

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

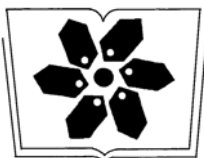
Acta Ecologica Sinica



第34卷 第11期 Vol.34 No.11 **2014**

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 34 卷 第 11 期 2014 年 6 月 (半月刊)

目 次

前沿理论与学科综述

土壤大孔隙流研究现状与发展趋势..... 高朝侠,徐学选,赵娇娜,等 (2801)

能源基地生态修复

我国大型煤炭基地建设的生态恢复技术研究综述..... 吴 钢,魏 东,周政达,等 (2812)

国家大型煤电基地生态环境监测技术体系研究——以内蒙古锡林郭勒盟煤电基地为例.....

..... 魏 东,全 元,王辰星,等 (2821)

基于 DPSIR 模型的国家大型煤电基地生态效应评估指标体系 周政达,王辰星,付 晓,等 (2830)

西部干旱区煤炭开采环境影响研究..... 雷少刚,卞正富 (2837)

露天煤矿区生态风险受体分析——以内蒙古平庄西露天煤矿为例..... 高 雅,陆兆华,魏振宽,等 (2844)

草原区矿产开发对景观格局和初级生产力的影响——以黑岱沟露天煤矿为例.....

..... 康萨如拉,牛建明,张 庆,等 (2855)

三七对土壤中镉、铬、铜、铅的累积特征及健康风险评价 林龙勇,阎秀兰,廖晓勇,等 (2868)

某焦化场地土壤中多环芳烃分布的三维空间插值研究..... 刘 庚,毕如田,权 腾,等 (2876)

个体与基础生态

杉木人工混交林对土壤铝毒害的缓解作用 雷 波,刘 彬,罗承德,等 (2884)

基于 $\delta^{15}\text{N}$ 稳定同位素分析的人工防护林大型土壤动物营养级研究 张淑花,张雪萍 (2892)

铅镉抗性菌株 JB11 强化植物对污染土壤中铅镉的吸收 金忠民,沙 伟,刘丽杰,等 (2900)

陕北地区石油污染土壤中不动杆菌属的筛选、鉴定及降解性能 王 虎,吴玲玲,周立辉,等 (2907)

祁连山高山植物根际土放线菌生物多样性..... 马爱爱,徐世健,敏玉霞,等 (2916)

新疆沙冬青 AM 和 DSE 真菌的空间分布 姜 桥,贺学礼,陈伟燕,等 (2929)

聚糠茶水剂对不同积温带玉米花后叶片氮同化的影响..... 高 娇,董志强,徐田军,等 (2938)

内蒙古河套灌区玉米与向日葵霜冻的关键温度..... 王海梅,侯 琼,云文丽,等 (2948)

四种类型栓皮栎栲胶含量..... 尹艺凝,张文辉,何景峰,等 (2954)

食物胁迫对翅二型丽斗蟋飞行肌和繁殖发育的影响..... 吴红军,赵吕权,曾 杨,等 (2963)

颜色对梨小食心虫产卵选择性的影响..... 杨小凡,马春森,范 凡,等 (2971)

缓释单萜类挥发物对落叶松毛虫行为及落叶松主要防御蛋白的影响..... 林 健,刘文波,孟昭军,等 (2978)

种群、群落和生态系统

黄土丘陵沟壑区不同植被恢复格局下土壤微生物群落结构 胡婵娟,郭 雷,刘国华 (2986)

刺参池塘底质微生物群落功能多样性的季节变化..... 闫法军,田相利,董双林,等 (2996)

基于 DGGE 技术的茯砖茶发花过程细菌群变化分析 刘石泉,胡治远,赵运林 (3007)

景观、区域和全球生态

中国区域间隐含碳排放转移..... 刘红光,范晓梅 (3016)

西南地区退耕还林工程主要林分 50 年碳汇潜力 姚 平,陈先刚,周永锋,等 (3025)

青海湖流域草地植被动态变化趋势下的物候时空特征..... 李广泳,李小雁,赵国琴,等 (3038)

黑龙江省温带森林火灾碳排放的计量估算..... 魏书精,罗碧珍,孙 龙,等 (3048)

三峡库区森林植被气候生产力模拟..... 潘 磊,肖文发,唐万鹏,等 (3064)

三峡水库支流拟多甲藻水华的形成机制..... 朱爱民,李嗣新,胡 俊,等 (3071)

流域库坝工程开发的生物多样性敏感度分区..... 李亦秋,鲁春霞,邓 欧,等 (3081)

城乡与社会生态

基于集对分析的京津冀区域可持续发展协调能力评价..... 檀菲菲,张 萌,李浩然,等 (3090)

江西省自然保护区发展布局空缺分析 黄志强,陆 林,戴年华,等 (3099)

鄱阳湖生态经济区生态经济指数评价 黄和平,彭小琳 ,孔凡斌,等 (3107)

基于有害干扰的中国省域森林生态安全评价..... 刘心竹,米 锋,张 爽,等 (3115)

期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 328 * zh * P * ¥90.00 * 1510 * 35 * 2014-06



封面图说: 三峡库区森林植被——三峡地区属亚热带区域,山高坡陡、地形复杂、物种丰富,森林是其最重要的自然资源之一,其面积占到库区总面积的 37%左右,库区内现有森林可初步分为 2 个植被型组,8 个植被型,18 个群系组,44 个群系,102 个群丛,主要树种有马尾松、杉树、柏树等,低海拔处多为落叶阔叶林、常绿阔叶林,较高海拔分布有针阔混交林、针叶混交林、灌木林等,人工林主要有经济林、竹林等。对三峡库区森林气候生产力进行模拟,分析库区森林植被的生产力并进行预测,可以为三峡库区的生态建设决策提供科学依据。

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

DOI: 10.5846/stxb201308052024

刘石泉, 胡治远, 赵运林. 基于 DGGE 技术的茯砖茶发花过程细菌群落变化分析. 生态学报, 2014, 34(11): 3007-3015.

Liu S Q, Hu Z Y, Zhao Y L. Analysis of bacterial flora during the fuzhuan fermentation process of fuzhuan brick tea production based on DGGE technology. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(11): 3007-3015.

