

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

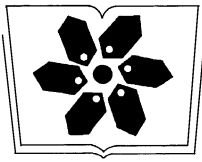
Acta Ecologica Sinica



第 32 卷 第 11 期 Vol.32 No.11 **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 11 期

2012 年 6 月 (半月刊)

目 次

黑龙江省大兴安岭林区火烧迹地森林更新及其影响因子·····	蔡文华, 杨健, 刘志华, 等 (3303)
基于 B-IBI 指数的温榆河生态健康评价·····	杨柳, 李泳慧, 王俊才, 等 (3313)
川西亚高山暗针叶林不同恢复阶段红桦、岷江冷杉土壤种子损耗特征·····	马姜明, 刘世荣, 史作民, 等 (3323)
老龄阔叶红松林下层木空间分布的生境关联分析·····	丁胜建, 张春雨, 夏富才, 等 (3334)
内蒙古高原荒漠区四种锦鸡儿属植物灌丛沙包形态和固沙能力比较·····	张媛媛, 马成仓, 韩磊, 等 (3343)
角果藜的生长动态及其生殖配置·····	全杜娟, 魏岩, 周晓青, 等 (3352)
基于 MODIS/NDVI 时间序列的森林灾害快速评估方法——以贵州省为例·····	侍昊, 王笑, 薛建辉, 等 (3359)
祁连山西水林区土壤阳离子交换量及盐基离子的剖面分布·····	姜林, 耿增超, 李珊珊, 等 (3368)
水分和温度对春玉米出苗速度和出苗率的影响·····	马树庆, 王琪, 吕厚荃, 等 (3378)
施氮对水稻土 N ₂ O 释放及反硝化功能基因 (<i>narG/nosZ</i>) 丰度的影响·····	郑燕, 侯海军, 秦红灵, 等 (3386)
中国西北潜在蒸散时空演变特征及其定量化成因·····	曹雯, 申双和, 段春峰 (3394)
基于植被降水利用效率和 NDVI 的黄河上游地区生态退化研究·····	杜加强, 舒俭民, 张林波 (3404)
异速生长法计算秋茄红树林生物量·····	金川, 王金旺, 郑坚, 等 (3414)
乌兰布和沙漠沙蒿与油蒿群落的物种组成与数量特征·····	马全林, 郑庆中, 贾举杰, 等 (3423)
不同光强下单叶蔓荆的光合蒸腾与离子累积的关系·····	张萍, 刘林德, 柏新富, 等 (3432)
浑善达克沙地沙地榆种子雨的扩散规律·····	谷伟, 岳永杰, 李钢铁, 等 (3440)
咸水灌溉对沙土土壤盐分和胡杨生理生长的影响·····	何新林, 陈书飞, 王振华, 等 (3449)
外源 NO 对 NaHCO ₃ 胁迫下黑麦草幼苗光合生理响应的调节·····	刘建新, 王金成, 王鑫, 等 (3460)
呼伦贝尔草地植物群落与土壤化学计量学特征沿经度梯度变化·····	丁小慧, 罗淑政, 刘金巍, 等 (3467)
海南稻田土壤硒与重金属的含量、分布及其安全性·····	耿建梅, 王文斌, 温翠萍, 等 (3477)
江苏省典型区农田土壤及小麦中重金属含量与评价·····	陈京都, 戴其根, 许学宏, 等 (3487)
应用稳定同位素研究广西东方洞食物网结构和营养级关系·····	黎道洪, 苏晓梅 (3497)
利用细胞计数手段和 DGGE 技术分析松花江干流部分地区的细菌种群多样性·····	屠腾, 李蕾, 毛冠男, 等 (3505)
中国主要入海河流域河口集水区划分与分类·····	黄金良, 李青生, 黄玲, 等 (3516)
基于 VGPM 模型和 MODIS 数据估算梅梁湾浮游植物初级生产力·····	殷燕, 张运林, 时志强, 等 (3528)
低温胁迫下虎纹蛙的生存力及免疫和抗氧化能力·····	王娜, 邵晨, 颜志刚, 等 (3538)
转 Bt 水稻土壤跳虫群落组成及其数量变化·····	祝向钰, 李志毅, 常亮, 等 (3546)
尼日利亚非洲蜂和安徽意大利蜜蜂及其杂交二代形态特征与微卫星 DNA 遗传多样性·····	余林生, 解文飞, 巫厚长, 等 (3555)
北京城市公园湿地休憩功能的利用及其社会人口学因素·····	李芬, 孙然好, 陈利顶 (3565)
基于协整理论的经济增长与生态环境变化关系分析——以重庆市渝东南地区为例·····	肖强, 胡聃, 肖洋, 等 (3577)
感潮河网区环境合作博弈模型及实证·····	刘红刚, 陈新庚, 彭晓春 (3586)
专论与综述	
国内外生态效率核算方法及其应用研究述评·····	尹科, 王如松, 周传斌, 等 (3595)
全球变化背景下的现代生态学——第六届现代生态学讲座纪要·····	温腾, 徐德琳, 徐驰, 等 (3606)
问题讨论	
流域环境要素空间尺度特征及其与水生态分区尺度的关系——以辽河流域为例·····	刘星才, 徐宗学, 张淑荣, 等 (3613)
研究简报	
不同光照强度对兴安落叶松几种主要防御蛋白活力的影响·····	鲁艺芳, 石蕾, 严善春 (3621)
木荷种源间光合作用参数分析·····	熊彩云, 曾伟, 肖复明, 等 (3628)
基于能值分析的深圳市三个小型农业生态系统研究·····	杨卓翔, 高阳, 赵志强, 等 (3635)

期刊基本参数: CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 342 * zh * P * ¥70.00 * 1510 * 37 * 2012-06



封面图说: 爬升樟木沟的暖湿气流——樟木沟是中国境内横切喜马拉雅山脉南坡的几条著名大沟之一,它位于我国西藏聂拉木县境内的希夏邦马峰东南侧,延绵 5400km 的 318 国道在此沟中到达其最西头。从聂拉木县城到樟木口岸短短的 30km 中,海拔从 4000m 急降至 2000m。在大气环流作用下,来自印度洋的暖湿气流沿樟木沟不断费力地往上爬升,给该沟谷留下了大量的降水。尤其是在雨季到来时,山间到处是流水及悬垂崖头的瀑布,翠峰直插云霄,森林茂密苍郁,溪流碧澄清澈,奇花异葩繁多,风景美如画卷,气势壮丽非凡。

彩图提供: 陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201105160635

屠腾, 李蕾, 毛冠男, 王莹莹. 利用细胞计数手段和 DGGE 技术分析松花江干流部分地区的细菌种群多样性. 生态学报, 2012, 32(11): 3505-3515.
Tu T, Li L, Mao G N, Wang Y Y. Analysis of bacterial diversity in the Songhua River based on nested PCR and DGGE. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(11): 3505-3515.

利用细胞计数手段和 DGGE 技术分析松花江 干流部分地区的细菌种群多样性

屠 腾, 李 蕾, 毛冠男, 王莹莹*

(南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要: 松花江是我国东北地区的重要河流之一, 为加强对水环境微生物状况的了解, 对松花江干流部分地区的微生物数量和多样性进行了分析。应用传统平板培养法和流式细胞技术测定水样中的细菌数; 直接提取样品中的总 DNA, 以巢式 PCR (Polymerase Chain Reaction) 扩增细菌 16S rDNA 片段, 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) 技术对扩增片段进行分离, 研究水样和底泥样品细菌的种群多样性。实验结果显示, pH 值为影响水环境中微生物总细胞数量的主要因素。水样中细菌群落多样性主要根据上下游分区, 分区点在哈尔滨段附近, 而底泥中细菌群落多样性的影响因素呈多样化, 没有显示出较为明确的分区特征。

关键词: 松花江; 流式细胞术; 巢式 PCR; DGGE; 细菌群落多样性

Analysis of bacterial diversity in the Songhua River based on nested PCR and DGGE

