

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(9):1033–1044; 4 September 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.008

典型淹水稻田土壤微生物群落的基因转录活性及其主要生理代谢过程

蔡元锋¹, 吴宇澄¹, 王书伟², 颜晓元², 朱永官³, 贾仲君^{1*}

¹ 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008

² 中国科学院常熟农田生态系统国家野外科学观测研究站, 江苏 常熟 215555

³ 中国科学院城市环境研究所, 福建 厦门 361021

摘要:【目的】利用环境转录组技术, 研究复杂稻田土壤中微生物群落主要生理代谢过程的基因表达水平及其对长期施氮磷钾肥 (Mineral nitrogen, phosphorus, and potassium, NPK) 的响应规律。【方法】针对中国科学院常熟农田生态系统长期定位试验的 NPK 施肥处理和不施肥对照处理 (Control check, CK) 稻田土壤, 淹水培养 2 周后提取土壤微生物总 RNA 进行高通量转录组测序, 利用 MG-RAST 网络分析平台 (Metagenomics Analysis Server) 进行活性微生物组成分析、基因功能注释及基因功能分类。【结果】细菌是 CK 和 NPK 处理稻田土壤微生物的优势类群, 占比高达 95% 以上, 细菌中的活性基因主要源于变形菌门 (Proteobacteria, 占细菌的 50% 以上)。同时也检测到古菌、真核生物和病毒等多种微生物的活性基因, 而古菌中的活性基因主要源于奇古菌门 (Thaumarchaeota, 约占古菌的 70%)。酸杆菌门 (Acidobacteria) 在 NPK 处理土壤中的转录活性显著高于 CK 处理土壤, 而其他的细菌及古菌类群的转录活性在 CK 和 NPK 处理土壤间无显著性差异。CK 和 NPK 处理土壤中表达量最高的基因是 ABC transporter 编码基因, 与物质跨膜运输紧密相关。基于 COG (Clusters of Orthologous Genes)、Subsystem、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 3 种基因功能分类数据库, 发现 CK 和 NPK 处理土壤中微生物的主要代谢活动均为能量产生与转化、碳水化合物代谢、蛋白代谢和氨基酸代谢, 而最活跃的代谢路径为氧化磷酸化及氨酰-tRNA 合成。【结论】淹水状态下 CK 和 NPK 处理稻田土壤中的活性微生物组成较为一致, 仅 Acidobacteria 的转录活性在两者间差异较大; 在微生物的主要代谢活动方面, CK 和 NPK 处理土壤之间基本一致, 均以能量获取与蛋白代谢为主, 长期施用无机化肥对复杂土壤微生物群落水平的主要代谢活动影响较小。

关键词: 淹水稻田土壤, 环境转录组, 基因功能分类, 代谢类型, 长期施肥

中图分类号: X172 **文章编号:** 0001-6209(2014)09-1033-12

稻田是地球上最大的人工湿地生态系统, 而土壤微生物则是维系稻田生态系统持续发展的重要驱

基金项目: 国家自然科学基金重大项目“典型稻田土壤氧化还原梯度下微生物群落的演变特征”(41090281); 中国博士后科学基金面上项目“长期施肥对稻田固氮蓝细菌种群结构及其固氮活性的影响”(2013M541743)

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

作者简介: 蔡元锋 (1983-), 男, 山东滕州人, 博士后, 主要从事环境微生物研究。E-mail: yfcai@issas.ac.cn

收稿日期: 2014-04-25; **修回日期:** 2014-06-19

动者^[1]。例如,稻田土壤中微生物的代谢活动对于调节土壤营养物质的循环,维持稻田土壤肥力,促进水稻的养分吸收具有重要意义。已有的大量研究表明特定功能微生物种群在稻田生态系统养分转化过程中发挥了重要作用,揭示了特定的功能基因在稻田土壤中的组成及表达特征,如固氮基因(*nifH*)^[2-3]、甲烷氧化酶基因(*pmoA*)^[4]、反硝化相关功能基因(*nirS*, *nirK*, *nosZ*)^[5]。然而,稻田微生物数量巨大、种类繁多并导致其生理代谢过程非常复杂,长期以来由于技术的限制,已有的研究几乎都集中于甲烷氧化菌、产甲烷古菌、氨氧化微生物等单一的生理类群,重点解析重要功能微生物在复杂土壤中的基因表达特征及代谢活动类型,对复杂稻田土壤中微生物群落整体水平的生理生态过程鲜有报道^[6]。2008年以来,高通量测序技术的迅速发展使环境转录组技术逐渐发展成熟。环境转录组技术是从微生物群体水平上研究其代谢活动特征的新兴实验技术,以环境样品中全部 mRNA 为研究对象, mRNA 可以表征特定环境条件下微生物的基因表达特征,因而可以直接反映微生物正在进行的代谢活动。环境转录组技术最近几年被迅速用于水体^[7]、土壤^[8-9]、活性淤泥^[10]、沉积物^[11]等多种环境微生物群落基因表达特征研究,在环境微生物生态学研究领域得到了广泛关注。

化肥施用是保障我国粮食安全的重要农业生产实践之一,大量研究表明长期施肥能够不同程度的影响稻田土壤微生物的群落结构和特定功能微生物的基因型组成^[12-16]。然而这些研究以传统的分子生态学技术为主,如 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 分子指纹图谱,其分辨率较低,并且大多在 DNA 水平上开展,不能直接反映活性微生物对长期施肥的响应。本试验所用稻田土壤采自中国科学院常熟农田生态系统长期定位试验的不施肥对照处理 (Control check, CK) 和氮磷钾施肥处理 (Mineral nitrogen, phosphorus, and potassium, NPK) 小区,基于这 2 类定位试验的研究已经发现长期的 NPK 处理对土壤氮肥转化相关微生物有明显影响,如增加了土壤的硝化活性^[15],改变了土壤中氨氧化微生物的数量和组成^[15,17],并且增加了土壤脲酶、转化酶、酸性磷酸酶的活性^[18],但目前尚不清楚微生物群体水平上各种代谢活性的变化。本实验通过室内模拟稻田土壤淹水状态,采用环境转录组学技

术,在微生物群落水平上分析淹水稻田土壤中的活性微生物种类、基因表达特征及功能,以期揭示淹水稻田土壤活性微生物的种类组成及其主要的代谢活动类型,分析长期施用化肥对复杂土壤中活性微生物主要类群及代谢活性的影响,为深刻理解稻田微生物群落生理生态过程提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

