

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(7): 894–901; 4 July 2012
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

3 次连续重复提取 DNA 能较好反映土壤微生物丰度

郭贇^{1,2}, 吴宇澄², 林先贵², 钟文辉^{1*}, 丁维新², 朱建国², 贾仲君^{2*}

¹南京师范大学地理科学学院, 南京 210046

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, 南京 210008

摘要 【目的】研究同一个土壤需要反复提取几次才能在最大程度上反映土壤微生物的丰度, 探讨风干土壤代替新鲜土壤用于微生物丰度研究的可行性。【方法】针对两种理化性质具有较大差异的旱地和稻田新鲜土壤及其风干土壤, 分别对土壤微生物进行 5 次连续裂解提取 DNA。通过实时荧光定量 PCR 技术分析连续反复提取对土壤古菌和细菌 16S rRNA gene 数量、氨氧化古菌和细菌功能基因 *amoA* 数量的影响。【结果】3 次连续提取 DNA 占 5 次提取 DNA 总量的 76% 以上, 氨氧化古菌、氨氧化细菌、古菌和细菌 4 类微生物的 3 次连续提取最低回收率为 77.5%; 与新鲜土壤相比, 风干处理导致氨氧化古菌、氨氧化细菌、古菌、细菌的数量分别降低 84.3%、81.2%、12.5% 和 90.3%, 然而, 2 种土壤风干过程中主要微生物类群的数量变化规律基本一致, 表明土壤微生物对风干处理的响应可能受土壤类型的影响较小。【结论】土壤微生物连续 3 次裂解能较好反映微生物丰度。与新鲜土壤相比, 风干过程显著降低了土壤微生物丰度, 然而, 通过风干土壤中微生物丰度的变化趋势反映新鲜土壤中微生物数量变化规律具有一定的可行性。

关键词: 土壤 DNA 连续提取, 风干处理, 古菌, 细菌, 氨氧化古菌, 氨氧化细菌

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 07-0894-08

土壤微生物丰度和组成是评价微生物多样性的重要内容。现阶段, 土壤微生物多样性分析主要包括传统的分离培养法和现代分子生物学技术 2 种手段。传统研究方法只能在实验室进行, 而实验室理想条件下的土壤微生物生理代谢特点可能与原位状况下的差异较大, 很难真实反映土壤微生物在自然环境中的群落结构与生理代谢功能。已有分子生态学研究表明传统方法只能培养不到 1% 的土壤微生物^[2], 大约 99% 的微生物难以在实验室培养。随着分子生物学手段的兴起, 特别是基于 16S rRNA 基

因的古菌和细菌分类体系逐渐被认可, 在分子水平上定量描述、研究复杂环境中微生物的丰度及其潜在的生理代谢功能, 是目前微生物多样性研究的主要内容, 也可能更为准确地反映自然环境中微生物的数量变化规律^[1]。

土壤微生物分子生态学的前提是土壤样品微生物 DNA 提取。不同方法的 DNA 提取效率、DNA 质量以及数量都可能对后续的土壤微生物丰度产生巨大影响, 高质量的土壤微生物 DNA 提取是土壤微生物分子生态学研究的關鍵。土壤微生物细

基金项目: 中国科学院应用微生物研究网络项目 (KSCX2-EW-G-16); 江苏高校优势学科建设工程项目 (164320H101); 南京师范大学“211 工程”重点学科建设项目 (1843203623)

* 通信作者。Tel: +86-25-83591347, +86-25-86881311; Fax: +86-25-85891347, +86-25-86881000; E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn, jia@issas.ac.cn

作者简介: 郭贇 (1988–), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: guoyun@issas.ac.cn

收稿日期: 2012-02-28; 修回日期: 2012-04-17

胞裂解是土壤 DNA 提取的核心, 细胞裂解主要有 3 种方法: 物理法、化学法和酶解法。目前, 大部分提取方法将 3 种裂解方法配合使用。物理法通过冻融、玻璃珠搅拌、液氮研磨、超声波处理和微波热击等破碎细胞。一般情况下, 采用物理法破碎细胞效果较好, DNA 提取效率较高。化学法也被人们广泛使用, 通常使用十二烷基磺酸钠 (SDS, Sodium Dodecyl Sulfonate) 和十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, Hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 作为 DNA 提取缓冲液的主要成分。SDS 是离子型表面活性剂, 能够使蛋白质变性, 溶解膜蛋白而破坏细胞膜。CTAB 在高盐溶液中与蛋白质和大多数酸性多糖以外的多糖形成复合物, 并能去除部分腐殖酸。酶解法通常不单独使用, 往往和物理或化学方法结合使用^[3]。然而, 由于土壤是一个高度复杂的有机无机聚合体, 现有的 DNA 提取方法似乎很难一次性将所有土壤微生物细胞裂解并获得 DNA, 现有的文献表明同一个土壤需要反复提取 3 次才能较好表征土壤微生物多样性^[18]。

