

# 极端干旱区防护林地土壤微生物多样性

靳正忠<sup>1,2</sup>, 雷加强<sup>1,\*</sup>, 徐新文<sup>1</sup>, 李生宇<sup>1</sup>, 赵思峰<sup>3</sup>

(1. 中国科学院新疆生态与地理研究所, 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039;

3. 石河子大学农学院, 石河子 832003)

**摘要:** 土壤微生物在森林土壤中有重要功能。采用传统培养、脂肪酸鉴定和 PCR-DGGE 3 种方法分别研究了塔里木沙漠公路防护林地土壤微生物数量、脂肪酸种类和细菌 DNA 片段的多样性, 从微生物学角度为塔里木沙漠公路防护林的管理提供理论依据。结果表明, 塔里木沙漠公路防护林的建设促进了风沙土壤微生物的发育, 随着防护林定植年限的增加, 土壤微生物数量、脂肪酸和细菌 DNA 片段的多样性指数明显增大; 土壤微生物区系组成中, 细菌是优势类群, 占微生物总数 80% 以上, 而真菌很少, 不到微生物总数 1%, 但在不同土层间有所差异; 传统培养法与现代生物标记和分子生物学方法对塔里木沙漠公路防护林地土壤微生物多样性的研究结果基本一致, 说明塔里木沙漠公路防护林的建设使林地土壤生物活性有所增强, 有利于林地土壤养分循环与利用。

**关键词:** 塔里木沙漠公路防护林; 土壤微生物; 微生物数量; 脂肪酸; DNA 片段

文章编号: 1000-0933(2009)08-4548-12 中图分类号: Q143 文献标识码: A

## Microbial diversities of shelter-forest soils in the extreme arid area

JIN Zheng-Zhong<sup>1,2</sup>, LEI Jia-Qiang<sup>1,\*</sup>, XU Xin-Wen<sup>1</sup>, LI Sheng-Yu<sup>1</sup>, ZHAO Si-Feng<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Xinjiang Institute of Ecology and Geography, CAS, Xinjiang, Urumqi 830011, China

<sup>2</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

<sup>3</sup> Agricultural College of Shihhotze University 832003, China

*Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(8): 4548 ~ 4559.

**Abstract:** Soil microbe has an important role in forest land. In this study, methods of conventional culture, identifying fatty acid and PCR-DGGE were utilized to analyze soil microbial quantity, fatty acid and bacterial DNA segment in Tarim desert highway forest land, which can provide theoretical foundation for managing Tarim desert highway shelter-forest scientifically. The main results are: construction of Tarim desert highway shelter-forest promoted soil microbial development, and with increase of plantation time of the shelter-forest, the quantity, fatty acid diversity index of soil microbe and diversity index of bacterial DNA segment enhanced notably. As to soil microbial community structure, bacteria are dominant population with amounting for over 80% of total soil microbe, and fungi is not more than 1% of total soil microbe, but soil microbial community structure was different among three soil layers. The conclusions from study methods of conventional culture, biological marker and molecule biology were almost identical, which illuminates that construction of Tarim desert highway made soil microbial activity enhance and so promote nutrient cycle and utilization of Tarim desert highway shelter-forest land.

**Key Words:** Tarim desert highway shelter-forest; soil microbe; microbial quantity; fatty acid; DNA segment

**基金项目:** 中国科学院西部之光人才培养计划资助项目; 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(200821163); 中国科学院西部行动计划资助项目(KZCX2-XB2-13); 新疆维吾尔自治区重大科技专项资助项目(200733144-3)

收稿日期: 2008-05-18; 修订日期: 2009-02-12

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: desert@ms.xjb.ac.cn

土壤微生物多样性指微生物在遗传、种类和生态系统层次上的变化,代表着微生物群落的稳定性,反映土壤生态机制和土壤胁迫对群落的影响,通常以土壤生物区系的变化和生物化学过程间的相互关系来反映,主要包括微生物遗传多样性、微生物分类多样性、微生物的生态功能多样性以及微生物系统发育多样性,由于它能较早地预测土壤养分及环境质量的变化过程,被认为是最有潜力的敏感性生物指标之一<sup>[1]</sup>。土壤微生物群落结构和组成的多样性指数增大有助于维持土壤生态系统的稳定性与和谐性,同时可提高抵御土壤微生态环境恶化的缓冲能力<sup>[2]</sup>。目前土壤微生物多样性已引起国内外学者的极大重视,对土壤微生物群落结构的研究日益增多,研究的方法也在不断的改进,大致可分为传统培养法、生物标记法、BIOLOG 鉴定系统和分子生物学方法 4 类<sup>[3]</sup>。

塔里木沙漠公路防护林生态工程建成已有十多年,受咸水滴灌和极端干旱环境的影响,以风沙土为主的土壤势必会发生变化,尤其是土壤微生物的变化更为明显<sup>[4]</sup>。但前人有关塔里木沙漠公路防护林地土壤微生物的研究仅局限于传统培养计数<sup>[5,6]</sup>。传统培养法是基于生化性状和表现型来分离培养微生物,用于土壤可培养微生物群落的分析;现代生物标记和分子生物学方法能够更加全面反映土壤微生物的群落结构。因此,为了发挥不同方法的优点,本文从传统培养、脂肪酸鉴定和 PCR-DGGE 三方面研究土壤微生物多样性,旨在揭示塔里木沙漠公路防护林地建设后土壤微生物变化特征,为防护林管理提供理论指导。

# 1 研究区概况

## 1.1 研究区自然环境特征

本研究的采样点分布在位于塔克拉玛干沙漠腹地的塔中油田附近(表 1),这里的沙漠公路段沿线自然环境极为严酷,气候极端干燥、地表水资源匮乏、地下水矿化度高、风沙活动强烈、土壤贫瘠。据前期研究及监测资料,沙漠公路沿线降水量不足 50mm,潜在蒸散量达 3800mm,极端最高气温 43.2℃,极端最低气温 -19.3℃,最大风速 24m/s,≥6.0m/s 的起沙风总时数 550~800h/a;沙漠公路沿线沙丘形态复杂多样,既有高度达 50m 以上的纵向复合沙垄,也有高度不足 1m 的新月形沙丘,次级沙丘覆盖率达 60% 以上,分布于高大复合沙垄垄间的小沙丘年移动量在 15m 以上;沙漠公路沿线土壤以形成过程极为微弱的风沙土为主,自然植被贫乏,盖度极低<sup>[7,8]</sup>。

