

不同层面上微生物多样性研究方法

陈敏玲, 李伟华, 陈章和*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广州 510631)

摘要: 在讨论不同层面上微生物多样性研究的特征和对比各主要研究方法的基础上, 探讨了在不同层面上研究微生物多样性时对方法的选择性应用, 分析了微生物多样性研究技术体系的发展趋势。

关键词: 方法; 微生物多样性; 研究层面; 选择

文章编号: 1000-0933(2008)12-6264-08 中图分类号: Q143 文献标识码: A

Methods for investigation of microbial diversity on different levels: a review

CHEN Min-Ling, LI Wei-Hua, CHEN Zhang-He*

Key Laboratory of Ecological and Environmental Sciences in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(12): 6264 ~ 6271.

Abstract: Based on the analysis of the characteristics of research approaches for microbial diversity and a comparison of the properties of several main methods, we discussed the selection of the methods specific to a level of research on microbial biodiversity and provided an overview of the technical system.

Key Words: methods; microbial diversity; research levels; selection

微生物多样性的研究不仅是微生物学发展进入新阶段的标志, 更是生物多样性科学的重要进展^[1]。随着全球生态环境的破坏、自然资源的不可再生性损耗和生物多样性的逐渐丧失, 微生物多样性研究在环境监测^[2]、新资源开发^[3]、遗传研究^[4]以及物种多样性保护^[5]等应用领域发挥越来越重要的作用。

从国内外研究现状来看, 微生物多样性研究正处于实践积累^[6~9]和理论框架构建阶段^[10~12], 不同层面的研究有不同的特征, 不同的研究方法也有其优势与局限, 这就需要科研工作者在明晰多样性概念层次的基础上, 有针对性地筛选和优化技术组合, 使研究向深广拓展。然而相关方法技术虽处在不断的改进和创新中^[13~15], 方法的优势和局限性对比研究仍不多^[16, 17], 在多样性的不同层面上采用不同研究方法的指导体系尚未完整建立。本文先讨论不同层面上微生物多样性研究的特征, 再从优势与局限、指纹类型和研究偏向性等方面比较几种主要的研究方法, 最后探讨不同层面的研究中对方法的选择性运用以及技术体系的发展趋势, 为微生物多样性研究提供方法论上的参考。

1 微生物多样性各层面的研究特征

综合对已有文献提出概念的分析^[18~20]、对微生物特征的认识和对生命科学研究层次的理解, 可以从微生

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30470346)

收稿日期: 2007-08-11; 修订日期: 2008-04-09

作者简介: 陈敏玲 (1983 ~), 女, 广东省佛山市人, 硕士生, 主要从事人工湿地微生物多样性研究. E-mail: morning8306@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: chenzhh@sclu.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30470346)

Received date: 2007-08-11; Accepted date: 2008-04-09

Biography: CHEN Min-Ling, Master candidate, mainly engaged in microbial diversity in constructed wetlands. E-mail: morning8306@163.com

物生命活动层次的角度将微生物多样性分为遗传多样性、生理多样性、物种多样性和生态多样性四个层面。

遗传(基因)多样性是指微生物群体或群落在基因水平上数目和频率的分布差异^[21],主要体现在组成核酸分子的碱基数量的巨大性和排列顺序的多样性上;此外,DNA 复制中出现的碱基对变化、双链/单链 DNA、双链/单链 RNA 等多种遗传形式的存在,转导、转化和接合等微生物特有的基因重组现象,使微生物遗传多样性大大扩展^[10]。例如 16SrDNA 是微生物遗传多样性分析最常用的指标,其序列中有几个高度保守区段和可变区段,通过用相关软件及指数分析可变区的差异可以获得微生物进化关系和群落结构等信息^[22~24]。该水平上微生物多样性的研究要求高通量地获得生物大分子,对其进行基因层面的操作并进行精细的程序化检测。

生理多样性可以分为生理结构和生理功能的多样性。微生物的细胞组分和形态结构有广泛差异,体现了其生理结构的多样性。如微生物细胞的生化组成成分或其细胞外分泌产物具有类属特异性,可以作为生物标志物^[25,26]。美国 MIDI 公司就测定出许多常见微生物的特征磷酸脂脂肪酸(PLFAs)谱图,根据不同种类微生物细胞膜中 PLFA 的类型和含量具有种的特异性、指示性和遗传稳定性等特殊性能对微生物进行全自动鉴定和分析^[27]。而生理功能多样性则包括代谢类型和功能活性等的多样性^[1,18],例如不同的微生物群落对特定底物的利用有不同的特征^[28]。该水平上微生物多样性的研究依赖于在特定条件下对微生物的观察、对细胞组分的分析以及对生化反应的程度、底物、位置等的测定。

