

阿维菌素杀虫剂对甘蓝叶际微生物群落结构的影响

张保国^{1,2}, 唐玲^{1,3}, 李祖明⁴, 王会利¹, 许雯婷¹, 张洪勋^{1,2}, 庄国强¹, 白志辉^{1*}

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083; 4. 北京联合大学师范学院, 北京 100011)

摘要:植物的叶际存在各种类型微生物包括不同类型的细菌、丝状真菌、酵母、藻类等, 它们发挥着重要的生态功能. 本研究首次利用磷脂脂肪酸分析(PLFA)和末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP) 2种非培养方法评价2种不同剂量的阿维菌素杀虫剂喷施甘蓝后对叶际微生物群落的影响. 结果表明, 低剂量阿维菌素农药处理对甘蓝叶际微生物的生物量和群落结构影响不显著, 而高剂量阿维菌素杀虫剂处理明显地改变了甘蓝叶际微生物的群落结构和组成, 减少了总叶际微生物生物量、细菌生物量和革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌特征磷脂脂肪酸之间的比值, 而真菌生物量变化不大. PLFA分析结果表明经高剂量阿维菌素农药处理后增加了不饱和脂肪酸 16:1 ω 9、18:1 ω 7和环丙烷脂肪酸 cy17:0、cy19:0的含量, 而减少了饱和脂肪酸 i15:0、a15:0、i16:0和a17:0的含量. T-RFLP分析结果表明经高剂量阿维菌素农药处理后出现一些新的酶切片段(如58、96、236和420 bp), 这些片段所属的微生物对甘蓝叶片上阿维菌素的降解可能发挥重要的作用; 而一些酶切片段消失(如51、89、99、338、66、223和482 bp), 这些片段所属的微生物可能对阿维菌素类农药残留的指示具有重要意义.

关键词:阿维菌素; 叶际; 微生物群落; PLFA; T-RFLP

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)05-1292-06

Effect of Abamectin Insecticide on The Microbial Community in Broccoli Phyllosphere

ZHANG Bao-guo^{1,2}, TANG Ling^{1,3}, LI Zu-ming⁴, WANG Hui-li¹, XU Wen-ting¹, ZHANG Hong-xun^{1,2}, ZHUANG Guo-qiang¹, BAI Zhi-hui¹

(1. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Civil & Environment Engineering School, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China; 4. Teacher's College of Beijing Union University, Beijing 100011, China)

Abstract: The indigenous microbial communities within the plant phyllosphere are highly diverse and include many different species of bacteria, filamentous fungi, yeasts and algae which play important ecological roles. This study was the first attempt to assess the impact of abamectin treatments on microbial communities of broccoli phyllosphere using two culture-independent techniques of phospholipid fatty acid analysis (PLFA) and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). Results showed that low concentration of abamectin treatments did not affect the microbial biomass and microbial community structure of broccoli phyllosphere significantly. However, high concentration of abamectin treatments significantly change the microbial community structure including a decrease of total and bacterial biomass, and a decrease in the ratio of Gram-positive bacteria to Gram-negative bacteria, but did not change the fungal biomass. Moreover, PLFA suggested that the number of unsaturated and cyclopropane phospholipid fatty acids (PLFAs: 16:1 ω 9, 18:1 ω 7, cy17:0 and cy19:0) increased with high concentration abamectin treatment, while the saturated PLFAs i15:0, a15:0, i16:0 and a17:0 decreased. The appearance terminal restriction fragments (T-RFs: 58, 96, 236 and 420 bp) indicated that some bacteria might play a significant role in abamectin degradation in broccoli phyllosphere, while the disappeared T-RFs (51, 89, 99, 338, 66, 223 and 482 bp) implied some other bacteria might potentially serve as microbial indicator of abamectin exposure.

