

珠江口颗粒附着微生物群落沿环境梯度的演替

范艳君^{1,2} 朱 玲^{2*} 朱 伟¹ 高志强^{1,2} 庄志猛²

(¹青岛农业大学生命科学学院, 青岛 266109)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 将 PCR-DGGE 技术和典范对应分析相结合, 研究了珠江口水体颗粒附着微生物群落沿环境梯度的空间分布特征及其影响因素。DGGE 指纹图谱分析表明, 颗粒附着微生物群落沿环境梯度表现出明显的空间演替; 不同站位之间既存在共同谱带, 又具有各自的特征谱带; S4 和 S5 两个站位的微生物群落结构与其相邻站位相比, DGGE 指纹图谱变化明显, 是颗粒附着微生物从海淡水混合区向海水区演替的中间过渡类型。对 DGGE 图谱中 19 条主带回收、测序表明, 两个序列与已培养的微生物同源性 $\geq 99\%$, 其余 17 条序列均与未培养的环境微生物种群具有很高的相似性 (91% ~ 100%); 变形菌门和拟杆菌门是珠江口颗粒附着微生物的优势种群, 其中变形菌门为绝对优势种群 (78.9%)。典范对应分析显示, 氮相关营养盐水平和盐度是影响水体颗粒附着微生物群落分布格局的两个主要因素。

关键词 颗粒附着微生物 变性梯度凝胶电泳 典范对应分析 珠江口

中图分类号 S932.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)03-0008-07

Succession of particle-attached bacterial community structure along environmental gradient in the Pear River Estuary

FAN Yan-jun^{1,2} ZHU Ling^{2*} ZHU Wei¹

GAO Zhi-qiang^{1,2} ZHUANG Zhi-meng²

(¹College of Life Science, Qingdao Agricultural University, 266109)

(²Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Community structure and spatial distribution of the particle-attached bacteria along environmental gradient in the Pear River Estuary, as well the influencing factors, were studied by PCR-DGGE and canonical correspondence analysis. The DGGE profiles showed significant spacial succession of the particle-attached bacteria along environmental gradient. Some bands from DGGE gel were shared by two or more stations, while the others belonged to the special station. The bacterial communities in S4 and S5, differed significantly from those in adjacent stations, with transitional form from the freshwater-seawater mixing zone to seawater

国家自然科学基金项目(40776090;40976073)资助

* 通讯作者。E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

收稿日期:2011-06-15;接受日期:2012-03-09

作者简介:范艳君(1987-),女,硕士研究生,主要从事微生物分子生态学。E-mail: yanjunfan2008@163.com

zone. Sequence analysis of nineteen major bands from DGGE profiles revealed that two sequences were highly similar to those of the cultured bacteria ($\geq 99\%$), and the others were similar to those of the uncultured bacteria ($91\% \sim 100\%$). Proteobacteria and bacteroidetes were dominant populations in all stations, particularly proteobacteria (78.9%). Canonical correspondence analysis indicated that nitrogen nutrient and salinity were the major contributing parameters for the spatial distribution of the particle-attached bacterial community structure in the Pear River Estuary.

KEY WORDS Particle-attached bacteria Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)
Canonical correspondence analysis Pear River Estuary

