BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用*

郑　华　欧阳志云†　方治国　赵同谦
(中国科学院生态环境研究中心系统生态重点实验室, 北京　100085)

摘　要　微生物功能多样性信息对于明确不同环境中微生物群落的作用具有重要意义, 而微生物群落的定量描述一直是微生物学家面临的最艰巨的任务之一。目前, 以群落水平碳源利用类型为基础的 BIOLOG 氧化还原技术为研究土壤微生物群落功能多样性提供了一种简单、快速的方法, 并得以广泛应用。但它仍然是一种以培养为基础的方法, 显示的代谢多样性类型也不一定反映整个土壤微生物群落的功能多样性。因此, 这种方法优点明显, 缺陷也存在, 并且在应用过程中还有很多关键的操作要点与技巧。本文综述了 BIOLOG 研究土壤微生物群落功能多样性的原理、BIOLOG 研究土壤微生物群落功能多样性的方法与技巧、应用过程中容易产生的问题及可能克服的办法, 同时还提出了值得进一步研究的问题。旨在促进对 BIOLOG 测定土壤微生物群落功能多样性的了解, 为正确运用这种方法开展土壤微生物群落功能多样性研究提供科学依据和理论指导。

关键词　BIOLOG; 土壤微生物群落; 功能多样性
中图分类号　S714.6　　文献标识码　A

微生物功能多样性信息对于明确不同环境中微生物群落的作用具有重要意义[1]。而平板上肉眼计数的分类技术只检测到环境样品中的一小部分微生物使得微生物群落的定量描述成为微生物学家面临的最艰巨的任务之一[2]。目前, 有两种方法在此研究领域中得到认可: 利用微生物 rRNA (rDNA) 和环境样品中磷酸脂肪酸分析微生物群落功能多样性[3]。但是这两种方法要求的劳动强度大、时间长、技术含量较高, 难以在较短的时间内分析较多的样品, 以 BIOLOG 微孔板碳源利用为基础的定量分析为描述微生物群落功能多样性提供了一种更为简单、更为快速的方法[1, 4~8], 并广泛应用于评价土壤微生物群落的功能多样性: 不同土壤类型[9]、不同植物物种下的土壤[10]、不同管理策略下的农业土壤[11, 12]和不同植被的根际土壤[13]。但这种方法存在选择培养问题, 只有能够利用 BIOLOG 微孔板上碳源的微生物才能反映出来, 也只代表了整个微生物群落的一部分, 这种代谢多样性类型也就不一定反映整个土壤微生物群落的功能多样性[6, 14~17], 因此许多研究者对此方法的利与弊及其准确性、重现性开展了广泛研究, 本文对这种方法应用于土壤微生物研究的进展和应用技巧作一综述, 旨在促进对 BIOLOG 测定土壤微生物群落功能多样性的了解, 为正确运用这种方法开展土壤微生物群落功能多样性研究提供科学依据和理论指导。

1　BIOLOG 研究土壤微生物群落功能多样性的原理

BIOLOG 研究微生物的载体是微孔板 (MicroPlate), 每板包含 96 个孔, 其中 95 个孔中加入了 95 种单一碳源和四唑染料, 另外一个未加碳源的孔中加水作为对照。微生物接种到微孔板上的孔中后, 孔中的微生物就可能利用其中的碳源而发生氧

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX3-SW-424)、国家重点基础研究发展规划项目 (G2000046807) 和国家自然科学基金项目 (30230090) 资助

† 通讯作者, E-mail: zyouyang@mail.rcees.ac.cn; 电话: 010-62849191
作者简介: 郑　华 (1974~), 男, 湖南岳阳人, 博士研究生, 主要从事人类活动对生态系统的胁迫效应和恢复生态学等领域的研究。E-mail: zhenghua27@sohu.com

