

## 耕作和施肥对不同深度黑土中细菌群落结构的影响

高崇洋<sup>1</sup>, 赵阳国<sup>2\*</sup>, 王爱杰<sup>1</sup>, 任南琪<sup>1</sup>, 白洁<sup>2</sup>, 田伟君<sup>2</sup>, 张健<sup>2</sup>, 李海艳<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

(<sup>2</sup> 中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 266100)

**摘要:**【目的】为探讨耕作和施加有机肥、化肥对黑土表层(0-30 cm)、中层(100-130 cm)及深层(200-230 cm)细菌群落结构的影响,【方法】应用 DGGE 技术对相应土层中细菌群落结构进行了解析。【结果】结果表明,与对照相比,耕作和施加有机肥、化肥对表层黑土细菌群落结构影响较大,二者差异度为 4%;而对中层和深层细菌群落结构影响较小,二者差异度为 2%。对于细菌群落结构的垂向变化,中层和深层中细菌群落结构的相似性远远高于同表层的相似性。【结论】可见,耕作和施加有机肥、化肥仅对黑土表层土壤(0-30 cm)具有一定的影响,而对 100 cm 以下土壤细菌群落影响较小,细菌群落随土壤深度不同的垂向变化要远高于土壤管理措施造成的影响。

**关键词:** 黑土; 群落结构; 变性梯度凝胶电泳

**中图分类号:** Q142.3, Q938.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0067-07

据第二次全国土壤普查资料统计,我国黑土总面积约  $7 \times 10^4 \text{ km}^2$ , 主要分布在吉林省和黑龙江省中东部广大平原上,与乌克兰和美国密西西比河流域的黑土并称世界三大黑土带<sup>[1]</sup>。我国黑土地处温带半湿润地区,四季分明,雨热同季。土壤母质粘重,并有季节冻土层。夏秋多雨,土壤常形成上层滞水,草甸草本植物繁茂,地上和地下均有大量有机残体进入土壤。漫长的冬季,微生物活动受到抑制,有机质分解缓慢,并转化成大量腐殖质累积于土体上部,形成深厚的黑色腐殖质层。自然状态下,黑土腐殖质层可厚达 100 cm,养分含量丰富,肥力水平高,号称“土中王”,是我国重要的商品粮基地<sup>[2]</sup>。

黑土作为一种独特的生境,蕴含着丰富的微生物物种资源,是良好的菌种库。而且土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,它们参与土壤有机质分解、腐殖酸形成、土壤养分转化和循环等过

程<sup>[3]</sup>。研究表明,微生物与黑土中腐殖质的形成有着重要的相关性,是土壤有机质的活性部分<sup>[4]</sup>,同时,它也是衡量土壤质量、维持土壤肥力和作物生产力的一个重要指标<sup>[5]</sup>。基于此,近年来对黑土微生物群落结构及功能的研究引起了人们的广泛关注<sup>[3,6]</sup>。然而,相关研究均集中于黑土土壤表层 0-20 cm<sup>[3,6-7]</sup>或 0-50 cm<sup>[8]</sup>,50 cm 以下黑土中的微生物群落结构分析还未见报道。虽然地表土壤中微生物具有更高的多样性,同地表作物的相互作用更强烈,但作为整个黑土生态系统,50 cm 以下部分也是不可或缺的,故此,对该部分土壤中的微生物群落进行结构解析是很有必要的。对于土壤表层(0-50 cm)微生物而言,大多研究认为,长期施加化肥或采用不同耕作方式改变了细菌群落的结构<sup>[3,6,8]</sup>,细菌群落结构随着深度而发生的变化要远远高于耕作方式的影响<sup>[8]</sup>,而耕作方式或施加化肥

基金项目:水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07208-009);国家自然科学基金(40801193)

\* 通信作者。Tel: +86-532-66786568; Fax: +86-532-66782810; E-mail: yg.zhao@yahoo.com.cn

作者简介:高崇洋(1979-),女,黑龙江人,博士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail: cy.gao@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-07-05; 修回日期:2009-09-18

是否能够对更深层次的土壤微生物产生影响还需要进一步研究。

以 rRNA 基因为基础的不依赖于培养的基因指纹技术,如变性梯度凝胶电泳(DGGE),单链构象多态性(SSCP)和末端限制性片段长度多态性(TRFLP)等技术,已经广泛用于揭示各种生境中微生物群落的结构差异,对不同生态系统中优势类群、易变类群的全面评价起到了重要推动作用,是传统的以培养为基础的调查研究无法比拟的。相比其它 2 种技术,DGGE 具有重复性好、操纵简单、利于后续分析等优点而被广泛应用<sup>[9]</sup>。故此,本研究应用 DGGE 及其特异条带的克隆测序分析,并结合土壤理化性质分析技术,对耕作施肥和草地(对照)土壤 0-30 cm, 100-130 cm, 200-230 cm 深度中细菌群落进行结构解析,以阐明耕作施肥对更深层次的土壤细菌群落可能产生的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究区描述

