 R 组井处的果园饲养了鸡鸭有关,在 R 组井存在较多的硝化螺旋菌属可将亚硝酸盐氧化成硝酸盐,从而对受污染的水体起“解毒作用”.

M 组井的真杆菌属需严格厌氧下存活,有文献

表明其可能还原硝酸盐,这正与 M 组井所处的地理环境相关,位于中山大学珠海校区的中心,人类活动影响大,而且长期在附近存有生活垃圾,M 组井检测到 γ -变形菌纲的甲基球形菌属能在低氧气浓度和产甲烷的环境中以甲烷或甲醇作为其唯一的碳和能量来源生长,表明微生物与周围环境有很好的互动关系.

D 组井位于环境复杂的海-陆交错带,其中形成不同的微环境单位,在整体无氧环境中的微环境单位中有可能是含氧的,兼备了相邻的陆地生态系统和海洋生态系统的特征.例如在其中检测出属于变形细菌门的红环菌可用分子氢进行光自养生长,容易利用不同的有机底物作为碳源和电子供体进行厌氧光照生长,也可在黑暗微好氧到好氧条件下生长,为有机物残体的降解起重要作用,对海陆交错带生态系统中碳氮循环的正常进行有不可忽视的贡献.

3.4 16S rRNA 基因系统发育树的构建

每个样品文库随机选取 96 个阳性克隆子进行 RFLP 分析后,挑选不同的分型(OTU)进行 16S rDNA 测序,将获得的结果构建原核微生物 16S rRNA 基因系统发育树,分支上的数值代表经 1 000 次计算后的置信度值,样品微生物的 16S rDNA 克隆子分别命名为 Rx、Mx 和 GW/ZH GW_x(*x* 为数字).图 2~4 为 R、M、D 组井地下水 16S rDNA 的聚类结果.在 3 棵系统发育树中,大部分克隆子与 GenBank 中相似度最高的参照序列归属在一起,也有些克隆子存在归属错位的现象,3 组井的 16S rRNA 基因克隆文库均统一以珠海的部分克隆子

表 2 R、M、D 组井水样的主要微生物类群统计

Table 2 Microbial communities of analyzed clones from water samples of R, M, D

微生物类别	R		M		D	
	克隆数	丰度/%	克隆数	丰度/%	克隆数	丰度/%
α-Proteobacterium	2	3.57	9.00	15.52	2	3.84
β-Proteobacterium	10.00	17.85	8.00	13.79	7.00	13.46
γ-Proteobacterium	1.00	1.79	4.00	6.90	3.00	5.77
δ-Proteobacterium	—	—	—	—	3.00	5.77
Nitrospirae	4.00	7.14	—	—	—	—
Bacteroidetes	5.00	8.93	—	—	6.00	11.55
Eubacterium	2.00	3.57	7.00	12.07	—	—
Candidate division OPx	6.00	10.72	5.00	8.62	7.00	13.46
Acidobacteria	—	—	3.00	5.17	1.00	1.92
Crenarchaeote	9.00	16.07	4.00	6.90	8.00	15.39
Euryarchaeote	3.00	5.36	1.00	1.72	4.00	7.69
Actinobacteria	4.00	7.14	7.00	12.07	4.00	7.69
Verrucomicrobia	1.00	1.79	—	—	—	—
the others	9.00	16.07	10.00	17.24	7.00	13.46

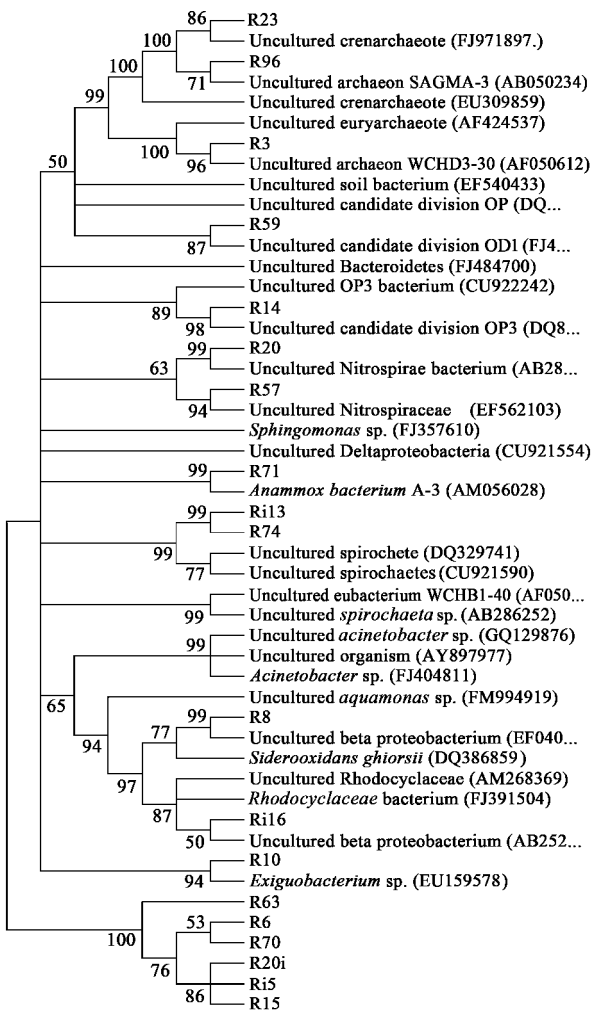


图 2 R 组井原核微生物 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of prokaryotic from R samples

