

基于 PCR-DGGE 技术的剑湖湿地湖滨带土壤微生物群落结构多样性分析

刘绍雄¹, 王明月¹, 王娟², 杨宇明², 缪福俊², 王金华¹, 张敬宜¹, 熊智^{1*}

(1.西南林业大学,西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室,昆明 650224;2.云南省林业科学院,国家林业局云南珍稀濒危特森林植物保护和繁育重点实验室,云南省森林植物繁育和开发利用重点实验室,昆明 650204)

摘要: 为了解剑湖湿地湖滨带植物根际土壤中细菌的群落结构特征多样性,应用 PCR-DGGE 技术对剑湖湿地湖滨带 4 种植物根际土壤细菌的群落结构进行了研究,根据 DGGE 指纹图谱,对它们的遗传多样性进行了分析。结果表明,不同植物群落根际和非根际土壤细菌多样性指数(H')、丰度(S)和均匀度(J)均有所不同,根际土壤细菌多样性指数、均匀度、丰富度均高于非根际,其中茭草根际土壤细菌多样性指数、均匀度、丰富度均最高,说明植物群落类型与土壤微生物多样性的关系十分密切;不同植物群落根际土壤细菌群落结构相似性较高,非根际土壤细菌群落结构相似性较低,在 82% 的相似水平上聚为 4 大类群,根际土壤细菌和茭草非根际土壤细菌聚为一类,其余非根际土壤细菌各聚为一类,说明植物群落对微生物群落结构具有一定的影响。对 DGGE 的优势条带序列分析,同源性最高的微生物分别属于变形菌门(Proteobacteria)、草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)、杜榉氏菌属(*Duganella*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和链球菌属(*Streptococcus*),它们均为未培养微生物。不同植物群落根际土壤氮磷含量均有所差异,其中茭草根际土壤氮磷含量最高,湿地土壤细菌多样性与土壤有机质、总 N、总 P 的含量呈正相关关系,土壤细菌多样性与土壤 pH 值呈负相关关系。

关键词: PCR-DGGE; 剑湖湿地; 根际微生物; 多样性

中图分类号: S154.36 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)07-1405-08 doi:10.11654/jaes.2013.07.018

Analyzing Soil Microbial Community Structure Diversity from Jianhu Wetland Lakeside Zone Using PCR-DGGE Technique

LIU Shao-xiong¹, WANG Ming-yue¹, WANG Juan², YANG Yu-ming², MIAO Fu-Jun², WANG Jin-hua¹, ZHANG Jing-yi¹, XIONG Zhi^{1*}

(1. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. Key Laboratory for Conservation of the Rare, Endangered and Endemic Forest Plants of State Forestry Administration, Kunming 650204, China)

Abstract: This study analyzed the bacterial community structure from the rhizosphere of four plants found in the Jianhu wetland lakeside zone using PCR-DGGE technique. The results showed that soil samples collected from plant rhizosphere and non-rhizosphere displayed significant differences in the Shannon-wiener index, richness and evenness, respectively. With the highest bacterial diversity was found in *Zizania latifolia* rhizosphere soil, plant community did influence microbial diversity. Community structure similarity was higher in plant rhizosphere than non-rhizosphere soil. Based on 82% community similar levels, two major groups were categorized, with rhizosphere bacteria and *Zizania latifolia* non-rhizosphere bacteria as one group, and the rest as the other group. Plant community did influence microbial community structure. Additionally, according to the results of sequence analysis of DGGE dominant bands, all bacterial strains were phylogenetically closed to some uncultured microbes, including *Proteobacteria*, *Oxalobacteraceae*, *Janthinobacterium*, *Duganella*, *Escherichia*, and

收稿日期: 2012-12-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(U0933601); 国家重点基础研究发展计划 973 前期研究专项(2010CB434807); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2010C1016); 云南省西南林业大学生物技术特色专业建设项目(50116001); 云南省教委湿地生态学创新团队项目资助

作者简介: 刘绍雄(1987—), 男, 汉族, 云南保山人, 硕士研究生, 研究方向植物生物技术。E-mail: lsxcary@gmail.com

* 通信作者: 熊智 E-mail: zhix65.swfc@gmail.com

Streptococcus. Plant rhizosphere soil nitrogen and phosphorus contents were different. The highest nitrogen and phosphorus contents were found in *Zizania latifolia* rhizosphere soil. Soil bacterial diversity positively related to soil organic matter, total nitrogen and total phosphorus contents, but negatively related to soil pH.

