



## 不同土壤采样设计下土壤表层微生物 $\alpha$ 多样性的差异分析

孙万龙 陈苏铭 刘雪华\* 王科朴 杨云锋

清华大学环境学院 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室 北京 100084

**摘要:**【背景】土壤采样是土壤研究的基础,采样方案的不同可能会对土壤微生物多样性的研究结果产生一定影响。【目的】研究不同的土壤采样设计方案对土壤样品 16S rRNA 基因高通量测序结果的影响。【方法】对 2 个不同生境样地的土壤进行网格化采样,对采集的 18 个土壤样品进行 16S rRNA 基因测序分析,通过模拟 5 种常见土壤采样方法,对比不同采样方式所获得的测序结果。【结果】不同采样方式会产生不同的测序结果。在测序深度有效的情况下,细菌总物种数随着采样数的增加而逐渐增长,增长速度在采样数大于 5 以后趋于平缓;样品中的优势物种(序列数 200 以上)只需很少的采样数(1–3)即可观察到全部物种;Shannon-Wiener 指数与 Simpson 指数的变化较相似,当采样数由 1 到 3 时两指数均有较大增长,之后变化放缓。【结论】土壤细菌微生物测序研究中,土壤样地采样数量低于 3 个会影响测序结果的可靠性,采样方案选择梅花形采样法或蛇形采样法较为适宜。

**关键词:** 16S rRNA 基因高通量测序, 采样设计, 土壤采样, 微生物群落

## Effect of soil sampling designs on soil microbial alpha diversity

SUN Wan-Long CHEN Su-Ming LIU Xue-Hua\* WANG Ke-Pu YANG Yun-Feng

State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract:** [Background] Soil sampling is the basis of soil research, and different sampling designs can have a considerable impact on the results of soil microbial research. [Objective] To investigate the effects of different soil sampling designs on microbial community structure and diversity of soils obtained through 16S rRNA gene high-throughput sequencing. [Methods] In this study, soils from two different habitats were sampled by grid sampling method, and all the 18 soil samples were analyzed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing. Five common soil sampling methods were simulated through combining different points from the sampling grids. The sequencing results of different sampling methods were simultaneously compared. [Results] Different sampling methods resulted in different soil microbial sequencing results. The number of bacterial species gradually increased with the increased of numbers of samples, and the growth rate would be gentle when numbers of samples were greater than 5; dominant species (more than 200 sequences) could be wholly observed in few numbers of samples (1–3); the Shannon-Wiener index and Simpson index were similar, when the numbers of samples was from 1 to 3, both indices increased significantly, then it slowed down. [Conclusion] In the study of soil bacterial

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (41671183)

\*Corresponding author: Tel: 86-10-62794264; E-mail: xuehua-hjx@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 25-05-2019; Accepted: 28-03-2020; Published online: 26-04-2020

基金项目: 国家自然科学基金(41671183)

\*通信作者: Tel: 010-62794264; E-mail: xuehua-hjx@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2019-05-25; 接受日期: 2020-03-28; 网络首发日期: 2020-04-26

microbial sequencing, numbers of soil samples below 3 would affect the reliability of sequencing results. Comparison of the sampling methods, Quincunx sampling or serpentine sampling method is more suitable for soil sampling design.

**Keywords:** 16S rRNA gene high-throughput sequencing, Sampling design, Soil sampling, Microbial community

自然界中微生物无处不在, 其在生态系统中扮演着重要的角色。有研究表明, 1 g 土壤中平均含有 10 万个物种和 10 亿个细菌细胞<sup>[1]</sup>。其中只有少部分细菌可通过传统的培养方式分离<sup>[2]</sup>, 因此需要更有效的方式对土壤中微生物组成进行研究。随着测序技术的发展, 基因测序变得越来越容易, 尤其是高通量测序技术的出现为土壤微生物研究提供了一种性价比很高的研究手段。由于采用 16S rRNA 基因进行系统分类结果与采用全基因组进行系统分类的结果相似<sup>[3]</sup>, 因此越来越多的研究者采用 16S rRNA 基因测序的方法研究微生物群落结构组成和多样性。已有诸多研究应用了 16S rRNA 基因测序的方法, 研究领域包括人体<sup>[4-6]</sup>以及我们生活的环境<sup>[7-10]</sup>, 这些研究对重新认识人体微生物和环境微生物组成具有重要意义。

土壤是一个重要的环境要素, 在生态系统中扮演了重要的角色。对土壤微生物的研究有助于明确土壤微生物对环境变化的响应, 加深对于陆地生态系统中地上与地下部分关系的认识<sup>[11]</sup>。但是, 即使同一区域的土壤也会在组成、性质等方面存在差异, 因此采样调查就成为土壤研究中获得土壤样品信息的基本方法。土壤采样是土壤研究的基础, 不同的采样设计会对土壤研究产生不同的影响。因此, 土壤采样设计成为土壤研究中的一个重要研究内容<sup>[12-13]</sup>。Fortunati 等认为, 采样位置产生的误差大于样品预处理、处理、分析过程中产生的误差总值<sup>[14]</sup>, 要使研究结果能如实

