

# 氚标记胸腺嘧啶掺入法在土壤细菌生长速率研究中的应用

赵灿灿<sup>1,2\*</sup>, 王伟<sup>2</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 河南大学, 河南 开封 475004)

**摘要:** 氚标记胸腺嘧啶掺入法因其原理明确、方法简单易行、重复性好等特点在测定细菌生长速率中发挥着重要的作用。然而, 相比较医学和水生生态学领域, 该方法在土壤生态学研究中的应用还较少, 尤其是我国此方面的研究尚未见报道。就氚标记胸腺嘧啶掺入法的原理、操作流程、影响因素、计算方法及其在土壤生态学中的应用等方面进行了综述, 为该方法在我国土壤生态学领域的推广应用提供参考。

**关键词:** 土壤细菌; 生长速率; 放射性同位素; 微生物功能; 氚标记胸腺嘧啶掺入法

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.01.017

## Applications of Tritiated Thymidine Incorporation in Determination of Bacterial Growth Rate

ZHAO Can-can<sup>1,2\*</sup>, WANG Wei<sup>2</sup>

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China; 2. Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** Tritiated thymidine incorporation method plays an important role in determination of bacterial growth rate, due to its clear principle, simple operation and good repeatability. However, there has been little research on soil ecology using tritiated thymidine incorporation method for determination of bacterial growth rate compared with medical science and aquatic ecology field. Especially studies on this area in China have been reported hardly. The principle, operation procedure, influential factor and calculation method of tritiated thymidine incorporation method were introduced, and its applications in soil ecology were summarized. These would provide reference for the further applications of this technology in soil ecology.

**Key words:** Soil bacteria; Growth rate; Radioactive isotope; Microbial function; Tritiated thymidine incorporation

土壤微生物数量巨大、种类繁多, 在陆地生态系统中, 对有机物质的分解、转化和传递, 调控土壤食物网的结构和功能等方面都起了重要作用。土壤微生物中占优势地位的两个类群分别是细菌和真菌, 它们的生物量、群落组成和生长速率等存在着很大的差异, 在分解的不同阶段也发挥着不同的功能, 因此分别探究这两大类群的特性十分必要<sup>[1-2]</sup>。能

够测定细菌和真菌生物量和群落组成的方法有很多, 包括显微镜观察计数法、氯仿熏蒸法、磷脂脂肪酸(PLFA)法<sup>[3]</sup>、葡萄糖胺法<sup>[4]</sup>和基于 DNA 的分子技术<sup>[5]</sup>等。显微镜观察计数法主要应用于测定细胞数量, 具有方法直接、简单的优点, 缺点是由于细菌个体大小差异大, 与生物量的转换系数精确度低; 氯仿熏蒸法主要用于测定微生物生物量, 具有方法简

收稿日期: 2013-06-06 接受日期: 2013-07-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200408)资助

作者简介: 赵灿灿(1982~), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为土壤生态学。

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: cczhao2008@163.com

单、经济,可同时操作大量样品的优点,缺点是不能区分细菌和真菌生物量;磷脂脂肪酸(PLFA)法主要用于测定微生物生物量和群落结构,具有可提取活体微生物 PLFA,能区分功能群的优点,缺点是不能精确到种水平;基于 DNA 的分子技术主要应用于测定微生物生物量和群落结构,可精确到种水平,但方法复杂,费用昂贵,不能区分功能群。但是在自然界中微生物本身的生理状态是多样的,有的处于休眠状态,有的较为活跃,有的高度活跃,生理状态具有不确定性,因此上述方法不能将微生物与其参与的生态过程直接地联系起来。近年来,一些学者用微生物基础呼吸来估计微生物的生长速率,但有研究表明由于碳底物分配在生物量和呼吸用能量的比例不同,微生物呼吸与生长速率之间并没有直接的联系<sup>[6-7]</sup>。因此找到一种合适的反映微生物生长活性的方法十分必要。

氚标记胸腺嘧啶掺入法测定细菌生长速率是真实反映细菌活性和功能的重要手段,它原理明确,方法简单易行,有较好的可重复性,能真实反映细菌生理状态。目前,这种方法已经广泛应用于医学领域,并已于 20 世纪 80 年代应用在水生环境的细菌生长速率研究中<sup>[8-9]</sup>,目前已经发展成为水生

