

# 采用分子生物学技术分析不同施肥土壤中细菌多样性

吴展才, 余旭胜, 徐源泰

(台湾大学园艺学研究所, 台北 10600)

**摘要:** 本研究探讨在小白菜栽培时, 分别添加果蔬加工废弃物生产的堆肥和化肥对土壤微生物区系的影响。利用扩增 16S rRNA 基因来比较微生物群落的技术, 分离出所有群落 DNA, 再以此 DNA 为模板, 以专一性引物扩增出 16S rRNA 基因 (rDNA)。随后建立 16S rDNA 基因文库后, 再以计算机仿真的方式, 选出能将上述引物扩增的 16S rDNA 基因中间切割成片段长度范围集中的一组限制性内切酶——*AciI*、*BstUI*、和 *RsaI*。结果表明, 无施肥土壤与添加堆肥土壤中微生物较接近。无施肥、添加堆肥、添加化肥土壤三者的微生物多样性指数分别为 0.990、0.986 和 0.962; 均匀度为 0.979、0.977 和 0.931。

**关键词:** 堆肥; 化肥; 土壤微生物; 多样性; 均匀度

## Analysis on Microbial Diversity of Different Agricultural Soils by Using Molecular Biology Technique

NG Chang-chai, YU Hsu-sheng, SHYU Yuan-tay

(Institute of Horticulture, Taiwan University, Taipei 10600)

**Abstract:** The microbial diversity and evenness in three different soil samples: compost-treated, chemical fertilizer-treated and control group soil samples were studied. The 16S rRNA gene cloning and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used for the comparison of soil microbe community. The optimization of RFLP digestion was firstly carried out, and *AciI*, *BstUI*, *RsaI* were optimal restriction enzymes for the digestion. The diversity indexes of soil microbes were also calculated and the indices of three treatments: control, compost, and chemical fertilizer-treated soils, are 0.990, 0.986, and 0.962 for D value, respectively; and 0.979, 0.977, and 0.931 for evenness, respectively.

**Key words:** Compost; Chemical fertilizer; Soil microorganism; Diversity; Evenness

以土壤微生物分解植物、动物残体产生有助于土壤保水力, 以及改良土壤物理状况、减缓冲蚀和流失的腐殖质<sup>[1,2]</sup>, 堆肥是这一过程的最好体现, 腐熟后的物质可以储存或施用于农田, 对环境无负面影响。经微生物的处理加速并提升糖解率, 使有机物分解、发酵至完全腐熟, 形成松软、茶褐色并具有泥土芳香的有机肥, 直接施用于土壤, 不会危害作物, 有利于作物的生长, 且能增加抵抗病虫害能力<sup>[3]</sup>。林达昌等<sup>[4]</sup>认为农产废弃物堆肥化处理, 在环境与生态保护上实为一较健全之处理与处置方法。以堆肥方式处理蔬菜废弃物, 不但可以产生高质量的有机堆肥, 适合作土壤改良剂, 同时亦无植物病毒及毒素感染的顾虑<sup>[5]</sup>。

近年来, 为改善土壤环境中农药及工业、民用废弃物的污染, 以及维护生态平衡, 使得具有特殊分解能力的土壤微生物益显其重要性。对土壤微生物菌落结构的了解, 是农业生态环境中的重要工作。由于土壤微生物相的复杂性与差异性, 在生态学上称为生物多样性 (biodiversity)。Ludwig 等<sup>[5]</sup>、陈建霖<sup>[6]</sup>定义多样性为种类丰富度 (species richness) 与均匀度 (evenness) 所组合而成, 由实用性出发, 将多样性加以量化, 并以多样性指数模式来表示。

本试验以分子生物学为切入点, 以核糖体 SSU (small subunit) rRNA 为调查对象, 因它在序列上同时具有高保守性和变异性, 此外, 其易于自细胞中萃

收稿日期: 2004-09-14

作者简介: 吴展才 (1976-), 男, 马来西亚人, 博士, 主要从事土壤环境微生物学研究。徐源泰为通讯作者, Tel: +886-2-23660727; Fax: +886-2-23661441; E-mail: tedshyu@ntu.edu.tw



