

恩诺沙星对土壤微生物群落功能多样性的影响

马 驿^{1,2}, 陈杖榴^{1,*}, 曾振灵¹

(1. 华南农业大学 广东省兽药研制与安全评价重点实验室 广州 510642 2. 广东海洋大学动物医学系 湛江 524088)

摘要 :为了评价恩诺沙星 (enrofloxacin) 对土壤微生物群落的影响 ,借助 BIOLOG 检测法比较了不同浓度恩诺沙星影响下的土壤微生物的群落特征。结果表明 ,各添加药物组与空白对照组的土壤微生物群落代谢多样性差异显著 ($P < 0.05$) ,空白对照组土壤微生物在 BIOLOG 微平板上的平均每孔颜色变化率 (AWCD)和微生物代谢多样性指数 (丰富度和多样性)显著高于添加药物组 ;药物显著影响微生物群落对 BIOLOG 微平板中碳源的利用能力 ,较低浓度的恩诺沙星 ($0.01 \mu\text{g/g}$)就显著影响了土壤微生物群落对 α -Ketobutyric Acid、L-Phenylalanine、1-Erythritol、D-Xylose 等碳源的利用代谢能力 ($P < 0.05$) ,且土壤微生物群落利用各类碳源的能力随药物浓度加大而降低。由此可见 ,恩诺沙星在土壤中残留时对土壤微生物的影响不容忽视。

关键词 :恩诺沙星 ;土壤微生物群落 ;功能多样性 ;BIOLOG 检测法

文章编号 :1000-0933 (2007)08-3400-07 中图分类号 :Q142 Q93 文献标识码 :A

Effects of enrofloxacin on functional diversity of soil microbial communities

MA Yi^{1,2} , CHEN Zhang-Liu^{1,*} , ZENG Zhen-Ling¹

1 Guangdong Key Laboratory for Veterinary Pharmaceuticals Development and Safety Evaluation , South China Agricultural University , Guangzhou 510642 , China

2 Department of Veterinary Medicine , Guangdong Ocean University , Zhanjiang 524088 , China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (8) 3400 ~ 3406.

Abstract : Functional diversity of soil microbial communities was examined by microbial metabolic diversity (BIOLOG) assays to evaluate the effects of enrofloxacin with different concentrations on soil microbial communities. The results showed that soil microbial metabolic diversity in CK was significantly higher than that in the soils in which the enrofloxacin was added. In BIOLOG assays , the average well colour development (AWCD) and the richness and diversity indices indicated the differences of microbial metabolic diversity. It also indicated that the enrofloxacin significantly affected the sole-carbon-source metabolic ability of soil microbial communities , While low concentration of enrofloxacin ($0.01 \mu\text{g/g}$) significantly affected the metabolic ability of sole-carbon-source , such as α -Ketobutyric Acid , L-Phenylalanine , 1-Erythritol , D-Xylose and so on. The effects of enrofloxacin on functional diversity of soil microbial communities were enhanced with the increasing enrofloxacin concentration. Therefore , the potential effects of enrofloxacin on the soil microbial communities warrant further studies.

Key Words : enrofloxacin ; soil microbial community ; functional diversity ; BIOLOG

基金项目 国家自然科学基金重点资助项目 (30130140)

收稿日期 2007-01-25 ; 修订日期 2007-06-16

作者简介 : 马驿 (1976 ~) 男 , 湖南岳阳人 , 博士生 , 主要从事兽药生态毒理学研究. E-mail : mayi761@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail : chenzt@scau.edu.cn

致谢 : 本研究在中国科学院生态环境研究中心城市与区域生态国家重点实验室完成 , 谨致谢忱。

Foundation item : The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30130140)

Received date 2007-01-25 ; **Accepted date** 2007-06-16

Biography MA Yi , Ph. D. candidate , mainly engaged in ecotoxicity of veterinary drugs. E-mail : mayi761@163.com

