

磷脂脂肪酸分析方法及其在土壤微生物多样性研究中的应用*

颜 慧¹ 蔡祖聪² 钟文辉^{1, 2†}

(1 南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097)

(2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

摘 要 磷脂脂肪酸(PLFA)是活体微生物细胞膜的重要组分,不同类群的微生物可通过不同的生化途径合成不同的 PLFA。一些 PLFA 可作为分析微生物量和微生物群落结构变化的“生物标记”。在土壤微生物分析中,越来越多地采用了 PLFA 方法。本文介绍了表征微生物的一些 PLFA、从土壤中提取 PLFA 的方法以及用 GC-MS 分析 PLFA 的原理。本文还将常用的研究微生物多样性的几种方法进行了比较。传统的分析土壤微生物群落的方法依赖于培养技术,只能培养和分离出一小部分微生物群落;Biolog 方法可用于研究土壤微生物群落生理多样性,即可反映微生物群落如何利用各种碳源底物,但对快速生长和适合在 Biolog 实验条件下生长的小部分群落成员有强烈的选择性;核酸分析方法的主要缺点是不能对土壤微生物进行定量分析;而 PLFA 方法相对于上述几种方法有诸多优势。本文通过一些实例证明 PLFA 方法的特色或独到之处,也分析了其缺点。采用 PLFA 方法并结合其他方法有助于获取土壤微生物群落多样性的更多和更全面而完整的信息。

关键词 土壤微生物;磷脂脂肪酸;生物量;群落结构;GC-MS(气相色谱-质谱);多样性
中图分类号 X172 文献标识码 A

土壤微生物参数很可能最早被用于表征土壤质量^[1]。土壤微生物群落的组成和活性很大程度上决定生物地球化学循环、土壤有机物的代谢过程以及土壤的肥力和质量^[1]。传统上,土壤微生物多样性研究多依赖于培养方法和显微技术,即采用选择性培养基从土壤样品中分离出纯菌株后进行鉴定,获得可培养微生物的种类和数量信息。但该方法存在以下缺点:(1)许多土壤微生物是不可培养的,分离鉴定到的微生物只占土壤微生物总数的 1%~10%,因此,通过该传统方法只能得到微生物群落信息的极小部分^[2]。(2)只能了解可培养的极少数微生物数量和群落结构,具有选择性且不能对大多数土壤微生物定量研究^[3]。(3)对于微生物群体相互作用研究的贡献很小^[3]。

目前,磷脂脂肪酸(PLFA)分析被广泛地应用于土壤微生物多样性研究。磷脂是所有生物活细胞重要的膜组分,在真核生物和细菌的膜中磷脂分别占约 50%和 98%^[4]。PLFA 是磷脂的构成成分,它具有结构多样性和生物特异性,土壤中 PLFA 的存

在及其丰度可揭示特定生物或生物种群的存在及其丰度。磷脂在细胞死亡后快速降解(厌氧条件下约需 2 d,而好氧条件下约需 12~16 d)^[5],故用以表征微生物群落中“存活”的那部分群体。总之,通过对 PLFA 的定量测定可完成对了解微生物活细胞生物量的测定,并可通过根据 PLFA 分析的种类了解土壤微生物群落结构。

1 PLFA 可以作为土壤微生物标记物

生物标记物可分为通用生物标记物(General biomarkers)和特定生物标记物(Specific biomarkers)两类。通用生物标记物可反映总生物量。如 PLFA、酯链磷脂脂肪酸(EL-PLFA)的总量可用于了解土壤微生物总生物量^[6,7]。革兰氏阳性和阴性细菌中均含有单不饱和脂肪酸(MUFA),但在革兰氏阳性细菌中它们对总 PLFA 的相对贡献很少(<20%),所以 MUFA 可用作革兰氏阴性细菌的通用生物标记^[8]。甲

* 土壤与农业可持续发展国家重点实验室基金(055122)资助

† 通讯作者, E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn

作者简介:颜 慧(1982-),女,汉族,江苏淮安人,硕士研究生,主要从事土壤微生物学和生物化学研究。E-mail: huixiaoyan@hotmail.com

收稿日期:2005-10-31;收到修改稿日期:2006-03-22

烷营养细菌特征性 PLFA 的总量可被当作甲烷营养细菌生物量^[9]。

特定生物标记物表征特定微生物。总 PLFA 谱中某些特征脂肪酸分别对细菌、真菌和放线菌是特异的^[10,11],且在大多数情况下 PLFA 的某专一类型在某一土壤微生物分类中占优势。直链脂肪酸广泛分布在微生物中。细菌除含有在其他生物中常见的直链脂肪酸,如油酸或顺型异油酸(十八碳-11-烯酸(顺),简称为 18 1 7)外,还含有一些独特的脂肪酸,如具有分支、-羟基和环丙基的脂肪酸^[12]。MUFA(单不饱和脂肪酸)(特别是 18 1 7)是具有厌氧-去饱和酶途径的真细菌的特征脂肪酸^[11]。支链脂肪酸(异、反异和支链的)主要发现于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性的硫酸盐还原菌、*Cytophaga* 和黄杆菌属(*Flavobacterium*)中^[13],而环丙基脂肪酸常见于

