

新一代高通量测序与稳定性同位素示踪 DNA/RNA 技术研究稻田红壤甲烷氧化的微生物过程

郑燕^{1,2}, 贾仲君^{1*}

¹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, 南京 210008

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 【目的】利用新一代高通量测序技术分析复杂土壤环境中整体微生物群落结构的变化规律, 研究特定功能微生物生理过程的分子机制; 利用稳定性同位素示踪微生物核酸 DNA/RNA, 研究复杂土壤中关键元素转化的微生物调控机制。【方法】针对我国第四纪红色粘土母质发育的 3 种稻田红壤, 围绕¹³C-甲烷好氧氧化的微生物过程, 在 DNA 和 RNA 水平高通量测序土壤微生物群落 16S rRNA 基因和 16S rRNA, 通过超高速密度梯度离心土壤微生物总核酸获得¹³C-标记的 DNA/RNA, 进一步采用克隆文库技术研究稻田红壤甲烷好氧氧化的微生物作用者。【结果】新一代高通量测序结果表明, 3 种稻田红壤甲烷的好氧化过程中, 甲烷好氧化菌占土壤整体微生物群落的丰度显著增加, RNA 水平的增幅显著高于 DNA 水平, 能够更为灵敏地反映土壤甲烷好氧氧化的微生物过程。3 种稻田红壤甲烷的好氧化过程中, 类型 I 和类型 II 甲烷好氧化菌在湖南古市土壤中显著增加, 湖南桃源土壤中类型 II 甲烷好氧化菌增加明显, 而类型 I 甲烷好氧化菌在广东雷州土壤中增幅最大。进一步利用¹³C-DNA 和¹³C-RNA 分别构建 *pmoA* 基因和 16S rRNA 克隆文库, 发现类型 I 甲烷好氧化菌主导了湖南古市和广东雷州稻田红壤甲烷的好氧化过程, 类型 II 甲烷好氧化菌主导了湖南桃源稻田红壤甲烷的好氧化过程。【结论】新一代高通量测序技术能够在整体微生物群落水平, 清楚反映复杂土壤中特定功能微生物的生理生态过程, 而 RNA 较 DNA 水平的分析更为灵敏; 稳定性同位素示踪微生物核酸 DNA/RNA 技术能够准确地揭示复杂土壤重要过程的微生物作用者。

关键词: 新一代高通量测序, 稳定性同位素示踪 DNA/RNA, 稻田红壤, 甲烷好氧化

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)02-0173-12

21 世纪以来, DNA 测序技术取得革命性突破, 新一代高通量测序技术将成为一种常规手段研究土壤微生物多样性, 类似于目前土壤氮磷钾等营养元素的化学分析, 成为土壤质量评价的常规方法。同时, 新一代高通量测序是耦合研究土壤微生物多样性及其生态环境功能的关键技术。据估算, 每克土

壤最多可能含有约 100 亿个微生物个体, 上百万种不同的微生物物种^[1], 这些海量的微生物驱动着土壤关键元素的生物地球化学循环, 维系着土壤生产力的可持续发展。利用新一代高通量测序技术在整体水平破译土壤微生物的群落结构, 分析特定功能微生物的相对丰度变化规律, 并与土壤关键元素的

基金项目: 国家自然科学基金(41090281, 31270147); 中国科学院应用微生物研究网络项目(KSCX2-EW-G-16)

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

作者简介: 郑燕(1986-), 女, 河南郑州人, 博士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: yzheng@issas.ac.cn

收稿日期: 2012-09-07; **修回日期:** 2012-11-19

通量变化规律耦合,能够在群落水平清楚反映土壤重要微生物生理生态过程的分子调控机制。同时,新一代高通量测序能够极大地降低实验误差,提供一种几乎无偏差的特定微生物生理生态过程分析策略。理论上而言,微生物生理生态过程通常针对特定的土壤样品进行研究,因此在整体微生物群落水平,来自于环境微生物核酸提取、PCR 扩增等技术带来的误差对于每一个土壤微生物个体都是相同的,特定微生物占总体微生物相对丰度的变化,极可能反映了特定微生物生理代谢产物在土壤中的动力学规律。例如,我们最近的研究表明,尿素培养酸性茶园土壤 8 周后,土壤中硝态氮浓度由 92.9 $\mu\text{g/g}$ 土增加到 149.5 $\mu\text{g/g}$ 土,采用 16S rRNA 基因的通用引物扩增土壤微生物群落并进行高通量测序,发现泉古菌占总微生物的相对丰度由 0.28% 增至 9.76%,与硝化微生物代谢产物的通量增加较为一致,表明泉古菌极可能主导了酸性土壤氨氧化。同时,这一结果与泉古菌特异的 *amoA* 功能基因分子指纹图谱和实时荧光定量 PCR 结果高度吻合^[2]。此外,微生物生理过程并不一定导致细胞分裂生长,因此,RNA 水平通常较 DNA 水平的研究灵敏度更高,在 RNA 水平高通量测序整体微生物群落结构,研究复杂环境中特定微生物生理生态过程的分子调控机制具有重要意义。

稳定同位素核酸探针技术简称 DNA/RNA-SIP (Stable Isotope Probing),通过稳定同位素示踪微生物核酸 DNA/RNA,在分子水平揭示复杂环境中重要元素生态过程的微生物调控机制。2000 年英国科学家开发了 DNA-SIP 技术并成功获得森林土壤¹³C-DNA^[3];2002 年研究者利用 RNA-SIP 发现了生物反应器中苯酚降解的微生物作用者^[4];与 DNA-SIP 相比,RNA-SIP 的研究不依赖于细胞分裂,能够采用更低浓度的¹³C-标记底物培养环境样品,研究结果更接近原位状况,灵敏度更高^[5]。目前稳定性同位素示踪复杂环境中微生物核酸 DNA/RNA 技术得到了国际学术界的高度关注,2009 年 DNA/RNA-SIP 技术被写入微生物学著名教科书 (Brock Biology of Microorganisms 12th)^[6];2011 年美国微生物学会出版专著评述了 DNA/RNA-SIP 技术在微生物领域的应用^[7]。近年来,DNA/RNA-SIP 技术在我国也得到了高度的关注和快速发展。

据此,本研究围绕稻田红壤甲烷的好氧化过

程,利用新一代高通量测序技术研究土壤微生物群落整体变化规律,在 DNA 和 RNA 水平研究甲烷好氧化菌占土壤微生物的相对丰度变化;进一步利用稳定性同位素示踪稻田红壤甲烷好氧化菌的核酸 DNA/RNA,揭示稻田红壤甲烷好氧化过程的微生物调控机制,为新一代高通量测序与稳定性同位素示踪 DNA/RNA 技术研究复杂环境中微生物生理生态过程的分子机制提供一定的技术参考。

1 材料和方法

1.1 土壤样品概况

稻田红壤样品分别采自湖南桃源 (TY) (28°55' N, 111°27' E), 湖南古市 (GS) (28°95' N, 111°51' E), 广东雷州 (LZ) (20°33' N, 110°04' E)。采样区块属于典型的双季稻种植区,土壤母质均为第四纪红色粘土。采集 0 - 20 cm 表层新鲜土壤,研磨并过 2 mm 筛,然后将均一混合的新鲜土壤置于阴凉、干燥、通风的室温条件下风干直至土壤基本保持恒重 (15 d) 后,装入无菌塑料袋密封保存待用。湖南古市、湖南桃源和广东雷州稻田红壤的基本理化性质如下:pH 分别为 6.57, 5.99, 6.80;硝态氮分别为 3.10 $\mu\text{g/g d. w. s}$, 9.61 $\mu\text{g/g d. w. s}$ 和 1.35 $\mu\text{g/g d. w. s}$;铵态氮分别为 45.8 $\mu\text{g/g d. w. s}$, 42.9 $\mu\text{g/g d. w. s}$ 和 8.01 $\mu\text{g/g d. w. s}$;全氮分别为 2.62 mg/g, 2.27 mg/g 和 1.22 mg/g;有机质为 48.0 mg/g, 43.1 mg/g 和 23.1 mg/g;最大持水量分别为 72.4%, 65.5% 和 59.4%。

