

# 高通量培养方法在苏打盐碱土细菌资源发掘中的应用

滕钊军<sup>1,2</sup>, 蔡元锋<sup>2\*</sup>, 吴俏利<sup>2</sup>, 张耀鸿<sup>1</sup>, 贾仲君<sup>2,3</sup>

1 南京信息工程大学 生态与应用气象学院, 江苏 南京

2 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展全国重点实验室, 江苏 南京

3 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 吉林 长春

滕钊军, 蔡元锋, 吴俏利, 张耀鸿, 贾仲君. 高通量培养方法在苏打盐碱土细菌资源发掘中的应用[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1426-1446.

TENG Zhaojun, CAI Yuanfeng, WU Qiaoli, ZHANG Yaohong, JIA Zhongjun. Application of high-throughput cultivation methods for exploring bacterial resources in soda saline-alkaline soils[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(3): 1426-1446.

**摘要:** 【目的】评价培养基浓度、土壤悬液稀释度及土壤类型对细菌高通量培养结果的影响, 为苏打盐碱土微生物资源的高效挖掘提供理论依据和技术支撑。【方法】以盐碱荒地与玉米地表层土壤为研究对象, 设置 1×TSB、1/5×TSB、1/10×TSB 3 种培养基浓度, 结合最适和 2×最适土壤悬液稀释度, 开展细菌的高通量分离培养与分子鉴定, 系统分析不同处理条件下细菌的培养偏好性。【结果】2 种土壤中原位细菌群落的优势门类为假单胞菌门(*Pseudomonadota*)、放线菌门(*Actinomycetota*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、芽孢杆菌门(*Bacillota*)和绿屈挠菌门(*Chloroflexota*); 前 10 个优势属中仅芽孢杆菌属(*Bacillus*)和红色杆菌属(*Rubrobacter*)为可培养类群。高通量培养共获得 2 256 个阳性体系, 纯菌孔占比达 79.3%; 从中鉴定出 153 个扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs), 隶属于 4 门 52 属。平均每 100 个纯菌孔可获得 6.8 个 ASVs 或 2.3 个属。1/10×TSB 培养基处理的纯菌孔占比最高, 而 1×TSB 培养基的 ASVs 分离效率最优; 2×最适稀释度在纯菌比例和分离效率方面均优于最适稀释度。盐碱荒地土壤在纯菌比例、ASV 及属水平分离效率方面均高于玉米地土壤, 且其特有 ASVs 数量更多。高通量培养获得的高频属包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、嗜氢菌属(*Hydrogenophaga*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、食酸菌属(*Acidovorax*)和节杆菌属(*Arthrobacter*), 其中仅 *Bacillus* 为原位土壤中的优势属。【结论】高通量培养技术是快速获取苏打盐碱土细菌纯培养菌株的有效手段。相较于旱地土壤, 盐碱荒地中可获得更高多样性的可培养细菌; 适度降低培养基浓度和提高土壤悬液稀释度有助于提升纯菌分离效率和物种多样性。然而, 多数原位优势类群难以通过单一类型培养基获

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA28110100, XDA28020203); 国家重点研发计划(2022YFD1500203); 国家自然科学基金(42175138)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA28110100, XDA28020203), the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1500203), and the National Natural Science Foundation of China (42175138).

\*Corresponding author. E-mail: yfcai@issas.ac.cn

Received: 2025-09-03; Accepted: 2025-12-11; Published online: 2026-01-04

得, 未来需进一步拓展培养条件多样性以提高土壤优势细菌的可培养性。

关键词: 苏打盐碱地; 高通量培养; 菌株资源; 培养偏好

## Application of high-throughput cultivation methods for exploring bacterial resources in soda saline-alkaline soils

TENG Zhaojun<sup>1,2</sup>, CAI Yuanfeng<sup>2\*</sup>, WU Qiaoli<sup>2</sup>, ZHANG Yaohong<sup>1</sup>, JIA Zhongjun<sup>2,3</sup>

1 School of Ecology and Applied Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing, Jiangsu, China

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

3 Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin, China

**Abstract:** [Objective] To evaluate the effects of medium concentration, soil suspension dilution, and soil type on bacterial high-throughput cultivation outcomes, providing a reference for the exploration of bacterial resources in soda saline-alkali soils. [Methods] High-throughput cultivation and identification of bacteria from soda saline-alkali wildland and maize field soils were conducted. Three medium concentrations (1×TSB, 1/5×TSB, and 1/10×TSB), two soil suspension dilutions (optimal dilution and 2× optimal dilution), and two soil types (wildland and maize field) were set as experimental factors to analyze bacterial cultivation preferences under different treatments. [Results] The dominant bacterial phyla in both soils were *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Acidobacteriota*, *Bacillota*, and *Chloroflexota*. Among the top 10 dominant genera, only *Bacillus* and *Rubrobacter* were cultivable. A total of 2 256 positive cultures were obtained through high-throughput cultivation, with pure cultures accounting for 79.3%. A total of 153 amplicon sequence variants (ASVs) were identified, belonging to 52 genera of 4 phyla. On average, every 100 pure cultures yielded 6.8 ASVs or 2.3 genera. The 1/10×TSB medium resulted in the highest proportion of pure culture wells, while the 1×TSB medium showed the highest ASVs isolation efficiency. Cultivation with 2× optimal soil suspension dilution achieved higher pure culture ratios and isolation efficiency than the optimal dilution. The proportion of pure cultures, ASVs isolation efficiency, and genus isolation efficiency were all higher in wildland soil than in maize field soil, with more unique ASVs detected in wildland. The most frequently isolated genera via high-throughput cultivation were *Pseudomonas*, *Hydrogenophaga*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Acidovorax*, and *Arthrobacter*, among which only *Bacillus* was a dominant genus in the soda saline-alkali soils. [Conclusion] High-throughput cultivation is an efficient method for obtaining numerous pure bacterial strains from soda saline-alkali soils within a short period. Natural wildland soil yielded more diverse cultivable bacteria than dryland soil. Moderately reducing medium concentration and soil suspension dilution improved pure culture isolation efficiency and diversity. However, most dominant soil taxa could not be cultivated via a single medium type, underscoring

the need to diversify cultivation conditions to enhance the cultivability of dominant soil bacteria.

**Keywords:** soda saline-alkali soils; high-throughput cultivation; strain resources; cultivation preference

全球约有  $1 \times 10^9 \text{ hm}^2$  的土地受到盐渍化的影响<sup>[1-2]</sup>, 其分布范围覆盖美洲、欧洲、亚洲及大洋洲等多个大洲。我国盐碱土面积约占全球总面积的 1/10, 达  $9.91 \times 10^7 \text{ hm}^2$ <sup>[3]</sup>。盐碱土通常具有较差的理化性质, 表现为肥力水平低、易板结、生物活性弱以及土壤温度偏低等特征<sup>[4]</sup>。由于该类土壤具有高盐碱的极端环境特性, 其微生物群落以耐盐碱乃至嗜盐碱类群为主。这些微生物凭借特殊的细胞结构、遗传特性与生理功能, 不仅能够适应高盐碱胁迫, 还可通过代谢活动在一定程度上改良盐碱土的理化性质<sup>[5]</sup>。因此, 挖掘盐碱土中的微生物资源对开发盐碱土微生物修复技术、提升盐碱地农业产能具有重要战略价值。

多项研究表明, 不同地域盐碱土壤的细菌优势类群存在差异, 在我国北方多数地区, 如河西走廊<sup>[6]</sup>、新疆阿克苏<sup>[7]</sup>及河套平原<sup>[8]</sup>盐碱土中假单胞菌门(*Pseudomonadota*)为优势类群; 而天津滨海盐碱土<sup>[9-10]</sup>则以芽孢杆菌门(*Bacillota*)为主; 在东北的苏打盐碱土区域优势类群为 *Pseudomonadota* 与酸杆菌门(*Acidobacteriota*)<sup>[8]</sup>, 同时含有较高比例的放线菌门(*Actinomycetota*)、*Bacillota* 及拟杆菌门(*Bacteroidota*)的细菌<sup>[11-13]</sup>。在属水平上, 盐碱土中的常见优势类群包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)<sup>[9]</sup>及海洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)<sup>[10]</sup>。目前, 基于传统分离培养方法已从盐碱土中筛选出多种具有促生功能的菌株。例如, 李青青等<sup>[14]</sup>分离到 2 株 *Bacillus* 菌, 并系统评估了其耐盐碱性、溶磷能力及对黄豆萌发的促进作用; 张小霞等<sup>[15]</sup>自柾柳根际盐碱土中分离出一株盐单胞菌属(*Halomonas*)细菌, 该菌株具有溶解有机磷、固氮、产生吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA) 及 1-氨基环丙烷-1-羧酸

(l-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氢酶等多种促生特性; 陈小娟等<sup>[16]</sup>则从滨海盐碱地中筛选到 2 株 *Bacillus* 属细菌, 研究证实其可显著提高玉米产量, 并有效缓解盐胁迫对植物的伤害。

传统微生物分离培养方法通过配制特定组分的培养基模拟目标微生物的自然生长环境, 并经由富集、分离、纯化与鉴定等一系列流程获取目标菌株。尽管该方法在环境微生物研究中仍具有重要地位, 但其存在菌株类群覆盖范围有限、纯化周期较长以及鉴定成本较高等局限性<sup>[17]</sup>。高通量分离培养技术, 也称培养组学, 基于梯度稀释和多条件培养的原理, 通过将环境样品进行梯度稀释以实现微生物细胞的充分分散, 从而提高获得单一细菌菌株的几率<sup>[18]</sup>。近年来, 该技术的进步显著提升了未知菌株的鉴定效率, 降低了鉴定成本, 并增加了新物种的发现概率, 可在较短时间内建立大规模的纯种微生物培养体系, 已成为挖掘特定环境中微生物菌株资源、构建微生物菌种库的重要策略<sup>[19]</sup>。目前高通量分离培养技术已逐步应用于多种环境样本的微生物批量培养。例如, Bai 等<sup>[20]</sup>采用培养组学方法成功获得超过 400 株纯菌, 构建了拟南芥叶际和根际的微生物纯培养资源库; Lagier 等<sup>[21]</sup>系统综述了近年来培养组学在人体微生物研究中的应用, 指出通过该方法已鉴定出数百种与人体相关的新微生物; Bilen 等<sup>[22]</sup>于 2018 年更新的人类微生物物种库显示, 2015–2018 年间发现的新物种中 66.2% 系通过培养组学方法获得; 张万源<sup>[23]</sup>利用该技术从水稻根系中分离培养细菌, 初步建成水稻根系细菌资源库, 为解析根系微生物与水稻互作机制奠定了基础; 宋蕾蕾等<sup>[24]</sup>在对稻虾共作土壤细菌的研究中发现, 高通量培养法所鉴定到

