

敌敌畏杀虫剂对桃树叶际微生物群落结构的影响

荆 梦^{1,2}, 宿燕明^{1,2}, 谷立坤², 彭霞薇¹, 李 林², 白志辉²

(1.北京林业大学,北京 100083;2.中国科学院生态环境研究中心,北京 100085)

摘 要 采用平板计数法和磷脂脂肪酸(PLFA)分析方法评价了喷施敌敌畏杀虫剂后对桃树叶际微生物群落的影响。平板计数法分析结果表明,经 80%敌敌畏乳油的 1 000 倍液喷雾处理后,可培养微生物数量低于喷水对照。PLFA 分析结果显示,桃树叶际真菌标记物 18:1 ω 9t 磷脂脂肪酸(PLFAs)含量最高,超过总 PLFAs 含量的 60%;喷施杀虫剂后,叶际微生物 PLFAs 的含量、种类均有所增加,明显有别于喷水对照,并且增加敌敌畏处理次数会增强其对叶际微生物群落影响的显著性。PLFAs 主成分分析表明,处理 1 d 后不同样品的叶际微生物群落结构差异最明显,7 d 后,不同处理样品的叶际微生物群落结构差异变小。

关键词 桃树;叶际;敌敌畏;微生物群落;磷脂脂肪酸

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2010)05-0864-06

Effects of Dichlorovos Insecticide on the Microbial Community in Peach Phyllosphere

JING Meng^{1,2}, SU Yan-ming^{1,2}, GU Li-kun², PENG Xia-wei¹, LI Lin², BAI Zhi-hui²

(1.Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2.Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract Although dichlorovos(DDVP) is one of the most widely used organophosphorus insecticides, little is known regarding the impacts of applying the insecticide on the microbial community in plant phyllosphere. In the present study, the impact of DDVP treatment on the microbial community of peach phyllosphere was assessed using the culture-dependent method of dilution-plate counting and the culture-independent technique of phospholipid fatty acid(PLFA) analysis. Dilution-plate counting assay indicated that the number of culturable microorganisms in peach phyllosphere treated by DDVP insecticide was less than that in the water treatment. Whereas, PLFA analysis suggested that DDVP insecticide treatment led to a significant increased in both total biomass and species. PLFA profiles also indicated that the fungal unsaturated PLFA (18:1 ω 9t) was predominant (>60% of the total PLFAs) in peach phyllosphere. Principal component analysis of PLFAs data indicated that DDVP treatment did change the phyllosphere microbial community structure significantly; the phyllosphere microbial communities of DDVP and water treatments were the most different after 1 day treatment, and became similar after 7 days.

Keywords *Prunus persica*; phyllosphere; dichlorovos; microbial community; phospholipid fatty acid

敌敌畏(dichlorovos),化学名称 O,O-二甲基-O-(2,2-二氯乙烯基)磷酸酯(2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate,DDVP),是一种使用广泛的有机磷杀虫剂,具有触杀、胃毒和熏蒸作用,对咀嚼口器和

刺吸口器的害虫均有效,可用于蔬菜、果树和多种农田作物^[1]。农药虽然在现代化农业发展过程中发挥了重要作用,但对叶际微生物的影响也非常直接。目前,利用生物化学与分子生物学技术来研究农药污染物对微生物群落结构的影响正在被广泛应用,这些技术可以有效地避免传统培养方法造成的微生物多样性的丢失,更能够有效直接地反映环境中微生物的原始组成^[2-3]。

植物地上部分(包括叶、茎、花、果等)的表面和内部存在大量各种类型的细菌、丝状真菌、酵母、藻

收稿日期:2009-11-18

基金项目:国家自然科学基金项目(30600082);国家科技支撑计划项目(2007BAC27B01);中国科学院知识创新工程重大项目(kzcx1-yw-06-03)

