Biolog 和 PCR-DGGE 技术解析施肥对德惠黑土细菌群落结构和功能的影响

王光华,刘俊杰,齐晓宁,金 剑,王 洋, 刘晓冰
(中国科学院东北地理与农业生态研究所 黑土生态重点实验室,哈尔滨 150081)

摘要:试验采用 Biolog 和 PCR-DGGE 技术研究了不同施肥处理对吉林省德惠市黑土细菌群落结构和功能的影响。Biolog 试验结果表明,单施有机肥处理的土壤细菌群落对底物碳源利用种类最多,代谢功能多样性最高;而施用化肥处理降低了土壤细菌群落代谢功能。DGGE 图谱表明,不同施肥处理的土壤细菌 16S rDNA 多数条带分布相同,说明这些细菌类群在黑土中较稳定,在本试验中未受到施肥的影响,但也有一些特殊条带出现或缺失,施用化肥处理降低了土壤细菌群落结构组成多样性。对 Biolog 和 DGGE 试验结果的主成分分析显示,未施肥和单施有机肥处理的土壤细菌群落结构和功能相似,表明单施有机肥处理主要是增加了土壤微生物的总量,而对黑土细菌群落结构组成影响是次要的;单施化肥和半量有机肥 + 化肥处理的土壤细菌群落代谢功能多样性相似,但其结构组成产生了分离。研究表明化肥处理主要是影响到土壤中快速生长和富营养的细菌类群,施用化肥降低了这些细菌类群的代谢活性。

关键词:有机肥;化肥;黑土;微生物群落;多样性
文章编号:1000-0933(2008)01-0220-07 **中图分类号**:Q142,Q145,Q938,S154.1 **文献标识码**:A

Effects of fertilization on bacterial community structure and function in a black soil of Dehui region estimated by Biolog and PCR-DGGE methods

WANG Guang-Hua, LIU Jun-Jie, QI Xiao-Ning, JIN Jian, WANG Yang, LIU Xiao-Bing
Laboratory of Black Soil Ecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, *China*
***Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(1): 0220 ~ 0226.**

Abstract: Black soils (Mollisols) in China are primarily distributed in the northeast region, which is one of the three largest Mollisol areas in the world. Although original black soils are commonly thought to be fertile and productive, some of the cultivated black soils have been degraded after more than 100 years of cultivation. Many researchers have reported the influences of organic and inorganic fertilizers application on crop yield, and changes in soil physical and chemical characteristics in the black soils, but less attention has been paid on soil microbial communities. In this paper, we used Biolog and PCR-DGGE methods to examine the influences of the fertilization on structure and function of bacterial community in a black soil of Dehui region, Jilin Province.

Biolog examination showed that substrate richness and catabolic diversities of soil bacterial community were the highest in the treatment of farm yard manure. However, the opposite was observed in the treatment of chemical fertilizers; the metabolic ability of bacterial community was decreased after using chemical fertilizers. DGGE fingerprint showed that the distribution patterns of most bands of 16S rDNA were similar among all treatments, indicated that microbe with those bands

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40541004,40671099)
收稿日期:2006-10-27; **修订日期**:2007-01-19
作者简介:王光华(1966 ~),男,黑龙江海林人,博士,研究员,主要从事土壤微生物生态和生物防治研究. E-mail:wanggh@neigaehrb.ac.cn
Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 40541004, 40671099)
Received date: 2006-10-27; **Accepted date**: 2007-01-19
Biography: WANG Guang-Hua, Ph. D., Professor, mainly engaged in soil microbial ecology and biocontrol. E-mail: wanggh@neigaehrb.ac.cn

were stable, not influenced by fertilization treatment. In general, chemical fertilizer decreased the diversity of soil bacterial community. The PCA plots of Biolog and DGGE revealed that the structure and function of bacterial community were similar in the non-fertilized control and the treatment of farm yard manure alone, which inferred that the application farm yard manure had increased the quantity of soil microbes but had less effect on the bacterial community structure. The catabolic function was similar but composition structure differed between the treatments of chemical fertilizer alone and comined application of farm yard manure and chemical fertilizer. These results suggest the use of chemical fertilizer mainly declined the catabolic activity of the fast growth bacteria or eutrophic bacteria.

