

基于 BIOLOG 的微生物群落碳代谢功能分析

Analysis of Microbial Community Carbon Metabolism Function Based on BIOLOG

陈瑞蕊，俞冰倩，张建伟，林先贵^{*}，冯有智^{*}

土壤与农业可持续发展国家重点实验室，中国科学院南京土壤研究所，南京，江苏

*通讯作者邮箱：xqlin@issas.ac.cn; yzfeng@issas.ac.cn

引用格式：陈瑞蕊，俞冰倩，张建伟，林先贵，冯有智. (2021). 基于BIOLOG的微生物群落碳代谢功能分析. *Bio-101* e2003577. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003577.

How to cite: Chen, R. R., Yu, B. Q., Zhang, J. W., Lin, X. G. and Feng, Y. Z. (2021). Analysis of Microbial Community Carbon Metabolism Function Based on BIOLOG. *Bio-101* e2003577. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003577.(in Chinese)

摘要：BIOLOG 方法是基于不同底物诱导下的代谢响应模式，测算环境样本中微生物群落代谢功能多样性的一种方法。BIOLOG 微平板上小孔中分别装有不同碳源和四唑类显色物质，微生物群落可以利用不同种类的碳源进行代谢，以代谢过程产生的自由电子与四唑类显色物质（如 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC）发生颜色反应的吸光度差异为基础，表示微生物对碳源的利用程度，通过分析微生物群落的代谢特征指纹图谱，反映不同环境条件引起的微生物群落功能的变化，也可用于指示微生物群落结构的变化。BIOLOG 法可以根据不同的检测目的选择不同的微平板，如 GP 板（革兰氏阳性板）、GN 板（革兰氏阴性板）和 ECO 板（生态板）等。微生物群落的整体活性指标采用培养过程中微平板每孔颜色平均变化率（average well color development, AWCD）来描述；计算 Shannon、Simpson 和 McIntosh 等多样性指数，可表征微生物群落碳代谢功能的丰富度、优势度和均一性；通过主成分分析（principal component analysis, PCA）反映出不同微生物群落的代谢特征。BIOLOG 法具有灵敏度高、测定简便及检测速度快等优点，可最大限度地保留微生物群落原有的代谢特征，是目前用于揭示土壤微生物群落功能多样性的一种相对简单快捷的研究方法。

关键词：BIOLOG，微生物群落，功能多样性，AWCD

材料与试剂

1. 称量纸
2. 枪头
3. V型槽
4. 新鲜土
5. KH₂PO₄
6. K₂HPO₄
7. 磷酸缓冲液 (pH 7.0) (见溶液配方)
8. BIOLOG ECO板

仪器设备

1. 振荡机
2. 移液器
3. 灭菌锅
4. BIOLOG 自动读板仪 (Emax precision microplate reader, Molecular Devices, USA)
(图 1)



图 1. BIOLOG 自动读板仪

实验步骤

注：以土壤样品为例（林先贵，2012）。

1. 称取 10 g 新鲜土置于 100 ml 灭菌 0.05 M 磷酸缓冲液中, 70 r/min 左右振荡 30 分钟。
2. 在超净台中吸取 1 ml 稀释液加入有 9 ml 无菌缓冲液的试管中, 制成 10⁻² 的稀释液, 同此法稀释到 10⁻³ 稀释度 (图 2. A)。
3. 将 10⁻³ 的稀释液倒入灭菌的 V 型槽中 (图 2. B), 用 8 通道移液器向 BIOLOG EC O 板 (生态板) 孔中分别添加 150 μ l 稀释后的悬液 (图 2. C), 每个土壤样品 3 次重复。也可以根据不同的试验目的, 选择不同类型的 BIOLOG 微孔板, 包括 BIOLOG GP 板 (革兰氏阳性细菌板) 、BIOLOG GP 板 (革兰氏阴性细菌板) 、BIOLOG FF 板 (真菌板)。
4. 将加入样品的微平板置于 25 °C 恒温培养, 分别在培养 24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144 小时后使用 BIOLOG 读板仪读取各孔在 750 nm 和 590 nm 波长下的光吸收 (图 2. D)。可以根据样品调整不同的培养时间进行读数。
5. 将数据导出, 计算 AWCD, 获得 AWCD 随时间变化的曲线图。选取合适的时间点, 将数据转入 SPSS、SAS 等统计软件进行多样性指数的计算和主成分分析 (Chojniak *et al.*, 2015) 。

