

贵州红壤水稻土淹水培养过程中 Fe-氢酶微生物的多样性

闫苗章¹, 李丽娜¹, 王保莉¹, 曲东^{2*}

西北农林科技大学,¹生命科学学院,²资源环境学院,杨凌 712100

摘要:【目的】研究水稻土淹水培养过程中 Fe-氢酶微生物的多样性,对于揭示 Fe-氢酶微生物的群落演替规律和产氢微生物的生化代谢机理具有重要的意义。【方法】采用 PCR-变性梯度凝胶电泳和实时定量 PCR 技术进行基于梭菌属 Fe-氢酶基因的多样性和丰度的分析。【结果】水稻土淹水培养过程中 Fe-氢酶基因的变性梯度凝胶电泳图谱显示,培养 1-5 d 时 Fe-氢酶基因条带数增加,10 d 时 Fe-氢酶基因条带数减少,20-40 d 时 Fe-氢酶基因条带数再次增加并保持稳定,对应的含 Fe-氢酶微生物的群落结构随着培养过程的进行发生了显著变化。主成分分析表明,1 d 与 20 d、5 d 与 10 d、30 d 与 40 d 的含 Fe-氢酶微生物群落结构相似性较高,随着培养时间的增长含 Fe-氢酶微生物群落结构趋于稳定。 α 多样性指数分析显示,1 d 和 10 d 的丰富度指数 (R)、Shannon-Weaver 指数 (H')、Simpson 指数 (D_s) 与其他时间点相比较小,说明这 2 个时间点的 Fe-氢酶多样性低,对应的含 Fe-氢酶微生物群落结构较为简单,表明淹水培养过程中微生物的群落结构发生了演替变化。变性梯度凝胶电泳指纹图谱 15 个 Fe-氢酶的优势条带测序后构建的系统发育树表明,培养前期的优势条带与梭菌属的 Fe-氢酶关系较近,培养后期出现了非梭菌属的 Fe-氢酶。淹水培养过程中 Fe-氢酶基因的拷贝数在 10^6 /g 干土的水平,占细菌的相对比例为 1% - 2%。【结论】水稻土淹水培养过程中发现了 4 种梭菌属 Fe-氢酶和 3 种非梭菌属 Fe-氢酶基因,对应的含 Fe-氢酶微生物在培养前期群落结构发生显著演替变化,培养后期趋于稳定。

关键词: 水稻土, Fe-氢酶, 群落结构, 丰度

中图分类号: S154.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)06-0577-09

微生物产氢过程与其氢酶的作用直接相关,其中梭菌属 Fe-氢酶因较强产氢能力被广泛研究^[1-5]。淹水稻田为产氢微生物提供了广阔的厌氧环境,在有机质降解过程伴随着氢气的产生。水稻土中产生的 H_2 很快被同型产乙酸菌和甲烷菌消耗,而不同微生物种间 H_2 转移为土壤提供还原力,同时也能促进硝酸盐、硫酸盐和氧化铁的还原及甲烷的产生^[6]。厌氧环境中的产甲烷菌可利用 H_2 还原 CO_2 产生

CH_4 ,理论上 H_2 对产甲烷的贡献可达到 33%,所以 H_2 -依赖产甲烷过程被视为稻田温室气体产生的重要途径之一^[7-9]。Parameswaran 等研究揭示产甲烷途径优先利用 H_2 产生甲烷,当体系中产甲烷途径受阻时,同型产乙酸发酵菌可以利用 H_2 还原乙酸盐生成乙酸^[10]。诸多的研究结果显示,当土壤中存在硝酸盐、硫酸盐及 Fe(III) 时可竞争消耗 H_2 ,显著抑制了甲烷的形成^[11-15]。水稻土中氧化铁含量平均在

基金项目:国家自然科学基金(40971158,41171204)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-29-87082624; E-mail: dongqu@nwsuaf.edu.cn

作者简介:闫苗章(1986-),男,陕西陇县人,硕士研究生,主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail: ymzh20052006@126.com

收稿日期:2012-12-02;修回日期:2013-01-25

4%，因此铁还原过程对抑制甲烷产生具有不可忽视的作用。另外，土壤中脱氢酶活性与微生物 Fe(III) 还原过程具有相关性，推测微生物代谢有机物产 H₂ 是水稻土淹水初期氧化铁快速还原的主要原因^[16]。因此，深入研究水稻土中的氢酶及其产氢过程对于揭示土壤中生化代谢机理具有重要的理论意义。

目前土壤中 Fe-氢酶的研究大多集中在富集培养体系中的混合菌群产氢发酵过程，通过检测不同发酵阶段的产氢微生物种群、氢酶的种类和活性，揭示混和发酵产氢过程中的微生物群落结构及氢酶变化特征^[17-18]。刘洪艳等^[19]经过厌氧富集培养潮间带的污泥，应用变性凝胶梯度电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) 技术研究了发酵产氢过程中产氢微生物种类和 Fe-氢酶基因，发现发酵产氢微生物菌群以梭菌属 (*Clostridium*) 微生物为主，Fe-氢酶测序发现与产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 和玫瑰色梭菌 (*Clostridium roseum*) 的 Fe-氢酶相似性较高。Chang 等^[20]通过厌氧培养的堆肥研究，从 DNA 和 RNA 水平揭示了暗发酵产氢过程中产氢菌群的群落结构特征，发现了与巴氏梭菌 (*Clostridium pasteurianum*) 和糖丁酸梭菌 (*Clostridium saccharobutylicum*) 的亲缘关系较近的氢酶。然而，针对厌氧水稻土中氢酶基因及其产氢微生物的群落结构演替研究相对较少，特别是结合土壤铁还原环境下的氢酶基因的多样性尚未见报道。本文拟采用非种植水稻土厌氧培养过程，通过对不同淹水时间条件下水稻土中混合菌群的 Fe-氢酶多样性与丰度变化分析，来揭示淹水培养过程中含 Fe-氢酶微生物的群落结构演替特征，为 Fe-氢酶及其微生物在厌氧水稻土中的生化代谢机理和产氢种质资源的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试土样

