

# 土壤微生物多样性分析技术研究进展

黄艳霞 (苏州出入境检验检疫局, 江苏苏州 215000)

**摘要** 对土壤微生物多样性的3类主要研究方法及其应用特点进行了简要的评述和分析, 指出使用 Biolog 分析、磷脂脂肪酸分析和分子生物学分析方法可研究和表征那些目前还不能够被培养的微生物, 从而获取关于土壤微生物多样性的更多和更完整的信息。

**关键词** 土壤微生物; 微生物多样性; 分子生物学

**中图分类号** S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)32-15924-02

土壤微生物包括从原核到真核的不同类群的生物: 细菌、放线菌、原生动物、真菌、藻类和病毒, 是生物多样性的的重要组成部分。土壤微生物群落作为生态系统中极重要的一环, 对植物的生长、生态系统中能量流动和物质循环及环境污染物的降解和解毒等方面起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。

## 1 土壤微生物群落多样性概念

土壤微生物群落多样性是指土壤微生物群落的种类和种间差异, 一般包括物种多样性、遗传多样性、结构多样性及功能多样性。物种多样性是微生物多样性最基本的内容, 指土壤生态系统中微生物的物种丰富度和均一度, 是多样性分析中最直观、最容易理解的要素。与高等生物相比, 不同种群间的遗传物质和基因表达具有很大的差异, 因而微生物多样性在分子水平尤为突出。结构多样性是指土壤微生物群落在细胞结构组分上的多样化程度, 是导致微生物代谢方式和生理功能多样化的直接原因。土壤微生物群落有多种多样的代谢方式和生理功能, 可以适应各种生态环境, 并以不同生活方式与其他生物相互作用, 这就表现出功能上的多样性<sup>[3-4]</sup>。

## 2 土壤微生物群落多样性分析方法

**2.1 传统培养方法** 传统研究方法是利用选择性平板培养基将微生物从土壤中分离, 实验室培养和鉴定。这种方法对于衡量小群体多样性方面不失为一种快速方法。由于这种方法人为限定了一些培养条件, 无法全面反映微生物生长的自然条件, 常常造成某些微生物的富集生长, 而另一些微生物缺失。另外, 由于缺乏对微生物真正生存环境的认识, 所以 80%~99% 的微生物种不可培养或未能得到培养<sup>[5]</sup>。传统的研究方法只能反映极少数微生物的信息, 所测结果误差较大, 埋没了大量极有应用价值的微生物资源。因此传统培养方法只能作为一种辅助手段, 并且只有与其他先进方法结合起来才能较为客观而全面地反映土壤微生物群落结构的真实信息。但这种方法在分离具有一定功能的特殊目标物种时是非常有用的, 利用这种方法已获得许多很有应用价值的微生物种类, 并应用于基因介导及生态修复等方面<sup>[6]</sup>。

## 2.2 生物化学方法

**2.2.1 基于 DNA 动力学的研究方法。** 研究者认为, DNA 混合物的复杂性可用  $C_0t$  1/2 值(经热变性解链后, 50% 的 DNA 链复性为双链 DNA 所需的时间)表示:  $C_0t$  1/2 值越大, DNA

复性所需时间就越长, 相应的 DNA 混合物就越复杂。提取环境样品中的总 DNA, 测量其  $C_0t$  1/2 值, 并与简单 DNA(如质粒或单基因组)  $C_0t$  1/2 值相比, 可知该 DNA 样品的复杂程度。Torsvik 等研究了挪威等地的森林土壤样品, 通过提取样品中总 DNA, 然后在高压下将 DNA 剪切成 420 kD 的片段, 测定热变性复性过程, 得到  $C_0t$  1/2 值, 结果显示, 该土样的基因多样性是一般分离法所得基因多样性的 200 多倍<sup>[7]</sup>。还有些研究者也对土壤微生物及浮游细菌群落作了 DNA 复性动力学研究, 比较了群落间基因多样性的差异。

