

土壤样品长期保存对微生物群落代谢活性和功能类群的影响

周杨^{1,2} 崔航¹ 朱红惠² 傅声雷³ 姚青^{1*}

(1. 华南农业大学 园艺学院 广东 广州 510642)

(2. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东 广州 510070)

(3. 中国科学院华南植物园 广东 广州 510160)

摘要:【目的】评估土壤长期保存(4个月)对土壤微生物群落代谢活性的影响。【方法】采用Biolog[®] EcoPlate[™]生态板研究4℃风干保存和-20℃低温冻存的农田土壤和森林土壤中微生物群落的碳源利用模式。【结果】与新鲜土壤样品相比,长期保存的土壤样品的微生物群落对碳源的利用能力大大降低,其多样性、均匀度和Simpson指数均降低;风干保存和低温冻存两者对土壤微生物的碳源利用的影响没有显著差异;除风干保存的土壤样品中利用多聚物类的微生物类群的代谢活性外,两种保存方法显著降低微生物群落的代谢活性,降低幅度为54.5%–99.8%。【结论】长期保存土壤可能会导致对微生物群落信息的低估,土壤微生物代谢活性研究的最佳样品为新鲜土壤。

关键词: 土壤微生物, 风干保存, 低温冻存, Biolog生态板, 代谢活性

Effects of long-term soil storage on the metabolic activity and functional groups of soil microbial community

ZHOU Yang^{1,2} CUI Hang¹ ZHU Hong-Hui² FU Sheng-Lei³ YAO Qing^{1*}

(1. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510160, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to assess the effects of long-term (4 months) soil storage on the metabolic activity of soil microbial community. [Methods] Biolog[®] EcoPlate[™] was used to test carbon source utilization patterns of the microbial communities in the arable and forest soils stored at 4℃ after air drying or at -20℃ with field moisture, respectively. [Results] Compared with the fresh soil samples, the abilities of carbon source utilization of microbial communities in the stored soils were

基金项目: 国家自然科学基金-广东省联合项目(No. U1131001)

*通讯作者: Tel: 86-20-85286902; 邮箱: yaoqscau@scau.edu.cn

收稿日期: 2014-08-26; 接受日期: 2014-11-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-20

greatly reduced, with the microbial diversity index, evenness and Simpson index decreased as well. There was no significant difference in the influence on the abilities of carbon source utilization of microbial community between air dried samples and frozen samples. Two storage methods significantly decreased the metabolic activity of microbial community except for the metabolic activity of polymer-utilizing microbial group in air dried soil samples, with the reduction of 54.5%–99.8%.

[Conclusion] Long-term storage of soil samples may lead to underestimation of the information about soil microbial community, and fresh soils are the best samples for exploring soil microbial metabolic activity.

Keywords: Soil microbes, Air drying storage, Freezing storage, Biolog[®] EcoPlate[™], Metabolic activity

土壤是最重要的生态系统之一,在地球生物化学循环中扮演重要角色,其中土壤微生物的多样性和代谢活性直接影响土壤养分循环过程^[1-2]。到目前为止已经发展了许多研究土壤微生物多样性的方法^[3-4],例如以生物化学为基础的磷脂脂肪酸(PLFA)分析法^[5]、呼吸醌指纹图谱法^[6]、群落水平生理图谱法(CLPP)^[7]等,以现代分子生物学为基础的PCR-DGGE^[1]、Microarray等^[8]方法。

新鲜土壤样品能最好地反映土壤微生物群落的本来状态^[9],然而对土壤微生物生态的研究者来说,野外采样和大量土壤样品的运输是不可避免的。此外,由于样品数量和测定指标众多、实验过程复杂等原因,土壤样品的保存也是不可避免的。因此,许多研究采用不同方法探讨了土壤保存对微生物活性的影响。Martí等^[9]通过测定土壤呼吸强度和PCR-DGGE研究土壤保存方法对微生物代谢活性及群落组成的影响,结果表明保存后的土壤呼吸代谢活性降低,不同保存方法对微生物群落组成影响不同;Liu等^[10]采用PLFA分析法研究土壤风干及低温保存对稻田土壤微生物生物量和群落结构的影响,表明对于水稻田土壤的PLFA分析,冷冻干燥后超低温冷冻比风干保存要好;Dadenko等^[11]则评估了保存土壤酶活性的变化,在保存的前12周(约3个月),过氧化氢酶活性显著降低,随后保持稳定。实际上,尽管许多研究者用PCR-DGGE、PLFA、土壤酶活性的变化等方法来探究土壤样品的保存方法对微生物群落和代谢活性的影响,然而,用Biolog方法进行此类研究的报道比较少见。

