



基于高通量测序的稀释平板计数细菌群落变化研究

李凯凯¹, 曹伟伟^{2,3}, 文昌丽¹, 周晓丽⁴, 徐修远¹, 邱旭¹, 赵悦蓓¹, 贾仲君^{2,3*}, 孟磊^{1*}

1 海南大学热带作物学院, 海南 海口 570208

2 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

3 中国科学院大学, 北京 100049

4 盐城师范学院海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 224007

李凯凯, 曹伟伟, 文昌丽, 周晓丽, 徐修远, 邱旭, 赵悦蓓, 贾仲君, 孟磊. 基于高通量测序的稀释平板计数细菌群落变化研究. *微生物学报*, 2022, 62(11): 4447–4464.

Li Kaikai, Cao Weiwei, Wen Changli, Zhou Xiaoli, Xu Xiuyuan, Qiu Xu, Zhao Yuebei, Jia Zhongjun, Meng Lei. Assessment of differences between high-throughput sequencing and plate-dilution method for microbial ecology study of soils under distinct land use scenarios. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4447–4464.

摘要:【目的】明确平板计数法中不同稀释梯度对土壤细菌数量和组成的影响规律, 比较稀释平板计数法和高通量测序研究土地利用方式变化下土壤细菌群落的差异。【方法】针对不同土地利用方式下的 4 种土壤(次生林、健康蕉园、发病蕉园和水稻土), 设置 5 个土壤悬液 10^{-1} – 10^{-5} 稀释梯度开展平板计数, 获得平板上可培养细菌富集物并提取总 DNA; 同时直接提取原位土壤微生物总 DNA, 高通量测序细菌富集物 DNA 和土壤总 DNA 中的 16S rRNA 基因, 研究不同土壤悬液稀释梯度下的可培养细菌群落和背景土壤细菌多样性, 明确可培养细菌占土壤总细菌的比例以及多样性差异。【结果】次生林垦殖为蕉园土壤后土壤呼吸增幅最高, 细菌数量降幅最高, 稀释平板计数与实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR) 结果一致, 但其他土地利用方式变化的稀释平板计数与实时荧光定量细菌数量的结果并不完全一致。连续稀释显著降低了可培养细菌多样性。与原位土壤总细菌相比, 土壤可培养细菌群落 Chao 1 指数降幅高达 86%–98%。与土壤悬液稀释 10 倍(10^{-1})相比, 稀释 100–10 万倍(10^{-2} – 10^{-5})后可培养细菌群落 Chao 1 指数降幅高达 35%–60%。连续梯度稀释

基金项目: 国家自然科学基金(32072688, 318723623); 江苏省农业科技自主创新资金[CX(19)1006]

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32072688, 318723623) and by the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund [CX(19)1006]

*Corresponding author. E-mail: jia@issas.ac.cn; menglei@hainanu.edu.cn

Received: 19 March 2022; Revised: 18 May 2022; Published online: 17 June 2022

也降低了物种多样性, 所有稀释梯度共检测到 315–401 个微生物属, 共有属仅为 21–38 个, 而 10^{-1} 梯度独有属有 92–210 个, 10^{-2} – 10^{-5} 梯度独有属为 2–59 个。4 种土壤中可培养细菌占背景土壤总细菌比例范围为: 16.1%–47.7% (门水平), 7.4%–30.9% (属水平)。两两比较不同土地利用方式间的显著差异物种, 可培养方法获得的显著增加和减少的物种数量仅为高通量直接测序原位土壤结果的 9.7% 和 22.9%; 免培养和可培养均发现了一些共同的差异物种, 包括 *Bacillaceae*、*Micrococcaceae*、*Microbacterium*、*Comamonadaceae* 和 *Burkholderiales*。【结论】传统稀释平板计数可培养细菌数量过程中, 10^{-1} 稀释梯度下可培养细菌比例及多样性明显高于 10^{-2} – 10^{-5} 梯度, 而 10^{-2} – 10^{-5} 梯度之间并无明显差异。表明传统稀释平板计数过程中, 遗漏了相当数量的独特微生物属, 其比例范围为 35.9%–99.0%。可培养法和免培养法均发现, 土地利用方式变化可导致一些微生物类群显著降低, 如 *Microbacterium*。尽管可培养方法低估了不同土地利用方式间细菌群落的差异, 但可培养与免培养方法发现了共同的差异细菌类群。与 4 种土壤中细菌本底丰度相比, 固体平板显著富集 *Pseudomonas* 和 *Flavobacterium*, 增加倍数分别为 2 233–5 805 倍和 43–4 506 倍。未来应耦合分子生态学与可培养技术深入发掘复杂土壤环境中的微生物资源。

关键词: 高通量测序; 稀释平板法; 可培养细菌; 16S rRNA 基因

Assessment of differences between high-throughput sequencing and plate-dilution method for microbial ecology study of soils under distinct land use scenarios

LI Kaikai¹, CAO Weiwei^{2,3}, WEN Changli¹, ZHOU Xiaoli⁴, XU Xiuyuan¹, QIU Xu¹, ZHAO Yuebei¹, JIA Zhongjun^{2,3*}, MENG Lei^{1*}

¹ College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570208, Hainan, China

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

³ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

⁴ School of Marine and Biological Engineering, Yancheng Teachers University, Yancheng 224007, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To assess the effect of different dilution gradients of dilution-plate method on the number and composition of soil bacteria, and to study the differences in soil bacterial communities under distinct land use scenarios by comparing plate-dilution method and high-throughput sequencing.

[Methods] With four types of soil (secondary forest soil, healthy banana soil, diseased banana soil and paddy soil) collected, soil suspensions of five dilution gradients (10^{-1} – 10^{-5}) were prepared. Classic plate-dilution method was employed to obtain culturable bacteria, followed by colony-counting and DNA extraction. In addition, the total bacterial DNA in background soils was extracted. Then high-throughput sequencing of 16S rRNA gene was performed to study the diversity of bacterial communities at different dilution gradients and in background soils, proportion of culturable bacteria in total soil bacteria, and species difference. **[Results]** The highest increase in soil respiration was found

after the conversion of secondary forest to banana plantations, and both dilution-plate method and real-time fluorescence quantitative PCR found the highest decrease in bacterial counts. However, the results of these two methods were not entirely consistent for other land use changes affecting soil bacterial populations. The Chao 1 index of the soil culturable bacterial community was reduced by 86%–98% compared with that of the total background soil bacteria. Dilutions of 100–100 000 times (10^{-2} – 10^{-5}) lowered the Chao 1 index of the culturable bacterial community by 35%–60% compared with dilutions of 10 times of soil suspensions. Gradient dilution also reduced the species diversity. Dilution-plate method detected a total of 315–401 microbial genera, with only 21–38 genera common to all dilution gradients, compared with 92–210 genera unique to the 10^{-1} gradient and 2–59 genera unique to the 10^{-2} – 10^{-5} gradients. The proportions of culturable bacteria in the four types of background soils were in the range of 16.1%–47.7% (phylum level) and 7.4%–30.9% (genus level). The number of significantly increased and decreased species detected by plate-dilution method was only 9.7% and 22.9%, respectively of the results by high-throughput sequencing. The two methods identified a number of common divergent species, including *Bacillaceae*, *Micrococcaceae*, *Microbacterium*, *Comamonadaceae* and *Burkholderiales*. **[Conclusion]** The highest percentage of culturable species in total soil bacteria was 47.74% and 30.90% at phylum and genus levels, respectively. The community diversity of culturable species was much lower than that of the background soil bacteria. The proportion and diversity of culturable bacteria was significantly higher in the 10^{-1} dilution gradient than in the 10^{-2} – 10^{-5} gradients, while there was no remarkable difference between the 10^{-2} – 10^{-5} gradients. Although the dilution-plate method greatly underestimated the differences in bacterial communities between land use practices, common differential bacterial taxa were found by the culture-free and culturable methods. Compared to the background abundance of bacteria in the four soils, the solid plates were significantly enriched in *Pseudomonas* and *Flavobacterium*, with fold increases of 2 233–5 805 and 43–4 506. Culture-independent molecular techniques and classical culturable methods should be coupled in the future research to deepen the exploration of microbial resources in complex environments.

