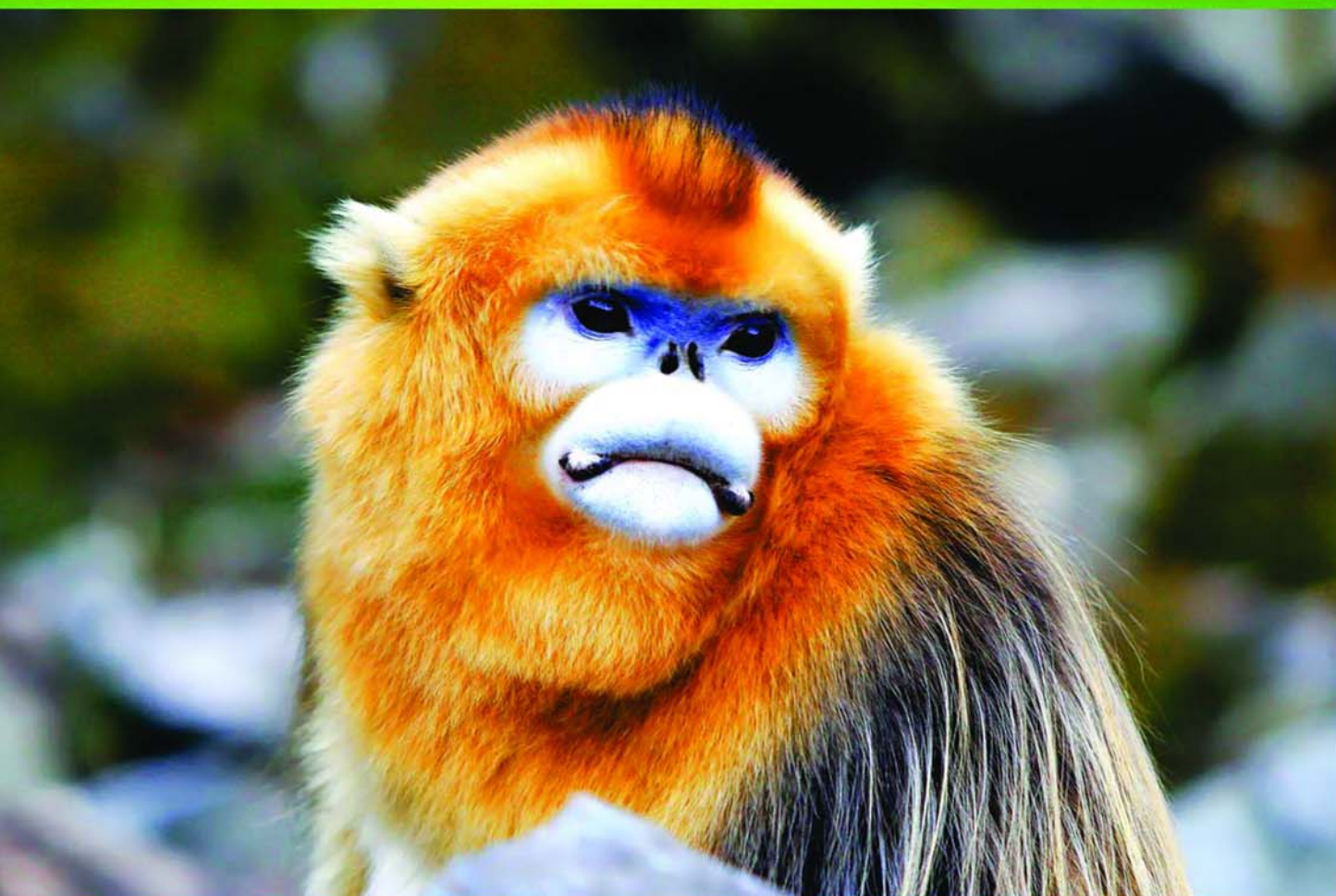


ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第32卷 第2期 Vol.32 No.2 **2012**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 32 卷 第 2 期

2012 年 1 月 (半月刊)

目 次

北部湾秋季底层鱼类多样性和优势种数量的变动趋势	王雪辉,邱永松,杜飞雁,等 (333)
中国大陆鸟类和兽类物种多样性的空间变异	丁晶晶,刘定震,李春旺,等 (343)
粉蝶盘绒茧蜂中国和荷兰种群学习行为及 EAG 反应的比较	王国红,刘 勇,戈 峰,等 (351)
君主绢蝶的生物学及生境需求	方健惠,骆有庆,牛 犇,等 (361)
西南大西洋阿根廷滑柔鱼生物学年间比较	方 舟,陆化杰,陈新军,等 (371)
城市溪流中径流式低坝对底栖动物群落结构的影响	韩鸣花,海燕,周 斌,等 (380)
沉积再悬浮颗粒物对马氏珠母贝摄食生理影响的室内模拟	栗志民,申玉春,余南涛,等 (386)
太平洋中西部海域浮游植物营养盐的潜在限制	徐燕青,陈建芳,高生泉,等 (394)
几株赤潮甲藻的摄食能力	张清春,于仁成,宋静静,等 (402)
高摄食压力下球形棕囊藻凝聚体的形成	王小冬,王 艳 (414)
大型绿藻浒苔藻段及组织块的生长和发育特征	张必新,王建柱,王乙富,等 (421)
链状亚历山大藻生长衰亡相关基因的筛选	仲 洁,隋正红,王春燕,等 (431)
太湖春季水体固有光学特性及其对遥感反射率变化的影响	刘忠华,李云梅,吕 恒,等 (438)
程海富营养化机理的神经网络模拟及响应情景分析	邹 锐,董云仙,张祯祯,等 (448)
沙质海岸灌化黑松对蛀食胁迫的补偿性响应	周 振,李传荣,许景伟,等 (457)
泽陆蛙和饰纹蛙蝌蚪不同热驯化下选择体温和热耐受性	施林强,赵丽华,马小浩,等 (465)
麦蚜和寄生蜂对农业景观格局的响应及其关键景观因子分析	赵紫华,王 颖,贺达汉,等 (472)
镉胁迫对芥蓝根系质膜过氧化及 ATPase 活性的影响	郑爱珍 (483)
生姜水浸液对生姜幼苗根际土壤酶活性、微生物群落结构及土壤养分的影响	韩春梅,李春龙,叶少平,等 (489)
九州虫草菌丝体对 Mn 的耐性及富集	罗 毅,程显好,张聪聪,等 (499)
土霉素暴露对小麦根际抗生素抗性细菌及土壤酶活性的影响	张 昊,张利兰,王 佳,等 (508)
氮沉降对杉木人工林土壤有机碳矿化和土壤酶活性的影响	沈芳芳,袁颖红,樊后保,等 (517)
火炬树雌雄母株克隆生长差异及其光合荧光日变化	张明如,温国胜,张 瑾,等 (528)
湖南乌云界自然保护区典型生态系统的土壤持水性能	潘春翔,李裕元,彭 亿,等 (538)
祁连山东段高寒地区土地利用方式对土壤性状的影响	赵锦梅,张德罡,刘长仲,等 (548)
沙质草地生境中大型土壤动物对土地沙漠化的响应	刘任涛,赵哈林 (557)
腾格里沙漠东南缘可培养微生物群落数量与结构特征	张 威,章高森,刘光琇,等 (567)
塔克拉玛干沙漠南缘玉米对不同荒漠化环境的生理生态响应	李 磊,李向义,林丽莎,等 (578)
内蒙古锡林河流域羊草草原 15 种植物热值特征	高 凯,谢中兵,徐苏铁,等 (588)
不同密度条件下芨芨草空间格局对环境胁迫的响应	张明娟,刘茂松,徐 驰,等 (595)
环境因子对巴山冷杉-糙皮桦混交林物种分布及多样性的影响	任学敏,杨改河,王得祥,等 (605)
海藻酸铈配合物对毒死蜱胁迫下菠菜叶片抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响	栾 霞,陈振德,汪东风,等 (614)
城市化进程中城市热岛景观格局演变的时空特征——以厦门市为例	黄聚聪,赵小锋,唐立娜,等 (622)
基于遥感和 GIS 的川西绿被时空变化研究	杨存建,赵梓健,任小兰,等 (632)
亚热带城乡复合系统 BVOC 排放清单——以台州地区为例	常 杰,任 远,史 琰,等 (641)
研究简报	
不同水分条件下毛茛苔草枯落物分解及营养动态	侯翠翠,宋长春,李英臣,等 (650)
大山雀对巢箱颜色的识别和繁殖功效	张克勤,邓秋香,Justin Liu,等 (659)
期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 330 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 37 * 2012-01	