Key Words: farm yard manure; chemical fertilizer; black soil; microbial community; diversity

东北黑土是世界三大片黑土之一,主要分布在我国黑龙江和吉林两省。东北黑土自然肥力较高,土壤的理化性质好,垦殖指数在80%以上,是我国重要的商品粮基地,对我国的粮食安全起到举足轻重的作用。但是,由于长期的过度垦殖和不良的经营管理方式,黑土农田质量退化问题日益严重[1,2]。为了维持黑土农田的生产力,向土壤中施用有机肥和化肥已是一项常规的农业生产措施。不同的施肥方式及用量对黑土区作物产量、土壤养分、土壤微生物量和土壤酶活性等方面已有很多报道[3~5],但有关土壤微生物群落结构及功能方面研究还鲜有报道。

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,它们参与土壤有机质分解、腐殖质形成、土壤养分转化和循环等过程。土壤微生物群落结构组成及活性变化是衡量土壤质量、维持土壤肥力和作物生产力的一个重要指标[6]。所以对土壤微生物群落结构和功能的研究一直以来是土壤生态学研究的一个热点。由于土壤微生物群落结构组成复杂,数量巨大,对其研究的难度较大。传统的研究方法主要是纯培养技术,但现有研究结果表明,培养法只能分离到1% ~10%的微生物[7,8],因此用该方法获得的土壤微生物信息是有限的,不能够全面、真实地反映自然状况下土壤微生物群落结构变化。近年来基于生物化学(PLFA)、生理学(Biolog)、特别是分子生物学技术(PCR-RFLP、PCR-DGGE、T-RLFP、RISA)的发展,弥补了传统培养方法的不足,可以比较全面了解在各种条件下微生物群落结构变化情况,促进了微生物生态学的发展[9~12]。为此本文采用 Biolog 和 PCR-DGGE 相结合的方法对吉林德惠黑土不同施肥处理进行研究,目的旨在从群落水平解析施肥对土壤细菌群落结构和功能的影响。

1　研究区概况

研究地点位于吉林省德惠市沃皮乡晨光村的中国科学院东北地理与农业研究所农业示范研究基地(N44°12′,E125°33′),气候属于中温带大陆季风气候,年平均气温 4.4℃,年平均积温 2851℃,年均日照时数为 2695.2 h,年降水量 520 mm。供试土壤为中层黑土,种植作物玉米。

2　研究方法

2.1　试验设计及样品采集

不同施肥处理试验始于 1999 年。本研究选取 4 个试验处理,即无肥区(NoF);化肥区(CF),每年施肥量为:N 75 kg·hm^{-2}、P_2O_5 65 kg·hm^{-2}、K_2O 60 kg·hm^{-2};有机肥区(FYM),每年施用厩肥 40 t·hm^{-2};半量有机肥+化肥区(HFYM+CF),每年施用厩肥 20 t·hm^{-2},配合施用化肥,化肥用量同 CF 处理。试验处理为随机区组设计,3 次重复,小区面积 50 m^2。2005 年 7 月 21 日于玉米抽穗期采集 0 ~20 cm 耕层土壤样品,每试验区随机采样 5 点混合,作为 1 个土壤样品。土壤的部分化学和生物学性状如表 1 所示。

2.2　Biolog 试验

2.2.1　Biolog EcoPlate 接种和培养

称取相当于 4 g 烘干土重的鲜土加入到装有 36 ml 灭菌 NaCl 溶液的三角瓶中(浓度为 0.85%),超声 1 min,然后在旋转振荡器上震荡 30 min 摇匀。土壤溶液依次稀释至 10^{-3},向 Biolog 生态版(美国 BIOLOG 公

