

中国新疆火焰山土壤环境及细菌群落结构*

张矛宇¹ 李强¹ 张杰¹ 侯若彤¹ 杨志荣¹ 罗璠^{2**}

¹四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064

²西南民族大学生命科学与技术学院 成都 610041

摘要 为评价火焰山地区土壤环境现状,并了解环境因子对土壤微生物数量和细菌群落结构的影响,测定了土壤理化性质和4种典型土壤酶活性,结合传统分离培养计数所得微生物数量进行主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)和相关性研究,运用变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)技术结合冗余分析(Redundance Analysis, RDA)解析影响细菌群落结构的关键因子。结果表明:(1)火焰山地区土壤肥力状况较差,主要特点为含水率低、养分贫瘠和盐碱化严重,其中盐分含量是限制土壤肥力水平的关键因素,脱氢酶活性可作为快速评价火焰山土壤肥力的重要指标,多酚氧化酶活性最能代表火焰山土壤系统内的肥力变异状况;(2)火焰山土壤微生物数量处于较低水平,细菌为绝对优势菌群(占98.13%),土壤水分是决定微生物数量的关键因子,但盐分含量与微生物数量的相关性不明显;(3)环境因子与土壤细菌群落多样性和结构分布的相关性密切,全氮含量和土壤水分是影响细菌群落多样性的关键因子,各环境因子对不同细菌群落的影响迥异,其共同作用决定了火焰山地区细菌群落结构分布。图5 表7 参39

关键词 新疆;火焰山;肥力评价;土壤酶;土壤微生物;细菌群落结构;DGGE

CLC S154 (245)

Soil fertility status and bacterial community structure on Huoyan Mountain, China*

ZHANG Maoyu¹, LI Qiang¹, ZHANG Jie¹, HOU Ruotong¹, YANG Zhirong¹ & LUO Fan^{2**}

¹College of Life Sciences, Key Laboratory of Bio-resource and Bio-environment, Sichuan University, Chengdu, 610064, China

²College of life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu, 610041, China

Abstract For a comprehensive understanding of the extreme soil habitats on the Huoyan Mountain, the main factors for microbial growth need to be investigated. This paper aimed to evaluate the soil fertility status and to find out how environmental conditions affect the soil bacterial community structure on Huoyan Mountain. Correlation analysis and principal component analysis (PCA) were used to explore how soil physicochemical properties correlate with soil enzyme (polyphenol oxidase, dehydrogenase, catalase, urease) activities and microbe quantity. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and redundancy analysis (RDA) were used to study the relationship between soil bacterial community diversity and environmental variables. The soil on Huoyan Mountain was found to be relatively infertile. Both moisture and nutrient content were extremely low, and the soil was severely salinized. The PCA indicated that total salt content was the key factor limiting soil fertility, that dehydrogenase activity could be used as an important indicator of soil fertility, and that polyphenol oxidase could represent the variation of soil fertility. The total soil microbial count was relatively low. Bacteria accounted for approximately 98% of the soil microbes. According to the correlation analysis, the microbe quantity was most significantly related to moisture content, but not to salt content. The RDA suggested that environmental variables, especially total nitrogen and moisture contents, correlate significantly with soil bacterial community diversity and structure. This research identified the key environmental variables for soil fertility and bacterial community structure. These results will provide a scientific basis for both soil management and further studies on microbes in the extreme environment on the Huoyan Mountain.

Keywords Xinjiang; Huoyan Mountain; soil fertility evaluation; soil enzyme; soil microbe; bacterial community structure; DGGE

火焰山位于我国新疆吐鲁番盆地,是一座主要由砾岩和泥岩组成的褶皱低山,曾是古丝绸之路之上高昌国的地标,而

今是吐鲁番的核心地质遗迹景观。该地区气候干旱炎热,土壤盐渍化严重,整个山体寸草不生,基岩裸露。特殊的地形地貌和气候环境造就了火焰山地区极端恶劣的土壤环境。在这样极度恶劣的生境中有一些特殊生物资源存在,它们蕴涵着生命进化历程的丰富信息,代表着生命对于环境的极限适应能力,是生物遗传和功能多样性极其丰富和最具特色的宝

收稿日期 Received: 2014-06-23 接受日期 Accepted: 2014-10-14

*四川省平台项目(09PT-02)资助 Supported by the Platform Project of Sichuan Province, China (09PT-02)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: luofany77@sina.com)

藏^[1]。从20世纪90年代初开始,科学家们展开了对火焰山特殊土壤环境中极端微生物的分离筛选研究^[2-4],其中筛选出一株高温中性蛋白酶产生菌“XJT-9503”,使我国在特性蛋白酶研究领域居于国际领先水平^[5]。近年来,极端微生物的开发和利用越来越成为生物技术领域的研究热点,但由于极端微生物的生长环境特殊,研究过程中如何还原极端生境就成了一大难题。因此,掌握极端环境的土壤生境现状,了解其生境中的群落多样性,对于推进极端微生物的研究具有重要意义。

土壤酶作为参与土壤中各种生物化学反应过程的生物催化剂,是反映土壤综合肥力特征和土壤养分转化进程的良好指标^[6-7]。因此作为评价土壤质量优劣的一个重要方面,土壤酶的活性高低能够揭示土壤发育的现状和趋势^[8]。土壤酶活性会随土壤环境变化而快速变化,常作为监测土壤质量变化的敏感指标^[9]。土壤中的脱氢酶、过氧化氢酶、脲酶与土壤肥力的诸因素密切相关,是判断土壤肥力状况的关键酶^[10-11]。多酚氧化酶能够促进土壤有机碳的累积过程,并且有报道称其活性在土壤养分含量低的情况下才激活^[12],适于研究火焰山贫瘠的土壤。因此本实验选定土壤多酚氧化酶、脱氢酶、过氧化氢酶、脲酶为研究对象。

对于火焰山环境状况的研究,长久以来都集中于其形成演化和环境变迁,少有结合土壤理化特性与微生物多样性的探究。基于此现状,本研究拟通过测定火焰山地区土壤理化性质和典型土壤酶活性,结合PCA (Principal Component Analysis, 主成分分析) 方法,以反映该地区土壤环境现状并找出影响其肥力状况的主要因子^[13],同时采用PCR-DGGE技术分析土壤中微生物群落的多样性,结合土壤理化性质进行RDA (Redundance Analysis, 冗余分析) 来探究影响火焰山土壤微生物群落结构的关键因子,旨在对当地土壤生态环境进行系统的生物化学评价,并为建立火焰山土壤环境质量评估系统奠定基础,同时为开发和利用火焰山极端环境微生物资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

火焰山位于天山中东段南麓吐鲁番盆地中部。山体呈东西展布,长约100 km,南北宽约10 km,海拔高度230-500 m,主峰由侏罗系、白垩系和古近系、新近系地层组成,主要岩性为砂岩和泥岩。火焰山地区属于温带大陆性荒漠气候,主要特点为气温高、温差大、日照长、降水少、风力强,年平均气温14.4℃,最高气温47.7℃,最低气温-25.2℃,夏季最高

地表气温可达82.3℃,年平均降水量16.4 mm,年平均蒸发量高达2 844.9 mm,是北纬42°线上世界唯一的热火炉。特殊的地质环境和气候条件,导致火焰山整个山体土壤盐渍化,且营养匮乏,山体寸草不生,童山秃岭。