TU Teng, LI Lei, MAO Guannan, WANG Yingying*

Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: As the largest tributary of the Heilong River, the Songhua River flows about 1,434 kilometers from the Changbai Mountains through the Jilin and Heilongjiang provinces. It occupies a significant position in the ecological and commercial fields in Northeast China. As it suffers from complex contaminant conditions, comprehensive environmental improvement and management of the Songhua River is vital. Thus, a relatively accurate monitoring and investment system is essential to supply basic data for decision and policy making. In this study, we aim to analyze the bacterial concentration and diversity, along with their relationship to various environmental factors in the river, for the purpose of a brief evaluation towards the microbial condition in the Songhua River. Representative sampling points were chosen from upstream to downstream of the Songhua River. A total of fifteen water samples and ten sludge samples were collected. The bacterial concentration was assessed by both traditional heterotrophic plate counts (HPC) and a novel flow cytometric (FCM) technique. HPC used to be widely utilized as an approach to detect the cultivable bacterial communities; however, it has been under discussion due to its non-negligible drawbacks and the development of new alternative tools. Results show that the order of magnitude of cultivable cells counted by HPC is about 10^6 while the order of magnitude of total cells counted by flow cytometry is about 10^4 . It shows that traditional heterotrophic plant counts might easily neglect those cells that are uncultivable but possess physiological properties. Also, flow cytometry exhibits several advantages compared with HPC, for instance, more rapid

基金项目: 国家水专项 (2008ZX07526-002-01); 国家自然科学基金项目 (31000247)

收稿日期: 2011-05-16; 修订日期: 2012-03-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wangyy@nankai.edu.cn

rates and greater sensitivity. Regression analysis of environmental factors and microorganism concentrations was made based on four main factors: temperature, pH, dissolved oxygen, and conductivity. Results show that pH has the most significant effect towards the total cell count in each sample. The molecular technique using 16S rRNA profiles generated by PCR-DGGE was used in order to determine the variation in bacterial community structure of water and sludge samples from the Songhua River. Nested PCR and touch down PCR were utilized for the purpose of generating more DNA from samples, especially aquatic samples. Similarity analysis, cluster analysis and statistical analysis were performed according to the DGGE gels and the data output by Quantity One. The results showed that the bacterial diversity in water samples has an obvious discrimination between upper and lower zones, and the demarcation point is near the area of Harbin city. However, bacterial diversity in the sludge samples showed no significant differences along the river basin. The Shanno-Wiener Index, Uniformity Index and richness of water and sludge samples were calculated according to the DGGE profiles. The results showed that the bacterial diversity and richness decreases from downstream to upstream. The present study provides fundamental data for bacterial concentration and diversity, together with influencing environmental factors, which could be used to support the future discrimination between functional zones in the whole Songhua River Basin.

Key Words: Songhua River; FCM; nested-PCR; DGGE; Bacterial diversity

松花江是黑龙江水系在我国境内的最大支流,全长 1956 km,流域面积达 54.56 万 km²,为我国东北部地区最为重要的水上运输线之一。松花江水系发达,干流长,支流众多,流域面积广,污染情况较为复杂,工业污染和城市污染是其流域内污染的主要因素^[1]。其次,松花江流域的生态环境一直承受着城市经济发展的压力,自我恢复能力受到限制,造成土地沙化、水源涵养能力下降和水土流失严重;大量泥沙夹带有机质进入河流,引起松花江干流有机质浓度增高和细菌的大量繁殖^[2]。2005,受中国石油吉林石化公司爆炸事故影响,松花江受到苯系物(苯、苯胺、硝基苯、二甲苯等)的污染,水质发生恶化,并将持续相当长的一段时间。^[3]新老污染导致的环境复杂性和流域面积广阔带来的水质数据不足,成为松花江监测和治理的障碍。为了弥补水环境数据的缺失,本研究从松花江微生物数量、群落多样性角度出发,分析松花江的水质状况和发展趋势,旨在为其进行监测、分区、管理和治污提供一定程度的理论支持。

关于微生物的数量和群落结构的研究,传统方法一般是对细菌进行分离、培养和鉴定,但这种方法具有无法避免的缺陷。Amann 等人^[4]的研究发现,自然界中大部分的微生物无法通过培养鉴别——中营养湖泊中可培养细胞占细胞总数的 0.1% 至 1%,未受污染的河口中可培养细胞也只占 0.1% 至 3%,这意味着传统的培养方法推算出的水体微生物数量并不十分准确。本研究为了解决这一问题,采用了新型的流式细胞计数方法,并通过与传统的平板计数方法(Heterotrophic Plate Count, HPC)比对,综合分析松花江的微生物数量。流式细胞计数方法最早应用于水体微型生物的研究始于 20 世纪 60 年代末期,是水体生命科学研究热点——微型生物研究的重要工具。^[5]微生物群落结构分析采用的是基于核酸提取原理的分子生态学技术——聚丙烯酰胺凝胶电泳(DGGE)。这一技术基于细菌 16SrRNA 基因中可变区域碱基组成的差异,而对不同的细菌进行快速检测和鉴定,是当前微生物菌群研究的常用技术手段,在比较微生物群落的多样性以及监测种群动态等诸多方面得到广泛应用。^[6]

1 材料和方法

1.1 样品的采集

本研究采集了 15 个地点的水样和 10 个地点的底泥样品,总采样图见图 1。其中水样的采集和保存按照《地表水环境质量标准》(GB3838—2002)进行。样品储存于 50 mL 离心管中(4 °C 冰盒保存),运输回实验室后置于冷藏冰箱保存备用。

1.2 细胞平板培养分析

平板培养采用 LB 固体培养基,每升培养基中含酵母膏 5 g,胰蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,琼脂 15 g,加入高

纯水补足至 1 L。液态培养基配制好后在 121 ℃ 高温下灭菌 30 min, 冷却至 50 ℃ 左右, 在每个平板中倒入约 15 mL, 紫外吹干后待用。取环境水样各 3 份, 用浓度为 0.85% 的生理盐水稀释至 100 倍; 混匀后, 各取 100 μL 稀释后水样加入已凝固的平板中, 涂匀, 于 30 ℃ 恒温培养箱中倒置培养。72 h 后取出观察计数。

1.3 流式细胞技术分析

取 1 mL 待测水样过滤进一次性计数管中,加入 SYBR® Green 1 核酸染料 10 μ L (将 10000 $\times$ 的母液于 DMSO 中稀释 100 倍),避光染色至少 15 min,进入流式细胞仪计数。选择绿色荧光作为微生物检测触发信号,该荧光在 FL1 通道显示,波长为 (520 $\pm$ 20) nm,通过空白和对照试验,人为“设门”将目标细胞群和背景分离开,所有数据均通过流式细胞仪处理软件进行记录和分

为了进行微生物细胞总数的检测,在进行样品计数前先作标准计数。取直径 $6\text{ }\mu\text{m}$ 的纳米玻璃珠(1.0×10^8 个/mL)于质量分数为 0.85% 的生理盐水(已高压灭菌)中稀释 10000 倍,加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ SYBR® Green I 染色至少 15 min,进入流式细胞仪计数。根据纳米玻璃珠已知的数量,与流式细胞仪记录的数值比对,得到一固定参数。在进实际环境样品时,操作步骤同前,实际的细菌数目根据对照试验中已求固定参数和流式细胞仪的计数推算出。^[8]样品中微生物细胞数目的计算公式为:

$$\text{细胞数目 (个/mL)} = \text{获取细胞数} \times \text{Beads 总量} / (\text{Beads 获取数} \times \text{样本量})$$

1.4 样品基因组总 DNA 的提取

水样 DNA 采用 DNeasy Blood 和 Tissue Kit(QIAGEN,USA)进行提取。提取前将水样静置一段时间,使水体中的沙砾等悬浮颗粒沉淀下来,取上层清液 1.5 mL 按照试剂盒提供步骤进行 DNA 提取,DNA 提纯后重悬于 200 μ L TE 缓冲液。泥样 DNA 采用淤泥基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)进行提取,取样量为 (0.25 $\pm$ 0.005)g,DNA 提纯后重悬于 50 μ L TE 缓冲液。提取的 DNA 样品均置于-20℃保存备用。

