

# 北方农牧交错带林地、耕地和草地土壤微生物群落结构特征的 PLFA 分析\*

文倩<sup>1,2</sup> 林启美<sup>1†</sup> 赵小蓉<sup>1</sup> 李贵桐<sup>1</sup> 赵沛一<sup>3</sup>

(1 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094)

(2 湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128)

(3 内蒙古自治区农牧科学院, 呼和浩特 010031)

**摘要** 从内蒙古武川县采集了林地、雨养耕地、灌溉耕地和草地等 4 个不同利用方式的土壤, 研究了土壤微生物磷脂脂肪酸的分布特征。结果表明, 土壤总脂肪酸含量  $19.82 \sim 47.28 \text{ ng g}^{-1}$ , 以指示  $G^-$  细菌的单烯脂肪酸和指示  $G^+$  细菌的支链脂肪酸为主, 其含量分别占脂肪酸总量的 29% ~ 37% 和 15% ~ 20%, 灌溉耕地和草地土壤明显高于林地和雨养耕地土壤, 差异最大接近 3 倍。主成分分析表明, 第一主成分 (PC1) 主要包括 14 0 3OH, cy19 0, 12 0, br17 0 和 18 2 9, 12 等直链及支链脂肪酸; 第二主成分 (PC2) 包括 16 0, 16 1 11, 18 1 9, 19 0 和 a15 0 等不饱和及支链脂肪酸; 灌溉耕地、雨养耕地、草地土壤有相似的微生物群落结构, 与林地土壤有明显差异。

**关键词** 土壤微生物; 磷脂脂肪酸; 土地利用方式; 半干旱地区

**中图分类号** S154.36

**文献标识码** A

磷脂脂肪酸 (PLFA) 是微生物细胞膜的主要成分, 一些研究结果显示, 微生物死亡后, PLFA 将迅速分解<sup>[1]</sup>, 因此, 所提取并测定的土壤 PLFA 可以指示土壤微生物量<sup>[2]</sup>。同时, 由于不同的微生物其 PLFA 的组成和结构存在差异, 所以 PLFA 图谱也能提供微生物群落结构的信息。Mallory 和 Saylor<sup>[3]</sup>曾应用 PLFA 分析技术成功地鉴定出 8000 多种细菌。Zelles 等<sup>[2]</sup>比较 8 个耕地土壤的 PLFA, 发现每个土壤都有特异的 PLFA 图谱, 称之为土壤指纹。Larkin<sup>[4]</sup>报道玉米轮作土壤以单烯不饱和脂肪酸为主, 而玉米与黍轮作的土壤多烯不饱和脂肪酸含量最高, 土豆连作的土壤主要是直链脂肪酸。Frostegard 等<sup>[5]</sup>报道施用石灰、灰分等碱性物质后, 森林土壤 PLFA 有明显的变化, 农药、重金属污染土壤的 PLFA 也存在差异<sup>[6,7]</sup>。

北方农牧交错带是我国三大生态环境最为脆弱的地区之一, 由于不合理的利用, 土壤退化十分严重。因此, 研究和了解土壤退化的机制是遏制土壤退化的基础, 而研究和了解土壤物质和能量循环转化动力—

土壤微生物, 就显得格外重要。鉴于此, 本研究选择本地区四种土壤利用类型, 即林地、草地、雨养耕地和灌溉耕地, 通过分析土壤 PLFA 含量及其组成, 试图了解不同利用方式的土壤微生物群落结构特征, 探索土壤利用方式与微生物群落结构变化之间的关系, 从而为合理地利用土壤资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品采集

于 2002 年 5 月上旬, 在内蒙古武川县中国农业大学旱作农业试验站采集 4 个表层土壤 (0 ~ 20 cm), 分别为: 主要植被为羊茅和蒿类的草地土壤, 20 年生杨树林地土壤, 雨养耕地土壤和灌溉耕地土壤。除去土壤中植物残体、石块及蚯蚓等, 调节土壤至 50% 田间持水量, 在 25 °C 预培养 7 ~ 10 d 后, 立即测定土壤微生物量碳和 PLFA, 或置于 4 °C 下保存。取部分土壤风干过筛, 测定土壤 pH、黏粒、有机质及全氮含量 (表 1)。

\* 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2002AA2Z4221) 和国家“十五”科技攻关计划项目 (2001BA508B12) 资助

† 通讯作者, 林启美 (1961 ~), 男, 湖北武穴人, 教授, 博士, 主要从事土壤微生物生态研究。E-mail: linqm@cau.edu.cn, Tel: 010-62732502