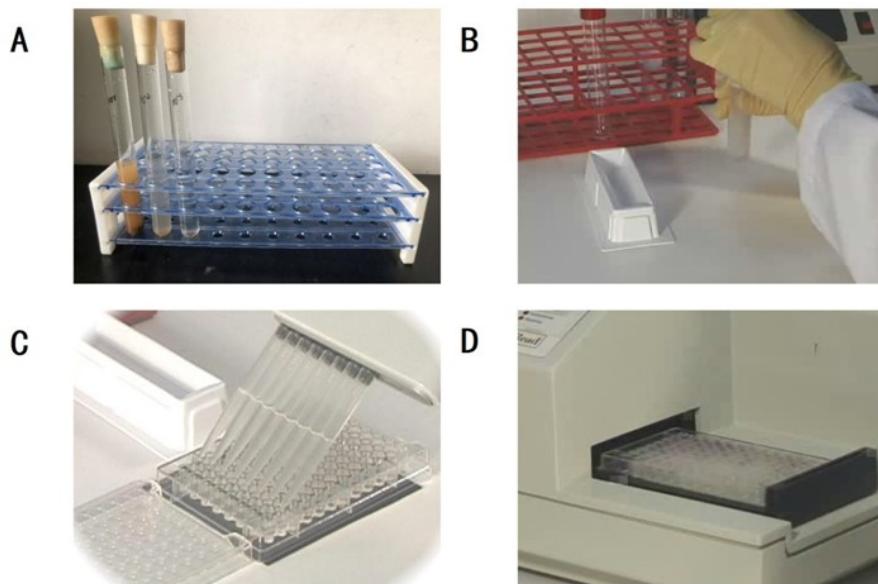


图 2. BIOLOG 法分析流程

平均吸光度 AWCD, 可以表征微生物群落对碳源利用的总的能力

$$AWCD = \frac{\sum(A_i - A_{A1})}{95}$$

其中 A_i 为第 i 孔的相对吸光度， A_{A1} 为 $A1$ 孔的相对吸光度。

Shannon 指数 H' ，用于评估微生物群落功能的丰富度

$$H' = -\sum P_i \cdot \ln(P_i)$$

其中 P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

Simpson 指数 D ，用于评估微生物群落功能优势度的指数(Anne E.Magurran , 2011)

当群落为无穷大群落时，计算公式如下：

$$D = 1 - \sum(P_i)^2$$

其中 P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

当群落为有限群落时，计算公式如下：

$$D = 1 - \sum \frac{A_i \cdot (A_i - 1)}{N(N-1)}$$

其中 A_i 为第 i 孔的相对吸光度， N 是相对吸光值总和。

McIntosh 多样性指数 D (Anne E.Magurran, 2011)

$$D = \frac{N - U}{N - \sqrt{N}}$$

Mcintosh 指数 U

基于群落物种多维空间上的 Euclidian 距离的多样性指数（杨永华等，2000）。

$$U = \sqrt{(\sum n_i^2)}$$

其中 n_i 是第 i 孔的相对吸光值， N 是相对吸光值总和。

Mcintosh 均匀度

$$E = \frac{N - U}{N - N/\sqrt{S}}$$

其中 N 是相对吸光值总和， S 为发生颜色变化的孔的数目。

结果与分析

近地层臭氧浓度升高对麦田土壤微生物碳转化功能的影响 (余永昌, 2011)

我们利用 Biolog ECO 板, 分析了近地层臭氧浓度升高 (O_3 -FACE) 4 年后对麦田土壤微生物碳转化功能的影响。可以发现, 臭氧浓度升高下的 AWCD 曲线于培养 132 小时达到平台期, 而对照条件下的 AWCD 曲线平台期出现在 168 小时。从培养 60 小时起直到培养 180 小时, 臭氧浓度升高下的 AWCD 值都高于对照处理, 培养 96 小时时高出对照 31.6% (图 3)。说明臭氧浓度升高提高了麦田土壤微生物对碳源底物的利用能力, 刺激了麦田土壤微生物的碳代谢活性, 这可能是因为臭氧浓度升高增加了土壤水溶性有机碳含量进而刺激土壤微生物的活性所致。根据 96 小时的光吸收值, 计算得到麦田土壤微生物群落的 Shannon、Simpson 和 McIntosh 指数 (表 1), 可以发现, 臭氧浓度升高 4 年后, 土壤微生物群落碳代谢功能的丰富度和优势度都没有显著变化, 但是均匀度显著增加, 可能暗示臭氧浓度升高会导致土壤中非优势菌对碳源底物代谢能力的提高。

