

污染土壤的微生物多样性研究*

滕 应^{1,2} 骆永明^{1,2†} 李振高^{1,2}

(1 中国科学院南京土壤研究所土壤与环境生物修复研究中心, 南京 210008)

(2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

摘 要 土壤微生物多样性是土壤微生物生态学的重要研究内容, 目前已成为国际上生态学发展的崭新方向之一。土壤微生物多样性包括微生物群落功能多样性、结构多样性及分子遗传多样性, 是指示土壤生态系统稳定性及其功能的重要传感器。本文基于分离培养以及生物标志分子方法, 从不同生态层次上认识微生物多样性, 较全面、系统地综合评述国内外污染土壤环境的微生物群落功能、结构及分子遗传多样性的研究进展, 并针对新形势下土壤污染所面临的新问题, 探讨了近期土壤微生物生态学过程研究的重要手段与科学问题。

关键词 污染土壤; 微生物多样性; BIOLOG 系统; 磷脂脂肪酸; 分子多态性

中图分类号 S154.36 **文献标识码** A

随着工业化、城市化、农业集约化的快速发展, 人们对农业资源的高强度开发利用, 使大量未经处理的固体废弃物、污水向农田转移, 过量的化肥与毒害污染物逐年土壤中残留, 造成土壤环境发生显性或潜性复合污染^[1]。这不仅影响了土壤地上部分的作物多样性, 而且直接危害到地下部土壤微生物的多样性。过去人们多强调的是地上部植物多样性与整个生态系统的功能关系, 直至后来生态学家们才开始认识到并着手研究土壤中微生物多样性、微生物学过程与其他生物、非生物因素(如土壤养分、环境污染物)之间的动态作用。2000 年 Jon Copley^[2] 在《Nature》杂志上公开指出生态学正走向地下, 如果忽视了土壤环境中生物多样性及其生态功能研究, 这是令人担忧的。土壤生物多样性是调节陆地生态系统功能的至关重要因素, 尤其土壤微生物多样性。土壤微生物多样性包括微生物群落功能多样性、结构多样性及分子遗传多样性。研究土壤微生物多样性的方法大致可分为两类: 一类是基于培养和分离手段来揭示土壤微生物群落变化; 另一类是基于生物指示分子(如 DNA、RNA 及磷脂脂肪酸) 变异模式的土壤微生物多样性。在此, 本文将从不同生态层次上认识土壤微生物多样性, 较全面、系统地综合评

述污染土壤的微生物群落功能、结构及分子遗传多样性的研究进展, 以及今后的重要研究方向。

1 经典的分离培养方法在污染土壤微生物多样性研究中的应用

人们应用分离培养方法已有 100 多年的历史, 至今仍然是研究土壤微生物区系组成、数量及主要生理类群结构状况的一种重要而不可替代的经典方法, 它在认识污染物与土壤微生物间关系方面发挥了积极作用。有研究表明, 在 As、Cd、Cr、Cu、Pb、Ni、Zn 复合污染土壤中, 重金属总量达到 658 mg kg^{-1} 时, 细菌和真菌数量分别为对照 (121.0 mg kg^{-1}) 的 29% 和 45%, 当重金属总量为 3447 mg kg^{-1} 时, 其分别下降为 81% 和 85%^[3]。而且不同类群微生物对重金属污染的耐性也不一样, 通常为真菌 > 细菌 > 放线菌^[4]。滕应等报道重金属污染土壤比自然土壤中耐性细菌种群的数量多 15 倍^[5]。Yamamoto 等发现对照土壤 ($\text{Cu} < 100 \text{ mg kg}^{-1}$) 有 35 种真菌, 中等污染土壤 ($\text{Cu} 1000 \text{ mg kg}^{-1}$) 有 25 种真菌, 高度污染土壤 ($\text{Cu} 10000 \text{ mg kg}^{-1}$) 只有 13 种真菌^[6]。近期,

* 国家自然科学基金重点项目(40432005)、国家重点基础研究发展规划项目(2002CB410810/9)、江苏省自然科学基金(BK2005166)资助

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

作者简介: 滕 应(1975~), 男, 贵州江口人, 博士, 主要从事土壤化学生物学方向研究。E-mail: yteng@mail.issas.ac.cn

收稿日期: 2005-12-08; 收到修改稿日期: 2006-05-28

高军等^[1]实验结果还表明,多氯联苯(PCBs)长期污染土壤中细菌数量受污染程度的影响较小,则真菌数量较为明显。可见,重金属和有机污染物胁迫对土壤微生物种群结构会产生一定程度的影响。但由于培养基类型和培养条件的限制,分离培养方法存在很大的局限性,土壤中绝大部分微生物种群仍无法直接分离,用该方法来真实评估土壤微生物多样性已显得尤为艰难。Amann 等^[7]根据在原位、无培养的微生物系统发育学研究,认为自然界中 95%~99% 的微生物种群未被分离培养和描述。因此,大量微生物的不可培养性成为传统微生物生态学在揭示土壤环境微生物群落结构组成、生态功能及其相互关系研究中的最大障碍,最终导致土壤微生物多样性及生态学研究一直落后于其他生物的研究水平。近 10 多年来,随着现代生物化学及分子生物学等分析技术的发展,纷纷出现了一些先进的微生物多样性研究方法,如碳素利用法(BIOLOG 系统)、磷脂脂肪酸(PLFA)分析法和基于聚合酶链反应(PCR)的各种核酸定量分析技术等^[8~12],目前上述方法已经成为人们认识污染土壤微生物多样性的重要手段。

