

高产水稻土细菌多样性的培养法与非培养法比较研究^①

崔中利^{1,2}, 刘娟², 曹慧², 骆永明^{1*}, 赵其国¹

(1 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008;

2 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 利用细菌的通用引物扩增江西余江县高产水稻土细菌总 DNA 和平板培养细菌混合总 DNA 的 16S rDNA 基因片段, 在此基础上分别建立两种 16S rDNA 文库 (文库 a 和文库 b)。从两个文库中各随机挑选 100 个克隆, 扩增出阳性克隆中的插入片段后选用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两种四碱基酶进行 ARDRA (amplified rDNA restriction analysis) 分析。统计比较分析发现, 文库 a 的 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数、丰富度、均一度分别为 4.432、0.987、18.885 和 0.973, 均高于文库 b 中相应的多样性参数 (分别为 2.271、0.758、5.736 和 0.501), 即平板培养方法所展现的细菌群落结构多样性低于土壤中原有的多样性。结果表明, 传统培养方法存在着很大的局限性, 必须结合新的分子生物学技术手段才能更全面完善地认识土壤微生物群落结构多样性, 以期充分利用其中丰富的微生物资源。

关键词: 水稻土红壤; 平板培养细菌; 16S rDNA 克隆文库; ARDRA; 多样性指数

中图分类号: S154.3

土壤是一个极为复杂的生态系统, 微生物在其中起着重要的作用, 它们不仅是土壤中物质循环的驱动力, 也直接影响到土壤的理化性质^[1], 其代谢产物还可作为植物的养分或抗逆性物质。因此, 对土壤微生物多样性的研究一直是微生物生态学的重要内容。水稻土是中国最重要的耕作土壤类型, 主要分布在长江以南的热带亚热带地区。水稻生产以获得高产为追求目标, 高产水稻土在面积上虽然不是稻田的主体, 但对于确保粮食生产持续稳定上升却发挥了重要的作用^[2]。研究其中的微生物群落结构多样性以及微生物在稻田生态系统中的作用有助于针对性地进行土壤性质的改良, 达到高产的目的。为了研究微生物在水稻土红壤生态过程中的作用, 需要了解其中的微生物种类、功能等背景资料。长久以来, 人们都是利用传统的微生物学培养方法对土壤微生物进行研究^[3]。近年来, 人们日趋认识到传统的培养方法存在无法避免的局限性^[4], 而分子生物学技术和基因组学的不断成熟和广泛应用, 为微生物生态学的发展提供了新的研究方法, 人们可以从基因水平上深入了解复杂环境样品中的微生物功能、遗传和群落结构的多样性, 极大地丰富了人们对未培养微生物的认识, 为更好地开发利用环境中丰富的微生物资源提供了新的机遇^[5-7]。

本文以红壤地区长期定位试验的高产水稻土为实验材料, 构建了红壤细菌的 16S rDNA 文库, 同时以该样品平板培养的细菌构建相应的 16S rDNA 文库, 对两种文库中的克隆进行了限制性酶切多态性分析, 从另一个角度揭示红壤微生物群落结构, 为改善红壤当前的生态环境, 利用红壤微生物基因资源提供新的解决途径。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

长期定位试验的高产水稻土位于中国科学院红壤生态实验站, 该地区为中亚热带温暖湿润的季风气候, 年均温为 17.8℃, 年均降雨量为 1785 mm, 主要集中在 4—6 月。地形为低丘岗地, 海拔 35.0~54.6 m, 坡度为 5°~8°。土壤母质为第四纪红黏土^[8]。土地利用类型为高产水稻土。农作方式以双季稻为主。其气候、土壤、地形地貌等自然条件和轮作制、生产力水平等社会经济状况在中国南方亚热带地区具有典型代表性。土壤样品为 5 点混合样, 采样深度 0~20 cm。土壤采集后除去根系、石块等杂物并过 4 mm 筛, 然后存放于 4℃, 分别用于理化性质测定、微生物数量测定及土壤微生物总 DNA 提取。

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40371069) 和国家基础研究重大项目计划 (2005CB121108) 资助。

