

磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域的应用

齐鸿雁*, 薛 凯, 张洪勋

(中国科学院生态环境研究中心环境生物技术研究室, 北京 100085)

摘要:应用磷脂脂肪酸谱图分析技术对微生物群落进行定量分布, 克服了传统的微生物培养方法和显微技术的局限性。介绍了磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域中的应用, 包括对微生物群落的生物量、群落结构、营养状况和新陈代谢活动等方面的研究。

关键词:微生物生态; PLFA; 微生物群落; 营养状况; 新陈代谢活动

Phospholipid fatty acid analysis and its applications in microbial ecology

QI Hong-Yan, XUE Kai, ZHANG Hong-Xun (*Environmental Biotechnology Lab., Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China*). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8): 1576~1582.

Abstract: The quantitative description of microbial community is one of the difficult tasks for microbial ecologist. Conventional cultivation techniques cannot be used to fully characterize most soil microorganisms in respect that most of species cannot be cultured. Using phospholipid fatty acids (PLFA) profiles to characterize microbial communities can overcome the limitation of traditional techniques, because it doesn't require the removal and the culture of the microbes.

The membrane phospholipids exist in all living cellular membrane. They are not found in storage products or in dead cells by reason of rapidly degradation after cells dying. PLFA don't vary much in a cell which they form a part, and keep reasonably constant amounts as cells occur in nature. The analysis of the ester-linked fatty acids of the phospholipids makes use of capillary gas chromatography and mass spectrometry. With such technique, the component of each PLFA and the shift in PLFA pattern can be quantitatively analyzed.

PLFA profiles, consisted of quantitative determination of each PLFA component and the shift in PLFA patterns, can provide comprehensive information for detecting the microbial community. Several fatty acids are known to be "signatures" of subsets of microbial community. Therefore, the specific PLFA profiles can be used to characterize different groups of bacteria. Furthermore, a phospholipid pattern change in the related samples could be indications of a shift in microbial community. In fact, the PLFA technique has been used to illuminate the shifts in microbial community for adapting to the changed

基金项目: 国家“十五”科技攻关重点资助项目(2001BA903B)

收稿日期: 2002-12-12; 修订日期: 2003-04-20

作者简介: 齐鸿雁(1957~), 女, 河北石家庄人, 副研究员。主要从事微生物生态学、微生物工程学研究。E-mail: qihy@mail.rcees.ac.cn

Foundation item: the National "Tenth Five-year Plan" Key Technologies R&D Programe(2001BA90313)

Received date: 2002-12-12; Accepted date: 2003-04-20

Biography: QI Hong-Yan, Associate professor, main research field: microbial ecology and environmental biotechnology.

environmental conditions under wide range of soil types, management practices, climatic origins, etc. Although PLFA profile is unable to identify microorganisms at a species and strain level, it produces descriptions of the whole microbial community. It can be utilized to measure the viable microbial biomass and the community structure in environmental samples, such as sediments, soils, etc. Because of relative simplicity and good resolution, PLFA has become more and more popular.

We introduced an analysis measurement of PLFA profiles and reviewed the published applications, including the assessment of microbial biomass, community structure, nutritional status and metabolic activity, in microbial ecology.

Key words: microbial ecology; PLFA; microbial community biomass; community structure; nutritional status; metabolic activity

文章编号:1000-0933(2003)08-1576-07 中图分类号:Q938.1 文献标识码:A

定量描述微生物群落是微生物生态学的难题之一^[1]。应用传统的微生物培养方法和显微技术,需要在选择性培养基上培养微生物,即首先从环境样品中分离出纯菌株,再对该菌株进行一系列的生理生化分析。这类传统方法存在着以下缺点:①操作费时费力;②平板计数本身存在着不准确性^[2];③大部分土壤微生物是不可培养或者非活性的^[3]。因此,通过传统方法只能提供微生物群落信息的一小部分,分离鉴定到的微生物只占环境微生物总数的 0.1%~10%^[4]。

White 和 Findlay^[5,6]于 20 世纪 70 年代末,80 年代初发展了磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)谱图分析技术,对微生物群落进行定量分析,成功地克服了传统方法的缺点。用 PLFA 方法定量分析微生物群落的生物量和群落结构不需要进行微生物纯培养,虽然它不能在菌种和菌株(strain)的水平鉴别出微生物的种类,但是能够依靠脂肪酸谱图定量描述整个微生物群落,是一种快捷、可靠的检测方法^[7]。

