

## 不同施肥/土地利用方式对黑土细菌多样性的影响

孟庆杰<sup>1,2</sup>, 许艳丽<sup>2</sup>, 李春杰<sup>2</sup>, 韩晓增<sup>2</sup>, 裴希超<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; <sup>2</sup>中国科学院东北地理与农业生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**摘要:**微生物多样性是表征土壤质量变化的敏感指标。为探讨黑土生态系统转变过程中土壤微生物多样性变化,应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法对黑土区3种生态系统和豆田3种施肥制度下土壤细菌多样性进行了初步研究。结果表明:土壤细菌多样性以草地(GE)最高,其细菌丰富度(S)和Shannon多样性指数均高于农田(CK)和裸地(BE);在豆田土壤中,长期不施肥(CK)的土壤细菌丰富度和Shannon多样性指数最高,其次为长期化肥配施有机肥(NPM),长期单施化肥(NP)最低。UPGMA聚类分析表明,NP与CK处理细菌的群落结构相似,相似性系数达到65.5%,NPM与GE和BE处理细菌的群落结构相似,相似性系数分别为52.5%和57.3%。

**关键词:**大豆;DGGE;黑土;细菌多样性;施肥;土地利用

中图分类号:S565.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9841(2008)03-0480-07

## Effects of Different Fertilization and Land Use History on the Bacterial Diversity in Black Soils

MENG Qing-jie<sup>1,2</sup>, XU Yan-li<sup>2</sup>, LI Chun-jie<sup>2</sup>, HAN Xiao-zeng<sup>2</sup>, PEI Xi-chao<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang; <sup>2</sup>Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, CAS, Harbin 150081, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Soil managements such as fertilization and land use history can affect soil quality, and the whilst biology diversity is a sensitive indicator of it. To discuss the change of soil microbial diversity with the evolvement of the soil ecosystems, the method of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was applied to study the diversity of soil bacteria in the three black soil ecosystems and soybean fields which were applied three fertilizers. The results showed that the bacteria diversity of grassland ecosystem (GE) is the highest, and the bacteria richness (S) and Shannon diversity index were higher than those of agricultural ecosystem (CK) and bare land ecosystem (BE); soil bacteria richness and Shannon diversity index of soybean fields with no fertilization for the long-term (CK) were the highest, followed by chemical fertilizers for the long-term with farmyard manure (NPM), those of the application of chemical fertilizer (NP) alone were the lowest, respectively. UPGMA clustering analysis showed that bacterial communities of CK and NP belonged to one cluster, the similarity coefficient was 65.5%, that bacterial communities of NPM was similar to that of GE and BE, the similarity coefficients were 52.5% and 57.3%, respectively.

**Key words:** Soybean; DGGE; Black soil; Bacterial diversity; Fertilization; Land use

土壤是农业可持续发展的物质基础,是作物生长的重要营养源泉,因此,对土壤质量和健康状况的研究倍受青睐。土壤微生物是土壤的重要组成部分,其在土壤养分转化循环、系统稳定性和抗干扰能力以及土壤可持续发展中占据主导地位<sup>[1]</sup>,而且土壤微生物是土壤生态系统变化的敏感指标之一,其活性和群落结构的变化能敏感地反映出土壤生态系

统的质量和健康状况<sup>[2]</sup>。因此,对土壤微生物群落结构及其组成的研究越来越受到众多学者的关注。

东北黑土区是世界上仅有的三大块黑土带之一,因其质地疏松、土质肥沃,有机质含量丰富,而成为我国重要的商品粮生产基地<sup>[3]</sup>。大豆、春小麦和玉米是黑土区适宜种植的三种作物,其中大豆是优质高效作物,近年来为使大豆高产,农民采取了不同

收稿日期:2008-01-11

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(kzcx2-yw-408);国家“十一五”科技支撑资助项目(GA06B101)。

作者简介:孟庆杰(1982-),女,硕士研究生,主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail: mengqingjie6646499@163.com。

通讯作者:许艳丽,研究员,博士生导师。E-mail: xyll@neigaehrb.ac.cn。

的施肥措施<sup>[4]</sup>。施肥在提高作物产量的同时,对土壤理化性质和土壤肥力方面产生了重要影响。有研究指出,长期施用化肥可使土壤耕层中养分下降,而化肥配施有机肥(秸秆还田或猪粪)可长期保持土壤中养分,使土壤有机质含量提高,是增产、培肥地力的最佳措施<sup>[5-6]</sup>。另外,施肥也对栖息于土壤中的微生物产生重要影响。长期施肥,特别是施有机肥不仅可明显提高土壤微生物数量<sup>[7]</sup>,而且也可提高土壤微生物量碳含量、土壤酶活性和土壤微生物群落功能多样性<sup>[8]</sup>,然而也有研究认为,施肥虽能不同程度提高微生物整体活性和丰富度,但施有机肥使微生物群落均匀度有所降低<sup>[9]</sup>。由于土壤类型和施肥方法及用量的不同,所以关于长期施肥对土壤微生物的影响结果尚存在差异。

