

特征碳源简化土壤微生物 Biolog 测定的方法及应用

李胜华, 刘可星, 廖宗文

(华南农业大学资源环境学院新肥料资源研究中心, 广州 510642)

摘要: 【目的】从发生番茄青枯病的土壤微生物群落 Biolog 测定结果中, 在 ECO 微平板 10 种特征碳源基础上, 减为 9 种特征碳源, 利用 MT 板进行试验, 以简化其测定手续。【方法】选用盆栽番茄土样进行了特征碳源的浓度试验, 并应用所确定的浓度分别针对施肥处理不同但均未发病的大田辣椒土样、发病程度不同的大田番茄土样和盆栽辣椒土样进行了 3 次验证试验。【结果】浓度试验结果表明, 各碳源不同浓度的 OD 值普遍存在差异, 将其与 ECO 板结果相关联后确定了各特征碳源的应用浓度。3 次验证试验结果表明, 选用的试验浓度能明显地区分作物发病差异。【结论】特征碳源能反映出茄科作物病土与健康土以及发病轻与重的区别, 可以简化土壤微生物 Biolog 测定。

关键词: Biolog; 特征碳源; 简化; 土传病害

Method for Simplification of Characteristic Carbon Sources for Biolog Analysis of Soil Microbial Community and Its Application

LI Sheng-hua, LIU Ke-xing, LIAO Zong-wen

(New Fertilizer Resource Research Center, College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: 【Objective】 In order to simplify the Biolog analysis, 9 kinds of characteristic carbon sources selected from the carbon resources in Biolog ECO microplate containing 10 carbon resources and added in Biolog MT microplate to analyse soil microbial community where bacterial wilt of tomato occurred. 【Method】 The optimal concentration of characteristic carbon resources added in Biolog MT microplates was studied with the soil of potted tomato and three tests of verifying the carbon resource concentrations were carried out by using the soils of potted pepper without soil-borne diseases occurrence treated with different fertilization rates and the soils of field tomato and potted pepper with varied incidences of bacterial wilt. 【Result】 The result of carbon resource concentration experiment showed that the OD values of different concentrations of characteristic carbon resources were obviously different. Compared with the OD in ECO microplate, the optimal concentrations in MT microplate were determined. The results of verifying tests indicated that the soil microbial community functional diversity (Shannon index) with different incidences of crop were differentiated by characteristic carbon resources. 【Conclusion】 Therefore, the characteristic carbon resources could be used to differentiate the health soil and disease soil, and the soils with varied incidences of soil-borne diseases. The Biolog analysis can be simplified by using 9 kinds of characteristic carbon resources.

Key words: Biolog; characteristic carbon source; simplifying; soil-borne disease

0 引言

【研究意义】1991 年, Garland 等^[1]首次将 Biolog 微孔板用来描述微生物的群落特征。Biolog 法通过测

试微生物对单一能源碳利用程度, 来反映微生物群体水平的群落结构, 用于测定微生物群落的功能多样性。这种方法简便、快速, 灵敏度高, 分辨力强, 现被广泛应用于土壤、水体以及活性污泥等生态系统的研

收稿日期: 2009-03-05; 接受日期: 2009-11-04

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD10B03)、农业部“948”项目(2006-G62)、农业部公益性行业项目(200803031)和广东省科技项目(2008B021000039)

作者简介: 李胜华, 硕士研究生。E-mail: lishenghua8283@126.com。通信作者廖宗文, 教授。Tel: 020-85283066; E-mail: zwliao@sohu.com

