

文章编号: 1000-5862(2021)02-0162-10

江西龙宫洞不同季节土壤微生物群落结构比较

马羊帅¹ 陆紫云¹ 杨慧林^{1*} 张志斌¹ 颜日明¹ 江玉梅¹ 朱 笃^{1,2}

(1. 江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室 江西 南昌 330022;

2. 江西科技师范大学生命科学学院 江西省生物加工过程重点实验室 江西 南昌 330038)

摘要: 采用非培养法和传统培养法相结合,利用 Illumina 高通量测序技术对江西省九江市彭泽县龙宫洞微生物的 16S rDNA 和 ITS 相关区域进行测序及生物信息学分析,通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 对洞穴土壤中细菌和真菌含量进行绝对定量,探究不同季节对洞穴土壤微生物群落结构的影响,同时观察相应可培养微生物分布情况. 结果表明: 随着季节的变化,洞穴土壤的理化性质发生改变,继而引起土壤菌群结构的改变,其中土壤含水率是影响菌群结构的重要因素之一; 利用高通量测序技术获得非培养微生物的群落分布,根据其基因组信息,调整培养条件将可能有助于实现未培养微生物的可培养化.

关键词: 洞穴; 微生物; 高通量测序; 菌群结构

中图分类号: Q 939 **文献标志码:** A **DOI:** 10. 16357/j. cnki. issn1000-5862. 2021. 02. 09

0 引言

洞穴是在水、风等外力作用下形成的地表或地下形态,大多数属于喀斯特地貌^[1],主要是在碳酸盐岩石上形成的^[2]. 洞穴内的营养贫瘠,是一种寡营养极端环境^[3],但其中仍存在许多微生物^[4-5],在洞穴岩石中的微生物数量平均可以达到 1×10^6 个 \cdot g^{-1} 土壤样品^[6]. 对洞穴微生物组的研究,有助于人们对洞穴微生物的群体结构、组成以及地理学分布的认知,加深对洞穴生态系统的理解,并为开发洞穴资源提供指导^[7].

在洞穴微生物中存在许多具有独特代谢功能的类群,具有巨大的研究和潜在的应用价值. 目前关于洞穴微生物的研究主要集中在微生物代谢和群落结构多样性 2 个方面,其中关于代谢方面的研究集中于洞穴中碳酸盐的沉积及溶解^[8-9]、特殊活性代谢产物的探索^[1,10-11]、化学元素的利用^[12-13]等方面; 关于洞穴微生物群落多样性的研究主要集中于利用纯培养或高通量测序的方式分析由于土壤酸化^[14]、温度改变^[15]等因素对洞穴微生物群落结构的影响. 其中季节性降水变化往往会改变土壤中稀有细菌和优

势真菌的组成^[7,16],然而关于季节性变化对洞穴内土壤微生物菌群变化的影响却鲜有报道. 通过可培养的方式可以对土壤中的菌群进行分离鉴定,获得具有特殊活性或者新的菌株,但目前实验室培养条件并不能完全满足微生物生长需要,且由于环境改变,微生物的生存受到胁迫,细胞结构和形态发生改变,使得许多微生物无法被分离得到^[17-19]. 随着测序技术的不断进步,人们开始利用基因组学方法对环境样品中的微生物遗传组成和群落功能进行研究^[20],但无法从中直接得到单一物种的独立基因组信息.

本文以江西省九江市彭泽县龙宫洞雨季和旱季的洞穴土壤为研究对象,利用高通量测序及荧光定量 PCR 技术,对不同季节引起洞穴土壤微生物分布情况的改变进行探究. 通过传统培养方法对可培养微生物进行培养纯化,分析可培养微生物的组成,比较在可培养与免培养方式下群落组成差异情况,根据未培养微生物的基因组信息,以期期望为实现未培养微生物可培养化提供指导信息,结合可培养与免培养手段,进一步提高对未培养微生物的认识. 同时,通过比较雨季和旱季洞穴土壤群落结构的差异,揭示不同季节对洞穴土壤菌群结构的影响.

收稿日期: 2020-12-03

基金项目: 国家自然科学基金(31760449)、江西省自然科学基金(20181BAB214003)和江西师范大学研究生创新基金(YJS2019014)资助项目.

通信作者: 杨慧林(1986—)男,江西宜春人,副教授,博士,主要从事微生物多样性及生物信息学研究. E-mail: yanghl@jxnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 样品采集

2018 年 4 月(雨季)和 11 月(旱季),在温度均为 20 ℃ 时,利用 5 点取样法采集江西省九江市彭泽县龙宫洞(地理坐标为 29°42′N,116°26′E)靠近洞口的洞内土壤样品,置于 50 mL 无菌离心管中,用冰盒携带至实验室将其分为 A(旱季)和 B(雨季)2 类样品,测定样品的含水率,并进行后期处理。

1.2 微生物培养

将采取的土壤样品稀释涂布于 LB、TSA 及 PCA 培养基中,对可培养细菌在 37 ℃ 条件下培养 2 d,记录菌株的菌落大小、形状、颜色、光泽、透明度、湿润度、边缘等特征。根据菌落特征挑取单菌落,采用连续划线法进行纯化,将获得的单菌落用 20% 甘油管保藏于 -80 ℃ 超低温冰箱中。同时用无菌水将涂布的菌体充分洗涤下来,混合均匀后离心取沉淀备用。

1.3 DNA 提取及 16S rDNA 扩增

取 0.5 g 土壤样品于离心管中,利用 Fast DNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) 土壤基因组提取试剂盒对土壤基因组总 DNA 进行提取。同时利用 OMEGA 细菌基因组提取试剂盒对可培养细菌的单菌及混菌总 DNA 进行提取,并进行电泳检测。利用引物 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) 和 1492R (5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′) 对纯化后的细菌进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为 95 ℃

300 s、95 ℃ 30 s、55 ℃ 45 s 和 72 ℃ 90 s,共 35 个循环,再 72 ℃ 600 s。将 PCR 产物送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。

1.4 16S、ITS 基因扩增和高通量测序

将非培养和可培养微生物的基因组 DNA 分别利用引物 338F (5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′) 和 806R (5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′) 对 16S rDNA 进行 PCR 扩增;利用引物 ITS1F (5′-CTTGGT-CATTTAGAGGAAGTAA-3′) 和 ITS2R (5′-GCTGCGT-TCTTCATCGATGC-3′) 对 ITS 进行扩增。利用 OMEGA 胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行切胶回收,用 Invitrogen Qubit 3 对回收的 DNA 浓度进行测定,并将胶回收产物进行等量混匀,构建 16S rDNA 以及 ITS 文库,最后利用 Illumina HiSeq2500 高通量测序平台进行 PE250 测序(北京诺禾致源生物技术有限公司)。

