

内蒙古典型草原细菌群落结构的 PCR-DGGE 检测

周小奇¹, 王艳芬^{1,*}, 蔡莹², 黄祥忠¹, 郝彦宾¹, 田建卿¹, 柴团耀¹

(1. 中国科学院研究生院生物系, 北京 100049 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 用液氮冻融法和蛋白珠法对内蒙古典型草原土壤基因组 DNA 进行提取, 用 PCR-DGGE 对细菌群落结构进行分析, 并对主要的条带进行测序。发现蛋白珠法比液氮冻融法更能反应出实际的微生物群落结构和组成。内蒙古典型草原土壤细菌主要有 5 个分支: 放线菌门 (Actinobacteria), 变形菌门 (Proteobacteria) 的 α 、 β 及 γ 类群, 拟杆菌门 (Bacteroidetes), 芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 和酸杆菌门 (Acidobacteria)。与基因库中进行比较后发现 4 个序列和已知的细菌种类相似达到了 99% 以上。

关键词 16S rDNA; PCR-DGGE; 液氮冻融法; 蛋白珠法; 内蒙古典型草原

文章编号: 1000-0933 (2007) 05-1684-06 中图分类号: Q78, Q938, Q948, S812 文献标识码: A

PCR-DGGE detection bacterial community structure in the Inner Mongolia steppe with two different DNA extraction methods

ZHOU Xiao-Qi¹, WANG Yan-Fen^{1,*}, CAI Ying², HUANG Xiang-Zhong¹, HAO Yan-Bin¹, TIAN Jian-Qing¹, CHAI Tuan-Yao¹

¹ Department of Biology, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (5) 1684 ~ 1689.

Abstract : Soil microorganisms probably represent the greatest reservoir of biological diversity in the world and play key roles in soils through regulating organic matter decomposition and plant nutrient availability. However, due to the complexity of microorganism survival condition, only 1% — 5% of the total microorganisms can be isolated by cultural method in soils. Recently, the advances of molecular biological techniques, e. g., PCR DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) can provide information regarding soil bacterial community structure through the extraction of microbial DNA from soil, and bacterial community profiles can be generated through the PCR amplification of 16S rRNA genes. During this process, extract efficiency of soil genomic DNA is the most important step. At present, the most widely used methods to extract soil genomic DNA are frozen-thawing method and bead beating method that each has its unique property and advantage. Nevertheless, little research has been conducted to compare of the genomic DNA when dealing with different types of soil using these two methods, especially when soil is rich in humus.

The objective of the work are to evaluate these two methods themselves in soil genomic DNA extract efficiency when dealing with high humus soil of Inner Mongolia steppe based on the PCR-DGGE analysis of bacterial community structure and to determine bacterial community through cloning and sequencing of the bands in the DGGE patterns.

基金项目 国家自然科学基金重大研究计划资助项目 (90211017)

收稿日期 2006-04-11; 修订日期 2007-01-14

作者简介 周小奇 (1981 ~) 男, 安徽安庆人, 博士生, 主要从事微生物分子生态学研究. E-mail: zhou318@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yfwang@gucas.ac.cn

Foundation item The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 90211017)

Received date 2006-04-11; **Accepted date** 2007-01-14

Biography ZHOU Xiao-Qi, Ph. D. candidate, mainly engaged in microbial molecular ecology. E-mail: zhou318@yahoo.com.cn

According to of the results of PCR-DGGE pattern using the bacterial primers 338F and 758R , we found that bead beating method is better than frozen thawing method in genomic DNA extract efficiency. Twenty-one bands in the DGGE pattern were selected , cloned and sequenced. Based on similarity matching , all the sequences formed five major clusters : *Actinobacteria* ; α - , β - , γ - , *Proteobacteria* ; *Bacteroidetes* ; *Gemmatimonadetes* and *Acidobacteria*. Of the 21 clones obtained from DGGE patterns , YC4 exhibited 99.7% similarity to *Pseudomonas sp.* (DQ339153) ; YC5 , YC18 and YC19 exhibited 99.9% similarity to *Gram-positive bacterium* (AB008510) , *Virgisporangium ochraceum* (AB006162) , *Micromonospora chalcea* (X92613) , respectively.

