

农业土壤微生物基因与群落多样性研究进展

孔维栋, 朱永官*, 傅伯杰, 陈保冬, 童依平

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要:介绍了群落基因组多样性、结构多样性与功能多样性相互关系的研究方法, 重点论述了近年来农业土壤微生物群落遗传、结构与功能多样性的研究进展。同时总结了耕作措施和养分管理对农业土壤微生物群落多样性的影响, 提出微生物序列分析、比较基因组学和微生物芯片技术与传统研究技术结合将有助于对微生物群落结构与功能和生物与环境因素对土壤微生物群落影响的深刻理解。

关键词:土壤微生物; 群落; 多样性; 功能

A review on microbial gene and community diversity in agricultural soil

KONG Wei-Dong, ZHU Yong-Guan, FU Bo-Jie, CHEN Bao-Dong, TONG Yi-Ping (Research Center for Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(12): 2894~2900.

Abstract: Soil is a complex and dynamic system and sustains an immense diversity of microbes. All life forms rely on microbial processes for their survival. Microbial diversity is greater than the diversity of any other group of organisms. Microbes are responsible for diverse metabolic functions that affect soil and plant health. However microbial diversity, to a large extent, is unexplored.

A range of novel methods based on rRNA and rDNA analysis have revealed parts of soil microbial diversity. The key problem posed by the link between microbial diversity and soil function is to understand the relations between genetic diversity or community structure and community function. A better understanding of the relations requires not only the application of more accurate assays for taxonomical and functional characterization of DNA and RNA extracted from soil, but also high-resolution techniques with which to detect inactive and active microbial cells in the soil matrix. Subsequently the application of DNA microarray and stable isotope probe will provide huge amounts of new data, potentially improving our understanding of the structure and function of soil microbial community, and the interactions that occur within them. The next step is to acquire genomic, functional and evolutionary information from bacterial artificial chromosome libraries of soil microbial community genomes.

This paper summarized the recent progress in studies of soil microbial communities with focus on novel approaches that provides insight into the relationship between structure and function. The effects of agricultural practices (cropping cultivation and nutrient management) on soil microbial community were also reviewed. At the end of this paper, key points of further research foci on microbial community in agricultural soils were suggested as follow: I. The novel approaches for determining the functional diversity; II. The mechanisms of interactions between microbes and plant and the co-evolution of microbes/plant; III. The response of soil microbial community to nutrient management and the ways modulating the microbial community; IV. The mechanisms of microbial responses to environmental stresses (such as pollutants); V. The interactions between soil microbial community and global changes.

Key words: soil microbe; community; diversity; function

文章编号: 1000-0933(2004)12-2894-07 中图分类号: Q938.1 文献标识码: A

土壤生态系统是保证动植物生存、农业健康、持续发展的基础^[1], 对全球环境变化有着深远的影响。土壤微生物群落是土壤中的活性组分, 包括细菌、真菌、放线菌和原生动物、病毒和小型藻类^[7]。每克土壤中栖息着大约 100 亿个微生物^[8], 但在显微镜下观察到的微生物不到 1% 可以培养^[9]。土壤微生物对全球生态系统功能如养分运转^[2]、有机质分解、土壤结构维持、温室气体产生^[3]、环境污染物净化^[4]的调节发挥着重要作用。因此, 在一定程度上全球生态系统的变化与土壤微生物群落密切相关。根据

基金项目:国家自然科学基金委创新群体资助项目(40321101)

收稿日期: 2004-04-20; **修订日期:** 2004-10-26

作者简介: 孔维栋(1976~), 男, 河北沧州人, 博士生, 主要从事环境微生物分子生态学研究。E-mail: weidongkong@sohu.com

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: ygzhu@mail.rcees.ac.cn

Foundation item: Innovation research group supported by the National Sciences Foundation of China (No. 40321101)

Received date: 2004-04-20; **Accepted date:** 2004-10-26

Biography: KONG Wei-Dong, Ph. D. candidate, mainly engaged in molecular ecology for environmental microbiology.

联合国粮农组织的统计,在氮素固定、有机废弃物处理、土壤形成、污染修复及农业害虫的生物防治等方面,全球农业土壤生物每年创造的总价值超过 1542 亿美元^[5]。正是由于土壤微生物在陆地生态系统中的重要性,有关土壤生物多样性的研究得到了广泛的重视。英国自然与环境委员会(Natural Environment Research Council, NERC)于 1999 年启动了土壤生物多样性研究计划,该计划为期 5a^[6]。联合国粮农组织也启动了国际土壤生物多样性计划(Soil biodiversity initiative),开展与土壤生物多样性的评价、管理和保护有关的基础和应用基础研究^[6]。这些研究为全球农业生态系统的可持续利用提供理论依据。

