

# 土壤微生物多样性实验研究方法概述

章家恩 蔡燕飞 高爱霞 朱丽霞

(华南农业大学热带亚热带生态研究所 广州 510642)

**摘要** 对有关土壤微生物多样性,包括微生物类群多样性、群落结构多样性、功能多样性以及基因多样性等的描述与表征方法进行了探讨,同时对当前国内外土壤微生物多样性的一些实验研究方法,包括土壤微生物分离培养方法、Biolog 微平板方法、FAME 分析方法和分子生物学方法等进行了介绍和评述。并指出在土壤微生物多样性研究中,如果可能的话,需要将各种方法结合起来使用,方可得到有关土壤生物多样性的较为全面的信息和理解。

**关键词** 土壤微生物;生物多样性;FAME;Biolog;PCR

**中图分类号** Q938.1;S154.36

生物多样性是当今国际上共同关注的问题,它也因此日益成为学术界的热点研究领域之一。目前在地上部植物和动物的多样性方面开展了大量的研究,但对土壤生物多样性,特别是在土壤微生物多样性方面的研究仍较薄弱。其中一个重要的原因就是在土壤微生物多样性的研究方法方面还存在着较大的困难和缺陷,很多方法还不能全面地、准确地研究土壤微生物多样性状况。为此,本文对当前国内外土壤微生物多样性研究方法进行概述,旨在为相关研究提供一些参考。

## 1 土壤微生物多样性的表示方法

生态学意义上的“生物多样性”是指生物与环境形成的生态复合体以及与此相关的各种生态过程的总和,一般包括遗传多样性、物种多样性和生态系统多样性 3 个层次<sup>[1]</sup>。生物多样性通常用“多样性指数”来表示。生物(物种)多样性指数的计算一般需要知道群落中物种的种数以及各物种的个体数等相关的信息。对于土壤微生物,由于方法上的限制和微生物自身的变异性,目前还不可能将土壤中的全部微生物培养出来,而且对于土壤微生物种属的鉴定分类也是一件不易的工作。因此,在实际研究中,通常从某一侧面或某一角度来近似或间接地描述土壤微生物的多样性状况。

用以研究和描述土壤微生物多样性状况的相关指标和方法很多,大致有以下几个方面:(1)从土壤

微生物类群 细菌、真菌和放线菌 3 大类群的数量及其比例组成来描述;(2)从微生物的代谢功能与生物活性来描述,主要包括土壤微生物呼吸、土壤酶活性、能量代谢类型、土壤微生物生物量等;(3)从分子水平来研究微生物群落结构的多样性,如从土壤微生物 DNA 基因多态性,以及微生物细胞膜内磷脂类化合物数量和种类的多样性来描述;(4)从某一类群或者优势微生物种类组成及其数量来研究土壤微生物多样性,如对土壤中的固氮菌、根瘤菌、菌根菌、产甲烷细菌等的多样性进行研究<sup>[2]</sup>。

## 2 土壤微生物多样性的实验研究方法

土壤微生物多样性的实验研究方法很多,从国内外目前采用的方法来看,大致上包括以下几类:(1)传统的微生物平板纯培养方法;(2)Biolog 微平板分析方法;(3)脂肪酸分析方法;(4)分子生物学方法;(5)其他方法,如用于微生物生物量测定的氯仿熏蒸方法(Fumigation-incubation)、底物诱导呼吸法(Substrate-induced respiration)和光合微生物色素法等等;用于测定土壤 C 矿化速率和微生物呼吸强度等方法;用于测定土壤酶活性分析方法;用于土壤微生物形态鉴定的方法;用于测定微生物能量代谢的分析方法;用于测定微生物对土壤养分利用与转化功能的同位素示踪法;以及以荧光为基础的显微技术,包括荧光标记蛋白、荧光染色和荧光原位杂交等<sup>[2~8]</sup>(图 1)。

