

污染土壤微生物群落结构多样性及 功能多样性测定方法

陈承利, 廖 敏*, 曾路生

(污染环境修复与生态健康教育部重点实验室, 浙江大学环境与资源学院, 杭州 310029)

摘要: 土壤微生物在促进土壤质量和植物健康方面发挥着重要的作用, 土壤微生物群落结构和组成的多样性及其变化在一定程度上反映了土壤质量。为了更好地了解土壤健康状况, 非常有必要发展有效的方法来研究污染土壤微生物的多样性、分布以及行为等。回顾了近年来国内外污染土壤微生物群落结构多样性及功能多样性的测定方法, 包括生物化学技术和分子生物学技术, 现将它们的原理、优缺点、实用性及其发展动态作一阐述, 同时指出结合这两种技术可为微生物群落分析提供一个更全面的、精确的方法。

关键词: 污染土壤; 微生物多样性; 分子生物学; BIOLOG; PLFA; PCR; DNA

文章编号: 1000-0933 (2006) 10-3404-09 **中图分类号:** Q143, Q938, S154 **文献标识码:** A

Methods to measure the microbial community structure and functional diversity in polluted soils

CHEN Cheng-Li, LIAO Min*, ZENG Lu-Sheng (MOE Key Laboratory, Environmental Remediation and Ecosystem Health, College of Environmental and Resources Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(10): 3404 ~ 3412.

Abstract: Soil microorganisms, such as bacteria and fungi, play important roles in promoting soil quality and improving plant health and nutrition, thus influencing terrestrial ecosystems. Increasing anthropogenic activities, such as sprawling urbanization, agricultural development, pesticides utilization, and pollutions from all sources, can potentially affect soil microbial community composition and diversity, leading to deterioration of soil quality and fertility. However, it is yet to be determined how these changes in microbial diversity can influence surface and ground ecosystems. To that end, there is an acute need for reliable and accurate methods to study the community structure and taxonomy of soil microorganisms. Without the development of effective methods for studying the microbial diversity, distribution, and behavior in polluted soil, a thorough understanding of microbial diversity, as well as its impact on soil health, cannot be achieved.

The determination of species diversity depends on several factors including the intensity of each species, the total number of species present, species evenness, and the spatial distribution of species. Methods to measure microbial community structure and functional diversity in polluted soils can be classified into two groups, i. e., biochemical-based techniques and molecular biological-based techniques. Typically, diversity studies include the relative comparisons of communities across a gradient of stress and disturbance. With current techniques, it is difficult to study true diversity due to lack of knowledge on composition and the techniques to determine the accuracy of the extraction or detection methods. Traditionally, the analysis of soil microbial

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”资助项目 (2002CB410804); 国家自然科学基金资助项目 (40201026)

收稿日期: 2005-06-27; **修订日期:** 2006-05-20

作者简介: 陈承利 (1982 ~), 男, 浙江平阳, 硕士, 主要从事土壤环境化学与环境生态毒理学研究. E-mail: clchen1982@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liaomin@zju.edu.cn or liaominzju1@163.com

Foundation item: The project was supported by National Key Basic Research Support Foundation of China (No. 2002CB410804) and National Natural Science Foundation of China (No. 40201026)

Received date: 2005-06-27; **Accepted date:** 2006-05-20

Biography: CHEN Cheng-Li, Master, mainly engaged in soil environmental chemistry and ecotoxicology. E-mail: clchen1982@163.com

communities has always depended on culturing techniques using a variety of culture media designed to maximize the recovery of diverse microbial populations. However, only a small fraction ($< 1\%$) of the soil microbial community has been accessed with this approach. To overcome these problems, other methods such as the community level physiological profiling and analysis of phospholipid fatty acids have been used in an attempt to measure a greater proportion of the soil microbial community. In recent years, molecular-based approaches for assessing soil microbial community have provided a new understanding of the phylogenetic diversity of microbial communities in polluted soils. Among all the available techniques, the PCR-based methods are most useful including denaturing/temperature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), ribosomal intergenic spacer analysis (RISA), automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA), etc. The use of these techniques might provide new ways of measuring soil microbial diversity, ultimately leading to a more complete understanding of the potential impacts of pollution on soil microorganisms. Information obtained from such studies will also provide insight on the role of microbial processes in soil health. However, although the PCR-based molecular techniques have been used to overcome the limitations of culture-based methods, they have their own limitations such as the lysis efficiency of cells or fungal structures variation between and within microbial groups. Since each group of methods (biochemical-based versus molecular biological-based) can only provide a partial picture of one aspect of soil microbial diversity, a combined use of techniques from the two groups will certainly help to develop a broader, more complete profile of soil microbial diversity in polluted soils, which will eventually enhance our knowledge on the changes in microbial community function caused by the changes in microbial community structure.