以上两个层面的微生物多样性研究直接以微生物细胞及其组分为研究对象,因此常作为较为宏观的物种多样性和生态多样性的研究基础。

狭义微生物物种多样性的主要研究对象是微生物系统分类、物种数量、物种构成等^[10,21],而物种的差异主要体现在遗传物质和生理特征的差异上,所以该层面的研究虽然在概念框架中是独立的,但在具体的实验里还需以遗传和生理多样性的研究方法作为认识工具。例如 Brambilla 等通过培养观察研究了溪水中的细菌品系及它们的聚集状态,然后用生物标志物分析技术进一步研究微生物的类属,最后以基因分析研究了 *Flavobacterium* 属细菌的系统分类^[29]。Nicomrat 等通过人工湿地中细菌的遗传多样性分析研究了群落中物种数量与组成^[30]。

生态多样性这个层面可以分为生态结构以及生态功能多样性。前者包括生境分布广泛性和种群、群落结构的多样性^[10],后者主要指微生物与其它生物和非生物环境的关系^[1,10]。该层面很多时候需要研究微生物在特定时空和介质中的形态、结构、代谢和种群分布等,除了以遗传多样性和生理多样性的研究为基础外,对原位检测有特别的要求。如 Rogersa 等研究了煤焦油污染的蓄水层土壤微生物原位群落大小、结构、空间分布和对污染物的矿化反应^[31];Sinha 等研究了部分硝化反应器开始运行阶段微生物群落结构以及污泥团聚态的变化^[32]。

2 微生物多样性的主要研究方法对比

微生物多样性的研究方法可以分为培养依赖法和非培养依赖法。前者主要有传统培养法和单一碳源利用法(BIOLOG),后者主要包括荧光原位杂交技术(FISH)、生物标志物法和分子生物学方法。方法分类没有统一标准,例如 FISH 技术有时被包括在分子生物学方法中^[16],但 FISH 有原位可视的特征,能够提供微生物的形态学、数量、空间分布和细胞环境等信息^[33],本文为了突出该法的特点而将其独立出来。各种方法的原理不同^[17,33],从不同的角度(生长、代谢、组分或产物的组成模式等)和不同的程度揭示了微生物多样性。下面先讨论各种方法的优势与局限,再以此为基础列表分别对这几种方法的指纹类型(表 1)和研究偏向性(表 2)进行分析。

传统培养法除了可以对研究对象进行形态观察外,还可对其营养需求和生理生长特性进行深入的研究,而且在分离具有一定功能的特殊目标物种时非常适用。Jayasinghe 等^[34]利用该法对比了两种森林类型中的放线菌群落大小和物种丰度,分离了 156 个放线菌品系并研究放线菌与落叶分解真菌的竞争关系;Liu 等^[35]从水华微生物群落中分离了 35 个细菌品系,发现品系 BBB25 对水华藻类的生长有特别的促进作用并研究了

其染色特征和形态。与传统培养法相比, BIOLOG 的优点是无需分离培养纯种微生物, 即可获得有关微生物群落总体活性与代谢功能的信息, 最大限度地保留微生物群落原来的代谢特征^[36]。Yang 等研究多种植物混合种植是否能减弱重金属铅对土壤微生物和土壤酶活性的影响, 以 BIOLOG 特征作为土壤微生物活性的指标^[37]。Wurst 等以 BIOLOG 方法反映根周微生物对营养物质利用的变化, 表征食根昆虫对根周土壤物质可利用性的影响^[38]。

表 1 几种方法的指纹类型
Table 1 Fingerprint types of the methods

传统培养法 Cultivation	单一碳源利用法 BIOLOG	荧光原位杂交法 FISH	生物标志物法 Biomaker	分子生物学方法 Molecular techniques
专性培养基中的形态与代谢 Morphology and metabolism on specific culture medium	对单一碳源组合的利用特征 Patterns of utilization of various single carbon combinations	遗传物质与荧光探针的特异性结合 Specific combination of genetic material with fluorescent probes	生化组分或稳定产物的组成模式 Patterns of biochemical components or stable metabolites	遗传物质特征 Characteristics of genetic material