恩诺沙星 (Enrofloxacin) 作为动物专用抗菌药 ,已广泛用于动物感染性疾病的治疗^[1~3]。动物摄入后 ,不仅会在畜禽产品中残留 ,并且药物将以原形化合物和代谢产物的方式经粪、尿等排泄物进入生态环境 ,污染环境土壤、表层水体等 ,并通过食物链影响植物、动物和微生物的正常生命活动 ,最终将影响人类的健康^[4,5] ,恩诺沙星对植物和土壤微生物等的影响已有报道^[6,7]。土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分 ,在有机质分解、养分循环和植物养分利用过程中发挥着关键的作用^[8,9] ,近年来 ,运用不同方法对土壤微生物多样性进行的研究已越来越多^[10~16]。土壤微生物多样性主要包括物种多样性、基因多样性和功能多样性 ,以 BIOLOG 微孔板碳源利用为基础的定量分析为描述微生物群落功能多样性提供了一种更为简单、更为快速的方法^[17~19] ,土壤微生物对 BIOLOG 微平板中各类碳源的利用情况的差异反应了土壤中微生物群落代谢功能的不同 ,此方法已广泛应用于评价土壤微生物群落的功能多样性^[13~16]。本文通过研究恩诺沙星对土壤微生物群落功能多样性的影响 ,评价其带来的后遗作用 ,为兽药的安全使用、环境监测与保护提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

- (1)土壤 采自北京某建筑工地 50 ~ 100cm 土层的均质土壤 ,色深 ,质细。
- (2)药物 恩诺沙星 (98.5%) ,浙江国邦兽药有限公司 ,批号 050821-2。
- (3)仪器 Microstation system ,美国 BIOLOG 公司 ;BIOLOG EcoPlate 微平板 ,美国 BIOLOG 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 土壤处理

新鲜土样过 4mm 筛后于室温下放置 3 d ,待微生物活化后 ,按每 3 kg 鲜土 50 ml 恩诺沙星溶液的比例混匀 ,加入不同浓度的恩诺沙星溶液后使土壤中药物含量分别为 I 组 0 μg/g、II 组 0.01 μg/g、III 组 0.1 μg/g、IV 组 1 μg/g、V 组 10 μg/g、VI 组 100 μg/g ,倒入 5 L 的塑料桶中 (3kg 鲜土/桶) ,每处理设 3 次重复。将土壤含水量调至饱和持水量的 40% ,并用湿布盖于土表 ,置于室温 (20 ~ 25℃)下培养。

1.2.2 土壤微生物群落功能多样性的测定

土壤微生物群落功能多样性应用 BIOLOG 方法^[20] ,取加药后 3d 的土壤 10 g ,加 90 ml 灭菌生理盐水 (0.85%)在摇床上振荡 30 min ,然后将土壤样品稀释至 10⁻³ 倍 ,再从中取 150 μl 该悬浮液接种到 BIOLOG 微平板中的每一个孔中 ,最后将接种好的板置于 25℃ 的恒温培养箱中培养 ,每隔 24h 在波长为 590 nm 的 BIOLOG 读数器上读数。

平均每孔颜色变化率 (AWCD) 计算方法如下^[21] : $AWCD = \sum (C - R) / n$,式中 C 为每个有培养基孔的光密度值 , R 为对照孔的光密度值 , n 为培养基数据 ,EcoPlate 板 n 值为 31。丰富度指数指被利用的碳源的总数目 ,为每 31 孔中 $C - R$ 的值大于 0.25 的孔数^[22] ,多样性指数采用 Shannon-Wiener 指数 (H') : $H' = - \sum (P_i \times \ln P_i)$, P_i 为有培养基的孔与对照孔的光密度值差与整板总差的比值 ,即 $P_i = (C - R) / \sum (C - R)$ 。

本试验采用 BIOLOG 微平板培养 72h 的数据 ,来比较土壤微生物群落功能多样性 ,统计分析采用 SPSS10.0 在计算机上进行。

2 结果与分析

2.1 平均每孔颜色变化率 (AWCD)

