

## 研究报告

## 大水面放养水葫芦对富营养化湖泊水体可培养细菌群落结构的影响

郑有坤 刘凯 熊子君 苗翠苹 陈有为 徐丽华 赵立兴\*

(云南大学 云南省微生物研究所 西南微生物多样性教育部重点实验室 云南 昆明 650091)

**摘要:**【目的】了解大水面放养水葫芦对富营养化湖泊水体可培养细菌群落结构和多样性的影响。【方法】采用稀释平板法, 分别对云南滇池紫根水葫芦放养区(ZW)、野生型普通水葫芦放养区(PW)、未放养水葫芦对照区(CK)水体中细菌进行分离, 并对其 16S rRNA 序列进行分析。【结果】分别从 ZW、PW、CK 3 种水体分离得到 54、49、40 株菌落形态差异的细菌, Shannon-Wiener 多样性指数分别为 3.17、3.07、2.73, 细菌数量分别为  $1.35 \times 10^7$ 、 $8.35 \times 10^6$ 、 $2.70 \times 10^6$  CFU/L。16S rRNA 序列分析表明, ZW、PW、CK 3 种水体可培养细菌主要包括变形菌门  $\alpha$  亚群(Alphaproteobacteria, 35.1%、32.4%和 40%)、放线菌门(Actinobacteria, 18.9%、32.4%和 20%)、变形菌门  $\beta$  亚群(Betaproteobacteria, 13.5%、5.9%和 16.0%)、变形菌门  $\gamma$  亚群(Gammaproteobacteria, 13.5%、14.6%和 12.0%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 13.5%、8.8%和 8.0%)和厚壁菌门(Firmicutes, 2.7%、5.9%和 4.0%)。在属的水平上, 3 种水体仅有鞘氨醇盒菌属(*Sphingopyxis*)、红细菌属(*Rhodobacter*)、黄色杆菌属(*Xanthobacter*)、新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等 10 个属的细菌为共有菌属。【结论】大水面放养水葫芦提高了富营养化湖泊水体中可培养细菌的多样性, 改变了细菌的群落结构。

**关键词:** 水葫芦, 富营养化, 滇池, 可培养细菌, 群落结构, 多样性

## Effect of large-scale planting water hyacinth on cultivable bacterial community structure in the eutrophic lake

ZHENG You-Kun LIU Kai XIONG Zi-Jun MIAO Cui-Ping CHEN You-Wei

XU Li-Hua ZHAO Li-Xing\*

(Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the impact of large-scale planting water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) on the cultivable bacterial community structure and diversity in the eutrophic lake. [Methods] Diluting plate counting method was applied to monitor the cultivate bacteria communities in three water hyacinth planting areas composed of purple root water hyacinth planting area (ZW),

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. U0932601, 21062028); 云南大学校基金项目(No. 2010YB001)

\*通讯作者: Tel: 86-871-65034073; ✉: zlx70@163.com

收稿日期: 2014-05-07; 接受日期: 2014-07-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-07-15

wild-type water hyacinth planting area (PW) and non-planting sites (control, CK), and then the 16S rRNA gene of the isolates were sequenced. [Results] 54, 49 and 40 isolates with various morphological characteristics were obtained from ZW, PW and CK, respectively. The Shannon-Wiener diversity indexes were 3.17, 3.07 and 2.73, respectively. And the quantities of the culturable bacterial in ZW, PW and CK were  $1.35 \times 10^7$  CFU,  $8.35 \times 10^6$  CFU,  $2.70 \times 10^6$  CFU of per Liter, respectively. The 16S rRNA sequencing result showed that at the common and dominant phylum species among the three sampling sites were Alphaproteobacteria, which accounting for 35.1%, 32.4% and 40.0% of total culturable bacteria, and Actinobacteria which accounting for 18.9%, 32.4% and 20.0%, and Betaproteobacteria which accounting for 13.5%, 5.9% and 16%, and Gammaproteobacteria which accounting for 13.5%, 14.6% and 12.0%, and Bacteroidetes which accounting for, 13.5%, 8.8% and 8.0%, and Firmicutes which accounting for 2.7%, 5.9% and 4.0%, respectively. Only ten genera *Sphingopyxis*, *Rhodobacter*, *Xanthobacter*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Flavobacterium* and *Bacillus* were shared by all the three water samples. [Conclusion] This study indicates that large-scale planting water hyacinth could both increase the cultivated bacterial diversity and modify the bacterial community composition in the eutrophic lake.

**Keywords:** Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), Eutrophication, Lake Dianchi, Cultivable bacterial, Community structure, Diversity

水葫芦, 学名凤眼莲(*Eichhornia crassipes*), 多年水生漂浮植物, 因其具有极强的氮、磷吸收能力和重金属富集能力, 且根部能分泌抑藻物质抑制蓝藻的生长, 被广泛用于富营养化水体, 特别是藻型富营养化水体的生态修复中<sup>[1-5]</sup>。但水葫芦作为一种恶性外来入侵杂草, 已经引起了一系列的生态、经济、社会问题, 一些研究者担忧水葫芦的生长会威胁其他水体生物群落结构及其多样性<sup>[6-7]</sup>。有关大水面放养水葫芦对底栖动物、浮游动物以及浮游藻类群落结构与多样性的影响已有报道<sup>[7-9]</sup>。而细菌是湖泊生态系统中的重要组成部分, 驱动着湖泊生态系统中绝大多数生物活性元素的形态转化和地球化学循环, 有关水葫芦对湖泊水体细菌群落结构及其多样性影响的研究还未见报道。

滇池位于昆明市西南(N24°23′-26°22′, E102°10′-103°40′), 是云贵高原面积最大的淡水湖, 面积约 300 km<sup>2</sup>, 平均水深 4.7 m<sup>[8]</sup>。由于城市化进程的飞速发展, 自 20 世纪 80 年代以来, 排入滇池的污染物不断增加, 水质恶化, 整个湖泊富营养化问题十分严重, 并爆发严重的蓝藻水华。近年来, 水葫芦被广泛应用于滇池水污染的治理, 取得了一系列实用性进展<sup>[1,10]</sup>。目前, 滇池中放养的水葫芦主要有两个品种: 紫根水葫芦和野生普通水葫芦。紫根水葫芦系云南省生态农业研究所诱导培育而成, 叶柄短

小, 根系发达, 根长最长可达 150 cm, 去污能力和抑制蓝藻的能力均显著强于普通水葫芦<sup>[11-12]</sup>。

本研究以滇池紫根水葫芦放养区、普通水葫芦放养区以及未放养水葫芦区域水体为研究对象, 通过对 3 种水体中的可培养细菌进行分离鉴定, 分析可培养细菌群落结构与多样性, 初步探讨了水葫芦对水体细菌群落结构与多样性的影响, 为进一步认识水葫芦对水体生物多样性的影响, 科学评价其在生态修复工程中的安全性提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:** 采样区位于滇池外海西侧的晖湾水葫芦放养区。于 2013 年 9 月水葫芦生长旺盛期分别采集紫根水葫芦放养区(ZW)、普通水葫芦放养区(PW)以及周围未放养水葫芦区域(CK)水样, 每个区域选择 5 个采样点, 采集水面下 0-30 cm 水样, 混合均匀。实验样品为各区域采样点的混合水样, 样品带回实验室立即进行细菌的分离。

