

土壤微生物多样性研究进展

崔金香, 王 帅*

(青岛科技大学 化工学院 生物工程与技术系, 山东 青岛 266042)

摘要: 阐述了土壤微生物多样性的概念、主要影响因素以及国内外土壤微生物多样性的研究方法等, 展望了未来土壤微生物多样性的研究方向。

关键词: 土壤; 土壤微生物; 生物多样性; 方法

中图分类号: Q154.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)06-0165-05

土壤是微生物的大本营, 微生物在土壤养分转化与腐殖质形成过程中有着重要的作用。土壤中微生物多样性受耕作方式、地理位置、土壤层次、植被、土壤肥力、气候变化及土壤类型等诸多因素的影响, 反之, 土壤微生物的多样性又影响土壤生态系统的结构、功能及过程, 它是维持土壤生产力的重要组分^[1]。土壤微生物多样性是一门近来在土壤学、微生物学及生物多样性领域均给予较多关注的新兴交叉学科。研究土壤微生物多样性对于探索自然生命机制、应对全球气候变化、治理各类环境污染、维持生态服务功能及促进土壤持续利用等方面具有重要意义^[2]。保持微生物的多样性对于人类农业生产亦具有重要意义^[3]。

1 土壤微生物多样性概念

土壤微生物是土壤中一切肉眼看不见或看不清楚的微小生物的总称, 通常意义上应当包括古菌、细菌、放线菌、真菌、病毒、原生动物和显微藻类等。土壤是微生物生长和繁殖的天然培养基。土壤微生物多样性是指土壤生态系统中所有的微生物种类、它们拥有的基因以及这些微生物与环境之间相互作用的多样化程度及生命体在遗传、种类和生态系统层次上的变化^[4]。土壤微生物多样性包括在栖息地中微生物分类群的多样性和微生物分类群内的遗传多样性, 以及包括群落结构的变异、相互作用的复杂性、营养水平和共位群数量在内的生态多样性。目前土壤微生物多样性研究主要从物种、功能和遗传

多样性 3 个层面展开^[5]。土壤微生物多样性存在于基因、物种、种群以及群落 4 个层面, 是土壤生态系统的—个基本生命特征, 也是时间和空间的函数^[6]。

2 影响土壤微生物多样性的主要因素

影响土壤微生物群落的结构组成和多样性, 尤其是其功能多样性的因素有很多种, 可大体分成自然因素和人为因素两大类。自然因素包括农业植被类型、土壤类型、温度、水分以及 pH 值等; 人为因素包括农药、施肥以及土壤耕作方式等人类对土壤的管理方式, 现分述如下。

2.1 植被类型

植被通过影响土壤含水量、温度、通气性、pH 值及有机碳和氮的水平而影响土壤生物多样性^[7]。毕江涛等^[8]研究指出, 植被的类型、种类、植被不同生长发育阶段等均会对土壤微生物多样性产生影响。植被是土壤微生物赖以生存的有机营养物质和能量的重要来源, 影响着土壤微生物定居的物理环境。杨喜田等^[9]对太行山针阔混交林等 6 种不同植被群落中的微生物区系、微生物生物量和土壤呼吸强度变化测定表明, 微生物群落特征存在较大差异, 微生物数量顺序依次为落叶阔叶纯林> 针阔混交林> 针叶纯林> 针叶混交林> 裸地。Han 等^[10]研究发现, 豆科植物能够明显增加可培养微生物数量、微生物生物量和群落代谢多样性; 也证实较多的植被种类、豆科植被和天然植被类型能够增强土壤微生物群落的功能。Merciris 等^[11]在砂壤土上利用小区试验,