Keywords: PCR-DGGE; Jianhu wetland; rhizosphere microorganisms; diversity

湿地是介于陆地和水体之间、兼有水陆特征的生态类型和地球上具多功能的独特生态系统,被誉为“自然之肾”^[1]。湖滨带是水陆生态交错带的一种类型^[2-4],历来是人类活动最集中的场所^[5],是湖泊天然的保护屏障,健康湖泊生态系统的重要组成部分和评价标志,具有保持物种多样性、调节物流和能流、拦截泥沙、净化水体及减少污染等功能^[6]。目前,由于湿地生态系统脆弱和不稳定的特征,湿地退化和土壤环境改变所带来的一系列环境问题已成为阻碍当地经济发展,资源持续利用和环境质量改善的重大障碍,湿地退化不仅对当地的生态环境产生极大影响,还可能对未来经济、社会与环境的持续发展和全球变化产生负面影响^[7]。因此,对湿地的保护以及湿地生态的恢复已成为学者们广泛探讨的问题。

根际作为土壤、植物生态系统物质交换的活跃界面,通过植物、土壤、微生物的相互关系维持着土壤生态系统的生态功能。微生物是湿地生态系统的重要组成部分,作为湿地生态系统的分解者,不仅推动了湿地生态系统的物质循环和能量流动,还制约着沼泽湿地类型的分异和演替^[8],土壤微生物在维持湿地的能量物质循环方面起着不可或缺的作用^[9]。目前对剑湖湿地的研究主要集中在土壤特性、湖滨带对生活污水的净化效果及其对入湖泥沙截留效果等方面^[10-12],这些研究主要针对植物和土壤的相互关系对湿地生态系统的生态功能,而对其土壤微生物群落结构多样性的研究还鲜有报道。研究表明^[13-15],影响土壤微生物群落结构多样性的因素有很多种,可大体分为自然因素和人为因素两大类:自然因素包括植被、土壤类型、pH值、有机质等;人为因素包括农药、施肥及其土壤耕作方式等人类对土壤的管理方式。本研究从自然因素出发,应用PCR-DGGE技术研究其对剑湖湿地湖滨带植物根际土壤微生物群落结构变化和种群数量构成的影响,通过了解湿地土壤中微生物的群落结构和分布,可以了解微生物对植物的作用及其活动规律,探索土壤、植物和微生物三者之间的复杂关系,对开发其中的微生物资源和保护湿地环境具有重要的意义,为研究剑湖湿地生态系统结构和功能提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 采样地概况及样品采集

剑湖湿地位于云南省大理州剑川县城东南3 km处,地处99°55'E,26°28'N,海拔2186 m,径流面积918 km²,湖面面积6.23 km²,平均水深2.7 m,常年蓄水量1.68×10⁷ m³,其湖滨带植物群落以茭草(*Zizania latifolia*)为主,其中零星分布着水蓼(*Polygonum hydropiper*)、蒿(*Artemisia selengensis*)、禾草(*Alternanthera philoxeroides*)等植物。本试验选取这4种湿地植物为研究对象,采样时间为2011年5月。土壤样品采集方法如下:利用抖根法采集植物的根际土壤^[16],将植株根系从土壤中整体挖出,抖掉与根系松散结合的土,即为非根际土壤,然后将与根系紧密结合的土壤刷下来作为根际土土样,每种植物随机取3株,3次重复,然后将3次重复的9株作物的根际土壤混合为1个样品,取得的根际土样立即放入4℃的冰盒中保存。将冷藏保存的土样带回实验室后,迅速过2 mm土筛,除去可见根系、动物残体和石块等杂物。将过筛后的土样保存到-20℃条件下,用于土壤微生物群落结构的研究及理化性质的测定(表1)。

1.2 土壤微生物DNA的提取和纯化

采用OMEGA N.A.™ Soil DNA Kit(50)试剂盒方法,称取0.5 g土壤样品,按试剂盒的试验步骤进行土壤微生物总DNA的提取,保存于-20℃。

1.3 16S rDNA V3片段的PCR扩增

16S rRNA基因V3区的扩增:将纯化后的基因

表1 供试土壤理化指标($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The soil physical and chemical properties($\bar{x} \pm s$)

植物	编号	pH	有机质/g·kg ⁻¹	总 N/g·kg ⁻¹	总 P/g·kg ⁻¹
茭草	1(根际)	6.53±0.03	4.78±0.09	2.56±0.01	1.23±0.1
	5(非根际)	7.28±0.02	3.17±0.6	0.92±0.05	0.65±0.1
蓼	2(根际)	6.66±0.06	3.97±0.10	2.24±0.07	1.11±0.07
	6(非根际)	7.23±0.10	2.88±1.1	1.12±0.03	0.86±0.05
蒿	3(根际)	6.76±0.03	2.38±0.04	1.01±0.02	0.83±0.03
	7(非根际)	7.13±0.03	1.56±0.03	0.83±0.06	0.54±0.02
禾草	4(根际)	6.80±0.02	2.79±0.01	1.5±0.08	0.56±0.02
	8(非根际)	7.16±0.02	1.98±0.4	0.96±0.04	0.32±0.01

组 DNA 作为聚合酶链反应(PCR)的模板,采用对大多数细菌和古细菌的 16S rRNA 基因 V3 区具有特异性的引物^[9] 341F-GC (5'-CGCCGCGCGCGCG-GCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGCCTACGGGA-GGCAGCAG-3') 和 517R(5'-ATTACCGCGGCTGCT-GG-3')进行 PCR 扩增,扩增产物片段长约 230 bp。