作者简介: 文倩 (1974 ~), 女, 辽宁本溪人, 讲师, 博士, 主要从事土地生态和土壤生态学研究。E-mail: wenqian23@163.com

收稿日期: 2006-10-23; 收到修改稿日期: 2007-03-09

表 1 土壤基本性质

Table 1 Basic properties of soils tested

| 土地利用类型<br>Land use type | pH   | 黏粒<br>Clay<br>(g kg <sup>-1</sup> ) | 有机碳<br>Organic carbon<br>(g kg <sup>-1</sup> ) | 全氮<br>Total nitrogen<br>(g kg <sup>-1</sup> ) | 微生物量碳<br>Microbial biomass carbon<br>(mg kg <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|------|-------------------------------------|--|---|---|
| 林地 Woodland             | 8.38 | 20.4 ±1.3                           | 17.71 ±0.01                                    | 1.48 ±0.06                                    | 207.5 ±0.7  |
| 雨养耕地 Rain-fed cropland  | 8.42 | 29.5 ±1.8                           | 17.31 ±0.60                                    | 1.14 ±0.01                                    | 189.3 ±1.8  |
| 灌溉耕地 Irrigated cropland | 8.56 | 32.2 ±2.1                           | 29.93 ±1.50                                    | 1.85 ±0.02                                    | 336.0 ±1.3  |
| 草地 Grassland            | 8.76 | 12.2 ±0.5                           | 12.48 ±0.44                                    | 1.35 ±0.05                                    | 217.7 ±3.6  |

注:数据为三个重复的平均值 ±标准差 Note: Data are means ±standard deviation of triplicates

## 1.2 磷脂脂肪酸测定

采用修正的 Bligh—Dyer 方法<sup>[2]</sup>。称取相当于 15 g 烘干土壤质量的湿润土壤 3 份,用混合浸提液(缓冲液 甲醇 氯仿体积比为 0.8 2 1)在 < 18 °C 下避光振荡 2 h (200 r min<sup>-1</sup>) 后加入水和氯仿各 37.5 ml,于 4 °C 黑暗中静置 12 h,吸去上部的水和甲醇,剩余溶液用硅藻土过滤及无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥,再用 30~40 °C 水浴旋转蒸发至 1 ml, N<sub>2</sub> 干燥后直接分析或在 -20 °C 下保存。

用 200 μl 氯仿溶解 N<sub>2</sub> 干燥的样品,转移至硅胶柱中,分别用 1 ml 氯仿、2 ml 丙酮和 2 ml 甲醇各淋洗两次,依次得到中性酯、糖酯和磷脂,将磷脂用 N<sub>2</sub> 干燥后在 -20 °C 下保存。

用 0.5 ml 甲醇 甲苯混合液(体积比为 1:1)溶解干燥的磷脂样品,加入 0.5 ml 的 0.2 mol L<sup>-1</sup> KOH 甲醇溶液,在 37~40 °C 加热 15 min,冷却至室温后再用 0.5 ml、0.2 mol L<sup>-1</sup> 醋酸调节 pH 至中性,加入氯仿和水各 2 ml 并充分混匀,静置分层后收集底层的氯仿相,并用 N<sub>2</sub> 干燥后用气相色谱(Hewlett-Packard 6890)测定脂肪酸,载气为氢气,补偿气体为氮气,助燃气体为空气,流量分别为 20~30、30 和 300 ml min<sup>-1</sup>。初始温度 80 °C 保持 1 min 后,以 25 min<sup>-1</sup> 升至 145 °C,再以 2.5 min<sup>-1</sup> 升至 250 °C 后以 10 min<sup>-1</sup> 升至 300 °C。以 C14:0 为外标物质,按照下式计算脂肪酸含量:

$$PLFA \text{ (ng g}^{-1}\text{土)} = (PPLFA \times S \times V) / (POSTD \times D \times R \times W)$$

式中, PPLFA 和 POSTD 分别为样品和标准物质的峰面积, S 为标准物质的浓度 (ng μl<sup>-1</sup>), D 为稀释倍数, R 为分取倍数, V 为样品的测定体积 (μl), W 为烘干土壤质量 (g)。

脂肪酸采用 Frostegard 方法命名<sup>[5]</sup>,分子式以

“X:Y Z(c/t)”表示,其中“X”代表脂肪酸分子的碳原子总数,“Y”代表不饱和烯键的数目,“Z”代表烯键距离羧基的位置,“Z”为烯键或环丙烷链的位置。前缀“i”(iso)代表异构甲基支链(距甲基端的第二个碳原子),“a”(anteiso)代表前异构甲基支链(距甲基端的第三个碳原子),“cyc”代表环丙基支链,“br”表示甲基支链的位置未知。后缀“c”和“t”分别代表顺式和反式同分异构体,“OH”前的数字表示羟基的位置(从羧基端计数,第二个碳为 C<sub>2</sub>、第三个碳为 C<sub>3</sub>)。

## 1.3 分析及数据处理方法

土壤微生物量碳用氯仿熏蒸浸提法测定<sup>[8]</sup>,有机碳用外加加热重铬酸钾容量法,全氮用半微量凯氏法,土壤质地用吸管法,pH 用 pH S-3 酸度计测定(1:2.5 土水比)<sup>[9]</sup>。

