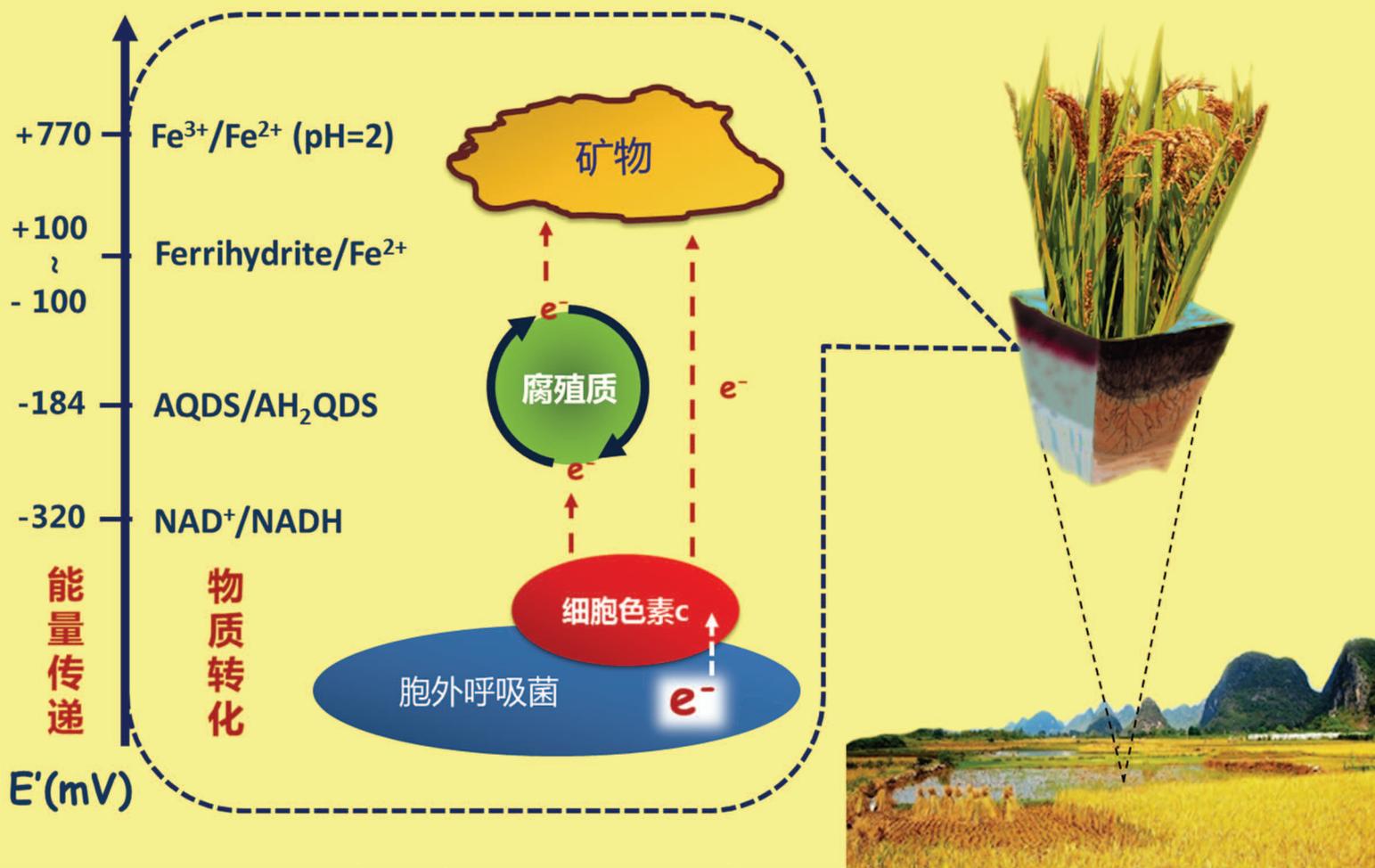


# Acta Pedologica Sinica 土壤学报

Turang Xuebao

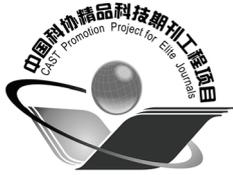


中国土壤学会 主办  
科学出版社 出版

2016

第53卷 第2期

Vol.53 No.2



# 土壤学报

(Turang Xuebao)



第 53 卷 第 2 期 2016 年 3 月

## 目 次

### 综述与评论

- 土壤微生物—腐殖质—矿物间的胞外电子传递机制研究进展····· 吴云当 李芳柏 刘同旭 (277)
- 长期施肥对农田土壤氮素关键转化过程的影响····· 王 敬 程 谊 蔡祖聪等 (292)

### 新视角与前沿

- 土壤学不应忽视对作物土传病原微生物的研究····· 蔡祖聪 黄新琦 (305)

### 研究论文

- 西安少陵塬黄土—古土壤序列S<sub>3</sub>剖面元素迁移及古气候意义····· 楚纯洁 赵景波 (311)
- 基于盲源分离的稀疏植被区土壤含盐量反演····· 刘 娅 潘贤章 石荣杰等 (322)
- 基于地类分层的土壤有机质光谱反演校正样本集的构建····· 刘艳芳 卢延年 郭 龙等 (332)
- 基于多分辨率遥感数据与随机森林算法的土壤有机质预测研究····· 王茵茵 齐雁冰 陈 洋等 (342)
- 鄂东南崩岗剖面土壤水分特征曲线及模拟····· 邓羽松 丁树文 蔡崇法等 (355)
- 放水冲刷对红壤坡面侵蚀过程及溶质迁移特征的影响····· 马美景 王军光 郭忠录等 (365)
- 汶川震区滑坡堆积体坡面土壤侵蚀率及水动力学参数研究····· 王仁新 何丙辉 李天阳等 (375)
- 咸水冻融灌溉对重度盐渍土壤水盐分布的影响····· 张 越 杨劲松 姚荣江 (388)
- 基于不同估算方法的贵州省土壤温度状况····· 陆晓辉 董宇博 涂成龙 (401)
- 拉萨灌丛草甸区土壤温度变化特征····· 巩玉玲 王兆锋 张德锂等 (411)
- 砂土和黏土的颗粒差异对土壤斥水性的影响····· 杨 松 吴珺华 董红艳等 (421)
- AQDS加速红壤性水稻土中DDT厌氧脱氯效应研究····· 刘翠英 王 壮 徐向华等 (427)
- 激发式秸秆深还对土壤养分和冬小麦产量的影响····· 赵金花 张丛志 张佳宝 (438)
- 臭氧污染对麦田土壤不同活性有机碳库的影响····· 寇太记 程相涵 张东亮等 (450)
- 黑土区水稻土有机氮组分及其对可矿化氮的贡献····· 丛耀辉 张玉玲 张玉龙等 (457)
- 水土保持措施对红壤缓坡地土壤活性有机碳及酶活性的影响····· 黄尚书 成艳红 钟义军等 (468)
- 祁连山青海云杉林叶片—枯落物—土壤的碳氮磷生态化学计量特征····· 赵维俊 刘贤德 金 铭等 (477)
- 基于核酸DNA/RNA同位素示踪技术的水稻土甲烷氧化微生物研究····· 郑 燕 贾仲君 (490)
- 适应玉米的溶磷细菌筛选及其对玉米生长的影响····· 梅新兰 闪安琪 蒋 益等 (502)
- 旱地红壤线虫群落对不同耕作年限的响应及指示意义····· 王明伟 刘雨迪 陈小云等 (510)
- 西藏“玉米田养鹅”模式下养分吸收与养分平衡特征····· 沙志鹏 张宇阳 王 超等 (523)
- 加工番茄连作对土壤理化性状及微生物量的影响····· 康亚龙 景 峰 孙文庆等 (533)

### 研究简报

- CTMAB对BS-12修饰膨润土的复配修饰模式····· 余 璐 孟昭福 李文斌等 (543)
- 不同机械改土方式对白浆土物理特性及酶活性的影响····· 孟庆英 张春峰 贾会彬等 (552)

### 信息

- 《土壤学报》2015年度审稿专家名录····· (560)

封面图片: 微生物胞外电子传递: 能量传递与物质转化 (由吴云当、李芳柏、刘同旭提供)

DOI: 10.11766/trxb201509020090

# 基于核酸DNA/RNA同位素示踪技术的水稻土甲烷氧化微生物研究\*

郑 燕<sup>1, 2</sup> 贾仲君<sup>2†</sup>

(1 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 郑州 450002)

(2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

**摘 要** 稳定性同位素示踪复杂土壤中微生物DNA/RNA的技术难点是<sup>13</sup>C-DNA/RNA的鉴定。本研究针对我国六种典型水稻土, 利用稳定性同位素<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>示踪活性的甲烷氧化菌, 超高速密度梯度离心获得不同浮力密度DNA/RNA后, 以甲烷氧化菌独有的*pmoA*功能基因和16S rRNA特异基因作为分子标靶, 通过半定量凝胶电泳技术评价了特异基因作为分子标靶判定<sup>13</sup>C-DNA/RNA的可行性, 进一步利用克隆文库技术研究水稻土中的活性甲烷氧化菌群落结构。结果表明: 甲烷氧化菌功能基因*pmoA*作为分子标靶, 能够准确鉴别<sup>13</sup>C-DNA, 而甲烷氧化菌特异的16S rRNA基因则能较好地地区分<sup>12</sup>C和<sup>13</sup>C标记的RNA, 但<sup>13</sup>C-RNA中的非目标微生物污染高于<sup>13</sup>C-DNA示踪技术。进一步以<sup>13</sup>C-DNA和<sup>13</sup>C-RNA为模板, 分别构建了*pmoA*和16S rRNA基因的克隆文库, 系统发育分析表明I型菌主导了土壤甲烷氧化过程, 其中江西鹰潭和黑龙江五常土壤中活性甲烷氧化菌全部属于Ia型, 而四川资阳、浙江嘉兴、江苏常熟和江都土壤中Ia型和Ib型甲烷氧化菌均有发现, 并且后者比例较低。这些结果表明分子标靶基因能够有效判定复杂土壤中的甲烷氧化菌<sup>13</sup>C-DNA/RNA, 在DNA和RNA水平的结果基本一致, 我国典型水稻土中活性甲烷氧化菌可能存在一定的地理分异规律。

