

养殖大菱鲈肠炎病的流行病学和病原学研究

姜燕¹, 崔晓翠¹, 张正^{2*}, 景亚运¹, 王印庚², 吴立新¹, 常亚青¹

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁大连 116023; 2. 中国水产科学院黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

摘要 [目的] 肠炎病是目前大菱鲈养殖行业中比较常见的疾病之一, 该病感染率高, 传播迅速。[方法] 从山东半岛 3 个不同的养殖厂肠炎病发病大菱鲈体内分离致病菌, 对其进行了常规生理生化特征测试和 16S rRNA 基因序列对比研究。[结果] 从发病大菱鲈体内分离到了株优势细菌。理化特征分析结果显示这 3 株菌中有 2 株分别与溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 和大菱鲈弧菌 (*Vibrio scophthalmi*) 表型特征非常相似, 另 1 株细菌被证实为非弧菌属的细菌, 具体定种尚需进一步研究。分析这 2 株弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列并构建了系统发育树, 结果表明这些菌株与溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 和大菱鲈弧菌 (*Vibrio scophthalmi*) 的亲缘关系最近。[结论] 从发病大菱鲈体内分离菌株的 2 株细菌被鉴定为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 和大菱鲈弧菌 (*Vibrio scophthalmi*)。

关键词 大菱鲈; 肠炎病; 16S rRNA; 溶藻弧菌; 大菱鲈弧菌

中图分类号 S941 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)17-123-04

Epizootic and Aetiological Study on the Enteritis Disease in Cultured *Scophthalmus maximus*

JIANG Yan¹, CUI Xiao-cui¹, ZHANG Zheng^{2*} et al (1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Shandong 116023; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao, Shandong 266071)

Abstract [Objective] To research the epidemiology and etiology of the enteritis disease in cultured *Scophthalmus maximus*. [Method] Pathogenic bacteria were isolated from *S. maximus* with enteritis disease in different aquatic plants of Shandong peninsula. The traditional physiological and biochemical tests and 16S rRNA sequencing analysis were carried out. [Result] Three strains were isolated from the diseased *S. maximus*. Results of physicochemical characteristics showed that two strains were the same as *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio scophthalmi*, while the other strain was identified to be bacterium not belonging to *Vibrio*, and further research was still needed. The 16S rRNA sequence of the two strains was analyzed and molecular phylogenetic dendrogram were constructed. Result showed that there was high level of consanguinity between *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio scophthalmi*. [Conclusion] The two strains isolated from *S. maximus* are identified to be *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio scophthalmi*.

Key words *Scophthalmus maximus*; Enteritis diseases; 16S rRNA; *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio scophthalmi*

大菱鲈 (*Scophthalmus maximus* L) 隶属鲆科菱鲈属, 分布于欧洲沿岸各主要海区, 是欧洲水产品市场广受欢迎的一种名贵鱼种, 具有较高经济价值。我国国内的大菱鲈商业养殖始于 1997 年。近几年由于养殖规模的不断扩大, 疾病的暴发也越来越频繁。每年我国的养殖大菱鲈因疾病的损失就达 4 亿~5 亿元^[1]。丁春林等^[2]对养殖大菱鲈进行了系统流行病学调查, 发现肠炎病是养殖大菱鲈较为常见的疾病之一。笔者从山东半岛不同的养殖厂采集发病大菱鲈的样品, 并进行细菌分离和系统病原鉴定研究。

1 材料与方法

1.1 病鱼样品的采集 从山东半岛 3 个不同的养殖厂采集到患肠炎病的大菱鲈样品, 分别来自莱州市、青岛市流亭镇和荣成市。这 3 个病鱼样品的肠壁都可见明显充血, 且呈红色, 肠道中淤积了大量的黄白色粪便和黏液。

1.2 菌种的采集分离及培养基 无菌挑取病鱼肠道中的白色粪便和黏液接种于盐度 3% 的 TSB (胰蛋白胨大豆肉汤) 平板培养基上, 28℃ 下培养 24~30 h 后, 挑取优势菌的单个菌落纯化 2 遍后, 置于 20% 甘油中 -80℃ 冰箱下保存。

1.3 形态观察和生理生化试验 使用 Nikon E800 光学显微镜观察细菌个体形态、大小和鞭毛, 用半固体培养基穿刺接种培养和水浸片结合观察细菌运动性。参照伯杰氏细菌