1.2 样地设置与采样方法

土壤样品在2013年4月采集于中国新疆的火焰山山脉(E 89° 29' 35" -89° 56' 52", N 42° 55' 19" -42° 56' 12"),在实地调查的基础上,尽可能避开人为干扰因素,选定吐鲁番地区二堡乡境内山体,沿着山脉每隔800m均匀布设5个样地(表1)。在每个样地20 m×20 m范围内按照“三角形法”分别布设3次重复^[14],采样深度为0-20 cm,每次重复选取面积为0.25 m² (50 cm×50 cm)的3个样方混合,每个样方内的采样量为0.5 kg。土样采集完毕后立即装入已灭菌的封口聚乙烯袋中,迅速放入冰盒保存,并及时运回实验室进行分析。采集的土样分为3部分:一部分进行风干处理,用于测定土壤理化性质;另一部分放入4℃冰箱中保存,用于测定土壤酶活性和微生物计数;剩余部分置于-20℃保存,用于土壤总DNA的提取。

1.3 实验方法

1.3.1 土壤理化性质测定 土壤含水率采用烘干法测定;pH值采用电位法(GB7859-87)测定;有机质含量采用重铬酸钾氧化-外加热法(GB7857-87)测定;全氮含量采用半微量凯氏定氮法(GB7173-87)测定;全磷含量采用硫酸-高氯酸消化-钼锑抗比色法(GB7852-87)测定;全钾含量采用氢氟酸-高氯酸消化-火焰光度计法(GB7854-87)测定;碱解氮含量采用扩散吸收法(GB7849-87)测定;速效磷含量采用酸-氟化铵浸提-钼锑抗比色法(GB7853-87)测定;速效钾采用乙酸铵浸提-火焰光度法(GB7856-87)测定;可溶盐总量含量采用电导法(GB7871-87)测定^[15]。

1.3.2 土壤酶活性测定 土壤多酚氧化酶、脱氢酶、过氧化氢酶和脲酶的测定分别采用邻苯三酚比色法、TTC比色法、高锰酸钾滴定法和苯酚钠比色法^[16]。

1.3.3 土壤微生物的计数 土壤微生物数量使用稀释平板法^[17]测定,细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基,放线菌采用高氏1号培养基,真菌采用马丁氏-孟加拉红培养基。

1.3.4 土壤总DNA提取和16S rDNA的PCR扩增 采用美国OMEGA Bio-Tek公司的E.Z.N.A Soil DNA Kit试剂盒,按操作说明对土壤总DNA进行提取和纯化。以提取的DNA作为模板进行PCR扩增。采用细菌16S rDNA基因V6-V8区具有特异性的引物954F: 5'-GC-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3'和1369R: 5'-GCCCGGGAACGTATTCACCG-3'^[18]进行扩增,所得片段长度在400bp左右。为了使PCR产物在变性梯度胶中

表1 采样地分布

Table 1 Distribution of sample sites

土壤样品 Soil sample	经度 (E) Longitude	纬度 (N) Latitude	海拔 (h/m) Elevation(m)	温度 (θ/℃) Temperature	样地特征 Characteristics
A	89° 34' 56"	42° 55' 57"	105	41	山头向阳处泥岩 Mudstone exposure to the sun
B	89° 56' 52"	42° 56' 12"	153	24	沟壑间阴凉处泥岩 Mudstone in gully region
C	89° 39' 54"	42° 55' 29"	246	36	砂砾土 Gravel soil
D	89° 29' 35"	42° 55' 19"	-52	34	风沙土 Sandy soil
E	89° 27' 25"	42° 55' 51"	-20	35	盐渍土 Saline soil

更好地分离,在前引物的5'末端增加40 bp富含GC碱基的序列^[19], GC夹子: 5'-CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCGCCCGGCC-3'^[20].

PCR采用50 μL反应体系: 10 × Ex-Taq buffer 5 μL (TaKaRa), MgCl₂ 4 μL (25 mmol/L), dNTPs 4 μL (2.5 mmol/L), 前、后引物各1 μL, Ex-Taq DNA聚合酶0.25 μL (5 U/μL) (TaKaRa), 模板2 μL (20 ng左右), 加ddH₂O至50 μL.

细菌16S rDNA-PCR扩增条件: 为减少特异性扩增, 采用降落PCR法. 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 之后每一循环退火温度降低0.5 °C, 10个循环; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 25 cycles; 72 °C延伸10 min.

1.3.5 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 及图谱分析 得到的PCR产物利用Dcode™ Universal Mutation Detection System系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 进行分离^[21]. 从每个样品PCR产物中取200 ng DNA加入到6%的聚丙烯酰胺凝胶中, 凝胶的变性范围为35%-65% (100%变性相当于7 mol/L尿素和 40%去离子甲酰胺). 电泳条件为: 在温度60 °C和电压120 V下, 电泳6 h; 电泳缓冲液为1 × TAE. 电泳完毕后, 经SYBR green I (1:10 000稀释) 染色3次共45 min, 超纯水清洗后, 用Bio-Rad公司的凝胶成像系统进行拍照, 并用图形分析软件 (Quantity One 4.5, Bio-Rad) 对凝胶图像进行分析. 本研究使用 Shannon- Weaver指数 (H) 和丰富度 (S) 评价土壤微生物群落多样性. 其计算公式为:

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

式中, S 为某一泳道的条带总数^[22], p_i 为泳道中某一条带的强度与泳道中所有条带强度的比值^[23].

1.3.6 DGGE条带切胶测序分析 根据所得DGGE图谱, 挑选各样品的优势条带, 在紫外灯照射下用无菌手术刀片将选定的条带从凝胶上切割下来, 随即浸泡于50 μL无菌超纯水中, 置于4 °C过夜. 以所得的浸提液作为模板进行PCR扩增, 引物为不含GC夹子的954F/1369R, PCR反应体系和扩增程序与之前相同. 得到的PCR产物使用DNA凝胶回收试剂盒 (Omega) 进行纯化后与克隆载体 (pGEM-T) 连接, 筛选出阳性克隆送由上海英潍捷基公司 (Life technologies™) 测序. 测序结果在GenBank数据中进行BLAST比对分析, 找出相似序列, 使用MEGA 5.1软件NJ算法构建系统进化树 (进行1000次bootstrap统计学检验). 并将16S rDNA序列上传到NCBI数据库中, 序列登录号为KJ958472-KJ958478.