水稻土采自贵州省贵阳市小河区王武村水稻收

获后的稻田，采样时间为 2010 年 10 月。采集 0-20 cm 耕层土壤，风干，磨细，过 1 mm 土壤筛，贮存备用。土壤有机质含量为 34.41 g/kg，全量氮、磷和钾分别为 1.85、0.42 和 19.98 g/kg，游离铁和无定形氧化铁含量分别为 8.11 和 2.48 g/kg，pH 值 7.56。

1.2 试验方案与方法

试验设置 6 个不同淹水时间处理，分别为淹水培养 1、5、10、20、30 和 40 d。称取 3.000 g 土样若干份，置于灭菌后的 10 mL 血清瓶中，分别加入无菌去离子水 3 mL，保持水土比为 1:1。加橡胶盖，充氮除氧，用铝盖密封，置于 30℃ 恒温培养箱中避光培养。分别在每个时间点取出 3 份作为重复，置于 -20℃ 保存土壤泥浆样品，待全部培养处理完成后统一提取土壤总 DNA。

1.3 土壤微生物总 DNA 提取

泥浆样品解冻后，采用 OMEGA soil DNA kit (D5625-01) 提取土壤微生物总 DNA，0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

1.4 基因组 DNA 的 PCR 扩增

采用 Chang 等^[20]报道的梭菌属 Fe-氢酶基因 (*hydA*) 引物 E_f 和 E_r (表 1) 进行 PCR 扩增。用于 DGGE 分析的样品经过两轮 PCR 扩增获得。第一轮 PCR: 用 E_f 和 E_r 引物，以土壤总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。在 25 μL 的反应体系中包含 TaKaRa SYBR Primix Ex Taq™ II 10 μL、模板 2 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL，添加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应循环条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 32 个循环; 72℃ 延伸 10 min。第二轮 PCR: 将第一轮 PCR 产物稀释 10 倍作模板，以 E_f 和 GC-E_r 为引物进行 PCR 扩增。在 50 μL 反应体系中包含 TaKaRa Primix Taq 20 μL、模板 1 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL，添加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应循环条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 32 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1. Fe-氢酶基因扩增引物

Table 1. Primers used for cloning of the Fe-hydrogenase gene (*hydA*)

Primers	Sequences (5'→3')
E _f	GCTGATATGACAATAATGGAAGAA
E _r	GCAGCTTCCATAACTCCACCGGTTGCACC
GC-E _r	CGCCCCGGGGCGCCCCGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGGGCAGCTTCCATAACTCCACCGGTTGCACC

1.5 变性梯度凝胶电泳

用 Bio-Rad 公司的 Dcode™ 基因突变分析仪分离第二轮的 PCR 产物。制备 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂梯度为 0 到 50% (100% 变性剂中含有 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺)。电泳时上样量为 35 μ L PCR 产物。在 60°C 系统温度下先 50 V 电泳 30 min, 接着 100 V 电泳 6 h, EB 染色 30 min, 用 Bio-Red DOC1000 凝胶成像系统检测。实验设置重复 3 次。

1.6 胶回收测序及系统发育树构建

切取 DGGE 图谱的代表条带于 100 μ L 的 ddH₂O 中浸泡过夜。取 2 μ L 浸泡液作为模板, 用引物 E_f 和 E_r 进行 PCR 扩增。将扩增产物纯化后连接到 pMD19-T, 转化到大肠杆菌 JM109, 挑取白色阳性克隆接种到 LB 液体培养基中, 37°C 摇菌过夜。菌液送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。DGGE 优势条带的测序结果与 NCBI 的 GenBank 数据进行对比分析, 选取参比序列, 采用 ClusterW 软件进行序列的多重比对, 用 MEGA5.0 的 N-J 法构建系统发育树。

1.7 多样性指数及主成分分析

利用 Quantity One 软件分析 DGGE 图谱的相似性、丰富度和 Shannon-Weiner 多样性指数^[21]。Sorensen 群落相似度指数计算公式为: $C_{ij} = 2 \times L_{ij} / (L_i + L_j)$, 其中 C_{ij} 为样品 i 和样品 j 上位置相同的条带数, L_i 为样品 i 上的条带数, L_j 为样品 j 上的条带数。丰富度指数的计算公式为 $R = S - 1 / \ln N$, 其中 R 为样品的丰富度指数, S 为样品的条带数, N 代表所有峰的总面积。多样性的 Shannon-Weiner 指数 (H') 的计算公式为 (1) $H' = - \sum P_i \ln P_i$, (2) $P_i = N_i / N$, 其中, N_i 代表单一条带的峰面积, N 代表所有峰的总面积, P_i 为特定条带亮度相对于所有条带总亮度的比率。Simpson 指数 (D_s) 的计算公式为: $D_s = 1 / \sum P_i^2$ 。均匀度指数 (E) 计算公式为: $E = H' / \ln L_i$ 。

