

土壤微生物多样性研究方法*

钟文辉^{1,2**} 蔡祖聪¹

(¹中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008; ²南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097)

【摘要】 概述了研究土壤微生物多样性的主要方法. 传统上, 土壤微生物群落的分析依赖于培养技术, 使用各种培养基最大限度地培养各种微生物群体, 但仍只能培养和分离出一小部分土壤微生物群落. 使用 Biolog 分析、磷脂脂肪酸分析和核酸分析等方法, 可研究和表征那些现在还不能够被培养的土壤微生物, 从而获取关于土壤微生物群落多样性的更多和更完整的信息.

关键词 土壤 微生物多样性 Biolog 磷脂脂肪酸 核酸分析

文章编号 1001-9332(2004)05-0899-06 **中图分类号** S154.3 **文献标识码** A

Methods for studying soil microbial diversity. ZHONG Wenhui^{1,2}, CAI Zucong¹ (¹Institute of Soil Science, Chinese Academy of Science, Nanjing 210008, China; ²College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2004, 15(5): 899~904.

This paper gave a review on the main methods for studying soil microbial diversity. Traditionally, the analysis of soil microbial communities relied on culturing techniques, using a variety of culture media. However, only a small fraction of the soil microbial community has been cultured and isolated with this approach. Other methods such as Biolog GN analysis, phospholipids fatty acids analysis and nucleic acid-based analysis can be used to study and characterize soil microbes which currently cannot be cultured, and to get more and complete information about soil microbial community.

Key words Soil, Microbial diversity, Biolog, FLFA, Nucleic acid-based analysis.

1 引言

生物多样性包括物种多样性、遗传(基因)多样性和生态系统多样性. 土壤微生物多样性包括在栖息地中微生物分类群的多样性和在微生物分类群内的遗传多样性, 以及包括群落结构的变异性、相互作用的复杂性、营养水平(trophic level)和共位群(guild)数量(功能多样性)在内的生态多样性. 其中遗传多样性可认为是遗传信息在微生物聚集地或群落中的量和分布, 反映微生物群落中总的遗传潜力. 功能多样性则是指发生在一个群落中的碳源利用模式或作用过程数^[33].

土壤微生物多样性的研究方法大体上可分为两类: 一类是用于分析土壤中可培养的微生物群落; 另一类是用于分析土壤的整个微生物群落. 第一类分析方法基于微生物分离菌(isolates)的形态判别、微生物分离菌在 Biolog GN 微滴定板中的反应和微生物分离菌的脂肪酸甲酯谱(FAME profiles)等. 后一类分析方法不需要培养微生物, 包括群落水平的生理特性(CLPP)分析(如在 Biolog GN 微滴定板中的反应分析)、磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acids, PLFA)方法和核酸分析(nucleic acid-based analysis)方法等.

2 琼脂培养基培养方法

这是用于估计微生物多样性的传统方法. 琼脂培养基培养方法是在琼脂培养基平板上接种培养, 可作以下用途: 跟踪特定分类组(group)或功能组的微生物数量, 并评价在该

平板上的微生物群落的组成. 在后一种情况下, 需从琼脂平板上将菌落分离出来, 并对分离菌进行鉴定. 由所得到的分类组或分类群的分布情况可了解群落的结构.

培养基的成份影响微生物的生长状况, 故培养基的选择可强烈影响所得菌落的多样性^[34, 64]. 菌落形成单位(CFU)的数量通常随培养基营养浓度的降低而增加^[40, 49]. 然而, 只有一小部分土壤微生物群落可用这种方法得到. Fægri 等^[16]用荧光显微镜检出细菌数比用培养基培养得到的细菌数提高 100~1000 倍. 根据 Amann 等^[3]的评估, 大约 80%~99% 的微生物种不可培养或未能得到培养, 说明大部分微生物的特征不能用传统的琼脂培养基平板培养技术来描述. 此外, 琼脂培养基培养方法需要使用包括分子生物学手段在内的分析技术, 才能完成对微生物种的鉴定, 分析工作烦琐, 工作量大. 由于以上局限性, 在出现新的评价微生物多样性的方法, 特别是分子方法以后, 该传统方法已逐渐失宠.

3 Biolog GN 方法

Biolog GN 分析方法是一种群落水平的生理特性分析方法. 它是基于微生物利用碳源能力的不同, 利用 Biolog GN 系统来研究微生物的碳源利用模式的方法. Biolog GN 微滴定板的每一个孔中含有一种不同的碳源(共 95 种)、其它营

* 国家杰出青年基金资助项目(40125004).