1.5 功能基因荧光定量

利用 TB GREEN™ Premix Ex Taq™ II (宝生物工程公司,TakaRa,大连)试剂盒在 ABI 7500 Real-Time PCR System 扩增仪上对土壤微生物基因组 DNA 的 16S rDNA、ITS 基因进行绝对定量 PCR(见表 1)。在冰浴上配制 20 μL 反应体系,反应体系为 10 μL TB GREEN Premix Ex Taq II (2×),前后端引物分别为 0.8 μL、0.4 μL ROX Reference Dye II,1 μL 土壤基因组 DNA 模板以及 7 μL 无菌水。

表 1 荧光定量 PCR 引物及条件

基因名称	引物名称	引物序列	PCR 条件
16S rDNA	Eub338	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	变性 95 ℃ 5 s 退火 53 ℃ 30 s , 扩增 72 ℃ 30 s 40 个循环
	Eub518	ATTACCGCGGCTGCTGG	
ITS	5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	
	ITS1f	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

取适量采集的土壤样品,称其被烘干前后的质量,计算出不同土壤样品的含水率(见表 2),其中 A 类土壤含水率为 24% 左右,B 类土壤样品的含水率为 30% 左右,干、湿 2 季土壤含水率相差 6.26%。B 类土壤 pH 均值较 A 类高 0.26,总氮和总碳含量 A 类土壤均值均高于 B 类土壤。

2.2 荧光定量 PCR 结果分析

利用荧光定量 PCR 测定不同土壤中细菌、真菌

表 2 土壤样品理化性质

样品名	含水率/%	pH 值	总氮/%	总碳/%
A ₁	25.00	5.93	0.19	2.23
A ₂	22.98	6.21	0.20	2.41
A ₃	24.85	5.67	0.23	2.16
A ₄	23.55	6.01	0.19	2.34
A ₅	27.75	6.22	0.16	2.09
B ₁	30.78	6.44	0.15	1.74
B ₂	30.70	6.81	0.16	1.81
B ₃	31.35	5.91	0.18	1.71
B ₄	30.80	6.23	0.14	1.79
B ₅	31.96	5.93	0.17	1.72

基因拷贝数. 以浓度为 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$ Copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的标准质粒为模板, 反应体系设为 $20 \mu\text{L}$. 按照表 1 的扩增条件将样品和标准品均重复 3 次实验, 分别对洞穴土壤细菌和真菌基因进行绝对定量. 根据所得的 C_t 值和相应的标准品浓度绘制标准曲线. 16S 基因标准曲线方程为 $y = -3.305 \lg C + 35.755$, $R^2 = 0.999$, $E_{ff}\% = 1000.720$, 结合样品扩增的 C_t 值可以计算出相应土壤中细菌的拷贝数. 同理, 也可得出土壤中相应的 ITS 基因拷贝数, 其中 ITS 基因标准曲线为 $y = -3.594 \lg C + 37.895$, $R^2 = 1.00$, $E_{ff}\% = 89.773$.

在荧光定量检测后对不同土壤样品相应基因的拷贝数进行统计 (见图 1), 3 组重复样基因拷贝数取其均值, 计算细菌、真菌基因在干、湿土壤中基因的拷贝数. 最终拷贝数计算方式为: 最终拷贝数 Copies $\cdot g^{-1}$ (原样品) = $(150 \times \text{稀释倍数} / 0.5)$ Copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$.

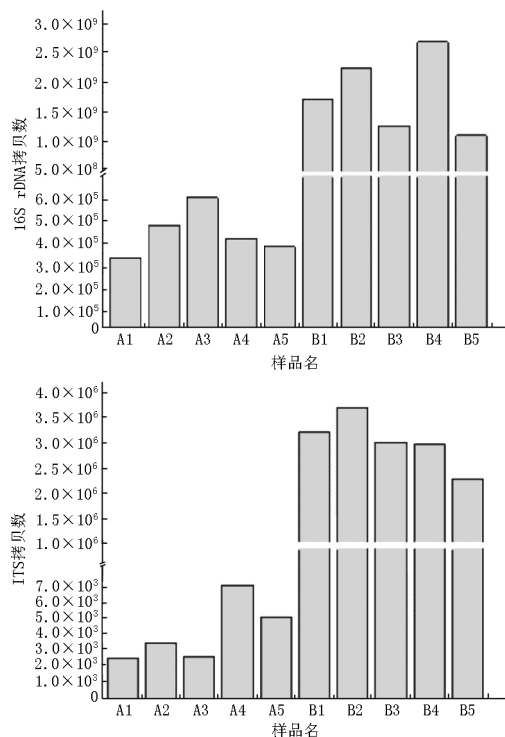


图 1 功能基因拷贝数

3 细菌群落结构分析

3.1 洞穴土壤非培养细菌群落相对丰度

从门水平上来看 (见图 2(a)), 在雨季和旱季洞穴土壤中均检测到放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、芽单

胞菌门 (Gemmatimonadetes) 等 10 个菌门. 在雨季洞穴土壤中变形菌门处于优势门类, 所占比例最大 (29.58% ~ 71.21%), 其次是放线菌门 (6.85% ~ 24.65%) 和厚壁菌门 (13.59% ~ 32.09%). 而在旱季洞穴土壤中处于优势门类的细菌则是放线菌门 (54.01% ~ 72.98%), 其次是变形菌门 (6.71% ~ 12.85%) 和酸杆菌门 (9.15% ~ 13.71%). 随着土壤湿度的降低, 变形菌门相对丰度明显降低, 放线菌门的相对丰度明显升高. 从属的角度来看 (图 2(b)), 在不同湿度的洞穴土壤中, 虽然群落组成相似, 但是其相对丰度具有较大的差异. 在旱季洞穴土壤中以 *Gaiella* 为优势菌属, 在雨季洞穴土壤中以假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 为优势菌属. 相关原始数据已提交至 NCBI SRA 数据库, 登录号为 SRR10048496—SRR10048531.