收稿日期: 2003-09-01; 收到修改稿日期: 2003-12-01

表 1　BIOLOG 研究土壤微生物群落功能多样性的载体

Table 1　The carrier for study on soil microbial community function diversity

类　型 Type	组　成 Composition	特　点 Characteristic
革兰氏阴性板	适合于该类微生物的 95 种碳源, 组成主要为: 氨基酸(20 种)、醣类(28 种) 和羧酸(24 种)。该类板碳源的选择偏向于简单的碳水化合物[10]	(1) 加入的抗生素使革兰氏阳性细菌和真菌对该板上颜色剖面的作用极小[10,41]。(2) 实际上其中仅有少数碳源对土壤样品中的群落分离有作用[4]。(3) 土壤研究中应用最为广泛的一种微孔板[19], 板中的许多有机酸、醣类和氨基酸是根系分泌物的组成成分[4] 或其结构与自然界的物质结构相似[20]
生态板	生态板利用更多的与生态有关的化合物, 具有 31 种培养基, 其组成主要为: 氨基酸(6 种)、醣类(10 种) 和羧酸(7 种)	(1) 其中的 6 种培养基在革兰氏阴性板中没有[19]; (2) 至少有 9 中是根系分泌液的组分[4], 这些培养基更适合于土壤微生物群落功能多样性研究
MT 板	研究者根据研究需要利用自然物质作培养基, 如植物根系分泌液[4]。	MT 板包含有氧化还原作用的化学药品, 但没有培养基, 允许研究者根据具体的研究需要生产专用型板
真菌板	包含能够被真菌转变的四唑染料和抑制细菌但不影响真菌生长[3,21] 的抗生素(如: 100 μg ml^{-1}利福平; 50 μg ml^{-1}链霉素)	专门用作真菌实验 BIOLOG 真菌板(FF)
SF-N 和 SF-P 板	共有两种类型: (1) 一种包含有 GN 和 GP 同样的相应碳源, 但缺乏四唑染料; (2) 另一种有四唑染料二甲基臭硫 联苯四唑溴化物(MTT)	(1) 真菌不能还原微孔板中四唑染料[3,7] 使得其不能对革兰氏阴性[10]、革兰氏阳性、MT 和生态板的内颜色反应剖面起作用。能够通过孔中的浊度变化来评价真菌的活动[21]。(2) MTT 能与真菌待测液一起加入到没有染料的 BIOLOG 板中, 将其中的颜色变化用作评价真菌活动性的一个指标[3]

化还原作用, 而孔中一旦有电子转移这种四唑染料就会变为紫色, 同时也表明这种碳源被接种到其中的微生物所利用[18]。Biolog 板最初就是根据其中具体类型的代谢指纹来鉴定已分离纯化的微生物物种。BIOLOG 数据库包含有鉴定 1 449 种细菌和酵母的信息。1991 年, Garland 和 Mills 首次将 Biolog 微孔板用来描述微生物的群落特征, 该项工作引起了许多微生物生态学研究者的广泛关注[9]。

将 Biolog 微孔板用来研究土壤微生物群落功能多样性的原理与其鉴定单一物种的反应原理相似, 不同的是: 前者利用以群落水平(而不是单一物种) 碳源利用类型为基础的 Biolog 氧化还原技术来表述土壤样品微生物群落特征[9], 运用主成分分析(PCA) 或相似类型的多变量统计分析方法展示不同微生物群落产生的不同代谢多样性类型。其理论依据是: BIOLOG 代谢多样性类型的变化与群落组成的变化相关[14]。

根据测定对象的不同, 还研制出了除革兰氏阴性板之外的不同类型的 Biolog 板用于研究土壤微生物群落的功能多样性, 如生态板(EcoPlates)、MT 板(MT plates)、真菌板、SF-N 和 SF-P 板等(表 1)。

2　BIOLOG 研究土壤微生物群落功能多样性的方法与技巧

应用 BIOLOG 研究土壤微生物群落功能多样性的方法较为简单, 但由于对结果产生影响的因素很多, 在具体的操作过程中也存在许多排除干扰因素的技巧, 具体说明如表 2 所示。

3　BIOLOG 研究土壤微生物群落功能多样性中的问题及其克服方法

3.1　BIOLOG 研究土壤微生物群落功能多样性中易产生的问题

在不同地点和同一地点的不同时间微生物群落的物种组成、利用不同 BIOLOG 孔中培养基的呼吸活跃细胞(还原 BIOLOG 染料的潜在能力) 的相对丰富度很不相同。而 BIOLOG 微孔板的颜色反应既依赖于细胞数量/ 生物量, 又依赖于其生理活性(氧气

表 2 应用 BIOLOG 研究土壤微生物群落功能多样性的操作流程与关键技术

Table 2 Operational flow and skills for study on soil microbial community functional diversity