究中^[2-11]。Biolog 微平板种类较多,其中应用较为广泛的微孔板主要有 GN 板和 ECO 板,分别有 95 种和 31 种碳源。但这种方法在将其用于分析复杂的环境微生物群落时,并非所有碳源都是同等重要的,过多的碳源可能会带来冗余的信息从而降低数据分析的效率和准确性,并且造成资源和资金的浪费。事实上,有些碳源几乎不被利用,而且目前 Biolog 微孔板的价格昂贵,难以普遍应用。用少量的特征碳源代替繁多的碳源来反映土壤微生物群落的变化,可以减少不必要的误差和麻烦,还可以节省成本。【前人研究进展】应用特征碳源于土壤微生物群落方面的研究在国内外仅有少量报道^[12-13],将特征碳源应用于指示作物土传病害的发生,目前国内外还鲜见研究。谭兆赞等^[14]利用 Biolog ECO 微孔板分析施入堆肥所引起土壤微生物群落功能变化的碳源,结合数学分析方法对 3 次取样的结果经主成分分析和聚类分析检验后共选出 10 种能较好地反映发病情况、更敏感地反映土壤微生物群落特征变化的特征碳源。【本研究切入点】而特征碳源简化土壤微生物 Biolog 测定的实施则需确定特征碳源的适宜浓度以及合适的载体,对这两点的研究国内尚属空白。【拟解决的关键问题】因此,本文拟采用 MT 板为载体,将所选出的特征碳源加入其中进行浓度试验,确定各特征碳源的最适应用浓度,并与盆栽试验和大田试验进行对比,验证其效果,为进一步简化用于表征土壤微生物群落特征的 Biolog 测定法提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试碳源

9 种供试特征碳源为吐温 80、D-木糖、 α -D 乳糖、 α -丁酮酸、L-苯基丙氨酸、苯乙胺、腐胺、L-苏氨酸和 β -D-葡萄糖苷,均为分析纯,分别用 c1—c9 表示。葡萄糖用作检验碳源。

1.2 试验设计

1.2.1 浓度试验 浓度试验的土样取自华南农业大学农场连作番茄菜园土的盆栽土壤。

1.2.2 特征碳源验证

(1) 验证试验一 土样为海南罗牛山辣椒试验地土壤,共 2 个土样。2 个取样点施用肥料不同,取样时辣椒均无病害发生。

(2) 验证试验二 土样为华南农业大学农场番茄试验地土壤,取样后冰箱冷藏 2 个月。共 3 个土样,分别为不同处理 3 个小区的土样,取样前已施肥 2 次,番茄青枯病发生情况如下:

土样 I 为对照土样,取样时番茄发病率达 62.5%;土样 II 为处理一土样,取样时番茄发病率 37.5%;土样 III 为处理二土样,取样前番茄没有发病。

(3) 验证试验三 土样为盆栽辣椒土壤,取样后同时进行 ECO 板测定和特征碳源的测定。共 4 个土样,均为不同施肥处理土样,详细情况如下:

土样一为 CK,取样时辣椒发病率达 61.1%;

土样二为 T1,取样时辣椒发病率 22.2%;

土样三为 T2,取样时辣椒发病率 11.1%;

土样四为 T3,取样时辣椒发病率 5.6%。

供试 Biolog 板: ECO 微孔板和 MT 板,均购自美国 BIOLOG 公司。ECO 共有 96 个小孔,容积 150 μ L,每 32 个孔为 1 次重复,除 1 个孔为未加碳源、只有显色剂的对照外,其余 31 个均加有显色剂和不同的碳源物质。MT 板共有 96 个孔,每个孔中均只加有显色剂。

1.3 试验方法

1.3.1 浓度试验 Campbell 等^[13]将碳源浓度配置为 0.3 mg 后加于 Biolog MT 板微孔中。本试验设 4 个浓度: 0.1、0.3、0.45 和 0.6 mg,每个浓度设 4 次重复。每孔加 100 μ L 土壤接种液,加碳源后体积不足部分用 0.85%的灭菌生理盐水补足至总体积 150 μ L。除灭菌外,其它操作均在超净工作台上进行。

