多样性激发的确定性细菌装配过程限制了群落功能



翻译：马腾飞 南京农业大学

导读

由于土壤微生物的复杂性和难培养性，长期以来人类对土壤微生物的多样性及其生态功能认识不深，只能用“黑箱”来概括。土壤微生物活动是实现土壤物质循环和养分转化的功能基础，不同的微生物具有不同的生态功能，因此土壤微生物群落的装配会影响土壤养分循环能力和生态系统生产力的高低，并关系到生态系统的稳定。该研究发现，土壤微生物群落中的“特异性”功能微生物多样性是决定群落装配过程的关键，也是维持微生物群落稳定的重要基础。所谓“特异性”功能，就是仅由少数微生物功能群“持有”的功能，如土壤氨氧化过程、有机污染物降解等功能。在土壤微生物群落装配初期，营养和空间位充足，微生物随机生长、繁殖、死亡，群落遵循随机装配过程。在群落装配后期，空间和营养条件受限，环境选择压力增加，仅在土壤微生物多样性较高、能够“持有”和“表达”更多“特异性”功能时，群落才能适应环境，维持随机生长、繁殖、死亡的随机性装配过程；相反，在土壤微生物多样性较低时，微生物类群趋向于“各自为战”，群落维持条件选择或者均一化选择的确定性装配过程。该研究提出“特异性”功能微生物多样性在影响土壤微生物群落装配过程和维持土壤生态系统服务功能中的重要作用，对破译土壤微生物多样性和系统生态功能之间的关系具有重要的科学意义。

正文

越来越多的证据表明,微生物α-diversity(固有物种丰富度)可能对生态系统功能有积极的作用。然而，很少有人注意到微生物β-diversity(固有微生物装配差异)。本文研究了微生物α-diversity对微生物群落装配的随机性/确定性过程（这与β-diversity有关）的影响以及对群落功能的影响。从DNA测序结果我们能够了解到细菌群落的α-diversity差异以及其结构和潜在功能的特点。系统发育零模型分析表明在高的微生物多样性条件下群落随机性装配过程占据主导地位。然而，在低的微生物多样性条件下群落确定性装配过程占据主导地位，这与土壤微生物群落中的“特异性”功能微生物的减少有关。总之，我们认为由低的微生物群落多样性引导的确定性群落装配过程也许限制了群落的功能，强调了“特异性”功能在微生物群落装配及产生和维持土壤生态系统功能的潜在作用。

微生物群落是陆地生态系统中最丰富的且占主导地位的有机体。微生物的活动极大地影响了生态系统的功能且有助于土壤生产力的提升、土壤元素循环以及许多其他的生态系统特征与服务功能。一个主要的普遍假设是，包含众多物种的生态系统具有高度的生态系统功能，并且功能稳定。这一预测假定物种重叠可以充分地为生态系统提供一些冗余和缓冲的功能，用以防止生物多样性的缺失。广泛的理论、实验以及对不同生态系统类型的观察研究证实高的生物系统多样性对于产生和维持生态系统功能和服务非常重要。因此生物多样性的急剧损失对生态系统的功能有不利的影响。然而，其他的一些研究生物多样性与生态系统功能关系的实验产生了混淆的结果。因此，尽管高水平的细菌多样性导致了这一假设即有些细菌在功能上是冗余的，但是我们对与多样性相关的细菌群落之间的相互作用是如何调节生态系统功能和群落装配知之甚少。

在不同的时空尺度上，人们对微生物多样性的各种驱动因素进行论文深入研究。环境调查表明，土壤细菌多样性受pH、土壤类型，纬度、植被湿度、温度和养分有效性的强烈影响。其中，土壤pH值是土壤细菌多样性和丰度的最佳预测因子，而土壤类型对土壤细菌组成有强烈的影响。虽然已经观察到生物多样性变化的一般模式，然而，控制这些模式的因素尚不清楚。一般来说，土壤微生物多样性和功能的产生被称为群落装配过程。微生物群落的装配反映了决定群落组成的时空过程的聚集，主要分为确定性过程和随机性过程。无论这两个过程中哪一个占优势，微生物群落的装配决定了物种的存在和丰富程度。

根据Wardle与Putten的理论，物种丰富度也是决定生态系统功能和这些物种身份的重要因素。因此群落装配过程必然会影响土壤微生物的多样性与组成以及下游系统的功能。Mori et al.最近指出β-多样性即两个地点或群落间的物种变化在生态系统多功能性的背景下尤为重要。然而相较于α多样性我们更少的关注β多样性。β多样性对于推断土壤微生物群落装配过程是随机性还是确定性是有用的。因此深入的了解土壤微生物β多样性和多样性与功能之间的联系将促使我们更好的理解生物多样性对功能过程的贡献。

在本研究中，我们建立了一个土壤微生物培养实验，即将不断稀释的土壤悬液接种到经过消毒和pH处理的土壤中用以阐明α多样性与群落装配过程（与β多样性相关的随机性/确定性过程）中不确定的关系以及评估装配过程在产生群落功能中的作用。通过DNA测序，我们对重组菌群的物种分类特征和潜在的群落功能特征进行了研究，发现减少的“特异性”功能主导了确定性的群落装配过程，这为破译微生物多样性与群落功能之间的联系奠定了基础。

结果

重新组装细菌群落的系统分类特征

稀释对重新装配细菌群落的组成及α多样性有显著的影响(Fig.1a,b和补充Fig.1)。与高的稀释水平有关的富集细菌组在门/纲（β-变形菌纲，γ-变形菌纲，拟杆菌门）中显著过表达（P-value < 0.001, one-way analysis of variance (ANOVA)），然而减少的细菌组大多属于酸杆菌门、放线菌门、硝化螺菌属和Delta-变形菌纲。细菌α-多样性，香浓多样性指数所表达的值在初始土壤中最大且随稀释梯度而下降（Fig.1b）。尽管接种到两种经pH修饰的土壤类型的悬液是相同的，但是细菌的α多样性在中性pH时达到最大值。然而，这些多样性指数在pH水平上的变化小于在稀释水平上的变化。基于Bray-Curtis距离的非度量多维标度(NMDS)的分析（Fig.1a）表明在横轴上，黑土样品与红土样品区分开来。此外，垂直轴上可以区分土壤pH梯度上的样品，在较高的稀释水平下，样品更加分散。

