

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2024.05.001

宏基因组学检测技术在土壤微生物群落物种及功能多样性研究中的应用

栗卢瑞¹, 文俊明², 林波², 杨吉勇²,
张斌², 郝兴安¹, 安航¹, 杨照²

1. 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 咸阳 712100;

2. 陕西省烟草公司 咸阳市公司, 陕西 咸阳 712000

摘要: 宏基因组学作为一种前沿检测技术, 通过高通量测序直接从环境样本中提取DNA, 无需培养即可获得微生物群落的全基因组信息. 常用的宏基因组测序平台包括 Illumina 和 PacBio, 关键的数据分析方法有 QIIME 和 MEGAN, 可用于处理和分析大量微生物数据. 宏基因组测序技术在微生物群落物种多样性研究中, 采用 16S rRNA 基因测序, 并基于 Shannon 指数和 Simpson 指数进行多样性分析; 在功能基因研究中, 通过使用 KEGG 和 COG 数据库进行基因注释, 并借助 PICRUSt 等工具进行功能预测和代谢途径分析. 宏基因组学检测技术为深入解析土壤微生物群落结构及其生态功能提供了有力支持, 并在揭示土壤微生物与环境因子的互作机制方面取得了重要进展.

关键词: 宏基因组学; 土壤; 微生物

中图分类号: S154.3

文献标志码: A

文章编号: 2097-1354(2024)05-0001-07

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Application of Metagenomic Technique in the Study of Species and Functional Diversity of Soil Microbial Communities

LI Lurui¹, WEN Junming², LIN Bo², YANG Jiyong²,
ZHANG Bin², HAO Xing'an¹, AN Hang¹, YANG Zhao²

1. College of Plant Protection, Northwest A & F University, Xianyang Shaanxi 712100, China;

2. Xianyang Branch of Shaanxi Tobacco Corporation, Xianyang Shaanxi 712000, China

收稿日期: 2024-04-29

基金项目: 陕西省烟草公司咸阳市公司科技项目(XYKJ-2022-08).

作者简介: 栗卢瑞, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究.

通信作者: 杨照, 农艺师.

Abstract: As an advanced detection technology, metagenomics can directly extract DNA from environmental samples and obtain the whole genome information of microbial communities through high-throughput sequencing without culture. At present, there are commonly used metagenomics sequencing platforms, such as Illumina and PacBio, and key data analysis methods, including QIIME and MEGAN, which are used to process and analyze a large number of microbial data. In the study of microbial community species diversity with metagenomic sequencing technology, 16S rRNA gene sequencing is applied, along with diversity analysis based on Shannon index and Simpson index. In functional gene research, gene annotation is performed using KEGG and COG databases, and tools such as PICRUSt are employed for functional prediction and metabolic pathway analysis. Metagenomics provides strong support for the in-depth analysis of soil microbial community structure and its ecological functions, and significant progress has been made in revealing the interaction mechanisms between soil microbes and environmental factors.

Key words: metagenomics; soil; microorganism

土壤中蕴藏着丰富的微生物,包括细菌、真菌、放线菌、古细菌、原生动物和线虫等,这些微生物群落是土壤生态系统的重要组成部分,对土壤生态功能和植物生长发育具有重要影响^[1].大多数土壤微生物无法通过人工培养,传统的分离鉴定方法不仅费时费力,还只能检测可培养微生物.宏基因组检测技术克服了传统方法的局限性,能够直接提供全面的信息.近年来,随着宏基因组检测技术的应用,土壤微生物群落研究取得了显著进展.宏基因组测序无需培养微生物,可帮助研究者全面了解土壤微生物的遗传信息和功能潜力,并能深入探究不同微生物的相互关系及群落的生态功能^[2].宏基因组测序是一种用于检测土壤微生物群落的先进技术,能够提供全面的信息,包括遗传信息、多样性和功能潜力,并可深入揭示其结构和生态功能^[3].它为土壤生态系统研究提供了全面而高效的方法,并为可持续土壤健康管理和生态保护提供了有力支持.本文综述了近年来宏基因组学在土壤微生物群落研究中的应用技术和成果,以期为进一步深入研究土壤微生物群落提供理论基础.