1.5 巢式 PCR 扩增

(1)根据 Nico Boon 等人^[9]的实验结果,巢式 PCR 有利于从微生物较少、DNA 含量较低的样品中富集目的基因;本研究采用这一手段,从松花江水样直接提取的 DNA 样品中富集目标 DNA 片段。巢式 PCR 扩增引物为 16SrDNA V3 区的通用引物。第一步反应引物为 63F(5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC)和 1378r(5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG);第二步反应引物为 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG)和 518r(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG)。为后续 DGGE 准备,引物 338f 需在其 5'末端加上 GC 链,GC 链结构为 5'-CGCCCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG。扩增产物片段长 236bp。^[4]上述引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

(2) 巢式 PCR 反应体系, 第一步反应体系为 25 μL , 包括 5 μL 10 $\times$ PCR 缓冲液 (10 mmol/L, Mg^{2+} 终浓度为 1.5 mmol/L), 0.5 μL dNTP (10 mmol/L), 0.25 μL Taq 酶 (5 u/ μL), 各 0.5 μL PCR 前、后引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 17.25 μL ddH₂O 和 1 μL DNA 模板。第二步反应体系为 50 μL , 体系中各组分由第一步反应的组分加倍, 其中 DNA 模板由第一步 PCR 产物适当稀释而来。

(3) PCR 反应程序为降落 PCR(Touch Down PCR)。参考 Niannian Ji 等人的程序^[10],改良程序如下:预变性条件为 94℃ 5 min;前 10 个循环为: 94℃ 1 min, 65—55℃ 1 min, 72℃ 1 min;后 20 个循环为: 94℃ 1 min 55℃ 1 min, 72℃ 1 min;72℃ 延伸 7 min。

1.6 变性梯度凝胶电泳分析

使用美国 Bio-Rad 公司的 Dcode Universal Mutation Detection System 电泳系统进行变性梯度凝胶电泳。本

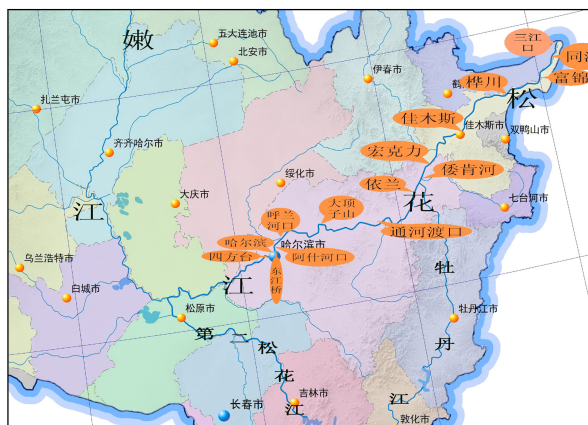


图 1 松花江干流部分地区采样图

Fig. 1 Sampling map of the main stream in Songhua River

研究使用的是浓度为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉丙烯酰胺 = 37.5:1),选用的变性剂梯度为 30%—60% [100% 的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺],用 1×TAE 将两种变性梯度的溶液配至 16 mL,灌胶量为 14.5 mL。待胶凝固后,将 20 μL 的 PCR 扩增产物和 5 μL 溴酚蓝染料混合均匀,上样量为 25 μL。

运行条件参考 Zhi-Yong Li 等人^[11]的做法,根据 PCR 产物略作调整,具体如下:将上样后的胶板置于 1×TAE [40 mmol/L Tris, 40 mmol/L 冰乙酸, 1.0 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)] 电泳缓冲液中,恒温 60 °C,恒压 140 V 跑 4 h。电泳完毕后,用 ddH₂O 漂洗凝胶,再用 0.5 μg/mL EMB 染料染色 30 min,在 Image Quant350 (GE health) 成相系统下进行拍照并分析。

1.7 数据分析

本课题选用的 DGGE 图谱分析软件为 BioRad 公司的凝胶定量软件 Quantity One。在图像处理过程中,首先对图谱进行优化处理,排除干扰的背景后,经过泳道识别、条带识别和配对 3 个步骤,对图谱中的条带进行定量分析。根据定量结果,进一步得到泳道间的对比分析结果,主要包括泳道对比图、系统进化树和相似性矩阵图。

利用 Quantity One 软件输出的 DGGE 图谱数据可计算各采样点的多样性指数、丰度及均匀度。其中,微生物群落的多样性指数^[12]指的是 Shanno-Wiener Index 指数,一般用于比较各样品的细菌多样性,用 H 表示,其计算公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^{i=s} (P_i \ln P_i) = - \sum_{i=1}^{i=s} \left(\frac{N_i}{N} \ln \frac{N_i}{N} \right)$$

式中, P_i 是某个样品中单一条带强度在该样的所有条带总强度所占的比率, s 是某个样品中所有条带数目总和, N 为泳道中所有条带的光密度和, N_i 为第 i 个条带的光密度值。丰度 (S) 为 DGGE 胶中每个泳道的条带数。均匀度 (E_H) 为:

$$E_H = \frac{H}{H_{\max}} = \frac{H}{\ln S} \quad [13]$$

2 结果

2.1 松花江水域总微生物数量分析

流式细胞技术是利用流式细胞仪测量液相中悬浮单细胞或微粒信号的一种现代分析技术,在国内被广泛应用于医学、发酵和环保领域^[14];但在细胞计数,尤其是水生态方面的应用并不是十分广泛。

本课题利用流式细胞仪对松花江的总微生物浓度进行了检测。以呼兰河口为例,图 2 显示了该地区的总微生物数量。

流式细胞仪检测结果显示,各地区水样总微生物数量的数量级在 10^6 左右,最高点出现在桦川段,其数值为 11.610×10^6 ;最低点出现在佳木斯段,其数值为 1.121×10^6 。各地数值的连续性并不是很理想,在佳木斯、通河渡口地区的水生微生物总细胞数均与前后地区的总细胞数相差较大。

2.2 平板培养细胞数与总细胞数的比较

表 1 所示为松花江干流部分自下游到上游的 15 个采样点所得数据。其中,总细胞数由流式细胞仪测得,可培养细菌数为平板培养方法测得,两种方法均设置 3 次平行试验并取平均值。15 支水样中,总细胞数的数

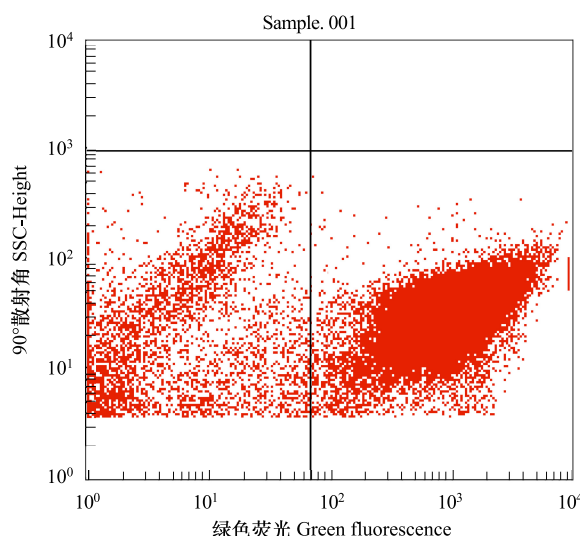


图 2 呼兰河口水样总微生物计数 FCM 示意图
Fig. 2 FCM dot-plot for total bacterial concentration in water sample from Hulan River estuary

图中横坐标 FITC (Fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素) 表明使用的染料,纵坐标 SSC (Side light scatter, 侧向角散射) 产生的散射光信号提供有关细胞颗粒性质的信息;右下部分的密集点群为经 SYBR® Green I 染色显示出的微生物细胞颗粒

量级在 10^6 左右,而平板培养细胞数仅为 10^4 左右,在总细胞数中所占比例为 0.05% 至 5%,平均比例不超过 2%。这一结果表明,传统的平板培养测数方法容易低估水环境中实际的微生物数量。在连续性方面,流式计数法给出的总细胞数在某几点上不是很连续,在总体看来还是有一定的变化规律;而平板培养细胞数则较为缺乏规律性,其各点前后相差数目均比较明显,不具有连续性。