Key words: polluted soils; microbial diversity; molecular biology; BIOLOG; PLFA; PCR; DNA

在陆地生态系统中,生活在土壤中数量庞大的微生物种群,与植物和动物有着明确的分工,主要扮演“分解者”的角色,几乎参与土壤中一切生物和生物化学反应,担负着地球 C、N、P、S 等物质循环的“调节器”^[1]、土壤养分植物有效性的“转化器”和污染环境的“净化器”等多方面生态功能^[2]。土壤微生物是气候和土壤环境条件变化的敏感指标,土壤微生物群落结构和多样性及其变化在一定程度上反映了土壤的质量。然而,随着近代工农业的发展,大面积土壤受到严重污染,导致了土壤微生物群落结构和多样性的变化,而这种变化会如何影响地上部分和地下部分生态系统的变化尚不清楚。目前,对污染土壤微生物多样性的研究已引起国内外学者的极大重视。

土壤微生物多样性一般包括微生物分类群的多样性、遗传(基因)多样性、生态特征多样性和功能多样性^[3]。目前,对污染土壤微生物多样性方面的研究仍较薄弱。一方面是由于测定微生物种类的方法和技术还不是很成熟,不能全面地、准确地研究土壤微生物多样性状况。另一方面是由于环境的高度异质性,时间和空间上的小环境随时发生变化^[4]。另外,栖息在土壤中的微生物种类繁多,生存状况复杂,而且个体微小,结构简单,缺乏可以区分的明显特征,尤其它们的组成和活动及其引起的许多生化过程,互相交替、互相影响,给土壤微生物数量、组成和生态分布的鉴定带来了许多困难。本文回顾了近年来国内外污染土壤微生物群落结构多样性及功能多样性的测定方法,包括生物化学技术和分子生物学技术^[5],将它们的原理、优缺点、实用性及其发展动态作一阐述,以利于今后的研究。

1 污染土壤微生物群落结构多样性的测定方法

1.1 传统微生物平板培养方法

传统的微生物平板培养法就是根据目标微生物选择相应的专性固体培养基进行分离培养,然后通过各种微生物的生理生化特征、外观形态及其菌落数来计测微生物的数量及其类型^[6]。平板计数法仍然是一个评价污染效应的有效方法^[7,8]。Busse 等^[9]用平板计数法研究了草甘膦除草剂对造林土壤中微生物群落结构及其代谢特性的影响,测定结果表明,草甘膦除草剂对细菌和真菌有毒害作用,提高除草剂含量,降低了培养基中存活细菌的生长速率和代谢多样性。

该方法也存在许多不足之处^[6,10]。首先,微生物对培养基具有选择性,不可能用有限的几种培养基培养

获得土壤中所有的不同生理类群的微生物,同时培养基的成分也影响微生物的生长状况^[11]。其次,实验室的培养条件不可能用同一种方法同时满足所有微生物对温度、pH 以及通气状况等条件的要求,从而用某一种特定条件不能培养出来那些不适应条件的微生物^[12]。而且,许多微生物在环境变化过程中表现出一种“存活但不能培养”(Viable but nonculturable, VBNC)的状态,在这种状态下,细胞不能在传统的培养基上生长,但仍然处于存活状态,并在一定条件下可以恢复代谢活性并转入可培养的状态^[3]。因而,利用平板培养法不可能全面地获得土壤中所有微生物的全部信息,只能获得一小部分土壤微生物群落。迄今为止,只有不到 1% 的土壤微生物能够被培养^[13],而大多数只能存在而无法被培养。因此,这种传统的平板培养方法只能作为一种辅助工具,需要结合现代生物技术方法才能更客观而全面地反映微生物群落结构的真实信息^[7]。

1.2 磷脂脂肪酸 (PLFA) 谱图分析法

磷脂脂肪酸 (Phospholipid Fatty Acid, PLFA) 是构成活体细胞膜的重要组成部分,其含量在自然条件下是相对恒定的。不同类群的微生物能通过不同生化途径形成不同的 PLFA,部分 PLFA 总是出现在同一类群的微生物中,而在其它类群的微生物中很少出现,细胞死亡后数分钟到数小时内细胞膜水解和释放磷脂,PLFA 被降解,可以代表微生物群落中“存活”的那部分群体。不同菌群的微生物生物量和群落组成各不相同,每种样品具有独特的 PLFA 谱图(包括 PLFA 总量、组成),即具有专一性;不同样品的谱图之间差别很大,具有多样性。PLFA 谱图的变化能够说明环境样品中微生物群落结构的变化。因此,磷脂脂肪酸分析十分适合于土壤微生物群落的动态监测。PLFA 分析法是用氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲液(1 2 0.8)提取土样的脂类,用柱层析法分离得到磷酸酯脂肪酸,然后经甲酯化后用气相色谱分析各种脂肪酸(C5-C20)的含量。