1.2 稻田红壤甲烷的好氧化过程

称取相当于 40 g 干土的稻田红壤置于无菌封口袋中,添加适量的无菌去离子水,调节土壤含水量至最大持水量的 30% 后,25°C 预培养 120 h,进一步将预培养土壤分装至 120 mL 血清瓶中 (相当于 6.0 g 干土),并加入适量的无菌去离子水,调节土壤水分至最大持水量 60%,丁基橡胶塞密封并用铝盖封口。对于¹³C-甲烷标记和¹²C-甲烷对照处理,每个处理 3 个重复,首先从密封瓶内移除 1.2 mL 的空气后注入等体积的¹³C-甲烷或¹²C-甲烷,保持培养瓶内大气压维持稳定,置于 25°C 恒温箱内进行好氧培养^[8]。血清瓶内初始 CH₄ 浓度约为 400 $\mu\text{mol/L}$,动态监测培养瓶内甲烷浓度变化,前 4 天每 48 h 测定 1 次,4 天之后每 24 h 测定 1 次。当培养瓶内 CH₄

浓度低于 $0.45 \mu\text{mol/L}$, 结束培养实验并打开瓶盖破坏性采集土壤样品。收集大约 3 g 新鲜土样, 加入 *RNAlater* (Ambion) 后, -20°C 保存用于 RNA 提取^[9]; 其余土壤样品保存于 -20°C , 用于 DNA 提取以及其它后续分析。

1.3 稻田红壤的核酸 DNA/RNA 提取

1.3.1 土壤总 DNA 提取: 采用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Bio) 试剂盒, 称取 0.5 g 新鲜土样, 按照说明书的提取步骤进行, 将提取得到的土壤微生物总 DNA 溶解于 $100 \mu\text{L}$ 无菌水后, 通过微量紫外分光光度计 (NanoDrop[®] ND-1000) 测定 DNA 浓度和纯度 (OD_{600}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{280}), 此外, 利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离 $5 \mu\text{L}$ 的 DNA ($0.5 \times \text{TAE}$ 缓冲液), 分析 DNA 的完整性和相对浓度。

1.3.2 土壤总 RNA 提取: 根据已有文献报道的方法完成^[10], 具体如下: (1) 称取 0.5 g 新鲜土于 2.0 mL 带螺帽口的裂解管并立即加入 $500 \mu\text{L}$ *RNAlater* 于 4°C 过夜保存后, $20000 \times \text{g}$ 离心 2 min 去除 *RNAlater*; (2) 在土壤沉淀物中加入 0.5 g 玻璃珠 ($0.5 \text{ mm} : 0.1 \text{ mm} = 3 : 2$, Sigma) 和 $700 \mu\text{L}$ 预冷的 TPM buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH5.0, 1.7% polyvinylpyrrolidone, 20 mmol/L MgCl_2), 并使用 Fast Prep[™] FP120 核酸提取仪以 6 m/s 的速度裂解土壤微生物细胞 35 s , 随后将裂解混合物在 4°C 下 $20000 \times \text{g}$ 离心 2 min , 上清液转移至 2.0 mL 的无菌离心管; (3) 向裂解管中加入 $700 \mu\text{L}$ 预冷的 PBL buffer (5 mmol/L Tris-HCl pH5.0, 5 mmol/L EDTA Na_2 pH8.0, 0.1% SDS, 6% 水饱和酚), 重复步骤 (2), 连续反复提取土壤核酸以提高 DNA/RNA 回收效率^[11]; (4) 依次采用 3 种有机试剂清洗上清液: $500 \mu\text{L}$ 水饱和酚 (pH4.5), $500 \mu\text{L}$ 苯酚: 氯仿: 异丙醇 ($25 : 24 : 1$) (pH4.5), $500 \mu\text{L}$ 氯仿: 异丙醇 ($24 : 1$), 混匀后 4°C 低温 $20000 \times \text{g}$ 离心 2 min 并将上清液转移至 2.0 mL 离心管中; (5) 加入 2 倍体积 PEG-NaCl (30% PEG-6000, 1.6 mol/L NaCl) 于上清液混匀, 室温静置 2 h 后 4°C 低温下 $20000 \times \text{g}$ 离心 10 min , 去除上清液后加入 $200 \mu\text{L}$ 70% 乙醇清洗沉淀, 并再次离心 5 min ; (6) 移除上清液后, 无菌台吹干离心沉淀并加入 $50 \mu\text{L}$ DNase/RNase-free H_2O 溶解, 将总核酸保存于 -80°C 。(7) 利用 Recombinant DNase I (TaKaRa) 除去土壤总核酸中的 DNA 后, 通过 RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 试剂盒纯化土壤总

RNA, 进一步利用微生物 16S rRNA 基因的通用引物 (515F/907R) 扩增土壤总 RNA, 确保土壤总 RNA 中不存在 DNA 污染; (8) 利用微量紫外分光光度计 (NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis) 测定 RNA 浓度, 并保存于 -80°C 待用。

1.4 新一代高通量测序

如表 1 所示, 针对 ^{13}C -甲烷培养的稻田红壤, 选择培养零时刻 (2 个重复)、培养瓶内甲烷被完全氧化后 (3 个重复) 的土壤 DNA 和 RNA 进行高通量测序分析。利用通用引物 (8F/533R) 扩增土壤 DNA/RNA 的微生物 16S rRNA 基因, 修饰后的通用引物含有不同的 Tag 标签用以区分不同样品^[12]。每对引物中同时包含 adaptor 和 key 序列以提高下游测序效率^[2,13]。DNA 水平的 PCR 扩增体系主要包括: $0.25 \mu\text{L}$ 的 TaKaRa Ex Taq HS ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$), $5.0 \mu\text{L}$ 的 $10 \times \text{Ex Taq Buffer}$ (Mg^{2+} Plus), $4.0 \mu\text{L}$ 的 dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), $1.0 \mu\text{L}$ 的引物 $20 \mu\text{mol/L}$, 加入 $1.0 \mu\text{L}$ 的 DNA 模板和无菌水至 $50 \mu\text{L}$ 反应体系。PCR 扩增的反应条件: 94°C , 5.0 min ; $30 \times (94^\circ\text{C}, 45 \text{ s}; 55^\circ\text{C}, 45 \text{ s}; 72^\circ\text{C}, 1 \text{ min})$; 72°C , 10 min 。RNA 水平的 PCR 扩增采用 One Step RNA PCR Kit (Takara) 完成, 反应体系包括: $1.0 \mu\text{L}$ 的 AMV RTase XL ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$), $1.0 \mu\text{L}$ 的 AMV-Optimized Taq ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$), $1.0 \mu\text{L}$ 的 RNase Inhibitor ($40 \text{ U}/\mu\text{L}$), $5.0 \mu\text{L}$ 的 $10 \times \text{One step RNA PCR Buffer}$, $10 \mu\text{L}$ 的 MgCl_2 (25 mmol/L), $5.0 \mu\text{L}$ 的 dNTP Mixture (各 10 mmol/L), $1.0 \mu\text{L}$ 的引物, $1.0 \mu\text{L}$ 的 RNA 模板, 加水补足 $50 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增的反应条件: 50°C , 30 min ; 94°C , 2.0 min ; $30 \times (94^\circ\text{C}, 45 \text{ s}; 55^\circ\text{C}, 45 \text{ s}; 72^\circ\text{C}, 1 \text{ min})$; 72°C , 10 min 。需要指出的是, 广东雷州土壤 RNA 浓度极低 (约 $9 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 为了满足稳定性同位素 ^{13}C 示踪 RNA 的后续实验, 没有进行 RNA 水平的焦磷酸测序。

