

土壤微生物 BIOLOG 分析中特征碳源的判别

谭兆赞, 刘可星, 廖宗文

(华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:利用 BIOLOG ECO 微孔板分析施入不同堆肥后,引起土壤微生物群落防治土传病害功能变化的碳源,结合3种数学分析方法对移栽后 13、33、55 d 的土壤进行分析,共选出 10 种特征碳源,分别是吐温 80、D-木糖、苯乙基胺、腐胺、 α -D-乳糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷、 γ -羟基丁酸、 α -丁酮酸、L-苯基丙氨酸和 L-苏氨酸. 利用 31 种特征碳源作主成分分析图,结果表明:PCA 图中各处理点的分布情况较相似,能较好地反映发病情况,且特征碳源能更敏感地反映土壤微生物群落特征的变化. 聚类分析结果表明,与 31 种碳源相比,利用特征碳源的聚类图能更合理地将各处理按发病情况归类.

关键词:BIOLOG; 主成分分析; 特征碳源

中图分类号:S154.36

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2006)04-0010-04

The Discrimination of Characteristic Carbon Sources on Soil Microbial Community Using BIOLOG Microplates

TAN Zhao-zan, LIU Ke-xing, LIAO Zong-wen

(College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract:Characteristic carbon sources caused from the changes of the soil ecological regulation for soil-borne disease control were studied by BIOLOG ECO microplates. Principal components analysis (PCA) was used to identify contribution rate of 31 kinds of carbon substrates in the different soil samples collected in 13, 33 and 55 d after transplanting. Ten characteristic carbon sources (Tween 80, D-cellobiose, phenylethylamine, putrescine, α -D-lactose, β -methyl-D-glucoside, γ -hydroxybutyric acid, α -ketobutyric acid, L-phenylalanine, and L-threonine) were selected to perform PCA, the characteristic carbons results were similar to that of 31-kind carbons, and more sensitive to indicate the changes of soil community functional structure. The result of cluster analysis showed that, clustering analysis of ten characteristic carbon sources was more reasonable to classify the compost treatments according to the development of tomato bacterial wilt than that of 31 carbon sources.

Key words:BIOLOG; principal components analysis; characteristic carbon sources

BIOLOG 微孔板的碳源最初是为鉴定已分离纯化的微生物物种而设计的,1991年, Garland 等^[1]首次将 BIOLOG 微孔板用来描述微生物的群落特征,现已广泛应用于评价环境微生物群落的功能多样性^[2-7]. 然而将其用于分析复杂的环境微生物群落时,并非所有碳源都是同等重要的,过多的碳源可能会带来冗余的信息而降低数据分析的效率和准确

性. 目前已有部分学者初步研究了引起微生物群落代谢特征变化的碳源. 席劲瑛等^[2]定义一个 BIOLOG 代谢谱图,通过采用与 BIOLOG 微孔板相对应的网格图,用颜色深浅来定性表示微生物对不同碳源的利用能力,直观地反映微生物群落的代谢特征和代谢功能. 运用主成分分析,可解释隐含的存在于群落间的功能差异,对主成分 1 (PC1) 和主成分

收稿日期:2006-04-12

作者简介:谭兆赞(1980—),男,硕士研究生;通讯作者:廖宗文(1947—),男,教授,E-mail:zwliao@sohu.com

基金项目:国家“863”计划项目(2001AA246023);农业部“948”项目(2006-G62)

2(PC2)的贡献率高的碳源进一步分析,可揭示引起这些差异的主要碳源^[3-5]. Yu等^[6]利用方差分析和Fisher's LSD作多重比较,分析出处理与未处理土壤间差异明显的碳源,并通过逐步聚类分析将土壤微生物群落较相似的处理归类. 这些多为利用代谢指纹图、主成分分析或多重比较等单一方法分析,结果得到的碳源总数往往较多,且不完全一致,有必要综合各种方法,筛选出几种能敏感反映土壤微生物群落特征变化的碳源. 本文利用包含31种碳源的BIOLOG ECO微孔板,结合上述各种数学方法,以期找出同时为各种方法所确定的特征碳源,并对这些特征碳源进行验证,以了解其可靠性,探讨自制BIOLOG微孔板几种特征碳源应用于土壤微生物群落功能研究的可能性.

1 材料与方 法

1.1 材 料

盆栽试验设7个处理. 每处理设5个重复. 每盆装5 kg土. 每盆种2株番茄,共10株番茄. 移栽后15、33和55 d采土样分析,并在移栽后15、33 d分别追肥. 2005年4月4日育苗,4月21日移栽,7月6日收获. 生长期为75 d,期间统计发病情况. 处理及发病结果见表1.

