

李 范,李 娜,陈建中,等. 基于磷脂脂肪酸提取方法的微生物群落结构研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):323-325.

# 基于磷脂脂肪酸提取方法的微生物群落结构研究

李 范<sup>1</sup>, 李 娜<sup>2</sup>, 陈建中<sup>2</sup>, 李 萍<sup>1</sup>, 陈 怡<sup>2</sup>, 蒋小强<sup>2</sup>

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川成都 610031; 2. 中国科学院成都生物研究所, 四川成都 610041)

**摘要:**选取川西高原土壤和凋落物作为研究对象,分别取 1、3、5、8、10 g 土壤和 0.5、0.7、0.9、1.0、1.2 g 凋落物用于 PLFA(磷脂脂肪酸)的提取。经试验确定,土壤和凋落物用于 PLFA 提取的最佳提取量分别为 8 g 和 1.0 g,用超声波提取替代振荡提取,缩短了 PLFA 方法的提取时间。进一步分析土壤和凋落物中微生物群落结构信息,结果表明,相同环境下土壤和凋落物中大部分微生物类群的种类和含量都十分接近,革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌更有优势,厌氧菌比好养菌更加活跃。

**关键词:**土壤;凋落物;PLFA(磷脂脂肪酸);微生物群落结构

**中图分类号:** S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0323-03

土壤和凋落物中存在极其丰富的微生物,它们直接影响着土壤的结构、肥力以及养分转化等,通过磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)方法可以对微生物群落进行定量分析。本研究首次采用超声波方法提取森林土壤及凋落物中 PLFA,探讨各提取条件得到的 PLFA 含量差异,并分析森林土壤和凋落物间微生物群落结构及其相互作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验土壤与凋落物均取自中国科学院茂县山地生态系统定位研究站,地理坐标(31°41'N, 103°53' E),属暖温带亚高山季风气候,冬季寒冷干燥、夏季多雨,土壤 pH 值为 5.8~6.0,年平均温度为 8.9℃,年降水量 919.5 mm。取表层 0~20 cm 土壤并混匀,过 2 mm 筛,去掉石块植物残根等杂物,装入塑封袋后置于放有冰袋的泡沫箱运回实验室,于 -70℃ 保存,7 d 内完成 PLFA 测定。

凋落物收集于分解试验开始前半年进行,样方内均匀设置凋落物收集框,框的大小为 2 m(长)×2 m(宽)×20 cm(高),底部安装有孔径为 8 mm 的尼龙网。收集时间为 1 个季度,将收集到的凋落物样品去除网内杂物,将枝叶以枝与叶的重量比为 1:1 的比例混合均匀,将收集到的凋落物放入分解袋,再将分解袋放置在采样地表周围,本次试验采用的塑料网袋为 20(长)cm×20(宽)cm、网眼为 1 mm,并在下一季度取回,低温保存带回实验室,测重后将凋落物碾碎进行磷脂脂肪酸分析。

### 1.2 试验方法

为了确定土壤跟凋落物中 PLFA 的最适提取量,土壤分别取 1、3、5、8、10 g,凋落物分别取 0.5、0.7、0.9、1.0、1.2 g 用

于 PLFA 的提取,加入足量的提取剂(25 mL),保证不同样品量的凋落物和土壤都能得到充分的提取,进而确定各自最佳取样量。

为了确定提取方法对提取效率的影响,同时为了验证超声波提取样品中的 PLFA 能否在传统振荡提取的基础上用更短的时间提出 PLFA,本试验采用有机质含量较高的黑土作为研究对象,具体方法为:第 1 次提取,振荡时间设 120 min,超声时间分别设 20、30、40、50、60 min,第 2 次提取方法与第 1 次提取方法相同,提取时间分别减半。用 2 次提取的 PLFA 总含量来衡量提取效率。

从 -70℃ 的冰箱中取出经冷冻干燥的土壤及掉落物,用氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲液(体积比为 1:2:0.8)作提取剂振荡提取脂类<sup>[1]</sup>,再用 100 μL 25 mg/L 的 C<sub>19</sub> 做内标溶解氮吹干的脂肪酸甲酯,通过带有 MIDI 峰识别软件的 Agilent N6850 气相色谱进行分析。

