

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.05.008

土壤微生物群落结构分析中磷脂脂肪酸法和 温和碱性甲酯化法的比较及定量优化^{*}

任慧琴 赵念席^{**} 陈 磊 高玉葆

(南开大学生命科学学院, 天津, 300071)

摘 要 分别用磷脂脂肪酸法 (PLFA) 和温和碱性甲酯化法 (EL) 对同一土壤样品脂肪酸 (FAs) 进行提取, 结果表明, EL 法提取到更多种类的短链和长链 FAs, 且总 FAs 含量是 PLFA 法的 3 倍; 两种方法提取的细菌、真菌和放线菌的相对含量存在显著差异。此外, 在定量计算时, 基于“内标对比法”与“直接计算法”计算值之间的差异得到校正系数 $\bar{K}$, 用于定量值的校正。经检验, 借助校正系数可使定量结果更准确。

关键词 土壤微生物群落, PLFA 法, EL 法, 校正系数。

Comparison of phospholipid fatty acid method and mild alkaline methylesterification method in characterizing soil microbial communities and quantitative optimization

REN Huiqin ZHAO Nianxi^{**} CHEN Lei GAO Yubao

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin, 300071, China)

Abstract: In the present study, fatty acids (FAs) were extracted from soil samples by both phospholipid fatty acid (PLFA) method and mild alkaline methylesterification (EL) method. More kinds of both short and long chain FAs, and 2-fold higher total FAs content were extracted by EL method than by PLFA method. Relative content of bacteria, fungi and actinomycetes showed significantly different between the two methods ($P < 0.05$). When quantitating FAs, a correction factor $\bar{K}$ was defined based on the variance between quantitation values that calculated by “internal standard correlation method” and “direct calculation method”, then was used to correct values that calculated by “direct calculation method”. The results showed that correction values were more accurate than values calculated by “direct calculation method”.

Keywords: soil microbial community, PLFA method, EL method, correction factor.

土壤微生物群落对整个生态系统具有重要作用, 因此有关其结构及多样性的研究是近年来土壤生态学研究的热点^[1]。磷脂脂肪酸 (PLFAs) 作为磷脂的一种, 在不同的微生物类群 (如细菌、真菌、放线菌) 中有所不同, 其水解释放的脂肪酸 (FAs) 组成的差异可以反映微生物群落结构的差异^[2-3]。因此, 一些从土壤中提取 PLFAs 的方法和技术被广泛用于土壤微生物群落结构的研究^[4-7]。提取 PLFAs 常用的方法有两种: 磷脂脂肪酸 (PLFA) 法和温和碱性甲酯化 (EL) 法。PLFA 法由 Bligh 等^[8] 创建, 该方法是用有机试剂从土壤中萃取活体微生物细胞 PLFAs, 然后水解释放 FAs, 经硅胶柱纯化后再甲酯化形成脂肪酸甲酯 (FAMES, Fatty acid methyl esters) 来反映微生物群落结构。EL 法由 Schutter 等^[9] 提出, 该方法运用氢氧化钾-甲醇溶解微生物细胞膜, PLFAs 水解释放 FAs, 被甲酯化后形成 FAMES。目前, 关于两种方法的提取

2013 年 7 月 14 日收稿。

^{*} 国家自然科学基金项目 (31270463) 资助。

^{**} 通讯联系人, E-mail: zhaonianxi@nankai.edu.cn

重复性、提取组分的产量、组分比例及提取效果等方面的比较很少,需更多的实验数据补充验证^[6,9-10]。

土壤微生物 FAMES 常用气相色谱-质谱联用仪(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)进行分析,并可通过“内标对比法”(既加内标又结合外标作对照)进行准确定量^[11-13]。但在实际应用中,提取的混菌 FAs 中有很多组分并没有相应的纯品物质作外标对照;另外,多数研究只用外标或只加内标,借用样品含量和峰面积呈正比的原理(下文称“直接计算法”)进行定量^[14-15],造成测定结果会有一定的偏差。其原因是不同组分即使含量相同,在同一检测器中的响应值(峰面积)也并不相同,同时“直接计算法”定量结果还受仪器灵敏度不同等的影响^[11]。

本文采用 PLFA 法和 EL 法对同一土样进行 FAs 提取,从定性和定量两方面比较了二者在提取 FAs 时的差异;在定量分析时,基于“内标对比法”和“直接计算法”存在差异这一事实,提出校正系数,并对只能用于“直接计算法”的组分进行校正,使得没有纯品作为对照的 FAs 仍能准确定量。这将为土壤微生物群落结构分析时在方法选择及定量计算方面提供参考。