表 2 几种方法对不同微生物生命特征的研究偏向性微生物生命特征
Table 2 Research preference of the methods for different properties of microorganism

微生物生命特征 Properties of microorganism	传统培养法 Cultivation	单一碳源利用法 BIOLOG	荧光原位杂交法 FISH	生物标志物法 Biomaker	分子生物学方法 Molecular techniques
基因结构 Gene structure					√
系统进化与分类 Phylogenetic			√		√
形态结构与生长特性 Morphology and growth characteristics	√		√		
营养需求 Nutritional requirement	√	√			
代谢产物 Metabolites	√				
群落总体信息 General information of community		√		√	√
原位分布 <i>In situ</i> distribution			√		√

表中“√”表示该方法常用于对应的微生物生命特征研究 The mark “√” in the table means that the method is commonly applied in the investigation of the corresponding property

但一般认为至少有 95% 以上的土壤微生物在种的水平上还无法分离和培养^[39], 因此依赖培养的方法都存在着选择培养的问题。另外, 传统培养法根据微生物形态和营养条件要求进行分类不能完全准确地反映微生物之间的进化关系, 也不能精确地反映混合菌群的组成和多样性^[33]; BIOLOG 中, 培养环境的改变、微生物的生长和竞争、种群的变化导致孔中物种间相互作用, 引起分解代谢和产糖的变化^[40], 这可能引起微生物对碳底物实际利用能力的改变, 不一定反映原位的代谢特征。不少实验对培养依赖方法进行改进^[40~42], 但未能彻底突破这类方法本身非原位研究的局限。

分子生物学方法理论上可以完全实现对环境微生物种类的鉴别, 有着精细的分辨能力 (可达菌株)^[43], 还可以从基因水平准确定位微生物的分类和种群关系^[25]。例如 Nguyen 等用 PCR-DGGE 技术检测了来源和捕获季节不同的 *Pangasius* 鱼身体上微生物群落的 16S rDNA 特征, 实验表明这种微生物群落分子特征可以作为这种鱼的“商品条码”^[44], 凸显分子生物学方法的高分辨力。但由于技术上的局限, 完整的 DNA 提取以及高程度的纯化使得分析过程复杂, 最终所得到数据的可靠性也打了折扣^[36]; 又由于该方法体系本身的局限, 不能提供微生物形态学、原位空间分布^[41]、代谢功能及生态联系等信息。近年出现的稳定同位素标记法利用¹³C 标记营养物培养微生物, 选择性回收标记 DNA, 在鉴定微生物的同时研究其代谢功能^[45], 部分地解决分子生物学方法不能研究代谢功能的问题。

生物标志物法的优势在于无需分离细胞^[21], 而且常采用的标志物 PLFAs 只在活细胞中存在, 群落的微生

物结构发生变化,即可以通过谱图的变化得到快速有效的监测。该法可以区分群落中的死细菌与活细菌^[46],在很多实验中这种方法还用于区分细菌和真菌的生物量^[47,48]。但这种方法分析结果的准确性与微生物的 PLFAs 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,而且不同属甚至不同科的微生物 PLFAs 图谱有可能重叠,该法只能鉴定到属^[17]。

FISH 结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性特征^[33],能够真实反映在自然环境下微生物的情况及分布,而且细胞在测定过程中不被破坏^[25]。另外,该法基于基因探针,可以对环境中的微生物种群进行系统分类^[49]。如 Gérard 等将 FISH 与免疫金标记、扫描电镜结合,将原核微生物区分到个体并对其进行系统进化定位^[50]。虽然该法很大程度上弥补了其它方法的不足,但也有一些技术上的局限,如微生物的自身荧光干扰、染料激发后很快发生光熄灭、探针的渗透和杂交不稳定^[33]等,而且方法体系本身较难描绘出微生物生理代谢差异。

综上可知,某种方法可能在分析某类问题时明显优于其它方法,但分析另外一些问题时又存在局限——技术本身的局限可以通过条件和操作改进来突破,但方法理论本身的局限性未必能完全消除。因此,不同研究方法的针对性运用是十分重要的。另一方面,多种方法的综合运用能更全面更客观地反映生物多样性状况^[51,52],这时不同的方法揭示的是微生物多样性不同侧面的特征,所以方法的选择和合理组合也是不可忽视的。