微生物学的常规方法<sup>[10-13]</sup>。但是在土壤科学领域中的应用还很少<sup>[14-15]</sup>。为此,本文对氚标记胸腺嘧啶掺入法的基本原理、操作流程、影响因素、计算方法及在土壤生态学中的应用等方面进行简要介绍,希望能对土壤细菌的有机质分解过程、在污染土壤中的耐受能力、土壤食物网结构和功能等研究领域提供有益的参考,为推广氚标记胸腺嘧啶掺入技术的应用提供理论支持。

## 1 氚标记胸腺嘧啶掺入法的基本原理

胸腺嘧啶是 DNA 合成必须的 4 种碱基之一,将放射性同位素 <sup>3</sup>H 标记的胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR)加入到土壤提取溶液中,当土壤溶液中的异养细菌增殖时,<sup>3</sup>H-TdR 会掺入到细菌的 DNA 中,通过结束时测定掺入 <sup>3</sup>H 的含量可以计算细菌的增殖速度。

胸腺嘧啶脱氧核苷酸的合成主要通过两条途径,第一条为挽救途径(Salvage pathway),即 TdR 在胸苷激酶的催化下被磷酸化形成 dTMP,进一步合成 DNA;第二条为重新合成途径(*De novo* pathway),即由一些合成前期的分子如氨甲酰磷酸或天门冬氨酸等合成 DNA<sup>[16]</sup>(图 1)。通常情况下, TdR 很

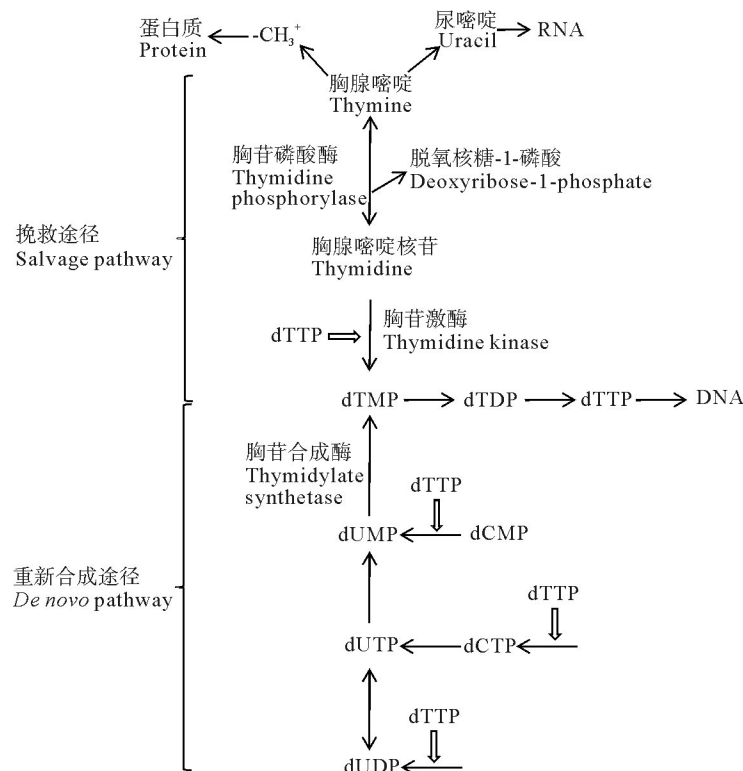


图 1 DNA 合成的挽救途径和重新合成途径

Fig. 1 Salvage pathway and *De novo* pathway of DNA synthesis

顺利地通过挽救途径合成 DNA,但是在合成过程中一些细菌会随着 TdR 浓度的下降而停止合成,重新合成途径启动将 dUMP 转变成 dTMP,因此在计算  $^3\text{H-TdR}$  浓度时要综合考虑两种途径<sup>[17]</sup>。

