

关键飞,曹 阳.高通量测序分析黑土稀有微生物群落结构[J].江苏农业科学,2020,48(20):288-292.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.053

高通量测序分析黑土稀有微生物群落结构

关键飞,曹 阳

(牡丹江师范学院,黑龙江牡丹江 15700)

摘要:稀有微生物群落作为地球生态系统中的重要组成部分,在土壤生态系统中扮演着超比例的角色。以黑龙江省黑土中稀有微生物为研究对象,采用高通量测序技术分析黑土中稀有细菌、真菌群落结构组成及其与土壤理化性质的相关性。对属水平上稀有微生物群落进行分析发现,相对丰度在 0.01% 以下的稀有细菌菌属 420 种,稀有真菌菌属 210 种,各采样点处稀有微生物类群分布差异性较大,存在特征稀有微生物类群,但未见黑土共有稀有菌属的检出。总磷和有效磷的含量分别影响不同种类的稀有细菌菌属,其中放线孢菌属(*Actinomycetospora*)与总磷含量呈现极显著正相关关系,无色杆菌属(*Achromobacter*)与有效磷含量呈现极显著正相关关系。真菌稀有菌群中的小孢霉属(*Microbotryum*)、顶孢霉属(*Acremonium*)等与土壤含水率、有机质含量、总氮含量、硝态氮含量呈现极显著正相关关系。

关键词:稀有微生物;群落结构;高通量测序;黑土;理化性质

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)20-0288-05

微生物作为土壤生态系统的重要组成部分,在维持生态系统功能和服务过程中起着关键作用^[1]。现阶段对于土壤微生物的研究主要集中在物种组成、结构功能以及遗传多样性等方面。土壤中的微生物群落具有典型的物种丰度分布偏斜特征,表现为相对高丰度的少量优势物种与相对低丰度的大量稀有物种共存^[2],稀有群落作为地球生态系统中至关重要的组成部分,在土壤生态系统中扮演着超比例的角色^[3],是微生物群落功能的一个潜在驱动力^[4],稀有微生物群落是评价微生物多样性的重要因素,是微生物遗传和功能多样性的存储库,具有驱动地球化学循环^[5-6]、指示环境变化^[7-8]、降解污染物^[9-10]、稳定群落结构^[11]等重要功能。然而相对于优势类群,现阶段对于稀有微生物类群的研究较少^[12]。本研究以黑龙江省黑土为研究对象,解析土壤中稀有细菌和真菌的群落结构组成,分析稀有微生物群落与土壤理化性质的相关性,为稀有微生物的生态学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

本研究以黑龙江省表层(0~20 cm)黑土为研究对象,在黑龙江省区域内设置 10 个采样点(图 1),于 2019 年 5 月进行土壤样品采集。土壤样品采集过程中去除细根等杂物后,充分混匀,置于密封袋,带回实验室后,−80℃ 保存土壤样品用于高通量测试分析,常温风干土壤样品用于理化性质测定。

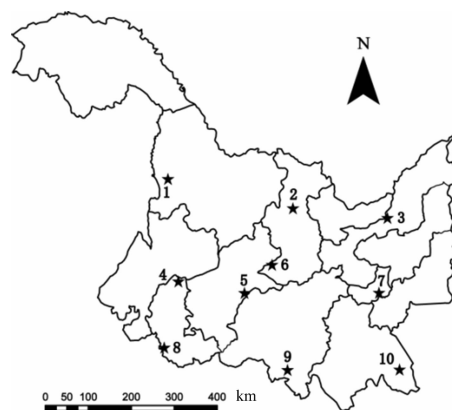


图1 采样点分布

1.2 高通量测序

采用 Illumina MiSeq 测序平台对测序样本进行双端测序,委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。测序过程中,采用 E. Z. N. A.® Soil DNA Kit 提取试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U. S.)提取土壤总 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因 V3-