封面图说: 雄视——中国的金丝猴有川、黔、滇金丝猴三种,此外还有越南和缅甸金丝猴两种。金丝猴是典型的森林树栖动物,常年栖居于海拔 1500—3300m 的亚热带山地、亚高山针叶林、针阔叶混交林,常绿落叶阔叶混交林中,随着季节的变化,只在栖息的生境中作垂直移动。川金丝猴身上长着柔软金色长毛,十分漂亮。个体大,嘴角处有瘤状突起的是雄性金丝猴的特征。川金丝猴只分布在中国的四川、甘肃、陕西和湖北省。属国家一级重点保护、CITES 附录一物种。

彩图提供: 陈建伟教授 国家林业局 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201012131772

张昊, 张利兰, 王佳, 朱孔方, 王洪涛, 杨清香. 土霉素暴露对小麦根际抗生素抗性细菌及土壤酶活性的影响. 生态学报, 2012, 32(2): 0508-0516.

Zhang H, Zhang L L, Wang J, Zhu K F, Wang H T, Yang Q X. Influence of oxytetracycline exposure on antibiotic resistant bacteria and enzyme activities in wheat rhizosphere soil. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(2): 0508-0516.

土霉素暴露对小麦根际抗生素抗性细菌 及土壤酶活性的影响

张 昊, 张利兰, 王 佳, 朱孔方, 王洪涛, 杨清香*

(河南师范大学 生命科学院, 黄淮水环境与污染防治省部共建教育部重点实验室, 新乡 453007)

摘要: 通过培养的方法研究了土霉素暴露和小麦根际抗性细菌的数量、种类、分布特征及土壤酶活性之间的剂量效应关系。结果表明, 土霉素暴露下小麦根际单一抗生素抗性细菌数量和抗土霉素-链霉素双重抗性细菌数都明显增加, 且与暴露剂量呈正效应关系; 同时, 土壤磷酸酶、脱氢酶活性下降, 但与土霉素的剂量效应关系不明显。从土霉素暴露的土壤分离到 50 株抗性细菌, 经形态观察、RFLP 分组和 16S rDNA 序列测定与分析, 将它们聚集在 Actinobacteria、Bacilli、Alphaproteobacteria、Gammaproteobacteria 和 Sphingobacteria 类群。其中放线菌最多(15 株), 占抗性菌总数的 30%; 其次是 *Bacillus* 属细菌(9 株)和 *Pseudomonas* 属细菌(8 株), 分别占 18% 和 16%。同时, 具有抗性的人类机会致病菌 *Pseudomonas*、*Sphingomonas* 和 *Stenotrophomonas* 属细菌在土霉素暴露的样品中均被分离到, 分别占抗性菌株总数的 16%、8% 和 4%。值得注意的是, 随着土霉素暴露剂量的增加, 小麦根际优势促生菌 *Bacillus* 属细菌的抗性检出率逐步降低; 但具有抗生素抗性的人类机会致病菌 *Pseudomonas*、*Sphingomonas* 和 *Stenotrophomonas* 属细菌的检出率却明显增加, 提示可能会进一步增大其机会致病性。

关键词: 小麦; 根际; 抗生素; 抗性细菌; 土霉素; 土壤酶

Influence of oxytetracycline exposure on antibiotic resistant bacteria and enzyme activities in wheat rhizosphere soil

ZHANG Hao, ZHANG Lilan, WANG Jia, ZHU Kongfang, WANG Hongtao, YANG Qingxiang*

College of Life Sciences, Key Laboratory for Yellow River and Huai River Water Environment and Pollution Control, Ministry of Education, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract: Oxytetracycline is a tetracycline that is widely used to treat animals during poultry farming in China. Approximately 25% to 90% of antibiotics administered to animals are subsequently excreted, after which they enter the soil as manure. Due to the persistence and accumulation of such antibiotics in soil, oxytetracycline pollution may lead to a series of changes in soil microbial concentrations, microbial species, microbial antibiotic resistance, microbial community structure, and soil enzyme activities. In this study, relationships between antibiotic exposure dosages and the concentrations, species and distribution characteristics of antibiotic resistant bacteria and the activities of soil enzymes in wheat rhizosphere soil were investigated. To accomplish this, isolation and liquid cultivation methods were employed in the presence of different exposure dosages of oxytetracycline. Exposure to various concentrations of oxytetracycline resulted in a significant increase in the concentrations of oxytetracycline resistant bacteria to one to three times that of control samples that were not exposed to antibiotics. Exposure also led to an increase in the concentration of oxytetracycline-streptomycin double resistant bacteria to one to two times that of control samples that were not exposed to antibiotics. Additionally, the

基金项目: 国家自然科学基金(20677014); 河南省杰出青年基金(104100510006); 河南省教育厅自然科学研究项目(2010B180018)

收稿日期: 2010-12-13; **修订日期:** 2011-06-20

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yangqx66@163.com

majority of double resistant bacteria (60%—80%) were colored bacteria. As the microbial community structures changed in response to oxytetracycline exposure, the activities of some soil enzymes such as alkaline phosphatase, acidic phosphatase and dehydrogenase in the wheat rhizosphere decreased; however, there was no clear relationship between the change in enzymes and oxytetracycline dose. A total of 50 strains of dominant antibiotic resistant bacteria were isolated from wheat rhizosphere soil samples treated with different doses of oxytetracycline. These bacteria were assigned to five groups, Actinobacteria, Bacilli, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Sphingobacteria, based on morphological observations, RFLP grouping and their full length 16S rRNA gene sequences. Among them, Actinobacteria (15 strains) was the most commonly observed genus, accounting for 30% of the total antibiotic resistant isolates. This was followed by *Bacillus* sp. (9 strains) and *Pseudomonas* sp. (8 strains), which accounted for 18% and 16% of the total antibiotic resistant isolates, respectively. Additionally, several important human opportunistic pathogenic bacteria with antibiotic resistance were frequently isolated from antibiotic treated soil, including *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp. and *Stenotrophomonas* sp., which accounted for 16%, 8% and 4% of the total resistant isolates, respectively. Moreover, the dominant bacteria with antibiotic resistance in the wheat rhizosphere were *Bacillus* sp.. These organisms were generally isolated from samples of soil that had been treated with low doses of oxytetracycline (0, 100 $\mu\text{g/L}$), while very few were isolated from samples of soil that had been treated with 2000 $\mu\text{g/L}$. Taken together, these findings suggest that exposure to high concentrations of antibiotics would inhibit the wheat growth—promoting bacteria in the rhizosphere, thereby indirectly inhibiting the growth of wheat. Conversely, human opportunistic pathogenic bacteria with antibiotic resistance (*Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp. and *Stenotrophomonas* sp.) were generally isolated from soil samples treated with high doses of oxytetracycline exposure (2000 $\mu\text{g/L}$). These antibiotic resistant opportunistic pathogenic bacteria and their antibiotic resistant genes pose a risk because they have the potential to spread within plants and humans.

