

若尔盖高原沼泽土和草甸风沙土细菌 16S rDNA PCR-RFLP 和系统发育分析

张 可, 陈 强*, 赵 珂, 王文跃, 朱雪梅

(四川农业大学资源环境学院, 四川 雅安 625000)

摘要: 采用稀释平板法从若尔盖高原沼泽土和草甸风沙土分离获得 66 株细菌, 在 16S rDNA PCR-RFLP 分析的基础上, 测定了 22 株代表菌株的 16S rDNA 序列, 构建了供试细菌的系统发育关系。16S rDNA PCR-RFLP 分析中, 在 78% 相似性水平处, 除 REG14, REG20, REG22 和 REG55 单独成群外, 其余菌株分为 8 个遗传群, 其中, 群 I 和群 IV 最大, 均有 15 个菌株, 其次是群 VIII, 由 11 个菌株组成, 其余 21 个菌株分布于 5 个群内。对 22 个代表菌株 16S rDNA 全序列系统发育表明, 这些菌株分布于不同的系统发育分支。其中, 以芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 为主, 其余菌株分布于 *Lysinibacillus* 属、中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 和醋酸杆菌属 (*Acetobacter*) 等 7 个属。

关键词: 若尔盖高原; 沼泽土; 草甸风沙土; 细菌; 系统发育

16S rDNA PCR-RFLP analysis and phylogeny of bacteria isolated from swamp and meadow aeolian soils in the Zoige Plateau, Sichuan, China

ZHANG Ke, CHEN Qiang*, ZHAO Ke, WANG Wenyue, ZHU Xuemei

College of Resource and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Yaan 625000, Sichuan, China

Abstract: Using the pour plate method, 66 bacterial strains were isolated from swamp soil and meadow aeolian soils collected in the Zoige Plateau. The genetic diversity and phylogeny were determined by 16S rDNA PCR-RFLP and 16S rRNA gene sequencing analysis. The result of 16S rDNA PCR-RFLP analysis showed that except for the unique strains REG14, REG20, REG22 and REG55, the other strains were clustered into eight different genetic groups at the similarity of 78%. The largest groups were group I and IV, each containing 15 bacteria, and group VIII, consisting of 11 strains. 16S rRNA gene sequences of 22 representative strains were determined and a phylogenetic tree was constructed, the results suggested that these bacteria were mainly distributed in the phylogenetic branches of *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Mycobacterium*, whereas the remaining strains belonged to genus *Lysinibacillus*, *Sinorhizobium*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus* and *Acetobacter*; Thus, the genetic diversity among the cultivable bacteria in this region was considerable.

Key Words: Zoige; swamp soil; meadow aeolian soil; bacteria; phylogeny

四川若尔盖高寒湿地地处黄河上游、青藏高原东北部, 是我国第一大高原沼泽湿地, 也是世界上最大的高原泥炭沼泽, 是中国生物多样性关键地区之一^[1]。但是由于无序开采泥炭、人为疏干沼泽以及过度放牧, 湿地生态系统退化严重^[2-3]。尽管许多学者已对该区域的植物和脊椎动物作了较为系统的研究^[4-6], 但至今还未见对该区域土壤微生物的特征进行系统的研究。

基金项目: 四川省教育厅重点资助项目(2004A004); 四川农业大学双支计划资助项目; 国家科技支撑计划资助项目(2007BAD89B15)

收稿日期: 2009-04-15; **修订日期:** 2009-08-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: cqiang@sicau.edu.cn

研究表明,在高寒湿地生态系统中蕴育的低温微生物,具有独特的遗传学特征和生理生化适应机制,不仅在高寒湿地生态系统中有着重要的地位和作用,在基础研究和生物工程应用方面,亦具有相当大的潜在价值^[7-8]。近年来,国际上对湿地微生物多样性、微生物种群数量的时空分布,环境修复以及系统发育方面开展了大量的研究工作^[9-10],并从湿地分离出了多种具有重要价值的微生物新的资源^[11-13]。同时,细菌作为土壤中最微生物类群,在物质循环,能量流动中起着重要作用,进而对气候变化产生深刻影响^[14]。因此,对我国特有高寒湿地生态系统细菌的研究,无论对于发现新的微生物资源和反映环境变化都具有积极的意义。

