

根际细菌便利和竞争互作类型和强度的研究方法

Determination of Facilitation And Competition Among Rhizobacteria

李梅^{1,2}, 王宏归³, 尹悦¹, 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; ²Institute for Environmental Biology, Ecology & Biodiversity, Utrecht University, Padualaan 8, 3584CH Utrecht, The Netherlands; ³环境科学与工程学院, 扬州大学, 扬州, 江苏。

*通讯作者邮箱: weizhong@njau.edu.cn

摘要: 根际微生物群落结构复杂, 群落成员之间有着各种各样的相互作用关系, 而且群落结构越复杂, 群落成员间的交流也越复杂, 这些复杂的相互作用关系会影响到整个群落的功能。在复杂的自然微生物生态系统中, 基于高通量数据进行网络互作分析, 虽然可以在群落整体水平上理解群落成员间的相互作用关系, 但获得具有生物学意义的微生物相互作用关系是非常困难的。本方法通过比较两株菌分别单独培养和共培养后稀释涂布的生长量值来确定两株菌之间的相互作用关系; 并根据两株菌之间的互作关系来预测多株菌组成群落 (分别为 3 株菌、4 株菌、5 株菌和 6 株菌) 的互作特征; 最后通过使用绝对荧光定量 PCR 的方法, 比较多株菌分别单独培养和共培养后的生长量值来验证多株菌组成群落的互作特征。

关键词: 根际细菌, 便利关系, 竞争关系

材料与试剂

一、试验菌株及质粒

1. WR4 (*Flavobacterium johnsoniae*) CP000685, WR21 (*Chryseobacterium daecheongense*) HQ220102, WR42 (*Delftia acidovorans*) AM180725, HR92 (*Lysinibacillus sphaericus*) CP000817, T-5 (*Bacillus amyloliquefaciens*) JF899265 and QL-A6 (*Ralstonia pickettii*) HQ267096 (Huang et al., 2013; Tan et al., 2013; Wei et al., 2013)
2. 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞 (Solarbio, C1100)

3. PMD-19T 质粒载体 (pMD19-T Vector takara 6013) : 含有用于筛选的氨苄青霉素抗性基因

二、化学试剂

1. 葡萄糖 (南京化学试剂有限公司)
2. 酵母粉 (OXOID, YEAST EXTRACT, LP0021)
3. 牛肉膏 (国药集团化学试剂有限公司, 沃凯, 69004461)
4. 胰蛋白胨 (OXOID, TRYPTONE, LP0042)
5. 氯化钠 (NaCl, 南京化学试剂有限公司)
6. 琼脂 (福建省金燕海洋生物科技股份有限公司, 乘风)
7. 氨苄青霉素
8. Cycle Pure Kit PCR 纯化试剂盒 (OMEGA, D6492-01)
9. E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit OMEGA 质粒提取试剂盒 (D6943-01 *)
10. 细菌 DNA 提取试剂盒 e.Z.N.A (OMEGA bio-tek)
11. 荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa BioInc., Japan)

三、培养基

1. 液体 NA 培养基 (见溶液配方)
2. 固体 NA 培养基 (见溶液配方)
3. 液体 LB 培养基 (见溶液配方)
4. 固体 LB 培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 恒温摇床 (MIN QUAN, MQD-BIR)
2. 酶标仪 (SpectraMax M5, Sunnyvale, CA, USA)
3. 离心机 (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, 5424EH062551) 48 孔板 (48 well costar clear)
4. -80 °C 冰箱 (海尔, 立式超低温保存箱, DW-86L626, 2013 款)
5. 高压灭菌锅 (日本, 鸟取, Tega SANYO Industry Co., Ltd, MLS-3780)
6. 天平 (sartorius BSA2202S)

7. 移液枪 (Eppendorf Research plus)
8. 涡旋仪 (SCIENTIFIC INDUSTRIES, USA)
9. 恒温恒湿培养箱 (新苗, 隔水式电热恒温培养箱, GNP-9080BS-III)
10. 一次性培养皿 (江苏康健医疗用品, 90 mm)
11. 96 孔板 (96 well costar clear)
12. 48 孔板 (48 well costar clear)
13. PCR 仪 (life technologies, Applied Biosystems PCR 热循环仪)
14. NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA)
15. 荧光定量仪器 Applied Biosystems StepOne Plus (Applied Biosystems, CA, USA)

