

环境微生物样品真菌群落 BIOLOG 分析方法

韩 蕙¹, 翟振华², 张燕燕¹, 王晓丹², 郑少奎^{1,*}, 李艳红²

(1. 北京师范大学环境学院水环境模拟国家重点实验室, 北京 100875; 2. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

摘要: 利用 BIOLOG YT、FF 微孔板分别考察了 4 个真菌群落代谢活性及群落间的代谢相似性, 并与聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 结构相似性分析对比试图探讨代谢相似性与结构相似性的内在联系, 探讨了超低温冻存法作为样品保存手段对真菌群落特征 BIOLOG 分析结果的影响。结果表明: 两种微孔板所反映的代谢相似性聚类分析结果完全不同, FF 板所反映的代谢相似性聚类分析规律与 PCR-DGGE 提供的种群结构聚类分析规律一致; 超低温冻存处理影响显著影响 BIOLOG YT 代谢活性 ($P = 0.023$) 和 BIOLOG FF 多样性指数 (H') ($P = 0.041$), 但对两种微孔板所反映的其它指数如代谢活性、丰富度指数 (S)、多样性指数 (H') 分析结果均无显著性影响 ($P > 0.05$)。

关键词: BIOLOG; 真菌群落; CLPPs; PCR-DGGE; 超低温冻存

文章编号: 1000-0933(2009)05-2368-06 中图分类号: Q145, Q938.1 文献标识码: A

BIOLOG analysis for fungal communities in environmental samples

HAN Hui¹, ZHAI Zhen-Hua², ZHANG Yan-Yan¹, WANG Xiao-Dan², ZHENG Shao-Kui¹, LI Yan-Hong²

1 State Key Laboratory of Water Environment Simulation, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

2 College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(5): 2368 ~ 2373.

Abstract: BIOLOG YT and FF microplates were used in this study to investigate the metabolic activities and similarity of 4 fungal communities in environmental samples. Subsequently, the BIOLOG metabolic similarity expressed by these two microplates was linked to structural similarity expressed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE). In addition, the effect of cryopreservation on BIOLOG analytic results, including metabolic activities, richness index and diversity index, was also discussed. The following conclusions have been drawn: (1) BIOLOG FF microplate expressed a metabolic similarity relation among 4 fungal communities absolutely different from that by BIOLOG YT microplate. (2) The BIOLOG FF metabolic similarity of 4 fungal communities nearly corresponded to the PCR-DGGE structural similarity. (3) The cryopreservation had no significant influence on BIOLOG richness index, BIOLOG FF metabolic activities and BIOLOG YT diversity index ($P > 0.05$).

Key Words: BIOLOG; fungal community; CLPPs; PCR-DGGE; cryopreservation

BIOLOG 微生物分析系统自从 1991 年起被广泛应用与环境微生物群落分析^[1], 具有灵敏度高、分辨力强、无需分离纯种微生物、操作简便等优点^[2]。在微生物群落水平生理图谱 (CLPPs) 分析时通常采用 GN 或 ECO 板^[3~6], 它们通过微孔中四唑紫染料 (MTT) 显色反应来反映微生物代谢作用^[7]。由于许多真菌代谢过程不能使四唑紫染料显色^[8], 因此真菌群落 CLPPs 不能在 BIOLOG GN 或 ECO 板上得到有效反映, 而需要改用 BIOLOG FF 或 YT 板^[9,10], 这两种分别用于酵母菌和丝状真菌鉴定的微孔板^[7]在表达方式上存在不同, 其中 FF 板因采用碘硝基四氮唑紫染料 (INT) 使真菌代谢过程能够通过显色反映出来, 而 YT 板则通过前三排微

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 资助项目 (2006CB403306)

收稿日期: 2008-01-29; 修订日期: 2008-06-10

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zshaokui@yahoo.com.cn

孔的四唑紫显色反应和后五排微孔(无染料)的浊度变化来分别表达代谢作用和同化作用^[7]。然而,目前尚无人研究这两种微孔板表达方式和碳源组合的不同对同批环境微生物样品真菌群落相似性分析结果的影响。由于基于 rDNA 的聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)分析方法被认为能够直观地反映环境微生物样品群落特征^[11,12]。因此本文以 PCR-DGGE 所表达的 4 个环境样品间真菌群落相似性关系为对照,比较了 BIOLOG FF、YT 微孔板所表达的真菌群落相似性关系,并探讨了更准确地反映真菌群落相似性规律的微孔板类型。此外, BIOLOG 微生态分析一般要求采用新鲜样品^[13,14],这不利于野外取样分析。针对这一普遍存在的问题,本文重点探讨了超低温冻存法作为样品保存手段对真菌群落特征 BIOLOG 分析结果的影响。