革兰氏阴性菌株和革兰氏阳性厌氧菌株^[8]。非酯链脂肪酸(NEL-PLFAs)是鞘酯、缩醛磷脂和其他氨基磷脂的组分。鞘酯已发现存在于拟杆菌属(*Bacteroides*)/黄杆菌属中^[14]。缩醛磷脂主要存在于梭状芽孢杆菌属等厌氧细菌中^[15],只有很少数的好氧和兼性厌氧细菌含有缩醛磷脂^[15,16]。在第 10 个碳上有甲基支链的脂肪酸是放线菌所特有的^[17]。多不饱和脂肪酸(PUFA)只存在于蓝细菌(cyanobacteria)中,并被认为是原核生物的特征性脂肪酸。真菌菌丝中已检测出存在长链非酯链羟基取代脂肪酸^[18]。

特定生物标记物的数目随着所研究的脂肪酸的增多而增加。特定生物标记物应该代表某一单独的属或种,且在土壤中的浓度应该较大,这样才能便于检测数量少的细菌^[19]。可作为特定生物标记物的一些脂肪酸列于表 1。

表 1 表征微生物的 PLFA^[4, 15, 16, 20~24]

Table 1 PLFA characterizing microbes

微生物类型 Microbial group	磷脂脂肪酸标记 ¹⁾ Phospholipids fatty acid signatures
细菌 Bacteria in general	含有以酯链与甘油相连的饱和或单不饱和脂肪酸(如 15 0、i15 0、a15 0、16 0、i16 0、16 1 5、16 1 9、16 1 7t、17 0、i17 0、a17 0、cy17 0、18 1 5、18 1 7、18 1 7t、i19 0、a19 0 和 cy19 0 等)
革兰氏阳性细菌 Gram-positive bacteria	含有多种分枝脂肪酸
革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	含有多种羟基脂肪酸
厌氧细菌 Anaerobes	cy17 0、cy19 0
好氧细菌 Aerobes	16 1 7、16 1 7t、18 1 7t
硫酸盐还原细菌 Sulfate-reducing bacteria	10Me16 0、i17 1 7、17 1 6
甲烷氧化菌 Methane-oxidizing bacteria	16 1 8c、16 1 8t、16 1 5c、18 1 8c、18 1 8t、18 1 6c
嗜压/嗜冷细菌 Barophilic/psychrophilic bacteria	20 5、22 6
黄杆菌 <i>Flavobacterium balustinum</i>	i17 1 7
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> spp.	各种支链脂肪酸
放线菌 Actinomycetes	10Me16 0、10Me17 0、10Me18 0 等
真菌 Fungi	含有特有的磷脂脂肪酸(如 18 1 9、18 2 6、18 3 6、18 3 3)
蓝细菌 Cyanobacteria	含有多不饱和脂肪酸(如 18 2 6)
微藻类 Microalgae	16 3 3
原生动物 Protozoa	20 3 6、20 4 6
脱硫细菌 Desulfobacteria	cy18 0 (7,8)
硫细菌 Sulfobacteria	i17 1 5、10Me18 1 6、11Me18 1 6
脱硫弧菌 Desulfobivrio	i17 1 7c、i15 1 7c、i19 1 7c
脱硫叶菌 Desulfobulbus	17 1 6、15 1

1) i、a、cy 和 Me 分别表示异、反异、环丙基和甲基分枝脂肪酸; c、t 分别表示脂肪端、顺式空间构造和反式空间构造 i、a、cy and Me refer to iso, anteiso, cyclopropyl and methyl branching fatty acids, respectively; c and t refer to the aliphatic end, cis configuration and trans configuration, respectively. Containing saturated or monounsaturated fatty acids linked to glycerol with ester; Containing a variety of branched fatty acids; Containing a variety of hydroxylated fatty acids; MUFA; Various branched chain fatty acids; Containing specific PLFAs; Containing polyunsaturated fatty acids

2 PLFA 的提取

PLFA 的提取和测定是 PLFA 分析的关键。PLFA 的提取主要采用简单提取、扩展提取和商用微生物鉴定系统(MIDI)提取等方法^[1]。

2.1 简单提取

简单提取用于提取酯链磷脂脂肪酸(EL-PLFA)。基本过程如下^[25~30]：

(1) 脂类抽提:按 0.8 : 1 : 2 的体积比向土样中先后加入磷酸盐缓冲液(0.1 mol L^{-1} , pH 7.0)、氯仿和甲醇,所加试剂的具体量一般根据 1 g 土壤加 1 ml 氯仿的原则,再根据所用的土壤作适当的改变^[31,32]。于暗处剧烈振荡 2 h,离心。将上清液转移到干净试管内,先后加入磷酸盐缓冲液和氯仿,剧烈振荡,静置过夜。液体分为两相,膜脂分布于氯仿层(下层)中。用氮气吹干或不吹干直接进行下一步固相抽提。

