

乙草胺、甲胺磷及其复合对土壤真菌种群的毒性效应

李新宇¹, 张惠文¹, 吴敏娜^{1,2}, 张 勤¹, 张成刚¹

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 农药的施用会对土壤非靶向微生物的数量、种群结构产生影响, 目前关于这方面的研究主要集中在土壤细菌, 而真菌的较少。以从中科院海伦生态站采集的农田黑土作为实验土壤, 采用室内模拟和 PCR-DGGE (变性梯度凝胶电泳) 的方法, 考察北方常用的除草剂乙草胺和杀虫剂甲胺磷对真菌多样性和种群结构的影响。设定对照, 乙草胺 3 个浓度单独处理 (50、150、250 mg·kg⁻¹), 甲胺磷 3 个浓度单独处理 (50、150、250 mg·kg⁻¹) 和它们复合的 9 个处理, 共 16 个处理。结果表明, 乙草胺单独作用时, 增加了土壤真菌的多样性, 并且对真菌多样性和种群结构的影响在第 1 周尤为显著, 处理 8 周后呈恢复的趋势。甲胺磷单独作用时对土壤真菌多样性起抑制作用, 使真菌种群结构发生了改变, 随着培养时间的延长, 其对真菌影响也逐渐减弱, 真菌种群多样性和结构在处理 8 周后可部分恢复。乙草胺与甲胺磷相复合时, 土壤真菌多样性的变化因两种农药浓度组合的不同而不同。在培养初期多数复合处理降低了土壤真菌的多样性, 至末期时多数处理可增加真菌的多样性。对种群结构的影响在第 1 周时, 中、高浓度甲胺磷与乙草胺的复合以甲胺磷为主导因子, 第 8 周时乙草胺与低、中浓度甲胺磷复合时起到主导作用, 经 8 周培养后, 各复合处理土壤真菌种群结构并未恢复到对照水平, 复合处理比单因子的生态效应要强, 作用方式更复杂。

关键词: 变性梯度凝胶电泳; 土壤真菌; 复合污染; 乙草胺; 甲胺磷

中图分类号: X592 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)05-1842-06

Toxic Effects of Acetochlor, Methamidophos and Their Combinations on Soil Fungi

LI Xin-yu¹, ZHANG Hui-wen¹, WU Min-na^{1,2}, ZHANG Qin¹, ZHANG Cheng-gang¹

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Science, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Pesticide application has negative effects on the diversity and population structure of non-target soil microbes. Many studies have been made on the effects of pesticides on soil bacteria, but less on soil fungi. With the farmland black soil at Hailun Ecological Experimental Station under Chinese Academy of Sciences in Heilongjiang Province of Northeast China as test object, a laboratory incubation test was conducted to investigate the effects of acetochlor and methamidophos, the commonly used pesticides in North China, on the diversity and population structure of soil fungi. 16 treatments were installed, i.e., 3 concentrations (50, 150 and 250 mg·kg⁻¹) of acetochlor, 3 concentrations (50, 150 and 250 mg·kg⁻¹) of methamidophos, 9 combinations of each concentration of acetochlor and methamidophos, and CK, and soil samples were taken at a 7 day-interval during the incubation for PCR-DGGE analysis. The results showed that acetochlor increased the diversity of soil fungi, and its effects on the fungal diversity and population structure were most obvious in the 1st week of incubation but less remarkable after 8 weeks. Methamidophos decreased the diversity and altered the population structure, but the effects were weakened with time, and a partial recovery of the diversity and population structure was observed after 8 weeks. As for the combinations of acetochlor and methamidophos, most of them decreased the fungal diversity in the early period of incubation but increased it by the end of the incubation. The effects also differed with the concentrations of the two pesticides in the combinations. In the 1st week of incubation, medium and high concentration methamidophos in their combinations with acetochlor played dominant role; while in the 8th week, acetochlor in its combinations with low and medium concentration methamidophos was the leading factor. After 8 weeks incubation, the population structure of soil fungi under the effects of the combinations of acetochlor and methamidophos was still not restored to the level of CK. Compared with applying acetochlor or methamidophos alone, the combined application of the two pesticides had stronger ecological effects on soil fungi, and the action mechanisms were more complicated.