取出来, 且不受后天基因转移 (lateral gene transfer) 的影响。本试验利用微生物多样性指针, 结合 PCR 及 RFLP 技术, 分析果蔬加工废弃物中的微生物多样性, 因此引物对于限制酶的选择也就相对重要。理论上经多限制酶的组合筛选, 可获得较高的分辨率<sup>[7,8]</sup>。经由 16S rDNA 序列的搜索以及计算机仿真方式, 欲找出最佳工具。如此得到的微生物多样性将具有较高可信度。有鉴于过去对环境土壤样本或农业微生物评估、鉴定和发展土壤肥力研究上较少着墨, 本研究尝试从分子层次建立模块, 由不同多样性指针, 分析微生物对植物生长的影响, 建立对堆肥品质的评估模式, 以利日后继续开发利用土壤有限的生物资源, 避免对生态环境的破坏, 是改良农业环境, 保证增产等的基础, 对农业发展有较好的应用潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及处理

土壤样品采集自台湾大学大农场, 置于通风处自然风干研磨后, 通过 10 mesh (2 mm) 筛网, 再充分拌匀。其理化性质如表 1 所示。取 25 kg 土壤与 190 g 肥料充分混合后, 于 15 cm×7.5 cm (直径×高) 小盆栽植 12 株苗龄为 12 d 的小白菜苗。试验设 3 个处理。处理 1: 每盆土施入氮、磷、钾分别为 2.0 g、0.6 g、1.7 g, 即每盆分别施入尿素 4.32 g、过磷酸钙 9.36 g、氯化钾 2.88 g。处理 2: 自制堆肥中氮、磷、钾含量分别相当于化学肥料 2.0 g、1.45 g、1.85 g。20 d 后取土壤以平板培养 (NA agar) 的方式来计算菌数。处理 3 (对照): 以不施肥为对照。

表 1 土壤理化性质

Table 1 Initial properties of soil used

项目 Items	测定值 Measurements
pH	7.0
砂土 Sand	61%
壤土 Silt	24%
黏土 Clay	15%
质地 Texture	沙壤 Sandy loam
有机物 Organic matter	4.0%
总氮 Total nitrogen	1.73 g·kg <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	60 mg·kg <sup>-1</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	23 mg·kg <sup>-1</sup>
阳离子交换能力 Cation exchange capacity	58.0 cmol·kg <sup>-1</sup>
电导度 Electric conductivity	0.53 mmho·cm <sup>-1</sup>

### 1.2 土壤总 DNA 的提取

参考 Miller 等<sup>[9]</sup>方法, 稍作修改。取土壤 10 g 于

离心管中, 加入 20 ml TENS buffer。震荡后置于 70 °C 水浴 1 h (每 15 min 摇匀 1 次), 取出后加入 9 g 0.1 mm 玻璃珠, 每隔 1 min 震荡 30 s (共 4 次); 冰浴中各管再上下摇晃 3 次, 再以 4 °C, 6 000 × g, 离心 10 min, 收集上清液 (A)。沉淀加入 10 ml TEN buffer (100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris pH 8.0), 以 4 °C, 6 000×g, 离心 10 min, 收集上清液 (B)。混合 A 和 B, 将沉淀加入 15 ml TEN buffer, 在液态氮中冷冻 2 min 后, 于沸水中解冻, 反复 3 次。以 4°C, 6000×g, 离心 10 min, 收集上清液 (C)。沉淀再重复上述冷冻解冻过程。以 4°C 6 000×g, 离心 10 min, 收集上清液 (D)。将 A、B、C 和 D 混合, 加入 0.6 倍体积异丙醇后, 置于 -70°C 30 min, 以 12 000×g, 离心 15 min, 沉淀溶于 10 ml TE buffer。加入等体积酚-氯仿-异丙醇, 以 10 000×g, 离心 1 min。再以等体积氯仿-异丙醇离心。收集上清液, 加入 2 倍体积纯酒精, 以 12 000 × g 离心, 15 min 沉淀核酸。以冷冻干燥机干燥后, 加入 1 ml TE buffer 溶解, 即为粗提取液。粗提取液以管柱纯化, 用 1 cm 注射针筒填充。在填充 Sepharose 4B 之前先以玻璃棉塞满 1 cm, 加入琼脂糖凝胶 4B 后以 1 100×g, 离心 5 min 压实, 最后填充至 4 cm 左右。待管柱制备完毕, 取 50 μl 粗提取液通过琼脂糖凝胶 4B column 分次收集。利用分光光度计选择 DNA 含量最高的 3 管混合, 进行 PCR。剩余的纯化液 -70°C 保存。