Key Words : 16S rDNA ; PCR-DGGE ; Frozen-Thawing method ; Bead-Beating method ; Inner Mongolia steppe

土壤中存在大量微生物 , 这些微生物在植物凋落物和根系分泌物的分解、提供植物所必需的养分、维持生态系统的物质养分循环中起到了十分重要的作用^[1]。然而 , 限于研究方法和实验手段 , 要想对土壤微生物群落结构有一个比较清楚的了解 , 目前还十分困难。而且 , 许多研究表明细菌的群落结构随着土壤理化性质、植物群落演替以及农业措施的改变而改变^[2,3] , 这更增加了人们了解它们的难度^[3]。

传统方法中对土壤微生物的研究是基于分离培养技术 , 但是由于微生物形态简单 , 缺乏明显的外部特征 , 而且自然环境中的大多数微生物难于模拟其生长繁殖的真实条件而不能获得纯培养 , 另外由于培养基的选择性作用 , 所分离得到的微生物只占总量的 1% ~ 5%^[4]。因此 , 传统的分离培养方法在分析自然环境中的微生物群落结构和多样性上存在着很大的局限性^[4]。

近几十年来 , 随着一系列分子指纹分析方法的发展 , 特别是基于 rRNA 小亚基的分析使人们对自然环境中的微生物群落结构比以前有了更全面的认识。变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis , DGGE) 自 1993 年引入到环境微生物检测以来 , 被广泛地运用到微生物群落的多样性分析和监视种群的动态检测当中^[5]。其基本原理是在含有浓度线性递增的变性剂 (尿素) 聚丙烯酰胺凝胶电泳中 , 具有相同片段长度的核苷酸分子的解链行为不一样 , 从而停留在凝胶中不同位置。根据胶中条带的数目、位置和强度可以得出自然环境中微生物的相对多样性^[6]。DGGE 这种分子研究手段的引入为研究微生物群落结构提供了一个有力的分子指纹标记技术 , 结合对特定 DGGE 条带的测序分析 , 能够对土壤微生物群落结构有更多的认识^[7]。

DGGE 在分析微生物群落组成和动态时包括 3 个步骤 , 一是核酸的提取 , 二是基因扩增 , 三是通过 DGGE 分析 PCR 产物得到特定类型样品的微生物图谱。在这个过程中 , 第一步工作是关键 , 因为核酸提取效率的高低决定着我们能认识的微生物群落的实际结构。目前对核酸的提取主要有两种方法 : 液氮冻融法和蛋白珠法。这两种方法在处理不同的样品时都有着广泛的应用。Segher^[8]用液氮冻融法成功的研究了施用不同除草剂对农业土壤的影响 , Gonzalez-Toril^[9]用这种方法甚至检测到极度酸性环境中古菌的存在 ; 另外 , 用蛋白珠法对农业土壤和草原土壤也有着很多研究^[2,3]。但是 , 对这两种提取土壤基因组 DNA 的方法进行比较的研究相对较少 , 对腐殖质含量较高的内蒙古半干旱草原土壤样品的提取方法的比较至今还没有人报道。

内蒙古羊草草原是欧亚草原的一部分并且是作为特征植物群落结构而存在^[9]。目前对植物、动物的群落结构和多样性已经有很多的研究 , 并且取得了一系列的重大成果^[10] , 但是对微生物的群落结构了解甚少。本文的目的在于 : (1) 比较两种土壤基因组 DNA 提取方法 , 确定哪一种方法更适合于内蒙古草原土壤微生物群落结构的分析 ; (2) 用 PCR-DGGE 方法并结合对特定 DGGE 条带的克隆测序分析 , 从而对内蒙古典型草原的细菌群落结构有着更为清楚的了解。

1 材料和方法

1.1 自然概况

羊草样地 (地理坐标 43°32'45" ~ 44°33'10"N , 116°40'30" ~ 116°40'50"E , 海拔 1200m) 位于锡林河南岸玄武岩台地 , 丘陵顶部浑圆 , 谷坡漫长 , 坡度 < 5° , 是全球变化中中国东北样带 (NECT) 穿过的中心区域。全年

平均气温 -0.4°C ,年降水量 350 ~ 450mm ,属于大陆性半干旱温带草原气候 ,其中 70% 的降水量集中于七八月份。冬春寒冷干燥多风 ,夏秋温暖湿润 ,无霜期仅为 90 ~ 110d。土壤为暗栗钙土 ,样地建群种为羊草 (*Leymus chinensis*) ,优势种为冰草 (*Agropyron cristatum*)、大针茅 (*Stipa grandis*)。

羊草样地自 1979 年围封以来 ,已经有 25a 的历史 ,而且植物群落丰度自 1980 年基本没有改变过 ,经过长时期的封育 ,具有内蒙古草原顶极植物群落的特点^[9]。

