

啉虫脒污染下土壤微生物多样性

姚晓华^{1,2}, 闵 航^{1,*}, 袁海平¹

(1. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310029; 2. 广西大学农学院, 南宁 530005)

摘要:避开传统的分离培养过程,采用现代分子生物学方法探讨了杀虫剂啉虫脒污染条件下旱地土壤微生物种群多样性。通过对不同培养时间、不同浓度啉虫脒污染下旱地土壤微生物进行 DGGE 基因多样性的分子指纹图谱分析,发现随着培养时间不同,各处理之间的土壤微生物基因多样性出现了一定的差异。但在整个试验过程中,正常田间使用浓度(0.5 mg kg^{-1} 干土)的啉虫脒对土壤微生物群落的影响不明显,DGGE 图谱条带与对照没有明显差异,土壤微生物基因多样性没有明显下降,这说明在旱地中使用正常田间浓度的啉虫脒不会对微生物群落造成较大的影响,高浓度啉虫脒对土壤微生物群落基因多样性有一定的影响,但是影响时间不长。在培养第五周时,浓度为 5 mg kg^{-1} 干土的土样出现了特异性条带,为对照所没有,其他处理浓度染色暗淡。经序列比对分析,与来自土壤的 Uncultured bacterium 具有 100 % 的相似率,可能为不可培养或未培养过的细菌种。

关键词:啉虫脒;PCR-DGGE;微生物多样性

文章编号:1000-0933(2006)09-3074-07 中图分类号:Q938,X172 文献标识码:A

Microbial diversity in an acetamiprid-polluted upland soil

YAO Xiao-Hua^{1,2}, MIN Hang^{1,*}, YUAN Hai-Ping¹ (1. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China). Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(9): 3074 ~ 3080.

Abstract: Acetamiprid is an insecticide used on cotton, leafy vegetables, fruit trees, and other horticultural crops to control sucking insects. Acetamiprid has been classified as an unlikely human carcinogen and it has relatively low acute or chronic toxicity in mammals. As an insecticide, considerable part of applied acetamiprid would enter actually soil. However, its possible effects on the soil bacterial community have not been well known up to date. We examined bacterial community composition in an acetamiprid polluted upland soil in China using PCR-DGGE method which can detect variation of microbial gene diversity in environments. Soils to which acetamiprid was applied at the normal field dose (0.5 mg kg^{-1} dry soil), at higher dose (5 mg kg^{-1} , 25 mg kg^{-1} , 50 mg kg^{-1}) or not applied were put in pots, respectively, incubated at 28°C , and sampled weekly after incubation for PCR-DGGE analysis. Soil sample DNA was extracted using the SDS-high strength salt method and purified by CsCl_2 . The V3 region of 16S rDNA was amplified using the universal primers (BSF8/20 and BSR1541/20; F338 GC and R518). Amplified DNA fragments were separated by parallel denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The DGGE results indicated that there were differences in bacterial community diversity in upland soils treated with different concentrations of acetamiprid. There was no significant difference in DGGE patterns between 0.5 mg kg^{-1} dry soil of acetamiprid and the control soil during the whole incubation time. This suggested that acetamiprid applied at the normal field dose would be unlikely to pose a threat to soil bacterial communities. However, changes were observed in DGGE fingerprints derived from soil after one week receiving the high concentrations of acetamiprid, such as 5, 25, and 50 mg kg^{-1} dry soil. DNA in application-responsive bands from the acetamiprid treatments was recovered and amplified using the universal primers (F338 and R518). PCR products were recovered and cloned

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370048)

收稿日期:2005-12-29; **修订日期:**2006-07-28

作者简介:姚晓华(1971~),女,陕西扶风人,博士,主要从事环境微生物学研究。E-mail: xhyao@gxu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: minhang@zju.edu.cn

Foundation item: The project was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30370048)

Received date: 2005-12-29; **Accepted date:** 2006-07-28

Biography: YAO Xiao-Hua, Ph.D., mainly engaged in environmental microbiology. E-mail: xhyao@gxu.edu.cn

into pGEMT Easy (Promega) and two clones were obtained. The two clones were sequenced using the automated Model 377 or 3730 DNA sequencing system (Applied Biosystems). The two cloned sequences had very high similarities (100 %) to many uncultured bacteria reported previously in database of NCBI.