作者简介:荆梦(1984—),女,硕士研究生,主要从事环境微生物生态学。

通讯作者:白志辉 E-mail:zhbai@rcees.ac.cn

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^[4], 它们发挥着重要的生态功能, 既有阻碍植物生长、发育的病原微生物, 也有相当一部分的非病原微生物^[5-7]。植物叶际微生物的生存环境相当不稳定, 甚至是恶劣, 如紫外线辐射强、温度和相对湿度波动大、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^[4, 6, 8-9]。为了能适应复杂的叶际环境, 叶际微生物的群落特征也很可能相当复杂, 这些微生物也可能为人们提供许多编码具有很强耐受特性的基因资源^[4]。

本实验是将 DDVP 杀虫剂喷施在感染桃粉蚜的桃树叶片上, 在杀灭害虫的同时, 初步探究 DDVP 对叶际微生物群落的影响, 采用培养方法(稀释平板计数法)和非培养方法(磷脂脂肪酸分析技术, PLFA)同时进行调查、比较和分析。

1 材料与方 法

1.1 样品采集和处理

于 2009 年 6 月, 选取生长在中国科学院生态环境研究中心的桃树 (*Prunus persica*) 为实验材料, 设计叶面喷施浓度为 80% 敌敌畏乳油 (河南省普朗克生化工业有限公司) 1 000 倍液喷雾, 叶面喷水为对照, 叶面不做任何处理为空白。实验分 3 次喷药 (分别标记为 、 、 , 隔 7 d 喷 1 次), 实验持续 15 d。每次喷药后第 1、3、7 d 随机采集叶片样品 (大约采集 100 g), 样品采集后放入无菌样品袋中, 带回实验室直接进行实验分析。

1.2 叶际细菌分离和计数

分别取 10 g 不同样品经 100 mL 无菌的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0, 含 0.1% Tween) 超声波振荡 (40 kHz) 处理 7 min 后, 于 25 °C, 200 r·min⁻¹ 摇床振荡 30 min, 将叶际微生物洗脱下来。然后洗液系列稀释, 取 10⁻² 稀释度 100 μL 分别涂布在桃树叶汁固体培养基和 LB 固体培养基平板上 (设置 3 个重复), 30 °C 恒温培养 3 d 后统计菌落数量。桃树叶汁固体培养基 200 g 桃树叶片/1 000 mL 蒸馏水榨汁, 1.7%~2.0% 琼脂, pH 7.0~7.4, 121 °C 灭菌 15 min。LB 固体培养基购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 磷脂脂肪酸分析 (PLFA)

分别取 20 g 不同样品加入装有 200 mL 无菌的磷酸缓冲液 (pH 7.0, 含 0.1% Tween) 中, 超声波振荡 (40 kHz) 7 min 后, 于 25 °C, 200 r·min⁻¹ 摇床振荡 30

min, 洗脱叶际微生物。去除植物叶片样品, 洗液高速 (9 000 r·min⁻¹) 离心 8 min 后收集菌体沉淀, 用于 PLFA 分析。

利用 Bligh/Dyer 法通过氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲液振荡提取总脂, 经硅胶柱层析分离得到磷脂脂肪酸 (PLFAs), 甲酯化后溶于含有正十九烷脂肪酸甲酯 (nonadecanoic acid methyl ester Sigma Aldrich Co., USA) 内标物的正己烷中, 进行 GC-MS 检测^[10-12]。

采用 HP6890-HP5973 型气相色谱质谱联用仪 (GC-MS, 美国 Agilent 公司) 分析 PLFAs 的组成, 检测中使用的升温程序如下: 进样后在 50 °C 保持 1 min, 以 12 °C·min⁻¹ 的速率升到 180 °C 保持 2 min, 以 6 °C·min⁻¹ 的速率上升到 220 °C 停留 2 min, 以 15 °C·min⁻¹ 的速率上升到 240 °C 保持 1 min, 以 15 °C·min⁻¹ 的速率达到最终温度 260 °C 并保持 15 min。气相色谱与质谱之间的连接温度为 280 °C, 用高纯氦气 (1 mL·min⁻¹) 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 数据分析

采用平板菌落计数法对可培养微生物进行计数统计。PLFA 数据使用 SPSS 11.5 进行主成分分析 (PCA, principal components analysis)。每种 PLFAs 的摩尔百分含量都进行底数为 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。