研究区为典型黑土分布带,位于哈尔滨双城市希勤乡正红旗四屯(N 45°15'31.37", E 126°01'54.79"),海拔 145 m,属中温带气候,全年太阳总辐射量为 511.28 kJ/cm<sup>2</sup>。日照时数 2383-2888 h,年平均温度为 3.5℃,年平均降雨量 400 mm 以上,年相对湿度为 65%,年平均积温 2800℃以上,属于黑龙江第一积温带。取样时间为 2006 年 10 月 15 日,气温为 16.5℃。研究区包括相邻的荒地土壤(H)和耕作土壤(G)(图 1),其中荒地土壤为多年未开垦草地,长满禾本科杂草,在本研究中作为对照;耕作土壤为玉米、大豆和高粱轮作 10 a 以上的耕地,今年作物为高粱,每年于作物生长期施加有机肥(厩肥 15 t/hm<sup>2</sup>)和化肥(尿素 400 kg/hm<sup>2</sup>)。



图 1 研究区荒芜草地(H)(对照)与耕作施肥农田(G)照片

Fig. 1 The photos of deserted grassspot (H) (control) and the tillage and fertilization cropland (G).

### 1.2 材料

**1.2.1 主要试剂、仪器和分析软件:** 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒(Mobio, USA), *Ex Taq* DNA 聚合酶、dNTP、Marker DL2000、pMD19-T 载体(TaKaRa 公司),其它试剂为国产分析纯;pH 计(上海雷磁),

凯氏定氮仪(FOSS,瑞典),754 型分光光度计(上海长方光学仪器),6400A 型火焰光度计(上海光学仪器),电泳系统 Power Pac1000、mycycle 扩增仪、DeCode System (Bio-Rad Laboratories, USA),3730 测序仪(ABI, USA)。序列分析软件 Chromas

(Technelysium Pty, Australia), SPSS 12 (SPSS Inc., USA), ClustalW<sup>[10]</sup> 和 Mega 4.0<sup>[11]</sup>。

**1.2.2 引物:** DGGE 分析引物为 BA101F: 5'-TGGCGGACGGGTGAGTAA-3' 和 BA534R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', 对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的 101 - 534 bp, 其中反向引物 BA534R 的 5'端带有 GC 夹, 引物由 Invitrogen (上海) 合成。

### 1.3 采样和分析方法

在每一试验区, 应用土壤取样器按 3 点取样法获得土壤样品, 取样点水平相隔 100 cm。取样深度依次为 0 - 30 cm (耕作施肥土壤简称 G1, 荒芜草地简称 H1), 100 - 130 cm (G2, H2) 和 200 - 230 cm (G3, H3), 将同一取样点中相同深度土壤混合, 立即置于灭菌塑料袋中, 于冰中运回实验室中, 分析检测土壤中各种成分或用于细菌总 DNA 提取。

土壤分析项目与方法按林大仪<sup>[12]</sup>方法进行, 即含水率(%), 烘干法; pH, 电位法; 有机质(g/kg), 高温外热 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 氧化-容量法; 全氮(g/kg), 混合指示剂、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 消煮-半微量凯氏法; 碱解氮(mg/kg), 碱解扩散法; 全磷(g/kg), HClO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 消煮-钼锑抗比色法; 速效磷(mg/kg), 0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 浸提、钼锑抗比色法; 缓效钾(mg/kg), 1 mol/L HNO<sub>3</sub> 煮沸、火焰光度法; 速效钾(mg/kg), 1.0 mol/L 中性乙酸铵浸提、火焰光度法。

### 1.4 土壤 DNA 提取及 PCR 扩增

取 5 g 土壤(dw) 按 Zhou 等<sup>[13]</sup>的方法提取总 DNA。由于土壤中有有机质含量高, 按该方法提取的 DNA 仍含有大量的腐殖酸, 提取的 DNA 溶液呈棕褐色。腐殖酸类物质能够与 PCR 反应体系中的 *Taq* 酶作用, 影响扩增效率<sup>[14]</sup>。为此, 本研究又采用胶回收试剂盒, 将基因组 DNA 与其它杂质电泳分离后, 切胶回收纯化, 最终将纯化的 DNA 溶解于 2 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中, 取 5 μL DNA 进行电泳检测。

以总 DNA 为模板, 采用细菌 16S rRNA 基因保守引物进行 PCR 扩增。50 μL 反应体系包括 5 μL 10 × PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>), 4 μL dNTP, 引物各 1.5 μL (-20 μmol/L), 0.25U *Taq* DNA 聚合酶, DNA 模板约 10 ng。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 接以 30 个循环包括 94℃ 变性 40 s, 50℃ 退火 30 s (DGGE 为 55℃, 每一循环降 0.2℃), 72℃ 延伸 90 s; 72℃ 10 min。PCR 完成后取 5 μL 产物电泳检测, 并与定量 Marker DL2000 进行比对。

