

# 绰墩山遗址古水稻土的一些微生物学特性研究\*

申卫收<sup>1, 2, 3</sup> 尹睿<sup>1, 2</sup> 林先贵<sup>1, 2</sup> 褚海燕<sup>1, 2</sup> 胡正义<sup>1</sup> 曹志洪<sup>1, 2†</sup>

(1 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

(2 中国科学院南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室, 南京 210008)

(3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘 要** 在江苏绰墩山遗址考古发掘中, 发现了在剖面不同深度埋藏的距今约 6 500 a 的史前古水稻土(100 ~ 200 cm)和距今约 3 320 a 的商周时期的古水稻土(42 ~ 100 cm)。本研究为了解古水稻土的生物学性状及其与现代水稻土的差别, 以土壤剖面 P-01 (包含史前古水稻土和商周时期古水稻土)与 P-03 (仅含商周时期古水稻土)为对象, 利用土壤厌氧培养、Biolog 分析和古生菌界 16S rDNA 的 V3 区的 PCR-DGGE 分析, 初步研究了不同土层厌氧微生物多样性、产甲烷潜势以及产甲烷古菌群落多样性的变化。结果表明, 史前古水稻土仍有较多厌氧微生物存活, 可达  $7.0 \times 10^5$  cfu g<sup>-1</sup> 干土, 并且其单一碳源利用能力和多样性也显著高于其湖相沉积母质和相同时期的非水稻土(黄土母质)。与现代水稻土相比, 古水稻土仅存留了很微弱的产甲烷潜势。但史前古水稻土比同期非水稻土和商周时期古水稻土的产甲烷潜势较高。PCR-DGGE 结果显示, 水稻土层都有其区别于非水稻土层的产甲烷古菌群落结构, 而现代水稻土、商周时期古水稻土和史前古水稻土也各有不同的优势产甲烷古菌群, 不同时期的水稻耕作方式是造成这种差异的可能的重要原因之一。

**关键词** 古水稻土; 产甲烷古菌; 嵌套式 PCR; DGGE

**中图分类号** S154.36 **文献标识码** A

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是当今世界上最重要的谷类作物之一, 目前在世界许多地方广泛种植。水稻栽培已经有非常悠久的历史, 但关于古代水稻栽培技术及其与水稻土形成、发育和可持续利用的关系尚无研究。近年来在浙江、江苏、湖南等地相继发现了多处 7 000 ~ 8 000 a BP 史前古代稻作遗址<sup>[1, 2]</sup>, 因此水稻栽培在我国至少可追溯到 7 000 a BP。2003 年底, 中国科学院南京土壤研究所与江苏考古部门合作, 对江苏昆山的绰墩山遗址进行考古发掘, 在其马家浜文化层(地下 100 cm 左右)土层再次发现了十几块大小不等的田块, 通过对从中出土的陶片、淘洗得到的炭化稻粒、土壤中植硅体含量、土壤有机碳<sup>14</sup>C 定年以及稻田灌溉系统, 如水沟、出水口、蓄水池塘和水井、在田间和水沟中出土的灌溉用的陶罐和陶盆等的研究和考证, 确定是距今约 6 500 a 的古灌溉稻田<sup>(1)</sup>, 是迄今发现的最早的灌溉稻田。

从土壤学的角度看, 在长期的水稻栽培过程中, 由于受人类耕作活动影响和氧化还原交替等物理化学的作用, 种植水稻的土壤会在土壤物理结构、化学成分以及土壤生物等方面形成独特的与非水稻种植土壤有明显差异的特征。因此, 对古水稻土进行土壤学研究, 一方面可以了解古代水稻栽培措施对土壤性质的影响, 另一方面也可以为水稻栽培起源提供土壤学佐证。本文报告了江苏绰墩山遗址古水稻土微生物学研究的一些初步结果和进展。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品采集与处理

采样地点在江苏绰墩山遗址(北纬 31°24'07", 东经 120°50'41"), 采样时间为 2003 年 12 月。在考古发掘现场挖出 2 个邻近(相距 15 m)的土壤剖面, 分别命名为 P-01 和 P-03, 见图 1。根据土壤质

