

一株红树林根际固氮菌的分离、鉴定以及固氮活性测定

凌娟^{1,2,3,4}, 董俊德^{1,3}, 张燕英^{1,3}, 杨志浩^{1,3}, 王友绍²

(1. 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 中国科学院热带海洋环境动力学重点实验室, 广东 广州 510301; 3. 中国科学院海南热带海洋生物实验室, 海南 三亚 572000; 4. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 采用选择性无氮培养基从红树林根际土壤中分离出一株具有高效固氮活性的固氮细菌, 通过形态学, 生化鉴定, G+C 摩尔分数含量和 16S rRNA 以及固氮基因 *nifH* 的序列分析, 初步鉴定为短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*。其特征是该菌为革兰氏阳性, 直杆状, 固体培养基上形成圆形白色菌落(直径 3—4mm), 与短小芽孢杆菌标准菌株相比较, 它们在碳源利用, 水解以及生长温度盐度等方面具相似程度很高, G+C 摩尔分数含量为 44.6%, 以 16S rRNA 为基础构建的系统进化树分析其与短小芽孢杆菌 *B. pumilus* B402 的进化距离最近, 相似性为 99.6%, 利用乙炔还原法对其固氮活性进行测定, 具有较高的固氮活性, 为 $156.32 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 红树林; 固氮菌; 16S rRNA; *nifH*

中图分类号: Q178.531 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)05-0149-05

Isolation and characterization of a N_2 -Fixing Bacterium from the mangrove rhizosphere and study on its nitrogen-fixing ability

LING Juan^{1,2,3,4}, DONG Jun-de^{1,3}, ZHANG Yan-ying^{1,3}, YANG Zhi-hao¹, WANG You-shao²

(1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Key Laboratory of Tropical Marine Environmental Dynamics, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 3. National Experiment Station of Tropical Marine Biology, Sanya 572000, China; 4. Graduate school of Chinese academy of science, Beijing 100049, China)

Abstract: A bacterial strain H9 capable of nitrogen fixation was isolated from the mangrove rhizosphere using N-free medium. It was identified as *Bacillus pumilus* by type description, physiological and biochemical test, G+C Mole fraction (%), 16S rRNA sequence analysis and the *nifH* sequence analysis. It was a gram-positive, straight-rod shaped bacterium, which forms white colony with diameter of 3–4 mm on the solid agar medium. Compared with the standard strain of the species *B. pumilus*, there were high similarity in the carbon source utility, hydrolysis and the optimal growth temperature and salinity. The G+C content of the strain DNA was 44.6%. A phylogenetic tree was constructed by comparing validly published 16S rRNA sequences of the related strains in the Genbank, using the neighbor-joining method. It showed that the strain H9 and the strain *B. pumilus* B402 have the highest similarity, which is 99.6%. The measurement of nitrogen-fixing ability by acetylene reduction was $156.32 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, indicating its high nitrogen-fixing ability.

Key words: mangrove; nitrogen-fixing bacterium; 16S rRNA; *nifH*

红树林是生长在热带、亚热带潮间带的木本植物群落, 是我国海岸带湿地生态系统的重要类型之

一, 具有十分重要的生态意义。如通过网罗碎屑的方式, 拦淤造陆, 促进土壤的形成、形成滨海湿地防

收稿日期: 2008-12-05; 修订日期: 2009-02-06。刘学东编辑

基金项目: 中国科学院知识创新项目(KSCX2-SW-132); 国家自然科学基金(40776069、40676091); 国家生态系统研究网络三亚站数据库与信息系统, 中科院生态系统研究网络台站研究基金; 海洋公益性行业科研专项经费项目(200705026); 广东省科技计划项目(2004B60302004, NO.2005B60301032); 重大基础研究前期研究专项(2005CCA04800); 广东省海洋药物重点实验室开放课题; 中国科学院南海海洋研究所 LMM-LAMB-LMB 联合开放课题。

作者简介: 凌娟(1985—), 女, 山东省临沂市人, 博士研究生, 主要从事海洋生态、微生物培养及分子生物学研究。E-mail: jingling0224@163.com

通信作者: 董俊德, tel: 020-89023225, E-mail: dongjunde@vip.163.com.

