

根际细菌群落资源利用网络的研究方法

Calculation of Trophic Network of Rhizosphere Bacterial Community

杨天杰¹, 张璐璐¹, Alexandre Jousset^{1,2}, 韦中^{1,*}

¹ 江苏省固体有机废弃物资源化高新技术研究重点实验室/江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心/资源节约型肥料教育部工程研究中心/国家有机类肥料工程技术研究中心, 资源与环境科学学院, 南京农业大学, 南京, 江苏省;

² Institute of Environmental Biology, Ecology & Biodiversity, Utrecht University, The Netherlands

*通讯作者邮箱: weizhong@njau.edu.cn

摘要: 微生物群落内部以及与外界的营养竞争决定了群落内部互作关系以及抵抗外界生物入侵的能力, 量化以资源利用为基础的物种互作关系是评价群落功能和稳定性的关键。本文借鉴了动物生态学领域描述营养竞争互作的 3 个参数 (资源利用连接度、资源利用嵌套度和生态位重叠), 应用到微生物生态学中, 描述微生物群落内部以及群落与外来物种的资源利用网络。本文描述了评价菌株资源利用能力的高通量检测方法, 并提供了计算合成菌群内部以及与病原菌资源利用网络的计算方法, 评价营养竞争强度。通过用化学纯品模拟根系分泌物, 检测单菌 48 种根系资源的能力, 计算并获得合成菌群内部的资源利用连接度、嵌套度以及合成菌群与病原菌之间的生态位重叠指数, 进而提供构建功能高效稳定合成菌群的依据。

关键词: 根际, 合成菌群, 资源利用网络, 生物防治, 土传病原菌

材料与试剂

一、供试菌株

1. 野生型茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* QL-Rs1115 (GenBank accession GU390462, 以下简称青枯菌) 为本实验室于南京市麒麟后村发病番茄植株中分离而得, 具有强的致病性(Wei 等, 2011)。

2. 5 株非致病性并与青枯菌同属的菌株也于南京市麒麟后村番茄植株中分离而得, 分别是: 菌株 QL-A2、QL-A3、QL-A6、QL-117 和 QL-140。5 株细菌相互之间无拮抗竞争

(不产生拮抗物质)(Wei 等, 2015), 与青枯菌 QL-Rs1115 之间均无拮抗竞争 (不产生拮抗物质)(Wei 等, 2013)。所用菌株信息见表 1。

表 1. 本研究所用菌株和质粒

菌株或质粒		相关特性	GenBank 号	参考文献或来源
非致病菌	QL-A2	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	JN699058	(Wei 等, 2015)
	QL-A3	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	KJ780056	(Wei 等, 2015)
	QL-A6	<i>Ralstonia pickettii</i>	HQ267096	(Wei 等, 2015)
	QL -117	<i>Ralstonia taiwanensis</i>	KJ780054	(Wei 等, 2015)
	QL-140	<i>Ralstonia</i> sp.	KJ780055	(Wei 等, 2015)
青枯菌	QL-Rs1115	<i>Ralstonia solanacearum</i>	GU390462	(Wei 等, 2013)

二、耗材

1. 一次性培养皿 (江苏康健医疗用品, 90 mm)
2. 96 孔板 (96 well costar clear)
3. 96 孔板 0.22 μ m 滤膜 (Millipore®, MultiScreen^{HTS} GV Filter Plate, 0.22 μ m, clear, sterile, MSGVS2210)
4. 移液枪枪头 (国产-耗材, 目录号: JWD-MTB1250-5)
5. 一次性注射器 (国产-耗材, 目录号: BG1327)
6. 离心管 (康健医疗, 目录号: KJ307)

三、化学试剂

1. 胰蛋白胨 (OXOID, TRYPTONE, 目录号: LP0042)
2. 酵母 (OXOID, 目录号: LP0021B)
3. 牛肉膏 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, 目录号: 69004438)
4. 乙酸 (fluorochem, 目录号: 044721)
5. L-丙氨酸 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: D800003)
6. β -丙氨酸 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: D800003)
7. L-精氨酸 (VETEC, 目录号: V900303)

