

典型农田土壤的磷脂脂肪酸分析方法的比较

付晓倩 黄巧云 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以湖北省武穴市典型农田土壤为研究对象,对现有的磷脂脂肪酸(PLFA)提取方法加以改进,分别通过设置不同甲醇萃取时间、不同土壤样品量梯度以及不同正己烷溶解量梯度以确定磷脂脂肪酸提取过程中的甲醇萃取效率、最适土样量和最适溶解量。试验发现,甲醇开始萃取得到的待测样品即为目标样品,用于PLFA提取的武穴典型农田土壤最适提取量为2 g,用250 μ L正己烷溶解的待测样品经检测能够得到有效完整的磷脂脂肪酸数据。为验证改进后的磷脂脂肪酸提取方法的效果,进一步分析了武穴地区种植不同农作物(一季稻、双季稻和油菜)的农田土壤微生物组成,结果表明,该方法的稳定性和重复性良好,能够反映武穴地区典型农田土壤的微生物群落结构。

关键词 农田土壤; 磷脂脂肪酸(PLFA); 微生物群落; 磷脂脂肪酸提取方法

中图分类号 S 154.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)03-0001-06

典型农田土壤中存在丰富的微生物,微生物群落直接或间接影响着土壤的肥力及养分转化等^[1],农田土壤微生物群落的研究已经成为国内外微生物生态学的研究热点之一^[2-3]。由于栖息在结构复杂的土壤中的微生物种类繁多、个体微小、生长状况各异,各类微生物间紧密联系,且许多微生物是不可培养的,仅靠实验室现有的纯培养技术只能分离获得适应于实验室培养条件的微生物,而这些仅仅只占环境微生物种类的1%~10%^[4],使得土壤微生物群落结构的研究受到一定的限制。

随着科学技术的不断进步,研究微生物群落结构与功能的方法趋于多样化^[5-6]。生物标记物是指在细胞代谢或其他生理活动过程中出现的化学类物质,是一类与细胞增殖有关的标志物,例如生物细胞膜上的磷脂脂肪酸。生物标记物法是针对某一种物质进行提取,再对该种物质进行测定,以反映生物量差异,避免了其他条件对测定带来的影响^[7]。由于磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acids, PLFA)几乎是所有活体细胞膜的主要成分,代谢速率极快且随细胞死亡而迅速降解,以PLFA为生物标记物的研究方法已成为较为成熟的微生物多样性研究手段之

一^[8-10]。本研究对现有PLFA提取方法加以改进和比较,对土壤肥力高的典型农田土壤进行PLFA提取,探讨提取及检测过程中影响PLFA含量差异的各种操作条件,以期为典型农田土壤微生物的提取及检测方法提出改良性建议。

1 材料与方法

1.1 材料

典型农田土壤取自湖北省黄冈市武穴的油菜地和水稻高产示范区,当地属亚热带季风性湿润气候,年平均温度为17.6 $^{\circ}$ C。取农田表层0~20 cm土壤并混匀,多点取样,去掉石块、植物残体等杂物,装入塑封袋后尽快运回实验室,于-70 $^{\circ}$ C保存,冷冻干燥后1周内完成PLFA测定。

所有的有机试剂均为HPLC色谱纯,化学试剂为分析纯。内标为十九酸甲酯(C19),磷脂商品固相萃取小柱(CNWBOND Si SPE Cartridge, 500 mg, 3 mL)购自上海安谱科学仪器有限公司。玻璃器皿先用无磷洗涤剂清洗,然后用自来水润洗8次后,再用去离子水润洗3次,最后放入400 $^{\circ}$ C的马福炉中烘烤4 h。其他器皿均为特氟隆材料。清洗时,

收稿日期: 2016-06-03

基金项目: 国家重点基础研究发展计划("973"计划)(2015CB150504); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT1247); 中央高校基本科研业务费专项(2662015PY016, 2013PY111 和 2013PY136)