护林、拦抗潮汐、为许多海洋生物提供栖息地、净化海区污染物^[1]、为近海海区提供有机碎屑,形成近海湿地生物高生产力的生态系统。但是近年来由于人们的不合理活动,如围林养殖、围海造田、过度砍伐、放牧和家禽养殖、乱采滥挖取无脊椎动物和过渡收集饵料等^[2],使得红树林的面积大大减少,因此红树林的有效保护、保育和生态恢复研究是迫在眉睫的研究任务。虽然红树林中有机物含量较高,却通常被认为是营养较缺乏的生态系统,尤其是氮和磷^[3-5]。氮素是植物正常生长的所必需的大量元素,有些生物可以利用空气中的氮气,将其直接转化为生物体可以利用的氮素,这个过程即为生物固氮(Biological Nitrification),可为全球的植物提供约75%的氮素^[6]。固氮微生物包括细菌,放线菌和古生菌等原核生物,研究较多的是固氮细菌,特别是共生固氮菌,因为它可以直接为植物提供氮源,促进其生长。

红树林的保护和恢复工作是当前研究的热点,国外关于红树林的固氮菌的研究报道有很多^[7-9],国内虽然也有关于红树林生态系统的研究报道^[10-13],但相对于系统内的其它成分^[14-16],对固氮微生物的研究还较为薄弱。在红树林的保护和促生方面,其中就有采取植物促生菌(PGPB)这一方法^[17-18],目前国内用于该用途的固氮菌主要是从国外进口,这就不可避免产生了一个问题:该进口菌是否可以在我国红树林环境下正常生长并发挥其作用。红树林中孕育着丰富的微生物资源如细菌、放线菌和丝状真菌等,细菌在3大类群占96%—99%以上,它们在分解落叶和固氮等方面具有重要的作用。其中已经测定的放线菌约52.4%都可以进行生物固氮^[1]。而我国具备一定面积的红树林,这就充分说明了从我国红树林中分离出具有高效固氮活性的固氮菌株是完全具有可能性的。对此,本实验以我国海南三亚红树林根际土壤为研究对象,用无氮培养基分离得到了一株具有较高固氮酶活性的细菌H9,并做了一系列的鉴定工作,如形态学,生理生化鉴定,G+C摩尔分数含量和16S rRNA以及固氮基因*nifH*的序列分析等。初步鉴定为短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*,且该菌株为国内首次从红树林中分离出。关于短小芽孢杆菌的作用有不少报道,如可以产生抗肿瘤多糖,抗电离辐射性,多具芳香烃(PAH)的降解等^[19-20],但是关于该菌具有生物固氮活性的报道不是很多^[21-22]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

样品采集于2006年9月,地点在中国海南省三亚市红沙河口的红树林区植株的根际土壤。红树林种类主要优势种为木榄 *Bruguiera gymnorhiza* 和红海榄 *Rhizophora stylosa*, 根际土壤按标准方法取样后装入灭菌的封口聚乙烯袋中,带回实验室立即低温保存(-20℃)。

1.1.2 培养基

Ashby 液体培养基的主要成分是^[23]: 甘露醇 10.0g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, NaCl 0.2g, CaSO_4 0.1g, CaCO_3 5.0g, 定容至1L, pH为7.0。改良 DÖbereiner 无氮液体培养基的主要成分^[24]: 蔗糖 10g, 苹果酸 5.0g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, NaCl 0.1g, $\text{Na}_2\text{M}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002g, FeCl_3 0.01g, 定容至1L, pH为7.0。LB 液体培养基: 蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g, 定容至1L, pH为7.0。固体培养基中加入1.8%的Agar, 半固体培养基中加入0.2%的Agar, 其中液体无氮培养基用0.22μm的滤器进行抽滤灭菌, LB液体培养基采用高温高压灭菌。

1.2 菌株的分离筛选

将样品混匀后取约1g于200mL Ashby 无氮液体培养基中, 30℃下180rpm离心并进行恒温48h进行加富培养。从中取出200μL以涂布法接种于Ashby 固体培养基上, 30℃, 48h培养后选择典型的单一菌落进一步纯化, 直至获得纯种, 将纯化的菌接种至斜面培养基, 以检测固氮酶活性。

1.3 固氮酶活性能力测定

将已纯化的菌株接种于10mL 液体改良 DÖbereiner 培养基内, 于30℃摇床振荡培养72h, 测定此时的OD值, 并分别取1mL于灭菌的5mL小瓶中, 盖上橡皮塞。瓶盖边缘以石蜡封口, 用注射器将1mL的乙炔注入, 在同样条件下培养24h, 并取出其中40μL反应后气体, 采用气相色谱仪测固氮菌的乙炔还原活性(Acetylene-reducing Activity, ARA)。乙炔还原活性计算方法参见文献^[25]:

$$\text{ARA}(\text{nmol}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}) = V_{\text{st}} \times C_{\text{st}} \times A_{\text{sa}} \times V_{\text{tu}} / V_{\text{sa}} \times A_{\text{st}} / H / 22.4$$

