

磷脂脂肪酸法在土壤微生物群落分析中的应用

姚晓东^{1,2} 王妮^{2*} 曾辉^{1,2}

(1. 北京大学深圳研究生院 广东 深圳 518055)

(2. 北京大学城市与环境学院 北京 100871)

摘要: 土壤微生物群落的组成一直是土壤学、微生物学和生态学研究的热点问题。我国在这方面的研究处于国际前列,越来越多的研究成果在国际重要刊物上发表。而磷脂脂肪酸(PLFA)法在土壤微生物群落分析中占有举足轻重的地位,国内外学者都热衷于使用该方法。但是PLFA法的使用仍存在一些不足的地方,需要研究学者们慎重使用。本文综述了国际上相关研究,概述了PLFA方法使用的发展历史,应用及挑战。总结了使用和数据解读时需要注意的问题,整理了PLFA法相关的生物标记以及与新方法结合的设计,方便以后研究的开展。

关键词: 磷脂脂肪酸, 土壤微生物, 生物表征

Application of phospholipid fatty acid method in analyzing soil microbial community composition

YAO Xiao-Dong^{1,2} WANG Wei^{2*} ZENG Hui^{1,2}

(1. Shenzhen Graduate School, Peking University, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

(2. College of Urban and Environment, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Soil microbial community composition was the hot issue of soil science, microbiology and ecology. This research conducted in China was in the international forefront and more and more relevant research has been published in high influential international journals. The phospholipid fatty acid (PLFA) method plays a significant role in the analysis of soil microbial communities, both domestic and foreign. But it also has some shortages, which should arouse the concern of research scholars. This paper reviewed the related research focusing on the development history and the application of PLFA method. This review highlights the caution when using and interpreting PLFA data, summarizes the PLFA biomarker and provides some suggestions towards the combination with the new approach in order to facilitate future studies.

Keywords: Phospholipid fatty acid, Soil microbial communities, Biomarker

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31222011, 31270363, 31021001, 31321061); National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB956303)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-10-62755923; E-mail: wangw@urban.pku.edu.cn

Received: January 07, 2016; Accepted: April 20, 2016; Published online (www.cnki.net): May 11, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31222011, 31270363, 31021001, 31321061); 国家重点基础研究发展规划项目(973 计划) (No. 2013CB956303)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-10-62755923; E-mail: wangw@urban.pku.edu.cn

收稿日期: 2016-01-07; 接受日期: 2016-04-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-11

土壤中微生物的数量和种类都十分丰富, 主要包括细菌、放线菌、真菌、藻类和原生动物等。土壤微生物是土壤有机质中最活跃的生命体。虽然微生物量碳只占总有机碳很小的一部分, 但是土壤微生物群落在全球碳氮循环中起关键作用, 它们负责有机质分解, 控制氮的吸收和释放^[1]。土壤微生物在土壤生物活性、土壤结构的形成、有机质周转、营养循环、土壤可持续发展过程中都起到重要作用, 土壤微生物的组成和含量都被看成是指示土壤质量的重要指标^[2-3]。Bardgett 等(2014)指出巨大的地下微生物群落多样性显著影响了地上生物多样性和陆地生态系统功能, 同时指出, 地下微生物群落的分布以及与之相关的陆地生态系统功能的研究不断增加^[4]。中国科学家在土壤微生物的研究中扮演重要的角色, 中国科学院启动的“土壤-微生物系统功能及其调控”的战略性先导科技专项进一步推动了我国土壤微生物方面的研究。在草原、森林、农田多种生态系统都开展了相关研究^[5-8]。Chen 等(2014)研究了蒙古高原草地的土壤微生物群落和线虫的区域格局^[8]。Xu 等(2015)研究表明中国西南地区亚高山冷杉森林的土壤细菌随增温而增加, 土壤真菌随增温而减小^[6]。Yuan 等(2015)报道了稻田演变为蔬菜田的土壤微生物群落响应^[7]。特别是, 我国在农田系统中施肥实验对于土壤微生物群落影响开展了广泛的研究, 处于国际前列^[9-11]。我们课题组则在森林草地生态系统做了相关的研究。例如, Zhang 等(2015)观测了我国北方温带生态系统的微生物季节过程, 对比了冬季与夏季土壤微生物群落, 发现冬季的真菌/细菌比和革兰氏阴性/阳性细菌比要高于夏季^[12]。Du 等(2014)在樟子松人工林的施肥实验中发现土壤真菌和细菌对于氮添加无显著影响^[13], Zeng 等(2015)则发现磷添加和结合磷的氮添加对于微生物真菌细菌比有显著的促进作用^[14]。