操作流程 Operation flow	操作要点 Operation point	关键技术 Key technology
土壤样品采集与接种	通过多设重复的办法来考虑群落内的变异。每一处理中尽量多布点取样, 然后将取得的样品放到一块混匀以减少地点异质性, 单个子样品再从放在一块的样品中抽取, 用灭菌的磷酸缓冲液[1] 或 0.145 mol L^{-1} NaCl[23] 制成悬浮液, 将 3 个子样品的悬浮液分别接种到 3 个板中作为 3 次重复。用有土壤颗粒的土壤悬浮液接种要比用静置或离心后的上清液接种好。样品的背景颜色可以通过减去零时间点孔的初始读数予以纠正[21,24]	(1) 从取样到接种微孔板的时间应缩短到最小。因为土壤样品的采集[25]、冷藏或冷冻保存[26]、接种前的预处理等[1] 均可能使微生物群落发生变化。(2) 比较不同生境或不同微生物群落时应保持样品体积或重量基本一致。这要求先进行水分测定以缩短样品采集与接种之间的时间差[1]。(3) 在较高的接种密度下, 微孔板反映的结果更客观, 但预先要确定合适的浓度以便减少由样品中可溶解的碳源产生的额外的颜色反应[1]。(4) 用土壤悬浮液液体部分接种培养产生的微生物物种要比用泥沙或直接用土壤接种培养产生的微生物物种要少得多[27,28], 静置或离心后的上清液接种会导致沾附在土壤颗粒上的细菌和真菌菌丝的损失
微孔板的培养	大多数 BIOLOG 细菌板是利用 15~28℃之间的某一固定温度进行培养[21,29]	(1) 温度是影响微孔板培养的一个关键因素。将多个板分别放在不同的温度下培养, 既可获得一个地点的微生物群落功能多样性信息, 又可获得一个群落对于季节温度波动所作出功能反应的信息[19]。(2) 氧气浓度是影响微孔板培养的另一因素。培养过程中应保持孔中的氧气分布均匀。在厌氧的条件下没有糖产生[16]。细胞的氧气消耗速率能够影响颜色反应速率[30]
微孔板读数	在 590 nm 波长下监测微孔板[31]。其数据通过单孔光密度或平均孔颜色反应(Average well color development, AWCD= $\sum(C-R)/n$, C 与 R 分别是培养基孔和对照孔的光密度, n 是碳源数目) 来表达	读数前培养时间的长短能显著影响读数结果[9,14,30]。单孔的反应随时间而变化, 读数前的培养时间太短, 一些孔的颜色反应可能看不到; 培养时间太长, 一些孔将达到饱和水平。并且孔与孔之间颜色反应时间关系不同, 不存在单个最优读数时间, 在最短和最长两个极限时间内必须重复读数
数据分析	研究较多、用得较为广泛的数据分析方法是主成分分析和聚类分析[1,32,33]	(1) 运用协方差矩阵比相关矩阵的主成分分析的解释更为简单[29]。(2) 培养基利用的丰富度、多样性和均匀度指数能按照计算物种指数同样的方法计算出来[10,19]。聚类分析可进一步帮助了解哪种类型的培养基被利用

消耗速率)[30], 另外, 多种微生物在微孔板的孔中一起培养后, 所导致的颜色并不一定是各物种单独产生颜色的简单加和[14], 这些协同效应或拮抗效应也依赖细胞密度。并且细胞的绝对和相对数量/生物量以及它们的相互效应随时间发生变化, 这些变化在孔与孔/培养基与培养基之间又会不同。因此接种密度和培养时间是直接影响土壤微生物群落功能多样性测定结果的两个关键问题。

如果在单个固定的时间内比较 BIOLOG 板上群落类型, 这在很大程度上反映的是由微生物总数带来的差异, 而不是反映培养基利用差异以及是否所有成员或只有这一群落的一部分成员利用碳源[9,14]。这是因为在产糖启动之前要求有一临界细胞密度(10^5 ml^{-1}或 10^8 ml^{-1})[16,23,34~36], 在一个固定的时间读数可能对某些孔的颜色改变来说还为时过早。因此, 在通过排序分析(如主成分分析) 分开样品/样地, 并解释隐含的存在于群落间的功能差异时, 这些可能只是样品中微生物丰富度变化的结果, 即较大的丰富度导致较快的颜色扩展速率[9,14]。一旦密度效应不是群落差异的重要方面, 接种密度就成为影响结果的主导因子。例如: 单一时间点读数(第 5 天) 的典型变量分析表明接种密度差异(通过测量整板的光密度, AWCD) 比由于土壤和植物类型导致的不同碳源利用差异占优势[37]。当接种差异通过在同一 AWCD(此种情况为 0.5) 对板读数(不考虑接种时间) 予以补偿, 植物和土壤类型分成不同的团体, 通过聚类, 植物类型比土壤发挥更大的影响。此时调整培养时间又成为正确解释结果的关键。