此方法用到的 TdR 浓度较低( $200 \text{ nmol L}^{-1}$ ),土壤中的真菌、植物根系、土壤动物等高等生物在短时间内并不能利用低浓度的 TdR,因为这些生物很多没有胸腺嘧啶激酶,不会利用 TdR 合成 dTMP。此外, DNA 的合成速率在加入 TdR 后至少 45 min 内是恒定的,这都为细菌生长速率的测定提供了基础和前提。

## 2 氚标记胸腺嘧啶掺入法的操作流程

**土壤溶液的制备** 称取新鲜土壤到离心管中,加入去离子水,制成 1:5 土水比溶液,放置在振荡器上以每分钟 200 次的速度震荡 20 min,制成土壤悬浮液。将悬浮液在  $1000 \times g$  下离心 10 min 后,大土壤颗粒沉淀到底部,取上清液作为供试细菌溶液,得到的细菌溶液需在 15 min 内进行  $^3\text{H}$  标记等操作。实验用各种器皿都应经高温灭菌后方可使用。

**$^3\text{H-TdR}$  参与 DNA 的合成** 将细菌溶液在室温中放置 10 min 稳定后,取 1.5 mL 细菌溶液于微离心管中,将  $5 \mu\text{L } ^3\text{H-TdR}$  ( $25 \text{ Ci mmol}^{-1}$ ,  $1 \text{ mCi mL}^{-1}$ ) 和  $2 \mu\text{L } 50 \mu\text{mol L}^{-1}$  未标记的胸腺嘧啶加入到离心管中,此时 TdR 终浓度为  $200 \text{ nmol L}^{-1}$ , 2 h 后加

$75 \mu\text{L } 100\%$  的冰三氯乙酸(TCA),此高浓度 TCA 可以立即阻止 DNA 的合成。对于空白对照样品,应先加冰 TCA 阻止一切 DNA 合成,10 min 后加细菌溶液和胸腺嘧啶,实验过程温度设定与原位土壤温度一致<sup>[18]</sup>。

**$^3\text{H-DNA}$  的提取** 早期的学者利用过滤膜清洗未插入 DNA 的  $^3\text{H-TdR}$ , Bååth 等<sup>[18]</sup>省略了过滤步骤,用更为简单经济的微离心法来提取  $^3\text{H-DNA}$ ,得到了广泛应用。样品稳定 30 min 后,微离心管在  $15000 \times g$  下离心 5 min,弃上清液后加 1.5 mL 5% 的冰 TCA,再次离心弃上清液;再加入 1.5 mL 80% 的冰乙醇离心弃上清液后,加  $0.2 \text{ mL } 1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ ,在室温下过夜溶解大分子<sup>[19]</sup>。将样品在  $90^\circ\text{C}$  水浴锅中水浴 2 h,冷却后转入闪烁计数管中,并用  $250 \mu\text{L } 0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$  洗微离心管 2 次,加入液体闪烁液后用液体闪烁计数仪测定放射性同位素  $^3\text{H}$  的含量。

## 3 影响氚标记胸腺嘧啶掺入的因素

影响氚标记胸腺嘧啶掺入的因素很多,主要包括:(1) 土壤有机质含量。土壤中含有有机质和矿物质颗粒,因此确定土壤中细菌的生长速率不像在水环境中那么明确,胸腺嘧啶和土壤颗粒之间的连接具有不确定性<sup>[20]</sup>,可能导致  $^3\text{H-TdR}$  加入零时刻的放射量较高,降低了测量精度,因此在预实验