1 材料与方法

1.1 环境微生物样品

用于 BIOLOG FF 和 YT 板 CLPPs 分析和 PCR-DGGE 分析的污泥样品采自实验室废水处理装置不同运行阶段的曝气柱污泥,而超低温冻存预处理研究采用北京市高碑店污水处理厂 A²O 工艺曝气池污泥。

1.2 真菌群落的 BIOLOG 分析

污泥样品充分混匀后,采用无菌生理盐水离心清洗(10000 r/min, 10 min),再用无菌生理盐水稀释离心沉淀物(至浊度为 0.3),分别接种 100 μ l 菌液至 BIOLOG YT、FF 微孔板,并添加抗生素 ampicillin 和 streptomycin 使其最终浓度均为 50 μ g/ml 以抑制细菌生长,将平板在 25 $^{\circ}$ C 下恒温培养,每隔 12h 分别在 590nm(YT 板)、490nm(FF 板)处检测吸光度值。本文采用 240h 时数据计算真菌群落平均每孔吸光度(AWCD)、BIOLOG 丰富度指数和代谢多样性指数,并作代谢相似性分析。其中 $AWCD = \sum (C_i - R) / 95$,式中 C_i 是除对照孔外各孔吸光度值, R 是对照孔吸光度值;丰富度指数即被利用碳源总孔数或 $C_i - R$ 值大于 0.25 的孔数^[15];代谢多样性指数(Shannon-Wiener 指数) $H' = - \sum (P_i \times \ln P_i)$,式中 $P_i = (C_i - R) / \sum (C_i - R)$;代谢相似性分析采用简单匹配系数 S_{SM} 计算微生物群落的代谢相似性,利用算术平均的不加权成对分组方法(UPGMA)作聚类分析,建立距离树。

1.3 真菌群落的 PCR-DGGE 分析

将微生物样品在 Matrix E Tube 中(Q-Biogene)采用 Bio101 Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒(Q-Biogene)提取基因组 DNA,采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取效果。PCR 过程采用真菌 18S rDNA 特异性扩增引物 FF390(CGA TAA CGA ACG AGA CCT)/FR1 + GC(CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GCA CGG GCC GAI CCA TTC AAT CGG TAI T)^[16]。25 μ l PCR 反应体系为:2.5 μ l 10 $\times$ PCR buffer,5 mmol/L dNTP,5 μ mol/L FR1 + GC,5 μ mol/L FF390,50 ng DNA 提取物,2.5 U *Taq* 酶,用 ddH₂O 补足至 25 μ l 反应体系。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,运行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 min。PCR 扩增产物先采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,然后采用 DecodeTM 基因突变检测系统(Bio-Rad)开展 DGGE 分析。DGGE 变性剂(甲酰胺)浓度范围为 40% ~ 55%,电泳条件为:1 $\times$ TAE 电泳缓冲液(pH 约为 8.5),130V、60 $^{\circ}$ C 分离 6.5 h。电泳结束后凝胶经银染(Sigma)^[17]后采用紫光 100 扫描仪扫描,并通过 Quantity One 4.31(Bio-Rad)软件分析 DGGE 指纹图谱,根据图谱中每个样品不同条带的强度和迁移率考察群落相似性,按照 UPGMA 算法对每个样品条带图谱开展聚类分析。

1.4 环境微生物样品的超低温冻存预处理

将高碑店污水处理厂曝气池污泥充分混匀后,取部分样品立即开展 BIOLOG 分析,另取部分样品加入 20% 甘油,经 -20 $^{\circ}$ C 处理后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。3d 后解冻用于 BIOLOG 微生态分析(各 3 个平行样)。用 SPSS 软件对两类分析结果作方差分析(显著性差异基于 $P = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 真菌群落微生态相似性分析

2.1.1 真菌群落代谢相似性分析

4 个样品真菌群落 BIOLOG YT、FF 板的 AWCD 值分析情况如图 1 所示,通常 AWCD 值反映微生物利用

单一碳源能力,其变化速率反映 BIOLOG 代谢活性,AWCD 值增加越快表示 BIOLOG 代谢活性越高^[18]。从图中可以看出,在终止培养时 FF 板 AWCD 值形成了较为明显的 S 型曲线,相比而言,YT 板中真菌生长启动速度较慢,生长停滞期较长;与此同时,FF 板能清楚区分 4 个真菌群落,4 条变化曲线明显分离,而 YT 板 4 条曲线相互交叉,在 240h 反应终止时 1、3 号样品曲线甚至还没有很好地分开。此外,两种 BIOLOG 微孔板所反映的真菌群落代谢活性存在差异,其中 YT 板所反映的代谢活性大小依次为 $1 > 3 > 2 > 4$,而 FF 板则反映为 $3 > 1 > 4 > 2$,区别明显,并且 1、3 号样品真菌代谢活性大于 2、4 号样品。