**关键词** 水稻土; 好氧甲烷氧化; 稳定性同位素示踪DNA/RNA

**中图分类号** Q938 **文献标识码** A

甲烷是一种重要的温室气体, 稻田是大气甲烷的重要源。据估算, 稻田甲烷约占全球甲烷排放总量的10%<sup>[1]</sup>。微生物是稻田甲烷氧化的唯一生物源, 在稻田甲烷排放过程中发挥了重要作用<sup>[2]</sup>, 大约30%~90%稻田甲烷排放到大气前即被微生物氧化<sup>[3]</sup>。好氧甲烷氧化被认为是最主要的稻田甲烷氧化过程, 主要发生在表层土壤大约0~2 mm的微氧界面、水稻根际以及根际土壤有氧微域中<sup>[4-5]</sup>。

目前已知的甲烷氧化菌属于变形菌门(*Proteobacteria*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*), 但已有的报道表明疣微菌门仅存在于极端酸性环

境, 迄今尚未有稻田生态系统的相关报道<sup>[6]</sup>。根据形态、代谢途径、GC含量、磷脂脂肪酸组成以及细胞膜结构等特征, 已知的稻田甲烷氧化菌可分为I型(type I)和II型(type II), 其中I型菌可分为Ia(type Ia)和Ib(type Ib)类群<sup>[7]</sup>。近年来, 基于DNA/RNA序列分析的分子技术在稻田甲烷氧化研究中得到了广泛应用<sup>[8]</sup>, 特别是颗粒状单加氧酶(Particulate methane monooxygenase, pMMO)基因*pmoA*, 存在于除*Methylocella*之外所有的甲烷氧化菌, 常被用于甲烷氧化菌多样性的分子生态学研究<sup>[8]</sup>。此外, 由于甲烷氧化菌

\* 国家自然科学基金项目(41501276, 31270147)和中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB15040000)资助 Supported by the National Science Foundation of China (Nos. 41501276, 31270147) and the "Strategic Priority Research Program" of the Chinese Academy of Sciences (No. XDB15040000)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jia@issas.ac.cn

作者简介: 郑 燕(1986—), 女, 河南郑州人, 博士, 讲师, 主要从事微生物学研究

收稿日期: 2015-09-02; 收到修改稿日期: 2015-11-18

16S rRNA基因的系统发育亲缘关系与*pmoA*基本一致<sup>[9]</sup>，甲烷氧化菌的特异16S rRNA 基因也常被作为分子标靶开展生态学研究<sup>[8]</sup>。

然而，以往的稻田甲烷氧化微生物过程研究大多依赖于定性的线性耦合，即甲烷氧化速率与甲烷氧化微生物群落组成和数量变化之间的相关性分析<sup>[10-11]</sup>，很难将复杂土壤环境中甲烷氧化过程及其微生物作用者直接偶联。稳定性同位素核酸探针技术（DNA/RNA based stable isotope probing, DNA/RNA-SIP）则能有效地克服这一技术难点。2000年英国科学家发明了DNA-SIP技术，利用稳定性同位素示踪复杂森林土壤中甲醇同化微生物，将复杂环境中生态过程与微生物作用者直接联系<sup>[12]</sup>。随后科学家开发了RNA-SIP技术并成功应用于工业反应器中苯酚降解微生物研究<sup>[13]</sup>。目前，DNA/RNA-SIP已被广泛应用于复杂环境中重要过程的微生物作用者研究，但两种方法各有其优势<sup>[14-15]</sup>。DNA-SIP的优点是：标记的<sup>13</sup>C-DNA一定来自新产生的子代微生物细胞，是证明微生物生理生长并驱动生态过程的最直接证据；同时，DNA较为稳定，可以同时分析16S rRNA基因和功能基因，在分子水平上鉴定生态过程的微生物驱动者。RNA-SIP则无需微生物细胞的大量增殖，同时核糖体RNA特别是16S rRNA参与蛋白质合成并发挥重要作用，获得标记的<sup>13</sup>C-RNA则表明微生物

可能具有较强的活性。但这些分析大多来自理论推测，DNA和RNA-SIP技术各自的优缺点仍待深入研究。

我国稻谷产量世界第一，植稻面积世界第二，研究我国水稻土甲烷氧化过程中的微生物作用者，具有重要意义。据此，针对我国六种典型水稻土，围绕好氧甲烷氧化过程，利用稳定性同位素底物<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>示踪水稻土中好氧甲烷氧化菌核酸DNA/RNA，评价了DNA-SIP和rRNA-SIP研究土壤活性甲烷氧化菌的比较优势，揭示了水稻土好氧甲烷氧化过程的活性甲烷氧化菌群落结构，并为稳定性同位素示踪核酸技术研究复杂环境中微生物生理生态过程提供了技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

土壤样品采自中国典型水稻种植区，包括江西鹰潭（YT）、四川资阳（ZY）、浙江嘉兴（JX）、江苏常熟（CS）、江苏江都（JD）以及黑龙江五常（WC）。采集0~20 cm层新鲜土壤，研磨并过2 mm筛，然后将均一混合的新鲜土壤置于阴凉、干燥、通风的室温条件下风干直至土壤基本保持恒重。采样点的地理位置及土壤基本理化性质如表1所示。

表1 六种水稻土的地理位置和基本理化性质

Table 1 Physiochemical properties and geographic location of the six paddy soils

样品代号 Sample code	地理位置 Location		pH (H <sub>2</sub> O)	有机质 Organic matter (g kg <sup>-1</sup> )	全氮 Total N (g kg <sup>-1</sup> )	铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )
	N	E					
YT	28° 23'	116° 82'	5.41 ± 0.01	23.5 ± 0.1	1.28 ± 0.01	38.1 ± 4.0	1.42 ± 0.20
ZY	30° 05'	104° 34'	8.23 ± 0.04	30.4 ± 0.5	1.78 ± 0.01	39.1 ± 0.5	15.2 ± 0.1
JX	30° 38'	120° 46'	6.16 ± 0.10	32.5 ± 0.2	1.86 ± 0.02	65.9 ± 0.8	22.0 ± 0.4
CS	31° 56'	120° 71'	5.29 ± 0.02	28.4 ± 0.1	1.51 ± 0.01	2.88 ± 0.14	14.0 ± 0.1
JD	32° 35'	119° 42'	7.34 ± 0.21	35.4 ± 0.2	1.91 ± 0.03	9.18 ± 0.42	14.4 ± 0.2
WC	45° 10'	127° 00'	5.97 ± 0.06	21.9 ± 0.1	1.06 ± 0.02	4.17 ± 0.30	11.4 ± 0.2

注：YT，江西鹰潭；ZY，四川资阳；JX，浙江嘉兴；CS，江苏常熟；JD，江苏江都；WC，黑龙江五常。下同 Note: YT, Yingtan, Jiangxi; ZY, Ziyang, Sichuan; JX, JiaXing, Zhejiang; CS, ChangShu, Jiangsu; JD, Jiangdu, Jiangsu; WC, Wuchang, Heilongjiang. The same below

## 1.2 水稻土好氧甲烷氧化过程

原位土壤样品分析：称取相当于40 g干土的水稻土置于无菌封口袋中，添加适量无菌去离子水调节土壤含水量至最大持水量的30%，25℃预培养5 d，以此时的样品作为原位土壤样品。收集约5.0 g左右的土壤保存于-20℃，用于后续分子生物学分析。提取六种水稻土总DNA，并通过构建*pmoA*基因克隆文库分析原位土壤甲烷氧化菌群落结构组成。

SIP微宇宙培养：将相当于6.0 g干土的原位水稻土置于120 ml血清瓶中，加入适量无菌去离子水，调节土壤含水量至最大持水量的60%，丁基橡胶塞密封并用铝盖封口。设置<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>标记和<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>对照两个处理，每个处理3个重复。首先从密封培养瓶内移除1.2 ml的空气，然后注入等体积的<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>或<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>，以保持培养瓶内大气压维持稳定，并置于25℃恒温培养。血清瓶内初始CH<sub>4</sub>浓度约为400 μmol<sup>-1</sup> L (~10 000 ppmv)，动态监测培养瓶内甲烷浓度变化。第8天左右，当培养瓶内甲烷几乎全部被氧化后，结束实验并打开培养瓶破坏性采集土壤样品。收集大约3 g新鲜土壤，加入RNA<sub>later</sub> (Ambion, 美国)，然后置于-80℃保存，用于RNA提取。其余土壤样品保存于-20℃，用于DNA提取以及其他后续分析。

## 1.3 水稻土微生物核酸提取

土壤微生物核酸提取：采用FastDNA Spin Kit for Soil (MP Bio, 美国)试剂盒提取土壤微生物基因组DNA。称取0.5 g土样，根据说明书的操作步骤提取土壤微生物总DNA并溶解于100 μl无菌水中，置于-80℃保存备用。通过微量紫外分光光度计 (NanoDrop ND-1000, 美国)测定DNA浓度和纯度，同时利用1.2%的琼脂糖凝胶电泳分析DNA的完整性。对于土壤总RNA，参考以往文献报道的方法进行<sup>[16-17]</sup>。称取0.5 g土样置于2.0 ml带螺帽口的裂解管中，立即加入500 μl RNA<sub>later</sub>于4℃过夜保存后，离心去除RNA<sub>later</sub>；通过Bead-beating玻璃珠裂解微生物细胞方法；获得土壤总核酸，并将其溶解于50 μl DNase/RNase-free H<sub>2</sub>O，置于-80℃保存备用。利用Recombinant DNase I (TaKaRa, 日本)除去土壤总核酸DNA后，通过RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 德国)试剂盒纯化RNA。

