

## 土壤细菌网络互作调控线虫肠道细菌群落

张慧<sup>1,2</sup>, 肖娴<sup>1</sup>, 黄瑞林<sup>2</sup>, 马志远<sup>2</sup>, 刘满强<sup>3</sup>, 赵远<sup>1</sup>, 蒋瑀霁<sup>2</sup>, 孙波<sup>2</sup>,  
梁玉婷<sup>2\*</sup>

1 常州大学环境科学与工程学院, 江苏 常州 213164

2 中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008

3 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210008

张慧, 肖娴, 黄瑞林, 马志远, 刘满强, 赵远, 蒋瑀霁, 孙波, 梁玉婷. 土壤细菌网络互作调控线虫肠道细菌群落[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2276-2290.

ZHANG Hui, XIAO Xian, HUANG Ruilin, MA Zhiyuan, LIU Manqiang, ZHAO Yuan, JIANG Yuji, SUN Bo, LIANG Yuting. Nematode gut bacterial communities are regulated by soil bacterial network interactions[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(6): 2276-2290.

**摘要:** 动物肠道细菌群落在联系宿主与生态系统功能中发挥着至关重要的作用。【目的】本研究旨在评估绿肥翻压和水稻生长不同时期对土壤细菌和线虫肠道细菌群落组成和结构的影响, 并探究土壤细菌和线虫肠道细菌群落间的潜在关联关系。【方法】基于盆栽试验, 结合 16S rRNA 基因高通量测序技术, 分析黑麦草翻压和对照处理下水稻生长的前期(返青期)和后期(收获期)土壤细菌和线虫肠道细菌群落, 结合网络分析研究土壤细菌网络互作对线虫肠道细菌群落的潜在影响。【结果】黑麦草翻压对土壤细菌和线虫肠道细菌群落组成和结构没有显著影响( $P>0.05$ ); 水稻生长后期样品比前期样品具有更高的  $\alpha$  多样性。基于随机森林机器学习法获得的土壤细菌和线虫肠道细菌生物标志物之间存在广泛的显著相关关系, 为土壤细菌群落变化调控线虫肠道细菌群落组成提供了有力的证据。共现网络分析表明土壤细菌之间的正相互作用显著促进了土壤细菌和线虫肠道细菌之间的正相互作用( $P<0.01$ ), 进而影响了线虫肠道细菌之间的网络互作。结构方程模型进一步表明土壤养分含量的降低主要通过降低土壤细菌之间正相互作用, 从而间接影响线虫肠道细菌之间的互作。【结论】土壤细菌互作可能在调控线虫肠道细菌互作和群落组成方面有重要作用。

**关键词:** 土壤细菌; 线虫肠道细菌; 网络互作; 黑麦草; 结构方程模型

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1900400); 国家自然科学基金(42107146)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1900400) and the National Natural Science Foundation of China (42107146).

\*Corresponding author. Tel: +86-025-86881568, E-mail: ytliang@issas.ac.cn

Received: 2023-04-26; Accepted: 2023-05-30

# Nematode gut bacterial communities are regulated by soil bacterial network interactions

ZHANG Hui<sup>1,2</sup>, XIAO Xian<sup>1</sup>, HUANG Ruilin<sup>2</sup>, MA Zhiyuan<sup>2</sup>, LIU Manqiang<sup>3</sup>, ZHAO Yuan<sup>1</sup>, JIANG Yuji<sup>2</sup>, SUN Bo<sup>2</sup>, LIANG Yuting<sup>2\*</sup>

1 School of Environmental Science and Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu, China

3 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210008, Jiangsu, China

**Abstract:** The gut microbiota of animals plays a crucial role in bridging host and ecosystem functions. **[Objective]** We aimed at assessing the effects of ryegrass application and different sampling periods of rice growth stages on the composition and structure of soil bacterial and nematode gut bacterial communities and exploring their potential linkages. **[Methods]** Based on a pot experiment, soil bacterial and nematode gut bacterial communities in the early (green returning period) and later (harvest period) stages of rice growth under ryegrass application and control treatments were analyzed by using 16S rRNA gene high-throughput sequencing technology. The potential impact of soil bacterial interactions on nematode gut bacterial communities was further studied with the network analysis. **[Results]** Ryegrass application did not significantly affect the composition and structure of soil and nematode gut bacterial communities ( $P>0.05$ ). The later samples had higher alpha diversity than earlier ones. Extensive and significant correlations between soil bacterial and nematode gut bacterial biomarkers were obtained based on random forest machine learning, providing strong evidence that soil bacterial community changes regulate intestinal bacterial community composition of nematodes. Co-occurrence network-based analysis showed that positive interactions among soil bacteria were significantly ( $P<0.01$ ) positively correlated with positive interactions between soil and nematode gut bacteria, thereby influencing network interactions among nematode gut bacteria. Structural equation modeling (SEM) further showed that the reduction of soil nutrients indirectly affected the network interactions among nematode gut bacteria mainly by reducing the positive network interactions among soil bacteria. **[Conclusion]** Soil bacterial interactions may play important roles in regulating network interactions and community composition of nematode gut bacteria.

**Keywords:** soil bacteria; nematode gut bacteria; network interaction; ryegrass; structural equation modeling

土壤线虫是土壤小型动物中极为活跃的一类动物, 可通过取食、代谢等活动参与调控土壤有机质的分解和养分循环<sup>[1-3]</sup>。因为土壤线虫

世代周期短、对环境变化反应敏感、耐受性高和容易分离等特点, 土壤线虫可以作为农田土壤措施改变的敏感指示物种<sup>[4-6]</sup>。鉴于土壤线虫

在土壤食物网中具有多重营养等级, 如食细菌线虫、食真菌线虫、捕食者和杂食者, 近年来土壤线虫的生态学功能和影响因素受到了广泛关注<sup>[7-9]</sup>。由于高通量测序技术的发展和持续降低的测序成本, 越来越多的研究者开始由单一评估非生物因子对线虫群落组成和结构的影响转变为关注生物因子以及非生物因子和生物因子相互作用对线虫生态功能影响的研究。其中, 线虫肠道细菌及其对环境变化和人类活动(如施肥)的响应对宿主线虫的影响的研究是众多研究中的热点。

线虫肠道细菌在宿主的健康、功能和种群增长中起着重要作用<sup>[10-11]</sup>。比如, 一些变形菌门可以进入线虫的肠道并定居, 且一些特定的变形杆菌属与秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的种群增长有关<sup>[12]</sup>。除变形菌门外, 其他线虫肠道细菌也与线虫的种群增长密切相关。例如, 通过在实验室内简化重构细菌群落发现, 秀丽隐杆线虫肠道内的高水平拟杆菌门会诱导产生更多的非增殖性幼虫<sup>[13]</sup>。另外, 一些研究显示外界环境的变化会引起线虫肠道微生物组的变化从而影响线虫的生长、发育和繁殖<sup>[14-16]</sup>。例如, 研究表明施肥改变的土壤性质如有机碳含量、pH、氮含量和磷含量变化与线虫肠道细菌群落组成显著相关<sup>[9]</sup>。这些外界环境变化引起的肠道细菌的变化大多数被归因于线虫肠道内的环境过滤或线虫与细菌之间的适应性<sup>[11,17-18]</sup>。有证据表明细菌之间的种间相互作用可能决定了细菌在线虫肠道内的成功定殖, 而肠道环境过滤或线虫-细菌适应性的重要性较小<sup>[17,19]</sup>。这些研究表明外界环境变化、土壤细菌种间相互作用和线虫肠道群落变化三者之间可能存在密切的关联。因此, 有必要深入解析三者之间的潜在关系。

