



贾仲君, 博士生导师, 中国科学院南京土壤研究所, 中国科学院特聘研究员, 主要从事微生物生态与进化研究。2002 年获博士学位后连续在美国农业部、日本名古屋大学和德国马普陆地微生物所工作。2008 年入选中国科学院百人计划, 2012 年获终期评估优秀。近年来重点开展了微生物资源与功能研究。(1) 建立了稳定同位素示踪环境微生物 DNA/RNA-SIP 技术平台。(2) 发现了细菌主导碱性土壤氨氧化; 古菌主导了酸性土壤氨氧化, 并通过脲酶进化适应低氨环境。(3) 阐明了湿地消耗大气甲烷的遗传代谢机制, 发现高浓度甲烷刺激下, 甲烷氧化菌获得高亲和力并氧化极低浓度的大气甲烷。近 5 年发表论文 72 篇, 一半以上 SCI 论文发表于 TOP 期刊。担任欧洲地球学会 *Biogeosciences* 等 3 份 SCI 期刊副主编。

## 单细胞、显微计数和高通量测序典型水稻土微生物组的技术比较

贾仲君<sup>1\*</sup>, 蔡元锋<sup>1</sup>, 负娟莉<sup>2</sup>, 杜文斌<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008

<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

**摘要:**【目的】比较传统显微计数、单细胞分选和现代分子方法研究典型水稻土微生物组的细胞数量、物种组成及好氧甲烷氧化菌生理生态过程的技术特点。【方法】针对水稻土中可提取微生物细胞(土壤细胞)及其 DNA (细胞 DNA)、单细胞 DNA、土壤微生物组总 DNA (土壤 DNA), 利用传统显微计数和实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法, 研究水稻土好氧甲烷氧化过程中微生物数量的变化规律; 通过高通量测序 16S rRNA 基因技术, 研究微生物物种组成的变化规律。【结果】水稻土微生物组的传统显微计数结果显著低于现代分子方法 qPCR, 最高可达 3 个数量级。基于 DAPI 染色、CARD-FISH、细胞 DNA 及土壤 DNA 的 qPCR 定量结果分别为:  $(5.8-7.4) \times 10^7$ 、 $(1.7-1.9) \times 10^7$ 、 $(2.8-6.3) \times 10^8$ 、 $(1.5-2.7) \times 10^{10}$  cells/g。基于 qPCR 的水稻土好氧甲烷氧化菌数量为  $1.1 \times 10^7$  cells/g, 比传统显微计数方法高 3 个数量级。然而, 当水稻土氧化高浓度甲烷后, 所有方法均发现甲烷氧化菌显著增加, 增幅分别为 54 倍(CARD-FISH)、388 倍(细胞 DNA)和 45 倍(土壤 DNA)。在微生物分类学门的水平, 细胞 DNA (25 个门)与土壤 DNA (30 个门)结果基本一致, 均能较好地反映水稻土微生物组的群落结构, 而单细胞 DNA 尽管检测到 20 个门, 但偏好性较大, 95%以上均为 Proteobacteria。在微生物分类学属的水平,

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(B类)项目(XDB15040000); 国家自然科学基金青年基金(41401294)

\*通信作者。Tel: +86-25-86881311; Fax: +86-25-86881000; E-mail: jia@issas.ac.cn

收稿日期: 2017-02-16; 修回日期: 2017-04-07; 网络出版日期: 2017-04-14

土壤 DNA、细胞 DNA 和单细胞 DNA 分析均表明背景土壤含有 7 个好氧甲烷氧化菌的 *pmoA* 基因型, 但氧化高浓度甲烷后,  $\gamma$ -Proteobacteria 的 2 个属 *Methylobacter*/*Methylosarcina* 则成为优势类群。【结论】土壤微生物的传统显微计数(DAPI 和 CARD-FISH)结果显著低于 qPCR 技术, 相差 1–3 个数量级。qPCR 定量土壤 DNA 和细胞 DNA 表明: 水稻土可提取微生物细胞约占土壤微生物总量的 2%左右, 而好氧甲烷氧化菌的提取效率最高可达 6%。细胞 DNA 在门水平能较好地反映水稻土微生物组成, 但在属水平和土壤 DNA 有着较大差异。Planctomycetes 微生物门的细胞易被提取, Acidobacteria 门的微生物则较难被提取, 而单细胞分选技术则偏好 Proteobacteria。尽管传统方法和分子技术的分辨率明显不同, 但均能较好地表征水稻土甲烷氧化的微生物生理生态过程。未来土壤微生物组研究应更加重视科学问题本身对技术手段的内在需求, 最大限度发挥各种先进技术的优势。

关键词: 微生物数量, 微生物组成, 土壤 DNA, 土壤可提取细胞, 单细胞

土壤是地球上异质性最强的历史自然体, 孕育着地球最高的微生物多样性, 是地球最大的基因资源库<sup>[1]</sup>。然而, 受限于微生物分类学理论的发展, 迄今尚未有一种方法能真实反映土壤中微生物的物种组成和准确数量。卡尔·伍思提出的 rRNA 为基础的生物三域分类理论尽管未能完全解决地球环境中微生物分类的理论难题<sup>[2]</sup>, 但提供了一种事实上可操作的、针对海量微生物的分类学策略<sup>[3]</sup>。因此, 20 世纪 90 年代以来, 随着 DNA 测序技术的快速发展, 针对复杂环境如土壤、海洋、动物和植物等体系的微生物组研究成为不同学科、不同领域实验室的一种常规策略, 从根本上改变了传统微生物生态学的研究理念, 发现了大量前所未知微生物, 微生物组研究成为工业、农业和医药等行业的重要学科交叉前沿。

土壤微生物的定量一直是微生物学研究难点。理论上最佳的定量策略包括: 有效分离土壤中的非生物颗粒与微生物细胞, 随后对微生物细胞进行准确计数。然而, 目前尚未有被广泛认可的普适性土壤微生物细胞提取策略, 准确定量土壤微生物的真实数量理论上仍不可行。主要原因是: 土壤母质类型多样、发生过程复杂, 并且土壤中绝大部分物质

尚未有明确的化学结构<sup>[1]</sup>, 因此, 很难设计一种普适性的提取缓冲液, 实现复杂土壤中微生物细胞与土壤颗粒的完全分离。同时, 传统的微生物细胞计数方法通常依赖于细胞染色和生长, 涉及的一系列操作过程也存在较大的计数偏差。(1) 基于细胞染色的计数方法通常具有较大误差<sup>[4-5]</sup>。例如, 经典的 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)染色计数法、荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)、酶联荧光原位杂交 CARD-FISH (catalyzed reporter deposition-FISH)方法, 皆采用特异的化学物质, 通过对细胞内核酸 DNA 直接染色或杂交放大外源荧光信号并在特定波长下显影成像, 直接计数细胞数量。但细胞提取的效率、非生物颗粒干扰、细胞通透性及其对染色物质的吸收、显微设备的检测效率等, 均会对微生物计数结果产生较大影响。(2) 经典的平板培养计数法或最大或然数法(most probable number, MPN)则依赖于细胞的生长, 计数结果与自然环境中微生物真实数量相去甚远<sup>[6-7]</sup>。事实上, 这类方法主要根据可培养细胞在固体培养基生长形成肉眼可见的菌落, 或者在液体培养基中产生可检测的浑浊度变化, 结合稀释倍数推算环境中的微生物细胞数量。尽

管在微生物学发展早期曾发挥重要作用,但这类方法很难模拟原位环境条件,并且依赖于细胞的生长,因此事实上仅能大致反映土壤中可培养微生物的多寡及其在不同环境中的相对优势度。此外,这些传统微生物研究方法操作繁琐,流程复杂,需要专业技术人员和特殊实验室,在很大程度上限制了微生物学的发展及其与相关领域的跨学科交叉研究。

基于核酸序列的物种分类已经成为土壤微生物组研究的重要内容。传统微生物分类主要基于细胞形态、结构和生理生化特征等属性。20世纪80年代后期,随着测序技术的快速发展,基于核酸DNA/RNA的分子生物学技术逐渐成为土壤微生物数量和组成研究的主要策略<sup>[8]</sup>。关键流程包括复杂环境中微生物基因组总核酸DNA/RNA提取,进而对其16S rRNA基因或微生物靶基因进行特异扩增,随后对PCR产物进行测序并分析微生物组成<sup>[9]</sup>或者针对特定靶标基因开展qPCR分析微生物数量<sup>[10]</sup>。特别是2007年以来高通量测序技术发展迅猛,已经成为主流的分子生态学研究手段,逐渐替代了传统的分子指纹图谱技术,如克隆文库技术、变性梯度凝胶电泳DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)<sup>[11]</sup>、末端限制性片段长度多态性分析T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism)。此外,新兴的单细胞筛选及分析技术代表着未来微生物学研究的一个重要方向。细胞是生命的基本单元,利用各种提取策略获得复杂环境中微生物细胞混合物之后,理论上不仅可对单个细胞计数,也可对单个细胞基因组进行分析,研究同种或近源物种的生态进化规律。单细胞技术同时能够规避传统MPN和平板计数法研究难培养微生物的内在缺陷,辅之以高效的土壤微生物细胞提取技术,可能是未来研

究原位环境中微生物生理功能和物种分化的重要手段<sup>[12]</sup>。

总体而言,无论传统显微计数还是现代分子方法,土壤微生物组的研究对象包括:可提取的土壤微生物细胞(土壤细胞)、微生物细胞DNA(细胞DNA)、直接从土壤中提取微生物组总DNA(土壤DNA)。然而,目前土壤微生物组不同技术优势的比较研究较少,许多技术问题仍处于定性描述阶段。例如:(1)土壤微生物组的数量比较。如基于土壤细胞的DAPI染色、CARD-FISH杂交计数,基于细胞DNA、土壤DNA的qPCR数量之间的相互比较。(2)土壤微生物组的物种组成比较。如基于土壤DNA、细胞DNA测序的微生物组成是否一致。土壤细胞经单细胞筛选及全基因组扩增后,基于单细胞DNA测序的微生物多样性似乎未见报道。此外,针对复杂土壤环境中的特定微生物生理过程如好氧甲烷氧化,不同研究方法能否准确反映好氧甲烷氧化菌的群落变化规律,目前仍不清楚。据此,本研究采用DAPI染色、CARD-FISH杂交、qPCR分析了一种典型水稻土中的微生物数量;采用高通量测序16S rRNA基因的PCR扩增产物研究了微生物的物种组成;基于显微计数和分子方法,比较分析了水稻土好氧甲烷氧化的微生物生理生态过程。

## 1 材料和方法

### 1.1 土壤采集及实验技术路线

1.1.1 土壤采集:水稻土于2012年11月采自江苏扬州宗村良种场(119°42'0"E, 32°35'5"N),隶属于中国FACE (free air CO<sub>2</sub> enrichment)大气二氧化碳浓度升高全球变化平台。该区域属于典型的中国亚热带单季稻麦轮作农业区。土壤类型为钙质