地反映研究区域的客观情况, 就需要采集的样品具有代表性。然而要达到这个目的, 最简单的方法就是增加采样密度, 通过增加采样点和采样数来使研究结果接近该区域的土壤真值。但采样密度的增加意味着成本、时间、工作量的增加, 同时也给后期的数据分析带来了极大的不便, 因此, 如何平衡研究精度与研究成本成为了一个重要的问题<sup>[15]</sup>。

虽然关于土壤微生物的研究越来越多, 但不同研究对于土壤样品的采样设计并不统一。目前国内和国际上出版了很多土壤采样规程, 这些规程提供了很多前人经过大量研究和总结得出的方法<sup>[16-20]</sup>。现在的研究基本都遵从和沿用这些方法, 如对角线采样法<sup>[21]</sup>、梅花形采样法<sup>[22-24]</sup>、蛇形采样法<sup>[25]</sup>等。为研究不同土壤采样设计对 16S rRNA 基因高通量测序结果的影响, 本研究对 2 个不同生境样地的土壤进行了网格化采样, 并对采集得到的 18 个土壤样品全部进行了 16S rRNA 基因高通量测序分析, 通过不同的方式组合来模拟几种常见的土壤采样方法, 同时对比不同采样方式的测序结果, 以期得到适合土壤细菌 16S rRNA 基因高通量测序的采样设计。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 研究区概况

研究区位于中国秦岭自然保护区内。秦岭是全球同纬度地区具有高生物多样性的热点地区, 选取两个高生物多样性地带的典型物种生境进行考察和采样, 具体信息见表 1。

表 1 研究样地信息

Table 1 Information of research sites

样地	海拔	经度	纬度	生境类型
Location	Elevation (m)	Longitude	Latitude	Habitat type
凉风垭	2 300	33.679°N	107.857°E	中海拔秦岭箭竹林
Liangfengya				<i>Fargesia qinlingensis</i> of intermediate altitude
西沟	1 600	33.634°N	107.278°E	低海拔龙头竹林
Xigou				<i>Fargesia dracocephala</i> of low altitude

### 1.2 土壤采样设计和样品采集

2014年7月于每个样地 10×10 m 的区域内采用网格法定 9 个样点。每个样点内分散用土钻钻取 4 次表层土壤(0–20 cm)。每次钻取获得土壤转移到 2 mm 土筛上, 将 1 个样点内的 4 次钻取土壤过筛混匀, 作为本样点的土样。

在土壤研究中有一些常见的采样方法, 如对角线采样法、梅花形采样法、蛇形采样法、网格采样法或直接于样地取一点进行采样。本研究对同一样地的 9 个样点进行编号, 通过选取不同数量、不同位置的样点测序结果进行分析, 以达到对不同采样法采样结果的模拟。每种采样法选取的样点数量和位置如图 1 所示。

### 1.3 测序方法

研究过程中的 DNA 提取、土壤 16S rRNA 基因测序工作由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成, V4 区 PCR 扩增使用通用引物 515F (5'-GTGCCA GCMGCCGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHV GGGTWTCTAAT-3'), 扩增子长度约为 290 bp。PCR 反应体系和反应条件参照文献[26]。研究采用 Illumina HiSeq V4 PE250 高通量测序平台进行测序, 测序深度约为每个样品 50 万 Reads。测序所得结果采用 QIIME 软件包计算, 以 SILVA 数据库序

列作为参考序列, 根据 97%的相似性水平, 将匹配到的序列进行聚类得到 OTU; 未匹配到的序列采用 Cluster 聚类方法, 根据 97%的相似性水平, 聚类得到新的 OTU, 将两部分整合后得到所有 OTU。之后利用 RDP Classifier 对 OTU 进行分类学注释。

### 1.4 $\alpha$ 多样性分析

生物多样性的研究从空间尺度上来说有 3 种:  $\alpha$  多样性、 $\beta$  多样性、 $\gamma$  多样性。 $\alpha$  多样性主要关注局部单一均匀生境下的物种数目, 因此也被称为生境内的多样性。 $\alpha$  多样性分析是微生物群落研究中的常用分析方法, 本研究中主要关注  $\alpha$  多样性随样品数量增加的变化, 具体来说, 本研究采用物种数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数来反映样品的  $\alpha$  多样性, 这 3 种多样性指数分别从不同的侧面反映了物种多样性, 是生物多样性研究中常用的 3 种指数。

Shannon-Wiener 指数的计算公式:

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

式(1)中,  $P_i$  为第  $i$  个物种在所有物种中所占比例。Shannon-Wiener 指数不仅反映了群落物种的多寡, 还反映了群落的异质性;  $H$  值越高, 群落的复杂程度越高。