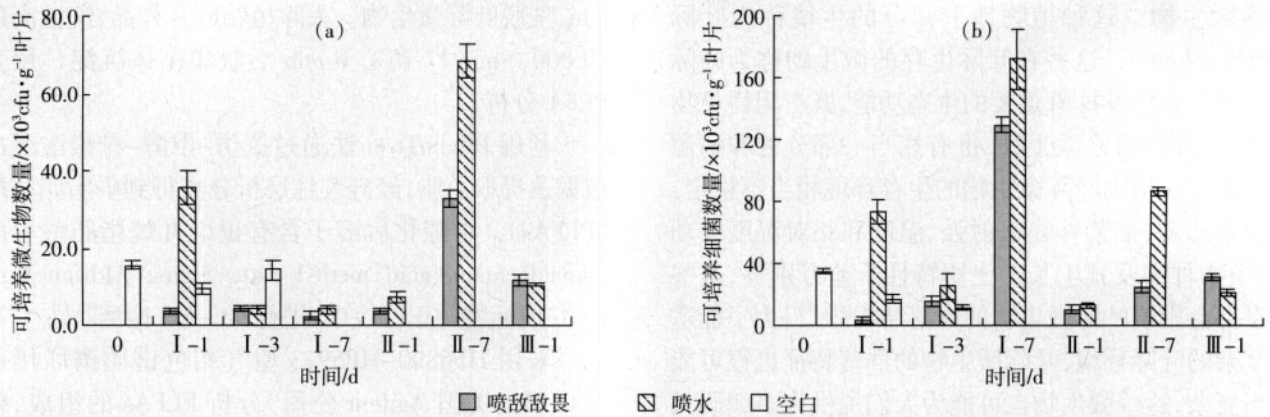
2 结果与分析

2.1 不同处理样品叶际可培养微生物数量

本实验分 3 次喷药 (分别标记为 、 、) 所做处理分别为: 喷施 80% 敌敌畏乳油的 1 000 倍稀释液、喷水对照以及不做任何处理的空白。

用平板菌落计数法统计桃树叶际可培养微生物数量^[13], 其中桃树叶汁培养基统计了细菌与真菌总和, 即可培养微生物数量; LB 培养基统计了细菌的数量。从平板上看, 桃树叶汁培养基真菌数量较细菌数量多, 微生物数量级为 (10³~10⁴) cfu·g⁻¹ 叶片, 而 LB 培养基细菌数量级为 (10⁴~10⁵) cfu·g⁻¹ 叶片。可能是因为叶汁培养基较 LB 培养基营养匮乏, 所以两种培养基统计的微生物数量级有差别, 同时也可以说明真菌更能适应叶汁培养基的培养条件。

如图 1(a, b) 所示, 与第 0 d 空白样品相比, 第 1 d 空白样品菌量减少, 第 1 d 喷 DDVP 样品的菌量与空



(a)桃树叶汁培养基 peach leaves juice medium; (b)LB培养基 LB medium

图1 DDVP杀虫剂对桃树叶际可培养微生物数量的影响

Figure 1 Effect of DDVP insecticide on the number of culturable microorganisms in peach phyllosphere

白相比明显下降,而第1d喷水样品的菌量却有所增加。说明叶际微生物数量会随时间呈现动态变化,而经过喷水和喷药处理,对桃树叶际微生物也有比较明显的影响,喷DDVP很可能是抑制了某些对DDVP敏感的微生物的生长繁殖,而喷水恰恰有利于某些需要高相对湿度的微生物生长繁殖。总体来讲,喷DDVP样品的可培养微生物数量低于喷水对照。另外,桃树叶汁培养基微生物数量最多是出现在第2次喷药后的第7d(图1a);LB培养基细菌数量最多则出现在第1次喷药后的第7d(图1b)。微生物数量达到高峰都是出现在喷药后的第7d,说明随处理时间的延长,叶际微生物数量有增长趋势,并且不同培养基对叶际可培养微生物也具有选择性,LB培养基体现的是可培养细菌的数量,桃树叶汁培养基体现的是营养贫乏条件下真菌与细菌的总量。因此,叶际可培养微生物数量的多少不仅与所做的处理有关,还与培养基选择、气候、环境等因素相关。

