



## “99%难培养”微生物的概念与初步评价：以固氮菌为例

杨丽洁<sup>1,2</sup>, 贾仲君<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:**【目的】以固氮菌为例,厘清“99%难培养”的概念,定量评价土壤中可培养固氮菌的比例。【方法】直接提取土壤中所有微生物 DNA,同时,利用传统微生物富集技术获得固体和液体培养基第一代和第二代菌体及其 DNA,高通量测序 *nifH* 和 16S rRNA 基因,通过系统发育分类方法,明确固氮菌富集物的物种组成及可培养比例。【结果】文献分析表明,“99%难培养”并未有严格的定量实验证据,是“平板计数异常”的同义词,即采用显微计数法的微生物数量远高于平板计数法。针对典型旱作潮土中的固氮菌,微生物属水平的 *nifH* 基因分析发现,可培养固氮菌占比为(22.4±4.5)%–(28.4±6.3)%,而 16S rRNA 的结果为(31.6±3.4)%–(41.4±13)%。*nifH* 基因分析发现土壤中固氮菌共 67 属,其中 39 属可在固体和液体培养基形成菌落,但仅有 4 属得到显著富集,固体培养基富集了 *Proteobacteria* 门 *Azotobacter* 属,相对丰度高达(98.2±0.94)%;而液体培养基极显著富集了 *Firmicutes* 门的 *Paenibacillus* 和 *Clostridium* 属,相对丰度高达(76.7±3.9)%和(21.7±4.0)%。16S rRNA 基因分析发现,土壤中所有固氮菌共计 14 门、255 属,其中 248 属可在固体和液体培养基形成菌落被培养,但高达 6 门、226 属尚未获得纯菌株或固氮生理报道,并且固体培养基仅显著富集了 *Proteobacteria* 门 6 个属;液体培养基则富集了 *Firmicutes* 门 5 个属。【结论】“99%难培养”是“平板计数异常”的同义词。*nifH* 基因发现土壤中 58.2%固氮菌属可培养;而 16S rRNA 基因则发现高达 97.3%固氮菌属可在培养基上形成菌落,但其中 91.1%的固氮菌尚未获得纯菌株或固氮生理报道。同时,绝大部分固氮菌为数量占弱势的稀有属,69.5%的 *nifH* 基因属丰度<0.1%;而 78.5%的 16S rRNA 基因属丰度<0.1%,导致传统富集培养传代过程中,定向富集了常见的 *Proteobacteria* 和 *Firmicutes* 门的固氮菌,遗漏了绝大部分已形成菌落但尚未被分离纯化的固氮菌属。“不可培养”微生物的表述并不合理,未来亟需创新培养策略,定向分离传统培养基上被遗漏的微生物,获得更多“难培养”或“尚未培养”微生物。

**关键词:** 可培养微生物, 固氮菌, 固氮, *nifH* 基因

基金项目: 国家自然科学基金(41530857, 91751204)

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

收稿日期: 2020-04-21; 修回日期: 2020-07-13; 网络出版日期: 2020-07-31

过去 30 年来,微生物学领域最为引人关注的论述常被认为是“绝大多数微生物尚未培养”,或具有一定主观色彩的“99%难培养”。这一论述缺乏严格的实验证据,却被学术界广泛认可,其主要归功于 Carl Woese 基于核糖体 16S rRNA 基因的系统发育进化理论及其分类意义<sup>[1-2]</sup>,换言之,提取土壤中所有微生物的基因组 DNA,测序 16S rRNA 基因并开展系统发育同源性分析,通常会发现大量的序列与已知纯培养菌株的 16S rRNA 亲缘关系较远,被认为代表了尚未培养的微生物,或难培养微生物<sup>[3-4]</sup>,甚至被称为微生物暗物质<sup>[5]</sup>,具有潜在巨大的理论与应用价值,因此,复杂环境如土壤、海洋、人体、动物和植物微生物组的多样性与功能研究,成为过去 30 年来微生物学的热点和前沿<sup>[6-7]</sup>。

然而,“99%难培养”本身即为悖论,简言之,地球环境中微生物的物种数量,尚未有共识,具有极大的不确定性,估算误差最高可达 1 亿倍,从 1 万到 1 万亿<sup>[8-9]</sup>。物种总数量尚不确定的条件下,则无法计算未知微生物的比例。例如,经典的微生物分类学表明,已知的微生物属和种分别为 2930 属、15448 种<sup>[10]</sup>。但是,基于目前数据库已有的 16S rRNA 基因序列,模型推测地球最多栖息着 1 万亿微生物种<sup>[8]</sup>。但这一模型算法存在较大争议<sup>[11]</sup>,最新的估算则认为全球微生物种的数量约为 80 万到 160 万<sup>[12]</sup>。截止 2020 年 4 月 10 日,NCBI 分类学专题报道微生物(细菌和古菌)共计 4071 属 465268 种,其中可培养 3770 属 27773 种<sup>[13]</sup>,据此,我们推测可培养属和种占有所有微生物比例分别为 92.6%和 5.96%,但这一算法参考价值有限,具有较大的不确定性。同时,“不可培养”的表述并不严谨,其本身即为悖论,更合理的表述

是“难培养”或“尚未培养”微生物。因为目前条件下,无法穷尽所有人工培养配方,获得明确实验数据,证明微生物具有“绝对的不可培养性”。

文献分析表明“99%难培养”并未有准确出处<sup>[14-15]</sup>,更多是作为“平板计数异常”的同义词而成为共识,也就是说,针对同一个环境样品,采用显微计数和培养基平板计数两种不同的方法,微生物数量相差最高可达几个数量级,这一现象在 1985 年被命名为平板计数异常,即“The Great Plate Count Anomaly”<sup>[16]</sup>。最早的文献报道似乎来自 1898 年,针对多种病原微生物检测,奥地利科学家 Heinrich Winterberg 发现平板计数法占显微计数病原菌比例最低约为 6%<sup>[17]</sup>。针对环境样品的分析,1932 年俄罗斯科学家围绕自来水消毒后的安全评价文献被广泛引用<sup>[18]</sup>;而土壤最早文献来自 1934 年英国科学家 Henry Thornton 的报道,发现草地土壤和农田土壤中,显微计数法是平板计数的 117-1780 倍,平板形成的菌落 CFU (colony forming unit),仅占显微计数所得微生物的 0.09%-0.74%<sup>[19]</sup>。一般认为,造成这种差异的主要原因是培养基无法代表真实的自然环境,导致绝大部分微生物不能在培养基上生长并形成菌落。其他一些原因包括,损伤或死亡细胞较多、细胞聚集成团或吸附于土壤颗粒无法分散<sup>[20]</sup>,或者细胞之间存在共生以及具有活性但无法生长形成菌落等<sup>[21]</sup>。值得注意的是,传统“99%难培养”概念,通常针对纯培养菌株。然而,目前技术条件下很难获得复杂环境如土壤中所有的纯培养菌株。接种量、传代次数、分离方法、培养时间和营养组成等均可导致特异性分离而遗漏某些微生物。例如,即使从土壤和地下水中分离获得 1366 株纯菌,仍然仅占显微计数总量的 0.1%-1.0%<sup>[22]</sup>。因此,

经典的纯培养菌株分离及表型和形态分类, 很难解决平板异常难题<sup>[16]</sup>。

基于 16S rRNA 基因的分子系统分类为定量评估“99%难培养”提供了新思路。尽管存在一定争议, 16S rRNA 基因同源性的系统发育分子分析, 事实上提供了一种可操作的微生物分类策略, 如分类操作单元 Operational Taxonomic Unit (OTU)。通过提取环境中所有微生物的基因组 DNA, 高通量测序 16S rRNA 基因并重构物种的系统发育进化关系, 即可获得所有微生物的分类信息。这一方法规避了传统富集分离的内在缺陷。例如, 常规的细菌培养基会遗漏绝大多数功能菌, 如固氮菌、甲烷氧化菌、硝化菌等微生物, 特别是化能无机自养菌。这些功能微生物必须采用特殊培养基富集分离, 并在专业实验室完成。理论上而言, 没有一种培养基可以分离富集所有微生物。因此, 针对特定的功能微生物, 利用其特异的培养基富集策略, 定量评估“99%难培养”概念更具现实意义。然而, 迄今尚未有相关报道。

氮是地球所有生命的主要元素, 深度发掘可培养固氮菌资源具有重要意义。据估算, 全球每年固氮量高达 4.15 亿吨<sup>[23]</sup>, 其中 2.9 亿吨源自生物固氮<sup>[24]</sup>。同时, 2010 年以来, 高通量测序已成为一种常规实验手段。据此, 我们以固氮菌为例, 利用特殊培养基富集可培养固氮菌, 结合菌体 DNA 和土壤 DNA 提取及分子分类, 定量评估可培养富集固氮菌的比例, 为“99%难培养”概念提供参考。基本思路如下: (1) 可培养固氮菌的富集。采用常规的固体和液体固氮培养基, 传代两次并收集平板表面和液体中所有菌体后, 提取 DNA 开展 *nifH* 和 16S rRNA 基因扩增子测序分析。这些固氮菌富集物在理论上能够最大程度代表潜在的

所有可培养纯菌株; (2) 所有固氮菌。直接提取土壤微生物 DNA 样品, 测序 *nifH* 基因获得所有固氮菌, 同时利用通用引物测序获得所有微生物 16S rRNA 序列, 进一步与 Ribosomal Database Project (RDP) 数据库中已知固氮菌开展同源性分析, 结合可培养固氮菌富集物, 获得待测土壤中的所有固氮菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 土壤样品描述

土壤样品采集于中国科学院河南封丘农田生态系统国家野外科学观测试验站 (35°00' N, 114°24' E), 该地区年均气温 13.9 °C, 年均降水量 615 mm, 实行冬小麦和夏玉米轮作制度<sup>[25]</sup>。供试土壤类型为潮土, 由黄河冲积沉积物发育形成。基本理化性质如下: 土壤含水量, 8.23%; 土壤最大持水量(SWHC), 47.1%;  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , 3.85 mg/kg;  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , 32.4 mg/kg; 全氮, 1.26 g/kg; 全碳, 18.6 g/kg; 土壤碳氮比, 14.8; pH ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 7.8。采集 0–20 cm 新鲜土壤, 研磨并过 2 mm 筛, 4 °C 保存。

