南京 8 个湖泊超微真核浮游生物遗传多样性的研究

赵璧影[1,2], 陈美军[2], 孙颖[2], 陈非洲[2*], 杨家新[1]

(1. 南京师范大学生命科学学院,南京 210046; 2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室,南京 210008)

摘要:用末端限制性片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)方法对南京市区 8 个不同营养水平湖泊的沿岸带和敞水带超微真核浮游生物(0.2 ~ 5.0 μm)遗传多样性进行了研究,目的是了解不同营养水平湖泊超微真核浮游生物遗传多样性的差异以及影响这种差异的主要因子. T-RFLP 结果表明,不同湖泊超微真核浮游生物的 T-RFLP 指纹图谱存在明显差异,沿岸带和敞水带末端限制性片段 T-RFs 平均值分别为 16.4 和 15.9,其中营养水平中等的南湖沿岸带 T-RFs最多(30 个),营养水平较低的百家湖敞水带T-RFs最少(10 个),除琵琶湖和莫愁湖外,沿岸带的超微真核浮游生物遗传多样性均比敞水带高. 聚类分析表明,除百家湖、前湖、南湖外,其他湖泊沿岸带和敞水带的相似度都比较高. 超微真核浮游生物遗传多样性与环境因子的典型对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)表明,叶绿素 a 浓度与超微真核浮游生物群落结构和多样性显著相关($p = 0.004$). 本研究表明,超微真核浮游生物遗传多样性受湖泊营养水平的影响,而且在敞水带和沿岸带存在差异.

关键词:超微真核浮游生物;南京;湖泊;T-RFLP;遗传多样性;营养水平

中图分类号:X172 **文献标识码**:A **文章编号**:0250-3301(2010)05-1293-06

Genetic Diversity of Eukaryotic Picoplankton of Eight Lakes in Nanjing

ZHAO Bi-ying[1,2], CHEN Mei-jun[2], SUN Ying[2], CHEN Fei-zhou[2], YANG Jia-xin[1]

(1. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; 2. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: The method of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) was used to study the genetic diversity of eukaryotic picoplankton (0.2-5.0 μm) in the pelagic and littoral zones in 8 lakes with different trophic status in Nanjing. The objectives of this study were to confirm the difference of the genetic diversity of eukaryotic picoplankton among lakes and the main factors affecting this difference. T-RFLP indicated that there were various fingerprints among lakes and zones. The average terminal restriction fragments (T-RFs) in the littoral and pelagic zones were 16.4 and 15.9, respectively. The littoral zone in Lake Nan and the pelagic zone in Lake Mochou had 30 T-RFs and 27 T-RFs, respectively. The T-RFs were the least abundant (10) in the pelagic zone in Lake Baijia with relatively low trophic status. The genetic diversity of eukaryotic picoplankton was higher in the littoral zone than that in the pelagic zone except Lake Pipa and Mochou. The cluster analysis indicated that the similarities of the littoral zones and the pelagic zones were very high except Lake Baijia, Qian and Nan. The canonical correspondence analysis between the genetic diversity of eukaryotic picoplankton and environmental factors revealed the concentration of chlorophyll *a* had the most important impact on the eukaryotic picoplankton communities ($p = 0.004$). The results indicated that the genetic diversity of eukaryotic picoplankton is affected by the trophic status and has the difference in the pelagic and littoral zones.

Key words: eukaryotic picoplankton; Nanjing; lakes; terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP); genetic diversity; trophic status

超微真核浮游生物(0.2 ~ 5.0 μm)是地球上最为丰富的真核生物,它们主要由微型藻类和原生动物组成,是微食物网的主要成员,在地球化学循环中起着重要作用[1-3]. 由于缺乏明显的形态特征,用形态学方法很难鉴定这些生物体[4,5]. 虽然高效液相色谱和气相色谱分析能研究生物组成[6,7],染料和(或)脂肪酸分析能得到自养和(或)异养浮游生物的结构和动力学信息,但不能提供系统发生的信息[8].