目前,关于豆田不同施肥制度对土壤的研究多侧重于土壤养分、pH 值和水分等理化性质方面<sup>[10-12]</sup>,对土壤微生物的研究多集中在主要微生物类群数量及微生物量方面<sup>[13-14]</sup>,但对豆田由无肥向化肥继而向化肥加有机肥转化过程中土壤微生物多样性变化的研究还相对较少,同时,关于黑土生态系统由自然草地向农田转变过程中土壤微生物多样性变化的研究报道尚不多见。采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法对黑土 3 种生态系统和豆田 3 种不同施肥制度下的土壤细菌多样性进行分析,旨在探讨不同施肥制度及土地利用方式下的土壤细菌多样性差异,这将有助于人们进一步认识黑土生态系统转变过程中土壤的微生态环境变化,以期对土壤的合理利用和大豆的科学施肥提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

1.1.1 试验地点及设置 地点位于中国科学院海伦农业生态试验站,长期定位试验区,地处黑土区中部,北纬 47°26',东经 126°38',海拔高度 240 m,属于温带大陆性季风气候区,冬季寒冷干燥,夏季高温多雨,雨热同季。当地年平均气温 1.5 °C,年均降水量 570 mm,年均有效积温 2400 °C。土壤类型为中厚层黑土,地下水埋深 10 ~ 20 m<sup>[15]</sup>。供试土壤类型属典型黑土,开垦前植被为草甸草原植被,开垦历史为 100 年左右,前 60 年不施肥,接下来 20 年左右开始施用农家肥,后 20 年施用化肥氮肥<sup>[16]</sup>。1985 年将试验地设为 3 个土壤生态系统:(1)土壤—无植被生态系统,简称裸地生态系统(Bare field Eco-

system, BE);(2)土壤-草甸草原植被,简称草地生态系统(Grass field Eco-system, GE);(3)土壤—作物生态系统,简称农田生态系统(Crop Eco-system, CE)。1993 年又将农田设为 3 个处理:无肥(CK)、化肥(NP)和化肥+有机肥(NPM)。农田生态系统种植方式为小麦-玉米-大豆轮作。2006 年取样时农田作物为大豆。施肥量为:小麦(N 120 kg·hm<sup>-2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 54.96 kg·hm<sup>-2</sup>、有机肥 15 000 kg·hm<sup>-2</sup>);玉米(N 150 kg·hm<sup>-2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 75.00 kg·hm<sup>-2</sup>、有机肥 30 000 kg·hm<sup>-2</sup>);大豆(N 32.26 kg·hm<sup>-2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 82.44 kg·hm<sup>-2</sup>、有机肥 15 000 kg·hm<sup>-2</sup>),有机肥为腐熟猪粪。试验设 5 个处理:BE、GE、CK、NP、NPM,每个处理 4 次重复。

1.1.2 采样时间与方法 于 2006 年 7 月 10 日(大豆盛花期)采集农田和草地系统根际土壤,裸地系统采集土体。农田系统按 5 点取样法选取大豆植株,轻轻抖掉根系外围土作为土体土,选用粘附在根表面的土壤作为根际土;草地系统去掉地表杂草和 5 cm 表土,按 5 点取样法采集 5 ~ 20 cm 根际土样;裸地系统去掉 5 cm 表土,按 5 点取样法采集 5 ~ 20 cm 土体,混合均匀后用无菌的封口袋包扎密封,置于冰盒中带回实验室,新鲜土样过 2 mm 筛,置 -80 °C 超低温冰箱中保存,用于土壤微生物 DNA 分析。

1.1.3 主要仪器和试剂 变性梯度凝胶电泳(DGGE)所用仪器为 The Dcod™ Univertion Mutation Detection System(Bio-Red Co.)。

引物扩增 16S rDNA V3 高变区,引物为带有 GC 夹子的 F357-GC 和 R518<sup>[17]</sup>,其中 F357-GC(5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGG CACGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3'), R518(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 测定项目与方法

1.2.1 土壤基因组 DNA 的提取 参照 Miller 等<sup>[18]</sup>的方法,用酚:氯仿抽提法代替基因组 DNA 纯化试剂盒对总 DNA 进行初步纯化,然后用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增 PCR 扩增采用 25 μL 体系,包括 10 × PCR buffer(不含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL; 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> 脱氧核苷酸(dNTP) 2 μL; 上下游引物使用浓度 20 μmol·L<sup>-1</sup>,各 0.5 μL; 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> 1.5 μL; TaqDNA 聚合酶 0.3

