

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11): 1311–1322; 4 November 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.009

风干土壤中氨氧化微生物的恢复

周雪^{1,2}, 黄蓉¹, 宋歌¹, 潘贤章¹, 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, 江苏 南京 210008

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 【目的】比较历史风干土壤与加水恢复培养土壤中氨氧化古菌 AOA 和细菌 AOB 的组成与数量差异, 探究风干土壤用于后续微生物生理生态学研究的可能性; 明确我国典型酸性森林土壤中, 海洋类 Group 1. 1a 是否为数量上占据优势的古菌 AOA 生态型。【方法】针对中国生态系统研究网络 10 个台站的典型森林土壤样品, 围绕风干保存和加水培养两种处理, 通过高通量测序土壤氨氧化古菌及细菌 *amoA* 标靶基因, 分析氨氧化微生物群落组成的变化规律; 利用实时荧光定量 PCR 和 DGGE 指纹图谱技术, 研究森林土壤微生物群落 16S rRNA 基因的数量变化规律, 以及氨氧化细菌和古菌群落结构的差异。【结果】10 个历史风干土壤加水培养 28 天后, 土壤细菌和古菌数量均急剧增加, 最高可达 3230 倍和 568 倍; 其中 8 个土壤中氨氧化古菌 AOA 明显增加, 5 个土壤中氨氧化细菌 AOB 表现出明显的增加趋势。然而, 高通量测序和系统发育分析表明, 历史风干土壤与加水恢复培养土壤中 AOA 和 AOB 的群落组成无明显变化。Group 1. 1b 是氨氧化古菌的优势类群, 而氨氧化细菌的主要类群是 *Nitrosospira* 螺菌属。氨氧化古菌和细菌的比例与总氮浓度呈显著正相关 ($r^2 = 0.54$, $P < 0.05$), 表明酸性条件下土壤矿化并提供铵态氮底物可能是古菌氨氧化的驱动机制。【结论】风干土壤加水恢复培养后, AOA 和 AOB 的种群数量大多出现增加的趋势, 但其物种组成未发生显著变化, 表明风干保存的土壤样品可用于后续室内培养, 开展微生物生理生态学研究。与已有的海洋 AOA 生态型主导酸性土壤氨氧化类群的报道不同, 土壤 Group 1. 1b 是本研究森林土壤中的优势类群。

关键词: 焦磷酸, 高通量测序, 酸性森林土壤, 氨氧化古菌, 风干土壤

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1311-12

一般认为, 微生物体积小, 繁殖快, 适应强, 但长期以来由于技术手段的限制, 复杂自然环境中微生物的生理生态过程仍然无法定量表征, 对环境干扰的适应与响应机制大多处于概念性的描述阶段。以栖息于土壤中的复杂微生物群落为例, 其对水分胁迫的机制仍是研究难点。水是已知所有生命的基本要素, 早在 1958 年已有报道发现干旱的土壤加水培

养后, 土壤呼吸作用显著增强, 排放出更多的二氧化碳, 这一现象常被称为干土效应或 Birch 效应^[1]。尽管学术界对 Birch 效应的内在机制仍然存在不同观点, 但对微生物的作用争议较少, 通常认为在加水恢复培养条件下, 微生物利用有机碳异养生长, 促进了土壤有机质的分解, 是重要的土壤微生物生理生态过程。Birch 效应的重要意义在于, 土壤微生物群

基金项目: 江苏省杰出青年科学基金 (BK2012048); 土壤学科领域基础科学数据整合与集成应用 (XXH12504-1-02)

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

作者简介: 周雪 (1989–), 女 (回), 江苏南京人, 博士研究生, 主要从事微生物生态与进化研究。E-mail: xzhou@issas.ac.cn

收稿日期: 2014-01-19; **修回日期:** 2014-04-17

落经过风干处理并适应水分胁迫后,可能长期处于休眠状态,当土壤加水湿润恢复培养后,微生物群落的组成与数量可能会发生变化,对后续研究产生较大的影响。事实上,野外采集的大量土壤样品很难在实验室保持其原位自然状况。因此,实际工作中通常采用风干土壤样品测定土壤理化指标,同时,目前全世界范围内土壤样品的保存,也几乎全部采用风干处理后的土壤样品,这些风干土壤样品能否用于后续土壤微生物研究,风干土壤加水恢复培养后所获得的结果是否具有现实意义,不仅具有重要的理论意义,也是土壤微生物方法论的研究内容。

最近的研究表明,美国加州两种草地土壤经过严酷干旱后,加水恢复培养过程中土壤微生物类群的反应较为复杂并可大概分为3大类,快速反应性、中间反应型和反应迟缓型^[2]。16S rRNA系统发育分析表明,这些微生物在分类学亚门的水平具有一定的规律可循。进一步的研究发现,氨氧化古菌的响应滞后于氨氧化细菌,但两种酸性土壤中优势氨氧化微生物种群结构并未发生明显变化^[3]。我国研究人员较早开展了风干效应对土壤硝化过程的研究。与风干土壤相比,农田和苗圃旱地新鲜土壤的硝化率显著较高,表明风干过程可能对微生物造成了较大的负面影响,导致加水湿润培养后,氨氧化古菌和细菌无法恢复到初始新鲜土壤的水平^[4]。然而,最近的研究却发现,与旱地土壤相反,长期淹水种植的稻田土壤表现出明显的干土效应^[5]。迄今为止,土壤氨氧化微生物对干土效应的适应机制仍不清楚。

基于 *amoA* 功能基因的分子生态学研究表明,氨氧化古菌 AOA 可分为3大类,主要包括海洋类群 (Group 1.1a 和 Group 1.1a-associated)、土壤类群 Group 1.1b 以及嗜热型 ThAOA^[6]。利用 454 高通量测序 *amoA* 的 PCR 扩增产物, Gubry-Rangin 等在全球尺度研究了氨氧化古菌的地理分异规律,发现 pH 可能是土壤氨氧化古菌多样性的主控因子。其中,以 *N. devanattera* 为代表的海洋类古菌 Group 1.1a-associated 是酸性土壤的优势种群,而土壤类古菌 Group 1.1b 在中性和碱性土壤中含量较高,以生境 pH 为基础的氨氧化古菌生态位分异规律进一步在和区域和田块尺度得到了验证^[7]。针对我国较大空间尺度下的 65 个好氧旱地土壤样品,利用荧光实时定量 PCR、以及基于 16S rRNA 基因和 *amoA* 功