PCR 采用 50 μ L 反应体系:2 $\times$ Taq PCR MasterMix 25 μ L, each primer (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 2.5 μ L, 1 μ L DNA (20 ng 左右), 补足灭菌双蒸水至 50 μ L。16S rDNA-PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 30 min。其细菌 16S rDNA-PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 1 min (每个循环降 1 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 1 min, 10 个循环, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 20 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

PCR 产物检测:经质量分数为 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后 EB 染色观察,用凝胶成像仪照相。

1.4 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

PCR 产物用基因突变检测仪分析,PAGE(聚丙烯酰胺)胶浓度为 8%(w/v),变性梯度为 40%~60%。电泳运行条件:1 $\times$ TAE 电泳缓冲液,60 V 电压,60 $^{\circ}$ C 恒温、恒压电泳 14 h。采用银染^[17]的方法进行染色,并用图形分析软件(Quantity One)对凝胶图象进行分析。用 Shannon-Wiener 多样性指数(Shannon-Wiener diversity index, H'),基因型丰富度(Genotypic richness, S)^[18] 和 Pielou 均匀度指数((Pielou evenness index, J)等指标来比较各个样品的细菌多样性。计算公式如下:

$$H' = -\sum P_i \ln P_i$$

$$J = H' / H_{max} = H / \ln S$$

式中: $P_i = n_i / N$, n_i 是第 i 条条带的多度, N 为样品中所有条带的总多度; $H_{max} = \ln S$, S 为样品中总的条带数。

采用 MVSP 软件的非加权组算术平均法(Un-weighted pair-group method with arithmetic means, UP-GMA)分析比较不同植物根际土壤微生物群落结构的差异或相似性。

1.5 DGGE 条带的序列测定及系统发育树的构建

将 DGGE 条带的切割后分别放入 EP 管中,去离子水重复冲洗 3 次后加入 50 μ L 去离子水碾碎过夜保存,上清液作为 PCR 的模板进行扩增。纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,送 Invitrogen 公司进行测序。所测得序列用 DNAMAN 去除载体序列后,将有效序列在 NCBI 上进行比对,将其中同源性最高的序列确定为参照菌株,相似性 $\geq 97\%$ 的序列则视为同一序列型

(sequence type)^[19], 并应用 MEGA 4 软件采用邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 土壤总 DNA 提取及 V3 区扩增

由图 1、2 可以看出,OMEGA N.A.TM Soil DNA Kit 试剂盒提取土壤基因组 DNA 浓度较大,在 23 Kbp 有明显的条带,通过 16S rDNA V3 区引物进行 PCR 扩增反应,且均能够扩增出大小约为 200 bp 的 DNA 片段。

2.2 土壤样品微生物的遗传多样性

对土壤样品 16S rDNA V3 区 PCR 产物进行 DGGE 分析,结果如图 3 所示。Quantity One 软件分析表明,不同条带代表该样品中不同细菌 16S rDNA V3 区基因片段。从各土壤样品 DGGE 指纹图谱来看,不同的