珠江口是珠江流域的主要入海口,受海陆作用的交互影响,河口区域各种物理、化学、生物等因素变化剧烈,生态系统脆弱而敏感,易受各种人为活动的干扰和破坏。自20世纪70年代,随着珠江三角洲地区经济迅猛发展,大量生产、生活废物、废水随珠江径流和土表径流等途径汇入珠江口,导致水质富营养化及赤潮频繁发生,给河口生态系统造成了巨大影响(Qiu *et al.* 2010)。颗粒附着微生物(Particle-attached Bacteria)作为水体微生物的一种重要存在方式,能够直接降解水体颗粒有机物或有机碎屑并转化为自身生物量,通过微捕食者(主要是鞭毛虫和纤毛虫等原生动物)的摄食作用流向更高营养级,是“微生物食物环”(Microbial loop)的关键环节之一,对河口生态系统主要食物链起高效补充作用,在河口生态系统的生源要素转化、能量流动及生态系统多样性和稳定性维护等方面发挥重要作用(Boynton *et al.* 2008; 郑天凌等 2002)。同时,颗粒附着微生物与环境之间关系密切,其群落组成和结构反应了颗粒附着微生物对栖息环境的适应,而环境条件的改变也直接或间接影响着颗粒附着微生物群落结构的演化,二者之间的相互作用对河口生源要素的生物地球化学循环过程起着重要的调节作用(LaMontagne *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2007)。

自从Muyzer等(1993)首次将DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)指纹分析技术引进微生物生态学研究领域,该技术不依赖限制性酶切,从而保证了目标DNA的完整性;能同时反映多个环境样品中微生物群落的多样性、丰度和均度等优势,特别适合微生物群落时空变化与演替的研究;分离的目标DNA片段可直接测序等,使这一技术被广泛用于各种环境样品微生物群落结构分析(Fontana *et al.* 2005; Sharma *et al.* 2006)。典范对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA)是一种非线性多元直接梯度分析方法(ter Braak 1986)。不同于以往的直接梯度分析,CCA将对应分析与多元回归相结合,可同时解析多个环境因子,包含的信息量大,结果直观明显,从而更好地反映了生物群落与环境的关系。近年来,CCA被广泛应用于动物、植物群落与环境因子间复杂关系的研究(Attayde *et al.* 1998; 栾青杉等 2007),但在微生物分子生态学应用的相关报道还很少。本研究将PCR-DGGE技术与典范对应分析相结合,研究了珠江口颗粒附着微生物群落结构沿环境梯度的变化特征,探讨了颗粒附着微生物群落结构对环境的适应策略及影响珠江口颗粒附着微生物群落结构演替的主要环境因子。

1 材料与方 法

1.1 样品采集与理化因子分析

2007年12月沿珠江口盐度梯度选取7个站位(图1),采集沉积物上方0.5m水样。用 $1.0\ \mu\text{m}$ 聚碳酸酯微孔滤膜(Millipore)过滤收集颗粒附着微生物,保存于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱用于基因组DNA提取。用GF/F玻璃纤维滤膜过滤水样,保存于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱用于营养盐分析。每个站位设置3个重复。

水温、盐度等环境参数用YSI6600现场测定。营养盐测定方法参照《海洋监测规范》(GB17387.4,2007)进行:磷酸盐($\text{PO}_4\text{-P}$)采用磷钼蓝法测定;氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)采用次溴酸盐氧化法测定;亚硝酸盐($\text{NO}_2\text{-N}$)采用萘乙二胺法测定;硝酸盐($\text{NO}_3\text{-N}$)采用镉柱还原法测定;用元素分析仪PE 2400分析颗粒有机氮(PON)、颗粒有机碳(POC)含量;用灼烧法测定总悬浮颗粒物(TPM)和颗粒有机物(POM)。

1.2 DNA 的提取与 PCR 扩增

基因组 DNA 提取参照 Zhou 等(1996)的基于 SDS 的 DNA 提取方法。以 GC341F(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3')和 758R(5'-CTA CCA GGG TAT CTA AT CC-3')为引物进行 PCR 扩增。25 μ l 的 PCR 反应体系包括: 2.5 μ l 10 \times PCR Buffer, 1.5 μ l MgCl₂(25 mmol/L), 2 μ l dNTP (25 mmol/L), 1 μ l 引物 (10 μ mol/L), 0.2 μ l (1U) *Taq* 酶, 1 μ l DNA 模板, 15.8 μ l 无菌水。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s(每个循环降 1 $^{\circ}$ C 至退火温度为 55 $^{\circ}$ C)(Touchdown PCR), 然后再进行 25 个循环: 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将每个站位 3 个重复样品的 PCR 产物混合, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)与测序