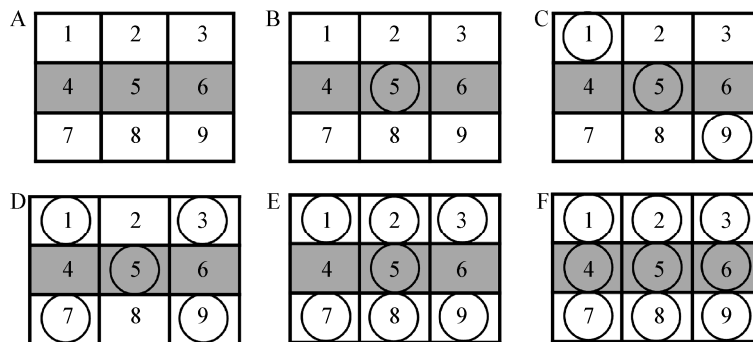


图 1 采样方法设计模拟

Figure 1 Sampling method design simulation

注: A: 样点编号; B: 单点采样; C: 对角线采样; D: 梅花形采样; E: 蛇形采样; F: 网格法采样。

Note: A: Sample number; B: Single-point sampling; C: Diagonal sampling; D: Quincunx sampling; E: Serpentine sampling; F: Grid sampling.

Simpson 指数计算公式:

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

式(2)中,  $P_i$  为第  $i$  个物种在所有物种中所占比例。Simpson 指数更多反映了群落中各物种的均匀度, 常与 Shannon-Wiener 指数一起用来反映群落的多样性。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序结果

原始下机的双端测序数据通过质控后, 将成

对的 Reads 拼接成一条序列, 得到所有序列。对序列进行聚类、分类学注释后得到测序结果, 其中凉风垭样地共得到 25 741 个 OTU, 西沟样地共得到 28 319 个 OTU, 各 OTU 与其序列数的关系如图 2 所示, 绝大多数 OTU 的丰富度很低, 只有少数 OTU 具有很大的序列数。

图 3 稀释性曲线随序列数的增加而斜率逐渐平缓, 说明测序深度有效, 更多的序列数只会增加有限的物种丰富度。由于测序结果受到测序深度的影响, 序列数较少的 OTU 误差更大。

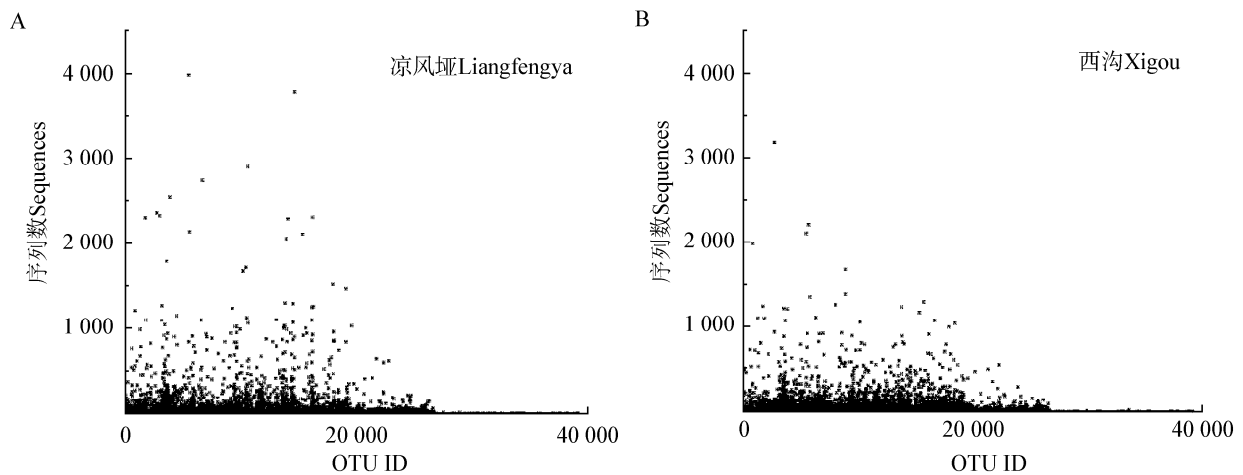


图 2 各 OTU 的序列数

Figure 2 The number of sequences of each OTU

注: A: 凉风垭样地; B: 西沟样地。

Note: A: Liangfengya-site; B: Xigou-site.

