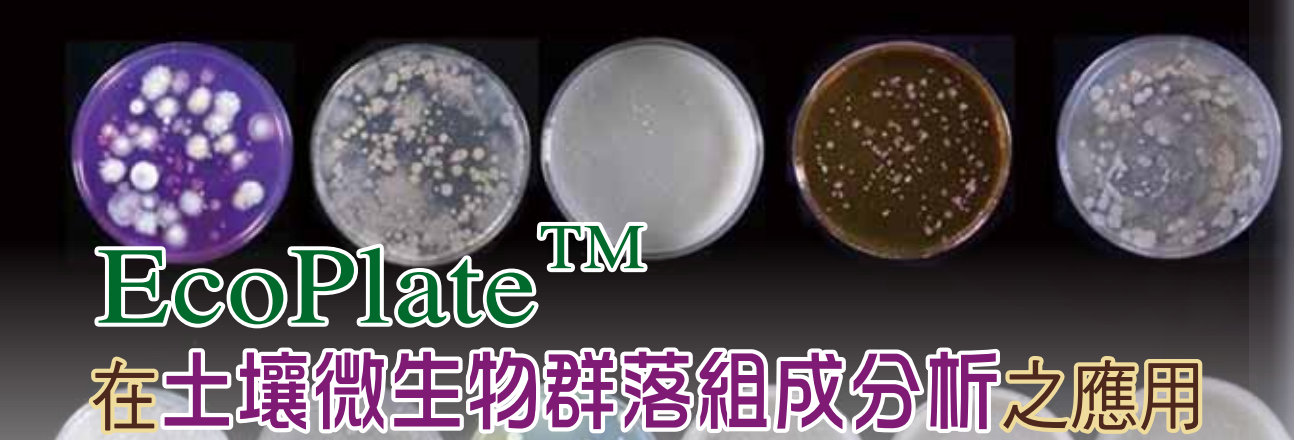


EcoPlate™ 在土壤微生物群落組成分析之應用

農試所生技組 陳涵葳 杜元凱 陳敬文 曾清山

一、前言

土壤微生物在環境中扮演重要的角色，與土壤養分轉換、物質水解、植物殘體分解甚至土壤結構的維持都極其相關。土壤微生物的研究範疇包括微生物區系(microflora)與微生動物區系(microfauna)，微生物區系又可分真菌、細菌、放線菌，而細菌在整個土壤生態平衡中扮演重要角色，雖然我們了解微生物參與自然界物質循環，但對微生物群落的了解卻相當有限，目前僅有不到1%的微生物菌種可在實驗室中進行培養或研究，試驗需耗費大量時間與資源，結果判讀亦仰賴經驗累積，這也是微生物群落組成與生態功能關聯性的研究進展緩慢的主因。本文將介紹EcoPlate™在土壤微生物群落組成分析之應用，美國Biolog公司生產的微孔盤(microplate)是目前微生物群落層級多樣性(community-level diversity)研究的主流方法，可快速分析微生物群落功能性歧異度(functional diversity)，得到微生物群落層級生理描述或稱群落層級生理譜(community-level physiological profiles, CLPP)的訊息。

早在1980年代開始，Biolog公司便開始生產多種生化代謝微孔盤，如GNIII、GN2、GP2、AN、SF、FF與YT，可應用於各式細菌、真菌、酵母菌的菌種鑑定，在微生物群落分析上則較常使用EcoPlate™，不同的生化代謝微孔盤適用範圍與對應資料庫列於表一。Biolog生化代謝微孔盤提供靈敏、快速、可信賴的微生物群落歧異度分析方法，GNIII、GN2、GP2等生化代謝微孔盤，適用於純化培養的菌種鑑定，MT微孔盤樣品槽底部沒有塗佈特定碳源，研究人員可自行添加特殊碳源來分析，EcoPlate™則適用於環境樣品菌相檢測，環境樣品如海水、灌溉水等，需經過過濾、濃縮的前處理，而土壤樣品則需經過分離與稀釋的步驟，才能進行分析。

二、EcoPlate™ 使用原理簡介

Biolog生化代謝微孔盤的呈色原理，是因樣品槽底部塗佈四唑鹽(tetrazolium)染劑與不同種類的碳源物質，將純化培養後的菌液或環境樣品注入樣品槽，微生物若能利用樣品槽底部塗佈的碳源物質，便會開始生長並進行生化代謝反應，tetrazolium染劑可接受呼吸作用所釋

