



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。

北极冻土区活跃层与永冻层土壤微生物组的空间分异

张慧敏^{1,2,3}, Anders Priemé^{4,5}, Samuel Faucherre⁴,
Bo Elberling^{4*}, 贾仲君^{2*}

¹ 中国科学院大学中丹学院, 北京 100190

² 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

³ 中国科学院大学, 北京 100049

⁴ Center for Permafrost (CENPERM), Department of Geosciences and Natural Resource Management, University of Copenhagen, Øster Voldgade 10, 1350 Copenhagen K, Denmark

⁵ Department of Biology, University of Copenhagen, Øster Voldgade 10, 1350 Copenhagen K, Denmark

摘要:【目的】研究北极地区表层季节性融解冻土(活跃层)及埋藏于其下深层永久冻土(永冻层)的土壤呼吸速率、土壤微生物组差异和活性甲烷氧化微生物。【方法】在相距 2700 km 的挪威斯瓦尔巴群岛和俄罗斯西伯利亚典型冻土区, 共获得 4 个活跃层及 4 个永冻层土壤。模拟北极夏季近原位温度(10 °C)培养土壤样品, 测定土壤呼吸强度; 利用稳定性同位素 ¹³CH₄ 示踪土壤甲烷氧化微生物核酸 DNA; 结合高通量测序 16S rRNA 基因, 实时荧光定量 qPCR 及土壤理化性质分析, 研究活跃层和永冻层土壤微生物群落差异及其对土壤呼吸的影响, 揭示活性甲烷氧化微生物的群落组成。【结果】西伯利亚冻土区土壤呼吸速率明显高于挪威斯瓦尔巴岛地区, 其平均速率相差高达 17 倍。冻土区活跃层呼吸速率高于永冻层, 活跃层约为 61–7293 nmol CO₂/(g dws·d), 而永冻层约为 47–523 nmol CO₂/(g dws·d)。相应的, 在所有活跃层中均发现变形菌和酸杆菌门共计 10 个微生物科的丰度显著高于永冻

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB15040000); 丹麦国家基金委员会项目(DNRF100)

*通信作者。贾仲君, Tel: +86-25-86881311, Fax: +86-25-86881000, E-mail: jia@issas.ac.cn; Bo Elberling, E-mail: be@ign.ku.dk

收稿日期: 2017-02-13; 修回日期: 2017-04-07; 网络出版日期: 2017-04-11

层,其中 Hyphomicrobiaceae、Solibacteraceae 和 Sinobacteraceae 是优势科,在活跃层中的相对丰度约为 4.3%–18.6%,是永冻层的 2.6–23.7 倍,这些微生物可能是活跃层土壤呼吸强度较高的主要原因。稳定性同位素 $^{13}\text{CH}_4$ 示踪仅发现西伯利亚冻土活跃层能够氧化高浓度甲烷,其中的活性甲烷碳同化微生物为 *Methylobacterium* 和 *Crenothrix*。【结论】北极冻土区土壤微生物组存在明显的空间分异规律,并能较好解释土壤呼吸强度变化特征,而活跃层和永冻层垂直深度及其可能引起的物理化学因子可能是冻土区微生物组演替的主要环境驱动力。未来全球变暖情景下,永冻层逐渐融解并形成活跃层,其中的功能微生物将可能经历定向演替,并在北极冻土碳转化中发挥重要作用。

关键词: 北极冻土区, 活跃层, 永冻层, 土壤呼吸, 16S rRNA 基因测序

永冻土占北半球陆地面积约 25%, 被认为是对环境变化响应最显著的生态系统之一。永冻土上层通常会发生季节性冻融, 其厚度随季节而变化, 变幅因地区而异并可达几十倍, 从几厘米到 200 cm 甚至更厚。因此, 永冻土表层发生季节性融解的土层常被称为活跃层, 而埋藏于活跃层下方长期处于 0°C 以下且至少保持 2 年以上不融化的冻土则被称为永冻层, 其深度可达 1500 m, 内含物包括土壤、沉积物或岩石层。北冰洋沿岸是地球永冻土分布最为集中的地区, 包括欧亚大陆北部、北美大陆北部以及北冰洋的许多岛屿, 永冻土面积高达 $7.2 \times 10^6 \text{ km}^2$ ^[1]。研究表明冻土生态系统对气候变化异常敏感, 其气候变暖速度高于地球平均水平, 相关长期监测发现部分永冻土地区的活跃层以每年 0.7–1.3 cm 的速度变厚, 多个测点的永冻层消失^[2]。全球变暖情景下, 永冻层转化为活跃层并伴随着复杂的相态变化, 从单一固相的永冻层逐步转化为气、液、固三相的复杂活跃层, 其中水分、温度和有机质等要素变化极可能改变其中关键元素的生物地球化学循环, 永冻土相关的地质生物学已成为全球变化的研究热点^[3]。

全球冻土区碳储量巨大, 是气候变化的重要调节阀。据估算, 永冻土中碳储量高达 16720 亿吨, 相当于大气与地上植物碳的总和, 并且其中

绝大部分碳储量位于冻土区季节性融解的活跃层 0–3 m 深处, 约为 10240 亿吨^[4]。有研究表明, 随着气候变暖, 原先的永冻层不再“永冻”并转化为季节性融化的新活跃层, 从而导致其中固定的碳源被微生物分解, 通过好氧土壤呼吸产生 CO_2 或者厌氧微生物作用排放甲烷, 从而加剧温室效应, 形成全球变暖正反馈^[5]。此外, 气温升高导致永冻土变为活跃土后, 原先闭蓄于永冻土中的甲烷和二氧化碳也可能通过物理扩散方式进入大气, 进一步加剧温室效应。然而, 目前冻土区碳排放通量的估算通常未考虑空间异质性, 特别是活跃层和永冻层的垂直梯度差异, 导致模型预测结果存在较大的不确定性, 例如, 有研究表明 2040 年冻土区的碳排放量可以达到 190–450 亿吨 $\text{CO}_2\text{-C}$, 2.6–8.5 亿吨 $\text{CH}_4\text{-C}$, 变幅可达 3 倍之多^[4]。因此, 在全球变化估算模型中耦合微生物过程模型, 量化冻土区活跃层和永冻层的相对贡献及其时空变异规律具有重要意义。

冻土中的微生物群落在土壤碳转化过程中发挥了极为重要的作用。夏季高温期间, 活跃层融解并通过土壤微生物呼吸释放大量的 CO_2 , 其强度变化受到环境条件如水分、氧气的较大影响。此外, 季节性冻融的表层活跃土及深层永久冻土极可能栖息着不同的微生物, 导致活跃层和永冻层土壤呼吸强度具有较大的差异。因此, 深入解

析活跃层和永冻层微生物群落的演替规律及其环境驱动机制, 有利于准确预测冻土区温室气体源和汇的强度^[6]。但长期以来理论与技术发展滞后并制约了对土壤微生物包括冻土区微生物生态过程的深入认识。近年来以高通量测序为代表的分子方法发展迅猛, 根本上改变了土壤真菌、细菌和放线菌的传统区系研究理念, 为研究冻土区微生物过程及其生态意义提供了重要支撑。最近, Schostag (2015)等研究了挪威斯瓦尔巴群岛季节性融解活跃层的微生物年际变化规律, 发现活跃层的微生物在夏季和冬季的数量无显著变化, 但群落组成发生了明显分异, 其中 alpha-Proteobacteria 变化最为明显, 在整个夏季中相对百分比逐渐增加, 而在 10 月到 11 月秋冬季呈降低趋势。研究同时发现 pH 和可溶性有机碳含量可能是冻土区微生物群落演替的主控环境因子^[7]。然而, 由于冻土区极端的气候和环境条件, 目前仅有个别样点的相关报道, 这些研究能够在多大程度上反映冻土区土壤微生物群落结构和功能, 仍需在不同的冻土区开展实验, 获得更多的数据支持。

已有的室内模拟实验表明活跃层融解过程中微生物组多样性和功能发生了明显的变化。Mackelprang 等采用宏基因组技术, 发现阿拉斯加冻土区 3 个活跃层(35 cm 以上表层)和永冻层(85 cm 以下深层)的微生物呼吸和甲烷排放具有明显差异。尽管原位 3 个永冻层土壤微生物组之间存在一定差异, 但 5 °C 培养 1 周后这种差异逐渐变小, 意味着永冻土融化后, 可能发生定向的趋同演替^[8]。同时, 研究人员通过宏基因组测序获得了 1 株难培养产甲烷古菌的基因组草图, 推测这些古菌能够适应寒冷条件并在冻土中产甲烷^[9]。随后在温度上升冻土融解过程中, 闭蓄其中的甲烷扩散到活跃层中, 一部分被其中的甲烷氧化菌所

