

# 应用16S rDNA-RFLP方法分析宁夏地区稻田土壤细菌的多样性

张建萍 董乃源 余浩滨 周勇军 陆永良 耿锐梅 余柳青\*

(中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006)

**摘要:** 水稻是宁夏地区主要粮食作物, 水稻种植也具有维持生态系统平衡, 防止土地荒漠化等重要的生态功能。而稻田土壤细菌是维持土壤生态功能的基础。但长期以来缺乏对于干旱地区稻田土壤细菌多样性的认识。本研究采用非培养技术提取稻田土壤样品总DNA, 构建其16S rDNA克隆文库, 用PCR-RFLP分析进一步测序后聚类分析细菌群落的多样性。从稻田土样中分离获得了大于23 kb的DNA片段。PCR-RFLP共得到74种酶切带型, 序列分析发现77.3%的克隆序列与环境未培养细菌的16S rDNA序列有较高的相似性, 仅有22.7%的克隆序列与数据库中可培养细菌有较高的相似性, 表明宁夏稻区土壤中的多数细菌尚未培养。系统发育研究发现74个序列分属于12个类群, 其中变形细菌所占比例最大(37.8%), 依次为酸杆菌(16.2%)、放线菌(12.2%)、拟杆菌(10.8%)、绿屈挠菌(10.8%)、浮游霉菌(8.1%), 另外有少量厚壁菌门、芽单胞菌门和疣微菌门细菌克隆。在变形细菌的序列中包括 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$  4个类型, 比例分别为13.5%、5.4%、12.2%和6.8%。表明宁夏稻区土壤中优势细菌类群为变形杆菌和酸杆菌, 且土壤细菌类群具有丰富的多样性。

**关键词:** 水稻田, 土壤细菌多样性, 16S rDNA克隆文库, RFLP分析

## Bacteria diversity in paddy field soil by 16S rDNA-RFLP analysis in Ningxia

Jianping Zhang, Naiyuan Dong, Haobin Yu, Yongjun Zhou, Yongliang Lu, Ruimei Geng, Liuqing Yu\*

State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006

**Abstract:** Rice is one of the most important crops in the Ningxia region of China, and rice planting helps to maintain ecosystem balance and prevent land desertification. Soil microbial diversity provides basic functions for rice field soil ecosystems. To better understand bacterial diversity and community composition in Ningxia paddy soil, the total bacterial DNA was extracted from paddy soil collected from a typical rice field of Ningxia using the culture independent method. A 16S ribosomal DNA (16S rDNA) clone library of soil bacteria was constructed. The 16S rDNA fragments were analyzed by PCR-RFLP. Further sequencing and cluster analysis were conducted to elucidate the bacterial diversity. Over 23 kb DNA fragments were obtained from the paddy soil and 74 *MspI* restriction endonuclease types were detected by PCR-RFLP analysis. Sequence analysis revealed that 77.3% of clone sequences were similar to those of uncultured bacteria in the environment, while only 22.7% clone sequences were most closely related to those of cultured bacteria in GenBank, suggesting great potential for undeveloped bacterial resources was available in paddy fields. Our phylogenetic analysis found that the sequenced clones fell into 12 major lineages within the domain bacteria. Among them, members of the Proteobacteria were the dominant group, accounting for 37.8%, including  $\alpha$ -Proteobacteria (13.5%),  $\gamma$ -Proteobacteria (12.2%),  $\delta$ -Proteobacteria (6.8%) and  $\beta$ -Proteobacteria (5.4%), followed by Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi and Planctomycetes division with 16.2%, 12.2%, 10.8%, 10.8%, 8.1%, respectively. Firmicutes, Gemmatimonadetes, and Verrucomicrobia were less well represented. Our study revealed an extensive diversity of soil bacteria in a paddy field in

收稿日期: 2008-05-21; 接受日期: 2008-08-25

基金项目: 中央级公益性科研院所专项资金项目(2006RG013)、国家 863 项目(2006AA10A214)和浙江省自然科学基金项目(Y306180)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: liuqyu53@yahoo.com.cn

Ningxia.