Key Words: wheat; rhizosphere; antibiotics; resistant bacteria; oxytetracycline; soil enzyme

自 20 世纪 50 年代,金霉素、土霉素、四环素相继从链霉菌发酵液中分离得到后,由于其广泛的抗菌谱和相对低廉的价格,使之不仅在医药行业,尤其在养殖业中作为兽药和饲料添加剂在禽畜疾病防治及生长促进中发挥了重要作用^[1]。据报道,2003 年我国仅土霉素产量就达到 10^4 t,占世界总产量的 65%^[2]。调查发现,畜禽用抗生素一般有 25%—90% 以原药形式随动物粪尿排出,进而通过粪肥进入土壤并长期持留^[3]。在施用动物粪肥的 0—40 cm 土层中,土霉素和金霉素含量高达 32.3 mg/kg 和 26.4 mg/kg^[4]。虽然目前检测到的土壤抗生素残留平均多在 $\mu\text{g/kg}$ 级^[5-6],但由于土霉素、四环素类抗生素与土壤或底泥的亲合力强、迁移性差而在环境中具有较长的持留性^[7],如此长期持续暴露,对土壤微生物抗药性的产生、土壤活性的影响、以及通过食物链对高营养级生物的毒性效应值得关注。

土壤微生物和酶是土壤生化特性的重要组成部分,在营养物质转化、有机质分解等方面发挥着重要作用^[8]。尤其在植物的根际,由于存在高浓度的植物代谢产物,是土壤微生物生长、繁殖和代谢特别旺盛的区域,微生物数量大、活性强^[9]。同时,根际细菌还被认为是生存在健康植物内部的植物内生菌的主要来源^[10]。因此,由动物粪肥中的抗生素残留诱导产生的抗生素抗性细菌很有可能从根际进入植株内部进行传播,进而通过食物链进入人体,导致人抗药性的产生。此外,Berg 等^[11]还认为,植物根际是人类机会致病菌的重要储存库,例如 *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* 和 *Stenotrophomonas* 属的多种细菌都可以进入植物和人类寄主间的相互作用系统,在植物根际和人类器官或组织中发挥相同的定植作用。毋庸置疑,一旦此类细菌产生了抗生素抗性,对人类健康将会造成巨大威胁。

目前,针对兽药用抗生素的污染现状,研究热点多集中在环境中抗生素的残留及微生物的降解行为方面,至于抗生素对环境生态结构、微生物抗性产生的影响的报道还很少。由于我国是世界上最大的小麦生产和消费国^[12],且小麦播种前常以粪肥肥田,由此导致抗生素残留长期反复进入农田,造成的环境效应不容忽视。

我课题组前期研究中报道了土霉素对小麦根际微生物群落结构的影响,发现土霉素暴露对根际优势微生物的生长有明显抑制作用^[13]。本研究进一步探讨了土霉素暴露剂量与小麦根际抗性细菌数及土壤酶活性之间的剂量效应关系,并利用分子生物学手段分析了小麦根际抗性细菌的组成、分布等特点。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤样品采集于从未施用过禽畜粪肥的河南师范大学小麦试验田,小麦植株处于孕穗期。按 5 点取样法采样,刮取小麦根系附着的土壤、混匀,即得小麦根际土壤样品。

1.2 土霉素与小麦根际抗性细菌数量的剂量效应关系

称取 5 g 新鲜土样添加到装有 100 mL 无菌生理盐水的三角瓶中,制成土壤悬液。向其中适量添加土霉素,使其终浓度分别为 0、100 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$,每个浓度 3 个平行,30℃、150 r/min 振荡培养。在培养的第 5、10、20、30 天取样,稀释涂布牛肉膏蛋白胨平板,分别计数细菌总数和土霉素抗性细菌数。抗性细菌计数的培养基中含有 20 $\mu\text{g/mL}$ 土霉素。

1.3 土霉素与双重抗性细菌的剂量效应关系

挑取 1.2 中来源于不同样品的土霉素抗性菌落,分别对应点接到含链霉素 20 $\mu\text{g/mL}$ 的新鲜牛肉膏蛋白胨平板上培养,分离双重抗性细菌,并记录抗性菌的菌落特征。

1.4 抗性细菌的鉴定

抗性细菌的革兰氏染色、芽孢染色、显微镜观察等参照沈萍^[14]方法。分子生物学鉴定分两部分进行,首先提取菌株总 DNA,然后利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GTTACCTTGTACGACTT-3') 按常规方法进行 16S rDNA 片段扩增^[15]。

PCR 产物根据 Kim^[16]方法进行 RFLP 分析。选用两种限制性内切酶 Msp I 和 Hha I,20 μL 体系,37℃ 水浴反应 60 min。酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶、120 V 电压电泳 60 min,染色后在 Bio-Rad 凝胶成像系统中观察,根据酶切图谱对所有菌株进行 RFLP 分组。依据 RFLP 分组结果和菌株的生理生化特征,从各组选择 1 株菌进行 16S rDNA 全序列测定(由上海生工生物工程技术有限公司完成)。测序结果提交 Genbank 获得序列号并通过 BLAST 比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>),利用 MEGA4.1 软件构建细菌的系统进化树,确定各菌株的分类地位。

1.5 土霉素与小麦根际土壤酶活性的剂量效应关系

在 1.2 的培养体系中,定期于培养第 5、10、20、30 天取样,测定土壤磷酸酶和脱氢酶活性。测定方法参见杨清香文献^[13]。

2 结果与讨论

2.1 土霉素与小麦根际抗性细菌数量的剂量效应关系

依材料与方法所述,定期对不同剂量土霉素暴露下的土壤样品中可培养细菌总数及土霉素抗性细菌数进行了统计。结果表明,无论是否添加土霉素,样品中可培养细菌总数都在 0.58×10^8 — 1.16×10^8 cfu/g 之间波动。由于土壤被制成了悬液,因此该计数结果与已报道的小麦根际可培养细菌总数相比略有下降^[13]。而土霉素抗性细菌的计数结果见图 1。

由图 1 可见,未经土霉素处理的土样中也含有 3×10^6 — 6×10^6 cfu/g 的抗性细菌,说明环境中的土霉素抗性菌是自然存在的,但其数量明显少于土霉素暴露环境中存在的抗性菌数。其中,培养 5 d 时,抗生素暴露与否和抗性菌数并无明显剂量效应关系;处理 10 d 时,抗生素暴露下的抗性细菌数比无抗生素的对照组明显增加了 1 倍以上,且暴露剂量越高,抗性菌数越多,二者之间的剂量效应关系明显;第 20 天时,100 $\mu\text{g/L}$ 土霉素暴露的样品中抗性菌数趋于稳定,而 2000 $\mu\text{g/L}$ 土霉素暴露下的抗性菌数仍继续增加至峰值 1.84×10^7 cfu/g;随着暴露时间延长至 30 d,抗性菌数明显下降,100 $\mu\text{g/L}$ 土霉素暴露下的抗性菌数与对照组基本持平,这可能与土壤中所加入的土霉素被降解、含量下降有关。