基于核糖体小亚基 DNA(SSU rDNA)分析的分子生物学方法已经成功地用于细菌和古细菌多样性的研究,现在这些方法也逐渐用于环境中超微真核浮游生物方面的研究. 在过去的几年里关于此类的研究越来越多,并发现真核超微浮游生物具有高度多样性. 近年来,末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术由于具有快捷、高分辨率、高通量和不依赖于培养等优点而被广泛应用于微生物群落结构的

收稿日期:2009-07-21;修订日期:2009-09-14
基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目(2008CB418104)
作者简介:赵璧影(1985 ~),女,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物学,E-mail: zby5843@hotmail.com
* 通讯联系人, E-mail: feizhch@niglas.ac.cn

研究[9]. 目前有人将之用于真核超微型浮游生物的研究[8],结果表明末端限制性片段(T-RFs)能有效地表现群落结构,并能结合环境中理化因子和其他生物因子,运用典型对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)找出影响超微真核浮游生物群落结构的主要调控因子.

已有研究表明很多环境因子能影响超微真核浮游生物的结构,如营养水平和温度[8]、底泥再悬浮[10]、浮游植物[11]和后生浮游动物[8,12]等. 南京市区分布着若干个湖泊,这些湖泊由于受人为干扰的不同,其营养水平存在差异. 目前这些湖中超微真核浮游生物的研究鲜见报道. 此外,有关湖泊沿岸带和敞水带浮游生物多样性差别的研究都集中在大中型浮游动物[13,14],而超微真核浮游生物的多样性是否也存在差别尚不清楚. 因此,本实验的主要目的是通过T-RFLP的方法对南京8个湖泊沿岸带和敞水带真核超微型浮游生物进行研究,探讨不同营养水平湖泊中超微真核浮游生物的遗传多样性是否存在差异,如果存在差异,确定产生这种差异的主导环境因子,同时明确沿岸带和敞水带超微真核浮游生物的遗传多样性是否存在差异,以期为进一步探讨超微真核浮游生物在浅水湖泊生态系统中的功能提供参考.

1 材料与方法

1.1 采样点和方法

2008年11月分别在南京市花神湖、百家湖、前湖、琵琶湖、紫霞湖、南湖、莫愁湖和玄武湖采样,这8个湖的面积分别为0.056、1.67、0.067、0.06、0.045、0.06、0.32和4.71 km^2,湖泊分布如图1,其中前湖、琵琶湖和紫霞湖位于紫金山上,玄武湖的采样点在其东南湖区. 浅水湖泊湖区一般分沿岸带和敞水带,沿岸带指靠近湖岸的浅水区,一般有高等水生植物分布,而敞水带高等水生植物没有或不能分布[15]. 考虑到浅水湖泊由于富营养化的影响,有些成为藻型湖泊,所以选择的8个湖敞水带的点位于湖(区)中心,而沿岸带的点分为:①有水草分布的,在水草区采;②无水草分布的,在离岸20 m以内的范围采. 8个湖中,花神湖的沿岸带密布水草,百家湖、前湖、琵琶湖和玄武湖沿岸带水草零星分布,其它湖泊无水草分布.

样品常规理化和生物指标按照标准方法测定[16]. 超微真核浮游生物样品取表层和底层200 mL的混合湖水,先用孔径为5 μm的聚碳酸酯膜预过滤,以去除一些大型浮游生物,然后抽滤到孔径为0.2 μm的聚碳酸酯膜上,在提取基因组DNA前,滤膜保存在-80℃超低温冰箱中.