** 通讯联系人.

2002-02-20 收稿, 2003-07-15 接受.

养物和四氮唑染料. 接种微生物悬浮物于微滴定板孔中后, 将滴定板保温一段合适的时间, 通过测定伴随的四氮唑染料的还原, 而定期监测底物的氧化. Biolog GN 微滴定板原来用作对细菌分离菌进行分类^[6]. 然而, 这种方法现已被改进, 用于表征土壤微生物群落的功能潜力, 即被用于估计诸如碳源利用模式等功能多样性^[21]. Biolog GN 分析方法当作此用途时, 接种物是来自土壤微生物群落的混合物(而不是纯培养), 所得结果采用一定的统计方法进行分析.

采用该方法时接种量和培养时间很重要. 研究表明, 底物的氧化取决于所用接种物的组成和密度^[20, 23, 77]. 另外, 接种的微生物的生理状态可能影响底物利用的动力学和模式^[35]. 在测定过程中, 微生物只在含有适合其利用碳源的孔中生长^[21, 23, 77]. 因此, 所观察到的底物利用模式可能只反映了那些在 Biolog GN 微滴定板孔中能够生长的微生物的功能特性, 且很可能不是所有的微生物都对 Biolog 反应特征有贡献^[23, 28]. 所得到的碳源利用模式也不一定反映接种的微生物群落中数量上占优势的成员的功能潜力^[62].

该方法已用于了解土壤^[23, 41, 77]和根际^[20]中微生物群落间的差异, 也有的研究者用它确定非土著微生物或转基因植物对土壤^[13, 75]、植物凋落物^[32, 52]、根际^[28]和叶际^[28]微生物群落的影响.

Biolog GN 方法具有快速而可再现的特点. 然而, 该方法对快速生长和适合在实验条件下生长的小部分群落成员有强烈的选择性^[62], 故与琼脂平板分离微生物的传统方法有同样的局限性; 另一缺点是被测试的底物不能准确地代表出现于生态系统中的底物类型. 因此, Biolog 反应特征只能粗略地代表实际土壤微生物群体底物利用的动力学特征.

4 磷脂脂肪酸方法

4.1 PLFA 在微生物中的分布

磷脂脂肪酸谱(PLFA profile)常被用于研究复杂群落中微生物的多样性^[54, 79]. 磷脂是所有生活细胞的细胞膜的基本组分. PLFA 是磷脂的组分, 具有结构多样性和高的生物

学特异性, 是特别有效的生物标记物, 可用于了解微生物群落结构. 总 PLFA 谱中某些特征脂肪酸分别对细菌、真菌和放线菌是特异的^[74], 且在大多数情况下 PLFA 的某专一类型在某一土壤微生物分类群中占优势. 至今, 已经积累了大量关于微生物脂类的脂肪酸组成的数据. PLFA 或酯链 PLFA(EL-PLFA)的总量已被用作土壤样品中微生物生物量的指示物(indicator)^[80]. 细菌含有在其它生物中常见的直链脂肪酸, 如油酸或顺型异油酸[十八碳-11-稀酸(顺), 简称为 18:1 ω 7 或 18:1 ω 7c]等单不饱和脂肪酸(MUFA). 然而, 细菌独特的脂肪酸是具分枝链、环丙基和 β -羟基脂肪酸. 这些脂肪酸在其它生物体中不普遍存在^[38]. 支链脂肪酸主要发现于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性的硫酸盐还原菌、Cytophaga 和黄杆菌属^[24], 而环丙基脂肪酸常见于革兰氏阴性菌株以及革兰氏阳性厌氧菌株^[57]. MUFA 特别是 18:1 ω 7 具有厌氧-去饱和酶途径的真细菌特征, 很多这种细菌是革兰氏阴性菌^[79]. 虽然 MUFA 可出现在革兰氏阳性和阴性细菌中, 但在革兰氏阳性细菌中它们对总 PLFA 的相对贡献很少(< 20%), 故 MUFA 可用作革兰氏阴性细菌的通用生物标记^[57]. 多不饱和脂肪酸(PUFA)被认为是真核生物的特征性脂肪酸. 亚油酸(十八碳-9, 12-二稀酸(顺, 顺), 简称为 18:2 ω 6)可作为真菌的一个通用生物标记. 但 Sundh 等^[66]推断, 这种脂肪酸可能不是对每一生态系统都合适的生物标记, 可能只在植物细胞不存在的生态系统中是真菌的较好标记.

