

提取杨树人工林土壤微生物菌体细胞的 4 种方法

Four methods to extract soil microbes from poplar plantation

王科选^{1,2}, 秦媛^{2,3}, 潘雪玉^{2,4}, 靳微², 杨预展², 袁志林^{1,2,*}

¹ 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院, 北京; ² 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州; ³ 现工作单位: 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京; ⁴ 现工作单位: 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广州

*通讯作者邮箱: yuanzl@caf.ac.cn

摘要: 本实验采用超声波、搅拌器 2 种物理方法对微生物、土壤颗粒物和团聚体等进行分散; 采用焦磷酸钠、吗啉乙磺酸一水合物 2 种化学分散剂处理方法对土壤颗粒进行分散和预处理后, 再分别通过 2 步离心法获得菌体样品。即将杨树人工林土壤微生物中的菌体细胞提取出来获得土壤微生物菌群。实验得出超声波、搅拌器 2 种物理处理分散方法和焦磷酸钠、吗啉乙磺酸一水合物 2 种化学分散剂方法均可提取出菌体样品。

关键词: 杨树, 菌体细胞提取, 超声波, 搅拌器

材料与试剂

1. 无菌采样袋
2. 无菌锡箔纸
3. 50 ml 无菌离心管
4. 250 ml 无菌离心瓶
5. 土壤样品
6. 0.05 M 焦磷酸钠溶液 (上海阿拉丁生化科技有限公司, Aladdin, S108847-500g, 见溶液配方)
7. 2.5 mM 吗啉乙磺酸一水合物 (MES) 溶液 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, Aladdin, M105074-25g, 见溶液配方)
8. 0.85%的生理盐水 (见溶液配方)

仪器设备

1. 20 目筛
2. 无菌三角瓶
3. 定性滤纸
4. 超净工作台
5. 天平
6. 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海申安医疗器械厂, SHENAN, LDZF-50KB-II)
7. 超声波细胞破碎仪 (上海净信实业发展有限公司, 净信, JY 92-II)
8. 搅拌器 (Waring 公司, 美国 Waring, 8011S)
9. 恒温水浴振荡器 (金坛市科析仪器有限公司, 科欣仪器, SHA-B)
10. 高速落地离心机 (赛默飞世尔科技有限公司, Thermo, LYNX 4000)
11. 移液枪

实验步骤

1. 土样采集

采集 1-2 年生健康树木地下部分根部周围 10 cm 以内的土壤, 放入无菌采样袋中, 周围放置冰袋, 且在 48 h 内带回进行处理。

2. 土壤预处理

2.1 取 200 g 的土壤样品平铺于无菌锡箔纸上, 在超净台吹风状态下进行风干 (每隔 15 min 用手上下翻动一次)。

2.2 风干后, 土样过 20 目筛。

2.3 在天平上称取 50 g/份备用。

3. 四种处理土样的方法 (以下四种处理方法至少设置 3 个重复) (Lindahl, 1996; Lindahl and Bakken, 1995; Wagner *et al.*, 2014)

3.1 超声波处理法:

在 500 ml 0.85%生理盐水中加入 50 g 土样, 上下颠倒混匀。用超声波细胞破碎仪分散土壤颗粒, 设置功率 60 W, 工作和间隔时间为 5 s/5 s, 处理 12 次。

3.2 搅拌器处理法:

取 500 ml 0.85%生理盐水作为分散剂, 向其中加入 50 g 供试土样, 使用搅拌器对土壤样品充分搅拌混匀, 再在 20,000 r/min 速度下搅拌 1.5 min。

3.3 焦磷酸钠处理法:

在无菌三角瓶中加入 50 g 土样和 250 ml 0.05 M 焦磷酸钠溶液 (焦磷酸钠需在 121 °C 高压灭菌 25 min), 将其置于 26 °C 水浴恒温振荡器 150 r/min 振荡 2 h 左右。

3.4 MES 处理法:

在无菌三角瓶中加入 50 g 土样和 250 ml 0.05 M MES 溶液(MES 需在 121 °C 高压灭菌 25 min), 置于 26 °C 水浴恒温振荡器 150 r/min 振荡 2 h 左右。