所有测定结果均为 3 次重复的平均值,用烘干土壤质量表示。用 SPSS12.0 进行 PLFA 的主成分分析,为减小误差,确保结果的可靠性,仅分析含量高于 0.1% 的脂肪酸<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤磷脂脂肪酸组成和微生物群落结构

4 种利用方式土壤共检测出 23 种磷脂脂肪酸,主要是 4 种单烯脂肪酸,相对含量占总量的 1/3 左右,其中 18:1 9t&c11 最多,占总量的 11%~15%;其次是 10 种直链和 5 种支链脂肪酸,相对含量各约占总量的 20%,其中主要是 16:0 和 19:0;但林地和雨养耕地土壤没有检测到 15:0 直链脂肪酸,林地土壤没有检测到 19:0 直链脂肪酸。羟基脂肪酸 2 种,多烯不饱和脂肪酸 1 种和环丙烷脂肪酸 1 种,相对含量均不到总量的 5% (表 2、表 3)。

表 2 林地、雨养耕地、灌溉耕地与草地土壤磷脂脂肪酸类型及其比例

Table 2 PLFAs and their proportions (%) in soils of woodland, rain-fed cropland, irrigated cropland and grassland

| 磷脂脂肪酸<br>PLFAs              |      | 土地利用类型 Land use type |                           |                            |                 |
|-----------------------------|------|----------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------|
|                             |      | 林地<br>Woodland       | 雨养耕地<br>Rain-fed cropland | 灌溉耕地<br>Irrigated cropland | 草地<br>Grassland |
| 直链饱和脂肪酸                     | (个数) | 8                    | 9                         | 10                         | 10              |
| Saturated fatty acids       | (%)  | 18.5 ±2.4            | 17.1 ±3.3                 | 20.5 ±0.5                  | 19.7 ±0.6       |
| 单烯脂肪酸                       | (个数) | 4                    | 4                         | 4                          | 4               |
| Monounsaturated fatty acids | (%)  | 35.3 ±3.0            | 29.4 ±6.1                 | 37.2 ±1.2                  | 34.6 ±1.2       |
| 多烯脂肪酸                       | (个数) | 1                    | 1                         | 1                          | 1               |
| Polyunsaturated fatty acids | (%)  | 4.5 ±0.8             | 3.8 ±0.3                  | 3.1 ±0.1                   | 4.0 ±0.1        |
| 支链饱和脂肪酸                     | (个数) | 5                    | 5                         | 5                          | 5               |
| Branched fatty acids        | (%)  | 18.0 ±2.6            | 15.7 ±2.7                 | 20.8 ±0.8                  | 19.4 ±0.6       |
| 羟基脂肪酸                       | (个数) | 2                    | 2                         | 2                          | 2               |
| Hydroxy fatty acids         | (%)  | 2.2 ±0.1             | 2.0 ±0.4                  | 1.7 ±0.03                  | 1.8 ±0.2        |
| 环丙烷脂肪酸                      | (个数) | 1                    | 1                         | 1                          | 1               |
| Cyclo fatty acids           | (%)  | 1.0 ±0.7             | 0.7 ±0.2                  | 0.4 ±0.02                  | 0.8 ±0.04       |

注:数据为三个重复的平均值 ±标准差 Note: Data are means ±standard deviation of triplicates

表 3 林地、雨养耕地、灌溉耕地与草地土壤脂肪酸组成及占总量的比例

Table 3 PLFAs composition and proportions (%) in the soils of woodland, rain-fed cropland, irrigated cropland and grassland soil