基于 DGGE 技术的茯砖茶发花过程细菌群落变化分析

刘石泉^{1,2}, 胡治远², 赵运林^{2,*}

(1. 湖南农业大学生物科学与技术学院, 长沙 410128; 2. 湖南城市学院化学与环境工程学院, 益阳 413000)

摘要:变性梯度胶电泳是当前微生物生态学研究重要技术之一。为研究茯砖茶发花过程中细菌群落结构和种类, 对发花过程中不同时段细菌 16S rDNA 的 V3 可变区扩增, 经变性梯度胶电泳 (DGGE) 后, 对细菌 DGGE 条带进行克隆、测序和比对。结果表明, 在发花过程的第 0—4 天、6—8 天、10—14 天茯砖茶发花存在 3 个差异较大的细菌优势种群结构的演变; 从 16SrDNA 的 V3 可变区比对结果证明黑毛茶发花过程中有短波单胞菌属、诺卡氏菌属、新鞘脂菌属、突那梭菌属、韦龙氏假单胞菌属、乳杆菌属、克雷伯氏菌属以及不可培养 ϵ -变形菌、腐败螺旋菌属、粘球菌属、根瘤菌属和 6 种未知分类地位的不可培养细菌, 说明采用 DGGE 指纹图谱能更系统、更真实地反映茯砖茶发花发酵过程中细菌群落结构和多样性变化。

关键词:茯砖茶; 发花发酵; 变性梯度凝胶电泳 (DGGE); 细菌群落

Analysis of bacterial flora during the fahua-fermentation process of fuzhuan brick tea production based on DGGE technology

LIU Shiquan^{1,2}, HU Zhiyuan², ZHAO Yunlin^{2,*}

1 College of Biology and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2 College of Chemistry and Environmental Engineering, Hunan City University, Yiyang 413000, China

Abstract: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is one of the most important and commonly used techniques in studies of microbial molecular ecology. DGGE has been widely used in the analysis of community structures and biodiversity of bacteria, cyanobacteria, archaea, miniature eukaryotes, eukaryotes, and viruses. This technique can be used for the reliable analysis of multiple samples at the same time. It is suitable for the surveillance of microbial population changes over both space and time, and is used to probe microbial community composition by DNA sequence analysis. This technology can overcome the limitations associated with traditional analysis techniques, such as cultivation, purification, and microscopy. In this research, DGGE spectra analysis was used to examine the microbial diversity during the Fahua-fermentation process of Fuzhuan Brick Tea production. To explore the bacterial community structure during this process, we collected Fuzhuan Brick Tea samples at days 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 of the Fahua-fermentation process. Total genomic DNA was extracted from each of the samples, and the V3 variable region of the 16S rDNA gene was amplified. The amplified products were separated by DGGE. The separated DGGE bands were extracted and gel-purified then ligated into the pEASY-T vector. Resultant plasmids were transformed into electrocompetent *Escherichia coli* DH5 α cells, and positive clones were identified by blue white screening experiment. Plasmids from the positive clones were then extracted and sequenced, and the resulting sequences were submitted to the GenBank database. Using the BLASTN tool to carry out homology comparisons, we identified sequences in the database that were most similar to the 16S rDNA sequences amplified from the Fahua-

基金项目:湖南省自然科学基金项目 (13JJ6074); 湖南省高校产学研合作示范基地产业化项目 (13CY025, 11CY003, 11CY004); 湖南省科学技术厅科技计划国际合作项目 (2012WK2013); 益阳市科学技术局科技计划项目 ([2013]YK1323)

收稿日期:2013-08-05; **网络出版日期:**2014-02-24

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zyl8291290@163.com

fermentation community samples. The results showed three distinctive kinds of bacterial community structure, correlating to fermentation times of 0—4 days, 6—8 days, and 10—14 days. Alignments of the V3 variable regions of the 16S rDNA genes showed that samples contained *Brevundimonas aurantiaca*, *Millisia brevis*, *Novosphingobium* sp, *Clostridium ultunense*, *Pseudomonas veronii*, *Lactobacillus plantarum*, *Klebsiella pneumoniae*, uncultured *Epsilonproteobacteria*, uncultured *Saprospiraceae* bacterium, uncultured *Myxococcales* bacterium, uncultured *Rhizobiales* bacterium, and six kinds of unculturable bacteria. This analysis technique provided a detailed spectrum of bacteria at the different time periods during the Fahua-fermentation process, and showed that bacterial species present during this stage of Fuzhuan Brick Tea production are abundant. Amongst the bacterial species, nine strains belonged to the *Proteobacteria*, three strains were identified as *Firmicutes*, one strain belonged to the *Actinobacteria*, and one strain belonged to the phylum *Bacteroidetes*. We also identified six strains with the greatest similarity to unknown unculturable bacteria, which will require further analysis. This study also identified *K. pneumoniae*, *B. aurantiaca*, *P. veronii*, and a *Myxococcales* bacterium in the Fahua-fermentation process samples, all of which are generally considered to be conditionally pathogenic bacteria. The roles of these species during the fermentation process remain unknown and will require further investigation. Overall, the results of the current study indicate that DGGE fingerprinting is a useful technique to obtain a comprehensive, detailed bacterial community structure and estimate of diversity variation from samples collected during Fahua-fermentation in the production of Fuzhuan Brick Tea.

Key Words: fuzhuan brick tea; fahua-fermentation; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); bacterial flora

茯砖茶是我国古老茶类——黑茶中的高档品种,据《明史·茶法》记载,早在明嘉靖三年(公元1524年),茯砖茶就被规定为运往西北供少数民族消费的官茶^[1],可见其在历史上的重要地位。茯砖茶属于完全发酵茶,其加工工序在黑茶中最为复杂且耗时较长,包括毛茶筛分、拼配、气蒸渥堆、压制定型、发花干燥、成品包装等步骤^[2],各个环节的控制对保证其品质稳定至关重要。过去茯砖茶消费主要集中在边疆少数民族区域,故又被称为“边销茶”。而近年来随着相关研究深入,大量人体和动物实验资料表明茯砖茶对高血压、高血脂、肥胖、糖尿病等疾病具备良好的保健效果,并有提高机体免疫力的作用^[3-8],因而获得了“富贵病杀手”的美誉,进而受到广大国内外消费者的关注与青睐,大有超过昔日普洱茶热潮之势。

作为完全发酵茶,茯砖茶独特品质的形成与微生物作用密切相关,微生物发酵给予了茯砖茶独特的菌花香、醇厚的滋味以及在保健功效方面的提升^[9-10],之前研究者们对茯砖茶中微生物的研究,主要是围绕优势菌群——冠突散囊菌(俗称金花菌)发生、生长工艺(俗称发花工艺)进行,而对于发花过程中同时存在的其他微生物特别是细菌菌群的系统性研究较少见于报道。发花过程中细菌的存在对发花

质量、茯砖茶品质有着重要的影响,要提高茯砖茶的质量必须对发花过程中细菌的动态变化加以深入研究,但对发花过程中细菌研究主要集中在平板分离计数、鉴定上^[11],不能全面反映茶叶微生物群落的多样性^[12],部分“存在但无法培养”的微生物不能被有效分离和鉴定,因而有待于新技术的投入与使用。分子生物学方法如免培养 DGGE 技术使得研究者能够在分子水平上对微生物群落多样性进行研究,并具有可靠性强、重现率高等优点,适宜对较为复杂的环境中微生物种群结构进行分析^[13-15]。

本研究采用 DGGE 技术,对益阳茶厂有限公司(湖南产销量最大的茯砖茶生产企业)生产线上不同发花工艺期的茯砖茶样品中细菌群落的结构进行分析,以期能为茯砖茶发花工艺改进研究提供更多信息,为揭示茯砖茶这一发酵食品品质与微生物群落结构关系的深入研究提供实验支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 茯砖茶样品采集