的属级类群数量为传统涂布法的 4 倍。以上研究表明, 高通量培养技术是系统挖掘特定环境中可培养微生物资源的高效手段。

本研究选择东北苏打盐碱区 2 类土壤样本, 采用高通量培养技术获取一批分类地位明确的细菌纯培养菌株, 旨在为开发适用于苏打盐碱土的沃土微生物菌剂储备候选菌种资源。同时, 通过比较不同利用类型的盐碱土壤、土壤悬液稀释度、培养基浓度等培养条件对高通量培养结果的影响, 系统分析微生物的培养偏好, 以为后续相关环境微生物的高通量分离培养工作在样品选择、培养体系设置等方面提供理论依据与方法参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品基本信息

2021 年 10 月, 本研究在东北苏打盐碱地典型分布区吉林省白城市通榆县(44°50'27"N, 123°14'56"E)分别采集盐碱荒地和旱地(玉米地) 2 类样地的表层土壤(0–20 cm)。采集后的新鲜土样立即装入自封袋, 采用硬质瓦楞纸箱包装, 并辅以冰袋维持低温环境, 快速寄送实至实验室。在实验室内去除土壤中可见的植物根系与石砾等杂质, 过 2 mm 筛后于 4 °C 保存。该采样区属温带半干旱气候, 年平均温度为 5.5 °C, 年平均降水量约 350 mm, 平均海拔约 160 m。2 种土壤样品的详细理化性质见表 1 和表 2。

### 1.2 土壤细菌群落组成分析

土壤 DNA 提取与 16S rRNA 基因扩增由上海美吉生物医药科技有限公司完成。土壤 DNA 提取选用 FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit for Soil (MP Biomedicals 公司)。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): 5 $\times$ FastPfu Buffer 4  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')/907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')引物 (5  $\mu$ mol/L) 各 0.8  $\mu$ L, FastPfu DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L, BSA (10 mg/mL) 0.2  $\mu$ L, 模

板 DNA 10 ng, ddH<sub>2</sub>O 补足至总体积 20  $\mu$ L。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 28 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。扩增产物经 Illumina 平台进行高通量测序。利用 QIIME 2 对原始测序数据进行质量控制, 剔除低质量序列及引物、接头序列; 进一步采用 DADA2 对质控后的序列进行处理并添加注释, 最终生成细菌分类学表格以供后续统计分析。

### 1.3 培养基

1 $\times$ TSB (trypticase soy broth) 液体培养基: 称取 15.0 g TSB 培养基粉剂溶于 500 mL 去离子水中(终浓度 3%), 使用 2 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 经 121 °C 灭菌 30 min; 1/5 $\times$ TSB 和 1/10 $\times$ TSB 液体培养基: 分别称取 3.0 g 与 1.5 g TSB 培养基粉剂溶于 500 mL 去离子水中, 同法调节 pH 至 8.0 并进行灭菌处理。碱性裂解缓冲液: 将 25 mmol/L 的 NaOH 与 0.2 mmol/L Na<sub>2</sub>-EDTA 混合, 调节 pH 至 12.0, 灭菌后备用。中和缓冲液: 配制 40 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.5), 灭菌处理。体积分数为 80% 的灭菌甘油: 量取 400 mL 甘油与 100 mL 去离子水混合均匀, 灭菌后用于菌种保存。

### 1.4 土壤细菌的高通量培养

土壤微生物的高通量培养与鉴定流程参照已有文献[18]并作适当调整。首先通过稀释梯度实验确定土壤悬液的最适稀释度(optimal dilution concentration, ODC)。具体步骤为: 分别称取玉米地和盐碱荒地土壤样品各 1.0 g, 加入至装有 50 mL 无菌水的三角瓶中, 于 200 r/min 摇床中振荡 45 min 制备土壤悬液。随后将该悬液接种于含 50 mL 1 $\times$ TSB 液体培养基的离心管中, 依次进行系列稀释, 混匀后得到 150 $\times$ 、300 $\times$ 、600 $\times$ 、1 200 $\times$ 、3 000 $\times$ 、6 000 $\times$ 、12 000 $\times$ 、24 000 $\times$ 、36 000 $\times$  共 9 个梯度稀释液, 并设置对照。将上述的梯度稀释培养液每个梯度分装 3 个 96 孔细胞培养板, 每孔分装 160  $\mu$ L, 采用

表1 土壤基础理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the soils

土壤样品 Soil	pH	含水量 Water content (%)	有机碳 Organic carbon (g/kg)	全氮 Total nitrogen (g/kg)	硝氮 Nitrate nitrogen (mg/kg)	氨氮 Ammonium nitrogen (mg/kg)	有效磷 Available phosphorus (mg/kg)	速效钾 Available potassium (mg/kg)	溶解性有机 碳 Dissolved organic carbon (mg/kg)	微生物生物 量碳 Microbial biomass carbon (mg/kg)	微生物生物 量氮 Microbial biomass nitrogen (mg/kg)
盐碱荒地 Wildland	9.00	15.95	9.78	0.82	0.13	14.75	6.09	201.61	65.10	144.65	39.99
玉米地 Maize field	9.21	13.91	10.00	0.71	5.99	9.49	4.68	167.68	50.41	144.36	46.65

表2 土壤的基础盐分含量指标及其组成

Table 2 Basic salt content indicators and their composition of soils

土壤样品 Soil	碱化度 Exchangeable sodium percentage (%)	碳酸根 Carbonate (g/kg)	碳酸氢根 Bicarbonate (g/kg)	氯化物 Chloride (mg/kg)	硫酸根 Sulfate (mg/kg)	全盐含量 Total salt (g/kg)	水溶性钙 Water soluble calcium (mg/kg)	水溶性镁 Water soluble magnesium (mg/kg)	水溶性钾 Water soluble potassium (mg/kg)	水溶性钠 Water soluble sodium (mg/kg)
盐碱荒地 Wildland	10.2	0.029	0.387	46.94	79.51	0.87	52.76	7.35	7.74	92.46
玉米地 Maize field	44.7	0.071	0.372	105.29	202.78	1.57	33.15	3.69	3.25	221.31

parafilm 膜封口后, 于 28 °C 恒温培养箱中静置培养。培养一周后使用酶标仪测定 96 孔细胞培养板在 600 nm 处的吸光度( $OD_{600}$  值), 将  $OD_{600}$  值增加超过 0.5 且呈现肉眼可见的浑浊状态的孔判定为阳性孔, 选取阳性孔比例约为 50% 的稀释梯度作为最适稀释度, 用于后续正式培养实验。在正式培养阶段, 分别以所确定的 ODC 和  $2\times$ ODC 2 个稀释水平, 配合  $1/5\times$ TSB 和  $1/10\times$ TSB 2 种浓度的培养基, 对 2 种土壤样品进行培养。每个稀释度-培养基组合设置 5 块 96 孔板作为重复, 共计 40 板。培养 2 周后结束实验, 筛选其中阳性孔占比介于 30%–60% 的培养板, 使用多通道移液器从各阳性孔中吸取 10  $\mu$ L 菌液, 用于后续高通量分子鉴定。操作步骤示意图见图 1。

### 1.5 高通量培养体系的分子鉴定

采用碱性裂解法提取细菌培养液的 DNA。

具体步骤为: 向每孔含有 10  $\mu$ L 样品的 96 孔 PCR 板中加入 16.6  $\mu$ L 的碱性裂解液, 在 PCR 仪中 95 °C 下裂解菌体 30 min; 随后每孔加入 16.6  $\mu$ L 中和缓冲液, 混匀离心后作为模板 DNA。在新的 96 孔 PCR 板中配制 30  $\mu$ L 的 PCR 反应体系: DNA 模板 3  $\mu$ L, 带特异性标签的 515F 和 907R 引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.6  $\mu$ L, 预混型 *Taq* 酶 Premix (TaKaRa *Taq* version 2.0) 15  $\mu$ L, 无菌双蒸水 10.8  $\mu$ L。为便于后续序列溯源, 每块 96 孔板使用 1 种标签化的 907R 引物(共 50 种), 用于区分不同板的测序来源; 每孔使用 1 种标签化的 515F 引物(共 96 种), 用于区分同一板内不同孔的测序来源<sup>[18]</sup>。PCR 扩增程序: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。

完成扩增后, 将每个 PCR 板所有产物合并至 15 mL 的无菌离心管中, 4 °C 保存。取每板混

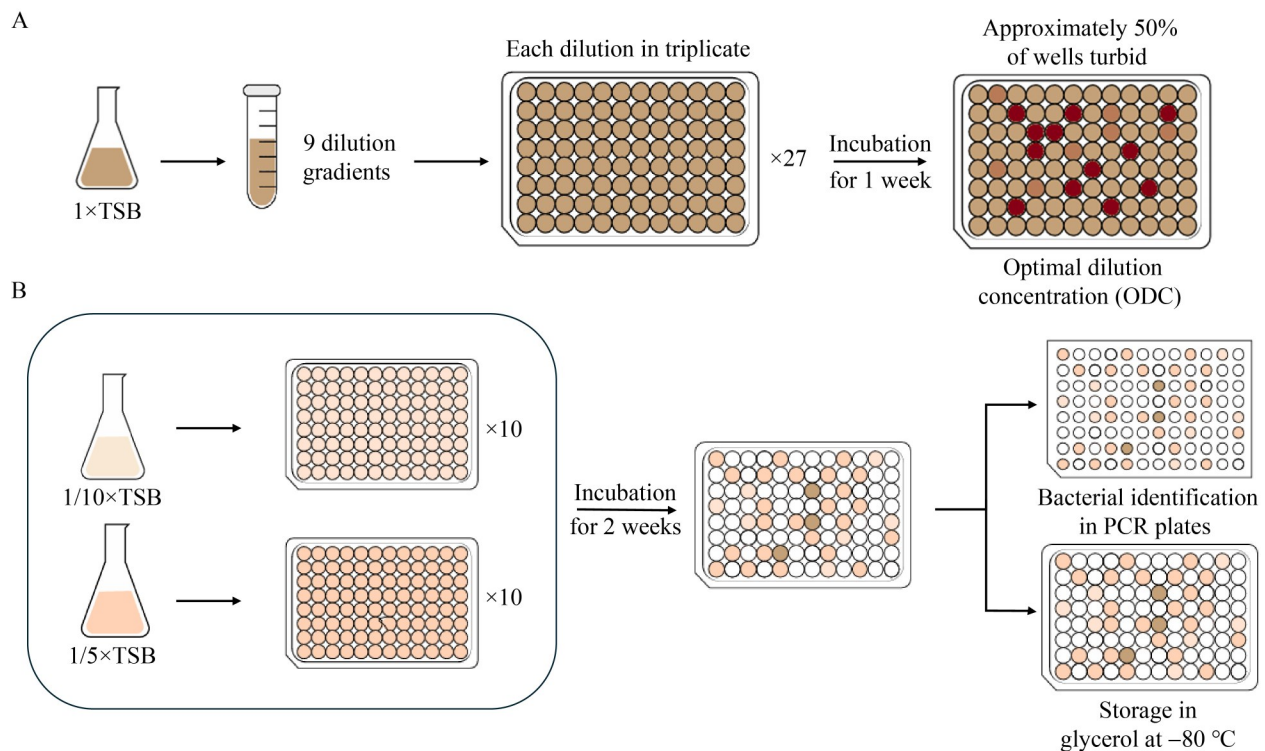


图1 实验设计和流程示意图(根据Zhang等<sup>[18]</sup>的文章插图调整)。A: 稀释梯度确定; B: 后续正式培养。

Figure 1 Schematic diagram of the experimental design and workflow (adapted from Zhang et al.<sup>[18]</sup>). A: Determination of dilution gradient; B: Subsequent formal culture.