土壤 RNA 保护液 RNAlater 购自 Ambion 公司; RNA 提取过程中用到的玻璃珠及 RNase-/DNase-free water 购自 Sigma 公司;用于 DNA 降解的 Recombinant DNase I 购自 TaKaRa 公司;RNA 纯化试剂盒 RNeasy MinElute Cleanup Kit 购自 Qiagen 公司。微量紫外分光光度计名称及型号: NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher 公司)。转录组测序平台为 Illumina HiSeq 2000 (Illumina 公司),建库试剂盒 Truseq™ RNA sample prep Kit、扩增试剂盒 Truseq PE Cluster Kit v3-cBot-HS 及测序试剂盒 Truseq SBS Kit v3-HS(200 cycles)均购自 Illumina 公司。

1.2 土壤淹水实验

实验所用土壤采自常熟农田生态系统国家野外科学观测研究站的长期施肥 (NPK) 和不施肥 (CK) 处理样地,土壤类型为乌栅土 (湖相沉积物发育)。长期施肥试验开始于 1988 年,施肥方式为:尿素, 180 kg/ha/yr; 过磷酸钙, 75 kg/ha/yr; 氯化钾, 150 kg/ha/yr。不施肥对照样地不施用任何形式的无机肥及有机肥。在 2 种不同处理地块分别采集表层 (0-5 cm) 土壤,每种处理采集 2 个平行土壤样品 (分别命名为 CK1, CK2; NPK1, NPK2)。风干后土壤的基本理化性质如下: NPK 处理土壤 pH 为 6.33, 硝态氮 1.83 mg/kg, 铵态氮 15.13 mg/kg, 总氮 2.41 g/kg, 总碳 22.8 g/kg; CK 处理土壤 pH 为 6.40, 硝态氮 2.75 mg/kg, 铵态氮 13.70 mg/kg, 总氮 2.05 g/kg, 总碳 20.8 g/kg, 2 种处理间仅总氮和总碳存在显著性差异 ($P < 0.05$)^[15]。稻田土壤淹水实验的设计参考 Shrestha 等人已有报道^[6],采集新鲜土壤,将其风干研磨后过 2 mm 筛,和适量去离子水在 500mL 烧杯中混合均匀,形成约 5 cm 的淹水土壤层,并保持 2 cm 的水层,28℃ 避光培养 2 周,培养过程中需通过补充去离子水保持淹水层深

度。培养结束后,用无菌枪头除去表层水,用无菌药匙将土壤样品混匀,以 0.5 g 为单位保存在 RNAlater 中, -20℃ 保存用于总 RNA 的提取。

1.3 土壤总 RNA 提取

土壤总 RNA 的提取参照 Mettel 等人的玻璃珠震荡提取法^[19],略有改动。改动处如下:震荡所用 0.5 g 玻璃珠为直径 0.5 mm 和 0.1 mm 的两种玻璃珠的混合物,比例为 3:2;沉淀总核酸用 2 倍体积的 PEG-NaCl(30% PEG-6000, 1.6 mol/L NaCl),室温静置 2 h;总核酸用 50 μL 超纯水(DNase/RNase-free H₂O)溶解,并经 Recombinant DNase I (TaKaRa)处理除去 DNA 后获得总 RNA,然后通过 RNeasy MinElute Cleanup Kit 对总 RNA 进行纯化和浓缩。用 16S rRNA 基因通用引物(341F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 907R: 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')扩增总 RNA 以检验是否存在残留的 DNA。利用微量紫外分光光度计(NanoDrop ND-1000 UV-Vis)测定 RNA 浓度,通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳初步评价 RNA 的提取质量。纯化后的总 RNA 干冰保存快递至测序公司进行转录组测序。

1.4 转录组测序及生物信息学分析

总 RNA 通过 TruseqTM RNA sample prep Kit 试剂盒建库,cDNA 第一链的合成使用逆转录酶 SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies),引物为随机六聚体引物。之后的步骤参照试剂盒说明书进行。桥式扩增及上机测序按照 Illumina 标准步骤进行,使用的试剂盒分别为 Truseq PE Cluster Kit v3-cBot-HS 和 Truseq SBS Kit v3-HS(200 cycles)。测序平台为 Illumina HiSeq 2000,测序方式为 2 × 100 bp 双末端测序。获得的 fastq 格式序列数据文件上传至 MG-RAST 网络分析平台(Metagenomics Analysis Server)进行序列的质量控制,高质量序列通过 BLAT (the BLAST-like alignment tool) 和 M5NR 蛋白数据库(整合了 GenBank、RefSeq、TrEMBL 等多种蛋白数据库)进行比对($E\text{-value} < 1e-5$, identity cutoff > 60%),对基因进行功能注释,注释完成后筛选表达量最高的基因,分析其功能;同时对活性微生物的种类组成进行分析。完成功能注释的基因通过 COG(Cluster of Orthologous Genes)、Subsystem 及 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库进行不同层次的基因功能分类,阐明微生物

的代谢活动类型。

转录组数据 CK1 和 CK2 经过 MG-RAST 的质量控制过程,分别获得了 9904791 条和 16874558 条高质量序列数据,其中成功匹配到 M5NR 蛋白数据库的分别为 3583240 条(占 36.2%)和 6801000 条(占 40.3%)。NPK1 和 NPK2 分别获得 25043269 条和 19736200 条高质量序列数据,成功匹配到 M5NR 蛋白数据库的分别为 10202012 条(占 40.7%)和 8004107 条(占 40.6%)。分析发现 2 个平行土壤样品的转录组数据在基因注释结果上具有较高的一致性,因此,如无特殊说明,以下所有结果为 2 个平行转录组数据的平均值。

2 结果和分析

2.1 淹水稻田土壤中优势活性微生物种类

在 CK 和 NPK 处理土壤转录组数据中均检测到了源于细菌、古菌、真核生物和病毒的转录子,其中绝大部分(CK 处理中占 96.1%; NPK 处理中占 98.2%)来自细菌,其次是古菌(CK, 2.4%; NPK, 1.1%),少量源于真核生物(CK, 0.7%; NPK, 0.1%)和病毒(CK, 0.7%; NPK, 0.1%),仅有少量序列(CK 和 NPK 处理均为 0.6%)未能匹配到已知的微生物。细菌中共检测到 15 个已知的门类,图 1-A 表明 8 个含量在 1% 以上的门在 CK 和 NPK 处理中的分布情况。含量最高的为变形菌门(Proteobacteria),在 CK 和 NPK 处理中分别占 66.9% 和 53.7%。其次为酸杆菌门(Acidobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、硝化螺菌门(Nitrospirae)、放线菌门(Actinobacteria),这些门含量大多在 1% - 10% 之间。其中 Acidobacteria 和 Actinobacteria 这 2 个门在 NPK 处理中的含量显著高于在 CK 处理中的含量,尤其是 Acidobacteria,在 NPK 处理中的含量是在 CK 处理中含量的 7 倍以上。其余 7 个含量在 0.1% 以下的门分别为厚壁菌门(Firmicutes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、螺旋体门(Spirochaetes)、柔膜菌门(Tenericutes)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)。在古菌中检测到 3 个门(图 1-B),含量最高的为奇古菌门