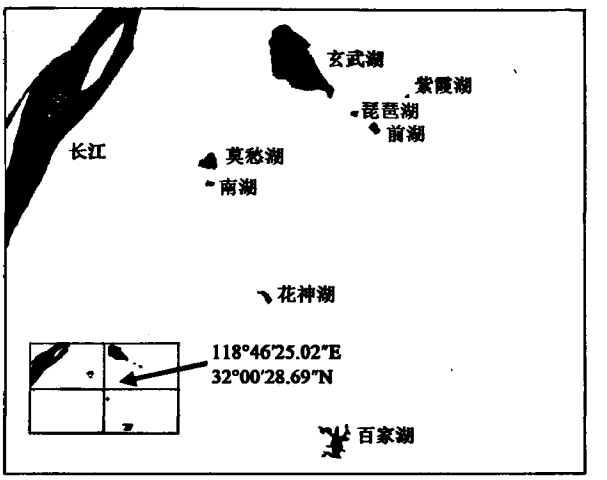


图1 南京八湖分布

Fig. 1 Eight lakes in Nanjing

1.2 环境基因组提取

参考文献[17],结合化学裂解和物理破碎的方法提取基因组,并作适当修改. 配制2×核酸裂解液[100 mmol/L Tris(pH 8.0),40 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,1% sodium dodecyl sulfate](现配现用),置于70℃预热. 将聚集有样品的0.2 μm聚碳酸酯膜剪碎放入已加有0.5 g玻璃珠(直径为0.5 mm,BioSpec产品)的离心管,再加入已预热的核酸裂解液1 mL,在Mini-Bead-Beater(BioSpec product, USA)上振荡10 s,频率为2 500 r/min;然后70℃水浴5 min,涡旋1 min,此步骤重复2次,接着冰浴5 min,加入140 μL 5 mol/L NaCl到终浓度0.7 mol/L,127 μL 10%的CTAB到终浓度1%,充分混匀后70℃水浴15 min;用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,体积比,下同)和氯仿:异戊醇(24:1)依次抽提1次;取上清用等体积的冰冷的异丙醇沉淀DNA,-20℃ 0.5 h后13,100 r/min离心10 min,弃上清;用冰冷的70%酒精500 μL洗涤1次,13 100 r/min离心10 min,弃上清;风干后加入50 μL TE(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,10 mmol/L EDTA pH 8.0)溶解,-20℃保存备用.

1.3 T-RFLP

PCR扩增:用真核生物的通用引物,上游引物为EuklA,5′末端标记了6-羧基二乙酸荧光素(6-FAM):5′-CTGGTTGATCCTGCCAG-3′,下游引物为Euk516r:5′-ACCAGACTTGCCCTCC-3′,片断长度约

560 bp. 50 μL 的反应体系,其组分为: ddH_2O 37.5μL,10 × PCR buffer(不含 Mg^{2+})5 μL,25mmol $MgCl_2$ 溶液 3 μL,10 mmol dNTP 1 μL,10 pmol 的上下游引物各 1 μL,0.5 μL *rTaq* 酶(5 U/μL),模板 1 ~10 ng. 运行条件为:94℃,预变性 130 s,然后 35 个循环的 94℃,变性 30 s,56℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 130 s,最后 72℃ 10 min. 取 5 μL PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳检测.

PCR 产物用绿豆酶处理(Promega product),在 30℃下消化 35 min. 然后用 E. Z. N. A. ™DNA 纯化试剂盒纯化(Omega product). 纯化产物取 3 μL 用 1% 的琼脂糖电泳检测,再经限制性内切酶 *Msp* I (TaKaRa product)37℃ 酶切 3 h,随后即可上样至 CEQ 8800(Beckmancoulter, USA)进行 T-RFLP 的分析. 末端限制性片段(T-RFs)可用 CEQ 系统软件进行分析.

1.4 统计分析

从 T-RFLP 的结果中得到超微真核浮游生物群落组成,再采用多元变量统计分析环境因子与超微真核浮游生物群落组成变化的相关性,分析软件采用 CANOCO 4.5[18]. 将 T-RFLP 的结果转化为 0/1 矩阵;环境因子包括温度(Temp)、总磷(TP)、总氮(TN)、叶绿素 a(Chl a)、总悬浮质(TSS)、透明度(SD);生物因子包括轮虫(rotifera)、枝角类(cladocera)、桡足类(copepoda)和浮游植物(phytoplankton)密度以及浮游动物总生物量(zooplankton biomass),由于紫霞湖中的总氮和总磷浓度存在比例失衡,故在做多元统计分析时将总氮的浓度去除.