潜育土(calcaric glevsols), 植稻历史大于 50 年。用不锈钢土钻采集表层 15 cm 土壤, 土样风干后经过研磨, 并过 2 mm 筛除去大颗粒杂质, 4 °C 保存备用。土样最大持水量(maximum water holding capacity, WHC)为 55%, 总有机碳 15 g/kg, 总氮 1.59 g/kg, 总磷 1.23 g/kg, pH 7.4 (水土比 2.5)<sup>[13]</sup>。

**1.1.2 实验技术路线:** 如图 1 所示, 每个土壤可获得 4 种不同的样品: 直接提取的土壤微生物细胞(土壤细胞)、从土壤细胞悬液进一步提取的细胞 DNA (细胞 DNA)、从土壤细胞悬液经单细胞分选及全基因组扩增后获得的 DNA (单细胞 DNA)和直接提取的土壤微生物总 DNA (土壤 DNA)。(1) 针对水稻土微生物组的数量: 采用 DAPI 染色和 CARD-FISH 杂交两种显微计数方法, 分析土壤细胞数量; 采用 qPCR 分子技术分析细胞 DNA 和土壤 DNA 中微生物基因数量。(2) 针对水稻土微生物

物的物种组成: 采用高通量测序 16S rRNA 和 *pmoA* 基因的方法, 分析土壤 DNA、细胞 DNA、单细胞 DNA 中的微生物组成。水稻土样品则来自高浓度甲烷氧化前后, 即零时刻的背景土壤(Day 0)和氧化了 600  $\mu\text{mol}$  甲烷的水稻土(Day-17)。最后比较传统显微计数、现代分子方法研究土壤微生物组的数量、组成及好氧甲烷氧化微生物生理生态过程的技术特点。

**1.1.3 水稻土好氧甲烷氧化微生物过程:** 调整土壤含水量至最大持水量的 60% (实际含水量 33%), 在无菌封口袋中充分混匀后, 28 °C 预培养 4 d, 使土壤微生物充分活化。取 8 g 作为 0 时刻样品(Day 0), -20 °C 保存用于总 DNA 及土壤细胞的提取。其余土样用于微宇宙培养。在 120 mL 血清瓶中加入 8 g 水稻土, 设置 3 个平行, 用丁基橡胶塞密封后用铝盖封口, 抽真空后, 用注射器注入 14.4 mL  $\text{CH}_4$ , 36 mL  $\text{O}_2$ , 并用  $\text{N}_2$  补充至 1 个大气压, 甲烷初始浓度约 85.7  $\text{g}/\text{m}^3$ , 28 °C 避光培养。前 10 d 每天监测 1 次  $\text{CH}_4$  浓度, 10 d 后每 3-4 d 监测 1 次。待瓶内甲烷浓度降至 7.14  $\text{g}/\text{m}^3$  以下(第 17 天)终止实验, 取出土壤保存于 -20 °C 用于总 DNA 及土壤细胞的提取。培养 0 时刻(Day 0)及培养 17 d (Day 17)的土壤样品用于后续土壤微生物组和甲烷氧化菌的数量和组成分析。

## 1.2 土壤微生物组及好氧甲烷氧化菌细胞数量分析

**1.2.1 土壤微生物细胞提取:** 利用差速离心结合 Nycodenz 密度梯度离心的方法从土壤中提取微生物细胞<sup>[14]</sup>, 方法略有改动, 步骤如下: (1) 称取 1 g 土壤样本至 10 mL 无菌离心管, 加入 0.1 mm 的玻璃珠(Sigma) 0.5 g、0.2% 焦磷酸钠(sodium pyro-phosphate, pH 7.5)溶液 5 mL, 涡旋 2 min 后

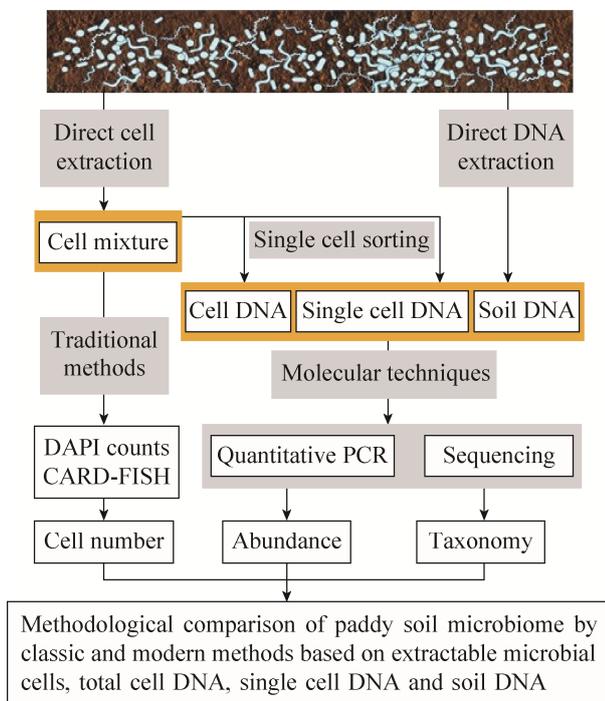


图 1. 实验整体思路和技术流程

Figure 1. Flow diagram of the study.

250×g 低速离心 2 min。(2) 准备新的 10 mL 离心管, 加入 4 mL Nycodenz 溶液(密度 1.3 g/mL, 8 g Nycodenz+10 mL ddH<sub>2</sub>O), 将低速离心得到的上清液贴壁缓缓加到 Nycodenz 溶液上方(切勿扰动上清液与 Nycodenz 之间形成的界面)。4 °C, 9800×g 离心 50 min (离心条件: Acc: 4, Del: 3)。(3) 离心结束后, 吸取水层和 Nycodenz 层之间的灰白色细胞层转移至 2 mL 离心管中, 4 °C 下 12000×g 离心 10 min, 弃上清。然后用 1×PBS 缓冲液洗涤菌体细胞 2 次(12000×g 离心 2 min)。(4) 细胞沉淀最终用 0.5 mL 4%多聚甲醛重悬, 置于 4 °C 过夜固定及保存。

**1.2.2 土壤微生物组的 DAPI 染色计数:** 将固定后的细胞悬液过滤到 0.22 μm 的聚碳酸酯滤膜上 (GTTP, Millipore, 直径 25 mm), 滤膜用 1×PBS 缓冲液清洗, 晾干, 在无菌培养皿中切取部分滤膜, 在滤膜上滴加 1 μg/mL 的 DAPI 水溶液, 室温下避光染色 10 min, 随后用过量双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)清洗后晾干。将滤膜正反面用 Citiflour 有机油浸润, 并借助有机油将滤膜固定在载玻片上, 盖上盖玻片在荧光显微镜(Axio Imager A2, ZEISS)下观察并拍照。随机挑选 10 个视野统计细胞数量。根据视野及滤膜面积计算每克土壤中提取的细胞数量。

**1.2.3 土壤微生物组的 CARD-FISH 计数:** 用于总细菌计数的 16S rRNA 探针为 EUB I-III<sup>[15]</sup>, 杂交步骤如下: (1) 将固定后的细胞悬液过滤到 0.22 μm 的聚碳酸酯滤膜上, 滤膜用 1×PBS 缓冲液清洗, 晾干, 在培养皿中切取部分滤膜, 背面做上标记。(2) 将滤膜置于 0.01 mol/L HCl 中室温下浸泡 10 min, 使细胞内过氧化氢酶失活, 然后用 1×PBS 缓冲液清洗, 晾干。(3) 将滤膜浸入新配制的溶菌酶缓冲液[溶菌酶 10 mg/mL, 并含

0.05 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)] 中, 37 °C 下处理 30 min, 以增加细胞的通透性。随后用 ddH<sub>2</sub>O 清洗后晾干。(4) 取 600 μL 杂交缓冲液[0.9 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20% dextran sulfate (W/V), 0.02% (W/V) sodium dodecyl sulfate (SDS), 35% (V/V) formamide, 1% (W/V) Blocking Reagent]加入 1.5 mL 的离心管中, 加入 2 μL 探针(50 ng/μL) 将滤膜全部浸入 46 °C 杂交 2 h。(5) 将滤膜从杂交缓冲液中取出, 浸入 50 mL 预热至 48 °C 的探针洗涤液[70 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA (pH 8.0), 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.01% (W/V) SDS], 在 48 °C 下继续水浴 10 min; 随后取出滤膜, 将其浸入 1×PBS 缓冲液中常温下放置 15 min, 之后用滤纸吸掉滤膜上多余的液体。(6) 配制酪胺信号扩增体系: 10 μL 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (现用现配)、1 μL Alexa Fluor™ 488 Tyramide Reagent (B40953, 150 slides, 150 μL DMSO 溶解)、989 μL 扩增缓冲液[在 1×PBS 缓冲液中包含 2 mol/L NaCl, 10% dextran sulfate (W/V), 1% (W/V) Blocking Reagent], 将滤膜浸入其中, 37 °C 避光水浴 30 min。然后在 1×PBS 缓冲液中浸泡 10 min, 用过量 ddH<sub>2</sub>O 清洗。(7) 将滤膜正反面用 Citiflour 有机油浸润, 并借助有机油将膜固定在载玻片上, 盖上盖玻片在荧光显微镜下观察、拍照并计数。

**1.2.4 土壤好氧甲烷氧化菌的 CARD-FISH 计数:** 好氧甲烷氧化菌主要分为 type I 及 type II 两大类, 分别属于  $\gamma$ -和  $\alpha$ -Proteobacteria, 对它们进行 CARD-FISH 杂交用的 16S rRNA 探针分别为 M $\gamma$ 84/705 和 M $\alpha$ 450<sup>[16]</sup>。具体步骤和土壤微生物组的 CARD-FISH 计数步骤基本相同, 两处不同之处为: 杂交缓冲液中 formamide 的比例为 20%, 探针洗涤液中 NaCl 的浓度为 215 mmol/L。

### 1.3 土壤微生物组及好氧甲烷氧化菌基因数量分析

**1.3.1 土壤 DNA 的提取** :采用 FastDNA Spin Kit for Soil (MP Bio)试剂盒提取土壤总 DNA ,土壤用量为 0.5 g ,提取步骤严格按照试剂盒说明书进行。利用微量紫外分光光度计(NanoDrop® ND-1000 UV-Vis)测定提取的总 DNA 浓度及质量,随后将 DNA 置于-20 °C 保存,用于后续定量 PCR 及高通量测序分析。

**1.3.2 细胞 DNA 的提取** :同 1.2 部分提取土壤微生物细胞,用 10 mL 1×PBS 缓冲液重悬细胞,随后将细胞悬液过滤到孔径 0.22 μm 的聚碳酸酯滤膜上(GTTP, Milipore),将滤膜用无菌剪刀剪碎,收集至 2 mL 无菌离心管中,用 FastDNA Spin Kit for Soil (MP Bio)试剂盒提取细胞 DNA ,细胞 DNA 置于-20 °C 保存,用于后续定量 PCR 及高通量测序分析。