Key words: abamectin; phyllosphere; microbial community; phospholipid fatty acid analysis (PLFA); terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

植物地上部分(包括叶、茎、花、果等)的表面和内部存在有大量的各种类型的细菌、丝状真菌、酵母、藻类等微生物. 这种植物地上部分的生境称为叶际 (phyllosphere), 这些在叶际生存的微生物称为叶际微生物^[1]. 这些叶际微生物中不仅有阻碍植物生长、发育的病原微生物, 还有相当一部分的非病原微生物, 它们起着重要的生态功能, 如: 促进植物的生长发育、抵御病害微生物、改变植物表面特性、生物

固氮、降解有机污染物以及可以作为理想的有机物污染的传感器等^[2-5]. 而植物叶际微生物的生存环境相当不稳定, 甚至是恶劣, 如温度和相对湿度波动

收稿日期: 2008-02-25; 修订日期: 2008-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30600082); 北京市优秀人才培养项目(20061D0302200295); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06A407)

作者简介: 张保国(1977-), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物技术.

* 通讯联系人. E-mail: zhbai@cees.ac.cn

大、紫外线辐射强、植物种类及其生长的土壤特性千差万别等,这些因素都会影响叶际微生物的群落结构^[1,3,6,7]。由于叶际环境的复杂性,为了适应在叶际环境中生存,叶际微生物的群落特征也很可能非常复杂,这些微生物也可能为人们提供许多编码了具有很强耐受特性的基因资源^[1]。

农药在现代化农业发展过程中发挥了重要作用,但是大量施用的农药,不仅能够杀灭害虫或植物病原菌,而且对其他叶际微生物的影响也是非常直接的。利用生物化学与分子生物学技术来进行农药污染物的环境风险评价正在被广泛应用^[8,9]。利用这些技术可以有效地避免培养方法造成的微生物多样性的丢失,能够更有效更直接地反映环境中微生物的原始组成。目前对植物叶际微生物的研究主要集中在病原菌行为与防控方面,而利用这些非培养技术评价农药胁迫对植物叶际微生物多样性影响的研究在国内外鲜有报道。

阿维菌素(abamectin)是由阿维链霉菌发酵而得到的基本结构为十六元大环内酯二糖苷类化合物,具有高效、低毒及杀虫谱广等优点,作为高毒有机磷类农药的替代品已广泛用于防治蔬菜害虫^[10]。本实验是利用磷脂脂肪酸分析(PLFA)和末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)技术,研究了阿维菌素杀虫剂喷施甘蓝后对其叶际微生物群落的影响。本研究的目的是为了评价阿维菌素的生物毒性和生态效应,以期应用生物化学和分子生物学方法评价污染条件下叶际微生物多样性,确定植物叶际有机污染影响指标提供理论基础与技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验设计

甘蓝生长在大棚温室内(中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供)。实验期间大棚内日平均最高/最低温度为 17℃/27℃,平均相对湿度为 65%。当甘蓝生长处于结球期时,用阿维菌素(河北威远生物化工股份有限公司)喷施。实验设 3 个处理:处理 1(低剂量)为 1.8%阿维菌素乳油 667 m²施用 45 mL(推荐最大剂量);处理 2(高剂量)为 1.8%阿维菌素乳油 667 m²施用 90 mL(推荐最大剂量的 2 倍);处理 3(对照)不施药,喷洒清水。每组处理设 3 个重复,随机区组排列,小区面积 180 m²。待喷药雾滴挥发干后,分别于施药后 0、1、3、5、9、14、21 d 采集不同处理的叶片样本,所有样品放入 -20℃冰箱用于 PLFA 和 T-RFLP 分析。

1.2 从植物叶面提取微生物细胞

分别取 10 g 不同样品加入装有 100 mL 无菌的磷酸缓冲液(pH 7.0)中,超声波振荡(40 kHz)7 min。低速(500 r/min)离心 10 min 后去除掉植物叶片样品,然后 9 000 r/min 离心 8 min 后收集菌体沉淀,用于 PLFA 和 DNA 的提取。

1.3 磷脂脂肪酸分析(PLFA)