针对 DGGE 图谱中的优势条带, 采用 UniFrac 对基于 Fe-氢酶基因进化树的微生物群落构成进行主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)。

1.8 基于 Fe-氢酶基因的丰度测定

Real-time PCR 反应体系为: TaKaRa SYBR Primix Ex Taq™ II 12.5 μ L, E_f 和 E_r 各 1 μ L, 土壤微生物总 DNA 1 μ L, 补加 ddH₂O 至 25 μ L。反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 延

伸 45 s, 反应 40 个循环。

标准曲线的构建: 用梭菌属氢酶通用引物 E_f 和 E_r 扩增 *C. pasteurianum* 的 Fe-氢酶基因, 并与 pMD19-T 载体连接后转化到 JM109 感受态细胞, 筛选阳性克隆并提取质粒, 测定质粒浓度后计算质粒拷贝数 (copies/ μ L)。以 10 倍梯度稀释后的质粒作为模板构建标准曲线。

2 结果和分析

2.1 水稻土淹水培养过程中基于 Fe-氢酶的群落结构变化

2.1.1 基于 Fe-氢酶的微生物群落结构的相似性和演替变化: 水稻土在淹水培养过程中, 不同时间点基于梭菌属 Fe-氢酶基因的 DGGE 图谱如图 1 所示。从图 1 看出不同时间点的条带数有明显的差异, 表明 Fe-氢酶的群落结构发生变化。淹水 1 d 的 Fe-氢酶 DGGE 图谱相似度与其他时间点的差异最大, 相似性系数仅为 0.16。在淹水 1 d 时, 土样泥浆中可能存在少量溶解氧, 体系中的氧化还原电位相对较高, 致使土壤中复苏的微生物大多是耐氧或兼性厌氧的种群, 故淹水 1 d 与后面厌氧环境下各时间点的微生物群落产生了较大的差异。淹水 5 d 和 10 d 的 Fe-氢酶 DGGE 图谱条带较为相似, 相似性系数为 0.61, 而淹水 20 d 和 30 d 群落相似性最高, 相似性指数达 0.70。淹水 20、30 和 40 d 的 Fe-氢酶条带在 DGGE 相似图中聚为一簇 (图 2), 表明厌氧培养后期优势的 Fe-氢酶条带趋于相似和稳定。

根据灰度和电泳迁移位置变化, 可将水稻土不同淹水时间点的 Fe-氢酶 DGGE 优势条带分为以下类型: (1) 多个时间点泳道的同一水平位置连续出现的条带。如条带 7、10 和 14, 分别出现在淹水 20、30 和 40 d, 随着淹水培养时间的增长条带的灰度依次减弱, 在淹水前期并没有出现。出现在淹水 30 d 的条带 11, 其相邻的左右泳道同一位置均出现条带 (未标出), 但条带 11 的灰度最大, 灰度从 20 d 到 40 d 有一个由低到高再降低的变化过程。(2) 多个时间点泳道的同一水平位置非连续出现的条带。如条带 1 和 6, 分别出现在淹水 1 d 和 20 d; 条带 4 和 8, 分别出现在淹水 10 d 和 30 d。条带 3、5 和 15 分别出现在淹水 5、10 和 40 d。其中淹水 1 d 的条带 1 为一个单克隆。(3) 仅在一个时间点中出现的条

带。如条带 2 出现在淹水 5 d, 条带 9 出现在淹水 30 d, 条带 12 和 13 均只出现在淹水 40 d。

Fe-氢酶种类代表了体系中存在的含 Fe-氢酶微生物的种类。由 Fe-氢酶的 DGGE 图谱变化(图 1)可以推测出, Fe-氢酶对应的微生物群落结构也发生了变化和演替。Fe-氢酶 DGGE 条带数比较表明: 在淹水 1 d 时 Fe-氢酶微生物种类单一, 淹水 5 d 时的 Fe-氢酶微生物种类增加, 而淹水 10 d 时的 Fe-氢酶微生物种类又出现了回落, 表明淹水前期 Fe-氢酶微生物群落结构变化较大。淹水 20 d 以后 Fe-氢酶微生物种类基本持平, 反映出淹水培养后期群落结构较为丰富和稳定。

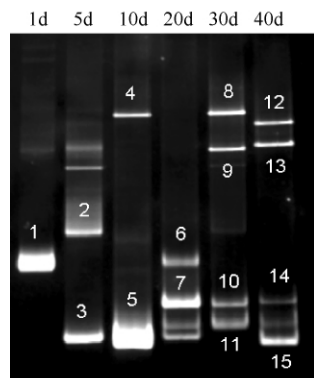


图 1. 不同淹水时期水稻土基于梭菌 Fe-氢酶基因的 DGGE 电泳图谱

Figure 1. DGGE profile of Fe-hydrogenase in paddy soil during flooding incubation and cluster analysis of similarities. The 1 d, 5 d, 10 d, 20 d, 30 d and 40 d stand for different treatments and the data in figure stand for typical DGGE band for sequencing.

