DOI:10.13758/j.cnki.tr.2004.05.004

土 壤 (Soils), 2004, 36 (5): 476~480

土壤微生物群落结构研究方法进展①

张瑞福 崔中利 李顺鹏

（南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095）

摘 要 分离培养技术在土壤微生物的研究中有很大的局限性，因为土壤中的微生物大部分还处于不能被分离培养状态。随着微生物研究技术的发展尤其是分子生物学技术的发展，一系列不依赖于培养的技术在土壤微生物研究中得到广泛应用。本文介绍了生物标志物法、SCSU、DNA 复性分析、DGGE、TGGE、ARDRA、T-RFLP、SSCP、PAPD 和 ERIC-PCR 图谱分析等方法在土壤微生物群落结构研究中的应用。

关键词 微生物群落结构； 不依赖培养； 研究方法

中图分类号 Q 938

土壤是一个极为复杂的生态体系，土壤微生物学一直被认为是研究中的“黑匣子”（black box）。许多研究已经证实，通过传统的分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的 0.1 %~10 %[1, 2]。传统的土壤微生物研究方法如分离计数法、显微镜法往往会过低估价土壤微生物的群落结构组成，虽然使用电子显微镜或荧光抗体染色法可以对土壤微生物形态多样性进行观察，但是这两种方法并不能描述出土壤微生物的群落结构组成方面的信息，也无法描绘出不同群体的生理差异。随着微生物研究技术的发展尤其是分子生物学技术的发展，土壤微生物学家开发出一系列的研究土壤微生物群落结构的方法。

1 生物标志物（Biomarker）法

使用生物标志物来定量描述土壤微生物的群落结构组成是最常用的方法之一。这种生物标志物通常是微生物细胞的生化组成成分或是细胞外分泌产物。当测定土壤中这些化合物时，首先使用一种合适的提取剂直接把其从土壤中提取出来，然后对提取物进行纯化后用合适的仪器加以定量测定。用这种方法来定量描述土壤微生物的群落结构组成的优点是既不需要把微生物的细胞从环境样中分离，同时又能克服由于对微生物培养而导致不同微生物种群可能会发生选择性生长所造成的麻烦。

磷脂脂肪酸（phospholipid fatty acid, PLFA）图谱分析、脂肪酸（fatty acid, MFA）谱图以及甲基脂肪酸酯（fatty acid methyl ester, FAME）谱图分析在群落动态分析上的应用十分广泛。磷脂是构成生物细胞膜的主要成分，约占细胞干重的 5%[3]。在细胞死亡时，细胞膜很快被降解，磷脂脂肪酸被迅速代谢掉，因此它只在活细胞中存在，十分适合于微生物群落的动态监测。另一个重要因素是脂肪酸具有属的特异性，特殊的甲基脂肪酸已经被作为微生物分类的依据。磷脂脂肪酸谱图分析法首先将磷脂脂肪酸部分提取出来[4]，然后用气相色谱分析，得出 PLFA 谱图。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。甲基脂肪酸酯是细胞膜磷脂水解产物，该法利用 MIDI 系统（一种气相色谱分析系统）分析出全细胞的 FAME 谱图。Wilkinson SC[5]等人用 PLFA 谱图法找出了微生物群落与树木根系的关系。

Haack[6]等人通过试验验证了 FAME 谱图法分析土壤微生物群落的可行性，还同时进行了生物量、分类结构实验，结果表明 FAME 谱图法能够监测土壤微生物群落细微变化。为人们提供了一个监测土壤微生物群落结构的常规方法。

Yao Huiying[7]等应用 PLFAs 分析了 8 个不同肥力水平和种植历史的中国红壤的微生物群落结构，发现 PLFAs 总量与土壤有机 C、总 N、微生物量 C 和基础呼吸呈显著正相关，种植历史和植被类型对土壤微生物群落结构有很大影响。