Keywords: high-throughput sequencing; plate-dilution method; culturable bacteria; 16S rRNA gene

微生物肉眼不可见, 因此, 微生物学的发展始终依赖于研究方法的突破和改进。19 世纪末建立的稀释平板计数是研究土壤微生物数量的经典方法, 被认为是微生物学发展史上的里程碑^[1]。传统的稀释平板计数^[2-3]通过将连续稀释梯度的土壤悬液均匀涂布于固体培养基上, 其上的微生物生长繁殖并形成肉眼可见的菌落, 然后根据菌落数、稀释倍数和接种量计算土壤中微生物的数量。该方法的基本假设是: 土壤中所有微生物均为可培养菌, 可在平板上

生长形成肉眼可见的菌落; 同时, 所有微生物均匀分散于土壤悬液中, 充分分散为单个细胞。大多数情况下, 10^{-3} – 10^{-5} 梯度的平板菌落界限清晰, 是平板计数法常用的稀释梯度。但在连续稀释过程中, 数量上占弱势的微生物极可能被遗漏, 导致不同稀释梯度平板上的菌落代表不同的可培养微生物类群。然而, 迄今为止, 不同稀释梯度下可培养微生物的组成变化规律, 特别是平板计数过程中常见的 10^{-3} – 10^{-5} 稀释梯度, 是否遗漏了主要的可培养细菌类群,

尚未有相关报道。

值得注意的是，最近有研究认为传统的“99%微生物难培养”理念存在巨大的认知偏差，而绝大多数微生物是可培养的^[4]。然而，目前仍缺乏可信的实验证据准确计算可培养微生物占有所有微生物的比例。2019年，Martiny^[4]针对6种不同环境中的微生物区系，通过高通量测序16S rRNA基因并与数据库中的纯菌株序列比对分析发现，可培养细菌物种占比高达52%–74%。然而，Steen等^[5]重新分析了原始数据，认为Martiny采用的分析策略具有一定的偏好性，研究结论夸大了可培养菌的比例，可培养细菌占比仅为2%–18%，绝大部分细菌仍然难以培养。随后*Nature Reviews Microbiology*以“The culture debate”为题，发表了评述观点，认为难培养微生物是重要的资源，应科学区分“难培养”、“可培养”和“不可培养”微生物的概念^[6]。这些争议的焦点主要在于“99%难培养”概念的界定标准模糊不清^[7]。同时，以上所有研究均聚焦于数据分析，未有相关实验验证。事实上，采用经典的可培养策略获得可培养菌群DNA，结合原位直接提取环境微生物总DNA，比较分析可培养菌群DNA和环境DNA的差异，则能在一定程度上克服这一难点，计算可培养菌的比例。换言之，针对可培养微生物及其原位环境微生物总DNA，测序16S rRNA基因序列并与数据库中纯菌株序列比对分析，即可推测可培养微生物的比例。例如，我们最近的研究^[8]表明土壤中固氮菌共计255个属，其中248个属在固体和液体培养基中可形成菌落被培养，表明可培养固氮菌的比例高达97.2%，但其中高达226属尚未获得纯培养或固氮生理报道，意味着高达91.1%的可培养固氮菌属在常规的定向富集和分离培养过程中，由

于连续传代富集等操作被遗漏，导致其尚未获得纯培养或固氮生理报道。然而，其他微生物类群是否也有类似规律，特别是常见的土壤细菌区系研究过程中，牛肉膏蛋白胨培养基上可培养总细菌占土壤总细菌的比例，尚未有相关报道。

通常认为传统可培养法研究微生物群落数量和组成的误差较大，而基于免培养法的分子生态学技术先进，能更准确反映微生物群落的生态适应规律，特别是以核糖体rRNA基因序列差异为核心的生物三域分类理论逐渐得到学术界广泛认可，成为过去20年微生物生态学蓬勃发展的主要理论基础^[9–10]。但是，可培养法和免培养法研究同一个科学问题是否会得到完全不同的结论，或者可培养法在多大程度才能真实反映微生物群落的环境适应规律，仍未有可信证据。例如，土地利用方式导致土壤理化性质变化，进而可能产生截然不同的原位土壤微生物区系^[11–13]。但可培养法能否反映微生物区系的差异性，与免培养方法的结果是否具有一致性尚未可知。据此，本研究采集了次生林土壤、次生林垦殖而来的健康蕉园土壤、发病蕉园土壤以及水稻土，拟开展如下研究：(1) 利用平板计数法，首先研究不同稀释梯度(土壤悬液 10^{-1} – 10^{-5} 的连续稀释)下，土壤可培养细菌的数量变化规律，然后结合高通量测序技术，研究牛肉膏蛋白胨固体平板培养基上可培养菌多样性及其对土地利用方式变化的响应规律；(2) 利用免培养分子生态技术，直接提取土壤环境中DNA，通过实时荧光定量PCR技术分析微生物数量，通过高通量测序16S rRNA基因研究微生物群落组成对土地利用方式变化的适应规律；(3) 可培养菌占土壤总细菌比例。通过高通量测序原位土壤环境DNA和可培养菌DNA中的16S rRNA基因，即可获得不同原位土壤

微生物多样性和可培养微生物多样性, 分析可培养细菌在原位土壤中的比例、物种组成以及多样性, 评估传统可培养方法与现代分子方法研究土壤细菌群落的优缺点。

1 材料与方法

1.1 土壤样品概况

土壤样品采自海南省澄迈县桥头镇(19°56'N, 109°56'E), 包括未经过人为活动干扰的天然次生林土壤(forest soil, FS), 次生林垦殖后的香蕉园健康土壤(healthy banana soil, HS), 连续种植香蕉后患枯萎病的发病土壤(diseased banana soil, DS), 长期种植水稻的稻田土壤(paddy soil, PS), 供试土壤类型均为玄武岩发育形成的砖红壤。该地区年平均气温为 23.7 °C, 年均降水量为 1 756 mm, 雨热同季, 属于热带季风气候。针对每一种土地利用类型, 随机选取 3 个采样点, 采集 0–20 cm 新鲜表层土壤, 除去杂物、细根, 然后将 3 个样点的土壤混合均匀, 研磨过 2 mm 筛, 4 °C 保存待用。

1.2 土壤理化性质分析

土壤 pH 值采用 pH 计进行测定(土:水=1:5, 质量体积比); 土壤有机质(soil organic matter, SOM)的测定采用重铬酸钾容量法-稀释热法; 土壤全氮(total nitrogen, TN)采用 CNS 元素分析仪测定; 土壤铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)采用连续流动分析仪 Skalar 测定。土壤微生物呼吸采用室内培养法^[14–15], 用气相色谱测定单位时间内微生物分解释放 CO₂ 的量, 具体方法如下: 称取 10 g 土壤(以干重计)于 120 mL 的血清瓶内, 将土壤水分调节至 60% WHC, 28 °C 预培养 48 h, 然后用丁基橡胶塞加铝盖密封培养, 采集 0–24 h 血清瓶内的混合气体, 通过气相色谱仪(岛津 GC-2014)进行分析。土壤微生物呼吸速率按照公式(1)计算。

$$F = \rho \times \frac{V}{W} \times \frac{\Delta C}{\Delta t} \times \left(\frac{273.15}{273.15 + T} \right) \quad (1)$$

式中, F 为 CO₂ 排放速率(mg/kg·h); ρ 为标准状态下的气体密度(kg/m³); V 为培养瓶内气体体积(m³); W 为干土质量(kg); $\Delta C/\Delta t$ 表示在观测时间内气体浓度随时间变化的直线斜率(mg/h); T 为血清瓶内温度(°C)。

1.3 土壤可培养细菌的稀释平板涂布计数

采用稀释平板涂布^[16]计数土壤可培养细菌的菌落数量。使用牛肉膏蛋白胨培养基分离培养土壤细菌, 具体操作步骤如下: 首先称取 5 g 土壤样品, 添加到装有 45 mL 无菌水的三角瓶中, 以 180 r/min 转速振荡 30 min 后制成土壤悬液作为接种液, 母液浓度为 0.1 g/mL; 用微量移液枪准确吸取土壤悬液 100 μL 添加到装有 900 μL 无菌水的 1.5 mL 灭菌离心管中, 并用涡旋仪混匀, 此为 10⁻¹ 梯度。按照上述操作步骤, 依次将土壤悬液逐步稀释至 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 梯度。5 个梯度的浓度依次为: 100、10、1、0.1、0.01 mg/mL。吸取每个梯度的土壤悬液 0.1 mL 均匀涂布于固体培养基表面, 即接种的土壤质量依次为: 10、1、0.1、0.01、0.001 mg。将平板倒置于 28 °C 培养箱培养 2 d 后计数平板上形成的菌落数, 土壤可培养细菌数量以菌落数转换成 CFU (colony forming unit)/g *d.w.s* (dry weight soil) 表示。

1.4 土壤微生物 DNA 和可培养细菌 DNA 的提取

1.4.1 土壤微生物 DNA 的提取

采用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals)提取土壤微生物基因组总 DNA, 得到的 DNA 溶于 100 μL DES 缓冲液, 详细操作步骤参考试剂盒说明书。通过微量紫外分光光度计(NanoDrop ND-1000)测定 DNA 浓度和纯度(OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230}), 以 1.2%

的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, DNA 保存于 -20°C 待下游分析。

1.4.2 可培养细菌 DNA 的提取

用 10 mL 无菌水多次冲洗培养基表面的菌体至 50 mL 无菌离心管并保存于 -20°C , 采用 E.Z.N.A.[®] Bacterial DNA Kit (Omega)试剂盒提取其 DNA, 得到的 DNA 溶于 100 μL 洗脱缓冲液中。通过微量紫外分光光度计(NanoDrop ND-1000)测定 DNA 浓度和纯度, 通过凝胶电泳检测 DNA 质量后保存于 -20°C 待下游分析。

