

Biolog EcoPlate™实验信息提取方法改进

张燕燕^{1,2} 曲来叶¹ 陈利顶^{1*}

(1. 中国科学院生态环境研究中心 城市与区域生态国家重点实验室 北京 100085)

(2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: Biolog EcoPlate™微平板是用于研究微生物群落水平多样性的一种主流研究方法。针对目前国内研究者对Biolog实验结果解读不充分和错误层出不穷的情况,提出了一套改进实验结果信息提取的方法。方法包含两个部分,一是基于微生物生理学和生态学意义上的Biolog碳源分类表,是研究者进行解读的参考依据和索引;二是结合实例,阐释如何根据上述分类表、以环境富集原理为指导,利用排序的统计方法进行结果解译,发掘出更多的信息。

关键词: Biolog, 群落水平多样性, 碳源, 分类, 解读

An Amendment on Information Extraction of Biolog EcoPlate™

ZHANG Yan-Yan^{1,2} QU Lai-Ye¹ CHEN Li-Ding^{1*}

(1. State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

(2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Biolog EcoPlate™ is a mainstream approach of studying community-level physiological profiles of microbes. To correct misunderstanding and insufficiency of experimental result explanation, we announced an amendment of information extraction of Biolog EcoPlate™, which included two parts: (1) carbon substrates assortment sheets based on microbial physiological metabolism and ecological function, providing reference and index for researchers; (2) illustration of how to use assortment sheet and ordination method to find out more information, guiding by environmental concentration principle.

Keywords: Biolog EcoPlate, Community-level physiological profiles, Carbon substrates, Classification, Explanation

Biolog EcoPlate™是一款由美国Biolog公司生产的微平板培养基,用于测定微生物群落水平多样性(Community-level physiological profiles, CLPP),每块平板上有8×12共计96个微孔,每32个孔为1个重复,包含31种碳源(编号A2-H4)和水空白(编号

A1),共计3次重复。在一定温度条件下,通过将微生物溶液接种至微孔内进行培养,微生物呼吸产生的电子能够使微孔内的氧化还原染料变色,在分光光度计下读数,即可得到微生物生长的特征参数。该方法由于操作简便,培养周期短,得到了研究者

的青睐,是研究环境微生物多样性的主流方法之一,与DGGE、PLFA等分子手段互为补充、相互印证,被用于评估植物对重金属污染土壤、养殖场土壤、曝气废水处理反应器的修复效果^[1-3]、长期施肥等农田管理措施对土壤的影响等^[4-6]。

微生物对Biolog 微平板内 31 种碳源的生理代谢能力差异和利用模式的不同是进行鉴定的基础。然而由于相关资料的匮乏,目前国内研究者对Biolog EcoPlateTM的使用上主要存在以下问题:

1) 对 31 种碳源的理解不够深入,对其基本的物质属性、分类存在误解。与在鉴定中起到的基础性、重要性相比,Biolog微平板的碳源可供参考的数据和资料却不成比例地缺少和不受研究者的重视。在Biolog公司的产品介绍上仅仅提供了31种碳源的名称,而研究者所关注的分子结构式、物理化学性质、生态学上的意义均未涉及。此外,为了达到缩减数据的目的,一部分作者喜欢将碳源分类后再进行分析^[7,8];但不同作者各自有自己的分类标准,具有较大的随意性,其中不乏明显的错误。如申卫收^[9]误认为Biolog EcoPlateTM有125种碳源,而实际上只有31种。徐华勤^[10]在生态学报上发表的《长期施肥对茶园土壤微生物群落功能多样性的影响》,由于对分子结构的误解,将不具备苯环的 α -丁酮酸归于苯甲酸一类。魏志强^[11]在环境科学学报上发表的《海河-渤海湾沿线地区沉积物中微生物群落代谢特征》里将D,L- α -磷酸甘油归于糖类,而糖类是多羟基醛酮的通称,甘油虽然具备3个羟基,却不含羰基,因此不适于被归为糖类。实际上,D,L- α -磷酸甘油是 α 位的羟基被磷酸根(H_2PO_3^-)脂类的组成成分之一。这些由于缺乏参考资料和相关基础知识造成的误解势必影响研究者对实验结果的正确解读。

2) 对实验结果的解读不充分。研究者在利用Biolog 方法将不同研究对象区分开来的同时,对结果本身的解释往往语焉不详。使用PCA等统计方法能够辨别出不同微生物群落偏好某些碳源,但大多数文章仅仅描述了这一现象,而没有做出进一步的解释。而更多的研究者仅仅用一个代表总体情况的平均值,如AWCD来概况实验结果,抹杀了不同碳源间的差异性,无异于是对Biolog这种实验工具的浪费。