获得土壤 DNA 和 RNA 水平的 16S rRNA 基因扩增产物后, 利用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 试剂盒 (Takara) 将 PCR 产物切胶纯化, 纯化产物溶解于 $25 \mu\text{L}$ DNase/RNase-free H_2O , 将 $3.0 \mu\text{L}$ 的 PCR 产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测纯化效果, 利用微量紫外分光光度计 (NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis) 测定扩增产物的浓度。将不同样品的 PCR 扩增产物等摩尔数混合后, 利用罗氏公司的 454 FLX Titanium sequencer 完成序列分析。共计获得约 16 万序列, 在 80% 的置信度

水平采用 RDP Classifier 进行分类^[14], 得到高质量序列约 10 万条, 单个样品的高质量序列平均 4020 条,

单个序列平均长度为 499bp, 高通量测序样品的基本概况如表 1 所示。

表 1 焦磷酸高通量测序样品描述
Table 1 Summary of 454 pyrosequencing results

Sampling site	Soil DNA/RNA	¹³ C-labeled treatment	High quality read number	<i>Methanotrophic</i> bacterial read number
Gu-Shi (湖南古市)	DNA	Day-0	4124 ± 182	5.00 ± 1.41
		Day-8	5056 ± 657	67.3 ± 8.39
	RNA	Day-0	4057 ± 832	12.5 ± 0.71
		Day-8	3819 ± 974	170 ± 57.1
Tao-Yuan (湖南桃源)	DNA	Day-0	2383 ± 54.5	2.00 ± 1.41
		Day-8	3553 ± 267	86.0 ± 11.1
	RNA	Day-0	4372	23.0
		Day-8	4864 ± 632	185 ± 8.14
Lei-Zhou (广东雷州)	DNA	Day-0	4189 ± 271	7.50 ± 5.00
		Day-8	3589 ± 468	134 ± 39.0

1.5 稳定性同位素示踪土壤 DNA/RNA

如上所述, 3 种稻田红壤培养瓶内 400 μmol/L 甲烷几乎被氧化殆尽后, 提取¹³C-甲烷标记和¹²C-甲烷对照处理的土壤样品 DNA 和 RNA, 并进行超高速密度梯度离心。

DNA-SIP 的操作细节见相关文献^[15]。简言之, 将 2.0 μg DNA 与氯化铯溶液混合形成初始密约为 1.725 g/mL 离心溶液, 并转移至 6.0 mL 的超高速离心试管; 利用贝克曼 Vti65.2 转子在 20℃ 下 190000 × g 超高速密度梯度离心 44 h; 采用本实验室创制的自动分层分离装置获得 15 个不同浮力密度 DNA 溶液, 通过 PEG-6000 除去不同浮力密度 DNA 溶液中的氯化铯离心介质后, 进一步采用 70% 乙醇清洗 DNA 沉淀, 并将其溶于 30 μL 无菌水 -20℃ 保存。

RNA-SIP 的操作细节见相关文献^[16]。简言之, 将 500 ng RNA、175 μL 去离子甲酰胺与 4.5 mL 三氟乙酸铯混合后形成初始密度约为 1.790 g/mL 的离心溶液, 并转移至 6.0 mL 的超高速离心试管; 利用贝克曼 Vti65.2 转子在 20℃ 下 130000 × g 超高速密度梯度离心 65 h; 采用本实验室创制的自动分层分离装置获得 15 个不同浮力密度 RNA 溶液, 通过异丙醇除去 RNA 溶液中的三氟乙酸铯离心介质后, 进一步采用 70% 乙醇清洗 RNA 沉淀, 并将其溶于 30 μL 无核酸酶的灭菌水, -80℃ 保存。部分 RNA 通过 PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) 反转录为 cDNA, 保存于 -20℃ 用于后续分析。此外, 高通量测序结果表明, 各处理重复间变异系数小, 重复性好 (图

2, 图 3), 因此将 3 个培养瓶真重复的土壤核酸混合后进行后续的 DNA/RNA-SIP 超高速离心实验。

1.6 稳定性同位素¹³C-DNA/RNA 鉴别及下游分析

¹³C-DNA 的鉴定策略如前所述^[15]。超高速密度梯度离心¹²C-甲烷对照处理和¹³C-甲烷标记处理的土壤总 DNA, 以不同浮力密度 DNA 为模板, 采用甲烷氧化菌特异的引物 (A189F/mb661R) PCR 扩增 *pmoA* 标靶功能基因, 在完全一致的条件下通过琼脂糖凝胶电泳定性分析 *pmoA* 功能基因在不同浮力密度 DNA 中的分布规律, 通过比较¹³C-甲烷和¹²C-甲烷处理的结果鉴别¹³C-DNA。进一步以¹³C-DNA 为模板, 采用 pEASY-T 载体 (TransGen Biotech) 构建 *pmoA* 基因的克隆文库, 测序大约 20 个阳性克隆。

¹³C-RNA 鉴定的基本原理与¹³C-DNA 类似^[15]。本实验主要通过构建微生物 16S rRNA 基因克隆文库完成。超高速密度梯度离心¹²C-甲烷对照处理和¹³C-甲烷标记处理的土壤总 RNA, 将不同浮力密度 RNA 反转录为 cDNA 后作为模板, 采用 16S rRNA 基因通用引物 515F/907R 进行 PCR 扩增重浮力密度 cDNA, 利用 PCR 产物构建克隆文库, 挑取大约 10 个阳性克隆并测序, 通过计算¹²C-和¹³C-甲烷处理重浮力密度 DNA 中甲烷好氧氧化菌的比例鉴定¹³C-RNA。

将所得的克隆序列在 NCBI 的 GenBank 数据库中进行 Blast 比对分析, 获得高度相近的同源基因序列, 进一步采用 MEGA 软件 (版本 4.0) 进行分析, 按照相似度 97% 对所有基因克隆子的序列进行操作

分类单元 (Operating Taxonomic Unit, OTU) 分类, 利用 NJ (Neight-Joining) 法建立系统发育树。

1.7 数据分析

所有数据采用 Excel 2007 和 SPSS 16.0 进行处理分析, 处理之间的平均值差异采用 one-way ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示显著差异。

2 结果和分析

2.1 稻田红壤甲烷好氧氧化的动力学规律

如图 1 所示, 对于 ^{13}C -甲烷和 ^{12}C -甲烷处理, 3 种

稻田红壤甲烷好氧氧化动力学规律基本一致, 在第 8 天左右培养瓶内甲烷几乎全部被消耗 ($< 0.45 \mu\text{mol/L}$)。3 种土壤培养瓶内 $^{12}\text{CH}_4$ 或 $^{13}\text{CH}_4$ 处理的甲烷初始浓度均为 $400 \mu\text{mol/L}$ 左右, 湖南古市 (图 1-A) 土壤在 2-4 天甲烷好氧氧化强度最大, 甲烷浓度下降幅度高达 90%, 第 7 天几乎被全部消耗; 湖南桃源 (图 1-B) 土壤在 4-6 天甲烷好氧氧化活性最强, 甲烷浓度降低约 75%, 第 9 天低于大气甲烷本底浓度; 广东雷州 (图 1-C) 土壤在 5-6 天甲烷好氧氧化最明显, 甲烷浓度降低约 60%, 第 8 天几乎所有甲烷被氧化。