## 2 试验结果

### 2.1 土壤中 PLFA 含量的分析

在 3 g 土壤中检测得到的单体 PLFA 数为 24 个,而在 8 g 土壤中则增加到了 29 个,10 g 土壤中单体 PLFA 的数量比 3 g 土壤中多 6 个,在土壤小于 8 g 时,检测到的 PLFA 数量随着土壤量的增加而增加(表 1)对于总 PLFA 的提取率,这里设 10 g 土壤中 PLFA 含量为 100%,则 8.5、3.1 g 土壤中提

表 1 不同土壤量 PLFA 的提取结果

土壤量 (g)	PLFA 单体数 (个)	总 PLFA <sup>①</sup> (nmol/g)	共有 PLFA <sup>②</sup> (nmol/g)	百分比 <sup>③</sup> (%)
1	18	12.51 ± 1.34c	12.48 ± 1.29c	0.24
3	24	23.79 ± 2.63b	23.77 ± 2.64b	0.08
5	25	28.28 ± 2.28ab	27.54 ± 2.20ab	2.62
8	29	39.24 ± 1.22a	37.17 ± 1.89a	5.28
10	30	39.63 ± 1.86a	37.52 ± 1.82a	5.32

注:数据为平均值 ± 标准偏差。①在不同土壤量中检测到的所有的 PLFA;②在不同土壤量中检测到的共有的 PLFA(记为共有 PLFA);③增加 PLFA 的含量占有 PLFA 含量的百分比,通过以下公式计算:(总 PLFA - 共有 PLFA)/总 PLFA × 100%。同列数据后不同小写字母表示不同土壤量之间的显著差异水平(P < 0.05)。

收稿日期:2013-10-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:31170916);中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(编号:yg20110708)。

作者简介:李 范(1988—),男,四川自贡人,硕士研究生,主要研究方向为土壤微生物。E-mail:554063409@qq.com。

通信作者:李 萍,博士,教授,硕士生导师。E-mail:wuping4535@sina.com。

取的 PLFA 分别占 99%、73%、63%、33%。由上述分析可见, 8 g 冻干土壤能够充分满足土壤中 PLFA 的提取。

2.2 凋落物中 PLFA 含量的分析

在 0.5 g 凋落物中,检测得到的单体 PLFA 数为 23 个,而在 1.2 g 土壤中则增加到了 36 个,检测到的单体 PLFA 增加了 13 个(表 2)。在一定质量范围内的凋落物内,检测到的 PLFA 数量随着凋落物质量的增加而增加,这与土壤中微生

物提取的情况类似。对于总 PLFA 的提取,当凋落物含量达到 0.9 g 后提取到的总 PLFA 变化较小(无显著性差异),这里设 1.2 g 土壤中的磷脂脂肪酸含量为 100%,则 1、0.9、0.7、0.5 g 凋落物中提取的 PLFA 总量分别占 100%、95%、86%、64%,由上述分析可见,对于川西高原针叶林森林凋落物,1 g 凋落物量能够充分满足凋落物中 PLFA 的提取。

表 2 不同凋落物量 PLFA 的提取结果

凋落物量 (g)	PLFA 单体数 (个)	共有 PLFA 单体 (个)	总 PLFA (nmol/g)	共有 PLFA (nmol/g)	百分比 (%)
0.5	23	20	22.61 ± 2.41b	22.01 ± 2.34b	2.65
0.7	28	22	29.45 ± 1.42ab	29.25 ± 1.36ab	0.68
0.9	32	25	32.59 ± 1.64ab	32.28 ± 1.58ab	0.95
1.0	34	26	36.69 ± 1.73a	35.92 ± 1.67a	1.88
1.2	36	31	34.85 ± 2.75a	34.13 ± 2.65a	2.08

注同表 1。

2.3 振荡和超声提取土壤中 PLFA 含量分析

120 min 振荡提取法能够提取出土壤中的 PLFA 含量为 45.34 nmol/g,得到了 35 个单体 PLFA,而超声最多得到 38 个 PFLA 单体和 50.22 nmol/g 的 PLFA 含量。当超声时间达到 30 min 时所提取到的 PLFA 含量和单体 PFLA 数量分别为 43.65 nmol/g 和 33 个,这与振荡 120min 所提取到 PLFA 含量