(Thaumarchaeota, 约占古菌的 70%), 其次为泉古菌门 (Crenarchaeota, 约占 25%), 广古菌门 (Euryarchaeota, 占 0.5%) 最少, 这 3 个已知古菌门

的含量在 CK 和 NPK 处理之间非常一致。另外有少量的序列无法确定具体的古菌门类。

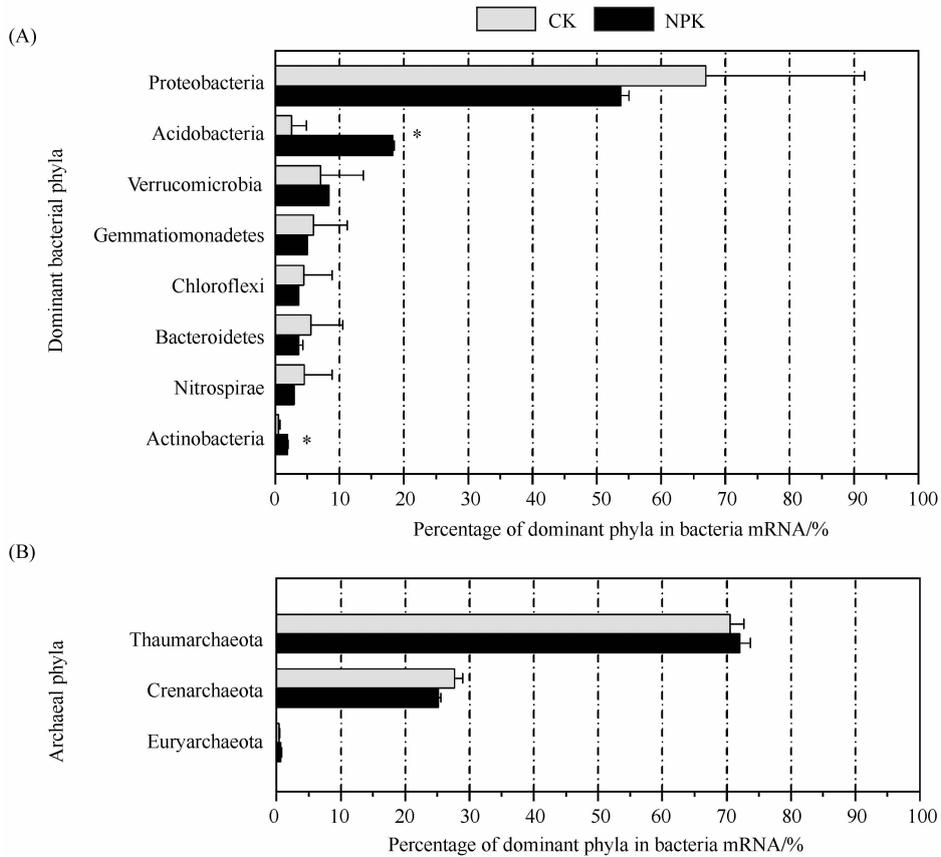


图 1. 淹水稻田土壤中主要的活性微生物门类

Figure 1. Active microbial phyla that dominated in flooded paddy soils of this study. A: dominant bacterial phyla; B: archaeal phyla. * means the percentage of that phylum is significant different ($P < 0.05$) between CK and NPK treatments.

2.2 淹水稻田土壤微生物优势表达基因

在所有成功注释的基因中, 表达量最高的前 10 种基因的编码产物列于表 1。从中可以看到这些高表达量基因在所有注释的基因中占 2.52% - 3.63%, 在 CK 和 NPK 2 个不同的处理中, 这些基因的表达量基本一致。表达量最高的基因其编码产物为“ABC transporter”, 该蛋白主要介导物质的跨膜运输。其余高表达基因多数与蛋白的代谢相关, 涉及到前期的转录 (DNA-directed RNA polymerase subunit beta), 肽链的合成 (leucyl-tRNA synthetase, isoleucyl-tRNA synthetase, valyl-tRNA synthetase, alanyl-tRNA synthetase, elongation factor G)、折叠和组装 (chaperonin GroEL)、错误折叠蛋白的降解 (ATP-dependent protease La)。excinuclease ABC

subunit A 负责识别和处理 DNA 损伤。

表 1. 淹水稻田土壤微生物表达量最高的 10 种基因的编码产物
Table 1. Products of 10 genes with most abundant genes in flooded paddy soils (values in parentheses are standard deviations)

Gene products	Proportion / %	
	CK	NPK
ABC transporter	3.34 (1.27)	3.63 (0.06)
chaperonin GroEL	3.29 (1.10)	3.42 (0.04)
ATP-dependent protease La	3.11 (0.91)	3.35 (0.08)
leucyl-tRNA synthetase	2.66 (0.64)	2.89 (0.01)
isoleucyl-tRNA synthetase	2.59 (0.67)	2.84 (0.07)
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	2.80 (0.79)	2.82 (0.03)
excinuclease ABC subunit A	2.55 (0.73)	2.73 (0.05)
valyl-tRNA synthetase	2.53 (0.64)	2.65 (0.06)
alanyl-tRNA synthetase	2.52 (0.64)	2.62 (0.01)
elongation factor G	2.53 (0.66)	2.62 (0.07)

2.3 COG 功能分类

根据 COG 的分类体系,所有基因的功能可分为 4 大类:新陈代谢 (Metabolism)、信息储存和加工 (Information storage and processing)、细胞加工和信号传递 (Cellular processes and signaling) 及功能未知 (Poorly characterized)。通过 COG 数据库获得的基因功能分类结果见图 2。从图中可以看出,大部分的基因与新陈代谢有关 (CK, 55.0%; NPK, 56.4%),其次为信息储存和加工及细胞加工和信号传递,有少部分基因功能未知。4 个大类还可进一步分为 21 个亚类,其中参与能量产生和转化 (Energy production and conversion) 的占绝对优势

(CK, 18.0%; NPK, 18.5%),其次为翻译、核糖体结构和生物合成 (Translation, ribosomal structure and biogenesis)、氨基酸运输和代谢 (Amino acid transport and metabolism)、碳水化合物运输和代谢 (Carbohydrate transport and metabolism) 及翻译后修饰、蛋白转化及分子伴侣 (Posttranslational modification, protein turnover, chaperones) 相关的基因,这 4 个次优势亚类的含量在 7.6% 到 11.4% 之间,并且在 CK 和 NPK 处理之间没有显著性差异。在所有亚类中,仅有脂质转运和代谢 (Lipid transport and metabolism) 这一亚类在 CK (6.1%) 和 NPK (4.9%) 处理间表现出统计上的显著性差异。