能基因的高通量测序等分子生态学技术,我国同行也发现了类似规律,海洋类古菌 Group 1.1a-associated 相对丰度与 pH 呈显著负相关,而 Group 1.1b 土壤类古菌的相对丰度则与 pH 呈显著正相关^[8]。这些研究结果与古菌 AOA 生理代谢特点较为吻合。例如,土壤类古菌 Group 1.1b 可耐受高浓度铵态氮^[9-10],并主要存在于中性和碱性土壤中^[11]。同时, Group 1.1a 和 Group 1.1a-associated 海洋类 AOA 对底物 NH₃ 具有极高的亲和力,能够较好地适应 NH₃ 匮乏的海洋环境^[12] 和酸性土壤^[13],并可能在这些生境中主导了氨氧化过程^[14-16]。然而,目前尚未有专门针对酸性土壤的氨氧化古菌多样性报道,这一结论是否适用于所有酸性土壤仍不清楚。

森林土壤通常呈酸性,是研究酸性胁迫条件下氨氧化微生物响应与适应的模式体系之一。中国生态系统研究网络 (China Ecosystem Research Network) 拥有 10 个森林生态系统野外长期监测试验站,基本代表了我国主要森林生态系统。本研究针对 CERN 森林台站 2010 年采集的风干历史土壤样品,通过室内加水恢复培养 28 d 后,利用分子生态学技术研究风干土壤加水恢复培养后氨氧化古菌的群落差异,探讨风干土壤开展微生物群落研究的可行性。

1 材料和方法

1.1 土壤样品概况

森林土壤样品采集于 2010 年,来自中国科学院南京土壤研究所 CERN 土壤样品库,选用 0-10 cm 的表层土。土壤样品采集、分析和保存严格按照 CERN 陆地生态系统土壤观测规范的操作指南完成。采样点信息及土壤基本理化性质如表 1 所示。

1.2 土壤微宇宙培养与微生物 DNA 提取

针对每一种森林土壤样品,称取相当于 5 g 干重的历史风干森林土壤样品进行培养。添加适量的无菌去离子水,使得土壤含水量达到其最大持水量的 60%,用于恢复土壤中的微生物,模拟新鲜土壤环境,密封后在黑暗条件下 28 °C 培养 28 天。随后采集约 0.6 g 的加水培养新鲜土壤,利用 FastDNA® Spin Kit for Soil 试剂盒 (MP Biomedicals),根据其提供的操作指南提取土壤微生物总 DNA。由于森林

土壤中腐殖酸含量较高,而腐殖酸的存在会影响样品的下游分子分析,因此本研究采用 5.5 mol/L 异硫氰酸胍(Guanidine Thiocyanate)反复清洗 DNA,除去腐殖酸,并将 DNA 溶解于 100 μ L 无菌水后零下 20 $^{\circ}$ C 保存待用。同时提取等量干重的历史风干土

壤样品,采用上述相同方法,提取土壤 DNA。通过微量紫外分光光度计(NanoDrop[®] ND-1000)分析土壤微生物 DNA 的浓度和纯度(OD_{600}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230}),进一步通过 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的完整性和相对含量。

表 1. 不同野外森林台站土壤理化性质

Table 1. Physicochemical properties of 10 forest soils from CERN

Sample site	Nitrate ^a (N mg/kg)	Ammonium (N mg/kg)	SOM (g/kg)	TN (N g/kg)	pH	Collection date
CB(长白山)	0.02	0.07	94.44	7.51	4.73	2010-11-18
BJ(北京)	4.10	3.06	34.51	3.86	6.07	2010-7-2
SN(神农)	12.22	0.40	50.36	1.94	5.62	2010-8-15
HT(会同)	12.30	7.72	55.01	2.49	4.29	2010-10-6
MX(茂县)	1.26	11.35	67.65	3.53	5.28	2010-9-11
GG(贡嘎)	7.46	2.67	101.53	3.88	5.63	2010-9-6
HS(鹤山)	9.57	9.41	54.08	2.01	3.81	2010-10-30
DH(鼎湖)	3.28	6.05	49.47	1.82	3.84	2010-10-27
AL(哀牢)	15.75	15.75	243.24	10.47	4.25	2010-12-20
XS(西双版纳)	5.53	4.23	32.78	2.07	4.48	2010-11-18

^a Soil properties are obtained from China soil database.

1.3 高通量测序氨氧化古菌和细菌 *amoA* 功能基因

通过反复优化 PCR 反应体系及扩增程序,共获得了四种样品的古菌 *amoA* 扩增产物(长白山 CB,哀牢 AL,北京 BJ 及贡嘎 GG)和 2 种样品的细菌 *amoA* 扩增产物(茂县 MX,北京 BJ)。针对可以得到 PCR 产物的风干样品和加适量无菌水培养样品的 DNA 进行高通量测序分析。如表 2 所示,利用 CrenamoA 23F/616R 和 amoA-1F/2R 的引物对,分别扩增氨氧化古菌和细菌的 *amoA* 功能基因。引物设计根据高通量测序方法完成^[14],引物前端连接了不同的 Tag 序列标签以区分不同样品。每对引物中同时包含了特异的接头 adaptor 和 key 序列以提高测序质量^[14]。PCR 扩增体系如下:0.25 μ L 的 TaKaRa Ex Taq HS

(5 U/ μ L), 5.0 μ L 的 10 \times Ex Taq Buffer (Mg²⁺ Plus), 4.0 μ L 的 dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 0.5 μ L 的引物 (20 μ mol/L), 加入稀释后的 1.0 μ L DNA 模板和无菌水至 50 μ L 反应体系。PCR 扩增的反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C,10 min。

获得 PCR 产物后,利用 Agarose MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒(TaKaRa)切胶纯化,纯化产物溶解于 30 μ L ddH₂O。将不同样品的 PCR 纯化产物等摩尔数混合后,利用罗氏公司的 454 FLX Titanium sequencer 完成测序分析。对测序所得总序列进行去除嵌合体处理,根据不同 Tag 标签提取样品序列,进行后续分析。

表 2. PCR 扩增引物

Table 2. Primers used in this study

primer name	primer sequence (5' \rightarrow 3')	target gene	molecular analysis	reference
Arch-amoAF	STA ATG GTC TGG CTT AGA CG	archaeal <i>amoA</i> gene	Real-Time PCR in Fig. 4	[17]
Arch-amoAR	GCC GCC ATC CAT CTG TAT GT			
amoA-1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	bacterial <i>amoA</i> gene	Real-Time PCR in Fig. 4	[17]
amoA-2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC			
A364aF	CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA	archaeal 16S rRNA gene	Real-Time PCR in Fig. 4	[17-18]
A934b	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT			
515F	GTG CCA GCM GCC GCG G	universal 16S rRNA genes	Real-Time PCR in Fig. 4	[19]
907R	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT			
CrenamoA23f	ATGGTCTGGCTWAGACC	archaeal <i>amoA</i>	DGGE in Fig. 5	[20]
CrenamoA616r	GCCATCCATCTGTATGTCCA		454 Pyrosequencing in Fig. 1	

