

淹水培养过程中水稻土芽孢杆菌群落结构变化特征

王保莉¹, 黄森¹, 刘浩², 曲东^{2*}

(1.西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2.西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用淹水非种植水稻土微环境模式系统,对水稻土进行1 h和1、5、10、20、30 d淹水培养,利用PCR-DGGE技术检测、多元统计分析淹水培养过程中芽孢杆菌的群落结构和多样性变化规律及其影响因子。结果表明,淹水培养过程中芽孢杆菌群落结构发生了明显的演替性变化:淹水培养前期(1 h~5 d)R-策略芽孢杆菌占优势,并演替至中后期(5~30 d);后期(10~30 d)K-对策芽孢杆菌占优势且逐渐趋于平衡。在培养初期(1 h~1 d),芽孢杆菌属微生物优势种群相似度高且多样性指数变化较小;1~5 d期间多样性指数有较大变化;在培养后期(20~30 d),优势种群相似度高且多样性指数趋于平衡。DCCA分析将淹水处理过程分成早期、中期和末期3类不同的生境,CCA分析进一步显示淹水过程中水稻土二价铁含量及芽孢杆菌的多样性指数 H' 、 D_s 和丰富度指数 d_{m} 变化与上述生境产生有相关性。测序结果表明,除HZ-B1外,其余9个优势DGGE条带均属于芽孢杆菌属细菌,且大多与来自不同地域的水稻土的芽孢杆菌关系密切。

关键词:芽孢杆菌;群落结构;水稻土;变性梯度凝胶电泳

中图分类号:S154.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2013)05-1021-07 **doi:**10.11654/jaes.2013.05.021

Characteristics of *Bacillus* Communities in Flooded Paddy Soil

WANG Bao-li¹, HUANG Sen¹, LIU Hao², QU Dong^{2*}

(1.College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2.College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: *Bacillus* is one of the best characterized bacterial genera. It is defined as a gram-positive, rod-shaped bacterium which can be aerobic or facultative anaerobic. *Bacillus* can produce highly resistant dormant endospores in response to nutritional or environmental stresses. Since the late 19th century, the long history of *Bacilli* research has included classical microbiology, biochemistry, and more modern genomic and proteomic approaches. Flooded rice field has become a model system for the study of soil microbial ecology. In this study, the total DNA was extracted from six paddy soil slurries including 1 h, 1 d, 5 d, 10 d, 20 d and 30 d of flooding incubation. The changing characteristics of community diversity and succession of *Bacillus* were analyzed by using Denatured Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) based on 16S rRNA gene (rDNA) of *Bacillus*. The influence factors on characteristics of community diversity and succession of *Bacillus* in different flooding treatments were analyzed by Detrended Canonical Correspondence Analysis (DCCA) and Canonical Correspondence Analysis (CCA). It showed that the *Bacillus* community structure was taken place the successive changes under different flooding times. The R-strategists organisms dominated in the early succession, while the K-strategists organisms gradually replaced them in the late succession. At the early stage of incubation (1 h~1 d), the similarity coefficient indices of predominant *Bacillus* were relatively high but the variety of diversity indices were low; during 1 d and 5 d, the diversity index changed more; during the later stage of incubation (20~30 d), there were the highest similarity coefficient indices and diversity indices kept invariableness. The flooding process could be divided into three different ecotopes including early-stage, mid-stage and later-stage, on the basis of DCCA. Further more, the CCA ordination among DGGE profiles and environmental variable factors demonstrated that Fe(II) concentration and the changes of diversity and richness of *Bacillus* correlated with the above three ecotopes. From the phylogenetic tree, we found that the nine preponderant DGGE bands belonged to *Bacillus* except of the HZ-B1 band divided into *Paenibacillus* sp.. Most of them had close relations with *Bacillus* sp. isolated from paddy soil fields.