4. 菌体样品的提取

4.1 将上述四种处理方法所得土壤悬浮液样品分别转移至 250ml 无菌离心瓶中, 使用离心机 569 *xg*, 4 °C 离心 5 min。

4.2 取上清液转移至新的 250 ml 无菌离心瓶中, 6000 *xg*, 4 °C 离心 20 min, 弃上清后获得菌体沉淀样品。

4.3 用移液枪吸取约 10 ml 无菌生理盐水将管壁上的菌体重悬浮并转移至 50 ml 无菌离心管中, 再次 6000 *xg* 离心 20 min。

4.4 弃上清后将离心管倒扣在无菌滤纸, 吸掉残留液体, 所得沉淀物即为菌体细胞。

结果与分析

1. 不同提取方法对微生物多样性和群落结构的影响

1.1 样品 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性是指一个特定区域或生态系统内的多样性, 是反映丰富度和均匀度的综合指标。通过 Alpha 多样性指数可比较和衡量四种不同方法提取所得细菌、真菌物种的丰富度、均匀度与原始土壤的差异, 包括 observed species 指数、Shannon 指数、Simpson 指数以及 Chao1 指数等 (见表 1, 表 2)。Observed species 指数和 Chao1 指数表示样品中所含样品可操作分类单元 (operational taxonomy unit, OTU) 数目, 数值越大代表物种越多; Shannon 指数和 Simpson 指数代表物种多样性程度, 指数越大代表物种丰富度和均匀度较高。

Chao1 是用 Chao1 算法估计群落中含 OTU 数目的指数, 在生态学中常用来估计物种总数。计算公式为 $chao1 = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$, 其中 S_{obs} 为样本中观察

到的 OTU 数, n_1 为只有一条序列的 OTU 数目, n_2 为只有两条序列的 OTU 数目。

如表 1 所示, 原始土壤样品组所含细菌物种种类最多, 与对照相比, 四种处理后均损失 400-500 余种 OTU, 其中超声波处理后损失最大, MES 和焦磷酸钠两种化学分散剂处理后损失较少; 表 2 中, MES 分散剂和超声波处理后真菌物种种类损失较少, 与对照组 Observed species 指数和 Chao1 指数差异不大, 但是焦磷酸钠分散剂和搅拌器处理后损失较大。

表 1. 五种样品细菌 Alpha 多样性分析 (平均值 \pm 标准差)

	Observed species 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数
原始土壤样品	2207.20 \pm 28.78	10.17 \pm 0.07	1.00 \pm 0.0004	4196.86 \pm 76.59
MES 处理	1826.33 \pm 55.08	9.26 \pm 0.16	0.99 \pm 0.0011	3721.41 \pm 92.72
焦磷酸钠处理	1791.67 \pm 95.70	9.46 \pm 0.32	0.99 \pm 0.0032	3614.35 \pm 96.99
超声波处理	1665.00 \pm 74.07	8.79 \pm 0.39	0.98 \pm 0.0061	3210.79 \pm 80.45
搅拌器处理	1734.33 \pm 29.63	8.97 \pm 0.49	0.99 \pm 0.0053	3558.14 \pm 49.85

表 2. 五种样品真菌 Alpha 多样性分析 (平均值 \pm 标准差)

	Observed species 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数
原始土壤样品	590.60 \pm 31.69	5.33 \pm 0.36	0.89 \pm 0.037	664.68 \pm 23.24
MES 处理	571.67 \pm 29.09	5.67 \pm 0.38	0.94 \pm 0.013	640.64 \pm 29.06
焦磷酸钠处理	397.33 \pm 26.31	5.69 \pm 0.23	0.96 \pm 0.009	536.94 \pm 40.26
超声波处理	530.00 \pm 67.80	5.86 \pm 0.84	0.96 \pm 0.006	613.38 \pm 93.11
搅拌器处理	414.00 \pm 81.50	5.82 \pm 0.46	0.93 \pm 0.045	569.38 \pm 91.78