在益阳茶厂有限公司茯砖茶生产线上采集同一批压制的茯砖茶作为实验样品,分别在压制后进入发花房的第0天、2天、4天、6天、8天、10天、12天、

14 天取样,并编号为 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8 (采样时间为 2013 年 3 月 28 日—4 月 11 日)。

1.1.2 主要试剂

引物 338F(CCT ACG GGA GGC AGC AG)、GC-338F(CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGG CGG GGC GGG GGC GCG GGG GG CCT ACG GGA GGC AGC AG)和 518R(ATT ACC GCG GCT GCT GG)由北京美亿美生物技术有限公司合成、扩增相关试剂均购自北京美亿美生物技术有限公司;聚合酶链式反应(PCR)产物纯化回收采用 AXYGEN 公司 DNA Gel Extraction Kit 试剂盒;采用 OMEGA 公司 Poly-Gel DNA Extraction Kit 回收 DGGE 目的条带;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器与设备

PTC220 型 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);Gel-Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);DGGE-2401 变性梯度凝胶电泳仪(美国 C.B.S.scientific 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 茶叶细菌总 DNA 提取

用 Shaheen BH^[16] 方法提取样本细菌基因组 DNA,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 样品,置于-20℃冰箱内保存。

1.2.2 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

以不同样品组 DNA 为模板、用通用引物 GC-338F 和 518R 扩增 16S rDNA 的 V3 高变区序列^[17-18]。

PCR 扩增体系为:10× PCR buffer 5 μL; dNTP (2.5 mmol/L) 3.2 μL; rTaq (5 U/μL) 0.4 μL; GC-338F(20 mmol/L) 1 μL; 518R(20 mmol/L) 1 μL; 模板 DNA 100 ng;补 ddH₂O 至 50 μL。

PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 30 s、30 个循环;最终 72℃延伸 10 min。

PCR 产物采用 AXYGEN 公司 DNA Gel Extraction Kit 纯化回收。

1.3.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳

将 PCR 所得产物进行 DGGE 分析,PCR 产物取 10 μL,选择变性梯度为 35%—55%、浓度为 8%的聚丙烯酰胺凝胶(化学变性剂为 100%尿素 7 mol/L 和 40%的去离子甲酰胺)在 1×TAE 缓冲液中 150 V 60

℃下电泳 4 h,变性梯度凝胶电泳(DGGE)完毕后、采用银染法染色显色。

1.3.4 DGGE 凝胶条带回收测序

用灭菌手术刀切下待回收 DGGE 条带,采用 OMEGA 公司 Poly-Gel DNA Extraction Kit 回收目的条带。

以 2 μL 回收产物为模板,338F(CCT ACG GGA GGC AGC AG)/518R(ATT ACC GCG GCT GCT GG)为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系(50 μL)为:10× PCR buffer 5 μL; dNTP (2.5 mmol/L) 3.2 μL; rTaq(5 U/μL)0.4 μL;338F(20 mmol/L)1 μL;518R(20 mmol/L)1 μL;模板 DNA 1 μL;补 ddH₂O 至 50 μL。PCR 扩增程序为:94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;最后,72℃延伸 10 min。

切胶回收重新扩增的 DNA 片段,纯化后连接到 pEASY-T 载体上,并转化至 DH5α 感受态细胞中,筛选阳性克隆,由北京美亿美生物技术有限公司对插入细菌 16S rDNA 片段进行序列测定。

1.3.5 序列片段分析

将序列提交到 GenBank 数据库。在 GenBank 中使用 Blast 程序进行同源性比较,获得最相似典型菌株的 16S rDNA 序列^[19]。

1.4 多样性分析

利用分析软件(Quantity One 4.2.3, Bio-Rad) DGGE 图谱进行聚类 and 相似性分析。多样性分析用多样性指数 *H*、均匀性指数 *E*、丰度指数 *S*,具体计算参见 Eichner C A^[20] 和 Sekiguchi H^[21]。利用 DNASTAR 软件包中的 SeqMan 程序将 DNA 序列进行人工校对,并将所有校对后的序列方向统一为正向,通过在 NCBI(美国国立生物技术信息中心)进行 Blast 检索,根据比对结果获得序列对应的细菌种属信息。

2 结果与分析

2.1 样本基因组 DNA 提取

经凝胶电泳检测,各组样品的细菌基因组 DNA 能够较高质量的提取。

2.2 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增

以 GC-338F 和 518R 为引物扩增 16S rDNA 序列、经 2%的琼脂糖凝胶电泳检测,获得约 200 bp 的

DNA 片段预期 DNA 片段(图 1),用于 DGGE 分析。

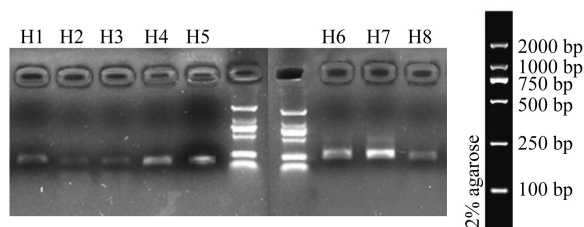


图 1 PCR 扩增的 16S rDNA 部分序列琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 PCR amplification agarose gel electrophoresis of 16S rDNA partial sequence

2.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳

样品细菌种群的 16S rDNA PCR 产物的变性梯度凝胶电泳分析结果如图 2。

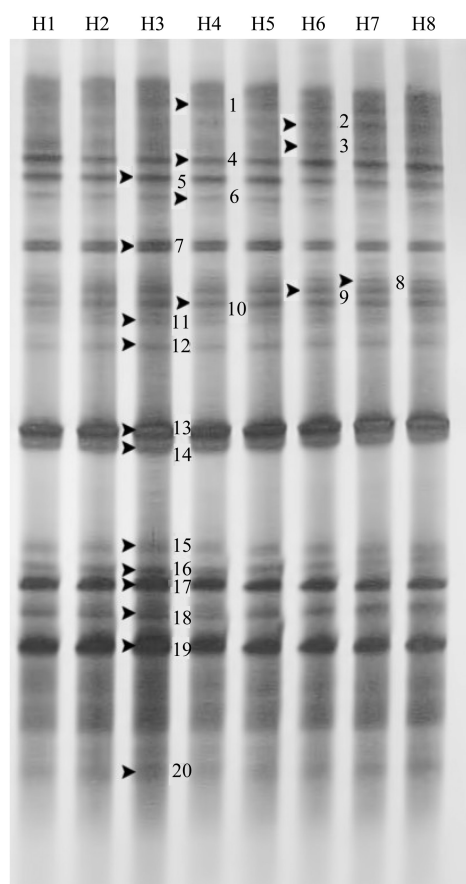


图 2 不同发花段细菌 16S rDNA-PCR 产物 DGGE 图谱

Fig. 2 Bacterial 16SrDNA-PCR product of DGGE map in different pile-fermentation stage