Key words: acetamidrid; PCR-DGGE; bacterial diversity

长期以来,农药对土壤微生物生态的影响研究主要采用平板计数等传统方法。然而,文献报道,能培养的微生物只占土壤微生物种类总数的 0.1 % ~ 1 %^[1],因而分离得到的微生物并不能真实反映土壤微生物的原始状态^[2],所以传统方法越来越不能满足人们探索土壤生态的需求。目前随着分子生物技术的发展,一些先进的分子生物学方法已经用来评价农药对土壤微生物群落多样性变化影响^[3~6]。

啮虫脒是一种正被广泛使用的比较新的类烟碱杀虫剂,关于啮虫脒对土壤细菌多样性的影响国内外均未报道。本研究选取不同浓度啮虫脒处理土壤为研究对象,通过土壤微生物总 DNA 提取、PCR 扩增及变性梯度凝胶电泳(DGGE),获得土壤微生物 16S rDNA V3 可变区序列,对啮虫脒污染下旱地土壤细菌基因多样性变化进行了生物信息学分析。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

本研究土壤样品为采自浙江临平——从未施用过啮虫脒的长期种植旱作的灰潮土。取 2 ~ 15 cm 耕作层新鲜土样,风干,过 1 mm 筛,混匀备用。供试土壤理化性质为:pH 7.84,有机质含量 15.2 g kg⁻¹,全氮 1.8 g kg⁻¹,全磷 5 g kg⁻¹,全钾 18.7 g kg⁻¹。

1.2 试验设置与实施

取经上述处理的新鲜风干土,称取 1.5 kg,分别装入相同带有通气玻璃管的塑料小桶(上口直径 179 mm,底面直径 134 mm,高 161 mm)中,将含水量调到最大田间持水量的 60 %,以模拟田间环境,于 28 ℃ 预培养 2 周。随后分别加入不同剂量 3 % 的啮虫脒乳油,使终浓度为 0、0.5、5.0、50 mg kg⁻¹干土。每个处理 3 个重复。

1.3 土壤总 DNA 的提取

参照文献^[7,8]中的方法进行,取 5g 湿土,加 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH8.0)5ml,加入直径为 0.1、0.5mm 和 5mm 玻璃珠各 0.5g,并于室温下振荡 5 min,加入溶菌酶 25 mg,使终浓度为 2.5mg ml⁻¹,室温下振荡 15 min,然后于 4 ℃ 下放置 30 min。加入 600μl 20 % SDS 处理 15 min,分装到 Ep 管中。每个 Ep 管装入 0.5 ml 上述混合物,然后加等体积饱和酚抽提。12000r min⁻¹离心 15min,取上清液,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)抽提 3 次;12000r min⁻¹离心 15min,取上清,加入预冷的无水乙醇,-20 ℃ 放置 2h。12000r min⁻¹离心 15min,沉淀用 70 % 无水乙醇洗涤 1 次,去乙醇后 37 ℃ 干燥。干燥后每管加适量 TE 缓冲液垂悬,合并于一管,加入 CsCl₂,使终浓度为(1g ml⁻¹),室温下静置 3h;14000 r min⁻¹离心 20 min,取上清液加入 4ml 去离子水、3ml 冷异丙醇于室温下静置 15 min。14000 min⁻¹离心 15 min,干燥,沉淀定容于 1000μl TE 中,加入 200μl 8 mol L⁻¹ KAc 溶液,室温放置 15min。14000r min⁻¹离心 15min,去上清液,加入 600μl 冷异丙醇,混匀,置室温下放置 5min。14000r min⁻¹离心 15min,DNA 沉淀用 70 %乙醇清洗,离心、干燥,定容于 200μl TE 缓冲液中。