PLFA 分析方法参考 Pennanen 等^[11]所描述的方法。即取 0.2 g 上述收集的植物叶际微生物菌体悬浮于 50 mL 氯仿、甲醇和磷酸缓冲液(pH 7.2, 0.5 mol/L)的混合液(1:2:0.8, 体积比),避光振荡提取 2~4 h, 7 000 r/min 离心(15 min)取上清液,转入分液漏斗中,再加入 10 mL 磷酸缓冲液和 10 mL 氯仿,室温下避光静置分离(2~4 h),使单相提取液分离成两相。收集下层氯仿相,氮气吹干至 1 mL。用硅胶柱(100~200 目硅胶,用前 100℃活化 1 h)从中性脂和糖脂中分离出磷脂脂肪酸(PLFAs)。分别用 15 mL 氯仿、30 mL 丙酮和 15 mL 甲醇溶剂洗脱,收集甲醇的洗液,用氮气吹干。上步得到的样品加入 1 mL 甲醇-甲苯(1:1, 体积比)和 1 mL 0.56% (质量分数) KOH 的无水甲醇溶液,将溶液于 35℃下反应 30 min。冷却至室温,加入醋酸中和,再加入有机溶剂氯仿和正己烷(1:4, 体积比)2 mL 和适量超纯水后静置分层,取上清液(正己烷相),氮气吹干,上述提取物溶解于含有 33 μg/mL 的正十九烷脂肪酸甲酯(nonadecanoic acid methyl ester, Sigma Aldrich Co., USA)内标物的氯仿:正己烷(1:4, 体积比)溶剂中,氮气吹干,进行 GC-MS 检测。

气相色谱质谱联用仪(GC-MS)采用得是 HP6890 气相色谱-HP5973 质谱联用仪,检测中使用的升温程序如下:进样后在 50℃保持 1 min,之后以 12℃/min 的速率升到 180℃,保持 2 min 后,以 6℃/min 的速率上升到 220℃,停留 2 min 后以 15℃/min 的速率上升到 240℃,保持 1 min 后以 15℃/min 的速率达到最终温度 260℃,并在此保持 15 min。气相色谱与质谱之间得连接温度为 280℃,用高纯氮气(1 mL/min)作载气。质谱仪采用电子电离(EI)方式,电子能量为 70 eV。PLFA 的定性根据质谱标准图谱和已有的相关报道,以正十九烷脂肪酸甲酯内标物进行定量计算。

1.4 T-RFLP 分析

1.4.1 DNA 提取

采用改进的化学裂解法直接提取植物叶际微生物基因组 DNA^[12],方法改进后如下:取 0.2 g 上述收

集的植物叶际微生物菌体悬浮于 800 μL 裂解液中, 加入 5 μL 50 mg/mL 的溶菌酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min; 加入 20% 的 SDS 溶液使其终浓度为 2%, 混匀, 60 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h; 再加入 5 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min; 加入等体积的氯仿, 混匀, 1 000 r/min 离心 8 min; 上清液加入 0.6 倍体积的冷异丙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 h 后 12 000 r/min 离心 20 min; 弃上清, 干燥后重悬于 30 μL TE 缓冲液中。

1.4.2 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增和纯化

将提取的基因组 DNA 作为聚合酶链式反应 (PCR) 的模板, 采用通用引物扩增细菌 16S rDNA. 正向引物为 8-27F, 反向引物为 1378-1401R, 它们的序列分别为: 8-27F: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1378-1401R: (5'-TACCTTGTACGACTT-3')^[13]. 正向引物 5' 端用 6 羧基二乙酸荧光素 (FAM) 标记, 带标记的引物由上海基康生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系总体积为 50 μL , 内含 *Taq* DNA 聚合酶缓冲液 5 μL , MgCl_2 2.5 mmol/L, dNTPs (each) 0.25 mmol/L, 正向和反向引物各 0.5 mmol/L, 模板 30 ng, *Taq* DNA 聚合酶 (Programa) 4 单位. 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 前 20 个循环为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 65 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min (其中每个循环后复性温度下降 0.5 $^{\circ}\text{C}$), 后 10 个循环为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 7 min. PCR 产物用纯化试剂盒 (OMEGA) 纯化, 方法按说明操作。