DGGE 指纹图谱分析采用 DCodeTM 系统(Bio-Rad)。每个站位 200 ng PCR 产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶中分离, 变性梯度为 40% ~ 70%。运行条件在 1 \times TAE 电泳缓冲液中, 60 $^{\circ}$ C, 80V 恒温、恒压下电泳 16h。电泳结束后在 1 \times TAE 缓冲液中用 Genefinder(1:10 000)染色 25 min, 在凝胶成像分析系统(Bio-Rad)中拍照, 采用 Quantity One 分析软件(Bio-Rad)分析 DGGE 指纹图谱。

从 DGGE 凝胶上小心切下不同位置清晰的电泳主带, 用无菌水反复冲洗 3 次后, 置于 50 μ l 无菌水中 4 $^{\circ}$ C 过夜。以上清液为模板, 341F(不含 GC-clamp)和 758R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物切胶纯化, 与 pMD18-T (Takara) 载体连接后, 转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中。利用载体通用引物 M13F/M13R 筛选菌落, 以去除假阳性和非目标克隆。以阳性克隆为模板, 进行二次 DGGE(条件与第一次相同), 选取位置相同的谱带测序。

1.4 系统发育分析

序列相似性搜索通过 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Blastx 程序进行。选取相似性最高的序列作为构建系统进化树的参照序列, 利用 EBI 的 ClustalW2 程序(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)和 MEGA 4.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树, 进行系统发育分析。

1.5 典范对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA)

采用 Canoco for Windows 4.5 软件对微生物种群数据和环境数据进行 CCA 分析。种群数据和环境数据经过 $\lg(x+1)$ 转换, 用 WCanolmp 分别将其生成名为 sp. dta 和 env. dta 的文件, 应用 Canoco Windows 4.5 进行运算, 用 Canodraw for Windows 作图。

2 结果

2.1 环境因子特征

珠江口底层水的理化性质见图 2。从总体趋势看, 沿入海口方向, 盐度呈梯度递增。与历史数据相比, 由

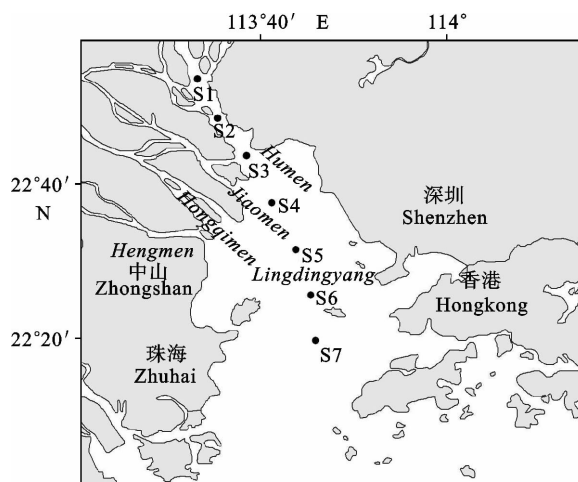


图 1 珠江口采样站位

Fig. 1 Sampling stations in the Pear River Estuary

于采样时间恰逢珠江口咸潮,使 S1~S4 站位的盐度显著提高,本来处于淡水区 S1 站位和海淡水混合区分界线附近 S2 站位盐度升高了近 20 倍,S3~S4 站位也由低盐混合区变成了高盐混合区(殷建平等 2006)。NH₄-N、NO₃-N 和 TIN 浓度沿入海口方向总体呈递减趋势,S1 最高,S7 最低。NO₂-N 含量始终处于较低水平,也呈轻微递减趋势。与全球其他海域、海湾和河口相比,TIN(80.50~129.17 μmol/L)和 N/P(62.89~118.50)明显偏高,说明珠江口富营养化程度较高(温伟英等 1995)。PON、POC、TPM 和 POM 表现了站位的特异性,没有明显的变化规律。