**1.3.3 qPCR 分析土壤总微生物数量** :土壤微生物的 qPCR 定量所用引物为原核微生物 16S rRNA 基因 V4-V5 区通用引物对 515F (5'-GTGCCAGCM GCCGCGG-3')/907R (5'-CCGTC AATTCMTTTRA GTTT-3')。反应总体积为 20 μL ,包括 10 μL SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa)、0.25 μL 正反向引物 (50 μmol/L)、1 μL DNA 模板以及 8.5 μL 无菌双蒸水。反应程序如下:95 °C 3 min ;40×(95 °C 30 s ,55 °C 30 s ,72 °C 30 s ,with plate read) ;melt curve 65 °C to 95 °C ,increment 0.5 °C ,0:05+plate read<sup>[17]</sup>。反应在 CFX96 Optical Real-Time PCR System (Bio-Rad, Laboratories Inc. , Hercules , CA , USA)上进行。阴性对照采用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 代替样品作为反应模板。标准曲线的制作简述如下:用相应的引物扩增任意一个土壤样品的 DNA ,PCR 产物回收后进行 TA 克隆 ,选阳性克隆子培养后提取

质粒 ,用微量紫外分光光度计 (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis)测定质粒浓度,根据含目标片段的质粒长度及质量浓度计算得出每微升的目标基因拷贝数。用无菌去离子水对质粒进行 10 倍梯度稀释,作为标准样品用于构建标准曲线。

**1.3.4 qPCR 分析土壤好氧甲烷氧化菌的数量** :土壤好氧甲烷氧化菌的 qPCR 定量所用引物为甲烷单加氧酶 β 亚基编码基因 *pmoA* 扩增通用引物对: A189F (5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3')/mb661R (5'-CCGGMGCAACGTCYTTACC-3')<sup>[18-19]</sup> ,反应程序如下:95 °C 3 min ;40×(95 °C 10 s ,55 °C 30 s ,72 °C 30 s ,80 °C 5 s ,with plate read) ;melt curve 65 °C to 95 °C ,incremental 0.5 °C ,0:05+plate read。反应体系组成及标准曲线的制作过程同 16S rRNA 基因的 qPCR。

### 1.4 单细胞 DNA 的获取

**1.4.1 土壤微生物单细胞的分选** :首先提取土壤微生物细胞,方法同 1.2 部分。细胞沉淀最终用 1 mL 1×PBS 缓冲液重悬。然后,用血球计数板在显微镜(OLYMPUS PT-005)下对提取的细胞进行计数,根据计数结果将细胞悬液稀释至 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> 个/mL。最后,将 1 mL 稀释后的细胞悬液用 1×SYBR Green 室温避光染色 30 min ,用流式细胞仪(Moflo XDP , Beckman)将染色完毕的细胞分选到 96 孔板中。

**1.4.2 单细胞全基因组扩增** :使用 MDA (multiple displacement amplification)试剂盒(Qiagen REPLI-g Single Cell Kit)对单细胞进行全基因组扩增,使用前将各成分进行分装以避免污染。首先向 96 孔板中加入 40 μL 石蜡油(sigma aldrich),然后使用微量注射泵(harvard apparatus)加入裂解液(DLB),每孔 30 nL,阳性对照中加入 40 nL 大肠杆菌基因组 DNA (≤10 ng/μL),阴性对照孔中不加任何模板<sup>[20-21]</sup>。将 96 孔板放入预热至 65 °C 的

金属浴( $H_2O^3$ -PRO)中热裂解 10 min, 结束后冰上冷却。随后, 向 96 孔板中加入 30 nL 终止液中和反应。将 Reaction buffer、ddH<sub>2</sub>O、 $\phi$ 29 Polymerase、50 $\times$ SYBR Green 从冰上取出, 按照说明书配制 MDA Mix, 然后在每个孔中加入 400 nL MDA Mix, 2500 r/min 离心 30 s。MDA 总反应体积为 500 nL, 反应条件为 30  $^{\circ}C$  恒温扩增 10 h (RT-PCR 仪, ABI 7500), 每 10 min 采集 1 次荧光信号。Day 0 样品检测到阳性孔 84 个, Day 17 样品检测到阳性孔 196 个。在每个阳性孔内加入 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 对 MDA 扩增产物进行稀释。Day 0 和 Day 17 样品每个样品的每个孔吸取 2  $\mu$ L 混合, 作为单细胞 DNA 的 PCR 扩增模板, 用于后续的高通量测序分析。

## 1.5 土壤微生物组及好氧甲烷氧化菌群落的基因组分析

### 1.5.1 高通量测序分析土壤微生物组 16S rRNA

**基因组组成:** 土壤微生物 16S rRNA 基因 V4-V5 区扩增引物对为 515F/907R, 其中 515F 的 5'端连接有 12 个碱基的 barcode 序列, 用于区分不同的样品。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}C$  3 min; 95  $^{\circ}C$  30 s, 55  $^{\circ}C$  30 s, 72  $^{\circ}C$  45 s, 32 个循环; 72  $^{\circ}C$  10 min。PCR 扩增产物通过切胶回收试剂盒(MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.3.0, TaKaRa)进行纯化, 测定浓度后等质量混合, 然后建库测序。建库试剂盒为 VAHTS<sup>TM</sup> Nano DNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup>(南京诺唯赞生物科技有限公司), 测序试剂盒为 MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles, Illumina)。Mothur (version 1.33.3)软件用于测序结果的处理和分析<sup>[22]</sup>。“make.contigs”命令(deltaq=5)用于双末端序列的拼接, “trim.seqs”命令用于原始序列的质量控制。“classify.seqs”命令用于高质

量序列的 taxonomic 分类, 比对数据库文件为 trainset14\_032015.rdp.fasta 和 trainset14\_032015.rdp.tax, cutoff 值设为 80%。

### 1.5.2 高通量测序分析土壤好氧甲烷氧化菌 16S

**rRNA 基因的相对丰度:** 在土壤总微生物 16S rRNA 基因分类完成后, 从属水平的分类结果中筛选好氧甲烷氧化菌种类, 统计其在总微生物中的相对丰度。进一步根据相对丰度数据计算各个甲烷氧化菌种类在整体甲烷氧化菌中的相对含量。

### 1.5.3 高通量测序分析土壤好氧甲烷氧化菌

***pmoA* 功能基因组组成:** 好氧甲烷氧化菌 *pmoA* 基因扩增引物为 A189F 和 mb661R, 其中 A189F 的 5'端连接有 6 个碱基的 barcode 序列, 用于区分不同的样品。反应程序为 94  $^{\circ}C$  3 min; 94  $^{\circ}C$  30 s, 55  $^{\circ}C$  30 s, 72  $^{\circ}C$  45 s, 32 个循环; 72  $^{\circ}C$  10 min。PCR 产物的纯化、建库及测序过程同 16S rRNA 基因。测序完成后, 使用 Mothur 软件中的“trim.seqs”命令对序列进行质量控制, “classify.seqs”命令用于高质量序列的 taxonomic 分类, 比对数据库文件为 pmoa.mothur.2013.fasta 和 pmoa.mothur.2013.tax, cutoff 值设为 80%<sup>[23]</sup>。

## 1.6 统计分析

Alpha 多样性和 Beta 多样性指数的计算使用 Mothur (version 1.33.3)软件完成<sup>[24]</sup>。16S rRNA 基因按照 97%的序列相似度划分 OTU (Operational Taxonomic Unit), 命名为 OTU<sub>0.03</sub>, *pmoA* 基因按照 90%的核酸序列相似度分 OTU, 命名为 OTU<sub>0.10</sub>。样品测序量进行归一化以避免测序深度的差异对多样性计算的影响。“rarefaction.single”命令用于计算样品 OTU 数量随测序量不断加深的变化过程。“unifrac.weighted”命令用于统计不同分组样品群落结构是否具有显著差异, 样品间

的差异性通过“pcoa”命令进行 PCoA (principal coordinates analysis, 主坐标分析)分析进行展示。不同处理间平均值差异的显著性采用 SPSS 17.0 软件中的 one way-ANOVA 或 T-TEST 进行检验。

## 2 结果和分析

### 2.1 土壤微生物组的研究方法比较及水稻土好氧甲烷氧化微生物过程

传统显微计数和现代分子方法研究土壤微生物数量的问题包括:(1) 土壤微生物细胞的提取效率。目前技术条件下,一般认为土壤 DNA 来自于土壤微生物组中所有细胞的 DNA,而直接提取的微生物仅反映了土壤中易与土壤颗粒分离的细胞。因此,如图 1 所示,土壤 DNA 的 qPCR 定量在一定程度上可代表土壤中所有微生物的基因数量,而细胞 DNA 的 qPCR 定量则代表了土壤中可提取微生物的基因数量,两者之间的比例即为土壤微生物的细胞提取效率。(2) 可提取细胞 DNA 与直接提取土壤微生物 DNA 的物种差异比较。一般认为目前的提取技术很难获得所有微生物细胞。因此,通过测序土壤 DNA、细胞 DNA 和单细胞 DNA,即可初步推测可提取微生物在多大程度上能够代表土壤微生物组的全貌;可提取细胞悬液经单细胞分选后,其单细胞 DNA 分析是否具有代表性。

本研究针对 2 个土壤样本(Day 0, Day 17)开展了上述分析。如图 2-A 所示,与零时刻(Day 0)相比,Day 17 水稻土氧化了大约 600  $\mu\text{mol}$  的高浓度甲烷,相应地,培养瓶中零时刻甲烷浓度从 85.7  $\text{g}/\text{m}^3$  降至 6.14  $\text{g}/\text{m}^3$  左右。

### 2.2 基于 qPCR 的土壤微生物组及甲烷氧化菌数量比较

通过 qPCR 比较了土壤 DNA 和细胞 DNA 中

的 16S rRNA 基因拷贝数,结果表明:土壤微生物细胞的提取效率约为 2.0%。如图 2-B 所示,Day 0 土壤 DNA 中的 16S rRNA 基因数量在  $8.7 \times 10^{10}$  copies/g,而细胞 DNA 中 16S rRNA 基因的数量在  $1.7 \times 10^9$  copies/g,两者相差 50 倍(ANOVA,  $P < 0.05$ )。类似的,Day 17 土壤 DNA 中 16S rRNA 基因数量为  $1.6 \times 10^{11}$  copies/g,相应的细胞 DNA 中 16S rRNA 基因数量为  $3.8 \times 10^9$  copies/g,两者相差 41 倍,土壤细胞提取效率(2.4%)和 Day 0 土壤样本基本一致。此外,通过比较 Day 0 和 Day 17 土壤 DNA 的 qPCR 定量结果,发现整体微生物数量略微增加 1 倍左右,基于土壤 DNA 和基于细胞 DNA 的 qPCR 结果均发现相同的增加趋势(图 2-B)。

通过对土壤 DNA 和细胞 DNA 中的 *pmoA* 基因进行 qPCR 定量,结果表明土壤甲烷氧化菌细胞的提取效率由零时刻的 0.9%左右提高到高浓度甲烷培养后的 6.1%左右(ANOVA,  $P < 0.05$ )。如图 2-C 所示,零时刻土壤 DNA 和细胞 DNA 中甲烷氧化菌 *pmoA* 基因数量分别为  $2.1 \times 10^7$  copies/g 和  $1.8 \times 10^5$  copies/g,细胞提取效率仅 0.9%;高浓度甲烷培养之后,分别增加到  $1.2 \times 10^9$  copies/g 和  $7.0 \times 10^7$  copies/g,土壤甲烷氧化菌细胞提取效率也增大到了 6.1%左右(图 2-C)。