2 碳素利用法在污染土壤微生物群落功能多样性研究中的应用

碳素利用法,通常又称 BIOLOG 系统,它是美国 BIOLOG 公司于 1989 年开发成功的,最初主要用于微生物的纯种鉴定,如今已经能够鉴定包括细菌、酵母菌和霉菌在内的 2 000 多种病原微生物和环境微生物。1991 年 Garland 和 Mills 开始将这种方法应用于土壤微生物生态学研究^[13]。BIOLOG 系统的基本原理是:微生物的存活、生长以及竞争需要不同形式的碳源,根据微生物对碳源利用模式差异来鉴定微生物群落功能多样性。碳素利用法借助于 BIOLOG 板(如革兰氏阴性板(BIOLOG GN)、革兰氏阳性板(BIOLOG GP)、生态板(ECO)等)来实现。该测试系统已被广泛运用于土壤环境微生物的代谢功能多样性研究^[14~18]。Knight 用 BIOLOG 微平板反应系统评价了 Cd、Cu、Zn 污染土壤微生物的功能多样性^[19]。Kell 等也用 BIOLOG 微平板反应系统对锌污染下的土壤微生物群落进行了研究,发现锌污染会影响土壤微生物群落结构和功能多样性^[20]。Bååth 等用碳

素利用法研究了 Cu、Ni、Zn 等重金属污染土壤的微生物组成,结果得出高铜污染土壤中微生物群落较 Ni、Zn 污染的土壤中微生物群落少,重金属严重污染减少了能利用有关碳源底物的微生物数量,降低微生物对单一碳底物的利用能力,减少了土壤微生物群落的多样性^[21]。姚槐应等研究了外源铜对不同利用方式下红壤中微生物群落结构的影响,结果表明外源铜对不同利用方式的红壤微生物群落结构有明显影响,且重金属污染降低了土壤微生物对碳源的利用效率^[22]。近来,我们在中国南方某矿区重金属复合污染土壤微生物功能多样性特征及动力学方面也进行了研究^[23]。

这里值得一提的是,使用该方法时应注意接种密度和时间,它们是直接影响土壤微生物群落功能多样性评价结果的关键因素。有研究表明,碳源的可利用程度取决于接种物的组成和密度^[24~26],它不仅依赖于微生物细胞数量,还依赖其生理代谢活性。而且多种微生物在微孔板中培养后,显色孔颜色变化并非各碳源利用产生的简单相加^[24],也存在协同效应或拮抗效应。针对上述问题,可以采用以下办法来加以克服:(1)将每孔颜色差异(碳源孔值减去对照孔值)除以整板的平均吸光值(Average well color development, AWCD)进行数据转换,可比较样品间单一碳源利用类型的差异^[27,28]。(2)利用固定水平的 AWCD 值去决定读数时间,以补偿接种密度差异进行比较^[29]。但应指出,如果群落由不同生理活性的物种组成,相同的 AWCD 值不一定产生于同一接种密度^[30]。(3)可调节接种浓度至相近水平^[14],以排除接种密度带来的影响。但必须注意,稀释可能导致稀有物种的丧失^[31]。(4)通过测定每孔颜色的动态变化,建立颜色变化指数方程(如 $Y = OD_{590} = K / (1 + b \times e^{-r(t-s)})$),其中 K 表示在培养过程中土壤微生物群落的最大平均吸光值, r 表示其平均吸光值的变化指数,即影响其生长曲线圆滑度的参数, t 是指测定微生物群落功能代谢的培养时间, s 是指当达到最大平均吸光值 1/2 时所需时间。这些参数是建立在各种碳源利用程度的基础上,当给它们排序时,每个参数可产生不同的分类,以克服接种密度和培养时间对结果的影响。在这方面我们曾作了一些尝试,运用微生物群落功能多样性动力学参数却成功地指示了矿区重金属复合污染土壤微生物群落的碳源利用模式差异^[23]。

(1) 高军. 长江三角洲典型污染农田土壤多氯联苯分布、微生物效应和生物修复研究. 浙江大学博士学位论文, 2005. 39~45

BIOLOG系统是目前揭示土壤微生物群落功能多样性的一种相对简单、快速的研究方法。但是也存在一些不足,该方法仅能鉴定快速生长的部分微生物成员,BIOLOG板微孔中碳源不能完全代表土壤生态系统中的实际碳源类型,而且BIOLOG板内是近中性的缓冲体系,高浓度的碳源及其生物毒性的指示剂均可能影响测试效果^[32]。

3 磷脂脂肪酸方法在污染土壤微生物群落结构多样性研究中的应用

磷脂脂肪酸(Phospholipid fatty acid, PLFA)是构成活体生物细胞膜的重要组分,不同类群微生物能通过相应生化途径形成特定的PLFA,使部分PLFA总是出现在同一类群的微生物中,作为区分活体微生物群落生物标记的基础。一些微生物类群的特定生物标记物PLFAs如表1所示。根据表中脂肪酸的种类及