该方法在污染土壤的微生物群落组成和种群变化方面研究得到越来越广泛的应用^[14]。Pennanen 等^[15]模拟酸雨和重金属条件,用 PLFA 方法研究它们对林地土壤微生物群落结构各自作用和协同作用的影响。Frostegard 等^[16]用不同浓度的重金属污染林地的腐殖质土壤和农业耕地,然后检测其 PLFA 组成,对这两种土壤微生物群落的磷脂脂肪酸成分、生物量和活性进行了研究。表明微生物群落结构逐渐发生改变,但比生物量和活性的变化要小。Kelly 等^[17]用 PLFA 方法发现 Zn 污染土壤中指示菌根真菌和放线菌的 PLFA 相对含量下降,微生物群落结构发生了变化。Suhadolc 等^[18]用 PLFA 分析了在重金属污染土壤中改变重金属有效性对土壤微生物群落结构的影响,发现用磷灰石处理降低重金属有效性和补充重金属来提高其有效性两种方式均改变了土壤微生物群落结构。

该方法不需要对土壤微生物进行培养,可以直接提取原位土壤微生物群落的脂肪酸。但其分析结果的准确性与微生物体内的磷脂脂肪酸是否提取完全、稳定以及实验过程是否造成污染等有很大关系。概括起来有以下几个:(1)温度波动,温度的增加会带来磷脂双分子层流动性的增加,这会导致形成磷脂非双分子层相,进而影响细胞膜的渗透性^[19]。PLFA 成分发生适应性变化以改变膜的流动性变化是生物体内消除这些影响的机制之一。(2)饥饿,营养状况的变化也有可能改变磷脂的含量,有学者对此进行了相关研究^[62]。(3)标记性 PLFA 的非专一性,其变动会导致误差的产生^[20]。而且该方法只能鉴定到微生物属,不能在种和菌株的水平上区分微生物。

2.3 基于 PCR 的分子生物学技术

2.3.1 扩增核糖体 DNA 限制性分析法 (ARDRA)

扩增核糖体 DNA 限制性分析法 (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA),是一种 DNA 指纹技术,其原理是基于将保守区序列作为引物,用 PCR 扩增 16S rRNA 基因,所得片段用限制性内切酶消化,并用琼脂糖凝胶电泳分离。此方法无需进行纯培养,具备特异性强,效率高的特点,因此广泛应用于污染土壤微生物群落结构及其多样性的研究^[21]。Smit 等^[22]用扩增的核糖体 DNA 限制性分析法研究了铜污染对土壤微生物群落的影响,发现微生物群落结构发生了明显的变化,与无污染土壤相比,受铜污染土壤的微生物多样性减少;还证明可培养部分的细菌只代表了总的细菌种群的一小部分;同时表明扩增的核糖体 DNA 限制性分析法是一种非常理想的研究土壤微生物群落的方法,能为微生物生态研究提供有价值的信息。Wenderoth 等^[23]用扩增的核糖体 DNA 限制性分析法研究了重金属 Zn 对自养型

细菌的影响,结果显示随着 Zn 浓度的增加,各土样中细菌的代谢多样性随之减少。Moffett 等^[24]用扩增核糖体 DNA 限制性分析法比较了 Zn 污染土壤与非污染土壤的微生物多样性,经限制性片段长度多态性分析,结果表明,Zn 毒害胁迫明显降低了细菌群落的多样性。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,造成分辨率较低^[25]。

2.3.2 限制性片段长度多态性(RFLP) PCR 限制性片段长度多态性分析法(PCR-restriction fragment length polymorphisms, PCR-RFLP),是将 PCR 引物中的一条加以荧光标记,反应后用合适的限制酶切、电泳分析,再根据片段的大小不同以及标记片段种类和数量的不同分析群落的结构及组成多样性^[26]。该技术可以用来监测因环境改变,如污染等而引起的微生物种群的变化。Sandaa 等^[27]用 PCR-RFLP 方法评价了重金属污染对土壤中可培养细菌和总细菌群落结构的影响,结果发现增加重金属浓度会降低细菌群落的多样性,同时证明了可培养细菌种群只代表了土壤细菌群落的一部分。