其中, V_{st} 是注入标准气的体积(mL), C_{st} 是标准气的浓度, V_{tu} 是所用试管体积(mL), A_{sa} 是样品乙炔峰的面积(cm^2), V_{sa} 是样品注入体积(mL), A_{st} 是标准气峰面积(cm^2), H 是培养时间(h)。

1.4 菌种鉴定

革兰氏染色后用光学显微镜观察细菌的形态和大小,扫描电镜来进行样品表面结构和鞭毛观察。LB 固体培养基,30℃ 培养,观察 18—24h 菌龄的菌落形态。

生理生化鉴定其方法参考文献^[26],API 实验由广东省微生物所测定完成。

基因组 DNA 的(G+C)摩尔分数含量测定:先按照 Marmur J 氏法^[27]提取核酸,-20℃ 保存。将提取的 DNA 用 RNaseA 和 RNaseT1 处理消化 RNA。将制备好的 DNA 用 1×SSC 溶解,具体步骤参见^[28-29]。

DNA 模板的提取,细菌接种于 LB 液体培养基中,37℃,300rpm,振荡培养过夜。取 1.5mL 培养物 8000rpm 离心收集菌体,重悬于 1mL TE(pH8.0),具体实验步骤参考 Orsini^[30]和徐平^[31]。

16S rRNA 和 *nifH* 基因 PCR 的扩增,以总 DNA 为模板,16S rRNA 正向引物:5'—AGAGTTTGATCCTGGCTCAG—3',反向引物:5'—ACGGTTACCTTGTTACGACTT—3'^[32]。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5min,接着进入 94℃ 变性 1min,52℃ 退火 1min,72℃ 延伸 3min,30 循环,最后 72℃ 延伸 5min。*nifH* 基因 PCR 的扩增采用固氮细菌通用引物^[33],其中正向引物:5'—TGCGA(C/T)CC(G/C)AA(A/G)GC(C/G/T)GACTC—3',反向引物:5'—AT(G/C)GCCATCAT(C/T)TC(A/G)CCGGA—3',PCR 扩增程序如下:94℃ 预变性 5min,94℃ 变性 30s,退火温度 55℃ 复性 30s,72℃ 延伸 30s,进行 30 个循环后 72℃ 延伸 10min。

序列测序和分析,16S rRNA 扩增产物经纯化后,送交测序公司(拓谱)测序,将所得到序列利用 EditSeq 软件处理后,在 NCBI 数据库中进行相似性比对,选取同源性比较高的典型菌株的 16S rRNA 序列作参比对象,用 CLUSTAL X 软件进行多列比对并计算供试菌株与参比菌株之间的序列相似性,应用 MEGA 4 软件采用邻位相接^[34-36],构建供试菌与参比菌之间的系统化树,其中用于检验支持率的重复抽样次数为 1000 次。

2 结果与分析

2.1 菌的分离、纯化与鉴定

该菌为革兰氏阳性,直杆状,端圆,通常为 0.5μm×1.0—3.0μm(图 1),不运动,无滑动或泳动,严格好氧。在固体培养基上生长时,为圆形(直径 3—4mm),白色菌落,周围有放射状针状扩散和鞭毛,

