

应用 PLFA 方法分析长期不同施肥处理对玉米地 土壤微生物群落结构的影响

于 树, 汪景宽*, 李双异

(沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:土壤微生物群落被认为是土壤生态系统变化的预警及敏感指标, 指示土壤质量变化, 决定着土壤的生态功能。为了探讨长期施肥处理(1987~2004 年)对土壤微生物群落结构的影响, 采用磷脂脂肪酸(PLFA)法测定了沈阳农业大学棕壤长期定位试验站玉米地不同施肥土壤微生物生物量的活性部分及群落结构的变化情况。结论: 长期施肥处理都能提高土壤微生物总生物量、细菌生物量及真菌生物量, 特别是有机肥和有机无机肥配施在整个生育期对微生物总生物量的增加作用比较明显。真菌的生长与季节变化和玉米生育的关系较为密切, 各施肥处理土壤真菌含量在抽雄期都明显降低。长期不同施肥处理可以改变土壤微生物群落结构, 单施氮肥处理土壤微生物群落结构与长期不施肥处理较为相似, 没有明显的优势种群。施用有机肥和有机无机配施的土壤微生物群落均以含 a15:0, i15:0, cy17:0, i16:0, 16:1w7t, 10Me18:0 和 15:0 的微生物为优势种群。土壤有机质、碱解氮、速效磷和速效钾是微生物生长和活性的主要能源和营养因子。

关键词:长期不同施肥处理; 土壤微生物群落结构; 磷脂脂肪酸

文章编号: 1000-0933(2008)09-4221-07 中图分类号: Q142, Q938.1 文献标识码: A

Effect of long-term fertilization on soil microbial community structure in corn field with the method of PLFA

YU Shu, WANG Jing-Kuan*, LI Shuang-Yi

College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(9): 4221~4227.

Abstract: Soil microbial community which indicates soil quality changes and controls the soil ecosystem functions has been regarded as the early warning and the sensitive indicator of soil ecosystem. In order to study the effects of long-term fertilization (1987—2004) on soil microbial community structures, active microbial biomass and community structure were determined by phospholipid fatty acid (PLFA) in the long-term located experiment with different fertilization treatments on brown earth in Shenyang Agricultural University. The results showed that total soil microbial biomass, bacterial biomass and fungal biomass were enhanced significantly with long-term fertilization treatments, especially in manure or manure with chemical fertilizers' treatments. Fungal biomass in all fertilization treatments decreased during corn heading stage. Soil microbial community structure had been changed due to long-term fertilization, but no predominant group in single nitrogen applied treatment. The microorganisms containing the PLFA of a15:0, i15:0, cy17:0, i16:0, 16:1w7t, 10Me18:0 and 15:0 were dominance in microbial community in the treatments applied with manure. In addition, soil organic matter,

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2005CB121108)

收稿日期: 2007-03-13; 修订日期: 2008-04-09

作者简介: 于树(1979~), 女, 辽宁盘锦人, 博士, 从事土壤肥力研究. E-mail: ysxiaoshaniao@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jkwang@syau.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Key Project for Great Basic Research of China(No. 2005CB121108)

Received date: 2007-03-13; **Accepted date:** 2008-04-09

Biography: YU Shu, Ph. D., mainly engaged in soil fertility research. E-mail: ysxiaoshaniao@163.com

alkali-hydrolyzable-N, available potassium and available phosphorus were main factors of energy and nutrition for growth and activities of microorganism.