1.5 土壤细菌的定量分析

利用实时荧光定量 PCR 分析土壤总 DNA 中的 16S rRNA 基因, 计算原位土壤细菌的基因拷贝数量。具体方法如下:

土壤总 DNA 和可培养细菌 DNA 采用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪进行 16S rRNA 基因定量。具体步骤如下: 采用 515F/907R 通用引物对^[17-18], 515F 序列为: 5'-GTGCCAGC MGCCGCGG-3'; 907R 序列为: 5'-CCGTCATTCM TTTRAGTTT-3'。PCR 反应体系为: 10 μL SYBR Premix Ex *Taq* (TaKaRa), 正反向引物 (20 pmol/ μL)各 0.25 μL , DNA 模板 1 μL , 8.5 μL DNase/RNase-free H_2O 。PCR 扩增程序为: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 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 8 个浓度梯度, 以 C_t 值为横坐标, 以初始模板 DNA 的基因拷贝对数为纵坐标, 获得标准曲线: $\lg C = -0.309C_t + 10.655$ ($R^2 = 0.998$)。

1.6 高通量测序土壤总细菌和可培养细菌的 16S rRNA 基因

针对土壤总 DNA, 首先利用 515F/907R 通用引物对开展 PCR 扩增。PCR 扩增程序为: 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 反应体系为:

25 μL Premix *Taq* (TaKaRa), 正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , DNA 模板 2 μL , 21 μL DNase/RNase-free H_2O 。扩增后得到的产物利用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 试剂盒 (TaKaRa)进行纯化, 并将其溶于 30 μL DNase-free H_2O 。然后通过 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物纯化效果, 利用微量紫外分光光度计 (NanoDrop ND-1000)测定 PCR 纯化产物浓度。

针对可培养细菌 DNA, 同样利用 515F/907R 通用引物开展 PCR 扩增。PCR 扩增、纯化程序与土壤 DNA 相同。最后将可培养细菌 DNA 和土壤 DNA 的 PCR 纯化产物按等摩尔数混合, 利用北京诺禾致源科技股份有限公司的 Illumina NovaSeq 平台进行测序分析。

本研究中 12 个土壤 DNA 样品(4 种土壤, 每种土壤含 3 个生物学重复), 60 个土壤可培养细菌 DNA 样品(将 4 种土壤分别稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 共 5 个梯度, 每个处理含 3 个生物学重复), 共 72 个样品进行高通量测序。利用 QIIME (quantitative insights into microbial ecology, version 1.9.1)对原始序列进行低质量序列过滤和嵌合体去除。其中, 土壤 DNA 样品得到高质量序列共 884 400 条, 单个样本平均 73 700 条; 可培养细菌 DNA 样品得到高质量序列共 4 870 704 条, 单个样本平均 81 178 条。在 97%置信度下将 16S rRNA 基因序列聚类并同 Greengenes 数据库进行比对分类, 获得门、纲、目、科和属各水平下的物种分类单元。

1.7 可培养细菌比例及富集率的计算

可培养细菌的比例计算方法如下: 土壤细菌的物种分类通过 16S rRNA 基因完成, 可培养细菌占土壤所有细菌的比例计算公式为: 可培养细菌比例=可培养细菌富集物的物种数量/土壤中所有细菌的物种数量^[8]。其中, 土壤中所

有细菌的物种数量包含两部分: (1) 土壤 DNA 中的细菌物种数量。直接提取土壤总 DNA, 高通量测序 16S rRNA 基因, 并在微生物门、属水平获得土壤中所有细菌的物种分类信息; (2) 可培养细菌的富集物。固体培养基上 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 5 个梯度中所有菌落富集物的物种分类信息。

可培养细菌的富集率计算方法如下: 基于 16S rRNA 基因分类, 首先获得土壤 DNA 中所有细菌属的相对丰度; 其次获得固体培养基富集物菌落 DNA 中所有细菌属的相对丰度; 后者除以前者, 即可计算特定细菌在固体培养基中的富集率。富集率 > 1 表示该菌属在培养中得到了富集。

1.8 数据分析

利用 Excel 2019 处理基础数据; SPSS 26.0 对处理之间的平均值差异采用 one-way ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示显著差异。门、属水平下物种组成中优势细菌类群的判断依据为相对丰度 > 1%^[19]。采用主成分分析^[20] (principal component analysis, PCA) 揭示不同处理间细菌群落的差异, 并用相似性分析^[21] (analysis of similarities, ANOSIM) 判断差异是否达到显著水平 ($P < 0.05$)。PCA 分析使用 canoco 5.0 完成, ANOSIM 分析和 Venn 图使用 R 软件 (version 3.4.4) 的 vegan 包完成。利用 LEfSe^[22] (linear discriminant analysis effect size) 分析从高维数据中寻找组间差异的细菌类群。制图采用 Origin

2021。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 PRJNA800347。

2 结果与分析

2.1 土地利用方式对土壤性质和微生物呼吸的影响

土地利用方式变化影响土壤理化性质。如表 1 所示, 与次生林土壤 pH 5.92 相比, 农业垦殖后均导致土壤 pH 值显著下降, 特别在发病蕉园土壤降至最低 pH 4.91。与次生林土壤相比, 水稻土和发病蕉园土的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量显著增加至约 18.9 mg/kg, 而健康蕉园土的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量最低, 仅为 11.3 mg/kg; 相反, 发病蕉园土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量最高, 而水稻土最低仅为 6.0 mg/kg。次生林转变为蕉园和稻田后土壤有机质和全氮含量均呈现下降趋势, 值得注意的是农业垦殖后土壤 C/N 比明显增加。次生林转变为蕉园土壤后土壤微生物呼吸活性明显增加, 而香蕉园连续种植导致土壤患枯萎病后微生物呼吸活性明显降低, CO_2 排放速率仅为健康蕉园土壤的 35% 左右。次生林转变为稻田后土壤微生物呼吸活性略有降低。

2.2 不同土地利用方式对土壤细菌数量和多样性的影响

土地利用方式变化显著影响土壤细菌数量, 但基于免培养和可培养技术得出的规律并不一致。如图 1 所示, 实时荧光定量 PCR 分析

表 1 土壤基本理化性质和微生物呼吸速率(平均值±标准差)

Table 1 Basic physical and chemical properties of soil and microbial respiration rate (mean±SD)

Soil type	pH	Organic matter/(g/kg)	Total nitrogen/(g/kg)	Soil C/N	$\text{NH}_4^+\text{-N}/$ (mg/kg)	$\text{NO}_3^-\text{-N}/$ (mg/kg)	Soil respiration rate/(mg/kg·h)
Forest soil	5.92±0.35	34.8±0.31	1.78±0.04	11.3±0.12	15.9±1.65	8.76±2.25	0.27±0.03
Healthy banana soil	5.14±0.31	32.6±4.31	1.54±0.22	12.3±0.34	11.3±0.97	13.50±4.24	0.40±0.03
Diseased banana soil	4.91±0.10	32.6±0.64	1.49±0.01	12.7±0.16	19.2±0.74	26.10±4.08	0.14±0.01
Paddy soil	5.32±0.16	33.0±6.63	1.57±0.32	12.2±0.20	18.7±0.80	5.98±1.86	0.25±0.03

