

DOI: 10.5846/stxb201801180138

武志华, 夏冬双, 王雪寒, 马强, 唐凯, 刘惠荣. 利用 PCR-DGGE 技术分析内蒙古西部地区土壤细菌的多样性. 生态学报, 2019, 39(7): - .  
Wu Z H, Xia D S, Wang X H, Ma Q, Tang K, Liu H R. Analysis of bacterial diversity of soil in western Inner Mongolia using PCR-DGGE. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(7): - .

# 利用 PCR-DGGE 技术分析内蒙古西部地区土壤细菌的多样性

武志华, 夏冬双, 王雪寒, 马强, 唐凯, 刘惠荣\*

内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018

**摘要:**为明确内蒙古西部地区土壤细菌的多样性, 利用聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳 PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) 技术对 170 份土壤样品中的细菌丰度和群落结构组成进行了分析, 并研究了土壤细菌多样性与肥力参数的关系。结果表明: 内蒙古西部地区土壤细菌的多样性是比较丰富的, 丰富度指数处于 4 到 60 之间, 香浓指数处于 1.38 到 4.09 之间。不同土壤类型, 其细菌的多样性有明显差异。其中, 新积土、棕钙土、栗钙土和灰钙土中的细菌多样性指数均高于其他类型土壤, 而灰漠土的多样性指数最低。且土壤的不同利用方式也会对土壤细菌多样性有所影响, 其中耕地土壤细菌多样性指数最高, 而未利用土壤的多样性指数最低。细菌多样性与土壤肥力参数的相关性分析结果显示二者之间并无显著的相关性。内蒙古西部地区土壤中的优势种群包括 Proteobacteria (变形菌门)、Bacteroidetes (拟杆菌门)、Firmicutes (厚壁菌门)、Actinobacteria (放线菌门)、Acidobacteria (酸杆菌门)、Gemmatimonadetes (芽单胞菌门)、Nitrospira (硝化螺旋菌门)。可为该地区的土壤生态系统治理与恢复及未来该地区特有微生物资源的开发利用、农业生产指导等提供一定的科学依据。

**关键词:** 变性梯度凝胶电泳; 土壤细菌; 多样性; 内蒙古西部地区; 群落结构

## Analysis of bacterial diversity of soil in western Inner Mongolia using PCR-DGGE

WU Zhihua, XIA Dongshuang, WANG Xuehan, MA Qiang, TANG Kai, LIU Huirong\*

College of Life Sciences of Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

**Abstract:** The purpose of this study was to determine bacterial diversity of soil in the western region of Inner Mongolia. The bacterial abundance and community structure of 170 soil samples collected from the western region of Inner Mongolia were tested using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), and the correlation between bacterial community and soil fertility parameters was analyzed. The results showed that the diversity of bacteria in the western region of Inner Mongolia was relatively rich. The richness index was between 4 and 60 and the Shannon index was between 1.38 and 4.09. There were significant differences in the diversity of bacteria among different soil types. The bacterial diversity index of alluvial soil, brown calcic soil, chestnut soil, and sierozem were higher than that of other types of soil. Furthermore, the manner of soil utilization also affected the diversity of bacteria. The Shannon index and richness of cultivated land were the highest and that of unused soil were the lowest. The correlation analysis between bacterial diversity and soil fertility parameters showed that there was no significant correlation between them. The dominant populations of bacteria in soil in the western region of Inner Mongolia include Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Acinetobacter, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, and Nitrospira. This study can provide a scientific basis for the management and restoration of soil ecosystem and the development and utilization of microbial resources and agricultural

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370058)

收稿日期: 2018-01-18; 网络出版日期: 2018-00-00

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: huirong\_liu@imau.edu.cn

production guidance in this region.

**Key Words:** PCR-DGGE; soil bacteria; diversity; western Inner Mongolia; community structure

细菌种类繁多,对环境、人类和动物既有危害又有用处。一些细菌成为病原体,导致了破伤风、伤寒、肺炎、梅毒、霍乱和肺结核。在植物中,细菌导致叶斑病、火疫病和萎蔫。但一些细菌可以与酵母菌及其他种类的真菌一起用于发酵食物,例如奶酪、泡菜、酱油、醋、酒等的制作。细菌也能够分泌多种抗生素,例如链霉素即是由链霉菌(*Streptomyces*)所分泌的。细菌还能降解多种有机化合物,常被用来清除污染,如嗜甲烷菌(*methanotroph*)可以分解三氯乙烯和四氯乙烯。在生物科技领域中,细菌也有着广泛的运用。细菌与人类的生产和生活关系极为密切,因此研究细菌多样性对于环境系统十分重要,了解环境中的优势菌群和功能菌群具有特殊的指导意义。随着现代分子生物学技术的发展,仍有大量细菌没有被发现,因而对于细菌的研究与开发是非常必要的。

内蒙古西部地区地域辽阔,包括阿拉善、鄂尔多斯、乌海、巴彦淖尔和包头 5 个盟市,以农业和畜牧业为基础产业<sup>[1]</sup>。由于所处纬度较高,边沿有山脉阻隔,气候以温带大陆性季风气候为主。该地区地形地貌复杂,有鄂尔多斯高原、河套平原以及阴山山脉<sup>[2]</sup>,且水资源短缺,水土流失和沙漠化严重<sup>[3]</sup>。整个西部地区以温带荒漠区和温带草原区为主,土壤类型分布较多,包括 38 个土壤亚类。阿拉善与鄂尔多斯等地区沙漠化严重,以风沙土和灰棕漠土为主;包头、巴彦淖尔和乌海地区的土壤主要为栗钙土、灰钙土、棕钙土。土地利用方式多样,有耕地、林地、牧区草地、退化草地、荒地等。由于土壤的营养成分含量、有机物的丰富程度、pH 的大小、以及土壤植被的不同,都会导致细菌分布的不同<sup>[4]</sup>,也可能存在着特殊类型的细菌。

DGGE 技术具有可靠性强、重现性高、方便快捷等优点,该技术已经被应用于各种环境下微生物多样性的研究,如沙漠、海洋、湖泊、沙丘、植物根系土壤等。本研究首次通过 PCR-DGGE 技术<sup>[5-6]</sup>来研究内蒙古西部地区土壤细菌的多样性,为未来该地区的细菌资源开发利用及生态系统的稳定性提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 土壤样品

根据内蒙古西部地区土壤类型及土壤利用方式,于 2014 年与 2015 年的 7—8 月份对 5 个地区的土壤进行布点采样,其中阿拉善 38 份、鄂尔多斯 32 份、巴彦淖尔 45 份、乌海 14 份、包头 41 份,共计 170 份土样,将其放于-80℃冰箱保存备用,具体采样信息详见表 1。

表 1 土壤样品信息

Table 1 Information of soil samples

样品编号 Sample No.	土壤类型 Soil type	利用类型 Utilization type	样品编号 Sample No.	土壤类型 Soil type	利用类型 Utilization type	样品编号 Sample No.	土壤类型 Soil type	利用类型 Utilization type
WH-01	灰漠土	未利用	BT-12	灰褐土	耕地	BM-29	粗骨土	风沙土
WH-02	灰漠土	未利用	BT-13	灰褐土	草地	BM-30	粗骨土	草地
WH-03	粗骨土	未利用	BT-14	森林土	林地	BM-31	盐碱土	未利用
WH-04	潮土	草地	BT-15	灰褐土	未利用	BM-32	风沙土	草地
WH-05	潮土	耕地	BT-16	灰褐土	林地	BM-33	风沙土	未利用
WH-06	盐土	耕地	BT-17	灰褐土	耕地	BM-34	风沙土	未利用
WH-07	盐土	林地	BT-18	新积土	林地	BM-35	灌淤土	草地
WH-08	栗钙土	草地	BT-19	灰褐土	耕地	BM-36	灌淤土	耕地
WH-09	栗钙土	耕地	BT-20	灰褐土	草地	BM-37	灌淤土	耕地
WH-10	风沙土	草地	BT-21	沼泽土	林地	BM-38	灌淤土	耕地
WH-11	风沙土	耕地	BT-22	沼泽土	耕地	BM-39	新积土	耕地

