



水热增加下黑土细菌群落共生网络特征

李东¹, 肖娴^{1,2}, 孙波², 梁玉婷^{2*}

¹常州大学环境与安全工程学院, 江苏 常州 213164

²土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008

摘要: 黑土是有机质含量高且肥沃的土壤类型之一, 气候变化会显著改变黑土中微生物群落的结构, 同时影响群落间的潜在相互作用关系。【目的】揭示水热增加对黑土中的细菌群落结构及潜在互作关系的影响。【方法】基于土壤移置试验, 采用 16S rRNA 高通量测序解析农田黑土(原位黑土、水热增加 1 和水热增加 2)中的细菌群落结构对水热增加的响应; 使用 CoNet 构建微生物群落共生网络, 识别共生网络中的枢纽微生物; 利用结构方程模型、相关性分析探究水热条件变化下土壤性质、微生物交互作用、多样性之间的直接、间接关系。【结果】黑土中的微生物以疣微菌、变形杆菌、酸性杆菌和放线菌为主。水热增加下土壤微生物共生网络的拓扑性质发生显著变化, 网络中表征微生物潜在竞争关系的负连线随着水热增加而显著增加。气候因素通过改变微生物潜在相互作用影响了群落水平分类多样性。物种竞争增强可能直接导致了土壤有机碳含量的降低。【结论】水热增加会显著改变黑土中微生物之间的潜在交互作用, 枢纽微生物的响应更加敏感。

关键词: 水热增加, 土壤移置, 微生物共生网络, 枢纽微生物

微生物在生物地球化学循环中起着引擎作用, 土壤微生物群落对气候变化的响应直接影响着土壤生态系统的结构和功能^[1]。微生物的世代周期短、生长速率快, 因此微生物群落可能是生态系统中响应气候变化最快的群落^[2]。另一方面, 微生物的功能和遗传多样性高、进化速率快、扩散能力大, 这些特点还可能使其有助于缓解环境变化^[3]。因此, 研究陆地生态系统微生物群落将如何

响应未来全球气候变化有重要的意义。

土壤有机碳是农田土壤肥力的核心, 深刻影响着土壤诸多物理、化学和生物学过程, 是农作物高产稳产和农业可持续发展的基础^[4]。温度与水分是影响土壤有机碳矿化最重要的环境因素, 全球气候变化导致的水热条件的变化势必引起土壤有机碳库及其对大气 CO₂ 的源汇效应的改变。气候变化与土壤碳库之间的相互作用及耦合机制一

基金项目: 国家自然科学基金(41877060)

*通信作者。Tel: +86-25-86881568; Fax: +86-25-86881000; E-mail: ytliang@issas.ac.cn

收稿日期: 2021-03-05; 修回日期: 2021-04-13; 网络出版日期: 2021-04-23

直是学术界研究的热点与难点。目前已有的大部分研究从不同层面考察了气候变化对土壤碳库改变的驱动过程及作用机理,包括微生物群落变化^[5]、土壤呼吸^[6]、有机质分解的敏感性^[7]等。Tardy 等^[8]的研究表明土壤中细菌和真菌的多样性对土壤碳矿化能力有极为重要的影响。跨越欧洲多个国家针对不同土地利用方式下土壤碳循环的研究表明,微生物学指标可以解释高达 82% 的土壤碳循环的变异程度^[9]。在陆地生态系统碳循环的过程中,土壤微生物既通过分解代谢向大气释放碳,同时也通过合成代谢将碳转化成稳定形态储存于土壤中。

对高等动植物的研究表明,物种多样性对气候变化的响应,更受到物种间相互作用关系的影响^[10]。通过对全球 688 份相关研究的 meta 分析表明,气候变化几乎影响了陆地生态系统所有类型的物种相互作用(如植物-病原菌、捕食关系、土壤食物网等)^[11]。此外,在多种空间尺度下,生物间的相互作用(如种间竞争)都会影响物种在应对气候变化时的响应情况^[11-12]。虽然我们对于动植物物种间交互作用关系对气候变化的敏感性研究已有比较深入的了解,但目前对微生物群落相互作用对气候条件的响应及其带来的土壤有机碳库的变化特征的认识还很有限。

本文基于土壤移置实验平台的土样,通过 16S rRNA 高通量测序的数据分析,利用 CoNet (co-occurrence network inference)的微生物共生网络的构建方法研究气候变化背景下微生物群落内的潜在交互关系的变化趋势,及其对群落多样性的影响。

1 材料和方法

1.1 实验设计

本研究是基于在中国东部南北样带

(North-South Transect of Eastern China, NSTEC)选择中国科学院海伦、封丘、鹰潭农田生态系统国家野外科学观测研究站建立的土壤移置试验(2005 年至今)。海伦农业生态试验站(126°38'E, 47°26'N),属于半湿润的寒温带季风气候,年均气温 3.0 °C,年均降水量 530 mm。封丘农业生态试验站(114°24'E, 35°00'N),属半干旱、半湿润的暖温带季风气候,年均温为 13.9 °C,年降水量 605 mm。鹰潭红壤生态试验站(116°55'E, 28°15'N),属于中亚热带湿润季风气候,年均温度 17.6 °C,年均降雨量 1795 mm。2005 年 10 月,分层(每层 20 cm)采集 3 种土壤的剖面(1.2 m 宽×1.4 m 长×1 m 深),将每层土壤混匀后装袋运输到海伦、封丘和鹰潭试验站,按原来的土层顺序填装到试验小区的砖砌水泥池中(小区隔墙厚 20 cm,露出地表 20 cm,底部铺石英沙,内壁覆盖防水布)。试验设置 3 个处理(3 个重复):①种植+施肥处理;②种植+不施肥;③裸地处理。