通过比较 Day 0 和 Day 17 土壤 DNA、细胞 DNA 的 qPCR 结果,均发现高浓度甲烷培养导致甲烷氧化菌大量增长。土壤 DNA 的定量分析表明高浓度甲烷培养导致土壤甲烷氧化菌增加了 54 倍,而基于细胞 DNA 的 qPCR 分析表明这一增加量约为 388 倍。尽管两种方法的具体增加量不同,但基于土壤 DNA 和细胞 DNA 的定量结果均表明水稻土氧化高浓度甲烷后其中的甲烷氧化菌大量增加,两种方法均能较好表征水稻土中甲烷氧化菌的生长过程(图 2-C)。

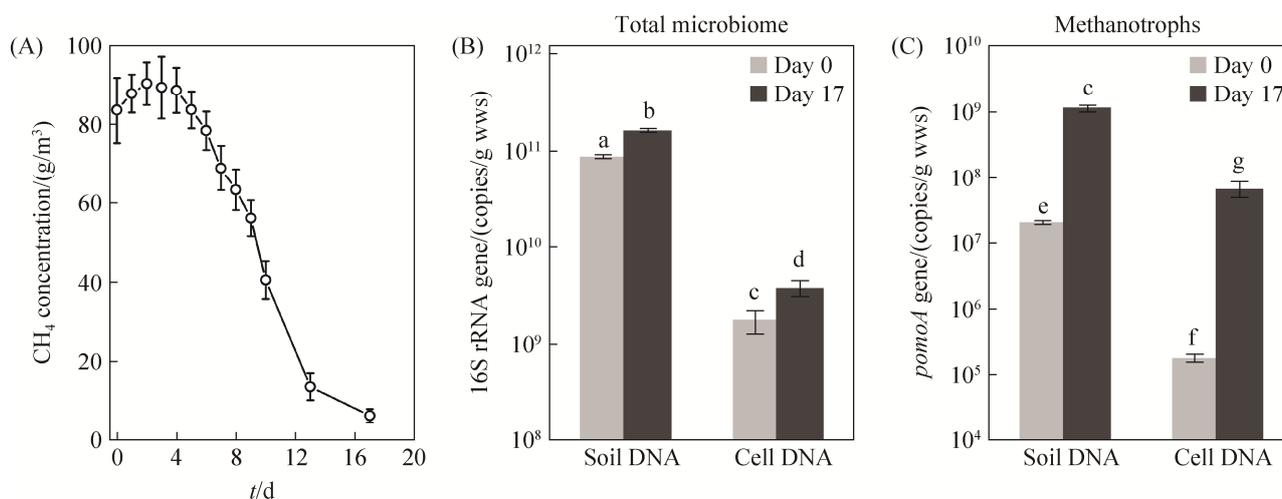


图 2. 水稻土氧化甲烷的动力学过程(A)及土壤总微生物(B)与甲烷氧化菌(C)的数量变化

Figure 2. Consumption dynamics of methane by paddy soil (A), copy number changes of 16S rRNA (B) and *pmoA* genes (C) in 1 g wet weight soil (wws) or in cells extracted from 1 g wet weight soil before and after methane incubation. Error bars represent standard deviations ( $n=3$ ), and columns with the different letters are significantly different ( $P<0.05$ ) by one-way ANOVA.

### 2.3 基于 DAPI 染色和 CARD-FISH 杂交的土壤微生物组及甲烷氧化菌数量比较

通过 DAPI 染色及 CARD-FISH 计数对土壤可提取微生物细胞计数。如图 3-A 所示, Day 0 样本中总微生物细胞的 DAPI 计数为  $5.8 \times 10^7$  cells/g, Day 17 样本中略微增加至  $7.4 \times 10^7$  cells/g。而 CARD-FISH 的计数结果分别为  $1.7 \times 10^7$  cells/g (Day 0) 和  $1.9 \times 10^7$  cells/g (Day 17) (图 3-B)。DAPI 染色的灵敏度更高, 是 CARD-FISH 计数结果的 3–4 倍。

利用 Type I 和 Type II 甲烷氧化菌的特异探针进行 CARD-FISH 计数, 结果表明高浓度甲烷氧化过程中, 好氧甲烷氧化菌的数量显著增加(图 3-C, D)。零时刻甲烷氧化菌数量较低, Type I 甲烷氧化菌约  $1.6 \times 10^4$  cells/g, Type II 甲烷氧化菌约  $2.1 \times 10^4$  cells/g; 而高浓度甲烷培养后(Day 17), 两类甲烷氧化菌数量均显著增加( $t$ -test,  $P<0.01$ ), Type I 甲烷氧化菌数量增加至  $1.7 \times 10^6$  cells/g, 增

加 100 倍左右(图 3-C)。Type II 甲烷氧化菌增加到  $4.1 \times 10^4$  cells/g, 增加 1 倍左右(图 3-D)。Day 0 水稻土中甲烷氧化菌总量约  $3.7 \times 10^4$  cells/g; Day 17 则增加至  $1.7 \times 10^6$  cells/g, 增幅约 45 倍。

### 2.4 基于高通量测序的土壤微生物组成分析

在微生物分类学门的水平, 高通量测序土壤 DNA 和细胞 DNA 的 16S rRNA 基因组成基本一致, 表明可提取细胞中涵括了栖息于土壤中的主要微生物类群。如图 4-A 所示, 在 Day 0 土壤 DNA 中含有 30 个已知的门, 而细胞 DNA 中则检测到了 25 个门, 且未检测到的 5 个门均为丰度非常低的门类, 在土壤 DNA 中仅占 0.14%。然而, 同一个微生物门在土壤 DNA 和细胞 DNA 中的相对丰度具有明显差异, 例如, Planctomycetes 门在土壤 DNA 中仅占 3.1%, 但在细胞 DNA 中比例上升至 19.6%。Acidobacteria 门在土壤 DNA 中占 12.2%, 而在细胞 DNA 中仅占 1.1%。此外, 土壤中存在大量的未知微生物类群(unclassified bacteria), 在

土壤 DNA 中占比高达 20.1%，而在细胞 DNA 中仅占 4.0%，表明这些未知微生物细胞很难被提取。针对土壤细胞悬液的单细胞分选结果则表明，尽

管也发现了 20 个门类的细胞，但分离出来的细胞绝大部分属于 Proteobacteria 门，可占 95%以上，具有非常明显的偏好性(图 4-A)。

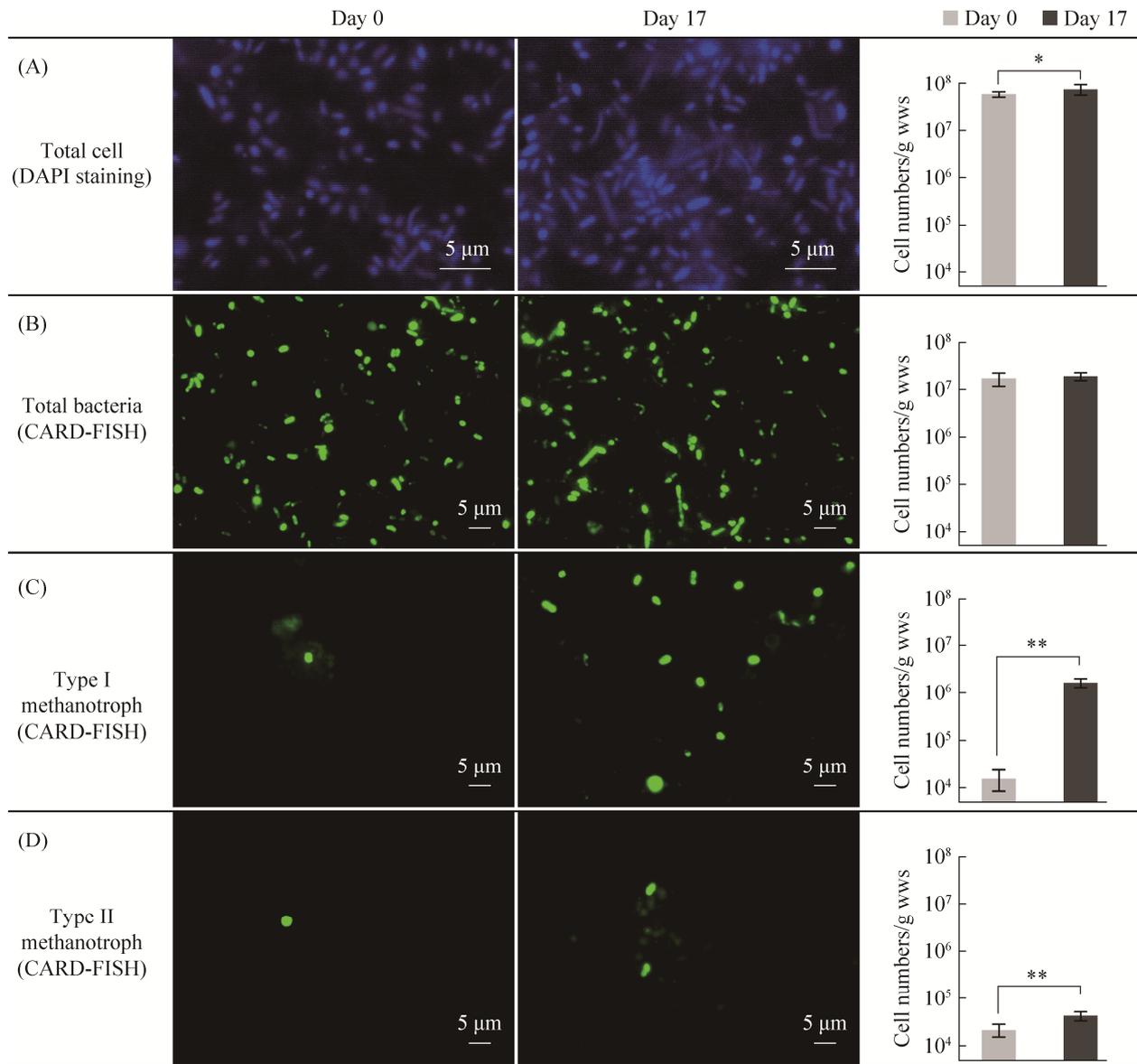


图 3. 高浓度甲烷培养前后土壤总微生物及甲烷氧化菌细胞经过 DAPI 染色(A)及 CARD-FISH 杂交(B, C, D)后的显微图像

Figure 3. Abundance changes of DAPI and CARD-FISH-stained cells extracted from 1 g wet weight paddy soils before and after high concentration methane incubation. A: DAPI-stained total cell; B: CARD-FISH of total bacteria using probes EUB338 I-III; C: CARD-FISH of type I methanotrophs using probes M $\gamma$ 84/705; D: CARD-FISH of type II methanotrophs using probes M $\alpha$ 450. Cell numbers were obtained by classical microscopic counting method. \*: *t*-test ( $n=10$ ),  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