### 1.3 目标 DNA 片段的 PCR 扩增

引物序列 BSF8/20: AGAGTTTGATCCTGGC TCAG 和 BSR1507/16: TACCTTGTTACGACTT<sup>[10]</sup>。在总 PCR 体积 50 μl 中取 13.5 μl 无菌水, 5 μl 的 10×PCR buffer, 10 μl 的 1 mol·L<sup>-1</sup>dNTP, 各 30 pmol 的 BSF8/20 及 BSR1507/16 引物, 0.5 μl 的 Taq DNA 聚合酶 (5U·μl<sup>-1</sup>), 模板 10 μl。

### 1.4 载体连接反应

PCR 产物使用 QIAquick<sup>TM</sup> PCR Purification Kit 纯化回收。利用 TA Cloning<sup>®</sup> Kit (美国 Invitrogen 公司出品) 进行连接反应。将载体和 PCR 产物以 1:3 的摩尔比, 加入反应 buffer 1 μl, T4 DNA ligase 1 μl, 最后加入无菌水, 将体积补至 10 μl, 混合均匀, 置于 14°C 反应 12~16 h。

### 1.5 阳性克隆的筛选、分析

将完成连接反应的 DNA 溶液, 直接转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 自转化成功菌株中, 提取其质粒 DNA, 进行 PCR 分析、限制性内切酶鉴定, 筛选

正确插入的质粒。

1.6 限制片段长度多态性 (RFLP) 和多样性指数分析

以计算机仿真方式, 自 Ribosomal Database II (RDPII) 中获取 3351 条原核生物的 16S rRNA 序列, 以 24 种可识别 4 种碱基的限制性内切酶 (tetrameric restriction enzyme, TRE) 寻找酶切位点, 筛选出最佳 RFLP 限制性内切酶。RFLP 的计算机仿真以 Bioedit 软件分析, 多样性指数以 Biodiversity Professional Version 2 分析。

多样性 (diversity) 与均匀度 (evenness) 指数: 显示群落中种数多寡及个体分布情形。计算公式(1)~(3):

$$\text{Simpson 指数: } D=1 - \sum(n_i/N)^2 \quad (1)$$

$$\text{Shannon 指数: } H = - \sum(n_i/N) \log_2(n_i/N) \quad (2)$$

(1) 和 (2) 式中,  $n_i$ : 第  $i$  种的个体数;  $N$ : 所有  $i$  之总个数。

$$\text{Evenness} = H/H_{\max} \quad (3)$$

(3) 式中,  $H$ : Shannon 指数;  $H_{\max}$ : 最大 Shannon 指数, 大小为  $\log_2(S)$ 。

种类丰富度 ( $E$ ): 可观察种数相对于群落个体数量的丰富情形。

$$E = S/N \quad (4)$$

(4) 式中,  $S$ : 种数;  $N$ : 所有  $i$  之总个数。

2 结果与分析

2.1 最佳限制性内切酶的选择

以计算机仿真的方式切割各条序列, 选出使片段长度范围集中的 TRE。表 2 为预先预测出各个限制性内切酶对所有 16S rDNA 的平均酶切位点。AciI, BstUI

和 RsaI 3 种酶出现频率较高, 大小为 200~600 bp。

2.2 各样品土壤 RFLP 分析结果

表 3 分别对 3 种样品土壤克隆文库做 RFLP 分析, 由此可看出各自基因文库菌落出现的重复性, 这表明堆肥较化肥不易找到相似物种。在 165 个克隆中只有 75 种模式只出现过 1 次。重复性降低的原因, 可能是 3 种土壤间存在相同菌落, 且没有因为肥料的添加而造成原菌落的完全改变。