收稿日期: 2010-01-23

基金项目: 财政部中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目

作者简介: 崔金香(1983-), 女, 山东青岛人, 在读硕士研究生, 研究方向: 生化工程。

* 通讯作者: 王 帅(1985-), 男, 山东淄博人, 在读硕士研究生, 研究方向: 生化工程。E-mail: wang.sh.7@163.com

开展植物多样性对土壤微生物群落的快速影响效果试验,结果显示:种植4种植物处理的土壤培养的微生物群落活性和多样性均高于种植3种、2种和1种植物处理的土壤。孟庆杰等^[12]在中国科学院海伦生态试验站进行长期定位试验,结果表明:在春季和夏季,土壤微生物两季平均颜色变化率和多样性指数均表现为草地最高,农田次之,裸地最低。有研究证明^[13],根系分泌物不仅为根际微生物提供能量,而且不同根系分泌物直接影响着根际微生物的数量和种群结构。严君等^[14]研究了不同植被覆盖下所形成的不同的土壤属性对微生物类群(细菌、真菌和放线菌)组成、数量的影响,结果表明:不同植被覆盖下的土壤,在长期没有肥料投入的情况下,土壤微生物总数量的变化情况为:草地>作物覆盖>裸地。同时外来植物取代本土植物后会改变根系对土壤的营养物质输入,从而影响土壤微生物的结构与功能;外来植物扩散到新栖息地并形成稳定种群,会影响侵入地植物群落结构,进而引起土壤生物多样性和生态系统过程发生改变^[15]。

2.2 土壤类型

近年来的大量试验都证明了土壤类型是土壤微生物群落结构和密度的主要影响因素之一^[16]。徐晶等^[17]对3类不同类型的土壤(红壤、黑土、灰漠土)研究发现,随着耕作年代的增加,土壤细菌、真菌、放线菌、固氮菌以及氨化细菌在3类不同土壤中都呈现明显差异。杨超等^[18]研究了皖南烟区4种不同植烟土壤类型,结果表明:不同生态环境下,根际及非根际土壤中各类微生物数量及多样性指数各不相同,多种微生物数量与土壤养分含量呈正相关关系。刘文娜等^[19]研究了山东桓台县3种土壤类型(潮土、褐土和砂姜黑土)与农业用地方式(林地、菜地和粮田)对土壤表层(0~10 cm)微生物量碳的影响。结果表明,土壤类型不同,土壤微生物量碳含量不同,碳含量依次为:粮田>菜地>林地。土壤酸碱度亦对微生物数量影响显著,酸性土壤中真菌多,中性或碱性土壤中细菌和放线菌数量较多。

2.3 土地利用及管理方式

土地利用方式、农药使用和施肥及土地耕作方式等这些人为因素通过改变土壤的理化性质而影响土壤微生物多样性。姚槐应等^[20]使用碳素和磷酸酯脂肪酸法研究了8种供试红壤微生物群落的功能多样性和结构多样性,2种方法均表明,土地利用方式能显著影响微生物的多样性。农药等杀虫剂作为一种外施入土壤生态系统的物质,它和土壤中其他

物质一样能被土壤中的微生物降解,从而刺激或抑制土壤中微生物的活性,引起土壤微生物群落结构的改变。研究发现,含有HCl的部分有机磷杀虫剂能够使土壤中细菌迅速增加,而对放线菌、真菌作用则不显著^[21]。施肥对土壤微生物多样性的影响可能与肥料种类、施用方式(施用量、长期或短期施用)等因素有关。林新坚等^[22]通过盆栽试验研究表明,施用各品种有机肥较不施肥与施用化肥促进了土壤某些微生物量的提高,而施用不同有机肥品种促使不同种类微生物量的提高。同时,施用肥料还能改变土壤的物理性状,影响植被生长,从而间接影响土壤微生物群落结构。此外,不同耕作方式会对土壤微生物多样性造成不同的影响。有报道认为,免耕土壤中微生物多样性和生物量均高于传统耕作后土壤,连作后土壤微生物区系发生变化,各类微生物数量上升,真菌、硝化、反硝化细菌数量明显增加^[23];轮作不仅影响土壤微生物,使有益微生物增加,有害微生物减少,而且使土壤微生物活性增强。