针对上述问题,本文将结合化学官能团、微生

物生理代谢途径和生态功能3方面,将31种碳源重新分类并给出具体的生态学意义,提出环境富集这个基本的解释原则,并举例说明如何利用适当的统计工具,更加充分地解释Biolog实验结果。

1 Biolog EcoPlateTM 31种碳源分类与性质

有的研究者认为,群落水平多样性关注的是微生物对碳源利用的模式(Pattern)而不是对其中某一个碳源的绝对利用情况。但是,特定的化学结构是生理功能的基础,从分子的角度理解Biolog EcoPlateTM碳源的结构,结合其生态学上的意义,才能更好地研究微生物群落分解代谢的特点,为研究者更好地解释自己的实验结果、设计出更合理的实验做出参考。

以微生物对3大营养物质的代谢途径为基本划分原则,将Biolog EcoPlateTM的31种碳源底物分为4大类:糖类及其衍生物、氨基酸及其衍生物、脂肪酸和脂类、代谢中产物和次生代谢物。使用高级化学发展有限公司(Advanced Chemistry Development, Inc.)设计的化学绘图软件包ACD/Chemsketch,根据国际纯粹和应用化学协会(International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)制定的有机命名规则为每一种化合物绘制分子结构式,并标明分子式、分子量和CAS编号(数据来源:化合物基本物性库<http://chemfinder.cambridgesoft.com>) CAS编号(CAS Registry Number)是美国化学会的下设组织化学文摘社(Cheical Abstracts Service, CAS)为每一种出现在文献中的物质分配的唯一数字识别号码,读者若对某一种碳源有疑问均可通过唯一的CAS号在化学数据库中进行检索。在备注栏中说明该物质在自然界的分布及其生态学意义。对化工污染物还标明其对环境的影响[数据来源:材料安全数据表或化学材料安全评估报告MSDS (Material Safety Data Sheet)]。

1.1 糖类及其衍生物(表1、表2)

糖类是多羟基醛或多羟基酮的通称,是微生物应用最广的碳源。在Biolog EcoPlateTM中,属于糖类及其衍生物的多达12种,接近碳源总数的一半,这也从某种程度上反映了糖类在微生物分解代谢中的重要地位。在这12种碳源中,又可根据其水解产物的数量进一步分为单糖、二糖、多糖。

表 1 单糖类底物及其衍生物
Table 1 Monosaccharide substrates and their derivants

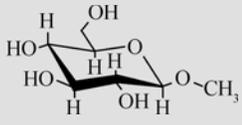
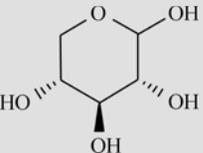
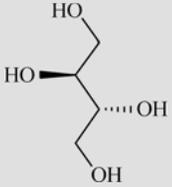
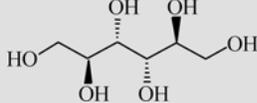
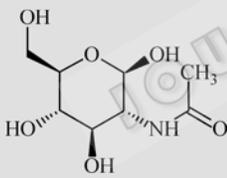
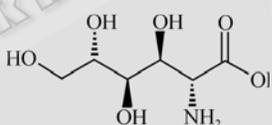
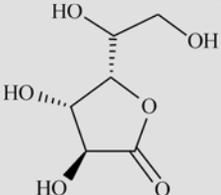
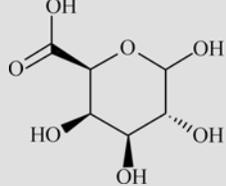
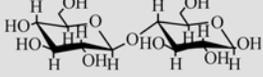
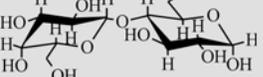
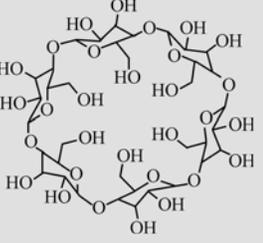
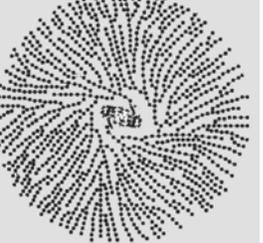
编号 Plate number	A2	B2	C2	D2
分子结构式 Molecular structure				
名称 Name	β-甲基-D-葡萄糖苷 β-Methyl-D-Glucoside	D-木糖 D-Xylose	i-赤藓糖醇 i-Erythritol	D-甘露醇 D-Mannitol
分子式 Molecular formula	C ₇ H ₁₄ O ₆	C ₅ H ₁₀ O ₅	C ₄ H ₁₀ O ₄	C ₆ H ₁₄ O ₆
分子量 Molecular weight	194.184	150.131	122.1206	182.173
CAS 号 CAS registry number	1824-94-8	58-86-6	149-32-6	69-65-8
备注 Notes	具有糖苷键的糖类衍生物, 构成半纤维素的重要单体, 广泛分布于水果、蘑菇、地衣等植物中, 在工业上用作甜味剂。 可由纤维素酶进行分解。			
编号 Plate number	E2	F2	A3	B3
分子结构式 Molecular structure				
名称 Name	N-乙酰-D-葡萄糖氨 N-Acetyl-D-Glucosamine	D-葡萄糖胺酸 D-Glucosaminic Acid	D-半乳糖酸 γ-内酯 D-Galactonic Acid γ-Lactone	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic Acid
分子式 Molecular formula	C ₈ H ₁₅ NO ₆	C ₆ H ₁₃ NO ₆	C ₆ H ₁₀ O ₆	C ₆ H ₁₀ O ₇
分子量 Molecular weight	221.2096	195.1718	178.1414	194.1408
CAS 号 CAS registry number	7512-17-6	3646-68-2	2782-7-2	685-73-4
备注 Notes	是几丁质、粘多糖、糖蛋白的组成成分。是细菌细胞壁、昆虫体壁和许多真菌细胞壁的组成成分。			

