

DOI: 10.11766/trxb202012140588

王昌毅, 楼骏, 严康, 汪海珍, 徐建明. 基于整合高通量绝对定量法的土壤微生物多样性分析[J]. 土壤学报, 2022, 59(4): 1432–1446.
WANG Changyi, LOU Jun, YAN Kang, WANG Haizhen, XU Jianming. Analysis of Soil Microbial Community Structure via Integrated High-throughput Absolute Abundance Quantification (iHAAQ) Method[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(4): 1432–1446.

基于整合高通量绝对定量法的土壤微生物多样性分析*

王昌毅¹, 楼 骏^{2†}, 严 康¹, 汪海珍^{1†}, 徐建明¹

(1. 浙江大学水土资源与环境研究所, 浙江省农业资源与环境重点实验室, 杭州 310058; 2. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江省媒介生物学与病原控制重点实验室, 浙江湖州 313000)

摘 要: 目前, 常用的高通量测序技术只能得到微生物群落结构的物种种类和相对丰度, 而整合高通量绝对定量法(iHAAQ)结合了高通量测序技术和 qPCR 技术, 可以进一步计算得到微生物群落结构的绝对含量。相对丰度和绝对含量均是描述微生物群落结构的必备指标, 其中相对丰度适合描述和评价微生物群落结构在单个样本内微生物之间的关系, 而绝对含量更适于描述和评价微生物群落结构真实的数量变化以及在样本间微生物之间的关系。本研究基于发表的香蕉土传病害、再造沙地农业生态系统和微生物抑制剂作用 3 篇文献的高通量测序和 qPCR 数据, 通过整合高通量绝对定量法获得 3 篇文献中古菌域、细菌域和真核生物域的真菌三类微生物群落结构的绝对含量数据, 并进一步计算出这三类微生物整体(简称三域微生物)的绝对含量和相对丰度, 从而对土壤微生物群落结构不同物种的相对丰度和绝对含量进行分析, 旨在更加深入、准确地揭示土壤微生物群落及其生态功能。结果表明: (1) 土壤中细菌的物种丰度和绝对含量高于古菌和真菌, 在三域微生物中占据主导地位, 缺乏绝对含量指标可能造成对微生物群落结构变化理解的偏差; (2) 基于相对丰度和绝对含量数据分析, 微生物群落结构 α 多样性指数结果相同, 但 β 多样性指数结果不同; (3) 在香蕉土传病害和再造沙地农业生态系统研究中, 三域微生物的 PCoA 结果与细菌的结果较为相似, 表明这两项研究中三域微生物群落结构主要受细菌的影响, 但在微生物抑制剂的研究中未发现类似结果。整合高通量绝对定量法可以应用于所有同时进行高通量测序和 qPCR 测序的研究, 在未来的土壤微生物群落结构研究中, 采用高通量绝对定量法开展三域微生物群落的物种种类、相对丰度和绝对含量的整体评价, 具有重要的生态学意义。

关键词: 整合高通量绝对定量法; 绝对含量; 相对丰度; 三域微生物; 群落结构

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A

Analysis of Soil Microbial Community Structure via Integrated High-throughput Absolute Abundance Quantification (iHAAQ) Method

WANG Changyi¹, LOU Jun², YAN Kang¹, WANG Haizhen¹, XU Jianming¹

(1. Institute of Soil and Water Resources and Environmental Science, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Agricultural Resources and Environment, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Key Laboratory of Vector Biology and Pathogen Control of Zhejiang Province, College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou, Zhejiang 313000, China)

* 国家重点研发计划项目(2016YFD0200302)和国家自然科学基金项目(41771344)资助 Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0200302) and the National Natural Science Foundation of China (No. 41771344)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: litmor@163.com; wanghz@zju.edu.cn

作者简介: 王昌毅(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为土壤微生物。E-mail: wangchangyi@zju.edu.cn

收稿日期: 2020–12–14; 收到修改稿日期: 2021–07–04; 网络首发日期(www.cnki.net): 2021–09–10

Abstract: 【Objective】 The high-throughput sequencing technology can easily access the species varieties and the relative abundance of a microbial community. Nevertheless, the relative abundance cannot fully reflect the microbial quantities when using it to evaluate the community. On the other hand, the absolute abundance which is one of the essential parameters for describing a microbial community structure in ecology has been ignored. The absolute abundance can be calculated by integrated high-throughput absolute abundance quantification (iHAAQ); which combines high-throughput sequencing and quantitative PCR (qPCR). Both relative and absolute abundances are essential parameters for describing a microbial community structure in ecology. The relative abundance could describe and evaluate the relationship of specific taxa with others in the same sample, while the absolute abundance as a constant parameter is more suitable for describing and evaluating the quantitative variations of specific taxa in a sample or among samples. Thus, this study aimed to provide a comprehensive and in-depth analysis of soil microbial community through the relative and absolute abundances of the archaeal, bacterial, and eukaryotic (fungi) domains of microorganisms (described as three-domain microorganisms). 【Method】 Based on data of soil microbial community in the studies of banana panama disease, the reclaimed sandy agricultural ecosystem and microbial inhibitor, the absolute abundances of archaea, bacteria and fungi in three papers were obtained by iHAAQ. Then the absolute and relative abundances of three-domain microorganisms were further calculated. The α - and β -diversity analyses of archaea, bacteria, fungi and three-domain microorganisms were conducted according to their relative and absolute abundances, respectively. 【Result】 The results showed that: (1) Compared to archaea and fungi, the bacteria dominated the soil microbial community with higher species varieties and absolute abundance. Meanwhile, the lack of absolute abundance parameters might lead to the misunderstanding of the microbial community. (2) The α -diversity indexes calculated by relative and absolute abundances were the same, while the β diversity indexes were different. (3) In the research of banana panama disease and reclaimed sandy agricultural ecosystem, PCoA results of three-domain microorganisms and bacteria were relatively similar, which indicated that the community structures of three-domain microorganisms were mainly affected by bacteria in these two studies. But no similar results were found in the research of microbial inhibitors. 【Conclusion】 The iHAAQ method can be applied to the studies that perform high-throughput sequencing and qPCR analyses, simultaneously. It is of great ecological significance to study the three-domain microbial community with the species varieties, relative and absolute abundances obtained by the iHAAQ method, and it should be encouraged for future research.

Key words: Integrated high-throughput absolute abundance quantification; Absolute abundance; Relative abundance; Three-domain microorganisms; Community structure

随着技术的进步和发展, 微生物群落结构和多样性研究深度日益提升^[1]。目前, 微生物群落结构的研究方法大致可以分为两大类^[2]: 第一类方法是基于微生物的生理生化性质, 例如平板培养分离法^[3]、Biolog 微平板法^[4]、磷脂脂肪酸图谱分析法^[5]等, 这类方法存在可培养微生物少、分析精度低等局限^[3], 无法完全反映环境中微生物的多样性; 第二类方法是基于微生物遗传物质的分子生物学方法, 例如荧光原位杂交法^[6]、变性梯度凝胶电泳法^[2]、qPCR 群落总量定量法^[7]和群落结构高通量测序法^[8]等。第二类方法尤其是群落结构高通量测序法, 可以深入研究不可培养微生物的群落结构信息, 极大地拓展了微生物分子水平信息的获取, 进一步增强了人们对微生物群落结构信息的获取。然而, 运用单个高通

量测序技术研究土壤微生物群落结构只能得到群落结构的物种信息及其相对丰度, 却无法获取生态学中群落结构评价三要素之一的绝对含量指标^[9-11]。Jiang 等^[11]在沿海盐碱土壤的番茄种植实验中发现, 施加肥料后细菌群落中变形菌门的相对丰度并未显著变化, 但是通过高通量测序耦合其他技术获得群落结构绝对含量指标后, 发现肥料处理后的细菌变形菌门绝对含量有了显著提升。这类相对丰度变化不显著而绝对含量变化显著的现象, 在 Yang 等^[9]和 Lou 等^[10]的研究中也有报道。此外, 在 Shi 等^[12]微生物群落结构研究中, 通过绝对含量的计算发现, 土壤疮痂病致病菌链霉菌属 (*Streptomyces*) 的数量与疮痂病的严重程度呈显著正相关。由此可见, 绝对含量是微生物群落结构评价研究中非常重

要的指标,缺少该指标不能准确反映微生物群落的真实数量^[13]。

目前,通过高通量的方式获得土壤微生物群落结构绝对含量信息的方法,逐渐引起微生物研究者的关注和重视^[14]。相关的高通量绝对定量方法主要有两类:一是高通量测序与 qPCR 结合的多技术联用法^[10, 15-16],将 qPCR 测定的真菌/细菌总量与高通量测序得到的真菌/细菌各分类相对丰度结果相乘获取绝对含量。Dannemiller 等^[15]首次将 454 焦磷酸高通量测序和 qPCR 相结合测定了气溶胶中真菌的绝对含量,但未涉及细菌的高通量绝对定量。Zhang 等^[16]采用 qPCR、PLFA、微生物生物量碳、流式细胞仪等方法结合土壤细菌 Illumina 测序结果,对土壤细菌的高通量绝对定量进行了研究,但因未进行验证,研究结论中未得出哪两种方法结合可适用于土壤细菌的高通量绝对定量。而 Lou 等^[10]研究中,结合了 Illumina 测序技术和 qPCR 技术提出整合高通量绝对定量法 (Integrated High-Throughput Absolute Abundance Quantification, iHAAQ),并通过向土壤中添加大肠杆菌进一步验证了 iHAAQ 方法应用于土壤细菌绝对含量研究的可行性。iHAAQ 方法现已被多个学者引用,如 Wu 等^[17]利用 iHAAQ 方法研究了重金属生物淋滤中细菌群落结构的变化,发现通过绝对含量可以更好地揭示细菌与重金属淋滤的关系;Qiao 等^[18]利用 iHAAQ 法研究不同异构体六氯环己烷对厌氧古菌和细菌群落结构的影响,发现通过绝对含量能更好地揭示不同异构体六氯环己烷脱氯与功能菌的关系。二是添加内标法,在土壤或 DNA 样本中加入已知含量的内标菌株或 DNA 片段作为内标物质^[19-20],根据高通量测序获得内标物质的相对丰度并结合其绝对含量计算微生物总量,进而计算其他各分类水平的绝对含量。两种方法均可以获取绝对含量的信息,但是所得结果存在一定差异。例如,土壤样本内标菌株的添加在提取土壤 DNA 之前,内标菌株经历了和土著微生物一样的提取损失,因而所获得的绝对含量信息更接近土壤微生物群落结构的真实值,但是其操作较为繁琐;而高通量测序与 qPCR 联用的方法虽然较添加内标法精确度差,但是其操作较为便利,同时可以实现对已有高通量测序结果的实验进行绝对含量信息的 qPCR 补充分析^[17]。通过这些研究方法均可以获得土壤微生物群落的绝对定量信息,但是大多只针对