| 磷脂脂肪酸<br>PLFAs                       | 土地利用类型 Land use type        |                           |                            |                 |
|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------|
|                                      | 林地<br>Woodland              | 雨养耕地<br>Rain-fed cropland | 灌溉耕地<br>Irrigated cropland | 草地<br>Grassland |
| 12:0                                 | 0.96 ±0.23                  | 0.69 ±0.08                | 0.48 ±0.03                 | 0.63 ±0.02      |
| 14:0                                 | 0.74 ±0.04                  | 0.57 ±0.07                | 0.63 ±0.02                 | 0.77 ±0.03      |
| i15:0                                | 3.67 ±0.21                  | 3.10 ±0.68                | 4.81 ±0.48                 | 4.40 ±0.09      |
| a15:0                                | 2.07 ±0.70                  | 1.53 ±0.10                | 2.69 ±0.09                 | 2.55 ±0.07      |
| 15:0                                 | nd                          | nd                        | 0.36 ±0.02                 | 0.40 ±0.01      |
| 14:0 3OH                             | 1.13 ±0.04                  | 0.88 ±0.21                | 0.78 ±0.02                 | 0.91 ±0.04      |
| i16:0                                | 1.38 ±0.07                  | 1.14 ±0.27                | 1.18 ±0.03                 | 1.38 ±0.03      |
| 16:1c9                               | 7.90 ±0.55                  | 7.99 ±1.73                | 9.17 ±0.85                 | 8.79 ±0.74      |
| 16:1 11                              | 4.47 ±0.24                  | 3.10 ±0.66                | 4.37 ±0.07                 | 4.89 ±0.05      |
| 16:0                                 | 6.47 ±0.33                  | 5.67 ±1.17                | 6.92 ±0.10                 | 7.06 ±0.02      |
| br17:0                               | 3.37 ±1.10                  | 2.62 ±0.18                | 1.68 ±0.16                 | 2.48 ±0.06      |
| i17:0                                | 7.50 ±0.54                  | 7.26 ±1.46                | 10.45 ±0.07                | 8.57 ±0.40      |
| 17:0c9,10                            | 1.25 ±0.03                  | 1.17 ±0.24                | 1.02 ±0.01                 | 1.21 ±0.01      |
| 17:0                                 | 1.92 ±0.06                  | 1.92 ±0.35                | 2.89 ±0.04                 | 2.24 ±0.02      |
| 16:0 2OH                             | 1.03 ±0.04                  | 1.07 ±0.22                | 0.93 ±0.01                 | 0.87 ±0.18      |
| 18:2 9,12                            | 4.49 ±0.83                  | 3.77 ±0.27                | 3.10 ±0.09                 | 4.02 ±0.10      |
| 18:1 9                               | 8.98 ±0.85                  | 6.98 ±1.37                | 9.03 ±0.10                 | 8.56 ±0.15      |
| 18:1 9t&c11                          | 13.92 ±1.33                 | 11.32 ±2.30               | 14.63 ±0.21                | 12.32 ±0.29     |
| 18:0                                 | 1.81 ±0.05                  | 1.57 ±0.38                | 1.72 ±0.04                 | 1.31 ±0.03      |
| 19:0c9,10                            | 3.85 ±0.05                  | 0.40 ±0.02                | 0.38 ±0.02                 | 0.45 ±0.03      |
| 19:0                                 | nd                          | 4.31 ±0.27                | 5.23 ±0.13                 | 4.58 ±0.22      |
| cyc19:0                              | 1.03 ±0.67                  | 0.69 ±0.18                | 0.41 ±0.02                 | 0.79 ±0.04      |
| 20:0                                 | 1.26 ±0.66                  | 0.51 ±0.18                | 0.86 ±0.04                 | 0.95 ±0.06      |
| 总量 Total PLFAs (ng g <sup>-1</sup> ) | 21.10 ±3.29 c <sup>1)</sup> | 19.82 ±3.54 c             | 47.28 ±2.71 a              | 37.03 ±1.09 b   |

注:数据为 3 个重复的平均值 ±标准差。nd: 未达到检测标准。1) 同一行中不同字母表示差异显著 ( $p < 0.01$ ) Note: Data are means ±standard deviation of triplicates. nd: not detected; 1) Different letters within the same rows indicate significant difference ( $p < 0.01$ )

灌溉耕地土壤脂肪酸总量最高,为  $47.28 \pm 2.71 \text{ ng g}^{-1}$ ,其次是草地土壤为  $37.03 \pm 1.09 \text{ ng g}^{-1}$ ,林地和雨养耕地土壤较低,分别为  $21.10 \pm 3.29 \text{ ng g}^{-1}$ 和  $19.82 \pm 3.54 \text{ ng g}^{-1}$ 。4 种土壤中含量较高的脂肪酸为 18:1w9t&c11、17:0、16:1c9 和 16:0,占脂肪酸总量的 6% 以上;其中 18:1w9t&c11 的含量最高,在灌溉耕地土壤达到 14.63%;19:0、19:0c9、10:18:2:9、12:br17:0、17:0、16:1:11、i15:0、16:1:11、i15:0、a15:0 等脂肪酸含量也较高,超过 2%,其余脂肪酸含量则多低于 1.5%(表 3)。

一方面由于土壤微生物种类的多样性;另一方面由于微生物细胞脂肪酸结构的复杂性,目前对脂肪酸

所指示的意义还没有十分清楚的认识。根据现有的研究结果,细菌细胞膜一般含有饱和、不饱和、支链或直链脂肪酸,其中革兰氏阴性细菌( $G^-$ )主要含有羟基、单烯和环丙烷脂肪酸<sup>[11]</sup>,而革兰氏阳性细菌( $G^+$ )主要含有支链脂肪酸<sup>[12]</sup>,偶数和多烯脂肪酸是大部分真菌细胞膜的成分<sup>[13]</sup>。据此,本研究对 HFA 进行了相应的归类(表 4),发现灌溉耕地和草地土壤中代表  $G^-$ 、 $G^+$  和真菌的脂肪酸含量较雨养耕地和林地土壤高出 1~2 倍,4 种土壤真菌/细菌的脂肪酸含量比例为 0.05~0.08,灌溉耕地最低。 $G^-/G^+$  的脂肪酸含量比例约为 0.5,但从总量来看,灌溉耕地和草地的  $G^-$  和  $G^+$  脂肪酸含量分别较林地和雨养耕地高 1 倍左右。