表3 不同土壤取样点中土壤理化性质比较 ($N=3$)

Table 3 Comparison of soil physicochemical properties in different soil samples ($N=3$)

土壤样品 Soil sample	MC (r%)	pH	OM (w/g kg ⁻¹)	TN (w/g kg ⁻¹)	TP (w/g kg ⁻¹)	TK (w/g kg ⁻¹)	AN (w/mg kg ⁻¹)	AP (w/mg kg ⁻¹)	AK (w/mg kg ⁻¹)	TS (w/g kg ⁻¹)
a	1.92 ± 0.02b	8.27 ± 0.04b	2.06 ± 0.10d	0.38 ± 0.03a	0.52 ± 0.02d	19.78 ± 0.54a	78.40 ± 2.12a	3.49 ± 0.58c	287.50 ± 12.50b	26.77 ± 0.63c
B	2.03 ± 0.02a	7.93 ± 0.03b	1.41 ± 0.06e	0.26 ± 0.01b	0.57 ± 0.02c	18.05 ± 0.27c	34.30 ± 2.12c	3.08 ± 0.20c	270.83 ± 7.22c	79.41 ± 2.88b
C	0.87 ± 0.02e	8.35 ± 0.02c	4.62 ± 0.08a	0.24 ± 0.02b	0.61 ± 0.01b	18.51 ± 0.31c	44.10 ± 3.68b	7.56 ± 0.37a	533.33 ± 7.22a	6.77 ± 0.17e
D	1.23 ± 0.04c	8.29 ± 0.02b	3.71 ± 0.03b	0.28 ± 0.02b	0.74 ± 0.01a	20.75 ± 0.21b	31.85 ± 2.12c	4.20 ± 0.36b	291.67 ± 7.22b	7.69 ± 0.15d
E	1.03 ± 0.04d	8.66 ± 0.01a	2.89 ± 0.06c	0.25 ± 0.03b	0.63 ± 0.01b	20.34 ± 0.29ab	24.50 ± 2.12d	3.26 ± 0.50c	254.17 ± 7.22d	145.97 ± 4.32a

MC: 含水率; pH: pH值; OM: 有机质; TN: 全氮; TP: 全磷; TK: 全钾; AN: 碱解氮; AP: 速效磷; AK: 速效钾; TS: 可溶盐总量. 表中数据为平均数 ± 标准偏差. 同一指标中不同字母表示平均数的差异在 $P < 0.05$ 时达到显著水平.

MC: Moisture content; OM: Organic matter; TN: Total N; TP: Total P; TK: Total K; AN: Alkali-hydrolyzable N; AP: Available P; AK: Available K; TS: Total soluble salt. Data in the table are mean ± SD. Different small letters in the same row mean significant difference at 0.05 level among treatments.

1.3.7 统计分析 相关性分析和PCA分析利用SPSS 17.0软件进行, 土壤理化性质与DGGE输出数据的RDA分析利用Canoco for Windows 4.5软件进行.

2 结果与分析

2.1 土壤微生物数量、土壤理化性质、土壤酶活性及其之间的相关性分析

通过测得的土壤微生物数量 (表2) 可看出, 火焰山地区土壤微生物的种类分布为细菌数量最多, 放线菌数量次之, 真菌数量最少, 细菌为绝对优势菌群. 这与王林霞等早在1991年的研究结果^[2]一致. 但对比我国其他地区的土壤微生物数量测定结果会发现, 该地区的土壤微生物总量远远低于其他地区的土壤微生物数量. 各采样点间微生物数量的差异表现为: $A > B > D > E > C$. 其中A、B样品在采样时的温差达到17 °C, 但在微生物数量上的差异不大.

表2 不同土壤取样点中土壤微生物数量比较 ($N=3$)

Table 2 Comparison of soil microbial quantity in different soil samples ($N=3$)

土壤样品 Soil sample	细菌 Bacteria	放线菌 Actinomycetes	真菌 Fungi	总数 Sum
A	49.67 ± 1.53a	0.91 ± 0.06a	0.04 ± 0.02a	50.62 ± 2.53a
B	47.67 ± 2.08a	0.50 ± 0.03c	0.06 ± 0.02ab	48.23 ± 2.10a
C	19.00 ± 1.00c	0.20 ± 0.03d	0.03 ± 0.02a	19.23 ± 1.02c
D	29.67 ± 1.48b	0.90 ± 0.05a	0.03 ± 0.02a	30.60 ± 1.56b
E	27.33 ± 2.52b	0.61 ± 0.03b	0.02 ± 0.01ac	27.96 ± 2.51b

表中数据为平均数 ± 标准偏差. 同一指标中不同字母表示平均数的差异在 $P < 0.05$ 时达到显著水平.

Data in the table are mean ± SD. Different small letters in the same row mean significant difference at 0.05 level among treatments.

各取样点土壤的理化性质测定结果见表3. 从整体来看, 各土样的理化性质存在显著差异, 但整体波动较小. 参照全国第二次土壤普查推荐的土壤肥力分级标准^[24], 该地区土壤的有机质、氮、磷含量均处于极低水平, 为土壤肥力等级中的最低级, 而其钾元素含量却远远高于标准水平, 达到一级优质土壤的钾含量水平, 但单一营养元素的肥沃并不能改善整体的土壤肥力状况. 土壤可溶盐总量的测定表明, 火焰山地区的土壤盐含量整体处于较高水平, 最高盐含量达到145.97 g kg⁻¹, 远高于普通植物的耐盐范围 (< 3 g kg⁻¹). 测定

结果表明, 新疆火焰山地区的土壤含水率极低, pH偏碱性, 土壤肥力水平较低, 且土壤盐渍化严重, 由此也就可初步解释其整个山体寸草不生的原因。

酶活性测定结果(图1)显示, 火焰山地区土壤酶活性整体处于较低水平, 且不同土样之间酶活性存在显著差异 ($P < 0.05$)。同时, 4种酶活性在各土样间的变化趋势有所不同, 其中脱氢酶变化趋势与各土样间微生物数量的变化趋势基本一致, 这表明, 脱氢酶作为胞内酶, 其活性可以作为土壤微生物氧化还原系统的指标, 用来有效表征土壤中微生物数量。此外, 结合土壤理化性质分析, 脲酶活性最高的土样A, 其碱解氮/全氮比值(20.6%)也明显高于其他土样, 说明脲酶

在土壤氮素转化过程中发挥着重要作用, 这与李华等的研究结果^[25]一致。

为进一步了解火焰山土壤养分与生物学指标之间的相互关系, 利用SPSS软件分析了土壤微生物数量与土壤理化性质和土壤酶活性的相关性, 结果如表4所示。土壤微生物数量与土壤含水率、pH值、有机质、全氮、碱解氮、速效磷、速效钾和脱氢酶含量呈极显著相关, 与全磷含量呈显著相关。其中土壤含水率与土壤微生物数量的相关性最为密切。