CLPP方法是表征土壤微生物群落快速、简便的方法,该方法最早由Garland和Mills^[12]提出,后来经Biolog公司商业化后被广泛应用。Biolog生态微平板含有31种微生物常用碳源,微生物在利用碳源的过程中产生的自由电子与染料发生显色反应,其颜色的深浅反映微生物对碳源利用的多少。与PCR-DGGE、PLFA等研究技术相比,Biolog方法通过对31种碳源的利用不仅能反应微生物的群落结构,还能反应微生物的代谢活性与功能,有助于加深对微生物群落结构和功能的理解。Govaerts等^[13]用Biolog[®] EcoPlate[™]微平板研究了免耕、轮作和作物秸秆还田对土壤微生物分解代谢多样性的影响,发现这些措施增强了微生物群落的代谢活性和多样性。杨永华等^[14]用Biolog GN微平板法研究了农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响,发现农药污染导致土壤微生物群落功能多样性的降低,减少了微生物对微平板上碳源的利用数量,微生物对碳源的利用能力降低。

低温冻存是土壤微生物研究中最常用的土壤保存方法之一,而风干保存则不适于此类研究,但是风干保存的土壤中哪些微生物类群产生显著变化,目前未见报道。农田土壤和森林土壤是农林业中两个重要的土壤生态系统,其中的微生物群落参与养分的生物地球化学循环,进而影响农林生态系统的生产力。基于此,本研究以农田土壤和森林土壤为研究对象,进行-20℃低温冻存或者风干保存4个月,采用Biolog微平板技术评估了长期低温冻存对土壤微生物群落功能多样性的影响,以及风干

保存土壤中不同微生物类群的代谢活性变化,以期
为土壤微生物代谢活性及多样性的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集和保存

供试土壤样品采自广东鹤山森林生态系统国家野外科学观测研究站(112°54'E, 22°41'N)。农田土壤采自该研究站的菜地,从菜地中随机选择4个相距6m的垄,每条垄用土钻从0–20cm深的土层取6个相隔1m的土柱,混合后过2mm筛;森林土壤采自该研究站的自然林,在同一等高线随机选择4个相距30m的采样点,每个采样点用土钻从0–20cm深的土层取6个相隔1m的土柱,混合后过2mm筛。两种土壤各取4个土样,装袋后置于冰上带回实验室。化学分析显示两种土壤的基本理化性状差异较大(表1)。

将每份土壤样品等分3份,分别进行以下处理:第1份土壤样品放置在–20℃保存4个月(即低温冻存);第2份土壤样品在室内风干(约10d),然后放置在4℃保存4个月(即风干保存);第3份土壤样品直接用Biolog生态板进行CLPP分析(即土壤鲜样)。低温冻存样品和风干保存样品在保存4个月后用Biolog生态板进行CLPP分析。

1.2 土壤样品微生物群落生理图谱分析

土壤微生物群落水平生理图谱的分析采用Garland和Mills^[12]的方法,稍作修改。称取相当于

10g干重的土壤置于250mL三角瓶中,加入100mL 0.85%的灭菌生理盐水,180r/min振荡20min,然后在冰上静置5min。用0.85%的灭菌生理盐水将上述土壤溶液稀释1000倍。取150μL稀释的土壤溶液加到Biolog微平板中,微平板放在30℃恒温培养箱中培养7d。每24h用酶标仪(Tecan Infinite M200)测定590nm处的吸光值。