2.4 温度、水分、气候

微生物数量不仅与土壤养分因素有关,而且与温度、水分、气候等有关。温度和水分对土壤微生物多样性的影响存在交互性,具有协同效应^[24]。Papathodorou等^[25]研究指出,也可以用季节来说明不同温度和水分对微生物多样性的影响。张乃莉等^[26]指出,气候变暖和大气N沉降引起土壤温度、湿度、pH等土壤环境因素变化,引起凋落物的质量和数量的变化,改变土壤微生物与植物之间的养分分配,直接或间接地影响微生物的生长、活动和群落组成。任岩岩等^[27]应用自控、独立、封闭的生长室系统研究证明了岷江冷杉根际和非根际土壤细菌、放线菌和真菌数量对环境CO₂浓度和环境温度升高及其交互作用的响应。CO₂浓度和温度升高对根际放线菌和根际真菌不产生影响,而交互作用却对它们的数量产生显著影响。土壤孔隙中的水分通过影响空隙中的氧气进而影响了相关土壤中微生物的活性。土壤中细菌在高的水势下活性高,而真菌、放线菌在相对低的水势下活性高。当土壤含水量降低到一定程度时,微生物数量就会大幅度下降。

3 土壤微生物多样性的研究方法

目前研究土壤微生物多样性的方法可以分为2类:基于生物或化学的方法和基于现代分子生物学技术的方法。

3.1 以生化技术为基础的微生物多样性的经典研

究方法

3.1.1 平板计数和形态学分析 在传统的土壤生态系统中,微生物群落多样性及结构分析大多是将微生物进行分离培养(表1),用显微镜观察所分离的微生物,通过形态特征来确定微生物的种类,直接评估多样性。此方法快速、廉价,可提供活的、异养类型的种群信息,特别是在水环境样品中,确实可以鉴定出许多种类。但是,有些种类形态相似的微生物,仅凭显微镜无法准确判断。因此,采用培养和形态鉴别的方法进行微生物多样性的研究,不可避免地会低估多样性的丰富度。

表1 土壤微生物三大类菌的分离培养方法

分离对象	培养基名称	培养温度/℃	培养时间/d
细菌	牛肉膏蛋白胨	37	2~3
放线菌	高氏1号	28~30	5~7
真菌	马丁氏	28~30	5~7

注:样品为土样;分离方法为稀释分离;稀释度为 10^{-5} ~ 10^{-7}

3.1.2 群落水平单碳源利用模式(CLP) Garland等^[28]首次利用96孔微量板,通过单一碳源利用能力来评价细菌群落的功能多样性。目前该方法已经广泛应用于评价污染物对微生物群落及其代谢功能影响的研究中。由于这种方法只选择了在试验条件下可培养的、快速生长的微生物,所以从严格意义上来说,只反映了潜在的而不是原位的代谢多样性。

3.1.3 脂肪酸甲酯(FAME)/磷脂脂肪酸甲酯法(PLFA)分析法 生物在形态上有区别,在结构上亦有不同。采用生物标记分子作为鉴定微生物种群的指示因子,可减少使用显微镜等形态观察方法带来的人为误差,同时也给定量研究种群开辟了新的方法。脂肪酸甲酯分析法就是在此基础之上,且不依赖微生物培养技术,并能提供微生物种群脂肪酸组成的一种分析法。脂肪酸图谱的改变就代表着微生物种群的变化,FAME法已经广泛应用到化学物质污染和农业生产活动引起的微生物种群组成和结构改变的研究中。其局限性主要是检测设备昂贵。

3.2 基于分子技术的微生物多样性的研究方法

分子生物学技术的应用克服了传统方法的限制,使研究者可以从基因水平上估算种的丰度、均度,查明种的变异情况等,从而可以更客观地认识环境中微生物天然的生态状况。目前用于微生物生态研究的分子技术主要有rRNA-rDNA序列分析、T-RFLP、RAPD、核酸探针检测技术、TGGE、DGGE等。其中DGGE是近几年在国外应用比较