土壤RNA纯度及可能的DNA污染检测：通过微

量紫外分光光度计 (NanoDrop ND-1000, 美国)测定RNA浓度和纯度，同时利用1.2%的琼脂糖凝胶电泳分析RNA的完整性。以纯化后的土壤微生物总RNA为模板，进一步利用微生物16S rRNA基因的通用引物 (515F: CCAGCMGCCGCGG/907R: CCGTCAATTCMTTTRAGTTT)进行PCR扩增，确保土壤总RNA中不存在DNA污染。16S rRNA基因的PCR扩增体系主要包括：0.25 μl TaKaRa Ex Taq HS (5 U μl<sup>-1</sup>)，5.0 μl 10× Ex Taq Buffer，4.0 μl dNTP Mixture (2.5 mmol L<sup>-1</sup>)，1.0 μl引物 (10 μmmol L<sup>-1</sup>)，1.0 μl DNA模板，加入灭菌水补足至50 μl反应体系。反转录PCR扩增的反应条件如下：50℃，30 min；94℃，2.0 min；30× (94℃，45 s；55℃，45 s；72℃，1 min)；72℃，10 min。

## 1.4 超高速密度梯度离心及<sup>13</sup>C-DNA/RNA的鉴别

DNA-SIP超高速密度梯度离心操作细节参考相关文献<sup>[18]</sup>。超高速密度梯度离心<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>标记处理和<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>对照处理的土壤总DNA后，以不同浮力密度DNA为模板，利用甲烷氧化菌特异引物 (A189F/mb661r)<sup>[19]</sup>PCR扩增*pmoA*功能基因，在完全一致的实验条件下开展琼脂糖凝胶电泳半定量分析，通过比较<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>标记处理和<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>对照处理不同浮力密度DNA中的*pmoA*基因PCR扩增产物的信号强度，鉴别<sup>13</sup>C-DNA。*pmoA*基因的PCR扩增体系主要包括：0.25 μl TaKaRa Ex Taq HS (5 U μl<sup>-1</sup>)，5.0 μl 10× Ex Taq Buffer，4.0 μl dNTP Mixture (2.5 mmol L<sup>-1</sup>)，1.0 μl引物 (10 μmmol L<sup>-1</sup>)，1.0 μl RNA模板，加入灭菌水补足至50 μl反应体系。PCR扩增的反应条件：94℃，5.0 min；30× (94℃，45 s；55℃，45 s；72℃，1 min)；72℃，10 min。

RNA-SIP的超高速密度梯度离心操作细节见相关文献<sup>[17, 20]</sup>。针对<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>标记处理和<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>对照处理的土壤总RNA，分别开展超高速密度梯度离心并获得不同浮力密度的RNA。进一步以不同浮力密度RNA为模板，采用好氧甲烷氧化菌16S rRNA基因引物 (type IF: ATGCTTAACACATGCAAGTCGAACG/type IR: CCACTGGTGTTCCTTCMGAT)<sup>[21]</sup>反转录并扩增好氧甲烷氧化菌16S rRNA，在完全一致的条件条件下开展琼脂糖凝胶电泳半定量分析，通过比较标记处理和对照处理不同浮力密度DNA中的甲烷氧化

菌16S rRNA基因PCR扩增产物的信号强度，鉴别 $^{13}\text{C}$ -RNA。好氧甲烷氧化菌16S rRNA的反转录扩增采用 One Step RNA PCR Kit (TaKaRa, 日本) 完成，反应体系包括：1.0  $\mu\text{l}$  AMV-Optimized Taq (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ )，1.0  $\mu\text{l}$  AMV RTase XL (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ )，1.0  $\mu\text{l}$  RNase Inhibitor (40 U  $\mu\text{l}^{-1}$ )，5.0  $\mu\text{l}$  10  $\times$  One step RNA PCR Buffer，10.0  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (20 mmol  $\text{L}^{-1}$ )，5.0  $\mu\text{l}$  dNTP Mixture (2.5 mmol  $\text{L}^{-1}$ )，1.0  $\mu\text{l}$  引物 (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ )，1.0  $\mu\text{l}$  RNA模板，加入DNase/RNase-free水补足至50  $\mu\text{l}$ 反应体系。反转录PCR扩增条件如下：50  $^{\circ}\text{C}$ ，30 min；94  $^{\circ}\text{C}$ ，2.0 min；30  $\times$  (94  $^{\circ}\text{C}$ ，45 s；60  $^{\circ}\text{C}$ ，45 s；72  $^{\circ}\text{C}$ ，1 min)；72  $^{\circ}\text{C}$ ，10 min。

### 1.5 水稻土甲烷氧化菌分子标靶基因的克隆文库和系统发育树构建

利用甲烷氧化菌特异引物 (A189F: GGNGA-CTGGGACTTCTGG /mb661r: CCGGMGC-AACGTCYTTACC) [19]，PCR扩增原位土壤微生物总DNA的甲烷氧化菌*pmoA*功能基因，*pmoA*基因的PCR扩增体系和反应条件如1.4所述。采用pEASY-T载体 (TransGen Biotech, 中国)，构建*pmoA*基因的克隆文库，测序25个左右阳性克隆。根据1.4各浮力密度DNA的*pmoA*基因琼脂糖凝胶电泳半定量分析结果，确定 $^{13}\text{C}$ -DNA所在的浮力密度区间，然后以 $^{13}\text{C}$ -DNA为模板，即 $^{13}\text{CH}_4$ 标记处理的重浮力密度梯度 (5~7层) DNA，构建*pmoA*基因 (A189F/mb661r) 的克隆文库，测序25个左右阳性克隆。

进一步以 $^{13}\text{C}$ -RNA为模板，即 $^{13}\text{CH}_4$ 标记处理和 $^{12}\text{CH}_4$ 对照处理重浮力密度梯度 (5~7层) RNA，利用微生物16S rRNA基因通用引物 (515F/907R) 进行反转录扩增并构建克隆文库，每层约挑取10个阳性克隆并测序。通过计算 $^{13}\text{CH}_4$ 标记处理和 $^{12}\text{CH}_4$ 对照处理RNA克隆文库中好氧甲烷氧化菌所占比例，推测甲烷氧化菌的 $^{13}\text{C}$ -RNA标记程度，并从中挑选出好氧甲烷氧化菌16S rRNA序列进行系统发育分析。

### 1.6 数据分析

所得的克隆序列在NCBI的GenBank中进行Blast比对分析，获得高度相似的同源基因序列，进一步采用MEGA6软件进行分析，按相似度97%对所有基因克隆子的序列进行操作分类单元 (Operating Taxonomic Unit, OTU) 分类，利用NJ

(Neighbor-Joining) 法建立系统发育树。所有数据采用Excel 2007和SPSS 16.0进行处理分析，处理之间的平均值差异采用One-Way ANOVA单因素方差分析， $p < 0.05$ 表示显著差异。所用图表均通过Origin 8软件 (OriginLab, 美国) 进行绘制。

## 2 结 果

### 2.1 六种典型水稻土甲烷氧化动力学规律

对于 $^{13}\text{C}$ -甲烷标记处理和 $^{12}\text{C}$ -甲烷对照处理，培养瓶内水稻土好氧甲烷氧化动力学规律基本一致，因此，采用两种处理共计6个重复的平均值表征土壤甲烷氧化过程。如图1所示，6种水稻土的 $^{13}\text{CH}_4$ 或 $^{12}\text{CH}_4$ 的初始甲烷浓度均约为400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ，所有培养瓶内外源添加的甲烷几乎全部被消耗，表明6种水稻土具有较强的好氧甲烷氧化能力。然而，不同水稻土甲烷氧化潜力具有明显的差异。其中江苏江都水稻土的甲烷氧化最快，在第4天即消耗了99%以上的甲烷；其次为黑龙江五常和江西鹰潭土壤，在第5天消耗了99%以上的甲烷；而浙江嘉兴、江苏常熟和四川资阳土壤分别在第6天、第7天和第8天消耗了99%以上的甲烷。