本文在研究该区域沼泽土和草甸风沙土细菌数量和遗传多样性的基础上,采用 16S rDNA PCR-RFLP 与 16S rDNA 序列分析方法,进一步研究了 66 株细菌的系统发育地位,以期初步揭示了该区域的土壤细菌资源,丰富我国高原湿地生物多样性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

2006 年 7 月从若尔盖湿地采集了具有代表性的沼泽土和草甸风沙土壤样品共 11 份,采样地点及土壤相关理化性质见表 1。采用稀释平板法,牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,从两种土壤中共分离纯化获得 66 株细菌。其中沼泽土细菌 35 株,编号为 REG1-REG35;草甸风沙土细菌 31 株,编号为 REG36-REG66。

表 1 采样地点及土壤基本理化性质
Table 1 Sampling sites and soil physicochemical properties

土壤类型 Soil type	编号 Sample No.	采样点 Sampling site	海拔高度 Altitude /m	采样深度 Sampling heigh/cm	pH	TN /(g·kg ⁻¹)	TP /(g·kg ⁻¹)	OM /(g·kg ⁻¹)	水分含量 Water content/%
沼泽土 Swamp soil	1	达扎寺 Dazasi	3436	0—26	6.96	3.84	1.14	99.74	79.15
	2	花湖 Huahu	3443	0—23	7.74	4.72	0.86	98.60	74.67
	3	阿西 A'xi	3437	0—22	7.55	3.87	0.42	91.88	72.54
	4	嫩哇 Nenwa	3438	0—25	7.57	3.33	0.88	88.86	69.01
	5	盖东 Gaidong	3476	0—20	7.74	5.58	1.27	150.17	76.85
	6	黑河 Heihe	3481	0—20	7.38	3.66	0.84	97.30	70.58
草甸风沙土 Meadow Aeolian soil	7	墨溪 Moshi	3430	0—41	8.16	1.20	0.58	20.34	25.14
	8	辖曼北 North Xiaman	3461	0—25	6.51	0.15	0.30	7.30	24.84
	9	辖曼南 South Xiaman	3467	0—26	8.23	0.17	0.39	13.11	22.12
	10	黑河大桥 Heihe bridge	3434	0—19	7.65	0.21	0.45	15.20	28.98
	11	唐克 Tangke	3442	0—47	8.09	0.11	0.44	6.77	28.09

1.2 方法

1.2.1 菌种的分离纯化

称取 10g 土样,分别制备浓度为 10⁻³、10⁻⁴和 10⁻⁵的菌悬液,采用混菌平板法测定土壤细菌数量,重复 3 次。平板置 20℃恒温培养箱倒置培养 24—48h。根据特征挑取单个典型菌落,平板划线、镜检后获得纯菌株,保存于 4℃冰箱备用。

1.2.2 DNA 提取

将镜检纯化的菌株活化后接种到 LB 培养液,恒温振荡培养 12—14h,离心收集菌体。按照张于光等^[15]的方法提取 DNA。琼脂糖凝胶电泳检测后保存于 -20℃备用。

1.2.3 16S rDNA PCR-RFLP 分析

选用 P1,P6 为扩增引物^[16]。反应体系为:PCR Mix 15 μL(北京美莱博公司),DNA 模板 1 μL,P1 和 P6 引物各 0.15 μL,超纯水补足 30 μL。反应程序为 95℃预变性 2 min,94℃变性 1 min,56℃退火 1 min,72℃延伸 3 min,循环 30 次,最后 72℃延伸 10 min。取 7 μL 扩增产物,用 *Hinf*I、*Hae*III、*Msp* I 于 37℃酶切过夜,*Taq*I

为 65℃ 过夜。酶切产物用 3% 的琼脂糖凝胶(含 EB)在 80 v 恒压下电泳 3h,凝胶扫描仪检测记录。将 16S rDNA PCR-RFLP 电泳图谱转换为计算机数值,用 NTSYS-PC 软件采用平均连锁法聚类,得到供试菌株的聚类树状图。