相反, 在堆肥研究中, 密度效应是群落差异的重要方面。当运用单一时间点读数时, 由于明显不同

的整板光密度, 两个不同时期的堆肥就能区分开来。不过, 当调整时间, 通过在同一 AWCD(0.5) 对整板读数时, 区分的情况明显减弱, 这表明: 在碳源利用类型相似的情况下[37], 不同的接种密度(也为群落密度) 促使了整个光密度的不同。

3.2　克服接种密度和培养时间问题的可能办法

(1) 将每孔原始差异(培养基孔值减去对照孔值) 除以整板的 AWCD 来进行数据转换((*C-R*)/AWCD), 更能显示出样品间单一碳源利用类型的差异[9,38]。这样可以减小由于接种密度带来的不同颜色扩展速率对样品分类的影响。

(2) 利用固定水平的 AWCD 去决定读数时间用作板的比较[5,30]。即在延长的培养时期内进行重复读数, 然后选取最接近于参考 AWCD 的读数来比较[30,34, 38,39], 以补偿接种密度差异, 但应注意防止因孔中液体蒸发而导致 OD 值提高[31]。不过, 如果群落由不同生理活性的物种组成, 同样的 AWCD 不一定是起源于相同的接种密度。

(3) 接种前将接种浓度调节到相似的水平[5,10,30]以排除不同起始密度带来差异。不过, 比较野外地点时, 这不是一种切实可行的办法。因为这要求在接种 BIOLOG 板之前进行细胞数量记数或估计微生物碳, 耽误实验进程, 致使这段时间内群落结构产生变化。另外, 稀释可能导致稀有物种的丧失[40]。

(4) 通过连续几天重复测定每孔的颜色变化, 建立颜色变化动态方程(如: $y = OD_{595nm} = K/(1+e^{-r(t-s)})$, 式中 y 为波长为 595nm 处的光密度值; K 为光密度曲线的渐进线; 参数 r 决定光密度变化的潜在速率; t 为时间; s 为光密度值达到 $K/2$ 时的时间[31]) 来克服接种密度和培养时间对结果的影响。方程中参数间的相关性较弱, 有助于结果的分析, 而这些参数又是建立在有关碳源利用的不同信息的基础上, 当给它们排序时, 每个参数可产生不同的分类[34]。

在利用上述方法之前, 必须先了解研究的对象, 即是否密度效应是微生物群落差异的一个重要方面, 盲目转换数据去抑制接种密度的影响是不合适的。进行群落比较时, 接种密度不仅在分析光密度, 而且在分析随密度来区分培养基利用类型方面具有重要意义。如果没有考虑密度效应进行数据转换或将接种调节到相同的密度, 在群落比较中许多信息可能丧失。需要强调的是: 无论采用哪种方法, 采取多时间点读数, 以允许有足够数据做全面分析是至关重要的。另外, 如果所研究的问题纯粹集中在比较不同地点的实际微生物群落功能, 那么只要用于接种板的取样大小(如土壤体积或平均干重) 基本一致, 接种密度不应该是一个问题。但如果测定功能多样性, 即与实际功能相对的潜在的功能多样性时, 考虑接种密度是很重要的。

4　结　语

只要数据分析正确、培养时间合适, BIOLOG 作为一种快速、简单的研究微生物群落功能多样性的方法是很有意义的[23,38], 目前也得到广泛应用。但也还存在许多尚待检验的问题。为了令结果解释更为有效、更为科学, 下列问题还有待进一步研究。

1) 如何充分反映出群落所有成员的功能。反映群落的偏差来源于: ①从环境样品中提取所有微生物接种到板上的技术问题; ②对 BIOLOG 板碳源利用类型作贡献的种群所反映的不一定是最初接种的那些种群的相对比例[20]。