2 结果与分析

2.1 湖泊理化特性及生物因子

不同湖泊的理化及生物因子明显不同,每个湖泊沿岸带和敞水带之间也略有变化(表 1). 营养水平差异显著,按照总磷和叶绿素 a 浓度进行比较,营养水平较低的是花神湖、百家湖、前湖和紫霞湖,营养水平中等的是琵琶湖、南湖和玄武湖,营养水平最高的是莫愁湖. 不同湖泊总磷和叶绿素 a 浓度呈正相关关系($r = 0.89$, $p < 0.0001$). 浮游动物总生物量在琵琶湖敞水带最高(7 670.1 $\mu g \cdot L^{-1}$),而花神湖沿岸带最低(19.1 $\mu g \cdot L^{-1}$). 浮游植物密度在莫愁湖沿岸带最高(1.5×10^8 cells · L^{-1}),而紫霞湖敞水带最低(3.1×10^4 cells · L^{-1}).

表 1　8 个湖泊沿岸带和敞水带的理化及生物指标

Table 1　Physicochemical and biological characteristics in the pelagic and littoral zones of eight lakes

地点	类型	TP /mg · L^{-1}	TN /mg · L^{-1}	Chl *a* /μg · L^{-1}	TSS /mg · L^{-1}	SD /m	轮虫密度 /ind. · L^{-1}	枝角类密度 /ind. · L^{-1}	桡足类密度 /ind. · L^{-1}	浮游植物密度 /cells · L^{-1}	浮游动物总生物量/μg · L^{-1}
花神湖	沿岸带	0.030	0.60	2.8	0.5	0.90	20	0.2	1.7	4.0×10^4	19.1
	敞水带	0.030	0.52	2.9	1.5	0.90	710	21.5	33.7	7.0×10^4	729.2
百家湖	沿岸带	0.058	1.48	5.7	3.0	0.70	180	2.5	4.7	1.2×10^5	159.5
	敞水带	0.054	1.44	4.3	4.5	0.70	280	5.5	14.8	1.3×10^5	274.4
前湖	沿岸带	0.054	0.82	4.5	3.0	1.10	30	0	0.6	5.7×10^7	19.6
	敞水带	0.077	0.96	4.7	10.0	0.80	200	1.0	0.6	1.4×10^6	130
琵琶湖	沿岸带	0.147	1.15	29.1	11.5	0.40	690	326.4	15.4	3.5×10^6	3 582.1
	敞水带	0.143	1.59	28.1	16.0	0.40	2 650	631	48.0	2.6×10^7	7 670.1
紫霞湖	沿岸带	0.011	3.21	1.1	8.5	0.60	30	4.5	0.6	7.3×10^4	59.7
	敞水带	0.019	3.32	1.9	6.0	1.10	55	10.2	0.2	3.1×10^4	126.2
莫愁湖	沿岸带	0.360	1.76	46.2	11.0	0.25	350	2.3	6.7	1.5×10^8	231.5
	敞水带	0.406	1.96	39.5	11.5	0.27	520	2.1	7.0	4.6×10^6	226.0
南湖	沿岸带	0.139	1.88	27.2	11.0	0.22	20	7.0	3.4	1.1×10^7	90.6
	敞水带	0.135	1.86	29.5	9.0	0.20	170	2.8	0.9	5.7×10^6	87.5
玄武湖	沿岸带	0.116	2.47	22.4	25.5	0.19	245	7.0	4.0	6.3×10^6	209.4
	敞水带	0.116	2.18	24.1	21.0	0.19	295	0	13.0	7.9×10^6	191.0