\* 国家自然科学基金重点项目“水稻土可持续利用机理研究”(40171056)资助

† 通讯作者, E-mail: zhcao@mail.issas.ac.cn

作者简介: 申卫收(1979 ~), 男, 陕西杨凌人, 博士研究生, 主要从事环境与土壤微生物学研究

(1) 已提交《中国科学》与 *Naturwissenschaften*

收稿日期: 2005 - 06 - 17; 收到修改稿日期: 2005 - 10 - 19

地和颜色判断, 2 个剖面从表层到母质层都可分为 12 个土层。其中剖面 P-01 含有 3 个时期的水稻土: 0~15 cm 为现代水稻土表层, 42~57 cm 为 3 320 a 前的商周时期的古水稻土表层, 100~116 cm 为 6 500 a 前的新石器时代古水稻土表层; 剖面 P-03 仅含有 2 个时期的水稻土: 0~13 cm

为现代水稻土表层, 50~60 cm 为 3 320 a 前的商周时期古水稻土表层。采集时使用无菌竹刀, 将暴露于空气的表面土壤铲掉后, 迅速采集土壤并保存于无菌聚乙烯袋, 一部分于 4 ℃ 下保存, 另一部分在 -20 ℃ 下保存至分析。部分土层有机碳含量与 pH 值见表 1。

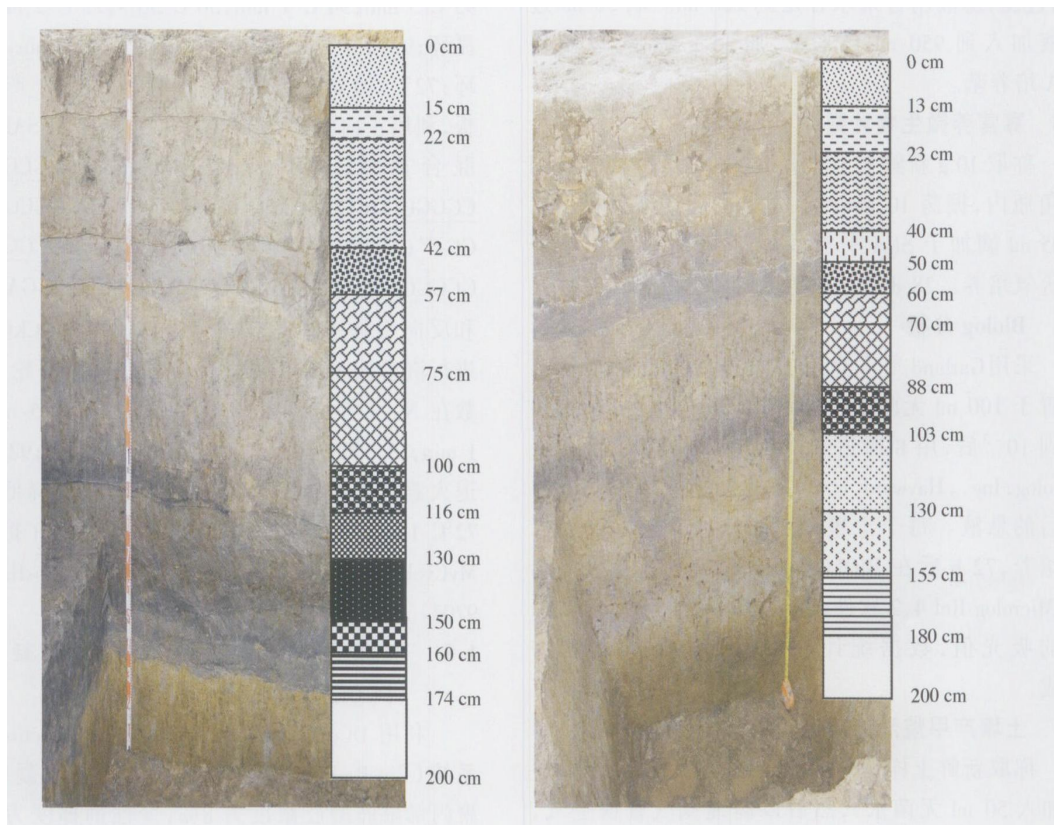


图 1 绰墩山遗址古水稻土 P-01 与 P-03 剖面图

Fig. 1 Profiles P-01 and P-03 of ancient paddy soils at Chuodun Relics

表 1 古水稻土剖面 P-01 和 P-03 部分土层有机碳含量与 pH 值

Table 1 Organic C contents and pH values in some soil layers of Profiles P-01 and P-03