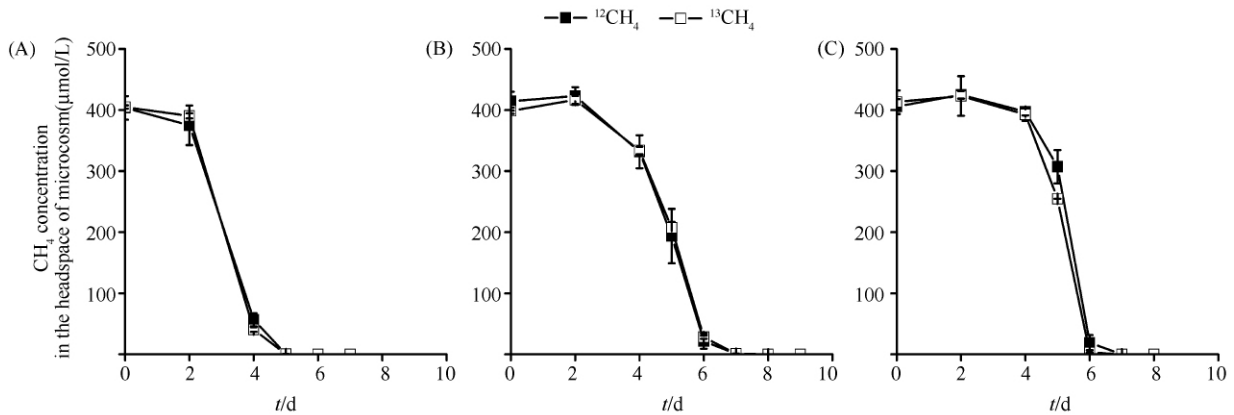


图 1 湖南古市 (A)、湖南桃源 (B) 和广东雷州 (C) 稻田红壤甲烷好氧氧化的动力学规律

Fig. 1 Dynamic changes of methane concentration in the headspace of soil microcosms incubated with ^{13}C - CH_4 or ^{12}C - CH_4 using paddy soils collected from Gu-Shi (A) and Tao-Yuan (B) cities of Hunan province, and from Lei-Zhou (C) city of Guangzhou province.

2.2 新一代高通量测序稻田红壤甲烷好氧氧化菌的丰度变化规律

如图 2 所示, 通过计算土壤中甲烷好氧氧化菌 16S rRNA 序列占总 16S rRNA 序列的百分比, 发现与零时刻相比, 甲烷好氧氧化菌的相对丰度在培养结束后显著增加, 在 RNA 水平增加幅度显著高于 DNA 水平, 表明甲烷好氧氧化促进了土壤甲烷好氧氧化菌的生长与活性。

在 DNA 和 RNA 水平, 湖南古市 (GS) 土壤零时刻 (Day-0) 甲烷好氧氧化菌占总微生物的相对丰度分别为 1.34% 和 4.57%, 统计上并无显著差异; $400 \mu\text{mol/L}$ 甲烷浓度培养 8 天后 (Day-8), 在 DNA 和 RNA 水平下甲烷好氧氧化菌丰度显著增加, 分别达到 13.6% 和 44.4%, RNA 水平的增加量明显高于 DNA 水平。湖南桃源土壤也表现出类似的规律, 零时刻 (Day-0) 甲烷好氧氧化菌在 DNA 和 RNA 水平的相对丰度分别为 0.85% 和 6.86%, 培养 8 天后

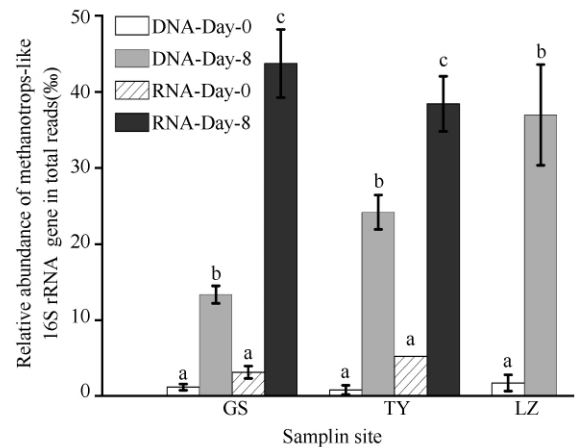


图 2 湖南古市、湖南桃源和广东雷州稻田红壤甲烷好氧氧化过程中甲烷氧化菌相对丰度的变化规律*

Fig. 2 Changes in relative abundance of aerobic methanotrophic 16S rRNA reads during soil methane oxidation. * Different letters represent there was a significant difference at $P < 0.05$.

(Day-8) 其相对丰度分别达到 24.6‰ (DNA) 和 39.6‰ (RNA)。在 DNA 水平, 广东雷州 (LZ) 土壤中甲烷好氧氧化菌的增幅高达 18 倍, 由零时刻 2.23‰ 增加至培养后的 36.9‰。

2.3 新一代高通量测序稻田红壤甲烷好氧氧化菌的组成规律

如图 3 所示, 在属的分类水平, 稻田红壤中共检测到 10 个不同的甲烷氧化菌种群, 其中 7 个属于类型 I 甲烷氧化菌, 3 个属于类型 II 甲烷氧化菌, 然而, 土壤甲烷好氧氧化过程中不同类群甲烷氧化菌的变化规律具有明显差异。湖南古市类型 I 和类型 II 甲烷好氧氧化菌增加明显, 湖南桃源类型 II 甲烷好氧氧化菌显著增加, 广东雷州土壤中类型 I 甲烷好氧氧化菌增加最明显。

稻田红壤甲烷好氧氧化过程中, 湖南古市土壤中类型 I 甲烷氧化菌 *Methylobacter* 和类型 II 甲烷氧

化菌 *Methylosinus* 的增长趋势非常明显, 且 RNA 水平的增加量高出 DNA 水平 5 倍左右。例如, 对于类型 I 甲烷好氧氧化菌, 在 DNA 和 RNA 水平上 *Methylobacter* 的增幅分别为 3.93‰ 和 14.9‰; 对于类型 II 甲烷好氧氧化菌, 在 DNA 和 RNA 水平上 *Methylosinus* 的增幅分别为 3.92‰ 和 20.8‰; *Methylocystis* 的增幅分别为 1.03‰ 和 2.20‰。湖南桃源土壤中类型 II 甲烷好氧氧化菌变化最明显。类型 I 甲烷好氧氧化菌 *Methylocaldum* 略有增加, 但增幅仅为千分之一。例如, 在 DNA 水平上类型 II 甲烷好氧氧化菌 *Methylocystis* 和 *Methylosinus* 分别增加了 6.86‰ 和 14.4‰; RNA 水平的增幅分别为 16.9‰ 和 14.8‰。广东雷州土壤中类型 I 甲烷好氧氧化菌增加最为明显, *Methylobacter* 的增幅高达 34.41‰, *Methylosarcina* 略微增加 (1.22‰), 而类型 II 甲烷好氧氧化菌稍有下降趋势。