* 通讯作者 (ymluo@issas.ac.cn)

作者简介: 崔中利 (1972—), 男, 山东青岛人, 博士, 教授, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: czl@njau.edu.cn

1.2 主要菌株和试剂

pUC 18 质粒 (Amp^r)、大肠杆菌DH5 α 均由本实验室保存;限制性内切酶Hha I、Rsa I, Taq DNA聚合酶、TA克隆载体pMD18-T Vector购自Takara公司;蛋白酶K为德国MERK公司产品;溶菌酶、CTAB (十六烷基三甲基溴化铵), SDS (十二烷基磺酸钠), EDTA二钠盐购自南京赛吉生物公司, 引物合成、序列测定均委托上海英骏生物公司完成, DNA回收试剂盒购自V-gene 生物公司。

1.3 土壤微生物总 DNA 的提取与纯化

参考Zhou 等^[9]的直接提取法并进行了适当修正, 透析袋电洗脱纯化回收提取的土壤微生物总DNA^[10]。采用Maniatis等^[11]的紫外分光光度法定量土壤微生物总DNA, 并用 0.75% 的琼脂糖凝胶电泳检查提取DNA的质量和片段大小。

1.4 土壤细菌的培养与总 DNA 提取

选择实验室常用的细菌培养基 (牛肉膏蛋白胨培养基) 培养土壤中的细菌。采用常规稀释涂布平板法^[12]。用适量无菌生理盐水将 28℃ 条件培养的LB平板上 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释梯度的细菌小心洗下, 合并混匀后用生理盐水洗涤两次。12000 r/min离心 5 min 收集菌体, 5 ml TE缓冲液重悬后, 加溶菌酶至终浓度为 0.5 mg/ml, 37℃ 水浴 2 h。加饱和氯化钠溶液调整终浓度至 0.5 mol/L, 混匀后加入 40 μ l 蛋白酶K (10 mg/ml) 和 20% SDS (终浓度为 0.5%~1%), 50℃ 水浴至溶液澄清粘稠。加 1/3 体积的饱和NaCl剧烈震荡 15 s后, 12000 r/min离心 5 min, 收集上清至一灭菌离心管中, 加入 0.6 倍体积异丙醇混匀后沉淀, 12000 r/min 离心收集沉淀, 用 70% 乙醇洗涤、吹干后溶于 400 μ l 灭菌去离子水中。

1.5 细菌总 DNA 的 16S rDNA 的扩增和纯化

用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') 分别扩增两种来源的总DNA中的细菌 16S rDNA 片段。扩增反应体系: DNA (约 50 ng/ μ l) 0.5 μ l, Taq 聚合酶Buffer 2.5 μ l, dNTP (20 mmol/L) 2 μ l, 引物 27F 和引物 1492R (25 pmol/ μ l) 各 0.5 μ l, Mg^{2+} (25 mmol/L) 2 μ l, Taq 酶(5 U/ μ l) 0.5 μ l, 补水至 25 μ l。扩增 10 管重复, 扩增产物均匀混合以消除单次扩增的偏向性。反应条件: 95℃ 变性 5 min; 再接 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 20 min。反应完成后经 0.75%的琼脂糖电泳检测PCR产物。切胶回收目的片段。操作方法按照V-gene试剂盒说明。

1.6 两个 16S rDNA 文库的构建

纯化后的 16S rDNA 片段通过TA克隆技术连接

pMD18-T vector转化到*E. coli* DH5 α 中, 方法按分子克隆^[13]。涂布平板于 37℃ 培养 12~14 h后, 随机挑取克隆, 少量提取质粒验证插入片段的正确性。将阳性克隆转接到加氨苄青霉素的LB平板上, 构建 16S rDNA文库。其中以提取土壤细菌总DNA扩增的 16S rDNA构建的文库标记为文库a, 以平板上生长细菌的总DNA扩增 16S rDNA构建的文库标记为文库b。