续表

样品编号 Sample No.	土壤类型 Soil type	利用类型 Utilization type	样品编号 Sample No.	土壤类型 Soil type	利用类型 Utilization type	样品编号 Sample No.	土壤类型 Soil type	利用类型 Utilization type
WH-12	风沙土	林地	BT-23	潮土	草地	BM-40	新积土	耕地
WH-13	石质土	草地	BT-24	潮土	耕地	BM-41	盐土	草地
WH-14	风沙土	草地	BT-25	盐土	草地	BM-42	盐土	耕地
ERDS-01	栗钙土	耕地	BT-26	盐土	耕地	BM-43	碱土	草地
ERDS-02	栗钙土	林地	BT-27	潮土	草地	BM-44	碱土	耕地
ERDS-03	栗钙土	草地	BT-28	潮土	耕地	BM-45	棕漠土	耕地
ERDS-04	风沙土	草地	BT-29	风沙土	草地	AL-1	草甸土	草地
ERDS-05	风沙土	耕地	BT-30	风沙土	耕地	AL-2	草甸土	耕地
ERDS-06	栗钙土	耕地	BT-31	风沙土	林地	AL-3	草甸土	未利用
ERDS-07	栗钙土	草地	BT-32	草甸土	耕地	AL-4	草甸土	未利用
ERDS-08	栗褐土	林地	BT-33	草甸土	草地	AL-5	棕漠土	耕地
ERDS-09	栗褐土	草地	BT-34	盐土	耕地	AL-6	棕漠土	草地
ERDS-10	栗褐土	耕地	BT-35	盐土	林地	AL-7	潮土	未利用
ERDS-11	盐土	耕地	BT-36	盐土	草地	AL-8	盐土	未利用
ERDS-12	盐土	林地	BT-37	草甸土	草地	AL-9	盐土	未利用
ERDS-13	风沙土	耕地	BT-38	草甸土	耕地	AL-10	红柳林	未利用
ERDS-14	风沙土	草地	BT-39	石质土	草地	AL-11	棕漠土	未利用
ERDS-15	潮土	耕地	BT-40	栗钙土	草地	AL-12	棕漠土	林地
ERDS-16	潮土	草地	BT-41	栗钙土	耕地	AL-13	胡杨林	耕地
ERDS-17	潮土	耕地	BM-1	黄河边	耕地	AL-14	灰褐土	非耕地
ERDS-18	潮土	草地	BM-2	黄河边	草地	AL-15	灰褐土	林地
ERDS-19	风沙土	耕地	BM-3	潮土	耕地	AL-16	灰褐土	草地
ERDS-20	风沙土	草地	BM-4	潮土	耕地	AL-17	棕钙土	耕地
ERDS-21	风沙土	林地	BM-5	潮土	未利用	AL-18	棕钙土	林地
ERDS-22	风沙土	草地	BM-6	栗钙土	草地	AL-19	灰漠土	牧区草地
ERDS-23	棕钙土	耕地	BM-7	栗钙土	耕地	AL-20	风沙土	耕地
ERDS-24	棕钙土	草地	BM-8	灰褐土	未利用	AL-21	风沙土	未利用
ERDS-25	粗骨土	未利用	BM-9	栗钙土	草地	AL-22	风沙土	耕地
ERDS-26	棕钙土	耕地	BM-10	栗钙土	草地	AL-23	灰漠土	未利用
ERDS-27	棕钙土	草地	BM-11	粗骨土	未利用	AL-24	灰模土	牧区
ERDS-28	灰钙土	草地	BM-12	粗骨土	耕地	AL-25	灰模土	牧区
ERDS-29	灰钙土	耕地	BM-13	未知	林地	AL-26	石质土	牧区
ERDS-30	灰钙土	林地	BM-14	栗钙土	草地	AL-27	石质土	牧区
ERDS-31	灰钙土	耕地	BM-15	栗钙土	耕地	AL-28	石质土	未利用
ERDS-32	灰钙土	草地	BM-16	棕钙土	草地	AL-29	风沙土	未利用
BT-01	栗钙土	草地	BM-17	棕钙土	耕地	AL-30	风沙土	未利用
BT-02	栗钙土	耕地	BM-18	石质土	草地	AL-31	风沙土	未利用
BT-03	栗钙土	耕地	BM-19	石质土	耕地	AL-32	风沙土	未利用
BT-04	栗钙土	草地	BM-20	潮土	耕地	AL-33	灰模土	未利用
BT-05	棕钙土	耕地	BM-21	棕钙土	草地	AL-34	灰模土	未利用
BT-06	棕钙土	草地	BM-22	棕钙土	草地	AL-35	灰漠土	未利用
BT-07	棕钙土	草地	BM-24	梭梭林	林地	AL-36	灰漠土	耕地
BT-08	棕钙土	耕地	BM-25	灰漠土	未利用	AL-37	灰漠土	牧区
BT-09	棕钙土	林地	BM-26	风沙土	耕地	AL-38	灰漠土	牧区
BT-10	栗钙土	耕地	BM-27	风沙土	林地			
BT-11	栗钙土	草地	BM-28	风沙土	草地			

AL: 阿拉善地区, Alashan region; ERDS: 鄂尔多斯地区, Ordos region; WH: 乌海地区, Wuhai region; BM: 巴彦淖尔地区, Bayan Nur region; BT: 包头地区, Baotou region

### 1.1.2 PCR 引物

根据林海龙等<sup>[7]</sup>的方法选用适合细菌 PCR-DGGE 的 V3 区特异性引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,详见表 2。

表 2 本研究所用的引物  
Table 2 The primers used in this study

引物名称 Primers	序列(5'-3') Sequences	扩增基因 Amplify the gene
GC-F341	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGGCGGGGCACGGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG	细菌 16S rRNA
F341	CCTACGGGAGGCAGCAG	细菌 16S rRNA
R518	ATTACCGCGGCTGCTGG	细菌 16S rRNA

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 土壤肥力参数的测定

土壤样品水分含量的测定采用烘干法<sup>[8]</sup>,pH 值的测定参见生态学常用实验研究方法与技术<sup>[9]</sup>,有效磷的测定采用 NaHCO<sub>3</sub>浸提—钼锑抗比色法<sup>[10]</sup>,速效钾的测定采用 NaNO<sub>3</sub>浸提—四苯硼钠比浊法<sup>[11]</sup>,水解氮的测定采用碱解扩散法<sup>[12]</sup>,有机质的测定采用重铬酸钾容量法(稀释热法)<sup>[13]</sup>。

