稻秸对土壤细菌群落分子多态性的影响*

卜元卿 黄为一
(南京农业大学生命科学学院微生物学系, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘 要 模拟稻秸原位还田条件, 分别在水稻土和红壤中添加水稻秸秆培养 70 d, 第 0、5、25、45、70 天采集土样。采用非机械破壁法直接提取水稻土和红壤细菌总 DNA, 水稻土细菌总 DNA 经过二次纯化; 红壤细菌总 DNA 经过一次纯化后, PCR 扩增其 16S rDNA V3 可变区, 均可获得清晰的目的条带, 对扩增产物进行 DGGE 分析, 结果显示: 水稻土和红壤样品的 DGGE 条带增加, 说明稻秸能够增加土壤细菌群落分子多态性的丰富度, 随着培养期的延长, 施有稻秸的处理中土壤细菌群落多态性的变化远远复杂于空白对照土壤中的细菌群落变化; 同时发现在稻秸刺激下不同土壤细菌群落多态性高峰期出现时间不同。

关键词 分子多态性; 变性梯度凝胶电泳; 稻秸; 土壤细菌
中图分类号 Q938 文献标识码 A

稻秆富含纤维素、半纤维素等物质, 因此稻秆还田能激发微生物活性, 促进微生物的繁殖, 增强呼吸作用以及氨化、硝化等作用, 从而引起微生物群落组成的变化[1]。通常, 对稻秆降解过程中微生物群落的研究是采用在选择培养基(例如纤维素、果胶和木质素等)平板上稀释涂布的传统方法[2, 3]。然而, 水稻秸秆是由多种不同成分组合而成的复杂结构, 主要包括半纤维素(26% ~ 35%), 纤维素(38% ~ 41%), 木质素(15%)和水溶性多糖物质(8%)[4]。这类物质的降解往往需要多种微生物的联合作用, Kimura 等的显微研究结果显示: 秸秆腐解过程中确实存在着复杂的微生物群系[5]。大量研究表明平板计数法不能检测那些尚未能培养细菌[6~8], 纤维素细菌分解纤维素产生的糖及其代谢产物可被这些伴生的非纤维素细菌利用, 从而解除代谢产物对纤维素分解细菌的反馈抑制, 因此中温好氧纤维素细菌总是和非纤维素分解细菌混生在一起[9], 传统方法难以对完整的纤维素分解菌群进行研究。

变性梯度凝胶电泳法(Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis, DGGE)是基于 16S rRNA 保守性的 DNA 指纹技术, 它能有效分析复杂微生物群落及其多样性且无须培养微生物, 而受到广泛重视。DGGE 基本原理是长度相同而碱基组成不同的 DNA 序列在不同变性条件(如尿素浓度)下变性, 在变性梯度凝胶上的特定位置形成泳带[10]。

本研究模拟自然农田生态条件, 利用 PCR/DGGE 技术研究稻秸对水稻土和红壤中细菌群落分子多态性的影响, 并结合相似性分析比较不同土壤中细菌群落动态变化规律, 旨在明确秸秆降解菌群的基本构成情况, 为秸秆原位降解菌剂的优化和应用提供分子生态学方面的科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源和试验设计

JM 菌剂: 秸秆原位降解菌剂, 本研究室研制; 水稻秸秆采自江苏省农业科学院试验田, 45 ℃恒温烘干粉碎。该稻秸全碳 487.2 g kg^{-1}, 全氮 8.57 g kg^{-1}, C/N 58.6, 全 K 18.24 g kg^{-1}; 水稻土采自上海市农业科学院南汇试验站; 红壤采自中国科学院红壤生态实验站, 均为表层 0~ 20 cm 土样, 风干后过2 mm筛备用。相关性质如表 1 所示。

称取 2 kg 供试水稻土, 分别装入盆钵中, 作为空白对照(A4); 另加入 20 g 稻秸(烘干重), 作为对照处理(A5); 处理 A6 是将 20g 稻秸和 10ml JM 菌剂与供试土壤混匀。供试红壤处理设计同上, 但为满

* 上海市科技兴农重点攻关项目(农科攻字(2000) 5- 6 号)资助
- 通讯作者, Tel: 025- 84395216
作者简介: 卜元卿(1977~), 女, 硕士研究生, 主要从事环境微生物方面研究。E-mail: yqbu@issas.ac.cn
收稿日期: 2004- 06- 08; 收到修改稿日期: 2004- 10- 19

足 JM 菌剂生长要求, 用石灰调节红壤 pH 至 7.5, 设空白对照为 C4, 有秸秆无菌剂处理为 C5, 有秸秆有菌剂处理为 C6。以上所有处理加入硫酸铵 2.0 g。保持供试土壤含水量 40% ~ 60%, 在 20~ 28℃条件下培养 70 d, 分别在第 0、5、25、45、70 天时取样分析。每处理设 3 个重复。

