



## 干湿交替水分胁迫对水稻土细菌群落影响的研究

周晓丽<sup>1,2#</sup>, 包丽君<sup>3#</sup>, 柳旭<sup>2,4</sup>, 熊艺<sup>2</sup>, 褚海燕<sup>2,4</sup>, 贾仲君<sup>2,4\*</sup>

1 盐城师范学院海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 224007

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 北京大学深圳研究生院环境与能源学院, 广东 深圳 518055

4 中国科学院大学, 北京 100049

周晓丽, 包丽君, 柳旭, 熊艺, 褚海燕, 贾仲君. 干湿交替水分胁迫对水稻土细菌群落影响的研究. 微生物学报, 2022, 62(3): 1004–1019.

Zhou Xiaoli, Bao Lijun, Liu Xu, Xiong Yi, Chu Haiyan, Jia Zhongjun. Convergent adaption of bacterial community in a paddy field experiencing repeated drying-wetting cycles. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1004–1019.

**摘要:**【目的】连续 3 次风干-湿润循环培养水稻土, 在 DNA 和 RNA 水平下, 探究细菌对干湿交替胁迫的响应机制, 明确风干水稻土能否代替新鲜土壤进行细菌群落组成分析。【方法】针对我国江苏省常熟市水稻土, 开展新鲜土壤的 3 次风干-湿润循环连续培养处理(每次循环中风干、湿润状态各维持 7 d), 在 DNA 和 RNA 水平应用 16S rRNA 基因高通量测序和实时荧光定量 PCR 技术, 分析细菌数量和群落组成的变化规律。【结果】在湿润-风干过程中, DNA 水平细菌数量降幅高达 300–771 倍, 但 RNA 水平仅为 1.95–5.60 倍。在 DNA 水平, 风干土细菌多样性与湿润土无显著差异, 但在 RNA 水平, 风干土明显高于湿润土。非度量多维尺度及共发生网络分析表明, 水稻土干湿交替过程中, 土壤细菌的群落结构发生显著改变( $P < 0.05$ ); 在 DNA 和 RNA 水平, 水稻土在干湿交替过程中均检测到 8 个相同的优势菌门, 占有微生物 90% 以上, 但不同门相对丰度变化显著( $P < 0.05$ )。在 DNA 和 RNA 水平, 湿润-风干处理显著增加绿弯菌门(*Chloroflexi*)和放线菌门(*Actinobacteria*)的相对丰度, 显著降低变形菌门(*Proteobacteria*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*)的相对丰度。3 次湿润-风干过程中共检测到 7 246 个微生物属, 在 DNA 水平 35 个属发生显著变化, 而 RNA 水平则有 58 个属, 但仅有 4 个属在 DNA 和 RNA 水平均表现出显著变化, 占本研究中可

**基金项目:** 国家自然科学基金(41530857, 91751204)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41530857, 91751204)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

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

Received: 15 June 2021; Revised: 25 August 2021; Published online: 7 December 2021

分类微生物属的百分比为 1.09%，其中绿弯菌门未分类属 KD4-96 显著增加、黏细菌门未分类属 *bacteriap25* 显著减少，氨氧化菌 *Nitrososphaeraceae* 未分类属、伯克氏菌目 *Burkholderiales* 未分类属则在 DNA 水平显著减少，但在 RNA 水平显著增加。【结论】3 次湿润-风干过程中，水稻土细菌数量在 RNA 水平的变幅远低于 DNA，相差可达上百倍，表明土壤 RNA 来自于完整活细胞，而 DNA 水平 16S rRNA 基因数量的剧烈变化可能来自土壤游离 DNA 等因素干扰。尽管湿润-风干交替过程显著改变了 16S rRNA 基因数量，但风干土壤 RNA 代表的活性物种组成与湿润土微生物基本一致，表明多次干湿交替并未导致优势细菌类群发生不可逆转的死亡，土壤微生物具有极强的功能可塑性并能适应干旱胁迫，风干土壤在一定程度可用于微生物学研究。

**关键词：**水稻土；干湿交替；细菌群落；16S rRNA；高通量测序；实时荧光定量 PCR

## Convergent adaption of bacterial community in a paddy field experiencing repeated drying-wetting cycles

ZHOU Xiaoli<sup>1,2#</sup>, BAO Lijun<sup>3#</sup>, LIU Xu<sup>2,4</sup>, XIONG Yi<sup>2</sup>, CHU Haiyan<sup>2,4</sup>, JIA Zhongjun<sup>2,4\*</sup>

1 School of Marine and Biological Engineering, Yancheng Teachers University, Yancheng 224007, Jiangsu, China

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

3 School of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055, Guangdong, China

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

**Abstract: [Objective]** This study aims to explore the mechanism of bacterial taxa adapting to repeated drying-wetting cycles in a paddy field via culture-dependent DNA/RNA-based 16S rRNA gene analysis, and to assess whether air-dried paddy soil could be used for the study of microbial community structure. **[Methods]** The fresh soil representative of rice production in China was collected from Changshu city of Jiangsu province, and three consecutive cycles of air drying and wetting were conducted (drying or wetting state was maintained for seven days in each cycle). We then analyzed the changes of the abundance and community composition of soil bacteria by using 16S rRNA gene high-throughput sequencing and real-time fluorescence quantitative PCR respectively. **[Results]** The bacterial abundance decreased by 300–771 times at the DNA level while only by 1.95–5.60 times at the RNA level during the wetting-drying cycles. The bacterial diversity in the air-dried soil showed no significant difference from that in the wet soil at the DNA level, while was significantly higher than that in the wet soil at the RNA level. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) and co-occurrence network analysis showed that the community structure of soil bacteria changed significantly during the drying-wetting cycles ( $P < 0.05$ ). The drying-wetting cycles caused significant changes in relative abundance of key taxa, and a total of 8 numerically dominant phyla was consistently observed at both the DNA and RNA levels ( $P < 0.05$ ). The drying-wetting cycles significantly increased the relative abundance of *Chloroflexi* and *Actinobacteria*, while significantly decreased that of *Proteobacteria* and *Acidobacteria*. A total of 7 246 microbial genera were detected during the three wetting-drying cycles.

The relative abundance of 35 and 58 bacterial genera changed significantly at the DNA and RNA levels, respectively, in response to the drying-wetting cycles. Among all the bacterial genera with significant changes in relative abundance, only 4 genera showed significant changes at both DNA and RNA levels, accounting for only 1.09% of the detected genera in this study. Specifically, the relative abundance of KD4-96 significantly increased and that of *bacteriap25* significantly decreased at DNA and RNA levels; the relative abundance of *Nitrososphaeraceae* and SC-I-84 decreased significantly at the DNA level while increased significantly at the RNA level. **[Conclusion]** The three wetting-drying cycles resulted in significant decrease in the absolute abundance of bacterial taxa. The 16S rRNA transcripts were two orders of magnitude lower than the 16S rRNA genes, which implied that 16S rRNA transcripts could be originated most likely from intact living cells, and soil extracellular DNA could have likely resulted in drastic variations of 16S rRNA genes. Intriguingly, the composition of bacterial taxa remained generally unchanged during the drying-wetting cycles at both DNA and RNA levels, suggesting strong capacity of bacterial taxa to recover from desiccation. Our results indicate that soil microorganisms have strong functional plasticity of being adaptive to drought, and air-dried soil can be used for microbiological research under certain circumstances.

