

基于高通量培养分析稻虾共作模式土壤的细菌群落

宋蕾蕾¹, 孙文晓¹, 焦可欣¹, 陈钰璐¹, 邹淑琪¹, 张淅月¹,
徐晨伟^{2,3}, 张 杨¹, 戴传超¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心,
江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏 南京 210023)

(2. 江苏省农业农村污染防治技术与装备工程研究中心, 江苏 南通 226007)

(3. 南通科技职业学院, 江苏 南通 226007)

[摘要] 高通量测序技术的发展发现并鉴定了土壤微生物的未培养物种, 然而, 仅依赖非培养的高通量测序无法获得发挥关键功能的微生物培养物, 限制了对其功能的验证及其应用, 这对关键功能微生物的机理性研究和应用具有一定的局限性. 本研究以稻虾共作和水稻单作两种稻作模式的土壤样品为研究对象, 分别对比了传统平板涂布、96 孔培养板划线分离以及将非培养和培养法相结合的——“96 孔高通量培养法”3 种方法的土壤细菌分类差异、菌群多样性、组成特异性以及细菌功能特征. 结果表明, 相对于传统涂布培养法, 96 孔高通量培养法所获取的细菌数量高约 5 倍, 能鉴定到属的培养物高约 4 倍, 预测功能鉴定提高约 2 倍. 由此可见, “96 孔高通量培养法”大大提高了对土壤细菌培养物的获取和鉴定率. 本研究弥补了传统培养法的获得率低的不足, 拓宽了高通量培养技术的应用领域, 同时, 也为进一步揭示稻虾共作模式参与土壤生态变化过程的微生物机制提供研究基础.

[关键词] 高通量测序, 稻虾共作模式, 涂布培养法, 土壤微生物群落

[中图分类号] S154.37 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2024)01-0057-11

Comparison of Soil Bacterial Communities in Rice-Crayfish Cocropping Based on High-Throughput Culturable Method

Song Leilei¹, Sun Wenxiao¹, Jiao Kexin¹, Chen Yulu¹, Zou Shuqi¹, Zhang Xiyue¹,
Xu Chenwei^{2,3}, Zhang Yang¹, Dai Chuanchao¹

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics,
Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, Nanjing 210023, China)

(2. Jiangsu Province Engineering Research Center of Agricultural and Rural Pollution Prevention Technology and Equipment, Nantong 226007, China)

(3. Nantong College of Science and Technology, Nantong 226007, China)

Abstract: With the development of high-throughput sequencing technology, more and more unculturable species of soil microorganisms have been discovered and identified. However, high-throughput sequencing cannot isolate and purify a single strain with key functions from massive databases, which has certain limitations on the mechanical research and application of key function microorganisms. In this study, soil samples of rice-crayfish cocropping and rice-single cropping were taken as the research object. The differences were compared in soil bacterial classification, microbial diversity, composition specificity, and microbial functional characteristics of traditional spread plate method, 96-well culture plate in situ scribing separation, and the combination of high-throughput and cultivable methods—the “96-well high-throughput cultivable method”. The results showed that comparing with the traditional spread plate method, the number of bacteria obtained by 96-well high-throughput culture method was increased by about 5 times, the identification of genus level was increased by about 4 times, and the identification of function was increased by about 2 times. It can be seen that the 96-well high-throughput cultivable method greatly improves the “resolution” of the separation and identification of soil microorganisms. The results of this study made up for the shortage of strains that could not be obtained by traditional

收稿日期: 2023-08-21.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(32001210)、江苏省高校自然科学基金面上项目(22KJB180003)、江苏省农业农村污染防治技术与装备工程研究中心开放课题(GCZXZD2301)、江苏省级大学生创新创业训练项目(202210319101Y).

通讯作者: 张杨, 博士, 讲师, 研究方向: 土壤微生物生态. E-mail: yangzhang@nnu.edu.cn

spread plate method, expanded the application field of high-throughput culturable technology, and also provided a research basis for further revealing the microbial mechanism involved in the soil ecological change process of rice-crayfish cocropping model.

Key words: high-throughput sequencing, rice-crayfish cocropping, spread plate method, soil bacterial communities

土壤微生物是最丰富的微生物资源库,是联系大气圈、水圈、岩石圈及生物圈物质与能量交换的重要纽带,被称为地球关键元素循环过程的引擎^[1]. 然而,随着人类活动对自然资源的过度开发,尤其是对农耕地的集约化利用造成土壤微生物多样性及组成受到强烈干扰^[2],而这将直接影响土壤养分循环能力并关系到生态系统的稳定. “稻虾共作”是一种利用稻田环境同时养殖小龙虾的高度集约化的农业生态种养模式,一水两用的管理方式大大提高了农田资源利用率和产出效益^[3]. 然而,因为过度追求养殖利润,多地区已出现“重养殖轻种植”现象,即动物饵料过量投放,水稻田多年种养连作,长期淹水. 在此条件下可导致稻田土壤还原性增强,有机质分解不彻底,微生物群落结构紊乱. 同时,对稻虾共作模式的过度利用也会降低稻田土壤微生物的丰富度和多样性^[4]. 这些问题严重破坏了土壤微生物的群落结构,长此以往,轻则环境恶化、水稻减产,重则将直接威胁人类生产、生活尤其是粮食食品安全^[5].

近年来,随着高通量技术的发展让土壤微生物不再是“暗物质”,越来越多的未培养物种被发现并鉴定. 其原理主要是将 DNA 样品进行分离、扩增后进行化学催化等操作,获得大量碱基序列,再通过计算机进行处理和分析,最终得到生物分子的序列信息. 相比于传统的培养方法,高通量测序因其具有高效性、高灵敏性、高准确性等特点成为了分子生态学研究的重要手段^[6]. 然而,该技术与传统可培养技术相比的最大的不足就是无法获得发挥关键功能的微生物培养物,限制了对其功能的验证及其应用,从而阻碍了对关键功能微生物的应用以及机理性研究的发展,同时也制约着基于高通量测序分析出的微生物特征的可靠性和可重复性.

传统的微生物的分离培养技术主要通过人工配制的营养基质对土壤微生物进行分离、培养、计数,并对获得的微生物纯培养基于形态及生理生化特征进行分类、鉴定,其方法易于操作,同时可获取菌株形态、营养类型等信息. 因此,在土壤微生物研究中,传统的分离培养方法至今仍是一种不可替代的技术手段. 但是,该方法只是对土壤生境的简单人工模拟,在土壤化学条件、环境结构及气候等因素方面不能满足大多数土壤微生物生长所需的实际生境^[7],从而导致土壤中绝大多数微生物无法培养,土壤中微生物的可培养率只有 0.1%~1%^[8],而且,通过该方法一次性获取的菌株数量有限,培养速度慢、效率低、成本高.