合 PCR 产物 40  $\mu\text{L}$ ，经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后切取目标条带，使用 TaKaRa 切胶回收试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit v4.0) 进行纯化。将来自不同 96 孔板的纯化产物等摩尔量混合，每 10–20 板构建为一个测序文库，送往上海美吉生物医药科技有限公司进行建库与测序。利用 Mothur 软件对测序数据进行处理<sup>[25]</sup>，首先依据反向引物标签拆分为各 96 孔板的混合序列文件，再根据正向引物标签进一步拆分为单孔序列。随后进行质控筛选，保留序列长度在 370–380 bp 范围内、出现频次大于 20 的高质量序列，最终生成扩增子序列变体 (amplicon sequence variant, ASV) 相对丰度表用于统计分析。序列分类学注释基于 RDP training set version 16 完成。

## 1.6 统计分析

采用 R 4.4.3 对细菌组成进行统计分析。高通量培养结果中，将单一测序孔中超过 95% 序列归属于同一 ASV 的孔定义为纯菌孔。基于 ASV 表，利用 R 的 vegan 包分别计算土壤微生物类群的 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数，从而综合评估群落物种丰富度与均匀度<sup>[26]</sup>。在属分类水平上，比较高通量培养获得的细菌类群与原始土壤原位微生物群落的组成差异，分析二者在优势类群上的异同。使用 Origin 2025 软件绘制不同 ASVs 的整体分布频率图，以及不同培养条件下可培养菌属的分布热图。

# 2 结果与分析

## 2.1 土壤细菌群落组成

盐碱荒地和玉米地土壤细菌组成基本一致 (图 2)。在门水平上，优势类群有 *Pseudomonadota* (26.8%–27.3%)、*Actinomycetota* (20.0%–21.3%)、*Acidobacteriota* (13.0%–16.2%)、*Bacillota* (8.4%–9.8%)、绿屈挠菌门 (*Chloroflexota*, 7.1%–8.3%) (图 2A)，其余类群包括 *Bacteroidota*、浮霉菌门 (*Planctomycetota*)、芽单胞菌门

(*Gemmatimonadota*)、硝化螺菌门 (*Nitrospirota*) 等，占比均在 8.0% 以下。在属水平上，排名前 10 的仅有 2 个属于可培养类群，包括 *Bacillota* 门的 *Bacillus*，占比 3.2%–3.9%；*Actinomycetota* 门的红色杆菌属 (*Rubrobacter*)，占比 0.7%–2.7%。其余未培养类群包括 *Acidobacteriota* 门 *Vicinamibacterales* 目的未分类群 (norank *Vicinamibacterales*)、*Actinomycetota* 门微球菌科的未培养属 (unclassified *Micrococcaceae*)、*Pseudomonadota* 门的 *RB41* 等 (图 2B)。玉米地细菌  $\alpha$  多样性指数如下：Chao1 指数为 2 334.70、ACE 指数为 2 357.50、Shannon 指数为 6.97，明显低于盐碱荒地细菌的 3 个多样性指数值 (2 859.42、2 918.02 和 7.12)。

## 2.2 土壤悬液稀释度及培养基的选择

在稀释梯度确定阶段选择 1 $\times$ TSB 液体培养基进行培养，以便在短期内确定最适稀释度。每种土壤悬液均设置了 9 个稀释度进行培养，一周后 96 孔板的阳性孔数量见图 3A、3B。盐碱荒地土壤悬液稀释度在 600 $\times$ 以下时细胞培养板的 96 个孔均为阳性，随着土壤悬液稀释度的提升，阳性孔数量呈梯度减少，在稀释度为 6 000 $\times$ 和 12 000 $\times$ 时细胞培养板阳性孔数量分别为 52 和 34，本研究折中选择 10 000 $\times$ 作为盐碱荒地土悬液的最适稀释度进行正式培养实验。玉米地土壤悬液的稀释梯度确定结果类似，本研究选取 6 000 $\times$ 作为玉米地土壤悬液的最适稀释度进行正式培养实验。

在正式培养实验时使用 1/5 $\times$ 和 1/10 $\times$  2 种浓度的 TSB 培养基，结果表明平均每个 96 孔板上获得的阳性孔数量两者之间无显著性差异 (图 3B)。悬液稀释度选择最适和 2 $\times$ 最适 2 种，结果表明 2 $\times$ 最适稀释度获得阳性孔数量比最适稀释度少，但统计上不显著 ( $P>0.05$ ) (图 3B)。所有 40 个正式实验获得的 96 孔板中，有 6 个出现了 60 个以上的阳性孔，1 个仅 29 个阳性孔，其余 33 个 96 孔板的阳性孔占比均在 30%–60% 之间，共计获得阳性培养体系 1 958 个。在稀释梯度确定阶

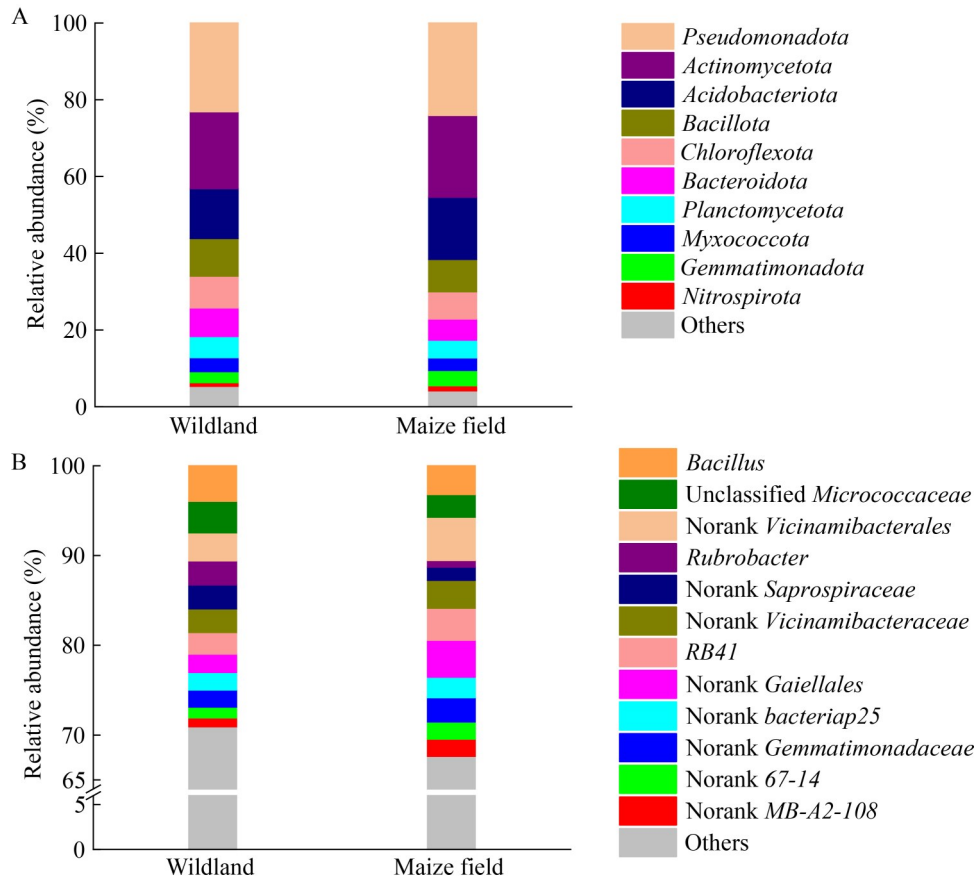


图2 两种苏打盐碱土壤中细菌优势类群的相对丰度。A: 门水平; B: 属水平。  
Figure 2 Relative abundance of bacteria in two types of soda saline-alkali soils. A: Phylum level; B: Genus level.

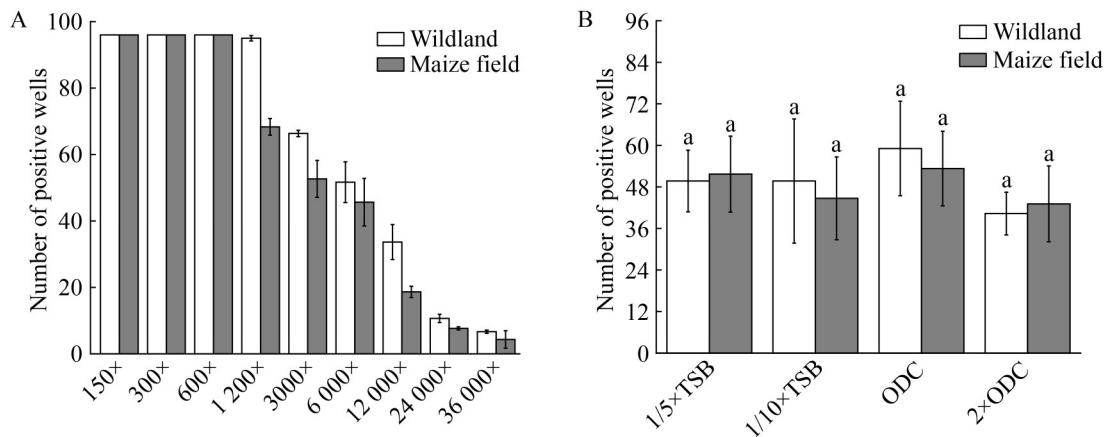


图3 稀释梯度确定与正式实验时每个96孔细胞培养板的平均阳性孔数量。A: 盐碱荒地与玉米地稀释梯度确定; B: 盐碱荒地与玉米地正式实验。不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Figure 3 The average number of positive wells per 96-well cell culture plate in the dilution gradient determination and formal experiment. A: Dilution gradient determination in wildland and maize field; B: Formal experiment in wildland and maize field. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

段获得的 96 孔板中选了 6 个(对应阳性孔 298 个)和正式实验产生的培养体系一起进行高通量鉴定。

### 2.3 高通量培养获得的细菌类型

通过鉴定所有的 2 256 个阳性培养体系,发现其中的 1 789 孔符合纯菌认定标准。这些纯菌分属于 153 种 ASVs 或菌株,属于 4 个细菌门中

的 47 个已知属、4 个未分类属以及 1 个未分类科。其中 74 个 ASVs 属于 *Bacillota* 中的 16 个已知属和 2 个未分类属; 49 个 ASVs 属于 *Pseudomonadota* 中的 20 个已知属和 2 个未分类属; 29 个 ASVs 属于 *Actinomycetota* 中的 10 个已知属和 1 个未分类科, 1 个 ASV 属于 *Bacteroidota* 的已知属(图 4)。培养频率最高的几