3 微生物多样性各层面研究中方法的选择与整合

3.1 遗传多样性

相对于宏观生物而言,不同微生物在形态上的差异并不明显,而基因水平上的差异则很突出,这正使现代分子生物学的优势得以发挥。分子生物学方法以在分子水平上掌握细胞的功能并揭示生命的本质为目标^[53],通过研究生物大分子的结构功能和相互联系,在基因的遗传、变异、转录、翻译和修饰等过程中阐释生命的多样性本质。现代分子生物学方法包括群落水平总 DNA 分析方法、核酸杂交技术、克隆文库方法和基因指纹技术等^[33],为微生物遗传多样性研究提供了广阔的平台和有效的手段。经 PCR 可以实现微量基因样本的扩增;DNA-DNA 杂交,DNA 指纹图谱分析,RFLP,RAPD 等分析可以反映不同菌株之间的 DNA 相似程度;原核生物核糖体亚基(如 16SrRNA^[36])与真核生物核糖体转录间隔区因其在遗传进化上的保守性,已成为分类鉴定和系统发育分析的重要依据^[10]。

虽然分子生物学方法的技术要求较高,但因其信息的全面性和根本性(能反映遗传物质的差异)在微生物遗传多样性研究中得到广泛的应用。发展到今天,该方法的分析对象主要可以分为两大类:16SrDNA 文库和元基因组文库^[54]。薛冬等应用 PCR 技术,直接从土壤中抽提总 DNA,扩增 16SrDNA V3 片段,采用变性梯度凝胶电泳分析片段的多态性,研究了茶园土壤微生物群落基因多样性^[55];Michelle 等利用 BAC 载体构建两个土壤微生物宏基因组文库,共获得超过 1Gbp 的 DNA 分子,通过对 16SrDNA 序列的分析发现,BAC 文库中包括低 G+C%、革兰氏阳性的 *Acidobacterium*, *Cytophagales*, *Proteobacteria* 等多种微生物^[56],这是其它解析方法不能及的。

3.2 生理多样性

在培养法中,微生物的结构没有被破坏,生理功能也继续发挥;尤其是传统培养法,所得到的细胞能作后续研究,因此该法在微生物生理特性的认识上有独特的优势^[33,36]。但培养法具有很强的选择性,因此难培养或不可培养微生物的生理多样性只能利用分子生物学的方法作局部研究^[45],相关研究有限而且不深入。

生理结构多样性 传统培养法不仅可以观察可培微生物的生长特性和菌落形态,结合显微技术还可以观察可培养微生物的细微结构和组织形式,结合生化分析的方法则可用于研究细胞的物质组成,为系统分类和进一步的研究提供坚实的基础。分子生物学方法和生物标志物法能够较全面地获得微生物组成成分的信息,弥补了培养法不能研究不可培微生物的缺陷;FISH 提供了原位可视化的条件^[41],使环境中微生物生理结构多样性研究得以扩展。

生理功能多样性 传统培养法结合培养基的选择和显微观察法、比色法、酶活测定法等代谢表征方法,已有一套较成熟的生理功能研究技术体系并已成功地应用于多种可培微生物的生理功能多样性描述。

BIOLOG 方法是用微生物对碳源的利用程度来反映其群落生理活动的轮廓,而不像传统培养法那样对某类型微生物的生理活动分析;另外,该法采用氧化反应指示剂显色,比传统方法对活性变化的反映更迅速和敏感。但由于此法只能粗略地表示实际土壤微生物群体的底物利用动力学特征,所表征的生理功能多样性较片面。传统培养法可以分析特定种类微生物的多种生理活动,可以与 BIOLOG 方法相互结合与补足^[57]。

3.3 物种多样性

传统培养法积累了种群分类的大量数据,为生物标记物法和现代分子生物学技术提供了良好的背景材料(例如用作标准品或分子工具),在物种功能特性的认识上有独特的优势;生物标记物方法可快速进行单个环境微生物样品的群落结构和多样性解析,但在定性上依赖于传统培养分离方法;现代分子生物学提高了解析的灵敏度,在基因水平上扩大了物种多样性的视野。

FISH 技术能够克服传统方法分离培养的困难,可以应用于检测和鉴定未被培养的种属或新种属,也修正了传统培养分离方法的很多认识。例如 Juretschko 和 Schramm 等曾对硝化流化床、普通活性污泥等工艺的活性污泥中硝化细菌的多样性采用 FISH 法进行了跟踪分析,发现 *Nitrosospira*、*Nitrospira* 为优势菌种,而并未检测到 *Nitrosomonas* 和 *Nitrobacter* 这些在传统培养法中得到的优势类群^[58~60]。用该法也发现氨氧化菌 *Ni* 广泛分布在各种环境中,而 *Nitrosomonas* 却很少在环境中监测到,与实验室传统培养得出的结果正好相反^[41]。