2.3.3 末端限制性片段长度多态性分析法(T-RFLP) 末端限制性片段长度多态性分析法(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP),是对 ARDRA 技术的改进。土壤细菌的 16S 核糖体 DNA 和真菌核糖体 DNA 的 ITS 区域都是研究土壤微生物多样性非常重要的目标区域。T-RFLP 就是根据样品中的这些目标区域 DNA 序列的不同或变化,进行 PCR 扩增后得到目标 DNA 片段,酶切后将会产生不同长度的限制性片段。根据这些特异片段的数量可以判断微生物区系的多样性,还可根据已知序列鉴定到种。通过比较不同样品间的异同,该方法能为评估土壤微生物多样性提供更敏感的数量化基础^[28]。Tupeinen 等^[29]用 T-RFLP 方法研究了 As、Cr、Cu 污染土壤的微生物群落结构,结果揭示了微生物能对土壤重金属污染产生响应作用,并通过改变微生物群落结构和产生耐性的方式来维持其代谢活性。

该方法也存在一些缺陷:(1)在 T-RFLP 的峰值图上,一个峰代表的有可能不只是一个种^[30];(2)样品中的总 DNA 的提取和限制性内切酶的选择是影响分析结果的关键因素^[21];(3)随着片段长度的增加,测序仪检测分辨率降低等^[31]。

2.3.4 核糖体基因间隔区分析法(RISA) 核糖体基因间隔区分析(ribosomal intergenic spacer analysis, RISA)方法是利用细菌群落概览图谱间的相似度对生态系统的空间异质程度进行定量分析。RISA 以细菌 16S 和 23S rDNA 间隔片段(ITS)为研究对象,ITS 片段的 PCR 扩增混合物用普通电泳即可分离并获得特异性的长度多态性图谱,这就是利用 RISA 概览图谱描述细菌群落的基本原理^[32]。Ranjard 等^[33]用 PCR-RISA 分析法研究了 Hg 对细菌群落结构的影响,发现在 Hg 污染胁迫下,优势细菌种群的组成发生了变化,耐 Hg 细菌变多,细菌群落多样性减少。该方法的一些不足之处也是不能忽视的。如普通 PAGE 只能分离大小相差十几个 bp 的 DNA 片段,对于差别小到几个甚至一个 bp 的 DNA 片段则很难分辨。因此该方法在精度上受到一定限制^[34]。

2.3.5 变性/温度梯度凝胶电泳技术(DGGE 或 TGGE) 同样大小的 DNA 序列由于含有的碱基不同,各片段的 T_m 也就不同,甚至一个碱基对的不同,都会引起 T_m 很大的差异。变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术是通过不同序列的 DNA 片段在各自相应的变性剂浓度下变性,发生空间构型的变化,导致电泳速度的急剧下降,最后在其相应的变性剂梯度位置停滞,经过染色后可以在凝胶上呈现为分散的条带^[35]。该技术可以分辨具有相同或相近分子量的目的片段序列差异,可以用于检测单一碱基的变化和遗传多样性以及 PCR 扩增 DNA 片段的多态性。温度梯度凝胶电泳(TGGE)技术的基本原理与 DGGE 技术相似,含有高浓度甲醛和尿素的凝胶温度梯度呈线性增加,这样的温度梯度凝胶可以有效分离 PCR 产物及目的片段。根据电泳条带的多寡和条带的位置可以初步辨别出样品中微生物的种类多少,可以分析土壤样品中微生物的多样性^[35]。

该技术最先由 Muyzer^[36]等人引入研究土壤微生物基因多样性,现已被证实能够精确地反映出土壤微生物多样性,并广泛地应用于污染土壤微生物多样性的研究^[37]。Kozdroj 等^[38]用 PCR-DGGE 结合传统培养方法研究了根系分泌物对受不同程度重金属污染土壤的细菌群落结构多样性的影响,结果显示根系分泌物对重金属污染土壤的细菌种群发展具有显著的刺激作用;同时发现,淹水会促进优势种细菌的快速生长,降低群落结构的多样性。Renella 等^[39]用 PCR-DGGE 方法研究了 Cd 污染对土壤微生物群落结构的影响,在高浓度 Cd 污

染下,细菌群落也只发生了微小的变化,是由于有效 Cd 浓度过低,表明高浓度但低有效态 Cd 污染主要诱导微生物生理上的适应,而非群落结构的变化,一些生化指标对胁迫更加敏感。滕应等^[40]用 PCR-DGGE 技术分析了重金属污染农田土壤细菌群落的多样性,其电泳图谱表明,PCR 产物经 DGGE 检测后得到的电泳条带清晰且分离效果好,可以明显反映出重金属复合污染导致了农田土壤微生物在基因上的损伤,影响到农田土壤生态系统的细菌丰富度,改变了土壤环境的优势菌群,从而使农田土壤微生物群落结构多样性发生变化。Brim 等^[41]用 PCR-TGGE 方法研究了 Zn 污染土壤的细菌群落,指出 TGGE 方法所显示的细菌群落多样性要高于用培养方法所获得的多样性。