1.4.3 酶切分析

纯化后的 PCR 产物用内切酶 *Rsa* I (NEB) 消化, 20 μL 中反应体系包含 10 \times NEB 缓冲液 2 μL , DNA 200 ng, *Rsa* I 5 U, 加入灭菌双蒸水至 20 μL . 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 6 h, 然后 65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min 将酶灭活. 酶切产物的 T-RFLP 分析由上海基康生物技术有限公司完成。

1.5 数据分析

PLFA 数据使用 SPSS (version 11.5) 进行主成分分析 (principal components analysis, PCA). 每种磷脂脂肪酸的量浓度都进行底数为 10 的对数转换, 得到的 PCA 数值用相关系数矩阵进行方差分析。

对于 T-RFLP 数据, 根据酶切图谱上不同酶切片段的有 (记为 1) 无 (记为 0) 构建二元矩阵. 利用 NTSYSpc 2.1 软件中的 Qualitative data 进行 Jaccard 相似性系数分析, 并通过非加权配对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析, 并绘制树状聚类图。

2 结果与讨论

2.1 PLFA 分析

磷脂是几乎所有微生物细胞膜的重要组成部分, 在自然生理条件下其含量相对恒定. 不同的微生物含有不同种类和数量的 PLFAs, 一些脂肪酸还特异性地存在与某种类微生物细胞膜中, PLFAs 可以作为微生物生物量和群落结构变化的生物标记分子^[14]. 由图 1(a) 可以看出, 低剂量阿维菌素农药处理后甘蓝叶际总微生物 PLFAs 和标记细菌的 PLFAs 含量变化不大. 而高剂量处理后甘蓝叶际总微生物 PLFAs 量明显的降低 ($p < 0.05$), 且在处理 9 d 后含量趋于稳定. 高剂量农药处理后甘蓝叶际细菌磷脂量变化情况与总微生物磷脂含量变化趋势一致 [图 1(b)], 不同之处在于处理 14 d 后其含量才趋于稳定. 而 2 种不同剂量阿维菌素农药处理后, 甘蓝叶际真菌磷脂含量变化不明显 [图 1(c)]. 革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌 PLFAs 含量之比 (GP/GN) 可以揭示污染物对微生物生态系统的影响^[15], 由图 1(d) 可知高剂量阿维菌素农药处理后 GP/GN 比值显著降低, 而低剂量阿维菌素农药处理对 GP/GN 比值影响不明显. 表明高剂量的阿维菌素农药的施用会明显减少甘蓝叶片上的总微生物和细菌生物量, 并增加革兰氏阴性菌在整个微生物系统中的比重. 总的微生物尤其是细菌生物量的减少表明高剂量的阿维菌素农药对部分甘蓝叶际微生物具有一定的生物毒性. 而革兰氏阴性菌在整个细菌微生态系统中比重的增加可能是因为革兰氏阴性菌具有抵抗阿维菌素农药毒性的能力, 也有可能降解农药, 并利用其作为营养物质而生长. 真菌则可能是由于其特殊的细胞壁结构使其对阿维菌素具有一定的耐受性, 在整个实验过程中其生物量变化不明显。

采用主成分分析法 (PCA) 将提取的 PLFAs 化为少数几个综合变量 (即主成分)^[16], 以反映经阿维菌素农药处理后叶际微生物群落结构变化情况. PCA 分析结果 (图 2) 表明, 低剂量阿维菌素农药处理对甘蓝叶际微生物群落组成影响不大, 而高剂量处理则明显地改变了甘蓝叶际微生物群落的结构. 从第一主成分看, 所有对照样品点和低剂量阿维菌素农药处理的样品点 (不同时间) 分布在主成分分析图的右边, 而经高剂量阿维菌素农药处理的样品点 (不同时间) 分布在左边. 第二主成分则主要把不同取样时间的样品点分开, 揭示了样品在不同时间的差异性. 第一主成分对总 PLFAs 数据变异的贡献率为 51%.