手册 (第 9 版) 对细菌进行常规分类^[3], 使用 API 20E 试剂条 (法国生物梅里埃公司) 结合菌种鉴定管 (北京陆桥公司) 进行常见碳氮源利用和酶反应的测定, 对于一些特征性反应则手工配制相应培养基进行。

1.4 16S rRNA 序列测定与分析

1.4.1 PCR 模板的制备。将细菌接种在 TSB 平板上, 28℃ 下培养 24 h。取单一菌落悬浮于无菌去离子水中, 100℃ 水浴 5~10 min 后, 4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为 PCR 扩增反应的模板。

1.4.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增和序列测定。16S rRNA 基因扩增的正向引物 P27f, 5' - AGAGTTTGATC (C/A) TGGCTC AG - 3', 反向引物 P1429r, 5' - GGCTACCT-TGTTACGACTT - 3' (此引物为细菌 16S rRNA 基因序列扩增的通用引物)。PCR 反应体系 (100 μL): 1 × PCR 缓冲液、1.5 mmol/L MgCl₂、4 × dNTP 混合物 125 μmol/mL、引物各 7.5 nmol/mL、Taq DNA 聚合酶 1 μL (5 U/μL)、1 μL DNA 原液。PCR 反应条件如下: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 100 s, 35 个循环; 最后 72℃ 温育 15 min。最后, 对 PCR 产物进行测序。

1.4.3 序列分析和系统发育树的构建。将所获得的 3 株菌的 16S rRNA 基因序列使用 BIOEDIT 软件进行对比分析, 确定其相似性。从 GenBank 数据库中选取与他们相似率最高的细菌 16S rRNA 基因序列, 使用 BIOEDIT 软件中集成的 ClustalW 软件进行多序列匹配排列, 使用系统发生推断软件包 PHYLIP3.6a3 进行统计和聚类分析。采用邻位相连法 (Neighbor-joining) 进行发育系统树分析, 通过自举分析

作者简介 姜燕 (1990 -), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物病害防控。* 通讯作者, 副研究员, 博士, 硕士生导师, 从事水产动物病原学研究。

收稿日期 2016-05-10

(Bootstraping) 进行系统进化树评估, 自举数据集为 1 000 次^[4]。

1.4.4 通过系统发育树构建 16S rRNA 基因序列来源。从 GenBank 数据库中选取 25 株与所分析的细菌 16S rRNA 基因序列相似性较高的已知种菌株, 与分离到的菌株共同构建系统发育树。所选取菌株的相关数据和基因编号见表 1。

表 1 构建系统发育树的 16S rRNA 基因序列及其数据库编号

Table 1 The 16S rRNA gene sequence and database access for phylogenetic dendrogram

编号 Code	菌株名称 Strain name	菌株号 Strain number	编号 Code	菌株名称 Strain name	菌株号 Strain number
AJ310648	<i>V. agarivorans</i>	CECT 5084	AY426978	<i>V. haliotocoli</i>	HDD1 - 2
AJ421444	<i>V. penaeicida</i>	DSM 14398T	AY426982	<i>V. ezurae</i>	HDV1 - 1
AJ440004	<i>V. coralliilyticus</i>	LMG 21349	AF513447	<i>V. alginolyticus</i>	LA6
AJ514915	<i>V. fortis</i>	LMG 21562	AF513463	<i>V. proteolyticus</i>	PH8
AJ514916	<i>V. fortis</i>	LMG 21557	AY035896	<i>V. campbellii</i>	L61
AY332566	<i>V. alginolyticus</i>	EcGS021001	AY373027	<i>V. alginolyticus</i>	—
X56575	<i>V. campbellii</i>	ATCC 25920	U46579	<i>V. scopthalmi</i>	CECT 4638
X56576	<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	AB000391	<i>V. haliotocoli</i>	IAM 14597
X56581	<i>V. natriegens</i>	ATCC 14048	X74725	<i>V. tubiashii</i>	ATCC19109T
X74690	<i>V. alginolyticus</i>	ATCC17749T	X76335	<i>V. fluvialis</i>	NCTC11327T
X74691	<i>V. alginolyticus</i>	CIP 70. 65	X76336	<i>V. furnissii</i>	ATCC35016T
X74714	<i>V. natriegens</i>	ATCC14048T	X74723	<i>V. proteolyticus</i>	ATCC15338T
X74716	<i>V. nereis</i>	ATCC25917T	X74722	<i>V. pelagius</i>	ATCC25916T
X74720	<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC17802T	X74706	<i>V. harveyi</i>	ATCC14126T
X74721	<i>V. parahaemolyticus</i>	CIP 73. 30			

