

甘肃西峰黄土中细菌16S rDNA文库的 构建与组成初步分析

黄晟¹, 陈旻^{1*}, 潘雪莲², 崔益斌², 季峻峰¹, 陈骏¹

1. 表生地球化学教育部重点实验室, 南京大学 地球科学与工程学院, 南京 210093;
2. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学 环境学院, 南京 210093

摘要: 对黄土高原西峰地区黄土沉积物中的有机质进行了总DNA提取和PCR(聚合酶链式反应)扩增,通过克隆测序技术构建了含有44个克隆子的细菌16S rDNA文库。对16S rDNA系统发育的分析表明,西峰地区的黄土沉积物中细菌可分属13个类群,包括:酸杆菌(Acidobacteria)、变形菌(Proteobacteria)、放线菌(Actinobacteria)、绿弯菌(Chloroflexi)、厚壁菌(Firmicutes)、疣微菌(Verrucomicrobia)、浮霉菌(Planctomycetes)、芽单胞菌(Gemmatimonadetes)、异常球菌-栖热菌(Deinococcus-Thermus)、硝化螺旋菌(Nitrospirae)、蓝细菌(Cyanobacteria)、拟杆菌(Bacteroidetes)和Candidate division TG1。其中酸杆菌为最主要优势类群,变形菌为次优势类群,二者占黄土细菌总克隆数的70%,且大多为不可培养的基因型。

关键词: 黄土; 16S rDNA文库; 细菌多样性; 酸杆菌

中图分类号: P539.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-7493(2012)04-0765-08

Construction and Preliminary Analysis of the 16S rDNA Clone Library of Bacteria in the Xifeng Loess Section, the Northwest of China

HUANG Sheng¹, CHEN Yang^{1*}, PAN Xuelian², CUI Yibin², JI Junfeng¹, CHEN Jun¹

1. Key Laboratory of Surficial Geochemistry (Ministry of Education), School of Earth Sciences and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: The development of culture-independent techniques using nucleic acids has provided much new insight into studies of microbial diversity of soils. In this study, the bulk DNA was extracted and purified from the loess deposit in the Xifeng Section, the northwest of China, and subjected to PCR amplification with primers specific for 16S rRNA gene sequences (rDNAs). Then a 16S rDNA clone library was constructed and 44 clones were sequenced. Phylogenetic analysis of these sequences revealed extensive diversity. Guided by the phylogenetic tree, bacteria fell into 13 main lineages: Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Deinococcus-Thermus, Nitrospirae, Cyanobacteria, Bacteroidetes and Candidate division TG1. It is striking to find that the Acidobacteria division was the most abundant phylogenetic group in loess, occupying 43.3% of total clones. Acidobacteria group includes 17 gene types and 65 clones, most of which are uncultured type. The Proteobacteria division (26.7%) was the second-predominant bacterial community, including 13 gene types and 40 clones. These two divisions (accounting for 70% of clones) represented the majority of the identified phylotypes in loess. However, further study is needed to probe into the function and environmental implications for the two predominant bacterial communities in loess.

Key words: Loess; 16S rDNA clone library; Bacterial diversity; *Acidobacteria*

Corresponding author: CHEN Yang, Associate Professor; E-mail: chenyang@nju.edu.cn

收稿日期: 2011-02-26; 修回日期: 2011-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(40331001; 40603019; 41021002)

作者简介: 黄晟,男,1983年生,地球化学专业,硕士; *通讯作者: 陈旻,副教授,研究方向为表生地球化学; E-mail: chenyang@nju.edu.cn

土壤是一个固、液、气三相组成的高度异质环境,含丰富的微生物群落,它们是土壤中最活跃的部分,参与土壤生物化学过程、有机物的分解转化、菌根的形成、与植物互利共生等,在推动土壤物质转换、能量流动和生物地球化学循环中起着重要作用(Elsas et al., 1998)。过去传统的分离培养和鉴定方法只能获得1%左右的微生物群落特征(Torsv et al., 1990),难以深入了解土壤微生物群落分布、多样性组成、环境影响因素等方面信息。近年来,分子生物学技术迅猛发展,并被运用到土壤微生物多样性研究中,极大地推动了在DNA分子水平上探讨土壤微生物群落结构、生态系统功能和环境效应等方面的研究。

我国西北地区黄土高原作为一个大规模内陆连续的风成沉积区域倍受研究学者的瞩目,其发育的黄土-古土壤-红粘土序列在重建晚新生代以来东亚古季风气候和环境变迁与演化方面占有非常重要的地位(An, 2000; Guo et al., 2002)。以往研究主要从黄土和古土壤的物理与化学性质,如磁化率(An et al., 1991)、粒度(Ding et al., 1994)、Rb/Sr值(Chen et al., 1999)、游离铁/全铁值(郝青振和郭正堂, 2001)等参数来作为揭示和重建东亚季风演变的指标,而有关微生物的研究却十分薄弱,仅有几篇文献报道了可培养的微生物种群及趋磁细菌的特征及功能(滕志宏和郭爱莲, 1996; 贾蓉芬等, 2001)。风成的黄土沉积物实质是一种埋藏的古代土壤,在其风化成壤过程中,微生物必定起了不可忽略的重要作用。因此,开展黄土微生物多样性的研究将有助于了解黄土中微生物资源及其分布,可为黄土古环境研究提供新视角。

