

微生物研究在土壤质量评估中的应用*

田耀华^{1, 2} 冯玉龙^{1* *}

(¹中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部 昆明 650223)

(²云南省热带作物科学研究所 云南景洪 666100)

摘要 为了防止土壤退化,实现资源的持续利用,必须对土壤质量进行评估。传统的理化指标已难满足需要,寻找能够全面反映土壤质量动态变化和判别胁迫环境或人为干扰下土壤质量变化的灵敏指标,已成为土壤生态学的研究热点。土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,在生物地球化学循环过程中有重要的作用,对土壤环境变化和胁迫的反应十分灵敏。但由于土壤微生物种类繁多且难以培养,限制了其在土壤质量评价中的应用。近年来围绕土壤微生物总量、活性和组成的测定发展出了很多新的技术,如微生物生物量测定、土壤酶活性测定、土壤诱导呼吸强度测定、Biolog微量分析、纯培养、磷脂脂肪酸谱图分析和分子生物学技术等,极大地促进了微生物指标在土壤质量评价中的应用。本文就这3个方面的土壤微生物研究技术及其在土壤质量评价中的应用进行评述。表1参70

关键词 土壤微生物;生物量;多样性;土壤质量

CLC S154.3

Application of Microbial Research in Evaluation of Soil Quality*

TIAN Yaohua^{1, 2} & FENG Yulong^{1* *}

(¹Kunming Section, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223 China)

(²Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinhong 666100 Yunnan China)

Abstract It is necessary to evaluate soil quality in order to prevent soil degradation and realize sustainable use of resources. The traditional physicochemical measures can not meet this need. Therefore, the study on soil ecology has become a hot research that aims to find out sensitive indices that can comprehensively reflect the dynamic changes in soil quality under different situations. Soil microbes are the important components of soil ecosystem, exhibiting the important role in biogeochemical cycle. They are very sensitive to the changes of soil environments. However, their applications in the evaluation of soil quality are limited by the facts that soil microbes comprise various species and most of them are difficult to be cultivated. In recent years, many new techniques have been developed for this purpose and they can greatly promote the use of soil microbes in the evaluation of soil quality. These techniques include the measurements of microbial biomass, enzyme activity, biodiversity of soil microbes, substrate-induced respiration of soil. Biolog analysis, pure cultivation, phospholipid fatty acid analysis and molecular methods. In this paper, these techniques and their applications in the evaluation of soil quality are reviewed. Tab 1, Ref 70

Keywords biodiversity, biomass, soil microbe, soil quality

CLC S154.3

人口的不断增长和土地开发利用强度的不断加大引发了诸如地下水污染、土壤侵蚀及荒漠化、保水能力下降、肥力下降、污染物增多等土地退化问题^[1]。大规模的生态系统结构和功能的恢复重建已提上议事日程^[2~4],土壤作为生态系统中重要的组成部分,吸引了众多的国际组织和研究机构的关注^[1, 5, 6]。为了防止土壤质量退化,实现土壤资源的持续利用,对土壤质量的评估和预测显得越来越重要,传统的理化指标已难满足需要。因而寻找能够全面反映土壤肥力动态变化和判别胁迫环境或人为扰动下土壤生态系统质量的早期预警指标,已

经成为现代土壤生态学的一个迫切任务^[7]。

土壤微生物是土壤生态系统的基本组分,由于土壤微生物的比表面积远远大于动物和植物,可与环境因子充分作用,因此与植物或动物群落相比,土壤微生物对环境改变和胁迫的反应更敏感^[1, 8, 9]。但是土壤微生物种类繁多且难以培养,考察其种类和数量一直是个极其艰巨的任务^[10~12]。为克服“培养”这个难点,近年来基于生理学、生物化学和分子生物学发展出了多种新的研究方法,极大地促进了微生物指标在评价土壤质量中的应用。目前,土壤微生物研究主要有3个方面的内容:一是微生物总量,通常以微生物库(如微生物生物量)和流(C和N循环)表示;二是微生物活性,即对输入养分的代谢反应,常用技术包括土壤酶活性和土壤诱导呼吸(SR)强度测定、Biolog微量分析等;三是微生物组成,即各种微生物或功能群的丰度,常用技术包括微生物纯培养、微生物生物标记物、微生物分子