2.3 各样品土壤微生物的多样性指数

各种克隆文库所呈现出的生态意义, 由 3 种不同的指针来表示。图 1 为 3 种挑选的菌落数与出现的分

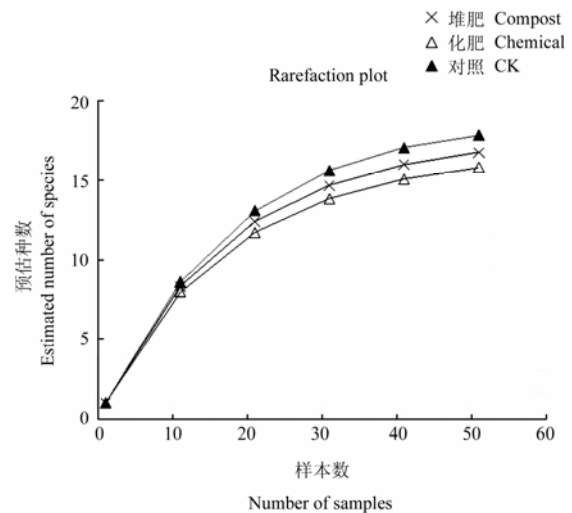


图 1 3 种土壤克隆文库的种丰富度曲线

Fig. 1 Phylotype richness curves for clone libraries of three soil treatments

表 2 各限制性内切酶 (TRE) 的酶切位数

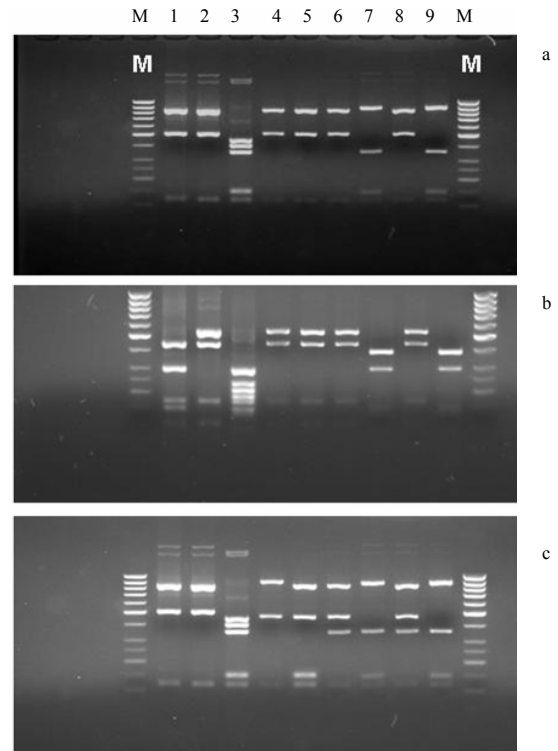
Table 2 Summary of restriction sites per taxon for tetrameric restriction enzyme (TREs)

限制性内切酶 Restriction enzyme	位置 Site	平均酶切位数 Mean no. of restriction sites per taxon	限制性内切酶 Restriction enzyme	位置 Site	平均酶切位数 Mean no. of restriction sites per taxon
AciI	C/CGC	7.65	MnII	CCTC(N) <sub>7</sub>	4.12
AluI	AG/CT	7.07	MseI	T/TAA	7.19
Bfal	C/TAG	5.35	Sth132I	CCCG	7.72
BspKT6I	GAT/C	5.41	Taq <sup>q</sup> I	T/CGA	5.25
BstUI	CG/CG	7.61	Tsp59I	/AATT	5.45
RsaI	GT/AC	5.51	BssKI	/CCNGG	10.26
CviAII	C/ATG	9.20	DdeI	C/TNAG	7.41
CviRI	TG/CA	8.02	Fnu4HI	GC/NGC	11.93
HaeIII	GG/CC	8.79	HinII	G/ANTC	5.47
HhaI	GCG/C	5.48	Hpy188I	TCN/GA	6.71
HpaII	C/CGG	9.14	HpyCH4III	ACN/GT	4.76
HpyCH4IV	A/CGT	7.23	MaeIII	/GTNAC	7.45

类模式间关系, 挑选的菌落越多, 得到的模式种类也应当越高。由图 1 可看出, 对照相对其它处理组而言, 具有较高的多样性。可能是因为肥料的添加提供了特殊养分, 导致某些优势菌种出现, 降低了多样性。表 4 以数字将各指针量化, 因为各种克隆文库挑选的菌落数不同, 所以  $E(S)$  值以较少的菌落数为基准, 计算比较出各样品间差异。可看出对照具有较多物种个数, 堆肥次之, 化肥最低。均匀度, 表示物种在环境中的分布状况, 各物种数目愈接近, 数值愈高。在化肥中, 或许是化学肥料提供了比有机肥料更有效的养分, 导致优势菌种的产生, 均匀度下降, 而堆肥土壤此现象较不显著。D 值表示多样性的高低, 显示与化肥相比较, 堆肥分析的个数多, 并且具有较多种类, 但二者皆低于对照组。