司)上每孔加入 150 μl 土壤稀释液,然后在室温条件下(25℃左右),将微孔板放在保湿容器中避光培养,每隔 24 h 用 Biolog Reader(美国 BIOLOG 公司)读取在 590(颜色 + 浊度)和 750 nm(浊度)波长的数值[13]。

表 1 供试土壤的化学和生物学性状

Table 1 General chemical and biological characteristics of the soil samplings

处理 Treatment	有机质(%) SOM	速效氮 ($mg \cdot kg^{-2}$) Available N	速效磷 ($mg \cdot kg^{-2}$) Available P	速效钾 ($mg \cdot kg^{-2}$) Available K	微生物量碳 ($mg \cdot kg^{-2}$) Microbial biomass C	pH
无肥区 NoF	2.62	107	8	103	315	6.26
化肥区 CF	2.67	156	27	133	287	5.43
有机肥区 FYM	2.90	136	40	203	570	6.53
半量有机肥 + 化肥区 HFYM + CF	2.83	151	35	153	445	5.77

2.2.2 Biolog 数据分析

Biolog 微孔板的单孔颜色平均值(average well color development, AWCD)计算采用 Classen 等的方法。即将单孔在 590 nm 和 750 nm 的光密度值分别减去对照孔光密度值,然后再用每个对应孔 590 nm 得值减去 750 nm 的值,即为单孔实际颜色反应而测得的光密度值。其中数值小于 0.06 时按 0 处理[13]。

单孔平均光密度值计算按照 Garland 和 Mills 的方法[14],即 AWCD (590 ~ 750 nm) = $\sum (C_{590-750})/31$,其中 31 为 Biolog EcoPlate 上供试碳源的种类数。选取培养时间 72 h 的试验结果计算山农多样性指数(H)、利用的底物碳源数(S)。其中 $H = -\sum (P_i \times \ln P_i)$,$P_i$ 为单孔的相对光密度值,即 $P_i = C_{590-750} / \sum (C_{590-750})$;$S$ 为微生物群落利用的底物碳源数。经过转换计算后得到的单孔相对光密度值用于主成分分析(PCA)(EXCEL STATISTICS 97, SRI, Tokyo Japan)。

2.3 PCR-DGGE

2.3.1 土壤微生物 DNA 提取

微生物 DNA 提取参考 Zhou 等[15]方法。采用小型的珠磨器(Mini-Bead beater)和 DNA 提取和分离溶液提取土壤微生物总 DNA。由于黑土土壤有机质含量较高,提取的总 DNA 含有腐殖酸类物质,妨碍 PCR 反应,因此在本研究中采用 Sphadex G-200 过滤柱对总 DNA 进行纯化[16, 17]。

2.3.2 PCR 扩增

采用的引物 GC-357f 和 517r 对提纯后的微生物总 DNA 进行 PCR 扩增[9]。PCR 反应体系为:两引物各 0.5 μl,10 × Ex Taq Buffer 5.0 μl,dNTP 混合液 5.0 μl,模板 DNA 1 μl,Ex Taq 0.5 μl,用灭菌超纯水补足至 50 μl。PCR 反应条件为 94℃ 3 min;然后 94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1.5min,共 30 个循环;最后是 72℃ 10 min。PCR 产物用含有 EB 染色剂的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2.3.3 DGGE

DGGE 在变性梯度凝胶电泳仪上进行(Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)。丙烯酰胺凝胶强度为 8%,变性剂梯度为 30% ~70%,凝胶板制作好后,组装放入含有 1 × TAE 的电泳槽中,预热到 60℃时,加样。每孔加入 12 μl 的 PCR 产物和 5 μl 的 1 × Loadding dye,加样完成后,接通电泳电源,在 100 V、60℃条件下电泳 16 h。电泳结束后,小心取出凝胶,放在稀释 10000 倍的 SYBR Green I 核酸染料中避光染色 20 min,然后在凝胶成像仪下进行观察,拍照。