作　　者：陳涵葳助理研究員
連絡電話：04-23317322

出的NADH，將無色的四唑鹽染劑還原成紫色，再以590 nm波長分析樣品槽內呈色情形，即可推知微生物對樣品槽內碳源物質的利用率。每塊微孔盤都採獨立無菌包裝，共有96個樣品槽，EcoPlate™與其他微孔盤最大的差異是，每32個樣品槽為1重複，共計3重複，每重複包含1個空白對照與31種碳源，環境樣品經過適當的前處理後，於每個樣品槽注入150 mL，在適合的溫度條件下進行培養，當微生物開始生長時便可偵測染劑呈色變化，若搭配全自動培養判讀分析系統(OmniLog system™)或半自動判讀分析系統(MicroStation system™)，可即時偵測微生物的生長參數，或於培養終了時紀錄最終呈色情形。EcoPlate™的優點包括操作簡便、培養週期短、人為誤差少、再現性高、數據量大等，是目前環境微生物多樣性研究方法的主流。

EcoPlate™的底部塗佈的碳源物質可分成4大類，簡單敍述如下：

(一) 醣類及其衍生物

醣類是微生物碳源的主要來源，EcoPlate™中醣類及其衍生物共計12種，這反映出醣類在微生物代謝上的重要地位。貯存式醣類如澱粉與肝醣，微生物需利用amylase、glycogen phosphorylase和glycogen debranching enzyme等酵素作用，將澱粉或肝醣水解成可溶性單醣後才能進入細胞，這些6碳醣小分子會經由醣解作用(glycolysis)分解成2個丙酮酸，並產生ATP；而纖維素等結構式醣類，是由葡萄糖單元以β-1,4鍵結而成，屬於非分支狀聚合多醣，僅少數菌種如Clostridium、Myxobacteria及Actinomycetes等，才能產生打開β-1,4-醣苷鍵之酵素。

(二) 胺基酸及其衍生物

胺基酸形式的小分子可直接進入微生物細胞，進行脫羧(decarboxylation)、脫胺(deamination)及轉胺(transamination)等胺基酸代謝，產生延胡索酸、草醋酸、α-酮基及戊二酸等，之後再進入TCA循環或檸檬酸循環代謝路徑。微生物分解胺基酸的能力因菌種而異，一般認為革藍氏陰性菌的分解力大於革藍氏陽性菌，微生物學實驗中常根據微生物降解胺基酸的能力進行菌種鑑定。

(三) 脂肪酸及脂類

脂肪酸及脂類最終代謝為丙酮酸、乙醯基輔酶等形式的中間代謝產物，接著再經由β氧化作用(β-oxidation)產生Acetyl-CoA與NADH、FADH2進入循環產生能量。因為微生物具有多種脂酶(esterase)與脂肪酶(lipase)，根據微生物lipase的胺基酸序列保守性，又可以區分成Pseduomonase lipase subfamily、Bacillus lipase subfamily、Staphylococcal lipase subfamily等等，可以特異性的分解不同脂類受質，作為微生物鑑定工具。

(四) 代謝中間產物與二級代謝物

歸屬於此類的基質，多為植物與病原交互作用相關，如環境中出現1-磷酸葡萄糖(glucose-1-phosphate, G-1-P)時，可以活化Listeria monocytogenes的致病因子(virulence factors)表現，並調控菌種對G-1-P的利用率，而2-羥基苯

甲酸(2-hydroxy benzoic acid)、4-羥基苯甲酸(4-hydroxy benzoic acid)、苯乙胺(phenylethylamine)及腐胺(putrescine)，為植物根際部位常見的二級代謝物，多具有抑菌或干擾微生物生長效果。

三、EcoPlate™ 呈色結果判讀

碳源利用模式的判讀主要依據呈色深淺，可分定性分析(qualitative patterns)與定量分析(quantitative patterns)。定性分析目的係比較不同來源土壤樣品內微生物群落組成差異，在相同的培養條件下，不同樣品盤間呈色時間或色度略有差異，但呈色模式(pattern)仍會相同；定量分析則是利用色度差異來反應樣品內微生物對特定碳源的分解活性，定量分析時要特別注意分析樣品的起始微生物群落數(initial cell densities)。以下簡單介紹EcoPlate™呈色結果判讀方法。

(一) 數據校正

樣品盤呈色需經儀器讀取596 nm波長之吸光值，原始吸光值需再經背景校正、誤差訊號排除、樣品槽平均發色(average well color development, AWCD)校正等步驟(圖一)，再進行統計分析。