细菌或真菌不同域微生物进行研究。因此,杨黎^[21]进一步更新了添加内标法,通过构建通用内标菌株实现了古菌域、细菌域和真核生物域的真菌三类微生物整体(简称三域微生物)的绝对定量,为土壤古菌、细菌和真菌跨域比较和三域微生物评价提供了新的方法和思路。

基于上述文献报道,本研究选择香蕉土传病害^[22]、再造沙地农业生态系统^[23]和微生物抑制剂作用^[24] 3 篇文献中原核生物、真菌的高通量测序和 qPCR 数据,采用整合高通量绝对定量法分析文献中未挖掘的微生物群落绝对含量信息,并比较相对丰度和绝对含量在古菌、细菌、真菌及三域微生物的群落结构和微生物生态学过程等评价中的不同作用、优劣势及其意义,进一步探讨整合高通量绝对定量法在土壤微生物多样性分析及评估中的作用与意义。

1 材料与方法

1.1 数据来源与预处理

本研究中从 NCBI 的 SRA 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 中下载 Shen 等^[22]、Wang 等^[23]和 Pan 等^[24]的 3 篇文献研究的原始测序序列数据,检索号分别为 PRJNA393637、PRJNA472201 和 PRJNA504943。为了保证数据一致,下载所有原始测序序列数据后采用 QIIME2^[25] (版本 2019.1) 进行重新分析处理,采用 DADA2^[26]方法进行序列质控,包括降噪、去除嵌合体 and 去冗余,生成特征表 (Feature table) 和代表序列 (Representative sequences)。使用 QIIME2 的 classify-sklearn 插件对序列进行注释分类,其中 16S rRNA 和 18S rRNA 基因序列采用 SILVA^[27] (版本 128) 数据库进行注释,ITS 序列采用 UNITE^[28] (版本 2016.11) 数据库进行注释,最后获得微生物群落结构中不同分类水平的相对丰度。使用 GetData^[29]软件从相应文章图片中获取古菌、细菌和真菌的 qPCR 数据。

1.2 整合高通量绝对定量法

采用 Lou 等^[10]的整合高通量绝对定量法 (Integrated High-Throughput Absolute Abundance Quantification, iHAAQ),将通过 qPCR 获得的古菌、细菌 (16S rRNA) 和真菌 (18S rRNA 或 ITS) 的基因拷贝数与相对应高通量测序的相对丰度进行相乘

(式(1)),从而计算得到微生物群落不同分类水平的绝对含量^[11, 15]。最后,为了探究三域微生物的总量及结构,本研究将土壤古菌、细菌和真菌的微生物量相加来表征三域微生物总量^[30-31],再将不同分类水平微生物的绝对含量除以三域微生物总量,计算出土壤三域微生物中不同分类水平微生物的相对丰度。

$$A_i = R_i \times Q \quad (1)$$

式中, A_i 为微生物 i 水平分类绝对含量; R_i 为微生物 i 水平分类相对丰度; i 为微生物物种; Q 为 qPCR 测定对应样本基因拷贝数。

1.3 数据分析与统计

方差分析使用 SPSS (版本 20) 软件进行分析,采用 Levene 检验方差齐次性,方差齐次时采用 Tukey 检验显著性,方差不齐时采用 Tamhane T2 检验显著性;微生物群落结构的 α 多样性指数和 PCoA (Principal coordinate analysis) 使用 R (版本 3.6.2) 软件中的 vegan 包^[32]进行分析;其余数据的分析和统计采用 Origin 2019 和 Excel 2016。

2 结 果

2.1 土壤微生物相对丰度与绝对含量

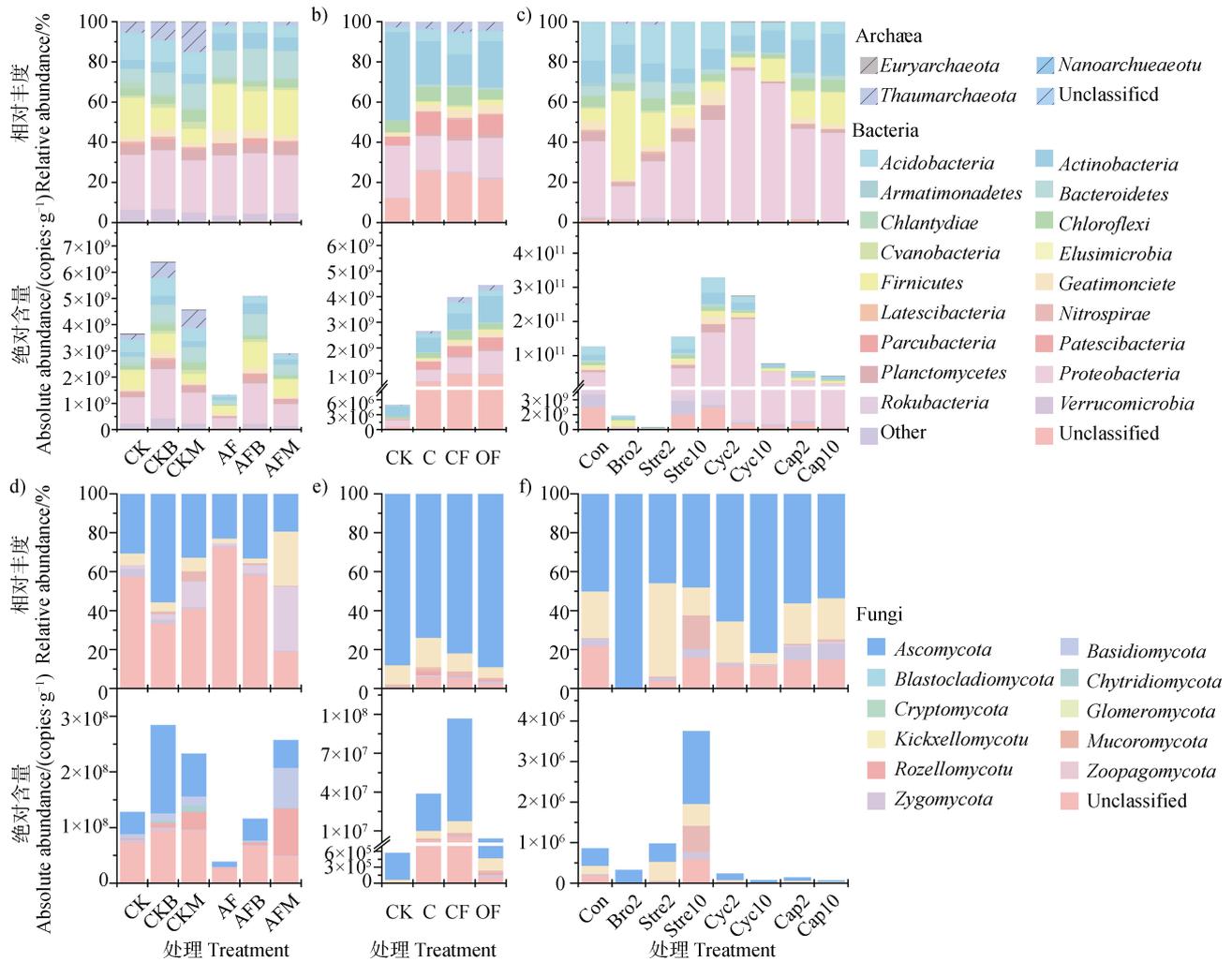
2.1.1 古菌、细菌和真菌相对丰度与绝对含量

通过对 3 篇文献高通量数据重分析,在此基础上应用 iHAAQ 方法计算获得了相应的绝对含量信息(图 1),并发现了先前文献中未曾报道的结果。在香蕉土传病害研究中,基于 18 个土样的 16S rRNA 和 ITS 基因的高通量测序结果,所有样本中共含有 3 个古菌门、35 个细菌门和 5 个真菌门。古菌、细菌和真菌相对丰度结果显示,奇古菌门 (*Thaumarchaeota*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 和子囊菌门 (*Ascomycota*) 分别是古菌、细菌和真菌的优势门类,其相对丰度为 5.62%±5.66%、28.54%±1.65% 和 32.38%±12.71% (图 1a 和图 1d)。通过 iHAAQ 高通量绝对定量法计算得出了古菌、细菌和真菌的绝对含量(图 1a 和图 1d),奇古菌门、变形菌门和子囊菌门的绝对含量分别为 $(2.63 \pm 3.02) \times 10^8$ copies·g⁻¹、 $(1.13 \pm 0.52) \times 10^9$ copies·g⁻¹ 和 $(6.17 \pm 5.20) \times 10^7$ copies·g⁻¹。由分析结果可见,变形菌门的相对

丰度平均值较子囊菌门低,但是其绝对含量较子囊菌门高近两个数量级。细菌中,变形菌门在未受熏蒸 (CK、CKB、CKM) 土壤中的相对丰度差别不大,但在添加生物肥料处理 (CKB) 中其绝对含量 $(1.87 \pm 0.057) \times 10^9$ copies·g⁻¹ 是对照处理 (CK) 中的 $(9.89 \pm 0.28) \times 10^8$ copies·g⁻¹ 近两倍,而厚壁菌门 (*Firmicutes*) 在氨熏蒸 (AF) 处理土壤中相对丰度明显高于其他处理,但是其绝对含量却远低于其他处理;在真菌中,未经熏蒸土壤施加牛粪堆肥 (CKM) 处理中子囊菌门的相对丰度与对照 CK 处理相比未见增加,但绝对含量发生了近两倍的增加。同时,在此外两项研究中也发现了此类现象。

沙地农业生态系统 12 个土样的高通量测序数据分析表明,所有样本共含有 2 个古菌门、20 个细菌门和 9 个真菌门。相对丰度结果显示(图 1b 和图 1e),古菌、细菌和真菌的优势门分别为奇古菌门 (*Thaumarchaeota*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和子囊菌门 (*Ascomycota*),各自相对丰度分别为 3.78%±0.96%、25.90%±12.46% 和 75.78%±9.49%。所有样本中,未经耕种 (CK) 的沙地土壤放线菌门占比最高 (43.91%±1.21%),同时随着轮作和施加肥料,放线菌门占比均有所下降,其中在施加化学肥料的小麦-玉米轮作 (CF) 样本中最低,仅为 15.29%±1.13%。然而,由绝对含量计算结果发现,放线菌门从 CK 处理中最低的 $(2.20 \pm 0.061) \times 10^6$ copies·g⁻¹ 增加至施加有机肥料的小麦玉米轮作处理 (OF) 中的 $(1.02 \pm 0.14) \times 10^9$ copies·g⁻¹ (图 1b)。