表 1 松花江干流部分地区水样平板培养微生物计数

Table 1 HPC and total bacterial concentration in different water samples from main stream of the Songhua River

取水地点 Water sampling spots	总细胞数($\times 10^6$) Total cells	可培养细胞数($\times 10^4$) Cultivable cells	可培养细胞所占百分比 Percentage(Cultivable cells/Total cells)
同江	4.640	18.600	4.02%
三江口	4.580	0.667	0.15%
富锦	7.650	10.800	1.41%
桦川	11.600	0.587	0.05%
佳木斯	1.120	6.330	5.65%
哈尔滨	6.360	4.870	0.77%
四方台	6.630	15.900	2.40%
东江桥	6.590	4.570	0.69%
阿什河口	6.200	5.100	0.82%
呼兰河口	3.990	11.800	2.97%
大顶子山	4.760	4.470	0.94%
倭肯河	2.300	10.600	4.61%
宏克力	4.400	0.713	0.16%
通河渡口	9.300	4.000	0.43%
依兰	3.080	11.400	3.70%

Allen^[15]提出,平板计数法,不管其具体方法如何,都无法完全表达出水样中真正的微生物含量。在 Kell^[16]等人看来,平板计数方法可能会忽略水环境中具有生理特性表达但是无法培养成为肉眼可见的群落的细胞,因此,这一方法所得的细菌数量将大大少于实际的有效值,降低了平板培养方法的有效性和可信度。

相对而言,流式细胞仪对于水样的检测时间仅需要几分钟;能够有效地给出样品中总的细胞数量;并且,通过不同的染色剂,还能选择性的采集专门细胞的信息。^[17]在国内的水生态微生物研究中,流式细胞计数还处在起步阶段,但可以预测,这一技术在该领域还将具有极大的发展潜力。

2.3 水温、pH 值、溶解氧和电导率对水样微生物浓度的影响

微生物的种类和数量受到外界环境因素的影响,处于一种动态变化和平衡的过程,环境因素的研究在探讨微生物数量分布方面具有重要的作用。本课题在各采样点收集了水温、pH 值、溶解氧和前十个采样点的电导率这四项基本环境影响因子的数据。由于各地区平板培养细胞数量没有明显的规律,本课题仅对采样地区的微生物总细胞数进行了分析。结合在采样点收集的各项环境信息,利用 SPSS 软件对各环境因子和该地的微生物浓度进行回归分析,计算各影响因子的相关系数,结果见表 2,图 3。

表 2 环境影响因子与微生物浓度的相关性分析

Table 2 The correlation analysis between main environmental factors and bacterial concentration

	水温 Temperature	电导率 Conductivity	酸碱度 pH	溶解氧 Dissolved oxygen
相关系数 Correlation coefficient	0.365	-0.05	-0.423	-0.377
P	0.221	0.859	0.116	0.167

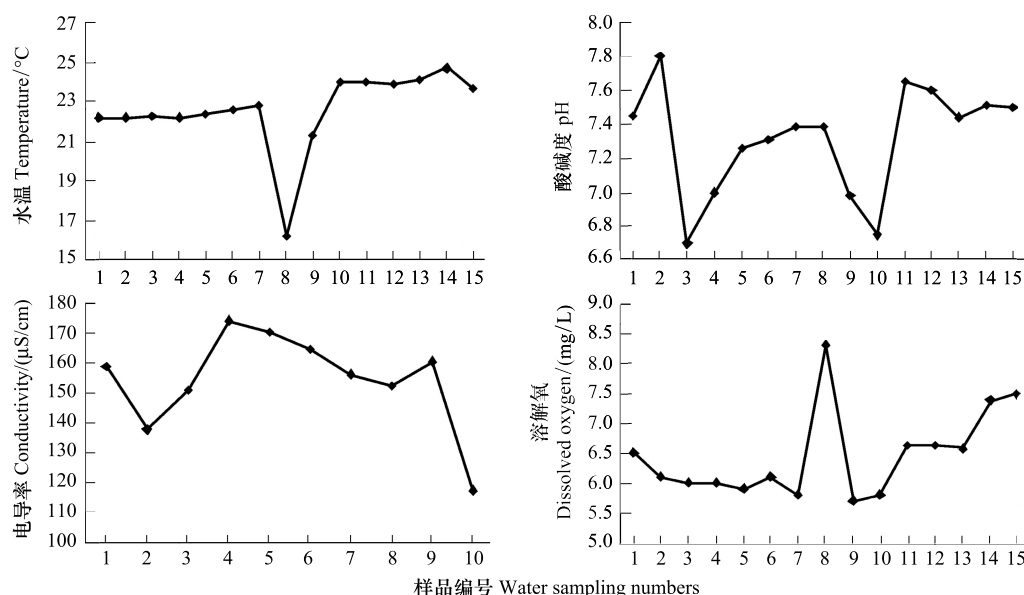


图3 松花江水样各点环境影响因子的变化趋势

Fig. 3 Changes of environmental factors in the water samples from Songhua River

根据分析结果,在4项检测的环境因子中,对微生物数量分布影响相对最大的为pH值。电导率和pH值对微生物数量都属于负相关的作用,而水温和溶解氧属于正相关作用。在采样点东江桥段,水温和溶解氧均出现较大幅度的变化,其变化原因目前还无法分析。

2.4 水样微生物群落结构的 DGGE 图谱分析

根据1.6变性梯度凝胶电泳分析中所述实验条件进行DGGE电泳,电泳图谱如图4。水样共有15个,其中左起至右端的加样顺序为下游至上游的微生物DNA扩增片段。左起至右端泳道对应的采样点为:同江、三江口、富锦、桦川、佳木斯、哈尔滨、四方台、东江桥、阿什河口、呼兰河口、大顶子山、倭肯河、宏克力、通河渡口、依兰。

应用DGGE技术分离PCR扩增产物,可以看到,泳道上分离出若干条带,并且各泳道的条带数、强度和迁移率均存在一定程度的差异,充分显示了水环境中微生物的多样性。将1号水样同江作为标准,根据戴斯系数Cs(Dice coefficient)计算出各样品的相似性矩阵图,戴斯系数的范围是从0(没有共同带)到1(所有的条带相同)。利用相似性矩阵数据,通过UPGMA算法可实现聚类分析,生成系统树聚类分析(UPGMA)(图5)。

图5可见,15个水样微生物群落大体上分成3个族群。其中,6号水样(哈尔滨)与其他的水样微生物差异均比较明显;在采水样时,该段水质也最清,DNA提取量较其他水样都少,这可能与采水点的周边环境有关系。余下的水样微生物群落在系统树上明显分成两大族群。根据实际的地理位置分析,应为:下游三江口至桦川为一大族群,中下游佳木斯至中上游阿什河口为一大族群,上游的东江桥和四方台两处族群与邻近的采样点族群相似度不高,有可能与其上游自成一族群。各族群内又分化为更小的相似性族群,而相邻两地水样中微生物群落的相似性一般较高。总体上看,水样中的微生物群落结构出现了较为明显的分区特征。

水样微生物的多样性指数、均匀度和丰度见表3。

由表3可见,15个水样中的多样性指数处于2到3之间,均匀度较为平均,而丰度变化不一。总体来看,从下游至上游,水样微生物的多样性在逐渐递减。

2.5 底泥微生物群落结构的 DGGE 图谱分析

根据1.6DGGE中所述实验条件和方法进行DGGE电泳,底泥电泳图谱如图6,其中左起至右端的加样顺序为同江、三江口、富锦、桦川、佳木斯、四方台、大顶子山、倭肯河、通河渡口、依兰的微生物DNA扩增片段。



图4 水样中菌群16SrDNA的DGGE指纹图谱

Fig. 4 DGGE fingerprint and its pattern of the 16S rDNA of the bacteria from water samples