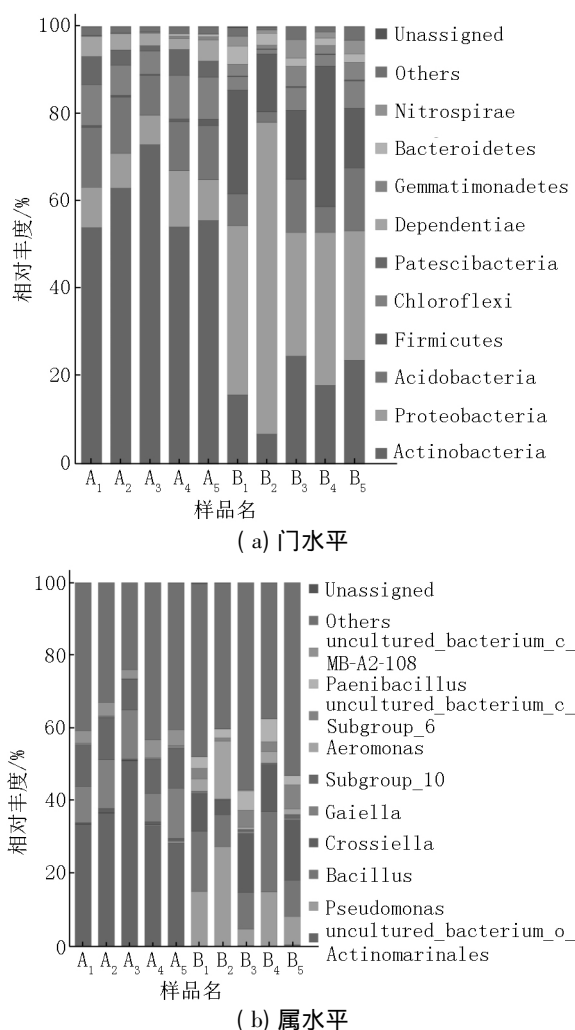


图 2 不同季节非培养细菌门水平和属水平群落相对丰度

3.2 洞穴土壤可培养细菌分离结果

从江西省九江市彭泽县龙宫洞中共分离出 115 株细菌, 通过 16S rDNA 测序, 并进行统计 (见表 3).

从表 3 可知, 这些菌株分别属于 6 个属, 26 个种, 其中在雨季洞穴土壤中有芽孢杆菌属 12 株, 10 个种; 假单胞菌属 17 株, 9 个种; 不动杆菌属 2 株, 1 个种; 产气单胞菌属 3 株, 2 个种; 谷氨酸杆菌属 1 株, 1 个种; 沙雷菌属 2 株, 1 个种. 在旱季洞穴土壤中有芽孢杆菌属 10 株, 9 个种; 假单胞菌属 14 株, 8 个种; 不动杆菌属 2 株, 1 个种; 产气单胞菌属 3 株, 2 个种; 谷氨酸杆菌属 1 株, 1 个种; 沙雷菌属 1 株, 1 个种.

表 3 可培养细菌分离结果

样品名	近缘种	登录号	培养基	季节
JXJJ-1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain ATCC 17909	NR_117624.1	TSA	雨季
JXJJ-3	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966	NR_074841.1	TSA	雨季
JXJJ-4	<i>Aeromonas media</i> strain RM	NR_036911.2	TSA	雨季
JXJJ-6	<i>Bacillus paramycoides</i> strain MCCC 1A04098	NR_157734.1	TSA	雨季
JXJJ-9	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	NR_152692.1	TSA	雨季
JXJJ-13	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> strain KL28	NR_145644.1	TSA	雨季
JXJJ-14	<i>Pseudomonas baetica</i> strain a390	NR_116899.1	TSA	雨季
JXJJ-15	<i>Pseudomonas donghuensis</i> strain HYS	NR_136501.2	TSA	雨季
JXJJ-16	<i>Pseudomonas japonica</i> NBRC 103040	NR_114192.1	TSA	雨季
JXJJ-17	<i>Pseudomonas mohnii</i> strain IpA-2	NR_042543.1	TSA	雨季
JXJJ-19	<i>Pseudomonas parafulva</i> NBRC 16636	NR_113856.1	TSA	雨季
JXJJ-21	<i>Pseudomonas reidholzensis</i> strain ID3	NR_157777.1	TSA	雨季
JXJJ-22	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> strain ID2	NR_157778.1	TSA	雨季
JXJJ-23	<i>Serratia quinivorans</i> strain 4364	NR_037112.1	TSA	雨季
JXJJ-27	<i>Bacillus albus</i> strain MCCC 1A02146	NR_157729.1	PCA	雨季
JXJJ-28	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain NBRC 15535	NR_112685.1	PCA	雨季
JXJJ-29	<i>Bacillus mobilis</i> strain MCCC 1A05942	NR_157731.1	PCA	雨季
JXJJ-30	<i>Bacillus muralis</i> strain LMG 20238	NR_042083.1	PCA	雨季
JXJJ-33	<i>Bacillus nakamurai</i> strain NRRL B-41091	NR_151897.1	PCA	雨季
JXJJ-35	<i>Bacillus simplex</i> strain LMG 11160	NR_114919.1	PCA	雨季
JXJJ-36	<i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	NR_075005.2	PCA	雨季
JXJJ-37	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> Re117	NR_074608.1	PCA	雨季
JXJJ-39	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> strain KL28	NR_145644.1	PCA	雨季
JXJJ-41	<i>Serratia quinivorans</i> strain 4364	NR_037112.1	PCA	雨季
JXJJ-43	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain ATCC 17909	NR_117624.1	LB	雨季
JXJJ-44	<i>Aeromonas media</i> strain RM	NR_036911.2	LB	雨季
JXJJ-45	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain MPA 1034	NR_117946.1	LB	雨季
JXJJ-46	<i>Bacillus mobilis</i> strain MCCC 1A05942	NR_157731.1	LB	雨季
JXJJ-49	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	NR_152692.1	LB	雨季
JXJJ-52	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> strain KL28	NR_145644.1	LB	雨季
JXJJ-53	<i>Pseudomonas baetica</i> strain a390	NR_116899.1	LB	雨季
JXJJ-54	<i>Pseudomonas donghuensis</i> strain HYS	NR_136501.2	LB	雨季
JXJJ-55	<i>Pseudomonas japonica</i> NBRC 103040	NR_114192.1	LB	雨季
JXJJ-57	<i>Pseudomonas jessenii</i> strain CIP 105274	NR_024918.1	LB	雨季
JXJJ-58	<i>Pseudomonas mohnii</i> strain IpA-2	NR_042543.1	LB	雨季
JXJJ-60	<i>Pseudomonas reidholzensis</i> strain ID3	NR_157777.1	LB	雨季
JXJJ-63	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> strain ID2	NR_157778.1	LB	雨季
JXJJ-65	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain ATCC 17909	NR_117624.1	TSA	旱季
JXJJ-66	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966	NR_074841.1	TSA	旱季
JXJJ-69	<i>Aeromonas media</i> strain RM	NR_036911.2	TSA	旱季
JXJJ-70	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> strain KL28	NR_145644.1	TSA	旱季
JXJJ-71	<i>Pseudomonas baetica</i> strain a390	NR_116899.1	TSA	旱季
JXJJ-72	<i>Pseudomonas donghuensis</i> strain HYS	NR_136501.2	TSA	旱季