消耗, 其余则逃逸至大气中成为大气甲烷的重要来源。最近, 研究人员利用先进的多组学(蛋白组、转录组和基因组)技术, 比较了原位永冻土的母质喀斯特泥沼、活跃层和永冻层中土壤微生物组的系统发育地位及其遗传潜能, 揭示了具有潜在功能的微生物组过程, 如厌氧产甲烷和一些特殊的永冻土功能微生物适应机制^[7]。然而, 不同冻土区及其中的土壤微生物组形成是一个漫长的地质历史过程并可能具有较大的差异, 已有的研究大多聚焦于个别样点的原位观测及室内分析。全球变化情景下典型冻土区活跃层和永冻层土壤呼吸和甲烷氧化过程的微生物演替规律及其环境驱动机制尚未见报道。

据此, 本研究针对北极冻土区相距 2700 km 的挪威斯瓦尔巴岛和俄罗斯西伯利亚的典型活跃层和永冻层土壤样品, 在 10 °C 下模拟全球变暖情景下开展室内培养实验, 研究了土壤呼吸强度和好氧甲烷氧化潜力的空间变异规律, 利用 MiSeq 测序 16S rRNA 基因 V4-V5 高可变区分析土壤微生物组的群落结构, 结合稳定性同位素 ¹³C-CH₄ 示踪好氧甲烷碳同化微生物核酸 DNA, 研究了典型冻土区活跃层和永冻层土壤微生物功能演替规律及其环境驱动机制, 以期预测未来气候变化下北极冻土区微生物组结构与功能变化提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 典型冻土区活跃层和永冻层土壤样品采集

如图 1-A 所示, 在相距 2700 km 的挪威斯瓦尔巴群岛(Svalbard)和俄罗斯西伯利亚勒拿河三角洲(Lena Delta)分别采样, 共获得 4 个活跃层及 4 个永冻层土壤。挪威斯瓦尔巴岛的 2 个沉积柱分别

来自 Adventdalen (AD, 78°11'11.6"N, 15°55'11.5"E, 永冻层形成于全新世, 11700 年前)和 NyAlesund (NA, 78°55'13.2"N, 11°51'21.1"E, 永冻层形成于全新世, 约 11700 年前), 其中 AD 和 NA 样点的活跃层厚度皆为 80 cm (图 1-B)。俄罗斯西伯利亚的 2 个沉积柱分别来自勒拿河三角洲第一梯度 Lena delta First terrace (LF, 72°23'16.0"N, 126°24'45.4"E, 冻土形成于永冻土形成于 1000 多年前)和第三梯度 Kurungnakh Third terrace (KU, 72°17'32.0"N, 126°12'46.2"E, 永冻土形成于更新世, 从 2588000 年前到 11700 年前), 其中 LF 和 KU 样点的活跃层厚度分别为 40 cm 和 30 cm (图 1-C)。2 个采样点均为典型永冻土区域, 其中挪威斯瓦尔巴特群岛采样点的地理气候条件如下: 夏季最高温度可达 7 °C, 冬季平均温度-12~-16 °C。俄罗斯西伯利亚勒拿河冻土区域的地理气候条件如下: 夏季最高温可达 10.1 °C, 平均年温度-12.5 °C。

样品采集时间分别为 2013 年 6 月和 2013 年 8 月, 具体采样步骤如下: 分别在挪威斯瓦尔巴群

岛和俄罗斯西伯利亚勒拿河冻土区各自选择 2 个采样小区, 利用直径 4.8 cm、深度 1.0 m 的土钻, 在每个采样小区内获得 1 个沉积柱, 并切割为活跃层和永冻层两部分。本试验中选择挪威斯瓦尔巴群岛 10–20 cm 的活跃层、80–90 cm 永冻层土壤开展后续研究, 俄罗斯西伯利亚勒拿河冻土区则选择 10–20 cm 的活跃层、30–50 cm 永冻层土壤开展后续研究。将活跃层和永冻层土壤样品放入无菌塑料袋并现场保存于-18 °C 冰箱后运送到实验室后于-20 °C 保存。4 个活跃层和 4 个永冻层土壤理化性质如前所述^[10], 包括总碳、总氮、总硫、土壤密度与 pH 的平均值(图 1-D)。

1.2 活跃层和永冻层土壤呼吸和甲烷氧化过程

冻土区土壤呼吸过程: 从-20 °C 冷冻柜中取出活跃层和永冻层土壤, 根据已知的土壤含水率^[9], 称取相当于 15.0 g dws (dry weight soil)的 4 个活跃层样品和对应的 4 个永冻层样品置于 100 mL 血清瓶中, 并在血清瓶内侧安装光化学传感芯片(PreSens, 德国), 通过 Fibox 4 检测仪(PreSens, 德国)在血

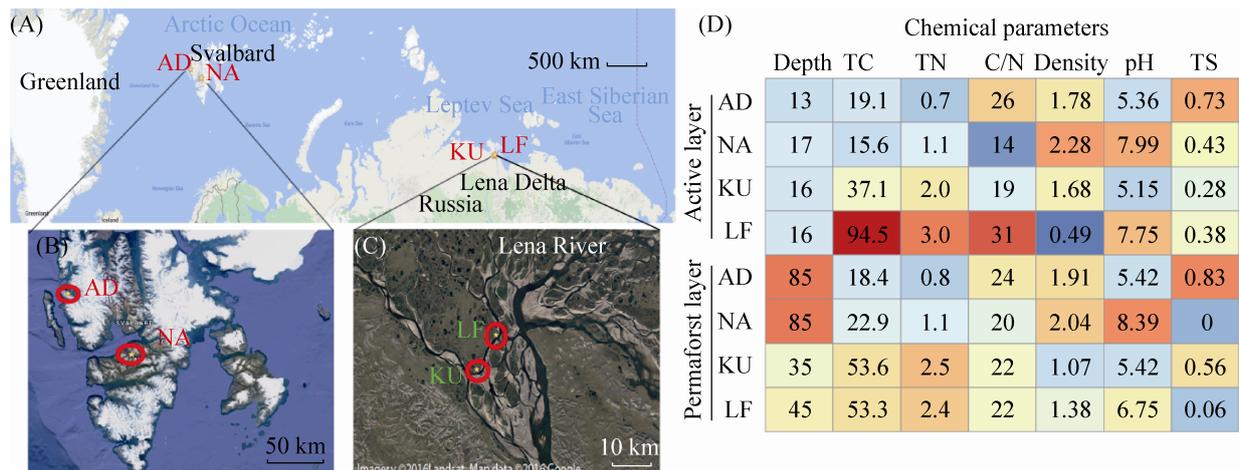


图 1. 挪威斯瓦尔巴群岛和俄罗斯西伯利亚勒拿河三角洲活跃层及永冻层的土壤采样示意图

Figure 1. Location of Sampling sites and soil physiochemical properties. A: The active layer and permafrost soils are collected from four different sites; B: AD and NA stand for samples at Adventdalen and Ny-Alesund of Svalbard islands in Norway, respectively; C: KU and LF stand for soil samples from Kurungnakh Third terrace and Lena delta First terrace of Siberia in Russia, respectively; D: Soil physiochemical properties are shown in heatmap.

清瓶外侧扫描芯片并测定氧气浓度, 随后采用丁基橡胶塞密封并用铝盖封口培养瓶, 在 10 °C 培养箱中避光培养, 模拟夏季最高温度下活跃层和永冻层土壤融解过程。整个培养持续 30 d 并持续测定瓶内 CO₂ 和 O₂ 浓度变化。同时设置好氧甲烷氧化过程培养实验, 整个实验步骤与土壤呼吸培养相似, 培养瓶密封后, 采用 1.0 mL 针管向瓶内注入 0.5 mL ¹³CH₄ (99 atom% ¹³C, Sigma-Aldrich), 血清瓶内初始 CH₄ 浓度约为 400 μmol/L (10 mL/L)。整个培养过程持续 26 d, 规律性测定培养瓶内 CO₂、O₂ 和 CH₄ 浓度。CO₂ 和 O₂ 浓度浓度如前所述通过传感器实时监测。CH₄ 和 N₂O 浓度通过气象色谱仪测定, 首先从培养瓶内抽出 0.5 mL 顶部气体, 稀释到 3 mL 的测气瓶(瓶内预先配有 2.5 mL 稀释气体, 组分为氮气和氧气, 比例为 4:1), 稀释后用气相色谱仪测定甲烷与二氧化碳浓度。每天气体样品采集后均向瓶内补充 0.5 mL 的合成空气平衡气体压力。每隔大约 3 d 采气 1 次, 培养期间共计采气 8 次。根据加入甲烷后混匀培养瓶内的气体中甲烷浓度, 计算培养瓶内甲烷浓度, 结合甲烷浓度随培养时间的动态变化规律, 计算外加高浓度甲烷消耗速率, 同时结合 O₂ 浓度变化规律, 计算土壤呼吸速率。土壤呼吸和甲烷氧化培养实验结束后, 打开培养瓶盖并破坏性采集土壤样品, 部分样品保存于 -20 °C 用于 DNA 提取和分子分析。

1.3 活跃层和永冻层土壤微生物组的数量和组成分析

1.3.1 土壤微生物组总 DNA 提取:采用 PowerSoil[®]-DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories, Inc.)试剂盒, 称取约 0.25 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 μL 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