目前生物多样性与生态系统功能及稳定性的相互关系的探讨越来越受到重视和广泛研究^[10~12],但目前绝大部分的研究还是以植物群落为主。最近土壤微生物群落多样性与土壤生态系统功能之间关系的研究也开始起步。van der Heijden 等^[13]研究表明植物多样性与生态系统生产力随土壤中菌根真菌物种数量的增加而增加,土壤微生物与植物间的相互作用推动着生态系统功能的变化如植物群落多样性、产量及其变异性等。Klironomos 等^[14]的研究也发现土壤生物影响植物群落的相对丰富度(Relative Abundance)。Stocking^[15]指出在热带地区土壤微生物多样性越高则农业土壤的肥力也越高,其生产力也较高。Mäder 等^[16]研究发现,与施用化肥的常规耕作相比,有机农业耕作条件下(化肥输入降低 34%、能源输入降低 53%、除草剂用量降低 97%),土壤具有较高的微生物群落多样性,但作物产量仅降低 20%,说明土壤微生物群落多样性较高的有机耕作系统对外界物质输入的依赖性降低。因此,土壤微生物群落一定程度上调节着土壤乃至整个生态系统功能。

本文将综述近年来研究土壤微生物群落的分子生物学方法,重点分析土壤微生物群落基因多样性与功能、群落结构与功能之间的关系,以引起国内对土壤微生物群落基因和功能多样性研究的重视,引发研究者对微生物基因组与功能关系研究的兴趣。此外本文论述了耕作措施对农业土壤微生物群落多样性的影响。

1 土壤微生物群落多样性研究方法

土壤微生物群落多样性指微生物在各个组织水平上的复杂和变异程度,包括微生物数量(丰富度)和相对丰富程度(均匀度)。在生态系统水平上,土壤微生物群落多样性主要研究与微生物相关的过程分析,相互作用复杂程度及各水平食物链数量。因此土壤微生物群落多样性研究方法应该包括微生物群落水平的整体和结构或功能单位的局部测定^[17,18]。简而言之,微生物多样性就是指土壤中微生物种类、数量及其在土壤中的分布信息,根据这些信息可以直接估计土壤微生物群落的总基因多样性或复杂性。

在过去的 20 多年里,分子生物学技术,尤其 16SrDNA 技术已经广泛应用于鉴定未知菌的研究中^[19,20]。微生物群落中鸟嘌呤和胞嘧啶含量可以揭示其群落结构特征^[21],但却不能反应其他多样性指数,如群落丰富度、均匀度及群落组成。基于 PCR 技术的单核苷酸构象多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)检测方法,如温度梯度凝胶电泳(Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE)、变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)、单链构象多态性(Single-Stranded-Conformation Polymorphism, SSCP)、扩增 rDNA 限制分析(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA)、末端限制片段多态性(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)等技术均可提供群落中种类组成信息及比较样品中常见种类的微生物。然而,PCR 技术仍然存在一些问题,如不同引物对不同种类微生物 DNA 的扩增效果不同,容易引起误差^[22,23],且 DGGE 运行时间不同,土壤微生物群落 DNA 的 PCR 产物的 DGGE 带型存在很大差异^[24],因此这些方法不能作为多样性的一个绝对指标^[25]。近年来微生物芯片技术(Microarray)迅猛发展。芯片技术的基本原理是应用已知的核苷酸序列作为探针与标记的靶核苷酸序列进行杂交,通过对信号的检测进行定性与定量分析。该方法快速、简捷且获取的信息量大,微生物群落多样性研究将进入一个崭新的阶段^[26,27]。有关土壤微生物群落多样性研究方法详细信息可参阅 Hill^[28]和 Johnsen^[18]的文章。

1.1 微生物单基因组与群落基因组研究关系

单个种类微生物基因组测序有助于鉴定和表征所有存在的基因,可以了解微生物新的代谢途径、基因调控因素、未知功能基因及对病原菌、病毒和毒品具有抗性的基因^[29],有助于深入了解微生物基因进化过程。但对单个种类的微生物基因序列的了解并不能揭开整个土壤微生物群落的生命过程和功能。土壤中微生物所有的基因可以看做一个大的土壤微生物群落基因组即宏基因组(Metagenome)^[30]。对微生物宏基因组进行研究才能最终揭开土壤微生物群落的价值。利用现代微生物芯片分析技术,对基于比较基因组学的物种多样性的研究将开创生命科学研究的新纪元^[31]。微生物基因组学研究领域下一步的工作应从繁杂的数据中获取微生物进化和功能方面的信息,利用基因技术来解决微生物生态中相关问题。如对一些管家基因(Core Housekeeping Genes)如 rDNA 和功能基因进行对比分析,可以获取土壤微生物群落基因和功能多样性方面的信息。利用芯片技术对土壤微生物宏基因组进行研究,可以了解土壤微生物群落基因表达图谱和新的代谢途径,快捷的探测未知基因的功能,进而追踪一些能够高效表达或控制微生物群落重要功能的一些关键基因。此外,微生物芯片技术有助于认识调控微生物细胞能源供应、电子受体有效性等重要生命过程的因素,深入了解微生物基因进化过程和微生物功能多样性的影响因素。