Blanck 的群落诱导抗性 (Pollution-Induced Community Tolerance, PICT) 理论^[17]认为,土壤微生物群落为了在抗生素等污染环境中继续生存,会通过生理生化与遗传特征的改变或以抗性类群代替敏感性类群的方式,使整个群落抗性产生并不断提高。Schmitt 等^[18]在对不同浓度磺胺氯哒嗪对土壤微生物群落的抗性诱导效应研究中也发现:与对照相比,药品浓度升至 7.3 mg/kg 时土壤微生物群落的抗性增长了 10%。本研究,土霉素暴露下的小麦根际抗性细菌数明显增加,且与暴露剂量呈正效应关系。同时,抗性细菌的增加并不是短时间内的快速增长,而是在 20 多天达到峰值。分析其原因可能是由于土霉素分子既可通过—OH 和—C=O 等功能基团与土壤中的带正电荷胶体作用,也可通过—CONH₂基团与土壤中带负电荷的胶体作用^[19],因而与土壤表现出较好的亲和力,药效持留性增强。抗性细菌虽能适应这样的环境,但由于土壤中的营养等因素却导致其生长缓慢。而随着培养时间的延长,抗性菌数明显回落,可能是营养物质耗尽以及长时间处理伴随抗生素的降解使其含量下降,使某些抗性菌由于生存环境的改变而逐步丧失了抗性,因此在后续研究中有必要关注土霉素随培养时间延长的持留性问题。

2.2 土霉素与小麦根际双重抗性细菌数量的剂量效应关系

挑取 1.2 中含土霉素平板上的典型抗性菌落,逐一点接到含链霉素 20 μg/mL 的新鲜牛肉膏蛋白胨平板上培养,计数抗土霉素-链霉素的双重抗性细菌。双重抗性菌与土霉素抗性菌的比例关系见图 2。

由图可知,25%—69% 的土霉素抗性菌同时具有抗链霉素的双重抗性。其中,培养 5 d 的样品中即检测到明显的双重抗性菌,其比例随土霉素暴露剂量的升高明显增加至接近 70% (2000 μg/L 土霉素暴露),土霉素暴露剂量与双重抗性菌数呈明显的正剂量效应关系。随后,双重抗性菌的数量变化没有明显的规律性。同时研究发现,双抗细菌中有色菌比例高达 60%—80%,最多的是黄色菌落,其次为粉红色和棕色。这与本课题组以前报道的水生环境下抗生素双重抗性细菌中有色菌检出比例明显较高的结论相一致^[20]。细菌细胞的黄色和红色主要由细胞所含的类胡萝卜素所致,Hermandsson 等^[21]研究也发现,有色细菌比无色细菌更具有多种抗药性,而细菌的抗生素抗性与类胡萝卜素的积累呈明显正相关性。

2.3 抗性细菌的鉴定

经土霉素、链霉素双重抗性平板筛选后,依据抗性菌落形态的差异,从小麦根际土壤中共分离出 50 株抗性细菌,各菌株的形态特征、革兰氏染色、芽孢染色结果等详见表 1。其中 G⁻菌 22 株, G⁺菌 29 株;杆菌 22 株,球菌 21 株,放线菌 8 株。菌落呈黄色的 11 株,粉红色的 4 株。如前所述,色素与细菌抗性之间存在着密切联系,尤其类胡萝卜素的积累,利于细菌抵抗不利的环境因素。另外,检测到有质粒的菌株 30 株,占总菌数的 59%,而质粒与耐药基因间也存在着紧密联系。例如已知的细菌对四环素类抗生素的耐药机制中,一类重要的耐药方式就是由菌体外输泵基因编码外输泵蛋白将抗生素泵出胞外,降低胞内药物浓度来保护核糖体,从

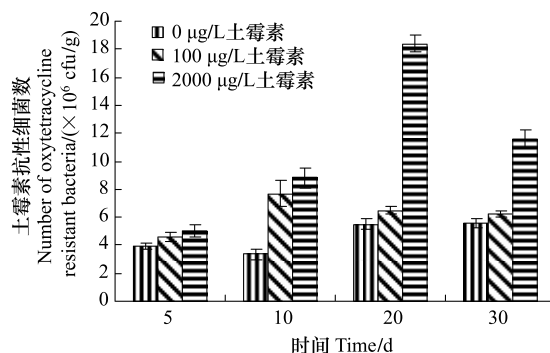


图 1 不同剂量土霉素暴露下小麦根际土霉素抗性细菌数量

Fig.1 Number of antibiotic resistant bacteria in wheat rhizosphere under various dosages of oxytetracycline

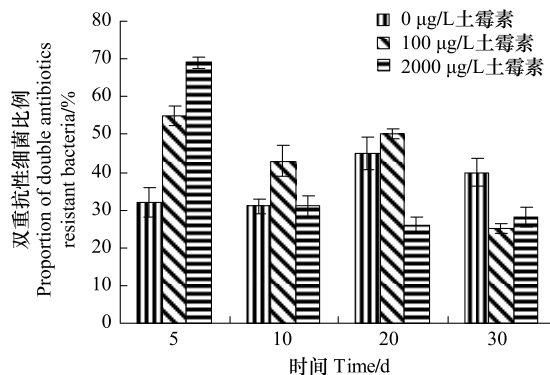


图 2 不同剂量土霉素暴露下小麦根际双重抗性细菌与土霉素抗性细菌的比例

Fig.2 Proportion of double resistant bacteria to oxytetracycline resistant bacteria in wheat rhizosphere under various dosages of oxytetracycline

表 1 小麦根际 50 株土霉素-链霉素抗性菌的特征

Table 1 Properties of 50 strains oxytetracycline-streptomycin resistant bacteria isolated from wheat rhizosphere

编号 Number	菌株 Strain	细胞形态 Cell shape	菌落颜色 Colony color	革兰氏染色 Gram stain	芽孢染色 Spore stain	质粒 Plasmid	RFLP 分组 Group of RFLP
1	0-1	短杆状	白色	—	—	—	B
2	0-2	杆状	乳白色	+	+	+	F 二
3	0-3	丝状	白色	+	—	—	J
4	0-4	球状	白色	—	—	+	A
5	0-5	球状	黄色	—	—	+	H 二
6	0-6	杆状	白色	+	+	+	F 三
7	0-7	丝状	白色	+	—	—	J
8	0-8	放线菌	白色	+	—	—	C
9	0-9	短杆状	粉红色	+	+	+	F 一
10	0-10	短杆状	粉红色	+	+	+	F 一
11	0-11	杆状	白色	—	—	+	G
12	0-12	球状	白色	—	—	—	A
13	0-13	丝状	白色	+	—	—	K
14	0-14	杆状	乳白色	+	+	+	F 二
15	0-15	球状	白色	—	—	+	H 一
16	0-16	放线菌	白色	+	—	—	C
17	0-17	球状	黄色	+	—	—	D
18	100-1	球状	白色	—	—	+	H 一
19	100-2	球状	白色	+	—	—	I
20	100-3	杆状	棕黄色	+	+	+	F 三
21	100-4	球状	白色	—	—	—	E
22	100-5	杆状	棕黄色	+	+	+	F 三
23	100-6	杆状	乳白色	+	+	+	F 二
24	100-7	杆状	乳白色	+	+	+	F 二
25	100-8	杆状	白色	—	—	+	G
26	2000-1	球状	黄色	+	—	—	D
27	2000-2	短杆状	白色	—	—	+	B
28	2000-3	球状	白色	—	—	+	A
29	2000-4	球状	白色	—	—	+	H 一
30	2000-5	球状	黄色	—	—	+	H 二
31	2000-6	球状	黄色	—	—	+	H 二
32	2000-7	放线菌	白色	+	—	—	C
33	2000-8	丝状	白色	+	—	—	K
34	2000-9	球状	白色	+	—	+	I
35	2000-10	球状	白色	—	—	+	H 一
36	2000-11	球状	黄色	—	—	+	H 二
37	2000-12	短杆状	棕黄色	+	+	+	F 一
38	2000-13	丝状	白色	+	—	—	K
39	2000-14	短杆状	白色	—	—	+	B
40	2000-15	杆状	乳白色	+	+	+	F 二
41	2000-16	短杆状	粉红色	+	+	+	F 一
42	2000-17	短杆状	粉红色	+	+	+	F 一
43	2000-18	球状	白色	—	—	—	E
44	2000-19	球状	黄色	+	—	+	D
45	2000-20	杆状	白色	—	—	+	G
46	2000-21	球状	白色	—	—	+	A
47	2000-22	杆状	乳白色	+	+	+	F 二
48	2000-23	球状	黄色	+	—	—	D
49	2000-24	球状	白色	+	—	—	I
50	2000-25	杆状	白色	—	—	+	G