该方法也有一些不足之处,如易受腐殖酸、不同 DNA 萃取效率的干扰^[42],而且花费时间较多、费用昂贵,还有代表性不强^[43]等。

3 污染土壤微生物功能多样性的测定方法

由于微生物群落在污染土壤的有机质分解、N、C 物质循环以及生物修复等方面扮演着非常重要的角色,微生物功能多样性因此成为与分类学、基因多样性一样重要的研究因素。目前,对土壤微生物多样性的研究主要集中于微生物群落结构多样性的研究,而对微生物功能多样性的研究则相对偏少,绝大多数对微生物功能多样性的研究主要采用基于碳素利用的 BIOLOG 微平板分析方法。

BIOLOG 微平板分析方法是由美国 BIOLOG 公司于 1989 年发展起来的,最初应用于纯种微生物鉴定。1991 年,Garland 和 Mills 开始将这种方法应用于土壤微生物群落的研究,并认为 BIOLOG 碳素利用法是一种较为先进的研究不同环境下的土壤微生物群落结构和多样性的方法^[44]。该方法是根据土壤微生物对 95 种碳源的利用能力及其代谢差异情况来对化能异养细菌进行鉴定的系统。BIOLOG 微平板是一种多底物的酶联反应平板,由一个对照孔(仅有指示剂)和 95 个反应孔组成,每个反应孔装有不同的单一碳源底物和氧化还原染料四氮唑蓝作为指示剂,将土壤溶液接种到每一个微平板孔中,各孔中微生物利用碳源底物,呼吸作用产生还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,引起四氮唑蓝发生氧化还原变色反应,根据反应孔中颜色变化的吸光值来指示微生物对 95 种不同碳源的利用方式差别,从而来判定微生物群落的功能代谢能力差异情况。

从国内外近几年研究来看,该方法在研究污染土壤的微生物群落结构及其多样性方面发挥了越来越重要的作用^[45,46]。德国的 Engelen 等^[47]用 BIOLOG 研究了除草剂对土壤中微生物群落及其代谢特性的影响,测定结果表明,使用除草剂降低了土壤中微生物的代谢活性,还定量显示了微生物群落对不同碳源的利用能力及代谢功能多样性的变化。Banerjee 等^[48]用 BIOLOG 分析了灌溉污水污泥对土壤微生物群落结构和功能多样性的影响,发现高浓度污水污泥降低了土壤微生物多样性,但总的土壤微生物量和 N 的矿化速率并没有变化或增加。杨永华等^[49]利用 BIOLOG 方法对农药污染土壤中的微生物群落进行了研究,测定结果显示,农药污染导致了土壤中微生物代谢功能多样性的下降,同时也导致了微生物种类的减少。姚斌等^[50]利用 BIOLOG 方法研究了甲磺隆除草剂对土壤微生物多样性的影响,发现甲磺隆除草剂在使用浓度较高时(10 mg kg^{-1})明显降低土壤微生物多样性,并且这种抑制效果随时间而变化,培养初期影响不显著,随培养时间的推移甲磺隆对土壤微生物多样性的影响加剧。滕应等^[51]利用 BIOLOG 方法研究了铅锌银尾矿区土壤微生物活性及其群落功能多样性,BIOLOG 测试结果显示,随着重金属污染程度的加剧其土壤微生物群落结构发生了相应变化,尾矿区土壤微生物群落代谢剖面(AWCD)及群落丰富度、多样性指数均显著低于非矿区土壤,表明尾矿区重金属污染引起了土壤微生物群落功能多样性的下降。

BIOLOG 方法不仅灵敏度高,分辨力强,测定简便,而且无需分离培养纯种微生物,是监测污染土壤微生物群落结构的快速、可靠方法^[52,53]。但是该方法也有一些不足之处,首先,BIOLOG 方法中所使用的微平板具有一定的选择性,比如 BIOLOG GN 微平板只适用于革兰氏阴性菌,而 BIOLOG GP 微平板只适用于革兰氏阳性菌^[54]。其次,影响平板微孔显色的因素较多,除了培养液中微生物的种群组成、数量与活性外,样品的预处理,培养时间和温度,培养液含有干扰物质等因素都会影响平板显色结果^[54]。因此,今后要结合其他方法,更深入地研究环境微生物群落结构与功能及其相互关系,从而获得更全面的结果。

4 结合方法

生物化学技术和分子生物学技术都能很好地描述污染土壤微生物群落结构多样性及功能多样性的变化情况。各种方法的综合使用可起到互补作用,避免由于方法原理本身所带来的不可避免的偏差,将提供更加全面的群落组成、变化方面的信息,必将成为今后研究的有力工具。