**Keywords:** paddy soil; drying-wetting cycle; bacterial community; 16S rRNA; high-throughput sequencing; real-time fluorescence quantitative PCR

近几十年乃至百年的观测资料显示,世界上主要国家或地区出现温度提升,降水增多,极端天气情况频发的气候变化趋势,异常气候变化可能导致干旱和降水的模式不断发生改变,土壤干湿交替的频率和强度将更大<sup>[1]</sup>。微生物被认为是元素生物地球化学循环的引擎,其种类多、分布广、代谢活力强、繁殖速度快,是土壤生态系统中最活跃的部分,也是生态系统碳氮循环的主要驱动者<sup>[2]</sup>。因此,研究土壤微生物群落对降水和干旱胁迫的适应机制具有重要意义。

早在1958年 Birch 就发现干旱的土壤加水培养后,土壤呼吸作用增强,CO<sub>2</sub>的排放量增加,因为土壤干旱的表层遇水湿润后,会增强微生物对土壤碳源物的矿化作用<sup>[3-4]</sup>。同时,微生物呼吸作为土壤呼吸的重要组成部分<sup>[5]</sup>,是大气中CO<sub>2</sub>浓度变化的主要影响因素<sup>[6]</sup>,也是陆地生态系统光合固定大气碳元素的几乎唯一的输出途径<sup>[3]</sup>。事实上,在微生物活性受到抑

制的极度干旱地区,短时间内土壤含水量的变化影响CO<sub>2</sub>的释放<sup>[7-9]</sup>。因此,外界环境的变化如动态的土壤水环境,必然会对微生物群落产生影响,从而进一步影响生态系统碳氮循环的收支平衡<sup>[2,10-11]</sup>。近年来分子生态学技术快速发展,有研究发现微生物群落在土壤含水量受限制的生存环境中,会发生季节性的变换。例如,美国南部奇瓦瓦沙漠的微生物群落结构在不同的季节和降水模式下可发生改变<sup>[12]</sup>。我国研究人员则发现,农田旱地和苗圃旱地新鲜土处理的净硝化量及硝化率均显著高于风干土处理,其可能的原因是氨氧化细菌和亚硝酸氧化细菌的数量在经历了风干过程后很难恢复到新鲜土水平,但整体微生物群落的研究尚未有相关报道<sup>[13]</sup>。

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<sup>[14]</sup>,但在干旱和降雨交替模式影响下,这些微生物群落的响应规律尚不明了<sup>[15]</sup>。16S rRNA 基因被

认为是微生物分类学的分子标靶, 而 rRNA 转录子的数量则可表征微生物活性。2007 年以来, 利用高通量测序技术分析地球环境中微生物 16S rRNA 基因的方法已经极大改变了传统的微生物遗传多样性研究<sup>[16]</sup>, 新一代高通量测序技术通量大, 可同时分析上百个不同样品等优点, 成为分析复杂土壤中微生物群落组成和相对丰度的重要工具<sup>[17]</sup>。据此, 本研究利用高通量测序技术探究多次风干以及加水培养后土壤微生物群落的整体变化规律, 在 DNA 和 RNA 水平上, 探究水稻土主要细菌类群对干湿交替水分胁迫的适应规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品概况

水稻土采自江苏省常熟市农田生态系统国家野外科学观测研究站(31°33'N, 120°42'E)。通过五点采样法收集 0–20 cm 表层的新鲜土壤, 剔除可见根系和石块并混匀后过 2 mm 筛, 在冷库中保存待用。土壤基本理化性质如下: pH 7.3, 全氮 1.9 g/kg, 硝态氮 0.04 g/kg, 铵态氮 0.007 g/kg, 有机质 36.2 g/kg, 土壤最大持水量为 53.6%。

### 1.2 水稻土的干湿交替过程

土壤的干湿交替培养过程具体如下: 湿润(F1)-风干(D1)-湿润(F2)-风干(D2)-湿润(F3)-风干(D3)-湿润(F4), 其中湿润-风干过程 3 次, 包括 F1-D1、F2-D2 和 F3-D3, 风干-湿润过程 3 次, 包括 D1-F2、D2-F3 和 D3-F4。每个过程中风干、湿润状态各持续 7 d 并开展分子生态学分析。风干过程为自然风干, 风干 7 d 后土壤含水量为 2.7%, 对风干土加水湿润, 使得土壤含水量恢复至田间持水量的 60%, 并维持 7 d。本研究中, 将干湿交替过程中 3 次的风干处理和 4 次的湿润处理归为风干土(D)和湿润土(F)

2 类, 在 DNA 和 RNA 水平进行细菌多样性分析。

主要流程如下, 首先, 称取 210 g 新鲜水稻土于无菌托盘置于通风处晾干, 7 d 后, 将这些风干土壤加水湿润并恢复到新鲜状态保持 7 d, 然后继续进行风干培养 7 d, 并循环培养。每次风干或湿润状态持续 7 d 后收集土壤样品。每次风干或湿润作为一个处理, 每次处理设置 3 个重复。每个重复收集大约 10 g 土, 其中 3 g 土壤样品, 加入 RNAlater (Ambion)后, -20 °C 保存用于 RNA 提取, 其余样品保存于 -20 °C, 用于 DNA 提取以及后续分析。

### 1.3 土壤细菌 DNA 的提取

利用 FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit for Soil 试剂盒 (MP Bio)提取土壤细菌总 DNA, 具体操作步骤如下: (1) 称取等量干重的 0.5 g 土壤样品, 置于 2 mL 的螺帽口的裂解管, 并加入 978 μL SPB 和 122 μL MT 缓冲液, 使用 Fast Prep<sup>™</sup> FP 120 核酸提取仪以 6 m/s 的速度裂解土壤细菌细胞 30 s, 14 000×g 离心 10 min 保留上清液; (2) 上清液转移至新的 2 mL 无菌离心管, 加入 250 μL PPS, 手动倒置振荡 10 次, 14 000×g 离心 5 min 保留上清液; (3) 上清液转移至新的 2 mL 无菌离心管, 加入 1 mL 均匀分布的 Binding Matrix 后, 在涡旋仪上涡旋振荡 2 min, 放置于离心管架静置 3 min, 为了让 DNA 更好地吸附在硅胶上而沉淀到离心管下部; (4) 弃上清液 500 μL 后, 用移液器将剩余液体吹打混合均匀, 分次全部转移到 SPIN<sup>™</sup> 离心管滤膜上, 14 000×g 离心 1 min, 弃滤液; (5) 在滤膜上加入 500 μL SEWS-M 溶液, 用移液器轻轻吹吸使滤膜上的硅胶重新悬浮, 14 000×g 离心 1 min, 弃滤液; (6) 滤膜转移至新的 2 mL 无菌离心管中, 14 000×g 干燥离心 2 min; (7) 滤膜转移至新的 2 mL 无菌离心管中, 打开离心管盖, 室温下干燥 5 min; (8) 土壤微生物总 DNA 溶解于 100 μL 无

菌水后 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存待用。通过微量紫外分光光度计(NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000)测定 DNA 的浓度和纯度( $OD_{260}/OD_{280}$ 和 $OD_{260}/OD_{230}$ ),其中每个样品浓度均保证大于 $30\text{ ng}/\mu\text{L}$ ,大部分 DNA 样品的 $OD_{260}/OD_{280}$ 值在 $1.8\text{--}2.0$ 之间以保证 DNA 质量。同时,利用 $1.2\%$ 的琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的完整性和相对浓度。

#### 1.4 土壤细菌 RNA 的提取

根据已有文献[18]报道的方法,提取土壤细菌总 RNA,具体步骤如下:(1) 将保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,装有等量干重的 $0.5\text{ g}$ 土样并加入了 $500\text{ }\mu\text{L}$  RNAlater 的 $2\text{ mL}$ 带螺帽口的裂解管置于冰上解冻后, $20\text{ }000\times g$ 离心 $2\text{ min}$ 弃上清液,去除 RNAlater;(2) 在沉淀物中加入 $0.5\text{ g}$ 玻璃珠( $0.5\text{ mm}:0.1\text{ mm}=3:2$ , Sigma)和预冷的 $700\text{ }\mu\text{L}$  TPM 缓冲液( $50\text{ mmol/L}$  Tris-HCl pH 5.0,  $1.7\%$  polyvinylpyrrolidone,  $20\text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ ),使用 Fast Prep<sup>™</sup> FP120 核酸提取仪以 $6\text{ m/s}$ 的速度裂解土壤细菌细胞 $35\text{ s}$ ,随后将裂解混合物在 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $20\text{ }000\times g$ 离心 $2\text{ min}$ ,上清液转移至 $2\text{ mL}$ 的无菌离心管中;(3) 向裂解管中的沉淀物加入预冷的 $700\text{ }\mu\text{L}$  PBL 缓冲液( $5\text{ mmol/L}$  Tris-HCl pH 5.0,  $5\text{ mmol/L}$  EDTA- $\text{Na}_2$  pH 8.0,  $0.1\%$  SDS,  $6\%$ 水饱和酚),重复步骤(2)连续 $2$ 次提取土壤核酸以提高 RNA 回收效率<sup>[19]</sup>;(4) 依次利用 $500\text{ }\mu\text{L}$ 的 $3$ 种有机试剂清洗(2) (3)步骤合并后的上清液:水饱和酚(pH 4.5),苯酚:氯仿:异戊醇( $25:24:1$ ) (pH 4.5),氯仿:异戊醇( $24:1$ ),充分混匀后 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $20\text{ }000\times g$ 离心 $2\text{ min}$ 并将上清液转移至新的 $2\text{ mL}$ 无菌离心管中;(5) 加入 $2$ 倍体积 PEG-NaCl ( $30\%$  PEG-6000,  $1.6\text{ mol/L}$  NaCl)于上清液中并混匀,室温下静置 $2\text{ h}$ 后 $20\text{ }000\times g$ 离心 $10\text{ min}$ ,弃上清液后加入 $400\text{ }\mu\text{L}$   $70\%$ 乙醇清洗沉淀,并再次 $20\text{ }000\times g$ 离心 $5\text{ min}$ ;(6) 弃上清液后,离心管置于无菌台吹干沉淀并加入