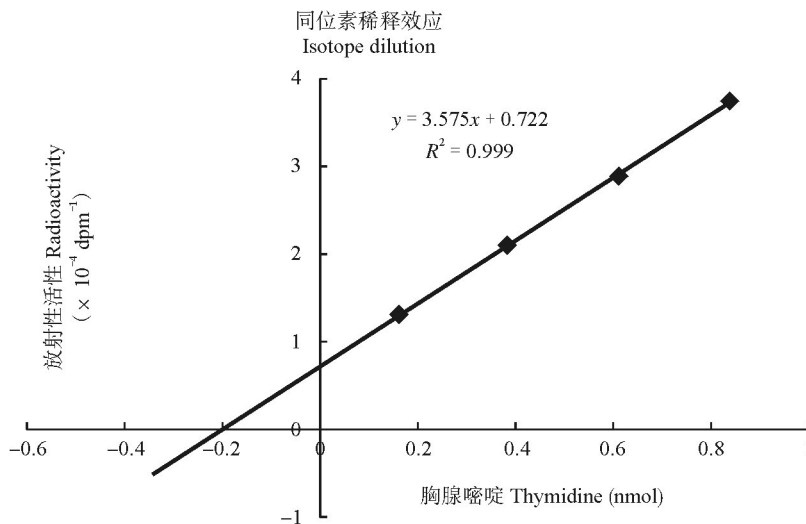


图2 插入 DNA 的  $^3\text{H}$  浓度与初始胸腺嘧啶浓度的关系。农田土壤的 TOC 含量为 0.89%、pH 值为 6.56,标准曲线在 x 轴上的截距将用于新放射性浓度的计算。

Fig. 2 Relationship between  $^3\text{H}$  incorporation into DNA and initial concentration of thymidine. Total organic carbon (TOC) and pH value of selected farm soil were 0.89% and 6.56, respectively. Intercept on the x axis of calibration curve were used to calibrate new specific activity.

中设置不同 TdR 浓度测定  $^3\text{H}$ -TdR 加入零时刻的放射量十分必要,为后面重新计算放射性浓度提供数据支持(图 2),一般有机质含量较高的土壤用量要适当减少<sup>[18]</sup>。(2) 土壤 pH 值。土壤 pH 值过高或过低都会影响微生物活性,例如有些酸化较严重的松林土壤需根据需要调节 pH 值<sup>[21]</sup>。(3) 细胞的大小。不同土壤中细菌细胞大小不一,会直接对  $^3\text{H}$ -TdR 的掺入产生影响。小型细胞在数量上要远远多于大型细胞,但小型细胞的生物量小,生长速率低,对碳转化的贡献较小<sup>[22]</sup>。(4)  $^3\text{H}$ -TdR 参与 DNA 合成的时间。 $^3\text{H}$ -TdR 掺入的时间要适中,

如果太短 DNA 不能完成一个复制周期,一般一个复制周期不少于 45 min;但如果时间过长,可能会导致  $^3\text{H}$ -TdR 的逐步掺入而原浓度被稀释,不能以正常的速度掺入 DNA,或者  $^3\text{H}$ -TdR 部分掺入到真菌、原生动物和土壤动物等中(图 3)。(5) 温度。温度由  $0^\circ\text{C}$  升高到  $15^\circ\text{C}$ ,细菌生长速率随之增加,当温度高于  $15^\circ\text{C}$  时,细菌生长速率不再增加较为恒定<sup>[23]</sup>。(6) 细菌溶液的浓度和 TdR 的浓度都会对细菌生长速率产生影响,实验前进行预实验确定土水比、TdR 浓度、掺入时间、 $^3\text{H}$ -TdR 加入零时刻的放射量初始值等十分必要<sup>[24]</sup>。

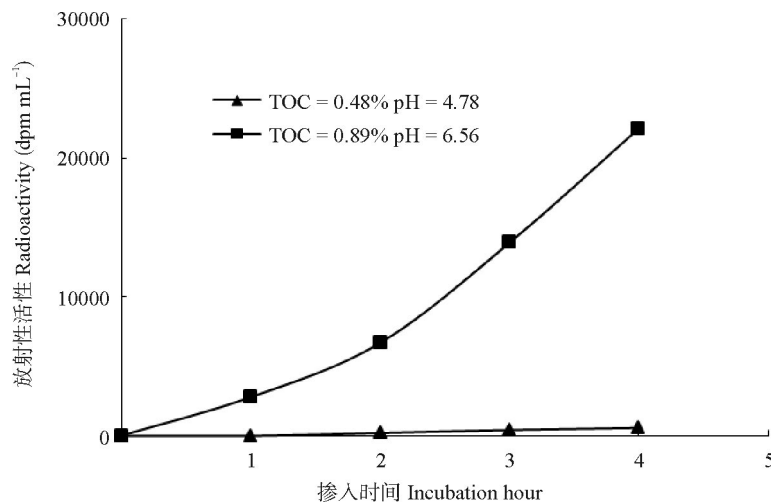


图 3 插入 DNA 的  $^3\text{H}$  浓度与掺入时间的关系

Fig. 3 Relationship between  $^3\text{H}$  incorporation into DNA and incorporation time