- 50 8. 抗坏血酸 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: A800295)
- 51 9. L-天冬门酰胺 (Fluorochem, 目录号: M02999)
- 52 10. γ -氨酪酸 (TRC, 目录号: A602920)
- 53 11. 柠檬酸 (源叶, 目录号: 12242)
- 54 12. 瓜氨酸 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: L805041)
- 55 13. 乙醇胺(国药集团化学试剂有限公司, 沪试, 目录号: 81007928)
- 56 14. 甲酸 (上海晶纯生化科技股份有限公司, Aladdin, 目录号: F112038)
- 57 15. 甲糖 (Santa Cruz, 目录号: sc-221456)
- 58 16. 半乳糖醛酸 (索莱宝科技有限公司, 索莱宝, 目录号: G8120-5)
- 59 17. 葡萄糖 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, 目录号: 63005518)
- 60 18. L-谷氨酰胺 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, 目录号: 62010838)
- 61 19. 戊二酸 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: g822471-5g)
- 62 20. L-甘氨酸 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: G800883-500g)
- 63 21. 乙醇酸 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: g810374-100ml)
- 64 22. L-组氨酸 (上海晶纯生化科技股份有限公司 Aladdin, 目录号: H111055-25g)
- 65 23. 异亮氨酸 (j&k, 目录号: 559486)
- 66 24. 乳酸 (上海晶纯生化科技股份有限公司 Aladdin, 目录号: L108841-500g)
- 67 25. L-赖氨酸 (Phytotech, 目录号: L594)
- 68 26. L-亮氨酸 (Caisson, 目录号: L005-100GM)
- 69 27. 马来酸 (BBI, 目录号: A610333-0250)
- 70 28. 苹果酸 (Phytotech, 目录号: M5536)
- 71 29. 丙二酸 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, 目录号: 30111926)
- 72 30. L-蛋氨酸 (J&K, 目录号: 945776)
- 73 31. 肌醇 (上海晶纯生化科技股份有限公司, Aladdin, 目录号: i108336-25g)
- 74 32. 2-酮戊二酸 (源叶, 目录号: S64994-5g)
- 75 33. L-苯丙氨酸 (J&K, 目录号: 162943)
- 76 34. L-脯氨酸 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, 目录号: 62019936)
- 77 35. 丙酮酸 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: p815676-25g)
- 78 36. L-丝氨酸 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: d817775-25g)

- 79 37. 琥珀酸 (j&k, 目录号: 106413)
- 80 38. 蔗糖 (上海晶纯生化科技股份有限公司, Aladdin, 目录号: s112224-5g)
- 81 39. 酒石酸 (santa cruz, 目录号: sc-252654)
- 82 40. L-苏氨酸 (上海晶纯生化科技股份有限公司, Aladdin, 目录号: t108222-25g)
- 83 41. L-色氨酸 (LGC, 目录号: MM1267.01)
- 84 42. L-缬氨酸 (源叶, 目录号: S67607-5g)
- 85 43. 麦芽糖 (phytotech, 目录号: m588)
- 86 44. L-阿拉伯糖 (爱必信生物科技有限公司, absin, 目录号: abs47018938-20mg)
- 87 45. D-半乳糖 (TargetMOL, 目录号: T0591-25mg)
- 88 46. D-甘露糖 (j&k, 目录号: 196857)
- 89 47. D-木糖 (j&k, 目录号: 203390)
- 90 48. D-核糖 (上海麦格林生化科技有限公司, 麦克林, 目录号: d817221-25g)
- 91 49. D-甘露醇 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, 目录号: 63008816)
- 92 50. 肌苷 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, 目录号: 65009734)
- 93 51. 草酸 (j&k, 目录号: 391404)

94

95 四、培养基与缓冲液 (见溶液配方)

- 96 1. 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (Nutrient Broth)

97 仪器设备

- 98 1. 96 道手动移液工作站 (苏州中析仪器有限公司, 中析, SC9000)
- 99 2. 恒温摇床 (MIN QUAN, MQD-BIR)
- 100 3. 酶标仪 (SpectraMax M5, Sunnyvale, CA, USA)
- 101 4. -80°C冰箱 (海尔, 立式超低温保存箱, DW-86L626, 2013 款)
- 102 5. 离心机 (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, 5424EH062551)
- 103 6. 移液枪 (Eppendorf Research plus)
- 104 7. 高压灭菌锅 (日本, 鸟取, Tega SANYO Industry Co., Ltd, mlS-3780)
- 105 8. 恒温恒湿培养箱 (新苗, 隔水式电热恒温培养箱, GNP-9080BS-III)
- 106 9. 天平 (sartorius BSA2202S)