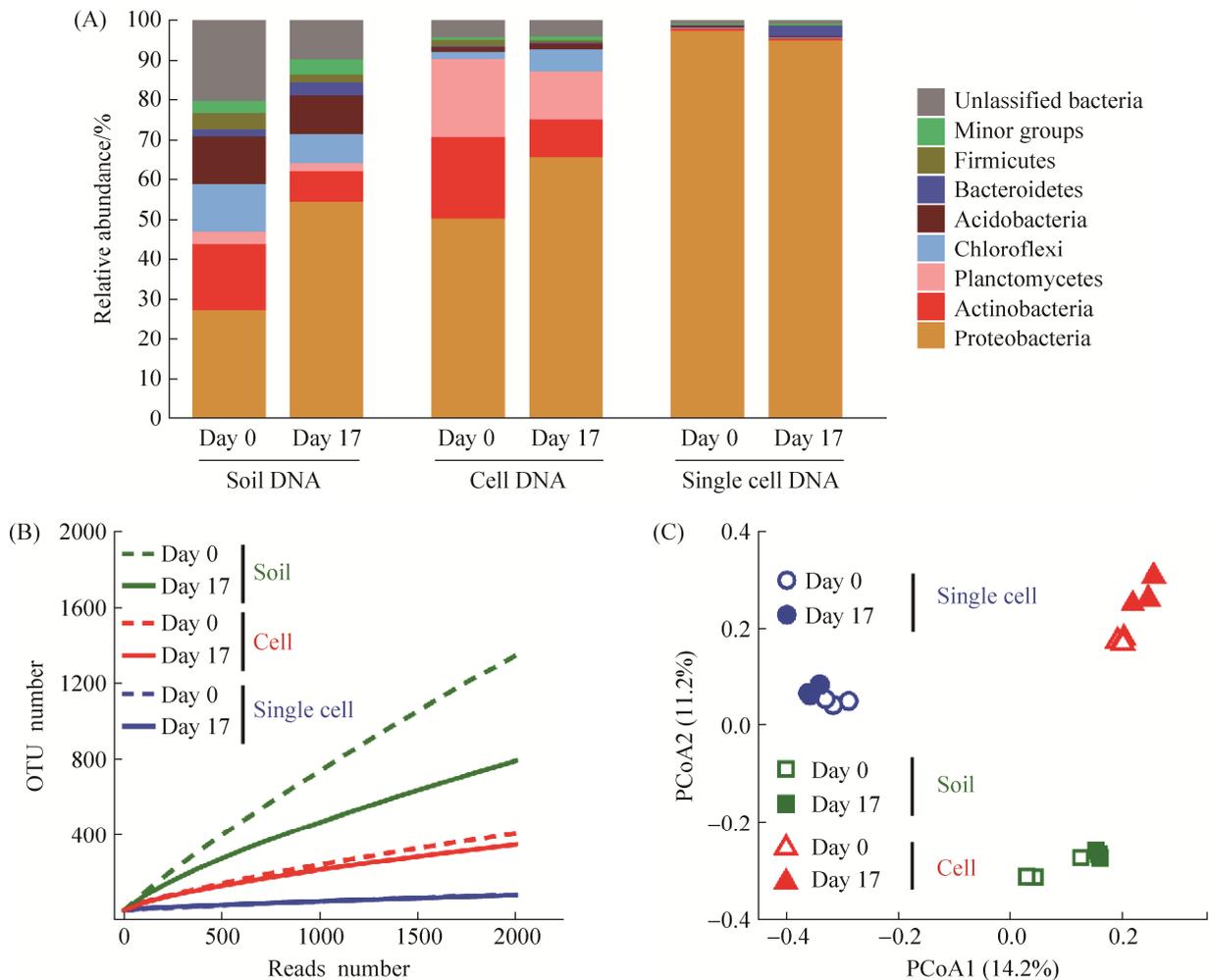


图 4. 高浓度甲烷培养前后土壤 DNA、细胞 DNA 及单细胞 DNA 中总微生物的群落结构及多样性的变化  
 Figure 4. Community composition and diversity changes of the total soil microbiome in paddy soils before and after high concentration methane incubation on the basis of 16S rRNA gene analysis. A: Phyla detected in soil DNA, cell DNA and single cell DNA; B: Rarefaction curves of OTU number; C: Principal coordinate analysis (PCoA) of bacterial communities from soil DNA, cell DNA and single cell DNA.

针对 Day 17 的样品分析表明, 水稻土好氧甲烷氧化过程在一定程度上也可能影响门水平的微生物类群。在土壤 DNA 中, Proteobacteria 门相对丰度从 Day 0 的 27.5% 增至 Day 17 的 54.5%; 而在细胞 DNA 中, 则从 50.6% 增至 66.0%。此外, Actinobacteria 门在土壤 DNA 中从 Day 0 的 16.6% 降至 Day 17 的 7.7%; 在细胞 DNA 中从 20.4% 降低至 9.3% (图 4-A)。基于单细胞 DNA 的测序结果未能展示这一趋势。

但值得注意的是, 在微生物分类学种的水平 (DNA 序列相似度大于 97%) , 土壤 DNA、细胞 DNA 及单细胞 DNA 的高通量测序结果差异较大。经过测序深度的归一化后, 发现土壤 DNA 的微生物多样性指数最高, 而细胞 DNA 中的微生物多样性指数明显降低, 单细胞 DNA 中的微生物多样性最低 (图 4-B), 这一结果极可能源于分离的单细胞数量过少 (<200 个)。基于 OTU<sub>0.03</sub> 组成相似性, PCoA 分析进一步展示了不同研究方法获得的微生物群

落结构间的差异,所有样品按照3种方法聚成3个明显分离的簇(weighted unifrac,  $P < 0.005$ ),表明在种的水平,土壤DNA、细胞DNA和单细胞DNA中微生物组成差异较大,本研究采取的细胞提取策略及单细胞分选技术具有明显的偏好性(图4-C)。

## 2.5 基于高通量测序的土壤好氧甲烷氧化菌组成分析

高通量测序水稻土微生物组16S rRNA基因后,通过筛选好氧甲烷氧化菌的16S rRNA序列并在科和属的水平计算不同甲烷氧化菌的相对丰度,比较了水稻土氧化甲烷过程中甲烷氧化菌的组成变化规律。如图5-A所示,水稻土中检测到的所有好氧甲烷氧化菌可分为Type I和Type II两个类型,

分别对应Methylococcaceae和Methylocystaceae两个科。在土壤DNA中,Type I和Type II在Day 0的相对百分比分别为0.7%和0.3%;而在Day 17的相对百分比分别为18.4%和1.0%,增幅为25.3倍和2.3倍。类似的,在细胞DNA中,Type I的百分比从2.0%增加至35.2%,增幅达16.6倍,而Type II甲烷氧化菌则从0.9%增加至4.9%,增幅约为4.4倍。这一结果和基于CARD-FISH显微计数基本一致(图3-C, D)。单细胞DNA测序结果未检测到足量的甲烷氧化菌16S rRNA序列,因此未能反映这一趋势。

进一步在属的水平分析好氧甲烷氧化菌的组成。在土壤DNA中,Day 0样品中的优势种为一

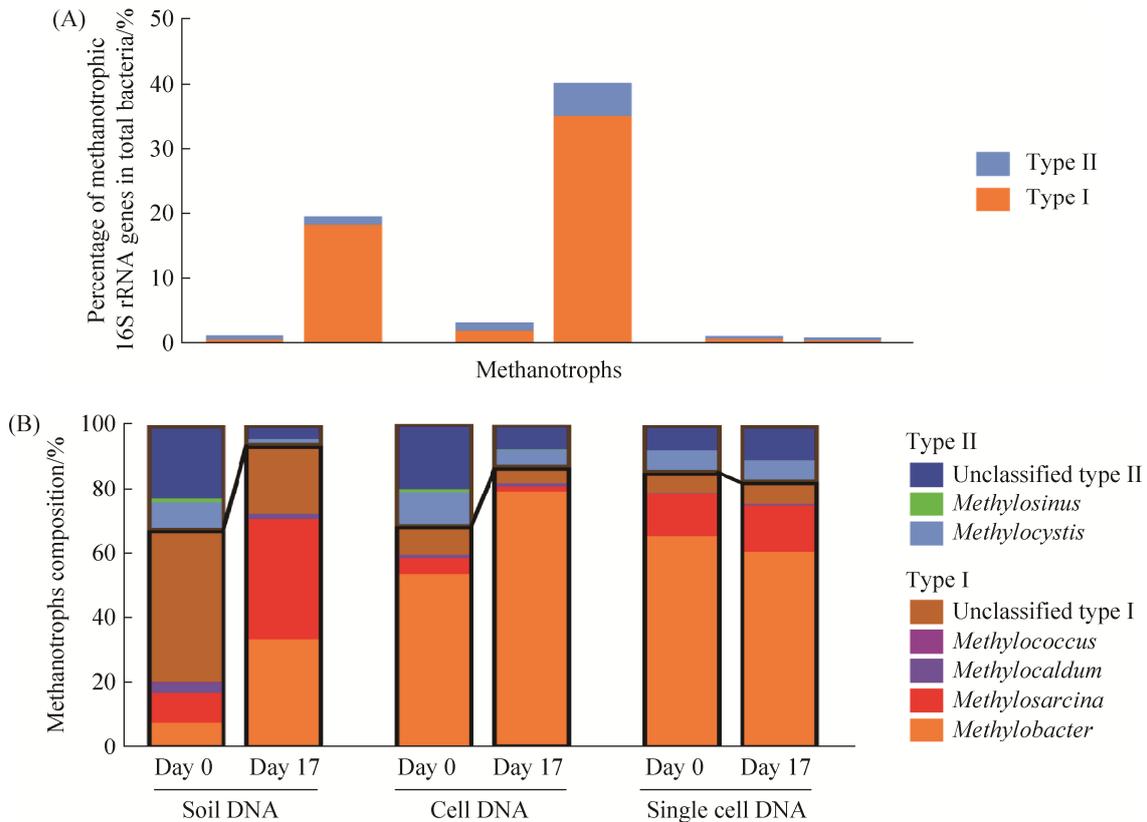


图5. 高浓度甲烷富集前后甲烷氧化菌在整体微生物中的相对含量(A)及群落组成变化(B)

Figure 5. Changes of relative abundance of methanotrophs in total microbiome (A) and methanotroph community composition (B) before and after high concentration methane incubation.