#### 2.4 各样品土壤微生物群落相似性

取小白菜采收末期土壤(第 20 天)来分析菌落, 此时各菌落估计已到成熟阶段, 以平板计数比较添加堆肥、化肥及对照土壤第 3 天及第 20 天菌数, 分别为  $4.02 \times 10^7$  cfu、 $3.75 \times 10^7$  cfu、 $0.54 \times 10^7$  cfu 以及  $1.90 \times 10^7$  cfu、 $4.82 \times 10^7$  cfu、 $0.67 \times 10^7$  cfu。发现化肥处理菌数大量增加, 推测应有大量优势菌种出现, 符合表 4 结果, 即化肥土壤均匀度较低。依据各种土壤不同的 RFLP 模式结果, 图 2 列出克隆编号 1~9 的模式结果, 依此可以根据微生物把 3 种土壤分类(图 3); 但是若以各土壤中 18 种群落分布情况为基础, 将 3 种土壤分类, 则 3 者间的相似度皆提高(图 4)。两图皆可看



1~9. 16S rRNA 经由不同的 RFLP 模式结果。A. *Acil*; b. *Bst*UI; c. *Rsa*I。M: 分子量(由上而下分别为 1、900、800、500、400、300、250、200、150、100、50 bp)  
a. *Acil*; b. *Bst*UI; c. *Rsa*I digestion. M: Marker (1, 900, 800, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp)

图 2 3 种土壤的克隆文库 RFLP 分析结果

Fig. 2 Clone no. 1-9 of clone library were restricted using different restriction enzymes and its RFLP pattern

表 3 3 种克隆文库 *Acil*-*Bst*UI-*Rsa*I RFLP 模式个数

Table 3 Numbers of *Acil*-*Bst*UI-*Rsa*I RFLP phylotypes in clone libraries from three soil treatments

参数 Parameter	克隆文库 Clone libraries			克隆 Clones
	对照 Control	堆肥 Compost	化肥 Chemical fertilizer	
总模式数 Total no. of patterns	41(54) <sup>a</sup>	41(57) <sup>a</sup>	28(54) <sup>a</sup>	75(165) <sup>a</sup>
特殊模式数 No. of unique patterns <sup>b</sup>	30	28	17	30
特殊模式数百分比 Percengtage of unique patterns (%)	73.2	68.3	60.79	40

<sup>a</sup>. 括号内值为克隆或分离株的数目; <sup>b</sup>. 特殊模式数仅出现在单一克隆文库或保存株中

<sup>a</sup>. The values in parentheses are the numbers of clones or isolates; <sup>b</sup>. Unique patterns were found in only one clone library or culture collection

表 4 3 种克隆文库 *Acil*-*Bst*UI-*Rsa*I RFLP 模式多样性指针

Table 4 Diversity indices based on *Acil*-*Bst*UI-*Rsa*I RFLP phylotypes in clone libraries from three soil treatments

指数 Index	克隆文库 Clone libraries		
	对照 Control	堆肥 Compost	化肥 Chemical fertilizer
预估种数 $E(S)$ <sup>a</sup>	16.77	15.79	17.83
均匀度 Evenness <sup>b</sup>	0.953	0.936	0.962
歧异度 $D^c$	0.943	0.929	0.95

<sup>a</sup>. E 可由每一克隆文库当中选取 51 个克隆进行丰富度曲线计算而来; <sup>b</sup>. 均匀度可以 H 计算而来, 公式为  $E=H/H_{max}$ ,  $H_{max}=\log_2(S)$ , S 为分类数的总数; <sup>c</sup>. D 的计算如下:  $1 - \sum(n_i/N)^2$ ;  $n_i$ : 第 i 个分类数的数目; N: i 的总数

<sup>a</sup>. E was calculated by rarefaction for a standardized sample size of 51 clones for each clone library; <sup>b</sup>. Evenness (E) was calculated from H as follows:  $E = H/H_{max}$ , where  $H_{max} = \log_2(S)$  and S is the total number of phylotypes; <sup>c</sup>. D was calculated as follows:  $1 - \sum(n_i/N)^2$ ;  $n_i$ : the number of ith phylotype and N: total number of i