**1.1.2 培养基:** 牛肉膏蛋白胨培养基(NA)<sup>[13]</sup>。

### 1.2 细菌的分离和计数

样品经系列梯度稀释后涂布在 NA 培养基上, 28 °C 倒置恒温培养, 5 d 后统计数量。挑取具有不同菌落形态的单菌落进一步纯化, 纯化后的菌种转

接到 NA 斜面, 4 °C 保存。

### 1.3 16S rRNA 序列分析

参照文献[14]的方法提取菌株基因组 DNA。以细菌 16S rRNA 基因通用引物 PA (5'-CAGAGTTTG ATCCTGGCT-3')和 PB (5'-AGGAGGTGATCCAGC CGCA-3')进行扩增。扩增产物送上海生工生物工程 有 限 公 司 测 序 。 使 用 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>)在线比对序列, 下载相似性最高的菌株序列。结合 LPSN (<http://www.bacterio.net/>)在线分析各菌株的属以上分类单位。将测定序列和获得的同源序列用 ClustalX 进行多重比对, 采用 MEGA 5.0 软件包中的 Kimura2-Parameter Distance 模型进行多序列匹配, 用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树, Bootstrap 1 000 次检测各分支的置信值<sup>[15]</sup>。NCBI 数据库中获得序列登录号为 :KJ513784–KJ513879。

### 1.4 群落多样性分析

定义 16S rRNA 基因一致性>97%作为同一分类单位, 以 Shannon-Wiener 多样性指数( $H'$ )评估 3 种水体可培养细菌的多样性。计算方法参考文献[16]。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种不同水体细菌的分离和计数

利用 NA 培养基对 3 种水体样品进行分离, 共获得了 143 株菌落形态差异的细菌, 其中紫根水葫芦区(ZW) 54 株, 普通水葫芦区(PW) 49 株, 未放养

水葫芦区(CK) 40 株。所有菌株分属于变形菌门  $\alpha$  亚群 (Alphaproteobacteria)、变形菌门  $\beta$  亚群 (Betaproteobacteria)、变形菌门  $\gamma$  亚群 (Gammaproteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria), 拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus) 7 大类群中。ZW、PW、CK 3 种水体细菌的数量分别为  $1.35 \times 10^7$ 、 $8.35 \times 10^6$ 、 $2.70 \times 10^6$  CFU/L。

### 2.2 细菌的多样性分析

定义 16S rRNA 基因相似性低于 97%时作为不同的分类单位进行多样性计算, 结果表明: 分离自紫根水葫芦区的 54 个菌株可以划分为 37 个不同的分类单元, Shannon-Wiener 多样性指数为 3.17; 分离自普通水葫芦区的 49 个菌株可划分为 34 个不同的分类单元, Shannon-Wiener 多样性指数为 3.07; 分离自未放养水葫芦区域水体的 40 个菌株可划分为 25 个不同的分类单元, Shannon-Wiener 多样性指数为 2.73。在属的水平上, 分离自紫根水葫芦区水体的 54 株细菌分属于 7 大类群的 29 个属; 分离自普通水葫芦区的 49 株菌分属于 6 大类群的 27 个属; 分离自未放养水葫芦区域水体的 40 个菌株分属于 6 大类群的 20 个属(图 1)。以紫根水葫芦区细菌多样性最高, 普通水葫芦区次之, 未放养水葫芦区域最低。

### 2.3 紫根水葫芦区水体细菌的系统发育分析

16S rRNA 序列分析表明, 54 株紫根水葫芦区水体细菌分属于 7 大类群(表 1, 图 2)。其中, 23 株

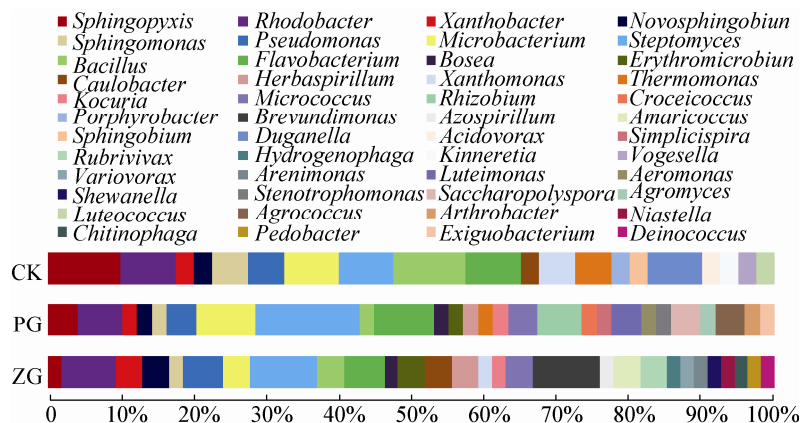


图 1 3 种不同水体细菌属水平的比较

Figure 1 Relative abundance of bacterial genera associated with three different water in Lake Dianchi