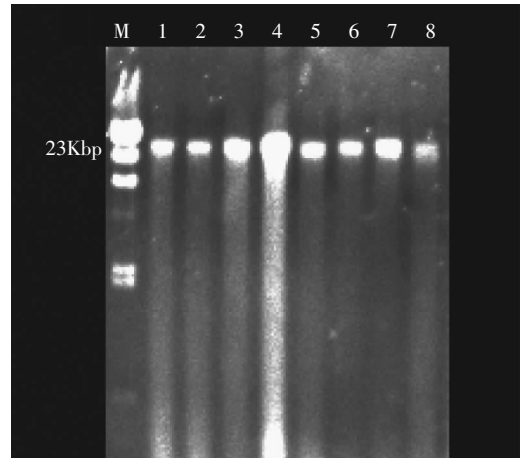


图 1 部分样品基因组 DNA 提取图

Figure 1 The picture of some samples genomic DNA extraction

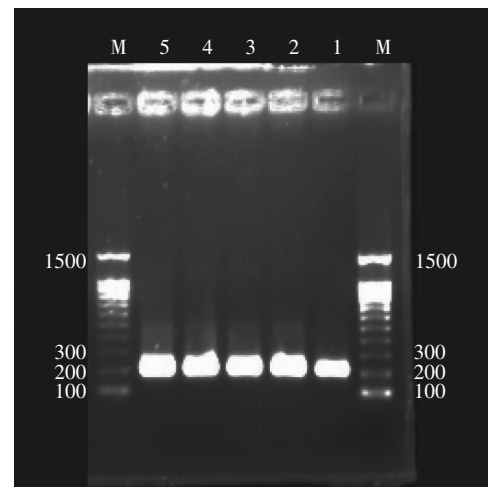


图 2 部分样品 16S rDNA 基因 PCR 扩增图

Figure 2 The picture of 16S rDNA gene PCR amplification of some samples

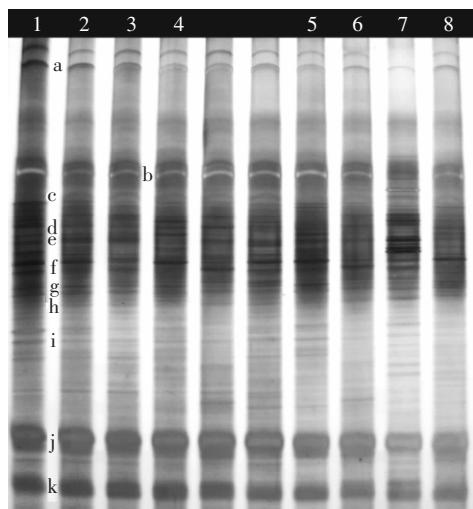


图 3 不同土壤样品的 DGGE 图谱

Figure 3 DGGE profile of different soil samples

条带代表不同的细菌 16S rDNA V3 区基因片段,每个泳道中条带的亮度反映出细菌相对生物量的多少,电泳条带的多少可以直观地反映样品中细菌群落的遗传多样性,本研究根据电泳图谱中每条条带的信息,对各样品中的细菌多样性指数(H')、丰度(S)和均匀度(J)等指标进行了综合分析,结果如表 2 所示。各土壤样品细菌多样性指数(H')、丰度(S)和均匀度(J)均有所不同,不同植物群落根际土壤细菌多样性指数、均匀度、丰富度均高于非根际,其中茭草根际土壤细菌多样性指数最高,指数为 3.318,均匀度最高,为 0.957,丰富度也最大,为 32。蓼非根际土壤细菌多样性指数和丰富度最低,为 2.953、21,蒿的非根际土壤细菌均匀度最低,为 0.920。

2.3 土壤样品细菌群落相似性

在 DGGE 指纹图谱中,不同的样品共有条带数目的多少,可以反映不同样品之间细菌群落相似性。对不同站位细菌群落结构相似性进行聚类分析,结果如图 4 所示。不同植物群落根际土壤细菌群落结构相似性较高,非根际土壤细菌群落结构相似性较低,在 82%的相似水平上聚为 4 大类群,根际土壤细菌和茭草非根际土壤细菌聚为一类,其余非根际土壤细菌各

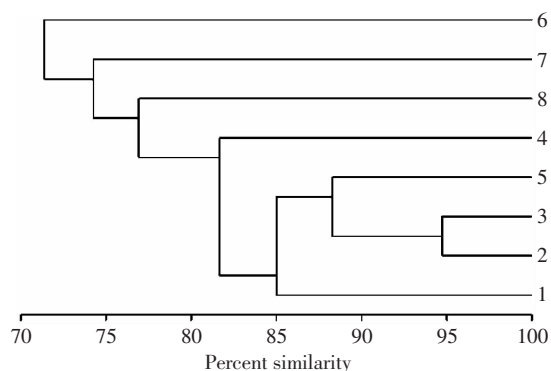


图 4 UPGMA 群落结构相似性的聚类分析

Figure 4 Bacterial community structure similarity clustering analysis by UPGMA

聚为一类,说明植物群落对微生物群落结构具有一定的影响。在 95%相似水平上 8 个土壤样品聚为 8 个类群,说明剑湖湿地湖滨带土壤微生物群落结构多样性较为丰富。

2.4 土壤样品条带序列的系统发育分析

根据土壤样品的 PCR-DGGE 指纹图谱,对优势的条带进行切胶回收,共得到 11 个公共条带,如图 3 所示。对这 11 条带进行序列测定,将所得序列通过输入 GenBank,以 Blast 程序进行相似性比较分析。结果表明,所有序列与数据库中 16S rDNA 序列的相似性在 97%~100%之间,同源性最高的序列均为未培养微生物(图 5),它们分别属于变形菌门(Proteobacteria)、草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)、杜辮氏菌属(*Duganella*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和链球菌属(*Streptococcus*)。

2.5 土壤有机质、N、P 含量及 pH 值与细菌多样性的关系

由图 6、7 可以看出,土壤细菌多样性与土壤有机质、总 N、总 P 的含量呈正相关关系,相关系数分别为 0.776、0.783、0.880, P 值分别为 0.008、0.006、0.003。微生物多样性越丰富,植物根际土壤氮磷的含量也越高,说明土壤微生物的多样性对植物根际对氮磷的累积效应有显著的影响。土壤细菌多样性与土壤 pH 值呈负相关关系,相关系数为 0.826, P 值为 0.005,说明

表 2 不同土壤微生物群落基因型丰富度、多样性及均匀度

Table 2 Shannon-Wiener index, richness and evenness of different microbial community