表 3(续)

样品名	近缘种	登录号	培养基	季节
JXJJ-73	<i>Pseudomonas japonica</i> NBRC 103040	NR_114192.1	TSA	旱季
JXJJ-74	<i>Pseudomonas jessenii</i> strain CIP 105274	NR_024918.1	TSA	旱季
JXJJ-77	<i>Pseudomonas mohnii</i> strain IpA-2	NR_042543.1	TSA	旱季
JXJJ-79	<i>Pseudomonas parafulva</i> NBRC 16636	NR_113856.1	TSA	旱季
JXJJ-80	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> strain ID2	NR_157778.1	TSA	旱季
JXJJ-81	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain ATCC 17909	NR_117624.1	PCA	旱季
JXJJ-82	<i>Bacillus albus</i> strain MCCC 1A02146	NR_157729.1	PCA	旱季
JXJJ-85	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain MPA 1034	NR_117946.1	PCA	旱季
JXJJ-86	<i>Bacillus mobilis</i> strain MCCC 1A05942	NR_157731.1	PCA	旱季
JXJJ-87	<i>Bacillus muralis</i> strain LMG 20238	NR_042083.1	PCA	旱季
JXJJ-88	<i>Bacillus nakamurai</i> strain NRRL B-41091	NR_151897.1	PCA	旱季
JXJJ-90	<i>Bacillus velezensis</i> strain CBMB205	NR_116240.1	PCA	旱季
JXJJ-91	<i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	NR_075005.2	PCA	旱季
JXJJ-92	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	NR_152692.1	PCA	旱季
JXJJ-94	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> Re117	NR_074608.1	PCA	旱季
JXJJ-95	<i>Glutamicibacter rhizophytocola</i> strain KLBMP 5180	NR_156872.1	PCA	旱季
JXJJ-96	<i>Serratia quinivorans</i> strain 4364	NR_037112.1	PCA	旱季
JXJJ-97	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966	NR_074841.1	LB	旱季
JXJJ-99	<i>Bacillus simplex</i> strain LMG 11160	NR_114919.1	LB	旱季
JXJJ-101	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	NR_152692.1	LB	旱季
JXJJ-102	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> strain KL28	NR_145644.1	LB	旱季
JXJJ-103	<i>Pseudomonas donghuensis</i> strain HYS	NR_136501.2	LB	旱季
JXJJ-105	<i>Pseudomonas japonica</i> NBRC 103040	NR_114192.1	LB	旱季
JXJJ-108	<i>Pseudomonas mohnii</i> strain IpA-2	NR_042543.1	LB	旱季
JXJJ-110	<i>Pseudomonas parafulva</i> NBRC 16636	NR_113856.1	LB	旱季

3.3 洞穴土壤可培养细菌群落分布情况

分别利用不同的培养基对洞穴土壤微生物进行培养,以 PCA、LB 及 TSA 分别培养 4 月样品 C₁ ~ C₃、C₄ ~ C₆、C₁₀ ~ C₁₂和 11 月样品 C₇ ~ C₉、C₁₃ ~ C₁₅、C₁₆ ~ C₁₈. 将不同培养基的样品充分洗涤后提取总 DNA,再进行高通量测序.从属水平的角度可以发现:当用不同培养基培养微生物时,不同微生物由于在接种时土壤本身菌体含量以及菌体生长速度不同,使得相对群落丰度有所差异,但所得到的群落微生物组成是基本一致的,且干、湿程度不同的洞穴土壤细菌,在可培养状态下同种培养基的细菌生长状况和群落组成基本一致.总的来说,干、湿程度不同对土壤可培养细菌的组成无影响.

3.4 洞穴土壤非培养细菌群落聚类 and 主成分分析

通过 Python 语言工具对土壤样品进行聚类,用以判断各样品间物种组成的相似性;结合判断各土壤样品间属水平物种丰度相似性的柱状图(见图 4(a)),可更加清晰地反映洞穴土壤细菌群落的聚类情况.从图 4(a)可看出 A、B 2 组土壤分别分开聚

类在一起,这表明在同一时间取样的土壤样品中群落结构较为相似,而在不同时间取样的土壤样品中群落的物种丰度差异较大.利用 PCoA 分析(见图 4(b))同样也证实了这一点,从图 4(b)中可看出,相近湿度的土壤群落结构更加相近,而不同湿度的土壤则表现出较大的差异.总的来说,洞穴土壤细菌群落结构因土壤湿度不同而存在明显差异,土壤湿度相近的洞穴土壤表现出相似的物种丰度.

