

磷脂脂肪酸技术及其在土壤微生物研究中的应用

白震^{1,2}, 何红波¹, 张威^{1,2}, 解宏图^{1,3}, 张旭东^{1,3,*}, 王鸽⁴

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039;
3. 沈阳农田生态系统国家野外观测研究站, 沈阳 110016; 4. 沈阳农业大学, 沈阳 110161)

摘要:以复杂群落形式存在的土壤微生物是 C 等养分的生物地球化学循环的主要参与者, 而存在于活体微生物细胞膜的磷脂脂肪酸(PLFAs)分布广泛、含量相对恒定、周转迅速、对环境因素的变化敏感、分析方法较简单, 因此该技术已广泛应用于土壤微生物学研究。阐述了 PLFAs 概念、命名、种类、意义、提取方法及操作过程中应注意的问题, 介绍了 MIDI、GC-MS 和 HPLC-ESI-MS 等鉴定手段。概述 PLFAs 技术应用途径和目的, 及其在土壤微生物量、结构、代谢状态、不同农业措施对土壤微生物影响以及土壤生物修复等研究领域的应用。同时, 讨论了 PLFAs 技术的不足。例如, 对原位土壤微生物群落特定菌种指征有时不够明确; 估算真菌生物量时不够准确; 不能用于分析古菌; 不同提取法结果区别较大且易受土壤腐殖酸等有机质干扰; 供试土样必须 -80℃ 或冻干保存。因此, 利用 PLFAs 技术研究土壤微生物时, 应辅以其他生物标识物及相应分析手段, 才能更准确地反映土壤微生物群落组成、代谢途径与机理。

关键词:提取; 应用; 磷脂脂肪酸; 微生物; 土壤

文章编号: 1000-0933(2006)07-2387-08 中图分类号: S154.36 文献标识码: A

PLFAs technique and it's application in the study of soil microbiology

BAI Zhen^{1,2}, HE Hong-Bo¹, ZHANG Wei^{1,2}, XIE Hong-Tu^{1,3}, ZHANG Xu-Dong^{1,3,*}, WANG Ge⁴ (1. Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, CAS, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China; 3. National Field Observation and Research Station of Shenyang Agro-Ecosystems, Shenyang 110016, China; 4. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(7): 2387 ~ 2394.

Abstract: The soil microorganisms as complex communities are the leading participants of the bio-geochemistry cycling of C and other nutrients. And phospholipids fatty acids (PLFAs) can serve as an important indicator of the viable microorganisms since they exist in all types of microbial membranes with constant quantity and fast turning-over rate, and they can respond promptly to the variations in environmental factors. Therefore, the relative simple and valuable PLFAs techniques have been utilized widely to investigate the characteristics of soil microorganisms.

The conception, nomenclatures, types, and characteristics of PLFAs are introduced in this paper. Different extraction processes for PLFAs and total soil fatty acid methyl esters (TSFAMEs) are sketched. At the same time, the comparison of extraction procedures between PLFAs and TSFAMEs is drawn. The possible problems that are likely to occur during the extraction processes are discussed in detail. The PLFAs-associated techniques such as the MIDI, GC-MS and HPLC-ESI-MS are also recommended here for the interpretation of PLFAs implications. In addition, this paper specifies the practical applications of PLFAs to the studies of soil microbial biomass, microbial communities and microbial metabolic conditions, as well as the effect of agricultural management on the microbial characteristics. Some other applications are also summed up, for instance, ecosystem

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(40535028); 中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(KZCX3-SW-433)

收稿日期: 2005-11-24; 修订日期: 2006-01-19

作者简介: 白震(1975~), 男, 辽宁人, 博士生, 主要从事土壤微生物学研究. E-mail: baizhen@iae.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xdzhang@iae.ac.cn

Foundation item: The project was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 40535028); Knowledge Innovation Project of CAS(No. KZCX3-SW-433)

Received date: 2005-11-24; **Accepted date:** 2006-01-19

Biography: BAI Zhen, Ph.D. candidate, mainly engaged in soil microbiology. E-mail: baizhen@iae.ac.cn

recovery study and ^{13}C -labeling technique.

Meanwhile, some limitations by using PLFAs as an indicator are figured out as well. For example, PLFAs can't be used to distinguish the specific microbial communities in the native soils clearly in some cases. Nor can they be used to evaluate the fungal biomass correctly due to the uncertain structures of different microorganisms. PLFAs analysis can do nothing about Archaea either. Moreover, the results from different PLFAs extraction methods vary significantly and are easily interfered by other organic compounds in soil matrix. The soil samples for PLFAs analysis must be stored at -80°C or lyophilized because of oxidation effects.

It is thereby suggested that in order to elucidate clearly the metabolic pathway and the structure of native microbial consortiums, PLFAs techniques should be employed together with other molecular biological techniques when necessary.