土壤微生物在 BIOLOG 微平板上的 AWCD 是反映土壤微生物活性 ,即利用碳源能力的一个重要指标^[23]。由图 1 可见 ,微生物活性随培养时间延长而提高 ,各组土壤微生物利用碳源能力顺序为 :I 组 > II 组 > III 组 > IV 组 > V 组 > VI 组。微生物在 BIOLOG 微平板上培养至 72h 各添加药物组 AWCD 比对照组降低的百分率分别为 :II 组 5.58%、III 组 16.10%、IV 组 18.26%、V 组 28.97%、VI 组 61.82%。说明恩诺沙星影响土壤微生物碳源利用能力 ,且随土壤中药物浓度的增加而影响加大。

2.2 土壤微生物群落代谢功能主成分分析

31 种碳源的测定结果形成了描述微生物群落代谢特征的多元向量 ,不易直观比较 ,因此应用主成分分析

来分析土壤微生物对 BIOLOG 微平板上 31 种碳源的利用情况。采用土壤微生物在 BIOLOG 微平板上培养至 72h 的读数进行分析 ,可以提供药物影响土壤微生物群落的部分信息。土壤微生物利用碳源类型的主成分分析 (图 2)中 2 个主成分因子的特征值之和达到总方差的 59. 08% ,其中主成分 1 的特征值达到总方差的 49. 60% 。主成分得分系数的方差分析表明 :主成分 1 (PC1)得分系数差异显著 ($F_{5,12}=92.647, P<0.001$) ,表明 6 个组的微生物群落代谢多样性差异显著 ,这种差异主要表现在 除了 0.1 $\mu\text{g/g}$ 和 1 $\mu\text{g/g}$ 两组之间差异不显著外 ,其它各组相互之间的差异均达到显著水平 ;主成分 2 (PC2)得分系数差异不显著 ($F_{5,12}=2.891, P>0.05$) ,因此在主成分 2 上各组之间差异性未达到显著水平。主成分 1 与各种碳源的相关系数列于表 1 ,与主成分 1 相关性达显著水平 ($P<0.05$) 的碳源有 25 种 ,说明有 25 种碳使 6 个组的土壤微生物群落代谢多样性在主成分 1 上差异显著。

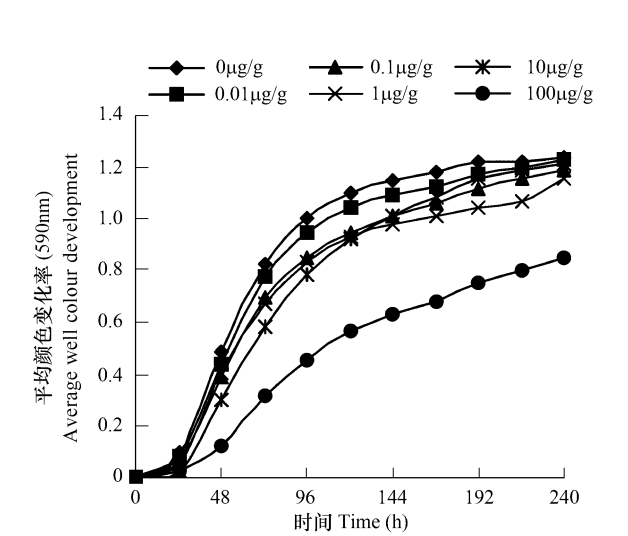


图 1 不同土壤平均颜色变化率

Fig. 1 Average well colour development (AWCD) in soil from different treatments

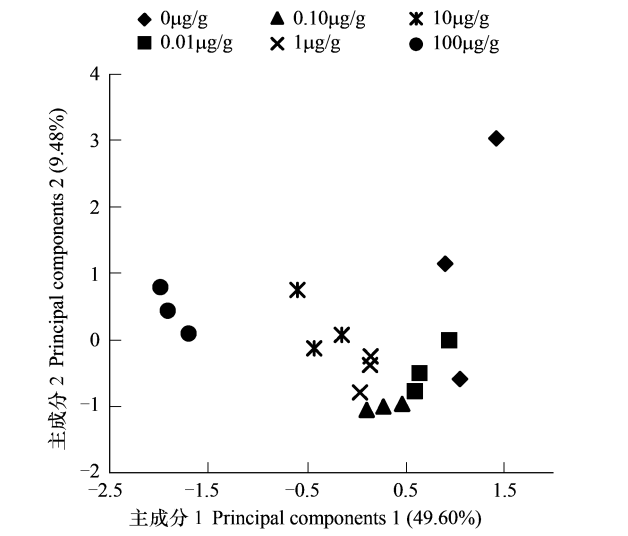


图 2 不同土壤微生物群落主成分分析

Fig. 2 Principal components analysis on soil microbial communities from different treatments

