

分子生物学方法在污染土壤微生物多样性研究中的应用*

李 慧^{1,2} 陈冠雄^{1,3} 张 颖¹ 张成刚¹

(1 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016)

(2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

(3 沈阳大学, 沈阳 110044)

摘 要 综述了应用于污染土壤微生物多样性分析的各种分子生物学方法, 包括 DNA 中 mol% G+ C 丰度的分析、核酸杂交技术、DNA 复性动力学研究及基于 PCR 技术的 DNA 指纹图谱分析等方法。阐述了这些方法的主要应用及各自的优势和局限性。

关键词 污染土壤; 微生物多样性; PCR; DNA 复性动力学; 核酸杂交; mol% G+ C

中图分类号 Q938.1 文献标识码 A

土壤中存在的大量微生物对整个生态系统产生着重要的影响, 它们不仅是自然界有机物的分解者, 而且是食物链中的初级生产者, 在自然界的碳、氮、硫、磷等元素的循环中发挥着重要作用。然而, 随着近代工农业的发展, 大面积土壤受到严重污染, 在新的选择压力下可能导致土壤微生物群落多样性和结构的变化。以往对于土壤微生物多样性的研究是建立在传统的微生物培养和分离技术上的, 然而在自然界中可培养的微生物仅占很小的一部分(土壤中约为 0.3%)^[1], 为了摆脱对培养技术的依赖, 20 世纪 80 年代末至 90 年代初发展起来的一系列分子生物学技术被广泛应用于土壤微生物多样性的研究。本文综述了近年来应用于污染土壤微生物多样性分析的各种分子生物学技术, 这些方法大多基于对土壤中直接提取的 DNA 或 RNA 分子的分析, 包括 DNA 中 mol% G+ C 丰度的分析、核酸杂交技术、DNA 复性动力学研究及基于 PCR 技术的 DNA 指纹图谱分析等方法, 阐述了这些方法的主要应用及各自的优势和局限性。

1 总 DNA 中 mol% G+ C 丰度分析

不同种微生物含有不同的核酸比例, G+ C mol 百分含量在 24% ~ 76% 之间波动, 因此总 DNA 分子中 mol% G+ C 丰度的变化能够作为测定微生物群

落多样性变化的一个敏感指标^[2]。测定 mol% G+ C 丰度的主要方法有热变性法、密度梯度离心、不同 DNA 样本杂交、变性 DNA(单链 DNA)复性动力曲线分析等。Griffiths 等^[3]应用此技术测定了被各种重金属(Cd, Cu, Ni, Pb, Zn)污染的土壤中微生物群落结构的变化, 分析结果表明被 Cd 污染的土壤中微生物群落组成与其他重金属污染有明显不同。但是这项技术也存在着一定的局限性, 当 mol% G+ C 相同时, 不能判定是微生物群落组成相同还是组成不同而含有相同的 mol% G+ C; 当 mol% G+ C 不同时, 也不能断定是微生物群落组成不同还是群落组成相同而所含各个菌种的比例不同。例如 Sandaa 等^[4]在比较低浓度重金属污染、高浓度重金属污染和未受污染的土壤中细菌 DNA 的 mol% G+ C 含量时, 并未发现 mol% G+ C 的明显变化。因此, 单独使用此技术并不能准确说明微生物群落多样性的变化, 还需要结合核酸杂交等专一性更强的技术。

2 核酸杂交分析技术

核酸分子杂交技术是 20 世纪 70 年代发展起来的一种新的分子生物学技术。它是基于核酸分子碱基互补配对的原理, 用特异性探针与待测样品的 DNA 或 RNA 形成杂交分子的过程。由于它的高度特异性和灵敏性, 近年来被广泛应用于土壤微生物

* 沈阳环境工程重点实验室和中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX2-401)资助

作者简介: 李 慧(1977~), 女, 中国科学院沈阳应用生态研究所读博士研究生, 主要从事石油污染土壤微生物修复工作

收稿日期: 2003-03-07; 收到修改稿日期: 2003-12-15

多样性的研究。用于微生物多样性研究常用的探针主要有 rRNA 基因探针、抗性基因探针和编码代谢酶基因探针等。特别是近年来发展起来的荧光原位杂交技术^[5]是研究环境中不可培养微生物群落多样性最为常用和有效的手段。