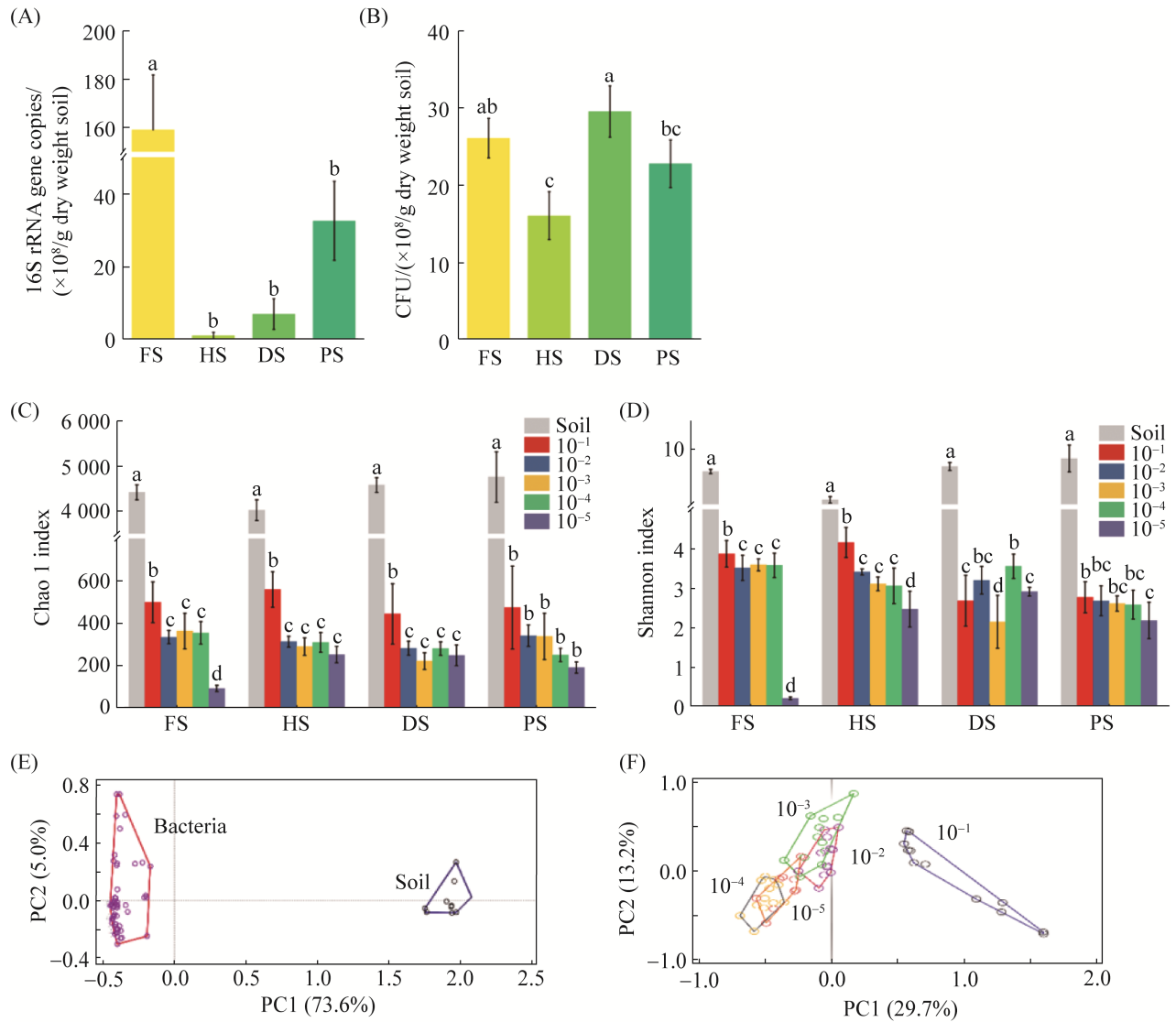


图 1 原位土壤总细菌与不同稀释梯度下固体平板可培养细菌的数量及多样性

Figure 1 Quantity and diversity of background soil bacteria and culturable bacteria with different dilution gradients. A: 16S rRNA gene copies in different types of soil; B: numbers of culturable bacteria in different types of soil; C: Chao 1 index of culturable bacteria and total bacteria; D: Shannon index of culturable bacteria and total bacteria; E: principal component analysis of background soil bacteria and culturable bacteria; F: principal component analysis of different dilution gradient culturable bacteria. Error bars represent standard deviations ($n=3$). The different letters above bars indicate significant differences at $P<0.05$ level according to least significant difference (LSD). FS: forest soil; HS: healthy banana soil; DS: diseased banana soil; PS: paddy soil.

表明, 次生林细菌 16S rRNA 基因拷贝数最高, 健康蕉园土最低: 次生林土(1.59×10^{10} copies/g *d.w.s*)>水稻土(3.26×10^9 copies/g *d.w.s*)>发病蕉园土(7.02×10^8 copies/g *d.w.s*)>健康蕉园土

(1.10×10^8 copies/g *d.w.s*); 传统稀释平板计数结果则略有不同: 发病蕉园土(2.95×10^7 CFU/g *d.w.s*)>次生林土(2.61×10^7 CFU/g *d.w.s*)>水稻土(2.28×10^7 CFU/g *d.w.s*)>健康蕉园土(1.61×10^7 CFU/g

d.w.s)。同时, 原位土壤总细菌 alpha 多样性显著高于可培养细菌。针对 4 种土壤及其可培养细菌总 DNA 中的 16S rRNA 基因高通量测序结果表明, 4 种土壤的细菌多样性 Chao 1 指数范围为 4 000–4 800, 而可培养细菌仅为 90–560 (图 1C); 土壤细菌 Shannon 指数的范围为 8.16–9.66, 而可培养细菌则为 0.22–4.16 (图 1D)。此外, 土壤悬液 10^{-2} – 10^{-5} 稀释梯度下可培养细菌的 Chao 1 指数仅占 10^{-1} 梯度的 40%–65%, 而 10^{-2} – 10^{-5} 梯度间并无明显差异。

进一步基于微生物属水平的主成分分析发现, 原位土壤总细菌与可培养细菌群落结构发生了非常明显的分异, 第 1 主成分上的贡献率达 73.6% (图 1E)。仅对可培养细菌开展主成分分析发现, 土壤悬液不同稀释梯度下的群落分别聚集成簇, 特别是 10^{-1} 梯度和其他稀释梯度在第 1 主成分上的贡献率为 29.7% (图 1F)。基于 ANOSIM 分析结果表明, 原位土壤细菌和可培养细菌之间存在显著差异 ($R=0.968$, $P=0.001$), 组间差异远大于组内差异 (表 2); 通过接种 10^{-1} 至 10^{-5} 稀释梯度的土壤悬液富集得到的可培养细菌之间也存在着不同程度的差异, 稀释

梯度之间相差越大差异越显著。例如, 不同稀释梯度富集的可培养细菌之间存在显著差异的为: 10^{-1} 梯度与 10^{-4} 梯度 ($R=0.269$, $P=0.003$), 10^{-1} 梯度与 10^{-5} 梯度 ($R=0.472$, $P=0.001$), 10^{-2} 梯度与 10^{-4} 梯度 ($R=0.134$, $P=0.028$), 10^{-2} 梯度与 10^{-5} 梯度 ($R=0.357$, $P=0.004$), 10^{-3} 梯度与 10^{-4} 梯度 ($R=0.187$, $P=0.005$), 10^{-3} 梯度与 10^{-5} 梯度 ($R=0.410$, $P=0.001$)。

2.3 不同土壤悬液稀释梯度下可培养细菌比例变化

16S rRNA 基因系统发育分类表明 (图 2A), 在微生物门水平, 不同土壤悬液稀释梯度下, 4 种土壤中可培养细菌占土壤总细菌比例范围为 16.10%–47.74%。土壤 10^{-1} 稀释梯度下可培养比例最高, 例如, 次生林、健康蕉园和发病蕉园土壤分别为 47.74%、31.18% 和 35.58%, 显著高于其他稀释梯度 (10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5}); 而水稻土中可培养细菌占比仅为 19.04%, 与其他稀释梯度无明显差异。其他 4 个稀释梯度下可培养菌占比分别为 16.1%–21.9% (10^{-2} 梯度)、16.2%–19.0% (10^{-3} 梯度)、19.0%–28.7% (10^{-4} 梯度) 和 17.2%–36.0% (10^{-5} 梯度)。进一步发现属水平的可培养细菌比例显著低于微生物门水平。例如, 不同土壤悬液稀释梯度下, 4 种土壤中可培养细菌属占比范围为 7.4%–30.9%。土壤 10^{-1} 稀释梯度下可培养比例最高, 例如次生林、健康蕉园和发病蕉园土壤中 10^{-1} 梯度可培养细菌占土壤总细菌的比例仍显著高于其他 4 种稀释梯度, 分别为 29.20%、26.24% 和 30.90%, 水稻土中可培养细菌占比仅为 10.22%, 相比于其他稀释梯度并无显著差别。其他 4 个稀释梯度下可培养菌占比并未表现出明显的变化, 分别为 10.4%–10.9% (10^{-2} 梯度)、7.9%–10.5% (10^{-3} 梯度)、8.2%–14.3% (10^{-4} 梯度) 和 7.4%–13.6% (10^{-5} 梯度)。

表 2 不同处理间土壤细菌 ANOSIM 分析

Table 2 Analysis of similarities between different treatments in soil bacteria

Group	R (coefficient)	P (significance)
soil vs bacteria	0.968	0.001
10^{-1} vs. 10^{-2}	0.066	0.107
10^{-1} vs. 10^{-3}	0.066	0.108
10^{-1} vs. 10^{-4}	0.269	0.003
10^{-1} vs. 10^{-5}	0.472	0.001
10^{-2} vs. 10^{-3}	0.028	0.211
10^{-2} vs. 10^{-4}	0.134	0.028
10^{-2} vs. 10^{-5}	0.357	0.004
10^{-3} vs. 10^{-4}	0.187	0.005
10^{-3} vs. 10^{-5}	0.410	0.001
10^{-4} vs. 10^{-5}	0.030	0.265