	P-01						P-03					
	0 ~15 cm	42 ~57 cm	57 ~75 cm	75 ~100 cm	100 ~116 cm	150 ~160 cm	0 ~13 cm	50 ~60 cm	60 ~70 cm	70 ~88 cm	88 ~103 cm	130 ~155 cm
有机碳 Organic C(g kg <sup>-1</sup> )	20.5	9.8	7.7	13.4	22.3	17.2	23.5	10.1	5.5	6.8	14.0	3.3
pH(H <sub>2</sub> O)	5.8	6.1	5.9	6.1	6.2	6.3	5.6	6.9	6.9	6.8	6.7	6.7

## 1.2 土壤提取液-琼脂培养基 (Soil Extract Agar, SEA) 制备

参照 Taylor 等<sup>[3]</sup>的方法。将 100 g 新鲜土壤悬浮于 200 ml 自来水中,连续湿热灭菌 3 d (121 °C, 0.2 × 10<sup>6</sup> Pa, 1 h)。静置使固体颗粒沉降,轻轻倒出上清液,并离心(3 500 g, 10 min)。上清液冻融 1 次,过滤,滤液用自来水补足到 200 ml。取 50 ml 过滤液加入到 950 ml 自来水,加 15 g 琼脂,以制备 SEA 培养基。

## 1.3 寡营养微生物计数

称取 10 g 新鲜土于盛有 100 ml 无菌水的 250 ml 三角瓶内,振荡 10 min,按 10 倍进行系列稀释。取 0.05 ml 滴加于 SEA 平板,均匀涂布后在 24 °C 下进行厌氧培养。28 d 后计数生成的菌落数。

## 1.4 Biolog 分析

采用 Garland 等<sup>[4]</sup>介绍的方法。称取 10 g 新鲜土置于 100 ml 无菌水中,振荡 20 min。用无菌水稀释到 10<sup>-3</sup>后,用 8 通道加样器向 Biolog GN 微孔板 (Biolog, Inc., Hayward, USA) 各孔分别添加 150 μl 稀释后的悬液。每个土壤样品做 3 个重复。25 °C 恒温培养,72 h 后在 BIOLOG Emax<sup>TM</sup> 自动读盘机上利用 Microlog Rel 4.2 软件读取 750 nm 和 590 nm 波长下的吸光值,数据统计分析利用 SPSS10.0 软件完成。

## 1.5 土壤产甲烷潜势测定

称取新鲜土样 50 g,置于 250 ml 气体培养瓶(事先加入 50 ml 无菌水),然后以高纯氮气置换空气,持续 3 min。用 Parafilm 膜封口后,于 25 °C 恒温培养。在培养后 1 周和 3 周时采集气体样品,分别收集在抽真空后的收集瓶中,气相色谱 (Shimadzu, GAS CHROMATOGRAPH GC-12A) 测定甲烷浓度。每个土样设 3 次重复,以不加土样的气体培养瓶作为对照。气相色谱斜率设置为 200,在 20 °C 下测定采集的气体样品,峰面积的测量使用自动积分器法,气体样品浓度通过外标法确定。

## 1.6 土壤样品总 DNA 的提取与纯化

采用 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒和 Fast-Prep<sup>TM</sup> FP120 核酸提取仪提取和纯化土壤样品总 DNA<sup>[5]</sup>,具体方法参见生产商使用说明。提取的总 DNA 置于 -20 °C 保存。