表 4 林地、雨养耕地、灌溉耕地与草地土壤革兰氏阴性细菌( $G^-$ )、革兰氏阳性细菌( $G^+$ )和真菌磷脂脂肪酸含量

Table 4 HLFAs in  $G^-$ ,  $G^+$  and fungi in the soils of woodland, rairfed cropland, irrigated cropland and grassland soil ( $\text{ng g}^{-1}$ )

|                               | 土地利用类型 Land use type           |                           |                            |                            |
|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                               | 林地<br>Woodland                 | 雨养耕地<br>Rairfed cropland  | 灌溉耕地<br>Irrigated cropland | 草地<br>Grassland            |
| 革兰氏阳性细菌 $G^+$                 | $3.58 \pm 0.77 \text{ c}^{1)}$ | $3.65 \pm 0.63 \text{ c}$ | $9.85 \pm 0.81 \text{ a}$  | $7.18 \pm 0.25 \text{ b}$  |
| 革兰氏阴性细菌 $G^-$                 | $7.73 \pm 1.99 \text{ c}$      | $7.47 \pm 1.65 \text{ c}$ | $18.58 \pm 1.06 \text{ a}$ | $13.75 \pm 0.86 \text{ b}$ |
| $G^+/G^-$                     | 0.46                           | 0.49                      | 0.53                       | 0.52                       |
| 真菌 Fungi                      | $0.88 \pm 0.05 \text{ b}$      | $0.88 \pm 0.06 \text{ b}$ | $1.46 \pm 0.06 \text{ a}$  | $1.49 \pm 0.05 \text{ a}$  |
| 真菌/细菌( $G^- + G^+$ )          | 0.08                           | 0.08                      | 0.05                       | 0.07                       |
| Fungi/Bacteria( $G^- + G^+$ ) | 0.08                           | 0.08                      | 0.05                       | 0.07                       |

注:数据为三个重复的平均值  $\pm$  标准差; 1) 同一行中不同字母表示差异显著 ( $p < 0.01$ ) Note: Data are means  $\pm$  standard deviation of triplicate. nd: not determined; 1) Different letters within rows indicate means are significantly different ( $p < 0.01$ )

## 2.2 土壤微生物群落结构分析

4 种供试土壤的 23 种脂肪酸可以分成两个主

要类型(图 1),PC1 和 PC2 两个主成分合计达到土壤微生物群落结构组成的 86%,其余 14% 为其他种类

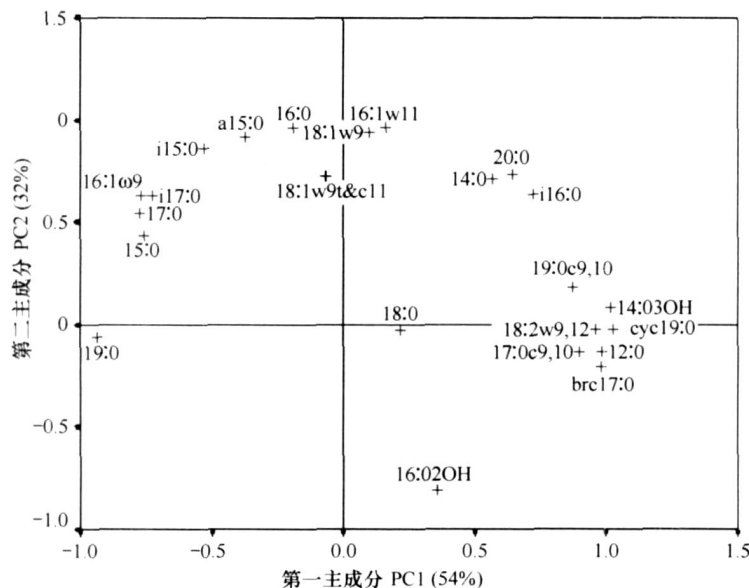


图 1 林地、雨养耕地、灌溉耕地、草地土壤磷脂脂肪酸的主成分分析

Fig. 1 Principal component analysis of HLFAs in the soils of woodland, rairfed cropland, irrigated cropland and grassland (PC1: First principal component; PC2: Second principal component)