微生物对碳源的利用能力用每孔颜色平均变化率AWCD (Average well-color development)表示,计算方法如下: $AWCD=\sum OD_i/31$, OD_i 是第*i*孔的吸光值。Shannon-Weaver多样性指数(H')的计算方法如下: $H'=-\sum P_i(\ln P_i)$,其中 P_i 为第*i*个孔的吸光值;均匀度(E)的计算方法如下: $E=H'/\ln S$, S 为被利用的碳源总数。用Simpson指数(S)评估群落中常见种的优势度指数,计算方法如下: $S=\sum(n_i(n_i-1)/N(N-1))$, n_i 是第*i*孔的相对吸光值, N 是各孔相对吸光值的总和^[15–16]。Simpson指数用1/ S 值表示,为避免计算时出现负值,所有数据扩大1000倍^[14]。用这些指标来表征土壤样品微生物群落对31种碳源的总体利用情况。

土壤保存对微生物群落代谢活性的影响幅度按如下公式计算:影响幅度=100%×(保存土样的AWCD–鲜样的AWCD)/保存土样的AWCD

1.3 数据处理

数据处理用Microsoft Excel 2007和SPSS软件,进行方差分析,多重比较采用Duncan法,方差分析的显著性水平为 $P<0.05$ 。主成分分析(PCA)采用Canoco 4.5软件。微生物对六大类碳源的利用情况、Shannon-Weaver多样性指数、均匀度的计算均用培养72h的吸光值。

2 结果与分析

2.1 微生物群落代谢活性的变化趋势

不同保存条件下土壤样品中微生物对31种碳源的利用能力和模式用每孔颜色平均变化率AWCD值表示,图1展示了生态板在30℃条件下培养7d的AWCD值变化趋势。保存的土壤样品,无论是风

表1 两种供试土壤的化学性状		
Table 1 Chemical properties of two tested soils		
化学性状 Chemical properties	森林土壤 Forest soil	农田土壤 Arable soil
pH	4.68±0.15	5.60±0.03
土壤有机质 SOM content (g/kg)	31.00±2.70	15.20±0.50
总氮 Total N (g/kg)	1.11±0.09	0.60±0.02
总磷 Total P (g/kg)	0.19±0.01	0.78±0.05
总钾 Total K (g/kg)	13.40±1.24	8.97±0.09
有效氮 Available N (mg/kg)	68.45±5.92	40.03±1.49

干保存,还是低温冻存4个月后,其微生物群落对碳源利用的总体水平大大降低,微生物群落的代谢活性显著降低($P=0$)。特别是在培养的前3天,土壤鲜样的 AWCD 值快速升高,而保存土壤的 AWCD 值的升高并没有一个快速增加的阶段,并且在培养的7d始终保持缓慢增长(图1)。对不同的土壤保存方法而言,土壤微生物对碳源利用的整体变化趋势比较相似(图1)。

2.2 不同土壤保存方法对微生物群落代谢活性的影响

用培养3d后的 AWCD 值分析土壤保存方法对微生物群落代谢活性的影响。结果如表2所示,鲜样、风干保存和低温冻存的3种土壤样品中,微生物群落的 Shannon-Weaver 多样性指数

($P=0.000$)、均匀度($P=0.000$)和 Simpson 指数($P=0.000$)都存在显著差异;土壤保存方法和土壤类型之间没有互作。

多重比较的结果表明(表2),两种土壤的所有指标都因土壤保存而显著降低;森林土壤的低温冻存使得微生物群落的物种均匀度显著低于风干保存,除此之外的其他指数在风干保存和低温冻存之间没有显著差异。

为了更好地评估微生物对各种碳源的利用情况,将 Biolog 生态板上的31种碳源分为六大类:多聚物类、碳水化合物类、羧酸类、氨基酸类、胺类和酚类化合物。如表3所示,土壤保存4个月后,除了风干保存的两种土壤中微生物对多聚物的利用能力与鲜样之间没有显著差异外,微生物对其他碳源的利用能力显著降低;土壤类型也显著影响微生物对多聚物($P=0.002$)和碳水化合物($P=0.000$)的利用能力,表现为森林土壤中微生物对多聚物和碳水化合物的利用能力显著低于农田土壤。

土壤保存使微生物对6类底物代谢能力降低的幅度顺序如下:酚类>碳水化合物>酰胺>氨基酸>羧酸>多聚物(表4)。而且微生物群落对六大类碳源利用能力的降低幅度因保存方法的不同而有差异:风干保存使得微生物对多聚物的代谢能力降低19.1%–34.5%,而低温冻存使其降低54.5%–68.4%;风干保存使得微生物对酚类的代谢能力降低96.3%–99.8%,而低温冻存使其降低80.6%–82.3%;两种保存方法使微生物对其他4类底物的代谢能力的降低幅度差别不大(表4)。