$\mu\text{L}$ ;模板  $1 \mu\text{L}$ ;最后加灭菌双蒸馏水补齐至  $25 \mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件参照罗海峰等<sup>[19]</sup>的方法,采用降落 PCR 策略,程序如下:94℃ 预变性 5 min,前 20 个循环为 94℃ 1 min,65℃ 1 min,72℃ 3 min(每个循环退火温度下降 0.5℃),后 10 个循环为 94℃ 1 min,55℃ 1 min 和 72℃ 3 min,最后在 72℃ 下延伸 7 min,PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.3 PCR 产物的 DGGE 分析** 制备 8% 的聚丙烯酰胺凝胶,变性剂梯度为 30%~70% (100% 变性剂为  $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物),变性剂浓度由胶的上方向下方依次递增;待胶凝固后,加入 PCR 样品  $20 \mu\text{L}$ ,90V 电压,60℃,电泳 14 h;电泳结束后,将凝胶置于 Genefinder DNA 染色液中染色 15~20 min;将染色后的凝胶用 Gel Doc 凝胶成像系统拍照,并用 Quantity One 分析软件 (Bio-Rad) 分析样品电泳条带。

在图像处理过程中,对于在 DGGE 电泳图谱上肉眼可见、但被软件忽略掉的一些小条带进行了手动处理,条带密度由该软件自动算出。

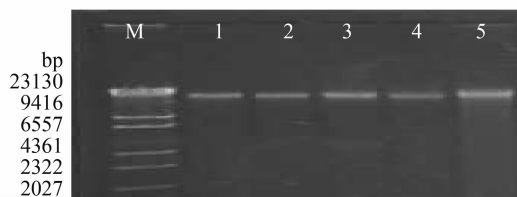
### 1.3 数据分析方法

待测微生物种的丰富度 (S) 采用数条带的方法,Shannon - Wiener index (H) 计算方法采用罗海峰等<sup>[20]</sup>的方法,聚类分析和相似性系数通过 Quantity One 分析软件 (Bio-Rad) 进行,数据处理用 Microsoft Excel 2003 进行。

## 2 结果与分析

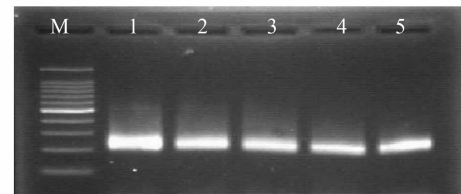
### 2.1 土壤细菌群落多样性分析

**2.1.1 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增** 提取土壤微生物基因组 DNA,供试土壤均得到了大小约为 23kb 左右的片段 (图 1),与细菌基因组大小相同<sup>[21]</sup>;PCR 扩增 16S rDNA 基因 V3 区,供试土壤均得到了大小约为 230bp 左右的片段 (图 2)。



1. CK;2. NP;3. NPM;4. GE;5. BE;  
M. Hind III - digested  $\lambda$  DNA marker

图 1 土壤基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from soil samples



1. CK;2. NP;3. NPM;4. GE;5. BE;  
M. 100bp ladder marker

图 2 PCR 扩增 V3 区 DNA 片段琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of V3 region amplified by PCR

**2.1.2 土壤细菌群落 DGGE 图谱分析** 应用 DGGE 技术分离 16S rDNA V3 片段 PCR 产物,可以分离出数目不等、位置各异的电泳条带,从而能够分析不同生态系统土壤中细菌群落结构的差异和多样性。根据 DGGE 能分离长度相同而序列不同 DNA 的原理,每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU) 相对应,条带数越多,说明生物多样性越丰富,条带染色后的荧光强度越亮,表示该种属的数目越多。从而反应土壤中微生物的种类和数量<sup>[22]</sup>。