FAME 分析法为种内关系的建立提供了一个快速而可靠的方法，但不同属甚至不同科的微生物的 FAME 有可能重叠，因此在区分关系较远的微生物

①国家高技术研究计划资助项目（2001.AA214121 和 2001.AA246081）。

应用上有一些困难。但以 FAME 的多样性来表示一个不太复杂的生态系统的生物多样性仍有一定的参考价值。

2　BIOLOG 微平板研究单一碳源底物利用能力（Sole-Carbon-Source Utilization，SCSU）

该方法最初由美国的 BIOLOG 公司于 1989 年开发成功，最初应用于纯种微生物鉴定，至今已经能够鉴定包括细菌、酵母菌和霉菌在内的 2000 多种病原微生物和环境微生物。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[8,9]。

这种方法是基于微生物群落对 95 种不同 C 源的利用度来描述群落中微生物的动态变化。微平板中有氧化还原指示剂和 95 种不同 C 源，加入样品后，由于样品对每种 C 源的利用能力不同，导致氧化剂颜色变化不同，用分析系统分析结果，就可以得到群落代谢的变化情况。这样，这种 C 源利用度的信息就可以用来研究不同环境条件引起的微生物群落变化。

杨元根等[10]用 Biolog 方法研究了英国阿伯丁市城市土壤和邻近农村土壤的微生物群落结构和功能多样性。结果表明，在重金属元素的胁迫下，城市土壤的微生物群落与农村土壤相比发生了显著的变化。

由于不同的微生物对同一 C 源的利用能力是有差异的，微生物对不同单一 C 源的代谢指纹差异并不能简单地归纳为微生物群落数量和结构的差异，而且土壤微生物在 BIOLOG 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，使得 BIOLOG 方法在准确性方面受到一定限制，但 BIOLOG 方法因快速、简便而受到人们的欢迎。

3　土壤总 DNA 复性分析

通过测定土壤 DNA 的碱基组成和复杂性可估计出总的遗传结构及其复杂性。分析 DNA 的溶解曲线可以得到碱基组成的 G+C 百分比。对于一个恒定的 DNA 浓度来讲，复性速率是 DNA 多样性的倒数。Britten 和 Dohne[11]引入 $C0t_{1/2}$ 这个术语来表示基因组的大小，C0 表示实验开始时，单链 DNA 中碱基对的原始摩尔浓度，$t_{1/2}$ 表示半数 DNA 发生复性时所需要的时间，它是以秒为单位的（$C0t_{1/2}=K^{-1}$）。他们证实从一个种中分离所得的 DNA，在没有 DNA 重复序列存在时，它的 $C0t_{1/2}$ 值和这个种的基因组大小成正比。从土壤中抽提所得到的 DNA 是各种不同类型微生物 DNA 的混合物，其比例也有着很大的差异。$C0t_{1/2}$ 值提供了 DNA 复杂性的资料。目前，已将 $C0t_{1/2}$ 作为多样性的指标，它是测定群落总的遗传复杂性的方法之一，它反应了群落中信息的量以及这些量是如何分布的。

Torsvik 等[12]用 DNA 复性试验研究了挪威一处山毛榉树林土壤的微生物群落多样性。根据试验结果估计每克土壤中大约有 4000 种微生物。

土壤总 DNA 复性分析是较早应用的方法，该方法对土壤微生物组成结构的估计是比较粗放的，准确性也差，提供的信息少，现在已很少使用。

4　以 PCR 为基础的 rRNA 及 rDNA 的分析方法

rDNA 在细胞中相对稳定，拷贝数多，并存在于所有细菌中。rDNA 由保守区和可变区组成，在细菌中高度保守，素有“细菌化石”之称，是细菌系统分类学研究中最有用和最常用的分子钟。原核生物的 rRNA 分为 3 种，分别为 5S rRNA、16S rRNA 和 23S rRNA，并且它们位于同一操纵子上。其中，16S rRNA 序列分析已经成为细菌种属鉴定和分类的标准方法，23S rRNA 分子比较大，并且只有少数种的核酸序列被报道，尚未在细菌分类和鉴定中得到广泛应用。16S ~ 23S rDNA 间区（Intergenic Spacer Region, ISR）由于没有特定功能和进化速率比 16S rDNA 大十多倍，近几年来在细菌系统发育学，特别是在相近种和菌株的区分和鉴定方面占据一席之地。由于以上序列每年都以很快的速度补充到 Genebank 中去，这使得微生物工作者能够比较方便地利用这一数据库进行微生物群体多样性研究。