付晓倩, 硕士研究生, 研究方向: 土壤与环境微生物. E-mail: xiaoqian_1991@sina.cn

通信作者: 陈雯莉, 博士, 教授, 研究方向: 土壤与环境微生物. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

先浸于10%的盐酸24 h,然后超声波洗涤,最后按清洗玻璃器皿的方法进行自来水和去离子水润洗。

1.2 试验方法

从-70℃的冰箱中取出冷冻干燥后的土壤样品,用体积比为1:2:0.8的氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲液作为提取剂^[11],对脂肪酸依次进行过柱分离、甲酯化之后,再以10 μL 0.5 mg/mL的十九酸甲酯作为内标,通过带有MIDI峰识别软件的Agilent N6850气相色谱进行测定。

1)SPE小柱分离效率检测。为了确定提取过程中所采用的商用萃取(SPE)小柱的磷脂脂肪酸分离效率,验证经过甲醇过柱萃取5 s内得到的磷脂脂肪酸与甲醇过柱萃取5 s后得到的磷脂脂肪酸是否均为待测磷脂脂肪酸,取6 g土壤进行独立试验,并上机检测。

2)最适提取量的确定。为了确定土壤样品的最适提取量,A和B两份土壤样品分别取1、2、4、6 g进行PLFA的提取,加入足量的提取剂(25 mL)以保证不同样品量的土壤样品都能得到充分的提取。在进行PLFA检测时,用100 μL正己烷溶解。

3)最适溶解量的确定。在PLFA进行气相色谱测定时,脂肪酸甲酯(fatty acid methylesters, FAME)用正己烷溶解的体积决定气相色谱的进样浓度。为了确定合适的正己烷溶解体积,在确定土壤样品的最适提取量后,随机取1份最适提取量的土壤样品进行PLFA提取,在检测前分别用170、200、250 μL的正己烷溶解。

4)方法可行性的验证。在分别确定土壤样品的最适提取量和正己烷最适溶解量后,分别选择武汉市不同农作物(油菜、一季稻、双季稻)的土壤样品进行PLFA提取及测定,以验证该提取方法的普遍适用性。

2 结果与分析

2.1 SPE小柱分离效率

经过甲醇过柱萃取5 s内的待测磷脂脂肪酸检测得到的单体PLFA数为45个,没有多余杂质,而经过甲醇过柱萃取5 s后的待测脂肪酸中检测得到的单体PLFA则增加到了71个。如图1所示,在甲醇萃取前后5 s得到的待测脂肪酸样品在保留时间