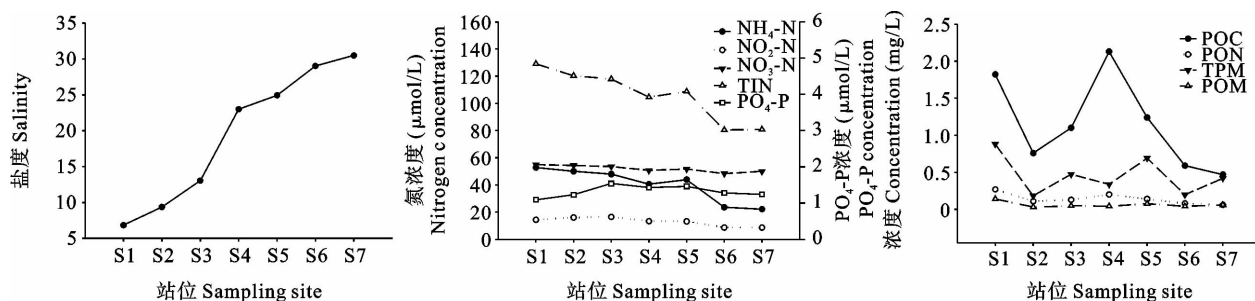


图 2 采样站位的环境因子特征

Fig. 2 Physical and biogeochemical characteristics of sampling sites in the Pear River Estuary

2.2 颗粒附着微生物 16S rDNA 的 DGGE 指纹图谱分析

对珠江口 7 个站位底层水的颗粒附着微生物群落结构进行 DGGE 指纹图谱分析显示(图 3):颗粒附着微生物的群落结构沿环境梯度表现出明显的空间演替。不同站位之间既存在共同谱带(如 PRE-19 为所有站位共有谱带;PRE-13 为 S5~S7 站位共有的谱带),也具有各自特征谱带(如 PRE-6、PRE-7 为 S4 特有的谱带;PRE-8、PRE-9 为 S5 特有的谱带)。沿着环境梯度既有新优势种群的繁衍(如 PRE-16 沿 S5~S7),也有某些优势种群的衰亡(如 PRE-1 沿 S1~S4)。

为了更直观反映各站位间颗粒附着微生物群落结构的相似性,作者采用 Quantity One 分析软件,以戴斯系数(Dice coefficient, Cs)量化了不同站位 DGGE 指纹图谱之间的相似性,用非加权算术平均法(The unweighted pairgroup method with arithmetic averages, UPGAMA)对 DGGE 指纹图谱进行聚类分析结果显示(图 4),7 个站位样品按 S1~S3、S4、S5、S6~S7 归为 4 族。族内相似性(61%~77%)明显高于族间相似性(37.0%~54.0%)。S6 与 S7 之间相似性最高(77%),说明两个站位颗粒附着微生物群落结构非常相似,其次为 S1、S2 和 S3,相似性为 61%~66%。S4 和 S5 各自独立成族并介于 S1~S3 和 S6~S7 两族之间,说明这两个站位的颗粒附着微

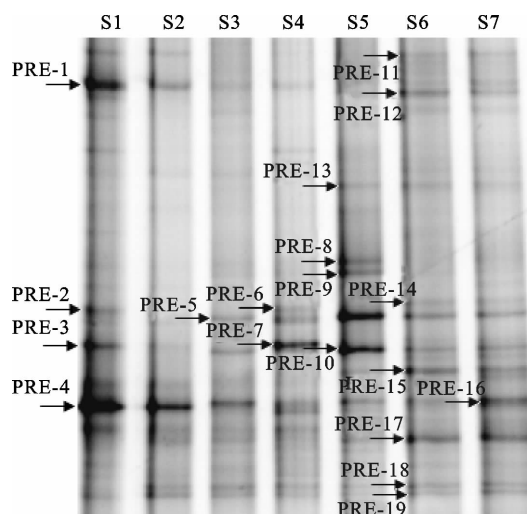


图 3 珠江口水体颗粒附着微生物 16S rDNA 的 DGGE 指纹图谱

Fig. 3 DGGE profiles of particle-attached bacterial 16S rDNA from water in the Pear River Estuary