收稿日期: 2006-11-21 接受日期: 2007-02-05

* 中国科学院知识创新工程重大项目(KSCX1-SW-13-0X-0X)资助
Supported by the Key Project of Knowledge Innovation Engineering of the Chinese Academy of Sciences (KSCX1-SW-13-0X-0X)

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: fty@xtbg.ac.cn)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

生物学技术等^[13-15]。本文就这三方面的微生物研究方法及其在土壤质量评估中的应用进行评述。

1 土壤微生物量

在生物地球化学循环中,物质在生态系统中的滞留被称为“库”(Pool),而C、N等有机物的循环被称为“流”(Flux)。土壤微生物是土壤生态系统中库和流变化的巨大原动力^[14],其变化必然导致土壤生态系统中库和流的变化。土壤微生物生物量和呼吸是表示土壤微生物群落总代谢水平的较好指标。测定土壤微生物生物量的方法很多,传统方法是直接镜检观察单位土壤中微生物的数目、大小,再根据假定的密度及干物质含碳量换算成微生物生物量。这种方法费时且不准确,不适于大量样品的分析。近年来相继出现的一些方便迅速的测定方法,按其测试原理可分为成分分析法和熏蒸法两种。成分分析法是根据微生物中某种特定成分的含量来确定微生物生物量;而熏蒸法又分为氯仿熏蒸培养法和氯仿熏蒸提取法,均可测定微生物生物量碳或者生物量氮。

Insam和Haselwandter(1989)对冰河消退时土壤微生物碳含量的研究表明,微生物生物量与冰河峰面消退程度和植被盖度均呈正相关^[16]。Ohtonen等(1999)对美国华盛顿州Lyman冰河的研究也得到类似结果^[17]。在其它一些受自然干扰的地区,也发现土壤微生物生物量随自然生态恢复进程而增加^[18-21]。在人为干扰环境下,Insam和Domisch(1988)对两个露天采煤废弃地进行生态恢复,也发现随恢复时间推移,农田和林地中土壤微生物生物量均在增加,而呼吸熵降低^[22]。这些结果与Odum(1969)提出的生态系统演替过程中能量最优化理论相符,即随生态系统成熟度的增加,CO₂放总量与生物量的比值降低^[23]。1997年,Odum再一次证实呼吸熵随演替而降低,随干扰而升高^[24]。尽管有众多的研究认为土壤微生物总量可表征土壤质量,但Zeller等(2001)通过研究欧洲阿尔卑斯山废弃的亚高山草地,发现土壤微生物中细菌生物量降低,而真菌生物量升高,并认为这种由细菌向真菌的转变比总生物量更能说明生态恢复的效应^[25]。微生物总量作为生态恢复的指示物可能存在敏感性差和不全面的缺陷。

2 土壤微生物活性

2.1 土壤酶

通常认为土壤酶起源于土壤微生物,是催化土壤中生物和生物化学过程持续进行的重要因素。由美国国家环保局(USEPA)资助、Dick主持的“Soil enzyme stability as an ecosystem indicator”项目(1998~2000)探讨了土壤酶活性作为土壤质量和生态系统功能指标的可行性以及土壤酶活性对农业管理措施的响应,建立了土壤酶活性与其它土壤理化因子间的概念模型^[26-27]。Badiane等(2001)也提出可以用土壤酶活性监测半干旱地区受干扰生境的土壤质量,并证实了土壤酶活性与生态恢复年限之间有显著的相关性^[28]。Harris和Birch(1989)曾经用土壤酶活性和氮硝化能力反映露天采矿后土壤质量变化,发现两者均随自然恢复时间延长而增加,生态恢复能明显增强氮的矿化速率^[29]。Vance和Entry(2000)在研究美国俄勒冈州山间荒地和红杉林的演替过程时,发现土壤酶活性比土壤微生物生物量能更好地反映土