微生物。其中第一主成分 PC1 主要由环丙烷脂肪酸、多烯脂肪酸和羟基脂肪酸组成,占微生物群落结构变异的 54%;其中 14:0 3OH, cyc19:0, 12:0, br17:0 和 18:2 9, 12 含量较高,占第一主成分的 47%。第二主成分 PC2 包括单烯不饱和脂肪酸、支链脂肪酸和偶数直链脂肪酸,合计解释微生物群落结构组成变异的 32%,主要由 16:0, 16:1 11, 18:1 9, 19:0 和 a15:0 等 5 个脂肪酸组成,占第二主成分 PC2 的 55%。

对不同利用方式土壤磷脂脂肪酸的主成分分析(图 2),结果表明土壤微生物群落结构可以分成两种类型,灌溉耕地、雨养耕地和草地土壤具有相似的微生物群落结构,占 4 种土壤微生物群落结构总变异的 96.7%,特别是耕地和草地土壤的因子载荷十分接近,二者几乎重叠。林地土壤的微生物群落结构则与另外三个土壤有明显差异,占 PC2 变异的 72%。

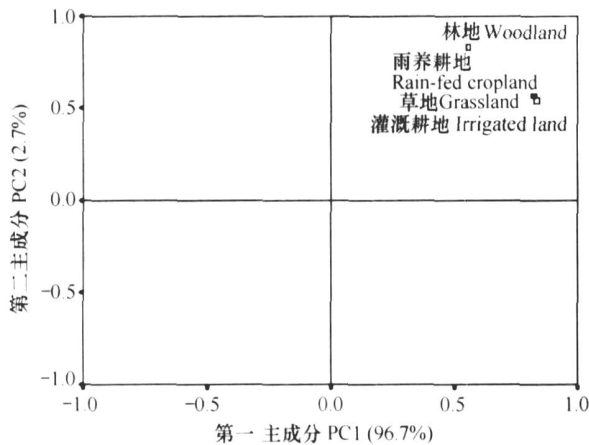


图 2 林地、雨养耕地、灌溉耕地和草地脂肪酸结构的主成分分析

Fig. 2 Principal components analysis of HLFAs structures in the soils of woodland, rain-fed cropland, irrigated cropland and grassland (PC1: First principal component; PC2: Second principal component)

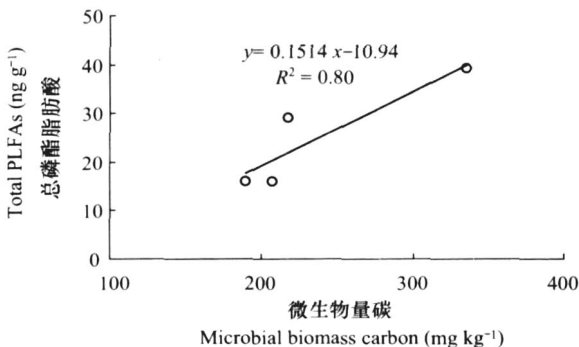


图 3 土壤磷脂脂肪酸总量与土壤微生物量碳的相关性

Fig. 3 Correlation between soil total HLFAs content and soil microbial biomass carbon

### 2.3 土壤磷脂脂肪酸含量与微生物量碳之间的相关性

土壤磷脂脂肪酸总含量与微生物量碳之间呈显著相关( $r=0.896$ )(图 3),林地、雨养耕地、灌溉耕地和草地土壤磷脂脂肪酸总量与微生物量碳的比率分别为 0.08、0.08、0.12 和 0.13  $\text{ng mg}^{-1}$ 。

## 3 讨论

灌溉耕地和草地土壤磷脂脂肪酸含量较高,而雨养耕地和林地土壤较低,这与不同土地利用管理方式下有机物质的输入、微生物数量和种类的变异有关<sup>[14,15]</sup>。灌溉耕地土壤肥力、植物生物量、输入土壤的有机无机物质量均较雨养耕地和林地土壤高很多,土壤微生物量碳也明显高于其他土壤。Feng 等<sup>[15]</sup>的研究表明土壤微生物量碳与磷脂脂肪酸含量有显著的相关性,本研究也获得相同的结果,二者的相关系数高达 0.90。但也有研究结果显示,二者之间不存在显著的相关性<sup>[16]</sup>,其原因可能为耕作及人类活动导致土壤微生物群落结构短期变化所致。

依据微生物细胞膜上磷脂脂肪酸的种类,可对土壤微生物群落进行划分<sup>[11]</sup>。灌溉耕地土壤微生物单烯脂肪酸含量较高,表明土壤有机质含量、底物活性以及通气状况均好于其他土壤;尤其是高含量的 18:1 9 及最低含量的 cyc19:0,反映出灌溉耕地不仅耕作层土壤气体交换处于平衡状态,同时下部土壤层的通气状况也很好<sup>[17]</sup>。灌溉耕地和草地土壤较高的支链脂肪酸含量说明其含有较多的好气微生物,如放线菌<sup>[12]</sup>、*Cytophaga* 和 *Flavobacterium* 属的革兰氏阳性细菌<sup>[18]</sup>,以及变形细菌纲如 *Bacteroides/Flavobacterium*、*Spirochaeta* 和 *Legionella* (亚纲)与 *Desulfobacter* (亚纲)等<sup>[19]</sup>,其原因还需进一步研究。