1.2 样品的采集

于 2004 年 8 月对羊草样地进行土壤样品采集。用直径为 2cm 土钻随机钻取 20 钻 (每钻相隔 5m) 0 ~ 5cm 的土层 ,用速封袋装好 ,放在便携式冰盒中带回实验室。过 2mm 的土壤筛后 ,放在 -20°C 长期保存 ,以备进行下一步的分子生物学实验。

1.3 土壤基因组 DNA 提取

(1)液氮冻融法 提取过程根据 Zhou^[11]的方法并作了改进。称取 0.5g 土壤放在 10ml 的离心管中 ,加入 0.1g 的 PVPP (聚乙烯吡咯烷酮)和 3ml DNA 提取缓冲液 (0.1mol/L 磷酸盐 [pH 8.0] , 0.1mol/L EDTA , Tris-HCl [pH 8.0] , 1.5mol/L NaCl , 1.0% CTAB)。混合后加入溶菌酶 250 μl (20mg/ml) , 37°C 、225r/min 震荡 30min ,放入液氮和 65°C 的水浴中反复冻融 3 次。然后加入蛋白酶 K 30 μl (20mg/ml) 和 2ml SDS (10%) , 65°C 水浴 2 h ,在水浴过程中 ,每 10min 将离心管上下颠倒 1 次。离心 (8000r/min \times 10min) 除去溶液中的蛋白质和细胞残骸 ,收集上清液 ,用酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提两次 ,13000r/min 离心 10min 后 ,在上清液中加入 0.7 倍体积的异丙醇 , -20°C 过夜。高速离心后 (13000r/min \times 25min) ,用 TE (10mmol/L Tris base , 1mmol/L EDTA , pH 8.0) 溶解沉淀即得到土壤基因组的 DNA 粗提液。

(2)蛋白珠法 提取过程根据 Kuske^[12]的操作并作了改进。称取 0.5g 土壤放入到 2ml 蛋白珠的小管子中 (Bio 101) 。加入提取缓冲液 800 μl ,在蛋白珠破碎机上破碎 30s ,速度是 4.5 m/s (FastPrep FP120 , Bio 101) 。13000r/min 离心 10min 后 ,取出上清液 ,再加入提取缓冲液 500 μl ,重新破碎 1 次 ,合并两次上清液 ,以达到最大的提取量。然后加入蛋白酶 K ,后面的操作同上。

土壤基因组 DNA 的抽提液进一步用 Qiagen 纯化试剂盒 (Qiagen) 进行纯化 ,操作根据 Qiagen 操作指南进行。所得到的样品用核酸蛋白仪 (Shimadzu , Japan) 检测 DNA 纯度和浓度。

1.4 PCR 扩增

PCR 扩增的引物采用细菌通用性引物^[5] ,序列是 338f (5' TACGG GAGGC AGCAG 3') , 758r (5' CTACC AGGGT ATCTA ATCC 3') ,另外在设计引物的时候 ,在反向引物的 5' 端加一段 GC 夹 (40 个) :CGCCC GCCGC GCGCG GCGGG CGGGG GCACG GGGGG。PCR 的反应体系是 50 μl ,各组分组成如下 :1 \times PCR buffer ,每个引物的浓度是 0.4 $\mu\text{mol/L}$, dNTP 200 $\mu\text{mol/L}$ (Promega) , MgCl_2 2mmol/L 2u Taq 酶 (Takara , 大连) ,模板 2 μl ,最后用无 DNase 和 RNase 经过灭菌的高纯水补足到 50 μl 。扩增先放在 4°C 预冷 ,然后立即放入 MJ PTC-200 (MJ Research Com. USA) ,迅速升温到 94°C 预变性 10min ,扩增程序是预变性 1min 55°C 退火 1min 72°C 延伸 1min ,30 个循环 ,最后在 72°C 延伸 10min。扩增结果用 1% 的琼脂糖凝胶进行检测。