2017 年,中科院遗传发育所白洋研究团队报道了一种高通量分离培养和鉴定细菌群落的新方法^[9-10],该方法将高通量测序和培养方法相结合,可以更高分辨率地分离培养原位生境中的单株细菌. 本研究以稻虾共作和水稻单作两种稻作模式的土壤样品为研究对象,对比了传统涂布分离培养法和高通量分离培养法对稻田土壤细菌种群的多样性和组成的鉴定效果,结果不仅拓宽了高通量培养技术的应用领域,证明了与传统涂布技术的显著优势,也为此项技术的广泛应用提供了数据支持. 此外,本研究也发现并描述了长期稻虾共作模式后土壤细菌的组成和分布的特征,为进一步揭示该模式与土壤生态环境变化过程的分子机制提供了研究基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验样品

2019 年 10 月采集稻虾共作和水稻单作土壤样品于江苏省泗阳县稻虾共作试验基地. 样品采集地于 2015 年被重新开垦规划,开垦前为约 2 公顷的水稻单作田,开垦后一块地继续水稻单作栽培(CK),另一块改为稻虾共作栽培模式(DX),两块地相邻且不连通,施肥模式一致. 供试水稻品种为嘉优中科 1 号,购于江苏农科院.

1.1.2 培养基与试剂

10×PBS 存储液:1.3 mol/L NaCl、70 mmol/L Na₂HPO₄、30 mmol/L NaH₂PO₄(pH=7),121 °C 高压灭菌

15 min;1×PBS 工作液:用无菌去离子水将 10×PBS 存储液稀释 10 倍;10% 液体 TSB 培养基:将 3 g TSB 培养基粉剂溶解于 1 L 去离子水中,121 ℃ 高压灭菌 1 min;10 mmol/L MgCl_2 :将 20.33 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 100 mL 去离子水中,配置成 1 mol/L MgCl_2 溶液. 用去离子水将 1 mol/L MgCl_2 稀释 100 倍,过滤灭菌;碱性裂解缓冲液:25 mmol/L NaOH 和 0.2 mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (pH=12). 121 ℃ 高压灭菌 15 min;中和缓冲液:40 mmol/L Tris-HCl (pH=7.5). 121 ℃ 高压灭菌 15 min;80% (vol/vol) 乙醇:将 1 份无核酸酶水与 4 份无水乙醇混合均匀,现配现用;50×TAE 溶液:将 242 g Tris 和 37.2 g $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 800 mL 去离子水中,加入 57.1 mL 乙酸至药品完全溶解,再定容至 1 L.

1.2 实验方法

1.2.1 平板稀释涂布法

分别取稻虾共作 (DX) 和水稻单作 (CK) 土样 10 g 于盛有 90 mL 无菌水的三角瓶内,经 30 ℃、170 rpm 振荡 20 min 后,制成土壤悬液,并依次稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 浓度梯度于 10% 的 TSB 固体平板上,每个梯度 5 块生物学重复,置于 30 ℃ 培养箱黑暗培养 1~2 d 后,挑取典型单菌落,经平板纯化后 4 ℃ 保存待用.

菌株保藏及鉴定:将菌液与 80% 甘油按 1:1 混合于 2 mL 无菌的离心管中,置于 -80 ℃ 冰箱保存待用. 菌落形态及生理生化特征鉴定参照《伯杰细菌鉴定手册 (第 8 版)》进行. 采用通用引物 27 F 和 1 492 R 扩增菌株的 16S rDNA 序列,PCR 产物切胶回收后,委托通用生物有限公司测序,测序结果在 RDP 数据库中进行比对,选取同源性较高的序列使用 MEGA 软件构建系统发育树,确定菌株的分类地位,对物种进行鉴定,具体方法参考文献 [11].

1.2.2 96 孔培养板划线分离法

分别取稻虾共作 (DX) 和水稻单作 (CK) 土样 20 g 于盛有 180 mL 灭菌的 10% 液体 TSB 培养基三角瓶中,经 30 ℃、170 rpm 振荡 40 min 后,制成土壤悬液,并依次稀释成 5 000×、6 500×、8 000×、10 000× 浓度梯度. 摇匀每瓶稀释液后,各取 20 mL 稀释液转移至无菌方皿中,再用排枪吸取稀释液移入 96 孔细胞培养板的每个孔中,每孔 200 μL ,每个梯度重复添加 3 板 96 孔细胞培养板,同时设置 3 板未添加土壤样品的空白无菌 10% TSB 培养基作为对照. 用封口膜将细胞培养板封口后,置于室温下孵育 2 周. 2 周后观察 96 孔细胞培养板中细菌的生长情况,保留约 30% 的孔呈现肉眼可见的浑浊状态的培养板为最适浓度培养板进行后续实验,如图 1 所示.

菌液分装:用排枪从最适浓度菌株培养板中吸取每孔 100 μL 菌株培养液于新的 96 孔细胞培养板,用于划线分离培养;再吸取每孔 10 μL 于另一新的 96 孔细胞培养板中,用于高通量测序. 两次分装后,将原始细胞板每孔加入 90 μL 80% 甘油,混匀后置于 -80 ℃ 冰箱保存.

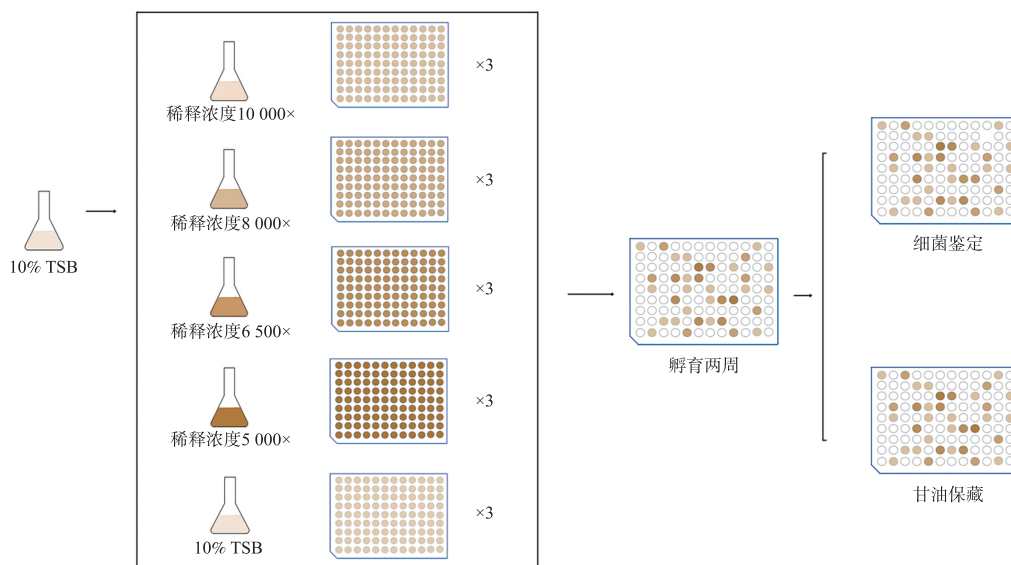


图 1 极限稀释法分离培养

Fig. 1 Isolation and cultivation by limiting dilution method

纯化分离培养:将最适浓度培养板中的每个孔内细菌纯化在 10% TSB 固体平板上,按 1.2.1 的方法进行菌株保存和鉴定.