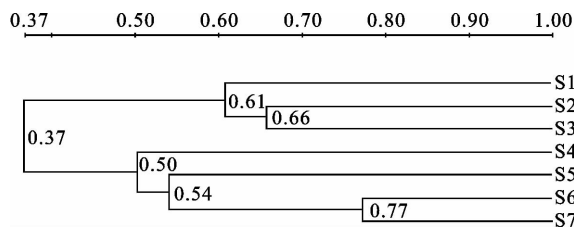


图 4 珠江口水体颗粒附着微生物 DGGE 图谱的 UPGAMA 聚类分析

Fig. 4 Clustering analysis of particle-attached bacterial DGGE profiles in water from the Pear River Estuary

生物群落结构与其相邻站位相比发生了较大的变化,是颗粒附着微生物从低盐海淡水混合区向海水区演替的中间过渡类型。

2.3 颗粒附着微生物 16S rDNA 的系统进化分析

切割 DGGE 图谱中不同位置的电泳主条带进行测序,共获得 19 条大小在 438~463bp 之间的 16S rDNA 序列,序列号为:HQ330737~HQ330755。将所有序列通过 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Blastx 程序进行相似性搜索发现:所获的序列与数据库中 16S rDNA 序列相似性在 91%~100%之间,除两个序列 PRE-2 和 PRE-6 与已培养的微生物 *Marivita* sp. RCC 1921(HQ871858)和 *Alpha proteobacterium* INB6(AB599907)的相似性 $\geq 99\%$ 外,其他 17 条序列均与未培养环境微生物具有很高的相似性。与它们最相似的序列中 11 条来自海水(HQ871858、AM990710、DQ189908、HM802458、FJ745136、DQ421777、DQ189935、EU512919、FJ745178、DQ189829、FJ744888)、1 条来自海岸带沉积物(DQ112498)、3 条来自淡水(AB599907、HM534209、AB607322)、3 条来自富营养化污染的湖泊或废水(HM051039、FJ828391、DQ435198)、1 条来自碳氢化合物污染的河流沉积物(EF575563)。利用上述序列构建系统发育树,结果如图 5:变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)在珠江口所有站位中均为优势种群,其中变形菌门为绝对优势种群,

