

韩庆莉,刘丽,张俊忠,等. Biolog 法解析敌敌畏及其 1 株高效降解菌对草莓果实微生物群落代谢活性的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):295-297.

Biolog 法解析敌敌畏及其 1 株高效降解菌对草莓果实微生物群落代谢活性的影响

韩庆莉¹, 刘丽¹, 张俊忠¹, 赵志瑞², 王栋³, 白志辉²

(1. 西南林业大学林学院/云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南昆明 650224; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

3. 江苏省无锡市中科活力生物技术有限公司, 江苏宜兴 214200)

摘要:利用 Biolog 法研究敌敌畏及其高效降解菌类球红细菌对草莓果实微生物群落代谢活性[用平均每孔颜色变化率(AWCD)衡量]的影响。结果表明,敌敌畏处理的 AWCD 显著低于对照,而敌敌畏+水处理和敌敌畏+菌处理的 AWCD 显著高于对照,其中敌敌畏处理、敌敌畏+水处理和对照 AWCD 变化趋势均为先降后升,敌敌畏+菌处理和水处理变化趋势为先升后降。主成分分析结果表明,敌敌畏处理草莓微生物的代谢活性特征与其他处理差异显著,水处理与敌敌畏+菌处理相近,敌敌畏+水处理与对照相近。

关键词:敌敌畏;类球红细菌;草莓;微生物代谢活性;Biolog 法

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0295-03

植物地上部分(包括叶、茎、花、果等)是一个独立的微环境,称为叶际(phylosphere)^[1],其表面和内部存在大量的各种类型的细菌、丝状真菌、酵母、藻类等微生物,这些在叶际生存的微生物称为叶际微生物^[2]。叶际微生物是植物生态系统中的重要组成部分,具有重要的生态功能,它的结构和功能受外界环境的影响而变化,同时这种变化也会对植物产生持续的作用,而这种作用主要通过群落代谢功能差异来实现^[3]。农药在现代化农业发展过程中发挥了重要作用,然而大量喷施于植株表面的农药在杀灭害虫或植物病原菌时,对叶际微生物群落的结构与代谢活性也会产生直接的影响。敌敌畏为中等毒性有机磷农药,可防治多种草莓害虫。草莓属于浆果,喷施的农药易渗入果肉内部,研究测得推荐浓度下敌敌畏在草莓中 7 d 的残留量仍高于国家蔬菜水果中敌敌畏残留限量标准(0.2 mg/kg)近 10 倍^[4]。类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroies*) EBL0706 菌株是 1 株敌敌畏高效降解菌^[5],其 1 亿 CFU/mL 菌液可有效降低草莓果实敌敌畏残留,7 d 后的敌敌畏为 0.18 mg/kg^[4]。草莓果实微生物属于叶际微生物的范畴,Biolog 法是目前已知的研究微生物代谢功能多样性的很有力的方法。本试验利用 Biolog 法研究敌敌畏及其降解菌类球红细菌对草莓叶际微生物群落代谢活性的影响,从新的角度评价化学农药及其微生物降解菌的生态效应。

1 材料与方法

1.1 材料

供试农药为 77.5% 敌敌畏乳油,天津市华宇农药有限公司生产。

供试微生物为类球红细菌 EBL0706,分离自土壤,保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No. 0645。

供试植物为草莓,种植于北京市昌平区温室大棚,处于果实膨大期,试验时间为 2010 年 3 月,大棚中白天温度约 20 ℃,夜间温度约 10 ℃,相对湿度约 70%,受试区草莓未喷过任何农药。

1.2 试验设计

敌敌畏用水稀释 1 000 倍,类球红细菌用水稀释到 5 亿 CFU/mL。共 5 个处理:喷敌敌畏、喷敌敌畏 2 h 后喷水(敌敌畏+水)、喷敌敌畏 2 h 后喷 5 亿 CFU/mL 类球红细菌(敌敌畏+菌)、喷水、对照(不作任何处理)。敌敌畏、类球红细菌及水的喷施量均以叶面湿润而无液滴落下来为准。待喷洒在草莓上的敌敌畏、菌液、水自然挥发干后,各组均采大小均一的草莓 100 g,计作喷后 0 d 的样,后分别于喷后 1、3、5、7 d 采收样品,3 次重复,样品用冰盒带回实验室,立即做菌体洗脱和收集。

1.3 草莓果实微生物菌体洗脱和类球红细菌的培养

每组分别取草莓果 100 g,放入 1 000 mL 烧杯中,分别加入 300 mL 无菌磷酸盐缓冲液(pH 值 7.0,含 0.1% 吐温-80),均超声波振荡(40 kHz)处理 6 min × 4 次,每次间隔中摇匀,收集洗脱菌液,备用。类球红细菌用无机盐培养液摇瓶培养至菌体浓度 50 亿 CFU/mL^[5]。