本实验选取土壤移置实验平台中的黑土移置部分作为本研究的研究对象,即将寒温带海伦试验站的黑土分别移置到暖温带的封丘以及中亚热带的鹰潭。土壤移置前的黑土基本理化性质如表 1 所示。本文中称原位黑土简称为原位(*in situ*),南移至封丘的黑土称为水热增加 1 (warming 1),南移至鹰潭的黑土称为水热增加 2 (warming 2)。采集黑土移置实验 2017 年种植+施肥处理以及种植+不施肥土壤样品研究。用不锈钢土钻(2 cm)按“S”形采集微区表层 15 cm 耕层土壤,混合后采用四分法留取实验用土量,装入无菌密封塑料袋中 4 °C 低温保藏带回。除去石块和根系,一部分土样风干后进行理化性质分析,另一部分放入-70 °C 冰箱,以备测定生物指标。

表 1. 土壤移置前黑土的基本化学性质

Table 1. The basic properties of mollisol soils before soil transplantation

pH	OM/(g/kg)	TN/(g/kg)	TP/(g/kg)	TK/(g/kg)	AP/(mg/kg)	AK/(mg/kg)	NH ₄ ⁺ -N/(mg/kg)	NO ₃ ⁻ -N/(mg/kg)
6.1±0.0	53.0±0.6	2.5±0.1	0.3±0.1	13.6±0.2	31.1±2.0	150.1±12.1	21.8±0.9	14.8±3.4

1.2 土壤化学性质测定

土壤 pH 采用玻璃电极测定, 水土比 2.5 : 1, 静置 30 min 后测定土壤 pH; 土壤有机质(OM)采用重铬酸钾容量法测定; 全氮(TN)测定采用半微量开氏法; 全磷(TP)采用碳酸钠熔融法, 速效磷(AP)测定采用 Olsen-P 法, 钼锑抗比色测定; 土壤硝态氮(NO₃⁻-N)中性盐(KCl)浸提, 连续流动分析仪(Skalar San⁺⁺ System)测定。土壤的化学性质分析均采用常规农业化学分析方法^[13]。

1.3 高通量测序

采用 MO BIO 试剂盒并结合液氮冷冻研磨的方法提取土壤样品中微生物基因组 DNA。提取的 DNA 用 Nanodrop 2000 检测 DNA 的浓度及纯度, 质量要求为: 浓度 ≥ 20 ng/μL, 总量 ≥ 500 ng, OD_{260/280}=1.82.0。DNA 置于 -20 °C 保存备用。

对于合格的样本检测区域进行高保真 PCR 扩增, 设置 3 个重复实验, 同时以标准的细菌基因组 DNA Mix 作为阳性对照。其中对于 2005 年至 2011 年的样本, 扩增序列为细菌的 16S rRNA 序列 V4-V5 区片段, 引物采用带有 barcode 的通用引物 Primer F=Illumina adapter sequence 1+GTGCCAGCMGCCGCGG 和 Primer R=Illumina adapter sequence 2+CCGTCAATTCMTTTRAGTTT; 2017 年的样本扩增序列为细菌的 16S rRNA 序列 V4 区片段, 引物采用带有 barcode 的通用引物 515 F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')和 806 R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。样本 PCR 反应体系(25 μL)包含 1×PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂,

dNTP 各 0.4 mol/L, 上下游引物各 1.0 mol/L, 0.5 U 的 DNA 聚合酶(TaKaRa, Dalian)以及 10 ng DNA 模板。PCR 反应程序为 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 25 个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物是否单一和特异。将同一个样本的 3 个平行扩增产物混合, 每个样本加入等体积的 AgencourtAMPure XP(Beckman Coulter, USA)核酸纯化磁珠对产物进行纯化。

根据琼脂糖凝胶电泳的初步定量结果, 对已经带有各自 Index 标签的样本文库浓度进行适当稀释, 后利用 Qubit 对文库进行精确定量, 根据不同样本的测序通量要求, 按相应比例(摩尔比)混合样本。混样后的文库通过 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)检测测序文库插入片段的大小, 确认在 120–200 bp 无非特异性扩增, 并准确定量测序文库浓度。采用 Miseq 平台 (Illumina, USA), 2×250 bp 的双端测序策略对文库进行测序, 后续进行生物信息学分析。

1.4 数据分析

利用 CoNet 构建网络分析, 网络构建参数如下: 首先将数据集中出现率小于 1/3 的 OTU 剔除, 之后选择 Pearson、Spearman 和 Bray-Curtis 三种方法进行两两 OTU 相关性的评估, 设置起始连线数为 2000; 为检验连线的显著性, 设置置换 (Permutation)次数、样品随机替代(bootstrap)次数均为 1000。CoNet 网络构建利用 Cytoscape 3.4.0 中的 CoNet 插件, 网络拓扑性质的计算利用

Network Analyzer 插件;模块群落(Modules)的划分以及网络图形的编辑利用 Gephi 0.9.2。在可视化网络结构图中,节点(通常以圆点表示)代表群落中的 OTU,节点之间的连线代表 OTU 之间的相互作用关系(正、负相关性等)。

在评估网络枢纽节点时,我们假设网络中存在一些重要的微生物,因为其在共生网络中的中心位置而被称为枢纽微生物(Hub),它们有可能对微生物群落的形成和保持有极为重要的作用。参考 Agler 等^[14]的研究方法,利用 R 软件中的‘extremevalues’数据包对网络中所有节点的连接数的数据集进行正态分布的拟合,并计算在 $P=0.1$ 的水平上哪些点为离群值,大于临界值连接数的节点则认为它们为网络中的枢纽。

采用 IBM® SPSS® Amos 20.0 (AMOS IBM USA) 进行结构方程模型(structural equation modeling; 简称 SEM)分析。首先对所有观测变量进行正态化检验,不能满足正态分布的变量对其取对数或者平方根处理,以提高其正态性。之后,采取极大似然法根据数据集对初始设定的先验模型进行参数化验证,测试其整体拟合优度。模型确定后,可以得到模型的路径系数(类似于偏相关系数,用以描述两个变量之间关系的强度以及正负关系)及其相关的 P 值,以及自变量对因变量的直接影响(direct effects)、间接影响(indirect effects)以及总影响(total effects)。