### 1.5 土壤细菌群落的 DGGE 分析

采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 基因突变检测系统

进行 DGGE 分析。使用梯度混合装置制备 40% - 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物) 的变性梯度胶, 其中变性剂的浓度自上而下依次递增。待胶聚合后, 取 5 μL PCR 样品和 5 μL 2 × 加样缓冲液混合后加入上样孔。在 150 V 的电压下, 60℃ 电泳 9 h。电泳结束后, 按 Bassam 等<sup>[15]</sup>方法剥胶银染, 并扫描获取胶图。将 DGGE 图谱数字化, 以同一迁移率下, 有条带计为 1, 无条带计为 0。采用 SPSS 软件 (SPSS Inc., Chicago IL) Ward's 方法对各泳道群落进行聚类分析, 比较群落的差异。

### 1.6 DGGE 条带的序列分析与系统发育分析

DGGE 条带的回收按文献[16]的方法进行。先将银染干燥的凝胶浸泡于 ddH<sub>2</sub>O 中 10 min, 用灭菌的刀片将感兴趣的条带切下放入 1.5 mL 离心管中, 用微量移液器的 tip 头与管壁挤压将条带研碎, 并加 50 μL 裂解液 [0.5 mol/L 乙酸铵, 10 mmol/L 乙酸镁, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.1% SDS], 37℃ 温浴 3 h; 稍离心后上清转至一新的离心管中, 并加 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 沉淀 2 h; 24000 × g, 4℃ 离心 15 min; 将沉淀于 37℃ 干燥 15 min 后, 加 10 μL TE 备用。以这些回收的 DNA 为模板, 以相同的 DGGE 引物再扩增并跑 DGGE 图谱验证后, 以不带 GC 夹引物进行普通扩增, 所得 PCR 产物, 采用上海华舜生物工程有限公司的胶回收试剂盒切胶回收。将切胶回收的目的片段与 pMD19-T 载体连接, 并转化 *E. coli* DH5α, 通过蓝白斑筛选和 PCR 扩增证明目的片段已与载体整合并转化到受体中。采用质粒抽提试剂盒提取质粒后, 应用 M13 通用引物在 ABI377 测序仪中进行序列测定。将序列去除载体序列后, 通过 Blast 程序在 GenBank 中进行相似性检索, 获得相似的可培养菌株的序列, 以 ClustalW 软件包对相似序列对齐后, 用 Mega 4.0 绘制系统发育树。

### 1.7 DNA 序列在基因库中的登录号

DGGE 条带克隆序列均已经递交至 GenBank 中, 登录号为: GQ254080-GQ254139。

## 2 结果

### 2.1 土壤理化性质

对耕作施肥和对照土壤中营养元素的垂向分布进行了定量检测, 结果如表 1。对于土壤含水率、有机质、全氮、碱解氮和全磷, 在两类土壤中垂向变化具有致同的趋势, 即随着深度的增加, 营养元素的含量逐渐下降, 对照表层土壤中含量稍高于耕作

施肥表层土壤,速效磷的垂向变化与此相似,但对对照表层土壤中含量稍低些。对于缓效钾和速效钾含量而言,虽然也是对照大于耕作施肥土壤,但在垂向分布上却表现出逐渐增加的趋势。通过比较两类土壤的 pH 发现,荒芜草地表层土壤呈现碱化趋势,而耕作施肥表层土壤却几乎中性,可能与耕作施肥土壤长期施加厩肥有关。

## 2.2 PCR 扩增及 DGGE 图谱分析

采用 Zhou 等<sup>[13]</sup>的方法提取的 DNA 溶液呈棕

褐色,在 PCR 过程中,即使加入能够促进 *Taq* 酶活性的牛血清白蛋白(BSA)也无法得到扩增产物。采用 50 - 100  $\mu\text{L}$  大剂量琼脂糖电泳,将 DNA 同褐色部分分开,切胶回收后的 DNA 样品无色透明,电泳检测虽然有部分降解,但无 RNA、有机质污染(图 2-A),最终产率为 10 - 50  $\mu\text{g/g}$  土壤(dw), $OD_{280}/OD_{260} = 1.6 - 2.0$ ,浓度 100 - 300  $\mu\text{g/mL}$ ,PCR 扩增均可得到较佳结果,片段为 480 bp 左右(图 2-B),浓度为 100 - 200  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

表 1 土壤样品的物理化学性质

Table 1 Physical and chemical properties of the soil samples

Samples	G1	G2	G3	H1	H2	H3
Soil types	Black soil	Loessal soil	Loessal soil	Black soil	Loessal soil	Loessal soil
Moisture content (%)	26.26	26.99	27.64	22.17	28.22	34.06
pH	7.63	8.23	8.46	9.22	8.83	8.67
Soil organic matter (g/kg)	32.71	21.01	17.90	39.06	18.44	19.25
Total N (g/kg)	1.647	0.787	0.789	1.839	0.800	0.717
Alkali dispelled N (mg/kg)	106.06	33.81	26.52	119.32	13.26	6.63
Total P (g/kg)	0.439	0.363	0.423	0.445	0.408	0.376
Available P (mg/kg)	26.03	23.99	19.92	21.96	28.06	26.03
Slow-release K (mg/kg)	755.65	936.07	1378.12	885.48	1071.83	1566.45
Available K (mg/kg)	92.59	120.28	153.91	96.54	118.30	173.69