1.4 PCR 扩增

用于 16S rDNA 的 PCR 扩增反应的引物为一对通用引物^[9],其序列如下:正向引物 BSF8/20,5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3' (*E. coli* 对应位置为 8 ~ 27);反向引物 BSR1541/20:5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3' (*E. coli* 对应位置 1541 ~ 1522)。用于 DGGE 电泳的 PCR 扩增产物的引物序列为:338F:5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GCG GGC GCA CGG GGC GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3';518R:5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' (正向引物的 5 端连接 GC 环主要是为了增加 DNA 双链解链区的数量)^[10]。

1.5 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳及染色

采用 Bio-Rad 公司 Dcode TM 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离。10 % 的聚丙烯酰胺凝胶变

性范围为 35 % ~ 52.5 %。150V 电压下,60 电泳 330min。电泳结束后,采用银染法染色,最后利用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统进行拍照并分析。

1.6 凝胶指纹图谱的生物信息学分析

DGGE 指纹图谱分析借助于 Bio-Rad 公司的凝胶成像系统(Quantity One 4.1.1, Bio-Rad, USA)进行条带判读,以配套软件 Quantity One 进行迁移率、强度、面积计算,并计算样品间的相似指数、绘制泳道间遗传图。

1.7 特异性条带的割胶回收与克隆

将 DGGE 图谱上的特异性条带进行割胶回收,回收的条带浸泡在 50 μ l 无菌水中 4 过夜,取 1 μ l 为模板进行基因组总 DNA 16S rDNA V3 区扩增体系和程序再次扩增(此时引物 338F 不要 CG 环)。扩增产物通过 V-gene DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化。纯化产物与 pGEM-T Easy vector (Promega) 连接,产物用 CaCl_2 法转化到 *E. coli* DH5 α /JM109 细胞中。对于阳性克隆直接取 1 μ l 培养液作为反应模板,以原扩增引物进行 PCR 反应。利用 PE 公司的 ABI 3700 型全自动测序仪测序得到(约 180bp)序列,将所得序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。

2 结果与分析

2.1 不经培养土壤微生物总 DNA 的提取和 16S rDNA V3 区的扩增

土壤 DNA 的提取方法多样,但是基本原理都是裂解土壤中微生物细胞,去除蛋白质、腐殖酸等杂质。在样品量不大的情况下,可利用土壤 DNA 提取商业试剂盒。但在样品量很大的情况下,利用试剂盒不经济。本试验采取的是 SDS-酚氯仿抽提法,经电泳检测提取的 DNA 大小在 21kb 左右,并且杂质含量较少,基本没有拖尾(见图 1)。

土壤总 DNA 经过 nest-PCR,即以所提取土壤总 DNA 作为模板,以 BSF/BSR 作为引物扩增出 16S rDNA 全长后,在以 338F/518R 作为引物进行 2 次 PCR 扩增,可获得特异性 16S rDNA V3 区扩增片段,大小在 240bp 左右(图 2)。

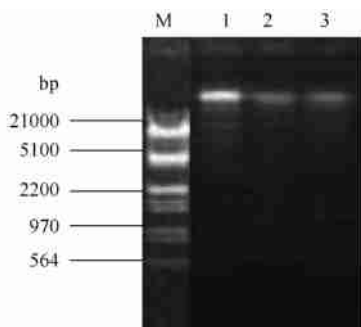


图 1 采用 SDS-酚氯仿抽提法提取总 DNA 琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of total DNA extracted from soil using SDS-phenol-chloroform method

M, marker; Land 1, 2 and 3, 0.5 mg kg⁻¹, 5 mg kg⁻¹, 25 mg kg⁻¹ samples incubated for one week, respectively

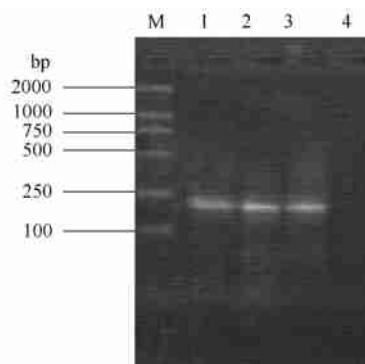


图 2 引物 338F,518R PCR 扩增产物的电泳条带

Fig. 2 Agrose gel electrophoresis of V3 variable region on 16S rDNA amplified from soil treated with acetamiprid