### 1.2.2 土壤总 DNA 提取

由于土壤中的物质繁多,而且复杂,其中的蛋白质、腐殖质等物质可能会抑制 PCR 过程中的关键物质 Taq DNA 聚合酶的活性,最终影响到整个实验的结果,因此土壤总 DNA 的提取质量是利用 PCR-DGGE 技术研究微生物多样性的关键环节,目前土壤总 DNA 的提取方法可以分为两种,分别是直接提取与间接提取方法。本研究参照李靖宇等人<sup>[14]</sup>的方法,将其稍加改进,对土壤进行适当的去除腐殖质处理。依据 Leff<sup>[15]</sup>等人提取土壤 DNA 的方法,在溶菌酶之前加入直径 1 mm 的玻璃珠,涡旋仪强烈震荡,以增加 DNA 的产量。

### 1.2.3 PCR 反应条件

采用 50 μL 反应体系:10×PCRBuffer 5 μL,dNTPs(2.5 mmol/L)4 μL,引物(20 μmol/L)各 0.4 μL,ExTaq(5 U/μL) 0.4 μL,模板(80 ng/μL) 1 μL,补足灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 扩增条件:94℃ 5 min;94℃ 35 s,65—55℃ 40 s,72℃ 50 s,10 个循环(每个循环退火温度降低 1℃);94℃ 35 s,55℃ 40 s,72℃ 50 s,72℃ 1 min,20 个循环。两对引物 GC-F341/R518 与 F341/R518 的反应体系及 PCR 扩增条件均相同。

### 1.2.4 DGGE 方法

采用 Bio-Rad 电泳系统。变性剂为梯度在 40%—60%的 8%聚丙烯酰胺凝胶。用 50 μL 注射器快速上样后,于 60℃条件下 120 V 恒压 5 min 后,再 75 V、150 W 恒压 14 h。硝酸银染色 15 min 后,用去离子水洗脱 10 min<sup>[16]</sup>。将制好的胶移至凝胶成像系统中拍照,图像用 Quantity One 4.6.2 进行分析。利用香农指数、丰富度以及均匀度等指标来比较不同土壤样品中细菌群落的基因型差异,计算公式为:香农指数  $H = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$ ;丰富度  $R = S$ ;均匀度  $E = H/H_{\max} = H/\ln S$ 。其中, $P_i$ 是某一个样品中(即每个泳道)属于第  $i$  种的个体比例,如样品总个体数为  $N$ ,则第  $i$  种个体数为  $n_i$ ,那么  $P_i = n_i/N$ ;  $S$  是某一个样品中(即每个泳道)所有条带的总和。

### 1.2.5 DGGE 切胶回收

用 75%酒精擦拭手术刀片并用酒精灯灼烧,待其冷却后将目的条带从凝胶上切下,置于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 去离子水,颠倒洗涤条带,3000 r/min 离心 1 min 后弃掉去离子水,重复该步骤两遍。加入 50 μL 的 1×TE 缓冲液,以上清液为模板,以不带 GC 夹的引物进行相同程序和体系的扩增,所得 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接后转入大肠杆菌,然后挑取单克隆进行菌落 PCR 后送北京华大公司测序。

### 1.2.6 序列分析

将所得测序结果于 NCBI 数据库的 Blast 程序进行分析及相似性比较,并下载同源性最高的核酸序列,利

用 ClustalX 2.0 程序进行比对后,利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树,进行系统发育分析。

### 1.2.7 数据处理与分析

使用 Quantity One 4.6.2 对 DGGE 图谱进行分析,采用 SPSS 18.0 统计软件对土壤样品的各项参数进行数据处理并对其与细菌多样性指数的相关性进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤肥力参数的测定

对内蒙古自治区西部地区采集的 170 份土壤样品的含水量、pH 值、有机质、有效磷、水解氮以及速效钾的含量进行了测定,将其分别与全国第二次土壤普查的各级土壤养分指标<sup>[17]</sup>进行对比,如表 3 所示,采集的土壤样品中 27.06% 为中性土壤,66.47% 为微碱性土壤;88.24% 的土样含水量低于 16%,处于干旱状态;75.38% 的土壤样品的有机质含量处于缺乏状态;有效磷的含量分布较均匀,每个等级均分布有一定的比例,约 41.77% 的土样处于适宜以下的水平;速效钾的含量分布相对集中,52.94% 的土样处在一个适宜的水平,大约占 44.70% 的土样处于缺乏状态;而水解氮的含量整体处于一个缺乏的状态,甚至 51.18% 的土样水解氮的含量处于很缺乏的水平。

表 3 西部地区土壤养分分级状况

Table 3 Soil nutrient grading scale in the western part of Inner Mmongolia

各级别所占比率 Ratio/%	I	II	III	IV	V	VI
有机质 Organic matter	3.53	2.94	18.24	47.06	24.12	4.12
有效磷 Effective phosphorus	15.88	18.24	24.12	25.29	8.24	8.24
水解氮 Hydrolytic nitroge	1.76	2.35	3.53	11.18	30.00	51.18
速效钾 Available potassium	0	2.35	52.94	33.53	5.29	5.88
含水量 Water content	0	6.47	5.29	14.71	27.06	46.47
pH	5.29	66.47	27.06	0.58	0.58	0

根据土壤类型进行统计分析,表 4 所示为不同土壤类型肥力参数均值。粗骨土、栗褐土、灰褐土、草甸土和灰色森林土为中性土壤,其余类型土样为微碱性土壤;栗褐土的含水量偏高,其余类型土壤均表现出不同程度的干旱状态;沼泽土的水解氮含量最高为 134.80 mg/kg,处于丰富的水平,灰褐土处于缺乏的状态,其余土壤处于很缺乏或极度缺乏的状态;沼泽土的有机质含量同样也是最高的,为 39.00 g/kg,处于丰富的水平,灰褐土与草甸土的有机质含量处于适宜的水平,粗骨土与灰钙土处于很缺乏的状态,其余土壤处于缺乏的状态;虽然粗骨土的有机质含量最低,但其有效磷含量最高,为 31.61 mg/kg,与潮土、盐土、栗钙土、棕钙土和草甸土均处于丰富的水平,而灰色森林土、沼泽土、灰钙土、栗褐土均处于极度缺乏的状态,其余土壤处于缺乏或很缺乏的状态;灰褐土、潮土、盐土、栗褐土与沼泽土的速效钾含量处于适宜的水平,其余土壤处于缺乏的状态。

根据土壤利用方式对各参数进行统计分析,如图 1 所示。土壤的不同利用方式对 pH 值的影响并不明显,而耕地和林地的含水量要高于草地与未利用土壤,未利用土壤含水量最低;对于水解氮的含量,耕地、草地与林地相差不大,但却都明显高于未利用土地;速效钾的含量则均相差较大,由高到低为草地>耕地>林地>未利用土地;未利用土壤、耕地与草地的有机质含量无明显差异,而林地的有机质含量明显高于其他利用方式,这可能是由于其长年落叶导致腐殖质的含量明显高于其他利用方式的土壤;未利用土壤与耕地的有效磷含量无明显差异,且明显高于其他利用方式,与林地有机质含量最高正相反,该利用方式的土壤样品的有效磷含量最低。