相关分析、方差分析(ANOVA)以及线性回归

分析在 SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) 完成。其中相关分析采用 Pearson 法;数据差异分析采用 Duncan 法。微生物群落的系统发育多样性是基于所有 OTU 的代表序列通过 Mothur 分析所得(https://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP#Phylogeny-based_analysis)。

2 结果和分析

2.1 细菌群落多样性

通过采集原位和移置处理下的土壤样本,研究土壤移置对黑土微生物群落的影响。变形菌门、放线菌门、酸杆菌门及拟杆菌门是黑土中主要的细菌类群,水热条件的增加显著改变了放线菌门、绿弯菌门和酸杆菌的相对丰度:将寒温带的黑土(*in situ*)移置到暖温带(warming 1)时,放线菌门和绿弯菌门的相对丰度变化较大;在中亚热带(warming 2)时,放线菌和酸杆菌的相对丰度变化最大。对微生物群落的多样性的分析表明,细菌的香浓指数和系统发育指数显著改变(表 2),水热增加下细菌的香浓指数先增加后降低,而系统发育指数持续降低。

2.2 土壤微生物共生网络的拓扑性质

利用 CoNet 生态网络构建方法研究不同水热增加下微生物共生网络关系的变化(图 1, 表 3)。结果显示,原位处理下连通度较大的微生物类群为放线菌门(*Actinobacteria*);移置到封丘(warming 1),酸杆菌门(*Acidobacteria*)与疣微菌门(*Verrucomicrobia*)

表 2. 微生物多样性和系统发育多样性

Table 2. The diversity of microorganisms and phylogeny

Diversity	<i>In situ</i>	Warming1	Warming2
Shannon	7.38b	7.62c	6.89a
Phylogenetic	64.89c	62.91b	57.35a

The letters show difference analysis of Duncan' test.

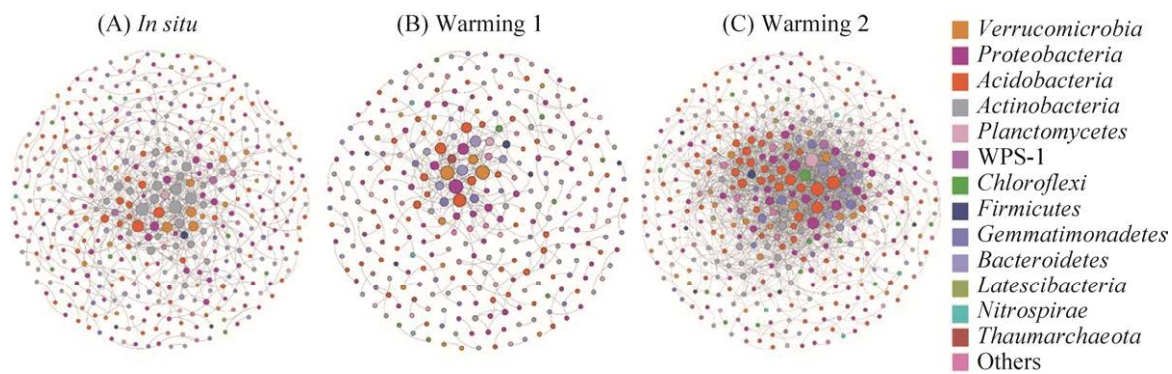


图 1. 水热增加下黑土微生物共生网络图

Figure 1. Overview of the co-occurrence networks for bacterial communities in mollisol soils under hydrothermal gradients. Each node represents an operational taxonomic unit (OTU). Node size is proportional to the relative abundance. Edges between nodes represent the relationships among OTUs.

表 3. 连通度较高的微生物类群

Table 3. Microbial groups with higher connectivity

Sites	OTU	Phylum	Degree
<i>In sute</i>	OTU77	<i>Actinobacteria</i>	22
	OTU372	<i>Actinobacteria</i>	22
	OTU17	<i>Acidobacteria</i>	20
	OTU82	<i>Actinobacteria</i>	19
	OTU44	<i>Acidobacteria</i>	18
	OTU31	<i>Actinobacteria</i>	18
Wariming1	OTU122	<i>Proteobacteria</i>	19
	OTU402	<i>Verrucomicrobia</i>	18
	OTU1374	<i>Verrucomicrobia</i>	18
Warming2	OTU143	<i>Acidobacteria</i>	17
	OTU15	<i>Acidobacteria</i>	67
	OTU148	<i>Acidobacteria</i>	67
	OTU575	<i>Proteobacteria</i>	66
	OTU1263	<i>Proteobacteria</i>	58
	OTU364	<i>Acidobacteria</i>	56
	OTU916	<i>Acidobacteria</i>	52
	OTU701	<i>Acidobacteria</i>	50
	OTU612	<i>Proteobacteria</i>	49
	OTU59	<i>Proteobacteria</i>	45

的连通度较高；土壤南移至鹰潭(warming 2)，连通度较大的微生物类群为酸杆菌门(*Acidobacteria*)。

我们进一步分析了网络的拓扑性质(表 4)。原位下，土壤微生物共生网络包含 431 个节点、581 条连线，其中 64%为正连线，36%为负连线；南

移至封丘后，微生物共生网络节点减少到 309、连线数也降低到 354，这可能是移置后导致环境突变，微生物的生存受到影响，这一点从共现关系类型中可以体现：56%为正连线，44%为负连线。说明环境突变可能会导致微生物关系从积极的促

进关系转变为竞争关系；当南移至鹰潭后，环境变化更加剧烈，微生物共生网络节点减少到 399，而连线数却增加到 1810 条，其中 51% 为正连线，49% 为负连线，主要是负连接数的增加。表明环境变化越剧烈微生物的潜在竞争关系可能越频繁。同时，网络拓扑性质的分析结果还表明，南移至鹰潭后共生网络的密度(network density=0.023)远高于南移至封丘(network density=0.007)以及原位(network density=0.006)。