1.3.2 验证试验 各碳源均配置浓度为 2%的母液,0.1、0.3、0.45 和 0.6 mg 等 4 个不同浓度对应吸取 2%的母液体积分别为 5、15、22.5 和 30 μ L。每孔加 100 μ L 土壤接种液和所需碳源(浓度由浓度试验得出)后,用 0.85%的灭菌生理盐水补足至每孔总体积 150 μ L。每个碳源设 4 次重复,仍用葡萄糖进行验证,其浓度为 0.30 mg。将加有碳源和土壤接种液的 MT 板置于 28 $^{\circ}$ C 恒温箱中温育,每 24 h 在酶标仪 590 nm 下比色读取 OD 值,同时对各土壤样本进行 ECO 板试验,与之进行对比。3 次验证试验,除土样不同外,其它操作均相同。

1.3.3 土壤接种液的制备 称取相当于 10.0 g 风干土的新鲜土样至盛有 100 mL 0.85%灭菌盐水的 250 mL 三角瓶中,将三角瓶在旋涡振荡器上震荡 1 min,然后置于冰水浴中 1 min,反复 3 次。静置 2 min 后吸取上清液 5 mL 置于盛有 45 mL 0.85%灭菌盐水的 150 mL 三角瓶中即制得供试土壤接种液^[15]。

1.4 测定项目和数据分析

Biolog ECO 和 MT 测定结果用 Shannon 指标表示,采用 Excel 软件和 SAS9.0 软件进行数据分析处理和差异显著性分析以及相关分析,通过比较二者的

结果进行验证。

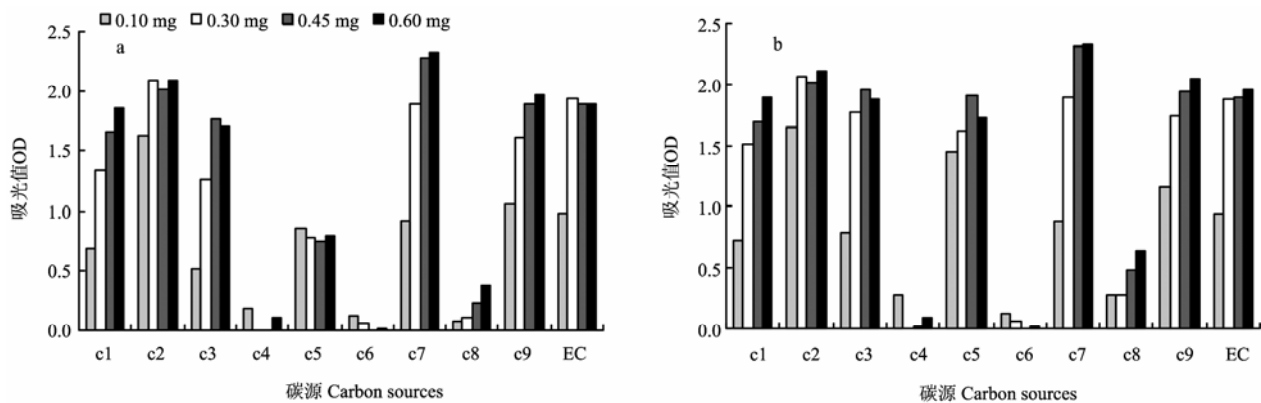
2 结果

2.1 特征碳源浓度与 OD 值的关系

2.1.1 特征碳源 OD 值 ECO 板温育 72—96 h 时,微生物对碳源的利用基本稳定,即 OD 值的变化趋于稳定,因此对特征碳源亦选取温育 72 h 和 96 h 的 OD 值进行研究,结果如图所示,除 L-苯基丙氨酸温育 96 h 的 OD 值明显高于 72 h 外,其它碳源的 OD 值在 72 h 和 96 h 时基本保持稳定,这与 ECO 板情况一致。9

种特征碳源中,大部分碳源不同浓度的 OD 值能达到 1.0 以上。 α -丁酮酸、苯乙胺和 L-苏氨酸的显色情况不理想,前二者在温育 72 h 和 96 h 时的值几乎没有变化,且均有低浓度的 OD 值高于高浓度的结果。而 L-苏氨酸则为温育 96 h 的值比 72 h 有所提高,且浓度越高 OD 值越大。