表 4 不同土壤类型肥力参数均值

Table 4 Fertility parameters of different types of soils

土壤类型 Soil types	含水量 Water content/%	pH	水解氮 Hydrolytic nitrogen/ (mg/kg)	有机质 Organic matter /(g/kg)	有效磷 Effective phosphorus /(mg/kg)	速效钾 Available potassium/ (mg/kg)
灰漠土 Gray desert soil	4.67de	7.73bc	31.84cd	17.47bc	15.72ab	83.66bcd
粗骨土 Skeletal soil	2.47de	7.47bc	24.59cd	8.11c	31.59a	83.43bcd
潮土 Moisture soil	14.92b	7.90ab	36.92cd	16.04bc	29.14ab	106.36ab
盐土 Saline	8.52bcd	7.94a	29.17cd	16.40bc	23.32ab	109.31ab
栗钙土 Chestnut soil	8.25bcde	7.85bc	51.43bcd	16.00bc	25.60ab	95.79abc
风沙土 Aeolian sandy soil	6.97bcde	7.84ab	29.11cd	13.48c	19.04ab	96.42abc
石质土 Chisley soi	3.38de	7.76ab	58.04bc	18.30bc	13.57ab	98.37abc
栗褐土 Cinnamon soil	26.28a	7.39bc	16.57d	11.99c	2.12ab	101.69ab
棕钙土 Brown calcic soil	6.19bcde	7.66ab	38.24bcd	17.46bc	29.54ab	108.80a
灰钙土 Sierozem	2.13e	7.67ab	20.18cd	8.21c	5.73ab	80.04bcd
灰褐土 Gray cinnamon soil	8.29bcde	7.40bc	67.90b	28.61b	16.91ab	113.43a
新积土 Alluvial soil	11.12bc	7.87bc	16.04d	15.55bc	10.35ab	49.81e
草甸土 Meadow soil	3.67cde	7.07d	53.13bc	20.02bc	22.76ab	65.34cd
灰色森林土 Gray forest soil	12.92bc	7.04c	14.18d	18.91bc	0.24b	52.11d
沼泽土 Bog soil	13.38bc	7.58abc	134.80a	39.00a	5.21ab	108.56ab

小写字母代表 0.05 差异显著性水平

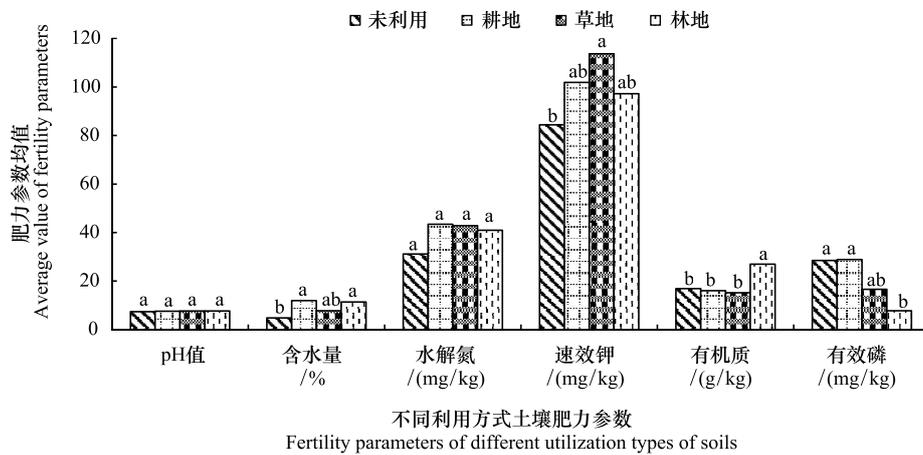


图 1 土壤不同利用方式对各环境参数的影响

Fig.1 Impact of different utilization types of soil on environment parameters

图中小写字母代表 0.05 差异显著性水平

## 2.2 细菌多样性的分析

### 2.2.1 土壤总 DNA 提取

本研究采用直接提取方法,在 SDS-酶结合的基础上对土壤样品做脱腐处理,经过预实验,对提取到的土壤总 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,显示条带不够明亮,如图 2 所示。

本研究采用物理、化学与酶相结合的实验方法,又根据实际情况适当调整脱腐的次数,最终使提取的土壤总 DNA 量明显增加,如图 3 所示。其中 1 号样品为流动荒漠风沙土,单娜娜<sup>[18]</sup>研究表明流动沙土的微生物含量较少,可能是导致优化后提取的 DNA 量仍相对较少的原因。

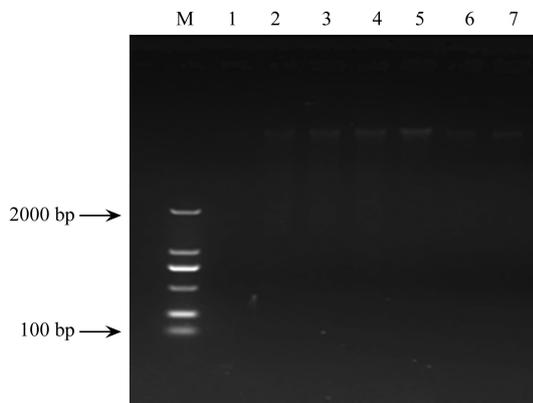


图 2 方法优化前土壤总 DNA 提取结果

Fig.2 DNA extraction of soil samples before the method was optimized

M:DNA Marker;泳道 1—7 分别为土样 BM33、BT40、BT27、BT16、BT32、AL12、BM9 的总 DNA

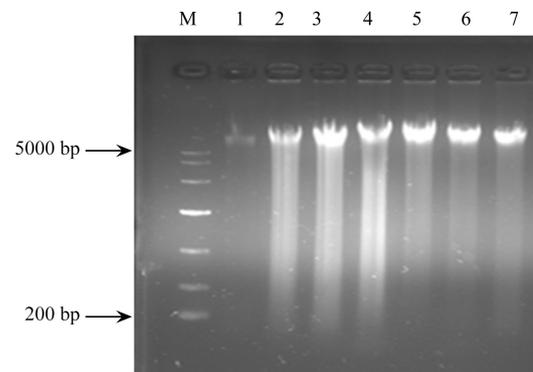


图 3 方法优化后土壤总 DNA 提取结果

Fig.3 DNA extraction of soil samples after the method was optimized

M:DNA Marker;泳道 1—7 分别为土样 BM33、BT40、BT27、BT16、BT32、AL12、BM9 的总 DNA

### 2.2.2 16S rRNA 片段的 PCR 扩增

以提取的土壤总 DNA 为模板,扩增细菌 16S rRNA 基因片段。由于引物前有一段高度重复的 GC 序列,因此对 PCR 扩增条件要求很苛刻,通过多次摸索,最终确定了细菌的 PCR 条件,得到清晰,无杂带的扩增条带,如图 4 所示,扩增片段大小约为 220 bp。

### 2.2.3 PCR 产物的 DGGE 分析

将扩增的细菌 16S rRNA 基因片段纯化后进行 DGGE 电泳检测。图 5 为部分样品的细菌 DGGE 电泳图,使用 Quantity One 4.6.2 对所有 DGGE 图谱进行分析。结果显示,内蒙古西部地区土壤样品的细菌 DGGE 图谱中的条带普遍分布均匀,条带数目较多,优势条带明显。

图 6 所示的为用 Quantity one 软件分析图 5 后得到的条带分布及强度示意图。1#、10#、11#泳道土样的利用方式均为草地,但 1#为栗钙土,10#为灰褐土,11#为潮土,由图 6 可知 10#泳道的条带数明显多于 11#泳道和 1#泳道,且 1#泳道的条带数最少,说明相同利用方式的不同土壤类型对菌群的多样性有明显影响。示意图