广泛的分子生物学技术之一。几种方法分述如下。

3.2.1 随机引物扩增多态性DNA方法 由Williams等建立的RAPD(randomly amplified polymorphic DNA)技术,因具有操作简便、快速和经济等优点而得到了广泛应用^[29]。该技术以随机寡核苷酸(5~10ng)作为引物,扩增得到的多态性片段较短,方便检测2个同源或异源等位基因的有无,适用于种内和亚种更为细致的分类。张峦等^[30]采用RAPD分子标记技术研究了重金属镉和多环芳烃菲复合污染对土壤中微生物群落DNA序列多样性的影响。结果表明,镉菲单一和复合污染均导致土壤微生物群落DNA序列的丰度、均度和多样性指数增加。重复性不好是该技术存在的主要问题,而DNA模板的质量与数量、MgCl₂和引物浓度的变化都有可能得到不同的图谱。另外,该方法无法得到任何微生物系统发育信息。

3.2.2 T-RFLP技术研究方法 T-RFLP技术是从细菌群落中提取DNA,以其为模板在合适的引物下进行PCR扩增目的基因。扩增的DNA由限制性酶进行酶切,用产物所产生的末端片段大小来对土壤中细菌群落的结构进行评价,而不需要对末端片断测序^[31]。Pett等^[32]利用T-RFLP技术研究氧化还原电位对土壤菌群的影响,发现经过4d的好氧/厌氧处理与未处理的土壤样品菌群结构相似,而经过持续12h的厌氧或好氧处理的土壤样品得到的分子条带则明显不同。Osborne等^[33]对T-RFLP方法进行了完善,采用多个限制性酶来代替单一限制性酶排除选择酶的干扰,通过叠加靶基因酶切位点,使待鉴定种属在数据库中匹配度提高。但目前该技术费用较高,此外这项方法并不适合用来评价群落成员的系统学地位。

3.2.3 变性梯度凝胶电泳和温度梯度凝胶电泳 1993年,Muyzer等^[34]将变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术引入到环境微生物学多样性的研究中。DGGE和TGGE(temperature gradient gel electrophoresis)的原理是根据含有不同序列的DNA片段(16S rRNA基因扩增产物)在具有变性剂梯度或温度梯度的凝胶上,由于其解链行为的不同而导致迁移率的不同,从而使不同碱基序列的DNA片段得到有效分离,结合PCR扩增标记基因或其转录物(rRNA和mRNA)。DGGE方法能直接显示微生物群落中优势组成成分。由于可同时对多个样品进行分析,使之非常适合研究微生物群落的时空变化,而且可以通过对切下条带进行序列分

析或与独特的探针杂交鉴定群落组成,可以方便地了解环境被干扰后的微生物群落变化或某种指示微生物的命运。但是,DGGE/TGGE技术也存在一定的局限性。其缺陷之一是只能分离约500bp大小的DNA片段,有些种类细菌16S rDNA在DGGE上不只显示1条带,而不同种细菌的16S rDNA序列在DGGE上也可能因为具有相同的解链行为而不能被分开。即便存在以上的局限性,DGGE/TGGE仍是分析微生物群落多样性有效方法之一。

3.2.4 核酸探针方法 核酸探针是指带有标记物的已知序列的核酸片断,它能够与其互补核酸序列杂交形成双链,可用于待测核酸样品中特定基因序列的检测。用核糖体RNA探针来研究微生物群落的生物多样性,所得到的结果就是微生物群落中存在种群的一幅系统进化图。简单地说,该法就是大量提取整个微生物群落中代表种群的DNA或RNA,然后用特异性核酸探针获得一系列rRNA克隆。对核糖体RNA基因测序后,就可以构建出组成微生物群落种群的系统进化树(图1)^[35]。