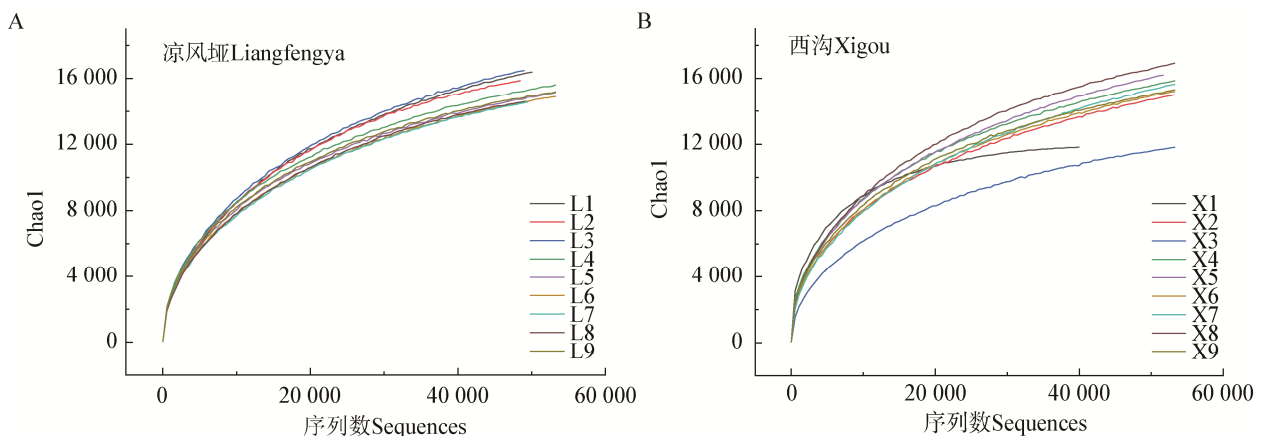


图 3 稀释性曲线

Figure 3 Rarefaction curve

注: A: 凉风垭样地; B: 西沟样地。

Note: A: Liangfengya-site; B: Xigou-site.

对各 OTU 所含的序列数进行统计, 关注序列数  $\geq 10$ 、 $\geq 20$ 、 $\geq 50$ 、 $\geq 100$ 、 $\geq 200$  和  $\geq 500$  (即占总序列数 0.002%、0.004%、0.01%、0.02%、0.04%、0.1%) 的 OTU 在总序列中所占的比例, 统计结果如表 2 所示。

考虑到序列数小于 10 的 OTU 极有可能是测序深度不够深而未能检测到, 为减小测序深度对研究带来的误差, 本研究只关注序列数足够多的 OTU, 即序列数大于 10 的 OTU。对测序结果以序列数为指标进行筛选, 分别保留 9 个样品中序列数  $\geq 10$ 、 $\geq 20$ 、 $\geq 50$ 、 $\geq 100$ 、 $\geq 200$  和  $\geq 500$  的 OTU, 筛选结果如表 3 所示。西沟样地测序所得的 OTU 数目(28 319)整体多于凉风垭的 OTU 数目(25 741), 但差异并不显著。

表 2 序列数不少于 10 的 OTU 所含序列数在总序列数中所占比例

Table 2 Proportion of sequences in OTUs containing more than 10 sequences in the total number of sequences (%)

样地	$\geq 10$	$\geq 20$	$\geq 50$	$\geq 100$	$\geq 200$	$\geq 500$
Location						
凉风垭	88.16	81.93	70.67	59.93	45.90	27.65
Liangfengya						
西沟	86.82	79.11	64.59	50.96	34.78	16.09
Xigou						

## 2.2 OTU 分析

对于序列数  $\geq 500$  的 OTU 来说, 不同采样方法对测序结果几乎没有影响; 对序列数  $\geq 100$  和  $\geq 200$  的 OTU 来说, 不同采样方法对于测序结果的影响很小; 对序列数  $\geq 50$ 、 $\geq 20$ 、 $\geq 10$  的 OTU 来说, 不同采样方法对于测序结果有一定影响(表 4)。

表 3 序列数不少于 10 的 OTU 数量

Table 3 The number of OTUs with a sequence number of not less than 10

样地	原始 OTU 数	$\geq 10$	$\geq 20$	$\geq 50$	$\geq 100$	$\geq 200$	$\geq 500$
Location	Primitive OTU						
凉风垭	25 741	5 570	3 382	1 630	899	425	135
Liangfengya							
西沟	28 319	6 827	4 130	1 887	950	396	94
Xigou							

Note:  $P=0.369>0.05$ .

表 4 不同采样方法下的不同序列数 OTU 数量占总 OTU 的比例

Table 4 Proportion of OTUs with different sequence numbers under different sampling methods in total OTUs (%)

样地	序列数	1 个样	3 个样	5 个样	7 个样	9 个样	
Location	Sequences	One sample	Three samples	Five samples	Seven samples	Nine samples	
凉风垭	$\geq 10$	82.783	97.917	99.641	99.892	100.000	
	Liangfengya	$\geq 20$	92.194	99.438	99.852	99.941	100.000
		$\geq 50$	97.239	99.939	100.000	100.000	100.000
		$\geq 100$	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		$\geq 200$	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		$\geq 500$	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
西沟	$\geq 10$	76.388	94.844	99.194	99.912	100.000	
	Xigou	$\geq 20$	86.489	97.167	99.685	99.952	100.000
		$\geq 50$	95.337	98.675	99.841	100.000	100.000
		$\geq 100$	99.158	99.895	100.000	100.000	100.000
		$\geq 200$	98.990	100.000	100.000	100.000	100.000
		$\geq 500$	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

## 2.3 $\alpha$ 多样性分析

### 2.3.1 物种数

物种数随采样数变化的折线图(图 4)显示,对于序列数 $\geq 10$ 、20、50 的 OTU 来说,当采样数达到 5 时,物种数基本达到稳定;而对序列数 $\geq 100$ 、200、500 的 OTU 来说,在超过 3 个样品时,物种数就达到稳定。但不同采样方案所得物种数差异并不显著(表 5-6)。西沟样地测序所得的 OTU 数目整体多于凉风垭的 OTU 数目,但序列数超过 200 的 OTU 数目则呈现相反的规律。

