

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

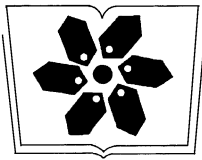
Acta Ecologica Sinica



第32卷 第13期 Vol.32 No.13 **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



生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

中国科学院科学出版基金资助出版

第 32 卷 第 13 期 2012 年 7 月 (半月刊)

目 次

砂质潮间带自由生活海洋线虫对缺氧的响应——微型受控生态系研究.....	华 尔, 李 佳, 董 洁, 等 (3975)
植物种群自疏过程中构件生物量与密度的关系	黎 磊, 周道玮, 盛连喜 (3987)
基于景观感知敏感度的生态旅游地观光线路自动选址.....	李继峰, 李仁杰 (3998)
基于能值的沼气农业生态系统可持续发展水平综合评价——以恭城县为例.....	杨 谨, 陈 彬, 刘耕源 (4007)
内蒙古荒漠草原植被盖度的空间异质性动态分析.....	颜 亮, 周广胜, 张 峰, 等 (4017)
典型草地的土壤保持价值流量过程比较.....	裴 厦, 谢高地, 李士美, 等 (4025)
长沙市区马尾松人工林生态系统碳储量及其空间分布.....	巫 涛, 彭重华, 田大伦, 等 (4034)
厦门市七种药用植物根围 AM 真菌的侵染率和多样性	姜 攀, 王明元 (4043)
Cd、低 Pb/Cd 下冬小麦幼苗根系分泌物酚酸、糖类及与根际土壤微生物活性的关系	贾 夏, 董岁明, 周春娟 (4052)
凉水保护区土壤产类漆酶-多铜氧化酶细菌群落结构	赵 丹, 谷惠琦, 崔岱宗, 等 (4062)
盐渍化土壤根际微生物群落及土壤因子对 AM 真菌的影响.....	卢鑫萍, 杜 茜, 闫永利, 等 (4071)
菌丝室接种解磷细菌 <i>Bacillus megaterium</i> C4 对土壤有机磷矿化和植物吸收的影响.....	张 林, 丁效东, 王 菲, 等 (4079)
闽江河口不同河段芦苇湿地土壤碳氮磷生态化学计量学特征.....	王维奇, 王 纯, 曾从盛, 等 (4087)
高山森林三种细根分解初期微生物生物量动态.....	武志超, 吴福忠, 杨万勤, 等 (4094)
模拟降水对古尔班通古特沙漠生物结皮表观土壤碳通量的影响	吴 林, 苏延桂, 张元明 (4103)
铁皮石斛组培苗移栽驯化过程中叶片光合特性、超微结构及根系活力的变化	濮晓珍, 尹春英, 周晓波, 等 (4114)
不同产量水平旱地冬小麦品种干物质累积和转移的差异分析.....	周 玲, 王朝辉, 李富翠, 等 (4123)
基于作物模型的低温冷害对我国东北三省玉米产量影响评估.....	张建平, 王春乙, 赵艳霞, 等 (4132)
黄土高原 1961—2009 年参考作物蒸散量的时空变异.....	李 志 (4139)
莫莫格湿地芦苇对水盐变化的生理生态响应.....	邓春暖, 章光新, 李红艳, 等 (4146)
不同蚯蚓采样方法对比研究.....	范如芹, 张晓平, 梁爱珍, 等 (4154)
亚洲玉米螟成虫寿命与繁殖力的地理差异.....	涂小云, 陈元生, 夏勤雯, 等 (4160)
黑河上游天然草地蝗虫空间异质性与分布格局.....	赵成章, 李丽丽, 王大为, 等 (4166)
苦瓜叶乙酸乙酯提取物对斜纹夜蛾实验种群的抑制作用.....	骆 颖, 凌 冰, 谢杰峰, 等 (4173)
长江口中国花鲈食性分析.....	洪巧巧, 庄 平, 杨 刚, 等 (4181)
基于线粒体控制区序列的黄河上游厚唇裸重唇鱼种群遗传结构.....	苏军虎, 张艳萍, 娄忠玉, 等 (4191)
镉暴露对黑斑蛙精巢 ROS 的诱导及其蛋白质氧化损伤作用机理	曹 慧, 施蔡雷, 贾秀英 (4199)
北方草地牛粪中金龟子的多样性.....	樊三龙, 方 红, 高传部, 等 (4207)
合肥秋冬季茶园天敌对假眼小绿叶蝉和茶蚜的空间跟随关系.....	杨 林, 郭 骅, 毕守东, 等 (4215)
植被、海拔、人为干扰对大中型野生动物分布的影响——以九寨沟自然保护区为例.....	张 跃, 雷开明, 张语克, 等 (4228)
基于社会网络分析法的生态工业园典型案例研究.....	杨丽花, 佟连军 (4236)
基于生命周期的户用沼气系统可用能核算——以广西恭城瑶族自治县为例.....	齐 静, 陈 彬, 戴 婧, 等 (4246)
专论与综述	
水文情势与盐分变化对湿地植被的影响研究综述	章光新 (4254)
松嫩碱化草甸土壤种子库格局、动态研究进展	马红媛, 梁正伟, 吕丙盛, 等 (4261)
一种新的景观扩张指数的定义与实现	武鹏飞, 周德民, 官辉力 (4270)
研究简报	
华山新麦草光合特性对干旱胁迫的响应.....	李 倩, 王 明, 王雯雯, 等 (4278)
美丽海绵提取物防污损作用.....	曹文浩, 严 涛, 刘永宏, 等 (4285)

期刊基本参数: CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 306 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 37 * 2012-07



封面图说: 涵养水源——在长白山南坡的峭壁上, 生长在坡面上的森林所涵养的水源还在汨汨地往下流个不停, 深红色的落叶掉在了苔藓上, 这里已经是长白山的深秋了。虽然雨季已经过去了很久, 但是林下厚厚的枯枝落叶层、腐殖质层、苔藓草本层所涵养的水分还在不间断地流淌, 细细的水线在壁下汇成了溪、汇成了河。涵养水源是森林的主要生态功能之一。

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

DOI: 10.5846/stxb201105270710

赵丹, 谷惠琦, 崔岱宗, 范晓旭, 张曦, 赵敏. 凉水保护区土壤产类漆酶-多铜氧化酶细菌群落结构. 生态学报, 2012, 32(13): 4062-4070.