(2) 固相抽提柱层析分离脂类:将第(1)步萃取得到的下层提取液上样于硅酸键合固相抽提柱(Silicic acid bonded solid-phase-extraction column, SPE-SI),分别用氯仿、丙酮和无水甲醇洗脱可将脂类裂解并分离出中性脂、糖脂和磷脂^[32,33]。将含磷脂部分(即甲醇部分)用氮气吹干。

(3) 磷脂的碱性甲醇水解和皂化(甲基化):磷脂溶于甲苯-甲醇混合液和 0.2 mol L^{-1} 氢氧化钠的甲醇溶液,于 37 °C 温育 15 min,冷却至室温后用己烷-氯仿混合液、 1 mol L^{-1} 乙酸和蒸馏水^[31,32,34]萃

取,上层有机相即为磷脂脂肪酸甲酯(FAME)。

2.2 扩展提取

采用碱皂化的方法,虽然能保护对酸敏感的脂肪酸如带有环丙基支链的脂肪酸,但是不能完全释放带有氨基的羟基脂肪酸。而酸催化的水解虽然能更有效地释放带有氨基的羟基脂肪酸,却会引起环丙基脂肪酸的降解。采取扩展提取方法^[33,35]可克服这个问题。该方法可用于提取包括 EL-PLFA 和非酯链磷脂脂肪酸(NEL-PLFA)在内的全部 PLFA。

(1) 用与简单提取方法相同的操作方法从土壤样品中抽提脂类、将磷脂从脂类中解离出来并用碱性甲醇水解和皂化。

(2) 将皂化产物上样于氨基键合 SPE 柱(Aminopropyl-bonded SPE-column, SPE-NH₂),分别用氯仿和 2% 乙酸的甲醇溶液洗脱得到总磷脂脂肪酸甲酯和未皂化酯。总磷脂脂肪酸甲酯再经 SPE-NH₂ 柱层析,先后用己烷-二氯甲烷混合液和二氯甲烷-乙酸乙酯混合液(9:1)洗脱得酯链未取代脂肪酸(EL-UNSAFA)、酯链羟基取代脂肪酸(EL-HYFA)。

(3) 用苯磺酸键合 SPE 柱(Benzenesulphonic acid-bonded SPE column, SPE-SCX)层析将 EL-UNSAFA 分离为酯链饱和脂肪酸(EL-SATFA)、酯链单不饱和脂肪酸(EL-MUFA)和酯链多不饱和脂肪酸(EL-PUFA)。

(4) 未皂化酯经酸水解后进一步 SPE-NH₂ 柱层析,分离得到非酯链未取代的脂肪酸(NEL-UNSAFA)和非酯链羟基取代脂肪酸(NEL-HYFA)。

扩展提取简略步骤见图 1。

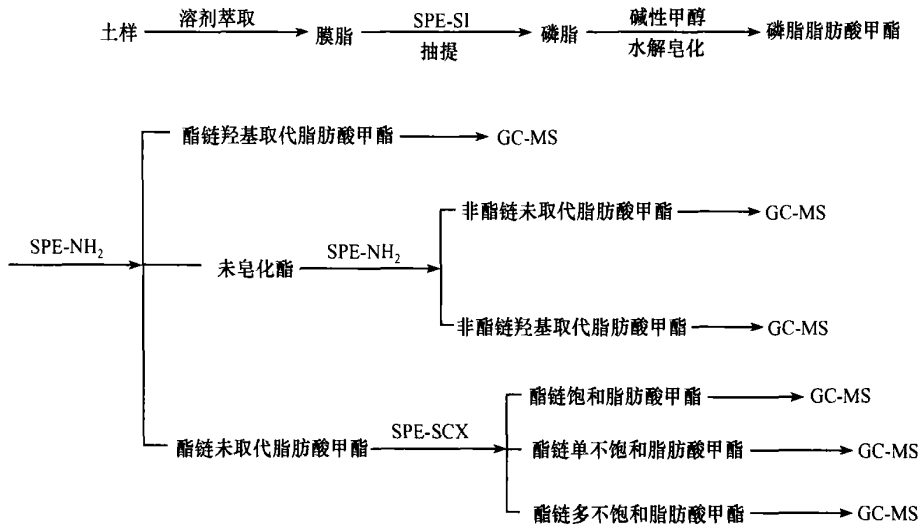


图 1 扩展提取步骤简图

Fig. 1 Extended extraction steps

2.3 MIDI(Microbial identification systems)方法

除上述方法外,有些研究者还用 MIDI 来提取和分析脂肪酸^[13, 36]。采用的操作方法包括用皂化/裂解液将脂肪酸从脂类中裂解出来、在 80 °C 下加入甲醇盐酸溶液使脂肪酸甲基化形成 FAME、提取 FAME、气相色谱(GC)分析等几个步骤^[14]。最后用 MIDI 开发商提供的自动程序软件对 FAME 进行分析。所提取的脂肪酸包括来自有生活力的细胞脂类和可能部分来自于细胞外的脂类^[1]。