1 PLFA 谱图分析方法简介

PLFA 谱图分析方法的原理基于磷脂几乎是所有生物细胞膜的重要组成部分,细胞中磷脂的含量在自然条件下(正常的生理条件下)恒定^[8],其长链脂肪酸的形式——磷脂脂肪酸可作为微生物群落的标记物^[9]。此外,磷脂不能作为细胞的贮存物质,在细胞死亡后会很快降解,可以代表微生物群落中“存活”的那部分群体^[6]。但是古菌不能使用 PLFA 谱图进行分析,因为它的极性脂质是以醚而不是酯键的形式出现^[10]。

PLFA 谱图发生变化更多的是源于样品中微生物的组成和生物量发生变化;生物体内细胞中磷脂的含量通常可认为相对显著恒定^[11]。不过,磷脂含量并非绝对不变,例如温度的变化就会影响膜脂。温度的增加会带来磷脂双分子层流动性的增加,这会导致形成磷脂非双分子层相,进而影响细胞膜的渗透性。PLFA 成分发生适应性变化以改变膜的流动性变化是生物体内消除这些影响的机制之一^[9]。营养状况的变化也有可能改变磷脂的含量,有学者对此进行了相关研究^[12],不过目前还很少见到这方面的报道。

不同菌群的 PLFA 特征谱图不同,在高度专一性基础上具有多样性^[13],可以作为微生物群落中不同群体的标记物^[14]。因为各种菌群的微生物生物量和群落组成很难与其他样品相同,所以每种样品具有独特的 PLFA 谱图(包括 PLFA 总量、组成),即具有专一性;不同样品的谱图之间差别很大,即具有多样性。磷脂构成的变化能够说明环境样品中微生物群落结构的变化,可以对微生物群落进行识别和定量描述^[1],并为进一步的研究提供相关信息。细菌的生物量(bactPLFAs)可以通过以下 PLFA 的总含量估算:i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1ω9, 16:1ω7t, i17:0, a17:0, 17:0, 18:1ω7, 和 cy19:0。真菌的生物量则通过 18:2ω6 的含量估算。18:2ω6:bactPLFAs 被用来代表土壤中真菌与细菌生物量的比率^[15]。也有研究表明可用 16:0(10Me), 17:0(10Me), 18:0(10Me), i15:0, a15:0, i16:0, i17:0 和 a17:0 的总含量来估算革兰氏阳性菌的含量,16:1ω5, 16:1ω7t, 16:1ω9, cy17:0, 18:1ω5, 18:1ω7 和 cy19:0 的总含量来估算革兰氏阴性菌的含量^[16]。

PLFA 谱图分析首先要提取出磷脂脂肪酸,用气相色谱(常与质谱联用,GC-MS)检测得到 PLFA 谱

图,再使用统计方法进行分析。

磷脂脂肪酸的提取一般使用 Bligh 和 Dyer 法^[17],White^[5],Petersen 和 Klug^[9]等人都在此基础上提出过改进方法。基本步骤包括:提取脂质,硅胶柱分离磷脂甲醇分解 PLFA。Å. Frostegård 等人评估了提取过程中使用不同的提取缓冲液,不同的提取和消化时间,不同的样品提取量,不同的脂质材料消化量的效果^[18]。Søren O. Petersen 等人对筛分,贮藏和培育温度对土壤微生物群落 PLFA 谱图的影响进行了研究^[9]。

大部分 PLFA 研究中都使用气相色谱与质谱连用,分析脂肪酸甲酯;也有人使用液相色谱来分析完整的磷脂脂肪酸(intact phospholipid)而无需甲醇分解磷脂脂肪酸的步骤。Jiasong Fang 等人就直接比较了气相色谱和液相色谱这两种不同的检测方法,结果表明在微生物区分和识别上用液相色谱检测完整的磷脂脂肪酸效果更好^[19]。

由于生命现象的复杂性,PLFA 谱图分析主要采用多元统计方法,包括主成分分析(principal component analyses, PCA)^[1,9,10]、部分最小二乘法识别(D-PLS)和标准判别式分析(RDA)^[20]等;其中主成分分析方法最为常用。此外,构造人工神经网络(neural network, NN)解释 PLFA 谱图也具有很高的准确率^[21]。