| 表 1 分离自滇池紫根水葫芦区水体的细菌   |   |                                       |  |                                 |
|--|---|---------------------------------------|--|---------------------------------|
| Table 1 List of isolates from water of planting water hyacinth with purple root (ZW) in Lake Dianchi |   |                                       |  |                                 |
| 属名<br>Phylogenetic group<br>(Genus)  | 代表菌株<br>Representative isolate<br>(Accession No.) | OTU 数<br>Number of<br>strains in OTU* | 最高相似序列<br>Nearest type strain<br>(Accession No.) | 相似性<br>Sequence<br>identity (%) |
| <i>Sphingopyxis</i>  | YIM 101   | 1                                     | <i>S. wooponensis</i> (HQ436493)                 | 97.81                           |
| <i>Bosea</i>   | YIM 102   | 1                                     | <i>B. robiniae</i> (FR774994)                    | 99.04                           |
| <i>Arenimonas</i>  | YIM 103   | 1                                     | <i>A. aquaticum</i> (GU332843)                   | 99.04                           |
| <i>Erythromicrobium</i>  | YIM 104   | 2                                     | <i>E. ramosum</i> (AF465837)                     | 99.86                           |
| <i>Microbacterium</i>  | YIM 105   | 1                                     | <i>M. oleivorans</i> (AJ698725)                  | 98.63                           |
|  | YIM 106   | 1                                     | <i>M. maritipicum</i> (AJ853910)                 | 99.86                           |
| <i>Rhodobacter</i>   | YIM 107   | 4                                     | <i>R. johrii</i> (AM398152)                      | 97.26                           |
| <i>Flavobacterium</i>  | YIM 108   | 2                                     | <i>F. terrigena</i> (DQ889724)                   | 97.39                           |
|  | YIM 109   | 1                                     | <i>F. cheonhonense</i> (GU295972)                | 99.56                           |
| <i>Bacillus</i>  | YIM 110   | 2                                     | <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)             | 100                             |
| <i>Brevundimonas</i>   | YIM 111   | 3                                     | <i>B. staleyii</i> (AJ227798)                    | 98.63                           |
|  | YIM 112   | 1                                     | <i>B. intermedia</i> (AJ227786)                  | 98.21                           |
|  | YIM 113   | 1                                     | <i>B. nasdae</i> (AB071954)                      | 100                             |
| <i>Niastella</i>   | YIM 114   | 1                                     | <i>N. populi</i> (EU877262)                      | 94.35                           |
| <i>Xanthomonas</i>   | YIM 115   | 1                                     | <i>X. translucens</i> (CAPJ01000550)             | 99.73                           |
| <i>Xanthobacter</i>  | YIM 116   | 2                                     | <i>X. flavus</i> (X94199)                        | 99.86                           |
| <i>Rubrivivax</i>  | YIM 117   | 2                                     | <i>R. gelatinosus</i> (D16213)                   | 99.86                           |
| <i>Pseudomonas</i>   | YIM 118   | 1                                     | <i>P. scichorii</i> (Z76658)                     | 99.73                           |
|  | YIM 119   | 2                                     | <i>P. savastanoi</i> (AB021402)                  | 100                             |
| <i>Hydrogenophaga</i>  | YIM 120   | 1                                     | <i>H. defluvii</i> (AJ585993)                    | 99.18                           |
| <i>Azospirillum</i>  | YIM 121   | 1                                     | <i>A. humicireducens</i> (JX274435)              | 97.91                           |
| <i>Novosphingobium</i>   | YIM 122   | 2                                     | <i>N. subterraneum</i> (AB025014)                | 100                             |
| <i>Chitinophaga</i>  | YIM 123   | 1                                     | <i>C. sancti</i> (AB078066)                      | 98.90                           |
| <i>Sphingomonas</i>  | YIM 124   | 1                                     | <i>S. insulae</i> (EF363714)                     | 97.39                           |
| <i>Amaricoccus</i>   | YIM 125   | 2                                     | <i>A. kaplicensis</i> (U88041)                   | 97.94                           |
| <i>Caulobacter</i>   | YIM 126   | 2                                     | <i>C. segnis</i> (CP002008)                      | 99.73                           |
| <i>Herbaspirillum</i>  | YIM 127   | 1                                     | <i>H. seropedicae</i> (Y10146)                   | 99.59                           |
|  | YIM 128   | 1                                     | <i>H. aquaticum</i> (FJ267649)                   | 99.86                           |
| <i>Micrococcus</i>   | YIM 129   | 2                                     | <i>M. flavus</i> (DQ491453)                      | 100                             |
| <i>Streptomyces</i>  | YIM 130   | 3                                     | <i>S. rubiginosohelvius</i> (AB184240)           | 99.86                           |
|  | YIM 131   | 1                                     | <i>S. fulvissimus</i> (CP005080)                 | 100                             |
|  | YIM 132   | 1                                     | <i>S. cyaneofuscatus</i> (AY999770)              | 100                             |
| <i>Variovorax</i>  | YIM 133   | 1                                     | <i>V. boronicumulans</i> (AB300597)              | 98.35                           |
| <i>Kocuria</i>   | YIM 134   | 1                                     | <i>K. rosea</i> (X87756)                         | 99.45                           |
| <i>Pedobacter</i>  | YIM 135   | 1                                     | <i>P. alluvionis</i> (EU030688)                  | 98.99                           |
| <i>Shewanella</i>  | YIM 136   | 1                                     | <i>S. oneidensis</i> (AE014299)                  | 99.45                           |
| <i>Deinococcus</i>   | YIM 137   | 1                                     | <i>D. aquaticus</i> (DQ017708)                   | 99.73                           |

Note: \*: OTUs generated a 16S rRNA percent identity value of 97%.

属于变形菌门  $\alpha$  亚群(Alphaproteobacteria, 35.1%), 10 株属于放线菌门(Actinobacteria, 18.9%), 6 株属于变形菌门  $\beta$  亚群(Betaproteobacteria, 13.5%), 6 株属于变形菌门  $\gamma$  亚群(Gammaproteobacteria, 13.5%), 6 株属于拟杆菌门(Bacteroidetes, 13.5%), 2 株属于厚壁菌门(Firmicutes, 2.7%), 1 株属于异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)。

类群 Alphaproteobacteria 在紫根水葫芦区水体细菌中比例最高, 包括了短波单胞菌属(*Brevundimonas*)

等 11 个属, 是分离获得的最优势菌群。10 株 Actinobacteria 类群的菌株, 包括了链霉菌属(*Streptomyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)和考克氏菌属(*Kocuria*), 是分离获得的第二优势菌群。除 YIM 114 与已报道菌株的 16S rRNA 序列相似性低于 97%, 其余菌株序列均与参比序列有 97%–100%的相似性。YIM 114 与已知菌株 *Niastella populi* (EU877262)序列相似性最高, 为 94.35%, 可能代表了新的分类单元, 其分类地位有待于进一步的鉴定。