**2.2.2 基于酶动力学的研究方法。** 早在 20 世纪 70 年代就有研究者利用基于微生物酶动力学的方法来研究微生物群落的功能和结构<sup>[8]</sup>。这些研究主要集中在微生物群落的酶活性方面。微生物群落中含有的酶种类非常多, 不同微生物群落的代表性酶种类也有所不同, 因此该方法缺少标准性, 较难将其应用于不同微生物群落的多样性研究上。Garland 等建立起一套利用 BIOLOG 微平板鉴定系统来研究不同环境下的微生物群落结构和功能多样性的方法<sup>[9]</sup>。借助于多底物的 ELISA 反应平板——BIOLOG GN (BIOLOG, Inc., Hayward, CA) 可研究不同微生物群落对单一碳源底物的利用能力 (Sole-Carbon-Source Utilization, SCSU) 的差异, 获得微生物群落结构和功能多样性方面的信息。BIOLOG GN 微平板反应系统最早用来鉴定不同的细菌分离菌, 由于快速简便, 该系统逐渐被用于研究微生物群落潜在功能上的差异及其多样性。如 Zak 等研究了 6 种不同植物群落中的土壤微生物群落的功能多样性, 认为该方法能较好地反映不同微生物群落间在多样性上的差异<sup>[10]</sup>; John 等对锌污染下的土壤微生物群落进行了研究, 发现锌污染会影响土壤微生物群落结构<sup>[11]</sup>; BIOLOG GN 系统还被广泛应用于植物根际、植物落叶层以及植物叶系等环境中的微生物群落结构和功能多样性上。

**2.2.3 磷脂脂肪酸分析研究法。** White 等用磷脂脂肪酸分析 (PLFA) 来研究微生物群落结构、营养结构和代谢活性<sup>[12]</sup>。磷脂脂肪酸是极性脂类派生脂肪酸 (PLFAs) 的一种。它是微生物细胞膜的主要组成成分, 对于许多属的微生物而言, 磷脂脂肪酸是一种特定的生物标记物。不同的微生物有不同的 PLFA 特征, 因此 PLFA 可对自然条件下的微生物群落样品进行群落特征研究。近年来, 许多研究者利用 PLFA 法研究微生物群落物种、结构和功能的多样性。此外, PLFA 还被广泛应用于沉积物、溪流及植物根际中微生物群落的生物量、物种和结构多样性以及营养状况的研究<sup>[13-14]</sup>。

**2.3 分子生物学方法** DNA 的多样性是生物多样性的本质

**作者简介** 黄艳霞 (1980-), 女, 安徽安庆人, 硕士, 从事细菌的研究工作。

**收稿日期** 2009-07-20

内容。现代分子生物学技术在微生物多样性研究上的应用克服了微生物培养技术的限制,能对样品进行客观的分析,更精确地揭示了微生物种类和遗传的多样性。

**2.3.1 对微生物总 DNA 扩增和分析技术。**随着从土壤中提取和纯化微生物总 DNA 方法的发展,使对土壤总 DNA 进行 PCR(Polymerase Chain Reaction)扩增成为可能<sup>[15-16]</sup>,从而推动了利用分子标记技术研究土壤微生物多样性的发展。从环境样本中提取微生物总 DNA 有 2 种方法:①直接用机械或化学的方法破碎样品中的微生物,释放出总 DNA<sup>[17]</sup>;②从样本中分离出微生物细胞,然后抽提 DNA<sup>[18]</sup>。从总体上来讲,前一种方法更能代表环境样本中微生物遗传多样性的实际情况<sup>[15]</sup>。

对环境样品微生物总 DNA 进行 PCR 扩增,根据所用引物、反应条件的不同,其产物的分析方法也不同。主要有:①对扩增产物以变性梯度凝胶电泳(DGGE)或温度梯度凝胶电泳(TGGE)直接显示 DNA 多样性<sup>[19]</sup>;②将扩增产物应用于分子杂交和限制性片段长度多态性(RFLP)分析。