西峰黄土位于黄土高原中部现存面积最大、保存最完整的董志塬东缘,出露有第四纪的黄土-古土壤序列和晚第三纪的红粘土序列(孙有斌等, 2001),是开展晚第三纪以来陆相风尘堆积的岩性、磁性地层、地球化学、矿物学及古气候变迁研究的经典地区之一(如Kukla, 1987; Liu et al., 1995; Guo et al., 2001; Jahn et al., 2001)。本文选取西峰黄土沉积物为研究对象,采用16S rDNA测序法,通过16S rDNA克隆文库测序,构建系统发育树,旨在了解黄土中细菌的种类和组成

情况,为进一步开展黄土优势细菌种群的功能及其环境效应提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集

西峰黄土剖面位于甘肃省西峰市以东约16 km的胡家峡险村(107.78° E, 35.58° N)。样品取自地面以下50 cm处(马兰黄土顶部),去除表层覆盖,暴露出新鲜面,用无菌铲子挖出约500 g黄土样品,取两个平行土样混匀,快速装入已灭菌的离心管中,密封并编号。采样时用车载冰箱临时保存样品(提前准备好的冰袋使冰箱温度保持在0℃左右),采样结束后将土样放入-20℃冰箱冷藏,回实验室后放入-80℃冰柜低温保藏。

1.2 主要试剂和仪器

脱腐缓冲液: 100 mmol · L⁻¹ Tris, 100 mmol · L⁻¹ Na₄P₂O₇, 100 mmol · L⁻¹ Na₂ EDTA, 质量分数为1.0% PVP, 100 mmol · L⁻¹ NaCl, pH 10.0(席峰等, 2006); DNA提取缓冲液: 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol · L⁻¹ EDTA, 100 mmol · L⁻¹ Na₃PO₄, 1.5 mol · L⁻¹ NaCl, 质量分数为1% CTAB, 质量分数为2% CaCl₂, pH 8.0(Zhou et al., 1996)。

RNase A(MBI), 蛋白酶K(MBI), 溶菌酶(MBI), 限制性内切酶(TaKarap), Ex Taq DNA Polymerase(TaKarap); 无菌操作台(SW-CJ-1FD), PCR仪(Bio-Rad), 紫外/可见分光光度计(上海凌光), DNA胶回收试剂盒(Sangon), 琼脂糖凝胶电泳装置(Bio-Rad), 引物由上海生工合成。

1.3 样品总DNA的提取和纯化

采用Zhou等(1996)的方法进行土壤总DNA的提取和纯化。

1) 样品的脱腐: 在无菌操作台中称取0.5 g土壤样品, 加入2.5 mL脱腐缓冲液, 涡旋混匀, 12 000 r/min离心5 min, 重复加入脱腐缓冲液涡旋离心, 直至上清液颜色与洗涤缓冲液颜色无明显差异为止。样品处理后立即用于下一步实验。

2) 基因组总DNA的提取: 在经过脱腐处理的土壤样品中加入1.35 mL DNA提取缓冲液, 涡旋振荡混匀后, 加入40 μL溶菌酶溶液, 于摇床上225 r/min 37℃震荡20 min, 再加入蛋白酶K溶液,

225 r/min 37℃震荡1 h, 加入160 μ L 20% SDS, 轻摇混匀, 于65℃水浴1 h (每隔15 min轻柔地颠倒一次)。6000 r/min离心10 min, 转移上清液至新离心管中, 向离心管中加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 4℃下12 000 r/min离心10 min, 吸取上清液至新离心管中。加入0.6倍体积异丙醇, 0.1倍体积3M NaAc (pH5.2), 混匀, 置于4℃冰箱1h, 沉淀DNA。从冰箱中取出样品, 于4℃下10 000 r/min离心10 min, 弃上清液, 用预冷的70%乙醇洗涤2~3次, 冷冻干燥后溶于500 μ L TE缓冲液中。

3) DNA的纯化: 在DNA的粗提液中加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 颠倒混匀, 4℃下12 000 r/min离心20 min, 取上清液, 加入0.1倍体积3M NaAc (pH5.2), 颠倒混匀, 加入0.6倍体积异丙醇4℃沉淀DNA 1 h, 12 000 r/min 4℃离心20 min, 弃上清液, DNA 沉淀用冷的70%乙醇洗涤2次, 冷冻干燥后溶于50 μ L灭菌TE缓冲液中。

4) 提取产物用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 PCR扩增和产物纯化回收

对所获的总DNA稀释10~100倍, 再加入PCR反应(聚合酶链式反应)体系。PCR扩增对象为16S rDNA, 采用细菌通用引物(Sangon): 上游引物Eubac 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和下游引物Eubac 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 进行扩增(Lane, 1991)。PCR反应条件为: 94℃预变性5 min, 30个循环为94℃ 1 min, 55℃ 1 min和72℃ 1 min, 最后在72℃下延伸10 min, 4℃保存。PCR反应产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 并用UNIQ-10柱式通用DNA 纯化试剂盒进行回收纯化。