通常情况下, 野外采集的大量土壤样品很难在实验室保持其原位自然状况, 例如水分和温度。因此, 通常采用风干土壤样品测定土壤理化指标^[4-5]。同时, 由于微生物适应性较强, 也有研究采用风干土壤进行土壤生物学分析, 如土壤酶活性测定^[6]。然而, 几乎所有的分子微生物生态学研究都采用新鲜土壤, 鲜有用风干土壤的报道。我们推测, 新鲜土壤中存在大量的游离 DNA, 这些 DNA 可能对后续分子生态学分析产生较大的影响。土壤风干过程中, 游离 DNA 可能作为易分解的有机质被迅速矿化, 而风干土壤中的完整休眠细胞能够在一定程度上反映土壤微生物的丰度。目前, 大多数研究更多关注风干处理对土壤微生物生物量碳、氮以及矿化过程的影响^[7-9], 风干过程对土壤微生物数量的影响仍不清楚。为了缓解新鲜土壤难以保存的现实, 风干土壤用于微生物丰度研究具有极大的实用性。然而, 相关的可行性评价迄今未见报道。

本研究采用分子生态学手段, 研究了连续提取过程对土壤微生物 DNA 提取效率和质量的影响, 分析了土壤风干处理对微生物数量的影响, 初步探讨了风干土壤用于微生物丰度研究的可行性, 为在大尺度下更准确地描述土壤微生物地理分布规律提供依据。

1 材料和方法

1.1 土壤样品概况

小麦土壤采自中国科学院封丘农业生态国家实验站 (35°00'N, 114°24'E)。该实验站成立于 1983 年, 隶属于中国科学院南京土壤研究所。实验站位于河南省东北部的封丘县潘店乡, 是中科院首批对外开放的野外站和网络研究重点站。封丘站年平均气温 13.9℃, 全年日照时数 2300 - 2500 h, 年平均降水量 615 mm, 无霜期 220 d, 年蒸发量 1875 mm。在小麦生长季节采集 0 - 20 cm 表层新鲜土壤 (WS-F), 过 20 目筛后, 一部分置于 4℃ 冰箱保存备用, 另一部分于室温下风干 (WS-D)。小麦土壤的有机碳、全氮、全磷、全钾、含水量和 pH 分别为: 7.0 g/kg, 0.64 g/kg, 0.71 g/kg, 20.8 g/kg, 27.5% 和 8.5。土壤详细理化特性已有报道^[10]。

水稻土壤采自江苏省扬州市小纪镇马凌村的中国稻麦轮作农田生态系统 FACE (Free Air Carbon-dioxide Enrichment) 试验平台 (32°35.5'N, 119°42'E)。该 FACE 平台于 2004 年 6 月开始运行, 设有 FACE 高 CO₂ 浓度圈与 Ambient 对照圈 2 个处理, FACE 圈内大气 CO₂ 浓度比 Ambient 对照圈区高 200 μmol/mol, 控制误差为 10%。实验田为典型的稻麦轮作种植制度, 土壤类型为发育于下位砂浆土的水耕人为土。其年平均气温 14.9℃, 全年日照时数 2100 h, 年平均降水量 980 mm, 无霜期 220 d, 年蒸发量 1100 mm。在水稻生长季节采集 Ambient 圈对照处理新鲜土壤 (RS-F), 过 20 目筛后, 一部分置于 4℃ 冰箱保存备用, 另一部分于室温下风干 (RS-D)。水稻土壤的有机碳、全氮、全磷、全钾、含水量和 pH 分别为: 18.4 g/kg, 1.50 g/kg, 0.63 g/kg, 14.0 g/kg, 22.4% 和 7.9。土壤详细理化特性已有报道^[11]。

风干处理具体流程如下: 将研磨并过 20 目筛后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 (15 d) 后, 装入无菌塑料袋密封保存待用。

1.2 土壤 DNA 提取方法

土壤微生物基因组 DNA 提取方法参考 Griffiths 等^[12], 但作适当修改。具体步骤如下: (1) 称取 0.5 g 土壤样品于 2.0 mL 带螺帽口的裂解管