$50\text{ }\mu\text{L}$  DNase /RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$  溶解;(7) 利用 recombinant DNase I (TaKaRa)去除总核酸中的 DNA,随后通过 RNeasy MinElute cleanup Kit (QIAGEN)试剂盒纯化土壤总 RNA,并利用细菌 16S rRNA 基因的通用引物(515F/907R)扩增土壤总 RNA,确保总 RNA 中不存在 DNA 污染;(8) 利用微量紫外分光光度计(NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000)测定 RNA 浓度,采用 Prime Script 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)试剂盒将土壤 RNA 样品反转录成 cDNA,并于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

#### 1.5 高通量测序土壤细菌 16S rRNA 基因

针对干湿交替过程中 $7$ 个处理,分别提取土壤总 RNA 和 DNA 后开展 16S rRNA 基因和 cDNA 的多样性分析。首先利用通用引物 515F ( $5'\text{-GTGCCAGCMGCCGCGG-3}'$ )<sup>[20]</sup>和 907R ( $5'\text{-CGTCAATTCMTTTRAGTTT-3}'$ )<sup>[20]</sup>扩增土壤细菌的 16S rRNA 基因,用于高通量测序的通用引物前端含有 $11$ 个碱基的特异 barcode 标签,用以区分不同的土壤样品。PCR 扩增体系为: $25\text{ }\mu\text{L}$  TaKaRa  $2\times\text{SYBR}^{\text{®}}$  Premix EX *Taq*<sup>™</sup> (dNTPs mixture, buffer,  $\text{Mg}^{2+}$  plus),  $0.5\text{ }\mu\text{L}$  引物 ( $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ ),  $2\text{ }\mu\text{L}$  DNA 模板,加无菌水至 $50\text{ }\mu\text{L}$  反应体系,每次 PCR 反应均设置无菌水的阴性对照。PCR 扩增条件为: $94^{\circ}\text{C}$   $5\text{ min}$ ;  $94^{\circ}\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$   $45\text{ s}$ ,  $30$ 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$   $10\text{ min}$ 。

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,并将纯化产物溶于 $30\text{ }\mu\text{L}$  DNase-free  $\text{H}_2\text{O}$ 。通过微量紫外分光光度计(NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000)测定浓度后,采用 TruSeq Nano DNA LT Sample Prep Kit 试剂盒对样品进行建库后,等摩尔数混合,利用中国科学院南京土壤研究所分析测试中心 Illumina 公司 MiSeq 测序系统上机分析。

## 1.6 土壤总 DNA 和 cDNA 的实时荧光定量 PCR

将土壤总 DNA 和 cDNA 样品, 根据 NanoDrop 测定的结果进行稀释, 使最终浓度保证在 1–10 ng/ $\mu$ L, 作为定量 PCR 的模板。定量 PCR 的标线利用含有细菌 16S rRNA 基因的克隆进行制备。首先利用特定引物进行目的基因的扩增, 构建克隆文库后, 将含有目的基因的克隆在 LB 营养液中过夜培养, 提取质粒纯化并测定质粒的浓度, 根据摩尔常数计算目的基因拷贝数, 随后用 DNase-free H<sub>2</sub>O 将质粒连续稀释 8 个数量级, 从而得到各个目的基因的标准曲线。实时荧光定量 PCR 于 CFX96 Optical Real-Time Detection System (Bio-Rad) 上完成。定量 PCR 扩增反应体系为: 10  $\mu$ L SYBR<sup>®</sup> Premix EX Taq<sup>™</sup> (TaKaRa), 上、下游引物(10 pmol/ $\mu$ L) 各 0.5  $\mu$ L, 1  $\mu$ L 土壤总 DNA/cDNA 模板, 加入 8  $\mu$ L 灭菌双蒸水至 20  $\mu$ L 反应体系。每次试验均采用灭菌双蒸水代替 DNA 作为反应模板设置严格的阴性对照。

## 1.7 生物信息学及统计分析

本研究在 3 次风干以及加水恢复培养后对土壤样品的 DNA 和 cDNA 进行 Miseq 高通量测序, 利用 Qiime 对原始序列进行分析<sup>[21]</sup>, 过滤、移除低质量序列, 分别获得 1 395 262 和 757 425 条高质量序列, 平均每个样品分别获得 66 441 和 36 067 条序列。通过 Qiime 软件进行系统发育分析, 在 97%置信度下将每个样品所有的 16S rRNA 基因序列进行 OTUs (operational taxonomic units) 聚类分析。基于 OTUs 聚类结果, 通过 alpha 多样性指数 species richness、Chao1 和 Shannon, 非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS), 群落共发生网络(co-occurrence network), 群落相对丰度聚

类热图以及曼哈顿图(Manhattan plot)等分析对样品中物种进行注释与评估, 以得到样品内细菌多样性、群落组成及结构等信息。

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单因素方差分析(one-way ANOVA),  $P < 0.05$  表示显著差异。NMDS 图、共发生网络结构图、聚类热图以及曼哈顿图均利用 R 软件统计绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 干湿交替过程中细菌数量及多样性的变化

实时荧光定量 PCR 分析 16S rRNA 基因表明, 水稻土 3 次湿润-风干循环显著影响细菌数量。如图 1 所示, 3 次湿润-风干过程中, 细菌数量显著降低, 在 DNA 水平降幅高达 300–771 倍, 而在 RNA 水平降幅仅为 1.95–5.60 倍。同时, 3 次风干-湿润过程中, 细菌数量显著增加, 在 DNA 水平增幅高达 224–754 倍, 而在 RNA 水平增幅仅为 2.13–4.96 倍。总体而言, 风干和湿润过程中细菌数量变化呈相反趋势, 并且 DNA 水平的变化远远高于 RNA 水平。

3 次湿润-风干过程中, DNA 水平的细菌多样性指数无显著变化, 但 RNA 水平呈增加趋势。例如, 在 DNA 水平, 湿润和风干土壤的物种丰富度(species richness)分别为 1 205 和 1 160, 甚至有降低趋势(图 1C); 而在 RNA 水平, 分别为 738 和 893, 表现出明显增加趋势(图 1D)。但值得注意的是, 无论风干土还是湿润土, DNA 水平的多样性指数, 均明显高于 RNA 水平 ( $P < 0.05$ )。例如, 在 DNA 水平, 湿润土 species richness、Chao1 index、Shannon index 平均值分别为 1 205、1 233、5.86; 而 RNA 水平则分别为 738、767、5.32。