表 1　供试土壤的主要理化性质

Table 1　Main physicochemical properties of the soils studied

土壤类型 Soil types	pH (H_2O)	有机质 Organic matter ($g\ kg^{-1}$)	全氮 Total N ($g\ kg^{-1}$)	速效 P Available P ($mg\ kg^{-1}$)	速效 K Available K ($mg\ kg^{-1}$)
水稻土 Paddy soil	7.52	24.8	1.87	1.81	228.37
红壤 Red soil	5.18	5.5	0.61	9.06	74.11

1.2　土壤细菌总 DNA 的提取和纯化

从供试土壤中直接抽提细菌总 DNA, 提取方法参照文献[11], 抽提得到的土壤细菌总 DNA 经细菌基因组 DNA 抽提纯化试剂盒纯化(上海华舜生物工程有限公司)。0.7%(W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳缓冲液 1×TAE(0.8 mmol L^{-1} Tris- 乙醇, 0.04 mmol L^{-1} EDTA, pH 8.0), 100 V 电压下电泳 20 min, 紫外光下观察。回收大于 21 kb 的 DNA 条带, 用凝胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司) 对回收条带进行二次纯化。0.7%(W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳条件同上。

1.3　土壤细菌 16S rDNA V3 可变区的扩增

土壤细菌 16S rDNA V3 可变区的扩增方法参见文献[12]。PCR 引物为带有 GC 夹子的 357f-GC 和 517r, 其中 357f-GC 为 5′-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG ACG-3′; 517r 为 5′-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3′, 由上海生工公司合成。PCR 产物用 2%(W/V) 琼脂糖电泳检测, 电泳缓冲液 1×TAE(0.8 mmol L^{-1} Tris- 乙醇, 0.04 mmol L^{-1} EDTA, pH 8.0), 80 V 电压下电泳 20 min, 紫外观察。

1.4　土壤细菌 16S rDNA V3 区多态性 DGGE 分析

土壤细菌 16S rDNA V3 可变区的 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析, DGGE 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶(含丙酰胺/二丙酰胺(37.5∶1)、尿素、甲酰胺和甘油), 其中尿素浓度梯度为 30% ~ 70%。电泳采用 D code DGGE 系统(Bio-Rad), 电泳缓冲液为 0.5×TAE(0.4 mmol L^{-1} Tris- 乙醇, 0.02 mmol L^{-1} EDTA, pH 8.0), 200 V 电压预电泳 10 min, 然后在 70 V 固定电泳下电泳 16 h。电泳结束后, 进行硝酸银染色[13]。DGGE 凝胶采用分析家软件包(Molecular Analyst, Bio-Rad) 进行相似性分析。

2　结果与分析

2.1　土壤细菌总 DNA 的抽提和纯化

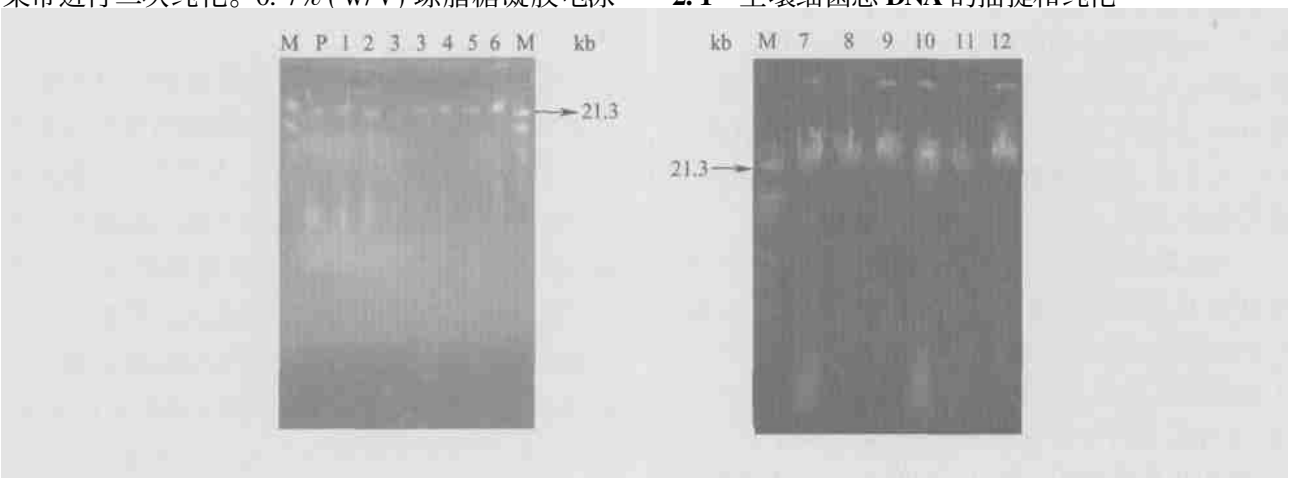

图 1　水稻土细菌总 DNA 的琼脂糖电泳(M: 分子量标准; P: 0 d 土壤细菌总 DNA; 1、4、7 和 10 分别代表 A4 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA; 2、5、8 和 11 分别代表 A5 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA; 3、6、9 和 12 分别代表 A6 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA)