1.2.3 96 孔培养板原位细菌高通量测序法

取 1.2.2 中用于高通量二代测序的菌液分装板,向每个孔 10 μ L 样品中加入 16.6 μ L 碱性裂解液,经 95 $^{\circ}$ C、50 min 高温裂解后,再加入 16.6 μ L 中和缓冲液. 随后,采用双侧标签系统两步 PCR 扩增法获取孔内菌株 DNA、测序和种类注释(图 2). 首先,第一步 PCR 扩增,以上述孔内混合液为模板,引物为 16 S rDNA V3-V4 区的 338 F 和 806 R;在第二步 PCR 扩增中,以第一步扩增产物为模板,使用的是添加了标签(barcode)的 338 F 和 806 R 引物,即将 338 F 引物端添加由 8 个不同碱基组合的标签作为每孔的标记,共标记 96 个(编号从 1-96);在 806 R 引物端添加由 8 个不同碱基组合标签作为区分细胞板的标记,共 12 个(编号从 A-L). 引物信息及扩增条件如表 1 和表 2 所示,引物设计由擎科生物技术有限公司完成.

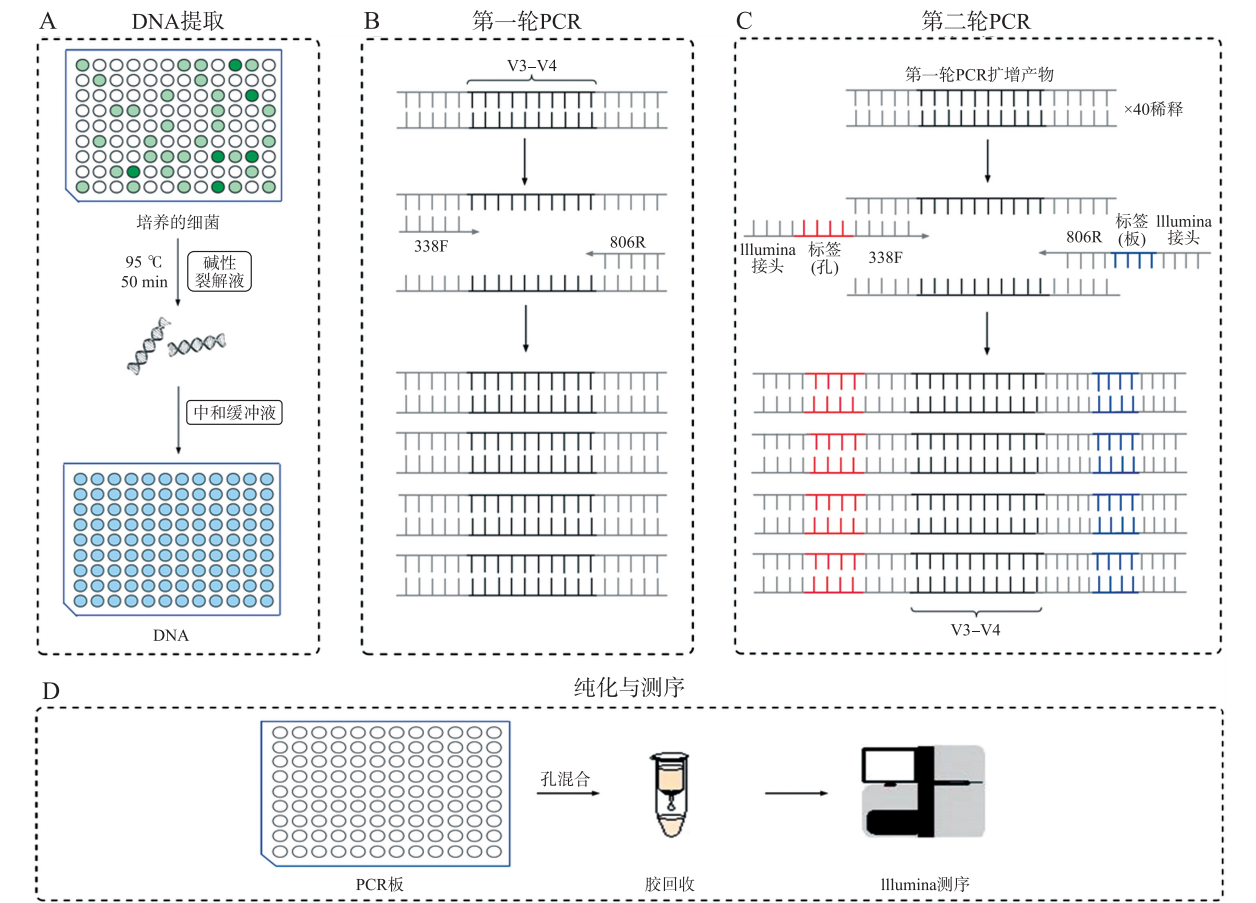


图 2 双侧标签系统两步 PCR 扩增法

Fig. 2 Two-step PCR amplification using the two-sided barcode system

表 1 双侧标签系统两步 PCR 扩增法引物信息

Table 1 Primer information for two-step PCR amplification using the two-sided barcode system

	编号	引物名称	原始引物序列 (5'→3')	添加 barcode 后引物序列
96 孔板 1	1	V3V4-1F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	CACATATCACTCTACGGGAGGCAGCAG
	2	V3V4-2F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	ACACACAGACTCTACGGGAGGCAGCAG
	3	V3V4-3F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	ACACATCTACTCTACGGGAGGCAGCAG

	96	V3V4-96F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	CACGCACAACCTCTACGGGAGGCAGCAG
板 2	A	V3V4-AR	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	AGTGTGTGGGACTACHVGGGTWTCTAAT
	B	V3V4-BR	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	AGATAGTGGGACTACHVGGGTWTCTAAT
.....
板 12	L	V3V4-LR	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	CAGTCTCTGGGACTACHVGGGTWTCTAAT