4 个样品真菌群落代谢相似性聚类分析结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,YT 板反映的第三级聚类相似度为 88.8%,而在 FF 板第三级聚类相似度仅为 77.4%,这表明与 FF 板相比,YT 板所反映出的真菌群落代谢情况具有更大的相似性。此外,在 YT 板中,1 号样品和 3 号样品代谢相似度高达 97.9% 首先聚为一类,而在 FF 板中,表现出最大相似度(89.6%)的是 1 号样品和 4 号样品。

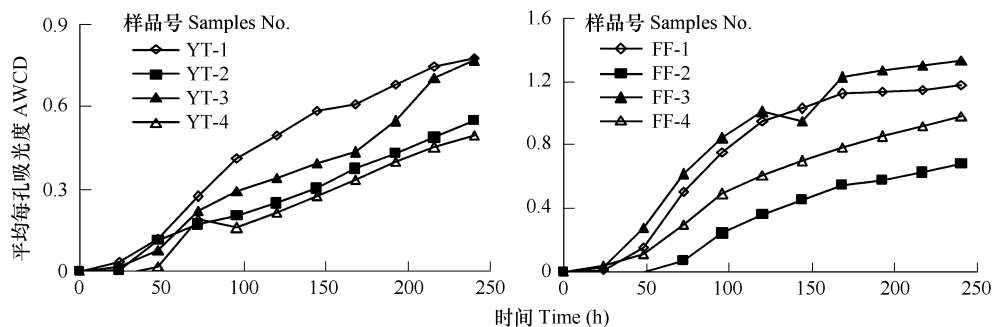


图 1 两种微孔板中 AWCD 值随时间的变化

Fig. 1 Change in AWCD with duration of incubation in 2 BIOLOG plates

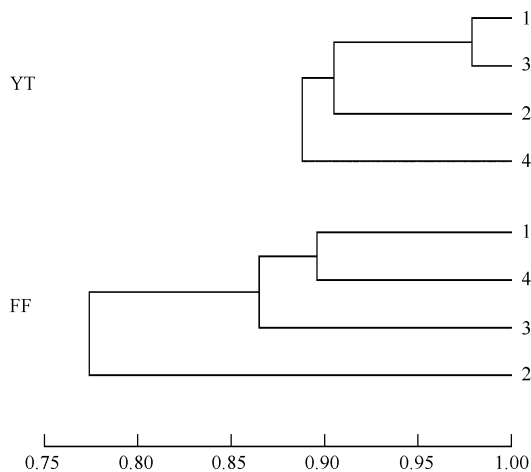


图 2 4 个真菌的群落 BIOLOG 聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of 4 fungal communities from 2 BIOLOG plates

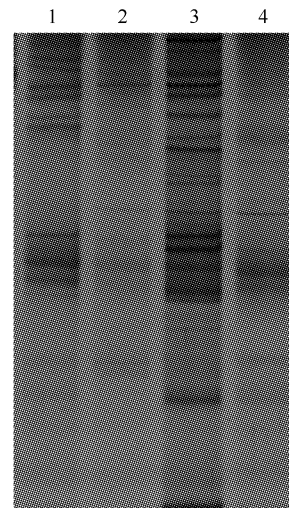


图 3 4 个真菌群落的 PCR-DGGE 分析结果

Fig. 3 PCR-DGGE result for 4 fungal communities

2.1.2 真菌群落结构相似性分析

4 个微生物样品中真菌 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测获得了高数量和高特异性 PCR 产物(390 bp 片段),其 DGGE 指纹图谱见图 3 所示,由图可以看出,4 个真菌群落结构特征存在显著差异,在 DGGE 图谱上呈现了数量不同的复杂条带,其中 3 号样品条带数最多,并且条带数量与亮度均大于其它 3 个样品,其次为 1 号样品,而 2 号和 4 号样品中所反映的条带数量较少,某些带型较弱甚至模糊,这说明 3 号样品真菌种类

最多,2、4 号样品真菌类型则相对较少。基于 DGGE 图谱的条带强度和迁移率计算的真菌群落结构相似性聚类分析结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,PCR-DGGE 结构相似度较低,其中相似性最大的 1、4 号样品的相似度仅为 55%,而在最后一级聚类中,2 号样品与 1、3、4 小类相似度则仅为 26%,表明 4 个样品真菌群落结构差异明显。