## 1.7 产甲烷古菌 16S rDNA PCR 与嵌套式 PCR 扩增

首先使用正向引物 1Af (5'-TCYGKITGATC-CYGSCRAG-3') 和反向引物 1 100 Ar (5'-TGGG-

TCTCGCTCGITG-3') 扩增广古生菌界 16S rDNA 片段<sup>[6]</sup>。反应体系为:在 50 μl PCR 反应体系中,加入 10 × PCR 缓冲液 5 μl, dNTP 0.2 mmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol L<sup>-1</sup>, 正向引物与反向引物 0.4 μmol L<sup>-1</sup>, 1.25 U *Taq* DNA 聚合酶 (宝生物工程(大连)有限公司), 1 μl 模板,加 Milli-Q 水至 50 μl。反应参数为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 30 s, 72 °C 2 min, 10 个循环; 92 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 2.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min<sup>[7]</sup>。然后以上一轮 PCR 产物为模板,利用正向引物 SAF<sup>[8]</sup> (为引物 SAF1 与 SAF2 以 2:1 混合而成, SAF1: 5'-CGCCCCGCCCGCCGCGCGGG-  
CGGGGCGGGGCACGGGGGGCCTA YGGGCGCCAGCA-  
GG-3'; SAF2: 5'-CGCCCCGCCCGCCGCGCGGG-  
CGGGGCGCCACGGGGGGCCTACGGGCGCCAGAGGG-3') 和反向引物 PARCH519<sup>[9]</sup> (5'-TTACCCGCGCKGCTG-3') 进行嵌套式 PCR 扩增。反应体系同上一轮,反应参数在 Nicol 等<sup>[7]</sup>基础上略有改动: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 53.5 °C 30 s, 72 °C 1 min, 5 个循环; 92 °C 30 s, 退火温度从 53.5 °C 降到 50.5 °C, 每循环降低 0.1 °C, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增使用 MyCycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler 热循环仪 (Bio-Rad, 170-9703)。

## 1.8 嵌套式 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

利用 DCode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection System 系统 (Bio-Rad, 170-9103) 进行变性梯度凝胶电泳。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性剂梯度为 35% ~ 60%<sup>[8, 10]</sup>。在 60 °C, 130 V 电压下持续电泳 11 h, 然后用 SYBR Gold<sup>[11]</sup> 染色 30 min, Universal Hood 凝胶成像系统观察 (Bio-Rad, S. N. 76S/0089), Quantity One 1-D Analysis Software 软件 (Bio-Rad, The Discovery Series<sup>TM</sup>) 记录与分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 古水稻土寡营养细菌数量

寡营养细菌是一类只能在含低浓度碳源的贫营养培养基上生活(专性寡营养细菌),或既可以在含较低浓度碳源的贫营养培养基上生活又可以在含高浓度碳源的富营养培养基上生活(兼性寡营养细菌)的微生物<sup>[12]</sup>,这类微生物可以在极端贫瘠的环境里生存。传统的富营养培养基可以培养土壤中可培养的快速生长的细菌,但不能培养生长缓慢的寡营养细菌。SEA 培养基仅含土壤中可溶态的有机碳,因

此可看作贫营养培养基,可反映土壤中适应贫营养条件的微生物数量。图 2 给出了利用 SEA 培养基在厌氧条件下培养计数的寡营养菌数量。可以看出,对于剖面 P-03 来说,随着土层深度的增加,厌氧的寡营养菌数量逐渐减少,但剖面 P-01 却在 75 cm 以下土层都有较多的厌氧寡营养细菌,其中在 6 500 a 前古水稻土层,即 100 ~ 116 cm 土层数量最多。对比两个土壤剖面可以看出,P-03 剖面 103 cm 以下土层颜色浅黄,有机质含量低(见表 1),为黄土母质(生土)层,因而微生物数量较少。而 P-01 剖面

100 ~ 170 cm 土层颜色呈深灰色,质地细腻,有机质含量较高(见表 1),属于受人为干扰、类似湿地的有利于微生物生存的土层。史前古人类由于缺乏适合的耕作工具和栽培技术,因而只能选择在地势低洼经常积水的湿地状地块种植水稻,在此基础上逐步发明了沟渠池塘水井等灌溉技术后,便可以长期在同一地块种植水稻。淹水植稻和季节性的落干对稻田土壤加入了人为影响,以及大量秸秆焚烧和根系的残留,使得耕作层积累有大量有机物,创造了有利于微生物活动和多样性的土壤条件。