1.2 土壤微生物群落结构与其功能、活性关系研究方法

目前微生物群落研究面临的最大挑战是如何将微生物群落结构与其功能联系起来。尽管基于 16SrDNA 技术的各种方法提供了大量土壤微生物群落结构的信息,但这些方法并不能提供充足的微生物群落功能方面的信息。群落基因组学分析可以通过研究微生物基因组序列与某些表达特征之间的关系,获得一些微生物功能方面的信息。但同时也需要运用其他方法将特定功能与具有这种特定功能的微生物群落结构对应起来。对 rRNA 表达基因和与环境因素相关的主要酶类的基因进行定量化和比较分析,将能了解微生物结构与特定功能之间的关系,如硝化、反硝化和污染物降解^[32~34]。

根据这种思想一些学者发展了微生物功能基因芯片技术(Functional Gene Microarray)。功能基因芯片技术是利用寡核苷酸探针来探测一些基因的表达或编码一些控制生物地球化学循环的重要酶的基因。因此可以根据具有特定功能且已知基因序列的微生物菌群设计寡核苷酸探针来探测未知环境样品中的微生物群落,确定该样品微生物群落的功能,并将特定微生物群落菌群与其功能联系起来。一些学者在这方面已取得一定进展,找到了编码氮素降解酶^[35]、氨氧化酶^[36]等的基因。

微生物放射技术(Microradioautography)也是近年发展起来的一项研究土壤微生物功能与结构关系的一种方法。该方法根据微生物细胞可利用特定放射性标记物的原理来检测和定量分析微生物活性。为了将特定微生物细胞的多态性与放射性物质的吸收量联系起来,通常将微生物放射技术与荧光原位杂交(Fluorescent In Situ Hybridization, FISH)、基因多态性特异探针和荧光显微镜联合起来研究环境微生物群落。有关微生物放射技术和荧光原位杂交联合应用的研究越来越多^[37~39]。目前分析环境样品中活性微生物群落结构的稳定性同位素技术(Stable Isotope Probing, SIP)在微生物生态研究中也得到广泛应用^[40~42]。SIP 方法的原理是,具有代谢活性的微生物在生长期积累大量¹³C,并在其遗传物质上标记,通过密度梯度离心可以将标记着¹³C 和¹²C 的 DNA 分开,通过研究被分开的不同密度 DNA 的特征,了解环境样品中活性微生物群落基因组特征。因此 SIP 方法为确定具有活性的特定种类微生物的代谢过程提供了强大的技术支持。另外一个研究土壤微生物群落结构及活性的方法是磷酸脂肪酸(Phospholipid Fatty Acid, PLFA)技术。PLFA 技术是通过检测微生物细胞膜中磷酸脂肪酸组成来研究微生物群落结构的一种方法^[43, 44]。磷酸脂肪酸只存在于活体细胞中,细胞一旦死亡,其中的磷酸脂肪酸迅速降解。不同种类微生物的磷脂类脂肪酸的种类和含量不同,因此可以根据磷酸脂肪酸的成分和组成了解活体微生物群落结构信息。一些学者也将同位素示踪技术与 PLFA 技术结合起来研究土壤中特定微生物群落对外界干扰的响应^[45~47]。

1.3 土壤微生物群落功能研究方法

土壤微生物群落功能多样性包括微生物活性、底物代谢能力及与 N、P、S 等营养元素在土壤中转化相关的功能等。碳源利用功能分析在微生物群落功能中研究较多。目前对土壤微生物群落多样性与微生物群落功能之间的关系还了解甚少。微生物利用碳源多样性方法,即 Biolog 方法,是通过测定微生物对 Biolog 微平板中 95 种单一碳源的利用能力来评价土壤微生物群落生理轮廓,测定土壤微生物群落功能多样性^[48]。由于 Biolog 方法快速、简便,该方法已成为研究土壤微生物群落功能的一种常规方法。Degens 等^[49]利用原位代谢功能多样性方法来评价土壤微生物群落短期底物呼吸能力(Catabolic Response Profile, CRP)。他们研究^[50]发现在长期耕作土壤上,代谢多样性低的土壤微生物群落对外界干扰的恢复能力低于代谢多样性高的土壤。较大的外界干扰可以使土壤微生物群落功能多样性产生很大的变化,甚至不能恢复^[51]。