如图2所示,利用培养3d的 AWCD 值计算相似性矩阵并进行主成分分析,可以发现农田土壤和森林土壤表现出相似的结果,即风干保存的土壤样品与低温冻存的土壤样品聚在一起,位于纵轴的左边,而鲜样则位于纵轴的右边。对农田土壤而言,氨基酸、碳水化合物和胺类化合物与第一排序轴的相关性较大;而在森林土壤中,羧酸、酚类和碳水化合物与第一排序轴的相关性较大。

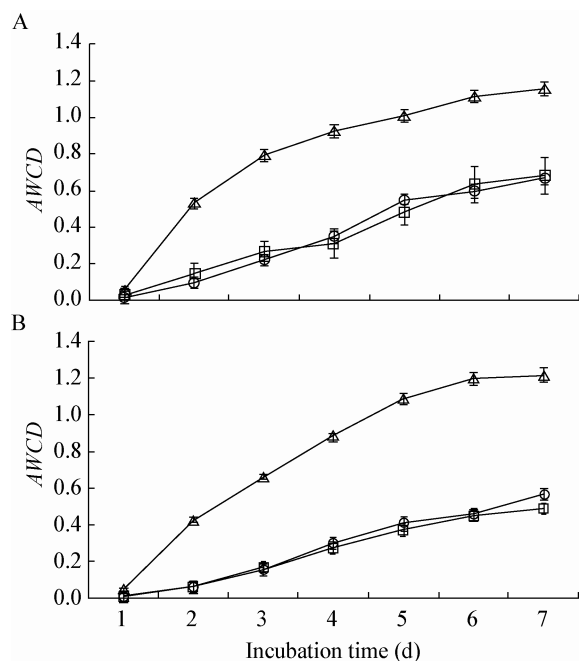


图1 Biolog® EcoPlate™在30℃条件下培养7d的 AWCD 值

Figure 1 AWCD values of microbial community at 30℃ for 7 d using Biolog® EcoPlate™

注: A: 农田土壤; B: 森林土壤。—Δ—、—○—和—□—分别表示鲜样、风干保存和低温冻存。

Note: A: Arable soils; B: Forest soils. —Δ—, —○— and —□— indicate fresh, air-dry and freeze.

表 2 不同保存条件下土壤微生物群落多样性指数				
Table 2 Diversity indexes of soil microbial community associated with different storage methods				
土壤类型 Soil type	保存方法 Storage method	<i>H'</i>	<i>E</i>	<i>S</i>
农田土壤 Arable soils	鲜样 Fresh	3.133±0.018 a	0.917±0.003 a	19.204±0.509 a
	风干保存 Airdry	2.755±0.051 b	0.872±0.015 a	13.042±0.804 b
	低温冻存 Freeze	2.785±0.025 b	0.876±0.017 a	13.934±0.304 b
森林土壤 Forest soils	鲜样 Fresh	3.103±0.017 a	0.912±0.003 a	18.767±0.442 a
	风干保存 Airdry	2.711±0.074 b	0.877±0.011 b	12.525±0.807 b
	低温冻存 Freeze	2.676±0.123 b	0.837±0.010 c	12.069±1.571 b
两因子方差分析(<i>P</i> 值) Two-way ANOVA (<i>P</i> value)				
土壤类型 Soil type (ST)		0.257	0.182	0.191
保存方法 Storage method (SM)		0.000	0.000	0.000
ST×SM		0.802	0.157	0.646

注：同一列不同字母表示差异达到显著水平(Duncan's 多重比较, *P*=0.05).
Note: Different letters in each column indicate significant difference (Duncan's multiple range test, *P*=0.05).