2.2 不同处理样品叶际微生物的 PLFAs 含量

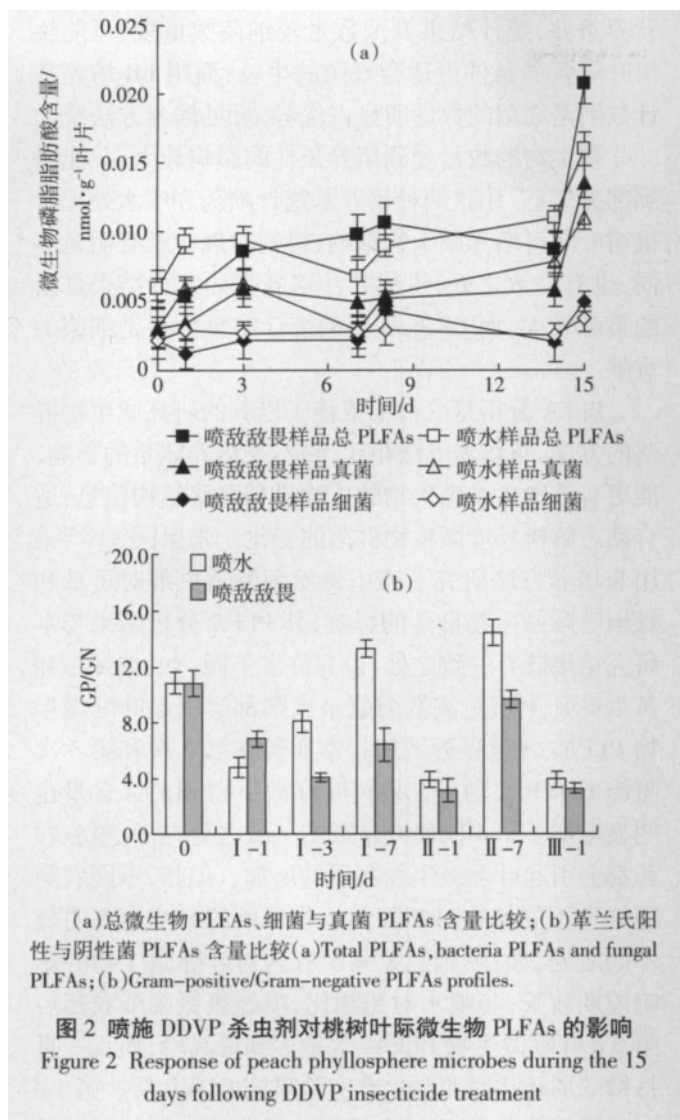
磷脂是几乎所有微生物细胞膜的重要组成部分,在自然生理条件下其含量相对恒定。不同的微生物含有不同种类和数量的 PLFAs,一些 PLFAs 还特异性地存在于某种类微生物细胞膜中,因此 PLFAs 可以作为微生物生物量和群落结构变化的生物标记分子^[14]。

本实验鉴定了 22 种 PLFAs, C 链长度从 14 到 20,包括饱和、不饱和、甲基化分支和环化脂肪酸。图 2a 显示了实验期间桃树叶际微生物 PLFAs 含量的动态变化,喷 DDVP 与喷水样品 PLFAs 含量存在差异 ($P<0.05$)。第 1 次喷药后第 1 d 喷 DDVP 样品 PLFAs

总含量低于喷水样品,从第 3 d 以后,两个样品 PLFAs 总含量基本上相接近,而到第 3 次喷药后,两种样品 PLFAs 含量都明显增加,其中喷 DDVP 的样品总 PLFAs 含量要高于喷水样品。可以说明 DDVP 对叶际微生物的影响比较复杂,桃树叶际微生物对 DDVP 有一个选择适应的过程,DDVP 的影响也具有一定时间的累积效应,即随 DDVP 处理时间的延长,某些微生物开始加快繁殖生长,表现为总 PLFAs 含量的增加,而后再次喷施 DDVP 会为某些农药残留降解微生物提供营养而促使其迅速生长繁殖,表现为 PLFAs 含量的迅速升高。PLFA 分析显示,随 DDVP 农药作用时间的延长,PLFAs 种类、含量有所增加。另外,DDVP 与叶际微生物之间的作用具有一定时间性,后两次喷药后第 1 d 的样品,都会比前一次喷药后第 7 d 样品的 PLFAs 总量有所增加,也表明可能有某些微生物对农药的代谢能力有所增强。