以上这些土壤微生物群落的研究, 都使用了磷脂脂肪酸(PLFA)法, 可见 PLFA 法在土壤微生物群落分析中占有重要的地位。PLFA 法已经发展了近

四十年, 成为土壤微生物生态学研究经典方法, 但是随着方法的广泛使用也出现了一些问题。本文从实际数据处理应用的角度出发, 探讨了可能遇到的问题。通过大量的文献整理, 梳理了生物表征择取的关键问题。我们通过综述目前的研究, 进一步分析 PLFA 法在当前土壤微生物群落研究中所处的地位, 以及它在使用中需注意哪些关键问题, 并希望这篇文章的一些结论能方便以后相关学者使用 PLFA 法分析土壤微生物群落的组成。

1 PLFA 法简介

1.1 PLFA 法发展历史

PLFA 是活体微生物细胞膜的重要组分, 不同类群的微生物能通过不同的生化途径合成不同的 PLFA, 其中部分 PLFA 可以作为分析微生物量和微生物群落结构等变化的生物标记^[15-16]。PLFA 法就是通过分析这种微生物细胞结构的稳定组分的种类及组成比例来鉴别土壤微生物结构多样性。这个方法在 20 世纪 60 年代就被提出, 在 70 年代末被引入土壤微生物的研究中, 所以 PLFA 法分析土壤微生物的应用, 至少已经有近四十年的历史。

White 等(1979)最早在海洋与河口沉积物的微生物群落研究中应用了 PLFA 法^[17] 这开启了 PLFA 法在土壤微生物应用的年代。但最初这个方法备受争议, 到 90 年代才开始慢慢被大家接受和使用。利用 ISI 科学网检索 Soil 和 PLFA 的研究结果, 可以看出, 1990-1994 年只有 3 篇文章, 但是随后每年都不断增加。Federle 等(1990)使用 PLFA 方法研究了土壤剖面方向的微生物量、活力和群落组成^[18]。Frostegård 等(2011)指出随着早期相关论述的发表, PLFA 法也越来越被关注^[19]。由于 PLFA 表征土壤微生物群落方面的优势, 被越来越多人认可和使用。从图 1 可以看出全世界范围, 每年同时涉及到 Soil 和 PLFA 两个关键字的文章不断增加。从图 1 中还可以看出 2005 年之前增长较为缓慢, 而 2005 年后增长有明显加速。这说明该方法, 近十年较之前有进一步发展, 得到更多研究者的认可。

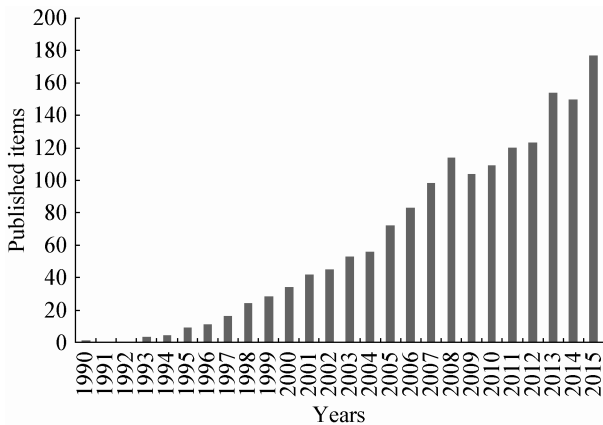


图1 每年文章发表情况

Figure 1 Published items in each years

注：在 ISI Web-of-Science 网站上使用“PLFA and Soil”检索得到相关的发表文章数目(2016-01-01)；检索结果总共 1 630 条记录。
Note: Publications found when searching ISI Web-of-Science for “PLFA and Soil” 2016-01-01; totally there were 1 630 hits.

王曙光等(2004)^[15]把 PLFA 法介绍引入国内后，中国学者在使用该方法的角色发生了明显变化。根据 Scopus 分析的结果，在 2004 年之前中国学者在国际刊物上发表的关于 Soil 和 PLFA 的文章仅 4 篇，占全世界的 1/60，而 2005–2015 年共发表 295 篇，占全世界的 1/4，并且成为应用该方法最多的国家。由于 2005 年这个时间节点与图中加速的时间点切合，中国学者的加入可能是 2005 年之后相关文章

增长速度加快的原因之一。这也说明，中国学者对进一步推动该方法的发展扮演了重要的角色。但随着方法的使用也出现了一些问题，在 2010 年前后出现使用相对减少的趋势。2011 年 Frostegård 等应 Soil Biology & Biochemistry 杂志特刊主编 Richard Burns 的邀请，讨论发表了一篇 PLFA 法的使用和滥用的综述，说明了 PLFA 法使用和解读时存在的一些问题^[19]。但是由于 PLFA 法的便捷和有效，依然还有很多人在使用这一方法。特别最近三年，可以看出这类文章的数目更是高达每年 150 篇以上。