2 PLFA 谱图分析方法在微生物生态学领域的应用

在微生物生态学研究,PLFA 谱图分析方法主要被应用于检测环境样品的微生物生物量、群落结构、营养状况和新陈代谢活动等。

2.1 土壤样品分析

PLFA 方法已经被成功应用在不同农业与林业土壤的检测上。由于土壤之间成分十分相似,仅仅依靠成分分析来区分是非常困难的。以化学组成为基础的 PLFA 方法从土壤微生物中提取出 PLFAs,作为其群落组成的标记,可以清楚的识别出与特定土壤作物相关联的微生物群落。Xinhua Song 等人对基于分析 PLFA 谱图的土壤识别模式进行了探索,对种植不同作物(牧草,西红柿,稻谷,杏仁,棉花,无花果,胡桃木等)的土壤成功的进行了分类识别^[20]。S. C. Wilkinson 等人用 PLFA 谱图确定了挪威云杉林中微生物群落与树木根系的关系,他们想要证明:微生物群落结构或其生理状况是由树冠层(canopy)下的生理状况所决定的。最后在忽略湿度影响的情况下得出的结论是:树冠层下土壤生理环境的不同导致了微生物群落空间分布的不同^[22]。Peter Saetre 等人研究了挪威云杉与桦树混合林中土壤微生物群落的空间差异,结果表明,云杉比桦树对 PLFA 谱图的影响更大,并且成为主成分分析中的第一影响因素;比较实验表明,尽管树种对土壤湿度和地面植被的影响也不同,但是它们对土壤微生物的影响很大程度上与两种树的土壤有机质含量相关^[23]。Å. Frostegård 等人则运用磷脂的总含量检测了不同有机成分土壤的微生物生物量^[18]。此外,Francisco J. Caldero An 等人用 PLFA 谱图分析研究了模拟耕种行为对微生物群落的短期影响,发现其对长期耕种土地的影响比对荒地的影响要小的多^[24]。

除了受植被、土壤成分影响外,土壤微生物群落的生物量和群落结构还受诸多环境因素的影响,这些均可通过 PLFA 谱图反映出来。泥炭地是全球碳循环中碳的重要储备库,其微生物矿化过程中形成的温室气体(例如 CH₄ 和 N₂O)会释放到大气中影响全球气候^[25,26]。Ingvar Sundh 等人使用 PLFA 谱图分析评估了瑞典北方两块泥炭地上微生物群落结构和总生物量的差异^[10]。Abasiofiok M. Ibekwe 等人利用 PLFA 谱图和碳利用方式相结合的方法来分析田间和温室条件下的土壤微生物群落结构^[1]。Zak 等人研究了大气中 CO₂ 对土壤微生物群落结构和功能的影响^[27]。Richard D. Bardgett 等人应用 PLFA 分析了大气升温对陆生生态系统模型中土壤微生物群落的发展和生物功能(根据微生物活性和 N 的矿化)的影响;此生态系统模型模拟了自然的陆生植物群落,特意将土壤中可利用的营养变少。研究结果显示大气升温对低营养条件下的土壤微生物群落的发展及其行为的影响不大^[28]。Richard D. Bardgett 等人研究了季节变化和土壤肥沃程度对土壤微生物群落的影响;结果表明,季节变化对 PLFA 谱图的影响与土壤矿物氮和水分的含量有关,并且发现真菌在低肥力的土壤生化过程中发挥的作用更大^[29]。

在污染物研究中,PLFA 谱图分析是一种灵敏度很高的检测方法,但也容易受其他非研究对象的有毒物质和环境因素(例如土壤水分,温度,碳利用度,pH 等)的影响。在实验室研究中,通常将这些因素标准化(standardized)以消除干扰^[30]。Taina Pennanen 等人模拟酸雨和重金属条件,研究它们对林地土壤微生物群落结构各自作用和协同作用的影响^[31]。Å. Frostegård 等人用不同浓度的重金属污染林地的腐殖质土壤和农业耕地,然后检测其 PLFA 组成,对这两种土壤微生物群落的磷脂脂肪酸成分、生物量和活性进行了研究^[32]。A. Mark Ibekwe 等人探讨了熏蒸对土壤微生物群落的影响,土壤微生物群落在熏蒸处理后的恢复能力用 PLFA 和变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)等方法来检测。结果表明熏蒸剂 MeBr 对土壤微生物群落具有很大的影响^[33]。H. E. Dickens 等人用氯仿熏蒸沼泽和林业土壤来控制微生物群落,发现最初群落的组成比熏蒸处理对最终微生物群落组成的影响更大^[34]。