1.7 转化子的 16S rDNA 插入片段的扩增和酶切

以 pMD18-T vector 多克隆位点两侧的引物 (Primer RV-M: 5'-GAGCGGATAATTTACACAGG-3', Primer M13-47: 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3') 扩增出阳性克隆中的 16S rDNA 插入片段。用 Hha I 和 Rsa I 两种限制性内切酶对 PCR 扩增的插入片段进行酶切 (37℃水浴过夜)。酶切产物跑 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经银染染色、脱色成像后即 16S rDNA 指纹图谱。

1.8 指纹图谱分析

所得 16S rDNA指纹图谱用Tanon凝胶分析软件辅以人工分析。以基因片段多态图像为基础进行聚类, 根据不同图像间的相似性将两种酶切后带型均相同的基因型归为一类, 每一个基因型即为一个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)^[14]。

1.9 群落结构多样性评价指数的计算方法^[15-16]

(1) Coverage C 文库的库容的计算公式为:

$$C = 1 - \frac{nl}{N} \quad (1)$$

式中, N 代表 16S rDNA 文库总克隆数, nl 代表在文库中仅出现 1 次的 OTUs 的数量。

(2) Shannon-Wiener 指数的计算公式为:

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i, \quad P_i = \frac{n_i}{N} \quad (2)$$

式中, S 为 16S rDNA 的所有 RFLP 总类型数; n_i 为第 i 种 16S rDNA 的 RFLP 类型克隆数, N 为总克隆数。

(3) Simpson 指数的计算公式为:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2 \quad (3)$$

(4) Margalef 物种丰富度指数的计算公式为:

$$d_{Ma} = \frac{S-1}{\ln N} \quad (4)$$

式中, S 为群落中所有物种数目, 也即物种丰富度。

(5) Evenness 均匀度指数的计算公式为:

$$E = \frac{H'}{H_{\max}} \quad (5)$$

1.10 序列测定和系统发育树构建

随机挑取 7 个克隆（其中文库 a 中挑选 4 个，文库 b 中挑选 3 个）测定其插入序列全长（1.5 kb 左右），委托上海英骏生物公司完成。序列编号分别为 JT7、JT25、JT33、HR24、HR31、HR57 和 HR85，依次登陆 Genebank 后获得登录号如下：DQ839379 ~ DQ839385。运用生物软件 BioEdit、ClustalX1.81 和 MEGA2.0 分析序列，构建系统进化树，判定测序克隆的系统发育地位。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物总 DNA 的提取与纯化

获得高浓度、多样性程度高的土壤微生物总 DNA 是进行土壤微生物群落结构分子生态学研究的基础。本实验中采用直接法即结合反复冻融的方式使微生物细胞易于裂解，并通过蛋白酶 K 和 20% SDS 裂解细胞提取土壤微生物的总 DNA，DNA 提取量为 $13.6 \mu\text{g/g} \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ 干土，经透析袋电洗脱纯化后为 $5.2 \mu\text{g/g} \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ 干土，纯化效率为 38.2%，吸光值 A260/A280 为 1.60 ± 0.05 ，所得纯化产物即可用于后续的 16S rDNA 扩增等分子生物学操作。

而对于从平板上洗下的细菌菌体，考虑到其多样性，很多较难裂解，因此在提取方法上较纯菌的提取略做改进，增加溶菌酶和蛋白酶 K 的使用量和作用时间，并在蛋白酶 K 作用时适当提高盐浓度以促进细胞裂解，使提取的总 DNA 更具有代表性。所提 DNA 吸光值 A260/A280 为 2.00 ± 0.05 。

2.2 两个 16S rDNA 文库的 RFLP 分析和比较

2.2.1 两个 16S rDNA 文库酶切类型统计分析 对文库 a 和文库 b 两种 16S rDNA 文库，小量提取质粒验证插入片段的正确性确定所构建文库的质量后，分

别从两个文库中各挑取 100 个克隆，经 PCR 获得其外源插入片段（约 1.5 kb），用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两种四碱基酶对扩增片段进行酶切，去除部分分辨不清的条带，对得到的清晰指纹图谱进行统计分析，共获得了 188 个 RFLP 类型，其中文库 a 87 个，文库 b 96 个。酶切类型的统计结果见表 1。研究表明^[17]，用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两种四碱基限制性内切酶对 16S rDNA 的酶切图谱界定的系统发育类型，代表的微生物之间的 16S rDNA 平均同源性达 95.6%，因此我们可以应用这种酶切图谱研究土壤环境中细菌类群的群落结构，反映其丰富的遗传多样性。