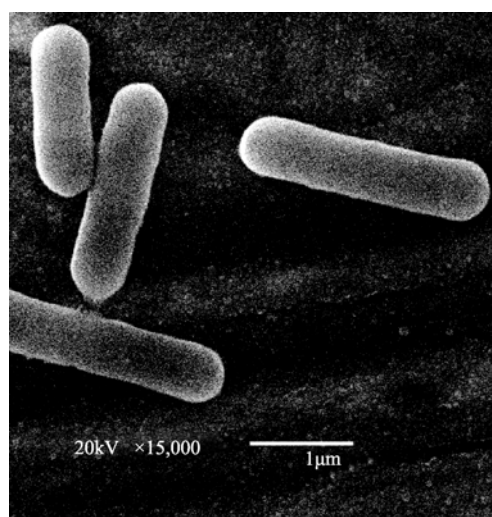


图 1 菌株 H9 的扫描电镜照片

Fig. 1 Scanning Electron Microscopy of strain H9

湿润稍褶皱,不透明,隆起或微隆起,接触酶、氧化酶均阳性,不消化琼脂,有机化能营养。

2.2 生理生化鉴定

生理生化测定一般是菌株本身某种代谢途径或某种酶的特有表现,其在一定程度上反映了菌株的本质特征,从而将不同类群的微生物分开。根据上述形态学,生理生化与短小芽孢杆菌标准菌株 ATCC7601 比较的结果(表 1),参照《常见细菌系统鉴定手册》^[26]。初步鉴定菌株 H9 为短小芽孢杆菌,生理生化特征为好氧菌,厌氧条件下不生长,接触酶阳性,V-P 测定反应为阳性,且终产物的 pH<6,可以利用的碳源有 D-葡萄糖, L-阿拉伯糖, D-木糖, D-甘露醇,明胶水解和酪朊水解阳性,利用柠檬酸盐,该菌的最适生长盐度 1‰,盐度为 7‰时能生长,最适生长 PH 为 7, PH 为 5.7 时能生长,最适生长温度为 37℃,温度为 40℃ 时能生长。

2.3 G+C 摩尔分数含量

经过 G+C 摩尔分数含量测定,得出 H9 的 G+C 摩尔分数含量为 44.6%,各个碱基 C, T, A, G 含量面积见图 2。

2.4 固氮酶活性测定和固氮基因 *nifH* 分析

分析乙炔峰图和公式计算推导得出,菌株 H9 乙炔还原速率为 156.32nmol C₂H₄·H⁻¹·mL⁻¹,通过乙炔还原和生物固氮之间的转换 C: N 比值为 3:1 或 4:1,可以计算出其固氮能力范围为 39.08—51.11 nmol N₂·H⁻¹·mL⁻¹;通过 OD 值测定,其细菌数为 10⁸cells·mL⁻¹。电泳图如图 3 所示。细菌的基因组 DNA, 16S rRNA, 固氮基因 *nifH*, 其中固氮基因

nifH 条带长度约为 360bp。

2.5 16S rRNA 序列分析

菌株 H9 的 16S rRNA 序列测序结果已经提交到 NCBI 的 Genbank 数据库中, Acession numbers 是(EF202990)。通过图 4 可以看出, 该菌株与芽孢杆菌属的短小芽孢杆菌 B402 的进化距离最近, 相似程度为 99.6%。这与生理生化鉴定结果较为一致。

表 1 短小芽孢杆菌标准菌株和 H9 的生理生化特征
Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of *Bacillus pumilus*^T and H9

特征	短小芽孢杆菌标准菌株的鉴定结果	H9
细胞直径>1μm	—	—
芽孢圆形	—	—
孢囊膨大	—	—
伴孢晶体	—	—
接触酶	+	+
厌氧生长	—	—
V-P 测定	+	+
V-P 培养物终 pH<6	+	+
pH>7	—	—
硝酸盐还原	—	—
产酸: D-葡萄糖	+	+
L-阿拉伯糖	+	+
D-木糖	+	+
D-甘露醇	+	+
葡萄糖产气	—	—
水解: 明胶	+	+
淀粉	—	—
酪朊	+	—
利用: 柠檬酸盐	+	+
丙酸盐	—	—
形成: 吲哚	—	—
需要尿囊酸和尿素盐	—	d
需要 NaCl 和 KCl	—	—
酪氨酸水解	—	d
苯丙氨酸脱氨酶	—	—
生长 pH: 6.8 营养肉汤	+	+
5.7 营养肉汤	+	+
生长 NaCl: 1%	+	+
2%	+	+
5%	+	+
7%	+	+
生长温度: 5	—	—
10	+	+
30	+	+
40	+	+
有溶菌酶时生长	d	d
H ² ⁺ 、CO ₂ 或 CO 自养生长	—	ND