Keywords: *Bacillus*; community structure; paddy soil; denatured gradient gel electrophoresis (DGGE)

收稿日期:2012-11-13

基金项目:国家自然科学基金(40971158,41171204)

作者简介:王保莉(1960—),女,陕西西安人,教授,主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail:wbl@nwsuaf.edu.cn

*通信作者:曲东 E-mail:dongqu@nwsuaf.edu.cn

芽孢杆菌属是一类最有特色的细菌。自19世纪晚期以来,已经对芽孢杆菌从经典微生物、基础生物化学到现代基因组和蛋白组学等方面进行了研究。芽孢杆菌属于革兰氏阳性的棒状细菌,厌氧或兼性厌氧^[1],并能产生高度抗逆性的休眠孢子,以适应营养和环境的变化^[2]。近年来,我国在调查特定区域内芽孢杆菌的资源,不断补充现有的微生物资源库方面开展了一定的研究工作。唐志燕等^[3]和刘秀花等^[4]采用传统的平板分离法分别对四川成都和河南省土壤中芽孢杆菌进行了调查分析,前者认为芽孢杆菌是成都市郊区土壤细菌中的主要类群,约占细菌总量的25.3%;广泛分布的种有巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、球形芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和环状芽孢杆菌。后者认为枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌的检出率居高,不同农作区的优势菌种种类及其检出率不同,与地理条件和耕作制度有一定关系。张华勇等^[5]对红壤中不同生态系统下芽孢杆菌属细菌的物种多样性进行分析,认为芽孢杆菌属内物种多样性程度最高的是林地,最低的是侵蚀地。上述研究表明,在不同地域和不同环境下土壤中芽孢杆菌主要类群组成不同,不同生态环境会导致芽孢杆菌群落结构变化。

淹水水稻土已经成为研究土壤微生物生态的模式系统^[6]。Noll等^[7]采用T-RFLP技术分析了意大利水稻土在厌氧非种植淹水培养过程中细菌的群落结构动态变化,发现在淹水1 h到2 d的时间段内群落结构变化最为活跃,淹水到21 d活跃程度下降,21 d后群落结构几乎处于稳定状态。拓晓骅等^[8]采用DGGE技术分析了水稻土地杆菌科细菌群落结构特征,认为在淹水过程中地杆菌科细菌群落结构发生了明显的演替性变化。水稻土中微生物生态研究也显示出芽孢杆菌在细菌群落结构中的重要地位。Hengstmann等^[9]采用MPN和16S rRNA基因序列分析发现,在厌氧水稻土中芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)细菌是主要细菌类型。Lu等^[10]认为水稻土中的优势菌种包括梭菌、芽孢杆菌、拟杆菌、疣微菌和放线菌。鉴于目前尚缺乏对于淹水培养下水稻土中芽孢杆菌的群落结构特征的系统研究,本文采用基于16S rRNA基因的PCR-DGGE技术分析了水稻土中芽孢杆菌属微生物群落结构特征,并分析了淹水培养过程中芽孢杆菌属的群落动态演替的变化规律,为进一步研究芽孢杆菌在水稻土中的生物学功能提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土样

供试水稻土于2008年10月采自陕西省汉中市南郑县董家营村水稻收获后的稻田。捡去其中的植物残体,自然风干后磨细并过1 mm土壤筛,将处理过的土样存于塑料容器中备用。

取3.000 g风干土样若干份,分别置于灭菌的血清瓶中,按水土比1:1加入去离子水并充N₂ 5 min用于排出其中的氧气,保证厌氧环境。用带铝盖的橡胶塞封闭后置于30℃的恒温闭光培养,设置1 h和1、5、10、20、30 d 6个淹水时间处理,每个处理设置3个重复。到达培养时间后将土壤泥浆样品保存于-20℃。淹水培养过程中土壤二价铁[Fe(II)]含量及pH值同文献[8]。

1.2 土壤微生物总DNA的提取

将冻藏样品取出解冻后,按照Zhou等^[11]的方法提取土壤泥浆总DNA。用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA,并用胶回收试剂盒进行DNA回收。