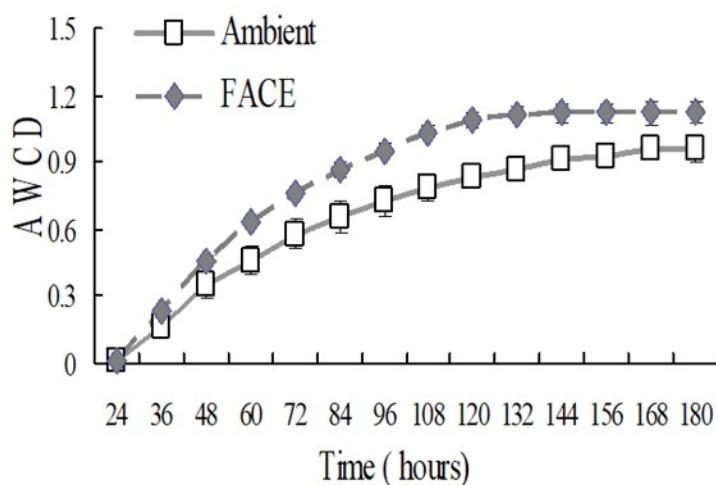


图 3. 麦田土壤微生物群落平均吸光值的变化 (AWCD) 随培养时间的变化

注: FACE, 臭氧浓度升高条件; Ambient, 对照条件

表 1. 近地层臭氧浓度升高 (O_3 -FACE) 对麦田土壤微生物群落功能多样性指数的影响

处理	Shannon 指数	Simpson 指数	McIntosh 指数
O_3 -FACE	3.27 ± 0.01 a	0.96 ± 0.01 a	5.44 ± 0.09 b
对照	3.24 ± 0.05 a	0.96 ± 0.01 a	4.73 ± 0.33 a

利用 96 小时的吸光度，进行主成分分析，结果如图 4 所示。臭氧浓度升高和对照条件下土壤微生物群落的碳源利用在主成分 1 (Principal component 1, PC1) 和主成分 2 (PC2) 上发生显著分异，说明臭氧浓度升高对麦田土壤微生物群落的碳代谢功能产生显著的影响。PC1 对区别碳源利用类型的贡献率约为 45%，PC2 的贡献率约为 20%，两者之和约为 65%。