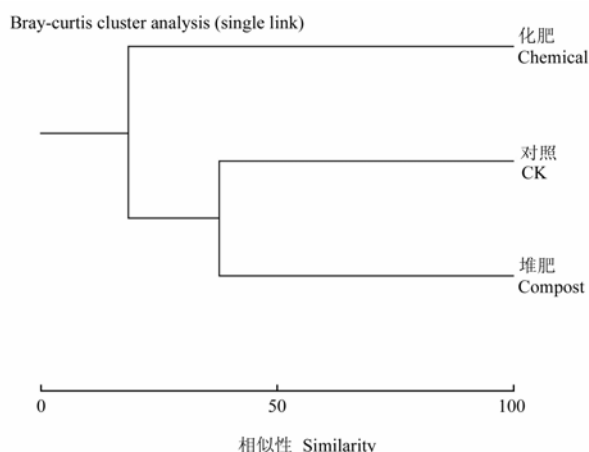


图 3 以 RFLP 模式分类 3 种土壤处理树状图

Fig. 3 Distance matrix trees of three soil treatments by RFLP

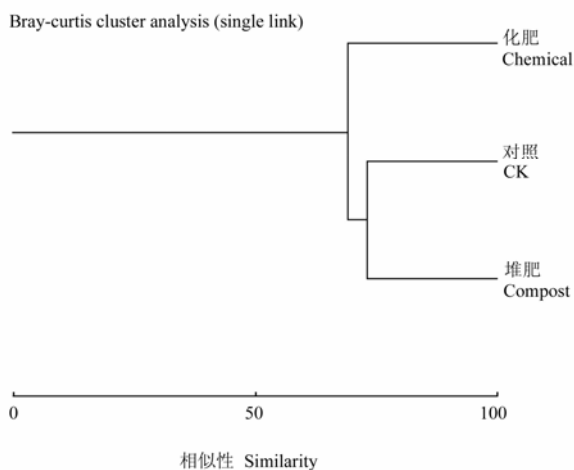


图 4 以细菌族群分类 3 种土壤处理树状图

Fig. 4 Distance matrix trees of three soil treatments by bacterial group

出化肥处理的土壤微生物组成差异性最大。比较 3 种土壤之 pH 值, 堆肥、化肥、对照组土壤分别为 7.3、6.9、7.0。因此, 推论 pH 值对微生物相的差异不是主要因素。

### 2.5 各样品土壤中微生物的分类鉴定

利用 RFLP 可归纳成 18 个群。从每个相类似群中取 3 条 16s rDNA 测序, 结果与数据库 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 进行 Blast 比对。在比对过程中, Blast 进行序列中核苷酸逐一比对, 再依照所得的相似度以百分比的方式依次由高至低排列, 选择比对结果中最高百分比者即为分类鉴定之依

据。在比对过程中的相似度通常在 90% 以上。比对过程中并未发现未培养物种序列。

## 3 讨论

本试验使用 BSF8/20 及 BSR1507/16 两条引物对细菌分别有 91.7% 与 82.1% 的扩增率。扩增出来的片段约 1.5 kb。仿真分析后选取第 3 组中 *AciI*、*BstUI*、*RsaI* 3 种内切酶进行 RFLP, 此组酶在 RFLP 完成后所得片段长度范围集中于 200~600 bp。RFLP 原理为电泳呈现之每种片段长度均为此样本的一个性状, 依据每个出现的性状统计, 可用作分类不同的样本。因此, 愈多的性状则分类愈明显。使用愈多种限制酶将产生愈多种性状, 将得到更高的分类可信度, 所以本试验采用 3 种限制酶, 目的在于获得较多的性状。本研究之 RFLP 图谱分类细菌, 共得到 18 个群落。以菌种分布来看, 堆肥和对照具有较接近的菌落。以生态指针来看 3 种土壤, 堆肥、化肥和对照组的多样性指数及均匀度分别为 0.986、0.962、0.990 及 0.977、0.931、0.979。由测序和 GenBank 比对, 表 5 显示, 由于 16S rRNA 在演化上保守性大, 其在序列上的变异性不足以将菌种定到种, 故针对比对出来的种名, 至属的准确性较高, 种名仅作参考之用。得知芽孢杆菌在堆肥土壤中占有率达 28%, 葡萄球菌和皮生球菌亦是 3 个样本中的大族群 (分别占 7% 和 8%)。Ng 等 (数据未列出) 利用微生物指针进行土壤环境微生物相的研究发现, 人为干扰因子如肥力干扰、游客到访等是微生物相改变的原因之一。Patrick 等<sup>[11]</sup>亦指出在堆肥的初期阶段, 以乳酸菌为主要的优势菌种, 到了后期则是以芽孢杆菌为主要菌相, 本试验中芽孢杆菌占 28%, 与 Patrick 等的试验结果一致。Sonia 等<sup>[12]</sup>利用堆肥改善草地的肥力研究中发现, 假单胞菌是其中的优势菌种之一, 但是在本试验中假单胞菌仅占 1.7%。