Key Words: long-term fertilization; soil microbial community structure; PLFA

土壤微生物群落是土壤生物区系中最重要的功能组分,土壤微生物本身不仅是土壤养分重要的“源”和“汇”,支撑着土壤肥力,它还对所生存的微环境十分敏感,能对土壤生态机制变化和环境胁迫做出反应,导致群落结构会发生改变。所以,土壤微生物群落被认为是土壤生态系统变化的预警及敏感指标,指示土壤质量变化。由于土壤微生物的数量巨大,组成极为复杂,用传统的土壤微生物研究方法往往会过低估价土壤微生物真实状况,无法得到它们在土壤生态系中的重要信息。磷脂是构成生物细胞膜的主要成分,约占细胞干重的5%,只存在于所有活细胞膜中,一旦生物细胞死亡,其中的磷脂类化合物马上消失^[1]。不同种类微生物体内磷脂类化合物中的脂肪酸(PLFA)组成及含量显示出极大的差异,可用来直接估价其微生物的生物量及群落结构^[2,3],是一种较为准确、有效的研究方法。

国内外一些学者纷纷开展土壤微生物群落结构及多样性方面的研究。蔡燕飞^[4]通过施生态有机肥对土壤微生物群落结构的影响研究表明,生态有机肥能改善土壤微生态环境,改变土壤微生物群落结构,提高土壤的生态肥力,甚至提高整个土壤生态系统的功能,从而能有效地抑制土传病害的发生。Degens^[5]已证明向土壤中添加简单有机物可改变土壤微生物的代谢特征和代谢多样性。Bossio 和 Scow^[6]报道向土壤中添加碳源能够增加土壤中单不饱和脂肪酸(MUFA)的相对丰度。FlieBboach^[7]等比较了长期施用各种有机肥的有机耕作与施用化肥的传统耕作方式的土壤微生物群落发现有机耕作土壤微生物群落功能多样性(Biolog 方法)显著高于常规的施用化肥耕作土壤,前者具有较高的代谢能力。

近年来,长期施肥处理对土壤肥力、土壤质量的影响研究的报道较多,对土壤生态功能的影响研究也有一些报道,但大多数研究方法都局限在土壤微生物量、呼吸强度、酶活性、微生物区系等研究上。本文采用磷脂脂肪酸(PLFA)法研究了沈阳农业大学棕壤长期定位试验站长期不同施肥处理对土壤微生物群落结构的影响。揭示长期施肥处理土壤微生物多样性的变化及群落结构的演变状况,为长期施肥处理而改变土壤的生态功能研究提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验区概况及供试材料

试验区位于沈阳农业大学棕壤长期定位实验站(北纬 41°49',东经 123°34'),土壤为发育在黄土性母质上的壤质棕壤。试验从 1987 年开始设置,采用玉米连作方式,每年 4 月 25 日左右播种。试验开始时有机质含量 15.6 g kg⁻¹,全氮 1.0 g kg⁻¹,全磷 0.5 g kg⁻¹,碱解氮 67.4 mg kg⁻¹,有效磷 8.4 mg kg⁻¹。施用的有机肥为猪厩肥,其有机质含量为 150 g kg⁻¹左右,全氮为 10 g kg⁻¹左右。本研究的施肥处理小区(面积为 69.12 m²)为:①对照(CK);②高量氮肥(N4),年施尿素含氮量 270 kg hm⁻²;③高量有机肥(M4),折合年施 N 量 270 kg hm⁻²;④高量有机肥和氮磷肥化肥配施(M4N2P1),年施有机肥 N 270 kg hm⁻²,化肥 N 135 kg hm⁻²和 P₂O₅ 67.5 kg hm⁻²。采样时间为 2004 年玉米 3 个生育期分别为:苗期(5 月 21 日),抽雄期(7 月 20 日),成熟期(9 月 23 日),采样深度为 0~20 cm,每个试验小区取 3 点混合样作为该小区的代表样品。

1.2 分析项目及方法

土壤有机质的测定采用元素分析仪(Elementar Vario EL III,德国)分析;速效 P 采用 NaHCO₃浸提-钼锑抗比色法;速效 K 采用 NH₄OAc 浸提-火焰光度法;碱解 N 采用碱解扩散法。

土壤微生物磷脂脂肪酸(PLFA)的测定方法在 White^[8]的方法上加以改进:(1)提取:称 4 g 鲜土加入 4 ml 左右柠檬酸缓冲液(减去土壤中含水量),5 ml 氯仿,10 ml 甲醇(柠檬酸缓冲液:氯仿:甲醇 = 0.8:1:2),25℃ 避光震荡 4 h,3000 r/min 离心 15 min,重复操作取上清液。再加入 7 ml 柠檬酸缓冲液和 7 ml 氯仿(柠檬酸缓