1.5 克隆和测序

采用pMDTM19-T Vector在16℃连接16S rDNA PCR产物6 h, 转化到E.coli DH5 α 感受态细胞中, 涂布接种于含有X-gal和氨卡青霉素(Amp)的LB培养基上, 37℃培养16 h。通过蓝白斑法筛选阳性克隆子, 用M13引物进行菌落PCR扩增。对PCR产物进行扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析(ARDRA), 分别用核酸限制性内切酶Msp I和Afa I完全酶切。酶切产物用3%琼脂糖凝胶电泳检测。借助Quantity One软件, 分析产物经酶切后的

谱型, 计算每个谱型的出现频率, 将具有不同谱型的克隆子进行测序。测序工作由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.6 序列分析

将获得的16S rDNA序列提交GeneBank数据库(<http://www.ncbi.com>), 获得数据库中注册号为GQ214086-GQ214129。在GeneBank数据库中用BLAST进行检索和同源性比较, 使用CHIMERA_CHECK和Pintail在线分析所得序列中可能的嵌合体和其他的异常二级结构。利用Clustal X程序进行序列比对分析, 并用Mega 3.0 软件对序列进行最小相邻法(Neighbor Joining)构建系统发育树, Bootstrap检验系统树, 自展数为1000。

2 结果和分析

2.1 DNA提取与PCR扩增

通过前述实验方法, 得到西峰黄土样品总DNA片断大小约为20 kb, 较为完整且纯度高(图1), 可以满足进一步的分子生态学分析。

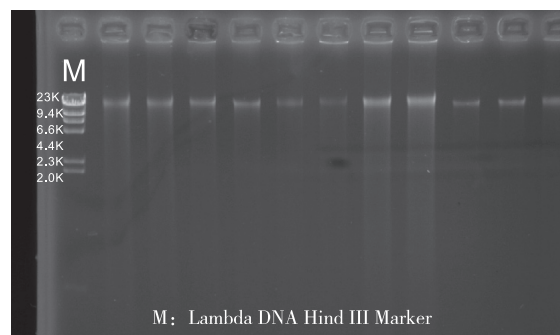


图1 西峰黄土样品总DNA琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from the Xifeng loess samples

提取的DNA经纯化后进行PCR扩增, 采用touchdown降落式PCR扩增策略(Erik et al., 1999), 适当降低了PCR循环数和模板浓度, 加长延伸时间, 提高了样品的扩增特异性, 并且将3个平行样品的多份PCR反应产物混合, 使结果更能代表该地区的微生物群落结构特征。最后得到16S rDNA序列, 长度约为1500 bp。所得产物纯度高, 可用于克隆(图2)。

2.2 细菌16S rDNA克隆文库构建和分析

采用M13通用引物对蓝白斑筛选所挑选的白色克隆子进行了菌落PCR, 以验证插入片段的大小。

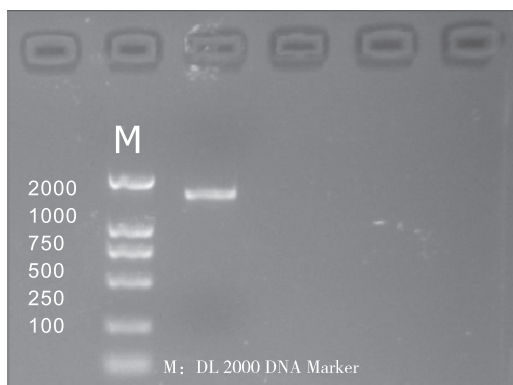


图2 西峰黄土细菌16S rDNA PCR纯化产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA gene extracted from the Xifeng loess sample

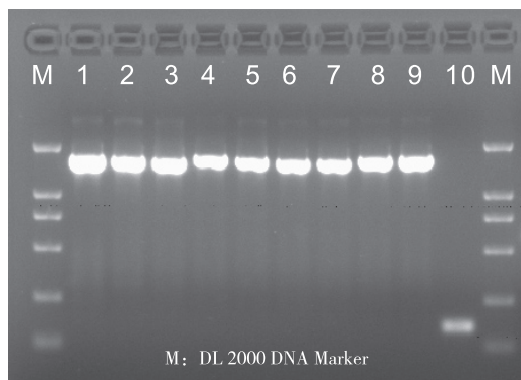


图3 阳性克隆子的菌落PCR产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of colony PCR amplified products of positive clones

图3为部分菌落PCR验证结果，正常产物大小约为1500 bp，10号泳道代表着假阳性克隆子，故从分析中去除。通过菌落PCR验证，最后共挑取999个阳性克隆子（编号P001—P999）来构建西峰黄土细菌16S rDNA克隆文库。

从文库中随机挑取153个克隆子进行16S rDNA扩增片段的限制性酶切分析，共得到84个分类学单元（OTUs）。通过稀释曲线（Rarefaction curve）可以评估所挑选的克隆子是否能充分代表黄土中细菌群落的16S rDNA多样性。由图4可以看出，在挑选克隆数逐步增加的过程中，西峰黄土细菌Rarefaction曲线已经逐渐进入平缓阶段，说明所分析的克隆数量已经能较好地反映环境中微生物的多样性。同时，还可以看出黄土细菌的多样性仅略低于海南红树林土壤。