堆肥中微生物相的变化涉及多个阶段, 即堆肥化过程中碳水化合物之糖消失期、纤维素分解期、木质素分解期等<sup>[13]</sup>。堆肥初始以嗜中温菌为优势菌种, 在中期由于堆肥温度上升, 优势菌种渐为嗜高温菌所取代。Peter 等<sup>[14]</sup>指出, 在超过 50℃ 的堆肥中以芽孢杆菌属的中温菌为主 (*Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*)。张承晋<sup>[2]</sup>在小白菜堆肥中添加枯草杆菌转殖株 *Bacillus subtilis* DBSB, 发现腐熟度是决定堆肥质量主要因素。因此, 了解微生物相在堆肥过程中的变化, 有利于掌握添加微生物的时机, 并节省腐熟时间。

本研究可作为中长期土壤肥力评估指标, 长远目

表 5 3 种样本土壤的微生物种类

Table 5 Microorganism found in three soil treatments

菌群 Group	分布比例 Distribution percentage (%)			相似菌种 Similarity	分类地位 Classification
	堆肥 Compost	化肥 Chemical fertilizer	对照 CK		
A	10.53	9.09	12.96	巨大芽胞杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	Low G+C G(+)
B	5.26	1.82	1.85	坚强芽胞杆菌 <i>Bacillus firmus</i>	Low G+C G(+)
C	12.28	7.27	5.56	苍白芽胞杆菌 <i>Bacillus pallidus</i>	Low G+C G(+)
D	7.02	5.45	5.56	表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Low G+C G(+)
E	5.26	3.64	7.41	氯酚鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas chlorophenolica</i>	$\alpha$ -Proteobacteria
F	7.02	0	3.70	发根土壤杆菌 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	$\alpha$ -Proteobacteria
G	7.02	18.18	7.41	硫磺色节杆菌 <i>Arthrobacter sulfureus</i>	high G+C G(+)
H	8.77	7.27	5.56	皮生球菌 <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	high G+C G(+)
I	5.26	0	1.85	北里孢菌 <i>Kitasatospora cheerisanensis</i>	high G+C G(+)
J	1.75	1.82	7.41	昏暗地嗜皮菌 <i>Geodermatophilus obscurus</i>	high G+C G(+)
K	0	3.64	1.85	乙酸钙不动杆菌 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	$\gamma$ -Proteobacteria
L	5.26	3.64	7.41	纽伦堡伯克霍尔法菌 <i>Burkholderia norimbergensis str. R2</i>	$\beta$ -Proteobacteria
M	1.75	10.91	3.70	勒氏假单胞菌 <i>Pseudomonas lemoignei</i>	$\beta$ -Proteobacteria
N	1.75	3.64	3.70	帕氏氢噬胞菌 <i>Hydrogenophaga palleronii</i>	$\beta$ -Proteobacteria
O	3.51	5.45	7.41	草根围伯克霍尔法菌 <i>Burkholderia graminis str. C4DIM</i>	$\beta$ -Proteobacteria
P	3.51	9.09	5.56	格氏伯克霍尔法菌 <i>Burkholderia gladioli</i>	$\beta$ -Proteobacteria
Q	7.02	3.64	5.56	糖黄单胞菌 <i>Xanthomonas sacchari</i>	$\gamma$ -Proteobacteria
R	3.51	7.27	5.56	嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	$\gamma$ -Proteobacteria

标,除可加以应用农作废弃物以减缓其对环境的冲击,配合未来针对作物产量、品质、土壤环境生态和土质分析等试验外,通过了解不同性质肥料处理土壤微生物菌相,亦有助于土壤改良,为耕地品质改良提供基础研究依据。

## 4 结论

本研究利用 RFLP 对堆肥、化肥和无施肥处理的土壤进行土壤微生物分析,发现堆肥较化肥不易找到相似物种,且其坚强芽胞杆菌 (*Bacillus firmus*)、北里孢菌(*Kitasatospora cheerisanensis*) 和发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*)较其它二者高出 3~5 倍,表示堆肥土壤微生物多样性较高。也显示微生物多样性指针在环境土壤应用的可行性。