Zhao D, Gu H Q, Cui D Z, Fan X X, Zhang X, Zhao M. The community structure of laccase-like multicopper oxidase-producing bacteria in soil of Liangshui Nature Reserve. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(13): 4062-4070.

凉水保护区土壤产类漆酶-多铜氧化酶 细菌群落结构

赵 丹^{1,2}, 谷惠琦¹, 崔岱宗¹, 范晓旭^{1,2}, 张 曦¹, 赵 敏^{1,*}

(1. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江大学生命科学学院 微生物省高校重点实验室, 哈尔滨 150080)

摘要:在凉水国家级自然保护区 3 种主要林型红松 (*Pinus koraiensis*)、白桦 (*Betula platyphylla*) 及云杉 (*Picea dietrich*) 林采集林下土壤样品, 以铜离子作为筛选剂处理后, 结合平板分离法与基于 16S rDNA V3 区片段的变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) 技术, 调查了土壤样品中产类漆酶-多铜氧化酶 (laccase-like multicopper oxidase, LMCO) 细菌的群落结构。这是研究产类漆酶-多铜氧化酶细菌在环境中存在的种、属及分布的新尝试。平板分离获得 10 株细菌均为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.), 其中梭状芽孢杆菌 (*Bacillus fusiformis*) 未见相关报道。通过 DGGE 图谱分析可知, 产类漆酶-多铜氧化酶细菌在研究地不同林型土壤中的群落结构无明显差异, 在红松林土壤中多样性最为丰富。DGGE 条带测序结果表明, 取样地土壤中产类漆酶细菌主要为罗尔斯顿菌属 (*Ralstonia* sp.)、肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.)、芽孢杆菌属和一些未培养细菌。

关键词:漆酶; 类漆酶-多铜氧化酶; 细菌; DGGE

The community structure of laccase-like multicopper oxidase-producing bacteria in soil of Liangshui Nature Reserve

ZHAO Dan^{1,2}, GU Huiqi¹, CUI Daizong¹, FAN Xiaoxu^{1,2}, ZHANG Xi¹, ZHAO Min^{1,*}

1 Department of Microbiology, College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2 Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China

Abstract: Laccases catalyze the oxidation of various aromatics, particularly phenolic and amine substrates, making them valuable in industrial applications. Laccases also play an important role in soil organic matter (SOM) turnover processes and the global carbon cycle due to their involvement in the synthesis and degradation of lignin as well as transformation of lignified substrates and humic substances. Laccases belong to the protein family of multicopper oxidases characterized by copper atoms in the active center. Laccases or laccase-like multicopper oxidases (LMCO) have been extensively studied especially in fungi. Recently, increasing evidence points to a wide occurrence of LMCO in bacteria. As bacterial communities are known to decompose pollutants and municipal wastes involving large quantities of phenolic substances and organic matter, it can be deduced that bacterial LMCO might also participate in lignin degradation and SOM cycling. Copper atoms not only constitute the catalytic center of laccases but can also confer copper resistance to bacteria. Consequently, copper ions have a well known use in isolating LMCO-producing bacteria. To gain deeper insights into the ecological role of bacteria with LMCO activity in soil, we used traditional plating methods and PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) technology to examine the community structure of LMCO-producing bacteria in forest soil of

基金项目:世界自然基金(WWF, CN0078.01); 国家自然科学基金(30170775, 30671702); 国家支撑项目(2008BADA1B01-10)共同资助

收稿日期:2011-05-27; **修订日期:**2011-09-19

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: 82191513@163.com

Liangshui nature reserve, Heilongjiang Province.

Soil samples were collected in three patterns of forests: *Pinus koraiensis*, *Betula platyphylla* and *Picea dietrich*. Soil samples were enriched in M9 basal medium and then screened in LB medium with gradient Cu^{2+} . Ten bacteria strains were isolated and identified based on traditional plating methods of bacteria separation. The results showed that they all belonged to *Bacillus* sp., falling into four different species: *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus fusiformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*, among which no laccase-related results have been reported on *Bacillus fusiformis*. To investigate the structural variation of LMCO-producing bacteria, 16S-rDNA-V3-fragment-based DGGE and clone sequence BLAST technologies were applied. The data based on DGGE plot indicated there was no distinct variation of LMCO-producing bacteria structure among soil samples of different forest patterns in the research district. The diversity of LMCO-producing bacteria in *Pinus koraiensis* forests was more abundant than that in *Betula platyphylla* and *Picea dietrich*. The results derived from BLAST revealed that *Ralstonia* sp., *Enterobacter* sp. and other uncultured species existed in soil samples in addition to *Bacillus* sp.. Band 3 was present in all soil samples and had a 100% homology to *Ralstonia mannitolilytica*. *Ralstonia* sp. had highly physical and biochemical similarities as well as sequence homology with *Cupriavidus* sp. which was a copper-philic bacteria community. Bands 2, 7 and 11 were commonly present except lane 8 and had a highly homology with *Enterobacter ludwigii* which had recently attracted interest in environment ecological research. Bands 5 and 9 had a highly homology with *Bacillus circulans* and *Bacillus thuringiensis*, respectively. Furthermore, Bands 1, 4, 6, 8 and 10 had highly homology with an uncultured bacterial clone which needed further investigation.

Key Words: laccase; laccase-like multicopper oxidase (lmco); bacteria; DGGE

漆酶,即 *p*-对苯二酚:双氧 氧化还原酶 (*p*-diphenol: dioxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2),能利用分子氧作为电子受体氧化多种酚类、胺类及芳香类化合物。漆酶参与木质素合成和降解、木质化底物及腐殖质的转化,在土壤有机质 (soil organic matter, SOM) 转化和地球碳素循环过程中起重要作用^[1]。因此,土壤中产漆酶微生物的种群、分布及生态学功能研究日益引人关注^[2]。

土壤中产漆酶真菌,尤其是子囊菌^[3]和担子菌^[4]漆酶基因多样性的研究较为深入。细菌漆酶与真菌漆酶相比,在序列同源性、底物范围、催化条件、反应动力学特性等方面有较大差异,其活性被定义为类漆酶-多铜氧化酶 (laccase-like multicopper oxidase, LMCO)^[5] (以下简称类漆酶)。虽然目前只在固氮菌属 (*Azotobacter* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 等少数种属细菌中发现了类漆酶活性并进行了鉴定、纯化和性质研究^[6],但越来越多的分子生物学和蛋白质组学证据表明,类漆酶在细菌中广泛存在^[7-8]。细菌类漆酶与微生物色素生成、孢子形成、紫外线和金属抗性密切相关^[8],与土壤中 Mn^{2+} 氧化和木质素及其他物质的生化循环过程相耦合^[9]。Kellner 等以铜原子结构域保守位点设计简并引物,从分子生物学水平研究了土壤中细菌类漆酶基因多样性,表明研究地土壤中这类细菌极其丰富并参与林地凋落物及土壤有机质的转化和物质循环过程^[1]。这种方法从环境样品总 DNA 中扩增类漆酶编码区片段,获得目的微生物种属和分布信息,但受引物简并性的局限较大。