表 1 不同定植年限防护林地位置  
Table 1 Sites of different age forest lands

| 位置 Sites                   | 林龄 Forest age                                                           |                                                                                 |                                                                                      |                                                                            |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
|                            | 流沙对照地 Drift sand as control treatment                                   | 2006 年定植 Forest land planted in 2006                                            | 2005 年定植 Forest land planted in 2005                                                 | 2004 年定植 Forest land planted in 2004                                       |
| 采样地点 Sample site           | 丁字路口外围流沙<br>Flowing sand outside of T-shaped Road Junction in Tazhong   | 肉苁蓉二期防护林地<br>Shelter forest land of the secondary phase <i>Cistanche salsa</i>  | 68 号井灌溉防护林地<br>Shelter forest land irrigated with No. 69 water well                  | 肉苁蓉一期防护林地<br>Shelter forest land of the first phase <i>Cistanche salsa</i> |
| 地理坐标 Geographic coordinate | 39°08' N<br>83°42' E                                                    | 39°08' N<br>83°44' E                                                            | 38°53' N<br>83°13' E                                                                 | 39°08' N<br>83°43' E                                                       |
| 林龄 Forest age              | 2003 年定植<br>Forest land planted in 2003                                 | 2001 年定植<br>Forest land Planted in 2001                                         | 1999 年定植<br>Forest land planted in 1999                                              | 1995 年定植<br>Forest land planted in 1995                                    |
| 采样地点 Samplesite            | 塔中植物园外围防护林地<br>Shelter forest land surrounding Tazhong Botanical Garden | 丁字路口南侧防护林地<br>Shelter forest land at southern T-shaped Road Junction in Tazhong | 丁字路口 2km 防护林地<br>Shelter forest land 2km away from T-shaped Road Junction in Tazhong | 中三点三角防护造林地<br>Shelter forest land at Zhongsandian of Tazhong               |
| 地理坐标 Geographic coordinate | 39°07' N<br>83°42' E                                                    | 39°07' N<br>83°41' E                                                            | 39°08' N<br>83°40' E                                                                 | 39°08' N<br>83°39' E                                                       |

## 1.2 沙漠公路防护林的建设管理模式

以耐干旱、耐盐碱的沙拐枣、怪柳、梭梭 3 种灌木作为防护林建设树种,配置方式为行间混交,株行距为  $1\text{m} \times 1\text{m}$ ,林带宽度  $72 \sim 78\text{m}$ 。灌溉方式为滴灌,灌溉周期为 10d,灌水定额  $450\text{cm}^3/\text{hm}^2$ ,滴头间距为 1.5m,滴灌用水矿化度约为  $4.04\text{g/L}$ ,pH 值 8.13。施肥一般在 6~8 月份进行,每月 1 次,主要以浴水施肥为主(将可溶性的尿素倒入施肥罐,随水施入),施肥量每次控制在  $10 \sim 15\text{g/株}$ 。

## 2 材料与方法

### 2.1 采样方法

在立地条件、树龄大小、周围树种类型、灌水时间、距离滴头位置、植株间距等其它条件基本一致的情况下,于 2006 年 7 月下旬,选取 7 种不同定植年限的防护林地和流沙地为采样地(表 1),于各林地中间分别随机选取除管理措施外其它干扰很小的 5 个点(重复 5 次),用直径为 5cm 的钢质土钻分别取出  $0 \sim 10\text{cm}$ 、 $10 \sim 20\text{cm}$ 、 $20 \sim 30\text{cm}$  3 种深度范围内的土样,弃去植物残体过 2mm 筛,各样地不同取样点的同层土样混和均匀后立即装入对应编号的样品袋,将用于分析土壤微生物的放入  $-4^\circ\text{C}$  的冰箱保存。

### 2.2 测定方法

#### 2.2.1 土壤微生物培养计数

土壤微生物数量的测定用稀释平板法<sup>[9]</sup>,其中细菌用牛肉膏蛋白胨培养基,放线菌用高氏一号培养基,真菌用加入孟加拉红的马铃薯葡萄糖培养基。

#### 2.2.2 土壤微生物 FAME 分析

采用 FAME 法分析土壤微生物种群(fatty acid methyl esters)<sup>[10,11]</sup>。GC 测试采用日本岛津公司 GC2010 型气相色谱仪。色谱柱为 DB-1( $30\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25\mu\text{m}$ ),柱温  $100 \sim 270^\circ\text{C}$ , $5^\circ\text{C min}^{-1}$ ,不同样品测定之间,在  $270^\circ\text{C}$  下清洗柱子 2min。脂肪酸种类的确认采用 37 种脂肪酸标准物(购买自 SIGMA 公司)为对照。脂肪酸含量测定用峰面积定量和 C16:0 内标法。

#### 2.2.3 土壤细菌 PCR-DGGE 分析

##### (1) 土壤总 DNA 的提取

① 溶菌酶处理<sup>[12,13]</sup> 该阶段溶液被称为粗提物。

② 纯化<sup>[14~16]</sup> 纯化步骤采用 CsCl 和 KAc 方法<sup>[17]</sup>(所有步骤在室温下进行)。

##### (2) PCR 扩增

参考有关方法加以改进后进行。细菌 16S rDNA 扩增反应的引物为一对通用引物序列如下<sup>[18,19]</sup>:

正向引物 16F27:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'和反向引物 16R1522:5'-AAG GAG CTG ATC CAG CCG CA-3')

用于 DGGE 电泳的 PCR 扩增的引物序列为<sup>[20]</sup>:

正向引物 338f,在 5'末端加 40 个碱基的 GC 夹:5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3';反向引物为 518R:5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'(正向引物的 5'端连接 GC 环主要是为了增加 DNA 双链解链区的数量)。

PCR 反应体系包括基因组 DNA  $2\mu\text{l}$ ,  $10 \times \text{PCR buffer}$   $5\mu\text{l}$ , dNTP ( $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $4\mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$  ( $25\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $3\mu\text{l}$ , primer1 ( $2\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $5\mu\text{l}$ , primer2 ( $2\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $5\mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶( $5\text{U}/\mu\text{l}$ )  $0.5\mu\text{l}$ ,最后加入  $\text{ddH}_2\text{O}$  至终体积为  $50\mu\text{l}$ 。PCR 反应在 PTC-200 循环仪上进行,条件为: $94^\circ\text{C}$  下预变性 5min 后,接着运行以下反应 35 个循环: $94^\circ\text{C}$  30sec; $55^\circ\text{C}$  30sec; $72^\circ\text{C}$  2min;最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 10min。反应完成后,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。第 2 轮 PCR 反应体系同上。反应完成后,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

##### (3) 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

① 电泳 参照 Muyzer 等人<sup>[21]</sup>方法,PCR 产物加入到质量浓度  $0.10\text{g/ml}$  聚丙烯酰胺凝胶中,凝胶的变性范围为 40%~65%。利用 Bio-Rad 公司的 Dcode System 电泳仪,在  $60^\circ\text{C}$ ,130V 条件下,采用  $1 \times \text{TAE Buffer}$  电

泳 400min。

②染色 采用硝酸银染色法<sup>[22~24]</sup>。

③割胶回收 从凝胶上切下含目标条带的凝胶块,转移至灭菌微量离心管中,加入 400 $\mu$ l 高盐溶液,室温放置 24h,然后 65 $^{\circ}$ C 温育 2h,加入 2 倍体积无水乙醇沉淀并溶于 20 $\mu$ l TE 中,取 5 $\mu$ l 回收的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增和纯化<sup>[25]</sup>。

(4) 克隆

①DNA 的连接<sup>[26~29]</sup> 在 200 $\mu$ l 微量 eppendorf 管配制 DNA 溶液,全量为 10 $\mu$ l。其中 pMD20-T Vector 0.5 $\mu$ l,回收的待插入 DNA 4.5 $\mu$ l, Solution I 5 $\mu$ l。以上溶液加完后,用离心机将溶液甩到管底部。16 $^{\circ}$ C 反应过夜。