在研究中发现, 土壤理化性质与土壤酶活性之间也存在一定相关性, 分析结果如表5。4种土壤酶的活性均与多个理化性质表现出显著或极显著相关。其中多酚氧化酶和脲酶都

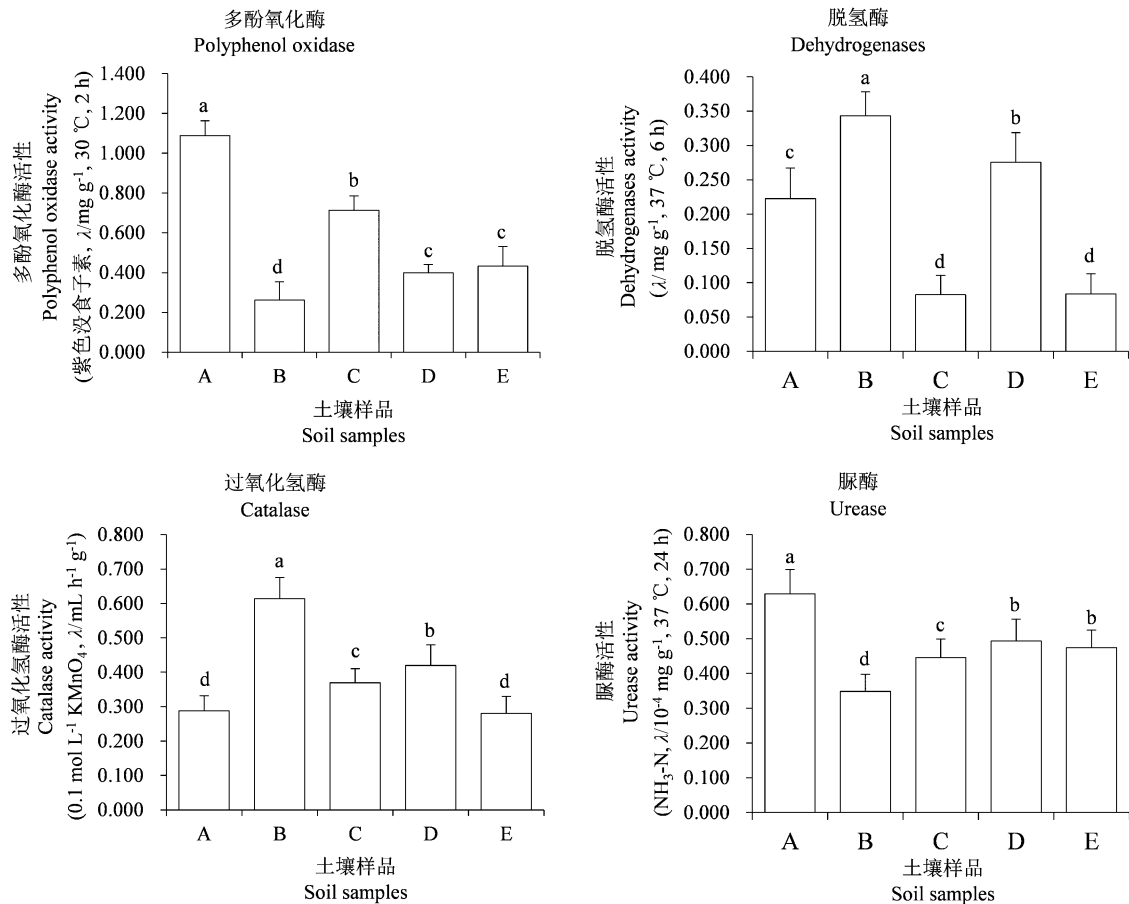


图1 不同土壤取样点的4种酶活性差异比较。同一指标中不同字母表示平均数的差异在 $P < 0.05$ 时达到显著水平。

Fig. 1 Comparison of soil enzymatic activities in different soil samples. Different small letters in the same row mean significant difference at 0.05 level among treatments.

表4 土壤微生物数量与土壤理化性质的相关性 ($N = 15$)

Table 4 Relationships between microbial quantity and physicochemical properties in soil samples ($N = 15$)

指标 Index	MC	pH	OM	TN	TP	TK	AN	AP	AK	TS	PPO	DH	CAT	URE
B	0.979**	-0.611**	-0.907**	0.657**	-0.585*	-0.181	0.521*	-0.701**	-0.614**	0.066	0.190	0.719**	0.321	0.188
A	0.413	0.015	-0.368	0.650**	0.157	0.694**	0.308	-0.658**	-0.728**	-0.072	0.197	0.448*	-0.227	0.631**
F	0.630**	-0.682**	-0.467*	0.263	-0.321	-0.468*	0.307	-0.159	-0.108	-0.173	0.014	0.562*	0.514*	-0.178
T	0.977**	-0.605**	-0.905**	0.664**	-0.575*	-0.165	0.522**	-0.707**	-0.622**	0.064	0.192	0.721**	0.313	0.199

B: 细菌; A: 放线菌; F: 真菌; T: 微生物总数; MC: 含水率; pH: pH值; TN: 全氮; TP: 全磷; TK: 全钾; AN: 碱解氮; AP: 速效磷; AK: 速效钾; TS: 可溶盐总量。表中*表示相关性在 $P < 0.05$ 达到显著水平, **表示相关性在 $P < 0.01$ 达到显著水平。

B: bacteria; A: Actinomycetes; F: Fungi; T: Total microbe quantity; MC: Moisture Content; OM: Organic Matter; TN: Total N; TP: Total P; TK: Total K; AN: Alkali-hydrolyzable N; AP: Available P; AK: Available K; TS: Total soluble salt. *and ** indicate significant difference at the level of 0.05 and 0.01, respectively.

表5 土壤酶活性与理化性质的相关性 (N = 15)

Table 5 Relationships between soil enzymes activity and physicochemical properties in soil samples (N = 15)

指标 Index	MC	pH	OM	TN	TP	TK	AN	AP	AK	TS
PPO	0.114	0.167	0.081	0.738**	-0.551*	0.074	0.914**	0.236	0.277	-0.425
DH	0.790**	-0.844**	-0.626**	0.258	0.011	-0.153	0.074	-0.528*	-0.505*	-0.203
CAT	0.463*	-0.846**	-0.373	-0.322	0.058	-0.592*	-0.337	-0.143	-0.093	-0.061
URE	0.064	0.376	0.046	0.776**	-0.021	0.568*	0.732*	-0.085	-0.118	0.288

MC: 含水率; pH: pH值; OM: 有机质; TN: 全氮; TP: 全磷; TK: 全钾; AN: 碱解氮; AP: 速效磷; AK: 速效钾; TS: 可溶盐总量; PPO: 多酚氧化酶; DH: 脱氢酶; CAT: 过氧化氢酶; URE: 脲酶. *表示土壤酶活性与土壤理化性质的相关系在 $P < 0.05$ 达到显著水平, **表示土壤酶活性与土壤理化性质的相关系在 $P < 0.01$ 达到显著水平.

MC: Moisture Content; OM: Organic Matter; TN: Total N; TP: Total P; TK: Total K; AN: Alkali-hydrolyzable N; AP: Available P; AK: Available K; TS: Total soluble salt; PPO: Polyphenol Oxidase; DH: Dehydrogenase; CAT: Catalase; URE: Urease. * and ** indicate significant difference at the level of 0.05 and 0.01, respectively.

与土壤全氮含量表现出极显著正相关, 这表明在火焰山地区的土壤生境中, 脲酶和多酚氧化酶的活性能够很好地反映土壤氮素含量. 在4种土壤酶中, 脱氢酶与土壤含水率、pH值、有机质含量极显著相关, 与速效磷、速效钾显著相关, 与土壤理化性质相关性较密切, 这说明, 脱氢酶活性可作为评价火焰山土壤肥力的一项重要指标.

2.2 土壤细菌遗传多样性

2.2.1 DGGE图谱及UPGMA聚类分析 通过DGGE实验, 得到5个土壤样品的16S rDNA基因V6-V8区指纹图谱(图2a). 每个土壤样品经过变性梯度凝胶电泳都分离出数目不等的电泳条带, 而电泳条带的多少能直观地反映土壤细菌群落的遗传多样性^[21], 各条带的亮度则反映了细菌群落的丰度. 此外, 从图谱中可以看出, 不同样品间具有许多迁移率相同的条带, 这表明供试土壤样品之间存在一些共有的细菌种群, 但有些共有条带的强度又各不相同, 说明相同细菌种群在不同土壤中的含量有所不同.

将电泳图谱进行UPGMA聚类分析, 结果如图2b. 一般认为相似值高于0.60的两个群体具有较好的相似性^[19], 将5个土壤样品聚为一类的相似值达到0.66, 说明供试土样的细菌群落结构差异较小, 其中C、E两个土壤样品的群落结构相似度最高, 达到0.85.