中 4#、5#、7#泳道为相同土壤类型,但是其条带数目与条带强度明显不同,4#有 24 个条带,5#有 32 个条带,而 7#泳道有 34 个条带,且 7#泳道主要分布在胶图的上半部分,4#与 5#主要分布在下半部分,4#与 5#的优势条带大体一致,7#泳道与 4#、5#有相同的优势条带也有不同的优势条带,由此可知 7#土壤菌群分布与 4#、5#明显不同,图谱中 4#为未利用淋浴灰褐土,5#都为耕地淋浴灰褐土,7#为草地淋浴灰褐土,说明不同利用方式对菌群的分布有明显影响。9#与 7#泳道为相同类型土壤,土壤的利用方式也都为耕地,条带数与优势条带基本保持一致,可知微生物类群大致相同。对内蒙古西部地区其他土壤的分析也基本遵循这一规律。

### 2.2.4 多样性指数分析

将细菌 16S rRNA 片段的 DGGE 图谱进行标准化后通过多样性指数的计算以分析不同土壤类型的细菌分布特点,包括香浓指数(H),丰富度(S),均匀度(Eh)三个指标,如表 5 所示。香浓指数是微生物的多样性

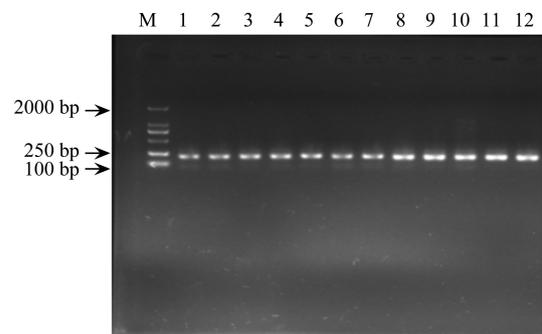


图 4 细菌 16S rRNA 片段 PCR 产物电泳结果图

Fig.4 PCR products of the bacterial 16S rRNA fragments

M:DNA Marker;泳道 1—12 为样品 BT4、BT4、BT14、BT15、BT16、BT8、BT17、BT18、BT19、BT20、BT23、BT22 总 DNA 为模板的 PCR 扩增产物

指数<sup>[19]</sup>,其数值越大多样性越丰富;丰富度是指一个群落结构中的物种数目;均匀度指数越接近 1,表明群落结构组成越均匀。将所有土样按照土壤类型进行归类,计算平均值后比较,香浓指数由高到低为新积土、灰钙土、棕钙土、栗钙土、灰褐土、沼泽土、潮土、粗骨土、石质土、风沙土、草甸土、盐土、栗褐土、灰漠土;丰富度由高到低为新积土、棕钙土、栗钙土、灰钙土、沼泽土、灰褐土、潮土、风沙土、粗骨土、石质土、草甸土、盐土、栗褐土、灰漠土;均匀度指数由高到低为灰漠土、灰钙土、灰褐土、棕钙土、潮土、石质土、粗骨土、栗褐土、栗钙土、盐土、草甸土、风沙土、沼泽土、新积土、灰色森林土。由此可知,新积土中的细菌物种数目最为丰富,灰钙土、棕钙土与栗钙土的细菌物种数目次之,也比较丰富,而灰漠土的细菌物种数目最少,其他土壤类型的居中;所有类型土壤的均匀度指数均接近于 1,说明其群落结构组成都比较均匀,土壤类型对细菌群落结构组成的均匀度影响不明显。

若将所有土样按照土壤利用方式进行归类,对香浓指数、丰富度以及均匀度三个指标计算平均值后比较,如表 6 所示。香浓指数与丰富度由高到低均为耕地土>草地土>林地土>未利用土壤,且耕地、草地与林地土壤样品的香浓指数与丰富度相差不多,但都明显高于未利用土壤的香浓指数与丰富度,说明这三种土壤利用方式的细菌物种数目要明显比未利用土壤的丰富。结合不同土壤利用方式对各参数的影响可知,土样利用方式对水解氮的含量与香浓指数及丰富度的影响相同,推测

1# 2# 3# 4# 5# 6# 7# 8# 9# 10# 11# 12#

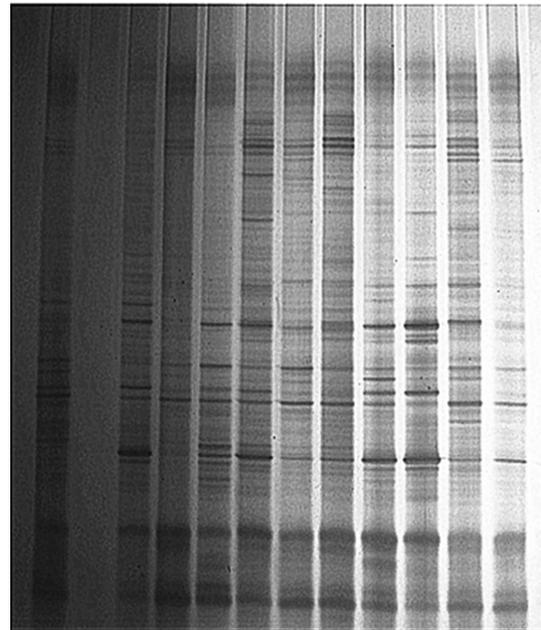


图 5 部分土壤样品细菌 16S rRNA 的 PCR 产物 DGGE 图谱

Fig.5 DGGE image of PCR products of bacterial 16S rRNA of partial soil samples

图中 1#—12# 分别为土样 BT4、空白、BT14、BT15、BT16、BT8、BT17、BT18、BT19、BT20、BT23、BT22 DNA 的 PCR 产物 DGGE 图谱

表 5 不同土壤类型细菌多样性指数

Table 5 Bacterial diversity index of different soil types

土壤类型 Soil types	香浓指数 (H) Shannon diversity	丰富度 (S) Richness	均匀度 (E) Evenness
灰漠土 Gray desert soil	2.4356d	13.2857e	0.9975a
粗骨土 Skeletal soil	3.1142bc	23.2500cde	0.9936ab
潮土 Moisture soil	3.2126abc	25.9286bed	0.9955ab
盐土 Saline	2.8441cd	18.0909de	0.9897ab
栗钙土 Chestnut soil	3.3303ab	31.0476bc	0.9916ab
风沙土 Aeolian sandy soil	3.0625bc	24.4118bede	0.9879ab
石质土 Chisley soi	3.0798bc	23.0000cde	0.9943ab
栗褐土 Cinnamon soil	2.8115cd	17.6667de	0.9930ab
棕钙土 Brown calcic soil	3.3617ab	31.2000bc	0.9964a
灰钙土 Sierozem	3.3987ab	30.3333bc	0.9966a
灰褐土 Gray cinnamon soil	3.2904abc	28.3750bcd	0.9964a
新积土 Alluvial soil	3.6863a	43.0000a	0.9801b
草甸土 Meadow soil	2.9949bc	21.2500cde	0.9879ab
灰色森林土 Gray forest soil	3.4330ab	35.0000ab	0.9656c
沼泽土 Bog soil	3.2902abc	30.0000bc	0.9825ab