表 1 两个 16S rDNA 文库的克隆的 *Hha* I-*Rsa* I 酶切类型数目

Table 1 Number of *Hha* I-*Rsa* I RFLP phylotypes in two 16S rDNA clone libraries

参数	文库 a	文库 b
克隆数	95	93
<i>Hha</i> I- <i>Rsa</i> I 酶切类型数	87	27
只有 1 个克隆的 <i>Hha</i> I- <i>Rsa</i> I 酶切类型数	80	17
只有 1 个克隆的 <i>Hha</i> I- <i>Rsa</i> I 酶切类型所占的比例	84.21%	18.28%

从表 1 中可以看到，两个文库中均含有大量独特的 RFLP 类型。文库 a 和文库 b 中只有 1 个克隆的 *Hha* I-*Rsa* I 酶切类型数分别占总克隆数的 84.21% 和 18.28%。这可以看出文库 a 中包含了更为丰富的 RFLP 类型。

每一酶切类型即操作分类单元所对应的克隆子数量反映了该物种的丰富度，经过统计我们发现，平板可培养细菌中出现了相对优势的细菌类群，而土壤中的细菌群落则比较均一，几乎没有哪一类群的细菌占优势。（图 1）

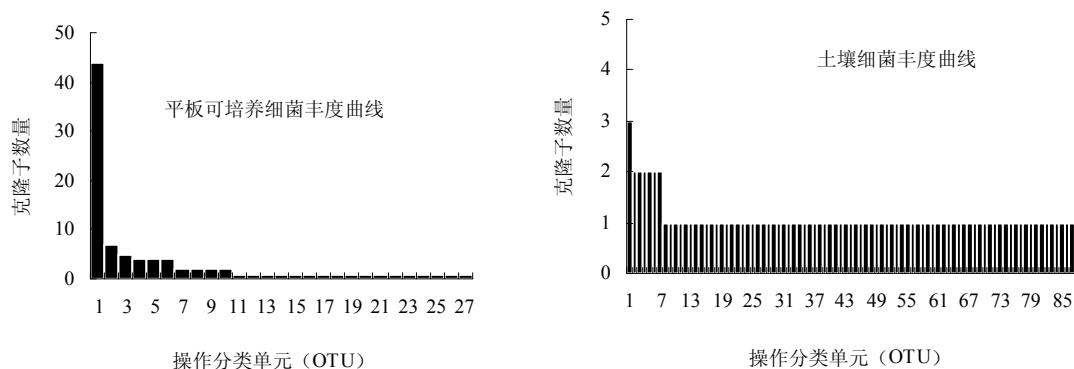


图 1 两个 16S rDNA 文库的细菌群落丰度曲线图

Fig. 1 Rank-abundance curves of bacterial community of two 16S rDNA clone libraries

2.2.2 两个 16S rDNA文库的多样性指数分析 应用多样性评价指标,我们对两个 16S rDNA文库的库容大小、RFLP类型的数量(即丰富度)和分布频率(即均匀度)进行了分析比较(表2)。所构建的 16S rDNA文库能否反映样本中细菌的种类与数量,首先需要考虑所构建文库的库容是否足以代表样本中细菌的多样性,我们通过两个克隆文库的种系丰度曲线(图1)和计算的Coverage C值对库容做出评价^[18-19]。一般来说,当丰度曲线趋于平缓或者达到平台期时,可认为 16S rDNA文库的库容已经基本足够,从图1中可看

到,文库b的曲线已经趋于平台而文库a的曲线仍处于上升阶段,也就是说,一定量相同克隆数目时,已足可以涵盖平板上生长的细菌的多样性,但却不能描述实际土壤中细菌丰富的多样性。相应的Coverage C值也反映出了这个问题,Coverage C值理论上表示克隆文库中所包含的细菌种类(OTU)占样品中全部细菌的类型的比例,文库b的库容达81.72%,可以认为容量已经基本满足要求,而文库a的库容仅15.79%,这说明土壤中实际的细菌多样性程度是很高的。