1 宏基因组检测技术简介

宏基因组检测技术主要研究环境中所有微生物群体遗传信息,可直接从环境样品中提取DNA,无需分离培养微生物,并利用高通量测序技术对混合DNA进行大规模测序,操作步骤包括采集环境样品、提取环境DNA、构建基因文库、高通量测序和数据分析等^[4-9].在土壤微生物研究中,宏基因组检测技术展现了显著优势^[10],与传统微生物学研究侧重于单一细菌或真菌的特定基因组不同,宏基因组学关注的是整个微生物群体的遗传信息,不仅可揭示已知微生物的存在,还能发现未知微生物的潜在新基因.宏基因组学深入揭示了微生物群体的功能潜力,包括有益微生物的生态角色及其在土壤生态系统中的相互作用.此外,宏基因组学还用于研究土壤微生物的适应性和响应机制,为理解土壤健康、生态系统功能及环境变化的影响提供了关键支持^[11].

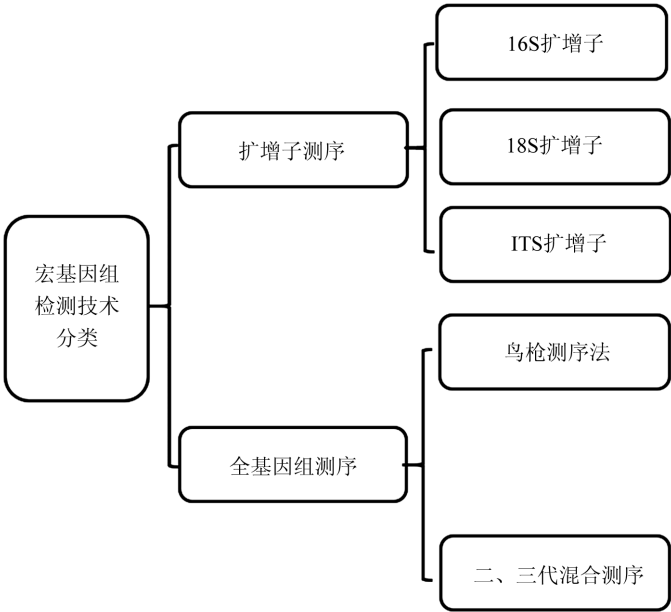


图 1 宏基因组检测技术分类

2 宏基因组学研究方法

2.1 微生物群落物种多样性研究方法

土壤微生物群落的物种多样性是指土壤中微生物物种的丰富度和相对丰度. α -多样性和 β -多样性分析法是微生物群落研究中常用的分析方法, 分别用于揭示群落内部多样性和不同样本间的差异. α -多样性描述单个样本内的群落多样性水平, 常用指标包括 Shannon 指数、Simpson 指数和 Chao1 指数, 通过 16S rRNA(细菌)或 ITS(真菌)序列测序计算多样性指数. β -多样性主要比较不同样本间的群落组成差异, 常用方法包括聚类分析和主坐标分析. 差异分析用于比较不同样本间微生物群落的差异, 以揭示不同环境条件或处理方式对群落的影响. 常用统计方法包括 ANOVA, Adonis, PERMANOVA 等, 可用于确定环境因素、生物样本来源等对群落组成的影响.

2.2 微生物功能基因研究方法

宏基因组学在基因功能预测中具有重要作用^[12]. 宏基因组测序得到的 DNA 序列可与已知数据库(如 NR、KEGG 等)中的序列比对, 通过比对蛋白编码基因的氨基酸序列, 可以推断新序列的可能功能. 使用 Clusters of Orthologous Groups (COG), euKaryotic Orthologous Groups(KOG)或 Gene Ontology (GO)分类系统对宏基因组序列进行注释和功能分配, 有助于预测新序列的功能, 结合基因邻近关系、共表达和共现模式, 可预测宏基因组序列参与的代谢通路和生物学功能.