表1 试验处理与发病情况

Tab.1 Experiment treatments and development of tomato bacterial wilt on different treatments

编号 no.	处理 ¹⁾ treatment	初发病时间 first time of occurrence	发病株数 diseased plants
CK	无机肥(CK ₁)	移栽35 d	8
20J0	20 d的堆肥(CK ₂)	移栽39 d	3
20J1	接种1次20 d的堆肥	移栽43 d	3
20J2	接种2次20 d的堆肥	移栽55 d	1
30J0	30 d的堆肥	移栽39 d	3
30J1	接种1次30 d的堆肥	移栽48 d	1
30J2	接种2次30 d的堆肥	移栽55 d	2

1)堆肥前第1次接种,堆肥14 d时第2次接种

1.2 BIOLOG 测定及数据处理方法

按Garland等^[1]的方法,分别对番茄移栽后15(前期)、33(中期)和55 d(后期)的土壤进行BIOLOG测定. 采用培养72 h的数据进行分析. 碳源分6类^[4],由于胺类和酚类混合物的碳源数目较少,各为2种,故分别与氨基酸类和聚合物类合并成4大类. 对31种碳源和分成4大类的碳源分别进行主成分分析,选择对PC1和PC2有较高贡献率的碳源;用Fisher's LSD分析各处理与CK间碳源的差异显著性,选择有4个处理以上差异极显著的碳源. 选出同时为以上3

种方法所确定的碳源.

2 结果与分析

2.1 特征碳源的判别结果

前期(15 d),利用31种碳源作主成分分析(方法1),对PC1或PC2的贡献率大于0.2或小于-0.2的碳源有23种;利用4大类碳源作主成分分析(方法2),对PC1或PC2的贡献率大于0.4或小于-0.4的碳源有18种,其中有15种与方法1选择的碳源相同;利用Fisher's LSD(方法3)分析各处理(表1)与CK间差异显著性,有16种为4个处理以上都差异极显著的碳源,其中有10种与方法1和方法2选出的碳源相同. 同样,中期(33 d)利用方法1、方法2和方法3分别选出23、12和13种碳源,其中前2种方法共同选出11种,3种方法共同选出10种. 后期(55 d)利用方法1、方法2和方法3分别选出22、15和13种碳源,其中前2种方法共同选出11种碳源,3种方法共同选出11种碳源.

在前、中、后期均被选出的碳源(表2)有:吐温80、苯乙基胺和腐胺;其中,2个时期均被选出的碳源有: α -D-乳糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-木糖、 γ -羟基丁酸、 α -丁酮酸、L-苯基丙氨酸和L-苏氨酸,以上10种碳源可能对土壤微生物群落特征有重要影响,可以认为是特征碳源. 这些特征碳源中,糖类有3种,羧酸类有2种,氨基酸类有2种,胺类有2种,聚合物类有1种. 这10种特征碳源,前期出现8种,中期出现9种,后期出现7种;故认为前、中期是研究特征碳源的较好时期.

2.2 特征碳源的检验

2.2.1 主成分分析 中期,利用31种碳源和特征碳源作的主成分分析图中,各处理点的分布与发病动态基本一致(图1). 31种碳源PCA图中(图1A),发病情况较轻的20J2和30J2分布于PC1轴的正轴方向,发病情况中等的20J0、20J1和30J0分布于PC1轴负轴接近原点附近,但发病较轻的30J1也分布其中,发病严重的CK则分布在PC1轴负轴的另一侧. 而在特征碳源PCA图中(图1B),也有相似规律,发病情况较轻的30J2和30J1集中分布在一起,但20J2距离较远;发病情况中等的20J0、20J1和30J0分布于原点附近,CK居于PC1负轴侧. 图1A与图1B相比,图1B中各处理的点分布得更集中. 而到后期,特征碳源分析图(图1D)与31种碳源分析图(图1C)各处理的点的分布位置较相似,可知所选的特征碳源能反映31种碳源的大部分信息,且能更敏感地反映土壤微生物群落功能特征的变化.