**Key words:** paddy rice field, bacterial diversity, 16S rDNA, RFLP analysis

水稻田因水分含量高, 土壤微生物群落相对较为丰富。稻田土壤微生物多样性是构成土壤生态功能的基础, 是土壤生态系统中C、N、S、P等物质和能量循环的主要参与者, 在减少植物病原体、保持土壤肥力、维持生态系统功能以及促进水稻生长方面起着重要的作用(Collins *et al.*, 1992; Kent & Triplett, 2002), 是衡量稻田生态系统功能是否正常的一个重要方面。以往对稻田微生物的研究主要集中于有关物质转化的功能细菌群落, 如硫氧化细菌(Graff & Stubner, 2002)、硫酸盐还原细菌(陈中云等, 2004)、反硝化细菌(赵兼强, 2003)、甲烷氧化细菌(Gundula *et al.*, 2005)、甲烷古菌(Werner *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 2004)等。随着现代农业技术的快速发展, 大量施用化肥、化学农药和种稻技术的变革等对稻田土壤微生物多样性产生了很大影响。钟文辉等(2007)研究了长期施用无机化肥对稻田土壤微生物群落多样性的影响; 王英等(2007)对免耕水稻土壤中细菌多样性及其在不同土层的空间分布进行了研究; 李慧等(2006)研究了石油污染对沈抚稻区土壤细菌遗传多样性的影响。

宁夏地处西部干旱地区, 水稻种植形成的湿地系统对于改善当地的生态系统起到极其重要的作用。近年来由于我国西部地区水资源缺乏, 造成宁夏水稻种植面积减少, 一些稻田改种旱地作物, 这必然会引起土壤生物化学性质的改变, 尤其是敏感的土壤微生物群落结构会发生相应变化, 进而影响到土壤生态系统功能的发挥和稳定并带来一系列的生态问题。但是目前对于沙漠性气候影响下的干旱地区稻田土壤细菌多样性及其与环境相互关系的研究还鲜见报道。

传统的土壤微生物研究方法是采用纯培养技术, 首先需将微生物从土壤中分离培养出来, 而土壤中可被培养的微生物仅有1% (Amann *et al.*, 1995; Torsvik & Ovreas, 2002)。分子生态学研究结果表明环境中存在大量未培养的微生物, 据估计每克土壤约含几千种不同的微生物, 最高可达 $10^{10}$ 个微生物个体(Rosello & Amann, 2001)。因此传统方法极大地限制了对土壤微生物多样性的认识。基于16S rDNA

分子分析技术, 包括16S rDNA序列的PCR-RFLP、DGGE/TGGE(变性/温度梯度凝胶电泳)等技术克服了传统培养技术的限制, 能够快速、简便地获取包括土壤中可培养和未培养微生物的大部分信息, 目前已经被广泛地应用于土壤微生物遗传多样性的研究。

本文采用PCR-RFLP方法对宁夏稻区土壤细菌群落构成和多样性进行研究, 以期了解干旱地区土壤生态功能良好的稻田中微生物群落多样性和环境之间的关系, 为进一步研究干旱地区土壤利用方式变化与生态效应之间的关系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品

采样地点位于宁夏中卫地区水稻田, 该地区具有典型的大陆性季风气候和沙漠气候, 年平均温度 $9.27^{\circ}\text{C}$ , 年均降水量200 mm。采样稻田地势平坦, 肥力均匀, 杂草种类和数量极少, 仅有零星蒿草生长。水稻生长期施用少量杀虫剂, 未施用任何化学除草剂, 土壤功能良好。

2007年10月于水稻收获后, 随机在一块 $500\text{ m}^2$ 的稻田内, 采用对角线五点混合法采集土壤样品。每个点取1.0 kg土样, 采集深度为3–10 cm, 装入灭菌的牛皮纸袋后带回实验室。除去根系、石块等杂物, 再过4 mm筛后混合用于土壤的细菌、放线菌和真菌三大菌群计数及土壤理化性质的测定, 其余在超净工作台分装后保存在 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于土壤总DNA提取。

### 1.2 试剂

DNA 纯化试剂盒购自Omega公司; LA-Taq DNA聚合酶、限制性内切酶MspI、DNA凝胶回收试剂盒、pMD19-T Vector、IPTG和X-Gal购自Takara公司; 蛋白酶K、溶菌酶购自Sigma公司; 引物合成和DNA测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