Keywords: DGGE; soil fungi; combined contamination; acetochlor; methamidophos

收稿日期: 2007-11-15

基金项目: 国家基础研究项目 (2004CB418503); 沈阳应用生态研究所博士启动基金 (C17DC06SBS31001)

作者简介: 李新宇 (1976—), 女, 博士。E-mail: lxygirl2002@yahoo.com.cn

通讯作者: 张惠文 E-mail: hwzhang@iae.ac.cn

黑土是我国北方农作物生长的重要土壤类型,为了提高商品粮基地的作物产量,除草剂乙草胺和杀虫剂甲胺磷的使用量也日益加大。据胡笑形^[1]和王律先^[2]报道,乙草胺和甲胺磷的消费量每年达到万吨以上,此外由于他们可以在同一生长季节被使用,导致两种农药在水环境与土壤系统中出现复合污染。相比单一污染物污染,许多实验结果显示复合污染形式,如有机-有机、有机-无机和无机-无机污染物往往带来更严重的污染问题^[3]。研究复合污染,而不是单一污染可以进一步了解污染物的生态行为,评估现实生活中潜在的生态风险^[4]。对这两种农药,目前已经有几篇关于它们对土壤细菌影响的研究^[5-7],但对土壤真菌还知之甚少。作为植物残渣的主要初级分解者和重要的土传病害类群,真菌在土壤中发挥着重要的作用,对土壤质量有重大影响^[8],因此农药对土壤真菌的影响应引起更多的关注。

随着分子生物学的发展,对土壤真菌的研究除了传统的培养方法外,许多分子方法的应用也日益广泛,如变性梯度凝胶电泳(denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE)^[9],末端限制性片断长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)^[10],克隆文库(Clone library)^[11],微阵列(Microarray)^[12]等,其中由于 DGGE 方法操作的简便性及高通量性,在研究真菌种群多样性和真菌结构变化上应用最为广泛。本研究目的是通过 DGGE 方法来评价乙草胺、甲胺磷及其复合对土壤真菌群落特征的影响并对潜在的生态风险进行评估。

1 材料与方法

1.1 材料和处理

供试相对清洁土壤采集于中国科学院黑龙江海伦农业生态实验站(位于 47°27'N, 126°55'E)肥-水耦合实验地,该样地采用小麦-玉米-大豆轮作方式耕作,至少 8 年以上未施用过任何农药。本实验中将其视为相对清洁土壤。该土壤理化性状为 pH 6.58,有机质 3.78%,全氮 0.26%,全磷 0.061%,全钾 2.60%。土壤样品以叉花点式采样法采集,分别采取 10 处表层 0~20 cm 土壤样品共 10 kg,充分混匀,使用前置于 4℃保存。用市售产品(禾耐斯 harness, 90%乳油,美国孟山都公司)配制乙草胺甲醇(225 mg·mL⁻¹)储备液,50%甲胺磷乳油(湖北省仙桃市农药厂)配制甲胺磷(200 mg·mL⁻¹)水溶液。其他化学试剂均为分析纯试剂。取过 2 mm 筛的土壤共 16 份,每份 900 g,施以不

同剂量乙草胺、甲胺磷。实验处理设对照、乙草胺 3 个浓度(50、150、250 mg·kg⁻¹),甲胺磷 3 个浓度(50、150、250 mg·kg⁻¹),复合 9 个浓度组合共 16 个处理(表 1),每个处理设 3 个重复。将农药施入土壤,充分混匀后,放置 30 min 使乙草胺中甲醇挥发,加水使土壤含水量达到田间最大含水量的 60%,放入培养盆中,盆口用密封膜密封,保证一定的通气性。置于培养箱中 25℃避光培养,在培养过程中不添加任何营养成分,但以称重法定期补充水分。每隔 7 d 取 1 次样。每次从 3 个重复各取 20 g 土,充分混匀,共 60 g 土,作为每个处理的采样土,保存于-20℃。