2.2 DNA 提取和 PCR 扩增的结果

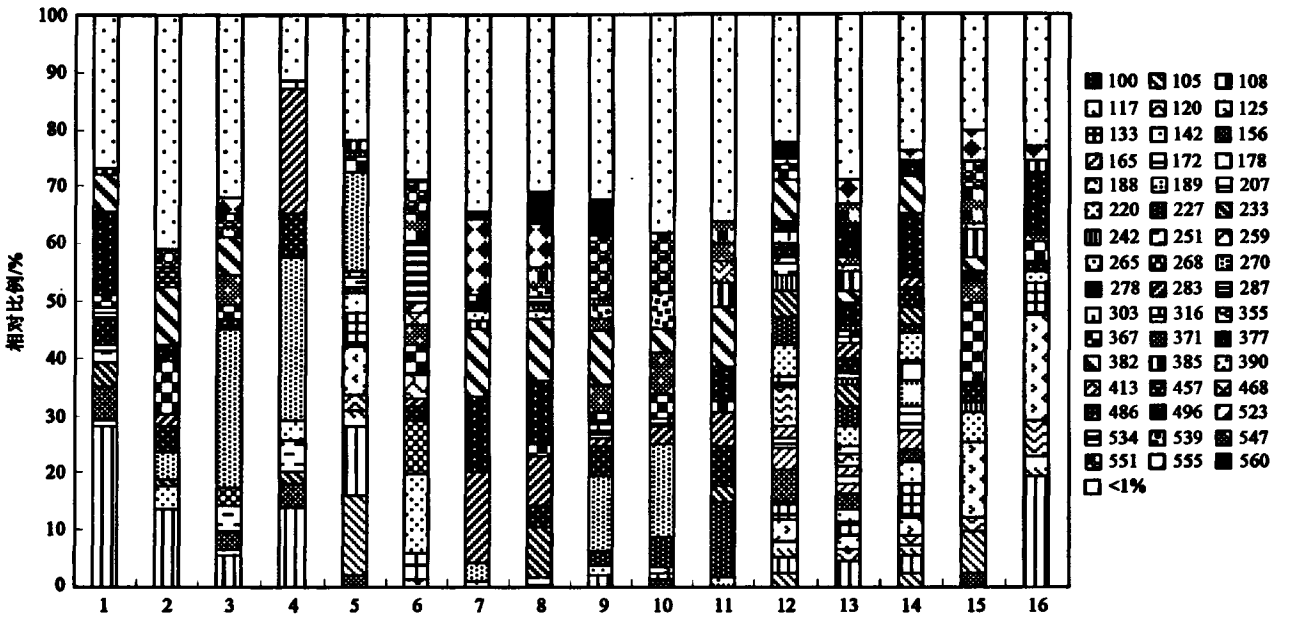
参考文献[17]提取基因组总 DNA 的方法并经过改进最终得到了较纯较完整的基因组 DNA. 用于 T-RFLP 分析的 18S rDNA 可变区片断的 PCR 扩增获得了满意的结果,效率高,特异性好,能用于进一步的分析.

2.3 T-RFLP 指纹图谱分析

T-RFLP 的指纹图谱经 CEQ 系统软件可读出,该软件能输出片段大小、峰面积、峰高等一系列 T-RFs的相关数据,一般一个 T-RF 代表一个物种. 为减小误差,<100 bp 和 >560 bp 的 T-RFs 均舍弃,经过处理后得到各片段大小的 T-RFs 及其所占面积

百分比(图2),通过 cluster 分析比较样品间的相似度及距离(图3).从图2可以看出,处于营养水平中等的南湖沿岸带和营养水平较高的莫愁湖敞水带T-RFs最多,分别有30和27个,则代表有30和27个左右优势物种;处于营养水平较低的百家湖敞水带T-RFs最少,只有10个,则代表有10个左右优势物种.一些T-RFs在大多数湖泊中均有出现,如108 bp在花神湖、百家湖、紫霞湖、莫愁湖、南湖和玄武湖均存在;而一些T-RFs则是少数湖泊独有的,如496 bp仅在琵琶湖和南湖存在.除琵琶湖和莫愁湖外,沿岸带的物种均比敞水带丰富.聚类分析表明,除百家湖、前湖、南湖外,其他湖泊沿岸带和敞水带的相似度都比较高(图3).