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted at different times from paddy soils different in treatment (M stands for Lambda DNA/HindIII+ EcoRI maker; P for Bacterial DNA of paddy soil on D0; 1、4、7 and 10, respectively for total bacterial DNA in A4 on D5, D25, D45 and D70; 2, 5, 8 and 11 respectively for A5 on D5, D25, D45 and D70; 3, 6, 9 and 12 respectively for A6 on D5, D25, D45 and D70)

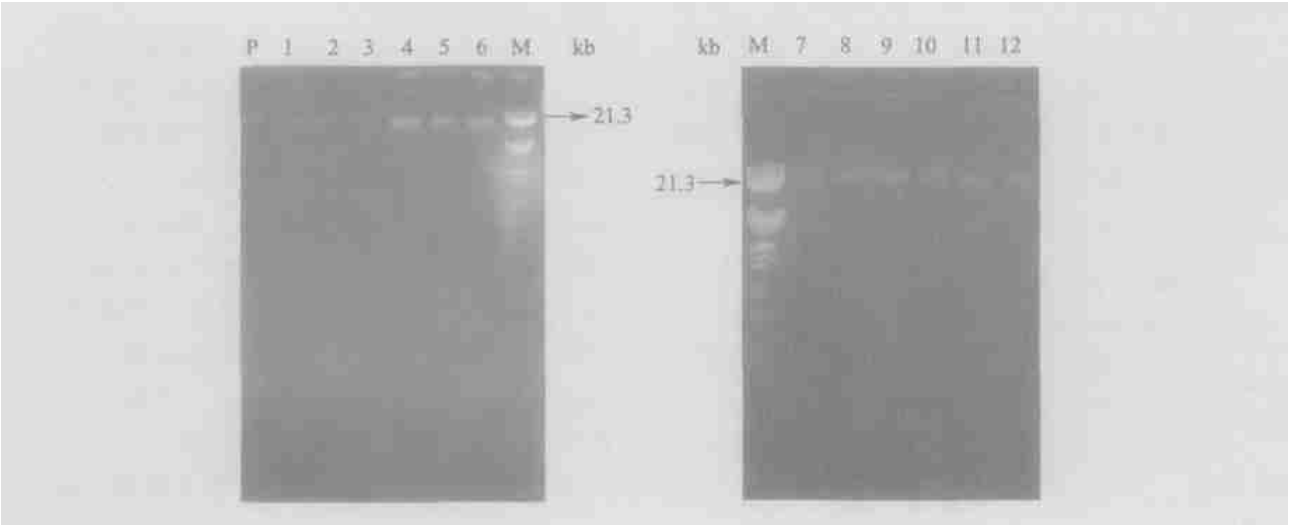

图 2 水稻土细菌总 DNA 二次纯化的琼脂糖电泳(M: 分子量标准; P: 0 d 土壤细菌总 DNA; 1、4、7 和 10 分别代表 A4 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA; 2、5、8 和 11 分别代表 A5 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA; 3、6、9 和 12 分别代表 A6 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA)

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of two purified total DNA extracted at different times from paddy soils different in treatment (M stands for Lambda DNA/HindIII+ EcoRI maker; P for Bacterial DNA of paddy soil on D0; 1, 4, 7 and 10 respectively for Bacterial DNA in A4 on D5, D25, D45 and D70; 2, 5, 8 and 11 respectively for A5 on D5, D25, D45 and D70; 3, 6, 9 and 12 respectively for A6 on D5, D25, D45 and D70)

采用非机械破壁法直接从水稻土和红壤中抽提土壤细菌总 DNA。水稻土细菌总 DNA 粗提样品呈棕褐色, 这是结合在 DNA 上的腐殖酸类物质产生的颜色。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对 DNA 粗提样品进行首次纯化后, 经过 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示水稻土细菌总 DNA 目的条带大于 21 kb, 如图 1, 说明已获得较完整的土壤细菌总 DNA。由于腐殖酸类物质会严重抑制 Taq DNA 多聚酶活性[14], 本研究通过琼脂糖电泳再次纯化水稻土 DNA 粗提样品后, 用凝胶回收试剂盒回收大于 21 kb 目的 DNA 条带, 二次纯化回收后得到的水稻土细菌总 DNA 呈无色, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 细菌总 DNA 条带清晰、整齐, 如图 2。

与水稻土细菌总 DNA 抽提结果不同, 红壤细菌总 DNA 粗提样品呈无色, 对样品进行初次纯化后, 经琼脂糖凝胶电泳, 不能观察到 DNA 条带, 同时加大土壤提取量到 15g(湿重) 仍不能观察到 DNA 条带, 这可能是因为红壤较为贫瘠, 微生物生物量较少, 或者是该提取方法不适于红壤细菌总 DNA 的提取所致。因此, 红壤细菌总 DNA 粗提样品不进行二次纯化而直接作为 PCR 反应模板。

