

# 磷脂脂肪酸方法在土壤微生物分析中的应用\*

王曙光 侯彦林

(中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

**摘要:** 磷脂脂肪酸 (PLFA) 是活体微生物细胞膜的重要组分, 不同类群的微生物能通过不同的生化途径合成不同的 PLFA, 部分 PLFA 可以作为分析微生物量和微生物群落结构等变化的生物标记。在土壤微生物分析中, 越来越多地采用了 PLFA 方法。主要对 PLFA 方法在土壤微生物分析中的应用做一综述。

**关键词:** 磷脂脂肪酸 (PLFA), 土壤微生物, 生物量, 群落结构

**中图分类号:** Q93.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0114-04

## APPLICATION OF PHOSPHOLIPID FATTY ACID METHOD IN SOIL MICROBIAL ANALYSIS

WANG Shu-Guang HOU Yan-Lin

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, CAS, Beijing 100085)

**Abstract:** Phospholipid fatty acids are the major constituents of the membranes of all living cells, and different groups of microorganism synthesize a variety of PLFA through various biochemical pathways. Several PLFAs can be used as "signatures" to analyze changes in microbial biomass and microbial communities structure. More and more PLFA method was used in soil microbial analysis. This article briefly reviewed the applications of PLFA methods in soil microbial analysis.

**Key word:** Phospholipid fatty acid (PLFA), Soil microbe, Biomass, Communities structure

土壤微生物是土壤有机无机复合体的重要组成部分, 它们是土壤中生理、生化等各种反应的参与者和推动者。但是, 由于栖息在土壤中的微生物种类繁多, 生存状况复杂, 加上微生物本身个体微小, 结构简单, 缺乏可以区分的明显特征, 尤其它们的组成和活动及其引起的许多生化过程, 往往是互相交替、互相影响, 给土壤微生物数量、组成和生态分布的测定带来了许多困难。虽然目前也有一些分析方法, 但局限性很大, 传统的方法观察到的微生物不到微生物群落的1%。所以, 探索新的土壤微生物分析方法是土壤微生物学发展的当务之急。随着分子生物学的发展, 有几种新方法被引用到土壤微生物分析中, 如 PLFA 法, DNA 法和 Biolog 法等。PLFA 法以其对试验条件要求低、测试功能多和稳定性好等优点应用越来越多, 但在国内, 应用还比较少。本文主要对 PLFA 方法做一介绍, 综述了其在土壤微生物分析中应用, 以促进该方法在我国土壤生物学研究中的应用。

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.40071053)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.40071053)

中国科学院生态环境研究中心知识创新工程课题资助项目 (RCEES 99014)

联系人 E-mail: shgwang2002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-11-20, 修回日期: 2003-01-09

## 1 什么是 PLFA 方法

PLFA 是磷脂脂肪酸 (phospholipid fatty acid) 的英文缩写。PLFA 是构成活体细胞膜的重要组分, 不同类群的微生物能通过不同生化途径形成不同的 PLFA, 部分 PLFA 总是出现在同一类群的微生物中, 而在其它类群的微生物中很少出现, 细胞死亡后数分钟到数小时内细胞酶水解和释放磷脂, PLFA 被降解, 这是 PLFA 作为区分活体微生物群落标记的基础。Frostegård 等<sup>[1]</sup>对已有的磷脂提取方法进行改进后, 成功地应用到土壤微生物分析中。

PLFA 的命名一般采用以下原则: 以总碳数: 双键数和双键距离分子末端位置命名, c 表示顺式, t 表示反式, a 和 i 分别表示支链的反异构和异构, br 表示不知道甲基的位置, 10Me 表示一个甲基在距分子末端第 10 个碳原子上, 环丙烷脂肪酸用 cy 表示。从已有的研究结果可以发现, 作为革兰氏阳性细菌的标记 PLFA 主要有: i14:0、a15:0、i15:0、18:1 $\omega$ 9, 作为革兰氏阴性细菌的标记 PLFA 主要有: cy17:0、cy19:0、16:1 $\omega$ 5、18:1 $\omega$ 7、18:1 $\omega$ 9、18:2 $\omega$ 6、18:2 $\omega$ 6, 9 是标记真菌的 PLFA。用作放线菌的标记 PLFA 主要是 10Me18:0。当然, 对这些 PLFA 来源的划分并不是绝对的, 而是根据它们在同类群微生物中出现几率和专一性及稳定性的一个相对划分, 旨在通过它们反映土壤微生物的变化。不可否认的是, 有的 PLFA 可能同时来自不止一种微生物, 如 10Me18:0 就可能同时来自放线菌和细菌。