## References

- [1] Vallini G, Pera A. Green compost production from vegetable waste separately collected in metropolitan garden-produce markets. *Biological Wastes*, 1989, 29: 33-41.
- [2] 张承晋. 外分泌纤维水解酶素之枯草杆菌转殖株在蔬菜加工废弃物应用之研究. 台湾大学园艺学研究所博士论文, 2001.  
Chang C C. Studies on the application of *Bacillus subtilis* that can secrete endoglucanase for vegetable waste processing. *Ph. D Dissertation, Taiwan University*, 2001. (in Chinese)
- [3] Hamamoto T, Foong F, Shoseyov O, Doi R H. Analysis of

functional domains of endoglucanases from *Clostridium cellulovorans* by gene cloning, nucleotide sequencing and chimerical protein construction. *Molecular Genetics and Genomics*, 1992, 231: 472-479.

- [4] 林达昌, 黄汝贤, 洪锡祯. 果菜市场废弃物之减量策略. 成功大学环境工程研究所研究报告第 163 号. 1989.  
Lin D C, Huang R X, Hong X Z. Strategy on fruit vegetable wastes reduction. *Project of Institute of Environmental Engineering, Cheng Kung University*, No. 163: 1989. (in Chinese)
- [5] Ludwig J A, Reynold J F. *Statistical Ecology*. New York: Wiley, 1988: 85-103.
- [6] 陈建霖. 生态目标与最适林分结构之研究. 台湾大学森林学研究所硕士论文, 1993.  
Chen J L. A study on ecological goal and optimal stand structure. *MS Thesis, Institute of Forestry, Taiwan University*, 1993. (in Chinese)
- [7] White T J, Cann R L, Wilson A C. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data*. San Diego: Academic Press, 1993: 456-487.
- [8] Moyer C L, Dobbs F C, Karl D M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi seamount, Hawaii. *Applied Environmental Microbiology*, 1994, 60: 871-879.
- [9] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, Ghiorse W C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment sample. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, 65: 4715-4724.

- [10] Volossiuk E, Robb E J, Nazar R N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assay of soil organism. *Applied Environmental Microbiology*, 1995, 61: 3972-3976.
- [11] Patrick D S, Anthony G H, David B W, Larry P W. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46: 1-9
- [12] Sonia M, Tiquia J L, Daniel A H, Harry A J, Frederick C, Michel J. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of TRFLPs of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21: 31-48.
- [13] Hadas A, Feigenbaum S, Sofer M, J. Molina J A E, Clapp C E. Decomposition of nitrogen-15-labeled wheat and cellulose in soil modeling tracer dynamics. *Soil Science Society of America Journal*, 1993, 57: 996-1001.
- [14] Peter M D, William C G. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35: 207-216.

(责任编辑 曲来娥)

(接 2456 页)

## 《中国农业科学》(2002 年) 单篇论文被引频次排序表

序号	被引论文作者	被引论文题名	年	期	被引频次	期刊引用频次
1	彭少兵,黄见良,钟旭华,杨建昌	提高中国稻田氮肥利用率的研究策略	2002	09	49	23
2	姜东,于振文,李永庚,余松烈	施氮水平对高产小麦蔗糖含量和光合产物分配及籽粒淀粉积累的影响	2002	02	46	18
3	王月福,于振文,李尚霞,余松烈	施氮量对小麦籽粒蛋白质组分含量及加工品质的影响	2002	09	37	17
4	何中虎,林作楫,王龙俊,肖志敏	中国小麦品质区划的研究	2002	04	37	21
5	杨仁崔,张书标,黄荣华,杨蜀岚	高秆隐性杂交稻(e-杂交稻)的育种技术	2002	03	33	21
6	张勇,何中虎	我国春播小麦淀粉糊化特性研究	2002	05	29	14
7	姜东,于振文,李永庚,余松烈	高产小麦强势和弱势籽粒淀粉合成相关酶活性的变化	2002	04	27	11
8	王绍华,曹卫星,王强盛,丁艳锋	水稻叶色分布特点与氮素营养诊断	2002	12	26	6
9	朱作峰,孙传清,付永彩,张培江	用 SSR 标记比较亚洲栽培稻与普通野生稻的遗传多样性	2002	12	25	6
10	张学勇,庞斌双,游光霞,王兰芬	中国小麦品种资源 Glu-1 位点组成概况及遗传多样性分析	2002	11	25	15

(转 2514)