微生物群落功能的另一个重要研究方面是土壤微生物群落稳定性。稳定性包括微生物对外界干扰的抗性(Resistance)和恢复性(Resilience)^[52]。氯仿熏蒸法是一种应用较多的一种方法,其原理是通过氯仿熏蒸杀死部分或全部土壤微生物,人为的调整土壤微生物群落多样性,然后研究土壤微生物群落多样性与土壤功能的关系^[53]。Griffiths 等^[54]研究发现土壤微生物一般的功能(General Function),如有机物料降解和反硝化功能随土壤微生物群落多样性升高而降低,特定功能(Specific Function)如硝化和甲烷氧化功能则随微生物群落多样性升高而升高,但是氯仿熏蒸方法并不能整体降低微生物多样性,而只能杀死一些对氯仿敏感的微生物。另一种调节土壤微生物群落多样性的方法是稀释法。Griffiths 等^[55]发现该方法调节后的微生物群落多样性与微生物群落稳定性如有机物料分解和外源干扰(加热和施入 Cu 污染)之间没有一致的相关性,因此稀释法可能也存在对某类微生物的选择性。目前任何调节土壤微生物群落多样性的方法对微生物种类均有一定的选择性^[56],因此调节微生物群落多样性适宜的方法是研究土壤微生物群落功能与多样性之间关系的一个重要的制约因素。一般认为多种微生物群落多样性调节方法联合应用可能能够更真实的反映微生物群落多样性与功能之间的关系^[55]。

2 农业耕作措施对土壤微生物群落多样性影响

土壤微生物不仅控制着土壤有机质和重要营养元素(如 N、P、S)的生物转化,还深刻影响着土壤物理—化学性质,如土壤团粒结构的形成、pH 变化等,因此土壤微生物对于土壤可持续利用具有至关重要的作用。同样,营养元素、土壤物理化学性质也显著的影响着土壤微生物群落结构、活性及其多样性。不同农业耕作措施对土壤的物理化学性质影响不同,从而影响土壤微生物群落多样性。

2.1 耕作措施

耕作可显著改变土壤物理—化学性质,土壤异质性降低,水分、氧气及 C、N、P、S 等营养元素有效性、土壤结构等发生变化。

不同粒径的土壤颗粒上栖息的微生物种类和数量不同,超过 80% 的细菌生活在稳态微团聚体的空隙中($2\sim 25\mu\text{m}$)^[57],即微生物对土壤颗粒的选择具有专一性。耕作引起土壤结构变化,从而影响土壤微生物群落多样性变化。一些研究表明,与免耕或少耕相比,连续翻耕降低了土壤稳态微团聚体数量,从而降低了土壤微生物群落多样性^[58]。Lupwayi^[59]等比较了小麦本体土壤(Bulk Soil)与小麦根际土壤(Rhizosphere Soil)微生物群落,在不同生长期的代谢多样性后发现,土壤微生物群落功能多样性(Biolog 方法)在营养生长期免耕与常规耕作没有差异,但在旗叶期免耕显著高于常规耕作处理,而这两个处理的根际微生物群落代谢多样性在这两个阶段均无显著差异;在营养生长期小麦收获后种植红三叶草或紫花豌豆处理的微生物群落代谢多样性高于小麦收获后休耕或连续种植小麦处理。这表明休耕和轮作均有利于提高土壤微生物群落代谢多样性,且耕作措施对土壤微生物群落的影响大于对根际微生物群落的影响。

植物根系向土壤中分泌大量有机物质,其残体也提供了丰富的有机物质^[60, 61],从而影响土壤中有机物质的数量和种类。土壤中的有机物质对微生物具有诱导作用,即土壤微生物群落结构及其多样性与土壤中有有机物种类和数量有关^[62~64]。因此植物是土壤微生物群落变化的驱动力^[65],对土壤微生物群落多样性产生显著影响^[56]。Söderberg 等^[66]采用 PLFA 和 Biolog 方法研究发现 *Dactylis glomerata* L., *Phalaris arundinaceae* L., *Phleum pratense* L. 和 *Trifolium pratense* 4 种作物均存在根际效应:根际与土壤微生物群落结构均存在一定差异,且豌豆的根际效应最明显;不同作物根际的微生物群落也各不相同。因此作物生长旺盛期或种植密度较大的土壤中,作物根系分泌物较多而影响整个土壤的微生物群落结构,使作物根际与土壤的微生物群落结构趋于一致^[67, 68]。

植物对土壤微生物群落的影响及植物与土壤微生物群落之间的相关性因植物类型而不同。Johnson 等^[69]应用 Intergenic Transcribed Spacer(ITS)方法研究了美国 San Joaquin 谷地农业土壤微生物群落与作物种类之间的关系发现,在不同土壤上种植葡萄和番茄的土壤微生物群落非常相似,而在不同土壤上种植棉花或红花的土壤微生物群落结构差异很大,说明葡萄或番茄对土壤微生物群落结构影响较大,而棉花和红花对土壤微生物群落影响较小。这与 Song 等^[70]应用磷酸脂肪酸(PLFA)方法研究的结果一致。Miethling 等^[71]在温室条件下在两种土壤上种植黑麦草和紫花苜蓿发现,植物是土壤微生物群落的驱动力,土壤类型对微生物群落影响较小。与此相似,种植油菜和苏丹草的 3 种类型土壤的微生物群落(PCR-DGGE)与这两种植物具有很好的相关性,而种植鹰嘴豆土壤的微生物群落与该植物之间不存在相关性^[72]。