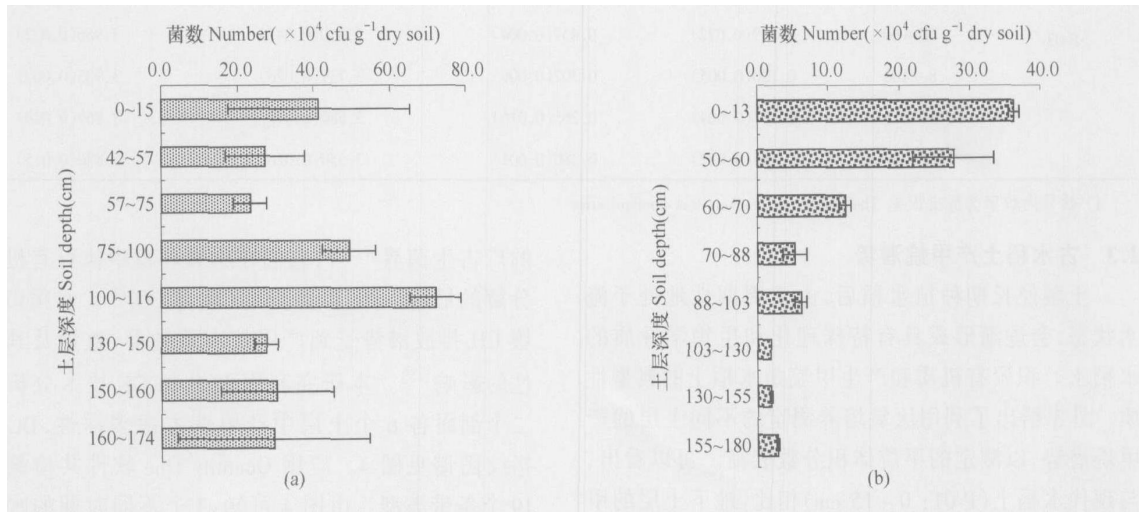


图 2 古水稻土剖面 P-01 (a) 和 P-03 (b) 部分土层厌氧寡营养细菌数量

Fig. 2 Number of anaerobic oligotrophic bacteria in some soil layers of Profiles P-01 (a) and P-03 (b)

## 2.2 古水稻土微生物群落功能多样性

从所采集的两个土壤剖面中分别选择了 5 个土层进行了 BIOLOG 分析。表 2 列出了不同土壤样品在反应 72 h 时的 BIOLOG 板平均吸光值 (Average Well Color Development, AWCD) 和由此计算出的 Shannon 多样性指数。AWCD 可以指示土壤中微生物的总代谢活性,而 Shannon 多样性指数可以表征土壤中微生物群落代谢功能丰富度。从表 2 中可以看出,无论是好氧还是厌氧培养条件下,二个剖面的现代水稻土层 (0 ~ 15 cm)、商周时期古水稻土层 (P-01: 42 ~ 57 cm; P-03: 50 ~ 60 cm) 和母质层 (P-01: 174 ~ 200 cm; P-03: 180 ~ 200 cm) 的 AWCD 和 Shannon 多样性指数都没有显著差异。但剖面 P-01 的史前古水稻土层 (100 ~ 116 cm) 和其下面的土层

(130 ~ 150 cm) 的 AWCD 和 Shannon 多样性指数均较剖面 P-03 相应的土层 (88 ~ 103 cm 和 130 ~ 155 cm) 显著高。从纵向来看,二个剖面都表现出随土层深度增加而 AWCD 和 Shannon 多样性指数均逐渐减少的趋势,但剖面 P-01 的史前古水稻土层 (100 ~ 116 cm) 较其下面的土层 (130 ~ 150 cm) 的 AWCD 和 Shannon 多样性指数高得多。由此可以推论,随土壤深度增加,土壤微生物(包括好氧和厌氧微生物)代谢活性逐渐下降,微生物对碳源的利用能力也逐渐降低。但史前古水稻土层的 AWCD 和 Shannon 多样性指数均较其同时期非水稻土层和其下面的黄土母质层高,说明种植水稻提高了土壤微生物的代谢活性和碳源利用能力,特别是提高了厌氧微生物的代谢能力。