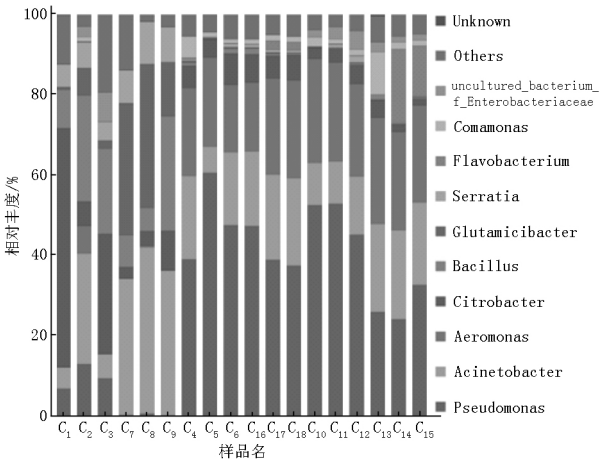


图 3 不同季节可培养细菌分布

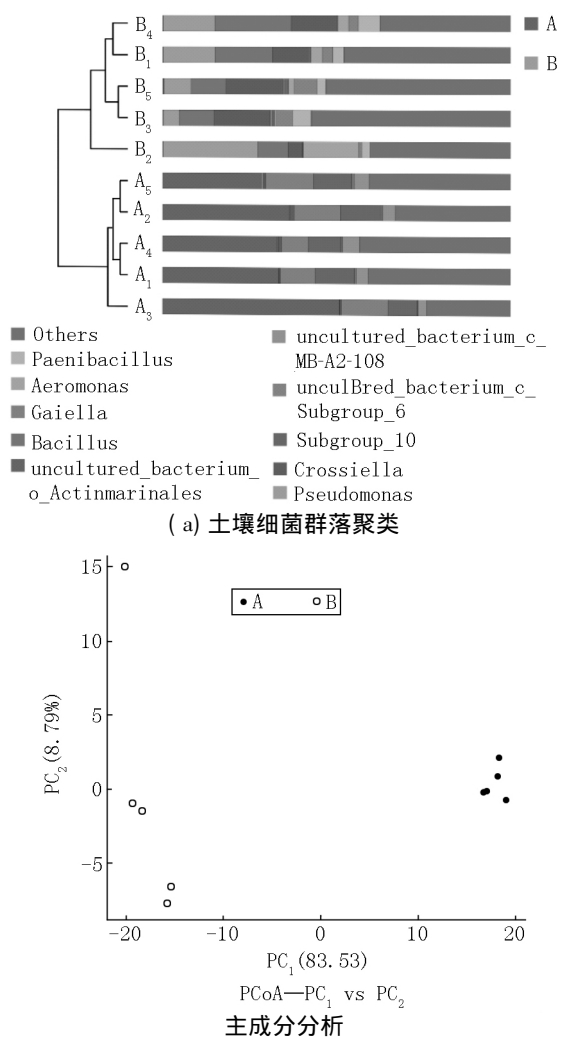


图 4 不同季节土壤细菌群落聚类 and 主成分分析

3.5 非培养细菌群落结构的理化因子相关性

为分析不同季节洞穴土壤理化性质对细菌群落结构的影响,对土壤中的含水率、总碳、总氮以及 pH 值进行了测定,结果如图 5 所示。其中含水率、总碳和总氮的夹角为锐角,这表明两两之间可能具有协同效应,pH 值与含水率、总碳和总氮之间呈负相

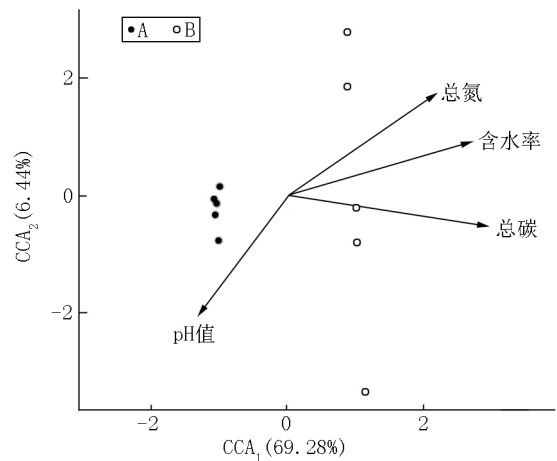


图 5 理化因子与非培养细菌群落结构的相关性

关关系。同时可以发现 2 个季节土壤样品与含水率相关性最高。

4 真菌群落结构分析

4.1 真菌非培养群落相对丰度

通过对洞穴土壤中真菌的物种分析(见图 6)可以看出:在门水平上土壤样品的群落组成基本一致,均以子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)为主。从门水平的群落相对丰度来看,2 个月份的洞穴土壤组成均以子囊菌门(Ascomycota)为优势菌群,所占比例均在 40% 以上,其次是担子菌门和被孢霉门。但在 2 组土壤样品中担子菌门和被孢霉门的相对丰度完全不同,在 11 月份洞穴土壤中被孢霉门的群落相对丰

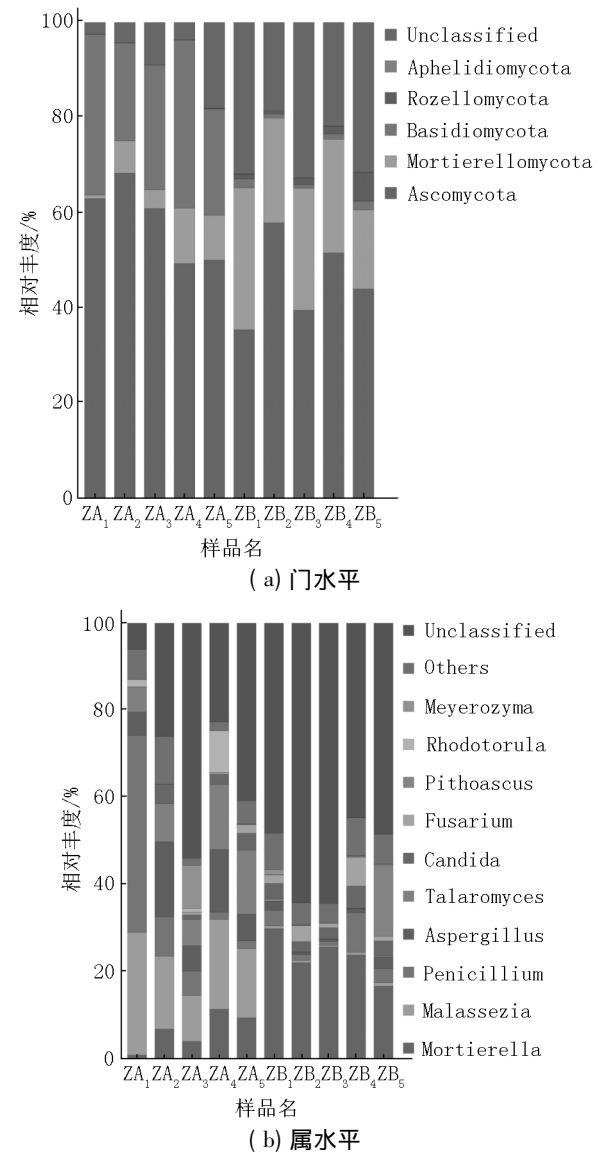


图 6 不同季节非培养真菌门水平和属水平群落相对丰度

度比 4 月份洞穴土壤明显降低,而担子菌门的群落相对丰度则显著增高.从属水平上来看 2 组土壤虽然群落组成相似,但各物种的相对丰度变化较大,其中随着土壤含水率降低被孢霉属(*Mortierella*)属群落相对丰度明显下降,而马拉色菌属(*Malassezia*)和曲霉属(*Aspergillus*)的相对丰度则明显上升.

