

土壤微生物群落及其活性与植被的关系^{*}

夏北成¹⁾ Zhou J Z²⁾ Tiedje J M³⁾

(1) 中山大学环境科学研究所, 广州 510275; 2) Oak Ridge National Laboratory,
3) Center for Microbial Ecology, Michigan State University, USA)

摘 要 植被通过影响土壤环境, 从而影响到土壤微生物群落的结构和多样性. 受植被影响的土壤环境中土壤微生物群落的多样性比不受植被影响或者没有植被的土壤环境中的微生物群落的多样性要高很多, 不受植被影响的表面以下土壤环境中的微生物群落具有显著的优势 OTU 种群, 而表层土壤环境中没有显著的优势 OTU 种群. 植被对微生物的影响同时也表现在对生命物质 DNA 的影响, 即有植被的土壤环境中的微生物 DNA 具有更高的活性, 其基因在克隆过程中更容易被转移, 获得更多的克隆细胞和种群.

关键词 土壤微生物, 群落结构, 多样性, DNA 活性

分类号 X 172, Q 938. 1

随着人类对土壤环境影响的日益加深以及通过各种不同的途径向土壤中排放污染物质, 使土壤环境受到的严重的污染和破坏. 在力图解决土壤污染问题时, 遇到了各种各样的困难, 这时土壤微生物受到了科学家的重视^[1,2]. 土壤微生物对土壤污染具有特别的敏感性, 同时它们又是降解污染物质和恢复土壤环境的最先锋者^[3,4]. 植被是影响土壤环境的重要因素, 对土壤环境中的理化性质、水力特性和生物相等都会产生极大的影响.

1 材料与方法

1.1 土壤样品

第一批样品于 1995 年 12 月初取自美国 Michigan State University 的 Kellogg 生物实验站 (KBS) 的长期生态观测点的白杨树实验区, 称为 KBS 样品, 共取得 4 个样品, 详见文献 [5]. 第二批样品取于 1996 年夏季, 取自美国 Virginia 州的 Abbott's Pits, 称为 AB 样品. 取样深度分别为 5, 157, 325 和 404 cm, 样品取出后立即放入冷藏盒内, 带回实验室藏于 -20℃.

1.2 DNA 的提取、纯化和定量测定

DNA 的提取采用液氮研磨和加 SDS 的方法, 纯化采用低熔点琼脂糖凝胶电泳和微型过滤柱的方法进行 2 次纯化, 定量测定采用普通琼脂糖凝胶电泳. 详见文献 [5, 6].

^{*} 国家教委留学回国人员科研启动基金资助项目

收稿日期: 1997-10-27 夏北成, 男, 41 岁, 副教授

1.3 DNA的扩增和基因转移

采用 PCR技术和选择对绝大部分土壤微生物种类均有较好的扩增效应的引物^[6]扩增提取的 DNA模板, 通过 TA克隆技术将扩增的 16 S因子转移至 *Escherichia coli* 中^[5,6].

1.4 RFLP分析

RFLP分析即为限制性内切酶消化 DNA片段的长度多态性图象分析方法 (restriction fragment length polymorphism). 通过克隆过程所获得的白色菌落即为所需的克隆细胞, 对其细胞进行直接扩增, 过程与引物见文献 [5, 6]. 根据土壤微生物群落的特点, 选用 *Msp*I -*Rsa*I 和 *Hha*I -*Hae*III两对酶, 取 7~8 μ L 的 PCR产物, 用 *Msp*I 和 *Rsa*I 酶 0.1个单位对其进行消化. 消化温度为 37 $^{\circ}$ C, 时间可为 5~15 h. 制备特别的 3.0%~3.3% 的 Metaphor 琼脂糖胶, 在 4 $^{\circ}$ C 下对消化了的 DNA进行电泳分离. 从而获得每一个克隆的基因多态图象, 应用图象转换分析软件 Gelcompar进行聚类, 给出聚类树. 对经 *Msp*I 和 *Rsa*I 消化处理而获得的具相同基因型的克隆再用 *Hha*I 和 *Hae*III进行消化处理. 经第二组酶消化后其多态图象相同的克隆被认为是携带同一因子的克隆. 各不相同的基因型为唯一基因型, 亦称为一个 OTU^[5,7].