(OD₆₀₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀)。此外, 利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离 5 μL 的 DNA (0.5×TAE 缓冲液), 分析 DNA 的完整性和相对浓度。样品包括 4 个活跃层和 4 个永冻层土壤及其对应的 ¹³C-甲烷标记和对照处理, 获得足量 DNA 后用于后续分析。针对 ¹³C-甲烷标记处理 KU 活跃层土壤及对照组, 额外提取 3 个土壤重复样品 DNA 用于超高速密度梯度 DNA-SIP 离心试验。

1.3.2 土壤微生物的数量分析:活跃层和永冻层的土壤微生物定量 PCR 引物序列为 515F/907R 引物^[11-12] (515F: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'; 907R: 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTT-3'), 定量 PCR 标线采用 16S rRNA 基因通用引物 515F/907R 克隆进行制备。利用通用引物扩增目的基因并构建克隆文库后, 将含有目标基因的克隆在 LB 营养液中过夜培养, 利用试剂盒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 8 个数量级, 以获得各目的基因的标准曲线。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 TM [宝生物工程(大连)有限公司], 上、下游引物(10 pmol/μL)各 0.5 μL, 1.0 μL 土壤总 DNA 模板, 8 μL 灭菌双蒸水。采用灭菌双蒸水代替 DNA 作为反应模板, 设置阴性对照。反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

1.3.3 土壤微生物组的组成分析:利用通用引物 515F/907R 扩增的 PCR 产物开展 MiSeq 高通量测序分析土壤微生物组成。首先采用 515F/907R 引物扩增土壤样品总 DNA 的细菌及部分古菌 16S rRNA 基因 V4-V5 高变区, 修饰后的通用引物含有不同的 Tag 标签用以区分不同样品, 包括 4 个

活跃层和 4 个永冻层土壤及其对应的 ^{13}C -甲烷标记处理, 每个样品 3 个重复, 共 48 个样品。每对引物中同时包含 adaptor 和 key 序列以提高下游测序效率。DNA 水平的 PCR 扩增体系包含: 25 μL EmeraldAmp PCR Master Mix (2 \times Premix) (TaKaRa), 1 μL 505F 引物, 1 μL 907R 引物, 加入 2.5 μL 的 DNA 模板, 补充无菌水至 50 μL 反应体系。PCR 扩增的反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。获得 16S rRNA 基因的扩增产物后, 利用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 试剂盒 (TaKaRa) 进行切胶纯化, 并将其溶于 30 μL DNase-free H_2O 。将不同样品的 PCR 扩增产物等摩尔混合后, 利用 Illumina 公司 MiSeq 测序仪完成序列分析。

1.4 稳定性同位素核酸探针示踪冻土区土壤好氧甲烷微生物核酸 DNA

如前所述, 针对 4 个活跃层及相应的 4 个永冻层土壤开展了甲烷氧化培养, 但仅有俄罗斯西伯利亚勒拿河活跃层土壤(KU)表现出明显的甲烷氧化潜力, 甲烷浓度由初始 10 mL/L 降为 0.25 mL/L, 其他培养瓶内甲烷浓度均保持恒定, 表明其它所有活跃层土壤和永冻层土壤均无法氧化 10 mL/L 高浓度甲烷。据此, 仅选取 ^{13}C -甲烷标记培养的 KU 活跃层土壤 DNA 及对照的未加甲烷的 KU 活跃层土壤 DNA 进行超高速密度梯度离心。DNA-SIP 的具体操作细节见已有文献描述^[13]。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 $^{\circ}\text{C}$ 下 190000 \times g 等密度密度梯度离心 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存用于下游分析。

1.5 稳定性同位素 ^{13}C -DNA 鉴别及下游分析

^{13}C -DNA 的鉴定策略如前所述^[13]。超高速密度梯度离心对照处理和 ^{13}C -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, 利用荧光定量 PCR 确定 *pmoA* 功能基因在不同浮力密度 DNA 中的拷贝数分布规律^[14], 通过比较 ^{13}C -甲烷和对照处理的结果鉴别 ^{13}C -DNA。进一步以 ^{13}C -DNA 为模板, 选取 ^{13}C -甲烷标记处理 6 层到 13 层, 对照处理 8 层到 13 层样品, 利用加 Tag 标签的通用引物 (515F/907R) 对 SIP 分层 DNA 样品中的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离 5 μL 的 PCR 产物 (0.5 \times TAE 缓冲液), 分析其完整性和相对浓度, 每个样品设置 3 个重复分析其 16S rRNA 序列组成, 比较 ^{13}C -甲烷标记处理的重层 DNA 与对照组重层 DNA 中甲烷氧化菌的相对百分比差异, 确定活性甲烷碳同化微生物。

1.6 数据的统计分析

16S rRNA 基因的原始数据利用 FLASH v1.2.2^[15] 进行双端拼接, 共计获得高质量序列 604437 条, 再利用 QIIME^[16] 去除 Tag 标签, 利用 sumacust^[17] 的算法以 97% 的相似度聚类提取 OTU, 利用 Greengenes 数据库进行注释, 得到每个样品中门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)水平上物种组成数据后进行注释, 按照高质量序列数量最小的样品设置 3900 条进行抽平, 进行多样性分析。NMDS (Non-metric multidimensional scaling) 分析通过 R

语言 Vegan 软件包 (R Development Core Team, 2008)完成。以 97%的相似度对活跃层和冻土层土壤微生物序列 OTU 注释,发现在属水平上大量微生物无法注释,故在科的水平开展土壤微生物组的群落结构分析。活跃层与永冻层土壤微生物相对组成之间的平均值差异采用 *t*-检验分析, $P < 0.05$ 表示显著差异。原始数据 NCBI 登录号为 SRP096268。

2 结果和分析

2.1 北极冻土活跃层和永冻层土壤微生物组的呼吸动力学规律

培养瓶内 CO_2 累积量可作为土壤呼吸强度表征指标。如图 2-A 所示,挪威斯瓦尔巴岛和俄罗斯西伯利亚 4 个典型冻土区的活跃层土壤呼吸强度明显高于永冻层,但土壤呼吸强度存在着极大的空间异质性。4 个活跃层的土壤呼吸速率范围为 61–7293 $\text{nmol CO}_2/(\text{g dws}\cdot\text{d})$,而 4 个永冻层的土壤呼吸速率范围 47–523 $\text{nmol CO}_2/(\text{g dws}\cdot\text{d})$ 。西伯利亚冻土区土壤呼吸速率明显高于挪威斯瓦尔巴岛,高达 17 倍之多,而西伯利亚勒拿河 LF 活跃层土壤呼吸速率最高,挪威斯瓦尔巴岛 NA 活跃层土壤呼吸速率最低,两者活跃层之间的差异高达 117 倍。

培养瓶内氧气浓度与土壤呼吸 CO_2 浓度变化负相关,其 O_2 消耗速率和 CO_2 产生速率表现出相同的变化规律,表明土壤微生物消耗氧气利用有机碳源异养呼吸。如图 2-B 所示,挪威斯瓦尔巴岛和西伯利亚 4 个冻土区的活跃层土壤氧气消耗速率明显高于永冻层。但冻土区土壤氧气消耗速率同样存在较大的空间变异性,4 个活跃层的土壤呼吸速率范围为 82–5292 $\text{nmol O}_2/(\text{g dws}\cdot\text{d})$,而

4 个永冻层变幅为 70–308 $\text{nmol O}_2/(\text{g dws}\cdot\text{d})$ 。西伯利亚冻土区土壤氧气消耗速率明显高于挪威斯瓦尔巴岛,高达 14 倍之多,而西伯利亚勒拿河 LF 活跃层土壤氧气消耗速率奇高,可达 5292 $\text{nmol O}_2/(\text{g dws}\cdot\text{d})$,3 d 内即可将培养瓶内氧气消耗殆尽。挪威斯瓦尔巴岛 NA 土壤氧气消耗速率最低,培养 26 d 过程中瓶内氧气浓度几乎没有发生变化,在氧气浓度变化最小检测限之内,与较低的土壤微生物呼吸速率一致(图 2-A)。

值得注意的是,根据实际的氧气消耗量计算(图 2-B),土壤 CO_2 实际排放量高于理论计算值(图 2-A),表明固体冷冻状态下活跃层和永冻层土壤

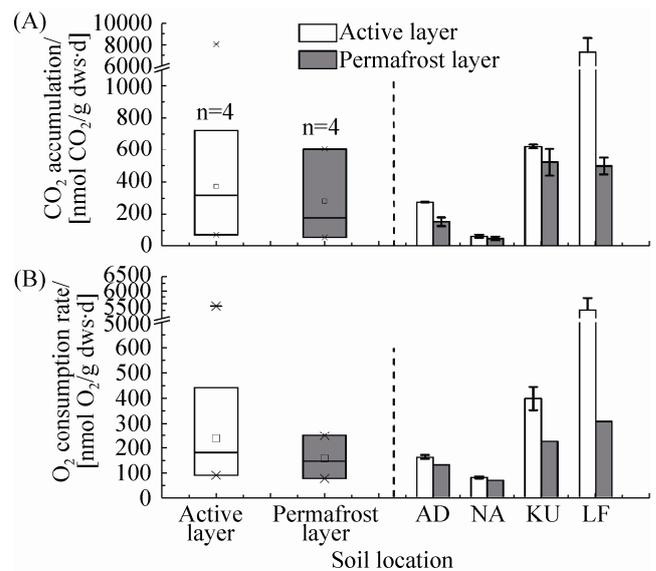


图 2. 冻土区土壤二氧化碳排放速率(A)和氧气消耗速率(B)

Figure 2. Soil respiration. A: carbon dioxide accumulation rates during incubation periods (26 days); B: oxygen consumption rates. Boxplot including the information of four sites and the whisker is the largest value and the error bar of barplot comes from methane and non-methane treatment. The abbreviations of AD, NA, KU and LF refer to the sites where soils of active and permafrost layers were collected as shown in Figure 1.