注: +表示≥90%菌株为阳性 —表示≥90%菌株为阴性 d表示 11%—89%菌株为阳性; ND 表示未测定; NG 表示不生长。

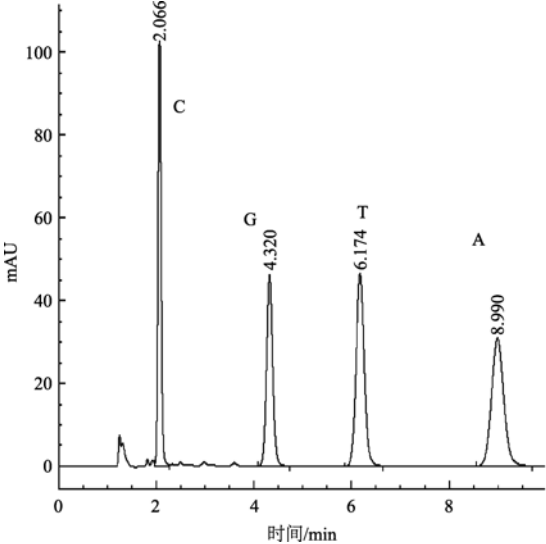


图 2 H9 菌株基因的 C、G、T、A 含量面积图
Fig. 2 The C, G, T, A content of H9

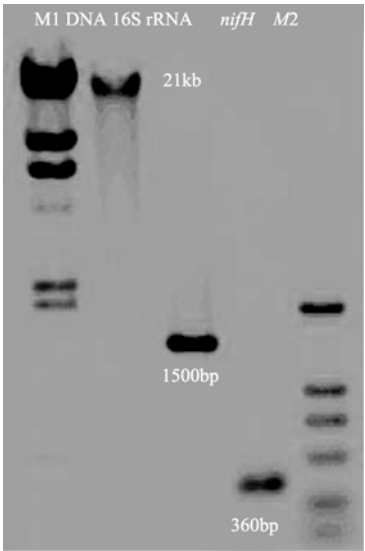


图 3 H9 菌株的基因组 DNA、16S rRNA 以及固氮基因 *nifH*
M1, M2 为 Marker
Fig. 3 The genomic DNA, 16S rRNA and nitrogen-fixing *nifH*

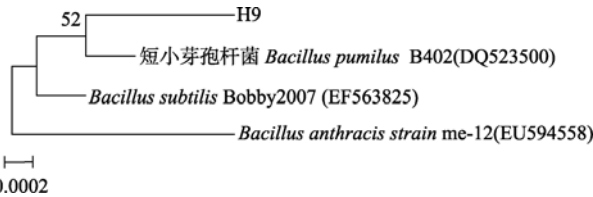


图 4 16SrRNA 系统进化树分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis of H9 based on the 16S rRNA sequences of related species

3 结论

本文是国内首次从红树林根际土壤中分离出可培养固氮菌并加以系统学鉴定, 通过一系列的形态学、生理生化鉴定及系统发育分析, 菌株 H9 鉴定为短小芽孢杆菌。关于该菌的具体描述以及生理生化

特性为:该菌为革兰氏阳性,直杆状,端圆,通常为 $0.5\mu\text{m}\times 1.0\text{—}3.0\mu\text{m}$,在固体培养基上生长时,为圆形(直径 $3\text{—}4\text{mm}$),白色菌落,好氧菌,厌氧条件下不生长,接触酶、氧化酶均阳性,V-P测定反应为阳性,且终产物的 $\text{pH}<6$,可以利用的碳源有D-葡萄糖,L-阿拉伯糖,D-木糖,D-甘露醇。明胶水解和酪朊水解阳性利用柠檬酸盐。该菌的最适生长盐度 1‰ ,最

适生长PH为7,最适生长为 37°C ,具有较高的固氮能力为 $51.11\text{ nmol N}_2\cdot\text{H}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

菌株 H9 显示出了良好的固氮性能,表明其在自然红树林生态系统的恢复、可持续发展以及红树植物的保育和繁殖中将具有较大的应用前景,关于该菌在人工接种红树植物后的具体促生作用及其实质的对红树植株的固氮贡献有待进一步研究。