(二) 常用統計分析方法

群集分析(cluster analysis)：將碳源利用的呈色變化數據轉化為樣點間的距離，單連法(single linkage)、全連法(complete linkage)、均連法(average linkage)及非加權成對分群法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)都是常見的集群距離計算方式，群集分析受距離計算方式影響很大。

對應分析(correspondence analysis, COA)：可以用來比較不同環境間的微生物群落組成，對應分析法可利用雙標

表一、生化代謝微孔盤之適用範圍與對應資料庫

類別	樣品型態	適用菌種	試驗項目	資料庫可判別菌種
微生物群落分析 (Microbial Community Analysis)				
EcoPlate™	環境樣品	-	31	-
微生物菌種鑑定 (Microbial ID / Characterization)				
GENIII MicroPlate™	純化培養	G-與G+ 細菌	71 (碳源物質利用分析) 23 (化學敏感試驗)	>1,000 /GENIII Database
GN2 MicroPlate™	純化培養	G- 細菌	95	501 /GENIII Database
GP2 MicroPlate™	純化培養	G+ 細菌	95	318 / GENIII Database
AN MicroPlate™	純化培養	厭氧菌	95	366 /AN Database
SFN2 MicroPlate™	純化培養	放線菌與真菌	95	>250,000 /MicroLog™
SFP2 MicroPlate™	純化培養	放線菌與真菌	95	>250,000 /MicroLog™
FF MicroPlate™	純化培養	絲狀真菌與酵母菌	95	>250,000 /FF Database
YT MicroPlate™	純化培養	酵母菌	35 (氧化能力試驗) 59 (物質同化試驗)	267 /YT Database

Step 1: 扣除背景值 $A_i' = A_i - A_0$

Step 2: 排除誤差訊號 $exclude\ Ai' \leq 0\ or\ Ai' \geq 2$
$truncated\ data:\ 0 < A_{i'} < 2$

Step 3: 計算樣品槽平均發色 $AWCD(j,t) = \frac{1}{31}\sum_{i=1}^{31} OD(i,j,t)$

Step 4: 呈色校正 $OD_{adj}(i,j,t) = \frac{OD(i,j,t)}{AWCD(j,t)}$

A_0：未加碳源的空白對照組吸光值

A_i：i碳源樣品槽吸光值

A_i'：扣除背景值之i碳源樣品槽吸光值

$AWCD(j,t)$：在t時間時，第j樣品盤(重複)的樣品槽平均發色

$OD_{adj}(i,j,t)$：在t時間時，第j樣品盤(重複)的i碳源樣品槽吸光校正值

圖一、EcoPlateTM數據校正步驟。

圖(biplot)的方式，同時呈現不同土壤樣品與微生物群落碳源利用結果，在同一個直角座標圖內表達樣本與變數間的相互關係，這種分析方法常用於生態學分析，特別適合描述地理位置間的差異性。

主成分分析(principal component analysis, PCA)：變數多而不容易分析時，可將樣點轉換後投射到2維平面成為彼此獨立的變數，通過樣點的集散型態與分布，可反應不同土壤樣品間微生物群落的生理代謝差異。

(三) 結果判讀可能會遇到的問題

起始濃度(inoculation density)：平盤呈色主要是根據樣品槽內微生物生長數量決定除了試驗前先計算菌落形成單位(colony forming unit)外，再利用不同倍率稀釋調整樣品間的濃度，或可利用AWCD進行數值校正，避免試驗開始時接種樣品內起始菌落數量造成的差異。

呈色培養條件與反應時間：培養條件包括溫度、時間，牽涉到酵素動力學問題，不同培養溫度會造成呈色深淺差異，但亦有學者指出經過AWCD校正後的數值與培養條件無關，有利不同試驗間相互比較。一般呈色時間與微生物生長及酵素活性相關，試驗以平盤內最多樣品槽呈色為主要時間依據，不會超過50小時。

三、結語

在環境微生物的研究方法中，傳統菌落形態辨識與計數，以及生化指標測定往往耗費時間長、工作量大，並且與試驗操作者的經驗有關。而Ecoplate™是一個快速簡便且靈敏度高的方法，可以獲得較為詳盡的環境微生物群落結構和功能多樣性方面的資訊，其在研究微生物群落功能多樣性上頗具潛力，目前也有廣泛的應用。若結合統計分析方法及軟體可以較為直觀、快捷的反映環境微生物的生物多樣性，相較於平板計數法更能忠實反映環境微生物群落組成的變化，有利於對環境微生物群落做更詳盡的研究。