以中国的红壤作为研究对象,黄昌勇曾用 PLFA 等方法研究了 8 种不同肥力和耕种历史的土壤样品微生物的生物量和群落结构^[35]。

目前在国内的研究中,对 PLFA 方法的应用还不普遍。唐玉霞等人曾采用平板计数法,简单结合细胞磷脂脂肪酸分析,评价了不同培养基分析筛选土壤细菌的效果^[36]。黄昌勇等人用 PLFA 总含量测算过土壤样品的微生物生物量,研究了在控制条件下,不同含水量与杀虫剂的加入与否对稻田土壤部分性质的影响。结果表明含水量对土壤磷脂含量等指标产生显著影响,而加入杀虫剂,这些指标不发生显著变化^[37]。

2.2 沉积物样品分析

江、海等沉积物的微生物区系由复杂的微生物群落组成,能够完成主要的矿化反应,这对营养元素的循环和一大部分深海食物链的形成具有重要作用。使用 PLFA 谱图分析方法能够获得有关沉积物中微生物生物量和群落结构的信息,沉积物样品可以不进行处理,也可以是冷冻或冻干的。D. C. White 等人于 1979 年进行了提取磷脂来确定河口沉积物微生物生物量的研究^[5], Robert H. Findlay 等人于 1989 年用磷脂分析法测定了深海沉积物中的微生物生物量^[38],为人们提供了一种分析沉积物样品的简便方法。

2.3 其他样品分析

Deborah M. Moll 等人用 PLFA 谱图研究了温度对饮用水生物过滤器上微生物群落结构的影响,对生物过滤器的净化效果进行分析^[39]。J. Guezennec 等人将不同组成的人工培养基放置到深海热液(hydrothermal)区域,暴露一段时间后用 PLFA 谱图分析方法研究长出的细菌群落^[13]。David C. White 和 Robert H. Findlay 用 PLFA 方法和其他方法相结合,分析生物膜上捕食(predation)效应对微生物生物量、群落结构、营养状况、新陈代谢活动的影响^[11]。

2.4 营养状况研究

从纯培养研究中可知,膜脂易受环境条件影响;因此,群落中微生物种的组成不是决定 PLFA 谱图的唯一可变因素^[9]。Gueckert 等人研究发现一些处于饥饿状态的海洋细菌的微细胞(由细菌细胞不正常分裂产生的)中反式单烯酸脂肪酸(trans monoenoic fatty acid)的含量增加^[12]。

多聚-β-羟基链烷酸酯(PHA)是在生物体不平衡生长状况下产生的内源贮存性物质。Robert H. Findlay 和 David C. White 应用测定磷脂、PLFA 和多聚-β-羟基链烷酸酯(PHA)相结合的方法来分析细菌的营养状况^[40],取得了良好的效果。

2.5 新陈代谢活动研究

PLFA 谱图分析在脂质提取前把放射性基质加入到样品中,对微生物进行计数和标记,可以用来测定新陈代谢活动^[14]。用¹⁴C 直接标记,即把¹⁴C 引入微生物的脂质,标记的和未标记的 PLFA 都通过气相色谱检测,单独的¹⁴C-PLFA 通过收集脂肪酸燃烧后产生的¹⁴CO₂ 来确定。使用¹⁴C-PLFA 分析,能获得单独使用传统 PLFA 分析无法获得的信息,被应用于混合微生物群落的基质新陈代谢研究中。

磷脂在细菌单一培养生长时具有新陈代谢活性^[41]。总磷脂的新陈代谢活性是许多脂质新陈代谢活动的结果^[42]。Peter Roslev 等人用¹⁴C 基质放射性标记和脂质分析来研究环境样品中的新陈代谢活跃细菌^[7]。此外,D. C. White 使用³²P 标记磷脂,检测沉积物微生物的新陈代谢活动^[5]。

3 结语

每一种分析方法都有其自身的优、缺点。PLFA 谱图分析方法虽然不能在菌种和菌株的水平精确的描述环境中微生物的种类,但是能定量描述环境样品中的微生物群体,并且操作相对简便,是一种快捷、可靠的分析方法^[7]。PLFA 在进行群落结构等方面研究时,尽管温度等其他非研究因素的变化也会引起 PLFA 谱图变化^[11],进而影响到实验结果,但是可以通过将环境因素标准化来解决这一问题。