随着基于 PCR 扩增反应的分子标记技术的发展,DNA 分子标记技术也广泛应用于土壤微生物多样性研究。目前应用的分子标记技术主要有单链构象多态性分析(SS-CP)<sup>[20]</sup>、末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)<sup>[21]</sup>、随机扩增产片长度多态性 DNA(RAPD)和扩增产片长度多态性(AFLP)等。

**2.3.2 以核酸杂交技术研究微生物多样性。**核酸分子杂交技术是于 20 世纪 70 年代发展起来的一种崭新的分子生物学技术。它是基于 DNA 分子碱基互补配对的原理,用特异性的 cDNA 探针与待测样品的 DNA 或 RNA 形成杂交分子的过程。由于它的高度特异性和灵敏性,近年来被广泛应用于微生物多样性的研究上。

用于微生物多样性研究的探针主要有双链 DNA、单链 DNA 和 RNA 以及寡核苷酸探针 3 类,可在多个层次上对微生物在特定环境中的存在、分布和丰度等情况进行研究。主要有以下 4 个层次:

(1)直接在环境样品上进行原位(*In situ*)杂交,可获得不可培养的微生物多样性的信息,如微生物的形态特征和丰度,以及在样品上的空间分布和动态。目前原位杂交是核酸杂交技术中应用较多的方法。近年来发展起来的荧光原位杂交技术(FISH)较大地推动了土壤微生物群落的检测和定量化研究<sup>[22]</sup>。

(2)对富集分离的微生物菌落进行全细胞杂交,可提供比点渍杂交更详细的信息。

(3)对从环境样本中提取出的 DNA 或 rRNA 进行数量点渍杂交,可获得有关特定 DNA 或 rRNA 序列丰度的信息。应用该方法,Ritz 等研究了土壤微生物群落种群结构的变化,用来评估海洋浮游细菌群落的结构相似性<sup>[23]</sup>。

(4)与 rDNA 的扩增产物或 rRNA 的反转录产物进行杂交,这是基于微生物 rRNA 信号序列在不同物种层次差异性基础上的,根据这些信号序列设计寡核苷酸探针可检测不同微生物。

**2.3.3 16S rRNA 序列研究。**Pace 等首次利用 rRNA 确定环

状样品中的微生物,通过直接从环境样品中提取 5S rRNA 分子,并电泳分离测序来研究微生物生态和进化<sup>[24]</sup>。该方法很快被用于微生物多样性研究领域。由于 5S rRNA 相对较小,携带信息少,随后开展了 16S rRNA 研究。

目前,16S rRNA 分析广泛应用于土壤微生物多样性的研究上。以 16S rRNA 研究微生物多样性的基本步骤:①样品总 DNA 的提取;②用可选择性扩增编码 16S rRNA 的 DNA 序列的多聚寡核苷酸引物对 DNA 进行 PCR 扩增;③对 PCR 扩增产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)或温度梯度凝胶电泳(TGGE)分析,该分析技术是基于双股 DNA 片段在变性梯度和温度梯度上迁移时解链行为不同原理的。

### 3 小结

上述各种方法在获取土壤微生物多样性信息方面各有优劣势,因此为获取更加全面、准确的土壤微生物群落组成、结构及变化等信息,在实际工作中,常常是采取多层次多角度的研究手段,同时使用 2~3 种分析方法,互相补充,避免使用单一方法所带来的偏差,这也是研究者在对土壤微生物多样性进行分析时应重点关注的问题。