非酯链未取代脂肪酸(non-ester-linked unsubstituted FA, NEL-UNSA)是鞘脂和缩醛磷脂的组分. 鞘脂已发现存在于拟杆菌属/黄杆菌属^[60]. 近来也发现革兰氏阴性多聚氯酚降解细菌(被鉴定为 Sphingomonas 属)含有鞘脂^[46]. 缩醛磷脂主要存在于梭状芽孢杆菌属等厌氧细菌中^[74], 只有很少数的好氧和兼性厌氧细菌含有缩醛磷脂^[79]. 真菌菌丝中已被检测出存在长链非酯链羟基取代脂肪酸(non-ester-linked hydroxyl substituted FA, NEL-HYFA)^[75]. 在脂肪酸第 10 位碳原子处甲基分枝是放线菌所特有的^[37]. 表征几大类微生物的重要脂肪酸见表 1.

表 1 表征微生物的 PLFA^[29, 32]

Table 1 PLFA signatures of microbes

| 微生物类型 Microbial group | 磷脂脂肪酸标记 Phospholipids fatty acid signatures |
|---|---|
| 细菌 Bacteria in general | 含有以酯链与甘油相连的饱和或单不饱和脂肪酸(如 15:0, i15:0, a15:0, 16:0, i16:0, 16:1 ω 5, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7t, 17:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 18:1 ω 5, 18:1 ω 7, 18:1 ω 7t, i19:0, a19:0 和 cy19:0 等) Contain saturated or monounsaturated fatty acids ester-linked to glycerol |
| 革兰氏阳性细菌 Gram-positive bacteria | 含有多种分枝脂肪酸 Contain more branched fatty acids |
| 革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria | 含有多种羟基脂肪酸 Contain more hydroxylated fatty acids; MUFA |
| 厌氧细菌 Anaerobes | cy17:0, cy19:0 |
| 好氧细菌 Aerobes | 16:1 ω 7, 16:1 ω 7t, 18:1 ω 7t |
| 硫酸盐还原细菌 Sulfate-reducing bacteria | 10Me16:0, i17:1 ω 7, 17:1 ω 6 |
| 甲烷氧化细菌 Methane-oxidizing bacteria | 16:1 ω 8c, 16:1 ω 8t, 16:1 ω 5c, 18:1 ω 8c, 18:1 ω 8t, 18:1 ω 6c |
| 嗜压/嗜冷细菌 Barophilic/psychrophilic bacteria | 20:5, 22:6 |
| 黄杆菌 <i>Flavobacterium balustinum</i> | i17:1 ω 7, Br 2OH-15:0 |
| 芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> spp. | 各种分枝链脂肪酸 Various branched chain fatty acids |
| 放线菌 <i>Actinobacteria</i> | 10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0 等 |
| 真菌 Fungi | 含有特有的磷脂脂肪酸如 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3 Contain a specific PLFA such as 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3 |
| 蓝细菌 Cyanobacteria | 含有多不饱和脂肪酸如 18:2 ω 6 Lipids containing polyunsaturated fatty acids such as 18:2 ω 6 |
| 微藻类 Microalgae | 16:3 ω 3 |
| 原生动物 Protozoa | 20:3 ω 6, 20:4 ω 6 |

i, a, cy 和 Me 分别表示反异(anteiso)、异(iso)、环丙基(cyclopropyl)和甲基(methyl)分枝脂肪酸

4.2 PLFA 的分离和分析

PLFA 的提取和分析是 PLFA 方法的关键步骤。PLFA 的提取主要采用简单提取、扩展提取和商用微生物鉴定系统 (MIDI) 提取等方法^[79]。

简单提取用于提取 EL-PLFA。先用有机溶剂提取土壤中的细胞脂类,将提取液上样于硅胶键合固相抽提柱 (solid-phase-extraction silicic acid bonded phase column, SPE-SI), 分别用氯仿、丙酮和甲醇洗脱, 可将脂类裂解, 并分离出中性脂、糖脂和磷脂。用温和碱性甲醇将磷脂水解和皂化, 得到酯链脂肪酸甲酯 (EL-FAME), 进一步用 GC 或 GC-MS 进行定性和定量测定。这种提取方法不能将非酯链 PLFA (NEL-PLFA) 从脂类中解离和提取出来。