1.2 PLFA 法的优势与不足

PLFA 方法之所以被这么多人使用，是因为它有以下几个优点(表 1)：(1) 能够快速解读出微生物群落组成是否受到环境变化的影响；(2) 相对于其他方法，能够更敏感地响应微生物群落的变化；(3) 方法已经相对完善和成熟，成本相对较低；(4) 相对于其他方法，能够提供更多微生物表型和活力等生态学层面的信息；(5) 适合微生物群落的总体分析，而不是专一的微生物物种研究。

但是它仍存在一些不足和问题(表 1)：(1) 目前已有多位学者认为在用这种方法解读微生物群落时一定要十分小心，因为微生物群落分类与 PLFA 并不是一一对应的^[19]；(2) 目前很多作为生物表征

表 1 PLFA 法的优势与不足

Table 1 Strengths and weaknesses of phospholipid fatty acids analysis method

比较项目 Comparative items	PLFA 法 PLFA method	DNA 测序法 DNA sequencing method
读取土壤微生物群落环境响应的速度 Environmental response speed of soil microbial communities	较快	较费时
成本 Cost	较低	趋于减少
信息种类 Types of information	更多在微生物表型、活力等生态学层面的信息	丰富的基因层面信息
分析层面 Analysis level	更多是微生物群落的总体分析	专一的微生物物种分析
分析对象 Analysis object	土壤微生物有生命个体	土壤微生物所有个体(包括休眠或死亡的个体)
表征数据库 Biomarkers database	仍有一些特征脂肪酸未搞清楚，总体种类较少，数据量相对较小	仍有较多未识别的土壤微生物物种基因，基因数据库正在不断完善，总体种类庞大，数据量巨大
表征 Biomarkers	大部分生物表征并不能与土壤微生物一一对应，需慎重选择	表征择取精确到物种，但是仍存在一定误差

的 PLFA 是在纯培养实验中发现和研究得出的,而多数是应用于原位的研究中,有研究表明在复杂的自然原位土壤系统,PLFA 种类和生物表征的对应关系比纯培养要更加复杂,一些 PLFAs 往往同时被多种微生物表达^[20]; (3) 目前仍然有未搞清的具有微生物特征的脂肪酸,这一定程度上会造成结果的不全面性^[21]; (4) 该方法主要是通过特征脂肪酸表征微生物群落结构,因此标记上的变动会很大程度影响解读的结果;(5) 目前大部分文章都是在相互引用,而不是从最原始的文章进行分析,而且发现不少文章在使用生物表征选择的时候并不是统一的,不同标准的使用难免会让结果产生较大的偏差。

2 PLFA 法的应用

2.1 方法应用

PLFA 方法在土壤微生物量、微生物群落表征、土壤微生物生理状态和代谢活动等方面都有广泛的应用^[20]。在土壤微生物量的应用,相较于氯仿熏蒸和基质诱导呼吸等方法,PLFA 法更偏重反映有活力的微生物量,而不仅仅是微生物量碳。但转换因子的选择经常不统一,导致结果差异较大。饱和与不饱和脂肪酸比(S/M)、反式顺式比(Trans/Cis)、含环丙基脂肪酸与含前体单不饱和脂肪酸比(Cy/Pre)和聚羟基丁酸与总脂肪酸比(Ph/T)都是在土壤微生物生理状态和代谢活动方面应用的常用指标。PLFA 法经常被用来分析微生物群落结构组成,分析细菌、真菌以及真菌/细菌比等。其中,生物表征的选择显著影响着分析的结果,在应用中需重点关注。

2.2 生物表征

总体来说,现在大部分文章仍使用不同 PLFA 种类作为不同的生物表征,并分析特定类群的微生物群落特征。我们收集了一些代表性文献,主要包括一些原始但经典的应用 PLFA 法来表征微生物群落的文献,以及一些最新的相关研究。总结了这些文献是如何使用 PLFA 的生物表征,并以 PLFA 的

结构进行归类整理(表 2)。表 2 中整理了 146 种 PLFA,其中只有 18 种同时表征多个微生物群落,而且有 4 个是同时表征革兰氏阴性和厌氧菌,这个是分类方法选择不同,不认为是表征不同的微生物群落。所以 146 个 PLFA 种类中只有 14 个即 1/10 左右的概率是同时表征多个类群的微生物。有研究在选择 PLFA 生物标记的时候,会把有矛盾的 PLFA 排除在结果分析之外^[22]。还有一些特殊的 PLFA 种类需要在使用中得到关注,例如 18:1 ω 9c 和 18:2 ω 9,12 同时产生时候,可以认为 18:1 ω 9c 是真菌的微生物标记^[19];但是如果只是单独产生的 18:1 ω 9c 可能是革兰氏阴性细菌^[23]和 II 型甲烷氧化菌^[24]等其他的微生物标记。