MIDI 提取和简单提取方法由于其简单性、可同时处理大量的样品而被广泛应用于土壤微生物群落研究^[37]。用简单提取方法和 MIDI 方法提取土壤 PLFA 得到的脂肪酸谱相似^[38],一般有 20~48 种脂

肪酸,最多可达 72 种,其中直链脂肪酸和不饱和脂肪酸分别占 15%~25%和 30%~50%;甲基分枝脂肪酸占 25%~40%。采用扩展提取方法检测到的 PLFA 的数量介于 200 至 400 种之间,且显示出不同地点、不同耕种方式的土壤中脂肪酸总量和种类数以及百分比分布有显著差异^[39, 40]。NEL-PLFA 占总 PLFA 量的 21%~25%,EL-SATFA 和羟基取代脂肪酸(包括 EL-HYFA 和 NEL-HYFA)也大量存在。有一些微生物对群落的贡献很小,用简单提取方法得到的 PLFA 谱图很可能体现不出这部分微生物的存在,而扩展提取方法可以得到更详细的信息^[41]。采用 MIDI、简单提取、扩展提取方法得到的 PLFA 在表征微生物群落组成中存在一定的差异(表 2)。

表 2 采用 MIDI、简单提取、扩展提取方法得到的 PLFA 在表征微生物群落组成中的差异^[1]

Table 2 Difference between PLFAs extracted with the MIDI method, simple method and extended method in characterizing composition of microbial communities

项目 Items	MIDI	简单提取 PLFA Simple PLFA	扩展提取 PLFA Extended PLFA
区分两种群落的能力(利用多变量统计方法)			
生物量判定的适用性			
表征整个群落结构中所有单个组分的能力			
表征酯链脂肪酸以外的其他脂肪酸的能力			
测得的土样中脂肪酸种类	<50	<50(偶尔 70)	200~400
检测脂肪酸和分子中脂质之间关联的能力		酯链脂肪酸	酯链及非脂脂肪
检测土壤提取物中低浓度的已确定的脂肪酸的能力			
检测土壤提取物中特异脂肪酸的能力			
已知生物体中特征脂肪酸的数目	很少	很少	大量
广泛出现在谱图中的脂肪酸之间的相关性	高	高	正常
鉴定引起微生物群落改变的生物体的能力			

3 PLFA 的测定

经提取得到的 PLFA 的分析方法经历了不断完善的过程。Jeffrey 等^[31]将 FAME 氢化后,加入一定量的十九碳脂肪酸甲酯做内标,然后用气液色谱法检测。Rajendran 等^[42]将提取得到的 FAME 先经过薄层色谱法纯化,然后用 GC 分析,比较样品和标准物质的保留时间,大致确定各峰代表什么物质,然后采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析确定双键或环丙基的位置以及 PLFA 的几何结构。

上述方法均存在一定的问题而被淘汰,目前 PLFA 的分析测定基本上都采用准确、方便和快捷的 GC-MS 方法。毛细管柱采用 50 m × 0.2 mm × 0.33 μm(Hewlett-Packard 5890 系列 GC 系统)、30 m

× 0.25 mm × 0.25 μm(HP6890 GC 系统)、60 m × 0.132 mm × 25 μm(Hewlett Packard HP6890)几种规格^[6, 31, 32, 43];载气一般用氦气,流速 0.8~1.2 ml min⁻¹;进样口和检测器温度分别维持在 250 和 300 °C 左右;电子冲击能常规采用 70 eV;柱温采用程序升温法^[6, 31]。各种参数对分离效果均有影响,柱长越长,理论塔板数越高,分离越好,但也不能太长,否则柱效降低,且需要很高的进口压力;柱内径越小,柱效越高;柱温太高有损分离,太低拖长保留时间,因此选择柱温时要综合考虑多方面因素;进样口温度必须足够高,以便迅速蒸发样品,而不使效率因注射技术而受到损失,另外,该温度又必须足够低以避免热分解和重排;温度对检测器的影响很大程度上取决于所用检测器的类型,一般检测器的温度应该足够高,以不使样品或液相发生冷凝。

GC-MS 分析中需要使用标准样品。所使用的标准样品一般是 C₄-C₂₄混合标准样品,也有采用内标样品的,如 Zelles 和 Bai 分别用二甲基二硫醚(Dimethyl disulphide, DMDS)、二甲基呢唑啉(4,4-dimethylloxazoline, DMOX)、三甲基硅烷(Trimethylsilylation, TMSi)作为内标测定 MUFA、PUFA 和 PLOH(羟基取代脂肪酸)/ UNSFA(未取代脂肪酸)^[24]。