2 结果与分析

2.1 流行病学特征 肠炎病患鱼病征主要表现为停止摄食或吃食后再吐出, 肠道中没有食物, 但有大量的黏性柱状白色物质。病情严重者, 腹部扁平、下陷, 整个内脏团萎缩, 肝脏大量出血, 体色逐渐变淡(图 1)。该病在苗期和养成期均较常见, 尤其多见于养成期, 亲鱼期很少见到。此病的危害性较大, 整池感染率可达 90% 以上, 病鱼表现为慢性死亡, 日死亡率均为 7% ~ 8%。



图 1 大菱鲷肠炎病的外观症状

Fig. 1 External appearance of *S. maximus* with enteritis disease

2.2 细菌的形态特征及运动性 从这 3 个病鱼样品中分别分离到 1 株优势细菌, 将其分别编号为菌株Ⅳ、菌株Ⅴ和菌株Ⅵ。这 3 株菌在盐度 3% 的 TSB 下培养基上 28 ℃ 培养 24 ~ 30 h 后, 其中菌株Ⅳ和菌株Ⅵ形成的单个菌落均很小、透明、接近无色, 菌株Ⅴ形成的单个菌落较大、呈弥散性分布。3 株细菌的革兰氏染色结果全部呈阴性, 短杆状。水浸片显微检查和半固体琼脂穿刺接种培养都未发现这 3 株菌有明显的

运动性。在 TCBS 琼脂平板培养基上, 菌株Ⅳ能生长但菌落不呈黄色, 菌株Ⅴ和菌株Ⅵ都呈明显黄色的菌落。

2.3 细菌的生长特性 这 3 株菌的温度生长范围存在一定的差异性, 菌株Ⅳ在 20 ~ 35 ℃ 范围内生长, 20 ℃ 下微弱生长, 高于 35 ℃ 几乎不生长。菌株Ⅴ在 10 ~ 40 ℃ 范围内都能生长, 并且没有太大的生长速度差异。菌株Ⅵ在 20 ~ 30 ℃ 范围内生长, 低于 20 ℃ 时仍能微弱生长, 10 ℃ 时完全不生长, 高于 30 ℃ 时几乎不生长。在盐度 3% ~ 5% 的范围内这 3 株细菌生长非常良好; 若此盐度范围, 这 3 株细菌表现出一定的生长差异性。在 pH 高于 7 的范围内, 这 3 株菌都能良好生长, 证明这 3 株细菌都是嗜碱性的。

2.4 生理生化特征 由表 2 可知, 这 3 株细菌在一些阳性项目上的差异是比较明显的。由于菌株Ⅳ在 TCBS 琼脂平板培养基上的菌落不显示黄色以及它对 O/129 抑制剂不敏感, 因此初步断定这株细菌不是弧菌属细菌。菌株Ⅴ和菌株Ⅵ在 TCBS 平板上的菌落都呈明显黄色的菌落, 对 O/129 特征性抑制剂敏感, 因此可将菌株Ⅴ和Ⅵ确定为弧菌属细菌。经查阅相关文献, 发现菌株Ⅴ在一些指标上与溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) 非常相似, 初步判断菌株Ⅴ为溶藻弧菌。由于菌株Ⅵ还未查到与其生理生化特征相同或相似的菌株, 暂时鉴定为弧菌属细菌。

2.5 16S rRNA 基因序列分析和系统发育树的构建 将这 3 株细菌 16S rRNA 基因序列分别输入 GenBank 数据库中进行相似性检索, 结果发现与菌株Ⅳ相似性最高的前 100 个序列中 50% 以上的序列是未鉴定的或非可人工培养的细菌。其中相似率最高的为一种 Unculturable *Mariana eubacterium* 细菌的 16S rRNA 序列, 相似率为 99. 79%。与菌株Ⅴ相似性最高的前 100 个序列中 91% 为弧菌属细菌, 与其最相近的 1