2.3 土壤微生物群落对各种碳源的代谢强度

土壤微生物群落代谢功能主成分分析反映了群落总体的变化 ,但未能反映微生物群落代谢的详细信息 [24]。研究土壤微生物对不同碳源利用能力的差异 ,有助于更全面了解微生物群落代谢功能特征。Biolog 实验结果 (AWCD 值)显示出添加不同浓度恩诺沙星的土壤微生物群落对不同碳源的代谢强度的差异性 (图 3) ,空白对照组土壤的微生物群落对大多数碳源的代谢能力显著高于添加药物组土壤微生物群落。加药组土壤微生物碳源利用代谢功能与空白对照组相比 ,差异显著 ($P<0.05$) 的碳源分别为 :Ⅱ组 4 种 ;Ⅲ组 10 种 ;Ⅳ组 6 种 ;Ⅴ组 16 种 ;Ⅵ组 27 种。说明恩诺沙星影响土壤微生物对部分碳源利用代谢功能 ,药物含量从 0. 01 $\mu\text{g/g}$ 至 100 $\mu\text{g/g}$ 都显著影响土壤微生物对 α -Ketobutyric Acid、L-Phenylalanine、1-Erythritol、D-Xylose 的代谢功能 随药物浓度的增加而受影响的碳源种类增多 ,微生物对碳源利用能力降低 ;恩诺沙星含量为 100 $\mu\text{g/g}$ 时 ,土壤微生物对 β -Methyl-D-Glucoside、L-Asparagine、Tween80、D-Mannitol、L-Serine、L-Threonine、Glycogen、D-Cellobiose、Glucose-1-Phosphate、D-Malic Acid 等物质的代谢能力极显著低于空白对照组的土壤微生物 ($P<0.001$)。

2.4 土壤微生物群落代谢多样性

培养基丰富度指数和多样性指数表明的是土壤微生物群落利用碳源类型的多与少 ,即功能多样性。土壤微生物群落代谢功能丰富度指数和多样性指数与药物浓度的变化见表 2 ,空白对照组的丰富度指数和多样性指数均为最大 ,添加恩诺沙星组的丰富度指数和多样性指数均随药物浓度增大而变小。空白对照组的丰富度