植物根系碳输入是土壤有机碳的重要来源

之一, 植物不同生长阶段根系分泌物的分泌量差别较大<sup>[20]</sup>。水稻苗期根系分泌物的渗透速率最低, 扬花期渗透速率最高; 随着水稻生长, 分泌物中有机酸的百分比含量增加, 糖类的含量降低<sup>[21]</sup>。研究表明, 水稻不同生育期内根际土壤微生物群落发生显著变化, 表现为根际土壤微生物结构和功能存在一些明显差异<sup>[22]</sup>。绿肥作为有机物还田可增加土壤养分、促进土壤中难溶性养分转化、改善土壤理化性状、增加土壤微生物活动等多重生态效应<sup>[23-25]</sup>。然而, 绿肥投入以及水稻根系碳输入导致的有机物大量投入对于土壤细菌种间相互作用和线虫肠道群落变化的影响研究还很不足。基于以上研究背景, 本研究拟评估水稻生长不同时期和绿肥翻压对土壤性质、土壤和线虫肠道细菌群落的影响, 拟解决以下两个问题: (1) 水稻生长不同时期和黑麦草翻压对土壤性质、细菌群落组成和线虫肠道细菌群落组成的影响及其重要性; (2) 土壤性质、土壤细菌和线虫肠道细菌之间的潜在关联关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

供试土壤为黄棕壤, 于2016年11月份采自中国江苏省常州市(119.75°E, 31.73°N)稻田0-10 cm土壤(非淹水条件下), 自然风干, 木槌粉碎后通过2 cm筛网后备用。黑麦草种子取自中国科学院植物研究所。

本试验为水稻盆栽试验, 设置种植黑麦草和对照(未种植黑麦草)两组处理; 分2个时期采样(破坏性采样), 每个处理3个重复, 每盆装填3 kg干土(花盆直径18 cm, 高16 cm)。试验初期, 向黑麦草处理的盆中撒入150粒黑麦草种子, 待种子发芽后, 每盆定株为120株, 继续生长30 d后翻压。除未种植黑麦草外, 对照组

所有操作与种植黑麦草的处理相同。黑麦草翻压进土壤 20 d 后, 分别在对照和种植黑麦草的盆栽中种植水稻。水稻品种为武运粳 7 号。在水稻前期(返青期)和后期(收获期), 分别采集土壤样品, 并将土壤样品分别保存于 4 °C (用于土壤性质测定和线虫分离)和-80 °C (用于 DNA 提取)的冰箱中。

## 1.2 土壤理化性质测定

土壤理化性质根据《土壤农业化学分析方法》进行测定<sup>[26]</sup>, 具体方法见表 1。

## 1.3 土壤微生物总 DNA 提取

准确称取 0.5 g 土壤样品, 经过液氮冷冻研磨后, 采用 Power Soil DNA 提取试剂盒(MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad)提取土壤总 DNA。提取的 DNA 样品经检测合格后, 于-80 °C 条件下低温保存。DNA 样品检测方式: (1) 利用琼脂糖凝胶电泳实验检测 DNA 完整性: 条带清晰可见, 无明显降解; (2) NanoDrop 2000 检测基因组 DNA 质量: 浓度 $\geq 20$  ng/ $\mu$ L,  $OD_{260}/OD_{280}=1.8-2.0$ 。

## 1.4 土壤线虫分离

通过结合浅盘法和离心浮选法分离线虫。具体步骤如下: (1) 取 10 目筛子套入对应浅盘中, 筛内铺上用于捕捉线虫的滤纸, 冲洗筛子内部边缘使滤纸完全贴合无气泡; (2) 称取 50 g 土壤样本, 平铺于线虫滤纸后加入适量蒸馏水, 使滤纸呈薄膜状。土壤混浊液需在 20 °C 静置

48 h, 2 d 后收集浅盘中的液体备用, 线虫分离期间应保持充足水分; (3) 上一步骤中剩余的土样置于离心管, 加入 100 mL 蒸馏水并搅拌均匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 后加入 100 mL 蔗糖溶液(1 L 水中加入绵白糖 454 g, 超声波振荡溶解), 充分搅拌至悬浊液, 1 300 r/min 离心 5 min, 收集上层浑浊液; (4) 将 2 个 500 目筛子组成套筛, 取前两步收集的浑浊液过筛, 将液体中的线虫收集至塑料皿, 每个土壤样本随机选择 50 条线虫作为线虫样本, 用于提取线虫肠道微生物; (5) 将收集的线虫置于 2%的次氯酸钠溶液处理 10 s, 无菌磷酸盐缓冲溶液漂洗 4 次, 将最后一次洗脱液在 LB 平板上 28 °C 无菌培养 24 h, 若未观察到菌落, 则表明线虫体表微生物已被完全去除, 否则重复上述步骤<sup>[9]</sup>。

将上述经体表杀菌后的线虫转移至 PowerBead Tube, 采用 Power Soil DNA 提取试剂盒提取线虫体内微生物。提取的 DNA 样品经检测合格后, 于-80 °C 低温保存。DNA 检测方式同土壤样品。

## 1.5 土壤细菌和线虫肠道细菌高通量测序

以合格的微生物基因组 DNA 为模板, 用正向引物 515F (GTGCCAGCMGCCGCGG)和反向引物 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT)扩增 16S rRNA 基因的 V4-V5 高变异区<sup>[27]</sup>。使用 ABI GeneAmp® 9700 (ABI, Foster City, CA)进行 PCR

表 1 水稻土理化性质测定方法

Table 1 Determination method of physico-chemical properties in paddy soil

Properties of paddy soil	Determination method
pH	Standard electrode
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	Potassium chloride extraction colorimetric method
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	Phenol disulfonic acid colorimetric method
Total nitrogen	Kjeldahl method
Total phosphorus	Olsen-P method
Available phosphorus	Amonium acetate extraction method
Soil organic carbon	Potassium dichromate oxidation spectrophotometric method
Cation exchange capacity	Amonium acetate saturation method

扩增, 扩增条件: 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 2 min。每个样品独立扩增 3 次, 扩增后通过琼脂糖凝胶(2.0%)电泳检查 2  $\mu$ L 的 PCR 产物, 然后将同一样品的所有 PCR 产物混合。使用 Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter, CA)对混合物进行纯化, 获得样本的原始文库。对文库定量并按比例混合样本, 向文库末端引入 read1、read2 和特异性 Index 标签序列。通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测测序文库插入片段的大小, 确认在 120–200 bp 无非特异性扩增, 并准确定量测序文库浓度。建库后采用 MiSeq 平台, 2 $\times$ 250 bp 的双端测序策略对文库进行测序, 原始下机数据经过质量控制和过滤后, 利用 UPARSE 软件对 97%相似水平的 OTU (operational taxonomic unit)代表序列进行分类学统计, 分类比对参照 RDP (ribosomal database project)数据库, 后续进行生物信息学分析, 测序工作委托上海天昊生物科技有限公司完成。

## 1.6 数据分析

在 R (version 4.1.2)中(<https://www.r-project.org/>), 使用 `vegan` (version 2.6-2)<sup>[28]</sup>包中的 `diversity` 函数评估不同样本的多样性指数; 使用 `pcoa` 函数对所有样本进行主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)<sup>[29]</sup>; 使用 `adonis2` 函数开展置换多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)以评估采样时期和黑麦草处理对土壤细菌和线虫肠道细菌群落结构的影响; 使用 `rda` 函数评估不同土壤性质对土壤细菌群落结构的影响。利用 R 语言中的 `lm` 函数评估不同网络正负关联之间的拟合关系。基于 `randomForest` (version 4.7-1.1)<sup>[30]</sup>包评估土壤细菌和线虫肠道细菌预测采样时期和黑麦草翻压处理的生物标志物。

