

土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征

夏北成^{1,3}, Zhou J, Tiedje J M³

(1. 中山大学环境科学研究所, 广州 510275; 2. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA; 3. Center for Microbial Ecology, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA)

摘要:以 16S rDNA 分析方法为基础, 获得来自不同土壤环境的细菌克隆群落(Cloning community), 并分析了这些土壤细菌群落结构特征。在不同土壤环境中, 细菌种类非常丰富, 但其多样性将受到植被、土壤水分或土壤层次等因子的影响。表层土壤环境中细菌种类最丰富, 多样性最高, 且基因型中无明显的优势类群。不同土壤环境间细菌群落的相似性较低, 表明群落结构以及空间隔离的复杂性。

关键词:土壤环境; 细菌群落; 克隆群落; 克隆多样性

Structures of bacteria cloning communities in the soil environment and their ecological characteristics

XIA Bei-Cheng^{1,3}, Zhou J.², Tiedje JM³ (1. *Institute of Environmental Science, Zhongshan University, Guangzhou, 510275, China*; 2. *Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA*; 3. *Center for Microbial Ecology, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA*)

Abstract: Some bacteria (eubacteria) cloning communities from different soil environments were obtained with a molecular method based on 16S rDNA analysis. The ecological characteristics of these cloning communities were analyzed. In the soil environments, bacteria species or strains are very abundant. The diversities are related to the vegetation, soil moisture and depth. There are the most abundant species and highest diversity in the surface soil environment, where no dominant gene pattern was observed. There are very few overlap gene patterns among bacteria communities from different soil environments. It shows that the structures of soil bacteria communities are complex.

Key words: soil environment; bacteria community; cloning community; cloning diversity

文章编号: 1000-0933(2001)04-0574-05 中图分类号: Q938.1 文献标识码: A

以分子生物学为基础的土壤微生物群落研究为微生物生态学研究提供了一种新的方法。过去由于研究手段的局限, 对微生物群落及其生态学的研究没有大的进展, 因此对土壤微生物群落的结构、生态功能和环境功能的了解具有一定的局限性。分子生物学方法的发展及其在微生物生态学领域的应用, 给微生物生态学研究的发展提供一个新的契机^[1~3]。

传统的微生物学研究方法从环境中获得的微生物种类非常少, 因为环境样品中的绝大多数微生物种类不能在人工培养基上培养生长。几乎没有人工培养基可以培养环境微生物群落中 10% 的微生物种类^[2,4], 因此利用传统的微生物学研究方法研究环境中微生物群落的多样性时, 必将失去大部分的物种信息, 从而使得研究结论不够全面。分子生物学方法直接从环境样品中获取生命信息物质-DNA, 克服了传统微生物学利用人工培养基培养微生物细胞的研究方法的缺陷, 所获得的微生物群落中的物种数量不受培养基的限制, 可得到更为全面的生物信息。

本文以从环境样品中获得的 DNA 为基础, 以 16S rDNA 分析技术为基本方法, 得到不同环境样品的

收稿日期: 1999-03-08; 修订日期: 1999-12-03

作者简介: 夏北成, 男, 湖南人, 博士。主要从事环境微生物学研究。

万方数据

细菌克隆群落(Bacteria cloning community),并在克隆群落的基础上研究和分析土壤细菌群落结构及其生态学特征。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

样品取自美国密西根州立大学的生物实验站的长期生态观测点和美国能源部(DOE)的实验基地,如弗吉尼亚州的 Abbott's Pits。表层及表层以下土壤是采用经蒸汽清洁过的 Lexan 直线取样器及音速钻孔技术,以获得深层的土壤样品。

土柱取出后,取一定量的土壤作为一个样品,立即放入冷藏盒内,带回实验室,置于 -20°C 下,以避免其中的细菌群落发生大的变化。土壤样品在 -20°C 储存至处理分析的时间不超过 2 星期。

1.2 DNA 提取及克隆

采用液氮研磨和加 SDS 的方法从环境土壤样品中直接提取细菌类 DNA,通过采用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 DNA,并进一步用微型过滤柱纯化^[5,6]。

获得纯度较高的 DNA 提取物后,采用 PCR 技术,并选用较适宜的引物对其进行扩增。通过 TA 克隆技术将扩增的 16S rDNA 转移至 *Escherichia coli* 中,将 16S rDNA 分开,对携带目标基因 16S 片段的 *E. coli* 克隆细胞进行群落分析^[6,7]。

1.3 RFLP 分析

RFLP 分析即为限制性内切酶消化 DNA 片段的长度多态性图像分析方法(Restriction fragment length polymorphism)。通过克隆过程所获得的携带 16S rDNA 的克隆细胞就是这一分析过程的基本对象。