冲液:氯仿:甲醇=0.9:1:1),震荡 1 min,避光条件下保存 18 h。经 18 h 分离后,吸走上层(大约 2/3)保留底层氯仿相,在氮气流下吹干氯仿。(2)分离:用柱层析硅胶 800 mg(在 120 ℃下烘干 2 h)填充玻璃管柱(直径 6 mm),用 10 ml 氯仿清洗硅胶柱,5 ml 氯仿溶解样品后注入硅胶柱内,然后依次分别加入 10 ml 氯仿、10 ml 丙酮、10 ml 甲醇,收集甲醇相在氮气流下吹干。(3)甲脂化:向吹干样品中加入 1 ml 甲醇:甲苯(1:1)和 1 ml 0.2 mol/L KOH 甲醇溶液,手动摇晃 1 min,放入水浴 35 ~ 36 ℃温浴 15 min,后冷却到室温,依次加入 2 ml 去离子水,0.3 ml 1 mol/L HAc,2 ml 正己烷,漩涡混合 30 s,然后 3000 r/min 离心 10 min,重复提取一次,合并两次提取的正己烷相,加入甲脂化的 C19:0 为内标,氮气流下吹干,-20 ℃冷冻保存,在上机测定前用 150 μ l 正己烷(色谱纯)定溶待测。所用标样为:内标为甲酯化的 19:0,外标为 Supelco™ 37 Component FAME Mix 和 Bacterial Acid Methyl Esters Mix(Supelco USA)。注意事项:所用试验用品和器皿均为玻璃或聚四氟乙烯,清洗容器不能使用清洗剂。在提取过程中容器用锡箔纸包被,尽量避光,样品冷冻保存,避免与水和氧气接触。脂肪酸的命名:脂肪酸链长以碳原子总数计算,从羧基开始,冒号后数字代表双键数目,w 后数字代表双键的位置(从羧基端算起),c(*cis*)表示顺势双键,t(*trans*)表示反势双键,i(*iso*)表示顺势支链,a(*antiso*)表示反势支链,br 表示不确定支链位置,Me 表示甲基位置,cy 表示环丙基。

本实验检测由安捷伦 GC-MS(6890N-5973N)完成。色谱柱为 hp5-MS(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m)石英毛细管柱。GC-MS 分析条件:柱温 70 ℃(5 min) $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 190 ℃ $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 200 ℃ $\xrightarrow{10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280 ℃,进样口温度为 250 ℃,载气为 He(0.9 ml/min),分流比为 10:1,离子源温度 230 ℃,四极杆 150 ℃,质谱全扫描范围 30 ~ 600 m/z。脂肪酸定量用峰面积和内标曲线法。PLFA 含量用 nmol g⁻¹ 表示。

1.3 数据分析

本文数据采用方差分析、相关分析、因子分析及主成分分析等数学统计方法,分析软件为 EXCEL, SPSS, DPS。

2 结果与分析

2.1 不同施肥处理对土壤微生物生物量的影响(PLFA)

Bardgett 等^[9]认为土壤中磷脂脂肪酸的组成可以表示土壤微生物群落的生物量和结构。一些学者曾发现使用直接从土壤中提取的磷酸酯类化合物的量可准确地表达成土壤微生物的生物量(表 1)。

表 1 估算微生物生物量的脂肪酸
Table 1 PLFA for calculating soil microbial biomass

微生物类型 Microbial group	磷脂脂肪酸标记 Phospholipids fatty acids signatures	文献 Reference
细菌 Bacteria in general	14:0,15:0,16:0,17:0, i15:0,a15:0,i17:0,a17:0,i19:0,16:1 ω 7,cy17:0,cy19:0	[10 ~ 12]
革兰氏阳性细菌 Gram-positive bacteria	i15:0,a15:0,i17:0,a17:0	[13 ~ 15]
革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	16:1 ω 7,cy17:0,cy19:0	[16,13]
放线菌 Actinomycete	10Me16:0,10Me17:0,10Me18:0	[10,14]
真菌 Fungi	18:1 ω 9c, 18:1 ω 9t, 18:2 ω 6, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3, 21:0,23:0	[8,17]