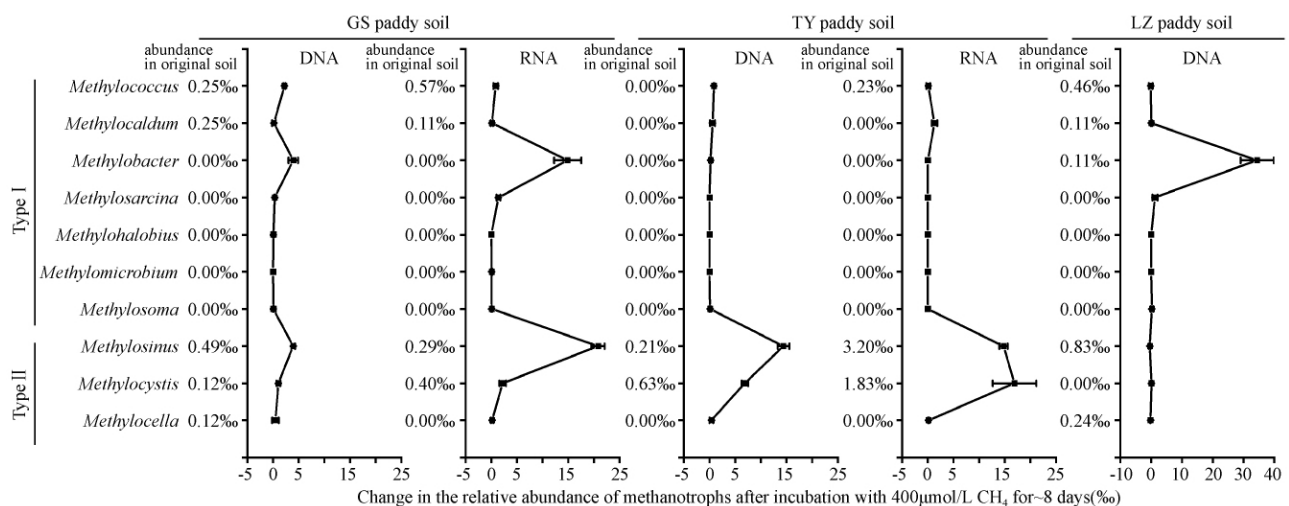


图 3 微生物分类属水平下湖南古市、湖南桃源和广东雷州稻田红壤甲烷好氧氧化过程中甲烷氧化菌相对丰度在 DNA 和 RNA 水平的变化规律

Fig. 3 Percent change of aerobic methanotrophic 16S rRNA genes and 16S rRNA during aerobic methane oxidation in paddy soils following addition of 400 $\mu\text{mol/L}$ methane at day 0.

2.4 稳定性同位素示踪稻田红壤甲烷好氧氧化菌的核酸 DNA

如图 4 所示, 超高速密度梯度离心获得不同浮力密度 DNA 后, 扩增甲烷氧化菌特异功能基因 *pmoA* 并进行半定量凝胶电泳分析, ^{13}C -甲烷标记处理的重浮力密度 DNA 中 (5-7 层) 发现大量 *pmoA* 基因产物, 而在 ^{12}C -甲烷对照处理的重浮力密度 DNA 中未能检测到明显的 *pmoA* 信号, 表明标记处理土壤中甲烷好氧氧化菌的 DNA 被 ^{13}C 标记并通过

超高速密度梯度离心迁移至试管下部的重浮力密度 DNA (5-7 层)。

如图 5 所示, 3 种稻田红壤 ^{13}C -*pmoA* 基因序列的系统发育关系具有显著差异, 表明稻田红壤中活性甲烷好氧氧化菌不同。例如, 湖南古市土壤中, 类型 I 甲烷好氧氧化菌占总克隆约 80% (*Methylobacter* 51%, *Methylosarcina* 23%, *Methylocaldum* 6%), 类型 II 甲烷好氧氧化菌 *Methylocystis* 占 20%。湖南桃源土壤中, 类型 II 甲

烷好氧化菌 *Methylocystis* 约占 80%, 类型 I 甲烷好氧化菌 *Methylocaldum* 仅占 15%。此外, 广东雷州土壤中未能检测到类型 II 甲烷好氧化菌, 类型

I 甲烷好氧化菌 *Methylobacter* 和 *Methylosarcina* 分别占有所有 *pmoA* 克隆的 95% 和 5%。

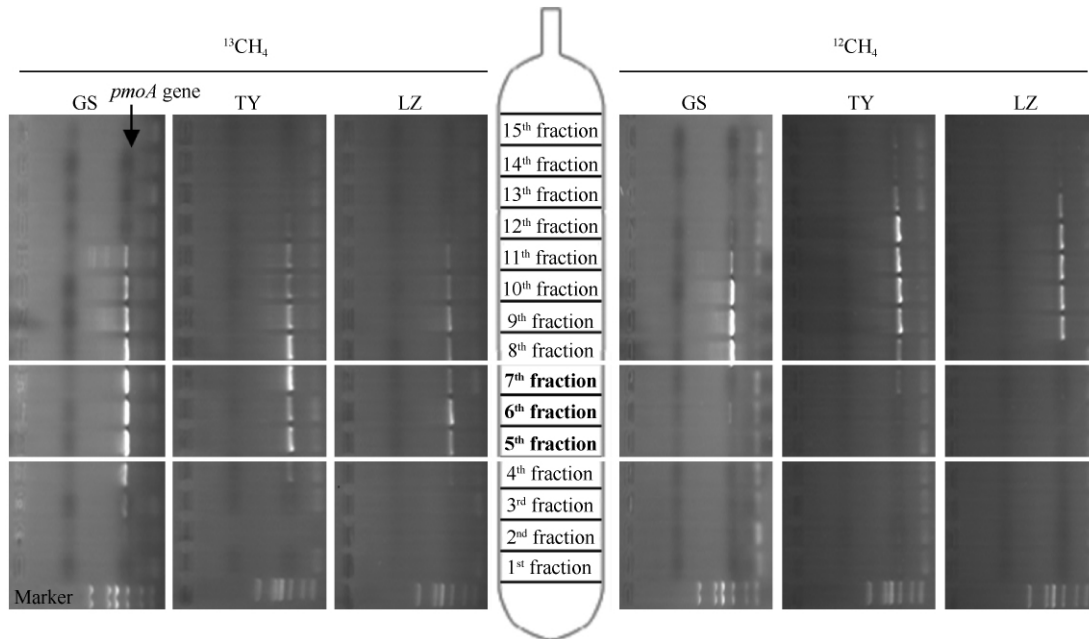


图 4 甲烷氧化菌特异功能基因 *pmoA* 的 PCR 扩增产物在不同浮力密度 DNA 中的分布规律

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of *pmoA* genes amplicons from the ultracentrifuged DNA over the entire density range of SIP gradient from microcosms incubated with $^{13}\text{CH}_4$ and $^{12}\text{CH}_4$.