中,加入 425 – 600 μm 和小于 106 μm 的玻璃珠各 0.5 g (Sigma 公司); (2) 向裂解管中加入 0.5 mL 的 CTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 提取液 (10% 的 CTAB (w/v) 和等体积的 0.2 mol/L 的 pH = 8.0 的磷酸缓冲液混合,混合液中含 0.7 mol/L NaCl), 再加入 0.5 mL 的 PCI 试剂 (苯酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1 (v/v/v)), 并用旋涡仪 (海门其林贝尔 Vortex - 6 旋涡混合器) 在 1960 r/min 下混匀; (3) 将裂解管放入 Fast PrepTM FP120 核酸提取仪, 在 5.5 m/s 的速度下裂解土壤微生物细胞 30 s, 并将裂解混合物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 16000 \times g 离心 5 min, 上清液转移至无菌的 2.0 mL 离心管中; (4) 重复步骤 (2) – (3) 4 次, 获得同一土壤 5 次连续提取的 DNA 上清液; (5) 在上清液中加入等体积的 CIA 试剂 (氯仿:异戊醇 = 24:1 (v/v)), 充分混匀后, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 16000 \times g 离心 5 min; (6) 转移上清液至无菌的 2.0 mL 离心管, 加入 2 倍体积的 PEG/NaCl 沉淀试剂 (1.6 mol/L 的 NaCl 和 30% 的 PEG 6000 混合), 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h; (7) 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 18000 \times g 离心 10 min; 弃去管中液体, 并加入 0.5 mL 的 70% 的乙醇清洗沉淀 DNA, 混合均匀后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 18000 \times g 离心 5 min; (8) 室温自然干燥 DNA 约 30 min; 5 次连续提取的土壤微生物基因组 DNA 依次溶解于 100、100、50、50、50 的 TE Buffer [1 mL Tris-HCl 溶液 (pH = 8.0, 1 mol/L) 和 200 μL 的 EDTA 溶液 (pH = 8.0, 0.5 mol/L) 定容于 100 mL 容量瓶中, 并用 NaOH 将 pH 调至 8.0], 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.3 DNA 样品定量及定性检测

取 1 μL 的 DNA 样品于微量紫外分光光度计 (NanoDrop ND - 1000) 测定 DNA 样品的浓度 (ng/ μL), 并记录 OD_{600}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 的比值以确定 DNA 样品的纯度。此外, 将 5 μL 的 DNA 通过 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离 (0.5 \times TAE 缓冲液), 检验 DNA 的完整性和含量。

1.4 实时荧光定量 PCR

将提取的 DNA 样品根据微量紫外分光光度计测定的 DNA 浓度进行稀释, 使 DNA 浓度在 1 – 10 ng/ μL , 然后对稀释过的样品进行定量 PCR, 从而获得基因拷贝数。采用特定引物 (表 1) 对细菌和古菌的 *amoA* 基因以及 16S rRNA 基因进行扩增。定量 PCR 标线采用含有古菌和细菌 *amoA* 基因以及 16S rRNA 基因的克隆进行制备。将含有目标基因的克隆在 LB 营养液中过夜培养, 提取质粒纯化并测定质粒浓度, 根据摩尔常数计算目标基因的拷贝数, 并将质粒连续稀释 6 – 8 个数量级。实时荧光定量 PCR 扩增反应体系为: 10 μL 的 SYBR[®] Premix EX TaqTM (TaKaRa 公司), 上、下游引物 (20 pmol/ μL) 各 0.2 μL , 1.0 μL 的土壤微生物 DNA 模板, 8.6 μL 的灭菌双蒸水, 反应体系总体积为 20 μL 。阴性对照采用灭菌双蒸水代替 DNA 作为反应模板。定量 PCR 反应在 CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad 公司) 扩增仪上进行。定量 PCR 扩增得到的基因拷贝数 (Copy Numbers) 用于后续计算。

表 1 PCR 引物及条件

Table 1 The primers and PCR conditions

Primer Name	Primer sequence (5'→3')	Target gene	Thermal Profile
Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	Archaeal <i>amoA</i>	95 $^{\circ}\text{C}$, 3.0 min;
Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT	gene ^[13]	40 \times (95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s;
amoA-1F	GGGGTTTCTACTGTTGGT	Bacterial <i>amoA</i>	55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$,
amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	gene ^[14]	30 s with plate
771F	ACGGTGAGGGATGAAAGCT	Archaeal 16S rRNA	read); Melt curve
934R	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	gene ^[10]	65.0 $^{\circ}\text{C}$ to 95.0 $^{\circ}\text{C}$,
515F	GTGCCAGCMGCCGCGTAA	Bacterial 16S rRNA	increment 0.5 $^{\circ}\text{C}$,
907R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	gene ^[15]	0:05 + plate read

2 结果和分析

2.1 土壤微生物基因组 DNA 提取

如图 1 所示, 琼脂糖凝胶电泳分析表明: 小麦鲜

土和水稻鲜土及其风干处理土壤的微生物总 DNA 提取效果较好, 5 次裂解后的土壤中仍然存在一定量的 DNA。相比于风干土壤, 新鲜土壤提取的总 DNA 条带较亮。大部分风干处理土壤连续 5 次提