为了对网络水平上的拓扑性质进行统计学分析比较，对每个独立样本基于以上 3 个网络分别提取子网络。对 3 个站点网络拓扑性质的分析结

果见图 2。3 个站点的网络总连线数、节点数、正负连线比例均有显著差异($P<0.001$)。有趣的是，共生网络的正负连线比例沿着水热梯度而变化，其中原位下的正负连线比例最高为 1.97 ± 0.12 ，南移至鹰潭后正负连线比例为 1.05 ± 0.16 。

2.3 土壤微生物共生网络正负连线

表 5 统计了气候变化背景下，黑土微生物共生网络中连通度较高的主要类群之间的正负连线数。由此可见，在土壤主要的细菌类群中，同一个类群内部的交互作用以正连线为主，疣微菌门内部的连线数在 3 个站点均为最低；在黑土南移后，负连线最多的类群均为变形菌门与酸杆菌门

表 4. 土壤微生物共生网络拓扑性质

Table 4. Topological properties of soil bacterial co-occurrence networks

Sites	Nodes	Edges			Network density
		Total edges	Positive edges	Negative edges	
<i>In situ</i>	431	581	372 (64%)	209 (36%)	0.006
Warming 1	309	354	198 (56%)	111 (44%)	0.007
Warming 2	399	1810	923 (51%)	887 (49%)	0.023

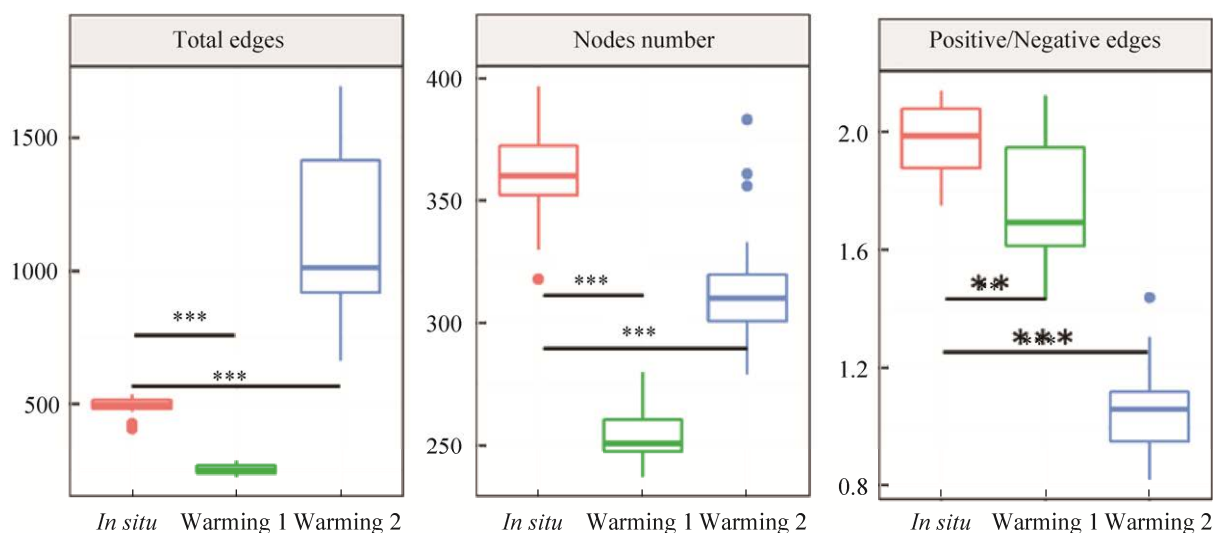


图 2. 水热增加 6 年下土壤微生物共生网络拓扑性质比较

Figure 2. Comparison of topological properties in the co-occurrence networks under hydrothermal gradient within 6 years of soil transplantation. The asterisk indicates that the difference between the two groups is statistically significant (T test, $**P<0.01$, $***P<0.001$).

表 5. 黑土微生物共生网络中主要类群之间的绝对连线数

Table 5. Edge numbers among dominant taxa in microbial co-occurrence networks

Hubs	Phylum	<i>In situ</i>		Warming 1		Warming 2	
		PE	NE	PE	NE	PE	NE
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobia</i>	11	0	4	1	9	3
	<i>Proteobacteria</i>	8	19	6	8	26	54
	<i>Acidobacteria</i>	12	3	9	7	52	31
	<i>Actinobacteria</i>	8	18	2	1	7	24
<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	30	5	19	4	49	38
	<i>Acidobacteria</i>	11	22	25	16	91	152
	<i>Actinobacteria</i>	47	6	8	3	35	24
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	23	1	9	8	128	66
	<i>Actinobacteria</i>	9	43	4	5	21	44
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	88	2	17	0	73	4
Total edges		372	209	198	156	923	887

PE: positive edges; NE: negative edges.

(南移至封丘 NE=16, 南移至鹰潭 NE=152)。基于以上对网络拓扑性质的分析, 网络中的连线主要来源于土壤中占主导地位的细菌门, 包括放线菌(占总连线数的 20.0%–23.6%)、酸杆菌(16.3%–28.9%)、放线菌(11.1%–32.6%)。然而, 这些细菌类群在 3 个站点所占的比例各异。当黑土移置到水热条件丰富的地区后, 变形菌门与酸杆菌门的相对连线比例增加; 而放线菌门的相对比例大幅度降低。其他一些细菌类群的相对比例也在移置后发生改变, 包括芽单胞菌门、拟杆菌门。值得注意的是, 虽然疣微菌门是黑土中相对丰度最高

的细菌门类, 但共生网络中该类群的连线较少, 仅占 8.2%–10.1%。此外, 本研究结果发现随着土壤移置到水热充沛的地区后, 负连线比例大大增加, 这一结果表明移置后土壤微生物之间竞争作用可能增强。这些增加的负连线主要表现为变形菌门与其他各细菌门之间负连线的增加, 尤其是变形菌门与酸杆菌门之间的负交互作用。酸杆菌门内部的负交互作用也在移置后增强。