0.16 0.30 0.40 0.50 0.60 0.70 0.80 0.90 1.00

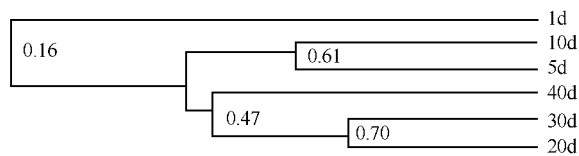


图 2. 不同淹水时期水稻土中基于 Fe-氢酶基因的 DGGE 电泳图谱相似性聚类图

Figure 2. The DGGE profile cluster analysis of similarities of Fe-hydrogenase in paddy soil during the different flooding incubation.

2.1.2 不同淹水时期的 PCA 分析: 对 Fe-氢酶基因的优势 DGGE 条带测序, 通过 UniFrac 进行 PCA 分析, 结果如图 3 所示。第一序轴和第二序轴构建的排序分布图展示了各个淹水时期的 Fe-氢酶微生物

构成相似度的情况, 2 个序轴共同解释了不同时间点分布变化的 84.89%。由图 3 可以看出, 淹水 5 d 和 10 d 紧密聚在一起, 淹水 1 d 和 20 d 可聚集一起, 淹水 30 d 和 40 d 紧密聚在一起。在 PCA 分布图中距离越近, 表示不同时间点的各个 Fe-氢酶序列关联性越高, 相似程度也越高, 通过 Fe-氢酶基因序列的系统进化树构建分析可以得到一致的结论。

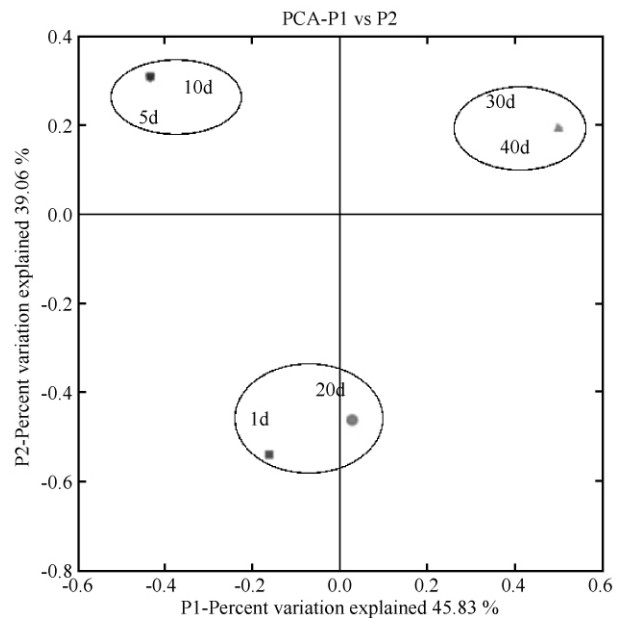


图 3. 基于优势 DGGE 条带的 Fe-氢酶基因序列的主成分分析关联散点图

Figure 3. ScatterPlot of PCA analyses by UniFrac basis on Fe-hydrogenase sequences of preponderant DGGE types.

2.1.3 基于 Fe-氢酶的微生物群落多样性指数变化: 淹水过程中水稻土基于 Fe-氢酶的微生物群落的丰富度指数 (R)、Shannon-Weaver 指数 (H')、均匀度指数 (E)、Simpson 指数 (D_s) 如表 2 所示。由于淹水 1 d 处理是单克隆, 所以多样性指数均为 0。淹水 5 d 到 40 d 时间点的 R 、 H' 和 D_s 指数变化可看出, 淹水 5 d 时的各个指数明显增大, 而淹水 10 d 的各种指数减小, 出现了一个低谷, 淹水 20 d 时各种指数迅速增大到淹水 5 d 时的水平, 并在随后的淹水 30 d 和 40 d 处理中呈现一个稳定持平的状态。除淹水 1 d 处理外, R 、 H' 和 D_s 最小值分别为淹水 10 d 的 0.1172、0.6895 和 0.4963, R 、 H' 和 D_s 最大值分别为淹水 40 d 的 0.4459、1.4142 和 0.7348。 E 基本保持在 0.9 左右, 最大值为淹水 10 d 的 0.9947, 而最小值为淹水 40 d 的 0.8787。

Fe-氢酶微生物群落多样性指数变化表明, 淹水

5 d时的 Fe-氢酶微生物的各种多样性指数增加, Fe-氢酶及 Fe-氢酶微生物丰富度提高;淹水10 d中各种多样性指数回落,其 Fe-氢酶及对应的 Fe-氢酶微生物丰富度降低;淹水20 d的 Fe-氢酶多样性指数回升并达到淹水 5 d 时的水平,表明其 Fe-氢酶及 Fe-氢

酶微生物丰富度再次增加;随后淹水30 d、40 d与 20 d的 Fe-氢酶多样性指数持平,表明 Fe-氢酶及 Fe-氢酶微生物丰富度和群落结构相对稳定,与前面的群落演替分析相吻合。

表 2. 不同淹水时期水稻土的 Fe-氢酶微生物群落多样性指数

Table 2. The diversity index of Fe-hydrogenase microbial community during paddy soils flooding incubation

Flooding time/d	Richness index (R)	Shannon-Weaver index (H')	Evenness index (E)	Simpson index (D _s)
1	0	0	0	0
5	0.3357 ± 0.0038	1.2905 ± 0.0483	0.9309 ± 0.0349	0.7051 ± 0.0234
10	0.1172 ± 0.0001	0.6895 ± 0.0025	0.9947 ± 0.0035	0.4963 ± 0.0025
20	0.3440 ± 0.0008	1.2904 ± 0.0065	0.9308 ± 0.0047	0.7046 ± 0.0033
30	0.3364 ± 0.0013	1.3548 ± 0.0032	0.9773 ± 0.0023	0.7344 ± 0.0016
40	0.4459 ± 0.0021	1.4142 ± 0.0012	0.8787 ± 0.0008	0.7348 ± 0.0001

The data are represented by "mean ± standard deviation".