4 PLFA 方法的特色

PLFA 方法是一种快速、可靠而可重现的分析土壤微生物群落结构的方法,可用于表征在数量上占优势的土壤微生物群落,包括不可培养微生物。该方法最适合用作总微生物群落分析,而不是专门的微生物种类的研究^[44]。总结起来,PLFA 方法有如下优点:(1)检测环境样品中微生物群落时,可避免由培养和直接的计数方法引起的问题。(2)不仅可用于检测土壤样品,还可用于检测沉积物、水和腐殖质中微生物多样性。(3)相对容易且能快速处理大量样品。(4)与传统方法相比,能更精确地测定微生物的生物量。(5)PLFA 谱图包含了磷脂结构的详细信息,可利用这些信息研究微生物群落结构和微生物的代谢条件。

不同的土壤微生物多样性研究方法均有各自的特色和优缺点。如 Biolog 分析是一种群落水平生理特性分析方法,它基于微生物利用碳源能力的不同,利用 Biolog 系统来研究微生物功能多样性^[45,46]。该方法对快速生长和适合在 Biolog 实验条件下生长的小部分群落成员有强烈的选择性,而且被测试的底物不能准确地代表出现于生态系统中的底物类型^[45]。因此,Biolog 反应特征只能粗略地代表实际土壤微生物群落的底物利用动力学特征。核酸分析方法可对土壤微生物(包括那些占土壤微生物绝大多数的不可培养微生物)群落结构进行全面调查。核酸分析方法中最常用的是基于 PCR 的核糖体 DNA 分析方法,该方法的主要缺点是不能对土壤微生物进行定量分析,且在对 SSU rDNA 扩增中存在一定的偏差^[47~49]。PLFA 方法的特色或独到之处可用以下应用实例说明^[31,50~53]:

Yao 等^[52]以中国红壤作为研究对象,用 Biolog 和 PLFA 两种方法评价不同肥力和耕种历史的土壤样品的微生物生物量和群落结构差异,发现虽然两种方法都能提供群落结构差异的信息,但是 PLFA 较 Biolog 方法能更准确、更客观全面地反映出不同

肥力和耕种历史的土壤中微生物量和群落结构差异。Biolog 方法需要经过实验室培养过程,得到的结果不总是与土壤微生物数量或微生物量有关,且在 Biolog 方法的结果中未能将真菌和慢速生长的细菌考虑在内,鉴于真菌在酸性土壤中的重要性,这对于像酸性红壤中微生物多样性的研究而言未免是有缺陷的,而 PLFA 方法没有这些缺陷,且可根据总 PLFA 量得出与土壤有机质和肥力的相关性。作者认为,PLFA 方法对于评价广谱群落差异(Broad-spectrum community differences)和微生物群落与土壤肥力的相关性方面是理想的方法。Abasiofiok 等^[31]使用 Biolog 和 PLFA 两种方法检测田间和温室条件下土壤的群落结构,发现后者比前者在定性检测群落结构方面更敏锐,这可能是因为 Biolog 只反映一部分群落的代谢活性,而 PLFA 方法反映整个群落的代谢活性。另外,作者还比较了同样能反映整个群落结构的 DGGE(变性梯度凝胶电泳)和 PLFA 方法,认为 DGGE 方法较 PLFA 方法耗费更多的人力和时间。Ibekwe 等^[53]利用 Biolog、PLFA、DGGE 三种方法,使用一溴甲烷、异硫氰酸甲酯、1,3-二氯乙烯(1,3-D)和三氯硝基甲烷几种熏蒸剂探讨了熏蒸对土壤微生物群落的影响,其中土壤微生物群落在熏蒸处理后的恢复能力用 PLFA 等方法来检测。结果显示 Biolog 得到的数据较另两种方法得到的数据变化更大,表明 PLFA 和 DGGE 方法在检测群落组成和群落结构方面比 Biolog 方法更敏锐。Schutter 等^[51]用 PLFA 和直接计数法两种方法检测休耕地以及耕种土地的微生物生物量,也发现 PLFA 比直接计数法在检测群落结构和生物量方面更敏锐、准确。

当然,PLFA 方法也存在以下缺点:(1)尚未确立土样中所有生物的特征脂肪酸,并且在很多情况下,还无法完全确定土样中某些特定脂肪酸和特定的微生物或微生物群落的对应关系。细菌和真菌产生完全不同量的 PLFA,脂肪酸的类型及含量可能随生长条件和环境污染情况,如空气湿度、pH 值、重金属污染、空气污染、油污染等而变化^[54~57],因此它们并没有严格的专一性。因此,可能引起错误的群落指征。(2)PLFA 方法不能在菌种和菌株(strain)的水平鉴别出微生物的种类。(3)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以酯键的形式出现^[58]。(4)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^[59]认为这是因为可培养的那部分微生物数量增加引起的,但是主成分分

析(Principal component analysis, PCA)结果却表明群落结构并没有发生变化。Kieft 等^[23]的研究也发现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。这种现象目前还没有令人满意的解释^[19]。