表 2 不同土层土壤微生物群落功能多样性指数的比较

Table 2 Comparison between soil layers in diversity of microbial communities

剖面 Profile	土层 Soil layer(cm)	吸光值 AWCD		指数 Shannon index	
		厌氧 Anaerobic	好氧 Aerobic	厌氧 Anaerobic	好氧 Aerobic
P-01	0~15	0.414(0.016) <sup>1)</sup>	0.609(0.040)	3.992(0.045)	4.237(0.018)
	42~57	0.422(0.066)	0.453(0.059)	3.997(0.116)	3.984(0.074)
	100~116	0.336(0.011)	0.499(0.048)	3.944(0.056)	3.974(0.020)
	130~150	0.211(0.017)	0.396(0.007)	3.905(0.017)	3.953(0.006)
	174~200	0.186(0.029)	0.304(0.010)	3.679(0.083)	3.934(0.005)
P-03	0~13	0.406(0.013)	0.581(0.019)	3.939(0.030)	4.118(0.072)
	50~60	0.419(0.022)	0.437(0.004)	3.950(0.041)	3.966(0.022)
	8~103	0.190(0.005)	0.302(0.009)	3.739(0.026)	3.905(0.002)
	130~155	0.167(0.004)	0.265(0.016)	3.680(0.079)	3.869(0.020)
	180~200	0.155(0.022)	0.280(0.001)	3.550(0.026)	3.880(0.015)

1) 括号内数字为标准误差 The number in brackets was standard error

### 2.3 古水稻土产甲烷潜势

土壤经长期种植水稻后,由于周期性地处于淹水状态,会逐渐形成具有特殊理化和生物学性质的水稻土。积聚有机质和产生甲烷是水稻土的典型性质。图 3 给出了利用厌氧培养测定的不同土层的产甲烷潜势,以测定的甲烷体积分数表征。可以看出,与现代水稻土(P-01: 0~15 cm)相比,地下土层的甲烷排放潜势都很弱。但史前古水稻土的甲烷排放潜势显著高于同时期同深度的非水稻土层,说明水稻种植增加了土壤产甲烷潜势。

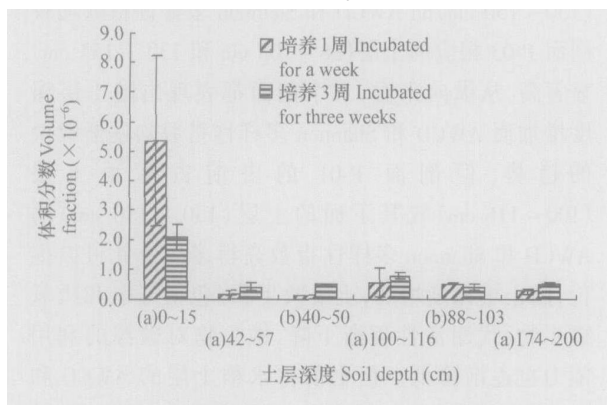


图 3 古水稻土剖面 P-01(a) 和 P-03(b) 部分土层产甲烷潜势比较

Fig. 3 Comparison between Profiles P-01(a) and P-03(b) in methane generation potential in some soil layers