②感受态细胞的制备<sup>[30~31]</sup>

③连接产物的转化 将 10 $\mu$ l 的连接产物加入 100 $\mu$ l 的感受态细胞 JM109 中,轻弹混匀,冰浴 30min。结束冰浴后,42 $^{\circ}$ C 热击 45~50s,立即再转入冰浴 2min。加入 890 $\mu$ l 预热的 SOC 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 下 150r/min 摇床培养 1h。取其中的 100 $\mu$ l 菌液涂布于预先加入在含有 Amp(100 $\mu$ g $\cdot$ ml<sup>-1</sup>), IPTG(0.5mmol $\cdot$ ml<sup>-1</sup>), X-gal(80 $\mu$ g $\cdot$ ml<sup>-1</sup>)的 LB 平板上培养。平板在 37 $^{\circ}$ C 下先正向放置 1h,后倒置培养过夜。形成单菌落,记数白色、蓝色菌落。

④碱裂解法少量提取质粒<sup>[32~34]</sup>

⑤酶切鉴定阳性克隆<sup>[35~37]</sup>:取 0.5ml 的 eppendorf 管,依次加入:质粒 DNA 6 $\mu$ l, 10 $\times$  PCR buffer 1.5 $\mu$ l, EcoR I(15U/ $\mu$ l)0.2 $\mu$ l, Xho I(8U/ $\mu$ l)0.4 $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 11.9 $\mu$ l。37 $^{\circ}$ C 酶切消化 3h 后用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

## 2.2.4 数据分析方法

(1) 土壤微生物脂肪酸和基因多样性分析

土壤中细菌脂肪酸和 DNA 片段的多样性用多样性指数( $H$ )、丰度( $S$ )和均匀度( $E_H$ )来表示,计算公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln p_i = - \sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln (N_i/N) \quad (1)$$

$$E_H = H/H_{\max} = H/\ln S \quad (2)$$

式中, $P_i$ 是特殊脂肪酸占总脂肪酸量的百分数或者单一条带的强度在所有条带总强度中所占的比率, $S$ 是从某个土壤样品中所有脂肪酸或者 DNA 条带数目总和。

(2) DGGE 指纹图谱相似性分析

DGGE 图谱相似性( $C_s$ )分析 DGGE 指纹图谱分析借助 Bio-Rad 公司的凝胶成像系统进行条带判读,以配套软件 Quantity one 进行迁移率、强度、面积计算,并由此得出样品间的相似指数。通过比较相似性系数,即戴斯系数( $C_s$ )来分析不同条件下土壤微生物指纹图谱的相似性, $C_s$  值的变化范围是(0~100):

$$C_s = 2j/(a+b) \times 100 \quad (3)$$

式中, $a$ 、 $b$  分别代表样品 A 和 B 各自的条带数目, $j$  指样品 A 和 B 共有的条带数。

然后用戴斯系数( $C_s$ )得出的各泳道样品的相似性矩阵作为聚类分析的原始数据,标准化后选择指数相似法,依据非加权配对算术平均法(unweighted pair group method with Arithmetic Averages, UPGMA)绘出 DGGE 条带相似性的系统树图<sup>[38,39]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 土壤微生物区系组成

从塔里木沙漠公路土壤微生物区系组成(表 2)看出,细菌、放线菌和真菌的数量级分别为 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup> 和 10<sup>3</sup>, 细菌数量最多,成为优势种,占整个微生物总数的 81.14%~92.59%,放线菌的比例介于 7.39%~18.83%,

而真菌数量很少,不到微生物总数的 0.1%。与流沙地相比,防护林建设后土壤细菌在微生物总数中的比例略有增大,但随定植年限增加的变化规律不明显,相应地,防护林的建设使放线菌数量在土壤微生物总数中的比例有所降低,而真菌在塔里木沙漠公路防护林地土壤中数量很少,在土壤微生物区系组成中变化很小。土壤微生物区系组成状况在不同土层间存在垂直差异,表层 0~10cm 土壤细菌在微生物区系组成中的比例基本表现为最小,而中下层 10~20cm 和 20~30cm 无明显差异;放线菌则在表层 0~10cm 土层的比例明显大于 10~20cm 和 20~30cm 土层,而真菌差异不明显。就不同土层微生物总数而言,由于细菌是优势种,表现为 10~20cm > 20~30cm > 0~10cm,但流沙地的这种差异不大,这是由于流沙在 0~30cm 的理化性质较均一,微生物生存的土体条件无明显区别;而流沙地上定植林木后,土壤发育加速,不同土层土体条件产生分异,所以微生物生长的土壤条件的不同导致微生物数量差异。

表 2 林龄不同的防护林地土壤微生物数量分布 (CFU/克干土)

Table 2 The quantitative distributions of soil microbes in the different forest lands (CFU/g dry soil)