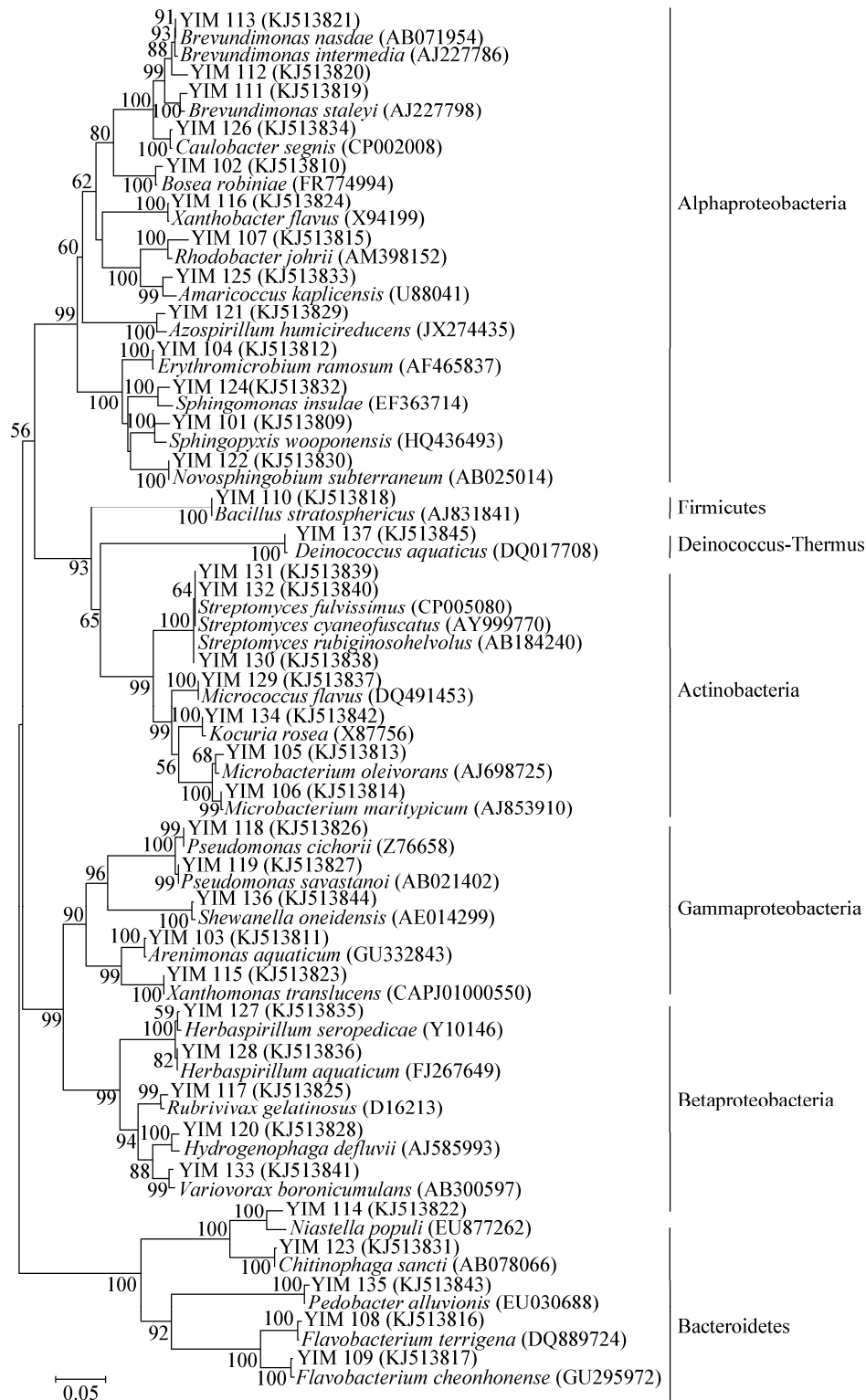


图 2 邻接法构建的滇池紫根水葫芦区水体可培养细菌 16S rRNA 序列系统发育树

Figure 2 Phylogenetic Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA gene sequences of cultivable bacterial from water of planting water hyacinth with purple root (ZW) in Lake Dianchi

Note: GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bootstrap values were calculated from 1 000 replications of Kimura 2-parameter, and bootstrap values higher than 50% are shown. The scale bar represents 0.05 changes per sequence position.

2.4 普通水葫芦区水体细菌的系统发育分析

16S rRNA 序列分析表明,分离的 49 株普通水葫芦区水体细菌分属于 6 大类群(表 2, 图 3)。其中,14 株属于变形菌门  $\alpha$  亚群(Alphaproteobacteria, 32.4%), 20 株属于放线菌门(Actinobacteria, 32.4%), 7 株属于变形菌门  $\gamma$  亚群(Gammaproteobacteria, 14.6%), 4 株属于拟杆菌门(Bacteroidetes, 8.8%), 2 株属于变形菌门  $\beta$  亚群(Betaproteobacteria, 5.9%), 2 株属于厚壁菌门(Firmicutes, 5.9%)。

类群 Alphaproteobacteria 和 Actinobacteria 在普通水葫芦区水体细菌中所占比例最高, 均为优势菌群。其中类群 Alphaproteobacteria 包括了鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)等 9 个属。10 株 Actinobacteria 类群的菌株,包括了链霉菌(*Streptomyces*)等 8 个属。除 YIM 202 与已报道菌株的 16S rRNA 序列相似性低于 97%, 其余菌株序列均与参比序列有 97%–100%的相似性。YIM 202 与 *Sphingomonas changbaiensis* (EU682685)序列相似性最高, 为 96.03%, 可能代表了新的分类单元。

| 表 2 分离自滇池普通水葫芦区水体的细菌  |   |                                       |  |                                 |
|---|---|---------------------------------------|--|---------------------------------|
| Table 2 List of isolates from water of planting wild-type water hyacinth (PW) in Lake Dianchi |   |                                       |  |                                 |
| 属名<br>Phylogenetic group<br>(Genus)   | 代表菌株<br>Representative isolate<br>(Accession No.) | OTU 数<br>Number of strains<br>in OTU* | 最高相似序列<br>Nearest type strain<br>(Accession No.) | 相似性<br>Sequence<br>identity (%) |
| <i>Sphingopyxis</i>   | YIM 201   | 1                                     | <i>S. woopenensis</i> (HQ436493)                 | 97.81                           |
|   | YIM 202   | 1                                     | <i>S. changbaiensis</i> (EU682685)               | 96.03                           |
| <i>Saccharopolyspora</i>  | YIM 203   | 2                                     | <i>S. gloriosae</i> (EU005371)                   | 99.45                           |
| <i>Rhizobium</i>  | YIM 204   | 1                                     | <i>R. taibaishanense</i> (HM776997)              | 98.27                           |
|   | YIM 205   | 2                                     | <i>R. borbori</i> (EF125187)                     | 97.81                           |
| <i>Croceicoccus</i>   | YIM 206   | 1                                     | <i>C. marinus</i> (EF623998)                     | 97.08                           |
| <i>Thermomonas</i>  | YIM 207   | 1                                     | <i>T. brevis</i> (AJ519989)                      | 97.67                           |
| <i>Bosea</i>  | YIM 208   | 1                                     | <i>B. robiniae</i> (FR774994)                    | 99.04                           |
| <i>Erythromicrobium</i>   | YIM 209   | 1                                     | <i>E. ramosum</i> (AF465837)                     | 99.86                           |
| <i>Microbacterium</i>   | YIM 210   | 4                                     | <i>M. maritypicum</i> (AJ853910)                 | 100                             |
| <i>Rhodobacter</i>  | YIM 211   | 3                                     | <i>R. johrii</i> (AM398152)                      | 97.25                           |
| <i>Flavobacterium</i>   | YIM 212   | 2                                     | <i>F. reichenbachii</i> (AM177616)               | 97.13                           |
|   | YIM 213   | 1                                     | <i>F. terrigena</i> (DQ889724)                   | 97.39                           |
|   | YIM 214   | 1                                     | <i>F. macrobrachii</i> (FJ593904)                | 97.94                           |
| <i>Bacillus</i>   | YIM 215   | 1                                     | <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)                 | 100                             |
| <i>Exiguobacterium</i>  | YIM 216   | 1                                     | <i>E. himgiriensis</i> (JX999056)                | 98.35                           |
| <i>Agromyces</i>  | YIM 217   | 1                                     | <i>A. italicus</i> (AY618215)                    | 99.31                           |
| <i>Xanthobacter</i>   | YIM 218   | 1                                     | <i>X. flavus</i> (X94199)                        | 99.86                           |
| <i>Simplicispira</i>  | YIM 219   | 1                                     | <i>S. metamorpha</i> (Y18618)                    | 97.81                           |
| <i>Pseudomonas</i>  | YIM 220   | 2                                     | <i>P. koreensis</i> (AF468452)                   | 99.45                           |
| <i>Novosphingobium</i>  | YIM 221   | 1                                     | <i>N. subterraneum</i> (AB025014)                | 100                             |
| <i>Agrococcus</i>   | YIM 222   | 2                                     | <i>A. jejuensis</i> (AM396260)                   | 99.86                           |
| <i>Sphingomonas</i>   | YIM 223   | 1                                     | <i>S. hankookensis</i> (FJ194436)                | 97.53                           |
| <i>Luteimonas</i>   | YIM 224   | 2                                     | <i>L. aestuarii</i> (EF660758)                   | 98.33                           |
| <i>Herbaspirillum</i>   | YIM 225   | 1                                     | <i>H. aquaticum</i> (FJ267649)                   | 99.86                           |
| <i>Micrococcus</i>  | YIM 226   | 2                                     | <i>M. yunnanensis</i> (FJ214355)                 | 99.73                           |
| <i>Arthrobacter</i>   | YIM 227   | 1                                     | <i>A. nitroguajacolicus</i> (AJ512504)           | 99.86                           |
| <i>Aeromonas</i>  | YIM 228   | 1                                     | <i>A. media</i> (X74679)                         | 99.45                           |
| <i>Streptomyces</i>   | YIM 229   | 3                                     | <i>S. griseorubiginosus</i> (AB184276)           | 99.86                           |
|   | YIM 230   | 2                                     | <i>S. fulvissimus</i> (CP005080)                 | 100                             |
|   | YIM 231   | 1                                     | <i>S. cyaneofuscatus</i> (AY999770)              | 100                             |
| <i>Kocuria</i>  | YIM 232   | 1                                     | <i>S. sindenensis</i> (AB184759)                 | 99.86                           |
|   | YIM 233   | 1                                     | <i>K. rosea</i> (X87756)                         | 99.45                           |
| <i>Stenotrophomonas</i>   | YIM 234   | 1                                     | <i>S. rhizophila</i> (AJ293463)                  | 99.45                           |