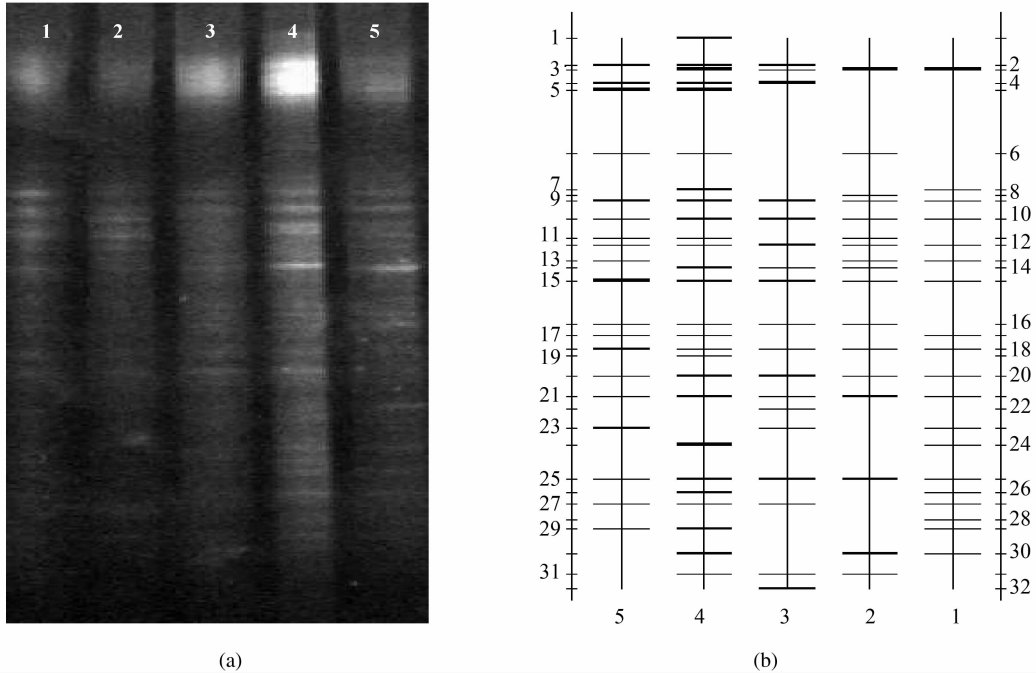
采用凝胶成像分析系统对 DGGE 图谱进行分析,结果表明 (图 3),不同处理土壤的条带位置和数目均存在一定差异,既有许多公共条带,又有少数特有条带,说明这些处理土壤可能即存在一些共有的细菌类型,又存在少数特有的细菌类型。此外,这些公共条带的亮度也有差异,表明土壤微生物在 DNA 水平上有明显的改变。各生态系统土壤条带数量由多到少顺序为草地 > 无肥  $\geq$  裸地 > 化肥加有机肥 > 化肥,其中草地土壤细菌丰富度最高 (S 为 26),而农田可能由于人为开垦使土壤细菌丰富度较草地有所降低,裸地由于无外界干扰,土壤细菌丰富度居中。与无肥相比,长期单施化肥使土壤细菌丰富度降低 (S 为 17),而化肥与有机肥配施可减轻土壤细菌丰富度的降低程度。

### 2.2 土壤细菌群落 Shannon 多样性指数分析

根据细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱中条带的位置和亮度的数字化结果计算了细菌群落结构多样性指标 Shannon-Wiener index, Shannon 指数值越大,表明细菌群落多样性越高<sup>[23]</sup>。分析不同生态系统土壤细菌 Shannon 指数,结果显示 (图 4),草地 (GE) 土壤细菌群落多样性最高,达 3.25,裸地 (BE) 和不施肥农田 (CK) 居中;而长期单施化肥 (NP) 和化肥配施有机肥 (NPM) 区的土壤细菌群落

多样性均低于无肥(CK)区,Shannon 指数值分别为 2.83、2.88 和 2.94。NPM 土壤细菌群落多样性高于 NP,原因可能是应用外援化学物质(化肥)对土

壤细菌群落结构产生了不利影响,而施用有机肥增加了土壤中碳源和氮源供给,有利于土壤细菌多样性的保持<sup>[8]</sup>。



1 CK;2 NP;3 NPM;4 GE;5 BE

图3 不同土壤样品的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离图谱(a)及示意图(b)

Fig.3 DGGE profile(a)and sketch map(b)of different soil samples

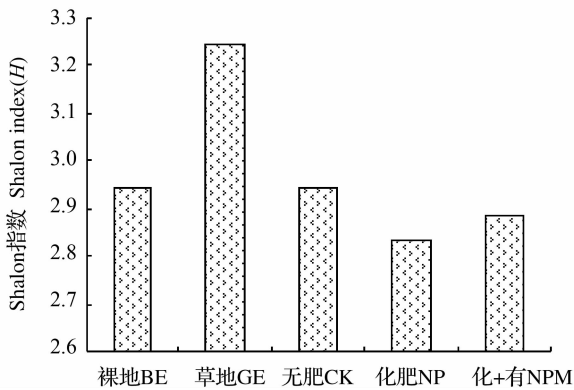


图4 土壤细菌群落 Shannon 指数

Fig.4 Shannon-Wiener index(H)of soil bacterial communities

### 2.3 土壤细菌群落相似性分析

所得图像用 Quantity One(Bio-Rad)软件进行处理,有关泳道和条带的技术处理都用该软件进行。采用 UPGMA 算法进行聚类分析,结果表明(图5),5个土壤样品共分为两大簇群,化肥与无肥为一种簇群,化肥配施有机肥、草地和裸地为另一种簇群。说明人为开垦可能改变土壤细菌的群落结构,而化肥配施有机肥有利于土壤细菌多样性的保持。