4.2 洞穴土壤可培养真菌分布情况

分别利用不同的培养基对洞穴土壤微生物进行培养,结果如图 7 所示.其中察氏和 PDA 培养基分旱季($Z_{11} \sim Z_{15}$ 、 $Z_{31} \sim Z_{35}$)和雨季($Z_{21} \sim Z_{25}$ 、 $Z_{41} \sim Z_{45}$).从属水平的角度可以发现,在察氏培养基中不同季节真菌群落组成基本相似,而在 PDA 培养基中虽然菌属组成相似,但群落相对丰度差异显著.

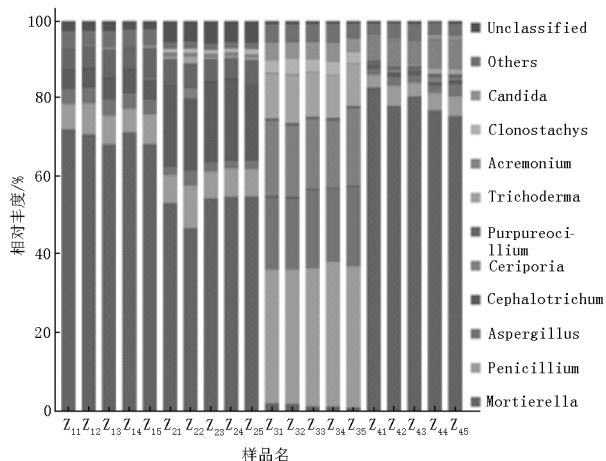


图 7 不同季节可培养真菌分布

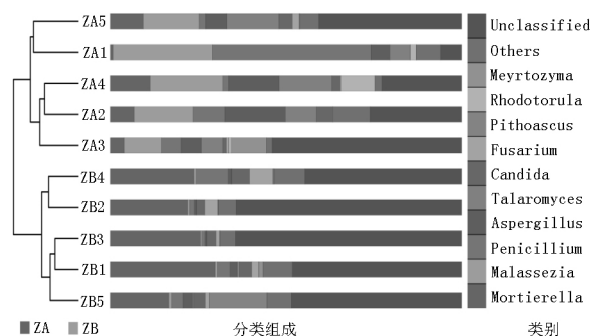
4.3 洞穴土壤真菌群落聚类和 Anosim 分析

利用 Python 语言工具对 2 组土壤样品进行聚类分析,将聚类树状图与群落丰度柱状图相结合,可清楚地反映出土壤样品的聚类信息.从图 8(a)可以看出 A、B 2 组土壤的真菌物种组成的相似关系,2 组样品分别聚类,湿度相近的土壤样品物种组成更为相近,反之则存在一定的差异.从 Anosim 分析(见图 8(b))中可发现,在 2 组样品中组内和组间都存在一定的差异,从分析的数据计算得出 $R = 0.800$,这表明组间存在明显差异,且组间差异明显大于组内差异, $P = 0.016$ 表明数据具有较高的可信度.总的来说,在 A、B 2 组样品中真菌物种丰度差异显著,组内样品也存在一定差异,但差异不显著.

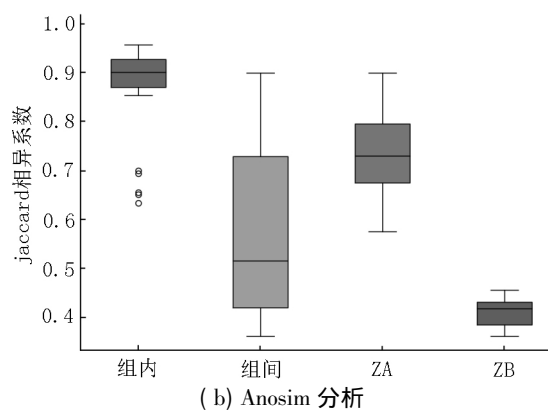
4.4 非培养真菌群落结构的理化因子相关性

为分析不同季节洞穴土壤理化性质对真菌群落结构的影响,对土壤中的含水率、总碳、总氮以及 pH 值进行测定,结果如图 9 所示.图 9 表明,旱季土壤

非培养真菌群落结构与土壤中总碳含量相关性最高,雨季土壤非培养真菌群落结构与土壤中总碳和含水率相关性较高.



(a) 土壤非真菌群落聚类



(b) Anosim 分析

图 8 不同季节土壤非真菌群落聚类和 Anosim 分析

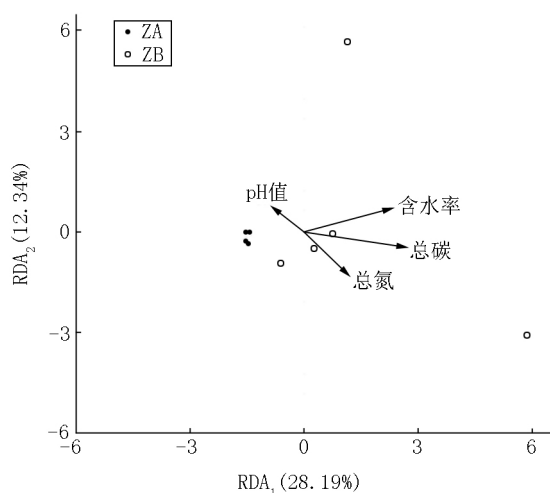


图 9 理化因子与非培养真菌群落结构的相关性

5 讨论

随着高通量技术的不断发展,人们对环境中微生物群落结构及多样性的研究也日益深入,同时这一技术也受到人们的广泛认可^[21-22].本文利用传统纯培养方法结合高通量测序技术,对江西省九江市彭泽县龙宫洞土壤在旱季和雨季条件下的微生物群