70

71 软件和数据库

1. Excel 2016
2. SigmaPlot 12.5
3. SPSS v. 19
4. Adobe Illustrator CS5
5. DNAMAN 6.0
6. Primer Premier 6.0

78

79 实验步骤

80 一、菌株两两之间互作关系的测定

1. 从-80 °C 冰箱中取出甘油管保存的 6 株菌 (WR4, WR21, WR42, T-5, HR92, QL-A6) , 分别于固体 NA 培养基上划线, 30 °C 培养 48 h。
2. 挑取各单菌落分别于 NA 液体培养基中, 在 30 °C, 170 rpm 摇床里培养 12 h 制备各菌悬液, 并将各菌株的悬浮液稀释至每毫升约 10^7 个菌体 (表 1) 。

85

86 表 1. 各菌株约 10^7 个菌体/ml 的悬浮液对应的的 OD₆₀₀ 值

菌株	OD ₆₀₀
WR4	0.6
WR21	0.4
WR42	0.4
T-5	0.6

HR92	0.5
QL-A6	0.5

3. 对于菌株单独培养实验，直接将 7 μl 以上菌悬液加入到含有 693 μl 液体 NA 培养基的 48 孔板中；对于两株菌共培养实验，先将以上菌悬液两两等体积混合均匀，然后再将混合后的 7 μl 菌悬液加入到含有 693 μl 液体 NA 培养基的 48 孔板中。
4. 将以上孔板于 170 rpm、30 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床中培养 48 h，然后将各个处理分别在 NA 固体培养基上进行稀释涂布，对各菌进行计数。6 株菌在 NA 固体培养基上的菌落形态不同 (图 1)，2 株菌共培养时可相互区分。这里用 i 和 j 分别表示两个菌株，那么单独培养时各自的生物量分别记作 MP_i 和 MP_j ，共培养时共同生物量记作 CP_{i+j} ，菌株各自的生物量分别记作 CP_i 和 CP_j 。

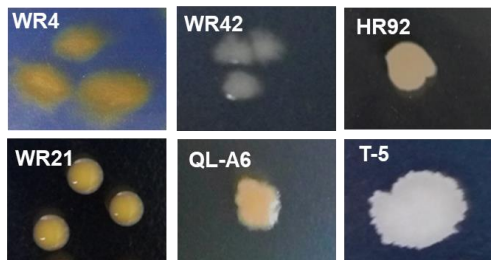


图 1. 六株菌在 NA 固体培养基上的菌落形态

5. 菌株 i 和菌株 j 之间的相互作用类型 (便利, 中立和竞争) 通过比较菌株单独培养时的生物量之和与共培养时共同生物量之间的关系 (Foster & Bell 2012) 来确定。当 $\text{MP}_i + \text{MP}_j > \text{CP}_{i+j}$ 时，二者之间是竞争关系；当 $\text{MP}_i + \text{MP}_j = \text{CP}_{i+j}$ 时，二者之间是中立关系；当 $\text{MP}_i + \text{MP}_j < \text{CP}_{i+j}$ 时，二者之间是便利关系 (图 2)。