和单体数十分接近,表明大部分有效成分会在超声波处理的前 30 min 内被提取出来,在超声时间达到 40 min 时所提取到的 PLFA 单体数和总含量均大于振荡 120 min 所提取到的结果(表 3),表明用超声法提取土壤中的磷脂脂肪酸可行,而且操作简便快捷、提出率更高,显示出明显的优势。

表 3 不同提取时间对 PLFA 的提取效率

提取方法	提取时间 (min)	PLFA 单体数 (个)	共有 PLFA 单体数(个)	总 PLFA (nmol/g)	共有 PLFA (nmol/g)	百分比 (%)
超声波提取	20	34	31	29.43 ± 2.15	28.88 ± 2.08	1.87
	30	33	30	43.65 ± 5.87	41.64 ± 5.46	3.16
	40	37	36	50.22 ± 2.34	49.03 ± 2.13	2.37
	50	38	36	47.50 ± 4.41	42.28 ± 4.13	10.99
	60	36	34	47.34 ± 3.21	39.31 ± 2.69	16.96
振荡提取	120	35	33	45.34 ± 3.67	44.12 ± 2.99	2.69

注同表 1。

2.4 土壤及凋落物中微生物群落结构分析

用特定的微生物指示剂(表 4),对检测到的 PLFA 进行分类,并对比了土壤和凋落物中的微生物群落信息(图 1 至

图 3)。

从图 1 至图 3 可以得出:各微生物类菌含量随土壤量从 1 g 到 8 g 以及凋落物量从 0.5 g 到 1 g 之间有明显的增幅,土

表 4 常见用于指示土壤微生物群落结构的 PLFA<sup>[2-5]</sup>

微生物	对应的 PLFA
常见细菌	14:0,15:0,16:0,17:0,18:0,16:0 N alcohol,13:0 iso,14:0 iso,15:0 iso,16:0 iso,17:0 iso,18:0 iso,19:0 iso,15:0 iso3OH,17:0 iso3OH,15:0 anteiso,17:0 anteiso,17:0cyclo,19:0cyclo,15:1 iso G,16:1 iso G,16:1 2 OH,16:1 w5c,16:1 w6c,16:1 w7c,16:1 w9c,18:1 w5c,18:1 w7c,18:1 w9c,16:1 w7t,16:1 w9t 等
真菌	18:1 w9,18:3 w6c (6,9,12),18:2 w6,9c,18:1 w6c
放线菌	16:0(10Me),17:0(10Me),18:0(10Me),19:0(10Me)
原生动物	20:0,20:3w6,20:4w6,9,12,15
革兰氏阳性菌	14:0,15:0,16:0,17:0,18:0,13:0 iso,14:0 iso,15:0 iso,16:0 iso,17:0 iso,18:0 iso,19:0 iso
革兰氏阴性菌	15:1 w4c,16:1 w5c,16:1 w6c,16:1 w7c,16:1 w9c,17:0 cyclo,19:0 cyclo,17:1 w9c,18:1 w5c,18:1 w7c,18:1 w9c,16:1 w7t,16:1 w9t,18:1 w7t
好氧菌	16:1 w7c,16:1 w7t,18:1 w7c
厌氧菌	17:0 cyclo,19:0 cyclo
嗜热解氢杆菌	20:1w9c,18:0
甲烷氧化菌	16:1w8c,16:1w8t,16:1w5c,18:1w8c,18:1w8t