基于 WGCNA 包<sup>[31]</sup>构建斯皮尔曼(Spearman)

相关矩阵以推断共现网络, 评估土壤细菌和线虫肠道细菌之间的关联关系。网络中的节点代表 OTU, 连接这些节点的边代表 OTU 之间的相关关系。使用 Benjamini 和 Hochberg false discovery rate (FDR)控制运算过程对所有  $P$  值进行多重检验调整<sup>[32]</sup>, 该过程在 `multtest` 包中实现。根据相关系数和 FDR 调整后的相关性  $P$  值, 构建共现网络。FDR 调整后的  $P$  值为 0.001, 基于随机矩阵理论的方法相关系数阈值确定为 0.78<sup>[33]</sup>。网络拓扑参数和子网络提取在 `igraph` 包中进行。

为评估土壤理化性质、土壤细菌之间的正相互作用、土壤细菌和线虫肠道细菌之间的正相互作用与线虫肠道细菌之间正相互作用的直接和间接联系, 构建了结构方程模型(structural equation modeling, SEM)<sup>[34]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻生长时期和绿肥翻压对土壤性质的影响

不同水稻生长时期是影响土壤性质的主要因素。相比于前期土壤样品来说, 后期土壤样品中氮含量如总氮、硝态氮和铵态氮含量均显著降低( $P < 0.05$ , 表 2)。相比之下, 黑麦草翻压主要降低了前期土壤样品中的硝态氮含量而增加了后期土壤样品中的硝态氮含量。无论是水稻生长时期还是黑麦草翻压处理对土壤有机碳、总磷和 pH 均无显著的影响。

### 2.2 土壤细菌和线虫肠道细菌对水稻生长时期和黑麦草翻压处理的响应

主坐标分析(PCoA)表明水稻生长时期是影响土壤细菌和线虫肠道细菌群落分布的主要因素(图 1A、1B)。对土壤细菌来说, PCoA1 和 PCoA2 分别能解释 42.84%和 21.05%的群落变化; 对于线虫肠道细菌, 它们分别能解释 29.77%和 13.20%的群落变化。无论是土壤细菌

表 2 水稻生长不同时期和绿肥翻压下的土壤性质  
Table 2 Soil properties under different periods and treatments

Soil properties	Early		Later	
	CK	Ryegrass	CK	Ryegrass
SOC (g/kg)	25.11±1.94Aa	24.52±1.25Aa	24.03±1.04Aa	23.27±1.96Aa
TN (g/kg)	1.78±0.15Aa	1.7±0.05Aa	1.44±0.04Ba	1.47±0.04Ba
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/kg)	11.67±0.36Aa	9.74±0.31Ab	0.17±0.25Bb	4.12±0.52Ba
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/kg)	124.65±21.27Aa	103.93±3.17Aa	20.13±0.22Ba	25.74±3.89Ba
TP (g/kg)	0.81±0.07Aa	0.78±0.05Aa	0.85±0.02Aa	0.88±0.02Aa
AP (mg/kg)	86.25±8.45Aa	82.67±13.64Aa	73.25±1.82Aa	73.25±1.82Aa
pH	7.58±0.23Aa	7.44±0.16Aa	7.62±0.04Aa	7.54±0.16Aa
CEC (mol/kg)	17.13±0.32Aa	17.2±0.60Aa	17.77±0.40Aa	18.33±0.21Ba

Mean±standard deviation; Different lowercase letters represent significant differences between control and treatment in the same period; Different capital letters represent significant differences between periods within treatments; Differences were calculated using Tukey HSD post hoc test.

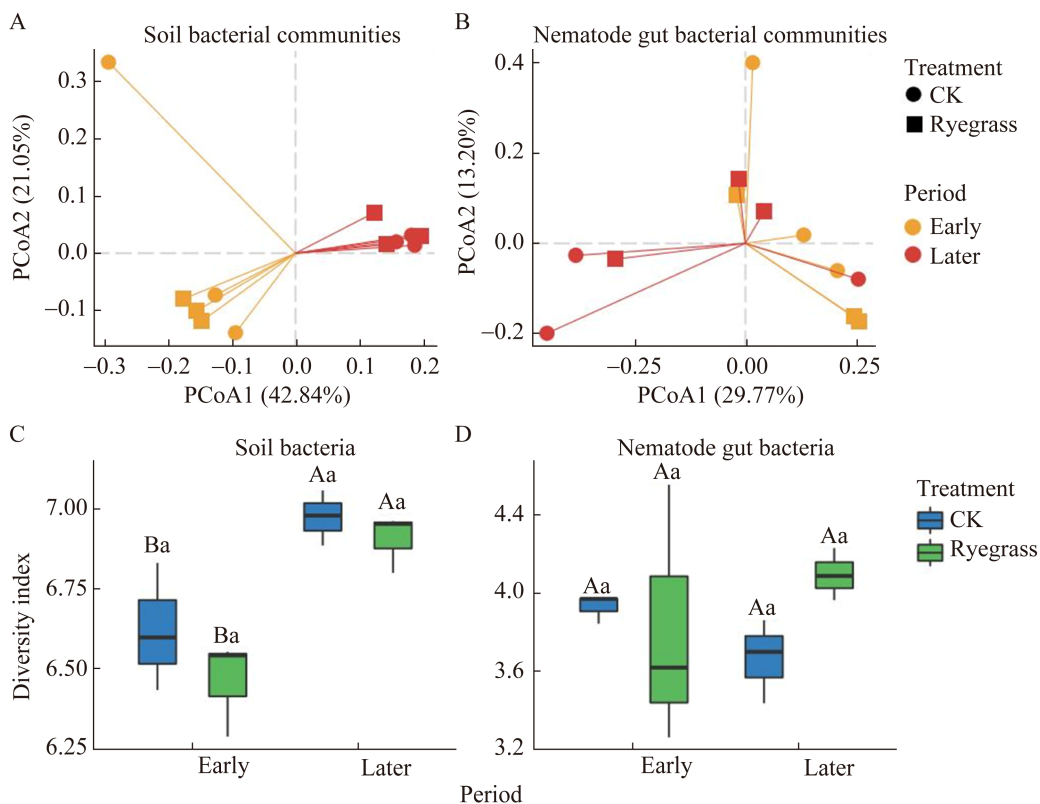


图 1 土壤细菌和线虫肠道细菌群落的主坐标分析

Figure 1 Principal coordinate analysis (A: Soil bacteria. B: Nematode gut bacteria) and alpha diversity analysis (C: Soil bacteria. D: Nematode gut bacteria) of soil bacterial and nematode gut bacterial communities. Different capital letters represent significant differences between different periods under the same treatment, and different lowercase letters represent significant differences between different treatments under the same period.

**表 3 黑麦草翻压处理和采样时期对土壤和线虫肠道细菌群落影响的多变量方差分析(PERMANOVA)**  
**Table 3 Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) for the effects of ryegrass application and sampling period on soil and nematode gut bacterial communities**

Habitats	Factors	df	R <sup>2</sup>	F value	P
Soil	Treatment	1	0.06	1.06	0.34
	Period	1	0.41	7.04	< 0.01
	Treatment×period	1	0.06	1.10	0.31
Nematode gut	Treatment	1	0.07	0.84	0.58
	Period	1	0.14	1.62	0.08
	Treatment×period	1	0.09	1.05	0.31

df is the degree of freedom; R<sup>2</sup> is the goodness of fit; F value is the F value; P is the significance.