表 2 二糖、多糖底物
Table 2 Disaccharide and polysaccharide substrates

编号 Plate number	G1	H1	E1	F1
分子结构式 Molecular structure				
名称 Name	D-纤维二糖 D-Cellobiose	α -D-乳糖 α -D-Lactose	α -环式糊精(图来自网络) α -Cyclodextrin	肝糖(图来自网络) Glycogen
分子式 Molecular formula	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$(C_6H_{10}O_5)_n$
分子量 Molecular weight	342.2992	342.2992	972.852	666.5832
CAS 号 CAS registry number	528-50-7	63-42-3	10016-20-3	9005-79-2
备注 Notes	纤维素的水解产物,也是纤维素的基本结构单元,纤维素是植物细胞壁的主要组成成分。微生物分解纤维素的酶是可诱导的,以葡萄糖为碳源的微生物产生的纤维素酶很少,但如果加入以纤维素为主的底物可使其产生较多的纤维素酶。	乳糖存在于动物乳汁中,水解后能产生一分子葡萄糖和一分子半乳糖。这两种水解产物均能直接进入糖代谢。	淀粉经某种特殊酶水解得到的环状低聚糖。环糊精一般由 6-8 个葡萄糖基通过 α -1,4-糖苷键结合而成。根据所含葡萄糖单位的个数(6, 7 或 8...), 分别称为 α -、 β -或 γ -环糊精(α -、 β -或 γ -CD)。	肝糖的结构与支链淀粉相似,主要生物学功能是作为动物和细菌的能量储存物质,因此又称肝淀粉。肝糖也是昆虫等变温动物合成抗冻剂的原料。

1.2 氨基酸及其衍生物(表 3)

由于天然存在的氨基酸都是 L 构型,因此根据惯例在分子结构式中不画出手性。

1.3 脂肪酸和脂类(表 4)

将脂肪酸与脂类归为一类是因为从生理代谢的角度来看,脂肪酸是脂肪的组成成分,脂肪酸的代谢途径是脂肪代谢的一部分。脂肪和脂肪酸可作为很多微生物生长的碳源和能源。细菌中的荧光假单胞菌和分枝杆菌属的一些种以及真菌中的白地霉、青霉、曲霉和镰刀菌等,都能分解脂肪和高级脂肪酸。

1.4 代谢中间产物及次生代谢物(表 5)

2 对Biolog EcoPlate™实验结果的解读

2.1 “质”与“量”的解读

大体上,研究者从“量”和“质”两个角度对于碳

源利用模式进行解读。“量”的差异主要由平均颜色变化率(AWCD)、Shannon 多样性指数(H')和均匀度指数(E)等指标来表征。

$$AWCD = \frac{1}{31} \sum_{i=1}^{31} (P_i - P_0)$$

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \log P_i$$

$$E = \frac{H'}{\ln S}$$

其中 P_i 为第*i*个孔的吸光值, P_0 为水的吸光值, S 为被利用的碳源的总数。可以看出,上述 3 种指标反映的是 31 种碳源总体的利用情况,并不区分具体某一种碳源。举例来说,对于:

$$P_{\text{纤维二糖}} = 2 P_{\text{吐温80}} = 0.5$$

以及

$$P_{\text{纤维二糖}} = 0.5 P_{\text{吐温80}} = 2$$

这两种组合来说,计算出的 AWCD、H'和 E 数

表 3 氨基酸底物及其衍生物
Table 3 Amino acid substrates and their derivants

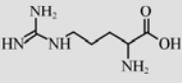
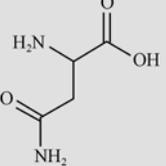
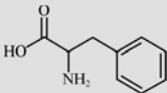
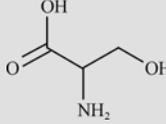
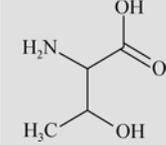
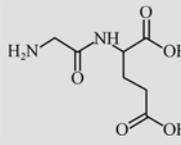
编号 Plate number	A4	B4	C4	D4	E4	F4
分子结构式 Molecular structure						
名称 Name	L-精氨酸 L-Arginine	L-天门冬酰胺 L-Asparagine	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	L-丝氨酸 L-Serine	L-苏氨酸 L-Threonine	甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-Glutamic Acid
分子式 Molecular formula	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	C ₉ H ₁₁ NO ₂	C ₃ H ₇ NO ₃	C ₄ H ₉ NO ₃	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₅
分子量 Molecular weight	174.2022	132.1188	165.1914	105.0932	119.12	204.1822
CAS 号 CAS registry number	74-79-3	70-47-3	63-91-2	56-45-1	72-19-5	7412-78-4
备注 Notes	微生物分解氨基酸的能力因菌种而异。一般认为革兰氏阴性菌分解能力大于革兰氏阳性菌。例如, 大肠杆菌、变形杆菌和绿脓杆菌几乎能分解所有的氨基酸, 而乳酸杆菌、链球菌的分解能力较差。前 5 种氨基酸都是植物根际分泌物 ^[12] , 甘氨酸-L-谷氨酸是一种二肽, 它们都是通过氨基酸代谢途径进入微生物的分解代谢。研究者普遍认为受胁迫及感病品种的植物根系分泌的氨基酸种类及数量均有增加 ^[13,14] , 但也有报道认为某些作物抗病品种根系的精氨酸分泌量比感病品种增加更为显著 ^[15] , 由此可见氨基酸对根病病原菌的影响因植物品种和病菌种类而异。					

表 4 脂肪酸和脂类
Table 4 Fat acid and lipid

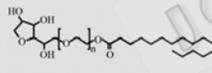
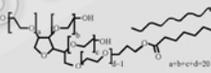
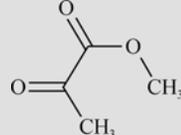
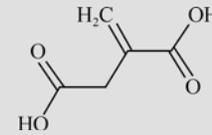
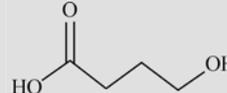
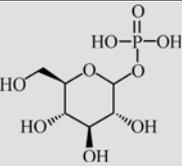
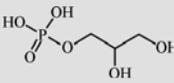
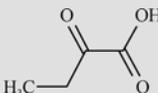
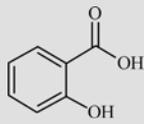
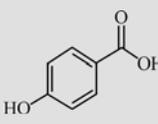
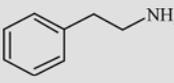
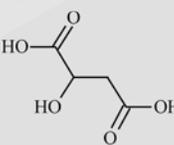
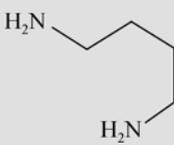
编号 Plate number	C1	D1	B1	F3	E3
分子结构式 Molecular structure					
名称 Name	吐温 40 Tween40	吐温 80 Tween 80	丙酮酸甲酯 Pyruvic Acid Methyl Ester	衣康酸 Itaconic Acid	γ-羟丁酸 γ-Hydroxybutyric Acid
分子式 Molecular formula	聚氧乙烯失水山梨醇单棕榈酸酯	聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯	C ₄ H ₆ O ₃	C ₅ H ₆ O ₄	C ₄ H ₈ O ₃
分子量 Molecular weight	—	—	102.0896	130.1	104.1054
CAS 号 CAS registry number	9005-66-7	9005-65-6	600-22-6	97-65-4	300-85-6
备注 Notes	脂类的一种, 是聚氧乙烯失水山梨醇和相应的脂肪酸生成的酯, 在工业菌株的筛选中可以作为解脂微生物的选择培养基, 也作为微生物培养基中的分散剂。吐温 40 中的棕榈酸为饱和脂肪酸, 吐温 80 中的油酸为不饱和脂肪酸。在食品、医药、化工等行业用作乳化剂、增溶剂、扩散剂、润滑剂、柔软剂、抗静电剂等。官能团为羰基和酯基。衣康酸是一种不饱和二元酸, 在自然界存在较少, 1837 年首次从柠檬酸甲酯是重要的有机合成中间体, 在医药、农药、电子等领域中被广泛应用。衣康酸是一种不饱和二元酸, 在自然界存在较少, 1837 年首次从柠檬酸热裂解产物中分离得到, 是化工生产的重要原料。官能团为羰基和羟基。迷幻药的一种, 能作用于神经系统导致亢奋、嗜睡等。其同分异构体β-羟丁酸是三大酮体之一。				