1.4 实时荧光定量 PCR

土壤总细菌、总古菌、氨氧化古菌和氨氧化细菌定量分析的分子靶基因如表 2 所示。实时荧光定量 PCR 的具体方法与已有的报道一致^[21]。将提取的 DNA 样品根据 NanoDrop 测定结果进行稀释,使 DNA 终浓度在 1 – 10 ng/ μL , 作为定量 PCR 的模板。定量 PCR 标线采用含有古菌和细菌 *amoA* 基因以及 16S rRNA 基因的克隆进行制备。首先采用特定引物分别扩增目的基因,构建克隆文库后,将含有目标基因的克隆在 LB 营养液中过夜培养,提取质粒纯化并测定质粒浓度,根据摩尔常数计算目标基因的拷贝数,并将质粒连续稀释 6 – 8 个数量级,从而获得各目的基因的标准曲线^[21]。实时荧光定量 PCR 于 CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad 公司) 上完成。定量 PCR 扩增反应体系为 20 μL , 包括: 10 μL 的 SYBR[®] Premix EX Taq[™] (宝生物工程(大连)有限公司), 上、下游引物 (20 pmol/ μL) 各 0.2 μL , 1.0 μL 土壤总 DNA 模板, 8.6 μL 灭菌双蒸水。每次试验均设置严格的阴性对照, 采用灭菌双蒸水代替 DNA 作为反应模板。

1.5 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 氨氧化古菌和细菌 *amoA* 功能基因

以稀释 10 倍后的土壤 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物用于 DGGE 电泳分离。通过反复优化 PCR 反应体系及扩增程序, 共获得了 5 种样品的古菌 *amoA* 的产物 (长白山 CB, 哀牢 AL, 西双版纳 XS, 北京 BJ 及贡嘎 GG) 和 3 种样品的细菌 *amoA* 的产物 (茂县 MX, 北京 BJ 及贡嘎 GG)。PCR 扩增体系主要包括: 0.25 μL 的 TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μL), 5.0 μL 的 10 \times Ex Taq Buffer (Mg²⁺ + Plus), 4.0 μL 的 dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 0.5 μL 的引物 (20 $\mu\text{mol/L}$), 加入稀释后的 1.0 μL DNA 模板和无菌水至 50 μL 反应体系。PCR 扩增的反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 35 \times (94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min); 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。

氨氧化古菌采用 6% 的聚丙烯酰胺胶, 实验中采用的变性梯度为: 30% – 60%; 氨氧化细菌采用 8% 的聚丙烯酰胺胶, 变性梯度为: 45% – 75%。每个样品采用约 150 ng 的 PCR 产物进行电泳。聚丙烯酰胺胶在 0.5 \times TAE 缓冲液中 80 V 电压下电泳 16 h。电泳完毕后, 用 SYBR Green I 核酸染色剂 (Generay[™] Biotechnology) 染色 30 min, 在凝胶成像

仪上观察分析。

将 DGGE 图谱中的代表性条带进行切胶回收, 然后再用对应的引物对回收条带 DNA 进行 PCR 扩增, 将扩增产物利用 pEASY-T3 Cloning Kit (TransGen Biotech) 按照说明书进行克隆测序。将测序结果利用 NCBI 数据库, 在 GenBank 数据中用 BLAST 进行同源性比较, 确定微生物种类。利用 MEGA4 软件, 进行 Bootstrap 验证系统发育分析, 邻接法 (Neighbor-joining, N-J) 构建系统发育树。

1.6 数据分析

所有数据采用 Origin 8.1 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。NMDS 图谱通过 R 软件统计绘制。

2 结果和分析

2.1 风干森林土壤加水恢复培养过程中氨氧化微生物 *amoA* 基因

如表 3 所示, 10 种不同的森林土壤中, 有 4 种样品可获得氨氧化古菌 *amoA* 基因的 PCR 产物, 同时有 2 种样品土壤 DNA 能够获得氨氧化细菌 PCR 产物, 其原因可能是高通量测序所用引物前端加入了 31 bp 的 Tag 标签、Adaptor 接头和识别 Key 序列, 导致 PCR 反应效率降低。

对于 AOA 而言, 森林土壤的风干和加水恢复培养两种处理分别获得了 5831 和 8337 条高质量序列。通过 mothur 软件对单个样品总序列进行 OTU 分析, 并利用 MEGA4 对每个样品中所占序列相对丰度最高的代表性 OTU 进行系统发育分析。对于长白山、哀牢山和北京 3 种森林土壤, 如图 1 所示, 风干和加水培养 30 天后 *amoA* 序列的系统发育关系几乎完全一致, 表明加水培养后, 氨氧化古菌的多样性并没有发生显著变化。然而, 贡嘎风干土 *amoA* 序列与加水恢复土壤序列的系统发育地位并不完全相同, 但都属于土壤类群古菌 Group1. 1b。进一步的非度量多维尺度 NMDS 分析则表明, 4 种土壤氨氧化古菌 *amoA* 基因之间存在显著差异, 但同一土壤的风干与加水培养处理对 *amoA* 基因的影响较小 (图 2)。根据图 1 中 *amoA* 序列的系统发育关系对氨氧化古菌进行分类, 如表 3 所示, 4 种森林土壤中的 *amoA* 序列可分为 2 大类, 包括海洋类群 Group

1.1a-associated 和土壤类群 Group 1.1b 古菌。所有 4 个森林土壤样品中, 仅哀牢山土壤样品中含有少量的海洋类群 1.1a-associated 古菌, 在历史风干和加水培养土壤中的比例分别为 1.55% 和 0.53%, 其

它 *amoA* 序列则全部隶属于土壤类群 1.1b, 对于长白山、贡嘎和北京 3 种森林土壤, 无论风干或加水培养处理, 所有 *amoA* 序列都属于土壤类群 1.1b 古菌。

表 3. 焦磷酸高通量测序氨氧化古菌 (AOA) 功能基因 *amoA* 数据概况

Table 3. Summary of 454 pyrosequencing results of Archaeal *amoA* genes

treatment	sample name ^a	read sequence	group 1.1a		group 1.1b	
			read	percentage, %	read	percentage, %
drying	CB-Drying-AOA	377	0	0.00	377	100.00
	AL-Drying-AOA	193	3	1.55	190	98.45
	BJ-Drying-AOA	1790	0	0.00	1790	100.00
	GG-Drying-AOA	3471	0	0.00	3471	100.00
wetting	CB-Wetting-AOA	2567	0	0.00	2567	100.00
	AL-Wetting-AOA	1876	10	0.53	1866	99.47
	BJ-Wetting-AOA	1356	0	0.00	1356	100.00
	GG-Wetting-AOA	2538	0	0.00	2538	100.00

^a All abbreviations are the same as those in Table 1 for sampling site.