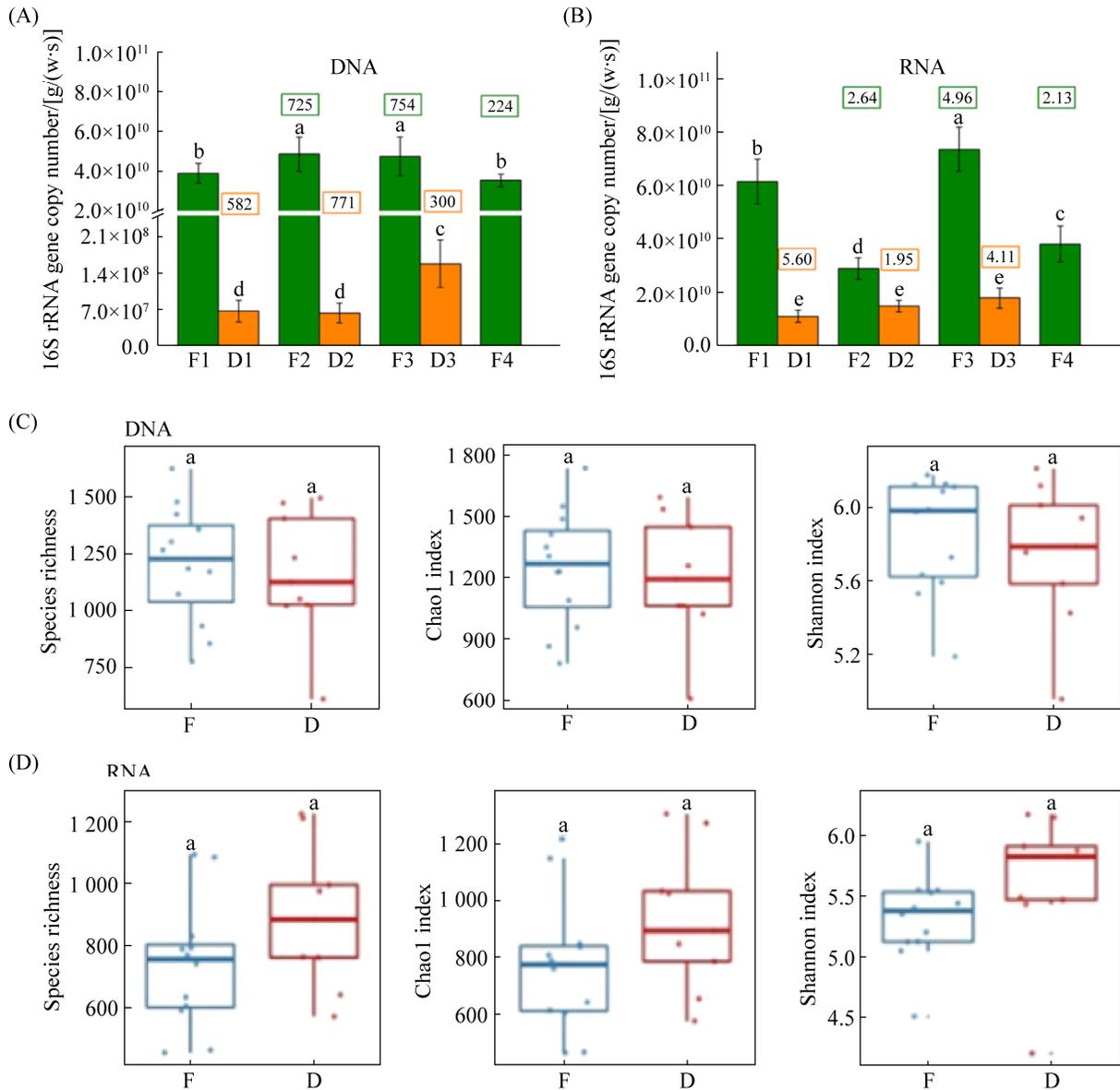


图 1 干湿交替过程中土壤细菌数量及多样性的变化

Figure 1 Variation of soil bacteria abundance and diversity under wet-dry cycle conditions. At the DNA (A) and RNA (B) level, abundance change of bacterial 16S rRNA genes, At the DNA (C) and RNA (D) levels, the species richness, Chao1 index and Shannon index of soil bacteria. Among them, species richness and Chao1 index are used to estimate the total number of species in ecology, while Shannon index is used to describe biological diversity. In figure 1A and 1B, error bar refers to the standard deviation ( $n=3$ ); different letters mean significant difference ( $P<0.05$ ); the multiple value in the green box at the top of the bar chart is the ratio of 16S rRNA gene copy number of bacteria in the soil after seven days of water culture to those in the air dried soil before water culture, and the multiple value in the yellow box is the ratio of 16S rRNA gene copy number of bacteria in the soil after seven days of air dry culture to those in the wet soil; in figure 1C and 1D, F represents wet soil, which is all the data of four wetting treatments; D represents dry soil, which is all the data of three air-dried treatments.

## 2.2 干湿交替过程中细菌群落的变化

非度量多维尺度法(NMDS)分析表明, 水稻土 3 次湿润-风干过程中, 细菌群落结构发生了显著变化。无论 DNA 和 RNA 水平, 湿润土壤的细菌群落结构更加相似, 而风干土壤细菌群落也具有更高的相似性, 尤其在 RNA 水平上, 风干土与湿润土分开距离更大, 表明 3 次干湿交替连续培养过程中, 新鲜土壤细菌群落结构发生了显著改变( $P < 0.05$ )。

进一步在 DNA 和 RNA 水平, 基于土壤细菌类群的共现性特征, 构建了基于 OTU 水平的

14 个共发生网络, 发现 3 次湿润-风干循环显著影响水稻土细菌群落共发生网络(图 2B)。无论在 DNA 还是 RNA 水平, 细菌共发生模式均表明干湿交替显著影响细菌群落的网络拓扑特征。同时, 在 DNA 水平, 参与网络互作的总节点数目(node, 图 2B)和网络的连通性均高于 RNA 水平。例如, 在 DNA 水平, 网络的平均连接度分别为 166.83、141.10、88.79、83.44、107.78、73.98、72.47; 在 RNA 水平, 平均连接度分别为 88.07、97.56、52.52、65.80、73.55、81.84、53.99。

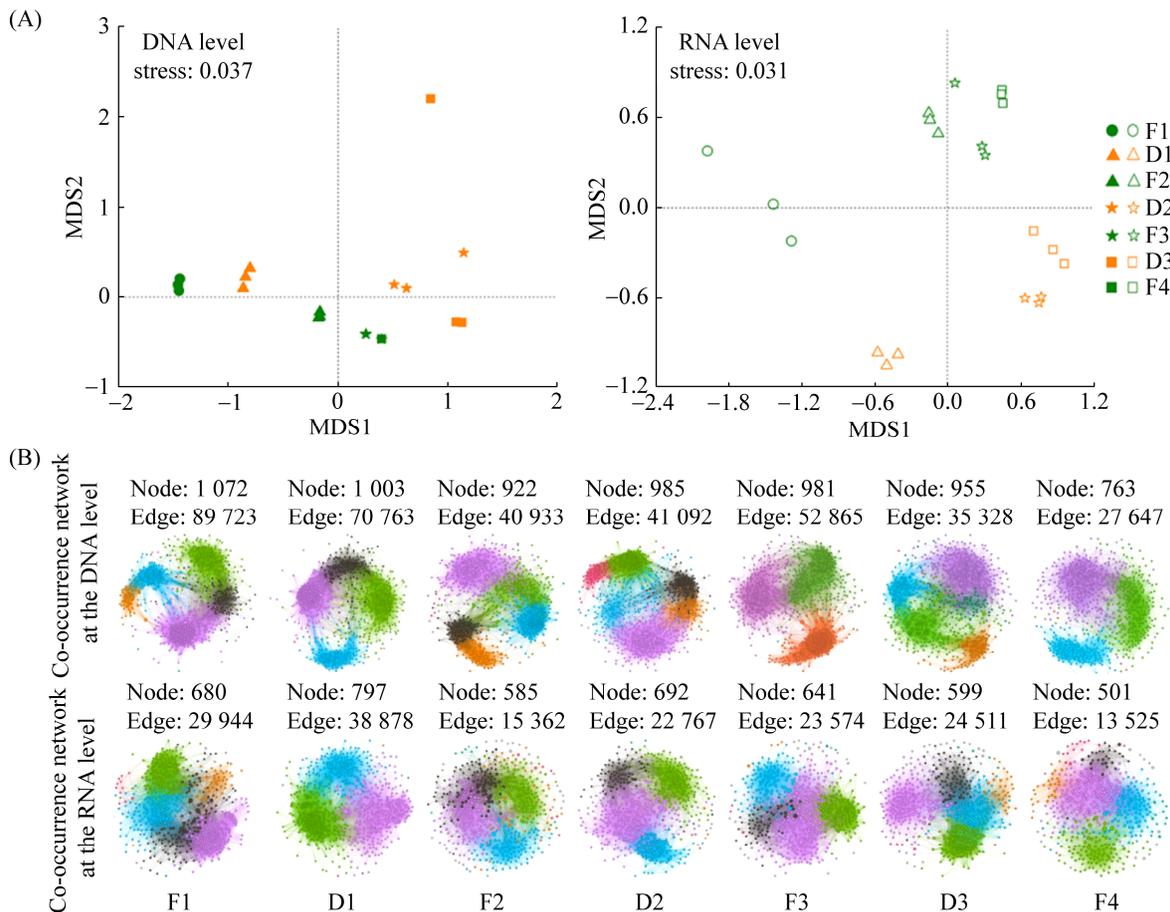


图 2 基于非度量多维尺度(A)和共发生网络结构(B)分析土壤细菌在干湿交替过程中群落结构的变化

Figure 2 The changes of community structure of soil bacteria under dry-wet cycle conditions based on non-metric multi-dimensional scale scaling (A) and co-occurrence network structure (B). In figure 2B, each node in the figure represents an OTU; the size of the node indicates the size of the connection; the node color shows the network module that it is assigned to.