表 1 微生物利用碳源与 PC1 的相关性分析

Table 1 Correlation analysis of different carbon with PC1					
碳源名称 Carbon		<i>r</i>	碳源名称 Carbon		<i>r</i>
1	β-甲基-D-糖化物 (β-Methyl-D-Glucoside)	0.919 **	17	N-乙酰基 D-葡萄糖胺 (N-Acetyl-D-Glucosamine)	0.771 **
2	D-乳酸酸-γ-内脂 (D-galactonic Acid-γ-Lactone)	0.804 **	18	γ-羧基丁酸 (γ-Hydroxybutyric Acid)	0.648 **
3	L-精氨酸 (L-Arginine)	0.782 **	19	L-苏氨酸 (L-Threonine)	0.754 **
4	甲基丙酮酸 (Pyruvic Acid Methyl Ester)	-0.184	20	肝糖 (Glycogen)	0.862 **
5	D-木糖醇 (D-Xylose)	0.437	21	D-葡萄糖胺酸 (D-Glucosaminic Acid)	0.811 **
6	D-乳酸酸 (D-Galacturonic Acid)	-0.199	22	甲叉丁二酸 (Itaconic Acid)	0.721 **
7	L-天冬酰胺酸 (L-Asparagine)	0.826 **	23	氨基乙酰 L-谷氨酸 (Glycyl-L-Glutamic Acid)	-0.158
8	吐温 40 (Tween 40)	0.705 **	24	D-纤维糖 (D-Cellobisoe)	0.917 **
9	1-赤藻糖醇 (1-Erythritol)	0.556 *	25	葡萄糖-1-磷酸盐 (Glucose-1-Phosphate)	0.880 **
10	2-羧基安息香酸 (2-Hydroxy Benzoic Acid)	0.480 *	26	α-酮络酸 (α-Ketobutyric Acid)	0.464
11	L-苯基丙氨酸 (L-Phenylalanine)	0.398	27	苯乙胺 (Phenylethyl-Amine)	0.706 **
12	吐温 80 (Tween80)	0.850 **	28	α-D-内脂 (α-D-Lactose)	0.577 *
13	D-甘露醇 (D-Mannitol)	0.901 **	29	D L-α-甘油磷酸盐 (D L-α-Glycerol Phosphate)	0.513 *
14	4-羟基安息香酸 (4-Hydroxy Benzoic Acid)	0.679 **	30	D-苹果酸 (D-Malic Acid)	0.875 **
15	L-丝氨酸 (L-Serine)	0.893 **	31	腐胺 (Putrescine)	0.853 **
16	α-环式糊精 (α-Cyclodextrin)	0.627 **			

r 为相关系数 ; * 示相关性达显著水平 (*P* < 0.05) ; * * 示相关性达极显著水平 (*P* < 0.01) *r* is correlation coefficients ; * *P* < 0.05 , * * *P* < 0.01 ;下同 the same below

指数和其它各组比较差异显著 ;Ⅱ、Ⅲ组的丰富度指数与Ⅳ组差异不显著 ,与Ⅴ、Ⅵ组差异显著 ;Ⅳ组与Ⅴ组差异不显著 ,与Ⅵ组差异显著 ;Ⅵ组的丰富度指数和其它各组比较差异显著。空白对照组的多样性指数除了与Ⅱ组差异不显著外 ,与其它各组差异显著 ;Ⅱ组与Ⅲ、Ⅳ组差异不显著 ,与Ⅴ、Ⅵ组差异显著 ;Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组差异不显著 ;Ⅵ组的多样性指数和其它各组比较差异显著。说明土壤中药物含量相对较低也能降低土壤微生物的丰富度 (0.01 μg/g)和多样性 (0.1 μg/g) ,但药物含量较低 (0.01 ~ 1 μg/g)时影响基本一致 (相互之间差异不显著) ,药物含量为 1 μg/g、10 μg/g 时影响加大 (与低浓度组的差异显著) ,药物含量最高组 (100 μg/g)土壤微生物的丰富度和多样性最小 ,与其它各组差异显著。

3 讨论

恩诺沙星是的一种广谱高效的抗微生物药物 ,其作用机理是选择性地抑制细菌的 DNA 回旋酶 (DNA 拓扑异构酶Ⅱ) ,使 DNA 无法复制 ,对部分真菌和放线菌也有抑制作用。该药物经动物排泄物进入土壤环境后 ,对土壤微生物具有广泛的效应 ,对土壤微生物种群的数量和功能都会造成一定的影响^[7]。

表 2 被利用培养基丰富度和多样性指数

Table 2 Richness and diversity of utilized substrates for each treatment

组别 Group	药物含量 (μg/g)	丰富度指数 Richness	多样性指数 Diversity
I	0	27.00 ± 1.00 a	3.22 ± 0.05 a
II	0.01	23.67 ± 0.58 b	3.18 ± 0.02 ab
III	0.1	23.67 ± 0.58 b	3.14 ± 0.04 bc
IV	1	22.33 ± 0.58 bc	3.13 ± 0.03 bc
V	10	21.33 ± 1.53 c	3.07 ± 0.05 c
VI	100	14.00 ± 1.00 d	2.77 ± 0.03 d

同列数据无相同字母者 ,表示差异显著 (*P* < 0.05) the data in one column without the same letter means have significant difference (*P* < 0.05)