从84个不同ARDRA谱型的克隆中，各挑一个克隆测序，共获得84条长约1500 bp的16S rDNA序

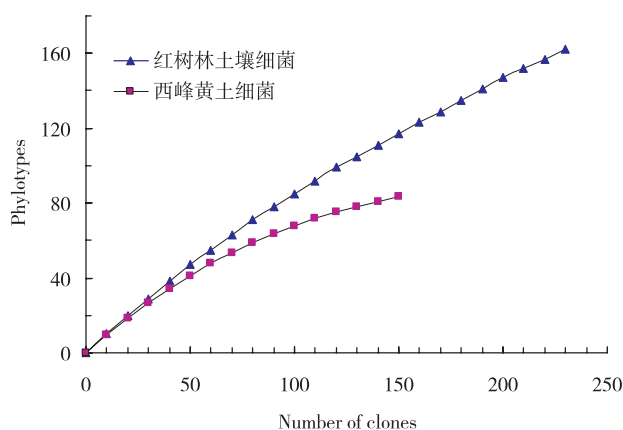


图4 西峰黄土细菌16S rDNA文库稀释曲线
（选取海南红树林土壤细菌为参照，据阎冰，2007）

Fig. 4 Rarefaction curve for bacterial 16S rDNA clone library derived from the Xifeng loess sample
(compared with soil bacteria from the mangrove forest in Hainan, Yan, 2007)

列。使用CHIMERA_CHECK，Pintail软件检验，去除嵌合体等异常序列3条。使用DNAMAN进行同源性比较，将相似度 $\geq 97\%$ 的序列归为一类，只挑选其中的一条作为代表。这样，共得到44种不同基因型的16S rDNA序列，在GenBank数据库中的注册号为GQ214086-GQ214129。

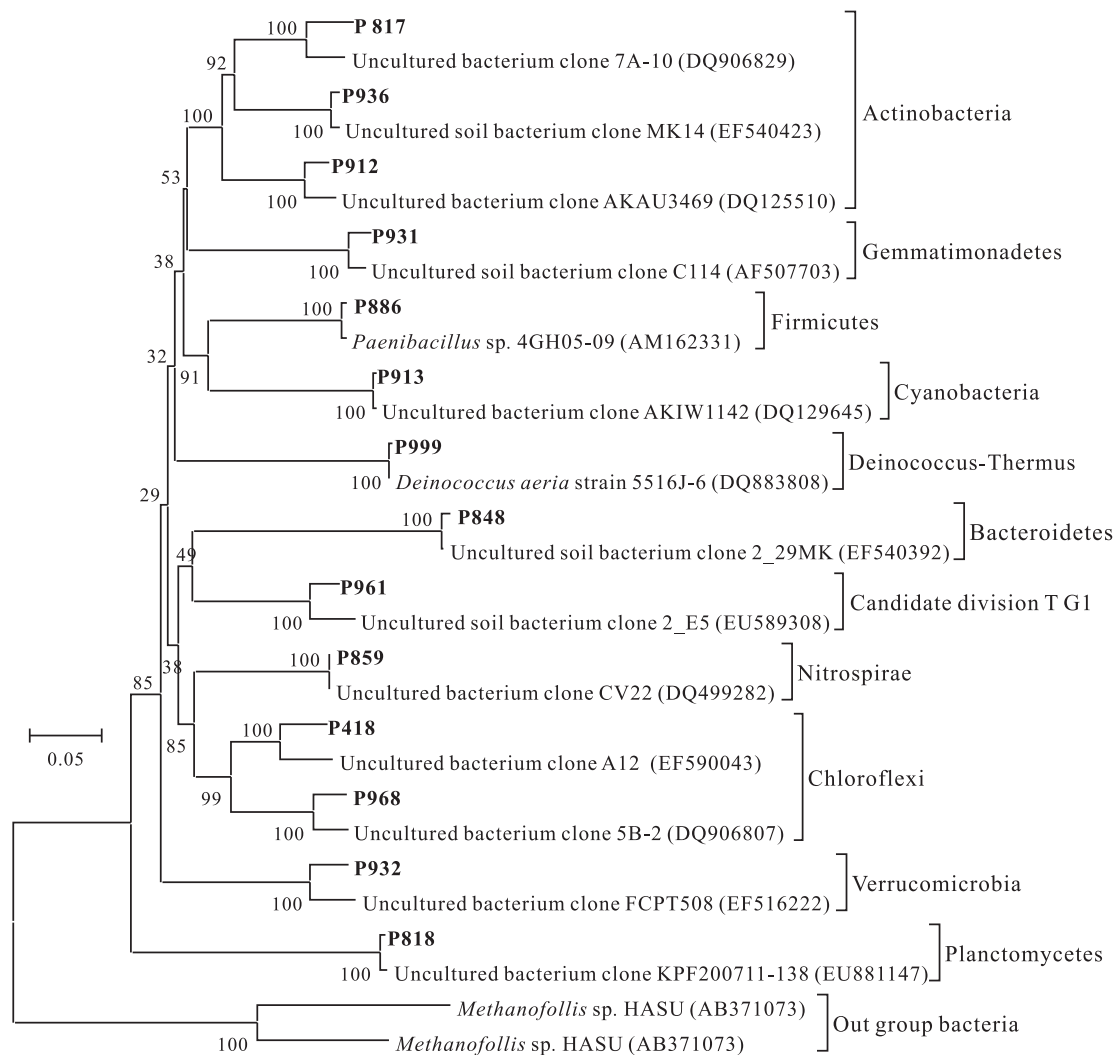
通过GenBank Blast比对，本研究所获得的44个16S rDNA序列与数据库中最相似序列的相似率处于91%~99%，其中有19个相似率 $< 97\%$ （占总克隆的43%），说明有很大一部分属于尚未发现的基因型。