### 1.2 可培养固氮菌的富集

**1.2.1 培养基成分:** 利用经典的 Modified-NFb 无氮培养基<sup>[26]</sup>, 研究土壤中可培养固氮菌富集物。液体培养基主要成分包括: 苹果酸 5 g, 葡萄糖 2.5 g, 蔗糖 2.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, NaCl 0.1 g,  $\text{CaCl}_2$  0.02 g, Fe-EDTA (solution 16.4 g/L) 4 mL, KOH 4 g, 最后将其定容于 1000 mL 去离子无菌水, 利用 KOH 调节 pH 为 7.0。固体培养基配方相同, 仅额外添加 1.5% 琼脂。高压灭菌锅 121 °C、20 min 灭菌。培养基灭菌后, 加入维生素混合液 1 mL (生物素 10 mg,

盐酸吡哆醇 20 mg, 定容至 100 mL, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌); 微量元素混合液 2.0 mL ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.04 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.40 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.175 g, 定容至 1 L, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌)。

**1.2.2 可培养固氮菌的富集策略:** 本研究所用的可培养固氮菌并非纯培养菌株, 而是常规培养基上可富集的固氮微生物集合。简言之, 在固体/液体培养基第一代、第二代中出现的所有微生物菌落集合, 可被认为是所有潜在可分离的纯培养菌株。同时, 这些微生物也是可利用人工配方营养的固氮菌富集物。

具体操作流程如下: 称取土壤样品 1 g, 溶于 100 mL 无菌水中后, 以 200 r/min 转速摇菌 0.5 h 制成土壤悬液作为接种液, 通过固体和液体培养基开展可培养固氮菌的富集。所有培养操作步骤均为无菌操作并设置 3 次生物学重复。

固体可培养固氮菌富集物的操作如下: 吸取 100  $\mu\text{L}$  土壤悬液并均匀涂布于固体培养基表面, 将平板倒置于 28  $^\circ\text{C}$  培养箱中培养 7 d 后, 采用 10 mL 无菌水将培养基表面菌体多次冲洗至 50 mL 无菌试管制成第一代富集菌液, 取 1 mL 提取 DNA。同时, 吸取 100  $\mu\text{L}$  菌液再次使用稀释涂布平板法接种传代培养 7 d 后, 同样以 10 mL 无菌水冲洗所有菌体制成第二代富集菌液, 取 1 mL 提取 DNA 并保存于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 。

液体可培养固氮菌富集物的操作如下: 吸取 100  $\mu\text{L}$  土壤悬液接种至 100 mL 液体培养基后, 将培养三角瓶放入 28  $^\circ\text{C}$  培养箱中, 静置培养 7 d 后获得第一代菌液, 将 100 mL 第一代富集菌液离心 ( $400\times g$ , 10 min) 后, 弃上清, 加入 10 mL 无菌水, 振荡混匀后浓缩为 10 mL 富集菌液后取 1 mL 提取 DNA。同时, 吸取 100  $\mu\text{L}$  富集菌液接种至新的

100 mL 液体培养基中, 传代培养 7 d 后, 采用相同方法浓缩为 10 mL 第二代富集菌液, 取 1 mL 提取 DNA 并保存于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 。

**1.2.3 稳定性同位素  $^{15}\text{N}_2$  示踪可培养固氮菌富集物的生长:** 将 30 mL 的固体培养基分装于 120 mL 血清瓶内, 接种 100  $\mu\text{L}$  第二代固体富集菌液后密封血清瓶, 设置  $^{15}\text{N}_2$ -标记组和  $^{14}\text{N}_2$ -对照组。标记组的培养瓶顶空包括 30% 的  $^{15}\text{N}_2$  (99% 原子百分超)、20%  $\text{O}_2$  和 50% Ar; 对照组则包括 30%  $^{14}\text{N}_2$ 、20%  $\text{O}_2$  和 50% Ar。所有接种和密封操作均在无菌室完成后, 置于 28  $^\circ\text{C}$  培养箱 7 d, 然后打开瓶盖, 采用 10 mL 无菌水反复冲洗固体培养基表面的菌体为富集菌液, 取 1 mL 提取 DNA 后存于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 超高速密度梯度离心分离  $^{15}\text{N}$ -DNA, 验证富集物为固氮菌。所有处理均设置 3 个生物学重复。

### 1.3 固氮菌的定量与测序

**1.3.1 土壤微生物的 DNA 提取:** 土壤样品 DNA 提取。采用 FastDNA Spin Kit for Soil (MP Bio) 试剂盒: 称取 0.5 g 土壤样品置于 2.0 mL 离心管中, 加入 SPB 和 MT 缓冲液后, 利用 Fast Prep 核酸提取仪以 6.0 m/s 振荡 45 s,  $14000\times g$  离心 15 min。转移上清至新 2.0 mL 离心管中, 以 PPS 沉淀蛋白溶液, Binding Matrix 结合 DNA, SEWS-M 洗涤过滤后, 将 DNA 溶解于 50  $\mu\text{L}$  DES 缓冲液。微量紫外分光光度计 (NanoDrop ND-1000) 测定 DNA 浓度为 15.2–56.7 ng/ $\mu\text{L}$ , 纯度  $A_{260/280}$  为 1.68–1.92,  $A_{260/230}$  为 1.52–2.03。同时利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

**1.3.2 可培养固氮菌富集物的 DNA 提取:** 固体和液体第一代、第二代固氮菌富集物 DNA 提取。采用 E.Z.N.A.<sup>®</sup> Bacterial DNA Kit (Omega) 试剂盒: 将 1 mL 富集菌液  $4000\times g$  离心 10 min, 吸除上清,

加入 100  $\mu\text{L}$  TE Buffer 重悬, 利用 Lysozyme、Proteinase K Solution 和 RNase A 裂解细胞, 去除蛋白质和 RNA, 100% DNA Wash Buffer 洗涤过滤后, 加入 50  $\mu\text{L}$  Elution Buffer, 过滤收集 DNA。DNA 浓度为 73.4–86.9 ng/ $\mu\text{L}$ , 纯度  $A_{260/280}$  为 1.78–1.89,  $A_{260/230}$  为 1.58–1.96。

**1.3.3 实时荧光定量 PCR:** 使用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪, 针对土壤 DNA、固体和液体固氮菌第一代、第二代富集物菌体 DNA 以及稳定同位素标记的富集物菌体 DNA 进行 *nifH* 基因和 16S rRNA 基因定量。

*nifH* 基因定量。采用 PolF/PolR 引物<sup>[27]</sup>, PolF 序列为 TGCGAYCCSAARGCBGACTC, PolR 序列为 ATSGCCATCATYTCRCCGGA。PCR 反应体系: 10  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa), 正反向引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 8  $\mu\text{L}$  DNase/RNase-free H<sub>2</sub>O, PCR 扩增程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 39 个循环。标准曲线制作: 计算含有目标基因片段质粒的摩尔数, 然后依次稀释 7 个浓度梯度, 以初始模板 DNA 的拷贝对数为横坐标, 以  $C_t$  值为纵坐标, 获得标准曲线:  $C_t = -3.7951\lg C + 44.457 (R^2 = 0.999)$ 。

16S rRNA 基因定量。采用 515F/907R 通用引物对<sup>[28]</sup>, 515F 序列为 GTGCCAGCMGCCGCGG; 907R 序列为 CCGTCAATTCMTTTRAGTTT。PCR 反应体系与 *nifH* 基因相同, PCR 扩增程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 39 个循环。标准曲线绘制如 *nifH* 基因定量所述,  $C_t = -3.5611\lg C + 27.639 (R^2 = 0.998)$ 。

固氮菌同化  $^{15}\text{N}_2$  的证据(可培养富集物  $^{15}\text{N}$ -DNA 分离)。超高速密度梯度离心详细步骤如前所述<sup>[29]</sup>。简言之: 将 2  $\mu\text{g}$  DNA 与氯化铯溶液混

合后, 形成初始浮力密度为 1.725 g/mL 的离心溶液, 然后将其封装至 5.1 mL 超高速离心试管, 利用贝克曼 Vti65.2 转子在速度 45 kr/min (190000 $\times$ g) 下 20  $^{\circ}\text{C}$  离心 44 h, 随后通过自动分离装置将离心管内溶液分为 30 层不同浮力密度溶液, 通过 PEG-6000 除去氯化铯介质后, 采用 70%乙醇纯化 DNA 离心沉淀并溶解于 30  $\mu\text{L}$  无菌水, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。针对分层所得到的  $^{15}\text{N}$ -DNA 进行 16S rRNA 定量, 定量方法如前所述。通过 16S rRNA 基因在不同浮力密度 DNA 中的变化规律, 即可判定所有固氮菌富集物是否皆同化  $^{15}\text{N}_2$  并合成了生物质 DNA。

**1.3.4 Illumina Miseq 高通量测序:** *nifH* 基因扩增子高通量测序。首先利用土壤 DNA 和固氮菌富集物 DNA 开展 PCR 扩增, 所用引物 PolF/PolR 如前所述。PolF 的 5'端连接 6 个碱基的 barcode 序列, 用于区分不同的样品。PCR 扩增程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 32 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 反应体系为: 25  $\mu\text{L}$  Premix Taq (TaKaRa), 正反向引物各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 21  $\mu\text{L}$  DNase/RNase-free H<sub>2</sub>O。PCR 扩增产物在 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下回收目标产物片段, 并通过 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 试剂盒(TaKaRa)纯化 PCR 扩增产物后, 溶于 30  $\mu\text{L}$  的 DNase-free H<sub>2</sub>O。进一步通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物纯化效果后, 利用微量紫外分光光度计(NanoDrop ND-1000)测定纯化后的 PCR 产物浓度。将所有样品 PCR 纯化产物按等摩尔数混合后建库和测序(Miseq PE300)。

16S rRNA 基因扩增子高通量测序。引物如前所述, 其中 515F 的 5'端连接 12 个碱基的 barcode 序列, 以便于后续识别不同样品的序列。PCR 反

应体系同 *nifH* 基因, 扩增程序如下: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物的纯化、建库及测序过程与 *nifH* 基因扩增子相同。

## 1.4 土壤固氮菌的分子分类

**1.4.1 高通量序列分析:** 背景土壤和传统固体、液体培养基两代富集物合计 15 个样品(含 3 个重复)用于高通量测序。*nifH* 基因共计 499965 条高质量序列, 单个样本平均 33331 条; 16S rRNA 基因共计 386390 条高质量序列, 单个样本平均 25759 条。16S rRNA 和 *nifH* 基因的高通量测序数据由 QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, version 1.9.1)分析完成, 并使用 usearch 去除嵌合体。*nifH* 基因的分析过程中, “extract\_barcode.py”指令用于提取 barcode, “split\_libraries\_fastq.py”指令用于分割文库。“pick\_otus.py”和“pick\_rep\_set.py”指令用于 OTU 聚类 and 提取代表序列, 聚类在 95%相似度进行。16S rRNA 数据预处理部分同 *nifH* 基因, 聚类在 97%相似度进行。步骤细节参考 <http://qiime.org/scripts/index.html>。