目前的方法并没有从环境样品中获得有代表性的微生物样品。因为微生物位于土壤颗粒、凋落物组分等上面或里面, 用缓冲液简单的振荡土壤或凋落物, 让其静置并以上清液接种导致相当数量的群落(数量或物种) 留在沉淀物中。另一问题是接种前样品存放的时间对不同群落有不同的影响, 对此有待进一步了解。

BIOLOG 碳源利用类型难以真实反映群落分解代谢能力, 其主要原因为: 缺乏培养能力或 BIOLOG 环境中不适合的碳源, 使得一些接种的种群不能对颜色剖面作贡献。由于不同的生长和竞争的结果, 种群的变化导致了孔中物种间相互作用引起的分解代谢和产糖的变化。因此, 进一步了解 BIOLOG 环境内物种间的相互作用也是很重要的, 而这种作用又是复杂的并非加和性的——两个物种混在一起培养后, 所导致的颜色并不一定是单一物种导致的颜色的简单加和[14]。通过在接种前对样品分离, 结合现代分子鉴定技术, 然后经过一段时间的培养, BIOLOG板内微生物群落如何变化以及那些不可培养、对剖面没有贡献的种群均能明确。

2) 进一步探索更为合理的数据分析方法。BIOLOG的数据分析方法很多, 但是在具体的研究中到底哪种分析方法能最有效的、最合理的解释结果还不完全清楚。

3) 开发适应性更广、针对性更强的产品。微孔板培养基范围应该更为广泛, 而在具体的研究中又应

该专一。在陆地系统中,起源于植物组织分解不同阶段的物质,如:纤维素、半纤维素和木质素或植物根系分泌液可能是合适的、也是重要的培养基结合物。

参 考 文 献

[1] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles-a critique. FEMS Microb. Ecol., 2002, 42: 1~14

[2] Alexander M. Introduction to Soil Microbiology. New York: John Wiley and Sons, 1977. 68~72

[3] Findlay R H. The use of phospholipid fatty acids to determine microbial community structure. *In*: Akkermans A D L, Van Elsas J D, de Bruijn F. eds. Molecular Microbial Ecology Manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. 1~17

[4] Choi K, Dobbs F C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. J. Microb. Methods, 1999, 36: 203~213

[5] Garland J L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. FEMS Microbiol. Ecol., 1997, 24: 289~300

[6] Garland J L, Mills A L. A community-level physiological approach for studying microbial communities. *In*: Ritz K, Dighton J, Giller K E. eds. Beyond the Biomass: Composition and Functional Analysis of Soil Microbial Communities. London: Wiley-Sayce Publications, 1994. 77~83

[7] Hollibaugh J T. Relationship between thymidine metabolism, bacterioplankton community metabolic capabilities, and sources of organic matter. Microb. Ecol., 1994, 28: 117~131

[8] Jellette J F, Li W K W, Dickie P M, *et al*. Metabolic activity of bacterioplankton communities assessed by flow cytometric and single carbon substrate utilization. Mar. Ecol. Prog. Ser., 1996, 136: 213~225

[9] 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. Microb., 1991, 57: 2 351~2 359

[10] Zak J C, Willig M R, Moorhead D L, *et al*. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. Soil Biol. Biochem., 1994, 26: 1 101~1 108

[11] Bossio D D, Scow K M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. Appl. Environ. Microb., 1995, 61: 4 043~4 050

[12] Buyer J S, Drinkwater L E. Comparison of substrate utilization assay and fatty acid analysis of soil microbial communities. J. Microb. Methods, 1997, 30: 3~11

[13] Grayston S J, Wang S, Campbell C D, *et al*. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. Soil Biol. Biochem., 1998, 30: 369~378

[14] Haack S K, Garchow H, Klug M J, *et al*. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. Appl. Environ. Microb., 1995, 61: 1 458~1 468

[15] Tate R L. Soil Microbiology. 2nd Ed. New York: John Wiley, 2000. 167~169

[16] Winding A, Hendriksen N B. Biolog substrate utilization assay for metabolic fingerprints of soil bacteria: Incubation effects. *In:* Insam H, Rangger A. eds. Microbial Communities: Function Versus Structural Approaches. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 195~205

[17] Wünsche L, Brüggemann L, Wolfgang B. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. FEMS Microbiol. Ecol., 1995, 17: 295~306

[18] Bochner B R. Sleuthing out bacterial identities. Nature, 1989, 339: 157~158

[19] Dobranic J K, Zak J C. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. Mycologia, 1999, 91: 756~765