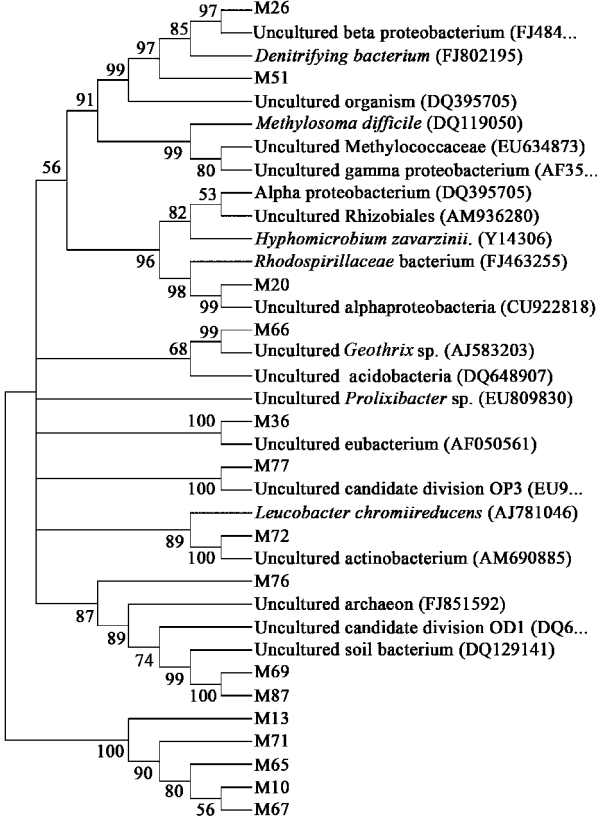


图 3 M 组井原核微生物 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of prokaryotic from M samples

16S rRNA 基因序列作为外群,实际上在序列比对时,它们与系统发育树上的已知微生物类群序列的相似性都很高,例如 R 组井的 R15 克隆子与 Acinetobacter 相似度达 99%,Query coverage 值也有

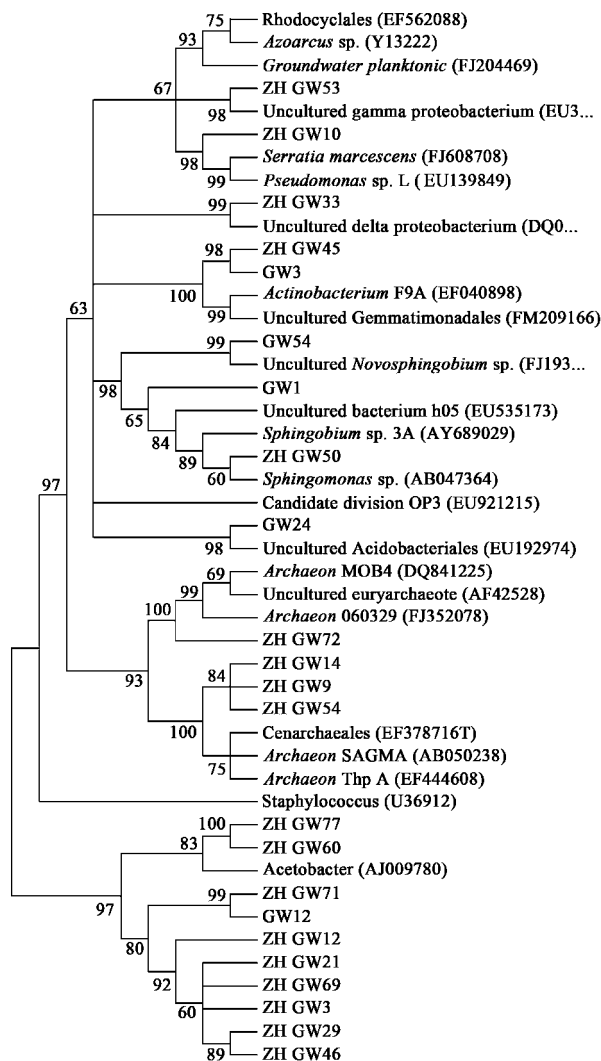


图4 D组井原核微生物16S rRNA基因系统发育树

Fig. 4 Neighbor-joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of prokaryotic from D samples