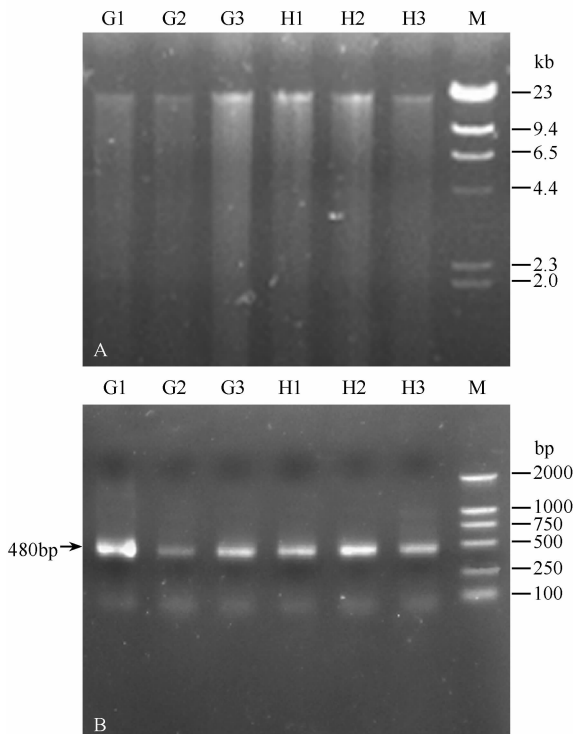


图 2 土壤样品 DNA(A)及 PCR 扩增产物(B)

Fig. 2 DNA extraction (A) and PCR products (B) of soil samples. G1 - G3, the soil sample at 0 - 30 cm, 100 - 130 cm and 200 - 230 cm in depth, respectively, of the tillage and fertilization cropland; H1 - H3, the soil sample at 0 - 30 cm, 100 - 130 cm and 200 - 230 cm in depth, respectively, of deserted grassspot; M, the DNA size marker.

耕作施肥与对照不同深度土壤细菌群落结构 DGGE 图谱如图 3-A,对各群落的聚类分析如图 3-B。在 DGGE 图谱中,耕作施肥土壤中细菌群落自浅而深分别得到 19,19 和 15 条明显条带,对照土壤中细菌群落分别得到 13,18 和 15 条可辨条带。对群落图谱的聚类分析表明,耕作施肥与对照土壤细菌群落结构垂向变化明显,而相同深度内细菌群落结构非常相似。耕作施肥与对照 200 cm 深(H3 和 G3)的细菌群落结构相似性可达 98%,100 cm 深(H2 和 G2)的细菌群落结构相似性也达到 98%,表层(H1 和 G1)细菌群落相似性为 96%。100 cm 和 200 cm 深度内的细菌群落相似性为 94%,表层与 100 cm 以下层内的细菌群落结构差异度较大,仅为 44%。这些结果表明,土壤深度变化更能决定细菌群落的分布,而土壤耕作施肥等作用仅对表层土壤(< 30 cm)细菌群落具有影响,而对深层(> 100 cm)土壤细菌群落分布影响较小。

根据 DGGE 图谱,发现表层及深层中均存在一些特异条带。条带 Xiqin1、4、5、8 和 10 为表层特异条带,而条带 Xiqin2、3、6、7、9、11、12、17 和 18 等为深层特异条带,其余条带为共有条带。