组成比例可鉴别土壤微生物群落结构多样性变化^[32~35]。该方法首先用氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲液(1 2 0.8)提取土壤鲜样或冷冻干燥样品中的脂类,用柱层析法分离得到磷脂脂肪酸,然后经甲酯化后用气相色谱分析各种脂肪酸(C₅ - C₂₀)的含量。Frostegård等对已有的磷脂提取方法进行改进后,成功地应用到污染土壤微生物群落结构分析中^[36]。Zelles在因施真菌杀虫剂的铜污染土壤中发现单不饱和脂肪酸的含量明显增加,支链脂肪酸和十碳甲基支链脂肪酸含量较低,表明格兰氏阴性菌类群较多,而格兰氏阳性和放线菌的比例则相对减少^[34]。Frostegård等研究表明,在重金属污染的耕地和森林土壤中随着重金属污染程度的加剧,微生物的PLFA模式也发生相应变化,即革兰氏阴性菌群占优势,其中革兰氏阴性菌的典型脂肪酸cy17 0含量较高,革兰氏阳性菌中异式(iso-)和反异式(anteiso-)支链脂肪酸含量较低。另外也发现,放线菌的指示标记物,如甲基支链PLFAs

表1 土壤中部分微生物类群的特征磷脂脂肪酸(PLFA)标记物

Table 1 Diagnostic PLFAs biomarkers of some microbial groups in soils

微生物类群 Microbial group	磷脂脂肪酸标记物 PLFA	参考文献 References
革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	单不饱和脂肪酸 monounsaturated FAs 16 1w7t, 16 1wSc, 18 1w7, cy17 0, cy19 0	[34, 44]
革兰氏阳性细菌 Gram-positive bacteria	异式和反异式脂肪酸 Iso- and anteiso FAs i15 0, A15 0, i16 0, i17 0, a17 0	[38, 44]
放线菌 Actinomycetes	甲基脂肪酸 10 Me FAs. 10 Me16 0, 10 Me17 0, 10 Me18 0	[36, 40]
假单胞菌 Pseudomonas	16 0, 16 1w7c, 18 1w7c/w9t/w12t	[24, 45]
真菌 Fungi	a15 0 and a17 0, 16 1wSc, 18 2w6, 9c, 18 1w9c, 20 4, 23 0, 25 0, 21 0	[24, 34, 36, 45]
藻类和原生动物 Eukaryotic algae and Protozoa	多不饱和脂肪酸 Polyunsaturated FAs. 16 1w4, 16 3, 18 4w3, 20 4, 20 5, 22 6	[47, 48]

的10Me16 0、10Me17 0及10Me18 0含量在森林土壤中较高,而耕地土壤中10Me16 0和10Me18 0则较低^[36]。随后,有人用不同浓度的Cd、Cu、Ni、Pb、Zn等重金属元素,详细探讨了18 2w5,9脂肪酸的比例变化,结果表明除Cu污染使其比例下降外,其余污染物使耕地土壤中18 2w5,9脂肪酸的比例上升,但森林土壤中没有受到明显影响。但后来Frostegård等发现耕地土壤中真菌特定标记物18 2 6,9含量与锌污染程度呈正相关,而在森林土壤中则相反。他们认为森林土壤中18 2 6,9可能来源于外生菌根真菌,由于重金属污染剥夺了它们的根部营养源,丧失了与正常腐生菌群的竞争能力,从而导致外生菌根真菌的死亡而释放出较多的18 2 6,9^[37]。Pennanen等同样也发现,在某冶炼厂长期重金属污染的针叶林土壤中真菌标记物(如

18 2 6,9和20 4)的含量较低,随着重金属污染程度的加剧,真菌/细菌微生物量的比值则明显下降,表明土壤微生物量的真菌部分对重金属污染较敏感。同时发现重度污染土壤中革兰氏阳性菌中许多支链PLFAs,如br17 0和br18 0,及iso-和anteiso-支链PLFAs含量明显增高。Pennanen等研究表明,在Cu、Ni及酸化的针叶林腐殖质土壤中,单独外加重金属并没有导致微生物群落结构或细菌对Cu、Ni的抗性变化^[38]。White等发现喷气燃料污染土壤中典型的革兰氏阴性异养菌(如16 1 7c, 18 1 7c)及产气放线菌(10Me18 0)较丰富,而革兰氏阳性菌中iso/ anteiso15 0比例则下降^[39]。Kelly等监测出锌污染土壤中反映微生物群落结构的PLFAs模式随时间会发生明显变化^[40]。Olsson研究得出,锌污染土壤中指示内生菌根和细菌(*Cytophaga Flavobacterium*

Bacteroides) 类群的特定标记物 16 S rDNA 及放线菌指示物 10Me16 0 均相对较低,而放线菌的另 2 种标记物 10Me17 0 和 10Me18 0 含量却较高,表明放线菌不同的 PLFA 片段对重金属反应是不一样的^[41]。Sara 等报道指出,在皮革厂附件铬污染土壤中细菌的特征 PLFA(i15 0, a15 0, 15 0, i16 0, a17 0 和 cy17 0) 随着 Cr 污染程度的加剧而出现显著降低($p < 0.01$)^[42]。同时, Maïke 等运用 PLFA 方法来评价蚯蚓(*Lumbricus terrestris*、*Allolobophora chlorotica* 和 *Eisenia fetida*) 对石油污染土壤微生物群落结构动态变化的影响,取得了很好的效果^[43]。