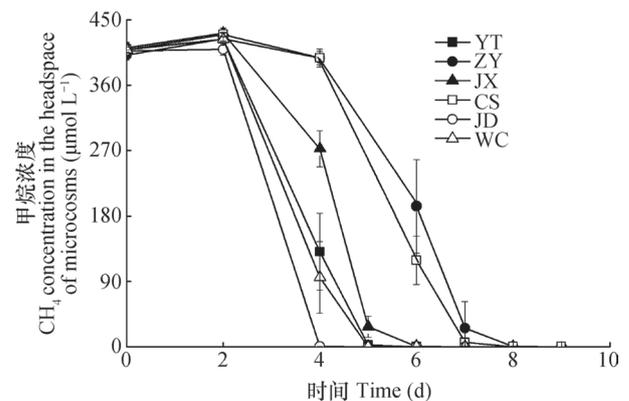
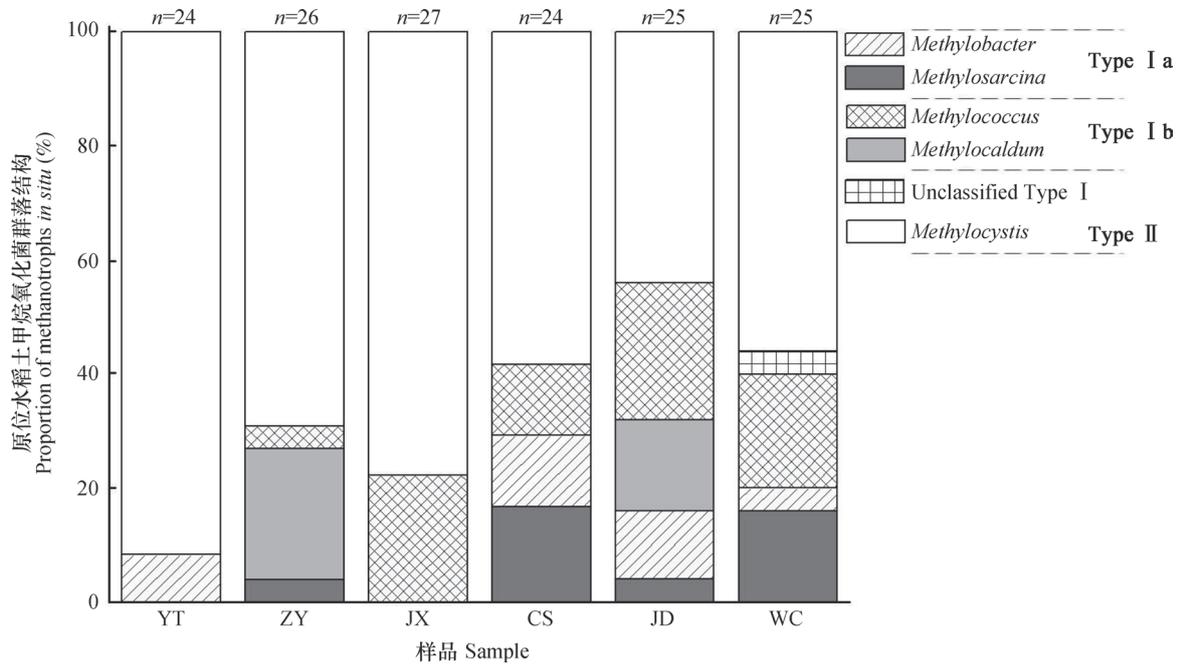


图1 六种典型水稻土的好氧甲烷氧化过程

Fig. 1 Dynamic changes of methane concentration in the headspace of soil microcosms incubated with  $\text{CH}_4$

### 2.2 原位水稻土好氧甲烷氧化菌的群落结构

以*pmoA*基因作为分子标靶的克隆文库和系统发育分析表明，虽然6种原位水稻土中的好氧甲烷氧化菌群落结构略有差异，但是均以II型甲烷氧化菌为主。尤其是*Methylocystis*属，在不同水稻土中占总好氧甲烷氧化菌的比例具有明显差异，由高到低分别为：91.7% (江苏鹰潭)、77.8%



注:  $n$ 代表克隆数量 Note:  $n$  represents the number of clones

图2 原位水稻土中好氧甲烷氧化菌的群落组成

Fig. 2 The community of methanotrophs based on the phylogenetic analysis of *pmoA* gene sequences from the paddy soils *in situ*

(浙江嘉兴)、69.2% (四川资阳)、58.3% (江苏常熟)、56.0% (黑龙江五常)、44.0% (江苏江都)。这些结果表明: 除江苏江都水稻土外, *Methylocystis* (II型) 是典型水稻土中的优势甲烷氧化菌。值得注意的是, 所有土壤中均未检测到另一大类II型甲烷氧化菌 *Methylosinus* (图2)。

### 2.3 水稻土中甲烷氧化菌 $^{13}\text{C}$ -DNA/RNA鉴别

超高速密度梯度离心获得不同浮力密度DNA后, 通过聚合酶链式反应PCR扩增甲烷氧化菌的特异功能基因 *pmoA*, 并利用琼脂糖凝胶电泳开展半定量分析 (图3a)。在重浮力密度DNA中 (5~7层),  $^{13}\text{C}$ -甲烷标记处理样品中发现了大量 *pmoA* 基因信号, 而在相同的位置 (5~7层) 中,  $^{12}\text{C}$ -甲烷对照处理样品未检测到明显的 *pmoA* 信号 (图3a)。相反, 在超高速密度梯度离心试管的上部 (9~11层),  $^{12}\text{C}$ -甲烷处理的不同浮力密度DNA中发现了大量的 *pmoA* 基因扩增产物。这些结果表明:  $^{13}\text{C}$ -甲烷标记处理土壤中的甲烷氧化菌快速生长并同化了大量的 $^{13}\text{C}$ 合成核酸DNA, 在超高速密度梯度离心过程中, 这些甲烷氧化菌的 $^{13}\text{C}$ -DNA与未标记的土壤总DNA分离并迁移聚集在试管下部的重浮力密度离心液中 (5~7层)。

类似于DNA分析, 针对 $^{13}\text{C}$ -甲烷标记处理和 $^{12}\text{C}$ -甲烷对照处理的不同浮力密度的RNA, 利用好氧甲烷氧化菌16S rRNA引物进行一步法反转录扩增 (One step RNA PCR kit) 并进行半定量凝胶电泳分析。结果表明 (图3b),  $^{13}\text{C}$ -标记处理的重浮力密度 (5~7层) RNA中好氧甲烷氧化菌16S rRNA信号明显强于 $^{12}\text{C}$ -对照处理, 说明好氧甲烷氧化菌利用 $^{13}\text{C}\text{H}_4$ 合成大量的核糖体 $^{13}\text{C}$ -RNA。在超高速密度梯度离心过程中, 这些标记的核酸分子随着浮力密度增加迁移至试管下部。然而, 有的样品 $^{12}\text{C}\text{H}_4$ 对照处理重层也发现微弱的好氧甲烷氧化菌16S rRNA信号 (图3b), 例如四川资阳以及江苏江都样品, 对 $^{13}\text{C}$ -RNA的鉴定造成干扰。为了进一步在rRNA水平研究好氧甲烷氧化菌的 $^{13}\text{C}$ 标记程度, 针对重浮力密度RNA (5~7层), 利用微生物16S rRNA基因通用引物 (515F/907R) 通过一步法反转录扩增RNA并构建克隆文库。结果表明 (表2), 6种水稻土 $^{12}\text{C}$ -对照处理重层的好氧甲烷氧化菌占有所有微生物的比例为0%~20%, 而 $^{13}\text{C}$ 标记处理中高达40~100%, 明显高于 $^{12}\text{C}$ -对照处理, 表明好氧甲烷氧化菌利用 $^{13}\text{C}$ 合成了大量核糖体RNA并被离心至试管下部。

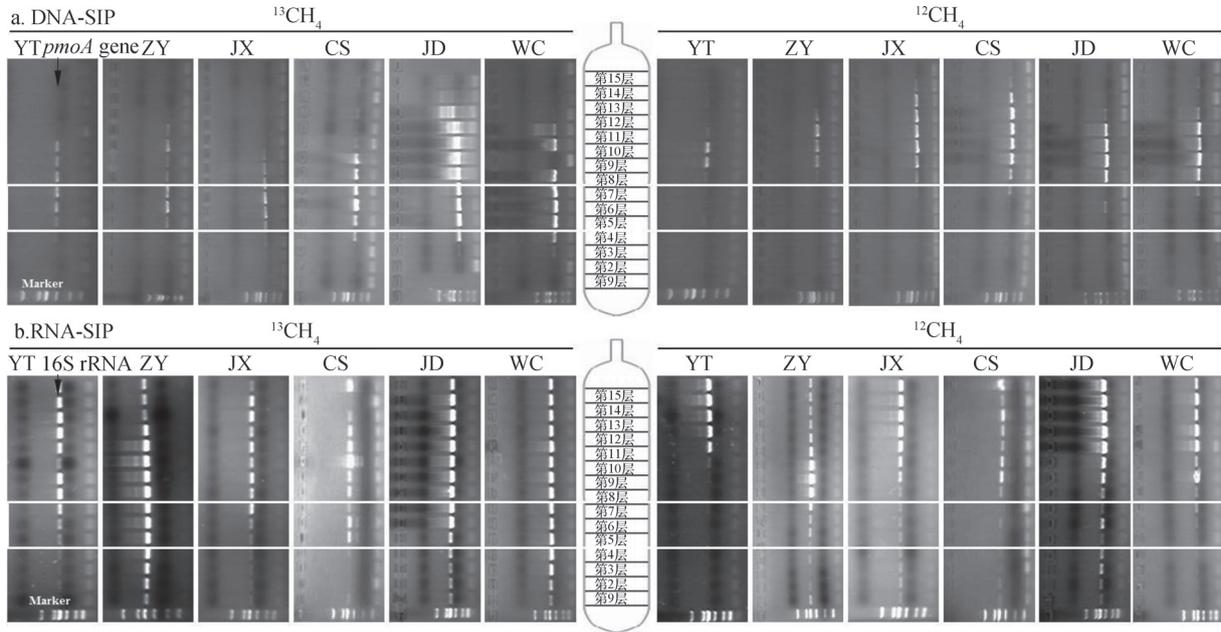


图3 好氧甲烷氧化菌功能基因 $pmoA$ 扩增产物 (a) 以及好氧甲烷氧化菌16S rRNA反转录扩增产物 (b) 分别在不同浮力密度DNA和RNA中的分布规律

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of  $pmoA$  gene amplicons (a) and methanotrophic 16S rRNA reverse transcription amplicons (b) from the ultracentrifuged DNA and RNA over the entire density range of SIP, respectively

表2  $^{13}\text{CH}_4$ 标记和 $^{12}\text{CH}_4$ 对照处理重浮力密度RNA中好氧甲烷氧化菌16S rRNA序列比例变化<sup>1)</sup>

