

BIOLOG 微平板技术检测农田土壤 微生物群落结构的方法比较

彭彩娟 黄巧云 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以采自湖北省荆州市和黄冈市的农田土壤作为供试土样, 分别采用土壤样品冰浴后上清液 100 倍稀释、冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释和离心去碳源 3 种方法, 利用多功能酶标仪间隔 12 h 检测 *D* 值, 并计算 AWCD (average well color development, 每孔平均颜色变化) 值来探究分析土壤肥力高、富含有机质、可利用碳源丰富的农田土壤微生物代谢功能的 BIOLOG-ECO 微平板技术适宜方法。结果表明, 土样冰浴后上清液 100 倍稀释的方法不能有效去除土壤中可利用碳源, 不能准确反映土壤微生物对碳源的利用程度。而冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释、离心去碳源都能准确显示土壤微生物的活性变化, 但是两者 AWCD 的标准差有极显著的差异, 比较而言, 离心去碳源的方法能更稳定地检测土壤微生物群落的代谢能力。研究结果为利用 BIOLOG-ECO 微平板技术检测富含有机质的农田土壤微生物代谢功能多样性提供了有价值的信息。

关键词 BIOLOG-ECO 微平板; 农田土壤微生物; AWCD; 碳源代谢

中图分类号 S 154.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)03-0007-06

BIOLOG 微平板技术最初被用于鉴别纯化培养后的病原微生物, Garland 等^[1]于 1991 年首次将其应用于描述混合的微生物群体特征, 这一应用引起了微生物生态学研究者的广泛关注。BIOLOG 微平板主要包括 ECO 板(微生物群落分析)、GN 板(革兰氏阴性好氧菌的鉴定)、GP 板(革兰氏阳性好氧菌的鉴定)等, 在微生物生态研究中 ECO 板的应用较为常见^[2]。BIOLOG-ECO Plate 系统由 96 孔 3 个重复组成, 各重复包括 31 个含不同单一碳源孔和 1 个不含碳源对照孔^[3]。BIOLOG 原理是基于测定微生物对单一碳源利用程度的差异来表征其生理特性^[4], 而微生物对不同碳源的利用能力很大程度上取决于微生物的种类, 该系统能同时测定微生物对不同单一碳源的利用能力, 依据这一原理可以分析不同样品中微生物群落的结构差异^[5]。

土壤微生物在生态系统中扮演着生产者和分解者双重角色, 搭建了土壤环境与作物之间的桥梁, 因此, 检测土壤微生物的代谢功能对解析微生物在增加作物产量、提高土壤肥力和抑制植物病害等方面

的功能和作用机制能提供有价值的信息, 并能为推广生态农业提供有效的理论支撑。

BIOLOG 微平板技术从开发至今已十分成熟, 但是针对农田土壤这种含有丰富可利用碳源的实验样品还没有非常准确而稳定的方法, 本研究比较 3 种土样处理方法, 旨在为建立适合农田土壤微生物群落代谢功能的样本制备、检测和评估的技术体系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤利用多点混合法采集, 来源于湖北省荆州市和黄冈市农田区 0~20 cm 表层土, 去掉根系等杂物后保存于 4 ℃ 备用^[6]。同时将土壤样品称取 10 g 于 105 ℃ 条件下烘干, 测定含水率。

1.2 设备与材料

酶标仪、恒温培养箱、烘箱、摇床、冰箱、BIOLOG ECO 平板 (BIOLOG, Inc., CA, USA)、离心机、灭菌锅、振荡器、排枪、移液枪 (1 mL,

收稿日期: 2016-03-31

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2015CB150504); 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT1247); 中央高校基本科研业务费专项(2662015PY016; 2013PY111; 2013PY136)

彭彩娟, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物. E-mail: 790799366@qq.com

通信作者: 陈雯莉, 博士, 教授, 研究方向: 土壤与环境微生物. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

5 mL)、200 μ L 枪头、1 mL 枪头、5 mL 枪头、三角瓶(250 mL, 150 mL)、1.5 mL micro tube、Liquid Transfer Trough、生理盐水(0.85% , m/V)、无菌水(45 mL)、无菌的磷酸缓冲液(PBS, 称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na_2HPO_4 和 0.24 g KH_2PO_4 , 用 HCl 调 pH 至 7.4, 定容至 1 L, 115 $^\circ\text{C}$ 下灭菌 20 min 制得^[7])。