2.2 土壤细菌 16S rDNA V3 区扩增

水稻土细菌总 DNA 经过 2 次纯化后进行 PCR 扩增, 获得大小为 250bp 左右的特异性片段, 为 16S rDNA V3 区片段, 如图 3(a)、图 3(b)。PCR 结果说明两次纯化能够较为完全地去除干扰 PCR 反应的杂质, 二次纯化后的水稻土细菌总 DNA 可以进行 PCR 反应。图 3(a) 是培养 0 d, 5 d 和 25 d 时的水稻土细菌 16S rDNA V3 区扩增情况; 图 3(b) 是培养 45 d 和 70 d 时的水稻土细菌 16S rDNA V3 区扩增情况。

图 4(a)、图 4(b) 是红壤细菌总 DNA 首次纯化后直接进行 PCR 扩增的结果, 获得的特异性片段大小为 250bp 左右, 为 16S rDNA V3 区片段。红壤细菌总 DNA 初次纯化产物浓度虽然不能达到溴化乙锭的检测浓度, 但是从 PCR 扩增情况来看, 此样品浓度是能够满足 PCR 扩增反应要求的。但是, 以 0 d 红壤细菌总 DNA 初次纯化产物为模板却不能扩增到目的条带, 可能是由于模板 DNA 含量太低所致。图 4(a) 是培养 5 d 和 25 d 时的红壤细菌 16S rDNA V3 区扩增情况, 目的片段为 250bp 左右, 虽然只经过一次纯化但 PCR 扩增的特异性很好; 图 4(b) 是培养 45 d 和 70 d 时的红壤细菌 16S rDNA V3 区扩增情况, 其中存在非特异性 PCR 扩增产物。

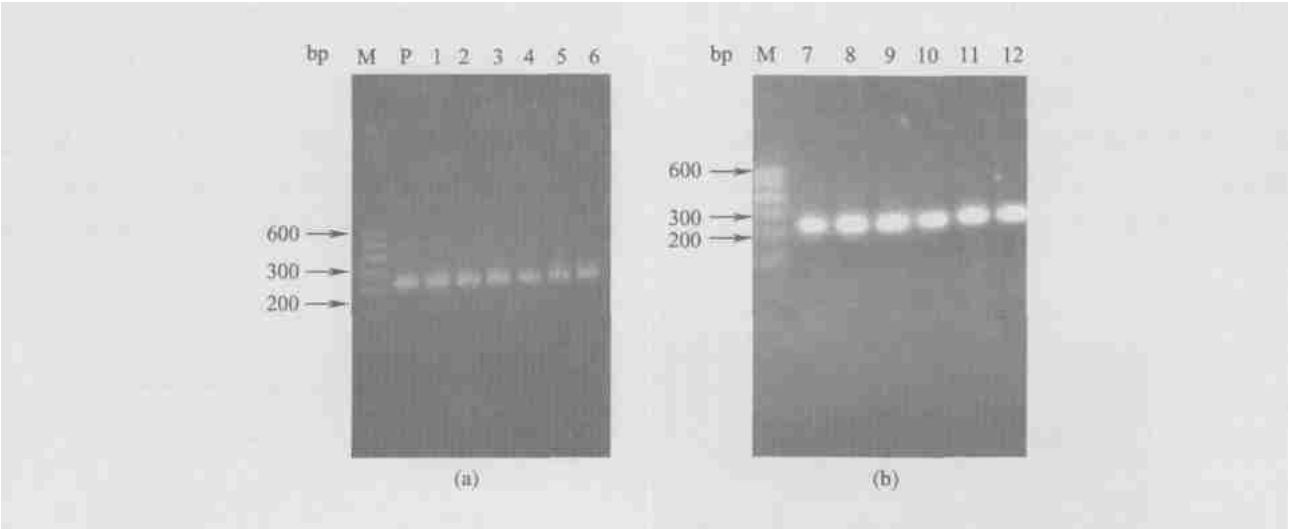

图 3　水稻土细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增(M: 分子量标准; P: 0 d 水稻土细菌总 DNA PCR 产物; 1、4、7 和 10 分别代表 A4 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA PCR 产物; 2、5、8 和 11 分别代表 A5 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA PCR 产物; 3、6、9 和 12 分别代表 A6 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA PCR 产物)

Fig. 3　PCR amplification of 16S rDNA V3 region from paddy soil(M stands for DL2000 maker; P for PCR production of paddy soil on D0; 1, 4, 7 and 10 respectively for PCR production of A4 on D5, D25, D45 and D70; 2, 5, 8 and 11 respectively for PCR production of A5 on D5, D25, D45 and D70; 3, 6, 9 and 12 respectively for PCR production of A6 on D5, D25, D45 and D70)