| 定植年份<br>Plantation<br>year | 土壤深度<br>Soil depth<br>(cm) | 细菌 Bacteria                      |                     | 放线菌 Actinomycetes                |                     | 真菌 Fungi                         |                     | 微生物总数<br>( $\times 10^6$ )<br>Total microbes |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------------------|
|                            |                            | 数量 ( $\times 10^6$ )<br>Quantity | 占总数%<br>Account for | 数量 ( $\times 10^5$ )<br>Quantity | 占总数%<br>Account for | 数量 ( $\times 10^3$ )<br>Quantity | 占总数%<br>Account for |                                              |
| 1995                       | 0~10                       | 383.00                           | 87.86               | 528.00                           | 12.11               | 152.67                           | 0.04                | 435.95                                       |
|                            | 10~20                      | 587.00                           | 92.12               | 501.00                           | 7.86                | 151.00                           | 0.02                | 637.25                                       |
|                            | 20~30                      | 479.00                           | 91.50               | 443.67                           | 8.48                | 105.67                           | 0.02                | 523.47                                       |
|                            | 平均值 Average                | 483.00                           | 90.49               | 490.89                           | 9.48                | 136.44                           | 0.03                | 532.22                                       |
| 1999                       | 0~10                       | 234.33                           | 83.80               | 452.33                           | 16.17               | 99.00                            | 0.04                | 279.66                                       |
|                            | 10~20                      | 452.67                           | 91.26               | 432.67                           | 8.72                | 105.67                           | 0.02                | 496.04                                       |
|                            | 20~30                      | 422.00                           | 92.59               | 336.67                           | 7.39                | 82.67                            | 0.02                | 455.75                                       |
|                            | 平均值 Average                | 369.67                           | 89.22               | 407.22                           | 10.76               | 95.78                            | 0.03                | 410.48                                       |
| 2001                       | 0~10                       | 167.67                           | 81.14               | 389.00                           | 18.82               | 72.33                            | 0.04                | 206.64                                       |
|                            | 10~20                      | 386.00                           | 91.13               | 374.67                           | 8.85                | 84.33                            | 0.02                | 423.55                                       |
|                            | 20~30                      | 372.33                           | 92.11               | 318.33                           | 7.88                | 53.33                            | 0.01                | 404.22                                       |
|                            | 平均值 Average                | 308.67                           | 88.13               | 329.67                           | 11.85               | 70.00                            | 0.02                | 344.80                                       |
| 2003                       | 0~10                       | 159.33                           | 82.01               | 349.00                           | 17.96               | 92.67                            | 0.05                | 194.32                                       |
|                            | 10~20                      | 289.67                           | 89.74               | 330.33                           | 10.23               | 75.33                            | 0.02                | 322.78                                       |
|                            | 20~30                      | 290.33                           | 90.43               | 306.67                           | 9.55                | 47.33                            | 0.01                | 321.04                                       |
|                            | 平均值 Average                | 246.44                           | 87.39               | 360.67                           | 12.58               | 71.78                            | 0.03                | 279.38                                       |
| 2004                       | 0~10                       | 155.33                           | 82.02               | 340.00                           | 17.95               | 75.67                            | 0.04                | 189.41                                       |
|                            | 10~20                      | 265.67                           | 88.51               | 344.33                           | 11.47               | 52.00                            | 0.02                | 300.16                                       |
|                            | 20~30                      | 247.67                           | 89.03               | 304.67                           | 10.95               | 49.00                            | 0.02                | 278.19                                       |
|                            | 平均值 Average                | 222.89                           | 86.52               | 328.67                           | 13.46               | 58.89                            | 0.03                | 255.92                                       |
| 2005                       | 0~10                       | 154.67                           | 83.04               | 315.33                           | 16.93               | 67.00                            | 0.04                | 186.27                                       |
|                            | 10~20                      | 259.67                           | 89.05               | 318.67                           | 10.93               | 57.33                            | 0.02                | 291.59                                       |
|                            | 20~30                      | 248.00                           | 89.76               | 282.33                           | 10.22               | 41.00                            | 0.01                | 276.27                                       |
|                            | 平均值 Average                | 220.78                           | 87.28               | 305.44                           | 12.69               | 55.11                            | 0.02                | 251.38                                       |
| 2006                       | 0~10                       | 137.33                           | 84.01               | 261.00                           | 15.97               | 41.00                            | 0.03                | 163.47                                       |
|                            | 10~20                      | 224.67                           | 89.82               | 254.00                           | 10.16               | 47.00                            | 0.02                | 250.12                                       |
|                            | 20~30                      | 225.33                           | 90.49               | 236.33                           | 9.49                | 40.33                            | 0.02                | 249.00                                       |
|                            | 平均值 Average                | 195.78                           | 88.11               | 250.44                           | 11.87               | 42.78                            | 0.02                | 220.86                                       |
| 流沙地                        | 0~10                       | 115.00                           | 91.08               | 112.33                           | 8.90                | 27.33                            | 0.02                | 126.26                                       |
| Drift sand                 | 10~20                      | 121.33                           | 89.95               | 135.33                           | 10.03               | 21.00                            | 0.02                | 134.88                                       |
|                            | 20~30                      | 105.67                           | 89.50               | 123.67                           | 10.48               | 11.33                            | 0.01                | 118.05                                       |
|                            | 平均值 Average                | 114.00                           | 90.18               | 123.78                           | 9.80                | 19.89                            | 0.02                | 126.40                                       |

### 3.2 土壤微生物脂肪酸多样性分析

通过 F 检验发现,塔里木沙漠公路不同定植年限防护林地土壤微生物脂肪酸的多样性指数 Shannon diversity( $H$ )、丰富度 Richness( $S$ )和均匀度 Evenness( $E_H$ )差异明显(表 3),其中多样性指数和均匀度的差异达到了极显著水平。进一步多重比较(LSD 法)后知:流沙地上建设防护林后,随着林龄的增大,土壤微生物脂肪酸多样性指数逐渐增大,但最大值出现在 8a 的林地上,12a 林地小于 6a 和 8a 林地,防护林地定植 3a 后,土壤脂肪酸多样性指数与流沙地的差异达到显著。同时随着防护林生长年限的增加,土壤微生物脂肪酸的丰富度明显增大,但均匀度并未增大,甚至有不明显的减小趋势,12a 的林地小于流沙地。土壤微生物脂肪酸多样性指数的提高主要是由脂肪酸丰富度增大引起的。

表 3 不同林龄下土壤微生物脂肪酸多样性、丰富度和均匀度指数

Table 3 The diversities, richness and evenness indexes for soil microbial fatty acids in different age forestlands

| 定植年份 Plantation year | 多样性指数 $H$ Diversity index | 丰富度指数 $S$ Richness index | 均匀度指数 $E_H$ Evenness index |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 流沙地 Drift sand       | $1.92 \pm 0.05$ a         | $13.33 \pm 0.58$ abc     | $0.81 \pm 0.06$ abc        |
| 2006                 | $2.27 \pm 0.23$ ab        | $19.33 \pm 1.08$ ab      | $0.84 \pm 0.03$ ab         |
| 2005                 | $2.34 \pm 0.24$ abc       | $27.67 \pm 1.43$ a       | $0.85 \pm 0.06$ a          |
| 2004                 | $2.38 \pm 0.21$ bcd       | $27.67 \pm 1.22$ abcd    | $0.78 \pm 0.05$ abc        |
| 2003                 | $2.58 \pm 0.44$ cde       | $29.00 \pm 1.86$ bcd     | $0.77 \pm 0.03$ bc         |
| 2001                 | $3.07 \pm 0.37$ de        | $36.33 \pm 3.04$ bcd     | $0.77 \pm 0.03$ bc         |
| 1999                 | $3.12 \pm 0.23$ e         | $45.67 \pm 3.33$ cd      | $0.74 \pm 0.03$ c          |
| 1995                 | $2.84 \pm 0.42$ cde       | $47.00 \pm 5.39$ d       | $0.67 \pm 0.02$ d          |
| $F$                  | 5.98 **                   | 3.74 *                   | 5.83 **                    |

\* 和 \*\* 表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著;数值后面不同的小写字母指在 0.05 显著水平上差异明显(下同) \* and \*\* indicate the values differ significantly at 0.05 and 0.01 significance level(the same below);Different lower letters following values show an obvious difference at 0.05 significance levels

对塔里木沙漠公路防护林地不同土层土壤微生物脂肪酸多样性分析比较后发现(表 4),土壤微生物脂肪酸多样性指数在土层 0~10cm、10~20cm、20~30cm 间的垂直差异显著,10~20cm 和 20~30cm 土层明显大于表层 0~10cm;而丰富度和均匀度指数在不同土层间差异并不明显。可能是由于表层土壤受客沙影响,养分含量和土壤结构较差,不利于微生物发育。

表 4 不同土层土壤微生物脂肪酸多样性、丰富度和均匀度指数

Table 4 The diversity, richness and evenness for soil microbial fatty acids at different soil layers

| 土层 Soil layer(cm) | 多样性指数 $H$ Diversity index | 丰富度指数 $S$ Richness index | 均匀度指数 $E_H$ Evenness index |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0~10              | $2.54 \pm 0.64$ a         | $31.38 \pm 2.44$ a       | $0.77 \pm 0.09$ a          |
| 10~20             | $2.79 \pm 0.44$ b         | $30.75 \pm 2.10$ a       | $0.79 \pm 0.06$ a          |
| 20~30             | $2.76 \pm 0.37$ b         | $30.13 \pm 1.34$ a       | $0.78 \pm 0.05$ a          |
| $F$               | 3.81 *                    | 1.97                     | 1.84                       |