### 2.3.2 Shannon-Wiener 和 Simpson 指数

Shannon-Wiener 指数结果(图 5)表明,对于序列数 $\geq 10$ 、20、50、500 的 OTU 来说,当采样数由 1 到 3 时,Shannon-Wiener 指数有较大变化,而采样数从 3 增加到 5、7、9 时,数值的变化相对来说不

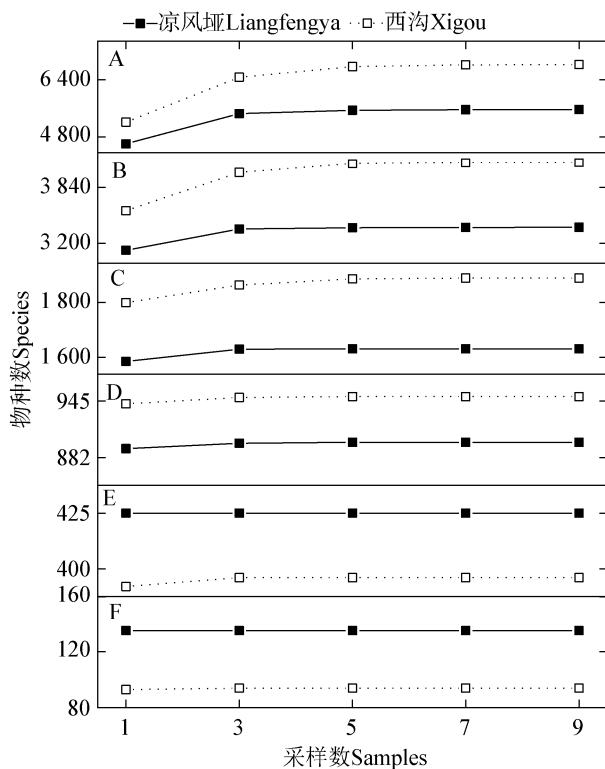


图 4 不同采样数量下的物种数

Figure 4 Number of species with different sampling numbers

注: A-F 分别为序列数 $\geq 10$ 、20、50、100、200 和 500 的 OTU。  
Note: A-F represent the OTUs with a sequence number of more than 10, 20, 50, 100, 200 and 500, respectively.

表 5 凉风垭样地不同采样方法下  $\alpha$  多样性差异显著性分析  
Table 5 Significance of different under different sampling methods in alpha diversity of Liangfengya-site

P value	3 个样 Three samples	5 个样 Five samples	7 个样 Seven samples	9 个样 Nine samples
1 个样 One sample	0.152 2	0.158 9	0.159 7	0.159 9
3 个样 Three samples		0.246 6	0.244 0	0.240 3
5 个样 Five samples			0.230 3	0.218 0
7 个样 Seven samples				0.196 9

表 6 西沟样地不同采样方法下  $\alpha$  多样性差异显著性分析  
Table 6 Significance of different under different sampling methods in alpha diversity of Xigou-site

P value	3 个样 Three samples	5 个样 Five samples	7 个样 Seven samples	9 个样 Nine samples
1 个样 One sample	0.116 9	0.116 9	0.117 8	0.118 0
3 个样 Three samples		0.118 6	0.122 6	0.123 5
5 个样 Five samples			0.157 0	0.159 7
7 个样 Seven samples				0.197 0

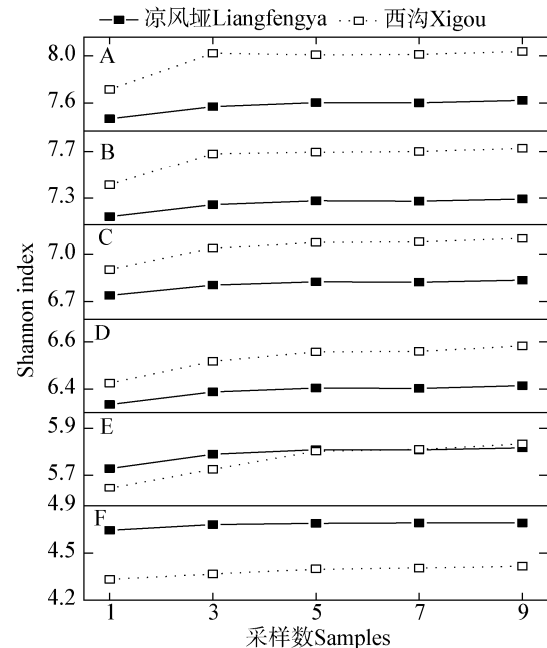


图 5 不同采样数量下的 Shannon-Wiener 指数

Figure 5 Shannon-Wiener index with different sampling numbers

注: A-F 分别为序列数 $\geq 10$ 、20、50、100、200 和 500 的 OTU。  
Note: A-F represent the OTUs with a sequence number of more than 10, 20, 50, 100, 200 and 500, respectively.