2.4 微生物共生网络中的枢纽节点

通过拟合正态分布的方法分别得到 3 个站点微生物共生网络的枢纽节点(图 3)。其中, 原位、

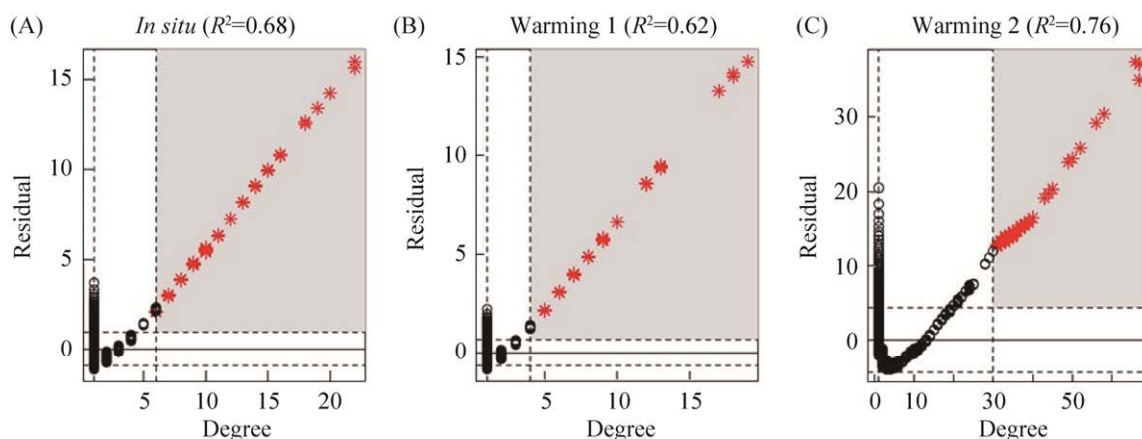


图 3. 微生物共生网络节点连接数的正态分布拟合

Figure 3. Fitting the node degrees in co-occurrence networks to normal distributions. Red stars are considered outliers corresponding to $P < 0.1$.

增温 1、增温 2 三个站点微生物共生网络中枢纽节点的连接数分别大于 6、4、30。原位情况下，识别出的网络枢纽的节点数为 58，增温 1 处理下的网络枢纽的节点数为 42，增温 2 处理下的网络枢纽的节点数为 46 (表 6)。

对以上识别出的 3 个站点的共生网络枢纽节点在门水平上进行划分(图 4)。原位的黑土微生物网络中的枢纽主要为放线菌(35%)、酸杆菌(19%)、疣微菌(17%)以及变形菌(17%)；南移至封丘后，黑土中的枢纽微生物主要由芽单胞菌(22%)、拟杆菌(19%)、变形菌(19%)、酸杆菌(17%)以及疣微菌(10%)组成；南移至鹰潭后，黑土中的枢纽微生物主要由酸杆菌(33%)、拟杆菌(17%)、变形菌(17%)、疣微菌(9%)以及芽单胞菌

(9%)组成。对微生物共生网络枢纽节点的分析结果可见，酸杆菌和变形菌在 3 个网络模型中都占据较高的比例，气候的改变对其在生态网络中的地位影响较小。说明二者是维持网络稳定的重要枢纽节点。另外，虽然疣微菌门在为网络中的节点数相对较低，但这个门类的物种依然活跃在 3 个站点的生态网络中，也是网络中相对重要的枢纽。此外，土壤移置后放线菌在网络中的枢纽作用下降，由原位的 35%下降为 2%以及 7%；相反，土壤移置后拟杆菌门和芽孢菌门在网络中的枢纽作用增强，拟杆菌门由原位的 5%增加至增温 1 处理下的 19%和增温 2 处理下的 17%，而芽孢菌门由原位的 0%增加至增温 1 处理下的 22%和增温 2 处理下的 9%。

表 6. 与微生物群落相关的网络枢纽的个数

Table 6. Number of hubs related to microbial community

Network hubs	<i>In situ</i>	Warming 1	Warming 2
Number of hubs in the network	58	42	46
Hubs related to taxonomic diversity	58	24	1
Hubs related to richness	57	3	0
Hubs related to phylogenetic diversity	58	11	0
Hubs related to taxonomic composition	58	8	46

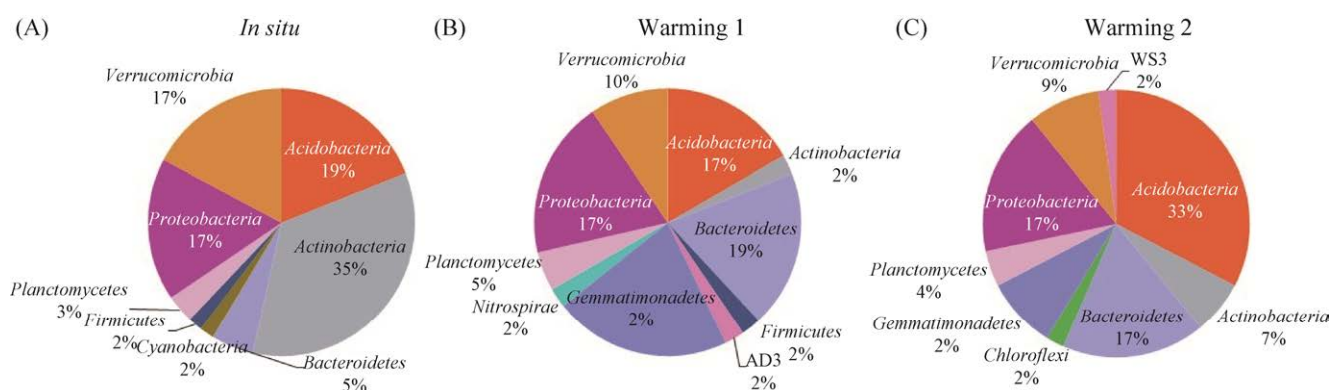


图 4. 共生网络中枢纽节点的分类

Figure 4. Taxonomic classification of the hubs in co-occurrence networks. (A), (B) and (C) represent the hubs in the *in situ*, warming 1 and warming 2 microbial network at the phylum level, respectively.