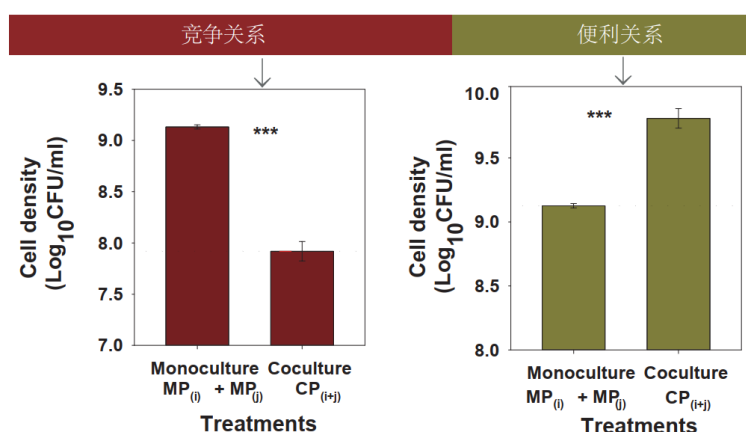


图 2. 两菌株间的互作类型确定方法

6. 比较两株菌相互作用的方向性：当 $\log_{10} (CP_i/MP_i) > 0$ 时，表示菌株 j 促进菌株 i 的生长；当 $\log_{10} (CP_i/MP_i) < 0$ 时，表示菌株 j 抑制菌株 i 的生长；当 $\log_{10} (CP_i/MP_i) = 0$ 时，表示菌株 j 对菌株 i 的生长没有作用。我们还用以下公式计算了两株菌之间的平均相互作用强度 (MIF)：

$$MIF_{ij} = \frac{1}{2} [\log(CP_i / MP_i) + \log(CP_j / MP_j)]$$

当 $MIF > 0$ 时，表示两株菌之间是便利关系；当 $MIF < 0$ 时，表示两株菌之间是竞争关系；当 $MIF = 0$ 时，表示两株菌之间是中立关系。

二、基于两株菌之间互作关系来预测多株菌群落 (3 株菌、4 株菌、5 株菌、6 株菌) 互作特征

我们用以下公式来预测多株菌群落中菌株之间的平均相互作用强度 (PIF)：

$$PIF = \frac{1}{C_n^2} \sum_{i=1}^{C_n^2} MIF_{ij}$$

其中 MIF_{ij} 表示多株菌组成群落所包含的任一两株菌之间的平均相互作用强度，n 表示组成群落的细菌数量，由 n 株菌组成的群落包含有 C_n^2 个 MIF_{ij} 。例如，一个由 3 株菌组成的群落包含 3 个 MIF_{ij} ，把这 3 个 MIF_{ij} 相加再除以 3 即为此 3 株菌群落中菌株之间的平均相互作用强度。PIF 由小变大则表示群落中菌株间便利关系越来越强，相反，群落中菌株间竞争关系则越来越弱。

三、多株菌组成群落 (3 株菌、4 株菌、5 株菌、6 株菌) 中菌株之间平均互作强度 (OIF) 测定

1. 从-80 °C 冰箱中取出甘油管保存的 6 株菌 (WR4, WR21, WR42, T-5, HR92, QL-A6) , 于固体 NA 培养基上划线, 30 °C 培养 48 h。
2. 挑取各单菌落分别于 NA 液体培养基中 30 °C, 170 rpm 摇床里培养 12 h 制备各菌悬液, 并将各菌株的悬浮液稀释至每毫升约 10^7 个菌体 (表 1) 。
3. 对于菌株单独培养实验, 直接将 7 μ l 以上菌悬液加入到含有 693 μ l 液体 NA 培养基的 48 孔板中; 对于多株菌共培养实验, 先将以上菌悬液按照共培养中包含的每个菌株等体积混合均匀, 然后再将混合后的 7 μ l 菌悬液加入到含有 693 μ l 液体 NA 培养基的 48 孔板中。
4. 将以上孔板于 170 rpm 30 °C 的摇床中培养 48 h, 然后将各个处理用细菌 DNA 提取试剂盒 e.Z.N.A, 按照其说明书分别提取 DNA, 并用 NanoDrop 1000 spectrophotometer 检测所提取的 DNA 浓度。将 DNA 浓度较高的样品进行稀释后备用。
5. 六株细菌相互区分的特异性引物设计
 - 5.1 利用 DNAMAN 6.0 对六株细菌的 16S DNA 全长序列进行比对分析, 找出同源性差别较大的区域, 并利用 Primer Premier 6.0 对该区域设计区分六株细菌的特异性引物 (表 2)。