2.2 水稻土淹水培养过程中基于 Fe-氢酶基因序列的系统进化树

对淹水培养过程中 Fe-氢酶的 15 个优势 DGGE 条带进行测序并构建了系统进化树(图 4)。测序结果比对分析发现大多数为梭菌属的 Fe-氢酶,但也出现了非梭菌属的 Fe-氢酶基因序列。系统进化树分析发现不同时间点优势 Fe-氢酶基因序列分为两大簇:G9、G7、和 G14 为一簇,其他的序列聚为一大簇。G3、G4 和 G5 与热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的 Fe-氢酶基因序列聚为一簇,蛋白序列的一致性和相似性分别达 86% 与 94%; G11 和 G12 与嗜热厌氧乙醇杆菌 (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) 的 Fe-氢酶基因聚为一类,蛋白序列的相似性 76%; G2 与解糖梭菌 (*Clostridium saccharolyticum*) 的 Fe-氢酶基因聚在一起,蛋白序列的相似性为 81%; G10 和 G15 与肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*) 的 Fe-氢酶基因聚为一簇,蛋白序列的相似性 76%; G1 和 G6 与 *C. perfringens* 的 Fe-氢酶基因聚为一簇,蛋白序列的相似性为 91%; G8 和 G13 与 *Ignavibacterium album* 的 Fe-氢酶基因序列聚为一簇,蛋白序列的一致性与相似性分别达 91% 和 95%; G9、G7、和 G14 与 *Marinilabilia salmonicolor* 的 Fe-氢酶基因序列聚为一簇,蛋白序列的相似性为 82%。

2.3 淹水培养过程中基于 Fe-氢酶基因的微生物丰度变化

不同淹水培养过程中水稻土 Fe-氢酶微生物的丰度变化如表 3 所示,用 Fe-氢酶基因和梭菌属、细

菌的 16S rRNA 基因在每克风干土的拷贝数来分别表示三者对应的微生物在土壤中的含量。由表 3 可以看出,每克干水稻土中 Fe-氢酶基因的拷贝数在 10⁶ 的水平,明显低于梭菌属 16S rRNA 基因的每克干水稻土中 10⁷ 水平的拷贝数,更低于细菌 16S rRNA 基因的每克风干水稻土中 10⁹ 水平拷贝数^[22]。Fe-氢酶基因的拷贝数在 1.197 × 10⁶ /g - 2.888 × 10⁶ /g 之间,占梭菌的相对比例在 1.25% - 15.29% 之间,占细菌的相对比例在 1.14‰ - 2.16‰ 之间。5 d 时的 Fe-氢酶拷贝数 1.197 × 10⁶ /g 最低,占梭菌属 16S rRNA 基因拷贝数的相对比例为 1.25%,占细菌 16S rRNA 基因拷贝数的相对比例为 1.14‰。40 d 时的 Fe-氢酶拷贝数 2.888 × 10⁶ /g 最高,占梭菌属 16S rRNA 基因拷贝数的相对比例为 8.80%,占细菌 16S rRNA 基因拷贝数的相对比例为 1.33‰。

3 讨论

厌氧水稻土中 Fe-氢酶微生物群落结构的变化与其土壤的营养条件、厌氧环境、其他种类的微生物关系紧密。梭菌属 Fe-氢酶在已知氢酶中产氢能力最高,也是目前发酵产氢研究的主要产氢酶类,但是梭菌属氢酶复杂多样,蛋白保守性差,对于基因本身和其群落结构研究是一个难点^[23]。梭菌属微生物对营养条件要求较低,大多数在厌氧或微厌氧的环境条件下生长^[18],Fe-氢酶的活性中心 [4Fe - 4S] 簇呈还原态时 Fe-氢酶才具有活性,当活性中心还原