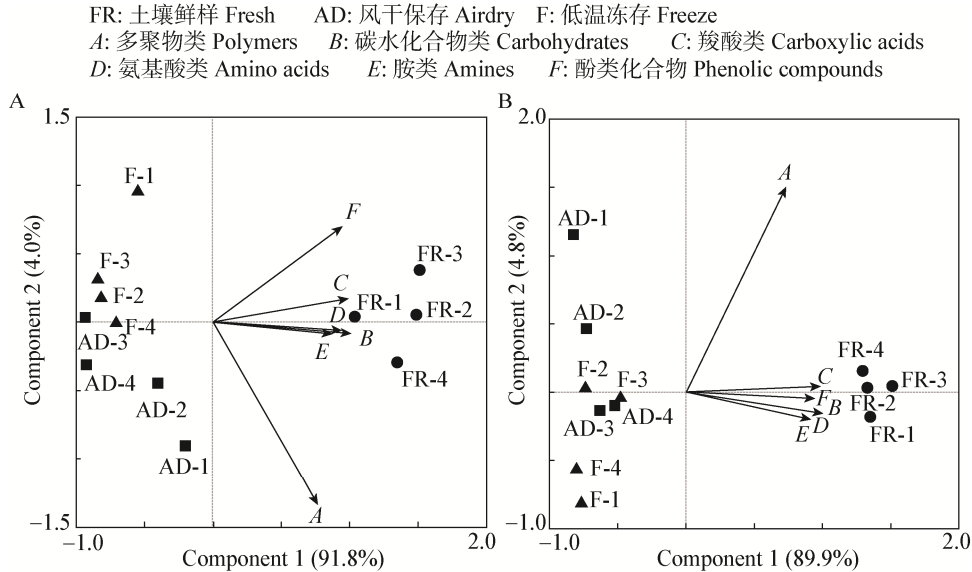


图 2 不同保存条件下土壤微生物群落的主成分分析(PCA)的双标图
Figure 2 Biplot of principal component analysis (PCA) of soil microbial community associated with different storage methods

注：A：农田土壤；B：森林土壤。
Note: A: Arable soil; B: Forest soil.

Table 3 Metabolic activity of soil microbial communities about different storage methods							
土壤类型 Soil type	保存方法 Storage method	多聚物类 Polymers	碳水化合物类 Carbohydrates	羧酸类 Carboxylic acids	氨基酸类 Amino acids	酰胺类 Amines	酚类 Phenolic compounds
农田土壤 Arable soils	土壤鲜样 Fresh	0.613±0.115 a	1.114±0.130 a	0.766±0.104 a	0.687±0.074 a	0.323±0.035 a	0.497±0.084 a
	风干保存 Airdry	0.496±0.070 a	0.296±0.065 b	0.280±0.060 b	0.230±0.060 b	0.088±0.044 b	0.018±0.015 b
	低温冻存 Freeze	0.279±0.045 b	0.256±0.042 b	0.247±0.050 b	0.216±0.060 b	0.083±0.036 b	0.088±0.075 b
森林土壤 Forest soils	土壤鲜样 Fresh	0.480±0.115 a	0.887±0.101 a	0.684±0.112 a	0.578±0.070 a	0.327±0.024 a	0.388±0.066 a
	风干保存 Airdry	0.314±0.052 ab	0.145±0.031 b	0.246±0.054 b	0.143±0.029 b	0.095±0.052 b	0.001±0.001 b
	低温冻存 Freeze	0.152±0.038 b	0.205±0.038 b	0.153±0.033 b	0.183±0.056 b	0.053±0.036 b	0.075±0.065 b
两因子方差分析(P 值) Two-way ANOVA (P value)							
土壤类型 Soil type		0.002	0.000	0.330	0.058	0.645	0.379
保存方法 Storage method (SM)		0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
ST×SM		0.857	0.039	0.909	0.670	0.631	0.645

注：同一列不同字母表示差异达到显著水平(Duncan's 多重比较, $P=0.05$).
Note: Different letters in each column indicate significant difference (Duncan's multiple range test, $P=0.05$).