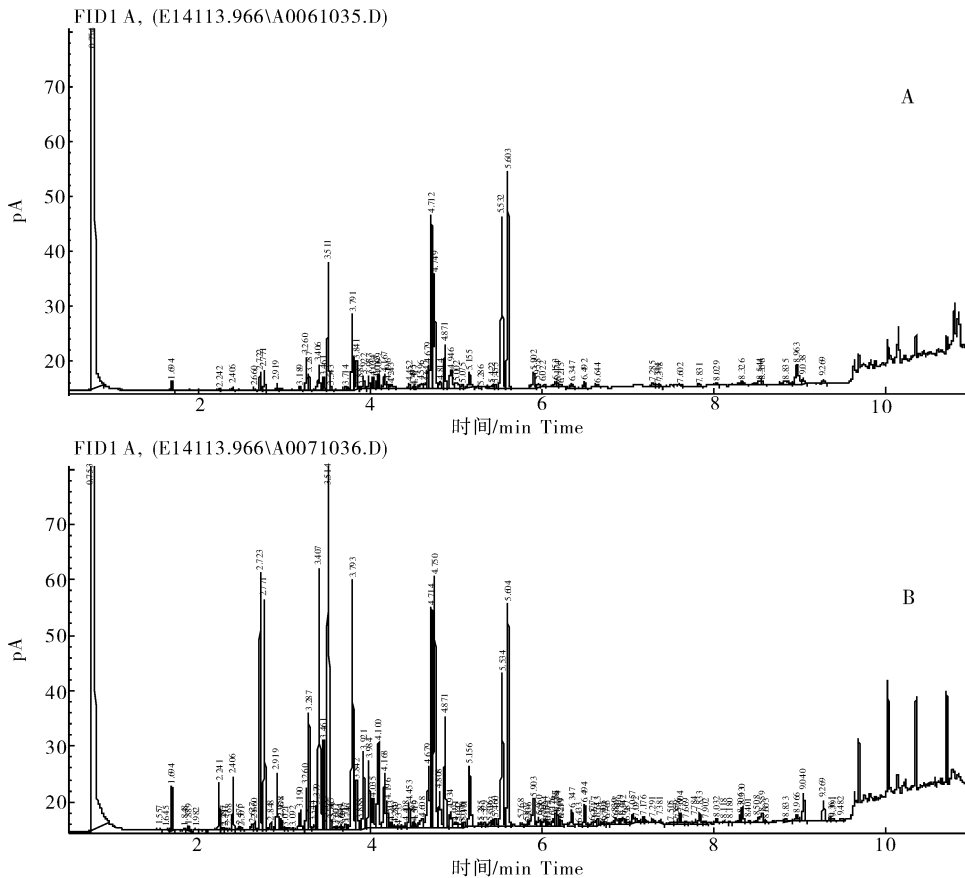


图1 经甲醇萃取5 s内(A)和5 s后(B)的气相色谱峰图

Fig.1 The meteorological chromatographic peak figures in 5 seconds (A) and after 5 seconds (B) by methanol extraction

和具体的脂肪酸种类上存在差异。图 1A 中,占整个脂肪酸含量 5% 以上的有 16:0, 16:0 10-methyl, 18:1 ω 9c, 18:1 ω 7c 和 19:0 cyclo ω 7c, 均比内标 C19 的响应值低;图 1B 中,占整个脂肪酸含量 5% 以上的则有 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:1 ω 7c, 16:0, 16:0 10-methyl, 18:1 ω 9c, 18:1 ω 7c, 且响应值增加。经甲醇萃取 5 s 内及 5 s 后得到的脂肪酸样品中共有的 PLFA 分别占 98.61% 和 96.78%, 前者得到的脂肪酸种类基本都能在后者的脂肪酸样品中被检测到,且经甲醇萃取 5 s 后得到的样品中的脂肪酸种类和响应值均有显著增加,说明甲醇萃取 5 s 后得到的脂肪酸样品为 PLFA 提取得到的主要待测样品,而甲醇萃取 5 s 内得到的脂肪酸样品也是待测样品的一部分,并无杂质干扰。综上,商用 SPE 小柱效果较好,甲醇的洗脱速率较快,能得到较高的小柱分离效率。因此,在使用商用 SPE 小柱进行甲醇萃取时,为了得到充分完整和足量的脂肪酸样品,建议在甲醇过柱后立即对过柱样品进行收集,最好不要停顿。

2.2 土壤中 PLFA 含量的分析

在 1 g 土壤样品 A 中检测得到的单体 PLFA 数为 69 个,而在 2 g 土壤样品 A 中则检测到 70 个单体 PLFA 数,4 g 土壤样品 A 中单体 PLFA 数则增加到了 75 个,6 g 土壤样品 A 中单体 PLFA 数比 1 g 土壤样品 A 中多 8 个,然而 4 g 和 6 g 土壤样品 A 的 PLFA 在进行气相色谱测定时过载,因此数据