1.3.1 PCR 扩增 直接将克隆细胞作为 PCR 扩增的模板,将所获得的所有克隆细胞中的 16S rDNA 扩增到足够的数量。

1.3.2 消化 根据土壤细菌群落结构的特点,选用 *Msp* I, *Rsa* I 和 *Hha* I, *Hae* III 两组限制性内切酶,对被扩增的每一个克隆细胞的 PCR 产物进行消化。消化温度为 37°C ,时间为 5~12h。当用第 1 组酶(*Msp* I, *Rsa* I)消化后所得的基因图像相同时,继续用第 2 组酶(*Hha* I, *Hae* III)进行消化。

1.3.3 电泳 制备 3.0%~3.3%的 Metaphor 琼脂糖胶,在 4°C 下用硼酸缓冲液进行电泳,将消化了的 16S rDNA 的不同大小片段进行分离,通过照像机和电脑获得电泳胶的基因片段多态图像文件。

1.3.4 图像分析 电泳分离后所获得的基因图像用电泳图像分析软件——GelCompar 进行分析。首先对每一个克隆产生的电泳胶图像进行标准化,使得所有克隆之间的基因图像具有可比性,消除因电泳而产生的 DNA 片段运动距离的偏差。其次是确认并标记每一个克隆的基因图像中的所有不同大小的 DNA 片段,最后以基因片段多态图像为基础进行聚类,根据不同图像间的相似性将所有的图像聚合成一个聚类树。通过聚类分析而被聚合到一起的具有相同的基因图像的克隆需要用第 2 组限制性内切酶进行消化与电泳分离。当第二次所获得的基因图像仍然相同时,则认为它们是相同的基因型。每一个基因型称为一个操作分类单位(OTU,Operational Taxonomic Unit)或称为唯一基因型。

2 结果分析

2.1 土壤环境中细菌种类丰富

微生物种类在环境中的丰富程度是一个具有重要意义的生物学和生态学指标。过去由于传统的微生物学研究方法的局限,对环境中微生物种类的多少,一般只是想象为非常丰富,但并没有具体的数量概念。本项研究自 1995 年起,至 1999 年已经对多个来自不同环境的土壤样品进行了分析和研究,获得了丰盛度极高的土壤细菌的克隆群落。部分克隆群落的丰盛度如表 1 所示。

从表 1 中的数字可知,土壤环境中的细菌种类(菌株)十分丰富,用分子生物学方法所获得的每一个样品的克隆群落中数以百计的基因型就是直接的证据。

表 1 中的 OTU 值与克隆数几乎在同一数量级上,除了样品 AB-4 和 D1-4 以外。这里的唯一基因型(OUT)虽然不能确定种类,但其丰盛度是可以肯定的。表 1 中的数值并不是细菌种类的极限值,因为工作量和时间的局限,从每个土壤样品中获得的 DNA 并没有全部被用于克隆,且获得的克隆细胞也没有全

部进行 RFLP 分析。据此可以想象,土壤中细菌种类的数量远远在表 1 所列数值以上。

表 1 部分土壤样品的克隆群落及其 OTU 数量

Table 1 Number of clones and OTUs of some samples

样品代号 Code of samples	KBS-1	KBS-2	KBS-3	KBS-4	AB-1	AB-4	D1-1	D1-4	DBO
克隆数 Number of clones	606	705	210	324	678	252	397	217	920
OTUs	551	684	191	311	665	84	362	85	886

2.2 群落多样性高

从研究结果可知,土壤环境中不仅细菌种类丰富,而且群落结构是稳定型的高多样性结构。表 1 所列数据表明,大部分情况下 OTU 与克隆总数的比值都在 0.9 以上;其中样品 AB-4 和 D1-4 是深层土壤样品,其群落结构受其他生态因素的影响,而不同于表层的群落。

获得 OTU 最多的 3 个样品为 DBO、KBS-2 和 AB-1。根据多样性指数(香农指数)的计算,除了样品 AB-4 和 D1-4 以外,其余各样品的多样性指数均在 2.0 以上。很显然,多样性指数比一般情况的其他生物群落要高很多。

土壤环境中细菌群落结构的稳定对维持土壤环境的稳定具有积极的意义。土壤细菌群落的生态功能将与具体的群落和土壤环境有关;一般而言,对土壤中各类有机物质的分解,特别是对有机污染物质的降解具有重要意义,在环境科学中受到重视。

2.3 植被对群落结构的影响

在有植被影响的土壤环境中,某些生态因子将有利于土壤微生物种群的活动,如经植物根系活动而改造的土壤粒子的结构,植物根系活动时的代谢产物,以及植物根系对水分的涵养等。研究表明,有植被覆盖的土壤环境中,细菌种类的丰盛度比无植被土壤中的要高得多。表 1 中的 KBS-1 和 KBS-2 是属于有丰富草本植物活动的表层土壤环境,而 KBS-3 和 KBS-4 的土壤环境中缺少草本植物。前者比后者有多得多的细菌种类(OTU)。