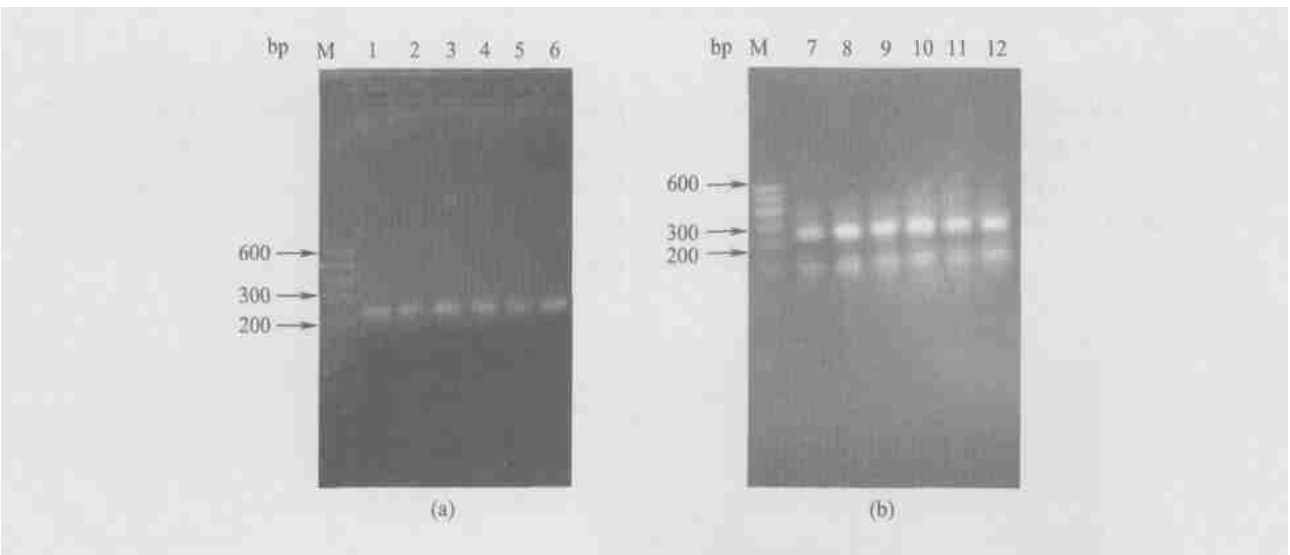

图 4　红壤细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增(M: 分子量标准; 1、4、7 和 10 分别代表 C4 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA PCR 产物; 2、5、8 和 11 分别代表 C5 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA PCR 产物; 3、6、9 和 12 分别代表 C6 在 5、25、45 和 70 d 取样时的细菌总 DNA PCR 产物)

Fig. 4　PCR amplification of 16S rDNA V3 region from red soil (M stands for DL2000 maker; 1, 4, 7 and 10 respectively for PCR production of C4 on D5, D25, D45 and D70; 2, 5, 8 and 11 respectively for PCR production of C5 on D5, D25, D45 and D70; 3, 6, 9 and 12 respectively for PCR production of C6 on D5, D25, D45 and D70)

2.3　变性梯度凝胶电泳分离扩增 V3 片段

图 5(a)、图 6(a) 是水稻土和红壤培养 0、5、25、45、70 天时的细菌 DGGE 图谱, 图 5(b)、图 6(b) 是土壤细菌区系变化相似性分析。图谱上的泳带反映了不同处理不同时间的优势菌群, 泳带数量和位置的复杂性说明了菌群的多态性。

图 5(a)、图 5(b) 是水稻秸秆对水稻土中细菌群落分子多态性影响的 DGGE 图谱和相似性分析。本研究以 JM 秸秆原位降解菌剂组成菌株的 16S rDNA V3 区 PCR 产物作为 DGGE 图谱标准条带, 显示为 A、B、C 和 D。通过分析发现不添加秸秆的空白对照 A4 中细菌群落构成简单而稳定, A、B、C 和 D 不是

A4 的优势菌株; 而添加秸秆的处理 A5 中, 在培养 5 d时土壤细菌群落就发生了较大变化, 细菌群落分子多态性明显增加, 优势菌群发生变化; A6 为添加稻秸和 JM 菌剂的处理, 第 5 d 时 JM 成为土壤细菌优势菌群, 并且在培养期前 45 d 内保持优势, 随着稻秸的半纤维素和纤维素类物质的不断降解, 培养 70d 时 A6 处理土壤细菌群落结构发生了极大转化, 预示着物质转化进入了一个新的阶段, 从而使优势种群也发生了相应变化。