1.2 样品 Beta 多样性和聚类分析

样品 Beta 多样性能反映群落物种组成差异的大小。分别使用三种 Euclidean、Unweighted unifrac 和 Weighted unifrac 不同的算法计算细菌、真菌样品间的距离, 得到的样品距离矩阵后, 使用 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) 方法对样品进行聚类, 分析结果如图 1 所示, 其中 A-C、D-F 分别为三种算法下细菌、真菌多样性聚类分析树。

结果显示,焦磷酸钠处理组中的细菌群落结构与原始土壤最接近,其他处理组与对照组相比距离较远,且组间差异不明显(图 1C);搅拌器处理后所得菌群中真菌物种与原始土壤最接近,其余三种处理组与对照相差较大,组间差异不明显(图 1F)。

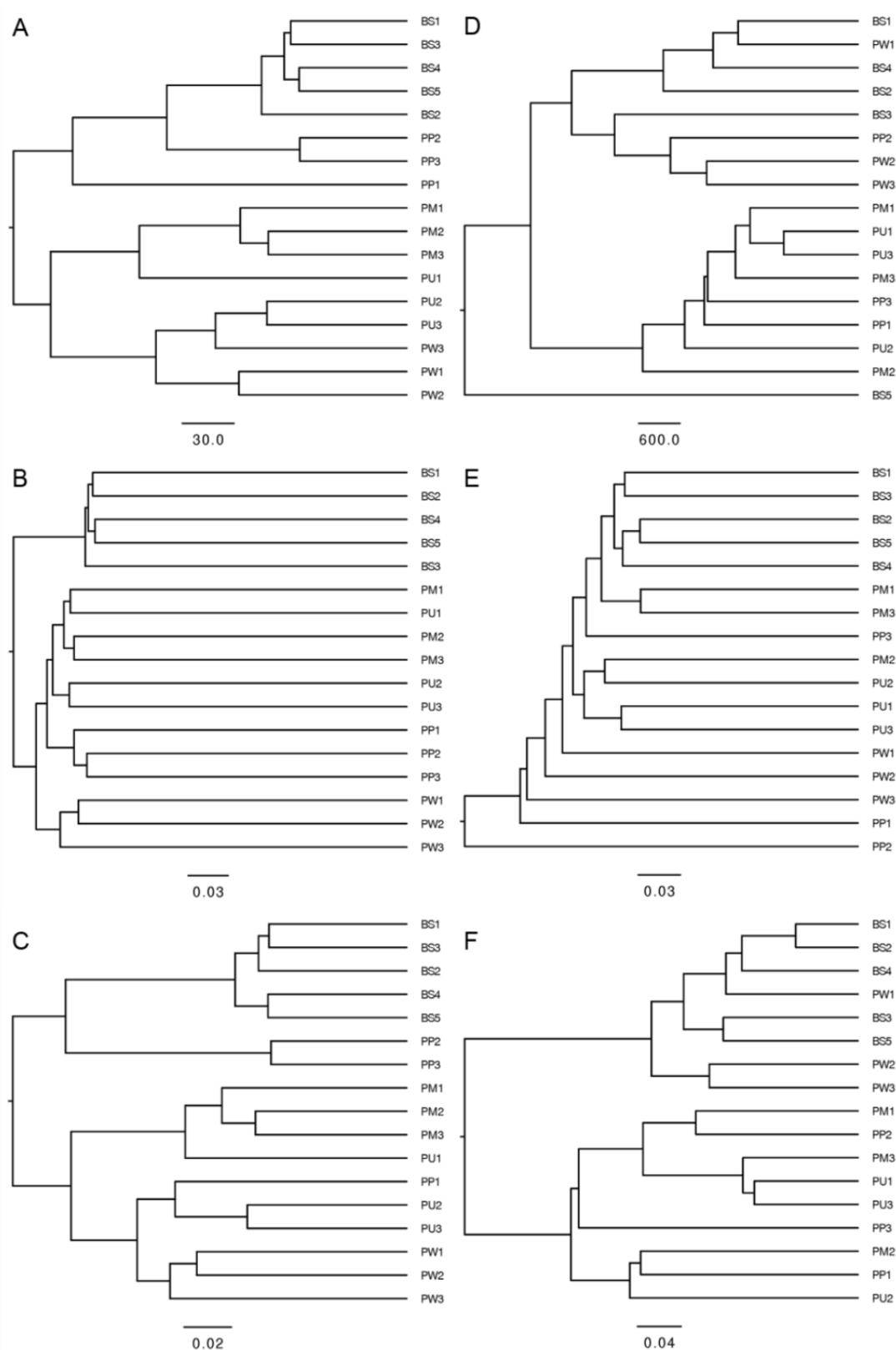


图 1. 基于 3 种矩阵算法的原始土样与不同处理样品细菌 (A-C) 真菌 (D-F) 群落结构 UPGMA 聚类树。

图中 A、D 为 Euclidean 算法；B、E 为 Unweighted unifracs 算法；C、F 为 Weighted unifracs 算法；字母 PP：焦磷酸钠处理组；PM：MES 处理组；PW：搅拌器处理组；PU：超声波处理组；BS：原始土壤样品；数字为样品编码

1.3 样品主坐标分析

主坐标分析（principal coordinates analysis, PCoA）是一种用于观察组间数据相似性或差异度的方法。基于 Weighted unifracs 算法对原始土壤和四种不同处理后样品微生物群落组成进行主坐标分析。结果表明，不同提取方法所得微生物与原始土壤中微生物群落差异较大。细菌群落主坐标分析过程中（如图 2A），原始土壤处理聚集在分析图左侧，其余四种处理组样品聚集在分析图右侧，这表明提取过程对土壤细菌群落的结构影响较大；真菌群落主坐标分析过程中（如图 2B），原始土壤样品相对和搅拌器处理组样品相对聚集于分析图右侧，其余三组样品分散于分析图左侧，表明和其他三组样品相比，使用搅拌器的物理分散法对土壤真菌菌落的影响较小。