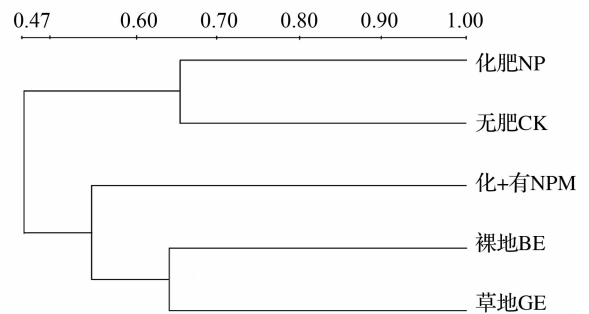


图5 DGGE UPGMA 分析

Fig.5 DGGE cluster analysis(UPGMA) of 16S rDNA profiles of bacterial communities in soil samples

对土壤细菌群落进行相似性分析,结果显示(表1),各处理土壤细菌群落结构的相似性都高于 42.1%,其中,CK 和 NP 之间的相似性最高,达到 65.5%,其次是 GE 和 BE(64.3%),此结果与张平究等<sup>[24]</sup>得出的单施化肥下与未施肥下土壤微生物分子群落相近的结果相似。Gelsomino 等<sup>[25]</sup>对两种粉沙壤土和 15 种其他土壤的研究表明了相同的土壤具有同样的微生物种群。Schutter 等<sup>[26]</sup>采用比较脂肪酸甲脂(FAME)判断季节、土壤类型和施肥措

施对蔬菜地微生物群落结构的影响,认为季节变化影响微生物群落结构主要通过影响土壤性质如阳离子交换量、有机质含量的季节变化而体现的。供试土壤都属于黑土,不同处理并未影响土壤质地(texture)的变化,但显然导致了有机碳含量和土壤其它理化性质的改变<sup>[12,27]</sup>。因此,不同处理间土壤微生物群落结构的相似性或多样性变化主要是由于土壤微生境的改变所致。

表 1 土壤细菌群落相似性系数

Table 1 Similarity coefficient of soil bacterial communities

|         | 无肥 CK | 化肥 NP | 化+有 NPM | 草地 GE | 裸地 BE |
|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| 无肥 CK   | 1.000 |       |         |       |       |
| 化肥 NP   | 0.655 | 1.000 |         |       |       |
| 化+有 NPM | 0.433 | 0.517 | 1.000   |       |       |
| 草地 GE   | 0.451 | 0.528 | 0.525   | 1.000 |       |
| 裸地 BE   | 0.421 | 0.463 | 0.573   | 0.643 | 1.000 |

### 3 讨论

以土壤微生物群体基因组 DNA 为研究对象,通过 DGGE 指纹图谱技术对黑土生态系统转变过程中的土壤细菌多样性进行了分析。DGGE 条带的数量及亮度分别反映土壤中细菌种群的数目和优势菌群数量。分析 DGGE 图谱可知,待测土壤均有丰富的细菌多样性组成,不同处理土壤间存在一定的差异性,草地土壤的细菌丰富度和群落多样性均高于农田,表明在黑土生态系统演变过程中,土壤细菌在 16S rDNA 分子水平的多样性有所降低,土壤细菌群落结构受到不同程度的影响。有报道认为耕作对土壤微生物多样性的影响与土壤有机碳含量有关<sup>[1]</sup>。韩晓增等<sup>[12]</sup>分析了黑土区自然草地开垦为农田后土壤的 C、N 储量变化认为,以草原植被覆盖下的土壤有机碳和氮向积累方向发展,开垦为农田后,在作物覆盖下,土壤有机碳和氮向降低方向发展,这可能是土壤细菌多样性降低的原因之一。另外也有研究认为,植被的类型、数量和化学组成可能是土壤生物多样性变化的主要推进力量<sup>[28]</sup>。植被通过影响土壤环境,从而影响到土壤微生物群落的结构和多样性,植被可使土壤中的微生物种类更丰富、群落多样性更高。草地系统是自然植被长期自然选择的结果,形成了较平衡、和谐的微生态环境,其植被种类和归还土壤的有机物数量均较农田多,因而使草地土壤细菌多样性高于农田,这与 van Elsas 等<sup>[29]</sup>通过 PCR - DGGE 检测发现的草地土壤细菌和真菌

等微生物的扩增条带数和 Shannon-Wiener 多样性指数远远高于耕地土壤的结果相近。而裸地尽管没有植被覆盖,但由于无人耕作,从而使其土壤细菌群落与草地相似,归为一大簇群。