Key words: extraction; application; PLFAs; microorganisms; soil

土壤微生物以复杂群落而非纯培养形式存在,是生物圈中 C、H、N、O 和 S 等元素基本生物循环的重要参与者^[1],因此它们的组成与活力深刻地影响着生物地球化学循环、有机质周转以及土壤质量。但是,目前土壤微生物学研究方法均有不足之处,如“最大可能或平板计数法”受培养条件限制而无法研究 88% ~ 99% 原位土壤微生物;“酶学方法”只能估算功能菌群最佳代谢活力;“总 DNA 或 RNA 技术”不能区分活体与死体 DNA、引物序列设计具有人工选择性^[2,3]。

显然,有必要分析微生物群落中其他更为独特的生化成分,以便更好地揭示土壤微生物群落原位代谢活力和功能特性^[4]。

1 磷脂脂肪酸技术概述

随着土壤微生物研究的深入,磷脂脂肪酸作为微生物活体指示物逐渐为人们所认识^[5,6]。

1.1 磷脂脂肪酸的概念、分类、命名与意义

目前已发现的磷脂物质有 1000 多种^[5]。依据极性由强到弱,磷脂可分为磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acids, PLFAs)、糖脂脂肪酸(glycolipid fatty acids, GLFAs)和中性脂肪酸(neutral lipid fatty acids, NLFAs)。PLFAs 是微生物细胞膜主要成分,是由甘油分子的第 3 位羟基被磷酸、其他羟基为脂肪酸酯化而形成的,其磷酸基部分被称作极性头部,两条碳氢链被称为非极性尾部^[7]。

脂肪酸通常被分成 6 类^[4]:直链、直链顺单烯(cis-)、直链反单烯(tran-)、支链饱和、环状及多烯脂肪酸(这些脂肪酸优先与磷脂甘油骨架中间 C 原子键合^[8])。脂肪酸经甲酯化后形成脂肪酸甲酯(Fatty acid methyl esters, FAMEs),它们又可分为:羟基取代的 FAMEs (OHFAMEs);酯连接羟基取代的 FAMEs (EL-OHFAMEs);非酯连接羟基取代 FAMEs (NEL-NYFAMEs);饱和 FAMEs (SAFAMEs);单不饱和 FAMEs (MUFAMEs);酯连接多聚不饱和 FAMEs (PUFAMEs);非酯连接不饱和 FAMEs (UNSFAMEs)^[9,10]。

不同种类 PLFAs 常以一系列 C 原子数目与希腊字母表示。比如,16:1 ω 7t 指的是含有“16 个 C 原子/一个双键/双键距甲基(ω)端 7 个 C 原子/反式构型”脂肪酸;也可将不饱和程度置于 Δx 之后, x 代表距羧基端(Δ)最近的双键位置。脂肪酸构型可用简单符号表示,如顺式(cis)- (双键两侧-H 在同侧)与反式(trans)- (双键两侧-H 键在异侧)分别用 c-与 t-表示;a-与 i-代表异型(anteiso)- (甲基在 C 末端第 3 位 C 原子上)和同型(iso)- (甲基在 C 末端第二位碳原子上);br-表示未知甲基支链的位置;ME-前的数字代表甲基取代基团距分子羧基端 C 原子数;cy-代表了环丙烷脂肪酸; α -与 β -代表羟基脂肪酸的-OH 分别第 2、3 位 C 原子上^[9]。

PLFAs 是几乎所有活体细胞膜的主要成分,周转速率极快且随细胞死亡而迅速降解^[11],脂肪酸结构与种类多样,对环境因素敏感,分析结果重复性较好^[3]。既可用简单试剂和设备测定由 PLFAs 转化的磷酸盐以确定微生物总量,也可以根据不同菌群的特定脂肪酸 C 链长度、饱和度及羟基等取代基位置差异研究特殊功能菌群^[11]。在微生物定量及活力测定方面,PLFAs 与微生物量 C、底物诱导呼吸(SIR)及 ATP 等测定方法所得结果十分吻合^[12]。因此,PLFAs 在土壤微生物学研究中极具潜力。

1.2 PLFAs 的提取与鉴定

1.2.1 PLFAs 的提取 PLFAs 常用提取方法有两种。一种是 PLFAs (Phospholipid linked-FAME)法,即先通过

氯仿-甲醇单相萃取浸提土壤微生物脂肪酸^[13],再经硅胶柱纯化以及酯化作用得到活体细胞膜结合态 FAMES^[3,5]。另一种是通过碱甲醇分解法提取总土壤 FAMES(total soil fatty acid methyl esters, TSFAMES)^[14-16]。

PLFAs 法步骤如下:1. 将 8g(干重)土壤于 46mL 氯仿-甲醇-磷酸盐提取液(体积比为 1:2:0.8)两次浸提;2. 于上清中加入磷酸盐与氯仿各 12mL 振荡过夜分层,所得氯仿相用高纯 N₂ 吹干;3. 过活性硅胶柱,收集甲醇相,高纯 N₂ 吹干;4. 加 1mL 甲醇-甲苯(体积比为 1:1)和 1mL 0.2 mol/L KOH 甲醇溶液,37℃ 保温 15min;加 2mL 去离子水、0.3mL 1 mol/L 冰醋酸(调 pH 值至中性^[17])、2mL 正己烷,涡旋混匀 30s 后提取上层的 FAMES;5. 在酯化样品中加入 13:0 与 19:0 甲基酯或者 16:0 与 24:0 甲基酯作内标^[18,19,20],GC 测定。Griffiths 等^[21]在土壤中直接加入 18 氘化双亚麻油酸磷脂胆碱(octadeuterated dilinoleoyl phosphatidylcholine, DDP 或 LPC)计算 PLFAs 回收率。