0: 从土霉素剂量 0 $\mu\text{g/L}$ 的样品中分离, 100: 从土霉素剂量 100 $\mu\text{g/L}$ 的样品中分离, 2000: 从土霉素剂量 2000 $\mu\text{g/L}$ 的样品中分离; +: 阳性, —: 阴性

而使菌体表现耐药性。Jones^[22]的研究也表明,四环素外输泵基因大都来源于不同的不相容质粒群,而病原菌或条件致病菌中的大部分四环素抗性基因也与转移质粒、转座子、结合转座子相连,这些转移单位可使抗性基因在种间传递或通过结合而在更大范围的属间传递。

对 50 株抗性细菌进行 16S rDNA 扩增及扩增产物的限制性酶切后,将其划分为 14 组 RFLP 类型(A—K 型,结果见表 1)。结合 16S rDNA-RFLP 分型和各菌株的形态学特征,从各组分别挑取菌株进行 16S rDNA 全序列测定,测序结果提交 Genbank,获得序列号 FJ959367-FJ959381。将测序结果用 MEGA4.1 软件中的 neighbor-joining 分析法构建系统发育树,结果如图 3。

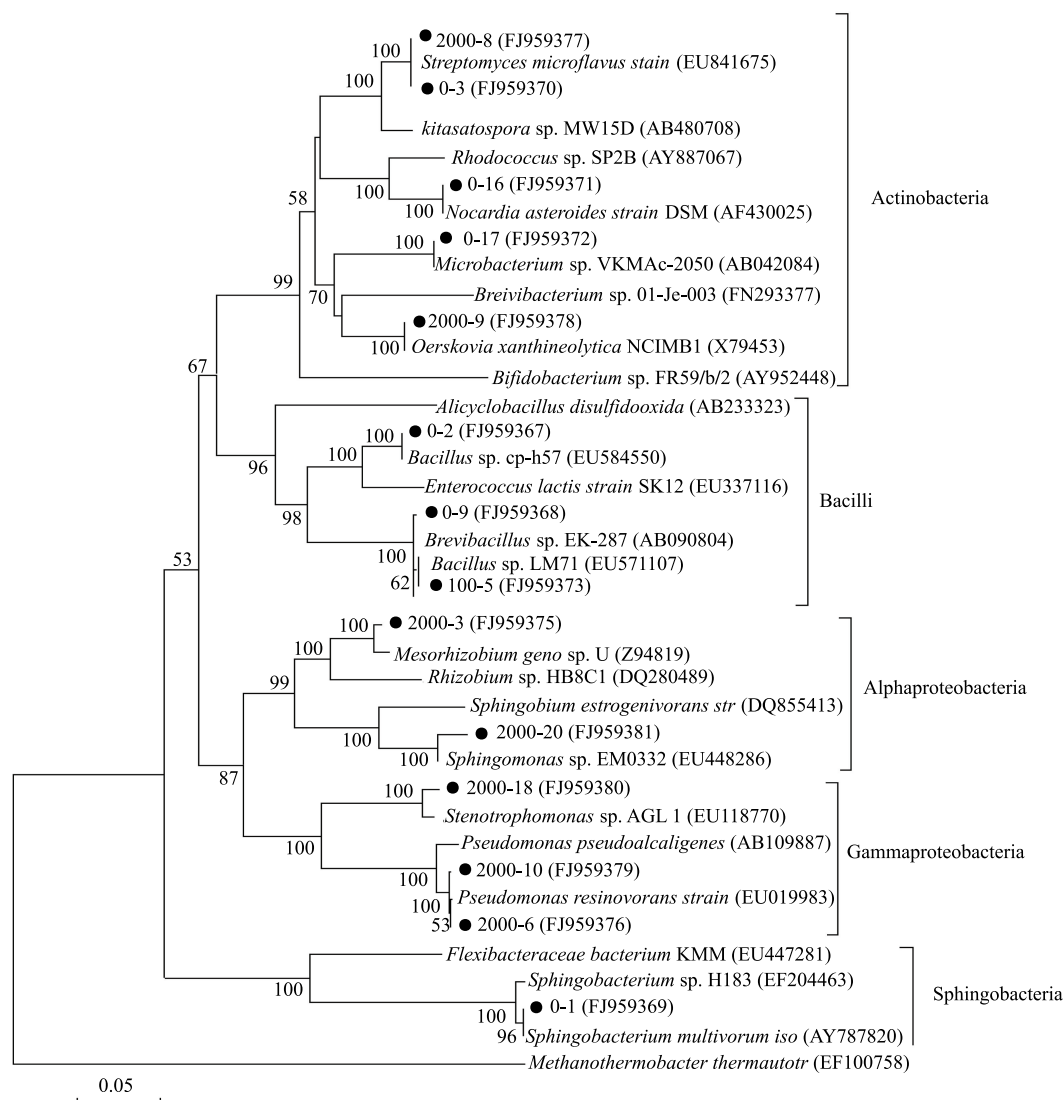


图 3 小麦根际 14 株抗生素抗性菌的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of 14 strains of antibiotic resistant bacteria isolated from wheat rhizosphere

由图 3 可知,分离的 50 株抗性菌聚集在 Actinobacteria、Bacilli、Alphaproteobacteria、Gammaproteobacteria 和 Sphingobacteria 类群。其中,属于放线菌的 15 株,占抗性菌总数的 30%,包括 *Streptomyces microflavus*、*Microbacterium* sp.、*Nocardia asteroides* 和 *Oerskovia xanthineolytica*。据 Raaijmakers 等^[23]报道,着生于植物根际的 *Streptomyces* 属细菌可以产生多种抗生素。Berg 也认为,与大多数土壤环境相比,由于根际区具有丰富的营养物质,因而微生物在该位点的生存竞争十分剧烈,一些具备高竞争能力的细菌可以通过例如产生抗生素类物质的方式定植于植物根际^[11]。因此,本研究在小麦根际分离到具有土霉素抗性的链霉菌的可能性必然较大。