可信度未知。不同梯度质量(从低到高)的土壤样品 A 检测得到的 PLFA 总量分别为 212.65、184.70、223.84 和 107.54 nmol/g。1 g 土壤样品 B 中的单体 PLFA 数为 63 个,而 2 g 土壤样品 B 中检测得到的单体 PLFA 数增加到 75 个,4 g 土壤样品 B 中的单体 PLFA 数比 1 g 土壤样品 B 多 16 个,6 g 土壤样品 B 中则检测到多达 82 个单体 PLFA,与土壤样品 A 类似,4 g 和 6 g 土壤样品 B 在进行 PLFA 检测时也过载,也导致了数据的不可信。不同梯度质量(从低到高)的土壤样品 B 检测得到的 PLFA 总量分别为 162.10、152.41、144.89 和 96.76 nmol/g。由以上结果可见,从检测的科学性来看,2 g 冻干土壤能够充分满足此类高产典型农田土壤 PLFA 的提取。

2.3 不同溶解量下的 PLFA 含量分析

如表 1 所示,在进行气相色谱检测前,170 μ L 正己烷溶解的待测 PLFA 样品被检测到含有 52 个单体 PLFA,土壤中的 PLFA 含量为 75.24 nmol/g,而 250 μ L 正己烷溶解的待测 PLFA 样品经检测,总 PLFA 含量为 122.83 nmol/g,含有 50 个单体 PLFA,200 μ L 正己烷溶解下的待测 PLFA 样品所示结果却普遍较低。尽管分别经 170 μ L 和 200 μ L 正己烷溶解的样品中显示的 PLFA 总量比较近似,但 250 μ L 正己烷溶解下的样品所显示的总 PLFA 含量却最高,表明微小的正己烷溶解量变化即能引起检测结果的巨大差异,且适当的高溶解量能够提高 PLFA 的检测效率。

表 1 不同正己烷溶解量对 PLFA 的检测效果

Table 1 The detection results of PLFA dissolved by different volumes of hexane

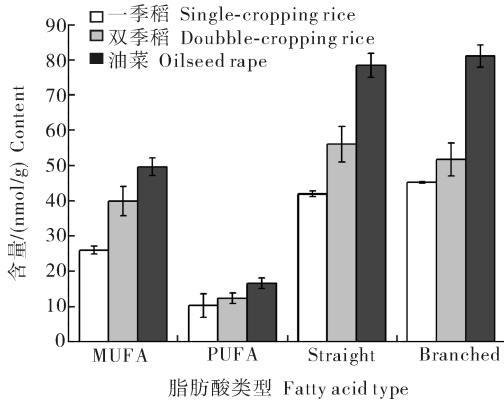
溶解体积/ μ L Dissolved volumes	质量/g Mass	脂肪酸的响应值 Response of FAMES	C19 响应值 Response of C19	单体 PLFA 数 The number of PLFA monomer	总 PLFA / (nmol/g) Total PLFA	共有 PLFA/(nmol/g) PLFA have in common	百分比/% Percent
170	2.000	560 283	59 574	52	75.24	73.34	2.53
200	2.021	381 443	43 213	45	69.88	67.66	3.18
250	2.016	573 024	37 026	50	122.83	99.22	19.22

2.4 同一地区不同种类农作物土壤微生物群落分析

1)不同土壤样品中磷脂脂肪酸结构。磷脂脂肪酸根据碳原子个数进行命名,脂肪酸通常被分为直链、直链反单烯(tran-)、支链饱和等 6 类^[12]。脂肪酸经甲酯化后形成脂肪酸甲酯(FAMES),它们又可分为:羟基取代的脂肪酸(OH FAMES)、单不饱和脂肪酸(MUFA)、酯连接多聚不饱和脂肪酸(PUFA)等^[11]。图 2 为不同土壤样品中存在的结构不同的主要脂肪酸甲酯分析结果,结果表明,种植不同

农作物的农田土壤中不同结构的脂肪酸类型虽然相似,但具体含量差异明显。武穴市油菜地土壤中直链、支链饱和及单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸含量均比水稻田土壤高,种植一季稻土壤中的各项脂肪酸含量最低。

