

DOI: 10.5846/stxb201106210906

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. 生态学报 2012, 32(14): 4421–4433.

Liu G H, Ye Z F, Wu W Z. Culture-dependent and culture-independent approaches to studying soil microbial diversity. Acta Ecologica Sinica 2012, 32(14): 4421–4433.

土壤微生物群落多样性解析法: 从培养到非培养

刘国华¹, 叶正芳^{1,*}, 吴为中²

(1. 北京大学环境工程系 教育部水沙科学重点实验室, 北京 100871; 2. 北京大学环境科学系, 北京 100871)

摘要: 土壤微生物群落多样性是土壤微生物生态学和环境科学的重点研究内容之一。传统的土壤微生物群落多样性解析技术是指纯培养分离法(平板分离和形态分析法以及群落水平生理学指纹法)。后来, 研究者们建立了多样性评价较为客观的生物标记法(磷脂脂肪酸法和呼吸醌指纹法)。随着土壤基因组提取技术和基因片段扩增(PCR)技术的发展, 大量的现代分子生物学技术不断地涌现并极大地推动了土壤微生物群落多样性的研究进程。这些技术主要包括: G+C% 含量、DNA 复性动力学、核酸杂交法(FISH 和 DNA 芯片技术)、土壤宏基因组学以及 DNA 指纹图谱技术等。综述了这些技术的基本原理、比较了各种技术的优缺点并且介绍了他们在土壤微生物群落多样性研究中的应用, 展望了这些技术的发展方向。

关键词: 土壤微生物多样性; 生化技术; 分子生物学技术; 应用和进展

Culture-dependent and culture-independent approaches to studying soil microbial diversity

LIU Guohua¹, YE Zhengfang^{1,*}, WU Weizhong²

1 The Key Laboratory of Water and Sediment Science, Ministry of Education, Department of Environmental Engineering, Peking University, Yi Heyuan Road 5, Beijing 100871, China

2 Department of Environmental Science, Peking University, Yi Heyuan Road 5, Beijing 100871, China

Abstract: One gram of soil may harbor up to 10 billion microorganisms belonging to possibly more than 10^4 different species, most of which play vital roles in various biogeochemical cycles such as the release and fixation of nutrient elements and decomposition of organic matter. The microbial community is considered to be a functional indicator because changes in the soil environments in which they live can affect their structure and diversity. Microbial diversity is a growing field of study in soil science and microbial ecology. Increases in knowledge of soil microbial diversity depend on improvement in the approaches to its study. Over the last four decades, culture-dependent and culture-independent technologies have been developed to assess microbial diversity in soil.

Conventional culture-dependent methods such as plate counts, morphology analysis and community level physiological profiling (CLPP) provide information on the active heterotrophic component and the functional role of the population. However, the evaluation of soil microbial diversity based on these methods has been limited to the cultivable cells, amounts of which are less than 1% of the microorganisms observed under the microscope. To overcome this issue, profiles based on biochemical components of cell membrane have been used to characterize the soil microbial community. The profiles mainly include phospholipids fatty acids and respiratory quinines, the structure of which can be used to classify microorganisms. Since these methods avoid the limits of selective culturing and isolating, they have been considered to be an approach to

基金项目: 中国博士后科学基金 (20110490219)

收稿日期: 2011-06-21; 修订日期: 2011-09-28

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yezhengfang@iee.pku.edu.cn

<http://www.ecologica.cn>

objectively reflecting soil microbial community diversity.

With improvements in DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) technologies, a number of molecular-based methods, which are more reliable and accurate than the above-mentioned methods, have been developed to assess soil microbial diversity. These approaches include DNA reassociation, guanine + cytosine (G + C) % content, nucleic acid hybridization technologies such as fluorescent in situ hybridization (FISH) and DNA microarrays, soil metagenomics based on cloning and library screening of soil genomic DNA, PCR-based genetic fingerprinting such as terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), denaturing/temperature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE), single strand conformation polymorphism (SSCP) and two-dimensional DNA gel electrophoresis (2-DGE) with high resolution. These molecular-based technologies can potentially provide excellent insights into diversity information of the cultivable as well as uncultivable soil microorganisms. Without a doubt, they have opened up novel ways to study soil microbial diversity in detail, and thus enable us to acquire a better understanding of the relationship between function and diversity of soil microorganisms. Genetic fingerprinting especially is a very suitable approach to monitoring changes of soil quality through analyzing temporal and spatial dynamics of microbial diversity.

The culture-independent methods do not require the selection of culture media and conditions, and also enable us to obtain more abundant and accurate information of microbial diversity than the culture-dependent methods. However, each method has its own limitations. Therefore, when applying these methods to the assessment of soil microbial community, a combination of more than two methods is recommended. This review introduces their principles, advantages and disadvantages, as well as summarizing their application and progress in studying soil microbial diversity.

Key Words: soil microbial diversity; culture-dependent; culture-independent technologies; application and progress

土壤中存活着种类极其丰富的微生物。据估算, 1g 土壤中有数千乃至数万种约数十亿个微生物个体^[1-5]。以群落的形式存在于土壤中的微生物不仅是土壤养分和有机质循环和转化的动力^[6], 而且也影响着土壤的结构^[7]、土壤肥力^[8]以及地上植物的健康^[9]等。另外, 土壤微生物也是一个相当大的地下能源宝库, 世界的可持续发展以及未来能源问题的解决都离不开土壤微生物。因此, 土壤微生物系统越来越成为当代最前沿的研究内容之一^[10]。土壤微生物研究中非常重要的研究内容之一就是土壤微生物群落多样性的研究。通过土壤微生物多样性的研究不仅可以预测土壤养分和环境质量的变化, 而且还可以认识和掌握在土壤微生物生态中起重要作用的微生物类群和他们的功能角色。

土壤微生物群落多样性主要研究土壤环境中微生物种群的种类、丰度、分布均匀性、结构变化和微生物群落的功能多样性等。在过去的 40 多年里, 土壤微生物多样性的研究方法已经从传统的培养分离发展到了无需培养的现代分子生物学技术。为了更好地了解和把握这些技术和方法, 本文将简要地综述他们的原理, 优缺点以及在土壤微生物多样性解析中的应用, 并且展望这些技术的发展方向。

1 以生化技术为基础的研究方法

这部分主要包括以培养为主的平板计数和形态分析、以检测微生物酶活性的群落水平生理学指纹分析以及以微生物细胞内生化合成为分析指标的生物标记法。

1.1 平板计数和形态分析

在 20 个世纪 70 年代以前, 土壤微生物多样性解析技术主要依靠细胞的培养分离和形态分析^[11], 即通过人工配制的简单营养基质对土壤中的微生物进行定时定温培养, 然后对生长的菌落进行计数, 并通过形态构造和生理生化特性来鉴定种属。该方法直观快捷, 而且可以提供具有代谢活性、异养类型等种群信息^[12]。然而, 微生物在实际土壤生境中的生长与温度、pH 值、养分和种间的相互作用有很大关系, 简单的人工模拟环境是无法满足其生长要求的。因此, 这种方法仅能培养出极少数(少于 1%)的微生物。Torsvik 等^[13]利用染色法在荧光显微镜下观察到 1 g(干重)土壤中含有 4.2×10^{10} 个细菌细胞, 而在培养平板上仅有 4.2×10^6 个细菌