表 2 双侧标签系统两步 PCR 扩增法体系和条件
Table 2 The system and conditions for two-step PCR amplification using the two-sided barcode system

	成分	体积/ μ L		循环数	变性	退火	延伸
第一步 PCR 反应体系	2 \times TaqMasterMix	6.5	第一步 PCR 反应体系	1	94 $^{\circ}$ C 4min		
	338F	0.5					
	806R	0.5		2-30	94 $^{\circ}$ C 30s	50 $^{\circ}$ C 30s	2 $^{\circ}$ C 30s
	DNA	2					
	ddH ₂ O	10.5		31			72 $^{\circ}$ C 5min
	总体积	20					
第二步 PCR 反应体系	2 \times TaqMasterMix	6.5	第二步 PCR 反应体系	1	94 $^{\circ}$ C 2min		
	338F-barcoded	0.5					
	806R-barcoded	0.5		2-26	94 $^{\circ}$ C 30s	55 $^{\circ}$ C 30s	72 $^{\circ}$ C 1 min
	DNA	2					
	ddH ₂ O	10.5		27			72 $^{\circ}$ C 5min
	总体积	20					

第二轮 PCR 结束后,随机选取 25~30 个孔,取 2 μ L 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,确保扩增有条带且无杂菌污染,利用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒对扩增产物进行回收,送至擎科生物技术有限公司进行二代测序。

经测序获得扩增子元数据,用 QIIME 脚本验证元数据格式。将序列末端反向互补原则进行合并,将双端读长合并其为单端读长;用 QIIME 的 extract_barcode.py 脚本切除板和孔的标签,根据标签与元数据对应关系重命名读长;移除正反向引物标签;使用 VSEARCH 去重复和 USEARCH 去噪鉴定扩增序列变体,测量每孔中 ASV 丰度。使用 VSEARCH 比对所有纯净序列至 ASV,获得特征表。采用 USEARCH 基于 RDP 数据库进行物种注释,鉴定并绘制培养菌物种分布图。最后,用 MAGE 11 构建系统发育树并进行美化。

2 结果与讨论

2.1 两种稻作模式与土壤细菌组成的关系

前期研究表明,相比于水稻单作,稻虾共作土壤由于长期淹水土壤有机质分解不完全,呈现一定程度的土壤潜育化,且水稻生长过程中表现出明显的“贪青”状态,在水稻成熟期,稻虾共作模式稻米结实率低、成熟度下降。经过对土壤细菌 α -多样性和 β -多样性分析,结果表明,两种稻作模式的细菌丰富度 (Richness),多样性 (Shannon) 以及组成 (PCoA) 均具有显著差异 ($P<0.05$),水稻单作 (CK) 模式的丰富度和多样性均显著高于稻虾共作 (DX) 模式,表明由于长期养殖小龙虾降低了水稻田土壤细菌丰富度和多样性 (图 3)。

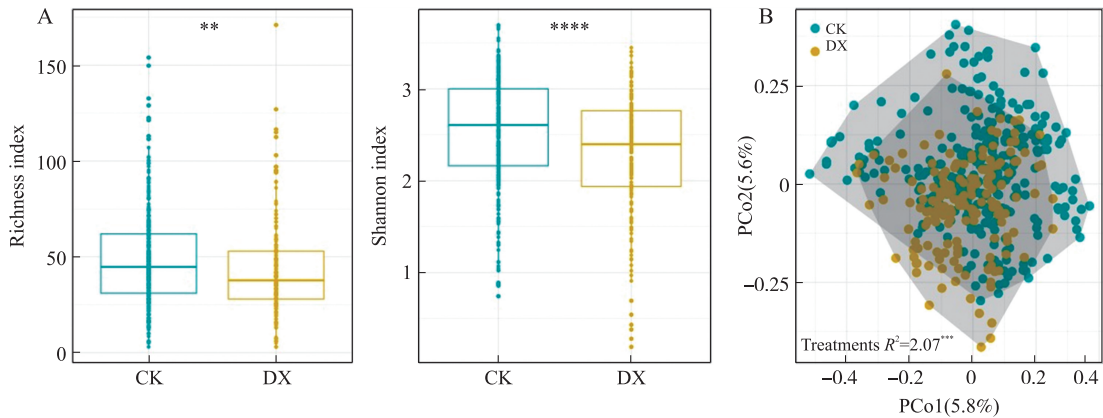


图 3 两种稻作模式对土壤细菌多样性的影响
Fig. 3 Effects of two rice cultivation modes on soil bacterial diversity

2.2 基于 3 种培养方式分析 2 种稻作模式土壤细菌数量

首先,采用传统的稀释涂布法(简称“涂布法”,下同),分别在 TSB 培养基和固碳培养基上对 DX 模式和 CK 模式的土壤细菌进行分离培养。结果表明,TSB 培养基对土壤细菌的计数量约为 10^7 CFU (Colony

Forming Unit)/g,固碳培养基对土壤固碳细菌计数量约 10⁵ CFU/g,而无论是利用 TSB 培养基还是固碳培养基,两种稻作模式的菌群数量均无显著差异,最终分离纯化 DX 模式菌株 57 株,CK 模式菌株 50 株.

其次,采用 96 孔培养板划线分离法(简称“划线法”,下同),对每个孔的菌株进行划线分离,96 孔培养板培养 2 周后,稀释倍数为 5 000×的板中 50% 左右的孔中出现浑浊,所以选定 5 000×浓度为最适划线分离浓度(图 1 所示).最终,在 DX 模式的 6 个重复板中获得纯培养单菌 112 株,CK 模式的 6 个重复板获得菌株 102 株,稻虾共作模式略高于水稻单作.

此外,将培养 2 周的稀释倍数为 5 000×的 96 孔培养板每个孔中的细菌进行高通量二代测序及鉴定(简称“测序法”,下同).每个板的测序深度相对均匀,约为 10 000 条序列,能够高效和无偏差的鉴定培养的细菌.两个模式共 12 个板,测序获得 1026 个孔的数据,其中 CK 模式有 555 个孔,DX 模式有 471 个孔,分析后共获得 634 个不同的扩增子序列变异(amplicon sequence variant,ASV).