条 16S rRNA 序列是溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 的 16S rRNA 序列,相似率为 99.58%。与菌株Ⅵ相似性最高的前 100 个序列中 87% 为弧菌属细菌,与其相似率最高的是大菱鲈弧菌 (*V. scopthalmi*) 的 16S rRNA 序列,相似率为 99.64%。

从 GenBank 数据库中选取与菌株Ⅴ和菌株Ⅵ的 16S rRNA 序列相似性较高的 29 株细菌的 16S rRNA 序列进行系统发育学分析,并构建系统发育树。从图 2 可以看出,B5(菌株Ⅴ)与 *V. alginolyticus* 自然聚类成一个分支,B6(菌株Ⅵ)与

V. scopthalmi 自然聚类成一个分支。B4(菌株Ⅳ)则单独形成一个分支。

综合生理生化特征的试验结果和 16S rRNA 系统发育学分析的结果,可初步判断从患白便病的大菱鲈肠道中分离的 3 株优势细菌中 2 株分别为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 和大菱鲈弧菌 (*Vibrio scopthalmi*)。另 1 株优势菌由于没有相似率较高的已知种菌株可供比对,暂时还是一种未知细菌。

表 2 分离菌株的主要生化特征
Table 2 Physiological and chemical characteristics of the three strains

检验项目 Detection item	菌株Ⅳ StrainⅣ	菌株Ⅴ StrainⅤ	菌株Ⅵ StrainⅥ	检验项目 Detection item	菌株Ⅳ StrainⅣ	菌株Ⅴ StrainⅤ	菌株Ⅵ StrainⅥ
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	-	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+	-
蔗糖 Sucrose	-	+	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+	-
葡萄糖 Glucose	-	-	(+)	色氨酸脱氨酶 Tryptophan deaminase	-	-	-
葡萄糖产气 Glucose gas	-	-	-	氧化酶 Oxidase	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	西蒙氏枸橼酸 Simon's citric acid	+	+	+
D-甘露糖 D-mannose	-	-	-	柠檬酸利用 Citrate utilization	(+)	+	-
蜜二糖 D-Melibiose	-	-	-	吡哌产生 Indole production	-	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-	-	丙二酸盐 Malonate	-	-	-
棉子糖 Raffinose	-	-	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-	+
山梨醇 Sorbitol	-	-	-	靛基质 Indole	-	+	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	-	-	ONPG	-	-	-
肌醇 Inositol	-	-	-	V.P	-	+	(+)
甘露醇 Mannitol	-	-	-	M.R	-	(+)	(+)
水杨素 Salicin	-	-	-	H ₂ S 产生	-	-	-
苦杏仁甙 Amygdalin	-	-	-	O/129 (10 μg)	-	-	+
脲酶 Urease	-	-	-	O/129 (150 μg)	-	+	+

注:(+)表示弱阳性生长。
Note: + indicated weak positive growth.