### 1.3 土壤细菌总DNA的提取和纯化

称取10 g(湿重)土壤样品, 与13 mL DNA提取液(100 mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM EDTA

(pH8.0), 100 mM磷酸钠(pH8.0), 1.5 M NaCl, 1% CTAB)混合, 再加入蛋白酶K(终浓度200  $\mu\text{g/mL}$ )。在225 r/min摇床上37℃水平摇动30 min; 接着加入5 mL TE缓冲液和溶菌酶(终浓度1 mg/mL), 继续摇动2 h; 加入7.5 mL 20% (w/v) SDS, 65℃水浴2 h, 每隔10–15 min轻轻颠倒几下, 室温6,000 g离心10 min。收集上清, 转移到新的100 mL离心管中。土壤沉淀中再加入4 mL DNA提取液和1 mL 20%的SDS, 涡旋10 s, 65℃水浴10 min; 室温6,000 g离心10 min; 收集上清, 与前次转至新管的上清合并。重复上述操作, 收集上清与前两次上清合并。将上清与等体积的苯酚、氯仿、异戊醇(25: 24: 1体积比)混合, 15,000 g 离心15 min, 吸取水相转移至另一个100 mL离心管中, 重复抽提2次, 上清以0.6倍体积的异丙醇室温沉淀DNA 10 min, 4℃ 12,000 g离心20 min, 收集核酸沉淀, 70%乙醇洗涤沉淀2次; 风干乙醇后, DNA沉淀重悬于500  $\mu\text{L}$  TE中为DNA粗提溶液。粗提溶液纯化按照Omega公司DNA纯化试剂盒操作指导完成。获得的DNA溶液采用紫外分光光度仪测定浓度和纯度, 采用经EB染色的琼脂糖凝胶电泳检测片段大小。

#### 1.4 土壤细菌总DNA的16S rDNA扩增

以细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3')扩增土壤细菌16S rDNA, 扩增片段长度为1.5 kb。PCR反应体系体积为50  $\mu\text{L}$ , 包括10 $\times$ PCR缓冲液(plus  $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{L}$ ; dNTPs (25 mM) 4  $\mu\text{L}$ ; 引物27F和1492R(5  $\mu\text{M}$ ) 各2  $\mu\text{L}$ ; *LA-Taq* DNA聚合酶2.5 U; 模板5  $\mu\text{L}$ , 分别采用土壤DNA溶液和土壤DNA溶液10、50和100倍稀释液。反应条件为: 94℃预变性10 min; 94℃变性1 min, 60℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸10 min。PCR产物用经EB染色的1%琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.5 构建16S rDNA文库

采用凝胶回收试剂盒纯化16S rDNA 基因片段, 然后通过 pMD19-T Vector System试剂盒连接在载体上, 转化大肠杆菌JM109感受态细胞。涂布到含有氨苄青霉素(Ampicillin)/IPTG/X-Gal的LB固体培养基上, 37℃下培养16–24 h, 白色克隆子即为阳性转化子。4℃保存, 备进一步PCR扩增用。

#### 1.6 转化子16S rDNA的PCR扩增、RFLP分析和测序

从平板上直接挑取一环单菌落菌苔, 加至100

$\mu\text{L}$ 灭菌去离子水中, 吹打混匀, 100℃水浴10 min, 12,000 rpm, 4℃离心10 min, 取上清直接作为PCR扩增模板。16S rDNA扩增引物为: pMD19-T Vector通用引物BacBEST RV和SP6W, 由上海生工生物工程公司合成。扩增体系包括10 $\times$ PCR缓冲液(plus  $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (25 mM) 4  $\mu\text{L}$ , 引物BacBEST RV(5  $\mu\text{M}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 引物SP6W(5  $\mu\text{M}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , *LA-Taq* DNA聚合酶2.5 U, 模板5  $\mu\text{L}$ , 无菌ddH<sub>2</sub>O补至总体积50  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94℃预变性10 min; 94℃变性1 min, 60℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸10 min。取5  $\mu\text{L}$  PCR产物用经EB染色的1%琼脂糖凝胶电泳检测。扩增到1.5 kb大小片段的PCR产物取5  $\mu\text{L}$ , 用1 U限制性核酸内切酶*MspI*在37℃下酶切1 h, 加EDTA终止酶切反应, 经EB染色的2%的琼脂糖凝胶分离酶切片段, 凝胶成像仪采集照片。选取酶切结果不同的PCR产物, 经纯化后测序, 测序反应由上海生工生物工程公司完成。