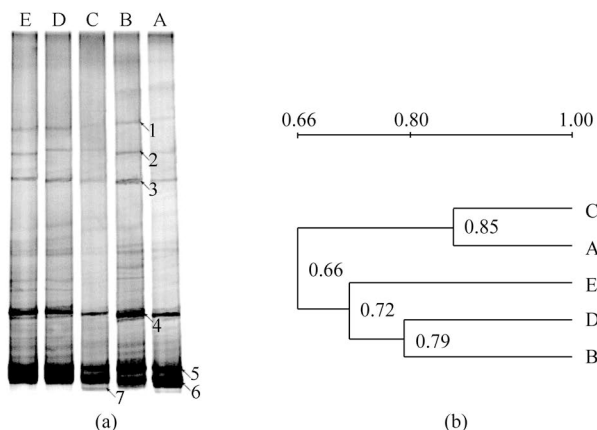


图2 土壤样品16S rDNA扩增片段的DGGE图谱(a)和聚类分析图(b). 数字标记条带被切胶测序.

Fig. 2 DGGE patterns (a) and UPGMA dendrogram (b) of 16S rDNA fragments amplified with DNA from soil samples. Number-marked bands were excised for sequencing.

2.2.2 土壤细菌群落多样性指数 根据电泳图谱中条带的多少和亮度所计算的Shannon-Weaver指数可作为比较细菌种群多样性的指数, 直观地反映样品微生物群落的遗传多样性^[26], 多样性指数数值越大, 表明土壤微生物的群落结构多样性越高, 反之亦然^[27]. 为计算样品细菌群落多样性指数, 本研究设计3次平行实验, 根据得到的DGGE电泳图谱, 对样品中的细菌多样性指数(H), 丰富度(S)指标进行分析(表6). 结果表明, 所有样品的多样性指数差异性显著($P < 0.05$), 其中土样D的多样性指数最大($H = 2.41$), 土样C的多样性指数最小($H = 1.45$).

表6 土壤细菌群落多样性指数 (N = 3)

Table 6 Soil bacterial community diversity index (N = 3)

土壤样品 Soil sample	Shannon-Weaver 指数(H) Shannon-Weaver index	丰富度(S) Richness
A	1.81 ± 0.02d	12 ± 1.00b
B	2.21 ± 0.02b	18 ± 2.08a
C	1.45 ± 0.03e	7 ± 1.53c
D	2.41 ± 0.03a	13 ± 2.00b
E	2.00 ± 0.08c	12 ± 1.53b

表中数据为平均数 ± 标准偏差. 同一指标中不同字母表示平均数的差异在 $P < 0.05$ 时达到显著水平.

Data in the table are mean ± SD. Different small letters in the same row mean significant difference at 0.05 level among treatments.

2.2.3 DGGE条带的测序分析 为更加深入地了解土壤中的优势菌群, 将DGGE电泳图谱中的优势条带切胶回收, 分离到的单一条带测序鉴定, 共得到7个条带(见图2a), 测序结果在GenBank数据库中进行BLAST比对, 结果显示其中4条序列与数据库中已有序列的相似度在97%以上, 而Band 5、Band 6和Band 7序列的比对结果相似度较低(82%-86%). 从DGGE优势条带的系统进化树(图3)中可看出, 所有序列可分为3个主要的簇, 其中Band 1-5聚在第一个簇里, 其同源菌株均为γ-Proteobacteria(γ-变形菌纲); Band 6和Band 7分别单独聚在第二和第三簇里, 由于其与同源菌株的相似度较低, 对序列的分类还需后续深入研究. 结合电泳图谱可发现Band 1-5为5个土壤样品的共有条带, 由此可基本判定γ-Proteobacteria为火焰山土壤中的优势细菌类群. 同时, 比对结果显示有3个条带与现有菌株的同源性较低, 说明这些细菌可能是目前尚未培养或者是难获得纯培养物的新种资源. 这些菌群长期适

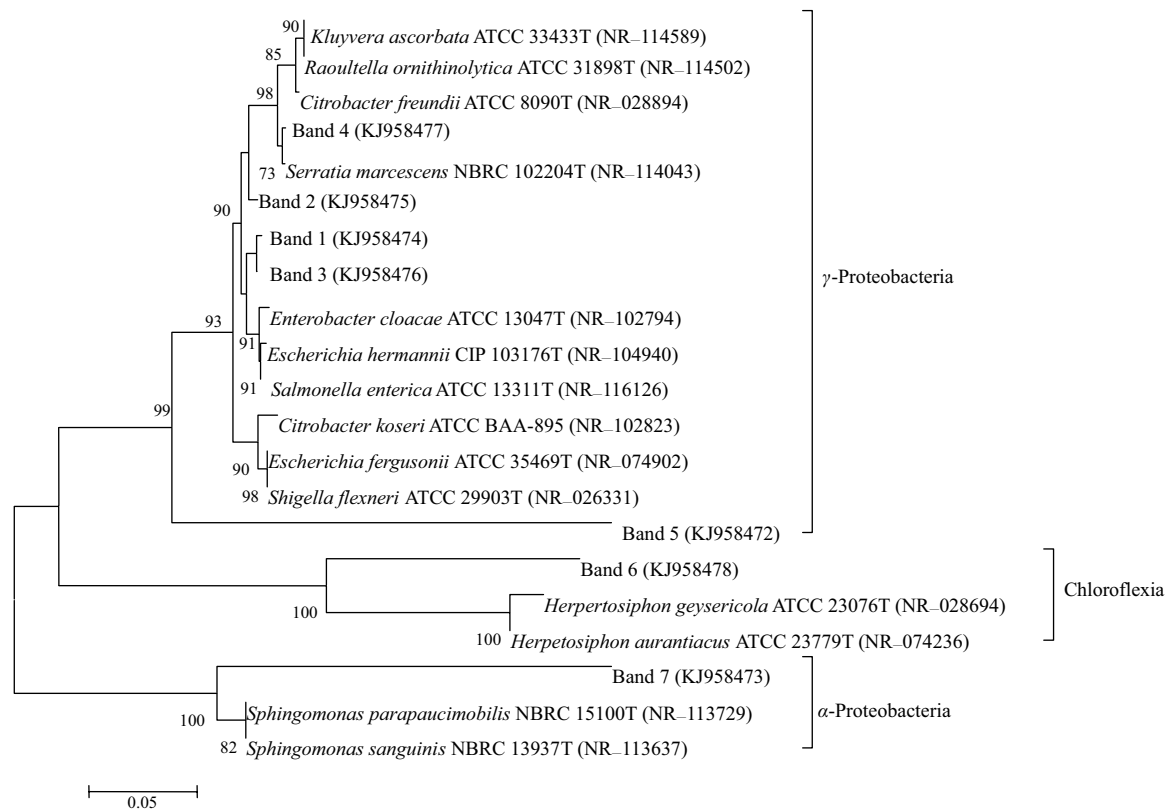


图3 DGGE优势条带的系统进化树。
Fig. 3 Phylogenetic tree of the dominant DGGE bands.