1.3 基因组DNA的PCR扩增

采用巢式PCR制备适合DGGE分析的PCR产物。以B-K1/F(5'-TCA CCA AGG CRA CGA TGC G-3')、B-K1/R(5'-CGT ATT CAC CGC GGC ATG-3')^[12]为引物从土壤微生物总DNA中扩增芽孢杆菌属细菌的16S rDNA。PCR反应体系为:总DNA模板1 μL、Premix EX Taq 25 μL、正反引物各1 μL,加ddH₂O至50 μL。PCR条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s、61℃退火50 s、72℃延伸80 s,30个循环。以稀释40倍的扩增产物为模板,以细菌通用引物GC-341F(5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCC CCG CCC CGC CTA CGG GAG GCA GCA G-3')(含GC clamp)和518R(5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3')^[13]为引物进行第二次PCR。PCR反应体系为:稀释的扩增产物1 μL、Premix EX Taq 25 μL、引物各1 μL。PCR条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s、50℃退火40 s、72℃延伸40 s,共30个循环;72℃延伸10 min。

1.4 PCR产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用Bio-Rad公司的Dcode™基因突变分析仪分离PCR产物。配制7 mol·L⁻¹的尿素和40%的去离子甲酰胺混合成的变性剂,使用梯度混合仪制备变性剂浓度从上到下为30%~60%的10%的聚丙烯酰胺胶。每个样孔中加入35 μL含有6×上样缓冲液的

PCR产物。50 V电泳1 h后,再于100 V电泳10 h,系统温度60 ℃。将胶在溴化乙锭中染色15 min,用Bio-Rad的紫外凝胶成像系统采集图像。

1.5 切胶回收测序

将DGGE图谱上的代表性条带切割后置于1.5 mL离心管中,加入50 μL ddH₂O过夜溶解,取2 μL上清液作为模板,以341F(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')和518R(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')为引物进行PCR。将PCR产物纯化后,连接至pMD19-T载体上并转化大肠杆菌JM109。由上海生工生物工程技术有限公司完成测序。

1.6 构建系统发育树

DGGE条带的测序结果在Genbank中比对分析;用ClusterW软件进行多重序列比对;根据N-J法及K2模型,用MEGA4.0软件构建系统发育树。

1.7 统计分析

通过Quantity One软件分析DGGE图中不同处理的Sorensen群落相似性聚类分析、丰富度(d_{Ma})、Simpson指数(D_s)和Shannon-Weiner多样性指数(H')。群落相似度计算公式为:

$$C_{ij} = 2 \times L_{ij} / (L_i + L_j)$$

式中: L_{ij} 为样品*i*和样品*j*上位置相同的条带数; L_i 为样品*i*上的条带数; L_j 为样品*j*上的条带数。

丰富度计算公式为:

$$R = S - 1 / \ln N$$

式中: R 为样品的丰富度指数(d_{Ma}); S 为样品的条带数; N 代表所有峰的总面积。

参照王英等^[14]的方法计算Simpson指数和Shannon-Weiner指数。

采用除趋势典范对应分析(Detrended canonical correspondence analysis, DCCA)对数据进行分类;采用典范对应分析(Canonical correspondence analysis, CCA)^[15-16]分析不同淹水时间处理的生境相似度以及与环境因子的关系。DCCA和CCA排序采用国际通用软件CANOCO4.5完成。

2 结果与分析

2.1 淹水培养过程中水稻土芽孢杆菌属细菌群落结构变化分析

2.1.1 微生物群落变化相似性与演替分析

淹水培养过程中,水稻土芽孢杆菌的群落结构发生了变化。图1A为芽孢杆菌16S rDNA的PCR-DGGE,图1B采用Quantity One软件对DGGE条带进

行相似性聚类分析。1 h和1 d处理的芽孢杆菌群落结构相似性较高,相似性系数为0.74,而与其他处理的群落结构差异较大,相似性系数仅为0.56;在培养中期5 d与10 d处理的相似性系数较高为0.89,20 d与30 d相似性系数最高为0.94,说明在淹水后期群落结构变化较小,有趋于稳定的趋势。