### 3.3 土壤细菌基因多样性分析

#### 3.3.1 多样性指数分析

由前面的区系分析发现塔里木沙漠公路防护林地土壤微生物主要以细菌为主,于是运用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 图像分析软件对细菌 DGGE 指纹图谱(图 1,图 2)进行分析,扣除背景强度,检测每个泳道的条带数目,分析每个条带的强度,再计算每个土壤样品的多样性指数(表 5),可以看出,随着塔里木沙漠公路防护林定植年限的增大,林地土壤细菌 DNA 序列的多样性指数明显提高, $F$  检验后有在  $\alpha=0.01$  水平上达到显著。通过多重比较后发现,当防护林定植一年后,林地土壤细菌 DNA 序列多样性指数有明显提高,定植 2a 后已在  $\alpha=0.01$  的显著水平上差异明显,说明防护林建设对土壤细菌 DNA 序列的多样性有明显促进作用。

另外,丰富度指数  $S$  表示 DNA 片段数目,从不同林龄防护林地土壤中检测到的大小不同的细菌 DNA 片段的条带数目变化在 2.00 ~ 11.67 之间,有明显差异,各个林地间的差异关系与多样性指数  $H$  较为相似,相关较密切。但均匀度指数  $E_H$  在不同林地间的差异不明显,表明片段大小不同的土壤细菌 DNA 序列在林地土壤的含量大小无明显差异。

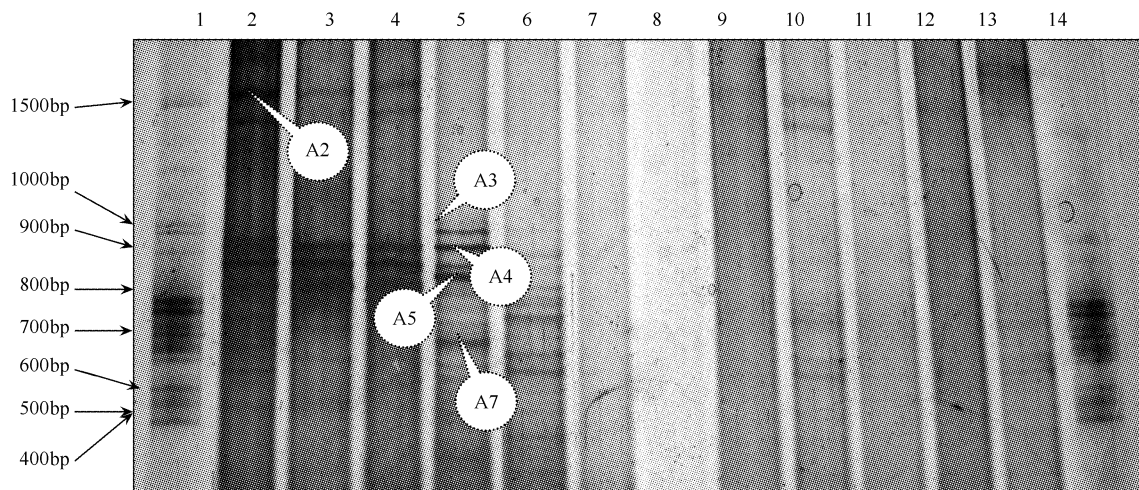


图1 不同定植年限林地土壤细菌 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profile of soil bacteria in the different planted age forestlands

From left to right, 1, 14 lanes indicate MARKER, 2 ~ 13 lanes show samples of 1995③, 2001①, 2001②, 1999①, 1999③, 2001③, 1995①, 1995②, 1999②, 2003①, 2003②, 2004①, respectively; the arrows point different segments of MARKER

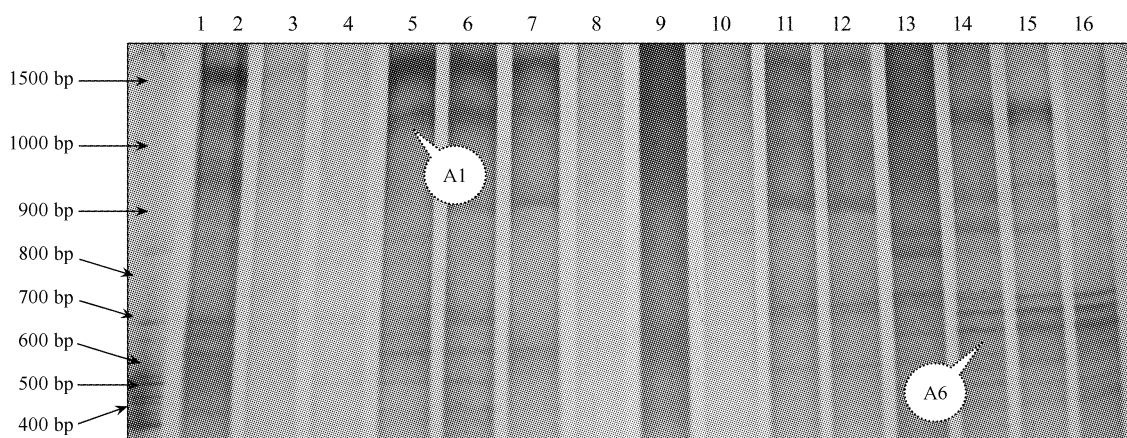


图2 不同定植年限林地土壤细菌 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profile of soil bacteria in the different planted age forestlands

1 lane is MARKER, 2 ~ 16 lanes indicate samples of 1995③, 2001①, 2001②, 2004②, 2005②, 2004③, 2005①, CK①, 2006②, 2005③, 2006①, 2003③, 2006③, CK③, CK②, respectively; the arrows point different segments of MARKER

### 3.3.2 DGGE 图谱的相似性分析

依据非加权配对算术平均法,对塔里木沙漠公路防护林地土壤细菌 DNA 的 DGGE 图谱作了聚类分析,由图 3 看出,定植年限相近的防护林地土壤细菌图谱相似性较高,其中 1999 年和 2001 年定植的防护林地相似性最好,相似系数接近 1.00,它们与 1995 年定植防护林地土壤形成 I 类;流沙地与 2006 年定植的林地土壤、2004 年与 2005 年定植的林地土壤也分别形成一级聚类,之后形成二级分类,相似系数大于 0.85,与第一类相似性最小,相似性系数约 0.74。总体而言,随着防护林定植年限的加长,林地土壤细菌 DGGE 图谱相似性变大。

表 5 细菌 DNA 序列的多样性指数 ( $\pm$ SD)