同时,植物对土壤微生物群落的影响也受到土壤本身特性的影响。Alvey 等^[73]采用 PCR-DGGE 方法研究了西非不同类型土壤的氨氧化细菌群落与植物之间的关系后发现,高阳离子交换量,高有机质含量和中性的高缓冲能力土壤的氧化细菌群落受植物影响较小,且种植不同植物的土壤氧化细菌群落相似;而在低阳离子交换量,低有机质含量和酸性低缓冲能力土壤的氧化细菌群落受植物影响显著。此外,菌根真菌对宿主植物根系分泌的有机物质数量和种类具有一定的影响^[74],从而影响土壤微生物群落结构^[75]。因此植物与土壤微生物群落之间的关系是一个综合作用的结果(Context-dependent)^[76]。

2.2 养分管理

有机和无机肥料可提供丰富的 C、N、P、S 等微生物活动所必需的生命元素以及 Fe、Mn 等微量元素,同时肥料的施用对植物根系的生长和生理活性有重要的影响,由于植物的根际效应是与根的生长和代谢直接相关联的,因此,肥料的施用必然要改变作物的根际环境,从而对土壤微生物群落多样性会产生直接和间接的影响。

一般土壤中有机质腐殖化程度较高,能被微生物直接利用的碳源含量低,微生物活性较低^[77],因此有机肥的施入可提供丰富的碳源,刺激土壤微生物的生长。在有机肥料施用初期,大量喜富营养微生物快速生长,但这类微生物种类较少,因此土壤微生物群落多样性降低。随着时间延长,易分解碳源及各种养分含量降低,喜富营养微生物逐渐衰亡,而贫营养微生物及土著微生物大量生长,这类微生物种类较多,因此土壤微生物群落多样性升高,随着时间延长,微生物群落多样性逐渐降低并趋于稳定,接近最初的原始状态^[78, 79]。

长期施用有机肥可保持土壤微生物具有较高的多样性和活性,有利于土壤可持续利用。Fließbach 等^[80]比较了长期施用各种有机肥的有机耕作与施用化肥的传统耕作方式的土壤微生物群落多样性的差异。结果表明,有机耕作土壤微生物群落功能多样性(Biolog 方法)显著高于常规的施用化肥耕作土壤,前者具有较高的代谢能力。O'Flaherty^[81]研究了长期施用污泥和厩肥对土壤微生物多样性的影响,发现二者均能提高土壤微生物的代谢均匀度(Catabolic Evenness)和基因多样性指数(Genetic Diversity),且污泥提高的程度要高于厩肥,但污泥处理的可培养的微生物群落少于厩肥处理,可能是由于污泥中重金属含量高于厩肥。Degens^[82]也研究了施用污泥对土壤微生物多样性的影响,他发现代谢均匀度与有机物料的施用量成正比,;但利用畜奶厂主要含乳糖的废水灌溉土壤后,土壤微生物群落的代谢均匀度由原来的 21.9 下降为 19.4,这可能是由于施入的物料所含底物种类较少,而诱导土壤中的微生物种类比较少^[79]。

不同来源的有机肥所含的碳源差异很大,故不同有机肥对土壤微生物群落的影响也存在很大差异。在低有机质含量(0.86%)土壤上,施用植物茎叶 28d 后土壤微生物群落功能多样性(Biolog 方法测定)高于施用植物根系处理,112d 后,植物茎

叶与根系处理的差异不明显;在高有机质含量(2.5%)土壤上,植物茎叶与根系处理在整个培养期内差异均不明显^[83]。因此,有机肥种类、土壤和不同取样时间土壤微生物群落功能差异很大^[84]。有机肥对土壤微生物群落多样性的影响取决于土壤性质(质地、pH、有机质含量等)和有机肥性质(种类、腐熟水平、C/N、糖类及木质素相对含量等),详见 Hoitink^[85,86]。

无机肥料深刻影响着土壤微生物的生存环境,即土壤的物理化学性质,所以在一定程度上无机肥料也影响着土壤微生物群落多样性。Sarathchandra 等^[87]研究发现,施用尿素后土壤微生物功能多样性(Biolog 方法)和线虫成熟指数(Maturity Index)显著降低,但施用磷肥对土壤微生物群落多样性无显著影响。一般而言,根际微生物对无机肥料的施用会更敏感^[88],因为作物根系分泌大量高碳/氮的碳源,造成根际形成缺 N 的微域环境^[89],而氮肥的施入减免了根际缺氮微域的形成;此外无机氮肥的施入容易引起作物根际 pH 的变化^[90],从而影响土壤微生物群落多样性。Katarina 等^[91]研究表明,与未施 N 肥的对照相比,施用 NH₄-N 后大麦根际微生物群落活性降低,但施用 NO₃-N 后根际微生物活性升高,且在 300mg/kg 施用范围内随着施用量的升高而升高。他们的结果还表明,根际微生物活性与根际 pH 成显著正相关。与此相似,Zaitlin 等^[92]也发现 N 肥对非根际土壤可培养线虫群落没有影响,仅未施 N 处理的 *S. halstedii* 数量稍微降低。