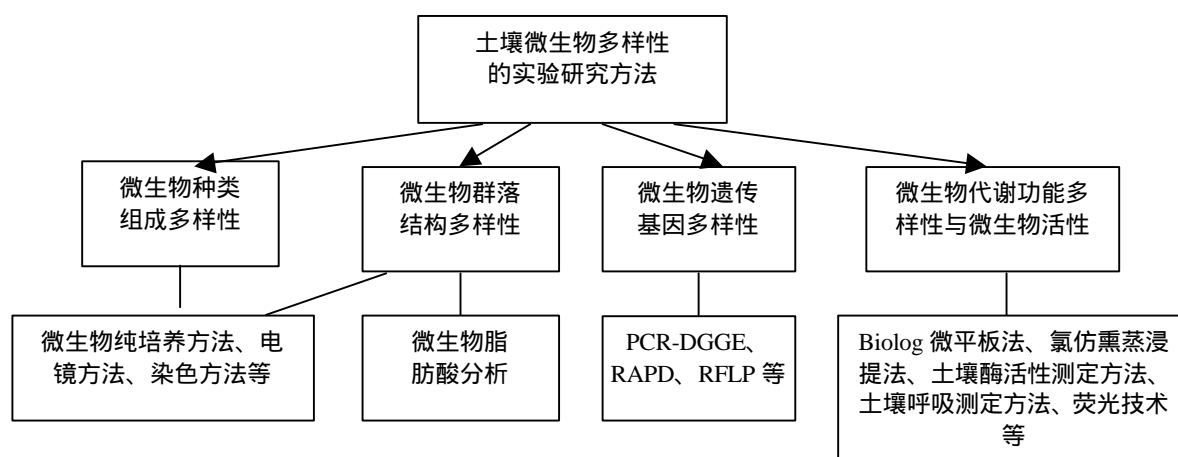


图1 土壤微生物多样性的实验研究方法

Fig. 1 Methods for laboratory analysis of biodiversity in soil

下面仅对有关土壤微生物多样性几种主要的实验研究方法加以介绍与评述。

### 2.1 微生物平板培养方法

微生物平板培养方法是一种传统的实验方法。这种方法主要使用不同营养成分的固体培养基对土壤中可培养的微生物进行分离培养，然后根据微生物的菌落形态及其菌落数来计测微生物的数量及其类型。平板稀释法进行土壤微生物分离培养的常用方法，一般分为稀释 接种 培养 计数等几个步骤，该方法简便易行，一直以来，被广泛应用。然而，这种方法也存在不少缺陷，主要表现在固体培养基的选择和实验室培养条件等方面的限制上。首先，由于微生物对培养基具有选择性，因此，有限的几种培养基不可能将土壤中所有的微生物培养出来。例如，在实验室用营养丰富的牛肉膏蛋白胨来测定土壤活细菌的总数，大量的贫营养微生物则不适宜生长，导致测定结果误差大；同时，实验室的培养条件不可能同时满足不同类型的微生物对温度、通气状况以及 pH 等条件的要求，因而采用某一特定条件就很难将不适宜该条件的微生物培养出来，而且，许多微生物在环境变化过程中表现为一种“存活但不能培养”（Viable but nonculturable, VBNC）的状态，因而，利用平板培养法不可能全面地获得土壤中所有的或者绝大多数的微生物的全部信息<sup>[2-4]</sup>，显然，这不利于研究土壤微生物多样性状况。利用平板培养法测定的土壤微生物类群数量只能占到土壤中实际存在的微生物总数的1%~10%。另一方面，这种平板培养方法通常只能得到微生物类群的数量信息，若要得到种类信息，

则必须进一步地分离、纯化和鉴定。因此，微生物培养方法存在许多不足，在土壤微生物群落多样性研究中，需要结合现代生物技术来更详细的了解土壤微生物状况。但也不能忽视这种传统微生物培养方法的作用，因为许多微生物资源的开发与利用还是要依赖传统的平板培养技术。

### 2.2 BILOG 微平板方法

Biolog 微平板法是测定土壤微生物对 95 种不同 C 源的利用能力及其代谢差异，进而用以表征土壤微生物代谢功能多样性或结构多样性的一种方法。该方法起始于医学领域。其具体做法是，利用由 95 孔不同单一 C 源和 1 个对照孔组成的 Biolog 微平板系统，将土壤溶液接种到每一个微平板孔中，在一定的温育时间内，由于不同微生物对不同单一 C 源利用程度和强度不一样而发生不同生化代谢反应，最终使得每一个孔的溶液呈现出不同程度的颜色，微平板中每一孔的颜色变化可以通过酶标仪测定和记录下来，这样便可得到土壤微生物特有的“代谢指纹”（Metabolic Fingerprint）。根据土壤微生物的代谢指纹图谱，结合有关的计算机分析软件和已有的菌种库资料，可以得到某些微生物的分类鉴定，对一般细菌的鉴定可以精确到种，有的甚至精确到种以下的分类单元，如不同的生化变种等<sup>[9-12]</sup>。但目前数据库中菌种资料不完善，有些只能得到相似的类群。因此，对于微生物的分类鉴定，仅靠 Biolog 系统的方法是远远不够的，需结合其他方法如微生物生理生化和表型分析等进行。同时，根据 Biolog 颜色反应数据组合模式，利用主成分分析和聚类分析方法可以获得土壤微生物群落结构和代谢功能方