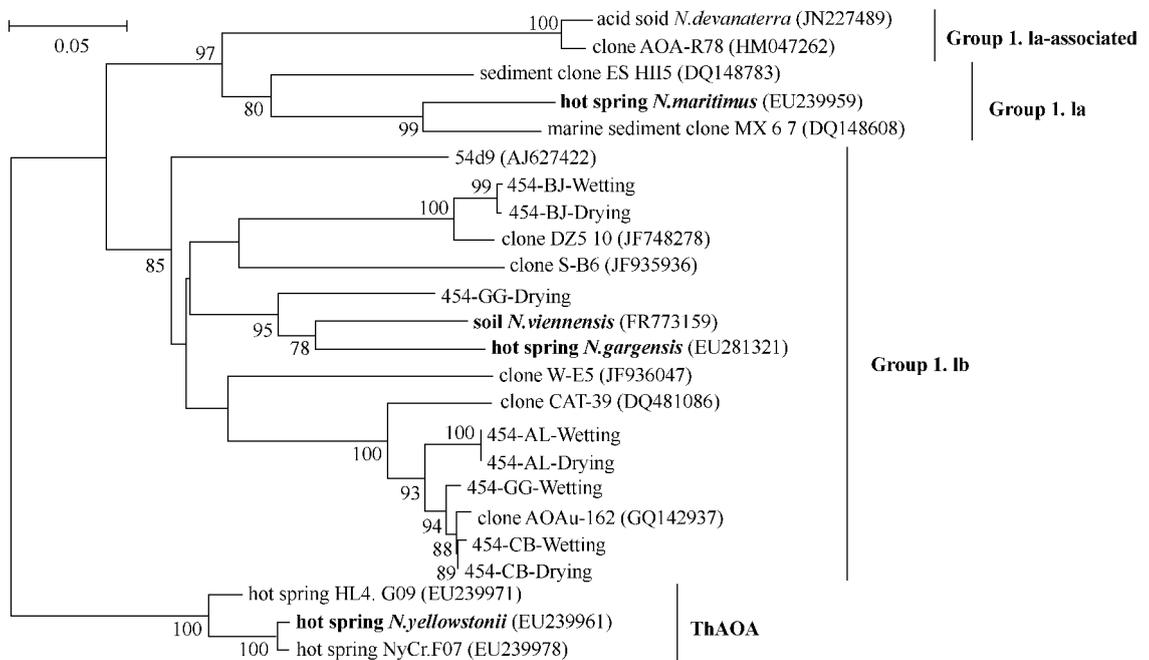


图 1. 氨氧化古菌 *amoA* 基因高通量测序代表性序列的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic analysis of archaeal *amoA* genes in 4 forest soils. Archaeal *amoA* genes of different samples were classified into distinct OTUs using mothur software package, and one representative sequence within the OTU was selected for phylogenetic analysis. The designation 454-BJ-Drying-AOA indicates that the representative sequence of dry soil from Beijing forest.

茂县和北京 2 种森林土壤的氨氧化细菌 *amoA* 基因数据分析方法与古菌功能基因分析方法相同 (表 3)。系统发育分析表明, 风干和加水培养 30 d 后, 细菌 *amoA* 序列的系统发育关系几乎完全一致 (图 3), 氨氧化细菌的多样性没有发生显著变化。而进一步的非度量多维尺度 NMDS 分析则显示, 胁

强系数 (Stress) 为 0, 说明不仅两种处理前后氨氧化细菌多样性高度相似, 茂县和北京站点样品的氨氧化细菌群落的系统发育地位也很相近。除了北京样品中少量序列属于 Cluster 0, 其余所有序列均属于 Cluster 3。

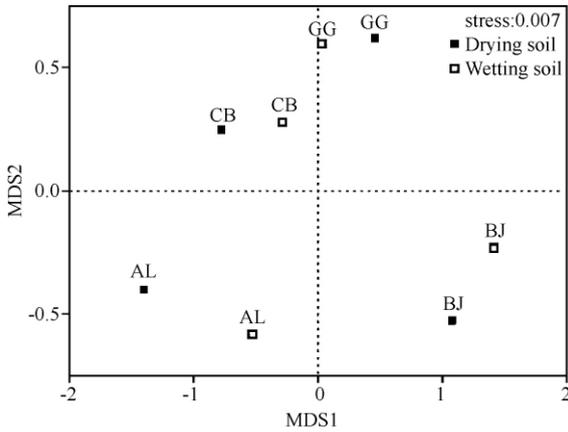


图 2. 土壤氨氧化古菌 *amoA* 基因的非度量多维尺度分析

Figure 2. Non-metric multi-dimensional scaling analysis of archaeal *amoA* gene compositions in air-drying and re-wetting soils for four geographic different forests. All abbreviations are the same as those in Table 1.

表 4. 焦磷酸高通量测序氨氧化细菌 (AOB) 功能基因 *amoA* 数据概况

Table 4. Summary of 454 pyrosequencing results of Bacterial *amoA* genes

treatment	sample name	read sequence	cluster 0		cluster 3	
			read	percentage, %	read	percentage, %
drying	MXa-Drying-AOB	261	0	0.00	261	100.00
	BJ-Drying-AOB	3386	4	0.12	3382	99.88
wetting	MX-Wetting-AOB	6774	0	0.00	6774	100.00
	BJ-Wetting-AOB	1318	6	0.46	1312	99.54

^a All abbreviations are the same as those in Table 1.

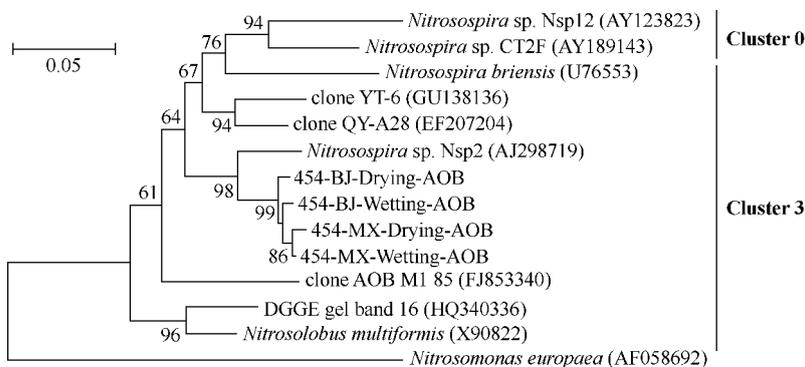


图 3. 氨氧化细菌 *amoA* 基因高通量测序代表性序列的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic analysis of bacterial *amoA* genes in 2 forest soils. Bacterial *amoA* genes of different samples were classified into distinct OTUs using mothur software package, and one representative sequence within the OTU was selected for phylogenetic analysis. The designation 454-BJ-Wetting-AOB indicates that the representative sequence of re-wetting soil from Beijing forest.