些未分类甲烷氧化菌(Unclassified type I or type II), 占比近 70%, 高浓度甲烷富集后 Day 17 样品中优势种转变为 Type I 中的 *Methylobacter* 和 *Methylosarcina*, 占比分别达 37.4%和 34.1%。而在细胞 DNA 中, Day 0 样品中的优势种为 Type I 中的 *Methylobacter*, 占比为 54.4%, 在 Day 17 样品中优势种仍为 *Methylobacter*, 占比增加到 80.3%, 而 *Methylosarcina* 的占比仅为 1.6%。单细胞 DNA 中也检测到了 5 种不同的甲烷氧化菌 16S

rRNA 基因型, 但 Day 0 和 Day 17 样品中的优势种没有发生变化, 均为 *Methylobacter*, 占比分别为 66.2%和 61.3% (图 5-B)。

通过分析 *pmoA* 基因高通量测序数据, 在微生物分类学种的水平(*pmoA* 基因相似度大于 90%), 研究了高浓度甲烷培养前后土壤 DNA、细胞 DNA、单细胞 DNA 中好氧甲烷氧化菌的多样性变化及群落结构聚类特征。如图 6-A 所示, 尽管 Day 0 的土壤 DNA、细胞 DNA、单细胞 DNA 中 *pmoA* 基

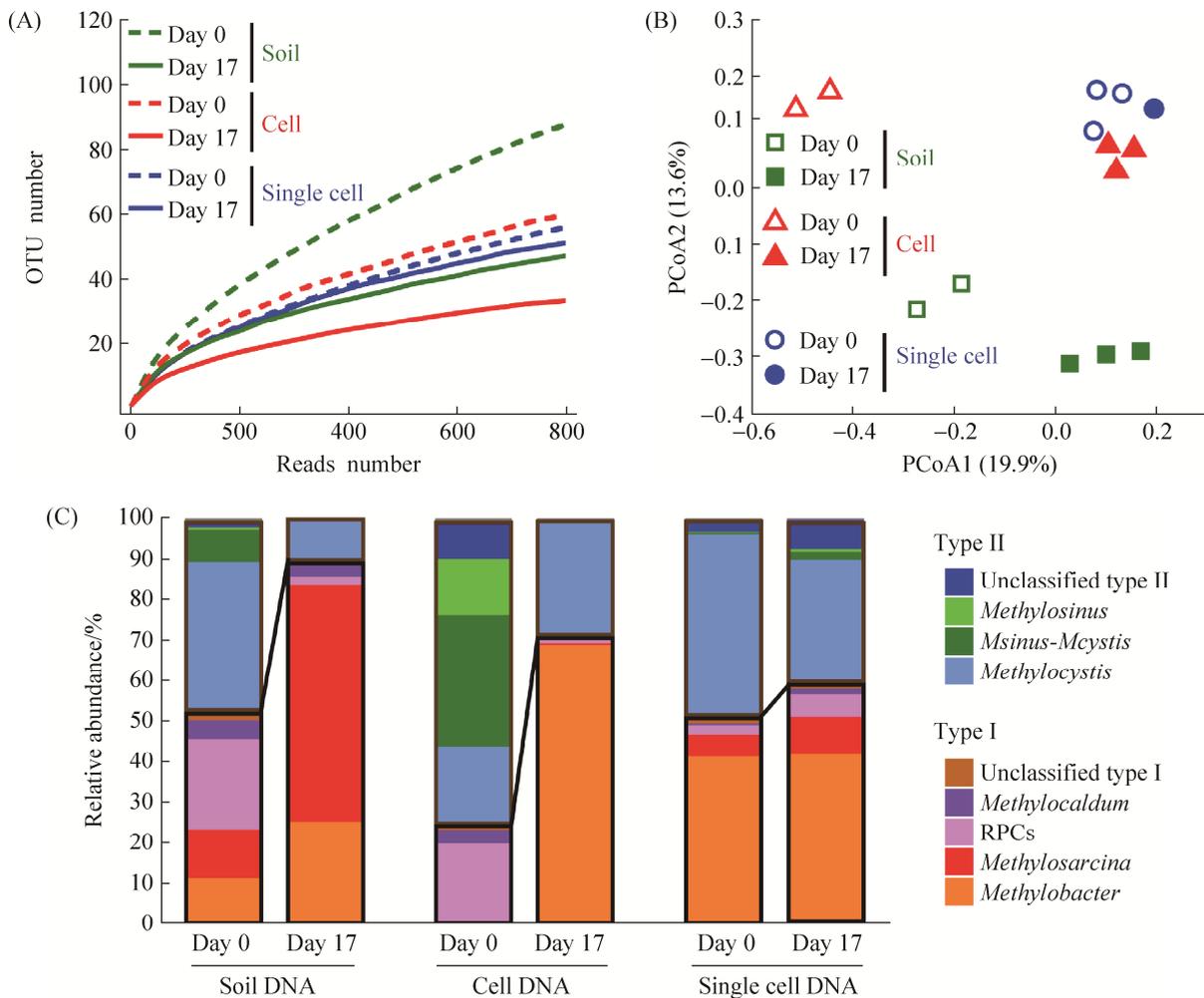


图 6. 高浓度甲烷培养前后土壤 DNA、细胞 DNA 及单细胞 DNA 中甲烷氧化菌群落 *pmoA* 基因多样性及组成变化  
Figure 6. Diversity and genotype composition of methanotrophs in soil DNA, cell DNA and single cell DNA based on MiSeq sequencing of *pmoA* gene. A: Rarefaction curves of OTU number; B: Principal coordinate analysis (PCoA) of methanotroph communities in soil DNA, cell DNA and single cell DNA; C: Methanotroph genus or *pmoA* genotypes detected in soil DNA, cell DNA and single cell DNA.

因多样性不尽相同,但均明显高于 Day 17,表明高浓度甲烷氧化过程中部分种群快速增加并导致整体多样性降低。进一步的群落结构聚类分析表明,与 Day 0 相比,水稻土氧化高浓度甲烷后 (Day 17),土壤 DNA、细胞 DNA 中的甲烷氧化菌的物种组成也发生了明显的分异(weighted unifracs,  $P < 0.005$ ),而在单细胞 DNA 中,没有检测到甲烷氧化菌在高浓度甲烷富集前后的群落结构分异趋势(图 6-B),这和图 5-B 基于 16S rRNA 基因的测序结果一致。

进一步在甲烷氧化菌属的水平,通过测序土壤 DNA、细胞 DNA、单细胞 DNA 中的 *pmoA* 基因发现 7 个甲烷氧化菌属,并且各个属在水稻土甲烷氧化过程中的变化规律并不一致(图 6-C)。在 Day 0 土壤 DNA 中,RPCs 是优势的 Type I 甲烷氧化菌,其相对丰度为 22.3%,次优势属为 *Methylosarcina* 和 *Methylobacter*,相对丰度分别为 12.1%和 11.6%。而 *Methylocystis* 则是优势的 Type II 甲烷氧化菌,其相对丰度为 36.4%。在 Day 0 细胞 DNA 中,Type II 则成为优势类群,其中 *Methylocystis-Methylosinus*、*Methylocystis*、*Methylosinus* 的相对丰度分别为 32.4%、19.4%和 13.9%。在水稻土氧化高浓度甲烷后,Day 17 土壤 DNA 中 *Methylosarcina*、*Methylobacter* 的百分比大幅增加至 58.6%和 25.6%,而在细胞 DNA 中,仅 *Methylobacter* 发生显著增加,从 Day 0 的 0.1%增至 Day 17 的 69.2%。单细胞 DNA 的测序结果则表明,在水稻甲烷氧化过程中,Type I 中的 *Methylosarcina* 和 RPCs 属发生少量增加,而 Type II 中尚未有明确分类地位的甲烷氧化菌属也有少量增加。

在甲烷氧化菌科的水平,基于 *pmoA* 基因和基于 16S rRNA 基因的高通量测序结果非常一致,

均表明在高浓度甲烷富集后 Type I 甲烷氧化菌相对含量大幅增加,并且土壤 DNA 和细胞 DNA 中检测到一致的甲烷氧化菌变化趋势。在土壤 DNA 中,Type I 甲烷氧化菌相对百分比从 Day 0 的 53.3%增至 Day 17 的 89.8%,增幅约为 68%;而在细胞 DNA 中,则从 24.8%增至 71.8%,增幅高达 190%。相反,与 Day 0 相比,土壤 DNA 和细胞 DNA 中 Type II 甲烷氧化细菌相对百分比在 Day 17 均明显降低。单细胞 DNA 的 *pmoA* 测序结果也表现出了类似的趋势(图 6-C)。

### 3 讨论

核酸 DNA 是分子方法研究土壤微生物组的核心,而传统方法则聚焦于土壤中可提取的微生物细胞。据此,我们针对土壤 DNA、土壤中可提取微生物细胞(土壤细胞)和土壤细胞 DNA (细胞 DNA),采用 qPCR 方法、显微计数方法(DAPI 染色、CARD-FISH 杂交)及高通量测序 PCR 产物方法,比较分析了不同方法研究土壤微生物组的特点。结果表明,不同方法获得的土壤微生物数量范围变化较大,在  $10^7-10^{10}$  cells/g 之间,DAPI 染色和 CARD-FISH 杂交的计数结果最低,而 qPCR 定量土壤 DNA 的结果最高,相差最高可达 3 个数量级。这些结果表明,不同方法研究土壤微生物组数量的结果差异显著,不具备可比性。进一步的高通量测序结果也发现,尽管在微生物分类学门的水平,土壤 DNA、细胞 DNA、单细胞 DNA 中的主要类群基本一致,但在种的分类水平,土壤微生物组群落结构分异明显。然而值得注意的是,尽管传统方法和分子技术的检测分辨率具有明显差异,但均能较好地表征水稻土甲烷氧化过程的好氧甲烷氧化菌变化规律。需要特别指出的是,本研究仅针对一种水稻土开展研究,并且主

要研究对象为好氧甲烷氧化菌这一类功能微生物类群。因此, 研究结果对旱地等不同类型土壤及其他功能微生物类群的普适性仍待更多试验验证。

实时荧光定量 PCR 的结果明显高于传统微生物计数法, 相差在 1–3 个数量级之间。然而, 基于土壤 DNA 的 qPCR 方法极可能高估微生物数量。主要原因包括: (1) 土壤中胞外 DNA 干扰。这些胞外 DNA 可能是活体微生物细胞分泌物, 也可能来自于死亡细胞裂解后的游离 DNA<sup>[25-26]</sup>。据估算, 每克土壤中附着于土壤颗粒或游离的胞外 DNA 含量可能高达 1.9  $\mu\text{g}$ <sup>[27]</sup>, 而本研究中每克水稻土总 DNA 的提取量约在 4–6  $\mu\text{g}$  之间, 导致土壤微生物量被高估可能达 1 倍之多。(2) 不同微生物 16S rRNA 基因拷贝数差异巨大。根据对已知 2013 个微生物基因组(130 个古菌、1883 个细菌)的分析, 发现单个细菌细胞中 16S rRNA 基因拷贝变幅为 1–15, 而古菌的变幅为 1–4, 并且超过 80% 已知细菌种类含有 2 个以上的 16S rRNA 基因拷贝<sup>[28]</sup>。此外, 已知的好氧甲烷氧化菌细胞通常含有 2–3 个 *pmoA* 基因拷贝<sup>[29-30]</sup>。因此, 基于 16S rRNA 或其它靶标基因的 qPCR 极可能高估土壤中的微生物细胞数量。据此, 假设每个微生物细胞含有 6 个 16S rRNA 基因拷贝, 每个好氧甲烷氧化菌含有 2 个 *pmoA* 基因拷贝, 基于土壤 DNA qPCR 的微生物数量约为  $1.5 \times 10^{10}$ – $2.7 \times 10^{10}$  cells/g, 基于细胞 DNA qPCR 的土壤总微生物数量约  $2.8 \times 10^8$ – $6.3 \times 10^8$  cells/g, 而基于 DAPI 染色和 CARD-FISH 的微生物数量约为  $1.7 \times 10^7$ – $7.4 \times 10^7$  cells/g。针对好氧甲烷氧化菌, 土壤 DNA qPCR 的数量约为  $1.1 \times 10^7$ – $6.0 \times 10^8$  cells/g, 细胞 DNA qPCR 的数量约为  $9.0 \times 10^4$ – $3.5 \times 10^7$  cells/g, 而 CARD-FISH 计数范围则为  $3.7 \times 10^4$ – $1.7 \times 10^6$  cells/g, 不同方法间的差异