1.2.4 代表菌株 16S rDNA 基因序列分析

根据聚类分析结果,选取 22 株代表菌以 P1, P6 为引物扩增 16S rDNA 片段,产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测定的序列应用 Chromas 分析校正, DNAMAN 拼接后提交 GenBank。代表菌株 REG3, REG6, REG11, REG13, REG14, REG15, REG19, REG20, REG21, REG22, REG23, REG32, REG34, REG45, REG46, REG52, REG53, REG55, REG59, REG60, REG63, REG65 在 GenBank 的序列登录号分别为 EU647693, EU647711, EU647698, EU647699, EU647704, EU647705, EU647706, EU647695, EU647700, EU647694, EU647708, EU647696, EU647697, EU586044, EU647701, EU647709, EU586045, EU647710, EU586046, EU647702, EU647703, EU647707。

在 GenBank 中索取相关标准菌株的序列后,利用 MEGA 4.0 软件, Neighboring-joining 方法构建供试菌株的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA PCR-RFLP 分析

对 66 株供试细菌的 16S rDNA 进行扩增,获得的片段大小为 1.5kb 左右。用 *Hinf*I、*Hae*III、*Msp*I 和 *Taq*I 分别对扩增片段进行酶切,产生了丰富的谱带类型(图 1),分别得到 19、22、18 和 17 种酶切图谱,共构成 22 种不同组合。结果表明:分离自沼泽土和草甸风沙土细菌 16S rDNA 扩增片段的 RFLP 电泳图谱存在较大差异,说明 16S rDNA 基因具有丰富的遗传多样性。

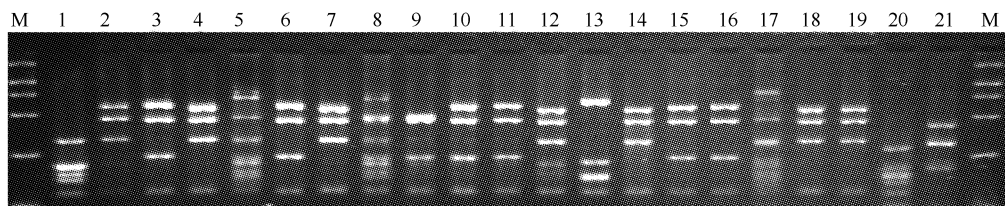


图 1 部分菌株 16S rDNA PCR-RFLP 扩增产物 *Hae*III 酶切产物电泳图

Fig.1 16S rDNA PCR-RFLP fingerprints of part of strains digested by *Hae*III

from left to right: M: Marker, REG41, REG2, REG3, REG64, REG6, REG27, REG2, REG5, REG30, REG52, REG23, REG19, REG38, REG4, REG54, REG61, REG37, REG65, REG50, REG15, REG18

用平均连锁法(UPGMA)对 4 种酶切带谱进行聚类分析,得到了供试菌 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析树状图(图 2)。结果表明,在 64% 的相似性水平处,66 个菌株聚在一起;在 78% 相似性水平处,除 REG14, REG20, REG22 和 REG55 单独成群外,其余菌株分为 8 个群。群 I 和群 IV 最大,均有 15 个菌株,其次是群 VIII,由 11 个菌株组成,其余 22 个菌株分布于 5 个群内。说明该区域土壤细菌存在着非常丰富的系统发育多样性。

2.2 16S rDNA 基因序列分析

根据 16S rDNA PCR-RFLP 分析结果,从每个遗传群选取一定数量的代表性菌株共 22 株,对其 16S rDNA 全序列进行了测定。将供试菌株 16S rDNA 序列与从 GenBank 获取的标准菌株序列进行比对,用 MEGA4.0 软件构建了菌株的系统发育关系(图 3)。由图 3 可知,22 个代表菌株分别位于 10 个不同的系统发育分支,其中,以芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)以及分枝杆菌属(*Mycobacterium*)系统发育分支为主,表明 3 个类群的细菌为该区域沼泽土和草甸风沙土的优势种群。其余供试菌株位于固氮菌属(*Azotobacter*),不动杆菌属(*Acinetobacter*),醋杆菌属(*Acetobacter*),中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*),红球菌属(*Rhodococcus*),微球菌属(*Micrococcus*)和 *Lysinibacillus* 属系统发育分支。