2.3 基于 3 种培养方式分析 2 种稻作模式土壤细菌分类组成

如图 4 所示,从培养方式看,涂布法和划线法获得的土壤细菌类群远远少于测序法分析结果,而划线法比涂布法可分离的种类更多,涂布法共获得 3 个门、5 个纲、10 个目、13 个科、20 个属;划线法获得 5 个门、6 个纲、13 个目、20 个科、33 个属;测序法获得 6 个门、14 个纲、23 个目、43 个科、83 个属.从门水平看来,3 种培养方式均可获得厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria),而芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)仅在测序法中含有.此外,涂布法和划线法中最主要的细菌分类都属于厚壁菌门(Firmicutes)、中杆菌纲(Bacilli)、芽孢杆菌目(Bacillales)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、芽孢杆菌属(Bacillus),可见,该类细菌是基于培养基可培养人工计数法中的优势细菌种属,而在测序法中的优势分类是变形菌门.

两种稻作模式土壤中具有各自独特的细菌种类组成,在门水平上,3 种培养方式的结果均体现了 CK 模式中的变形菌门丰度显著高于 DX 模式,而拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰度低于 DX 模式.值得注意的是,涂布法和划线法的结果中,CK 模式的厚壁菌门(Firmicutes)中杆菌纲(Bacilli)芽孢杆菌目(Bacillales)

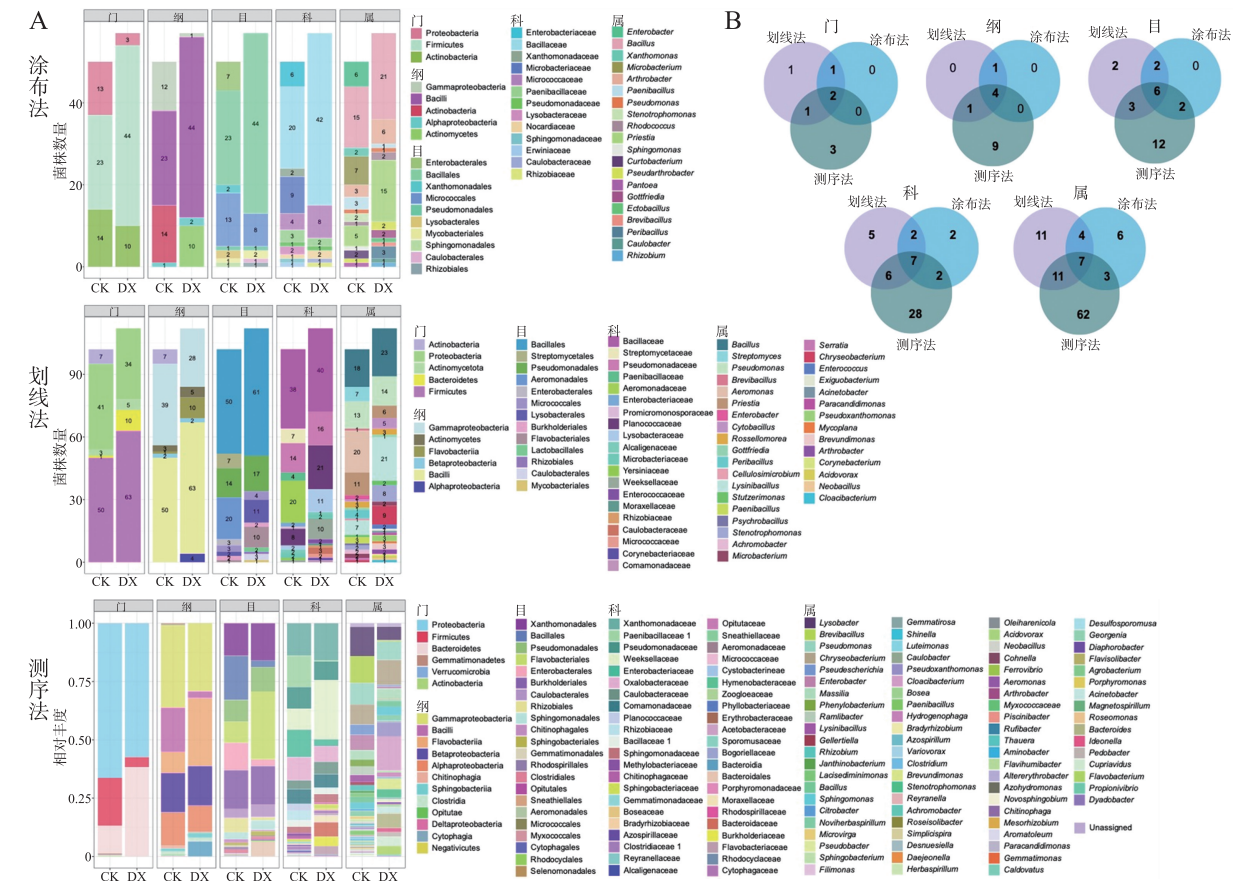


图 4 不同培养法获得两种稻作模式的土壤细菌分类

Fig. 4 Soil bacterial categories obtained from two rice cultivation modes using different cultivable methods

丰度显著高于 DX 模式,而在测序法中结果刚好相反。

接下来,对两种稻作模式属水平分类的进一步分析发现,涂布法分离获两种稻作模式 7 个共有属,CK 模式有 7 个特有属,DX 模式有 6 个特有属;划线法获得 11 个共有属,CK 模式有 11 个特有属,DX 模式有 13 个特有属;测序法获得 25 个共有属,CK 模式有 43 个特有属,DX 模式有 14 个特有属(图 5)。此外,涂布法和划线法在两个稻作模式上属的丰富度和多样性无显著差异,而测序法表现出 CK 模式的属水平丰富度和多样性均高于 DX 模式,这与 α -多样性和 β -多样性分析结果一致。