收稿日期:2020-04-19

基金项目:牡丹江师范学院博士科研启动基金(编号:MNUB201709)。

作者简介:关键飞(1986—),女,黑龙江齐齐哈尔人,博士,讲师,主要从事环境生态效应与资源利用研究。E-mail: bangeshiji@126.com。

V4 区引物 515F(5′ - GTGCCAGCMGCCGCGG - 3′) 和 907R(5′ - CCGTCAATTCMTTTRAGTTT - 3′) 对高变区片段进行扩增,PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 3 min;27 次循环(95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s);72 ℃ 延伸 10 min,10 ℃ 保存。20 μL 反应体系为 4 μL 的 5 × FastPfu Buffer,2 μL 的 2.5 mmol/L dNTPs,0.8 μL 的 Forward Primer(5 μmol/L),0.8 μL 的 Reverse Primer(5 μmol/L),0.4 μL 的 FastPfu Polymerase,0.2 μL 的 BSA,10 ng 的 Template DNA,补 ddH₂O 至 20 μL。真菌 18S rDNA 的 V5 - V7 区引物 SSU0817F(5′ - TTAGCATG GAATAATTRRAATAGGA - 3′) 和 1196R(5′ - TCTGG ACCTGGTGAGTTTCC - 3′) 对高变区片段进行扩增,PCR 反应条件为 90 ℃ 预变性 3 min;37 次循环(95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s);72 ℃ 延伸 10 min,10 ℃ 保存。20 μL 反应体系为 4 μL 的 5 × FastPfu Buffer,2 μL 的 2.5 mmol/L dNTPs,0.8 μL 的 Forward Primer(5 μmol/L),0.8 μL 的 Reverse Primer(5 μmol/L),0.4 μL 的 FastPfu Polymerase,0.2 μL 的 BSA,10 ng 的 Template DNA,补 ddH₂O 至 20 μL。利用 QuantiFluor™ - ST 微型荧光计进行 PCR 产物检测定量。测序数据经过 barcode 拆分后获得的有效序列信息统计,使用 Qiime2 软件中的 DADA2 插件对所有样品的全部原始序列进行质量控制、去噪、拼接并且去嵌合体,形成 OTU。

1.3 土壤理化性质测定

土壤含水率的测定采用真空烘箱法;pH 值的测定采用电位法;有机质含量的测定采用重铬酸钾滴定法;全氮含量的测定采用半微量开氏法;全磷含量的测定采用氢氧化钠碱融 - 钼锑抗比色法;全钾含量的测定则采用火焰光度法;硝态氮含量采用连续流动分析仪法进行测定;有效磷含量采用钼锑抗比色法进行测定,其中酸性土壤使用氟化铵 - 盐酸作为浸提剂,碱性土壤使用碳酸氢钠作为浸提剂;速效钾含量则使用乙酸铵浸提 - 火焰光度计测定,每个土壤样品测 3 次取平均值记录,用于后续试验数据的分析。

1.4 数据处理方法

选取代表性 OTU 序列,与核糖体 RNA 数据库(Greengenes Database 13_8 版本[按 99% 序列相似性聚类])进行比对获得物种注释信息。使用 Excel 2010、Origin 8.0 对数据进行处理以及作图分析,使

用 SPSS 19.0 进行土壤理化性质和稀有细菌、真菌菌群的 Pearson 相关性分析以及各采样点的细菌、真菌聚类分析,本研究中细菌和真菌菌属稀有性的定义为小于 0.01% 的相对丰度^[13]。

2 结果与分析

2.1 高通量测序结果评价

黑龙江省 10 个表层土壤样品中,共获得细菌原始序列 427 699 条,真菌原始序列 454 833 条,各样本 Alpha 多样性稀释曲线趋于平缓,测序结果足够反映各土壤样本中细菌和真菌的多样性。经核糖体 RNA 数据库比对获得物种注释信息,对细菌和真菌属水平上稀有微生物群落进行分析发现,共得到稀有细菌菌属 420 种,其中 92 种为数据库明确菌属,真菌菌属 210 种,其中 85 种为数据库明确物种,其他均为 Unspecified,本研究将对可明确的稀有菌属进行相关分析。

2.2 稀有细菌群落结构分析

每个采样点处均有其独特的稀有细菌群落结构组成,各采样点处稀有细菌菌属数量和特有稀有细菌菌属数量不等(图 2),稀有菌属结构组成差异较大,聚类分析结果如图 3 所示,不同采样点之间共有菌属较少,未检测出 1 种稀有菌属同时出现在所有样品中的情况,只有 *Methylobacter* 作为稀有菌属出现在 7 个采样点中。