Muller 等^[55]用琼脂培养基平板计法、PCR-DGGE 以及 BIOLOG 方法研究了 Hg 污染对土壤微生物群落,特别是细菌群落结构的影响。平板计数法发现,在高浓度 Hg 重污染土壤的细菌以及原生动物种群数量明显降低,但真菌数量并没有明显变化。经 PCR-DGGE 方法分析,也反映出 Hg 污染改变了细菌群落结构以及降低了其多样性,同时耐 Hg 速生细菌明显变多。结果证明了多样性的减少会降低生态系统稳定性,甚至导致生态系统机能的衰退。然而,BIOLOG 板并没有显示细菌群落结构有任何变化。在所有描述细菌群落的不同方法中,PCR-DGGE 分析方法能提供最明显的结果。为了获得更为详细的微生物群落蓝图,需要结合使用各种方法。Widmer 等^[56]用 DNA-、PLFA-、BIOLOG 法分析杀虫剂降解土壤的微生物性质变化,发现 3 种方法都有很好的重复性,能分辨出不同处理土壤,但通过聚类分析,3 种方法对同个处理土壤微生物性质测定结果相似性不太一致。因此,在选用测试方法时要谨慎。Ellis 等^[57]用平板计数、BIOLOG、FAME 等方法分析了长期重金属污染对土壤微生物群落的影响,结果显示各方法表现出一定程度的一致性,即可培养细菌的数量在重金属污染土壤受到了显著的抑制,重金属浓度越高其数量就减少;并得出 BIOLOG 与平板计数法在测定重金属对微生物群落的影响上是有效的方法。Lawlor 等^[58]用平板计数、BIOLOG、FAME 法比较分析了长期灌溉污泥土壤的微生物群落结构,3 种方法结果均显示土壤微生物群落结构发生了变化。Kelly 等^[59]用 PLFA 和 BIOLOG 方法研究了施用污水污泥对土壤微生物群落结构的影响,结果表明,施用污泥使得 BIOLOG 板中的吸光值速率变慢,指示菌根真菌和放线菌的 PLFA 相对含量下降,均说明了污泥影响了土壤微生物群落结构的变化。Baath 等^[60]用 PLFA 分析法发现长期重金属污染(Zn、Cu、Ni)改变了土壤微生物群落结构,但在同一实验,用 BIOLOG 法分析并没有发现群落结构有明显的变化。Torsvik 等^[61]用 DNA 重组技术和 PCR-DGGE 分析方法研究了重金属污染土壤的微生物群落结构和多样性,结果表明,重金属污染导致土壤微生物群落结构发生明显的变化、细菌多样性的降低以及一些细菌种群成为优势种,同时证明了 DNA 重组技术结合 PCR-DGGE 分析方法能提供整个多样性以及群落结构变化的信息。因此,在选用测定方法时要谨慎,有条件的话最好结合使用各种方法。

5 展望

土壤微生物“黑箱”已经打开,问题是有多多少新的土壤微生物分析方法可以揭示微生物种群结构和活性。我们现在仅仅才刚开始知道土壤微生物多样性远比仅用培养方法所了解的要复杂得多。污染物进入土壤后,对污染物有耐性响应的物种变多,微生物多样性降低,并促使群落结构发生实质性变化,这些都能够通过生化和分子技术方法分析而清晰地显示出来。而这些方法应该互相补充、结合使用,因为只有这样才能获得完整的微生物群落信息。然而,在分析污染土壤微生物群落结构多样性的同时,也应该关注它们的生理学多样性以及代谢活性的差异。同时,也应该注意到一个区域内微生物群落多样性的改变并不意味着其受到毒害作用,因此有必要对微生物群落结构的变化是如何影响微生物群落多样性进行研究^[15]。

总之,现代微生物群落分析技术,尽管都有它们各自的局限性和偏差,但还是能很好地测定群落结构因污染影响而发生的真实变化。目前,对微生物群落遗传和功能多样性的认识过程中产生了越来越多的问题,而这些问题又促进我们对新方法的探索。从而,对“Who is there”、“What are they doing”等的无知也会逐渐减少^[22],并对多样性和功能之间关系的认识也会逐渐清晰起来。

References:

- [1] Li F D. Prosperous Areas of Current Soil Microbiology. *Acta Pedologica Sinica*, 1993, 30(3): 229~236.
- [2] Xu G H, Li Z G. *Microbial Ecology*. Nanjing: Southeast University Press, 1991.

