

乙草胺对农田土壤细菌多样性的影响

罗海峰 齐鸿雁* 张洪勋

(中国科学院生态环境研究中心环境生物技术室 北京 100085)

摘 要 在实验室条件下,将农田土壤分别用终浓度为 1.0mg、5.0mg 和 10.0mg/g 土壤的乙草胺处理 40d 后,检测可培养的异养细菌的多样性和细菌物种多样性。可培养的异养细菌的多样性依据在 LB 平板上的菌落形态来研究,细菌物种多样性则通过基因组 DNA 的提取、纯化,16S rDNA 片段的扩增和变性梯度凝胶电泳(DGGE)的分离来研究,香农多样性指数(H'),丰度(S)和均匀度(E_H)等指标用于评价细菌多样性。实验结果表明,与对照土壤相比,处理土壤中上述两种类型的细菌多样性均降低,而且,不同处理浓度对土壤细菌多样性的影响也不同。将 DGGE 图谱中的条带回收并测序,结果显示乙草胺对土壤中的 *Proteobacteria* 的 α -*Proteobacteria* 和 γ -*Proteobacteria* 影响明显,表明乙草胺会在一定程度上改变土壤细菌多样性。

关键词 乙草胺 细菌多样性 菌落形态 变性梯度凝胶电泳

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)04-0519-04

长期以来,农药对土壤微生物群落影响的研究主要集中于采用传统方法对土壤微生物进行生理生化方面研究。随着分子生态学技术的发展,农药如百菌清^[1]、阿特拉津^[2]和泰乐菌素^[3]对微生物群落多样性的影响的研究已成为热点之一,而国内广泛采用的除草剂乙草胺对土壤细菌多样性的影响尚未报道。

传统的平板培养方法研究土壤微生物多样性有很大的限制性,如可分离出微生物种类只占土壤微生物种类总数的 0.1%~1%^[4],且这种分离培养方法不能很好地反映土壤微生物多样性的原始状态等^[5],而聚合酶链反应——变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)^[6]在遗传物质的水平上对土壤微生物多样性进行研究。首先从土壤样品中提取出基因组 DNA,然后进行 PCR 扩增,最后对 PCR 产物运用 DGGE 进行分离和鉴定,从而得出土壤微生物群体多样性的信息。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术其主要原理基于在含有变性剂的聚丙烯酰胺凝胶电泳中,序列不同的 DNA 分子有着不同的解链行为^[7],由于各类细菌的 16S rRNA 基因序列不同,所以它们在电泳中会得到分离。根据电泳条带的多寡和条带的位置、强度可以分析细菌多样性信息。本研究结合平板培养

和变性梯度凝胶电泳,从两方面(可培养的异养细菌的多样性和细菌物种多样性)研究乙草胺处理过的土壤中细菌多样性的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 农田土壤于 2002 年 3 月取自无乙草胺处理历史的陕西省凤翔县的普通小麦田,土壤的各项指标如下:总有机值 1.53%,总氮 0.094%,砂粒 26.68%,泥沙粒 59.16%,粘土粒 14.16%,持水量 15.27%,pH 8.02。

1.1.2 其它材料 除草剂乙草胺购于北京市植物保护公司,其它分子生物学试剂及生化试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 土壤样品的处理

将 100g 土壤样品分别按照乙草胺浓度为 1.0mg、5.0mg 和 10.0mg/g 土壤来处理,以未处理的土壤作为对照。各样品编码为:土壤 A:乙草胺处理浓度为 1.0mg/g 土壤;土壤 B:乙草胺处理浓度为 5.0mg/g 土壤;土壤 C:乙草胺处理浓度为 10.0mg/g 土壤;土壤 D:未处理土壤。所有样品均在 25℃ 下培养,培养周期为 40d,每隔 10d 研究物种多样性,到第 40 天同时研究可培养异养细菌的多样性。

基金项目:国家“十五”科技攻关重点项目(2001BA903B)

* 通讯作者。Tel:86-10-62849156; Fax:86-10-662849155; E-mail:qihy@mail.rcees.ac.cn

作者简介:罗海峰(1975-)男,陕西凤翔人,博士研究生。E-mail:luo2222@hotmail.com

收稿日期 2003-09-17,修回日期 2003-11-14

1.3 可培养异养细菌的形态学研究

将 100 μ L 的土壤样品稀释液涂布于制霉菌素(抑制真菌的生长)浓度为 25 μ g/mL 的 LB 固体平板上,25 $^{\circ}$ C 连续培养 4~5d 时,当平板上的菌落数在 30~300 之间时,任意挑选 100 个菌落按照文献[8]所述根据菌落颜色、边缘、直径和表面等特征进行形态学的分类,同时在含有乙草胺浓度为 5.0mg/mL 的上述平板上记录每天新生的乙草胺抗性菌落数。