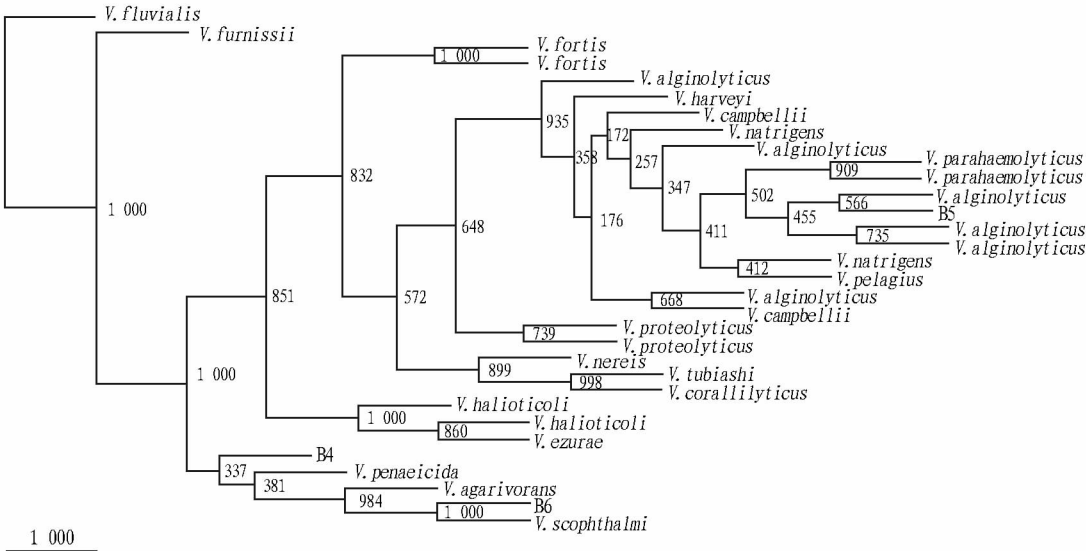


图 2 16S rRNA 基因序列的聚类分析结果
Fig. 2 Results of 16S ribosomal RNA cluster analysis

3 结论与讨论

肠炎病是养成期大菱鲈的常见疾病,流行范围较广,在黄渤海沿岸的大菱鲈养殖区发生较为普遍。肠炎病虽然是内脏器官的病变,但具有典型的外观发病特征,在生产过程

中比较容易发现和识别。针对来源不同的样品,笔者对肠炎病进行病原分离,发现其发病机理比较复杂。笔者从肠道白便中分离到大菱鲈弧菌、溶藻弧菌和 1 株目前还无法定种的非弧菌属细菌。从病原学的研究结果来看,与白便病发病相

关的细菌可能不止 1 种。

溶藻弧菌是我国近海水域养殖业的常见病原菌之一,可造成多种鱼、虾、贝类的死亡^[5-8]。目前在我国关于该菌对养殖大菱鲆的病害研究还属于空白,尽管已经从发病的大菱鲆体内检测到溶藻弧菌,并已证实在大菱鲆肠炎病发病状态下溶藻弧菌是优势菌群之一,但对于该种弧菌确切的入侵方式、准确的致病力以及是原发病原还是继发病原还需要更深入的研究。大菱鲆弧菌是弧菌属中命名种名时间不长的一种细菌。据报道,大菱鲆弧菌是大菱鲆幼苗期肠道中占优势数量的一种细菌,正常情况下并无致病性^[9-10]。大菱鲆弧菌在来自不同地理区域的大菱鲆样品肠道中都能被检测出来,在一些育苗场的水体中和活饵体内也曾被检测出来,但在一些池底沉积物中并不常见^[11]。在其他的海水养殖鱼类中还没有分离到大菱鲆弧菌的报道,国内的文献也没有关于大菱鲆弧菌致病性的研究报道。据此推断,大菱鲆弧菌可能是大菱鲆引进养殖过程中带入我国的一个新菌种,它是健康大菱鲆肠道中的正常优势菌群,但在大菱鲆患有一些消化道疾病和其他病原菌的入侵下是可能转变为致病菌的,属于继发性病原。然而,关于该菌一些病原学方面的具体特性还需要深入的研究。此外,在大菱鲆的肠道疾病中还分离到 1 株未知的非弧菌属细菌,通过对其生理生化特征和 16S rRNA 基因序列的研究,并未在已有文献资料中找到相似性很高的已鉴