2.1 基于 rRNA 基因序列设计的探针

具有种属特异性的 16S rRNA 或 23S rRNA 探针是微生物多样性分析中最为常用的探针。目前通过比较 16S rRNA 序列与数据库中的序列,已经设计出

许多探针用于鉴定不同的微生物,如表 1 所示^[4]。

Sandaa 等^[4]用原位杂交的方法分析了受重金属污染的土壤中微生物群落结构变化,用探针 ARCH915、BET42a、GAM42a、SRB385、CF319a、LGCb 和 HGC69a 检测的细胞数量减少,而用探针 ALF1b 检测的细胞数量显著增加,表明变形菌(*Proteobacteria*) α 亚群在重金属污染的土壤中具有选择性优势。

表 1 rRNA 探针序列与所对应的目标微生物¹⁾

Table 1 rRNA probes and target microorganism

探针 Probes	序列(5P-3P) Sequence (5P-3P)	目标微生物 Target microorganism
EU B338	GCTGCCTCCCGTAGGACT	细菌, 16S rRNA
ARCH915	GTGCTCCCGCCAATTCCT	古细菌, 16S rRNA
ALF1b	CGTTCGYCTGAGCCAG	变形菌 α -亚群, 16S rRNA
BET42a	GCCTCCCACTCGTTT	变形菌 β -亚群, 23S rRNA
GAM42a	GCCTCCCACTCGTTT	变形菌 γ -亚群, 23S rRNA
SRB385	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	变形菌 δ -亚群, 16S rRNA
CF319a	TGCTCCGTGTCTAGTAC	淡黄色嗜纤维菌系, 16S rRNA
HGC69a	TATAGTTACCACGCCGCT	高 DNA G+ C 含量的革兰氏阳性菌, 23S rRNA
LGC b	CGGAAGATTCCTACTGC	低 DNA G+ C 含量的革兰氏阳性菌, 16S rRNA

1) 参见文献[4] See reference[4]

2.2 抗性基因探针

应用抗性探针对污染土壤样品进行杂交也是检测污染土壤微生物种群的有效方法之一,这些抗性探针目前研究和应用较多的是各种重金属抗性探针。Hart 等^[6]以菌株 RC607 中的抗 Hg 基因 *merA* 作为探针检测英国西北部受 Hg 污染的土壤样品,杂交结果表明,从土壤中分离出的 98% 的杆菌染色体 DNA 上存在与 *merA* 同源的序列。Yang 等^[7]以 Cu 抗性操纵子(*cop*)对 Cu 污染土壤样品中的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)进行杂交,研究其在污染土壤中竞争存活的机理。Lee 等^[8]用抗性基因杂交的方法研究了恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)中 Cd 抗性基因片段。此外,还有其他许多编码抗性基因的探针用于污染土壤微生物种群的检测,如 *chr*(Cr^{R})、*ctr/ncc*(Co^{R})等。

2.3 编码活性酶基因的探针

除了上述两种常用的探针以外,也可以使用编

码活性酶基因的探针对特定土壤样品进行杂交。Guo 等^[9]应用一系列编码代谢燃油的活性酶基因片段,与被燃油污染的土壤样品进行杂交,发现很强的杂交信号。还有一些活性酶基因探针用于研究人造化合物四氯乙烯(PCE)和三氯乙烯(TCE)污染土壤中降解菌的组成和丰度^[10]。

2.4 荧光原位杂交

在核酸杂交技术中引入荧光标记的寡核苷酸探针具有里程碑式的重要意义,使得这种技术既可用于鉴定细胞形态和微生物种群组成,也可用于鉴定细胞活性和计数。FISH(Fluorescent in situ hybridization)方法首先从土壤中提取微生物细胞并将其固定,然后在缓冲液中进行杂交、染色,在荧光显微镜下观察杂交结果。Yang 等^[11]用 FISH 方法检测了四氯乙烯(PCE)污染地区降解菌 *Dehalococcoides* 的丰度。但是也有实验表明 FISH 方法对于土壤样品的灵敏度较低^[12]。

以上所述及的各种核酸杂交技术虽然被广泛应用于污染土壤微生物多样性的研究,但仍有许多因素限制其应用和发展。比如报告基因(包括 16S rRNA 基因和各类功能基因)数据库中信息量还比较少,限制了探针的设计,并且随着 DNA 复杂程度的提高杂交信号明显减弱^[13],因此核酸杂交技术仅适用于分析土壤中特定的微生物种群或者用限制酶消化了的 DNA 片段。