1.4 土壤样品的 DNA 提取和 PCR 扩增

按照文献[9]报道的方法提取各土壤样品的基因组 DNA,使用上海生工的玻璃珠 DNA 胶回收试剂盒(产品号 SK111)对 DNA 粗提液进行纯化。

将纯化后的基因组 DNA 作为 PCR 的模板,使用 Applied Biosystem 的 Gene Amp PCR System 2700 型基因扩增仪,采用对大多数细菌的 16S rRNA 基因 V3 区具有特异性的引物对^[10]:F₃₅₇ GC 和 R₅₁₈ 它们的序列分别为:F₃₅₇ GC:(5'-CGCCCCGCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3'),R₅₁₈ (5'-ATTACC GCGGCTGCTGG-3')来扩增长约 230bp 的产物。

PCR 反应体系:100ng 模板,30pmol 引物,200 μ mol/L dNTPs,10 μ L 10 \times buffer,1.5mmol/L MgCl₂,5U DNA 聚合酶,800ng BSA,补双蒸水到 100 μ L。PCR 反应条件:采用梯度 PCR 策略^[11]。94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,前 20 个循环为 94 $^{\circ}$ C 1min,65 $^{\circ}$ C~55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 3min(其中每个循环后复性温度下降 0.5 $^{\circ}$ C);后 10 个循环为 94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 3min,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

1.5 PCR 扩增产物的 DGGE 分离

采用 Bio-Rad 公司 DcodeTM 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离

样品在变性剂浓度从 30% 到 50%(100% 的变性剂为 7mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物)的 10% 的聚丙烯酰胺凝胶中。在 120V 的电压下,60 $^{\circ}$ C 电泳 5h。电泳完毕后,凝胶在 EB 中染色 20~30min 后用 YLN-2000 凝胶影像分析系统(北京亚力恩机电技术研究所)观察并拍照。

1.6 DGGE 分离后的电泳条带分析

观察各个土壤样品的 PCR 产物经变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离后的电泳图谱照片,采用 Quantity One 分析软件(Bio-Rad)对各土壤样品的电泳条带的多少及密度来进行定量分析,以作为多样性统计指标的初步数据。

1.7 可培养的异养细菌的多样性和细菌物种多样性的统计学分析

多样性指数(H),丰度(S)和均匀度(E_H)等指标被用来比较各个土壤样品的细菌多样性,每个土壤样品均计算上述两种不同类型的多样性,即可培养的异养细菌的多样性和细菌物种多样性。计算公式如下:

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

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

其中,在研究细菌物种多样性中, p_i 是某个土壤样品中单一条带的强度在该样品中的所有条带总强度中所占的比率, S 是某个土壤样品中所有条带数目总和;在研究可培养的异养细菌的多样性时, p_i 是从某个土壤样品分离培养出的某个形态的菌落数在总菌落数中所占的比率, S 是从某个土壤样品中分离出的菌落的形态类型总数。

1.8 回收条带的 16S rRNA 基因片断测序和鉴定

将 DGGE 电泳图谱中比较特殊的条带(在培养周期内条带加深或减弱)切胶回收,重新 PCR 后再 DGGE 分离,直至在 DGGE 中出现单一条带后,重新按照前面的引物进行 PCR 扩增,将扩增产物连接至 pUCm-T 载体(上海生工生物工程技术服务有限公司)后,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5- α ,将重组子进行测序(华大中生科技发展有限公司代测),将测序结果递交给 GenBank。

2 结果和分析

2.1 除草剂乙草胺对可培养细菌多样性的影响

乙草胺对土壤中可培养细菌多样性的影响如表 1 所示。未处理土壤(土壤 D)中可培养总细菌群体的多样性指数最高,群落丰度也最大。而乙草胺处理过的 3 个土壤样品中(土壤 A、B 和 C)可培养总细菌群体的多样性指数均降低,群落丰度也减小,说明乙草胺作为一种有毒化学物质使用于农田后,会杀死一些细菌种类,因而使得农田中细菌群落的多样性降低,另一方面,就可培养抗性细菌群体的多样性而言,相对于对照土壤样品,较低浓度的乙草胺处理(如土壤 A 和土壤 B)会提高其群落多样性及丰度,而更高的处理浓度(土壤 C)会降低其群落多样性及丰度。由此可见,不同的乙草胺处理会使可培养的总细菌和抗性细菌的多样性发生不同的变化。

表 1 40d 处理后各土壤样品中的可培养总细菌及抗性细菌群落的多样性、丰度及均匀度

Table 1 Shannon-Wiener index (H), richness (S) and evenness (E_H) [mean \pm S. E. M.] of each soil samples estimated by the morphotypes of random 100 clones on non-selective and acetochlor resistant agar plates after application of acetochlor for 40 days