2.4 统计分析



1,2:花神湖沿岸带和敞水带;3,4:百家湖沿岸带和敞水带;5,6:前湖沿岸带和敞水带;
7,8:琵琶湖沿岸带和敞水带;9,10:紫霞湖沿岸带和敞水带;11,12:莫愁湖沿岸带和敞水带;
13,14:南湖沿岸带和敞水带;15,16:玄武湖沿岸带和敞水带,下同

图2 不同湖泊敞水带和沿岸带末端限制性片段相对比例

Fig.2 Relative ratio of T-RFs in the pelagic and littoral zones of eight lakes

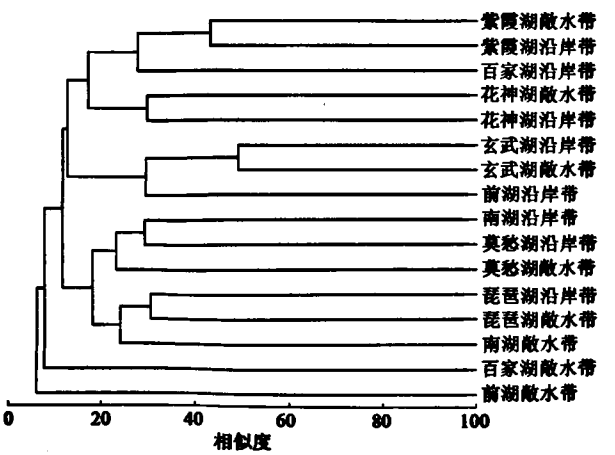


图3 样品的聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of samples

用CANOCO 4.5软件分析环境因子与超微真核浮游生物群落组成变化的相关性[18].趋势对应分析(detrended correspondence analysis, DCA)的结果显示,样品矩阵第一轴的梯度长度为2.999(>2),因此本研究假定物种与环境间具有非线性的相关关系,选择典型对应分析(CCA)来计算环境因子与真核超微型浮游生物群落组成变化的相关性.用于统计分析的所有因子即为表1中所列,所有数据均经过 $\lg(X+1)$ 转换[19].通过软件中的进一步选择手段和蒙特卡罗筛选检验(499个非限制性筛选循环)发现真核超微型浮游生物的组成和叶绿素a浓度极显著相关($p = 0.004$)(图4),与枝角类密度也有一定的相关性($p = 0.07$).第一轴和第二轴的特征值分别是0.312和0.229,这2个轴共解释了42.5%超微真核浮游生物的组成变化.第一轴与叶绿素a浓度相关系数较高($r = -0.6528$),而第二轴与枝角类密度、浮游动物总生物量相关系数较高(r 为0.7710和0.6463).

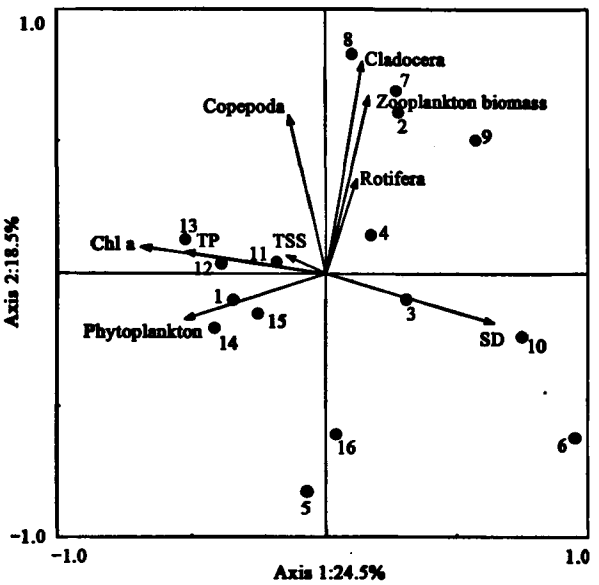


图 4　真核超微型浮游生物群落与其影响因子的 CCA 分析

Fig. 4　Correspondence canonical analysis (CCA) biplots showed variable compositions of the eukaryotic picoplankton community in relation to the important environmental factors in the eight lakes in Nanjing

3　讨论

T-RFLP 是近年来分子微生物生态研究运用较为广泛的一种方法,此方法的优点是能够迅速产生大量重复、精确的数据,且数据的输出形式允许对大量信息的快速分析,由于片段分析软件已经预装于 DNA 测序仪中,这些软件能够自动将电泳结果数字化并以表格方式输出,用于标准统计分析,避免了将指纹图谱再数字化的程序;根据 T-RFs 的长度与现有数据库进行对比,有可能直接鉴定群落图谱中的单个物种[20]. 缺点与最终的限制性酶切进程有关联,如不完全的消化或需要额外的纯化步骤[21]. 运用 T-RFLP 方法基本可了解环境中的主要生物组成,其中一个 T-RF 带代表一个可操作分类单位.