在同一个取样点上,表层和表层以下土壤所受植被活动的影响的差别很大。表层土壤的受植被,特别是草本植物的影响很大,而表层以下土壤所受的影响要小得多。表 1 中样品 AB-1 和 AB-4 的细菌群落的差异可以认为是因为土壤层次不同而引起的。AB-1 为表层土壤环境,而 AB-4 为土壤深度在 4m 左右的土壤环境。两个土壤环境的微生态条件差别很大,所得的两个细菌群落的结构也是不同的。D1-1 和 D1-4 也是与上述两个样品类似的不同土壤层次的样品,两者的细菌群落的差异也与样品 AB-1 和 AB-4 间的差异类似。

2.4 土壤层次与优势种群

经过对不同土壤层次(深度)样品的分析与研究,发现在不同层次的土壤环境中细菌群落的结构发生明显的变化。当土壤层次达到水分饱和或者地下水水位线以下时,细菌群落中就出现有明显优势的种群,本项研究中表现为优势 OTU 的优势度逐渐增加。表 2 中的几个参数可以说明这个变化。

随着土壤深度的加深,土壤环境越稳定,水分越充分。而表层的土壤环境所受到的自然的和人为的干扰非常剧烈,如下雨、霜冻、蒸发、机械翻耕、种植作物、施用农药和化肥等都会对表层环境产生直接的作用。土壤结构、土壤水分和营养等也同时剧烈地波动。在这种剧烈波动的环境中,很难出现一个稳定发展的优势种群,而适应不同环境的细菌种类就可能建立种群,但却只能维持在一个较低的种群发展水平。

从表中优势 OTU(视为一般概念上的种群)的克隆个数的变化来看,表层土壤没有明显的优势种群;在表层以下环境中,随着土壤层次深度的增加,优势 OTU 种群的数量显著增加,优势种群中的克隆数占群落克隆总量比例数据越大,如样品 AB-5 和 D1-8 中一个优势(OTU)的个体数量占整个群落个体总数的 20% 以上。

表 2 不同土壤层次细菌群落优势种群参数比较

Table 2 Comparing of some bacteria community's parameters in different depth of soil											
样品代号 Code of samples	KBS-1	KBS-2	AB-1	AB-2	AB-3	AB-4	AB-5	DBO	D1-1	D1-4	D1-8
土壤深度(cm) Depth of soil	5	15	5	157	325	404	750	50	50	410	750
总克隆数(C) (个) Total clones	606	704	687	54	74	250	204	920	397	217	218
OTU 数(O) (个) Number of OTUs	551	685	665	33	36	85	74	886	362	85	56
优势 OUT 克隆个数(个)(Y) Clones of the dominant OTU	7	2	3	5	10	36	41	7	4	24	46
O/C	0.91	0.97	0.97	0.61	0.49	0.34	0.36	0.96	0.91	0.39	0.26
Y/C	0.012	0.003	0.004	0.09	0.14	0.14	0.20	0.008	0.01	0.11	0.21

2.5 重叠 OTU

另一个能间接说明土壤环境中细菌群落种类丰富的参数是各群落之间出现的基因型图象相同的 OTU。比较来自不同环境的 OTU 群落中相同的 OTU 数量,当两个群落间相同的 OTU 多时,说明群落之间重叠较大,具有较多的相同的种群,群落间相似性高。反之,群落之间的相似性就小(见表 3)。

表 3 来自不同环境的样品的 OTU 重叠

Table 3 Overlap OTUs between different samples												
样品代号 Code of samples	AB-1	AB-2	AB-3	AB-4	AB-5	D1-1	D1-4	D1-8	J1	J2	O1	O2
OTU 数量 Number of OTUs	665	33	36	85	74	362	85	56	255	96	140	210
重叠 OTU 数 Overlap OTUs	0	0	7	11			3	14		5		4

从表 3 的数据可知,表层土壤环境中与表层以下土壤环境中的细菌群落间重叠的 OTU 少,而表层以下土壤环境中细菌群落之间则重叠的 OTU 较多,群落之间具有较高的相似性。如 AB-5 样品有 15%的 OTU 与 AB-4 中的 OTU 相同,D1-8 样品则有 20%的 OTU 与 D1-4 中的 OTU 相同(重叠)。

除了表 3 中部分样品属于同一取样点的不同土壤层次之间的比较外,还曾对不同取样点之间的样品的 OTU 进行过比较。如样品 J1 和 O1 之间,仅有 5 个重叠的 OTU,J2 和 O2 之间同样是 5 个重叠的 OTU。4 个样品间的优势 OTU 是重叠的。