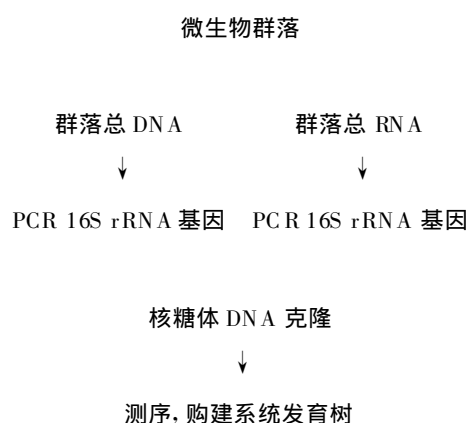


图1 微生物群落种群的系统进化树构建流程

以上介绍了几种研究土壤微生物多样性的方法,在实际工作中,常常是几种方法结合使用,这样能更准确、深入地阐明多样性的实质。

传统的方法主要是以物种的组成为基础进行微生物群落结构的分析,而现代分子生物学技术则是在基因水平上进行群落结构的分析,特别是通过研究特定的基因在自然环境中的表达调节,以弄清微生物在环境中的真实的状态。各种新技术的不断完善与发展,特别是分子生物学技术的发展,将会使人们能够不断地深入研究土壤微生物的多样性,了解自然生态环境中微生物多样性及实际的生存状态,探索土壤中的未知微生物,从而可以通过施肥等各种农业措施调整土壤微生物的种类及数量。

4 土壤微生物多样性研究趋势与展望

随着人们对土壤微生物多样性研究的不断深入,今后的研究工作将集中在如下4个方面:①缓解人类在粮食、能源、资源和环境等方面危机;②促进土壤微生物生态学发展;③以全新的视角审视微生物系统发育和功能多样性间的联系;④设计和探索更加准确、简单、可视或可读性强的研究方法,并加强分子生物学不同方法之间的联系及其与传统研究方法的有机结合。

总之,今后的土壤微生物多样性研究应紧紧围绕土壤生物过程、生态服务功能以及二者之间的联系,着重建立和完善土壤微生物多样性的研究指标和方法体系,进而阐明人类生产活动影响土壤微生物多样性及其生态服务功能的土壤生物过程^[39]。也可以人为引入一些有益微生物抑制有害病原菌的发展,提高土壤生态肥力,增强土壤生态系统对废物的吸收净化能力,促进整个陆生生态系统的良性循环,改善人类的生存环境,实现人与自然的和谐与可持续发展。

参考文献:

- [1] 杨芳,徐秋芳.土壤微生物多样性研究进展[J].浙江林业科技,2002,22(6):39-55.
- [2] 林先贵,胡君利.土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能[J].土壤学报,2008,45(5):893-899.
- [3] 游红涛.农药污染对土壤微生物多样性影响研究综述[J].安徽农学通报,2009,15(9):81-82.
- [4] 姚槐应,何振立,黄昌勇.不同土地利用方式对红壤微生物的影响[J].水土保持报,2003,17(2):51-54.
- [5] 毕江涛,贺达汉.植物对土壤微生物多样性的影响研究进展[J].中国农学通报,2009,25(9):244-250.
- [6] 黄昌勇.土壤学[M].北京:中国农业出版社,2000:50-55.
- [7] Waid J S. Does soil biodiversity depend upon metabolic activity and influences?[J]. Applied Soil Ecology, 1999, 13(2): 151-158.
- [8] 毕江涛,贺达汉,沙月霞,等.荒漠草原不同植被类型土壤微生物群落功能多样性[J].干旱地区农业研究,2009,27(5):149-155.
- [9] 杨喜田,宁国华,董慧英,等.太行山区不同植被群落土壤微生物学特征变化[J].应用生态学报,2006,17(9):1761-1764.
- [10] Han X M, Wang R Q, Liu J, et al. Effects of vegetation types on soil microbial community composition and catabolic diversity assessed by polyphasic meth-