小写字母代表 0.05 差异显著性水平

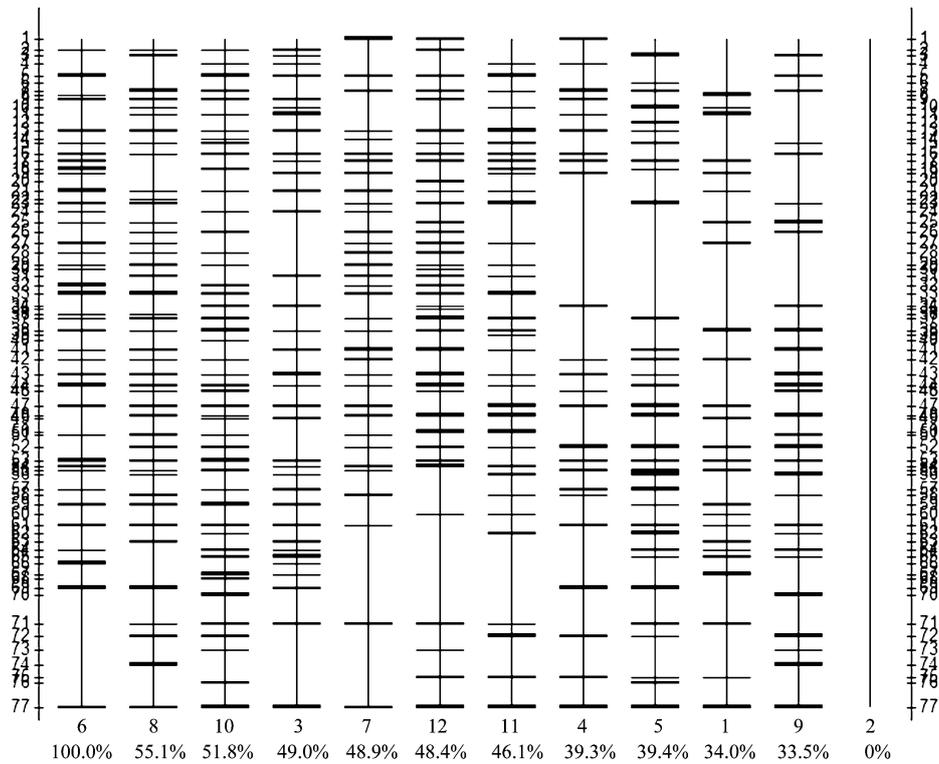


图 6 部分土壤样品细菌 16S rRNA 的 PCR 产物 DGGE 电子图谱(与图 5 对应)

Fig.6 DGGE electron image of PCR products of bacterial 16S rRNA of partial soil samples (corresponding to figure 5)

在环境参数中,水解氮的含量可能是影响细菌香浓指数与丰富度的主要因素;不同土壤利用方式的均匀度指数由高到低为未利用土>草地土>耕地土>林地土,但其数值均接近于 1,说明其群落结构组成都比较均匀,土壤利用方式对细菌群落结构组成的均匀度影响不明显。

表 6 不同土壤利用方式细菌多样性指数

Table 6 Bacterial diversity index of different utilization patterns of soils

土壤类型 Soil types	香浓指数(H) Shannon diversity	丰富度(S) Richness	均匀度(E) Evenness
未利用 Unused soil	2.7402b	17.4667b	0.9961a
耕地 Cultivated land	3.2341a	28.0000a	0.9923a
草地 Grassland	3.1834a	26.2564a	0.9935a
林地 Woodland	3.1002a	25.4286a	0.9838b

小写字母代表 0.05 差异显著性水平

### 2.2.5 系统发育树的构建

将内蒙古西部地区所有土壤样品的 DGGE 指纹图谱上的优势条带进行切胶回收,测序,由于有一部分优势条带胶回收 DNA 量没有达到测序要求,导致测序失败,只得到大部分优势条带的测序结果,将这部分序列在 NCBI 上与标准菌株比对,选取同源性高的菌株进行系统进化树的构建。优势条带胶回收测序后共得到了 35 个细菌 16S rRNA 基因序列,选取 27 个同源性相近的标准菌株构建系统发育树,如图 7 所示。由系统发育树可知,优势菌群大概分为两簇,其中一簇均与未被培养的标准菌株同源性相近,另外一簇多数都与可培养的标准菌株同源性相近。优势菌群共划分为 7 个门 19 个属,分别为 Proteobacteria(变形菌门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)、Actinobacteria(放线菌门)、Acidobacteria(酸杆菌门)、Gemmatimonadetes(芽单胞菌门)、Nitrospira(硝化螺旋菌门)。其中 Proteobacteria(变形菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)为多数样品的优

势菌群。19 个属分别为 *Corynebacterium* (棒状杆菌属)、*Sunxiuqinia*、*Paracoccus* (副球菌属)、*Sorangium* (堆囊菌属)、*Alicyclobacillus* (脂环酸芽孢杆菌属)、*Reyranalla* (未分类螺旋菌目)、*Prallsarella*、*Phreatobacter*、*Stenotrophobacter*、*Hankyongella*、*Enhydrobacter* (栖水菌属)、*Termodesnlfovibrio*、*Sphingomonadaceae* (鞘脂单胞菌属)、*Oxalicibacterium*、*Rhodococcus* (红球菌属)、*Pesulfotomaculum* (脱硫肠杆菌属)、*Paenibacillus* (类芽孢杆菌属)、*Burkholderia* (伯克氏菌属)、*Pasteurella* (巴斯德菌属), 还有两个 Bacteloidets (未分类拟杆菌门) 和 Alphaproteobacteria (未分类变形菌门), 表现出了较高的多样性。其中与未被培养的菌株亲缘关系较近的有 10 株, 占优势菌群的 28.6%, 其中的八株都集中在发育树的同一簇上, 表示这些未被培养的优势菌群亲缘关系较近。

### 2.3 细菌多样性与土壤理化性质的关系

将土样的含水量、pH、有机质、水解氮、有效磷和速效钾的含量与细菌的香浓指数、丰富度以及均匀度利用 SPSS 进行相关性分析, 结果如表 7 所示, 香浓指数、丰富度以及均匀度与 pH、含水量、水解氮呈正相关, 与有机质以及速效钾的含量呈负相关, 但由于相关系数的绝对值均较低, 说明它们之间的相关性并不显著。

表 7 土壤肥力参数与细菌多样性指数的相关系数 (n=109)

Table 7 Correlation coefficient between soil fertility parameters and bacterial diversity index

皮尔森相关系数 Pearson correlation	香浓指数 (H) Shannon diversity	丰富度 (S) Richness	均匀度 (Eh) Evenness
pH	0.026	0.022	0.078
含水量 Water content	0.123	0.117	0.053
有机质 Organic matte	-0.121	-0.059	-0.347**
有效磷 Available phosphorus	0.032	-0.036	0.099
速效钾 Available potassium	-0.027	-0.073	-0.045
水解氮 Hydrolytic nitrogen	0.127	0.134	0.043

## 3 讨论

对内蒙古西部地区的土壤参数进行分析统计, 可知该地区的土样基本为中性偏碱性, 且土样的含水量、水解氮、有机质和有效磷的含量基本处于适宜以下的水平, 而有效钾的含量则相对较高, 处在适宜的水平, 但单一元素的适宜并不能改善养分整体的肥力状况。由赵业婷<sup>[20]</sup>对陕西省关中地区土壤养分进行的分析可知, 该地区有机质、速效氮、速效磷及速效钾的含量分别处于土壤养分分级标准的第 5、4、3、2 级, 即除有机质处于缺乏的状态外, 其他含量均处于适宜及适宜以上的水平。付巧玲<sup>[21]</sup>在对河南省郑州市蔬菜基地的土壤资源评价中分析得出该市郊土壤肥力中等, 除速效磷含量较低外, 其他养分含量中等。相比可知内蒙古西部地区土壤旱化严重, 土壤肥力水平较低, 由此也可以解释该地区风沙及沙漠化严重、植被退化等一系列的生态环境恶化问题。