2.3 黄土细菌类群及系统发育分析

对44个基因型的克隆、数据库中与它们具有最大同源性的菌株或克隆，以及部分主要细菌群落内代表性菌株的16S rDNA序列进行系统发育树的构建（图5—图7）。

系统发育树表明44个基因型分属于13个细菌类群：酸杆菌门（Acidobacteria）、变形菌门（Proteobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）、绿弯菌门（Chloroflexi）、厚壁菌门（Firmicutes）、疣微菌门（Verrucomicrobia）、浮霉菌门（Planctomycetes）、芽单胞菌门（Gemmatimonadetes）、异常球菌—栖热菌（Deinococcus-Thermus）、硝化螺旋菌门（Nitrospirae）、蓝细菌门（Cyanobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）和Candidate division TG1。各细菌类群在文库中所占的比例见图8。

西峰黄土中主要优势细菌类群分析如下：



不含变形菌门和酸杆菌门; 发育树采用邻接法; 分支数值代表1000次计算后的置信度; 比例尺表示遗传距离
Acidobacteria and *Proteobacteria* are not included in the phylogenetic tree. The tree was constructed via the neighbor-joining method. Numbers on branch nodes are bootstrapping values (1000 resamplings). The scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position.

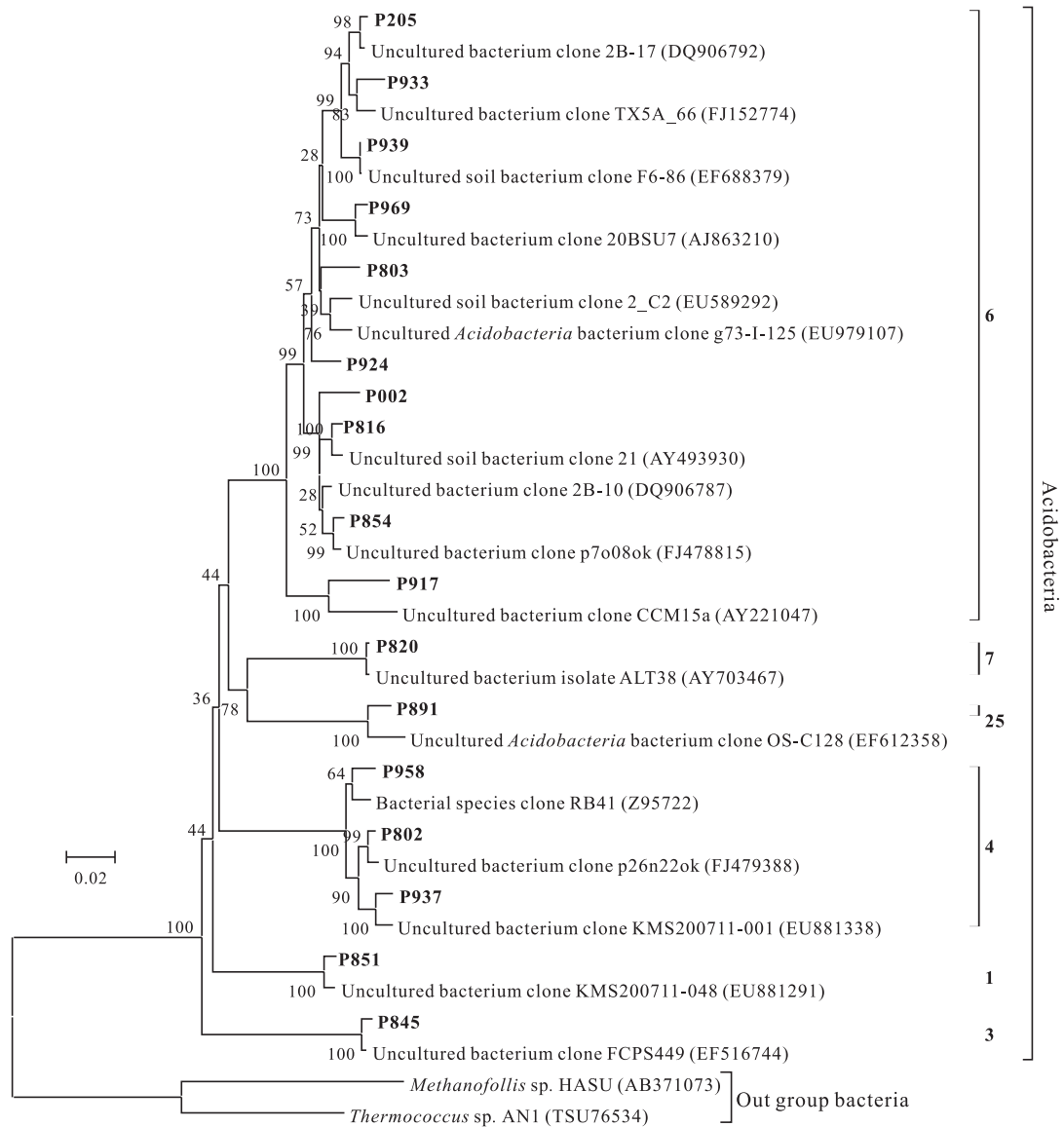
图5 西峰黄土细菌16S rDNA克隆系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of bacteria based on 16S rDNA sequences from the Xifeng loess