Note: \*: OTUs generated a 16S rRNA percent identity value of 97%.

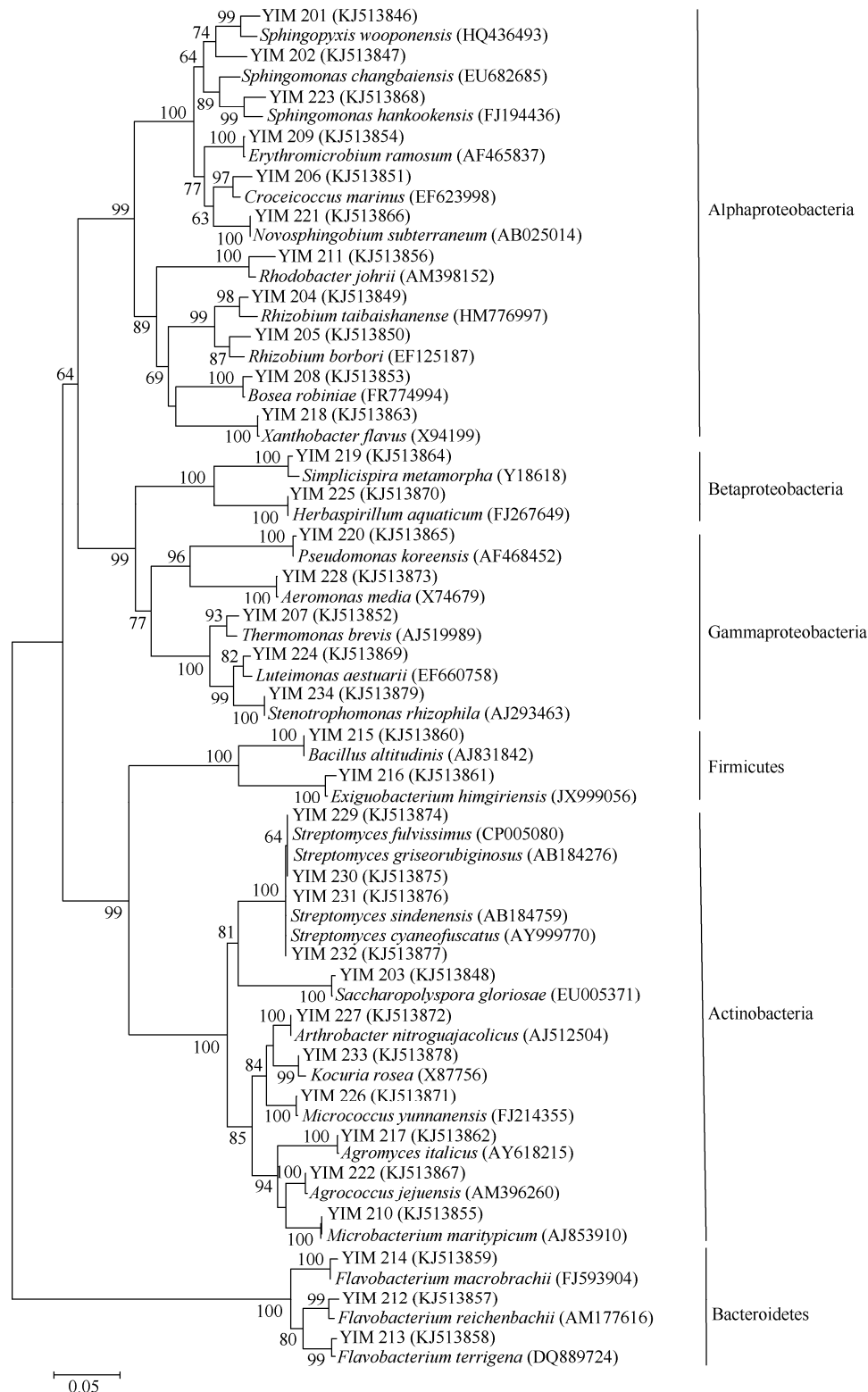


图3 邻接法构建的滇池普通水葫芦区水体可培养细菌 16S rRNA 序列系统发育树

Figure 3 Phylogenetic Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA gene sequences of cultivable bacterial from water of planting wild-type water hyacinth (PW) in Lake Dianchi

2.5 未放养水葫芦区域水体细菌的系统发育分析

16S rRNA 序列分析表明,分离的 40 株未放养水葫芦区域水体细菌分属于 6 大类群(表 3, 图 4)。其中, 14 株属于变形菌门  $\alpha$  亚群(Alphaproteobacteria, 40%), 7 株属于放线菌门(Actinobacteria, 20%), 6 株属于变形菌门  $\beta$  亚群(Betaproteobacteria, 16%), 6 株属于变形菌门  $\gamma$  亚群(Gammaproteobacteria, 12%), 3 株属于拟杆菌门(Bacteroidetes, 8%), 4 株属于厚壁菌门(Firmicutes, 4%)。