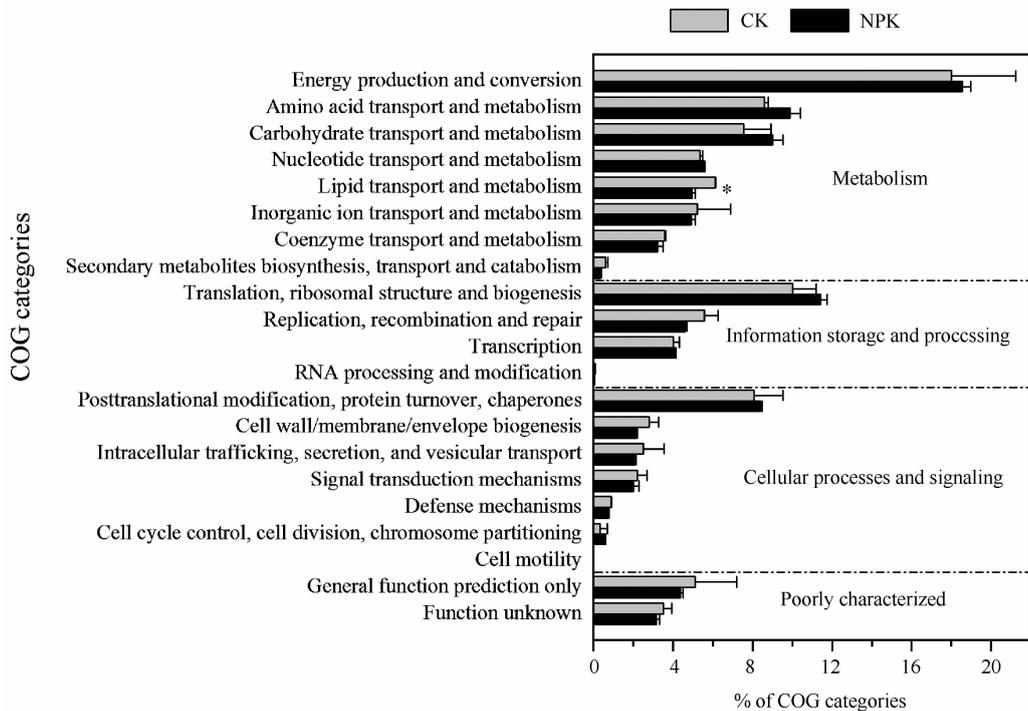


图 2. 淹水稻田土壤微生物活性基因的 COG 功能分类

Figure 2. Gene functional categories of microorganism in flooded paddy soils referring to COG database. * means a significant difference ($P < 0.05$) of the percentage of this category between CK and NPK treatments.

2.4 Subsystem 功能分类

根据 Subsystem 的功能分类体系,所有基因划分到 28 个 subsystem 中 (subsystem level1, 图 3)。从图中可以看到,这些 subsystem 在 CK 和 NPK 处理中的比例均没有显著差异。其中碳水化合物 (Carbohydrates) 代谢 subsystem 所占比例最大 (CK, 15.0%; NPK, 14.3%),其次为蛋白代谢 (Protein metabolism)、Clustering-based subsystems、氨基酸及其衍生物 (Amino acids and derivatives) 代谢这 3 个

subsystem, 含量均在 10% 以上,远高于其他的 Subsystem。

与氮、磷、硫、钾等土壤关键营养元素代谢相关 subsystem 中的大部分基因与这 4 种营养元素的吸收利用有关。如氮代谢 (Nitrogen metabolism) 相关基因的大部分 (CK, 54.8%; NPK, 52.9%) 与氨同化 (Ammonia assimilation) 相关,其次为硝酸盐和亚硝酸盐氨化 (Nitrate and nitrite ammonification) 相关基因 (CK, 23.9%; NPK, 23.0%)。磷代谢

(Phosphorus metabolism) 相关基因的大部分 (CK, 63.3% ; NPK, 63.4%) 与磷酸盐代谢 (Phosphate metabolism) 相关, 其次为高亲和力磷酸盐转运和 PHO 调节子的控制 (High affinity phosphate transporter and control of PHO regulon) 相关基因 (CK, 17.8% ; NPK, 20.3%)。硫代谢 (Sulfur

metabolism) 中大部分基因与无机硫同化 (Inorganic sulfur assimilation) 相关 (CK, 63.3% ; NPK, 66.3%)。钾代谢中的绝大部分基因 (CK, 92.5% ; NPK, 96.8%) 与钾平衡 (Potassium homeostasis) 即与钾的吸收和转运相关。

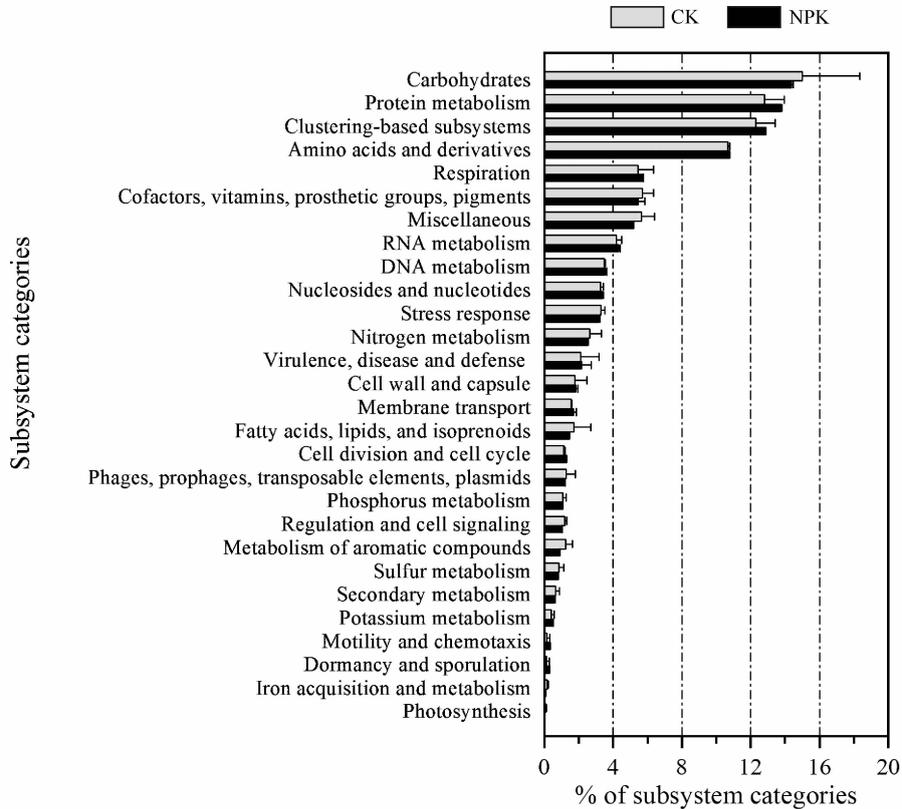


图 3. 淹水稻田土壤微生物活性基因的 Subsystem 功能分类

Figure 3. Gene functional category of microorganism in flooded paddy soils referring to Subsystem.