### 2.3 干湿交替对优势细菌门的影响

高通量测序和系统发育分析表明,在细菌门水平,干湿交替并未显著改变群落物种组成。如图 3 所示,整个干湿交替过程,水稻土共计检测到 63 个门,在 DNA 和 RNA 水平分别为 62 个和 50 个,但其中 8 个优势门存在于所有处理中(相对丰度>1%)。水稻土中 8 个优势门占所有微生物比例高达 90%以上,但其中 4 个门丰度最高,包括变形菌门(*Proteobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*),其丰度在 DNA 和 RNA 水平最高分别为 27%、36%、15%、20%和 44%、20%、14%、20%。

湿润-风干循环显著影响绝大多数优势门,并在 DNA 和 RNA 水平,均表现出一致的增加或降低趋势。如图 3 所示,变形菌门(*Proteobacteria*)是 RNA 水平水稻土中相对丰度最高的类群(24%–44%),而绿弯菌门(*Chloroflexi*)则是 DNA 水平相对丰度最高的类群(23%–36%)。

在湿润-风干过程中,绿弯菌门(*Chloroflexi*)的相对丰度明显增加,DNA 水平的增幅最高可达 35%,明显高于 RNA 水平。相反,变形菌门

(*Proteobacteria*)则随着湿润-风干过程,在 DNA 和 RNA 水平表现出降低趋势。其他两个优势门也表现出类似规律。酸杆菌门(*Acidobacteria*)在 DNA 和 RNA 水平均表现出减少趋势,且在 DNA 水平趋势降低更为明显;而放线菌门(*Actinobacteria*)在 DNA 和 RNA 水平均有增加趋势,且在 RNA 水平增幅更大。同时,*Myxococcota* 相对丰度在 DNA 和 RNA 水平均有减少趋势,且有显著性差异;而浮霉菌门(*Planctomycetes*)相对丰度在 DNA 和 RNA 水平均有增加趋势,特别在 RNA 水平,增幅最高可达 68%。

在风干-湿润过程中,绿弯菌门(*Chloroflexi*)的相对丰度显著降低,DNA 水平的降幅最高可达 32.5%,略高于 RNA 水平的 31%。变形菌门(*Proteobacteria*)则随着风干-湿润过程,在 DNA 和 RNA 水平表现出增加趋势,并在 RNA 水平的增势更明显。酸杆菌门(*Acidobacteria*)在 DNA 和 RNA 水平均表现出增加趋势,且在 DNA 水平趋势增加更为明显;放线菌门(*Actinobacteria*)在 DNA 水平变化不大,但在 RNA 水平显著降低。*Myxococcota* 相对丰度在 DNA 和 RNA 水平均有显著增加趋势,且在 RNA 水平的增加趋

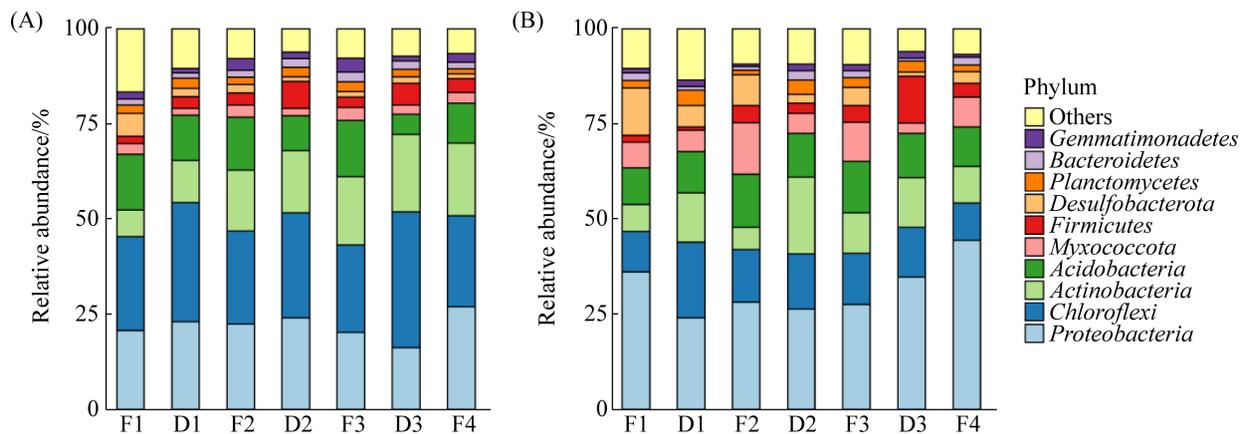


图 3 3 次湿润-风干过程中水稻土微生物门在 DNA (A)和 RNA (B)水平的相对丰度

Figure 3 Relative abundance of soil microorganisms at the phylum level under DNA level (A) or RNA level (B) relative to dry-wet treatments.

势更明显；而浮霉菌门(*Planctomycetes*)相对丰度在 DNA 和 RNA 水平均有减少趋势，特别在 RNA 水平，降幅最高可达 70%。

值得注意的是，干湿交替显著影响芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)与厚壁菌门(*Firmicutes*)，但 DNA 和 RNA 水平的规律不同。湿润-风干过程中，芽单胞菌门相对丰度在 DNA 水平显著降低，降幅最高达 67%；而在 RNA 水平则显著增加，增幅最高达 63%。相反，厚壁菌门相对丰

度在 DNA 水平显著增加，而在 RNA 水平呈明显降低趋势。风干-湿润过程中，芽单胞菌门相对丰度在 DNA 水平显著增加，增幅最高达 125%；而在 RNA 水平则显著降低，降幅最高达 61.4%。厚壁菌门相对丰度在 DNA 水平呈降低趋势，而在 RNA 水平呈增加趋势。