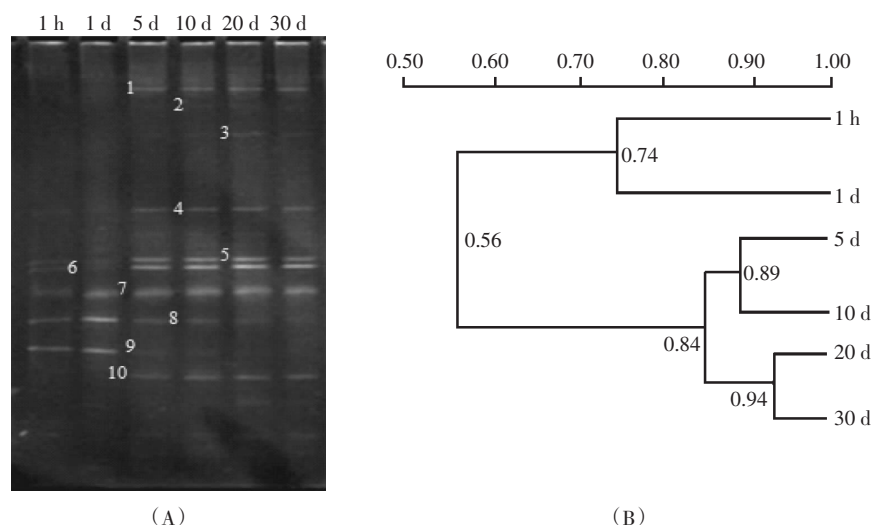
DGGE图谱表明各处理均分离出了数目不等的条带,且各个条带的灰度和迁移率都有所不同(图1A)。按其特征主要分为3类:(1)各处理中均存在的共同条带。如条带4和7,随着培养延长灰度有增大趋势;条带8则随着培养延长灰度变小,30 d处理中几乎消失;条带5和6除了在处理1 d中灰度较低外,在其他处理中保持恒定。(2)仅存在于培养初期。如条带9,仅在处理1 h到1 d中存在。(3)存在于培养中后期。如条带1、2、3、10,在5 d时出现,并维持到30 d。由此可见,在淹水培养的不同时期芽孢杆菌属的群落结构存在演替变化,有些持续存在但表现为DGGE电泳灰度上的恒定或增减,有些则在特定的时期出现。利用DGGE技术能够较好地反映微生物群落结构的演替现象。

2.1.2 微生物群落多样性指数分析

基于DGGE条带获得淹水培养过程中芽孢杆菌的多样性指数列于表1中。Shannon-Wiener指数(H')和Simpson指数(D_s)变化趋势均为5 d>30 d>20 d>10 d>1 h>1 d;丰富度指数(d_{Ma})在培养初期变化不大,但是在5 d时增大了1倍,在10 d达到峰值1.293 1,后期维持在1.267 8~1.272 2之间;均匀度指数(E)随培养时间变化不大,在20 d达到最低为0.982 6,并在30 d稍有增长。不同淹水处理间多样性指数的变异系数($CV\%$)分别为:16.84(H')、31.36(d_{Ma})、5.695(D_s)和4.275(E),不同处理间的 d_{Ma} 的 CV 值最大,其次为 H' 的,表明从丰富度指数和Shannon-Wiener指数的角度比较不同处理间的差异是本实验中较为敏感的指标。

2.2 不同淹水处理中优势芽孢杆菌属细菌系统发育树分析

从6个淹水处理水稻土芽孢杆菌属的PCR-DGGE的丙烯酰胺凝胶中切胶回收了10个优势条带(见图1中标注1~10),测定其核苷酸序列,分别记为HZ-B1~HZ-B10(登录号为KC262179~KC262188)。Blast比对表明10个测序序列除HZ-B1属于类芽孢杆菌外其余都为芽孢杆菌属细菌,其中HZ-B2和HZ-B10与挑剔芽孢杆菌(*B.fastidiosus*)、HZ-B8与烟酸芽孢杆菌(*B.niacini*)、HZ-B6和HZ-B9与*B.sub-*



1 h、1 d、5 d、10 d、20 d 和 30 d 分别表示 6 个淹水处理,图 1A 中数字表示进行序列测定的代表性条带
The 1 h, 1 d, 5 d, 10 d, 20 d and 30 d stand for different treatments and the data in figure 1A stand for typical DGGE band for sequencing