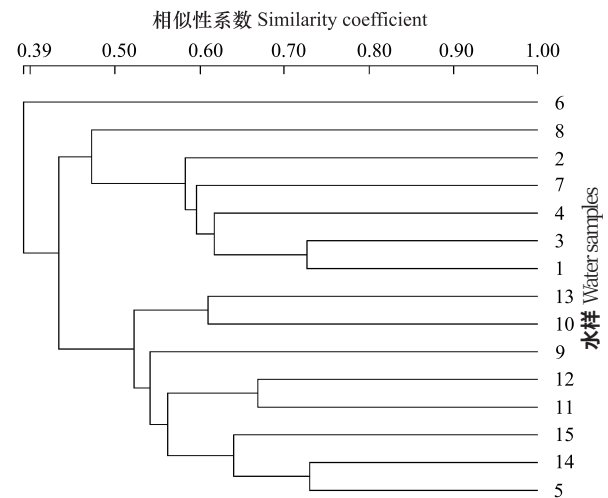


图5 水样微生物的DGGE (UPGMA) 分析

Fig. 5 DGGE Cluster analysis (UPGMA) of amplified DNA from water samples

表3 水样微生物的多样性指数、均匀度和丰度

Table 3 Shanno-Wiener Index, Uniformity Index and Richness of aquatic bacteria

取水地点 Water sampling spots	多样性指数 Shanno-Wiener Index	均匀度 Uniformity Index	丰度 Richness	取水地点 Water sampling spots	多样性指数 Shanno-Wiener Index	均匀度 Uniformity Index	丰度 Richness
同江	3.05	0.97	23	阿什河口	2.81	0.95	19
三江口	3.09	0.97	24	呼兰河口	2.80	0.93	20
富锦	3.18	0.98	26	大顶子山	2.78	0.94	19
桦川	3.22	0.98	27	倭肯河	2.60	0.93	16
佳木斯	3.10	0.97	24	宏克力	2.52	0.95	14
哈尔滨	2.68	0.94	17	通河渡口	2.44	0.90	15
四方台	3.02	0.98	22	依兰	2.67	0.94	17
东江桥	2.83	0.96	19				

根据 DGGE 图谱分析,松花江干流部分的底泥样品中微生物含量均十分丰富,并且不同的采样地点之间具有一定的差异。泳道比较图将 1 号泥样(同江,下游第一处采样点)作为标准,得出其他各点的相似性分析图。实现聚类分析,生成系统树(UPGMA)(图 7)。

底泥中微生物群落的相似度比水样高。其中,相似度最高的为 4 号采样点桦川和 5 号采样点佳木斯,两者为相邻采样点。但是,底泥的群落分布并没有很明显的地域分区,部分不相邻的采样点反而具有较高的群落相似度。据分析,可能的原因有以下两种:首先是底泥作为沉积物,包含的无机物和有机物含量丰富,群落结构复杂,影响因素众多,并非只受到某种单一因子或某些因子的影响;其次,底泥中微生物的变化不如水样受到外界环境因素的影响大,相邻两采样点之间并没有严格的分界线,连续性好,微生物可以四处迁徙,因此分区现象不明显。因此,底泥未能同水样一样,出现较为明显的分区现象。底泥微生物的多样性指数、均匀度和丰度的计算由 1.7 中的公式可得,其数值如表 4 所示。

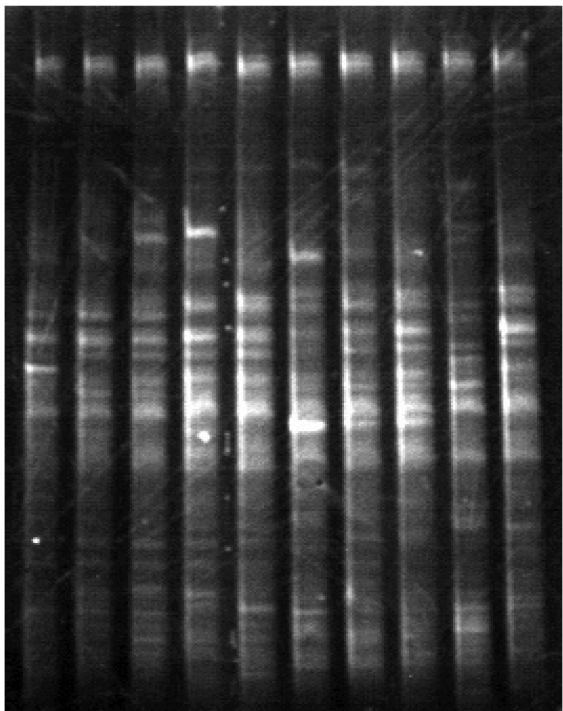


图6 底泥中菌群16SrDNA 的 DGGE 指纹图谱

Fig. 6 DGGE fingerprint and its pattern of the 16S rDNA of the bacteria from sludge samples

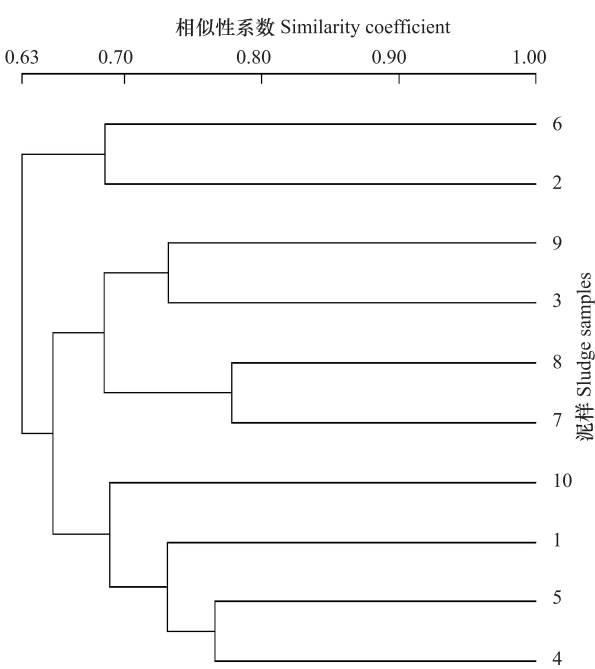


图7 泥样微生物的 DGGE (UPGMA) 分析

Fig. 7 DGGE Cluster analysis (UPGMA) of amplified DNA from sludge samples

表4 底泥微生物的多样性指数、均匀度和丰度

Table 4 Shanno-Wiener Index, Uniformity Index and Richness of sludge bacterial							
取水地点 Water sampling spots	多样性指数 Shanno-Wiener Index	均匀度 Uniformity Index	丰度 Richness	取水地点 Water sampling spots	多样性指数 Shanno-Wiener Index	均匀度 Uniformity Index	丰度 Richness
同江	3.24	0.97	28	四方台	3.06	0.97	23
三江口	3.14	0.97	25	大顶子山	3.04	0.98	22
富锦	3.06	0.96	24	倭肯河	3.01	0.96	23
桦川	3.12	0.97	25	通河渡口	3.05	0.97	23
佳木斯	3.13	0.97	25	依兰	3.00	0.97	22

由表4可见,从松花江下游至上游,微生物群落的多样性和丰度在逐渐下降,微生物群落由复杂变为简单,但是均匀度基本一致,细菌分布较为均匀。这一变化趋势与水样的微生物群落变化趋势一致。

3 讨论

在以往关于松花江流域的研究工作中,大部分是探讨某一区域的微生物数量根据环境条件的变化情况,或者某一地段的污染监测状况。徐海超^[18]等人对松花江吉林段的水体中可培养菌落数进行了研究分析,结合季节和环境因子分析微生物数量的变化规律;程英等人^[19]对松花江哈尔滨江段水生生物进行了调查和统计,给出综合的生物学评价;战培荣、卢晏生等人^[20]通过对松花江哈尔滨段冰封期制糖废水污染区微生物组成的调查、数学模式计算、污水优势群落生物体系和有机污染综合评价得出松花江污染区段的水质状况。也有一部分工作侧重于松花江特定污染物的降解,如重金属离子、有机物等。Jia-Ren Liu^[21]对松花江水体中有机物的遗传毒性进行了研究;Shu-hai GUO^[22]调查了松花江沉积物中 Fe、Mn、Cu、Pb 和 Cd 的含量,并讨论了重金属离子的分布规律。在松花江苯污染事件爆发后,关于松花江中苯系物的迁移转化规律和治理修复条件得到了广泛的关注和研究。Zonglai LI^[23]探讨了松花江中硝基苯的生物可降解性,张振宇^[24]和刘百仓^[25]研