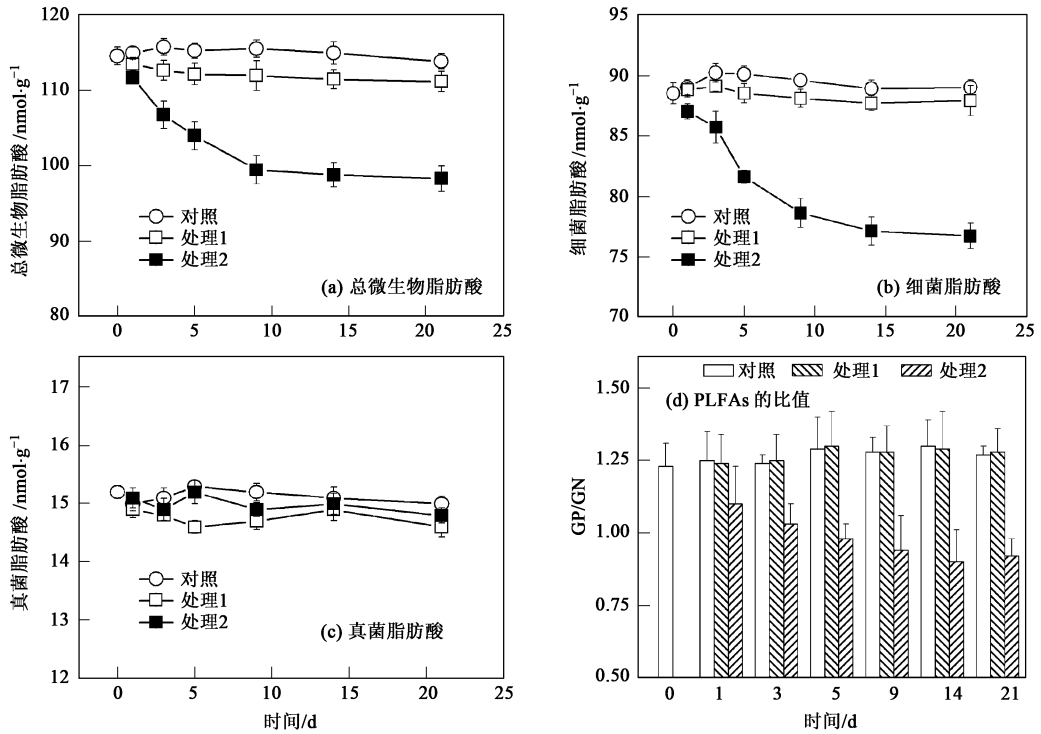


图1 总微生物脂肪酸、细菌脂肪酸、真菌脂肪酸和革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌特征 PLFAs 之间的比值
Fig. 1 Total PLFAs, bacteria PLFAs, fungal PLFAs and the ratio of Gram-positive to Gram-negative bacteria PLFAs

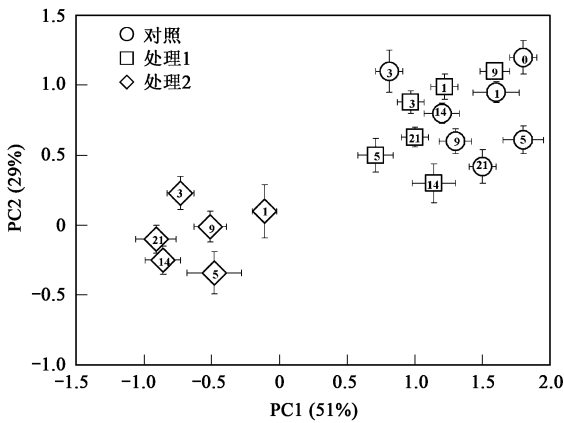


图2 不同的阿维菌素农药浓度处理磷脂脂肪酸图谱主成分分析
Fig. 2 PCA showing variation in PLFA pattern in different abamectin concentration treatment