目前分离产类漆酶细菌的方法主要有两种,一是在培养基中添加漆酶底物如木质素和染料进行富集,二是添加铜离子筛选^[10]。低浓度的铜离子即对微生物的生长代谢具有毒害作用,但多铜氧化酶结构上共有的铜原子结构域,赋予了微生物特殊的铜抗性^[6],许多报道表明类漆酶与细菌的铜抗性有关^[11-13]。本研究以铜离子为筛选剂,结合微生物平板分离方法与基于 16S rDNA V3 区片段的 PCR-DGGE 技术,调查了凉水保护区土壤中产类漆酶细菌的群落结构,是获得环境样品中产类漆酶细菌种群信息的新尝试,以期为这类细菌在土壤中的木质素降解和物质循环等生态学功能研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究地概况

研究地位于凉水国家级自然保护区(黑龙江省伊春市带岭区行政区内),东经 $128^{\circ}48'30''$ — $128^{\circ}55'50''$,北

纬 47°7'39"—47°14'22"。该地区属温带大陆性季风气候,年平均气温-0.3℃,年平均相对湿度 78%,主要保护对象是以红松为主的针阔叶混交林生态系统。主要树种有红松 (*Pinus koraiensis*)、云杉 (*Picea dietrich*)、冷杉 (*Abies mill*)、落叶松 (*Larix mill*)、黄菠萝 (*Phellodendron amurense*)、水曲柳 (*Fraxinus mandshurica*)、榆属 (*Ulmus propinqua*、*U. pumila*、*U. laciniata*)、紫椴 (*Tilia amurensis*)、山杨 (*Populus davidiana*)、白桦 (*Betula platyphylla*)、枫桦 (*B. costata*)、和蒙古栎 (*Quercus mongolica*)。其中以红松林为最多,占面积 64%,云杉林占面积 13.2%。地带性土壤为暗棕壤,非地带性土壤由草甸土、沼泽土和泥炭土及其亚类组成。

1.2 土壤样品采集

2009 年 10 月,在凉水自然保护区坡地过熟红松林、谷地云杉林及草甸白桦林下分别设定样地,每个样地各选取 3 个采样点,样点间隔均大于 10 m。采样时去除掉 5—10 cm 表层土后,铲取土壤样品装入聚乙烯袋中迅速封口,并标记采样处树种及地理位置坐标。红松林土样编号分别为 1—3、云杉林土样编号分别为 4—6 和白桦林土样编号分别为 7—9,土壤理化性质见表 1。

表 1 土壤理化性质
Table 1 Physicochemical properties of soil samples

土样编号 Soil sample	植被 Forest	地形 Landform	有机质(C%) Organic matter	全 N(%) Total nitrogen	pH
1—3	红松林 (<i>Pinus koraiensis</i>)	低山中部	9.59	0.334	6.29
4—6	云杉林 (<i>Picea dietrich</i>)	坡底	4.15	0.232	5.13
7—9	白桦林 (<i>Betula platyphylla</i>)	山间谷地	6.14	0.332	5.54

1.3 产类漆酶细菌的筛选

参照黄俊和王行国^[11]的方法富集产类漆酶细菌。

取 2 mL 富集液,依次在 100 mL 含 0.2 mmol/L 和 0.4 mmol/L Cu^{2+} 的 LB 液体培养基中筛选两代,培养条件为 37℃、160 r/min 振荡 7 d。

1.4 产类漆酶细菌的平板分离

1.4.1 细菌类漆酶的检测

将筛选液适当稀释后涂布于含 0.4 mmol/L Cu^{2+} 的固体 LB 培养基上,37℃ 恒温倒置培养。

类漆酶的定性检测:以 0.5 mmol/L 丁香醛联氮(4-羟基-3,5-二甲氧基-苯甲醛连氮,4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine)无水乙醇溶液定性检测平板单菌落,显现粉红色的菌落判定其具有分泌胞外类漆酶的活力。

类漆酶的定量检测:将所有平板菌落纯培养在含有 0.4 mmol/L Cu^{2+} 的液体 LB 培养基中扩大培养,培养条件为 37℃、160 r/min 振荡 7 d。分别检测发酵液上清、菌体悬液及细胞内含物上清的类漆酶活力,以判定是否分别具有胞外、芽孢及胞内类漆酶活力。酶活力测定参考 Martins 等^[14]的方法,每分钟氧化 1 μmol 丁香醛联氮所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.4.2 产类漆酶细菌的鉴定

16S rDNA 序列分析:CTAB 法提取的基因组为模板,扩增产类漆酶细菌 16S rDNA 片段,PCR 引物 (27F/1492R,表 2)、反应体系及程序参考 Tanner 等^[15]的方法。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,用北京庄盟公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收。胶回收产物与 pMD18-T 载体连接,并转化大肠杆菌 JM109 细胞,重组菌以 pMD18-T 载体上的 M13/RV-M 引物(表 2) PCR 方法鉴定,由北京英骏生物工程有限公司测序。测序结果在 GenBank 数据库上以 BLAST 程序比对分析。

菌株形态学及生理生化鉴定参照东秀珠和蔡妙英^[16]的方法。

1.5 产类漆酶细菌的 PCR-DGGE 分离

1.5.1 总 DNA 的提取及 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增

以 CTAB 法提取筛选的二代菌液总 DNA 为模板,扩增产类漆酶细菌 16S rDNA V3 区片段,PCR 引物

(F357-GC/R518,表 2)、反应体系及程序参考 Zhou 等^[17]的方法。扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 DGGE