表2 两个 16S rDNA 文库的群落结构多样性参数

Table 2 Diversity indices based on *Hha*-*Rsa* RFLP phylotypes in 16S rDNA clone libraries

文库类型	RFLP 类型	库容 (C)	Shannon-Wiener 指数 (H)	Simpson 指数 (D)	丰富度 (d)	均一度 (E)
文库 a	87	15.79%	4.432	0.987	18.885	0.973
文库 b	27	81.72%	2.271	0.758	5.736	0.501

一般从两个方面来考虑土壤中物种的多样性,一方面是环境中物种数量的丰富度,即 species richness,另一方面是各物种的相对比例,即 species evenness。丰富度 (richness) 是根据文库中所包含的克隆和 OTU 的数量以及相对比例来预测样品中微生物的种类,环境中种群丰富度 (species richness) 越高,均一度 (species evenness) 越均一,则物种的多样性越高。数据显示,文库 a 的丰富度要高于文库 b 且均一度更趋向于 1。这也反映了实际土壤中的细菌多样性。

Shannon-Wiener 指数是综合反映丰富度和均一度两方面因素的一个多样性指数,数值越高则说明样品中微生物的多样性也就越丰富。Simpson 指数反映的则是种群分布的概率集中性,文库中该指数越高,说明假定从文库中随机选取出两个克隆且不放回,这两个克隆属于同一物种的几率越低,多样性程度也就越高。这两个指数同样说明了文库 a 中包含了丰富的微生物类群。

总之,文库 b 所代表的细菌类群遗传多样性低于文库 a,也就是说,平板培养得到的细菌种类、数量与原始土壤中的细菌群落结构存在很大的差别。由于实验室一般采用牛肉膏蛋白胨培养基培养细菌,这种营养丰富的培养基类型与土壤原始的营养环境差异相当大,这不仅使很多贫营养型的微生物无法生长,而且可能利于某几种微生物类群生长,使它们成为平板上的优势类群。因此,平板培养细菌的类群不能全面地代表土壤中细菌群落结构。

2.2.3 两个文库的系统发育分析 从文库中挑取 7 个阳性克隆(其中文库 a 4 个,文库 b 3 个)测定其插

入片段全长(1.5 kb 左右),测定后的序列经 RDP (ribosomal database project) 数据库 CHECK-CHIMERA 程序检验,无可能的嵌合片段(chimeric fragment)后,在 Gene Bank 中进行比对分析其相似和同源性较高的序列。将测序序列与不同类群的细菌进行比较并据此构建系统发育树,以明确这些从文库中挑选出克隆的系统发育地位(图2)。

根据聚类 and 同源性比较发现,文库 a 中的测序克隆未培养占绝大部分,这说明了土壤中未培养的微生物是占很大比例,而利用实验室的传统培养手段是远远不够的;而文库 b 中即平板上可培养的微生物则以假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)为主,说明它们在平板培养时是平板上的优势菌群。从系统进化树上可以看到,测序菌株中未培养的克隆和一些已培养的菌株有很高的同源性,这说明了红壤中存在着丰富而多样的微生物资源待开发。

3 讨论

(1) 比较传统的培养方法和分子生态技术的结果可以看出,后者分析出的微生物多样性远远高于用前者得到的结果,我们看到在分析的克隆数接近的情况下(a文库 95 个,b文库 93 个),a的覆盖率为 15% 左右,而b已基本覆盖了整个文库。测序结果显示a文库中主要是未培养微生物的 16S rDNA序列(图1),这些结果从一个侧面反映土壤中存在很多未培养微生物^[20]。