Table 5 The diversity index of soil bacterial DNA sequence

| 定植年份 Plantation year | 多样性指数 ( $H$ ) Diversity index | 丰富度指数 ( $S$ ) Richness index | 均匀度指数 ( $E_H$ ) Evenness index |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 流沙地 Drift sand       | 2.26 $\pm$ 0.07 aA            | 11.67 $\pm$ 0.58 aA          | 0.92 $\pm$ 0.04 aA             |
| 2006                 | 2.28 $\pm$ 0.11 aA            | 11.00 $\pm$ 1.00 abA         | 0.95 $\pm$ 0.02 aA             |
| 2005                 | 2.24 $\pm$ 0.16 aA            | 10.67 $\pm$ 0.58 bA          | 0.93 $\pm$ 0.03 aA             |
| 2004                 | 1.56 $\pm$ 0.24 bB            | 5.67 $\pm$ 1.53 cB           | 0.92 $\pm$ 0.03 aA             |
| 2003                 | 1.30 $\pm$ 0.05 cBC           | 4.33 $\pm$ 0.58 dC           | 0.90 $\pm$ 0.10 aA             |
| 2001                 | 1.17 $\pm$ 0.15 cCD           | 3.67 $\pm$ 0.58 dCD          | 0.91 $\pm$ 0.12 aA             |
| 1999                 | 0.90 $\pm$ 0.27 dDE           | 2.67 $\pm$ 0.58 eDE          | 0.92 $\pm$ 0.07 aA             |
| 1995                 | 0.65 $\pm$ 0.03 eE            | 2.00 $\pm$ 0.00 eE           | 0.94 $\pm$ 0.05 aA             |
| $F$                  | 74.36 **                      | 197.83 **                    | 0.19                           |

#### 4 结论与讨论

(1)塔里木沙漠公路防护林地的建设促进了风沙土土壤微生物的发育。森林植被能影响林地微环境,通过根系分泌物、地上和地下凋落物以及树冠的拦截和淋洗作用改变土壤微生物生长所需能量物质的数量和质量<sup>[40,41]</sup>。塔里木沙漠公路防护林土壤细菌、放线菌和真菌数量,微生物脂肪酸和细菌 DNA 片段的多样性指数均随防护林定植年限增加呈现增大趋势,同时在不同土层间存在一定的垂直差异,这主要是受森林植被的影响,流沙土逐渐固定,风沙土的理化性质发生变化,土壤肥力提高<sup>[42,43]</sup>。

(2)细菌是塔里木沙漠公路防护林地土壤微生物

区系组成中的优势类群。一般来说,土壤中细菌数量最多,其次为放线菌,真菌数量最少,随着土壤环境的变化,微生物的区系种类会发生改变<sup>[44]</sup>。土壤微生物数量主要取决于细菌,这主要是由细菌个体的生化特性所决定的细菌个体小,繁殖方法简单,速度快,耐高温、抗逆性强<sup>[45]</sup>。塔里木沙漠公路防护林土壤微生物的区系组成能够出现这样的规律,可能是土壤环境因子对于土壤不同种类微生物的胁迫和选择的结果。细菌一般喜好湿润环境,可存活于透气性不好的条件下;真菌能耐受干旱,适宜于通气良好的环境状况;放线菌喜热耐旱,但竞争力较弱<sup>[46,47]</sup>。塔里木沙漠公路防护林长期处于滴灌条件下,0~30cm 土壤基本处于湿润状态,同时风沙土的透气性较差,造成细菌的竞争力较强,而放线菌和真菌在这种条件下的生长发育相对弱一些。

(3)通过传统培养计数,脂肪酸鉴定和 PCR-DGGE 3 种方法对土壤微生物多样性的分析结果基本一致。传统培养法局限于从固体培养基上分离微生物,在琼脂平板上能生长的微生物只能占到土壤微生物总数的 0.1%~1% 到 10%,不能充分反映土壤微生物群落结构<sup>[48,49]</sup>。磷脂脂肪酸分析是一种用于研究微生物群落多样性的生物化学方法,其图谱可代表整个活的微生物群落<sup>[50]</sup>。土壤中 PLFA 的存在及其丰度可揭示特定微生物种群的存在及其丰度<sup>[51,52]</sup>。磷脂在细胞死亡后快速降解,故用以表征微生物群落中“存活”的那部分群体<sup>[53]</sup>。总之,通过对 PLFA 的定量测定和种类鉴定,可实现微生物活细胞生物量的估算和对微生物种群结构变化的了解。目前,磷脂脂肪酸(PLFA)分析被广泛地应用于土壤微生物多样性研究<sup>[54~56]</sup>。自 1993 年 DGGE 被引入微生物生态学以来,该技术被广泛于微生物群落的多样性研究,具有可靠、可重复、快速和容易操作等特点<sup>[57,58]</sup>,结合聚合链式反应(PCR)扩增标记基因或其转录物的 DGGE 能直接显示微生物群落结构<sup>[59,60]</sup>。由于它可同时对多个样品进行分析使之非常适合调查微生物群落的时空变化<sup>[61]</sup>。可见,PCR-DGGE 在分析微生物种群多样性和结构变化规律上具有其独特的优越性<sup>[62,63]</sup>,它可以使研究者直接利用

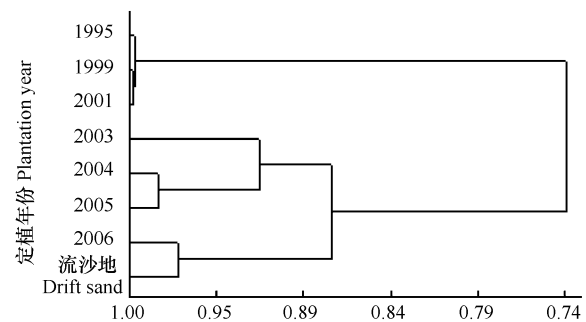


图 3 不同定植年耕地土壤细菌 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of soil bacterial DNA DGGE profile of different planted age forestland

DNA 在分子水平上对微生物多样性进行研究。本文采用以上 3 种方法研究了塔里木沙漠公路防护林地土壤微生物多样性,发现土壤微生物数量、微生物脂肪酸种类和 PCR-DGGE 中细菌 DNA 片段数目关系密切,土壤微生物数量随防护林定植时间明显增加,同时脂肪酸种类和 DNA 片段也增多,这很好地说明了塔里木沙漠公路防护林建设后明显促进了土壤生物的繁殖与发育。