不同pH水平下基于丰度的加权UniFrac群落相异度分类显示黑土和红壤在更稀释处理下均表现出较大的差异（Fig.2a）表明了在更低的α多样性的群落中有更大的差异。两种土壤在每一稀释水平上都存在较大的差异（Fig.2b）, 尽管这些差异在相同pH水平的稀释样品中变得更小(补充Fig2)。

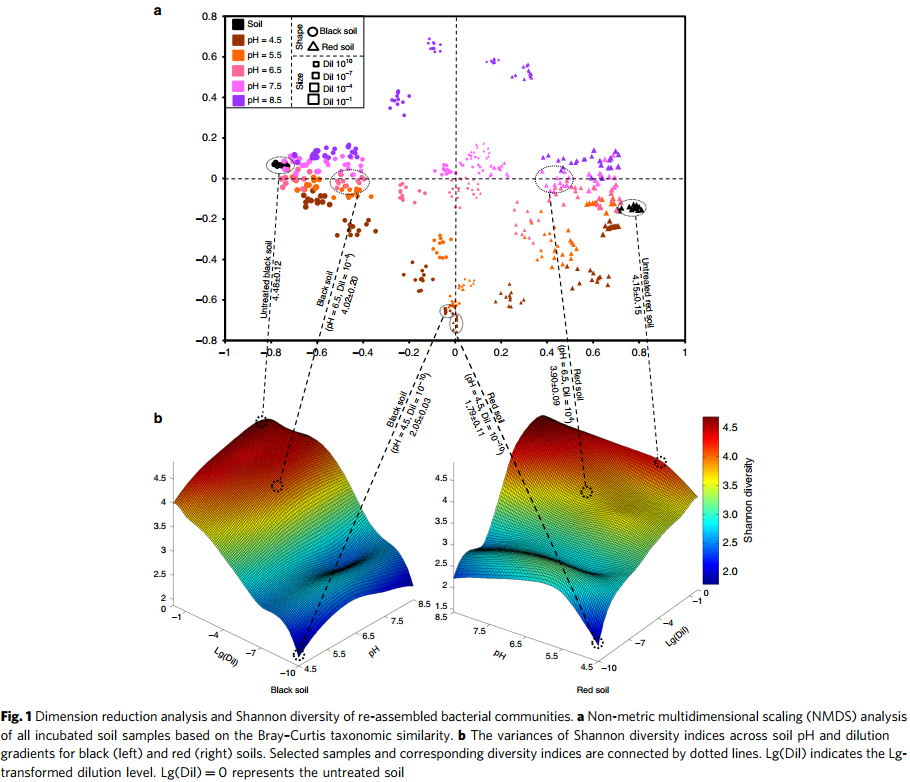


图1重组菌群的降维分析和香农多样性。

A: 基于Bray-Curtis距离物种分类相似性的所有培养土壤样品的非度量多维尺度分析(NMDS)；

B：黑(左)和红(右)土壤香农多样性指数在土壤pH值和稀释梯度上的差异；

++注释++：

选取的样本和相应的多样性指数用虚线连接；

Lg(Dil)表示Lg转化的稀释水平；

Lg(Dil) = 0代表为未经处理的土壤；

尽管土壤类型和pH与不断地稀释相比对土壤微生物α多样性的影响更不显著，尽管如此，它们还是影响了重组细菌群落的结构。我们采用变异分解分析(VPA)对各稀释水平下土壤类型、土壤pH值和Ca、Fe、SO42−浓度对群落差异的相对贡献进行了评价（Fig.2c）。土壤类型对群落差异的贡献从初始土壤的(Fig. 2d) 46.2%(P-value < 0.001 based on partial mantel test)与10-1梯度样品(Fig. 2e)的47.9% (P-value < 0.001 based on partial mantel test)及10-4稀释样品(Fig. 2f)的超过40.2% (P-value < 0.001 based on partial mantel test)，下降到10-7稀释样品(Fig. 2g)的29.7% (P-value < 0.001 based on partial mantel test)及最大稀释样品(Fig. 2h)的19.3% (P-value < 0.001 based on partial mantel test)。与此相反，土壤pH值的影响沿稀释梯度增加（随着样品的稀释分别为初始土壤变异的9.6%, 10.7%, 13.6%,28.1%,43.3% P-value < 0.001 based on partial mantel test）。此外，虽然不同数量的CaO和FeSO4被用来调控土壤pH值，但Ca和Fe的浓度对重新组合的群落影响不大。置换多元方差分析一直显示土壤类型(P-value = 0.001, F1,502 = 16.73 using PERMANOVA)与pH (P-value = 0.001, F4,475 = 7.02 using PERMANOVA)显著改变了细菌群落的组成分别解释了变异的35.2%与29.5%。与此同时Ca, Fe和 SO42-的浓度分别仅仅解释了细菌群落变异的3.0% (P-value = 0.037, F9,470 = 1.97 using PERMANOVA), 2.4% (P-value = 0.063, F9,470 = 1.49 using PERMANOVA), 和1.1% (P-value = 0.046, F9,470 = 1.90 using PERMANOVA)。