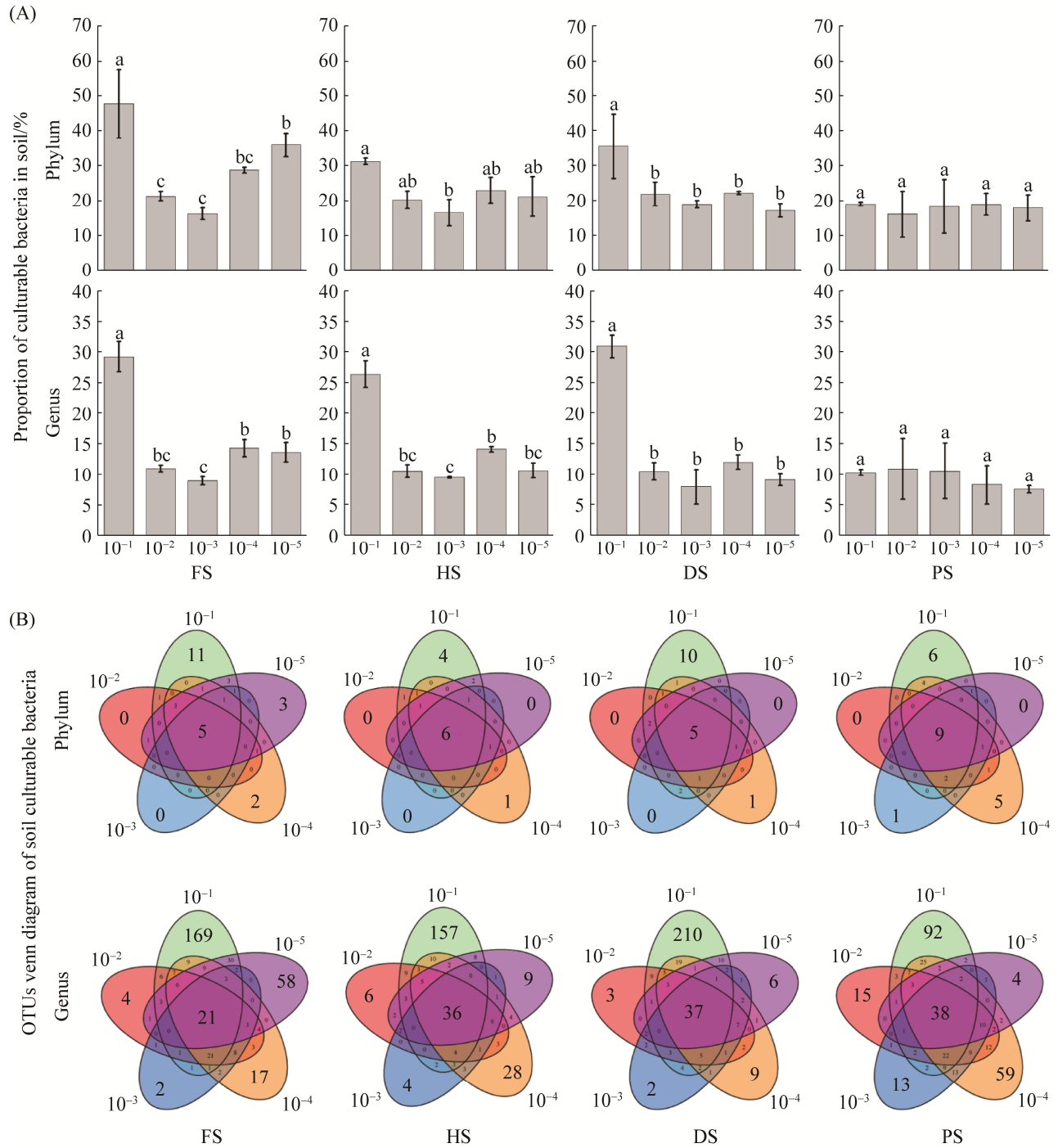


图 2 微生物门和属水平下，不同土壤悬液稀释梯度可培养细菌比例变化规律

Figure 2 The change rule of the proportion of culturable bacteria in different dilution gradients at the phylum and genus level. A: the proportion of culturable bacteria in soil at the phylum and genus level. B: common and unique bacteria at different dilution gradients based on 16S rRNA gene analysis. Error bars represent standard deviations ($n=3$). The different letters above bars indicate significant differences at $P<0.05$ level according to least significant difference. FS: forest soil; HS: healthy banana soil; DS: diseased banana soil; PS: paddy soil.

值得注意的是, 接种 10^{-1} 梯度悬液得到的可培养细菌类群数量明显多于 10^{-2} – 10^{-5} 稀释梯度, 而 10^{-2} 至 10^{-5} 梯度并未表现出明显差异(图 2B)。例如, 4 种土壤 5 个稀释梯度下共计检测到 18–33 个微生物门, 所有稀释梯度共有门仅为 5–9 个。而 4 种土壤的 5 个稀释梯度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 则分别检测到 4–11 个门、0 个门、0–1 个门、1–5 个门、0–3 个门。在微生物属水平也得到了类似规律。4 种土壤中 5 个稀释梯度下共计检测到 315–401 个微生物属, 所有稀释梯度共有属仅为 21–38 个。而 4 种土壤的 5 个稀释梯度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 则分别检测到 92–210 个属、3–15 个属、2–13 个属、9–59 个属、4–58 个属。

2.4 不同土地利用方式下原位土壤与可培养细菌群落的物种组成及其富集规律

针对 4 种原位土壤, 如图 3A 所示, 16S rRNA 基因系统发育分类发现了 6 个相同的优势菌门(相对丰度>1.0%), 包括 *Actinobacteria* (36.5%)、*Proteobacteria* (18.6%)、*Firmicutes* (14.3%)、*Acidobacteria* (8.4%)、*Chloroflexi* (12.2%)和 *Planctomycetes* (2.9%)。然而, 针对稀释平板计数过程中的可培养细菌, 4 种土壤的可培养细菌仅有 3 个相同的优势门, 分别为 *Proteobacteria* (46.1%)、*Firmicutes* (27.0%)和 *Actinobacteria* (18.4%)。其中, *Proteobacteria* 和 *Firmicutes* 在培养基中的相对丰度明显高于原位土壤。此外, *Actinobacteria* 相对丰度随着平板稀释梯度的增加呈现上升趋势。进一步针对 4 种原位土壤的微生物属分析, 发现 4 种土壤中共有 7 个相同的优势属, 依次为: *Bacillus* (8.1%)、*Gaiellaceae* (6.8%)、*Streptomyces* (10.0%)、*Rhodoplanes* (4.5%)、*Alicyclobacillus* (2.2%)、*Rhodospirillaceae* (2.9%)和 *Micromonosporaceae* (2.2%)。针对稀释平板计数过程中的可培养细菌,

发现 4 种土壤可培养细菌中含有 5 个相同的优势类群, 依次为: *Pseudomonas* (44.7%)、*Bacillus* (21.9%)、*Micrococcaceae* (10.7%)、*Flavobacterium* (7.4%)和 *Micrococcus* (4.9%)。值得注意的是, 次生林土壤可培养细菌中的 *Micrococcaceae* 明显高于其他 3 种土壤, 而发病蕉园土可培养细菌中的 *Flavobacterium* 显著高于其他 3 种土壤。

如图 3B 所示, 与原位土壤相比, 4 种土壤可培养计数过程中, 在固体培养基中均显著富集了 *Pseudomonas* 和 *Flavobacterium*。其中, 在原生土壤中 *Pseudomonas* 的丰度仅为 0.009% (次生林土)、0.049% (健康蕉园土)、0.019% (发病蕉园土)和 0.019% (水稻土), 但经过固体培养基富集后平均丰度分别增加至: 25.2% (次生林土)、46.5% (健康蕉园土)、51.0% (发病蕉园土)和 53.1% (水稻土), 富集倍数分别高达 2 233、3 918、6 487 和 5 805 倍。当平板稀释梯度达到 10^{-4} 、 10^{-5} 梯度时, *Pseudomonas* 富集率呈下降趋势, 次生林、健康蕉园和发病蕉园土中富集倍数在 10^{-4} 梯度时下降为 440、1 689 和 3 094 倍, 健康蕉园和发病蕉园土中富集倍数在 10^{-5} 梯度时下降为 185 和 924 倍。此外, *Flavobacterium* 在次生林土、健康蕉园土、发病蕉园土和水稻土 4 种原位土壤中的丰度仅为: 0.010%、0.136%、0.013%和 0.005%, 在可培养菌群中的平均丰度为: 2.3%、1.7%、26.6%和 1.8%, 富集倍数为: 43、168、4 506 和 370 倍; 在发病蕉园土 *Flavobacterium* 的富集率远高于其他 3 种土壤。