中闭蓄了一定 CO_2 ,在 10°C 融解过程中通过物理扩散方式进入培养瓶上方。通过实际氧气消耗量推测土壤异养呼吸释放的 CO_2 ,进而根据实际 CO_2 排放速率推测被冰冻闭蓄的 CO_2 量。计算表明 AD、KU 与 LF 活跃层闭蓄于土壤中的 CO_2 量占其实际排放量贡献分别为 40%、36%与 27% ,永冻层闭蓄于土壤中的 CO_2 量占其实际排放量贡献分别为 12%、56.8%与 38% ,NA 的活跃层和永冻层土壤呼吸较低,其氧气的消耗量在检测限附近,无法计算冰冻闭蓄的 CO_2 量。进一步的统计分析表明,冻土区土壤呼吸强度和氧气消耗速率与土壤性质紧密相关,与总碳($P=0.015$)和总氮($P=0.034$)正相关,与土壤是活跃层还是永冻层相关($P=0.024$)。

2.2 北极冻土活跃层和永冻层土壤甲烷氧化潜力

俄罗斯西伯利亚和挪威斯瓦尔巴岛 4 个活跃层及相应的 4 个永冻层土壤中,仅发现西伯利亚勒拿河 KU 活跃层土壤能够几乎完全氧化 10 mL/L 的高浓度甲烷。在整个 26 d 培养过程中,其他 7 个活跃层和永冻层土壤培养瓶内甲烷浓度始终维持在初始 8–15 mL/L 水平,表明这些土壤不具备氧化高浓度甲烷能力。相反,KU 活跃层土壤在 26 d 内几乎将瓶内 10 mL/L 甲烷消耗殆尽,其甲烷氧化速率约为 $50 \text{ nmol CH}_4/(\text{g dws}\cdot\text{d})$,但 KU 活跃层下方的永冻层土壤却无明显的甲烷氧化。此外,西伯利亚 LF 的活跃层和永冻层土壤在培养过程中释放了大量甲烷,导致培养瓶内甲烷浓度持续上升,其甲烷排放速率分别 0.3 和 $11.7 \text{ nmol CH}_4/(\text{g dws}\cdot\text{d})$ 。

2.3 北极冻土活跃层和永冻层土壤微生物组的比较分析

分子生态学分析表明活跃层土壤微生物组的数

量、组成和多样性指数明显高于永冻层,并且绝大多数位点均达到了统计显著性(图 2)。首先,实时荧光定量 PCR 分析表明活跃层土壤微生物组的 16S rRNA 基因拷贝数明显高于永冻层,除了西伯利亚 KU 样点外,其他 3 个样点的差异均达到统计显著。但值得注意的是,活跃层和永冻层微生物数量均存在较大的空间异质性,活跃层土壤中微生物 16S rRNA 基因拷贝数为 $7.1\times 10^8\text{--}3.2\times 10^{10} \text{ copies/g dws}$,而永冻层微生物 16S rRNA 基因拷贝数为 $6.8\times 10^7\text{--}7.0\times 10^9 \text{ copies/g dws}$ 。西伯利亚勒拿河 LF 样点土壤微生物量最高,活跃层和永冻层分别为 $3.2\times 10^{10} \text{ copies/g dws}$ 与 $7.0\times 10^9 \text{ copies/g dws}$,显著性高于其他冻土层微生物数量。其次,通过谱系多样性指数 PD 以及稀释曲线分析表明,活跃层的微生物多样性显著高于永冻层,活跃层土壤微生物多样性指数由高到低分别为 $\text{NA}>\text{AD}>\text{KU}>\text{LF}$,但 KU 与 LF 之间的差异不显著(图 3-B)。永冻层的多样性指数由高到低分别为 $\text{KU}>\text{LF}>\text{NA}>\text{AD}$,其中 NA 与 AD 之间的多样性不显著。此外,土壤微生物组 16S rRNA 基因的非度量多维尺度 NMDS 分析表明(图 3-C),活跃层与永冻层之间的微生物群落结构具有显著差异。相似度分析 [Multiple Response Permutation Procedure (MRPP)] 结果表明,活跃层和永冻层群落结构差异性由高到低分别是 AD ($A=0.748, P=0.004$)、KU ($A=0.712, P=0.002$)、NA ($A=0.654, P=0.005$)和 LF ($A=0.507, P=0.002$)。挪威斯瓦巴岛(AD, NA)与俄罗斯西伯利亚(KU, LF)冻土之间的微生物群落结构差异显著,而来自同一地区的冻土之间群落结构更为相似。总体而言,冻土区微生物数量变化与总碳显著相关($P=0.041$) ,而冻土区地理位置是土壤微生物群落分异的主导因子。

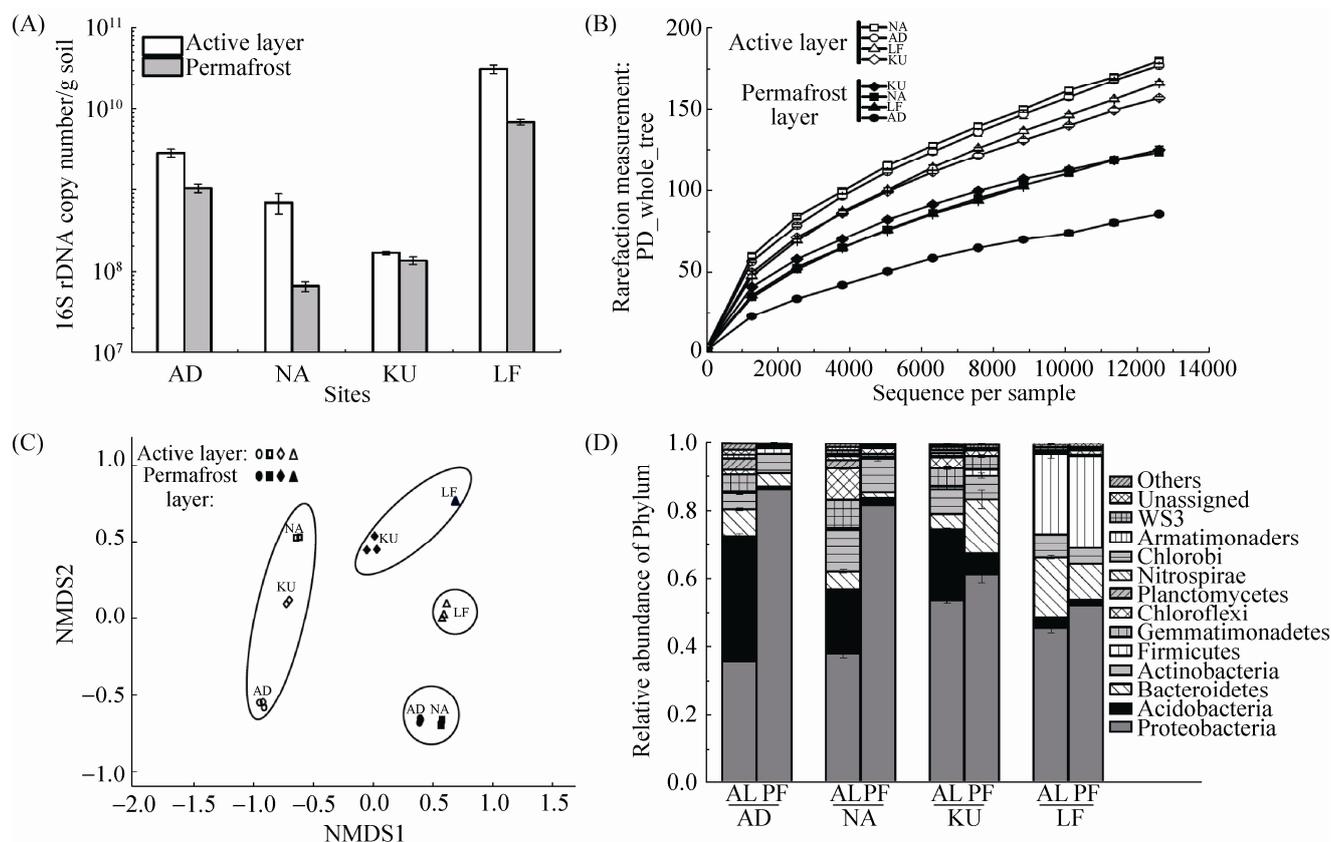


图 3. 北极冻土活跃层与冻土层微生物丰度与多样性

Figure 3. Microbial diversity and abundance of active layer and permafrost layer. A: 16S rDNA gene copy number of active layer and permafrost layer with three replicates; B: Rarefaction of each sample; C: Non-metric multidimensional scaling of active layer and permafrost layers at genus level; D: Relative abundance of bacterial taxa at phylum of each sample with three replicates. The abbreviations of AD, NA, KU and LF refer to the sites where soils of active and permafrost layers were collected as shown in Figure 1.