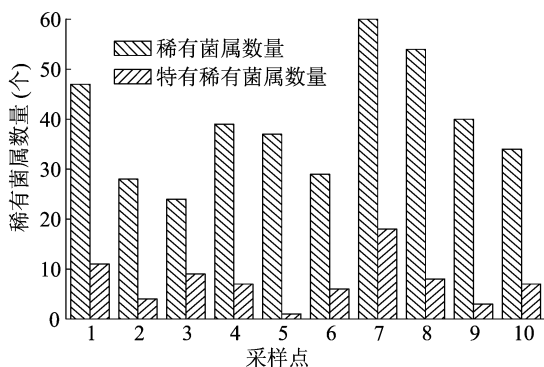


图2 可鉴定细菌稀有菌属数量

将稀有菌属与土壤理化性质进行 Pearson 相关性分析发现,囊裸藻属(*Trachelomonas*)与土壤含水率呈极显著正相关关系,与有机质、总氮和硝态氮含量呈显著正相关关系。*Salinarimonas*、*Adhaeribacter*、特吕珀菌属(*Truepera*)与土壤 pH 值呈显著正相关关系,而马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)则与土壤 pH 值呈现显著或极显著负相关关系。总磷

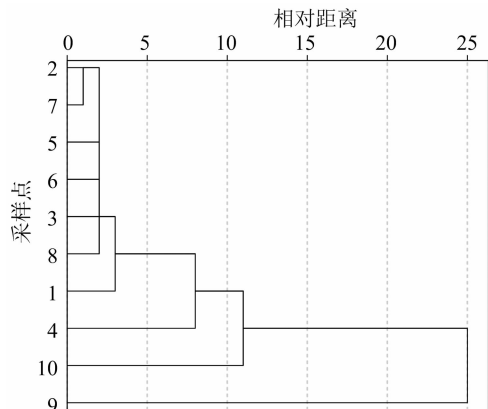


图3 不同采样点处细菌稀有菌属聚类分析

表 1 土壤理化性质与稀有细菌菌属相关性分析

土壤理化性质		显著相关性稀有细菌菌属	
pH 值		<i>Salinarimonas</i> (0.717 [*])	
		浮霉状菌属 (<i>Planctomycete</i>) (0.633 [*])	
		新鞘脂菌属 (<i>Novosphingobium</i>) (−0.671 [*])	
		<i>Dongia</i> (−0.822 ^{**})	
		<i>Adhaeribacter</i> (0.659 [*])	
		马杜拉放线菌属 (<i>Actinomadura</i>) (−0.770 ^{**})	
		特吕珀菌属 (<i>Truepera</i>) (0.633 [*])	
含水率		囊裸藻属 (<i>Trachelomonas</i>) (0.789 ^{**})	
有机质含量		囊裸藻属 (<i>Trachelomonas</i>) (0.712 [*])	
		<i>Ferruginibacter</i> (0.634 [*])	
总氮含量		囊裸藻属 (<i>Trachelomonas</i>) (0.737 [*])	
		<i>Salinarimonas</i> (−0.656 [*])	
		生丝微菌属 (<i>Hyphomicrobium</i>) (0.680 [*])	
硝态氮含量		囊裸藻属 (<i>Trachelomonas</i>) (0.734 [*])	
		生丝微菌属 (<i>Hyphomicrobium</i>) (0.720 [*])	
总钾含量		玫瑰单胞菌属 (<i>Roseomonas</i>) (−0.674 [*])	
		土微菌属 (<i>Pedomicrobium</i>) (−0.683 [*])	
速效钾含量		假黄色单胞菌属 (<i>Pseudoxanthomonas</i>) (0.655 [*])	
		<i>Massilia</i> (−0.703 [*])	
		柄杆菌属 (<i>Caulobacter</i>) (0.642 [*])	
		无色杆菌属 (<i>Achromobacter</i>) (0.654 [*])	
土壤理化性质		显著相关性稀有细菌菌属	
总磷含量		球衣细胞属 (<i>Sphaerotilus</i>) (0.659 [*])	
		<i>Rubricoccus</i> (0.927 ^{**})	
		玫瑰单胞菌属 (<i>Roseomonas</i>) (0.782 ^{**})	
		土微菌属 (<i>Pedomicrobium</i>) (0.784 ^{**})	
		<i>Parasegittibacter</i> (0.927 ^{**})	
		副球菌属 (<i>Paracoccus</i>) (0.927 ^{**})	
		颤藻属 (<i>Oscillatoria</i>) (0.927 ^{**})	
		<i>Oceaniovalibus</i> (0.927 ^{**})	
		<i>Litorilinea</i> (0.884 ^{**})	
有效磷含量		暖绳菌属 (<i>Caldilinea</i>) (0.927 ^{**})	
		<i>Ardenscatena</i> (0.927 ^{**})	
		放线孢菌属 (<i>Actinomycetospora</i>) (0.772 ^{**})	
		无色杆菌属 (<i>Achromobacter</i>) (0.691 [*])	
		假黄色单胞菌属 (<i>Pseudoxanthomonas</i>) (0.836 ^{**})	
		新鞘脂菌属 (<i>Novosphingobium</i>) (0.811 ^{**})	
		野野村氏菌属 (<i>Nonomuraea</i>) (0.949 ^{**})	
		小囊菌属 (<i>Nannocystis</i>) (0.949 ^{**})	
		<i>Fimbriimonas</i> (0.786 ^{**})	
		<i>Elizabethkingia</i> (0.855 ^{**})	
		梭菌属 (<i>Clostridium</i>) (0.946 ^{**})	
		柄杆菌属 (<i>Caulobacter</i>) (0.739 ^{**})	
		杜拉放线菌属 (<i>Actinomadura</i>) (0.818 ^{**})	
		无色杆菌属 (<i>Achromobacter</i>) (0.824 ^{**})	