2)不同土壤样品中微生物群落结构。据特征性脂肪酸对不同种类微生物的指征^[13-16],对检测到的 PLFA 进行分类,并对比了同一地区不同农作物(一季稻、双季稻、油菜)土壤样品中的微生物群落结构信息,结果如图 3 和图 4 所示。



MUFA:单不饱和脂肪酸; PUFA:多不饱和脂肪酸; Straight:直链脂肪酸; Branched:饱和支链脂肪酸。MUFA: Monounsaturated fatty acids; PUFA: Polyunsaturated fatty acids; Straight: Straight chain fatty acids; Branched: Branched chain fatty acids.

图 2 不同土壤样品的主要磷脂脂肪酸含量

Fig.2 The main phospholipid fatty acid contents of different soil samples

图 3 显示,革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的微生物含量在种植水稻及油菜的土壤中有显著差异。油菜地土壤样品中的革兰氏阳性菌及阴性菌含量均比水稻田土壤高,一季稻土壤样品的各项含量最低,3 种农作物土壤样品中的革兰氏阴性菌含量均比革兰氏阳性菌高。

从图 4 可以看出,种植不同农作物的农田土壤样品中的微生物及原生动物含量也有明显差异,油菜地土壤样品除了真菌含量外,细菌、放线菌及原生动物的含量均为最大值,而真菌在双季稻土壤中含量最高,一季稻农田土壤的微生物及原生动物含量均为最低。结果表明革兰氏阴性菌更适合在农田土

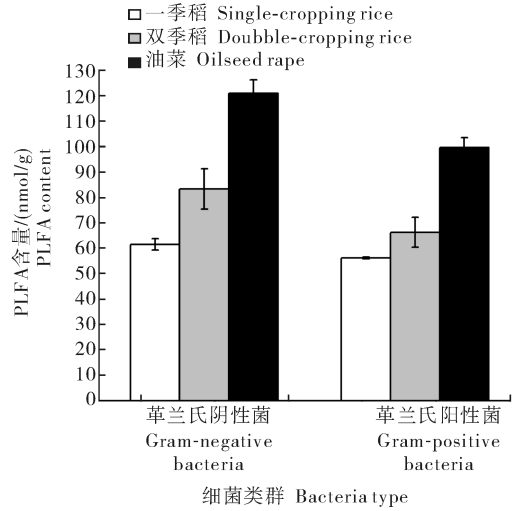


图 3 不同农作物土壤中革兰氏阳性菌、阴性菌含量

Fig.3 The contents of gram-positive and negative bacteria in different crop soils

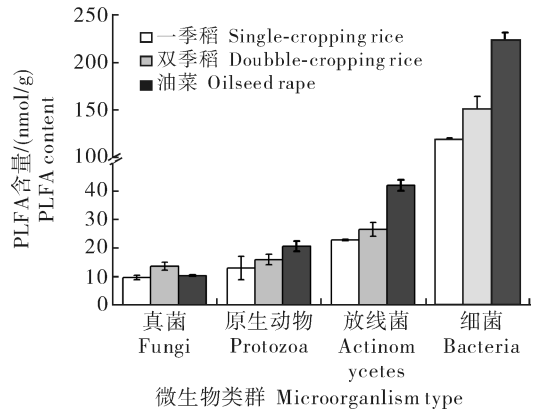


图 4 不同农作物土壤中原生动物及微生物群落结构

Fig.4 The analysis of microbial community structure in different crop soils

表 2 种植不同农作物的农田土壤磷脂脂肪酸检测结果的变异系数

Table 2 The variation coefficient of phospholipid fatty acids data of different crop soils