2.1.2 特征碳源浓度的确定 将温育 72 h 和 96 h 的 MT 板结果与 ECO 板结果进行差异性比较,由不同浓度 OD 值与 ECO 板 OD 值的显著差异性可以帮助人们找出各特征碳源的合适供试浓度。由表 1 可知,温育



c1—c9 分别为吐温 80、D-木糖、 α -D 乳糖、 α -丁酮酸、L-苯基丙氨酸、苯乙胺、腐胺、L-苏氨酸和 β -D-葡萄糖苷, EC 为葡萄糖。下同
c1-c9 are the Tween 80, D-cellobiose, α -D-lactose, α -ketobutyric acid, L-phenylalanine, Phenylethylamine, Putrescine, L-threonine and β -methyl-D-glucoside. EC is the glucose. The same as follows

图 特征碳源温育 72 h (a) 和 96 h (b) 的 OD 值

Fig. The OD value of characteristic carbon sources cultured at 72 h (a) and 96 h (b)

表 1 各碳源温育 72 h 和 96 h OD 值和 ECO 板对应值以及差异显著性

Table 1 The OD value and the diversity in MT and ECO in each characteristic carbon source cultured at 72 h and 96 h

温育时间 Culturing time	浓度 Concentration (mg)	特征碳源物质 Characteristic carbon sources								
		c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9
72 h	0.10	0.682c	1.634b	0.515c	0.185b	0.860b	0.121b	0.915d	0.075c	1.051b
	0.30	1.337b	2.096a	1.256b	0.000c	0.784b	0.064bc	1.894b	0.101c	1.614a
	0.45	1.665ab	2.011a	1.778a	0.000c	0.739b	0.000c	2.276a	0.239bc	1.901a
	0.60	1.861a	2.093a	1.707a	0.106b	0.786b	0.011bc	2.329a	0.378b	1.967a
	ECO	1.623ab	1.911a	1.65a	0.613a	1.813a	2.051a	1.405c	0.673a	1.493a
96 h	0.10	0.718b	1.645b	0.788b	0.280b	1.447b	0.121b	0.879d	0.285c	1.160b
	0.30	1.515a	2.069a	1.774a	0.000c	1.617ab	0.056b	1.899b	0.275c	1.738a
	0.45	1.692a	2.028a	1.964a	0.012c	1.915ab	0.009b	2.314a	0.484bc	1.949a
	0.60	1.893a	2.117a	1.881a	0.089c	1.729ab	0.016b	2.331a	0.630ab	2.059a
	ECO	1.705a	1.970ab	1.888a	0.938a	2.204a	2.352a	1.364c	0.997a	2.109a

同一列数据不同字母表示处理之间差异达 5% 显著水平, 下同

Different letters in the same line every treatment means significant at 5% level. The same as follows

相同时间时,各特征碳源不同浓度的 OD 值均有一定差异,且与 ECO 板 OD 值亦有一定差异,因而可以对其进行分析来确定各碳源浓度。

特征碳源浓度选取原则:特征碳源各浓度 OD 值与 ECO 板 OD 值进行差异显著性比较,当特征碳源 OD 值与 ECO 板值无显著差异时,选取其最低浓度作为待试浓度;当特征碳源 OD 值均与 ECO 板 OD 值差异显著时,选取差异最小中的最低浓度作为待试浓度。根据此原则,对表 1 数据进行分析后得出各特征碳源及葡萄糖的适用浓度,结果列于表 2。

表 2 各特征碳源适用浓度

Table 2 The optimal concentration of each characteristic carbon source

编号 Code	碳源名称 Name of carbon	适用浓度 Optimal concentration (mg)
c1	吐温 80 Tween 80	0.30
c2	D-木糖 D-cellobiose	0.30
c3	α -D 乳糖 α -D-lactose	0.30
c4	α -丁酮酸 α -ketobutyric acid	0.10
c5	L-苯基丙氨酸 L-phenylalanine	0.30
c6	苯乙基胺 Phenylethylamine	0.10
c7	腐胺 Putrescine	0.30
c8	L-苏氨酸 L-threonine	0.60
c9	β -D-葡萄糖苷 β -methyl-D-glucoside	0.30