扩展提取方法是在简单提取方法的基础上延伸的, 可用于提取包括 EL-PLFA 和 NEL-PLFA 在内的全 PLFA。用与简单提取方法相同的操作方法从土壤样品中抽提脂类, 将磷脂从脂类中解离出来, 用碱性甲醇水解和皂化, 接着用氨基键合, SPE 柱 (aminopropyl-bonded SPE-column, SPE-NH₂) 分离皂化产物, 得到未取代脂肪酸甲酯。酯链羟基取代脂肪酸 (EL-HYFA) 甲酯和不皂化脂。未取代脂肪酸甲酯用苯磺酸键合。SPE 柱 (benzenesulphonic-acid-bonded SPE column, SPE-SCX) 分离, 得到酯链饱和脂肪酸 (EL-SATFA)、酯链单不饱和脂肪酸 (EL-MUFA) 和酯链多不饱和脂肪酸 (EL-PUFA) 组分。不皂化脂经酸水解后, 用 SPE-NH₂ 柱分离, 可得到非酯链脂肪酸 (包括 NEL-UNSA 和 NEL-HYFA)。得到的 EL-PLFA 和 NEL-PLFA 进一步用 GC 或 GC-MS 进行定性和定量分析。采用这种方法可使多数类型的脂肪酸根据它们结合成脂类的本来状况 (酯链, 非酯链) 而得到分离。检测结果用多变量统计方法加以分析。

除上述方法外, 有些研究者还用 MIDI 来提取和分析脂肪酸^[9, 24, 30]。其操作方法包括用皂化/裂解液将脂肪酸从脂类中裂解出来, 在 80 °C 下加入甲醇盐酸溶液, 使脂肪酸甲基化形成 FAME, 提取 FAME, 进行 GC 分析等几个步骤^[24]。最后, 用 MIDI 开发商提供的自动程序软件对 FAME 进行分析。该方法的主要问题是提取的脂肪酸包括来自有生活力的细胞脂类和可能部分来自于细胞外的脂类^[79]。

用简单提取方法和 MIDI 方法提取土壤 PLFA 得到的脂肪酸谱相似^[9, 19], 一般有 20 至 48 种脂肪酸 (最多 72 种), 其中直链脂肪酸和不饱和脂肪酸分别占 15%~25% 和 30%~50%; 甲基分支脂肪酸占 25%~40%。采用扩展提取方法检测到的 PLFA 的数量介于 190 至 360 种之间, 且显示出不同地点、不同耕种方式的土壤中脂肪酸的总量和种类数以及百分比分布有显著差异^[65, 81]。NEL-PLFA 占总 PLFA 量的 21%~25%, EL-SATFA 和羟基取代脂肪酸 (包括 EL-HYFA 和 NEL-HYFA) 也大量存在。

4.3 PLFA 方法的特点和局限性

PLFA 方法是一种快速、可靠而可重现的分析土壤微生物群落结构的方法, 可用于表征在数量上占优势的土壤微生物群落, 包括不可培养微生物。该方法最适合用作总微生物

群落分析, 而不是专一的微生物种类的研究^[15]。PLFA 的组成和浓度受土壤微生物生长条件和生理状态的影响^[31, 74]。另外, 包括 PLFA 在内的所有的土壤生物标记都存在可萃取性 (extractability) 和未知的稳定性问题。土壤的生物标记稳定性主要取决于与降解过程有直接关系的温度、湿度和其他条件^[31]。

5 核酸分析方法

5.1 总 DNA 分析

研究表明, 土壤微生物大体的群落组成和总的遗传多样性可通过测定群落 DNA 的解链行为和复性率来确定^[70, 73]。在溶液中变性单链 DNA 的复性率随着 DNA 复杂性的增加或在溶液中不同 DNA 分子数量的增加而下降; DNA 浓度越大, 复性越快。Cot_{1/2} 表示复性一半的 Cot (DNA 浓度和复性时间的乘积) 值, 与 DNA 的复杂程度成正比, 被用作多样性指数^[71]或用于估计基因组的大小。用该方法分析表明, 在未扰动的有机土壤中微生物群落基因组大小相当于 6 000~10 000 大肠杆菌基因组的大小, 而在耕作土壤或受重金属污染土壤中相当于 350~1 500 大肠杆菌基因组的大小, 且这些估计值可能是保守的^[50, 72]。但该方法的分率低, 只能确定土壤微生物群落的大体差异。另外, 通过测定碱基在群落 DNA 中的分布, 即鸟嘌呤和胞嘧啶的摩尔百分率 (% G + C), 也可得到有关总的群落组成的信息^[12]。