**1.4.2 基于 *nifH* 和 16S rRNA 基因的固氮菌分子分类:** 固氮菌的物种分类。通过提取土壤 DNA 和固氮菌富集物 DNA, 利用高通量测序 *nifH* 和 16S rRNA 基因后, 与固氮菌数据库比对, 通过系统发育分子分类方法, 在微生物门、纲、目、科、属水平, 获得物种分类信息及其相对丰度。

基于 *nifH* 基因的分子分类。将 *nifH* 基因代表序列上传 RDP 网站上的 FunGene pipeline (<http://fungene.cme.msu.edu/FunGenePipeline/pipeline/form.spr>)处理进行 OTU 注释, *nifH* 基因的 OTU 分类在 95%相似度进行, 注释参数 Percent Identity>0.8<sup>[30]</sup>。

基于 16S rRNA 基因的分子分类。将 16S rRNA 基因代表序列同 RDP 数据库进行比对, 注释置信度阈值 0.8, 门、纲、目、科、属分类阈值分别为 75.0%、78.5%、82.0%、86.5%、94.5%, 某级别无法分类的序列被直接归为该级别的无法分类单元, 统一纳入计算<sup>[31-32]</sup>。同时, 本研究利用 RDP 建立了固氮微生物数据库, 针对土壤中所有 16S rRNA 基因比对后, 获得固氮菌序列进行分类。值得注意的是, 基于富集物菌体 16S rRNA 基因比对 RDP 固氮菌数据库发现, 固体和液体培养基中部分微生物菌落 16S rRNA 基因的亲缘菌株, 尚未有固氮生理报道, 我们将其定义为未培养固氮菌, 并作为可培养固氮菌计算。

**1.4.3 可培养固氮菌比例及富集率的计算:** 固氮菌的物种分类均通过 *nifH* 基因和 16S rRNA 基因分析完成。可培养固氮菌比例按公式(1)计算。

可培养固氮菌比例=可培养固氮菌富集物物种数量/土壤中所有固氮菌物种数量 (1)

其中土壤中所有固氮菌的物种数量包括两部分: (1) 土壤 DNA 中的固氮菌物种数量。直接提取土壤 DNA, 高通量测序 *nifH* 和 16S rRNA 基因, 并在微生物门、纲、目、科、属水平, 获得土壤中所有固氮菌的物种分类信息; (2) 可培养固氮菌的富集物。固体和液体培养基第一代、第二代中所有菌落富集物的物种分类信息。

可培养固氮菌富集率计算方法如下, 基于 *nifH* 或 16S rRNA 基因分类, 首先获得土壤 DNA 中所有固氮菌属的相对丰度; 其次获得固体和液体培养基富集物菌落 DNA 中所有固氮菌属的相对丰度; 后者除以前者, 即可计算特定固氮菌在培养基中的富集率。富集率>1 表示该菌属在培养中得到了富集。

### 1.5 统计分析 with 数据提交

采用 SPSS16.0 (SPSS Inc., USA)对可培养固氮菌的富集率进行 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示显著差异 (\*);  $P < 0.001$  表示极显著差异 (\*\*).

高通量测序数据已提交至 The National Center for Biotechnology Information (NCBI)数据库, 具体编号为 SRR12214932–12214961, 其中含 30 个标

签, 包括 5 个处理(土壤、固体和液体培养基的第 1、2 代)及 3 个重复的两种基因测序数据。

## 2 结果和分析

### 2.1 可培养固氮菌的定量富集规律

实时荧光定量 PCR 分析表明固氮菌在培养基中大量增殖(图 1)。背景土壤中 *nifH* 基因数量为

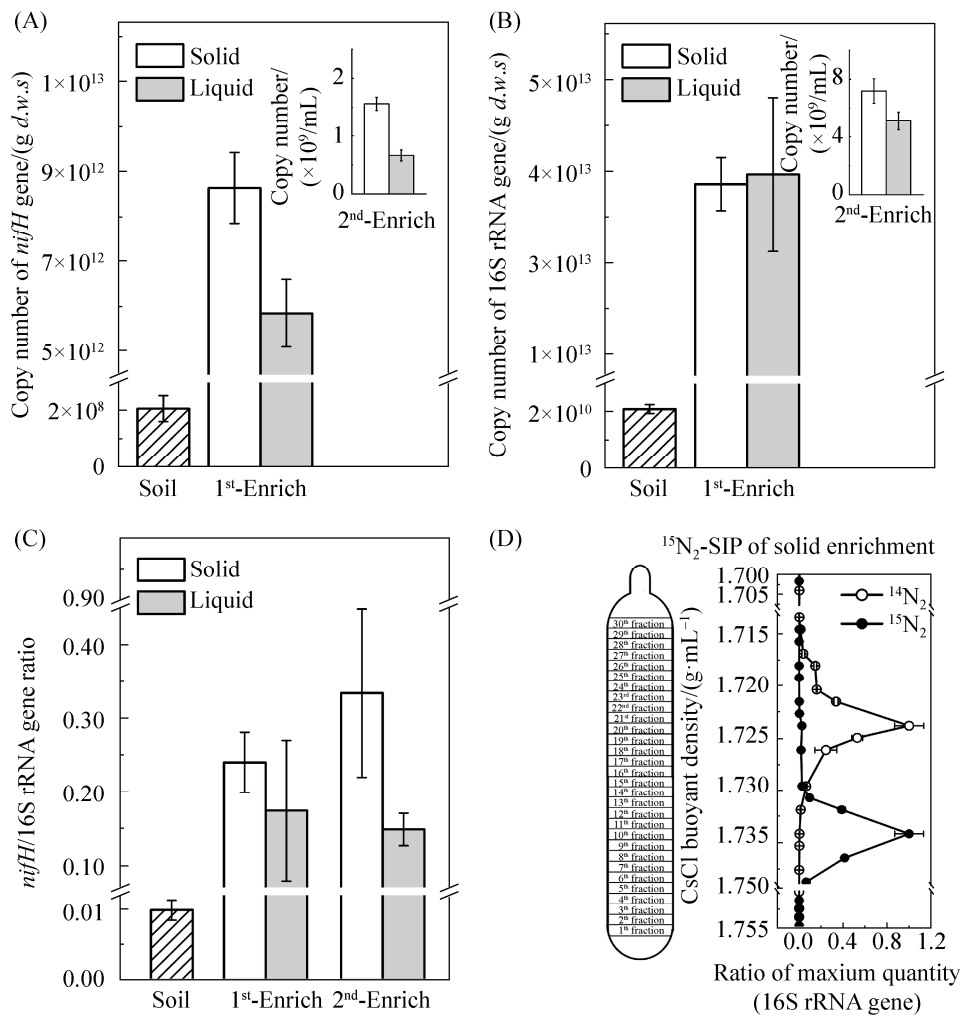


图 1. 土壤及可培养固氮菌富集物的数量变化规律

Figure 1. Quantification of *nifH* genes and 16S rRNA genes in  $N_2$ -fixing enrichments on solid and liquid medium and in background soil. A: copy number of *nifH* genes; B: copy number of 16S rRNA genes. Inset figure on the upper right represents the gene copy numbers in the second generation; C: the ratio of *nifH* to 16S rRNA genes; D: Quantitative distribution of bacterial 16S rRNA across the entire buoyant density of the DNA fractions from  $N_2$ -fixing enrichments incubated with either  $^{15}N_2$  or  $^{14}N_2$ . 1<sup>st</sup> Enrich and 2<sup>nd</sup> Enrich denote the first and second generations of  $N_2$ -fixing enrichments, respectively.

$2.08 \times 10^8$  copies /g *d.w.s* (dry weight soil), 而根据接种土壤量计算, 第一代固体和液体培养富集物 *nifH* 基因拷贝数分别为  $8.79 \times 10^{12}$ 、 $5.58 \times 10^{12}$  copies/g *d.w.s*, 增幅 >2.5 万倍(图 1-A)。土壤中 16S rRNA 基因为  $2.11 \times 10^{10}$  copies/g *d.w.s*, 第一代固体和液体培养富集物中拷贝数分别为  $3.73 \times 10^{13}$ 、 $3.86 \times 10^{13}$  copies/g *d.w.s*, 增幅 >1800 倍(图 1-B)。由于第二代的接种液为 0.1 mL 第一代富集物(含  $8.79 \times 10^7$  *nifH* genes), 其中理论上仅含  $1.0 \times 10^{-6}$  g 土壤( $2.08 \times 10^2$  *nifH* genes), 两者相差达 4 万倍之多, 因此接种物主要来自第一代菌体而非土壤, 故第二代菌体根据其终体积 10 mL 计算, 在固体和液体培养基中 *nifH* 基因分别为  $1.56 \times 10^9$ 、 $6.63 \times 10^8$ /mL; 16S rRNA 基因分别为  $7.19 \times 10^9$ 、 $5.11 \times 10^9$ /mL(图 1-B)。同时, 土壤中 *nifH*/16S rRNA 基因拷贝数的比例仅为 (0.982±0.15)% (图 1-C), 而在固体和液体第一代培养基中, 分别增至(23.9±4.1)%、(17.4±9.6)%, 增幅 25.5 和 18.9 倍。第二代富集液中该比例未有明显变化, 分别为(33.4±11)%、(14.9±2.2)%。

针对超高速密度梯度离心后的 30 个不同浮力密度 DNA, 定量分析其中的 16S rRNA 基因拷贝数(图 1-D), 结果表明,  $^{14}\text{N}_2$ -对照处理中, 16S rRNA 基因的最大值位于离心试管上部第 20 层, DNA 浮力密度较小, 约为 1.718–1.729 g/mL; 而  $^{15}\text{N}_2$ -标记处理中, 16S rRNA 基因的最大值出现在离心试管的下部第 16 层, 浮力密度较大, 约为 1.730–1.738 g/mL, 说明固氮菌富集物同化了  $^{15}\text{N}_2$  并合成了大量基因组 DNA, 导致超高速离心后,  $^{15}\text{N}$ -DNA 迁移至离心试管下部。