壤有机质的累积^[30]。但在土壤微生物研究中,土壤酶测定的一个最大弱点是不能直接反映土壤中实际的微生物状况。

2.2 土壤诱导呼吸

Anderson和Domisch(1978)首先发现,当向土壤中加入足量的葡萄糖使土壤酶催化的反应充分进行时,土壤CO₂释放速率与微生物生物量呈线性相关^[31]。在前人的研究基础上,Degens和Harris(1997)提出底物诱导呼吸(Substrate-induced respiration)的微生物分析方法,即通过土壤微生物对添加的碳源底物的代谢强度,来反映土壤中微生物种类和生物量^[32]。Schipper等(2001)运用这种方法研究了泥石流、火山喷发、冰川退却等自然干扰后植物演替过程中土壤的代谢反应,发现一旦输入有机质,干扰地的异养代谢反应就开始增强,而在此之前代谢缓慢^[33]。这个结果与Grime的驼峰模型(Humpback model)相符合,即缓慢—增多—缓慢的趋势^[34]。底物诱导呼吸法适用的土壤范围较宽,但受土壤pH值及含水量的影响较大,特别是碱性土壤,由于CO₂溶解于土壤液相中,导致测试结果偏低。

2.3 Biolog微量分析

Yin等(2000)将不同的单一碳源底物(如L-丝氨酸、L-苏氨酸、柠檬酸钠、α-乳糖等)和溴脱氧尿苷(Bromodeoxyuridine, BrdU)加入到土样中,碳源底物的存在使一定量的BrdU与细菌DNA结合,得到一个功能冗余指数,从而能够确定参加反应的细菌生物量。细菌的冗余指数从干扰地到非干扰地有显著增加,且与植物种类增多有关^[35]。依据与这一方法相似的原理,Garland和Mills(1991)提出了Biolog微量分析法,该法是通过测定土壤微生物对95种不同的碳源底物的利用速率和程度来确定微生物群落结构,目前这种方法已开发出商业系统,称为Biolog[®] system,被广泛地应用于土壤微生物群落分析^[36]。例如,随着重金属污染程度的加剧,尾矿区土壤微生物群落Biolog测试的平均吸光值、群落丰富度及多样性指数均显著低于非矿区土壤,表明尾矿区重金属污染引起了土壤微生物群落功能多样性的下降,减少了可利用碳源底物的种类,降低了微生物对单一碳源底物的利用能力^[37]。尽管Biolog微量分析法快速、简便,但由于这种方法只能检验微生物群落中快速生长的那部分细菌(主要是革兰氏阴性菌)的信息,所以有很大的局限性。

3 土壤微生物组成

3.1 培养法

早期常用不同的固相和液相培养基分离和培养不同微生物的技术,研究土壤微生物群落结构。在土壤质量研究中,应用这种方法已经揭示了不同的微生物与不同的土壤质量参数(抑制疾病流行、有机质降解等)有关。刘世贵等(1994)应用这种方法对川西北3种不同退化程度的草地土壤微生物数量和区系进行了研究,发现退化程度高的草地微生物种类少,数量也少,不同退化草地中起主导作用的微生物种类不同,主要生理类群在数量上差异较大^[38]。但这种方法的缺点是会低估土壤微生物生物量和组成物种。Brock(1987)证明通过传统的分离方法鉴定出的微生物只占环境微生物总数的0.1%~10%^[39]。

3 2 生物标记物

在生物化学基础上发展起来的非培养方法,在一定程度上可以克服培养法的缺点.通过测定土壤中特异生物标记物 (Biomarkers)的含量,可以间接估测土壤中总的或者某类甚至某种微生物的生物量.这种生物标记物应具有以下特点:存在于土壤中所有个体或者某类、某种微生物内,其浓度确定,并且不随微生物的生长而改变;仅存在于活细胞内,细胞死后迅速被分解;能被定量提取;能被准确测定^[40]. West等 (1987)曾经报道了土壤中麦角固醇含量可以作为真菌生物量的标记物^[41],

但目前应用较多的土壤微生物的标记物是磷脂脂肪酸 (Phospholipid fatty acid PLFA)^[42-43].与其它微生物标记物相比,PLFA有下列优点:存在于所有生物细胞膜中,细胞一旦死亡很快消失;容易从土壤微生物细胞中抽提;能获取更多的微生物信息.不同的土壤微生物类群有不同的 PLFA 组成 (表 1),土壤中特异 PLFA 的有无和丰度能说明某类微生物的存在与否和丰度. PLFA 谱图分析或脂肪酸甲酯 (Fatty acid methyl esters FAME)谱图分析是土壤微生物群落研究的常用方法.