3 结论与展望

已有的研究结果表明土壤中微生物群落具有很高的多样性,是一个丰富的微生物资源库。土壤微生物库与土壤的生产(作物生长)和生态功能(生物修复)密切相关,是决定土壤资源可持续利用和改善环境质量的关键因子之一。研究不同土壤环境与该环境中微生物基因表达之间的关系,将有助于我们设计和完善微生物培养方法,为使之更接近于自然环境。随着生物信息学及生物统计学的发展,将分子生物学技术与传统的微生物生长、活性和生理分析数据结合起来,能够将微生物群落在各个层次(基因、细胞、个体、群落)的多样性统一起来,使我们对土壤微生物群落多样性与环境因素相互关系的理解更全面、更深刻。可以预见,对土壤微生物群落多样性的深刻理解将为人类在基因、细胞、个体和群落水平上利用和调控土壤微生物提供理论依据,使土壤以及整个生态系统健康、持续发展。

回顾已有的研究成就,展望未来,今后有关土壤微生物的研究应加强以下几个方面的研究:

- (1)土壤微生物群落功能多样性表征的新方法和新技术;
- (2)土壤微生物与植物(地上与地下)相互作用的机制和植物/微生物协同进化的理论;
- (3)土壤微生物群落对土壤养管理(包括各类有机废弃物的农用)的响应规律、特点和可能的调控措施;
- (4)土壤微生物个体和群落响应环境胁迫(如外源污染物物质)的机制;
- (5)土壤微生物群落与全球变化的相互作用机制(正负反馈调节)和可能调控途径。

References:

- [1] Pimental D, Stachow U, Takacs D A, *et al.* Conserving biological diversity in agricultural /forest systems. *Biosphere*, 1992, **42**: 354~362.
- [2] Vitousek P M, Matson P A. Mechanism of nitrogen retention in forest ecosystem. *Science*, 1984, **225**: 51~52.
- [3] Kennedy A C, Smith K L. Microbial diversity and sustainability of agricultural soils. *Plant Soil*, 1995, **23**(2): 69~79.
- [4] Lammar R T, Dietrich D M. In situ depletion of pentachlorophene from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Appl. Environ. Microb.*, 1990, **56**: 3093~3100.
- [5] www. FAO. org.
- [6] www. NERC. ac.uk/funding guidance/planet earth.
- [7] Jackinson D S, Ladd J N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul E A, Ladd J N eds. *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker INC., 1981. 4145~471.
- [8] Rosello M R, Aman R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microb. Rev.*, 2001, **25**: 39~67.
- [9] Ward D M, Weller R, Bareson M M. 16SrRNA sequences reveals numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 1990, **345**: 63~65.
- [10] Tilman D, Wedin D, Knops J. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grass ecosystems. *Nature*, 1996, **379**: 718~720.
- [11] Tilman D, Knops J, Wedin D, *et al.* The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science*, 1997, **277**: 1300~1302.
- [12] Tilman D, Reich P B, Knops J, *et al.* Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science*, 2001, **294**: 843~845.
- [13] van der Heijden M G A, Klironomos J N, Ursic M, *et al.* Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 1998, **396**: 69~72.
- [14] Klironomos J N. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*, 2002, **417**: 67~70.
- [15] Stocking M A. Tropical soils and food security: the next 50 years. *Science*, 2003, **302**: 1356~1359.
- [16] Mäder P, Fließbach A, Dubois D, *et al.* Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*, 2002, **296**: 1694~1697.
- [17] Kozdroj J, Van Elsas J D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J. Microbiol. Methods*, 2001, **43**: 197~212.
- [18] Johnsen K, Jacobsen C S, Torsvik V, *et al.* Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils: a review. *Biol. Fertil. Soils*, 2001, **33**: 443~453.
- [19] Chelius M K, Triplett E W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.*, 2001, **41**: 252~263.
- [20] Derakshani M, Lukow T, Liesack W. Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**: 623~631.
- [21] Griffiths B S, Retz K, Ebbelwhite N, *et al.* Soil microbial community: effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, **31**:

- 145~153.
- [22] Zheng D, Alm E W, Stakl D A, *et al.* Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 4504~4513.
- [23] Suzuki M T, Giovannini G J. Bias caused by template annealing in the application mixtures of 16SrRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 625~630.
- [24] Zhang H X, Wang X Y, Qi H Y. Development in research methods of microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **29**(5): 988~995.
- [25] Sigler W V, Miniaci V, Zeyer J. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *J. Microb. Methods*, 2004, **57**: 17~22.
- [26] Wu L Y, Thompson D K, Li G S, *et al.* Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **68**: 5780~5790.
- [27] Cho J C, Tiedje J M. Quantitative Detection of Microbial Genes by Using DNA Microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**: 1425~1430.
- [28] Hill G T, Mitkowski N A, Aldrich-Wolfe L. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.*, 2000, **15**: 25~36.
- [29] Macmeil I A, Tiong C L, Minor C, *et al.* Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J. Mol. Microbial Biotech.*, 2001, **67**: 301~308.
- [30] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **66**: 2541~2547.
- [31] Zhou J Z. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr. Opin. in Microb.*, 2003, **6**: 288~294.
- [32] Priem A, Braker G, Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (nirK and nirS) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**: 1893~1900.
- [33] Kitagawa W, Takami S, Miyauchi, *et al.* novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation fenes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. *J. Bacteriology*, 2002, **184**(2): 509~518.
- [34] Metheu B A, Nelson K E, Eisen J A, *et al.* Genome of *Geobacter sulfurreducens*; metal reduction in subsurface environments. *Science*, 2003, 1967~1969.
- [35] Braker G, Zhou J, Wu L Y. Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 2096~2104.
- [36] Nold S C, Zhou J Z, Devol A, *et al.* Pacific northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the subdivision of the *Proteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 4532~4535.
- [37] Daims H, Nielsen J L, Nielsen P H, *et al.* In situ characterization of *Nitrospira-like* nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**: 5273~5284.
- [38] Gray N D, Howarth R, Pickup R W, *et al.* Use of combined microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization to determine carbon metabolism in mixed natural communities of uncultured bacteria from the genus *Achromatium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 4518~4522.
- [39] Lee N, Nielsen P H, Andreasen K H, *et al.* Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography: a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 1289~1297.
- [40] Bull I D, Parekh N R, Hall G H, *et al.* Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. *Nature*, 2000, **405**: 175~178.
- [41] Radajewski S, Ineson P, Parekh N R, *et al.* Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, **403**: 646~649.
- [42] Wellinton E M, Berry A, Krsek M. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploring genomics and stable isotope probing. *Curr. Opin. in Microb.*, 2003, 295~301.
- [43] White D C, Davis W M, Nichols J S, *et al.* Determination of sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 1979, **40**: 51~62.
- [44] Frostegård Å, Tulid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 3605~3617.
- [45] Johnsen A R, Winding A, Karlson U, *et al.* Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ¹³C-labeled cell lipids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**: 6106~6113.
- [46] Alexandrino M, Knief C, Lipski A. Stable-isotope-based labeling of styrene-degrading microorganisms in biofilters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**: 4796~4804.
- [47] Roslev P, Iversen N. Radioactive fingerprinting of microorganisms that oxidize atmospheric methane in different soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 4064~4070.
- [48] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterophic microbial communities on the basis patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**: 2351~2359.
- [49] Degens B P, Harris J A. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, **29**: 1309~1320.
- [50] Degens B P, Schipper L A, Sparling G P, *et al.* Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biol. Biochem.*, 2001, **33**: 1143~1153.
- [51] Schipper L A, Degens B P, Sparling G P, *et al.* Changes in microbial heterotrophic diversity along five plant successional sequences. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, **33**: 2093~2103.
- [52] Griffiths B S, Bonkowski M, Roy J, *et al.* Functional stability, substrate utilization and biological indicators of soils following environmental impacts. *Appl. Soil Ecol.*, 2001, **16**: 49~61.
- [53] Dickens H E, Anderson J M. Manipulation of soil microbial community structure in bog and forest soils using chloroform fumigation. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, **31**: 2049~2058.
- [54] Griffiths B S, Ritz K, Bardgett, R D, *et al.* Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos*, 2000, **90**: 279~294.
- [55] Griffiths B S, Ritz K, Wheatley R, *et al.* An examination of biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, **33**: 1713~1722.
- [56] Lawton J H, Naeem S, Thompson L J, *et al.* Biodiversity and ecosystem function: getting the ecotron experiment in its correct context. *Functional Ecol.*, 1998, **12**: 848~852.
- [57] Ranjard L, Richaume A. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.*, 2001, **152**: 707~716.
- [58] Wander M M, Hdrick D S, Kaufman D, *et al.* The functional significance of the microbial biomass in organic and conventionally managed soils. *Plant Soil*, 1995, **170**: 87~97.