在微生物分类学门水平(图 3-D), 室内模拟培养后活跃层和永冻层土壤微生物群落组成明显不同。变形菌门、酸杆菌门、厚壁菌门、放线菌门和 Planctomycetes 门普遍存在于 4 个冻土区样点。变形菌是优势微生物类群, 在所有冻土层中显著高于活跃层, 在永冻层中的占比由高到低分别为 86.3%(AD)>81.8%(NA)>61.3%(KU)>52.1%(LF), 在活跃层土壤微生物组中的占比由高到低分别为 53.5%(KU)>45.3%(LF)>37.9%(NA)>35.7%(AD)。Acidobacteria 和 Planctomycetes 门的规律正好相反, 在活跃层中显著高于永冻层。Acidobacteria

在活跃层中的平均丰度为 20.0%, 永冻层中的平均丰度为 2.6%; Planctomycetes 在活跃层中的平均丰度为 1.8%, 在永冻层中的平均丰度为 0.2%。此外, 活跃层显著高于永冻层的门除了上述 2 个门之外, 在采样点 AD 还有 Armatimonadetes、Elusimicrobia、OD1、TM6 和 Verrucomicrobia, 相对百分比总和达到 1.6%。在采样点 NA 则有 Verrucomicrobia、Elusimicrobia、Armatimonadetes 与 Nitrospirae, 相对百分比总和达到 1.6%。在采样点 KU 还发现了 Verrucomicrobia、Elusimicrobia、Armatimonadetes 和 Nitrospirae, 相对百分比总和

为 1.2%。在采样点 LF 的门水平活跃层与永冻层的细菌差异最小，除 Acidobacteria 和 Planctomycetes 门，仅有 Verrucomicrobia 显著高于其永冻层，相对百分比为 0.2%。

进一步在科的水平对土壤微生物组进行分类后，针对活跃层和永冻层土壤中共同存在或者特异性存在的微生物类群开展分析(图 4)。在所有微生物类群中，发现 10 个类群普遍存在于活跃层和永冻层中，并在活跃层中的相对丰度显著高于永冻层(Wilcoxon Signed-Rank Test, $P < 0.05$)，可能是活跃层和永冻层分异的特征微生物，平均值分别为 10.3%和 1.6% (图 4-A)。这些类群在 4 个活

跃层由高到低分别为 18.6% (NA)、10.2% (AD)、8.0% (KU)、4.3% (LF)；而在永冻层中分别为 3.1% (LF)、1.9% (KU)、1.0% (NA)、0.5% (AD)。这 10 个类群具有明显的地理分异特征，在挪威斯瓦尔巴岛活跃层土壤中明显高于俄罗斯西伯利亚，而在永冻层中则表现出相反规律，导致其在挪威斯瓦德活跃层/永冻层的比例远高于俄罗斯西伯利亚，分别为 23.7 (AD)、9.8 (NA)、2.6 (KU)和 4.4 (LF)。同时发现俄罗斯西伯利亚 LF 活跃层土壤中有 6 个显著优势科，这些科在俄罗斯西伯利亚 LF 活跃层的相对百分比显著高于其他所有土壤，相对百分比总和达到 26.9% (图 4-B)。

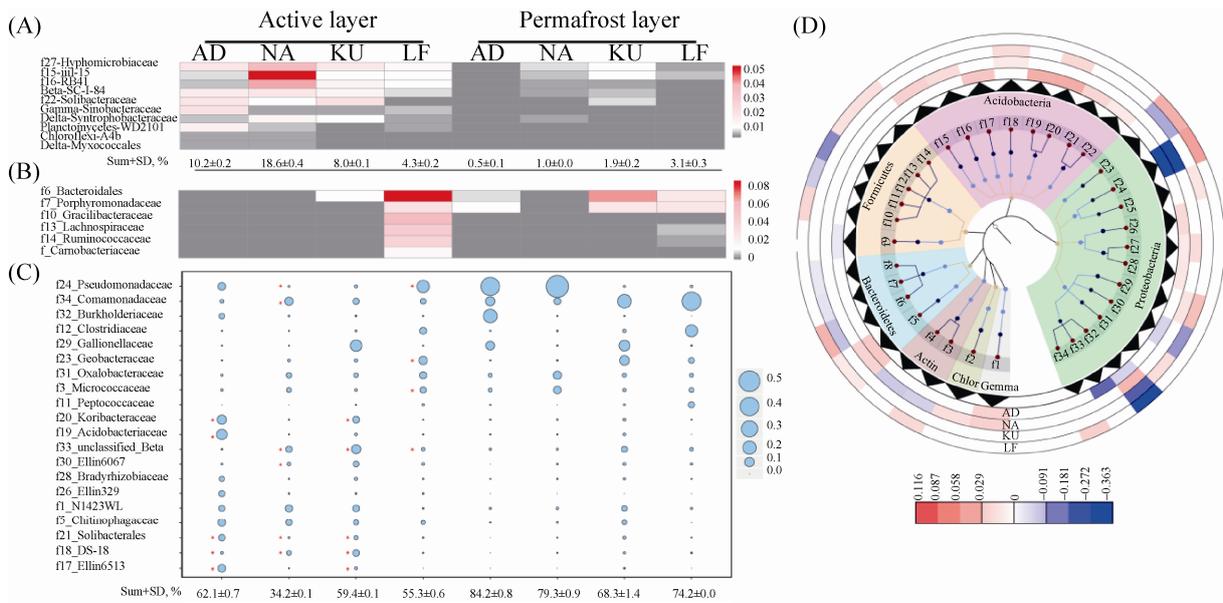


图 4. 北极冻土活跃层与永冻层在科水平上的微生物差异分布

Figure 4. Microbial community structure difference at family level of active layer and permafrost layer. A: Bacterial family of selected sampling sites that is higher in active layer than permafrost layer; B: Bacterial families that are significantly higher in Siberia Lena delta First terrace active layer than other soils; C: Bubble plot of other significantly different families between active layer and permafrost layer, red star marks out the significant higher family relative abundance in active layer than permafrost layer; D: Taxonomic tree of bacterial 16S rRNA for bacterial families with statistically significant changes between active layer and permafrost layer. Metadata in lanes 1–4 indicate the relative increasing (red) or decreasing (blue) abundance of active layer compared to permafrost layers where difference is present by colors intensity. The abbreviations of AD, NA, KU and LF refer to the sites where soils of active and permafrost layers were collected as shown in Figure 1.

除活跃层中显著高于永冻层的科及俄罗斯西伯利亚 LF 活跃层的显著优势科外, 各采样点的活跃层和永冻层中均存在一些其他优势科(图 4-C), 并且多数来自酸杆菌门及变形菌门(图 4-D)。例如, 针对挪威斯瓦尔巴岛冻土区 AD 活跃层中, Acidobacteriaceae 及 Koribacteraceae 科(Acidobacteria 门)的相对百分比分别为 12.2%及 9.0%, 显著高于永冻层; 而在 NA 活跃层中, Comamonadaceae 及 Oxalobacteraceae (Burkholderiales 目)的相对丰度分别为 7.5%与 3.2%, 显著高于永冻层。此外, 针对俄罗斯西伯利亚冻土, KU 活跃层中 Gallionellaceae 及 Koribacteraceae 相对丰度分别为 14.8%与 5.1%, 皆为优势科并显著高于永冻层, 前者属于 β 变形菌, 后者则隶属 Acidobacteria 门。勒拿河第一梯度 LF 活跃层中优势科显著不同于其他 3 个采样点, Pseudomonadaceae、Bacteroidales 和 Geobacteraceae 的相对百分比分别为 17.4%、8.5%和 7.2%, 可能是勒拿河第一梯度 LF 活跃层呼吸强度异常高的主要原因。通过直接比较活跃层与永冻层主要科的相对百分比差异(图 4-D), 可以看出随着温度升高, 微生物组成在冻土融化一个月后仍保留显著的差异, 可能是永冻层碳排放速率不同的原因, 而不同区域永冻层优势菌结构分异也可能与环境中的可利用碳源变化相关。