1 材料和方法

1.1 土样的采集及保存

将田间采集的 0—15 cm 土层的土样过 1 mm 筛,混匀,于 -20 °C 冰箱中保存待用。

1.2 土壤 PLFAs 的提取

分别用 PLFA 法和 EL 法对相同土壤样品中的微生物 FAs 进行提取。PLFA 法采用修正的 Bligh-Dyer^[8]方法,EL 法采用 Schutter 和 Dick 的方法^[9],每种方法重复 4 次。

PLFA 法可概括为 3 步:(1)提取:提取液(氯仿:甲醇:柠檬酸缓冲液 = 1:2:0.8)提取 2 次,合并上清液后加 pH 4.0 的柠檬酸缓冲液和氯仿,振荡 1 min,静置过夜。保留下层液,即氯仿相(包含磷脂),氮气吹干后用氯仿溶解。(2)分离:将氯仿溶解的样品置于活化的硅胶柱内,依次用 5 mL 氯仿、10 mL 丙酮、5 mL 甲醇洗脱,收集甲醇相,氮气吹干后用 1.0 mL 甲醇:甲苯(体积比 = 1:1)混合液溶解。(3)甲酯化:加 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钾-甲醇溶液,涡旋振荡后于 37 °C 下保温 15 min,依次加去离子水、1.0 mol·L⁻¹ 冰醋酸中和溶液,混匀后加正己烷,涡旋 30 s,离心 10 min 后取上清液,氮气吹干后用正己烷溶解。

EL 法可概括为 2 步:(1)提取:加 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钾-甲醇溶液提取土样,振荡温育 1 h。(2)甲酯化:加 1.0 mol·L⁻¹ 的冰醋酸中和样品。随后加正己烷,离心,取上层正己烷相,氮气吹干后溶解在正己烷:甲基叔丁基醚溶液(体积比 = 1:1)中。

每份提取液中均加一定比例的 1 mg·mL⁻¹ 正十九烷脂肪酸甲酯作为内标物,同时用 SupelcoTM 37 FAMES 混标(购于美国 Supelco 公司)作外标对照。

1.3 GC-MS 分析

提取液和外标同时用 GC-MS(Agilent 7890 A-5975 C)进行检测分析。柱箱初始温度 80 °C,保持 2 min;以 50 °C·min⁻¹ 升温至 150 °C,保持 2 min;再以 2.5 °C·min⁻¹ 升温至 195 °C,保持 3 min 后继续升至 240 °C,保持 5 min。色谱柱为 30 m × 250 μm × 0.25 μm,载气为高纯氮气,每针进样量为 1 μL,分流比为 10:1。

1.4 数据分析

PFLAs 定性分析:根据 37 种 FAMES 混合物 GC-MS 分析结果、已有的相关报道以及 MIDI 鉴定软件对样品中 FAs 定性。分别统计每种方法所测定的结果:(1)统计所有重复中 FAs 种类总数以及剔除只在一个重复中出现的 FAs 后 FAs 种类总数,分别记作: N 、 N^- ;(2)统计剔除前后每个重复中检测到的 FAs 的种类数,并计算变异系数(变异系数 = 标准差/平均值),分别记作 n 、 n^- 和 CV 、 CV^- ;(3)计算单样品的代表性,分别用 n/N 和 n^-/N^- 来表示。

PFLAs 定量分析:对在 37 种 FAMES 混标中有相应对照的 FAs 分别用“内标对比法”和“直接计算法”计算。“内标对比法”计算公式: $W_{i\text{样品}} = \frac{(A_i/A_s)_{\text{样品}}}{(A_i/A_s)_{\text{对照}}} \times W_{i\text{对照}}$, 其中: $W_{i\text{样品}}$ 代表样品中待测组分 i 的含量; $(A_i/A_s)_{\text{样品}}$ 代表样品中组分 i 的峰面积与内标峰面积的比值; $(A_i/A_s)_{\text{对照}}$ 代表标准对照品中组

分 i 的峰面积与内标峰面积的比值; $W_{i\text{对照}}$ 代表标准对照品中组分 i 的含量,此方法定量准确,但只能用于对照品和样品中共同物质的定量;“直接计算法”公式: $W_{i\text{样品}} = \frac{A_{i\text{样品}}}{A_{s\text{样品}}} \times W_{s\text{样品}}$, 其中: $W_{i\text{样品}}$ 代表样品中待测组分 i 的含量; $A_{i\text{样品}}$ 代表样品中组分 i 的峰面积; $A_{s\text{样品}}$ 代表样品中内标物峰面积; $W_{s\text{样品}}$ 代表样品中内标物的含量.由于两种方法对同一样品同一物质的含量计算上存在很大差异,因此本文提出了校正系数 $\bar{K}$: $\bar{K} = \sum_{k=1}^n \frac{\text{内标对比值}}{\text{直接计算值}}/n$, 再对只能用于“直接计算法”的 FAs 的含量值进行校正(下文称“校正系数法”): 校正值=直接计算值 $\times \bar{K}$, FAs 的含量用 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (干土重 DW)表示.