2.1.1 不同施肥处理对玉米地土壤微生物 PLFA 总量的影响

由图 1 可以看出,在玉米不同生育时期不同施肥处理土壤微生物总生物量表现不同的变化趋势。方差分析表明,在玉米苗期各施肥处理之间土壤微生物 PLFA 总量有显著差异;抽雄期 N4、M4 和对照处理之间差异不显著;成熟期 N4 和对照处理及 M4 和 M4N2P1 处理差异不显著。苗期,N4 低于对照处理 19.5%,M4 和 M4N2P1 分别高于对照处理 29.9%和 73.7%,且 M4N2P1 最高。抽雄期,施肥处理土壤的 PLFA 总量都略高于对照,N4 和 M4 处理分别高于对照 6.8%和 8.0%,M4N2P1 处理表现为最高,且高于对照 27.8%。成熟期,施肥处理土壤的 PLFA 总量也高于对照,且 M4 和 M4N2P1 都表现出较高的水平,分别高于对照 75.4%和

70.6%。说明长期施肥能提高土壤微生物的生物总量,特别是有机肥和有机无机肥配施处理在整个生育期对微生物总生物量的提高作用比较明显,但施用氮肥处理在玉米苗期降低土壤微生物总生物量,在玉米生育中后期有增加作用。

2.1.2 不同施肥处理对土壤细菌生物量的影响

由图 2 可见,苗期施肥处理与对照处理间土壤细菌生物量有显著差异,其中, N4 低于对照处理 24.2%, M4 和 M4N2P1 分别高于对照处理 30.1% 和 73.9%, 且 M4N2P1 最高。抽雄期, N4 处理显著低于对照处理 14%, 而 M4 和 M4N2P1 处理与对照间没有显著差异。成熟期, M4 和 M4N2P1 处理土壤细菌生物量显著高于对照处理 77.8% 和 79.1%, 而 N4 处理与对照处理之间没有显著差异。可以看出, 长期施肥玉米地土壤微生物细菌的生物量变化与微生物总生物量变化大致相同, 这也证明了土壤微生物是以细菌为主体的群落结构。

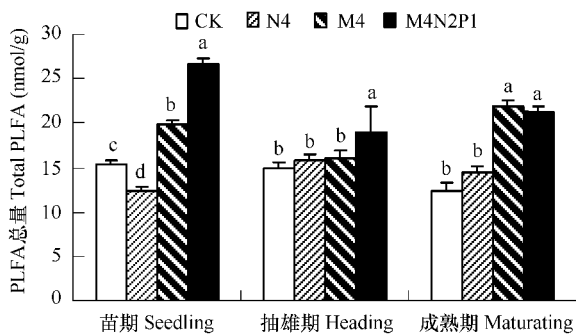


图 1 玉米生育期内不同施肥处理对土壤 PLFA 总量的影响

Fig. 1 Effect of different fertilization treatments on total PLFA in corn growth periods

每个玉米生育期内相同字母表示差异不显著 ($P < 0.05$); 下同
The data in the same column with the same smaller letter indicate no significance in each corn growth period ($P < 0.05$); the same below