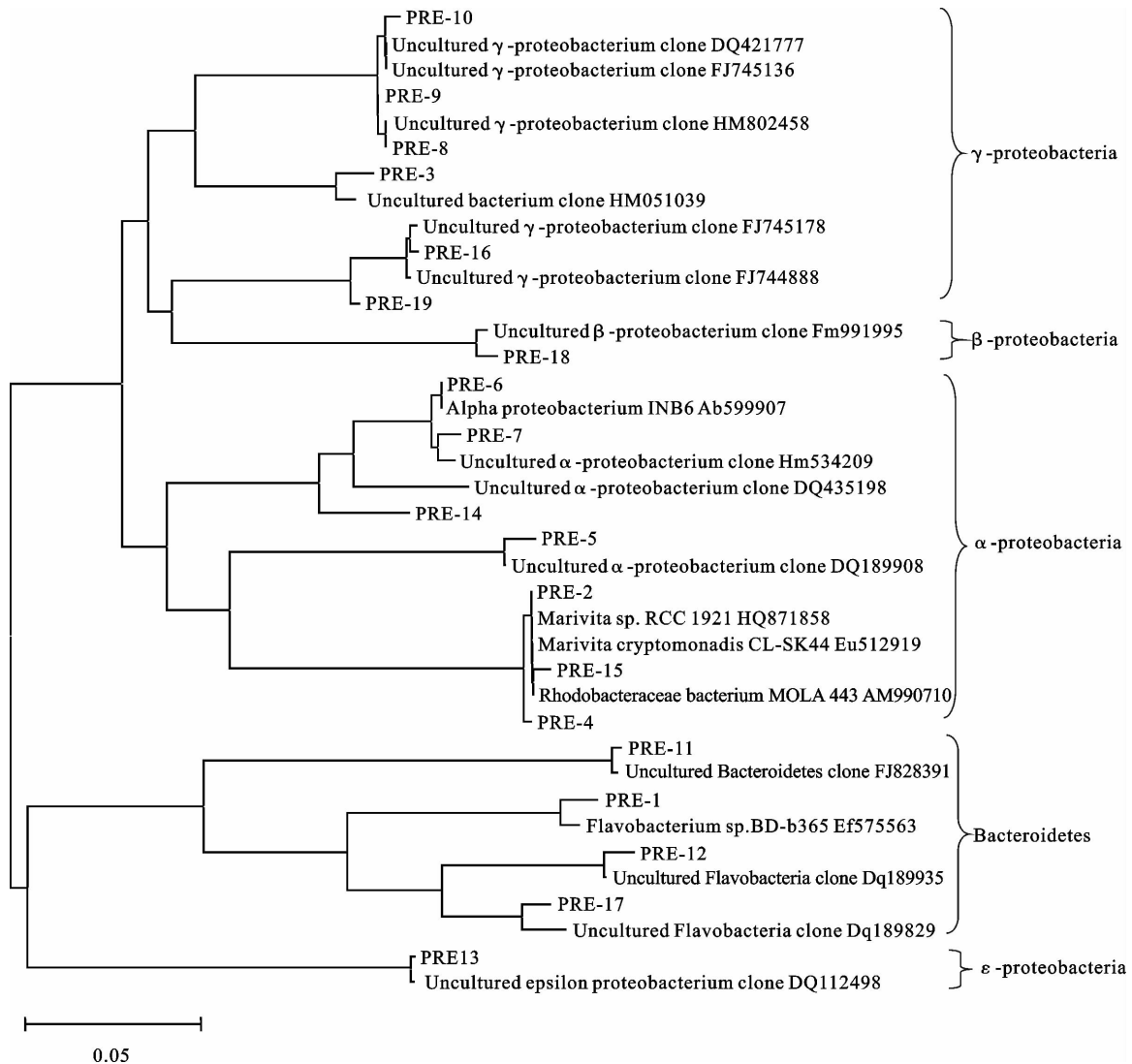


图 5 珠江口水体颗粒附着微生物 16S rDNA 的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of particle-attached bacterial 16S rDNA sequences in water from the Pear River Estuary

19 条序列中有 15 条(78.9%)分别与该类群的 α 变形菌纲(α -proteobacteria)、 β 变形菌纲(β -proteobacteria)、 γ 变形菌纲(γ -proteobacteria)和 ϵ 变形菌纲(ϵ -proteobacteria)高度相似。

2.4 颗粒附着微生物群落结构组成与环境因子的典范对应分析

应用典范对应分析(CCA),将 DGGE 图谱数字化后与环境因子相结合,探讨环境因子对珠江口水体颗粒附着微生物群落结构的影响(图 6)。在 CCA 排序中(图 6),环境因子用带有箭头的线段表示,向量长短代表了其为主轴中的作用,箭头所处象限表示环境因子与排序轴之间相关性的正负。第一、第二排序轴间的相关系数都为 0,说明排序结果是可信的。分析发现,与第一排序轴(水平)关系最大的是 $\text{NH}_4\text{-N}$ (0.785)和 TIN(0.755);其次为 $\text{NO}_2\text{-N}$ (0.574)和 $\text{NO}_3\text{-N}$ (0.555),均为正相关。与第二排序轴(垂直)关系最大的是 Salinity(0.626),其次为 $\text{NO}_2\text{-N}$ (0.374)、 $\text{NO}_3\text{-N}$ (0.384),均为正相关。图 6 的分析结果表明,氮相关营养盐水平与珠江口水体颗粒附着微生物群落结构组成的关联作用最大,其次是盐度,说明珠江口咸潮发生期,氮相关营养盐水平和盐度是影响水体颗粒附着微生物群落分布格局的两个主要因素。