PLFA 方法已经广泛地应用于土壤微生物多样性研究,用于揭示植被^[60,61]、作物栽培及土地管理方式^[51,62~64]、有机污染物^[50,65,66]、重金属^[67~69]、季节变化^[70]、气候条件^[71,72]及其他方面^[73~75]等诸多因素对土壤微生物群落结构和生物量的影响,所获得的结果有些是其他土壤微生物多样性研究方法无法获得的。鉴于该方法固有的缺点,为获取土壤微生物群落多样性的更多和更全面而完整的信息,宜联合使用多种微生物多样性研究方法^[76],如 Bodelier 等^[75]综合采用 PLFA 和 PCR-DGGE 方法,比较清楚地了解了水稻土壤中甲烷氧化菌群落结构。

参考文献

- [1] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review. *Biol. Fert. Soils*, 1999, 29:111 ~ 129
- [2] McCarthy C M, Murray L. Viability and metabolic features of bacteria indigenous to a contaminated deep aquifer. *Microbial Ecol.*, 1996, 32:305 ~ 321
- [3] White D C, Pınkard H C, Ringelberg A B. Biomass measurements: Biochemical approaches. *In*: Hurst C J, Knudson G R, McInerney M J, *et al.* eds. *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, 1997. 91 ~ 101
- [4] Vestal J R, White D C. Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities. *Bioscience*, 1989, 39:535 ~ 541
- [5] White D C, Bobbie R J, Herron J S, *et al.* Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples. *In*: Costerton J W, Colwell R R. eds. *Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity and Ecology*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1979
- [6] Zelles L, Bai Q Y, Ma R X, *et al.* Microbial biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and poly-hydroxybutyrate in agriculturally-managed soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1994, 26:439 ~ 446
- [7] Johansen A, Olsson S. Using phospholipid fatty acid technique to study short-term effects of the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* DR54 on the microbial microbiota in barley rhizosphere. *Microbial Ecol.*, 2005, 49(2):272 ~ 281
- [8] Ratledge C, Wilkinson S G. *Microbial Lipids*. London: Academic Press, 1988
- [9] 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 Microbiol. Ecol.*, 1995, 18: 103 ~ 112
- [10] Tunlid A, Høitink H A J, Low C, *et al.* Characterization of bacteria that suppress *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media by analysis of fatty acid biomarkers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 55: 1 368 ~ 1 374
- [11] Crossman Z M, Ineson P, Evershed R P. The use of C-13 labelling of bacterial lipids in the characterisation of ambient methane-oxidising bacteria in soils. *Organic Geochem.*, 2005, 36(5): 769 ~ 778
- [12] Lechevalier M P. Lipids in bacterial taxonomy. *In*: O Leary W M. ed. *Practical Handbook of Microbiology*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1989. 455 ~ 561
- [13] Haack S K, Garchow H, Odelson D A, *et al.* Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60: 2 483 ~ 2 493
- [14] Shah H N. The genus *Bacteroides* and related taxa. *In*: Balows A, Trüper H G, Dworkin M. eds. *The Prokaryotes*. New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 1992. 3 593 ~ 3 608
- [15] Tunlid A, White D C. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial community in soil. *In*: Stotzky G, Bollag J M. eds. *Soil Biochem*. New York: Dekker, 1992. 229 ~ 262
- [16] Harwood J L, Russel N J. *Lipids in Plants and Microbes*. London: Allen and Unwin, 1984
- [17] Kroppenstedt R M. The genus *Nocardopsis*. *In*: Balows A, Trüper H G, Dworkin M, *et al.* eds. *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1992. 1 139 ~ 1 156
- [18] Vahjen W, Munch J C, Tebbe C C. Carbon source utilization of soil extracted microorganisms as a tool to detect the effect of soil supplemented with genetically engineered and non-engineered *Corynebacterium glutamicum* and a recombinant peptide at the community level. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1995, 18: 317 ~ 328
- [19] Green C T, Scow K M. Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeol. J.* 2000, 8: 126 ~ 141
- [20] Hill G T, Mitkowski N A, Aldrich W L, *et al.* Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.*, 2000, 15: 25 ~ 36
- [21] Frostegård A, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fert. Soils*, 1996, 22: 59 ~ 65
- [22] Joergensen R G, Potthoff M. Microbial reaction in activity, biomass, and community structure after long-term continuous mixing of a grassland soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2005, 37(7): 1 249 ~ 1 258
- [23] 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 Biol. Biochem.*, 2004, 36(11): 1 827 ~ 1 834
- [24] Bååth E, Anderson T H. Comparison of soil fungal/ bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biol. Biochem.* 2003, 35: 955 ~ 963
- [25] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and

- purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37: 911 ~ 917
- [26] White D C, Davis W M, Nickels J S, *et al.* Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 1979, 40: 51 ~ 62
- [27] Findlay R H, Dobbs F C. Quantitative description of microbial communities using lipid analysis. *In*: Kemp P F, Sherr B F, Sherr E B, *et al.* eds. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecol.*, Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 347 ~ 358
- [28] 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. *Microbial Ecol.*, 1998, 36: 1 ~ 12
- [29] Gebert J, Gongroft A, Schloter M, *et al.* Community structure in a methanotroph by phospholipid fatty acid biofilter as revealed analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 240(1): 61 ~ 68
- [30] Ariesa E, Doumenqa P, Artauda J, *et al.* Effects of petroleum hydrocarbons on the phospholipid fatty acid composition of a consortium composed of marine hydrocarbon-degrading bacteria. *Organic Geochem.* 2001, 32: 891 ~ 903
- [31] Abasiotiok M, Ibekwe, Kennedy A C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization pattern for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *Microbiol. Ecol.*, 1998, 26: 151 ~ 163
- [32] Silvie S, Jarmila L, Martin R, *et al.* Determination of phospholipid fatty acids in sediments. *Chemica*, 2003, 42: 39 ~ 49
- [33] Zelles L, Bai Q Y. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by soil phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biol. Biochem.*, 1993, 25: 495 ~ 507
- [34] White D C, Ringelberg D B. Signature lipid biomarker analysis. *In*: Burlage R S, Atlas R, Stahl D, *et al.* eds. *Techniques in Microbial Ecology*. New York, Oxford: Oxford University Press, 1998
- [35] Zelles L. Fatty acid patterns of microbial phospholipids and lipopolysaccharides. *In*: Schinner F, Ohlinger R, Kandeler E, *et al.* eds. *Methods in Soil Biology*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1996. 80 ~ 93
- [36] Ibekwe A M, Kennedy A C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and green house conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1998, 26: 151 ~ 163
- [37] Frostegård A, Petersen S O, Bååth E, *et al.* Dynamics of a microbial community associated with manure hot spots as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 2 224 ~ 2 231
- [38] Frostegård A, 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: 723 ~ 730
- [39] Steinberger Y, Zelles L, Bai Q Y, *et al.* Phospholipid fatty acid profiles as indicators for microbial community structure and biodiversity in soils along a climatic transect in the Judean desert. *Biol. Fertil. Soils*, 1999, 28: 292 ~ 300
- [40] Zelles L, Palojärvi A, Kandeler E, *et al.* Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 29: 1 325 ~ 1 336
- [41] Bossio D A, Scow K M. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: Phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbiol. Ecol.*, 1998, 35: 265 ~ 278
- [42] Rajendran N, Matsuda O, Inamura N, *et al.* Variation in microbial biomass and community in the sediments of eutrophic bays as described by phospholipid ester-linked fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58: 562 ~ 571
- [43] Xue K, Luo H F, Qi H Y, *et al.* Changes in soil microbial community structure associated with two types of genetically engineered plants analyzing by PLFA. *Environ. Sci.*, 2005, 17(1): 130 ~ 134
- [44] Elsas J D, Duarte G F, Rosado A S, *et al.* Microbiological and molecular biological methods monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J. Microbiol. Meth.*, 1998, 32: 133 ~ 154
- [45] Bochner B. "Breathprints" at the microbial level. *ASM News*, 1989, 55: 536 ~ 539
- [46] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BIOLOG在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. *土壤学报*, 2004, 41(3): 456 ~ 461. Zheng H, Ouyang Z Y, Fang Z G, *et al.* Application of biolog to study on soil microbial community functional diversity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(3): 456 ~ 461
- [47] Borneman J, Skroch P W, O'Sullivan K M, *et al.* Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62: 1 935 ~ 1 943
- [48] Chandler D P, Fredrickson J K, Brockman F J. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol. Ecol.*, 1997, 6: 475 ~ 482
- [49] 马万里, Josquin T, Mark A. 土壤微生物多样性研究的新方法. *土壤学报*, 2004, 41(1): 103 ~ 107. Ma W L, Josquin T, Mark A. A new method for research on soil microbial diversity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(1): 103 ~ 107
- [50] Bundy J G, Paton G I, Campbell C D. Combined microbial community level and single species biosensor responses to monitor recovery of oil polluted soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2004, 36(7): 1 149 ~ 1 159
- [51] Schutter M E, Sandeno J M, Dick R P. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. *Biol. Fertil. Soils*, 2001, 34: 397 ~ 410
- [52] 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
- [53] Ibekwe A M, Papiernik S K, Gan J Y, *et al.* Impact of fumigants on soil microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 3 245 ~ 3 257
- [54] Lundquist E J, Scow K M, Jackson L E, *et al.* Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, 31: 1 661 ~ 1 675
- [55] Bååth E, Frostegård A, Pennanen T, *et al.* Microbial community composition and pH response in relation to soil organic matter quality in woodchips fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1995, 27: 229 ~ 240
- [56] Polymenakou P N, Bertilsson S, Tselepidis A, *et al.* Links between