在对土样中细菌多样性的分析后可知, 新积土、棕钙土与栗钙土的香浓指数及丰富度均相对较高, 栗褐土和灰漠土则相对较低。新积土是由河流流水沉积物或山丘、河谷低处的洪积物和堆积物发育而成, 多数是肥力水平较高的农耕地, 而棕钙土和栗钙土等是我国北方分布范围极广的草原土壤, 钙积作用强, 相对西部地区其他土壤来说较肥沃, 同时棕钙土地区光热资源丰富, 这都可能是细菌分布较为丰富的主要原因。栗褐土风蚀严重, 母质特征明显, 灰漠土则是石膏盐层土中稍微湿润的类型, 是温带漠境边缘细土物质上发育的土壤, 有盐化和碱化的缺点, 这可能是该类型土壤细菌多样性指数较低的原因。

在本研究中, 由于土壤利用方式的不同而在相同地区的相同类型土壤中细菌多样性出现了一定的差异性, 土壤的利用方式不同可能会影响到土壤微生物结构与多样性, 此外, 内蒙古西部地区降雨量、温度与地形等诸多因素都有很大的区别<sup>[22]</sup>, 可能导致不同地区的相同土壤类型的微生物结构差异很大。研究中发现, 相同类型的土壤的整体微生物结构中草地的微生物比耕地的微生物丰富, 如本文图 5 中 4# 为未利用淋浴灰褐

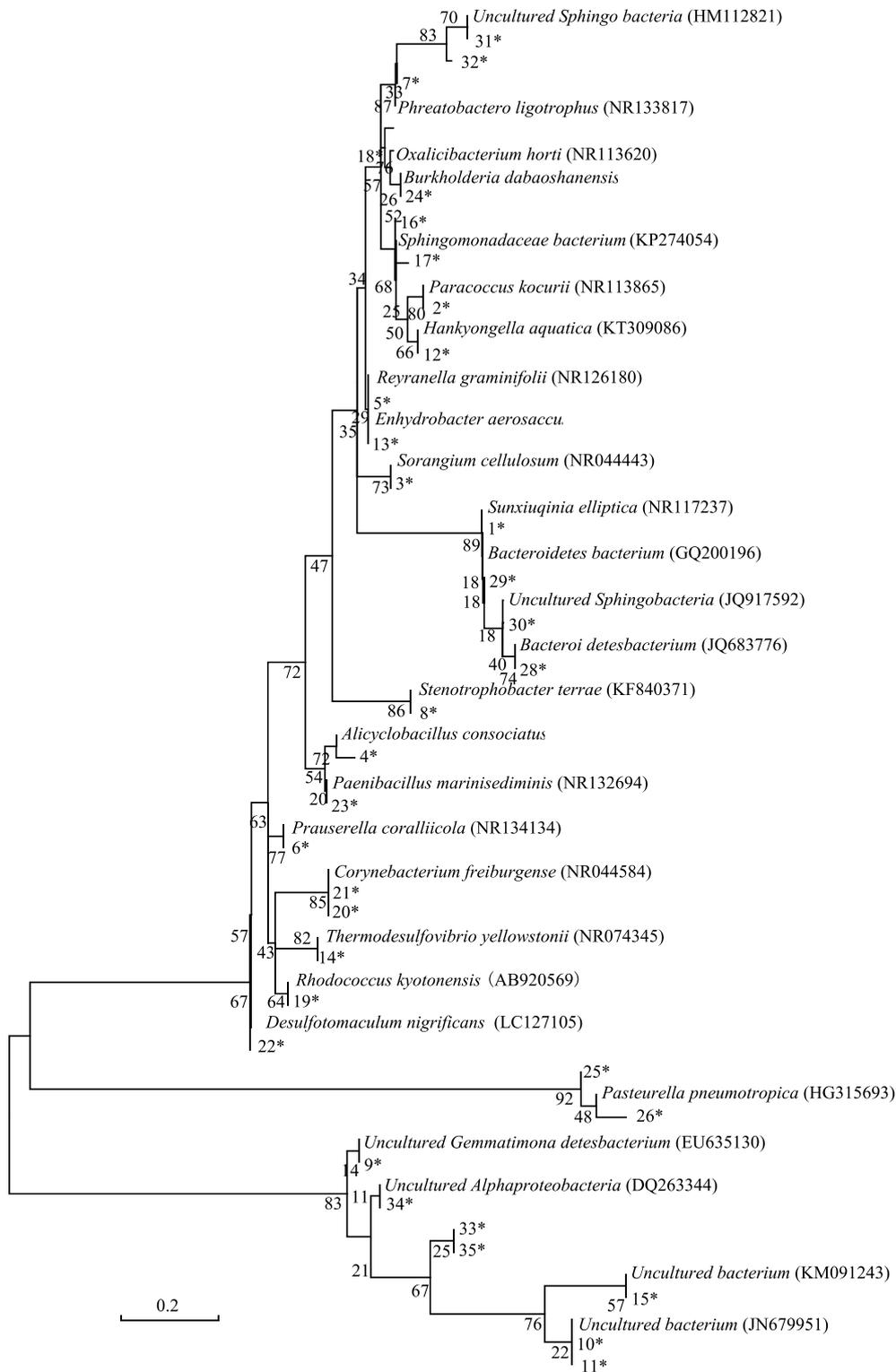


图 7 土壤细菌 16S rRNA-DGGE 优势条带系统进化树

Fig.7 The phylogenetic tree of soil bacterial 16S rRNA-DGGE dominant bands

土,5#都为耕地淋浴灰褐土,7#为草地淋浴灰褐土,7#泳道的细菌条带数明显多于4#与5#泳道。由于内蒙古西部地区地域辽阔,土壤类型众多,土壤利用方式多样,加之产生细菌多样性差异的原因众多,包括重金属污染、温度、盐度等<sup>[23-25]</sup>都可能导致细菌多样性的差异。

经过 16S rRNA 基因序列测序比对后总共得到了 7 个门的细菌优势条带,分别为 Proteobacteria(变形菌

门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)、Actinobacteria(放线菌门)、Acidobacteria(酸杆菌门)、Gemmatimonadetes(芽单胞菌门)、Nitrospira(硝化螺旋菌门),共属于19个属,其中Proteobacteria(变形菌门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)与Actinobacteria(放线菌门)的菌种为多数样品的优势菌群。以上结果基本与张星星<sup>[26]</sup>、张善利<sup>[27]</sup>等人的研究基本一致。吴永胜等<sup>[28]</sup>对内蒙古不同退化阶段的荒漠草原进行研究发现荒漠草原中土壤微生物的数量最多的为细菌,其中优势菌群为Proteobacteria(变形菌门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)和Firmicutes(厚壁菌门),明显少于本研究中发现的优势菌群种类。细菌在人类生产生活中扮演着重要的角色,如Proteobacteria(变形菌门)中的粘细菌除了产生可以应用于临床的抗生素外,还产生与抗肿瘤有关的物质<sup>[29-30]</sup>;Nitrospira(硝化螺旋菌门)中的硝化细菌在农业生产以及氮污染环境方面都具有重要的作用<sup>[31-32]</sup>,了解这些菌群的分布对于评价内蒙古西部地区土壤环境稳定性以及开发利用微生物资源都具有重要的指导意义。