在土壤微生物抑制剂作用研究中,21 个农田非根际土样在微生物抑制剂培养 6 周后,共测到 1 个古菌门 (奇古菌门, *Thaumarchaeota*, 0.32%±0.49%)、30 个细菌门和 6 个真菌门,其中细菌和真菌的优势菌门分别为变形菌门 (*Proteobacteria*, 44.66%±18.55%) 和子囊菌门 (*Ascomycota*, 62.54%±19.06%) (图 1c 和图 1f)。施加克菌丹 (Captan) 抑制剂后,变形菌门的相对丰度 (Cap2, 44.99%±7.66%; Cap10, 43.98%±4.58%) 较对照处理 (Con, 37.32%±2.75%) 有所增加,但绝对含量却由 $(4.74 \pm 0.35) \times 10^{10}$ copies·g⁻¹ (Con) 下降至 $(2.41 \pm 0.41) \times 10^{10}$ copies·g⁻¹ (Cap2) 和 $(1.80 \pm 0.19) \times 10^{10}$ copies·g⁻¹ (Cap10) (图 1c 和图 1f); 施加溴硝醇 (Bronopol) 后,细菌厚壁菌门 (*Firmicutes*) 的相对丰度 (Bro2, 43.41%±11.61%;



注: 图 a) 和图 d)、图 b) 和图 e)、图 c) 和图 f) 的原始数据分别取自 Shen 等^[22]、Wang 等^[23]和 Pan 等^[24], 图 a) 和图 d) 中 CK 为未受氨熏蒸的处理, CKB 为未受氨熏蒸+施加生物肥料的处理, CKM 为未受氨熏蒸+施加牛粪堆肥的处理, AF 为氨熏蒸的处理, AFB 为氨熏蒸+施加生物肥料的处理, AFM 为氨熏蒸+施加牛粪堆肥的处理; 图 b) 和图 e) 中 CK 为未耕种处理, C 为未施加肥料的小麦、玉米轮作处理, CF 为施加化学肥料的小麦、玉米轮作处理, OF 为施加有机肥料的小麦玉米轮作处理; 图 c) 和图 f) 中 Con 为未添加抑制剂的对照处理, Bro2 为添加 $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 溴硝醇的处理, Bro10 为添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 溴硝醇的处理, Stre2 为添加 $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 链霉素的处理, Stre10 为添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 链霉素处理, Cyc2 为添加 $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 放线菌酮处理, Cyc10 为添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 放线菌酮处理, Cap2 为添加 $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 克菌丹处理, Cap10 为添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 克菌丹处理。3 篇文章各处理中相对丰度前 10 的所有门类均在微生物群落中呈现, 其余门类归于其他 (Other) 中。下方图与表中的处理表示与图 1 相同。Note: The raw data of Fig. a) and Fig. d) were from Shen et al^[22], Fig. b) and Fig. e) were from Wang et al^[23] and Fig. c) and Fig. f) were from Pan et al^[24]. In Fig. a) and Fig. d), CK represents non-fumigated treatment, CKB represents non-fumigated and biofertilizer applied treatment, CKM represents non-fumigated and cow manure applied treatment, AF represents ammonia fumigated treatment, AFB represents fumigated and biofertilizer applied treatment, AFM represents fumigated and cow manure applied treatment; In Figs. b) and Figs. e), CK represents no planted treatment, C represents wheat and maize rotation treatment, CF represents wheat and maize rotation treatment with chemical fertilization, OF represents wheat and maize rotation treatment with organic fertilization; In Figs. c) and Fig. f), Con represents no inhibitor, Bro2 represents $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ bronopol, Bro10 represents $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ bronopol, Stre2 represents $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ streptomycin, Stre10 represents $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ streptomycin, Cyc2 represents $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ cycloheximide, Cyc10 represents $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ cycloheximide, Cap2 represents $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ captan, Cap10 represents $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ captan. All the top 10 phyla in relative abundance in each treatment of the three pieces of literature were presented in the Figs, and the rest of the phyla were classified into Other. The same treatments below.

图 1 土壤原核微生物 (a、b 和 c) 和真菌 (d、e 和 f) 群落结构主要门水平的相对丰度和绝对含量

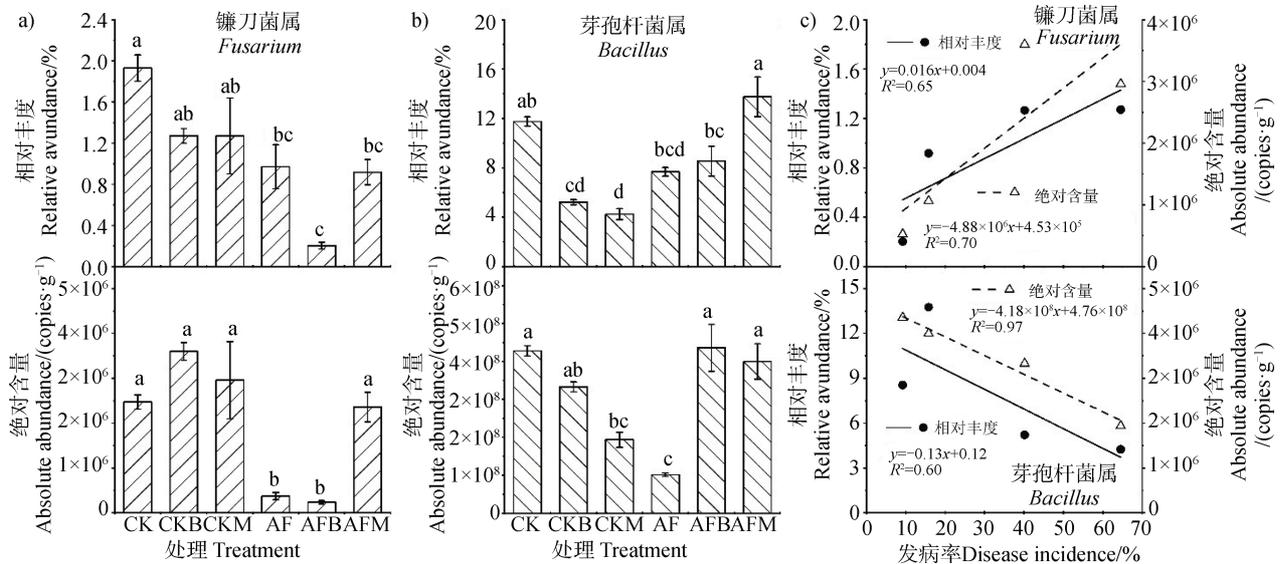
Fig. 1 The relative and absolute abundances of Prokaryotic (a, b and c) and fungal (d, e and f) communities at the phylum level in soil

Bro10, $16.15\% \pm 4.62\%$) 和对照相比 (Con, $5.94\% \pm 1.75\%$) 均有了大幅度提高, 但其绝对含量由 $(7.53 \pm 2.22) \times 10^9$ copies·g⁻¹ (Con) 下降至 $(6.17 \pm 1.65) \times 10^8$ copies·g⁻¹ (Bro2) 和 $(3.74 \pm 1.07) \times 10^7$ copies·g⁻¹ (Bro10), 有着数量级上的减少。对于真菌的子囊菌门, 添加链霉素 (Streptomycin) 后其相对丰度略微下降 (Con, $50.05\% \pm 15.06\%$; Stre2, $45.80\% \pm 13.29\%$; Stre10, $47.92\% \pm 8.24\%$), 但绝对含量却由 $(4.31 \pm 1.30) \times 10^5$ copies·g⁻¹ 分别上升至 $(4.49 \pm 1.30) \times 10^5$ copies·g⁻¹ (Stre2) 和 $(1.80 \pm 0.31) \times 10^6$ copies·g⁻¹ (Stre10)。

相对丰度和绝对含量相反的趋势不仅出现在门水平, 在属水平上也有类似现象。如沙地农业生态系统研究中, 镰刀菌属的相对丰度在轮作和施肥处理下降低, 从 $16.66\% \pm 12.87\%$ (CK) 降低至 $3.08\% \pm 0.30\%$ (CF); 但轮作后土壤中镰刀菌属的绝对含量却由 $(1.00 \pm 0.79) \times 10^5$ copies·g⁻¹ (CK) 上升至最高的 $(3.34 \pm 0.33) \times 10^6$ copies·g⁻¹ (CF)。土壤微生物抑制剂作用的研究中属于厚壁菌门的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 对溴硝醇的反应最大, 施加 $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的溴硝醇后, 芽孢杆菌属在原核微生物中的相对丰度由 $1.78\% \pm 0.40\%$ (Con) 上升至 $9.42\% \pm 2.28\%$ (Bro2), 增长了 5.3 倍, 但其绝对含量却由 $(2.25 \pm 0.51) \times 10^9$ copies·g⁻¹ 下降至 $(1.34 \pm 0.33) \times 10^8$

copies·g⁻¹, 增加了一个数量级。

此外, 在香蕉萎蔫病发病研究中, 绝对含量相比于相对丰度可以揭示出更多的现象。通过对病害有关的真菌子囊菌门镰刀菌属 (*Fusarium*) 和细菌厚壁菌门芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 进一步分析后发现 (图 2a 和图 2b), 氨熏蒸处理中 (AF), 镰刀菌属的绝对含量和相对丰度均较 CK 处理有显著降低 ($P < 0.05$); 芽孢杆菌属绝对含量显著降低 ($P < 0.05$), 其相对丰度有所降低但并不显著 ($P < 0.05$)。在氨熏蒸基础上施加肥料后与 AF 处理相比, 施加生物肥料处理 (AFB) 中镰刀菌属的相对丰度和绝对含量均呈下降趋势, 而在施加牛粪堆肥处理 (AFM) 中其相对丰度没有显著变化, 但绝对含量显著上升 ($P < 0.05$); 芽孢杆菌属在两种肥料作用下, 其相对丰度和绝对含量皆呈上升趋势, 相对丰度在 AFM 和 AFB 处理下均显著增加 ($P < 0.05$)。进一步将发病率与这两个属的相对丰度和绝对含量进行线性回归分析发现 (图 2c), 无论相对丰度还是绝对含量, 随着镰刀菌属的增加和芽孢杆菌属的减少, 香蕉土传萎蔫病的发病率增加。但是镰刀菌属、芽孢杆菌属的绝对含量与发病率的关系更紧密, 其绝对含量与发病率的相关系数 (R^2) 分别达到 0.70 和 0.97, 而相对丰度与发病率的相关系数 (R^2) 较低, 分别为 0.65 和 0.60。



注: 不同小写字母表示处理间差异显著。Note: Different lowercase letters mean significant differences between treatments.