- geographic location, environmental factors, and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microbial Ecol.*, 2005, 49(3): 367 ~ 378
- [57] Kasurinen A, Keinänen M M, Kaipainen S, *et al.* Below-ground responses of silver birch trees exposed to elevated CO₂ and O₃ levels during three growing seasons. *Global Change Biol.*, 2005, 11(7): 1 167 ~ 1 179
- [58] Sundh I, Nilsson M, Borgå P. Variation in microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 1 476 ~ 1 482
- [59] 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
- [60] Saetre P, Baath E. Spatial variation and patterns of soil microbial community structure in a mixed sprucebirch stand. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, 32: 909 ~ 917
- [61] Felix P J, Mahasin T. Phospholipid fatty acids in forest soil four years after organic matter removal and soil compaction. *Appl. Soil Ecol.*, 2001, 19: 173 ~ 182
- [62] Zhang W J, Rui W Y, Tu C, *et al.* Responses of soil microbial community structure and diversity to agricultural deintensification. *Pedosphere*, 2005, 15(4): 440 ~ 447
- [63] Yao H Y, He Z L, Huang C Y. Phospholipid fatty acid profiles of Chinese red soils with varying fertility levels and land use histories. *Pedosphere*, 2001, 11(2): 97 ~ 103
- [64] Vepsäläinen M, Erkomaa K, Kukkonen S, *et al.* The impact of crop plant cultivation and peat amendment on soil microbial activity and structure. *Plant and Soil*, 2004, 264(1/2): 273 ~ 286
- [65] Hesselsoe M, Boysen S, Iversen N, *et al.* Degradation of organic pollutants by methane grown microbial consortia. *Biodegradation*, 2005, 16(5): 435 ~ 448
- [66] Wilke B M, Gättinger A, Fröhlich E, *et al.* Phospholipid fatty acid composition of a 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soil and an uncontaminated soil as affected by a humification remediation process. *Soil Biol. Biochem.*, 2004, 36(4): 725 ~ 729
- [67] Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59(11): 3 605 ~ 3 617
- [68] John J K, Max M, Håggblom, *et al.* Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. *Biol. Fertil. Soils*, 2003, 38: 65 ~ 71
- [69] Murata T, Kanao K M, Takamatsu T. Effects of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipid fatty acid profiles of soil microbial communities. *Water, Air Soil Poll.*, 2005, 164(1/4): 103 ~ 118
- [70] Keith R M J, Bryan N D, Bardgett R D, *et al.* Seasonal changes in the microbial community of a salt marsh, measured by phospholipid fatty acid analysis. *Biogeochem.*, 2002, 60(1): 77 ~ 96
- [71] Bardgett R D, Kandler E, Tschirko D, *et al.* Below ground microbial community development in a high temperature world. *OIKOS*, 1999, 85: 193 ~ 203
- [72] Dickens H E, Anderson J M. Manipulation of soil microbial community structure in bog and forest soils using chloroform fumigation. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, 31: 2 049 ~ 2 058
- [73] Pennanen T, Perkimki J, Kiikkil O, *et al.* Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1998, 27: 291 ~ 300
- [74] Song X H, Hopke P K. Pattern recognition of soil samples based on the microbial fatty acid contents. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33: 3 524 ~ 3 530
- [75] Bodelier P L E, Roslev P, Henckel T, *et al.* Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature*, 2000, 403(67/68): 421 ~ 424
- [76] 章家恩, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述. *土壤*, 2004, 36(4): 12 ~ 16. Zhang J E, Cai Y F, Gao A X, *et al.* Review on laboratory methods for soil microbial diversity (In Chinese). *Soils*, 2004, 36(4): 12 ~ 16

PLFA ANALYSIS AND ITS APPLICATIONS IN THE STUDY OF SOIL MICROBIAL DIVERSITYYan Hui¹ Cai Zucong² Zhong Wenhui^{1,2†}*(1 College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)**(2 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)*

Abstract Phospholipid fatty acids are major constituents of the membranes of all living cells, and different groups of microorganisms synthesize different varieties of PLFA through different biochemical pathways. Thus some PLFAs can be used as “bio-signatures” to analyze changes in microbial biomass and microbial community structure. Currently the PLFA method is more and more used in soil microbial analysis. An introduction was made by the authors to some PLFAs characterizing microorganisms, methods to extract PLFAs from soils and the principle of using GC-MS to analyze PLFAs. Besides, comparison of the PLFA method was conducted with some other commonly used methods. The traditional method, which analyzes soil microbial community structure, depends on culture technology and it is able to culture and separate a small number of microbial communities; the Biolog method is used to investigate physiological diversity of soil microbial communities, i. e. how the microbial communities potentially utilize a range of carbon substrates, but it is of high selectivity to the small fraction of microbial communities that grow fast or fit the Biolog experimental conditions; and the main shortcoming of nucleic acid analysis lies in that it can't make quantitative analysis of soil microbes. However, compared to those methods mentioned above, the PLFA analysis has a number of advantages. The characteristics of the PLFA analysis have been demonstrated in this article with several practical examples, and some disadvantages of the PLFA analysis have been analyzed. By using the PLFA method combined with some others, more comprehensive and integrated information about the diversity of soil microbial communities can be obtained.

Key words Soil microbe; Phospholipid fatty acid (PLFA); Biomass; Community structure; GC-MS; Diversity