本研究发现土样的含水量、pH、有机质、水解氮、有效磷和速效钾的含量与细菌的香浓指数、丰富度以及均匀度之间的相关性并不显著。杨菁等<sup>[33]</sup>发现影响降香黄檀混交林土壤细菌群落结构和细菌多样性的主要土壤理化因子除了pH值和有机质外,还有脲酶和多酚氧化酶,而这两项参数在该研究中并未测定。李鹏等<sup>[34]</sup>在研究水稻秸秆还田时间对土壤真菌群落的结构影响时发现土壤有机碳、pH和速效磷是影响菌群结构及多样性变异的主要因素;靳正忠<sup>[35]</sup>等通过探究沙漠人工绿地土壤微生物与环境因子的关系,认为全氮和速效氮是影响微生物数量的主要因素;张瑞娟<sup>[36]</sup>的研究结果显示钾素和氮素对土壤微生物的多样性影响较大。由此可知土壤中有有机质、氮、磷、钾等元素是影响微生物多样性的重要养分因子。这与本文的研究结果略有不符,可能是由于影响细菌多样性的原因众多,土壤类型与土壤的利用方式也会对其产生影响,而上述研究人员的实验结果前提是其采取的土壤样品多为同一利用方式。此外,也可能还有其他环境因子的影响,比如微量元素、金属离子等,但本研究尚未对其进行检测。

#### 4 结论

本研究首次对内蒙古西部地区土壤中的细菌多样性进行了分析。内蒙古西部地区细菌资源较为丰富,其多样性受到土壤类型及土壤利用方式的显著影响。该地区土壤中的优势菌群包括Proteobacteria(变形菌门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)、Actinobacteria(放线菌门)、Acidobacteria(酸杆菌门)、Gemmatimonadetes(芽单胞菌门)、Nitrospira(硝化螺旋菌门)。本研究为今后该地区的细菌资源开发利用以及进一步研究其多样性提供了基础数据。

#### 参考文献(References):

- [1] 王春美,王春丽. 内蒙古西部地区生态环境治理对策. 内蒙古电大学刊, 2010, (3): 2-4.
- [2] 冯学武,王弋,吴丽萍. 内蒙古西部生态环境综合评价研究. 中国沙漠, 2003, 23(3): 322-327.
- [3] 刘红霞. 内蒙古西部地区的生态环境建设. 西部资源, 2005, (6): 46-49.
- [4] McCarthy A J, Williams S T. Methods for studying the ecology of actinomycetes. Methods in Microbiology, 1990, 22: 533-563.
- [5] 陈硕,李辉,杨世忠,牟伯中. PCR-DGGE用于检测油田产出液中烃降解菌的多样性. 微生物学杂志, 2010, 30(2): 1-6.
- [6] 谢科,余晓峰,郑海松,宗凯,连英琪,刘国庆. 传统分离培养结合PCR-DGGE技术分析广式腊肠中优势菌. 食品科学, 2013, 34(4): 157-160.
- [7] 林海龙,李伟光,闫险锋,任南琪. 中药废水污泥群落结构解析中PCR-DGGE引物的选择与评价. 环境科学, 2011, 32(5): 1505-1510.
- [8] 叶厚源,张金畅. 介绍一种土壤湿度速测法. 云南林业科技, 1984, (1): 63-66.
- [9] 章家恩. 生态学常用实验研究方法与技术. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [10] 邢晓丽,岳志宏,陈瑞鹤,唐刚强. 土壤有效磷测定方法及注意事项. 河南农业, 2011, (2): 48-49.
- [11] 李西开,张淑民,周斐德. 四苯硼比浊法测定土壤速效钾. 土壤通报, 1982, (5): 39-42.
- [12] 李金彦. 土壤水解性氮的测定(碱解扩散法). 农业科技与信息, 2010, (10): 15-15.
- [13] 季天委. 重铬酸钾容量法中不同加热方式测定土壤有机质的比较研究. 浙江农业学报, 2005, 17(5): 311-313.

- [14] 李靖宇, 赵吉, 边玉, 武琳慧, 于景丽. 湿地土壤微生物 DNA 提取及其脱腐技术. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1130-1137.
- [15] Leff L G, Dana J R, McArthur J V, Shimkets L J. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1141-1143.
- [16] Bassam B J, Caetano-Anollés G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 1991, 196(1): 80-83.
- [17] 丁一秀. 鄂尔多斯高原地区粘细菌的分离鉴定及其拮抗致病疫霉活性的初步分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- [18] 单娜娜, 潘伯荣, 文启凯, 罗明, 赖波. 塔克拉玛干沙漠腹地人工绿地土壤微生物生态学特性研究. 干旱区研究, 2001, 18(4): 52-56.
- [19] Kwiatkowski R E. The use of the Shannon-Wiener diversity index to delineate the horizontal distribution of crustacean zooplankton communities in Lake Superior, 1973. Hydrobiologia, 1980, 68(3): 247-256.
- [20] 赵业婷. 基于 GIS 的陕西省关中地区耕地土壤养分空间特征及其变化研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [21] 付巧玲. 郑州市蔬菜基地的土壤资源评价[D]. 郑州: 河南农业大学, 2005.
- [22] 侯德坤. 内蒙古西部地区持久性有毒物质的分布特征及生态效应研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2014.
- [23] 张记霞. 土壤微生物多样性及其影响因素. 农民致富之友, 2015, (24): 137-137, 231-231.
- [24] 黄进勇, 周伟. 农田土壤微生物多样性的影响因素及效应//生态学及全面·协调·可持续发展——中国生态学会第七届全国会员代表大会论文摘要荟萃. 中国生态学会, 2004: 2-2. (四川省绵阳市)
- [25] 云文丽, 侯琼, 李友文, 王永利. 内蒙古地区土壤水文特征的空间分布. 干旱区资源与环境, 2013, 27(2): 193-197.
- [26] 张星星. 内蒙古荒漠生物土壤结皮及下层土壤微生物多样性和群落结构研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.
- [27] 张善利. 内蒙古不同退化程度草原土壤细菌群落多样性研究[D]. 大连: 中国科学院研究生院(大连化学物理研究所), 2007.
- [28] 吴永胜. 内蒙古荒漠草原不同退化阶段土壤微生物变化的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2008.
- [29] 钱云开. 纤维堆囊菌胞内脂类内含物成分、形成及其对埃博霉素生物合成的影响[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [30] 李越中. 纤维堆囊菌 Soce90 菌株发酵合成新型抗癌物质 epothilones 的营养控制. 中国抗生素杂志, 1998, (6): 22-26.
- [31] 孙瑜. 堆肥过程中硝化细菌和反硝化细菌多样性的分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [32] 朱晓东, 张根玉, 朱雅珠, 张海明, 施永海. 硝化细菌的生物学特性以及在水产养殖中的应用. 水产科技情报, 2009, 36(5): 221-224.
- [33] 杨菁, 周国英, 田媛媛, 刘倩丽, 刘成锋, 杨权, 周洁尘. 降香黄檀不同混交林土壤细菌多样性差异分析. 生态学报, 2015, 35(24): 8117-8127.
- [34] 李鹏, 李永春, 史加亮, 郑宪清, 武国干, 蒋玮, 赵凯, 明凤, 潘爱虎, 吕卫光, 唐雪明. 水稻秸秆还田时间对土壤真菌群落结构的影响. 生态学报, 2017, 37(13): 4309-4317.
- [35] 靳正忠, 雷加强, 徐新文, 李生宇, 赵思峰, 邱永志, 许波, 谷峰. 沙漠腹地人工绿地土壤微生物变异与土壤环境因子关系的研究. 中国生态农业学报, 2008, 16(6): 1358-1364.
- [36] 张瑞娟. 不同土地利用方式对土壤养分和微生物群落结构的影响研究[D]. 太原: 山西大学, 2014.