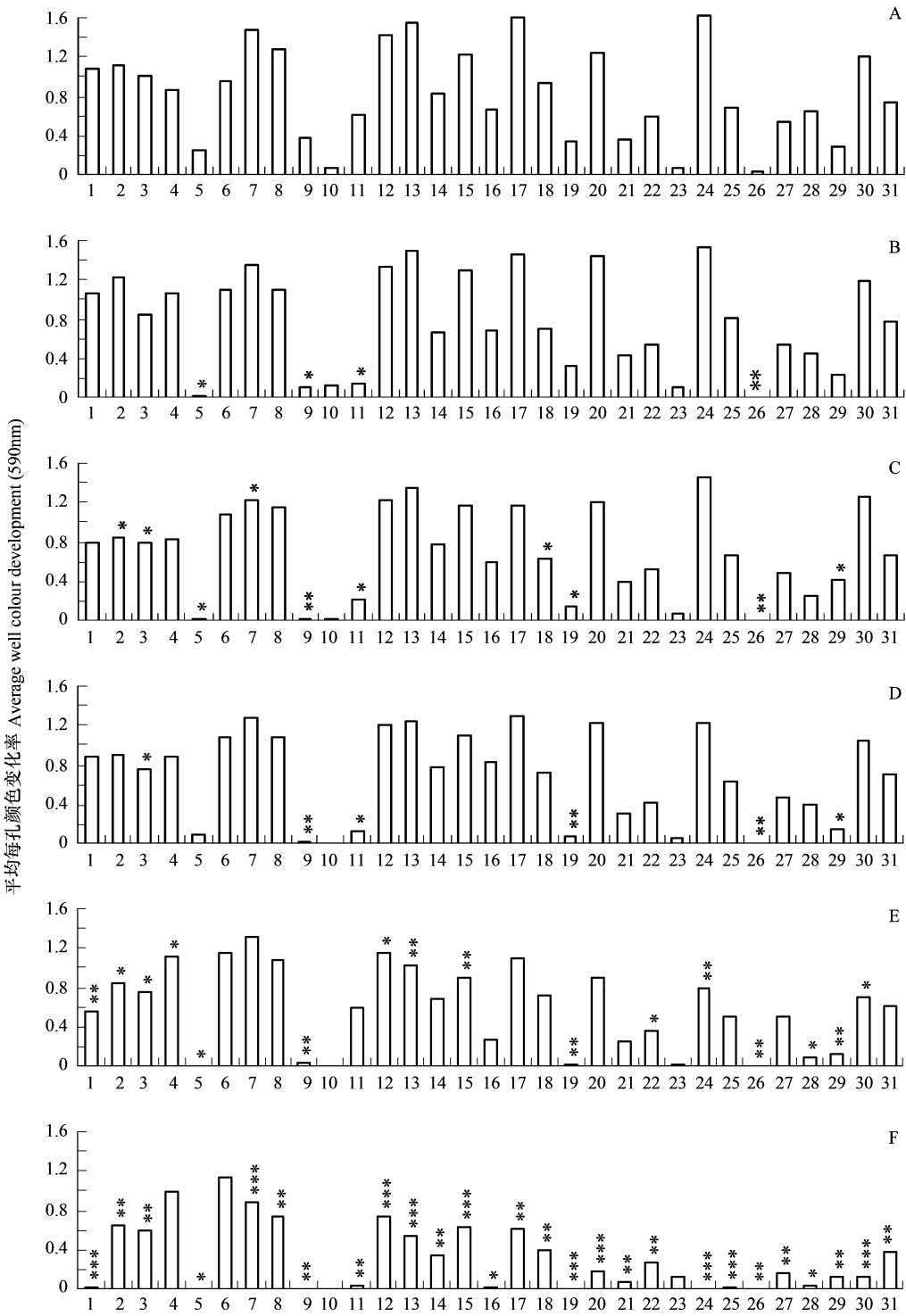


图3 用药后第3天土壤微生物群落对31种碳源的代谢强度

Fig. 3 Metabolic ability of soil microbial communities to 31 sole-carbon-source after treatment for 3 days