1.4 草莓果实微生物群落代谢多样性的 Biolog 分析

采用 Biolog Eco 板碳素利用法研究叶际微生物群落代谢多样性^[6-7]。用无菌的 0.85% NaCl 溶液按 10 倍稀释法把草

收稿日期:2013-05-27

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BA-C25B01);云南省重点学科森林保护学基金(编号:XKZ200905);云南省教育厅基金(编号:2013Y123)。

作者简介:韩庆莉(1975—),女,陕西西安人,博士,讲师,从事果蔬农药残留降解及农药微生态效应研究。E-mail: hanqingli1103@163.com。

通信作者:白志辉。E-mail: zhbai@rcees.ac.cn。

莓果洗脱菌液稀释到 10^{-3} 。用排枪吸取 150 μL 加入到 Biolog Eco 微孔中,于培养箱 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养,每 12 h 在 Biolog 读数器上读数(590 nm)。

1.5 数据分析

1.5.1 平均每孔颜色变化率(average well color development, AWCD) AWCD 反映了微生物的代谢活性,是碳源利用能力的一个重要指标。计算公式如下:

$$AWCD = \sum (C - R) / n。$$

其中: C 是每一个孔里的颜色变化(光密度), R 是微孔板上空白孔的光密度, n 是碳源的数量,Biolog Eco 微孔板的碳源数量为 31,3 个重复。

1.5.2 主成分分析(principal components analysis, PCA) 主成分分析通过将原始变量向新的坐标轴投影,产生新的主成分(PC)来简化变量,方便比较。Biolog 所测 AWCD 值通过 SPSS 13.0 中分析→数据缩减→因子分析进行主成分分析。差异性分析用 SPSS 13.0 中单因素方差分析计算。

2 结果与分析

2.1 敌敌畏和类球红细菌对草莓果微生物代谢活性(AWCD)的影响

所有样品 AWCD 均随培养时间的延长而增大,而且增长规律相同,即培养 24 h 后 AWCD 开始指数增长,96 h 趋于平稳。图 1 列举了喷敌敌畏处理后不同时间所采样品微生物的 AWCD 变化趋势。

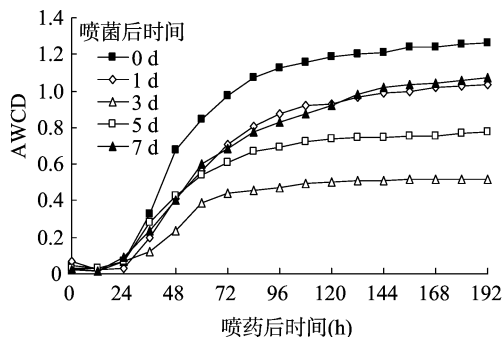


图1 草莓果实微生物代谢活性变化

为了考察不同样品对每种碳源的利用情况,取不同处理不同采样时间的样品培养 120 h 的 AWCD 进行对比分析(图 2)。敌敌畏处理、敌敌畏 + 水处理和对照有相似变化规律,AWCD 先降后升,处理后 3 d 下降到最低,之后开始回升;处理后 7 d 的 AWCD 接近处理后 1 d 的值。不同之处是处理后 3 d 时,敌敌畏处理 AWCD 显著低于对照,而敌敌畏 + 水处理则显著高于对照。因为在处理后 1 ~ 3 d 内,高浓度敌敌畏处理抑制了微生物的代谢活性,AWCD 急剧降低,3 d 后降到最低,之后由于敌敌畏的自然降解作用,草莓果实上的敌敌畏浓度逐渐降低,微生物的代谢活性有所恢复,AWCD 开始回升;敌敌畏 + 水处理中可能是喷水对草莓果实上的敌敌畏浓度有所稀释,稀释后的敌敌畏浓度可作为碳源被微生物利用,使 AWCD 高于对照。敌敌畏 + 菌处理和水处理的 AWCD 具有先升后降变化趋势,其中敌敌畏 + 菌处理 1 d 时,AWCD 即上升到最大,且显著高于对照及其他处理;处理后 3 d,AWCD 下降至与水处理接近。一方面是因为类球红细菌对敌敌畏的降