5.2 基于 PCR 的核糖体 DNA 分析

5.2.1 概述 大多数 DNA 多样性研究以核糖体 RNA (rRNA) 或其编码基因 rDNA 为对象。在微生物多样性研究中, 人们最感兴趣的是小亚基 RNA (SSU rRNA) 或其编码基因 SSU rDNA。SSU rDNA 包括保守区和变异区。保守区内核苷酸序列恒定, 在分类上相距远的微生物分类群之间才有差异; 变异区能够显示微生物分类种的差异。SSU rDNA 的这种独特的特性可被用来对微生物进行系谱分类。目前人们已经对很多种已知微生物的 SSU rDNA/ rRNA 序列进行了测序 (大多数工作是对原核生物 16S rDNA/ rRNA 进行的), 建立了 SSU rDNA/ rRNA 序列数据库。该数据库正在不断扩大, 目前已有足够大的数据库来对微生物进行系谱分类。

rDNA 分析中, 通常用 PCR 扩增 SSU rDNA, 扩增产物用凝胶电泳分离并进行分析。目前最常用的分析方法的基本步骤如下^[7, 14, 43, 45, 55, 56]: 抽提土壤 DNA → PCR 扩增 SSU rDNA (16s rDNA 或 18s rDNA) → PCR 产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 或温度梯度凝胶电泳 (TGGE) 分离及带谱分析 → 回收 DGGE 电泳片段 → DNA 序列测定 → 将测得的 SSU rDNA 序列与 rDNA 序列数据库中已知微生物的 rDNA 序列相比较 → 获得土壤中可能含有的微生物 (包括不可培养微生物) 的信息。

与 rDNA 分析有关的问题包括 rDNA 序列的异质性 (heterogeneity)^[47] 和 SSU rDNA 的数量变化较大^[18] 等。

5.2.2 DNA 的抽提和纯化 抽提的 DNA 的质量影响后续 PCR 扩增的效率和准确性。抽提中应尽可能避免 DNA 断

裂.模板的浓度对PCR扩增有影响.过低的模板浓度可能会导致扩增失败或不正确的扩增^[10],故抽提效率应该高,以保证有足够的模板浓度^[26].此外,被抽提的DNA必须纯化,因为土壤中可能含有抑制PCR反应的腐殖酸^[68].

不同的土壤类型要用不同的DNA抽提方法^[4,45].抽提方法可分为两种:一是先抽提土壤中的微生物细胞,再将细胞裂解和回收DNA;二是直接抽提土壤中的DNA.第一种方法得到的是在数量上占优势的微生物的DNA, DNA纯度较高;第二种方法较方便、抽提较完全,得到的DNA更能代表总群落^[71].目前大多数研究者采用第二种方法,该方法经过改进后,已经能够做到避免腐殖酸对PCR的抑制^[31].对于很多土壤,用商用抽提试剂盒能够快速而有效地直接抽提和纯化DNA^[5],对另一些土壤需要用烦琐的其它抽提方法.从不同土壤类型抽提DNA的得率不同,变化范围在2~35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间^[4].

5.2.3 rDNA的PCR扩增 首先慎重选择待扩增的rDNA区域.rDNA的PCR扩增常采用不同的引物和扩增条件分别扩增原核微生物16S rDNA或真核微生物18S rDNA的全序列或部分序列^[14,17,27,36,63].PCR扩增中存在着一些问题,如PCR产物的组成不一定反映原始DNA模板的组成^[25,53,67];PCR产物也不一定能反映原始DNA模板的相对数量.定量PCR方法操作烦琐,需要进一步改进和完善,才能在实际中应用^[48].

5.2.4 PCR产物的凝胶电泳分离 分离效果比较好的凝胶电泳方法有DGGE或TGGE.DGGE或TGGE均可对具有同等长度并具有不同的核苷酸序列的DNA片段进行快速、可再现分离^[27,44].DGGE分离是基于DNA片段在具线性变性梯度的聚丙烯酰胺凝胶中迁移率的不同,常用的变性剂有脲和甲酰胺^[44].TGGE可区分单个碱基水平发生取代的DNA分子^[61].两种方法电泳效果基本相同^[27].不同微生物群落的rDNA电泳后带型不同^[22].凝胶电泳的低分辨率仍然是该方法存在的一个问题^[69].