1.5 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳及染色

DGGE 是根据 Muzer 的方法并作了优化^[5] ,PCR 产物在 DCode (Bio-Rad) 突变检测系统上操作。细菌 PCR 产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺:甲叉丙烯酰胺 [37.5:1]) 分析。聚丙烯酰胺凝胶变性范围都是从 40% 到 60% ,100% 的变性剂含有 7mol/L 尿素和 40% 的去离子甲酰胺。在加样时 ,PCR 产物重复加样两次 ,每个加样孔中加入 DNA 的量不少于 3 μg 。随后在 DGGE 上 1 \times TAE buffer (40mmol/L Tris , 40mmol/L 乙酸 , 1mmol/L EDTA pH7.2) 恒温 60°C 恒压 120v 条件下电泳 14 h。电泳以后 ,DGGE 凝胶放在 Sybr Green (1:10000) 中浸泡 30min ,脱水 10min 后 ,最后利用 Bio-Rad 凝胶成像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

所得图像用 Labworks software version 4.0 (UVP UK) 软件进行处理。有关泳道和条带的技术处理都用该

软件进行。DGGE 图谱每个泳道根据它们条带存在-记为 (1) 和缺失-记为 (0)。这样就形成了每个泳道的二元数据然后根据 Jaccard 相关系数^[13]建立一个相似性矩阵,从而建立 DGGE 图谱的相似性距离矩阵。Jaccard 相关系数是一个相对客观的评价而不受到 DGGE 带型中条带弯曲带来的负面影响。

1.7 特异性条带的割胶、克隆和测序

主要的 DGGE 条带从聚丙烯酰胺凝胶上切割下来,切割下来的小条放到 1.5ml 离心管中用 20 μ l 的水在 4 $^{\circ}$ C 重悬过夜洗脱胶中的 DNA。每管中取 10 μ l 作为 PCR 模板重新扩增一遍,方法如前所述。扩增产物通过 Qiagen (Qiagen Inc.) 胶回收试剂盒进行纯化,纯化产物与 pGEM-T Easy vector (Promega) 连接。进行蓝白斑筛选,筛选同样扩增片断的质粒 DNA。利用 PE 公司的 ABI 3700 型全自动测序仪 (ABI Biosystems, Inc.) 进行测序。

DNA 序列用 BLAST 软件进行序列比较。多序列的排列用 Clustalx 1.81 和人工适当的精细矫正。16S rDNA 的序列的系统进化树用 PAUP version 4. b10 (Sinauer Assoc., Inc.) 最大似然法。系统进化树的遗传距离采用临近模型,进化树的支持率是进行 1000 次重复运算得到的结果。

1.8 提交序列

所有的序列已经提交到 GenBank, 序列号为 DQ414821-DQ414827 和 DQ414829-DQ414844。

2 结果与讨论

2.1 两种基因组 DNA 提取方法的比较

对液氮冻融法和蛋白珠法所提取的基因 DNA 用核酸分析仪测定,获得的 DNA 浓度为 30 ~ 50 μ g,二者之间没有显著差异。但是用 DGGE 进行分析时,发现用液氮冻融法得到的条带明显比蛋白珠法得到的少(图 1)。而且,液氮冻融法得到的 DGGE 条带主要集中在一个小区域,即使改变聚丙烯酰胺凝胶的梯度范围(50% ~ 60%),也未发生变化。

通过对 DGGE 图谱进行聚类分析,每种方法的两次重复之间也存在着一些差异,但是差异的变化不大(<10%)。但是在两种方法之间,对于同一土壤样品,两种方法所得到的结果差异明显(图 2)。同时,液氮冻融法得到的 DGGE 图谱的条带总共有 21 条,主要条带有 10 条;而蛋白珠法得到条带总共有 46 条,主要条带有 21 条。两种方法得到的图谱都有弥散的条带存在,这种情况可能是土壤中细菌的种类太多,而在一定的梯度范围内条带难以完全分离。在土壤基因组 DNA 提取过程中,细胞的裂解是极为关键的一步^[14]。在本实验中,蛋白珠法比液氮冻融法在基因组 DNA 提取效率上表现出更大的优势(图 2)。对 DGGE 图谱的序列进行分析,发现有一类革兰氏阴性细菌芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*) 的存在(图 3),而这类细菌在类似的草原土壤中用液氮冻融法提取的基因组 DNA 中却没有发现^[1]。