2.5 不同土地利用方式下土壤细菌群落的免培养和可培养技术比较研究

如图 4A 所示, 平板计数法研究不同土地利用方式间土壤细菌群落差异时, 遗漏了大部分显著差异物种, 而高通量测序则较为全面地

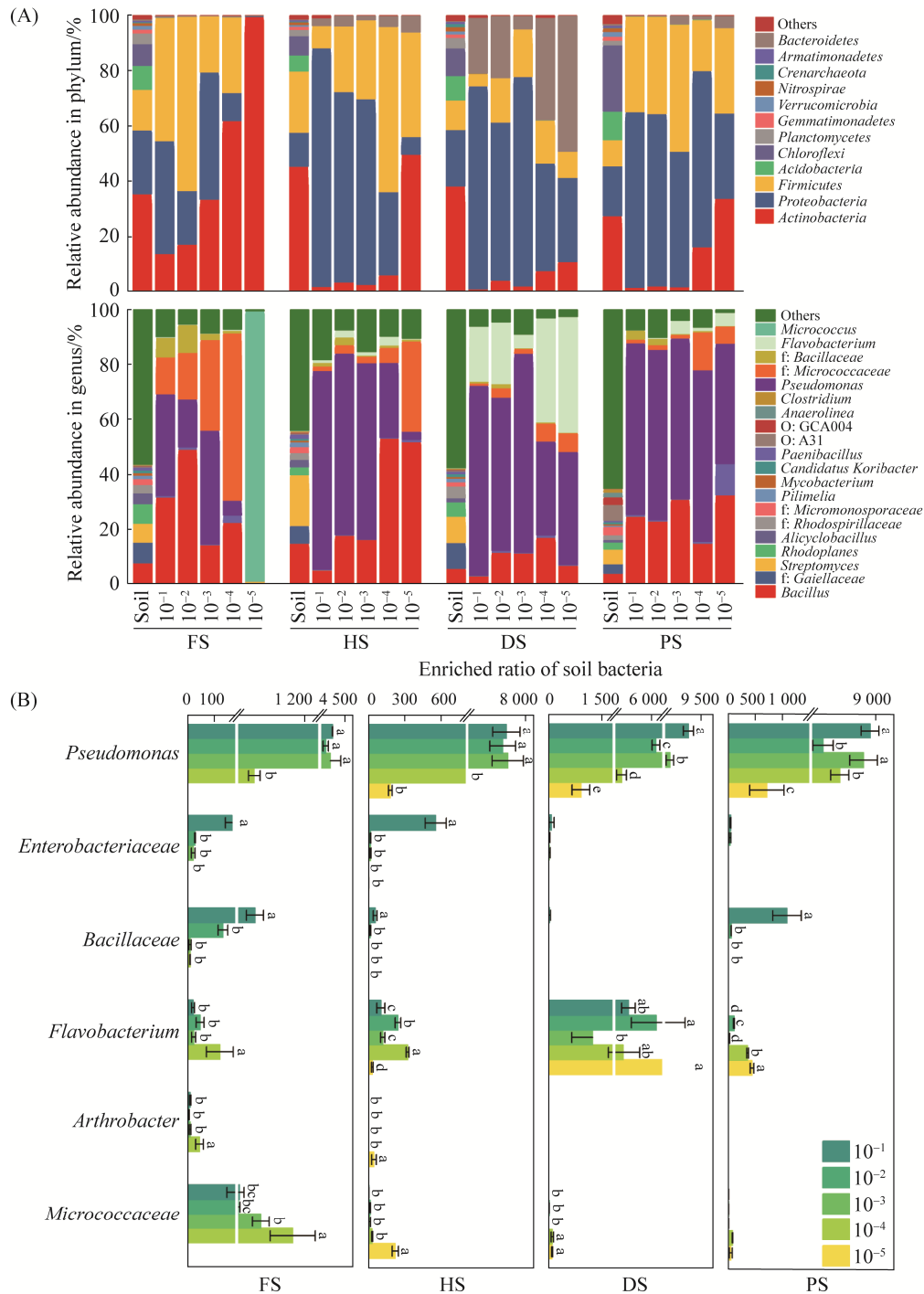


图 3 原位土壤与固体平板可培养细菌群落的物种组成及可培养细菌富集规律

Figure 3 Community species composition of background soil bacteria and culturable bacteria, and enrichment patterns of culturable bacteria in solid media. A: species composition of bacterial communities in soils at phylum and genus levels. B: the enrichment fold of soil bacteria in solid medium at genus level. Error bars represent standard deviations ($n=3$). The different letters above bars indicate significant differences at $P<0.05$ level according to least significant difference. FS: forest soil; HS: healthy banana soil; DS: diseased banana soil; PS: paddy soil.

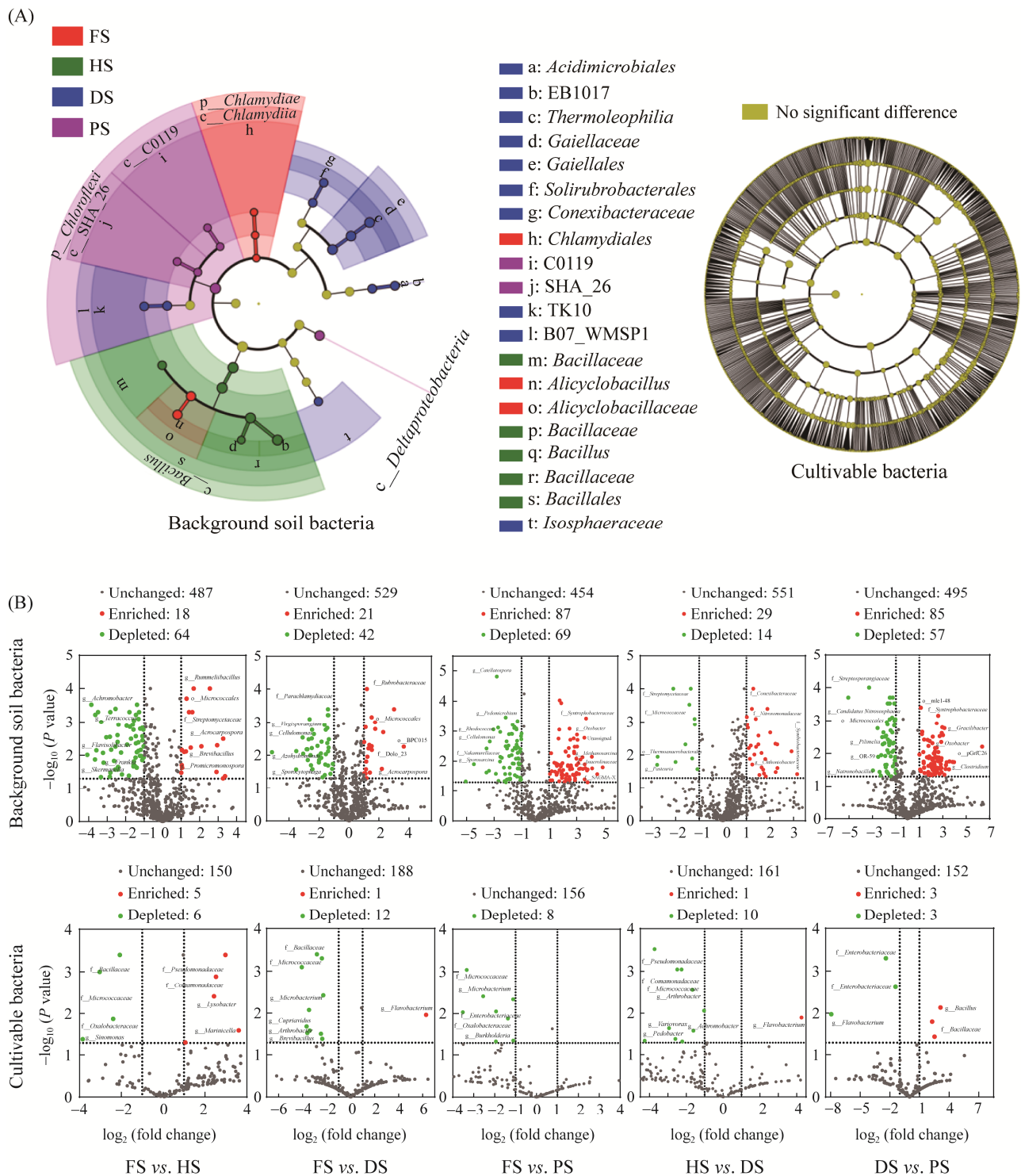


图 4 不同土地利用方式间土壤细菌群落的差异比较

Figure 4 Differential analysis of soil bacterial communities under different land use patterns. A: analysis result of linear discriminant analysis effect size of background soil bacteria and cultivable bacteria. B: differential species analysis of different land utilization type at genus level. FS: forest soil; HS: healthy banana soil; DS: diseased banana soil; PS: paddy soil.