## 2.3 克隆条带的系统发育学分析

将 DGGE 图谱中部分条带(共 20 条,见图 3-a)回收并再扩增、切胶纯化后,克隆并转化进 *E. coli*



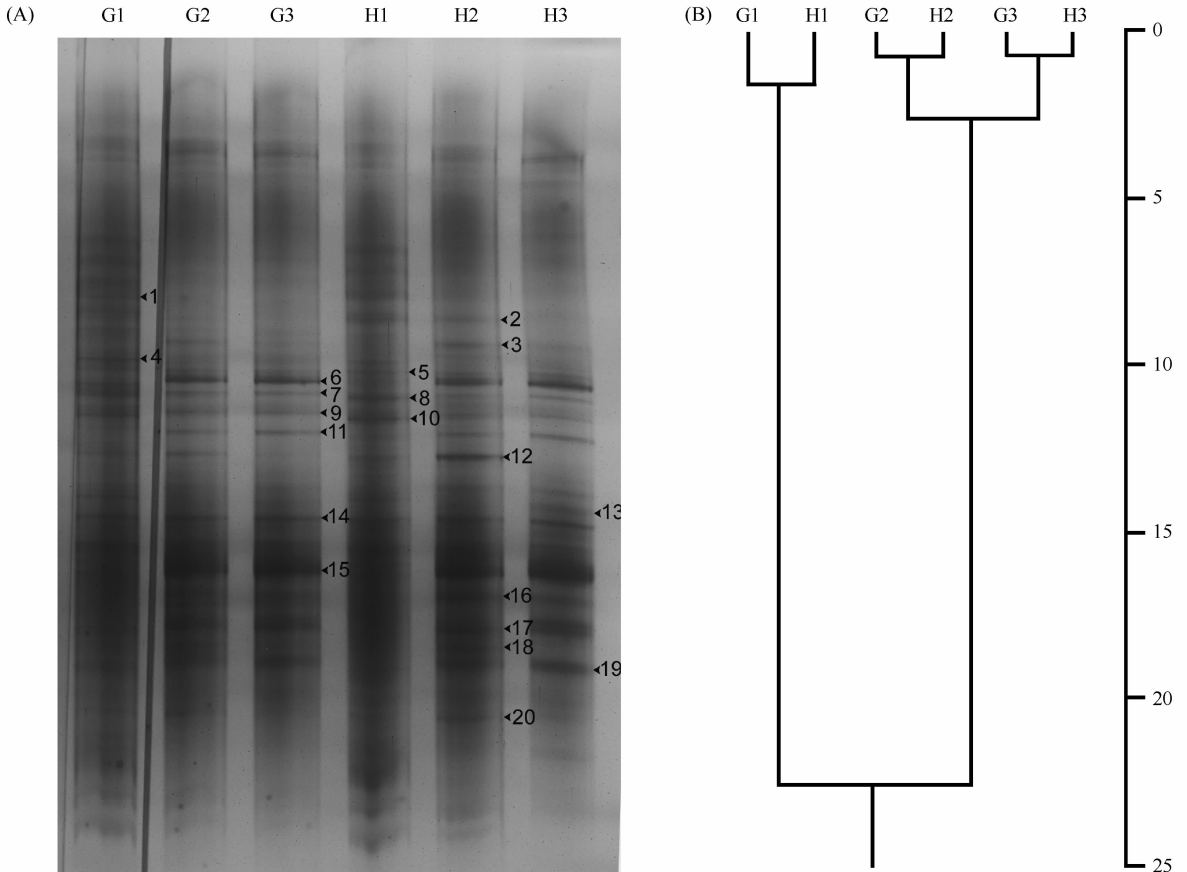


图3 细菌群落 16S rRNA 基因 DGGE 图谱 (A) 及其聚类分析 (B)

Fig.3 DGGE profiles of the soil samples (A) and their clustering analysis (B). G1 (G3, the soil sample at 0 - 30 cm, 100 - 130 cm and 200 - 230 cm in depth, respectively, of the tillage and fertilization cropland; H1 (H3, the soil samples at 0 - 30 cm, 100 - 130 cm and 200 - 230 cm in depth, respectively, of deserted grassspot; the numbered bands (Xiqin bands) in the DGGE profiles are those excised and sequenced; the scale on the right shows the divergence distance.

DH5 $\alpha$ , 通过蓝白斑和 PCR 筛选出阳性克隆, 每个条带随机挑取 5 个克隆进行测序, 共得到 60 条序列, 获取相似序列后构建系统发育树如图 4。这些序列分布于 6 个已知的门, 其中变形菌门 (Proteobacteria) 有 29 条序列, 放线菌门 (Actinobacteria) 9 条序列。在变形菌门中,  $\alpha$ -变形菌纲 (Alpha-proteobacteria) 14 条, 为最优势类群,  $\beta$ -变形菌纲 (Beta-proteobacteria) 8 条, 另外  $\gamma$ -和  $\delta$ -变形菌纲 (Gamma-, Delta-proteobacteria) 分别为 5 条和 2 条。在所有序列中, 无法分类序列 11 条, 包括 Xiqin2 - 3, 3 - 2, 4 - 1, 4 - 2, 7 - 2, 7 - 3, 8 - 2, 9 - 2, 15 - 2, 17 - 1 和 17 - 2, 这表明, 在该土壤中存在大量未培养细菌, 甚至存在大量未知序列。

### 3 讨论

本研究主要对耕作施肥和荒弃草地(对照)黑土表层(0 - 30 cm)、中层(100 - 130 cm)及深层

(200 - 230 cm) 土壤中的营养元素含量及相应的细菌群落结构进行了调查分析。根据全国第二次土壤普查<sup>[11]</sup> 制定的养分分级标准, 耕作施肥和对照区表层土壤样品各养分的含量均在中等以上水平, 有机质含量丰富。通过对不同类型土壤中养分的垂向变化发现, 有机质、氮和磷含量一般随着深度的增加而降低<sup>[17-19]</sup>, 一般在表层(0 - 30 cm) 最高, 而对于钾(缓效钾和速效钾) 元素的分布却较特殊, 在小于 100 cm 深度的范围内, 随着深度的增加而增加<sup>[18]</sup>, 或先降低再升高<sup>[17]</sup>, 其原因一般认为与成土母质有关。在本研究中, 调查土壤尺度为 0 - 230 cm, 有机质、氮和磷等营养元素基本随着深度的增加而递减, 唯一不同是对照表层土壤中速效磷低于下层, 钾元素自表层至 230 cm 范围内随着深度增加而明显增加。对照表层土壤的 pH 远高于耕作施肥土壤, 过高的 pH 一方面可能会导致土壤过度盐渍化, 影响植物的正常生长<sup>[20]</sup>, 另一方面, 土壤中磷元素