2.3.4 DGGE 图谱分析

采用 QuantityOne-1-D 软件(Version 4.5)对 DGGE 条带进行数字化分析。由于 DGGE 条带 DNA 含量与其灰度(范围 0 ~255,0:灰度最小,255:灰度最大)呈比例关系,用条带灰度大小来代替每个 DGGE 条带的扩增量(N_i)用于计算[18]。每个条带的相对含量 P_i 为该条带的灰度值与该列所有条带灰度平均值的比值。根据 P_i 值计算土壤微生物群落结构多样性指数和均匀度指数,同时进行主成分分析,其计算和分析方法同 Biolog 试验。

3　试验结果

3.1　Biolog 试验结果

3.1.1　单孔颜色平均变化

由图 1 可知,不同施肥处理的土壤细菌群落 AWCD 值在整个培养时间内均以 CF 处理最低,以 FYM 处理为高,而 NoF 和 HFYM + CF 处理的 AWCD 值处于中间,且这种差异随着培养时间的延长在培养后期表现得更明显。AWCD 值的大小代表了不同处理土壤细菌对底物碳源利用能力上的差异,从本试验结果可以看出,施用有机肥和化肥对土壤细菌代谢功能的影响是相反的,施有机肥显著地促进了土壤细菌对 Biolog 微孔板上碳源的利用能力,而施化肥的作用正相反。

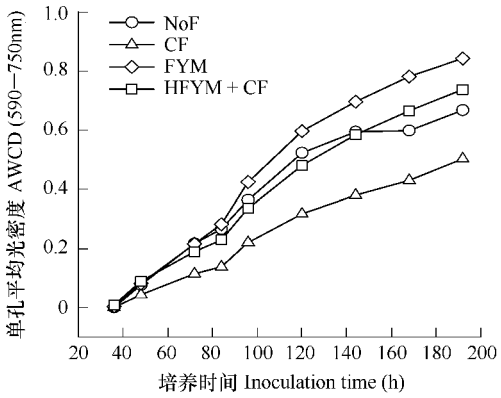

图 1　不同处理土壤细菌群落单孔平均光密度的变化

Fig. 1　Variation in AWCD of soil bacterial community over time for different treatments

3.1.2　底物碳源利用和代谢 Shannon 指数

表 2 结果显示,CF、HFYM + CF 和 NoF 处理的土壤细菌利用碳源的种类数和代谢 Shannon 多样性指数明显的小于 FYM 处理,表明单施有机肥提高了土壤细菌代谢功能多样性和碳源利用种类数,而施用化肥则作用相反。

表 2　不同处理土壤细菌群落底物代谢的多样性指数(H)和底物碳源利用数(S)

Table 2　Effect of different treatments on soil bacterial community catabolic diversity as evaluated by Shannon's diversity index (H), substrate richness (S) in the Biolog EcoPlate incubated for 72 h

处理 Treatment	多样性指数 H	底物碳源利用数 S
无肥区 NoF	2.80 ± 0.01 b	19.33 ± 0.33 b
化肥区 CF	2.73 ± 0.10 b	18.67 ± 0.88 b
有机肥区 FYM	3.04 ± 0.07 a	24.67 ± 1.85 a
半量有机肥 + 化肥区 HFYM + CF	2.76 ± 0.12 b	19.33 ± 2.17 b

表中数据为平均数 ± 标准误差,n = 3 Data in the table are Mean ± SE; 表中不同字母表示 5% 差异显著水平　Different letters represent the significant difference at $p < 0.05$

Biolog EcoPlate 含有 31 种不同种类的碳源,其中羧酸类 9 种,碳水化合物类 7 种,氨基酸类 6 种,聚合物类 4 种,胺类 2 种,其他类化合物 3 种。图 2 为不同处理土壤细菌对微孔板上 6 大类碳源的相对利用率分析结果。由图可知,NoF 处理土壤细菌对氨基酸类和其他类化合物的利用率较其他处理为高;CF 处理对聚合物类的利用能力高于其他处理;HFYM + CF 处理虽然对羧酸类化合物利用率相对较高,但与其他处理差异不显著;而 FYM 处理对 6 大类碳源的相对利用率在不同处理间变化不大。该结果表明,不同施肥处理对不同种类碳源利用效率上存在差异,表明不同肥料处理已导致土壤细菌群落代谢功能产生变化。