## 2.4 干湿交替对优势细菌属的影响

与细菌门类似，干湿交替显著影响细菌属的组成(图 4)。整个干湿交替过程，水稻土共计

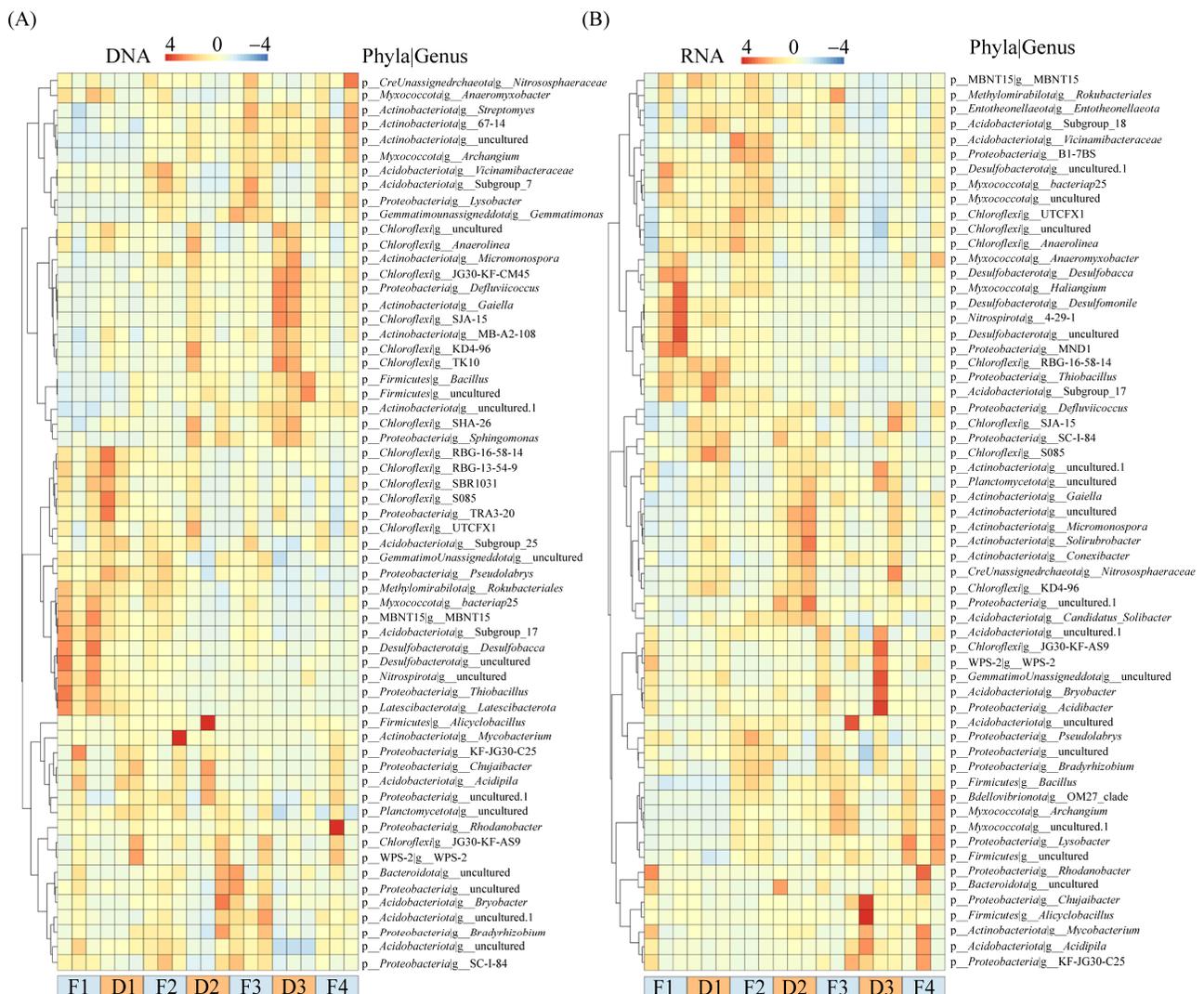


图 4 干湿交替过程中 DNA (A)和 RNA (B)水平下物种丰度聚类热图

Figure 4 Cluster heatmap of species relative abundance at genus level in different treatments at DNA level (A) and RNA level (B), respectively.

检测到 7 246 个 OTUs, 在 DNA 和 RNA 水平, 分别发现了 6 649 和 3 349 个 OTUs, 最优势(百分比丰度>0.05%)的 OTUs 分别有 384 个和 371 个, 占有可分类微生物种类的 5.78%和 11.12%。所有 OTUs 中, 在 DNA 和 RNA 水平, 分别有 35 和 58 个 OTUs 在 3 次湿润-风干处理过程中相对丰度差异显著(图 5)。其中, 在 DNA 水平有 21 个是优势的 OTUs, 在 RNA 水平有 36 个是优势的 OTUs。

3 次湿润-风干过程, 在 DNA 水平有 35 个 OTUs 相对丰度发生显著变化, 其中 8 个显著增加, 27 个显著减少。在 RNA 水平有 58 个 OTUs 相对丰度发生显著变化, 其中 38 个显著增加, 20 个显著减少(图 5)。

3 次湿润-风干过程, 共计 4 个 OTUs 相对丰度在 RNA 和 DNA 水平, 均发生了显著变化, 其中 KD4-96 (绿湾菌门 *Chloroflexi* 未分类属)显著增加、*bacteriap25* (黏细菌门未分类属)显著减少, 而 *Nitrososphaeraceae* (泉古菌门 *Crenarchaeota* 未分类属)和 SC-I-84 (伯克氏菌目 *Burkholderiales* 未分类属)在 DNA 水平显著减少, 但在 RNA 水平显著增加(图 5)。这些所有 OTUs, 占可分类微生物属的百分比为 1.09%, 但仅占有 DNA 和 RNA 序列的 0.80%和 1.26%。

3 次湿润-风干过程中, 在 DNA 水平, KD4-96 的相对丰度显著增加, 从 0.80%最高增加至 2.30%, 增幅高达 1.89 倍, 而在 RNA 水平也表现出相同规律, 但增幅更高, 可达 28 倍。

相反, *bacteriap25* 则随着湿润-风干过程, 在 DNA 水平相对丰度显著降低, 从 1.33%最高下降至 0.41%, 降幅高达 69%, RNA 水平降幅达到 68%。

3 次湿润-风干处理显著影响 *Nitrososphaeraceae* 和 SC-I-84 的相对丰度, 但在 DNA 和 RNA 水平的规律不同。在 DNA 水平, *Nitrososphaeraceae*

的相对丰度显著降低, 从 1.02%最高下降至 0.39%, 降幅高达 62%, 但在 RNA 水平则显著增加, 增幅达到 3 倍。SC-I-84 也表现出类似规律, 相对丰度在 DNA 水平显著降低, 降幅达到 85%, 而在 RNA 水平则显著增加, 增幅为 2.59 倍。

在 DNA 水平, 3 次湿润-风干过程中相对丰度显著增加的 8 个微生物物种, 变化最显著的 4 个属分别是 *Chelativorans* (根瘤菌科 *Rhizobiaceae* 未分类属)、*Serratia* (耶尔森菌科 *Yersiniaceae* 未分类属)、*Marinobacter* (交替单胞菌目 *Alteromonadales* 未分类属)、uncultured (变形菌纲 *Alphaproteobacteria* 不可培养细菌), 增幅分别达到 105 倍、28 倍、84 倍、1.35 倍; 相对丰度显著减少的 27 个微生物物种, 变化最显著的 4 个属分别是 *Gemmatimonas* (芽单胞菌属)、uncultured (芽单胞菌科 *Gemmatimonadaceae* 不可培养细菌)、*Vicinamibacteraceae* (酸杆菌门 *Acidobacteria* 未分类属)、S0134\_terrestrial\_group (芽单胞菌门 *Gemmatimonadetes* 未分类属), 降幅分别达到 86%、81%、66%、82%。

在 RNA 水平, 3 次湿润-风干过程中相对丰度显著增加的 38 个微生物物种, 变化最显著的 4 个属分别是 *Frankia* (弗兰克氏菌属)、JG30-KF-CM45 (热微菌目 *Thermomicrobiales* 未分类属) *Nitrososphaeraceae* (泉古菌门 *Crenarchaeota* 未分类属)、JG30-KF-CM66 (绿湾菌门 *Chloroflexi* 未分类属), 增幅分别为 4.38 倍、33 倍、3 倍、4.58 倍; 显著减少的 20 个微生物物种, 变化最显著的 4 个属分别是 uncultured (粘液球菌科 *Myxococcaceae* 不可培养细菌)、uncultured (厌氧绳菌科 *Anaerolineaceae* 不可培养细菌)、*Rokubacteriales*、BBMC-4 (丝状杆菌目 *Fibrobacterales* 未分类属), 降幅分别为 63%、76%、80%、91%。