类群 Alphaproteobacteria 在对照区水体细菌中所占比例最高, 包括了柄杆菌属(*Caulobacter*)等 8 个属, 为分离菌株的最优势菌群。9 株(19.2%) Betaproteobacteria 类群的菌株在系统发育上与福格斯氏菌属(*Vogesella*)、杜櫟氏属(*Duganella*)、噬酸菌属(*Acidovorax*)和 *Kinneretia* 菌属关系密切, 为次优势类群。除 YIM 002 与已报道菌株的 16S rRNA 序列相似性低于 97%, 其余菌株序列均与参比序列有 97%–100%的相似性。YIM 002 与 *Sphingopyxis ummariensis* (EF424391) 序列相似性最高, 为 96.26%, 可能代表了新的分类单元。

| 表 3 分离自滇池未放养水葫芦区域水体的细菌<br>Table 3 List of isolates from non-planting sites (CK) in Lake Dianchi |   |                                    |  |                                 |
|---|---|------------------------------------|--|---------------------------------|
| 属名<br>Phylogenetic group<br>(Genus)   | 代表菌株<br>Representative isolate<br>(Accession No.) | OTU 数<br>No. of strains<br>in OTU* | 最高相似序列<br>Nearest type strain<br>(Accession No.) | 相似性<br>Sequence<br>identity (%) |
| <i>Sphingopyxis</i>   | YIM 001   | 2                                  | <i>S. panaciterrae</i> (AB245353)                | 97.81                           |
|   | YIM 002   | 1                                  | <i>S. ummariensis</i> (EF424391)                 | 96.26                           |
|   | YIM 003   | 1                                  | <i>S. woopenensis</i> (HQ436493)                 | 97.80                           |
| <i>Duganella</i>  | YIM 004   | 3                                  | <i>D. zoogloeoides</i> (D14256)                  | 99.59                           |
| <i>Thermomonas</i>  | YIM 005   | 2                                  | <i>T. brevis</i> (AJ519989)                      | 97.64                           |
| <i>Microbacterium</i>   | YIM 006   | 1                                  | <i>M. lacus</i> (AB286030)                       | 99.86                           |
|   | YIM 007   | 2                                  | <i>M. foliorum</i> (AJ249780)                    | 99.18                           |
| <i>Rhodobacter</i>  | YIM 008   | 3                                  | <i>R. johrii</i> (AM398152)                      | 97.26                           |
| <i>Porphyrobacter</i>   | YIM 009   | 1                                  | <i>P. donghaensis</i> (AY559428)                 | 99.45                           |
| <i>Flavobacterium</i>   | YIM 010   | 2                                  | <i>F. succinicans</i> (AM230492)                 | 98.07                           |
|   | YIM 011   | 1                                  | <i>F. macrobrachii</i> (FJ593904)                | 98.08                           |
| <i>Bacillus</i>   | YIM 012   | 4                                  | <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)             | 100                             |
| <i>Acidovorax</i>   | YIM 013   | 1                                  | <i>A. radices</i> (AFBG01000030)                 | 99.18                           |
| <i>Xanthomonas</i>  | YIM 014   | 2                                  | <i>X. translucens</i> (CAPJ01000550)             | 99.73                           |
| <i>Xanthobacter</i>   | YIM 015   | 1                                  | <i>X. flavus</i> (X94199)                        | 99.86                           |
| <i>Pseudomonas</i>  | YIM 016   | 2                                  | <i>P. koreensis</i> (AF468452)                   | 99.45                           |
| <i>Novosphingobium</i>  | YIM 017   | 1                                  | <i>N. subterraneum</i> (AB025014)                | 100                             |
| <i>Luteococcus</i>  | YIM 018   | 1                                  | <i>L. peritonei</i> (AJ132334)                   | 99.72                           |
| <i>Sphingomonas</i>   | YIM 019   | 2                                  | <i>S. endophytica</i> (HM629444)                 | 99.86                           |
| <i>Vogesella</i>  | YIM 020   | 1                                  | <i>V. indigofera</i> (AB021385)                  | 99.72                           |
| <i>Caulobacter</i>  | YIM 021   | 1                                  | <i>C. segnis</i> (CP002008)                      | 100                             |
| <i>Sphingobium</i>  | YIM 022   | 1                                  | <i>S. vulgare</i> (FJ177535)                     | 98.08                           |
| <i>Streptomyces</i>   | YIM 023   | 2                                  | <i>S. microflavus</i> (AB184284)                 | 100                             |
|   | YIM 024   | 1                                  | <i>S. badius</i> (AY999783)                      | 99.86                           |
| <i>Kinneretia</i>   | YIM 025   | 1                                  | <i>K. asaccharophila</i> (AY136099)              | 99.45                           |

Note: \*: OTUs generated a 16S rRNA percent identity value of 97%.