为进一步探究微生物网络中的枢纽对群落多样性及群落组成的潜在影响, 将网络中枢纽节点的丰度与群落多样性及群落组成指标做 Pearson 相关性分析, 表 6 列出了与这些微生物群落指标显著相关($P<0.05$)的枢纽节点数目。结果表明, 在原位处理下, 几乎所有识别出的网络枢纽的丰度显著影响着整个微生物群落的多样性(包括 Shannon 指数、物种丰富度、系统发育多样性)与组成; 而当土壤移置到水热条件丰富的地区后, 网络中的枢纽节点对群落指标的影响变弱, 在南

移至鹰潭的处理下, 46 个网络枢纽几乎只与群落结构相关。

2.5 土壤微生物交互作用对多样性的影响

为研究土壤微生物之间的交互作用对群落物种与系统发育多样性的影响, 本研究利用 SEM 模型分析水热因子变化下土壤性质、微生物交互作用、多样性之间的直接、间接关系。对分类多样性与系统发育多样性预测的结构方程模型均可以通过参数检验(图 5)。其中网络大小与多样性指标的 SEM 模型参数检验总体符合要求: 模型 a

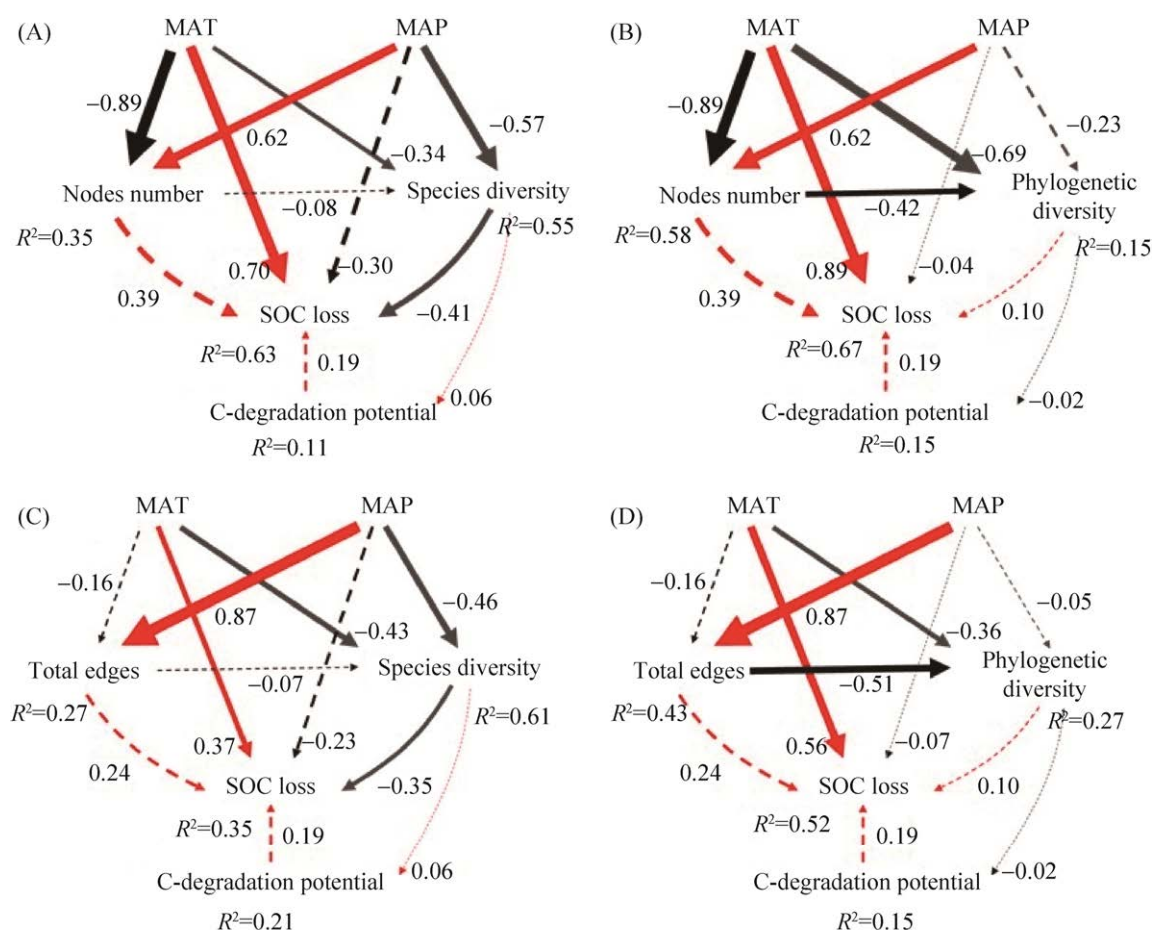


图 5. 微生物共生网络的大小对微生物多样性影响的结构等式方程图

Figure 5. Effects of network sizes on microbial diversities based on structural equation models. (A), (B), (C) and (D) represent the influence of the number of network nodes and edges on the diversity of microorganisms and phylogeny, respectively. MAP, mean annual precipitation; MAT, mean annual temperature; SOC loss, soil organic carbon loss. Dotted arrows represent non-significant paths ($P>0.05$). Red and black arrows indicate positive and negative relationships, respectively. The path widths are scaled proportionally to the path coefficient.