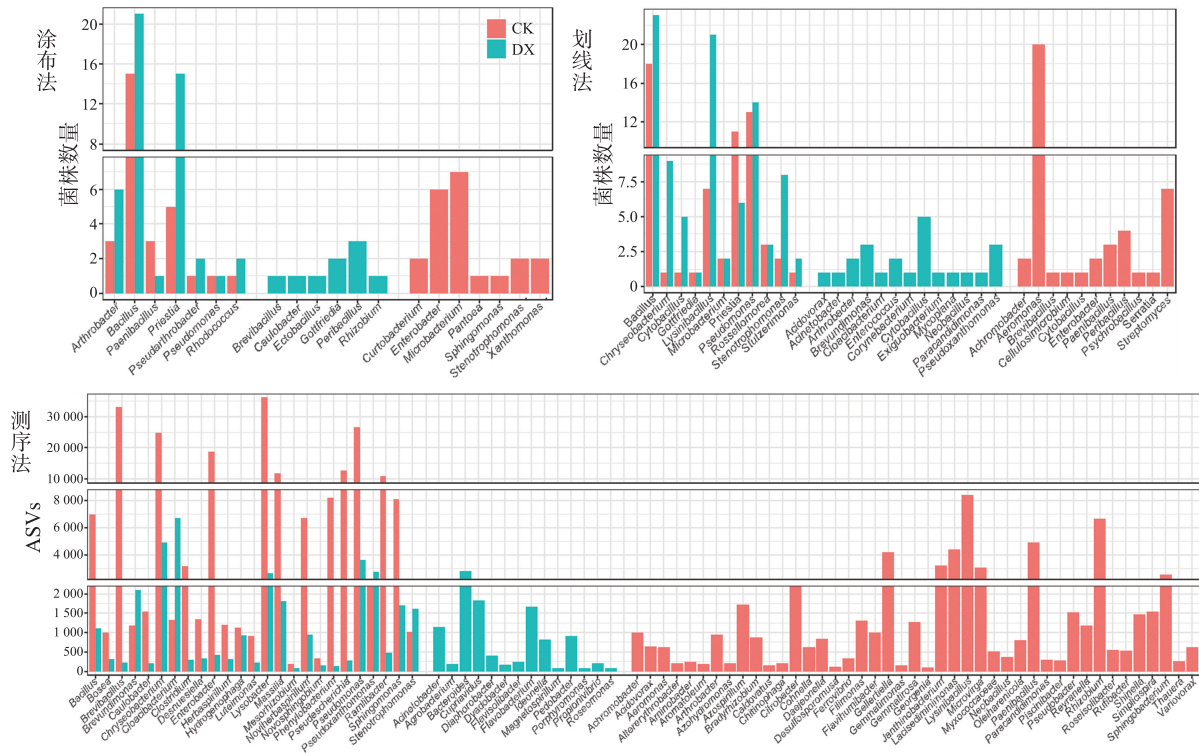


图 5 不同培养法获得两种稻作模式的差异土壤细菌属

Fig. 5 Differential soil bacterial genera obtained from two rice cultivation modes using different cultivable method

2.4 基于 3 种培养方式分析两种稻作模式构建土壤细菌系统发育树

从群落系统发育方面,3 种培养方式获得的菌群系统发育距离从近到远依次是涂布法、划线法和测序法,涂布法和划线法是培养基挑选获得菌株,虽然划线法比涂布法增加了种属的数量,但是在多样性上仍体现了菌群种类的单一性和发育距离的相似性,而测序法是高通量识别 DNA 信息的技术,从发育图谱上可以看出即便是同一个门水平,但是种间发育关系有了更多分支的延伸(图 6)。

2.5 基于 3 种培养方式分析两种稻作模式差异土壤细菌功能

3 种培养方式对土壤细菌功能预测分析结果表明,涂布法和划线法预测了 8 种功能的细菌,测序法中预测的细菌功能共有 16 种,大大提高了前两种培养方式中预测的细菌功能多样性的灵敏度,且增加了乙醇氧化、甲基营养、固氮、尿素分解等参与土壤碳氮循环的关键细菌功能(图 7)。

2.6 讨论

本研究基于对传统平板涂布、96 孔培养板划线分离以及 96 孔培养板原位细菌高通量测序 3 种可培养方法的比较,探究了水稻单作模式和稻虾共作模式土壤细菌分类差异、菌群多样性和组成的特异性以及细菌功能特征。在前期研究中,通过对土壤总 DNA 细菌的高通量测序结果表明,不同稻作模式土壤细菌的分类及构建均具有显著差异^[4],但是本研究利用培养基涂布法和划线法对稻作模式不同的细菌群落差异表现不显著,而测序法显示了水稻单作比稻虾共作更高的群落丰富度和多样性,这与对土壤总 DNA 细菌进行高通量扩增的结果一致。这个结果表明,虽然 3 种方式都是基于培养基对土壤细菌的可培养,但利用两次 PCR 标记扩增测序法大大提高了传统的分离划线培养的灵敏度。对于利用培养基实验室培养复杂系统中的微生物的局限性已被大量研究论文和综述报道,主要由于微生物的生长可能取决于环境条件的组合,或意想不到的某些生