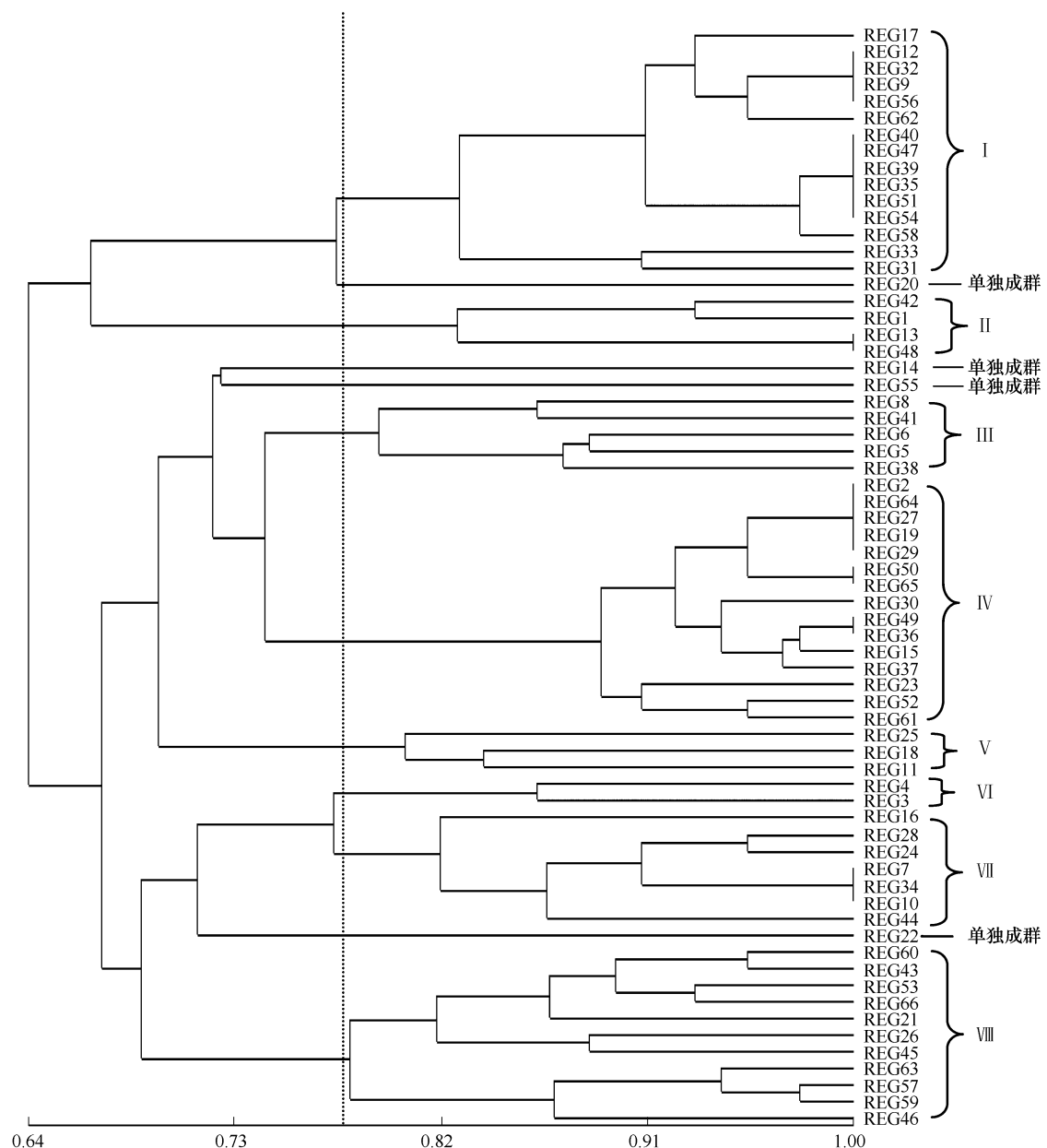


图2 供试菌株的 16S rDNA PCR-RFLP 分析结果聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram obtained by 16S rDNA PCR-RFLP patterns