### 参考文献

- [1] SCHLENSINGER W H. Evidence from chronosequence studies for a low carbon-storage potential of soil[J]. *Nature*, 1990, 348: 232-234.
- [2] LAMMAR R T, DIETRICH D M. *In-situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 3093-3100.
- [3] 林先贵, 胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能[J]. *土壤学报*, 2008, 45(5): 892-900.
- [4] 姚晓华. 土壤微生物群落多样性研究方法及其进展[J]. *广西农业生物科学*, 2008, 27(S1): 84-88.
- [5] AMANN R L, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 143-169.
- [6] AMARAL J, REN T, KNOWLES R. Atmospheric methane consumption by forest soils and extraction bacteria at different pH value[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 2397-2402.
- [7] TORSVIK V L, GOKSOYR J, DAAE F L. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 776-781.
- [8] OU L T, ROTHWELL D F, WHEELER W B. The effect of high 2,4-D concentration on degradation and carbon dioxide evolution in soils[J]. *J Environ Qual*, 1978, 7: 241-250.
- [9] GARLAND J L, MILLS A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities using patterns of potential C source utilization[J]. *Soil Biol Biochem*, 1991, 28: 213-221.
- [10] ZAK J C, WILLIG M R, MOORHEA D L, et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach[J]. *Soil Biol Biochem*, 1994, 26: 1101-1108.
- [11] JOHN J K, ROBERT L T. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter[J]. *J Environ Qual*, 1998, 27: 609-617.
- [12] WHITE D C, FINDLAY R H. Biochemical markers for measurement of predation effect on the biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial biofilms[J]. *Hydrobiologia*, 1988, 159: 119-132.
- [13] SYAKTI A D, MAZZELLA N, NERINI D. Phospholipid fatty acid of a marine sedimentary microbial community in a laboratory microcosm: response to petroleum hydrocarbon contamination[J]. *Organic Geochemistry*, 2006, 37(11): 1617-1628.
- [14] MEDEIROS P M, FERNANDES S F, DICK R P. Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(5): 832-839.
- [15] LEFF L G, DANA J R, MCARTHUR J V, et al. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediment[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 1141-1143.

100%,也就是说前3个主成分所携带的数据信息就已经完全包括了原来17个指标所携带的数据信息。这样就大大简化了数据结构,使分析问题的困难大大降低。事实上,根据最小 $m$ 的选取标准( $E_j > 80.000\%$ ),只要选取前2个主成分,因为它们所包含的数据信息为 $88.63\% > 80\%$ ,而损失的数据信息只有 $11.387\%$ 。因此,在此选取2个主成分。

(7)根据主成分 $Z_1, Z_2$ 和对应的权数 $e_1, e_2$ 之积 $Z_{1-2} = Z_1e_1 + Z_2e_2$ 计算得到各省(市)的综合主成分及排名(表5)。从表5可以看出,上海市水环境可持续发展状况最好,其次是江苏、浙江,最后是安徽。而从综合主成分数据可以看出,除了上海市为2.002,其他省都小于1.000,这说明太湖流域水环境可持续发展水平不高,存在严重的水环境问题。

表5 各省(市)的主成分及综合主成分及排名

Table 5 Principal component, synthetic principal component and ranking of four Provinces (City)

序号 Serial No.	分区 Region	$Z_1$	$Z_2$	$Z_{1-2}$	排名 Ranking
1	江苏省	1.150	0.120	0.819	2
2	浙江省	1.216	-0.917	0.525	3
3	安徽省	-0.577	0.928	-0.090	4
4	上海市	2.776	0.388	2.002	1

### 3 讨论

水环境可持续发展评价指标体系全面概括了太湖流域自身发展状况及与水环境相关的社会、经济、生态、资源等各个子系统之间的协调发展状况信息。主成分分析结果表明,太湖流域水环境可持续发展水平低下。从太湖流域自身状况分析,过去几十年内,大量的工农业和生活污水排入和水资源大量使用已远远超过水资源承载能力,导致了太湖水质污染严重和水资源紧缺。从各子系统协调发展分析,自改革开放以来,太湖流域经济得到了快速发展,短短几十年内走过了西方国家的百年历程。经济的快速增长固然带来巨大财富,然而大量的经济生产活动必然带来污染物大量排放和资源消耗,同时由于短期内的快速扩张和落后的经济发展模