表 1 实验处理列表
Table 1 Experimental treatments list

编号 No.	处理组	处理浓度/mg·kg ⁻¹ soil	
1	CK	乙草胺=0 甲胺磷=0	
2	乙草胺单因子	乙草胺=50	
3		乙草胺=150	
4		乙草胺=250	
5	甲胺磷单因子	甲胺磷=50	
6		甲胺磷=150	
7		甲胺磷=250	
8	复合处理	乙草胺=50	甲胺磷=50
9			甲胺磷=150
10			甲胺磷=250
11		乙草胺=150	甲胺磷=50
12			甲胺磷=150
13			甲胺磷=250
14		乙草胺=250	甲胺磷=50
15			甲胺磷=150
16			甲胺磷=250

1.2 实验方法

1.2.1 土壤总 DNA 提取

土壤总 DNA 提取采用周集中^[13]的方法,略有修改。用 1 g 土加 1 mL 裂解液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl [pH 8.0], 100 mmol·L⁻¹ EDTA [pH 8.0], 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 [pH 8.0], 1.5 mol·L⁻¹ NaCl, 1% CTAB, 100 μL 20% SDS), 涡旋 10 s, 在 65℃水浴温育 30 min,每隔 15 min 颠倒混匀 1 次,随后在-20℃、65℃冻融 3 次使细胞充分裂解。再放入 65℃水浴温育 1 h 后,在 6 000×g 离心 10 min,取上清,与等体积的氯仿/异戊醇混合,8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上部水相,加 0.6 倍水相体积的异丙醇混合,室温沉淀 2 h,用 16 000×g 离心 20 min 得到 DNA 沉淀,用 70%冷乙醇

漂洗 1 次,最后重悬于 50 mL TE 中,得到粗提 DNA。粗提 DNA 用纯化试剂盒(wizard cleanup prep, promega)纯化后即可进行 PCR 扩增。本文采用 GC (CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGG)+U1 (5′-GTGAAATTGTTGAAAGGGAA-3′)和 U2 (5′-ACTCCTTGCTCCGTGTT-3′)引物扩增真菌 28S DNA 中的 260 bp 片段^[4],使用 Thermo Hybaid PCR express 扩增仪,PCR 反应条件为:在 94 ℃预变性 3 min 后进行 94 ℃变性 1 min,50 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 1 min 的 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。

1.2.2 DGGE 条件

DGGE 采用 D-Code system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA),8%聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为 30%~70%(100%变性相当于 7 mol·L⁻¹ 尿素和 40%去离子甲酰胺),PCR 产物加样量 40 μL,在 60 ℃,1×TAE,200 V 条件下电泳 5 h,电泳胶片利用改进的 Bassam^[15]银染方法进行染色,染色胶片干燥后进行扫描分析(Bio-Rad, USA)并封片保存。

1.2.3 实验数据处理

所得图像用 Bio-Rad Quantity one 4.2.3 软件进行处理。根据条带密度计算香农多样性指数 $SDI = -\sum P_i \log P_i$,其中 P_i 是孔道中第 i 条带的亮度/该泳道中所有条带的总亮度。为了更直观的表现处理与对照的差异,我们将各处理多样性指数除以对照,考察多样性指数相对对照的增长倍数。结果中的 DGGE 图片分为图 a 和图 b,每个都有 3 个对照,分别为对照+乙草胺 3 个单因子处理,对照+甲胺磷 3 个单因子处理,对照+复合 9 个处理,与对照相比时各处理分别除以各自的对照,以消除各处理不在同一张图片上所造成的差异。同时将各处理谱带转为 0、1 矩阵,利用 PHYLIP3.0 软件对所有处理土壤样品进行聚类分析。