系统发育分析表明,该区域土壤细菌在种水平上遗传多样性极为明显。在 16S rDNA 序列系统发育分析中,大多数供试菌株与标准菌株间的序列相似性在 99.4%—100% 之间,根据国际细菌分类原则,22 株代表细菌中,分布于假单胞菌属(*Pseudomonas*)分支的有 7 个种;分布于芽孢杆菌属(*Bacillus*)分支的有 5 个种;分布于其他不同属的有 8 个种。

3 讨论

本研究较系统地研究了若尔盖高原沼泽土和草甸风沙土细菌的 16S rDNA 酶切和系统发育多样性。供试的 66 个细菌菌株分布于 10 个不同的系统发育分支,分属于 20 个不同的种,这表明在若尔盖湿地的高寒条件下,土壤细菌存在着丰富的种群多样性。

16S rDNA PCR-RFLP 是研究细菌系统发育分群的重要方法。本研究中,16S rDNA PCR-RFLP 与序列分析结果较为吻合,仅 REG14 和 REG55 的分群存在差异。16S rDNA PCR-RFLP 分析的 12 个 RFLP 遗传群,各

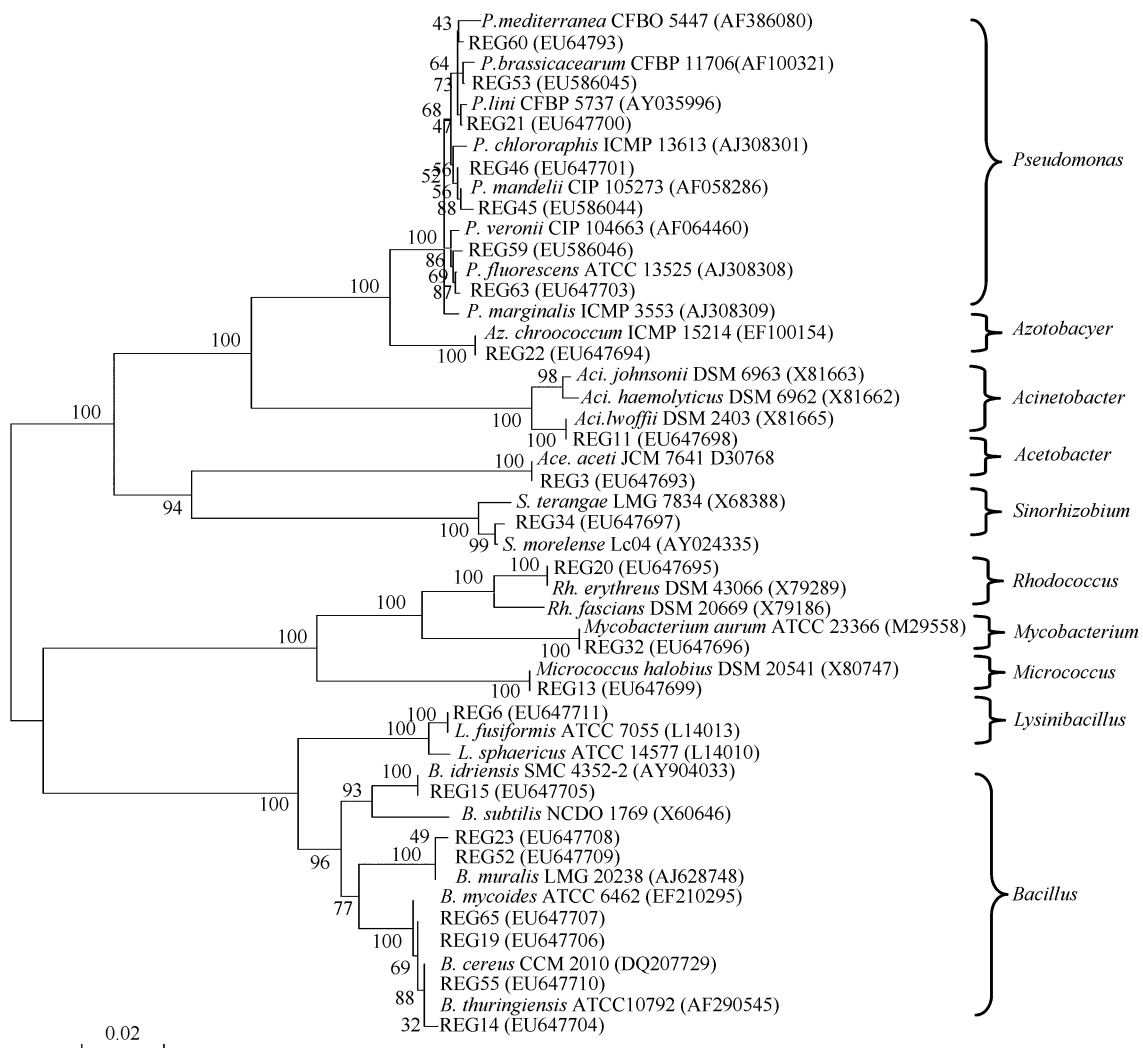


图3 供试菌株 16S rDNA 系统发育图

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by 16S rDNA sequences

Scale bar represents 0.02 substitutions per base position

自构成了单独的系统发育分支。RFLP 群 I 的菌株属于分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 分支; 群 II 的菌株属于微球菌属 (*Micrococcus*) 分支; 群 III 的菌株与 *Lysinibacillus* 属菌株聚在一起; 群 IV 菌株聚于芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 分支, 分别与 *Bacillus muralis*, 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*), 蕈状芽孢杆菌 (*B. mycoides*) 亲缘关系最近; 群 V 菌株归于不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 