3 DNA 复性动力学分析

样品中 DNA 的序列复杂性也反映了微生物的多样性,可用于土壤中总的微生物多样性的研究。DNA 的序列复杂性可以用一定条件下单链 DNA 的复性率来表示, DNA 复性率与样品中同源 DNA 浓度的平方成正比。微生物多样性越复杂, DNA 的同源性越差,复性率也越低^[14]。Sandaa 等^[4]用这种方法研究了受不同程度重金属污染的土壤中微生物多样性的变化。DNA 复性动力学分析表明未受污染的对照土壤含有 16 000 个细菌基因组,受低浓度重金属污染的土壤含有 6 400 个细菌基因组,而受高浓度重金属污染的土壤含有 2 000 个细菌基因组,分别比对照下降了 60% 和 90%。Atlas 等^[15]用复性的方法也发现被除草剂三氯苯氧乙酸(2, 4, 5-T)污染的土壤中细菌基因多样性的减少。

虽然复性动力学分析提供了土壤样品中微生物群落总体遗传多样性的数据,但单独使用此技术并不能揭示多样性的结构,需结合 mol% G + C 丰度分析和 16S rRNA 序列分析等技术才能得到微生物群落组成的具体信息。要想进一步对比不同微生物群落的结构并对某些特定种群进行精确测定,还需要依赖于群落总 DNA 的指纹图谱技术。

4 基于 PCR 技术的群落总 DNA 指纹图谱分析

最早应用于微生物多样性分析的技术是通过某些低分子量 rRNA (5S rRNA, tRNA) 电泳图谱的分析^[16],但是由于低分子量 rRNA 基因相对较小(约 120 个核苷酸),携带信息较少,因而揭示微生物群落多样性的能力有限。16S rDNA 在原核微生物中普遍存在,并且含有相对保守区域和可变区域,大小也适合电泳技术分析,目前主要应用 16S rDNA 序列分析来研究原核微生物群落多样性,通过与已建立

的微生物 16S rDNA 序列数据库比较,可以确定微生物系统发育关系。此外,核糖体间隔区序列和染色体上的回文序列等近年来也被广泛应用于微生物群落多样性研究。群落总 DNA 指纹图谱分析的通用技术路线为: 1) 从土壤样品中提取微生物总 DNA; 2) 聚合酶链反应(Polymerase chain reaction/PCR)扩增特定基因序列; 3) 对特定基因序列扩增产物进行分析。根据 PCR 扩增片段的不同及扩增产物分离、分析方法的差异可分为以下几种实用技术。

4.1 变性梯度凝胶电泳和温度梯度凝胶电泳

自 1993 年 Muyzer 等^[17]将 DGGE(Denaturing gradient gel electrophoresis)的方法应用于微生物生态学以来, DGGE 迅速成为一项简便而有效的 DNA 扩增片段检测技术。DGGE 和 TGGE(Temperature gradient gel electrophoresis)的原理是根据含有不同序列的 DNA 片段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^[18]。这种方法的灵敏度非常高,能将仅有 1 个碱基差异的 DNA 片段分开。Lasse 等^[19]用 DGGE 的方法研究了模拟 Hg 污染土壤中微生物遗传多样性的改变,结果表明,当刚加入 Hg 时微生物多样性迅速减少,并且抗 Hg 菌株数量有明显增加。Step en 等^[20]检测了飞机燃油污染土壤中的微生物群落结构, DGGE 图谱显示污染土壤中仅含有很少的微生物物种,并且这些物种很难归类。Brim 等^[21]用 TGGE 的方法研究了 Zn 污染土壤中微生物群落组成的变化,随着 Zn 污染程度的减轻,原来在群落组成中占主要位置的金属抗性菌 *Raistonia eutropha* 逐渐减少,而节杆菌属(*Arthrobacter*) 在群落中逐渐占据主要位置。C eung 等^[22]应用 TGGE 的方法检测了原油污染土壤中分枝杆菌(*Mycobacterium*) 的多样性变化, DGGE 图谱表明污染严重地区的多样性明显减少。DGGE/TGGE 技术在土壤微生物多样性分析上已有很多应用实例。