3 宏基因组学在土壤微生物学中的应用

3.1 土壤微生物群落的物种多样性

宏基因组学全面揭示了土壤微生物的物种组成, 其多样性研究有助于深入了解土壤生态系统的健康状况、环境适应性及人类活动对微生物群落的影响.

3.1.1 相对丰度和多样性指数

相对丰度和多样性指数相互关联, 共同揭示土壤微生物群落的结构和功能. Enagboma

等^[13]研究了白蚁丘土壤与周围土壤之间的细菌多样性差异,采用鸟枪测序方法对提取的宏基因组 DNA 进行测序, β -多样性分析显示白蚁丘与周围土壤样品之间的细菌功能类别存在显著差异. Bulgarelli 等^[14]采用 16S rRNA 基因测序与鸟枪宏基因组分析相结合的方法,分析了野生与驯化大麦相关的微生物群,结果显示丛毛单胞菌科、黄杆菌科和根瘤菌科在大麦根富集菌群中占据主导地位. 土壤中的微生物群落包括细菌、真菌和古菌等,其中细菌凭借高度的生存适应性和快速繁殖能力,在土壤中广泛分布且数量庞大. 细菌以异养型为主,少数为自养型. 真菌是土壤微生物群落中第二大类群. 古菌在土壤中的占比较低,但参与了硫循环等特殊的生物地球化学过程^[15]. 总之,土壤中微生物的多样性及其相互作用对于维持土壤生态系统的平衡至关重要.

3.1.2 土壤微生物群落的多样性变化

土壤微生物群落动态变化受到季节、植被类型、土壤性质和水分状况等多种因素的影响. 长期监测与宏基因组技术的应用使研究者能够追踪土壤微生物群落的时空变化. 分析不同土壤的宏基因组数据有助于准确揭示微生物群落的变化趋势,表 1 为利用宏基因组技术检测土壤微生物群落变化的实例,并探讨了病害对群落多样性的影响.

表 1 宏基因组学检测技术检测土壤微生物群落变化的实例

应用技术	研究对象	研究内容	研究结果	文献来源
16S 扩增子测序	烟草土壤细菌群落	烟草连作病害土壤与连作非病害土壤的细菌群落差异	连作病害土壤样本的细菌群落组成具有相似性,同源性更高;烟草连作可影响土壤细菌群落结构	[16]
全基因组测序	油梨根际土壤微生物	萎蔫综合症感染对油梨根际土壤微生物的影响	油梨萎蔫综合症植株根区土壤微生物多样性高于无症状植株根区土壤,假单胞菌属仅存在于油梨萎蔫综合症植株根区土壤	[17]
全基因组测序	橡胶树根际土壤微生物	红根病感染对橡胶树根际土壤微生物群落的影响	健康和发病橡胶树根际土壤微生物群落结构及其土壤代谢物成分有很大差异	[18]

3.1.3 影响土壤微生物多样性的因素

土壤微生物多样性受自然和人为因素的共同影响^[19-20]. 宏基因组学使用多元统计分析(如主成分分析、冗余分析)、机器学习(如回归模型、随机森林)、网络分析(如共现网络、功能关联网络)和功能预测(如基因功能注释、代谢途径分析)等方法来分析和预测环境因子(如温度、pH 值、污染物)对微生物群落的影响^[21-24]. 这些方法揭示了微生物群落结构和功能的变化趋势,为理解土壤微生物多样性的变化提供了支持. Tkacz 等^[25]采用高通量测序技术分析了 4 种植物的土壤、根际、根面和根内圈的原核和真菌特异性微生物群,结果显示,虽然细菌微生物群来自周围土壤,但其结构受根的影响大于土壤或植物物种的影响;相比之下,真菌微生物群主要受土壤的影响. Novello 等^[26]研究了位于意大利的一个综合虫害管理葡萄园中葡萄根际细菌微生物群的多样性,并比较了散装土壤和根际土壤的微生物群落结构,同时分析了开花和果实早期发育 2 个物候阶段对土壤微生物群落的影响;利用宏基因组学测序技术鉴定葡萄菌群后,结果表明生物多样性与物候期无关,但根际土壤的多样性高于散装土壤.