A :0μg/g ;B :0.01μg/g ;C :0.1μg/g ;D :1μg/g ;E :10μg/g ;F :100μg/g , * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$;31种碳底物名称见表1 31 kinds of carbon sources were listed in Table 1

本研究结果表明恩诺沙星影响土壤微生物群落代谢功能多样性,且随着药物含量的增高而影响加大。首先,BIOLOG微平板平均每孔颜色变化率(AWCD)的结果显示,添加药物组的AWCD均低于对照组,且I组>II组>III组>IV组>V组>VI组,AWCD是反映土壤微生物利用碳源能力的一个重要指标,说明在恩诺沙星

的作用下 ,土壤微生物利用碳源的能力降低 ,且药物浓度愈大土壤微生物利用碳源的能力愈低 ;其次 ,碳源利用类型的主成分分析结果表明 ,当恩诺沙星含量大于或等于 0.01 μg/g 时 ,土壤微生物群落代谢多样性与空白对照组差异性显著 ,低浓度药物组与高浓度药物组差异显著 ,说明药物含量越高对土壤微生物群落碳源利用类型多样性的影响越大 ;第三 ,恩诺沙星影响土壤微生物对单一碳源的代谢功能 ,且药物含量的高低与受影响的碳源种类的多少呈正比 ;第四 ,培养基丰富度指数和多样性指数结果表明 ,药物浓度大于或等于 0.1 μg/g 显著降低土壤微生物的丰富度和多样性 ,药物浓度越高 ,土壤微生物的丰富度和多样性就越低。

土壤微生物在土壤生态系统的物质转化和能量流动中起重要作用 ,土壤微生物既是土壤养分循环过程的动力和进入土壤有机质的“转化者” ,又是土壤能量和养分 (特别是 C、N、P、S 等元素)内循环的“源”和“库”^[25] ,可见土壤微生物活性和功能是土壤肥力的一个重要指标。恩诺沙星残留于土壤后 ,使土壤微生物利用碳源的能力及功能多样性降低 ,则会降低土壤肥力 ,将对农业生产产生不利影响。

References :

[1] Anita K R , Anne V G , Mireille G , *et al.* Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance. *Veterinary Microbiology* , 2005 , (106) : 129 — 137.

[2] Elie K B , Shady H , Rabih T , *et al.* Evaluation of an enrofloxacin treatment program against *Mycoplasma gallisepticum* infection in broilers. *Preventive Veterinary Medicine* , 1998 , (35) : 91 — 99.

[3] Bolourchi M , Hovareshti P , Tabatabayi A H. Comparison of the effects of local and systemic dry cow therapy for staphylococcal mastitis control. *Preventive Veterinary Medicine* , 1995 , (25) : 63 — 67.

[4] Chen Z L , Yang G X , Sun Y X , *et al.* Advance of Toxicities and Ecotoxicology of Veterinary Drug Residues. *Journal of South China Agricultural University* , 2001 , 22 (1) : 88 — 91.

[5] Vaccaro E , Giorgi M , Longo V , *et al.* Inhibition of cytochrome P₄₅₀ enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology* , 2003 , (62) : 27 — 33.

[6] Migliore L , Cozzolino S , Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* , 2003 , (52) : 1233 — 1244.

[7] Wang J L , Liu J Z , Chen Z L , *et al.* Effects of enrofloxacin residue on number and community function diversity of soil microbes. *Chin J Appl Environ Biol* , 2005 , 11 (1) : 86 — 89.

[8] Kirk J L , Beaudette L A , Hart M , *et al.* Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* , 2004 , 58 : 169 — 188.

[9] Steenwerth K L , Jackson L E , Caldero'n F J , *et al.* Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. *Soil Biology and Biochem* , 2002 , 34 : 1599 — 1611.

[10] Chen S H , Sun T H , Zhou Q X , *et al.* Interaction between micro-organisms and heavy metals and its application. *Chinese Journal of Applied Ecology* , 2002 , 13 (2) : 239 — 242.