4.1　变性梯度凝胶电泳（DGGE）和温度梯度凝胶电泳（TGGE）

自从 Myuzer[13]首先将 DGGE 技术应用到分子微生物生态学后，已证明这类电泳技术是揭示土壤中微生物群体遗传多样性的有效手段，可用于污染土壤中微生物群落结构的研究、微生物种群动态的分析等。

DGGE 和 TGGE 开始时在医学上用于检测基因突变，后来被广泛应用于微生物生态的研究。同样大小的 DNA 序列由于含有的碱基不同，各片段的 Tm 值也就不同。甚至一个碱基对的不同，都会引起 Tm 很大的差异，DGGE 或 TGGE 就是应用这种差异来区分不同的基因序列。这种电泳方法在聚丙烯酰胺中加入甲酰胺（DGGE），从正极到负极梯度

递加，或是形成温度梯度（TGGE）。电泳中的 DNA 到达它的变性甲酰胺浓度或温度时，双链部分解开，造成泳动速度发生变化，从而达到分离效果。而且染色后的凝胶用成像系统分析，还可以半定量地测定样品 DNA 浓度的大小。反映微生物群落组成的变化。该方法扩增土壤样品的 16S rRNA 的部分基因序列（100 ~ 400bp），通过 DGGE 或 TGGE 分离收集不同条带的 DNA 测序，再同 GENEBANK 中现有的序列比较即可确定微生物种类。该方法分析土壤微生物群落结构组成具有快速、重复性好等优点，目前在土壤微生物群落结构分析上应用最为广泛。但该方法在对土壤微生物群落结构进行精细解析上具有一定的限制性，因为对于 G+C 含量相同但碱基序列不同的片段难以区分。

Said EL Fantroussl 等[14]提取了长期使用 3 种 Phenylurea 类除草剂(diuron, linuron, and chloro toluron）的土壤中总 DNA，采用 16Sr RNA 通用引物 PCR 扩增了 16S rDNA，通过分析 DGGE 的条带模式，发现除草剂污染的土壤和没有使用过除草剂的土壤微生物群落结构有显著的不同，并且使用过除草剂的土壤微生物多样性减少了。而且还通过测序几种变化的 DGGE 条带，发现 diuron 和 linuron 污染后影响最大的属于几种未被培养的微生物类群。

4.2 16S rDNA 的限制性片段长度多态性（RFLP）分析（ARDRA）

提取土壤中的微生物总 DNA，以通用引物扩增 16S rRNA 基因，并构建于载体上，转化大肠杆菌，建立 16S rRNA 基因文库，随即选取一定数量的克隆，以特定的限制性内切核酸酶消化 16S rRNA 基因，通过电泳分析消化后的片段长度多态性，来反映微生物群落结构的多样性。

Dunbar 等[15]同时利用分离培养物和直接从土壤中提取的 16S rDNA 基因的 RFLP 图谱分析了松树根圈土壤（pinyon rhizosphere soil）和树间的土壤（between-tree soil）微生物的群落结构，他们通过 Rsa 和 BstU 两种限制性内切酶分别分析了 179 种分离培养物和 801 种直接从土壤中提取的 16S rDNA 基因的 RFLP 图谱，发现从土壤中直接提取的有 498 种系统型（Phylotype）而在分离培养物中却只有 34 种。并且还发现松树根圈土壤中的微生物丰富度大于树间的土壤。

ARDRA 方法是基于碱基的排列顺序为依据的，更具有精确性，而且，土壤 16S rRNA 基因文库越大，反映土壤微生物的结构越全面，该方法获得的序列还能准确的反映菌株的系统发育信息。ARDRA 方法最大的缺点是工作量大，目前，应用该方法进行微生物群落结构分析，还没有人设置重复。