表 2. 六株细菌相互区分的特异性引物

菌株	正向引物(5' - 3')	反向引物(5' - 3')
WR4	CACTCCTATGTATAGGAGCTTGACG	AGTATCAATGGCCGTTCCAC
WR21	CGTTTTTGGGTTTTTCGGAT	TGGTAAGGTTCCCTCGCGTAT
WR42	GAAGTTTCCAGAGATGGATTCTG	CCACCTATAAGGGCCATGAG
T-5	ACAAGTGCCGTTCAAATAGGG	GCCACTGGTGTTCCTCCAC
HR92	GACATCCCGTTGACCACTG	ATTAGCTCCCTCTCGCGAG
QL-A6	CTCGAAAGAGAAAGTGGACACAG	GCTTGGCAACCCTCTGTATG

- 5.2 引物的特异性验证:(1) 将活化后的六株细菌分别接种于 NA 培养基中, 30 °C、170 r/min 振荡培养 12 h, 以制得的新鲜菌悬液为模版, 利用表 2 中每一对引物对 6 株细菌都分别在 PCR 仪 (life technologies, Applied Biosystems PCR 热循环仪) 内进行 PCR 扩增。PCR 反应 (50 μ l) 包含 2 μ l 细菌菌液, 25 μ l 混合

物，各 2 μ l 正向和反向引物，以及 19 μ l 去离子水。PCR 反应程序如下：首先在 95 $^{\circ}$ C 预热 5 min，后进入循环，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，60 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s，共 30 个循环。最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 分钟。(2) 对 PCR 产物进行凝胶电泳，确定每一对特异性引物只能扩增出对应菌株的目的片段。

6. 定量 PCR 标准曲线的制定

6.1 将活化后的六株细菌分别接种于 NA 培养基中，30 $^{\circ}$ C、170 r/min 振荡培养 12 h，以制得的新鲜菌悬液为模版，利用各菌株的特异性引物 (表 2) 在 PCR 仪 (life technologies, Applied Biosystems PCR 热循环仪) 内对对应菌株进行 PCR 扩增。PCR 反应 (50 μ l) 包含 2 μ l 细菌菌液，25 μ l 混合物，各 2 μ l 正向和反向引物，以及 19 μ l 去离子水。PCR 反应程序如下：首先 95 $^{\circ}$ C 预热 5 min，后进入循环，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，60 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s，共 30 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

6.2 使用其中 2 μ l PCR 产物进行凝胶电泳，确定扩增出目的片段后，对剩余的 48 μ l PCR 产物使用 Cycle Pure Kit PCR 纯化试剂盒进行纯化。得到各个引物扩增对应菌株的纯化 PCR 产物片段。

6.3 通过酶联反应将纯化后的 PCR 产物片段连接到 PMD-19T 质粒载体上面，随后通过热激转化将连接成功的质粒转入大肠杆菌感受态 DH5 α 中，涂布于含氨苄抗性 (终浓度 100 μ g/ml) 的 LB 平板上，37 $^{\circ}$ C 培养 15 h。

6.4 分别挑取在抗性平板上长出来的单菌落 (已成功转入各个菌株特异性片段) 接种于含氨苄抗性 (终浓度 100 μ g/ml) 的液体 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C、170 r/min 振荡培养 12 h。然后按照 OMEGA 质粒提取试剂盒说明书提取质粒。

6.5 使用 Nanodrop 测定所得线性质粒的浓度和纯度。代入公式：拷贝数 (copies/ μ l) = 6.02×10^{23} (copies/mol) \times 质粒浓度 (ng/ μ L) $\times 10^{-9}$ / [(载体质粒分子量 + 插入特异性片段分子量) $\times 660$] (g/mol)，计算得到质粒拷贝数。

6.6 将以上计算过拷贝数的质粒进行梯度稀释，得到 6 个浓度的质粒。将每个浓度的质粒分别作为模版进行荧光定量 PCR 反应。荧光定量 PCR 使用荧光定量仪器 Applied Biosystems StepOne Plus 进行。PCR 反应 (20 μ l) 包含 2 μ l 质粒，10 μ l SYBR Premix Ex Taq，各 0.8 μ l 正向引物和反向引物，0.4 μ l Dye I 和 6 μ l 无菌去离子水。PCR 反应程序为：第一步，95 $^{\circ}$ C 30 s；第二步，95 $^{\circ}$ C 5 s，