的自由度=3, 卡方值=2.455, $P=0.484$, GFI=0.979, RMESA<0.001 ($P=0.523$), Bollen-Stine $p=0.498$, 模型 b 的自由度=3, 卡方值=2.525, $p=0.48471$, GFI=0.978, RMESA<0.001 ($P=0.510$), Bollen-Stine $P=0.577$; 网络连线与多样性指标的 SEM 模型参数检验基本符合要求(除 RMESA 外): 模型 c 的自由度=3, 卡方值=4.237, $P=0.237$, GFI=0.964, RMESA=0.107($P=0.274$), Bollen-Stine $P=0.214$, 模型 d 的自由度=3, 卡方值=4.370, $P=0.224$, GFI=0.963, RMESA=0.113 ($P=0.261$), Bollen-Stine $P=0.259$ 。基于 SEM 模型结果可见, 在气候变化条件下微生物网络大小的指标对土壤微生物分类多样性的影响甚微(图 5-A, C), 但潜在改变了微生物系统发育多样性(图 5-B, D)。网络节点数($r=-0.42$, $P<0.05$)与总连线数($r=-0.51$, $P<0.01$)显著影响了系统发育多样性。同时, SEM 模型结果表明微生物共生网络节点的大小对耕层土壤有机碳降低无显著的影响。

3 讨论和结论

温度改变不仅会引起微生物群落多样性和分布格局的变化, 同时也会改变物种之间相互作用关系^[15]。本研究中土壤移置后导致的温度与降雨条件的改变显著改变了土壤微生物群落的潜在交互作用, 具体表现为负连线比例的显著增加(图 1, 表 4)。我们可以推测负连线比例的增加可能表明群落中负交互作用的增强, 这种土壤微生物之间的负交互作用可能是竞争导致的。物种之间的竞争作用的一个典型例子就是基于“高斯假说”的生态位理论, 即具相同的生态位不能共存^[16]。本研究中负连线比例的增强主要体现为变形菌门与其他各细菌门之间负连线的增加, 尤其是变形菌门

与酸杆菌门之间的负交互作用, 酸杆菌门内部的负交互作用也在移置后增强(表 5)。最近对酸杆菌门下的三个可培养物种的全基因组测序结果显示这些物种具有较宽的底物利用范围, 而且能够应对干燥胁迫以及土壤湿度的大幅度变化^[17]。酸杆菌的这些特性恰好解释了本研究中酸杆菌在移置后具有较高的竞争力。

气候变化下, 微生物群落负连线比例的增加与微生物多样性的降低有直接联系(表 4, 图 5-C、D)。这意味着群落中竞争作用的增强潜在降低了微生物多样性。这一结果与以往的研究结果类似, 即当环境中的某种资源成为限制因子, 这使得群落中具有相同生态位的物种竞争作用增强, 从而导致物种的灭绝或者多样性的损失^[18]。值得注意的是, 当讨论潜在竞争关系时, 不能忽略群落中非层级竞争(nontransitive competitive)。近来研究结果表明, 非层级竞争是复杂植物群落维持较高多样性水平的重要机理^[19]。事实上, 虽然在纯培养体系中证明了微生物群落中同样遵循该规则^[20], 但是在土壤环境中微生物群落是否存在这种非层级竞争关系仍有争议^[21]。此外, 本研究结果发现微生物共生网络的大小、节点数可能与土壤微生物的系统发育多样性有潜在的关系(图 5-B、D), 但是目前网络水平上的节点、连线这些表征微生物网络大小特性的指标很难与现有的生态理论知识结合^[22]。因此在今后的研究中, 进一步认识微生物网络大小的特性所指征的生态学意义很有必要。

本研究发现气候变化(温度)会直接导致土壤有机质的损失, 而物种间的交互作用通过影响物种多样性可能间接地导致了土壤有机碳的降低(图 5)。表明水热增加下的物种间交互作用的改变

可能直接导致了土壤碳的损失。Shade^[23]认为具有较高微生物多样性的生态系统不一定是一个更好或者更健康的系统。这里我们的研究也同样表明, 当评判某个生态系统的过程速率与微生物多样性之间的关系时, 不能仅仅关注其多样性的增加或者降低, 要利用多种测度评估微生物群落的特征, 如微生物群落的交互作用。

综上所述, 将寒温带的黑土移置到暖温带及中亚热带后, 土壤微生物共生网络的性质发生显著变化。网络中表明微生物潜在竞争关系的负连线比例随着水热梯度显著增加, 负连线比例的增加主要表现为变形菌门与酸杆菌门之间负交互作用的增强。识别了土壤微生物共生网络中的枢纽节点, 且随着水热条件的增加, 放线菌门在网络中的枢纽作用下降, 拟杆菌门和芽孢菌门在网络中的枢纽作用增强。气候变化导致的温度与降水条件的变化一方面直接影响了分类多样性, 另一方面气候因子通过直接和改变物种间交互作用间接改变了物种的多样性, 并直接促进了土壤有机碳的降低。这种生物因素对多样性的直接影响甚至大于气候因子。因此, 未来在探究环境压力下土壤微生物多样性改变的研究时, 不但要重视非生物因子, 更要重视生物因素对群落多样性的影响。