菌落形成(CFU)。

1.2 群落水平生理学指纹(CLPP) 或单一碳源利用模式法(SSCU)

这个技术主要是基于某一微生物群落所含有的酶可催化利用特定的碳源基质, 然后通过测定其利用能力和模式来评价微生物种群多样性。Garlan 和 Mills^[14]于 1991 年首次提出该技术, 经 BIOLOG 公司商业化后在土壤微生物群落功能多样性的评价研究中得到了广泛的应用^[15]。如, Derry 等利用 BIOLOG 系统分别研究了杂酚油污染土壤^[16]和北极土壤^[17]中微生物的功能多样性和种群结构; 李云等^[18]利用 BIOLOG 生态测试微平板研究了气候对旱地紫色土微生物功能多样性的长期影响, 结果发现中亚热带气候的紫色土壤微生物对含 C 化合物的利用能力强, 而暖温带气候的紫色土壤微生物对含 N 化合物的利用能力强。BIOLOG 公司根据不同的检测目的开发了 ECO(生态板)、GP(革兰氏阳性板)、GN(革兰氏阴性板)、FF(丝状真菌板)和 MT 等一系列微平板。每个平板上有 96 个微井, 其中 95 个微井的干膜上都含有碳源基质和氧化还原染料, 一个不含碳源的微井用作对照。当微生物利用碳源进行呼吸时释放出的 NADH 还原染料并使其变色, 然后通过测定氧化还原燃料的变色速率来推测微生物的呼吸速率, 最终达到评价能利用碳源基质的微生物种类和利用程度的目的。MT 微平板上只含染料不含基质, 允许科研人员自行设计和检测不同的碳源基质。

该方法具有自动化程度高、检测速度快等优点。然而, BIOLOG 系统仅限于检测那些可培养、能迅速生长的微生物。检测结构并不能完全代表原位的代谢多样性。另外, 样本处理、培养条件和微平板应用类型等都会给微生物多样性评价带来误差^[19]。

1.3 生物标记法

生物标记法^[20]主要是利用微生物细胞内某种生化成分的结构特点来区别微生物种类。这种方法避免了传统培养法的缺陷, 能比较客观地评价微生物多样性。方法的主要步骤是通过提取土壤微生物中的某种生化成分并纯化, 然后利用气、液相色谱等化学手段对该种化学成分进行分类鉴定。常用的微生物多样性生物标记法有: 磷脂脂肪酸分析法^[21-22]和呼吸醌指纹法^[23-24]。

1.3.1 磷脂脂肪酸(PLFA) 分析法

磷脂是所有生物活细胞重要的膜组分。在正常生理条件下, 磷脂中的长链成分——PLFA 在细胞内的含量一定而且具有生物特异性, 故 PLFA 可用作微生物群落分析标记物^[25]。磷脂随着细胞的死亡而很快分解^[26], PLFA 总含量可以用来表征活性微生物的生物量。通过从土壤中提取 PLFA 并且测量其种类和丰度来判断特定微生物种群的存在和丰度, 进而揭示土壤微生物种群结构和多样性的变化。Murata 等^[27]分析了大米土壤中细菌群落多样性和 PLFA 的关系后发现, 细菌多样性和 PLFA 的量呈比例关系。Keith-Roach 等^[28]的研究表明, 温暖的季节可促使盐碱地微生物的 PLFA 丰度增加, 并且发现一年中好氧细菌是优势菌。Zhang 等^[29]利用 PLFA 法分析了不同管理方式对农业土壤微生物的结构和多样性的影响。结果表明, 适度或加强土壤管理可以提高土壤微生物多样性。微生物 PLFA 的提取和测定是该分析法的关键所在。Zelles 等^[22]介绍了 3 种 PLFA 提取方法即简单提取法、MIDI(microbial identification systems) 系统提取法和扩展提取法。采用前两种方法提取 PLFA 后产生的脂肪酸谱相似, 而且可检测到的 PLFA 一般有 20—48 种, 最多可达 72 种; 采用扩展提取法提取的 PLFA 数量可多达 200—400 种。PLFA 的测定方法经过不断完善, 目前主要是采用准确、方便和快捷的 GC-MS 方法^[27]。

PLFA 分析法在描述整个微生物群落结构变化的研究中具有快捷、可靠的优点, 然而其分类水平较低, 不能鉴定到微生物种的水平。

1.3.2 呼吸醌指纹法

呼吸醌是微生物细胞膜的重要组份, 也是微生物呼吸链中的一种电子导体^[30]。它主要包括泛醌(ubiquinone, UQ) 即辅酶 Q 和甲基萘醌(menaquinone, MK) 即维生素 K 两大类。泛醌广泛存在于革兰氏阴性细菌的细胞膜上, 主要用于微生物的好氧呼吸, 甲基萘醌存在于革兰氏阳性细菌和个别革兰氏阴性细菌的细胞膜上, 主要用于微生物的厌氧呼吸。每种微生物所含的呼吸醌在结构上是特有的, 因此根据呼吸醌的测

量能判断微生物的群落的种类多样性。并且,在土壤里微生物呼吸醌的含量和和微生物生物量存在线性关系^[31]。因此,呼吸醌指纹法能评估土壤尤其是被污染土壤微生物成分和生物量的变化。如,日本的 Katayama 研究组多次使用该方法成功地分析了除草剂^[32]、杀虫剂^[33]和烃类^[34]等有机化合物对土壤微生物群落结构、成分和多样性的影响,并且认为它是有潜力的土壤微生物群落变化的检测工具。此方法的主要步骤是首先从土壤中提出呼吸醌,然后用液相等方法测定呼吸醌的种类,进而推断土壤中微生物种类多样性。Fujie 等^[24]已经报道了一些呼吸醌和微生物种类的对对应关系。比如,泛醌 Q-8,9,10 分别代表了 *Proteobacteria* 的 α - β - 和 γ -subclass。

该方法简单方便,然而和磷脂脂肪酸法一样,缺点是分类水平低,无法判断到微生物属或种^[35]。

2 现代分子生物学技术

为了克服上述方法的分类局限性,科研人员利用微生物细胞内的遗传物质来评估土壤微生物的种类和结构多样性。这种从遗传分子的水平来研究微生物群落特点的方法即为现代分子生物学方法。遗传分子特征序列主要是核糖体基因序列(rRNA)。在生物漫长的进化过程中,rRNA 分子在碱基组成、核苷酸序列和高级结构等方面表现出高度的变化和保守性,被喻为生物进化的分子计时钟^[36]。16S rRNA 基因由于分子大小适中而且拥有相当丰富的数据库等优点已经成为原核微生物分类和进化标记的最常用核糖体操纵子基因,而 18S rRNA 基因分子被用来分析真核微生物。另外,许多特异性蛋白编码基因也常常被用作微生物分析的靶标分子^[37]。如:用来检测细菌的促旋酶 B 亚单位基因(*gyrB*)、用来检测氨氧化细菌的氨单加氧酶基因(*amoA*)、用来检测反硝化细菌的亚硝酸还原酶(含 Cu)基因(*nirK*)、用来检测沙门氏菌的沙门氏菌侵袭蛋白 A 基因(*invA*)和用来检测甲烷杆菌属的甲基 coA 还原酶基因(*mcrA*)等。