在大豆田中,各施肥制度都不同程度使土壤细菌丰富度 S 和 Shannon 多样性指数降低,而适当地化肥配施有机肥有利于土壤细菌多样性的保持。这是由于长期施用化肥限制了土壤中某些细菌的生长<sup>[30]</sup>,同时刺激了某类细菌的生长并促使其成为优势种类,使得土壤细菌种类减少<sup>[31]</sup>,此推论有待进一步研究证实。Yang 等<sup>[32]</sup>的研究显示,在施入碳酸氢铵的土壤中微生物生物量碳含量较高,但是 DNA 多样性减少,除此之外,Sarathchandra 等<sup>[33]</sup>认为无机氮肥和磷肥对土壤微生物群落无明显影响。目前有关施用无机肥对土壤微生物多样性的影响报道存在矛盾之处,可能与无机肥的种类、施用量和施用时间长短、土壤类型和利用方式等因素有关。

总之,通过分析土壤微生物群落结构和组成变化,可作为评价土壤质量和可持续发展的潜力预测。

### 4 结论

施肥制度影响豆田土壤细菌多样性,无肥土壤细菌丰富度 S 和 Shannon 多样性指数最高,化肥配施有机肥次之,单施化肥最低。土地利用方式影响土壤细菌多样性,草地土壤细菌丰富度 S 和 Shannon 多样性指数均高于农田和裸地。化肥与无肥处理的土壤细菌群落结构相似,而化肥配施有机肥与草地和裸地的土壤细菌群落结构相似。

**致谢:**本研究得到中国科学院海伦农业生态试验站赵全老师等在样品采集方面的大力支持,谨表衷心感谢。

### 参考文献

- [1] 钟文辉,蔡祖聪. 土壤管理措施及环境因素对土壤微生物多样性影响研究进展[J]. 生物多样性,2004,12(4):456-465. (Zhong W H, Cai Z C. Effect of soil management practices and environmental factors on soil microbial diversity: a review [J]. Biodiversity Science, 2004, 12(4):456-465.)
- [2] 黎宁,李华兴,朱凤娇,等. 菜园土壤微生物生态特征与土壤理化性质的关系[J]. 应用生态学报,2006,17(2):285-290. (Li N, Li H X, Zhu F J, et al. Relationships between soil microbial ecological characteristics and physical-chemical properties of vegetable garden soil [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,