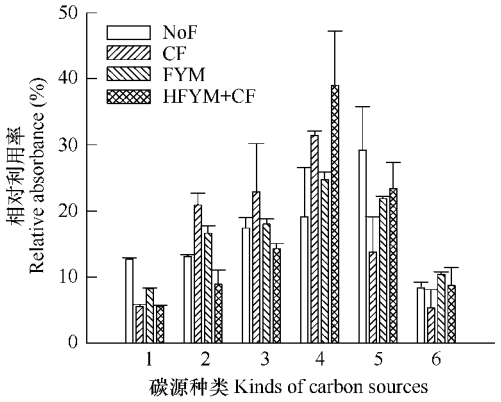

图 2　不同处理土壤细菌群落对 Biolog 微孔板上 6 类碳源相对利用情况

Fig. 2　Relative use efficiency of 6 kinds of carbon sources in Biolog Ecoplate by soil bacterial community of different treatments

1:其他化合物 Miscellaneous;2:聚合物 Polymers;3:碳水化合物 Carbohydrates;4:羧酸类 Carboxylic acids;5:氨基酸类 Amino acids;6:胺类 Amines/amides

3.1.3　主成分分析(PCA)

由图 3 可知,除了 CF 和 HFYM + CF 处理各有一点离散较大外,其余所有处理样品的土壤细菌群落对底物碳源的代谢功能可划分为两大类。其中 CF 和 HFYM + CF 处理的土壤细菌群落功能相似,集合在第 1 象限;而

NoF 和 FYM 处理的土壤细菌群落功能类同,聚集在第3象限。PCA 结果表明,不同施肥处理土壤细菌群落对底物碳源的代谢特征产生了差异,其中施用化肥处理是导致土壤细菌群落代谢功能产生分异的主导因素。

3.2 PCR-DGGE 试验结果

3.2.1 DGGE 图谱

用引物 GC-357f 和 517r 对不同处理土壤微生物 16S rDNA 扩增产物 DGGE 指纹图谱分析表明,不同处理间的 DGGE 图谱具有很强的相似性,许多条带为共有条带(如图中空心圆所示的条带),这说明这些条带所代表的土壤细菌很稳定,不受施肥管理措施的影响。但也有一些条带受到施肥处理的影响增加或缺失,如图中实心圆所标注为 CF 处理特有条带,而空心三角所显示的为 CF 缺失的条带,实心三角形为 FYM 处理增加的条带(图 4)。

对不同处理的 DGGE 条带统计分析表明,NoF 和 FYM 处理的 DGGE 条带数及其所代表土壤细菌群落结构多样性指数明显地高于 CF 和 HFYM + CF 处理,处理间差异显著(表 3)。

3.2.2 DGGE 图谱的主成分分析

对不同处理 DGGE 图谱上条带位置和亮度进行数字化处理后的主成分分析结果表明,NoF 与 FYM 处理的土壤细菌群落结构组成相似性较高,散点聚在 PCA 图中第 2 象限;CF 和 HFYM + CF 处理的土壤细菌群落组成与上两个处理相差较大,在 PCA 图中主要位于第 3 和 4 象限(图 5)。该结果表明,在德惠黑土上,单施有机肥处理对土壤细菌群落结构组成影响不大,但长期施用化肥处理对土壤细菌群落结构产生了一定的影响。