第二主成分对总 PLFAs 数据变异的贡献率为 29%。图3表示的是单体 PLFAs 在主成分上的载荷值,可以看出,饱和支链 PLFAs i15: 0、a15: 0、i16: 0 和 a17: 0 与第一主成分正相关,这些 PLFAs 与对照甘蓝叶际样品和低剂量处理后样品相关性较高。而不饱和的 PLFAs 16: 1 ω 9t、18: 1 ω 7 以及环丙烷 PLFAs cy17: 0、cy19: 0 与第一主成分负相关,这些 PLFAs 与经高剂量阿维菌素农药处理后甘蓝叶际样品相关性

较高。这些结果表明经高剂量阿维菌素农药处理后 PLFAs 16: 1 ω 9t、18: 1 ω 7、cy17: 0、cy19: 0 在甘蓝叶际微生物中的含量增加,而 PLFAs i15: 0、a15: 0、i16: 0 和 a17: 0 的含量减少。PLFA 16: 1 ω 9t、18: 1 ω 7、cy17: 0、cy19: 0 用来标记革兰氏阴性菌^[17],表明革兰氏阴性菌在高剂量阿维菌素农药处理后生物量增加,这可能是因为一些革兰氏阴性菌能够利用阿维菌素农药作为营养物质,降解阿维菌素农药来促进自身生长导致其生物量增加。

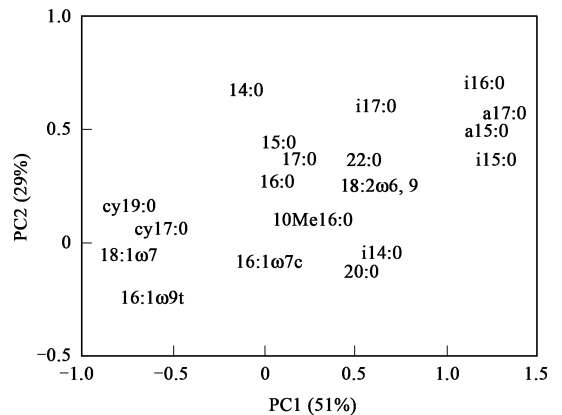


图3 单体 PLFAs 的主成分载荷值

Fig. 3 Loading values for individual PLFA with principal components

2.2 T-RFLP 分析

酶切图谱上每一个末端限制性酶切片段(T-RFs)代表一种类型的微生物^[18].为了评价阿维菌素农药对甘蓝叶际上主要微生物的影响,笔者主要研究了相对面积>1%的T-RFs.图4是对照样品(7个样品点)和2个不同剂量阿维菌素农药处理后样品(6个样品点)的T-RFs变化情况.与对照样品相比,低剂量阿维菌素农药处理样品的T-RFs种类和数量变化不明显;而对于高剂量阿维菌素农药处理的样品,T-RFs的种类和数量都发生了显著的变化.长度为51、89、99和338 bp片段所属的微生物在经高剂量阿维菌素农药处理后的样品里已经消失;66、223和482 bp片段所属的微生物数量明显的减少;而经高剂量阿维菌素农药处理后的甘蓝叶际上出现了一些新的微生物T-RFs(如58、96、236和420 bp);片段44、195、331、465和473所代表的微生物在处理前后变化不大.经高剂量阿维菌素农药处理后一些T-RFs的消失和减少(如51、89、99、338、66、223和482 bp)表明这些片段所属微生物对高剂量阿维菌素农药比较敏感,作为阿维菌素农药残留的指示菌具有一定潜力.而一些出现新的条带如58、96、236和420 bp可能会以阿维菌素农药作为营养物质而生长,具有降解阿维菌素农药残留的潜力.