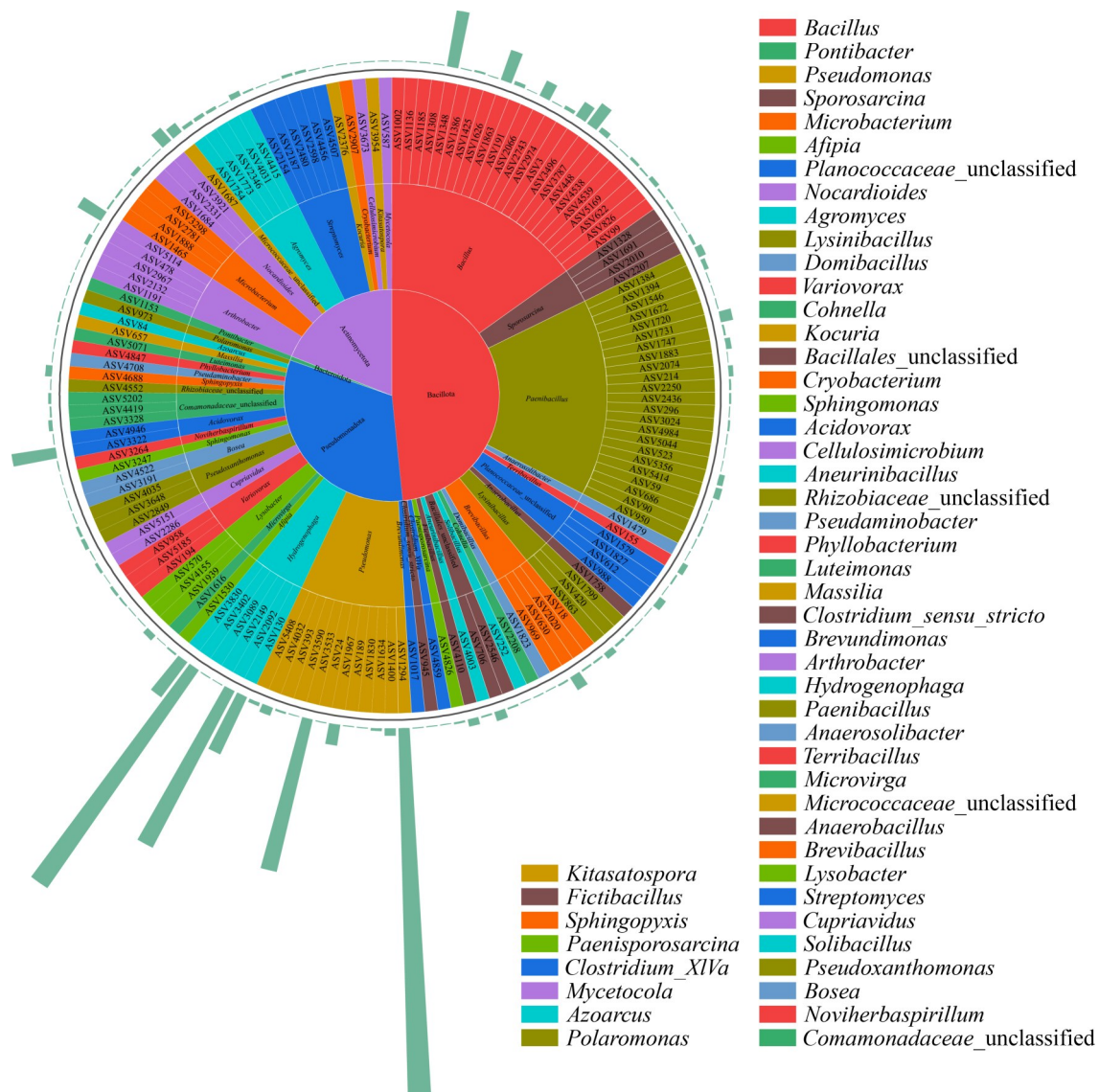


图4 高通量培养获得的153个ASVs对应的物种分类及培养频率。最外圈的柱子表示该ASV在所有纯菌孔中出现的频次。

Figure 4 Phylum and genus assignments of the 153 ASVs obtained through high-throughput cultivation. The bars in the outermost circle represent the frequency of occurrence of this ASV in all pure culture wells.

个属分别为假单胞菌属(*Pseudomonas*, 34.7%)、嗜氢菌属(*Hydrogenophaga*, 33.1%)、*Bacillus* (11.0%)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*, 4.0%)、食酸菌属(*Acidovorax*, 2.7%)和节杆菌属(*Arthrobacter*, 2.0%) (图4)。在所有52个属水平类群中有28个属仅包含1个ASV, 占比高达53.8%。

## 2.4 培养条件的影响

本研究依次分析了高通量培养过程中培养基浓度、土壤悬液稀释度以及土壤类型对ASVs的培养偏好(表3、图5、图6)。整体来看, 所有阳性培养体系中纯菌的占比可达79.3%, 每获得100个阳性培养体系平均可获得6.8种ASVs, 2.3种细菌属。

### 2.4.1 培养基浓度的影响

在3种浓度培养基中1/10×TSB获得的纯菌孔占比最高, 达81.1%, 但从ASVs及微生物属的分离效率来看, 1×TSB分离效率最高, 每100个阳性孔平均可获得21.5种ASVs, 对应7.4个属; 而1/5×TSB分离效率最低, 仅有2.6个属(表3)。从已培养的4个门的分离频率来看, 3种培养基均对*Pseudomonadota*分离偏好最强(图5), 其中1/5×TSB对*Pseudomonadota*

分离频率高达81.3%, 其次为1/10×TSB, 达68.6%, 1×TSB相对略低, 也达到61.1%。3种培养基偏好次强的是*Bacillota*, 其中1×TSB对*Bacillota*分离频率达33.6%, 其次为1/10×TSB, 达20.8%, 1/5×TSB相对略低, 为15.7%。3种培养基对*Actinomycetota*的分离偏好差别不大, 分离频率最高的为1/10×TSB, 为10.6%, 其他2种浓度的TSB对*Actinomycetota*的分离频率仅3.0%–4.8%。3种培养基对*Bacteroidota*分离偏好均最低, 仅在1×TSB培养体系中检测到0.4%。

三种浓度培养基均对*Bacillus*、*Hydrogenophaga*和*Pseudomonas*表现出明显的培养偏好, 只是在具体的分离频率上表现出一定差异(图5)。其中1×TSB对*Bacillus*的分离频率为19.7%, 高于1/10×TSB和1/5×TSB的11.5%和8.2%; 而1/10×TSB和1/5×TSB更倾向于分离*Hydrogenophaga*, 分离频率分别达33.4%和33.9%, 略高于1×TSB的29.3%。1/5×TSB对*Pseudomonas*的分离频率最高, 为41.8%, 1/10×TSB和1×TSB分别为27.5%和30.1%。仅在1/10×TSB中分离出的属有*Anaerosolibacter*和*Brevundimonas*等19种; 仅在1/5×TSB中分离出的属有*Azoarcus*、*Clostridium\_sensu\_stricto*

表3 高通量培养条件对培养结果的影响

Table 3 Effects of high-throughput cultivation conditions on cultivation results

Condition		Number of positive wells	Number of pure wells	Pure culture (%)	Number of ASVs	Number of genus	ASV isolation efficiency*	Genus isolation efficiency*
Concentration of TSB	1×	298	229	76.8	64	22	21.5	7.4
	1/5×	1 097a	862a	78.6a	79	28	7.2	2.6
	1/10×	861a	698a	81.1a	102	44	11.8	5.1
Soil dilution degree	ODC <sup>†</sup>	1 007A	733B	72.8B	81	30	8.0	3.0
	2×ODC	951B	827A	87.0A	105	43	11.0	4.5
Soil	Wildland	1 193	980	82.2	110	42	9.2	3.5
	Maize field	1 063	809	76.1	55	25	5.2	2.4
Total		2 256	1 789	79.3	153	52	6.8	2.3

\*: Isolation efficiency refers to the average number of ASVs or genus species obtained per 100 positive culture systems. <sup>†</sup>ODC refers to the optimal dilution concentration. Lowercase letters a, b and uppercase letters A, B indicate significant differences among different concentrations of culture medium and different dilution levels at  $P < 0.05$  level, respectively.

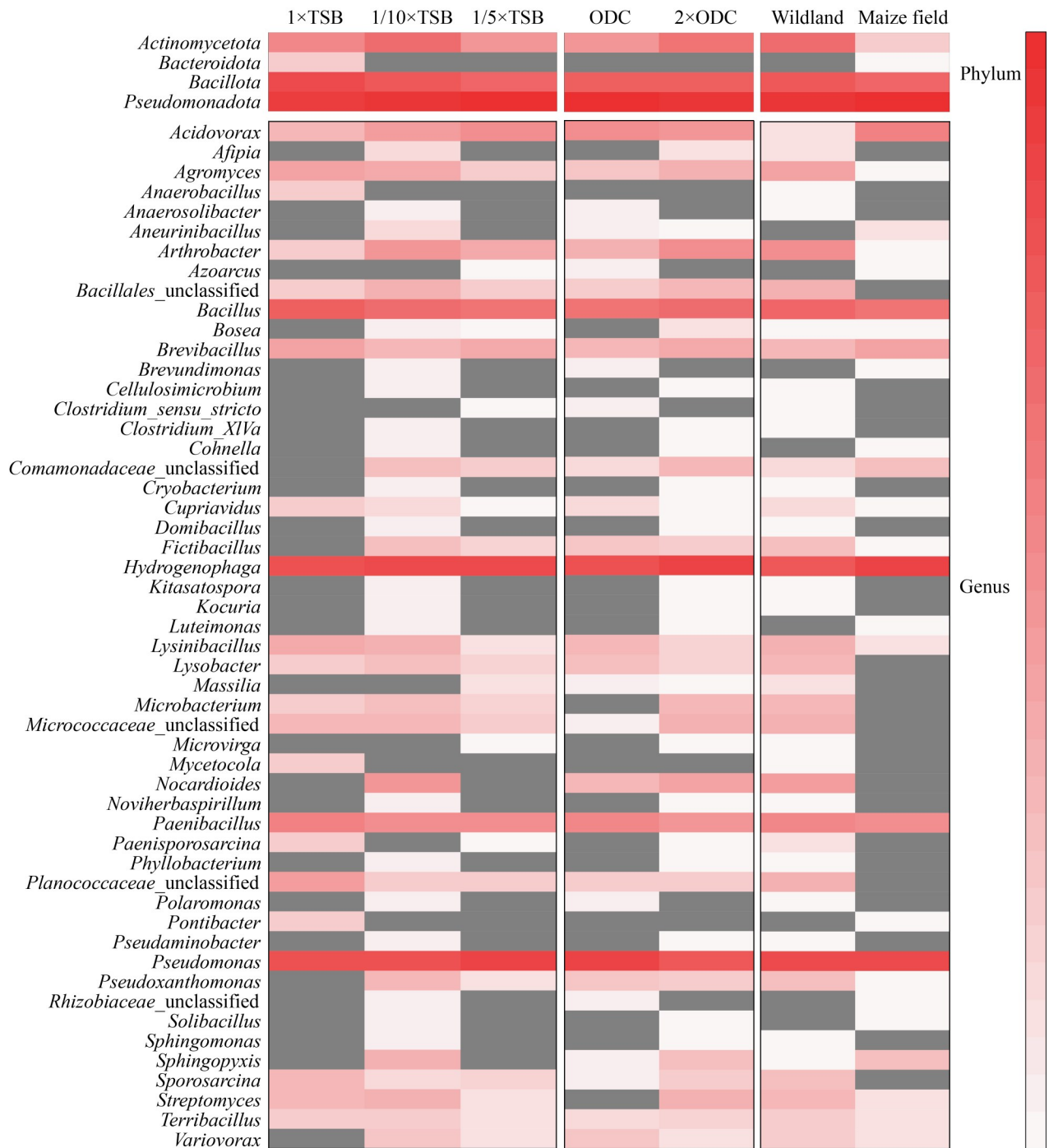


图5 培养基浓度、土壤悬液稀释度及土壤类型对高通量培养获得的细菌分离频率的影响。作图数据为原始数值经 $\lg x$ 转换后的值( $x$ 为原始值), 灰色表示该条件下未分离到对应类群。

Figure 5 Effects of medium concentration, soil suspension dilution, and soil type on the bacterial isolation frequency obtained from high-throughput cultivation. The data used for plotting are the original values after  $\lg x$  transformation ( $x$  represents the original value), and gray indicates the corresponding taxon was not isolated under this condition.