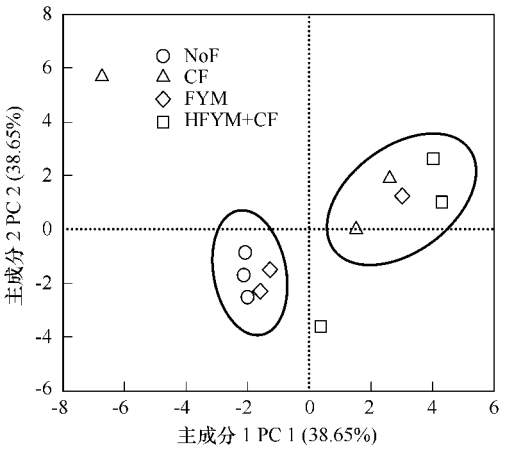

图 3 不同处理土壤细菌群落对 Biolog EcoPlate 底物碳源代谢的主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis (PCA) of Biolog Ecoplate data from soil samples of different treatments

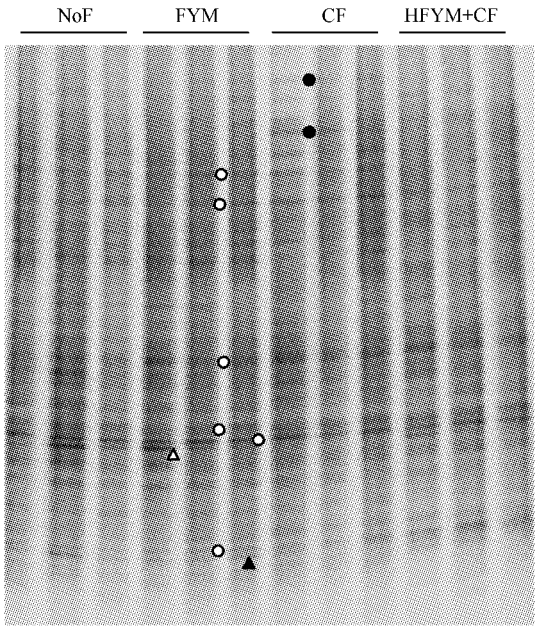

图 4 不同处理土壤微生物 16S rDNA 片断 DGGE 电泳结果

Fig. 4 DGGE banding patterns of 16S rDNA fragment from different soil treatments

4 讨论和结论

Biolog 微孔板分析技术开始主要用于异养细菌的分类鉴定,1991 年 Garland 和 Mills 首次将该技术用于环境微生物群落变化研究,拓展了 Biolog 技术的应用范围[14]。在本研究中发现,不同施肥处理的土壤细菌群落对底物碳源的利用数量和利用强度上存在差异(图 1,图 2,表 2),其中 CF 处理的土壤微生物量碳(287 $mg \cdot kg^{-1}$)与 NoF 处理(315 $mg \cdot kg^{-1}$)相差不显著(表 1),但该处理土壤细菌群落对 Biolog 微孔板上碳源代谢能力上却显著地低于 NoF 处理,这说明施用化肥处理对土壤细菌群落代谢功能的作用大于对微生物量的作用,施用化肥处理降低了土壤细菌群落的代谢功能。与施用化肥处理不同,FYM 处理的土壤微生物量碳(570 $mg \cdot kg^{-1}$)、土壤细菌对底物碳源的利用数量和强度上都明显地高于 NoF 处理(图 1,2;表 1,2),说明施用有机肥处理可能通过增加细菌总量和改变细菌群落结构两方面来提高土壤细菌的群落代谢功能。而在 HYM + CF 处理中,尽管其微生物量碳为 445 $mg \cdot kg^{-1}$(表 1),但由于化肥的施用掩盖有机肥的作用,导致其细菌群落代

谢功能降低(图 1)。

尽管 Biolog 技术常被用于研究土壤微生物群落功能,但该技术本身也有局限性。Biolog 技术表征的只是土壤中生长快速或富营养微生物的活性,而不能反映土壤中生长缓慢或不可培养微生物活性[19,20]。因此采用 Biolog 技术解析的只能是土壤中部分微生物群落特征,要全面解析土壤微生物群落结构还需结合其他的研究手段。