综上,PLFA 方法可有效地提取土壤中大部分微生物的脂肪酸成分,表征土壤微生物群落结构的动态变化。但也存在以下不足:(1) 它很难从种的水平上鉴定微生物类群,只能鉴定到属;(2) 该方法依赖于标记脂肪酸,PLFA 的组成和浓度可能受土壤微生物生长发育及外界环境的影响,难以区别死与活的微生物,给微生物群落结构的定性和定量分析带来了一定困难;(3) 土壤中 PLFA 标记物的组成及其稳定性还受提取方法、提取条件等因素直接影响,即使是同一土壤样品采用不同的提取方法和条件可能会偏差估计微生物群落结构多样性变化,因此,在操作过程中需要严格把握质量保证和质量控制(QA/QC),排除各种可能发生的误差干扰。

4 核酸分析方法在污染土壤微生物群落遗传多样性研究中的应用

4.1 土壤总 DNA 分析法

通过测定土壤总 DNA 的碱基组成和复杂性可估计出微生物总的遗传结构及其多样性。其主要方法包括 DNA 的 G + C 丰富度,使用温度变性程序^[49,50]或密度梯度离心^[51,52],不同样品 DNA 的分子杂交以及变性 DNA 的复性动力学研究^[50,53,54]。DNA 碱基比例是基于不同微生物种类有不同的核苷摩尔百分比(从 24 ~ 76 G + C mol %),是反映土壤微生物群落组成变化的敏感指标^[52]。根据 DNA 相似性,Giffiths 等将不同重金属处理土壤的微生物群落分成了四类:Pb 和 Ni, Zn 和 Cd, Cu 及对照,并将 G + C mol % 和群落 DNA 杂交技术结合起来,发现重金属污染土壤的微生物群落变化与其污染程度和种类有关^[55]。Sandaa 等在未污染土壤、轻度污染、重度污染土壤上均未发现 DNA 的 G + C mol % 剖面发生明显差异^[56]。Øreås 等发现在甲烷扰动土壤

中 DNA 的碱基组成变化为 35 % ~ 77 % mol G + C,而对照土壤中为 45 % ~ 70 % mol G + C,表明细菌群落结构对扰动发生了明显的变化。G + C mol % 分布反映了微生物群落结构的差异,但该方法的分辨率较低,只能初步确定土壤微生物群落差异^[57]。因此,G + C mol % 剖面必须通过杂交数据或其他专门技术进行解释。微生物群落 DNA 杂交是一项量化微生物群落区系结构水平的分析手段,测定群落之间 DNA 杂交的相似程度^[58]。

土壤总 DNA 分析是较早估计土壤微生物群落结构组成及多样性的分子生物学方法,但它的准确性较差,提供的信息量也有限,目前已很少使用。

4.2 PCR 扩增的 rRNA 及 rDNA 分析方法

近 10 多年来,随着土壤微生物 DNA 提取方法的改进和提高,以 DNA 序列变异(如 16S rDNA 指纹)为基础的现代分子生物学技术在微生物多样性研究上的应用,克服了微生物培养技术的限制,从分子水平层面上揭示土壤微生物种类和遗传多样性已成为可能^[59~65]。目前基于 PCR 检测土壤微生物遗传多样性的分子指纹技术主要有:扩增核糖体 DNA 限制性酶切分析(ARDRA)、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)、核糖体基因间间距分析(RISA)、单链构象多态性(SSCP)、可重复指纹技术(rep-PCR)、DNA 微阵列、定量 PCR、竞争性 RT-PCR 以及变性或温度梯度凝胶电泳(PCR-DGGE/ TGGE)分析,这些技术在污染土壤环境微生物群落多样性评价中已得到一定范围的应用。

Smith 等运用 ARDRA 技术分析了铜污染土壤微生物群落遗传多样性,结果发现铜胁迫使土壤中细菌群落结构发生了显著的变化,铜污染土壤中可扩增的微生物区系仅有对照的一半,但铜污染并没有影响到氨化细菌群落的多样性^[60]。同时,Brim 等采用 ARDRA 指纹技术研究了土壤微生物群落抗 Zn 的遗传图谱,发现尽管在来源上存在较大差异的微生物,但是它们在 *Raistonia* 属内表现为极密切的遗传相似性^[69]。ARDRA 分子指纹技术经改进后,便产生了末端限制性片段长度多态性 T-RFLP 标记方法,它是利用一定的标记引物对样品中 DNA 进行特异扩增,然后进行限制性内切酶酶切,检测末端限制片段的多样性,主要应用于微生物群落组成和结构、微生物系统发育及其菌种鉴定等研究,是一种应用比较广泛的微生物生态学研究方法。这一技术成功地用来区分土壤微生物群落结构剖面对环境污染胁迫的响应^[70~72]。近来,Ranjard 等则应用一种基于 16S rRNA