随着 DNA 提取、聚合酶链式反应(PCR)等技术的发展,现代分子生物学技术被逐步建立和改进,为土壤微生物群落多样性的研究带来了良好的契机。自 20 世纪 70 年代以后,国外就已经建立了各种分子微生物生态学研究机制。这些机制主要包括:(1)基于 DNA 热变性后同源单链发生重组行为的核酸复性动力学和基于 DNA 序列成分不同的 G+C% 含量法。(2)基于核酸的碱基配对原则,用特异性的 DNA 探针与待测样品的 DNA(RNA)杂交或者直接进行原位杂交(*in situ*)形成杂合分子,然后由仪器检测杂交后的信号并定量。(3)以基因组学技术为依托,将从环境样品中直接提取的 DNA 克隆到合适的载体中,然后将载体转化到宿主细菌建立环境基因组文库,对得到的环境基因组文库再进行功能基因筛选和基因测序等。(4)以检测基因组中 DNA 多态性为目的而开发出了许多 DNA 指纹图谱技术。

2.1 核酸复性动力学技术和 G+C% 含量法(G+C% content)

核酸复性动力学技术是一个被用来测量微生物基因复杂程度的方法,它已经被用于评价土壤微生物的多样性^[38]。如,Torsvik 等^[2-3]用核酸复性动力学的方法很好地估计了土壤当中的细菌多样性,并且发现 1 g 干燥的土壤中含有大约 4000 个完全不同的染色体基因单位。该方法的步骤是总 DNA 被从土壤中提取、纯化、变性解链和再复合。通常,再复合的程度取决于微生物多样性大小。在特定条件下,半数 DNA 发生复性时的 $COt_{1/2}$ (CO 为核苷酸浓度)值与总 DNA 的复杂度即微生物多样性的复杂度成正比。因此, $COt_{1/2}$ 可被作为一个指标来评价土壤微生物的多样性。该方法的优点是不受 PCR 扩增偏差的影响,可是受基因拷贝数的影响,即由于大部分土壤细菌的拷贝数很低故利用此法检测土壤微生物多样性时缺乏灵敏度。

G+C% 含量法是基于 DNA 链上 G+C% 含量的不同来评价土壤微生物多样性。Nüsslein 等^[39]利用 G+C% 含量法研究了不同植被覆盖下土壤细菌群落的多样性并且发现,森林和草地两种植被对土壤细菌群落的成分和结构有很大影响。该法主要利用二苯丙咪唑与 DNA 链上 A+T 碱基对结合,放大了不同基因之间 G+C% 含量的差别,进而通过 DNA 分子质量差异离心产生不同 DNA 的 G+C% 含量分布图谱。该法也是不受 PCR 扩增偏差的影响而且能使分类鉴定达到属的水平,然而也同样需要大量 DNA 样品,而且不同种类的微生物可能拥有同样的 G+C% 含量,是一种粗略的方法。

2.2 核酸杂交技术

核酸杂交技术是将已知微生物基因序列作为特异探针,与从样品中提取的 DNA 或者 RNA 进行杂交,然

后通过杂交信号的检测和分析来判断土壤微生物多样性。这是一种既能定性又能定量地进行土壤微生物多样性解析的分子生物学工具^[40-41]。

2.2.1 原位杂交(In situ hybridization, ISH) 技术

对于土壤微生物多样性研究而言,细胞水平的原位杂交可能更具有实际应用价值。比如,利用探针可以直接和环境土壤样品、纯培养菌落进行原位杂交,获得自然和人工状态下微生物种类、相对丰度和空间分布信息^[42-43]。Delon 等^[44]于 1989 年首次使用荧光标记寡核苷酸探针检测单个微生物细胞。由于安全、灵敏和简便等特点,荧光原位杂交技术(FISH)已经被广泛地用来研究土壤微生物多样性。如 Llobet-Brossa 等^[45]用荧光标记的 rRNA 探针和海底底质土壤微生物细胞进行原位杂交后发现,73% 以上被 DAPI 染色的细胞能被杂交,总细胞数的 45% 能被鉴定到细菌门,而且还发现噬胞菌属(*Cytophaga*) 和黄杆菌属(*Flavobacterium*) 丰度最高,其次是硫酸还原菌。Liebner 等^[46]通过 FISH 法发现永久冻土中存在极其多样的细菌群落,并且观察到拟杆菌(*Bacteroidetes*) 和放线菌(*Actinobacteria*) 是优势菌群。原位杂交要求土壤微生物基因必须有很高的拷贝数,否则那些非优势微生物很难被检测出来。然而,原位 PCR 技术的开发使核酸杂交技术克服了上述问题,通过在细胞内扩增目标基因片断然后用特异探针进行杂交可以更加准确地评价土壤微生物多样性。

2.2.2 基因芯片技术

基因芯片(DNA chip),又称 DNA 微阵列(DNA microarrays),是核酸杂交技术家族中的另一重要成员,是将成千上万个已知序列的探针分子按照特定的排列方式固定在固相载体(玻片、硅片等)上所组成的微点阵列。经过标记的靶核苷酸序列与基因芯片特定位点上的探针进行杂交,然后通过检测杂交信号定性和定量地判断样品中的靶序列分子^[47-48]。自从 Fodor 等人于 1991 年报道了应用光刻技术制作 DNA 芯片的技术以来^[49],具有不同功能的基因芯片的研究和商业化得到了快速的发展。目前,用于土壤微生物生态研究的基因芯片技术主要有 3 种类型^[50]:(1) 群落基因组芯片(community genome array, CGAs);(2) 系统寡核苷酸芯片(phylogenetic oligonucleotide arrays, POAs);(3) 功能基因芯片(functional gene arrays, FGAs)。CGAs 和 POAs 芯片最适用来分析复杂的土壤环境中微生物的种群结构和多样性变化以及种群间的系统发育关系,而 FGAs 芯片适合用来描述土壤环境中那些具有特殊功能的微生物(如,硝酸盐还原菌、固氮菌和硫酸还原菌等)^[51]。Wu 等^[52]建立了一个用于检测特定微生物种群的全基因组芯片,该芯片具有特异性高、敏感性强(0.2 ng DNA)的特点,而且可以根据调节杂交温度鉴定到细菌种或株的水平。作者利用该芯片成功地分析了土壤、海洋和河流沉积物之间的微生物群落结构差异。Yergeau 等^[53]利用含有 8741 个细菌和古菌 16S rDNA 探针的 POAs 芯片,研究了不同的南极土壤微生物的群落多样性。结果显示了微生物多样性随着纬度的增高而明显地减小,也证明了在检测微生物多样性的广泛性时基因芯片技术比基于 PCR 的 16SrRNA 基因克隆库更敏感。Liang 等^[54]利用 FGAs 芯片评价了用臭氧氧化和生物方法联合处理原油污染土壤过程中,细菌功能基因的变化,即在臭氧作用后,微生物的功能基因多样性有所降低,然而在生物处理后,那些主要的具有碳氮硫等循环功能的功能基因数量却有所回升。