表2 特征碳源分析结果¹⁾

Tab.2 Analysis results of characteristic carbon sources

碳源 carbon sources	对应孔号 well no.	移栽天数 days after transplanting			碳源归类 group	是否特征碳源 characteristic carbon sources
		15 d	33 d	55 d		
吐温 80 Tween 80	H1	有	有	有	聚合物	+
α -D-乳糖 α -D-lactose	A2	无	有	有	糖类	+
β -甲基-D-葡萄糖苷 β -methyl-D-glucoside	B2	有	有	无	糖类	+
D-木糖 D-xylose	E2	有	无	有	糖类	+
N-乙酰基-D-葡萄糖胺 N-acetyl-D-glucosamine	F2	无	无	有	糖类	-
D-葡萄糖胺 D-glucosaminic acid	H2	无	有	无	羧酸类	-
D,L- α -甘油 D,L- α -glycerol	A3	无	无	有	糖类	-
D-半乳糖内酯 D-galactonic acidy-lactone	C3	无	无	有	糖类	-
2-羟基苯甲酸 2-hydroxy benzoic acid	D3	有	无	无	酚类混合物	-
4-羟基苯甲酸 4-hydroxy benzoic acid	E3	无	无	有	酚类混合物	-
γ -羟基丁酸 γ -hydroxybutyric acid	G3	有	有	无	羧酸类	+
α -丁酮酸 α -ketobutyric acid	H3	有	有	无	羧酸类	+
D-苹果酸 D-malic acid	A4	有	无	无	羧酸类	-
L-精氨酸 L-arginine	C4	无	无	有	氨基酸类	-
L-苯基丙氨酸 L-phenylalanine	E4	无	有	有	氨基酸类	+
L-苏氨酸 L-threonine	G4	有	有	无	氨基酸类	+
苯乙基胺 phenylethyl-amine	H4	有	有	有	胺类	+
腐胺 putrescine	H1	有	有	有	胺类	+
合计 total		10种	10种	11种		