和 23S rRNA 的 PCR 扩增基因间间距的长度多态性分析方法,评价 Hg 暴露污染土壤细菌群落结构多样性变化,结果表明 Hg 污染土壤 RISA 剖面发生转移,即 Hg 污染前后土壤细菌群落的一些特定条带数目和强度发生了变化,一些新条带的出现意味着污染导致土壤中一些敏感性微生物种类消失,而出现更多的是对污染胁迫有耐性的细菌群落^[73]。后来人们也用 rep-PCR 基因指纹(即用引物与原核生物基因间散布的 DNA 重复单元相连,使 PCR 产生高特异性和可重复指纹),鉴别不同程度镉污染土壤中细菌群落的遗传差异,16S rDNA 序列显示节杆菌属(*Arthrobacter*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)及假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)等细菌对 Cd 毒性的抗性能力存在明显差异^[74]。

相比之下,多聚酶链反应—变性或温度梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE/ TGGE)更受广大环境微生物学家们的青睐^[64, 73~78]。该方法是使用一对特异性引物 PCR 扩增微生物自然群体的 16S rRNA 基因,产生长度相同但序列有异的 DNA 片段的混合物,然后用 DGGE 分离。PCR 具有特异性、灵敏性高、快速简便和重现性好等优点,应用该方法可使极微量的特异 DNA 片段在几小时内(2~4 h)迅速扩增百万倍以上,从而有利于对 DNA 分子检测。Sandaa 等用 PCR-DGGE 研究了含重金属垃圾长期污染土壤的微生物群落结构变化,结果表明随着重金属污染程度的增加,土壤中古细菌非嗜热细菌(如 *Crenarchaeota*)数量明显降低^[56]。Kozdroj 等采用 PCR-DGGE 评价了重金属污染条件下根系分泌物对土壤微生物群落响应,DGGE 条带显示污染土壤中细菌区系和群落模式依赖于根系分泌物的有效性和分布状况,重度污染土壤中根系分泌物有利于优势种群的增加,而土壤微生物群落多样性则降低^[77]。Muller 研究了汞长期污染土壤微生物群落多样性的变化,扩增 16S rDNA 的 DGGE 分离图谱分析结果表明汞污染改变了土壤微生物群落结构,离污染源越近的土壤微生物多样性越低^[78]。同时,Perkiomaki 也应用 PCR-DGGE 技术评价了木灰修复酸害和重金属复合长期暴露的土壤微生物多样性^[79]。

近 2 年来,国内在环境微生物分子遗传多样性方面研究也相继展开。陈敏等用 ERIC—PCR、苯酚经化酶大亚基基因(LmPHs)扩增和群落结构探针分子杂交检测技术评价了不同培养基从活性污泥分离优势菌群的能力^[80]。张晓君等利用 16S rDNA 克隆测序的方法分析了马兰冰川一个深层冰芯环境样品的微生物多样性,样品中很多序列与嗜冷微生物的

序列很相似^[81]。近年来,我们通过扩增土壤总 DNA 中的 16S rDNA,然后进行变性梯度凝胶电泳,初步分析了长期受重金属复合污染农田土壤中微生物群落的遗传多样性变化,其结果表明不同程度的重金属复合污染明显改变了农田土壤微生物群落的遗传多样性,影响到农田土壤生态系统的细菌丰富度,改变了土壤环境的优势菌群,但发现重金属复合污染与微生物多样性的改变不是简单的负相关关系,最大的多样性指数出现在中等程度复合污染土壤中^[82~83]。

以上几种现代微生物分子遗传多样性分析方法在污染土壤环境中得到了一定程度的应用,取得了一些研究成果。但在复合污染土壤环境微生物分子遗传多样性的研究还鲜有报道,其认识几乎是空白,尤其在國內。由于复合污染在土壤生态系统中具有多样而复杂的效应机制,包括协同作用、拮抗作用、竞争作用、加和作用以及土壤环境条件的影响作用。并且,几种毒害污染物长期共存或短期暴露在农田土壤中,其形态转化、生物有效性会发生明显变化。这些复合变化将如何影响土壤微生物群落结构及组成?其影响程度怎样?复合污染土壤微生物多样性演变的外因(环境因素和污染程度)和内因(遗传多样性或遗传结构变化)间相互关系如何?如何鉴别?以及演变的分子机理是什么?也就是说复合污染土壤中不同微生物类群对多种重金属污染的响应及其机理怎样?等等这些过程问题还了解甚微,正成为国内外土壤环境与污染生态过程科学研究的前沿课题。为回答这些科学问题,目前稳定同位素探针技术提供了一种强有力的研究手段^[84]。稳定性同位素无放射性,物理性质稳定,对环境无害。稳定同位素的相对比值在一定程度上可以指示土壤中发生的物理、化学和生物过程。Radajewski 与其同事使用稳定同位素探针技术(Stable-isotope probing, SIP)来鉴定土壤中能利用甲醇的微生物群落遗传多样性特征,进一步明确土壤环境中该类微生物的生态功能或生物地球化学过程。这一结果在《Nature》杂志上发表^[85]。其后,Samantha 和 Radajewski 等学者运用这一技术(SIP-PCR-DGGE)研究了土壤中甲烷细菌群落以及有机污染土壤微生物群落的功能和遗传结构的演变过程^[86]。据最近报道,我国陆雅海教授在德国同样也应用了稳定同位素探针技术检测到水稻根部活性产甲烷细菌群落结构的变化^[87]。至今,这一新兴有效的分子探针检测技术在國內土壤微生物多样性研究中尚未见报道,这是今后我们所要努力