明显;而对序列数 $\geq 100$ 、200 的 OTU 来说,在采样数由 1 到 3、5 时,Shannon-Wiener 指数有明显的变化,采样数由 5 到 7 时,数值变化不大;对几种多度水平下采样数从 7 到 9 时,Shannon-Wiener 指数均再次出现小幅变化。Simpson 指数结果(图 6)显示,对序列数 $\geq 10$ 、20、50、100 的 OTU 来说,当采样数由 1 增加到 3 时,Simpson 指数会有较大增长;而由 3 增加至 5 时,指数变化较小,由 5 到 7 时 Simpson 指数的变化相对来说较平稳,但在采样数由 7 到 9 时,可以观察到 Simpson 指数又出现了小幅变化,这一变化在序列数较多的 OTU 时更为明显。与不同采样方案对物种的影响相似,不同采样方案所得多样性存在差异但并不显著(表 5)。西沟样地的微生物多样性水平整体高于凉风垭,但序列数超过 200 的 OTU 数目在多样性方面则呈现相反的规律。

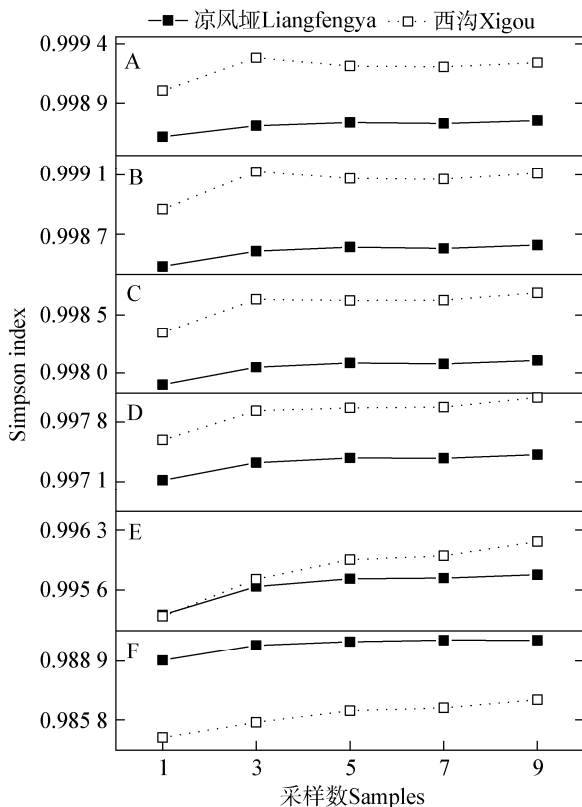


图 6 不同采样数量下的 Simpson 指数

Figure 6 Simpson index with different sampling numbers

注: A-F 分别为序列数 $\geq 10$ 、20、50、100、200 和 500 的 OTU。  
Note: A-F represent the OTUs with a sequence number of more than 10, 20, 50, 100, 200 and 500, respectively.

### 3 讨论

土壤微生物的分布特征受多种因素影响,如海拔<sup>[27-28]</sup>、温度<sup>[29]</sup>、pH<sup>[30]</sup>、水分和土壤营养元素<sup>[31]</sup>等。本研究所得 OTU 数目和多样性均高于 Wang 等报道的关于南极洲土壤微生物的 OTU 数目(3 503-4 536)和 Shannon-Wiener 多样性指数(6.61-7.45)<sup>[32]</sup>,这可能是因为本研究区域的土壤温度远高于南极洲,因为土壤微生物对温度敏感<sup>[33]</sup>。本研究结果显示,整体而言,西沟样地土壤微生物的物种数和  $\alpha$  多样性均高于凉风垭样地,这可能与凉风垭样地的海拔高于西沟样地有关。值得注意的是,序列数超过 200 的 OTU 数目和  $\alpha$  多样性则在凉风垭样地较高,这可能与样地植被群落组成不同有关<sup>[34]</sup>。

本研究采样方案为 9 个样点时,所得到的 OTU 数目和  $\alpha$  多样性与本区域相关研究<sup>[35]</sup>处于同一水平,因此可认为当采样方案为 9 个样点时,采样已经充分。本研究是基于前人总结出的土壤采样规程进行的,所以假设几种采样方法已经考虑到了样点的空间分布。但土壤细菌对环境因素更加敏感,所以极有可能在一片小区域中土壤细菌就有较大变化,本研究也观察到个别物种在某一样点序列数高而在另一样点较为稀少的情况。本研究的样地范围为  $10 \times 10$  m,对于土壤细菌来说可能是较大区域,因此可能需要增加更多样点来更深入地了解生物多样性与采样设计的关系。再者,本研究只关注了细菌的种类,而目前的研究更多开始关注细菌在环境中的功能,在这一方面采样设计造成的影响还需要进一步的研究,以上原因也是造成本研究中差异水平并不显著的主要原因。

值得注意的是,尽管 16S rRNA 基因测序具有高度的保守性和特异性,且已经被广泛地应用到各个领域用于原核生物的检测和鉴定<sup>[36-38]</sup>,但 Sun 等研究发现基因组内的非均质性将会导致 16S rRNA 基因测序得到的原核生物多样性结果偏高,这在一定程度上会影响应用 16S rRNA 基因测序时对细菌