## 2.2 可培养固氮菌占土壤所有固氮菌的比例

如图 2 所示, 基于 *nifH* 基因系统发育分类计算表明, 土壤中可培养固氮菌范围为(7.38±1.1)%–

(53.8±10)%。以微生物属为例, 土壤中所有固氮菌共 67 属, 而固体培养基第一代、第二代菌落富集物分别含有 19、14 个固氮菌属, 占比分别为 (28.4±6.3)%和(20.9±6.5)% (图 2-A)。值得注意的是, 在更高的微生物分类水平门、纲、目、科, 可培养固氮菌的比例逐渐增加, 例如, 土壤中所有固氮菌共 7 门, 第一和第二代富集物中分别为 4 门、3 门, 占比(50.0±10)%、(38.1±10)% (图 2-A)。在更低的 OTU 种水平下, 可培养比例显著降低, 第一和第二代固氮菌富集物的比例分别为 (8.09±4.2)%、(7.38±1.1)%。液体培养基也得到类似规律(图 2-B)。第一、第二代液体培养基分别含 17、15 个固氮菌属, 占有固氮菌 67 属的比例为 (25.4±6.5)%、(22.4±4.5)%; 在 OTU 种水平, 占比为(13.4±4.6)%和(8.62±3.2)% (图 2-B)。

基于 16S rRNA 基因的系统发育分类也得到类似结果, 可培养固氮菌占有固氮菌的比例较高: (31.6±3.4)%–(61.9±15)%。如图 2-C 所示, 在微生物属水平, 土壤中所有固氮菌共 255 属, 第一代、第二代固体培养基分别含有 106、100 个固氮菌属富集物, 占比分别为 (41.4±13)%和(39.2±4.2)%。在微生物门水平, 第一代、第二代固体可培养固氮菌占比分别为 (54.8±8.2)%、(47.6±15.3)%, 并且在纲、目、科分类水平未有显著性差异(图 2-C)。液体培养基也得到了类似结果, 第一代、第二代液体培养基分别含有 82、81 个可培养固氮菌属, 占有固氮菌 255 属的比例分别为(32.3±3.3)%、(31.6±3.4)% (图 2-D)。在更高的微生物分类水平, 可培养固氮菌比例呈增加趋势, 第一代、第二代液体培养基分别含有 9、7 固氮菌门, 占有固氮菌门比例分别为(61.9±15)%、(52.4±4.1)% (图 2-D)。



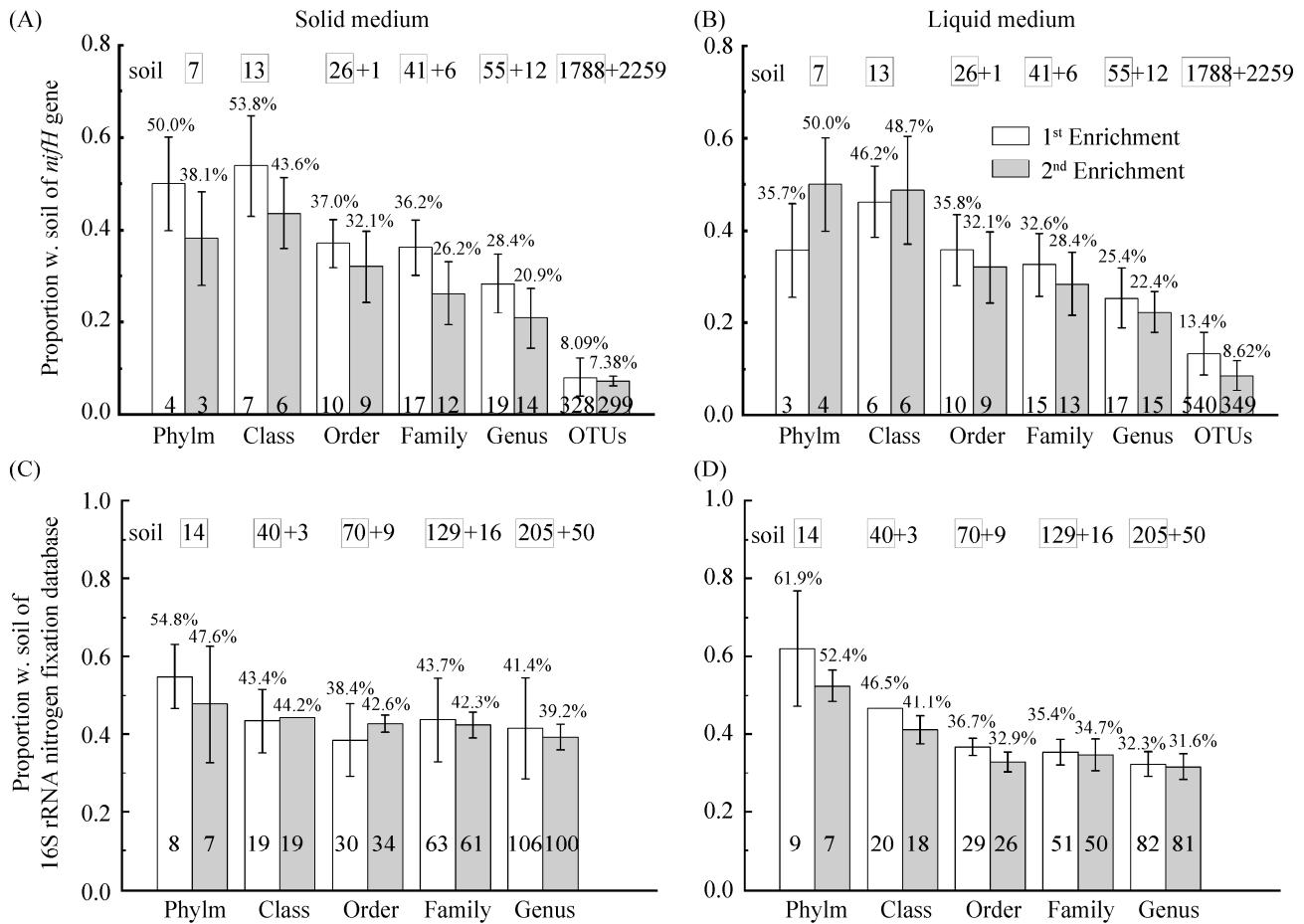


图 2. 不同微生物分类水平下, 土壤中可培养固氮菌富集物占有所有固氮菌的比例

Figure 2. The proportion of culturable diazotrophs in soil at different taxonomic levels. The *nifH* genes-based proportion of culturable diazotroph in soil by solid (A) and liquid (B) medium enrichments; and the 16S rRNA gene-based proportion of culturable diazotroph in soil by solid (C) and liquid (D) medium enrichments. The percent number above the column represents the proportion of culturable diazotrophs at different taxonomic levels. Culturable diazotrophs are defined as all bacteria detected on solid or liquid medium, and abundance and composition was obtained on the basis of *nifH* and 16S rRNA gene analysis. All diazotrophs are defined as the sum of diazotrophs in soil DNA and bacteria detected on medium. Soil: DNA was directly extracted from soil, and microbial abundance and community composition was obtained by *nifH* and 16S rRNA gene analysis for phylogenetic classification (the number of taxa shown in the box). The number after “+” represents the number of diazotrophs taxa found only in the culture medium, but not detected in the soil. Solid and Liquid represent Solid and Liquid medium for enrichment of nitrogen-fixing bacteria, respectively. 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> enrichment represent the first and second generation.

### 2.3 可培养固氮菌的物种变化规律

分子系统分类表明, 固体和液体培养基对土壤固氮菌具有极强的选择富集特征(图 3)。基于 *nifH* 基因的系统分类发现土壤中仅有 7 个固氮菌

门(图 2-A), 其中 *Proteobacteria* 丰度高达 (90.9±5.7)% , 其次为 *Firmicutes* 门, 占比 (0.974±0.20)% ; 另外 5 个门占比共计 (0.220±0.018)% ; 值得注意的是, 7.89% 的土壤 *nifH*

基因序列无法分类,可能来自未培养固氮菌(图 3-A)。同时,固体培养基检测到 5 个固氮菌门富集物,其中 *Proteobacteria* 在第一代和第二代丰度分别为(96.4±2.7)%和(98.4±0.89)%,而 *Firmicutes* 也小幅度上升,相对丰度分别为(3.02±2.4)%和(1.49±0.90)%,另外 3 个门的丰度总计仅为 0.002%和 0.001%。液体培养基则得到完全不同的结果,共计检测到 4 个门, *Firmicutes* 门是优势固氮菌,在第一代和第二代的丰度分别高达(96.7±0.55)%和(93.5±4.0)%,而 *Proteobacteria* 仅为(0.714±0.29)%和(0.65±0.070)%,另外 4 个门的丰度在第一代和第二代总计分别为 0.004%和 0.054%(图 3-A)。

基于 *nifH* 基因的固氮微生物属富集物也得到了类似结果。土壤中所有 67 个固氮菌属中(图 2-A),我们选择了 19 个优势属分析(每个样品中的丰度前 10 属),其相对丰度分别占土壤、固体和液体培养基固氮菌属的 89.2%、99.3%–99.8%和 94.2%–97.4% (图 3-B)。土壤中 *Azospirillum* 占比最高达(47.0±2.9)%,其次为 *Bradyrhizobium* (31.0±2.8)%和 *Rhizobium* 属(7.36±0.89)%。固体培养基中, *Azotobacter* 在第一代和第二代占比分别高达 96.6%±2.7%和 98.2%±0.94%,而在土壤本底中仅为 1.71%±0.40%;而原始土壤中丰度最高的 *Azospirillum* 和 *Bradyrhizobium* 则降至 0.234%–0.289%和 0.004%–0.005% (图 3-B)。液体培养基则选择了完全不同的固氮菌, *Paenibacillus* 在土壤中丰度为(0.843±0.140)%,在第一代和第二代中占比分别高达(76.7±3.9)%和(57.4±9.6)%; *Clostridium* (土壤中 0.12%)在第二代显著增加至(21.9±4.0)%和(24.8±7.7)%;同样值得注意的是,土壤中最优势的 *Bradyrhizobium* 和 *Azospirillum* 丰度急剧下降至 0.038%–0.094%和 0.002%–0.006% (图 3-B)。