- 107 10. 移液枪 (Eppendorf Research plus)
- 108 11. 涡旋仪 (SCIENTIFIC INDUSTRIES, USA)

109 软件和数据库

- 110 本研究中将微生物不能利用的资源计做 0，可利用的计做 1，以此获得二进制数组。用
- 111 R 3.1.2 (www.r-project.org)进行资源利用网络参数的计算。

112 实验步骤

- 113 一、供试菌株培养与菌悬液制备
- 114 1. 从-80℃冰箱里拿出菌种，在胰蛋白胨大豆肉汤固体培养基 (Nutrient Agar,
- 115 NA)上活化。
- 116 2. 待平板上长出单菌落后，挑取平板上的单菌落转接到液体 NA 培养基中，30℃、170
- 117 rpm 振荡培养过夜，直至对数生长期。
- 118 3. 发酵好的菌液用 0.85%无菌生理盐水洗 3 次以去除表面残留的培养基，具体操作：
- 119 6000 rpm 离心 6min 收集菌体，用 0.85%无菌生理盐水重悬菌体，如此重复 3 次，最终
- 120 用 0.85 %无菌生理盐水调节菌液浓度为 $OD_{600} = 0.5$ (约为 10^7 CFU•ml⁻¹) 。
- 121 二、菌株的资源利用能力的检测
- 122 1. 48 种碳源包含氨基酸、有机酸、糖等，表征番茄根际环境 (或根系分泌物) 中的营养
- 123 成分(表 2)。接种 10 μL 菌液至含有不同资源的 96 孔板中，孔板中资源的终浓为 10 mM，
- 124 最后用 OS 无机盐培养基(Scheublin 等, 2010)补齐孔板中 200 μL 的体系。

125 表 2. 48 种碳源分类

编号	资源名称	资源分类
1	乙酸	有机酸
2	L-丙氨酸	氨基酸
3	β-丙氨酸	氨基酸

4	L-精氨酸	氨基酸
5	抗坏血酸	有机酸
6	L-天冬门酰胺	氨基酸
7	γ -氨酪酸	氨基酸
8	柠檬酸	有机酸
9	瓜氨酸	氨基酸
10	乙醇胺	其他
11	甲酸	有机酸
12	甲糖	糖
13	半乳糖醛酸	有机酸
14	葡萄糖	糖
15	L-谷氨酰胺	氨基酸
16	戊二酸	有机酸
17	L-甘氨酸	氨基酸
18	乙醇酸	有机酸
19	L-组氨酸	氨基酸
20	异亮氨酸	氨基酸
21	乳酸	有机酸

22	L-赖氨酸	氨基酸
23	L-亮氨酸	氨基酸
24	马来酸	有机酸
25	苹果酸	有机酸
26	丙二酸	有机酸
27	L-蛋氨酸	氨基酸
28	肌醇	其他
29	2-酮戊二酸	有机酸
30	L-苯丙氨酸	有机酸
31	L-脯氨酸	氨基酸
32	丙酮酸	有机酸
33	L-丝氨酸	氨基酸
34	琥珀酸	有机酸
35	蔗糖	糖
36	酒石酸	有机酸
37	L-苏氨酸	氨基酸
38	L-色氨酸	氨基酸
39	L-缬氨酸	氨基酸

40	麦芽糖	糖
41	L-阿拉伯糖	糖
42	D-半乳糖	糖
43	D-甘露糖	糖
44	D-木糖	糖
45	D-核糖	糖
46	D-甘露醇	糖
47	肌苷	其他
48	草酸	有机酸

2. 将 96 孔板放置在摇床中，30 ℃、170 rpm 震荡培养 48h 后，用酶标仪测得吸光值，若吸光值 $OD_{600} > 0.05$ 则认为微生物可利用孔中的碳源。

三、合成菌群的构建

1. 表 3 是由 5 株非致病菌构建的微生物群落包含了所有可能组合，包括从单一菌株至 5 株菌株，表示由低到高的物种多样性 (31 种组合) 。采用“替代设计”(substitutive design) 理论，单一物种在所有群落中的数量均在同一水平上(Gibson 等, 1999)。