的重要方向。

5 结 语

综上所述,分离培养、BIOLOG系统、PLFA及基于PCR扩增的核酸定量分析等方法,从不同生态层面上揭示了土壤微生物群落结构及多样性变化。它们发挥了各自的优点,同时在分析过程中也暴露其不足。因此,必须取长补短,将经典的培养方法与现代生物化学以及分子生物学等先进技术结合起来应用于土壤微生物学研究,大大拓展了对污染土壤微生物多样性的认识,不论在微生物群落功能、结构方面,还是分子遗传基础等研究上均取得了一定的进展,为现代土壤微生物生态学的发展奠定了坚实基础。土壤是具有活跃生命的“黑箱”系统和基因库,蕴藏着十分丰富的微生物资源和多样性,这些微生物类群与毒害污染物之间的内在关系还远未认识清楚。今后,我们不仅要继续加强和完善土壤微生物生态学的方法研究,如稳定同位素分子探针技术等;在内容上应重点开展典型污染土壤的微生物功能基因研究、构建基因文库及宏基因组学研究,探讨土壤污染过程的微生物生态适应机制,建立基于微生物多样性的土壤修复和生态恢复理论,以便尽早揭开土壤生命生态系统的神秘微观世界。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院地学部. 东南沿海经济快速发展地区环境污染及其治理对策. 地球科学进展, 2003, 18(4):493~496. Earth Ministry of Chinese Academy of Sciences. Environmental pollution and controlling countermeasure in rapid developing coastal region of Southeast China (In Chinese). Advance in Earth Sciences, 2003, 18(4): 493~496
- [2] Copley J. Ecology goes underground. Nature, 2000, 406: 452~454
- [3] Kuperman R G, Carreiro M M. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. Soil Biol. Biochem., 1997, 29:179~190
- [4] Hiroki M. Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. Soil Sci. Plant Nutr., 1992, 38:141~147
- [5] 滕应, 黄昌勇. 重金属污染土壤的微生物生态效应及其修复研究进展. 土壤与环境, 2002, 11(1): 85~89. Teng Y, Huang C Y. Ecological effect of heavy metals on soil microbes and research advances on the mechanisms of bioremediation (In Chinese). Soil and Environmental Sciences, 2002, 11(1): 85~89
- [6] Yamamoto H, Tatsuyama K, Uchwa T. Fungal flora of soil polluted with copper. Soil Biology & Biochemistry, 1985, 17:785~790
- [7] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev., 1995, 59: 143~169
- [8] 马万里. 土壤微生物多样性研究的新方法. 土壤学报, 2004, 41(1):103~107. Ma W L. A new method for research on soil microbial diversity (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(1):103~107
- [9] 李慧, 陈冠雄, 张颖, 等. 分子生物学方法在污染土壤微生物多样性研究中的应用. 土壤学报, 2004, 41(4):612~617. Li H, Chen G X, Zhang Y, et al. Application of molecular biotechniques and the study on microbial diversity in polluted soils (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(4):612~617
- [10] 陆雅海, 张福锁. 根际微生物研究进展. 土壤, 2006, 38(2): 113~121. Lu Y H, Zhang F S. The advances in rhizosphere microbiology (In Chinese). Soil, 2006, 38(2):113~121
- [11] 张瑞福, 崔中利, 李顺鹏. 土壤微生物群落结构研究方法进展. 土壤, 2004, 36(5):476~480. Zhang R F, Cui Z L, Li S P. Advance in methods for research on soil microbial community structure (In Chinese). Soil, 2004, 36(5):476~480
- [12] 章家恩, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述. 土壤, 2004, 36(4):346~350. Zhan J E, Cai Y F, Gao A X, et al. Review on laboratory methods for soil microbial diversity (In Chinese). 2004, 36(4):346~350
- [13] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57:2351~2359
- [14] Zak J C, Willing M R, Moorhead D L, et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. Soil Biology & Biochemistry, 1994, 26:1101~1108
- [15] Pennanen T. Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 27:291~300
- [16] 杨元根, 刘丛强, 吴攀登, 等. 贵州赫章土法炼锌导致的土壤重金属污染特征及微生物生态效应. 地球化学, 2003, 32(2):131~138. Yang Y G, Liu C Q, Wu P D, et al. Soil heavy metal accumulation induced by local smelting and its microbial environmental effects in Hezhang County, Guizhou Province (In Chinese). Geochemica, 2003, 32(2):131~138
- [17] 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 等. 铅锌银尾矿区土壤微生物活性及其群落功能多样性研究. 土壤学报, 2004, 41(1):113~119. Teng Y, Huang C Y, Luo Y M, et al. Microbial activities and functional diversity of community in soils polluted with Pb-Zn-Ag mine tailings (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(1):113~119
- [18] Liao, M., Xie, X. M., Subhani, A., et al. Combined effect of nutrient and pest managements on substrate utilization pattern of soil microbial population in hybrid rice cropping system. Pedosphere, 2002, 12(3): 219~228
- [19] Knight B. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or zinc. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 39~43
- [20] Kell J J, Tate R L. Effects of heavy metal contamination and remedi-