2.4 北极冻土活跃层和永冻层土壤甲烷氧化的活性微生物群落结构

如前所述, 4 个样点共计 8 个活跃层和永冻层土壤中, 仅俄罗斯西伯利亚 KU 活跃层土壤氧化了 10 mL/L 的 ^{13}C -高浓度甲烷(100 mL 培养瓶上方甲烷浓度从 10 mL/L 降至 0.24 mL/L)并能够开展下一步的稳定性同位素核酸探针研究。根据土壤微生物总 DNA 的 16S rRNA 测序结果, 发现 KU

的加甲烷和不加甲烷处理的甲烷碳同化微生物群落结构无显著差异(图 5-A), 但各采样点中活跃层甲烷碳同化微生物占土壤微生物组的相对丰度明显高于永冻层(图 5-A)。4 个活跃层中甲烷碳同化微生物相对丰度由高到低分别为: 2.3% (KU), 1.8% (NA), 1.4% (AD), 0.9% (LF); 而 4 个永冻层分别为: 1.4% (KU), 1.1% (NA), 1.0% (AD), 0.8% (LF)。16S rRNA 基因的遗传系统发育分析表明, 冻土区 4 个样点的甲烷碳同化微生物主要类群基本一致, 包括 *Methylobacterium*、Methylobacteriaceae 科、Methylophilaceae、Methylophilales 和 *Crenothrix* (图 5-B)。这些甲烷碳同化微生物的相对百分比具有明显的空间异质性。例如, 西伯利亚 KU 活跃层中优势甲烷碳同化微生物为 Methylophilaceae (1.3%)、*Methylobacterium* (0.4%)和 *Crenothrix* 属 (0.2%), 与 KU 永冻层基本一致。挪威斯瓦尔巴群岛 AD 活跃层的甲烷碳同化微生物相对百分比为 1.35%, 以 alpha-Proteobacteria (Methylocystaceae 科, *Methylobacterium* 属)和 beta-Proteobacteria (Methylophilaceae)为主, AD 永冻层的甲烷碳同化微生物相对百分比为 0.97%, 以 alpha-Proteobacteria (*Methylobacterium* 属)和 beta-Proteobacteria (Methylophilales 目)为主。挪威斯瓦尔巴岛总体甲烷碳同化微生物数量低于西伯利亚勒拿河区域。通过比较加 ^{13}C -甲烷处理与对照组处理的重层 DNA 中甲烷氧化菌标靶 *pmoA* 基因的相对丰度变化, 发现 ^{13}C -标记处理的重层 DNA 并未发生 *pmoA* 基因的明显富集(图 5-C)。然而, 进一步利用高通量测序重层 DNA 中的微生物 16S rRNA 基因, 则发现甲烷碳同化微生物类群得到了明显富集, 主要包括 *Methylobacterium* 属、*Methylosinus* 属、beta-Proteobacteria 的 Methylophilales 目的 2

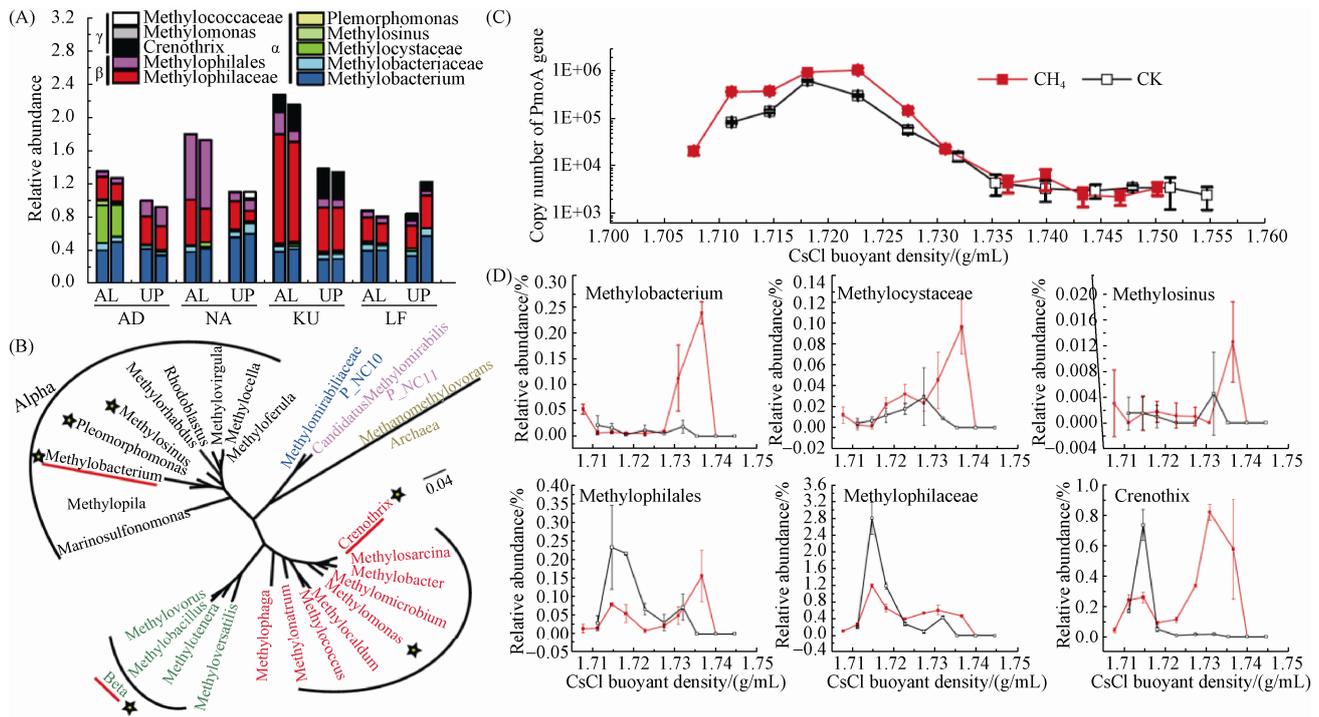


图 5. 北极冻土区活跃层与永冻层的甲烷碳同化微生物菌与活性甲烷碳同化微生物菌

Figure 5. Methyloprophs and active methyloprophs in active layer and permafrost alayer. A: Relative abundance of the 16S rRNA gene sequence reads affiliated with methyloprophs in each sample; B: Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene of methyloprophs where “star” represents the dominant methyloprophs among samples and red lines refer to the apprant active methyloprophs; C: Quantitative distributions of the pmoA gene copy numbers across the entire buoyant density gradient of the fractionated DNA from the soil incubated with ^{13}C labeled methane or without methane; D: Relative frequency of the 16S rRNA gene sequence reads of different active methyloprophs in each fraction in heavier layer after incubation for 26 days. The abbreviations of AD, NA, KU and LF refer to the sites where soils of active and permafrost layers were collected as shown in Figure 1.

个属, 以及 *Crenothrix*。在对照组重层 DNA 中这些微生物 16S rRNA 基因序列占有所有 16S rRNA 基因的相对百分比约为 0, 但在 ^{13}C 处理的重层 DNA 中, 则分别增至 0.25%、0.10%、0.01%、0.15%、0.50%、0.80% (图 5-D), 表明这些微生物在甲烷氧化过程中同化了其代谢产物并被 ^{13}C 标记。

3 讨论

本研究发现北极冻土区季节性融解的活跃层土壤呼吸强度明显高于活跃层, 并且土壤微生物

群落结构具有明显的空间异质性。随着全球变暖加剧, 活跃层深度向永冻层延伸, 使得永冻层中的碳源解冻, 更容易被微生物利用。但由于永冻层长期处于固体冰冻状态, 其微生物丰度、活性及多样性较低, 导致短时间内永冻层融化后, 其碳排放速率仍显著低于活跃层。特别是 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 个月后, 冻土微生物组可能发生一定的演替, 不能完全代表原位环境的微生物群落结构, 未来仍需强化室内模拟与野外观测的综合研究。我们推测在较大的时间尺度下, 永冻层转变为活跃层后也会经历长期的季节性冻融, 可能向活跃

层发生定向演替并在原位形成稳定的冻土功能微生物组, 其中的微生物群落能够迅速在土壤融化后分解碳源, 导致碳排放速率升高并形成全球变暖正反馈。

本研究样品来自典型冻土区, 包括挪威斯瓦尔巴群岛及俄罗斯西伯利亚勒拿河区域。已有研究表明这些样区域存在永冻层融化、活跃层厚度增加的现象, 但相关的冻土区微生物机理研究尚未有报道^[18]。我们的结果表明活跃层呼吸强度显著高于永冻层, 微生物数量和组成的差异是土壤呼吸变化的主要原因。微生物群落结构分异是不同生物对环境长期适应的进化结果。比较分析各样点活跃层与永冻层细菌群落结构发现, 活跃层特征微生物主要来自于 Acidobacteria 门与 Planctomycetes 门。此外, 也有部分属于变形菌门, 如 Hyphomicrobiaceae 科, 仅能在可利用碳源少的贫营养情况下生存, 且大部分为好氧化能菌, 少部分能通过反硝化或混合酸发酵条件下厌氧生长^[19]。Acidobacteria 门中 iii1-15 目, Solibacteraceae 科被发现是对水分响应较明显的类别, 干旱条件下相对百分比减少, 水分较多的条件下增多^[20], 这种干湿交替模式与活跃层的季节性冻融过程极为类似, 导致这些细菌可能具有竞争优势并在碳转化中发挥作用。