展示了不同土壤间细菌群落的差异。利用 LEfSe 差异分析筛选 4 种土壤中具有显著差异的细菌类群(线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)阈值为 2), 图 4A 表明 4 种土壤总细菌中具有显著差异的物种, 图中不同颜色代表不同样本之间的显著差异物种, 每个圆点代表 1 个细菌类群。与其他 3 种原位土壤总细菌相比, 次生林土壤中的显著差异物种具体表现在 *Chlamydiae* 门, 健康蕉园土具体表现在 *Bacilli* 纲, 而发病蕉园土壤中为 *Gaiellaceae* 科, 水稻土中的差异物种具体表现为 *Chloroflexi* 门。其中以 *Bacilli* 纲的差异最为显著。然而, 针对 4 种土壤可培养菌的分析则发现, 没有任何细菌类群在 4 种土壤中表现出显著差异。

进一步在属水平下两两比较不同土地利用方式间土壤细菌群落的差异, 发现原位土壤总细菌群落间的差异明显大于可培养细菌(图 4B)。例如, 相比于次生林土壤, 健康蕉园中原位土壤细菌显著增加 18 个属, 显著减少 64 个属, 而可培养细菌显著增加的仅有 5 个属, 显著减少的有 6 个; 发病蕉园土中原位土壤细菌显著增加 21 个属, 显著减少 42 个属, 但可培养细菌仅显著增加 1 个属, 显著减少 12 个属; 水稻土中原位土壤细菌显著增加 87 个属, 显著减少 69 个属, 而可培养细菌仅显著减少 8 个属, 无显著增加的细菌。此外, 不同农业利用方式下也得到类似规律, 相比于健康蕉园土, 发病蕉园土中原位土壤细菌显著增加 29 个属, 显著减少 14 个属, 而可培养细菌仅显著增加 1 个属, 显著减少 10 个属。与发病蕉园土壤相比, 水稻土中原位土壤细菌显著增加 85 个属, 显著减少 57 个属, 而可培养细菌仅显著增加 3 个属, 显著减少 3 个属。对比两种方法研究不同土地利用方式间的显著增加和减少的差异物种, 发现稀释平板法检测到的显著增加和减少的差异

物种数量仅为高通量测序原位土壤结果的 9.7%和 22.9%。

值得注意的是, 两两比较不同土地利用方式间细菌群落发现 8 个可培养属显著增加, 而 18 个可培养属显著降低。可培养法与高通量测序技术均发现了一些显著降低的共同物种, 却未发现显著增加的共同物种。例如, 两种方法均表明, 与次生林土壤相比, 发病蕉园和水稻土中 *Microbacterium* 均发生了显著降低。同时, 与健康蕉园相比, 两种方法均发现发病蕉园土壤中 *Microbacterium* 发生了显著降低。然而, 可培养法和免培养法也得到了相反结果。例如, 与次生林土壤相比, 健康蕉园土中可培养菌 *Comamonadaceae* 显著增加, 但免培养法却得到相反结果。此外, 与次生林土壤相比, 健康蕉园土壤和水稻土中可培养菌 *Microbacterium* 显著降低, 水稻土中 *Burkholderiales* 显著降低; 与发病蕉园土壤相比, 水稻土中可培养 *Flavobacterium* 显著降低, 但免培养技术均发现这些微生物类群显著增加, 与可培养结果的规律并不一致。

3 讨论

尽管目前尚未有公认的理论可清楚解释微生物群落构建的环境驱动机制, 但也有不少研究推测微生物对土壤环境的变化极为敏感^[23-24]。例如, 人类活动主导的土地利用方式(包括林地、农田和湿地等)变化, 极可能显著改变土壤理化性质以及养分元素的生物地球化学循环, 从而影响土壤微生物群落构建, 反过来影响土壤生态功能^[25-27]。事实上, 大量研究表明土壤 pH、有机碳、全氮、矿质氮等土壤性质的改变显著影响土壤微生物多样性和群落组成^[28-30]。然而, 稀释平板计数法中不同稀释梯度的选择依据, 不同土壤悬液稀释梯度下可培养细菌群落的差

异,特别是稀释平板计数法能够在多大程度上反映不同土地利用方式下微生物群落的适应规律,与免培养分子生态技术的差异性比较具有重要意义。

我们的研究表明,基于实时荧光定量PCR与稀释平板计数得出的土地利用方式演替下细菌数量变化规律尽管并不完全一致,但也较好反映了次生林和蕉园土壤之间的差异。此外,可培养细菌群落多样性(Chao 1 指数和Shannon 指数)远低于原位土壤细菌,原位土壤细菌与可培养细菌的群落结构具有明显的差异。造成这种差异的主要原因是培养基的成分无法完全代表真实的微生物生长环境,简单的人工模拟环境无法满足所有土壤微生物的生长需求。本研究中采用的牛肉膏蛋白胨培养基营养比较丰富,与土壤真实的营养环境差异相当大,导致很多寡营养型的微生物无法生长^[31-32],而土壤环境中的绝大部分微生物可能处于“寡营养”状态。例如,高通量测序土壤细菌发现氨氧化细菌的丰度仅不足 0.01%^[33],一般认为氨氧化微生物严格化能无机自养,需要特殊培养基才能定向富集。事实上,高通量测序可培养细菌 DNA 未发现任何氨氧化菌相关 16S rRNA 基因序列。同时,富营养条件下微生物快速生长,并可能产生大量自身难以调节的过氧化物、超氧化物和羟基自由基等“活性氧物质”,破坏细胞内膜结构,甚至出现底物加速死亡现象,降低土壤微生物的可培养性^[34-35]。

传统的稀释平板计数通常采用 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释梯度进行计数,但不同稀释梯度下固体培养基富集所得可培养细菌是否一致,尚未有相关报道。据此,我们采用 5 个稀释梯度,相当于土壤接种量相差 10 000 倍(10、1、0.1、0.01、0.001 mg)。结果表明, 10^{-2} – 10^{-5} 稀释梯度间可培养细菌并无明显的差别,而 10^{-1} 梯度

富集得到的可培养细菌与其他稀释梯度(10^{-2} – 10^{-5})具有明显的差异。这极可能是土壤悬液从 10^{-1} 梯度稀释至 10^{-2} 梯度时便导致相当一部分微生物被遗漏,而保留下来的微生物具有较强的生存优势,能够在连续稀释(10^{-2} – 10^{-5})的情况下继续生长。尽管在进一步的稀释过程中有少量的细菌类群遗漏或增加,但可培养细菌群落的整体结构和多样性没有发生明显的变化。这也从侧面表明土壤中蕴藏着海量的微生物多样性^[36],即便接种量仅为 0.001 mg 土壤,其在固体培养基富集所得细菌类群与 1 mg 土壤基本一致。

尽管“99%难培养”已成为近年来微生物学领域的主流观点^[37-39],但这一概念却未有可信的实验证据,而我们的整合分析^[8]则表明这一概念起源于“平板计数异常”。例如,1934 年 Gray^[40]通过对草地土壤和农田土壤进行显微计数和平板计数,得出平板上形成的菌落数量仅为显微计数结果的 0.09%–0.74%。微生物 16S rRNA 基因作为分类依据的理论突破和高通量测序计数的快速发展,则为解决这一难题提供了重要契机。因此,结合富集培养和高通量测序技术能够为定量评估可培养微生物的比例提供重要依据。我们的研究表明在属水平下,土壤中可培养细菌的物种比例为 7.4%–30.9%,可培养细菌群落多样性(Chao 1 指数)仅为原位土壤的 2%–14%。

值得注意的是,传统可培养方法极大低估了环境对土壤细菌群落的塑造影响,未能全面反映不同土地利用方式对细菌群落结构的影响规律。例如,两两比较不同土地利用方式下土壤细菌群落,发现稀释平板法检测到的显著增加和减少的物种数量仅为高通量测序原位土壤结果的 9.7%和 22.9% (图 4B)。特别是针对 4 种土壤整体开展 LEfSe 分析,发现 4 种原位土壤

中存在 33 个属的显著差异物种(图 4A), 而固体培养基上未检测到存在显著差异物种(图 4D)。无论次生林土壤、健康蕉园土、发病蕉园土和水稻土, 可培养优势细菌类群均为 *Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Actinobacteria*, 这些菌群在原地土壤细菌中也属于优势微生物门, 与以往的一些研究报告基本一致^[41-43]。进一步在属水平的系统发育分类表明, 土壤中的可培养优势菌属主要为 *Pseudomonas* 和 *Bacillus*, 且 *Pseudomonas* 在土壤中的富集率远高于其他微生物, 这些微生物生理功能多样, 能够较好适应各种环境, 可能是其广泛存在于各种环境的主要原因^[44-46]。然而, 16S rRNA 基因的系统分类也存在一定的偏差, 如 *Vibrio*、*Pseudomonas* 等^[47], 这也可能是 *Pseudomonas* 的丰度远高于其他微生物类群的原因之一。尽管通过可培养方法研究土地利用方式变化对细菌群落组成时遗漏了大多数显著差异物种, 但可培养方法与免培养方法发现了一些共同的差异物种, 包括 *Bacillaceae*、*Micrococcaceae*、*Microbacterium*、*Comamonadaceae* 和 *Burkholderiales*。这些显著差异物种在次生林土、蕉园土和水稻土的土地利用方式变化中极可能发挥了重要作用。虽然高通量测序较为全面地反映了土壤细菌群落结构和多样性, 但其无法反映微生物生理功能, 未来应针对生理类群多样的微生物开展更多研究, 结合富集分离、分类鉴定、生理表型和系统发育等相关研究, 深入发掘复杂环境中的微生物资源。