- 2006,17(2):285-290.)
- [3] 魏丹,杨谦,迟凤琴. 东北黑土区土壤资源现状与存在问题[J]. 黑龙江农业科学,2006(6):69-72. (Wei D, Yang Q, Chi F Q. The soil resource conditions and the problems in northeast black soil regions[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2006(6):69-72.)
- [4] 陈溯,王占哲. 黑土区大豆高效组合施肥技术试验研究[J]. 农业系统科学与综合研究,2001,17(3):221-222. (Chen S, Wang Z Z. The study on techniques of assemble fertilization for soybean in black soil area[J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture,2001,17(3):221-222.)
- [5] 索东让,王平. 长期定位施肥对土地生产力的影响[J]. 西北农业学报,2000,9(3):72-75. (Suo D R, Wang P. Effect of long-term located fertilization on land productivity[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2000,9(3):72-75.)
- [6] 邱多生,李恋卿,焦少俊,等. 长期不同施肥下太湖地区黄泥土肥力的变化[J]. 土壤肥料,2005,(4):28-32. (Qiu D S, Li L Q, Jiao S J, et al. Change of soil fertility under long-term different fertilization practices in a paddy soil from the Tai Lake region[J]. Soil and Fertilizers,2005(4):28-32.)
- [7] 樊军,郝明德. 长期轮作与施肥对土壤主要微生物类群的影响[J]. 水土保持研究,2003,10(1):88-89,114. (Fan J, Hao M D. Effects of long-term rotations and fertilizations on soil microflora[J]. Research of Soil and Water Conservation,2003,10(1):88-89,114.)
- [8] 王光华,齐晓宁,金剑,等. 施肥对黑土农田土壤全碳、微生物量碳及土壤酶活性的影响[J]. 土壤通报,2007,38(4):661-666. (Wang G H, Qi X N, Jin J, et al. Effect of fertilization on total soil C, microbial biomass C and soil enzyme activities in farmland black soil[J]. Chinese Journal of Soil Science,2007,38(4):661-666.)
- [9] 徐华勤,肖润林,邹冬生,等. 长期施肥对茶园土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报,2007,27(8):3355-3361. (Xu H Q, Xiao R L, Zou D S, et al. Effects of long-term fertilization on functional diversity of soil microbial community of the tea plantation[J]. Acta Ecologica Sinica,2007,27(8):3355-3361.)
- [10] 刘鸿翔,王德禄,王守宇,等. 黑土长期施肥及养分循环再利用的作物产量及土壤肥力质量变化Ⅲ. 土壤养分收支[J]. 应用生态学报,2002,13(11):1410-1412. (Liu H X, Wang D L, Wang S Y, et al. Changes of crop yield and soil fertility under long-term application of fertilizer and recycled nutrients in manure on a black soil. Soil nutrient budget[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2002,13(11):1410-1412.)
- [11] 董炳友,高淑英,吕正文. 不同施肥措施对连作大豆的产量及土壤pH值的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2002,14(4):19-21. (Dong B Y, Gao S Y, Lü Z W. Effect of different fertilizing on soybean yield and soil pH value in continuous cropping[J]. Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2002,14(4):19-21.)
- [12] 韩晓增,王守宇,宋春雨,等. 土地利用/覆盖变化对黑土生态环境的影响[J]. 地理科学,2005,25(2):203-208. (Han X Z, Wang S Y, Song C Y, et al. Effects of land use and cover change on ecological environment in black soil region[J]. Scientia Geographica Sinica,2005,25(2):203-208.)
- [13] 隋跃宇,焦晓光,张兴义,等. 不同施肥制度对大豆生育期土壤微生物量的影响[J]. 土壤通报,2006,37(5):894-896. (Sui Y Y, Jiao X G, Zhang X Y, et al. Effect of different fertilizer application strategies on soil microbial biomass during soybean growth periods[J]. Chinese Journal of Soil Science,2006,37(5):894-896.)
- [14] 刘新晶,许艳丽,李春杰,等. 大豆轮作系统对土壤细菌生理菌群的影响[J]. 大豆科学,2007,26(5):723-727. (Liu X J, Xu Y L, Li C J, et al. Effect of soybean rotation system on the bacterial physiological groups[J]. Soybean Science,2007,26(5):723-727.)
- [15] 刘强,邓伟,韩晓增,等. 海伦黑土区农田水分动态平衡与数值模拟[J]. 农业系统科学与综合研究,2005,21(3):185-189. (Liu Q, Deng W, Han X Z, et al. The dynamic balance on the black soil moisture and its numerical simulation in Hailun district[J]. System Sciences and Comprehensive Studies In Agriculture,2005,21(3):185-189.)
- [16] 王凤,韩晓增,李海波,等. 不同黑土生态系统的土壤水分物理性质研究[J]. 水土保持学报,2006,20(6):67-70. (Wang F, Han X Z, Li H B, et al. Hydro-physical properties of black soil in different type of eco-system[J]. Journal of Soil and Water Conservation,2006,20(6):67-70.)
- [17] 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 encoding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology,1993,59:695-700.
- [18] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples[J]. Applied and Environmental Microbiology,1999,65(11):4715-4724.
- [19] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等. PCR-DGGE技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生态学报,2003,23(8):1570-1575. (Luo H F, Qi H Y, Xue K, et al. A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil[J]. Acta Ecologica Sinica,2003,23(8):1570-1575.)
- [20] 罗海峰,齐鸿雁,张洪勋. 乙草胺对农田土壤细菌多样性的影响[J]. 微生物学报,2004,44(4):519-522. (Luo H F, Qi H Y, Zhang H X. The impact of acetochlor on the bacterial diversity in soil[J]. Acta Microbiologica Sinica,2004,44(4):519-522.)
- [21] 赵兴青,杨柳燕,陈灿,等. PCR-DGGE技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究[J]. 生态学报,2006,3(26):3610-3616. (Zhao X Q, Yang L Y, Chen C, et al. Study on microbial diversity in lake sediments by the method of PCR-DGGE[J]. Acta Ecologica Sinica,2006,3(26):3610-3616.)
- [22] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology,