DGGE 参考 Smalla 等^[18]的方法,聚丙烯酰胺凝胶浓度 8%,变性剂梯度范围 30%—60%,电泳缓冲液为 1×TAE,使用 BIO-RAD 系统于 60 ℃、160 V 电泳 5 h,银染法染色。DGGE 凝胶谱图以 Quantity One (4.62) 软件分析。将目的条带切下放入 0.5 mL 离心管中充分碾碎,加入 12 μL 灭菌去离子水,3000 r/min 离心 30 s 后 50 ℃水浴 30 min,12000 r/min 离心 1 min,将上清转移进 1.5 mL 离心管。以上述凝胶回收产物为模板,扩增产类漆酶细菌 16S rDNA V3 区片段,PCR 引物 (F357/R518,表 2)、反应体系及程序参考 Zhou 等的方法^[17]。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,按 1.4.2 中的方法回收、测序及分析。

表 2 本研究中采用的 PCR 扩增引物

Table 2 Primers used in the study			
目的片段 Target fragment	引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	片段长度 Length of fragment
16S rDNA	27F	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	~ 1500bp
	1492R	GGTTACCTTGTACGACTT	
16S rDNA V3	F357	CCTACGGGAGGCAGCAG	~ 230bp
	F357-GC	GC clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG	
	R518	ATTACCGCGGCTGCTGG	
16S rDNA V3	M13	CGCCAGGGTTTCCCACTCAACGAC	200bp
	RV-M	GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG	

GC 夹 GC clamp (5'-CGC CCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3')

2 结果与分析

2.1 产类漆酶细菌的平板分离

在含 0.4 mmol/L Cu²⁺的固体 LB 培养基上,共获得 68 个单菌落,其中 10 个可使丁香醛联氮显粉红色。这 10 株细菌的 16S rDNA 片段均约为 1500—1600 bp,经 BLAST 比对结合形态学及生理生化试验(结果未列)鉴定均为芽孢杆菌属细菌。它们在平板及摇瓶培养初期即菌体生长阶段,菌落均不能使丁香醛联氮显色,发酵液上清及菌体悬液也均未检测到漆酶活力。至培养后期即产孢阶段,平板菌落及摇瓶发酵液芽孢悬液可检测到酶活性,判定其均为芽孢类漆酶活性。菌株编号、GenBank 序列接受号、鉴定结果及芽孢酶活如表 3 所示。

表 3 产类漆酶细菌鉴定及酶活测定结果

Table 3 Identification and enzyme activity of laccase-like producing bacteria				
菌株编号 Strain No.	菌株名称 Strain name	序列接受号 Accession No.	酶活/(U·mL ⁻¹ ·min ⁻¹) Enzyme activity	来源 Source
NB-02	短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	HM214543	23.23	红松林土样 1
NB-03	短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>	HQ009752	85.80	红松林土样 2
NB-09	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	HM992830	21.39	红松林土样 3
NB-01	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	HM214542	24.95	白桦林土样 4
NB-08	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	HM992831	14.86	白桦林土样 5
NB-17	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	HQ222830	17.87	白桦林土样 5
NB-04	短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>	HQ222829	15.97	白桦林土样 6
NB-16	梭状芽孢杆菌 <i>B. fusiformis</i>	HM992833	22.40	白桦林土样 6
NB-05	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	HQ222833	40.39	云杉林土样 7
NB-06	解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	HQ222832	22.05	云杉林土样 8

平板分离获得的 10 株产类漆酶细菌在分类上属于芽孢杆菌属的 4 个种,即枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 和梭状芽孢杆菌 (*B.*

fusiformis)。芽孢杆菌属细菌是土壤中的土著细菌,类漆酶活性广泛存在于细菌芽孢中,与土壤中酚类化合物的脱毒氧化和有机物转化密切相关^[6]。枯草芽孢杆菌芽孢外衣蛋白 CotA 类漆酶研究最为广泛,Enguita 等成功解析了 CotA 的晶体结构^[19]。Renate 和 Julian 曾报道一株短小芽孢杆菌芽孢类漆酶,具有很好的热稳定性和宽泛的底物范围^[20]。Pan 等在解淀粉芽孢杆菌 LC02 中发现了芽孢类漆酶活性^[21]。梭状芽孢杆菌具有类漆酶活性未见相关报道。

1993 年 Givaudan 等首次从土壤根际细菌生脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*) 中纯化到胞内细菌类漆酶^[22],稍后研究者分别从海单胞菌 (*Marinomonas mediterranea*)^[5]和克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp. 601)^[11]等少数细菌的细胞内含物中获得了纯化类漆酶。本研究以丁香醛联氨为底物,从 68 个细菌纯培养的细胞内含物中均未检测到胞内类漆酶活性。可能原因是采样地生境中所含具有胞内类漆酶活性的细菌数量稀少,也可能是样品富集、分离方式不利于生长速度慢细菌生长。

2.2 产类漆酶细菌的 PCR-DGGE 分离

2.2.1 总 DNA 的提取及 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增

以铜离子筛选后的土壤样品富集液总 DNA(图 1)为模板,以带 GC 夹的细菌 16S rDNA V3 区通用引物扩增,获得长度约 230 bp 的特异性片段,如图 2 所示。

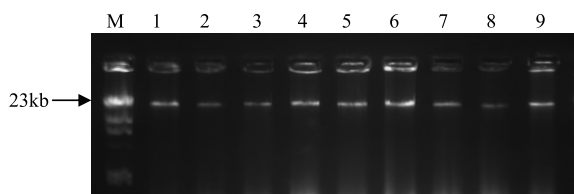


图 1 土壤筛选液总 DNA 琼脂糖电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of genome DNA in soil screening sample

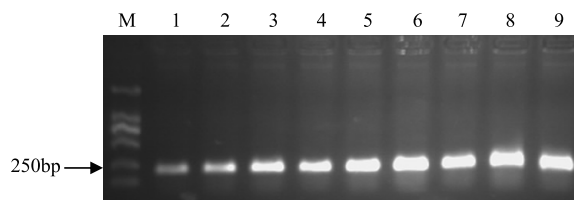


图 2 PCR 扩增 16S rDNA V3 区片段琼脂糖电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of PCR amplification of 16S rDNA V3 region fragments