1.3 方法与步骤

1) 方法 1: 土样冰浴后上清 100 倍稀释。先将土壤样品放置于 28 $^\circ\text{C}$ 培养箱预培养 12 h 左右, 称取相当于 5 g 烘干土的新鲜土样加入装有 45 mL 无菌磷酸缓冲液的 150 mL 三角瓶中。28 $^\circ\text{C}$ 180 r/min 摇床振荡 10 min 后, 冰浴 1 min, 如此重复 3 次。静置 2 min, 取上清液 3 mL 加入 27 mL 灭菌的磷酸缓冲液中, 稍加振荡(1:100 提取液)。将 BIOLOG-ECO 微平板从冰箱中取出, 预热到 28 $^\circ\text{C}$ 。将稀释 100 倍的菌液加入 BIOLOG-ECO 微平板中, 每孔加 125 μL 。最后将 BIOLOG 板于 28 $^\circ\text{C}$ 培养, 每隔 12 h 测定 D_{750} 和 D_{595} 并记录。

2) 方法 2: 土样冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释。土壤样品在 30 $^\circ\text{C}$ 条件下活化 24 h, 将相当于 10 g 烘干的新鲜土样加入到灭菌生理盐水(10 g/100 mL, 0.85% NaCl), 并置于 250 mL 三角瓶中, 28 $^\circ\text{C}$ 180 r/min 摇床振荡 20 min 后, 冰浴 5 min。取土壤悬浊液 5 mL 加入 45 mL 无菌生理盐水(10 倍稀释), 重复此步骤 2 次直至土壤悬浊液稀释 1 000 倍为止。将 BIOLOG-ECO 微平板从冰箱中取出, 预热到 30 $^\circ\text{C}$ 。将稀释 1 000 倍的土壤悬液加入 BIOLOG-ECO 微平板中, 每孔加 150 μL 。最后将 BIOLOG 板于 30 $^\circ\text{C}$ 培养^[8], 每隔 12 h 测定 D_{750} 和 D_{595} 并记录。

3) 方法 3: 土样离心去碳源。土壤样品在 25 $^\circ\text{C}$ 条件下活化 24 h, 将相当于 5 g 烘干的新鲜土样加入到无菌水中(5 g:45 mL ddH₂O)。28 $^\circ\text{C}$ 180 r/min 摇床振荡 30 min 后, 用移液枪取 1 mL 土壤悬液到 1.5 mL 离心管中。在 10 000 r/min 下离心 20 min, 弃去上清液, 加 1 mL 生理盐水, 在振荡器上振动 5 min 使之混匀; 再于 10 000 r/min 下离心 20 min, 重复 2 次, 除去其中的碳源, 弃去上清液, 加 1 mL 生理盐水, 在振荡器上振动 5 min 使之混匀, 于 2 000 r/min 下离心 1 min。取 0.5 mL 上清液倒入装有 20 mL 的已灭菌生理盐水(0.85% NaCl)的

Liquid Transfer Trough, 并使其 D_{595} 维持在 0.13 \pm 0.02。将上述稀释液加入 BIOLOG ECO 微平板中(150 μL /孔), 然后在 20 $^\circ\text{C}$ 下培养, 每隔 12 h 测定 D_{750} 和 D_{595} 并记录。

4) 数据处理与分析。将各方法测得的数据进行 AWCD(average well color development, 每孔平均颜色变化)值分析, 其中 $\text{AWCD} = \sum(C - R) / 31$, C 是每个孔(光密度测量)的吸光度, R 是板内控制孔的吸光度。因为是连续培养, 在读取吸光度时 BIOLOG-ECO 板的盖子处于关闭状态, 所以需要测定 D_{750} 再减去背景值。数据的统计与分析使用 Origin 7.5 和 Excel 2013 软件进行。

2 结果与分析

2.1 3 种不同处理方法的准确性比较

图 1 为利用方法 1 将土样冰浴后上清液 100 倍稀释, 培养 7 d 的 BIOLOG-ECO 板显色情况, 由图 1 可以看出, 冰浴后上清液 100 倍稀释的 BIOLOG-ECO 板显色重复性不高, 同时可以看出红色框标出的 3 个空白对照孔中有 2 个各有一定程度的显色, 因此, 该方法得到的数据没有参考价值, 不能用于后续的分析处理。表明土样冰浴后稀释上清液的处理方式不能将碳源去除干净, 导致空白孔中残存可以被利用的碳源, 从而在培养过程中出现负对照显色的情况。