Soil	Shannon-Wiener index (H)	Richness (S)	Evenness (E_H)
A(r)	0.72 \pm 0.06	3.68 \pm 0.21	0.66 \pm 0.03
A(n)	1.17 \pm 0.13	4.32 \pm 0.14	0.85 \pm 0.06
B(r)	0.75 \pm 0.05	3.73 \pm 0.11	0.60 \pm 0.02
B(n)	1.35 \pm 0.11	4.65 \pm 0.16	0.88 \pm 0.09
C(r)	0.43 \pm 0.07	2.35 \pm 0.08	0.62 \pm 0.03
C(n)	1.28 \pm 0.12	4.23 \pm 0.14	0.92 \pm 0.11
D(r)	0.58 \pm 0.08	2.99 \pm 0.13	0.53 \pm 0.02
D(n)	1.57 \pm 0.16	6.47 \pm 0.12	0.88 \pm 0.05

(r) represents the acetochlor resistant agar plates, (n) represents the non-selective agar plates.

2.2 乙草胺处理土壤样品的 DGGE 图谱分析及其对物种多样性的影响

对不同浓度的乙草胺处理的第 10 天、第 20 天、第 30 天和第 40 天的样品进行 DGGE 分离(图 1)。结果显示,所有样品的 DGGE 图谱的电泳条带都较多,说明这些样品中均具有丰富的细菌类型,而且,这些样品中均有一些共有的条带,说明在这些土壤中存在一些共有细菌类型;同时,就同一样品的不同处理时间而言,有些条带随着培养时间的加长而变弱或消失,说明有些细菌类型难以适应长时间的这种选择环境而最终死亡。相反,一些其它的细菌由于长时间培养而逐渐适应这种选择压力而生存下来,

表现在图谱中为有些条带的强度随时间的加长而加强或者在第 40 天的样品中才出现。另外,就同一时间的不同处理浓度的样品而言,也有比较类似的情况出现。

根据图 1 中 DGGE 不同条带的强度及迁移率,计算经过 40d 处理后各样品细菌物种多样性的相关指标如表 2 所示。与可培养细菌群体多样性的变化规律相似,处理过的土壤样品的多样性和丰度等指标相对于对照而言均有所降低,说明无论从考察细菌物种多样性还是可培养细菌多样性均可推断土壤中使用除草剂乙草胺均会降低细菌群落的多样性。然而,从同一样品而言,考察两种类型的多样性时,无论群落多样性指数(H),还是群落的丰度(S),物种多样性的数据均比可培养细菌多样性的数据值大。由此可见,考察物种多样性可以将那些“存活但不能培养”的一些细菌类型也加以研究,而一般的可培养细菌多样性研究则不能实现这一要求,说明使用分子生物学技术研究微生物多样性比传统的平板培养分离方法获得的结果更加可靠。

表 2 40d 处理后各土壤样品中细菌物种多样性、丰度及均匀度

Table 2 Shannon-Wiener index (H), richness (S) and evenness (E_H) of each soil samples estimated by the DGGE bands patterns of 40 day treated samples

Soil	Shannon-Wiener index (H)	Richness (S)	Evenness (E_H)
A	2.370	14	0.898
B	2.219	12	0.893
C	2.173	11	0.906
D	2.690	21	0.884

2.3 电泳条带测序和分析

将图 1 中的 5 个特殊条带(图中表示为 1、2、3、4、5 右边的条带)进行测序并和 GenBank 中的序列比对后,得到各个条带所代表的细菌类型及其相似程度的结果如表 3 所示。测序结果表明,在乙草胺的环境压力下,Proteobacteria 的 α -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria 两分支的部分种属的细菌可以存活,它们或者利用,或者可以降解这种除草剂。根据序列的比对结果可以推断,可能以下 3 个属的部分细菌可以利用或降解乙草胺而生存,它们是 Pseudomonas (条带 1, 条带 3 和条带 4), Shigella (条带 2) 和 Mesorhizobium (条带 5)。序列分析结果表明,它们可能是 Pseudomonas, Shigella 和 Mesorhizobium 3 属细菌中的某些种。这一信息为后期进行深入的研究提供了实验依据。

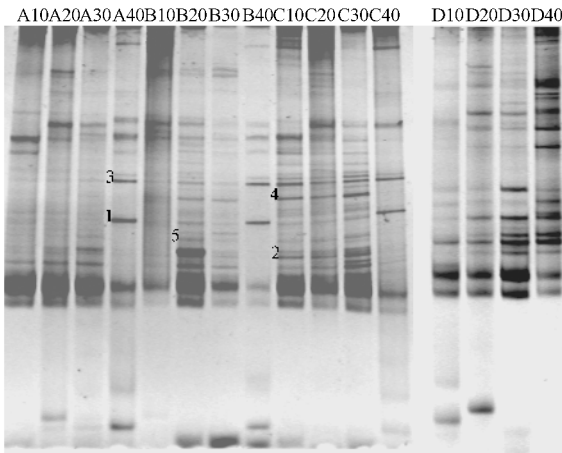


图 1 不同处理样品的 DGGE 图谱
Fig.1 DGGE profiles of different treatment soil samples
A10 in figure represents the 10-day sample of soil A, others as the above.