## 4 细菌生长速率的计算

### 4.1 计算掺入DNA的TdR量

$$SA = \frac{\mu Ci}{\text{nmol} + [x]} \quad (1)$$

$$T = \frac{\text{dpm}}{SA} = \frac{\text{dpm} \times \text{mmol} \times 10^{-3}}{Ci \times 2.22 \times 10^{22}} \quad (2)$$

其中 SA 为胸腺嘧啶放射性浓度, Ci 为放射性活性单位居里, [x] 为标准曲线在 x 轴上的截距, T 为插入 DNA 的 TdR 摩尔数。

### 4.2 计算细菌增殖数

$$N = \frac{T \times 318 \times 1/p}{w} = T \times 5 \times 10^{17} \quad (3)$$

其中 N 为细菌增殖数, 318 为 TdR 的分子量,

p 为 TdR 在 AGCT 中所占的比例, 平均值为 0.25, w 为每个细胞 DNA 的质量, 一般在 1.7 ~ 5 fg 范围内, 平均值为 2.5 fg。

### 4.3 计算单位时间细菌增殖数

$$N/h = \frac{\text{dpm} \times 10^{-3} \times 60 \times 5 \times 10^{17}}{SA \times 2.22 \times 10^{12} \times t} = \frac{\text{dpm} \times 1.35 \times 10^4}{SA \times t} \quad (4)$$

其中, N/h 为每小时的细菌增殖数, t 为掺入时间(min)。

### 4.4 计算细菌生长速率和世代周转时间

$$\mu = \frac{N}{Nt}, g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (5)$$

其中,  $\mu$  为细菌生长速率, Nt 为现存细菌总数, g 为世代周转时间。Nt 可通过荧光染色制片后用紫外灯荧光显微镜观察计数等方法获得。氚标记

胸腺嘧啶掺入法计算细菌生长速率公式的转化系数均为平均值,而实际情况是不同的生境、不同的土壤类型的转化系数都会有较大变异,因此使用平均值会降低估算精确度,在实验中可根据实际情况调整转化系数。

## 5 氚标记胸腺嘧啶掺入法在土壤生态学中的应用

自 20 世纪 90 年代起,氚标记胸腺嘧啶掺入法测定细菌生长速率已经应用于土壤生态学领域,着重于解决生物与非生物环境对土壤细菌功能的影响等科学问题,具体有以下 3 个方面:第一,细菌对于土壤重金属污染的响应。随着人类工业化水平的提高,重金属污染问题日益突出,土壤微生物对此会做出怎样的反应? Díaz-Raviña & Bååth<sup>[25]</sup>对镉、铜、镍、铅、锌 5 种人工重金属污染处理的研究表明,加入重金属土壤的细菌生长最大速率远远高于对照<sup>[26]</sup>,铜污染土壤的细菌生长速率在处理 1 个月后达到最大,表明土壤细菌对铜污染很敏感,而其它重金属污染处理中,细菌生长速率在处理 1 年后才达到最大,表明土壤细菌对镉、镍、铅、锌污染的耐受性较好。Pennanen 等<sup>[27]</sup>在芬兰和瑞士重金属污染地区进行野外实验,研究表明土壤重金属污染显著影响 PLFA 群落结构组成和细菌生长速率,铜污染地区的细菌耐受性增加,而镉、镍、锌污染处理对细菌耐受性没有显著影响,所有重金属混合时的细菌耐受性最高<sup>[28]</sup>。第二,细菌活性对于土壤 pH 值变化的响应。土壤 pH 值是影响土壤微生物群落结构和功能的重要因子。Rousk 等<sup>[2]</sup>在英国一个定位观测站分别测定了 pH 为 4.0 ~ 8.3 范围内的土壤细菌和真菌的生物量和生长速率,结果表明 pH 值从 8.3 逐渐降低到 4.0 时,细菌生长速率降低了 5 倍而真菌生长速率升高了 5 倍,总体相当于近 30 倍的差异,而细菌和真菌的生物量仅有不到 3 倍的差异,由此可见随着土壤 pH 值的降低总的矿化速率降低,出现功能冗余现象。第三,细菌在植物根际和非根际的不同作用。Christensen 等<sup>[29]</sup>的研究表明,在根际以微生物为食的原生动物和线虫数量是非根际的 3 ~ 4 倍,根际土壤细菌生长速率比非根际土壤和没有植物种植的土壤慢,但是稳定性极高,说明土壤食物网的动态变化不是上行效应