2.2 特征碳源待用浓度的验证

2.2.1 验证试验一 在应用 Biolog 进行微生物群落多样性分析时一般应用温育 72 h 的 Shannon index 来进行评价和说明问题,验证试验一温育 72 h 的 Shannon index,结果见表 3。由表 3 可知,特征碳源试验温育 72 h 的 Shannon index 与 ECO 板温育相同时间的值有一致性:土样 I 和土样 II 之间的 ECO 板结果和特征碳源 MT 板结果均无显著差异。对 ECO 板结果与 MT 板结果进行相关性分析发现,二者存在极显著

表 3 大田辣椒土样温育 72 h 的 MT 板试验结果与 ECO 板结果对比

Table 3 The results of MT and ECO cultured at 72 h in the soil samples of hot pepper in field

土样 Soil sample	香农指数 Shannon index	
	ECO	MT
土样 I Soil sample I	3.238a	1.750a
土样 II Soil sample II	3.331a	1.810a

正相关性 ($r=0.9999$, $P<0.0001$)。

2.2.2 验证试验二 验证试验二温育 72 h ECO 板和 MT 板特征碳源的 Shannon index,结果列于表 4。由表 4 可知,温育 72 h 时,各土样 MT 的结果与 ECO 的结果均与发病情况有一致性,即发病越少 Shannon index 越高。将 ECO 板结果与 MT 板结果进行相关性分析,结果显示,ECO 板 Shannon index 与特征碳源 Shannon index 之间存在显著正相关性 ($r=0.9991$, $P=0.0274$)。由此说明应用特征碳源可以与 ECO 板媲美,且能应用特征碳源表征作物发病情况。

表 4 大田番茄土样温育 72 h 的 MT 板试验结果与 ECO 板结果对比

Table 4 The results of MT and ECO cultured at 72 h in the soil sample of tomato in field

土 样 Soil sample	发病率 Morbidity (%)	香农指数 Shannon index	
		ECO	MT
土样 I Soil sample I	62.5a	3.195c	1.791c
土样 II Soil sample II	37.5b	3.275b	1.892b
土样 III Soil sample III	0c	3.321a	1.941a

2.2.3 验证试验三 验证试验三测定结果(表 5)显示,辣椒枯萎病发病率越低,则其土壤微生物 Shannon index 越高。温育 72 h 时,ECO 板测定数据和 MT 板数据虽然相差很大,但二者测定结果均能显著区分不同发病程度的土样。将温育 72 h 的 ECO 板结果和 MT 板结果进行相关性分析,结果显示,ECO 板 Shannon index 与特征碳源 Shannon index 之间存在极显著正相关性 ($r=0.9995$, $P=0.0189$)。结合验证试验一和二,此结果进一步证明特征碳源在土壤微生物多样性和作物土传病害发生方面具有良好的反应结果,可以将其应用于土壤微生物群落多样性指示作物土传病害发生的研究中。因特征碳源 γ -羟基丁酸为限制类药品,

表 5 盆栽辣椒土样温育 72 h 的 MT 板试验结果与 ECO 板结果对比

Table 5 The results of MT and ECO cultured at 72 h in the soil sample of hot pepper in greenhouse

土样 Soil sample	发病率 Morbidity (%)	香农指数 Shannon index	
		ECO	MT
CK	61.1a	3.014d	1.604d
T1	22.2b	3.112c	1.708c
T2	11.1c	3.223b	1.829b
T3	5.6d	3.357a	1.957a

一直未能买到, 且从谭兆赞等^[14]的文中能看出, 将其甚至更多碳源舍去以进一步减少碳源数量是可能的。

3 讨论

采用少数几种特征碳源应用于土壤微生物尤其是施肥防病方面的研究, 国内外尚无相关报道。应用此方法可以减少多余的碳源, 腾出更多的空间用于重复, 优化了 Biolog 在土壤微生物分析方面的应用, 并能大幅降低生产成本和使用成本。而且在分析过程中由于有目标地选择碳源分析土壤微生物群落功能, 免去了对冗余数据的提取和计算, 可以较大程度地减少工作量。