应火焰山干旱、高温、有机质缺乏、盐碱度较高的极端环境，最终成为优势菌株，作为生物学领域的宝贵资源其开发和利用还有待进一步研究。

2.3 土壤理化性质与土壤酶活性的PCA分析

为评价火焰山地区土壤环境现状，并找出影响其肥力水平的主要因子，本研究使用SPSS软件对所得土壤理化性质和土壤酶活性数据做PCA分析。根据主成分分析原理，以及相关文献报道^[28]，当累积方差贡献率大于85%时，可用来基本反应系统的变异信息。由表7可看出，前3个主成分的累积方差贡献率为87.476%，因此可用来代表土壤肥力系统的变异信息。PCA分析结果见图4。

表7 土壤的主成分特征值
Table 7 Principal component characteristic values of soil samples

成分 Component	第一主成分 1st Principal component	第二主成分 2st Principal component	第三主成分 3st Principal component
特征根 Latent root	4.926	4.357	2.964
方差贡献率(r/%) Variance	35.183	31.121	21.172
累积方差贡献率(r/%) Cumulative	35.183	66.304	87.476

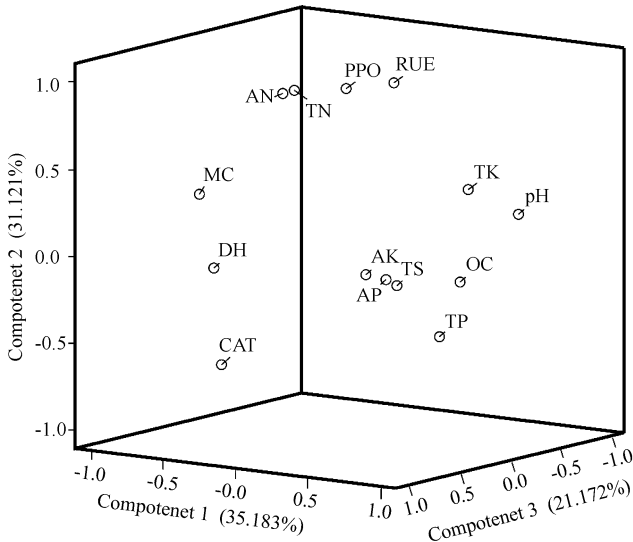


图4 基于土壤理化性质与酶活性的主成分分析。MC: 含水率; pH: pH值; OM: 有机质; TN: 全氮; TP: 全磷; TK: 全钾; AN: 碱解氮; AP: 速效磷; AK: 速效钾; TS: 可溶盐总量; PPO: 多酚氧化酶; DH: 脱氢酶; CAT: 过氧化氢酶; URE: 脲酶。

Fig.4 Principal Component Analysis (PCA) based on soil physicochemical properties and enzyme activities. MC: Moisture Content; pH: pH value; OM: Organic Matter; TN: Total N; TP: Total P; TK: Total K; AN: Alkali-hydrolyzable N; AP: Available P; AK: Available K; TS: Total soluble salt; PPO: Polyphenol Oxidase; DH: Dehydrogenase; CAT: Catalase; URE: Urease.

根据因子载荷系数与主成分系数之间的关系^[29],将因子载荷换算为特征向量后,可以得到反映土壤肥力水平的综合主成分表达式:

$$F = -0.107X_1 + 0.073X_2 + 0.167X_3 + 0.060X_4 - 0.037X_5 - 0.009X_6 - 0.158X_7 + 0.137X_8 + 0.197X_9 + 0.197X_{10} + 0.191X_{11} - 0.145X_{12} - 0.143X_{13} + 0.128X_{14}$$

上述表达式中, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 分别为土壤含水率、pH值、有机质、全氮、全磷、全钾、可溶盐总量、碱解氮、速效磷、速效钾、多酚氧化酶、脱氢酶、过氧化氢酶、脲酶的特征值。将各指标的参数代入上述函数中以算可得到综合主成分的得分,即能得到反映土壤肥力的综合水平。由上述函数式可看出,各理化性质中,有机质、碱解氮、速效磷、速效钾含量对土壤肥力的贡献率较大,而含盐量是限制土壤肥力的关键因素。4种土壤酶中,多酚氧化酶、脲酶与土壤肥力水平成正相关,并且贡献率较大。

2.4 土壤环境因子与细菌群落结构多样性的RDA分析

对物种数据进行去趋势对应分析(DCA),分析过程中去除了相对含量小于1%和只出现过一次的条带,对15个条带的分析结果中第一排序轴的Lengths of Gradient(梯度长度)值为1.253(<2),因此环境因子对细菌群落分布的影响应选用基于线性模型的RDA方法。

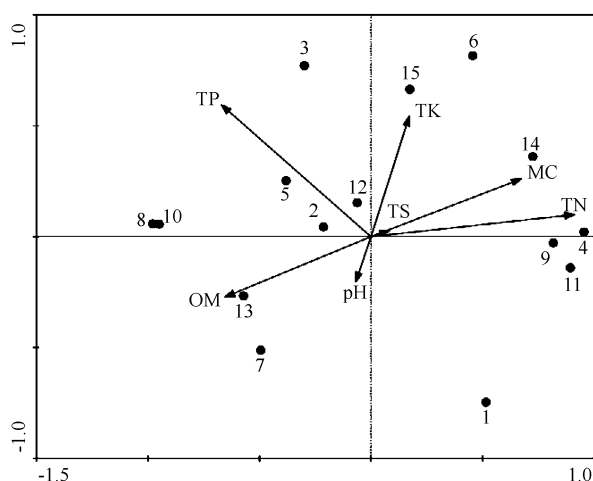


图5 土壤细菌群落多样性与环境因子的RDA双序图。MC: 含水率; pH: pH值; TN: 全氮; TP: 全磷; TK: 全钾; TS: 可溶盐总量。

Fig. 5 Redundance Analysis (RDA) biplot based on DGGE banding patterns and environmental variables. MC: Moisture Content; OM: Organic Matter; TN: Total N; TP: Total P; TK: Total K; TS: Total soluble Salt.

在RDA双序图(图5)中,环境因子用箭头表示,箭头所处的象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性,箭头连线长度代表该环境因子与种群分布相关程度的大小,而物种在箭头连线间的投影距离则代表其与环境因子间的相关性大小^[30]。从图5可看出,土壤中细菌群落结构主要与MC、OM、TN和TP相关联,其中MC($r = 0.6735$, $P < 0.05$)和TN($r = 0.9133$, $P < 0.05$)与物种第一排序轴呈正相关,OM($r = -0.6561$, $P < 0.05$)和TP($r = -0.6717$, $P < 0.05$)与物种第一排序轴呈负相关。土壤环境因子中pH和TS与细菌群落结构的关联度较小,分析原因可能是由于火焰山极端土壤生境中所

能生存的细菌群落对于盐碱环境都有耐受性,因此pH和TS就不再是影响其群落结构的关键因素。双序图中15个条带所代表的物种分散在4个象限中,它们与各环境因子相关性的差异,代表了环境因子对物种多样性的影响程度,由此说明火焰山土壤环境因子对其细菌种群分布也有显著影响。

3 讨论与结论

3.1 火焰山地区土壤环境现状的生物化学评价

各土壤理化性质指标的测定结果表明,新疆火焰山地区的土壤含水率极低,pH偏碱性,土壤肥力水平较低,且土壤盐渍化严重,整体土壤环境恶劣。酶活性在一定程度上反映了土壤肥力和活性状况,是评价土壤水平高低的重要指标^[31],利用土壤酶活性作为土壤肥力指标的评价方法,能与土壤的化学分析互补,有助于提高土壤养分评价的效率^[32]。本研究中土壤酶活性的测定结果进一步论证了火焰山地区土壤养分贫瘠的结论,且发现4种土壤酶活性中脱氢酶与土壤理化性质和微生物数量相关性最密切,表明脱氢酶既能有效表征土壤微生物的数量和多样性,又能作为评价土壤肥力的重要指标。