### 2.4 古水稻土产甲烷古菌群落多样性

水稻田中甲烷的产生主要与产甲烷古菌有关。产甲烷古菌是严格的厌氧原核微生物,属于古菌域

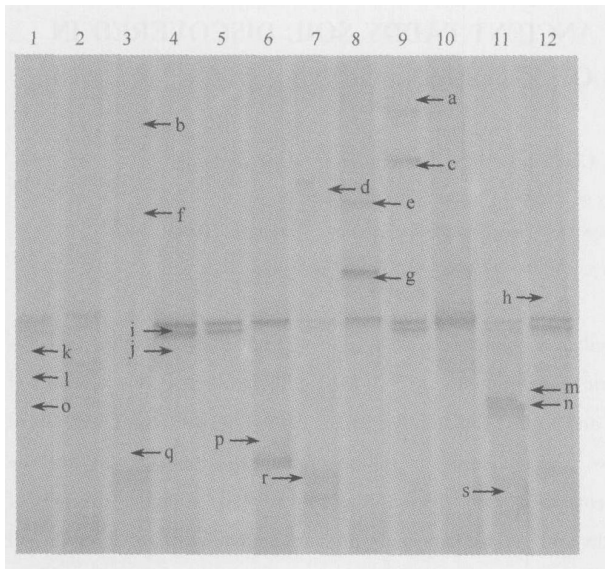
的古生菌界<sup>[7, 13]</sup>,它们在厌氧环境中执行有机质分解的最后一步,矿化产生 CH<sub>4</sub>与 CO<sub>2</sub><sup>[14]</sup>。水稻田土壤 CH<sub>4</sub>排放潜势受到产甲烷古菌群、数量及其活性的影响<sup>[15]</sup>。本研究利用 PCR-DGGE 技术分析了二个剖面各 6 个土层中产甲烷古菌多样性,DGGE 指纹图谱见图 4。应用 Quantity One 软件共检测到 19 个条带类型。由图 4 可知,3 个不同时期的水稻土既有与其他土层共有的条带类型(条带 i 和 j),也有其他土层没有的特异条带。现代水稻土(泳道 1 和 2)具有 3 条特异性条带(条带 k、l 和 o),商周时期古水稻土(泳道 3 和 4)具有 2 条特异性条带(条带 b 和 f),而史前古水稻土(泳道 9)也具有 2 条特异性条带(条带 a 和 c)。如果每种条带类型可以假定代表一个实用分类单位,即简单种<sup>[16]</sup>,这些结果表明,水稻种植可以引起特异性的产甲烷古菌群落发育,而且不同的栽培措施可能导致不同的优势种群。

## 3 结论

1) 在埋藏于地下 100 cm 深度的 6 500 a 前的史前古水稻土中仍有较多厌氧微生物存活,可达  $7.0 \times 10^5$  cfu g<sup>-1</sup>干土,显著高于其黄土母质和相同时期同深度的非水稻土层。

2) 史前古水稻土微生物群落的碳源利用能力和多样性也显著高于其黄土母质和相同时期同深度的非水稻土层。

3) 与现代水稻土相比,古水稻土仅存留了很微



1. P-01: 0 ~ 15 cm; 2. P-03: 0 ~ 13 cm; 3. P-01: 42 ~ 57 cm;  
4. P-03: 50 ~ 60 cm; 5. P-01: 57 ~ 75 cm; 6. P-03: 60 ~ 70 cm;  
7. P-01: 75 ~ 100 cm; 8. P-03: 70 ~ 88 cm; 9. P-01: 100 ~ 116 cm;  
10. P-03: 88 ~ 103 cm; 11. P-01: 150 ~ 160 cm; 12. P-03: 130 ~ 150 cm

图 4 古水稻土剖面 P-01 与 P-03 部分土壤样品产甲烷古菌 16S rDNA 嵌套式 PCR 产物变性梯度凝胶电泳

Fig. 4 DGGE analysis of 16S rDNA nested-PCR products of methanogenic archaeal communities in some soil layers of Profiles P01 and P03

弱的产甲烷潜势,但史前古水稻土比同期非水稻土和商周时期古水稻土的产甲烷潜势较高。

4) PCR-DGGE 结果显示,水稻土都有区别于其他土壤的产甲烷古菌群落结构,而现代水稻土、商周时期古水稻土和史前古水稻土各有不同的优势产甲烷古菌群。

## 参考文献

- [ 1 ] 游修龄. 中国稻作史. 北京: 中国农业出版社, 1995. 43 ~ 57, 209 ~ 215. You X L. History of Rice Cultivation in China (In Chinese). Beijing: China Agricultural Press, 1995. 43 ~ 57, 209 ~ 215
- [ 2 ] 丁金龙. 长江下游新石器时代水稻田与稻作农业的起源. 东南文化, 2004, 178(2): 19 ~ 23. Ding J L. The neolithic rice field in the low region of Changjiang River and the origin of rice agriculture (In Chinese). Southeast Culture, 2004, 178(2): 19 ~ 23
- [ 3 ] Taylor J P, Wilson B, Mills M S, *et al.* Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34: 387 ~ 401
- [ 4 ] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source-utilization. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(8): 2351 ~ 2359