2 结果与讨论

2.1 群落结构与植被的关系

2.1.1 表层土壤群落结构与植被的关系 相同层次的土壤样品微生物克隆群落的结构受植被的影响很大. 从 KBS样品多草小区获得的 OTU 数或克隆种群数比无草小区的得多, 这说明植被使得土壤微生物种类更丰富 (图 1).

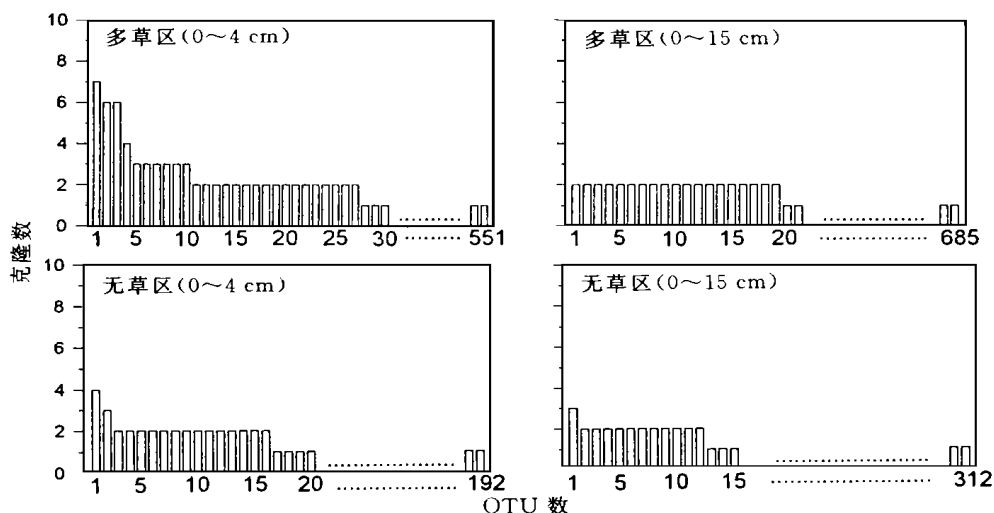


图 1 KBS样品不同小区和不同层次样品的微生物克隆群落结构比较

Fig. 1 Soil microbial community structures from KBS samples (weedy and weed-free plots)

2.1.2 不同层次土壤微生物群落结构变化 AB样品是来自同一种处理的不同土壤层次, 表层有较丰富的草本植物, 表层以下第一个层次的样品取自 157 cm, 一般草本植物对这一层次以及以下层次的影响将很小. 在表层以下的各层次中, OTU 数量大大减少 (图 2).

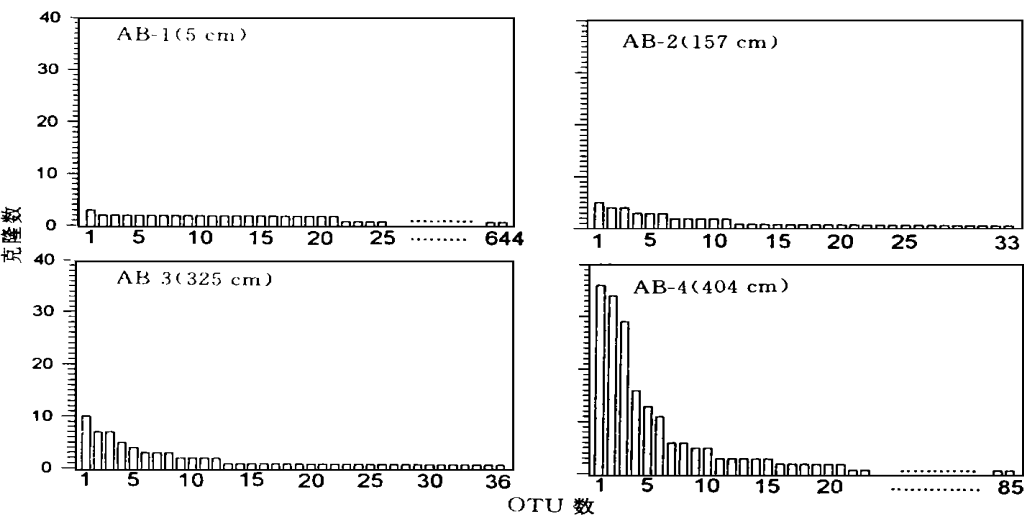


图 2 不同土壤层次的微生物克隆群落结构比较

Fig. 2 The cloning microbial community structures from surface and subsurface soil