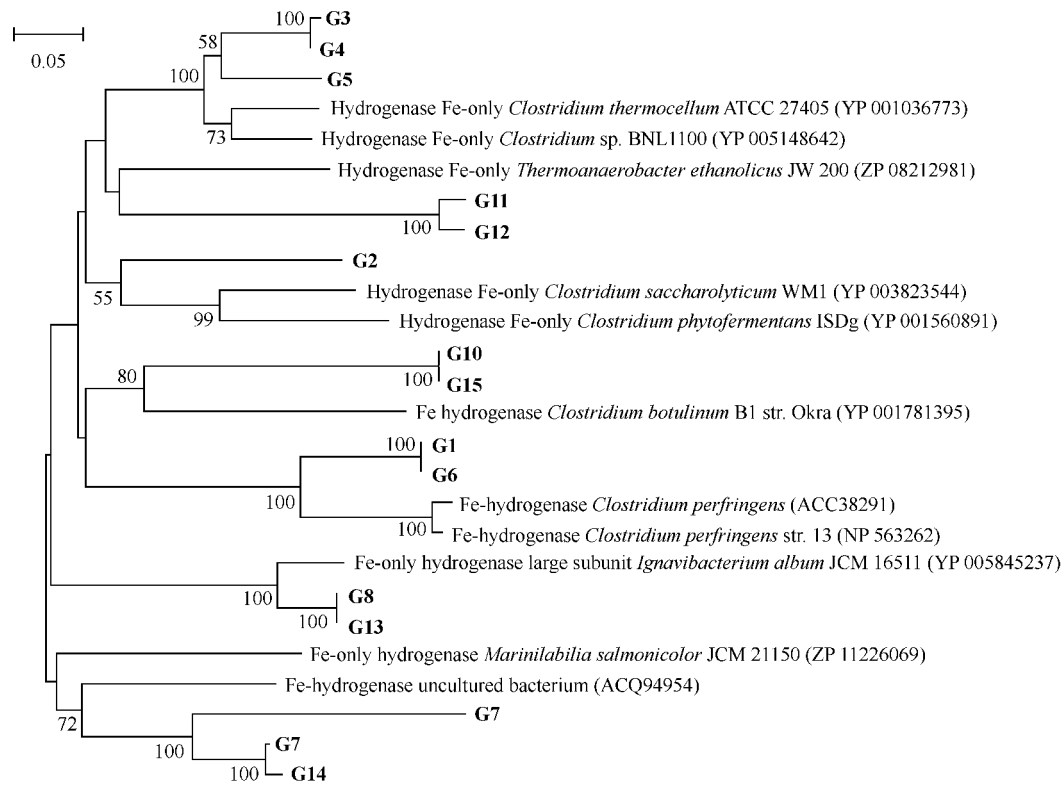


图 4. 优势 DGGE 条带基于 Fe-氢酶蛋白序列的系统发育树

Figure 4. Phylogenetic analysis of preponderant DGGE types based on Fe-hydrogenase amino acid sequences. Boldface type G1 – G15 of Phylogenetic tree indicates Fe-hydrogenase gene amino acid sequences obtained from preponderant DGGE types in this study. Bootstrap values (> 50%) represent amino acid substitution rate, and the scale bar represents 5% estimated sequence divergence.

表 3. 水稻土中 Fe-氢酶基因、梭菌属和细菌 16S rRNA 基因拷贝数

Table 3. The Fe-hydrogenase, 16S rRNA gene copies of *Clostridium* and bacteria in paddy soil during flooding incubation

Flooding time/d	Fe-hydrogenase copies / (10^6 /g)	<i>Clostridia</i> 16S rRNA gene copies / (10^7 /g)	Bacteria 16S rRNA gene copies / (10^9 /g)	Copies proportion of Fe-hydrogenase to <i>clostridia</i> /%	Copies proportion of Fe-hydrogenase to bacteria /%
1	1.622 ± 0.112	12.955 ± 0.345	1.419 ± 0.019	1.25	1.14
5	1.197 ± 0.020	2.542 ± 0.091	1.055 ± 0.047	4.71	1.13
10	1.730 ± 0.372	1.290 ± 0.033	0.802 ± 0.015	13.41	2.16
20	2.325 ± 0.101	1.521 ± 0.103	1.140 ± 0.045	15.29	2.04
30	1.608 ± 0.068	1.827 ± 0.117	1.214 ± 0.051	8.80	1.33
40	2.888 ± 0.066	3.065 ± 0.127	1.399 ± 0.042	9.42	2.07

The data are represented by "mean ± standard deviation".

能力降低时 Fe-氢酶活性降低甚至丧失,因此 Fe-氢酶微生物对生长环境的厌氧性要求较高,这也是水稻土淹水培养后期的 Fe-氢酶微生物数量、种类较多,且群落结构相对稳定原因之一。

微生物产氢是一个氧化还原的过程,产生的 H_2 在这些微生物的生长代谢和土壤微环境还原能力传递中扮演着重要的角色,影响着其生长微环境中的电子供体和电子受体的种类和数量^[6]。自然界的

厌氧水稻田中,有机物经过一系列的氧化分解最终生成 CO_2 和甲烷等,其中甲烷菌可以从乙酸和 H_2 / CO_2 获得还原力产生甲烷,而产氢菌在产甲烷过程中可提供 H_2 ,产氢产乙酸菌和产甲烷菌是互营菌,能够促进甲烷的产生^[9,24]。产氢和产甲烷 2 个过程的偶联,为深刻揭示各微生物厌氧消化阶段的关联提供了契机,在水稻土中有机物的生化代谢机理和产甲烷抑制生态学方面具有重要意义。

由本研究的前期培养中看出, 淹水 1 h 时没有出现 Fe-氢酶的条带(结果未显示), 淹水 1 d 到 5 d 时随着时间的增长 Fe-氢酶的条带数增加, 表明 Fe-氢酶和 Fe-氢酶微生物种类增加, 但是对应的细菌数量在培养过程中是逐渐减少的, 表明营养可能不是这个时期 Fe-氢酶微生物生长的限制因素。淹水 5 d 时出现 Fe-氢酶微生物群落结构的丰富, 推测由于 Fe-氢酶微生物对厌氧环境要求较高, 厌氧环境有利于 Fe-氢酶微生物生长。淹水 10 d 时 Fe-氢酶微生物和细菌数量均达到最低, 推测由于培养初期复苏的各种土壤微生物的演替和各种营养物质的消耗, 具有很强繁殖能力的前期 r-策略优势菌的数量和种类减少, 具有很强的竞争能力 k-策略的微生物开始繁殖, 群落结构发生较大的变化, Fe-氢酶微生物受此影响而种类减少。随着淹水 20 d 培养中期的到来, 相对于前期的激烈竞争营养环境趋于缓和, k-策略的 Fe-氢酶微生物逐渐成为优势菌, 并在培养后期群落结构趋于稳定。本实验室前期研究结果表明供试水稻土淹水 20 d 以后, 细菌、梭菌、芽胞杆菌、地杆菌等在数量和群落结构上都趋于稳定^[22, 25], 这对于厌氧条件严格的 k-策略梭菌属 Fe-氢酶微生物是一个适宜的生存环境, 故 Fe-氢酶微生物种类较前期增加, 群落结构丰富且微生物种类相对趋于稳定。