2.5 KEGG 功能分类

通过和 KEGG 数据库中的 KO (KEGG Orthology) 数据库进行比对, 得到不同层次的基因功能分类。从 KO level 1 层次来看, 淹水稻田土壤微生物的大部分活性基因与新陈代谢 (Metabolism) 相关 (CK, 62.2% ; NPK, 62.9%), 其次为遗传信息加工 (Genetic information processing, CK, 20.9% ; NPK, 21.9%) 和环境信息加工 (Environmental information processing, CK, 9.1% ; NPK, 8.4%) 相关基因, 细胞过程 (Cellular processes) 相关基因约占 4.0%, 人类疾病 (Human diseases) 及生物体系统 (Organismal systems) 相关基因含量在 1.4% 到 1.9% 之间。KO level 2 层次上的基因功能分类见图

4。从图中可以看到, 微生物新陈代谢相关的活动主要表现为氨基酸代谢、碳水化合物代谢及能量代谢; 蛋白翻译相关基因占遗传信息加工的大部分; 信号转导占环境信息加工的大部分, 而细胞过程相关的基因主要参与了细胞的生长和死亡。从不同层次的 KO 分类来看, CK 和 NPK 处理中的微生物代谢活动均非常一致, 仅氨基酸代谢 CK 略高于 NPK 处理。

KO level 3 这一层次的分类即对应各种代谢通路 (pathway), 含量最高的前 30 个 pathway 见图 5, 这些 pathway 的含量在 CK 和 NPK 处理之间比较一致, 统计上无显著性差异。从图 5 可以看出最活跃的 pathway 为能量代谢中与 ATP 产生直接相关的氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation), 蛋白翻译过程

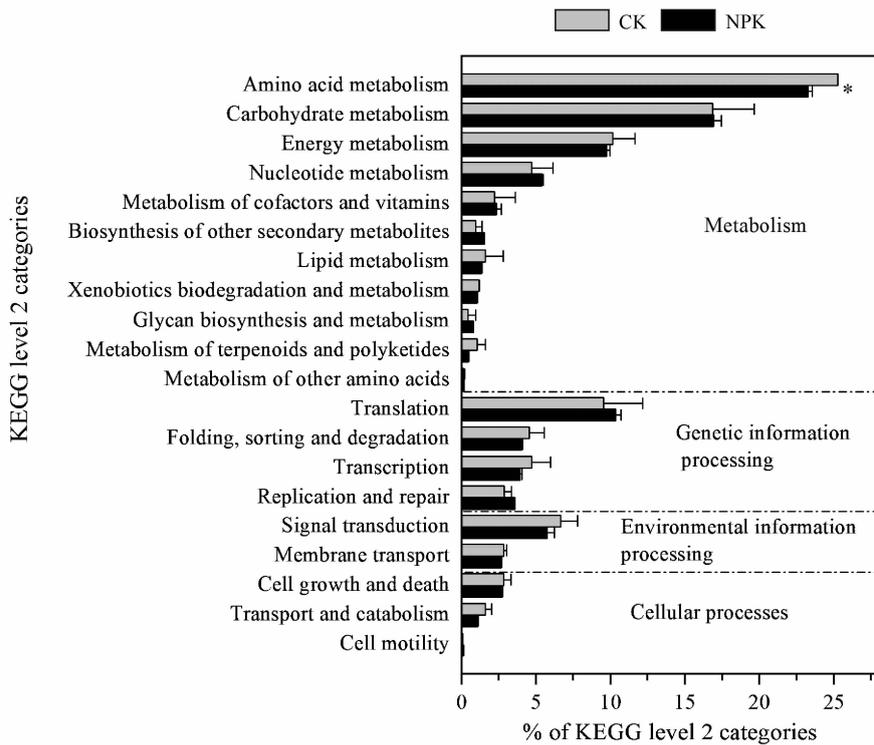


图 4. 淹水稻田土壤微生物活性基因在 KEGG level 2 水平上的功能分类

Figure 4. Gene functional category of microorganism in flooded paddy soils referring to KEGG level 2. * means a significant difference ($P < 0.05$) of the percentage of this category between CK and NPK treatments

中至关重要的氨酰-tRNA 合成 (Aminoacyl-tRNA biosynthesis)。在前 30 个 pathway 中,属于氨基酸代谢的有 7 个,覆盖了大部分氨基酸的代谢 pathway。属于碳水化合物代谢的有 6 个,其中最主要的为三羧酸循环 (Citrate cycle (TCA cycle)),其次为糖酵解/糖异化 (Glycolysis / Gluconeogenesis) 和丙酮酸代谢 (Pyruvate metabolism)。其余的 pathway 与核苷酸代谢、信号转导及跨膜运输等多种生理过程相关。

3 讨论

本试验通过环境转录组技术研究淹水状态下长期施肥 (NPK) 及不施肥 (CK) 处理稻田土壤活性微生物种类及其主要的代谢活动类型。每个样品获得的高质量序列数量在千万级别,测序深度在环境转录组研究中居于前列^[8, 20-21]。因此,目前技术条件下,本研究能够较为全面地反映稻田土壤中各类活性微生物种类 (包括含量在 0.1% 以下的多个微生物门类) 及其功能基因的整体表达特征。经过为期 2 周的淹水过程,稻田土壤微生物的群落组成已经变的相当稳

定^[22]。本文研究结果表明,淹水稻田土壤中的活性微生物种类繁多,跨越了三界分类系统,包括细菌、古菌、真核生物及病毒,其中源于细菌的活性基因占绝对优势,源于其余 3 类微生物的活性基因仅占很小的比例。Shrestha 等^[6]在德国一个类似的淹水稻田土壤中也观察到了相同的现象:在得到的 218 个 cDNA 克隆子中有 208 个来自细菌,来自古菌和真菌的分别只有 8 个和 2 个,这一结果与土壤中的细菌数量远大于其他种类有关。从细菌的组成来看,50% 以上的细菌活性基因源于 Proteobacteria,在活性微生物中占绝对优势,基于 16S rRNA 水平的研究已多次证实该门类在稻田土壤微生物中的优势地位^[14, 23],其他门类如 Acidobacteria、Verrucomicrobia、Gemmatimonadetes、Chloroflexi、Bacteroidetes、Nitrospirae 及 Actinobacteria 均为稻田土壤中的常见门类^[12, 23-24]。