87%, R20i 克隆子与 Uncultured organism 相似度达 99%, 它们不与系统发育树上相应的类群归属在一起, 却自成一分支; M 组井的 M71 与 Uncultured actinobacterium 相似度达 99%, 也不与 Uncultured actinobacterium 聚合, 而 M72 与 Uncultured Methylococcaceae bacterium 相似度达 99%, 却与 Uncultured actinobacterium 归属在一起, 同样地, D 组井的 ZH GW21 与 Pseudomonas 相似度达 99%, Query coverage 值是 76%, 它在系统发育树上不与相似度最高的 Pseudomonas 归属在一起, 而是与 D 组井的其余克隆子如 ZH GW69、ZH GW3 等成一分支, 这也许与进化距离算法, 跨类群的丰富程度等因素有关, 也可能本来就是地下水样品的克隆子亲缘

关系更为接近。

从 3 组井 R、M、D 微生物的 16r RNA 基因系统发育分析的 Neighbor-Joining 树大致可以看出, 由于出自同一小流域, 微生物的主要类群比较接近, 但是各自的微生物多样性比较丰富, 表现出的序列归属与序列比对分析统计分类的结果具有较好的一致性。

4 讨论

4.1 井中的细菌类群多样性

从覆盖率分析上看, C 值均超过 75%, 可以认为基本反映了所属环境中微生物的多样性情况, 因为国内外研究地下水流过程中的微生物文献很少, 以小流域作为研究区的尚未见报道, 所以本研究所覆盖的微生物类群目前尚无法与其它研究区域的相比较。

4.2 3 组井微生物类群的分布

从上游井至海边井约 2 km, 按地下水流速度 $100 \text{ m/a}^{[15]}$ 计, 水流时间 10 a, 使得整体差异较小, 3 组井均以变形菌、Candidate division OPx、古菌 (含泉古菌和广生古菌) 和放线菌为优势类群, 变形菌 (Proteobacteria) 是比较常见的微生物类群, 主要涉及 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 几个纲。变形菌类群及其多样性也因水的化学成分、pH 值以及温度的不同而有所差别。本研究中, 每组井的水样, 均检测出超过 $1/5$ 多的变形菌门类群的克隆子; Candidate division OPx 系列则最先发现于热泉地区, 不过也适应于各种类型的生态环境, 在海洋沉积物中也是常见的类群, OP8 和 OP10 类群同源序列都来自秘鲁边缘深海沉积物, OP11 一般发现于硫化物 (如海洋环境中的硫酸盐和硫化物) 含量较高的还原环境, 推测该类群参与硫的生物地球化学循环^[20], 3 组井地下水中 Candidate division OPx 均以优势类群出现, 或许与研究区第四纪气候冷暖变化而发生海侵海退的演替及海陆交互环境相关^[21]。

4.3 小流域微生物与水环境的响应

沿地下水流方向 (补给区-径流区-排泄区), 研究区域内地下水水化学类型主要从 Ca-Na-HCO₃-Cl 型向 Na-Cl 及 Na-Ca (Mg)-HCO₃-Cl 型演化^[22]; 研究区电导值表现出补给区相对稳定, 平均电导为 9.94 mS/m, 地下水流过程受物理化学因素影响, 到中间区电导平均值为 28.53 mS/m, 稍高于补给区, 位于海边排泄区的 6 口观测井电导率平均值为 104.04 mS/m, 明显高于补给和中间区, 且具有周期

性起伏趋势,可能受到海水入侵的影响;研究区的氧化反应电位同样地表现为排泄区高于补给和中间区;而水温和 pH 值基本上没多大差异.理论上,R 和 M 二组井微生物群落与 D 相比,应该更为相似,但是因为有了人类活动的扰动,所以在流域中显示为优势菌落的泉古菌在中间区只占 6.9%,明显少于补给区的 16.07% 和排泄区的 15.39%,而且中间区的放线菌占到了 12.07%,多于补给区和排泄区的 7.14% 和 7.69%,其微生物特征与 M 组井原为池塘,后经人工回填土堆积之环境吻合,显示人类活动对 M 组井地下水的的影响较为显著.总之,3 组井的微生物优势类群的细微差别佐证了近海小流域补给区-径流区-排泄区与环境相吻合的互动关系.

5 结论

(1)小流域地下水上游、中、下游三组井的微生物均以变形菌、Candidate division OPx、古菌(含泉古菌和广生古菌)、放线菌为优势类群,在 R、M、D 组井中变形菌分别占 23.21%、36.21%、28.84%;Candidate division OPx 分别占 10.72%、8.62%、13.46%;古菌分别占 21.43%、8.62%、23.08%;放线菌分别占 7.14%、12.07%、7.69%.