60 °C 34 s, 40 个循环；第三步，95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s，反应结束后确认扩增曲线和融解曲线。得到每个质粒浓度 (拷贝数) 对应的 CT 值。以拷贝数的对数值为横坐标，CT 为纵坐标绘制标准曲线 (图 4) 。

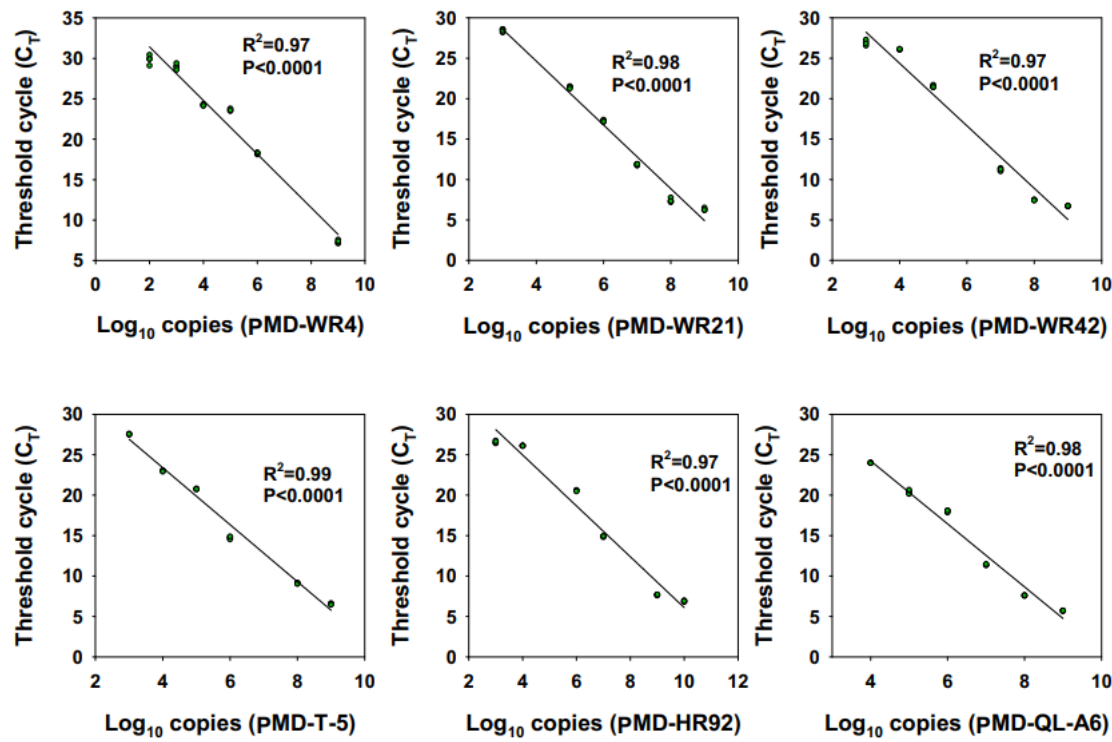


图 3. 六株菌分别对应的特异性引物定量 PCR 标准曲线

7. 对步骤 4 提取的 DNA 样品中所含的每个菌 i 使用特异性引物 (表 2) 进行荧光定量 PCR，以确定处理中每个菌的生物量。菌株 i 单独培养时的生物量用 MP_i 表示，和其他菌株共培养时的生物量用 CP_i 表示。PCR 反应 (20 μ l) 包含 2 μ l 细菌 DNA，10 μ l SYBR Premix Ex Taq，各 0.8 μ l 正向引物和反向引物，0.4 μ l Dye I 和 6 μ l 无菌去离子水。PCR 反应程序为：第一步，95 °C 30 s；第二步，95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环；第三步，95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s，反应结束后确认扩增曲线和融解曲线。得到每个菌对应的 CT 值，然后根据每个菌对应的定量 PCR 标准曲线 (图 3) 计算出每个菌的拷贝数量。
8. 多株菌群落中菌株之间的平均相互作用强度 (OIF) 使用以下公式来计算：