2 结果

2.1 乙草胺、甲胺磷及其复合对土壤真菌多样性的影响

图 1 为不同浓度乙草胺、甲胺磷及其复合处理土壤的总真菌 PCR-DGGE 电泳图谱,通过计算多样性指数可以看出(表 2),在第 1 周,3 种浓度乙草胺处理土壤真菌多样性指数都高于对照,以低、中浓度乙草胺(50 和 150 mg·kg⁻¹)尤为显著。第 8 周时,各处理土壤的多样性指数仍高于对照,但这种刺激作用明显弱

于第 1 周,渐渐的接近对照。低浓度的乙草胺比高浓度的刺激作用强。

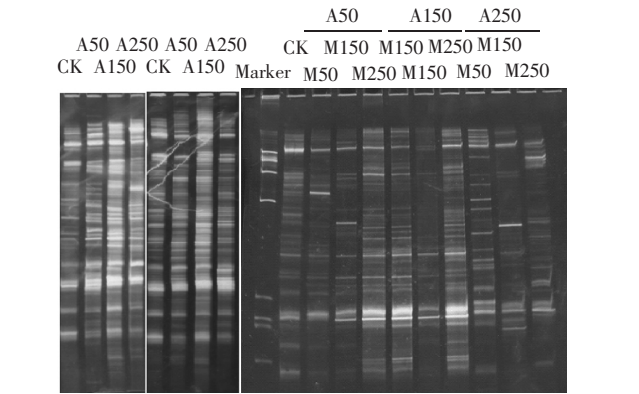


图 1a

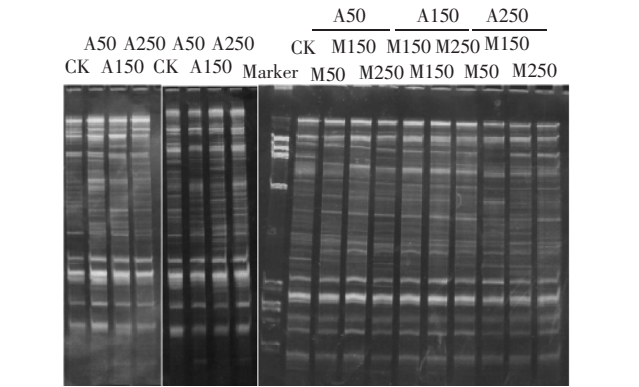


图 1b

CK 为对照,A50、A150、A250 表示 50、150 和 250 mg·kg⁻¹ 乙草胺处理,M50、M150 和 M250 表示 50、150 和 250 mg·kg⁻¹ 甲胺磷处理。
CK: the control; A50, A150, A250 stand for soil contaminated by acetochlor of 50, 150, 250 mg·kg⁻¹, respectively; M50, M150, M250 stand for soil contaminated by methamidophos of 50, 150, 250 mg·kg⁻¹, respectively.

图 1 乙草胺、甲胺磷及其复合处理下黑土真菌在第 1 周(图 1a)和第 8 周(图 1b)的 PCR-DGGE 电泳图谱
Figure 1 PCR-DGGE of soil fungi in black soil under the stress of acetochlor, methamidophos and their combinations at 1st week (Figure 1a) and 8th week (Figure 1b)

对于甲胺磷单因子处理土壤,通过计算土壤真菌多样性指数可以看出(表 2),与乙草胺对土壤真菌种群的促进作用不同,甲胺磷处理土壤的真菌多样性指数在第 1 周都低于对照土壤,表现为抑制作用。随着处理时间延长,各甲胺磷处理土壤真菌多样性指数逐渐增高,到第 8 周时,除低浓度处理仍低于对照土壤,其他两个处理都恢复到对照水平。同样是低浓度的比高浓度的抑制作用强。