最高达到 3 个数量级。

与 qPCR 相比, 基于细胞提取的显微计数极可能低估土壤微生物的数量。这种低估与土壤微生物细胞提取效率紧密相关, 并受很多因素影响, 主要包括微生物细胞本身、物理和化学分散策略、土壤类型等。(1) 微生物细胞类群。细胞形态、活性及代谢方式均可能影响土壤微生物细胞提取<sup>[31]</sup>, 其中细胞大小可能是最重要的因素。微生物细胞直径范围跨度可达 0.2–750.0  $\mu\text{m}$ <sup>[32]</sup>, 而古菌细胞更小, 与细菌细胞差异可达 10 倍之多。最近的研究采用不同滤膜分选土壤中的微生物细胞, 表明 59%–67% 的细胞直径均小于 1.2  $\mu\text{m}$ , 细胞直径越小, 其中的难培养微生物包括古菌比例越高, 两者之间具有较好的相关性<sup>[33]</sup>。(2) 物理干扰因子。土壤中不同种类的微生物细胞提取效率具有一定的差异, 这可能是由于不同种类微生物细胞与土壤颗粒的粘附程度不同导致的。相当数量的微生物细胞可能与土壤颗粒紧密粘附在一起。因此, 首先需要通过超声波、物理匀浆、机械振荡以及化学分散剂等方式将微生物细胞和土壤颗粒分离<sup>[34]</sup>, 随后利用差速离心、密度梯度离心或者两相分离技术等将微生物细胞与土壤颗粒分开, 而不同的分离方式会对土壤微生物细胞提取造成不同的影响。例如, 已有研究表明超声波对细胞损伤最大, 而物理旋转搅拌影响较小, 并与机械强度和作用时间紧密相关<sup>[35]</sup>。(3) 化学干扰因子。不同的缓冲溶液配比及不同的离心介质具有完全不同的细胞分离效果<sup>[36]</sup>, 如 Nycodenz 作为离心介质, 较之蔗糖或 Percoll 等其他介质, 可以获得纯度更高的微生物细胞, 但其损失较大, 提取效率较低<sup>[37]</sup>。(4) 土壤类型影响<sup>[38-39]</sup>。据估算, 地球上高级分类单元的土系高达 22000 类, 这些土壤起源自不同的母质、地形、气候、时间和生

物作用，形成了极为复杂的历史自然体。例如，花岗岩、玄武岩和石灰岩等母质在不同地理气候风化条件下，会产生物理化学性质各异的土壤黏粒，这些带有不同电荷的蒙脱石、高岭石等矿物胶体最终形成了各种粒径的土壤团聚体，构成了多相疏松多孔土壤环境维持微生物的生长<sup>[40]</sup>。未来需要发展物理-化学-生物的原位综合观测技术，在不损失活体细胞条件下，尽量消除微生物与土壤颗粒之间相互作用，发展高效的土壤微生物细胞分离技术和评价体系。

高通量测序 16S rRNA 基因清楚表明土壤微生物细胞提取过程中存在明显的偏差，特别是土壤 DNA 中 Acidobacteria 门类微生物占比高达 12.2%，但在细胞 DNA 中该门类微生物仅占 1.1%。这一结果与最近的瑞典苔原草地土壤结果类似，土壤 DNA 中 Acidobacteria 门含量可达 50% 左右，而 CARD-FISH 特异探针杂交则表明 Acidobacteria 门的相对丰度仅为 10% 左右<sup>[41]</sup>。Acidobacteria 微生物难以被提取的主要原因可能是其细胞较小，直径通常小于 0.8  $\mu\text{m}$ ，与土壤颗粒结合比较紧密，常规的涡旋方法难以使其与土壤颗粒充分分离，导致大部分 Acidobacteria 门细胞随着土壤颗粒离心到离心管底部而远离细胞层<sup>[33]</sup>。同时，相当数量的 Acidobacteria 门微生物能够分泌粘性的胞外多糖复合物，增加了细胞和土壤颗粒间的粘附力，降低了该门类细胞的提取效率<sup>[42]</sup>。此外，Planctomycetes 门在土壤 DNA 中仅占 3.1%，但在细胞 DNA 中比例上升至 19.6%，因此，也可能是 Planctomycetes 类群微生物更容易提取，间接导致 Acidobacteria 微生物的比例变低。值得注意的是，细胞 DNA 中未分类的微生物较少，其原因可能是很多难培养微生物直径小于 0.2  $\mu\text{m}$ <sup>[43]</sup>，而这些微小的微生物可能被土壤团聚

体包裹而难以被分离。

尽管采用传统显微计数和现代分子方法研究水稻土微生物组的结果具有明显差异，但不同方法均能较好反映好氧甲烷氧化过程的微生物生理生态特征。例如，基于可提取细胞的 CARD-FISH 甲烷氧化菌计数仅为  $10^4$  cells/g，而基于土壤 DNA 的数量高达  $10^7$  cells/g，两者相差可达数千倍。然而，水稻土甲烷氧化过程中，CARD-FISH 计数、土壤可提取细胞 DNA 的 qPCR 定量以及土壤 DNA 定量分析，均表明好氧甲烷氧化菌明显增长，增幅分别为 54 倍(土壤 DNA)、388 倍(细胞 DNA)和 45 倍(CARD-FISH)。16S rRNA 和 *pmoA* 基因测序均表明：高浓度甲烷富集后 Type I 甲烷氧化菌成为甲烷氧化菌中的优势类群，并且这一规律在土壤 DNA 及细胞 DNA 中非常一致。因此，至少在微生物分类科的水平，基于细胞 DNA 的高通量测序结果可以完全反映甲烷氧化菌对高浓度甲烷刺激的响应规律。然而，在甲烷氧化菌各个属中，*Methylosarcina* 在细胞 DNA 中的丰度远低于其在土壤 DNA 中的丰度，表明其提取效率明显低于其他甲烷氧化菌种类。*Methylosarcina* 属的细胞常呈现不规则形，并且细胞表面分布有纤毛状结构或者致密的粘液层，能将多个细胞粘附在一起形成团块，而其他种类的甲烷氧化菌则不具备这些特征<sup>[44]</sup>。因此，这些形态及生理上的特异性可能导致了 *Methylosarcina* 属细胞与土壤颗粒结合非常紧密，降低了其细胞提取效率。不过对于整体甲烷氧化菌来说，特别是水稻土氧化了高浓度甲烷后，甲烷氧化菌在细胞 DNA 中比例(40.1%)要远大于在土壤 DNA 中的比例(19.4%)(图 5-A)，表明大部分新产生的甲烷氧化菌细胞和土壤颗粒的结合并不紧密，比较容易通过常规的涡旋处理与土壤颗粒分离。事实

上, 水稻土好氧甲烷氧化过程中的甲烷氧化菌细胞提取效率从 0.9% 增加至 6.1%, 明显高于整体微生物细胞提取效率(2.0%–2.4%), 与已有报道较为一致<sup>[45-46]</sup>。

单细胞是未来土壤微生物组研究的重要内容, 而单细胞的研究取决于土壤微生物细胞的提取效率。假设土壤 DNA 的 16S rRNA 基因序列能够代表真实的土壤微生物物种组成, 那么基于土壤 DNA 和细胞 DNA 的高通量测序结果表明: 土壤 DNA 共计检测到 30 个微生物门, 而细胞 DNA 中检测到 25 个门, 其中细胞 DNA 未覆盖到的 5 个门类在本研究水稻土中丰度极低, 总占比不到 0.14%。因此, 本研究获得的细胞 DNA 可以比较真实地反映水稻土中的微生物组成。然而, 在更精细的分类水平(图 4-B, 图 6-A), 细胞 DNA 和土壤 DNA 群落结构具有明显差异, 后续的单细胞随机分选则可能产生进一步的偏差。单细胞 16S rRNA 基因分析表明绝大部分微生物属于 Proteobacteria 门, 偏好性非常明显。同时, 尽管细胞 DNA 中甲烷氧化菌占比已经高达 40.1% (图 5-A), 但单细胞分选所得到的甲烷氧化菌细胞也较少, 这可能与流式细胞仪分选区域的选择及单细胞全基因组 MDA 扩增的特征有关。流式细胞仪分选时同时考虑细胞大小、荧光强弱、是否单细胞等多方面因素。选定区域不同, 得到的细胞类群也就不同。本研究随机选取荧光信号较强的细胞分布区域作为分选目标, 由于高浓度甲烷富集后, 甲烷氧化菌的活性最强, 理论上荧光强的区域可能包含较多的甲烷氧化菌。但是, MDA 扩增法本身覆盖度在 40%–70% 左右, 并且对 16S rRNA 基因的扩增覆盖度只有约 1/3 左右<sup>[47]</sup>。因此, MDA 扩增后的产物(单细胞 DNA)进行 16S rRNA 基因高通量测序会在很大程度上低估菌群的多样性, 并可能导

致较明显的物种偏好。从实验结果来看, MDA 产物的 *pmoA* 功能基因测序与土壤 DNA 高通量测序结果更为接近, 说明通过检验功能基因可以更准确地判定所分离的单细胞是否为目标微生物。这些结果为未来的微生物单细胞分选及鉴定提供了参考。

## 4 结论

直接提取土壤中的微生物总 DNA 或者微生物细胞, 是分子方法和显微计数研究土壤微生物组的核心。我们的结果表明, 基于土壤 DNA 的 qPCR 得到的水稻土微生物组数量最高, 比传统 DAPI 染色和 CARD-FISH 杂交计数结果高 2–3 个数量级。土壤中的胞外 DNA 使得 qPCR 定量结果偏高, 而微生物细胞粘附于土壤颗粒导致细胞提取效率低, 使得传统显微计数结果偏低。因此, 水稻土微生物的实际数量应处于 2 种结果之间。尽管 2 种方法的检测精度差异显著, 但无论是传统显微计数方法还是现代分子定量方法, 都表明水稻土好氧甲烷氧化过程中甲烷氧化菌数量显著增加, 特别是基于细胞 DNA 的 qPCR 结果表明甲烷氧化菌增幅高达 388 倍。高通量测序 16S rRNA 和 *pmoA* 基因 PCR 扩增产物的结果表明, 基于土壤 DNA、细胞 DNA 和单细胞 DNA 的高通量测序结果检测到了较一致的微生物种类, 并且都表明高浓度甲烷氧化后, *Methylobacter/Methylosarcina* 成为优势甲烷氧化菌, 主导了水稻土高浓度甲烷的氧化。Planctomycetes 微生物门的细胞易被提取, 而 Acidobacteria 门的微生物则较难被提取, 单细胞筛选过程中则选择性偏好 Proteobacteria 门的微生物细胞。总体而言, 尽管传统显微计数方法和现代分子生态学技术在土壤微生物组研究方