图 6(a)、图 6(b) 是稻秸对红壤中细菌群落多态性影响的 DGGE 图谱和相似性分析。JM 菌剂对应条带为A、B、C和D。通过多态性和相似性分析发现

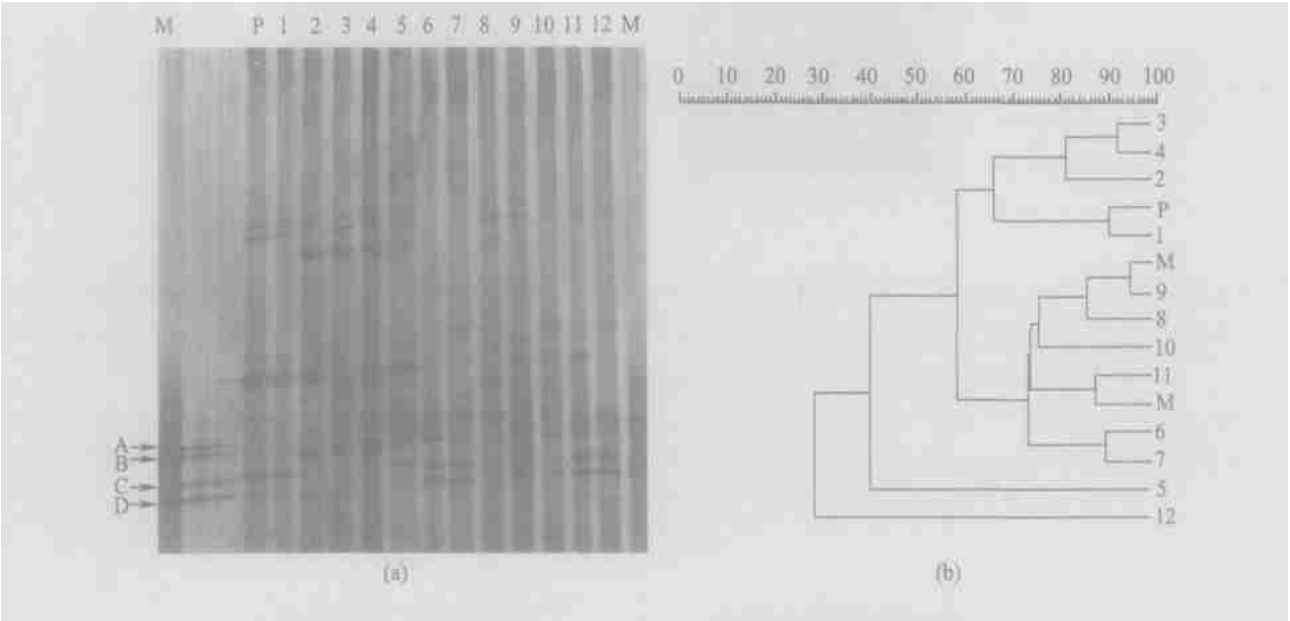

图 5 水稻土细菌 DGGE 图谱和相似性分析(M: JM 菌剂标准样品; P: 0 d 土壤样品; 1~ 4: 分别为 A4 在第 5、25、45 和 70 天样品; 5~ 8: 分别为 A5 在第 5、25、45 和 70 天样品; 9~ 12: 分别为 A6 在第 5、25、45 和 70 天样品)

Fig. 5 DGGE pattern and similarities of the 16S rDNA fragments of paddy soil at different times (M stands for V3 fragments of JM maker; P for paddy soil sample D0; 1 to 4 for A4 samples on D5, D25, D45 and D70; 5 to 8 for A5 samples on D5, D25, D45 and D70; 9 to 12 for A6 samples on D5, D25, D45 and D70)

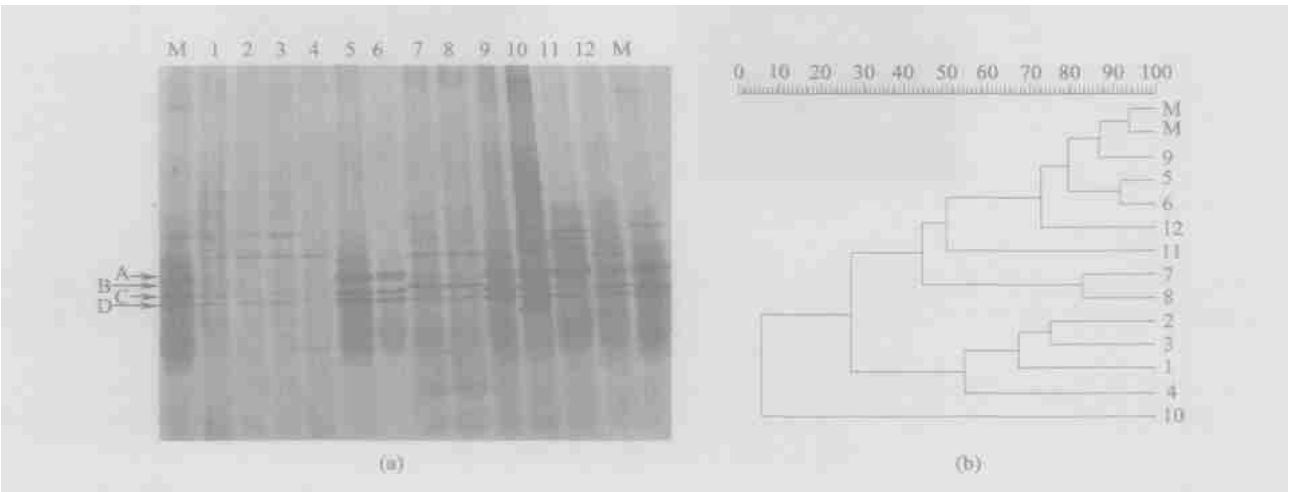

图 6 红壤细菌 DGGE 图谱和相似性分析图 (M: JM 菌剂标准样品; 1~ 4: 分别为 C4 在第 5、25、45 和 70 天样品; 5~ 8: 分别为 C5 在第 5、25、45 和 70 天样品; 9~ 12: 分别为 C6 在第 5、25、45 和 70天样品)