注:括号内数据为相关系数。*、** 分别表示在 0.05、0.01 水平(双侧)上显著相关,下表同。

将稀有菌属与土壤理化性质进行 Pearson 相关性分析,如表 2、表 3 所示,*Nuclearia*、*Trichomonascus* 等菌属与土壤含水率、有机质含量、总氮含量、硝态氮含量具有显著或极显著正相关关系,土壤中总磷的含量则是影响 *Obertrumia*、雕蚀菌属 (*Coelomomyces*)、*Naganishia* 等真菌分布的主要环境因素。

和有效磷含量分别影响了不同种类稀有细菌菌属的组成丰度,而放线孢菌属 (*Actinomycetospora*) 与总磷含量呈现极显著正相关关系,无色杆菌属 (*Achromobacter*) 与有效磷含量呈现极显著正相关关系(表 1)。

2.3 稀有真菌群落结构分析

如图 4 所示,采样点 3 处的稀有真菌菌属在其他采样点处有分布,故未见特有真菌稀有菌属。对各采样点真菌进行聚类分析(图 5)发现,可鉴定稀有真菌菌群在各点差异较大,各点未见共有菌属检出。

3 讨论与结论

近年来,稀有微生物群落由于其未知的生态学意义和潜在的进化学意义受到了越来越多研究者的关注。研究发现,高活性的稀有关键物种(约占细胞总数的 0.3%)贡献了系统中 40% 以上铵和