2.2.2 DGGE 分析 16S rDNA V3 区片段 PCR 产物

如图 3a 所示,不同林型土壤样品均分离到 10 条以上的电泳条带,但带型有一定差别。以红松林 1 号样品为基准,同种林型的 3 个样品与基准之间的相关性较为接近:红松林 3 号样品与 1 号样品的相似性最高,戴斯系数 (Dice coefficient) 为 73.2%,其次是 2 号样品与 1 号样品的相似性 (60.5%);云杉林 4—6 号样品与 1 号样品的相似性较低,但彼此间较为接近,分别为 47.1%,61.6% 和 49.0%;白桦林 7—9 号样品与 1 号样品的相似性最低,分别为 45.3%、35.4% 和 44.9% (图 3b)。通过未加权算数平均对群法 (The unweighted pair group method with arithmetic averages, UPGMA) 进行聚类分析,如图 4 所示,结果表明同种林型样品如红松林 1 号与 3 号 (0.73),白桦林 7 号与 9 号 (0.58) 相似值较高被归为一类,但不同林型样品如红松林 2 号与云杉林 4 号 (0.67),云杉林 6 号与白桦林 8 号 (0.59) 也被归为一类。这表明不同林型土壤中产类漆酶-多铜氧化酶细菌群落结构无明显差异。

DGGE 谱图 Shannon index 指数分析表明,凉水自然保护区土壤中产类漆酶细菌多样性丰富,不同林型土壤中产类漆酶细菌多样性无明显差异 ($P < 0.05$)。红松林土壤中产类漆酶细菌的多样性 (2.53) 略高于白桦林 (2.37) 和云杉林 (2.05) (表 4)。Kellner 等指出类漆酶活性与土壤有机质转化有关^[1]。刘振花等对凉水保护区红松阔叶混交林土壤活性有机碳的研究表明,红松林系演替阶段的顶级群落,土壤中总有机碳 (total organic carbon, TOC) 和易氧化碳 (ease of oxidation of carbon, EOC) 含量高于低级演替阶段的针阔混交林^[23]。红松林下为典型的针叶林土壤,每年松针大量凋落,芳香族物质含量较高,其是漆酶的天然底物。而且红松木质更为坚硬不易腐朽,因此促进了参与芳香类物质氧化和木质素降解的产类漆酶细菌的生长。

2.2.3 16S rDNA V3 区序列分析

选择 DGGE 胶上易于区分的条带切割、纯化,其中 11 个 (条带编号如图 3 所示) 条带获得克隆子,对成

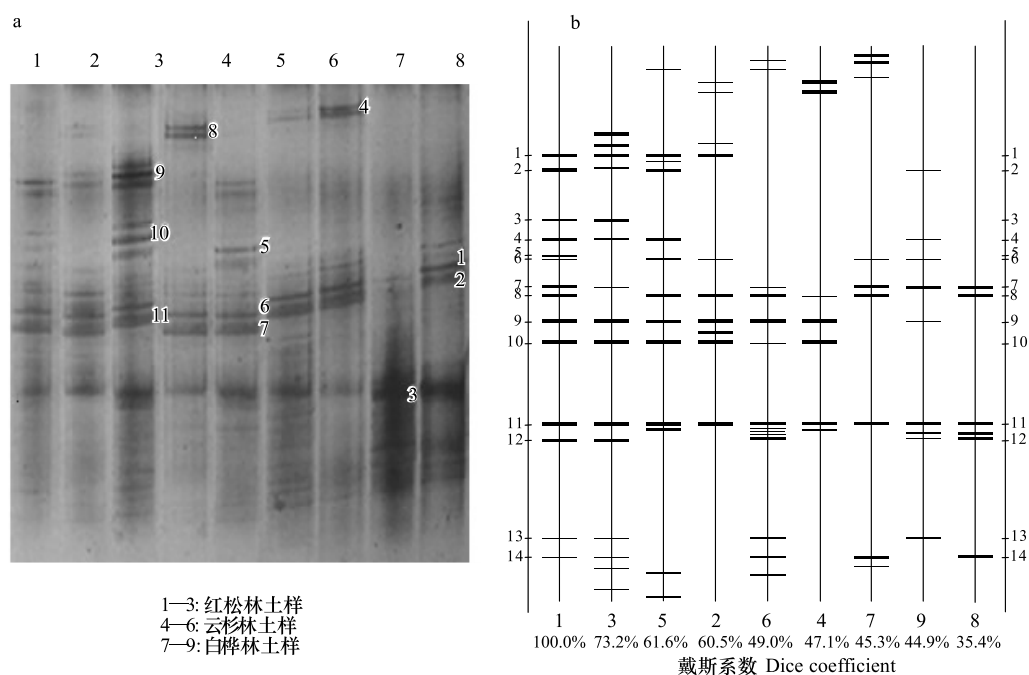


图3 16S rDNA V3 区扩增片段的 DGGE 电泳图(a) 以及电泳比较图(b)

Fig.3 DGGE analytical result of 16S rDNA V3 region fragments (a) and electrophoretic comparison chart (b)

1—3: 红松林土样 Three soil samples in *Pinus koraiensis*; 4—6: 云杉林土样 three soil samples in *Picea dietrich*; 7—9: 白桦林土样 three soil samples in *Betula platyphylla*

功克隆的白色单菌落进行 DNA 测序,序列 BLAST 比对结果见表 5。

DGGE 条带测序结果表明,凉水保护区土壤样品中产类漆酶-多铜氧化酶主要包括罗尔斯顿菌属 (*Ralstonia* sp.)、肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.)、芽孢杆菌属和一些未培养细菌(表 5)。如图 3 所示,条带 3 为 9 个泳道中的共有条带,与 GenBank 收录序列 HM486415 甘露醇罗尔斯顿菌 (*Ralstonia mannitolilytica*) 的相似性达到 100%。罗尔斯顿菌属分布广泛,能够在缺乏营养的潮湿环境中生长,是人类条件致病菌及重要的植物致病菌,与亲铜菌属 (*Cupriavidus* sp.) 有着相似的生理生化特性及高度的序列同源性^[24]。Hernandez-Romero 等^[25]曾报道罗尔斯顿菌属中的青枯罗尔斯顿菌 (*Ralstonia solanacearum*) 在具有多酚氧化酶活性的同时,能够氧化多种典型的漆酶底物。条带 2、7、11 是除泳道 8 外所有泳道的共有条带,与 GenBank 收录菌株

Enterobacter ludwigii (FR820478) 的同源性极高。*E. Ludwigii* 是临床常见肠杆菌属的肠道致病菌,近年来其在土壤及环境中的生态学功能研究逐渐兴起。Shoebitz 等从黑麦草根系分离到一株 *E. Ludwigii* BNM0537,并研究了该菌株促进植物生长及抑制病原真菌孢子萌发的生防特性^[26]。赵萍等^[27]和周元祥等^[28]分别报道了 *E. Ludwigii* 降解土壤中残留有机磷农药和对 ABR 反应器污泥中溴氨酸的脱色作用。条带 5 和条带 9 的序列分别与芽孢杆菌属的环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*) (接受号 FJ215785,相似度 99%) 和苏云金芽孢杆菌