除 Actinobacteria 外,另有 14 株抗性细菌与 Bacilli 聚在一起构成了进化簇的第二大类群,其中 *Bacillus* 属细菌占所分离抗性菌总数的 18%。前期研究中发现,*Bacillus* 属细菌是小麦根际的主要优势菌群^[13],对小麦病害有一定拮抗作用,还能参与营养物质的循环及利用,是植物根际重要的促生菌种。由于该类菌在小麦根际分布众多,因此在抗生素长期暴露下诱导产生的抗性菌比例也会增加,故分离的抗性细菌中芽孢杆菌最多。

第三大类 Gammaproteobacteria 包括 10 株菌,其中 8 株 *Pseudomonas* 属细菌(4 株与具有柴油降解能力的 *Pseudomonas resinovorans* strain(EU019983)菌株极为相似,另 4 株与 1 株未发表的能利用联苯的 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*(AB109887)聚在一起),另外 2 株则与 1 株从冶金行业污染的土壤中分离的 *Stenotrophomonas* sp. AGL 1(EU118770)菌株近缘。

此外,进化树 Alphaproteobacteria 类群中的 2000-3(代表类型 A 的 4 个菌株)与菌株 *Mesorhizobium* genosp. U(Z94819)的相似性最高,该菌株与豆科植物共生并具有固氮能力^[24];2000-20(代表类型 G 的 4 个菌株)与一株未发表的分离自韩国农田土壤中的 *Sphingomonas* sp. EM0332(EU448286)具有最大相似性。

菌株 0-1(代表类型 B 的 3 个菌株)与从玉米根际获得的、具有植物促生作用的 *Sphingobacterium multivorum* iso(AY787820)^[25]亲缘关系最近,构成了进化树的 Sphingobacteria 类群。

值得注意的是,分离到的小麦根际抗性菌中,有 8 株 *Pseudomonas* 属、4 株 *Sphingomonas* 属和两株 *Stenotrophomonas* 属细菌,分别占抗性菌总数的 16%、8%和 4%,而上述属的多种细菌都是已报道的对人体具有潜在致病性的重要根际细菌^[11]:例如能引起皮肤和伤口感染的 *Pseudomonas* spp.、与人的囊性纤维化病有关的 *Pseudomonas aeruginosa*,在油菜、马铃薯、水稻和小麦根际都能分离到。尤其在油菜、马铃薯、苜蓿、向日葵、玉米等多种植物根际都检测到的 *Stenotrophomonas maltophilia*,与多种临床症状例如菌血症、心内膜炎、呼吸道感染密切相关。Berg^[11]等发现,由于这些菌在根际和人体组织器官中具有相同的定植机制,因此,与其它土壤区域相比,根际的机会致病菌也大大增加。而这些具有抗生素抗性的机会致病菌在环境中的广泛分布必将成为人类健康的巨大隐患。例如近年来多例超级细菌感染致死的事例就已经引起了人类的关注。

2.4 抗性细菌在不同抗生素剂量下的种属分布特征

比较 50 株抗性菌在不同抗生素剂量下的种属分布特征(表 2)发现,链霉菌属在无抗生素或 2000 μg/L 抗生素暴露的环境中均有发现,说明该类菌抗生素抗性的产生与抗生素剂量间无明显效应关系。抗性 *Bacillus* 属细菌主要来源于抗生素暴露剂量相对较低(0、100 μg/L)的样品,而 2000 μg/L 土霉素处理的样品中 *Bacillus* 属抗性细菌检出较少,提示自然环境中人为因素造成的抗生素高浓度积累可能抑制小麦根际促生菌群的优势地位,进而影响植物生长。另外值得关注的是,具有人类机会致病性的 *Pseudomonas*、*Sphingomonas* 和 *Stenotrophomonas* 属细菌主要来源于 2000 μg/L 土霉素暴露的样品,这些可以在植物根际和人体细胞间传

表 2 50 株抗性细菌在不同土霉素剂量下的种属分布
Table 2 Distribution of 50 strains resistant bacteria under different dosages of oxytetracycline

土霉素暴露剂量/(μg/L) exposure dosages of oxytetracycline	种属 Species
0	<i>Streptomyces microflavus</i> (0-3, 0-7, 0-13)、 <i>Nocardia asteroides</i> (0-8,0-16)、 <i>Microbacterium</i> (0-17)、 <i>Bacillus</i> (0-2,0-6, 0-14)、 <i>Brevibacillus</i> (0-9, 0-10)、 <i>Pseudomonas resinovorans</i> (0-5)、 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (0-15)、 <i>Mesorhizobium</i> genosp(0-4,0-12)、 <i>Sphingobacterium multivorum</i> (0-1)、 <i>Sphingomonas</i> (0-11)
100	<i>Oerskovia xanthineolytica</i> (100-2)、 <i>Bacillus</i> (100-3,100-5,100-6,100-7)、 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (100-1)、 <i>Stenotrophomonas</i> (100-4)、 <i>Sphingomonas</i> (100-8)
2000	<i>Streptomyces microflavus</i> (2000-8, 2000-13)、 <i>Nocardia asteroides</i> (2000-7)、 <i>Oerskovia xanthineolytica</i> (2000-9,2000-24)、 <i>Microbacterium</i> (2000-1,2000-19, 2000-23)、 <i>Bacillus</i> (2000-15,2000-22)、 <i>Brevibacillus</i> (2000-12,2000-16, 2000-17)、 <i>Pseudomonas resinovorans</i> (2000-5,2000-6,2000-11)、 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (2000-4,2000-10)、 <i>Stenotrophomonas</i> (2000-18)、 <i>Mesorhizobium</i> genosp(2000-3,2000-21)、 <i>Sphingobacterium multivorum</i> (2000-2,2000-14)、 <i>Sphingomonas</i> (2000-20,2000-25)

播的条件致病菌在高剂量抗生素长期暴露下产生了抗性,必定会加大其传播力度和治疗难度,而禽畜养殖过程中抗生素的长期大量使用则是人为造成其风险增加的重要隐患。

2.5 土霉素与小麦根际土壤酶活性的剂量效应关系

由于土壤酶与土壤的理化性质、环境条件等密切相关,是土壤生态系统变化的敏感指标。因此,本研究在关注抗生素暴露下小麦根际抗性细菌活性的同时,也对土壤酶活性进行了检测,结果见图4。

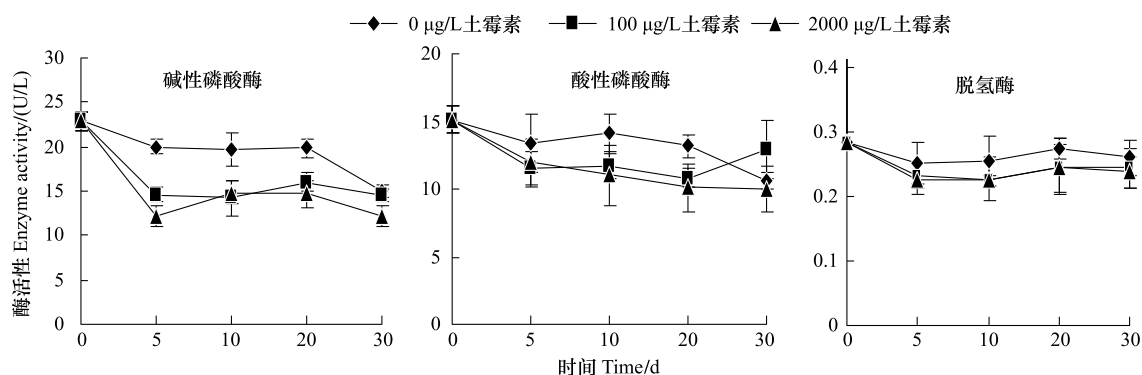


图4 不同剂量土霉素暴露下的小麦根际土壤酶活性

Fig. 4 Enzyme activities of wheat rhizosphere soil under exposure of various dosages of oxytetracycline