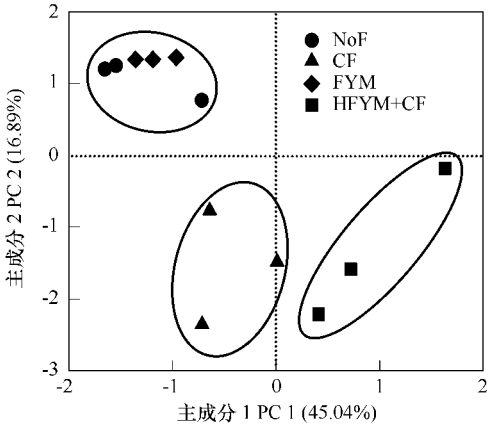

图 5　不同处理土壤微生物群落 DGGE 条带的主成分分析

Fig. 5　Principal component analysis (PCA) of DGGE banding patterns of different soil microbial community

PCR-DGGE 技术是通过研究土壤微生物群落 DNA 片段上碱基组成上的差异来解析其群落结构组成的。Marschner 等采用该技术对 5 种不同处理方式土壤微生物群落结构研究表明,长期施肥处理显著地改变了土壤微生物的群落结构[21]。Sun 等研究了长期施用化肥和有机肥对土壤细菌群落结构的影响,结果表明施用 NPK 化肥处理的 DGGE 条带数明显地少于有机肥处理,化肥处理降低了土壤细菌群落的多样性[22],这一结论与本研究结果相一致(表 3)。

表 3　不同处理土壤微生物 DGGE 图谱条带数和多样性指数

Table 3　The number of DGGE bands and Shannon's diversity index (H) of soil microbial community as influenced by different treatments

处理 Treatment	DGGE 条带数 Band number	多样性指数 H
无肥区 NoF	30.33 ± 0.27 a	3.40 ± 0.01 a
化肥区 CF	24.67 ± 0.98 b	3.23 ± 0.08 b
有机肥区 FYM	31.00 ± 0.47 a	3.42 ± 0.01 a
半量有机肥 + 化肥区 HFYM + CF	26.67 ± 0.54 b	3.27 ± 0.02 b

表中数据为平均数 ± 标准误差,$n=3$ Data in the table are Mean ± SE; 表中不同字母表示 5% 差异显著水平　Different letters represent the significant difference at $p<0.05$

由于 Biolog 试验获得的数据多,DGGE 图谱条带复杂,因此直观上很难比较处理间存在的差异,所以主成分分析常被用来比较不同样品微生物群落结构和功能多样性。在本试验中,对 Biolog 和 DGGE 试验结果的主成分分析表明,FYM 和 NoF 处理的土壤细菌群落在结构组成和代谢功能上具有较高的相似性(图 3,5),表明单施有机肥处理对黑土细菌群落结构组成改变的影响是次要的,其作用主要体现在数量(微生物量)上。对 CF 和 HFYM + CF 处理的 Biolog 和 DGGE 试验结果的主成分分析表现不一致,这两处理在对底物碳源代谢上相似性较高(图 3),而在细菌群落结构组成上产生分异(图 5),这可能与两种方法表征的细菌群落结构组成部分不一致有关,Biolog 代表的只是快速生长和富营养的一部分,而 DGGE 代表的更广一些。由此可见,不论是单施化肥处理,还是化肥配施有机肥处理,都对黑土细菌群落结构产生了影响,但化肥的作用更主要地体现在对土壤中变化敏感、快速生长或富营养的部分,化肥的应用降低了这些细菌类群的代谢活性。

References:

[1] Meng K, Zhang X Y, Sui Y Y. Impedient factors in black soil in the northern-northeast of China. Soil, 2003, 2:145 - 151.

[2] Yu L, Zhang B. The degradation situation of black soil in China and its prevention and counter measures. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2004, 18(1):99 - 103.

[3] Wang J, Xie H T, Zhang X D, *et al*. Effect of fertilization on soil microbial biological carbon in black soil. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2004, 12(2):118 - 120.

[4] Li D P, Wu Z J, Chen L J, *et al*. Dynamics of urease activity in a long-term fertilized black soil and its affecting factors. Chinese Journal of

Applied Ecolpgy, 2003, 14(12):2208 －2212.