图 1 淹水培养过程中水稻土芽孢杆菌属的 DGGE 电泳图谱(A)和相似性聚类图(B)

Figure 1 DGGE profile of *Bacillus* in paddy soil during flooding incubation(A) and cluster analysis of similarities(B)

表 1 水稻土芽孢杆菌属细菌多样性指数

Table 1 Diversity indices based on PCR-DGGE of *Bacillus* in paddy soil

处理 Treatments	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index(H')	丰富度指数 Richness index(d_{Ma})	Simpson 指数 Simpson index(D_s)	均匀度指数 Evenness index(E)
1 h	1.599 8	0.641 7	0.796 0	0.994 0
1 d	1.583 3	0.622 1	0.789 5	0.992 6
5 d	2.285 6	1.271 4	0.896 6	0.992 5
10 d	2.173 3	1.293 1	0.883 2	0.989 1
20 d	2.262 4	1.267 8	0.891 5	0.982 6
30 d	2.274 3	1.272 2	0.893 9	0.987 7

terraneus、HZ-B5 和 HZ-B7 与 *B.drentensis*、HZ-B4 与枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)、HZ-B3 与苏云金芽孢杆菌(*B.thuringiensis*)分别聚在一起。构建的系统发育树见图 2。HZ-B8、HZ-B6 和 HZ-B9 还分别与来自湖南和四川水稻土中分离出的具有铁还原能力的芽孢杆菌聚为一类(登录号分别为 JN118279 和 JN118466)^[17],也与分离自太湖地区水稻土的菌株 A1148(登录号为 JX266307)相似度相近;HZ-B4 与具有产氢能力的芽孢杆菌 AuChE413(JX471147)相近;HZ-B1 与铁还原微生物 C1-A11^[18]相似性高。

2.3 环境因子对土壤淹水培养过程中芽孢杆菌的影响

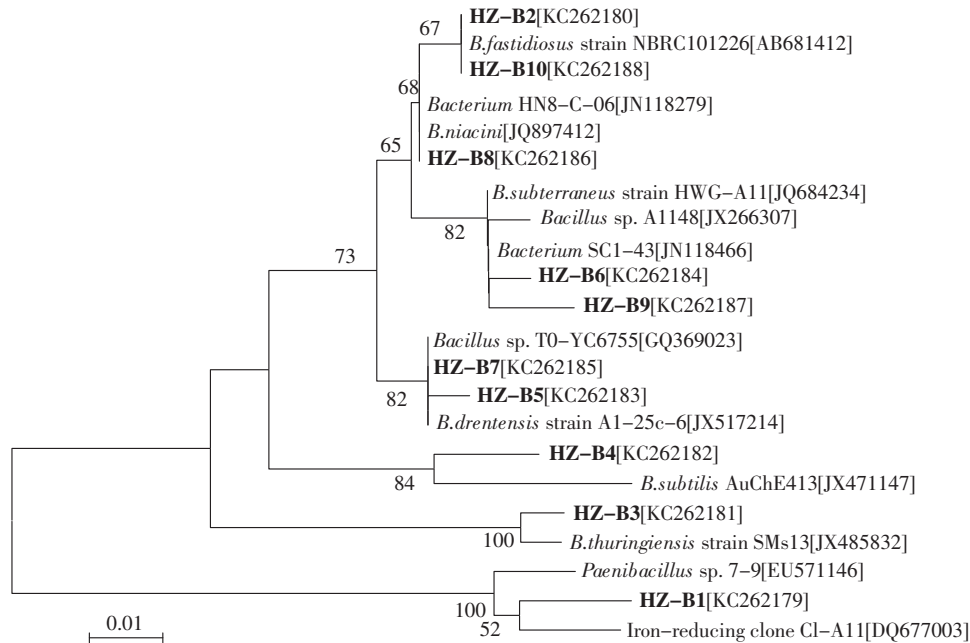
采用除趋势典范对应分析不同淹水时间处理的环境相似度以及与环境因子的关系。排序中环境因子包括淹水时间(Time)、pH 值(pH)、土壤二价铁含量[Fe(II)]、Shannon-Wiener 指数(H')、Simpson 指数(D_s)、丰富度指数(d_{Ma})和均匀度指数(E)。