## 2 PLFA 方法在土壤微生物生物量分析中的应用

土壤微生物生物量是土壤养分重要的源和汇, 尤其与土壤有机质含量和转化有很大关系, 是反映土壤生物性质变化的一个重要指标, 受到大家的普遍重视。已有的土壤微生物量测试方法有: 熏蒸培养法 (fumigation-incubation), 熏蒸提取法 (fumigation-extraction) 和基质诱导呼吸法 (substrate-induced respiration) 等, 但这些方法只能用来反映总土壤微生物生物量, 不能反映属或种群水平的微生物生物量。PLFA 是目前较为流行的测定微生物生物量的一种新方法, 它根据不同类群微生物的指示性 PLFA 不同, 通过提取和分离指示性 PLFA, 测定它们的含量, 定量反映可繁殖或有潜在繁殖能力的不同类群微生物生物量和总生物量。由于 PLFA 在死亡微生物中很快被分解, 所以, 能很好的测定有繁殖能力的微生物生物量。

污染土壤的生物修复是目前大家研究的热点, Frostegård 等<sup>[2]</sup>用 PLFA 方法测试不同重金属污染森林和耕地土壤中生物量的变化, 发现重金属污染导致森林土壤中 10Me16:0, 10Me17:0 和 10Me18:0 增加, 耕地中 10Me16:0, 10Me18:0 下降, 15:0 和 17:0 增加, 表明森林土壤放线菌生物量增加, 耕地放线菌生物量下降, 细菌生物量增加。在有机污染物对土壤的影响研究中, Andersson 等<sup>[3]</sup>通过测 PLFA 18:2 $\omega$ 6, 9 的水平观察多环芳烃化合物 (PAH) 污染土壤中接种的 3 个白腐真菌生物量变化, 发现 18:2 $\omega$ 6, 9 水平增加, 表明真菌生物量的增加, 肉眼也观察到了大量菌丝, 同时还通过 PLFA 分析了细菌和白腐真菌相互作用的情况。

## 3 PLFA 方法在土壤微生物群落结构和生物多样性分析中应用

在对微生物的研究中, 有时会怀疑总生物量没发生变化时, 微生物群落结构是否

发生变化,而传统分析方法很难证实或观察到这种变化,但 PLFA 方法能用于这种情况下微生物群落结构的检测,是一种较好的评价广谱群落差异的分析方法<sup>[4]</sup>。Schmidt 等<sup>[5]</sup>采用 PLFA 方法测定土壤施用真菌和细菌杀菌剂对土壤微生物的影响,发现施用两种杀菌剂没有明显影响真菌/细菌微生物量比,但真菌杀菌剂对微生物群落结构影响很大。Kelly 等<sup>[6]</sup>用 PLFA 方法发现 Zn 污染土壤中指示菌根真菌和放线菌的 PLFA 相对含量下降,微生物群落结构发生了变化。Lei 等<sup>[7]</sup>用 PLFA 方法检测堆肥过程中接种微生物和调节 pH 对微生物群落结构的影响,发现在出现温度高峰前接种微生物对堆肥微生物群落结构没什么影响,但过程温度和起始 pH 调节影响显著。Yao 等<sup>[4]</sup>通过 PLFA 分析红壤地区微生物群落结构的变化后认为,土地使用历史、植被覆盖类型和作物栽培方式对微生物群落结构有明显影响。Marin 等<sup>[8]</sup>用 PLFA 方法观察 Swiss Jura 山区草原有机质循环对生物多样性的影响,认为微生物功能多样性同观察到的结构多样性是相应的,PLFA 丰富显示了生化功能的多样性和微生物种类多样性。PLFA 可以作为生物多样性的指示性标记。

#### 4 PLFA 在菌根研究中的应用

菌根是普遍存在的一种自然共生现象,菌根真菌是唯一直接联系土壤和植物根系的微生物。由于菌根能增加植物吸收养分,促进植物生长和增强植物抗逆性的能力,以及在污染土壤修复等方面的作用,引起了大家极大的兴趣。在对菌根的研究中,经常会遇到一些测试方法上的问题,如侵染率、菌丝量的测定受人为因素和其它微生物干扰较大,尤其是菌丝量的测定,显微镜下很难区分 AM 真菌菌丝和其它腐生真菌菌丝。随着 PLFA 方法的完善,其逐渐被引入到菌根的研究中。AM 孢子和丛枝菌根化根系提取的 PLFA 分析结果表明,AM 真菌有几种其它微生物不常有的 PLFA,虽然不同 AM 真菌 PLFA 的组成也不一样,但它们是高度相似的<sup>[9]</sup>,这为菌根研究采用 PLFA 方法奠定了基础。Olsson 等在这方面做了大量的工作,他们用 PLFA 方法观察 AM 真菌在土壤和根系,菌丝体和贮存结构中的分布,发现施 P 使土壤和根系中 PLFA 16:1 $\omega$ 5 水平下降,土壤中外生菌丝量与 PLFA 16:1 $\omega$ 5 呈较强的相关性,显微镜方法观察到根系侵染和土壤中菌丝量下降,两种方法结果是一致的<sup>[10]</sup>。他们又用 PLFA 方法测定亚麻子田地中施用 dazomet (棉隆,用作杀菌剂和除草剂)后菌根侵染率 and 外生菌丝量的变化,发现 PLFA 16:1 $\omega$ 5 水平下降,显微镜观察根系侵染率和土壤中菌丝量也下降<sup>[11]</sup>。Olsson<sup>[12]</sup>在其综述中认为,PLFA 16:1 $\omega$ 5 为评估土壤和根系中 AM 真菌生物量提供了一个有希望的新工具,通过特定的 PLFA 研究土壤中菌根菌丝和细菌,土壤和根系中 AM 真菌菌丝和腐生与寄生真菌菌丝间的相互作用是可能的。