(1) 酸杆菌门 (*Acidobacteria*)

酸杆菌是西峰黄土中第一优势类群, 包含了17个基因型, 65个克隆, 所占比例为43.3% (图6, 图8)。它们大多为未发现的基因型, 有10个基因型与数据库中最相似序列的相似率 $\geq 97\%$, 这些最相似序列全部是不可培养的。酸杆菌广泛存在于自然界中, 在各土壤细菌16S rDNA 克隆文库中的含量可高达10%~50% (Ward et al., 2009)。虽然土壤pH值越低, 酸杆菌会越富集 (Fierer et al., 2007), 但在一些弱酸性或中偏碱性土壤中也较为富集。例如在宁夏水稻土 (张建萍等, 2008) 和山西柠条种植区中根际土和自然土 (张薇等,

2007) 中均发现酸杆菌为优势类群之一, 这表明发育于相同母质的土壤具有相似的微生物多样性, 并且酸杆菌可能是以黄土为母质的土壤中的优势类群。通过对3000 多条酸杆菌16S rRNA 基因序列的分析, 发现它们可以进一步分成26个系统发育亚单元 (Subgroup1-Subgroup26, Barns et al., 2007), 其分支宽幅不亚于变形菌门。从西峰黄土获得的酸杆菌克隆中, 44.6%属于Subgroup6, 33.8%属于Subgroup4, 9.2%属于Subgroup7, 6.2%属于Subgroup25, 4.6%属于Subgroup3, 1.5%属于Subgroup1。由于在实验室分离和培养酸杆菌门细菌困难重重, 对这类细菌与环境温度、pH、碳氮



采用邻接法；分支数值代表1000次计算后的置信度；比例尺表示遗传距离
The tree was constructed via the neighbor-joining method. Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 resamplings).
The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position

图6 西峰黄土酸杆菌门细菌16S rDNA克隆系统发育树

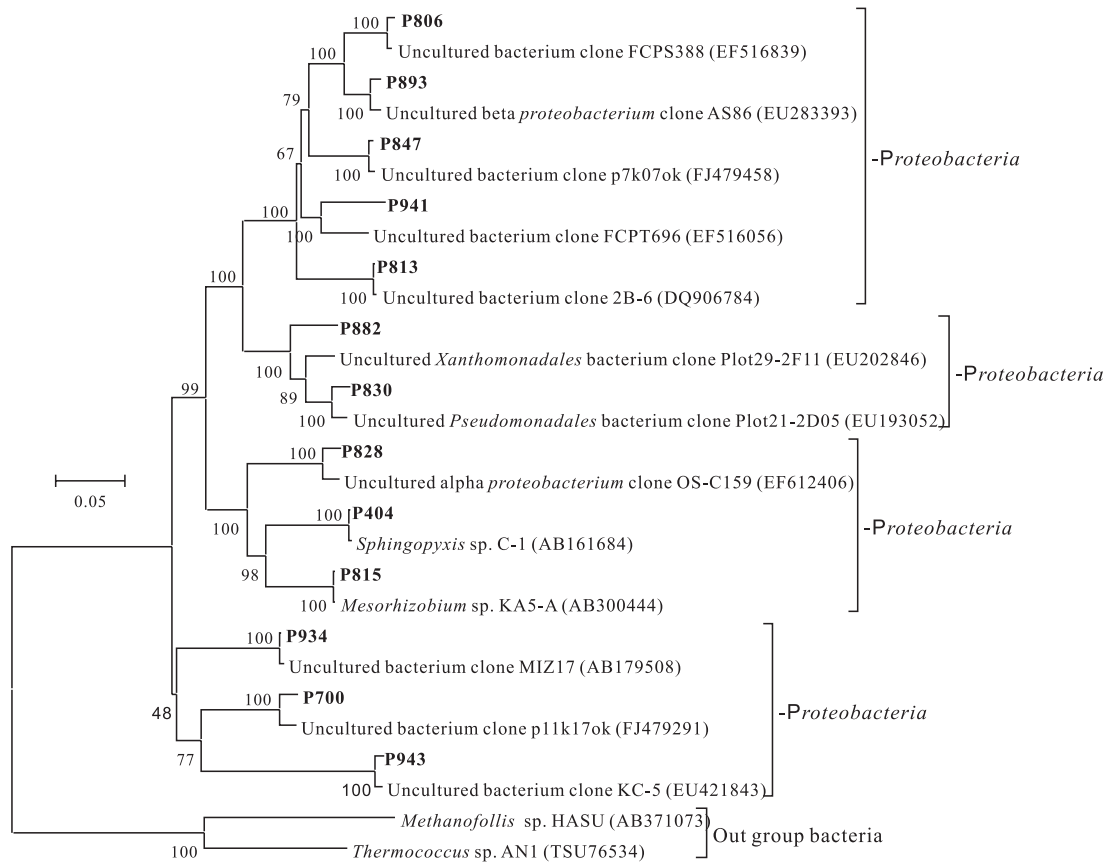
Fig. 6 Phylogenetic tree of Acidobacteria 16S rDNA sequences from the Xifeng loess