3 讨论

颗粒附着微生物附生在颗粒物、有机分泌物或生物残体上,直接降解附着物并转化为自身生物量,在河口食物网中发挥着重要作用(Zhang *et al.* 2007)。目前,针对我国河口或海岸带颗粒附着微生物群落结构的研究还鲜有报道,但国际上已有学者将水体浮游微生物划分为颗粒附着微生物和自由生活微生物(Free-living Bacteria)分别予以研究,并获得以下结果:a)自由生活微生物的丰度高于颗粒附着微生物,但颗粒附着微生物的生物活性是自由生活微生物的 10~100 倍,占水体异养微生物活性的 90%以上(Crump *et al.* 2004);b)颗粒附着微生物群落多样性较低,自由生活微生物群落多样性相对丰富,二者之间既有明显的群落结构差异,又有部分重叠(Bidle *et al.* 1995;LaMontagne *et al.* 2003);c) α 和 γ 变形菌纲是颗粒附着微生物的主要优势菌群(Bidle *et al.* 1995;LaMontagne *et al.* 2003)。作者沿环境梯度,对珠江口 7 个站位颗粒附着微生物群落结构的分析结果表明,变形菌门和拟杆菌门在珠江口所有站位中均为优势类群,其中变形菌门为绝对优势类群,尤其是 α 和 γ 变形菌纲类细菌,这与上述的研究结果一致。变形菌门是河口和海岸带微生物分布的主要类群,也是代谢活动最活跃类群。这个类群的 α 、 β 、 γ 和 ϵ -变形菌在珠江口各站位中普遍存在,并且具有不同系统发育类型,表明珠江口环境较复杂,能满足不同代谢类型变形菌群的生存。除了变形菌门,拟杆菌门在 7 个站位中也普遍存在。拟杆菌门是河口、海洋微生物中数量十分丰富的重要类群,是生态系统有机物质矿化的最主要贡献者之一(Zhang *et al.* 2007)。这个类群在珠江口颗粒附着微生物中普遍存在,可能与其存在形式和功能息息相关。

环境因子与微生物群落结构的关系是微生物分子生态学研究的重点。一些研究已经证实,河口的盐度、营养盐、有机质、颗粒物结构、pH 等都可以成为影响水体微生物群落结构变化的重要因素。Bernhard 等(2005)在研究大西洋西北部的一个河口的微生物群落结构时发现,盐度和活性硅酸盐浓度对浮游微生物群落结构具有显著影响,其次是降雨。对葡萄牙 Ria de Aveiro 河口浮游微生物群落结构的季节和空间分布的研究显示,

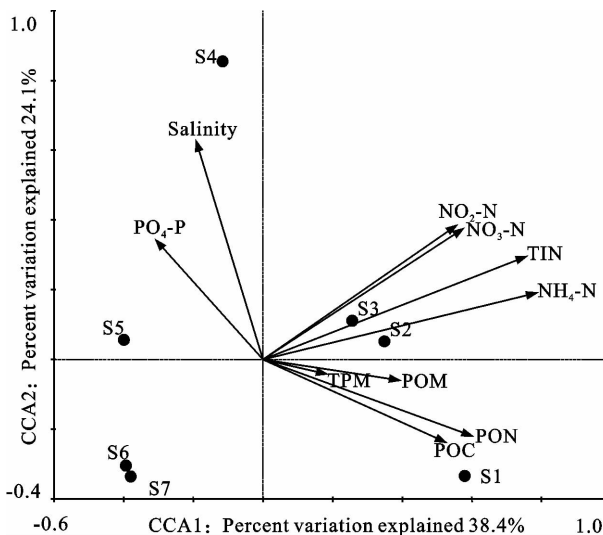


图 6 珠江口水体颗粒附着微生物 16S rDNA 与环境关系的 CCA 排序

Fig. 6 CCA biplot of particle-attached bacterial 16S rDNA and environmental variables in water from the Pear River Estuary