2.2 群落多样性与植被的关系

表层土壤样品及其微生物群落的多样性如表 1. 从表 1 可以看出,土壤微生物群落的多样性指数受植被的影响很大,克隆数的差异更为明显. 表层土壤样品的 OTU 与克隆数的比值较接近,都在 0.9 以上;表面以下的 3 个样品其比值却明显不同. 随着土壤层次的加深,比值变小,样品 AB-2、AB-3 和 AB-4 的比值分别为 0.61、0.49 和 0.34. 这一变化除受植被的影响以外,还与表面以下土壤的结构特性和营养等有关^[11].

植被对土壤中微生物的群落结构影响很大,能提供较为多样的营养物质和微生物种群生长所需的资源,为丰富的微生物种类提供了稳定发展的基本条件.

表 1 不同土壤环境样品的土壤微生物群落多样性指数

Tab. 1 The diversity indexes of soil microbial cloning community from different samples

样 品	植被情况	土壤层 /cm	获得克隆数	OTU 数	多样性指数 ¹⁾
KBS-1	植被丰富 (多草区)	0~ 4	606	551	2.77
KBS-2	植被丰富 (多草区)	0~ 15	705	684	2.93
KBS-3	无草本植物 (无草区)	0~ 4	210	191	2.27
KBS-4	无草本植物 (无草区)	0~ 15	324	311	2.49
AB-1	植被丰富 (表层)	5	687	665	2.82
AB-2	受植被影响很小 (表面以下)	157	54	33	1.44
AB-3	受植被影响很小 (表面以下)	325	74	36	1.43
AB-4	受植被影响很小 (表面以下)	404	252	85	1.52

1) 根据 Shannon 指数计算

2.3 植被对 DNA 分子活性的影响

以上关于植被对土壤微生物群落结构的影响的结论是基于获得的克隆群落. 获得克隆群落的过程则是一个重要的环节,并可揭示植被对 DNA 分子活性的影响. 在克隆过程中所获得的与活性有关的数据整理如表 2.

表 2 KBS 样品的克隆过程的差异

Tab. 2 Cloning difference between weedy and weed free samples (KBS)

样 品	多草小区			无草小区		
	(0~ 4 cm)	(0~ 15 cm)	合计	(0~ 4 cm)	(0~ 15 cm)	合计
兰色菌落总数 (B)	5 209	3 167	8 376	5 297	6 740	12 037
白色菌落总数 (W)	4 744	3 581	8 335	2 238	5 822	8 060
W / (B+ W)	0.48	0.53	0.50	0.30	0.46	0.40
挑选进行扩增的白色菌落 (W P)	857	858	1 715	551	686	1 237
携带 16 S 因子的克隆数 (16 S)	606	705	1 311	210	324	534
16 S/W P	0.71	0.82	0.76	0.38	0.47	0.43

从克隆过程所获得的克隆菌落总数来看，从无草小区的样品所获得的菌落总数略多于多草小区，2个小区样品所获得的白色菌落数量则很接近，因此从多草小区的样品所获得的白色菌落的比例稍高于无草小区样品的白色菌落的比例。白色的菌落的克隆细胞并不一定都携带有被转移的目标基因 16 S 因子，某些白色菌落可能是携带一个小于 16 S 因子的基因或者是自我连接。将挑选的白色菌落经 PCR 直接扩增，然后检测其克隆细胞是否携带 16 S 因子。结果表明从多草样品所获得的克隆中带 16 S 因子的克隆细胞的比例显著高于从无草样品所获得的带 16 S 因子的克隆细胞的比例。