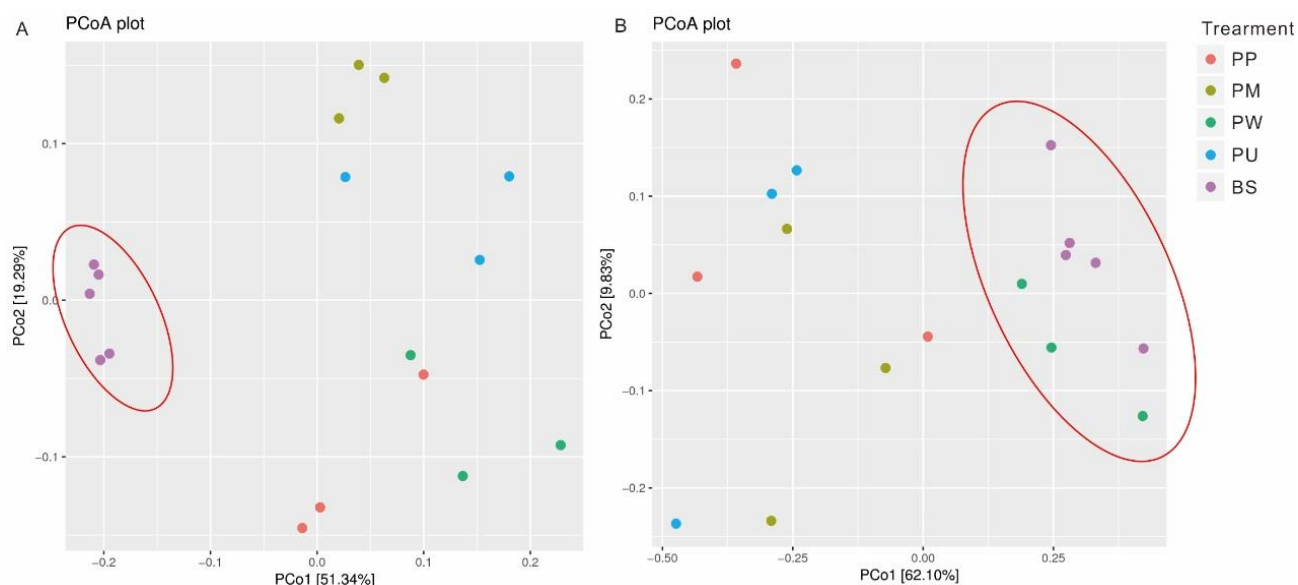


图 2. 不同处理组细菌 (A)、真菌 (B) 样品群落结构主坐标分析

PP：焦磷酸钠处理组；PM：MES 处理组；PW：搅拌器处理组；PU：超声波处理组；BS：原始土壤样品

2. 不同提取方法对可培养细菌和真菌数量的影响

采用平板计数法分别对四种不同提取方法所得菌群中可培养细菌、可培养真菌数量进行了比较，如下图 3。结果显示，不同提取方法对可培养微生物的影响较大（图 3A-3H）。从图 3I 可看出，使用搅拌器处理所得可培养细菌数量显著高于其他三种处理（ $P<0.01$ ），而 MES 溶液处理后所得可培养细菌数量最少。从图 3J 可看出，使用焦磷酸钠溶液处理后所得可培养真菌数量最多，显著高于其他三种处理（ $P<0.05$ ），其他三种处理组间差异不显著。