16S rRNA 基因的系统分类表明,土壤中大部分固氮菌门均可通过经典的固体和液体培养基富集生长(图 3-C),但多次传代驯化了特定固氮菌,导致部分固氮菌被遗漏。例如,在微生物门水平,第一代和第二代固体培养基富集后,共检测到 12 种固氮菌门,包括 8 个门已知可固氮,而 4 个门尚未有固氮生理报道。已知 8 个固氮菌门中 *Proteobacteria* 丰度最高,在第一代和第二代中占比分别为(69.30±0.87)%和(81.4±3.4)%,其次是 *Firmicutes* 占比分别为(26.7±1.0)%和(8.64±3.60)% (图 3-C)。其他 4 个未知固氮门包括 *Acidobacteria*、*Planctomycetes*、*Chloroflexi*、*Gemmatimonadetes*, 这些微生物门在数量上极为弱势,占固体培养基所有固氮菌丰度的 0.05%。液体培养基也得到了类似结果,共检测到 12 种固氮菌门,包括 6 个已知门,6 个未知门。已知固氮菌门中 *Firmicutes* 丰度最高[第一代(80.9±13.0)%;第二代(59.8±18)%]、其次分别为 *Bacteroidetes* [第一代(13.0±12.0)%;第二代(19.0±12.0)%]和 *Proteobacteria* (第一代(6.01±0.96)%;第二代(21.1±7.8)%;未知的 6 个固氮菌门则包括 *Acidobacteria*、*Planctomycetes*、*Chloroflexi*、*Gemmatimonadetes*、*Crenarchaeota*、*Armatimonadetes*),它们在数量上极为弱势,占液体培养基所有固氮菌丰度仅为 0.01%。值得注意的是,土壤中含有固体和液体培养基上检测到的所有 14 个固氮菌门,其中 8 个为已知固氮菌门,占有固氮菌丰度为 79.7%, *Firmicutes* 最高为(36.1±3.4)%,其次分别为 *Proteobacteria* [(27.0±1.6)%]和 *Actinobacteria* [(12.100±0.061)%]。

进一步基于 16S rRNA 基因分类,发现土壤中所有 255 个固氮菌属(图 2)也具有类似规律(图 3-D)。根据相对丰度由高到低选择排名前 10 优势

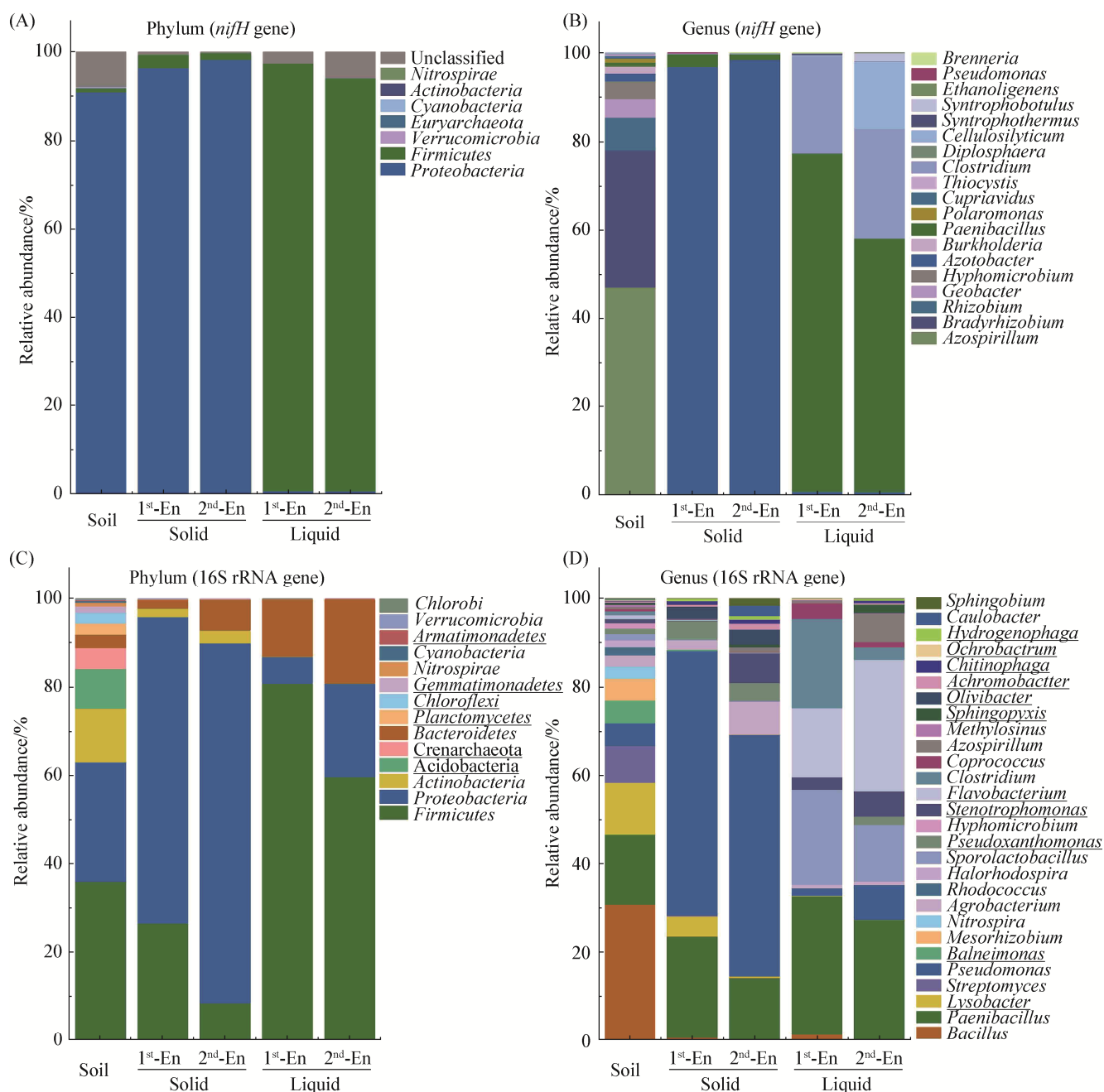


图 3. 微生物门和属水平下, 土壤中可培养固氮菌的物种组成变化规律

Figure 3. Dynamic changes of diazotrophic communities in soils and enrichments at phylum and genus levels. The *nifH* gene-based taxonomic composition of diazotrophs in soil and enrichments at levels of phylum (A) and genus (B). The 16S rRNA gene-based taxonomic composition of diazotrophs in soil and enrichments at levels of phylum (C) and genus (D). The underlined taxa indicate that the sequences of these taxa showed high similarity to bacterium in which  $N_2$ -fixing physiology has not been demonstrated within the underlined phylum and/or genus. All taxa without underlined signs denote at least one of strain within these phylum or genus has shown the physiological capability of  $N_2$ -fixation. All other labels are the same as Figure 2.

类群, 土壤、固体和液体培养基中共计 28 个属(图 3-D)。固体培养基中共检测到 27 个优势固氮菌属富集物, 已知的固氮菌属共 15 个, 其中 *Pseudomonas* 丰度最高[第一代(59.8±1.4)%, 第二代(54.6±15)%], 其次为 *Paenibacillus* [(23.1±5.6)%, (14.1±0.43)%]; 而 12 个属尚未有固氮生理报道, 其丰度分别为 14.2%和 18.0%, 丰度较高的包括 *Lysobacter* [第一代(4.52±0.98)%; 第二代(0.335±0.230)%、*Pseudoxanthomonas* [(4.19±1.1)%; (4.030±0.012)%]、*Olivibacter* [(2.77±1.30)%; (3.43±2.0)%]。液体培养基 27 个优势固氮菌属富集物中, 15 个为已知固氮属, 12 个属尚未有固氮生理报道。15 个已知属中, *Paenibacillus* 丰度最高[第一代(31.3±20)%, 第二代(27.7±22)%], 其次为 *Sporolactobacillus* [(21.5±6.5)%, (13.0±12)%]; 所有 12 个未知固氮菌属中丰度较高的分别为 *Flavobacterium* [(15.7±15)%, (30.3±15)%], *Stenotrophomonas* [(2.74±0.87)%, (5.87±3.5)%]。此外, 土壤中含有所有 16 个已知固氮菌属和 12 个未有固氮生理特征的属, 16 个已知固氮菌属占土壤中所有优势固氮菌丰度为 70.1%, 其中 *Bacillus* 占比最高为 30.8%±2.8%, 其次为 *Paenibacillus* (15.8%±2.3%), *Lysobacter* (11.7%±1.1%)。

## 2.4 可培养固氮菌的富集规律

*nifH* 基因分析发现土壤中含有 67 个固氮菌属, 经过两代富集后, 固体和液体培养基共获得固氮菌富集物 39 属, 其中固体培养基 30 属, 液体培养基 23 属; 固体和液体共有属 14 个(图 4-A)。16S rRNA 基因分析则发现土壤中含有 255 固氮菌属, 培养基两代富集后共计获得 248 属富集物, 其中固体培养基 212 个属, 而液体培养基 164 个属; 固体和液体共有属 128 个, 然而值得注意的

是, 仅有 22 个属已有固氮生理报道, 其他 226 属尚未有固氮报道(图 4-A), 占可培养属高达 91.1%。同时, 绝大部分微生物均为数量上占弱势的稀有属, *nifH* 基因分析表明菌体富集物中 69.5%固氮菌属丰度<0.1%, 42.8%的属<0.01%; 而 16S rRNA 分析则发现菌体富集物中 78.5%固氮菌属丰度<0.1%, 50.2%的属<0.01%。

尽管固体和液体固氮培养基均可富集大量固氮菌, 但与背景土壤中固氮菌丰度相比, 仅有很少一部分固氮菌被显著富集(图 4)。例如, *nifH* 基因分析表明, 固体培养基上的 30 个属中(图 4-A), 仅有 *Azotobacter* 属发生了显著富集(图 4-B), 其在背景土壤中的丰度为(1.53±0.35)%, 而在第一代和第二代固体培养基的丰度分别为(96.6±2.7)%和(98.00±0.94)%, 富集率 63 倍和 64 倍。液体培养基也得到了类似结果, 共计 23 个固氮菌属富集物中(图 4-A), 仅选择性富集了 3 个固氮菌属(图 4-C), 其中 *Paenibacillus* 和 *Clostridium* 是液体培养基中的优势物种, 在土壤中丰度为(0.771±0.13)%和(0.111±0.035)%, 而在第一代培养中丰度分别为(76.6±3.8)%和(21.9±4.0)%, 富集倍数高达 99.3 和 192 倍, 此外, 背景土壤中 *Syntrophothermus* 丰度仅为 0.029%, 在第一代培养中显著增加至 0.048%, 导致其富集率为 1.99(图 4-C)。