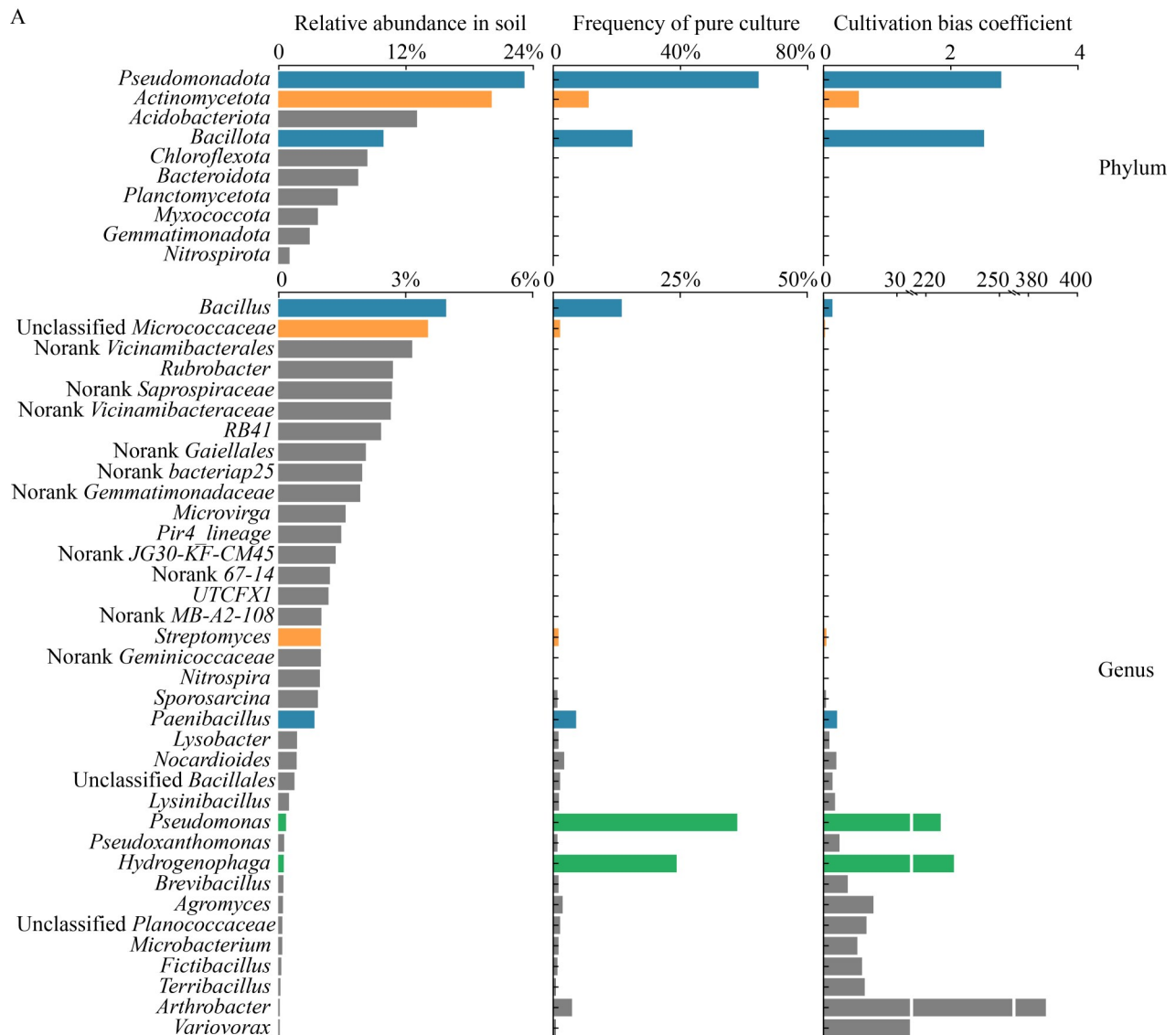
*Pseudomonas* 的分离频率达到了 36.1%，其次是 *Hydrogenophaga* 的 24.2% 和 *Bacillus* 的 13.4%；而玉米地土中分离频率最高的是 *Hydrogenophaga*，为 43.9%，接下来是 *Pseudomonas* 的 33.0%、*Bacillus* 的 8.0% 和 *Acidovorax* 的 5.7%。

## 2.5 土壤细菌类群与可培养类群的比较

在盐碱荒地和玉米地土壤中利用细菌 16S rRNA 基因测序共检测到 686 个属，通过高通量培养获得了 52 个属的纯菌株，在属水平上培养类群约占土壤中全部类群的 7.6%。基于各个培养属在高通量培养体系中的分离频率及其在土

壤中的相对丰度，本研究计算了其培养偏好系数(cultivation bias coefficient, CBC) (图 7)。结果表明本研究用到的高通量培养方法对 2 种土壤中的 *Pseudomonadota* 培养偏好最强，CBC 值分别为 2.8 和 3.5。对 *Bacillota* 的 CBC 值次之，分别为 2.5 和 1.7。对 *Actinomycetota* 的 CBC 值较低，分别为 0.6 和 0.02。对于土壤中的 *Acidobacteriota* 和 *Chloroflexota* 等其他优势门类未获得纯培养。

在属水平上，本研究用到的高通量培养方法对盐碱荒地和玉米地土壤中细菌的 CBC 值也比较一致。土壤优势属(相对丰度>1.0%)中 *Bacillus*



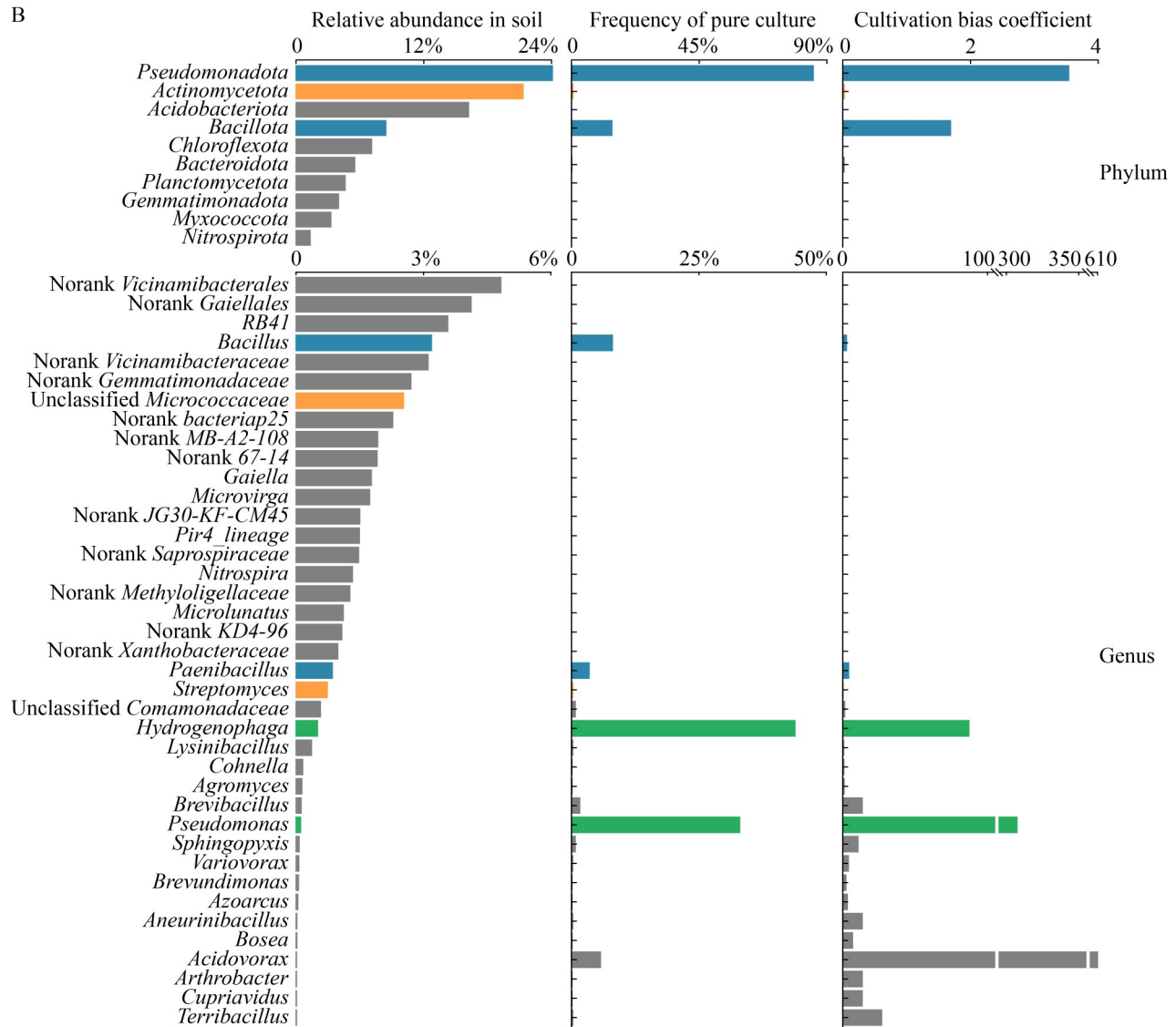


图7 土壤中优势类群与高通量培养类群的比较以及不同类群的培养偏好系数。A: 盐碱荒地; B: 玉米地。Cultivation bias coefficient为培养偏好系数, 为该类群在高通量培养体系中的分离频率(frequency of pure culture)和其在土壤中的相对丰度(relative abundance in soil)的比值。图中门水平统计的为在土壤中相对丰度排在前10的门, 属水平为土壤中相对丰度前20的属以及培养体系中分离频率前20的属。图中蓝色代表培养偏好系数大于1的土壤优势类群及近优势类群(相对丰度0.8%左右), 橙色代表培养偏好系数小于1的优势类群, 绿色代表培养偏好系数大于80的高频培养类群。

Figure 7 Comparison of dominant taxa in soil and taxa from high-throughput cultivation, and cultivation bias coefficient of different taxa. A: Wildland; B: Maize field. The cultivation bias coefficient of one taxon is the ratio of its isolation frequency in the high-throughput culture systems to its relative abundance in soil. At the phylum level, the top 10 phyla in soil were shown. At the genus level, the top 20 genera in soil and pure culture systems were shown. Blue bars represent soil dominant taxa and sub-dominant taxa (with a relative abundance of approximately 0.8%) with a cultivation bias coefficient > 1; Orange bars represents dominant taxa with a cultivation bias coefficient < 1; Green bars represents high-frequency cultivable taxa with a cultivation bias coefficient > 80.