此外,在一些贮存样品的研究中,发现平板计数结果稳定增加,而 PLFA 测定的生物量却保持不变。Haldeman 等人假设这是因为可培养的那部分微生物数量增加引起的,但是 PCA 的分析结果却表明群落结构并没有发生变化^[43]。Kieft 等人的研究也发现纯菌种数量在培养过程中随时间呈现出很大的不同,但其 PLFA 总量却保持恒定^[44]。这个现象目前还没有令人满意的解释,可能存在着 PLFA 技术无法反映而平板计数法却可以反映的群落变化或其他现象(如数量增加,生理变化等)^[45]。

在实际研究中,PLFA 谱图分析还常常与其他方法共同使用,以获得更为准确的分析结果。Taina Pennanen 等人就同时使用分析 PLFA 谱图与测定微生物耐受能力两种方法,探讨了两种污染梯度下,重金属长期沉积对针叶林土壤微生物群落的影响;既克服了 PLFA 谱图易受非研究因素影响的缺点,又保证了测定的高灵敏度^[30]。

本文简要介绍了 PLFA 谱图分析技术及其在微生物生态学研究中的应用。在建立细菌进化史和分类学的生化基础等其他领域的研究中,PLFA 分析方法也被证明十分有效^[46~49]。随着 PLFA 谱图分析方法的应用越来越广泛,其自身也在不断地得到改进、发展,相信在今后的研究工作中该方法将会发挥越来越大的作用。

References:

- [1] 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 Microbiology Ecology*, 1998, **26**:151~163.
- [2] Brock T D. The study of microorganisms in situ: progress and problems. *Symp. Soc. Gene. Microbiol.*, 1987, **41**:1~17.
- [3] Bakken L R. Separation and purification of bacteria from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **49**:1482~1487.
- [4] Amann R I, Ludwig W and Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**:1143~169.
- [5] White D C, Davis W M, Nickels J S, et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia*, 1979, **40**:51~62.
- [6] Tunlid A, Baird B H, Trexler M B, et al. Determination of phospholipid ester-linked fatty acid and poly β -hydroxybutyrate for the stimulation of bacterial biomass and activity in the rhizosphere of the rape plant *Brassica napus*(L.). *Can. J. Microbiol.*, 1985, **31**:1113~1119.
- [7] Roslev P, Iversen N, Henriksen K. Direct fingerprinting of metabolically active bacteria in environmental samples by substrate specific radiolabelling and lipid analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, **31**:99~111.
- [8] White D C, Bobbie R J, Herron J S, et al. Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples. In: Proc. ASTM Symp. *Native aquatic bacteria, enumeration, activity and ecology*. Minneapolis, 1979.
- [9] Petersen S O, Klug M J. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty profile of a soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**: 72421~72430.
- [10] Sundh I, Nilsson M, Borgå P. Variation in microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**:41476~41482.
- [11] White D C, Findlay R H. Biochemical markers for measurement of predation effects on the biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial biofilms. *Hydrobiologia*, 1988, **159**:119~132.
- [12] Gucker 万方数据 M A, White D C. Phospholipid, ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increase in trans/cis ration and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Appl.*