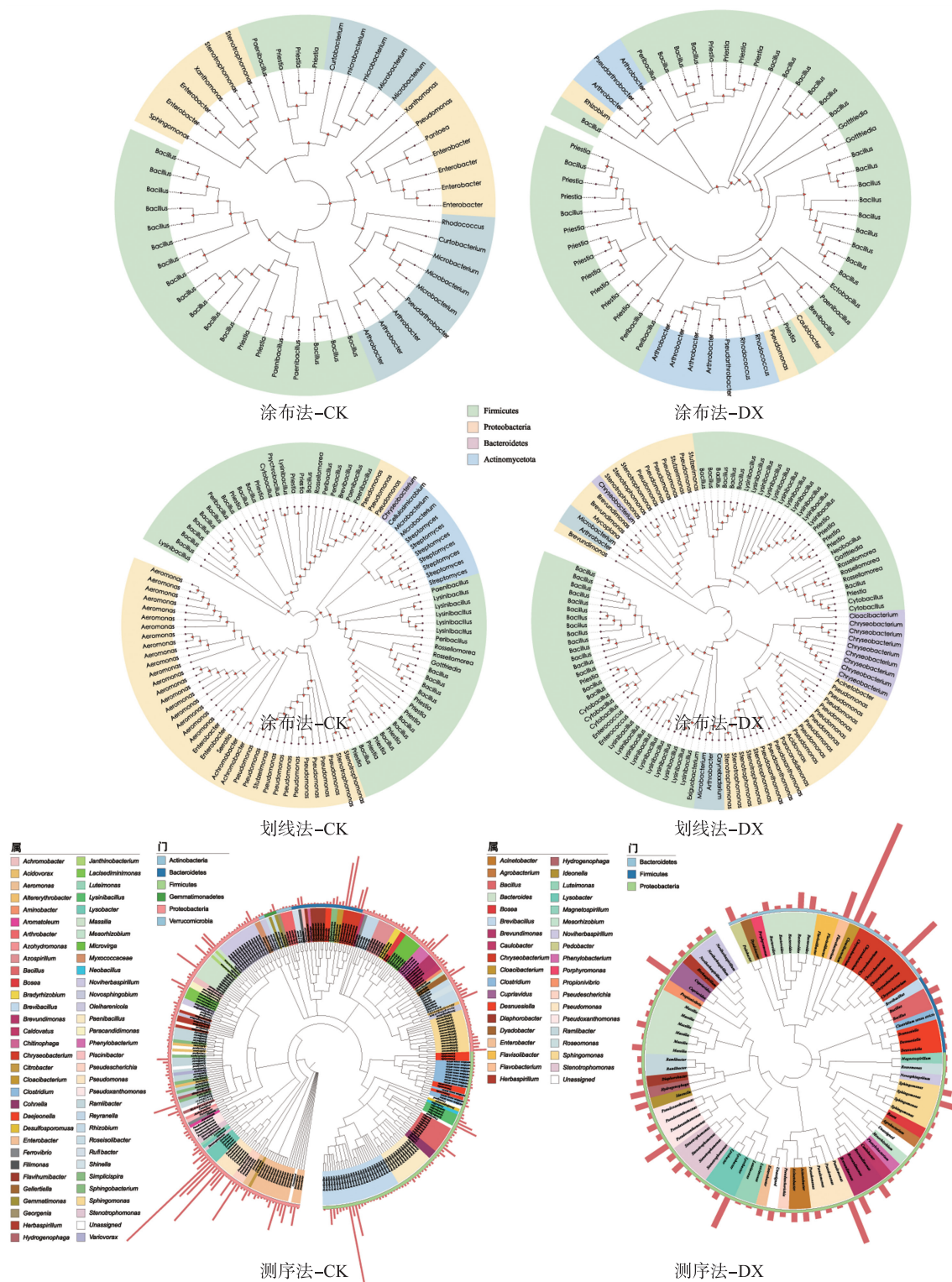


图 6 不同培养法获得两种稻作模式的土壤细菌系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of soil bacteria in two rice cultivation models with different cultivation methods

长因子,或特异性的对某些化合物的敏感^[7,12],此外,在培养过程中也会存在互相依赖或排斥生长的物种^[13]. 在本研究中,涂布法尤其放大了这些原因,导致培养物种极其单一,而 96 孔培养板虽然也是基于培养基培养,但是通过孔的隔离以及单细胞稀释避免了代谢产物导致的菌种依赖或排斥,有效增加了菌株数量,其中,划线法由于经过再次划线步骤或损失掉了不能在划线培养基再次富集的菌株,测序法则将原位孔内所有 DNA 以 PCR 技术原位识别,所以比划线法获得更多的菌株数量和种类.

从系统发育的结果表明,与测序法相比,涂布法和划线法分离获得的菌株系统发育更相近,表明培养

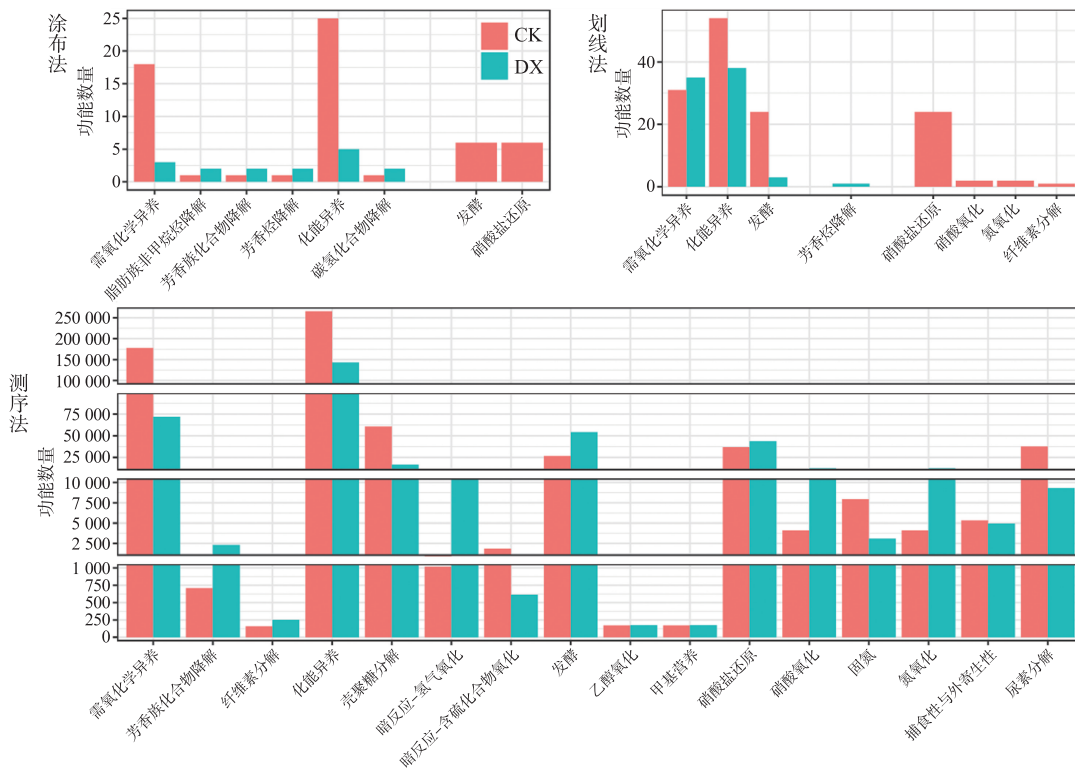


图7 不同培养法获得两种稻作模式的差异土壤细菌功能

Fig. 7 Differential soil bacterial functions obtained from two rice cultivation modes using different cultivable methods

基筛选法更易获得同源关系近的物种,或者说同源关系相近的物种因其营养类型或生理生化特征相近,更易被同一培养条件分离培养,这也符合菌种间或存在菌种依赖的关系,同时,由于易培养分离物种的快速繁殖,导致不易生长物种缺少适合的“生态位”而不易被分离^[14],这或许可以解释划线法和测序法同为96孔培养板培养的菌群,但测序法获得的物种亲缘关系更加多样化。此外,对3种方法获得的菌株的细菌功能预测结果表明,尽管划线法比涂布法获得了更多的物种数量,但在功能数量上并无显著差异,证实了土壤细菌不同物种间存在较大的功能冗余,即多种细菌种具有同一功能,而这个特征证实了群落稳定性的生态理论^[15],同样,尽管测序法具有更高的细菌丰富度,在属水平上的数量约是划线法的2.3倍,约是涂布法的4倍,但是在功能数量上仅是涂布法和划线法的2倍。