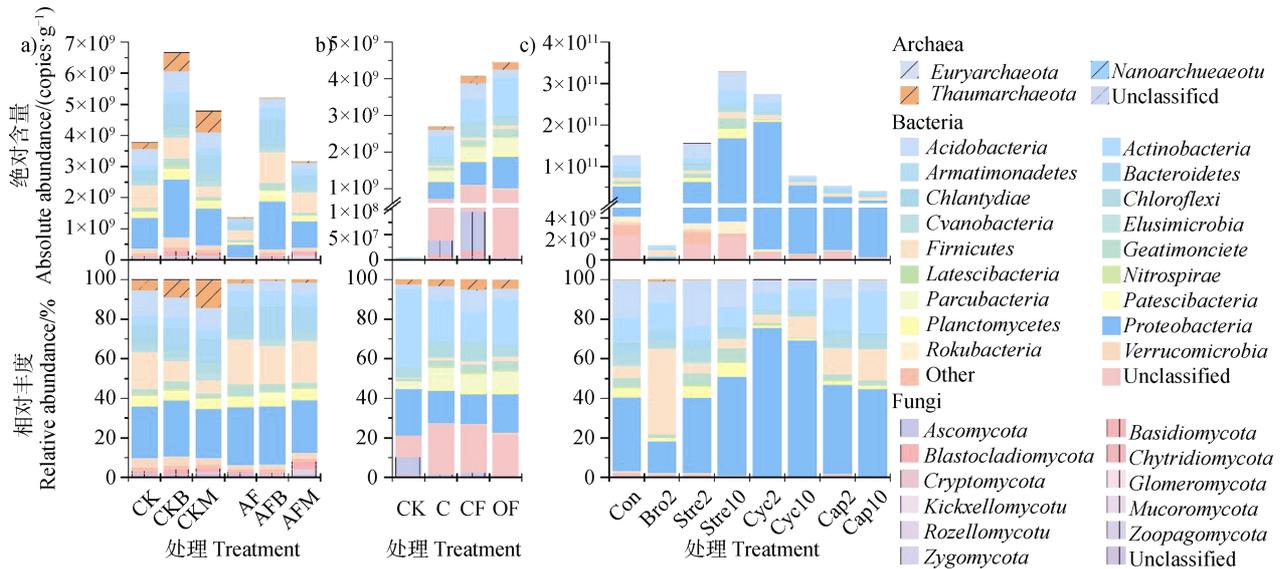
图 2 香蕉土传病害研究中镰刀菌属 (a) 和芽孢杆菌属 (b) 的相对丰度和绝对含量与土传病害发病率的相关关系 (c)
 Fig. 2 The relative and absolute abundances of *Fusarium* (a) and *Bacillus* (b) and their correlation with the disease incidence (c) under the research of banana panama disease

2.1.2 三域微生物绝对含量与相对丰度 通过上述所计算得到古菌、细菌和真菌的绝对含量,进一步计算得到三域微生物的绝对含量和相对丰度(图 3),其中细菌在土壤三域微生物群落结构中占据主导地位,不同处理中古菌和真菌的占比不同。在香蕉土传病害微生物群落结构研究中,细菌在土壤微生物中占据 90.34%±6.00%,古菌和真菌共占据了 9.66%±6.00%(图 3a)。在未经熏蒸的处理中,古菌和真菌随着肥料添加不仅其绝对含量增加,相对丰度在所有微生物的占比也明显增加,在 CKM 处理中古菌相对丰度占比增加至 14.80%±1.60%,而细菌的相对丰度却有所下降。而土壤经过熏蒸之后,相较于 CK 处理,虽然真菌的绝对含量明显下降,但相对丰度无明显下降;在熏蒸并施加牛粪堆肥处理中真菌不仅绝对含量增加且相对丰度也明显增加,与 AF 处理相比较相对丰度增加了近 2.5 倍。在三域微生物门水平上,CKM 中古菌奇古菌门的相对丰度高达 14.79%±1.60%,仅次于细菌变形菌门,成为该样本中占比第二高的微生物门。虽然熏蒸后土壤中三域微生物门水平的绝对含量下降,但仍有 11 个门的相对丰度占比增加,其中占比增加最多的是细菌放线菌门和拟杆菌门,分别从 4.41%±0.08%和 6.50%±0.19% 增加近两倍至 8.27%±0.23%和 12.97%±0.76%。

沙地土壤在经过小麦和玉米 17 年轮作后,土壤三域微生物的总量均明显增加(图 3b),从未种植的 $(5.59 \pm 0.20) \times 10^6$ copies g^{-1} 增加至轮作加有机肥(OF)的 $(4.46 \pm 0.077) \times 10^9$ copies g^{-1} ,增加了三个数量级。经过轮作和施肥处理,真菌的绝对含量从未耕作处理(CK)的 $(5.72 \pm 0.045) \times 10^5$ copies g^{-1} 最多增加至轮作后加化肥(CF)的 $(3.80 \pm 0.039) \times 10^7$ copies g^{-1} ,增加了 66.5 倍。但是未耕作处理(CK)中真菌在微生物群落中的相对丰度最高,达到 10.25%±0.32%,而经过轮作后(C)其相对丰度出现了极大的下降,仅剩 1.41%±0.04%。而古菌的变化与真菌不同,随着轮作及肥料的施入其绝对含量和相对丰度均增加,从未耕作处理的 $(1.37 \pm 0.21) \times 10^5$ copies g^{-1} 和 2.47%±0.45% 分别最多增加至轮作加化肥处理的 $(2.24 \pm 0.60) \times 10^8$ copies g^{-1} 和 5.51%±1.55%。细菌的变化与古菌相似,均随着轮作及肥料的施入其绝对含量和相对丰度有所增加。

在门水平上,古菌奇古菌门的绝对含量和相对丰度分别从未耕作处理(CK)的 $(1.37 \pm 0.21) \times 10^5$ copies g^{-1} 和 2.47%±0.45% 最多增加至轮作后加化肥的(CF) $(1.96 \pm 0.30) \times 10^8$ copies g^{-1} 和 4.80%±0.81%;细菌放线菌门的绝对含量虽然从轮作前(CK)的 $(2.20 \pm 0.049) \times 10^6$ copies g^{-1} 增加了近两个数量级至轮作后(C)的 $(5.71 \pm 0.74) \times 10^8$ copies g^{-1} ,但轮作后其相对丰度在微生物中占比由 39.48%±1.84% 降至 21.27%±3.47%;在轮作施加化肥的影响下,真菌子囊菌门也有相同趋势,占比由 9.00%±0.45%(CK) 降至 1.97%±0.06%(CF),但绝对含量却从 $(5.03 \pm 0.23) \times 10^5$ copies g^{-1} 升至 $(8.06 \pm 0.22) \times 10^7$ copies g^{-1} 。

在探究 4 种微生物抑制剂对土壤微生物影响的研究中,不同抑制剂对土壤微生物的影响不同(图 3c)。在 2 mg g^{-1} 溴硝醇的处理下(Bro2),三域微生物的绝对含量发生明显变化,由对照处理的 $(1.27 \pm 0.11) \times 10^{11}$ copies g^{-1} (Con) 降至 $(1.42 \pm 0.053) \times 10^9$ copies g^{-1} ,各域微生物的绝对含量也降低。但相对丰度上,真菌和古菌的占比却从 0.00068%±0.000015% 和 0.17%±0.096% 分别增长了近 34 倍和 5.8 倍至 0.023%±0.0061% 和 0.97%±0.51%。施加链霉素(Stre)反而使微生物绝对含量增加,且随链霉素施加浓度的增高而增加,在施加了 10 mg g^{-1} 链霉素的处理中,微生物绝对含量总量从 $(1.56 \pm 0.14) \times 10^{11}$ copies g^{-1} (Stre2) 增至 $(3.29 \pm 0.25) \times 10^{11}$ copies g^{-1} (Stre10),相较于对照处理增长了近三倍。门水平上,虽然溴硝醇(Bro2)使所有门的微生物绝对含量明显下降,但是其中细菌厚壁菌门的相对丰度却从 5.94%±1.75%(Con) 上升 7 倍至 41.37%±15.65%(Bro2),使厚壁菌门成为 Bro2 处理土壤三域微生物中优势度最高的菌门;施加克菌丹后,细菌变形菌门的绝对含量由 $(4.74 \pm 0.35) \times 10^{10}$ copies g^{-1} (Con) 降至 $(2.41 \pm 0.19) \times 10^{10}$ copies g^{-1} (Cap2) 和 $(1.80 \pm 0.19) \times 10^{10}$ copies g^{-1} (Cap10),但其相对丰度却从 37.72%±2.75% 增至 44.99%±3.45% 和 43.98%±4.58%。由此可见,溴硝醇的抑菌效果最好,克菌丹次之,不同放线菌酮浓度的效果则有促进也有抑制,而链霉素几乎没有抑菌效果反而促进了微生物的生长。



注：图 a)、b)、c) 的原始数据分别取自 Shen 等^[22]、Wang 等^[23]和 Pan 等^[24]。Note: The raw data of Figs. a), b) and c) were from Shen et al^[22], Wang et al^[23] and Pan et al^[24].