(2) ARDRA 分析 (amplified rDNA restriction analysis)^[21]是一种对 16S rDNA片段进行RFLP分析的

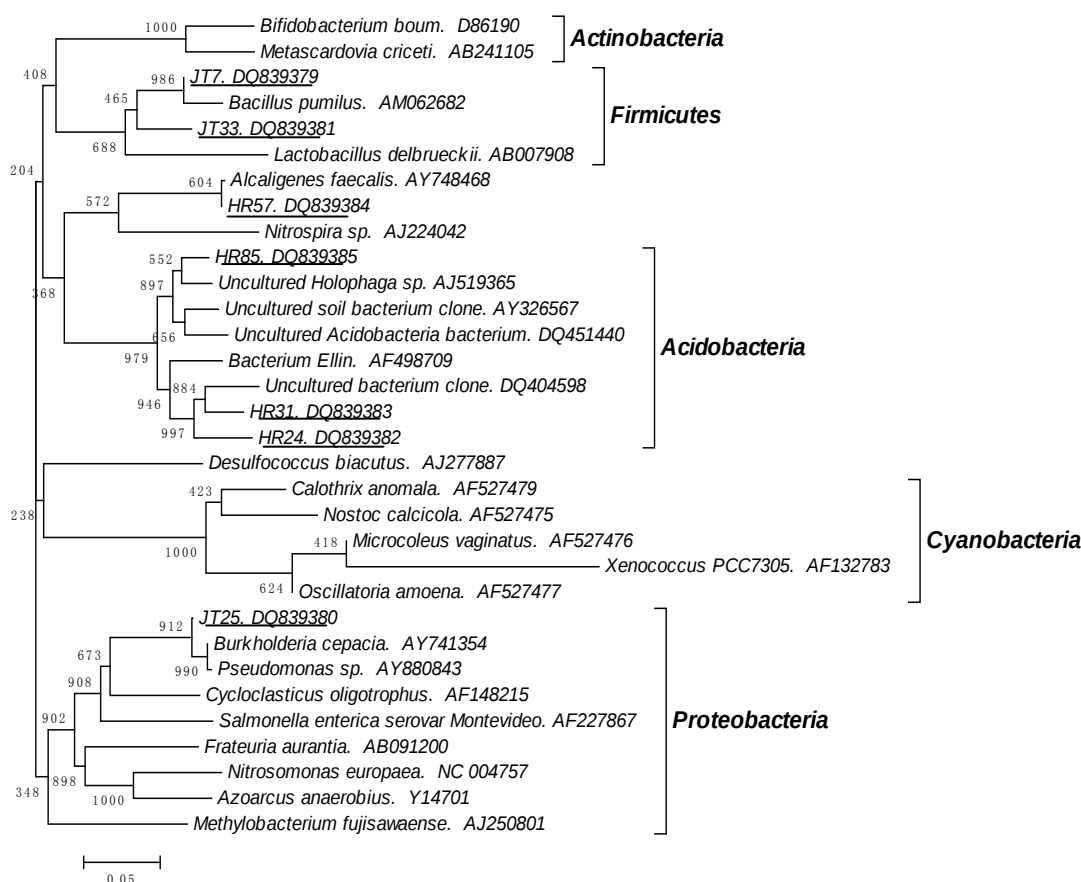


图2 基于16S rDNA的土壤细菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of soil bacteria based on 16S rDNA sequencing (Underlined: 16S rDNA sequenced in this work)

方法，其优点是不需要待分析16S rDNA片段的序列信息，因而适合对环境样品文库中大量16S rDNA片段的初步分析或是对这些16S rDNA进行测序前的简单筛选。尽管ARDRA分析方法对土壤微生物多样性的研究是定性的，但这种方法使微生物多样性的研究更直接。同时表明将ARDRA技术和不同的平板培养法结合对于定性分析可培养微生物的类群也具有一定的应用前景，可以有效地对可培养微生物的类群进行区分，粗略反映可培养微生物的类群数量，比传统的单纯培养法更精细地反映土壤中微生物的多样性。