表 3. 合成菌群的构建

菌株 编号	菌株					多样性
	QL-A2	QL-A3	QL-A6	QL-117	QL-140	
1	1	0	0	0	0	1
2	0	1	0	0	0	1
3	0	0	1	0	0	1
4	0	0	0	1	0	1
5	0	0	0	0	1	1

6	1	1	0	0	0	2
7	1	0	1	0	0	2
8	1	0	0	1	0	2
9	1	0	0	0	1	2
10	0	1	1	0	0	2
11	0	1	0	1	0	2
12	0	1	0	0	1	2
13	0	0	1	1	0	2
14	0	0	1	0	1	2
15	0	0	0	1	1	2
16	1	1	1	0	0	3
17	1	1	0	1	0	3
18	1	1	0	0	1	3
19	1	0	1	1	0	3
20	1	0	1	0	1	3
21	1	0	0	1	1	3
22	0	1	1	1	0	3
23	0	1	1	0	1	3
24	0	1	0	1	1	3
25	0	0	1	1	1	3
26	1	1	1	1	0	4
27	1	1	1	0	1	4
28	1	1	0	1	1	4
29	1	0	1	1	1	4
30	0	1	1	1	1	4
31	1	1	1	1	1	5

135

136 四、细菌资源竞争网络特征的计算

137 微生物群落与青枯菌的资源竞争网络特征参数均由各菌株资源利用能力的结果计
138 算而得（详见“菌株的资源利用能力的检测”部分，图 1A）。微生物群落内部的营养竞争
139 特征用以下两个参数表征：资源利用连接度(Galiana 等 2014)和资源利用嵌套度
140 (Thébault and Fontaine 2010)。具体计算方式如下。

141 1. 资源利用嵌套度 (Nestedness, NE) 的计算：

资源利用嵌套度用于表征资源广谱型物种 (Generalists) 与资源窄谱型物种 (Specialists) 的营养相关性。具有高嵌套结构的群落，广谱型物种可利用的资源包括了窄谱型物种可利用的资源，即后者生态位是前者生态位的子集，这将导致两者之间激烈的竞争 (图 1B)。嵌套结构通过二进制数组计算得来 (Rodriguez-Girones and Santamara 2006)，本研究中将微生物不能利用的资源计做 0，可利用的计做 1，以此获得二进制数组；资源利用嵌套度通过 R 语言中 `nested()` 计算而得。资源利用嵌套度的数值范围在 0 至 100 之间 (表示群落从随机分布到高嵌套度)。

2. 资源利用连接度 (Connectance, CO) 的计算：

资源利用连接度从一定程度上反映了群落的平均生态位幅度 (Average niche breadth)。当群落存在高度的物种连接关系时，所有物种将会利用相似的资源，增加了每种资源被利用的可能性，即可理解为存在较高的平均生态位幅度；反之，各物种利用不同的资源，每种资源被利用的可能性降低，平均生态位幅度减小 (图 1C)。资源利用连接度 (CO) 可通过公式 $C=L/S^2$ 计算，L 代表所有物种可利用的资源数，S 表示物种多样性。若物种多样性为 3 的微生物群落可利用的所有资源总数为 20，则该群落的资源利用连接度为 2.22 ($20/3^2$)。

3. 生态位重叠指数 (Niche overlap index, NOI) 的计算：

微生物群落与青枯菌间的营养竞争特征用“生态位重叠指数”表征，通过本地群落与青枯菌可共同利用资源数量和青枯菌可利用资源数量的比例表示 (Ji and Wilson 2002)。生态位重叠指数越高，表示本地群落与青枯菌之间生态位重叠度越高 (Nicheoverlap, NO)，即更加激烈的营养竞争 (图 1D)。生态位重叠指数 (NOI) 计算公式如下：

$$(NOI) = \frac{\text{共生菌群落与青枯菌可共同利用资源数量}}{\text{青枯菌可利用资源数量}} \times 100\%$$

48 种资源中，青枯菌可利用资源数量为 21 个，若微生物群落与青枯菌共同利用的资源数量为 10，则该群落与青枯菌的生态位重叠指数 (NOI) 为 0.48 ($10/21$)。