编号	1	2	3	4	5	6	7	8
丰富度(S)	32	30	29	27	28	21	28	23
Shannon-Wiener 指数(H')	3.318	3.220	3.147	3.091	3.142	2.953	3.066	2.966
均匀度(J)	0.957	0.947	0.935	0.938	0.943	0.955	0.920	0.946

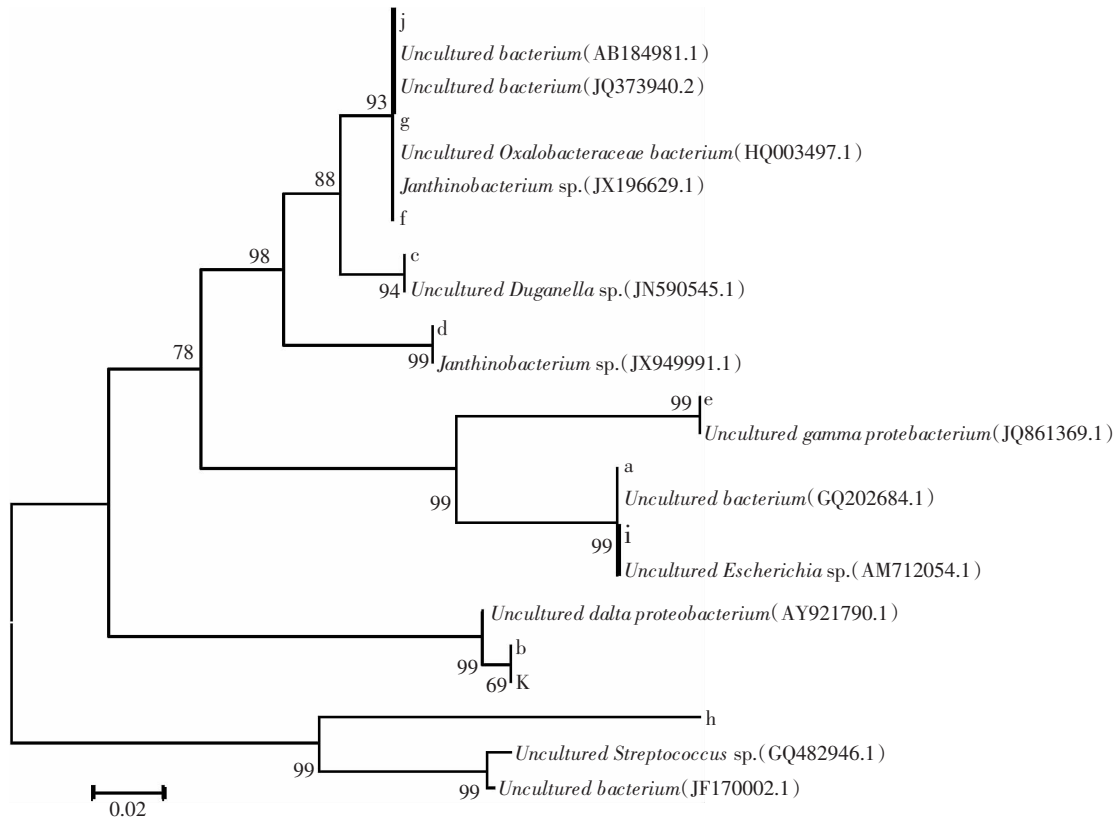


图 5 以 16S rDNA 同源性为基础的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

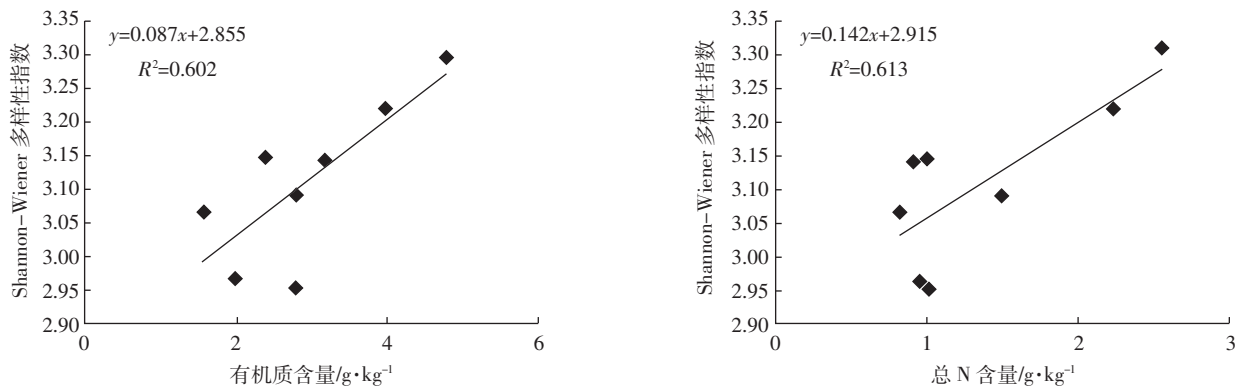


图 6 土壤有机质和总 N 与细菌多样性的关系

Figure 6 Relations of soil organic matter and total nitrogen between the bacterial diversity