解和敌敌畏的自然降解作用,使草莓果实上敌敌畏浓度迅速降低到微生物可以利用的浓度;另一方面,死亡的类球细菌可能作为一种碳源被微生物利用,使 AWCD 在处理 1 d 后迅速上升到最大,之后敌敌畏和类球红细菌提供的碳源浓度降低,AWCD 下降;处理后 1、3 d,水处理的 AWCD 均高于对照;处理后 5 d,其 AWCD 与对照接近。可能是因为喷水后增加了果面的湿润度,微生物的代谢活性增强,随着采样时间的延长,水分蒸发,湿润度降低,微生物代谢活性减弱。

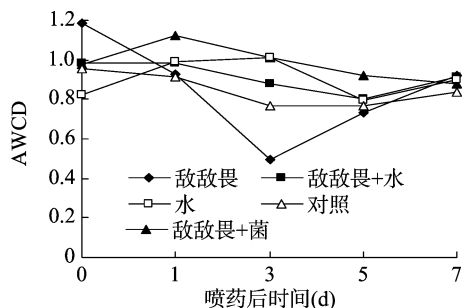


图2 不同处理对草莓果实微生物AWCD的影响

2.2 不同处理微生物对不同碳源的利用程度

AWCD 值的差异主要是由微生物对 Biolog 微孔板上单个不同的碳源利用能力的差异而引起的,研究结果表明,不同处理草莓果实微生物对碳源的利用程度不相同。敌敌畏处理对 β -甲基-D-葡萄糖苷、L-精氨酸、吐温-80 和 D-甘露醇利用程度相对较高,敌敌畏 + 水处理对 D-木糖、D-半乳糖醛酸、L-天冬酰胺酸、D-甘露醇和 N-乙酰基-D-葡萄糖胺利用程度相对较高,敌敌畏 + 类球红细菌处理对 L-精氨酸、D-半乳糖醛酸、L-天冬酰胺酸、D-甘露醇、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、D-纤维二糖和 D-苹果酸利用程度相对较高,水处理对 L-精氨酸、D-半乳糖醛酸、L-天冬酰胺酸、吐温-40、吐温-80、D-甘露醇、4-羟基苯甲酸、L-丝氨酸、D-纤维二糖和 α -D-乳酸利用程度相对较高,对照对 D-木糖、D-半乳糖醛酸、D-甘露醇、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、D-纤维二糖和 α -D-乳酸利用程度相对较高。

2.3 不同处理草莓果微生物碳源代谢特征

由图 3 可知,草莓果实微生物主成分 1(PC1)和主成分 2(PC2)累积方差贡献率分别约为 42%、30%,基本可以认为这 2 个主成分可以表征原来 31 个变量(31 种不同碳源的 Biolog 数据)。结果表明,经过不同处理后,草莓上的微生物形成了不一样的群落结构和特点,从而产生了不同的碳源代谢特性,

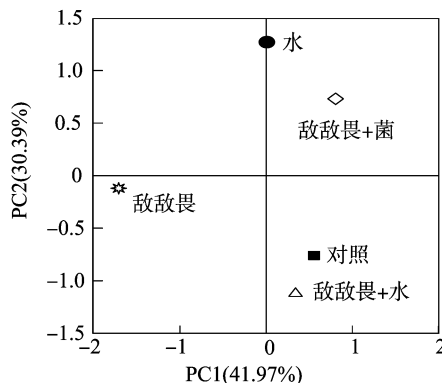


图3 不同处理草莓果实微生物利用碳源的主成分分析结果

处在同一方位表明对微生物群落对碳源代谢特征比较相近,反之则远。敌敌畏处理位于左下方,敌敌畏+菌处理位于右上方,敌敌畏+水处理与对照位于右下方,而水处理位于左上方和右上方之间,由此可见,只有敌敌畏+水处理微生物的代

谢特征与对照接近,而其他处理中微生物的代谢特征都发生了显著的变化,且均相距较远。草莓不同处理主成分分析中相关性显著的主要碳源如表 1 所示。

表 1 草莓果微生物不同处理主成分分析中相关性显著的主要碳源

PC1	<i>r</i>	PC2	<i>r</i>
<i>D</i> -半乳糖醛酸	0.849 056	<i>L</i> -精氨酸	0.960 587
<i>L</i> -丝氨酸	0.802 198	吐温-40	0.844 305
<i>N</i> -乙酰基- <i>D</i> -葡萄糖胺	0.738 389	吐温-80	0.737 929
<i>D</i> -葡萄糖胺	0.826 577	γ -羟基丁酸	0.850 273
<i>D</i> -纤维二糖	0.951 938	<i>D,L</i> - α -磷酸甘油	-0.831 930
葡萄糖-1-磷酸	0.976 976	<i>D</i> -木糖	-0.922 740
α - <i>D</i> -乳酸	0.923 684		
β -甲基- <i>D</i> -葡萄糖苷	-0.746 840		
<i>D</i> -半乳糖酸- γ -内酯	-0.827 590		
丙酮酸甲酯	-0.732 550		
<i>L</i> -苯甲基丙氨酸	-0.781 030		
α -丁酮酸	-0.772 490		