可以发现一些脂肪酸表征在不同研究中表征的微生物不同,这会造成脂肪酸生物标记与微生物对应关系的混乱。为了减少这种混乱的发生,一方面就 PLFA 方法本身,目前国际上最新的观点是,避免选择不明确的脂肪酸(包括未找到表征的和可能同时表征不同微生物的),而一些已经有相对明确使用条件的,需符合条件才能选择(如 18:1 ω 9c)^[22]。另一方面会结合高通量测序技术进行修正补充^[25-26]。因此,我们可以看出在 PLFA 表征的选择上需特别小心,不仅需要尽可能去找全这些标记 PLFA,而且还要慎重解读。文章对于生物表征的较全面梳理,将有助于今后的 PLFA 方法使用,减少这种混乱的发生。

2.3 比率的使用

PLFA 比率的应用仍然是目前很多研究所使用的,我们整理了 6 种常见的不同 PLFA 比值以及它们表征的生态学信息(表 3)。这些比率经常被作为微生物群落变化的重要指示,表征微生物对环境变化的响应和生理胁迫等生态学信息。但是由于这些表征受到微生物细胞膜的干扰,使用上仍然还有局限。一方面,磷脂脂肪酸是细胞膜主要成分,微生物细胞膜在遇到环境变化时会发生响应,一定程度上影响 PLFAs 比率。另一方面,不同胁迫条件下土壤微生物群落组成发生变化。目前仍很难区分

表 2 磷脂脂肪酸的生物表征
Table 2 Phospholipid fatty acids used as biomarkers

磷脂脂肪酸种类 PLFA	生物标记 Biomarkers	参考文献 References
Straight-chain saturated fatty acids		
10:0; 11:0; 12:0; 13:0; 14:0; 15:0; 17:0; 18:0; 19:0	General bacterial	[27]
16:0	General bacterial Fungi	[5,28-29]
20:0	General bacterial Protozoa	[27] [30]
22:0; 24:0	Plants	[29,31]
Cyclopropyl saturated fatty acids		
cy 17:0; cy19:0	Gram-negative bacteria (generally recognizing) Gram-positive bacteria Anaerobic bacteria	[32] [33] [34]
cy15:1	Clostridia	[28]
cy19:0	Aerobic bacteria	[35]
cy19:0 ω8c	Gram-negative bacteria	[35]
cy19:0 ω11,12c	General bacterial	[36]
Terminally branched fatty acids		
a13:0; i13:0; i14:0; a14:0; i15:0; a15:0; a16:0; i16:0; a17:0; i17:0; a18:0; i18:0; i19:0	Gram-positive bacteria	[28,37]
i15:0; a15:0; i16:0; a17:0; i17:0	Anaerobic bacteria	[38]
Methyl-branched fatty acids		
10Me 17:0; 10Me18:0; 10Me 19:0; 10Me 20:0; TBSA10Me 18:0;11Me16:0; 12Me 18:0 br16:0; br17:0	Actinomycetes Actinomycetes Gram-positive bacteria	[38-40] [38] [23]
br18:0r; br19:0	Gram-positive bacteria	[23]
10Me 16:0	Actinomycetes, Gram-negative bacteria Sulphate-reducing bacteria	[37] [8,29,41] [28]
10Me 16:0; 10Me 18:0	Anaerobic bacteria	[38]
14Me 15:0; 15Me 16:0; 9,10Me 16:0	Bacteria	[42]
Monounsaturated fatty acids		
14:1ω5c; 15:1; 15:1ω4c; 16:1ω5c; 16:1ω6c; 16:1; 16:1ω9c; 16:1ω9t; 16:1ω11c; 17:1; 17:1ω9c; 18:1ω5c; 19:1ω9c; 19:1ω12c; 20:1ω9c; 20:1ω9t; 21:1; 22:1ω9c; 22:1ω9t	Gram-negative bacteria	[27,38,40,43-44]
14:1	Aerobic bacteria Gram-negative bacteria	[38] [38]
15:1ω6c	Gram-negative bacteria Aerobic bacteria	[27] [38]
16:1ω5	Arbuscular mycorrhizal fungi	[45-46]
16:1ω7	Bacteria widespread	[31]

(待续)