3 讨论

从以上的结果分析可知土壤环境中细菌种类极其丰富,且群落的多样性很高。在数以千计的 OTU 中估计将有很多是人们没有认识的细菌种类,有待进一步研究发现。

3.1 无竞争多样性

从上面分析的结果可以看出,表层土壤细菌群落的 OTU 数量比表层以下土壤细菌群落的 OTU 要多很多,且从各 OTU 的克隆数量来看没有具显著数量优势的 OTU,是一个均匀度很高的特殊群落。在这个群落中没有任何一个种群的数量占绝对的优势。也就是说,所有种群(以 OTU 而言)在群落中的生态地位是相似的。在竞争多样性中种群与种群之间的竞争作用较弱。每个种群对群落多样性的贡献基本相同。根据多样性指数的计算公式,这样可使群落的多样性指数达到极大值。

表层土壤环境除了上面分析的由于植被活动、水分等生态因子的变化以外,表层土壤环境空间结构的异质性也是一个很重要的直接作用于细菌群落的生态因子。表层土壤环境结构复杂,土壤颗粒性质差异较大。表层土壤中既有土壤母质,又有非母质的成分,如有机质、腐殖质和生物残骸等。不同的颗粒物的粒径、电荷、空隙度、吸附力等都有很大的差异。

表层土壤环境将随着大的空间环境而出现较剧烈的水分含量的变化,从而引起空间隔离。当水分很少时土壤颗粒表层丧失水膜,微生物在颗粒间的交流将被大大减弱。因此在表层土壤环境中的细菌种群必须采取保存种群的最佳策略,使种群在低水平上维持平衡。

3.2 群落结构与取样空间

从本文中的结论来看,群落结构还将与取样的空间有关,各样品之间的 OTU 种群重叠很少,特别是表层土壤这一特殊环境中的细菌群落,不同样品之间出现很少的重叠,说明定义土壤细菌群落的空间还有待进一步研究。本文研究的样品均为 5g 土壤,5g 土壤的母样本一般为 100g 左右的土壤样品。

有待研究更大样品(取样范围更大、样品土壤量更多)和更小样品的土壤细菌群落结构。首先是考虑从更大的样品所获得的克隆是否更多,或者具有更丰富的细菌种类,从而更小的样品中所获得的克隆与大样品有什么样的关系。用于一般的研究的样品应该从多大的空间上获得,样品应该有多大,才能获得一个能更加准确表达土壤细菌群落的概念。当然,取大样品进行研究将要付出更大的努力,例如处理更多的克隆,同时分子生物学方法所能处理的实验样品也只能是大样品的一小部分。

3.3 克隆群落与实际群落

本文所获得的结论都是以克隆群落为基础。克隆群落是通过分子生物学方法所获得一个带有不同基因的 *E. Coli* 群体。这个群体以相等的概率携带有来自自然土壤环境的各种基因,即通过分子生物学方法所获得的 16S rDNA。从克隆群落到真实群落还需要对每一个 OTU 种群的 16S rDNA 进行序列分析。由于所获得的 OTU 数量很大,这部分工作正在努力之中。另外,由于 OTU 数量大,现有的基因库不能满足要求,工作还将遇到困难。

一般而言,若旨在进行一般生态学规律研究,克隆群落可以满足基本要求。但是,若要深入研究某一个具体种群在群落中的生态功能时,克隆群落就难以满足要求。不管怎么样,克隆群落对于开展微生物生态学的研究是一个有效的方法,摆脱了过去因研究方法而对研究工作的束缚。

参考文献

- [1] Akkerman A D L S, Mirza M Sajjad, Harmsen J M H, *et al.* Molecular ecology of microbes: A review of principles, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, **15**: 185~194.
- [2] Ringelberg D B, Sutton S, White D C. Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997, **20**: 371~377.
- [3] Fredrickson J K, McKinley J P, Nierzwicki-Bauer, *et al.* Microbial community structure and biogeochemistry of miocene subsurface for long term microbial survival, *Molecular. Ecology*, 1995, **4**: 619~626.
- [4] Smith G A, Nickels J S, Kerger B D, *et al.* Quantitative characterization of microbial biomass and community structure in subsurface material: a prokaryotic consortium responsive to organic contamination. *Canadian Journal of Microbiology*, 1986, **32**: 104~111.
- [5] Zhou J, Brune M A, Tiedje J M. DNA recovery from soil of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 316~322.
- [6] 夏北成, Zhou J, Tiedje J M. 植被对土壤微生物群落结构的影响. *应用生态学报*, 1998, **9**(3): 296~300.
- [7] 夏北成, Zhou J, Tiedje J M. 分子生物学方法在微生物生态学中的应用. *中山大学学报*, 1998, **37**(3): 97~101.