2.5 稳定性同位素示踪稻田红壤甲烷好氧化菌的核酸 RNA

针对 ^{13}C -标记和 ^{12}C -对照处理土壤的总 RNA, 超高速密度梯度离心获得重浮力密度 RNA 后, 利用微生物 16S rRNA 基因通用引物扩增 cDNA 并构建克隆文库。如图 6 所示, 与 ^{12}C -甲烷对照处理相比, ^{13}C -甲烷标记处理重浮力密度 RNA 中甲烷好氧化菌占有所有微生物的比例最高可达 100%, 表明甲烷好氧化菌利用 ^{13}C 合成了大量核糖体 RNA 并由于浮力密度增加而迁移至试管下部, 在重浮力密度 RNA 中高度富集, 其中湖南古市和广东雷州土壤的 ^{13}C -RNA 中类型 I 甲烷好氧化菌为主, 湖南桃源土壤中类型 II 甲烷好氧化菌比例较高。

湖南古市 ^{12}C -甲烷对照处理土壤的重浮力密度 RNA 中, 甲烷好氧化菌的比例仅有 10%, 而 ^{13}C -甲烷标记处理的甲烷好氧化菌比例高达 80%, 其中类型 I 甲烷好氧化菌 *Methylobacter* 占 70%, 类型 II 甲烷好氧化菌 *Methylocystis* 占 10%; 对于湖南桃源土壤, 对照处理的甲烷好氧化菌比例为

11%, 而标记处理重 RNA 中甲烷好氧化菌的比例达 70%, 其中类型 II 甲烷好氧化菌 *Methylocystis* 占 40%, 类型 I 甲烷好氧化菌 *Methylocaldum* 和 *Methylobacter* 分别占 20% 和 10%。广东雷州对照处理的重 RNA 中甲烷好氧化菌比例为 40%, 而标记处理 ^{13}C -RNA 中甲烷好氧化菌比例高达 100%, 所有 16S rRNA 序列均与类型 I 甲烷好氧化菌 *Methylobacter* 具有最近的亲缘关系。

3 讨论

新一代高通量测序技术为在整体微生物群落水平解析重要功能微生物的生理生态过程提供了重要技术支持; 稳定性同位素示踪微生物核酸 DNA/RNA 技术则有助于发掘复杂环境中重要微生物功能, 深刻认识自然条件下微生物的作用与作用的微生物。我们的研究表明, 高通量测序土壤微生物群落结构, 能够较好地反映稻田红壤甲烷好氧化过程的微生物机制, 并且在 RNA 水平的分析灵敏

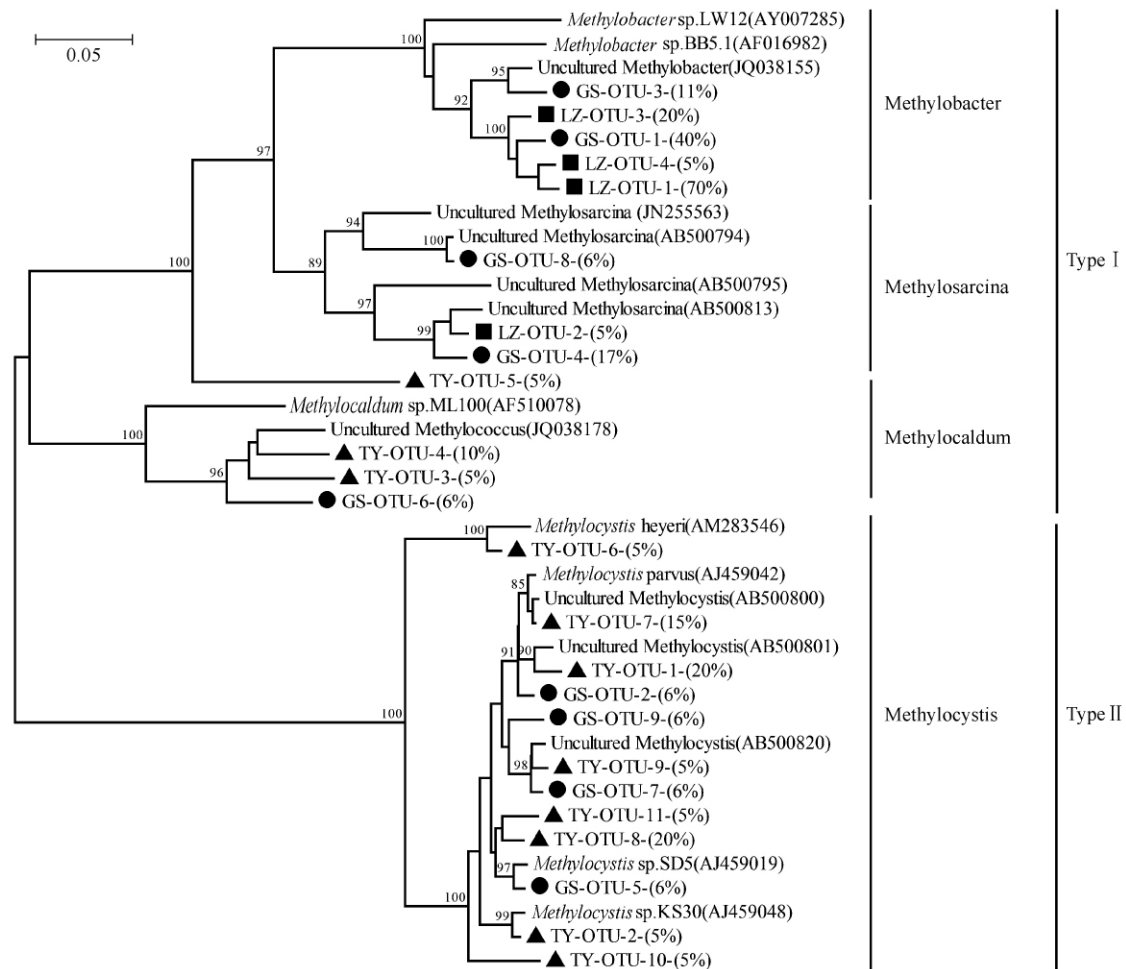


图5 稳定性同位素¹³C-标记的甲烷好氧化菌 *pmoA* 基因序列系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic relationship of *pmoA* gene sequence in the ¹³C-DNA to those in the GenBank. The abbreviations of GS, TY and LZ represent red paddy soil collected from the cities of Gu-Shi (●), Tao-Yuan (▲) and Lei-Zhou (■) respectively. The designation of GS-OTU-1-(40%) indicates that OTU-1 that contains *pmoA* genes with identity of >97% accounts for 40% of total *pmoA* genes sequences retrieved in the ¹³C-DNA from Gu-Shi paddy soil. Bootstrap values higher than 85% are indicated at branch nodes. The scale bar represents 5 changes per 100 nucleotide positions.

度高于 DNA; 利用稳定性同位素示踪土壤微生物核酸 DNA/RNA, 发现 3 种稻田红壤甲烷过程的微生物作用者具有明显差异。这一结果同时表明 3 种供试土壤在一定时间的风干保存后, 至少部分甲烷好氧化菌仍然能够在适当条件下恢复活性并发挥作用。事实上, 也有报道^[17]表明风干过筛处理对土壤甲烷好氧化过程没有明显的影响。此外, 干湿交替是稻田生态系统独特的耕作方式, 淹水期间或好氧土壤的厌氧微域中厌氧甲烷氧化菌也可能发挥了重要作用, 新一代高通量测序与稳定性同位素示踪环境微生物核酸 DNA/RNA 是未来系统阐释土壤甲烷氧化微生物群落生理生态过程的重要技术。

16S rRNA 是微生物系统分类的关键指标。利用 PCR 技术扩增土壤 16S rRNA 基因并进行高通量测序, 能够初步认知土壤微生物群落的整体概貌。以 3 种稻田红壤甲烷好氧化为模式过程, 通过在 DNA 和 RNA 水平高通量测序土壤微生物 16S rRNA 基因, 发现甲烷好氧化菌随甲烷好氧化过程, 在菌群中的比例显著增加, 并且 RNA 较 DNA 水平增幅更明显。采用 400 μmol/L 高浓度甲烷培养后, 湖南古市土壤甲烷好氧化菌在 RNA 水平的增幅大约是 DNA 水平的 4 倍, 其中类型 I 甲烷氧化菌 *Methylobacter* 和类型 II 甲烷氧化菌 *Methylosinu* 在 RNA 水平高出 DNA 水平 5 倍左右; 湖南桃源土壤