图 2 则是利用方法 2 将土样冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释, 培养 7 d 后的 BIOLOG-ECO 板显色情况, 采用方法 3 将土样离心去碳源的方法显色情况与之类似(结果未显示)。从图 2 可以看出, 空白对照都没有显色, 说明方法 2 和 3 得到的数据准确, 具有一定的参考价值。具体哪一种方法更适合稻田土样的 BIOLOG-ECO 板检测还需要更进一步的数据分析。

2.2 冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释和离心去碳源 2 种方法的稳定性比较

本研究主要采用 BIOLOG-ECO 板分析中最常用的参数 AWCD 来反映土壤微生物的代谢活性, 寻求更适于检测营养丰富的农田土壤中微生物的代谢功能的方法。从图 3 和图 4 可以看出, AWCD 值在 276 h 内变化只出现适应期、对数期和稳定期, 主要是由于监测时间不够长, 未能监测到衰亡期。由于刚接种不久, 在前 24 h 土壤微生物还处于适应

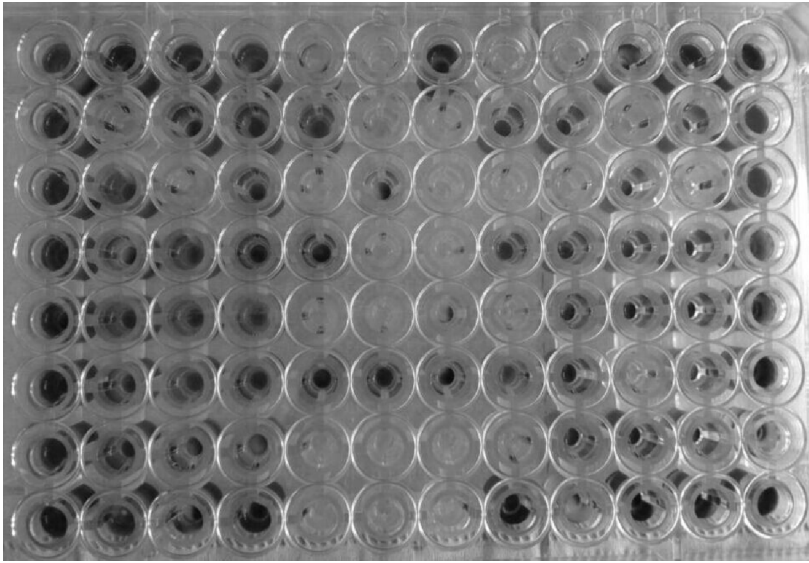


图 1 土样冰浴后上清液 100 倍稀释, 培养 7 d 的 BIOLOG-ECO 板显色情况

Fig.1 The color of BIOOG-ECO Plate with incubating the 100-fold eluted supernatant for 7 days after incubating on ice

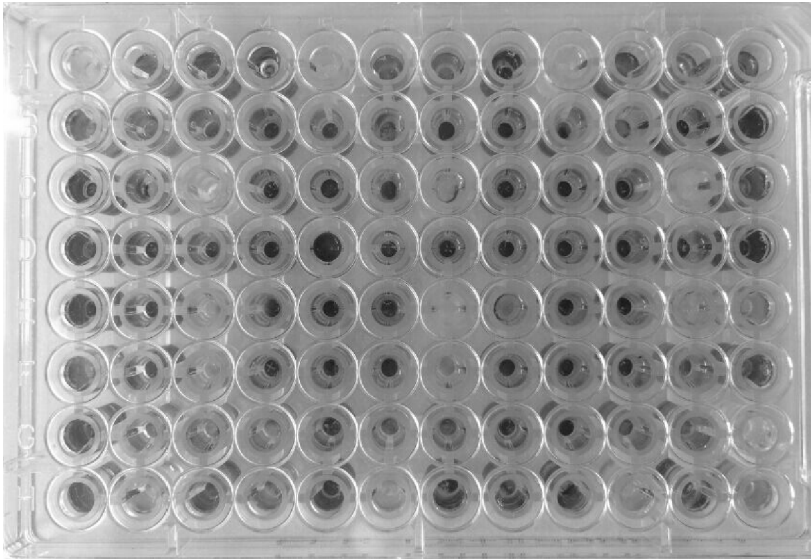


图 2 土样冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释, 培养 7 d 的 BIOLOG-ECO 板显色情况