本试验是在谭兆赞等^[14]研究的基础上进行的, 但本研究在其原有 10 种碳源基础上进行了简化, 只采用了其中 9 种碳源用于研究。碳源 γ -羟基丁酸为管制类药品, 市面无售, 必需简化。同时, 从谭兆赞等^[14]文中看出进一步减少碳源数量用于研究也是可能的, 因此, 本文重点对 γ -羟基丁酸进行简化研究。本研究结果表明, 用 9 种特征碳源分析土壤微生物群落功能并将其与作物发病情况结合分析时, 其规律与 ECO 板结果基本一致, 二者的测定结果具有显著正相关性, 说明对碳源数量进行简化研究 Biolog 测定指标与作物土传病害关系既有必要, 也是可行的。

碳源的浓度是否合适影响着特征碳源能否简化土壤微生物 Biolog 的测定以及能否应用于施肥防病方面的研究。本研究对各特征碳源设置 4 个浓度进行试验, 在将各浓度的值与 ECO 板结果进行差异性分析后确定了各特征碳源的适用浓度。

Biolog ECO 板为美国专利产品, 虽然应用简单、方便, 但价格昂贵, 且为一次性产品, 一般一块板只能用于一个处理 (每板共 96 孔, 每 32 孔相同, 共 3 次重复), 药品消耗大, 不利于其在相关领域的推广应用。MT 板也为美国专利产品, 但利用其进行特征碳源试验且条件成熟后可以自制类似的板, 然后自行添加合适浓度的碳源和显色物质, 有可能最终形成产品。当采用 9 种或 10 种碳源时, 可节省 60 个孔, 一块板将至少可以设置 2 个处理, 一块板承载量由 1 个处理增加到 2 个, 成倍增加, 而且每处理可以重复 4 次, 若再简化碳源的数量至 7 种, 则每块板可以设置 4 个处理 (3 次重复)。此时, 不但板本身的成本大幅降低, 由于承载处理的数目增多也将使研究成本大为降低, 操作程序简化, 并缩短操作时间。本文在这方

面的研究, 如碳源浓度和温育时间的确定已获得了进展, 在土壤微生物多样性的 Biolog 指标与作物土传病害的相关研究领域值得进一步深入研究。

特征碳源是在防治番茄青枯病试验的土壤 Biolog 测定基础上提出的, 本研究不仅对健康土壤进行了验证, 同时对不同作物不同发病程度的病土进行了验证试验。应用 MT 板的特征碳源结果显示, 其 Shannon index 值与 ECO 结果有显著相关性, 均能反映不同发病程度的显著区别。以上结果表明, 特征碳源在茄科作物不同土传病害的研究中均反映出病土与健康土以及发病轻与重的 Biolog 指标的区别, 说明特征碳源应用于茄科作物 2 种土传病害方面的研究显示出普适性。至于应用于其它作物的土传病害研究是否有效、是否会因土壤及季节而发生变化尚需进一步研究。

在现有基础上, 今后将进一步探索在其它科如十字花科和瓜果类作物方面的应用效果和不同土壤类型以及取样时间等方面的影响, 并研究在已有基础上继续减少特征碳源数, 以进一步降低成本, 充分利用 MT 板空间, 扩大承载量。这方面的探索有可能进一步扩大特征碳源应用范围并完善相关应用技术, 有利于推动土壤微生物多样性的 Biolog 测定指标与作物土传病害关系的深入研究。

4 结论

采用 9 种特征碳源取代 31 种碳源进行土壤微生物 Biolog 测定, 不仅能降低成本、简化程序、缩短操作时间, 而且所选用试验浓度的测定结果能够反映健康土与发病土以及不同发病程度土壤微生物群落的差异, 表明采用 9 种特征碳源及其选用的浓度可以简化土壤微生物 Biolog 测定, 能应用于土壤微生物多样性的 Biolog 测定指标与作物土传病害关系的研究, 而茄科 2 种作物、2 种土传病害的试验结果则表明特征碳源应用于土传病害方面的研究具有普适性。