究了利用活性炭去除松花江原水中硝基苯的技术参数和效果。可见,对于松花江生化状况的研究虽然并不少见,但系统性、全面性、有序性地分析松花江干支流地区水域及底泥中微生物的群落多样性及其结构变化的工作并未有人完成。本实验作为该方面的一个初探,在一定程度上弥补了这一空白,并有望在未来对松花江进行多点重复采样,进一步完善松花江微生物总细菌数量和微生物群落多样性的数据研究。

流式细胞技术作为水生态领域新引进的一项技术,在这一领域的应用主要体现在以下几个方面:(1) 水环境中细菌的计数及生物量统计;(2) 细菌的生理生化分析,如选择双荧光染料(SYBR Green 结合 PI)检测细菌活性;(3) 结合其他技术手段对水环境生态状况进行更深层面的监测分析,如结合 ATP 测定或变性梯度凝胶电泳(DGGE)的方法等。Huang Bang-qin 等人^[26]通过流式细胞仪和其他技术,对中国南海北部的微型生物数量、群落结构等进行了生态分析。Karina^[27]利用流式细胞仪调查了百慕大大西洋不同季节的浮游植物和细菌的生物量,得出一年中不同季节海中浮游植物和细菌的水平变化和垂直变化规律;Kyoko Hibi^[28]等人发现,结合免疫手段和流式细胞技术可以快速检测出土壤和水体中某种特定的致病细菌。综合流式细胞仪计数和传统的平板培养计数(HPC)这两种计数方法比较发现,流式细胞仪检测出的水样之间连续性较高,其总细胞数量要高于平板计数所得数量 1—2 个数量级;正如 Frederik Hammes 等人的研究表明^[29],可培养细胞只占总细胞数的 1% 左右。再者,由于许多能够在水环境中表现出生理活性的细胞无法进行培养,导致计数结果偏低,会给研究造成不可消除的误差。在这一方面,流式细胞技术表现出了良好的应用潜力。

黄江丽^[30]在对松花江流域吉林段的水质进行监测分析后得出,该区段水质呈有机污染特征,主要污染物包括高锰酸盐、氨氮等。这一污染特征也基本体现在松花江整体流域的范围,并对微生物数量和分布造成一定程度的影响。此外,本研究也就河流水温、pH 值、溶解氧和电导率这四项基本环境影响因子进行了监测分析。结果表明,四者均以不同的程度影响水体中微生物的数量,其中,以 pH 值与微生物数量的相关性最高。

变形梯度凝胶电泳技术(DGGE)是由 Fischer 和 Lerman^[31]于 1979 年最先提出的用于检测 DNA 突变的一种分析技术,是一种可以直接用于检测复杂微生物群体的基因多样性的方法。Dong Li^[32]利用 DGGE 技术探讨了硝基苯污染事件后松花江沉积物的微生物群落多样性变化,并对其中的重要菌落进行了分析;Mauro Celussi^[33]结合分子生物学技术和 DGGE 手段分析了里雅斯特海湾中细菌浮游生物随时空分布的差异。由于水样中直接提取的微生物 DNA 含量较少,基于 Hafez^[34]等人的研究表明,巢式 PCR 能比普通 PCR 扩增出更多的 DNA 产物,本课题选择了巢式 PCR 反应手段和 Touchdown 反应程序。巢式 PCR 曾受到部分学者的质疑,Suzuki^[35]认为,这种选择性的扩增可能会在重复的扩增步骤中引起较大的偏差。但 Heuer^[36]提出,这种说法对偏差的估计过大;Zhen-Yu Fan 等人^[37]也认为,巢式 PCR 并没有特别的偏差,仍可适用于检测微生物多样性的实验。专门的 Bio-Rad 分析软件 Quantity One 被用于 DGGE 图谱各泳道条带的分析。结果表明,底泥的相似性较高,连贯性较好,但是没有明显的聚类现象,分区不明显;而水样的相似性虽略低于底泥,上下游却有较为明显的分区效果,以 8 号水样(东江桥)和 9 号水样(阿什河口)为界,出现了各有差异的群落多样性和聚类特征。从多样性指数、丰度和均匀度的数据来看,水样和底泥的均匀度都比较相近,变化不大;但多样性指数和均匀度均呈现出从下游至上游逐渐降低的趋势。水样的多样性指数和丰度在整体上要略低于底泥。

松花江作为黑龙江在我国境内的最大支流,水量充沛,支流众多,微生物群落丰富。本研究将松花江水样的微生物多样性与其他水体进行了比对,发现,阳澄湖^[38]湖区微生物多样性在 2.4—2.8 之间,而巢湖^[39]的微生物多样性为 2.56—3.10。可见,松花江的微生物多样性比较符合一般特征,且相较而言呈现出稍高的趋势。在国外的水生态研究中,Schauer 等人^[40]利用 PCR-DGGE 手段评价沿 Catalan 海岸(NW Mediterranean)浮游细菌的组成。结果显示,这一地区的丰度为 17—35,多样性指数在 2.5 和 3.0 之间,属于微生物群落较丰富的情况。Casamayor 等人^[41]结合显微镜和分子生物学手段,对 Ciso 和 Vilar 湖中的微生物群落进行了时空分析,其中丰度仅为 8—17 左右。可以推测,松花江水体中微生物群落的多样性和丰度高于内陆湖,略低于外海,在整体上属于中上水平。

在微生物生态研究领域,不同的技术手段和方法正被综合起来运用,如 Jochem 等将荧光原位杂交技术和

流式细胞仪技术相结合,从而准确鉴定海洋中细菌的种类^[42]; Laetitia Bernard^[43]利用 FCM 的分选功能和 DGGE 方法达到分析水生态系统中可培养和具有生物效应的细菌多样性的实验目的。随着流式细胞仪等新兴技术的发展,综合实验手段将会迅速被带动起来,并大大扩展分子生物手段和细胞手段在微生物方面的应用领域。

致谢:感谢南开大学环境科学与工程学院周启星老师、于宏兵老师以及刘硕、刘尧等同学的支持与帮助,感谢华涛老师提供化学数据。

References:

- [1] Li P. Analyzing the problem of water environment and countermeasure of pollution prevention. *Environmental Science and Management*, 2005, 30(3): 5-8.
- [2] Zhai P Y. Analysis and prediction of aquatic environment in Songhua Basin. *North Environment*, 2001, (4): 26-28.
- [3] Tan X B, Ma L X, Sun H B. Pollution and control measurements in Songhua River. *Agriculture Environment and Development*, 2007, 24(3): 76-79.
- [4] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143-169.
- [5] Guo P Y, Shen H T, Zhang L H. Application of flow cytometry in aquatic microbiota research. *Acta Biophysica Sinica*, 2002, 18(3): 359-364.
- [6] Zhao G, Wang H Y. Soil microorganism bio-diversity molecule ecology research approach. *Forest By-Product and Speciality in China*, 2006, (1): 54-56.
- [7] Hammes F, Berney M, Wang Y Y, Vital M, Köster O, Egli T. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*, 2008, 42(1/2): 269-277.
- [8] Wang X D, Zhai Z H, Zhao S, Dai Y H, Wang J S, Zhao S Y, Li Y H. The bacterial diversity in different seasons of Miyun Reservoir, *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(7): 3919-3927.
- [9] Boon N, de Windt W, Verstraete W, Top E M. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39(2): 101-112.
- [10] Ji N N, Peng B, Wang G Z, Wang S Y, Peng X X. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 57(3): 409-413.
- [11] Li Z Y, He L M, Wu J, Jiang Q. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 329(1): 75-85.
- [12] Guan X Y, Zhou Z C, Chen Z, Jiang B, Wang X Y, Dong Y, Yang A F, Deng H, Xu X H. Bacterial diversity analysis on the water of sea cucumber (*Apostichopus Japonicus*) culture pond under high-temperature season based on PCR-DGGE fingerprint technology. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2010, (1): 82-88.
- [13] Wang X D, Zhai Z H, Zhao S, Li R Q, Ma W L, Li Y H. Effect of free surface flow wetland and subsurface flow wetland on bacterial diversity in Beijing Cuihu Wetland Park. *Environmental Science*, 2009, 30(1): 280-288.
- [14] Li J, Li C B, Dun W T, Wang Z, Fang Q. Application progress of flow cytometry (FCM) in the biological research. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(6): 107-111.
- [15] Allen M J, Edberg S C, Reasoner D J. Heterotrophic plate count bacteria-what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 92(3): 265-274.
- [16] Kell D B, Kaprelyants A S, Weichert D H, Harwood C R, Barer M R. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(2): 169-187.
- [17] Wang Y Y, Hammes F, de Roy K, Verstraete W, Boon N. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(8): 416-424.
- [18] Xu H C, Chen L. Microbial variation in Jilin part of Songhua River. *Heilongjiang Science and Technology*, 2008, (22): 171-171.
- [19] Cheng Y, Song Y. Survey and evaluation of aquatic life in Songhua River Harbin section. *Heilongjiang Environmental Journal*, 2010, 34(2): 34-37.
- [20] Zhan P R, Lu Y S. Preliminary report on microbial and water quality in the sugar manufactory polluted zone in Harbin part of Songhua River during ice period. *Environmental Science*, 1989, 10(4): 27-30.
- [21] Liu J R, Pang Y X, Tang X L, Dong H W, Chen B Q, Sun C H. Genotoxic activity of organic contamination of the Songhua River in the north-eastern region of the People's Republic of China. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2007, 634(1/2): 81-92.
- [22] Guo S H, Wang X L, Li Y, Chen J J, Yang J C. Investigation on Fe, Mn, Zn, Cu, Pb and Cd fractions in the natural surface coating samples and surficial sediments in the Songhua River, China. *Journal of Environmental Sciences*, 2006, 18(6): 1193-1198.
- [23] Li Z L, Yang M, Li D, Qi R, Liu H J, Sun J F, Qu J H. Nitrobenzene biodegradation ability of microbial communities in water and sediments along the Songhua River after a nitrobenzene pollution event. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(7): 778-786.
- [24] Zhang Z Y, Cui F Y, Huang P F, Zhao Z W, Lü C M, Han X D. Experimental investigation of PAC against source of Songhua river polluted by nitrobenzene. *Journal of Harbin University of Commerce: Natural Sciences Edition*, 2008, 24(6): 672-677.
- [25] Liu B C, Han B J, Ma J, Liu G F, Fang L Y, Zhang L, Li X C, Wang Q, Wang S J, Yang J J, Yu D M, Wang Z H. Removal of organic pollutants from raw water of Songhua river by powdered activated carbon. *China Water and Wastewater*, 2008, 24(21): 38-41.
- [26] Huang B Q, Lin X J, Liu Y, Dai M H, Hong H S, William K K L. Ecological study of picoplankton in northern South China Sea. *Chinese Journal*

- of Oceanology and Limnology, 2002, 20: 22-32.
- [27] Gin K Y, Chisholm S W, Olson R J. Seasonal and depth variation in microbial size spectra at the Bermuda Atlantic time series station. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 1999, 46(7): 1221-1245.
- [28] Hibi K, Mitsubayashi K, Fukuda H, Ushio H, Hayashi T, Ren H F, Endo H. Rapid direct determination using combined separation by prepared immunomagnetic and flow cytometry of *Flavobacterium psychrophilum*. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(9/10): 1916-1919.
- [29] Hammes F, Berney M, Vital M, Egli T. A Protocol for the Determination of Total Cell Concentration of Natural Microbial Communities in Drinking Water with FCM, 2007.
- [30] Huang J L, Zheng Q Z. Change law of water quality and monitoring for micro-polluted water in Jilin basin section of Songhua River. Journal of Jilin Institute of Chemical Technology, 2009, 26(3): 26-28.
- [31] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 127-141.
- [32] Li D, Yang M, Li Z L, Qi R, He J Z, Liu H J. Change of bacterial communities in sediments along Songhua River in Northeastern China after a nitrobenzene pollution event. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65(3): 494-503.
- [33] Celussi M, Cataletto B. Annual dynamics of bacterioplankton assemblages in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). Gene, 2007, 406(1/2): 113-123.
- [34] Hafez H M, Hauck R, Lüscho D, McDougald L. Comparison of the specificity and sensitivity of PCR, nested PCR, and real-time PCR for the diagnosis of histomoniasis. Avian Diseases, 2005, 49(3): 366-370.
- [35] Suzuki M T, Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 625-630.
- [36] Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington E M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3233-3241.
- [37] Fan Z Y, Li X R, Mao D P, Zhu G F, Wang S Y, Quan Z X. Could nested PCR be applicable for the study of microbial diversity? World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(8): 1447-1452.
- [38] Ling Y, Wang Q S, Gu J J, Wu H X, Xue J Z. Population dynamics and diversity of bacteria in Yangcheng lake and its enclosure culture area. Hubei Agricultural Sciences, 2010, 49(8): 1942-1945.
- [39] Bao S M. Horizontal and Seasonal Dynamics of the Bacterioplankton Community Composition in the Large Shallow Chaohu Lake, China. [D] Hefei: Anhui Agricultural University, 2008.
- [40] Schauer M, Massana R, Pedrós-Alió. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 33(1): 51-59.
- [41] Casamayor E O, Schäfer H, Bañras L, Pedrós-Alió C, Muyzer G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 499-508.
- [42] Jochem F J. Morphology and DNA content of bacterioplankton in the northern Gulf of Mexico: analysis by epifluorescence microscopy and flow cytometry. Aquatic Microbial Ecology, 2001, 25(2): 179-194.
- [43] Bernard L, Courties C, Duperray C, Schäfer H, Muyzer G, Lebaron P. A new approach to determine the genetic diversity of viable and active bacteria in aquatic ecosystems. Cytometry, 2001, 43(4): 314-321.

参考文献:

- [1] 李平. 松花江水环境问题剖析与污染防治对策研究. 环境科学与管理, 2005, 30(3): 5-8.
- [2] 翟平阳. 松花江流域水环境形势分析及预测. 北方环境, 2001, (4): 26-28.
- [3] 覃雪波, 马立新, 孙海彬. 松花江水污染及其防治对策. 农业环境与发展, 2007, 24(3): 76-79.
- [5] 郭沛涌, 沈焕庭, 张利华. 流式细胞术在水体微型生物研究中的应用. 生物物理学报, 2002, 18(3): 359-364.
- [6] 赵光, 王宏燕. 土壤微生物多样性的分子生态学研究方法. 中国林副特产, 2006, (1): 54-56.
- [8] 王晓丹, 翟振华, 赵爽, 戴育华, 王景仕, 赵守彦, 李艳红. 密云水库不同季节细菌群落多样性. 生态学报, 2009, 29(7): 3919-3927.
- [12] 关晓燕, 周遵春, 陈仲, 姜北, 汪笑宇, 董颖, 杨爱馥, 邓欢, 徐晓红. 应用 PCR-DGGE 指纹技术分析高温季节仿刺参养殖水环境中菌群多样性. 海洋湖沼通报, 2010, (1): 82-88.
- [13] 王晓丹, 翟振华, 赵爽, 李荣旗, 马文林, 李艳红. 北京翠湖表流和潜流湿地对细菌多样性的影响. 环境科学, 2009, 30(1): 280-288.
- [14] 李靖, 李成斌, 顿文涛, 王政, 方庆. 流式细胞术 (FCM) 在生物学研究中的应用. 中国农学通报, 2008, 24(6): 107-111.
- [18] 徐海超, 陈亮. 松花江吉林段微生物的变化规律. 黑龙江科技信息, 2008, (22): 171-171.
- [19] 程英, 宋扬. 松花江哈尔滨江段水生生物调查与评价. 黑龙江环境通报, 2010, 34(2): 34-37.
- [20] 战培荣, 卢晏生. 松花江哈尔滨段冰封期制糖废水污染区微生物调查及水质评价初报. 环境科学, 1989, 10(4): 27-30.
- [24] 张振宇, 崔福义, 黄鹏飞, 赵志伟, 吕春梅, 韩雪东. 松花江水源粉末活性炭去除硝基苯的试验研究. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2008, 24(6): 672-677.
- [25] 刘百仓, 韩帮军, 马军, 刘桂芳, 方晶云, 张静, 李旭春, 王群, 王胜军, 杨晶晶, 于德森, 王争辉. 粉末活性炭吸附去除松花江原水中有机物的研究. 中国给水排水, 2008, 24(21): 38-41.
- [30] 黄江丽, 郑庆子. 松花江流域吉林江段微污染水监测及水质变化规律. 吉林化工学院学报, 2009, 26(3): 26-28.
- [38] 凌云, 王妍淑, 顾佳洁, 吴惠仙, 薛俊增. 阳澄湖湖区与围网养殖区浮游细菌群落结构变化研究. 湖北农业科学, 2010, 49(8): 1942-1945.
- [39] 鲍素敏. 巢湖水体浮游细菌群落结构时空差异的分子生态学研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 32, No. 11 June, 2012 (Semimonthly)