从左至右上样顺序: H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8; 图中 1—20 分别代表 2.4 中回收测序的条带

由图 2 可知,在茯砖茶的发花过程中,16S rDNA 的 V3 高变区序列类型较为丰富,表 1 数据表明,多

样性指数 H 在茶叶进入发花房发花的早期阶段(0—2 d)略有降低,随后则稳定升高,在发花末期(14 d)上升到最高水平 2.936。均匀性指数 E 的变化波动较小,同多样性指数 H 相似呈现初期略下降而后上升的趋势。丰度指数 S 变化趋势则与多样性指数 H 基本对应,在样品 H6—H8 中稳定为 20,说明随着茯砖茶发花的进行,茶叶内细菌群落数量是呈上升趋势的,这和之前的研究者们对茯砖茶发花微生物的检测结果有一定差异,推测是由于在之前茶叶中微生物检测主要采用平板培养观察计数法,部分不能被培养的细菌未能进入统计所致。对于茯砖茶发花过程中微生物的观察结果,文献检索表明主要集中在散囊菌属和其他一些霉菌方面,许多研究者们认为“茯砖茶内部独特的环境及营养组成最适合冠突散囊菌生长,而于其他微生物生长不利”,加上黑毛茶本身具备一定抑菌作用^[22],从而简单的推测茯砖茶发花过程中较少有细菌生长代谢的观念,实验证明细菌在发花过程中始终存在,而且发花后期细菌的群落结构趋向稳定,因而忽略细菌在茶叶中的作用,这种观念存在一定的局限性。

由图 3 的主成分分析(PCA)可知,H1、H2 分布在第二象限;H3、H4 分布在第二象限;H6、H7、H8 分布在第一象限,H5 单独分布在第三象限,而由图 4 的带型进化树也验证了这种变化,H1、H2、H3 相似性较近;H4、H5 相似性较近;H6、H7、H8 相似性较近,这说明在 14 d 的发花过程中,细菌种群的构成变化较大,分别在发花的 0—4 d、6—8 d、10—14 d 茶叶内存在着 3 个差异较大的细菌优势种群结构的演变。推测是在茶叶经过高温气蒸压制后,一部分耐热的细菌以芽孢的方式存活了下来并在茶叶内生长繁殖,而从发花的第 3—4 天起,随着冠突散囊菌为主导的散囊菌属微生物快速生长,而冠突散囊菌的代谢产物对部分细菌具备一定抑制作用^[23],这使得受到拮抗作用的菌群慢慢消失,而取代以能与冠突散囊菌共生的细菌构建优势群落。同时,随着发花过程的进行,烘房温度升高,茯砖茶内水分含量越来越低(由初期的 24%—26%到结束时的 12%以下)。这些也影响了茶叶内细菌结构组成,使得细菌种群结构向更耐高温、干燥的趋势变化。

表 1 不同发花阶段细菌群落特征

Table 1 Characteristics of bacterial community in different Fahua-fermentation stage				
样品编号 Number of samples	发花时间/d Fahua-fermentation stage	多样性指数 <i>H</i> Shannon-Wiener Index	均匀性指数 <i>E</i> Evenness	丰度指数 <i>S</i> Richness
H1	0d	2.781	0.962	18
H2	2d	2.771	0.959	18
H3	4d	2.844	0.966	19
H4	6d	2.846	0.967	19
H5	8d	2.858	0.971	19
H6	10d	2.896	0.967	20
H7	12d	2.924	0.976	20
H8	14d	2.936	0.980	20

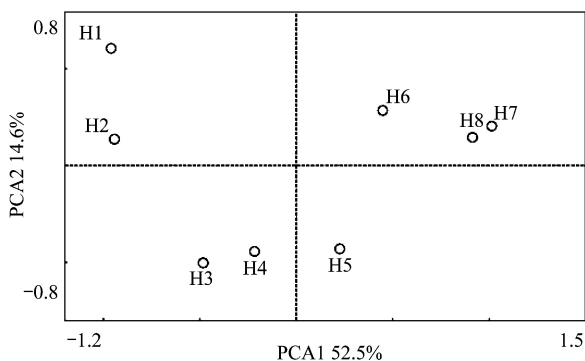


图 3 不同发花阶段主成分分析 (PCA) 分析

Fig. 3 Principal Component Analysis (PCA) in different Fahua-fermentation stage

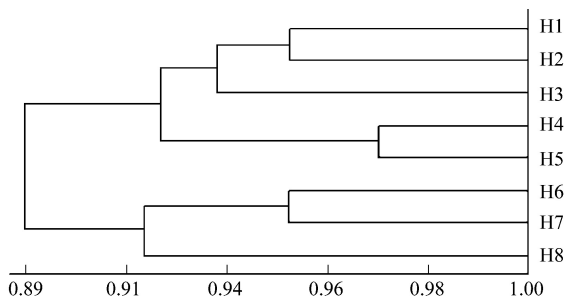


图 4 不同发花阶段进化树

Fig.4 Evolution tree of different Fahua-fermentation stage

2.4 DGGE 凝胶条带回收测序及序列分析

DGGE 凝胶条带回收后,以 338F/518R 为引物进行 PCR 扩增,获得约 200 bp 的 DNA 片段。PCR 产物纯化后连接到 pEASY-T 载体上,转化至 DH5 α 感受态细胞中,筛选阳性克隆测序。测序结果递交 GenBank 数据库,并于 GenBank 中的序列进行比对,得到不同条带所代表的不同细菌类型。每个回收条带选取 3 个克隆进行重复检验比较,编号 band1、band2、band3、...、band20 表示图 2 中位置 1—20 条

带进行了序列测定,将序列提交到 GenBank 数据库,在 GenBank 中使用 Blast 程序进行同源性比较,获得最相似典型菌株的 16S rDNA 序列如表 2 所示,根据这些 DGGE 带谱所代表的微生物即可判定茯砖茶不同发花阶段细菌群落的组成状况。

一般情况下认为,两种细菌 16S rDNA 序列同源性小于 98% 时属于不同种,而同源性小于 93%—95% 时,则属于不同的属^[24],因此,从比对结果可以获知,在茯砖茶发花过程中有短波单胞菌属 (*Brevundimonas aurantiaca*)、诺卡氏菌属 (*Millisia brevis*)、新鞘脂菌属 (*Novosphingobium* sp)、突那梭菌属 (*Clostridium ultunense*)、韦龙氏假单胞菌属 (*Pseudomonas veronii*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus plantarum* KC965107; *Lactobacillus plantarum* KC845197)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella pneumonia* KC609741; *Klebsiella pneumoniae* KC431795; *Klebsiella* sp. XC-08) 以及不可培养 ϵ -变形菌 (*Uncultured epsilon proteobacterium*)、不可培养腐败螺旋菌属 (*Uncultured Saprospiraceae bacterium*)、不可培养粘球菌属 (*Uncultured Myxococcales bacterium*)、不可培养根瘤菌属 (*Uncultured Rhizobiales bacterium*) 和未知分类地位的不可培养细菌 *Uncultured bacterium* (HE860554)、*Uncultured bacterium* (GQ866159)、*Uncultured bacterium* (KC304531)、*Uncultured bacterium* (HQ889765)、*Uncultured bacterium* (HE663286)、*Uncultured bacterium* (JQ383874) 六种。