表 5 代谢中间产物和次生代谢物
Table 5 Metabolic mediates and secondary metabolites

编号 Plate number	G2	H2	G3	C3	D3	G4
分子结构式 Molecular structure						
名称 Name	1-磷酸葡萄糖 Glucose-1-Phosphate	D,L- α -磷酸甘油 D,L- α -Glycerol Phosphate	α -丁酮酸 α -Ketobutyric Acid	2-羟基苯甲酸 2-Hydroxy Benzoic Acid	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxy Benzoic Acid	苯乙胺 Phenylethylamine
分子式 Molecular formula	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	C ₃ H ₉ O ₆ P	C ₄ H ₆ O ₃	C ₇ H ₆ O ₃	C ₇ H ₆ O ₃	C ₈ H ₁₁ N
分子量 Molecular weight	260.13706	172.07426	102.0896	138.1226	138.1226	121.1816
CAS 号 CAS registry number	59-56-3	3325-00-6	600-18-0	69-72-7	99-96-7	64-04-0
备注 Notes	<p>羟基被磷酸取代的活化的葡萄糖, 参与糖酵解和糖异生过程。糖原、蔗糖合成的中间体, 乳酸发酵的中间体, 经过异构酶的作用转化为葡萄糖-6-磷酸之后能够进入糖酵解。</p> <p>羟基被磷酸取代的活化的甘油, 是甘油分解的中间产物。</p> <p>是苏氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸的代谢产物之一, 可经由合成代谢途径生产。该物质对环境非必需氨基酸和糖、酮体等, 或者完全氧化为CO₂和水。</p> <p>又称为水杨酸, 用作染料中间体、消毒剂、食品防腐剂等。该物质对环境非必需氨基酸和糖、酮体等, 或者完全氧化为CO₂和水。</p> <p>根系分泌物的一种。苯乙胺为重要的医药和染料中间体。短期降解产物没有毒性, 长期降解产物可能出现毒性。降解物本身毒性小于苯乙胺。</p>					
编号 Plate number	H3		H4			
分子结构式 Molecular structure						
名称 Name	D-苹果酸 D-Malic Acid		腐胺 Putrescine			
分子式 Molecular formula	C ₄ H ₆ O ₅		C ₄ H ₁₂ N ₂			
分子量 Molecular weight	134.0884		88.1522			
CAS 号 CAS registry number	636-61-3		110-60-1			
备注 Notes	<p>三羧酸循环的中间产物, 也存在于苹果、樱桃等水果中。苹果酸: 同时也是根系分泌物的一种。有报道苜蓿(<i>Medicago sativa</i> L.)在缺 P 胁迫条件下根系分泌的有机酸有柠檬酸、苹果酸和丁二酸^[16]。苹果酸、肉桂酸会抑制大麦根磷酸盐和钾离子的吸收, 其原因可能是自毒物质抑制呼吸作用和氧化磷酸化过程, 抑制质膜 ATP 酶的活性^[17]。</p> <p>多胺的一种, 是广泛存在于原核生物及真核生物中的生物活性物质。一些多胺首先在极端嗜热菌首先发现, 植物体内多胺在逆境胁迫下的积累是目前的研究热点之一^[18]。用于有机合成和农药、活性染料、医药、环氧树脂固化剂等的制取。该物质对环境可能有危害, 对水体应给予特别注意。</p>					

值都是一样的。但很显然,这样并不能完全反映 Biolog 微平板培养带来的信息。前者代表能够分解 β 糖苷键的纤维素利用型微生物,而后者则代表能够分解脂类的微生物群落。

“质”的差异则主要是利用主成分分析(PCA)、冗余分析(RDA)等排序方法,将样点投射到两条排序轴构成的二维平面上,通过样点的集散形态、在象限的分布等来反映研究区的特点。载荷(又称负荷,因子得分),是联系样点、碳源与排序轴的纽带。样点在排序图上的分布取决于样点载荷(Sample scores),因为对于某一个既定样点,其横、纵坐标就是两个排序轴的样点载荷。同理,碳源(在排序方法里称为 species)与排序轴的位置关系也由物种载荷(Species scores)决定。通过排序这种统计方法,可以在一张二维图上反映出不同微生物群落对不同碳源的利用差异。