本研究结果表明叶绿素 a 浓度是 8 个湖泊超微真核浮游生物组成的重要影响因子,不同营养水平的湖泊呈现出不同的遗传多样性. Gaedke 等[22]、Lefranc 等[23]和 Lepère 等[8]研究发现不同湖泊微型真核浮游生物的群落组成与营养水平密切相关, Chen 等[24]发现太湖不同湖区微型真核浮游生物的遗传多样性与总磷浓度显著相关. 本研究中叶绿素 a 浓度与总磷浓度呈显著正相关($p < 0.0001$),叶绿素 a 浓度能够反映湖泊营养水平的高低,因此 8 个湖的超微真核浮游生物群落结构与营养水平密切相关. 其中营养水平中等的湖泊(如南湖)其敞水带的多样性明显高于营养水平相对低或高的湖泊,这与文献[23]的结果一致.

后生浮游动物的捕食对微食物网的结构能产生重要的影响[25,26]. 本研究表明枝角类密度和超微真核浮游生物的结构变化也有一定的相关性. 已有研究表明,大型枝角类溞 *Daphnia* 能影响整个微食物网,从纤毛虫到大型的细菌和超微型藻类[27~29]. 本研究的湖泊中枝角类主要以小型种类为主,如象鼻溞、基合溞、秀体溞和盘肠溞等,而优势种为象鼻溞和基合溞. Burns 等[30]曾报道小型枝角类网纹溞对微型生物的控制作用比较弱,本研究则表明小型枝角类象鼻溞和基合溞可能会控制超微真核浮游生物的群落结构.

湖泊沿岸带和敞水带由于存在生境的差异而造成生物组成不同. 有关湖泊沿岸带和敞水带浮游生物差别的研究都集中在大中型浮游动物,如轮虫、枝角类和桡足类等,而且沿岸带的种类要比敞水带的多,无论沿岸带是否有水草[13,14],就种类而言,无论是沿岸带或敞水带,与湖泊的面积均没有关系[13]. 本研究的湖泊中,只有花神湖的沿岸带密布水草,除琵琶湖和莫愁湖外,沿岸带超微浮游生物的遗传多样性均比敞水带多,由于本研究只是一次采样的结果,因此超微浮游生物的物种数是否是沿岸带比敞水带多,还需要进一步地分析.

4　结论

南京市区的 8 个湖泊营养水平不同,可相对分为低、中、高 3 种营养水平,营养水平不同的湖泊中超微真核浮游生物遗传多样性及群落组成差异显著,其中中营养水平湖泊中超微真核浮游生物的遗传多样性最高. 除琵琶湖和莫愁湖外,沿岸带超微真核浮游生物的遗传多样性普遍高于敞水带. 统计分析发现叶绿素 a 浓度与超微真核浮游生物群落结构和多样性显著相关,说明超微真核浮游生物的遗传多样性与湖泊营养水平密切相关.

致谢:感谢张镇、王媛媛和龚伊在采样和实验过程中给予的支持和帮助.

参考文献:

[1] Azam F, Fenchel T, Field J G, *et al*. The ecological role of water-column microbes in the sea [J]. Mar Ecol Progr, 1983, **10**: 257-263.

[2] Caron D A, Peele E R, Lim E L, *et al*. Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in the surface waters of

the Sargasso Sea south of Bermuda [J]. Limnol Oceanogr, 1999, 44: 259-272.

[3] Stockner J G, Antia N J. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective [J]. Can J Fish Aq Sci, 1986, 43: 2472-2503.

[4] Díez B, Pedrós-Alió C, Massana R. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 2932-2941.

[5] Savin M C, Martin J L, LeGresley M, *et al*. Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods [J]. Microbiol Ecol, 2004, 48: 51-65.