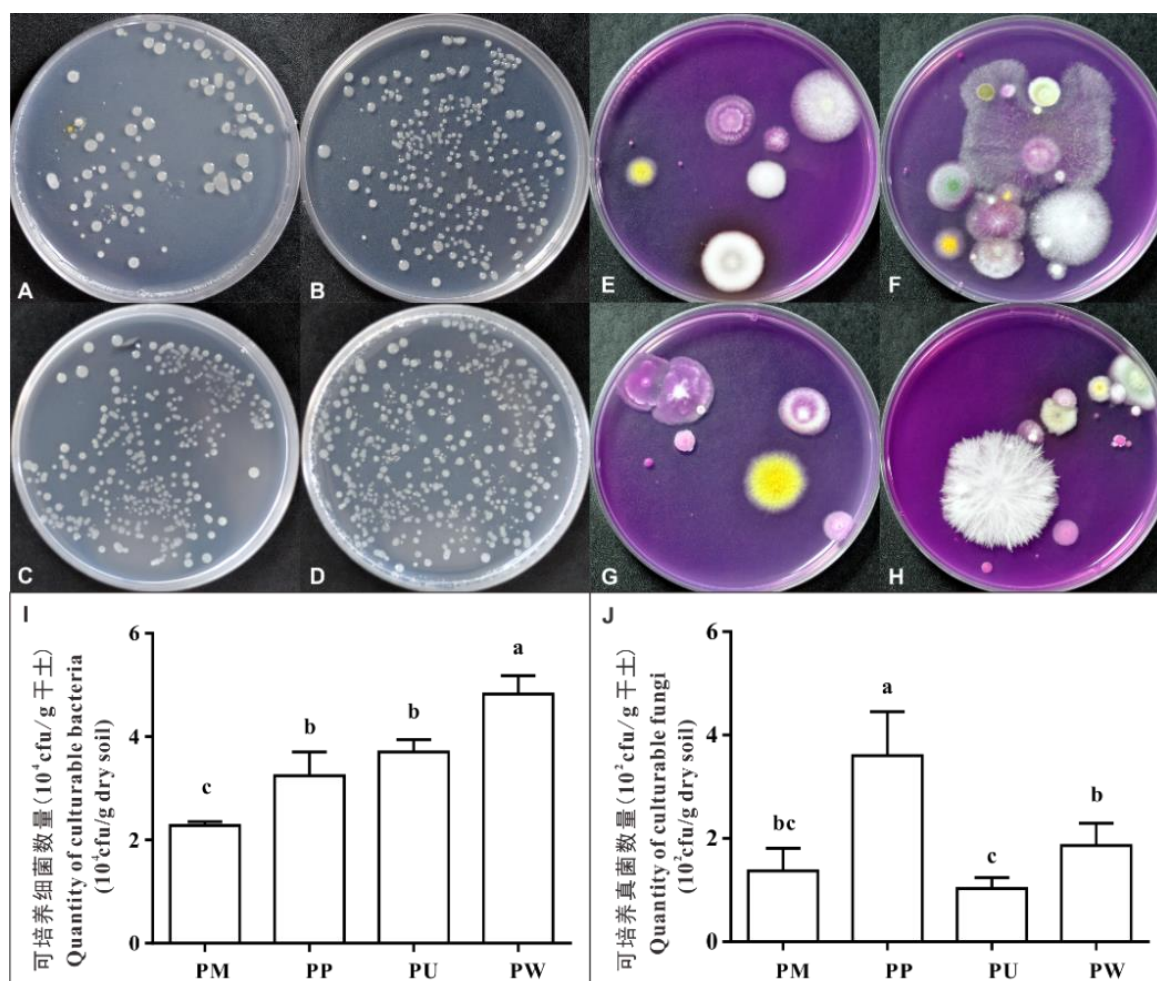


图 3. 不同处理组间可培养微生物数量的差异

A-D、E-H 分别依次代表 MES 处理组（PM）、焦磷酸钠处理组（PP）、超声波处理组（PU）和搅拌器处理组（PW）可培养细菌、真菌菌落形态。柱状图上方小写字母表示不同处理间可培养微生物数量显著性差异（ $P<0.05$ ）。

3. 不同提取方法对微生物群落代谢活性的影响

四种样品细菌、真菌群落在 BIOLOG ECO 板、FF 板中培养 7 天内的 AWCD 值分析情况如图 4 所示。AWCD 值是衡量微生物利用单一碳源能力和微生物代谢活性的指标，即微生物数量越多，碳源利用的程度越高，AWCD 值越大，增长速率越快。