微生物多样性的判定;同时该研究结果也指出,16S rRNA 的 V4 和 V5 区基因组间的变异性高,是进行 16S rRNA 基因测序的理想目标区域<sup>[39]</sup>。本研究中采用了 16S rRNA 基因测序所得的结果来比较不同土壤采样设计下土壤微生物  $\alpha$  多样性的差异,可能同样会受到基因组内非均质性的影响而导致得到的  $\alpha$  多样性偏高,但由于测序目标区域选择了 V4 区域且不同采样设计下的结果对比是基于同样的测序技术,这在很大程度上减少了因测序技术带来的误差,因此,尽管可能对  $\alpha$  多样性存在一定的影响,对研究结果规律性方面影响不大。

#### 4 结论

本研究表明,不同采样方式会产生不同的土壤微生物基因测序结果。细菌物种数会随着采样数的增加而逐渐增长,增长速度会在采样数大于 5 以后趋于平缓;样品中的优势物种(序列数 200 以上)只需很少的采样数(1-3)即可观察到全部物种;而对于样品中非低序列数个体数的物种,例如序列数达到总序列数的 0.02%以上的物种,采样数对其影响相对来说更大,但当采样数到 3 时,即采用对角线采样法,测序结果已基本能涵盖 95%以上的物种。微生物多样性指数整体表现为随土壤采样数增加而变高,且序列数越少的 OTU 多样性越丰富,Shannon-Wiener 指数与 Simpson 指数在这方面的变化较为一致。当采样数由 1 到 3 时两指数均有较大增长,之后变化放缓;在采样数达到 5 (梅花形采样法)和 7 (蛇形采样法)时两指数均相对稳定;采样数由 7 增加到 9 时两指数又出现小幅增长。相对来说,Simpson 指数的变化要比 Shannon-Wiener 指数更大。

#### REFERENCES

- [1] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil[J]. *Science*, 2005, 309(5739): 1387-1390
- [2] Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. *Nature*, 1990, 345(6270): 63-65
- [3] Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 431-437
- [4] Grice EA, Kong HH, Conlan S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J]. *Science*, 2009, 324(5931): 1190-1192
- [5] Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time[J]. *Science*, 2009, 326(5960): 1694-1697
- [6] Liu KL, Wang JQ, Bu DP, et al. Advances in diversity and functionality of human gut microflora[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(5): 2589-2594 (in Chinese)  
刘开朗, 王加启, 卜登攀, 等. 人体肠道微生物多样性和功能研究进展[J]. *生态学报*, 2009, 29(5): 2589-2594
- [7] Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(4): 283-290
- [8] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(32): 12115-12120
- [9] Wang P, Chen B, Zhang H. High throughput sequencing analysis of bacterial communities in soils of a typical Poyang Lake wetland[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(5): 1650-1658 (in Chinese)  
王鹏, 陈波, 张华. 基于高通量测序的鄱阳湖典型湿地土壤细菌群落特征分析[J]. *生态学报*, 2017, 37(5): 1650-1658
- [10] Xu F, Cai TJ, Yang X, et al. Effect of cultivation and natural restoration on soil bacterial community diversity in marshland in the Sanjiang Plain[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(22): 7412-7421 (in Chinese)  
徐飞, 蔡体久, 杨雪, 等. 三江平原沼泽湿地垦殖及自然恢复对土壤细菌群落多样性的影响[J]. *生态学报*, 2016, 36(22): 7412-7421
- [11] He JZ, Li J, Zheng YM. Thoughts on the microbial diversity-stability relationship in soil ecosystems[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 411-420 (in Chinese)  
贺纪正, 李晶, 郑袁明. 土壤生态系统生物多样性-稳定性关系的思考[J]. *生物多样性*, 2013, 21(4): 411-420
- [12] Yang L, Zhu AX, Qin CZ, et al. A soil sampling method based on representativeness grade of sampling points[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(5): 938-946 (in Chinese)  
杨琳, 朱阿兴, 秦承志, 等. 一种基于样点代表性等级的土壤采样设计方法[J]. *土壤学报*, 2011, 48(5): 938-946
- [13] Han ZW, Huang W, Luo Y, et al. Application of simulated annealing method and neural network on optimizing soil sampling schemes based on road distribution[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(3): 891-900 (in Chinese)