2.2 环境与碳源的关系——富集原理

不同环境除了具有不同的pH、水分、矿质养分外,其为微生物提供的能源形式也不尽相同,从而形成的微生物群落碳源利用模式也有差别。这是研究者利用 Biolog EcoPlate™ 研究群落水平多样性的原理。张海涵等发现商南油松林下的土壤微生物,能够很好地利用甘露醇(AWCD>1.5),但对木糖几乎不利用(AWCD<0.1)^[19]。周文新的研究显示稻草还田土壤中的微生物,其优势碳源之一为木糖,随着稻草还田量的增加,其对木糖的利用能力增强,而对甘露糖利用并不强^[20]。甘露糖和木糖都是组成半纤维素的单体,而半纤维素是构成植物细胞壁的主要成分,在自然界中广泛分布。然而甘露糖和木糖的分布具有生境异质性,甘露糖主要存在于针叶树的半纤维素中,而木糖主要存在于单子叶植物半纤维素中^[21],这就造成了油松林土壤和稻草还田土壤微生物对这两种碳源的差异利用。由于微生物生存环境里某些碳源的富集或者稀缺,促使微生物群落产生特异的生理代谢模式,这正是 Biolog EcoPlate™ 实验的精髓所在。

2.3 举例应用

应用上述原则,对金剑^[22]等已发表的对不同产量大豆土壤微生物的数据进行分析,演示如何通过新分类和富集原理充分挖掘隐含在实验数据中、但未被原作者阐明的信息。

由 31 种碳源的主成分载荷表做图(图 1),发现 4 种碳源有如下分布特征:

投影在第 1 轴正方向的碳源有糖类(第 1 象限)和脂类(第 4 象限)。

投影在第 1 轴负方向的碳源有:根系分泌物中的苯乙胺、苏氨酸、苯丙氨酸。

碳源在第 2 轴的分异较大,具有统计显著意义的碳源主要有:2-羟基苯甲酸、腐胺、L-精氨酸、半乳糖酸- γ -内酯,它们均与第 2 轴正方向显著相关。此外,丙酮酸甲酯、 α -丁酮酸与第 2 轴高度负相关。

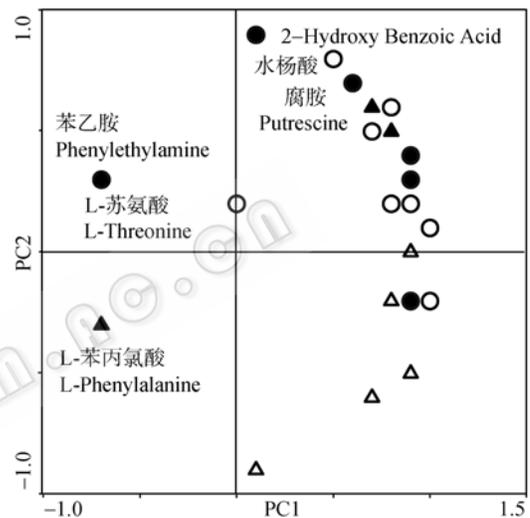


图 1 不同产量大豆根际及非根际微生物对 Biolog EcoPlate™ 31 种碳源利用的主成分排序图

Fig. 1 PCA biplot of Biolog EcoPlate™ carbon substrates utilized by microbe in rhizosphere and bulk soil of different soybean genotypes

注: ●: 糖类及其衍生物; ○: 氨基酸及其衍生物; ▲: 脂类及羧酸; △: 代谢中产物及次级代谢物。

Note: ●: Carbohydrates and their substrates; ○: Amino acid substrates and their derivants; ▲: Fat acid and lipid; △: Metabolic mediates and secondary metabolites.

样品在排序图(图 2, 直接引用金剑原文的图)中的分布规律为:

大豆土壤微生物被分为 3 类: 高产根际组, 与第 1 轴高度正相关; 低产根际组, 与第 2 轴高度正相关; 非根际组, 分布在原点附近, 意味着对碳源应用能力的普遍低下。

结合碳源排序图和样点排序图可以看出, 高产大豆根际微生物利用糖类和脂类碳源能力最强, 脂

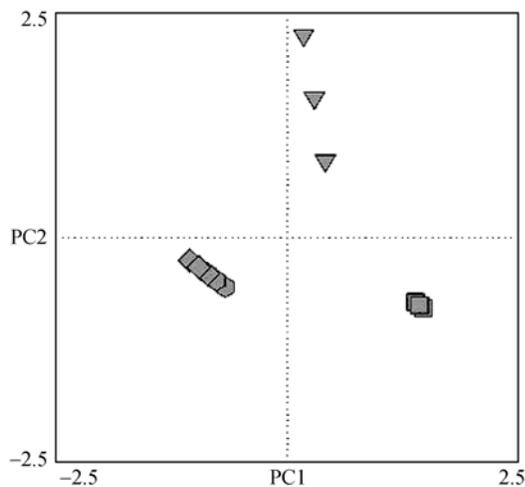


图 2 不同产量大豆根际及非根际微生物样点主成分排序图^[22]