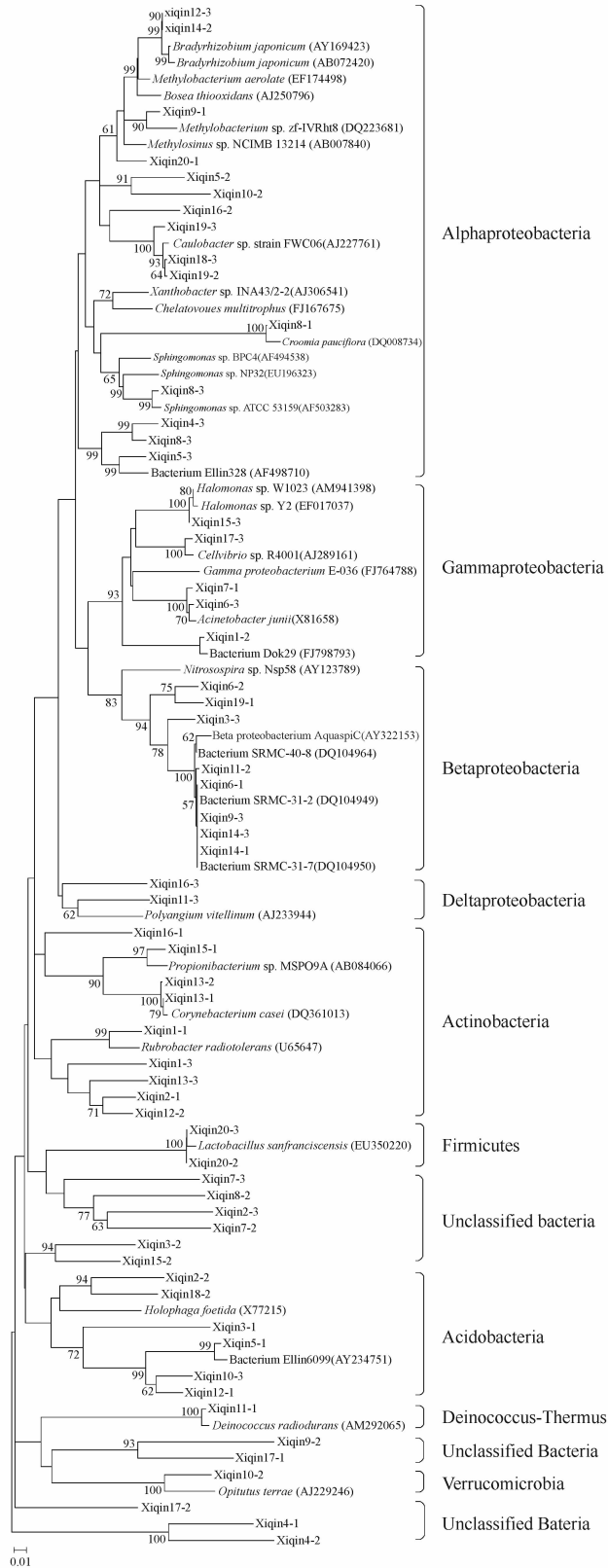


图4 DGGE条带的16S rRNA基因系统发育分析

Fig.4 Phylogeny of excised 16S rRNA gene bands in the DGGE profiles. The recovered 16S rRNA gene sequences are shown as Xiqin plus the band number. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. Numbers on the nodes are their bootstrap support values (1000 bootstrap replicates); bootstrap values below 50% are not presented. The scale bar: 1% sequence divergence.

在高 pH 条件下更易与其它金属离子形成不溶性化合物,如为  $\text{Ca}_{10}\text{-P}$ 、 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 、 $\text{O-P}$ 、 $\text{Fe-P}$ ,从而影响了磷的释放和植物对磷的吸收。大量研究表明,低 pH 可以促进植物对磷素的吸收,而相反高 pH 则不利于磷的活化<sup>[21]</sup>,可见,对照表层土壤中速效磷含量较低很可能是由于 pH 过高所致。对于钾元素而言,其浓度随着深度而增加的原因,除了与其成土母质相关外,还可能与雨水的冲刷淋洗下移有关,有研究表明,与磷相比,钾元素更容易向土壤深层迁移<sup>[19]</sup>。可见,在较大尺度范围内(0-230 cm),黑土中有机质、氮和磷的含量随着深度增加而降低,而钾元素含量随着深度增加而增加,营养元素在耕作施肥与对照土壤中没有明显区别。