在门的分类水平上,CK 和 NPK 处理间活性微生物组成比较一致,但 NPK 处理中 Acidobacteria 的含量远高于 CK 处理。Acidobacteria 是一个命名较晚的门,基于 16S rRNA 基因的分析表明,该门类系统进化宽度 (phylogenetic breadth) 仅次于

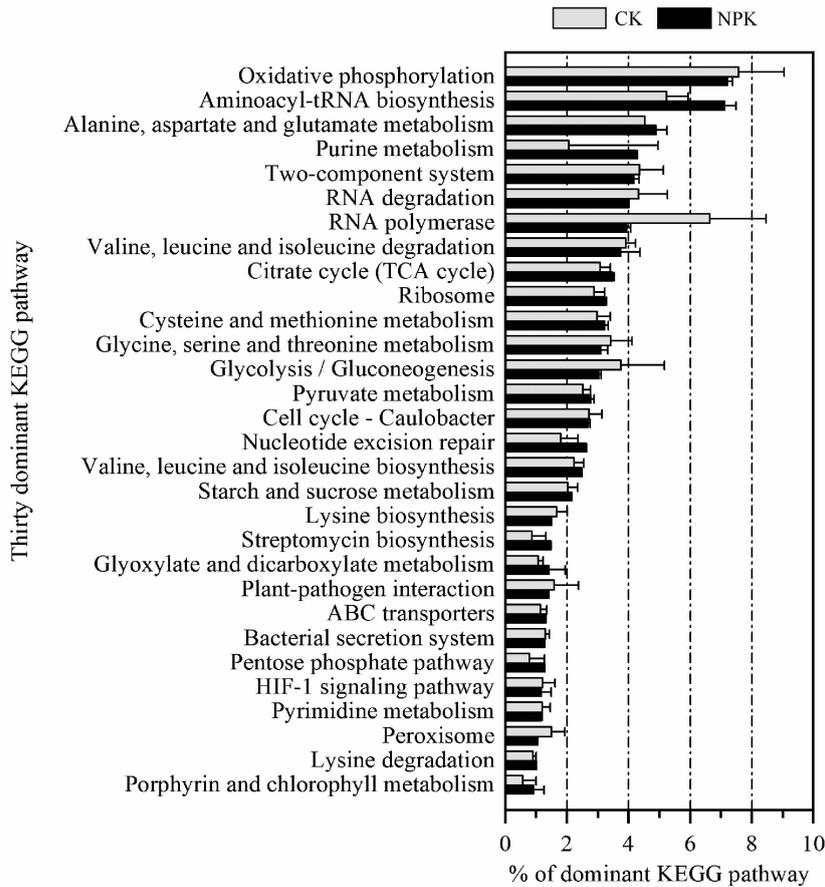


图 5. 转录子数量最多的前 30 个 KEGG pathway 及其百分比

Figure 5. Top 30 KEGG pathways with most abundant transcripts and their percentages in flooded paddy soils.

Proteobacteria, 至少包含 26 个显著不同的亚门 (subdivision)^[25], 尽管最近几年不断有新的纯培养菌株分离的报道, 但现有的这些菌株均属于其中的 5 个亚门, 其他大多数的亚门仍缺乏代表性的纯培养菌株^[26]。基于纯培养菌株的生理学及基因组学研究表明: 该门类微生物能够利用多种碳源, 但生长比较缓慢, 能够适应并耐受营养缺乏、干旱等不利环境条件^[27-28]。Acidobacteria 广泛分布于理化性质迥异的各种土壤环境^[29-30], 是土壤中仅次于 Proteobacteria 的第二大微生物类群^[31], 其数量和组成受 pH 值影响较大^[32], 其他土壤理化因子及生物因子如有机碳、氮、磷及纤毛虫数量等也有一定影响^[30,33]。已有研究表明长期施用化肥对稻田土壤中 Acidobacteria 在总细菌中的相对含量影响不显著^[14] 或对 Acidobacteria 某些亚门有显著影响, 但影响程度较小^[24]。然而, 本研究发现在 NPK 处理土壤中 Acidobacteria 的基因转录活性远大于 CK 处

理, 可能是由于两种处理土壤中 Acidobacteria 单个细胞的活性具有较大差异, 但这一现象背后的原因还需要进一步的研究。

针对淹水条件下稻田土壤微生物主要代谢过程, 本研究采用 COG、Subsystem 以及 KEGG 3 种基因功能分类数据库将其活性功能基因进行分类注释研究。尽管 3 种数据库的分类原则及分类层次不尽相同, 但分析结果基本一致: 即在稳定的淹水状态下稻田土壤微生物的核心代谢活动为能量获取及蛋白代谢。如 COG 分类中的能量产生和转化相关代谢活动占绝对优势, Subsystem 分类中的碳水化合物代谢, KEGG pathway 中的氧化磷酸化及三羧酸循环; 而蛋白代谢相关的代谢活动体现在 COG 分类中的氨基酸运输和代谢, 翻译、核糖体结构和生物合成, Subsystem 分类中的蛋白代谢, KEGG pathway 中的氨酰-tRNA 合成等。能量获取及蛋白代谢这 2 大类代谢活动类型的优势地位在其他环境微生物转录组

学研究中也被多次发现,如深海沉积物与淹水稻田土壤均处于缺氧状态,具有一定的环境可比性,研究人员也发现深海底泥中微生物的氨基酸代谢和碳水化合物代谢是优势代谢类型^[11];而在一处污水处理系统的活性淤泥中^[34],以及小猪肠道中^[35],碳水化合物代谢、蛋白代谢也被发现是其中微生物的优势代谢类型。其他代谢类型大部分与这2大类核心代谢类型紧密相关,如在氮、磷、硫、钾等土壤关键营养元素代谢相关的功能基因中,与这些元素同化吸收相关的基因表达量最高,而这些元素被大量吸收进入细胞很大程度上是微生物蛋白代谢及能量获取的需要,因为氮和硫是蛋白合成的主要原料,而磷是能量代谢中心物质三磷酸腺苷(ATP)的关键成分,钾对维持细胞内渗透压平衡具有重要作用。