尽管核酸杂交技术对于那些特殊的土壤微生物的鉴定非常有效,但是由于目前我们还无法得到所有土壤微生物的探针序列,故该方法不适宜检测总土壤微生物多样性。

2.3 土壤宏基因组学

Handelsman 等^[55]于 1998 年首次提出宏基因组学的概念,即不需要经过培养、分离单一种类的微生物,而是利用现代基因组技术直接研究自然状态中环境微生物群落。土壤宏基因组学的主要任务之一就是揭示土壤微生物群落多样性^[56]。通过 16S rRNA 基因(或其他标记基因如 *amoA* 等)文库的构建和系统化分析来研究土壤微生物群落种类和存在丰度,并且挖掘有用的基因,使土壤微生物多样性分析更趋于完整客观^[57]。该方法的步骤主要包括土壤 DNA 的提取克隆文库的构建和筛选^[58]。

(1) DNA 提取 DNA 提取是现代分子生物学方法的基础和关键,提取方法会影响所构建文库的代表性。DNA 提取方法大致分为两类,即直接细胞溶解法(直接从土壤细胞中提取 DNA)^[59]和间接细胞溶解法(先从

土壤中分离细胞,再从细胞中提取 DNA^[60]。直接法比间接法简便、且能获得更多 DNA^[61],但是间接法能获得更大更纯的基因片断^[62]。细胞的溶解通常采用多种方式相结合的策略,如用酶(如, *lysozyme* 或 *proteonaseK*)、高温、界面活性剂(如, SDS)和机械破碎法(*beads beating*)同时处理土壤细胞。在土壤宏基因组学中,采用什么样的 DNA 提取方法取决于土壤性质特点和研究目的。

(2) 文库的构建 根据插入载体的片断大小,宏基因组文库一般能被分为两种,即插入质粒载体的小片断基因文库和插入人工染色体(BAC)或粘粒(*cosmid*)的大片段基因文库。小片断文库(<15 kb) 适宜于单个基因或具有新的代谢功能的小操纵子基因的筛选^[63-64]。大片段文库(>40 kb) 适宜于分析那些不可培养微生物的基因组^[65-66]。

(3) 文库筛选 高度复杂的土壤元基因组要求文库的筛选方法具有高通量和高灵敏度的能力。目前,筛选技术主要包括功能驱动筛选^[67]、序列驱动筛选^[68]和底物诱导基因表达筛选^[69]等。

土壤宏基因组学为土壤微生物群落结构和多样性,特别是对那些土壤功能微生物的分析提供了很好的技术平台。Rondon 等^[70]采用 BAC 载体构建了两个大片段土壤宏基因组文库(>1Gbp of DNA),对文库进行 16S rDNA 系统发育学分析后发现,文库中的 DNA 代表了不同的细菌门(如,低 G+C 百分含量细菌 *Acidobacterium*, *Cytophagales*, and *Proteobacteria*) 揭示了该土壤样品中有很高的微生物多样性。德国 Schleper 研究室的研究者们通过大插入片断文库的构建和鉴定,第一次报道了在草地土壤基因组中酸杆菌门的基因组成分和多样性^[71]。通过构建 3 个大片断 Fosmid 基因文库,分析了沙地生态和森林土壤中古细菌的多样性^[72]。

然而,这个技术对所构建文库的质量和文库筛选方法的要求比较高,而且工作量大,不适合用来分析不同土壤环境中微生物多样性的时空动态变化和监测。

2.4 基因指纹图谱技术

基因指纹图谱技术是基于基因在长度、成分和结构上的多态性,利用电泳方法将复杂的 PCR 扩增片断分离成简单的基因条带图谱,然后根据条带信息进行基因分析的技术。一般地,每个条带代表一种不同的可操作分类单位(*operational taxonomy unit*, OTU),条带的数量可反映土壤环境微生物群落中优势类群的种类,而亮度可以反映微生物种群的相对丰度。由于具有操作简便以及可同时分析多个样品的优点,这个技术已经被广泛地用于土壤微生物群落结构和多样性评价以及他们的动态监测。指纹图谱技术在土壤微生物多样性研究中的主要步骤包括土壤总核酸(DNA 或 RNA)提取、PCR(或 RT-PCR)扩增、电泳分离和统计分析。目前,指纹图谱技术主要有以下几种类型。

2.4.1 DNA 长度多态性图谱分析

DNA 长度多态图谱分析主要用于检测土壤微生物基因片断的长度多态性。DNA 长度多态片断常常通过限制性酶切的方法产生,因此也被称为限制性片断长度多态(*restriction fragment length polymorphism*, RFLP)和末端限制性片断长度多态(*terminal restriction fragment length polymorphism*, T-RFLP)。这两个方法的原理相同,均是利用无变性的琼脂或者聚丙烯酰胺凝胶对限制性酶切片断进行电泳分离,不同长度的 DNA 片断会停留在不同的凝胶位置上,最后形成长度多态图谱。T-RFLP 是 RFLP 的发展,克服了 RFLP 图谱复杂的缺点,即在 PCR 扩增的过程中,一个引物被用荧光标记,当进行片断分析时,只针对那些末端带有荧光标记的产物。因此, T-RFLP 简化了 RFLP 的条带图谱,能够更加准确地反映土壤微生物多样性^[73]。由于核糖体 DNA 常常被用来作为基因标记,故 RFLP 也通常被称为扩增核糖体 DNA 限制分析(*amplified ribosomal DNA restriction analysis*, ARDRA)。限制性酶的应用是这些方法的关键,2—4 种酶通常被同时用来产生不同长度的土壤 DNA 片断。对于各种土壤微生物多样性的动态变化检测,这 3 个方法是非常方便的。T-RFLP 技术自 1997 年被 Liu 等^[74]首次将应用于土壤微生物多样性的研究以来,已经被广泛地用来研究各种土壤中的微生物群落结构和多样性变化^[75-76]。王英等^[77]利用 ARDRA 和 RFLP 技术对免耕水稻土壤中细菌的多样性和空间分布分析后发现,细菌种类非常丰富,而且在不同层的土壤中细菌的多样性存在差异。然而,一条 RFLP(T-RFLP/ ARDRA)条带可能代表几种微生物种类,容易给微生物多样性评价带来误差。