M, marker; Land 1, 2 and 3, 0.5 mg kg⁻¹, 5 mg kg⁻¹, 25 mg kg⁻¹ samples incubated for one week, respectively. Land 4, negative control

可见本试验土壤采用 SDS-酚氯仿抽提法提取的 DNA 结果良好,可以获得较为理想的 16S rDNA V3 区扩增片段,便于后续实验的进行。

2.2 DGGE 的指纹图谱分析

通过对不同浓度啶虫脒处理的旱地土壤 16S rDNA V3 可变区片段进行 DGGE 指纹图谱分析,结果显示在处理的第一周,不同浓度啶虫脒胁迫下的土壤微生物区系的基因条带出现较为明显的差别(图 3)。与对照土壤相比,0.5 mg kg⁻¹干土浓度处理土样的微生物群落条带变化不大,表明正常田间施用量对土壤中微生物基本没有影响,25 mg kg⁻¹、50 mg kg⁻¹干土这两个高浓度处理土样之间的条带非常相似。

通过 Bio-Rad 凝胶成像系统对 DGGE 指纹图谱进行生物信息学分析,绘制不同浓度啮虫脒处理土样之间的遗传簇关系(图 4),图中各泳道间条带所代表的遗传簇异同表示了各土样微生物之间多样性亲缘关系远近。聚类分析表明,各重复土壤聚于一簇,说明重复之间差别较小,重复性较好。对照土样与最低浓度土壤位置较近,归为一簇,表明低浓度啮虫脒对旱地土壤微生物影响较小,其种群差异不明显,基因多样性较为一致。随着浓度的增加,基因多样性差异明显。3 个高浓度处理土样聚为一簇,其中 25mg kg^{-1} 和 50mg kg^{-1} 干土两个最高浓度的位置较近,它们相对于对照土样的 Jaccard 指数相似性(62.8、57.7)明显低于对 0.5mg kg^{-1} 干土土样相对于对照的指数(85.7)。



图 3 不同浓度啮虫脒处理第 1 周后土壤总 DNA 扩增的 16S rDNA 的 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE profiles of amplified 16S rDNA fragments from soil applied with acetamiprid in different concentrations for one week

泳道 Lanes: 1~3, 对照 control; 4~6, 0.5mg kg^{-1} dry soil; 7~9, 5mg kg^{-1} dry soil; 10~12, 25mg kg^{-1} dry soil; 13~15, 50mg kg^{-1} dry soil

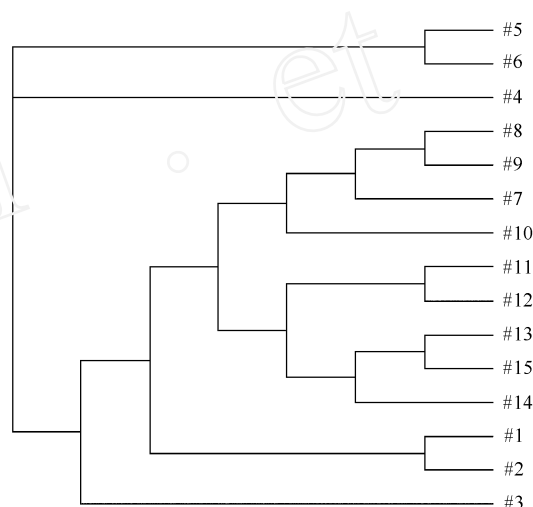


图 4 不同浓度啮虫脒处理 1 周后土壤总 DNA 扩增的 16S rDNA 片断多样性聚类分析

Fig. 4 Cluster analyses of amplified 16S rDNA fragments from soil amended with acetamiprid in different concentrations for one week

泳道 Lanes: 1~3, 对照 control; 4~6, 0.5mg kg^{-1} dry soil; 7~9, 5mg kg^{-1} dry soil; 10~12, 25mg kg^{-1} dry soil; 13~15, 50mg kg^{-1} dry soil; 下同 the same below