对黑土细菌群落结构与功能的研究,主要集中于对表层土壤(<50 cm)<sup>[3,6]</sup>,而对深层土壤细菌群落分析还未见报道。本研究结果表明,100 cm 以下土壤中细菌群落结构相似性较高,而同表层土壤中细菌群落结构相差很大。表层杂草和作物根系一般较难达到 100 cm 以下深度,100 cm 以下土壤物理化学性质比较相近,均为黄土质土壤,含水率比较高,营养较为单一,这种生境的一致性决定了细菌群落的较高相似性,可达 98% 以上(图 3)。表层土壤中除了本研究中检测的营养元素之外,植物根系还将向土壤中分泌大量代谢产物,另外还有耕作及施加有机肥和化肥,从而使得环境差异较大,进而与深层细菌群落结构相距较远,相似性较小。

根据 DGGE 图谱,条带 Xiqin1,4,5,8 和 10 为表层特异条带;Xiqin2 和 12 为表层和中层特异条带,Xiqin3,6,7,9,11,13,18 和 20 为中层和深层特异条带;其余条带 14,15,16,17 和 19 为各层共有条带。这些条带的差异反映了各层中细菌群落结构的差异。表层序列主要分布于  $\alpha$ -变形菌纲、放线菌门和酸杆菌门中,其中 Xiqin1-1 和 1-3 为放线菌门序列,Xiqin1-1 同一株抗辐射的高 GC 含量的革兰氏阳性菌 *Rubrobacter radiotolerans* (GenBank 登录号:U65647)相似性为 96%;Xiqin5-1 同从澳大利亚牧草土壤中分离的酸杆菌门细菌 *Ellin6099* 相似性达 98%,但该菌的具体特性仍待研究<sup>[22]</sup>。表层和中层共有序列 Xiqin2 和 12 分别为放线菌门和酸杆菌门细菌。Xiqin6 是 100 cm 以下的特异条带,同  $\beta$ -变形菌纲中的对抗生素和重金属均具有抗性的菌株 SRMC-31-2<sup>[23]</sup>和  $\gamma$ -变形菌纲中琼氏不动杆菌 (*Acinetobacter junii*)相似性最高,为 99%。Xiqin14 为各层中均出现的条带,其序列一部分同

$\beta$ -变形菌纲中的对抗生素和重金属均具有抗性的菌株 SRMC-31-2<sup>[23]</sup>的相似性为 99%,还有序列同  $\alpha$ -变形菌纲中分离自冰核中的嗜冷菌 *Bradyrhizobium japonicum*<sup>[24]</sup>相似性 99%。可见,不同深度的土壤中,细菌群落的种类非常丰富,蕴藏着丰富的种质资源。

在本研究中,对条带的认识是采用克隆测序的方法进行的,对每个条带随机挑取了 3-5 个克隆进行测序。然而,通过比对分析,发现在不同条带中存在完全一致的序列,如 Xiqin12-3 和 Xiqin14-2,分析其原因,可能是 DGGE 条带中存在单链污染所致,故此,采取合适的步骤以去除 PCR 产物中的单链污染是必要的<sup>[25]</sup>。另一方面,作者还发现同一条带中的序列相似性很低,有的甚至不是同一个门的细菌,如条带 Xiqin6 是 100 cm 以下的特异条带,其中一条序列 Xiqin6-1 同  $\beta$ -变形菌纲中的对抗生素和重金属均具有抗性的菌株 SRMC-31-2<sup>[23]</sup>相似性可达 99%,而另一条序列 Xiqin6-2 也是  $\beta$ -变形菌纲中的细菌,但二者相似性仅为 96%,同样是该条带中的序列 Xiqin6-3,却同  $\gamma$ -变形菌纲中琼氏不动杆菌 (*Acinetobacter junii*)的相似性最高均为 99%,同 Xiqin6-1 相似性仅 81%。产生这种差异的原因,一是由于基因指纹技术分辨率过低而无法完全解析非常复杂的群落,二是由于序列过短、信息不足从而导致系统发育位置不够准确。Sekiguchi 等<sup>[26]</sup>对 DGGE 图谱中的一个条带进行克隆后,随机对 11 个克隆测序,至少得到 7 个不同的操作分类单元 (OTU),部分序列的系统发育分歧严重,序列相似性仅 90% 左右;同样,Schmalenberger 和 Tebbe<sup>[27]</sup>对 SSCP 图谱中的 3 个条带进行克隆后,分别挑取 40 个,26 个和 36 个克隆进行测序后,获得 5 个,24 个和 22 个 OTU。这表明,以 16S rRNA 基因为基础的基因指纹技术,其分辨率均存在一定的限制,一个条带中可能包含一个以上的不同序列,这在本研究中也得到了证实,可见,采用基因指纹技术分析复杂群落时,为了能够反映环境中群落的实际结构状况,应用多种方法相互补充是必须的。

## 参考文献

- [1] 全国土壤普查办公室. 中国土壤. 北京:中国农业出版社,1998.
- [2] 崔海山,张柏,于磊,等. 中国黑土资源分布格局与动态分析. 资源科学 (Resources Science), 2003, 25(3): 64-68.