4.2 扩增核糖体 DNA 限制性分析

这是对 16S rRNA 基因扩增产物进行分析的另一种简便有效的方法,将 16S rRNA 扩增产物用限制酶切割,然后再进行电泳。Smit 等^[23]用 ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis)的方法研究了 Cu 污染对土壤微生物群落多样性的影响, ARDRA 图谱显示在 Cu 污染土壤中微生物多样性明显减少并且群落结构发生很大变化,但是 Cu 污染对氨氧化菌的多样性没有影响。Tiedje 等^[2]用该法检测了除草剂二氯苯氧乙酸(2, 4-D)对土壤中微生物

物群落结构的影响。Brim 等^[24]用 ARDRA 比较了从土壤中分离出的抗 Zn 菌株的遗传特征, 结果表明, 尽管这些菌株来源不同, 但都与 *Raistonia* 属细菌有很近的亲缘关系。ARDRA 所获得的谱带更为简单, 易于分析, 但是所能获得的信息量也相对较少, 并且难以用来评估物种的丰度和均度。

4.3 末端限制片段长度多态性

T-RFLP(Terminal restriction fragment length polymorphism)方法是 ARDRA 方法的进一步发展, 所不同的是在 PCR 扩增 16S rRNA 基因过程中, 其中一个引物用荧光标记, 在计算机程序自动分析时仅分析荧光标记的末端限制片段, 这样使得限制片段长度多态性图谱更为简化并且每个可见的条带都代表一个“核型”或一个分类单元^[25, 26]。这种方法能够得到一个群落的特征指纹图谱, 可用于比较不同群落的相似性和由于污染压力造成的群落结构在时间和空间上的改变。Clement 等^[27]成功地用 T-RFLP 方法比较了未受污染沙地、石油污染沙地和鹿粪中的微生物群落多样性。Tokunaga 等^[28]用此法研究了 Cr 污染土壤中微生物群落组成和活性的变化。Lord 等^[29]用 T-RFLP 方法研究了原油污染土壤中真菌多样性的变化。

4.4 核糖体基因间隔序列分析

该方法是用 PCR 扩增核糖体上 16S rRNA 和 23S rRNA 之间的基因序列, 然后对扩增产物进行长度多态性分析。16S~23S rRNA 间区由于没有特定功能并且进化速率比 16S rRNA 大, 近几年来在细菌鉴定和分类方面倍受关注。Ranjard 等^[30]用这种方法研

究了 Hg 污染土壤中微生物群落结构的变化, RSA (Ribosomal intergenic spacer analysis) 图谱显示污染土壤样品中 Hg 敏感种群的减少和适应种群的增加。

4.5 重复基因外回文序列 PCR

REP-PCR (Repetitive extragenic palindromie-PCR) 通过使用特定的引物(REP, BOX, ERIC) 与染色体上的 DNA 重复序列随机结合, 得到的电泳图谱能够显示种内各个菌株之间 DNA 指纹图谱的微小差异, 因此适合做特定种内不同菌株的差异分析^[2]。Roane 和 Pepper^[31]用 ERIC-PCR 的方法分析了从 Cd 污染土壤中分离出的若干菌株的遗传特征, 通过 16S rRNA 测序, 分别鉴定为节杆菌 (*Arthrobacter*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 和假单胞菌 (*Pseudomonas*)。D ruva 等^[32]应用 REP-PCR 的方法对总石油烃(TPH) 污染土壤中降解菌香茅醇假单胞菌(*P. citronellolis*) 进行了种内的细致分类, 29 株香茅醇假单胞菌被分为 12 个不同的基因组型。

4.6 随机引物扩增多态性 DNA

RAPD(Randomly amplified polymorphic DNA)以随机寡核苷酸做引物, 得到的多态性片段较短, 更方便检测两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^[33]。姚健^[34]和王勳骋等^[35]应用 RAPD 分子遗传标记技术研究了农用化学品污染对土壤中微生物群落 DNA 多样性的影响。