另外核糖体间隔区分析(ribosomal intergenic spacer analysis, RISA)和随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)也是长度多态性图谱家族中的成员,常被用来研究土壤微生物多样性^[78-79]。RISA以原核生物16S和23S rDNA间隔片断为研究对象,根据rDNA大小转录单元间的长度多态性揭示土壤环境中微生物多样性。RAPD方法利用单个人工合成的随机多态核苷酸序列(通常10 bp)为引物,在一定的PCR条件下(低退火温度)对土壤基因组DNA进行随机扩增,产物被电泳分离后产生长度多态性指纹图谱。

2.4.2 DNA成分多态性图谱分析

DNA成分多态性图谱分析是用来分离那些DNA分子长度相同,碱基序列成分不同的PCR扩增产物。该技术主要包括变性剂浓度梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)和时间温度梯度凝胶电泳(temporal temperature gradient gel electrophoresis, TTGE)。这些电泳技术的原理是相似的,即通过使双链DNA在化学变性剂或者温度形成线性梯度的环境下部分熔解变性成单链,然后根据不同序列的DNA在聚丙烯酰胺凝胶上移动速度的差异而将其分离成条带图谱。DGGE技术最初被用于检测人类基因的点突变,自Muyzer等^[80]将其首次应用于微生物基因多样性的研究以来,已经被广泛应用于土壤等环境微生物群落结构和多样性的评价^[81-86]。为了提高DNA片断的分离效率,在PCR扩增土壤基因组时,PCR引物的一端常常被加上一个约30—40个碱基的GC夹子以保证扩增产物在被凝胶电泳分离时,不至于将双链DNA完全熔解成单链。理论上,DGGE可以分离仅有1 bp碱基差异的DNA片断,然而对于超过500 bp的DNA片断,DGGE的分离灵敏度会降低^[87]。

TGGE和TTGE都是在DGGE的基础上开发出来的,尽管都是采用温度梯度,但是凝胶的变性环境的形成过程却不一样。在TGGE方法中,从凝胶的上端到末端有一个固定的温度梯度^[88],而在TTGE中,温度是在电泳的过程中以一定的速率缓慢地增加的。在实际执行这两个方法时,TTGE更容易被达到,而且由于能够提供更宽的分离范围,故分离灵敏度更高^[89-90]。

2.4.3 DNA单链构象多态性图谱分析

DNA单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)是另一个重要的指纹图谱技术。它是一种基于单链DNA的构象差异来分离DNA片断的方法。理论上,当DNA分子链上的一个碱基发生改变时,单链DNA的空间折叠构象就会发生改变,这些空间构象有差异的单链DNA在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时会产生不同的迁移率,从而可以在凝胶上产生单链DNA条带图谱。和DGGE一样,SSCP最初也是被用于检测碱基点突变和已知小分子基因序列变化^[91]。该技术对300 bp的DNA片断中的单碱基突变,可以达到90%以上的检出率。有时为了提高单链DNA的分离效率,往往在聚丙烯酰胺凝胶中加入化学交联剂如甘油或聚乙二醇(PEG)^[92]。该技术的优点是无需DNA片断带GC夹和凝胶变性梯度的建设,故操作相对简便,已经被广泛地应用于土壤微生物群落分析。Schwieger等^[93]首次证明SSCP在土壤微生物多样性的研究中具有应用潜力。而后,Kleinstueber等^[94]利用SSCP技术分析了不同盐度(0, 7.5, 15和20)的柴油污染土壤中优势菌群结构的变化。Smalla等^[95]利用包括SSCP在内的3种DNA指纹技术(另两种是DGGE和T-RFLP)考察了4种可耕种土壤中的细菌群落,结果发现,菌群结构与土壤的理化性质相关,对于同一类土壤,3种方法可产生相似的细菌群落多样性结果。Vivas等^[96]通过PCR-SSCP分析发现,在被烃类污染最严重的土壤中PAH降解基因的多样性是最大的。然而,SSCP的重现性较差,易受电泳温度(4—16℃)和凝胶浓度等条件的影响,对于300 bp以上的DNA序列,分离效率低下。

2.4.4 DNA双向(2-D)图谱分析

DNA双向(2-D)图谱技术是一种具有高分辨率的新型基因指纹图谱技术。该技术主要以DNA序列在长度、成分和空间构象3种多态性参数中的任何两个为DNA片断分离依据,对复杂的土壤基因组进行分离鉴定^[97]。DNA双向图谱技术的概念最早由Fischer和Lerman^[98]于1983年提出,目的是用来检测基因的点突变。近年,该技术已经渐渐地被用来详细地分离土壤等环境基因组,以至于使我们对环境基因组有更好的认

识和把握。Isshi 等^[99]于 2006 年利用 16S rRNA 基因在 V1 高度变化区域的自然多态性(长度和成分)开发了一个新的高分辨率 2-D 基因图谱技术。后来, Liu 等^[100-102]将此技术成功地应用于土壤微生物群落结构多样性的研究,并且发展建立了两个不同的 2-D 基因图谱技术^[97]。另外, Jones and Thies^[103]也建立了可以用来详细分离土壤微生物核糖体基因的转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)片断的 2-D 技术。

2-D 技术的主要特点是具有基因高分辨率,那些利用常规的 DGGE、T-RFLP 和 SSCP 等一维方法无法分开的基因片断,利用 2-D 技术便能将其很好地分开。李刚等研究者^[104]具体比较了 RISA、DGGE 和 2-D 方法在分析大豆根际土壤细菌多样性时的不同,结果表明 2-D 方法能够获得更多的土壤细菌多样性信息。如果对图谱中的信号进行剪切并鉴定分析时,具有高分辨率特点的 2-D 技术可以简化克隆文库中的基因种类,并利用 2-D 参数可以排除那些由于 PCR 的错误扩增产生的序列和假阳性克隆体基因序列,从而确定正确的基因扩增序列来准确地鉴定土壤微生物种类^[102]。

然而,由于基因 2-D 图谱技术尚处于发展期,而且还受仪器装置的限制,目前还不适宜同时分析比较大量的土壤样品。随着技术的发展,2-D 技术在土壤等环境微生物群落结构多样性的分析中将发挥更大的作用。

3 土壤微生物多样性研究方法的应用策略

如前所述,现有的每一种技术都有其局限性。因此,任何一种方法都无法全面地解决土壤微生物群落结构和多样性。在实际应用中,研究人员往往根据自己的研究目的利用多种方法组合的策略减少误差,以获得更准确的信息。Ellis 等^[105]利用培养和非培养的方法研究了重金属污染对可培养和不可培养土壤微生物多样性的影响。结果发现,各种污染土壤的总基因组的 DGGE 图谱非常相似,而每种土壤的可培养细菌基因的 DGGE 图谱却显示出了很大的不同。因此,作者们认为,对于评价重金属对土壤微生物多样性的影响研究而言,培养的方法可能更准确。Enwall 等^[106]利用 T-RFLP 和 DGGE 的方法评价了农业土壤中脱氮菌群的组成。结果发现,DGGE 比 T-RFLP 有更高的解析度,更适合区别样本的不同。Rosenberg 等^[107]利用 FISH 和 DGGE 研究了土壤变形虫对阿拉伯芥根圈细菌群落的影响,第一次全面地阐明了原生动物的如何迅速地使根圈细菌群落发生改变的。Voget 等^[108]通过联合培养方法和土壤宏基因组学筛选的策略迅速鉴定出多个已知和新的编码生物催化剂基因,表明了土壤微生物具有高度多样性。