林地土壤中 cyc19:0 的含量最高,与土壤较大的大根系及根系总量有关;同时也可能表明林地的亚表层土壤较为紧实且处于还原状态、以及硫酸盐还原菌 *Desulfobacter* 的存在<sup>[20]</sup>,同时反映出林地土壤肠细菌 *Achromobacter*、*Lactobacillus* 和变形细菌纲的亚纲(*Cromatium/ Legionella*)、亚纲(*Rhodospirillum*)、亚纲(*Campylobacter*)的革兰氏阴性细菌<sup>[11]</sup>的含量高于其他土壤。

林地和雨养耕地土壤较高的羟基脂肪酸表明土壤微生物群落含有较多的 *Pseudomonas* spp. 和 *Thiobacillus* spp.<sup>[21]</sup>。指示真菌的亚油酸 18:2 9, 12 在林地和草地土壤显著高于耕地,可能与两种土壤中根系总量较多有关,但土壤 18:2 9, 12 仅占总脂

肪酸含量的 4% 左右,远低于农业和森林土壤中真菌生物量约占总生物量 60%~70% 的比例<sup>[22]</sup>。其原因为磷脂脂肪酸甲酯以测定土壤中碳链长度小于 20 的细菌为主,直接从土壤中提取出的真菌脂肪酸种类仍十分有限<sup>[23]</sup>。

土壤的饱和与不饱和脂肪酸比例对研究其微生物群落结构和环境状况有重要意义,受土壤有机物质输入多少和有机碳含量高低的影响。一般而言,草地和灌溉耕地土壤该比值大于 1,雨养耕地土壤近似于 1,有机物输入较少的土壤则小于 1<sup>[17]</sup>。本研究的 4 种土壤该比值仅为 0.5 左右,说明半干旱地区土壤总体肥力水平和有机物投入水平较低,但仍能反映土壤环境的相对状况,即耕地和草地土壤肥力和有机物输入高于林地土壤。

灌溉耕地和草地土壤的  $G^+ / G^-$  高于林地和雨养耕地土壤,真菌/细菌比率则低于林地和雨养耕地。有机物质输入、施肥、灌溉等的差异可能是造成这种差异的主要原因<sup>[24,25]</sup>。灌溉耕地土壤施用了大量的有机、无机肥料,草地土壤凋落物和根系则提供大量有机物质,林地土壤既无任何管理措施,输入土壤的有机物抗分解能力又较强,难以被微生物分解和利用,雨养耕地投入很少,有机物质输入也很少,从而造成微生物群落结构的差异。

土壤是一个巨大的微生物基因库,不仅数量大,而且种类繁多,目前还没有良好的方法能够完全准确地检测出土壤微生物的种类和数量。土壤 PLFA 分析技术是近 10a 来发展起来的方法,其基本假设是:微生物死亡后其细胞膜上的脂肪酸迅速分解,所测定的脂肪酸是活体微生物细胞的成分;不同微生物细胞,其脂肪酸含量是恒定的,脂肪酸种类具有特异性。因此,所测定的土壤脂肪酸含量和组成,可以用于指示土壤生物量,也能提供微生物群落结构的信息。但至今还没有直接的证据完全证实这些假设,尽管在纯培养条件下,一些研究者已经成功地应用脂肪酸分析技术鉴定出不少微生物类群,也有一些研究包括本研究所获得的结果,能够提供一些微生物群落结构方面的信息,但需要注意的是,由于土壤是一个复杂的且易变的生态系统,对土壤脂肪酸含量、组成及其意义还缺乏充分的了解,仅依靠土壤脂肪酸分析就能够全面地了解土壤微生物群落结构是不可能的,还需要与其他分析技术如 BIOLOG、基因图谱等相结合,才能逐渐揭开土壤微生物群落结构这个“黑箱”。