对于乙草胺与甲胺磷复合土壤(表 2),结果表明,除了 A50+M250(对照的 1.0 倍)、A150+M50(对照的

1.03)、A150+M250(对照的 1.08)3 个处理比对照略高外,其他处理都低于对照,而且这 3 个处理虽然起促进作用,但促进程度小于乙草胺单独处理,表明甲胺磷在其中起抑制作用。在 7 个呈抑制作用的复合处理中,除 A150+M50、A150+M150、A250+M150、A250+M250 4 个处理的抑制程度要低于甲胺磷单独处理外,其他处理都大于甲胺磷单独处理,这说明低浓度乙草胺与甲胺磷复合时对真菌多样性起促进作用,但由于甲胺磷抑制作用要强于乙草胺的促进作用,所以总体表现为抑制作用。但在乙草胺中、高浓度与甲胺磷复合这 4 个处理 A150+M50、A150+M150、A250+M150、A250+M250 中,乙草胺表现为抑制作用,使得总的多样性指数甚至低于甲胺磷单独处理。到第 8 周时,各复合处理除了 A50+M50 和 A50+M150 的真菌多样性指数仍低于对照外,其他处理都高于对照,而且在 7 个促进的处理中有 5 个的多样性指数是高于乙草胺和甲胺磷各自的单独处理,说明在末期由于乙草胺和甲胺磷的降解促进了真菌的多样性,促进作用强于两种农药单因子处理。总的来说,在乙草胺与甲胺磷组合时,乙草胺对土壤真菌主要起促进作用,而甲胺磷起到抑制作用,他们不同浓度的组合产生了不同的生态效应。