挪威斯瓦尔巴群岛 AD、NA 冻土, 俄罗斯西伯利亚勒拿河三角洲 KU、LF 冻土之间的微生物群落结构具有明显分异, 表明活跃层和永冻层微生物群落结构受空间分布约束(图 6)。全球冻土区分布广泛且具有较大的空间异质性, 主要体现在历史地理气候因子、关键元素含量, 以及活跃层与永冻层分界线形成过程中所带来的理化因子差异^[21]。因此, 长期地质历史过程中形成的地理环

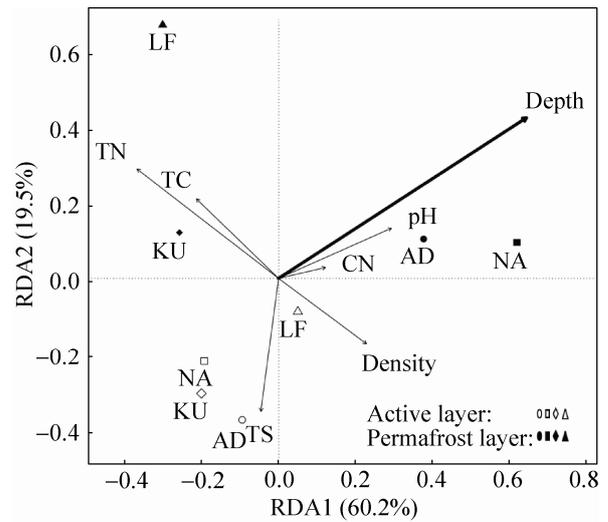


图 6. 北极冻土区活跃层和永冻层微生物科水平变化规律的环境因子冗余分析(RDA)

Figure 6. Redundancy analysis biplot for bacterial community on family level. Bold arrow represents soil parameter with significant (Wilcoxon Signed-Rank Test, $P < 0.05$) influence on bacterial communities' structure. The abbreviations of AD, NA, KU and LF refer to the sites where soils of active and permafrost layers were collected as shown in Figure 1.

境分异极可能是微生物群落定向演替的重要原因。据此, 我们利用原位的土壤理化性质与微生物相对丰度进行主成分分析(图 6)。结果表明总碳、总氮、碳氮比、总硫、土壤密度及样品采样深度这些理化因子中, 采样深度能够较好地解释细菌群落的分异规律($R^2=0.87$, $P=0.01$)。同时, 活跃层与冻土层作为影响因子也具有统计显著性($R^2=0.76$, $P=0.03$), 各采样点活跃层之间的细菌群落结构差异比活跃层与永冻层之间的细菌群落结构差异更小。然而, 由于本研究的样本容量较小, 未来仍需开展大数据的整合分析, 准确分析在不同空间尺度下驱动环境微生物群落演替的具体环境因子, 特别是在活跃层中相对丰度显著高于永冻层的 10 大类微生物演替过程的主控

因子(图 4-A)。

值得注意的是,已有研究表明 pH 是北极高寒地区土壤群落结构的主要影响因子^[22],但本研究中并未观测到类似的现象,表明未来冻土区微生物地理学研究中应该更加重视冻土垂直空间尺度的研究。在 AD、NA、KU 三个采样点中,活跃层 pH 略低于永冻层,而 LF 样点规律恰好相反。相应的,我们在 AD、NA、KU 三个样点中也发现 Acidobacteria 门微生物类群显著高于永冻层,而在 LF 采样点这种规律不明显。事实上,瑞士恩嘎丁西北和东南高海拔冻土区研究也得到了类似结果,活跃层 pH 低于永冻层,且活跃层中 Acidobacteria 丰度高于永冻层^[5]。然而,尽管 Acidobacteria 丰度与 pH 似乎具有一定相关性,但绝大部分 Acidobacteria 尚未被培养,其生理生态功能未知,这些微生物是否为耐酸或嗜酸菌仍待进一步研究。我们推测不同冻土区可能适应特异的地理环境而演化出特征优势菌(图 4-B、C),这些优势菌的生理代谢策略使之能够更好地适应当地的地理环境。例如,俄罗斯西伯利亚勒拿河三角洲的 LF 活跃层具有异常高的 CO₂,最高可达其他位点的 120 倍(图 2-A),尽管我们发现了 LF 活跃层中 6 个微生物科显著高于其他所有冻土,相对百分比总和达到 26.9%(图 4-B),但仍需通过纯培养或同位素示踪技术研究这些微生物在土壤呼吸过程中的作用,特别是综合利用微生物学、地质学、分子生物学和计算生物学等学科的先进理念和手段,深入探讨冻土区难培养微生物生理代谢特点并推测其功能,解析宏观尺度下微生物驱动的关键元素生物地球化学循环过程及其环境影响。

本研究 2 个冻土区的供试土壤几乎都不具备高浓度甲烷氧化能力。所有 8 个活跃层和冷冻层

土壤样品中,仅在俄罗斯西伯利亚勒拿河 KU 活跃层土壤发现了明显的高浓度甲烷氧化。尽管 KU 永冻层的甲烷碳同化微生物群落结构与其活跃层相似,未发表的 *pmoA* 基因实时荧光定量 PCR 结果表明永冻层中甲烷氧化菌数量低于活跃层,可能是永冻层甲烷氧化潜力低的重要原因。稳定性同位素示踪甲烷碳同化微生物核酸 DNA 结果表明:KU 活跃层主要活性甲烷碳同化微生物为 Crenothrix 科,与 Christiansen (2015)在格陵兰岛迪斯科岛湿地中发现的优势甲烷氧化菌一致。这一类微生物通常能够适应高浓度甲烷环境,被认为具有 *r*-生长策略。相反,类型 II 甲烷氧化菌具有 *K*-生长策略,具有极高的底物亲和力并通过氧化 2.5 mg/m³ 极低浓度大气甲烷生长,通常存在于北极旱地活跃层土壤中^[22]。事实上,KU 活跃层氧化高浓度甲烷后,其中的甲烷单加氧酶功能基因 *pmoA* 拷贝数增加约 1 倍,从 2.4×10⁶ 个/g dws 增至 4.8×10⁶ 个/g dws。这表明 KU 样点的甲烷氧化菌具有较强的生理生长活性。挪威斯瓦尔巴岛活跃层和永冻层均不能氧化高浓度甲烷,其主要原因可能与底物甲烷浓度相关,这些冻土层通常含水量较低,属于典型的北极旱地苔原土壤,一般认为其中的甲烷氧化菌通常具有极高的亲和力,利用极低的大气浓度甲烷生长,在长期的环境驯化下,这些甲烷氧化菌可能丧失了高浓度甲烷氧化能力,或者需要更长的适应期以氧化高浓度甲烷。总体而言,KU 活跃层甲烷氧化菌数量高于永冻层、前者能够氧化高浓度甲烷而后者不具备这一能力。这些结果在一定程度上表明全球升温条件下,永冻层解冻变为活跃层之后,特定功能微生物类群极可能与环境发生协同进化并发挥重要作用。

4 结论

北极冻土区土壤呼吸具有明显的空间分异特征, 西伯利亚冻土区高于挪威斯瓦尔巴岛地区, 并表现出垂直分布规律, 即所有冻土区中活跃层土壤呼吸强度明显高于其下的永冻层。土壤微生物组也表现出类似规律, 北极冻土区活跃层的生物多样性显著高于永冻层。在所有活跃层中, 均发现变形菌和酸杆菌门共计 10 个微生物科的丰度显著高于永冻层, 其中 Hyphomicrobiaceae、Solibacteraceae 和 Sinobacteraceae 是优势科, 在活跃层中的相对丰度约为 4.3%–18.6%, 是永冻层相应微生物类群的 2.6–23.7 倍。这些微生物可能是冻土活跃层的特征类群, 在土壤呼吸过程中发挥了重要作用。此外, 俄罗斯西伯利亚勒拿河三角洲的冻土活跃层中 6 个微生物科显著高于其它活跃层和永冻层, 相对丰度为 26.9% (主要包括 Bacteroidales 和 Gracilibacteraceae 优势科), 可能是该冻土活跃层土壤呼吸速率异常高的原因。进一步发现俄罗斯西伯利亚冻土活跃层土壤中活性的甲烷碳同化微生物主要为 *Methylobacterium* 和 *Crenothrix*。这些结果暗示未来全球变暖情景下, 永冻层逐渐融解并形成活跃层后, 其中的微生物类群将可能经历定向演替, 并在北极冻土碳转化中发挥重要作用。研究结果为准确预测未来全球变暖情景下冻土区碳转化过程提供了参考。

致谢

感谢丹麦哥本哈根大学冻土中心主任 Bo Elberling 教授实验室 Morten Schostag Nielsen 和 Christian Nyrop Alber 在实验过程中提供的技术帮助。