Table 4 Effects of two storage methods on metabolic activity of soil microbial community							
土壤类型 Soil type	保存方法 Storage method	多聚物类 Polymers (%)	碳水化合物类 Carbohydrates (%)	羧酸类 Carboxylic acids (%)	氨基酸类 Amino acids (%)	酰胺类 Amines (%)	酚类 Phenolic compounds (%)
农田土壤 Arable soils	风干保存 Airdry	-19.1	-73.4	-63.4	-66.5	-72.8	-96.3
森林土壤 Forest soils	低温冻存 Freeze	-54.5	-77.1	-67.8	-68.5	-74.4	-82.3
	风干保存 Airdry	-34.5	-83.6	-64.0	-75.3	-71.1	-99.8
农田土壤 Arable soils	低温冻存 Freeze	-68.4	-76.9	-77.6	-68.3	-83.8	-80.6
	风干保存 Airdry	-19.1	-73.4	-63.4	-66.5	-72.8	-96.3

3 讨论

土壤相关酶活性、微生物生物量、特定生化过程(例如,呼吸作用、硝化作用、氨化作用)等常用来作为评估保存土壤微生物代谢活性及多样性变化的指标^[11,17-19]。本试验中,我们应用 Biolog 生态板评估不同的土壤保存方法对微生物群落代谢活性的影响,结果表明,与土壤鲜样相比,风干保存和低温冻存的土壤样品的微生物代谢活性显著降低(表 2、3,图 1),这与 Lee 等^[20]和 Deforest^[21]用土壤酶活性表征微生物代谢活性的结果一致。在本试验中的两种保存方法,可能是由于保存过程中温度和水分的变化引起了微生物代谢活性的大幅降低,甚至是死亡。Wu 等^[22]认为土壤冻干后冷冻保存使土壤总 PLFA 降低了 28%,最好在采样后立即进行 PLFA 分析。磷脂脂肪酸是活细胞细胞膜的组成成分,细胞死亡后,就会快速降解^[23]。基于此,我们推测,本试验中土壤保存导致微生物群落代谢活性的降低是由于土壤保存过程中部分活性微生物细胞的死亡造成的。

对比本试验中的两种保存方法(即不同温度、水分条件)可以发现微生物对碳源的总体利用没有显著差异(图 1)。Deforest^[21]采用土壤酶活性表征保存土壤的活性,结果表明 4℃ 保存和低温冻存对土壤活性的影响没有显著差异。另一方面,本试验中低温冻存的林地土壤的物种均匀度显著低于风干保存样品,可能森林土壤经低温冻存 4 个月后,某些种群的活性受到较大抑制。土壤风干过程中,水分含量快速降低,细胞失水死亡。土壤样品冻存时,细胞自由水结冰使胞内离子浓度大大升高,渗透压升高导致细胞失水,甚至死亡;并且胞内的冰晶会破坏细胞结构,引起细胞死亡^[17]。土壤保存过程中,水分和温度胁迫可能导致土壤微生物细胞死亡,而且不同类群的抗性不同,这应该是本试验中基于 CLPP 的微生物活性和多样性指数降低的原因(表 2)。

本试验中的两种保存方法对微生物群落的影响

差异不大,但是森林土壤中利用多聚物和碳水化合物类的微生物的代谢活性低于农田土壤(表 3)。Cernohlavkova 等^[17]认为在土壤样品保存过程中,农田土壤对环境变化的敏感性高于森林土壤,与我们的结果存在差异。这样不一致的结果可能是由于在 Cernohlavkova 等^[17]的试验中,森林土壤有机质含量是农田的近 8 倍,而本试验中两者的有机质含量差异较小(约 2 倍)。有机质含量高的土壤有助于微生物抵抗环境条件的变化而保持活性^[24]。此外,两者在多样性指数、4 类碳源利用等方面均没有显著差异(表 2、3),这不仅是两者的有机质含量差异小,更重要的原因可能在于多样性指数和碳源利用等测定指标反应的是群落功能,而不是群落构成。推测如果对样品进行 PCR-DGGE 并切胶回收测序,或者进行宏基因组测序,可能发现两者在微生物群落构成上存在明显差异。这有待于进一步证实。当根据碳源特性把土壤微生物分成 6 个类群后,本试验结果表明利用酚类的微生物对土壤保存最为敏感,而利用多聚物的微生物最不敏感(表 3)。那么,这些微生物类群在分类上是否具有特殊性?这是一个值得深入研究的问题。

总之,不论哪种土壤保存方法(风干保存 4 个月和低温冻存 4 个月)都大大降低了土壤微生物群落的多样性和对特定碳源的利用能力,并且两种保存方法之间没有显著差异。由于土壤微生物对环境的敏感性,研究土壤生理特性,即微生物的相关代谢指标时,最好采用土壤鲜样,否则会导致大量信息的丢失。