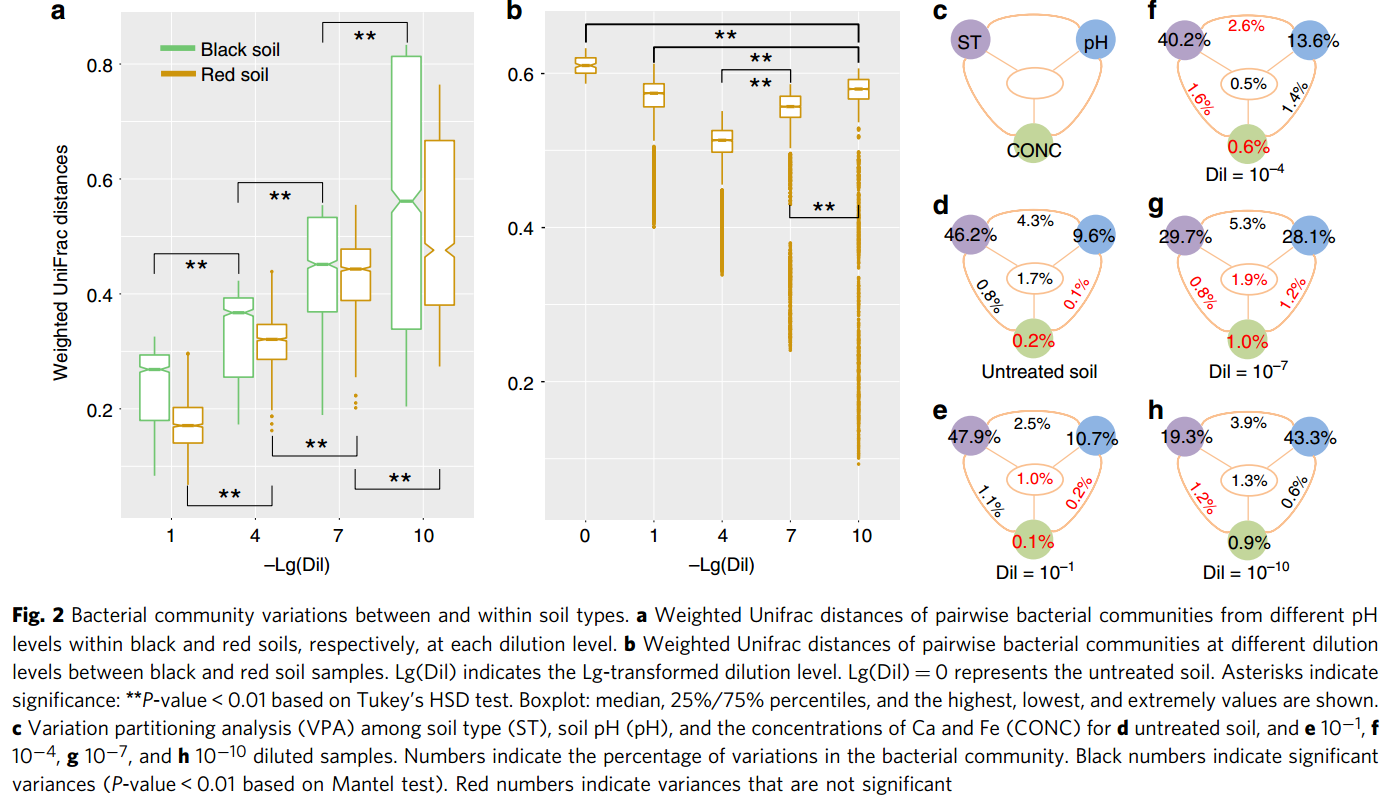


图2土壤类型间及土壤内部细菌群落的变化

A：在不同稀释水平下，黑土和红土中不同pH值的成对菌群的加权Unifrac距离；

B：黑土和红土样品在不同稀释程度下成对细菌群落的加权Unifrac距离。Lg(Dil)表示Lg转化的稀释水平。Lg(Dil) = 0代表为未经处理的土壤。星号表示显著性：\*\* p值< 0.01，基于Tukey的HSD检验。箱线图:中位数、25%/75%百分位数、最高、最低和极端值被显示；

C：土壤类型(ST)、土壤pH (pH)和Ca、Fe浓度(CONC)之间的变异分解分析(VPA)；

D：未处理的土壤；

E：10-1稀释的样品；

G：10-4稀释的样品；

H：10-10稀释的样品；

数字表示细菌群落中变异的百分比。黑色数字表示差异显著(p值< 0.01基于Mantel检验)。红色的数字表示差异不显著。

细菌群落的装配过程

为了辨别随着稀释梯度与pH梯度变化的群落装配中的确定性与随机性过程，我们计算了每一个处理的最邻近的β生物分类学指数（βNTI）。为了推测确定性/随机性群落装配过程随着稀释梯度与pH梯度的变化，我们测定了βNTI与稀释梯度和pH梯度的关系。每个处理的βNTI值与pH及稀释水平有关显示出不同的模式（Fig. 3）。在黑土与红土中，群落装配随着稀释梯度水平的增加从随机性过程(|βNTI| < 2)向确定性过程转变(|βNTI| > 2)并且βNTI在所有的pH水平下相助相关于稀释梯度(Fig. 3a, b)。然而，βNTI在不同土壤pH水平条件下随着稀释梯度的变化其分布趋势是不同的。在稀释最少的样品中随机性过程占主导地位，在pH值为6.5是朝着多变化选择(βNTI > 2)主导方向转变，而在稀释更小的更酸性（pH=4.5）与更碱性(pH=8.5)样品中朝着均一化选择(βNTI < -2)主导方向转变。

相同的β数据集被重组用以检测每一个稀释水平下pH梯度从4.5到8.5条件下βNTI的分布情况。无论是黑土还是红土，βNTI随着pH梯度呈单峰模型(Fig. 3c, d)。峰值出现在中性土壤中，峰谷出现在酸性及碱性条件下。此外，这些模式的大小随着稀释梯度的增加而增加。这些结果表明有低物种丰富度的细菌群落更可能是确定性装配过程。最后，我们结合了所有的βNTI值发现|βNTI|与土壤细菌香浓多样性指数呈现显著的负相关关系(Spearman’s correlation coefficient R2 = 0.38, P-value < 0.001, two-sided tests; Fig. 3e)。