4.3 16S rDNA 末端标记限制性片段长度多态性分析（T-RFLPs）

由于 16S rDNA 的限制性片段长度多态性（RFLP）分析（ARDRA）所产生的片段多，分析起来工作量大，人们在此基础上又发展了一种高效、灵敏的方法。该方法在用细菌通用引物 PCR 扩增 16S rRNA 基因时，在其中一条引物的 5 末端用荧光素进行标记，然后对土壤样品 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物 16S rDNA 经特定限制性内切酶消化后，经电泳分离，荧光素标记的末端片段经显色后，可以比较精确的确定标记末端的片段长度，或对其进行测序，末端标记限制性片段长度多态性分析是研究土壤微生物多样性和结构的一种有效而快速的手段。它克服了 ARDRA 方法工作量大、分析烦琐的缺点，同时又保留了 ARDRA 方法分析精度高、能获得土壤微生物系统发育信息的优点，是一种较为理想的方法。目前，RDP[16]数据库（http:// rdp. cme. msu.edu/html）已经建立了 T-RFLP 数据库，研究者只需把自己的 T-RFLP 片段类型与数据库已知类型比较，不必测序即可知道菌株的系统类群。Wen TL 等[17]用 T-RFLP 分析了活性污泥、生物反应器污泥等环境样品的微生物结构，揭示了高度的种群多样性。

5 单链构象多态性（single strand conformational polymorphism,SSCP）

SSCP 本来是用于临床鉴定基因突变，近年来被应用于微生物生态学研究[18 ~ 20]。单链 DNA 片段呈复杂的空间折叠构象，这种立体结构主要是由其内部碱基配对等分子内相互作用力来维持的。当有一个碱基发生改变时，会或多或少地影响其空间构象，使构象发生改变。空间构象有差异的单链 DNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶中受排阻大小不同。因此，通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE），可以非常敏锐地将构象上有差异的分子分离开。该方法主要包括以下步骤：①提取土壤基因组 DNA； 用细菌通用的扩增 16S rRNA 基因的引物扩增 16S rDNA； 将扩增后的产物变性，形成单链的 DNA； 用聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同的片段分离； 回收 DNA，测定不同条带的序列，同 GENEBANK 的 16S rDNA

序列比较，确定微生物的分类地位。Frank 等人[21]通过对根系微生物的分析表明 SSCP 可以很好地分析微生物群落的动态变化，并应用此方法研究了种植对土壤微生物群落的影响。

6　随机扩增多态性 DNA（RAPD）分析

Williams 等[22]发展起来的随机扩增的多态性 DNA（RAPD，Random Amplified Polymorphic DNA）分子遗传标记技术以检测多态 DNA 为目的，因其快速、简便在物种分类和亲缘关系鉴定、基因组分析等方面得到广泛应用，也可用于在 DNA 水平上反映微生物群落的多样性。

Yang 等[23]用 RAPD 方法分析了农业化学污染物（三双甲酮、碳酸氢铵及其中间产物）对 4 个土壤微生物群落的 DNA 序列多样性的影响，用 14 个随机引物，有 12 个引物扩增出共 155 个可靠的片段，其中 134 个具有多态性，经过对 DNA 序列多态性的分析和 DNA 丰度、修饰丰度、Shannon-Weaver 指数和相似性系数的计算，结合土壤微生物生物量的测定，结果表明农业土壤化学物质可在 DNA 水平上影响微生物多态性。

7　ERIC-PCR 图谱分析

在肠道细菌中发现的 ERIC 序列（Enterobacterial Pepetitive Intergenic Consensus，肠杆菌基因间的重复共有序列）是一段长为 126 bp 的反向重复序列，定位于基因组内可转录的非编码区域或与转录有关的区域[24]。后来证明这种序列在许多微生物中存在。

以 ERIC 序列设计的特异引物对土壤中直接提取的总 DNA 进行 PCR 扩增，通过电泳分析其图谱，可以快速地用来比较土壤微生物的群落组成。

ERIC-PCR 图谱分析和 RAPD 方法一样具有简便、快速的特点，可用于比较不同土壤样品微生物结构的变化。但由于该方法不能反映土壤微生物系统发育方面的信息，所以无法对土壤微生物的群落结构进行精细的分析。