#### 5 PLFA 方法和其它土壤微生物测试方法的比较

新近发展的几种土壤微生物分析方法,如 DNA 法,PLFA 法,Biolog 法等能对微生物群落进行更详细的分析,每种方法能针对土壤微生物特性、微生物群落结构和功能变化及差异进行独立分析。DNA 方法通过提取土壤中总 DNA,用特定 PCR 和限制性片段长度多态性(RFLP)结合,分析特殊标记基因库,根据在琼脂糖凝胶上的基因图谱(DNA 印迹)特殊基因带的数量、相对迁移位置和强度,定量和解释土壤微生物群落结构的变化。Biolog 法是把所有的土壤微生物群落固定在 Biolog GN 板上,好氧和异养微

生物在孔内生长发生一定的颜色反映,通过比色可以定量测定特定微生物种群和群落的代谢活性。Ibekwe 等<sup>[13]</sup>用 PLFA 方法和 Biolog 方法测农田和温室条件下种植不同植物土壤中微生物群落结构的变化,发现分析微生物群落时 PLFA 方法比 Biolog 更敏感。Balkwill 等<sup>[14]</sup>比较了 PLFA 方法与 ATP 法、细胞胞壁酸法、吡啶橙直接染色法测定沉积物中可繁殖微生物生物量的差异,发现几种方法测试结果是一致的,但 PLFA 法的标准偏差更小。Widmer 等<sup>[15]</sup>用 DNA, PLFA, Biolog 法分析杀虫剂降解土壤的微生物性质变化,发现3种方法都有很好的重复性,能分辨出不同处理土壤,但通过聚类分析,3种方法对同个处理土壤微生物性质测定结果相似性不太一致。因此,建议大家选用测试方法时要谨慎。

## 6 PLFA 测定方法及影响因素

PLFA 方法的简要过程为:取一定量的鲜土样,用氯仿、甲醇和柠檬酸缓冲液的混合液(1:2:0.8, V/V/V)振荡提取,取氯仿相, N<sub>2</sub> 吹干,氯仿溶解后过硅胶柱(100-200 目),以甲醇洗提, N<sub>2</sub> 吹干洗提液,用甲醇甲苯溶液(1:1, V/V)溶解后甲酯化,最后通过 GC-MS 进行磷脂脂肪酸甲酯的测定和鉴定,或通过查找 MIDI (Microbial Identification System) 库完成。

在土壤微生物分析过程中,还存在一些影响 PLFA 方法准确性的因子,但这方面的研究还不是很多,主要是通过微生物纯培养进行的,概括起来有以下几个:(1) 温度波动;(2) 饥饿;(3) 标记性 PLFA 的非专一性。在实际土壤微生物分析中,土壤有机质含量、植物的 PLFA 等也可能对该方法产生一定的影响,但做处理对照实验可解决部分问题。另外, PLFA 方法不能用来分析生态系统中单个菌株或种水平上的微生物。

## 参考文献

- [1] Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, **14**: 151 ~ 163.
- [2] Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59** (11): 3605 ~ 3617.
- [3] Andersson B E, Welinder L, Olsson P A, *et al.* *Bioresource Technology*, 2000, **73**: 29 ~ 36.
- [4] Yao H, He Z, Wilson M J, *et al.* *Microb Ecol*, 2000, **40**: 223 ~ 237.
- [5] Schmidt I K, Ruess L, Bååth E, *et al.* *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, **32**: 709 ~ 720.
- [6] Kelly J J, HaEggholm M, Tate R L. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**: 1455 ~ 1465.
- [7] Lei F, VanderGheynst J S. *Process Biochemistry*, 2000, **35**: 923 ~ 929.
- [8] Maire N, Borcard D, Laczkó E, *et al.* *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**: 1281 ~ 1293.
- [9] Bentivega S P, Morton J B. *Mycol Res*, 1994, **98**: 1419 ~ 1426.
- [10] Olsson P A, Bååth E, Jakobsen I. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63** (9): 3531 ~ 3538.
- [11] Olsson P A, Thingstrup I, Jakobsen I, *et al.* *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**: 1879 ~ 1887.
- [12] Olsson P A. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **29**: 303 ~ 310.
- [13] Ibekwe A M, Kennedy A C. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **26**: 151 ~ 163.
- [14] Balkwill D L, Leach F R, Wilson J T, *et al.* *Microbial Ecol*, 1988, **16**: 73 ~ 84.
- [15] Widmer F, Fließbach A, Laczkó E, *et al.* *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, **33**: 1029 ~ 1036.