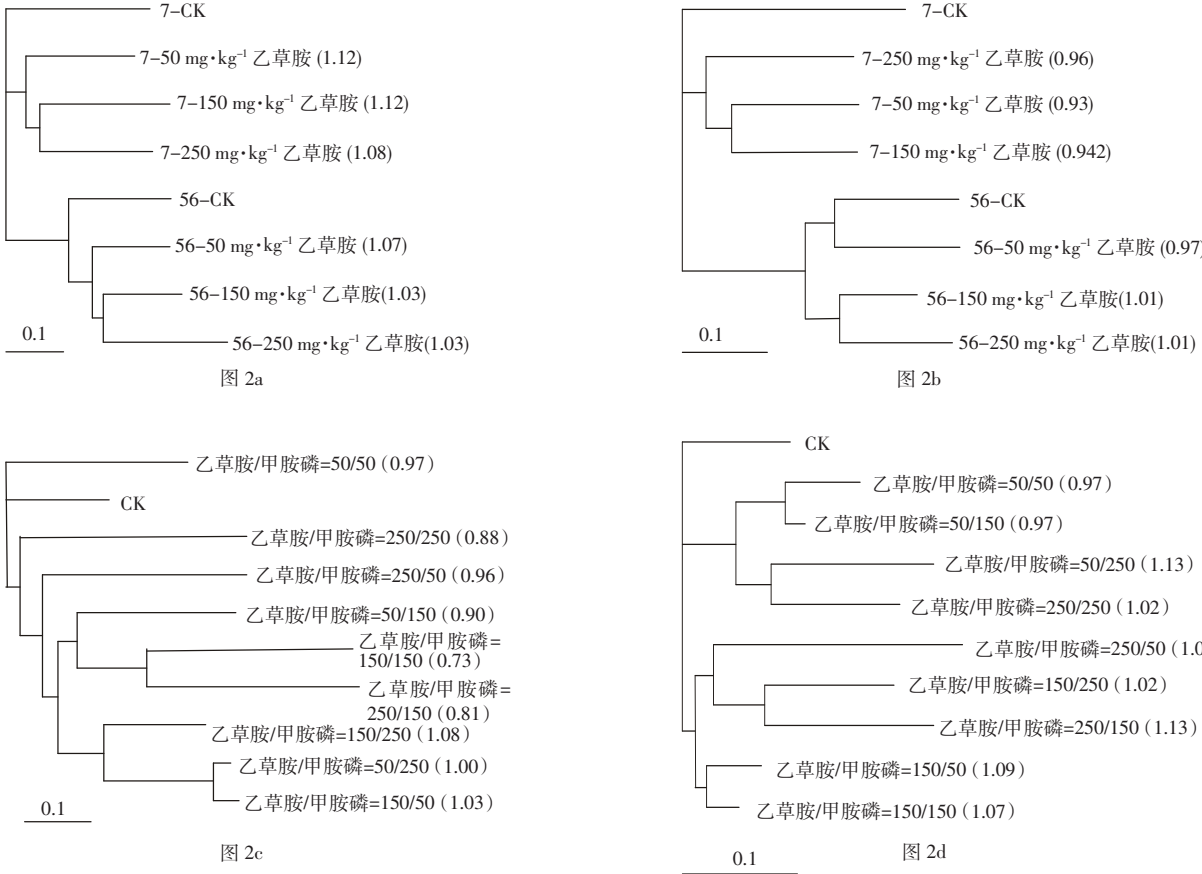
2.2 乙草胺、甲胺磷及其复合对土壤真菌种群结构的影响

通过聚类分析可以看出(图 2a),对于乙草胺单因子处理,第 1 周的种群结构变化最大,对照单独聚为一个分支,而第 1 周的其他 3 个乙草胺处理单独聚为一个分支,在第 8 周时,种群结构有所恢复,对照和 3 个处理都聚到 1 个亚分支内。这与真菌多样性的变化规律一样,同样是在第 1 周影响最大,第 8 周时有所恢复,接近对照。对于甲胺磷单因子处理(图 2b),具有同样的变化规律,都是第 1 周对种群结构影响最大,到第 8 周时,种群结构有所恢复,与对照聚为同一分支内。

对于乙草胺与甲胺磷复合处理的种群结构来说,由于二者的相互作用,使得种群结构的变化也较为复杂。在第 1 周时(图 2c),甲胺磷低浓度与 3 个浓度乙草胺的复合对真菌结构变化较大,其中 A50+M50 对真菌种群的影响不同与其他复合处理,单独处于 1 个分支,而 M50 与其他两个的复合也相距较远,种群结构相差很大。当中浓度甲胺磷与乙草胺 3 个浓度复合时它们的种群结构较相似,聚在 1 个亚分支内。而甲胺磷高浓度的两个处理(M250+A50, M250+A150)和同时也起促进作用的 A150+M50 处理聚在了一起,这

表 2 乙草胺、甲胺磷及其复合处理土壤的真菌多样性指数
Table 2 The shannon diversity indices of fungal communities in black soil under the stress of acetochlor, methamidophos and their combinations.

处理浓度/mg·kg ⁻¹ soil		第 7 d		第 56 d	
		多样性指数	处理/对照	多样性指数	处理/对照
CK-1		3.03	—	2.93	—
乙草胺=50		3.40	1.12	3.14	1.07
乙草胺=150		3.41	1.12	3.02	1.03
乙草胺=250		3.28	1.08	3.02	1.03
CK-2		3.20	—	2.93	—
甲胺磷=50		2.99	0.93	2.86	0.97
甲胺磷=150		3.03	0.94	2.98	1.01
甲胺磷=250		3.08	0.96	2.98	1.01
CK-3		3.13	—	2.63	—
乙草胺=50	甲胺磷=50	3.04	0.97	2.56	0.97
	甲胺磷=150	2.83	0.90	2.56	0.97
	甲胺磷=250	3.16	1.00	2.99	1.13
乙草胺=150	甲胺磷=50	3.24	1.03	2.88	1.09
	甲胺磷=150	2.30	0.73	2.82	1.07
	甲胺磷=250	3.39	1.08	2.70	1.02
乙草胺=250	甲胺磷=50	3.03	0.96	2.88	1.09
	甲胺磷=150	2.56	0.81	2.99	1.13
	甲胺磷=250	2.77	0.88	2.70	1.02



在图 2a 和 2b 中 7 和 56 表示采样时间,各处理后面括号内的数字表示各处理多样性指数与对照的比值。

7 and 56 represent the sampling time in Fig.2a and Fig.2b, and the numbers in brackets are the ratio of diversity indices between the control and treatments.