决定的。

氚标记胸腺嘧啶掺入法测定细菌生长速率以其掺入速率稳定、方法简单易行和重复性好等特点,为土壤生态学研究提供了很好的工具,并将在多个研究方向发挥更重要的作用:第一,土壤是一个巨大的碳库,有机质分解速率的微小变化会引起大气成分和气候的较大改变,因此在大气层温度上升、温室气体浓度上升和土地利用方式改变等全球变化背景下,研究土壤细菌调节有机质分解和对大气的反馈,对于阐明其内在机理和预测未来气候变化具有重要意义。第二,土壤生物包括土壤细菌、真菌、放线菌以及原生动物、线性动物、节足动物等,种类丰富且数量巨大,这些生物交错联结,形成错综复杂的食物网对土壤能量流动和物质循环起决定性作用,探究土壤细菌的数量和生长速率对于阐明底端资源(上行效应)还是顶端捕食者(下行效应)决定食物网不同营养级结构和功能机理具有重要贡献。第三,在陆地生态系统中,生产者通过地上部分为系统提供有机物质,而分解者通过分解凋落物和释放营养物质使得营养物质得以循环,研究土壤最主要分解者细菌的生长和周转是整合地上和地下部分生态系统功能和过程的有效途径。相信在未来的时间里,氚标记胸腺嘧啶掺入法测定土壤细菌生长速率会被更多的土壤生态学家所认识并得到更加广泛的应用,为进一步丰富土壤生态系统功能和过程的机理研究提供技术保障。

## 参考文献

- [1] Rousk J, Bååth E. Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios [J]. *FEMS Microb Ecol*, 2007, 62(3): 258–267.
- [2] Rousk J, Brookes P C, Bååth E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization [J]. *Appl Environ Microb*, 2009, 75(6): 1589–1596.
- [3] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review [J]. *Biol Fert Soils*, 1999, 29(2): 111–129.
- [4] Appuhn A, Joergensen R G, Raubuch M, et al. The automated determination of glucosamine, galactosamine, muramic acid, and mannosamine in soil and root hydrolysates by HPLC [J]. *J Plant Nutr Soil Sci*, 2004, 167(1): 17–21.
- [5] Boyle S A, Yarwood R R, Bottomley P J, et al. Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008,