TSFAMES 法步骤为:1. 取 3g 土壤(干重),加 3mL 3.75 mol/L NaOH 甲醇-水(体积比为 1:1),涡旋振荡后于 80℃ 水浴保温 30min(此过程中细胞溶解,脂肪酸从细胞磷脂上水解下来并转移到钠盐上);2. 加入 6mL 6 mol/L 盐酸-甲醇(体积比为 1:0.85),85℃ 水浴保温 10 min(甲酯化);3. 加 6mL 正己烷-甲基丁醚(体积比为 1:1),将 FAMES 由酸液中提取至有机相;4. 2500rpm 离心 10min,收集有机相并经 N₂ 吹干,FAMES 溶于少量正己烷后 GC 测定,MIDI 系统分析。Drijber^[15]认为,可采用条件较温和的碱-甲醇溶液分解法(将 FA 从磷脂骨架上水解下来形成 FAMES)提取酯连接而不是游离的脂肪酸,以便更准确地反映土壤活体微生物量。

PLFAs 与 TSFAMES 两种提取法优、缺点比较见表 1。

表 1 PLFAs 与 TSFAMES 提取法的比较^[9,14,15]

Table 1 Comparison between the PLFAs and TSFAMES extraction^[9,14,15]

	PLFAs	TSFAMES
来源及意义 Origin and meaning	仅来自于活体细胞膜;可了解土壤微生物群落即时状态 Coming only from viable cellular membranes; providing information on the present status of microbial communities in soil	部分来自于土壤稳定有机质(土壤腐殖质、根系);反映土壤微生物代谢史 Originating partly from soil stable organic matters (soil humic substances and plant roots); providing insight into history of microbial communities
脂肪酸种类 Type of FAs	仅有 EL-脂肪酸,多为细菌特有 Only EL-PLFAs mostly specific for bacteria	酯连接与非酯连接 PLFAs,多为真菌所特有, FAs 多小于 14CEL and Non-ester linked FAs mostly specific for fungi, more FAs < 14 C in length
精密度 Precision	变异系数约 14% An average CV of nearly 14%	变异系数达 40% An average CV of nearly 40%
检出限量 Detection limit	群落指纹分析至少需要 1.1g 土壤;测定总脂肪酸含量时至少需 1.8g 土壤 ≥ 1.1 g to obtain a reliable community fingerprint; ≥ 1.8 g to obtain reliable total FAs contents	群落指纹分析至少需要 140mg 土壤;测定总脂肪酸含量时至少需 170mg 土壤 ≥ 140 mg to obtain a reliable community fingerprint; ≥ 170 mg to obtain reliable total FAs contents

多种因素影响 PLFAs 的提取效率:①甲醇与土壤比例至关重要^[22]。②缓冲液及相应 pH 值。如用酸性柠檬酸代替中性磷酸盐缓冲液提取酸性高有机质土壤,可提高磷脂回收率且避免无机 P 污染(Frostegård 等认为,三价柠檬酸根所键合的高浓度钠离子是 PLFAs 高回收率的真正原因^[23]);又如,C14~C20 PLFAs 在没有其他成分保护时会被氧化而迅速降解,提高酸度可延迟酸败。③盛放磷脂的玻璃器皿应“10% HCl 浸泡后,于 450℃ 烘 4h^[24]或在 400℃ 过夜”去除磷脂污染^[25]。④硅胶应绝对避免与水等强极性介质接触,使用前应在 120℃ 活化 2h^[26]。⑤整个提取过程应在避光、低温(< 35℃)条件下完成。

为保证 PLFAs 分析准确,处理土壤样品时应尽量减少筛分磨匀等操作,以保证真菌菌丝体等微生物细胞结构的完整性^[24]。土壤样品的保存也必须谨慎,以 -80℃ 冷冻或冻干保藏为首选(若采土时平均温度大于 20℃,则 4℃ 冷藏对 PLFAs 测定结果的影响难以预料)。土壤样品的数量也直接影响 PLFAs 测定结果。例如,Drenovsky^[14]发现:当土样较少时(< 1.1g 干土重),不同 PLFAs 提取方法的土壤微生物组成差别极小(原因是土样数量低时所提取的 PLFAs 亦少,微量脂肪酸差异难以显现);而当土壤样品较多时(≥ 1.8g 干土重时),不同 PLFAs 法分析结果差异显著(其原因是大量土样使微量 PLFAs 得以回收,从而展示出不同土壤微生物群落结构的细微差异)。

1.2.2 对 PLFAs 的鉴定 通常用 MIDI 系统(Microbial Identification System)、气质联机(Gas Chromatography-Mass

Spectrometry, GC-MS)^[27] 和液质联机等方法 (High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, HPLC-ESI-MS)^[28,29] 鉴定 PLFAs。

MIDI 系统是以火焰离子检测器反复测定的标准脂肪酸保留时间为基础,用标准混合脂肪酸保留时间锁系统进一步校准,整个过程通过 Automated Sherlock ® MIDI 软件实现。MIDI 系统能极精确地完成对二甲甲基乙缩醛以及典型甲酯等碳氢化合物的识别与定量。

GC-MS 以质谱为检测器,可获得更低的检测下限。该法可识别那些不包括在 MIDI 系统中的 FAMEs,且可排除被 MIDI 系统错误识别为 FAMEs 的非酯成分。虽然, MIDI 系统与 GC-MS 均可定性与定量,但前者仅适用于 C9 ~ C20 脂肪酸,而后者可检测大于 C30 脂肪酸。

HPLC-ESI-MS 可分析完整磷脂种类(极性头部)与脂肪酸侧链(非极性尾部),能展示最初活体细胞膜磷脂分子所承载的全部信息。此系统中,磷脂类物质是通过其头部基团而不是通过其侧链分离的。