基于 16S rRNA 基因的分析也得到类似结果, 固体培养基 212 个固氮菌属富集物中(图 4-A), 与土壤中的丰度相比, 仅有 8 个属发生了显著增加(图 4-D), 包括 4 个已知固氮菌属, 4 个尚未有固氮生理报道的属。已知固氮属中 *Pseudomonas* 富集率最高, 在土壤中丰度为(0.620±0.14)%, 在第一和第二代分别为(49.0±13)%和(45.5±7.1)%, 富集率高达 79 和 74 倍; 另外 3 个显著富集的已知

固氮属分别为 *Paenibacillus* (第一代 10 倍, 第二代 6.2 倍)、*Agrobacterium*(5.67 倍; 20 倍)和 *Azospirillum* (第二代 15 倍), 在土壤中的丰度分别为 1.89%、0.30%、0.06%。此外, 4 个未知固氮属

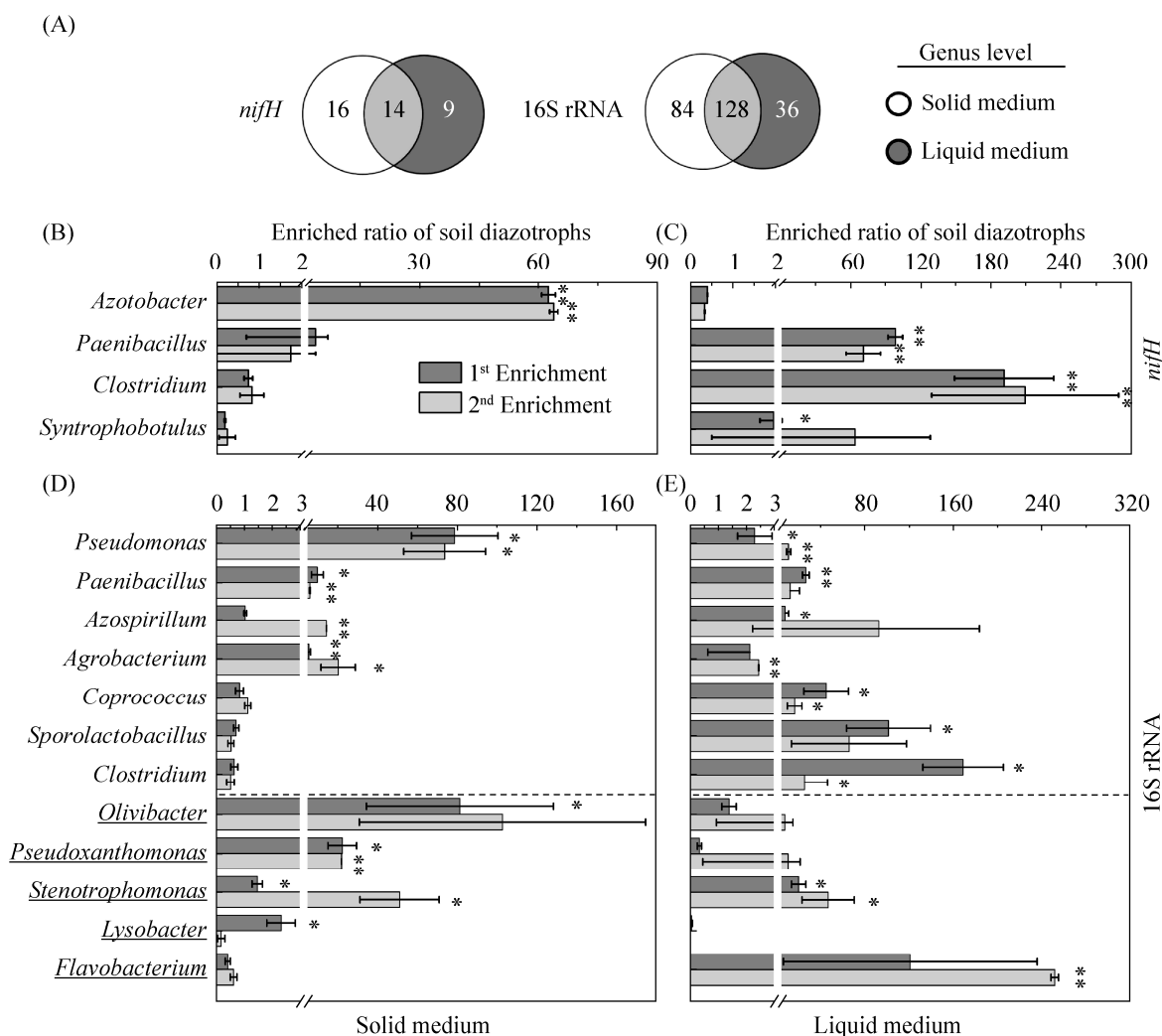


图 4. 土壤固氮菌属在固体和液体培养基中的选择性富集规律

Figure 4. Selective enrichment patterns of culturable diazotrophs in solid and liquid media. A: The common and unique diazotrophs between solid and liquid medium based on *nifH* and 16S rRNA gene analysis; B: One nitrogen-fixing genus was significantly enriched based on analysis of *nifH* gene in solid media (30 diazotrophs in total) as indicated by the stars above the columns, all other three genera are not in solid medium; C: Three nitrogen-fixing genera were significantly enriched based on analysis of *nifH* gene in liquid media (23 diazotrophs in total) as indicated by the stars above the columns; D: Eight nitrogen-fixing genera were significantly enriched based on analysis of 16S rRNA gene in solid media (212 nitrogen fixers in total); E: Nine nitrogen-fixing genera were significantly enriched based on analysis of 16S rRNA gene in liquid media (164 nitrogen fixers in total). The underlined genera indicate that the sequences of these genera showed high similarity to bacterium in which  $N_2$ -fixing physiology has not been demonstrated within the underlined genus. All genera without underlined signs denote at least one of strain within the genus has shown the physiological capability of  $N_2$ -fixation. All other labels are the same as Figure 2 and Figure 3.

的富集倍数分别为 *Olivibacter* (第一代 82 倍; 第二代 103 倍)、*Pseudoxanthomonas* (23 倍; 22 倍)、*Stenotrophomonas* (1.48, 51.3) 和 *Lysobacter* (第一代 2.33), 这些未知固氮属在土壤中的丰度分别为 0.03%、0.15%、0.11%、1.41%, 经过富集培养后在第一代液体培养基中占比共计 11.6%, 第二代则增至 14.5% (图 3-D)。

类似的, 液体培养基共计 164 个固氮属中 (图 4-A), 与土壤中丰度相比, 仅有 9 个属发生了显著富集 (图 4-E), 包括 7 个已知固氮菌属, 2 个尚未有固氮生理报道的属。已知固氮属中富集率最高的为第一代 *Clostridium* 属 (169 倍), 在土壤和培养基中的丰度分别为  $(0.0980 \pm 0.0094)\%$  和  $(16.6 \pm 3.6)\%$ ; 其他显著富集的 6 个固氮菌属分别为 *Sporolactobacillus* (102 倍; 66.2 倍)、*Coprococcus* (45.6; 17.1)、*Paenibacillus* (13.6; 12.9)、*Azospirillum* (8.32 ; 93.2)、*Pseudomonas* (2.32 ; 11.5)、*Agrobacterium* (2.16; 2.47); 它们在土壤中的丰度分别为 0.17%、0.06%、1.89%、0.06%、0.62%、0.30%。两种未知固氮属中, *Flavobacterium* 富集率最高 (122 倍; 252 倍), 其次为 *Stenotrophomonas* (20.6; 47.3), 它们在土壤中的丰度仅为 0.11%, 在第二代液体培养基中丰度高达 26.8%、5.17%, 在所有未知固氮属中丰度最高 (图 3-D)。

### 3 讨论

“99% 难培养”通常意味着绝大部分微生物尚未获得纯培养。事实上, 连续的传代过程中, 代时长且生理功能多样的微生物通常会处于竞争劣势, 进而被易生长的微生物所淘汰。本研究假设所有可利用人工营养配方的固氮菌均可富集并形成菌落, 同时, 第一代和第二代培养基的菌落集

合, 能够在最大程度代表潜在的、可利用人工培养配方的可培养纯菌株。同时, 选择第一代和第二代微生物菌落集合可规避连续传代可能引起的多样性丧失。进一步利用固氮菌分子标靶基因 *nifH* 和 16S rRNA 基因引物, 高通量测序菌落 DNA 和土壤 DNA 并进行比较分析。结果表明, 在目前技术条件下, 土壤中可培养固氮菌属的比例 > 22.4%。

尽管本研究中可培养固氮菌定义为所有可培养纯菌株的集合, 但也不能完全排除个别微生物为非固氮菌或者必须通过互利共生的非固氮菌。研究中所用培养基中未添加无机氮, 所有试剂中也未检测到无机氮, 稳定同位素示踪也表明固氮菌富集物同化了  $^{15}\text{N}_2$ , 同时 *nifH*/16S rRNA 的比例在传代中保持相对恒定, 表明固氮菌富集物群落组成未发生显著改变。然而, 尽管固体培养基菌落的 16S rRNA 基因与 12 个门高度同源, 但其中 4 个门尚未有固氮生理报道 (*Acidobacteria*、*Planctomycetes*、*Chloroflexi*、*Gemmatimonadetes*), 而液体培养基更检测到非固氮菌 *Crenarchaeota*、*Armatimonadetes* 门的 16S rRNA 基因同源序列。这些微生物迄今尚未被分离培养的可能原因是, 传统微生物分离纯化过程中, 平板挑选或液体转接具有极大的随机性, 会遗漏代时较长、生长缓慢的非优势固氮菌<sup>[26]</sup>。同时, 这些固氮菌可能属于营养缺陷体, 需要与其他细菌共生获得营养物质, 如钴胺素、生物素等<sup>[33-35]</sup>。然而, 本研究也不能排除这些微生物是非固氮菌。例如, 培养基中的固氮菌可能会分泌  $^{15}\text{N}$ -化合物, 作为营养物促进非固氮菌的生长, 同样导致非固氮菌基因组被  $^{15}\text{N}_2$  所标记。事实上, 针对西伯利亚落叶松林冻土层土壤的研究发现, 将非固氮纯菌株与固氮

菌株混合培养后, 可显著增加土壤固氮量<sup>[36]</sup>。未来通过优化固氮培养基和富集策略, 获得这些与非固氮菌 16S rRNA 基因高度同源的纯菌株具有重要意义。