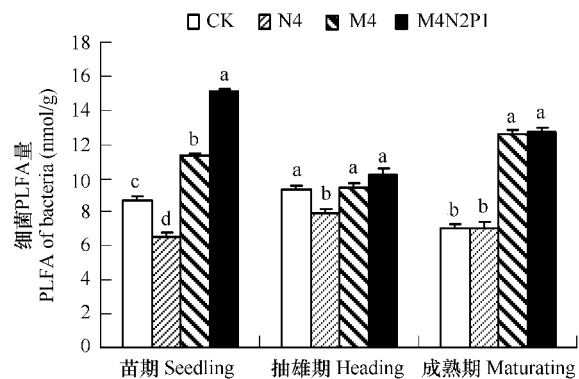


图 2 玉米生育期内不同施肥处理对土壤细菌 PLFA 量的影响

Fig. 2 Effect of different fertilization treatments on PLFA of bacteria in corn growth periods

2.1.3 不同施肥处理对土壤真菌生物量的影响

由图 3 看出, 苗期, N4 与对照处理之间土壤真菌生物量差异不显著, M4 和 M4N2P1 处理分别显著高于对照处理 76.1% 和 36.7%, 且 M4 处理最高。抽雄期, N4、M4 和 M4N2P1 处理土壤真菌生物量都分别显著低于对照处理 66%、38.5% 和 25.5%, 且 N4 处理最低。成熟期, N4、M4 和 M4N2P1 处理土壤真菌生物量都分别显著高于对照 179.2%、256.5% 和 103.3%, 且 M4 处理最高。可以看出, 在玉米抽雄期对照处理土壤真菌生物量较高, 这也说明真菌的生长与季节和玉米的生育关系较为密切。总的来看, 施肥处理能使土壤真菌生物量有所提高, 在苗期和成熟期单施有机肥处理对其的作用最明显, 在抽雄期表现为有机无机肥配合施用处理的作用最为明显。

2.1.4 不同施肥处理对土壤真菌/细菌的影响

真菌/细菌的比例可反映真菌和细菌相对含量的变化范围^[10]和两个种群的相对丰富程度^[11]。由图 4 看出, 苗期, N4 和 M4 之间真菌/细菌比例差异不明显, 但显著高于 M4N2P1 和对照处理, 而 M4N2P1 处理显著低于对照处理, 说明 N4 和 M4 处理土壤中真菌与细菌比较, 丰富度高于 M4N2P1 和对照处理, 而 M4N2P1 处理土壤真菌的丰富度相对较低。抽雄期, 施肥处理土壤真菌/细菌比例显著低于对照处理, 且 N4 处理最低, 说明在这一时期不施肥处理的土壤真菌丰富程度有所提高, 而施肥处理却降低了真菌/细菌的数量比例。成熟期, 施肥处理土壤真菌/细菌数量比例都显著高于对照处理, N4 最大, 说明氮肥对真菌的生长有一定的刺激作用, 能提高土壤中真菌的相对含量。而 M4N2P1 相对较低, 说明有机无机肥配合施用对真菌的作用还不如 M4 处理明显, 这也看出了不同肥料在影响细菌和真菌生物量上的差异。

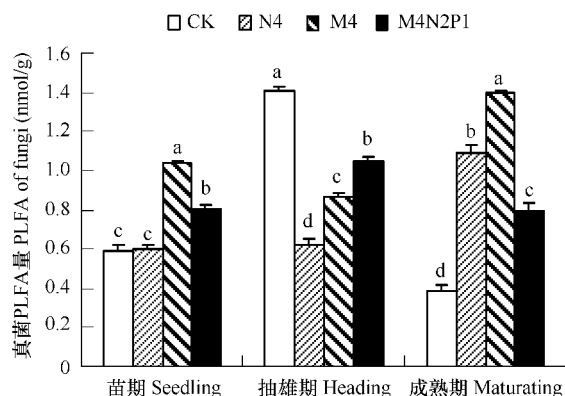


图3 玉米生育期内不同施肥处理对土壤真菌 PLFA 量的影响

Fig. 3 Effect of different fertilization treatments on PLFA of fungi in corn growth periods