- 40(2): 443–451.
- [6] Six J, Frey S D, Thiet R K, et al. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems [J]. *Soil Sci Soc Amer J*, 2006, 70(2): 555–569.
- [7] Rousk J, Demoling L A, Bahr A, et al. Examining the fungal and bacterial niche overlap using selective inhibitors in soil [J]. *FEMS Microb Ecol*, 2008, 63(3): 350–358.
- [8] Fuhrman J A, Azam F. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British-Columbia, Antarctica, and California [J]. *Appl Environ Microb*, 1980, 39(6): 1085–1095.
- [9] Moriarty D J W, Pollard P C. DNA synthesis as a measure of bacterial productivity in seagrass sediments [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1981, 5(1): 151–156.
- [10] Kirchman D L, Hoch M P. Bacterial production in the Delaware Bay estuary estimated from thymidine and leucine incorporation rates [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1988, 45(1): 169–178.
- [11] Jiang X Y, Wang L Q, Chen M K. The measurements of bacterioplankton growth rate and its seasonal variation [J]. *J Shanghai Ocean Univ*, 1997, 6(4): 258–262.  
姜新耀, 王丽卿, 陈马康. 涪湖水域中细菌生长速率的测定及其动态研究 [J]. *上海水产大学学报*, 1997, 6(4): 258–262.
- [12] Peng A G, Huang Y P, Qiu Y S, et al. Study on bacterial production in the high latitude coastal waters, Antarctica [J]. *J Xiamen Univ*, 2005, 44(1): 85–89.  
彭安国, 黄奕普, 邱雨生, 等. 南极高纬度沿岸海域的细菌生产力 [J]. *厦门大学学报*, 2005, 44(1): 85–89.
- [13] Bai J, Li K R, Zhang H F, et al. Phosphorus uptake by heterotrophic bacterioplankton and its affecting factors in Jiaozhou Bay [J]. *Period Ocean Univ China (Nat Sci)*, 2005, 35(5): 835–838.  
白洁, 李岩然, 张昊飞, 等. 胶州湾异养浮游细菌对磷的吸收作用及影响因素研究 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2005, 35(5): 835–838.
- [14] Bååth E. Thymidine incorporation into soil bacteria [J]. *Soil Biol Biochem*, 1990, 22(6): 803–810.
- [15] Harris D, Paul E A. Measurement of bacterial growth rates in soil [J]. *Appl Soil Ecol*, 1994, 1(4): 277–290.
- [16] Pollard P C, Moriarty D J W. Validity of the tritiated thymidine method for estimating bacterial growth rates: Measurement of isotope dilution during DNA synthesis [J]. *Appl Environ Microb (AEM)*, 1984, 48(6): 1076–1083.
- [17] Moriarty D J W. Techniques for estimating bacterial growth rates and production of biomass in aquatic environments [M]// *Methods in Microbiology*, Vol. 22. New York: Academic Press, 1990: 211–234.
- [18] Bååth E, Pettersson M, Söderberg K H. Adaptation of a rapid and economical microcentrifugation method to measure thymidine and leucine incorporation by soil bacteria [J]. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33(11): 1571–1574.
- [19] Ipsilantis I, Coyne M S. Soil microbial community response to hexavalent chromium in planted and unplanted soil [J]. *J Environ Qual*, 2007, 36(3): 638–645.
- [20] Cortez J, Schnitzer M. Nucleic acid bases in soils and their association with organic and inorganic soil components [J]. *Can J Soil Sci*, 1979, 59(3): 277–286.
- [21] Bååth E. Thymidine incorporation into macromolecules of bacteria extracted from soil by homogenization-centrifugation [J]. *Soil Biol Biochem*, 1992, 24(11): 1157–1165.
- [22] Bååth E. Thymidine and leucine incorporation in soil bacteria with different cell size [J]. *Microb Ecol*, 1994, 27(3): 267–278.
- [23] Diaz-Raviña M, Frostegård Å, Bååth E. Thymidine, leucine and acetate incorporation into soil bacterial assemblages at different temperatures [J]. *FEMS Microb Ecol*, 1994, 14(3): 221–231.
- [24] Thorn P M, Ventullo R M. Measurement of bacterial growth rates in subsurface sediments using the incorporation of tritiated thymidine into DNA [J]. *Microb Ecol*, 1988, 16(1): 3–16.
- [25] Diaz-Raviña M, Bååth E. Thymidine and leucine incorporation into bacteria from soils experimentally contaminated with heavy metals [J]. *Appl Soil Ecol*, 1996, 3(3): 225–234.
- [26] Diaz-Raviña M, Bååth E, Frostegård Å. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique [J]. *Appl Environ Microb*, 1994, 60(7): 2238–2247.
- [27] Pennanen T, Frostegård Å, Fritze H, et al. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests [J]. *Appl Environ Microb*, 1996, 62(2): 420–428.
- [28] Bååth E, Frostegård Å, Fritze H. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition [J]. *Appl Environ Microb*, 1992, 58(12): 4026–4031.
- [29] Christensen H, Grifeiths B, Christensen S. Bacterial incorporation of tritiated thymidine and populations of bacteriophagous fauna in the rhizosphere of wheat [J]. *Soil Biol Biochem*, 1992, 24(7): 703–709.