培养两周后 16S rDNA 的 DGGE 电泳图谱(图 5)发生了变化,啮虫脒处理导致土壤中细菌种群结构改变。电泳图谱泳道间的遗传簇关系(图 6)同样说明了这点。在图 6 中, 0.5mg kg^{-1} 和 5mg kg^{-1} 干土土样聚在一簇, 25mg kg^{-1} 和 50mg kg^{-1} 干土土样聚在一簇,与对照土样距离较远。 50mg kg^{-1} 干土土样的指数相似性(43.0)与对照(100)差异非常显著,说明啮虫脒对土壤细菌群落结构有一定的影响,特别是高浓度的啮虫脒对群落结构的影响比较大。

又经过 2 周的培养, DGGE 图谱(图 7)又有所改变,低浓度处理土样的条带数量有所增加,与对照土样的相似。

聚类树状图(图 8)反映了啮虫脒处理土壤与对照土样之间的基因多样性差异,高浓度啮虫脒污染土壤的微生物基因多样性继续发生较大变化,仍然不能与对照土样归于一簇。低浓度啮虫脒随着在土壤中降解而减少,对土壤细菌种群的影响减少,又与对照归为一簇。

第 5 周时啮虫脒对土壤微生物群落的影响继续减小(图 9), 25mg kg^{-1} 和 5mg kg^{-1} 处理土样归为一簇, 0.5mg kg^{-1} 干土浓度处理土样与对照归为一簇,最高浓度土样单独成簇(图 10)。在 5mg kg^{-1} 干土、 25mg kg^{-1} 干土处理土样中出现染色较亮的特异性条带(箭头所指)。上面的特异条带在 5mg kg^{-1} 干土土样中染色较亮,在 50mg kg^{-1} 干土土样中染色较暗;下面的特异性条带仅在 5 和 25mg kg^{-1} 干土这两个土样中出现。

经过长时间的培养,啮虫脒对土壤微生物多样性的影响趋势不明显,主要可能是由于啮虫脒在土壤中逐渐被分解^[11],失去有效性造成。从图 11 可以看出,各个泳道之间的条带差异(无论是条带的数量还是量度)

已经不明显,电泳图谱泳道间的遗传簇关系(图 12)同样验证了上述结果。50 mg kg⁻¹干土处理土样已经和对照归为一簇,而且与其它处理也位置较近。从相似性指数对比中也可以看出,各个处理与对照间相似性增加。此时不同浓度啉虫脒处理土样间微生物种群的影响已经不明显。

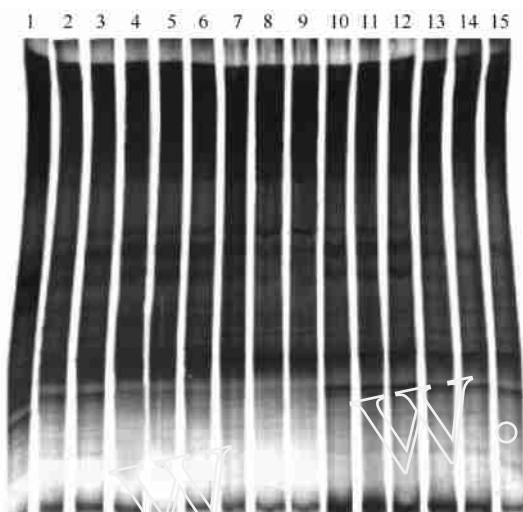


图5 不同浓度啉虫脒处理第2周后土壤总DNA扩增的16S rDNA的DGGE图谱

Fig. 5 DGGE profiles of amplified 16S rDNA fragments from soil applied with acetaminophen in different concentrations for two weeks



图7 不同浓度啉虫脒处理第4周后土壤总DNA扩增的16S rDNA的DGGE图谱

Fig. 7 DGGE profiles of amplified 16S rDNA fragments from soil applied with acetaminophen in different concentrations for four weeks