从图 4A 中可看出，四种处理所得菌群接种 ECO 板后，搅拌器处理组和焦磷酸钠处理组的 AWCD 值稍高于其他两种处理组，超声波处理组最低，但差异不显著；从图 4B 中可看出，FF 板中的 4 条变化曲线分离情况较为明显，其中焦磷酸钠处理组样品 AWCD 值最高。无论是 ECO 板还是 FF 板，超声波和 MES 溶液处理组的 AWCD 值均维持在较低水平。

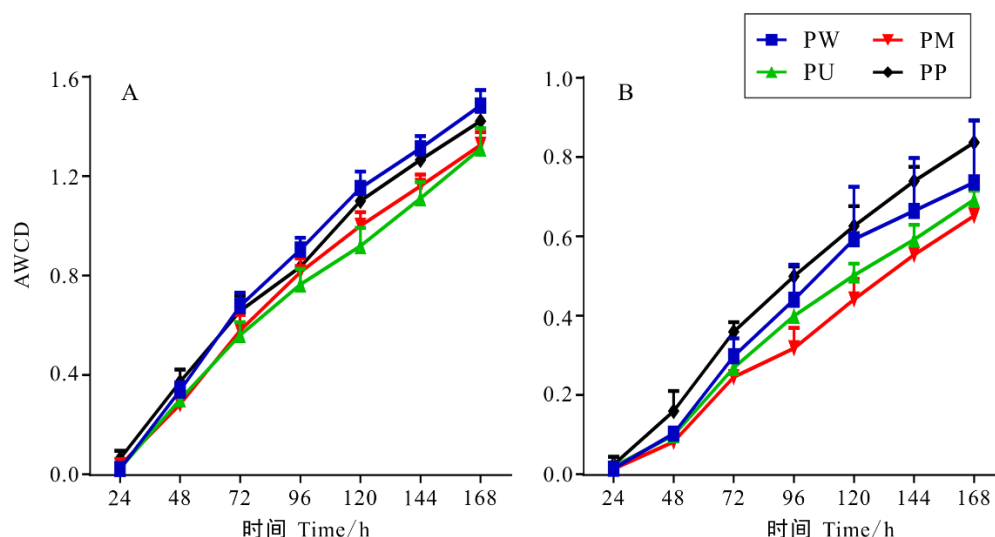


图 4. ECO 板 (A)、FF 板 (B) 中不同处理组微生物培养过程中 AWCD 动态变化
PP: 焦磷酸钠处理组; PM: MES 处理组; PW: 搅拌器处理组; PU: 超声波处理组