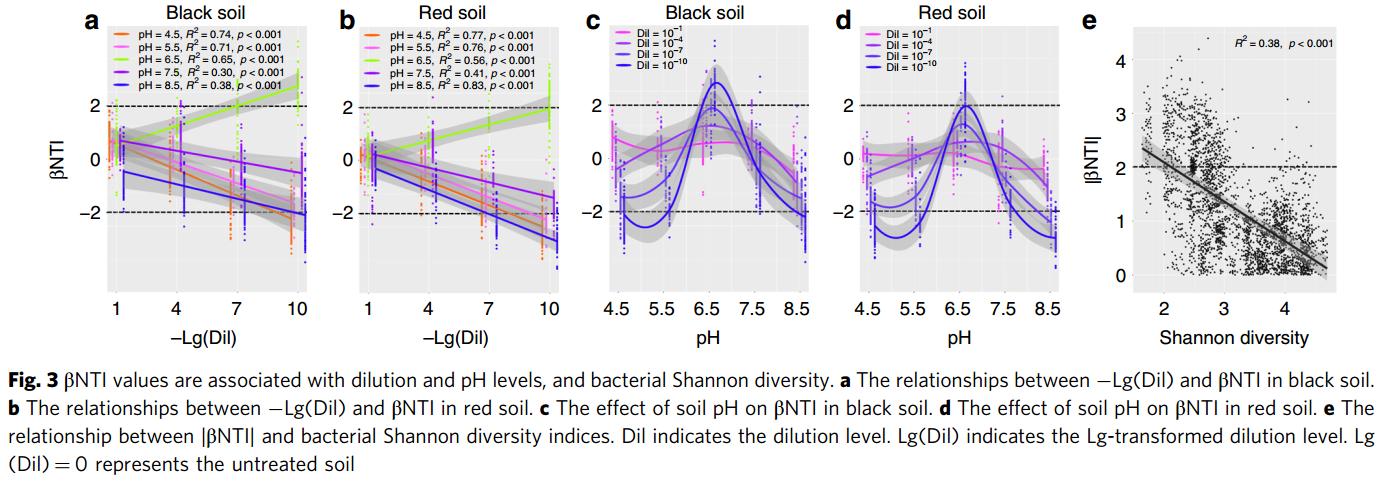


图3与稀释和pH值及细菌香农多样性有关βNTI值。

A：黑土中-Lg(Dil)与βNTI之间的关系；

B：红土中-Lg(Dil)与βNTI之间的关系；

C：黑土中土壤pH对βNTI的影响；

D：红土中土壤pH对βNTI的影响；

E：|βNTI|与细菌香浓多样性之间的关系；

Dil表示稀释水平。Lg(Dil)表示Lg转化的稀释梯度，Lg(Dil) = 0代表未处理土壤。

重新装配细菌群落的潜在的功能

为了评估土壤pH及稀释效应如何影响重新装配细菌群落潜在的功能，我们从红土样品中提取的DNA对其进行鸟枪法宏基因组测序及分析。我们比较了不同的pH和稀释条件下与物质代谢相关的基因(Fig. 4a)，发现绝大多数是与碳、氮、硫循环相关。选择这些功能类别是因为许多生态服务，例如粮食生产和污染物降解和净化，在很大程度上依赖于与各种物质代谢有关的微生物功能。各功能类群的相对丰度在稀释程度上存在显著差异，但在不同的pH值水平下，影响就不那么明显了，或者在某些情况下根本没有影响。

由一小群微生物完成的一种功能即相关基因分布在特定的微生物中，在接种了更稀的接种剂的样品中会逐渐变得不那么丰富。例如，与"硫代谢" "氮代谢"、“甲烷代谢”、“萜类和多酮类化合物代谢”和“外源性生物降解和代谢” (包括“阿特拉津降解”、“多环芳烃降解”等)相关全部的功能（特殊功能定义为功能组1，后面简称FunGp1）随着稀释梯度的增加逐渐消失。这些类别中所有独特基因的相关分析表明很大比例(31.45-64.87%)的这些基因的相对丰度随稀释程度的增加而显著降低，而这些基因中只有一小部分(1.67-9.22%)显著增加。(补充表1)。在这些基因中，指标分析(IndVal)显示，FunGp1的一个特异基因，氮代谢的周质硝酸还原酶基因napA(IndVal = 0.938, P-value = 0.001 using the multipatt function of  
IndVal),在更稀释的样本中作为指示基因被富集，而其他基因，如硫代谢的磷酸腺苷磷酸硫酸盐还原酶基因cysH(IndVal = 0.946, P-value = 0.002 using the multipatt function of IndVal)由于稀释而耗尽(补充表2)。

相反，与“糖酵解/糖异生”，“TCA循环”，以及一些容易利用的碳水化合物如果糖、半乳糖、淀粉和蔗糖的代谢相关的其他功能(广义功能定义为功能组2，下文简称FunGp2) 在更稀释的样品中出现得更多(Fig.4a)。对于FunGp2的这些功能类别，这些基因的大部分比例(34.89-61.95%)，随着稀释程度的增加，显著增加，而只有一小部分(1.98-8.12%)显著减少(补充表1)。指标分析显示，在稀释条件下一些必需氨基酸(苯丙氨酸和色氨酸)的代谢基因被耗尽，然而一些非必须氨基酸（组氨酸）的代谢基因被富集。然而，并不是所有的功能类别FunGp2遵循这一趋势; “氨基酸代谢”和“脂质代谢”功能随着稀释总体呈耗竭趋势，基因比例显著下降分别为36.76%和30.09%(图4a和补充表1)。

尽管FunGp1和FunGp2的相对丰度存在这些相反的模式，各功能类群的多样性随稀释程度的增加呈下降趋势(Fig.4b, c)。此外，相较于FunGp2(Fig. 4c),FunGp1(Fig. 4b)的功能多样性下降幅度更大。为了进一步研究细菌多样性的影响以及确定性/随机性装配过程对代谢功能的相对丰度(FGRA)和多样性(FGDiv)的影响，我们计算了|βNTI |值及其对应的香农多样性指数、FGRA值,FGDiv值之间的相关性(Fig. 4d)。FunGp1的功能性状多样性和相对丰度，以及FunGp2的功能性状多样性与Shannon多样性呈正相关，与|βNTI |值呈负相关。而FunGp2的功能性状相对丰度则与Shannon多样性呈负相关，与|βNTI |值呈正相关。因此，FunGp1和FunGp2对细菌多样性损失的反应不同，对细菌群落组装的贡献也可能不同。