还是线虫肠道细菌群落，在 PCoA 中的分布均表现为前期样品点发散而后后期样品点相对聚集的模式。进一步使用多变量方差分析(PERMANOVA)定量评估水稻生长时期和黑麦草翻压处理对群落分布的影响，发现水稻生长时期显著地影响土壤细菌的群落组成( $P < 0.01$ ，表 3)，但黑麦草翻压处理对群落组成无显著影响( $P = 0.34$ )。水稻生长时期对线虫肠道细菌群落组成的影响较弱( $P = 0.08$ )，黑麦草翻压处理不影响肠道细菌群落组成( $P = 0.58$ )。

土壤和线虫肠道细菌的  $\alpha$  多样性分析表明，在相同处理下，水稻生长后期土壤样品中细菌具有更高的多样性( $P < 0.01$ ，图 1C、1D)。但黑麦草翻压处理对细菌的  $\alpha$  多样性无显著影响。对土壤线虫肠道细菌来说，水稻生长时期和黑麦草处理对其  $\alpha$  多样性均无显著影响。

### 2.3 土壤细菌和线虫肠道细菌生物标志物之间的关系

为了解析土壤细菌和土壤线虫肠道细菌之间的关联，首先使用随机森林机器学习法评估了不同分类等级(即门、纲、目、科、属和种)下微生物丰度变化对采样时期和黑麦草处理预测的准确性。结果表明在目水平土壤细菌和线虫肠道细菌对采样时期和黑麦草处理有最高的预测准确率分别为 63.57%和 75.33%。使用 5 次重复和 10 折交叉验证分析表明随细菌数量的增加模型预测准确率先增加而后趋于平稳。在土壤细菌目水平数量为 6 时，细菌丰度变化对水

稻生长时期和黑麦草翻压处理的预测准确率最高，为 71.67%；在线虫肠道细菌目水平数量为 5 时，细菌丰度变化的预测准确率最高，为 72.67% (图 2A、2B)。基于此，将 6 个对预测准确率贡献最高的土壤细菌目和 5 个对预测准确率贡献最高的线虫肠道细菌目作为水稻生长时期和黑麦草翻压处理的生物标志物。土壤细菌 6 个生物标志物分别是：根瘤菌目(*Rhizobiales*)、拟杆菌目(*Bacteroidales*)、螺旋体目(*Spirochaetales*)、着色菌目(*Chromatiales*)、甲烷杆菌目(*Methanobacteriales*)和互营杆菌目(*Syntrophobacteriales*)。线虫肠道细菌 5 个生物标志物分别是：噬纤维菌目(*Cytophagales*)、*Candidatus Brocadiales*、梭菌目(*Clostridiales*)、假单胞菌目(*Pseudomonadales*)和肠杆菌目(*Enterobacteriales*)。

在 6 个土壤细菌生物标志物中根瘤菌目的相对丰度最高，平均为 3.32%，最低的为螺旋体目，其平均占整体土壤细菌的 0.18% (图 3A)。在 5 个线虫肠道细菌生物标志物中梭菌目的相对丰度最高，平均为 41.4%，*Candidatus Brocadiales* 占整体线虫肠道细菌的相对丰度最低，其平均值为 0.02%。使用斯皮尔曼(Spearman)相关分析评估土壤细菌和线虫肠道细菌生物标志物之间的相关性表明大多数土壤细菌生物标志物与线虫肠道细菌生物标志物存在显著的正相关或负相关关系( $P < 0.05$ ，图 3B)。这意味着土壤细菌群落潜在影响着线虫肠道细菌群落。

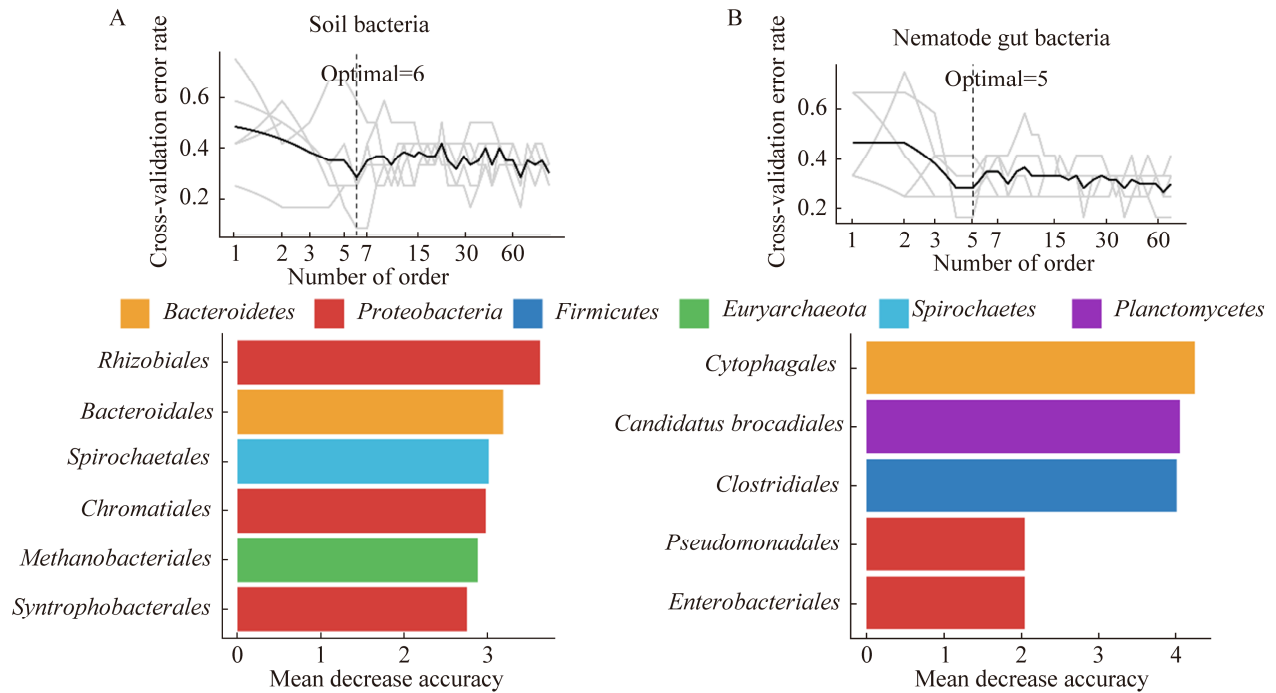


图 2 预测准确率随细菌目数量增加的变化情况

Figure 2 Variation in the accuracy of bacterial prediction with increasing numbers of bacterial order.