Table 2 The percentage changes of methanotrophic 16S rRNA sequences in the 'heavy' RNA fractions from the microcosms incubated with  $^{13}\text{CH}_4$  and  $^{12}\text{CH}_4$

样品 Sample	浮力密度重层 Heavy fractions	16S rRNA克隆数 The numbers of 16S rRNA clones		好氧甲烷氧化菌占总细菌的比例 The relative abundance of MOB (%)	
		$^{13}\text{CH}_4$	$^{12}\text{CH}_4$	$^{13}\text{CH}_4$	$^{12}\text{CH}_4$
YT	5	10		80.0%	
	6	12	10	75.0%	10.0%
	7	10		40.0%	
ZY	5	8		87.5%	
	6	12	10	100.0%	20.0%
	7	6		83.3%	
JX	5	10		60.0%	
	6	10	10	80.0%	20.0%
	7	11		81.8%	
CS	6	20	19	50.0%	0.0%
	JD	5	11		80.0%
WC	6	9	9	80.0%	11.1%
	7	5		80.0%	
	5	9		77.8%	
	6	9	7	66.7%	14.3%
	7	10		60.0%	

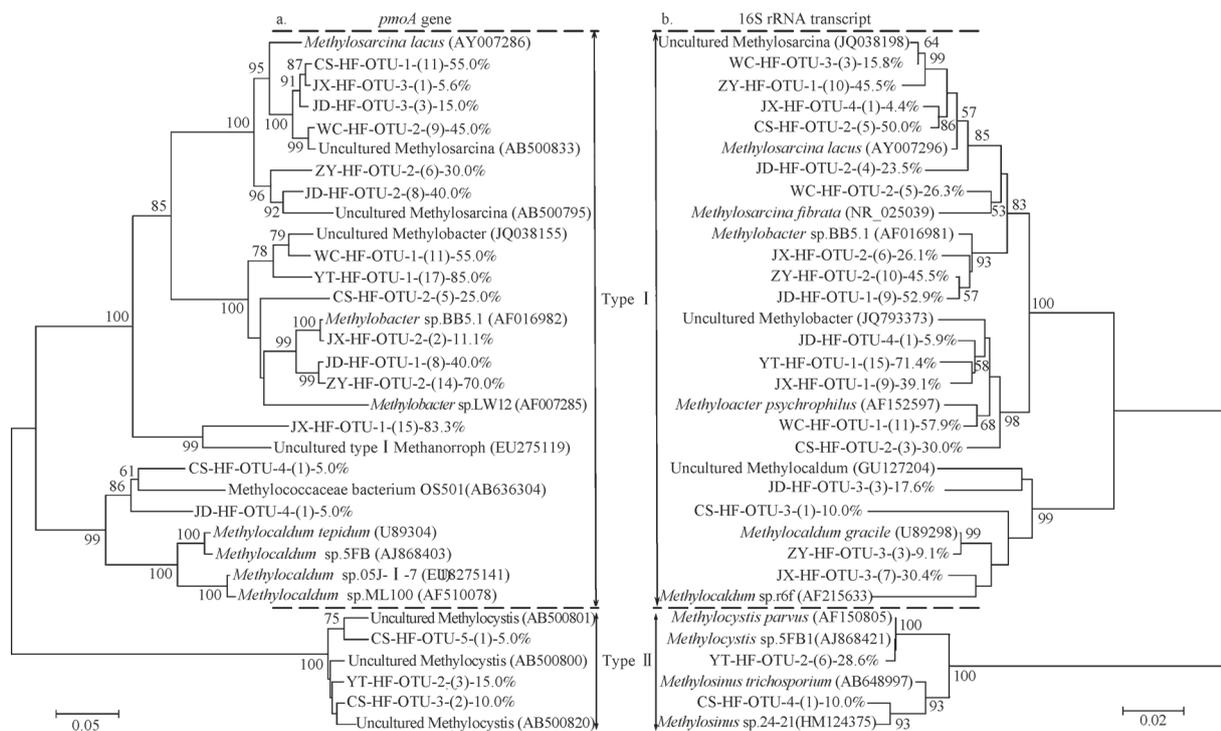
1) 数据来源于16S rRNA序列系统发育分析 The data was based on the phylogenetic relationship of 16S rRNA sequences

## 2.4 水稻土中活性甲烷氧化菌的系统发育地位

$^{13}\text{C}$ -*pmoA*基因序列的系统发育分析(图4a)表明,6种水稻土好氧甲烷氧化过程中活性甲烷氧化菌群落结构在属水平不同,但是所有样品中的活性甲烷氧化菌均以I型为主。如图5a所示,江西鹰潭土壤中,I型占总甲烷氧化菌群落的85.0%,且全部为Ia型*Methylobacter*;四川资阳土壤中,活性甲烷氧化菌均为Ia型,其中*Methylosarcina*和*Methylobacter*分别占30.0%和70.0%;浙江嘉兴土壤中,I型占总甲烷氧化菌群落结构的100%,其中Ia型*Methylosarcina*占5.6%,Ia型*Methylobacter*占11.1%,其余皆为unclassified的I型甲烷氧化菌;江苏常熟土壤中,I型甲烷氧化菌占总甲烷氧化菌群落结构的85.0%,其中55.0%属于Ia型*Methylosarcina*,25.0%属于Ia型*Methylobacter*,

5.0%属于Ib型*Methylocaldum*;江苏江都土壤中,活性甲烷氧化菌全部为I型,Ia型*Methylosarcina*和*Methylobacter*分别占55.0%和40.0%,其余5.0%属于Ib型*Methylocaldum*;黑龙江五常样品中,活性甲烷氧化菌全部为I型,Ia型*Methylosarcina*和*Methylobacter*分别占45.0%和55.0%。

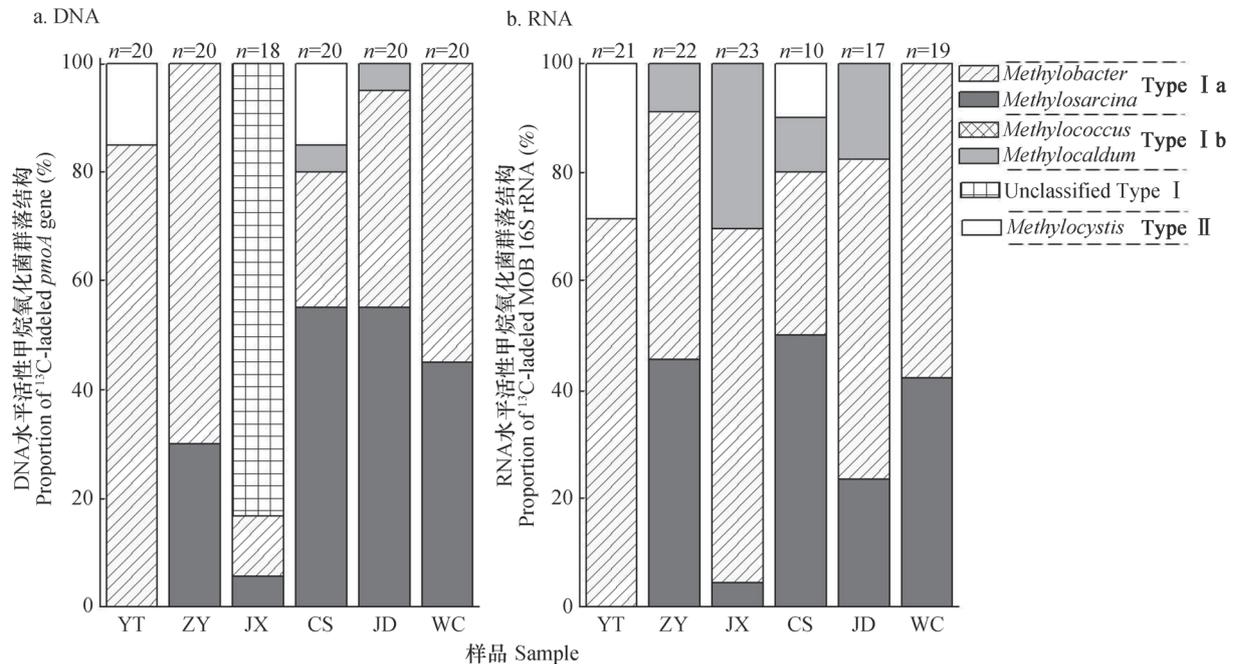
对 $^{13}\text{C}$ -rRNA进行16S rRNA基因的系统发育分析表明(图4b),基于 $^{13}\text{C}$ -16S rRNA基因的甲烷氧化细菌分类结果与 $^{13}\text{C}$ -*pmoA*基因一致,6种水稻土中的活性甲烷氧化优势菌均为I型微生物。如图5b所示,江西鹰潭土壤中,I型好氧甲烷氧化菌占总好氧甲烷氧化菌的比例高达71.4%,而且均可归为Ia型*Methylobacter*;四川资阳土壤中,活性好氧甲烷氧化菌均为I型好氧甲烷氧化菌,其中Ia型*Methylosarcina*和*Methylobacter*各占45.5%;浙