- 韩宗伟, 黄魏, 罗云, 等. 基于路网的土壤采样布局优化——模拟退火神经网络算法[J]. 应用生态学报, 2015, 26(3): 891-900
- [14] Fortunati GU, Banfi C, Pasturenzi M. Soil sampling[J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1994, 348(1/2): 86-100
- [15] Liu C, Li JB, Rui JP, et al. The applications of the 16S rRNA gene in microbial ecology: current situation and problems[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(9): 2769-2788 (in Chinese)
- 刘驰, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 16S rRNA 基因在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报, 2015, 35(9): 2769-2788
- [16] Burton JD. Soil sampling apparatus and method: US, 7827873[P]. 2010-11-09
- [17] Guo MM. Soil sampling and methods of analysis[J]. Journal of Environmental Quality, 2009, 38(1): 375
- [18] Vogt DJ, Tilley JP, Edmonds RL. Soil and Plant Analysis for Forest Ecosystem Characterization[M]. Beijing: Higher Education Press, 2015
- [19] Li ZG, Luo YM, Teng Y. Soil and Environmental Microbiology Research Method[M]. Beijing: Science Press, 2008 (in Chinese)
- 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008
- [20] National Agricultural Technology Extension Service Center. Soil Analysis Technical Specification[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2006 (in Chinese)
- 全国农业技术推广服务中心. 土壤分析技术规范[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2006
- [21] Wang X, Chen Z, Yuan HZ, et al. Effect of long-term fertilization by the application of rice straw on bacterial diversity in paddy soil[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(14): 3865-3874 (in Chinese)
- 王霞, 陈哲, 袁红朝, 等. 应用 16S rDNA 克隆文库技术研究长期稻草还田对水稻土细菌多样性的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(14): 3865-3874
- [22] Li YF, Song B, Song YN, et al. Analysis of the bacterial communities in paddy soils in Fujian province using 16S rDNA -PCR- DGGE[J]. Microbiology China, 2008, 35(11): 1715-1720 (in Chinese)
- 李友发, 宋兵, 宋亚娜, 等. 福建省稻田土壤细菌群落的 16S rDNA-PCR-DGGE 分析[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1715-1720
- [23] Zhao ZX, Luo K, Chen GH, et al. Analysis of bacterial diversity in rhizosphere of cucumber in greenhouse by the methods of metagenomic end-random sequencing and 16S rDNA technology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(14): 3849-3857 (in Chinese)
- 赵志祥, 罗坤, 陈国华, 等. 结合宏基因组末端随机测序和 16S rDNA 技术分析温室黄瓜根围土壤细菌多样性[J]. 生态学报, 2010, 30(14): 3849-3857
- [24] Teng QH, Cao H, Cui ZL, et al. PCR-RFLP analysis of bacterial 16S rDNA from a typical garden soil in Taihu region[J]. Biodiversity Science, 2006, 14(4): 345-351 (in Chinese)
- 滕齐辉, 曹慧, 崔中利, 等. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析[J]. 生物多样性, 2006, 14(4): 345-351
- [25] Wang QZ, Xu QF, Jiang PK, et al. DGGE analysis of PCR OF 16S rDNA V3 fragments of soil bacteria community in soil under natural broadleaf forest invaded by phyllostachy pubescens in Tianmu mountain nature reserve[J]. Acta Pedologica Sinica, 2009, 46(4): 662-669 (in Chinese)
- 王奇赞, 徐秋芳, 姜培坤, 等. 天目山毛竹入侵阔叶林后土壤细菌群落 16S rDNA V3 区片段 PCR 的 DGGE 分析[J]. 土壤学报, 2009, 46(4): 662-669
- [26] Zhang LH, Wang SJ. Bacterial community diversity on in-shell walnut surfaces from six representative provinces in China[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 10054
- [27] Fierer N, McCain CM, Meir P, et al. Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals[J]. Ecology, 2011, 92(4): 797-804
- [28] Ranjard L, Dequiedt S, Jolivet C, et al. Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing french national initiative[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2010, 30(2): 359-365
- [29] Zhou GX, Zhang JB, Chen L, et al. Temperature and straw quality regulate the microbial phospholipid fatty acid composition associated with straw decomposition[J]. Pedosphere, 2016, 26(3): 386-398
- [30] Griffiths RI, Thomson BC, James P, et al. The bacterial biogeography of British soils[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(6): 1642-1654
- [31] Ganzert L, Lipski A, Hubberten HW, et al. The impact of different soil parameters on the community structure of dominant bacteria from nine different soils located on Livingston Island, South Shetland Archipelago, Antarctica[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 76(3): 476-491
- [32] Wang NF, Zhang T, Zhang F, et al. Diversity and structure of soil bacterial communities in the Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1188
- [33] Bahram M, Hildebrand F, Forslund SK, et al. Structure and function of the global topsoil microbiome[J]. Nature, 2018, 560(7717): 233-237
- [34] Ren CJ, Zhang W, Zhong ZK, et al. Differential responses of soil microbial biomass, diversity, and compositions to altitudinal gradients depend on plant and soil

- characteristics[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 610-611: 750-758
- [35] Wang HH, Chu HL, Dou Q, et al. Phosphorus and nitrogen drive the seasonal dynamics of bacterial communities in *Pinus* forest rhizospheric soil of the Qinling Mountains[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1930
- [36] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638
- [37] Hong PY, Wheeler E, Cann IKO, et al. Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the Galápagos Islands using 16S rRNA-based pyrosequencing[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(9): 1461-1470
- [38] Pei AY, Oberdorf WE, Nossa CW, et al. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(12): 3886-3897
- [39] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of Prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969

~~~~~  
(上接 p.1698)

### 征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377

Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)

王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6-17

Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)

沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87

Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)

刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

#### 4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

#### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

#### 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>