2.3.1 不同处理环境相似度分类及特征

不同处理的环境相似度分类 DCCA 排序结果见图 3,第一二排序轴是主成分轴,所能解释的无踪数据比例达 33.9%。不同淹水时间处理表现出明显的分离和聚类,其中淹水 1 h 和 1 d 处理的点在散点图上紧密聚在一起,说明淹水 1 h 和 1 d 处理的环境相似,且与其他处理高度疏离;与 1 h 和 1 d 的观察结果相同,第 20 d 和 30 d 处理的环境类似,在散点图上聚在一起;中期淹水的 5 d 和 10 d 处理虽与第 20 d 和 30 d 的处理靠近,但较之 1 h 和 1 d 以及 20 d 和 30 d 的情况,仍属于孤立状态,即有各自的生境特点。本实验所观察结果显示不同淹水时间对生境的影响具有规律性。

2.3.2 不同处理分布与环境因子的 CCA 分析

6 个淹水时间处理和 7 个环境因子进行 CCA 关联分析结果见图 4。箭头表示环境因子,箭头连线的



黑体字代表本文得到的测序基因序列, 刻度尺表示 1% 序列估计偏差
Boldface type indicates gene sequences obtained in this study. The scale bar represents 1% estimated sequence divergence

图 2 优势芽孢杆菌 DGGE 条带的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of preponderant DGGE types of *Bacillus* based on 16S rDNA sequences

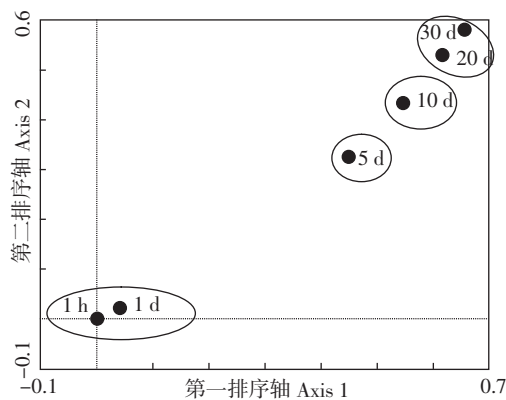


图 3 基于 DCCA 的不同淹水时间处理环境相似度

Figure 3 Environment similarity among different flooding samples by DCCA analysis

长短表示不同环境因子对不同淹水处理生境相似度分布贡献的大小, 即相关性大小。箭头连线与排序轴夹角的大小表示环境因子与排序轴相关性的大小, 夹角越小说明关系越密切, 箭头所处的象限表示环境与排序轴之间的正负相关性。排序图中前两个排序轴的特征值分别为 0.193 和 0.021, 共同解释了不同淹水时间处理环境点于二维图中分布特征的 99.9%。两个环境排序轴的相关系数为 0, 表明排序结果可靠, 能够反映不同淹水处理生境相似度与环境因子的关系。

与 CCA 排序图中第一排序轴相关系数较大的是土壤 Fe(II) 含量 ($r=-0.9947$)、淹水时间 ($r=-0.8980$)、代表物种多样性的 H' 、 D_s 和 d_{Ma} (r 值分别为 -0.8755 、 -0.8664 和 -0.8579), 说明第一排序轴从左至右表示涉及三价铁还原的代谢强度和芽孢杆菌多样性及物种丰富度的增加; 与第二排序轴相关性较高的是 pH ($r=0.5371$) 和 d_{Ma} ($r=0.5019$), 说明第二排序轴自下