系统进化树构建过程中我们发现: NCBI 数据库中已知的梭菌属 Fe-氢酶序列多和淹水培养前期的测序条带相似性高, 淹水培养后期的 DGGE 优势条带测序结果与数据库中已知的 Fe-氢酶序列匹配的数量较少, 而且多为非梭菌 Fe-氢酶基因。本研究中测序的 Fe-氢酶基因对应的相似菌株 *C. perfringens*、*C. saccharolyticum*、*C. thermocellum*、*Thermoanaerobacter ethanolicus*、*Marinilabilia salmonicolor* 等均为厌氧发酵菌株, 其中 *C. perfringens* 在混合菌群产氢发酵中研究较多, 其余的菌株则多应用于厌氧乙醇发酵^[26-28]。对贵州水稻土不同淹水时间的 Fe-氢酶基因多样性研究, 间接揭示了各个时间点存在不同的 Fe-氢酶优势菌群, 反映了不同淹水时间产氢菌群落结构的演替和变化。

4 结论

本实验以淹水非种植水稻土模式为研究系统,

基于 Fe-氢酶为出发点来研究水稻土淹水培养过程中 Fe-氢酶基因的多样性及 Fe-氢酶对应的微生物群落结构。Fe-氢酶基因的 DGGE 指纹图谱、PCA 分析、 α 多样性指数和 Fe-氢酶基因优势条带的系统进化树揭示了淹水培养过程中 Fe-氢酶微生物的群落结构发生了显著的演替变化, 培养后期 Fe-氢酶微生物群落结构趋于稳定。淹水培养过程中发现了 4 种梭菌属 Fe-氢酶基因、3 种非梭菌属 Fe-氢酶基因, 其中对应的 Fe-氢酶微生物几乎都是研究较为深入的发酵类菌株。通过对水稻土不同淹水培养阶段的 Fe-氢酶及其微生物群落结构演替研究可为厌氧水稻土中依赖发酵微生物的生化代谢机理探究提供必要的科学依据。

参考文献

- [1] Peters JW, Lanzilotta WN, Lemon BJ, Seefeldt LC. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (*Cpl*) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*, 1998, 282 (4): 1853-1858.
- [2] Mulder DW, Boyd ES, Sarma R, Lange RK, Endrizzi JA, Brodeurick JB, Peters JW. [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of *HydAΔEFG*. *Nature*, 2010, 13 (465): 248-252.
- [3] Kuchenreuther JM, Grady-Smith CS, Bingham AS, George SL, Cramer SP, Swartz JR. High-yield expression of heterologous [FeFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2010, 5 (11): e15491.
- [4] Yu R, Zong W, Zhou Z. Engineering of *Escherichia coli* for convenient expression of [FeFe]-hydrogenase. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (11): 1468-1475. (in Chinese)
于瑞嵩, 宗文明, 周志华. 异源表达 [FeFe] 氢酶的基因工程大肠杆菌的构建. *微生物学报*, 2011, 51 (11): 1468-1475.
- [5] Morimoto K, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. Overexpression of a hydrogenase gene in *Clostridium paraputrificum* to enhance hydrogen gas production. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 246 (2): 229-234.
- [6] Conrad R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2 , CO, CH_4 , OCS, N_2O , and NO). *Microbiology Review*, 1996, 60 (4): 609-640.
- [7] Conrad R, Klose M. Selective inhibition of reactions involved in methanogenesis and fatty acid production on