#### References:

- [ 1 ] Sun B, Zhao Q G, Zhang T L, *et al.* Soil quality and sustainable environment III. biological index of soil quality evaluation. *Soils*, 1997, 29:225—234.
- [ 2 ] Kennedy A C, Smith K L. Soil microbial diversity and the sustainability of a cultural soils. *Plant and Soil*, 1995, 170:75—86.
- [ 3 ] Zhou J, Lei T. Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity. *Biodiversity Science*, 2007, 15(3):306—311.
- [ 4 ] Zhou Z B, Li P J. Study on soil microorganism activities of shelter forest along Tarim desert highway. *Journal of Desert Research*, 2003, 23(4):452—458.
- [ 5 ] Zhou Z B, Li P J. Ecological distribution of soil microorganism in artificial greenbelt in hinterland of Taklimakan desert and their relations with soil factors. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(8):1246—125.
- [ 6 ] Gu F X, Wen Q K, Pan B R, *et al.* A preliminary study on soil microorganisms of artificial vegetation in the center of Taklimakan desert. *Chinese Biodiversity*, 2000, 8(3):297—303.
- [ 7 ] Zhou Z B, Li P J, Xu X W, *et al.* Effect of artificial green belt on salt distribution in sand land in hinterland of Taklimakan desert. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2002, 16(2):16—19.
- [ 8 ] Li S Y, Li H Z, Lei J Q, *et al.* Analysis of growth differences of seedlings irrigated with high degree of mineralization water. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2004, 18(3):118—122.
- [ 9 ] The microbe staff room of Institute of Soil Science, Chinese Academy of Science. *Soil microbe research method*. Beijing: Science Press, 1985. 85—176.
- [ 10 ] Robert P, Larkin C, Wayne H, *et al.* Effect of swine and dairy manure amendments on microbial communities in three soils as influenced by environmental conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 2006, 43:51—61.
- [ 11 ] Nancy J R, Marye S, Richard P D, *et al.* Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66:1668—1675.
- [ 12 ] Duan X J, Min H. Diversity of microbial genes in paddy soil stressed by cadmium using DGGE. *Environmental Science*, 2004, 25(5):122—126.
- [ 13 ] Xu X Y, Min H, Liu H, *et al.* Comparison of DNA extraction methods for PCR-DGGE analysis of bacterial communities in soil. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(3):377—381.
- [ 14 ] Zhao Y, Zhou Z H, Li W, *et al.* DNA Extraction from Soil for Molecular Microbial Community Analysis. *Journal of Agro-environment Science*, 2005, 24(5):854—860.
- [ 15 ] Zhang Y G, Li D Q, Wang H M, *et al.* Extraction method of soil microbial DNA for molecular ecology study. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(5):956—960.
- [ 16 ] Zhang R F, Cao H, Cui Z L, *et al.* Extraction and purification of soil microbial total DNA extraction and purification of soil microbial total DNA. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2):276—282.
- [ 17 ] Van Elsas J D, Mantynen V, Wolters, A C. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, 24:188—195.
- [ 18 ] 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.
- [ 19 ] Overas L, Forney L, Dae F L. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevanner, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8):3367—3373.
- [ 20 ] Gerard M, Ellen C D, Andre G U. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695—700.
- [ 21 ] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rDNA. *Amplified and Environmental Microbiology*, 1993, 59:695—700.
- [ 22 ] Bassam B J, Caetano-Anolles G. Fast and sensitive sliver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annual Biochemistry*, 1991, 196:80—83.

- [23] Mao X J, Xiao X, Xiong A H. A modified silver-stain development of DNA in metamorphic polyacrylamide gel. *Journal of Modern Clinical Medical Bioengineering*, 2006, 12(4):371—373.
- [24] Guan H T, Xu S C, Guo Y H. Comparison of two ways of silver staining for DNA in PAGE, *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2006, 37(1):86—87.
- [25] Zhou X Q, Wang Y F, Cai Y, *et al.* PCR-DGGE detection bacterial community structure in the Inner Mongolia steppe with two different DNA extraction methods. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(5):1684—1689.
- [26] Su Y, Yao W, Zhu W Y. Changes of bacterial flora from hindguts of piglets after oral administration of *Lactobacillus amylovorus* S1 as a probiotic strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(6):961—966.
- [27] Orphan V J, Taylor L T, Hafenbradl D, *et al.* Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66:700—711.
- [28] Yang G M, Tang W Q, Li H R, *et al.* Analysis on *Vibrio* bacterial flora in *Takifugu obscurus* by PCR-DGGE. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(3):257—263.
- [29] He L M, Li Zh Y, Wu J, *et al.* Revelation and phylogenetic analysis of the predominant bacterial community associated with sponges in the South China Sea based on PCR-DGGE fingerprints. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(3):487—491.
- [30] Li F, Qiang K X, Wang Y J. Study progress on preparation method and application of competent cell of *Escherichia coli*. *Journal of Ningxia Medical College*, 2003, 25(5):372—374.
- [31] Li M C, He S H. An efficient and rapid method for the preparation and transformation of competent cells from *Escherichia coli*. *Journal of Shantou University Medical College*, 2005, 18(4):228—231.
- [32] Yang X G, Qi Zh G, Zhao B C, *et al.* The compare study on the method of extracting plasmid DNA. *Biotechnology Bulletin*, 2003, 6:24—26.
- [33] Zhang X M, Wang J Sh. A modified alkaline lysis method for the preparation of plasmid DNA. *Journal of Anhui University*, 2000, 24(4):75—78.
- [34] Zhang X N, Huang Y, Zhang Y F, *et al.* A Method of direct extraction of plasmid DNA with phenol-chloroform from clone. *Biotechnology*, 2007, 17(1):44—46.
- [35] Gao J L, Luo J X, Pan R Q, *et al.* Immunoscreening of cDNA expression library of *Haemaphysalis qinghaiensis* and characterization of positive clones. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2006, 26(6):631—633.
- [36] Xu H M, Wan K, Li Z G. Two Rapid Screening Positive Clones Methods. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2001, 8(2):72—74.
- [37] Wang Y, Chen H Z, Chu B, *et al.* Screening positive clone in prokaryotic cell. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2003, 38(6):486—489.
- [38] Zhang J, Zhang H W, Su Z C, *et al.* The effect of long-term organic wastewater irrigation on the soil nitrogen-fixing bacteria population. *Journal of Agro-environment Science*, 2007, 26(2):662—666.
- [39] Luo P, Hu Ch Q, Xie Zh Y, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in brackish water *Litopenaeus vannamei* culture system. *Journal of Tropical Oceanography*, 2006, 25(2):49—53.
- [40] David A W. *Communities and Ecosystems: linking the aboveground and belowground components*. New Jersey: Princeton University Press. 2002, 56—104.
- [41] Amalia V D S, Flora A R. Fungal mycelium and decomposition of needle litter in three contrasting coniferous forests. *Acta Oecologica*, 2002, 23:247—259.
- [40] Chen Z C. Activities of Soil Enzymes in Sand Dune Crust of Different Zones. *Journal of Desert Research*, 1989, 9(1):86—91.
- [41] Gu F X, Wen Q K, Pan B R, *et al.* Research on soil enzyme activities of aeolian soil under artificial plantation in Taklimakan desert heartland. *Journal of Desert Research*, 2000, 20(3):293—297.
- [42] Yao H, He Z, Wilson M J, *et al.* Microbial Biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microbial Ecology*, 2000, 40:223—237.
- [43] Xu J W, Li C Y, Wang W D, *et al.* Soil microbes of poplar plantations on lowland of yellow river downstream. *Journal of Northeast Forestry University*, 2007, 35(9):52—55.
- [44] Brown, A L. *Ecology of Soil Organisms*. Heinemann Educational Books Ltd; 1978, 35—43.
- [45] Wall D H, Virginia R A. Control on soil biodiversity: insights from extreme environments. *Applied Soil Ecology*, 1999, 13:137—150.
- [46] Amann R L, Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Review*, 2000, 24:555—565.
- [47] 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. *Microbial Ecology*, 2000, 40:169—176.
- [48] Ringelberg D B, Davis J D, Smith G A, *et al.* Validation of signature polarlipid fatty acid biomarkers for alkane-utilizing bacteria in soils and