土壤磷酸酶是一类能催化土壤有机磷化物矿化的酶,其活性高低直接影响土壤中有有机磷的转化,是衡量土壤酶活性的重要指标。该酶又分为酸性磷酸酶和碱性磷酸酶,不同环境中的酶活性有一定差异^[26]。由图4可见,小麦根际土壤的碱性磷酸酶活性明显高于酸性磷酸酶,这与供试土壤环境 pH 值为 7.8,偏碱性有关。进一步对比两种磷酸酶活性的变化,可知碱性磷酸酶对土霉素的处理更加敏感。培养 5 d 时,暴露于 100 µg/L 土霉素下的碱性磷酸酶活性下降了 31.7%,暴露于 2000 µg/L 土霉素下的酶活性降低了 44.3%,酶活变化与土霉素浓度之间呈明显的正剂量效应关系。随后,抗生素对酶活的抑制作用稍有缓解;至 30 d 时,各处理的酶活性均普遍下降,100 µg/L 土霉素暴露的样品中酶活性接近对照组,而 2000 µg/L 土霉素处理的样品的酶活也降低明显。同样,土霉素暴露也引起了土壤酸性磷酸酶活性的下降,但降低水平与土霉素暴露剂量间的效应关系并不显著。

除磷酸酶外,脱氢酶也是土壤酶的主要类型之一,其活性可以看作土壤微生物活性和功能多样性的重要指标。本研究中小麦根际土壤脱氢酶活性在抗生素暴露下也有一定程度的下降,但剂量效应关系不明显。据报道,不同环境下的土壤脱氢酶活性有一定差异,且不同化学物质或污染物都能影响酶活性^[26]。上述研究结果也表明,土霉素暴露影响了土壤功能酶活性,说明抗生素抑制了根际某些有益微生物类群的活动。

3 结论

(1) 土霉素长期暴露下小麦根际抗性细菌数明显增加,且与暴露剂量呈正效应关系。

(2) 从土霉素暴露环境的小麦根际土壤中分离到 50 株抗性细菌,经鉴定聚集在 Actinobacteria、Bacilli、Alphaproteobacteria、Gammaproteobacteria 和 Sphingobacteria 类群。其中,随着土霉素暴露剂量的增加,小麦根际优势促生菌 *Bacillus* 属细菌的检出率逐步降低;而具有抗生素抗性的人类机会致病菌 *Pseudomonas*、*Sphingomonas* 和 *Stenotrophomonas* 属细菌检出率明显增加,提示可能会进一步增加其机会致病性。

(3) 土壤碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、脱氢酶活性在土霉素暴露环境中均有所下降,但该效应与土霉素的剂量关系不明确。

References:

- [1] Li Z J, Yao Z P, Zhang J, Liang Y C. A review on fate and ecological toxicity of veterinary antibiotics in soil environments. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(1): 15-20.
- [2] An Q C, Zhang X, Chen K L. Detection of tetracyclines residue in animal tissues by ELISA: preparation of anti-OTC antibodies. *Animal*

- Husbandry and Veterinary Medicine, 2004, 36(9): 8-10.
- [3] Zhang J Q, Dong Y H, An Q, Liu X C. Environmental fate of veterinary medicines in soil. *Soils*, 2005, 37(4): 353-361.
- [4] He J X. The status and countermeasure of antibiotic residue in raw milk. *Modern Livestock and Poultry Breeding Industry*, 2003, (8): 53-54.
- [5] Hamscher G, Sczesny S, Höper H, Nau H. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(7): 1509-1518.
- [6] Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T, Thurman E M, Zaugg S D, Barber L B, Buxton H T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999—2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(6): 1202-1211.
- [7] Yang W, Carlson K. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research*, 2003, 37(19): 4645-4656.
- [8] He W X, Lai H X, Wu Y J, Zhu M G. Study on soil enzyme activities effected by fertilizing cultivation. *Journal of Zhejiang University*, 2001, 27(3): 265-268.
- [9] Inbar E, Green S J, Hadar Y, Minz D. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *streptomycetes*. *Microbial Ecology*, 2005, 50(1): 73-81.
- [10] Gray E J, Smith D L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling process. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(3): 395-412.
- [11] Berg G, Eberl L, Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(11): 1673-1685.
- [12] Han Y J. Analysis of wheat industry development in china. *Agricultural Outlook*, 2006, 2(3): 3-7.
- [13] Yang Q X, Zhang J, Zhu K F, Zhang H. Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(7): 954-959.
- [14] Shen P, Fan X R, Li G W. *Microbiology Experiment*. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 1999.
- [15] Yang Q X, Wang Y S, Zhang J, Zhang H, Zhu K F, Li X M. Isolation and distribution of oxytetracycline-resistant entophytic bacteria in plant of wheat. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(8): 4580-4587.
- [16] Kim S R, Nonaka L, Suzuki S. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 237(1): 147-156.
- [17] Blanck H, Wängberg S A, Molander S. Pollution-induced community tolerance — a new ecotoxicological tool // Cairns J, Pratt J R, eds. *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1988: 219-230.
- [18] Schmitt H, Haapakangas H, van Beelen P. Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(10): 1882-1892.
- [19] Zhang M K, Wang L P, Zheng S A. Adsorption and transport characteristics of two exterior-source antibiotics in some agricultural soils. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(2): 761-766.
- [20] Yang Q X, Li X M, Jia Z J, Li H J. Ecological distribution of antibiotic-resistant heterotrophic bacteria in different sources of water. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2006, 7(12): 57-60.
- [21] Hermansson M, Jones G W, Kjelleberg S. Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation, and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(10): 2338-2342.
- [22] Jones C S, Osborne D J, Stanley J. Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6(4): 313-317.
- [23] Raaijmakers J M, Vlami M, de Souza J T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 81(1/4): 537-547.
- [24] Lafay B, Burdon J J. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3989-3997.
- [25] Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G. *Sphingobacterium canadense* sp. nov., an isolate from corn roots. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(7): 519-524.
- [26] Meng L J, Wu F Z. Advances on soil enzymes. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2004, 35(5): 622-626.

参考文献:

- [1] 李兆君, 姚志鹏, 张杰, 梁永超. 兽用抗生素在土壤环境中的行为及其生态毒理效应研究进展. *生态毒理学报*, 2008, 3(1): 15-20.
- [2] 安清聪, 张曦, 陈克麟. 动物组织中四环素类抗生素残留的 ELISA 检测研究——土霉素抗体的制备. *畜牧与兽医*, 2004, 36(9): 8-10.
- [3] 张劲强, 董元华, 安琼, 刘新程. 兽药抗生素在土壤环境中的行为. *土壤*, 2005, 37(4): 353-361.
- [4] 何家香. 原料乳中抗生素残留的现状与对策. *当代畜禽养殖业*, 2003, (8): 53-54.
- [8] 和文祥, 来航线, 武永军, 朱铭菡. 培肥对土壤酶活性影响的研究. *浙江大学学报*, 2001, 27(3): 265-268.
- [12] 韩一军. 中国小麦产业发展分析. *农业展望*, 2006, 2(3): 3-7.
- [14] 沈萍, 范秀容, 李广武. *微生物学实验* (第三版). 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [15] 杨清香, 王育水, 张晶, 张昊, 朱孔方, 李学梅. 小麦土霉素抗性内生细菌分离、鉴定及分布. *生态学报*, 2009, 29(8): 4580-4587.
- [19] 章明奎, 王丽平, 郑顺安. 两种外源抗生素在农业土壤中的吸附与迁移特性. *生态学报*, 2008, 28(2): 761-766.
- [20] 杨清香, 李学梅, 贾振杰, 李慧君. 抗生素抗性异养细菌在不同水体中的生态分布研究. *环境污染治理技术与设备*, 2006, 7(12): 57-60.
- [26] 孟立君, 吴凤芝. 土壤酶研究进展. *东北农业大学学报*, 2004, 35(5): 622-626.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol.32 ,No.2 January ,2012(Semimonthly)