比较不同处理桃树叶际微生物细菌和真菌含量(图 2a),主要真菌指示物(18:1 ω 9t 和 18:2 ω 6 9)^[14-15]含量要高于细菌(i14:0、a15:0、16:1 ω 7c、16:0、i16:0、17:0、a17:0、cy17:0、和 18:0)含量^[16-18]。图 2a 显示,喷水或喷药处理都会影响叶际微生物细菌和真菌的含量,但影响的程度不同。喷水处理对叶际细菌影响不明显,使真菌含量有所增加,喷 DDVP 处理使叶际细菌含量先减少后略有增加,真菌含量逐渐增加,其中第 3 次喷药后第 1 d 细菌与真菌含量都达到高峰。喷 DDVP 比喷水处理 PLFAs 含量略高。

分析不同处理桃树叶际微生物革兰氏阳性和阴性菌含量 GP/GN(图 2b),喷水和喷药处理都会影响革兰氏阳性菌和阴性菌含量的变化($P<0.05$)。结果显示,革兰氏阳性菌(i14:0、a15:0、16:0、i16:0 和 a17:0)含



量高于革兰氏阴性菌(16:1 ω 7c 和 cy17:0)含量^[16-17]。如图 2b 所示,分析第 1 次处理后喷水样品与第 0 d 对照相比,GP/GN 比值先降低后逐渐升高,而喷 DDVP 样品在第 3 d GP/GN 比值下降最明显,表明喷水和喷 DDVP 杀虫剂对叶际微生物产生显著影响的时间不同。第 2 次处理后,两种样品第 1 d 的 GP/GN 比值都明显下降,之后第 7 d 又明显升高,并且喷 DDVP 样品要低于喷水样品。第 3 次处理后第 1 d,两种样品 GP/GN 比值都同样是明显降低。说明喷水或喷 DDVP 都会在短时间内使 GP/GN 比值下降,而随处理时间的延长,GP/GN 比值又会升高。分析可能由于随处理时间的延长,DDVP 残留降解所致,而喷水样品水分也会在较短时间蒸发,影响作用不持久。同时我们也发现,随着 3 次喷施 DDVP,其在短时间内不能完全降解,因此植物叶际也存在一定的农药残留累积效应,从而表现为喷 DDVP 样品的 GP/GN 比值基本上