3.4 生态功能多样性

因为生态功能多样性的基本单位是微生物种群,所以表征微生物种群与群落总体特征的方法如 BIOLOG、生物标记物法和分子生物学法在这个层次上都得到较好的应用。研究中不仅可以用单一碳源的利用能力、生物标记物或 DNA 的构成模式作为指纹在横向上估价土壤中微生物的群落结构和多样性,还可以利用这些指纹时空上的差异来定性甚至半定量地估价其中微生物的动态变化。FISH 技术作为一种不依赖 PCR 的分子分析技术,避免了其他分子生物学方法的烦杂的过程,可准确快捷地反映出微生物群落的原位分布,监测环境样品中的种群并对其进行系统分类^[41],也可以用于研究特异菌群的空间定位和原位生理学,是精确研究环境微生物群落结构的较佳工具。它能提供形态学、数量、空间分布与细胞环境方面的信息,可用于环境样品中微生物多样性检测、污水处理微生物多样性的研究、内共生微生物和医学微生物生态学的研究^[61]。

生态功能多样性的研究范围包括微生物在其独特的生态位上的代谢、产物作用、原位分布与生长特征等,研究手段较为多样。如 Friedrich 等结合变性梯度凝胶电泳法和显微镜观察测定不同处理的海绵组织共生微生物群落类群结构,用液相色谱法分析不同处理的共生体产物特征,结果表明很大一部分微生物与海绵有永久的专性共生关系^[62]。Kavadia 等用恒化器培养法研究了固氮细菌群落和其竞争微生物种群在不同营养条件下的竞争关系^[63]。

4 研究展望

可以看到,微生物多样性不同概念层次上的研究重点不同,表征方法也有差异,这就要求研究者在一个系统全面的概念层次划分体系上优化表征技术的选取与组合。纵观近年国内外研究,可以看到不同层面上微生物多样性研究方法体系的一些趋势。

目前微生物多样性研究正处于概念和方法体系构建阶段,单一的研究方法已经基本成熟^[16],但方法的针对性选用和优化组合的指导体系尚未建立。今后有必要在加深对微生物多样性层次认识的基础上加强对各种研究方法的表征偏向性分析,具体的研究中要根据所属的层次和不同研究方法的特点合理选择。

微生物多样性的有机整体性要求表征方法既包括群落宏观水平的整体表征方法,也包括针对分类子集功能与结构的特征技术^[64,65]。综合运用多种层次上的方法是近年的新趋势^[66,67],研究中可以将各种方法有机结合,从不同角度揭示微生物多样性,提供更加全面的信息。在这些情况下,理解各种方法对多样性不同层次表征的偏向性将有助于人们对综合问题的分析。

另外,随着分子生物学技术的高速发展和微生物多样性研究向微观和宏观两个方向的拓展,各种分子生物学研究方法在微生物多样性各层面的研究中都得到广泛应用。但这些方法都有一些局限因素,不少研究者开始针对各种方法的优缺点,结合传统方法进行改进与系统提升^[68~70],有望更全面深入并且更有针对性地认识不同层面上的微生物多样性。

References:

- [1] Yan Z C, Dong X Z. The content of microbial diversity and a perspective on its application. *Microbiology*, 2001, 28(1): 96—102.
- [2] Winding A, Hund-Rinke K, Rutgers M. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, (62):230—248.
- [3] Jiang J, Yang B L, Lu H K, *et al.* Research on the bioactive substances of marine microorganisms. *Journal of Yunnan University(Natural Science Edition)*, 2004, 26 (6A): 91—95.
- [4] Liu G X, Ma X J, Chen T. Progress and significance of studies on microorganisms in permafrost sediments. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2004, 26(2):188—191.
- [5] Li Y, Zheng C Y. The conservation of microbial species diversity and the collection of microbial resources. *Amino Acids & Biotic Resource*, 2003, 25(3): 4—6.
- [6] Fang H, Damodaran P N, Cao M. Arbuscular mycorrhizal status of *Glomus* plants in tropical secondary forest of Xishuangbanna, Southwest China. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(12):4179—4185.
- [7] Chen Z, Wang X K, Duan X N, *et al.* Ozone effects on wheat root and soil microbial biomass and diversity. *Acta Ecologica Sinica*, 2007,27(5): 1803—1808.
- [8] Wilson M S, Siering P L, White C L, *et al.* Novel Archaea and Bacteria Dominate Stable Microbial Communities in North America's Largest Hot Spring. *Microbial Ecology*, 2007, DOI 10.1007/s00248-007-9347-6.
- [9] Kondakova G V, Verkhovtseva N V, Osipov G A. Investigation of microbial diversity of underground waters in monitoring deep horizons of the Earth's crust. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 2007, 62(2):69—75.
- [10] Zhang W, Wei H L, Gao H W, *et al.* Advances of studies on soil microbial diversity and environmental impact factor. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(1): 48—52.
- [11] López-García P, Moreira D. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in Microbiology*, 2007, DOI:10.1016/j.resmic.2007.11.019.
- [12] Green J, Bohannan B J. M. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 2006, 21(9): 501—507.
- [13] Herrera A, Cockell C S. Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction. *Journal of Microbiological Methods*, 2007,70(1):1—12.
- [14] Dong S, Brooks D, Jones M D. A method for linking in situ activities of hydrolytic enzymes to associated organisms in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007,39(9):2414—2419.
- [15] Zinger L, Gury J, Alibeu O, *et al.* CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 72(1):42—53.
- [16] Zhou J, Lei T. Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity. *Biodiversity Science*,2007,15 (3):306—311.
- [17] 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.
- [18] Chen J B. The concept and features of microbial diversity. *Microbiology*, 1994, 21(3): 173—176.
- [19] Watve M G, Gangal R M. Problems in measuring bacterial diversity and a possible solution. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(11):4299—4301.
- [20] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5:240—245.
- [21] Yao B, Qian X G, Yu C Z, *et al.* Approaches on how to explore and evaluate the soil microbial diversity. *Guizhou Agricultural Sciences*,2005, 33 (3): 91—92.
- [22] Li G Y, Li J, Jiang X, *et al.* Bacteria Composition of Organic Matter-decomposing Inoculant Analyzed with 16S rDNA Clone Library, *Microbiology*, 2007, 34(5):939—942.
- [23] Thomas V, Casson N, Greub G. New *Afipia* and *Bosea* strains isolated from various water sources by amoebal co-culture. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007,30(7):572—579.
- [24] Musat N, Werner U, Knittel K, *et al.* Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006,29(4):333—348.
- [25] Bai Q Y. Chemical methods for assessing microbial community structure in soil. *Agro-environmental Protection*, 1997, 16(6): 252—256.
- [26] Demoling F, Nilsson L O, Bååth E. Bacterial and fungal response to nitrogen fertilization in three coniferous forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*,2008,40(2):370—379.
- [27] Sherlock Microbial Identification System, Version 415, MIS Operating Manual. Newark, DE: MIDI, Inc, 2002.
- [28] Graham M H, Haynes R J. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-