表 1 磷脂脂肪酸与土壤微生物的对应关系^[13, 44, 45]
Table 1 Phospholipid fatty acids associated with different soil microbes^[13, 44, 45]

类群 Category	生物标记物 Biomarkers
革兰氏阴性细菌 Gram negative bacteria	3OH 10 Q 12 Q 2OH 12 Q 3OH 12 Q 14 Q 14 1ω5c 15 Q 3OH 15 Q 3OH 15 Q 15 1ω6c 16 1ω5c 16 1ω7c 16 1ω7t 2OH 16 t cy17 Q 17 Q 18 1ω5c 18 1ω7c 18 1ω7t 1Me18 1ω7c cy19 0
革兰氏阳性细菌 Gram positive bacteria	il2 Q al2 Q il3 Q al3 Q il4 Q al4 Q il5 Q al5 Q il6 Q al6 Q il7 Q al7 Q 18 1ω9
厌氧细菌 Anaerobes	cy17 Q cy19 0
好氧细菌 Aerobes	16 1ω7c 16 1ω7t 18 1ω7t
甲烷氧化细菌 Methane-oxidizing bacteria	16 1ω5c 16 1ω8c 16 1ω8t 18 1ω8c 18 1ω8t 18 1ω6c
硫酸盐还原菌 SO ₄ ⁻ reducers	10Me16 Q il7 1ω7 17 1ω6
放线菌 Actinomycetes	10Me16 Q 10Me17 Q 10Me18 0
真菌 Fungi	16 1ω5 18 1ω9 18 1ω9c 18 2ω6 9 18 2ω6 9c 18 3ω3 6 9 18 3ω6 9 12c
VAM 真菌 Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi	16 1ω5c
原生生物 Protozoa	20 4ω6 9 12 15c 20 2ω6 9c 20 3ω6 9 12c

PLFA 一般以主链总的碳原子数:双键 (ω)数和双键距脂肪酸分子末端羟基的碳原子数来命名,前缀 Me 和 OH 分别表示甲基和羟基基团,前面的数字表示它们距末端羟基的碳原子数,a和 i 分别表示脂肪酸支链的反异构和异构,br表示分支位置未知,cy表示环丙烷脂肪酸,后缀 c和 t表示顺式和反式

The abbreviated names for the fatty acids refer to the number of carbon atoms in the chain the number of double bonds followed by position from the methyl end and conformation. The prefix 'Me' refers to methyl group, 'OH' refers to hydroxy group the number before 'Me' or 'OH' refers to the location of methyl or hydroxy group relative to the carboxyl end of the molecule 'a' indicates anteiso branching 'i' indicates iso branching 'br' indicates an unknown branching position and 'cy' stands for cyclopropane ring The Suffix 'c' and 't' indicate the cis and trans configuration respectively

Hack等 (1994)利用 FAME 谱图分析法对土壤微生物群落进行了研究,并与生物量测定和纯培养实验结果进行了对比,发现该法能检测到土壤微生物群落的细微变化^[46],证实了该法的可行性. Yao等 (2000)用 FAME 谱图分析法研究了红壤地区土壤微生物群落结构的变化,发现土地利用历史、植被覆盖类型和作物栽培方式均对土壤微生物群落结构有明显的影响,认为 FAME 谱图分析法是评价土壤微生物群落差异的较好方法^[47].受污染土壤的监测是目前生态学的研究热点之一, Frostegard等 (1993)用 FAME 谱图分析方法比较研究了重金属污染的森林和耕地土壤中 PLFA 的变化,发现森林土壤中 10Me16 Q、10Me17 0和 10Me18 0增加,耕地中 10Me16 Q和 10Me18 0下降,15 0和 17 0增加,表明森林土壤放线菌增加,耕地放线菌下降,细菌增加^[48]. Peacock等 (2001)在研究军事行动对土壤的干扰时发现,干扰区、恢复区与对照区土壤微生物群落有显著的差异性,重度干扰区土壤微生物总生物量最小;干扰增加导致 FAME 谱图分析结果中的革兰氏阴性菌和真菌比例减少,而革兰氏阳性菌和放线菌比例增多^[49]. McKinley等 (2005)运用 FAME 谱图分析方法评价草原生态恢复的效果,认为生态恢复可提高表层土壤质量,但要恢复到原始状态需要花费几十年的时间^[50].