- [3] Luo S M. Agroecology. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2001. 72 ~ 96.
- [4] Van Elsas J D, Mantynen V, Wölters A. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biol. Fertil. Soils*, 1997, 24: 188 ~ 195.
- [5] Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, *et al.* Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58: 169 ~ 188.
- [6] Zhang J E, Cai Y F, Gao A X, *et al.* Review on laboratory methods for soil microbial diversity. *Soils*, 2004, 36(4): 346 ~ 350.
- [7] Delille D, Basseres A, Dessommes A. Seasonal variation of bacteria in sea ice contaminated by diesel fuel and dispersed crude oil. *Microb. Ecol.*, 1997, 33: 97 ~ 105.
- [8] Trevors J T. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically contaminated soils. *Water, Air, Soil Pollut.*, 1998, 101: 45 ~ 67.
- [9] Busse M D, Ratcliff A W, Shestak C J, *et al.* Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 1777 ~ 1789.
- [10] Jiao X D, Wu F Z. Progress on the Methods for Studying Soil Microbial Diversity. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(6): 789 ~ 792.
- [11] Tabacchioni S, Chiarini L, Bevivino A, *et al.* Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microb. Ecol.*, 2000, 40: 169 ~ 176.
- [12] Trevors J T. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.*, 1998, 101: 45 ~ 67.
- [13] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbial Rev.*, 1995, 59: 143 ~ 169.
- [14] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils*, 1999, 29: 111 ~ 129.
- [15] Pennanen T. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH — a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog and ³H-thymidine incorporation methods in field studies. *Geoderma*, 2001, 100: 91 ~ 126.
- [16] Frostegard A, Tunlid A, Baath E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from 2 soil types experimentally exposed to different heavy-metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 3605 ~ 3617.
- [17] Kelly J J, Haggblom M, Tate R L. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, 31: 1455 ~ 1465.
- [18] Suhadolc M, Schroll R, Gattinger A, *et al.* Effects of modified Pb²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ availability on the microbial communities and on the degradation of isoproturon in a heavy metal contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 1943 ~ 1954.
- [19] Graham J H, Hodge N C, Morton J B. Fatty acid methyl ester profiles for characterization of Glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61: 58 ~ 64.
- [20] Bossio D A, Scow K M, Gunapala N, *et al.* Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb. Ecol.*, 1998, 36: 1 ~ 12.
- [21] Tiedje J M, Asuming-Brempong S, Nusslein K, *et al.* Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.*, 1999, 13: 109 ~ 122.
- [22] Smit E, Leeftang P, Wernars K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 23: 249 ~ 261.
- [23] Wenderoth D F, Reber H H. Correlation between structural diversity and catabolic versatility of metal-affected prototrophic bacteria in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, 31: 345 ~ 352.
- [24] Moffett B F, Nicholson F A, Uwakwe N C, *et al.* Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43: 13 ~ 19.
- [25] Zhong W H, Cai Z C. Methods for studying soil microbial diversity. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(5): 899 ~ 903.
- [26] Zhang H X, Wang X Y, Qi H Y. Development in research methods of microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(5): 988 ~ 995.
- [27] Sandaa R A, Vorsvik V, Enger. Influence of long-term heavy metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 287 ~ 295.
- [28] Ma W L. A New Method for Research on Soil Microbial Diversity. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(1): 103 ~ 106.
- [29] Turpeinen R, Kairesalo T, Haggblom M M. Microbial community structure and activity in arsenic⁻, chromium⁺, and copper⁻ contaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47: 39 ~ 50.
- [30] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 2943 ~ 2950.
- [31] Jia J T, Song L S, Li J. T-RFLP technique and its application in research on microbial community structure. *Marine Sciences*, 2004, 28(3): 64 ~ 68.