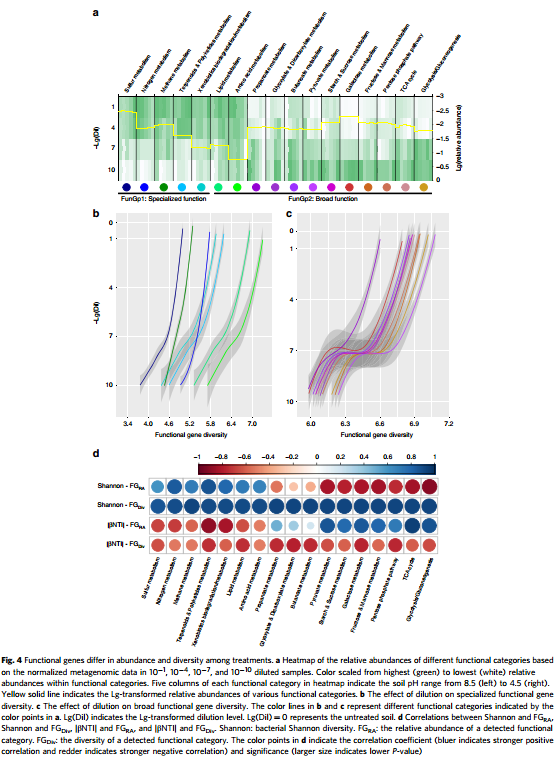


图4不同的处理方法中，功能基因的丰度和多样性各不相同。

A：在10-1, 10-4, 10-7, and 10-10稀释的样品中基于标准化宏基因组数据的不同功能类别相对丰度热图。在功能分类中，颜色按照比例从最高(绿色)到最低(白色)的相对丰度。热图中每个功能类别的5列表示土壤pH值范围从8.5(左)到4.5(右)。黄色实线表示各功能类别的lg转换的相对丰度；

B：稀释对特异性功能基因多样性的影响；

C：稀释对广泛性功能基因多样性的影响。b和c中的颜色线表示由a中的颜色点指示的不同的功能类别。Lg(Dil)表示Lg转化的稀释水平。Lg(Dil) = 0表示未处理的土壤；

D：Shannon和FGRA，Shannon和FGDiv ，|βNTI |和FGRA,以及|βNTI |和FGDiv之间的相关性。Shannon:细菌香浓多样性。FGRA：检测到的功能类别的相对丰度。FGDiv：检测到的功能类别的相对丰度。D中的颜色点表示相关系数(越蓝表示正相关越强，越红表示负相关越强)及显著性(越大表示p值越低)。

讨论

本研究中使用的方法是基于培育连续稀释土壤悬浊液并用γ射线消毒且通过pH修饰土壤样品,目的是为了研究微宇宙培养后重组微生物组的细菌物种丰富度。我们的目的是评估与细菌多样性相关的功能基因库在建立群落装配中的重要性。在相同稀释水平的样品中，我们只注意到，随着土壤pH值变化，细菌种类的丰富度发生了适度的变化。香农多样性指数在中性pH值时达到峰值，在某些情况下，黑土的香农多样性指数与红土相似，甚至明显高于红土。这些差异可能是由于pH值对群落多样性的直接影响造成的也可能与黑土中较高的养分利用率有关。这些与土壤类型和pH值有关的重组菌群的细菌多样性的相对温和的变化与更强的稀释作用形成对比。因此，稀释降低了接种土壤悬液中细菌的多样性从而影响了重组土壤微生物群落的细菌多样性，这证实了我们先前研究的结果。

我们观察到细菌α-diversity和功能基因多样性之间持续显著的正相关性。FunGp1和FunGp2的功能基因种类对稀释的反应不同。这种差异对于编码与FunGp1 的“硫代谢”，“氮代谢”，“甲烷代谢”，“萜类化合物和多酮类化合物代谢”和“外源生物降解与代谢”相关的功能基因尤为明显，随着稀释不断耗尽，虽然这些基因中有一小部分不是这样。分类学多样性下降对功能基因的影响随稀释程度的增加而增加，这可能是由于这些特异性功能分类学上冗余缺乏造成的。由于这些特异性的功能高度依赖于狭窄的分布的生理通路，所以一般认为它们高度依赖于环境条件。由于它们在大多数土壤微生物群中缺乏，这些特异性的功能将尤其会受到稀释的影响，因为它们更有可能在更丰富的分类单元中被移除。许多研究表明，酸杆菌、放线菌和硝化螺菌的一些细菌成员是关键分类群，**他们也许**具有固氮、氨氧化等特殊功能。例如，涉及到“萜类和多酮类代谢”的基因簇通常由少数土壤微生物群落所拥有，比如一些放线菌门物种。几项研究表明，参与“外源性生物降解/代谢”的酶是可诱导的，只存在于一小群微生物中。本研究的物种分类学组成结果一致表明，酸杆菌、放线菌和硝化螺菌的细菌组随着样品的稀释而被耗尽。因此，由稀释引起的稀缺性损失可能会显著限制其特殊功能的生理途径并导致代谢网络减弱。

与“糖酵解/糖异生”、“TCA循环”、“戊糖磷酸途径”相关的FunGp2的功能对微生物生长繁殖至关重要。这些功能即所谓的广义功能广泛的分布在生物体内，并通过稀释得以富集。在这些广义的功能中，氨基酸代谢”和“脂质代谢”功能分布十分广泛。例如，许多细菌中都有异脂肪酸和反异脂肪酸的生物合成，因为膜脂的主要酰基成分和非必需氨基酸的生物合成途径广泛分布于各种细菌中。然而，这两个功能通常被稀释耗尽。我们推断Ω-环己基和Ω-环庚基脂肪酸的生物合成以及一些必需氨基酸的代谢只存在于少数的的细菌种群中。因此，“氨基酸代谢”和“脂质代谢”是介于特殊功能和广泛功能之间的功能。此外，我们还观察到这两个功能组的多样性随着稀释程度的增加而减少。此外，FunGp2的下降幅度也小于FunGp1。这些观察结果表明，广义功能比特异性功能更冗余**且**群落中物种功能能力的重叠可能遵循不同的减法形式。