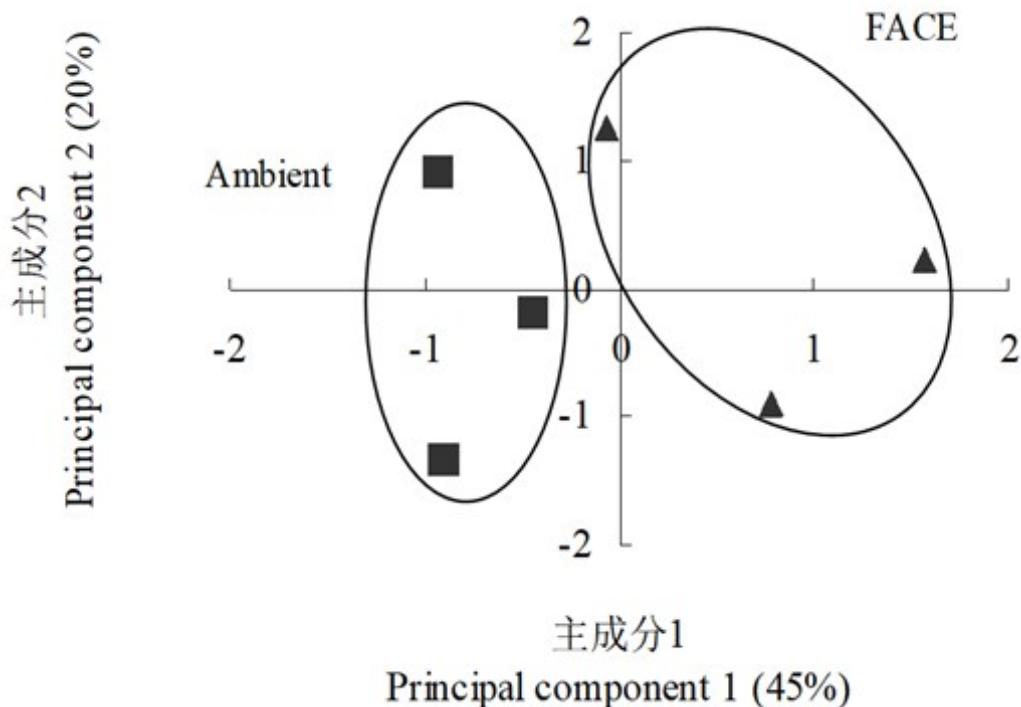


图 4. 麦田土壤微生物碳源利用特性的主成分分析

注：FACE，臭氧浓度升高条件；Ambient，对照条件

表 2. 导致 O₃-FACE 麦田土壤微生物群落碳源利用特性发生变化的主要碳源类型

主要碳源	相关系数	主要碳源	相关系数
PC1 糖类物质		PC1 代谢中间产物和次生代谢物	
D-纤维二糖	0.985	4-羟基苯甲酸	0.829
β-甲基-D-葡萄糖	0.876	葡萄糖-1-磷酸盐	0.726
I-赤藻糖醇	0.846	D-苹果酸	0.621
D-葡萄糖酸	0.828	PC2 糖类物质	
N-乙酰-D 葡萄糖氨	0.825	肝糖	0.808
D-甘露醇	0.817	D-木糖	0.745
α-环式糊精	0.795	糖类 α-D-乳糖	0.713
D-半乳糖醛酸	0.746	氨基酸底物及其衍生物	
D-半乳糖酸-γ-内酯	0.602	甘氨酰-L-谷氨酸	0.609
氨基酸底物及其衍生物		脂肪酸和脂类	
L-苏氨酸	0.907	吐温 80	0.672
L-天冬酰胺	0.897	丙酮酸甲酯	0.619
L-苯丙氨酸	0.880	代谢中间产物和次生代谢物	
脂肪酸和脂类		苯乙胺	0.792
吐温 40	0.897		
衣康酸	0.693		
丙酮酸甲酯	0.647		

进一步分析了与主成分 1 和主成分 2 具有较高相关系数的碳源种类，如表 2 所示。对 PC1 贡献较高的 18 个碳源中有 9 个属于糖类物质，3 个属于氨基酸底物及其衍生物，3 个属于脂肪酸和脂类和 3 个属于代谢中间产物和次生代谢物。其中贡献最高的是 D-纤维二糖，属于糖类物质，是主要的纤维素水解产物。对 PC2 贡献较高的 7 个碳源中有 3 个属于糖类物质，1 个属于氨基酸底物及其衍生物，2 个属于脂肪酸和脂类，还有 1 个属于代谢中间产物和次生代谢物。贡献率最大的是肝糖，也属于糖类物质。肝糖的主要生物学功能是作为动物和细菌的能量储存物质。因此，臭氧浓度升高条件下，导致麦田土壤微生物群落碳源利用特性发生变化的主要原因是糖类物质。

溶液配方

注：需要提前灭菌的试剂和器物。

1. 磷酸缓冲液 (pH 7.0)

称取KH₂PO₄ 2.65 g和K₂HPO₄ 6.96 g加蒸馏水至1,000 ml, 121 °C高压灭菌20 min后, 4 °C保存。

其他材料准备: 5 ml移液器, 称量纸, 1 ml枪头, V型槽等。

致谢

感谢余永昌博士提供 BIOLOG 技术的分析案例! 感谢国家自然科学基金面上项目(41977045) 的资助!

参考文献

1. 林先贵. (2012). 土壤微生物研究原理与方法. 高等教育出版社, 170-171.
2. 余永昌. (2011). [近地层臭氧浓度升高对稻麦轮作农田土壤碳转化功能微生物的影响](#). 中国科学院研究生院博士学位论文, 第五章.
3. Anne E. Magurran. (2011). 生物多样性测度. 张峰译. 科学出版社, 70-76.
4. 杨永华, 姚健, 华晓梅. (2000) [农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响](#). 微生物学杂志, 20(2): 23-25.
5. Chojniak, J., Wasilkowski, D., Paza, G., Mrozik, A., and Brigmon, R. (2015). [Application of Biolog Microarrays Techniques for Characterization of Functional Diversity of Microbial Community in Phenolic-contaminated Water](#). International Journal of Environmental Research 9:785-794.