[20] Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, *et al*. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. Appl. Environ. Microb., 1998, 64: 1 220~1 225

[21] Campbell C D, Grayston S J, Hirst D J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. J. Microbiol. Methods, 1997, 30: 33~41

[22] Abasiofiok M I, Ann C K. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. FEMS Microb. Ecol., 1998, 26: 151~163

[23] Schutter M, Dick R. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. Soil Biol. Biochem., 2001, 33: 1 481~1 491

[24] Baath E, Diaz-Ravina M, Frostegard A, *et al*. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. Appl. Environ. Microb., 1998, 64: 238~245

[25] Pennanen T. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH—A summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog® and 3H-thymidine incorporation methods in field studies. Geoderma, 2001, 100: 91~126

[26] Shishido M, Chanway C P. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficiency. Soil Biol. Biochem., 1998, 30: 937~947

[27] Warcup J H. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. Nature, 1950, 166: 117~118

[28] Warcup J H. Isolation of fungi from hyphae present in soil. Nature, 1955, 175: 953~954

[29] Glimm E, Heuer H, Engelen B, *et al*. Statistical comparisons of community catabolic profiles. J. Microbiol. Methods, 1997, 30: 71~80

[30] Garland J L. Analytical approaches to the characterization of sample microbial communities using patterns of potential C source utilization. Soil Biol. Biochem., 1996, 28: 213~221

[31] Lindstrom J E, Barry R P, Braddock J F. Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. Soil Biol. Biochem., 1997, 30(2): 231~239

[32] Podani J. Introduction to the Exploration of Multivariate Biological

Data. Leiden: Backhuys, 2000. 218~ 230

[33] Randerson P F. Ordination. *In:* Fry J C. ed. Biological Data Analysis: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press, 1993. 173~ 217

[34] Garland J L, Mills A L, Young J S. Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP). Soil Biol. Biochem., 2001, 33: 1 059 ~ 1 066

[35] Konopka A, Oliver L, Turco R F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. Microbiol. Ecol., 1998, 35: 103~ 115

[36] Verschuere L, Fievez V, Van Vooren L, *et al*. The contribution of individual populations to the Biolog pattern of model microbial communities. FEMS Mirobiol. Ecol., 1997, 24: 353~ 362

[37] Buyer J S, Roberts D P, Millner P, *et al*. Analysis of fungal communities by sole carbon source utilization profile. J. Microbiol. Methods, 2001, 45: 53~ 60

[38] Ibekwe A M, Kennedy A C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. FEMS Microb. Ecol., 1998, 26: 151~ 163

[39] Insam H, Hitzl W. Data evaluation of community-level physiological profiles: A reply to the letter of P. J. A. Howard. Soil Biol. Biochem., 1999, 31: 1 198~ 1 200

[40] Garland J L, Lehman R M. Dilution/extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities. FEMS Microbiol. Ecol., 1999, 30: 333~ 343

[41] Heuer H, Smalla K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. J. Microbiol. Methods, 1997, 32: 49~ 61

APPLICATION OF BIOLOG TO STUDY ON SOIL MICROBIAL COMMUNITY FUNCTIONAL DIVERSITY

Zheng Hua　Ouyang Zhiyun†　Fang Zhiguo　Zhao Tongqian

(Key Laboratory of Systems Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Beijing　100085, China)

Abstract　In order to understand the role of microbial communities in different environments it is essential to have knowledge of functions and functional diversity of microbial communities. However, the quantitative description of microbial communities is one of the most difficult tasks facing microbial ecologists. Now the BIOLOG redox technique proposes a simple and quick method for studying soil microbial community function diversity, based on the community-level carbon source utilization patterns. But BIOLOG is also a culture-based method, and the presentation of metabolic diversity patterns doesn't necessarily reflect the functional diversity of the soil microbial communities. Consequently, there are many problems as well as benefits using the approach, and a series of skills are needed for the application. The application of BIOLOG to the study on soil microbial community functional diversity is summarized in this paper, including theories, procedures, problems, and countermeasures during the application. The problems worthy of further research are also put forward. The objective of the study is to accelerate understanding how to apply BIOLOG properly to the study on soil microbial community functional diversity and provide a scientific foundation and theoretical guide for further research of the subject correctly.

Key words　BIOLOG; Soil microbial community; Functional diversity