4 土壤微生物群落多样性解析技术发展前景的展望

土壤微生物群落多样性研究对于人类理解整个生物圈的物质循环和能量流通、认识微生物在土壤生态系统中的功能、挖掘有用的土壤微生物资源以及保护土壤生物多样性方面有着非常重要的意义。今后,土壤微生物多样性解析技术主要从以下几个方向发展。

(1) 开发新的培养技术 尽管培养技术被严格的培养条件所限制,仅能培养土壤中小部分的微生物,但是它在菌株水平(如高效产酶菌株的筛选和定性等)的研究上是非常重要的,是其它技术无法代替的。另外,培养方法可以为微生物种群分子分类积累大量的数据,为生物标记法或分子生物学方法提供可靠的参照标准。因此,培养方法在微生物多样性的研究中仍然是很重要的,需要开发新的技术来培养那些在过去认为“不可培养”的微生物。Kaeberlein 等^[109]认为,尽管有充足的营养,有些微生物在一个不熟悉的环境中是不生长的。他们采用了一个模拟自然环境的扩散装置培养出一些在人工的灭菌培养基上不可培养出来的海洋微生物。Joseph 等^[110]利用一个简易的固体培养基(装在一个灭菌碟子里)从土壤中培养分离出了 350 个细菌个体(属于 9 个细菌门和 60 个细菌科),经过 16S rRNA 基因分类学比较发现,93 个细菌个体(属于 20 个未命名的细菌科)是所谓的不可培养细菌。

(2) 进一步发展分子生物学技术 分子生物学技术,特别是以基因为研究目标的现代分子生物学技术为土壤微生物多样性的研究提供了强有力的工具。然而,许多比较流行而且非常有潜力的方法还有待进一步改善。比如,土壤宏基因组学在阐明土壤微生物多样性和功能关系、开发微生物资源多样性、筛选新型活性物质以及发掘有机物高效降解基因的研究方面有着广阔的应用前景。然而,由于该方法工作量大且对 DNA 质量和宿主细胞的要求和选择性比较高,往往在实际应用中范围或者某个个体研究者很难完成或者深入进行这

方面的工作。因此, 在今后需要这方面的专家统一、整合以及标准化研究方案以方便研究人员使用^[57]。再如, 基因芯片技术除了需要在高密度和微量方面进一步发展外, 不同基因与探针之间的错配等技术性问题也有待改善。另外, 一种新型的芯片技术即宏基因组芯片^[111]是一种将芯片和宏基因组技术结合起来的新技术, 该技术无需分离培养菌株、无需了解菌群的基因序列, 它的探针来源于环境 DNA 的宏基因组文库, 因此, 对于大部分基因属于未知基因的土壤环境而言, 该技术具有实际应用价值, 需要进一步发展。

(3) 多种技术的有机结合 要实现全面、准确的土壤微生物多样性评价, 任何一种单一的技术都无法完成。比如, 大部分土壤微生物是不易被目前的纯培养技术培养的。然而, 尽管现代分子生物学技术可以克服不可培养的困难, 但是它无法在菌株水平上对土壤微生物进行研究。因此, 快速、准确以及全面的土壤微生物多样性研究需要多种方法的有机结合来完成。

References:

- [1] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276(5313): 734–740.
- [2] Torsvik V, Goksøyr J, Daae F L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(3): 782–787.
- [3] Torsvik V, Salte K, Sørheim R, Goksøyr J. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(3): 776–781.
- [4] Roselló-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*, 2001, 25(1): 39–67.
- [5] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 2005, 309(5739): 1387–1390.
- [6] Yao K Y, Huang C Y. *Soil Microbial Ecology and Experiment Technology*. Beijing: Science Press, 2006, 7–17.
- [7] Dodd J C, Boddington C L, Rodriguez A, Gonzalez-Chavez C, Mansur I. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant and Soil*, 2000, 226(2): 131–151.
- [8] O'Donnell A G, Seasman M, Macrae A, Waite I, Davies J T. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil*, 2001, 232(1/2): 135–145.
- [9] Smith K P, Goodman R M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 1999, 37(1): 473–491.
- [10] Curtis T P, Sloan W T. Exploring microbial diversity—A vast below. *Science*, 2005, 309(5739): 1331–1333.
- [11] Jensen V. The plate count technique // Gray T R G, Parkinson D, eds. *The Ecology of Soil Bacteria*. Liverpool: Liverpool University Press, 1968: 158–170.
- [12] Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, Moutoglou P, Klironomos J N, Leea H, Trevors J T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58(2): 169–188.
- [13] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 2402–2451.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Derry A M, Staddon W J, Trevors J T. Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole-carbon-source-utilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, 14(4): 571–578.
- [17] Derry A M, Staddon W J, Kevan P G, Trevors J T. Functional diversity and community structure of micro-organisms in three arctic soils as determined by sole-carbon-source-utilization. *Biodiversity and Conservation*, 1999, 8(2): 205–221.
- [18] Li Y, Sun B, Li Z P. Long-term effect of climate condition on soil microbial diversity of purple soil upland. *Soils*, 2009, 41(2): 230–235.
- [19] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles—a critique. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(1): 1–14.
- [20] Morgan J A, Winstanley C. Microbial biomarkers // van Elsas J D, Trevors J T, Wellington E M, eds. *Modern Soil Microbiology*. New York: Dekker, 1997: 331–352.
- [21] Findlay R. The use of phospholipid fatty acids to determine microbial community structure // Akkermans A D L, Elsas J D, van de Bruijn F, eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996: 1–17.