Fig.2 The color of BIOOG-ECO Plate with incubating the 1 000-fold eluted suspension for 7 days after incubating on ice

期, 基本没有利用孔中的唯一碳源; 随后 AWCD 逐渐增大, 说明土壤微生物随着培养时间的延长活性逐渐升高。方法 3 中细菌培养到第 8 天生长速度开始下降, 进入平台期, 直到监测结束时土样 AWCD 值达到 0.8(荆州)和 0.6(黄冈)以上。而方法 2 中, 细菌的生长速度在培养结束前都没有明显的下降, 没有监测到平台期, 并且 AWCD 值小于方法 3 中测得的值。

2 种方法的 AWCD 值的标准差随时间变化的结果如表 1 所示, 经过 11 d 的培养与监测, 冰浴后

悬浊液 1 000 倍稀释方法中 2 份土样的标准差都是离心去碳源方法的 2 倍左右, 通过配对 t 检验也发现这 2 种方法的标准差有极显著的差异。同时, 也可以看出不同土样的标准差随时间变化的趋势也不尽相同, 2 种方法中荆州农田土样 AWCD 的标准差逐渐增大, 可能是在培养后期 BIOLOG-ECO 板各孔中的水分都有不同程度的挥发散失、导致标准差变大。而黄冈土样的标准差则呈现先上升后下降的趋势。

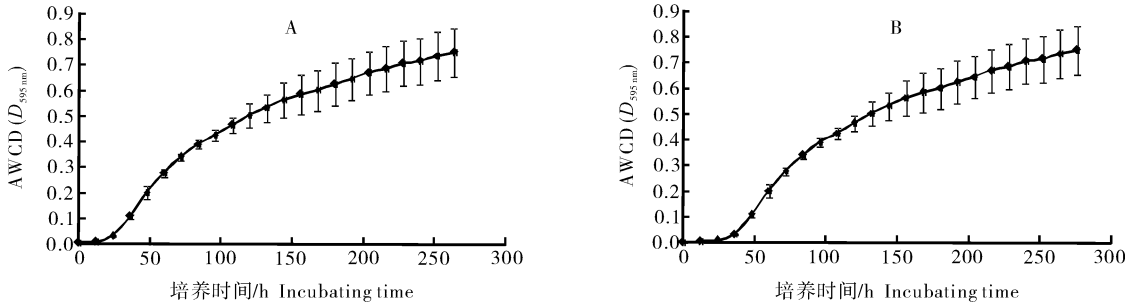


图 3 冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释的荆州(A)和黄冈(B)土样 AWCD 变化

Fig.3 Average well color development (AWCD) of metabolized substrates in BIOLOG-ECO

Plates of Jingzhou (A) and Huanggang soils (B) with incubating the 1 000-fold eluted suspension after incubating on ice

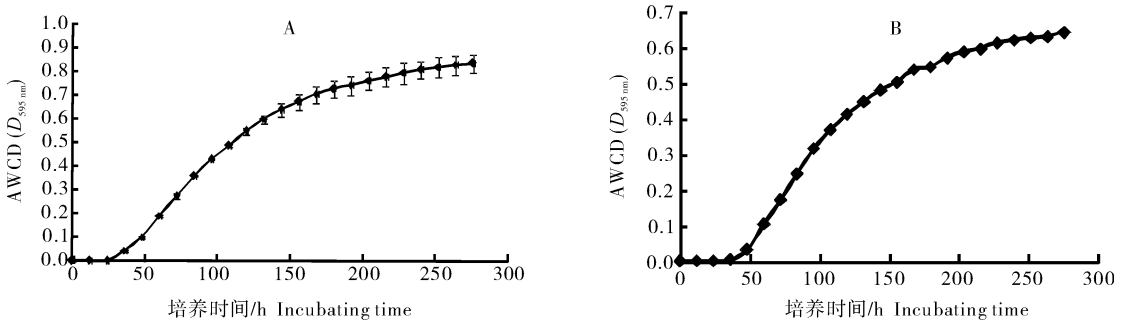


图 4 离心去碳源后荆州(A)和黄冈(B)土样 AWCD 变化

Fig.4 Average well color development (AWCD) of metabolized substrates in BIOLOG-ECO Plates of Jingzhou (A) and Huanggang soils (B) with incubating the supernatant after removing carbon with centrifuging

表 1 两种方法测得的荆州和黄冈土样 AWCD 值的标准差比较

Table 1 Standard deviation of the AWCD of Jingzhou and Huanggang soil samples measured by two methods