之间并不存在绝对的一一对应关系,一般来讲这种方法也不能将微生物鉴定到种;其次,生长时期和环境条件也会影响微生物 PLFA 的含量;第三,这种方法依赖 PLFA 来表征微生物群落结构,因此任何导致 PLFA 变化的因素都会加大群落估计的误差,超作要特别小心.而且,目前使用的土壤微生物标记物主要集中于土壤样品中提取出的极性酯部分,对中性酯和已二醇酯研究不够,可能不能全面反映土壤微生物群落的多样性^[44, 51].

3 3 分子生物学技术

在土壤微生物群落结构研究中,基于 DNA 或 RNA 信息的分子生物学方法显示出了极大的应用前景^[52-55].从土壤中提取 DNA,通过 DNA/DNA 杂交技术发现,1 g 土壤中有 4 000 多种细菌,在能被显微镜观察到的微生物中,有 90% 能被提取出 DNA 并进行分析,要比能被纯培养的比例 (0.1%) 高得多^[56, 57].一般来说,每个物种的 DNA 中 (G+C) 摩尔百分比含量是相对恒定的,因此常把它作为分类鉴定的一种指标,但这种方法的分辨率较低,只能初步确定土壤微生物群落的差异.荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 是通过荧光标记的寡核苷酸探针与特异的互补核苷酸序列杂交,通过激发杂交探针的荧光来检测信号,利用荧光显微镜直接观察和探测特定微生物的分布与数量.

上述两种方法不需对 DNA 进行 PCR 扩增,但更多的分子

生物学方法均需首先从土壤中提取总 DNA, 然后选择合适的引物进行 PCR 扩增. 随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术利用短的任意序列引物在非严格条件下进行 PCR, 使得基因组的许多位点同时得以扩增, 然后通过凝胶电泳分析 PCR 产物, 检测基因多个位点的多态性. 一些表型上不能反应出的遗传物质的细微变化都可以通过 RAPD 技术显示出来. 对于样品中数量少的微生物来说, 原核生物的 16S rDNA 是常被扩增、分析的区域, 因为它兼具保守性序列和高变异性序列. 变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 法可根据 PCR 扩增产物中 rDNA 的 (G + C) 含量不同把 rDNA 在凝胶中区分开, 直接反映 rDNA 多态性^[58]. 限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析法是用限制性内切酶切割 PCR 扩增产物并进行电泳, 然后用标记探针杂交来揭示微生物 RFLP 的多样性^[14]. 单链构象多态性分析 (Single strand conformation polymorphism, SSCP) 方法可研究 (G + C) 含量相同但序列不同的 DNA^[59]. 土壤中 DNA 提取、纯化技术的滞后, 以及 PCR 的扩增偏差等是目前限制分子生物学技术在土壤微生物群落研究中应用的主要因素^[13, 14, 44].

目前分子生物学技术在土壤恢复研究中应用较少, 罗海峰等 (2003) 利用 PCR-DGGE 技术对河北省盐碱地上的玉米田、棉花田、未耕作农田和吉林省的玉米田土壤进行了比较研究, 认为土壤样品中 16S rRNA 基因的 V3 区的 DNA 扩增片段能够反映不同类型土壤中微生物的差异^[60]. 相比之下, 分子生物学技术在重金属和农药污染对土壤微生物群落影响的研究中应用较多^[52-55]. 通常情况下, 环境污染对微生物有两个明显效应: 一是不适应的微生物数量的减少或消失; 二是适应性微生物数量的增大与积累. Griffiths 等 (1997) 通过测定 DNA 中 (G + C) 摩尔百分比含量的方法研究了被重金属 Cd、Cu、Ni、Pb、Zn 污染的土壤中微生物群落结构的变化, 发现被 Cd 污染的土壤中微生物群落组成与被其它重金属污染的土壤有明显不同^[61]. Sandaa 等 (1999) 用原位杂交法分析了重金属污染的土壤中微生物群落结构的变化, 发现用探针 ALF1b 检测的细胞数量显著增加, 表明变形菌 (*Proteobacteria*) α -亚群在重金属污染的土壤中具有选择性优势^[62]. 杨永华等 (2000) 应用 RAPD 法研究发现农药污染导致土壤微生物功能和结构多样性的下降, 群落多样性指数和均匀度指数均下降^[63]. William 和 Ronald (2002) 采用 DGGE 法研究发现, 杀真菌剂百菌清处理的各种土壤细菌和真菌群落结构与对照土壤存在显著差异, 而且不同处理浓度对土壤细菌和真菌多样性的影响也不同^[64].