取 DNA 过程中, 第 2 次 DNA 提取量明显高于第 1 次, 表明对于风干土壤来说, 常规土壤微生物 DNA 提取的 1 次裂解不能真实反映土壤中的微生物丰度, 可能遗失土壤中部分微生物的遗传信息。此外,

凝胶电泳图中出现 2 条清晰的核酸片段, 大小分别与 1489 bp 和 925 bp 的 Marker 片段相似, 表明 Griffiths 方法提取 DNA 的同时, 也获得了一定数量的核糖体 rRNA, 与已有报道相似^[12]。

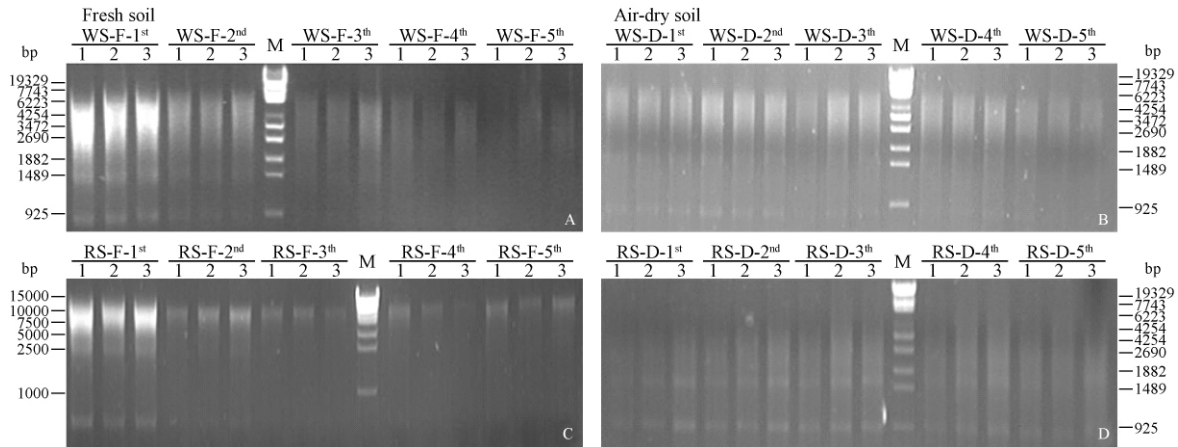


图 1 小麦土和水稻土 5 次连续提取的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total nucleic acid from five successive extractions in wheat and paddy soils. Soil samples in triplicate. A: Fresh wheat soil (WS-F); B: Air-dried wheat soil (WS-D); C: Fresh rice soil (RS-F); D: Air-dried rice soil (RS-D). M represent for λ -EcoT14 I digest DNA Marker in A, B and D, M represent for DLI5000 DNA Marker in C.

2.2 土壤细菌、古菌、氨氧化细菌、氨氧化古菌丰度

小麦鲜土和水稻鲜土以及风干处理土壤中氨氧化古菌、氨氧化细菌、古菌以及细菌的基因拷贝数如图 2 所示。随着 DNA 连续提取次数的增加, 微生物数量总体呈下降趋势, 第 4 次与第 5 次 DNA 提取样品中微生物数量处于较低的水平, 并趋于平稳, 表明同一个土壤样品 3 次提取后仅有少量 DNA 残存于土壤中。此外, 风干处理后土壤微生物基因拷贝数明显低于新鲜土壤。例如, 风干处理导致新鲜土壤的氨氧化古菌数量降低 84.3%, 氨氧化细菌数量降低 81.2%, 古菌数量降低 12.5%, 细菌数量降低 90.3%。

新鲜土壤风干后, 不同微生物类群基因数量的变化规律具有显著差异。如表 2 所示, 小麦鲜土与干土中古菌的数量几乎相同, 其比例为 1.01, 水稻鲜土与干土中古菌的比例仅为 1.32。然而, 鲜土与干土中氨氧化古菌的比例高达 8.64, 氨氧化细菌的比例不低于 4.68, 细菌的比例最高可达 10.99, 表明风干处理对氨氧化古菌、氨氧化细菌及细菌影响较大, 其中细菌受风干处理的影响最突出; 而古菌的比例为 1.01, 说明风干处理对古菌影响不明显。通过对小麦鲜土/小麦干土, 水稻鲜土/水稻干土的 4 类微生物比例进行线性回归, 相关系数高达 0.95, 表明风干处理过程对细菌、古菌、氨氧化细菌与氨氧化