3 结论与讨论

本研究结果表明,敌敌畏在杀死草莓的害虫时,对草莓果实微生物群落的代谢活性产生了一定影响,高浓度敌敌畏对微生物群落代谢活性有抑制作用,反之低浓度有促进作用;敌敌畏的高效降解菌类球红细菌对草莓果实微生物群落代谢活性的促进作用,主要由快速降解作用使草莓上的敌敌畏从高浓度降为低浓度而引起的。主成分分析表明,用敌敌畏、敌敌畏+菌处理草莓果实微生物群落对碳源的代谢特征不同,且与其他处理差异明显。

微生物群落结构决定了其生态功能,群落结构的高稳定性是实现生态功能的重要因素,同时群落结构变化是标志环境变化的重要方面^[8]。叶际微生物具有改变宿主微环境、促生、固氮、防御病害、降解污染物等重要生态功能^[9-11]。植物的叶际直接暴露于空气中,叶际微生物对环境的变化十分敏感。植物叶际微生物能够利用叶面上有限的营养生长,同时这些叶面上的营养物质又决定了其群落结构特征^[12]。目前,Biolog 已广泛应用于土壤微生物群落结构的研究,在叶际微生物群落多样性的研究中有报道,如张保国等用 Biolog 方法分析了菠菜、芹菜、油菜、青花菜和甘蓝等不同蔬菜叶际微生物对多种碳源的利用情况,结果显示,不同种类植物叶际微生物对不同种类碳源的利用能力差异显著,利用碳源能力的大小为菠菜>油菜>芹菜>甘蓝>青菜花;主成分分析表明,芹菜和甘蓝的叶际微生物群落碳源代谢特征比较相近,菠菜和油菜的叶际微生物群落碳源代谢特征比较相似^[13]。本研究用 Biolog 法解析了敌敌畏及其降解菌对草莓果实微生物群落代谢活性的影响。需说明的是 Biolog 是一种可培养方法,它侧重研究微生物群落对底物的利用能力即代谢多样性,通过测定微生物对碳源不同利用度的信息来研究由不同环境条件引起的微生物群落变化,检测到的微生物群落数据不包括休眠群体和不能利用 Biolog 底物的群体^[14],因此在实际研究中可结合多种方法综合应用,以便得到更全面的数据。

参考文献:

[1] Lindow S E, Leveau J H J. Phyllosphere microbiology[J]. Current

Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3): 238-243.

- [2] Lindow S E, Brandl M T. Microbiology of the phyllosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 1875-1883.
- [3] 国辉, 毛志泉, 刘训理. 植物与微生物互作研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(9): 28-33.
- [4] 韩庆莉, 王军民, 韩 祯, 等. 类球红细菌对草莓敌敌畏残留降解研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 286-287, 292.
- [5] 赵 凯, 于 影, 姜 丹, 等. 1 株类球红细菌及其降解敌敌畏的特性[J]. 环境科学, 2009, 30(4): 1199-1204.
- [6] Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, et al. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities[J]. Applied and Environment Microbiology, 1998, 64(4): 1220-1225.
- [7] Jena S, Jeanmeure L F C, Wichukorn S D, et al. Carbon substrate utilisation profile of a high concentration effluent degrading microbial consortium[J]. Environmental Technology, 2006, 27(8): 863-873.
- [8] 刘开朗, 王加启, 卜登攀, 等. 环境微生物群落结构与功能多样性研究方法[J]. 生态学报, 2010, 30(4): 1074-1080.
- [9] Sandhu A, Halverson L J, Beattie G A. Bacterial degradation of air-borne phenol in the phyllosphere[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(2): 383-392.
- [10] Leveau J H, Lindow S E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(6): 3446-3453.
- [11] Azevedo J L, Maccheroni J W, Pereira J O, et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2000, 3(1): 40-65.
- [12] Knoll D, Schreiber L. Plant-microbe interactions; Wetting if IVY (*Hedera helix* L.) leaf surfaces in relation to colonization by epiphytic microorganisms[J]. Microbial Ecology, 2000, 40(1): 33-42.
- [13] 张保国. 农药胁迫对叶际微生物群落的影响[D]. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 2008.
- [14] 田雅楠, 王红旗. Biolog 法在环境微生物功能多样性研究中的应用[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(3): 50-57.