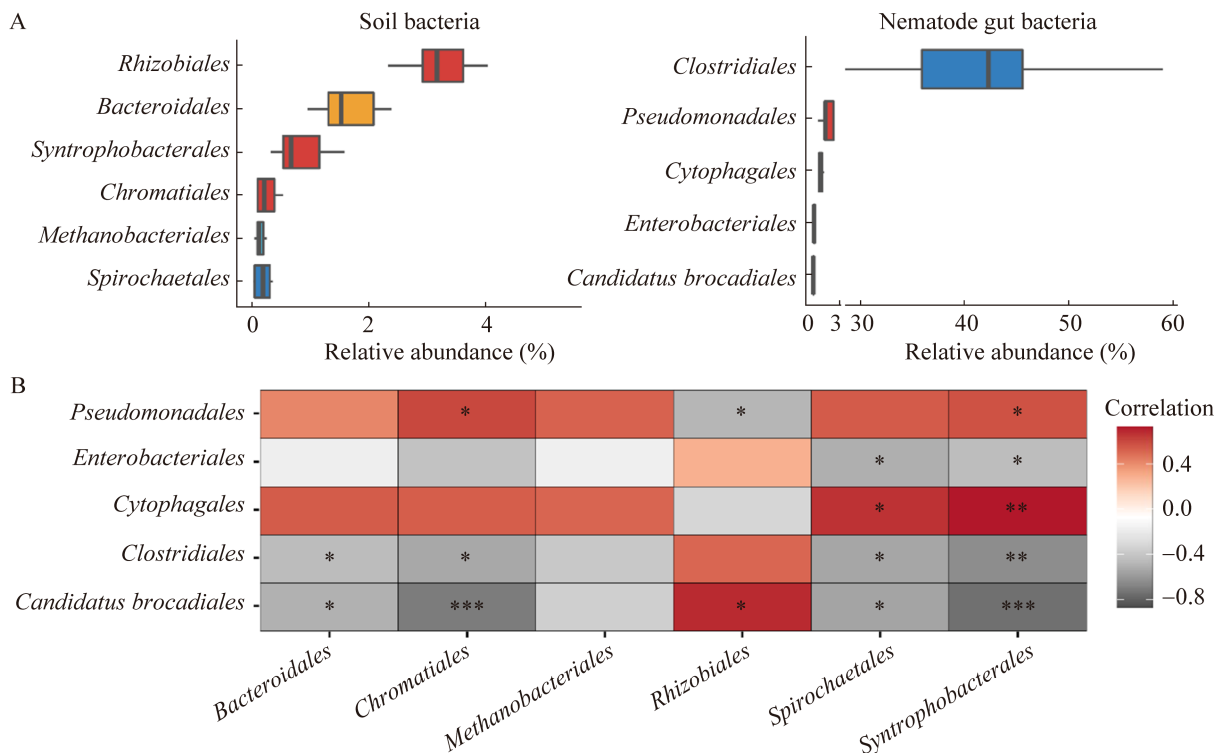


图 3 不同生物标志物占整体群落的相对丰度(A)和生物标志物之间的相关性(B)

Figure 3 Relative abundance of different biomarkers to the overall community (A) and correlation between biomarkers (B).



## 2.4 土壤细菌和线虫肠道细菌之间的网络关联

使用共现网络分析以解析土壤细菌如何影响线虫肠道细菌。网络分析表明细菌之间相互作用以正关联(即正边数)为主(表 4, 图 4A)。土壤细菌之间有最复杂的网络关联, 其次为土壤细菌与线虫肠道细菌之间, 线虫肠道细菌之间的网络关联最简单。

不同网络之间的正关联数和负关联数之间的拟合分析表明土壤细菌和线虫肠道细菌之间的正关联数与土壤细菌之间的正关联数显著正相关( $R^2=0.61$ ,  $P<0.01$ , 图 4B、4C、4D)。土壤细菌之间的正关联数不影响线虫肠道细菌之间的正关联数。而线虫肠道细菌之间的正关联数与土壤细菌和线虫肠道细菌之间的正关联数显著正相关( $R^2=0.77$ ,  $P<0.001$ )。对不同网络之间的负关联数的分析表明, 只有土壤细菌和线虫肠道细菌之间的负关联数显著正相关于线虫肠道细菌之间的负关联数( $R^2=0.57$ ,  $P<0.01$ , 图 4E、4F、4G)。

## 2.5 土壤性质、土壤细菌和线虫肠道细菌的关系

冗余分析(redundancy analysis, RDA)表明整体环境因子能够解释 91.60%的细菌群落矩阵变化。其中, RDA1 和 RDA2 分别解释了 58.76%和 16.16%的细菌群落变化(图 5A)。结

果表明土壤细菌群落分布主要受到土壤养分含量如总氮、铵态氮、硝态氮和总磷以及阳离子交换量(cation exchange capacity, CEC)等因素的影响, 而土壤 pH 变化对细菌群落分布的影响较小。基于此, 本研究构建了氮含量、磷含量、阳离子交换量、土壤细菌群落相似性、土壤细菌之间正关联(相互作用)、土壤细菌和线虫肠道细菌之间正关联和线虫肠道细菌之间正关联的结构方程模型(structural equation modeling, SEM) (图 5B)。结果表明养分含量(如氮和磷含量)主要通过影响土壤细菌之间的正关联从而影响土壤细菌和线虫肠道细菌之间的正关联以及线虫肠道细菌之间正关联的(图 5B)。另外, SEM 表明养分含量与土壤细菌群落之间的相似性显著负相关而与土壤细菌之间的正关联显著正相关。这意味着随时间变化土壤养分含量的降低有望增加细菌之间的负相互作用, 从而影响土壤细菌与线虫肠道细菌之间的关系, 进而影响线虫肠道细菌之间的关系。进一步分析不同因子的总影响表明影响土壤细菌之间正关联的主要因素是磷含量; 影响土壤细菌和线虫肠道细菌之间正关联的主要因素是土壤细菌之间的正关联; 影响线虫肠道细菌之间正关联的主要因素是土壤细菌和线虫肠道细菌之间的正关联(图 5C)。

表 4 网络拓扑性质

Table 4 Topological properties of networks

Networks	Node	Edge		Average connections	Average clustering coefficient	Network density
		Positive	Negative			
Total network	1 059	9 245	3 538	2 6.19	0.36	0.03
Soil bacterial network	912	9 078	3 417	29.56	0.40	0.04
Nematode gut bacterial network	147	53	13	2.77	0.30	0.23
Network between soil bacteria and gut bacteria	341	114	108	6.85	0.34	0.03