古菌的影响可能与土壤类型关联度不高。进一步通过对小麦鲜土/水稻鲜土, 小麦干土/水稻干土的 4 类微生物比例进行线性回归, 相关系数高达 1.00, 表明风干处理后不同土壤中主要类群微生物数量变化趋势与新鲜土壤基本一致。

表 2 土壤微生物拷贝数比值

Microorganisms	WS-F/WS-D	RS-F/RS-D	WS-F/RS-F	WS-D/RS-D
AOA	5.03	8.64	17.5	30.05
AOB	4.68	6.17	2.93	3.85
Archaea	1.01	1.32	3.09	4.05
Bacteria	9.7	10.99	2.53	2.86

2.3 DNA 连续提取法的提取效率

Griffiths 方法提取土壤微生物基因组总 DNA 的前 3 次累积效率达到了 82.3%; 对氨氧化古菌、氨氧化细菌、古菌及细菌的提取效率分别为 88.3%、77.5%、83.0% 和 80.4% (图 3)。氨氧化古菌的提取效率最高, 表明相对于氨氧化细菌、古菌和细菌, 土壤氨氧化古菌的细胞可能更易于裂解。除了细菌以外, 利用 Griffiths 方法连续提取小麦干土前 3 次累积效率都高于新鲜处理, 但是差别很小; 而水稻鲜土的提取效率则远高于水稻干土, 表明水稻干土微生物 DNA 的提取具有一定的难度, 风干过程可能对

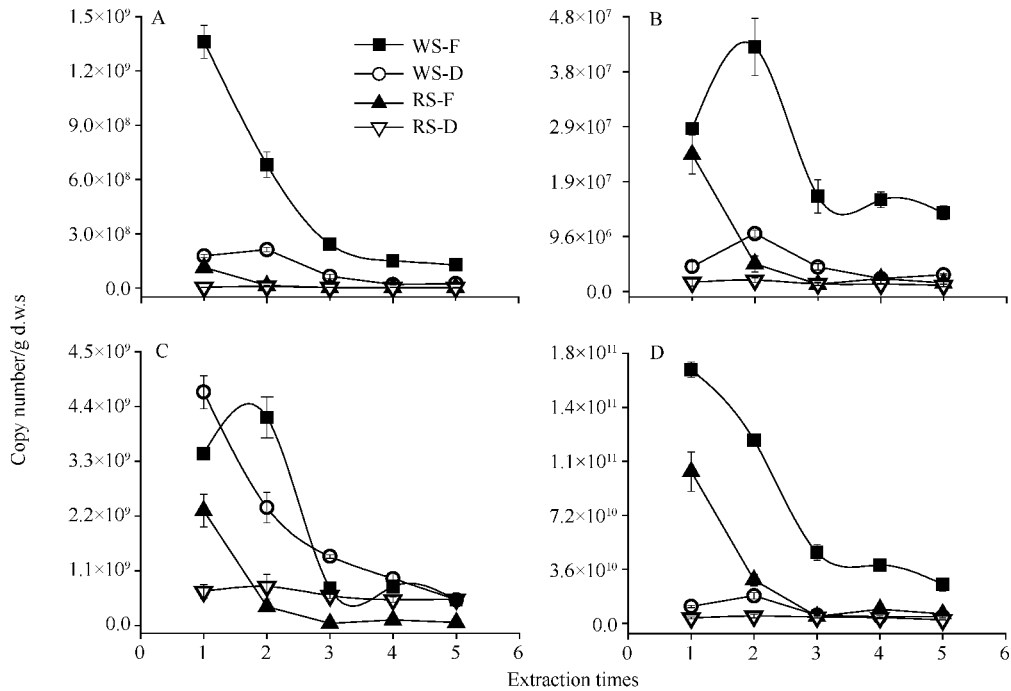


图 2 小麦鲜土和水稻鲜土及其风干处理后土壤中氨氧化古菌、氨氧化细菌、古菌及细菌的丰度

Fig. 2 The copy number of 16S rRNA and *amoA* genes of Archaea and Bacteria in fresh soils cultivated with wheat (WS-F) or rice (RS-F) crops and in air-dried soils (WS-D and RS-D). A: *amoA* gene of Archaea (AOA); B: *amoA* gene of Bacteria (AOB); C: 16S rRNA gene of Archaea (Archaea); D: 16S rRNA gene of Bacteria (Bacteria).