- Environ. Microbiol.*, 1986, **52**:794~801.
- [13] Guezennec J, Ortega-Morales O, Raguene G, *et al.* Bacterial colonization of artificial substrate in the vicinity of deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **26**:89~99.
- [14] Tunlid A, White D C. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. In: G. Stotzky, J. M. Bollag eds. *Soil biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1992. **7**:229~262.
- [15] Frostegård Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fertil Soils*, 1996, **22**:59~65.
- [16] Wilkinson S G. Gram-negative bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson SG, eds. *Microbial lipids*. London: Academic Press, 1988. **1**:299~408.
- [17] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, **37**:911~917.
- [18] Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, **14**:151~163.
- [19] Fang J, Barcelona M J, Alvarez P J J. A direct comparison between fatty acid analysis and intact phospholipid profiling for microbial identification. *Organic Geochemistry*, 2000, **31**:881~887.
- [20] Song X H, Hopke P K. Pattern recognition of soil samples based on the microbial fatty acid contents. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**:3524~3530.
- [21] Noble P A, Almeida J S, Lovell C R. Application of neural computing methods for interpreting phospholipid fatty acid profiles of natural microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**:2694~2699.
- [22] Wilkinson S C, Anderson J M. Spatial patterns of soil microbial communities in a Norway spruce (*Picea abies*) plantation. *Microb. Ecol.*, 2001, **42**:248~255.
- [23] Saetre P, Bååth E. Spatial variation and patterns of soil microbial community structure in a mixed spruce-birch stand. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, **32**:909~917.
- [24] Calderón F J, Jackson L E, Scow K M, *et al.* Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, **32**:1547~1559.
- [25] Bridgman S D, Johnston C A, Pastor J, *et al.* Potential feedbacks of northern wetlands on climate change. *BioScience*, 1995, **45**:262~274.
- [26] Gorham E. Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol. Appl.*, 1991, **1**:182~195.
- [27] Zak D R, Ringelberg D B, Pregitzer K S, *et al.* Soil microbial communities beneath *Populus grandidentata* grown under elevated atmospheric CO₂. *Ecol. Appl.*, 1996, **6**:257~262.
- [28] Bardgett R D, Kandeler E, Tscherko D, *et al.* Below-ground microbial community development in a high temperature world. *OIKOS*, 1999, **85**:193~203.
- [29] Bardgett R D, Lovell R D, Hobbs P J, *et al.* Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**:1021~1030.
- [30] Pennanen T, Frostegård Å, Fritze H, *et al.* Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**:2420~2428.
- [31] Pennanen T, Perkiömäki J, Kiikkilä O, *et al.* Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **27**:291~300.
- [32] Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(11):3605~3617.
- [33] Ibekwe A M, Papiernik S K, Gan J Y, *et al.* Impact of fumigants on soil microbial communities. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 2001, **67**(7):3245~3257.
- [34] Dickens H E, Anderson J M. Manipulation of soil microbial community structure in bog and forest soils using chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**:2049~2058.
- [35] Yao H, He Z, Wilson M J, *et al.* Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microb Ecol.*, 2000, **40**:223~237.
- [36] Tang Y X, Fan B Q. The evaluation and selection of soil bacteria culture media. *Hebei agriculture science*, 1999, **3**(2): 11~14.
- [37] Abid SUBHANI, Min L, Huang C Y, *et al.* Ecological effects of insecticide under different moisture levels in paddy soil. *Chinese J. Rice. Sci.*, 2001, **15**(2): 137~141.
- [38] Findlay R H, King G M, Watling L. Efficacy of phospholipid analysis in determining microbial biomass in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, **55**(11): 2888~2893.
- [39] Moll D M, Summers R S, Fonseca A C, *et al.* Impact of temperature on drinking water biofilter performance and microbial community structure. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**:2377~2382.
- [40] Findlay R H, White D C. A simplified method for bacterial nutritional status based on the simultaneous determination of phospholipid and endogenous storage lipid poly- β -hydroxyalkanoate. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, **6**:113~120.
- [41] White D C, Tucker A N. Phospholipid metabolism during bacterial growth. *J. Lipid. Res.*, 1969, **10**:220~223.
- [42] King J D, White D C, Taylor C W. Use of lipid composition and metabolism to examine structure and activity of estuarine detrital microflora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, **33**:1177~1183.
- [43] Haldeman D L, Amy P S, Ringelberg D, *et al.* Microbial growth and resuscitation alter community structure after perturbation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1995, **17**:27~38.
- [44] Kieft T L, Ringelberg D B, White D C. Changes in esterlinked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**:3292~3299.
- [45] Green C T, Scow K M. Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeology Journal*, 2000, **8**:126~141.
- [46] Lechevalier M P. Lipids in bacterial taxonomy—A taxonomist's view. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1997, **7**:109~210.
- [47] Guckert J B, Anthworth C P, Nichols P D, *et al.* Phospholipid ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1985, **31**:147~158.
- [48] Dowling N J E, Guezennec J G, White D C. Methods for insight into mechanisms of microbially influenced metal corrosion. In: Houghton, D. R., Smith, R. T., Eggins, H. O. U., eds. *Biodeterioration*. London: Elsevier, 1988.
- [49] Guezennec J G. Influence of cathodic protection of mild steel on the growth of sulphate-reducing bacteria at 35 C in marine sediments. *Biofouling*, 1991, **3**:339~348.

参考文献:

- [36] 唐玉霞, 范丙全. 土壤细菌培养基的筛选和评价. *河北农业科学*, 1999, **3**(2): 11~14.
- [37] Abid SUBHANI, 廖敏, 黄昌勇, 等. 同含水量条件下稻田土壤中杀虫剂的生态影响. *中国水稻科学*, 2001, **15**(2): 137~141.