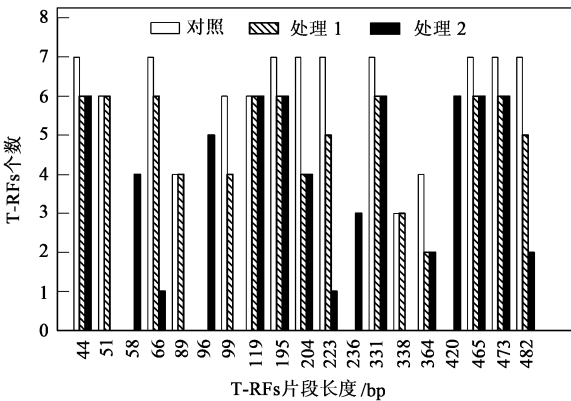


图4 不同浓度阿维菌素农药处理下甘蓝叶际细菌T-RFs片段的变化情况

Fig. 4 Changes in the T-RFs number of broccoli phyllosphere bacteria due to different abamectin concentration treatment

T-RFLP 图谱的聚类分析(图5)结果显示,低剂量阿维菌素农药处理(处理1)后甘蓝叶际细菌种群组成与对照样品的组成相似,同属于第I组类型,说明低剂量阿维菌素农药处理对甘蓝叶际细菌群落组成影响不大.而高剂量阿维菌素农药处理后的样品则属于第II组类型,表明高剂量阿维菌素农药处理

导致了甘蓝叶际细菌群落结构的变化,这与PLFA方法得出的结论一致.而且笔者还注意到,在第I组类型中,不同采样时间所有对照样品叶际细菌群落的相似性达到85%以上,说明在短时期内甘蓝叶际细菌群落结构变化不大.而对于高剂量阿维菌素农药处理后叶际细菌群落不同时间差异比较大(相似度<60%).

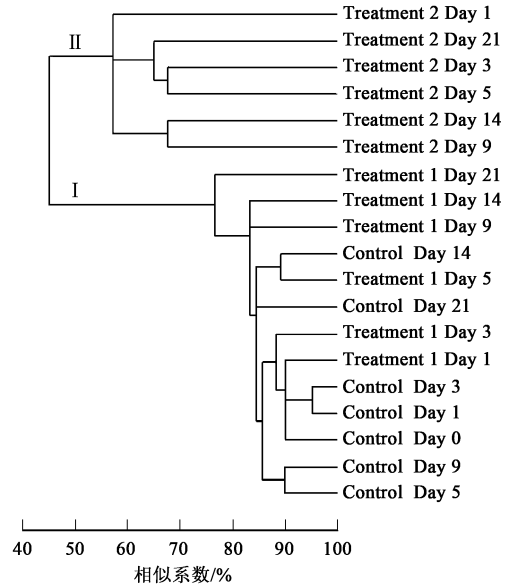


图5 不同浓度阿维菌素胁迫下甘蓝叶际细菌种群组成相似性矩阵图

Fig. 5 Similarity matrix of bacterial composition in broccoli phyllosphere under the stress of abamectin

据报道,高效氯氟菊酯农药即使在推荐使用剂量也会引起植物叶际微生物群落结构发生显著变化,主要是引起细菌生物量明显增加,真菌生物量显著降低^[19].而阿维菌素农药在推荐使用剂量对甘蓝叶际微生物群落结构影响不明显,可能从一个侧面显示了该农药的生态安全性比较高.

3 结论

(1) 利用PLFA和T-RFLP这2种非培养方法分析结果表明低剂量阿维菌素杀虫剂处理对甘蓝叶际微生物的群落结构影响不明显,而高剂量阿维菌素农药处理后则会显著地影响甘蓝叶际微生物群落的结构和组成.

(2) 高剂量阿维菌素杀虫剂处理后甘蓝叶际的总微生物量、细菌生物量和革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌特征PLFAs之间的比值减少,而对真菌的生物量影响不明显.