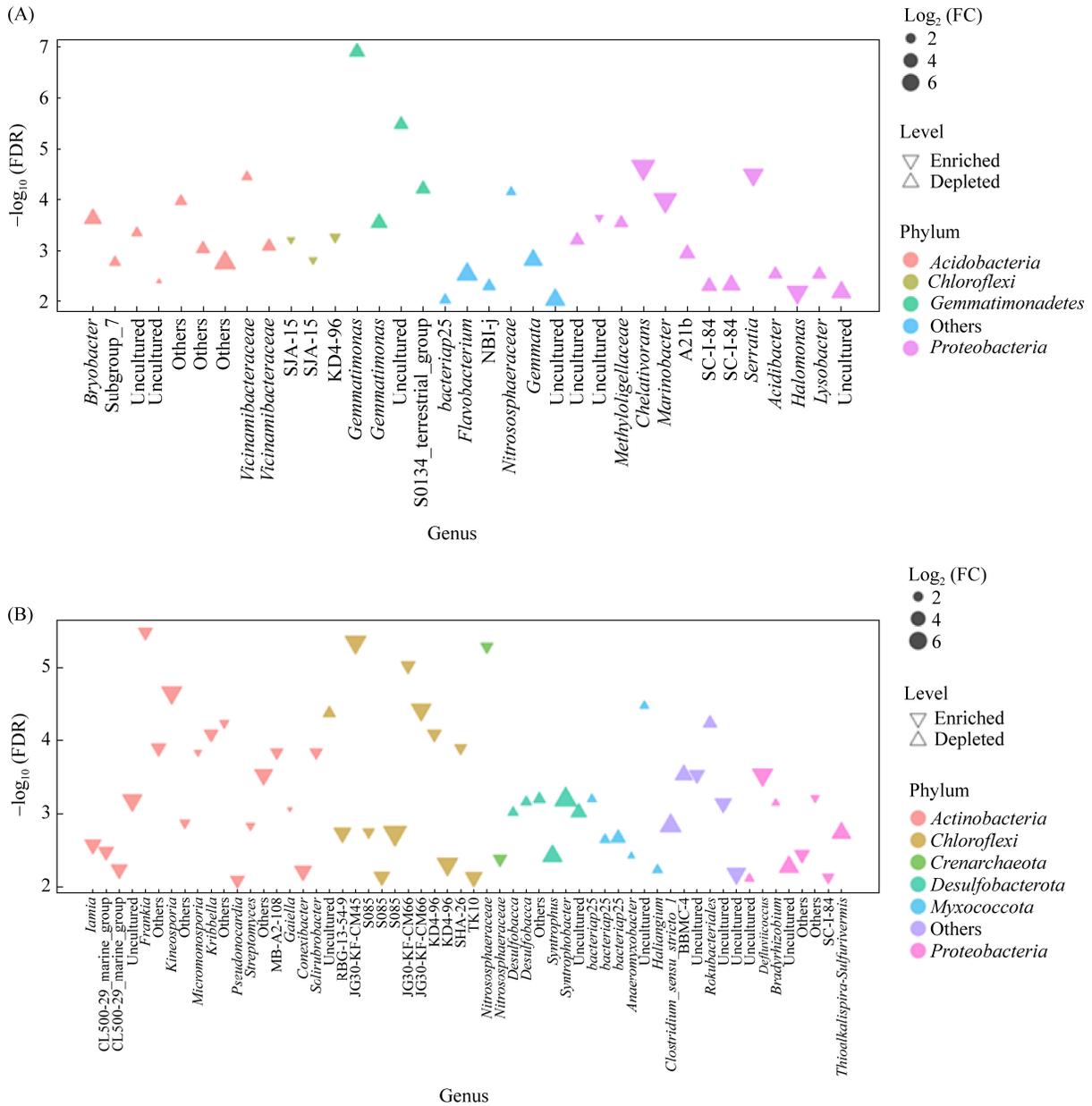


图 5 湿润-风干过程中 DNA (A)和 RNA (B)水平下土壤差异细菌的分类

Figure 5 Taxonomic characteristic of differential soil bacteria during dry-wet alternation at DNA level (A) and RNA level (B), respectively. Each triangle in the figure represents an OTU and the size indicates the relative abundance of the corresponding OTU.

### 3 讨论

土壤微生物群落结构和组成对土壤有机质转化和养分循环过程具有重要意义<sup>[2]</sup>, 干湿交替是土壤中普遍发生的自然现象, 影响着土壤

微生物群落数量、结构和组成特性<sup>[22-24]</sup>。本研究显示, 在湿润-风干过程中, 细菌数量在 DNA 水平的降幅要高于 RNA 水平, 而在风干-湿润过程中, DNA 水平细菌数量的增幅要明显高于 RNA 水平, 表明水分变化对细菌表达的影响要

小于对其数量的影响。这一规律似乎与高等生物类似,有研究显示,植物细胞通过休眠阶段的代谢转换更好地适应干旱胁迫<sup>[25]</sup>。同时有研究发现,休眠中的细胞仍然合成大量核酸,有利于细菌细胞维持其基本代谢功能,并在适宜条件下快速恢复代谢活性等<sup>[26]</sup>。此外,土壤微生物的诸多基本代谢活动,如细胞的渗透调节、基础呼吸等生理过程均可能导致 RNA 拷贝数增加,但并不意味着微生物的增长<sup>[27]</sup>。这些研究都暗示,土壤风干过程可能导致部分细胞处于休眠状态,其转录水平数量变化不明显。

在本研究中,风干过程导致 DNA 水平的细菌 16S rRNA 基因的拷贝数显著降低,而风干土壤加水恢复培养后,土壤细菌 16S rRNA 基因的拷贝数均又出现明显的增加,这与已有的研究报道一致<sup>[28-29]</sup>。值得注意的是,干湿交替过程中细菌 16S rRNA 基因数量变化高达 771 倍,一方面可能是在干旱条件下有一部分微生物细胞死亡<sup>[30]</sup>,而在土壤复水后,微生物活性提高,数量上升,因为在干燥过程中部分微生物被矿化分解,释放出养分供给其他微生物<sup>[31]</sup>。但另一方面也可能是土壤细菌 DNA 提取中存在一定的实验误差,土壤中存在大量的游离 DNA,可能导致土壤细菌 16S rRNA 基因数量被高估。例如,加水湿润后,风干土壤中粘粒与游离 DNA 的结合度变弱,有利于提取更多 DNA,显著影响后续的实时荧光定量 PCR。因此,在干湿交替过程中,这种极显著的数量变化是由于细菌细胞的大量繁殖,还是土壤 DNA 提取效率问题,目前仍不得而知。所以,未来仍需开发先进的技术方法,减少土壤中游离 DNA 的干扰,更加准确地表征土壤微生物多样性及其对干湿交替等环境干扰的响应和适应机制。

本研究中在门水平各处理的优势细菌类群是相同的,这与已有的古菌<sup>[32]</sup>研究结果一致,

反复的干湿交替并未显著影响水稻土古菌的主要类群组成。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,在短期的干湿交替培养条件下,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,如在加水恢复培养后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主要的微生物群落组成,如细菌的物种组成。我们推测本实验土壤中的微生物是其长期适应自然环境变化的演化产物。根据干湿交替过程中细菌 16S rRNA 基因的拷贝数的变化,发现细菌数量在 RNA 水平变化较小,因为土壤 RNA 降解快,所以 RNA 序列极可能来自完整的细菌细胞,表明这些细菌能够较好地适应水分胁迫。细菌群落组成的稳定性和细菌对水分胁迫的适应性暗示风干状态的土壤一定程度可以用于细菌群落组成的研究。

本研究的高通量测序结果表明,干湿交替对土壤细菌群落结构的影响显著,多次干湿交替改变了细菌群落各门类比,土壤细菌群落结构发生变化,这与刘奎等的研究相一致<sup>[33]</sup>。本研究条件下各处理水稻土的优势菌门为变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、放线菌门、硝化螺旋菌门、芽单胞菌门、浮霉菌门和厚壁菌门,这些菌群也常被认为是稻田土壤中常见的优势微生物<sup>[34]</sup>,干湿交替显著影响着上述菌门的丰度。在湿润-风干过程中,变形菌门(*Proteobacteria*)相对丰度在 DNA 和 RNA 水平显著减少,而在风干-湿润过程中,相对丰度显著增加,表明变形菌门(*Proteobacteria*)在土壤干湿交替过程中对水分胁迫的耐受性较弱。在 DNA 水平,酸杆菌门(*Acidobacteria*)相对丰度在湿润-风干过程中显著减少,在风干-湿润过程中显著增加,而在 RNA 水平无显著差异,表明

干湿交替对酸杆菌门(*Acidobacteria*)的数量有一定影响,但并没有影响其表达。此外,在 DNA 水平,芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)相对丰度在湿润-风干过程有降低趋势,在风干-湿润过程则出现增加趋势,而在 RNA 水平相对丰度变化规律相反,表明干湿交替过程对芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)数量有一定程度的影响,但并没有影响其活性的表达,细胞能够保持一定的完整性,并在适应水分胁迫的过程中大量表达。厚壁菌门(*Firmicutes*)在干湿交替过程中相对丰度的变化规律与芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)完全相反,在湿润-风干过程中,DNA 水平相对丰度有增加趋势,而在 RNA 水平则显著减少,表明厚壁菌门(*Firmicutes*)对水分胁迫有一定的耐受性,可能是干旱胁迫下,细菌的细胞分裂生长降低或者体积缩小,活性减弱,导致 RNA 转录水平降低<sup>[28-29]</sup>。

环境胁迫下水稻土部分菌属的反应有所不同,本研究中发现,湿润-风干过程中,在 DNA 水平,芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)相对丰度下降最显著,而 *Chelativorans* 相对丰度增加最显著。芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)是革兰氏阴性、兼性需氧型细菌,对生长环境要求相对较高,所以环境一旦恶化就表现出降低<sup>[35]</sup>。研究发现,水稻土中 *Chelativorans* 属于硝酸盐依赖性氧化细菌,具有维持生态系统氮素平衡、固碳等作用<sup>[36]</sup>,这些细菌在生物地球化学转化过程中具有很活跃的作用,推测这是其相对丰度在干湿交替过程中显著增加的原因。