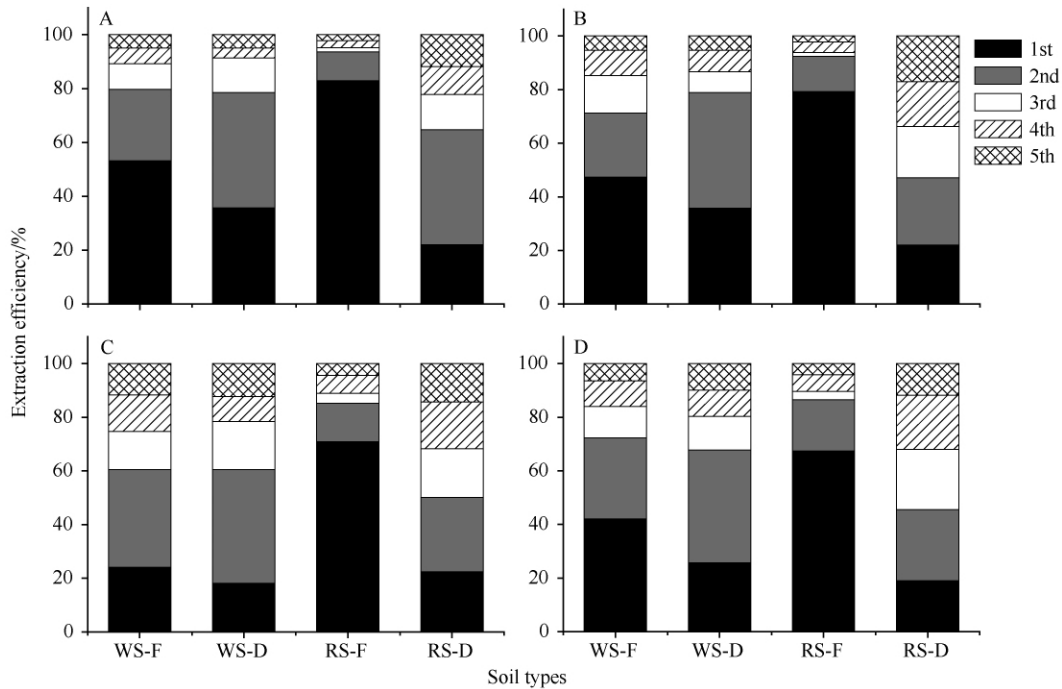


图 3 小麦鲜土和水稻鲜土及其风干处理土壤的氨氧化古菌、氨氧化细菌、古菌及细菌的提取效率

Fig. 3 Extraction efficiency of 16S rRNA and *amoA* genes of Archaea and Bacteria in fresh soils cultivated with wheat (WS-F) or rice (RS-F) crops and in air-dried soils (WS-D and RS-D). A: *amoA* gene of Archaea (AOA); B: *amoA* gene of Bacteria (AOB); C: 16S rRNA gene of Archaea (Archaea); D: 16S rRNA gene of Bacteria (Bacteria).

其细胞影响较大。

3 讨论

土壤微生物基因组 DNA 提取是现代微生物分子生态学研究的基础。对土壤微生物 DNA 的分子分析能充分认知土壤微生物的数量及其组成,并可能进一步推测其在自然环境中的生理代谢规律及其潜在的生态功能。然而,同一个土壤需要重复提取多少次才能在最大程度上反映土壤微生物的丰度,特别是反映数量上占较小比例的重要功能微生物,目前未见报道。因此,建立可靠的土壤微生物群落基因组 DNA 提取方法的指标体系,并对主要微生物类群的丰度变化规律进行评价,具有重要的科学意义。我们的结果表明,5次裂解后复杂土壤样品中仍存在一定量的 DNA,但 DNA 提取量在第4次和第5次趋于平稳,连续3次裂解和提取的 DNA 能够表征76%以上的土壤古菌、细菌、氨氧化古菌和氨氧化细菌丰度。风干处理显著降低土壤微生物 DNA 提取量,导致土壤微生物基因拷贝数明显减少。然而,风干处理过程中,2种土壤的4类微生物丰度的变化趋势基本一致,相关系数高达0.95,表明不同风干土壤中主要微生物类群的数量差异能在一定程度上反映新鲜土壤微生物丰度的变化规律。

鲜土的核酸电泳条带亮度明显高于干土,这表明从鲜土中所提取的总 DNA 量比干土多。这可能是由于微生物在风干过程中活性降低或者已经失活而裂解死亡^[16],部分细胞的核酸快速降解而不能被提取出来。鲜土中可能含有大量的游离 DNA^[17],风干过程中土壤微生物游离 DNA 可能被快速矿化,导致风干土壤微生物 DNA 提取量偏低。此外,Griffiths 法能同时提取风干土壤的 DNA 和 RNA,并且核糖体 rRNA 条带较为明显,这也从侧面表明风干处理后,尽管土壤水分含量极低,大部分土壤微生物仍然可能具有一定的代谢活性。