最后,从稻作模式的不同看,3种培养法在门水平上并无显著差异,主要为厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria),而这3种门类中的细菌是最易被培养的,尤其是厚壁菌门中的芽孢杆菌属^[16]。在属水平上,3种方式均体现了稻虾共作模式的细菌丰度和多样性均低于水稻单作,而这是由于稻虾共作土壤长期处于淹水模式、土壤生态被破坏导致,与前期研究结果一致,而这个结论也被其他研究者们证实,即高度集约化的农业生态模式大大降低了土壤微生物的多样性^[4,17-18]。基于测序法,分别对水稻单作和稻虾共作的特有种属进一步分析发现,CK模式中特有的黄杆菌属(*Flavibacter*),具有抑制病原菌方面的潜在作用^[19];无色杆菌(*Achromobacter*)常被作为处理有机污染物的降解菌^[20];慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)和芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)均被报道为固氮功能菌或参与氮循环的植物生长促生菌^[21-24]。而在DX模式特有的农杆菌属(*Agrobacterium*)虽然属于根瘤菌科,但固氮功能较低,且有报道其为条件致病菌^[25]; *Ideonella*属是一种革兰氏阴性的 β -变形菌,具有降解PET薄膜的能力^[26];黄色土源菌(*Flavisolibacter*)也被报道或为植物条件致病菌^[27-28]。可见,稻虾共作模式(DX)因其细菌群落多样性的降低,或将导致土壤病原菌的富集,这不仅对于土壤生态环境具有潜在的危害,也制约着稻米和小龙虾的粮食食品安全。

3 结论

本研究以稻虾共作和水稻单作两种稻作模式的土壤样品为研究对象,分别对比了传统平板涂布、

96 孔培养板划线分离以及 96 孔培养板原位细菌高通量测序 3 种可培养方法的土壤细菌分类差异、菌群多样性和组成的特异性以及细菌功能特征。这项研究结果弥补了传统的涂布可培养技术无法获取菌株的不足,拓宽了高通量培养技术的应用领域,为此项技术的广泛应用提供了数据支持,同时,也为进一步揭示稻虾共作模式的参与土壤生态变化过程的细菌机制提供了研究基础。

[参考文献]

- [1] 朱永官,沈仁芳,贺纪正,等. 中国土壤微生物组:进展与展望[J]. 中国科学院院刊,2017,32(6):12.
- [2] PIMM S L, RUSSELL G J, GITTLEMAN J L, et al. The future of biodiversity[J]. Science, 1995, 269(5222):347-350.
- [3] 赖政,肖力婷,赖胜,等. 稻虾种养新模式对稻田土壤肥力和微生物群落结构的影响[J]. 土壤学报, 2023, 60(6):1790-1800.
- [4] ZHANG Y, CHEN M, ZHAO Y Y, et al. Destruction of the soil microbial ecological environment caused by the over-utilization of the rice-crayfish co-cropping pattern[J]. Science of the total environment, 2021, 788:147794.
- [5] 许辉,赵阳阳,孙东岳,等. 稻虾共作模式研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(2):9.
- [6] 徐晓丽,林娟,鄢仁祥. 基因芯片与高通量测序技术的原理与应用的比较[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(11):1166-1174.
- [7] THRASH J C. Culturing the uncultured: risk versus reward[J]. mSystems, 2019, 4(3):e00130-19.
- [8] STEWART E J. Growing unculturable bacteria[J]. Journal of bacteriology, 2012, 194(16):4151-4160.
- [9] BAI Y, MÜLLER D B, SRINIVAS G, et al. Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota[J]. Nature, 2015, 528(7582):364-369.
- [10] ZHANG J, LIU Y X, GUO X, et al. High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota[J]. Nature protocols, 2021, 16(2):988-1012.
- [11] YANG C, LI R, SONG Y, et al. Identification of the biochemical degradation pathway of triazophos and its intermediate in *Diaphorobacter* sp. TPD-1[J]. Current microbiology, 2011, 62(4):1294-1301.
- [12] OVERMANN J, ABT B, SIKORSKI J. Present and future of culturing bacteria[J]. Annual review of microbiology, 2017, 71:711-730.
- [13] TYSON G W, BANFIELD J F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective[J]. Trends in microbiology, 2005, 13(9):411-415.
- [14] GUDE S, PINÇE E, TAUTE K M, et al. Bacterial coexistence driven by motility and spatial competition[J]. Nature, 2020, 578(7796):588-592.
- [15] XUN W, LI W, XIONG W, et al. Diversity-triggered deterministic bacterial assembly constrains community functions[J]. Nature communications, 2019, 10(1):3833.
- [16] LEWIS W H, TAHON G, GEESINK P, et al. Innovations to culturing the uncultured microbial majority[J]. Nature reviews microbiology, 2021, 19(4):225-240.
- [17] FIERER N, LADAU J, CLEMENTE J C, et al. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States[J]. Science, 2013, 342(6158):621-624.
- [18] LENNON J T, AANDERUD Z T, LEHMKUHL B K, et al. Mapping the niche space of soil microorganisms using taxonomy and traits[J]. Ecology, 2012, 93(8):1867-1879.
- [19] DENG X, ZHANG N, SHEN Z, et al. Soil microbiome manipulation triggers direct and possible indirect suppression against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*[J]. NPJ biofilms and microbiomes, 2021, 7(1):33.
- [20] BEREKAA M M, BARAKAAT A, EL-SAYED S M, et al. Degradation of natural rubber by *Achromobacter* sp. NRB and evaluation of culture conditions[J]. Polish journal of microbiology, 2005, 54(1):55-62.
- [21] PARKER M A. The spread of bradyrhizobium lineages across host legume clades: from Abarema to Zygia[J]. Microbial ecology, 2015, 69(3):630-640.
- [22] SELDIN L. *Paenibacillus*, nitrogen fixation and soil fertility[M]. Springer, Berlin: Endospore-forming Soil Bacteria, 2011.
- [23] ZAHARAN H H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 1999, 63(4):968-989.
- [24] CHEE-SANFORD J, TIAN D, SANFORD R. Consumption of N₂O and other N-cycle intermediates by *Gemmatimonas aurantiaca* strain T-27[J]. Microbiology(reading), 2019, 165(12):1345-1354.

- [25] HWANG H H, YU M, LAI E M. Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications[J]. Arabidopsis book, 2017, 15: e0186.
- [26] YOSHIDA S, HIRAGA K, TANIGUCHI I, et al. *Ideonella sakaiensis*, PETase, and MHETase: from identification of microbial PET degradation to enzyme characterization[J]. Methods enzymol, 2021, 648: 187–205.
- [27] 张嘉慧, 邢佳佳, 彭丽媛, 等. 丛枝菌根真菌提高感染青枯菌番茄根际土壤细菌群落多样性和稳定性及有益菌属相对丰度[J]. 植物营养与肥料学报, 2023, 29(1): 120–131.
- [28] 顾亚宁, 吴琳芳, 林德宝, 等. 福建省典型亚热带森林土壤细菌群落结构特征[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2023, 39(1): 38–47.

[责任编辑:黄 敏]