培养时间/h Incubating time	荆州土样 Jingzhou soil samples		黄冈土样 Huanggang soil samples	
	冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释 1 000-fold eluted suspension after incubating on ice	离心去碳源 Removing carbon with centrifuging	冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释 1 000-fold eluted suspension after incubating on ice	离心去碳源 Removing carbon with centrifuging
0	0.000 4	0.001 9	0.000 6	0.001 9
12	0.000 4	0.000 5	0.001 3	0.000 3
24	0.001 7	0.000 4	0.002 1	0.000 3
36	0.002 7	0.004 8	0.004 0	0.000 6
48	0.009 4	0.006 0	0.013 4	0.001 8
60	0.025 4	0.003 3	0.022 7	0.006 9
72	0.014 8	0.011 3	0.030 6	0.008 5
84	0.012 4	0.002 0	0.030 2	0.014 5
96	0.017 1	0.004 3	0.037 2	0.029 1
108	0.022 0	0.007 2	0.042 4	0.036 6
120	0.031 6	0.014 2	0.042 1	0.036 7
132	0.046 5	0.016 8	0.043 1	0.033 1
144	0.053 5	0.029 4	0.043 1	0.032 6
156	0.067 8	0.034 4	0.038 7	0.032 9
168	0.077 0	0.036 1	0.036 2	0.023 5
180	0.079 6	0.036 9	0.033 8	0.014 2
192	0.083 0	0.041 2	0.031 7	0.010 3

续表 1 Continued Table 1

培养 时间/h Incubating time	荆州土样 Jingzhou soil samples		黄冈土样 Huanggang soil samples	
	冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释 1 000-fold eluted suspension after incubating on ice	离心去碳源 Removing carbon with centrifuging	冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释 1 000-fold eluted suspension after incubating on ice	离心去碳源 Removing carbon with centrifuging
204	0.083 5	0.038 5	0.029 3	0.006 9
216	0.084 2	0.040 8	0.027 1	0.000 5
228	0.087 9	0.044 5	0.026 9	0.002 0
240	0.088 7	0.036 5	0.026 0	0.006 6
252	0.090 2	0.042 7	0.025 8	0.003 9
264	0.094 4	0.041 3	0.021 9	0.012 7
276	0.094 6	0.038 4	0.023 2	0.009 3
合计 Sum	1.168 6	0.533 3	0.633 4	0.325 6

3 讨 论

BIOLOG 微平板技术可以通过检测土壤微生物群落的碳代谢来评估环境样品,例如堆肥的腐熟程度等^[9-10],且鉴于其快速有效可靠的特点^[11],越来越多地被用于评估重金属^[12]或高盐度和高 pH 值^[13]等对微生物群落结构的影响作用。AWCD 值反映土壤微生物的氧化能力在 BIOLOG 微平板中的变化状态,可以用作监测微生物活性的一个指标^[14]。

本研究通过 3 种方法对比,连续培养 276 h 探索最适合富含可利用碳源农田土壤的 BIOLOG 微平板技术分析方法。如果监测时间过短,一些具有重要生态功能而又生长较慢的细菌种类(如自生固氮菌、硝化细菌等)并不能保证其完全增殖,因此,不能准确显示土壤微生物的生长状况。有研究表明,微平板培养时间应尽量选择 240 h 进行连续读数,然后再根据需求选择合适的时间点做统计分析^[15],为了数据的完整性本研究连续监测了 276 h。培养 276 h 后微平板孔中的水分都有不同程度的散失,为了保证数据的准确性不宜再继续监测。

冰浴后上清液 100 倍稀释的方法不能有效去除土壤中可利用碳源,在菌体培养过程中对照孔发生了显色反应,不能有效反映土壤微生物利用单一碳源的能力。这可能是由于采自农田的土壤自身营养比较丰富,含有大量可利用的碳源,故此法对于采自贫瘠地区的土壤可能比较适用,但是对于肥沃的农田土壤则有一定的局限性。