4 结语

土壤微生物与土壤生态系统结构和功能的关系值得深入研究, 尤其在生态恢复过程中, 养分供应的改变及某些关键种生长所必需的共生真菌的变化可能是生态系统功能恢复与否的关键^[65, 66]. 丰富多样的微生物种类不仅是维持土壤健康的重要因素, 其多样性变化也是监测土壤质量变化的敏感指标^[13], 作为生物指示物, 土壤微生物用于评价生态恢复状况是可行的^[67]. 土壤微生物群落定性和定量变化, 如微生物生物量、活性、种类组成、分布、功能、种间的相互作用等的变化, 可作为监测土壤质量短期和长期变化的敏感指标, 也能用于鉴别

特定的生态恢复或管理方式的优劣^[3]. 综合运用多种土壤微生物研究方法测定多项指标能更好地反映土壤退化和生态恢复过程中土壤质量的变化^[22, 68, 69], 有时微生物测定结果也要结合生态因子进行综合分析才能获得准确的信息^[70].

随着研究技术的发展, 特别是分子生物学技术的引进, 土壤微生物研究变得更加简便、快捷, 结果也更加可信. 新技术与传统方法相结合, 必将大大促进土壤微生物学的发展, 加深人们对土壤微生物群落结构与功能的认识, 这对自然和人工生态系统管理以及退化生态系统恢复具有重要的意义.

References

- Winding A, Hund-Rinke K, Rutgers M. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts *Ecotox Environ Safe* 2005, **62**: 230~248
- Caix J. Balancing ecological destruction and restoration: The only hope for sustainable use of the planet *Aquat Ecosyst Health Manag* 1999, **2**: 91~95
- Harris JA. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration *Eur J Soil Sci* 2003, **54**: 801~808
- Hobbs RJ, Harris JA. Restoration ecology: Repairing the earth's ecosystems in the new millennium. *Restor Ecol* 2001, **9**: 239~246
- Huber S, Syed B, Freudenschuss A, Emstsen V, Loveland P. Proposal for a European Soil Monitoring and Assessment Framework. Technical Report 61. Copenhagen: European Environment Agency 2001
- Ashad MA, Martin S. Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems *Agric Ecosyst Environ* 2002, **88**: 153~160
- Cao H (曹慧), Sun H (孙辉), Yang H (杨浩), Sun B (孙波), Zhao QG (赵其国). A review: Soil enzyme activity and its indication for soil quality *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, **9** (1): 105~109
- Pankhurst CE, Hawke BG, McDonald H, Kirkby CA, Buckerfield JC, Michelsen P, O'Brien KA, Gupta VVSR, Doube BM. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health *Aust J Exp Agri* 1995, **35**: 1015~1028
- Carter MR, Gregorich EG, Angers DA, Beare MH, Sparling GP, Wardle DA, Voroney RP. Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions *Can J Soil Sci* 1999, **79**: 507~520
- Dong XZ (东秀珠), Hong JH (洪俊华). Diversity of prokaryotic microorganisms *Biodiv Sci* (生物多样性), 2001, **9** (1): 18~24
- Bomenan J, Skroch PW, O'Sullivan KM, Palus JA, Rumjanek NG, Jansen JL, Nienhuis J, Triplett EW. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**: 1935~1943
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Fomey LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**: 4516~4522
- Zhang HB (张汉波), Duan CQ (段昌群), Qu LH (屈良鹄). Culture independent methods for studies on microbial ecology of soils *Chin J Ecol* (生态学杂志), 2003, **22** (5): 131~136
- Cai YF (蔡燕飞), Liao ZW (廖宗文). Advancement of methods in soil microbial ecology *Soil & Environ Sci* (土壤与环境), 2002, **11** (2): 167~171