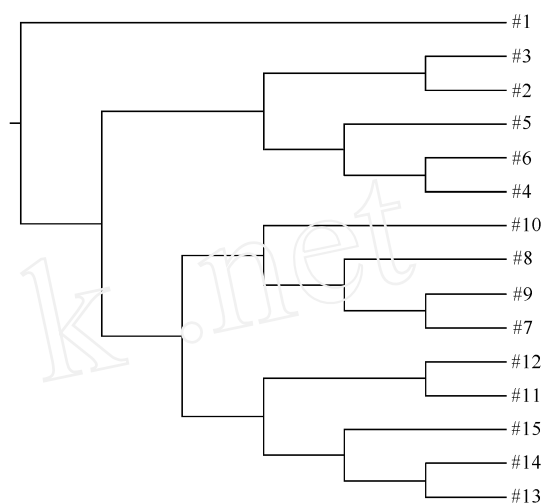


图6 不同浓度啉虫脒处理2周后土壤总DNA扩增的16S rDNA片断多样性聚类分析

Fig. 6 Cluster analyses of amplified 16S rDNA fragments from soil amended with acetaminophen in different concentrations for two weeks

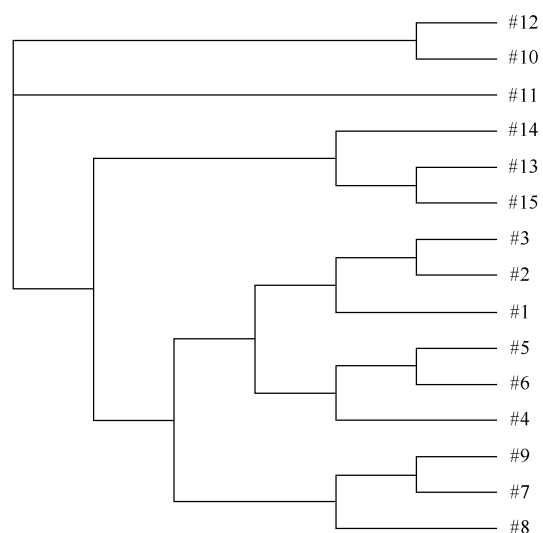


图8 不同浓度啉虫脒处理4周后土壤总DNA扩增的16S rDNA片断多样性聚类分析

Fig. 8 Cluster analyses of amplified 16S rDNA fragments from soil amended with acetaminophen in different concentrations for four weeks

2.3 特异性条带测序和比对结果分析

对图9中出现的特征性条带所代表的微生物进行初步鉴定,割胶回收克隆,经序列测定得到长度约为197bp的16S rDNA V3区可变序列,碱基序列见下:

ACTCCTACGGGAGCGAGCGATGGGGAATATTGCACAA
TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGA
AGGCCTTCGGGTTGIAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGG

GAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG
AAGAA GCACCGGCTAACTCCGTGCCA GCA GCCGC GGTAAT

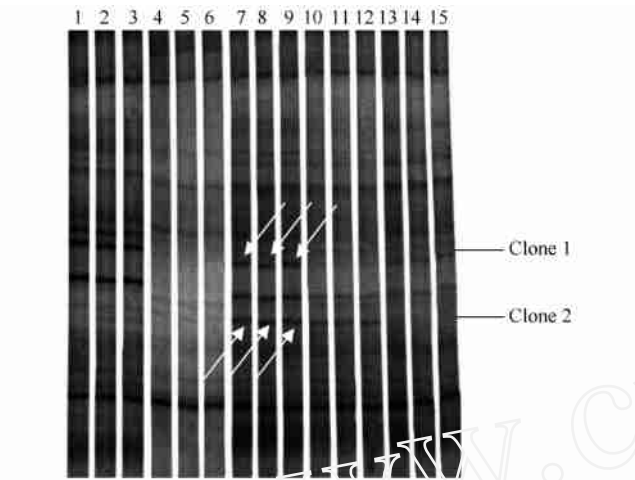


图9 不同浓度啮虫脒处理第5周后土壤总 DNA 扩增的 16S rDNA 的 DGGE 图谱

Fig. 9 DGGE profiles of amplified 16S rDNA fragments from soil applied with acetamiprid in different concentrations for five weeks