CONTENTS

Dynamics of demersal fish species diversity and biomass of dominant species in autumn in the Beibu Gulf, northwestern South China Sea	WANG Xuehui, QIU Yongsong, DU Feiyan, et al (333)
Spatial variation in species richness of birds and mammals in mainland China	DING Jingjing, LIU Dingzhen, LI Chunwang, et al (343)
Comparative study on learning behavior and electroantennogram responses in two geographic races of <i>Cotesia glomerata</i>	WANG Guohong, LIU Yong, GE Feng, et al (351)
Biological characteristics and habitat requirements of <i>Parnassius imperator</i> (Lepidoptera: Parnassidae)	FANG Jianhui, LUO Youqing, NIU Ben, et al (361)
Annual variability in biological characteristics of <i>Illex argentinus</i> in the southwest Atlantic Ocean	FANG Zhou, LU Huajie, CHEN Xinjun, et al (371)
The impact of run-of stream dams on benthic macroinvertebrate assemblages in urban streams	HAN Minghua, YU Haiyan, ZHOU Bin, et al (380)
Effect of suspended sediment on the feeding physiology of <i>Pinctada martensii</i> in laboratory	LI Zhimin, SHEN Yuchun, YU Nantao, et al (386)
Potential nutrient limitation of phytoplankton growth in the Western and Central Pacific Ocean	XU Yanqing, CHEN Jianfang, GAO Shengquan, et al (394)
Ingestion of selected HAB-forming dinoflagellates	ZHANG Qingchun, YU Rencheng, SONG Jingjing, et al (402)
Formation of aggregation by <i>Phaeocystis globosa</i> (Prymnesiophyceae) in response to high grazing pressure	WANG Xiaodong, WANG Yan (414)
Growth and reproduction of the green macroalga <i>Ulva prolifera</i>	ZHANG Bixin, WANG Jianzhu, WANG Yifu, et al (421)
Screening of growth decline related genes from <i>Alexandrium catenella</i>	ZHONG Jie, SUI Zhenghong, WANG Chunyan, et al (431)
Analysis of inherent optical properties of Lake Taihu in spring and its influence on the change of remote sensing reflectance	LIU Zhonghua, LI Yunmei, LU Heng, et al (438)
Neural network modeling of the eutrophication mechanism in Lake Chenghai and corresponding scenario analysis	ZOU Rui, DONG Yunxian, ZHANG Zhenzhen, et al (448)
The compensatory growth of shrubby <i>Pinus thunbergii</i> response to the boring stress in sandy coast	ZHOU Zhen, LI Chuanrong, XU Jingwei, et al (457)
Selected body temperature and thermal tolerance of tadpoles of two frog species (<i>Fejervarya limnocharis</i> and <i>Microhyla ornata</i>) acclimated under different thermal conditions	SHI Linqiang, ZHAO Lihua, MA Xiaohao, et al (465)
Effects of landscape structure and key landscape factors on aphids-parasitoids-hyper parasitoids populations in wheat fields	ZHAO Zihua, WANG Ying, HE Dahan, et al (472)
Effects of cadmium on lipid peroxidation and ATPase activity of plasma membrane from Chinese kale (<i>Brassica alboglabra</i> Bailey) roots	ZHENG Aizhen (483)
Effects of ginger aqueous extract on soil enzyme activity, microbial community structure and soil nutrient content in the rhizosphere soil of ginger seedlings	HAN Chunmei, LI Chunlong, YE Shaoping, et al (489)
Manganese tolerance and accumulation in mycelia of <i>Cordyceps kyusyuensis</i>	LUO Yi, CHENG Xianhao, ZHANG Congcong, et al (499)
Influence of oxytetracycline exposure on antibiotic resistant bacteria and enzyme activities in wheat rhizosphere soil	ZHANG Hao, ZHANG Lilan, WANG Jia, et al (508)
Effects of elevated nitrogen deposition on soil organic carbon mineralization and soil enzyme activities in a Chinese fir plantation	SHEN Fangfang, YUAN Yinghong, FAN Houbao, et al (517)
Differences in clonal growth between female and male plants of <i>Rhus typhina</i> Linn. and their diurnal changes in photosynthesis and chlorophyll fluorescence	ZHANG Mingru, WEN Guosheng, ZHANG Jin, et al (528)
Soil water holding capacity under four typical ecosystems in Wuyunjie Nature Reserve of Hunan Province	PAN Chunxiang, LI Yuyuan, PENG Yi, et al (538)
The effect of different land use patterns on soil properties in alpine areas of eastern Qilian Mountains	ZHAO Jinmei, ZHANG Degang, LIU Changzhong, et al (548)
Responses of soil macro-fauna to land desertification in sandy grassland	LIU Rentao, ZHAO Halin (557)
Characteristics of cultivable microbial community number and structure at the southeast edge of Tengger Desert	ZHANG Wei, ZHANG Gaosen, LIU Guangxiu, et al (567)
Physiological and ecological responses of maize to different severities of desertification in the Southern Taramakan desert	LI Lei, LI Xiangyi, LIN Lisha, WANG Yingju, et al (578)
Characterization of caloric value in fifteen plant species in <i>Leymus chinensis</i> steppe in Xilin River Basin, Inner Mongolia	GAO Kai, XIE Zhongbing, XU Sutie, et al (588)
Spatial pattern responses of <i>Achnatherum splendens</i> to environmental stress in different density levels	ZHANG Mingjuan, LIU Maosong, XU Chi, et al (595)
Effects of environmental factors on species distribution and diversity in an <i>Abies fargesii</i> - <i>Betula utilis</i> mixed forest	REN Xuemin, YANG Gaihe, WANG Dexiang, et al (605)
Effects of alginate cerium complexes on ascorbate- glutathione cycle in spinach leaves under chlorpyrifos stress	LUAN Xia, CHEN Zhende, WANG Dongfeng, et al (614)
Analysis on spatiotemporal changes of urban thermal landscape pattern in the context of urbanisation: a case study of Xiamen City	HUANG Jucong, ZHAO Xiaofeng, TANG Lina, et al (622)
The analysis of the green vegetation cover change in western Sichuan based on GIS and Remote sensing	YANG Cunjian, ZHAO Zijian, REN Xiaolan, et al (632)
An inventory of BVOC emissions for a subtropical urban-rural complex: Greater Taizhou Area	CHANG Jie, REN Yuan, SHI Yan, et al (641)
Scientific Note	
Litter decomposition and nutrient dynamics of <i>Carex lasiocapa</i> under different water conditions	HOU Cuicui, SONG Changchun, LI Yingchen, et al (650)
Nest-box color preference and reproductive success of great tit	ZHANG Keqin, DENG Qiuxiang, Justin Liu, et al (659)

《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的自然科学高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,280 页,国内定价 70 元/册,全年定价 1680 元。

国内邮发代号:82-7 国外邮发代号:M670 标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 32 卷 第 2 期 (2012 年 1 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 32 No. 2 2012

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元