3.2 土壤微生物群落的功能潜力

土壤微生物群落在有机物分解、养分循环、氮素转化及抑制病原体等方面发挥关键作用,并可提升植物免疫力. 同时,其作为生态系统的调节者,可促进植物健康、维持土壤生态平衡,

并在农业生产和生态环境中发挥重要作用^[27-31]。

3.2.1 功能基因的注释和预测

利用鸟枪宏基因组测序技术,Adedayo 等^[32]鉴定了健康蕃茄和白粉病蕃茄根际土壤微生物群落中与促生长和抗病功能相关的基因,结果显示健康根际微生物组中有 21 个植物生长促进基因,而病根际微生物组中仅含有 9 个,鉴定出的抗病基因包括核苷酸结合基因和抗菌基因。

3.2.2 土壤微生物群落的代谢潜力

土壤微生物群落的代谢潜力体现在降解有机物、促进养分循环和产生抗生素等功能上。微生物通过这些代谢活动,在生态系统中扮演关键的功能角色。利用宏基因组学检测技术研究土壤微生物群落代谢能力的实例见表 2。

表 2 宏基因组学检测技术研究土壤微生物群落代谢能力的实例

应用技术	研究对象	研究内容	研究结果	参考来源
16S 扩增子测序	土壤细菌群落	了解土壤微生物群落对多环芳烃(PAHs)生物降解的作用	没有直接确定细菌在多环芳烃降解中的作用,但证明了 <i>Beta proteobacteria</i> 类细菌的存在与 LMW 多环芳烃的较高降解相关	[33]
全基因组测序	黔中黄壤溶磷细菌	黔中黄壤溶磷细菌对土壤微生物碳循环基因的影响	溶磷细菌各处理的土壤微生物碳循环基因 <i>GHs</i> 相对丰度均高于基质处理,溶磷细菌各处理 <i>Ces</i> , <i>PLs</i> , <i>AAs</i> 基因相对丰度差异不显著	[34]
全基因组测序	森林土壤微生物	我国典型森林土壤微生物驱动的氮代谢途径特征	不同森林土壤中同一氮代谢过程可由不同的微生物参与,且负责整个氮代谢途径的微生物的群落结构不完全相同	[35]

3.2.3 土壤生态系统功能的关键微生物种群

研究土壤生态系统中的关键微生物种群(如氮循环微生物、磷溶解细菌和腐解真菌)有助于深入了解它们在养分循环和有机质降解等生态功能中的作用^[36]。Jiao 等^[37]利用高通量扩增子和宏基因组测序发现,核心微生物群对于维持再造林生态系统中土壤微生物群的功能稳定性至关重要。利用宏基因组测序技术研究关键微生物种群的实例见表 3。

表 3 宏基因组测序技术研究土壤关键微生物种群的实例

应用技术	研究对象	研究内容	研究结果	文献来源
16S 扩增子测序	土壤微生物	鉴定土壤中导致草莓产量下降的潜在微生物	导致草莓产量下降的因素可能是芽孢杆菌和假单胞菌种群丰度低、缺乏线虫真菌、2 种非特异性真菌根腐病病原菌含量高以及湿润的土壤条件	[38]
全基因组测序	土壤微生物	乌鲁木齐市河马泉新区土壤微生物多样性	不同样品泉古菌门的相对丰度均较高,该门所属氨氧化古菌的相对丰度较高,其在贫瘠土壤的氮、碳循环中具有重要作用	[39]
全基因组测序	根际噬菌体群落	根际噬菌体群落是否驱动土壤抑制细菌性枯萎病	归因于细菌的土壤抑制能力可能由根际噬菌体群落驱动	[40]