http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn



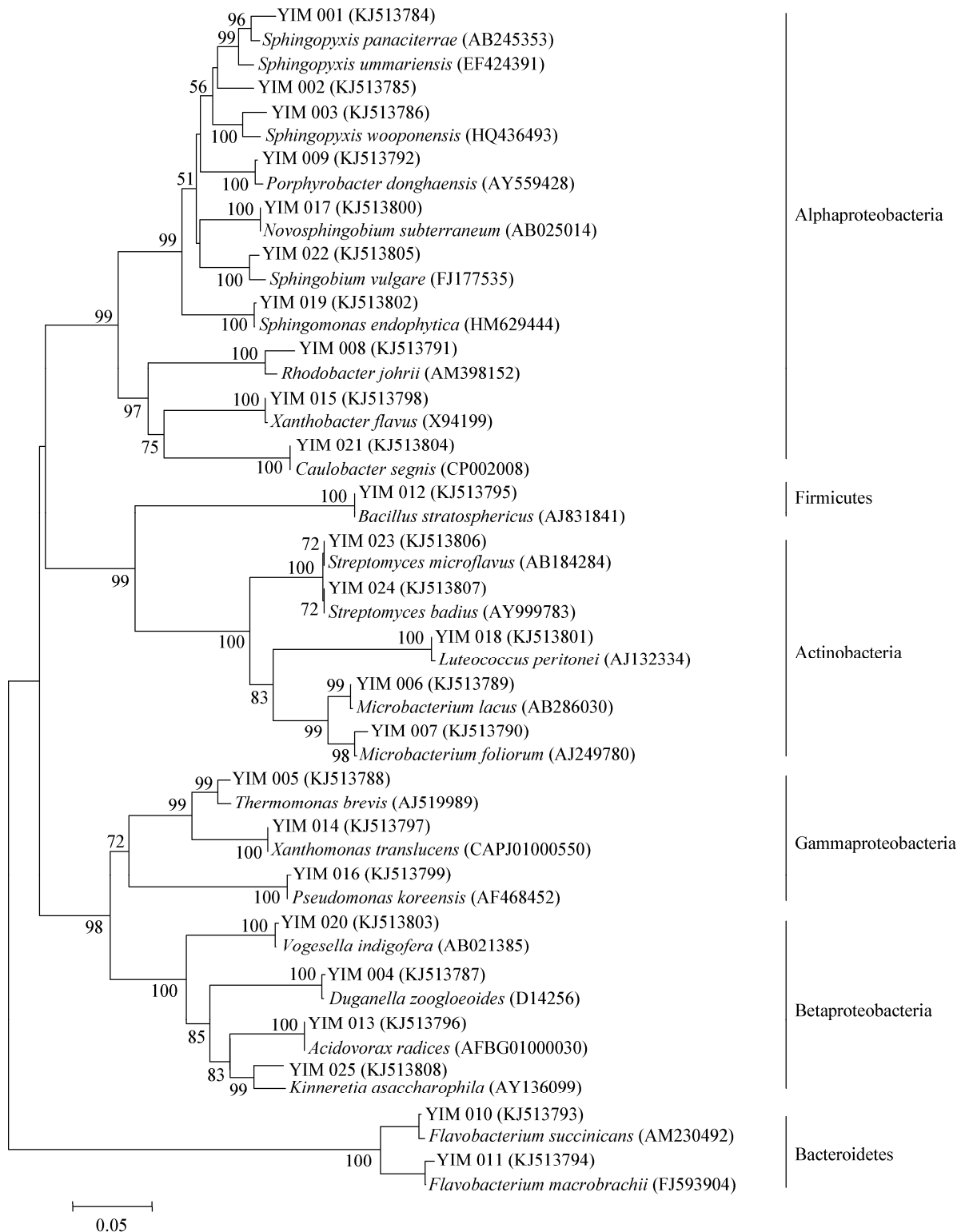


图 4 邻接法构建的滇池未放水葫芦区域水体可培养细菌 16S rRNA 序列系统发育树

Figure 4 Phylogenetic Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA gene sequences of cultivable bacterial from non-planting sites (CK) in Lake Dianchi

### 3 讨论

本文以传统的纯培养方法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对滇池湾紫根水葫芦放养区、普通水葫芦放养区以及未放养水葫芦对照区的 3 种水体可培养细菌群落结构进行研究。共分离纯化获得细菌 143 株, 其中紫根水葫芦区 54 株, 普通水葫芦区 49 株, 未放养水葫芦区 40 株, 所有菌株分属于 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes 和 Deinococcus-Thermus 等 7 大类群的 48 个属(图 1)。进一步统计分析发现, 放养水葫芦区域可培养细菌无论从数量还是多样性指数均相对未放养水葫芦区域较高, 其中紫根水葫芦区最高, 普通水葫芦区次之, 未放养水葫芦区域最低, 结果并未显示出水葫芦对于湖泊水体可培养细菌多样性的不利影响。分析其主要原因可能是放养水葫芦显著提高了水体中氮、磷的含量<sup>[8-10]</sup>, 因为氮、磷是细菌增殖的限制因子, 氮、磷的增加能促进湖泊中细菌的增殖<sup>[17]</sup>。其次, 由于水葫芦具有极强的竞争性和分泌化感物质, 可以抑制浮游植物的生长, 而浮游植物群落可以显著影响水体浮游细菌的多样性<sup>[7,18]</sup>。此外, 水葫芦在生长过程中能吸收水体中的有毒有害污染物质, 且根系分泌的代谢产物及根脱落物中含有大量有机质, 为微生物提供了丰富的营养来源, 为其增殖创造了条件<sup>[9,16]</sup>。

分离自紫根水葫芦区水体的 54 株细菌分属于 7 大类群的 29 个属, 其中短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、下水道球菌属(*Amaricoccus*)、红长命菌属(*Rubrivivax*)、噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、砂单胞菌属(*Arenimonas*)、希万氏菌属(*Shewanella*)、农研所丝杆菌属(*Niastella*)、噬几丁质菌属(*Chitinophaga*)、土地杆菌属(*Pedobacter*)和异常球菌属(*Deinococcus*) 12 个属的菌仅在该区域分离得到。分离自普通水葫芦区的 49 株菌分属于 6 大类群的 27 个属, 其中根瘤菌属(*Rhizobium*)、*Croceicoccus*、简单螺旋形菌属(*Simplicispira*)、藤黄单胞菌属(*Luteimonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、寡养单胞

菌属(*Stenotrophomonas*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、壤球菌属(*Agrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*) 11 属为该区域特有。而分离自未放养水葫芦区域水体的 40 株细菌也有 7 个属的菌为其特有(图 1)。3 种水体仅有鞘氨醇盒菌属(*Sphingopyxis*)、红细菌属(*Rhodobacter*)、黄色杆菌属(*Xanthobacter*)、新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等 10 个共有菌属。说明放养水葫芦确实对水体可培养细菌的群落结构产生了较大的影响, 而且两种水葫芦对水体细菌群落结构的影响也不相同。这可能与植物对根际微生物具有选择性有关; 另外, 紫根水葫芦的根系发达, 根长及根系密度远大于普通的野生水葫芦, 也可能是产生不同影响作用的原因之一。

吴根福等<sup>[19]</sup>对杭州西湖水域浮游可培养异养细菌的研究结果表明, 革兰氏阴性菌在杭州西湖水域浮游异养细菌中占到 95%, 为绝对优势菌群。Glockner F.等<sup>[20]</sup>分析了澳大利亚、俄国、德国的 3 个淡水湖泊中细菌的 16S rRNA 序列, 共获得 190 个序列, 可分为 16 个类群, 其中有 15 个类群为革兰氏阴性菌。本研究中分离获得的 143 株细菌中革兰氏阳性菌占到 69%左右, 为绝对优势菌群, 这与有关报道结果相似, 但革兰氏阴性菌所占比例相对较低。推测这一结果可能与放养水葫芦有关, 有待于进一步的研究证实。

本研究也获得了一批潜在的菌种资源。如鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、希万氏菌属(*Shewanella*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、微球菌属(*Micrococcus*)等类群的微生物被报道具有广泛的溶藻能力<sup>[21-22]</sup>。本研究中也分离到大量这些属的细菌, 这些细菌可能具有一定的溶藻活性, 有望应用于蓝藻的微生物控制中, 值得进一步的研究。另外, 16S rRNA 序列分析结果

表明, YIM 002、YIM 114、YIM 202 这 3 株菌与已知菌株的相似性均低于 97%, 可能代表了潜在的新微生物菌种资源, 其分类地位有待于进一步的鉴定。

本文首次对滇池两种水葫芦放养区水体细菌进行了分离, 并以未放养水葫芦区水体为对照, 研究了放养水葫芦对水体可培养细菌群落结构的影响。结果表明, 放养水葫芦确实对水体可培养细菌群落结构造成了一定的影响, 细菌数量和多样性均有所增加。应该看到, 尽管纯培养方法在研究环境微生物中具有不可替代的重要作用<sup>[14]</sup>, 但由于培养方法的限制, 环境中只有 0.1%–1.0% 的微生物通过常规分离方法能培养, 仅占环境中微生物的极小部分, 应用传统的纯培养方法研究环境微生物群落结构将导致严重的微生物多样性丢失<sup>[16]</sup>。因此, 在今后的研究中, 有必要应用不依赖纯培养的分子生物学方法如高通量测序技术<sup>[23]</sup>、T-RFLP 技术<sup>[24]</sup>、PLFA 分析<sup>[25]</sup>对富营养化湖泊放养水葫芦水体生态系统微生物多样性进行研究, 以便更为全面的认识微生物的群落结构, 为评价水葫芦在富营养化湖泊生态修复中的安全性提供更为充足的依据。