- [32] Garcia-Martinez Z J, Acinas S G, Anton A L, *et al.* Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36: 55 ~ 64.
- [33] Ranjard L, Nazaret S, Gourbiere F, *et al.* A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg() impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31: 107 ~ 115.
- [34] Fisher M M and Triplett E W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 4630 ~ 4636.
- [35] Luo H F, Qi H Y, Xie K, *et al.* A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8): 1570 ~ 1575.
- [36] Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 695 ~ 700.
- [37] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, 2: 317 ~ 322.
- [38] Kozdroj J, Van Elsland J D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 1405 ~ 1417.
- [39] Renella G, Mench M, Lelie D, *et al.* Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 443 ~ 451.
- [40] Teng Y, Luo Y M, Zhao X W, *et al.* Rapid extraction and purification of DNA in farmland soils contaminated with mixed heavy metals for PCR-DGGE analysis. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(3): 343 ~ 347.
- [41] Brim H, Heuer H, Krogerrecklenfort E, *et al.* Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can. J. Microbiol.*, 1999, 45: 326 ~ 338.
- [42] Theron J, Cloete T E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2000, 26: 37 ~ 57.
- [43] MacNaughton S J, Stephen J R, Venosa A D, *et al.* Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 3566 ~ 3574.
- [44] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57: 2351 ~ 2359.
- [45] Derry A M, Staddon W J, Trevors J T. Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole carbon-source-utilization. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 14, 571 ~ 578.
- [46] Konopka A, Oliver J L, Turco R F. The use of carbon source utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microb. Ecol.*, 1998, 35, 103 ~ 115.
- [47] Engelen B, Meinken K, Wintzingerode F, *et al.* Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 2814 ~ 2821.
- [48] Banerjee M R, Burton D L, Depoe S. Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 1997, 66: 241 ~ 249.
- [49] Yang Y H, Yao J, Hua X M. Effect of Pesticide Pollution Against Functional Microbial Diversity in Soil. *Journal of Microbiology*, 2000, 20(2): 23 ~ 25.
- [50] Yao B, Xu J M, Zhang C L. Effect of Metsulfuron Methyl on Microbial Diversity in Paddy Soil. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(2): 320 ~ 322.
- [51] Teng Y, Huang C Y, Luo Y M, *et al.* Microbial Activities and Functional Diversity of Community in Soils Polluted with Pb²⁺, Zn²⁺, Ag⁺ Mine Tailings. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(1): 113 ~ 119.
- [52] Knight B P, McGrath S P, Chaudri A M. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper or zinc. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 39 ~ 43.
- [53] Garland J L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 24: 289 ~ 300.
- [54] Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28, 213 ~ 221.
- [55] Muller A K, Westergaard K, Christensen S, *et al.* The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36: 11 ~ 19.
- [56] Widmer F, Flubach A, Laczo E, *et al.* Assessing soil biological characteristics — a comparison of bulk soil community DNA^a, PLFA^a, and BiologTM^a analyses. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 1029 ~ 1036.
- [57] Ellis R J, Neish B, *et al.* Comparison of microbial and meiofaunal community analyses for determining impact of heavy metal contamination. *Journal of*

- Microbiological Methods, 2001, 45: 171 ~ 185.
- [58] Lawlor K, Knight B P, *et al.* Comparison of methods to investigate microbial populations in soils under different agricultural management. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 33: 129 ~ 137.
- [59] Kelly J J, Haggblom M, Tate R L. Effects of the land application of sewage sludge on soil heavy metal concentrations and soil microbial communities. Soil Biology & Biochemistry, 1999, 31: 1467 ~ 1470.
- [60] Baath E, Diaz-Ravina M, Frostegard A, *et al.* Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 238 ~ 245.
- [61] Torsvik V, Daae F L, Sandaa R A, *et al.* Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal of Biotechnology, 1998, 64: 53 ~ 62.
- [62] Wang S G, Hou Y L. Application of Phospholipid Fatty Acid Method in Soil Microbial Analysis. Microbiology, 2004, 31(1): 114 ~ 117.

参考文献:

- [1] 李阜棣. 当代土壤微生物学的活跃研究领域. 土壤学报, 1993, 30(3): 229 ~ 236.
- [2] 许光辉, 李振高主编. 微生物生态学. 南京: 东南大学出版社, 1991.
- [3] 骆世明主编. 农业生态学. 北京: 中国农业出版社, 2001. 72 ~ 96.
- [6] 章家恩, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述. 土壤, 2004, 36(4): 346 ~ 350.
- [10] 焦晓丹, 吴凤芝. 土壤微生物多样性研究方法的进展. 土壤通报, 2004, 35(6): 789 ~ 792.
- [25] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法. 应用生态学报, 2004, 15(5): 899 ~ 903.
- [26] 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, 23(5): 988 ~ 995.
- [31] 贾俊涛, 宋林生, 李筠. T-RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用. 海洋科学, 2004, 28(3): 64 ~ 68.
- [35] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用. 生态学报, 2003, 23(8): 1570 ~ 1575.
- [40] 滕应, 骆永明, 赵祥伟, 等. 重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取及其 PCR-DGGE 分析. 土壤学报, 2004, 41(3): 343 ~ 347.
- [49] 杨永华, 姚健. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 23 ~ 25.
- [50] 姚斌, 徐建明, 张超兰. 甲磺隆对土壤微生物多样性的影响. 土壤学报, 2004, 41(2): 320 ~ 322.
- [51] 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 等. 铅锌银尾矿区土壤微生物活性及其群落功能多样性研究. 土壤学报, 2004, 41(1): 113 ~ 119.
- [62] 王曙光, 侯彦林. 磷脂脂肪酸方法在土壤微生物分析中的应用. 微生物学通报, 2004, 31(1): 114 ~ 117.