- induced respiration methods. *Applied Soil Ecology*, 2005, 29(2):155—164.
- [29] Brambilla E, P uker O, Cousin S, *et al.* High phylogenetic diversity of *Flavobacterium* spp. isolated from a hardwater creek, Harz Mountains, Germany. *Organisms Diversity & Evolution*, 2007, 7(2):145—154.
- [30] Nicomrat D, Dick W A, Dopson M. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(2):312—321.
- [31] Rogers S W, Ong S K, Moorman T B. Mineralization of PAHs in coal tar impacted aquifer sediments and associated microbial community structure investigated with FISH. *Chemosphere*, 2007, 69(10):1563—1573.
- [32] Sinha B, Annachatre A P. Assessment of partial nitrification reactor performance through microbial population shift using quinone profile, FISH and SEM. *Bioresource Technology*, 2007, 98(18):3602—3610.
- [33] Xing D F, Ren N Q, Wang A J. Application of fluorescence in situ hybridization(FISH) in microbial ecology. *Microbiology*, 2003, 30(6):114—119.
- [34] Dinishi Jayasinghe B A T, Parkinson D. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology*, 2008, 38(2):109—118.
- [35] Liu J Q, Lewitus A, Brown P, *et al.* Growth-promoting effects of a bacterium on raphidophytes and other phytoplankton. *Harmful Algae*, 2008, 7(1):1—10.
- [36] Chen J. Review on methods for investigation of microbial diversity. *Biotechnology*, 2005, 15(4):85—87.
- [37] Yang R Y, Tang J J, Chen X, *et al.* Effects of coexisting plant species on soil microbes and soil enzymes in metal lead contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 2007, 37(3):240—246.
- [38] Wurst S, Putten W H van der. Root herbivore identity matters in plant-mediated interactions between root and shoot herbivores. *Basic and Applied Ecology*, 2007, 8(6):491—499.
- [39] Sun Y J, Wang Y, Wang X. Application of fluorescence in situ hybridization in analysis of environmental microbial ecology. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2004, 5(11):14—20.
- [40] Zheng H, Ou Yang Z Y, Fang Z G, *et al.* Application of BIOLOG to study on soil microbial community functional diversity. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(3):456—461.
- [41] Janssen P H, Yates P S, Grinton B E, *et al.* Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68:2391—2396.
- [42] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein S S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, 296:1127—112.
- [43] Che Y L, Wang H, Hu H Y, *et al.* Research progresses on analytical technologies used in microbial community structure and diversity. *Ecology and Environment*, 2005, 14(1):127—133.
- [44] Nguyen D D L, Ngoc H H, Dijoux D, *et al.* Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on Pangasius fish from Viet Nam. *Food Control*, 2008, 19(5):454—460.
- [45] Liu W Q, Li X X, Zhao X Y, *et al.* The application of nucleic acid stable isotope labeling in the investigation of metabolic function of uncultivated microorganism. *Chemistry of Life*, 2005, 25(2):156—159.
- [46] 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(3-4):371—377.
- [47] Gordon H, Haygarth P M, Bardgett R D. Drying and rewetting effects on soil microbial community composition and nutrient leaching. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(2):302—311.
- [48] Wang M C, Liu Y H, Wang Q, *et al.* Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(3):778—788.
- [49] Bénédicte Ménez, C line Rommevaux-Jestin, Murielle Salom, *et al.* Detection and phylogenetic identification of labeled prokaryotic cells on mineral surfaces using Scanning X-ray Microscopy. *Chemical Geology*, 2007, 240(1-2):182—192.
- [50] Gérard E, Guyot F, Philippot P, *et al.* Fluorescence in situ hybridisation coupled to ultra small immunogold detection to identify prokaryotic cells using transmission and scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 63(1)1:20—28.
- [51] Kisand V, Wikner J. Combining culture-dependent and-independent methodologies for estimation of richness of estuarine bacterio-plankton consuming. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69:3607—3616.
- [52] Widmer F, Flie A, Laczko E, *et al.* Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog(TM)-analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(7-8):1029—1036.
- [53] Zhu Y X, Li Y. *Modern Molecular Biology (Second Edition)*. Beijing: Higher Education Press, 2002. 1.
- [54] Li W, Zhao Y, Wang Y J. Advances in metagenomic clone library analysis methods. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(5):2070—2076.
- [55] Xue D, Yao H Y, Huang C Y. Genetic diversity of microbial communities in tea orchard soil. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(4):843—847.
- [56] Michelle R R, Paul R A, Alan D, *et al.* Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66:2541—2547.
- [57] Litchfield C D, Gillevet P M. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 28(1):48—55.
- [58] Juretschko S, Tmmermann G, Schmid M, *et al.* Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge:

- Nitrosococcus mobilis and nitrospira-like bacteria as dominant populations. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 3042—3051.
- [59] Schramm A, DeBeer D, Wagner M, *et al.* Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospir* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. Appl Environ Microbio, 1998, 64: 3480—3485.
- [60] Schramm A, larsen L H, *et al.* Structrue and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrides. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 4641—4647.
- [61] Hu Q, Qi H Y, Zhang H X. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and its applications in microbial ecology. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(5): 1048—1054.
- [62] Friedrich A B, Fischer I, Proksch P, *et al.* Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 38(2-3): 105—113.
- [63] Kavadia A, Vayenas D V, Pavlou S, *et al.* Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations in antagonistic conditions. Ecological Modelling, 2007, 200(1-2): 243—253.
- [64] Kozdr j J, Elsas J D V. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. Microbiol Methods, 2001, 43: 197—212.
- [65] 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.
- [66] Chen C L, Liao M, Zeng L S. Methods to measure the microbial community structure and functional diversity in polluted soils. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(10): 3404—3412.
- [67] Poonguzhali S, Madhaiyan M, Sa T. Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown Chinese cabbage *Brassica campestris* ssp *pekinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion. Plant and Soil, 2006, 286(1-2): 167—180.
- [68] Zhao G, Wang H Y. Soil microorganism bio-diversity molecule ecology research approach. Forest By-Product and Speciality in China, 2006, 1: 54—56.
- [69] Kubartová A, Moukouni J, Béguiristain T, *et al.* Microbial diversity during cellulose decomposition in different forest stands I. microbial communities and environmental conditions. , 2007, 54(3): 393—405.
- [70] Villanueva L, Navarrete A, Urmeneta J, *et al.* Monitoring diel variations of physiological status and bacterial diversity in an estuarine microbial mat: an integrated biomarker analysis. Microbial Ecology, 2007, 54(3): 523—531.