- [22] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(2): 111-129.
- [23] Hiraishi A. Respiratory quinone profiles as tools for identifying different bacterial populations in activated sludge. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1988, 34(1): 39-56.
- [24] Fujie K, Hu H Y, Tanaka H, Urano K, Saitou K, Katayama A. Analysis of respiratory quinones in soil for characterization of microbiota. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1998, 44(3): 393-404.
- [25] Petersen S O, Klug M J. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(7): 2421-2430.
- [26] Vestal J R, White D C. Lipid analysis in microbial ecology: quantitative approaches to the study of microbial communities. *Bioscience*, 1989, 39(8): 535-541.
- [27] Murata T, Takagi K, Yokoyama K. Relationship between soil bacterial community structure based on composition of fatty acid methyl esters and the amount of bacterial biomass in Japanese lowland rice fields. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(6): 885-888.
- [28] Keith-Roach M J, Bryan N D, Bardgett R D, Livens F R. Seasonal changes in the microbial community of a salt marsh, measured by phospholipid fatty acid analysis. *Biogeochemistry*, 2002, 60(1): 77-96.
- [29] Zhang W J, Rui W Y, Tu C, Diab H G, Mueller J P, Creamer N, Bell M, Wager M G, Hu S. Responses of soil microbial community structure and diversity to agricultural deintensification. *Pedosphere*, 2005, 15(4): 440-447.
- [30] Hu H Y, Tong Z H. Bacterial quinone profile for the study of microbial community structure in environmental samples. *Microbiology*, 2002, 29(4): 95-98.
- [31] Saitou K, Nagasaki K, Yamakawa H, Hu H Y, Fujie K, Katayama A, Hu H Y. Linear relation between the amount of respiratory quinones and the microbial biomass in soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1999, 45(3): 775-778.
- [32] Uchida S, Tanaka H, Fujie K, Katayama A. Changes in microbial community structure in soil percolated with pentachlorophenol with reference to respiratory quinone profile. *Journal of Pesticide Science*, 1999, 24(2): 186-188.
- [33] Katayama A, Funasaka K, Fujie K. Changes in the respiratory quinone profile of a soil treated with pesticides. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 33(6): 454-459.
- [34] Song D J, Katayama A. Monitoring microbial community in a subsurface soil contaminated with hydrocarbons by quinone profile. *Chemosphere*, 2005, 59(3): 305-314.
- [35] Villanueva L, del Campo J, Guerrero R, Geyer R. Intact phospholipid and quinone biomarkers to assess microbial diversity and redox state in microbial mats. *Microbial Ecology*, 2010, 60(1): 226-238.
- [36] Woese C R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 1987, 51(2): 221-271.
- [37] Zhong W H, Wang W, Lin X G, Yin R, Shen W S. Application of nucleic acid-based methods in the study of soil microbial diversity. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(2): 334-341.
- [38] Torsvik V, Sorheim R, Goksoyr J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1996, 17(3): 170-178.
- [39] Nüsslein K, Tiedje J M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8): 3622-3626.
- [40] Clegg C D, Ritz K, Griffiths B S. % G+C profiling and cross hybridisation of microbial DNA reveals great variation in below-ground community structure in UK upland grasslands. *Applied Soil Ecology*, 2000, 14(2): 125-134.
- [41] Theron J, Cloete T E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology*, 2000, 26(1): 37-57.
- [42] Moter A, Göbel U B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 41(2): 85-112.
- [43] Schramm A, Larsen L H, Revsbech N P, Ramsing N B, Amann R, Schleifer K H. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(12): 4641-4647.
- [44] DeLong E F, Wiekham G S, Pace N R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 1989, 243(4896): 1360-1363.
- [45] Llobet-Brossa E, Rosselló-Mora R, Amann R. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2691-2696.
- [46] Liebner S, Harder J, Wagner D. Bacterial diversity and community structure in polygonal tundra soils from Samoylov Island, Lena Delta, Siberia. *International Microbiology*, 2008, 11(3): 195-202.

- [47] Ye R W, Wang T, Bedzyk L, Croker K M. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 47 (3): 257–272.
- [48] Zhou J Z, Thompson D K. Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13 (3): 204–207.
- [49] Fodor S P, Read J L, Pirrung M C, Stryer L, Lu A T, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991, 251(4995): 767–773.
- [50] Zhou J Z. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(3): 288–294.
- [51] McGrath K C, Mondav R, Sintrajaya R, Slattery B, Schmidt S, Schenk P M. Development of an environmental functional gene microarray for soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(21): 7161–7170.
- [52] Wu L Y, Thompson D K, Liu X D, Fields M W, Bagwell C E, Tiedje J M, Zhou J Z. Development and evaluation of microarray-based whole-genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(24): 6775–6782.
- [53] Yergeau E, Schoondermark-Stolk S A, Brodie E L, Déjean S, DeSantis T Z, Gonçalves O, Piceno Y M, Andersen G L, Kowalchuk G A. Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities. *The ISME Journal*, 2009, 3(3): 340–351.
- [54] Liang Y T, van Nostrand J D, Wang J, Zhang X, Zhou J Z, Li G H. Microarray-based functional gene analysis of soil microbial communities during ozonation and biodegradation of crude oil. *Chemosphere*, 2009, 75(2): 193–199.
- [55] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(4): 669–685.
- [56] Niu X G, Han M, Han X R. Metagenomics: new strategy for soil microbiology research. *Microbiology*, 2007, 34(3): 576–579.
- [57] He J Z, Zhang L M, Shen J P, Zhu Y G. Advances and perspectives of metagenomics. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(2): 209–218.
- [58] Daniel R. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 470–478.
- [59] Ogram A, Saylor G S, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, 7 (2/3): 57–66.
- [60] Holben W E, Jansson J K, Chelm B K, Tiedje J M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(3): 703–711.
- [61] Gabor E M, de Vries E J, Janssen D B. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44(2): 153–163.
- [62] Courtois S, Frostegård Å, Göransson P, Depret G, Jeannin P, Simonet P. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(7): 431–439.
- [63] Yun J, Kang S, Park S, Yoon H, Kim M J, Heu S, Ryu S. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7229–7235.
- [64] Gabor E M, de Vries E J, Janssen D B. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(9): 948–958.
- [65] Quaiser A, Ochsenreiter T, Klenk H P, Kletzin A, Treusch A H, Meurer G, Eck J, Sensen C W, Schleper C. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(10): 603–611.
- [66] Treusch A H, Kletzin A, Raddatz G, Ochsenreiter T, Quaiser A, Meurer G, Schuster S C, Schleper C. Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(9): 970–980.
- [67] Liles M R, Manske B F, Bintrim S B, Handelsman J, Goodman R M. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69(5): 2684–2691.
- [68] Ferrer M, Martínez-Abarca F, Golyshin P N. Mining genomes and ‘metagenomes’ for novel catalysts. *Current Opinion Biotechnology*, 2005, 16 (6): 588–593.
- [69] Uchiyama T, Abe T, Ikemura T, Watanabe K. Substrate-induced gene expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(1): 88–93.
- [70] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, Brady S F, Grossman T H, Liles M R, Loiacono K A, Lynch B A, MacNeil I A, Minor C, Tiong C L, Gilman M, Osburne M S, Clardy J, Handelsman J, Goodman R M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2541–2547.
- [71] Quaiser A, Ochsenreiter T, Lanz C, Schuster S C, Treusch A H, Eck J, Schleper C. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidences from environmental genomics. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(2): 563–575.
- [72] Treusch A H, Kletzin A, Raddatz G, Ochsenreiter T, Quaiser A, Meurer G, Schuster S C, Schleper C. Characterization of large-insert DNA

- libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(9): 970–980.
- [73] Tiedje J M, Asuming-Brempong S, Nüsslein K, Marsh T L, Flynn S J. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 1999, 13(2): 109–122.
- [74] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, Forney L J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4516–4522.
- [75] Fedi S, Tremaroli V, Scala D, Perez-Jimenez J R, Fava F, Young L, Zannoni D. T-RFLP analysis of bacterial communities in cyclodextrin-amended bioreactors developed for biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Research in Microbiology*, 2005, 156(2): 201–210.
- [76] Hartmann M, Frey B, Kölliker R, Widmer F. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 61(3): 349–360.
- [77] Wang Y, Teng Q H, Cui Z L, Sun B, Cao H, Hu F. Diversity and spatial distribution of bacteria in non-tillage paddy fields. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(1): 137–143.
- [78] Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbière F, Thioulouse J, Nazaret S. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbial Ecology*, 2000, 39(4): 263–272.
- [79] Wu S H, Zhang C G, Zhang Z Z. Application of RAPD in microbial biodiversity identification. *Journal of Microbiology*, 2000, 20(2): 44–47.
- [80] 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 coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695–700.
- [81] Felske A, Akkermans A D L. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in Grassland soils. *Microbial Ecology*, 1998, 36(1): 31–36.
- [82] Duineveld B M, Kowalchuk G A, Keijzer A, van Elsas J D, van Veen J A. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 172–178.
- [83] Peixoto R S, da Costa Coutinho H L, Rumjanek N G, Macrae A, Rosado A S. Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 35(4): 316–320.
- [84] Knief C, Lipski A, Dunfield P F. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6703–6714.
- [85] Martínez-Alonso M, Escolano J, Montesinos E, Gaju N. Diversity of the bacterial community in the surface soil of a pear orchard based on 16S rRNA gene analysis. *International Microbiology*, 2010, 13(3): 123–134.
- [86] Ben-David E A, Zaady E, Sher Y, Nejidat A. Assessment of the spatial distribution of soil microbial communities in patchy arid and semi-arid landscapes of the Negev Desert using combined PLFA and DGGE analyses. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 76(3): 492–503.
- [87] Xing D F, Ren N Q. Common problems in the analyses of microbial community by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(2): 331–335.
- [88] Wartell R M, Hosseini S H, Moran C P Jr. Detecting base pair substitutions in DNA fragments by temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(9): 2699–2705.
- [89] Yoshino K, Nishigaki K, Husimi Y. Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(11): 3153.
- [90] Chen T J, Boles R G, Wong L J C. Detection of mitochondrial DNA mutations by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(8): 1162–1167.
- [91] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, 5(4): 874–879.
- [92] Markoff A, Savov A, Vladimirov V, Bogdanova N, Kremensky I, Ganev V. Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clinical Chemistry*, 1997, 43(1): 30–33.
- [93] Schwieger F, Tebbe C C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 4870–4876.
- [94] Kleinstuber S, Riis V, Fetzer I, Harms H, Müller S. Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3531–3542.
- [95] Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kropf S, Ulrich A, Tebbe C C. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results?. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69(3): 470–479.

- [96] Vivas A, Moreno B, del Val C, Macci C, Masciandaro G, Benitez E. Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. *Journal of Environmental Monitoring*, 2008, 10(11): 1287-1296.
- [97] Liu G H, Harada T, Amemiya T, Itoh K. Novel two-dimensional DNA gel electrophoresis mapping for characterizing complex bacterial communities in environmental samples. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107(6): 646-651.
- [98] Fischer S G, Lerman L S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, 1979, 16(1): 191-200.
- [99] Isshi T, Rajendran N, Amemiya T, Itoh K. Development of a two-dimensional electrophoresis method to study soil bacterial diversity. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2006, 52(5): 601-609.
- [100] Liu G H, Amemiya T, Itoh K. Two-dimensional DNA gel electrophoresis mapping: a novel approach to diversity analysis of bacterial communities in environmental soil. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2008, 105(2): 127-133.
- [101] Liu G H, Rajendran N, Amemiya T, Itoh K. Bacterial community structure analysis of sediment in the Sagami River, Japan using a rapid approach based on two-dimensional DNA gel electrophoresis mapping with selective primer pairs. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, doi: 10.1007/s10661-010-1868-7.
- [102] Liu G H, Nakamura T, Rajendran N, Amemiya T, Itoh K. Analysis of bacterial populations in the environment using two-dimensional gel electrophoresis of genomic DNA and complementary DNA. *Microbes and Environments*, 2011, 26(2): 184-187.
- [103] Jones C M, Thies J E. Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69(2): 256-269.
- [104] Li G, Zhao J N, Wen Du R L, Yang D L. Bacterial diversity in rhizosphere soil of soybean: a comparison of RISA, DGGE, and 2D-PAGE techniques. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(1): 87-92.
- [105] Ellis R J, Morgan P, Weightman A J, Fry J C. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3223-3230.
- [106] Enwall K, Hallin S. Comparison of T-RFLP and DGGE techniques to assess denitrifier community composition in soil. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(1): 145-148.
- [107] Rosenberg K, Bertaux J, Krome K, Hartmann A, Scheu S, Bonkowski M. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *The ISME Journal*, 2009, 3(6): 675-684.
- [108] Voget S, Leggewie C, Uesbeck A, Raasch C, Jaeger K E, Streit W R. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6235-6242.
- [109] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein S S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, 296(5570): 1127-1129.
- [110] Joseph S J, Hugenholtz P, Sangwan P, Osborne C A, Janssen P H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7210-7215.
- [111] Sebat J L, Colwell F S, Crawford R L. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4927-4934.

参考文献:

- [6] 姚槐应, 黄昌勇. 土壤微生物生态学及其实验技术. 北京: 科学出版社, 2006: 7-17.
- [15] 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.
- [18] 李云, 孙波, 李忠佩. 气候对旱地紫色土微生物功能多样性的长期影响. *土壤*, 2009, 41(2): 230-235.
- [30] 胡洪营, 童中华. 微生物指纹法在环境微生物群体组成研究中的应用. *微生物学通报*, 2002, 29(4): 95-98.
- [37] 钟文辉, 王薇, 林先贵, 尹睿, 申卫收. 核酸分析方法在土壤微生物多样性研究中的应用. *土壤学报*, 2009, 46(2): 334-341.
- [56] 钮旭光, 韩梅, 韩晓日. 宏基因组学: 土壤微生物研究的新策略. *微生物学通报*, 2007, 34(3): 576-579.
- [57] 贺纪正, 张丽梅, 沈菊培, 朱永官. 宏基因组学 (Metagenomics) 的研究现状和发展趋势. *环境科学学报*, 2008, 28(2): 209-218.
- [77] 王英, 滕齐辉, 崔中利, 孙波, 曹慧, 胡锋. 免耕水稻土壤中细菌多样性及其空间分布的研究. *土壤学报*, 2007, 44(1): 137-143.
- [79] 吴少慧, 张成刚, 张忠泽. RAPD 技术在微生物生物多样鉴定中的应用. *微生物学杂志*, 2000, 20(2): 44-47.
- [87] 邢德峰, 任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析. *微生物学报*, 2006, 46(2): 331-335.
- [104] 李刚, 赵建宁, 文都日乐, 杨殿林. RISA、DGGE 和 2D-PAGE 技术对大豆根际土壤细菌多样性分析的比较. *生态学杂志*, 2011, 30(1): 87-92.