2 PLFAs 技术在土壤微生物研究中的应用

通常,分析 PLFAs 有以下两个途径和目的^[9]:①分析单一菌种组成以便比较或评价不同菌种特征性磷脂,提高 PLFAs 数据库的多项分类能力;②分析自然环境或实验室中培养的个别微生物类群磷脂成分,研究特定功能菌群结构变化和代谢途径。目前,PLFAs 技术已被用于细菌纯培养对外界胁迫的应答、根系排泄物对根际微生物影响、养分对泡囊丛枝菌的影响、农田土壤微生物区系特征以及诱导植物抗病性等领域^[15,30]。

2.1 土壤微生物量的测定

微生物量用来估计特定环境中活性微生物数量和代谢转化能力。由于磷脂存在于所有活体细胞膜且随菌体死亡而迅速降解,因而它们是极好的标识生物量的信号分子。真细菌总 PLFAs 含量大致为 100 μmol/g 干细胞。Sundh 等^[31]用甲烷氧化菌特定脂肪酸 16:1ω8、18:1ω8 计算不同土层甲烷氧化菌含量为 0.3 ~ 51 × 10⁶ 细胞数/克湿泥炭土。PLFAs 与 SIR 法测定的微生物量之间的相关系数在 0.900 ~ 0.984 之间;PLFAs 与总腺嘌呤核苷酸之间的相关系数为 0.959^[9];菌群 PLFAs 含量与吖啶橙直接计数法或 ATP 法相关性也很好^[11]。但值得注意的是,不同微生物体结构的细微差异可能会影响特定 PLFAs 与土壤微生物量之间的转换系数,从而为研究未知或不可培养微生物生物量带来一定的困难。

2.2 土壤微生物菌群结构的分析

微生物群落结构决定土壤中特定生化过程能否发生^[1]。由于不同微生物体酶系不同,致使个别生物体特定脂肪酸已经在遗传上被确定下来^[4]。因此,对某些微生物来说,其特定的 PLFAs 是唯一的^[25]。如 C14:0、C16:0 或 C18:0 脂肪酸存在于几乎所有土壤微生物群落磷脂中,可以作为衡量总群落生物量的指标^[27,32];18:2ω6,9、18:1ω9 等一般为真核生物所特有^[33];i15:0、a15:0、15:0、i16:0、16:1ω9、16:1ω7t、i17:0、a17:0、17:0、cy17:0、18:1ω7 和 cy19:0 总和可代表细菌总脂肪酸^[34];"奇数支链脂肪酸/偶数单链脂肪酸"的比值可表示了"G⁺/G⁻比率"^[33,35];10ME 分子是放线菌或硫化还原菌等特有脂肪酸^[35];另外,大多数放线菌含有 iso-或 anteiso-脂肪酸;cisΔ9 为好氧菌特有脂肪酸;而 C18:1、C11:1 为大多数 G-厌氧菌所特有^[4,9];16:1ω5、18:1ω9、20:1ω9 和 20:4 可作为特定标识物来识别并计算 *Gigaspora rosea* 属菌丝体生物量^[36],其中 16:1ω5 可用于估算根中泡囊丛枝菌(AM 真菌)生物量(由于 AM 中绝大多数 NLFAs 仅存在于贮存结构(例如在孢子、泡囊)中,因此可用 16:1ω5 的 NLFAs/PLFAs 比率区分菌丝与贮存结构^[25,37,38]);cy-脂肪酸为无色菌(*Achromobacter*)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)标识物^[4]。

2.3 土壤微生物菌群代谢状态的研究

菌体在代谢胁迫时会积累特殊脂肪酸,分析这些信号分子可了解逆境微生物群落原位组成。比如,细菌易积累聚-β-羟基丁酸;真菌则合成内源性甘油三酸酯^[1,39]。Lukas 等^[40,41]认为在某种代谢胁迫(如化学污染、干旱、温度骤变、饥饿、高氧、低 pH 值等)条件下,菌体 PLFAs 组成可能会发生下列一种或几种变化:饱和/不饱和脂肪酸、反式/顺式单烯脂肪酸或总环化脂肪酸/单烯前体比率升高,或者为维持脂膜流动性而诱导不饱和脂肪酸双键位置变动。Mazumder 等^[41]实验表明:培养基氧浓度由 11% 升高到 100% 时, *Pseudomonas jessenii*

菌胁迫指示物脂肪酸 cy17:0 的浓度升高了 5 倍。

另一个重要的逆境指示物是甘油二酯脂肪酸(DGFA)。由于磷酸酶会迅速切去死亡菌体破裂细胞膜游离 PLFAs 极性头部基团并形成 DGFA,因而 DGFA/PLFAs 可表示死亡细胞/活细胞的比率^[39]。Ingrid 等^[42]认为,NLFAs 是能量贮存物质(且可支持菌丝体 C 的迁移与转化),NLFAs/PLFAs 比率能反映 AM 真菌能量贮存状态。Olsson 等^[43]发现与高 P 介质相比,在无 P 或低 P 介质中生长的菌丝体长度会增加 40%(即高 P 可能不利于真菌生物量的积累)。由于腐熟时间长的微生物群落磷脂组成趋于更为常见的种类,Lei 等^[44]认为 PLFAs 组成分析可以用来确定堆肥的成熟度。