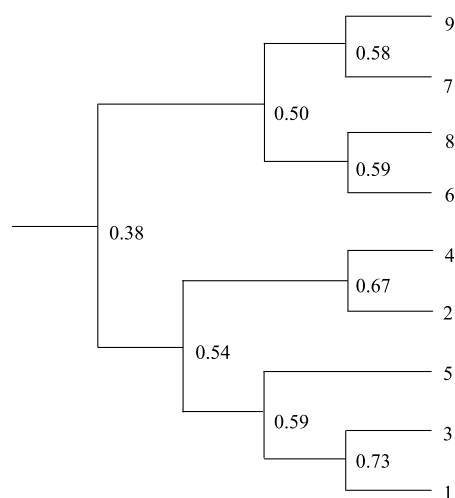


图4 Cu^{2+} 富集土壤 16S rDNA V3 区条带图谱的聚类分析

Fig.4 Cluster analysis of 16S rDNA V3 region band profiles of bacterial communities from Cu^{2+} enriched soil samples

(*Bacillus thuringiensis*) (接受号 HM629457, 相似度 100%) 同源性最高, 目前尚未见关于这两种细菌产类漆酶活性的报道。此外, 条带 1、4、6、8 和 10 的序列与一些未培养细菌克隆序列有极高相似性。

表 4 16S rDNA V3 区扩增片段的 DGGE 条带 Shannon 多样性指数
Table 4 Shannon indexes of DGGE bands of amplified 16S rDNA V3 fragments

林型 Forest pattern	Shannon 多样性指数 Shannon indexes			平均值 Average
红松林 <i>Pinus koraiensis</i>	2.63	2.27	2.70	2.53 a
云杉林 <i>Picea dietrich</i>	2.19	1.78	2.19	2.05 a
白桦林 <i>Betula platyphylla</i>	1.94	2.55	2.63	2.37 a

表 5 测序克隆序列与其 GenBank 最相似序列的比对结果
Table 5 Comparison between determined clone sequence and its most similar sequence in GenBank

条带编号 Band No.	序列接受号 Accession No.	亲缘性最近 Closest relative	相似度/% Similarity
1	JF750735	Uncultured bacterium clone JF226373	100
2	JF741205	<i>Enterobacter ludwigii</i> FR820478	100
3	JF750737	<i>Ralstonia mannitolilytica</i> HM486415	100
4	JF750739	Uncultured bacterium clone JF018035	99
5	JF741207	<i>Bacillus circulans</i> FJ215785	99
6	JF750736	Uncultured bacterium clone JF226373	100
7	JF741206	<i>Enterobacter ludwigii</i> FR820478	100
8	JF750740	Uncultured bacterium clone JF018035	99
9	JF741209	<i>Bacillus thuringiensis</i> HM629457	100
10	JF750738	Uncultured bacterium clone JF218015	100
11	JF741208	<i>Enterobacter ludwigii</i> FR820478	98

3 讨论

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,在光谱学、序列同源性及反应特性等方面与来源于哺乳动物的血浆铜蓝蛋白 (ceruloplasmin, Cp) 和来源于植物的抗坏血酸氧化酶 (ascorbate oxidase, AO) 相似,同属于多铜氧化酶家族。细菌漆酶与真菌及植物来源漆酶在酶学、光谱学等特性方面差异显著,因此其活性常被定义为类漆酶-多铜氧化酶^[29]。笔者用 Kellner 等设计的细菌类漆酶-多铜氧化酶简并引物 Cu1AF/Cu2R^[1],以其他环境样品总 DNA 为模板,获得了 140 bp 的特异性片段,但以本研究中分离到的 10 株产类漆酶细菌基因组(表 2)及原始和铜离子筛选后的土壤样品细菌培养液总 DNA 为模板,均未获得特异性扩增。在 Kellner 等的研究中,典型的具有芽孢类漆酶活性的枯草芽孢杆菌菌株也未检测到类漆酶基因的存在。原因可能有:该引物简并性弱,研究地目的种群微生物数量稀少,或者编码漆酶的基因并非与细菌的多酚氧化功能相耦合。

目前土壤中产漆酶微生物的多样性研究中,未见不同林型土壤中产类漆酶细菌的群落结构与生态学功能的相关报道。Kellner 等的研究表明同一地区土壤的不同垂直层中,细菌漆酶基因丰富程度与土壤中有有机物含量呈正相关^[1]。凉水保护区红松林下土壤中有有机质含量高于云杉及白桦林下土壤,且 pH 值更趋于适于细菌生长的中性范围(表 1),因此产类漆酶细菌数量最为丰富。本研究针对漆酶结构域铜原子赋予细菌的特殊铜抗性,以铜离子为筛选剂对土壤样品中产类漆酶活性的菌株进行富集,将传统微生物分离方法与 PCR-DGGE 技术结合,尝试获得产类漆酶细菌的群落结构信息。平板分离法获得了芽孢杆菌属产类漆酶细菌的种属信息,而 PCR-DGGE 图谱表明,除芽孢杆菌属外,凉水保护区土壤中还包括不易获得纯培养的罗尔斯顿菌属、肠杆菌属和一些未培养细菌。这些种属的细菌均有类漆酶或相关酶活性及生理特性,表明在类漆酶细菌研究中,铜离子作为筛选剂的有效性。平板分离技术是传统的微生物分离方法,其优点是可以获得目的微生物的纯培养,便于进行后续研究,但受样品量及其中微生物丰度、培养条件影响较大,且不易分离到慢生微生

物。PCR-DGGE 技术可同时快速分析多个样品、多种微生物,检测极限低且有利于获得新的微生物种属信息。本研究平板分离与 PCR-DGGE 获得的细菌种属信息不完全相符,这可能是这两种技术自身特性所决定^[30],也表明本研究所用技术的合理可行性。

漆酶宽泛的底物范围使其在生物技术领域广泛应用,但目前人们对于产类漆酶细菌在土壤及其他环境中的生态学功能知之甚少。改进产类漆酶细菌的富集、筛选方法;针对类漆酶编码序列设计简并性强的 PCR 引物,应用于类漆酶细菌的分子生态学研究;确定未培养产类漆酶细菌的种属及在土壤物质循环中的作用等为今后研究提供支持。