分支; 群 VI 聚于醋酸杆菌属 (*Acetobacter*) 分支, 与醋化醋杆菌 (*Acetobacter aceti*) 亲缘关系最近; 群 VII 菌株则归属于中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*); 群 VIII 归属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 不同的种, 包括荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*), *P. mediterranea*, *P. lini*, *P. brassicacearu*, *P. veronii*, *P. chlororaphi* 和 *P. mandelii*。单独成群的 REG20, REG22 分别属于固氮菌属 (*Azotobacter*) 和红球菌属 (*Rhodococcus*); REG14 和 REG55 在 16S rDNA PCR-RFLP 单独成群, 但系统发育将其分别归属于苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*) 和蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*)。

土壤细菌种群分布与该区域环境条件及变化密切相关。本研究中, 芽孢杆菌属是沼泽土和草甸风沙土的优势种群之一, 这可能是由于若尔盖及其周边地区年平均气温逐渐上升, 据报道, 年均温升幅达 $0.2284^{\circ}\text{C}/10\text{a}^{[17]}$ 。在夏秋季节, 气温较高, 蒸发量增大, 造成土壤表层干燥, 使得耐高温和干旱的芽孢杆菌数量增加。这与 Lisben 等^[18]从加拿大湿地分离的 76 株细菌, 大多为革兰氏阴性菌无芽孢的研究结果不同。可见该区域

气候条件的改变对细菌群落组成产生了明显影响。土壤中假单胞菌的广泛分布通常与土壤中复杂有机物的分解有关。在该区域内,由于沼泽土壤温度低,植物根系难于降解,极有可能导致了土壤中假单胞菌数量的增加。此外,该区域为重要的牧区,牲畜粪便的排放导致了与牲畜病原菌相关的分枝杆菌属细菌也成为该区域的优势细菌之一。