面的信息。虽然不同微生物对同一 C 源的利用能力是有差异的,但微生物对不同单一 C 源的代谢指纹差异不能简单地归纳为微生物群落数量和结构的差异,也就是说,需要同时考虑土壤微生物在 Biolog 微平板系统中生长时,由于温育环境的改变引起微生物对 C 底物实际利用能力的改变及其适应性问题如代谢补偿、代谢适应等。土壤微生物在 Biolog 微平板温育过程中,由于温育环境与土壤自然状况存在很大差异,快速生长型的土壤微生物变为优势类群,故不能原位反映土壤微生物<sup>[3]</sup>。同时,Biolog 微平板法描述的只是土壤中快速生长型或富营养微生物类群的活性,而不能反映土壤中生长缓慢的微生物信息,包括 Biolog 方法在内的微生物培养方法测定的土壤微生物种类数量不到 16S rRNA 方法测定的微生物数量的 1%<sup>[3]</sup>,因而大大低估了土壤中微生物的实际情况,故许多学者建议在使用 Biolog 微平板法时,需要结合其他方法,以获得更全面的结果。

### 2.3 PLFA 谱图分析

较早的研究发现,磷脂类化合物只存在于生物的细胞膜中,不同微生物体内往往具有不同的磷脂脂肪酸组成和含量水平,而且,一旦生物细胞死亡,其中的磷脂化合物就会马上消失,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。磷脂脂肪酸(Phospholipid Fatty Acid, PLFA)谱图分析方法、脂肪酸(Fatty acid)和脂肪酸甲酯(Fatty Acid Methyl Ester, FAME)谱图分析方法等早已应用

于对感染致病微生物以及人类和动物体内微生物卫生的研究方面。近些年来,磷脂脂肪酸分析方法也逐渐被应用于土壤微生物多样性的研究中来,并作为土壤微生物种群变化的监测指标。目前,FAME 谱图分析已成为土壤微生物多样性的较为常用研究方法之一<sup>[3-5, 13, 14]</sup>。该方法首先是利用有机溶剂将土壤微生物中的磷脂脂肪酸浸提出来,然后再进行分离纯化,最后利用标记脂肪酸,通过气相色谱(GC)等仪器分析方法,得到土壤微生物的磷脂脂肪酸组成图谱,进而得到不同脂肪酸的含量和种类,即所谓的 FAME 指纹剖面(Fingerprint Profile)(图 2)。根据 FAME 的多样性,利用相关的计算机分析软件和相关数据库便可同时得到土壤微生物的群落结构组成多样性、比例以及微生物生物量等方面的信息。FAME 分析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 FAME 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。在该方法中,细菌和真菌可根据其磷脂脂肪酸的组成来鉴别,但不同属甚至不同科的微生物 FAME 有可能重叠,而且该方法只能鉴定到微生物属,不能鉴定到种,同时,该方法强烈地依赖于标记脂肪酸,标记脂肪酸变化可导致错误的群落变化估计。另外,该方法一个明显的缺陷是实验条件要求高,耗时长,成本高,因而在实际研究工作中常受到一定的限制<sup>[5]</sup>。

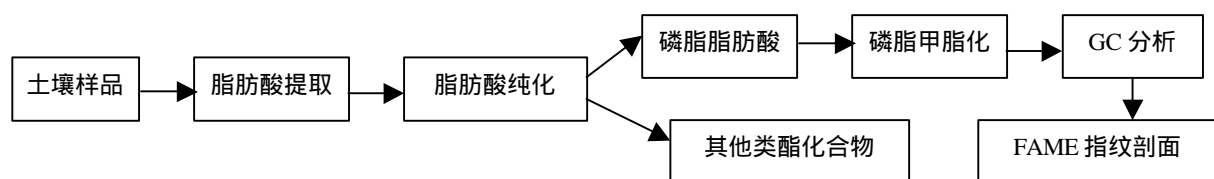


图 2 土壤微生物 FAME 谱图分析的一般程序

Fig. 2 The general procedures of FAME fingerprint analysis of soil microbes

### 2.4 分子生物学方法

最近 20~30 年间,以核酸分析技术为主的分子生物学技术(如 PCR、RFLP、RAPD、PCR-DGGE/TGGE、AFLP、SSR 等)的广泛应用,为从分子水平揭示生物多样性提供了新的方法论,开拓了分子生物学与生态学的交叉领域,分子生物学技术也逐渐被应用到土壤微生物多样性的研究中来<sup>[15-20]</sup>。PCR 技术即聚合酶链式反应,是一种体外