CONTENTS

Controls of post-fire tree recruitment in Great Xing'an Mountains in Heilongjiang Province	CAI Wenhua, YANG Jian, LIU Zhihua, et al (3303)
The assessment of river health using Benthic-Index of biotic integrity for Wenyu River	YANG Liu, LI Yonghui, WANG Juncai, et al (3313)
Consume of soil seeds of <i>Betula albo-sinensis</i> and <i>Abies faxoniana</i> in different natural successional stages of subalpine dark coniferous forest in western Sichuan, China	MA Jiangming, LIU Shirong, SHI Zuomin, et al (3323)
Habitat associations of understory species spatial distribution in old growth broad-leaved Korean pine (<i>Pinus koraiensis</i>) forest	DING Shengjian, ZHANG Chunyu, XIA Fucui, et al (3334)
Nabkha morphology and sand-fixing capability of four dominant <i>Caragana</i> species in the desert region of the Inner Mongolia Plateau	ZHANG Yuanyuan, MA Chengcang, HAN Lei, et al (3343)
Growth dynamics, biomass allocation and ecological adaptation in <i>Ceratocarpus arenarius</i> L.	QUAN Dujuan, WEI Yan, ZHOU Xiaoqing, et al (3352)
A rapid assessment method for forest disaster based on MODIS/NDVI time series; a case study from Guizhou Province	SHI Hao, WANG Xiao, XUE Jianhui, et al (3359)
Soil cation exchange capacity and exchangeable base cation content in the profiles of four typical soils in the Xi-Shui Forest Zone of the Qilian Mountains	JIANG Lin, GENG Zengchao, LI Shanshan, et al (3368)
Impact of water and temperature on spring maize emergence speed and emergence rate	MA Shuqing, WANG Qi, LÜ Houquan, et al (3378)
Effect of N application on the abundance of denitrifying genes (<i>narG/nosZ</i>) and N ₂ O emission in paddy soil	ZHENG Yan, HOU Haijun, QIN Hongling, et al (3386)
Temporal-spatial variations of potential evapotranspiration and quantification of the causes in Northwest China	CAO Wen, SHEN Shuanghe, DUAN Chunfeng (3394)
Analysis of ecosystem degradation and recovery using precipitation use efficiency and NDVI in the headwater catchment of the Yellow River basin	DU Jiaqiang, SHU Jianmin, ZHANG Linbo (3404)
An assessment method of <i>Kandelia obovata</i> population biomass	JIN Chuan, WANG Jinwang, ZHENG Jian, et al (3414)
Quantitative characteristics and species composition of <i>Artemisia sphaerocephala</i> and <i>A. ordosica</i> communities in the Ulanbuh Desert ...	MA Quanlin, ZHENG Qingzhong, JIA Jujie, et al (3423)
Photosynthesis and transpiration in relation to ion accumulation in <i>Vitex trifolia</i> under varied light intensity	ZHANG Ping, LIU Linde, BAI Xinfu, et al (3432)
Diffusion of elm seed rain in Otindag Sand Land	GU Wei, YUE Yongjie, LI Gangtie, et al (3440)
Effect of saline water irrigation on sand soil salt and the physiology and growth of <i>Populus euphratica</i> Oliv.	HE Xinlin, CHEN Shufei, WANG Zhenhua, et al (3449)
Regulation of exogenous nitric oxide on photosynthetic physiological response of <i>Lolium perenne</i> seedlings under NaHCO ₃ Stress	LIU Jianxin, WANG Jincheng, WANG Xin, et al (3460)
Longitude gradient changes on plant community and soil stoichiometry characteristics of grassland in Hulunbeir	DING Xiaohui, LUO Shuzheng, LIU Jinwei, et al (3467)
Concentrations and distributions of selenium and heavy metals in Hainan paddy soil and assessment of ecological security	GENG Jianmei, WANG Wenbin, WEN Cuiping, et al (3477)
Heavy metal contents and evaluation of farmland soil and wheat in typical area of Jiangsu Province	CHEN Jingdu, DAI Qigen, XU Xuehong, et al (3487)
The studies on the food web structures and trophic relationships in Guangxi Dongfang Cave by means of stable carbon and nitro- gen isotopes	LI Daohong, SU Xiaomei (3497)
Analysis of bacterial diversity in the Songhua River based on nested PCR and DGGE	TU Teng, LI Lei, MAO Guannan, et al (3505)

Preliminary delineation and classification of estuarine drainage areas for major coastal rivers in China	HUANG Jinliang, LI Qingsheng, HUANG Ling, et al (3516)
Estimation of spatial and seasonal changes in phytoplankton primary production in Meiliang Bay, Lake Taihu, based on the Vertically Generalized Production Model and MODIS data	YIN Yan, ZHANG Yunlin, SHI Zhiqiang, et al (3528)
Viability and changes of physiological functions in the tiger frog (<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>) exposed to cold stress	WANG Na, SHAO Chen, XIE Zhigang, et al (3538)
Community structure and abundance dynamics of soil collembolans in transgenic Bt rice paddyfields	ZHU Xiangyu, LI Zhiyi, CHANG Liang, et al (3546)
Morphological characteristics and microsatellite DNA genetic diversity of Nigeria African honey bee, Anhui <i>Apis mellifera</i> and theirs hybrid generation II	YU Linsheng, XIE Wenfei, WU Houchang, et al (3555)
Effects of social-demographic factors on the recreational service of park wetlands in Beijing	LI Fen, SUN Ranhao, CHEN Liding (3565)
Co-integration theory-based analysis on relationships between economic growth and eco-environmental changes: taking the south-east district in Chongqing city as an example	XIAO Qiang, HU Dan, XIAO Yang, et al (3577)
The cooperative environmental game model in the Tidal River Network Regions and its empirical research	LIU Honggang, CHEN Xingeng, PENG Xiaochun (3586)

Review and Monograph

Review of eco-efficiency accounting method and its applications	YIN Ke, WANG Rusong, ZHOU Chuanbin, et al (3595)
Overview on the 6th international symposium on modern ecology series of 2011	WEN Teng, XU Delin, XU Chi, et al (3606)

Discussion

Scale analysis of environmental factors and their relationship with the size of hierarchical aquatic ecoregion: a case study in the Liao River basin	LIU Xingcai, XU Zongxue, ZHANG Shurong, et al (3613)
--	--

Scientific Note

Effects of different light intensities on activities of the primary defense proteins in needles of <i>Larix gmelinii</i>	LU Yifang, SHI Lei, YAN Shanchun (3621)
An analysis of photosynthetic parameters among <i>Schima superba</i> provenances	XIONG Caiyun, ZENG Wei, XIAO Fuming, et al (3628)
Research on three small-scale agricultural ecological-economic systems in Shenzhen City based on emergy analysis	YANG Zhuoxiang, GAO Yang, ZHAO Zhiqiang, et al (3635)

《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 11 期 (2012 年 6 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 32 No. 11 (June, 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:100071	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