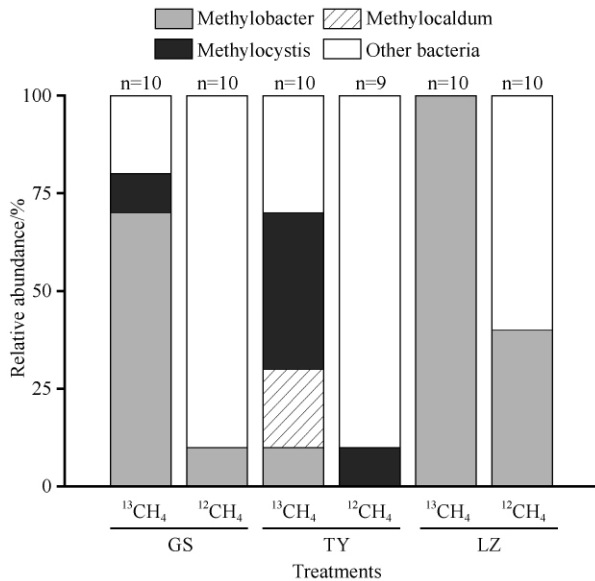


图6 ¹³CH₄-标记处理和¹²CH₄-对照处理土壤总RNA超高速离心后重浮力密度RNA中不同类群甲烷好氧氧化菌的相对百分比

Fig. 6 The percentage changes of aerobic methanotrophic populations in the 'heavy' RNA fractions from microcosms incubated with ¹³CH₄ and ¹²CH₄.

甲烷好氧氧化菌在RNA水平的增幅大约是DNA水平的1.5倍,其中类型II甲烷好氧氧化菌*Methylocystis*在RNA水平的增幅是DNA水平的2.5倍,表明RNA水平的研究更加灵敏,能够更加清楚地反映土壤微生物的生理过程。rRNA的合成与微生物细胞的活性之间的相关性远大于DNA,例如,DNA水平的16S rRNA基因数量增加通常依赖于甲烷好氧氧化菌的分裂增殖,而多数情况下细胞增殖消耗更多的能量,相反,甲烷好氧氧化菌数量没有增加的情况下,单个细胞可能产生大量核糖体rRNA参与蛋白质合成并氧化甲烷,因此,rRNA水平的分析可能更灵敏地反映了土壤甲烷好氧氧化的微生物生理过程。

稳定性同位素示踪土壤微生物核酸DNA/RNA均表明3种稻田红壤中甲烷好氧氧化微生物作用者具有明显差异,这可能是导致3种稻田红壤甲烷好氧氧化能力差异的根本原因,同时也侧面证明风干土处理至少对部分甲烷好氧氧化菌的生理功能影响较小。DNA-SIP表明类型I甲烷好氧氧化菌*Methylobacter*和类型II甲烷好氧氧化菌*Methylocystis*

分别是湖南古市和桃源土壤¹³C-DNA中优势种群(基于*pmoA*基因分析),广东雷州土壤中未能检测到类型II甲烷好氧氧化菌,类型I甲烷好氧氧化菌*Methylobacter*的*pmoA*在克隆文库中的比例高达95%,表明*Methylobacter*甲烷氧化菌主导了雷州红壤甲烷氧化过程。基于16S rRNA的RNA-SIP技术也得到了类似结果,特别是广东雷州土壤¹³C-RNA中所有的16S rRNA序列都属于类型I甲烷好氧氧化菌*Methylobacter*,与DNA-SIP结果一致。Lueders等利用稳定性同位素示踪技术研究了意大利稻田土壤甲烷氧化的微生物过程,发现在相同培养时间内,¹³C-RNA的产生量远高于¹³C-DNA,能够有效地示踪甲烷好氧氧化过程中活性微生物的变化规律^[8],表明RNA-SIP灵敏度高于DNA-SIP。

新一代高通量测序与稳定性同位素示踪的研究结果基本一致,但也存在一定的差异。针对广东雷州土壤,高通量测序表明类型I甲烷好氧氧化菌*Methylobacter*增幅最大,DNA/RNA-SIP结果也表明甲烷好氧氧化过程中活性甲烷好氧氧化菌几乎全部是类型I甲烷好氧氧化菌*Methylobacter*,二者研究结果几乎完全一致。然而,湖南古市土壤高通量测序结果在DNA和RNA的水平结果表明类型I甲烷好氧氧化菌*Methylobacter*和类型II甲烷好氧氧化菌*Methylosinus*均有明显增幅,且增幅水平几乎相当,然而DNA-SIP和RNA-SIP克隆结果表明类型I甲烷好氧氧化菌*Methylobacter*是主要功能甲烷好氧氧化菌,类型II甲烷好氧氧化菌所占比例非常少且以*Methylocystis*为主。对于湖南桃源土壤,在DNA和RNA水平的高通量测序都表明类型II甲烷好氧氧化菌*Methylosinus*和*Methylocystis*增幅最为明显,类型I甲烷好氧氧化菌仅有*Methylocaldum*略有增加,但增幅仅为千分之一;但DNA-SIP的¹³C-DNA未检测到类型II甲烷好氧氧化菌*Methylosinus*,仅检测到*Methylocystis*,并且RNA-SIP与DNA-SIP结果基本一致。产生这些差异的主要原因可能是DNA-SIP和RNA-SIP分别采用*pmoA*基因和16S rRNA基因对甲烷好氧氧化菌进行分类,可能会产生一定的偏差。此外,¹³C-标记核酸的克隆文库容量较小,也可能无法准确反映¹³C-DNA/RNA中所有活性甲烷好氧氧化菌的组成和丰度变化规律。未来高通量测序¹³C-

DNA/RNA 将可能更加完整地揭示土壤重要生态过程的微生物作用者^[15]。

土壤中巨大的土壤微生物数量意味着生理代谢的多样性。然而,目前的研究仍然是更加侧重特定微生物的特定基因,如 16S rRNA 和功能微生物的特异基因,更多地强调复杂土壤中活性微生物的鉴定。目前在群落水平重构微生物代谢路径和基因调控网络仍然具有较大的技术难度,但也有较为成功的探索,例如针对阿拉斯加冻土消融过程碳循环微生物功能基因组的研究报道^[18],在转录组水平研究复杂海水环境微生物群落对营养环境变化的响应^[19]。未来随着第二代高通量测序数据算法分析的快速发展,结合第三代测序技术的读长优点,将为研究海量土壤微生物代谢多样性及微生物资源定向发掘与调控提供重要支撑。

4 结论

(1) 新一代高通量测序技术能够在整体微生物群落水平,清楚反映复杂土壤中特定功能微生物的生理生态过程。在 16S rRNA 基因水平,甲烷好氧氧化菌随甲烷好氧氧化过程在菌群中的比例显著增加, RNA 水平的增幅显著高于 DNA 水平,表明 RNA 水平的分析较 DNA 更为灵敏。在属的分类水平上,湖南古市类型 I 和类型 II 甲烷好氧氧化菌增加明显,湖南桃源类型 II 甲烷好氧氧化菌显著增加,广东雷州土壤中类型 I 甲烷好氧氧化菌增加最明显。