落结构变化进行分析.当雨季转为旱季后,洞穴土壤含水率明显下降,平均下降 6.26%.通过对雨季和旱季土壤高通量测序的数据进行生物信息学分析发现:雨季土壤的优势菌群为变形菌门、放线菌门和厚壁菌门,旱季土壤的优势菌群为放线菌门、变形菌门和酸杆菌门.通过对比雨季和旱季土壤的菌群相对丰度发现:在 2 个季节土壤中各菌群的相对丰度存在较大差异,其中放线菌门的相对丰度随着土壤湿度的降低而增加,而变形菌门的菌群相对丰度变化则刚好与之相反,这表明在洞穴土壤微生物中放线菌门更适应土壤中含水率的改变,而变形菌门对含水率的改变更为敏感. R. L. Barnard 等^[23] 研究发现加利福尼亚州的 3 个草原土壤样品在干燥和湿润的条件下样品的细菌菌群有所差异,其中放线菌门的相对丰度在干燥时期增加,且随着土壤的重新湿润而减少,而变形菌门的变化趋势与放线菌门则正好相反.这与本文研究洞穴土壤微生物的结果相一致. T. D. V. Franciska 等^[24] 以从 Hazelrigg 野外草地监测站采集的样品为对象,将菌群分为干旱敏感型和耐旱型指示 OTU,发现在变形菌门中存在干旱敏感型指示 OTU,放线菌门存在耐旱型指示 OTU,这也解释了在土壤样品中菌群在土壤湿度降低时其相对丰度也随之降低的原因,这也进一步佐证了本文的结论.

对洞穴土壤真菌的研究发现,在干、湿季土壤样品中均以 Ascomycota 作为优势菌群,其次分别为 Basidiomycota 和 Mortierellomycota,其中 Mortierellomycota 的菌群相对丰度随湿度下降而下降. R. L. Barnard 等^[23] 从统计学上发现在草地土壤中真菌在干燥或湿润的条件下,所有群落在门水平上都未发生明显变化. T. D. V. Franciska 等^[24] 也发现 Mortierellomycota 存在干旱敏感型 OTU,这也印证了本文的实验结果.这些结果表明真菌在应对土壤湿度变化时,其群落相对丰度的改变比细菌更稳定,但不同土壤真菌的相对丰度的稳定性不同,洞穴土壤真菌的稳定性相对较差,这表明在洞穴内土壤中真菌群落相对丰度更易受到外界环境的影响.

采用传统的分离培养方法,通过优化培养条件和培养基成分等获得尽可能多的可培养菌株.然后对分离的菌株进行统计学分析,可以快速衡量一些小群体的多样性^[25].通过利用不同培养基对不同季节洞穴土壤微生物进行培养,将培养的群落全部混合后提取总 DNA,对其进行测序分析可以获得可培

养微生物的全部基因信息,同时利用传统的分离划线培养的方式分离单菌落测序,获得可培养的单菌落情况,通过传统分离的方式获得 6 个属 26 个种细菌,这表明可培养细菌分布较广泛,在不同季节分离的土壤中均以假单胞菌属和芽孢杆菌属为主,即这 2 种菌属为优势菌属.从属水平上看,分离得到的细菌均可以在相应进行高通量测序的可培养混合菌落中找到其对应的属,然而,混合菌落的一些属并没有通过传统分离的方式被分离出来,这表明传统分离的方式虽然可以分离大部分可培养的微生物,但仍会有一些微生物无法被分离出来.与非培养洞穴微生物相比,传统的分离培养方法未能发现 *Gaiella*、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、克洛氏菌属(*Crossiella*) 的微生物,但这些菌属在一定条件下均可以培养^[26-28],这表明在对土壤菌落分离培养时可以通过改变培养基和培养条件等方式来提高菌株的分离比例.但仍会存在一些无法培养的菌株,这可能需要根据非培养微生物的基因组信息对培养条件进一步优化分离.从真菌的角度来看,在非培养条件下相对丰度较高的群落在可培养条件下均有发现,这表明从土壤中分离纯化真菌相对细菌来说更容易.从可培养真菌的群落分布可知,不同培养基对于不同菌株的分离情况不同,其中当利用察氏培养基分离不同季节洞穴土壤真菌时,分离得到的群落基本一致,而用 PDA 培养基分离得到的群落结构有一定的差异,这表明不同培养基在分离培养真菌中具有较大的差异性,这与刘杰等^[29] 提出的 PDA 培养基更适合分离与环境因素相关的真菌的结论一致.

通过 qPCR 技术对洞穴土壤中 16S rDNA 和 ITS 基因拷贝数进行测定,经过分析计算发现从雨季转为旱季后,在洞穴土壤中细菌和真菌的拷贝数均显著降低,这表明洞穴微生物面对干、湿季节的变化,真菌和细菌均会通过改变群体数量来适应.通过对环境因子的分析可知,季节变化引起土壤理化性质的改变与土壤中微生物群落有着密切的关系,土壤含水率是影响洞穴土壤中细菌和真菌的群落结构的主要因素,刘旻霞等^[30] 认为土壤微生物与土壤有机碳、土壤 pH 值、全氮、土壤有机质等具有显著正相关性,这一结果与本文的不完全一致,本文发现洞穴土壤微生物群落结构与 pH 值呈负相关关系,这可能与洞穴内营养贫瘠有关.

总的来说,利用高通量测序手段揭示了不同季节洞穴土壤微生物群落结构的变化情况,同时也发

现土壤含水率、pH 值、总碳和总氮含量均对微生物群落结构和物种丰度有较大影响,对比传统分离培养的方式分离的物种组成与高通量测序的菌落组成发现,不同培养基分离的物种也存在一定的差异,而且传统分离培养方式仅能分离出一部分菌群,仍然有许多微生物可以通过改变培养方式分离得到。本文以高通量测序基因数据作为指导,对未培养微生物进行的分离,实现未培养微生物可培养化提供依据。