通过对单个基因表达量的统计分析,表明表达量最高的10种基因均与微生物的基本代谢活动相关,如物质的运输、蛋白的合成等。表达量最高的为ABC transporter 编码基因,在其他多种环境样品中均发现了该蛋白的大量表达,如水体^[36]、土壤^[6,8],这可能是由于ABC-type transporter 在细菌、古菌及真核生物中均是最活跃的物质跨膜转运系统之一。此外,CK和NPK处理土壤中的微生物代谢活动类型非常一致,仅在个别的功能分类中表现出很小的差异。尽管经过了长期的施肥处理,NPK处理稻田土壤和CK处理稻田土壤的pH值和营养盐浓度并没有表现出明显的差异,总氮、总碳、铵态氮和硝态氮等主要营养盐指标均差异极小或无显著性差异^[15],可能是CK和NPK处理土壤微生物代谢活性非常一致的原因。一般认为,施肥的长期效应和短期效应具有一定的差异^[37],短期施肥可能显著刺激土壤微生物的活性^[38],而经过长期的施肥过程,土壤理化环境及整个土壤生态系统已经趋于稳定,微生物群落对施肥的响应也会逐渐变弱^[14,39]。此外,大气氧通常能够扩散至淹水稻田土壤表层2mm深处,形成一个极小的有氧微域^[22,40],由于技术所限,本研究未能区分淹水土壤的好氧与厌氧微域微生物过程,而将表层与深层土壤均匀混合,代表了微生物群落为好氧土壤表层及厌氧土壤深层的主要代谢类型,未来仍需对淹水稻田生态系统典型微域环境中的土壤活性微生物主要生理代谢过程进行深入研究。

综上所述,本文通过环境转录组技术对淹水状

态下CK和NPK处理稻田土壤活性微生物种类及代谢活动类型进行了全景式的描述,发现在稳定的淹水状态下,稻田土壤中的活性微生物种类跨越三界分类系统,以细菌中的Proteobacteria为优势门类,Acidobacteria在NPK处理土壤中的活性显著高于CK处理土壤。淹水稻田土壤微生物的核心代谢活动为能量获取和蛋白代谢,在CK和NPK处理土壤中微生物代谢活动类型非常一致。本研究中检测到的大量微生物代谢类型表明环境转录组学技术是研究稻田土壤微生物整体代谢特征的强大工具。此外,根据研究需要,研究人员还可以单独针对某些具体的生物学过程(如三羧酸循环)或某类物质的代谢通路(如甲烷代谢)进行深入分析。值得注意的是,环境转录组学技术也有其局限性,转录组数据必须和已有的蛋白数据库进行比对后才能确定其基因功能组成,因此转录组技术只能分析已知的蛋白功能。然而自然环境中存在许多不可培养微生物,其大量的蛋白功能目前仍是未知的,因此在环境转录组数据中必然会存在相当一部分功能未知的蛋白序列^[21]。尽管因此,环境转录组学技术在微生物群落及特定功能微生物基因表达特征研究方面仍具有广阔的应用前景,如与环境基因组技术相结合,将会在环境微生物生理生态研究中发挥更加重要的作用。

参考文献

- [1] Liesack W, Schnell S, Revsbech NP. Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(5): 625-645.
- [2] Knauth S, Hurek T, Brar D, Reinhold-Hurek B. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(11): 1725-1733.
- [3] Mårtensson L, Díez B, Warttinen I, Zheng W, El-Shehawry R, Rasmussen U. Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. *Plant and Soil*, 2009, 325(1-2): 207-218.
- [4] Damon C, Vallon L, Zimmermann S, Haider MZ, Galeote V, Dequin S, Luis P, Fraissinet-Tachet L, Marmeisse R. A novel fungal family of oligopeptide transporters identified by functional metatranscriptomics of soil eukaryotes. *The ISME Journal*, 2011, 5(12): 1871-1880.
- [5] Yoshida M, Ishii S, Fujii D, Otsuka S, Senoo K.

- Identification of active denitrifiers in rice paddy soil by DNA- and RNA-based analyses. *Microbes and Environments/JSME*, 2011, 27(4): 456-461.
- [6] Shrestha PM, Kube M, Reinhardt R, Liesack W. Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4): 960-970.
- [7] Shi Y, McCarren J, DeLong EF. Transcriptional responses of surface water marine microbial assemblages to deep-sea water amendment. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(1): 191-206.
- [8] de Menezes A, Clipson N, Doyle E. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(9): 2577-2588.
- [9] Yergeau E, Sanschagrín S, Maynard C, St-Arnaud M, Greer CW. Microbial expression profiles in the rhizosphere of willows depend on soil contamination. *The ISME Journal*, 2014, 8(2): 344-358.
- [10] Ye L, Zhang T, Wang T, Fang Z. Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(24): 13244-13252.
- [11] Lesniewski RA, Jain S, Anantharaman K, Schloss PD, Dick GJ. The metatranscriptome of a deep-sea hydrothermal plume is dominated by water column methanotrophs and lithotrophs. *The ISME Journal*, 2012, 6(12): 2257-2268.
- [12] Ahn JH, Song J, Kim BY, Kim MS, Joa JH, Weon HY. Characterization of the bacterial and archaeal communities in rice field soils subjected to long-term fertilization practices. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(5): 754-765.
- [13] Eichorst SA, Breznak JA, Schmidt TM. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Teniglobus* gen. nov., in the phylum Acidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(8): 2708-2717.
- [14] Wu M, Qin H, Chen Z, Wu J, Wei W. Effect of long-term fertilization on bacterial composition in rice paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(4): 397-405.
- [15] Wu Y, Lu L, Wang B, Lin X, Zhu J, Cai Z, Yan X, Jia Z. Long-term field fertilization significantly alters community structure of ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in a paddy soil. *Soil Science Society of America Journal*, 2011, 75(4): 1431-1439.
- [16] Zheng Y, Zhang LM, Zheng YM, Di H, He JZ. Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(6): 406-414.
- [17] Zhang J, Cai Z, Yang W, Zhu T, Yu Y, Yan X, Jia Z. Long-term field fertilization affects soil nitrogen transformations in a rice-wheat-rotation cropping system. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2012, 175(6): 939-946.
- [18] Wang C, Wang D, Sun R, Lin J. The relationship between soil enzyme activities and soil nutrients by long-term fertilizer experiments. *Ecology and Environment*, 2008, 17(2): 688-692. (in Chinese)
王灿, 王德建, 孙瑞娟, 林静慧. 长期不同施肥方式下土壤酶活性与肥力因素的相关性. *生态环境*, 2008, 17(2): 688-692.
- [19] Mettel C, Kim Y, Shrestha PM, Liesack W. Extraction of mRNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5995-6000.
- [20] Cai L, Yu K, Yang Y, Chen BW, Li XD, Zhang T. Metagenomic exploration reveals high levels of microbial arsenic metabolism genes in activated sludge and coastal sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013; 1-10.
- [21] Gilbert JA, Field D, Huang Y, Edwards R, Li W, Gilna P, Joint I. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PLoS One*, 2008, 3(8): e3042.
- [22] Noll M, Matthies D, Frenzel P, Derakshani M, Liesack W. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3): 382-395.
- [23] Itoh H, Ishii S, Shiratori Y, Oshima K, Otsuka S, Hattori M, Senoo K. Seasonal transition of active bacterial and archaeal communities in relation to water management in paddy soils. *Microbes and Environments*, 2013, 28(3): 370-380.
- [24] Zhao J, Ni T, Li Y, Xiong W, Ran W, Shen B, Shen Q, Zhang R. Responses of bacterial communities in Arable Soils in a rice-wheat cropping system to different fertilizer regimes and sampling times. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85301.
- [25] Barns SM, Cain EC, Sommerville L, Kuske CR. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated

- subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 3113-3116.
- [26] George IF, Hartmann M, Liles MR, Agathos SN. Recovery of as-yet-uncultured soil acidobacteria on dilute solid media. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(22): 8184-8188.
- [27] Rawat SR, Mannisto MK, Starovoytov V, Goodwin L, Nolan M, Hauser L, Land M, Davenport KW, Woyke T, Haggblom MM. Complete genome sequence of *Terriglobus saanensis* type strain SPIPR4(T), an Acidobacteria from tundra soil. *Standards in Genomic Sciences*, 2012, 7(1): 59-69.
- [28] Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, Henrissat B, Coutinho PM, Wu M, Xie G, Haft DH, Sait M, Badger J, Barabote RD, Bradley B, Brettin TS, Brinkac LM, Bruce D, Creasy T, Daugherty SC, Davidsen TM, DeBoy RT, Detter JC, Dodson RJ, Durkin AS, Ganapathy A, Gwinn-Giglio M, Han CS, Khouri H, Kiss H, Kothari SP, Madupu R, Nelson KE, Nelson WC, Paulsen I, Penn K, Ren Q, Rosovitz MJ, Selengut JD, Shrivastava S, Sullivan SA, Tapia R, Thompson LS, Watkins KL, Yang Q, Yu C, Zafar N, Zhou L, Kuske CR. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(7): 2046-2056.
- [29] Barns SM, Takala SL, Kuske CR. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1731-1737.
- [30] Foesel BU, Nägele V, Naether A, Wüst PK, Weinert J, Bonkowski M, Lohaus G, Polle A, Alt F, Oelmann Y. Determinants of Acidobacteria activity inferred from the relative abundances of 16S rRNA transcripts in German grassland and forest soils. *Environmental Microbiology*, 2013, 16(3): 658-675.
- [31] Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 1719-1728.
- [32] Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *The ISME Journal*, 2009, 3(4): 442-453.
- [33] Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364.
- [34] Yu K, Zhang T. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38183.
- [35] Poroyko V, White JR, Wang M, Donovan S, Alverdy J, Liu DC, Morowitz MJ. Gut microbial gene expression in mother-fed and formula-fed piglets. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12459.
- [36] Stewart FJ, Ulloa O, DeLong EF. Microbial metatranscriptomics in a permanent marine oxygen minimum zone. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(1): 23-40.
- [37] Geisseler D, Scow KM. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 75(0): 54-63
- [38] Lazcano C, Gomez-Brandon M, Revilla P, Dominguez J. Short-term effects of organic and inorganic fertilizers on soil microbial community structure and function. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(6): 723-733.
- [39] Ogilvie LA, Hirsch PR, Johnston AWB. Bacterial diversity of the Broadbalk 'classical' winter wheat experiment in relation to long-term fertilizer inputs. *Microbial Ecology*, 2008, 56(3): 525-537.
- [40] Lüdemann H, Arth I, Liesack W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 754-762.

Microbial metabolism in typical flooded paddy soils

Yuanfeng Cai¹, Yucheng Wu¹, Shuwei Wang², Xiaoyuan Yan², Yongguan Zhu³,
Zhongjun Jia^{1*}

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

²Changshu Agro-ecological Experimental Station, Chinese Academy of Science, Changshu 215555, Jiangsu Province, China

³Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, Fujian Province, China

Abstract: [**Objective**] The object of this study is to reveal the composition of active microorganism and their metabolic activities in flooded paddy soils with long-term fertilization (Mineral nitrogen, phosphorus, and potassium, NPK) and without fertilizer (Control check, CK) by environmental transcriptomics. [**Methods**] Flooded soil microcosms were incubated in the laboratory for two weeks, then total RNA were extracted from the soil for transcriptome sequencing. Resulting fastq files were uploaded to the Metagenomics Analysis Server (MG-RAST) for taxonomic analysis, gene annotation and function classification. [**Results**] Transcripts from diverse active microorganism, including bacteria (> 95%), archaea, eukaryotes and viruses, were detected in both flooded paddy soils of CK and NPK treatments. Most of the transcripts (active genes) of bacteria and archaea were derived from Proteobacteria (more than 50% of total bacterial transcripts) and Thaumarchaeota (about 70% of total archaeal transcripts) respectively in both treatments. Transcriptional activity of Acidobacteria in NPK treatment paddy soil was significantly higher than that in CK treatment paddy soil. As for other phyla of bacteria and archaea, there were no significant differences of transcriptional activity of them between CK and NPK treatment paddy soils. The highest expressed gene in both CK and NPK treatment paddy soils is ABC transporter encoding gene which related to the transmembrane transport of substances. Based on gene function category of COG (Clusters of Orthologous Genes), Subsystem and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database, we found that the main metabolic activities of microorganisms in both CK and NPK treatment paddy soils were related to energy production and conversion, carbohydrate metabolism, protein metabolism and amino acid metabolism, and the dominant KEGG pathways were oxidative phosphorylation and aminoacyl-tRNA biosynthesis. [**Conclusion**] Composition of active microorganism in CK and NPK treatment paddy soils was generally similar, except Acidobacteria whose transcriptional activity was significantly different between these two treatment paddy soils. It was also very similar between CK and NPK treatment paddy soils considering the metabolic activities of microorganisms in them, for dominant metabolic processes in these two soils were both related to energy obtaining and protein metabolism. So, dominant metabolic activities of microorganism in flooded paddy soils used in this study were not altered significantly under long-term inorganic fertilization.

Keywords: flooded paddy soil, environmental transcriptomics, gene functional category, metabolic type, long-term fertilization

(本文责编:王晋芳)

Supported by the International Science Cooperation and Communication Program of China (2010DFA22770) and by the China Postdoctoral Science Foundation (2013M541743)

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

Received: 25 April 2014/ Revised: 19 June 2014