在检测到的 20 种细菌当中,诺卡氏菌^[25] 实验证明能分泌生物活性成分,对增强机体免疫功能有着一定的作用,具有抗病原微生物感染及明显的抑肿瘤作用,新鞘脂菌^[26] 属等能降解呋喃丹,短波单

胞菌^[27]能产 L-脯氨酸,植物乳杆菌^[28]可产生有机酸,此外还能产生多种酶如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等,显然对茯砖茶发花过程中 pH 值变化及茶叶风味和品质的形成起着重要作用。

发花在茯砖茶的生产工艺中又被称为“第二次发酵”,在之前茶叶原料还有着一次发酵过程即“渥堆”,渥堆之后的茶叶内成分得到微生物初步降解,茶叶纤维被软化,并且一些微生物在茶叶内开始形成优势种群,有利于之后的发花。温琼英等^[29]对茯砖茶渥堆中微生物多样性进行检测,认为主要存在的细菌包括无芽孢小杆菌、芽孢杆菌、乳杆菌、金黄色葡萄球菌等,且在渥堆的初期还有大量其他细菌存在,由于当时技术条件限制未能精确鉴定到种。而方祥、赵龙飞等^[30-31]对同属黑茶的普洱茶渥堆过程中微生物的检测结果显示,乳杆菌属、芽孢杆菌属、短杆菌属、球菌属都是普洱茶发酵中的常见微生物,其中芽孢杆菌属的细菌能产生丰富的多酚氧化酶和过氧化物酶等,有利于缩短发酵时间及提高产

品品质。通过与本次检测的结果对比可知,茶叶无论是在渥堆发酵还是发花过程中细菌的群落构成均较为丰富,且其中一部分渥堆细菌并未因为气蒸压制而完全失去活力,而是通过芽孢等休眠状态过渡到发花阶段继续生长繁殖。

付秀娟^[32]从自然发酵的普洱茶内分离出了两株细菌 B-04、B-07,并制成发酵菌液用于接种发酵普洱茶,结果显示,两种细菌单菌种发酵的普洱茶内茶褐素、茶多酚、咖啡碱均有一定程度降低,且 B-07 分泌的果胶酶在发酵初期时活性较高,证明细菌在茶叶发酵过程中具有一定的积极意义。

另外,本次研究中也发现茶叶中存在克雷伯氏菌、短波单胞菌、假单胞菌和粘球菌等,姚静^[33]等也曾普洱茶中分离了类似细菌,这些微生物通常被认为是条件致病菌,可感染人和动物使其患病,既然能在茯砖茶发花过程样品中却被检出,那么说明它们对于茯砖茶发花肯定有一定影响,但对茶叶品质的利弊、以及具体作用机理还有待进一步研究。

表 2 DGGE 凝胶条带回收序列分析结果

Table 2 The analysis results of DGGE gel bands recovery sequence				
编号 Number	相似菌 Similar strain	相似度 Similarity	登录号 Accession number	分类 Classification
Band1	<i>Millisia brevis</i> (诺卡氏菌属)	99	NR042952	<i>Actinobacteria</i> (放线菌门)
Band2	<i>Uncultured Myxococcales bacterium</i> (不可培养粘球菌属)	99	AM936499	<i>Proteobacteria</i> (变形菌门)
Band3	<i>Novosphingobium</i> sp. (新鞘脂菌属)	100	HF936984	<i>Proteobacteria</i> (变形菌门)
Band4	<i>Brevundimonas aurantiaca</i> (短波单胞菌属)	100	KC855474	<i>Proteobacteria</i> (变形菌门)
Band5	<i>Uncultured bacterium</i> (不可培养细菌)	99	GQ866159	—
Band6	<i>Uncultured bacterium</i> (不可培养细菌)	98	HE860554	—
Band7	<i>Pseudomonas veronii</i> (韦龙氏假单胞菌属)	99	HQ825038	<i>Proteobacteria</i> (变形菌门)
Band8	<i>Uncultured epsilon proteobacterium</i> (不可培养 ϵ -变形菌)	99	AY191496	<i>Proteobacteria</i> (变形菌门)
Band9	<i>Uncultured Saprospiraceae bacterium</i> (不可培养腐败螺旋菌属)	91	EU283496	<i>Bacteroidetes</i> (拟杆菌门)
Band10	<i>Uncultured bacterium</i> (不可培养细菌)	99	KC304531	—
Band11	<i>Clostridium ultunense</i> (突那梭菌属)	99	GQ461825	<i>Firmicutes</i> (厚壁菌门)
Band12	<i>Klebsiella pneumonia</i> (克雷伯氏菌属)	99	KC609741	<i>Proteobacteria</i> (变形菌门)
Band13	<i>Uncultured bacterium</i> (不可培养细菌)	99	JQ383874	—
Band14	<i>Uncultured bacterium</i> (不可培养细菌)	99	HQ889765	—
Band15	<i>Uncultured Rhizobiales bacterium</i> (不可培养根瘤菌属)	100	JQ401320	<i>Proteobacteria</i> (变形菌门)
Band16	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (克雷伯氏菌属)	99	KC431795	<i>Proteobacteria</i> (变形菌门)
Band17	<i>Klebsiella</i> sp. XC-08(克雷伯氏菌属)	100	KC787534	<i>Proteobacteria</i> (变形菌门)
Band18	<i>Lactobacillus plantarum</i> (乳杆菌属)	100	KC965107	<i>Firmicutes</i> (厚壁菌门)
Band19	<i>Uncultured bacterium</i> (不可培养细菌)	99	HE663286	—
Band20	<i>Lactobacillus plantarum</i> (乳杆菌属)	99	KC845197	<i>Firmicutes</i> (厚壁菌门)