略低于喷水样品。

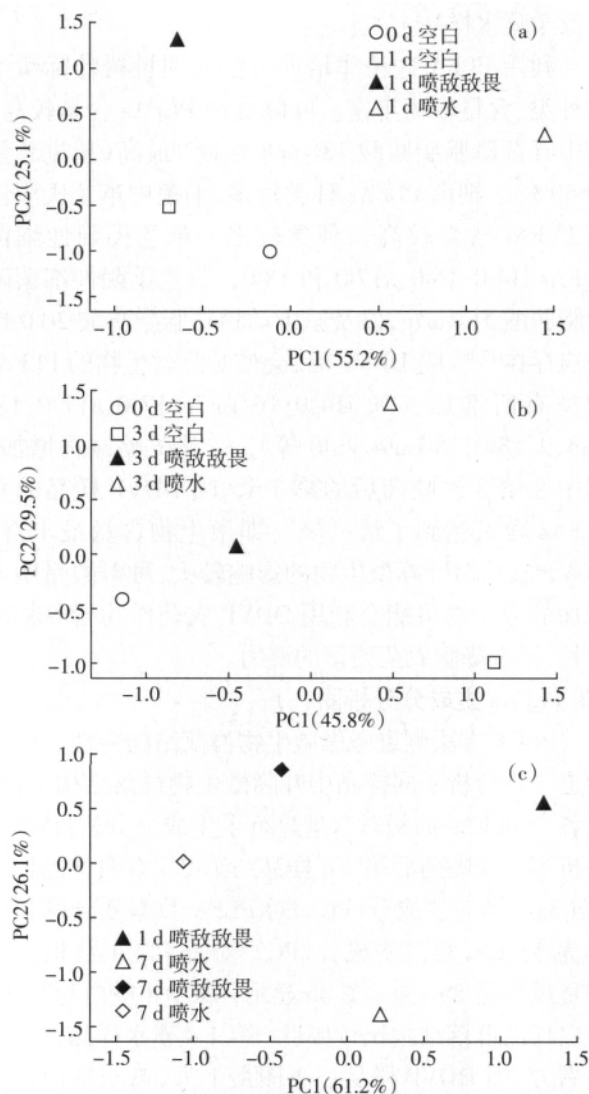
利用 PLFA 这种非培养方法表明桃树叶际微生物种类、含量较为丰富。叶际真菌 PLFAs 含量较高,其中真菌磷脂脂肪酸 18:1 ω 9t 含量^[14]最高(超过总量的 60%)。细菌 PLFAs 种类较多,细菌中革兰氏阳性菌 PLFAs 含量较高、种类较多。革兰氏阳性细菌 PLFAs i14:0、16:0、a17:0 和 18:0,革兰氏阴性细菌磷脂脂肪酸 16:1 ω 7c,以及原生动物的磷脂脂肪酸 20:0 也普遍存在^[15-18]。喷 DDVP 后,会使叶际微生物的 PLFAs 种类有所增加(如 i14:0、16:1 ω 7c、17:0、a17:0、18:2 ω 6 β 、18:0、18:1 ω 9t、20:0 等),含量先略减再增加。其中在第 3 次喷药后的第 1 d,喷 DDVP 样品的总 PLFAs 含量达到了最高峰,即微生物含量最丰富。DDVP 农药对叶际微生物的影响较大,种群数量明显增加的微生物可能会利用 DDVP 农药作为营养物质生长,具有降解农药残留的潜力。

2.3 PLFAs 主成分分析图

PLFA 方法侧重考虑微生物群落结构特性,因此为进一步分析不同样品中叶际微生物群落结构差异,对各个 PLFAs 的相对含量进行了主成分分析(PCA)。分析第 1 次喷药后第 1 d 样品与第 0 d 空白样品比较(图 3a),第一主成分(PC1)对 PLFA 数据变异的贡献率为 55.2%,第二主成分(PC2)对总 PLFA 数据变异的贡献率是 25.1%。图 3a 显示,第 0 d 空白与第 1 d 空白样品群落结构比较接近。第 1 d 喷水样品在图的最右方,喷 DDVP 样品位于图最上方,都与空白样品差别较大,表明这两种处理都对叶际微生物群落结构的影响较大,而这两种处理之间的差异也比较明显。

图 3b 所示第 1 次喷药后第 3 d 样品与第 0 d 空白样品比较,第一主成分(PC1)对 PLFA 数据变异的贡献率为 45.8%,第二主成分(PC2)对总 PLFA 数据变异的贡献率是 29.5%。第 0 d 空白与第 3 d 空白样品群落结构存在较大差异,表明叶际微生物群落也是随时间呈现明显的动态变化。第 3 d 喷水样品在图的最上方,与第一、第二主成分均呈正相关。喷 DDVP 样品位于原点附近,与其他样品差异明显。可以说明喷 DDVP 后第 3 d,DDVP 对叶际微生物群落结构仍有较大影响。

分析第 2 次喷药后第 1 d 和第 7 d 样品(图 3c),第一主成分(PC1)对 PLFA 数据变异的贡献率为 61.2%,第二主成分(PC2)对总 PLFA 数据变异的贡献率是 26.1%。不同处理的样品间存在差异,其中第 1 d 喷 DDVP 与喷水样品群落结构存在较大差异,第 7 d