#### 1.7 16S rDNA文库的Rarefaction分析

利用aRarefactWin软件进行Rarefaction分析, 检测16S rDNA克隆文库的充分性。

#### 1.8 系统发育分析与序列号

将16S rDNA序列提交到RDP-II(Ribosomal Database Project)数据库, 利用在线工具CHECK-CHIMERA 检验嵌合体; 应用BLAST程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)搜索相似序列, 进行系统发育分析。将测定的序列和部分网上下载的16S rDNA序列采用ClustalX Version 1.83软件进行多重比对, 通过MEGA3.1软件分析多重比对结果, 采用Neighbor-Joining方法构建系统发育树。

16S rDNA序列在GenBank核苷酸数据库中的注册号为EU589248–EU589321。

## 2 结果

#### 2.1 土壤样品微生物计数和理化特性分析

土壤样品中细菌、放线菌和真菌数量分别为 $4.75 \times 10^7$ 、 $4.90 \times 10^6$ 、 $2.45 \times 10^5$  cfu/g干土。土壤含水量9.07%, pH值6.4, 有机质含量19.7 g/kg, 全氮含量1.35 g/kg。

#### 2.2 土壤样品总DNA的提取、测定和16S rDNA扩增

本研究采用直接裂解法提取土壤样品中的总

DNA, 获得大于23 kb的DNA片段。粗DNA溶液的颜色为浅褐色, 含有腐殖酸等杂质。经纯化后的DNA溶液为无色。DNA得率为4.68  $\mu\text{g/g}$ 干土, A260/A280为1.87。以纯化后的土样总DNA作模板进行16S rDNA扩增, 结果发现: 以不经过稀释和稀释10倍的DNA溶液为模板均能够扩增出1.5 kb目的条带, 但有非特异条带出现; 而稀释50倍和100倍的DNA溶液为模板均可扩增出单一的1.5 kb目的条带, 其中稀释50倍扩增出的条带稍微亮一些。PCR扩增出的片段是土壤样品中所含各种细菌的16S rDNA的混合物。

### 2.3 构建16S rDNA克隆文库和RFLP分析

采用RFLP分析获得的克隆子, 便于快速区分克隆间的相似性。将扩增片段以pMD19-T为载体克隆到*E. coli* JM109, 共获得403个白色转化子。从中随机挑取转化子进行PCR扩增, 将其PCR产物进行RFLP分析。在*Msp*I酶切下, 1.5 kb的细菌16S rDNA片段产生了丰富的多态性。通过对酶切谱带的多态性分析, 得到74种RFLP带型。将其测序后进一步分析16S rDNA的多态性。

### 2.4 16S rDNA文库的Rarefaction分析

通过对16S rDNA克隆文库的RFLP分析, 得到了土壤细菌群落多样性的初步信息。为判断随机分析的192个克隆是否能充分代表土壤中细菌群落的16S rDNA多样性, 将酶切分析16S rDNA得到的RFLP带型(以OTU表示)和所分析的16S rDNA克隆子数进行Rarefaction分析(图1), 发现在完成162个克隆子的酶切后, 检测到新的RFLP带型的几率已显著降至很低水平, 说明随机取样和分析的强度已可以用来检测到克隆文库中的优势RFLP型。理论上, 16S rDNA克隆文库中所代表的各微生物类群比例应反映原始样品中各微生物类群的比例。但是Kemp和Aller (2004)运用多种统计方法分析比较了文献报道的225个来自多种环境的16S rDNA的组成, 发现随着16S rDNA克隆文库库容的增大, 所检测到的OTU的数目总是在增加。这一结果说明在实际克隆文库的构建过程中, 由于PCR反应偏向性等因素的影响, 几乎没有一个克隆文库能完全反映环境样品中微生物的种类和组成。