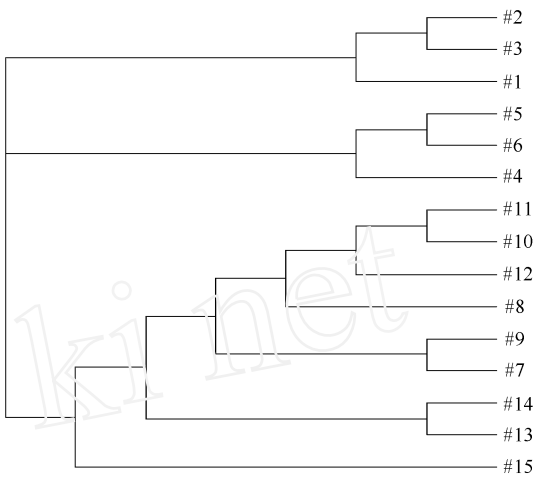


图10 不同浓度啮虫脒处理5周后土壤总 DNA 扩增的 16SrDNA 片断多样性聚类分析

Fig. 10 Cluster analyses of amplified 16S rDNA fragments from soil amended with acetamiprid in different concentrations for five weeks

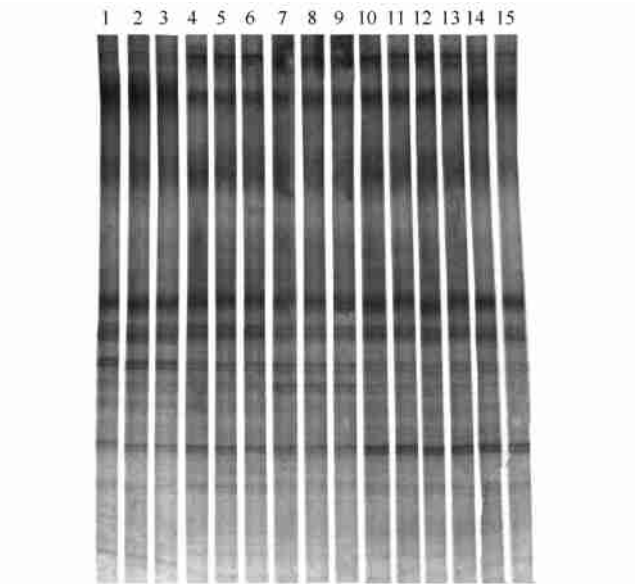


图11 不同浓度啮虫脒处理第7周后土壤总 DNA 扩增的 16S rDNA 的 DGGE 图谱

Fig. 11 DGGE profiles of amplified 16S rDNA fragments from soil applied with acetamiprid in different concentrations for seven weeks

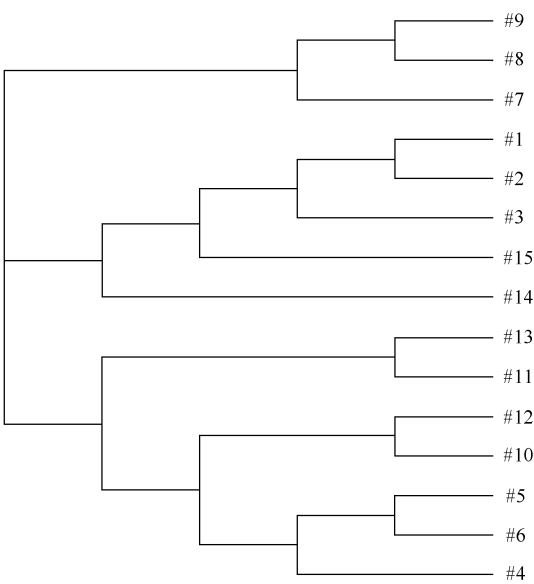


图12 不同浓度啮虫脒处理7周后土壤总 DNA 扩增的 16S rDNA 片断多样性聚类分析

Fig. 12 Cluster analyses of amplified 16S rDNA fragments from soil amended with acetamiprid in different concentrations for seven weeks