(a)第0 d空白样品与第1次喷药后第1 d不同样品;(b)第0 d空白样品与第1次喷药后第3 d不同样品;(c)第2次喷药后第1 d和第7 d不同样品

(a) 0 & 1st day samples after the first treatment; (b) 0 & 3rd day samples after the first treatment; (c) 1 & 7 days samples after the second treatment

图3 不同处理桃树叶际微生物 PLFAs 主成分分析

Figure 3 Scatter plot of the first two principal components in a principal-component analysis of relative molar abundance of PLFAs in the total microbial community in peach phyllosphere

两者差异缩小,说明 DDVP 与叶际微生物之间发生作用具有一定的时间性,喷药后第1 d对叶际微生物群落结构影响较大,随处理时间的延长,农药残留会逐渐降解,从而表现出微生物群落结构逐渐接近的动态变化。

3 讨论

采用桃树叶汁培养基进行桃树叶际可培养微生物平板计数,是为了模拟叶际微生物自然生存环境的

营养条件,统计结果真菌数量较细菌数量多,可能桃树叶际营养条件更适合真菌的生长,而用 LB 培养基计数则是细菌的数量明显占优势,可见培养方法统计叶际微生物的数量受到培养条件的影响较大,只能得到部分信息。用这两种培养基统计喷药和喷水处理对桃树叶际可培养微生物影响,得到的规律既有明显不同,也有一致之处,桃树叶汁培养基的统计结果真菌的贡献较大,而 LB 培养基的统计结果主要是细菌的贡献。

PLFA 分析是一种不依赖于培养的研究微生物群落的方法,与培养方法相比,它不受培养体系的影响,能更有效地提供微生物的生物量和群落结构信息,适合动态解析环境微生物群落的变化。张保国等^[19-20]采用非培养方法研究了喷施氯氰菊酯杀虫剂对黄瓜和辣椒叶际微生物群落的影响,其 PLFA 分析结果与本研究结果既有一致之处,也有许多不同。如:在辣椒和黄瓜叶片上喷施氯氰菊酯杀虫剂都会引起叶际微生物 PLFAs 含量显著增加;本实验在第2次和第3次喷施 DDVP 农药后,桃树叶际微生物 PLFAs 含量也明显增加了。不同研究结果的一致之处在于,喷施农药都会引起叶际微生物数量的增加。但是,不同农药喷施于不同植物对叶际微生物群落的影响也有明显不同之处,如:喷施氯氰菊酯农药对叶际微生物的影响周期较长,与喷水对照相比,喷施氯氰菊酯农药后第5 d叶际微生物 PLFAs 含量达到最高峰,而且一直持续3周还比对照高;本实验喷施 DDVP 后,第1 d对叶际微生物 PLFAs 含量影响最明显,持续1周后与对照趋于一致。表明氯氰菊酯农药的持效期比 DDVP 农药长,这个结果也与氯氰菊酯农药比 DDVP 农药的残留期长相符。再如:黄瓜和辣椒叶际微生物 PLFAs 中,细菌特征 PLFAs 含量明显高于真菌,而本实验结果桃树叶际微生物 PLFAs 中,真菌特征 PLFAs 含量明显高于细菌。可见不同植物的叶际微生物群落结构差异明显。造成这种差别的另一个因素是,张保国等选用的黄瓜和辣椒是在温室中种植,而本实验采用的桃树是在室外自然环境下种植,桃树叶际微生物群落的自然波动也相对较大。

PLFA 方法是对叶际微生物(包括可培养和非可培养)总体上进行定量,而平板计数只是针对可培养微生物,两种方法的侧重点不同,因此不同处理对可培养微生物与非培养微生物的影响也不相同。平板计数法分析结果表明喷水处理有利于叶际可培养微生物数量的增加,可能是因为叶际可培养微生物的生长

对湿度要求较高,而 PLFA 方法分析结果表明多次喷施 DDVP 有利于总微生物量的增加,可能是叶际存在某些非培养微生物能够利用 DDVP 为营养物生长。另外,农药与微生物之间、农药与植物之间、微生物与植物之间都存在着复杂的相互作用关系,这都可能影响到叶际微生物群落的动态变化。