浮游微生物群落变化的26%是由盐度和温度两个环境因子决定的(Henriques *et al.*, 2006)。在本研究中,典范对应分析图中的前两个排序轴解释了62.5%颗粒附着微生物群落结构的变化,说明氮相关营养盐水平和盐度在水体颗粒附着微生物群落的分布上起着重要作用,是影响其分布格局的两个主要环境因子。

参 考 文 献

- 郑天凌,王 斐,徐美珠,洪华生. 2002. 台湾海峡海域细菌产量、生物量及其在微食物环中的作用. *海洋与湖沼*, 33(4): 415~423
- 殷建平,王友绍,徐继荣,孙翠慈,张凤琴,何 磊. 2006. 特大咸潮对珠江入海河段环境要素的影响. *热带海洋学报*, 25(4): 79~84
- 栾青杉,孙 军,宋书群,沈志良,俞志明. 2007. 长江口夏季浮游植物群落与环境因子的典范对应分析. *植物生态学报*, 31(3): 445~450
- 温伟英,张观希,杜完成. 1995. 珠江河口水体污染的研究. 广州:广东高等教育出版社: 99~108
- Attayde, J. L., and Bozelli, R. L. 1998. Assessing the indicator properties of zooplankton assemblages to disturbance gradients by canonical correspondence analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(8): 1 789~1 797
- Bernhard, A. E., Colbert, D., McManus, J., and Field, K. G. 2005. Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52 (1): 115~128
- Bidle, K. D., and Fletcher, M. 1995. Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the Chesapeake Bay by stable low-molecular-weight RNA analysis. *Appl Environ Microbiol.* 61(3): 944~952
- Boynton, W. R., and Kemp, W. M. 2008. Estuaries, 809~856. In: Capone, D. G., Bronk, D. A., Mulholland, M. R., and Carpenter, E. J. (Eds.), *Nitrogen in the Marine Environment*, 2nd Edition. Elsevier Inc., Burlington, Massachusetts
- Crump, B. C., Hopkinson, C. S., Sogin, M. L., and Hobbie, J. E. 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3): 1 494~1 505
- Fontana, C., Vignolo, G., and Cocconcelli, P. S. 2005. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *J. Microbiol. Methods*, 63(3): 254~263
- Henriques, I. S., Alves, A., Tacao, M., Almeida, A., Cunha, A., and Correia, A. 2006. Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuar. Coast Shelf Sci.* 68(1-2): 139~148
- LaMontagne, M. G., and Holden, P. A. 2003. Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in a coastal lagoon. *Microbiol. Ecol.* 46(2): 228~237
- Muyzer, G., de Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3): 695~700
- Qiu, D. J., Huang, L. M., Zhang, J. Z., and Lin, S. J. 2010. Phytoplankton dynamics in and near the highly eutrophic Pearl River Estuary, South China Sea. *Cont. Shelf Res.* 30(2): 177~186
- Sharma, S., Szele, Z., Schilling, R., Munch, J. C., and Schloter, M. 2006. Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3): 2 148~2 154
- ter Braak C. J. F. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 67: 1 167~1 179
- Zhang, R., Liu, B. Z., Lau, S. C. K., Ki, J. S., and Qian, P. Y. 2007. Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(3): 496~508
- Zhou, J., Bruns, M. A., and Tiedje, J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2): 316~322