固体和液体培养中数量上优势的固氮菌属中绝大部分为共有属, 而弱势固氮菌中绝大部分为二者的特有属。*nifH* 基因分析表明其中数量上优势(相对丰度排名前十, >94.2%)的 19 个属中(图 3-B), 固体、液体培养基共有 14 个属, 固体培养基特有 4 个属, 分别为 *Hyphomicrobium*、*Burkholderia*、*Cupriavidus* 和 *Pseudomonas* (相对丰度由土壤中 0.001%–3.760%降为 0.0005%–0.0800%), 液体培养基特有的 1 个属 *Ethanoligenens* (相对丰度由土壤中 0.001%富集为 0.001%–0.030%); 数量上弱势的 20 个属中, 未发现共有属, 固体培养基特有 12 个属, 液体培养基特有的 8 个属, 弱势菌株丰度均未发生显著富集。16S rRNA 基因分析表明数量上优势(相对丰度排名前十, >81.1%)的 28 个属中(图 3-D), 固体、液体培养基共有属 26 个属, 固体培养基特有 1 个属 *Hyphomicrobium* (丰度由土壤中 0.15%降为(0.001±0.001)%), 液体培养基特有的 1 个属 *Nitrospira* (丰度由土壤中 0.33%降为(0.001±0.001)%)。数量上弱势的 220 个属中, 固体、液体培养基共有 102 个属(土壤中相对丰度总和为 0.65%, 液体和固体培养基中分别下降为 0.13%和 0.19%), 固体培养基特有 82 个属, 液体培养基特有 36 个属。这些数量上占弱势、与背景土壤相比未被显著富集但却能在培养基形成菌落生长的固氮菌, 是未来定向培养分离固氮菌资源的重要内容。

固体和液体培养基分别富集了不同的固氮菌, 造成这一差异的原因可能包括氧气、琼脂、

附着物环境差异。在属水平, *nifH* 基因分析表明固体培养基选择了 *Azotobacter* (96±2.94%), 而液体培养基选择了 *Paenibacillus* (54.63±9.15)%和 *Clostridium* (27.21±4.59)%。固体培养基中菌落与空气接触, 氧气浓度约为 19%, 而液体培养基中溶解氧浓度通常约为 0.1%。已有报道表明 *Azotobacter* 具有好氧生长的固氮功能, 可能通过细胞团聚形成厌氧微域, 防止氧气阻遏固氮酶合成及对固氮活性的影响, 而 *Paenibacillus* 和 *Clostridium* 适应氧气胁迫能力更强。此外, 尽管理论上琼脂不可被微生物代谢利用, 但也有研究发现中性或碱性条件下, 磷酸盐和琼脂混合后经高温灭菌后会产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 双氧水<sup>[37–38]</sup>, 而液体培养基中磷酸盐单独加热则不会产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对微生物生长有明显的抑制作用<sup>[37]</sup>, 也可能是造成固体培养与液体培养之间差异原因的。然而, 这些研究大多针对纯菌株的生理生化和遗传学研究<sup>[39]</sup>, 随着高通量测序成本急剧下降, 研究氧气对固氮菌富集培养过程的功能调控影响具有重要意义, 如胞内生物氧化与 ATP 合成、特定防氧机制如呼吸保护、构象保护和分隔保护等<sup>[40]</sup>对氧气的正负反馈机制, 以及琼脂的可能利用机制等。此外, 固体和液体培养基的环境特征也并不相同, 固体平板表面为微生物提供了附着物, 更利于可培养固氮微生物群落形成由胞外多聚基质联合的微生物被膜<sup>[41]</sup>, 进一步改变固氮菌群落之间的群体感应过程<sup>[42]</sup>, 从而影响固氮菌及其共生微生物的生理生态行为。

我们的研究结果为最近关于“99%难培养”的论断提供了明确的实验证据。通过整合已有的文献数据, Martiny 推测可培养微生物占比高达 52%–74%<sup>[43]</sup>。针对 6 个生境中 40 个微生物群落的

Sanger 测序 16S rRNA 基因,每个群落中随机抽取了 100 条全长序列(约 1.5 kb)并与 RDP (Ribosome Data Base)数据库中的纯菌株序列比对分析,发现可培养微生物的细胞和物种占比分别高达(52.0±24)%和(34.9±23.0)%<sup>[43]</sup>。这一结果引起了较大的争议,Steen 等重新分析了该论文的数据,认为可培养微生物占比约为 2%–18%<sup>[44]</sup>。两者的差异主要在于所用分析软件的可靠性、16S rRNA 基因数据库的差异、系统发育分类的阈值等。然而,这些研究均未开展实验室富集培养,存在较大不确定性。我们的结果则表明,单纯的 16S rRNA 基因序列并不能反映生理功能,序列相似度与可培养性之间并没有必然联系,相当高比例的微生物可被培养,但尚未分离获得纯菌株。

我们的结果也表明,传统富集培养与系统发育的耦合分析更有意义。尽管系统发育分类方法具有极强的实践操作性,但其生理生化意义有限。例如,即使同一微生物种的不同菌株,其 16S rRNA 同源性高于 99%,但其表型也可能存在很大差异<sup>[45]</sup>,因此,无论是 16S rRNA 基因或核心基因组,单纯的 DNA 序列同源性并不能作为细菌分类的唯一标准<sup>[46]</sup>。同时,环境样品 DNA 提取、PCR 扩增、文库构建、高通量测序等等一系列分子分析过程,均可能引入大量的误差,例如,尽管本研究所用引物对 PolF/PolR 特异性高,广泛应用于固氮微生物研究近二十年,却也有一定的偏好性,对一些土壤类型中的固氮菌覆盖度仅为 51%<sup>[27,47]</sup>,同时,16S rRNA 相似性>97%的所有固氮菌基因组中,43%的 *nifH* 基因同源性低于 85%<sup>[48]</sup>,而本研究中 *nifH* 和 16S rRNA 基因的固氮菌系统分类结果也并不完全一致。已有研究表明,基于特征性分子靶基因片段扩增子得到的 OTU 不足以代

表含有该特征片段的所有微生物,特别是稀有物种,其靶基因序列可能与已知菌株具有较大差异而无法被现有方法检测<sup>[49]</sup>。事实上,本研究发现相当比例的可培养固氮菌富集物并未在土壤 DNA 被检测。此外,PCR 扩增及高通量测序中也可能产生一些稀有序列变异体,进而高估了物种多样性。经典分类学则能较好地弥补系统分类的缺点,表型分析能够最大程度反映菌株的生理功能,而纯菌株靶基因和组学数据的积累则可形成完善的数据库,为系统发育分类学推测未培养微生物功能提供依据。例如,在严格固氮培养条件下,研究发现 22%纯培养固氮菌未检测到 *nifH* 基因,组学分析则能提供关键固氮酶的遗传信息,并与生理特性形成更好的互补<sup>[50]</sup>。值得注意的是,“不可培养微生物”的表述有待商榷,“尚未培养”或“难培养”微生物更为合理。因为在某个菌株被培养前,无法判断其可培养性,因此,未来应开展更大规模的富集培养与系统分类研究,定量评估高通量测序的系统性误差,构建纯菌株表型和组学特征为核心的数据库,结合系统发育进化分析,更好地促进难培养微生物的分离。

## 4 结论

通过文献整合分析、传统富集培养和靶基因的系统发育分子分类研究,得到如下结论。

(1) 文献分析表明“99%难培养”即为经典的“平板计数异常”同义词。

(2) “不可培养”微生物的表述有待商榷,“尚未培养”或“难培养”微生物更为合理。因为某个菌株被培养前无法判断其可培养性,特别是绝大多数数量上占弱势的稀有物种,目前条件下无法穷尽



所有人工培养配方开展可培养研究。

(3) 土壤中可培养固氮菌占比高达 97.3%，但其中 91.1% 属尚未获得纯培养或固氮生理报道。基于 16S rRNA 基因分析表明，土壤中固氮菌共计 255 属，其中 248 属在固体和液体培养基可形成菌落被培养，但高达 226 属尚未获得纯培养或固氮生理报道。*nifH* 基因则发现土壤中固氮菌共 67 属，而 39 属在固体和液体培养基可形成菌落被培养，占比高达 58.2%。

(4) 土壤中绝大部分固氮菌为稀有物种，>40% 的固氮菌属丰度 < 0.01%。基于 16S rRNA 基因分析表明，固体和液体富集物中 78.5% 固氮菌属丰度 < 0.1%，50.2% 属 < 0.01%；而 *nifH* 基因分析发现 69.5% 固氮菌属丰度 < 0.1%，42.8% 的属 < 0.01%。

(5) 传统分离方法遗漏的固氮菌属占比高达 95.2%。16S rRNA 基因分析发现，与背景土壤中固氮菌相比，固体和液体可培养 248 属中，仅有 12 属的丰度统计显著增加；*nifH* 基因分析则发现可培养 39 属中，仅 4 属的丰度显著增加。固体和液体培养基具有极强的选择性，分别富集了 *Proteobacteria* 和 *Firmicutes* 的优势固氮菌门；固体仅富集了 *Azotobacter* 优势属，而液体富集了 *Paenibacillus* 和 *Clostridium* 优势属。连续传代过程中选择性遗漏了大量尚未获得分离的固氮菌。

(6) 亟需发展先进分离方法获得纯培养固氮菌株。本研究仅基于固氮菌这一特定功能群，其他类群的微生物可培养比例可能存在差别，未来应针对生理类群多样的微生物开展更多研究；综合不同学科先进技术，如富集分离、分类鉴定、生理表型和系统发育相关研究，为定向发掘重要微生物资源及功能提供参考。