被成功培养, 其在原位土壤中的占比分别为 3.9% 和 3.2%, CBC 值分别为 3.4 和 2.5, 显示出明显的培养偏好(图 7A、7B)。 *Paenibacillus* 作为土壤中的近优势属(相对丰度 0.8% 左右), CBC 值也达到了 5.3 和 4.1。 *Streptomyces* 作为土壤中另一个近优势属(相对丰度 0.8% 左右), CBC 值分别为 0.9 和 0.3, 显示出较低的偏好性, 跟其所在门 *Actinomycetota* 一致。 *Micrococcaceae* 的未分类类群作为一类土壤中的未培养优势类群(2.5%–3.5%), 仅在荒地土样本中得到培养, CBC 值为 0.3, 培养偏好低, 同样属于 *Actinomycetota*。 土壤中的其他可培养优势属如 *Nitrospira*、 *Rubrobacter*、 *Sporosarcina*、 *Bradyrhizobium* 在本研究中均未能分离。 主要的高频培养属如 *Pseudomonas* 和 *Hydrogenophaga* 在土壤中的占比仅在 0.1%–0.5% 之间, 其 CBC 值却高达 87.2–307.3, 培养偏好远超其他类群。 其余 CBC 值在 10 以上的属也均为土壤中的稀有类群(相对丰度 <0.1%), 包括 *Acidovorax*、 *Arthrobacter*、 *Variovorax*、 *Terribacillus*、 *Cupriavidus*、 *Agromyces*、 *Aneurinibacillus*、 *Fictibacillus* 等, 这部分类群在自然土壤中难检出, 但在培养体系中具生长优势(图 7A、7B)。

## 3 讨论

### 3.1 培养基对高通量细菌培养结果的影响

TSB 培养基是一种营养丰富的通用型培养基, 含有胰蛋白胨、大豆蛋白胨和氯化钠等成分, 能为多数细菌提供基础生长所需的氮源、碳源和微量元素。 已有研究报道, 利用该培养基可从根系微生物中成功分离大量可培养菌株<sup>[18]</sup>。 基于此, 本研究以 TSB 为基础, 通过调节其浓度以筛选适应不同营养条件的菌株。 在稀释梯度确定阶段, 采用 1×TSB 培养一周后即可观察到阳性孔  $OD_{600}$  值增加量超过 0.5, 且呈现肉眼可见的浑浊状态; 而在正式实验中使用

1/5×TSB 和 1/10×TSB 培养基培养 2 周后, 阳性孔比例进一步提高(表 3), 表明在确定最适稀释度的基础上适度降低营养浓度有助于分离生长缓慢或稀有微生物类群。 该策略与 Mohamed 等<sup>[27]</sup>在海洋微生物分离中采用低营养条件以获取低丰度物种的方法一致。 本研究进一步发现, 1×TSB 的 ASVs 分离效率高于 2 种低浓度的 TSB, 但 1/10×TSB 所获纯菌占比最高。 造成这种差异的原因可能在于: 1×TSB 的富营养环境促进了异养型细菌在培养前期快速繁殖, 加剧了种间竞争, 使富营养类群优先占据生态位, 从而抑制慢生长菌的增殖, 最终分离得到更多属于富营养类型的 ASVs<sup>[28]</sup>。 相比之下, 1/5×TSB、1/10×TSB 所构建的寡营养环境可缓解种间竞争强度, 减少代谢抑制物积累, 为稀有或慢生长菌株提供生长机会, 进而提高纯菌比例。

在盐碱荒地土中 1/5×TSB 和 1/10×TSB 培养基各培养板阳性孔数量相近(图 3), 这可能源于相同稀释度下各孔实际接种量接近, 且 2 种营养条件下均存在适宜该土壤的菌株。 在玉米地土中 1/5×TSB 所获阳性孔数量显著多于 1/10×TSB 培养基, 这可能与玉米地因定期施肥形成的高营养环境有关, 使其优势菌群更适应较高营养条件, 从而在 1/5×TSB 中表现出更高生长活性<sup>[29]</sup>。 属水平分析显示, *Bacillus* 在 1×TSB 分离效率最高(图 5), 表明其对高营养环境具有明显偏好。 Schaeffer 等<sup>[30]</sup>研究发现, 高营养条件下 *Bacillus* 倾向于抑制孢子形成并优先进行营养生长与代谢以快速占据生态位; 而在寡营养条件下则更易形成孢子进入休眠, 这与本研究结果一致。 *Hydrogenophaga* 在 3 种浓度的培养基环境中分离频率差别仅有 4.6 个百分点, 说明其在高通量培养过程中对营养浓度变化不敏感。 *Pseudomonas* 则在 1/5×TSB 中达到最高分离效率, 提示该营养水平最适宜其生长繁殖。

盐碱荒地土壤与玉米地土壤的最适稀释度

分别为 10 000×与 6 000×, 反映 2 类土壤中可培养细菌的丰度与活性存在显著差异, 进一步说明盐碱荒地中细菌丰度高于玉米地。该结果与林耀奔等<sup>[31]</sup>关于荒地土壤细菌群落丰富度与多样性高于其他土地利用类型的报道相符。

高通量培养技术基于充分稀释使每孔尽可能仅含单个微生物细胞, 从而构建大规模纯培养体系。因此, 稀释度的选择需兼顾通量与纯度。在本研究中, 最适稀释度与 2×最适稀释度相比, 前者阳性孔数量仅多 5.9%, 但纯菌孔数低 11.4%, 纯菌比例低 14.2%, 所获 ASVs 种类也少 22.9%。从 ASV 与属水平的纯菌分离效率来看, 2×最适稀释度均优于最适稀释度(表 3), 说明适度提高稀释度虽略微牺牲通量, 但可显著提高纯培养物种多样性。尽管土壤悬液经充分稀释, 仍有 20.7% 的阳性孔为混合菌, 可能由于部分细菌细胞与土壤颗粒紧密结合, 未能充分分散<sup>[32]</sup>。提高稀释度至 2×最适稀释度可降低初始接种密度, 从而减轻培养初期的种间竞争, 为竞争力较弱的菌株提供生长机会; 同时, 低接种量也有助于减少细菌代谢产物(如抗生素与有机酸)的早期积累, 缓解其对敏感菌株的抑制。已有研究指出, 代谢产物抑制是限制难培养微生物分离的关键因素之一, 高接种量易导致此类物质快速积累<sup>[30]</sup>。因此, 适度提高稀释度不仅有助于提升培养体系纯度, 还可富集更多样化的微生物资源。随着稀释度从 2×最适稀释度到最适稀释度, *Pseudomonas* 的培养频率自 24.8% 上升到 47.3%, 而 *Hydrogenophaga* 则由 39.9% 降至 26.6% (图 5)。推测 *Pseudomonas* 在营养充足的条件下可通过快速糖酵解(如 EMP 途径)来占据竞争优势<sup>[33]</sup>, 在与 *Hydrogenophaga* 共存的培养初期更易形成单一优势类群。

在微生物资源开发中优化培养策略是获取多样化可培养菌株的关键。通过调整培养基类型和设置浓度梯度, 可为不同营养需求的微生物创造适宜生长条件, 这一策略有助于提高微生物的分离效率。尽管通用培养基能覆盖多数

类群, 但其针对性有限。未来可基于特定功能需求设计选择性培养基, 结合高通量技术实现目标微生物的高效富集, 为功能菌剂开发奠定基础<sup>[34]</sup>。从菌剂产业化角度出发, 快速生长的富营养微生物更具应用潜力。该类微生物繁殖周期短、培养成本低, 易于实验室扩繁与规模化保存。通过组合具备不同生态功能的速生菌株可构建适用于盐碱地、重金属污染及设施农业等多样环境的菌剂配方, 从而在资源多样性与开发效率之间取得平衡, 推动微生物技术的实际应用转化<sup>[35]</sup>。

### 3.2 土壤中的可培养细菌类群

盐碱荒地与玉米地可培养细菌类群的差异与其各自土壤环境特征密切相关。盐碱荒地中耐逆类群更为突出, 而玉米地中富营养适应型类群丰度较高。例如, *Rubrobacter* 和 *Micrococcaceae* 的未分类类群在盐碱荒地中的丰度均高于玉米地, 与林耀奔等<sup>[31]</sup>关于该类群偏好寡营养环境的报道一致。*RB41* 属以及 *Vicinamibacteraceae* 和 *Vicinamibacterale* 的未分类类群在玉米地中丰度较高, 研究表明其生长依赖外源有机碳<sup>[36]</sup>, 与玉米地长期施肥形成的高有机碳环境相吻合。因此, 细菌群落结构的差异本质上是盐碱胁迫与养分条件双重筛选的结果: 盐碱荒地的高盐碱环境筛选出更多耐逆类群, 而玉米地的高养分条件则富集了富营养适应型类群。该结论为后续针对不同土地利用类型的盐碱土微生物资源挖掘提供了方向: 从荒地中定向筛选耐盐碱功能菌, 从玉米地中挖掘高效有机质分解菌。

无论从门水平还是属水平来看, 高通量培养所获类群组成与原位土壤微生物群落均存在显著差异。在培养获得的 4 个门的纯菌株中对 *Pseudomonadota* 的培养偏好性最高, 其培养频率远高于其在土壤中的相对丰度(图 7), 推测原因如下: 首先, 已有研究表明在水稻土细胞提取过程中 *Pseudomonadota* 的细胞更易通过振荡脱离土壤颗粒进入悬液, 而 *Acidobacteriota* 等类

群与土壤颗粒结合紧密, 脱落效率较低<sup>[37]</sup>, 导致接种悬液中 *Pseudomonadota* 比例偏高, 进一步经高倍稀释后该差异被放大。这可能是培养体系中 *Pseudomonadota* 占比极高, 而 *Acidobacteriota* 等优势或次优势门类未能获得的原因之一。其次, *Pseudomonadota* 中包含大量富营养类群, 能在高营养环境中快速增殖<sup>[38]</sup>。尽管经过稀释, 1/5×TSB 与 1/10×TSB 培养基中仍含有较高浓度的多糖、蛋白质等营养物质, 且碳氮比适宜, 有利于该类群生长。此外, 部分 *Pseudomonadota* 可分泌抗生素、铁载体或有机酸等代谢产物, 抑制其他微生物生长, 从而在种间竞争中占据优势<sup>[39-40]</sup>。代先祝等<sup>[41]</sup>也发现, 在全培养基中常出现单一类群占优并抑制其他类群的现象, 与本研究结果一致。作为盐碱土中另一优势类群, *Actinomycetota* 的培养频率远低于 *Pseudomonadota* (图 7)。可能原因包括: 土壤中的 *Actinomycetota* 依赖于作物的根系分泌物或秸秆腐解产物等特殊有机成分, 而 TSB 的营养组成与其天然需求不一致, 从而抑制其生长<sup>[42]</sup>; 此外, *Actinomycetota* 在常温下普遍生长缓慢, 需进行长期培养(>14 d)、升高培养环境温度或添加额外养分, 而标准高通量培养周期(7-14 d)难以支持其充分增殖<sup>[43]</sup>。