$$OIF = \frac{1}{n} \sum \log(CP_i / MP_i)$$

其中 n 表示组成群落的细菌数量。当 OIF 由小变大的过程表示群落中便利关系越来越强，相对的，群落中竞争关系越来越弱。我们发现根据两株菌互作关系预测的多株菌群落平均互作强度 (PIF) 和实际检测到的多株菌群落平均互作强度 (OIF) 之间存在一定的正相关关系 (图 5)，说明两株菌群落中的相互作用在一定程度上可以用来预测多株菌群落中相互作用特征。

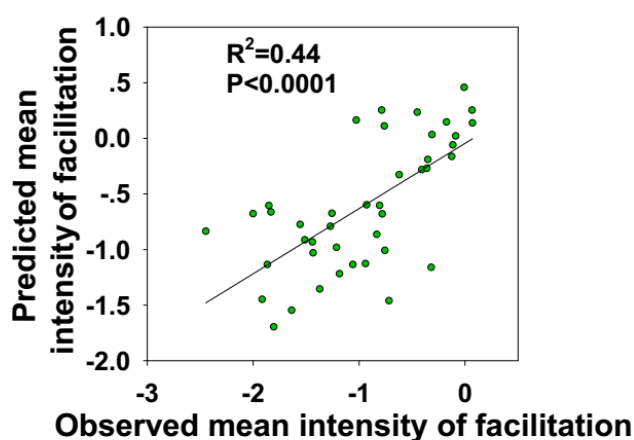


图 4. 多株菌群落内部平均互作强度预测值 (PIF) 与实测值 (OIF) 间的关系

结果与分析

采用 T 检验 (SPSS v. 19) 对两株菌单独培养生物量之和与共培养总生物量进行比较，以确定两株菌之间的互作关系。线性相关分析采用 Sigmaplot (v. 12.5) 进行拟合。

溶液配方

1. 液体 NA 培养基

葡萄糖 10 g，蛋白胨 5 g，酵母粉 0.5 g，牛肉膏 3 g，1,000 毫升去离子水，pH 7.0，115 °C 高压灭菌 30 min

2. 固体 NA 培养基

在 1,000 毫升液体 NA 培养基的基础上加 20 g 琼脂，115 °C 高压灭菌 30 min。

3. 液体 LB 培养基

蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g、去离子水 1,000 ml, pH 7.0, 121 °C 高压灭菌 20 min

4. 固体 LB 培养基

在 1,000 毫升液体 LB 培养基的基础上加 20 g 琼脂, 然后 121 °C 高压灭菌 20 min

致谢

本研究由国家自然科学基金 (41471213, 41671248), 江苏省自然科学基金 (BK20170085), 青年精英科学家资助计划 (2015QNRC001) 资助, 依托于南京农业大学资源与环境科学学院微生态与根际健康实验室 (LorMe) 顺利完成这项实验。

本实验流程基于已发表的论文 (Li *et al.*, 2019) 撰写。

参考文献

1. Foster, K.R. & Bell, T. (2012). [Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species](#). *Current biology*, 22, 1845-1850.
2. Huang, J., Wei, Z., Tan, S., Mei, X., Yin, S., Shen, Q. *et al.* (2013). [The rhizosphere soil of diseased tomato plants as a source for novel microorganisms to control bacterial wilt](#). *Applied Soil Ecology*, 72, 79-84.
3. Li, M., Wei, Z., Wang, J., Jousset, A., Friman, V.P., Xu, Y. *et al.* (2019). [Facilitation promotes invasions in plant-associated microbial communities](#). *Ecology letters*, 22, 149-158.
4. Tan, S., Dong, Y., Liao, H., Huang, J., Song, S., Xu, Y. *et al.* (2013). [Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato](#). *Pest Management Science*, 69, 1245-1252.
5. Wei, Z., Huang, J., Tan, S., Mei, X., Shen, Q. & 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, 278-285.