加水恢复培养 28 d 后, 土壤微生物群落数量出现了明显的增加。如图 4 所示。在 16S rRNA 基因水平上, 细菌群落数量增加极为明显, 最高可达 3230 倍。而古菌增加的幅度远低于细菌, 最

2.2 风干森林土壤加水恢复培养过程中细菌、古菌、氨氧化细菌和氨氧化古菌的丰度

10 种森林土壤的细菌、古菌、氨氧化细菌和氨氧化古菌的丰度如图 4 所示。在风干土中, 总古菌的丰度范围是 3.86×10^5 到 7.74×10^7 拷贝数 g^{-1} d. w. s, 总细菌的范围是 5.40×10^5 到 4.66×10^8 拷贝数 g^{-1} d. w. s。氨氧化古菌丰度的范围是 1.14×10^5 到 1.25×10^7 拷贝数 g^{-1} d. w. s, 氨氧化细菌 3.40×10^5 到 1.06×10^7 拷贝数 g^{-1} d. w. s。其中北京森林土壤 pH 为 6.07 ± 0.40 , 高于酸性土壤 pH5.5 的通用阈值, 且 16S rRNA 和 *amoA* 基因丰度都显著高于其它土壤。因此, 北京森林土壤作为酸性土壤的异常样品, 被排除在统计分析之外。相关性分析显示, 土壤 pH 与氨氧化古菌 AOA 的 *amoA* 基因拷贝数相关性不显著; 但 AOA/AOB 丰度比与土壤总氮呈显著正相关 ($r^2 = 0.54, P < 0.05$)。

高仅达 568 倍, 这一结果暗示在加水湿润条件下, 干土中细菌的生长繁殖速度明显高于古菌^[22]。对于氨氧化古菌和氨氧化细菌, 在 *amoA* 基因水平上, 培养前后, 除了北京和会同样品中 AOA 数量

有所减少, 其它样品中 AOA 均有不同程度增加 (1.38 - 44.46 倍); 而对于 AOB, 除了长白山、北

京和鼎湖样品中 AOB 增加, 其它样品中 AOB 均变化不大甚至减少。

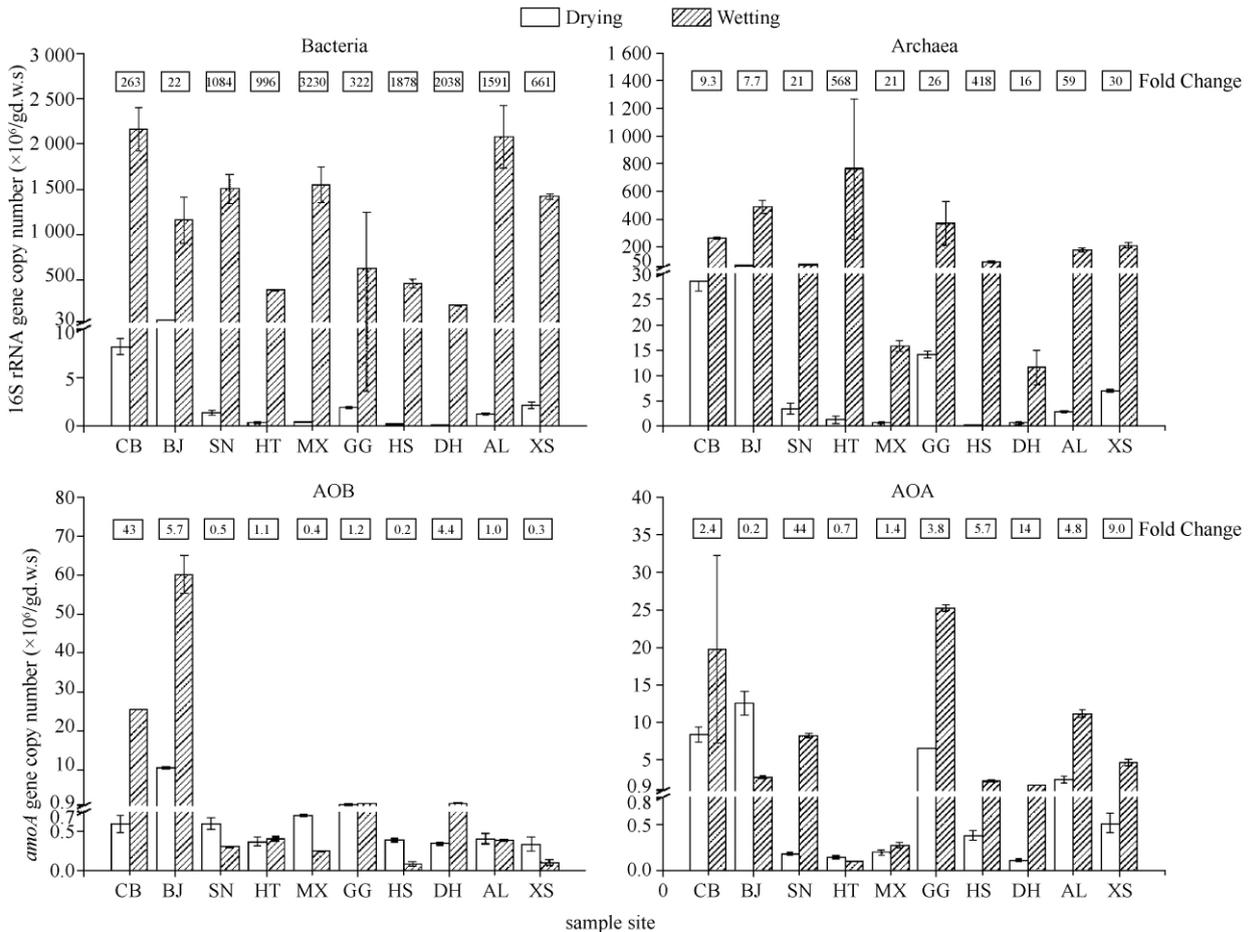


图 4. 不同森林风干土壤加水恢复条件下细菌和古菌 16S rRNA gene 和 *amoA* 的丰度

Figure 4. Copy number of 16S rRNA and *amoA* genes in soils of 10 geographic different forest. The air-dried soil is rewetted for incubation at 28°C for 28 days. All abbreviations are the same as those in Table 1. AOA and AOB represent ammonia-oxidizing archaea and bacteria, respectively. The fold-change is assessed as the gene ratio of wetting to drying soils in boxes above the column.