- [59] Lupwayi N Z, Rice W A, Clayton G W. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, **30**(13): 1733~1741
- [60] Matamala R, González-Meler M A, Jastrow J D, *et al.* Impacts of Fine Root Turnover on Forest NPP and Soil C Sequestration Potential. *Science*, 2003, **302**: 1385~1387.
- [61] Trumbore S E, Gaudinski J B. The Secret Lives of Roots. *Science*, 2003, **302**: 1344~1345.
- [62] Kong W D, Liu K X, Liao Z W. Effects of the species and composting level of organic matter on soil microbial community. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2004, **15**: 487~492.
- [63] Blackwood C B, Paul E A. Eubacterial community structure and population size within the soil light fraction, rhizosphere, and heavy fraction of several agricultural systems. *Soil Biol. Biochem.*, 2003, **35**: 1245~1255.
- [64] Shutter M, Dick R. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, **33**: 1481~1491.
- [65] O'Donnell A G, Seasman M, Macrae A, *et al.* Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant Soil*, 2001, **232**: 135~145.
- [66] Söderberg K H, Probanza A, Jumpponen A, *et al.* The microbial community in the rhizosphere determined by community-level physiological profiles (CLPP) and direct soil- and cfu-PLFA techniques. *Appl. Soil Ecol.*, 2004, **25**: 135~145.
- [67] Steer J, Harris J A. Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, **32**: 869~878.
- [68] Butler J L, Williams M A, Bottomley P J, *et al.* Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**: 6793~6800.
- [69] Johnson M J, Lee K Y, Scow K M. DNA fingerprint reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*, 2003, **114**: 279~303.
- [70] Song X H, Hopke P K, Bruns M A, *et al.* Pattern recognition of soil samples based on the microbial fatty acid contents. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**: 3524~3530.
- [71] Miethling R, Wieland G, Backhaus H, *et al.* Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microb. Ecol.*, 2000, **40**: 43~56.
- [72] Marschner P, Yang C H, Lieberei R, *et al.* Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, **33**: 1437~1445.
- [73] Alvey S, Yang C H, Burkert A, *et al.* Cereal/legume rotation on rhizosphere bacterial community structure in west African soils. *Biol. Fert. Soils*, 2003, **37**: 73~82.
- [74] Zhu Y G, Miller M R. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends in Plant Science*, 2003, **8**: 407~409.
- [75] Söderberg K H, Olsson P A, Bååth E. Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **40**: 223~231.
- [76] Wardle D A, Bardgett R D, Klironomos J N, *et al.* Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 2004, 1629~1633.
- [77] Alde'n L, Demoling F, Bååth E. Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. *Appl. Environ. Microb.*, 2001, **67**: 1830~1838.
- [78] Hu S J, van Bruggen A H C, Grunwald N J. Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil. *Appl. Soil Ecol.*, 1999, **13**: 21~30.
- [79] van Bruggen A H C, Demenov A M. In search of biological indicators for soil health suppression. *Appl. Soil Ecol.*, 2000, **15**: 13~24.
- [80] Fließbach A, Eyhorn F, Mader P, *et al.* 'DOK' long-term farming system trial: microbial biomass, activity and diversity affected the decomposition of plant residues. In: Rees R M, Campell B C, eds. *Sustainable Management of Organic Matter*. Wallingford: CABI Publishing, 2001, 363~369.
- [81] O'Flaherty S. Comparison of phenotypic, functional and genetic diversity of bacterial communities in soils. In: Rees R M and Campell B C (eds) *Sustainable Management of Organic Matter*. Wallingford: CABI Publishing, 2001. 370~376.
- [82] Degens B P. Microbial catabolic evenness: a potential integrative indicator of organic matter management. In: Rees R M, Campell B C eds. *Sustainable Management of Organic Matter*. Wallingford: CABI Publishing, 2001. 172~178.
- [83] Bending G D, Turner M K, Jones J E, *et al.* Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, **34**: 1073~1082.
- [84] Smit E, Leeftang L, Gommans S, *et al.* Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**: 2284~2291.
- [85] Hoitink H A, Boehm M J. Biocontrol within the context of soil microbial communities; a substrate-dependent phenomenon. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1999, **37**: 427~446.
- [86] Hoitink H A, Fahy P C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1986, **24**: 93~114.
- [87] Sarathchandra S U, Yeates G W, Burch G, *et al.* Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, **33**: 953~964.
- [88] Haynes R J. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance. A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant Soil*, 1990, **126**: 247~264.
- [89] Koch B, Worm J, Jensen L E, *et al.* Carbon limitation induces s-dependent gene expression in *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, **67**, 3363~3370.
- [90] Van der Krift T A J, Kuikman P J, Mille F, *et al.* Plant species and nutritional-mediated control over rhizodeposition and root decomposition. *Plant Soil*, 2001, **228**, 191~200.
- [91] Katarina H, Söderberg, Erland Bååth. The influence of nitrogen fertilisation on bacterial activity in the rhizosphere of barley. *Soil Biol. Biochem.*, 2004, 195~198.
- [92] Zaitlin B, Turkington K, Parkinson D, *et al.* Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycete communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes. *Appl. Soil Ecol.*, 2004, 53~62.

参考文献:

- [24] 张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁. 微生物生态学研究方法进展. *生态学报*, 2003, **29**(5): 988~995.
- [60] 孔维栋, 刘可星, 廖宗文. 有机物料种类及腐熟水平对土壤微生物群落影响研究. *应用生态学报*, 2004, **15**: 487~492.