目前,绝大部分土壤微生物基因组总 DNA 提取时采用1次裂解。本研究表明1次裂解并不能提取土壤中的大部分微生物 DNA,特别是风干土壤,其含水量较低,第1次提取时加入缓冲液的部分水相可能被土壤团聚体吸收,致使裂解时缓冲体系体积减小,可能影响后续 DNA 提取效率。单次裂解极可能对后续分子微生物生态学研究产生较大的实验

误差,特别是忽略了数量上不占优势的重要功能微生物,影响 DNA 下游分析。Feinstein 等人研究了连续提取对土壤微生物群落分析的影响,表明3次连续 DNA 提取效率大于80%,与本实验结果一致^[18]。然而,他们的研究基于新鲜土壤的 DNA 提取,未涉及风干处理对土壤微生物丰度的影响。本研究表明,尽管风干过程导致土壤微生物数量显著降低,但不同土壤中的相同微生物种类可能对风干处理的响应规律基本一致,风干处理后,不同土壤之间的微生物丰度差异具有一定的参考价值,此为使用风干土壤进行的土壤微生物多样性研究提供了一定的依据。

Feinstein 等人的研究结果^[18]显示,土壤提取次数既影响 DNA 的下游微生物丰度分析,也可能影响微生物组成。例如,采用新一代焦磷酸测序技术分析裂解1次和6次后提取的土壤 DNA 微生物组成,结果表明,对于土壤中数量上占弱勢的微生物类群(如 *Acidobacteria*, *Gemmatimonades* 和 *Verrucomicrobia*),裂解1次后土壤 DNA 中这些微生物的相对丰度高于裂解6次后的土壤 DNA;然而,对于土壤中数量上占优势的微生物类群如变形菌和放线菌,其相对丰度在裂解1次的土壤 DNA 中高于裂解6次后的土壤 DNA,进一步的分析表明同一个土壤反复提取3次后能够较好地表征土壤微生物的数量和物种组成。此外, Jones 等人采用稳定性同位素核酸探针技术(DNA-SIP)研究了土壤微生物 DNA 连续提取对污染土壤中蕈降解菌的影响,研究结果表明,尽管连续提取提高了 DNA 的回收率,但对微生物群落组成影响较小,与已有的报道基本一致^[19]。然而,土壤质地等环境条件极可能对土壤微生物 DNA 提取及其下游分析产生较大影响,风干和新鲜土壤连续多次提取 DNA 对微生物群落组成的影响仍需进一步研究。

小麦鲜土与水稻鲜土前3次累积提取量的各比值(WS-F/RS-F)和小麦干土与水稻干土前3次累积提取量的各比值(WS-D/RS-D)较相近,说明同一条件处理下的2种干土可以反映其新鲜土壤中氨氧化古菌、氨氧化细菌、古菌以及细菌的变化趋势。然而,已有的研究表明风干处理可能影响土壤重要微生物过程。例如,林江辉等人研究发现风干土加水培养后 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 量明显高于新鲜土处理,但是 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的量一直低于新鲜土处理,表明风干处理可

能抑制了氨氧化微生物的生长和硝化微生物的繁殖,风干后加水培养也很难再恢复到新鲜土水平^[20]。我们的结果也表明,相对于细菌而言,风干过程中古菌减少的幅度较小,但是风干处理对土壤微生物过程的影响仍需深入研究。

风干过程中遗失的 DNA 究竟来源于新鲜土壤中已有的游离 DNA,还是风干过程导致部分微生物细胞死亡后裂解而产生的 DNA,目前仍未有明确的结论。如果来自活体细胞,我们的研究结果表明不同类群的微生物对风干处理的适应能力具有显著差异;但如果来自游离于土壤中的 DNA 或者是形成复杂水合聚合物累积在细菌细胞表面的 DNA^[21],那么风干处理对土壤微生物多样性研究的影响有限。水是自然环境中生命得以延续发展的基本物质,干湿交替是陆地生态系统广泛存在的自然现象,也是土壤微生物多样性形成与演化的重要驱动因子,未来随着研究手段的不断进步,将有可能更加清楚地揭示风干过程对土壤微生物多样性的影响及其微生物生态学意义。