8　总 结

由于土壤微生物群落组成极其复杂，目前所应用的任何方法都不能穷尽对土壤微生物的认识，但是，这些方法的应用却使人们对复杂的土壤微生物的认识逐渐深入，新的微生物类群不断被发现[25~29]。

大多数土壤微生物未知种群蕴藏着目前还无法估量的资源。通过土壤微生物群落和多样性研究，从土壤微生物资源中分离筛选、开发出功能微生物，将是今后应该加强研究的重要工作。

结构总是和特定的功能相联系的，对土壤微生物结构的认识，是为了更好地发挥土壤微生物的功能，为工农业生产服务。稳定性同位素等方法在土壤微生物结构与功能关系上的研究，使人们找到了一些具有特定功能的新的微生物类群[30, 31]。

现代生物化学以及分子生物学技术应用于土壤微生物学研究，大大拓宽了研究的深度与广度，必将为土壤微生物学的研究带来深远的影响。

参考文献

1　Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev., 1995, 59 (1): 143 ~ 169

2　Brock TD. The study of microorganisms in situ: progress and problems. Symp. Soc. Gene Microbiol., 1987, 41:1~17

3　Lechevalier MP. Lipids in bacterial taxonomy-a taxonomist' s view. Critic Rev. Microbiol., 1977, 5: 109 ~ 210

4　Bligh EC, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification . Can. J. Microbiol., 1959, 37: 911 ~ 917

5　Wilkinson SC, Anderson JM. Spatial patterns of soil microbial communities in a Norway. Microb. Ecol., 2001, 42: 248 ~ 255

6　Hack SK, Garchow H, Odelson DA. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60: 2483 ~ 2493

7　Yao Huiying, He Zhenli, Huang Changyong. Phospholipid fatty acid profiles of Chinese red soil with varying fertility levels and land use histories. Pedosphere, 2001, 11(2): 97 ~ 103

8　Gland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial community-level sole-carbon-source utilization. Appl. Environ. Microbial., 1991, 57: 2351 ~ 2359

9　Konopka A, Oliver L, Turco RF. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. Microb. Ecol., 1998, 35:103~115

10　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

11 Britten RJ, Kohne DE. Repeated sequences in DNA. Science, 1968, 161: 529 ~ 540

12 Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56 (3): 782 ~ 787

13 Muyzer G, Ramsing NB. Molecular methods to study the organization of microbial communities. Wat. Sci. Technol., 1996, 32 (8): 1 ~ 9

14 Said EL, Fantroussl L, Verschuere W. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65 (3): 982 ~ 988

15 Dunbar J, Takala S, Barns SM. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 5 (4): 1662 ~ 1669

16 Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM, Tiedje JM. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Res., 2003, 31 (1): 442 ~ 443

17 Wen TL, Terence LM. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63 (11): 4516 ~ 4522

18 Frank S, Chistoph CT. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64 (12): 4870 ~ 4876

19 Head IM, Saunders JR, Pickup RW. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microb. Ecol., 1998, 35: 11 ~ 21

20 Marilley L, Vogt G, Blanc M. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of Lolium perenne and Trifolium repens as revealed by PCR restriction analysis. Plant Soil, 1998, 198: 219 ~ 224

21 Frank S, Chistoph CT. Effect of field inoculation with Sinorhizobium meliloti L33 on the composition of bacterial communities in rhizosphere of a target plant (Medicago sativa) and a non-target plant (Chenopodium album) linking of 16S rRNA gene-based single-strand-conformation polymorphism community profiles to the Diversity of cultivated bacteria. Appl. Environ. Microbiol,, 2000, 66 (8): 3556 ~ 3565

22 Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ. DNA polymer phisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res.,1990, 18: 6531 ~ 6535

23 Yang Y, Yao J, Hu S. Effects of agricultural chemicals on DNA sequences diversity of soil microbial community: A study with RAPD marker. Microbiol. Ecol., 2000, 39:72 ~ 79

24 Ulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repeatitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhi murium and other enterobacteria. Mol. Microbiol., 1991, 5 (4): 825 ~ 834

25 Cheryl RK, Susan MB, Joseph DB. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern united states that are present in many geographic regions. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63: 3614 ~ 3621