注:YT、ZY、JX、CS、JD和WC分别代表水稻土采样点,与表1所列相同;HF代表 $^{13}\text{C}$ -标记处理的重层核酸样品。如CS-HF-OTU-1-(11)-55.0%代表江苏常熟 $^{13}\text{C}$ -标记处理重层中OTU-1包含11个*pmoA*基因克隆序列,占克隆序列总数的55.0%。此外,OTU-1中的11个*pmoA*序列的相似度为97%。选取OTU中的代表性序列构建系统发育树,标尺长度代表2%的碱基变化比例 Note: The abbreviation of YT, ZY, JX, CS and JD refer to soil sampling site as shown in Table 1. HF denotes heavy fractions of the  $^{13}\text{C}$ -labeled DNA/RNA. The designation of CS-HF-OTU-1-(11)-55.0% in (a) indicates that OTU-1 contains 11 *pmoA* gene clones with sequence identify > 97% and accounts for 55.0% of total clone in  $^{13}\text{C}$ -labeled DNA from Chang-Shu (CS) paddy soil. The representative sequence from each OTU was extracted for tree construction, and the scale bar represents 2 changes per 100 nucleotide positions

图4 稳定性同位素 $^{13}\text{C}$ -DNA的甲烷氧化菌*pmoA*基因序列(a)和 $^{13}\text{C}$ -RNA的甲烷氧化菌16S rRNA基因序列(b)系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic relationship of *pmoA* gene sequences from the  $^{13}\text{C}$ -DNA (a) and methanotrophic 16S rRNA gene sequences from the  $^{13}\text{C}$ -RNA (b) to those in the GenBank



注：n代表克隆数量Note: n represents the number of clones

图5 DNA水平 (a) 和 RNA水平 (b) 活性甲烷氧化菌群落结构

Fig. 5 Active methanotrophic community based on the phylogenetic analysis of  $^{13}\text{C}$ -*pmoA* gene (a) and  $^{13}\text{C}$ -MOB 16S rRNA (b)

江嘉兴土壤中，所有的活性好氧甲烷氧化菌皆为 I 型微生物，其中4.4%属于Ia型*Methylosarcina*，65.2%属于Ia型*Methylobacter*，其余30.4%属于Ib型*Methylocaldum*；江苏常熟土壤中，I型好氧甲烷氧化菌占总好氧甲烷氧化菌比例的90.0%，其中50.0%属于Ia型*Methylosarcina*，30.0%属于Ia型*Methylobacter*，10.0%属于Ib型*Methylocaldum*；江苏江都土壤中，活性好氧甲烷氧化菌均为 I 型，其中 23.5%属于Ia型*Methylosarcina*，58.8%属于Ia型*Methylobacter*，17.6%属于Ib型*Methylocaldum*；黑龙江五常处理中，I型甲烷氧化菌组成了全部活性的好氧甲烷氧化菌，Ia型*Methylosarcina*和*Methylobacter*分别占42.1%和57.9%。

### 3 讨论

DNA/RNA-SIP的核心是：利用 $^{13}\text{C}$ 等稳定性同位素示踪微生物核酸DNA/RNA，揭示重要元素生物地球化学过程的活性微生物驱动者。但是，准确判定复杂环境样品中的 $^{13}\text{C}$ -DNA/RNA一直是技术难题<sup>[14-15]</sup>。针对六种典型水稻土中的微生物甲烷氧化过程，研究发现甲烷氧化菌特异基因16S rRNA或*pmoA*基因可作为分子标靶并鉴别 $^{13}\text{C}$ -DNA/

RNA，进一步的分子分析表明，六种水稻土中 $^{13}\text{C}$ -RNA和 $^{13}\text{C}$ -DNA的分析结果基本一致，I型甲烷氧化菌主导了微生物甲烷氧化过程，但6种水稻土中活性甲烷氧化菌群落结构略有差异。

通过与 $^{12}\text{C}$ - $\text{CH}_4$ 对照处理相比，在所有实验条件一致情况下，常规的PCR扩增和凝胶电泳分析甲烷氧化菌特异标靶基因，能够清楚识别 $^{13}\text{C}$ - $\text{CH}_4$ 标记处理土壤中的 $^{13}\text{C}$ -DNA/RNA。微宇宙培养实验结束后针对土壤总DNA/RNA进行超高速密度梯度离心， $^{13}\text{C}$ -标记处理重浮力密度中出现了明显的*pmoA*基因信号，表明土壤中活性甲烷氧化菌利用 $^{13}\text{C}$ - $\text{CH}_4$ 合成了细胞物质包括*pmoA*基因，这些标记的 $^{13}\text{C}$ -DNA在超高速离心过程中迁移至试管下部。针对RNA-SIP也到了类似的结果，如江西鹰潭 $^{12}\text{C}$ - $\text{CH}_4$ 处理土壤中，甲烷氧化菌16S rRNA特异基因在超高速离心试管下部的PCR信号几乎完全缺失。但值得注意的是，重浮力密度RNA的反转录PCR扩增结果表明，部分样品如四川资阳和江苏江都土壤， $^{12}\text{C}$ -对照处理的试管下部也能检测到一定的甲烷氧化菌16S rRNA基因信号。产生这一现象的原因可能是：(1) RNA容易形成二级结构，造成超高速离心分离不完全，某些非标记的 $^{12}\text{C}$ -RNA可能在超高速离心过程中进入试管下部，在重浮力密度中形

成rRNA背景污染<sup>[15]</sup>；(2) 甲烷氧化菌16S rRNA基因的引物特异性较低，它能够扩增大约20%左右的非好氧甲烷氧化菌<sup>[21]</sup>，在<sup>12</sup>C-对照处理重层形成造成非好氧甲烷氧化菌背景；(3) 培养时间过长，导致甲烷氧化菌快速生长，成为优势种群，在整体微生物群落中占比较高，其RNA转录子大量增加，极易在离心试管内部形成背景污染。

在本研究中，DNA-SIP在重层非标记的背景污染明显低于rRNA-SIP，DNA-SIP更适于对好氧甲烷氧化菌的<sup>13</sup>C-核酸进行鉴定，更清晰地反映了好氧甲烷氧化过程中功能微生物对<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>的利用情况。DNA-SIP和RNA-SIP的比较分析表明后者更为灵敏，更适合短时间、低浓度底物的培养研究。理论上而言，rRNA的合成不依赖于细胞分裂，rRNA的合成与微生物活性之间的相关性优于DNA，较DNA更灵敏地反映微生物生理生态过程<sup>[13]</sup>。以往对16S rRNA反转录产物和16S rRNA基因的高通量测序研究结果表明，400 μmol L<sup>-1</sup>甲烷培养后好氧甲烷氧化菌的16S rRNA的增长量是16S rRNA基因的4倍~5倍<sup>[17]</sup>。但RNA操作复杂，特别是mRNA降解时间最短仅为几秒，因此超高速离心后如何鉴别<sup>13</sup>C-RNA是一个难点。针对这一问题，我们提出了甲烷氧化菌特异16S rRNA基因作为分子标靶的鉴定策略，并通过反转录PCR和琼脂糖凝胶电泳分析发现其具有较强的可行性。这些结果表明，由于rRNA合成不依赖于细胞裂殖，因此rRNA-SIP理论而言具有更高的检测灵敏度，但同时也可能带来较高的背景污染。同时，DNA-SIP也具有不可替代的优势，当复杂环境中细胞发生分裂、繁殖并产生子代的同时，一定具有较强的生理活性。换言之，<sup>13</sup>C-DNA的存在必然伴随着细胞的分裂和标记底物的同化利用，是微生物活性的直接证据。因此，如本研究所示，在重浮力密度DNA中如能检测到较强的*pmoA*基因的PCR信号，就表明这些微生物一定发生了作用，其DNA通过超高速离心迁移至试管下部<sup>[14]</sup>。未来研究应根据实验目的，结合DNA-SIP和RNA-SIP的特点，优化试验设计并采取合理的策略开展研究。

基于*pmoA*功能基因分析表明，6种水稻土在原位条件下均以II型甲烷氧化菌为主，尤其是II型*Methylocystis*（图2），这一结果与已有的甲烷氧化菌地理分布规律一致。Lüke等<sup>[22]</sup>利用DNA高通量测序技术研究印尼、越南、中国以及意大利

等世界上主要水稻种植产地的20种水稻土好氧甲烷氧化菌，发现II型*Methylocystis/Methylosinus*是优势菌群，并且*Methylocystis*的丰度明显高于*Methylosinus*。有研究者认为II型甲烷氧化菌具有K-选择的生存策略，能够更好地适应资源有限的生存环境<sup>[23-24]</sup>。事实上，大量研究表明*Methylocystis*属的II型甲烷氧化菌具有高甲烷亲和力的甲烷单加氧酶，能够在甲烷浓度较低的环境下发挥作用<sup>[25]</sup>。也有研究发现，与II型甲烷氧化菌相比，原生动物的更倾向于以I型为食，这可能也是导致原位大田条件下II型为主导甲烷氧化菌群的原因之一<sup>[26]</sup>。Steenbergh等<sup>[24]</sup>认为II型甲烷氧化菌自身具有固氮能力，较I型更适合在贫营养条件下生存，同时II型甲烷氧化菌在不利的环境条件下会形成休眠状态以避免死亡。在原位水稻土中，甲烷浓度通常较低，因此，II型甲烷氧化菌可能在长期适应低甲烷浓度过程中，成为优势群落。

已有的大量报道表明I型甲烷氧化菌具有r-生长策略，在外源甲烷供应充足条件下，能够迅速成为优势甲烷菌<sup>[23-24]</sup>。*pmoA*功能基因（DNA-SIP）和16S rRNA（RNA-SIP）的分析结果基本一致，与原位水稻土甲烷氧化菌群落结构相比，高浓度甲烷（~10 000 ppmv）培养后的活性甲烷氧化菌群落结构发生显著变化（图4，图5）。6种水稻土中活性甲烷氧化菌均以I型为主，其中四川资阳、浙江嘉兴、江苏江都和黑龙江五常水稻土中活性好氧甲烷氧化菌全部为I型，并且Ia型甲烷氧化菌的作用更加明显。Cébron等<sup>[27]</sup>报道了类似结果，利用DNA-SIP发现I型好氧甲烷氧化菌是参与水稻土好氧甲烷氧化的主要功能微生物。Horz等<sup>[11]</sup>通过研究水稻根际甲烷氧化菌群落动态变化规律，推测I型好氧甲烷氧化菌适宜在营养源充足的环境中生长并成为优势菌群。纯培养实验则进一步发现，与II型好氧甲烷氧化菌相比，I型好氧甲烷氧化菌碳同化途径更加高效，在碳源充足的条件下细胞分裂繁殖更快<sup>[28-30]</sup>。这与I型甲烷氧化菌的生存策略倾向于r-选择的理论吻合<sup>[23]</sup>。