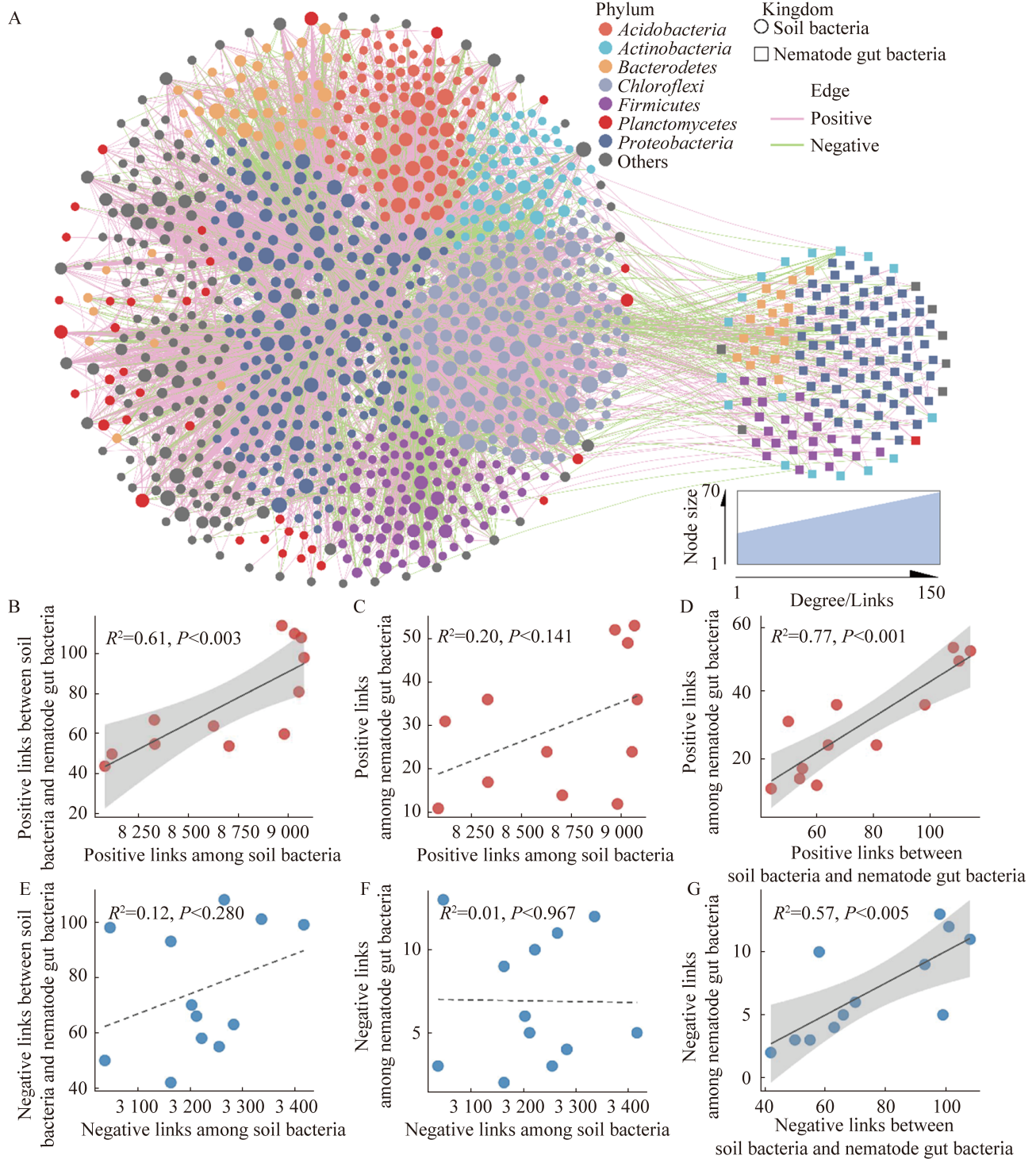


图 4 土壤细菌和线虫肠道细菌之间的网络关联关系

Figure 4 Network linkages between soil bacteria and nematode gut bacteria. A: Network linkage between soil bacteria and nematode gut bacteria. Nodes with different colors represent different bacteria, node sizes represent the number of links, edges with different colors represent the positive or negative associations between nodes, circular nodes represent soil bacteria, and square nodes represent nematode gut bacteria. B, C and D: Linear fit analysis of positive associations between different networks. E, F and G: Linear fit analysis of negative associations between different networks.

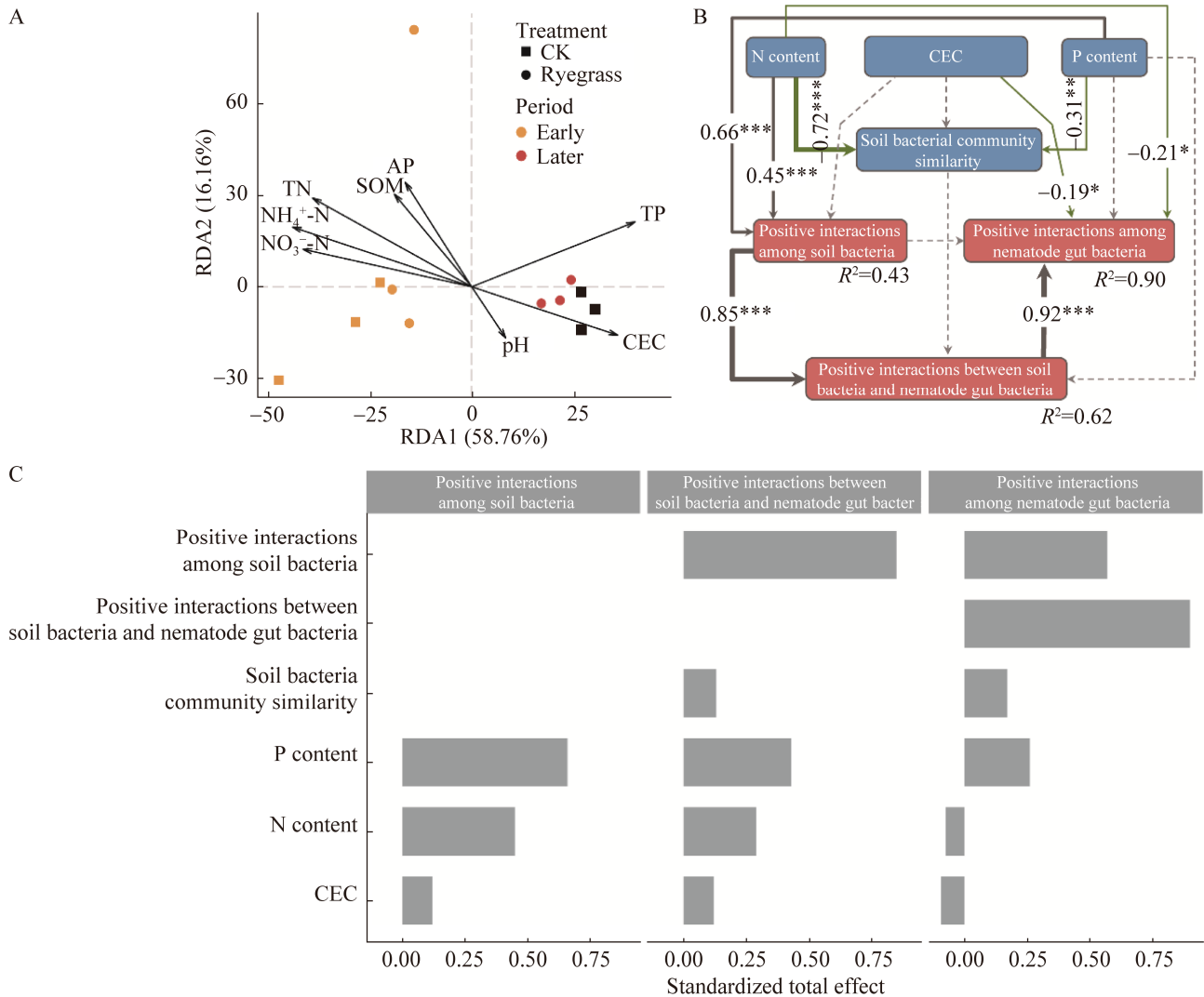


图 5 土壤性质、土壤细菌和线虫肠道细菌之间的关系

Figure 5 Relationships between soil properties, soil bacteria, and nematode gut bacteria. A: Redundancy analysis (RDA) between soil properties and soil bacterial communities. B: Structural equation modeling (SEM) of the direct and indirect effects of soil properties, soil bacterial community similarity, positive links among soil bacteria, and positive links between soil bacteria and nematode gut bacteria on positive links among nematode gut bacteria;  $\chi^2=1.48$ ,  $P=0.69$ ,  $df=3$ ; Bootstrap  $P=0.74$ ; GFI=0.99; RMSEA<0.001,  $P=0.74$ . C: Standard overall effects of different factors on positive links among soil bacteria, positive links between soil bacteria and nematode gut bacteria, and positive links among nematode gut bacteria.