2.4 农田生态系统中土壤微生物区系变化的研究

首先,微生物膜磷脂成分很易受到环境或其他生物因素的影响^[24,45,46-48]。比如,温度升高会导致活体微生物膜磷脂双分子层流动性增加、非双层脂相形成,并最终导致膜的非特异性渗透、饱和或支链脂肪酸增加以及菌群脂肪酸环丙烷数量或平均 C 链长度变化。土壤微生物 PLFAs 因季节更替所引起的变化要比因旱涝灾害或施入高量有机质引起的变化大得多^[3]。Toyota 等^[49] PLFAs 分析结果也表明土壤微生物群落结构呈现明显的季节变化。Wilkinson^[50]发现:真菌总 PLFAs 量不受湿度影响,而细菌则相反。Bossio 等^[51]认为桔秆与水淹会导致微生物对底物与氧利用方式变更,进而显著影响菌群 PLFAs 组成。Clapperton 等^[52]认为,蚯蚓的活动可提高土壤 PLFAs 含量、增强 G⁻细菌活力。

其次,施肥处理影响 PLFAs 组成。Pankhurst 等^[53]通过 PLFAs 分析发现,高盐土壤中含有大量耐盐菌。Bååth 与 Bailey 等^[12,54]认为,由于细菌与真菌 C/N 比率不同,因此参与土壤养分快速转化与固持的土壤微生物库 C/N 比率变化能反映特定施肥处理土壤 N 或 C 在真、细菌群落中贮存潜力、代谢归宿。Wick^[55]证明,*Mycobacterium freedriksbergene* LB501T 的直链 PLFAs 与相应的非饱和 PLFAs 和总饱和环状支链脂肪酸的比例与 C 源混合底物的比例有关。Kieft^[56]通过对各种养分(C、N、P、Glc-C、NH₄NO₃-N、KH₂PO₄-K)配施条件下土壤 PLFAs 测定后发现:与空白相比,N 或 P 不会增加可培养细胞数量;与 N、P 处理相比,有机 C 明显增加了可培养菌群数量;水分是醋酸盐矿化作用的主要限制因子,而 N 或 P 则没有影响。Böhme 等^[57]通过 28 种 PLFAs 的主成分分析表明,有机肥与 NPK 处理的土著微生物区系明显不同,而这种变化主要是由 G⁻细菌与真菌引起的。DeGroot^[58]等发现,养分贫瘠土壤微生物区系以真菌群落为主。Cookson 等^[59]研究表明,施用于草土壤总 PLFAs 含量明显高于空白、施化肥或干草+化肥处理。

最后,耕作方式改变土壤微生物 PLFAs 组成。Bailey^[54]采用(双)抑制剂附加比率法(Inhibitors additivity ratio, IAR)发现,在免耕土壤与草原修复土壤中积累了大量真菌。Feng 等^[60]发现免耕条件下 PLFAs 量比耕作土壤高,他们认为湿热条件下常规耕作土壤中出现的疏松-紧实“恶性循环”会导致有机质减少。

2.5 PLFAs 分析在生物修复中的应用

陆地生态修复过程包括生境功能与结构特性修复两个方面,灵敏的监测手段是生态修复过程优化的前提^[32]。由于土壤微生物对环境变化极为敏感,因此分析土壤微生物群落 PLFAs 组成可反映出土壤修复过程中各时期的细微差异。例如,Mummey 等^[11]发现:真菌与细菌 PLFAs 组成丰度的相对变化,可评价遭受不同程度破坏的土壤生态系统的恢复状况。Richard 等^[61,62]认为:赤杨(*Alnus*)等树种会使土壤从无真菌而富含 G⁺为主的菌群向富含真菌的群落结构转化,自然生态系统中的土壤微生物群落主要受真菌代谢途径的影响。

2.6 标记¹³C技术在 PLFAs 分析中的应用

由于底物可用性以及代谢途径不同,微生物对¹³C和¹²C的富集存在明显差异^[63]。原则上,¹³C标记技术能够研究所有含 C 化合物的微生物同化、异化过程。Sun^[64]认为¹³C标记技术有利于对已标记成分的代谢周转过程与机理进行深入分析,并用来估计磷脂的代谢速率。Arao^[65]用 1-¹³C醋酸盐培养土壤 24h 后发现,PLFAs 中参入的¹³C多于 NLFAs 和 GLFAs。Johnsen 等^[66]将¹³C标记菲加入土壤直接将活体代谢过程与菌体分类相结合,并定量菲降解微生物固醇、GLFAs 以及 PLFAs。Mark 等^[67]利用¹³C标记添加技术表明:不同植物(如黑麦草与苜蓿)的不同部位(如秸秆与根部残体中)C 源会参入不同土壤微生物体 PLFAs 中,并且土壤微生物 PLFAs 总

C 中来源于植物残体的仅占很少一部分。此结果一方面说明,土壤微生物对植物残体的降解具有选择性;另一方面也表明,在土壤中大多数微生物也许并不参与植物残体的降解。Malossoa 等^[68]在利用¹³C标记的植物残体研究有机质降解与微生物群落结构变化之间的关系时,也发现:与麦角固醇中¹³C富集现象相反,微生物体 PLFAs 没有随着植物体降解而发生显著变化。显然,¹³C标记技术通过直接将菌群活力与相应¹³C-标记代谢物相联系,极大地拓展了 PLFAs 技术的应用前景^[69]。