以上结果显示，多草小区样品中的 DNA 更容易在克隆过程中被转移进入 *Escherichia coli* 细胞中而获得携带 16 S 因子的克隆细胞。这表明从多草小区样品中获得的 DNA 具有更高的活性。土壤环境在植被的影响下更有利于微生物的生长与繁殖。生长与繁殖活跃的生物种群，其生命代谢过程也更旺盛，其生命物质的活性也较强。反之亦然。

2.4 植被对土壤微生物群落的影响分析

从以上分析可知，植被对土壤微生物群落的影响主要表现在以下几个方面：

(1) 群落多样性。从图 1 中不同群落结构的比较就可以直接得到植被使微生物群落多样性更高，使生物种类更丰富的结论。多草小区的样品中 OTU 数显著高于无草小区的样品。图 2 中表面以下的几个样品中 OTU 数量显著减少，显然，表面以下土壤环境受植被的影响要小得多，在较深的层次可能不受植被的影响。如果某一土壤环境的植被可以维持很长的时间，则可以使该环境的微生物群落达到一个很高而又稳定的状态。

(2) 群落结构。从图 2 所显示的结果看，表层土壤因受植被的影响，群落多样性极高，而在这个多样性高的群落中没有具有明显优势的 OTU 种群，各种群都处在相对均一的水平。根据生态学的一般原理，这是种群间竞争作用较弱的结果。分析土壤环境可知，表层土壤环境由于受植被的影响，可供微生物利用的各种资源极为充足，加上由于植物根系存在而导致的空间异质性，可以满足各种微生物的生存需求^[8]。未受植被影响或者受影响很小的表面以下各层的微生物群落中存在明显的优势种群，即有较强的竞争作用存在，因为资源的有限性和环境的同质性使得其生态条件不能充分满足各种不同种群的需求。

(3) 生物活性。从受植被影响的微生物群落中获得的生命物质的活性更高，因为植物根系的生命代谢过程对土壤微生物群落的各种生长与代谢活动具有激活作用，对各种群产生重要影响。从分析结果看，表现为 DNA 活性增强，在克隆过程中能够获得更多的携带目标基因的克隆细胞。

参 考 文 献

- 1 Ronald M, Bartha A R. Microbial ecology, fundamental and application. 3rd ed. Redwood City, USA: The Benjamin /Cummings Publishing Company, IN C, 1993
- 2 Karl R, Griffiths B S. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26 963~ 971.
- 3 Tiedje M J, Nusslen K, Xia B C. The vast world of microbial diversity. In: Proceeding of the 5th Japan science and technology corporation (JST). Tokyo International Symposium-New Frontiers in Microbiology, 1997. 26~ 28
- 4 Moyer L C, Dobbs F C, Karl D M. Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 1 555~ 1 562
- 5 夏北成, Zhou J, Tiedje J M. 分子生物学方法在微生物生态学中的应用. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1998, 37 (2): 97~ 101
- 6 Zhou J, Brune M A, Tiedje, J M. DN A recovery from soil of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 316~ 322
- 7 Moyer L C, Dobbs F C, Karl D M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16 S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60 871~ 879
- 8 Xia B C, Zhou J, Tiedje J M. Molecular analysis of spatial heterogeneity of microbial community compositions and interactions in subsurface environment. *Forum on Environmental Remediation and Environmental Toxicology and Microbial Ecology*, 1996. 23~ 25

Effects of Overlying Vegetation on Soil Microbial Community Structures and Their Activity

Xia Beicheng^{*} *Zhou Jizhong* *Tiedje M James*

Abstract The overlying vegetation on soil can change surface soil environment, and affect some ecological factors for soil microbial living. The soil environment with plant activity is more suitable for soil microbial population. It's better for microorganisms to reproduce and grow in the surface soil environment with overlying plants. Diversity is higher in surface soil with overlying plants than that in the soil environment without overlying plants or in the original subsurface soil not affected by vegetation. There is no dominant OTU population in the soil microbial community in the surface soil environment, and there are obvious dominant OTU populations in the subsurface soil environment. Vegetation can affect the activity of DN A from soil microbial community.

Keywords soil microbe, community structure, microbial diversity, DN A activity

^{*} Institute of Environmental Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China