功能基因多样性是功能冗余的重要指标，而基因丰富可能代表功能能力。壤微生物多样性的丧失导致特异性功能能力显著下降，如潜在的反硝化活性和农药矿化能力。相比之下，Griffiths等人发现在已建立的微生物培养实验中随着梯度稀释的土壤悬液的培养，虽然微生物多样性随着稀释程度的增加而减少，但土壤呼吸方面没有差异，但这是一个广泛的功能。

因此，我们认为特异性功能的减少同时导致了广义功能的增加，因此，在更稀释的样品中，更广泛的功能更丰富。

功能基因多样性下降与生态系统功能和服务退化的关系基于α-diversity,尤其是缺乏β-diversity已经被广泛地调查。由于没有可以同时支持所有功能的普遍存在的物种组合，因此群落功能在不同的环境条件下需要不同的物种组合。此外，对于形成物种组合的随机性/确定性过程也许能被β多样性很好地定义。因此，在研究调查生物多样性与生态系统功能的关系时应该考虑β多样性相关的分析。

在这项研究中，对于每种土壤，稀释程度较低的样品的细菌群落比稀释程度较高的样品更相似。稀释降低了物种的丰富度，导致土壤的恢复力降低，增加了对土壤pH值变化的敏感性。由于在物种丰富的群落中，群落稳定性增强，因此物种丰富度较低的群落更容易受到环境变化的影响，例如土壤pH的变化。显而易见的是VPA（方差分解分析）结果表明，土壤类型对重组菌群的影响随着稀释程度的增加而减小，而pH值的影响随着稀释程度的增加而增大。然而，我们发现在土壤pH值水平之间，每个功能类别的丰度几乎没有显著差异，表明群落功能基因组成可能不受分类学的限制。我们通过不同的pH与稀释梯度得到的结果显示βNTI类型的转化清楚地表明，当生物分类学多样性水平较低时，群落的装配倾向于由确定性过程主导。通过计算|βNTI |值和细菌香农多样性指数之间的关系进一步证实了这一趋势。之前的研究表明，随着生物量的减少和种群数量的减少，群落更容易受到漂移(随机过程)或建群者（Founder）效应的影响。这在群落和种群规模较小的时期是正确的。然而，在种群或群落规模已饱和的已建立的群落中，本区域是由随机性过程还是确定性过程主导会受到分散性的强烈影响，这基于区域环境。此外，我们还发现确定性过程与功能多样性的降低和特异性功能的相对丰度有关。因此，我们认为，在低多样性群落中离散性可能会增强环境选择，并有助于确定性(选择)过程。因此，随着土壤细菌种类的丰富度和功能多样性的降低，细菌群落的装配有一个从随机性向确定性过渡的过程。此外,根据βNTI值,确定性的装配过程在中性pH时往往是一个条件选择(βNTI > 2)和在酸性和碱性条件下是均一化选择(βNTI <−2)。

综上所述，本研究对两种土壤不同pH值下基于物种丰富度的细菌群落结构和功能装配模式进行了总体可视化研究。因此，我们将这些结果集成到一个概念模型中即在不同的环境条件下，多样性相关的随机性/确定性过程如何促进土壤细菌群落结构和功能的装配的(Fig. 5)。我们假设一个重新组合的群落，在这个框架中，随机/确定性生态过程的相对影响变得相对稳定。然而，由于环境的变化，这些稳定的过程可能并不存在于真实的生态系统中。我们也没有考虑到群落建立的初始阶段，这个阶段主要由随机性过程主导。然而，在群落装配的后期，微生物需要应对两个主要的压力源:环境选择和物种竞争。

第一部分：高多样性的群落装配。在这一阶段，群落装配主要是由生物与非生物影响的综合因素的驱使。由于细菌的高度多样性，群落装配有望涉及复杂的生物相互作用并且营养有效性是这些相互作用强度的原因。土壤中含有大量复杂而顽固且大多数微生物无法有效利用底物，并且当环境中可用的营养物质不足以支持大量微生物时，竞争将会加剧 。因此包含“硫代谢”、“氮代谢”等的特异性功能能否维持土壤中的养分循环，并为其他微生物提供可利用的养分从而潜在地削弱了生物竞争。

此外，在一些极端的环境中，有些细菌能与吞噬细胞相互作用以应对氧化压力，有些细菌能代谢农药(具有“外源性生物降解代谢”功能) 或者固定重金属离子以减少其毒性作用。因此，这些特殊的功能在生态系统中发挥着重要的作用，即减少环境压力，增加其他没有这些功能微生物的生存几率。总的来说，具有在营养循环和抑制剂抑制方面不可替代功能的多样化的特异功能群在群落装配过程中是至关重要的。因此，群落结构更可能独立于物种特征且群落装配过程更可能是与出生、死亡、定植、灭绝和物种形成相关的随机过程。

第二部分：pH中性土壤中低多样性群落的装配过程。土壤pH值能强烈的影响细菌群落组成，在中性pH土壤中大多种物种可以生长；因此，非生物栖息地筛选的影响减小。然而，多样性的丧失减少了特异性功能，并导致代谢网络的削弱，这可能会损害营养有效性，增加生物竞争。因此，在中性pH土壤中，群落装配应主要由生物相互作用(简单但强烈)和异质环境中的选择(只影响一小部分本地微生物)驱动。因此，装配过程更可能是条件选择。

第三部分：酸性与碱性土壤中低多样性群落的装配。当土壤pH值变得越来越极端时，在高pH值或低pH值条件下，环境的筛选作用会被强化。因此，同质选择(同时影响生态系统中的所有微生物)在没有特异性功能的情况下增加。