图 3 土壤三域微生物门水平绝对含量和相对丰度

Fig. 3 The absolute and relative abundances of three-domain microorganisms at the phylum level in the soil

2.2 三域微生物 α 多样性

基于绝对含量对古菌、细菌、真菌和三域微生物计算了 α 多样性指数 (表 1)。三项研究所有处理中的细菌 α 多样性指数均显著高于古菌和真菌 ($P < 0.05$), 而三域微生物的 α 多样性指数均与细菌没有显著区别, 具体如下:

在香蕉土传病害的土壤三域微生物研究中, 与对照相比, 其他处理古菌的香浓指数 (Shannon index) 和辛普森指数 (Simpson index) 与真菌的香浓指数均显著下降 ($P < 0.05$); 真菌的辛普森指数只有经过氯仿熏蒸处理后才显著下降 ($P < 0.05$); 细菌的香浓指数和辛普森指数变化均不显著; 三域微生物的香浓指数虽然随着处理而降低, 但是并未达到显著水平, 辛普森指数只有在未经熏蒸土壤施加牛粪堆肥处理 (CKM) 中显著降低。

在沙地土壤经过农业生态系统再造的研究中, 随着实验处理的加入, 细菌和三域微生物的香浓指数和辛普森指数均显著 ($P < 0.05$) 增加; 而真菌的 α 多样性指数仅在轮作 (C) 中有显著增加 ($P < 0.05$), 在其他实验处理中未有显著变化; 古菌微生物群落的多样性指数虽然在实验处理后有所增加但并不显著。

在微生物抑制剂的研究中, 不同微生物多样性受不同抑制剂的影响不同 (表 1)。施用溴硝醇的处理中, 古菌群落的香浓指数显著增加 ($P < 0.05$), 且随着溴硝醇的施用浓度的增加而增加, 但增加并不显著。而真菌群落丰富度和均匀度却出现了显著降低, 且在施用 $10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 溴硝醇时, 真菌未检出。施用链霉素后并未对三域、细菌和真菌微生物群落多样性造成显著影响, 古菌的香浓指数在施用浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 时显著下降 ($P < 0.05$), 当施用浓度增加为 $10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, 古菌群落仅检出 1 个 OTU, 使其香浓指数和辛普森指数均为 0。放线菌酮的施用对原核生物群落多样性有较大的影响, 不仅古菌群落只检测出 1 个 OTU, 而且细菌群落丰富度和均匀度均显著下降, 只有在 $2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 放线菌酮添加下的真菌群落的香浓和辛普森指数有所增加, 但增加并不显著。此外, 该抑制剂是 3 种抑制剂中唯一一种对三域微生物群落 α 多样性产生了显著影响, 使三域微生物的香浓和辛普森指数显著降低 ($P < 0.05$) 而克菌丹使古菌、细菌的香浓指数降低且真菌的香浓指数增加, 但是其对不同域微生物香浓指数和三域微生物 α 多样性的影响不显著。

表 1 土壤古菌、细菌、真菌和三域微生物 α 多样性指数

土壤	处理	古菌						细菌						真菌						三域微生物							
		Archaea		Bacteria		Fungi		Three-domain microorganisms		Archaea		Bacteria		Fungi		Three-domain microorganisms		Archaea		Bacteria		Fungi		Three-domain microorganisms			
		Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson		
香蕉萎蔫病 研究中土壤	CK	2.305 ± 0.087 a	0.828 ± 0.017 a	5.888 ± 0.093 ab	0.990 ± 0.000 ab	4.950 ± 0.109 a	0.978 ± 0.005 a	6.020 ± 0.086 a	0.991 ± 0.000 ab	6.096 ± 0.173 a	0.994 ± 0.001 a	5.697 ± 0.2371 a	0.984 ± 0.003 b	5.842 ± 0.201 a	0.993 ± 0.001 a	5.913 ± 0.109 a	0.994 ± 0.001 a	5.547 ± 0.420 a	0.987 ± 0.007 ab	5.882 ± 0.090 b	0.988 ± 0.002 b	6.619 ± 0.147 a	0.996 ± 0.001 a	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a
	CKB	1.446 ± 0.027 c	0.543 ± 0.001 d	6.103 ± 0.165 a	0.997 ± 0.001 a	4.591 ± 0.080 b	0.973 ± 0.002 ab	6.096 ± 0.173 a	0.994 ± 0.001 a	5.697 ± 0.2371 a	0.984 ± 0.003 b	5.842 ± 0.201 a	0.993 ± 0.001 a	5.913 ± 0.109 a	0.994 ± 0.001 a	5.547 ± 0.420 a	0.987 ± 0.007 ab	5.882 ± 0.090 b	0.988 ± 0.002 b	6.619 ± 0.147 a	0.996 ± 0.001 a	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a		
	CKM	0.983 ± 0.023 d	0.385 ± 0.006 e	5.861 ± 0.216 ab	0.995 ± 0.002 a	4.540 ± 0.140 b	0.969 ± 0.006 abc	5.697 ± 0.2371 a	0.984 ± 0.003 b	5.842 ± 0.201 a	0.993 ± 0.001 a	5.913 ± 0.109 a	0.994 ± 0.001 a	5.547 ± 0.420 a	0.987 ± 0.007 ab	5.882 ± 0.090 b	0.988 ± 0.002 b	6.619 ± 0.147 a	0.996 ± 0.001 a	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a				
	AF	1.745 ± 0.018 b	0.782 ± 0.006 b	5.739 ± 0.206 ab	0.993 ± 0.001 ab	4.162 ± 0.177 c	0.957 ± 0.005 c	5.842 ± 0.201 a	0.993 ± 0.001 a	5.697 ± 0.2371 a	0.984 ± 0.003 b	5.842 ± 0.201 a	0.993 ± 0.001 a	5.913 ± 0.109 a	0.994 ± 0.001 a	5.547 ± 0.420 a	0.987 ± 0.007 ab	5.882 ± 0.090 b	0.988 ± 0.002 b	6.619 ± 0.147 a	0.996 ± 0.001 a	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a		
	AFB	1.002 ± 0.003 d	0.603 ± 0.006 c	5.828 ± 0.113 ab	0.994 ± 0.001 ab	4.531 ± 0.1165 b	0.963 ± 0.005 bc	5.913 ± 0.109 a	0.994 ± 0.001 a	5.547 ± 0.420 a	0.987 ± 0.007 ab	5.882 ± 0.090 b	0.988 ± 0.002 b	6.619 ± 0.147 a	0.996 ± 0.001 a	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a								
	AFM	1.480 ± 0.128 c	0.759 ± 0.032 b	5.334 ± 0.449 b	0.985 ± 0.009 b	4.244 ± 0.170 bc	0.961 ± 0.010 bc	5.547 ± 0.420 a	0.987 ± 0.007 ab	5.882 ± 0.090 b	0.988 ± 0.002 b	6.619 ± 0.147 a	0.996 ± 0.001 a	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a										
再造沙地农业 生态系统中土壤	CK	1.556 ± 0.116 a	0.671 ± 0.052 a	5.863 ± 0.106 b	0.988 ± 0.003 b	2.730 ± 0.327 b	0.838 ± 0.059 b	5.882 ± 0.090 b	0.988 ± 0.003 b	2.730 ± 0.327 b	0.838 ± 0.059 b	5.882 ± 0.090 b	0.988 ± 0.002 b	6.619 ± 0.147 a	0.996 ± 0.001 a	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a								
	C	1.722 ± 0.056 a	0.755 ± 0.017 a	6.588 ± 0.149 a	0.996 ± 0.001 a	3.548 ± 0.072 a	0.936 ± 0.005 a	6.619 ± 0.147 a	0.996 ± 0.001 a	3.548 ± 0.072 a	0.936 ± 0.005 a	6.619 ± 0.147 a	0.996 ± 0.001 a	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a										
	CF	1.677 ± 0.120 a	0.729 ± 0.023 a	6.522 ± 0.071 a	0.996 ± 0.000 a	3.183 ± 0.077 ab	0.879 ± 0.017 ab	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	3.183 ± 0.077 ab	0.879 ± 0.017 ab	6.556 ± 0.068 a	0.996 ± 0.000 a	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a												
agricultural ecosystem	OF	1.773 ± 0.139 a	0.751 ± 0.029 a	6.460 ± 0.093 a	0.995 ± 0.001 a	2.770 ± 0.180 b	0.831 ± 0.050 b	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a	2.770 ± 0.180 b	0.831 ± 0.050 b	6.463 ± 0.094 a	0.995 ± 0.001 a														
	Con	0.224 ± 0.389 b	0.160 ± 0.277 a	5.966 ± 0.142 abc	0.996 ± 0.001 a	2.970 ± 0.237 a	0.863 ± 0.057 a	5.968 ± 0.140 a	0.996 ± 0.001 a	2.970 ± 0.237 a	0.863 ± 0.057 a	5.968 ± 0.140 a	0.996 ± 0.001 a														
	Bro2	1.500 ± 0.216 a	0.749 ± 0.048 a	6.038 ± 0.135 ab	0.996 ± 0.001 a	0.234 ± 0.127 b	0.098 ± 0.065 b	6.066 ± 0.189 a	0.996 ± 0.001 a	0.234 ± 0.127 b	0.098 ± 0.065 b	6.066 ± 0.189 a	0.996 ± 0.001 a														
微生物抑制剂 研究中土壤	Bro10	1.892 ± 0.351 a	0.827 ± 0.054 a	6.290 ± 0.062 a	0.997 ± 0.000 a	/	/	/	0.997 ± 0.000 a	/	/	/															
	Stre2	0.431 ± 0.375 b	0.303 ± 0.265 a	5.991 ± 0.135 ab	0.997 ± 0.000 a	2.804 ± 0.871 a	0.822 ± 0.167 a	5.994 ± 0.135 a	0.997 ± 0.000 a	2.804 ± 0.871 a	0.822 ± 0.167 a	5.994 ± 0.135 a	0.997 ± 0.000 a														
	Stre10	0	0	5.381 ± 0.047 cd	0.989 ± 0.001 a	2.635 ± 0.359 a	0.833 ± 0.063 a	5.382 ± 0.047 a	0.989 ± 0.001 a	2.635 ± 0.359 a	0.833 ± 0.063 a	5.382 ± 0.047 a	0.989 ± 0.001 a														
The soil under impacts of the microbial inhibitor	Cyc2	0	0	4.185 ± 0.507 e	0.947 ± 0.026 b	3.672 ± 0.144 a	0.929 ± 0.004 a	4.186 ± 0.508 b	0.947 ± 0.026 b	3.672 ± 0.144 a	0.929 ± 0.004 a	4.186 ± 0.508 b	0.947 ± 0.026 b														
	Cyc10	0	0	4.250 ± 0.010 e	0.956 ± 0.003 b	2.454 ± 0.753 a	0.692 ± 0.155 a	4.251 ± 0.009 b	0.956 ± 0.003 b	2.454 ± 0.753 a	0.692 ± 0.155 a	4.251 ± 0.009 b	0.956 ± 0.003 b														
	Cap2	0.215 ± 0.373 b	0.151 ± 0.262 a	5.502 ± 0.193 bcd	0.990 ± 0.005 a	3.723 ± 0.264 a	0.935 ± 0.008 a	5.603 ± 0.134 a	0.993 ± 0.000 a	3.723 ± 0.264 a	0.935 ± 0.008 a	5.603 ± 0.134 a	0.993 ± 0.000 a														
Cap10	0.185 ± 0.320 b	0.123 ± 0.213 a	5.365 ± 0.180 d	0.990 ± 0.003 a	3.239 ± 0.734 a	0.845 ± 0.102 a	5.368 ± 0.180 a	0.990 ± 0.003 a	3.239 ± 0.734 a	0.845 ± 0.102 a	5.368 ± 0.180 a	0.990 ± 0.003 a															