- ation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter. *Journal of Environmental Quality*, 1998, 27 (3) : 609 ~ 617
- [21] Bååth E, Diaz-Ravina M, Frostegård A, *et al.* Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 238 ~ 245
- [22] Yao H Y, Xu J M, Huang C Y. Substrate utilization pattern, biomass and activity of microbial communities in a sequence of heavy metal-polluted paddy soils. *Geoderma*, 2003, 115 (2) : 139 ~ 148
- [23] 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 等. 重金属复合污染下土壤微生物群落功能多样性动力学特征. *土壤学报*, 2004, 41 (5) : 735 ~ 741. Teng Y, Huang C Y, Luo Y M, *et al.* Kinetic characteristics of functional diversity of microbial community in soils polluted with mixed heavy metals (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41 (5) : 735 ~ 741
- [24] Haack S K, Garchow H, Klug MJ, *et al.* Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied Environmental Microbiology*, 1995, 61: 1458 ~ 1468
- [25] Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28: 213 ~ 221
- [26] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法. *应用生态学报*, 2004, 15 (5) : 899 ~ 904. Zhong W H, Cai Z C. Methods for study of soil microbial diversity (In Chinese). *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2004, 15 (5) : 899 ~ 904
- [27] Ibekwe A M, Kennedy A C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1998, 26: 151 ~ 163
- [28] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BIOLOG在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. *土壤学报*, 2004, 41 (3) : 156 ~ 161. Zhen H, Ou Y, Fang Z G, *et al.* Application of BIOLOG to study on soil microbial community's functional diversity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41 (3) : 156 ~ 161
- [29] Garland J L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1997, 24: 289 ~ 300
- [30] Lindström J E, Barry R P, Braddock J F. Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 30 (2) : 231 ~ 239
- [31] Garland J L, Lehman R M. Dilution/ extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1999, 30: 333 ~ 343
- [32] Yao H Y, He Z L, Campbell C D, *et al.* Some limitations of BIOLOG system for determining soil microbial community. *Pedosphere*, 2000, 10 (1) : 37 ~ 44
- [33] White D C. Chemical ecology: Possible linkage between macro- and microbial ecology. *OIKOS*, 1995, 74: 177 ~ 184
- [34] Zelles L. Identification of single cultured microorganisms based on their whole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure. *Chemosphere*, 1999, 39: 665 ~ 682
- [35] Yao H Y, He Z L, Huang C Y. Phospholipid fatty acid profiles of Chinese red soils with varying fertility levels and land use histories. *Pedosphere*, 2001, 11 (2) : 97 ~ 103
- [36] Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 3605 ~ 3617
- [37] Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biol. Biochem.*, 1996, 28: 55 ~ 63
- [38] Pennanen T, Perkiomäki J, Kikkilä O, *et al.* Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: Separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1998, 27: 291 ~ 300
- [39] White D C, Flemming C A, Leung K T, *et al.* *In situ* microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J. Microbiol. Methods*, 1998, 32: 93 ~ 105
- [40] Kelly J J, Häggblom M, Tate R L. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: A laboratory microcosm study. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, 31: 1455 ~ 1465
- [41] Olsson P A. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1999, 29: 303 ~ 310
- [42] Sara P B, Kamaludeen M, Megharaj R, *et al.* Microbial activity and phospholipid fatty acid pattern in long-term tannery waste-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56 (2) : 302 ~ 310
- [43] Maike S, Søren O, Petersen J, *et al.* Effects of *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* and *Eisenia fetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37 (11) : 2065 ~ 2076
- [44] Cavigelli M A, Robertson G P, Klug M J. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. *Plant and Soil*, 1995, 170: 99 ~ 113
- [45] Olsson S, Persson P. The composition of bacterial populations in soil fractions differing in their degree of adherence to barley roots. *Appl. Soil Ecol.*, 1999, 12: 205 ~ 215
- [46] Lindahl V, Frostegård A, Bakken L, *et al.* Phospholipid fatty acid composition of size fractionated indigenous soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 29: 1565 ~ 1569
- [47] Findlay R H. The use of phospholipid fatty acids to determine microbial community structure. *In: Akkermans A D L, van Elsas J D, de Bruijn F J. eds. Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer, Dordrecht*, 1996. 3.3.2: 1 ~ 18
- [48] Frostegård A, Petersen S O, Bååth E, *et al.* Dynamics of a microbial community associated with manure hot spots as revealed by phospholipid fatty acid analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 2224 ~ 2231
- [49] Torsvik V, Goksoy J, Dane F L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56: 782 ~ 787
- [50] Clegg C D, Ritz K, Griffiths B S. Broad-scale analysis of soil microbial community DNA from upland grasslands. *Antonie van Leeuwen-*