图 2 乙草胺(图 2a), 甲胺磷(图 2b)及其复合处理下(第 1 周-图 2c 和第 8 周-图 2d)黑土真菌种群组成相似性矩阵图
Figure 2 Similarity matrix of community composition of soil fungi in black soil under the stress of acetochlor (Figure 2a), methamidophos (Figure 2b) and their combinations at 1st week (Figure 2c) and 8th week (Figure 2d)

说明当复合起抑制或促进作用时,作用相似的处理它们的种群结构也较相似。在第 1 周时,中、高浓度甲胺磷与乙草胺的复合以甲胺磷为主导因子,同种浓度的甲胺磷复合处理聚在 1 个亚分支内。在第 8 周时,乙草胺对真菌影响的长效性显现出来,从图中(图 2d)可以看出,乙草胺与低、中浓度甲胺磷复合时起到主导作用,低浓度乙草胺与甲胺磷的两个复合 A50+M50、A50+M150,中浓度乙草胺与甲胺磷的两个复合 A150+M50、A150+M150,高浓度乙草胺与甲胺磷的两个复合 A250+M50、A250+M150 都分别聚在了 1 个亚分支内,呈现结构的相似性。而高浓度的甲胺磷在复合中表现出主导作用,它与乙草胺的两个复合 M250+A50 和 M250+A250 聚在了 1 个亚分支内。聚类结果也与第 1 周一样,表现为抑制和促进的处理分别聚在了不同的分支里,作用相似的处理它们的种群结构也

较相似。但它们都与对照处理有很大的距离。乙草胺对结构的长期影响与其对真菌多样性的影响是一致的,在乙草胺单因子处理时,第 8 周对真菌多样性的影响仍然高于甲胺磷单因子对真菌多样性的影响,说明乙草胺对真菌的影响比甲胺磷的作用时间更长。

3 讨论

目前用分子生物学方法来研究乙草胺或甲胺磷对土壤微生物影响的报道还很少。张惠文等^[6]研究了乙草胺与甲胺磷对土壤细菌的影响,通过 DGGE 分析和多样性指数的计算表明乙草胺和甲胺磷复合对细菌种群的影响同样很复杂,因浓度组合的不同而不同。但对于多样性来说,都表现为抑制作用,低于对照水平。结构上也与对照差别很大。在复合中有的以乙草胺为主导因子,有的以甲胺磷为主导因子。这与本

论文的研究相似。Seghers 等^[16]研究除草剂长期应用对土壤细菌种群结构和功能的影响,他采用 DGGE 方法,考察了连续施用 20 年 atrazine 和 metolachlor 对土壤微生物种群的影响,发现长期施用这两种农药会改变土壤的微生物种群结构。关于应用分子微生物学方法考察杀虫剂对土壤微生物的影响还未见报道。

土壤是一个复杂的群体,目前仅仅应用普通培养方法来研究微生物在各种压力下的变化已很有限。目前许多分子微生物生态学方法如 DGGE, T-RFLP 及克隆建库等方法都应用的日益广泛。但用分子生物学方法研究细菌的很多,真菌的却很有限,关于真菌的 DGGE 引物相对也较少。本文所应用的这对引物是扩增于 28S DNA 上的一段 260 bp 的片断,长度大小适合进行 DGGE,同时扩增效果也很理想,适合进行真菌多样性的分析。

研究表明应用于农业生产上的这两种农药乙草胺和甲胺磷都会对土壤非靶向微生物产生影响,同时它们复合所产生的毒害效果更为严重,在今后的生产中要合理、适度使用农药,尽量避免交叉使用。

4 结论

(1)乙草胺单因子作用时,3 种浓度乙草胺都增加了土壤真菌的多样性,同时改变了真菌的种群结构,且在第 1 周的促进作用和结构的改变要大于第 8 周。

(2)甲胺磷单因子作用时,3 种浓度甲胺磷在培养初期对土壤真菌多样性有抑制作用,且浓度越低,抑制作用越强。随着培养时间的延长,对真菌种群多样性和结构的影响在处理 8 周后可部分恢复。