参考文献

- [1] Margesin R. Permafrost soils. Berlin Heidelberg: Springer, 2008.
- [2] Åkerman HJ, Johansson M. Thawing permafrost and thicker active layers in sub-arctic Sweden. *Permafrost and Periglacial Processes*, 2008, 19(3): 279–292.
- [3] Liu GX, Ma XJ, Chen T, An LZ, Wang XL. Progress and significance of studies on microorganisms in permafrost sediments. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2004, 26(2): 188–191.
- [4] Schuur EAG, Abbott BW, Bowden WB, Brovkin V, Camill P, Canadell JG, Chanton JP, Chapin III FS, Christensen TR, Ciais P, Crosby BT, Czimeczik CI, Grosse G, Harden J, Hayes DJ, Hugelius G, Jastrow JD, Jones JB, Kleinen T, Koven CD, Krinner G, Kuhry P, Lawrence DM, McGuire AD, Natali SM, O'Donnell JA, Ping CL, Riley WJ, Rinke A, Romanovsky VE, Sannel ABK, Schädel C, Schaefer K, Sky J, Subin ZM, Tarnocai C, Turetsky MR, Waldrop MP, Anthony KMW, Wickland KP, Wilson CJ, Zimov SA. Expert assessment of vulnerability of permafrost carbon to climate change. *Climatic Change*, 2013, 119(2): 359–374.
- [5] Schuur EAG, Bockheim J, Canadell JG, Euskirchen E, Field CB, Goryachkin SV, Hagemann S, Kuhry P, Laffleur PM, Lee H, Mazhitova G, Nelson FE, Rinke A, Romanovsky VE, Shiklomanov N, Tarnocai C, Venevsky S, Vogel JG, Zimov SA. Vulnerability of permafrost carbon to climate change: Implications for the global carbon cycle. *Bioscience*, 2008, 58(8): 701–714.
- [6] Yergeau E, Hogues H, Whyte LG, Greer CW. The functional potential of high Arctic permafrost revealed by metagenomic sequencing, qPCR and microarray analyses. *The ISME Journal*, 2010, 4(9): 1206–1214.
- [7] Schostag M, Stibal M, Jacobsen CS, Baelum J, Taş N, Elberling B, Jansson JK, Semenchuk P, Prieme A. Distinct summer and winter bacterial communities in the active layer of Svalbard permafrost revealed by DNA- and RNA-based analyses. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 399.
- [8] 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.
- [9] Hultman J, Waldrop MP, Mackelprang R, David MM, McFarland J, Blazewicz SJ, Harden J, Turetsky MR, McGuire AD, Shah MB, VerBerkmoes NC, Lee LH, Mavrommatis K, Jansson JK. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. *Nature*, 2015, 521(7551): 208–212.
- [10] Faucherre S, Blok D, Jørgensen CJ, Siewert MB, Hugelius G, Kuhry P, Elberling B. Short and long term controls on permafrost carbon turnover across the Arctic (in prep.). *Biogeosciences*, 2017.
- [11] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York,

- NY: John Wiley and Sons, 1991: 125–175.
- [12] Stubner S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen™ detection. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50(2): 155–164.
- [13] 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.
- [14] Zheng Y, Jia ZJ. Next generation sequencing and stable isotope probing of active microorganisms responsible for aerobic methane oxidation in red paddy soils. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(2): 173–184. (in Chinese)
郑燕, 贾仲君. 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. *微生物学报*, 2013, 53(2): 173–184.
- [15] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [16] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich J, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [17] Mercier C, Boyer F, Bonin A, Coissac E. SUMATRA and SUMACLUSt: fast and exact comparison and clustering of sequences//Programs and Abstracts of the SeqBio 2013 workshop (Abstract). GdRBIM and gdrIM, Montpellier, France. 2013, 27_29. Available at <http://metabarcoding.org/sumatra>.
- [18] Instanes A. Incorporating climate warming scenarios in coastal permafrost engineering design—Case studies from Svalbard and northwest Russia. *Cold Regions Science and Technology*, 2016, 131: 76–87.
- [19] Oren A, Xu XW. The family *Hyphomicrobiaceae*//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. The Prokaryotes. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 247–281.
- [20] 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.
- [21] Zhang TJ, Frauenfeld OW, Serreze MC, Etringer A, Oelke C, McCreight J, Barry RG, Gilichinsky D, Yang DQ, Ye HC, Ling F, Chudinova S. Spatial and temporal variability in active layer thickness over the Russian Arctic drainage basin. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 2005, 110(D16): D16101.
- [22] Chu HY, Fierer N, Lauber CL, Caporaso JG, Knight R, Grogan P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(11): 2998–3006.

Soil microbiomes modulate distinct patterns of soil respiration and methane oxidation in arctic active layer and permafrost

Huimin Zhang^{1,2,3}, Anders Priemé^{4,5}, Samuel Faucherre⁴, Bo Elberling^{4*}, Zhongjun Jia^{2*}

¹ Sino-Danish Center for Education and Research, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

² State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

³ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

⁴ Center for Permafrost (CENPERM), Department of Geosciences and Natural Resource Management, University of Copenhagen, Øster Voldgade 10, 1350 Copenhagen K, Denmark

⁵ Department of Biology, University of Copenhagen, Øster Voldgade 10, 1350 Copenhagen K, Denmark

Abstract: [Objective] This study was aimed to study the difference in respiration, bacterial diversity and community composition of permafrost layer and active layer, and methane consumption potential, and to find the

Supported by the “Strategic Priority Research Program” of the Chinese Academy of Sciences (XDB15040000) and by the Danish National Research Foundation (Centre for Permafrost – CENPERM DNR100)

*Corresponding author. Zhongjun Jia, Tel: +86-25-86881311, Fax: +86-25-86881000, E-mail: jia@issas.ac.cn; Bo Elberling, E-mail: be@ign.ku.dk

Received: 13 February 2017; Revised: 7 April 2017; Published online: 11 April 2017

active methylotrophs in soil that has high methane consumption potential. **[Methods]** Soils were sampled from Adventdalen (Svalbard), Ny-Alesund (Svalbard), Kurungnakh Third terrace (Lena delta) and Lena delta First terrace (Lena delta), including active layers and their corresponding permafrost layers, coming from one intact core at each site in 2013 and they were incubated at 10 °C in darkness for 26 days, with or without isotope ^{13}C labeled methane. Miseq sequencing and quantitative PCR of 16S ribosomal RNA gene and particulate methane monooxygenase *pmoA* gene were performed to assess difference of bacterial abundance, bacterial diversity and community composition of permafrost layer and active layer. Stable isotope probing experiment with ^{13}C labeled methane as carbon source was performed to reveal the active methanotrophs in geographically distinct arctic soils. **[Results]** Active layer soil had higher respiration rate than its permafrost soil, which was positively correlated with the difference of bacterial communities. The respiration rate of active layer ranged from 61 to 623 $\text{nmol CO}_2/(\text{g dws}\cdot\text{d})$, while exceptionally high respiration rate of 7293/ $(\text{g dws}\cdot\text{d})$ was observed in LF active layer, and the respiration rate of permafrost layer varied from 47 to 523 $\text{nmol CO}_2/(\text{g dws}\cdot\text{d})$. The average respiration of Lena delta was 17 times higher than that of Svalbard. Accordingly, active layer had higher bacterial diversity and higher abundance than permafrost soil where the relative abundance of 10 families in active layer were significantly higher than its permafrost. These bacterial families were mainly affiliated with Proteobacteria and Acidobacteria, such as Hyphomicrobiaceae, Solibacteraceae, Sinobacteraceae and their relative abundance was between from 4.3% to 18.6%, 2.6 and 23.7 times higher than that in permafrost layer soil. In Lena delta First terrace active layer with extremely high respiration rate, 6 families (mainly Bacteroidales and Gracilibacteraceae) were found with significant higher relative abundance (26.9%) than in other soils. Only active layer soil from Kurungnakh was observed to have strong methane oxidation potential. The methane oxidation rate in Kurungnakh active layer soil was 55.9 $\text{nmol CH}_4/(\text{g dws}\cdot\text{d})$. And dominant active methylotrophs of Kurungnakh active layer were phylogenetically affiliated with *Crenothrix* and type I methane oxidizers (*Methylobacterium*). **[Conclusion]** The respiration rate of active layer was higher than its permafrost and with high heterogeneity and this could be well explained by difference of bacterial community composition and bacterial abundance in permafrost and active layer. Repeated thawing and refreezing of active layer has developed characteristic community structure that are key drivers for the turnover of the carbon pool, mainly including Hyphomicrobiaceae, Solibacteraceae and Sinobacteraceae. All these results suggest that microbial community structure in permafrost would go through a succession with a direction to that in its active layer, which might play important role in fixed carbon transformation in permafrost. These results provide a mechanistic understanding towards better optimization of soil carbon emission model under global change scenarios.

Keywords: arctic permafrost, active layer, permafrost layer, soil respiration, 16S rRNA gene sequencing

(本文责编: 张晓丽)