5.2.5 rDNA的PCR产物的分析 用PCR方法从土壤和微生物分离菌中扩增的rDNA可利用扩增的核糖体DNA限制性分析(the amplified ribosomal DNA restriction analysis,ARDRA)技术进行分析.在该方法中DNA被用一种或几种限制性酶消化,所得片段用凝胶电泳分离.该方法的不足之处是一组(分类群)微生物在分析中可得到几个片段,故分辨率较低.这个问题已在末端限制性片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)分析中得到解决.该方法是ARDRA的发展,在PCR中引入了荧光标记的引物,PCR产物也用一种或几种限制性酶消化,借助荧光标记对消化片段进行分离和鉴定^[39,42].

rDNA间隔区分析(ribosomal internal spacer analysis, RISA)^[1,8]则基于原核生物16S和23S rDNA基因之间的间隔区的长度多态性,用PCR方法对该间隔区进行扩增,扩增产物用凝胶电泳分离并分析带谱,也可对DNA带进行测序,从而获得更详细的信息.

5.3 杂交分析

与rDNA的保守和变异序列同源的DNA片段可制成寡核苷酸探针,用于杂交分析.探针可用在不同的杂交技术中,包括菌落和经克隆的PCR扩增子的杂交、群落DNA的斑点印迹、狭线印迹杂交和完整细胞的荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)^[2,3,51,70].

在使用印迹技术的杂交中,从细菌菌落或经克隆的PCR扩增子中来的16S和23S rRNA基因的PCR产物,可印迹到尼龙膜或硝酸纤维素膜中.该印迹与经放射性同位素、地高辛配基或其它半抗原标记的核苷酸探针杂交.这种方法常用于检测和鉴定细菌,确定土壤中细菌群体的多样性和结构^[51,59],比较微生物分类群变异率^[59].Ritz等^[58]应用整个群落DNA杂交技术,研究了在不同条件下土壤微生物群落结构的变化.在FISH中,可用表面荧光显微镜术,对具有与荧光探针杂交的核酸分子的微生物细胞进行观察和计数^[11].FISH技术使直接显现(visualization)土壤栖息地的微生物成为可能^[29],可用于对土壤样品中的微生物(包括不可培养微生物)进行原位检测^[3].

参考文献

- 1 Acinas SG, Anton J, Rodriguez-Valera F. 1999. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16s RNA. *Appl Environ Microbiol*, **65**:514~522
- 2 Amann RI, Krumholz L, Stahl DA. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol*, **172**:762~770
- 3 Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, **59**:143~169
- 4 Anthony G, O'Donnell, Görres EG. 1999. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion Biotechnol*, **10**:225~229
- 5 Barthelet M, Whyte LG, Greer CW. 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylidene fluoride spin columns. *FEMS Microbiol Lett*, **138**:17~22
- 6 Bochner B. 1989. "Breathprints" at the microbial level. *ASM News*, **55**:536~539
- 7 Borneman J, Skroch PW, O'Sullivan KM, *et al.* 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*, **62**:1935~1943
- 8 Borneman J, Triplett EW. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonian: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol*, **63**:2647~2653
- 9 Cavigelli MA, Robertson GP, Klug MJ. 1995. Fatty acid methyl esters (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. *Plant Soil*, **170**:99~113
- 10 Chandler DP, Fredrickson JK, Brockman FJ. 1997. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol Ecol*, **6**:475~482
- 11 Chatzinotas A, Sandaa RA, Schönhuber W, *et al.* 1998. Analysis of broad-scale differences in microbial community composition of two pristine forest soils. *Syst Appl Microbiol*, **21**:579~587
- 12 Clegg CD, Ritz K, Griffiths BS. 2000. %G+C profiling and cross hybridization of microbial DNA reveals great variation in below-ground community structure in UK upland grasslands. *Appl Soil Ecol*, **14**:125~134
- 13 Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, *et al.* 1995. Changes in levels, species and DNA profiles of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin.