4 结论

(1) 结合稀释平板法和 16S rRNA 基因高通量测序技术发现, 4 种土壤中可培养细菌比例分别为: 16.1%–47.7% (门水平)、7.4%–30.9% (属水平)。可培养细菌群落多样性远低于原地土壤, 群落结构呈明显差异。

(2) 10^{-1} 稀释梯度下可培养细菌比例及多样性明显高于 10^{-2} – 10^{-5} 稀释梯度, 而 10^{-2} – 10^{-5} 稀释梯度间没有明显差别, 表明传统稀释平板计数过程中, 遗漏了相当数量的微生物类群。

(3) 4 种土壤中可培养细菌主要包括 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Micrococcaceae* 和 *Flavobacterium* 等。

(4) 次生林转变为蕉园和稻田后显著增加的细菌类群有 18–87 个属, 显著减少的有 42–69 个属, 稀释平板法获得的显著增加和减少的物种数量仅为高通量测序原地土壤结果的 9.7% 和 22.9%。可培养方法与免培养方法均发现 *Micrococcaceae* 和 *Microbacterium* 属在土地利用方式变化过程中显著降低, 而 *Bacillaceae*、*Comamonadaceae* 和 *Burkholderiales* 属的变化规律则相反。

(5) 未来应将分子生态学技术与富集分离培养技术更紧密地结合起来, 明确微生物生态适应规律并更好地实现微生物功能的定向调控。

参考文献

- [1] Lewis WH, Tahon G, Geesink P, Sousa DZ, Ettema TJG. Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(4): 225–240.
- [2] Dahms S, Weiss H. Estimation of precision values for microbiological reference methods-standardized spread-plate method. *Fleischwirtschaft*, 1997, 77(5): 482–484.
- [3] Winterberg H. On the methodology of bacterial counting. *Journal of Hygiene and Infectious Diseases (now: Medical Microbiology and Immunology)*, 1898, 29(1): 75–93. (in German)
- [4] Martiny AC. High proportions of bacteria are culturable across major biomes. *The ISME Journal*, 2019, 13(8): 2125–2128.
- [5] Steen AD, Crits-Christoph A, Carini P, De Angelis 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.

- [6] Hofer U. The culture debate. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 17(10): 589–589.
- [7] Martiny AC. The ‘1% culturability paradigm’ needs to be carefully defined. *The ISME Journal*, 2020, 14(1): 10–11.
- [8] 杨丽洁, 贾仲君. “99%难培养”微生物的概念与初步评价: 以固氮菌为例. *微生物学报*, 2021, 61(4): 903–922. Yang LJ, Jia ZJ. History and definition of the “99% unculturability paradigm”—case analysis with nitrogen-fixing bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 903–922. (in Chinese)
- [9] Flemming HC, Wuertz S. Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(4): 247–260.
- [10] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *PNAS*, 1977, 74(11): 5088–5090.
- [11] Rodrigues JL, Pellizari VH, Mueller R, Baek K, Jesus EdC, Paula FS, Mirza B, Hamaoui GS, Tsai SM, Feigl B. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *PNAS*, 2013, 110(3): 988–993.
- [12] Kostin JE, Cesarz S, Lochner A, Schädler M, Macdonald CA, Eisenhauer N. Land-use drives the temporal stability and magnitude of soil microbial functions and modulates climate effects. *Ecological Applications*, 2021, 31(5): e02325.
- [13] Osburn ED, Aylward FO, Barrett J. Historical land use has long-term effects on microbial community assembly processes in forest soils. *ISME Communications*, 2021, 1(1): 1–4.
- [14] Fang C, Moncrieff J. The dependence of soil CO₂ efflux on temperature. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(2): 155–165.
- [15] Leirós M, Trasar-Cepeda C, Seoane S, Gil-Sotres F. Dependence of mineralization of soil organic matter on temperature and moisture. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(3): 327–335.
- [16] 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.
- [17] Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, Gilbert JA, Jansson JK, Caporaso JG, Fuhrman JA. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4–5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *Msystems*, 2016, 1(1): e00009–00015.
- [18] Xia WW, Zhang CX, Zeng XW, Feng YZ, Weng JH, Lin XG, Zhu JG, Xiong ZQ, Xu J, Cai ZC, Jia ZJ. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The ISME Journal*, 2011, 5(7): 1226–1236.
- [19] Dai TJ, Zhang Y, Tang YS, Bai YH, Tao YL, Huang B, Wen DH. Identifying the key taxonomic categories that characterize microbial community diversity using full-scale classification: a case study of microbial communities in the sediments of Hangzhou Bay. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(10): fiw150.
- [20] Abdi H, Williams LJ. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2010, 2(4): 433–459.
- [21] Clarke KR. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology*, 2010, 18(1): 117–143.
- [22] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60.
- [23] Cai ZQ, Zhang YH, Yang C, Wang S. Land-use type strongly shapes community composition, but not always diversity of soil microbes in tropical China. *Catena*, 2018, 165: 369–380.
- [24] Guo X, Chen HYH, Meng M, Biswas SR, Ye L, Zhang J. Effects of land use change on the composition of soil microbial communities in a managed subtropical forest. *Forest Ecology and Management*, 2016, 373: 93–99.
- [25] Tecon R, Or D. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(5): 599–623.
- [26] Ren C, Zhang W, Zhong Z, Han X, Yang G, Feng Y, Ren G. Differential responses of soil microbial biomass, diversity, and compositions to altitudinal gradients depend on plant and soil characteristics. *Science of the Total Environment*, 2018, 610: 750–758.
- [27] Siles JA, Margesin R. Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: what are the driving factors? *Microbial Ecology*, 2016, 72(1): 207–220.
- [28] Xiaqi Z, Zhiying G, Chengrong C, Zhongjun J. Soil microbial community structure and diversity are largely influenced by soil pH and nutrient quality in 78-year-old tree plantations. *Biogeosciences*, 2017, 14(8): 2101–2111.

- [29] Dhal PK, Islam E, Kazy SK, Sar P. Culture-independent molecular analysis of bacterial diversity in uranium-ore/-mine waste-contaminated and non-contaminated sites from uranium mines. *3 Biotech*, 2011, 1(4): 261–272.
- [30] Wu MN, Qin HL, Chen Z, Wu JS, Wei WX. Effect of long-term fertilization on bacterial composition in rice paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(4): 397–405.
- [31] Kalmbach S, Manz W, Szewzyk U. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4164–4170.
- [32] Schut F, De Vries EJ, Gottschal JC, Robertson BR, Harder W, Prins RA, Button DK. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(7): 2150–2160.
- [33] Ward BB, Martino DP, Diaz MC, Joye SB. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 2873–2881.
- [34] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373–399.
- [35] Bruns A, Nubel U, Cypionka H, Overmann J. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 1980–1989.
- [36] Jansson JK, Prosser JJ. Microbiology: the life beneath our feet. *Nature*, 2013, 494(7435): 40–41.
- [37] Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. Genetic diversity in sargasso sea bacterioplankton. *Nature*, 1990, 345(6270): 60–63.
- [38] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276(5313): 734–740.
- [39] Schleifer KH. Microbial diversity: facts, problems and prospects. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(1): 3–9.
- [40] Gray H. The numbers of bacterial cells in field soils, as estimated by the ratio method. *Proceedings of the Royal Society of London*, 1934, 115(795): 522–543.
- [41] Chaudhry V, Rehman A, Mishra A, Chauhan PS, Nautiyal CS. Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microbial Ecology*, 2012, 64(2): 450–460.
- [42] Hui S, Terhonen E, Koskinen K, Paulin L, Asiegbu FO. Bacterial diversity and community structure along different peat soils in boreal forest. *Applied Soil Ecology*, 2014, 74(2): 37–45.
- [43] Yun JL, Ju YW, Deng YC, Zhang HX. Bacterial community structure in two permafrost wetlands on the Tibetan Plateau and Sanjiang Plain, China. *Microbial Ecology*, 2014, 68(2): 360–369.
- [44] Bonin P, Gilewicz M. A direct demonstration of “co-respiration” of oxygen and nitrogen oxides by *Pseudomonas nautica*: some spectral and kinetic properties of the respiratory components. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 80(2/3): 183–188.
- [45] Ridgway HF, Safarik J, Phipps D, Carl P, Clark D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(11): 3565–3575.
- [46] Suzuki T, Ichihara Y, Yamada M, Tonomura K. Some characteristics of *Pseudomonas* 0-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1973, 37(4): 747–756.
- [47] Pascual J, Macián MC, Arahal DR, Garay E, Pujalte MJ. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt 1): 154–165.