2.3 DGGE 分析 AOA 和 AOB 群落多样性

5 种森林土壤样品可获得氨氧化古菌 *amoA* 基因的 PCR 产物 (图 5), 但仅有 3 种土壤样品可获得氨氧化细菌的 *amoA* 基因扩增产物 (图 6)。对各个样品的扩增产物进行 DGGE 凝胶电泳, 获得数量不等、亮度不同且位置相异的电泳条带, 表明不同森林台站样品中氨氧化古菌和氨氧化细菌群落结构具有一定的差异。如图 5 所示, 不同样品之间氨氧化古菌的群落结构差异较大, 其中北京 (BJ) 样品中氨氧化古菌的群落结构相对复杂, 而哀牢 (AL) 样品中氨氧化古菌的群落结构较简单, 其原因可能是由

于不同的环境因子所共同形成的特异的生态位对氨氧化古菌的群落结构具有较大影响引起的。进一步的系统发育分析表明, 所有测序条带均属于土壤 Group 1.1b, 未能检测到海洋类 Group 1.1a 或者 Group 1.1a-associated 的序列。相比较于氨氧化古菌, 氨氧化细菌的群落结构相对简单 (图 6), 每个样品的主要氨氧化细菌隶属于 Cluster 0 和 Cluster 3, 并且不同样品群落结构较为相似, 其中茂县 (MX) 和北京 (BJ) 台站的样品的主要条带的系统发育地位非常相近, 这一结果与高通量测序结果相吻合。

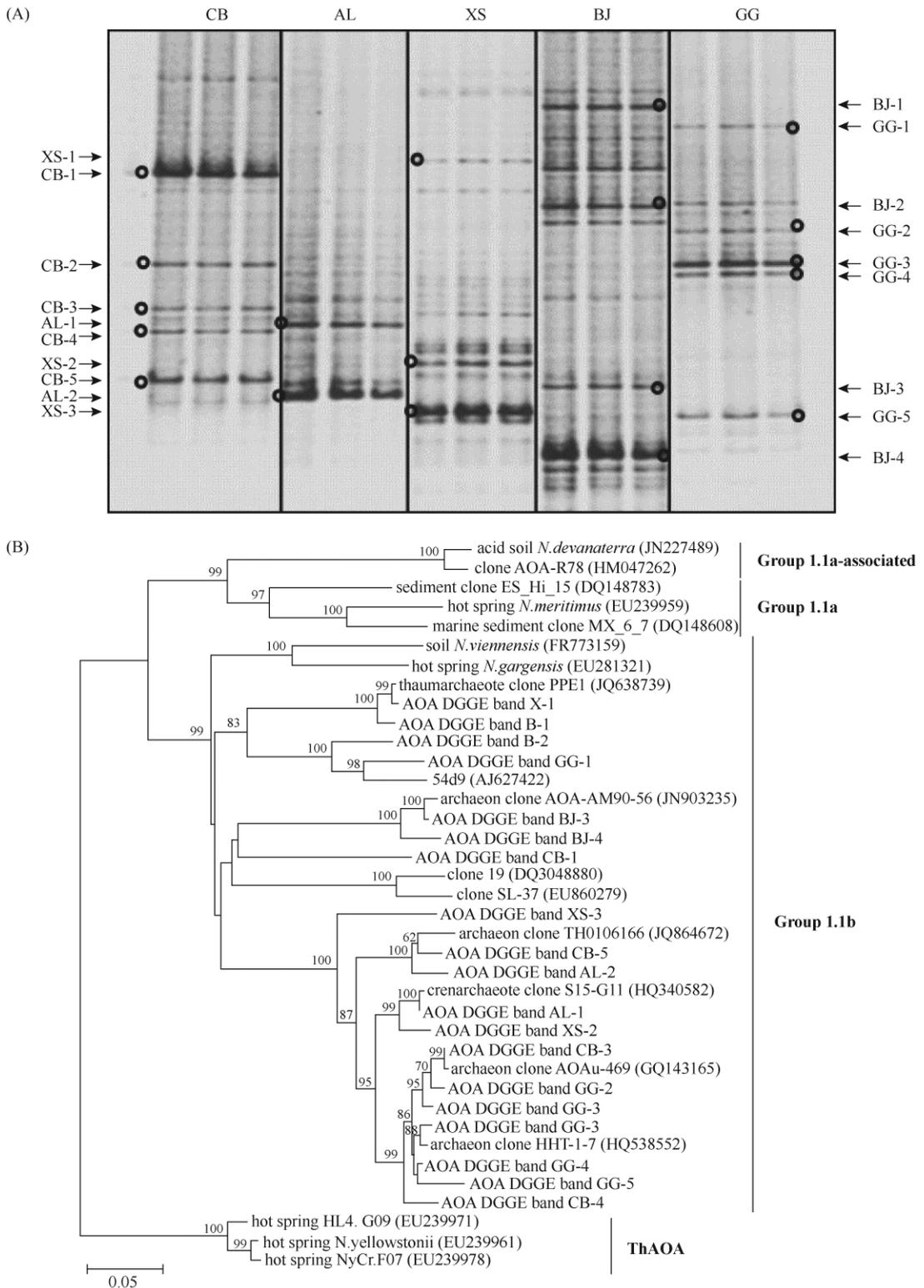


图 5. 不同森林土壤样品的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分离图谱及代表性条带的 AOA 系统发育树

Figure 5. DGGE fingerprints (A) of achaeal *amoA* genes in different samples and phylogenetic tree (B) of representative bands. The designation 'BJ-1' indicates the representative band of sample from Beijing site.

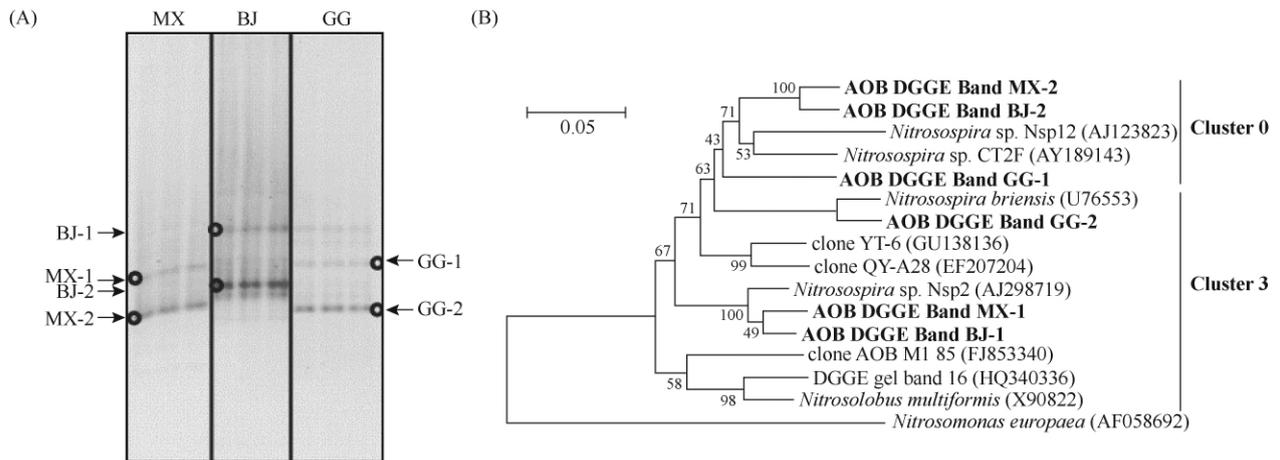


图 6. 不同森林土壤样品的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分离图谱及代表性条带的 AOB 系统发育树