参考文献:

- [1] 阎章才, 东秀珠. 微生物的生物多样性及应用前景. 微生物学通报, 2001, 28(1): 96—102.
- [3] 姜健, 杨宝灵, 鲁红凯, 等. 海洋微生物生物活性物质的研究. 云南大学学报(自然科学版), 2004, 26(6A): 91—95.
- [4] 刘光琇, 马晓军, 陈拓. 冻土微生物研究进展与意义. 冰川冻土, 2004, 26(2): 188—191.
- [5] 李雁, 郑从义. 微生物物种多样性的保护与其资源保藏. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(3): 4—6.
- [6] 房辉, P. N. Damodaran, 曹敏. 西双版纳热带次生林中的丛枝菌根调查. 生态学报, 2006, 26(12): 4179—4185.
- [7] 陈展, 王效科, 段晓男, 等. 臭氧浓度升高对盆栽小麦根系和土壤微生物功能的影响. 生态学报, 2007, 27(5): 1803—1808.
- [10] 张薇, 魏海雷, 高洪文, 等. 土壤微生物多样性及其环境影响因子研究进展. 生态学杂志, 2005, 24(1): 48—52.
- [16] 周桔, 雷霆. 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望. 生物多样性, 2007, 15(3): 306—311.
- [17] 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.
- [18] 陈健斌. 微生物的多样性及其某些特征. 微生物学通报, 1994, 21(3): 173—176.
- [21] 姚斌, 钱晓刚, 于成志, 等. 土壤微生物多样性的表征方法. 贵州农业科学, 2005, 33(3): 91—92.
- [22] 李国媛, 李俊, 姜昕, 等. 应用 16S rDNA 克隆文库法分析有机物料腐熟菌剂细菌组成. 微生物学通报, 2007, 34(5): 939—942.
- [25] 白清云. 土壤微生物群落结构的化学估价方法. 农业环境保护, 1997, 16(6): 252—256.
- [33] 邢德峰, 任南琪, 王爱杰. FISH 技术在微生物生态学中的研究及进展. 微生物学通报, 2003, 30(6): 114—119.
- [36] 陈晶. 微生物多样性的研究方法概况. 生物技术, 2005, 15(4): 85—87.
- [39] 孙寓姣, 王勇, 黄霞. 荧光原位杂交技术在环境微生物生态学解析中的应用研究. 环境污染治理技术与设备, 2004, 5(11): 14—20.
- [40] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. 土壤学报, 2004, 41(3): 456—461.
- [43] 车玉伶, 王慧, 胡洪营, 等. 微生物群落结构和多样性解析技术研究进展. 生态环境, 2005, 14(1): 127—133.
- [45] 柳伟强, 李晓霞, 赵晓瑜, 等. 稳定同位素标记核酸法在非培养微生物代谢功能研究中的应用. 生命的化学, 2005, 25(2): 156—159.
- [53] 朱玉贤, 李毅主编. 现代分子生物学, 2. 北京: 高等教育出版社, 2002. 1.
- [54] 李武, 赵勇, 王玉炯. 元基因组文库分析技术研究进展. 生态学报, 2007, 27(5): 2070—2076.
- [61] 呼庆, 齐鸿雁, 张洪勋. 荧光原位杂交技术及其在微生物生态学中的应用. 生态学报, 2004, 24(5): 1048—1054.
- [66] 陈承利, 廖敏, 曾路生. 污染土壤微生物群落结构多样性及功能多样性测定方法. 生态学报, 2006, 26(10): 3404—3412.
- [68] 赵光, 王宏燕. 土壤微生物多样性的分子生态学研究方法. 中国林副特产, 2006, 1: 54—56.