- rice roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 34 (1) : 27-34.
- [8] Phelps TJ, Conrad R, Zeikus JG. Sulfate-dependent interspecies H_2 transfer between *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio vulgaris* during coculture metabolism of acetate or methanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50 (3) : 589-594.
- [9] Conrad, R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentration in methanogenic soil and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28 (3) : 193-202.
- [10] Parameswaran P, Zhang H, Torres CI, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R. Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105 (1) : 69-78.
- [11] Achnich C, Bak F, Conrad R. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 19 (1) : 65-72.
- [12] Achnich C, Schuhmann A, Wind T, Conrad R. Role of interspecies H_2 transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16 (1) : 61-70.
- [13] Jaeckel U, Schnell S. Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32 (12) : 1811-1814.
- [14] Qu D, Zhang Y, Schnell S, Conrad R. Effect of iron oxide addition on hydrogen, carbon dioxide and methane genes in paddy soil. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14 (8) : 1313-1316. (in Chinese)
曲东, 张一平, Schnell S, Conrad R. 添加氧化铁对水稻土中 H_2 、 CO_2 和 CH_4 形成的影响. *应用生态学报*, 2003, 14 (8) : 1313-1316.
- [15] Qu D, Stefan R, Schnell S. Microbial reduction of weakly crystalline iron (III) oxides and suppression on methanogenesis in paddy soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 72 (6) : 1172-1181.
- [16] Yi W, Qu D, Jia R. Relationship between Fe (III) reduction and dehydrogenase activity during different flooding periods in paddy soils. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2012, 20 (5) : 768-776. (in Chinese)
易维洁, 曲东, 贾蓉. 不同淹水时期水稻土的 Fe (III) 还原能力及其与脱氢酶活性的关系. *应用基础与工程科学学报*, 2012, 20 (5) : 768-776.
- [17] Ueno Y, Haruta S, Ishii M, Igarashi Y. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57 (4) : 555-562.
- [18] Kawagoshi Y, Hino N, Fujimoto A, Nakao M, Fujita Y, Sugimura S, Furukawa K. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100 (5) : 524-530.
- [19] Liu H, Wang G, Zhu D, Pan G. Diversity analysis of microbial community and Fe-hydrogenase genes of fermentative mixed culture from intertidal sludge. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43 (1) : 180-184. (in Chinese)
刘洪艳, 王广策, 朱大玲, 潘光华. 潮间带污泥中厌氧发酵产氢混合菌群组成与 Fe-氢酶基因多样性分析. *海洋与湖沼*, 2012, 43 (1) : 180-184.
- [20] Chang JJ, Chen WE, Shih SY, Yu SJ, Lay JJ, Wen FS, Huang CC. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70 (5) : 598-604.
- [21] Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43 (1) : 1-11.
- [22] Tuo X, Zhu H, Wang B, Qu D. Changing characteristics of *Geobacteraceae* community structure in paddy soil during flooding incubation. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31 (6) : 1165-1171. (in Chinese)
拓晓骅, 朱辉, 王保莉, 曲东. 淹水培养过程中水稻土细菌科微生物群落结构变化特征. *农业环境科学学报*, 2012, 31 (6) : 1165-1171.
- [23] Calusinska M, Happe T, Joris B, Wilmotte A. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective. *Microbiology*, 2010, 156 (6) : 1575-1588.
- [24] Bryant MP, Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*, 1968, 1 (1) : 20-31.
- [25] You J, Xia S, Wang B, Qu D. Effect of flooding time on community structure and abundance of *Geobacteraceae* in paddy soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (6) : 796-804. (in Chinese)

- 由焦化, 夏淑红, 王保莉, 曲东. 淹水时间对水稻土中地杆菌科群落结构及丰度的影响. 微生物学报, 2011, 51 (6) : 796-804.
- [26] Yang SH, Giannone RJ, Dice L, Yang ZK, Engle NL, Tschaplinski, Hettich RL, Brown SD. *Clostridium thermocellum* ATCC27405 transcriptomic, metabolomic and proteomic profiles after ethanol stress. *BMC Genomics*, 2012, 336 (13) : 1471-2164.
- [27] Kumar S, Subramanian S, Raghava GPS, Pinnaka AK. Genome sequence of the marine bacterium *Marinilabilia salmonicolor* JCM 21150. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (14) : 3746.
- [28] Hui P, Wu GG, Shao WL. The aldehyde alcohol dehydrogenase (*AdhE*) in relation to the ethanol formation in *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200. *Anaerobe*, 2008, 14 (2) : 125-127.

Diversity of Fe-hydrogenase microbe in Guizhou red paddy soil during flooding incubation

Miaozhang Yan¹, Lina Li¹, Baoli Wang¹, Dong Qu^{2*}

¹College of Life Sciences, ²College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: [Objective] The diversity of Fe-hydrogenase based on Fe-hydrogenase gene of *Clostridium* was studied for exploring the biochemical mechanism of soil microbial hydrogen production and revealing the Fe-hydrogenase microbial community structure changes during the paddy soil flooding incubation [Methods] We used denatured gradient gel electrophoresis and real-time quantitative PCR to achieve the goal. [Results] The band number of Fe-hydrogenase denatured gradient gel electrophoresis fingerprints indicated Fe-hydrogenase microbes structure varied significantly during the completely flooding incubation. The Principal Component Analysis (PCA) showed the highly similar communities of Fe-hydrogenase microbial was divided into three groups: 1 d and 20 d, the 5 d, 30 d and 40 d. With the growth of the flooding incubation time Fe-hydrogenase microbial community structure became relatively stable and convergence. α diversity index analysis found that the richness index (R), Shannon-Weaver index (H'), Simpson index (D_s) numerical values of 1 d and 10 d were lower compared with other points, indicated the two time points of low Fe-hydrogenase diversity, simple Fe-hydrogenase microbial community structure and successive variation of community structure during the whole flooding incubation. After sequencing 15 Fe-hydrogenase preponderant bands (labeled by G1 - G15), the phylogenetic tree of Fe-hydrogenase showed that the preponderant bands all had high similarity with the *Clostridium* Fe-hydrogenase in earlier flooding incubation stage and non-*Clostridium* Fe-hydrogenase in the later stage. Real-time quantitative PCR results demonstrated that the Fe-hydrogenase gene copy number was 10^6 level. [Conclusion] In the research we found 4 kinds of *Clostridium* Fe-hydrogenases and three kinds of non-*Clostridium* Fe-hydrogenases, the corresponding Fe-hydrogenase microbial community structure had successively significant variation in the early incubation stage and tend to be relatively stable and convergence in the late stage.

Keywords: Fe-hydrogenase, paddy soil, community structure, denatured gradient gel electrophoresis (DGGE)

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40971158, 41171204)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-87082624; E-mail: dongqu@nwsuaf.edu.cn

Received: 2 December 2012/Revised: 25 January 2013