4. 不同提取方法比较

超声波处理后所得样品可培养细菌数量较多 (Lindahl et al.,1995; Priemé et al.,1996)，但高通量测序结果表明其细菌群落的 OTUs 数量和物种多样性最低；BIOLOG 微平板分析表明其细菌、真菌菌群代谢活力、多样性指数和均匀度均在较低水平。

搅拌器处理组对土壤分散能力明显高于超声波处理，其处理后所得样品的细菌、真菌多样性虽与超声波处理组无明显差异 (Lindahl et al.,1995; Priemé et al.,1996)，但其真菌群落结构与原始土壤最为接近。此外，搅拌器处理组所得可培养细菌数量

显著高于其他三种处理，且 BIOLOG ECO 板分析结果显示菌群代谢活性较高，说明该处理方法对细胞损伤不大。

MES 处理组所得细菌、真菌物种数量最大且多样性较丰富，但与原始土样微生物群落结构组成相差较大，且可培养细菌和真菌数量显著低于其他处理组；BIOLOG 分析也表明其细菌、真菌菌群代谢活性较低，不难看出 MES 溶液在一定程度上破坏了微生物细胞，影响了其生理和代谢功能。

焦磷酸钠处理后所得细菌群落结构组成与原始土样最接近，且群落多样性较为丰富，均匀度较高；虽然其真菌组分中 OTUs 数量明显较少，但可培养真菌的数量却显著高于其他三个处理组，且 FF 真菌微平板分析中 AWCD 值反映了真菌菌群利用碳源能力、代谢活性与群落多样性均最高，可见焦磷酸钠可能对细菌细胞造成了一定的损伤，导致细菌代谢活性和可培养细菌数量有所降低，但可能对真菌细胞代谢活性无明显影响。

综上，四种不同提取方法对微生物种类、代谢活性等提取结果均有不同程度的影响，其中超声波处理和 MES 溶液处理提取效率和效果较差，焦磷酸钠处理组和搅拌器处理组相对较好(秦媛等，2018)。因此将这两种提取方法相结合进行适当优化预期有较好的提取效果，可用于植物根际微生物组工程实验体系。

溶液配方

1. 0.05 M 焦磷酸钠

称取 13.295 g 的焦磷酸钠溶于 1 L 纯净水中（用 HCl 调节 PH=8），121 °C 高压灭菌 25 min。

2. 2.5 mM 吗啉乙磺酸一水合物（MES）溶液

称取 0.533 g 的 MES 溶于 1 L 纯净水中（用 KOH 调节 PH=5.7），121 °C 高压灭菌 25 min。

3. 0.85%的生理盐水

称取 8.5 g 的氯化钠溶于 991.5 ml 的纯净水。

参考文献

- 秦媛，潘雪玉，靳微，陈连庆，袁志林. (2018) [杨树人工林土壤土壤微生物群落](#) 4

[种提取方法比较](#). 林业科学, 54: 169-176.

2. Lindahl, V., Aa, K., and Olsen, R. A. (1996). [Effects on microbial activity by extraction of indigenous cells from soil slurries](#). *FEMS Microbiology Ecology* **21**: 221-230.
3. Lindahl, V., and Bakken, L. R. (1995). [Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil](#). *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 135-142.
4. Priemé, A., Bonilla Sitaula, J. I., Klemetsson, Å. K., and Bakken, L. R. (1996). [Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles](#). *FEMS Microbiology Ecology* **21**: 59-68.
5. Wagner, M. R., Lundberg, D. S., Coleman-Derr, D., Tringe, S. G., Dangl, J. L. and Mitchell-Olds, T. (2014). [Natural soil microbes alter flowering phenology and the intensity of selection on flowering time in a wild Arabidopsis relative](#). *Ecol Lett* **17**(6): 717-26.
6. Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Statist* **11**:265-270.

致谢

感谢中国林业科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(子课题)(重点项目 CAFYBB2017ZB001)、2016 年度留学回国人员科技活动项目择优资助经费和国家自然科学基金优秀青年项目(31722014)对本研究的支持。