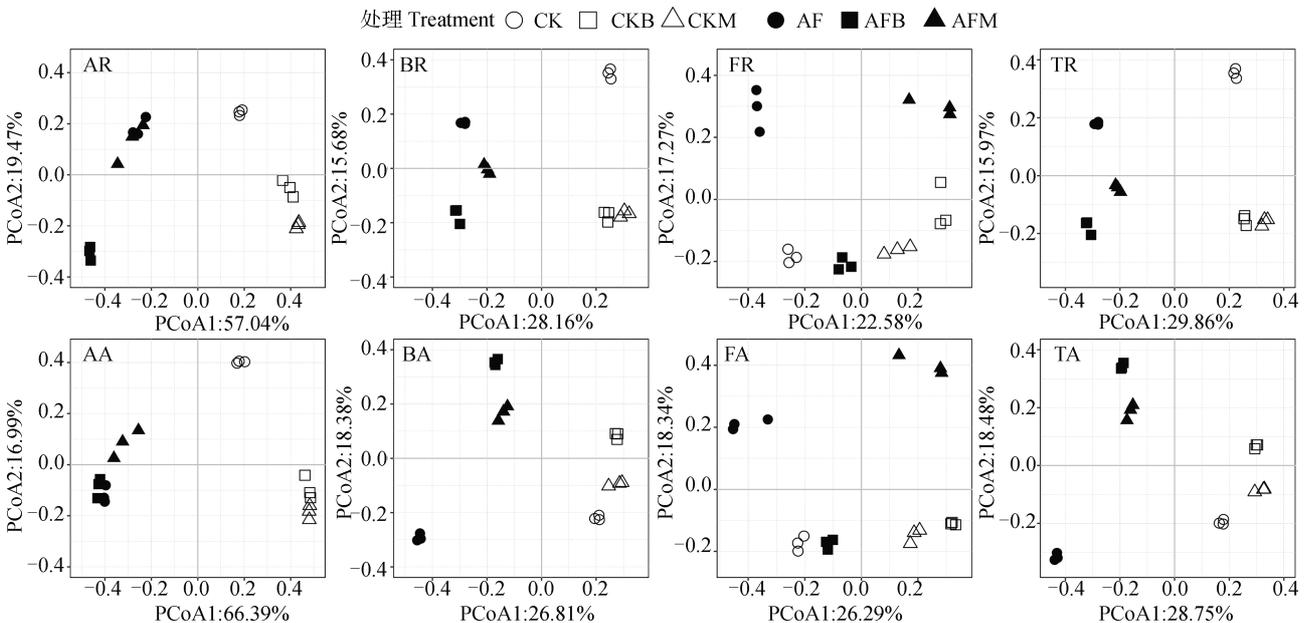
注: 不同小写字母表示处理间差异显著。Bro10 真菌测序未得到结果, 故真菌和三域微生物 α 多样性指数用 “/” 表示。Note: Different lowercase letters mean significant differences between treatments. The eukaryote sequencing result of treatment Bro10 was failed, so the α diversity indices of fungi and three domain microorganisms were expressed as “/”.

2.3 三域微生物 β 多样性

通过香蕉土传病害 OTU 水平相对丰度和绝对含量数据对古菌、细菌、真菌以及三域微生物进行 PCoA 分析, 两种数据所得的 PCoA 结果有所不同 (图 4), 古菌、细菌和三域微生物的结果受到熏蒸的影响均分在坐标系两侧, 但是各处理的分布及其相互距离有所不同, 同时不同域微生物的绝对含量和相对丰度 PCoA 结果也有所不同。例如, 在细菌中, 无论相对丰度还是绝对含量的 PCoA 结果, 熏蒸后的所有处理均分布在 PCoA1=0 的左侧, 未经熏蒸的均分布在右侧; 但在相对丰度的 PCoA 结果中经过熏蒸的处理分布相对于未熏蒸的更为紧密, 而绝对含量的 PCoA 结果与之相反。在真菌中, 相对丰度和绝对含量的分析结果与其他微生物的结果较为不同, 未明显受到熏蒸处理的影响, 熏蒸后且施加生物肥料处理的微生物群落结构与对照处理的最为相似, 未熏蒸且施加肥料的两个处理分布较近, 而熏蒸后和熏蒸且施加牛粪堆肥处理的微生物群落

与其他处理的相似度较低, 各自分布在第一和四象限中。三域微生物的 PCoA 分析结果大致上与细菌相同, 只是不同处理间的距离略有差别。此外, 除了个别处理分布的位置在绝对含量和相对丰度之间有区别外, 通过绝对含量的计算, 古菌、细菌、真菌和三域微生物的 PCoA 解释度增大, 从 76.51%、44.63%、39.79% 和 45.83% 分别增加至 83.38%、45.19%、44.63% 和 47.23%。

再造沙地农业生态系统的 PCoA 分析结果 (图 5) 与香蕉土传病害的较为相似, 古菌、细菌和三域微生物的结果受到处理的影响均分在坐标系两侧, 对照处理均分布在 PCoA1 的左侧, 而其他处理基本均分布在右侧。同时古菌、细菌和三域微生物的绝对含量和相对丰度 PCoA 结果也有所不同, 在绝对含量的结果中, C、CF 和 OF 的群落结构在 PCoA1 轴上基本无差别, 分布在 PCoA1=0.2~0.3 之间, 仅在 PCoA2 轴上有较大的区别, 且分布次序从上往下均为 OF、CF 和 C。而对于真菌, 绝对含量和相对丰



注: AR、AA 分别表示基于古菌的相对丰度、绝对含量进行分析, BR、BA 分别表示基于细菌的相对丰度、绝对含量进行分析, FR、FA 分别表示基于真菌的相对丰度、绝对含量进行分析, TR、TA 分别表示基于三域微生物的相对丰度、绝对含量进行分析。下同。Note: AR and AA represent the analyses were performed based on the relative and absolute abundances of Archaea, respectively. BR and BA represent the analyses that were performed based on the relative and absolute abundances of Bacteria, respectively. FR and FA represent the analyses that were performed based on the relative and absolute abundances of Fungi, respectively. TR and TA represent the analyses that were performed based on the relative and absolute abundances of three-domain microorganisms, respectively. The same below.

图 4 香蕉萎焉病研究中土壤古菌、细菌、真菌和三域微生物 OTU 水平的相对丰度和绝对含量的主坐标分析 (PCoA)

Fig. 4 Principal coordinate analysis (PCoA) of archaea, bacteria, fungi and three-domain microorganisms communities based on their relative and absolute abundances at the OTU level in the soil under the research of banana panama disease

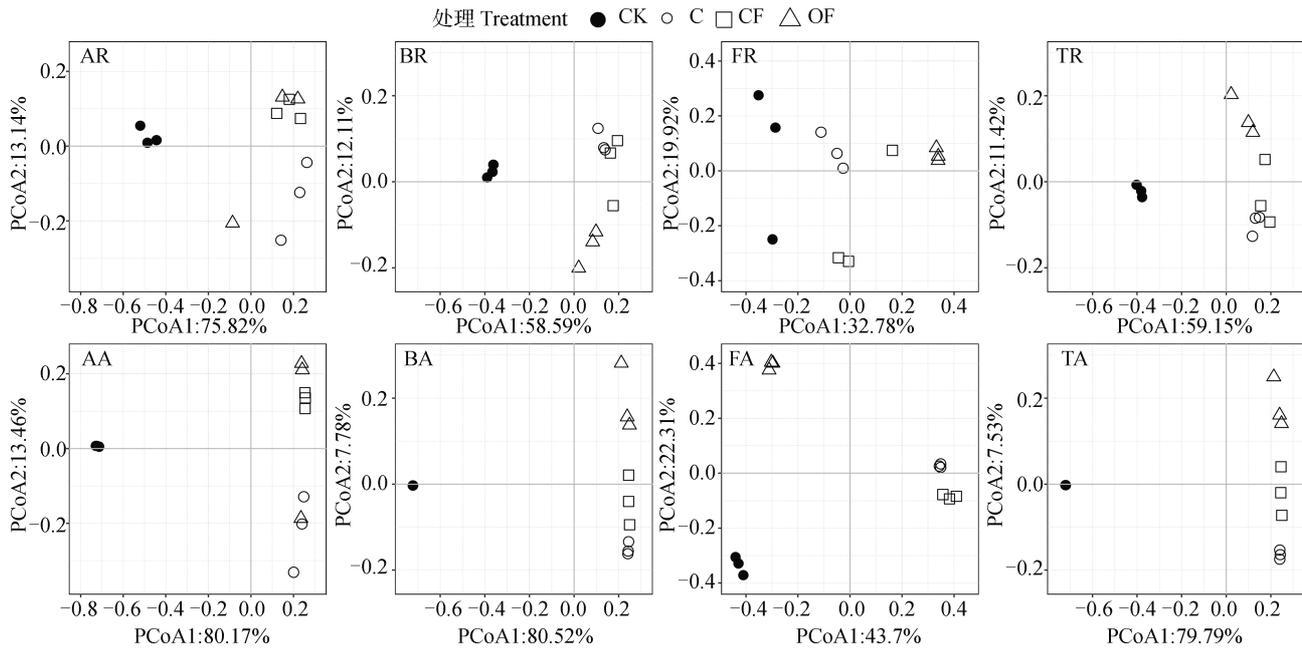


图 5 再造沙地农业生态系统研究中土壤古菌、细菌、真菌和三域微生物 OTU 水平的相对丰度和绝对含量的主坐标分析 (PCoA)

Fig. 5 Principal coordinate analysis (PCoA) of archaea, bacteria, fungi and three-domain microorganisms communities based on their relative and absolute abundances at the OTU level in the soil of the reclaimed sandy agricultural ecosystem

度 PCoA 分析结果的差异要更为明显, 与相对丰度的分析结果比较, 绝对含量分析结果中各处理内部距离更近而各处理间的距离更远。对三域微生物而言, 通过相对丰度 PCoA 分析的结果与细菌的分析结果呈上下镜像颠倒, 但其绝对含量分析后的分布趋势则基本与细菌绝对含量分布趋势相同。在解释度上, 与香蕉土传病害 PCoA 的变化相似, 通过绝对含量分析的 PCoA1 解释度均有所提升。