统计检验:(1)利用 t 检验来分析 PLFA 和 EL 两种方法所提取的 FAs 的种类(n, n^-)、单个重复提取的代表性($n/N, n^-/N^-$)以及表征不同微生物类群 FAs 相对含量的差异.其中表征细菌的 FAs 有: C15:0、a15:0、i15:0、C16:0、a16:0、i16:0、C17:0、i17:0、a17:0、C18:0、cy19:0、i19:0、18:1 ω 7c; 表征真菌的 FAs 为 18:2 ω 6,9; 表征放线菌的 FAs 为 10Me FAs^[8]. (2)通过单因素方差分析来检验“内标对比法”、“直接计算法”和“校正系数法”所得结果的平均值的差异.

2 结果与讨论

2.1 两种提取方法提取效果和所得 FAs 种类的差异

对比提取的 FAs 的种类(包括 N, N^-, n, n^-)以及单个重复提取的代表性($n/N, n^-/N^-$), EL 所得结果均高于 PLFA 法,且 n, n^- 以及 n/N 均表现为 EL 法显著高于 PLFA 法(表 1),这与 EL 法提取出更多种类的短链 FAs(如 C11:0、C12:0、C13:0、C14:0)和长链 FAs(如 C22:0、C20:3、C20:2、C23:0、C24:1)有关(图 1),结果与其他人的研究结果一致.Fernandes 等^[6]利用 EL 法提取到更多 PLFA 中未提取到的短链 FAs(如 C12:0、C14:0)和长链 FAs(如 C20:0、C22:0).Drenovsky 等^[10]研究也表明,EL 法提取的短链脂肪酸($C<14$)相对含量显著高于 PLFA 法.土壤腐殖质及植物残渣体中含有这些短链和长链 FAs 也早有报道^[16-17],因此 EL 法会提取到该类 FAs,因而来源较多且复杂,被认为可反映土壤代谢史^[18],而 PLFA 法提取的 FAs 只存在于活体微生物细胞膜上,反映的是土壤微生物群落的即时动态.

对比提取种类的变异系数(CV、CV⁻), PLFA 法和 EL 法均较低,但在 EL 法中更低(表 1),与 Drenovsky 等^[10]的研究结果并不一致,可能是提取的土壤样品不同造成的.此外,无论是 PLFA 法还是 EL 法,CV 较 CV⁻更低,与 Drenovsky 等^[10]的研究结果一致.

表 1 两种提取方法提取效果和提取脂肪酸种类比较
Table 1 Comparison of extraction performance and the types of FAs

	PLFA 法	EL 法	P 值		PLFA 法	EL 法	P 值
n	18	44.75	<0.001	n/N	62.07%	84.43%	0.009
n^-	15.25	41	<0.001	n^-/N^-	76.25%	87.23%	0.162
N	29	53	—	CV	13.61%	3.35%	—
N^-	20	47	—	CV ⁻	16.39%	6.60%	—

2.2 定量方法间的比较

对样品和外标对照中共有的 FAs(C15:0、C16:0、C18:0 等)采用“直接计算法”、“内标对比法”和“校正系数法”计算其含量.结果显示:校正值比直接计算值更加接近内标对比计算值,且绝大多数 FAs 含量的校正值和内标对比值无显著差异(PLFA 法中的 18:1 ω 9t 和 EL 法中的 C15:0、C16:0、C18:0 除外),而直接计算值则显著低于另外两种方法计算值(EL 法中的 C11:0、C22:0、C23:0 及 C24:1 除外)(图 1).“内标对比法”是色谱定量中最常用的、也是最准确的定量方法^[11].因此,无法用“内标对比法”进行定量的物质(i12:0、a12:0、i14:0、a16:0、i16:0 等)可通过校正系数校正.该校正系数在计算中的应用,既克服了无足够对照品的困境,又避免了“直接计算法”计算结果不准确的缺点,具有明显的优势(图 1).