References:

- [1] Kellner H, Luis P, Zimdars B, Kiesel B, Buscot F. Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(3): 638-648.
- [2] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(2): 215-242.
- [3] Lyons J I, Newell S Y, Buchan A, Moran M A. Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a southeastern US salt marsh. *Microbial Ecology*, 2003, 45(3): 270-281.
- [4] Luis P, Walther G, Kellner H, Martin F, Buscot F. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(7): 1025-1036.
- [5] Solano F, Lucas-Elío P, López-Serrano D, Fernández E, Sanchez-Amat A. Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 204(1): 175-181.
- [6] Sharma P, Goel R, Capalash N. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(6): 823-832.
- [7] Alexandre G, Zhulin I B. Laccases are widespread in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(2): 41-42.
- [8] Claus H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 2003, 179(3): 145-150.
- [9] Brouwers G J, Vijgenboom E, Corsjens P L A M, De Virnd J P M, De Vrind-de Jong E W. Bacterial Mn^{2+} oxidizing systems and multicopper oxidases: an overview of mechanisms and functions. *Geomicrobiology Journal*, 2000, 17(1): 1-24.
- [10] Wang C L, Zhao M, Wei X D. Research method progress of bacterial laccase. *Biotechnology*, 2010, 20(4): 92-95.
- [11] Huang J, Wang X G. Laccase activity in *Klebsiella* sp. 601 isolated from soil and its enzymatic properties. *Chemistry and Bioengineering*, 2006, 23(3): 31-34.
- [12] Cha J S, Cooksey D A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(20): 8915-8919.
- [13] Lee Y A, Henderson M, Panopoulos N J, Schroth M N. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *The Journal of Bacteriology*, 1994, 176(1): 173-188.
- [14] Martins L O, Soares C M, Pereira M M, Teixeira M, Costa T, Jones G H, Henriques A O. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial Laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(21): 18849-18859.
- [15] Tanner M A, Shoskes D, Shahed A, Pace N R. Prevalence of corynebacterial 16S rRNA sequences in patients with bacterial and "nonbacterial" prostatitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(6): 1863-1870.
- [16] Dong X Z, Cai M Y. *Manual for System Identification of Common Bacteria*. Beijing: Science Press, 2001: 253-298.
- [17] Zhou S, Wei C H, Liao C D, Wu H Z. Comprehensive study on dynamics of microbial community in Anaerobic-Oxic-Oxic process using PCR-DGGE, gas chromatography analysis, and dehydrogenase activity assays. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2010, 26(2): 273-279.
- [18] Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kropf S, Ulrich A, Tebbe C C. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results?. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69(3): 470-479.
- [19] Enguita F J, Martins L O, Henriques A O, Carrondo M A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(21): 19416-19425.
- [20] Reiss R, Ihssen J, Thöny-Meyer L. *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnology*, 2011, 11(1): 9-19.
- [21] Pan J B, Zhao M, Lu L, Du M H, Li G F, Li J, Wang T N, Tang X L. Isolation and characterization of laccase activity in a novel *Bacillus*

- amyloliquefaciens* LC02. Advanced Materials Research, 2011, 183-185: 773-777.
- [22] Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant M L, Bally R. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiol. Lett, 1993, 108(2): 205-210.
- [23] Liu Z H, Chen L X, Wang L L. Soil active carbon in soils under different stages of Korean Pine and broadleaf forest. Chinese Journal of Soil Science, 2009, 40(5): 1098-1103.
- [24] Li J Z, Li Z H, Liu L P. International Journal of Laboratory Medicine, 2008, 29(5): 437-441.
- [25] Hernández-Romero D, Solano F, Sanchez-Amat A. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6808-6815.
- [26] Shoenitz M, Ribaud C M, Pardo M A, Cantore M L, Ciampi L, Curá J A. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(9): 1768-1774.
- [27] Zhao P, Qi W J, Wang Y, Wu C J, Lin Y J, Wang L, Yang M F. Isolation and identification of two strains capable of degrading of organophosphorus pesticides and their biodegradation abilities. Journal of Lanzhou University of Technology, 2010, 36(3): 86-90.
- [28] Zhou Y X, Shi Q Q, Ye H M. Investigation on the isolation and characterization of high-efficient bromamine acid-decolorizing strains. Journal of Hefei University of Technology: Natural Science, 2010, 33(7): 1057-1061.
- [29] Solomon E I, Sundaram U M, Machonkin T E. Multicopper oxidases and oxygenases. Chemical Reviews, 1996, 96(7): 2563-2606.
- [30] Duong L M, Jeewon R, Lumyong S, Hyde K D. DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes. Fungal Divers, 2006, 23(1): 121-138.

参考文献:

- [10] 汪春蕾, 赵敏, 魏兴东. 产漆酶细菌研究方法进展. 生物技术, 2010, 20(4): 92-95.
- [11] 黄俊, 王行国. *Klebsiella* sp. 601 细菌漆酶的鉴定及性质. 化学与生物工程, 2006, 23(3): 31-34.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 253-298.
- [23] 刘振花, 陈立新, 王琳琳. 红松阔叶混交林不同演替阶段土壤活性有机碳的研究. 土壤通报, 2009, 40(5): 1098-1103.
- [24] 李金钟, 李中华, 刘利平. 罗尔斯顿菌属和亲铜菌属的研究进展. 国际检验医学杂志, 2008, 29(5): 437-441.
- [27] 赵萍, 亓文静, 王雅, 吴灿军, 林樱姬, 王莉, 杨明峰. 两株有机磷农药降解菌的分离鉴定及降解特性. 兰州理工大学学报, 2010, 36(3): 86-90.
- [28] 周元祥, 石倩倩, 叶红曼. 高效溴氨酸脱色菌的分离鉴定及其特性研究. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2010, 33(7): 1057-1061.