## 参考文献

- [1] Tunlid A, Baird B H, Trexler M B. Determination of phospholipid acids and poly  $\gamma$ -hydroxybutyrate for the estimation of bacterial biomass and activity in the rhizosphere of the rape plant *Brassica napus* (L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 1985, 31: 1113 ~ 1119
- [2] 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 Biology and Biochemistry*, 1992, 24(4): 317 ~ 323
- [3] Mallory L M, Saylor G S. Application of FAME (fatty acid methyl ester) analysis in the numerical taxonomic determination of bacterial guild structure. *Microbial Ecology*, 1984, 10: 283 ~ 296
- [4] Larkin R P. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 1451 ~ 1466
- [5] Frostegård Å, Bååth E, Tunlid A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(6): 723 ~ 730
- [6] Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soils type experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 3605 ~ 3617
- [7] Baath E, Frostegård A, Fritze H. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(12): 4026 ~ 4031
- [8] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, 19: 703 ~ 707
- [9] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京:中国农业科技出版社, 1999. 13 ~ 169. Lu R K. Analytical Methods for Soil and Agricultural Chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999. 13 ~ 169
- [10] Bossio D A, Grvan M S, Verchot L J, *et al.* Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 50 ~ 62
- [11] Wilkinson S G. Gram-negative bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson S G. eds. *Microbial Lipids*. Vol. 1. London: Academic Press, 1988. 299 ~ 488
- [12] O'Leary W M, Wilkinson S G. Gram-positive bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson S G. eds. *Microbial Lipids*, Vol. 1. London: Academic Press, 1988. 117 ~ 202
- [13] Zelles L. Fatty acid patterns of microbial phospholipids and lipopolysaccharide. In: Sahinner F, Ohlilinger R, Margesin R. eds. *Methods in Soil Biology*. London: Springer, 1996. 77 ~ 92
- [14] Zells L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29: 111 ~ 129
- [15] Feng Y, Motta A C, Reeves D W, *et al.* Soil microbial communities

- under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 1693 ~ 1703
- [16] Calder  $\acute{O}$  F J, Jackson L E, Scow K M, *et al.* Microbial responses to simulated tillage and in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 1547 ~ 1559
- [17] Zelles L, Bai Q Y, Rackwitz R, *et al.* Determination of phospholipid- and lipopolysaccharide-derived fatty acids as an estimated of microbial biomass and community structure in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 19: 115 ~ 123
- [18] Haack S K, Garchow H, Odelson D A, *et al.* Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Applied Environmental Microbiology*, 1994, 60: 2483 ~ 2493
- [19] Olsson P A, Bååth E, Jackson I, *et al.* Soil bacteria respond to presence of roots but not mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28: 463 ~ 470
- [20] White D C, Macnaughton S J. Chemical and molecular approaches for rapid assessment of the biological status of soils. *In*: Pankhurst C, Doube B M, Gupta V V S R. eds. *Biological Indicators of Soil Health*. New York: CAB International, 1997. 371 ~ 397
- [21] Wöhlenweber H W, Rietschel E T. Analysis of lipopolysaccharides (lipid A) fatty acids. *Journal of Microbial. Methods*, 1990, 11: 195 ~ 211
- [22] Frostegård Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22: 59 ~ 65
- [23] Calder  $\acute{O}$  F J, Jackson L E, Scow K M, *et al.* Short-term dynamics of nitrogen, microbial activity, and phospholipid fatty acid after tillage. *Soil Science Society of America Journal*, 2001, 65: 118 ~ 126
- [24] Buker R A, Mblina M, Cox J E, *et al.* Stable carbon isotope ratio and composition of microbial fatty acids in tropical soils. *Journal of Environmental Quality*, 2003, 32: 198 ~ 206
- [25] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 453 ~ 461

## APPLICATION OF PLFA ANALYSIS IN DETERMINATION OF SOIL MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE IN WOODLAND, CROPLAND AND GRASSLAND IN FARMLAND-PASTURE INTERLEAVING ZONE OF NORTH CHINA

Wen Qian<sup>1,2</sup> Lin Qimei<sup>1†</sup> Zhao Xiaorong<sup>1</sup> Li Guitong<sup>1</sup> Zhao Peiyi<sup>3</sup>

(1 College of Resource and Environment, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(2 Resources and Environment College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(3 Institute of Inner Mongolia Agricultural Science Academy, Huhehaote 010031, China)

**Abstract** Soil samples were collected from woodland, rainfed cropland, irrigated cropland and grassland in Wuchuan County, Inner Mongolia in early May of 2002 in the study on distribution characteristics of soil microbial phospholipid fatty acids (PLFAs). Soil microbial biomass carbon (MBC), PLFAs and some soil basic properties were determined. Results showed that total PLFAs ranged from 19.82 ng g<sup>-1</sup> to 47.28 ng g<sup>-1</sup>, and monounsaturated fatty acids with G<sup>-</sup> bacteria as indicator accounted for 29% ~ 37% and branch fatty acids with G<sup>+</sup> bacteria for 15% ~ 20% of the total PLFAs. Irrigated cropland and grassland soils were significantly higher or nearly 3 times than rainfed cropland and woodland soils in total PLFAs. Principal component analysis (PCA) indicated that PC1 consisted mainly of fatty acids of 14:0 3OH, cy19:0, 12:0, br17:0 and 18:2 9,12, and PC2 mainly of 16:0, 16:1 11, 18:1 9, 19:0 and a15:0. The irrigated cropland, rainfed cropland and grassland were quite similar in microbial community structure, but significantly different from woodland soil.

**Key words** Soil microorganisms; PLFAs; Land use type; Semi-arid region