- 15 A lef K, Nannipieri P. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. London: Academic Press, 1995
- 16 Insm H, Haselwandter K. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia*, 1989, **79**: 174~178
- 17 Ohtonen R, Fritze H, Pennanen T, Jumpponen A, Trappe J. Ecosystem properties and microbial community changes in primary succession on a glacier forefront. *Oecologia*, 1999, **119**: 239~246
- 18 Harris JA, Hill T. Soil biotic communities and new woodlands. In: Ferris-Kaan R. The Ecology of Woodland Creation. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. 91~112
- 19 Hopmans P, Bauhus J, Khanna P, Weston C. Carbon and nitrogen in forest soils: Potential indicators for sustainable management of eucalypt forests in south-eastern Australia. *For Ecol Manag*, 2005, **171**: 59~74
- 20 Merila P, Smolander A, Strummer R. Soil nitrogen transformations along a primary succession transect on the land-uplift coast in Western Finland. *Soil Biol Biochem*, 2002, **34**: 373~385
- 21 Singh KP, Mandal TN, Tripathi SK. Patterns of restoration of soil physico-chemical properties and microbial biomass in different landslide sites in the sal forest ecosystem of Nepal Himalaya. *Ecol Eng*, 2001, **17**: 385~401
- 22 Insm H, Domsch KH. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass: chronosequences of reclamation sites. *Microbiol Ecol*, 1988, **15**: 177~188
- 23 Odum EP. The strategy of ecosystem development. *Science*, 1969, **164**: 262~270
- 24 Odum EP. Ecology: A Bridge between Science and Society. Sunderland: Sinauer Associates, 1997
- 25 Zeller V, Bandgett RD, Tappeiner U. Site and management effects on soil microbial properties of sub-alpine meadows: A study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. *Soil Biol Biochem*, 2001, **33**: 639~649
- 26 Dick RP. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Doran JW, Coleman DC, Bezdicek DF, Stewart BA. Defining Soil Quality for a Sustainable Environment. Madison: Soil Sci Soc Am Spec Publ. W I, 1994. 107~124
- 27 Dick RP. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Parkhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR. Bioindicators of Soil Health. United Kingdom, Oxon: CAB International, 1997. 121~156
- 28 Badriane NNY, Chotte J, Patea E, Masse D, Rouland C. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Appl Soil Ecol*, 2001, **18**: 229~238
- 29 Harris JA, Birch P. Soil microbial activity in open cast coal mine restorations. *Soil Use Manag*, 1989, **5**: 155~160
- 30 Vance NC, Entry JA. Soil properties important to the restoration of Shasta red fir barrens in the Siskiyou Mountains. *For Ecol Manag*, 2000, **138**: 427~434
- 31 Anderson JPE, Domsch KH. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol Biochem*, 1978, **10**: 215~221
- 32 Degens BP, Harris JA. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol Biochem*, 1997, **29**: 1309~1320
- 33 Schipper LA, Degens BP, Sparling GP, Duncan LC. Changes in microbial heterotrophic diversity along five plant successional sequences. *Soil Biol Biochem*, 2001, **33**: 2093~2103
- 34 Grime JP. Plant Strategies and Vegetation Processes. Chichester: John Wiley & Sons, 1979
- 35 Yin B, Crowley D, Sparovek G, DeMele WJ, Boman J. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 4361~4365
- 36 Garland JL, Mills AL. 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
- 37 Teng Y (滕应), Huang CY (黄昌勇), Luo YM (骆永明), Long J (龙健), Yao HY (姚槐应). Microbial activities and functional diversity of community in soils polluted with Pb-Zn-Ag mine tailings. *Acta Pedol Sin* (土壤学报), 2004, **41** (1): 113~119
- 38 Liu SG (刘世贵), Ge SR (葛绍荣), Long ZF (龙章富). Studies on soil microorganism numbers and microbiota of degenerated rangelands in northwest region of Sichuan, P. R. China. *Acta Praticult Sin* (草业学报), 1994, **3** (4): 70~75
- 39 Brock TD. The study of microorganism in situ: progress and problems. *Symp Soc Gene Microbiol*, 1987, **41**: 1~17
- 40 Jenkinson L, Bai QY, Beck T, Beese F. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. IV. The decomposition of fumigated organisms in soil. *Soil Biol Biochem*, 1976, **8**: 203~208
- 41 West AW, Grant WD, Sparling GP. Use of ergosterol, dimyoinelic acid and glucosamine content of soils to monitor changes in microbial populations. *Soil Biol Biochem*, 1987, **19**: 607~612
- 42 Petersen SO, Deboz K, Schjonning P, Christensen BT, Ehnolt S. Phospholipid fatty acid profiles and C availability in wet-stable macro-aggregates from conventionally and organically farmed soils. *Geoderma*, 1997, **78**: 181~196
- 43 Zelles L, Bai QY, Beck T, Beese F. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol Biochem*, 1992, **24**: 317~323
- 44 Hill GT, Mikowski NA, Alkrich-Wolfe L, Emele LR, Jurkovic DD, Ficke A, Maldonado-Ramirez S, Lynch ST, Nelson EB. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl Soil Ecol*, 2000, **15**: 25~36
- 45 Kourtev P, Ehrenfeld J. H¹⁴globin. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology*, 2003, **83** (11): 3152~3166
- 46 Hack SK, Garchow H, Odelson DA. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 2483~2493
- 47 Yao H, He Z, Wilson MJ, Campbell CD. Microbial biomass and community structure in a sequence of soil with increasing fertility and changing land use. *Microb Ecol*, 2000, **40**: 223~237
- 48 Frostegard A, Tunlid A, Baath E. Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (11): 3605~3617
- 49 Peacock AD, McNaughton SJ, Cantu JM, Dale VH, White DC. Soil microbial biomass and community composition along an anthropogenic disturbance gradient within a long-leaf pine habitat. *Ecol Indicators*, 2001, **1**: 113~121