### 2.5 16S rDNA的测序结果和系统发育分析

将所测得的序列与NCBI数据库中序列采用

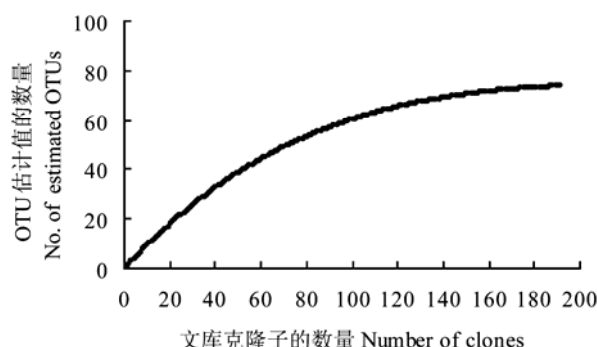


图1 宁夏稻田土壤细菌16S rDNA克隆文库的Rarefaction曲线

Fig. 1 Rarefaction curve for bacterial 16S rDNA clone library derived from paddy soil in Ningxia

Blast程序进行相似性比较分析, 结果发现48%的克隆序列与数据库中已提交的序列相似性介于97–99%, 46.7%的克隆序列相似性介于90–97%, 5.3%的克隆序列相似性介于85–90%。77.3%的克隆序列与环境未培养细菌的相似性最高, 仅有22.7%的克隆序列与数据库中的可培养细菌有较高的相似性。表明文库中大部分细菌克隆属于土壤环境中未培养细菌菌群。

从图2的系统发生树可以看出, 所测得的74个序列分属于12个类群, 其中变形细菌(Proteobacteria)所占比例最大, 为37.8%, 其次为酸杆菌(Acidobacteria)占16.2%, 放线菌(Actinobacteria)占12.2%, 拟杆菌(Bacteroidetes)占10.8%, 绿屈挠菌(Chloroflexi)占10.8%, 浮游霉菌(Planctomycetes)占8.1%, 另外有少量厚壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)细菌克隆, 共占4.1%。在变形细菌的序列中包括 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 和 $\delta$ 共4个类型, 各自比例为: 13.5%、5.4%、12.2%、6.8%。这些结果表明宁夏地区稻田土壤细菌具有丰富的多样性。

## 3 讨论

环境土壤样品总DNA的提取和纯化是后续16S rDNA分析的基础和关键(Richard *et al.*, 2001), 只有获得完整且高质量的土样总DNA才能保证分析结果的准确、可靠。土样中主要污染物为腐殖酸、多糖和酚类化合物, 腐殖酸具有与核酸相似的理化性质, 因此在DNA提取过程中很难完全去除, 而腐