以上所述及的基于 PCR 技术的总 DNA 指纹图谱分析方法可以用图 1 来归纳, 通过这些分析能够得到关于土壤中微生物群落多样性、群落组成、丰度和均度等信息。

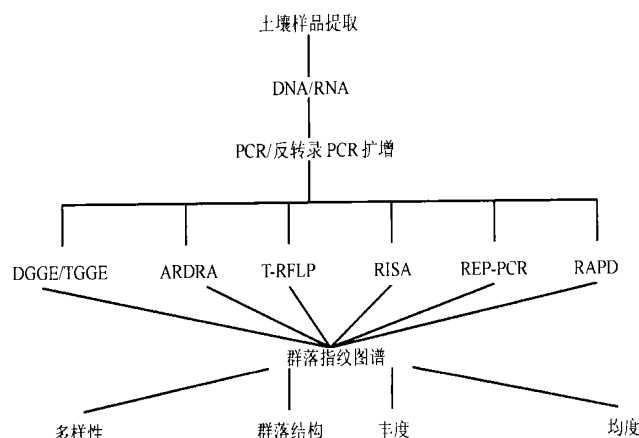


图 1 污染土壤中微生物群落指纹图谱检测方法

Fig. 1 Approaches available to determination of microbial community fingerprinting in polluted soils

5 结 语

本文所述及的各种分子生物学方法为分析污染土壤微生物多样性提供了更为广泛和有力的工具, 但是也应该看到每种技术都有其特定的优点和局限性, 在实验室中使用这些技术时应根据样品的不同特性选择和摸索最为合适的方法。并且, 一种方法的单独使用往往难以给出准确的定论, 需要各种方法的联合使用, 并与传统的培养技术结合。例如 Sandaa 等^[36]用 DGGE 和 FISH 结合的方法研究了重金属污染对土壤中古细菌群落多样性的影响; Schwartz 等^[37]应用传统 CFU 方法与 QG-PCR (Quantitative competitive PCR) 相结合的技术跟踪菲降解菌在污染土壤中的生长状况。我国应用分子生物学技术分析污染土壤中微生物群落结构的工作刚刚起步, 目前仅见少数报道^[34, 35], 正处于不断探索和积累经验之中。这些技术在实际应用中的结合和优化, 必将为发展新的分子生态学应用技术提供更为广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Torsvik V, Goksoyr J, Daae F L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56: 782~ 787
- [2] Tiedje J M, Asuming-Brempong S, Nusslein K, *et al.* Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.*, 1999, 13: 109~ 122
- [3] Griffiths B S, Diaz-Ravina M, Ritz K, *et al.* Community DNA hybridisation and %G+C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1997, 24: 103~ 112
- [4] Sandaa R A, Torsvik V, Enger O, *et al.* Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1999, 30: 237~ 251
- [5] 梁威, 邱东茹, 熊丽, 等. 荧光原位杂交技术 (FISH) 及其在环境微生物学中的应用. *生命科学*, 2002, 14: 186~ 187. Liang W, Qiu D R, Xiong L, *et al.* The process of FISH and its applications in the environmental microbiology (In Chinese). *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2002, 14: 186~ 187
- [6] Hart M C, Elliott G N, Osborn A M, *et al.* Diversity amongst *Bacillus merA* genes amplified from mercury resistant isolates and directly from mercury polluted soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1998, 27: 73~ 84
- [7] Yang C H, Menge J A, Cooksey D A. Role of copper resistance in competitive survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 580~ 584
- [8] Lee S W, Glickmann E, Cooksey D A. Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a *merR* family response regulator. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 1 437~ 1 444
- [9] Guo C, Sun W, Hars J B, *et al.* Hybridization analysis of microbial DNA from fuel oil-contaminated and non-contaminated soil. *Microb. Ecol.*, 1997, 34: 178~ 187
- [10] Stapleton R D, Ripp S, Jimenez L, *et al.* Nucleic acid analytical approaches in bioremediation: Site assessment and characterization. *J. Microbiol. Methods*, 1998, 32: 165~ 178
- [11] Yang Y, Zeyer J. Specific detection of dehalococoides species by fluorescence in situ hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69: 2 879~ 2 883
- [12] Han D, Amann R I, Ludwig W, *et al.* Detection of microorganisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.*, 1992, 138: 879~ 887
- [13] Ritz K, Griffiths B S. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. *Soil. Biol. Biochem.*, 1994, 26: 963~ 971
- [14] Torsvik V, Sorheim R, Goksoyr J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 1996, 17: 170~ 178
- [15] Atlas R M, Horowitz M, Krichevsky M, *et al.* Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb. Ecol.*, 1991, 22: 249~ 256
- [16] Stahl D A. Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. In: Hurst C J, Knudsen G R, McInerney M J, *et al.* eds. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington D. C: ASM Press, 1997. 102~ 114
- [17] Muyzer G, De Wall E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 695~ 700
- [18] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, 2: 317~ 322
- [19] Lasse D R, Sørensen J S. Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2001, 36: 1~ 9
- [20] Stepan J R, Chang Y J, Macnaughton S J, *et al.* Fate of a metal-resistant inoculum in contaminated and pristine soils assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, 18: 1 118~ 1 123
- [21] Brim H, Heuer H, Krogerreckendorf E, *et al.* Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can. J. Microbiol.*, 1999, 45: 326~ 338
- [22] Chung P Y, Kinkle B K. Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 2 222~ 2 229
- [23] Smit E, Leeftang P, Wernaus K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1997, 23: 249~ 261
- [24] Brim H, Heyndrickx M, de Vos P, *et al.* Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterization of metal-resistant