由此,在对内蒙古草原土壤样品分析中,蛋白珠法比液氮冻融法能够提供更多的细菌群落结构的信息,前者比后者具有更大的优越性。

2.2 PCR-DGGE 检测羊草样地细菌群落结构

对蛋白珠法得到的 DGGE 图谱的主要条带进行切胶测序,与 16S rDNA 的数据进行比较,有 5 个大纲的

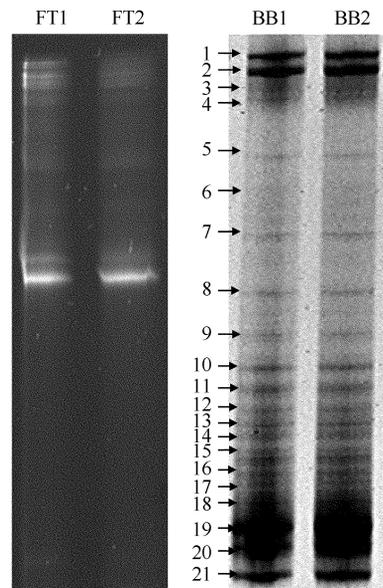


图 1 两种不同提取 DNA 方法得到的羊草样地细菌的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles of two different bacterial 16S rDNA extraction methods in *Leymus Chinensis* field (FT, Frozen-Thawing method; BB, bead beating method)

细菌种类:放线菌门 (Actinobacteria),变形菌门 (Proteobacteria) 的 α 、 β 及 γ 类群,拟杆菌门 (Bacteroidetes);芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)和酸杆菌门 (Acidobacteria)。其系统进化关系如图 3 所示。其中含有条带最多的是放线菌门,共有 11 条带,其次拟杆菌门含有 4 条带, α -变形菌门两条带,其他的都是一条带。部分条带和已知种类的细菌有着高度的相似性,YC4 和 *Pseudomonas* sp. (DQ339153) 有着 99.7% 的相似性,YC5、YC18、YC19 分别和 *Gram-positive bacterium* (AB008510)、*Virgisporangium ochraceum* (AB006162)、*Micromonospora chalcea* (X92613) 有着 99.9% 的相似性。

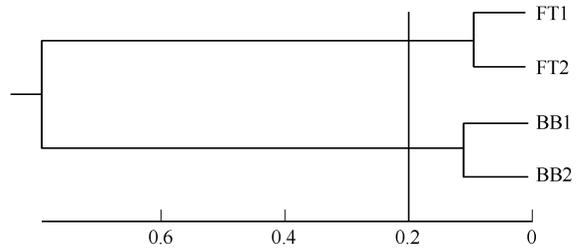


图 2 两种不同细菌 DNA 提取方法的 DGGE 图谱分析
Fig. 2 DGGE analysis of two different bacterial 16S rDNA extraction methods (FT, Frozen-Thawing method; BB, bead beating method)

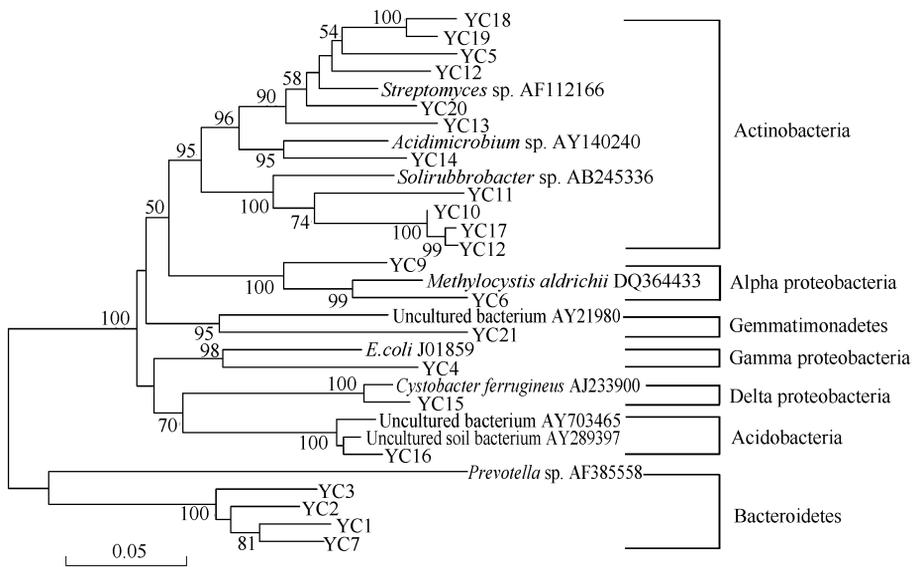


图 3 采用 NJ 方法对羊草样地的 21 个克隆进行系统进化树分析

Fig. 3 Neighbor-joining tree showing the relationship of *Leymus chinensis* grassland clones based on analysis of 21 bases of aligned 16S rRNA sequences clones