[11] Chen X Q , Yin H W. Progress on analytical methods used in microbial community diversity. *Shanghai Environment Sciences* , 2003 , 22 (3) : 213 — 217.

[12] Kong W D , Liu K X , Liao Z W , *et al.* Effects of organic matters on metabolic functional diversity of soil microbial community under pot incubation conditions. *Acta Ecologica Sinica* , 2005 , 25 (9) : 2291 — 2296.

[13] Bossio D D , Scow K M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Appl Environ Microb* , 1995 , 61 : 4043 — 4050.

[14] Gmyston S J , Wang S , Campbell C D , *et al.* Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* , 1998 , 30 : 369 — 378.

[15] Zheng H , Ouyang Z Y , Wang X K , *et al.* Effects of forest restoration patterns on soil microbial communities. *Chinese Journal of Applied Ecology* , 2004 , 15 (11) : 2019 — 2024.

[16] Zheng H , Ouyang Z Y , Fang Z G , *et al.* Application of BIOLOG to study on soil microbial community functional diversity. *Acta Pedologica Sinica* , 2004 , 41 (3) : 456 — 461.

[17] Preston-Matham J , Boddy L , Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles-a critique. *FEMS Microb EcoI* , 2002 , 42 : 1 — 14.

[18] Garland J L. Analytical approaches to the characterisation of sample microbial communities using patterns of potential C source utilisation. *Soil Bilogy & Biochemistry* , 1996 , 28 : 213 — 221.

[19] Zheng H , Ouyang Z Y , Zhao T Q , *et al.* Effect of different forest restoration approaches on soil biological properties. *Chin J Appl Environ Biol* ,

2006 , 12 (1) : 36 — 43.

[20] Schutter M , Dick R. Shift in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biology & Biochemistry* , 2001 , 33 : 1481 — 1491.

[21] Garland J L , Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source-utilization. *Appl Environ Microb* , 1991 , 57 : 2351 — 2359.

[22] Rogers B F , Tate III R L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. *Soil Biology & Biochemistry* , 2001 , 33 : 1389 — 1401.

[23] Zabinski C A , Gannon J E. Effects of recreational impacts on soil microbial communities. *Environmental Management* , 1997 , 21 (2) : 133 — 238.

[24] Kennedy A C. Smith K L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* , 1995 , 170 : 75 — 86.

[25] Fan J , Hao M D. Effects of long-term rotation and fertilization on soil microbial biomass carbon and nitrogen. *Res Soil Water Cons* , 2003 , 10 (10) : 85 — 87.

参考文献：

[4] 陈杖榴 杨桂香 孙永学 ,等. 兽药残留的毒性与生态毒理研究进展. *华南农业大学学报* , 2001 , 22 (1) : 88 ~ 91.

[7] 王加龙 刘坚真 陈杖榴 ,等. 恩诺沙星对土壤微生物数量及群落功能多样性的影响. *应用与环境生物学报* , 2005 , 11 (1) : 86 ~ 89.

[10] 陈素华 孙铁珩 周启星 ,等. 微生物与重金属间的相互作用及其应用研究. *应用生态学报* , 2002 , 13 (2) : 239 ~ 242.

[11] 陈晓倩 殷浩文. 微生物群落多样性分析方法的进展. *上海环境科学* , 2003 , 22 (3) : 213 ~ 217.

[12] 孔维栋 刘可星 廖宗文 ,等. 不同腐熟程度有机物料对土壤微生物群落功能多样性的影响. *生态学报* , 2005 , 25 (9) : 2291 ~ 2296.

[15] 郑华 欧阳志云 方治国 ,等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. *土壤学报* , 2004 , 41 (3) : 456 ~ 461.

[18] 郑华 欧阳志云 王效科 ,等. 不同森林恢复类型对土壤微生物群落的影响. *应用生态学报* , 2004 , 15 (11) : 2019 ~ 2024.

[19] 郑华 欧阳志云 赵同谦 ,等. 不同森林恢复类型对土壤生物学特性的影响. *应用与环境生物学报* , 2006 , 12 (1) : 36 ~ 43.