(2)小流域地下水水流过程中因为人类活动的影响体现出微生物类群亦有所差异,在 3 组井共有优势类群的同时,上游 R 组井微生物优势类群还有拟杆菌和硝化螺旋菌,分别占 8.93% 和 7.14%;中游 M 组井另有真杆菌和酸杆菌为优势类群,占 12.07% 和 5.17%;下游 D 组井中微生物优势类群还有拟杆菌,占 11.55%.而且,3 组井中同样是以变形菌作为被检测出的优势菌群,但 R 和 D 组井水样中又以 β -变形菌为优势菌群;在 M 组井中则 α -变形菌为其中的优势菌群, β -、 γ -变形菌次之;并且 D 样中有检测出 δ -变形菌类群,而 R 和 D 水样中未检测到.

(3)从三组井 R、M、D 微生物 16S rRNA 基因系统发育树看来,除少数克隆子存在归属错位的现象之外,大部分克隆子与 GenBank 中相似度最高的参照序列归属在一起,由于出自同一小流域,微生物的主要类群比较接近,但是各自的微生物多样性比较丰富,表现出的序列归属与序列比对分析统计分类的结果具有较好的一致性.

参考文献:

[1] Larson K J, Basagaoglu H, Marino M A. Prediction of optimal safe groundwater yield and land subsidence in the Los Banos

Kettleman City area, California, using a calibrated numerical simulation model[J]. *Journal of Hydrology*, 2001, **242**:79-102.

[2] 杨志峰,崔保山,黄国和,等.黄淮海地区湿地水生态过程、水环境效应及生态安全调控[J]. *地球科学进展*, 2006, **21**(11): 1119-1126.

[3] 赵新锋,曾松青,陈建耀,等.“珠三角”地区城市化对地下水水质影响案例研究[J]. *生态环境*, 2008, **17**(2):533-536.

[4] 吴海燕,徐红霞,洪宜斌,等.长三角地区有机农药污染地下水的微生物群落分析[J]. *农业环境科学学报*, 2009, **28**(9): 1898-1902.

[5] 付丛生,陈建耀,曾松青,等.滨海地区潮汐对地下水位变化影响的统计学分析[J]. *水利学报*, 2008, **39**(12):1365-1376.

[6] 杨平恒,旷颖仑,袁文昊,等.降雨条件下典型岩溶流域地下水中的物质运移[J]. *环境科学*, 2009, **30**(11):3249-3255.

[7] De Vet W W, Dinkla I J, Muyzer G, et al. Molecular characterization of microbial populations in groundwater sources and sand filters for drinking water production [J]. *Water Research*, 2009, **43**(1):182-194.

[8] Griebler C, Lueders T. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems[J]. *Freshwater Biology*, 2009, **54**(4): 649-677.

[9] Bethke C M, Ding D, Jin Q S, et al. Origin of microbiological zoning in groundwater flows[J]. *Freshwater Biology*, 2008, **36**(9): 739-742.

[10] 蔡运龙,李双成,方修琦.自然地理学研究前沿[J]. *地理学报*, 2009, **64**(11): 1363-1374.

[11] 王洪杰,史学正,李宪文,等.小流域尺度土壤养分的空间分布特征及其与土地利用的关系[J]. *水土保持学报*, 2004, **18**(1):15-18.

[12] 李政红,张翠云,张胜,等.地水微生物学研究进展综述[J]. *南水北调与水利科技*, 2007, **5**(5):60-63.

[13] 姜丽晶.珠江口沉积物微生物多样性及其与环境相互关系的研究[D]. 厦门:国家海洋局第三海洋研究所,2007.

[14] 梁进社.地理学的十四大原理[J]. *地理科学*, 2009, **29**(3): 307-315.

[15] 赵新锋.城市化地下水环境效应研究[D]. 广州:中山大学, 2008.

[16] 肖凯,曹理想,陆勇军,等.广东省金山温泉沉积物微生物多样性初步分析[J]. *微生物学报*, 2008, **48**(6):717-724.

[17] 陈彬,马超,周世宁,等.西藏羊八井废弃地地热井的细菌多样性[J]. *微生物学报*, 2009, **49**(2):217-226.

[18] Godon J J, Zumstein E, Dahert P, et al. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(7):2802-2813.

[19] 王廷华,景强. PCR 理论与技术. 21 世纪生物技术丛书[M]. 北京:科学出版社,2005. 24.

[20] Harris J K, Kelley S T, Pace N R. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(2):845-849.

[21] 王开发,张玉兰,蒋辉东,等.东海陆架区更新世晚期沉积的化石藻类组合及其古生态环境分析[J]. *生态学报*, 1984, **4**(3):224-232.

[22] 赵新锋,陈建耀,唐常源,等.珠江三角洲小流域地下水化学特征及演化规律[J]. *生态环境*, 2007, **16**(6):1620-1626.