(3)当乙草胺与甲胺磷相复合时,土壤真菌的多样性和种群结构的变化因两种农药浓度组合的不同而不同。在培养初期多数复合处理降低了土壤真菌多样性,至末期时则多表现为促进真菌多样性。对种群结构的影响在第 1 周时,中、高浓度甲胺磷与乙草胺的复合以甲胺磷为主导因子,第 8 周时乙草胺与低、中浓度甲胺磷复合时起到主导作用。复合处理比单因子的生态效应要强,作用方式更复杂。

参考文献:

- [1] 胡笑彤. 我国农药工业的现状与发展方向[J]. 农药, 1998, 37: 7-10.
HU Xiao xing. Current situation and developing direction of pesticide industry in China [J]. *Pesticides*, 1998, 37: 7-10.
- [2] 王律先. 我国农药工业概况及发展趋势[J]. 农药, 1999, 38: 1-8.
WANG Lu-xian. Survey and trends of pesticide industry in China [J].

Pesticides, 1999, 38: 1-8.

- [3] Kungolos A, Samaras P, Kipoulou A M, et al. Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms[J]. *Water Science Technology*, 1999, 40: 357-364.
- [4] Hadjispyrou S, Kungolos A, Anagnostopoulos A. Toxicity, bioaccumulation and interactive effects of organotin, cadmium and chromium on *Artemia franciscana* [J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2001, 49: 179-186.
- [5] 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: 519-522.
LUO Hai-feng, QI Hong-yan, ZHANG Hong-xun. The impact of acetochlor on the bacterial diversity in soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44: 519-522.
- [6] 张惠文, 周启星, 张倩茹, 等. 乙草胺、甲胺磷及组合对农田黑土细菌种群生长及多样性的毒性效应[J]. 环境科学, 2004, 25: 143-148.
ZHANG Hui-wen, ZHOU Qi-xing, ZHANG Qian-ru, et al. Toxic effects of acetochlor, methamidophos and their combination on bacterial amount and population richness at molecular levels in agricultural black soils[J]. *Environmental Science*, 2004, 25: 142-148.
- [7] 张倩茹, 周启星, 张惠文, 等. 乙草胺-铜离子复合污染对黑土农田生态系统中土著细菌群落的影响 [J]. 环境科学学报, 2004, 24: 326-332.
ZHANG Qian-ru, ZHOU Qi-xing, ZHANG Hui-wen, et al. Joint effects of acetochlor and Cu²⁺ on indigenous bacterial communities in phaeozem [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24: 326-332.
- [8] Eash N S, Karlen D L, Parkin T B. Fungal contributions to soil aggregation and soil quality[M]//Doran J W, Coleman D C, Bezdicek D F, et al. (eds). Defining soil quality for a sustainable environment. SSSA Spec. Publ. 35. SSSA Madison, WI. P. 1994. 221-228.
- [9] Rumberger A, Merwin I A, Thies J E. Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at a replant disease site [J]. *Soil Biol and Biochem*, 2007, 39: 1645-1654.
- [10] Calbrix R, Barray S, Chabrierie O, et al. Impact of organic amendments on the dynamics of soil microbial biomass and bacterial communities in cultivated land [J]. *Appl Soil Ecol*, 2007, 35: 511-522.
- [11] Miletto M, Bodelier P L E, Laanbroek H J. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70: 103-111.
- [12] Bar-Or C, Czosnek H, Koltai H. Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity [J]. *Trends in Genetics*, 2007, 23(4): 200-207.
- [13] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 316-322.
- [14] Sandhu G S, Kline B C, Stockman L, et al. Molecular probes for the diagnosis of fungal infections [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 2913-2919.
- [15] Bassam B J, Caetano-Anollés G. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. *Annual Biochemistry*, 1991, 196:80-83.
- [16] Seghers D, Verthe K, Reheul D, et al. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46:139-146.