面的分辨率具有显著差异,但均能较好表征水稻土好氧甲烷氧化的微生物生理生态过程,未来土壤微生物组研究中,应更加重视科学问题本身对技术手段的内在需求,结合显微观察的直观可视优点,更好地发挥分子技术的高分辨率特点,为在单细胞、种群、群落、土体、田块和流域等不同尺度耦合分析土壤微生物组的演化规律及其环境功能提供技术支撑。

## 参 考 文 献

- [1] Young IM, Crawford JW. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science*, 2004, 304(5677): 1634-1637.
- [2] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(11): 5088-5090.
- [3] Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S1): D141-D145.
- [4] Amann RI. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology*, 1995, 4(5): 543-554.
- [5] Stahl DA. Application of phylogenetically based hybridization probes to microbial ecology. *Molecular Ecology*, 1995, 4(5): 535-542.
- [6] Haas CN. Estimation of microbial densities from dilution count experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(8): 1934-1942.
- [7] McCrady MH. The numerical interpretation of fermentation-tube results. *The Journal of Infectious Diseases*, 1915, 17(1): 183-212.
- [8] Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA Approach. *Annual Review of Microbiology*, 1986, 40: 337-365.
- [9] Fuhrman JA, McCallum K, Davis AA. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature*, 1992, 356(6365): 148-149.
- [10] Okano Y, Hristova KR, Leutenegger CM, Jackson LE, Denison RF, Gebreyesus B, Lebauer D, Scow KM. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 1008-1016.
- [11] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [12] Mazutis L, Gilbert J, Ung WL, Weitz DA, Griffiths AD, Heyman JA. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature Protocols*, 2013, 8(5): 870-891.
- [13] Zheng Y, Huang R, Wang BZ, Bodelier PLE, Jia ZJ. Competitive interactions between methane- and ammonia-oxidizing bacteria modulate carbon and nitrogen cycling in paddy soil. *Biogeosciences*, 2014, 11(12): 3353-3368.
- [14] Lindahl V, Bakken LR. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16(2): 135-142.
- [15] Daims H, Brühl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22(3): 434-444.
- [16] Eller G, Stubner S, Frenzel P. Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 198(2): 91-97.
- [17] Stubner S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen<sup>TM</sup> detection. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50(2): 155-164.
- [18] Costello AM, Lidstrom ME. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11): 5066-5074.
- [19] Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME, Murrell JC. Evidence that participate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 132(3): 203-208.

- [20] Du WB, Xu P, Dong LB. Micro-pipeline-based liquid droplet generation method. China: CN201410655191.5. 2014-11-17 (in Chinese)  
杜文斌, 徐鹏, 董立兵. 基于微管道的液滴的生成方法. 中国: CN201410655191.5. 2014-11-17.
- [21] Xu P, Zheng X, Tao Y, Du WB. Cross-interface emulsification for generating size-tunable droplets. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(6): 3171-3177.
- [22] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [23] Dumont MG, Lüke C, Deng YC, Frenzel P. Classification of *pmoA* amplicon pyrosequences using BLAST and the lowest common ancestor method in MEGAN. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 34.
- [24] Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One*, 2011, 6(12): e27310.
- [25] Blum SAE, Lorenz MG, Wackernagel W. Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 1997, 20(4): 513-521.
- [26] Carini P, Marsden PJ, Leff JW, Morgan EE, Strickland MS, Fierer N. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature Microbiology*, 2016, 2: 16242.
- [27] Niemeyer J, Gessler F. Determination of free DNA in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2002, 165(2): 121-124.
- [28] Sun DL, Jiang X, Wu QL, Zhou NY. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969.
- [29] Gilbert B, McDonald IR, Finch R, Stafford GP, Nielsen AK, Murrell JC. Molecular analysis of the *pmo* (particulate methane monooxygenase) operons from two type II methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(3): 966-975.
- [30] Yimga MT, Dunfield PF, Ricke P, Heyer J, Liesack W. Wide distribution of a novel *pmoA*-like gene copy among type II methanotrophs, and its expression in *Methylocystis* strain SC2. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5593-5602.
- [31] Bakken LR, Olsen RA. DNA-content of soil bacteria of different cell size. *Soil Biology and Biochemistry*, 1989, 21(6): 789-793.
- [32] Schulz HN, Jørgensen BB. Big bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 105-137.
- [33] Portillo MC, Leff JW, Lauber CL, Fierer N. Cell size distributions of soil bacterial and archaeal taxa. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(24): 7610-7617.
- [34] Berry AE, Chiocchini C, Selby T, Sosio M, Wellington EMH. Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 223(1): 15-20.
- [35] Ehlers K, Bünemann EK, Oberson A, Frossard E, Frostegård Å, Yuejian M, Bakken LR. Extraction of soil bacteria from a Ferralsol. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(7): 1940-1946.
- [36] Lindahl V. Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival. *Journal of Microbiological Methods*, 1996, 25(3): 279-286.
- [37] Eichorst SA, Strasser F, Woyke T, Schintlmeister A, Wagner M, Wobken D. Advancements in the application of NanoSIMS and Raman microspectroscopy to investigate the activity of microbial cells in soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(10): fiv106.
- [38] Lombard N, Prestat E, van Elsas JD, Simonet P. Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 78(1): 31-49.
- [39] Maron PA, Schimann H, Ranjard L, Brothier E, Domenach AM, Lensi R, Nazaret S. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *European Journal of Soil Biology*, 2006, 42(2): 65-73.
- [40] 熊毅, 李庆逵. 中国土壤. 第2版. 北京: 科学出版社, 1987.
- [41] Ushio M, Makoto K, Klaminder J, Takasu H, Nakano SI. High-throughput sequencing shows inconsistent results with a microscope-based analysis of the soil prokaryotic community. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 76: 53-56.
- [42] Eichorst SA, Breznak JA, Schmidt TM. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen.

- nov., in the phylum *Acidobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(8): 2708-2717.
- [43] Hahn MW. Broad diversity of viable bacteria in 'sterile' (0.2  $\mu\text{m}$ ) filtered water. *Research in Microbiology*, 2004, 155(8): 688-691.
- [44] Wise MG, McArthur JV, Shimkets LJ. *Methylosarcina fibrata* gen. nov., sp. nov. and *Methylosarcina quisquiliarum* sp. nov., novel type 1 methanotrophs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(2): 611-621.
- [45] Bertrand H, Poly F, Van VT, Lombard N, Nalin R, Vogel TM, Simonet P. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 62(1): 1-11.
- [46] Neveu M, Poret-Peterson AT, Lee ZMP, Anbar AD, Elser JJ. Prokaryotic cells separated from sediments are suitable for elemental composition analysis. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2014, 12(7): 519-529.
- [47] Rinke C, Lee J, Nath N, Goudeau D, Thompson B, Poulton N, Dmitrieff E, Malmstrom R, Stepanauskas R, Woyke T. Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nature Protocols*, 2014, 9(5): 1038-1048.

## Comparison of soil microbiome by single cell technology, classical microscope methods and high-throughput MiSeq sequencing

Zhongjun Jia<sup>1\*</sup>, Yuanfeng Cai<sup>1</sup>, Juanli Yun<sup>2</sup>, Wenbin Du<sup>2</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Objective] Characterize classical microscope counting methods, single cell technology and modern molecular methods in determining abundance and composition of total soil microbiome and aerobic methanotrophs in the process of methane oxidation. [Methods] Based on the extracted microbial cells and their DNA (Cell DNA), Single cell DNA, and soil microbiome DNA (Soil DNA), the conventional microscope counting methods and real time quantitative PCR (qPCR) were used to assess the abundance changes of soil microbiome and major aerobic methanotroph groups in aerobic methane oxidation. MiSeq sequencing of 16S rRNA and *pmoA* genes was used to compare microbial composition changes of soil microbiome and aerobic methanotrophs. [Results] Total microbial abundance in the studied paddy soil obtained by qPCR could be up to 3 orders of magnitude higher than that obtained by microscope counting methods. DAPI staining, CARD-FISH, qPCR of 16S rRNA gene in Cell DNA and Soil DNA showed total microbial abundance (cells/g) were  $(5.8-7.4)\times 10^7$ ,  $(1.7-1.9)\times 10^7$ ,  $(2.8-6.3)\times 10^8$ , and  $(1.5-2.7)\times 10^{10}$ , respectively. For methanotrophs, the result of qPCR of Soil DNA is  $1.1 \times 10^7$  cells/g which is 3 orders of magnitude higher than that obtained by microscope counting methods. However, all different methods showed that methanotroph abundance increased by 54-fold (CARD-FISH), 388-fold (qPCR of Soil DNA) and

Supported by the Strategic Priority Research Program of the CAS (XDB15040000) and by the Youth National Natural Science Foundation of China (41401294)

\*Corresponding author. Tel: +86-25-86881311; Fax: +86-25-86881000; E-mail: jia@issas.ac.cn

Received: 16 February 2017; Revised: 7 April 2017; Published online: 14 April 2017

40-fold (qPCR of Cell DNA), respectively, after the soil consumed high-concentration methane. Soil DNA (30 phyla) and Cell DNA (25 phyla) showed similar composition at phylum level by MiSeq sequencing analysis of 16S rRNA genes. More than 95% of the sequences derived from single cell DNA were affiliated to Proteobacteria, though 20 phyla were detected. Furthermore, a similar tendency was found by MiSeq sequencing analysis of *pmoA* genes in Soil DNA, Cell DNA and Single cell DNA. That is *Methylobacter/Methylosarcina* of  $\gamma$ -Proteobacteria becoming dominant genera after high-concentration methane oxidation though, 7 *pmoA* genotypes existed in the original soil. [Conclusion] Total microbial abundance in the studied paddy soil obtained by microscope counting methods could be 1–3 orders of magnitude lower than that obtained by qPCR. qPCR of 16S rRNA gene in Soil DNA and Cell DNA revealed that the extracted microbial cells constituted only 2% of the total microbial cells in the studied paddy soil. However, the extraction efficiency of methanotrophic cells could be up to 6%. MiSeq sequencing analysis indicated that Cell DNA could reflect the microbiome composition of the paddy soil at phylum level but not genus level as compared to that in Soil DNA, while the single cell sorting technique tended to select for Proteobacteria. These results showed that the resolution of traditional methods and molecular techniques are obviously different, but both methods can well characterize the microbial physiological and ecological processes of methane oxidation in paddy soil. The future study of soil microbiome should pay more attention to the inherent needs of the scientific issues, and to maximize the advantages of different technologies.

**Keywords:** microbial abundance, community composition, soil DNA, soil microbial cell, single cell

(本文责编: 李磊)