### 3 讨论

探究绿肥翻压下水稻生长不同时期土壤和线虫肠道细菌群落变化,对于评估绿肥以及水稻根系碳输入导致的大量有机物投入的生态影响

具有重要意义。本研究结果表明相较于绿肥翻压处理,水稻不同生长期的土壤细菌群落差异更加显著,且水稻生长后期的土壤细菌多样性显著提升。前期基于高通量测序和磷酸脂肪酸的研究结果也发现不同生长期水稻土壤细菌群落的显著

变化<sup>[35-36]</sup>, 土壤细菌群落的演替一方面与水稻生长期土壤好氧、厌氧环境的交替有关, 另一方面也与水稻不同生长时期根系分泌物的动态变化有一定的联系。同时, 我们发现本研究中绿肥翻压对土壤细菌群落的改变并不明显。已有研究报道了绿肥翻压对土壤微生物群落的影响<sup>[37]</sup>, 比如翻压后的土壤微生物群落结构的变化、多样性的降低, 这些不同的结论可能与本研究中绿肥种植时间较短有关。比如, 在 Zhang 等<sup>[38]</sup>的研究中发现长达 31 年的绿肥-水稻轮作可以显著促进土壤有益微生物的生长。相比于土壤细菌群落, 线虫肠道微生物对绿肥翻压以及水稻不同生长期的响应不明显, 其群落结构和多样性均无显著变化。这一结果说明在肠道这样的特殊生境中其微生物群落相对稳定, 受环境因素尤其是非生物因素的影响较小。Zheng 等<sup>[39]</sup>的研究结果也说明线虫肠道微生物群落的组装模式是非随机的, 宿主条件是形成肠道微生物群的主要因素, 且土壤微生物群落和线虫微生物群落受到不同因素的调节。

进一步解析影响线虫肠道微生物的非生物和生物因子对评估线虫以及线虫肠道微生物对变化的环境的响应以及这些响应可能带来的生态后果具有重要的意义<sup>[9-10]</sup>。基于随机森林机器学习法, 本研究的结果表明土壤细菌生物标志物与线虫肠道生物标志物之间存在显著的相关性(图 3B)。这意味着线虫肠道细菌的群落构建过程可能是非随机<sup>[39-40]</sup>, 可能受到土壤非生物和生物因子的调控<sup>[9,11]</sup>。对非生物因素来说, 过去的研究表明了在农业生态系统中, 施肥模式的差异引起的土壤有机质、pH、有效磷、氮和硝氮含的量变化有潜力通过改变宿主微生物组群落组装从而间接地影响线虫肠道微生物组<sup>[9,15]</sup>。在本研究中, 尽管我们并未评估土壤性质差异对宿主微生物组的影响, 但是我们的结

果支持土壤性质对线虫肠道细菌群落的影响主要是通过间接影响(图 5B)。此外, 已有研究证明了土壤微生物组是线虫肠道细菌群落组成和结构的主要贡献者<sup>[41-42]</sup>, 因为一些土壤变形菌门能够直接地进入线虫肠道实现定殖, 并影响线虫的群落增长<sup>[12]</sup>。因此, 这可能是大多数土壤细菌生物标志物的相对丰度显著相关于线虫肠道细菌的生物标志物的相对丰度的原因之一(图 3B)。

基于共现网络推断的方法, 本研究发现线虫肠道细菌之间的网络相互作用会受到土壤细菌之间网络相互作用的调控(图 4B-4G, 图 5C)。基于对模式线虫如秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)肠道内细菌定殖影响因素的研究表明宿主肠道环境、宿主-细菌的适应性等因素对细菌在线虫肠道内定殖的重要性显著弱于细菌的种间相互作用<sup>[17]</sup>。这意味着土壤细菌之间的网络相互作用有潜力影响细菌的定殖从而影响线虫肠道细菌之间的相互作用。过去的研究表明了微生物之间的网络相互作用不仅与微生物的碳氮磷硫等元素循环功能密切相关<sup>[43-44]</sup>, 还决定了宿主对外界环境变化的抗性以及对病原微生物的抵抗力<sup>[45]</sup>。因此, 土壤细菌之间网络相互作用的变化不仅可能改变自身的生态功能, 还可能改变线虫肠道细菌的功能从而影响线虫宿主的生长和繁殖。进一步分析表明 CEC 和土壤养分含量尤其是磷和氮含量显著正相关于土壤细菌之间的正相互作用, 这表明随着作物的生长土壤中养分含量的减少会降低土壤细菌之间的正相互作用, 而增加细菌之间对有限资源的竞争<sup>[18]</sup>。这将加速细菌群落的周转速度从而改变土壤细菌和线虫肠道细菌的群落结构和功能。此外, 土壤细菌之间的正相互作用还影响着土壤与肠道细菌群落的互作, 且这一作用的影响高于其他因素(如土壤群落相似性、土壤性质)。这说明土壤

细菌可能通过积极的互作(如交叉喂养)而进入线虫肠道内,并在肠道的复杂环境中定殖<sup>[46]</sup>。

## 4 结论

相较于绿肥翻压处理,水稻不同生长期的土壤细菌群落差异更加显著,且水稻生长后期的土壤细菌多样性显著提升;线虫肠道微生物对绿肥翻压以及水稻不同生长期的响应不明显,其群落结构和多样性均无显著变化。非生物因素,即土壤性质能通过影响土壤细菌群落相似性、土壤细菌之间的网络相互作用从而影响线虫肠道细菌之间的相互作用;生物因素,即土壤细菌之间的相互作用在调控线虫肠道细菌之间相互作用方面有重要性影响。土壤和线虫肠道细菌之间紧密的关系为评估外界环境变化带来的生态效应提供了新的视角。

## 参考文献

- [1] BONGERS T, BONGERS M. Functional diversity of nematodes[J]. *Applied Soil Ecology*, 1998, 10(3): 239-251.
- [2] FERRIS H, MATUTE MM. Structural and functional succession in the nematode fauna of a soil food web[J]. *Applied Soil Ecology*, 2003, 23(2): 93-110.
- [3] ZHANG CZ, WANG JJ, REN ZH, HU ZK, TIAN SY, FAN WQ, CHEN XY, GRIFFITHS BS, HU F, LIU MQ. Root traits mediate functional guilds of soil nematodes in an ex-arable field[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 151: 108038.
- [4] YEATES GW. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, 37(4): 199-210.
- [5] NEHER DA. Role of nematodes in soil health and their use as indicators[J]. *Journal of Nematology*, 2001, 33(4): 161-168.
- [6] 叶成龙, 刘婷, 张运龙, 张俊伶, 沈其荣, 李辉信. 麦地土壤线虫群落结构对有机肥和秸秆还田的响应[J]. *土壤学报*, 2013, 50(5): 997-1005.  
YE CL, LIU T, ZHANG YL, ZHANG JL, SHEN QR, LI HX. Response of soil nematode community to application of organic manure and incorporation of straw in wheat field[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(5): 997-1005 (in Chinese).
- [7] LADYGINA N, JOHANSSON T, CANBÄCK B, TUNLID A, HEDLUND K. Diversity of bacteria associated with grassland soil nematodes of different feeding groups[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 69(1): 53-61.
- [8] MULDER C, MAAS R. Unifying the functional diversity in natural and cultivated soils using the overall body-mass distribution of nematodes[J]. *BMC Ecology*, 2017, 17(1): 36.
- [9] ZHENG F, ZHU D, CHEN QL, BI QF, YANG XR, O'CONNOR P, ZHU YG. The driving factors of nematode gut microbiota under long-term fertilization[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020, 96(4): f1aa037.
- [10] O'DONNELL MP, FOX BW, CHAO PH, SCHROEDER FC, SENGUPTA P. A neurotransmitter produced by gut bacteria modulates host sensory behaviour[J]. *Nature*, 2020, 583(7816): 415-420.
- [11] ZHENG H, STEELE MI, DIETRICH C, MORAN NA. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(18): 4775-4780.
- [12] DIRKSEN P, MARSH SA, BRAKER I, HEITLAND N, WAGNER S, NAKAD R, MADER S, PETERSEN C, KOWALLIK V, ROSENSTIEL P, FÉLIX MA, SCHULENBURG H. The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model[J]. *BMC Biology*, 2016, 14: 38.
- [13] SAMUEL BS, ROWEDDER H, BRAENDLE C, FÉLIX MA, RUVKUN G. *Caenorhabditis elegans* responses to bacteria from its natural habitats[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(27): E3941-E3949.
- [14] 郝操, CHEN TW, 吴东辉. 土壤动物肠道微生物多样性研究进展[J]. *生态学报*, 2022, 42(8): 3093-3105.  
HAO C, CHEN TW, WU DH. A review on gut microbial diversity of soil animals[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, 42(8): 3093-3105 (in Chinese).
- [15] DING J, ZHU D, CHEN QL, ZHENG F, WANG HT, ZHU YG. Effects of long-term fertilization on the associated microbiota of soil collembolan[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 130: 141-149.