比较原位土壤属水平细菌丰度与高通量培养所获属的分离频率(图 7)发现, 土壤中的稀有物种 *Pseudomonas* 与 *Hydrogenophaga* 在培养后成为高频菌属。*Pseudomonas* 在富营养环境下具备独特的代谢优势与竞争策略, 其可在盐碱环境中通过合成甜菜碱等相容性溶质维持细胞内稳态<sup>[44]</sup>, 并能分泌铁载体与抗生素抑制其他微生物<sup>[45-46]</sup>, 从而在培养体系中占据优势。*Hydrogenophaga* 则得益于其代谢灵活性与对好氧条件的适应性, 既能利用富营养环境中的碳源快速增殖, 也适宜于静态好氧培养条件<sup>[47]</sup>, 因而成为高频分离类群。在原生土壤中受资源竞争劣势或厌氧微环境限制, 其丰度相对较低。

*Bacillus* 在高营养环境下可通过高效分解代谢快速获取能量, 优先进行营养生长以抢占生态位优势<sup>[30]</sup>, 也成为优势类群之一。本研究同时发现, 部分原位土壤中的优势类群在高通量培养后丰度下降或未能成功培养(图 7)。例如, *Micrococcaceae* 的未分类类群可能依赖根际或土壤团聚体中的低氧微环境生长, 高通量培养提供的充足氧气抑制其增殖<sup>[48]</sup>; *RB41* 类群偏好寡营养条件, 在富营养的 TSB 培养基中生长受抑<sup>[49]</sup>; *Rubrobacter* 的生长则依赖光合作用及  $Fe^{3+}$  等特殊电子受体, 在实验室的暗培养条件下难以生长<sup>[50]</sup>。此外, 部分菌株需与其他菌株共培养才能存活<sup>[51]</sup>, 因此寻找这些共生的菌株并纳入盐碱地菌种库是未来的研究方向之一。通过对 45 个 96 孔培养板中构建的 2 256 个阳性培养体系进行高通量鉴定, 本研究获得了约 7.6% 的土壤细菌属。其中 53.8% 的属仅包含 1 个 ASV, 表明若进一步扩大培养通量有望获得更多 ASVs 与属级类群。

尽管本研究通过优化 TSB 培养基浓度与土壤悬液的稀释梯度实现了苏打盐碱土细菌的高通量培养, 但在生境特异性适配方面仍存在不足, 未能充分考虑苏打盐碱土高 pH、高碱度的核心环境特征, 导致依赖特殊离子条件或相容性溶质的微生物类群覆盖有限, 部分“未培养优势类群”仍难以检出<sup>[13]</sup>。近年来, 极端环境微生物培养技术的快速发展为解决上述问题提供了新途径。微流控芯片技术<sup>[52]</sup>可将单个微生物细胞与定制培养基封装于独立水性微滴中, 通过数字化操控实现超高通量筛选。该技术不仅可避免种间竞争与代谢抑制, 还能在液滴内精准调控离子梯度与营养供给, 并结合液滴活力检测方法定量评估难培养菌的生长状况, 分析菌株与培养基的匹配关系。同时, 可搭配原位培养装置<sup>[53]</sup>将微生物回置于苏打盐碱土中原位维持其原生环境, 构建“微流控精准筛选—原位富集”一体化技术体系, 进一步丰富可培养微生物

资源库, 为耐盐碱功能菌剂的筛选与应用提供技术支撑, 推动微生物技术在盐碱地生态修复中的实际应用转化。

## 4 结论

本研究表明, 培养基作为高通量细菌分离培养的基础, 其浓度的适度降低可有效抑制快速生长菌株的竞争性优势, 从而提高阳性孔比例。不同土壤来源的细菌对培养基浓度表现出明显的偏好差异, 该偏好直接影响菌株的分离效率及类群组成结构。土壤悬液的最适稀释度因土壤类型而异, 在高通量分离培养过程中需统筹兼顾培养通量与纯菌纯度。适当提高稀释度虽会略微降低通量, 但有助于提升纯培养体系的物种多样性。基于此, 本研究提出采用低浓度培养基与高稀释度土壤悬液相结合的培养策略, 有利于纯菌分离与多样性的同步提升。通过高通量分离培养技术, 本研究成功从苏打盐碱土中分离并鉴定出 153 株细菌, 为构建盐碱土微生物资源库提供了丰富的菌种材料。门水平高频分离类群为 *Pseudomonadota*、*Actinomycetota* 和 *Bacillota*。属水平高频分离类群为 *Bacillus*、*Hydrogenophaga*、*Pseudomonas* 属。综上所述, 本研究通过系统阐明培养基浓度优化、稀释度适配及土壤类型对培养结果的响应规律, 为高通量分离培养技术的精细化建立与定向应用提供了重要的理论依据与实践参考。

### 作者贡献声明

滕钊军: 实验数据收集及分析、图表制作、论文撰写; 蔡元锋: 提出概念、方法论、数据分析、论文审阅及编辑; 吴俏利: 数据分析; 张耀鸿: 监督管理、审阅; 贾仲君: 论文指导、监督管理。

### 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 杨瑞珍, 毕于运. 我国盐碱化耕地的防治[J]. 干旱区资源与环境, 1996, 10(3): 22-30.  
YANG RZ, BI YY. Prevention and amelioration of salinized cropland in China[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 1996, 10(3): 22-30 (in Chinese).
- [2] YANG F, AN FH, MA HY, WANG ZC, ZHOU X, LIU ZJ. Variations on soil salinity and sodicity and its driving factors analysis under microtopography in different hydrological conditions[J]. Water, 2016, 8(6): 227.
- [3] MARTINEZ-BELTRAN J, MANZUR CL. Overview of salinity problems in the world and FAO strategies to address the problem[C]. Proceedings of the International Salinity Forum, Riverside, California, USA, 2005: 311-313.
- [4] 林佳, 宋戈, 张莹. 基于景观生态风险格局的盐碱地分区规划防治研究: 以黑龙江省林甸县为例[J]. 生态学报, 2018, 38(15): 5509-5518.  
LIN J, SONG G, ZHANG Y. Regionalization planning for prevention and control of saline-alkali land based on a landscape ecology risk pattern theory: a case study in Lindian County, Heilongjiang Province[J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(15): 5509-5518 (in Chinese).
- [5] ROMANOWICZ KJ, FREEDMAN ZB, UPCHURCH RA, ARGIROFF WA, ZAK DR. Active microorganisms in forest soils differ from the total community yet are shaped by the same environmental factors: the influence of pH and soil moisture[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, 92(10): fiw149.
- [6] 牛世全, 龙洋, 李海云, 达文燕, 胡山, 李渭娟, 朱学泰, 孔维宝. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析河西走廊地区盐碱土壤微生物多样性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(9): 2067-2078.  
NIU SQ, LONG Y, LI HY, DA WY, HU S, LI WJ, ZHU XT, KONG WB. Microbial diversity in saline alkali soil from Hexi Corridor analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing system[J]. Microbiology China, 2017, 44(9): 2067-2078 (in Chinese).
- [7] 郑贺云, 黎志坤, 李超, 张鲜姣, 胡建伟, 朱红惠. 新疆阿克苏地区盐碱地细菌类群多样性及优势菌群分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 1031-1043.  
ZHENG HY, LI ZK, LI C, ZHANG XJ, HU JW, ZHU HH. Analysis of the bacterial diversity and dominant population in Akesu Saline-alkali in Xinjiang[J]. Microbiology China, 2012, 39(7): 1031-1043 (in Chinese).
- [8] 李新, 焦燕, 代钢, 杨铭德, 温慧洋. 内蒙古河套灌区不同盐碱程度的土壤细菌群落多样性[J]. 中国环境科学, 2016, 36(1): 249-260.  
LI X, JIAO Y, DAI G, YANG MD, WEN HY. Soil bacterial community diversity under different degrees of saline-alkaline in the Hetao Area of Inner Mongolia[J]. China Environmental Science, 2016, 36(1): 249-260 (in Chinese).
- [9] 孙佳杰, 尹建道, 解玉红, 杨永利, 舒晓武, 刘保东. 天津滨海盐碱土壤微生物生态特性研究[J]. 南京林业大学