主成分分析结果显示,土壤理化性质和土壤酶等各项因子在主成分中的贡献率各不相同,可作为综合评价土壤肥力状况的指标。某种酶活性在主成分中的载荷量,代表这种酶活性与主成分关系的密切程度,值越大与主成分关系越密切,越能代表土壤系统内肥力的变异状况^[33],因此,因子载荷系数较大的多酚氧化酶和脲酶可作为火焰山土壤肥力变异状况的监测指标。根据主成分分析得出反映土壤肥力水平综合得分表达式,可直观地了解各土壤理化指标对肥力的影响情况,其中,含盐量是限制土壤肥力的关键因子。以上结论为火焰山地区的土壤生态管理提供了科学依据,有助于快速高效地评价当地土壤状况,并推进火焰山土壤极端微生物的研究。

3.2 土壤理化性质对微生物数量和细菌群落多样性的影响

土壤微生物数量的测定结果显示,细菌为火焰山土壤生境的优势菌群,DGGE切胶测序分析进一步发现 γ -Proteobacteria为其优势细菌类群。 γ -Proteobacteria具有很强的适应性,能在多种不同浓度范围的碳源环境中迅速生长,并最终成为优势菌群^[34,35]。也有研究表明, γ -Proteobacteria是分离中度嗜盐细菌的主要菌群^[36]。在本研究中,土壤样品的平均含盐量达到 53.32g kg^{-1} ,属于高盐环境。通过DGGE切胶测序得到在该土壤环境中生长的优势菌群,其序列在GenBank中的比对结果显示,与*Serratia* sp.、*Citrobacter* sp.等菌属的同源性达到98%,而也有文献报道这些菌属中具有耐盐能力较强的菌株^[37-38]。此外,Band 5、Band 6和Band 7在Genbank中没有找到同源性较高的序列,表明在火焰山土壤环境中可能会有尚未被人类发现的物种存在,开发和利用这些极端环境下生存的优势菌株,对于丰富微生物资源和改善新疆地区干旱盐碱土壤环境具有重要的意义,值得深入研究。

相关性分析结果表明,在各土壤环境因子中,含水率对

火焰山地区微生物数量的影响最大,这与Baldrian等的研究结果^[39]一致,他们认为在温带大陆性气候地区,土壤水分是决定微生物数量空间分布的最重要因素之一。同时,土壤有机质和氮素含量作为微生物生长的必要养分,也是影响火焰山土壤微生物数量的关键因素。RDA双序图显示,土壤环境因子与细菌群落结构分布和多样性之间有密切的相关性。其中土壤全氮含量和含水率与细菌群落结构的关联性最大,关联性次之的是全磷和有机质含量,它们一起作为关键因素决定着火焰山土壤细菌群落的多样性和结构分布。土壤盐分在与微生物数量和细菌群落结构多样性的相关性分析中都没有表现出明显的相关性,由此可推测,火焰山地区土壤微生物在长期盐渍化的土壤生境中形成了某种广泛存在的耐受机制,使其对高盐环境有一定的适应性,该特殊的生理特性和极端酶还有待研究。

致谢 特别感谢四川省农业科学院土壤肥料研究所李小林博士和赫尔辛基大学Petri Penttinen教授在文章撰写过程中提供帮助和指导。

参考文献 [References]

- Bertoldo C, Antranikian G. Starch-hydrolysing enzymes from thermophilic archaea and bacteria [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, **6**: 151-160
- 王林霞, 王秀云, 潘惠云. 新疆吐鲁番盆地极端环境微生物资源研究——吐鲁番盆地土壤微生物的生态分布[J]. 干旱区研究, 1991, **1**: 43-46
- 王林霞, 王秀云, 潘惠云, 田长彦. 一株新的化能无机营养菌——聚积碳酸镁的细菌[J]. 干旱区研究, 2003, **20** (1): 11-15 [Wang LX, Wang XY, Pan HX, Tian CY. A new colony of chemolithotrophic bacterium—abacterium of gathering MgCO₃ [J]. *Arid Zone Res*, 2003, **20** (1): 11-15]
- 黄山, 孟醒, 毛虎章, 刘赵昆, 杨玮, 刘方. 新疆火焰山土壤中耐高温菌株的分离与鉴定[J]. 南开大学学报, 2011, **44** (5): 109-110 [Huang S, Meng X, Mao HZ, Liu ZK, Yang W, Liu F. Isolation and identification of thermophilic bacteria from the soil of Xinjiang Flaming Mountain [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis*, 2011, **44** (5): 109-111]
- 活泼, 茆军, 石玉瑚. 嗜热芽孢杆菌XJT9503高温中性蛋白酶的中式发酵工艺[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, **22** (3): 89-92 [Huo P, Mao J, Shi YH. Study on the pilot fermentation technology of the XJT9503 thermostable neutral protease [J]. *J Wuxi Univ Light Ind*, 2003, **22** (3): 89-92]
- JánosI, SzathmáryL, NádasE, BéniA, DinyaZ, MáthéE. Evaluation of elemental status of ancient human bone samples from Northeastern Hungary dated to the 10th century AD by XRF [J]. *Nucl Instrum Methods*, 2011, **269** (21): 2593-2599
- ChenSK, EdwardsCA, SublerS. The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms [J]. *Soil Biol Biochem*, 2003, **35**: 9-19
- Kotrocó Z, Veres Z, Fekete I, Krakomperger Z, Tóth JA, Lajtha K, Tóthmérész B. Soil enzyme activity in response to long-term organic matter manipulation [J]. *Soil Biol Biochem*, 2014, **70**: 237-243
- Lebrun JD, Trinsoutrot-Gattin I, Vincelas-Akpa M, Bailleul C, Brault A, Mougin C, Laval K. Assessing impacts of copper on soil enzyme activities in regard to their natural spatiotemporal variation under long-term different land uses [J]. *Soil Biol Biochem*, 2012, **49**: 150-156
- Rasool N, Reshi ZA, Shah MA. Effect of butachlor(G) on soil enzyme activity [J]. *Eur J Soil Biol*, 2014, **61**: 94-100
- 张焱华, 吴敏, 何鹏, 余贵连, 吴炳孙, 韦家少. 土壤酶活性与土壤肥力关系的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, **35** (34): 11139-11142 [Zhang YH, Wu M, He P, She GL, Wu BS, Wei JS. Research advance of the relationship between soil enzyme activity and soil fertility [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2007, **35** (34): 11139-11142]
- 王启兰, 王长庭, 刘伟, 曹广民, 龙瑞军. 江源区人工草地植物群落和土壤酶活性变化[J]. 应用与环境生物学报, 2010, **16** (5): 662-666 [Wang QL, Wang CT, Liu W, Cao GM, Long RJ. Changes in plant communities and soil enzyme activities of artificial grasslands in Headwater Areas of the Yangtze and Yellow Rivers [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2010, **16** (5): 662-666]
- Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Leiros MC, Seoane S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties [J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, **37** (5): 877-887
- Webster R, Oliver MA. Statistical methods in soil and land resource survey [M]. Oxford: Oxford University Press, 1990
- 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000 [Bao SD. Soil and agricultural chemistry analysis [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000]
- 李振高, 骆永明, 腾应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008
- 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000 [Cheng LJ, Xue QH. Laboratory manual of microbiology [M]. Xi'an: The World Publishing Corporation, 2000]
- Yu ZT, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Appl Environ Microb*, 2004, **70** (8): 4800-4806
- 陈法霖, 张凯, 郑华, 林学强, 欧阳志云, 屠乃美. PCR-DGGE技术解析针叶和阔叶凋落物混合分解对土壤微生物群落结构的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2011, **17** (2): 145-150 [Chen FL, Zhang K, Zheng H, Lin XQ, Ouyang ZY, Tu NM. Analyzing the effect of mixed decomposition of conifer and broadleaf litters on soil microbial communities by using RCR-DGGE [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2011, **17** (2): 145-150]
- 唐杰, 徐青锐, 王立明, 丁祥, 汤博, 吴俐莎, 冯甦, 孙群, 杨志荣, 张杰. 若尔盖高原湿地不同退化阶段的土壤细菌群落多样性[J]. 微生物学通报, 2011, **38** (5): 677-686 [Tang J, Xu QR, Wang LM, Ding X, Tang B, Wu LS, Feng S, Sun Q, Yang ZR, Zhang J. Soil bacterial community diversity under different stages of degradation in zoige wetland [J]. *Microbiol China*, 2011, **38** (5): 677-686]
- 李小林, 辜运富, 张小平, 涂仕华, 伍仁军. 烟草成熟期根际硝化细菌种群的结构及其多样性[J]. 中国农业科学, 2011, **44** (12): 2462-2468 [Li XL, Zhang YF, Zhang XP, Tu SH, Wu RJ. Nitrobacteriacommunity and diversity in the rhizosphere soil of mature *Tobacco* [J]. *Sci Agric*