由图 6 可见, 微生物抑制剂研究中土壤古菌相对丰度和绝对含量得到的 PCoA 结果呈对称分布, 其中 Stre10 与对照处理位置基本重合。细菌相对丰度分析结果中的处理大致可分为三组, 其中 Cyc2 与其他处理距离较远, 单独成一组; 而绝对含量分析结果中的处理大致可分为四组, 在相对丰度结果中与 Cap2 距离较为接近的 Bro2, 在此却单独成组, 与其他处理的距离最大。真菌相对丰度和绝对含量分析结果中各处理大致可分为三组, 只不过每个处理和每个组内内部样本的距离略有差别。而该研究中三域微生物群落结构的 PCoA 结果与上两个研究又存在区别, 相对丰度的 PCoA 结果与细菌较为类似, 但绝对含量的 PCoA 结果与细菌、真菌的差别较大, 尤为明显的是在细菌中与其他处理差距最大的

Bro2, 在三域微生物中与 Con、Stre2 和 Stre10 处理距离较为近成为一组。

3 讨论

在生态学研究, Molles^[33]提出生物群落物种的种类、绝对含量和相对丰度是描述群落结构的三个必备指标, 虽然高通量测序技术的应用快速拓展了微生物群落结构的研究, 但是目前高通量测序技术通常只能获得微生物群落的物种种类和相对丰度, 并不能获取群落中绝对含量的信息^[9-10], 而绝对含量指标在微生物群落结构及评价中的重要性越来越被研究人员所关注^[10-11, 34]。

分析结果表明, 绝对含量和相对丰度对微生物群落结构的评价结果存在一定差异, 出现了与先前研究报道的群落结构相对丰度和绝对含量变化趋势相反的现象^[9-10, 12, 35]。在再造沙地农业生态系统土壤微生物研究中, 在轮作且添加化肥处理后, 土壤中细菌放线菌门和真菌子囊菌门在其各自域的相对丰度出现了降低, 如果仅以此得出这两个菌门的数量发生降低, 则会得出在轮作且添加化肥的情况下不利于这两个门的菌的生长。而通过绝对含量的计

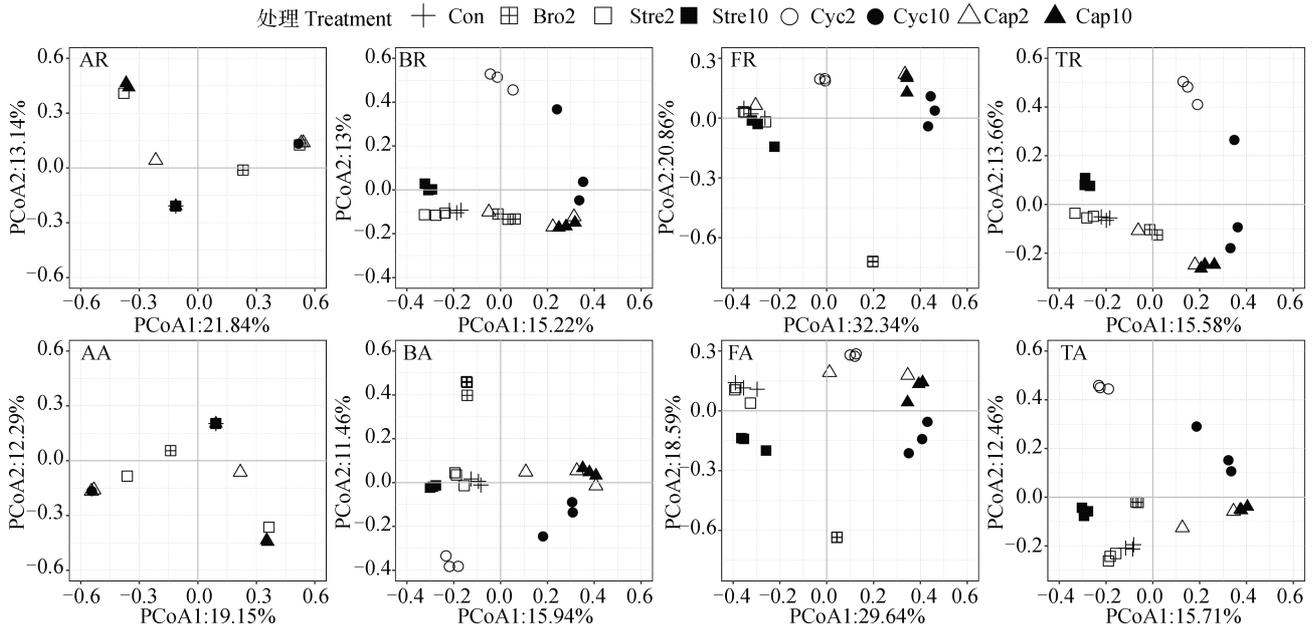


图6 微生物抑制剂研究中土壤古菌、细菌、真菌和三域微生物 OTU 水平基于相对丰度和绝对含量的主坐标分析 (PCoA)
Fig. 6 Principal coordinate analysis (PCoA) of archaea, bacteria, fungi and three-domain microorganisms communities based on their relative and absolute abundances at the OTU level in the soil under impacts of the microbial inhibitor

算,该处理下两个菌门的数量有了数量级上的增加,这样的结论也更符合添加肥料后微生物增加的常理。同样的现象也出现在微生物抑制剂影响的研究中,溴硝醇的使用使得细菌厚壁菌门的相对丰度增加了 7 倍,由此容易误解得出溴硝醇这类抑菌剂可促进厚壁菌门生长,但实际上在溴硝醇处理下其绝对含量下降。目前,也有越来越多的研究者发现了使用相对丰度评价微生物群落结构的固有限制^[36-39]。在生态学中,相对丰度主要用于描述某个物种在一个群落中的占比是丰富还是稀有的情况,而绝对含量则是真正描述某个物种数量多少的指标^[40]。也正因如此,在香蕉土传病害的研究中,子囊菌门镰刀菌属的绝对含量与发病率之间的相关系数高于相对丰度与发病率之间的相关系数,而镰刀菌属的数量被证明是与香蕉萎蔫病的发生有关^[22, 41],同时抑制萎蔫病发生的芽孢杆菌的绝对含量与发病率之间的相关系数亦高于相对丰度与发病率之间的相关系数。由此可见,在微生物群落结构评价中,相对丰度并不能代替绝对含量对整个群落及其变化进行评价,而绝对含量可以更好地表征群落中某个物种数量及不同样本间某个物种数量的变化^[34]。

但在评价单个样本微生物群落时,相对丰度指标具有绝对含量指标不能代替的作用。在香蕉土传病害的研究中,土壤经过氨熏蒸后,所有细菌门水

平上的微生物绝对含量有了明显的下降。但是通过相对丰度可以看出,放线菌门和厚壁菌门的相对丰度相对于 CK 处理而言有了明显的增加。由此可得,虽然氨熏蒸后微生物群落受到了极大的破坏,但是其中放线菌门和厚壁菌门相对于其他门的微生物更能抵御氨熏蒸的处理。类似结果在微生物抑制剂影响的研究中也有出现,土壤中真菌的子囊菌门在添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 放线菌酮后,绝对含量下降明显,但是其相对丰度却是唯一一个增加的门,子囊菌门相对于真菌其他菌门更能抵御放线菌酮的抑制。在未熏蒸且施加化肥和牛粪堆肥的处理中,虽然奇古菌门的绝对含量均在同一个数量级且没有明显差异,但是未熏蒸且施加牛粪堆肥的处理中,奇古菌门的相对丰度明显高于另一个处理。这些相对丰度不减反增或变化不大的微生物,对熏蒸剂有较大抗性,在土壤灭菌及相关农业生产管理中可进一步关注。由此可见,相对丰度和绝对含量这两个微生物群落结构的指标在评价中均各有优劣势,相对丰度更适合描述和评价微生物群落结构在单个样本内微生物之间的关系,而绝对含量更适于描述和评价微生物和群落结构真实的数量变化以及在样本间微生物之间的关系。

此外,通过古菌、细菌和真菌的绝对含量结果计算得到土壤三域微生物的绝对含量和相对丰度后

发现,土壤中有必要开展三域微生物群落结构整体评价的研究^[21]。在香蕉土传病害土壤微生物的研究中发现,各域微生物对不同肥料的偏好不同,细菌更偏好利用生物肥料,无论熏蒸与否细菌在添加生物肥料的土壤中均有着更高的相对丰度;而真菌则更偏好利用牛粪堆肥,在添加牛粪堆肥的土壤中相对丰度更高。在再造沙地农业生态系统的研究中,虽然经过轮作和施加化肥,真菌子囊菌门的含量增加了两个数量级,但是在三域微生物中,子囊菌门相对丰度的增加小于该处理下诸如古菌奇古菌门和细菌酸杆菌门等其他菌门的微生物,由此可见在三域微生物门水平的竞争中子囊菌门不占优势。而在微生物抑制剂研究中,施加 $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 溴硝醇的使细菌厚壁菌门的绝对含量下降,但相对丰度却增加了 7 倍左右,使厚壁菌门成为三域微生物中优势度最高的菌门,表明了在三域微生物中厚壁菌门相比于其他菌门对溴硝醇具有更强的抵抗作用。另从三域微生物绝对含量和相对丰度的结果中可以发现,在三项研究中细菌的物种种类和绝对含量均远高于古菌和真菌,与杨黎^[21]此前报导的结果一致。

基于古菌、细菌、真菌和三域微生物的绝对含量和相对丰度对微生物群落结构 α 多样性指数和 PCoA 的进一步分析结果表明,两种指标得到的 α 多样性指数结果相同,PCoA 则有所区别呈现出不同的聚类结果,这可能与计算方式有关。香浓和辛普森指数的计算过程只与物种数目和各物种所占比例有关^[42],在 iHAAQ 计算群落结构绝对含量过程中,并不会改变样本中的物种数目及其所占比例,因此得到的结果相同;而在 PCoA 计算中,会基于样本的 OTU 数据计算样本之间各个物种的距离矩阵^[43],在不同样本间乘以不同的 qPCR 值,得到的距离矩阵不同,致使最后的 PCoA 聚类结果不同。例如在再造沙地农业生态系统研究中,真菌的相对丰度和绝对含量的 PCoA 结果存在明显的区别,且绝对含量 PCoA 的解释度从相对含量的 52.70% 提升至 66.01%。同时,绝大多数 PCoA 的解释度通过绝对含量分析高于相对丰度,因此本研究认为这是由于在计算 PCoA 过程中绝对含量反映了各微生物的真实数量,使得更好的还原微生物群落结构的信息。除此之外,通过 PCoA 分析后发现,在香蕉土传病害和再造沙地农业生态系统研究中,三域微生物的 PCoA 结果和细菌的结果较为相似,可以表明在这