含量及土壤类型等因素的关系还不明确，一般认为酸杆菌群落与土壤有机碳浓度及pH值关系密切（Fierer et al., 2007），而其在黄土中的生理特性及生态功能还需进一步研究。

（2）变形菌门（*Proteobacteria*）

变形菌是西峰黄土中第二优势类群，包含了13个基因型，40个克隆（26.7%），其中3个基因型属于 α -变形菌，5个基因型属于 β -变形菌，2个基因型属于 λ -变形菌，3个基因型属于 δ -变形菌（图7，图8）。变形菌是世界上多样化最高的细

菌类群，平均占土壤细菌群落的39%（Janssen, 2006），其代谢方式多种多样。本研究发现变形菌中存在一些贫营养、耐干旱的种属，如基因型P404最接近的可培养细菌是*Sphingopyxis alaskensis*，相似率高达99%。*S. alaskensis*为一种专性好氧、化学异养的杆状革兰氏阴性超微细菌（Ultramicrobacteria），只有在稀释的培养基内才能得以培养，具有形体微小、耐饥饿、生长缓慢、抵抗力强，对矿物盐和有机质极其敏感的特征（Ohta et al., 2004）。最接近基因型P815的可



采用邻接法; 分支数值代表1000次计算后的置信度; 比例尺表示遗传距离
The tree was constructed via the neighbor-joining method. Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 resamplings).
The scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position.

图7 西峰黄土变形菌门细菌16S rDNA克隆系统发育树
Fig. 7 Phylogenetic tree of Proteobacteria 16S rDNA sequences from the Xifeng loess

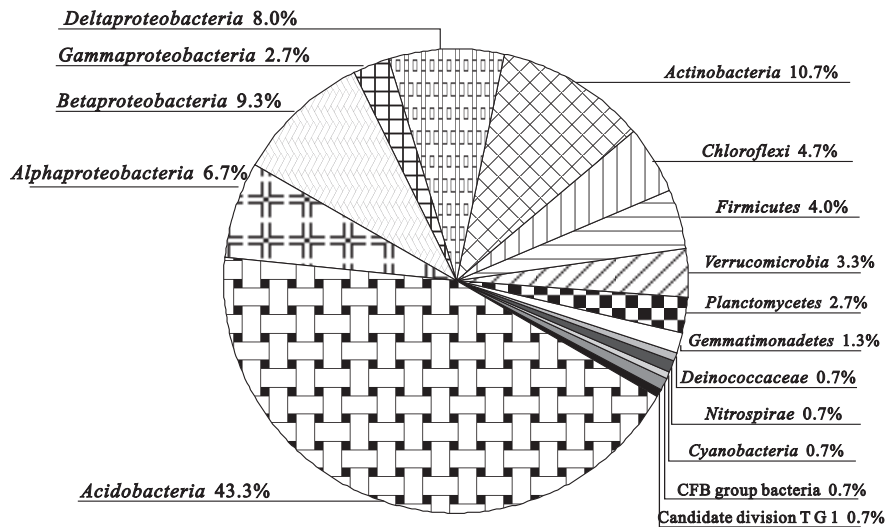


图8 细菌类群在西峰黄土16S rDNA文库中的分布
Fig. 8 Percentage of bacteria 16S rDNA phylotypes in xifeng loess samples

培养细菌是*Mesorhizobium tianshanense* (天山中慢生根瘤菌), 相似率为98%。*M. tianshanense*是一种

与寄主*Glycyrrhiza pallidiflora* (刺果甘草) 共生的细菌, 发现于新疆干旱地区 (谭志远等, 1997)。

(3) 放线菌门 (Actinobacteria)

放线菌为研究样品中第三优势类群, 含3个基因型, 16个克隆 (10.7%) (图5, 图8)。基因型P817、P936与Genbank数据库中最相似序列型度分别为93%和97%, 但分类地位不明确。P912被确定为Micrococcaceae (微球菌科) 中的一员, 并与Arthrobacter (节杆菌属) 具有较高亲缘性。这类细菌主要在土壤中生活, 并构成微生物群落的重要组成部分。它们能耐受干旱和贫瘠的环境 (Prescott et al., 2001)。

其余10种细菌只占西峰黄土细菌类群的19%, 所检出的一些基因型多为能耐受干旱和贫营养环境的种属, 反映了其对环境的适应性。

3 结论

16S rDNA克隆与测序方法是近年来开展微生物群落多样性研究比较有效的非培养技术之一。本研究利用该技术, 对西峰黄土沉积物进行了细菌多样性的初步研究, 结果发现黄土中16S rDNA克隆文库中总共44个基因型分属13个细菌类群, 其中酸杆菌 (Acidobacteria)、变形菌 (Proteobacteria)、放线菌 (Actinobacteria) 为黄土中的主要优势类群, 分别占总数的43.3%, 26.7%和10.7%。而这三类细菌在黄土风化成壤、环境影响效应等方面的作用则需要进一步深入研究。

参考文献 (References):

郝青振, 郭正堂. 2001. 1.2 Ma以来黄土-古土壤序列风化成壤强度的定量研究及东亚夏季风演化[J]. 中国科学(D辑), 31: 520-528.