16S rDNA 的 V3 高变区序列进行聚类分析,结果如图 5

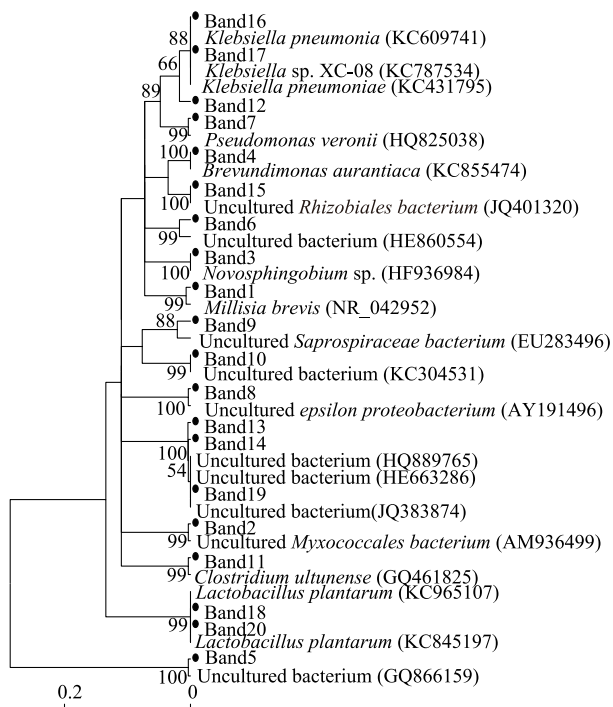


图 5 20 个条带建立的进化树
Fig.5 Evolution tree of 20 band

3 讨论

本研究通过 DGGE 技术对黑毛茶发花发酵中不同时间段的细菌群落结构进行分析,发现发花过程中细菌种类较为丰富,在比对出的细菌种类中, *Proteobacteria*(变形菌门)9 株、*Firmicutes*(厚壁菌门)3 株、*Actinobacteria*(放线菌门)1 株、*Bacteroidetes*(拟杆菌门)1 株,还有六株不可培养菌株(表 2),并且群落呈现较为规律的变化,三类差异较大细菌群落分别在发花的 0—4d、6—8d、10—14d 之间出现,通过对比茯砖茶中优势微生物冠突散囊菌的生长曲线^[34],可以发现早期的细菌群落随着冠突散囊菌的生长而受到抑制,而后期细菌与冠突散囊菌基本保持共生关系,细菌总数量随着发花的进行略有上升。其中有一部分细菌如放线菌、乳杆菌是存在于茯砖茶或普洱茶渥堆过程中的常见微生物,而另外一部分如克雷伯氏菌、短波单胞菌等在传统培养方法中都未曾检出过,因此 DGGE 指纹图谱在此更全面、更真实地反映了茯砖茶发花过程中细菌群落的结构和多样性变化。在利用现代分子技术解析茯砖茶发花细菌结构的基础上,进一步对细菌区系及其相互协同制约的代谢机制、以及与茯砖茶品质之间的具体

的关系有望成为今后黑茶研究的重点方向。

茯砖茶因其保健功效作为当代黑茶市场的新宠,发酵技术水平是决定其品质高低的重要因素,发酵相关微生物的研究深入,能更好的人工调控发酵工艺、进一步完善产品品质。以往由于细菌在茯砖茶的发酵过程中数量相对真菌处于劣势地位,再加上检测手段的限制,而被研究者们所忽视,我们的实验证实,细菌在发花过程中大量而且始终存在,我们要在茯砖茶精控发酵中取得进一步进展,就必须重视不同细菌在发酵过程中的作用,根据细菌种类和作用的程度,以不同条件加以控制,充分发挥有益菌种的协同作用,减少或杜绝有害菌的生长,并利用有益菌种的生物转化作用改善茯砖茶品质,提高发花效率,将茯砖茶制造技术提高到一个新的水平。

References:

- [1] Chen Z F. Chinese Tea. Shanghai: Shanghai Culture Press, 1992: 439-441.
- [2] Cai Z A, Tang H P. Hunan Dark Tea. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 2006: 12-68.
- [3] Wu X L, Liu Z H, Cao D, Jin L S, Lin Y. Effects of Fuzhuan Brick Tea on the adjustment of intestinal immune function in mice. Journal of Tea Science, 2013, 33(2): 125-130.
- [4] Fu D H, Liu Z H, Huang J A, Cai W L. Studies on Hyperlipidemia therapy compounds in Fuzhuan Tea. Journal of Tea Science, 2012, 32(3): 217-223.
- [5] Wang D, Huang J A, Ye X Y, Cao D, Zhang J W, Liu Z H. The Anti-obesity effects of Fuzhuan brick tea on high-fat-diet induced obesity in rats. Journal of Tea Science, 2012, 32(1): 81-86.
- [6] Xu X J, Huang J A, Xiao L Z, Yuan Y, Xiao W J. Effects of Fu Brick Tea and its formula on the content of TG in L-02 Steatotic Hepatocytes. Journal of Tea Science, 2011, 31(3): 247-254.
- [7] Xu X J, Hu Y B, Xiao W J. Effects of fermented *Camilla sinensis*, Fuzhuan tea, on egg cholesterol and production performance in Laying Hens. Agriculture and Food Science, 2012, (1): 6-10.
- [8] Manikandan R, Sundaram R, Thiagarajan R, Sivakumar M R, Meiyalagan V, Arumugam M. Effect of black tea on histological and immunohistochemical changes in pancreatic tissues of normal and Streptozotocin-induced diabetic mice (*Mus musculus*). Microscopy Research and Technique, 2009, 72(10): 723-726.
- [9] Fu D H, Liu Z H, Huang J A, Hao F, Wang F, Lei Y G. Variations of components of Fuzhuan tea during processing. Food Science, 2008, 29(2): 64-67.
- [10] Huang Q, Li Y P, Chen L J, Che K. Study on changes of active components in dark tea during liquid fermentation by *Eurotium*