式,导致了经济结构的严重不合理,进一步加大了污染物的排放和资源消耗,给太湖流域水环境带来重大压力。同时,人口的快速增长和人们的环保意识低下,导致水资源大量使用及环境治理落后,加大了水环境的破坏。这2方面的原因可从各省市的计算结果得到验证。上海市作为发展最长久和最完善的经济体,可持续发展水平远远高于其他省市。

因此,为了更好地改善太湖流域水环境污染现状,维持水环境的可持续发展,各地区必须加大环保意识的宣传力度和水环境污染治理的投资及进行经济结构的升级。

### 参考文献

- [1] 孙继昌. 太湖流域水问题及对策探讨[J]. 湖泊科学, 2005, 17(4): 289-293.
- [2] 2008年太湖健康状况报告[R]. 2008.
- [3] 陈荷生, 宋祥甫, 邹国燕. 太湖流域水环境综合整治与生态修复[J]. 水利水电科技进展, 2008(3): 76-79.
- [4] 廖文根, 彭静, 骆辉煌. 关于太湖流域水污染防治策略的思考[J]. 中国水利水电科学研究院学报, 2005(1): 8-12, 17.
- [5] 冯利华, 马末宇. 主成分分析法在地区综合实力评价中的应用[J]. 地理与地理信息科学, 2004(6): 73-75.
- [6] 姚焕玖, 黄仁涛, 刘洋, 等. 主成分分析法在太湖水质富营养化评价中的应用[J]. 桂林工学院学报, 2005(2): 248-251.
- [7] 鲍卫锋, 黄介生, 孔祥元. 基于主成分分析法的流域水循环效应[J]. 武汉大学学报: 工学版, 2007(2): 29-33.
- [8] 刘国, 许模, 于静. 可持续发展指标体系研究评述[J]. 成都理工大学学报: 社会科学版, 2007(3): 29-33.
- [9] 江苏省环保局. 江苏省水资源公报, 江苏省环境状况公报[R]. 2005-2006.
- [10] 江苏省统计局. 江苏省统计年鉴, 江苏省社会与经济发展公报[R]. 2005-2006.
- [11] 浙江省环保局. 浙江省水资源公报, 浙江省环境状况公报[R]. 2005-2006.
- [12] 上海市环保局. 上海市水资源公报, 上海市环境状况公报[R]. 2005-2006.
- [13] 上海市统计局. 上海市统计年鉴, 上海市社会与经济发展公报[R]. 2005-2006.
- [14] 郭显光. 如何用SPSS软件进行主成分分析[J]. 统计与信息论坛, 1998(2): 61-65.
- [15] WANG R H, ZHANG H Z. Characteristics and measurements of ecological compensation in ecosystem[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(6): 10-13.

(上接第15925页)

- [16] PORTEOUS L A, WATRUD R J, SEIDLER R J. A improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications[J]. Mol Ecol, 1997, 6: 787-791.
- [17] CHEN J S, WEI C, MARSHALL M R. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39: 1897-1901.
- [18] BRENNER O, BIANCHI E. Immobilised lacase for phenolic removal in Mustard wine[J]. Biotechnol Lett, 1994, 16: 35-40.
- [19] MUYZER G, DE WAAL E D, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695-700.
- [20] SAUBUSSE M, MILLET L, DELBES C, et al. Application of single strand conformation polymorphism-PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes* [J]. International

Journal of Food Microbiology, 2007, 116: 126-135.

- [21] OSBORN A M, MOORE E R B, TIMMIS K N. An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics[J]. Environmental Microbiology, 2000, 2: 39-50.
- [22] DELONG E F, TAYLOR L T, MARSH T L, et al. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 5554-5563.
- [23] RITZ K, GRIFFITHS B S. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities[J]. Soil Biol Biochem, 1994, 26: 963-971.
- [24] PACE N R, STAHL D A, LANE D J, et al. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequence[J]. Adv Microb Ecol, 1986, 9: 1-55.