Fig. 2 PCA biplots of microbe samples in rhizosphere and bulk soil of different soybean genotypes^[22]

注: □: 高产根际; ▽: 低产根际; ●: 高产非根际; ◆: 低产非根际。

Note: □: Rhizosphere of High productivity beans; ▽: Rhizosphere of Low productivity beans; ●: Bulk soil of High productivity beans; ◆: Bulk soil of Low productivity beans.

类碳源是其特征碳源。吴凤芝等也有类似的发现: 在大豆茬之后的微生物比小麦茬后的微生物能够更多地利用衣康酸^[23]。高产大豆根际微生物对脂类的利用偏好可能是某种富集作用: 由于收获的籽粒量较大造成植株下土壤脂类碳源的累积, 形成对解脂微生物的选择。低产大豆根际微生物则倾向于利用腐胺、精氨酸、2-羟基苯甲酸等常见于染病植物或者连作土壤中^[12]的植物根系分泌物成分($P=0.01$)。例如, 精氨酸为感病大豆品种根系分泌的主要氨基酸^[13]; 2-羟基苯甲酸是杉木的主要自毒物质^[24]; 黄瓜幼苗受盐胁迫后根系分泌腐胺量上升^[25]。这可能揭示了低产大豆相对某种受胁迫的状态, 其产量低下与受胁迫的状态孰为因果, 值得研究者进一步探讨。

从对“有益碳源”的利用程度来看, 高产大豆根际微生物利用糖类和脂类碳源能力最强, 低产大豆根际微生物次之, 非根际微生物最弱。糖类是微生物最广谱的能源, 对糖类利用的能力反应了微生物群落总体的生理活性, 这表明随着离根系的距离加大, 微生物群落的生理活性在降低, 而高产大豆根系的微生物代谢活性高于低产大豆。通过对根际微

生物特征碳源的分析, 发现脂类是衡量特殊作物(大豆)植株生长、繁殖能效的一个指标。这也启发了研究者, 可以通过对土壤微生物的生理代谢模式间接的研究, 来评价地上植被的某种难以量化或者不易测量的属性。

3 展望

作为预先设置好的培养基, Biolog微平板具有数据量大、方便、快捷、人为操作引起的差异少等优点。在一个特定的时间点, 每块Biolog微平板可以产生 93 个数据, 如果每隔一段时间进行读数, 那么数据量还将成倍增加。研究者应该利用不同的统计处理方法, 从多个侧面解读实验结果, 充分挖掘出每块Biolog EcoPlate™微平板所蕴含的微生物群落生理代谢信息。例如, 对固定时间的读数求平均值, 或者对连续观测数据进行曲线拟合、提取特征参数, 然后再对这些数据进行排序分析、SOM(Self-Organization Maps)分析、计算多样性指数等。

此外, 使用 Biolog 微平板只需简单的无菌接种操作, 相对于需要 DNA 抽提、纯化、引物设计、PCR、电泳、摸索反应体系条件等复杂过程的分子研究手段, 研究者无需基因组学、蛋白组学方面的专业知识即可快速上手, 是值得推广应用的一种实验手段。对于大部分研究者不能充分理解 31 种碳源的内涵, 造成结果解释片面、不完全的问题, 本文希望起到抛砖引玉和参考的作用。另一方面, 由于 Biolog 公司同时提供另一种没有预设碳源的微平板 MT2, 建议研究者也不必照搬 EcoPlate 板和 GN 板的模式, 可以根据研究需要自主选择培养基和特征碳源。

参考文献

- [1] Garau G, Castaldi P, Santona L, *et al.* Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. *Geoderma*, 2007, **142**(1-2): 47-57.
- [2] Yang R, Tang J, Chen X, *et al.* Effects of coexisting plant species on soil microbes and soil enzymes in metal lead contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 2007, **37**(3): 240-246.
- [3] Farnet AM, Prudent P, Cigna M, *et al.* Soil microbial activities in a constructed soil reed-bed under cheese-dairy farm effluents. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(14):