2.1.3 真菌群落代谢相似性与结构相似性的对比

对比 PCR-DGGE 结构相似性聚类图及 BIOLOG 代谢相似性聚类图可以看出 4 个真菌群落结构相似度远

小于其代谢相似度,这应该与二者的检测方法和分析方法的有很大关系。此外 FF 微孔板所反映的代谢相似性聚类方式与 PCR-DGGE 所反映的结构相似聚类方式相一致,而 YT 微孔板所反映的代谢相似性聚类方式则与 PCR-DGGE 结构相似性聚类方式存在较大差异,基本不具有可比性,这可能与 YT 板所反映 4 个样品代谢相似度高,区分表达不准确有关。因此,在分真菌菌群代谢相似性特征时,选用 FF 微孔板有可能得到与结构特点更加一致的分析结果。

2.2 超低温冻存对样品真菌群落 BIOLOG 微生态分析的影响

在超低温冻存前后活性污泥样品 BIOLOG 微生态分析结果如表 1 所示,可以看出,超低温冻存处理后, YT 板和 FF 板 AWCD 值、丰富度指数和 Shannon-Wiener 多样性指数均普遍增大,通过方差分析可以看出,除 YT 板 AWCD 值及 FF 板多样性指数值明显增大外,超低温冻存对真菌群落 BIOLOG 分析结果的影响并不显著。此外,从各组数据的 P 值来看,两种板所反映的丰富度指数均无显著性差异。

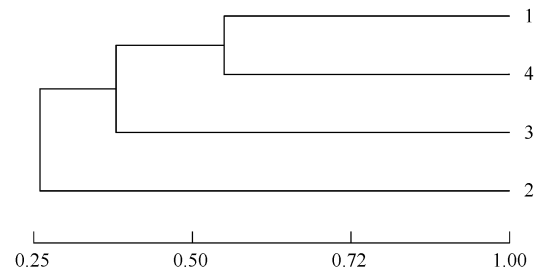


图 4 4 个真菌群落的 PCR-DGGE 聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of 4 fungal communities from PCR-DGGE

表 1 冻存前后真菌群落 BIOLOG 微生态分析差异性结果
Table 1 Different results of BIOLOG analysis from the influence of cryopreservation

样品 Sample	平均每孔吸光度 AWCD	P	丰富度指数 S richness index S	P	多样性指数 H diversity index H	P
YT	0.434 ± 0.031	0.023	88.000 ± 1.000	0.815	4.308 ± 0.017	0.132
YT-D	0.523 ± 0.030		88.333 ± 2.082		4.335 ± 0.018	
FF	0.646 ± 0.027	0.621	69.333 ± 2.309	0.539	4.239 ± 0.023	0.041
FF-D	0.662 ± 0.045		70.333 ± 1.155		4.294 ± 0.004	

YT、FF:新鲜样品微生态分析, YT-D、FF-D:冻存后样品微生态分析 YT、FF: BIOLOG analysis of fresh samples, YT-D、FF-D: BIOLOG analysis of samples after cryopreservation

3 讨论

本研究发现, BIOLOG FF 和 YT 微孔板均能够区分 4 个不同的真菌群落,但其 AWCD 值变化趋势存在一定差异,并且 4 个真菌群落在两种微孔板表现了不同的代谢相似度和聚类方式,这些结果说明由于真菌对这两种微孔板的不同碳源组合的利用方式不同,使两种微孔板表现出了截然不同的真菌群落代谢相似性聚类方式。Widmer 等^[19]利用 RFLP、PLFA、BIOLOG 3 种方法分析 3 份土壤样品中微生物群落。发现在对 3 个微生物群落进行相似性分析时,3 种方法提供了相同的聚类方式,并认为通过相似性聚类分析的方法,微生物群落代谢相似性和结构相似性具有一致性。本研究在此基础上利用 PCR-DEEG 结构相似性聚类图对比两种 BIOLOG 板代谢相似性聚类分析结果,表明 4 个真菌群落结构相似性聚类方式与 FF 板所表达的代谢相似性聚类方式一致,而与 YT 板所表达的代谢相似性聚类方式存在明显的不同。虽然 YT、FF 的碳源组合都是针对真菌设计的,但二者的具体碳源构成差异和碳源利用表达方式的不同,导致其描绘环境微生物样品真菌群落 CLPPs 的能力具有明显区别。此外,研究还表明 YT 微孔板并不能很清楚地区分 4 个真菌群落 CLPPs 表达模糊(相似度均较高)。综上所述,可以认为与 YT 板相比,FF 板更能清楚、准确地表达真菌群落 CLPPs。