- 1996,62:316-322.
- [23] 薛冬,姚槐应,黄昌勇. 茶园土壤微生物群落基因多样性[J]. 应用生态学报,2007,18(4):843-847. (Xue D, Yao H Y, Huang C Y. Genetic diversity of microbial communities in tea orchard soil[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2007,18(4):843-847.)
- [24] 张平究,李恋卿,潘根兴,等. 长期不同施肥下太湖地区黄泥土表土微生物碳氮量及基因多样性变化[J]. 生态学报,2004,24(12):2818-2814. (Zhang P J, Li L Q, Pan G X, et al. Influence of long-term fertilizer management on top soil microbial biomass and genetic diversity of a paddy soil from the Tai Lake region[J]. Acta Ecologica Sinica,2004,24(12):2818-2814.)
- [25] Gelsomino A, Keijzer - Wolters A C, Cacco G, et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Journal of Microbiological Methods,1999,38:1-15.
- [26] Schutter M E, Sandeno J M, Dick R P. Seasonal, soil type, and alter native management influences on microbial communities of vegetable cropping systems [J]. Biology and Fertility of Soils, 2001,34:397-410.
- [27] 赵丽娟,韩晓增,王守宇,等. 黑土长期施肥及养分循环再利用的作物产量及土壤肥力变化IV. 有机碳组分的变化[J]. 应用生态学报,2006,17(5):817-821. (Zhao L J, Han X Z, Wang S Y, et al. Changes of crop yield and soil fertility under long-term fertilization and nutrients - recycling and reutilization on a black soil IV. Soil organic carbon and its fractions[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2006,17(5):817-821.)
- [28] 黄进勇,李春霞. 土壤微生物多样性的主要影响因子及其效应[J]. 河南科技大学学报(农学版),2004,24(4):10-13. (Huang J Y, Li C X. Main factors of soil microbial diversity and their effect on cropland[J]. Journal of Henan University of Science and Technology (Agricultural Science), 2004, 24(4):10-13.)
- [29] van Elsland J D, Garbeva P, Salles J. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens [J]. Biodegradation, 2002, 13:29-40.
- [30] Ekundayo E O. Effect of common pesticides used in the Niger delta basin of southern Nigeria on soil microbial populations [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2003, 89:35-41.
- [31] 胡元森,刘亚峰,吴坤,等. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究[J]. 土壤通报,2006,37:126-129. (Hu Y S, Liu Y F, Wu K, et al. Variation of microbial community structure in relation to successive cucumber cropping soil [J]. Chinese Journal of Soil Science,2006,37:126-129.)
- [32] Yang Y H, Yao J, Hu S, et al. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD marker [J]. Microbial Ecology, 2000, 39:72-79.
- [33] Sarathchandra S U, Ghani A, Yeates G W, et al. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33:953-964.
- (上接第474页)
- [12] 刘晓莉. 黑河地区大豆重茬种植存在的问题及解决途径[J]. 中国农业科技导报,2005,7(5):22-25. (Liu X L. Problems and resolving methods of soybean continuous planting in Heihe region [J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2005,7(5):22-25.)
- [13] 许艳丽,韩晓增. 大豆重迎茬研究[M]. 哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,1995:1-5. (Xu Y L, Han X Z. The study of soybean alternate and continuous cropping [M]. Harbin: Harbin Engineering University Press, 1995:1-5.)
- [14] 刘增柱,周玉芝,韩静淑. 大豆连、轮作土壤微生物生态分布与大豆孢囊线虫群体动态的研究[J]. 大豆科学,1990,9(3):206-212. (Liu Z Z, Zhou Y Z, Han J S. Study on ecological distribution of soil microorganisms and colony dynamics of cyst-forming nematodes in continuous and rotation cropping systems of soybean [J]. Soybean Science, 1990,9(3):206-212.)
- [15] 武迎红,曹颖霞,董伟洁,等. 大豆重迎茬种植与孢囊线虫病发生关系的研究[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2001,16(1):39-42. (Wu Y H, Cao Y X, Dong W J, et al. Study on relationship between occurred and harm the soybean cyst nematode and continuous cultivation of soybean [J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities (Natural Science), 2001, 16(1):39-42.)
- [16] 靳学慧,辛惠普,郑雯,等. 长期轮作和连作对土壤中大豆胞囊线虫数量的影响[J]. 中国油料作物学报,2006,28(2):189-193. (Jin X H, Xin H P, Zheng W, et al. The influence of soil on the long-term rotation and continuous cultivation on soybean cyst nematode [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2006,28(2):189-193.)
- [17] 董全中. 2005年克拜地区大豆菌核病加重的原因分析[J]. 大豆通报,2007(3):36-37. (Dong Q Z. Analysis on the reasons of aggravated white mold of soybean in Kebai region in 2005 [J]. Soybean Bulletin, 2007(3):36-37.)
- [18] 胡亚军,赵滨,徐金彪,等. 东北地区大豆食心虫发生规律及防治措施[J]. 植物保护,2007(8):25-26. (Hu Y J, Zhao B, Xu J B, et al. Occurrence and control measures on soybean pod bore in the northeastern region [J]. Plant Protection, 2007(8):25-26.)
- [19] 陈海山,李春杰,刘新晶,等. 抗(耐)连作大豆品种筛选[J]. 大豆通报,2008(3):26-28. (Chen H S, Li C J, Liu X J, et al. Screening of varieties against continuous cropping soybean [J]. Soybean Bulletin, 2008(3):26-28.)