我们的结果表明，稀释影响群落装配过程，并显著降低重新组装细菌群落的生物分类学多样性和功能多样性。在低多样性的群落中，特异性功能类别的相对丰度降低，而广义性功能类群的相对丰度有所增加。这种情况导致在细菌多样性较低的群落装配中确定性装配过程占主导地位。然而，在高多样性群落中，特异性功能的存在导致了群落的随机性装配过程占优势。因此，特异性功能对于建立细菌群落和维持群落功能具有潜在的关键作用。进一步的β多样性相关的研究将提高我们对群落装配过程及群落功能结果的了解，这将确保持续的对生态系统的供应至关重要。

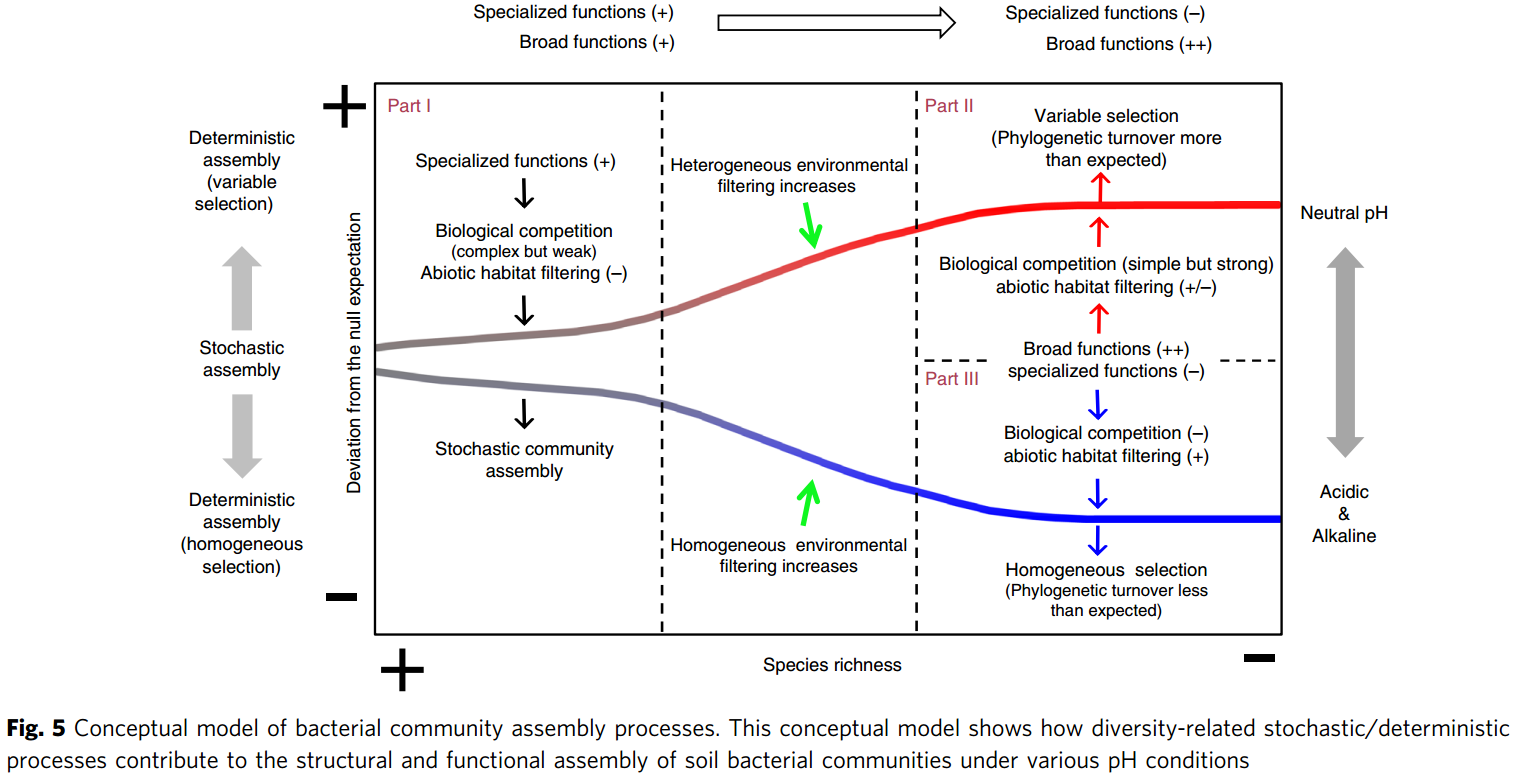


图5细菌群落装配过程的概念模型。这个概念模型展示了与多样性相关的随机/确定性过程是如何在不同pH条件下促进土壤细菌群落的结构和功能的装配。

方法

实验设计与微域培养

黑土和红土样品分别采集自位于中国东北黑龙江省哈尔滨市(127°54′E, 46°28′N)和中国南部的江西省鹰潭(116°94 e, 28°21 n)。根据联合国粮农组织/联合国教科文组织的说法黑土为钙质黑钙土，红壤是铁铝始成图的一个例子。样品取自常年被杂草覆盖的20厘米以上土壤。黑土pH值为8.0，有机质含量为4.6%，且含有100.8 mg\* kg - 1 氮、16.7 mg\* kg - 1 磷、90.5 mg \*kg - 1 钾。红壤pH值为5.3，有机质含量为1.6%，氮含量为53.9 mg\* kg - 1，磷含量为0.95 mg\* kg - 1和61.5 mg\* kg – 1钾。两种土壤混合均质，并过2毫米筛。用于制备培养液的部分暂时存储在室温下(20℃)匀称的充气袋中，并保持恒定的水分水平(30%的田间持水量)，而其余被γ-射线消毒(> 50kgray)(西岳辐射科技有限公司，新泽西州)。