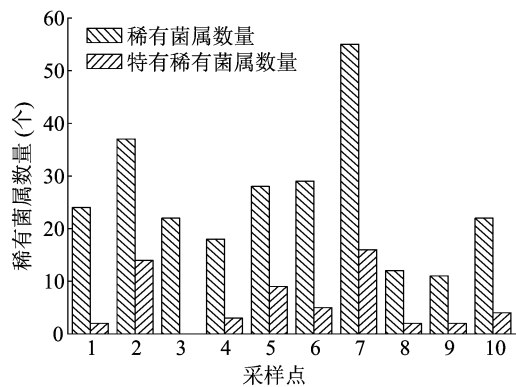


图4 可鉴定真菌稀有菌属数量

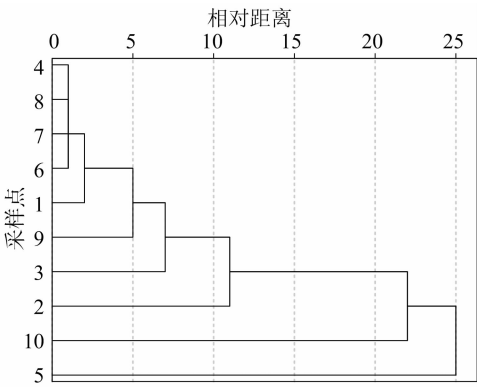


图5 不同采样点处真菌稀有菌属聚类分析

表 2 土壤理化性质与稀有真菌菌属相关性分析

真菌	相关系数			
	含水率	有机质含量	总氮含量	硝态氮含量
<i>Nuclearia</i>	0.813 **	0.840 **	0.816 **	0.941 **
<i>Trichomonascus</i>	0.827 **	0.764 *	0.755 *	0.785 **
<i>Incertae_Sedis</i>	0.709 *	0.655 *	0.672 *	0.667 *
<i>Paratritirachium</i>	0.830 **	0.827 **	0.800 **	0.921 **
<i>Trechispora</i>	0.810 **	0.837 **	0.804 **	0.929 **
<i>Stomiopeltis</i>	0.821 **	0.824 **	0.796 **	0.925 **
小孢霉属 (<i>Microbotryum</i>)	0.821 **	0.824 **	0.796 **	0.925 **
<i>Microdiaphanosoma</i>	0.821 **	0.824 **	0.796 **	0.925 **
顶孢霉属 (<i>Acremonium</i>)	0.821 **	0.824 **	0.796 **	0.925 **
柄锈菌 (<i>Puccinia</i>)	0.821 **	0.824 **	0.796 **	0.925 **
<i>Phyllosticta</i>	0.821 **	0.824 **	0.796 **	0.925 **
<i>Coemansia</i>	0.821 **	0.824 **	0.796 **	0.925 **
<i>Sphaeroeca</i>	0.762 *	0.660 *	0.639 *	0.828 *
<i>Tapinella</i>	0.821 **	0.824 **	0.796 **	0.925 **
<i>Fonticula</i>	0.821 **	0.824 **	0.796 **	0.925 **

表 3 总磷含量与真菌群落相关性分析

真菌名称	相关系数	真菌名称	相关系数
<i>Obertrumia</i>	0.929 **	<i>Paraphelidium</i>	0.879 **
雕蚀菌属 (<i>Coelomomyces</i>)	0.875 **	<i>Incertae_Sedis</i>	0.887 **
<i>Naganishia</i>	0.832 **	<i>Salpingoeca</i>	0.839 **
<i>Dictyamoeba</i>	0.734 *	<i>Monosiga</i>	0.869 **
管柄囊霉属 (<i>Funneliformis</i>)	0.696 *	<i>Colpodidium</i>	0.927 **

70% 以上碳的吸收量,对环境介质中氮和碳的吸收至关重要^[14]。稀有微生物群落在生物地球化学循环中扮演着超比例的角色。在 20 世纪的大部分时间里,我们对微生物多样性的理解依赖于显微镜、培养和实验来鉴定分离微生物的遗传和表型特征。虽然这些方法导致了许多基础性发现,但微生物多样性的 大小和微生物之间的系统发育关系却知之

甚少。高通量测序技术的出现、发展与应用,使得稀有微生物群落结构的深入分析成为可能,揭示了在低密度下存在的多种微生物^[15-18]。

研究发现,低丰度类群是评估 α - 多样性和 β - 多样性的重要因素^[19],然而,现阶段对于其在生物圈的分布和控制却知之甚少。微生物的稀有性可能是随机过程,简单地通过随机的种群波动而出现,而不存在任何特定的生理特征^[20];也可能是受外在的非生物和生物因素的驱动,狭窄的生态位、高度的种间竞争、低竞争能力、捕食频率都在一定程度上影响微生物的稀有性^[4]。本研究中,稀有微生物类群在土壤中的分布具有特异性,未见共有稀有菌群的检出,且各点稀有微生物类群结构组成差异较大,稀有性产生的原因则需进一步研究。

相对于优势菌群,稀有物种对环境波动更敏

感,更容易灭绝^[21]。目前与人类活动有关的突变,如全球变化和土地集约利用,可能因此对罕见的生物圈和相关的生态系统功能产生深刻影响^[22]。监测稀有微生物相对丰度或活性的变化,可以作为环境变化的早期预警系统^[23]。本研究发现,某些稀有细菌菌属如 *Rubricoccus* 等与土壤总磷的含量呈现极显著正相关性,而这些细菌菌属在低浓度的总磷含量的土壤中则未被检出。而对于真菌菌群小孢霉属、*Microdiaphanosoma*、顶孢霉属等而言,它们的存在则与土壤含水率、有机质、总氮、硝态氮含量有关,该群落的整体性出现,与采样点处含水率较高,有机质、总氮、硝态氮含量较大有关,且未见该群落其他采样点以稀有性群落组成存在。土壤含有一个复杂的微生物群落,其中含有大量的低丰度微生物^[24],然而对于它们的具体生态功能,仍需要进一步的探索。