1) “+”表示为特征碳源;“-”表示为非特征碳源

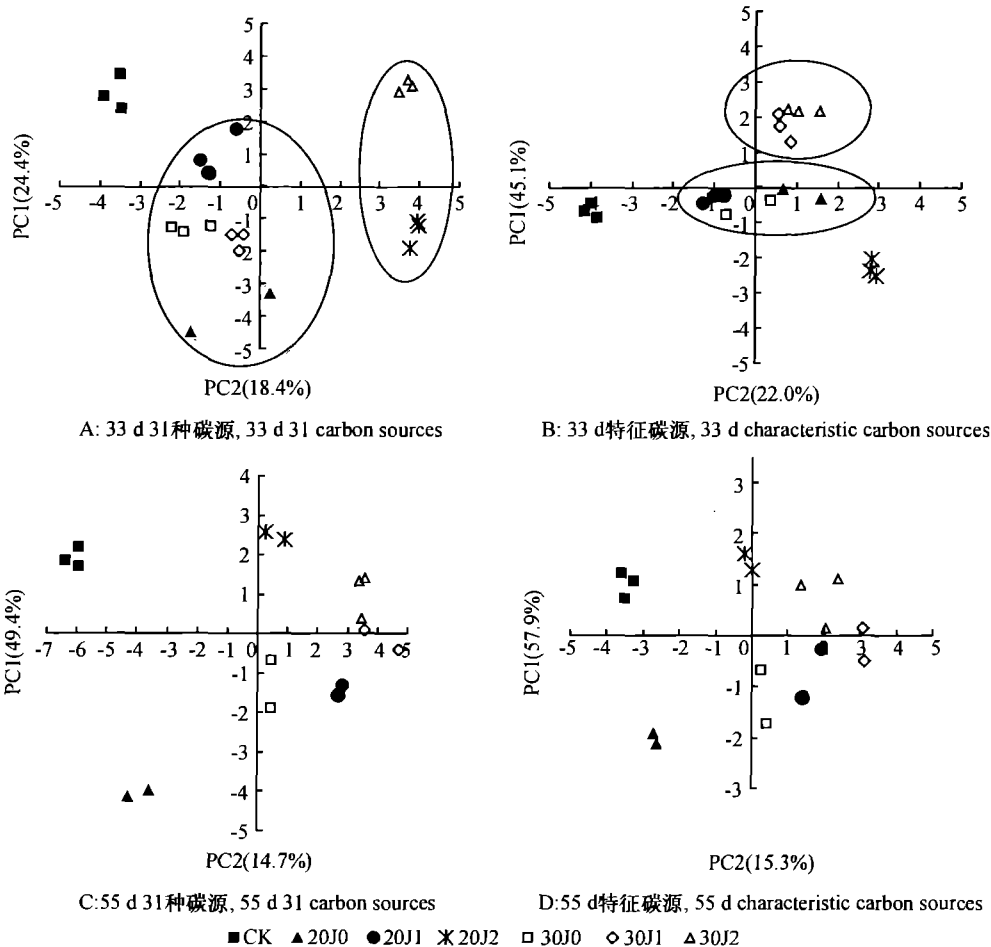


图1 各处理土壤微生物群落功能主成分分析图

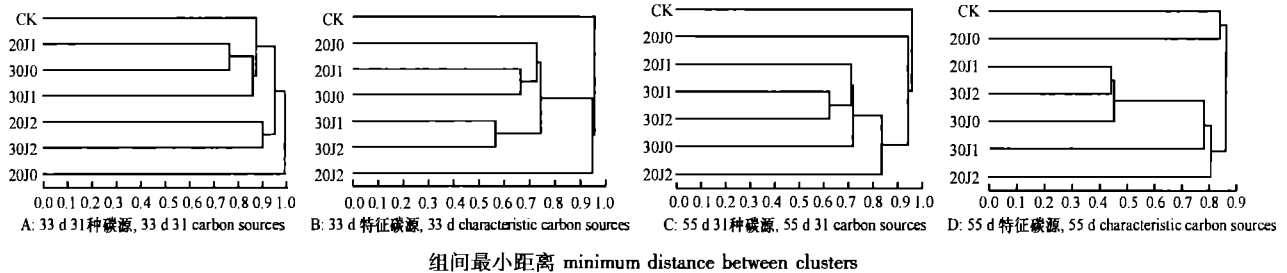
Fig.1 Principal component analysis for soil microbial communities of different treatments

2.2.2 聚类分析 中期,利用31种碳源的聚类图(图2A)还不能把CK区分,在第3步就被归为组3(CL3)。由以上分析结果可知,CK的群落功能结构与堆肥处理的有较大区别。故作聚类分析时,CK跟其他处理的聚类距离应该是最大的,即CK应在最后才跟其他处理归为一类。所以,中期利用31种碳源的聚类较不合理。

而利用特征碳源的聚类图则能把群落功能结构差异较大的CK最后归类,且归类情况与发病情况有较好的一致性(图2B)。防病较好的30J1和30J2的

聚类距离最小,说明其群落功能结构较相似,故先归为CL1,防病一般的20J1和30J0归为CL2,CL2再与20J0归为CL3,CL1和CL3再归为CL4,CL4再与20J2归为CL5,CL5与CK的最小距离较大,说明其群落结构差异较大。施入堆肥后,土壤微生物生态在中期发生本质变化,利用特征碳源能合理将相似的土壤微生物群落功能结构归类。

后期,CK与堆肥处理诱导的土壤微生物生态趋于稳定,且二者间已有较大差别,利用31种碳源和特征碳源均能区分各堆肥处理和CK(图2C、2D)。



组间最小距离 minimum distance between clusters

图2 各处理土壤微生物群落聚类分析图

Fig.2 Cluster analysis for soil microbial communities of different treatments

3 讨论与结论

BIOLOG 微平板用于分析土壤微生物的功能多样性,能较快捷、敏感地反映土壤微生物群落特征的变化,且能得到丰富的信息^[7]。但由于土壤微生物群落的复杂性,及 BIOLOG 微平板中碳源是为鉴定已分离纯化的微生物物种而设计,这大大限制了其信息的全面性和有效性。主成分分析,贡献率的定量是关键。本研究发现,对 PC1 和 PC2 的贡献率在 $\pm 0.2 \sim \pm 0.4$ 的碳源,能反映其中的大部分信息,最优的范围还有待进一步研究。通过主成分分析图可以在降维后的主元向量空间中,用点的位置直观地反映出不同土壤微生物群落功能多样性变化^[8]。利用主成分分析图对特征碳源作检验,也证明了这一点。用 Fisher's LSD 分析结果发现,6 个处理中,若与 CK 差异极显著的处理达 4 个以上时选出的碳源数量较为合适,与上述主成分分析选出的碳源数目较一致,故选择有 4 个处理以上差异极显著的碳源作进一步分析,结果表明,移栽后 33 d 时,利用特征碳源作聚类分析能较好地地区分堆肥处理和 CK 的土壤微生物群落,且与发病情况有较好的一致性。本文尝试综合运用以上 3 种数学方法处理数据,从 31 种碳源中,筛选出能敏感地反映土壤微生物群落功能特征变化的 10 种特征碳源,提高了数学分析方法的有效性和准确性,优化了 BIOLOG 微平板的碳源设计,降低研究成本,对进一步了解碳源与微生物群落功能的关系,有重要的意义。

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] 席劲瑛, 胡洪营, 姜健, 等. 生物过滤塔中微生物群落的代谢特性 [J]. *环境科学*, 2005, 26(4): 165-170.
- [3] GLIMM E, HEUER H, ENGELEN B, et al. Statistical comparisons of community catabolic profiles [J]. *J Microbiol Methods*, 1997, 30: 71-80.
- [4] 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 [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3): 203-213.
- [5] 郑华, 欧阳志云, 王效科, 等. 不同森林恢复类型对土壤微生物群落的影响 [J]. *应用生态学报*, 2004, 15(11): 2019-2024.
- [6] YU Xing-jun, YU Dan, LU Zhi-jun, et al. A new mechanism of invader success: Exotic plant inhibits natural vegetation restoration by changing soil microbe community [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(11): 1105-1112.
- [7] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用 [J]. *土壤学报*, 2004, 41(3): 456-461.
- [8] 席劲瑛, 胡洪营, 钱易. 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.

【责任编辑 周志红】