土壤 pH 值是影响土壤细菌多样性的主要因素。

3 讨论

本研究表明,根际土壤细菌多样性指数 (H')、丰度 (S) 和均匀度 (J) 均高于非根际,且根际土壤细菌群落结构相似性较高,非根际土壤细菌群落结构相似性较低。茭草根际土壤细菌多样性指数、均匀度、丰富度均最高。说明植物群落对微生物群落结构具有一定的影响,植物群落类型与土壤微生物多

样性的关系十分密切,茭草作为剑湖湿地湖滨带优势植物类型,对其土壤微生物多样性的影响最为显著。研究还表明,根际土壤有机质、总 N、总 P 的含量均显著高于非根际土壤,根际土壤 pH 值则低于非根际土壤,说明湖滨带植物对 N、P 有一定的根际效应,使 N、P 在根际的含量高于非根际。如表 1 不同湿地植物类群对氮磷的根际效应为茭草>藨>蒿>禾草,而茭草的根系比较发达,根较长且根数较多,可能是因为植物可以通过改变根系形态如根长、根

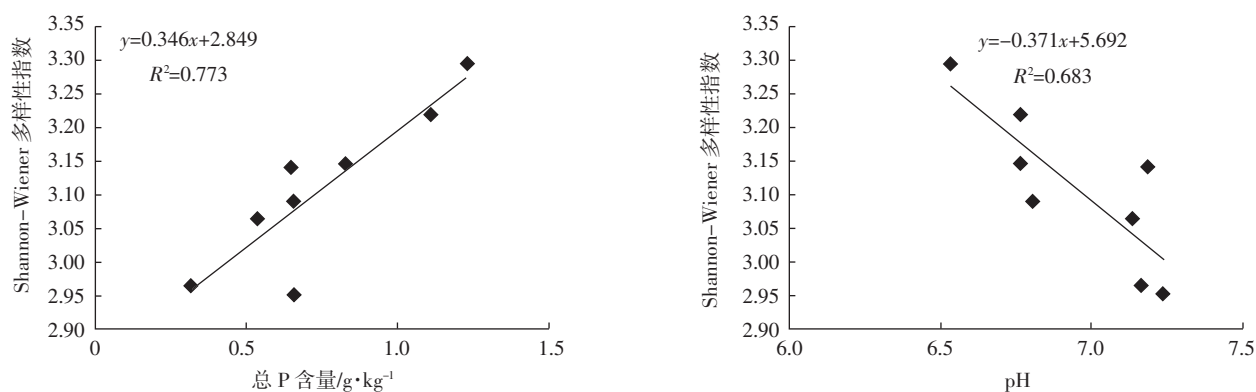


图 7 土壤总 P 和 pH 值与细菌多样性的关系

Figure 7 Relations of soil total phosphorus and pH value between the bacterial diversity

尖数、根表面积和根体积等,增加对氮磷素的吸收和利用^[20]。同时不同植物地上生物量大小与根际效应相符,可能是因为地上部氮磷浓度和生物量之间存在稀释效应,即地上部生物量增加,氮磷的浓度会下降,造成了由于生长产生的氮磷需求。植物地上部的生物量大,长势高,不断产生新的组织,对氮磷的需求就大,从而使氮磷在不同植物根际的积累存在差异。

土壤细菌多样性与土壤有机质、总 N、总 P 的含量呈正相关关系,与土壤 pH 值呈负相关关系。可能是因为 pH 值的降低使得根际土壤中的钙磷等在一定范围内发生溶解^[21],并增加了磷素随质流向根表转移的动力^[22],从而增加了植物根际有效磷含量,随着根际有效磷的增加,加速了有机氮转化为铵态氮,有利于植物的利用进而增加了氮素在根际的富集,而氮磷的积累影响了微生物的多样性,说明植物根系可以改善土壤的物理结构:改变 pH 值、提高土壤有机质及营养元素的含量等,改善了土壤微生物的生存环境,土壤有机质含量越高,土壤微生物群落越复杂,多样性越高,这一结果与 Sessitsch 等^[23]的研究结果相符。以上结果也表明,微生物-土壤-植物间的紧密联系是湿地生态系统中营养物质保存和循环的主要机制之一,具有高生产力和丰富多样性的湿地土壤微生物,不断地将湿地植物凋落物转化成可被植物利用的氮、磷或其他营养物质。植物根系分泌物又为该系统中微生物和其他大型生物提供营养,使得根际微生物的多样性更加丰富。