参 考 文 献

- [1] Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, van der Putten WH, Wall DH: Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 2004, 304(5677): 1629–1633.
- [2] Prosser JI, Bohannan BJM, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK, Freckleton RP, Green JL, Green LE, Killham K, Lennon JJ *et al*: Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(5): 384–392.
- [3] Girvan MS, Campbell CD, Killham K, Prosser JI, Glover LA: Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3): 301–313.
- [4] Pan G, Smith P, Pan W: The role of soil organic matter in maintaining the productivity and yield stability of cereals in China. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2009, 129(1-3): 344–348.
- [5] Sulman BN, Phillips RP, Oishi AC, Shevliakova E, Pacala SW: Microbe-driven turnover offsets mineral-mediated storage of soil carbon under elevated CO₂. *Nature Climate Change*, 2014, 4(12): 1099–1102.
- [6] Schlesinger WH, Andrews JA: Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry* 2000, 48(1): 7–20.
- [7] Davidson EA, Janssens IA: Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 2006, 440(7081): 165–173.
- [8] Tardy V, Spor A, Mathieu O, Leveque J, Terrat S, Plassart P, Regnier T, Bardgett RD, van der Putten WH, Roggero PP *et al*: Shifts in microbial diversity through land use intensity as drivers of carbon mineralization in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 90: 204–213.
- [9] Creamer RE, Hannula SE, Van Leeuwen JP, Stone D, Rutgers M, Schmelz RM, de Ruiter PC, Hendriksen NB, Bolger T, Bouffaud ML *et al*: Ecological network analysis reveals the inter-connection between soil biodiversity and ecosystem function as affected by land use across Europe. *Applied Soil Ecology*, 2016, 97: 112–124.
- [10] Alexander JM, Diez JM, Levine JM: Novel competitors shape species' responses to climate change. *Nature*, 2015, 525(7570): 515–518.
- [11] Tylianakis JM, Didham RK, Bascompte J, Wardle DA: Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 2008, 11(12): 1351–1363.
- [12] Leathwick JR, Austin MP: Competitive interactions between tree species in New Zealand's old-growth indigenous forests.

- Ecology*, 2001, 82(9): 2560–2573.
- [13] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [14] Agler MT, Ruhe J, Kroll S, Morhenn C, Kim ST, Weigel D, Kemen EM. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biology*, 2016, 14(1): e1002352. DOI:10.1371/journal.pbio.1002352.
- [15] Gilman SE, Urban MC, Tewksbury J, Gilchrist GW, Holt RD: A framework for community interactions under climate change. *Trends in Ecology & Evolution*, 2010, 25(6): 325–331.
- [16] GF G: The Struggle for Existence. *Soil Science* 1936, 41: 159.
- [17] Barns SM, Cain EC, Sommerville L, Kuske CR: Acidobactetia phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 3113–3116.
- [18] Hautier Y, Niklaus PA, Hector A: Competition for Light Causes Plant Biodiversity Loss After Eutrophication. *Science*, 2009, 324(5927): 636–638.
- [19] Soliveres S, Maestre FT, Ulrich W, Manning P, Boch S, Bowker MA, Prati D, Delgado-Baquerizo M, Quero JL, Schoening I *et al*: Intransitive competition is widespread in plant communities and maintains their species richness. *Ecology Letters*, 2015, 18(8): 790–798.
- [20] Maynard DS, Bradford MA, Lindner DL, van Diepen LTA, Frey SD, Glaeser JA, Crowther TW: Diversity begets diversity in competition for space. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(6).
- [21] Higgins LM, Friedman J, Shen H, Gore J: Co-occurring soil bacteria exhibit a robust competitive hierarchy and lack of nontransitive interactions. *BioRxiv*, 2017: 1–16.
- [22] Woodward G, Benstead JP, Beveridge OS, Blanchard J, Brey T, Brown LE, Cross WF, Friberg N, Ings TC, Jacob U, Jennings S, Ledger ME, Milner AM, Montoya JM, O'Gorman E, Olesen JM, Petchey OL, Pichler DE, Reuman DC, Thompson MSA, van Veen FJF, Yvon-Durocher G. Ecological networks in a changing climate. *Advances in Ecological Research*. Amsterdam: Elsevier, 2010: 71–138.
- [23] Shade A: Diversity is the question, not the answer. *The ISME Journal*, 2017, 11: 1–6.

Co-occurrence network of bacterial communities in mollisol soils under increasing hydrothermal conditions

Dong Li¹, Xian Xiao^{1,2}, Bo Sun², Yuting Liang^{2*}

¹ School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu Province, China

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

Abstract: Mollisol soil is one of the soil types with high content of organic matter and fertility, climate change will significantly change the structure and potential interactions of mollisol soils microbial communities. **[Objective]** This study is aimed to explore the microbial community structure and succession characteristics of mollisol soils under increasing hydrothermal conditions. **[Methods]** Based on a soil transplantation experiment, 16S rRNA high-throughput sequencing was used to analyze the bacterial community structure of mollisol soils (*in-situ*, warming1 and warming2); CoNet was used to construct the microbial co-occurrence networks and identify the hub microbes, structural equation models and correlation analysis were used to explore the direct and indirect relationships between soil properties, microbial co-occurrence networks, and diversity under the increasing precipitation and temperature conditions. **[Results]** We found that mollisol soils were dominated by *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, and *Actinobacteria*. Soil transplantation simulating climate change altered the patterns of microbial co-occurrence network with increased negative edge percentage and different network sizes. Climatic factors affected the taxonomic diversity directly and indirectly from altering the microbial interactions. The strengthen of negative interactions in communities directly induced the loss of soil organic carbon. **[Conclusion]** The increasing hydrothermal conditions will significantly change the microbial community co-occurrence network of mollisol soils, and the response of network hub microbes will be more sensitive.

Keywords: increasing hydrothermal conditions, soil transplantation experiment, microbial co-occurrence network, hub microbes

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41877060)

*Corresponding author. Tel: +86-25-86881568; Fax: +86-25-86881000; E-mail: ytliaang@issas.ac.cn

Received: 5 March 2021; Revised: 13 April 2021; Published online: 23 April 2021

梁玉婷, 博士, 中国科学院南京土壤研究所研究员, 博士生导师。于 2004 年和 2009 年获得清华大学学士和博士学位; 2007–2010 年美国俄克拉荷马大学访问学者、博士后。从事土壤微生物学领域的研究, 近年来在农田土壤微生物组功能与稳定机制方面取得了较为系统的创新性研究成果。揭示了我国不同气候带典型农田土壤中微生物群落结构特征及碳氮耦合转化、地力提升功能的演变规律等。近年来在 *ISME Journal*、*mBio*、*Environmental Science and Technology*、《土壤学报》等国内外期刊上发表相关论文 70 余篇。承担国家自然科学基金优秀青年基金、江苏省杰出青年科学基金等项目, 担任《土壤学报》、*Soil Ecology Letters* 等编委。