- 50 McK inley VL, Peacock AD, White DC. Microbial community PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tall grass prairie soils *Soil Biol Biochem*, 2005, **37**: 1946~ 1958
- 51 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
- 52 McGrath SP, Chaudri AM, Giller KE. Long-term effects of metals in sewage-sludge on soils, microorganisms and plants. *J Ind Microbiol* 1995, **14**: 94~ 102
- 53 Sandaa RA, Torsvik V, Enger O, Daae FL, Casberg T, Hahn D. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol Ecol* 1999, **30**: 237~ 251
- 54 Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA, Ovreas L. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *JBio-technol* 1998, **64**: 53~ 62
- 55 Turpeinen R, Kaarala T, Haggblom MM. Microbial activity and community structure in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiol Ecol* 2004, **47**: 39~ 50
- 56 Torsvik VL. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol Biochem*, 1980, **12**: 15~ 21
- 57 Torsvik VL, Goksoyr J, Daae FL. High diversity in DNA of soil bacterial. *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**: 782~ 787
- 58 Muyzer G, deWaal E, Uitterlinden A. Profiling of complex microbial populations by DGGE of PCR-amplified genes coding for 16S RNA. *Appl Environ Microbiol* 1993, **59**: 695~ 700
- 59 Schwiiger F, Tebbe CC. A new approach to utilize PCR-single strand-conformation polymorphism for 16S rRNA based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**: 4870~ 4876
- 60 Luo HF (罗海峰), Qi HY (齐鸿雁), Xue K (薛凯), Zhang HX (张洪勋). A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2003, **23** (8): 1570~ 1575
- 61 Griffiths BS, Diaz-Ravina M, Ritz K, McNicol JW, Ebbelwhite N, Baath E. Community DNA hybridization and % CC profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. *FEMS Microbiol Ecol* 1997, **24**: 103~ 112
- 62 Sandaa RA, Torsvik V, Enger O, Daae FL, Casberg T, Hahn D. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol Ecol* 1999, **30**: 237~ 251
- 63 Yang YH (杨永华), Yao J (姚健), Hua XM (华晓梅). Effect of pesticide pollution against functional microbial diversity in soil. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2000, **20** (2): 23~ 25, 47
- 64 Sigler WV, Truco RF. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Soil Ecol* 2002, **21**: 107~ 118
- 65 Requena N, Perez-Solis E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**: 495~ 498
- 66 Wolters V. Biodiversity of soil animals and its function. *Eur J Soil* 2001, **37**: 221~ 227
- 67 White DC, Flemming CA, Leung KT, Macnaughton SJ. In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring and risk assessment of pollution remediation in soils: the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J Microbiol Meth*, 1998, **32**: 93~ 105
- 68 Benthall H, Harris JA, Birch P, Short KC. Habitat classification and soil restoration assessment using analysis of soil microbiological and physico-chemical characteristics. *J Appl Ecol* 1992, **29**: 711~ 718
- 69 Tschirko D, Kandeler E. Classification and monitoring of soil microbial biomass, N-mineralisation and enzyme activities to indicate environmental changes. *Die Bodenkultur* 1999, **50**: 215~ 226
- 70 Pennane T, Frostegard A, Fritze H, Baath E. Phospholipid acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal polluted gradients in coniferous forests. *Appl Environ Microbiol* 1996, **62** (2): 420~ 428