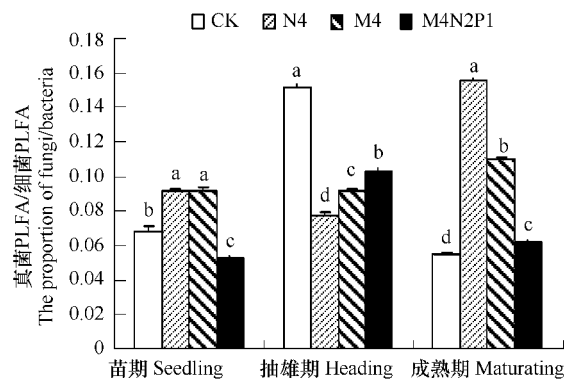


图4 玉米生育期内不同施肥处理对土壤 PLFA 真菌/细菌的影响

Fig. 4 Effect of different fertilization treatments on the proportion of fungi/ bacteria in corn growth periods

2.2 不同施肥处理对土壤的微生物群落结构的影响

经主成分分析(图5)得出,主成分一和主成分二基本上能把不同施肥处理区分开来。M4 处理和 M4N2P1 处理与主成分一表现出高度正相关;而 N4 处理与主成分一表现出负相关;M4N2P1 处理与主成分二之间呈高度正相关关系。N4 处理和对照处理相距较近,说明这两种处理土壤的微生物群落结构较为相似。另外,对照处理在主成分一和二的坐标零点附近,说明对照处理与两个主成分的相关性不大。

通过每种脂肪酸在主成分上的因子载荷分析结果表明(图6),a15:0, i15:0, cy17:0, i16:0, 16:1w7t, 16:0, br16:0 在主成分一上的载荷值较高,主成分一是它们的代表因子。其中支链脂肪酸多来自于革兰氏阳性菌, cy17:0 和 16:1w7t 是用来表征革兰氏阴性菌的脂肪酸。而 10Me18:0 在主成分一上的载荷值较低,它又是放线菌的标志性脂肪酸。说明单施有机肥和有机无机肥配合施用处理使土壤革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌增多,而放线菌减少。18:0, a17:0, i17:0, i19:0 和 cy19:0 在主成分二上有较高的载荷值,而 18:2w6 和 17:0 在主成分二上的载荷值较低,可以认为主成分二是 18:0, a17:0, i17:0, i19:0 和 cy19:0 的代表因子。其中, 18:2w6 是真菌的标志性脂肪酸,说明有机无机配合施用土壤中真菌的含量较低。综合分析得出,单施

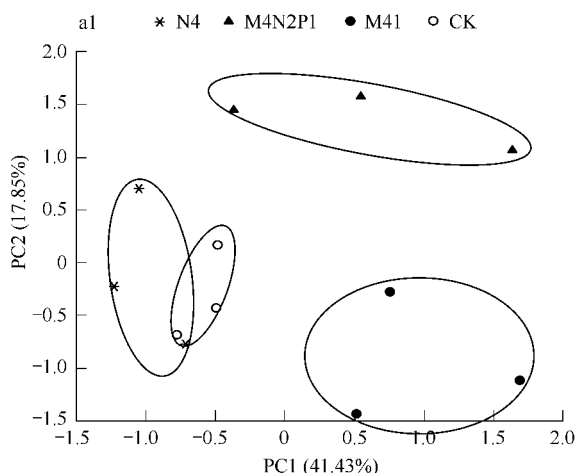


图5 不同施肥处理下土壤微生物群落 PLFA 的主成分分析

Fig. 5 Principle components analysis of PLFA profiles from soil microbial communities of different fertilization treatments

a1: PC1 × PC2

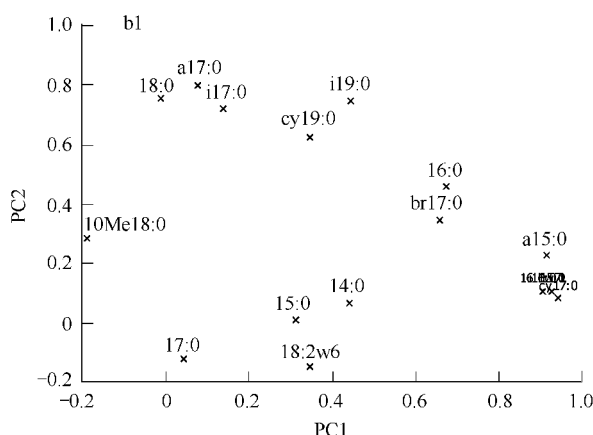


图6 不同施肥处理下土壤微生物群落 PLFA 载荷因子贡献

Fig. 6 Eigenvector loadings of PLFA contributing to soil microbial communities ordination pattern of different fertilization treatments