Figure 6. DGGE fingerprints (A) of bacterial *amoA* genes in different samples and phylogenetic tree (B) of representative bands. The designation 'BJ-1' indicates the representative band of sample from Beijing site.

3 讨论

水是自然环境中生命得以延续发展的基本物质,干湿交替是陆地生态系统广泛存在的自然现象,也是土壤微生物多样性形成与演化的重要驱动因子。微生物在适应干湿交替等长期的环境变化过程中,可能发展了独特的生理机制并形成了较高的多样性,在土壤氮素转化、碳素循环中发挥了重要作用。已有的研究表明,土壤细菌和真菌适应干湿交替所形成的不同生境,可能会占据不同的生态位并发展独特的生理适应机制^[23]。古菌则可能对极端环境如强酸、强碱和高盐等具有较强的适应能力^[22]。根据 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因拷贝数推测,风干土壤中古菌占微生物总量的比例在 90% - 98% 之间,而加水培养后,可能由于细菌繁殖速度远高于古菌,导致古菌占微生物总量的比例下降至 56.5% ± 26.8%,这一结果似乎表明古菌能够更好地适应风干土的极端缺水环境,而细菌对土壤水分的变化响应更快。

尽管在加水恢复过程中,大多数风干土壤中的氨氧化古菌和氨氧化细菌的数量表现出增加的趋势,但其群落组成未发生明显的变化。与历史风干土壤相比,高通量测序 *amoA* 功能基因表明,加水恢复培养 28 天后土壤中海洋类古菌的群落组成几乎没有变化,而氨氧化细菌也得到了类似结果,表明短期培养过程中,土壤水分含量的变化对氨氧化微生

物的群落组成没有显著影响,未来采用历史风干土壤样品开展氨氧化微生物研究具有一定的可行性。本研究同时表明,较之 DGGE 指纹图谱技术,新一代高通量测序技术能够获得大量的序列信息,因此可以检测到数量上不占优势的氨氧化微生物,从而更加清楚并且较为全面地反映氨氧化微生物群落的多样性。例如,高通量测序表明,所有待测样品中仅有哀牢山森林土壤中含有 1.55% 的海洋类古菌,其余序列均属于土壤类古菌 Group 1.1b;但 DGGE 分子指纹图谱技术仅检测到数量上占优势的土壤类 Group1.1b 古菌,未能检测到海洋类古菌。本实验表明土壤类 Group 1.1b 是本研究中 5 个典型森林土壤的主要类群,与已有的主流报道明显不同^[7]。

目前绝大多数的微生物地理学研究都表明土壤类 Group 1.1b 是中性和碱性土壤中的优势古菌^[11-24]。已有的纯菌和富集物的生理研究也表明,Group1.1b 更适应于中性或碱性环境的生长。例如,2011 年分离于奥地利中性土壤的 Group1.1b 菌株 EN79 的最佳生长 pH 为 7.5^[25]。然而,利用¹⁵N 同位素示踪酸性土壤氨氧化过程,我们最近的研究表明灌木林改为农田土壤后,硝化活性增加了 4 倍之多,而且 Group 1.1b 成为优势古菌^[26];稳定性同位素核酸探针技术则清楚表明土壤类 Group 1.1b 古菌主导了我国典型酸性农田土壤氨氧化过程^[27]。此外,也有研究表明 Group 1.1b 是斯洛文尼亚酸性森林土壤 (pH 4.0) 的优势古菌类群。这些研究暗示氨氧化古菌 Group 1.1b 具有较高的代谢多样性。

例如,酸性土壤中的氨分子浓度通常在 nmol/L 水平,而 2012 年分离自韩国碱性农田土壤的 Group 1.1b 菌株 JG1 米氏常数为 12.7 nmol/L,对氨分子具有较高的亲和力,理论上可在酸性条件下生长,但生理学实验表明 JG1 的最佳生长 pH 范围为 6.0 - 7.5,在 pH 小于 6.0 的环境中不能生长^[28],是严格嗜中性菌。这一结果表明酸性土壤中的 Group 1.1b 类古菌可能具有特殊的嗜酸机制,与碱性土壤中的 Group 1.1b 具有完全不同的生长策略。同时,本研究尽管表明 Group 1.1b 是优势古菌类型,但核酸序列的存在并不一定意味着功能意义,其在酸性森林土壤氨氧化过程中的作用仍有待进一步研究,特别是氨氧化古菌与氨氧化细菌的分离培养及生理研究,将为研究氨氧化微生物的代谢多样性及其生态与进化机制提供重要参考。

地球气候变化所导致的干湿交替现象,是陆地生态系统广泛存在的自然现象,复杂土壤中微生物群落长期适应环境条件变化的过程中,逐渐形成了不同的群落组成。一般而言,自然环境中土壤微生物群落的形成是一个长期的过程,特定土壤中的微生物群落在组成上也具有相对的稳定性。因此,尽管在短期的最佳水分培养条件下,土壤中不同的微生物物种可能具有不同的生长策略和代谢速率,如个别微生物繁殖较快并能迅速成为优势种群,但短期培养似乎很难改变微生物的物种组成,导致风干土壤中的 Group 1.1b 类群进化为 Group 1.1a 海洋类群。我们推测特定土壤中的氨氧化微生物是其长期适应自然环境变化的演化产物,本研究表明风干土壤可用于后续的微生物群落组成研究,能在一定程度上反映微生物适应复杂环境的生理生态特征及其功能意义。