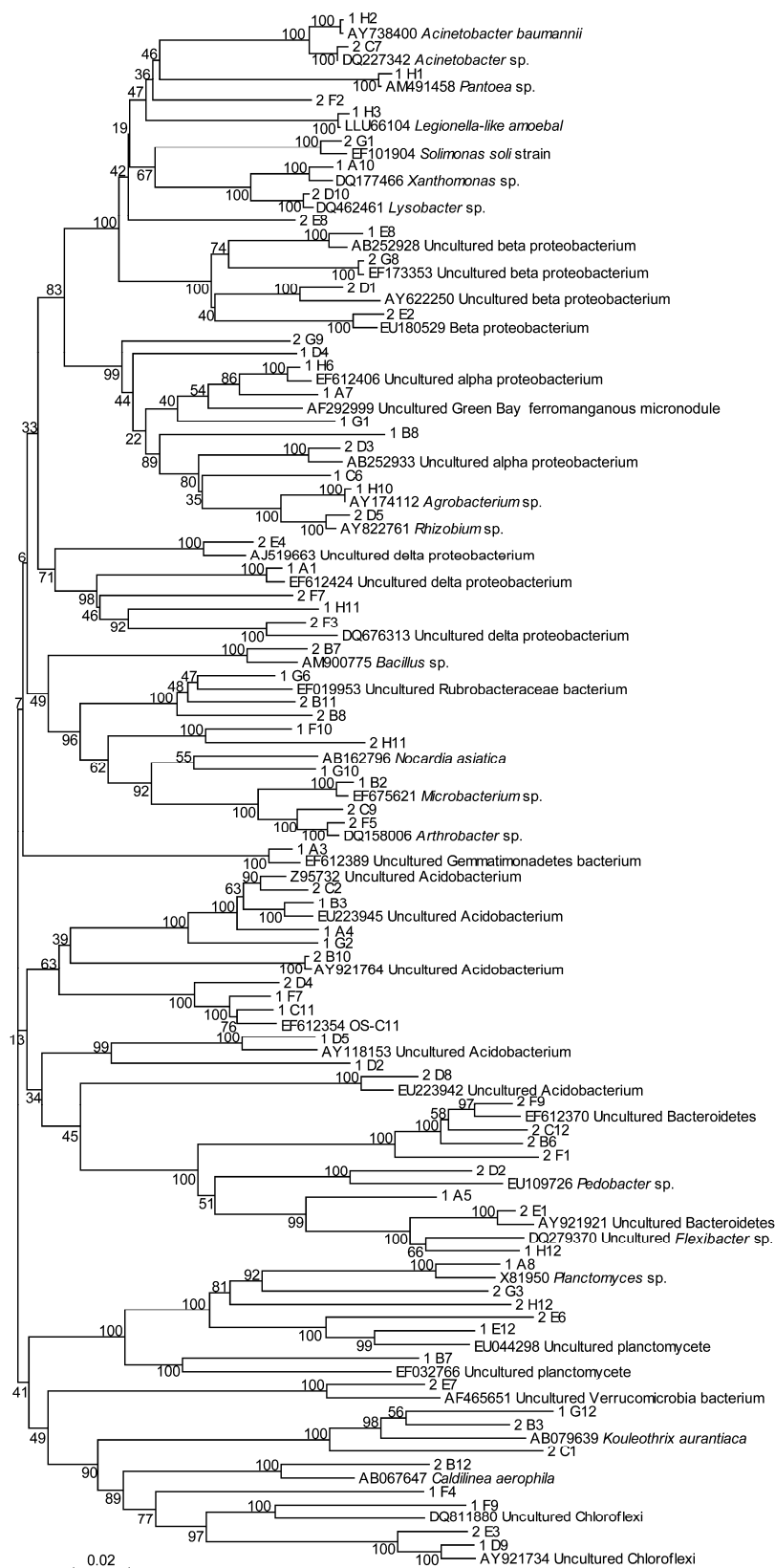


图2 基于16S rDNA序列的土壤细菌系统发育树。图中未标注GenBank数据库注册号的序列为本研究获得的克隆序列。

Fig. 2 A phylogenetic tree of soil bacteria based on 16S rDNA sequences. Sequences without GenBank access number are those obtained in this study.

植酸等杂质含量太高会影响后续的PCR扩增(Timothy *et al.*, 1995)。本研究采用直接裂解法提取DNA, 结合酶裂解和化学裂解法从土壤样品中获得的粗DNA为浅褐色, 含有较多的杂质, 但是经试剂盒纯化后的DNA为无色, PCR扩增反应表明DNA有足够的纯度, 其杂质质量不足以影响DNA聚合酶的活性。

通过研究16S rDNA克隆文库发现: 77.3%的克隆序列与未培养细菌的序列相似性较高。这也进一步证明了土壤中绝大部分细菌还处于不能培养和分离状态, 所以传统的细菌研究方法往往会低估环境细菌的群落组成。而通过建立土壤细菌的16S rDNA 克隆文库, 可以突破传统培养方法的局限性, 直接在分子水平上对细菌多样性进行分析, 使对土壤细菌群落多样性的认识更加全面。