(3) PLFA分析结果表明高剂量阿维菌素农药

处理后一些不饱和的脂肪酸 16: 1 ω 9t、18: 1 ω 7、cy17: 0、cy19: 0 含量增加,而减少了饱和脂肪酸 i15: 0、a15: 0、i16: 0 和 a17: 0 的含量。

(4) T-RFLP 分析结构表明甘蓝叶际上有些细菌对阿维菌素比较敏感,处理后这些细菌的数量减少甚至消失,作为阿维菌素农药残留的指示菌具有一定潜力.而有些细菌数量显著增加,可能会利用阿维菌素农药作为营养物质生长,具有降解阿维菌素农药残留的潜力。

参考文献:

- [1] Lindow S E, Brandl M T. Microbiology of the phyllosphere [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, **69** (4): 1875-1883.
- [2] Leveau J, Lindow S E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (6): 3446-3453.
- [3] Hirano S S, Upper C D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, **64** (3): 624-653.
- [4] Murty M G. Phyllosphere of cotton as a habitat for diazotrophic microorganisms [J]. Appl Environ Microbiol, 1984, **48** (4): 713-718.
- [5] Sandhu A, Halverson L J, Beattie G A. Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere [J]. Environ Microbiol, 2007, **9** (2): 383-392.
- [6] Gau A E, Dietrich C, Kloppstech K. Non-invasive determination of plant-associated bacteria in the phyllosphere of plants [J]. Environ Microbiol, 2002, **4** (11): 744-752.
- [7] Kadivar H, Stapleton A E. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity [J]. Microb Ecol, 2003, **45** (4): 353-361.
- [8] 段学军, 闵航. 镉胁迫下稻田土壤微生物基因多样性的 DGGE 分子指纹分析 [J]. 环境科学, 2004, **25** (5): 122-126.
- [9] Chinalia F A, Killham K S. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) biodegradation in river sediments of Northeast-Scotland and its effect on the microbial communities (PLFA and DGGE) [J]. Chemosphere, 2006, **64**: 1675-1683.
- [10] 谢显传, 张少华, 王冬生, 等. 阿维菌素对蔬菜地土壤微生物及土壤酶的生态毒理效应 [J]. 土壤学报, 2007, **44** (4): 740-743.
- [11] Pennanen T, Liski J, Baath E, *et al.* Structure of the microbial communities in coniferous forest soils in relation to site fertility and stand development stage [J]. Microb Ecol, 1999, **38** (2): 168-179.
- [12] 杨朝晖, 肖勇, 曾光明, 等. 用于分子生态研究的堆肥 DNA 提取方法 [J]. 环境科学, 2006, **27** (8): 1613-1617.
- [13] 李光伟, 刘和, 云娇, 等. 应用 T-RFLP 技术研究五氯酚对好氧颗粒污泥中细菌组成的影响 [J]. 环境科学, 2006, **27** (4): 794-799.
- [14] Frostegard A, Tunlid A, Baath E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, **59** (11): 3605-3617.
- [15] Pennanen T, Frostegard A, Frize H, *et al.* Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal polluted gradients in coniferous forests [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62** (2): 420-428.
- [16] 苏荣国, 胡序朋, 张传松, 等. 荧光光谱结合主成分分析对赤潮藻的识别测定 [J]. 环境科学, 2007, **28** (7): 1529-1533.
- [17] Ben-David E A, Holden P J, Stone D J, *et al.* The use of phospholipid fatty acid analysis to measure impact of acid rock drainage on microbial communities in sediments [J]. Microb Ecol, 2004, **48** (3): 300-315.
- [18] 刘和, 李光伟, 云娇, 等. 好氧颗粒污泥和活性污泥细菌种群结构对五氯酚污染的响应研究 [J]. 环境科学学报, 2006, **26** (9): 1445-1450.
- [19] Zhang B G, Zhang H X, Jin B, *et al.* Effect of cypemethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere [J]. J Environ Sci, 2008, **20** (11): 1356-1362.