参考文献

- [1] 林鹏. 海洋高等植物生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 76–80.
- [2] 黎遗业. 广西沿海红树林的生态保护政策 [J]. 资源开发与市场, 2008, 24(3): 267–269.
- [3] ALONGI D M, CHRISTOFFERSEN P, TIRENDI F, et al. The influence of forest type on microbial–nutrient relationships in tropical mangrove sediments[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 11: 201–203.
- [4] SENGUPTA A, CHAUDHURI S. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India[J]. Oecologia, 1991, 87: 560–564.
- [5] HOLGUIN G, GUZMAN M A, BASHAN Y, et al. Two new nitrogen–fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere of *Staphylococcus* sp.[J]. FEMS Microbial Ecol, 1992, 101: 207–216.
- [6] 韩威威, 沈世华, 荆玉祥. 生物固氮中的蛋白质组学[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 464–494.
- [7] HOLGUIN G, BASHAN Y. Nitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium *staphylococcus* sp[J]. Soil Biol Biochem, 1996, 28(12): 1651–1660.
- [8] TOLEDO G, BASHAN Y. In vitro colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria[J]. Can J Microbiol, 1995, 41(11): 1012–1020.
- [9] ADRIANA R, GINA H, YOAV B, et al. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N_2 -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 35(2): 181–187.
- [10] 林鹏. 红树林研究论文集: 第1集[G]. 厦门: 厦门大学出版, 1990.
- [11] 林鹏. 红树林研究论文集: 第2集[G]. 厦门: 厦门大学出版, 1993.
- [12] 林鹏. 红树林研究论文集: 第3集[G]. 厦门: 厦门大学出版, 1999.
- [13] 林鹏. 红树林研究论文集: 第4集[G]. 厦门: 厦门大学出版, 2000.
- [14] 尤崇杓, 姜涌明, 宋鸿雨. 生物固氮[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 224–245.
- [15] 曾定. 固氮生物学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1987, 260–263.
- [16] 林敏, 方宜钧, 程红梅, 等. 固氮细菌氮调系统组成及调控机制. 农业生物技术学报[J], 1995, 3(1): 28–33.
- [17] 章生卫, 章金鸿, 罗海蜆. 利用植物生长促进菌(PGPB)恢复红树林[J]. 广州环境科学, 2002, 17(2): 1–4.
- [18] RACIKUMAR S, KATHIRESAN K, THADEDUS S, et al. Nitrogen–fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers [J]. J Exp Mar Bio, 312 (2004): 5–17.
- [19] 梁静娟, 王松柏, 庞宗文, 等. 海洋细菌 *Bacillus pumilus* PLM4 产抗肿瘤多糖的发酵条件优化研究[J]. 广西农业生物科学, 2006, 25(3): 256–260.
- [20] 耿彦生, 李涛. 短小芽孢杆菌 E601 抗电离辐射研究[J]. 中华流行病学杂志, 1999, 20(6): 334–337.
- [21] CHANG B V, CHANG I T, YUAN S Y. Biodegradation of phenanthrene and pyrene from mangrove sediment in sub-tropical Taiwan[J]. J environ sci health, 2008, 43(3): 233–238.
- [22] 王逸群, 郑金贵, 陈文列, 等. 稻内生固氮菌的分离及鸚鸡肠球菌在水稻根中的分布[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(4): 296–302.
- [23] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 5(2): 254–255.
- [24] 谢光辉. 长江流域水稻根际芽孢杆菌属固氮菌株的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 1998, 38(6): 480–483.
- [25] XIE G H, CAI M Y, TAO G C, et al. Cultivable Heterotrophic N_2 -Fixing Bacterial Diversity in Rice Field along Yangtze River Plain[J]. Biol Fert Soils, 2003, 37: 29–38.
- [26] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 330–336.
- [27] MARMUR J. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids[J]. J Mol Biol, 1961, 3: 585–589.
- [28] 田新朋. 云南黑井盐矿可培养极端嗜盐古菌的分离及系统学研究[D]. 昆明: 云南大学硕士论文, 2006.
- [29] 何延静, 刘海明, 胡洪波, 等. 一株拮抗辣椒疫霉的假单胞菌的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2006, 46(4), 516–521.
- [30] ORSINI M, RONMANO-SPICA V. A microwave–based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. Lett Appl Microbiol Lett, 2001, 33: 17–20.
- [31] 徐平, 李文均, 徐丽华. 微波法快速提取放线菌基因组DNA[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82–84.
- [32] WEISBURG W, BARNS S, PELLETIER D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. J BACTERIOL, 1991, 173(2): 697–703.
- [33] POLY F, RANJARD L, NAZARET S, et al. Comparison of *nifH* gene pools between soils and between soil microenvironments of contrasting properties[J]. APPL ENVIRON MICROB, 2001(67): 225–2267.
- [34] SAITOU N, NEI M. The neighbor–joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406–425.
- [35] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions nucleotide sequence[J]. J Mol Evol, 1980, 16: 111–120.
- [36] KIMURA M. The neutral theory of molecular evolution[M]. New York: Cambridge University Press, 1983.