4 结论

(1) 喷施 DDVP 或喷水处理都会引起桃树叶际微生物群落结构的变化,但两种处理对叶际微生物影响的程度不同。喷水处理在短时间内对叶际微生物影响明显,之后较快恢复。相对于喷水对照,喷施 DDVP 对叶际微生物的影响显著,多次喷施后,微生物 PLFAs 种类和含量均有所增加,表明 DDVP 农药残留可增加桃树叶际微生物的多样性和生物量。

(2) 喷施 DDVP 农药对桃树叶际可培养和非培养微生物都有较大的影响。PLFA 分析方法与传统可培养方法相互补充,可以初步评价农药施用对叶际微生物群落的影响,为农药残留的微生物降解提供理论基础。但是喷施农药所引起的叶际微生物群落结构的改变是否会对植物的生长和病害防治产生影响,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李荣, 贾开志, 蒋建东, 等. 敌敌畏、敌百虫高效降解菌株 DDB-1 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2): 554-558.
LI Rong, JIA Kai-zhi, JIANG Jian-dong, et al. Isolation and identification of a bacterium DDB-1 capable of degrading dichlorvos and trichlorfon simultaneously and its degrading characteristics[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2): 554-558.
- [2] 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.
DUAN Xue-jun, MIN Hang. Diversity of microbial genes in paddy soil stressed by cadmium using DGGE[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(5): 122-126.
- [3] 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.
- [4] Lindow S E, Brandl M T. Microbiology of the phyllosphere[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 1875-1883.
- [5] Leveau J, Lindow S E. Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(6): 3446-3453.
- [6] Hirano S S, Upper C D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte[J]. *Micro-*

- biology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(3): 624-653.
- [7] Sandhu A, Halverson L J, Beattie G A. Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(2): 383-392.
 - [8] Gau A E, Dietrich C, Kloppstech K. Non-invasive determination of plant-associated bacteria in the phyllosphere of plants[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(11): 744-752.
 - [9] Kadivar H, Stapleton A E. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity[J]. *Microbial Ecology*, 2003, 45(4): 353-361.
 - [10] White D C, Flwmming C A, Leung K T, et al. In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, 32(2): 93-105.
 - [11] Frostegard A, Tunlid A, Baath E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, 14(3): 151-163.
 - [12] 王新新, 张颖, 韩斯琴, 等. 1, 3-二氯苯污染底泥的零价铁修复对微生物群落结构的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 173-178.
WANG Xin-xin, ZHANG Ying, HAN Si-qin, et al. Impact of the remediation of 1, 3-dichlorobenzene contaminated sediments on microbial communities structure using zero-valent iron [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(1): 173-178.
 - [13] 徐会娟, 何红波, 武叶叶, 等. 乙草胺对玉米根际和非根际可培养微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(9): 1936-1941.
XU Hui-juan, HE Hong-bo, WU Ye-ye, et al. Effects of acetochlor on culturable microbial communities in maize rhizosphere and non-rhizosphere soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(9): 1936-1941.
 - [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]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1993, 59(11): 3605-3617.
 - [15] Vestal J R, White D C. Lipid analysis in microbial ecology quantitative approaches to the study of microbial communities[J]. *Bioscience*, 1989, 39: 535-541.
 - [16] 白震, 何红波, 张威, 等. 磷脂脂肪酸技术及其在土壤微生物研究中的应用[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2387-2393.
BAI Zhen, HE Hong-bo, ZHANG Wei, et al. PLFAs technique and its application in the study of soil microbiology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(7): 2387-2393.
 - [17] Jennifer M F, Teri C B, Monica G T. Microbial community variation and its relationship with nitrogen mineralization in historically altered forests[J]. *Ecology*, 2006, 87(3): 570-579.
 - [18] Jennifer M K, Richard P D. PLFA profiling of microbial community structure and seasonal shifts in soils of a douglas-fir chronosequence [J]. *Microbial Ecology*, 2008, 55: 500-511.
 - [19] Zhang B G, Bai Z H, Hoefel D, et al. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407: 1915-1922.
 - [20] Zhang B G, Zhang H X, Jin B, et al. Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20: 1356-1362.