DGGE 指纹图谱能直观地反映不同植物根际土壤细菌组成成分的变化,是一种能够提供一细菌群落结构变化趋势的研究方法,通过对 DGGE 条带进

行切胶回收测序并可了解细菌群落结构的组成^[24]。本研究通过对剑湖湿地湖滨带植物根际土壤 DGGE 的优势条带进行测序,对应的同源性最高的微生物,归属于变形菌门(Proteobacteria)、草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)、杜榭氏菌属(*Duganella*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和链球菌属(*Streptococcus*)。而大部分属于变形细菌门的 γ -Proteobacteria 类群具有很强的适应性,它们在不同环境的生态系统中都有广泛的分布^[25],具有解磷作用,草酸杆菌属(*Oxalobacter*)也曾分离于湖底沉积物;埃希氏菌属(*Escherichia*)、色杆菌属(*Chromobacterium*)也为解磷细菌^[26],说明这些菌株能够长期适应湿地土壤高磷素的环境,并成为优势菌种。从 DGGE 指纹图谱能够清楚看到,变形菌门(e)、埃希氏菌属(i)和色杆菌属(f)在茭草根际土壤中 DGGE 条带较其他土壤量大,说明这些菌株在茭草根际土壤较丰富,可能对茭草的磷素根际效应有重要的作用,随着解磷作用的增强,促进植物对氮素的吸收从而使氮磷素大量积累于植物根际,由此可以说明微生物-土壤-植物间的紧密联系是湿地生态系统发挥其主要功能之一。这些微生物均为未培养微生物,这些细菌还未被培养或不可培养,就很难鉴定它们在原位生态环境中的生理生化特性及其所具备的生态功能意义,要具体了解这些优势菌群在湿地土壤的结构与功能,还需要通过更全面、更细致、更深入的实验去研究。另一方面也说明了剑湖湿地存在着大量未培养微生物和尚未发现的微生物资源,它们对于自然界和人类的贡献是无法估量的,对于微生物学和生态学的发展和环境污染的生物修复等方面的应用具有重要的意义。

4 结论

(1)不同植物群落根际和非根际土壤细菌多样性指数(H')、丰度(S)和均匀度(J)均有所不同,根际土壤细菌多样性指数、均匀度、丰富度均高于非根际,其中茭草根际土壤细菌多样性指数、均匀度、丰富度均最高。蒿非根际土壤细菌多样性指数及均匀度最低,蓼非根际土壤细菌丰富度最低。不同植物群落根际土壤氮磷含量均有所差异,其中茭草根际土壤氮磷含量最高,蒿根际土壤含量最低。湿地土壤细菌多样性与土壤有机质、总N、总P的含量呈正相关关系,土壤细菌多样性与土壤pH值呈负相关关系。

(2)不同植物群落根际土壤细菌群落结构相似性较高,非根际土壤细菌群落结构相似性较低,在82%的相似水平上聚为4大类群,根际土壤细菌和茭草非根际土壤细菌聚为一类,其余非根际土壤细菌各聚为一类,说明植物群落对微生物群落结构具有一定的影响。在95%相似水平上8个土壤样品聚为8个类群,说明剑湖湿地湖滨带土壤微生物群落结构多样性较为丰富。

(3)剑湖湿地土壤细菌的优势种群分别属于变形菌门(Proteobacteria)、草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)、杜榭氏菌属(*Duganella*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和链球菌属(*Streptococcus*)。

参考文献:

- [1] 陈宜瑜. 中国湿地研究[M]. 长春:吉林科学技术出版社, 1995.
CHEN Yi-yu. Study of wetlands in China[M]. Changchun: Jilin Science Press, 1995.
- [2] 邓红兵, 王庆礼, 蔡庆华. 流域生态学:新学科、新思想、新途径[J]. 应用生态学报, 1998, 9(4):443-449.
DENG Hong-bing, WANG Qing-li, CAI Qing-hua. Watershed ecology—new discipline, new idea and new approach[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1998, 9(4):443-449.
- [3] 金相灿, 尚榆民, 徐南妮, 等. 湖泊富营养化控制和管理技术[J]. 北京:化学工业出版社, 2001:147-153.
JIN Xiang-can, SHANG Yu-min, XU Nan-ni, et al. Lake eutrophication control and management technology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001:147-153.
- [4] 尹澄清. 内陆水-陆地交错带的生态功能及其保护与开发前景[J]. 生态学报, 1995, 15(3):331-335.
YI Cheng-qing. The ecological function, protection and utilization of land/inland water ecotones[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1995, 15(3):331-335.
- [5] 王云飞, 潘红玺, 吴庆龙, 等. 人类活动对洱海的影响及对策分析[J]. 湖泊科学, 1999, 11(2):123-128.
WANG Yun-fei, PAN Hong-xi, WU Qing-long, et al. The influence of human activities on the Erhai Lake and the countermeasure analysis[J]. *Journal of Lake Sciences*, 1999, 11(2):123-128.
- [6] 徐福利, 梁银丽. 黄土高原区“四位一体”高效设施农业模式研究[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(3):139-141.
XU Fu-li, LIANG Yin-li. A model of “combining—four factors in one system” with high efficiency facility agriculture in Loess Plateau[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2003, 11(3):139-141.
- [7] 邓伟, 吕宪国. 松嫩平原西部自然灾害及防治对策[J]. 地域研究与开发, 1996, 15(4):91-96.
DENG Wei, LÜ Xian-guo. On the natural damage and control countermeasures in western Songnen Plain[J]. *Areal Research and Development*, 1996, 15(4):91-96.
- [8] 刘兴土. 我国湿地的主要生态问题及治理对策[J]. 湿地科学与管理, 2007, 1(3):18-22.
LIU Xing-tu. Main ecological problems of wetlands in China and their countermeasures[J]. *Wetland Science and Management*, 2007, 1(3):18-22.
- [9] Veneklaas E J, Stevens J, Cawthray G R, et al. Chickpea and white lupinrhizo-sphere carboxylates vary with soil properties and enhance phosphorus uptake[J]. *Plant and Soil*, 2003, 248:187-197.
- [10] 田昆, 陆梅, 常凤来, 等. 农业利用和人为干扰对剑湖湿地土壤特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(2):267-271.
TIAN Kun, LU Mei, CHANG Feng-lai, et al. Impacts of agricultural activities and human disturbances on characteristics of wetland soil in Jianhu Nature Reserve [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(2):267-271.
- [11] 杨佼, 刘慧芳, 周耀华, 等. 剑湖湿地入湖河流廊道及河滨带对城镇生活污水净化效果的研究[J]. 河北农业科学, 2009, 13(10):96-98.
YANG Jiao, LIU Hui-fang, ZHOU Yao-hua, et al. Study on the purification effects of river corridor and lakeside zone of Jianhu wetland on the municipal domestic sewage[J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2009, 13(10):96-98.
- [12] 李卫东, 刘云根, 田昆, 等. 滇西北高原剑湖茭草湿地湖滨带对入湖泥沙截留效果研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3):17643-17645.
LI Wei-dong, LIU Yun-gen, TIAN kun, et al. Research on reduction efficiency for inlet lake sandy sludge by plateau Jianhu *Zizania latifolia* wetland lakeside zone of Yunnan North-west Region[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(3):17643-17645.
- [13] 张薇, 魏海雷, 高洪文, 等. 土壤微生物多样性及其环境影响因子研究进展[J]. 生态学杂志, 2005, 24(1):48-52.
ZHANG Wei, WEI Hai-lei, GAO Hong-wen, et al. Advances of studies on soil microbial diversity and environmental impact factors[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(1):48-52.
- [14] 周桔, 雷霆. 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与进展[J]. 生物多样性, 2007, 15(3):306-311.
ZHOU Ju, LEI Ting. Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity[J]. *Biodiversity Science*, 2007, 15(3):306-311.

- [15] Han Xuemei, Wang Renqing, Liu Jian, et al. Effects of vegetation types on soil microbial community composition and catabolic diversity as assessed by polyphasic methods in North China[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19: 1228–1234.
- [16] Huang X, Tian Y, Luo Y R, et al. Modified sublimation to isolate phenanthrene degrading bacteria of the genera *Sphingomonas* and *Burkholderia* from Xiamen oil port[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 57(6–12): 538–543.
- [17] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in *Polyacrylamide* gels[J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196: 80–83.
- [18] Bell T, Ager D, Song J I, et al. Larger islands house more bacterial taxa[J]. *Science*, 2005, 308(5730): 1884.
- [19] 周峻沛, 邹长松, 顾英琦, 等. 16S rDNA-RFLP 方法分析抑菌土中的细菌多样性[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2007, 29(4): 424–429.
- ZHOU Jun-pei, ZOU Chang-song, GU Ying-qi, et al. Phylogenetic diversity of bacteria in fungistasis soil determined by 16S rDNA-RFLP analysis[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*, 2007, 29(4): 424–429.
- [20] Ryan J, Estefan G, Rashid A. Soil and plant analysis laboratory manual[M]. Aleppo: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, 2001: 82–134.
- [21] Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review[J]. *Plant and Soil*, 2001, 237: 173–195.
- [22] Murrmann R P, Peech M. Effect of pH on labile and soluble phosphate in soils[J]. *Soil Science Society of America Proceedings*, 1969, 33: 205–210.
- [23] Sessitsch A, Wehlhalter A, Gerzabek M, et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 4215–4224.
- [24] Sun H Y, Deng S P, Raun W R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 5868–5874.
- [25] 苏玉环, 李会荣, 李 筠, 等. 北极太平洋扇区深海沉积物的细菌多样性研究[J]. 高技术通讯, 2006, 16(7): 752–756.
- SU Yu-huan, LI Hui-rong, LI Yun, et al. Investigation on bacterial diversity of deep-sea sediments from Pacific Arctic[J]. *High Technology Through*, 2006, 16(7): 752–756.
- [26] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料, 2001(1): 7–11.
- ZHAO Xiao-rong, LIN Qi-mei. A review of phosphate-dissolving microorganisms[J]. *Soils and Fertilizers*, 2001(1): 7–11.