- subsurface aquifer materials. *FEMS Microbiology Ecology*, 1989, 62:39–50.
- [48] Zelles L, Bai Q Y, Beck T, *et al.* Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24 (4):317–323.
- [49] Zhang R F, Cui Z L, Li S P. Advance in methods for research on soil microbial community structure. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 36(5):476–480.
- [50] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29:111–129.
- [51] Medeiro P M, Fernandes M F, Dick R P, *et al.* Seasonal variation in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil. *Chemosphere*, 2006, 65 (5):832–839.
- [52] Ren R X, Zhang Y, Li H, *et al.* Pollutant components and microbial community structure of oil-polluted soils after converted from paddy field to upland. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(5):1107–1112.
- [53] Bai Z, Zhang X D, He H B, *et al.* Effects of long-term nitrogen fertilizer application on NLFA and PLFA in mollisol farmland. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 2007, 44(4):43–50.
- [54] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rDNA. *Amplified and Environmental Microbiology*, 1993, 59:695–700.
- [55] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Microbiology*, 1999, 2:317–322.
- [56] Li Z J, Xu J M, Tang C X, *et al.* Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere*, 2006, 62:1374–1380.
- [57] Michihiko Sakurai, Katsumasa Suzuki, Masayuki Onodera, *et al.* Analysis of bacterial communities in soil by PCR DGGE targeting protease genes. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39:2777–2784.
- [58] Ma Y X, Carola Holmstrom, Jeremy Webb, *et al.* Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 8:1561–1569.
- [59] Alberto A, Judith A, Giuseppe C, *et al.* Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36:859–868.
- [60] Brodie E, Edwards S, Clipson N. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS Microbiological Ecology*, 2003, 45:105–114.

#### 参考文献:

- [1] 孙波, 赵其国, 张桃林, 等. 土壤质量与持续环境 Ⅲ. 土壤质量评价的生物学指标. *土壤*, 1997, 29:225–234.
- [3] 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.
- [4] 周智彬, 李培军. 塔里木沙漠公路防护林土壤微生物活性研究. *中国沙漠*, 2003, 23(4):452–458.
- [5] 周智彬, 李培军. 塔克拉玛干沙漠腹地人工绿地土壤中微生物的生态分布及其与土壤因子间的关系. *应用生态学报*, 2003, 14(8):1246–1253.
- [6] 顾峰雪, 文启凯, 潘伯荣, 等. 塔克拉玛干沙漠腹地人工植被下土壤微生物的初步研究. *生物多样性*, 2000, 8(3):297–303.
- [7] 周智彬, 李培军, 徐新文, 等. 塔克拉玛干沙漠腹地人工绿地对沙地盐分时空分布的影响. *水土保持学报*, 2002, 16(2):16–19.
- [8] 李生宇, 李红忠, 雷加强, 等. 塔克拉玛干沙漠不同立地条件下咸水滴溉苗木的生长差异. *水土保持学报*, 2004, 18(3):118–122.
- [9] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985. 85–176.
- [14] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态学研究总 DNA 的提取. *农业环境科学学报*, 2005, 24(5):854–860.
- [15] 张于光, 李迪强, 王慧敏, 等. 用于分子生态学研究的土壤微生物 DNA 提取方法. *应用生态学报*, 2005, 16(5):956–960.
- [16] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. *微生物学报*, 2003, 43(2):276–282.
- [18] 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.
- [23] 毛晓健, 肖听, 熊爱华. 一种改良的变性聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 银染显色方法. *现代临床医学生物工程学杂志*, 2006, 12(4):371–373.
- [24] 关海涛, 徐世昌, 郭玉华. 两种聚丙烯酰胺凝胶银染方法的比较. *沈阳农业大学学报*, 2006, 37(1):86–87.
- [25] 周小奇, 王艳芬, 蔡莹, 等. 内蒙古典型草原细菌群落结构的 PCR-DGGE 检测. *生态学报*, 2007, 27(5):1684–1689.
- [26] 苏勇, 姚文, 朱伟云. 益生菌 *Lactobacillus amylovorus* S1 对仔猪后肠菌群的影响. *微生物学报*, 2006, 46(6):961–966.
- [28] 杨桂梅, 唐文乔, 李会荣, 等. 利用 PCR-DGGE 法分析暗纹东方鲀的弧菌菌落组成. *上海水产大学学报*, 2006, 15(3):257–263.
- [29] 何丽明, 李志勇, 吴杰, 等. 基于 PCR-DGGE 指纹的南海海绵共附生细菌优势种群的揭示与系统发育分析. *微生物学报*, 2006, 46(3):487–491.

- [30] 李芳, 墙克信, 王玉炯. 大肠杆菌感受态细胞制备方法及应用的研究进展. 宁夏医学院学报, 2003, 25(5):372~374.
- [31] 李明才, 何韶衡. 一种高效、快速的大肠杆菌感受态细胞制备及质粒转化方法. 汕头大学医学院学报, 2005, 18(4):228~231.
- [32] 杨献光, 齐志广, 赵宝存, 等. 碱裂解法提取质粒 DNA 的研究. 生物技术通报, 2003, 6:24~26.
- [33] 张学民, 王金生. 碱裂解法提取质粒 DNA 方法的改进. 安徽大学学报(自然科学版), 2000, 24(4):75~78.
- [34] 张晓楠, 黄勇, 张延凤, 等. 用酚-氯仿直接从克隆中提取质粒 DNA. 生物技术, 2007, 17(1):44~46.
- [35] 高金亮, 罗建勋, 樊瑞泉, 等. 青海血蚱 cDNA 表达文库的免疫学筛选和阳性克隆的鉴定. 中国兽医学报, 2006, 26(6):631~633.
- [36] 徐寒梅, 王凯, 李治国. 两种快速筛选重组阳性克隆的方法. 药物生物技术, 2001, 8(2):72~74.
- [37] 汪渊, 陈厚早, 储兵, 等. 原核细胞阳性克隆的筛选. 安徽医科大学学报, 2003, 38(6):486~489.
- [38] 张晶, 张惠文, 苏振成, 等. 长期有机污水灌溉对土壤固氮细菌种群的影响. 农业环境科学学报, 2007, 26(2):662~666.
- [39] 罗鹏, 胡超群, 谢珍玉, 等. 凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析. 热带海洋学报, 2006, 25(2):49~53.
- [40] 陈祝春. 不同地带沙丘结皮层的土壤酶活性. 中国沙漠, 1989, 9(1):86~91.
- [41] 顾峰雪, 文启凯, 潘伯荣, 等. 塔克拉玛干沙漠腹地人工绿地风沙土的土壤酶活性研究. 中国沙漠, 2000, 20(3):293~297.
- [43] 许景伟, 李春艳, 王卫东, 等. 黄河下游滩地杨树人工林土壤微生物分析. 东北林业大学学报, 2007, 35(9):52~55.
- [49] 张瑞福, 崔中利, 李顺鹏. 土壤微生物群落结构研究方法进展. 土壤学报, 2004, 36(5):476~480.
- [52] 任瑞霞, 张颖, 李惠, 等. 石油污染土壤水改旱后污染物组份及微生物群落结构变化. 应用生态学报, 2007, 18(5):1107~1112.
- [53] 白震, 张旭东, 何红波, 等. 长期氮肥施用对农田黑土 NLFA 与 PLFA 特性的影响. 土壤学报, 2007, 44(4):43~50.
- [58] 马悦欣, Carola Holmstrom, Jeremy Webb, 等. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物生态学中的应用. 生态学报, 2003, 8:1561~1569.