- soil bacteria and related facultative hydrogenotrophic System. Appl. Microbiol., 1999, 22: 258~ 268
- [25] Liu W T, Mars T L, Cheng H, *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63: 4 516~ 4 522
- [26] Mars T L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. Curr. Opin. Microbiol., 1999, 2: 323~ 327
- [27] Clement B G, Keil L E, DeBord K L, *et al.* Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. J. Microbiol. Methods, 1998, 31: 135~ 142
- [28] Tokunaga T K, Wan J, Hazen T C, *et al.* Distribution of chromium contamination and microbial activity in soil aggregates. J. Environ. Qual., 2003, 32: 541~ 549
- [29] Lord N S, Kaplan C W, Shank P, *et al.* Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: Comparison of 18S and ITS ribosomal regions. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 42: 327~ 337
- [30] Ranjard L, Nazaret S, Goubiere F, *et al.* A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. FEMS Microbiol. Ecol., 2000, 31: 107~ 115
- [31] Roane T M, Pepper I L. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. Microb. Ecol., 2000, 38: 358~ 364
- [32] Druva B, Priyanga M S, Sanjeet M, *et al.* Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citreorubra* strains isolated from oily sludge contaminated sites. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69: 1 435~ 1 441
- [33] Agate C, Charles M, Xavier N. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 1 180~ 1 187
- [34] 姚健, 杨永华, 沈晓蓉, 等. 农用化学品污染对土壤微生物群落DNA序列多样性影响研究. 生态学报, 2000, 20: 1 021~ 1 027. Yao J, Yang Y H, Shen X R, *et al.* A preliminary study on DNA sequence diversity of soil microbial community affected by agricultural chemicals (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2000, 20: 1 021~ 1 027
- [35] 王勤聘, 杨永华, 姚健. 利用 RAPD 分子标记研究农用化学品污染土壤微生物群落的分子多样性. 南京大学学报(自然科学), 2000, 36: 518~ 522. Wang M C, Yang Y H, Yao J. Changes on molecular diversity at RAPD marker for microbial community in soils polluted by agricultural chemicals (In Chinese). Journal of Nanjing University (Natural Sciences), 2000, 36: 518~ 522
- [36] Sandaa R A, Torsvik V, Enger O, *et al.* Analysis of bacterial communities in heavy metal contaminated soils at different levels of resolution. FEMS Microbiol. Ecol., 1999, 30: 237~ 251
- [37] Schwartz E, Srinivasan V T, Kate M S. Measuring growth of a penicillin-degrading bacterial inoculum in soil with a quantitative competitive polymerase chain reaction method. FEMS Microbiol. Ecol., 2000, 34: 1~ 7

APPLICATION OF MOLECULAR BIOTECHNIQUES IN THE STUDY ON MICROBIAL DIVERSITY IN POLLUTED SOILS

Li Hui^{1,2} Chen Guanxiong^{1,3} Zhang Ying¹ Zhang Chenggang¹

(1 Key Laboratory on Terrestrial Ecological Processes, Shenyang Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

(2 Post-graduate College, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

(3 Shenyang University, Shenyang 110044, China)

Abstract Several molecular biotechniques which have been used for study on microbial diversity in polluted soils were reviewed. These approaches include analysis of mol% (G+C) abundance of DNA, nucleic acid hybridization, DNA reassociation kinetics and DNA fingerprints pattern based on PCR technique and so on. Both of the advantages and limitations of these approaches were also discussed.

Key words Polluted soil; Microbial diversity; 16S rRNA gene sequence; Nucleic acid hybridization; DNA reassociation kinetics; mol% G+C