26 Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ, Fry JC. Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal- contaminated soil. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69 (6): 3223 ~ 3230

27 Ludwig W, Bauer SH, Bauer M, Held I, Kirchhof G, Schulze R, Huber I, Spring S, Hartmann A, Schleifer KH. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. FEMS Microbiol. Lett., 1997, 153 (1): 181 ~ 190

28 Macrae A, Rimmer DL, O'Donnell AG. Novel bacterial diversity recovered from the rhizosphere of oilseed rape (Brassica napus) determined by the analysis of 16S ribosomal DNA. Antonie Van Leeuwenhoek. 2000, 78 (1): 13 ~ 21

29 Zhou JZ, Xia BC, Huang HS, David ST, Loren JH, Richard JM, Anthony VP, Tiedje JM. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. Soil Biol. Biochem., 2003, 35: 915 ~ 924

30 Boschker HTS, Nold SC, Welsbury P, Bos D, de Graaf W, PelR, Parkes RJ, Cappenberg TE. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C-labelling of biomarkers. Nature, 1998, 392 (23): 801 ~ 805

31 Hinrichs KU, Hayes JM, Sylva SP, Brewer PG, Delong EF. Methane-consuming archaebacteria in marine sediments. Nature, 1999, 398 (29): 802 ~ 805

(下转第 515 页)

A COMPARATIVE ANALYSIS OF CHANGES IN CULTIVATED LANDS OF FUJIAN AND TAIWAN PROVINCES AND THEIR DRIVING FACTORS

WEI Su-qiong[1]　CHEN Jian-fei[2]

(1 *Research Center of Natural Resources, Fujian Normal University, Fuzhou* 350007；

2 *College of Geographical Sciences, Guangzhou University, Guangzhou* 510405)

Abstract　Comparative analysis of LUCC between different regions was considered one of the three major research topics during 2000 ~ 2004 by IGU-LUCC. Comparison of LUCC between Fujian and Taiwan could be a good case for study because of their geographical proximity and historical and cultural similarity. Fujian and Taiwan had gone through and were in different economic development phases. By using the official statistics, quantitative changes in cultivated lands of Fujian and Taiwan were analyzed. The results showed that these two provinces seemed to have the same characteristics, i.e., increasing at first and then declining, and though some fluctuations were observed, the general tendency was declining. However, the phase of rapid changes in Fujian came somewhat later in the whole process of the economic growth, as compared with that in Taiwan. Besides, the cultivated land was decreasing at much lower rate in Taiwan. They were almost the same in terms of the change rate of acreage of cultivated land per capita but differed sharply in terms of acreage of cultivated land per farm laborer. In present study, major driving forces of the changes in cultivated lands of both provinces were analyzed for Grey Relevance Degree, with the following conclusions: (1) Agricultural restructuring, non-agricultural construction, disasters and reclamation were the direct driving factors that caused the changes in cultivated land. (2) The increasing demands for better living standards, and the development of the primary industry, constituted the first and the second indirect driving factors, respectively. (3) The level of the economic development could affect the scale and the efficiency of the land uses for non-agricultural purpose. (4) Exportation of farm produce had a greater impact on the changes in cultivated land in Taiwan than in Fujian. At the end of this article, the effects of economic policies and regulations for land management on cultivated land in different economic development phases were also analyzed.

Key words　Changes of cultivated land, Driving forces, Grey relevance degree, Fujian and Taiwan

****

(**上接第** 480 **页**)

ADVANCE IN METHODS FOR RESEARCH ON SOIL MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE

ZHANG Rui-fu　CUI Zhong-li　LI Shun-peng

(*Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agric Univ., Nanjing* 210095)

Abstract　Isolation and incubation as a means to study soil microbial communities has severe limitations, since the majority of microbes in the soil are unculturable. With the development of the molecular biology, a series of techniques which are independent of culturing are being widely used in the research of soil microbial communities. In this paper, techniques, such as Biomarker, SCSU, DNA renaturation experiment, DGGE, TGGE, ARDRA, T-RFLP, SSCP, PAPD and ERIC-PCR, commonly used in this field were introduced.

Key words　Microbial community, Independent of culturing, Research methods