4 展望

随着测序技术的不断发展,宏基因组学将提供更高分辨率的微生物群落解析,揭示更多细节和功能,并检测微生物群落的细微变化。结合宏基因组学数据和计算模型,可构建微生物群

落的动态模拟与预测模型,推测其在不同环境条件下的演变趋势.宏基因组学检测技术可挖掘微生物群落中的未知物种和功能基因,推动新型生物农药、生物能源和生物材料等产品的开发.通过整合宏基因组学数据与其他组学数据(如宏转录组学、宏代谢组学),可以更全面地理解微生物群落的功能和代谢活动,加深对微生物与宿主(包括植物)互作的认识.随着技术创新和数据处理方法的提升,宏基因组学将成为解析土壤微生物群落结构和功能的重要工具,为可持续土壤管理和生态系统保护提供科学依据.

参考文献:

- [1] TORSVIK V, ØVREÅS L, THINGSTAD T F. Prokaryotic Diversity—Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1064-1066.
- [2] VAN ELSAS J D, BOERSMA F G H. A Review of Molecular Methods to Study the Microbiota of Soil and the Mycosphere[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(2): 77-87.
- [3] 钮旭光, 韩梅, 韩晓日. 宏基因组学: 土壤微生物研究的新策略[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(3): 576-579.
- [4] DANIEL R. The Metagenomics of Soil[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 470-478.
- [5] BHARTI R, GRIMM D G. Current Challenges and Best-Practice Protocols for Microbiome Analysis[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2021, 22(1): 178-193.
- [6] OGRAM A, SAYLER G S, BARKAY T. The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, 7(2-3): 57-66.
- [7] HOLBEN W E, JANSSON J K, CHELMB K, et al. DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(3): 703-711.
- [8] RONDON M R, AUGUST P R, BETTERMANN A D, et al. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2541-2547.
- [9] QUINCE C, WALKER A W, SIMPSON J T, et al. Shotgun Metagenomics, from Sampling to Analysis[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(9): 833-844.
- [10] KNIGHT R, VRBANAC A, TAYLOR B C, et al. Best Practices for Analysing Microbiomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(7): 410-422.
- [11] BERTRAND H, POLY F, VAN V T, et al. High Molecular Weight DNA Recovery from Soils Prerequisite for Biotechnological Metagenomic Library Construction[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 62(1): 1-11.
- [12] 彭玺, 冯凯, 厉舒祯, 等. 宏基因组学技术与微生物群落多样性分析方法[J]. *科技导报*, 2022, 40(3): 99-111.
- [13] ENAGBONMA B J, AREMU B R, BABALOLA O O. Profiling the Functional Diversity of Termite Mound Soil Bacteria as Revealed by Shotgun Sequencing[J]. *Genes*, 2019, 10(9): 637.
- [14] BULGARELLI D, GARRIDO-OTER R, MÜNCH P C, et al. Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley[J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(3): 392-403.
- [15] TORSVIK V, ØVREÅS L. Microbial Diversity and Function in Soil: From Genes to Ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 240-245.
- [16] 邸慧慧, 王瑞, 谭军, 等. 烟草连作病害土壤与连作非病害土壤的细菌群落差异性比较[J]. *湖北农业科学*, 2023, 62(3): 47-51.
- [17] 叶蓓蕾, 张叶, 刘乐, 等. 油梨萎蔫综合征植株根区土壤微生物组成及代谢通路分析[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(10): 3355-3364.
- [18] 戴利铭, 李岚岚, 刘一贤, 等. 红根病感染对橡胶树根际土壤微生物群落和代谢物的影响[J]. *热带农业科技*, 2024, 47(1): 56-62.
- [19] BAHAM M, HILDEBRAND F, FORSLUND S K, et al. Structure and Function of the Global Topsoil Microbiome[J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 233-237.