钟文辉等^[19]认为,土壤微生物多样性与土壤类型特别是土壤有机质含量关系密切^[20-21],富含有机质的土壤其微生物多样性也较为丰富。本研究中,沼泽土有机质含量($150.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)远高于草甸风沙土($20.34\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。沼泽土水分含量在 69.01%—79.15% 之间,而草甸风沙土水分含量在 22%—28% 之间。在沼泽土向草甸风沙土演替过程中,随着土壤水分,有机质及氮,磷等养分条件的变化,土壤细菌种群数量呈下降趋势。固氮菌属,不动杆菌属,醋酸杆菌属以及红球菌属的菌株仅在沼泽土中有分布,说明这些细菌种群很可能在由沼泽土向草甸风沙土演化的过程中消失了。

在沼泽土中分离的 REG13 在系统发育上与微球菌属的盐生微球菌(*Micrococcus halobius* DSM 20541^T)的序列相似性达 100%,而盐生球菌生活环境为高盐浓度,揭示了该区域早期的盐碱化对土壤细菌的深刻影响。

本研究还发现了一批具有潜在生物修复功能的菌株,如分枝杆菌、红球菌、假单胞菌、固氮菌、根瘤菌和苏云金芽孢杆菌等种群。研究表明,分枝杆菌对四环及以上环数 PAHs 有较强降解能力;假单胞菌的某些种群具有降解四环苈、解磷、抑病等能力;红平红球菌能在低温条件下能够分解 3-氯苯甲酸^[22-23]。苏云金芽孢杆菌的杀虫晶体蛋白对草场常见的鳞翅目(*Lepidoptera*)昆虫具也有杀灭作用,可利用其进行生物防治^[24]。褐球固氮菌是土壤中重要的自生固氮菌,中华根瘤菌可与该区域的棘豆、苜蓿等豆科植物形成根瘤而共生固氮,有利于退化土壤的地力恢复。因此,进一步探明这些细菌的生理功能,可为该区域的生态修复,生物防治提供菌种资源。

致谢:感谢芬兰赫尔辛基大学 Kristina Lindstrom 教授对英文摘要的润色。

References:

- [1] Fei S M, Cui L J, He Y P, Chen X M, Jiang J M. A background study of the wetland ecosystem research station in the Zoige Plateau. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 2006, 27 (2): 22-29.
- [2] Wang Q, Bao W K, Yan Z L. Basic types and characters of the western Zoige meadows and their changes in recent decades. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2002, 8(2): 133-141.
- [3] Yang X, Zhai X L, Yu G Y. Current situation of Zoige plateau wetlands biodiversity and their conservation countermeasure. *Journal of Changchun University*, 2002, 12(3): 16-20.
- [4] Hou Z, Li Y H, Fang P. Analysis on the distribution regularity of spinal animals in Zoige. *Pratacultural Science*, 2003, 20(3): 18-20
- [5] Wang C K, Wang S Y, Zhang A D, Lü X G. Wetland resources and its protection in Zoige Plateau. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2001, 21(5): 20-23.
- [6] He C Q, Zhao K Y, Zhao Z C. Wetlands pastures degeneration mechanism and its sustainable utilization countermeasure in Zoige Plateau. *Grassland of China*, 2000, 23(6): 79-87.
- [7] Nicomrat D, Dick W A, Dopson M, Tuovinen O H. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(2): 312-321.
- [8] Ipsilantis I, Sylvia D M. Abundance of fungi and bacteria in a nutrient-impacted Florida wetland. *Applied Soil Ecology*, 2007, 35(2): 272-280.
- [9] Lee S J. Enhanced dissolution of TCE in NAPL by TCE-degrading bacteria in wetland soils. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 145(1): 17-22.
- [10] Guy Riefler R, Krohn J, Stuart B, Socotch C. Role of sulfur-reducing bacteria in a wetland system treating acid mine drainage. *Science of the Total Environment*, 2008, 394(2): 222-229.
- [11] Al-Zarban S S, Al-Musallam A A, Abbas I, Stackebrandt E, Kroppenstedt R M. *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(2): 555-568.
- [12] Chang Y H, Han J, Chun J, Lee K C, Rhee M S, Kim Y B, Bae K S. *Comamonas koreensis* sp. nov., a non-motile species from wetland in Woopo, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(2): 377-381.
- [13] José Martínez-Cánovas M, Béjar V, Martínez-Checa F, Quesada E. *Halomonas anticariensis* sp. nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland

- wildfowl reserve in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(4): 1329-1332.
- [14] Zhang N L, Guo J X. Soil microbial feedbacks to climate warming and atmospheric N deposition. *Journal of Plant Ecology*, 2007, 31(2): 252-261.
- [15] Yang X Y, Zhang Z X, Yang Y Z, Wei G H. Determination and phylogenetic analysis of whole 16S rDNA sequence in *Glycyrrhiza* Rhizobia. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(4): 707-711.
- [16] Ridell J, Siitonen A, Paulin L, Korkeala H, Albert M J. Characterization of *Hafnia alvei* by biochemical tests, random amplified polymorphic DNA PCR and partial sequencing of 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(9): 2372-2376.
- [17] Luo Q, Peng G Z. Climate change in Zoige Plateau and adjacent zone and its impact on wetland environment. *Plateau and Mountain Meteorology Research*, 2008, 28(3): 44-48.
- [18] Lisben D, Mark P. Structures of bacterial communities in the soil of wetland in east Canada. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 40(3): 312-321.
- [19] Zhong W H, Cai Z C. Effect of soil management practices and environmental factors on microbial diversity. *Biodiversity Science*, 2004, 12(4): 456-465.
- [20] Bossio D A, Scow K M. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbial Ecology*, 1998, 35(3): 265-278.
- [21] Ritchie N J, Schutter M E, Dick R P. Use of length heterogeneity PCR, and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1668-1675.
- [22] Kato T, Haruki M. Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(1): 64-70.
- [23] Qi Y, Zhao L, Hu B, Tan X. Biodegradation of chlorobenzoate at different temperatures and cometabolic degradation by *Rhodococcus* sp. *Journal of Tianjin University*, 2006, 39(12): 1428-1433.
- [24] Pimto L M, Azambua A O. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex*. *Brazilian Journal of Biology*, 2003, 63(2): 301-306.

参考文献:

- [1] 费世民, 崔丽娟. 若尔盖高寒湿地生态系统定位站的背景研究——若尔盖高寒湿地研究概述. *四川林业科技*, 2006, 27(2): 22-29.
- [2] 王乾, 包维楷, 晏兆莉. 若尔盖西部草甸的基本类型、特点及近几十年的变化. *应用与环境生物学报*, 2002, 8(2): 133-141.
- [3] 杨霞, 翟兴礼, 余国莹. 若尔盖高原湿地生物多样性现状及其保护对策. *长春大学学报*, 2002, 12(3): 16-20.
- [4] 侯众, 李元华, 方平. 若尔盖高寒湿地沼泽与草甸中脊椎动物分布规律浅析. *草业科学*, 2003, 20(3): 18-20.
- [5] 王长科, 王跃思, 张安定, 吕宪国. 若尔盖高原湿地资源及其保护对策. *水土保持通报*, 2001, 21(5): 20-23.
- [6] 何池全, 赵魁义, 赵志春. 若尔盖高原湿地草场退化成因分析及其保护利用. *中国草地*, 2000, 23(6): 79-87.
- [14] 张乃莉, 郭继勋, 王晓宇. 土壤微生物对气候变暖和大气 N 沉降的响应. *植物生态学报*, 2007, 31(2): 252-261.
- [15] 杨雪颖, 张执欣, 杨亚珍, 韦革宏. 甘草根瘤菌的 16S rDNA 全序列测定及系统进化分析. *西北植物学报*, 2006, 26(4): 707-711.
- [17] 罗清, 彭国照. 若尔盖及其邻近地区气候变化对湿地生态环境的影响. *高原山地气象研究*, 2008, 28(3): 44-48.
- [19] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤管理措施及环境因素对土壤微生物多样性影响研究进展. *生物多样性*, 2004, 12(4): 456-465.
- [23] 齐云, 赵林. 不同温度下红球菌降解氯代苯甲酸及其代谢作用. *天津大学学报*, 2006, 39(12): 1428-1433.