- Sin, 2011, **44** (12): 2462-2468]
- 22 Bell T, Ager D, Song J, Newman JA, Thompson P, Lilley AK, Gast CJ. Lager islands house more bacterial taxa [J]. *Science*, 2005, **308** (5730): 1884
 - 23 Li XL, Penttinen P, Gu Y, Zhang X. Diversity of *nifH* gene in rhizosphere and non-rhizosphere soil of tobacco in Panzhihua, China [J]. *Ann Microbiol*, 2012, **62**: 995-1001
 - 24 全国土壤普查办公室. 中国土壤[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998
 - 25 李华, 陈英旭, 梁新强, 田光明, 俞巧钢. 土壤脲酶活性对稻田田面水氮素转化的影响[J]. 水土保持学报, 2006, **20** (1): 55-58 [Li X, Chen YX, Liang XQ, Tian GM, Yu QG. Influence of soil urease activities on nitrogen conversion in floodwater in paddy field [J]. *J Soil Water Convers*, 2006, **20** (1): 55-58]
 - 26 刘新春, 吴成强, 杨清香, 杨敏. PCR-DGGE方法的建立及其在微生物生态群落分析中的应用探讨[C]//张洪勋, 庄绪亮. 微生物生态学研究进展——第五届微生物生态学术研讨会论文集. 北京: 气象出版社, 2003: 32-40
 - 27 罗倩, 黄宝灵, 唐治喜, 来利明, 魏伟, 郑元润. 新疆盐渍土3种植被类型土壤微生物碳源利用[J]. 应用与环境生物学报, 2013, **19** (1): 96-106 [Luo Q, Huang BL, Tang ZX, Lai LM, Wei W, Zheng YR. Carbon source utilization of microbes in saline soil of three vegetation types in Xinjiang, China [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, **19** (1): 96-104]
 - 28 林海明. 如何用SPSS软件一步算出主成分得分[J]. 统计与信息论坛, 2007, **22** (5): 15-17 [Lin HM. How to use SPSS software calculate the value of the Principal Component Scores in one step [J]. *Stats Inform Forum*, 2007, **22** (5): 15-17]
 - 29 李小胜, 陈珍珍. 如何正确应用SPSS软件做主成分分析[J]. 统计研究, 2010, **27** (8): 105-108 [Li XS, Chen ZZ. Correctly using SPSS software for Principal Components Analysis [J]. *Stat Res*, 2010, **27** (8): 105-108]
 - 30 Yan QY, Yu YH, Feng WS. Plankton community composition in the Three Gorges Reservoir Region revealed by PCR-DGGE and its relationships with environmental factors [J]. *J Environ Sci*, 2008, **20**: 732-738
 - 31 杨万勤, 王开运. 土壤酶研究动态与展望[J]. 应用与环境生物学报, 2002, **8** (5): 564-570 [Yang WQ, Wang KY. Advances on soil enzymology [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2002, **8** (5): 564-570]
 - 32 曹慧, 孙辉, 杨浩, 孙波, 赵其国. 土壤酶活性及其对土壤质量的指示研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2003, **9** (1): 105-109 [Cao H, Sun H, Yang H, Sun B, Zhao QG. A review soil enzyme activity and its indication for soil quality [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2003, **9** (1): 105-109]
 - 33 唐玉妹, 慈恩, 颜廷梅, 魏朝富, 杨林章, 沈明星. 太湖地区长期定位试验稻麦两季土壤酶活性与土壤肥力关系[J]. 土壤学报, 2008, **45** (5): 1000-1006 [Tang YS, Ci E, Yan TM, Wei CF, Yang LZ, Shen MX. Relationship between soil enzyme activity and soil fertility of paddy fields under water-rice cropping system in a long-term experiment in TAIHU lake region [J]. *Acta Pedol Sin*, 2008, **45** (5): 1000-1006]
 - 34 Eilers H, Pernthaler J, Amann R. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 4634-4640
 - 35 Uphoff HU, Felske A, Fehr W, Wagner-Dobler I. The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **35**: 249-258
 - 36 Yeon SH, Jeong WJ, Park JS. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns [J]. *J Microbiol*, 2005, **43**: 1-10
 - 37 吴涛, 依艳丽, 谢文军, 许杰, 姚志刚, 李小彬, 王君. 产生物表面活性剂耐盐菌的筛选鉴定及其对石油污染盐渍化土壤的修复作用[J]. 环境科学学报, 2013, **33** (12): 3359-3360 [Wu T, Yi YL, Xie WJ, Xu J, Yao ZG, Li XB, Wang J. Isolation and identification of halotolerant biosurfactant-producing bacteria and its application in bioremediation of petroleum-contaminated saline soil [J]. *Acta Sci Circumst*, 2013, **33** (12): 3359-3360]
 - 38 刘力嘉, 马玉龙, 谢丽, 张新莎. 泰乐菌素降解菌的分离鉴定及其系统发育分析[J]. 应用与环境生物学报, 2012, **18** (6): 1038-1042 [Isolation, identification and phylogenetic analysis of a Tylosin-degrading strain [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2012, **18** (6): 1038-1042]
 - 39 Baldrian P, Merhautová V, Petránková M, Cajthaml T, Šnajdr J. Distribution of microbial biomass and activity of extracellular enzymes in a hardwood forest soil reflect soil moisture content [J]. *Appl Soil Ecol*, 2010, **46** (2): 177-182