- [ 3 ] 王光华,刘俊杰,齐晓宁,等. Biolog 和 PCR-DGGE 技术解析施肥对德惠黑土细菌群落结构和功能的影响. *生态学报 (Acta Ecologica Sinica)*, 2008, 28: 220-226.
- [ 4 ] 刘文侠. 黑土退化的微生物学机理(1)-微生物在腐殖质形成与转化中的作用. 吉林农业大学硕士学位论文,2006.
- [ 5 ] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29: 111-129.
- [ 6 ] 白震,何红波,解宏图,等. 施肥与季节更替对黑土微生物群落的影响. *环境科学 (Environmental Science)*, 2008,29:3230-3239.
- [ 7 ] Wei D, Yang Q, Zhang JZ, et al. Bacterial community structure and diversity in a black soil as affected by long-term fertilization. *Pedosphere*, 2008, 18(5): 582-592.
- [ 8 ] Wang GH, Jin J, Liu JJ, et al. Bacterial community structure in a Mollisol under long-term natural restoration, cropping, and bare fallow history estimated by PCR-DGGE. *Pedosphere*, 2009, 19(2): 156-165.
- [ 9 ] 宫曼丽,任南琪,邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2004, 44(6):846-848.
- [10] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22:4673-4680.
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4. 0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24:1596-1599.
- [12] 林大仪,主编. 土壤学实验指导. 北京: 中国林业出版社, 2004.
- [13] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996,62: 316-322.
- [14] Tebbe CC, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59:2657-2665.
- [15] Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196(1):80-83.
- [16] Schwieger F, Tebbe CC. A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64:4870-4876.
- [17] 索全义,姬宝霖,高聚林,等. 高泥沙洪水淤地治沙后土壤养分分布特征的分析. *华北农学报 (Acta Agriculturae Boreali-Sinica)*. 2007, 22(5): 134-137.
- [18] 杨玉海,陈亚宁,李卫红. 塔里木河下游土壤特性及荒漠化程度研究. *水土保持学报 (Journal of Soil and Water Conservation)*, 2007, 21(1):44-49.
- [19] 黄绍文,金继运,杨俐苹,等. 粮田土壤磷、钾养分的垂直分布特征. *土壤肥料 (Soil and Fertilizer Sciences in China)*, 2001(4):8-12.
- [20] 梁正伟,王志春,马红媛,等. 利用耐逆植物改良松嫩平原高 pH 盐碱土研究进展. *吉林农业大学学报 (Journal of Jilin Agricultural University)*, 2008, 30: 517-528.
- [21] Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh IJ. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 2002, 245(1):83-93.
- [22] Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, et al. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 7210-7215.
- [23] Stepanauskas R, Glenn TC, Jagoe CH, et al. Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environmental Microbiology*, 2006, 8:1510(1514).
- [24] Sheridan PP, Miteva VI, Brenchley JE. Phylogenetic analysis of anaerobic psychrophilic enrichment cultures obtained from a greenland glacier ice core. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69:2153-2160.
- [25] Zhang X, Yan X, Gao P, et al. Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *Journal of Microbiological Methods*, 2005,60:1-11.
- [26] Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters*, 2001, 23:1205-1208.
- [27] Schmalenberger A, Tebbe CC. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*, 2003, 12:251-262.



# Effect of tillage and fertilization on bacterial community structure in different depth of black soil

Chongyang Gao<sup>1</sup>, Yangguo Zhao<sup>2\*</sup>, Aijie Wang<sup>1</sup>, Nanqi Ren<sup>1</sup>, Jie Bai<sup>2</sup>, Weijun Tian<sup>2</sup>, Jian Zhang<sup>2</sup>, Haiyan Li<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

(<sup>2</sup>College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To analyze the impact of tillage and fertilization on bacterial community structure under different depth in black soil. [ **Methods** ] We used denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profile analysis of bacterial community based on the 16S rRNA gene combining soil physico-chemical characteristics. [ **Results** ] DGGE profiles showed that tillage and fertilization influenced more on bacterial community structure in the surface soil than the subsurface and deep soil, and the divergence distance between the tillage soil and the control was about 4%. Subsurface and deep soil affected less compared with the control, and the divergence distance was 2%. The vertical similarity of bacterial community structure between subsurface and the deep soil was higher than that of surface soil. [ **Conclusion** ] Tillage and fertilization affected the surface bacterial community (0 – 30 cm), whereas little on the deeper soil (> 100 cm) bacterial community.

**Keywords:** black soil; community structure; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Important National Science & Technology Specific Projects for Water Pollution Control and Management (2008ZX07208-009) and the National Natural Science Foundation of China (40801193)

\* Corresponding author. Tel: +86-532-66786568; Fax: +86-532-66782810; E-mail: yg.zhao@yahoo.com.cn

Received: 5 July 2009/ Revised: 18 September 2009

## 《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要:基本要素包括研究目的、方法、结果和结论,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围,采用的手段和方法,得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要:包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点:英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中按照[ Objective ]、[ Methods ]、[ Results ]、[ Conclusion ]顺序分项撰写。英文摘要完成后,务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。
  - (1) 在英语摘要中,不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
  - (2) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
  - (3) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。
  - (4) 摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。
  - (5) 摘要中不用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP等。
  - (6) 句子的开头处最好不要使用数字。