- [16] DOMENE X, COLÓN J, URAS MV, IZQUIERDO R, ÀVILA A, ALCANIZ JM. Role of soil properties in sewage sludge toxicity to soil collembolans[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(11): 1982-1990.
- [17] ORTIZ A, VEGA NM, RATZKE C, GORE J. Interspecies bacterial competition regulates community assembly in the *C. elegans* intestine[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(7): 2131-2145.
- [18] LI B, ROLEY SS, DUNCAN DS, GUO J, QUENSEN JF, YU H, TIEDJE JM. Long-term excess nitrogen fertilizer increases sensitivity of soil microbial community to seasonal change revealed by ecological network and metagenome analyses[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 160: 108349.
- [19] JOHNKE J, DIRKSEN P, SCHULENBURG H. Community assembly of the native *C. elegans* microbiome is influenced by time, substrate and individual bacterial taxa[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(4): 1265-1279.
- [20] 丁娜, 林华, 张学洪, 贺瑶, 俞果. 植物根系分泌物与根际微生物交互作用机制研究进展[J]. *土壤通报*, 2022, 53(5): 1212-1219.  
DING N, LIN H, ZHANG XH, HE Y, YU G. Interaction mechanism between root secretion and rhizosphere microorganisms: a review[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2022, 53(5): 1212-1219 (in Chinese).
- [21] AULAKH MS, WASSMANN R, BUENO C, KREUZWIESER J, RENNENBERG H. Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars[J]. *Plant Biology*, 2001, 3(2): 139-148.
- [22] FERNÁNDEZ-BACA CP, RIVERS AR, KIM W, IWATA R, MCCLUNG AM, ROBERTS DP, REDDY VR, BARNABY JY. Changes in rhizosphere soil microbial communities across plant developmental stages of high and low methane emitting rice genotypes[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 156: 108233.
- [23] STARNES DL, PADMANABHAN P, SAHI SV. Effect of P sources on growth, P accumulation and activities of phytase and acid phosphatases in two cultivars of annual ryegrass (*Lolium multiflorum* L.)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(5/6): 580-589.
- [24] HE Y, XU JM, TANG CX, WU YP. Facilitation of pentachlorophenol degradation in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.)[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(11): 2017-2024.
- [25] LIANG YT, PEI M, WANG DD, CAO SN, XIAO X, SUN B. Improvement of soil ecosystem multifunctionality by dissipating manure-induced antibiotics and resistance genes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(9): 4988-4998.
- [26] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.  
LU RK. *Analytical Methods for Soil and Agro-chemistry*[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000 (in Chinese).
- [27] TAMAKI H, WRIGHT CL, LI XZ, LIN QY, HWANG C, WANG SP, THIMMAPURAM J, KAMAGATA Y, LIU WT. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25263.
- [28] DIXON WT. Spinning-sideband-free and spinning-sideband-only NMR spectra in spinning samples[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1982, 77(4): 1800-1809.
- [29] LEGENDRE P, GALLAGHER ED. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data[J]. *Oecologia*, 2001, 129(2): 271-280.
- [30] LIAW A, WIENER M. Classification and regression by random forest[J]. *R news*, 2002, 2(3): 18-22.
- [31] LANGFELDER P, HORVATH S. Fast R Functions for robust correlations and hierarchical clustering[J]. *Journal of Statistical Software*, 2012, 46(11): i11.
- [32] BENJAMINI Y, KRIEGER AM, YEKUTIELI D. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate[J]. *Biometrika*, 2006, 93(3): 491-507.
- [33] LUO F, ZHONG JX, YANG YF, SCHEUERMANN RH, ZHOU JZ. Application of random matrix theory to biological networks[J]. *Physics Letters A*, 2006, 357(6): 420-423.
- [34] GRACE JB. *Structural Equation Modeling and Natural Systems*[M]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2006.
- [35] NOLL M, MATTHIES D, FRENZEL P, DERAKSHANI M, LIESACK W. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3): 382-395.
- [36] WANG WH, LUO X, CHEN Y, YE XF, WANG H, CAO Z, RAN W, CUI ZL. Succession of composition and function of soil bacterial communities during key rice growth stages[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 421.

- [37] LONGA CMO, NICOLA L, ANTONIELLI L, MESCALCHIN E, ZANZOTTI R, TURCO E, PERTOT I. Soil microbiota respond to green manure in organic vineyards[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 123(6): 1547-1560.
- [38] ZHANG XX, ZHANG RJ, GAO JS, WANG XC, FAN FL, MA XT, YIN HQ, ZHANG CW, FENG K, DENG Y. Thirty-one years of rice-rice-green manure rotations shape the rhizosphere microbial community and enrich beneficial bacteria[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 104: 208-217.
- [39] ZHENG F, ZHU D, GILES M, DANIELL T, NEILSON R, ZHU YG, YANG XR. Mineral and organic fertilization alters the microbiome of a soil nematode *Dorylaimus stagnalis* and its resistome[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 680: 70-78.
- [40] BERG M, STENUIT B, HO J, WANG A, PARKE C, KNIGHT M, ALVAREZ-COHEN L, SHAPIRA M. Assembly of the *Caenorhabditis elegans* gut microbiota from diverse soil microbial environments[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(8): 1998-2009.
- [41] BURNS AR, STEPHENS WZ, STAGAMAN K, WONG S, RAWLS JF, GUILLEMIN K, BOHANNAN BJ. Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 655-664.
- [42] LAVRINIENKO A, MAPPES T, TUKALENKO E, MOUSSEAU TA, MØLLER AP, KNIGHT R, MORTON JT, THOMPSON LR, WATTS PC. Environmental radiation alters the gut microbiome of the bank vole *Myodes glareolus*[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(11): 2801-2806.
- [43] HUANG RL, MCGRATH SP, HIRSCH PR, CLARK IM, STORKEY J, WU LY, ZHOU JZ, LIANG YT. Plant-microbe networks in soil are weakened by century-long use of inorganic fertilizers[J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(6): 1464-1475.
- [44] MORRIËN E, HANNULA SE, SNOEK LB, HELMSING NR, ZWEERS H, de HOLLANDER M, SOTO RL, BOUFFAUD ML, BUÉE M, DIMMERS W, DUYTS H, GEISEN S, GIRLANDA M, GRIFFITHS RI, JØRGENSEN HB, JENSEN J, PLASSART P, REDECKER D, SCHMELZ RM, SCHMIDT O, et al. Soil networks become more connected and take up more carbon as nature restoration progresses[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14349.
- [45] WEI Z, YANG TJ, FRIMAN VP, XU YC, SHEN QR, JOUSSET A. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8413.
- [46] FAUST K, RAES J. Microbial interactions: from networks to models[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(8): 538-550.



梁玉婷，研究员，主要从事土壤微生物学领域研究。发表 SCI 论文 70 余篇，中文核心期刊论文 10 余篇。承担国家自然科学基金优秀青年基金、江苏省杰出青年科学基金等，中国科学院青年创新促进会优秀会员，担任《土壤学报》、*iMeta*、*Soil Ecology Letters*、*Soil Biology and Biochemistry*、*Geoderma* 等编委，中国土壤学会土壤质量标准化委员会主任、江苏省土壤学会学术工作委员会主任。