- [ 5 ] 腾应, 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
- [ 6 ] Embley T M, Finlay B J, Thomas R H, *et al.* The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. Journal of General Microbiology, 1992, 138: 1479 ~ 1487
- [ 7 ] Nicol G W, Gover L A, Prosser J I. Molecular analysis of methanogenic archaeal communities in managed and natural upland pasture soils. Global Change Biology, 2003, 9: 1451 ~ 1457
- [ 8 ] Nicol G W, Gover L A, Prosser J I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. Environmental Microbiology, 2003, 5(3): 152 ~ 162
- [ 9 ] Öreås L, Forney L, Daae F L, *et al.* Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3367 ~ 3373
- [ 10 ] McCaig A E, Gover L A, Prosser J I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4554 ~ 4559
- [ 11 ] Tuma R S, Beaudet M P, Jin X, *et al.* Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: A dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. Analytical Biochemistry, 1999, 268: 278 ~ 288
- [ 12 ] Tada Y, Himori M, Yamaguchi J. Oligotrophic bacteria isolated from clinical materials. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(2): 493 ~ 494
- [ 13 ] Adachi K. Methanogenic archaea and methanotrophic bacteria in subtropical paddy field and their interaction: Controlling methane emissions from paddy fields. Microbes and Environments, 2001, 16(4): 197 ~ 205
- [ 14 ] Joulain C B, Ollivier B, Patel B K C, *et al.* Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. FEMS Microbial Ecology, 1998, 25(2): 135 ~ 145
- [ 15 ] 陈中云, 闵航, 陈美慈, 等. 不同水稻土甲烷氧化菌和产甲烷菌数量与甲烷排放量之间相关性研究. 生态学报, 2001, 21(9): 1498 ~ 1505. Chen Z Y, Min H, Chen M C, *et al.* Studies on relationships among methane emission and methane-oxidizing and methanogenic bacteria in three types of rice-field soil (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2001, 21(9): 1498 ~ 1505
- [ 16 ] Hughes J B, Hellmann J J, Ricketts T H, *et al.* Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4399 ~ 4406

## MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF AN ANCIENT PADDY SOIL DISCOVERED IN CHUODUNSHAN RELICS OF KUNSHAN, CHINA

Shen Weishou<sup>1,2,3</sup> Yin Rui<sup>1,2</sup> Lin Xiangui<sup>1,2</sup> Chu Haiyan<sup>1,2</sup> Hu Zhengyi<sup>1</sup> Cao Zhihong<sup>1,2†</sup>

(1 *Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*)

(2 *Joint Open Laboratory of Soil and Environment, Institute of Soil Science and Hongkong Baptist University, Nanjing 210008, China*)

(3 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

**Abstracts** Two layers of ancient paddy soil were discovered in archeological excavation of Chuodunshan Relics in Kunshan, China. One of them could ascend to 6 500 a BP (prehistoric), and the other 3 320 a BP (Shang-Zhou Period). Two soil profiles, not far apart, named P-01 (containing both soil layers) and P-03 (containing only the latter) respectively, were fixed and soil samples were collected according to soil color and texture. The techniques of soil anaerobic incubation, Biolog analysis and PCR-DGGE of 16S rDNA gene fragments encoding Euryarchaeota variable V3 region were used to study microbial diversity of anaerobic microbes, methane emission potential and the genetic diversity of methanogenic archaea communities in different soil layers. The aim of this study is to determine biological properties of the ancient paddy soils. The results show that among all the underground soil layers of the two profiles, the prehistoric ancient paddy soil layer still had quite a number of anaerobic microbes surviving in the soil, up to  $7.0 \times 10^5$  cfu  $g^{-1}$  soil, and it also showed better carbon utilization capacity and diversity than the other soil layers. A tendency was noticed that the prehistoric ancient paddy soil showed slightly higher methane emission potential than its parent material —lake sediment and homochronous non-paddy soil —loess, though it was very weak compared with that of recent paddy soils. PCR-DGGE analysis revealed that the methanogenic archaea community made paddy soil layers different from the other soil layers, and paddy soils of different ages have their respective special predominant populations.

**Key words** Ancient paddy soil; Methanogenic archaea; Nested PCR; DGGE