- hoek, 1998, 73:9 ~ 14
- [51] Holben W E, Harris D. DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Mol. Ecol.*, 1995, 4: 627 ~ 631
- [52] Tiedje J M, Asuming B S, N üslein K, *et al.* Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.*, 1999, 13: 109 ~ 122
- [53] Griffiths B S, Ritz K, Glover L A. Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: Application of the community DNA hybridization technique. *Microb. Ecol.*, 1996, 31: 269 ~ 280
- [54] Griffiths B S, Ritz K, Ebbelwhite N, *et al.* Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, 31:145 ~ 153
- [55] Griffiths B S, Diaz R 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
- [56] 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
- [57] Ørreås L, Jensen S, Daae F L, *et al.* Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 2 739 ~ 2 742
- [58] 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
- [59] Zhou J, Brouns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2):316 ~ 322
- [60] Smith E, Leeflang P, Wernars 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
- [61] 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
- [62] Kozdroj J, van Elsas J D. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Applied Soil Ecology*, 2001, 17 (1): 31 ~ 42
- [63] Muller A K. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology*, 2002, 44 (1): 49 ~ 58
- [64] Ellis R J. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (6): 3 223 ~ 3 230
- [65] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. *微生物学报*, 2003, 43(2):276 ~ 282. Zhang R F, Cao H, Cui Z L, *et al.* Extraction and purification of soil microbial total DNA (In Chinese). *Acta Microbiological Sinica*, 2003, 43 (2): 276 ~ 282
- [66] 张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁. 微生物生态学研究方法进展. *生态学报*, 2003, 23(5): 988 ~ 995. Zhang H X, Wang X Y, Qi H Y. Development in research methods of microbial ecology (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(5): 988 ~ 995
- [67] Saleema S L, Michelle M, Rachel G C, *et al.* Microbial gene expression in soil: Methods, applications and challenges. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 63(1): 1 ~ 19
- [68] Sebastian G, Ingrid G, Susanne G, *et al.* Design and evaluation of an oligonucleotide-microarray for the detection of different species of the genus *Kitasatospora*. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 65(2):226 ~ 236
- [69] Brim H, Heuer H, Krögerrecklenfort E, *et al.* Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can. J. Microbiol.*, 1999, 45:326 ~ 338
- [70] Liu W T, Marsh 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
- [71] Clement B G, Kehl L E, DeBord K L, *et al.* Terminal restriction fragment patterns (TREPs), a rapid PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Methods*, 1998, 31: 135 ~ 142
- [72] L üleman H, Arth I, Liesack W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66:754 ~ 762
- [73] 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
- [74] Roane T M, Pepper I L. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microb. Ecol.*, 2000, 38:358 ~ 364
- [75] Smit E, Leeflang P, Gandorf B, *et al.* Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 2 614 ~ 2 621
- [76] Kozdroj J, van Elsas J D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 43:197 ~ 212
- [77] Kozdroj J, van Elsas J D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, 32: 1 405 ~ 1 417
- [78] Muller A K. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36 (1): 11 ~ 19
- [79] Perkiomaki J. Boreal forest microbial community after long-term field exposure to acid and metal pollution and its potential remediation by using wood ash. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35 (11): 1 517 ~ 1 526
- [80] 陈敏, 赵立平. 焦化废水处理系统中不同培养基分离的细菌种群多样性. *微生物学报*, 2003, 43(2):366 ~ 371. Chen M, Zhao L P. Biodiversity of bacterial isolates on three different media from coking wastewater treatment systems (In Chinese). *Acta Micro-*

- biologica Sinica, 2003, 43 (2) :366 ~ 371
- [81] 张晓君, 马晓军, 姚檀栋, 等. 马兰冰芯 16S rDNA 的多样性与影响冰芯中微生物的环境因素. 科学通报, 2003, 48 (9) : 947 ~ 952. Zhang XJ, Ma XJ, Yao CD, *et al.* Microbial diversity of 16S rDNA and impact factors of ice in Ma Lan (In Chinese). Chinese Science Bulletin, 2003, 48 (9) :947 ~ 952
- [82] 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) : 335 ~ 339. 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 Pedologica Sinica, 2004, 41 (3) : 335 ~ 339
- [83] 赵祥伟, 骆永明, 滕应, 等. 重金属复合污染农田土壤的微生物群落遗传多样性研究. 环境科学学报, 2005, 25 (2) : 186 ~ 191. Teng Y, Luo Y M, Zhao X W, *et al.* Genetic diversity of microbial communities in farmland soils contaminated with mixed heavy metals (In Chinese). Acta Scientiae Circumstantiae, 2005, 25 (2) : 186 ~ 191
- [84] Boschker H T, Nold S C, Wellsbury P, *et al.* Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers. Nature, 1998, 392 : 801 ~ 805
- [85] Radajewski S, Ineson P, Parekh N R, *et al.* Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature, 2000, 403 : 646 ~ 649
- [86] Samantha A, Morris L, Radajewski S. Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable isotope probing. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (3) :1 446 ~ 1 453
- [87] Lu Y H, Lueders T, Friedrich M W, *et al.* Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing. Environmental Microbiology, 2005, 7 (3) : 326 ~ 336

MICROBIAL DIVERSITY IN POLLUTED SOILS : AN OVERVIEW

Teng Ying^{1,2} Luo Yongming^{1,2†} Li Zhengao^{1,2}

(1 Soil and Environment Bioremediation Research Centre, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 State Key Laboratory of Soil and Agricultural Sustainable Development, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Soil microbial diversity is an important content of soil microbial ecology, which is a new frontal field in ecology. Soil microbial diversity encompasses functional, structural and molecular genetic diversities of microbial community, and is a key indicator of stability and functions of soil eco-systems. This paper reviews current development in researches of the field of microbial diversity in polluted soils at home and abroad based on the methods of isolating culture and biomarkers, and the knowledge of microbial diversity from the angles of different ecological levels, and explores advanced approaches, new ideas and issues in the research on soil microbial ecological processes aiming at new problems in soil pollution the world is faced with.

Key words Polluted soils; Microbial diversity; BIOLOG system; Phospholipid fatty acid; Molecular polymorphism