项目 Items	一季稻 Single-cropping rice	双季稻 Double-cropping rice	油菜 Oilseed rape
PLFA 总量 Total PLFA	3.82	9.20	3.08
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria	3.61	9.50	4.40
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria	0.57	8.89	4.04
真菌 Fungi	8.16	10.64	2.22
放线菌 Actinomycetes	1.13	9.21	4.67
细菌 Bacteria	1.40	8.98	4.10
原生动物 Protozoa	31.68	11.93	8.61
直链脂肪酸 Straight	1.86	9.04	4.35
饱和支链脂肪酸 Branched	0.44	9.03	3.82
MUFA	4.31	10.43	5.05
PUFA	32.69	12.15	

壤中生存,细菌在3种农田土壤中都是优势菌类,放线菌为第2大优势菌群。在农田管理系统下的土壤中,原生动物及微生物类群随着种植作物的不同而呈现出不同的含量变化。

3)对种植不同农作物的农田土壤磷脂脂肪酸数据精密度的评估。为了验证上述试验过程中的技术改进对农田土壤中磷脂脂肪酸分析的影响,通过对该地区种植水稻、油菜的农田土壤样品的磷脂脂肪酸进行分析(表2),结果表明:一季稻中原生动物及PUFA的变异系数高于30%,可能受到外界环境影响较大,这2项指标数值相对较低。而种植其他作物的农田土壤样品检测结果的变异系数普遍较低(低于15%),在磷脂脂肪酸数据分析中属于可信范畴。

3 讨论

磷脂脂肪酸分析方法是一种快速有效且重现性高的分析土壤微生物群落结构的方法,可用于表征包括不可培养微生物在内的土壤微生物群落的结构^[17]。对于磷脂脂肪酸的提取,在甲醇萃取步骤中,在甲醇刚开始淋洗即可收集待测样品,这与小柱分离效率、有机溶液的浸润及甲醇的特异性亲和力有关^[18]。在进行磷脂脂肪酸气相色谱分析前,使用250 μL 正己烷溶解待测样品能够较好地满足测定要求,且可以得到比较完整的测定数据。由于气相色谱柱容量有限,过高的进样量会导致过载,影响分离效果,并影响设备的正常使用,所以用适当体积的溶剂稀释样品,合适范围的响应值可使磷脂脂肪酸检测效果达到最佳。

对于武穴市典型农田土壤样品,取2 g土样可以充分满足土壤中PLFA的提取要求。由于农业利用土壤系统是在人为控制下进行肥料和水分的供给,典型农田土壤的有机质及相关肥力指标普遍较高,而土壤中的高含量腐殖质和有机质可能会影响磷脂脂肪酸的提取效果,因而2 g典型农田土样已足够用于PLFA的提取。吴愉萍等^[19-20]研究了不同质量土壤对PLFA方法的影响,结果表明,随着土壤样品质量的增加,检测到的PLFA越多,但并不呈线性相关,说明合适的土样量对试验结果很重要;在武穴地区土壤样品的磷脂脂肪酸提取过程中,2 g是最适土壤样品量,在甲醇一开始萃取即可收集待测样品,在样品检测前,250 μL 正己烷溶解待测样品即可得到信息完全的检测数据。

经过改良后的磷脂脂肪酸提取和检测方法普遍适用于武穴地区种植不同农作物的农田土壤的磷脂脂肪酸分析,且重复性和准确率较高。相应的数据表明种植不同农作物的农田土壤微生物种类接近但含量存在显著差异,说明不同农作物的生长及气候可能对农田土壤微生物群落变化有一定影响。因此,在研究同一地区的农田土壤微生物群落时,应考虑农作物种类的差异,并可以将不同农田土壤进行对比研究。