- cristatum. Food Science, 2007, 28(12): 231-234.
- [11] Hu Z Y. Flora Diversity and Fermentation Process Codition of Fuzhuan Brick-tea in Hunan Area [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012.
- [12] Zhong W H, Cai Z C. Methods for studying soil microbial diversity. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(5): 899-904.
- [13] Liu W J, Bao Q H, Jirimitu, Qing M J, Chen X, Sun T, Li M, Zhang J, Yu J, Bilige M, Sun T, Zhang H. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. Microbiological Research, 2012, 167(2): 110-115.
- [14] Hesham Ael-L, Qi R, Yang M. Comparison of bacterial community structures in two systems of a sewage treatment plant using PCR-DGGE analysis. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(12): 2049-2054.
- [15] 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.
- [16] Humayoun S B, Bano N, Hollibaugh J T. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1030-1042.
- [17] Ampe F, Ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot J P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for Cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(12): 5464-5473.
- [18] Thompson J R, Marcelino L A, Polz M F. Heteroduplexes in Mixed-template amplifications: Formation, consequence and elimination by 'Reconditioning PCR'. Nucleic Acids Research, 2002, 30(9): 2083-2088.
- [19] Attwood T K, Parry-Smith D J, Luo J C. Fundamental Concepts of Bioinformatics. Beijing: Peking University Press, 2002: 97-113.
- [20] Eichner C A, Erb R W, Timmis K N, Wagner-Döbler I. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(1): 102-109.
- [21] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B H, Uchiyama H. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5142-5150.
- [22] Fu D H, Yu Z Y, Huang J A, Luo Z M. Research on the bacteriostatic effect of water extract of brick tea produced in different years. China Tea, 2011, 33(1): 10-12.
- [23] Li J L, Hu B H, Zhao Y B, Liu S C, Jiang Y J, Liu Z H. Anti-microbial activity of fermentation supernatants of *Eurotium cristatum*. Food Science, 2011, 32(11): 157-160.
- [24] Wang Z X, Xu Y, Zhou P J. Taxonomy of a new species of haloalkalophilic archaon. Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(2): 115-120.
- [25] Zhang Z L, Tang W L, Huang Y Z, Hong J J. Bioactivity of *Nocardia Rubra* cell. Microbiology, 2009, 36(3): 389-392.
- [26] Jing X T, Li Q F, Guo W, Kong X Y, Zhang L H. Research progress of Carbofuran-degrading bacteria. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(27): 15032-15034.
- [27] Zhao S J, Dou W F, Li H, Zhang D D, Shi J S, Xu Z H. Breeding of *brevundimonas diminuta* for L-proline and optimization of its fermentation conditions. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2012, 10(4): 21-25.
- [28] Wang S Q, Bao Y, Dong X M, Su F, Yao G Q, Zhang H P. Physiological function and application of *Lactobacillus Plantarum*. Journal of Agricultural Science and Technology, 2010, 12(4): 49-55.
- [29] Wen Q Y, Liu S C. Variation of the microorganism groups during the Pile-fermentation of Dark Green tea. Journal of Tea Science, 1991, 11(S1): 10-16.
- [30] Fang X, Chen D, Li J J, Zhao C Y, Li B, Huan G Z, Chen Z Z. Identification of microbial species in Pu-erh tea with different storage time. Modern Food Science and Technology, 2012, 24(2): 105-108, 160-160.
- [31] Zhao L F, Zhou H J. Study on the main microbes of Yunnan Pu-er tea during Pile-fermentation process. Journal of Shangqiu Teachers College, 2005, 21(2): 129-133.
- [32] Fu X J, Song W J, Xu Y Q, Li C W. Effects of different microorganisms on the fermentative process of Pu-er tea. Journal of Tea Science, 2012, 32(4): 325-330.
- [33] Yao J, Chen D, Zheng X Y, Wang Y. Isolation and molecular identification of the bacterial colonization during the pile fermentation process of Pu-erh tea. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(6): 2667-2668, 2671-2671.
- [34] Hu Z Y, Liu S C, Zhao Y L, Li L M, Liu S Q, Li Y Z. Dynamic microbial changes of Fuzhuan Brick Tea during processing and identification of the dominant fungi. Food Science, 2012, 33(19): 244-249.

参考文献:

- [1] 陈宗樊. 中国茶经. 上海: 上海文化出版社, 1992: 439-441.
- [2] 蔡正安, 唐和平. 湖南黑茶. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2006: 12-68.
- [3] 吴香兰, 刘仲华, 曹丹, 金莉莎, 林勇. 茯砖茶对小鼠肠道免疫功能调节作用的研究. 茶叶科学, 2013, 33(2): 125-130.
- [4] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 蔡汶莉. 茯砖茶降脂功能成分研究. 茶叶科学, 2012, 32(3): 217-223.
- [5] 王蝶, 黄建安, 叶小燕, 曹丹, 张健炜, 刘仲华. 茯砖茶减肥作用研究. 茶叶科学, 2012, 32(1): 81-86.

- [6] 徐小江, 黄建安, 肖力争, 袁勇, 肖文军. 茯砖茶及其配方对脂肪变性 L-02 肝细胞中 TG 含量的影响. 茶叶科学, 2011, 31(3): 247-254.
- [9] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 郝翻, 王芳, 雷玉国. 茯砖茶加工过程中主要化学成分的变化. 食品科学, 2008, 29(2): 64-67.
- [10] 黄群, 李彦坡, 陈林杰, 车科. 冠突散囊菌液态发酵过程中黑茶活性成分变化研究. 食品科学, 2007, 28(12): 231-234.
- [11] 胡治远. 湖南地区茯砖茶菌群多样性及发花工艺优化研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [15] 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.
- [19] (英)谈莲莎 (Attwood T K), (英)史密斯 (Parry-Smith D J) 著//罗静初译. 生物信息学概论. 北京: 北京大学出版社, 2002: 97-113.
- [22] 傅冬和, 余智勇, 黄建安, 罗珍美. 不同年份茯砖茶水提取物的抑菌效果研究. 中国茶叶, 2011, 33(1): 10-12.
- [23] 李佳莲, 胡博涵, 赵勇彪, 刘素纯, 姜越君, 刘仲华. 冠突散囊菌发酵液的抑菌作用. 食品科学, 2011, 32(11): 157-160.
- [24] 王振雄, 徐毅, 周培瑾. 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究. 微生物学报, 2000, 40(2): 115-120.
- [25] 张祝兰, 唐文力, 黄颖楨, 洪金基. 红色诺卡氏菌的生物活性. 微生物学通报, 2009, 36(3): 389-392.
- [26] 荆新堂, 李勤凡, 郭伟, 孔祥雅, 张丽慧. 呋喃丹降解菌的研究进展. 安徽农业科学, 2010, 38(27): 15032-15034.
- [27] 赵世杰, 窦文芳, 李会, 张旦旦, 史劲松, 许正宏. 缺陷短波单胞菌高产 L-脯氨酸菌株的选育及其发酵条件优化. 生物加工过程, 2012, 10(4): 21-25.
- [28] 王水泉, 包艳, 董喜梅, 苏芳, 姚国强, 张和平. 植物乳杆菌的生理功能及应用. 中国农业科技导报, 2010, 12(4): 49-55.
- [29] 温琼英, 刘素纯. 黑茶渥堆(堆积发酵)过程中微生物种群的变化. 茶叶科学, 1991, 11(S1): 10-16.
- [30] 方祥, 陈栋, 李晶晶, 赵超艺, 李斌, 黄国资, 陈忠正. 普洱茶不同贮藏时期微生物种群的鉴定. 现代食品科技, 2008, 24(2): 105-108, 160-160.
- [31] 赵龙飞, 周红杰. 云南普洱茶渥堆过程中的主要微生物初探. 商丘师范学院学报, 2005, 21(2): 129-133.
- [32] 付秀娟, 宋文军, 徐咏全, 李长文. 不同种类微生物对普洱茶发酵过程的影响. 茶叶科学, 2012, 32(4): 325-330.
- [33] 姚静, 陈迪, 郑晓燕, 王云. 普洱茶渥堆发酵过程中细菌种群的分离与分子鉴定. 安徽农业科学, 2013, 41(6): 2667-2668, 2671-2671.
- [34] 胡治远, 刘素纯, 赵运林, 李罗明, 刘石泉, 李燕子. 茯砖茶生产过程中微生物动态变化及优势菌鉴定. 食品科学, 2012, 33(19): 244-249.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol.34, No.11 June, 2014 (Semimonthly)

CONTENTS

Frontiers and Comprehensive Review

Review on macropore flow in soil GAO Zhaoxia, XU Xuexuan, ZHAO Jiaona, et al (2801)