参考文献

- [1] Lopes AR, Faria C, Prieto-Fernández Á, et al. Comparative study of the microbial diversity of bulk paddy soil of two rice fields subjected to organic and conventional farming[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(1): 115-125
- [2] Fierer N, Caporaso JG, Leff JW, et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(52): 21390-21395
- [3] Liu GH, Ye ZF, Wu WZ. Culture-dependent and culture-independent approaches to studying soil microbial

- diversity[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(14): 4421-4433 (in Chinese)
- 刘国华, 叶正芳, 吴为中. 土壤微生物群落多样性解析法: 从培养到非培养[J]. *生态学报*, 2012, 32(14): 4421-4433
- [4] Yao XH. Advancement of methods in studying soil microbial diversity[J]. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, 2008, 27(S1): 84-88 (in Chinese)
- 姚晓华. 土壤微生物群落多样性研究方法及其进展[J]. *广西农业生物科学*, 2008, 27(S1): 84-88
- [5] 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[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(11): 3605-3617
- [6] Katayama A, Funasaka K, Fujie K. Changes in the respiratory quinone profile of a soil treated with pesticides[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 33(6): 454-459
- [7] Garland JL. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 24(4): 289-300
- [8] Yergeau E, Schoondermark-Stolk SA, Brodie EL, et al. Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(3): 340-351
- [9] Martí E, Cáliz J, Montserrat G, et al. Air-Drying, cooling and freezing for soil sample storage affects the activity and the microbial communities from two Mediterranean soils[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2012, 29(2): 151-160
- [10] Liu Y, Yao H, Huang C. Assessing the effect of air-drying and storage on microbial biomass and community structure in paddy soils[J]. *Plant and Soil*, 2009, 317(1): 213-221
- [11] Dadenko EV, Kazeev KS, Kolesnikov SI, et al. Changes in the enzymatic activity of soil samples upon their storage[J]. *Eurasian Soil Science*, 2009, 42(12): 1380-1385
- [12] Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2351-2359
- [13] Govaerts B, Mezzalama M, Unno Y, et al. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity[J]. *Applied Soil Ecology*, 2007, 37(1): 18-30
- [14] Yang YH, Hua XM. Effect of pesticide pollution against functional microbial diversity in soil[J]. *Journal of Microbiology*, 2000, 20(2): 23-25 (in Chinese)
- 杨永华, 华晓梅. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. *微生物学杂志*, 2000, 20(2): 23-25
- [15] Zhang YY, Qu LY, Chen LD. An amendment on information extraction of Biolog EcoPlate™[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(7): 1083-1091 (in Chinese)
- 张燕燕, 曲来叶, 陈利顶. Biolog EcoPlate™ 实验信息提取方法改进[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(7): 1083-1091
- [16] Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(1): 1-11
- [17] Cernohlavkova J, Jarkovsky J, Nesporova M, et al. Variability of soil microbial properties: effects of sampling, handling and storage[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(8): 2102-2108
- [18] Zornoza R, Mataix-Solera J, Guerrero C, et al. Storage effects on biochemical properties of air-dried soil samples from southeastern Spain[J]. *Arid Land Research and Management*, 2009, 23: 3213-3222
- [19] Stres B, Philippot L, Faganeli J, et al. Frequent freeze-thaw cycles yield diminished yet resistant and responsive microbial communities in two temperate soils: a laboratory experiment[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(2): 323-335
- [20] Lee YB, Lorenz N, Dick LK, et al. Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2007, 71(4): 1299-1306
- [21] Deforest JL. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and l-DOPA[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(6): 1180-1186
- [22] Wu Y, Wu J, Ding N, et al. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses[J]. *Geoderma*, 2009, 150(1): 171-178
- [23] Bai Z, He HB, Zhang W. PLFAs technique and its application in the study of soil microbiology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(7): 2387-2394 (in Chinese)
- 白震, 何红波, 张威, 等. 磷脂脂肪酸技术及其在土壤微生物研究中的应用[J]. *生态学报*, 2006, 26(7): 2387-2394
- [24] Brohon B, Delolme C, Gourdon R. Qualification of soils through microbial activities measurements influence of the storage period on int-reductase, phosphatase and respiration[J]. *Chemosphere*, 1999, 38(9): 1973-1984