a1: PC1 × PC2

氮肥与对照处理土壤微生物群落结构相似,没有明显的优势种群,而长期施用有机肥和有机无机配施处理使土壤微生物群落中产生明显的种群优势。

3.4 土壤微生物生物量(PLFA 总量)与土壤有机质、碱解氮、速效磷和速效钾的相关分析

PLFA 总量与土壤有机质、碱解氮、速效磷和速效钾的相关系数分别为 0.739^{**}, 0.648^{*}, 0.803^{**}, 0.794^{**} ($n=12$, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$)。可以看出,土壤微生物磷脂脂肪酸总量与土壤有机质、速效磷和速效钾之间呈极显著正相关,而碱解氮与土壤微生物 PLFA 总量之间显著相关。说明土壤有机质、碱解氮、速效磷和速效钾是微生物生长和活性的主要能源和营养因子,特别是土壤有机质、速效磷和速效钾与土壤微生物之间的关系十分密切。

表 2 不同施肥处理土壤有机质、碱解氮、速效磷和速效钾

Table 2 The amounts of organic matter, alkali-hydrolyzable-N, available K and available P in different treatments

生育期 Growth period	施肥处理 Treatment	碱解氮 (g/kg) Alkali-hydrolyzable-N	速 K (g/kg) Available K	速 P (g/kg) available P	有机质 (g/kg) Organic matter
苗期(5月21日) Seedling	CK	0.139	0.114	0.030	16.257
	N4	0.196	0.106	0.009	14.878
	M4	0.195	0.199	0.143	22.929
	M4N2P1	0.279	0.226	0.188	23.429
抽雄期(7月20日) Heading	CK	0.114	0.107	0.017	15.671
	N4	0.123	0.080	0.013	14.602
	M4	0.141	0.173	0.139	20.912
	M4N2P1	0.152	0.188	0.204	23.498
成熟期(9月23日) Maturing	CK	0.097	0.093	0.012	15.568
	N4	0.107	0.068	0.004	13.154
	M4	0.125	0.152	0.132	20.102
	M4N2P1	0.162	0.165	0.159	18.412

3 结论与讨论

长期施肥处理对玉米地土壤微生物生物量有不同程度的影响。单施氮肥、单施有机肥及有机无机肥配合施用都能提高土壤微生物总生物量及细菌生物量,特别是有机肥和有机无机肥配施在整个生育期对微生物总生物量的增加作用比较明显。因为有机肥的施入可提供丰富的碳源,刺激土壤微生物的生长。王曙光^[18]的研究也得出,氮肥不利于细菌的生长,而 Lovell^[19]研究证明,施氮肥有利于细菌的生长,还可能通过改变养分的有效性而直接影响其它微生物群落, Bardgett^[20]也得出这样的结论。另外,长期施肥处理能使土壤真菌生物量有所提高,氮肥对真菌的生长有一定的刺激作用,但 Bardgett^[20]等研究表明施用氮肥会降低真菌的含量。单施有机肥处理对真菌的作用比有机无机肥配合施用处理更为明显,但真菌生长与季节和玉米的生育关系较为密切,表现为各施肥处理土壤真菌含量在抽雄期都明显降低,原因可能是由于作物生长旺季施肥对作物生物量的增加使微生物可利用的养料发生数量和质量上的降低,而真菌在肥料的供给上又要比细菌敏感,而影响真菌的生物量。长期不同施肥处理可以改变玉米地土壤微生物群落结构,不同的施肥处理土壤微生物群落结构大不相同。施用有机肥和有机无机配施的玉米地土壤微生物群落均以含 a15:0, i15:0, cy17:0, i16:0, 16:1w7t, 10Me18:0 和 15:0 的微生物为优势种群;施氮肥对土壤微生物群落以含 10Me18:0 和 15:0 的微生物为优势种群。另外,单施氮肥处理土壤微生物群落结构与长期不施肥处理较为相似,而对照处理土壤没有明显的优势种群。土壤有机质、碱解氮、速效磷和速效钾是微生物生长和活性的主要能源和营养因子。