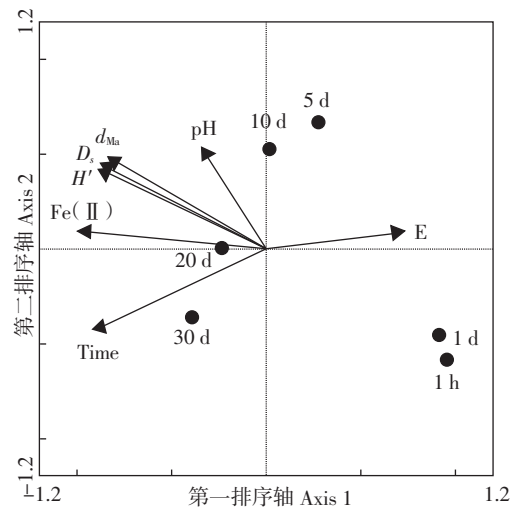


图 4 不同淹水时间处理与环境因子的二维排序图

Figure 4 Biplot of CCA ordination for treatments of different flooding periods and environmental factors

而上基本反映了不同处理所形成生境中 pH 值的增加和芽孢杆菌丰富度的增加,较之第一排序轴,第二排序轴对不同淹水时间处理生境相似度的影响小很多。

3 讨论

DGGE 最大的特点就是从图谱上能够直观地反映出淹水培养过程中优势芽孢杆菌的演替。对于淹水培养过程中微生物的演替现象可通过 R 策略和 K 策略分别进行解释:以 R 策略进行生长的微生物,通常在淹水培养早期因为脂肪酸碳源充足,受其刺激在其生长环境中有着非常强的繁殖能力占优势但不稳定^[19],而以 K 策略进行生长的微生物具有非常强的竞争能力,能高效代谢各种碳源,同时丰富度更大^[7,20],在淹水培养后期使微生物群落保持多样性的稳定及更大的丰富度。本试验中,淹水培养早期,营养条件充足时,采用 R-策略的芽孢杆菌物种速增长繁殖;随着营养物质的逐渐消耗,采用 K-策略的芽孢杆菌物种逐渐取代了采用 R-策略的物种,成为培养后期的优势物种。本文中,通过淹水培养过程中水稻土芽孢杆菌的 DGGE 图谱可以看出,条带 8、9 代表的芽孢杆菌在前期(1~5 d)为优势菌,以 R-策略生存;以 K-策略生存的微生物如条带 1、2、3、4、5、10,在培养后期(5 d 以后)成为优势菌;条带 7 代表的芽孢杆菌则既有着强竞争能力又有着强繁殖能力,可以适应环境的变化并利用不同的碳源。上述结果表明,水稻土淹水培养过程中优势芽孢杆菌群落存在演替性变化,且与其生存环境以及其对环境变化的适应性相关。

对 PCR-DGGE 淹水培养过程中芽孢杆菌的优势菌进行切胶回收测序,借助数据库系统,可以很好地分析芽孢杆菌群落结构的进化关系^[21]。通过构建系统发育树的结果可以发现,本实验获得的优势芽孢杆菌均可以与来自土壤环境的菌株相聚在一起,且与源自我国不同地域水稻土的优势芽孢杆菌存在着一定的相似性,而且,其中一些优势菌可分别与具有铁还原能力或发酵产氢能力的芽孢杆菌关系密切,暗示这些微生物在水稻土淹水培养过程中存在潜在的产氢和金属还原能力等功能。

不同淹水时间导致了不同生境形成。生境差异在导致微生物栖居上是重要的,从而影响到微生物群落的多样性和丰富度,继而影响其生态功能的发挥。不同淹水时间处理生境的 DCCA 分类结果反映出淹水过程产生出了早期、中期和末期三类不同的生境。

CCA 分析进一步显示生境中二价铁含量及芽孢杆菌的多样性和丰富度随淹水时间的规律性变化与上述生境产生具有一定的相关性。

4 结论

通过 Quantity One 软件对水稻土芽孢杆菌的 DGGE 图谱分析发现,培养前期群落结构变化较大,而在淹水培养后期群落结构趋于稳定。不同培养时间处理样品中芽孢杆菌多样性指数有演替性变化特征,具体表现为 1 d 到 5 d 多样性指数变化较大,而 20 d 到 30 d 变化较小。R-策略的芽孢杆菌在淹水培养初期占优势,K-策略的芽孢杆菌在淹水培养后期占优势并趋于稳定。

参考文献:

- [1] Alcaraz L D D, Moreno-Hagelsieb G, Eguarte L E, et al. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(5):332-348.
- [2] Earl A M, Losick R, Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis* [J]. *Trends Microbiology*, 2008, 16(6):269-275.
- [3] 唐志燕, 龚国淑, 刘 萍, 等. 成都市郊区土壤芽孢杆菌的初步研究 [J]. 西南农业大学学报, 2005, 27(2):188-192.
TANG Zhi-yan, GONG Guo-shu, LIU Ping, et al. A preliminary study of soil *Bacillus* in the suburbs of Chengdu[J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2005, 27(2):188-192.
- [4] 刘秀花, 梁 峰, 刘 茵, 等. 河南省土壤中芽孢杆菌属资源调查[J]. 河南农业科学, 2006(8):67-71.
LIU Xiu-hua, LIANG Feng, LIU Yin, et al. Genus *Bacillus* resources of soils in Henan Province[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2006(8):67-71.
- [5] 张华勇, 李振高, 王俊华, 等. 红壤生态系统下芽孢杆菌的物种多样性[J]. 土壤, 2003, 35(1):45-47.
ZHANG Hua-yong, LI Zhen-gao, WANG Jun-hua, et al. Diversity of *Bacillus* species in different red soil eco-systems[J]. *Soils*, 2003, 35(1):45-47.
- [6] Lüdeman H, Arth I, Liesack W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2):754-762.
- [7] Noll M, Matthies D, Frenzel P, et al. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3):382-395.
- [8] 拓晓骅, 朱 辉, 王保莉, 等. 淹水培养过程中水稻土地杆菌科微生物群落结构变化特征[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(6):1165-1171.
TUO Xiao-hua, ZHU Hui, WANG Bao-li, et al. Changing characteristics of *Geobacteraceae* community structure in paddy soil during flooding incubation[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(6):

- 1165–1171.
- [9] Hengstmann U, Chin K J, Janssen P H, et al. Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11):5050–5058.
- [10] Lu Y, Murase J, Watanabe A, et al. Linking microbial community dynamics to rhizosphere carbon flow in a wetland rice soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48(2):179–186.
- [11] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soil of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2):316–322.
- [12] Wu X Y, Walker M J, Hornitzky M, et al. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance[J]. *J Microbiol Methods*, 2006, 64(1):107–119.
- [13] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695–700.
- [14] 王英, 滕齐辉, 崔中利, 等. 免耕水稻壤中细菌多样性及其空间分布的研究[J]. 土壤学报, 2007, 44(1):137–143.
WANG Ying, TENG Qi-hui, CUI Zhong-li, et al. Diversity and spatial distribution of bacteria in non-tillage paddy fields[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(1):137–143.
- [15] Hoy C W, Grewal P S, Lawrence J L, et al. Canonical correspondence analysis demonstrates unique soil conditions for entomopathogenic nematode species compared with other free-living nematode species[J]. *Biological Control*, 2008, 46(3):371–379.
- [16] Terbraak C J F, Verdonschot P F M. Canonical correspondence-analysis and related multivariate methods in aquatic ecology [J]. *Aquatic Sciences*, 1995, 57(3):255–289.
- [17] 易维洁. 碳源对水稻土中铁还原特征和铁还原菌多样性的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学博士毕业论文, 2011:54–82.
YI Wei-jie. Effects of carbon sources on iron reduction characteristic and diversity of iron reducer isolates in paddy soils[D]. Yangling: Doctoral thesis of Northwest A&F University, 2011:54–82.
- [18] Lin B, Hyacinthe C, Bonneville S, et al. Phylogenetic and physiological diversity of dissimilatory ferric iron reducers in sediments of the polluted Scheldt estuary, Northwest Europe[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(8):1956–1968.
- [19] Rui J P, Peng J J, Lu Y. Succession of bacterial populations during plant residue in rice field soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(14):4879–4886.
- [20] Shrestha P M, Noll M, Liesack W. Phylogenetic identity, growth-response time and rRNA operon copy number of soil bacteria indicate different stages of community succession[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(10):2464–2474.
- [21] Woese C R. Bacterial evolution[J]. *Microbiological Review*, 1987, 51(2):221–271.