Ecological Restoration

A summary of study on ecological restoration technology of large coal bases construction in China
..... WU Gang, WEI Dong, ZHOU Zhengda, et al (2812)

The ecology and environment monitoring technical systems in national large-scale coal-fired power base: a case study in Xilingol
League, Inner Mongolia WEI Dong, QUAN Yuan, WANG Chenxing, et al (2821)

Evaluation index system on ecological effect of national large-scale coal-fired power base based on the dpsir conceptual model
..... ZHOU Zhengda, WANG Chenxing, FU Xiao, et al (2830)

Research progress on the environment impacts from underground coal mining in arid western area of China
..... LEI Shaogang, BIAN Zhengfu (2837)

Ecological risk receptors analysis of pingzhuang western open-cut coal mining area in inner mongolia
..... GAO Ya, LU Zhaohua, WEI Zhenkuan, et al (2844)

Impacts of mining on landscape pattern and primary productivity in the grassland of Inner Mongolia: a case study of Heidaigou
open pit coal mining KANG Sarula, NIU Jianming, ZHANG Qing, et al (2855)

Accumulation of soil Cd, Cr, Cu, Pb by *Panax notoginseng* and its associated health risk
..... LIN Longyong, YAN Xiulan, LIAO Xiaoyong, et al (2868)

3D interpolation of soil PAHs distribution in a coking contaminated site of China ... LIU Geng, BI Rutian, QUAN Teng, et al (2876)

Autecology & Fundamentals

Catabatic effect from artificial mixed plantation of *Cunninghamia lanceolata* on soil aluminum toxicity
..... LEI Bo, LIU Bin, LUO Chengde, et al (2884)

Study on the trophic levels of soil macrofauna in artificial protection forests by means of stable nitrogen isotopes
..... ZHANG Shuhua, ZHANG Xueping (2892)

Lead- and cadmium-resistant bacterial strain JB11 enhances lead and cadmium uptake in the phytoremediation of soils
..... JIN Zhongmin, SHA Wei, LIU Lijie, et al (2900)

Identification and oil-degrading performance of *Acinetobacter* sp. isolated from North Shaanxi oil-contaminated soil
..... WANG Hu, WU Lingling, ZHOU Lihui, et al (2907)

Phylogenetic and physiological diversity of actinomycetes isolated from plant rhizosphere soils in the Qilian Mountains
..... MA Aiai, XU Shijian, MIN Yuxia, et al (2916)

Spatial distribution of AM and DSE fungi in the rhizosphere of *Ammopiptanthus nanus*
..... JIANG Qiao, HE Xueli, CHEN Weiyan, et al (2929)

Effects of PASP-KT-NAA on maize leaf nitrogen assimilation after florescence over different temperature gradients
..... GAO Jiao, DONG Zhiqiang, XU Tianjun, et al (2938)

Key temperatures of corn and sunflower during cooling process in Hetao irrigation district, Inner Mongolia
..... WANG Haimei, HOU Qiong, YUN Wenli, et al (2948)

The content of tannin extract in four types of *Quercus variabilis* YIN Yining, ZHANG Wenhui, HE Jingfeng, et al (2954)

Effect of food stress on flight muscle and reproduction development in a wing dimorphic cricket, *Velarifictorus ornatus*
..... WU Hongjun, ZHAO Lüquan, ZENG Yang, et al (2963)

- Effect of colours on oviposition preference of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* Busck YANG Xiaofan, MA Chunsen, FAN Fan, et al (2971)
- Monoterpene volatiles affecting host selection behavior of *Dendrolimus superans* and the activities of defense protein in larch needles LIN Jian, LIU Wenbo, MENG Zhaojun, et al (2978)
- Population, Community and Ecosystem**
- Soil microbial community structure under different vegetation restoration patterns in the loess hilly area HU Chanjuan, GUO Lei, LIU Guohua (2986)
- Seasonal variation of functional diversity of microbial communities in sediment and shelter of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) cultural ponds YAN Fajun, TIAN Xiangli, DONG Shuanglin, et al (2996)
- Analysis of bacterial flora during the fahua-fermentation process of fuzhuan brick tea production based on DGGE technology LIU Shiquan, HU Zhiyuan, ZHAO Yunlin (3007)
- Landscape, Regional and Global Ecology**
- CO₂ emissions transfer embedded in inter-regional trade in China LIU Hongguang, FAN Xiaomei (3016)
- Carbon sequestration potential of the major stands under the Grain for Green Program in Southwest China in the next 50 years YAO Ping, CHEN Xiangang, ZHOU Yongfeng, et al (3025)
- Characteristics of spatial and temporal phenology under the dynamic variation of grassland in the Qinghai Lake watershed LI Guangyong, LI Xiaoyan, ZHAO Guoqin, et al (3038)
- Estimates of carbon emissions caused by forest fires in the temperate climate of Heilongjiang Province, China, from 1953 to 2012 ... WEI Shujing, LUO Bizhen, SUN Long, et al (3048)
- Simulation of the climatic productivity of forest vegetation in Three Gorges Reservoir area PAN Lei, XIAO Wenfa, TANG Wanpeng, et al (3064)
- The mechanism for occurrence of *Peridiniopsis* blooms in the tributaries of Three Gorges Reservoir ZHU Aimin, LI Sixin, HU Jun, et al (3071)
- Biodiversity sensitivity zoning of river dam and reservoir engineering development ... LI Yiqiu, LU Chunxia, DENG Ou, et al (3081)
- Urban, Rural and Social Ecology**
- Assessment on coordinative ability of sustainable development of Beijing-Tianjin-Hebei Region based on set pair analysis TAN Feifei, ZHANG Meng, LI Haoran, et al (3090)
- Vacancy analysis on the development of nature reserves in Jiangxi Province HUANG Zhiqiang, LU Lin, DAI Nianhua, et al (3099)
- Evaluation of ecological economy index in the poyang lake ecological economic zone HUANG Heping, PENG Xiaolin, KONG Fanbin, et al (3107)
- Research on China's provincial forest ecological security appraisal based on the detrimental interferences LIU Xinzhu, MI Feng, ZHANG Shuang, et al (3115)

《生态学报》2014 年征订启事

《生态学报》是由中国科学技术协会主管,中国生态学学会、中国科学院生态环境研究中心主办的生态学高级专业学术期刊,创刊于 1981 年,报道生态学领域前沿理论和原始创新性研究成果。坚持“百花齐放,百家争鸣”的方针,依靠和团结广大生态学科工作者,探索生态学奥秘,为生态学基础理论研究搭建交流平台,促进生态学研究深入发展,为我国培养和造就生态学科人才和知识创新服务、为国民经济建设和发展服务。

《生态学报》主要报道生态学及各分支学科的重要基础理论和应用研究的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;新书评价和学术、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 90 元/册,全年定价 2160 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 34 卷 第 11 期 (2014 年 6 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 34 No. 11 (June, 2014)

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	王如松	Editor-in-chief	WANG Rusong
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

国内外公开发刊

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 90.00 元