

Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用*

席劲瑛 胡洪营 钱 易

(清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点实验室 北京 100084)

Application of Biolog System in the Study of Microbial Community

Xi Jinying Hu Hongying Qian Yi

(Department of Environmental Science and Engineering, The State Key Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

关键词: Biolog 方法, 环境微生物群落, 代谢功能

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)01-0138-04

环境微生物群落研究具有非常重要的理论和应用价值。本文介绍了一种测定微生物代谢的 Biolog 微平板法, 以及这种新方法在环境微生物群落研究方面的应用成果。

1 环境微生物群落研究的意义与手段

1.1 环境微生物群落的研究内容

环境微生物是由多个种群(population)组成的微生物群落(community), 不同种群之间存在着共生、互利、共存、竞争等各种复杂的关系, 在物质循环和能量转化过程中发挥着重要作用。对环境微生物群落的研究可以从微生物的量、代谢活性、群落结构及代谢功能等几个不同层面上进行。其中, 微生物群落结构、代谢功能以及两者的关系是环境微生物群落研究的核心内容。

1.2 环境微生物群落的研究意义

研究微生物群落结构及其代谢功能, 可以揭示环境中污染物迁移转化的生物学基础, 提供评价和预测环境质量和安全性的基本信息, 并且可以从群落水平上了解和评价生物修复和生物处理技术的机理与效果, 同时为控制和优化微生物群落结构, 强化其代谢功能提供理论指导。

1.3 环境微生物群落的研究手段

传统的研究方法主要通过分离培养纯的微生物菌种, 对分离出来的纯菌种分别研究。这种方法存在着一定局限性, 如可分离培养的微生物种类有限^[1], 分离培养后微生物的生理特性易发生改变等。

近年来, 各种基于生物标志物(biomarker)的测定方法(微生物醌法、脂肪酸法等)和分子生物学方法^[2](FISH, TGGE, DGGE等)相继得到了广泛应用。这些方法无须分离培养就可反映微生物的群落结构信息, 但却无法获得有关微生物群落总体活性与代谢功能的信息, Biolog方法则弥补了这一不足。

2 Biolog 方法的原理、操作与数据分析

2.1 Biolog 方法的原理与特点

Biolog 方法的测定原理: 微生物在利用碳源过程中产生的自由电子, 与四唑盐染料发生还原显色反

* 国家 973(G199045711)和教育部留学回国人员科研启动基金和清华大学的资助

作者简介: 席劲瑛(1977-)男, 江苏镇江人, 清华大学环境科学与工程系博士研究生。

收稿日期: 2002-03-08, 修回日期: 2002-07-12

应,颜色的深浅可以反映微生物对碳源的利用程度。由于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和固有性质,因此在一块微平板上同时测定微生物对不同单一碳源的利用能力(sole carbon source utilization, SCSU)就可以鉴定纯种微生物或比较分析不同的微生物群落。

该方法由美国的 BIOLOG 公司于 1989 年开发成功^[3],最初应用于纯种微生物鉴定^[4],至今已经能够鉴定包括细菌、酵母菌和霉菌在内的 2000 多种病原微生物和环境微生物。1991 年, Garland 和 Mill 开始将这种方法应用于土壤微生物群落的研究^[4]。Biolog 方法用于环境微生物群落研究,具有以下特点: 1. 灵敏度高,分辨力强。对多种 SCSU 的测定可以得到被测微生物群落的代谢特征指纹(metabolic fingerprint),分辨微生物群落的微小变化。2. 无需分离培养纯种微生物,可最大限度地保留微生物群落原有的代谢特征。3. 测定简便,数据的读取与记录可以由计算机辅助完成。微生物对不同碳源代谢能力的测定在一块微平板上一次完成,效率大大提高。

2.2 Biolog 系统的组成与操作方法

Biolog 系统主要包括 Biolog 微平板、微平板读数器和一套微机系统^[3]。具体说明如表 1 所示。

表 1 Biolog 系统组成与说明

系统组成	说 明
Biolog 微平板	共 96 孔,孔中含有营养盐和四唑盐染料 TTC;其中 1 孔不含碳源为对照孔,其它 95 孔含有不同单一碳源
读数器	测定一定波长下每个小孔内的吸光度及变化
微机系统	与读数器相连,自动完成数据采集、传输、存储与分析

Biolog 方法操作的主要流程^[5,6]如表 2 所示:

表 2 Biolog 方法操作主要流程

序 号	步 骤	说 明
1	平板选择	针对 G ⁺ 和 G ⁻ 细菌选择不同平板(Biolog GP, GN),各孔内碳源也可调控
2	样品制备	将微生物从环境介质中提取出来,控制到适宜浓度(浊度表示)
3	加样	取一定体积菌液(一般 150 μ L/孔),平行加入各孔
4	培育与读数	恒温培育,用微平板读数器记录各孔吸光度值变化

2.3 数据分析

对于纯菌株鉴定^[5],将 95 种基质的测定结果与菌种库中的数据进行对比可判断菌种的归属。

对于微生物群落分析,一般要记录每孔的吸光度值及其时间变化^[6]。95 个孔吸光度的平均值(average well color development, AWCD)的计算公式为:

$$AWCD = [\sum (C_i - R)] / 95$$

其中 C_i 是除对照孔外各孔吸光度值, R 是对照孔吸光度值。

AWCD 及其时间变化可以用来表示微生物的平均活性,如图 1 所示^[7]。

95 种碳源的测定结果形成了描述微生物群落代谢特征的多元向量,不易直观比较^[8]。通过主成分分析(principal component analysis, PCA)可以将不同样本的多元向量变换为互不相关的主元向量(PC1 和 PC2 是主元向量的分量),在降维后的主元向量空间中可以用点的位置直观地反映出不同微生物群落的代谢特征,如图 2 所示^[8]。另外,各种多样性指数^[6]还可以反映微生物群落代谢功能的多样性。

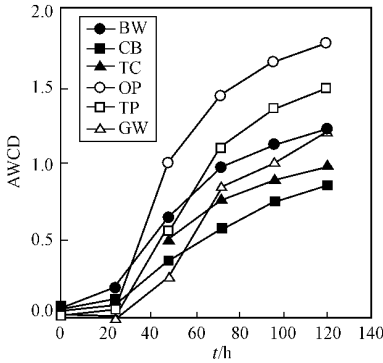


图1 六种水体微生物群落 AWCD 值的时间变化
波长 590nm, BW、CB、TC 为三种不同海水样；
OP、TP、GW 为三种不同淡水样。

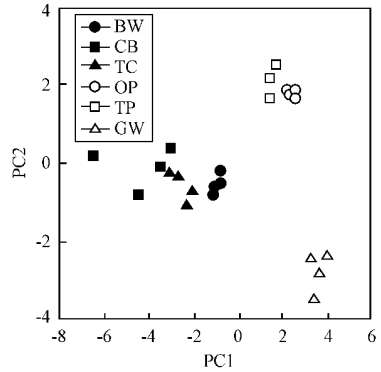


图2 六种水体微生物群落 PCA 分析结果
图标含义同图 1。

3 Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用

3.1 环境微生物群落的比较研究

土壤微生物群落:西弗吉尼亚大学的 De Fede 等^[9,10]用 Biolog 方法对农田与森林中的土壤微生物群落进行了测定。研究结果表明,对微生物提取液进行稀释会使优势种群富集,劣势种群缺失。研究中还发现不同深度农田土壤中的微生物群落的代谢特征非常接近,这可能是农田土壤经常翻耕的结果。

水体微生物群落:美国的 Choi 等^[8]利用 Biolog GN 和 Biolog ECO 平板对 6 种不同水样(3 种淡水水样,3 种海水水样)中的微生物群落进行了比较。结果表明,来自于不同水体中的好氧异养微生物群落的代谢特征具有明显差别,研究中还发现,微量营养元素不同会引起微生物对同种碳源的代谢差异。

活性污泥中的微生物群落:美国的 Kaiser 等^[11]用 Biolog 方法对比了实验装置中的活性污泥与污水厂的活性污泥。实验装置包括连续运行的 CAS 系统和半连续运行的 SCAS 系统。Biolog 测定表明,进水使用生活污水原水时,CAS 系统与 SCAS 系统中活性污泥的代谢特征均和污水厂污泥非常相似;并且 CAS 系统中微生物群落的代谢特征非常稳定,在 16 个月的实验周期内没有发生明显变化。进水使用葡萄糖蛋白胨废水时,SCAS 系统中的污泥代谢特征则发生了明显变化。