两项研究中三域微生物的群落结构主要受到细菌的影响。然而,在微生物抑制剂的研究中,三域微生物 PCoA 结果不与任何单类微生物的结果相似,仅仅研究古菌、细菌和真菌单类微生物并不能完整地反应土壤中三域微生物的群落结构。

通过 iHAAQ 方法不仅获取到生态学三要素之一的绝对含量,还能通过该要素进一步获取到三域微生物的绝对含量和相对丰度信息,可帮助研究人员更全面地观测微生物的群落结构。Lou 等^[10]建议,同一份 DNA 样品用同一引物进行高通量测序和 qPCR 测试分析,可避免不同提取方法、不同 DNA 试剂盒提取效率和不同引物扩增效率等差异带来的误差。但是,由于 iHAAQ 方法结合了高通量测序和 qPCR 定量技术,不可避免的也引入了这两个技术自身的缺陷,如 PCR 扩增的偏好性^[44]和核糖体基因多拷贝^[45-46]的问题。对于核糖体基因多拷贝的问题,RDP 数据库可以对已知完成基因组的细菌和古菌高通量测序群落数据进行多拷贝的矫正,但是对于真菌而言并没有多拷贝矫正的方法。于此同时,对于微生物(细菌、古菌或真菌)总量 qPCR 的测定更无法实现多拷贝的精准校正,目前只通过已知细菌基因组的数据获得一个经验平均值。但通过检索 NCBI 数据库发现,即便是同属不同种或同种不同菌株的微生物之间都存在着不同拷贝数的现象,如细菌的 *Acetobacter pasteurianus* (拷贝数 12 或 15, GenBank 登入号: NZ_CP039846.1 和 NZ_CP012111.1) 和 *Acetobacter acetii* (拷贝数 9, GenBank 登入号: NZ_AP023326.1), 古菌的 *Methanococcus maripaludis* C5 (拷贝数 10, GenBank 登入号: NC_009135.1) 和 *Methanococcus maripaludis* KA1 (拷贝数 7, GenBank 登入号: NZ_AP011526.1)。微生物高通量绝对定量分析的精度将随着这些问题的解决而提升,这有待于技术的进一步发展和数据库的进一步完善。

4 结论

通过整合高通量绝对定量法 iHAAQ 计算获得了古菌、细菌和真菌的绝对含量,绝对含量是微生物群落结构评价过程中和相对丰度一样不可缺少的评价指标。通过绝对含量发现了土壤中细菌的物种丰富度和绝对含量远高于古菌和真菌,在土壤微生物中占据主导地位。但是,绝对含量和相对丰度这

两个指标在评价过程中有着各自的优缺点，相对丰度更适合描述和评价微生物群落结构在单个样本内微生物之间的关系，而绝对含量更适于描述和评价微生物群落结构真实的数量变化以及在多个样本间微生物之间的关系。此外，通过三域微生物相对丰度计算和 PCoA 分析表明，同时研究土壤中古菌、细菌、真菌和三域微生物的群落结构，将具有重要的生态学意义。在未来的土壤微生物群落结构研究中，不仅有必要开展微生物群落物种种类、相对丰度和绝对含量三个必备指标的研究，更有必要开展对整体微生物的评价，从而更加深入、准确地认识土壤微生物的生态过程。

参考文献 (References)

- [1] Chu H Y, Feng M M, Liu X, et al. Soil microbial biogeography: Recent advances in China and research frontiers in the world[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57 (3): 515—529. [褚海燕, 冯毛毛, 柳旭, 等. 土壤微生物生物地理学: 国内进展与国际前沿[J]. *土壤学报*, 2020, 57 (3): 515—529.]
- [2] Liu B R, Jia G M, Chen J, et al. A review of methods for studying microbial diversity in soils[J]. *Pedosphere*, 2006, 16 (1): 18—24.
- [3] Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, et al. Methods of studying soil microbial diversity[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58 (2): 169—188.
- [4] Hu K, Wang L B. Application of BIOLOG microplate technique to the study of soil microbial ecology[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2007, 38(4): 819—821. [胡可, 王利宾. BIOLOG 微平板技术在土壤微生态研究中的应用[J]. *土壤通报*, 2007, 38 (4): 819—821.]
- [5] Petersen S O, Klug M J. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid Fatty Acid profile of a soil microbial community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(7): 2421—2430.
- [6] Theron J, Cloete T E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2000, 26 (1): 37—57.
- [7] Skovhus T L, Ramsing N B, Holmström C, et al. Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of *Pseudoalteromonas* species in marine samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2373—2382.
- [8] Nkongolo K K, Narendrula-Kotha R. Advances in monitoring soil microbial community dynamic and function[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2020, 61 (2): 249—263.
- [9] Yang L, Lou J, Wang H Z, et al. Use of an improved high-throughput absolute abundance quantification method to characterize soil bacterial community and dynamics[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 360—371.
- [10] Lou J, Yang L, Wang H Z, et al. Assessing soil bacterial community and dynamics by integrated high-throughput absolute abundance quantification[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e4514.
- [11] Jiang S Q, Yu Y N, Gao R W, et al. High-throughput absolute quantification sequencing reveals the effect of different fertilizer applications on bacterial community in a tomato cultivated coastal saline soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 687: 601—609.
- [12] Shi W C, Li M C, Wei G S, et al. The occurrence of potato common scab correlates with the community composition and function of the geocaulosphere soil microbiome[J]. *Microbiome*, 2019, 7 (1): 1—18.
- [13] Chen H Y, Zhu T, Li B, et al. The thermal response of soil microbial methanogenesis decreases in magnitude with changing temperature[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5733.
- [14] Chen X, Li W M, Liu Q. Bibliometric-based analysis of researches on soil microbes at home and abroad in the past 30 years[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57 (6): 1458—1470. [陈香, 李卫民, 刘勤. 基于文献计量的近 30 年国内外土壤微生物研究分析[J]. *土壤学报*, 2020, 57 (6): 1458—1470.]
- [15] Dannemiller K C, Lang-Yona N, Yamamoto N, et al. Combining real-time PCR and next-generation DNA sequencing to provide quantitative comparisons of fungal aerosol populations[J]. *Atmospheric Environment*, 2014, 84: 113—121.
- [16] Zhang Z J, Qu Y Y, Li S Z, et al. Soil bacterial quantification approaches coupling with relative abundances reflecting the changes of taxa[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 4837.
- [17] Wu C C, Jiang M Y, Hsieh L, et al. Feasibility of bioleaching of heavy metals from sediment with indigenous bacteria using agricultural sulfur soil conditioners[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 703: 134812.
- [18] Qiao W J, Jacome L A P, Tang X J, et al. Microbial communities associated with sustained anaerobic reductive dechlorination of alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane isomers to monochlorobenzene and benzene[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54 (1): 255—265.
- [19] Turlousse D M, Yoshiike S, Ohashi A, et al. Synthetic spike-in standards for high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45 (4): e23.
- [20] Smets W, Leff J W, Bradford M A, et al. A method for

- simultaneous measurement of soil bacterial abundances and community composition via 16S rRNA gene sequencing[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96: 145—151.
- [21] Yang L. The high-throughput absolute abundance quantification of soil microbial community and its applications[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018. [杨黎. 土壤微生物群落高通量绝对定量方法建立及其应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.]
- [22] Shen Z Z, Xue C, Penton C R, et al. Suppression of banana *Panama disease* induced by soil microbiome reconstruction through an integrated agricultural strategy[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 128: 164—174.
- [23] Wang Z R, Liu Y B, Zhao L N, et al. Change of soil microbial community under long-term fertilization in a reclaimed sandy agricultural ecosystem[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6497.
- [24] Pan Y S, Wu Y C, Li X Z, et al. Continuing impacts of selective inhibition on bacterial and fungal communities in an agricultural soil[J]. *Microbial Ecology*, 2019, 78 (4): 927—935.
- [25] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37 (8): 852—857.
- [26] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. *Nature Methods*, 2016, 13 (7): 581—583.
- [27] Pruesse E, Quast C, Knittel K, et al. Silva: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35 (21): 7188—7196.
- [28] Abarenkov K, Henrik Nilsson R, Larsson K H, et al. The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives[J]. *New Phytologist*, 2010, 186 (2): 281—285.
- [29] Epule E T, Bryant C R, Akkari C, et al. Can organic fertilizers set the pace for a greener arable agricultural revolution in Africa? Analysis, synthesis and way forward[J]. *Land Use Policy*, 2015, 47: 179—187.
- [30] Yu Y, Lee C, Hwang S. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method[J]. *Water Science and Technology*, 2005, 52 (1/2): 85—91.
- [31] Stevenson D M, Weimer P J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75 (1): 165—174.
- [32] Dixon P. Vegan, a package of R functions for community ecology[J]. *Journal of Vegetation Science*, 2003, 14 (6): 927—930.
- [33] Molles M C. *Ecology: Concepts and applications*[M]. McGraw-Hill Boston, 2005.
- [34] Barlow J T, Bogatyrev S R, Ismagilov R F. A quantitative sequencing framework for absolute abundance measurements of mucosal and luminal microbial communities[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2590.
- [35] Fu L, Penton C R, Ruan Y Z, et al. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium wilt* disease[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 104: 39—48.
- [36] Knight R, Vrbanac A, Taylor B C, et al. Best practices for analysing microbiomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16 (7): 410—422.
- [37] Gloor G B, Macklaim J M, Pawlowsky-Glahn V, et al. Microbiome datasets are compositional: And this is not optional[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2224.
- [38] Aitchison J. The statistical analysis of compositional data[J]. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B: Methodological*, 1982, 44 (2): 139—160.
- [39] Morton J T, Marotz C, Washburne A, et al. Establishing microbial composition measurement standards with reference frames[J]. *Nature Communications*, 2019, 10 (1): 2719.
- [40] Hubbell S P, Borda-De-água L. The unified neutral theory of biodiversity and biogeography: Reply[J]. *Ecology*, 2004, 85 (11): 3175—3178.
- [41] Ploetz R C. *Fusarium wilt* of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Phytopathology*, 2006, 96 (6): 653—656.
- [42] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43 (1): 1—11.
- [43] Minchin P R. An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination[J]. *Vegetatio*, 1987, 69 (1/3): 89—107.
- [44] Suzuki M T, Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 625—630.
- [45] Prokopowich C D, Gregory T R, Crease T J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes[J]. *Genome*, 2003, 46 (1): 48—50.
- [46] Sun D L, Jiang X, Wu Q L, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (19): 5962—5969.

(责任编辑: 檀满枝)