3 PLFAs 分析技术不足

尽管 PLFAs 可用来分析复杂的土壤微生物,但该法在应用中仍存在局限性。

(1)对原位土壤微生物群落中特定菌种指征有时不够明确 Bossio 等^[51]认为,PLFAs 法所依赖的针对个别脂肪酸标识物的细致描述源于少数可被分离的微生物纯培养。因此,在研究非培养菌群占绝大多数的原位土壤微生物时,无法证明某种脂肪酸标记物一定具有普遍的代表性。另外,不同菌种相同脂肪酸的相互叠加也难于在种水平上辩明微生物群落的确切组成^[70,71]。比如,18:2 ω 6 存在于个别细菌体内^[61];G⁻菌外层膜成分脂多糖的 β -OHFA 也存在于个别 G⁺菌、真菌或植物体之中^[9]。因而,在利用 PLFAs 技术分析特定菌群有机质动力学时尚有一定困难^[33]。

(2)PLFAs 的提取易受其他有机质的干扰 提取磷脂的颜色一般由黄色至棕色,它们主要是由腐殖酸引起的(占 PLFAs 总量 5%~10%)^[22]。Bååth^[12]实验表明,SIR 法测定微生物量-C 与总 PLFAs 回归曲线未过原点,也说明所提取的 PLFAs 中存在其他杂质。

(3)用于 PLFAs 分析的样品不易保存 Schutter 等^[15]认为,饱和脂肪酸会在 O₂ 作用下发生自氧化作用。因此,在好氧条件下土壤 PLFAs 的组成可能会发生一些不可预料的变化。另外,-80℃的贮存条件也是极为苛刻的。

(4)PLFAs 技术在估算真菌生物量时尚存不足 真菌 PLFAs 占总菌体 PLFAs 含量的 16.5%,该数值比用特定抑制剂测定的呼吸活力低很多^[24]。膜磷脂与细胞代谢活力之间出现这样的差异,原因可能是丝状真菌与单细胞细菌的表面积与体积间的比率不同;或是由于真核细胞细胞器与诸如硝化细菌中薄层状结构在分类尺度上有差异^[24]。因此,用 PLFAs 法计算真菌生物量时应明确 PLFAs 与菌体体积、质量之间的转换系数,并用其他方法验证。

(5)对古菌分析无能为力 古细菌膜成分只有醚键(二醚与四醚成分为主)^[35],因此不能用 PLFAs 法分析古细菌的组成变化。

4 结语

PLFAs 在土壤微生物中分布广泛、种类繁多、活体外迅速降解、分析方法灵敏且重复性较好,因此可用来描述原位土壤微生物主要群落的数量特征^[72]。但其应用受到微生物特定种属 PLFAs 定量、定性信息缺乏的制约;微生物个别种属的 PLFAs 构型相互叠加,甚至个别 PLFAs 所提供的菌群结构信息相互矛盾;不同 PLFAs 分析方法所得结果差异显著。

因此,在应用 PLFAs 技术时以下几点值得考虑:①分析结构特异性 PLFAs,以便不断完善不同菌种的特定脂肪酸数据库;②利用特定环境或特殊生理状态下不同微生物群落,揭示各种类型脂肪酸(如 PLFAs 与相应 NLFAs、GLFAs)之间或脂肪酸与其他生物标识物(蛋白质、核酸等物质)之间密切关系;③通过¹³C-底物添加技术在种水平上将功能菌群与特定有机质分解代谢相联系。只有这样,才能对土壤微生物参与的各种生物地化过程进行深入研究,才能使与土壤有关的生物层以可控方式向有利于人类生存发展的方向演化。

References:

- [1] Vestal J R and White D C. Lipid Analysis in Microbial Ecology. BioScienc, 1989, 39(8):535~541.
- [2] Insam H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. Geoderma, 2001, 100(3-4):389~402.
- [3] Bossio D A, Scow K M, Gunapala N, et al. Determinants of Soil Microbial Communities: Effects of Agricultural Management, Season, and Soil Type on Phospholipid Fatty Acid Profiles, Microb. Ecol., 1998, 36(1):1~12.
- [4] Zelles L, Bai Q Y, Beck T, et al. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure

- in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1992, 24 (4):317 ~ 323.
- [5] Tunlid and White, *et al.* Microbial Membrane Components and Fatty Acids. In: PAUL E A and CLARK F E eds. *Soil Microbiology And Biochemistry*. Second Edition. Academic Press, 1996.46 ~ 49.
- [6] Morgan and Winstanley. *Cell Envelope Biomarkers*. In: Elsas J. D., Trevors J. T., Wellington E M. H. eds. *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, Inc, 1997.332 ~ 335.
- [7] Li J W. Lipids. In: Shen T, Wang J Y eds. *Biochemistry*. Beijing: Higher Education Press, 1989. 44 ~ 73.
- [8] Suutari M, Laakso S. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology*, 1994, 20(4):285 ~ 328.
- [9] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and Lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fertil Soils*, 1999, 29(2):111 ~ 129.
- [10] Steinberger Y, Zelles L, Bai Q Y, *et al.* Phospholipid fatty acid profiles as indicators for the microbial community structure in soils along a climatic transect in the Judean Desert. *Biol Fertil Soils*, 1999, 28(3):292 ~ 300.
- [11] Hill T C J, Mcpherson E F, Harris J A, *et al.* Microbial biomass estimated by phospholipid phosphate in soils with diverse microbial communities. *Soil Biol Biochem.*, 1993, 25(12): 1779 ~ 1786.
- [12] Bååth E, Anderson T H. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35 (7): 955 ~ 963.
- [13] White D C, Davis W M, Nickels J D, *et al.* Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 1979, 40(1): 51 ~ 62.
- [14] Drenovsky R E, Elliott G N, Graham K J, *et al.* Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36(11):1793 ~ 1800.
- [15] Schutter M E, Dick R P. Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Methods for Characterizing Microbial Communities. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 2000, 64(4):1659 ~ 1668 (2000).
- [16] Glucksman A M, Skipper H D, Brigmon R L, *et al.* Use of the MIDI-FAME technique to characterize groundwater communities. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(4):711 ~ 719.
- [17] Stegera K, Jarvis Å, Smårs S, *et al.* Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55 (2): 371 ~ 382.
- [18] Abraham W R, Hesse C and Pelz O. Ratios of Carbon Isotopes in Microbial Lipids as an Indicator of Substrate Usage. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11):4202 ~ 4209.
- [19] Butler J L, Williams M A, Bottomley P J, *et al.* Microbial Community Dynamics Associated with Rhizosphere Carbon Flow. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11):6793 ~ 6800.
- [20] Keinänen M M, Korhonen L K, Lehtola M J, *et al.* The microbial community structure of drinking water biofilms can be affected by phosphorus availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1):434 ~ 439.
- [21] Griffiths B S, Ritz K, Ebbelwhite N, *et al.* Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31 (1): 145 ~ 153.
- [22] Nielsen P, Petersen S O. Ester-linked polar lipid fatty acid profiles of soil microbial communities: a comparison of extraction methods and evaluation of interference from humic acids. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32 (8-9):1241 ~ 1249.
- [23] Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soil of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, 14(3):151 ~ 163.
- [24] Petersen S O and Klug M J. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(7):2421 ~ 2430.
- [25] Bååth E. The Use of Neutral Lipid Fatty Acids to Indicate the Physiological Conditions of Soil Fungi Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Microb. Ecol.*, 2003, 45(4):373 ~ 383.
- [26] Keinänen M M, Korhonen L K, Martikainen P J, *et al.* Gas chromatographic-mass spectrometric detection of 2- and 3-hydroxy fatty acids as methyl esters from soil, sediment and biofilm. *Journal of Chromatography B*, 2003, 783 (2):443 ~ 451.
- [27] Salomonová S, Lamačová J, Rulík M, *et al.* Determination of phospholipids fatty acids in sediments. *Acta univ. Palacki. Olomuc. Fac. rer. nat. Chemica*, 2003, 42:39 ~ 49.
- [28] Karlsson A A, Michelsen P, Larsen A. Normal-phase liquid chromatography class separation and species determination of phospholipids utilizing electrospray mass spectrometry /tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1996, 10(7): 775 ~ 780.
- [29] Fang J, Barcelona M J, Alvarez P J. A direct comparison between fatty acid analysis and intact phospholipid profiling for microbial identification. *Organic Geochemistry*, 2000, 31 (4):881 ~ 887.
- [30] Eroshin V K, Dedyukhina E G. Effect of lipids from *Mortierella hygrophila* on plant resistance to hytopathogens. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, 18(2):165 ~ 167.
- [31] Sundh I, Borgå P, Nilsson M, *et al.* Estimation of cell numbers of methanotrophic bacteria in boreal peatlands based on analysis of specific phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 18(2):103 ~ 112.
- [32] Mummey D L, Stahl P D, Buyer J S. Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21(3): 251 ~ 259.
- [33] Frostegård Å, Bååth E, Tunlid A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipids fatty acid analysis. *Soil Biol Biochem.*, 1993, 25(6): 723 ~ 732.
- [34] Priha O, Grayston S J, Pennanen T, *et al.* Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizospheres of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings in an organic and mineral soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 30 (2):187 ~ 199.
- [35] Bai Q, Gatteringer A, Zelles L. Characterization of Microbial Consortia in Paddy Rice Soil by Phospholipid Analysis. *Microb Ecol*, 2000, 39(4):273 ~ 281.
- [36] Sakamoto K, Iijima T, Higuchi R. Use of specific phospholipid fatty acids for identifying and quantifying the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36(11):1827 ~ 1834.
- [37] Olsson P A, Thingstrup I, Jakobsen I, *et al.* Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(13): 1879 ~ 1887.
- [38] Nielsen K B, Rasmus K J, Olsson P A, *et al.* Colonization and molecular diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the aquatic plants *Littorella uniflora* and *Lobelia dortmanna* in southern Sweden. *Mycol. The British Mycological Society*, 2004, 108 (6): 616 ~ 625.
- [39] KIEFT T L, Ringelberg D B, White D C. Changes in Ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(9):3292 ~ 3299.
- [40] Wick L Y, Pelz O, Bernasconi S M, *et al.* Influence of the growth substrate on ester-linked phospho- and glycolipid fatty acids of PAH-degrading *M. sp.*