扩增核酸序列从而得到多个核酸拷贝的技术,可用于土壤微生物 DNA 扩增,并对扩增产物进行定量或定性分析;DGGE 即变性梯度凝胶电泳,是根据 PCR 扩增产物中长度系统但不同 G+C 含量的 rDNA 片段混合物在电泳胶中的移动位置不一样,进而形成不同 rDNA 指纹剖面,故可直接反映土壤微生物 rDNA 的多态性。RFLP 是利用 PCR 扩增产物用限制性内切酶进行切割并电泳,以酶切后 DNA 片段

长度变化来表现出来,通过 DNA 转印及分子杂交方法检测。RAPD 是以单一的短长度序列随机的寡核苷酸为引物,由于不同样本基因组序列的不同,以致与引物互补退火结合的 DNA 片段可能增加或减少,导致了扩增产物数目的变化。AFLP 是通过有选择的扩增经酶切的部分基因组 DNA 片段而达到发现各样本基因组间差异的目的。SSR 是利用微卫星标记 (Microsatellite) 来检测 DNA 序列的多态性<sup>[1, 3, 4]</sup>。

在土壤微生物 DNA 分析中,近年来,以 16S rDNA、23S rDNA 以及 16~23S rDNA 间区 (ISR) 的序列分析正在成为细菌分类核鉴定中的热点。其中,原核生物的 16S rDNA 区域应用较多,它具有保守序列和高变异序列等优点,因此,16S rDNA 序列分析已广泛用于土壤微生物多样性的研究中。16S rDNA 序列分析主要基于已建立的微生物 16S rDNA 基因数据库,用以确定细菌的系统发育关系,设计并制备序列探针用以识别不可培养菌<sup>[3-5]</sup>。

土壤微生物的 DNA 分析大致可分为以下几个步骤:(1)土壤微生物细胞中 DNA 的提取、纯化;(2)聚合酶链式反应;(3)变性处理,如电泳、酶切、转印、杂交、显影等;(4)DNA 检测与测序(图

3)。目前从土壤中抽提 DNA 的方法有两种:(1)反复的悬浮、离心以提取细胞,然后溶解细胞,提取总 DNA;(2)用机械破碎、化学、酶解的手段直接裂解土壤微生物细胞,释放 DNA。第 1 种方法提取的 DNA 纯度比第 2 种方法要高,但提取量少,不能反映整个微生物群落,而且费时费力。第 2 种方法接近土壤的实际情况,操作流线型<sup>[3]</sup>。

总之,上述分子生物学方法使得微生物多样性的研究更为直接,并较为准确。目前土壤微生物 DNA 多样性研究多局限于原核生物,而对真核生物研究不足。另一方面,上述技术分析成本高、费时,实验条件要求高,而且在微生物的种类鉴别与定量分析方面也存在一定的局限性。由于在土壤微生物总 DNA 提取过程中,腐殖质干扰大, DNA 容易断裂和降解,容易使 PCR 扩增失败或呈假阳性;而且土壤中有些细菌很难裂解,大多数 DNA 纯化方法仅适宜特定的土壤,不能通用于各种土壤,这些问题均有待解决。尽管如此,土壤微生物多样性的分子生物学研究方法已显示出了广阔的应用前景,随着方法的不断完善,它将使土壤微生物多样性研究逐步从黑箱研究进入到白箱研究阶段,使土壤微生物多样性在微观研究上深入到分子水平。

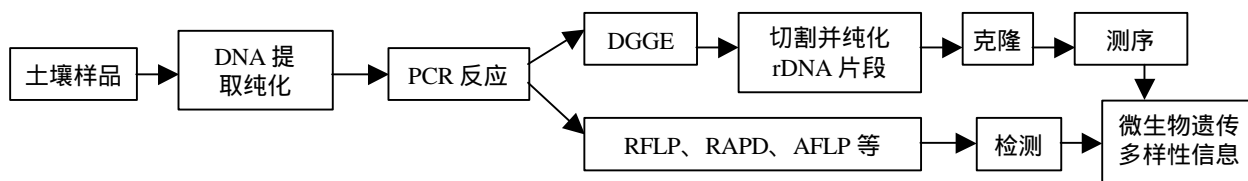


图3 分子生物技术在土壤微生物多样性研究中的应用图解

Fig. 3 A schematic of application of molecular biological techniques in the study of soil