(3) 在ARDRA分析的基础上，结合统计学数据和序列测定所得到的信息，反映出水稻土红壤的微生物群落中存在着丰富的功能、结构和遗传多样性。尽管有研究表明红壤中微生物的数量比较低^[22]，但由于红壤区特殊地理气候条件，其中同样可能存在较高的多样性，蕴涵着新的、有用的基因资源。同时，水稻土是中国最重要的耕作土壤类型，主要分布在长江以南的热带亚热带地区。微生物在土壤物质循环和作物养分供给中发挥着重要作用，对水稻土红壤的微生物群

落结构的深层次研究有助于有针对性地进行土壤性质的改良，以达到高产的目的，也有利于解决我国红壤地区的资源利用、生态环境与土壤退化等问题。

参考文献：

- [1] 姚槐应, 何振立, 黄昌勇. 不同土地利用方式对红壤微生物多样性的影响. 水土保持学报, 2003, 17(2): 51-55
- [2] 李忠佩, 张桃林, 陈碧云. 江西余江县高产水稻土有机碳和养分含量变化. 中国农业科学, 2006, 39(2): 324-330
- [3] 郑华, 欧阳志云, 王效科, 方治国, 赵同谦, 苗鸿. 不同森林恢复类型对土壤微生物群落的影响. 应用生态学报, 2004, 15(11): 2019-2024
- [4] 叶姜瑜, 罗固源. 未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展. 微生物学通报, 2004, 31: 111-115
- [5] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbial. Rev., 1995, 59: 143-169
- [6] Fernandez LA. Exploring prokaryotic diversity: There are other molecular worlds. Molecular Microbiology, 2005, 55(1): 5-15

- [7] Jo Handelsman. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Biology Reviews*, 2004, 68: 669–685
- [8] 雷志栋, 杨诗秀, 谢森传. 土壤水动力学. 北京: 清华大学出版社, 1988: 231–236
- [9] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 316–322
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里齐 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998
- [11] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Woodbury, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1982: 440–468
- [12] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 土壤微生物学. 北京: 中国农业出版社, 1996
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Woodbury, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989: 34–64
- [14] Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 2501–2507
- [15] Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. Using ecological diversity measure with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43: 1–11
- [16] Dunbar J, Barns SM, Ticknor LO, Kuske CR. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 3035–3045
- [17] Vaneechoutte M. Evaluation of the applicability of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Research in Microbiology*, 1995, 146(8): 633–644
- [18] Good IL. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40: 237–264
- [19] Bohannon BJ, Hughes J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Current opinion in Microbiology*, 2003, 6: 282–287
- [20] Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M, Kamagata Y. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 2162–2169
- [21] De Rouck A, Fiers T, Claeys G, Kersters K. Rapid identification of bacteria of the comamonadaceae with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, 93: 227–234
- [22] 陈国潮, 何振立, 黄昌勇. 红壤微生物生物量碳周转及其研究. *土壤学报*, 2002, 39 (2): 151–161

Comparison of Bacterial Diversity from a Rice Soil in Jiangxi Province by Cultivation and Uncultivation Method

CUI Zhong-li^{1,2}, LIU Juan², CAO Hui², LUO Yong-ming¹, ZHAO Qi-guo¹

(¹ Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; ² Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The objective of this study was to compare the diversity of the cultivable bacteria with the diversity of the total bacterial population in soil. Two 16S rDNA libraries, library a and library b, were constructed with DNA extracted directly from soil and cultivable bacteria derived from red soil in Jiangxi. About 100 positive clones selected randomly from each library were investigated by ARDRA (amplified rDNA restriction analysis). After PCR amplification of insert fragments, restricted digestion of the PCR products were carried out with two restriction enzymes, namely *Hha* and *Rsa*. The statistic data showed that, Shannon-Wiener index, Simpson index, Richness and Evenness of library a were 4.432, 0.987, 18.885 and 0.973, and all of them were higher than those of the counterparts of library b which were 2.271, 0.758, 5.736 and 0.501. It indicated that traditional cultivation methods have its limitations and difficulties in exploring the diversity and potential of microbial communities. But associate with the new molecular technology, we can analyze the diversity of the microorganism community, evaluate the ecology environment and exploit the microorganism gene resources.

Key words: Red soil, Cultivable bacteria on plate, 16S rDNA library, ARDRA, Diversity indices