土壤微生物存在丰富的遗传多样性。各类土壤中存在优势细菌类群, 同时又有一定的相似细菌类群(杨官品等, 2000)。一般来说在土壤细菌中变形杆菌是最丰富的细菌菌群。我们构建的系统发生树表明宁夏地区稻田土壤的细菌多态性很高。测得的序列涵盖4种变形杆菌、酸杆菌、放线菌、绿屈挠菌、拟杆菌、浮游霉菌等12个类群, 大部分属于变形杆菌, 其中 $\alpha$ 变形杆菌和 $\gamma$ 变形杆菌为优势类群。这一结果与近年来国内外有关农田土壤中细菌多样性的报道是一致的(滕齐辉等, 2006; 周峻沛等, 2007)。 $\alpha$ 变形杆菌是陆地土壤中的优势菌群(Zhou *et al.*, 1997)。在本研究构建的文库中 $\alpha$ 变形杆菌的克隆最多, 其中2个克隆与土壤杆菌属(*Agrobacterium* sp., AY174112) 和根瘤菌属(*Rhizobium* sp., AY822761) 的相似性分别为99%和98%, 而*Agrobacterium*和*Rhizobium*具有固氮作用, 是植物生长的有益菌。 $\gamma$ 变形杆菌有很强的适应性, 在不同环境中均有广泛分布(Katrin *et al.*, 1999), 包括很多动植物病原菌, 同时也存在很多能够抑制植物致病菌的有益菌。本研究中有2个克隆序列分别与 $\gamma$ 变形杆菌中分离自温室菜地的溶杆菌(*Lysobacter* sp., DQ462461, 相似性98%)和成团泛菌(*Pantoea agglomerans*, AY691543, 相似性99%)同源性很高。姜英华等(2005)分离到一株产酶溶杆菌能够防治番茄青枯病, 成团泛菌CPA-2 (*Pantoea agglomerans* CPA-2)被制成生防制剂用于保存收获后的水果(Costa *et al.*, 2002)。

植物根系、土壤环境和微生物类群具有相互选择性(张薇等, 2007)。实验发现该稻田土壤pH值为6.4, 呈微弱酸性, 适宜水稻生长。在聚类分析中发现所测得的序列中有较多的酸杆菌分布, 所占比例达16.2%, 比 $\alpha$ 变形杆菌(15.2%)和 $\gamma$ 变形杆菌(12.2%)都高, 分析可能是弱酸性的土壤环境有利于某些酸杆菌的生长。酸杆菌是新近分出的一类细菌, 目前对它们研究还很少, 其在遗传和代谢上具有很高的多样性, 并在土壤等生态系统中具有重要作用(Zhou *et al.*, 2003)。研究发现酸杆菌主要分布于陆地、海洋沉积物和活性淤泥等处(Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2002), 主要为不可培养的微生物。本研究发现文库中所测得的克隆均与环境中未培养的酸杆菌相似性较高, 其特定的生态功能有待进一步研究。

## 参考文献

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**, 143–169.
- Chen ZY (陈中云), Min H (闵航), Wu WX (吴伟祥), Chen MC (陈美慈), Zhang FD (张夫道), Zhao JQ (赵兼强) (2003) Effects of pesticide-contamination on population size and denitrification activity of denitrifying bacteria in paddy soils. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **14**, 1765–1769. (in Chinese with English abstract)
- Chen ZY (陈中云), Min H (闵航), Zhang FD (张夫道), Zhao BQ (赵秉强) (2004) Effects of pesticide-contamination on population and activity of sulfate-reducing bacteria in paddy rice soils. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), **41**, 97–102. (in Chinese with English abstract)
- Chin KJ, Lueders T, Friedrich MW, Klose M, Conrad R (2004) Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. *Microbial Ecology*, **47**, 59–67.
- Collins HP, Rasmussen PE, Douglas CLJ (1992) Crop rotation and residue management effects on soil carbon and microbial dynamics. *Soil Science Society of America*, **56**, 783–788.
- Costa E, Usall J, Teixidó N, Delgado J, Viñas I (2002) Water activity, temperature, and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**, 1082–1088.
- Graff A, Stubner S (2002) Isolation and molecular characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria from an Italian rice field soil. *Systematic and Applied Microbiology*, **26**, 445–452.
- Gundula E, Martin K, Peter F (2005) Comparing field and mi-