参考文献

- [1] 张海燕,王彩虹,龚明福,张利莉. 一种简单有效且适于土壤微生物多样性分析的 DNA 提取方法. *生物技术通报* (*Biotechnology Bulletin*), 2009 (8):151-155.
- [2] Amann R, Ludwig W, Schleifer K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 1995, 59 (1):143-169.
- [3] 陈敏. 土壤样品中 DNA 提取方法的比较. *微生物学杂志* (*Journal of microbiology*), 2005, 25 (3):101-104.
- [4] Marković M, Cupać S, Durović R, Milinović J, Kljajić P. Assessment of heavy metal and pesticide levels in soil and plant products from agricultural area of Belgrade, Serbia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 58 (2):341-351.
- [5] Marzaioli R, D'Ascoli R, De Pascale RA, Rutigliano FA. Soil quality in a Mediterranean area of Southern Italy as related to different land use types. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44 (3):205-212.
- [6] 赵炳梓,陈吉,张佳宝,钦绳武. 风干土保存时间和湿土培育时间对黄淮海平原潮土酶活性的影响. *土壤* (*Soils*), 2011, 43 (3):418-425.
- [7] 张威,张旭东,何红波,解宏图,白震. 干湿交替条件下土壤氮素转化及其影响研究进展. *生态学杂志* (*Chinese Journal of Ecology*), 2010, 29 (4):783-789.
- [8] 沈其荣,史瑞和. 土壤预处理对不同起源氮矿化的影响. *南京农业大学学报* (*Journal of Nanjing Agricultural University*), 1991, 14 (1):54-58.
- [9] 陶勤南,吴良欢,方萍. 风干水稻土氮矿化过程的相对稳定性. *土壤学报* (*Acta Pedologica Sinica*), 1996, 33 (1):101-104.
- [10] Xia W, Zhang C, Zeng X, Feng Y, Weng J, Lin X, Zhu J, Xiong Z, Xu J, Cai Z, Jia Z. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The ISME Journal*, 2011, 5 (7):1226-1236.
- [11] Wang F, Lin X, Hu J. Glomus caledonium spores can be occupied by Glomus microaggregatum spores. *Annals of Microbiology*, 2009, 59 (4):693-697.
- [12] Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (12):5488-5491.
- [13] Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (41):14683-14688.
- [14] Rotthauwe J, Witzel K, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (12):4704-4712.
- [15] Angenent LT, Kelley ST, Amand AS, Pace NR, Hernandez MT. Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (13):4860-4865.
- [16] 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.
- [17] Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, Ceccherini M, Guerri G, Nannipieri P. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 2009, 45 (3):219-235.
- [18] Feinstein LM, Sul WJ, Blackwood CB. Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology*,

- 2009, 75 (16) :5428-5433.
- [19] Jones MD, Singleton DR, Sun W, Aitken MD. Multiple DNA extractions coupled with stable-isotope probing of anthracene-degrading bacteria in contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (9) : 2984-2991.
- [20] 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 (Acta Pedologica Sinica)*, 2004, 41 (6) :924-930.
- [21] Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (9) : 5404-5410.
- [20] 林江辉, 李辉信, 胡锋, 赵海燕. 干土效应对土壤生

Three successive extractions reduce quantification bias of microbial communities associated with incomplete DNA recovery in soil

Yun Guo^{1,2}, Yucheng Wu², Xiangui Lin², Wenhui Zhong^{1*}, Weixin Ding², Jianguo Zhu², Zhongjun Jia^{2*}

¹ School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

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

Abstract: [Objective] To assess the quantification bias associated with incomplete extractions of soil microbial DNA and the feasibility of air-dried soil for microbial ecology study. [Methods] The flooded rice soil and upland wheat soil were used, and multiple extractions of soil microbial DNA was performed by lysing a single sample for 5 successive times. The copy number of 16S rRNA and *amoA* genes of Archaea and Bacteria was quantified in each DNA extraction by real-time PCR. [Results] Cumulative DNA yields in 3 successive extractions accounted for more than 76% of microbial DNA in soils, and more than 77.5% of gene copies could be recovered. Air-drying decreased the abundance of bacterial 16S rRNA gene and archaeal 16S rRNA gene by 90.3% and 12.5%, and the abundance of bacterial and archaeal *amoA* genes showed a decline by 81.2% and 84.3%, respectively. The decline showed similar trend in two soils, suggesting air-dried soil could be of choice for biogeographic survey of microbial communities. [Conclusion] Three successive extractions of microbial DNA in soil could be of choice for microbial ecology study in order to reduce quantification bias associated with incomplete DNA recovery. Air-dried soil could be employed under certain circumstances, and further investigation is warranted for the underlying mechanism by which microbial communities manage to survive the desiccation of soil.

Keywords: successive extractions of DNA in soil, air-dry treatment, archaea, bacteria, ammonia oxidizing archaea, ammonia oxidizing bacteria

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Research Network for Applied Microbiology of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-G-16), by the Academic Priority Development Program of Jiangsu Higher Education Institutions (164320H101), and by the 211 Project for Nanjing Normal University (the third phase) (1843203623)

* Corresponding author. Tel: +86-25-83591347, +86-25-86881311; Fax: +86-25-85891347, +86-25-86881000; E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn, jia@issas.ac.cn

Received: 28 February 2012 / Revised: 17 April 2012