[5] Wang Y, Qi X N, Wang Q C. Influences of applying stalk compost on the nutrient of field soil and corn yield of black soil. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2004, 12(4):132 －134.

[6] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review. Biol. Fertil. Soils, 1999, 29: 111 －129.

[7] Bakken L R. Separation and purification of bacteria from soil. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49: 1482 －1487.

[8] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a nature community. Nature, 1990, 344: 63 －65.

[9] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA. Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59:695 －700.

[10] Zhang Q C, Wang G H, Fang B. Influences of fertilization treatment on nutrients uptake by rice and soil ecological characteristics of soil microorganism in paddy field. Acta Pedological Sinica, 2005, 42(1):116 －120.

[11] Zhong W H, Cai Z C. Methods for studying soil microbial diversity. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(5):899 －904.

[12] Kimura M, Shibagaki T, Nakajima Y, *et al*. Community structure of the microbiota in the floodwater of a Japanese paddy field estimated by restriction fragment length polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis pattern analyses. Biol. Fertil. Soils, 2002, 36: 306 －312.

[13] Classen A T, Boyle S I, Haskins K E, *et al*. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. FEMS Microbiol. Ecol., 2003, 44, 319 －328.

[14] 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. Microbiol., 1991, 57:2351 －2359.

[15] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 316 －322.

[16] Cahyani V R, Matsuya K, Asakawa S, *et al*. Succession and phylogenetic composition of bacterial communities responsible for the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. Soil Sci. Plant Nutr., 2003, 49: 619 －630.

[17] Jackson C R, Harper J P, Willoughby D, *et al*. A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63:4993 －4995.

[18] Yao J, Yang Y H, Shen X R, *et al*. A preliminary study on DNA sequence diversity of soil microbial community affected by agricultural chemicals. Acta Ecologica Sinica, 2000, 20(6):1021 －1027.

[19] Li C G, Li X M, Wang J G. Effect of soybean continuous cropping on bulk and rhizosphere soil microbial community function. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(4):1144 －1150.

[20] Konopka A, Oliver L, Turco R F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. Microbiol. Ecol., 1998, 35(2):103 －115.

[21] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. Soil Biol. Biochem., 2003, 35: 453 －467.

[22] Sun H Y, Deng S P, Raun W R. Bacterial Community Structure and Diversity in a Century-Old Manure-Treated Agroecosystem. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70: 5868 －5874.

参考文献:

[1] 孟凯, 张兴义, 隋跃宇. 东北北部农田黑土障碍因子分析. 土壤, 2003, 2:145 ~ 151.

[2] 于磊, 张柏. 中国黑土退化现状与防治对策. 干旱区资源与环境, 2004, 18(1):99 ~ 103.

[3] 王晶, 解宏图, 张旭东, 等. 施肥对黑土土壤微生物生物量碳的作用研究. 中国生态农业学报, 2004, 12(2):118 ~ 120.

[4] 李东坡, 武志杰, 陈利军, 等. 长期培肥黑土脲酶活性动态变化及其影响因素. 应用生态学报, 2003, 14(12):2208 ~ 2212.

[5] 王洋, 齐晓宁, 王其存. 施用秸秆堆腐肥对黑土农田养分及玉米产量的影响研究. 中国生态农业学报, 2004, 12(4):132 ~ 134.

[10] 张奇春, 王光火, 方斌. 不同施肥处理对水稻养分吸收和稻田土壤微生物生态特性的影响. 土壤学报, 2005, 42(1):116 ~ 121.

[11] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法. 应用生态学报, 2004, 15(5):899 ~ 904.

[18] 姚健, 杨永华, 沈晓蓉, 等. 农用化学品污染对土壤微生物群落 DNA 序列多样性影响研究. 生态学报, 2000, 20(6):1021 ~ 1027.

[19] 李春格, 李晓鸣, 王敬国. 大豆连作对土体和根际微生物群落功能的影响. 生态学报, 2006, 26(4):1144 ~ 1150.