3.2 污染物对环境微生物群落的影响评价

通过 Biolog 方法可以评价污染物对微生物群落及其代谢功能的影响^[12]。

德国的 Engelen 等^[13]研究了除草剂对土壤中微生物群落及其代谢特性的影响。Biolog 测定结果表明,使用除草剂降低了土壤中微生物的代谢活性,这与微生物的基质诱导呼吸速率(SIR, substrate induced respiration)和脱氢酶活性测定结果相符,并且 Biolog 测定结果还能定量显示微生物群落对不同碳源的利用能力及代谢功能多样性的变化。

杨永华等^[6]用 Biolog 方法对农药污染土壤中的微生物群落进行了研究。测定结果显示,污染土壤的 Shannon 指数和均度、Simpson 指数、McIntosh 指数和均度均明显低于无污染土壤。这说明农药污染导致了土壤中微生物代谢功能多样性的下降,同时也导致了微生物种类的减少。

3.3 环境修复效果与处理效果的评价

美国的 Fang 等^[14]研究了利用植物根际微生物降解土壤当中阿特拉津(atrazine)和菲的效果。为了进一步了解植物对农药降解的促进作用,在实验过程中用 Biolog 方法对不同草本植物的根际微生物群落进行了研究。Biolog 测定结果显示出不同根际微生物的代谢差异,但是没有找到代谢特征指纹和降解效果之间的相关关系。

4 不足与改进建议

4.1 微平板具有选择性

Biolog 方法中所使用的微平板具有一定的选择性,比如 Biolog GN 微平板适用于革兰氏阴性菌,而 Biolog GP 微平板适用于革兰氏阳性菌。今后可以通过增加新碳源和改变碳源的数量与组合,开发出适用性更广或针对性更强的产品。

4.2 影响显色的因素较多

影响平板微孔显色的因素较多,除了培养液中微生物的种群组成、数量与活性外,样品的预处理、培养时间和温度、培养液含有干扰物质等因素都会影响平板显色结果。因此,操作过程中的条件控制非常重要,针对不同要求应该确定相应的标准方法。

4.3 获取微生物群落结构信息较难

虽然由 Biolog 实验得到的数据量很大,但从微生物代谢功能信息中得到的群落结构信息还很有限。使用 biolog 分析更多的是对环境微生物群落进行比较和识别,以及进行群落活性与功能的分析。目前还不能直接通过 Biolog 代谢指纹分析微生物群落结构信息。今后应该结合其它群落结构分析方法,通过对代谢特征指纹的解析研究组成环境微生物群落的功能类群,通过不同类型微生物的代谢特征分析它们在群落中的组成及动态变化。更深入地研究环境微生物群落结构与功能及其相互关系。

参 考 文 献

- [1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, **59**(1):143 ~ 169.
- [2] 白青云. 土壤微生物群落结构的化学估价方法. *农业环境保护*, 1997, **16**(6):252 ~ 256, 265.
- [3] Biolog 公司网页: www. biolog. com.
- [4] 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. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(8):2351 ~ 2359.
- [5] 冯瑞华, 樊 蕙, 李 力, 等. biolog 细菌自动鉴定系统应用初探. *微生物学杂志*, 2000, **20**(2):36 ~ 38.
- [6] 杨永华, 姚 健. 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*, 2000, **20**(2):23 ~ 25.
- [7] Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, **36**(3):203 ~ 213.
- [8] Hackett C A, Griffiths B S. Statistical analysis of the time-course of biolog substrate utilization. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, **30**(1):63 ~ 69.
- [9] De Fede K L, Panaccione D G, Sexstone A J. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOG(R) community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rRNA genes. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, **33**(11):1555 ~ 1562.
- [10] De Fede K L, Sexstone A J. Differential response of size-fractionated soil bacteria in BIOLOG(R) microtitre plates. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, **33**(11):1547 ~ 1554.
- [11] Kaiser S K, Guckert J B, Gledhill D W. Comparison of activated sludge microbial communities using biologTM microplates. *Water Science and Technology*, 1998, **37**(4-5):57 ~ 63.
- [12] 杨元根, Paterson E, Campbell C. 苏格兰阿伯丁城市土壤的微生物特性研究. *矿物学报*, 2000, **20**(4):342 ~ 348.
- [13] Engelen B, Meinken K, Wintzingerode F, et al. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(8):2814 ~ 2821.
- [14] Fang C W, Radosevich M, Fuhrmann J J. Characterization of rhizosphere microbial community structure in five similar grass species using FAME and BIOLOG analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, **33**(4-5):679 ~ 682.