参考文献:

- [1] Falkowski P G, Fenchel T, Delong E F. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles [J]. Science, 2008, 320 (5879): 1034 – 1039.
- [2] Nemergut D R, Costello E K, Hamady M, et al. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa [J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(1): 135 – 144.
- [3] Chen Q L, Ding J, Dong Z, et al. Rare microbial taxa as the major drivers of ecosystem multifunctionality in long – term fertilized soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 141: 107686.
- [4] Jousset A, Bienhold C, Chatzinotas A, et al. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings [J]. ISME Journal, 2017, 11(4): 853 – 862.
- [5] Zhang Y, Dong S K, Gao Q Z, et al. “Rare biosphere” plays important roles in regulating soil available nitrogen and plant biomass in alpine grassland ecosystems under climate changes [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2019, 279: 187 – 193.
- [6] Philippot L, Spor A, Hénault C, et al. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil [J]. The ISME Journal, 2013, 7(8): 1609 – 1619.
- [7] Jiao C C, Zhao D Y, Huang R, et al. Abundant and rare bacterioplankton in freshwater lakes subjected to different levels of tourism disturbances [J]. Water, 2018, 10(8): 1075.
- [8] Wang Y Q, Hatt J K, Tsementzi D, et al. Quantifying the importance of the rare biosphere for microbial community response to organic pollutants in a freshwater ecosystem [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(8): e03321 – 16.
- [9] Wei S T S, Wu Y W, Lee T H, et al. Microbial functional responses to cholesterol catabolism in denitrifying sludge [J]. mSystems, 2018, 3(5): e00113 – e00118.
- [10] Giebler J, Wick L Y, Chatzinotas A, et al. Alkane – degrading bacteria at the soil – litter interface: comparing isolates with T – RFLP – based community profiles [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 86(1): 45 – 58.
- [11] Vivant A L, Garmyn D, Maron P A, et al. Microbial diversity and structure are drivers of the biological barrier effect against *Listeria monocytogenes* in soil [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76991.
- [12] Lynch M D J, Neufeld J D. Ecology and exploration of the rare biosphere [J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(4): 217 – 229.
- [13] Galand P E, Casamayor E O, Kirchman D L, et al. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(52): 22427 – 22432.
- [14] Musat N, Halm H, Winterholler B, et al. A single – cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(46): 17861 – 17866.
- [15] Liu M, Xue Y Y, Yang J. Rare plankton subcommunities are far more affected by DNA extraction kits than abundant plankton [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 454.
- [16] Hu B Y, Xu B X, Yun J L, et al. High – throughput single – cell cultivation reveals the underexplored rare biosphere in deep – sea sediments along the Southwest Indian Ridge [J]. Lab on a Chip, 2020, 20: 363 – 372.
- [17] Hamasaki K, Taniguchi A, Tada Y, et al. Active populations of rare microbes in oceanic environments as revealed by bromodeoxyuridine incorporation and 454 tag sequencing [J]. Gene, 2016, 576(2): 650 – 656.
- [18] Podar M, Abulencia C B, Walcher M, et al. Targeted access to the genomes of low – abundance organisms in complex microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3205 – 3214.
- [19] Zhou Q, Zhang X M, He R J, et al. The composition and assembly of bacterial communities across the rhizosphere and phyllosphere compartments of *Phragmites australis* [J]. Diversity, 2019, 11(6): 98.
- [20] Ai D X C, Chu C J, Ellwood M D F, et al. Migration and niche partitioning simultaneously increase species richness and rarity [J]. Ecological Modelling, 2013, 258: 33 – 39.
- [21] Gaston K J. Biodiversity and extinction: the importance of being common [J]. Progress in Physical Geography, 2008, 32(1): 73 – 79.
- [22] Rodrigues J L, Pellizari V H, Mueller R, et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(3): 988 – 993.
- [23] Chambers L G, Guevara R, Boyer J N, et al. Effects of salinity and inundation on microbial community structure and function in a mangrove peat soil [J]. Wetlands, 2016, 36: 361 – 371.
- [24] Roesch L F W, Fulthorpe R R, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity [J]. ISME Journal, 2007, 1(4): 283 – 290.