## 4 结 论

采用甲烷氧化菌特有的功能基因*pmoA*或特异的16S rRNA基因作为分子标靶，结合常规PCR和琼脂糖凝胶电泳技术，能够准确鉴别SIP研究

中的<sup>13</sup>C-DNA/RNA并用于后续分析。在原位条件下，6种水稻土中的优势甲烷氧化菌落均为II型 *Methylocystis*，与II型甲烷氧化菌K-生存策略相吻合，能更好地适应寡营养环境；然而，在室内高浓度甲烷培养（400 μmol L<sup>-1</sup>）条件下，I型甲烷氧化菌迅速成为优势菌群并主导了水稻土甲烷氧化过程，但在微生物分类学属的水平，6种水稻土中I型甲烷氧化菌群落结构仍然具有显著差异。本实验中尽管发现I型甲烷氧化菌被<sup>13</sup>C标记，但这一结果在田间原位条件下是否具有一定普适性，仍需进一步的研究。未来仍需发展高度灵敏的原位观测技术，准确甄别稻田生态系统中不同类群甲烷氧化菌的作用。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Bodelier P L E. Interactions between nitrogenous fertilizers and methane cycling in wetland and upland soils. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2011, 3 ( 5 ) : 379—388
- [ 2 ] 闵航, 陈中云, 陈美慈. 水稻田土壤甲烷氧化活性及其环境影响因子的研究. *土壤学报*, 2002, 39 ( 5 ) : 686—692  
Min H, Chen Z Y, Chen M C. Effect of environmental factors on methane-oxidizing activity in paddy soil ( In Chinese ). *Acta Pedologica Sinica*, 2002, 39 ( 5 ) : 686—692
- [ 3 ] Henckel T, Roslev P, Conrad R. Effects of O<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environmental Microbiology*, 2000, 2 ( 6 ) : 666—679
- [ 4 ] Liesack W, Schnell S, Revsbech N P. Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24 ( 5 ) : 625—645
- [ 5 ] Ratering S, Schnell S. Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. *Biogeochemistry*, 2000, 48 ( 3 ) : 341—365
- [ 6 ] Dunfield P F, Yuryev A, Senin P, et al. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. *Nature*, 2007, 450 ( 7171 ) : 879—882
- [ 7 ] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 1996, 60 ( 2 ) : 439—471
- [ 8 ] McDonald I R, Bodrossy L, Chen Y, et al. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 ( 5 ) : 1305—1315
- [ 9 ] Kolb S, Knief C, Stubner S, et al. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 ( 5 ) : 2423—2429
- [ 10 ] Groot T, van Bodegom P, Harren F, et al. Quantification of methane oxidation in the rice rhizosphere using <sup>13</sup>C-labelled methane. *Biogeochemistry*, 2003, 64 ( 3 ) : 355—372
- [ 11 ] Horz H P, Yimga M T, Liesack W. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 ( 9 ) : 4177—4185
- [ 12 ] Radajewski S, Ineson P, Parekh N R, et al. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403 ( 6770 ) : 646—649
- [ 13 ] Manefield M, Whiteley A S, Griffiths R I, et al. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 ( 11 ) : 5367—5373
- [ 14 ] Dumont M G, Pommerenke B, Casper P, et al. DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. *Environmental Microbiology*, 2011, 13 ( 5 ) : 1153—1167
- [ 15 ] Lueders T, Wagner B, Claus P, et al. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, 2004, 6 ( 1 ) : 60—72
- [ 16 ] Mettel C, Kim Y, Shrestha P M, et al. Extraction of mRNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 ( 17 ) : 5995—6000
- [ 17 ] 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  
Zheng Y, Jia Z J. Next generation sequencing and stable isotope probing of active microorganisms responsible for aerobic methane oxidation in red paddy soils ( In Chinese ). *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 ( 2 ) : 173—184
- [ 18 ] 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.  
Jia Z J. Principle and application of DNA-based stable isotope probing ( In Chinese ). *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 ( 12 ) : 1585—1594
- [ 19 ] Costello A M, Lidstrom M E. Molecular characterization

- of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 ( 11 ) : 5066—5074
- [ 20 ] Manefield M, Whiteley A S, Ostle N, et al. Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: An approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, 16 ( 23 ) : 2179—2183
- [ 21 ] Chen Y, Dumont M G, Cebon A, et al. Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 ( 11 ) : 2855—2869
- [ 22 ] Lüke C, Frenzel P, Ho A, et al. Macroecology of methane-oxidizing bacteria: the beta-diversity of *pmoA* genotypes in tropical and subtropical rice paddies. *Environmental Microbiology*, 2014, 16 ( 1 ) : 72—83
- [ 23 ] Ho A, Kerckhof F M, Luke C, et al. Conceptualizing functional traits and ecological characteristics of methane-oxidizing bacteria as life strategies. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5 ( 3 ) : 335—345
- [ 24 ] Steenbergh A K, Meima M M, Kamst M, et al. Biphasic kinetics of a methanotrophic community is a combination of growth and increased activity per cell. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71 ( 1 ) : 12—22
- [ 25 ] Baani M, Liesack W. Two isozymes of particulate methane monoxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. strain SC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 ( 29 ) : 10203—10208
- [ 26 ] Murase J, Frenzel P. Selective grazing of methanotrophs by protozoa in a rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65 ( 3 ) : 408—414
- [ 27 ] Cebon A, Bodrossy L, Stralis-Pavese N, et al. Nutrient amendments in soil DNA stable isotope probing experiments reduce the observed methanotroph diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 ( 3 ) : 798—807
- [ 28 ] de Vries G E, K ü e s U, Stahl U. Physiology and genetics of methylotrophic bacteria. *FEMS microbiology Letters*, 1990, 75 ( 1 ) : 57—101
- [ 29 ] Graham D W, Chaudhary J A, Hanson R S, et al. Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism, continuous-flow reactors. *Microbial Ecology*, 1993, 25 ( 1 ) : 1—17
- [ 30 ] Macalady J L, McMillan A M S, Dickens A F, et al. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. *Environmental Microbiology*, 2002, 4 ( 3 ) : 148—157

## The Application of Biomarker Genes for DNA/RNA-Stable Isotope Probing of Active Methanotrophs Responsible for Aerobic Methane Oxidation in Six Paddy Soils

ZHENG Yan<sup>1, 2</sup> JIA Zhongjun<sup>2†</sup>

( 1 College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China )

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

**Abstract** Rice fields are major source of atmospheric methane ( CH<sub>4</sub> ). However, 30% ~ 90% of CH<sub>4</sub> produced in paddy soils is oxidized by methanotrophs before it escapes to the atmosphere. China holds the largest rice production in the world, but it remains largely unknown about the active methane oxidizers in paddy soils. In this study, soil microcosms of six paddy soil incubated with <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> were constructed to assess active methanotrophs by tracing the isotopically labeled <sup>13</sup>C-DNA/RNA. Six paddy soils collected from Yingtan City of Jiangxi Province ( YT ), Ziyang City of Sichuan Province ( ZY ), Jiaying City of Zhejiang Province ( JX ), Changshu City of Jiangsu Province ( CS ), Yangzhou City of Jiangsu Province ( YZ ), and Wuchang City of Heilongjiang Province ( WC ), were incubated with 400 μmol<sup>-1</sup> L labeled <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> or unlabeled <sup>12</sup>CH<sub>4</sub> to determine aerobic methane oxidation kinetics. The destructive sampling was conducted

when  $400 \mu\text{mol}^{-1} \text{L CH}_4$  was consumed.  $^{13}\text{C}$ -DNA and  $^{13}\text{C}$ -RNA were obtained through ultracentrifugation of total DNA and RNA, respectively. Clone library of *pmoA* genes from  $^{13}\text{C}$ -DNA and 16S rRNA genes from  $^{13}\text{C}$ -RNA were constructed to analyze composition of active methanotrophic community. After ultracentrifugation of total DNA and RNA, the agarose gel electrophoresis of *pmoA* gene amplicons and methanotrophic 16S rRNA reverse transcription amplicons from the fractionated DNA and rRNA, respectively, were performed, indicating the incorporation of  $^{13}\text{C}$ -substrate into methanotrophs during the aerobic methane oxidation. DNA-SIP and rRNA-SIP each have their advantages. In contrast to DNA, the incorporation of labeled substrate into rRNA is much faster, and a greater unspecific background of 'heavy' nucleic acid was observed in 'heavy' fractions in rRNA-SIP than DNA-SIP, indicating the more efficient separation for DNA. The separation of differentially labeled rRNA was effective, however, it was not as quantitative as for DNA. This resulted in a greater unspecific background of 'heavy' rRNA in 'light' fractions, which may be caused by their strong tendency to form secondary structure. Phylogenetic analysis of *pmoA* gene from total DNA of background paddy soils indicated that dominant methanotrophs *in situ* were type II in six paddy soils. It may be explained by the fact that type II methanotrophs can be better adapted to oligotrophic environments. Interestingly, consistent results were obtained from both clone libraries of *pmoA* genes from  $^{13}\text{C}$ -DNA and methanotrophic 16S rRNA transcripts from  $^{13}\text{C}$ -RNA, indicating that type I methanotrophs dominated active aerobic methane oxidation in the six paddy soils. All type I was composed of type Ia in YT and WC sample, whereas type I was composed of Ia and Ib in ZY, JX, CS and JD sample. The fast growth found for type I methanotrophs are in agree with a *r*-strategy lifestyle. Sufficient available nutrient e.g.  $\text{CH}_4$  may be prerequisite for the proliferation of type I methanotrophs. Phylogenetic analysis of *pmoA* gene from  $^{13}\text{C}$ -DNA and 16S rRNA transcript from  $^{13}\text{C}$ -rRNA revealed that the active methanotrophs responsible for aerobic methane oxidation in six paddy soils were type I. The results indicated that methanotroph-specific 16S rRNA and *pmoA* genes can be of great help for identification of  $^{13}\text{C}$ -DNA/RNA from methanotrophs grown on the labeled substrates.