References

- [1] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2351-2359.
- [2] Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(2): 213-221.
- [3] 席劲瑛, 胡洪营, 钱 易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的

- 应用. 微生物学报, 2003, 43(1): 138-141.
- Xi J Y, Hu H Y, Qian Y. Application of Biolog system in the study of microbial community. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(1): 138-141. (in Chinese)
- [4] 杨元根, Paterson E, Campbell C. Biolog 方法在区分城市土壤与农村土壤微生物特性上的应用. 土壤学报, 2002, 39(4): 282-289.
- Yang Y G, Paterson E, Campbell C. Application of Biolog method to study on microbial features in urban and rural soils. *Acta Pedologica Sinica*, 2002, 39(4): 282-289. (in Chinese)
- [5] 郑 华, 欧阳志云, 方治国, 赵同谦. 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.
- Zheng H, Ouyang Z Y, Fang Z G, Zhao T Q. Application of BIOLOG to study on soil microbial community functional diversity. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(3): 456-461. (in Chinese)
- [6] Crecchio C, Gelsomino A, Ambrosoli R, Minati J L, Ruggiero P. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36: 1873-1883.
- [7] 刘 峰, 张兰英, 刘 鹏, 刘莹莹, 高 松. 采用 Biolog 法分析制药废水处理工艺中微生物多样性. 中国给水排水, 2007, 23(21): 28-32.
- Liu F, Zhang L Y, Liu P, Liu Y Y, Gao S. Biolog method for analysis of microbial diversity during treatment of pharmaceutical wastewater. *China Water and Wastewater*, 2007, 23(21): 28-32. (in Chinese)
- [8] 胡 可, 王利宾. BIOLOG 微平板技术在土壤微生态研究中的应用. 土壤通报, 2007, 38(4): 819-821.
- Hu K, Wang L B. Application of BIOLOG microplate technique to the study of soil microbial ecology. *Chinese Journal of Soil Science*, 2007, 38(4): 819-821. (in Chinese)
- [9] 吴凤芝, 王学征, 潘 凯. 小麦和大豆茬口对黄瓜土壤微生物生态特征的影响. 应用生态学报, 2008, 19(4): 794-798.
- Wu F Z, Wang X Z, Pan K. Effects of wheat and soybean stubbles on soil microbial ecological characteristics in cucumber field. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(4): 794-798. (in Chinese)
- [10] Zak J C, Willig M R, Moorhead D L, Wildman H G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26(9): 1101-1108.
- [11] Yu X J, Yu D, Lu Z J, Ma K P. A new mechanism of invader success: exotic plant inhibits natural vegetation restoration by changing soil microbial community. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(11): 1105-1112.
- [12] 周丽霞, 丁明懋. 土壤微生物学特性对土壤健康的指示作用. 生物多样性, 2007, 15(2): 162-171.
- Zhou L X, Ding M M. Soil microbial characteristics as bioindicators of soil health. *Biodiversity Science*, 2007, 15(2): 162-171. (in Chinese)
- [13] Campbell C D, Grayston S J, Hirst D J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30: 33-41.
- [14] 谭兆赞, 刘可星, 廖宗文. 土壤微生物 BIOLOG 分析中特征碳源的判别. 华南农业大学学报, 2006, 27(4): 10-13.
- Tan Z Z, Liu K X, Liao Z W. The discrimination of characteristic carbon sources on soil microbial community using BIOLOG microplates. *Journal of South China Agricultural University*, 2006, 27(4): 10-13. (in Chinese)
- [15] 杨永华, 姚 健, 华晓梅. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 56-63.
- Yang Y H, Yao J, Hua X M. Effect of pesticide pollution against functional microbial diversity in soil. *Journal of Microbiology*, 2000, 20(2): 56-63. (in Chinese)

(责任编辑 李云霞)