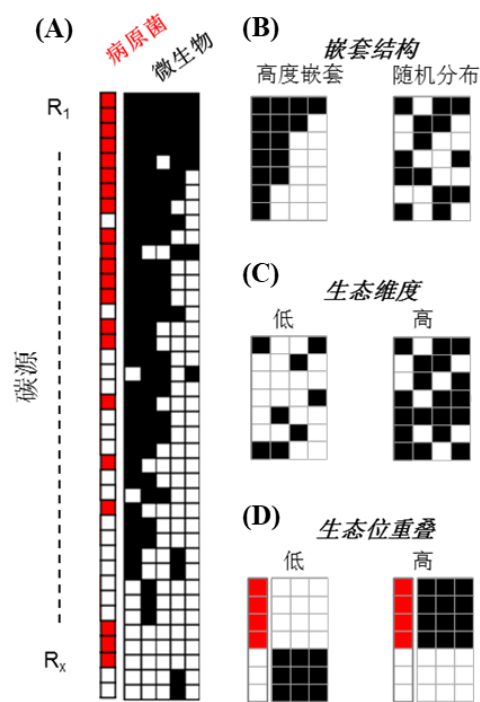


图 1. 营养网络模型计算原理示意图

注：红色表示病原菌（青枯菌）资源利用情况，黑色表示五株本地微生物的资源利用情况；方块填充表示该物种可利用相应资源，反之，无法利用。

溶液配方

1. 胰蛋白胨大豆肉汤培养基：

- 1.1 10 g 葡萄糖
- 1.2 5 g 胰蛋白胨
- 1.3 0.5 g 酵母
- 1.4 3g 牛肉膏
- 1.5 115 °C灭菌 30 min。

致谢

本项工作得到了国家自然科学基金（41301262 和 41471213）、国家“973”计划（2015CB150503）、江苏省自然科学基金（BK20130677）、江苏高校优势学科建设工程项目、111 项目、青蓝工程的资助。本实验流程基于已发表的论文（Wei 等, 2015）撰写。

参考文献

1. Galiana, N., Lurgi, M., Montoya, J. M. and López, B. C. (2014). [Invasions cause biodiversity loss and community simplification in vertebrate food webs.](#) *Oikos* 123(6): 721-728.
2. Gibson, D. J., Connolly, J., Hartnett, D. C. and Weidenhamer, J. D. (1999). [Designs for greenhouse studies of interactions between plants.](#) *Journal of Ecology* 87(1): 1-16.
3. Ji, P. and Wilson, M. (2002). [Assessment of the importance of similarity in carbon source utilization profiles between the biological control agent and the pathogen in biological control of bacterial speck of tomato.](#) *Applied and environmental microbiology* 68(9): 4383-4389.
4. Scheublin, T. R., Sanders, I. R., Keel, C. and Meer, J. R. v. d. (2010). [Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi.](#) *The ISME Journal* 4(6): 752-763.
5. Wei, Z., Huang, J., Tan, S., Mei, X., Shen, Q. and Xu, Y. (2013). [The congeneric strain *Ralstonia pickettii* QL-A6 of *Ralstonia solanacearum* as an effective biocontrol agent for bacterial wilt of tomato.](#) *Biological Control* 65(2): 278-285.
6. Wei, Z., Yang, T., Friman, V.-P., Xu, Y., Shen, Q. and Jousset, A. (2015). [Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health.](#) *Nature Communications* 6(1) : 8413.
7. Wei, Z., Yang, X., Yin, S., Shen, Q., Ran, W. and Xu, Y. (2011). [Efficacy of *Bacillus* - fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field.](#) *Applied Soil Ecology* 48(2): 152-159.
8. Galiana, N., M. Lurgi, J. M. Montoya, and B. C. López. (2014). [Invasions cause biodiversity loss and community simplification in vertebrate food webs.](#) *Oikos* 123:721–728.
9. Rodriguez-Girones, M. A., and L. Santamaria. (2006). [A new algorithm to calculate the nestedness temperature of presence-absence matrices.](#) *Journal of Biogeography* 33:924–935.
10. Thébault, E., and C. Fontaine. 2010. [Stability of ecological communities and the architecture of mutualistic and trophic networks.](#) *Science* 329:853–856.