References:

- [1] White D C, Davis W M, Nickels J S, *et al.* Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia*, 1979, 40: 51-62.

- [2] Zelles L, Bai Q Y. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biol. Biochem.*, 1993, 25: 495 — 507.
- [3] Guckert J B, Hood M A, White D C. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increase in *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, 52: 794 — 801.
- [4] Cai Y F, Liao Z W, Zhang J E, *et al.* Effect of ecological organic fertilizer on tomato bacterial wilt and soil microbial diversities. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(3): 349 — 353.
- [5] Degens B P. Microbial functional diversity can be influenced by the addition of simple organic substrates to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30: 1981 — 1988.
- [6] Bossio D A, Scow K M, Gunapala N, *et al.* Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management season and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, 1998, 36: 1 — 12.
- [7] FlieBbach A, Eyhorn F, Mader P, *et al.* DOK' long-term farming system trial: microbial biomass, activity and diversity affected the decomposition of plant residues. In: Rees R M, Campbell B C, eds. *Sustainable Management of Organic Matter*. Wallingford: CAB I. Publishing, 2001. 363 — 369.
- [8] White, D C, Stair, J O, Ringelberg, D B, Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *Journal of Industry Microbiology*, 1996, 17: 185 — 196.
- [9] Bardgett R D, Hobbs P J, Frostegård A. Changes in soil fungal: bacterial ratios following reductions in the intensity of management of upland grassland. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22: 261 — 264.
- [10] Frostegård A, Bååth E, Tunlid A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.*, 1993, 25: 723 — 730.
- [11] Federle T W. Microbial distribution in the soil—new techniques. In *Perspective in Microbial ecology*. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, 1986. 493 — 498.
- [12] Frostegård A, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22: 59 — 65.
- [13] O'Leary W M, Wilkinson S G. Gram-positive bacteria. In *Microbial Lipids*. Vol 1. Academic Press, London, 1988. 117 — 202.
- [14] Zogg G P, Zak D R, Ringleberg D B, *et al.* Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Sci. Soc.*, 1997, 61: 475 — 481.
- [15] Steinberger Y, Zelles L, Bai Q Y, *et al.* Phospholipid fatty acid profiles as indicators for community structure in soil along a climatic transect in the Judean Desert. *Biology and Fertility of Soil*, 1999, 28: 292 — 300.
- [16] Ratledge C, Wilkinson S G. *Microbial Lipids*. 1988, Vol 1. Academic Press. London.
- [17] Zelles L. Identification of single cultured micro-organisms based on their whole community fatty acid profiles using extraction procedure. *Chemosphere*, 1999, 39: 665 — 682.
- [18] Wang S G, Hou Y L. Effect of diffusion of urea patch on microbial communities in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(10): 2269 — 2274.
- [19] Lovell R D, Jarvis S C, Bardgett R D. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: effects of management changes. *Soil Biology & Biochemistry*, 1995, 27: 969 — 975.
- [20] Bardgett R D, Lovell R D, Hobbs P J, *et al.* Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 1021 — 1030.

参考文献:

- [4] 蔡燕飞, 廖宗文, 章家恩, 等. 生态有机肥对番茄青枯病及土壤微生物多样性的影响. *应用生态学报*, 2003, 14(3): 349 ~ 353.
- [18] 王曙光, 侯彦林. 尿素肥斑扩散对土壤微生物群落结构的影响. *生态学报*, 2004, 24(10): 2269 ~ 2274.