[6] Ansotegui A, Sarobe A, Trigueros J M, *et al*. Size distribution of algal pigments and phytoplankton assemblages in a coastal-estuarine environment: contribution of small eukaryotic algae [J]. J Plankton Res, 2003, 25: 341-355.

[7] Reuss N, Poulsen L K. Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland [J]. Mar Biol, 2002, 141: 423-434.

[8] Lepère C, Boucher D, Jardillier L, *et al*. Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake Pavin) [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72: 2971-2981.

[9] Liu W T, Marsh T L, Cheng H. Characterization of microbiolial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 4516-4522.

[10] Garstecki T, Verhoeven R, Wickham S A, *et al*. Benthic-pelagic coupling: a comparison of the community structure of benthic and planktonic heterotrophic protists in shallow inlets of the southern Baltic [J]. Freshwater Biol, 2000, 45: 147-167.

[11] Nakano S, Koitabashi T, Ueda T. Seasonal changes in abundance of heterotrophic nanoflagellates and their consumption of bacteria in Lake Biwa with special reference to trophic interactions with *Daphnia galeata* [J]. Arch Hydrobiol, 1998, 142: 21-34.

[12] Arndt H. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) -a review [J]. Hydrobiologia, 1993, 255: 231-246.

[13] Walseng B, Hessen D O, Halvorsen G, *et al*. Major contribution from littoral crustaceans to zooplankton species richness in lakes [J]. Limnol Oceanogr, 2006, 51: 2600-2606.

[14] Maia-Barbosa P M, Peixoto R S, Guimarães A S. Zooplankton in littoral waters of a tropical lake: a revisited biodiversity [J]. Braz J Biol, 2008, 68: 1069-1078.

[15] Wetzel R G. Limnology: Lake and River Ecosystem [M]. London: Academic Press, 2001. 129-134.

[16] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1990. 143-245.

[17] Gast R J, Dennett M R, Caron D A. Characterization of protistan assemblages in the Ross Sea, Antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 2028-2037.

[18] ter Braak C J F, Šmilauer P. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination [M]. (Version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, N.Y., USA 2002.

[19] Muylaert K, Van-der G K, Vloemans N, *et al*. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 4740-4750.

[20] 任南琪, 赵阳国, 高崇洋, 等. TRFLP在微生物群落结构与动态分析中的应用[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2007, 39: 552-556.

[21] Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, *et al*. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? [J]. J Microbiol Meth, 2007, 69: 470-479.

[22] Gaedke U, Seifried A, Adrian R. Biomass size spectra and plankton diversity in a shallow eutrophic lake [J]. Internat Rev Hydrobiol, 2004, 89: 1-20.

[23] Lefranc M, Thénot A, Lepère C, *et al*. Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 5935-5942.

[24] Chen M, Chen F Z, Yu Y, *et al*. Genetic diversity of eukaryotic microorganisms in Lake Taihu, a large shallow subtropical lake in China [J]. Microbiol Ecol, 2008, 56: 572-583.

[25] Zöllner E, Santer B, Boersma M, *et al*. Casecading predation effects of *Daphnia* and copepods on microbiolial food web components[J]. Freshwater Biol, 2003, 48: 2174-2193.

[26] Katrin T, Ursula G. Regulation of planktonic ciliate dynamics and functional composition during spring in Lake Constance [J]. Aquat Microb Ecol, 2007, 49: 87-100.

[27] Jürgens K. Impact of *Daphnia* on planktonic microbial food webs—a review [J]. Mar Microb Food Webs, 1994, 8: 295-324.

[28] Jürgens K, Jeppesen E. The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake [J]. J Plankton Res, 2000, 22: 1047-1070.

[29] Rothhaupt K O, Güde H. Influence of metazoan zooplankton on the microbial community before and after the onset of the spring clear-water phase in Lake Constance (Bodensee) [J]. Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol, 1996, 48: 21-30.

[30] Burns C W, Schallenberg M. Impacts of nutrients and zooplankton on the microbial food web of an ultra-oligotrophic lake [J]. J Plankton Res, 1998, 20: 1501-1525.