- 6198–6206.
- [4] Elfstrand S, Hedlund K, Mårtensson tensson A. Soil enzyme activities, microbial community composition and function after 47 years of continuous green manuring. *Applied Soil Ecology*, 2007, **35**(3): 610–621.
- [5] Wei D, Yang Q, Zhang JZ, *et al.* Bacterial community structure and diversity in a black soil as affected by long-term fertilization. *Pedosphere*, 2008, **18**(5): 582–592.
- [6] Jacometti MA, Wratten SD, Walter M. Understorey management increases grape quality, yield and resistance to *Botrytis cinerea*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2007, **122**(3): 349–356.
- [7] 王光华, 刘俊杰, 齐晓宁, 等. Biolog 和 PCR—DGGE 技术解析施肥对德惠黑土细菌群落结构和功能的影响. *生态学报*, 2008, **28**(1): 220–226.
- [8] 邓欢欢, 葛利云, 蒋榆林, 等. 水平潜流人工湿地微生物群落的碳源代谢特性和功能多样性研究. *农业环境科学学报*, 2007, **26**(6): 2144–2149.
- [9] 申卫收, 林先贵, 张华勇, 等. 不同施肥处理下蔬菜塑料大棚土壤微生物活性及功能多样性. *生态学报*, 2008, **28**(6): 2682–2689.
- [10] 徐华勤, 肖润林, 邹冬生, 等. 长期施肥对茶园土壤微生物群落功能多样性的影响. *生态学报*, 2007, **27**(8): 3355–3361.
- [11] 魏志强, 王 慧, 胡洪营, 等. 海河-渤海湾沿线地区沉积物中微生物群落代谢特征. *环境科学学报*, 2008, **28**(5): 1007–1013.
- [12] 刘 军, 温学森, 郎爱东. 植物根系分泌物成分及其作用的研究进展. *食品与药品*, 2007, **9**(03A): 63–65.
- [13] 张俊英, 王敬国, 许永利. 大豆根系分泌物中氨基酸对根腐病菌生长的影响. *植物营养与肥料学报*, 2008, **14**(2): 308–315.
- [14] 李廷轩, 马国瑞, 张锡洲, 等. 籽粒苋不同富钾基因型根系分泌物中有机酸和氨基酸的变化特点. *植物营养与肥料学报*, 2005, **11**(5): 647–653.
- [15] 潘 凯, 吴凤芝. 枯萎病不同抗性黄瓜(*Cucumis sativus* L.)根系分泌物氨基酸组分与抗病的相关性. *生态学报*, 2007, **27**(5): 1945–1950.
- [16] Lipton DS, Blanchar RW, Blevins DG. Citrate, malate and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiology*, 1987, **85**(2): 315–317.
- [17] 林文雄, 熊 君, 周军建, 等. 化感植物根际生物学特性研究现状与展望. *中国生态农业学报*, 2007, **15**(4): 1–8.
- [18] 苏国兴, 刘友良. 高等植物体内的多胺分解代谢及其主要产物的生理作用. *植物学通报*, 2005, **22**(4): 408–418.
- [19] 张海涵, 唐 明, 陈 辉, 等. 不同生态条件下油松(*Pinus tabulaeformis*)菌根根际土壤微生物群落. *生态学报*, 2007, **27**(12): 5463–5470.
- [20] 周文新, 陈冬林, 卜毓坚, 等. 稻草还田对土壤微生物群落功能多样性的影响. *环境科学学报*, 2008, **28**(2): 326–330.
- [21] 李雄彪, 张金忠. 半纤维素的化学结构和生理功能. *植物学通报*, 1994, **11**(1): 27–33.
- [22] 金 剑, 王光华, 陈雪丽, 等. Biolog-ECO 解析不同大豆基因型 R1 期根际微生物群落功能多样性特征. *大豆科学*, 2007, **26**(4): 565–570.
- [23] 吴凤芝, 王学征, 潘 凯. 小麦和大豆茬口对黄瓜土壤微生物生态特征的影响. *应用生态学报*, 2008, **19**(4): 794–798.
- [24] 杨 梅, 林思祖, 黄燕华, 等. 邻羟基苯甲酸胁迫下杉木叶片游离氨基酸的变化特征. *东北林业大学学报*, 2007, **35**(2): 40–41, 63.
- [25] 段九菊, 郭世荣, 康云艳, 等. 盐胁迫对黄瓜幼苗根系生长和多胺代谢的影响. *应用生态学报*, 2008, **19**(1): 57–64.

栏目介绍

显微世界

“显微世界”栏目将刊出一些精美清晰的显微照片,带您走进显微镜下的微生物世界,希望在阅读期刊相关科学新进展的同时,给您带来一种愉悦的科学艺术视觉享受。同时欢迎广大作者、读者朋友积极为我们推荐或提供高质量、高清晰的显微照片(提供者保证该图片无任何知识产权问题)。