相关研究证明冻存处理会不同程度地影响微生物代谢活性,甚至造成某些种类微生物的死亡而丢失部分代谢信息^[14],而采用合适的保护剂和正确的冻融步骤可以在一定程度上减小细胞失活的损失^[20],超低温冻存法作为一种普遍有效的微生物保存方式已为许多菌种保藏研究者所接受,然而,目前尚无研究深入考察超低温冻存对 BIOLOG 微生态分析结果的影响,从而不能确定是否可以将超低温冻存法作为远距离采样时 BIOLOG 微生态分析样品的保存手段。本研究表明,超低温冻存处理主要影响 YT 板 AWCD 值及 FF 板多样性指数值的测定,对两种微孔板的其它分析结果并无显著影响,这说明超低温冻存法可以作为环境微生物样品真菌群落 BIOLOG 微生态分析的一种可行的样品保存方法。此外,由于真菌细胞在冻存过程中细胞形态会发生变化、体积收缩^[21,22],在超低温冻存前后 AWCD 值增大可以理解为冻存处理使真菌细胞脱水收缩,即使在复苏后细胞体积也没有完全恢复到原有大小,从而使浊度相同的新鲜样品和冻存样品其实际菌浓度并不相同,即冻后样品实际加样量大于新鲜样品,最终形成了较大的 AWCD 值。

4 结论

BIOLOG YT、FF 两种微孔板在对 4 个真菌群落分析时,FF 板更能清楚的区分不同真菌群落且提供的相似性聚类图与 PCR-DGGE 分析结果一致,它更适合于分析真菌群落的代谢情况。超低温冻存处理对 BIOLOG 真菌群落碳源利用的丰富度指数均无显著差异。

References:

- [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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2351—2359.
- [2] Xi J Y, Hu H Y, Qian Y. Application of Biolog System in the Study of Microbial Community. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(1): 138—141.
- [3] Hernesmaa A, Björklöf K, Kiikkilä O, *et al.* Structure and function of microbial communities in the rhizosphere of Scots pine after tree-felling. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(4): 777—785.
- [4] Elfstrand S, Hedlund K, Mårtensson 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] Williams M A, Rice C W. Seven years of enhanced water availability influences the physiological, structural, and functional attributes of a soil microbial community. *Applied Soil Ecology*, 2007, 35(3): 535—545.
- [6] Ratcliff A W, Busse M D, Shestak C J. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34(1-2): 114—124.
- [7] Biolog company web: [www. biolog. com](http://www.biolog.com).
- [8] Dobranic, J K, Zak J C. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. *Mycologia*, 1999, 91(5): 756—765.
- [9] Cullings K, Raleigh C, New M H, *et al.* Effects of artificial defoliation of pines on the structure and physiology of the soil fungal community of a mixed pine-spruce forest. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1996—2000.
- [10] Kubicek C P, Bissett J, Druzhinina I, *et al.* Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 38(3): 310—319.
- [11] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16SrRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695—700.
- [12] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 317—322.
- [13] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles—a critique. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(1): 1—14.
- [14] Shishido M, Chanway C P. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30(7): 939—947.
- [15] Rogers B F, Tate III R L. Temporal analysis of the soilmicrobial community along a toposequence in Pineland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(10): 1389—1401.
- [16] Vainio E J, Hantula J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA.

Mycological Research, 2000, 104(8): 927—936.

- [17] Cairns M J, Murray V. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, 17(7): 915—919.
- [18] Zabinski C A, Gannon J E. Effects of recreational impacts on soil microbial communities. *Environmental Management*, 1997, 21(2): 233—238.
- [19] Widmer F, Fließbach A, Laczkó E, *et al.* Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and BiologTM-analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(7-8): 1029—1036.
- [20] Missous G, Thammavongs B, Dieuleveux V, *et al.* Improvement of the cryopreservation of the fungal starter *Geotrichum candidum* by artificial nucleation and temperature downshift control. *Cryobiology*, 2007, 55(1): 66—71.
- [21] Li Z Q, Yuan W. The response of various yeast strains subjected to ultra-low temperature freezing and thawing. *Mycosystema*, 1984, 3(3): 178—187.
- [22] Nei T. Some aspects of freezing and drying of microorganisms on the basis of cellular water. *Cryobiology*, 1973, 10(5): 403—408.

参考文献:

- [2] 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. *微生物学报*, 2003, 43(1): 138~141.
- [21] 李钟庆, 元伟. 各种酵母菌经超低温冻结和融化后的反应. *菌物学报*, 1984, 3(3): 178~187.