Fig. 6 DGGE pattern and similarities of the 16S rDNA fragments of red soil at different times (M stands for V3 fragments of JM maker; 1 to 4 for C4 samples on D5, D25, D45 and D70; 5 to 8 for C5 samples on D5, D25, D45 and D70 ; 9 to 12 for C6 samples on D5, D25, D45 and D70)

不添加稻秸的空白对照 C4 中细菌群落构成简单而稳定, 同不加稻秸的空白对照 A4 中细菌群落变化情况类似; 添加稻秸的处理 C5 中细菌群落优势菌群向标准菌株方向发展, 出现与标准菌株相对应的菌群; 添加秸秆和 JM 菌剂的处理 C6 中, 由于外源菌剂的加入, JM 成为培养前期土壤细菌优势菌群, 培养 25 d 时, 由于稻秸中易分解糖类物质的刺激, 红壤样品中 DGGE 图谱条带数明显增加, 预示细菌群落多态性显著增加, 随着培养期的延长, 易分解糖类被完全利用之后, 红壤细菌群落向对秸秆有分解功能的微生物方向发展, 并在培养期内趋于稳定。

3 讨　论

土壤微生物总 DNA 提取方法主要分为机械法和非机械法[11,15~17]。非机械法是利用化学试剂和酶裂解土壤微生物细胞, 裂解过程较为温和, 并可保证较高的核酸得率与核酸分子的完整性[11]。本文研究发现: 文献[11] 土壤细菌总 DNA 抽提法对水稻土细菌总 DNA 的提取效果较好, 5.0 g(湿重) 土样即可获得相当量的总 DNA, 而对红壤细菌总 DNA 的提取效果较差, 增加红壤提取量到 15.0 g(湿重), 提取到的 DNA 量仍然不能达到溴化乙锭的检测浓度, 推测其原因: 一方面是红壤有机质含量和 pH 低, 土壤通气性比水稻土差, 因此土壤微生物生物量较低; 另一方面可能是由于红壤质地较粘, 在提取过程中不易分散释放微生物细胞, 从而造成了红壤细菌总 DNA 提取量较低。滕应等认为土壤本身的复杂性、非均质性, 土壤中腐殖酸、黏土矿物以及其他离子等都会不同程度地影响土壤 DNA 的提取和纯化[18], 本研究土壤细菌总 DNA 提取结果也显示总 DNA 的抽提效果受到土壤性质的影响。

水稻土和红壤细菌总 DNA 粗提样品经过细菌基因组 DNA 提取试剂盒首次纯化后, 对其 16S rDNA V3 可变区进行 PCR 扩增, 结果显示, 水稻土细菌总 DNA 一次纯化样品不能扩增出目的条带; 而相同 PCR 条件下红壤细菌 DNA 一次纯化样品却能够扩增出清晰的目的条带, 但是 0 d 红壤细菌总 DNA 样品不能扩增出目的产物, 可能是由于 0 d 时红壤细菌生物量低, 从而导致土壤细菌总 DNA 提取量太低所致。

Christoph 等报道腐殖酸类物质对进一步的分子生物学操作例如 PCR 反应、连接试验等有严重抑制作用[14]。因此, 将初次纯化的水稻土细菌总 DNA 样品再经过琼脂糖电泳二次纯化, 用凝胶回收试剂盒回收目的条带后, 对回收产物进行 PCR 扩增, 发现二次纯化产物作为 PCR 反应模板可获得清晰目的条带, 说明经过两次纯化可以解除杂质对 PCR 反应的干扰。目前, 土壤细菌总 DNA 中腐殖酸类干扰物质的去除, 一般是采用双链 DNA 离子交换柱法, 但该法存在耗时长、成本高的缺点[14]。本研究采用的两步纯化法极为省时, 并且成本也低于离子交换柱法。由于腐殖酸类物质呈黄棕色, 当首次纯化后颜色接近无色的 DNA 样品往往可以直接进行下步操作, 所以纯化样品 DNA 的颜色可以作为污染程度的简单判断标准。但是, 由于本文只对水稻土和红壤两种土壤中细菌总 DNA 提取纯化进行了初步研究, 因此两步纯化法对土壤细菌总 DNA 的纯化能力需作进一步研究。

Hu 等人研究发现, 农作物连作及化肥和化学农药的过度使用, 都会引起土壤微生物结构与功能向单一化方向发展, 造成农田生态系统的不稳定[19]。本研究利用 DGGE 技术对水稻土和红壤细菌 16S rDNA V3 可变区 PCR 扩增产物进行了多态性和相似性分析, 结果显示, 培养期内, 不添加秸秆的空白对照土壤细菌群落构成简单, 群落变化基本保持不变; 从优势菌群的组成来看, 添加稻秸处理中的优势菌群与空白对照土壤中的优势菌群显著不同, 无论是水稻土还是红壤, 加入稻秸的处理细菌群落多态性显著增加, 形成以秸秆分解细菌为主的优势菌群, 而丰富的土壤微生物多样性可以降低土壤中传播性植物病害的发生[19], 稻秸还田对土壤微生物多样性的刺激增加, 将有助于减轻农田土壤的连作障碍。