- crococsm experiments: a case study on methano- and methylo-trophic bacteria in paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **51**, 279–291.
- Jiang YH (姜英华), Hu BS (胡白石), Liu FQ (刘凤权) (2005) Selection and identification of antagonistic bacteria against soil-borne plant pathogens. *Chinese Journal of Biological Control* (中国生物防治), **21**, 260–264. (in Chinese with English abstract)
- Katrin R, Kerstin S, Jakob P, Rudolf A (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3982–3989.
- Kemp PF, Aller JY (2004) Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, **47**, 161–177.
- Kent AD, Triplett EW (2002) Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, **56**, 211–236.
- Li H (李慧), Zhang Y (张颖), Su ZC (苏振成), Xu H (徐慧), Kravchenko I, Zhang CG (张成刚) (2006) Analysis of bacterial genetic diversity in paddy soil in Shenfu irrigation zone irrigated with waste water from petroleum industry—by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), **43**, 972–980. (in Chinese with English abstract)
- Richard AH, Qiu XY, Wu LY, Roh Y, Palumbo AV, Tiedje JM, Zhou JZ (2001) Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied Environmental Microbiology*, **67**, 4495–4503.
- Rosello MR, Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**, 39–67.
- Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S (2002) Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, **211**, 7–11.
- Teng QH (滕齐辉), Cao H (曹慧), Cui ZL (崔中利), Wang Y (王英), Sun B (孙波), Hao HT (郝红涛), Li SP (李顺鹏) (2006) PCR-RFLP analysis of bacterial 16S rDNA from a typical garden soil in Taihu region. *Biodiversity Science* (生物多样性), **14**, 345–351. (in Chinese with English abstract)
- Timothy MS, Ian LP, Charles PG (1995) Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil. *Water Science and Technology*, **31**, 311–315.
- Torsvik V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, **5**, 240–245.
- Wang Y (王英), Teng QH (滕齐辉), Cui ZL (崔中利), Sun B (孙波), Cao H (曹慧), Hu F (胡锋) (2007) Diversity and spatial distribution of bacteria in non-tillage paddy fields. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), **44**, 137–143. (in Chinese with English abstract)
- Werner L, Sylvia S, Niels PR (2000) Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**, 625–645.
- Yang GP (杨官品), Nan L (男兰), Jia HB (贾海波), Zhu YH (朱艳红), Liu YJ (刘英杰), Zhang K (张凯) (2000) Bacterial genetic diversity in soils and their correlation with vegetation. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), **27**, 278–282. (in Chinese with English abstract)
- Zhang W (张薇), Hu YG (胡跃高), Huang GH (黄国和), Gao HW (高洪文) (2007) Soil microbial diversity of artificial peashrub plantation on North Loess Plateau of China. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), **47**, 751–756. (in Chinese with English abstract)
- Zhao JQ (赵兼强), Zhang FD (张夫道), Chen MC (陈美慈), Wu WX (吴伟祥), Min H (闵航), Chen ZY (陈中云) (2003) Effects of pesticide-contamination on population size and denitrification activity of denitrifying bacteria in paddy soils. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **14**, 1765–1769. (in Chinese with English abstract)
- Zhong WH (钟文辉), Cai ZC (蔡祖聪), Yin LC (尹力初), Zhang H (张鹤) (2007) The effects of the long-term application of inorganic fertilizers on microbial community diversity in rice-planting red soil as studied by PCR-DGGE. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), **27**, 4011–4018. (in Chinese with English abstract)
- Zhou JP (周峻沛), Zou CS (邹长松), Gu YQ (顾英琦), Mo MH (莫明和) (2007) Phylogenetic diversity of bacteria in fungistasis soil determined by 16S rDNA-RFLP analysis. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences)* (云南大学学报自然科学版), **29**, 424–429. (in Chinese with English abstract)
- Zhou JZ, Davery E, Figure JB, Rivkina E, Gilichinsky D, Tiedje JM (1997) Phylogenetic diversity of a bacteria community determined from Siberian tundra soil DNA. *Microbiology*, **143**, 3913–3919.
- Zhou JZ, Xia BC, Huang HS, Treves DS, Hauser LJ, Mural RJ, Palumbo AV, Tiedje JM (2003) Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 915–924.

(责任编辑: 东秀珠 责任编辑: 时意专)