表 3 测序条带的种属关系

Table 3 Phylogenetic relationship of bands sequenced in the study

Band (GenBank accession number)	Number of bp sequenced	Kingdom	Phylogenetic group ^a	Closed unidentified relative (GenBank accession number)	Identity / %
Band 1 (AY298736)	184	Bacteria	γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i> (AF396077.1)	97
Band 2 (AY298738)	218	Bacteria	γ-Proteobacteria	<i>Shigella flemmeri</i> (AE016990.1)	98
Band 3 (AY298739)	205	Bacteria	γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (AF307873.1)	98
Band 4 (AY305761)	222	Bacteria	γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AY264292.1)	96
Band 5 (AY305762)	223	Bacteria	α-Proteobacteria	<i>Mesorhizobium ciceri</i> (AF217118.1)	96

^a α , alpha ; γ , gamma .

参 考 文 献

[1] Sigler , William V T , Ronald F . The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis . *Appl Soil Ecol* , 2002 , **21** (2) : 107 – 118 .

[2] Ralebitso T K , Senior E , van Verseveld H W . Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments . *Biodegradation* , 2002 , **13** (1) : 11 – 19 .

[3] Muller A K , Westergaard K , Christensen S , *et al* . The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances . *Microb Ecol* , 2002 , **44** (1) . 49 – 58 .

[4] Amann R I , Ludwig W , Schleifer K H . Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation . *Microbiol Rev* , 1995 , **59** (1) : 143 – 169 .

[5] Brock T D . The study of microorganisms in situ : progress and problems . *Symp Soc Gene Microbiol* , 1987 , **41** : 1 – 17 .

[6] Maarit R N , Ilse H , Kaisa W , *et al* . Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR – DGGE analysis of bacterial consortia . *J Microbiol Meths* , 2001 , **45** (3) : 155 – 165 .

[7] Muyzer G , Smalla K . Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology . *Antoni Van Lereuuenhoek* , 1998 , **73** : 127 – 141 .

[8] Palumbo A V , Zhang C , Liu S . Influence of media on measurement of bacterial population in the subsurface . *Appl Biochem Biotechnol* , 1996 , **57/58** , 905 – 914 .

[9] Zhou J , Mary B , James M T . DNA recovery from soils of diverse composition . *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** : 316 – 322 .

[10] Muyzer , Ellen C W , Andre G U . Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA . *Appl Environ Microbiol* , 1993 , **59** : 695 – 700 .

[11] Erik J , van H , Gabriel Z , *et al* . Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with virus . *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** : 795 – 801 .

The Impact of Acetochl or The Bacterial Diversity in Soil

LUO Hai-Feng QI Hong-Yan* ZHANG Hong-Xun

(Department of Environmental Biotechnology , Research Center for Eco-Environmental Sciences , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100085 , China)

Abstract : The impact of the herbicide acetochlor on the culturable heterotrophic and phylogenetic diversity of the bacterial community in soil was investigated. The changes in diversity were monitored for soils treated with 1.0mg , 5.0mg and 10.0mg acetochlor g⁻¹ soil for 40-day period respectively. The culturable heterotrophic bacterial diversity was investigated by colony morphology on solid LB medium. Phylogenetic diversity was measured by 16S rDNA fragments banding on denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) gels , which were amplified from the total DNA extracted from soil. The Shannon-Wiener index of diversity (*H*) , richness (*S*) and evenness (*E_H*) were used to measure the changes in the bacterial community in soils. The results showed both the culturable heterotrophic diversity and phylogenetic diversity decreased as the treatment with acetochlor , and the different rates of treatment with acetochlor had different impact on the diversity. Bands appearing to be either enhanced or inhibited as a result of the acetochlor treatment were excised and sequenced. Sequencing of excised DGGE bands indicated an obvious impact on two subdivisions of the *Proteobacteria* (α- *Proteobacteria* and γ- *Proteobacteria*). This revealed microbial community changes can occur due to the application of acetochlor in soil.

Key words : Acetochlor , Bacterial diversity , Colony morphology , DGGE

Foundation item : The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2001BA903B)
* Corresponding author . Tel : 86-10-62849156 ; Fax : 86-10-662849155 ; E-mail : qihy@mail.recees.ac.cn
Received date : 09-17-2003