按照Xun等人的描述制备了土壤微观模型。将250克无菌土壤放入500毫升的瓶子中，构建每个微生物群落。添加无菌蒸馏水，使水分保持在田间持水量的45%并在进行琼脂平板无菌试验前，将这样的土壤微观模型在20℃的黑暗环境中预培养4周。在这四周预培养期间石灰(CaO)和硫酸亚铁(FeSO4)随无菌蒸馏水一起加入(补充表3)，形成土壤pH梯度(4.5、5.5、6.5、7.5、8.5)。基于为期1个月的土壤培养预试验，得知所需的CaO和FeSO4含量。培育10 - 1土壤悬液，通过取新鲜土壤20 g(黑土10 g，红土10 g)加入无菌蒸馏水180 ml，混匀5 min获得。然后，10 - 1混悬液逐渐被稀释，形成10 - 4、10 - 7和10 - 10混悬液。这些10 - 1、10 - 4、10 - 7和10 - 10悬浮液被添加到每个pH水平的土壤微域中。我们还做了两种未经处理的初始土壤(未经处理的黑色和红色土壤，但同其他样本进行同样条件的培养)作为对照，所有处理重复6次。因此，我们共建立了252个微宇宙[(5个pH水平×4个稀释水平×2个土壤类型+ 2个初始土壤)×6个复制体]。然后将所有的微宇宙体系在20°C和45%田间持水量下置于黑暗中培养，并定期搅拌16周。在整个培育时期，容器被半透膜覆盖以允许空气交换，容器只能在无菌的生物罩中打开。每次打开后要更换半透膜。每2周检测一次土壤pH值，采用标准化的土壤理化分析方法检测Ca、Fe、SO42−浓度(补充表4)。

DNA提取和测序

培养16周后，从每个小宇宙体系中收集两个重复样本。采用PowerSoil DNA提取试剂盒(Mo Bio Laboratories, Inc.， Carlsbad, CA, USA)从0.25 g培养土壤中提取总DNA。为了最大限度地减少DNA提取的偏差，在进行PCR反应前都要把每个土壤样本的连续三次DNA提取液混合在一起。使用NanoDrop ND-2000分光光度计(NanoDrop, ND-2000, Thermo Scientific, 111 Wilmington, DE, USA)根据260/ 280 nm和260/230 nm吸光度比来评估DNA质量。

利用引物515 F: 5 -G TGCCAGCMGCCGCGGTAA-3和806 R: 5 -GGACTACHVGGGTWTCTAA T-3扩增细菌16S rRNA基因V4高变区从而评价细菌群落。PCR扩增产物按等摩尔比组合并在Illumina MiSeq测序仪上进行测序分析。测序数据采用UPARSE流程分析产(<http://drive5.com/usearch/manual/uparse_pipeline.html)63>。首先对原始序列进行质控，去除单克隆及嵌合体，剩余序列以97%的相似性聚类成OTU，并使用Silva数据库(第128版)进行物种注释(<https://www.arb-silva.de/>)。

从红壤样品中提取的DNA用于16S rRNA基因扩增子测序，也在Illumina HiSeq2000平台(150 bp双端读长)上进行宏基因组DNA测序。基于最小q值为30，去除Illumina原始数据中低质量的读长。所有读数均用IDBA 1.1.164进行组装，并以最小长度150 bp为阈值进行进一步过滤。最后，组装成了866230290个contigs,容量为61.75Gb。然后使用MetaGeneMark v4.3365进行基因预测并使用CD-HIT v4.6.266以0.95的相似度阈值进行聚类。**：**使用SOAPaligner 2.2167计算每个映射到基因的样本的读长数量；得到39 317 785个非冗余unigenes(补充表5)。我们采用基本的本地比对搜索工具通过京都基因和基因组百科全书(版本58)数据库进行功能基因注释。

统计分析

对于16S rRNA基因扩增子测序数据，我们创建了一个按照每个样品最小的序列数即每个样本11020个读长的抽平的OUT table(补充表5)。一个系统发生组的相对丰度被定义为与隶属于该组的序列数除以每个样本的总序列数。**：**香农多样性指数(α-diversity)计算和基于Bray-Curtis 距离的NMDS分析基于抽平的OTU表进行。用VPA（方差分解分析）和PERMANOVA（置换多元方差分析）评估土壤类型及其性质的贡献，其包括土壤pH值和Ca、Fe、SO42−浓度对细菌群落变化的贡献。根据抽平后的OTU表，将菌群数据标准化为百分数**且**采用最小-最大归一化法对钙、铁和SO42−的浓度进行标准化从而进行VPA（方差分解分析）和PERMANOVA（置换多元方差分析）分析。利用vegan R 包中的bioevn命令进行挑选最好的环境因子组合(与细菌组合差异相关性最好)并用vegan包中的adnois命令进行PERMANOVA（置换多元方差分析）分析。以上所有的分析都是使用vegan包进行的。基于抽平的OTU table 通过标准化成百分比后通过采用FastUnifrac方法用以计算群落系统发育的相异性(β-diversity)。

为了推断群落装配过程，我们首先使用picante R包计算了最接近分类单元距离的平均值然后使用了以前开发的零建模方法来计算βNTI。βNTI >2被认为显著高于预期的系统发育周转率，这被解释为确定性过程的变化选择。βNTI < -2被认为显著低于预期的系统发育周转率，这被解释为确定性过程的均一化选择。如果|βNTI | <2这表明所观察到的系统发育组成的差异是随机过程的结果。

对于宏基因组测序数据，一个功能类别的百分比频率定义为与该类别相关的读计数丰度除以每个样本的总读计数丰度。利用每个功能类别内的基因丰富度计算功能基因多样性。对用以做显示每个功能类别中功能基因富集或衰竭模式的heatmap图的标准化宏基因组数据通过去除均值并除以标准差进行标准化处理。我们采用结合给定基因的丰度和发生情况的指标分析(IndVal)用以测定稀释后富集或衰竭的特征性功能基因。IndVal值使用indicspecies R软件包(版本1.7.6)进行计算。所有相关系数均采用斯皮尔曼相关系数计算。采用Duncan多重比较检验计算样本间的显著性。采用Tukey’s honest显著性差异检验计算两个样本之间的显著性。所有统计分析均采用R软件(3.3.2版)进行。

Received: 23 August 2018

Accepted: 28 June 2019

Published online:23 August 2019