CONTENTS

Responses of sandy beach nematodes to oxygen deficiency: microcosm experiments	HUA Er, LI Jia, DONG Jie, et al (3975)
Allometric relationship between mean component biomass and density during the course of self-thinning for <i>Fagopyrum esculentum</i> populations	LI Lei, ZHOU Daowei, SHENG Lianxi (3987)
Automatic site selection of sight-seeing route in ecotourism destinations based on landscape perception sensitivity	LI Jifeng, LI Renjie (3998)
Emergy evaluation for sustainability of Biogas-linked agriculture ecosystem: a case study of Gongcheng county	YANG Jin, CHEN Bin, LIU Gengyuan (4007)
Spatial heterogeneity of vegetation coverage and its temporal dynamics in desert steppe, Inner Mongolia	YAN Liang, ZHOU Guangsheng, ZHANG Feng, et al (4017)
Soil conservation value flow processes of two typical grasslands	PEI Sha, XIE Gadi, LI Shimei, et al (4025)
Spatial distribution of carbon storage in a 13-year-old <i>Pinus massoniana</i> forest ecosystem in Changsha City, China	WU Tao, PENG Chonghua, TIAN Dalun, et al (4034)
Colonization rate and diversity of AM fungi in the rhizosphere of seven medicinal plants in Xiamen	JIANG Pan, WANG Mingyuan (4043)
Effects of Cd, Low Concentration Pb/Cd on the contents of phenolic acid and simple glucides exuding from winter wheat seedlings root and the relationship between them and rhizosphere soil microbial activity	JIA Xia, DONG Suiming, ZHOU Chunjuan (4052)
The community structure of laccase-like multicopper oxidase-producing bacteria in soil of Liangshui Nature Reserve	ZHAO Dan, GU Huiqi, CUI Daizong, et al (4062)
Effects of soil rhizosphere microbial community and soil factors on arbuscular mycorrhizal fungi in different salinized soils	LU Xinping, DU Qian, YAN Yongli, et al (4071)
The effects of inoculation with phosphate solubilizing bacteria <i>Bacillus megaterium</i> C4 in the AM fungal hyphosphere on soil organic phosphorus mineralization and plant uptake	ZHANG Lin, DING Xiaodong, WANG Fei, et al (4079)
Soil carbon, nitrogen and phosphorus ecological stoichiometry of <i>Phragmites australis</i> wetlands in different reaches in Minjiang River estuary	WANG Weiqi, WANG Chun, ZENG Congsheng, et al (4087)
Dynamics of soil microbial biomass during early fine roots decomposition of three species in alpine region	WU Zhichao, WU Fuzhong, YANG Wanqin, et al (4094)
Effects of simulated precipitation on apparent carbon flux of biologically crusted soils in the Gurbantunggut Desert in Xinjiang, Northwestern China	WU Lin, SU Yangui, ZHANG Yuanming (4103)
Changes in photosynthetic properties, ultrastructure and root vigor of <i>Dendrobium candidum</i> tissue culture seedlings during transplantation	PU Xiaozhen, YIN Chunying, ZHOU Xiaobo, et al (4114)
Analysis of dry matter accumulation and translocation for winter wheat cultivars with different yields on dryland	ZHOU Ling, WANG Zhaohui, LI Fucui, et al (4123)
Impact evaluation of low temperature to yields of maize in Northeast China based on crop growth model	ZHANG Jianping, WANG Chunyi, ZHAO Yanxia, et al (4132)
Spatiotemporal variations in the reference crop evapotranspiration on the Loess Plateau during 1961—2009	LI Zhi (4139)
Eco-physiological responses of <i>Phragmites australis</i> to different water-salt conditions in Momoge Wetland	DENG Chunnuan, ZHANG Guangxin, LI Hongyan, et al (4146)
Comparative study of different earthworm sampling methods	FAN Ruqin, ZHANG Xiaoping, LIANG Aizhen, et al (4154)
Geographic variation in longevity and fecundity of the Asian corn borer, <i>Ostrinia furnacalis</i> Guenée (Lepidoptera: Crambidae)	TU Xiaoyun, CHEN Yuansheng, XIA Qinwen, et al (4160)
Analysis on grasshopper spatial heterogeneity and pattern of natural grass in upper reaches of Heihe	ZHAO Chengzhang, LI Lili, WANG Dawei, et al (4166)
Inhibition effects of ethyl acetate extracts of <i>Momordica charantia</i> leaves on the experimental population of <i>Spodoptera litura</i>	LOU Ying, LING Bing, XIE Jiefeng, et al (4173)
Feeding habits of <i>Lateolabrax maculatus</i> in Yangtze River estuary	HONG Qiaoqiao, ZHUANG Ping, YANG Gang, et al (4181)
Genetic structure of <i>Gymnodontichus pachycheilus</i> from the upper reaches of the Yellow River as inferred from mtDNA control region	SU Junhu, ZHANG Yanping, LOU Zhongyu, et al (4191)
Toxicity mechanism of Cadmium-induced reactive oxygen species and protein oxidation in testes of the frog <i>Rana nigromaculata</i>	CAO Hui, SHI Cailei, JIA Xiuying (4199)
The diversity of scarab beetles in grassland cattle dung from North China	FAN Sanlong, FANG Hong, GAO Chuanbu, et al (4207)
Spatial relationships among <i>Empoasca vitis</i> (Gothé) and <i>Toxoptera aurantii</i> (Boyer) and natural enemies in tea gardens of autumn-winter season in Hefei suburban	YANG Lin, GUO Hua, BI Shoudong, et al (4215)
Effects of vegetation, elevation and human disturbance on the distribution of large- and medium-sized wildlife: a case study in Jiuzhaigou Nature Reserve	ZHANG Yue, LEI Kaiming, ZHANG Yuke, et al (4228)
Research of typical EIPs based on the social network analysis	YANG Lihua, TONG Lianjun (4236)
Exergy-based life cycle accounting of household biogas system: a case study of Gongcheng, Guangxi	QI Jing, CHEN Bin, DAI Jing, et al (4246)
Review and Monograph	
The effects of changes in hydrological regimes and salinity on wetland vegetation: a review	ZHANG Guangxin (4254)
Advances in research on the seed bank of a saline-alkali meadow in the Songnen Plain	MA Hongyuan, LIANG Zhengwei, LÜ Bingsheng, et al (4261)
A new landscape expansion index: definition and quantification	WU Pengfei, ZHOU Demin, GONG Huili (4270)
Scientific Note	
Response of photosynthetic characteristics of <i>Psathyrostachys huashanica</i> Keng to drought stress	LI Qian, WANG Ming, WANG Wenwen, et al (4278)
The antifouling activities of <i>Callyspongia</i> sponge extracts	CAO Wenhao, YAN Tao, LIU Yonghong, et al (4285)

《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态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13期 (2012年7月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 32 No. 13 (July, 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:100077	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

9 771000 093125

1 3>