### 3 结语

目前,用以测定土壤微生物多样性状况的方法很多,而且大多从不同的角度来研究土壤微生物多样性,有直接的,也有间接的。但每一种方法均有其优缺点。因此,为了获取较为全面的微生物多样性信息,在条件许可的情况下,尽可能将其中的几种方法结合起来。

#### 参考文献

- 1 骆世明主编. 农业生态学. 北京: 中国农业出版社, 2001, 72 ~ 96
- 2 李阜棣, 胡正嘉. 微生物学. 北京: 中国农业出版社, 2000, 4 ~ 301
- 3 蔡燕飞, 廖宗文. 土壤微生物生态学研究方法进展. 土壤与环境, 2002, 11 (2): 167 ~ 171
- 4 张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁. 微生物生态学研究方法. 生态学报, 2003, 22 (5): 988 ~ 995
- 5 John WD, Alice JJ. Methods for assessing soil quality. SSSA special publication number 49, Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA. 1996, 203 ~ 272
- 6 Kelting DL, Burger JA, Edwards GS. Estimating root respiration, microbial respiration in the rhizosphere, and root-free soil respiration in forest soils. Soil Biology And

- Biochemistry, 1998, 30 (7): 961 ~ 968
- 7 Chen GC, He ZL, Wang YJ. Impact of pH on microbial biomass carbon and microbial biomass phosphorus in red soils. *Pedosphere*, 2004, 14 (1): 9 ~ 15
- 8 Akmal M, Khan KS, Xu JM. Dynamics of microbial biomass in a rainfed soil under wheat cultivation. *Pedosphere*, 2004, 14 (1): 53 ~ 62
- 9 杨元根, Paterson E, Campbell C. Biolog 方法在区分城市土壤与农村土壤微生物特性上的应用. *土壤学报*, 2002, 39 (4): 582 ~ 589
- 10 龙健, 黄昌勇, 滕应, 姚槐应. 铜矿尾矿库土壤—海洲香薷(*Elsholtzia harchowensis*)植物体系的微生物特征研究. *土壤学报*, 2004, 41 (1): 120 ~ 125
- 11 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 龙健, 姚槐应. 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
- 12 Winding A, Hendriksen NJ. Biolog substrate utilization assay for metabolic fingerprint of soil bacteria: incubation effects. In: Insam H, Rangger A. eds. *Microbial communities: Functional versus structural approaches*. Heidelberg: Springer, 1997, 192 ~ 205
- 13 Guckert JB, White DC. Phospholipid ester-linked fatty acid analysis in microbial ecology. In: Megusar F, Gantar G. eds. *Perspectives in Microbial Ecology*. Proceedings of the 4th International Symposium on Microbial Ecology, Ljubljana, Slovenia, 1986, 455 ~ 459
- 14 Petersen SO, Debosz K, Schjonning P, Christensen BT, Elmholt S. Phospholipid fatty acid profiles and C availability in wet-stable macro-aggregates from conventionally and organically farmed soils. *Geoderma*, 1997, 78: 181 ~ 196
- 15 马万里. 土壤微生物多样性研究的新方法. *土壤学报*, 2004, 41 (1): 103 ~ 107
- 16 Torsvik VL, Goksoyr J, Daae FL. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Env. Microb.*, 1990, 56: 782 ~ 787
- 17 Torsvik VL. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1980, 12: 15 ~ 21
- 18 Ogram A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, 32: 1499 ~ 1504
- 19 Muyzer G, de Wall E, Uitterlinden A. Profiling of complex microbial populations by DGGE of PCR-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Env. Microbiol.*, 1993, 59: 695 ~ 700
- 20 Schwieger F, Tebbe CC. A new approach to utilize PCR-single strand-conformation polymorphism for 16s rRNA based microbial community analysis. *Appl. Env. Microbiol.*, 1998, 64: 4870 ~ 4876

## REVIEW ON LABORATORY METHODS FOR SOIL MICROBIAL DIVERSITY

ZHANG Jia-en   CAI Yan-fei   GAO Ai-xia   ZHU Li-xia

(*Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642*)

**Abstract** Methods for describing and characterizing soil microbial diversity, including population diversity, community diversity, gene diversity and function diversity, were discussed in this paper. A series of laboratory methods for measuring soil microbial diversity were reviewed and some new technologies, such as Biolog micro-plates, PFLA analysis and molecular biological techniques (such as PCR, DGGE, RAPD, RFLP, AFLP, SSR) were introduced as well. Meanwhile it was suggested that if possible, it is advisable to combine some of the methods in the test so as to get more accurate and comprehensive information and a better understanding of soil microbial biodiversity.

**Key words** Soil microorganisms, Biodiversity, FAME, Biolog, PCR