- 学报(自然科学版), 2010, 34(3): 57-61.  
SUN JJ, YIN JD, XIE YH, YANG YL, SHU XW, LIU BD. Microbial ecological characteristics of saline-alkali soil in coastal area of Tianjin[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2010, 34(3): 57-61 (in Chinese).
- [10] 冯伟. 天津滨海耐盐碱菌的筛选、鉴定以及对葱的降解研究[D]. 天津: 南开大学, 2013.  
FENG W. Screening, identification of salt-tolerant and alkali-resistant bacteria from Tianjin Binhai area and study on anthracene degradation[D]. Tianjin: Nankai University, 2013 (in Chinese).
- [11] 杜滢鑫, 谢宝明, 蔡洪生, 唐璐, 郭长虹. 大庆盐碱地九种植物根际土壤微生物群落结构及功能多样性[J]. 生态学报, 2016, 36(3): 740-747.  
DU YX, XIE BM, CAI HS, TANG L, GUO CH. Structural and functional diversity of rhizosphere microbial community of nine plant species in the Daqing Saline-alkali soil region[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(3): 740-747 (in Chinese).
- [12] PENG M, JIA HB, WANG QY. The effect of land use on bacterial communities in saline-alkali soil[J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(3): 325-333.
- [13] SHI W, TAKANO T, LIU SK. Isolation and characterization of novel bacterial taxa from extreme alkali-saline soil[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(5): 2147-2157.
- [14] 李青青, 张芮, 高彦婷, 张红娟, 刘柯含. 耐盐碱解磷菌的溶磷效果及其对黄豆萌发的影响[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(11): 4574-4589.  
LI QQ, ZHANG R, GAO YT, ZHANG HJ, LIU KH. Phosphorus solubilization effect of saline-tolerant phosphorus-solubilizing bacteria and its effect on soybean germination[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(11): 4574-4589 (in Chinese).
- [15] 张小霞, 陈筱玥, 王秋云, 张国只, 杨新平, 代金平, 梁振普. 柽柳根际一株盐单胞菌Bachu 26的分离、鉴定及其盐胁迫下的促生作用研究[J]. *微生物学报*, 2024, 64(2): 607-622.  
ZHANG XX, CHEN XY, WANG QY, ZHANG GZ, YANG XP, DAI JP, LIANG ZP. Isolation and identification of *Halomonas* sp. Bachu 26 with plant growth-promoting effect from rhizosphere of *Tamarix chinensis* under salt stress[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(2): 607-622 (in Chinese).
- [16] 陈小娟, 刘铠鸣, 宣明刚, 邵佳慧, 张瑞福. 增强作物耐盐胁迫能力的根际促生菌筛选、鉴定及田间应用效果[J]. *南京农业大学学报*, 2020, 43(3): 452-459.  
CHEN XJ, LIU KM, XUAN MG, SHAO JH, ZHANG RF. Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria to enhance salt stress tolerance of crops and their effects in field experiment[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2020, 43(3): 452-459 (in Chinese).
- [17] KAMAGATA Y, TAMAKI H. Cultivation of uncultured fastidious microbes[J]. *Microbes and Environments*, 2005, 20(2): 85-91.
- [18] ZHANG JY, LIU YX, GUO XX, QIN Y, GARRIDO-OTER R, SCHULZE-LEFERT P, BAI Y. High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(2): 988-1012.
- [19] 张婧赢, 刘永鑫, 郭晓璇, 秦媛, 白洋. 高通量分离培养和鉴定植物根系细菌[J]. *Bio-101*, 2021: e2003644.  
ZHANG JY, LIU YX, GUO XX, QIN Y, BAI Y. High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota[J]. *Bio-101*, 2021: e2003644 (in Chinese).
- [20] BAI Y, MÜLLER DB, SRINIVAS G, GARRIDO-OTER R, POTTHOFF E, ROTT M, DOMBROWSKI N, MÜNCH PC, SPAEPEN S, REMUS-EMSERMANN M, HÜTTEL B, McHARDY AC, VORHOLT JA, SCHULZE-LEFERT P. Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota[J]. *Nature*, 2015, 528(7582): 364-369.
- [21] LAGIER JC, DUBOURG G, MILLION M, CADORET F, BILEN M, FENOLLAR F, LEVASSEUR A, ROLAIN JM, FOURNIER PE, RAOULT D. Culturing the human microbiota and culturomics[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(9): 540-550.
- [22] BILEN M, DUFOUR JC, LAGIER JC, CADORET F, DAOUD Z, DUBOURG G, RAOULT D. The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 94.
- [23] 张万源. 水稻根系细菌的高通量分离及其功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.  
ZHANG WY. High throughput isolation and functional characterization of rice root bacteria[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [24] 宋蕾蕾, 孙文晓, 焦可欣, 陈钰璐, 邹淑琪, 张渐月, 徐晨伟, 张杨, 戴传超. 基于高通量培养分析稻虾共作模式土壤的细菌群落[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2024, 47(1): 57-67.  
SONG LL, SUN WX, JIAO KX, CHEN YL, ZOU SQ, ZHANG XY, XU CW, ZHANG Y, DAI CC. Comparison of soil bacterial communities in rice-crayfish cocropping based on high-throughput culturable method[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2024, 47(1): 57-67 (in Chinese).
- [25] SCHLOSS PD, WESTCOTT SL, RYABIN T, HALL JR, HARTMANN M, HOLLISTER EB, LESNIEWSKI RA, OAKLEY BB, PARKS DH, ROBINSON CJ, SAHL JW, STRES B, THALLINGER GG, van HORN DJ, WEBER CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [26] 马克平. 生物群落多样性的测度方法I  $\alpha$ 多样性的测度方法(上)[J]. *生物多样性*, 1994(3): 162-168.  
MA KP. Measurement of biotic community diversity I  $\alpha$  diversity (Part 1)[J]. *Biodiversity Science*, 1994(3): 162-168 (in Chinese).

- [27] MOHAMED SS, ABDELHAMID SA, ALI RH. Isolation and identification of marine microbial products[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2021, 19(1): 162.
- [28] FAUST K, RAES J. Microbial interactions: from networks to models[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(8): 538-550.
- [29] JANGID K, WILLIAMS MA, FRANZLUEBBERS AJ, SANDERLIN JS, REEVES JH, JENKINS MB, ENDALE DM, COLEMAN DC, WHITMAN WB. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(11): 2843-2853.
- [30] SCHAEFFER P, MILLET J, AUBERT JP. Catabolic repression of bacterial sporulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1965, 54(3): 704-711.
- [31] 林耀奔, 杨建辉, 叶艳妹. 盐碱地不同土地利用方式下土壤细菌群落结构多样性差异分析[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(4): 1266-1273.  
LIN YB, YANG JH, YE YM. Analysis on diversity of soil bacterial community under different land use patterns in saline-alkali land[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(4): 1266-1273 (in Chinese).
- [32] HUANG QY, WU HY, CAI P, FEIN JB, CHEN WL. Atomic force microscopy measurements of bacterial adhesion and biofilm formation onto clay-sized particles[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16857.
- [33] LIU Z, GONG HR, LI J, HOU RX, SUN ZG, OUYANG Z. Microbes with high-abundance attributes dominate the prokaryote communities of saline-alkali soil and construct more complex networks in the plant rhizosphere[J]. *Geoderma*, 2023, 439: 116684.
- [34] SALLET H, CALVO M, TITUS M, JACQUEMIN N, MEIBOM KL, BERNIER-LATMANI R. High-throughput cultivation and isolation of environmental anaerobes using selectively permeable hydrogel capsules[J]. *ISME Communications*, 2025, 5(1): ycaf117.
- [35] LEGMANN R, SCHREYER HB, COMBS RG, McCORMICK EL, RUSSO AP, RODGERS ST. A predictive high-throughput scale-down model of monoclonal antibody production in CHO cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(6): 1107-1120.
- [36] 孙小芳, 曾华兰, 刘勇, 何炼, 况再银, 代顺冬, 华丽霞, 蒋秋平. 四川三台县麦冬//玉米间作体系根际微生物多样性及功能分析[J]. *微生物学通报*, 2025, 52(1): 290-308.  
SUN XF, ZENG HL, LIU Y, HE L, KUANG ZY, DAI SD, HUA LX, JIANG QP. Biodiversity and functions of rhizosphere microbiome in the *Ophiopogon japonicus*-maize intercropping system in Santai County, Sichuan Province[J]. *Microbiology China*, 2025, 52(1): 290-308 (in Chinese).
- [37] 贾仲君, 蔡元锋, 俞娟莉, 杜文斌. 单细胞、显微计数和高通量测序典型水稻土微生物组的技术比较[J]. *微生物学报*, 2017, 57(6): 899-919.  
JIA ZJ, CAI YF, YUN JL, DU WB. Comparison of soil microbiome by single cell technology, classical microscope methods and high-throughput MiSeq sequencing[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6): 899-919 (in Chinese).
- [38] 周阳, 黄旭, 赵海燕, 郑青松, 吴田乡, 梁永红, 刘清秀, 罗朝晖, 管永祥. 麦秸秆和沼液配施对水稻苗期生长和土壤微生物的调控[J]. *土壤学报*, 2020, 57(2): 479-489.  
ZHOU Y, HUANG X, ZHAO HY, ZHENG QS, WU TX, LIANG YH, LIU QX, LUO ZH, GUAN YX. Regulation of wheat straw and biogas slurry application on rice seedling growth and soil microorganism[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57(2): 479-489 (in Chinese).
- [39] GETZKE F. Versatile functions of bacterial exometabolites in microbe-microbe and plant-microbe interactions[D]. Cologne, Germany: Universität zu Köln, 2022.
- [40] 胡元森, 李翠香, 孙富林, 吴坤, 贾新成. 不同培养基组合提高土壤细菌可培养性的研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(5): 882-887.  
HU YS, LI CX, SUN FL, WU K, JIA XC. Improved culturability of soil bacteria using proper combination with various culturing medium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(5): 882-887 (in Chinese).
- [41] 代先祝, 梁晓丽, 邱勤. 低营养浓度培养基分离培养生物膜中的细菌及其鉴定[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(7): 951-955.  
DAI XZ, LIANG XL, QIU Q. Isolation and identification of bacteria from biofilm with culture medium of low nutrient concentration[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(7): 951-955 (in Chinese).
- [42] 王晓彤, 靳振江, 周军波, 程跃扬, 袁武, 潘复静, 刘德深. 龙脊稻作梯田土壤细菌群落结构和功能类群及影响因素分析[J]. *农业资源与环境学报*, 2021, 38(3): 365-376.  
WANG XT, JIN ZJ, ZHOU JB, CHENG YY, YUAN W, PAN FJ, LIU DS. Community structure and functional groups of soil bacteria and their influencing factors in Longji rice terraces[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2021, 38(3): 365-376 (in Chinese).
- [43] 张利平, 陈冠华. 放线菌化学分类学的现状及发展趋势[J]. *微生物学通报*, 1997, 24(5): 310-312, 281.
- [44] NOWAK A, ŻUR-PIŃSKA J, PIŃSKI A, PACEK G, MROZIK A. Adaptation of phenol-degrading *Pseudomonas putida* KB3 to suboptimal growth condition: a focus on degradative rate, membrane properties and expression of *xylE* and *cfaB* genes[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 221: 112431.
- [45] 姜姗姗. 盐胁迫下甜菜碱介导的固氮施氏假单胞菌与水稻互作机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2023.  
JIANG SS. Mechanism of glycine betaine-mediated interaction between nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri* and rice under salt stress[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023 (in Chinese).
- [46] LAMONT IL, BEARE PA, OCHSNER U, VASIL AI,

- VASIL ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(10): 7072-7077.
- [47] CALDERER M, MARTÍ V, de PABLO J, GUIVERNAU M, PRENAFETA-BOLDÚ FX, VIÑAS M. Effects of enhanced denitrification on hydrodynamics and microbial community structure in a soil column system[J]. Chemosphere, 2014, 111: 112-119.
- [48] 杨晨, 张为艳, Dawoon Jung, 何山. 连续流生物反应器技术在微生物培养中的应用[J]. 微生物学报, 2021, 61(4): 793-806.
- YANG C, ZHANG WY, JUNG D, HE S. Application of continuous flow bioreactor technology in microbial cultivation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 793-806 (in Chinese).
- [49] DASTAGER SG, KRISHNAMURTHI S, RAMESHKUMAR N, DHARNE M. The family *Micrococcaceae*[M]//The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014: 455-498.
- [50] JURADO V, MILLER AZ, ALIAS-VILLEGAS C, LAIZ L, SAIZ-JIMENEZ C. *Rubrobacter bracarensis* sp. nov., a novel member of the genus *Rubrobacter* isolated from a biodeteriorated monument[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(5): 306-309.
- [51] MARMANN A, ALY AH, LIN WH, WANG BG, PROKSCH P. Co-cultivation: a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms[J]. Marine Drugs, 2014, 12(2): 1043-1065.
- [52] BROUZES E, MEDKOVA M, SAVENELLI N, MARRAN D, TWARDOWSKI M, HUTCHISON JB, ROTHBERG JM, LINK DR, PERRIMON N, SAMUELS ML. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(34): 14195-14200.
- [53] 张作艳, 丁立建, 何山. 未培养微生物原位培养技术研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 907-913.
- ZHANG ZY, DING LJ, HE S. Research progress on *in situ* cultivation of uncultured microorganisms[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(5): 907-913 (in Chinese).