内蒙古典型草原 α 变形菌纲在所有基因型当中大约占 9% ,比 McCaig^[1]对英国草原细菌多样性的研究结果 (30% ~ 53%)以及对北方冻原土壤的研究结果 (21%)都偏低,但是比 Kuske^[2]等人对美国西南部酸性土壤细菌群落克隆文库中 α 变形菌纲研究结果 (3%)稍高。

Barn 等^[5]对大量的土壤样品进行研究,发现酸杆菌门在生态系统中是广泛存在的,并且在生态学上具有重要的意义。最近有人对所有的酸杆菌门进行了系统分类,分为 7 个主要的类群^[6]。YC16 在 16S rDNA 数据库中进行比较,和已知的序列相差很大,和 *Uncultured bacterium* (AY703465) 只有 95% 相似性,但是根据系统进化树分析结果发现属于酸杆菌门 (图 3)。

DGGE 在进行环境样品分析时也存在一些问题,Muyzer^[5]等曾经指出 DGGE 法只能对微生物群落中数量上大于 1% 的优势种群进行分析。如果两种微生物 16S rRNA 的序列组成不一样,但是它们的 GC 含量是一样的,在 DGGE 图谱上就是同一条带,从而低估了微生物群落的多样性,产生虚假的认识^[6]。实验中也发现存在这个问题,对条带 1 随机挑了几个白斑进行测序,发现虽然在 DGGE 图谱上和 YC1 位置一样,但是他们的序列并不一样,表明 DGGE 上条带 1 是混和 PCR 产物的结果。由于 DGGE 长度上的限制,反应出来的微生物信息量小于克隆文库所反应的信息量 (Unpublished)。

总之,蛋白珠法和液氮冻融法在提取内蒙古典型草原土壤基因组 DNA 中,前者比后者更能反应出实际的微生物群落结构和组成。PCR-DGGE 对细菌群落结构作了一个全面的分析,并对主要的条带进行测序发现,主要有 5 个大纲的细菌种类:放线菌门 (Actinobacteria),变形菌门 (Proteobacteria) 的 α 、 β 及 γ 类群,拟杆菌门 (Bacteroidetes),芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 和酸杆菌门 (Acidobacteria)。

References :

- [1] McCaig A E, Glover L A, Prosser J I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65 : 1721 – 730.
- [2] Sun H Y, Deng S P, Raun W R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70 : 5868 – 5874.
- [3] Smit E, Leeftang P, Gommans S, *et al.* Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67 : 2284 – 2291.
- [4] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, 59 : 143 – 169.
- [5] 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59 : 695 – 700.
- [6] Seghers D, Wittebolle L, Top E M, *et al.* Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70 : 1475 – 1482.
- [7] Ma Y X, Carola H, Jeremy W, *et al.* Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23 : 1561 – 1569.
- [8] Gonzalez-Toril E, Llobet-Brossa E, Casamayor E O, *et al.* Microbial ecology of an extreme acidic environment, the tinto river. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69 : 4853 – 4865.
- [9] Chen Z Z, Wang S P. Chinese Typical Grassland Ecosystem. In : Chen, Z. Z., and Wang, S. P., eds. Beijing : Science Press, 2000.
- [10] Bai Y F, Han X G, Wu J G, *et al.* Ecosystem stability and compensatory effects in the Inner Mongolia grassland. *Nature*, 2004, 431 : 181 – 184.
- [11] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62 : 316 – 322.
- [12] Kuske C R, Banton K L, Adorada D L, *et al.* Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64 : 2463 – 2472.
- [13] Xu K X. Biological mathematics. In : Xu, eds. Beijing : Science Press, 2002. 83 – 100.
- [14] Roose-Amsaleg C L, Garnier-Sillam E, Harry E. Extraction and purification of microbial DNA from Soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, 2001, 18 : 47 – 60.
- [15] Barns S M, Takala S L, Kuske C R. Wide Distribution and Diversity of Members of the Bacterial Kingdom Acidobacterium in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65 : 1731 – 1737.
- [16] Zhou J Z, Xia B C, Huang H S, *et al.* Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35 : 915 – 924.

参考文献 :

- [7] 马悦欣, Carola H, Jeremy W, 等. 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 在微生物生态学中的应用. *生态学报*, 2003, 23 (8) : 1561 ~ 1569.
- [9] 陈佐忠, 汪诗平, 等. 中国典型草原生态系统. 北京 : 科学出版社, 2000.
- [13] 徐克学. 生物数学. 北京 : 科学出版社, 2002. 83 ~ 100.