参考文献

- [1] Birch HF. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant Soil*, 1958, 10(1):9-31.
- [2] Placella SA, Brodie EL, Firestone MK. Rainfall-induced carbon dioxide pulses result from sequential resuscitation of phylogenetically clustered microbial groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(27):10931-10936.
- [3] Placella SA, Firestone MK. Transcriptional response of nitrifying communities to wetting of dry soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(10):3294-3302.
- [4] Lin J, Li H, Hu F, Zhao H. Effects of rewetting on soil biota structure and nitrogen mineralization, nitrification in air-dried red soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 41(6):924-930. (in Chinese)
林江辉,李辉信,胡锋,赵海燕. 干土效应对土壤生物组成及矿化与硝化作用的影响. *土壤学报*, 2004, 41(6):924-930.
- [5] Qian C, Cai Z. Response of soil nitrification characteristics in subtropical area to air-drying. *Environment Science*, 2010, 31(5):1379-1386. (in Chinese)
钱琛,蔡祖聪. 亚热带红壤硝化特性的干土效应响应. *环境科学*, 2010, 31(5):1379-1386.
- [6] Stahl DA, de la Torre JR. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66:83-101.
- [7] Cubry R, Hai B, Quince C, Engel M, Thomson BC, James P, Schloter M, Griffiths RI, Prosser JI, Nicol GW. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(52):21206-21211.
- [8] Hu HW, Zhang LM, Dai Y, Di HJ, He JZ. pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, 13:1439-1449.
- [9] Tourna T, Stieglmeier M, Spang A, Könneke M, Schintlmeister A, Urich T, Engel M, Schloter M, Waner M, Richter A, Schleper C. Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(20):8420-8425.
- [10] Kim JG, Jung MY, Park SJ, W Irene C Rijnstra, Jaap S. Sinninghe Damsté, Madsen E L, Min D, Kim JS, Kim GJ, Rhee SK. Cultivation of a highly enriched ammonia-oxidizing archaeon of thaumarchaeotal group I.1b from an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(6):1528-1543.
- [11] Bates S T, Lyons D B, Caporaso J G, Walters W A, Knight R, Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME Journal*, 2011, 5(5):908-917.

- [12] Willm MH, Berube PM, Urakawa H, de la Torre JR, Stahl DA. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, 2009, 461 (7266) :976-979.
- [13] Lehtovirta Morley LE, Stoecker K, Vilcinskas A, Prosser JI, Nicol GW. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108 (38) : 15892-15897.
- [14] Lu L, Jia Z. Urease gene-containing Archaea dominate autotrophic ammonia oxidation in two acid soils. *Environmental Microbiology*, 2013, 15 (6) :1795-1809.
- [15] Zhang LM, Hu HW, Shen JP, He JZ. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The ISME Journal*, 2012, 6 (5) :1032-1045.
- [16] Lu L, Han WY, Zhang JB, 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) :1978-1984.
- [17] Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102 (41) : 14683-14688.
- [18] Kemnitz D, Kolb S, Conrad R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60 (3) :442-448.
- [19] Stubner S. Enumeration of 16S rDNA of Desulfotomaculum lineage I in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen (TM) detection. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50 (2) :155-164.
- [20] Tourna M, Freitag TE, Nicol GW, Prosser JI. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (5) :1357-1364.
- [21] Guo Y, Wu Y, Lin X, Zhong W, Ding W, Zhu J, Jia Z. Three successive extractions reduce quantification bias of microbial communities associated with incomplete DNA recovery in soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52: 894-901. (in Chinese)
- 郭贇, 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: 894-901.
- [22] Valentine DL. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5 (4) :316-323.
- [23] Barnard RL, Osborne CA, Firestone MK. Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. *The ISME Journal*, 2013, 7 (11) :2229-2241.
- [24] Pester M, Rattei T, Flechl S, Gröngroft A, Richter A, Overmann J, Hurek B R, Loy A, Wagner M. amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 (2) :525-539.
- [25] Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, Könneke M, Schintlmeister A, Urich T, Engel M, Schloter M, Wagner M, Richter A, Schleper C. Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108 (20) : 8420-8425.
- [26] Huang R, Wu YC, Zhang JB, Zhong WH, Jia ZJ, Cai ZC. Nitrification activity and putative ammonia-oxidizing archaea in acidic red soils. *Journal of Soils and Sediments*, 2012, 12 (3) :420-428.
- [27] Wang B, Zheng Y, Huang R, Zhou X, Wang D, He Y, Jia Z. Active ammonia oxidizers in an acidic soil are phylogenetically closely related to neutrophilic archaeon. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (5) : 1684-1691.
- [28] Kim JG, Jung MY, Park SJ, Rijpstra WI, Sinninghe Damste JS, Madsen EL, Min D, Kim JS, Rhee SK. Cultivation of a highly enriched ammonia-oxidizing archaeon of thaumarchaeotal group I. 1b from an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 (6) :1528-1543.

Restoration of microbial ammonia oxidizers in air-dried forest soils upon wetting

Xue Zhou^{1,2}, Rong Huang¹, Ge Song¹, Xianzhang Pan¹, Zhongjun Jia^{1*}

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

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

Abstract: [Objective] This study was aimed to investigate the abundance and community shift of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in air-dried forest soils in response to water addition, to explore the applicability of air-dried soil for microbial ecology study, and to elucidate whether AOA within the marine group 1.1a dominate ammonia oxidizers communities in the acidic forest soils in China. [Methods] Soil samples were collected from 10 forest sites of the China Ecosystem Research Network (CERN) and kept under air-drying conditions in 2010. In 2013 the air-dried soil samples were adjusted to 60% of soil maximum water holding capacity for a 28-day incubation at 28 °C in darkness. DGGE fingerprinting, clone library construction, pyrosequencing and quantitative PCR of *amoA* genes were performed to assess community change of ammonia oxidizers in air-dried and re-wetted soils. [Results] After incubation for 28 days, the abundance of bacteria and archaea increased significantly, up to 3,230 and 568 times, respectively. AOA increased significantly in 8 samples, and AOB increased significantly in 5 of 10 samples. However, pyrosequencing of *amoA* genes reveals insignificant changes in composition of AOA and AOB communities. Phylogenetic analysis of *amoA* genes indicates that archaeal ammonia oxidizers were predominated by AOA within the soil group 1.1b lineage, while the *Nitrosospora-like* AOB dominate bacteria ammonia oxidizer communities. There was a significantly positive correlation between AOA/AOB ratio and total nitrogen ($r^2 = 0.54$, $P < 0.05$), implying that soil ammonia oxidation might be dominated by AOA in association with ammonium released from soil mineralization. [Conclusion] Phylogenetic analysis suggest that AOA members within the soil group 1.1b lineage were not restricted to non-acidic soils as previously thought. The abundance rather than composition of AOA and AOB changed in response to water addition. This indicates that air-dried soil could be of help for microbial biogeography study.

Keywords: Pyrosequencing, acid forest soil, air-dried soil, ammonia-oxidizing archaea

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Distinguished Young Scholar Programme of Jiangsu Province (BK2012048)

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

Received: 19 January 2014 / Revised: 17 April 2014