6 参考文献

- [1] 朱海珍,姜成英,刘双江. 洞穴微生物组: 已知与未知 [J]. 微生物学报 2017 57(6): 829-838.
- [2] Ford D,Williams P. Karst hydrogeology and geomorphology [M]. Chichester: John Wiley and Sons 2007.
- [3] Danielopol D L, Pospisil P, Rouch R. Biodiversity in groundwater: a large-scale view [J]. Trends in Ecology and Evolution 2000 15(6): 223-224.
- [4] Engel A S. Microbial diversity of cave ecosystems. Geomicrobiology: molecular and environmental perspective [J]. Springer, Dordrecht 2010(10): 219-238.
- [5] Barton H A, Giarrizzo J G, Suarez P, et al. Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave is dominated by the *Chloroflexi* (Class *Ktedonobacterales*) and *Thaumarchaeota* Group I. 1c [J]. Frontiers in Microbiology 2014, 5: 615.
- [6] Tomczykżak K, Zielenkiewicz U. Microbial diversity in caves [J]. Geomicrobiology Journal 2015 33(1): 1-19.
- [7] He Dan, Shen Weijun, Eberwein J, et al. Diversity and co-occurrence network of soil fungi are more responsive than those of bacteria to shifts in precipitation seasonality in a subtropical forest [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 115: 499-510.
- [8] Laiz L, Gonzalez-Delvalle M, Hermosin B, et al. Isolation of cave bacteria and substrate utilization at different temperatures [J]. Geomicrobiology Journal, 2003, 20(5): 11-16.
- [9] Castanier S, Gaęle L M, Perthuisot J P. Carbonates precipitation and limestone genesis: the microbiogeologist point of view [J]. Sedimentary Geology, 1999, 126(1/2/3/4): 9-23.
- [10] 戴素娟,李静,刘少伟,等. 河南神仙洞放线菌资源勘探及抗菌活性筛选 [J]. 中国抗生素杂志 2015 40(9): 641-648.
- [11] 张万芹,张永光,房保柱,等. 贵州兴义喀斯特洞穴土可培养细菌多样性及其产蛋白酶、淀粉酶活性筛选 [J]. 微生物学通报 2016 43(5): 955-964.
- [12] Spilde M N, Northup D E, Boston P J, et al. Geomicrobiology of cave ferromanganese deposits: a field and laboratory investigation [J]. Geomicrobiology Journal 2005 22(3/4): 99-116.
- [13] Carmichael M J, Carmichael S K, Santelli C M, et al. Mn(II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the Upper Tennessee River Basin [J]. Geomicrobiology Journal 2013 30(9): 779-800.
- [14] Xu Huaqin, Zhang Jiaen, Ouyang Ying, et al. Effects of simulated acid rain on microbial characteristics in a lateritic red soil [J]. Environmental Science and Pollution Research International 2015 22(22): 18260-18266.
- [15] Barton H A, Northup D E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspective [J]. Journal of Cave and Karst Studies 2007 69(1): 163-178.
- [16] Klimek B, Chodak M, Jazwa M, et al. Functional diversity of soil microbial communities in boreal and temperate Scots pine forests [J]. European Journal of Forest Research 2016 135(4): 731-742.
- [17] Um H Y, Kong H G, Lee H J, et al. Altered gene expression and intracellular changes of the viable but nonculturable state in *Ralstonia solanacearum* by copper treatment [J]. Plant Pathology Journal 2013 29(4): 374-385.
- [18] Fu Bo, Jiang Qian, Liu Hongbo, et al. Occurrence and re-activation of viable but non-culturable *E. coli* in sewage sludge after mesophilic and thermophilic anaerobic digestion [J]. Biotechnology Letters 2014 36(2): 273-279.
- [19] 李晓丹,屈建航,张璐洁,等. 环境微生物可培养性影响因素及培养方法研究进展 [J]. 生命科学研究 2017, 21(2): 154-158.
- [20] 周恩民,李文均. 未培养微生物研究: 方法、机遇与挑战 [J]. 微生物学报 2018 58(4): 706-723.
- [21] 赵帅,周娜,赵振勇,等. 基于高通量测序分析盐角草根部分内生细菌多样性及动态规律 [J]. 微生物学报, 2016 56(6): 1000-1008.
- [22] Chen Lin, Xu Jianming, Feng Youzhi, et al. Responses of soil microeukaryotic communities to short-term fumigation-incubation revealed by MiSeq amplicon sequencing [J]. Frontiers in Microbiology 2015 6: 1149.
- [23] Barnard R L, Osborne C A, Firestone M K. Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting [J]. The ISME Journal 2013 7(11): 2229-2241.
- [24] Franciska T de V, Griffiths R I, Bailey M, et al. Soil bacterial networks are less stable under drought than fungal net-

- works [J]. Nature Communications 2018 9: 3033.
- [25] Kennedy A C ,Smith K L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils [J]. Plant and Soil , 1995 ,170(1) : 75-86.
- [26] Rita S ,Hugo J C F ,Cristina B et al. High-quality draft genome sequence of *Gaiella occulta* isolated from a 150 meter deep mineral water borehole and comparison with the genome sequences of other deep-branching lineages of the phylum *Actinobacteria* [J]. Microbiology Open ,2019 , 8(9) : 1-8.
- [27] Jang J H ,Maeng S H ,Sathiyaraj S et al. *Paenibacillus albus* sp. nov. , a UV radiation-resistant bacterium isolated from soil in Korea [J]. Archives of Microbiology ,2019 , 201: 1111-1118.
- [28] Labeda D P. *Crossiella* gen. nov. a new genus related to *Streptoalloteichus* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001 51(4) : 1575-1579.
- [29] 刘杰 ,丁艳丽 ,冯伟 等. 松花江底泥真菌的分离培养及分子鉴定 [J]. 农业环境科学学报 ,2013 ,32(2) : 354-362.
- [30] 刘旻霞 ,李瑞 ,张灿 等. 兰州市南山季节性土壤微生物特征及影响因素 [J]. 中国环境科学 ,2018 ,38(7) : 2722-2730.

The Comparison of Soil Microbial Community Structure in Different Seasons of Longgong Cave in Jiangxi Province

MA Yangshuai¹ ,LU Ziyun¹ ,YANG Huilin^{1*} ,ZHANG Zhibin¹ ,YAN Riming¹ ,JIANG Yumei¹ ,ZHU Du²

(1. College of Life Sciences ,Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China; 2. College of Life Sciences ,Jiangxi Key Laboratory of Bioprocess ,Jiangxi Science and Technology Normal University ,Nanchang Jiangxi 330038 ,China)

Abstract: A combination of non-culture method and traditional culture method is used ,and Illumina high-throughput sequencing technology is utilized to sequencing and bioinformatics analysis for the microbial 16S rDNA and ITS-related regions in Longgong cave in Jiangxi Province. The content of bacteria and fungi in the soil is quantified absolutely by real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) . To explore the effects of different seasons on the structure of the soil microbial community in the cave ,the distribution of the corresponding cultivable microorganisms is observed. The results show that with the change of seasons ,the physical and chemical properties of the cave soil change to some extent ,which leads to the change of soil microbial structure ,and the soil water content affects one of the important factors of the flora structure. High-throughput sequencing technology is used to get the community distribution of non-cultured microorganisms. And adjusting the culture conditions according to their genomic information may help to achieve culturability of uncultured microorganisms.

Key words: cave; microbe; high-throughput sequencing; community structure

(责任编辑: 刘显亮)