冰浴后悬浊液 1 000 倍稀释和离心去碳源这 2 种方法都能较好地显示农田土壤微生物代谢活性的变化过程,且荆州和黄冈土样的 AWCD 值的变

化趋势也表明此 2 种方法都具有重现性。配对 t 检验结果显示 2 种方法的标准误差有极显著的差异,可能是因为冰浴后稀释倍数过高导致试验误差升高;同时,方法 2 中的培养温度为 30 ℃,悬浊液中的微生物在此温度环境下生长速度快于方法 3,且此温度高于室温会导致土壤微生物的生长状况与实际出入较大,这也会引起 AWCD 标准差的差异。3 种方法中离心去碳源的处理方式准确且稳定性最高,最适合用于农田土壤的 BIOLOG 微平板技术分析。

本研究仅初步摸索了适合富含可利用碳源的肥沃农田土壤的 BIOLOG 微平板技术分析方法,后续应更多结合单一碳源的利用能力和多样性指数的计算等进行深入研究,为高效快速地检测土壤微生物群落结构的代谢能力提供理论基础和技术指导。

参 考 文 献

- [1] GARLAND J L, MILLS A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 2351-2359.
- [2] PRESTON M J, BODDY L, RANDERSON P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles: a critique[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 42: 1-14.
- [3] GRZYTA A, FRAC M, OSZUST K. The application of the BIOLOG ECO plate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 174: 1434-1443.
- [4] 王强,戴九兰,吴大千,等.微生物生态研究中基于 BIOLOG 方法的数据分析[J].生态学报, 2010, 30(3): 817-823.
- [5] 席劲瑛,胡洪营. BIOLOG 方法在环境微生物群落研究中的应用[J].微生物学报, 2003, 43(1): 138-141.
- [6] 吴则焰,林文雄,陈志芳,等.武夷山自然保护区不同植被

- 类型土壤微生物群落特征[J].应用生态学报,2013,24(8):2301-2309.
- [7] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南[M].黄培堂,译.3版.北京:科学出版社,2002.
- [8] CUI H,WANG C,GU Z,et al. Evaluation of soil storage methods for soil microbial community using genetic and metabolic fingerprints[J].Eur J Soil Biol,2014,63:55-63.
- [9] ELLIS R J,NEISH B,TRETT M W,et al. Comparison of microbial and meiofaunal community analyses for determining impact of heavy metal contamination[J]. J Microbiol Methods,2001,45:171-185.
- [10] GOMEZ E,GARLAND J,CONTI M. Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient[J]. Appl Soil Ecol,2004,26:21-30.
- [11] DUNFIELD K E,GERMIDA J J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus* [J]. FEMS Microbiol Ecol,2001,38:1-9.
- [12] BUNDY J G,PATON G I,CAMPBELL C D. Combined microbial community level and single species biosensor responses to monitor recovery of oil polluted soil[J]. Soil Biol Biochem,2004,36:1149-1159.
- [13] PIETIKAINEN J,HIUKKA R,FRITZE H. Does short-term heating of forest humus change its properties as a substrate for microbes[J]. Soil Biol Biochem,2002,32:277-288.
- [14] GOMEZ E,FERRERAS L,TORESANI S. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application [J]. Bioresour Technol,2006,97:1484-1489.
- [15] 贾夏,董岁明,周春娟.微生物生态研究中 Biolog Eco 微平板培养时间对分析结果的影响[J].应用基础与工程科学学报,2013(1):10-19.

Comparison of different BIOLOG microplate technology for detecting carbon metabolism of farmland soils

PENG Caijuan HUANG Qiaoyun CHEN Wenli

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Three methods of BIOLOG microplate analysis with BIOLOG ECO Plate were applied and compared to explore the optimal way to analyze the carbon metabolism of farmland soils with carbon abundance. The soil samples were collected from Jingzhou Municipality and Huanggang Municipality, Hubei, China. The 100-fold eluted supernatant was incubated after incubating on ice. The 1 000-fold eluted suspension was incubated after incubating on ice. The supernatant was centrifuged after removing carbon. Color development of each well with optical density at 595 nm and 750 nm every 12 h was recorded with an ELISA Reader. The microbial activity in each microplate was expressed as average well color development (AWCD). We found that incubating 100-fold eluted supernatant could not accurately reflect the microorganism activities due to the available carbon in the supernatant which caused the reaction in the control well. The other two methods can clean up the carbon. The standard of AWCD of the method of incubating 1 000-fold eluted suspension after incubating on ice was significantly higher than that of incubating the supernatant after removing carbon with centrifuging, indicating that the latter one was more stably to detect the carbon metabolism of farmland soils.

Keywords BIOLOG-ECO Plate; soil microorganism in farmland; AWCD; carbon metabolism

(责任编辑:张志钰)