参 考 文 献

- [1] KEITZ V, ANDREAS S, KARLHEINZ A, et al. Characterization of microbial communities of biofilters by phospholipid fatty acid analysis and rRNA targeted oligonucleotide probes[J]. Systematic and applied microbiology, 1999, 22(4): 626-634.
- [2] BAATH E, ANDERSON T H. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques[J]. Soil biology and biochemistry, 2003, 35(7): 955-963.
- [3] DORAN J W, ZEISS M R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality[J]. Applied soil ecology, 2000, 15(1): 3-11.
- [4] AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [5] KOZDROJ J, ELSAS J D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches[J]. Journal of microbiological methods, 2001, 43(3): 197-212.
- [6] MARKUS E, BIANCA W, THORSTEN L, et al. Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae) [J]. Applied and environmental microbiology, 2003, 69(11): 6659-6668.
- [7] FOSTER A L, MUNK L, KOSKI R A, et al. Relationships between microbial communities and environmental parameters at sites impacted by mining of volcanogenic massive sulfide deposits, Prince William Sound, Alaska[J]. Applied geochemistry, 2008, 23(2): 279-307.
- [8] HILL T C J, MCPHERSON E F, HARRIS J A, et al. Microbial biomass estimated by phospholipid phosphate in soils with diverse microbial communities[J]. Soil biology and biochemistry, 1993, 25(12): 1779-1786.
- [9] WHITED C, DAVIS W M, NICKELS J S, et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate[J]. Oecologia, 1978, 40(1): 51-62.
- [10] 杜改利, 汪方奎, 胡甜, 等. 2株节旋藻的分类鉴定和磷脂脂肪酸

- 特征分析[J].华中农业大学学报,2016,35(6):11-16.
- [11] BLIGHE G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Canadian journal of biochemistry and physiology, 1959, 37(8): 911-917.
- [12] ZELLES L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review[J]. Biology and fertility of soils, 1999, 29(2): 111-129.
- [13] BARDGETT R D, HOBBS P J, FROSTEGARD A. Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland[J]. Biology and fertility of soils, 1996, 22(3): 261-264.
- [14] FROSTEGARD A, TUNLID A, BAATH E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals [J]. Applied and environmental microbiology, 1993, 59(11): 3605-3617.
- [15] DUNGAIT J A J, KEMMITT S J, MICHALLON L, et al. Variable responses of the soil microbial biomass to trace concentrations of ^{13}C -labelled glucose, using ^{13}C -PLFA analysis[J]. European journal of soil science, 2011, 62(1): 117-126.
- [16] 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[J]. Soil biology and biochemistry, 1992, 24(4): 317-323.
- [17] QI H Y, XUE K, ZHANG H X. Phospholipid fatty acid analysis and its applications in microbial ecology[J]. Acta ecologica sinica, 2003, 23(8): 1576-1582.
- [18] 谭力, 鞠熯先, 黎介寿, 等. 血清总磷脂脂肪酸组分的固相萃取-气相色谱法分析[J]. 分析科学学报, 2006, 22(2): 125-128.
- [19] 吴愉萍. 基于磷脂脂肪酸(PLFA)分析技术的土壤微生物群落结构多样性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [20] WU Y P, DING N, WANG G, et al. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses[J]. Geoderma, 2009, 150(1/2): 171-178.

Comparison of methods for extracting phospholipid fatty acids in typical farmland soils

FU Xiaoqian HUANG Qiaoyun CHEN Wenli

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The typical farmland soil of Wuxue in Hubei Province was collected. Based on the phospholipid fatty acid (PLFA) extraction method existed, we set different methanol extraction time, soil sample weight and hexane dissolved volume. The results showed that the phospholipid fatty acids were extracted from the start of the methanol elution. The optimal weight of the soil in Wuxue typical farmland system was 2.0 g. The phospholipid fatty acid methyl esters dissolved in 250 μL hexane were proved to provide the most complete result. The further analysis of the microbial community structure in soils of different crops in Wuxue were conducted to verify the effect of the adjusted PLFA extraction method. The result showed that this method was of good stability and repeatability, reflecting the diversity of soil microbial community structure in typical farmland of Wuxue.

Keywords farmland soil; phospholipid fatty acids; microbial community; methods for extracting phospholipid fatty acids

(责任编辑: 张志钰)