定菌种,对这株细菌和相关病原学方面将开展更为深入的研究。

参考文献

- [1] 孙玉华,丁军. 大菱鲆工厂化养殖常见疾病防治技术[J]. 中国水产, 2015(12):84-85.
- [2] 丁春林,李文全,张健,等. 工厂化养殖大菱鲆肠炎病、腹水病防治技术探讨[J]. 河北渔业,2014(1):46-47.
- [3] 张正,王印庚,韩文君,等. 养殖大菱鲆烂鳍病原菌的鉴定及系统发育学研究[J]. 海洋科学进展,2004,22(2):193-197.
- [4] 李正义,贾俊涛,曹际娟,等. 一株分离自冻墨鱼的溶藻弧菌的鉴定及其低温下细胞脂肪酸的变化[J]. 水产科学,2014(5):317-320.
- [5] 赖迎迢,陶家发,孙承文,等. 鱼源溶藻弧菌生物学特性和病理组织学观察[J]. 微生物学报,2014,54(11):1378-1384.
- [6] 刘旭雅. 两株溶藻弧菌对对虾抗 WSSV 感染作用差异的分子作用机制的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2013.
- [7] 李建伟,刘帅,靳立兵,等. 三疣梭子蟹抗溶藻弧菌感染品系与野生蟹形态学、16S rRNA 和 COI 比较研究[J]. 海洋湖沼通报,2012(3):19-24.
- [8] CERDA - CUELLAR M,ROSSELLO - MORA R A,LALUCAT J, et al. *Vibrio scophthalmi* sp. , a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Int J Syst Bacteriol,1997,47(1):58-61.
- [9] 邢孟欣,李贵阳,侯战辉,等. 不同大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)个体肠道菌群结构差异研究[J]. 现代生物医学进展,2014,14(20):3801-3805.
- [10] 原媛,韩倩,郭华荣. 大菱鲆 3 种病原性红体病的流行性调查研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2013,43(11):49-56.
- [11] MONTES M,PEREZ M J,NIETO T P. Numerical taxonomy of gram - negative, facultative anaerobic bacteria isolated from skin of turbot *Scophthalmus maximus* and surrounding water [J]. Syst Appl Microbiol,1999,22(4):604-618.
- [12] BORMANN F H,LIKENS G E. Pattern and process in a forest ecosystem [M]. New York:Springer-Verlag,1979.
- [13] GOLLEY F B,MCGINNIS J T,CLEMENTS R G, et al. Mineral cycling in a tropical moist forest ecosystem [M]. Athens:University Georgia Press,1975.
- [14] TSUTSUMI T,KAWAHARA T,SHIDEI T. The circulation of nutrients in forest ecosystem. I. On the amount of nutrients contained in the above-ground parts of single tree and of stand[J]. Journal of Japanese forest society,1968,50(3):66-74.
- [15] 秦国伟,卫夏青,田明华,等. 新常态下安徽林业产业结构非均衡性分析[J]. 林业经济,2015,12(1):64-67.
- [16] 马恺,张秀芬,王卫东,等. 太子山国有林场功能定位及发展对策研究[J]. 林业经济问题,2014,34(6):548-552.
- [17] 李杰. 国有林场森林可持续经营面临的问题及政策建议:以福建五一、海南岛东两个国有林场为例 [J]. 林业经济,2013,6(1):18-20.
- [18] 文华英,黄义雄,张巧,等. 海坛岛沿海防护林森林生态系统间接经济价值评估[J]. 防护林科技,2014(11):11-14.
- [19] 龚传洋. 林业生态效益和社会效益估算 [D]. 福州:福州大学,2005.
- [20] 徐荫,陈文汇,刘俊昌,等. 林业绿色经济发展评价指标体系研究[J]. 林业经济,2015,5(1):24-28.
- [21] 郝园. 林业生态效益与经济效益关系探究[J]. 现代园艺,2012,24(1):197.
- [22] 张颖慧. 森林植被与土壤微生物研究进展 [J]. 安徽农业科学,2014(30):10683-10684,10758.
- [23] 胡雷,王长庭,王根绪,等. 青海省森林生态系统植被固碳现状研究[J]. 西南农业学报,2015(2):826-832.

(上接第 63 页)

在森林资源可持续发展方面的重要作用,提高林场管理人员对生态效益价值量的重视,尽可能地整合政府、企业和高校等各方面的力量及资金支持,也为国有林场对其森林资源系统的管理、保护方面提供理论依据和研究基础。

参考文献

- [1] 周丽丽. 不同发育阶段杉木人工林养分内循环与周转利用效率的研究 [D]. 福州:福建农林大学,2014.
- [2] EVANS J. Plantation silviculture/sustainability of forest plantations [M]. Encyclopedia of forest sciences, 2004:865-872.
- [3] ZHAO D, KANE M, BORDERS B E, et al. Site preparation and competing vegetation control affect loblolly pine long-term productivity in the southern Piedmont/Upper Coastal Plain of the United States [J]. Annals of forest science,2009,66(7):705.
- [4] O'HEHIR J F, NAMBIAR E K S. Productivity of three successive rotations of *P. radiata* plantations in South Australia over a century [J]. Forest ecology and management,2010,259(10):1869-1875.
- [5] 林开敏,俞新妥,黄宝龙,等. 杉木人工林林下植物物种多样性的动态特征[J]. 应用与环境生物学报,2001,7(1):13-19.
- [6] 杜国坚,钱玉红,洪利兴,等. 杉木连栽回心土造林技术研究[J]. 福建林学院学报,1997,17(2):120-125.
- [7] COLE D W,GESSEL S P,DICE S F. Distribution and cycling of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium in a second-growth douglas fir ecosystem [M]. Orono:Univeristy of Maine Press,1967:197-232.