贾蓉芬, 彭先芝, 高梅影, 等. 2001. 中国黄土剖面趋磁细菌的组成特征与生态意义[J]. 岩石矿物学杂志, 20(4): 428-432.

滕志宏, 郭爱莲. 1996. 陕西蓝田黄土剖面中的微生物初步研究[J]. 高校地质学报, 2(2): 237-240.

阎冰. 2007. 红树林土壤细菌和古菌的16S rDNA多样性研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文.

谭志远, 牛天贵, 陈文新. 1997. 天山根瘤菌 (R. tianshanense) 模式菌株16S rDNA全序列测定及其系统发育[J]. 高技术通讯, 7 (1): 5-8.

席峰, 傅莲英, 王桂忠, 等. 2006. 海洋沉积物DNA提取前的简易脱腐方法研究[J]. 高技术通讯, 16 (5): 539-544.

孙有斌, 强小科, 孙东怀, 等. 2001. 新近纪以来中国黄土高原的风尘记录[J]. 地层学杂志, 25 (2): 94-101.

张建萍, 董乃源, 余浩滨, 等. 2008. 应用16S rDNA-RFLP方法分析宁夏地区稻田土壤细菌的多样性[J]. 生物多样性, 16 (6): 586-592.

张薇, 胡跃高, 黄国和, 等. 2007. 西北黄土高原柠条种植区土壤微生物多样性分析[J]. 微生物学报, 47 (5): 751-756.

An Z S, Kukla G J, Porter S C, et al. 1991. Magnetic susceptibility evidence of monsoon variation on the loess plateau of central China during the last 130000 years [J]. Quaternary Research, 36: 29-36.

An Z S. 2000. The history and variability of the East Asian monsoon [J]. Quaternary Science Reviews, 19: 171-187.

Barns S M, Cain E C, Sommerville L, et al. 2007. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum [J]. Applied Environmental Microbiology, 73: 3113-3116.

Chen J, An Z S and Head J. 1999. Variation of Rb/Sr ratios in the loess-paleosol sequences of central China during the last 130,000 years and their implications for monsoon paleoclimatology [J]. Quaternary Research, 51 (3): 215-219.

Ding Z L, Yu Z W and Rutter N W. 1994. Towards an orbital time scale for Chinese loess deposits [J]. Quaternary Science Reviews, 13: 39-70.

Elsas J D van, Duarte G F, Rosado A S, et al. 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment [J]. Journal of Microbiological Methods, 32: 133-154.

Erik J, Van H, Gabriel Z, et al. 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with virus [J]. Applied and Environmental microbiology, 65: 795-801.

Fierer N, Bradford M and Jackson R. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria [J]. Ecology, 88: 1354-1364.

Guo Z T, Peng S Z, Hao Q Z, et al. 2001. Origin of the Miocene-Pliocene red-earth formation at Xifeng in Northern China and implications for paleoenvironments [J]. Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology, 170: 11-26.

Guo Z T, Ruddiman W F, Han Q Z, et al. 2002. Onset of Asian desertification by 22 Myr ago inferred from loess deposits in China [J]. Nature, 416: 159-163.

Kukla G. 1987. Loess stratigraphy in central China [J]. Quaternary Science Reviews, 6: 191-219.

Jahn B, Gallet S and Han J. 2001. Geochemistry of the Xining, Xifeng and Jixian sections, Loess Plateau of China: eolian dust provenance and paleosol evolution during the last 140 ka [J]. Chemical Geology, 178: 71-94.

Janssen P H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes [J]. Applied Environmental Microbiology, 72: 1719-1728.

Lane D J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing [G] // Stackebrandt E and Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. London: Wiley: 115-175.

Liu X M, Rolph T, Bloemendal J, et al. 1995. Quantitative estimates of palaeoprecipitation at Xifeng area, in the Loess Plateau of China [J]. Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology, 113: 243-248.

Ohta H, Hattori R, Ushiba Y, et al. 2004. Sphingomonas oligophenolica sp. nov., a halo- and organo-sensitive oligotrophic bacterium from paddy soil that degrades phenolic acids at low concentrations [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 2185-2190.

Prescott L M, Harley J P and Klein D A. 2001. Microbiology (Fifth Edition) [M]. 沈萍和彭珍荣主译. 2003. 微生物学(第5版). 北京: 高等教育出版社.

Torsv Ik V, Goksoyr J and Daae F L. 1990. High Diversity in DNA of Soil Bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 56 (3): 782-787.

Ward N L, Challacombe J F, Janssen P H, et al. 2009. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils [J]. Applied Environmental Microbiology, 75: 2046-2056.

Zhou J Z, Bruns M A and Tiedje J M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 62 (2): 316-322.