## 4 结论

新鲜水稻土在 3 次风干、加水恢复循环培养过程中,在 DNA 和 RNA 水平,土壤细菌数量随水分的添加呈现增长的趋势,土壤细菌群落结构也发生了统计学明显变化。尽管优势菌

门和主要菌属的相对丰度发生显著性变化,但多次反复的干湿交替并未导致优势细菌类群发生不可逆转的死亡,表明土壤微生物具有极强的功能可塑性并能适应干旱胁迫,风干土壤在一定程度可用于微生物学研究。但干湿交替过程中,细菌绝对数量的指数级变化,以及优势类群相对丰度的变化,其具体的碳氮底物和水分胁迫机制,仍需深入研究,特别在单细胞水平准确刻画系统发育具有显著差异的微生物类群,解析其对水分胁迫的适应机制具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 雷文, Chares AL. 全球气候变化及其影响. 水科学进展, 2003, 14(5): 667-674.  
Lei W, Chares AL. Global climate change and its impacts. *Advances in Water Science*, 2003, 14(5): 667-674. (in Chinese)
- [2] Balsler TC, Firestone MK. Linking microbial community composition and soil processes in a California annual grassland and mixed-conifer forest. *Biogeochemistry*, 2005, 73(2): 395-415.
- [3] Birch HF. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant and Soil*, 1958, 10(1): 9-31.
- [4] Gao JQ, Feng J, Zhang XW, Yu FH, Xu XL, Kuzyakov Y. Drying-rewetting cycles alter carbon and nitrogen mineralization in litter-amended alpine wetland soil. *CATENA*, 2016, 145: 285-290.
- [5] Chen LF, He ZB, Zhao WZ, Kong JQ, Gao Y. Empirical evidence for microbial regulation of soil respiration in alpine forests. *Ecological Indicators*, 2021, 126: 107710.
- [6] Goncharova OY, Matyshak GV, Bobrik AA, Timofeeva MV, Sefilyan AR. Assessment of the contribution of root and microbial respiration to the total efflux of CO<sub>2</sub> from peat soils and podzols in the north of western Siberia by the method of component integration. *Eurasian Soil Science*, 2019, 52(2): 206-217.
- [7] Delsarte I, Cohen GJV, Momtbrun M, Höhener P, Atteia O. Soil carbon dioxide fluxes to atmosphere: the role of rainfall to control CO<sub>2</sub> transport. *Applied Geochemistry*, 2021, 127: 104854.

- [8] Ghezzehei TA, Sulman B, Arnold CL, Bogie NA, Berhe AA. On the role of soil water retention characteristic on aerobic microbial respiration. *Biogeosciences*, 2019, 16(6): 1187–1209.
- [9] Lee X, Wu H-J, Sigler J, Oishi C, Siccama T. Rapid and transient response of soil respiration to rain. *Global Change Biology*, 2004, 10(6): 1017–1026.
- [10] Sheik CS, Beasley WH, Elshahed MS, Zhou XH, Luo YQ, Krumholz LR. Effect of warming and drought on grassland microbial communities. *The ISME Journal*, 2011, 5(10): 1692–1700.
- [11] Sarto MVM, Borges WLB, Bassegio D, Pires CAB, Rice CW, Rosolem CA. Soil microbial community, enzyme activity, C and N stocks and soil aggregation as affected by land use and soil depth in a tropical climate region of Brazil. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(10): 2809–2824.
- [12] Clark JS, Campbell JH, Grizzle H, Acosta-Martinez V, Zak JC. Soil microbial community response to drought and precipitation variability in the Chihuahuan desert. *Microbial Ecology*, 2009, 57(2): 248–260.
- [13] 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.  
Lin JH, Li HX, Hu F, Zhao HY. Effects of rewetting on soil biota structure and nitrogen mineralization, nitrification in air-dried red soil. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(6): 924–930. (in Chinese)
- [14] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 2005, 309(5739): 1387–1390.
- [15] 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 of the United States of America*, 2012, 109(27): 10931–10936.
- [16] Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 2007, 1(4): 283–290.
- [17] Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, Dodsworth JA, Hedlund BP, Tsiamis G, Sievert SM, Liu WT, Eisen JA, Hallam SJ, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Rubin EM, Hugenholtz P, Woyke T. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 2013, 499(7459): 431–437.
- [18] Mettel C, Kim Y, Shrestha PM, Liesack W. Extraction of mRNA from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5995–6000.
- [19] 郭赞, 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.  
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)
- [20] 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.
- [21] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, 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, Yatsunenkov T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [22] Warren CR. Response of osmolytes in soil to drying and rewetting. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 70: 22–32.
- [23] Nagano H, Atarashi-Andoh M, Koarashi J. Effect of dry-wet cycles on carbon dioxide release from two different volcanic ash soils in a Japanese temperate forest. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2019, 65(5): 525–533.
- [24] Rahman MM. Carbon dioxide emission from soil. *Agricultural Research*, 2013, 2(2): 132–139.
- [25] Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, Cohen M, Goloubinoff P, Kaplan A, Mittler R. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *The Plant Journal*, 2002, 31(3): 319–330.
- [26] Pohlen E, Rütz NK, Ekschmitt K, Marxsen J. Recovery dynamics of prokaryotes and extracellular enzymes during sediment rewetting after desiccation. *Hydrobiologia*, 2018, 820(1): 255–266.
- [27] Bodegom P. Microbial maintenance: a critical review

- on its quantification. *Microbial Ecology*, 2007, 53(4): 513–523.
- [28] Sukenik A, Kaplan-Levy RN, Welch JM, Post AF. Massive multiplication of genome and ribosomes in dormant cells (akinetes) of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria). *The ISME Journal*, 2012, 6(3): 670–679.
- [29] Tamer YT, Toprak E. On the race to starvation: how do bacteria survive high doses of antibiotics? *Molecular Cell*, 2017, 68(6): 1019–1021.
- [30] Hamer U, Unger M, Makeschin F. Impact of air-drying and rewetting on PLFA profiles of soil microbial communities. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2007, 170(2): 259–264.
- [31] 谢志煌, 高志颖, 郭丽丽, 张锦源, 于镇华. 土壤微生物活性和生物量对干湿交替的响应. *土壤与作物*, 2020, 9(4): 348–354.  
Xie ZH, Gao ZY, Guo LL, Zhang JY, Yu ZH. Responses of soil microbial activities and biomass to drying and wetting—a review. *Soils and Crops*, 2020, 9(4): 348–354. (in Chinese)
- [32] 包丽君, 贾仲君. 模拟干湿交替对水稻土古菌群落结构的影响. *土壤学报*, 2017, 54(1): 191–203.  
Bao LJ, Jia ZJ. Changes of archaeal communities in a paddy soil under drying and re-wetting cycles. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(1): 191–203. (in Chinese)
- [33] 刘奎, 葛壮, 徐英德, 刘磊, 叶超, 李明, 赵博, 梁爱珍, 张彬, 汪景宽. 不同耕作方式下黑土微生物群落对干湿交替的响应. *土壤学报*, 2020, 57(1): 206–216.  
Liu K, Ge Z, Xu YD, Liu L, Ye C, Li M, Zhao B, Liang AZ, Zhang B, Wang JK. Responses of soil microbial community to drying-wetting alternation relative to tillage mode. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57(1): 206–216. (in Chinese)
- [34] Huang Q, Wang JL, Wang C, Wang Q. The 19-years inorganic fertilization increased bacterial diversity and altered bacterial community composition and potential functions in a paddy soil. *Applied Soil Ecology*, 2019, 144: 60–67.
- [35] 张慧敏, 郭慧娟, 侯振安. 不同盐碱胁迫对土壤细菌群落结构的影响. *新疆农业科学*, 2018, 55(6): 1074–1084.  
Zhang HM, Guo HJ, Hou ZA. Effects of saline and alkaline stress on soil bacterial community structure. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2018, 55(6): 1074–1084. (in Chinese)
- [36] Zhang MM, Li Z, Häggblom MM, Young L, Li FB, He ZJ, Lu GM, Xu R, Sun XX, Qiu L, Sun WM. Bacteria responsible for nitrate-dependent antimonite oxidation in antimony-contaminated paddy soil revealed by the combination of DNA-SIP and metagenomics. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 156: 108194.

(本文责编 李磊)