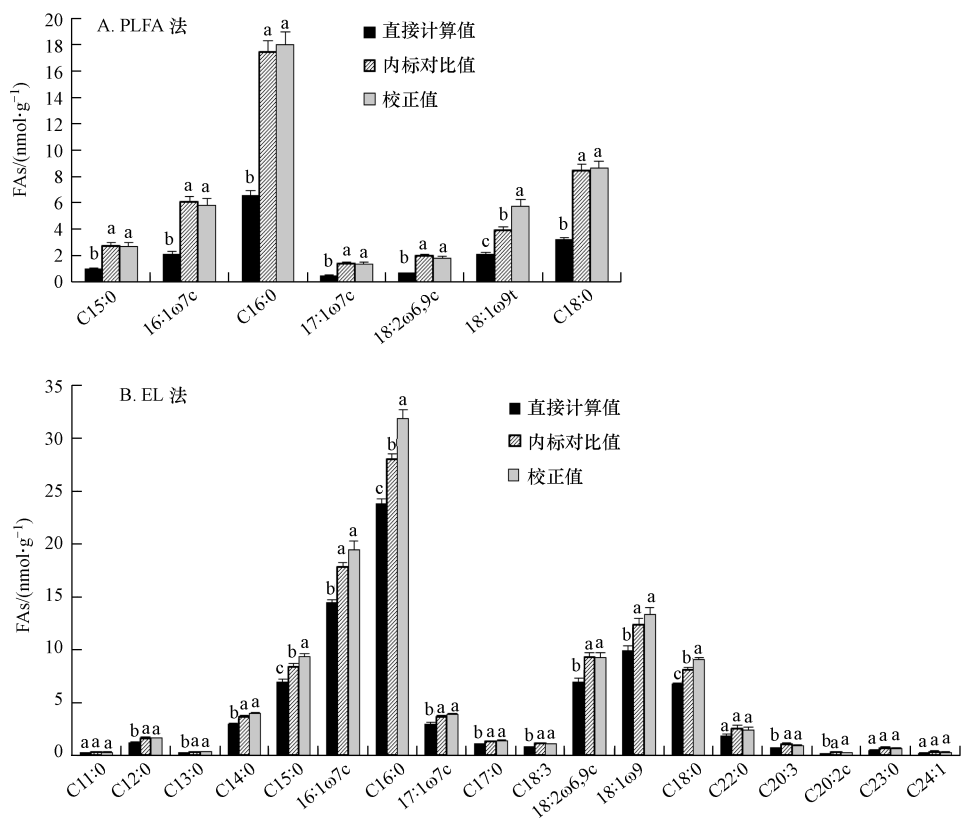


图 1 不同 FAs 的 3 种计算方法值比较

Fig.1 Comparison of values calculated by three methods for different FAs

2.3 PLFA 法和 EL 法所提取微生物 FAs 组分及含量的差异

不同方法提取出的土壤中 FAs 组分及含量差异很大:EL 法提取的 FAs 总量(237.14 nmol·g⁻¹DW)是 PLFA 法提取总量(72.55 nmol·g⁻¹DW)的 3.27 倍;细菌、真菌和放线菌在提取组分中的比例也存在显著差异:PLFA 法提取的细菌 FAs 占总提取脂肪酸的绝大部分(60.71%),其相对含量显著高于 EL 法(37.23%),真菌 FAs 和放线菌 FAs 占提取总脂肪酸的 2.46%和 12.14%,显著低于 EL 法(分别是 3.92%和 15.64%)(图 2)。

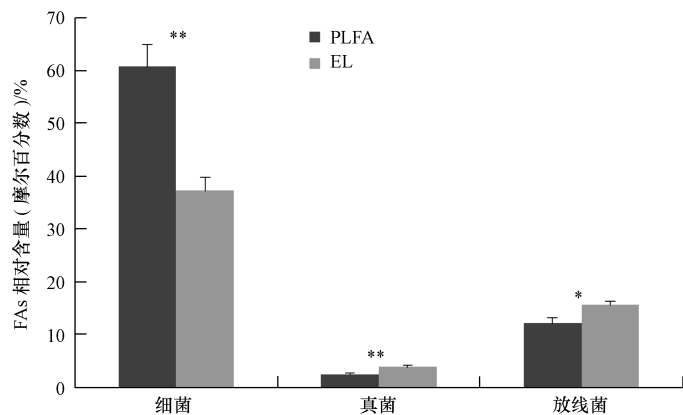


图 2 PLFA 法和 EL 法所提取的不同微生物标记性 FAs 相对含量的差异 (* 0.01<P<0.05, ** P<0.01)

Fig.2 The difference of relative content (mol%) of different microorganism biomarker FAs extracted by PLFA method and EL method