将该序列提交 GenBank ,得到序列号 DQ499993。通过 Blast 程序将该序列与 GenBank 中核酸数据进行比对分析,结果表明,该菌株序列与 2 株来自土壤的 Uncultured bacterium 具有 100 %的相似率^[12, 13],可初步确定该菌为不可培养或尚未培养过的种。该菌在对照土壤中数量很少,达不到 DGGE 检测下限,但是啮虫脒浓度为 5 mg kg⁻¹干土的土壤中则可大量富集,在 DGGE 图谱上呈现出明显的条带,啮虫脒含量增大(如浓度为 50mg kg⁻¹干土)时条带变暗或者消失,说明在啮虫脒引起的土壤细菌群落变化过程中,有很多是不可培养或尚未培养过的细菌,这些细菌可能对 5 mg kg⁻¹干土这个浓度十分敏感,这个是用传统平板培养方法所不能发现的。

当然这是否可以作为一种在合适的啮虫脘污染环境特征性细菌、并以其作为啮虫脘污染的指示基因需要进一步试验证明。

3 结论

不经过培养,从土壤中直接抽提微生物的总 DNA,由于避免了在培养过程中的筛选和富集作用,能够更直接地反映土壤中微生物多样性及种群分布情况。本方法应用于研究污染土壤环境下的土壤微生物生态多样性研究,比传统培养过程更快也更准确,对于全面掌握污染环境微生物变化具有重要意义。同时,新方法的引用,进一步丰富了旱地土壤农药污染环境质量的指标,为通过基因多样性变化评估旱地土壤啮虫脘污染程度提供了一些理论基础。

References:

- [1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143 ~ 169.
- [2] Brock T D. The study of microorganisms in situ: progress and problems. *Symp Soc Gene Microbiol*, 1987, 41: 1 ~ 17.
- [3] Sigler, William V T, Ronald F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Soil Ecol*, 2002, 21 (2): 107 ~ 118.
- [4] Muller A K, Westergaard K, Christensen S, *et al.* The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microb Ecol*, 2002, 44(1): 49 ~ 58.
- [5] Luo H F, Qi H Y, Xue K, *et al.* A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8) 1570 ~ 1575.
- [6] She Y H, ZHANG F, Xiang T S, *et al.* Microbial diversity in petroleum reservoirs analyzed by PCR-DGGE. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25 (2) 237 ~ 242.
- [7] Duan X J, Min H. Diversity of microbial genes in paddy soil stressed by cadmium using DGGE. *Environmental Science*, 2004, 25(5): 122 - 126.
- [8] Xu X Y, Min H, Liu H, *et al.* Comparison of DNA extraction methods for PCR-DGGE analysis of bacterial community in soil. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13 (3): 377 ~ 381.
- [9] Damiani G, Amedeo P, Bandi C, *et al.* Bacteria Identification by PCR-Based Techniques. Chapter 10, *Microbial Genome Methods*. CRC Press, 1996, 167 ~ 173.
- [10] Øvreas L, Forney L, Daae E L. Distribution of bacteriaoplanton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environment Microbiology*, 1997, 63: 3367 ~ 3373.
- [11] <http://www.epa.gov/oppr001/factsheets/acetamiprid.pdf>
- [12] Dunbar J, Barns S M, Ticknor L O, *et al.* Empirical and theoretical bacterial diversity in four arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol*, 2002, 68 (6): 3035 ~ 3045.
- [13] Liles M R, Manske B F, Bintrim S B, *et al.* A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol*, 2003, 69 (5): 2684 ~ 2691.

参考文献:

- [5] 罗海峰, 齐鸿雁, 张洪勋, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用. *生态学报*, 2003, 23 (8): 1570 ~ 1575.
- [6] 余跃惠, 张凡, 向延生, 等. PCR-DGGE 方法分析原油储层微生物群落结构及种群多样性. *生态学报*, 2005, 25(2): 237 ~ 242.
- [7] 段学军, 闵航. 镉胁迫下稻田土壤微生物基因多样性的 DGGE 分子指纹分析. *环境科学*, 2004, 25(5): 122 ~ 126.
- [8] 徐晓宇, 闵航, 刘和, 等. 土壤微生物总 DNA 提取方法的比较. *农业生物技术学报*, 2005, 13(3): 377 ~ 381.