## 参 考 文 献

- [1] Wang Z, Zhang Z, Zhang Y, et al. Nitrogen removal from Lake Caohai, a typical ultra-eutrophic lake in China with large scale confined growth of *Eichhornia crassipes*[J]. Chemosphere, 2013, 92(2): 177-183
- [2] Gao L, Li B. The study of a specious invasive plant, water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): achievements and challenges[J]. Acta Phytocologica Sinica, 2004, 28(6): 735-752 (in Chinese)  
高雷, 李博. 入侵植物凤眼莲研究现状及存在的问题[J]. 植物生态学报, 2004, 28(6): 735-752
- [3] Malik A. Environmental challenge vis a vis opportunity: the case of water hyacinth[J]. Environment International, 2007, 33(1): 122-138
- [4] Shanab S, Shalaby E, Lightfoot D, et al. Allelopathic effects of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13200
- [5] Deng L, Geng M, Zhu D, et al. Effect of chemical and biological degumming on the adsorption of heavy metal by cellulose xanthogenates prepared from *Eichhornia crassipes*[J]. Bioresource Technology, 2012(107): 41-45
- [6] Villamagna A, Murphy B. Ecological and socio-economic impacts of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): a review[J]. Freshwater Biology, 2010, 55(2): 282-298
- [7] Zhou Q, Han SQ, Yan SH, et al. The mutual effect between phytoplankton and water hyacinth planted on a large scale in the eutrophic lake[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(4): 783-791 (in Chinese)  
周庆, 韩士群, 严少华, 等. 富营养化湖泊规模化种养的水葫芦与浮游藻类的相互影响[J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 783-791
- [8] Wang Z, Zhang Z, Zhang J, et al. Large-scale utilization of water hyacinth for nutrient removal in Lake Dianchi in China: the effects on the water quality, macrozoobenthos and zooplankton[J]. Chemosphere, 2012, 89(10): 1255-1261
- [9] Wang Z, Zhang ZY, Zhang JQ, et al. The fauna structure of benthic macro-invertebrates for environmental restoration in a eutrophic lake using water hyacinth[J]. China Environmental Science, 2012, 32(1): 142-149 (in Chinese)  
王智, 张志勇, 张君倩, 等. 水葫芦修复富营养化湖泊水体区域内底栖动物群落特征[J]. 中国环境科学, 2012, 32(1): 142-149
- [10] Wang Z, Zhang ZY, Han YP, et al. Effects of large-area planting water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) on water quality in the bay of Lake Dianchi[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2012, 6(11): 3827-3832 (in Chinese)  
王智, 张志勇, 韩亚平, 等. 滇池湖湾大水域种养水葫芦对水质的影响分析[J]. 环境工程学报, 2012, 6(11): 3827-3832
- [11] Duan JC, Zhang YM, Chao JY, et al. Purification effect of water hyacinth with giant purple roots in wastewater with different concentrations[J]. Water Resources Protection, 2013, 29(3): 73-78 (in Chinese)  
段金程, 张毅敏, 晁建颖, 等. 巨紫根水葫芦在不同污染程度水体中的净化效果[J]. 水资源保护, 2013, 29(3): 73-78
- [12] Zhang YY, Yan SH, Li XM, et al. Comparison research on growth characteristics and purification efficiency of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water hyacinth with purple root under conditions of different pH[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2013, 7(11): 4317-4325 (in Chinese)  
张迎颖, 严少华, 李小铭, 等. 不同 pH 下水葫芦与紫根水葫芦生长特性与净化效能对比研究[J]. 环境工程学报, 2013, 7(11): 4317-4325
- [13] Fan XR, Li GW, Shen P. Microbiology Experiment[M]. 3rd Edition. Beijing: Higher Education Press, 1999  
范秀荣, 李广武, 沈萍. 微生物学实验[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 1999
- [14] Xiao W, Zhang SY, Zhao Q, et al. Diversity and heavy-metal tolerance of bacteria isolated from Gejiu tin mining area of Yunnan[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(11): 1158-1165 (in Chinese)  
肖伟, 张仕颖, 赵琴, 等. 云南个旧锡矿区可培养细菌多样性及其重金属抗性[J]. 微生物学报, 2013, 53(11): 1158-1165
- [15] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [16] Li LB, Liu M, Yang SZ, et al. Cultivable microbial diversity at the rhizosphere of *Phyllostachys pubescens*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(6): 772-779 (in Chinese)  
李潞滨, 刘敏, 杨淑贞, 等. 毛竹根际可培养微生物种群多样性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 772-779
- [17] Li LL, Tang XM, Gao G, et al. Influence of submerged vegetation restoration on bacterial diversity and community composition in West Lake[J]. Journal of Lake Science, 2013, 25(2): 188-198 (in Chinese)  
李琳琳, 汤祥明, 高光, 等. 沉水植物生态修复对西湖细菌多样性及群落结构的影响[J]. 湖泊科学, 2013, 25(2): 188-198
- [18] Eiler A, Bertilsson S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes[J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(12): 1228-1243
- [19] Wu GF, Yu ZM, Wu J, et al. Community diversity of cultivable heterotrophic bacteria in West Lake, Hangzhou[J]. Biodiversity Science, 2003, 11(6): 467-474 (in Chinese)  
吴根福, 虞左明, 吴洁, 等. 杭州西湖水域可培养异养细菌的群落多样性[J]. 生物多样性, 2003, 11(6): 467-474

- [20] Glockner F, Zaichikov E, Belkova N, et al. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 5053-5065
- [21] Wu G, Xi Y, Zhao YJ. The latest development of research on algae-lysing bacteria[J]. Research of Environmental Science, 2002, 15(5): 43-46 (in Chinese)  
吴刚, 席宇, 赵以军. 溶藻细菌研究的最新进展[J]. 环境科学研究, 2002, 15(5): 43-46
- [22] Li D, Li Y, Zheng TL. Advance in the research of marine algicidal functional bacteria and their algicidal mechanism[J]. Advances in Earth Science, 2013, 28(2): 243-252 (in Chinese)  
李东, 李伟, 郑天凌. 海洋溶藻功能菌作用机理研究的若干进展[J]. 地球科学进展, 2013, 28(2): 243-252
- [23] Zhang XY, Xiao Y, Tian H, et al. Analysis of denitrifying bacteria in a long-term shell sand amended soil[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 35-42 (in Chinese)  
张小远, 肖瑶, 田浩, 等. 贝壳砂改良土壤中反硝化细菌的分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 35-42
- [24] Dibbern D, Schmalwasser A, Lueders T, et al. Selective transport of plant root-associated bacterial populations in agricultural soils upon snowmelt[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014(69): 187-196
- [25] Zhao C, Xing M, Yang J, et al. Microbial community structure and metabolic property of biofilms in vermifiltration for liquid-state sludge stabilization using PLFA profiles[J]. Bioresource Technology, 2014(151): 340-346

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

#### 3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

#### 3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010
- [5] Xu JT. The study on the roles of  $\beta$ -glucosidases in induced expression of cellulose genes in *Trichoderma reesei*[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2014  
徐金涛. 瑞氏木霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶在纤维素酶诱导表达过程中作用机制的研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2014

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2015-00-00; 接受日期: 2015-00-00; 优先数字出版日期([www.cnki.net](http://www.cnki.net)): 2015-00-00

(下转 p.63)