- in. *Appl Soil Ecol*, 2: 111~124
- 14 Dunbar J, Takala S, Barns SM, *et al.* 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16s rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol*, 65:1662~1669
 - 15 Elsas JD van, Duarte GF, Rosado AS, *et al.* 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J Microbiol Meth*, 32:133~154
 - 16 Fægri A, Torsvik VL, Goksoyr J. 1977. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biol Biochem*, 9:105~112
 - 17 Fantroussi SE, Verschuere L, Verstraete W, *et al.* 1999. Effect of phenyl urea herbicides on soil communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl Environ Microbiol*, 65:982~988
 - 18 Fogel GB, Collins CR, Li J, *et al.* 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbiol Ecol*, 38:93~113
 - 19 Frostegård A, Bååth E, Tunlid A. 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipids fatty acid analysis. *Soil Biol Biochem*, 25:723~730
 - 20 Garland JL. 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol Biochem*, 28:213~221
 - 21 Garland JL, Mills AL. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol*, 57:2351~2359
 - 22 Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, *et al.* 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Meth*, 38:1~15
 - 23 Haack SK, Garchow H, Klug MJ, *et al.* 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl Environ Microbiol*, 61:1458~1468
 - 24 Haack SK, Garchow H, Odelson DA, *et al.* 1994. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 60:2483~2493
 - 25 Hansen MC, Tolker-Nielsen T, Givskov M, *et al.* 1998. Biased 16s rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol Ecol*, 26:141~149
 - 26 Head IM, Saunders JR, Pickup RW. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiol Ecol*, 35:1~21
 - 27 Heuer H, Krsek M, Baker P, *et al.* 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoresis separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol*, 63:3233~3241
 - 28 Heuer H, Smalla K. 1997. Evaluation of community level catabolic profiling using Biolog GN microplates to study microbial community changes in potato philosopher. *J Microbiol Meth*, 30:49~61
 - 29 Hill GT, Mitkowski NA, Aldrich WL, *et al.* 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl Soil Ecol*, 15:25~36
 - 30 Ibekwe AM, Kennedy AC. 1998. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and green house conditions. *FEMS Microbiol Ecol*, 26:151~163
 - 31 Insam H, Amor K, Renner M, *et al.* 1996. Changes in functional abilities of the microbial community during composing of manure. *Microbiol Ecol*, 31:77~87
 - 32 Insam H. 2001. Development in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma*, 100:389~402
 - 33 Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V. 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils—A review. *Biol Fert Soils*, 33:443~453
 - 34 Johnsen K, Nielsen P. 1999. Diversity of pseudomonas strains isolated with King's B and Gould' S1 agar determined by repetitive extragenic palindrome-Polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and fourier transform infrared spectroscopy characterization. *FEMS Microbiol Lett*, 173:155~162
 - 35 Konopka A, Oliver L, Turco RFJ. 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbiol Ecol*, 35:103~115
 - 36 Kowalchuk GA, Gerards S, Woldendorp JW. 1997. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (Mar-ram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18 S rDNA. *Appl Environ Microbiol*, 63:3858~3865
 - 37 Kroppenstedt RM. 1992. The genus *Nocardiopsis*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M eds. *The Prokaryotes*. New York, Berlin, Heidelberg: Springer. 1139~1156
 - 38 Lechevalier MP. 1989. Lipids in bacterial taxonomy. In: O' Leary WM ed. *Practical Handbook of Microbiology*. Boca Raton, Fla: CRC. 455~561
 - 39 Liu WT, Marsh TL, Cheng H, *et al.* 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16s rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 63:4516~4522
 - 40 Martin JK. 1975. Comparison of agar media for counts of viable bacteria. *Soil Biol Biochem*, 7:401~402
 - 41 McCaig AE, Grayston SJ, Prosser JI, *et al.* 2001. Impact of cultivation on characterization of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 35:37~48
 - 42 Moeseneder MM, Arrieta JM, Muiyzer G, *et al.* 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length Polymorphism analysis for complex marine bacteria plankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 65:3518~3525
 - 43 Muiyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion Microbiol*, 2:317~322
 - 44 Muiyzer G, de Waal ED, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denatunng gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59:695~700
 - 45 Niemi RM, Heiskanen I, Wallenius K, *et al.* 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J Microbiol Meth*, 45:155~165
 - 46 Nohynek LJ, Nurmiaho-Lassila EL, Suhonen EL, *et al.* 1996. Description of chlorophenol-degrading *Pseudomonas* sp. strains kf1, kf3, and nkf1 as a new species of the genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas subarctica* sp. *Nov Int J Syst Bacteriol*, 46:1042~1055
 - 47 Nübel U, Engelen B, Felske A, *et al.* 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyza* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*, 178:5636~5643
 - 48 Ogram A. 2000. Soil molecular microbial ecology at age 20: Methodological challenges for the future. *Soil Biol Biochem*, 32:1499~1504
 - 49 Olsen RA, Bakken LR. 1987. Viability of soil bacteria: Optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbiol Ecol*, 13:59~74
 - 50 Øvreås L. 2000. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecol Letts*, 3:236~251
 - 51 Øvreås L, Torsvik V. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbiol Ecol*, 36:303~315
 - 52 Pfender WF, Fieland VP, Ganio LM, *et al.* 1996. Microbial community structure and activity in wheat straw after inoculation with biological control organism. *Appl Soil Ecol*, 3:69~78
 - 53 Polz MF, Cavanaugh CM. 1998. Bias in template-to-product ratios in multi template PCR. *Appl Environ Microbiol*, 64:3724~3730
 - 54 Ponder F Jr, Tadros M. 2002. Phospholipid fatty acids in forest soil four years after organic matter removal and soil compaction. *Appl Soil Ecol*, 19:173~182
 - 55 Ranjard L, Poly F, Nazaret S. 2000. Monitoring complex bacterial

- communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment. *Res Microbiol*, **151**:167~177
- 56 Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE, et al. 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol*, **32**:1232~1240
- 57 Ratledge C, Wilkinson SG. 1988. *Microbial Lipids*. London: Academic Press.
- 58 Ritz K, Griffiths BS. 1994. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. *Soil Biol Biochem*, **26**:963~971
- 59 Sandaa RA, Torsvik V, Enger Ø, et al. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soil at different levels of resolution. *FEMS Microbiol Ecol*, **30**:237~251
- 60 Shah HN. 1992. The genus *Bacteroides* and related taxa. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M eds. *The Prokaryotes*. New York, Berlin, Heidelberg: Springer. 3593~3608
- 61 Sheffield VC, Cox DR, Ierman LS, et al. 1989. Attachment of a 40-base pair guanosine plus cytosine-rich sequence (guanosine cytosine clamp) to improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**:232~236
- 62 Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, et al. 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, **64**:1220~1225
- 63 Smit E, Leeftang P, Glandorf B, et al. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, **65**:2614~2621
- 64 Sørheim R, Torsvik VL, Goksøy J. 1989. Phenotypic divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. *Microbiol Ecol*, **17**:181~192
- 65 Steinberger Y, Zelles L, Bai QY, et al. 1999. Phospholipid fatty acid profiles as indicators for microbial community structure and biodiversity in soils along a climatic transect in the Judean desert. *Biol Fert Soils*, **28**:292~300
- 66 Sundh I, Nilsson M, Borgå P. 1997. Variation in microbial community structure in two boreal peat lands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *Appl Environ Microbiol*, **63**:1476~1482
- 67 Suzuki MT, Giovannoni SJ. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol*, **64**:625~630
- 68 Tebbe CC, Vahjen W. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol*, **59**:2657~2665
- 69 Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nüsslein K, et al. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol*, **13**:109~122
- 70 Torsvik V, Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiol*, **5**:240~245
- 71 Torsvik V, Daae FL, Goksøy J. 1995. Extraction, purification, and analysis of DNA from soil bacteria. In: Trevors JT, van Elsas JD eds. *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications*. New York, Berlin, Heidelberg: Springer. 9~48
- 72 Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA, et al. 1998. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotech*, **64**:53~62
- 73 Torsvik V, Salte K, Sørheim R, Goksøy J. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **56**:776~781
- 74 Tunlid A, White DC. 1991. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial community in soil. In: Stotzky G, Bollag JM eds. *Soil Biochemistry*. New York: Dekker. 229~262
- 75 Vahjen W, Munch JC, Tebbe CC. 1995. Carbon source utilization of soil extracted microorganisms as a tool to detect the effect of soil supplemented with genetically engineered and non-engineered *Corynebacterium glutamicum* and a recombinant peptide at the community level. *FEMS Microbiol Ecol*, **18**:317~328
- 76 Vandamme P, Pot B, Gillis M, et al. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol Rev*, **60**:407~438
- 77 Wells GB, Dickson RC, Lester LR. 1996. Isolation and composition of inositolphosphorylceramide-type sphingolipids of hyphal forms of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **178**:6223~6226
- 78 Wünsche L, Brüggemann L, Babel W. 1995. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiol Ecol*, **17**:295~305
- 79 Zelles L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review. *Biol Fert Soils*, **29**:111~129
- 80 Zelles L, Bai QY, Rackwitz R, et al. 1995. Determination of phospholipid- and lipopolysaccharide-derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structure in soils. *Biol Fert Soils*, **19**:115~123
- 81 Zelles L, Palojarvi A, Kandeler E, et al. 1997. Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation. *Soil Biol Biochem*, **29**:1325~1336

作者简介 钟文辉,男,1965年生,博士,副教授,主要从事环境微生物学和环境生物技术研究,发表论文20多篇,出版专著和高校教材4部. E-mail: w. h. zhong@yeah. net