- ods in North China[J]. Journal of environmental Sciences, 2007, 19(10): 1228-1234.
- [11] Merciris L G, Barthes L, Gastine A, *et al.* Rapid effects of plant species diversity and identity on soil microbial communities in experimental grassland ecosystems[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38(8): 2336-2343.
- [12] 孟庆杰, 许艳丽, 李春杰, 等. 不同植被覆盖对黑土微生物功能多样性的影响[J]. 生态学杂志, 2008, 27(7): 1134-1140.
- [13] 金剑, 王光华, 陈雪丽, 等. Biolog-ECO 解析不同大豆基因型 R1 期根际微生物群落功能多样性[J]. 大豆科学, 2007, 26(4): 565-570.
- [14] 严君, 韩晓增, 王守宇. 黑土不同植被覆盖与施肥下土壤微生物的变化特征[J]. 土壤通报, 2009, 40(2): 240-244.
- [15] 牛红榜, 刘万学, 王芳浩. 紫茎泽兰(*Ageratina adenophora*)入侵对土壤微生物群落和理化性质的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(7): 3051-3060.
- [16] Chiarini L, Bevivino A, Dalmastri C, *et al.* Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize root[J]. Applied Soil Ecology, 1998, 8(1/3): 11-18.
- [17] 徐晶, 陈婉华, 张夫道, 等. 三类不同开垦年代的土壤主要微生物类群和土壤酶活性的演变[J]. 土壤肥料, 2006(2): 56, 58.
- [18] 杨超, 刘国顺, 邱立友, 等. 不同植烟土壤微生物数量调查研究[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(5): 31-36.
- [19] 刘文娜, 吴文良, 王秀斌, 等. 不同土壤类型和农业用地方式对土壤微生物量碳的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(3): 406-411.
- [20] 姚槐应, 何振立, 黄昌勇. 不同土地利用方式对红壤微生物多样性的影响[J]. 水土保持学报, 2003, 17(2): 51-54.
- [21] 李志昆. 不同措施对草地土壤微生物的影响[J]. 养殖与饲料, 2008(7): 67-68.
- [22] 林新坚, 王飞, 蔡海松, 等. 不同有机肥源对土壤微生物量及花生产量的影响[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(2): 235-238.
- [23] 陈芝兰, 周晓英, 何建清. 设施栽培措施对土壤微生物区系的影响[J]. 西藏科技, 2007(1): 14-15.
- [24] 周才平, 欧阳华. 温度和湿度对长白山两种林型下土壤氮矿化的影响[J]. 应用生态学报, 2001, 12(4): 505-508.
- [25] Papatheodorou E M, Argyropoulou M D, Stamou G P. The effects of large and small scale differences in soil temperature and moisture on bacterial functional diversity and the community of bacterivorous nematodes[J]. Applied Soil Ecology, 2004(25): 37-49.
- [26] 张乃莉, 郭继勋, 王晓宇, 等. 土壤微生物对气候变暖和大气 N 沉降的响应[J]. 植物生态学报, 2007, 31(2): 252-261.
- [27] 任岩岩, 武继承. 保水剂对土壤性质及土壤微生物的影响研究进展[J]. 河南农业科学, 2009(4): 13-15.
- [28] Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1996, 28(2): 213-221.
- [29] Williams J G, Kubelik A R, Livek K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful gene marker[J]. Nucleic Acids Res 1990, 18(22): 6531-6535.
- [30] 张彦, 沈国清, 陆贻通, 等. 镉和菲复合污染对土壤微生物 DNA 序列多样性的影响[J]. 科技通报, 2005, 21(6): 763-769.
- [31] Dubey S K, Padmanabhan P, Purohit H J, *et al.* Tracking of methanotrophs and their diversity in paddy soil: a molecular approach[J]. Curr Sci 2003, 85(1): 92-95.
- [32] Pett R J. Redox fluctuation structures microbial communities in awet tropical soil[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11): 6998-7007.
- [33] Osborne C A, Rees G N, Bernstein Y, *et al.* New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(2): 1270-1278.
- [34] Muyzer G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.
- [35] 张旭霞, 刘左军, 陈正宏. 土壤微生物多样性的研究方法[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(32): 10373-10374, 10387.
- [36] 黄进勇, 李春霞. 土壤微生物多样性的主要影响因素及其效应[J]. 河南科技大学学报: 农学版, 2004, 24(4): 10-13.