- LB501T. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(8):672 ~ 680.
- [41] Mazumder R, Pinkart H C, Alban P S, *et al.* Low-Substrate Regulated Microaerophilic Behavior as a Stress Response of Aquatic and Soil Bacteria, *Current Microbiology*, 2000, 41(2): 79 ~ 83.
- [42] Aarle I M, Olsson P A. Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (11):6762 ~ 6767.
- [43] Olsson P A, Aarle I M, Allaway W G, *et al.* Phosphorus Effects on Metabolic Processes in Monoxenic Arbuscular Mycorrhiza Cultures. *Plant Physiology*, 2002, 130(3):1162 ~ 1171.
- [44] Lei F, VanderGheynst J S. The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting. *Process Biochemistry*, 2000, 35 (9): 923 ~ 929.
- [45] BOGGS L C, Kennedy A C, Reganold J P. Use of Phospholipid fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10):4062 ~ 4064.
- [46] Boggs L C, Kennedy A C. Use of PLFA and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 4062 ~ 4064.
- [47] Ringelberg D B, Sutton S, White D C. Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiology Review*, 1997, 20(3-4):371 ~ 377.
- [48] Petersen S P, Frohne P S, Kennedy A C. Division S-3—Soil Biology & Biochemistry Dynamics of a Soil Microbial Community under Spring Wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 2002, 66(3):826 ~ 833.
- [49] Toyota K, Kuninaga S. Comparison of soil microbial community between soils amended with or without farmyard manure. *Applied Soil Ecology*, Available online 28 October 2005.
- [50] Wilkinson S C, Anderson J M. Spatial Patterns of Soil Microbial Communities in a Norway Spruce (*Picea abies*) Plantation. *Microb Ecol*, 2001, 42(3): 248 ~ 255.
- [51] Bossio D A, Scow K M. Impacts of Carbon and Flooding on Soil Microbial Communities: Phospholipid Fatty Acid Profiles and Substrate Utilization Patterns. *Microb Ecol.*, 1998, 35(3):265 ~ 278.
- [52] Clapperton M J, Lee N O, Binet F, *et al.* Earthworms indirectly reduce the effects of take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) on soft white spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Fielder). *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33 (11):1531 ~ 1538.
- [53] Pankhurst C E, Yu S, Hawke B G, *et al.* Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity or alkalinity at three locations in South Australia. *Biol Fertil Soil*, 2001, 33(3):204 ~ 217.
- [54] Bailey V L, Smith J L, Bolton H Jr. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34(7): 997 ~ 1007.
- [55] Wick L Y, Pasche N, Bernasconi S M. Characterization of Multiple-Substrate Utilization by Anthracene-Degrading *Mycobacterium freedriksbergense* LB501T. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10):6133 ~ 6142.
- [56] Kieft T L, Kovacik W P. Factors limiting microbial growth and activity at a proposed high-level Nuclear repository, Yucca Mountain, Nevada. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8):3128 ~ 3133.
- [57] Böhme L, Langer U, Böhme F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2005, 109(1-2):141 ~ 152.
- [58] DeGroot S H, Claassen V P, Scow K M. Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37(8):1427 ~ 1435.
- [59] Cookson W R, Abaye D A, Marschner P, *et al.* The contribution of soil organic matter fractions to carbon and nitrogen mineralization and microbial community size and structure. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37(9):1726 ~ 1737.
- [60] Feng Y, Motta A C, Reeves D W, *et al.* Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35(1):1693 ~ 1703.
- [61] Richard D B, Walkerb L R. Impact of colonizer plant species on the development of decomposer microbial communities following deglaciation. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36(3):555 ~ 559.
- [62] Richard D B, Walkerb L R. The measurement of soil fungal:bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands, *Biol Fertil Soil*, 1999, 29(3):282 ~ 290.
- [63] Zhang C L. Stable carbon isotopes of lipid biomarkers: analysis of metabolites and metabolic fates of environmental microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(1):25 ~ 30.
- [64] Sun M Y. Mass spectrometric characterization of ^{13}C -labeled lipid tracers and their degradation products in microcosm sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2):455 ~ 466.
- [65] Arao T. In situ detection of changes in soil bacterial and fungal activities by measuring ^{13}C incorporation into soil phospholipid fatty acids from ^{13}C acetate. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31 (7):1015 ~ 1020.
- [66] Johnsen A R, Winding A, Karlson U, *et al.* Linking of Microorganisms to Phenanthrene Metabolism in Soil by Analysis of ^{13}C -Labeled Cell Lipids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6106 ~ 6113.
- [67] Mark A, Williams M A, Myrold D D, Bottomley P J. Carbon flow from ^{13}C -labeled straw and root residues into the phospholipid fatty acids of a soil microbial community under field conditions. *Soil Biology & Biochemistry*. Available online, 28 July 2005. 1 ~ 10.
- [68] Malossoa E, Englishb L, Hopkinsb D W, *et al.* Use of ^{13}C -labelled plant materials and ergosterol, PLFA and NLFA analyses to investigate organic matter decomposition in Antarctic soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004;36(1):165 ~ 175.
- [69] Boshker H T S, Nold S C, Wellsbury P, *et al.* Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C -labelling of biomarkers. *Nature*, 1998, 392(23):801 ~ 805.
- [70] Crossman Z M, Wang Z P, Ineson P, *et al.* Investigation of the effect of ammonium sulfate on populations of ambient methane oxidising bacteria by ^{13}C -labelling and GC/C/IRMS analysis of phospholipid fatty acids. *Soil Biology & Biochemistry*. Available online, 23 September 2005. 1 ~ 8.
- [71] Joergensena R G, Pothhoff M b. Microbial reaction in activity, biomass, and community structure after long-term continuous mixing of a grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37 (7):1249 ~ 1258.
- [72] Kaur A, Chaudhary A, Kaur A, *et al.* Phospholipid fatty acid-A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, 2005, 89(7): 1103 ~ 1112.

参考文献:

- [7] 李建武. 脂类. 见: 沈同, 王镜岩主编. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1989. 44 ~ 73.