- [20] EDWARDS J, JOHNSON C, SANTOS-MEDELLÍN C, et al. Structure, Variation, and Assembly of the Root-Associated Microbiomes of Rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(8): e911-e920.
- [21] 曲颖, 孙晓玥, 滕新栋, 等. 基于宏基因组技术分析全球不同温度带土壤微生物多样性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1853-1871.
- [22] 李致同. 我国几种主要土壤中微生物硫循环代谢途径特征及硫循环功能微生物群落结构[D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- [23] MEDINA-SAUZA R M, ÁLVAREZ-JIMÉNEZ M, DELHAL A, et al. Earthworms Building up Soil Microbiota, a Review[J]. Frontiers in Environmental Science, 2019, 7: 81.
- [24] 王紫涵, 刘莎, 杨光, 等. 运用宏基因组技术研究施加中药渣有机肥对丹参及土壤微生物群落的影响[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(5): 1206-1216.
- [25] TKACZ A, BESTION E, BO Zhiyan, et al. Influence of Plant Fraction, Soil, and Plant Species on Microbiota: a MultiKingdom Comparison[J]. mBio, 2020, 11(1): e02785-19.
- [26] NOVELLO G, GAMALERO E, BONA E, et al. The Rhizosphere Bacterial Microbiota of *Vitis vinifera* Cv. Pinot Noir in an Integrated Pest Management Vineyard[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1528.
- [27] TRIVEDI P, ANDERSON I C, SINGH B K. Microbial Modulators of Soil Carbon Storage: Integrating Genomic and Metabolic Knowledge for Global Prediction[J]. Trends in Microbiology, 2013, 21(12): 641-651.
- [28] WANG Quanlong, ADAMS C A, WANG Fayuan, et al. Interactions between Microplastics and Soil Fauna: a Critical Review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2022, 52(18): 3211-3243.
- [29] LEFEVRE F, ROBE P, JARRIN C, et al. Drugs from Hidden Bugs: Their Discovery via Untapped Resources [J]. Research in Microbiology, 2008, 159(3): 153-161.
- [30] SONG C X, ZHU F, CARRIÓN V J, et al. Beyond Plant Microbiome Composition: Exploiting Microbial Functions and Plant Traits via Integrated Approaches[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 896.
- [31] GAO Z L, KARLSSON I, GEISEN S, et al. Protists: Puppet Masters of the Rhizosphere Microbiome[J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(2): 165-176.
- [32] ADEDAYO A A, FADIJI A E, BABALOLA O O. Unraveling the Functional Genes Present in Rhizosphere Microbiomes of *Solanum lycopersicum*[J]. PeerJ, 2023, 11: e15432.
- [33] CRAMPON M, BODILIS J, PORTET-KOLTALO F. Linking Initial Soil Bacterial Diversity and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Degradation Potential[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 359: 500-509.
- [34] 乔志伟, 张永杰, 谢梅芳. 黔中黄壤溶磷细菌溶磷特性及对土壤微生物碳循环基因的影响[J]. 河南农业科学, 2023, 52(8): 78-86.
- [35] 吕雪丽, 赵永鹏, 林清火, 等. 我国典型森林土壤微生物驱动的氮代谢途径特征解析[J]. 环境科学, 2021, 42(10): 4951-4958.
- [36] JOUSSET A, BIENHOLD C, CHATZINOTAS A, et al. Where Less May Be More: How the Rare Biosphere Pulls Ecosystems Strings[J]. The ISME Journal, 2017, 11(4): 853-862.
- [37] JIAO S, CHEN W M, WEI G. Core Microbiota Drive Functional Stability of Soil Microbiome in Reforestation Ecosystems[J]. Global Change Biology, 2022, 28(3): 1038-1047.
- [38] XU X M, PASSEY T, WEI F, et al. Amplicon-Based Metagenomics Identified Candidate Organisms in Soils that Caused Yield Decline in Strawberry[J]. Horticulture Research, 2015, 2: 15022.
- [39] 阿瓦古丽·图尔荪, 张新强, 负丰泽, 等. 乌鲁木齐市河马泉新区土壤微生物多样性及其影响因素分析[J]. 中国环境科学, 2023, 43(S1): 277-287.
- [40] YANG K M, WANG X F, HOU R J, et al. Rhizosphere Phage Communities Drive Soil Suppressiveness to Bacterial Wilt Disease[J]. Microbiome, 2023, 11(1): 16.