## 参考文献

- [1] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(11): 5088–5090.
- [2] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(12): 4576–4579.
- [3] Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*, 1986, 40: 337–365.
- [4] Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 1990, 345(6270): 60–63.
- [5] Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, Lösekann T, Ivanova N, Martin HG, Szeto E, Platt D, Hugenholtz P, Relman DA, Quake SR. Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(29): 11889–11894.
- [6] Huang L, Feng XL, Du QS, Dong XZ, Liu SJ, Wen MZ, Dai X. Focusing on key scientific issues of microbiome research in hydrosphere: NSFC major research plan for microbes in hydrosphere. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32(3): 266–272. (in Chinese)  
黄力, 冯雪莲, 杜全生, 东秀珠, 刘双江, 温明章, 戴欣. 水圈微生物重大研究计划: 聚焦水圈微生物组研究的核心科学问题. *中国科学院院刊*, 2017, 32(3): 266–272.
- [7] Zhu YG, Shen RF, He JZ, Wang YF, Han XG, Jia ZJ. China soil microbiome initiative: progress and perspective. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32(6): 554–565. (in Chinese)  
朱永官, 沈仁芳, 贺纪正, 王艳芬, 韩兴国, 贾仲君. 中国土壤微生物组: 进展与展望. *中国科学院院刊*, 2017, 32(6): 554–565.
- [8] Locey KJ, Lennon JT. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(21): 5970–5975.
- [9] Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. How many species are there on earth and in the Ocean? *PLoS Biology*, 2011, 9(8): e1001127.
- [10] Parte AC. LPSN—List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio. net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(6): 1825–1829.
- [11] Willis A. Extrapolating abundance curves has no predictive power for estimating microbial biodiversity. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(35): E5096.
- [12] Louca S, Mazel F, Doebeli M, Parfrey LW. A census-based estimate of Earth's bacterial and archaeal diversity. *PLoS Biology*, 2019, 17(2): e3000106.
- [13] Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 2008, 37(S1): D26–D31.
- [14] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143–169.
- [15] Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 1990, 345(6270): 63–65.
- [16] Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 1985, 39: 321–346.
- [17] Winterberg H. Zur Methodik der Bakterienzählung. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1898, 29(1): 75–93.
- [18] Razumov AS. The direct method of calculation of bacteria in water: comparison with the Koch method. *Mikrobiologija*, 1932, 1: 131–146.
- [19] Thornton HG, Gray PHH. The numbers of bacterial cells in field soils, as estimated by the ratio method. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1934, 115(795): 522–543.
- [20] Skinner FA, Jones PCT, Mollison JE. A comparison of a direct- and a plate-counting technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms. *Microbiology*, 1952, 6(3/4): 261–271.
- [21] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 1982, 8(4): 313–323.
- [22] Kämpfer P, Steiof M, Dott W. Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microbial Ecology*, 1991, 21(1): 227–251.
- [23] Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Butterbach-Bahl K, Dentener K, Stevenson D, Amann M, Voss M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013, 368(1621): 20130164.
- [24] Vitousek PM, Menge DN, Reed SC, Cleveland CC. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013, 368(1621): 20130119.
- [25] Zhang JB, Zhu TB, Cai ZC, Qin SW, Müller C. Effects of long-term repeated mineral and organic fertilizer applications on soil nitrogen transformations. *European Journal of Soil Science*, 2012, 63(1): 75–85.
- [26] Baldani JI, Reis VM, Videira SS, Boddey LH, Baldani VLD. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 2014, 384(1/2): 413–431.
- [27] Poly F, Monrozier LJ, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 2001, 152(1): 95–103.
- [28] Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, Reeve JN. Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(9): 570–577.
- [29] Jia ZJ. Principle and application of DNA-based stable isotope probing—A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(12): 1585–1594. (in Chinese)  
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.
- [30] Wang Q, Quensen III JF, Fish JA, Lee TK, Sun YN, Tiedje JM, Cole JR. Ecological Patterns of *nifH* Genes in four terrestrial climatic zones explored with targeted metagenomics using FrameBot, a new informatics tool. *mBio*, 2013, 4(5): e00592–13.
- [31] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [32] Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(9): 635–645.
- [33] Zengler K, Zaramela LS. The social network of microorganisms - how auxotrophies shape complex communities. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(6): 383–390.
- [34] Degnan PH, Taga ME, Goodman AL. Vitamin B<sub>12</sub> as a modulator of gut microbial ecology. *Cell Metabolism*, 2014, 20(5): 769–778.
- [35] Mu DS, Liang QY, Wang XM, Lu DC, Shi MJ, Chen GJ, Du ZJ. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing. *Microbiome*, 2018, 6(1): 230.
- [36] Hara S, Desyatkin RV, Hashidoko Y. Investigation of the mechanisms underlying the high acetylene-reducing activity exhibited by the soil bacterial community from BC2 horizon in the permafrost zone of the East Siberian larch forest bed. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(4): 865–876.

- [37] Tanaka T, Kawasaki K, Daimon S, Kitagawa W, Yamamoto K, Tamaki H, Tanaka M, Nakatsu CH, Kamagata Y. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7659–7666.
- [38] Kawasaki K, Kamagata Y. Phosphate-catalyzed hydrogen peroxide formation from agar, gellan, and  $\kappa$ -carrageenan and recovery of microbial cultivability via catalase and pyruvate. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(21): e01366–17.
- [39] Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2011, 42: 489–512.
- [40] Robson RL, Postgate JR. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annual Review of Microbiology*, 1980, 34: 183–207.
- [41] McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(1): 39–50.
- [42] Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(6): 371–382.
- [43] Martiny AC. High proportions of bacteria are culturable across major biomes. *The ISME Journal*, 2019, 13(8): 2125–2128.
- [44] Steen AD, Crits-Christoph A, Carini P, DeAngelis KM, Fierer N, Lloyd KG, Cameron Thrash J. High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *The ISME Journal*, 2019, 13(12): 3126–3130.
- [45] Sun DL, Jiang X, Wu QL, Zhou NY. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962–5969.
- [46] Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi HN, Xu XW, De Meyer S, Trujillo ME. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 461–466.
- [47] Gaby JC, Buckley DH. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS One*, 2012, 7(7): e42149.
- [48] Gaby JC, Buckley DH. A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. *Database*, 2014, 2014: bau001.
- [49] Laehnemann D, Borkhardt A, McHardy AC. Denoising DNA deep sequencing data-high-throughput sequencing errors and their correction. *Briefings in Bioinformatics*, 2016, 17(1): 154–179.
- [50] Mirza BS, Rodrigues JLM. Development of a direct isolation procedure for free-living diazotrophs under controlled hypoxic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(16): 5542–5549.

## History and definition of the “99% unculturability paradigm” – case analysis with nitrogen-fixing bacteria

Lijie Yang<sup>1,2</sup>, Zhongjun Jia<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract: [Objective]** To clarify the source references of the paradigm that 99% of microorganisms are nonculturable; and to quantitatively evaluate the proportion of culturable diazotrophs in an agricultural soil. **[Methods]** Total microbial DNA was directly extracted from soil. Classic cultivation methods were used to obtain diazotrophic colonies from the first and second generation of solid and liquid culture medium for DNA extraction. The abundance and composition of microbiome were analyzed by high-throughput sequencing of *nifH* and 16S rRNA genes. Community composition and proportions of culturable diazotrophs were then identified through phylogenetic

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41530857, 91751204)

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

Received: 21 April 2020; Revised: 13 July 2020; Published online: 31 July 2020

classification. **[Results]** At the genus level, phylogenetic analysis of *nifH* gene showed the proportion of culturable diazotrophs in the soil was  $(22.4\pm 4.5)\%$ – $(28.4\pm 6.3)\%$ , and result of 16S rRNA genes was  $(31.6\pm 3.4)\%$ – $(41.4\pm 13.1)\%$ . Phylogeny of *nifH* genes revealed a total of 67 genera in soil; 39 genera could grow in liquid or solid medium, but only 4 genera were significantly enriched. The solid medium led to significant enrichment of *Azotobacter* of *Proteobacteria* as the dominant nitrogen-fixing bacteria with a relative abundance of  $(98.2\pm 0.94)\%$ . Meanwhile, liquid medium enriched members within two genera of *Paenibacillus* and *Clostridium* of *Firmicutes* significantly, and the relative abundance of the first generation was as high as  $(76.7\pm 3.9)\%$  and  $(21.9\pm 4.0)\%$ , respectively. As for 16S rRNA gene-based result, a total of 255 genera within 14 phyla were obtained in soil; 248 genera could grow in liquid or solid medium, but the sequences of up to 226 genera and 5 phyla showed high similarity to bacterium in which  $N_2$ -fixing physiology has not been demonstrated. Members within 6 genera of *Proteobacteria* were significantly enriched in solid medium, while liquid medium enriched significantly 5 genera of *Firmicutes*. **[Conclusion]** Literature survey reveals that 99% unculturability paradigm is not yet experimentally verified; and it is more a synonym for "the plate count anomaly", despite it is widely accepted in past 30 years. It indicates that direct microscopic counts of total microorganisms in environment is often much more than dilution plate counts of culturable microorganisms. Using  $N_2$ -fixer as an example, we show that up to 58.2% (*nifH* gene) and 97.3% (16S rRNA gene) of diazotrophs in soil can form colony in solid or liquid medium; but 91.1% of these colony have not been isolated yet with known physiology of  $N_2$ -fixing activity. Meanwhile, the majority of diazotrophs are rare taxa (with relative abundance  $<0.1\%$ ) at genus level on the basis of *nifH* and 16S rRNA genes, representing 69.5% and 78.5% of the total diazotrophs in soil, respectively. Despite of the colony forming in medium, these numerically less dominant taxa could thus likely escaped isolation, due to the continuous enrichment and long-term subculture strategies, and the members within the phyla of *Proteobacteria* and *Firmicutes* were particularly enriched. Our study thus highlight that the term "unculturable" should be avoided, and the difficult-to-cultivated term would be more appropriate because  $>90\%$  of diazotrophs could form colony in medium, although they are not isolated yet. Cultivation effort is warranted for future studies with focused target of these rare taxa.

**Keywords:** culturable bacteria, diazotrophs, nitrogen-fixation, *nifH* gene

(本文责编: 张晓丽)

贾仲君, 博士生导师, 中国科学院南京土壤研究所, 中科院特聘研究员, 主要从事土壤微生物研究。2002年获博士学位后连续在美国农业部、日本名古屋大学和德国马普陆地微生物所工作。2008年入选中科院百人计划, 2012年获终期评估优秀。连续入选江苏省“333高层次人才培养工程”, 曾获国际全球变化分析研究青年科学家奖、江苏省科技进步一等奖等。担任了中国植物营养与肥料学会生物与有机肥料专业委员会副主任、中国矿物岩石地球化学学会地表与生物地球化学专业委员会、中国微生物学会环境微生物专业委员会委员等; 主持了国家自然科学基金重大项目课题、重点项目、重大研究计划重点项目、中科院战略性科技先导专项B类项目, 科技部国际科技合作项目和973项目课题等。建立了稳定同位素示踪环境微生物DNA/RNA-SIP及高通量测序技术平台; 发现了基因水平转移是古菌适应酸性胁迫并主导土壤氮氧化的分子机制; 阐明了湿地土壤细菌氧化极低浓度甲烷的遗传代谢机制。近5年发表论文86篇, 包括中文核心期刊25篇, 60%强SCI论文发表在TOP期刊; 参加国内各种科学普及活动 $>30$ 余次。担任欧洲地球学会 *Biogeosciences* 和 *Frontiers in Microbiology* 等3份SCI期刊副主编及领域编辑, 《土壤学报》和《微生物学报》编委。