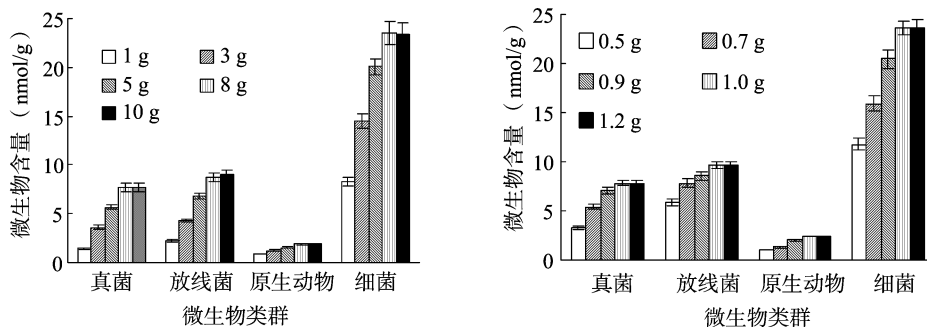


图1 不同土壤量(左)、凋落物量(右)中微生物群落分析

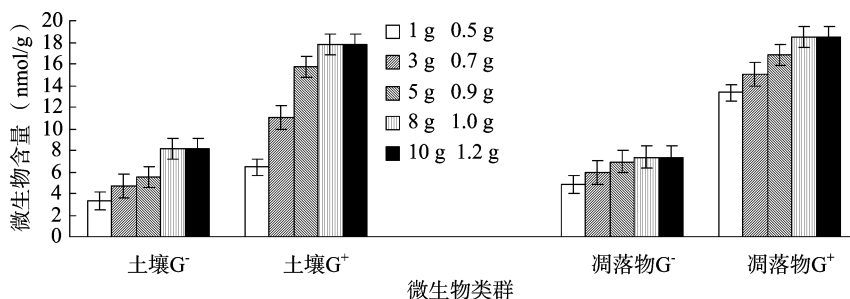


图2 不同土壤量及凋落物量中革兰氏阳性菌、阴性菌分析

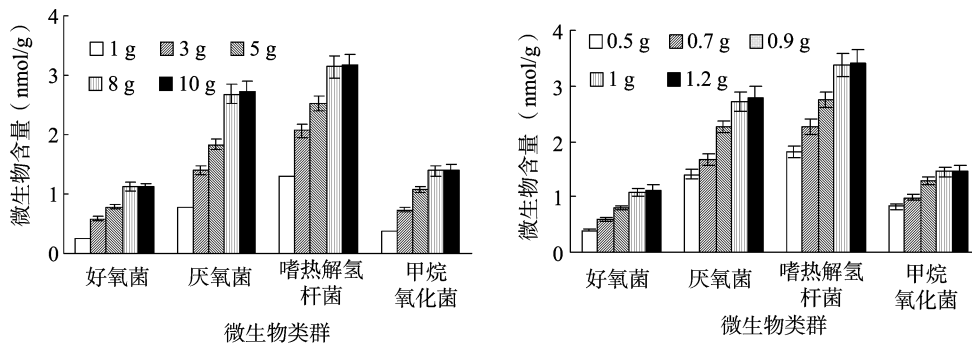


图3 不同土壤量(左)及凋落物量(右)中好氧菌、厌氧菌、嗜热解氢杆菌、甲烷氧化菌分析

壤量从 8 g 到 10 g、凋落物量从 1 g 到 1.2 g 各类菌群基本持平,其中细菌的增幅最大。鉴于此,可以认为 8 g 土壤量和 1 g 凋落物量可以作为微生物群落信息提取的试验用量,细菌在土壤和凋落物中都是优势菌类,可以认为磷脂脂肪酸总含量(总 PLFA)随着样品量的增加而增加的部分主要表现为所提取到的细菌含量的增加;革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌更有优势,地处川西高原森林土壤和凋落物中生活的厌氧菌比好养菌更加活跃,在一定范围的土壤量及凋落物量中微生物类群的变化随试样量的变化会发生一定范围的波动。

### 3 结论

针对川西高原森林,8 g 土壤量可以最大限度的满足土壤中 PLFA 的提取,1 g 凋落物量可以最大限度地满足凋落物中 PLFA 的提取。利用超声波在 30 ~ 40 min 内即可最大限度地提取土壤中的 PLFA,表明用超声提取土壤中的磷脂脂肪酸可以代替传统的振荡提取,且操作更加简便快捷。在研究相同环境土壤和凋落物中的微生物群落结构时,可以考虑把两者作为一个整体来研究。

### 参考文献:

- [1] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of 总 lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911 - 917.
- [2] Brant J B, Myrold D D, Sulzman E W. Root controls on soil microbial community structure in forest soils[J]. Oecologia, 2006, 148(4): 650 - 659.
- [3] Bai Q, Gatteringer A, Zelles L. Characterization of microbial consortia in paddy rice soil by phospholipid analysis[J]. Microbial Ecology, 2000, 39(4): 273 - 281.
- [4] Sakamoto K, Lijima T, Higuchi R. Use of specific phospholipid fatty acids for identifying and quantifying the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(11): 1827 - 1834.
- [5] 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[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, 18(2): 103 - 112.