**Key words** Paddy soils; Aerobic methane oxidation; DNA/RNA-Stable Isotope Probing

(责任编辑: 卢 萍)

CONTENTS

**Reviews and Comments**

- Mechanism of Extracellular Electron Transfer among Microbe-Humic-Mineral in Soils: A Review ..... WU Yundang, LI Fangbai, LIU Tongxu ( 290 )  
 Effects of Long-term Fertilization on Key Processes of Soil Nitrogen Cycling in Agricultural Soil: A Review ..... WANG Jing, CHENG Yi, CAI Zucong, et al. ( 303 )

**Insights and Perspectives**

- Soil-borne Pathogens Should not Be Ignored by Soil Science ..... CAI Zucong, HUANG Xinqi ( 310 )

**Research Articles**

- Element Migration in S<sub>3</sub> Profile of the Shaolingyuan Loess-Paleosol Sequence in Xi'an and Its Paleoclimatic Implication ..... CHU Chunjie, ZHAO Jingbo ( 320 )  
 Estimation of Soil Salt Content over Partially Vegetated Areas Based on Blind Source Separation ..... LIU Ya, PAN Xianzhang, SHI Rongjie, et al. ( 330 )  
 Construction of Calibration Set based on the Land Use Types in Visible and Near-Infrared ( VIS-NIR) Model for Soil Organic Matter Estimation ..... LIU Yanfang, LU Yannian, GUO Long, et al. ( 340 )  
 Prediction of Soil Organic Matter based on Multi-resolution Remote Sensing Data and Random Forest Algorithm ..... WANG Yinyin, QI Yanbing, CHEN Yang, et al. ( 353 )  
 Characteristic Curves and Model Analysis of Soil Moisture in Collapse Mound Profiles in Southeast Hubei ..... DENG Yusong, DING Shuwen, CAI Chongfa, et al. ( 363 )  
 Research on Sediment and Solute Transport on Red Soil Slope under Simultaneous Influence of Scouring Flow ..... MA Meijing, WANG Junguang, GUO Zhonglu, et al. ( 373 )  
 Research on Soil Erosion Rate and Hydrodynamic Parameters of Landslide Accumulation Slope in Wenchuan Earthquake Area ..... WANG Renxin, HE Binghui, LI Tianyang, et al. ( 386 )  
 Effects of Saline Ice Water Irrigation on Distribution of Moisture and Salt Content in Coastal Saline Soil ..... ZHANG Yue, YANG Jingsong, YAO Rongjiang ( 399 )  
 Soil Temperature Regime in Guizhou Province Relative to Assessment Method ..... LU Xiaohui, DONG Yubo, TU Chenglong ( 409 )  
 Characteristics of Variation of Soil Temperature in Shrub Meadow Area of Lhasa ..... GONG Yuling, WANG Zhaofeng, ZHANG Yili, et al. ( 419 )  
 Soil Water Repellency of Sands and Clay as Affected by Particle Size ..... YANG Song, WU Junhua, DONG Hongyan, et al. ( 426 )  
 Effect of AQDS Accelerating Anaerobic Dechlorination of DDT in Hydragric Acrisols ..... LIU Cuiying, WANG Zhuang, XU Xianghua, et al. ( 436 )  
 Effect of Straw Returning via Deep Burial Coupled with Application of Fertilizer as Primer on Soil Nutrients and Winter Wheat Yield ..... ZHAO Jinhua, ZHANG Congzhi, ZHANG Jiabao ( 448 )  
 Effects of Ozone Pollution on Different Active Organic Carbon Stocks in Wheat Farmland Soil ..... KOU Taiji, CHENG Xianghan, ZHANG Dongliang, et al. ( 455 )  
 Soil Organic Nitrogen Components and Their Contributions to Mineralizable Nitrogen in Paddy Soil of the Black Soil Region ..... CONG Yaohui, ZHANG Yuling, ZHANG Yulong, et al. ( 466 )  
 Effects of Soil and Water Conservation Measures on Soil Labile Organic Carbon and Soil Enzyme Activity in Gentle Slope Land of Red Soil ..... HUANG Shangshu, CHENG Yanhong, ZHONG Yijun, et al. ( 475 )  
 Ecological Stoichiometric Characteristics of Carbon, Nitrogen and Phosphorus in Leaf-Litter-Soil System of *Picea Crassifolia* Forest in the Qilian Mountains ..... ZHAO Weijun, LIU Xiande, JIN Ming, et al. ( 488 )  
 The Application of Biomarker Genes for DNA/RNA-Stable Isotope Probing of Active Methanotrophs Responsible for Aerobic Methane Oxidation in Six Paddy Soils ..... ZHENG Yan, JIA Zhongjun ( 500 )  
 Screening of Phosphate-solubilizing Bacteria Adaptable to Corn and Effects of the Bacteria on the Growth of Corn ..... MEI Xinlan, SHAN Anqi, JIANG Yi, et al. ( 508 )  
 Response of Soil Nematode Community to Cultivation in Upland Red Soil Relative to Cultivation History and Its Significance as Indicator ..... WANG Mingwei, LIU Yudi, CHEN Xiaoyun, et al. ( 521 )  
 Nutrient Absorption and Nutrient Balance in an Agro-pastoral Compound Production Pattern of "Raising Geese in Corn Fields" in Tibet ..... SHA Zhipeng, ZHANG Yuyang, WANG Chao, et al. ( 531 )  
 Effects of Continuous Cropping of Processing Tomato on Physical-chemical Properties of and Microbial Biomass in the Soil ..... KANG Yalong, JING Feng, SUN Wenqing, et al. ( 542 )

**Research Notes**

- Mechanism of CTMAB Modifying BS-12 Modified Bentonite ..... YU Lu, MENG Zhaofu, LI Wenbin, et al. ( 550 )  
 Effects of Mechanical Soil Amelioration Method on Physical Properties of and Enzyme Activity in Planosol ..... MENG Qingying, ZHANG Chunfeng, JIA Huibin, et al. ( 559 )

**Cover Picture:** Microbial Extracellular Electron Transfer: Energy Transfer and Substance Transformation ( by WU Yundang, LI Fangbai, LIU Tongxu )

# 《土壤学报》编辑委员会

主 编：史学正

执行编委：(按姓氏笔画为序)

丁维新	巨晓棠	王敬国	王朝辉	史 舟	宇万太	朱永官
李永涛	李芳柏	李保国	李 航	吴金水	沈其荣	张玉龙
张甘霖	张福锁	陈德明	邵明安	杨劲松	杨明义	杨林章
林先贵	依艳丽	周东美	周健民	金继运	逢焕成	胡 锋
施卫明	骆永明	赵小敏	贾仲君	徐国华	徐明岗	徐建明
崔中利	常志州	黄巧云	章明奎	蒋 新	彭新华	雷 梅
窦 森	廖宗文	蔡祖聪	蔡崇法	潘根兴	魏朝富	

编辑部主任：陈德明

责任编辑：卢 萍 檀满枝 陈荣府

## 土 壤 学 报

### Turang Xuebao

(双月刊, 1948年创刊)

第 53 卷 第 2 期 2016 年 3 月

## ACTA PEDOLOGICA SINICA

(Bimonthly, Started in 1948)

Vol. 53 No. 2 Mar., 2016

编 辑 《土壤学报》编辑委员会  
地址：南京市北京东路 71 号 邮政编码：210008  
电话：025 - 86881237  
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

Edited by Editorial Board of Acta Pedologica Sinica  
Add: 71 East Beijing Road, Nanjing 210008, China  
Tel: 025 - 86881237  
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

主 编 史 学 正  
主 管 中 国 科 学 院  
主 办 中 国 土 壤 学 会  
承 办 中国科学院南京土壤研究所

Editor-in-Chief Shi Xuezheng  
Superintended by Chinese Academy of Sciences  
Sponsored by Soil Science Society of China  
Undertaken by Institute of Soil Science,  
Chinese Academy of Sciences

出 版 科 学 出 版 社  
地址：北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717

Published by Science Press  
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,  
Beijing 100717, China

印刷装订 北京中科印刷有限公司  
总发行 科 学 出 版 社  
地址：北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717  
电话：010 - 64017032  
E-mail: journal@mail.sciencep.com

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company  
Distributed by Science Press  
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,  
Beijing 100717, China  
Tel: 010 - 64017032  
E-mail: journal@mail.sciencep.com

国外发行 中国国际图书贸易总公司  
地址：北京 399 信箱 邮政编码：100044

Oversea distributed by China International Book Trading Corporation  
Add: P. O. Box 399, Beijing 100044, China

国内统一连续出版物号：CN 32-1119/P

国内邮发代号：2-560

国外发行代号：BM45

定价：60.00 元

国 内 外 公 开 发 行



ISSN 0564-3929