其他研究也有类似报道,如:Drenovsky 等^[10]研究表明 EL 法提取的 FAs 的总量是 PLFA 法提取总量的 7 倍之高,且 PLFA 法提取的细菌相对含量也显著高于 EL 法,真菌相对含量也显著低于 EL 法;

Bååth^[19] 研究也表明 EL 法提取真菌 FAs 生物量显著高于 PLFA 法.产生此类结果的原因可能是 EL 提取的 FAs 来源较多且复杂,包括了活体微生物细胞膜 FAs 以外的其他 FAs,因此含量更高;此外,真菌含有较大量的中性脂肪酸(NLFAs),而 NLFAs 只能被 EL 法提取,不能被 PLFA 法提取^[10].

3 结 论

就 FAs 组分定量而言,采用“校正系数法”可使得计算结果更加准确.就两种提取方法来看,二者各有优劣,不同的提取方法得到的结果不同.PLFA 法的优点是由于提取的 FAs 仅来源于活体微生物,因此更能反映微生物群落结构的即时状态,缺点是对于土壤微生物混合菌群 FAs 的提取而言,PLFA 法提取条件苛刻、使用过多的危险试剂且步骤复杂、耗时长;EL 法优点是实验耗时短,更快速、廉价,适合在样品量较大时采用;缺点是提取的 FAs 来源较复杂,更主要反映土壤代谢史.

参 考 文 献

[1] 贺纪正, 李晶, 郑袁明. 土壤生态系统微生物多样性-稳定性关系的思考[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 411-420

[2] Vestal J R, White D C. Lipid analysis in microbial ecology[J]. Bioscience, 1989, 39(8): 535- 541

[3] Drenovsky R E, Steenwerth K L, Jackson L E, et al. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities [J]. Global Ecology and Biogeography, 2010, 19(1): 27-39

[4] García O, Fuensanta M, Alicia M S, et al. Effects of different agricultural managements in soil microbial community structure in a semi-arid Mediterranean region[J]. Geophysical Research Abstracts, 2012, 15: 9489

[5] Fernández D A, Roldán A, Azcón R, et al. Effects of water stress, organic amendment and mycorrhizal inoculation on soil microbial community structure and activity during the establishment of two heavy metal-tolerant native plant species[J]. Microb Ecology, 2012, 63 (4): 794-803

[6] Fernandes M F, Saxena J, Dick R P. Comparison of whole-cell fatty acid (MIDI) or phospholipid fatty acid (PLFA) extractants as biomarkers to profile soil microbial communities[J]. Microb Ecology, 2013, 66(1): 145-157

[7] Feng X, Simpson A J, Schlesinger W H, et al. Altered microbial community structure and organic matter composition under elevated CO2 and N fertilization in the duke forest[J]. Global Change Biology, 2010, 16(7): 2104-2116

[8] Bligh E 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

[9] Schutter M E, Dick R P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities[J]. Soil Science Society of America Journal, 2000, 64(5): 1659-1668

[10] Drenovsky R E, Elliott G N, Graham K J, et al. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(11): 1793-1800

[11] 孙毓庆, 胡育筑, 吴玉田, 等. 分析化学[M]. 科学出版社, 2006: 504-507

[12] 黄玉娟, 陈永山, 骆永明, 等. 气相色谱-质谱联用内标法测定土壤中 11 种酞酸酯[J]. 环境化学, 2013, 32(4): 658-665

[13] 肖刚, 李丽君, 杨柳, 等. 气相色谱-质谱法同时测定地下水中 55 种挥发性有机物[J]. 环境化学, 2012, 31(12): 2024-2025

[14] Sharma S K, Ramesh A, Sharma M P, et al. Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality[M]. Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture, 2011, 5: 317-358

[15] 白震, 张明, 闫颖, 等. 长期施肥对农田黑土微生物活力与群落结构的影响[J]. 土壤学报, 2009, 46(1): 107-116

[16] Hunneman D H, Eglinton G.. The constituent acids of gymnosperm cutins[J]. Phytochemistry, 1972, 11(6): 1989-2001

[17] Kolattukudy P E. Biopolyester membranes of plants: Cutin and suberin[J]. Science, 1980, 208: 990-1000

[18] 张瑞娟, 李华, 林勤保, 等. 土壤微生物群落表征中磷脂脂肪酸(PLFA)方法研究进展[J]. 山西农业科学, 2011, 39(9): 1020-1024

[19] Bååth E. The use of neutral lipid fatty acids to indicate the physiological conditions of soil fungi[J]. Microbial Ecology, 2003, 45(4): 373-383