JM 是本研究室研制的秸秆原位降解菌剂, 从 DGGE 试验结果来看, JM 菌能够迅速成为土壤中的优势菌群, 并在秸秆分解期内保持优势, 说明 JM 菌剂在供试土壤中有较强的定殖能力和秸秆分解能力, 试验结果同时显示水稻土和红壤中的秸秆降解菌群在种类和数量上存在差异。

致　谢　感谢南京农业大学消化道微生物研究室朱伟云老师、毛胜勇老师和苏勇同学在 DGGE 分析方面给予的大力帮助。

参 考 文 献

[1] Grant R F. Simulation of methanogenesis in the mathematical model ECOSYS. Soil Biology & Biochemistry, 1998, 30: 883~896

[2] Chin K J, Rainey F A, Janssen P H, *et al*. Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. Systematic and Applied Microbi-

ology, 1998, 21: 185~ 200

[3] Chin K J, Hahn D, Hengstmann U, *et al*. Characterization and identification of numerically abundant culturable bacteria from the anoxic bulk soil of rice paddy microcosms. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 5 042~ 5 049

[4] Stams A J M. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Micr., 1994, 66: 271~ 294

[5] Kimura M, Tun C C. Microscopic observation of the decomposition process of leaf sheath of rice straw and colonizing microorganisms during the cultivation period of paddy rice. Soil Science and Plant Nutrition, 1999, 45: 427~ 437

[6] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature, 1990, 345: 63~ 65

[7] Amann R I, Ludwig W, Schleifeer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 1995, 59: 143~ 169

[8] Wintzingerode F, Gobel U B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 21: 213~ 229

[9] 陈洪章, 李佐虎. 纤维素原料微生物与生物量全利用. 生物技术通报, 2002, 2: 25~ 29, 34. Chen H Z, Li Z H. Lignocellulosical microorganisms and biomass total utilization (In Chinese). Biotechnology Bulletin, 2002, 2: 25~ 29, 34

[10] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel eletrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding foe 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59: 695~ 700

[11] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 316~ 322

[12] Cahyani V R, Matsuya K, Asakawa S, *et al*. Bacterial communities in the composting process of rice straw. Soil Science and Plant Nutrition, 2003, 49: 619~ 630

[13] Sanguinetti C J, Dias N D, Simpson A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. BioTechniques, 1997, 17: 915~ 919

[14] Christoph C T, Wicfried V. 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, 53: 2 657~ 2 665

[15] Robe P, Nalin R, Capellano C, *et al*. Extraction of DNA from soil. European Journal of Soil Biology, 2003, 39: 183~ 190

[16] Van E J D, M¾ntynen V, Wolters A C. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacteriym chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. Biology and Fertility of Soils, 1997, 24: 188~ 195

[17] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, *et al*. DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 2 354~ 2 359

[18] 滕 应, 骆永明, 赵祥伟, 等. 重金属复合污染农田土壤DNA的快速提取及其PCR-DGGE分析. 土壤学报, 2004, 41(3): 343~ 347. Teng Y, Luo Y M, Zhao X W, *et al*. Rapid extraction and purification of DNA in farmland soils contaminated with mixed heavy metals for PCR-DGGE analysis (In Chinese). Acta Petologica Sinica, 2004, 41(3): 343~ 347

[19] Hu S, van Bruggen A H C. Microbial dynamics associates with multiphasic decomposition of 14C-labeled in soil. Microbial Ecology, 1997, 33: 134~ 143

EFFECT OF RICE STRAW ON MOLECULAR PHYLOGENETIC DIVERSIFY OF SOIL BACTERIAL COMMUNITIES

Bu Yuanqing　Huang Weiyi*

(Microbiology Department of College of Life Science of Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment of Agricultural Ministry, Nanjing 210095, China)

Abstract　Rice straw transformation takes place in soil but effects of rice straws on relations between soils and bacterial communities of the soils are still poorly understood. PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were used to monitor development of bacterial communities in paddy soil and red soil, into which rice straw or rice straw plus biological agent was applied during incubating period, respectively. The total bacterial DNA from the two studied soils was extracted directly on D0, D5, D25, D45 and D70. The DNA from paddy soil was purified twice, but the DNA from red soil was done only once. The regions V3 of the 16S rDNA of bacteria from the two soils were amplified. DGGE profiles of the PCR productions were compared by similarity analysis. The results show simple DGGE profiles for controls of the two soils without rice straw. Rice straw was incubated in paddy soil and red soil for 70 days. DGGE profiles revealed that the composition of the bacterial community in soil with rice straw was more complex than CK during the incubating period. Meanwhile, the results show that peaks of the bacterial communities appeared at different times in the paddy soil and red soil, treated with rice straw during incubation times.

Key words　Molecular polyphylogenetic diversify; Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; Rice straw; Soil bacteria