(2) 稳定性同位素示踪土壤微生物核酸 DNA/RNA,能够准确地揭示复杂土壤重要生态过程的微生物作用者。利用¹³C-DNA 和¹³C-RNA 分别构建 *pmoA* 基因和 16S rRNA 克隆文库,发现 3 种稻田红壤甲烷好氧氧化过程的微生物作用者具有明显差异,这可能是导致不同稻田红壤甲烷好氧氧化能力差异的根本原因。其中类型 I 甲烷好氧氧化菌主导了湖南古市和广东雷州稻田红壤甲烷好氧氧化过程,类型 II 甲烷好氧氧化菌主导了湖南桃源稻田红壤甲烷好氧氧化过程。

(3) 本研究中新一代高通量测序与稳定性同位素示踪的研究结果基本一致,但在更精细的分类水平,两种方法获得的活性甲烷好氧氧化菌也存在一

定的差异。产生这些差异的主要原因可能是基于 *pmoA* 基因与 16S rRNA 基因的甲烷好氧氧化菌分类地位不能完全吻合,同时,¹³C-标记核酸的克隆文库容量较小,不能准确反映¹³C-DNA/RNA 中所有活性甲烷好氧氧化菌的组成和丰度变化规律。此外,目前条件下核酸 DNA/RNA 中¹³C 的富集程度仍然需要通过间接手段,准确分析复杂土壤中微生物细胞的标记程度仍存在技术难点,结合新一代高通量测序, SIP 技术将可能更加完整地揭示土壤甲烷氧化微生物生理生态过程的分子机制。

致谢 感谢中国科学院南京土壤研究所丁维新研究员和徐华研究员实验室在甲烷浓度测定方面提供的技术帮助,感谢安徽农业大学许静提供的实验和技术帮助。

参考文献

- [1] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 2005, 309(5739): 1387-1390.
- [2] Lu L, Han W, Zhang J, Wu YC, Wang BZ, Lin XG, Zhu JG, Cai ZC, Jia ZJ. Nitrification of archaeal ammonia oxidizers in acid soils is supported by hydrolysis of urea. *The ISME Journal*, 2012, 6(10):1978-84.
- [3] Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403(6770):646-649.
- [4] Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey MJ. RNA Stable Isotope Probing, a Novel Means of Linking Microbial Community Function to Phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11):5367-5373.
- [5] Dumont MG, Pommerenke B, Casper P, Conrad R. DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(5):1153-1167.
- [6] Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Brock Biology of Microorganisms*. 12th Edition. United States: Benjamin Cummings, 2008.
- [7] Murrell JC, Whiteley AS. *Stable isotope probing and related technologies*. Washington D. C.: ASM Press,

- 2010.
- [8] Lueders T, Wagner B, Claus P, Friedrich MW. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methyloph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, 2004, 6 (1) :60-72.
- [9] Shrestha PM, Kube M, Reinhardt R, Liesack W. Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2009, 11 (4) : 960-970.
- [10] Mettel C, Kim Y, Shrestha PM, Liesack W. Extraction of mRNA from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (17) :5995-6000.
- [11] Guo Y, Wu YC, Lin XG, Zhong WH, Ding WX, Zhu JG, Jia ZJ.. Three successive extractions reduce quantification bias of microbial communities associated with incomplete DNA recovery in soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (7) : 894-901. (in Chinese)
郭赟, 吴宇澄, 林先贵, 钟文辉, 丁维新, 朱建国, 贾仲君. 3次连续重复提取DNA能较好反映土壤微生物丰度. *微生物学报*, 2012, 52 (7) : 894-901.
- [12] Xia WW, Zhang CX, Zeng XH, Feng YZ, Weng JH, Lin XG, Zhu Jianguo, Xiong ZQ, Xu J, Cai ZC, Jia ZJ. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The ISME Journal*, 2011, 5 (7) :1226-1236.
- [13] Pilloni G, von Netzer F, Engel M, Lueders T. Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. *Fems Microbiology Ecology*, 2011, 78 (1) :165-175.
- [14] Claesson M, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkila J, Marchesi JR, Smidt H, Devos WM, Ross RP, O'Toole PW. Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. *Plos One*, 2009, 4 (8) : e6669.
- [15] Jia ZJ. Principle and application of DNA-based stable isotope probing - A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (12) :1585-1594. (in Chinese)
贾仲君. 稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP 原理与应用. *微生物学报*, 2011, 51 (12) :1585-1594.
- [16] 贾仲君. 第七章-稳定性同位素技术的应用 // 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [17] Cebren A, Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Singer AC, Thompson IP, Prosser JI, Murrell JC. Nutrient amendments in soil DNA stable isotope probing experiments reduce the observed methanotroph diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 7 (3) : 798-807.
- [18] Mackelprang R, Waldrop MP, DeAngelis KM, David MM, Chavarria KL, Blazewicz SJ, Rubin EM, Jansson JK.. Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature*, 2011, 480 (7377) :368-371.
- [19] Shi Ym, McCarren J, DeLong EF. Transcriptional responses of surface water marine microbial assemblages to deep-sea water amendment. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 (1) :191-206.

Next generation sequencing and stable isotope probing of active microorganisms responsible for aerobic methane oxidation in red paddy soils

Yan Zheng^{1,2}, Zhongjun Jia^{1*}

¹State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] This study is aimed to establish an unbiased profiling strategy for investigating the microorganisms responsible for aerobic methane oxidation by pyrosequencing the total soil microbial communities at DNA and RNA levels, and to link aerobic methane oxidation activity with taxonomic identity of active microorganisms by DNA/RNA SIP in red paddy soils. [Methods] Three red paddy soils derived from quaternary red clay were collected from Gushi and Taoyuan cities of Hunan province and Leizhou city of Guangdong province, were incubated with the labeled $^{13}\text{C}\text{H}_4$ or $^{12}\text{C}\text{H}_4$ for determination of aerobic methane oxidation kinetics. Pyrosequencing of the 16S rRNA and 16S rRNA gene at the whole microbial community levels were performed over the course of aerobic methane oxidation in soil microcosms. ^{13}C -DNA and ^{13}C -RNA were obtained through ultracentrifugation of the total soil DNA and RNA extracts, respectively. Clone library of *pmoA* genes in ^{13}C -DNA and 16S rRNA genes in ^{13}C -RNA were constructed. [Results] Pyrosequencing of the total microbial communities revealed significant increase in the relative abundance of aerobic methanotrophs in soil microcosms upon the completion of aerobic methane consumption. The proportional increase of aerobic methanotrophs was significantly higher at RNA than DNA levels. Type I and II aerobic methanotrophs significantly increased in Gushi soil, while the significant increase of type II aerobic methanotrophs was observed in Taoyuan soil. In the meantime, type I aerobic methanotrophs appeared to be stimulated exclusively in Leizhou soil. Sequencing analysis of the ^{13}C -labeled *pmoA* genes and 16S rRNA further demonstrate that phylogenetically distinct methanotrophs dominated aerobic methane oxidation activity in paddy soils of Gushi (Type I and II), Taoyuan (Type II) and Leizhou (Type I). [Conclusion] High-throughput pyrosequencing at the whole community level of 16S rRNA genes provides an almost unbiased profiling strategy for measuring characteristic changes in relative proportions of aerobic methanotrophs responsible for aerobic methane oxidation activity in red paddy soils, and higher sensitivity was observed at RNA than DNA levels. DNA/RNA-SIP can accurately reveal the active microorganisms responsible for aerobic methane oxidation in red soil, being largely consistent to pyrosequencing-based fingerprinting analysis of the total microbial communities.

Keywords: next-generation sequencing, stable-isotope probing, red paddy soil, aerobic methane oxidation

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41090281, 31270147) and by the Research Network for Applied Microbiology of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-G-46)

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

Received: 7 September 2012 / Revised: 19 November 2012