(续表)		
16:1 ω 7c; 16:1 ω 7t	Gram-negative bacteria	[23]
	Aerobic bacteria	[28]
16:1 ω 7c	Type I methanotrophs	[24]
16:1 ω 5t; 16:1 ω 6; 16:1 ω 8; 16:1 ω 8c	Type I methanotrophs	[47-49]
	Methylococcaceae	
17:1 ω 5; 17:1 ω 6; 17:1 ω 8	Sulphate-reducing bacteria	[28,50]
17:1 ω 8c	Gram-negative bacteria	[51]
18:1 ω 7c; 18:1 ω 7t	Gram-negative bacteria	[29,40,52]
18:1 ω 7	Arbuscular mycorrhizal fungi	[53]
	Aerobic bacteria	[28,38,43]
18:1 ω 7c	Type II methanotrophs	[24,54]
18:1 ω 6; 18:1 ω 8	Type II methanotrophs	[31,47-49,55]
	Methylococcaceae	
18:1 ω 9	Gram-positive bacteria	[29,31]
	Arbuscular mycorrhizal fungi	[56-57]
18:1 ω 9c	Fungi	[28]
	Aerobic bacteria	[38]
	Gram-negative bacteria	[23]
	Type II methanotrophs	[24,54]
18:1 ω 9t	Gram-negative bacteria	[38]
	Aerobic bacteria	[38]
18:1 ω 11c	Gram-positive bacteria	[33]
	Gram-negative bacteria	[22]
20:1 ω 9	Arbuscular mycorrhizal fungi	[56]
Hydrox-substituted fatty acids		
2OH 12:0; 3OH 12:0; 2OH 14:0; 3OH 14:0; 2OH 16:0; 2OH 18:0	Gram-negative bacteria	[58-60]
OH in C10-C18	Gram-negative bacteria	[31]
iOH 13:0; i17:0 3OH; 16:1 2OH	Gram-negative bacteria	[59-60]
Branched monounsaturated fatty acids		
i17:1 ω 5c; i17:1 ω 7	Sulphate-reducing bacteria/Desulfobacter/Desulfovibrio	[28,37]
Polyunsaturated fatty acids		
18:2 ω 6c; 18:3 ω 6c; 18:2 ω 9c; 18:2 ω 6,9	Saprotrophic fungi	[31,61-62]
18:2 ω 6; 18:2 ω 9,12; 18:3 ω 3; 18:3 ω 6; 18:9 ω 1	Fungi	[27,63-67]
18:3 ω 6c	Gram-negative bacteria	[11,68]
18:3 ω 6,19,12	Plants/zygomycetes (Higher fungi)	[31]
20:2 ω 6; 20:3 ω 6; 20:4; 20:4 ω 6; 20:4 ω 6,9,12,15; 22:6 ω 4c	Protozoa	[30,69]
20:5; 22:6	Barophilic, psychrophilic bacteria	[28]
Others fatty acids		
16:0 N alcohol	Non-specific bacteria	[40,70]
	Gram-negative bacteria	[5]
i17:1 ω 1G; 19:1 ω 8 alcohol; cy19:0 c11-12; cy19:0 c11-12 2OH	Gram-negative bacteria	[5]

注: 修改自 Willaers 等(2015)^[20].

Note: Modified from Willaers et al., 2015^[20].

表 3 磷脂脂肪酸比率的生物表征
Table 3 Ratios of phospholipid fatty acids used as biomarkers

不同磷脂脂肪酸的比率 Ratios of PLFA	生态学信息 Indicators	参考文献 References
Fungal to bacterial (F/B) PLFAs	真菌/细菌比得变化;微生物量的变化;土壤微生物群落的组成;养分循环,有机质分解,碳循环等的环境响应	[5,43,62,71-72]
Gram-positive to Gram-negative (GP/GN) bacterial PLFAs	土壤不同细菌组成的相对丰度;胁迫情况革兰氏阴性细菌会增加,所以也可表征环境响应	[5,62]
Trans- to cis monoenoic fatty acids (trans/cis)	微生物胁迫	[20]
Saturated fatty acids to monounsaturated fatty acids (S/M)	微生物胁迫	[35,62,73]
Cyclopropyl fatty acids to their monoenoic precursors (cy/pre)	生理与养分胁迫;微生物胁迫	[62,74-75]
The amount of poly- β -hydroxybutyrate relative to total-PLFA biomass (ph/t)	植物不平衡增长和营养胁迫	[20]

是细胞膜还是物种组成的变化而引起 PLFA 谱系的变化^[19]。目前,在环境变化过程研究中,结合稳定同位素技术的 PLFA 方法分析微生物群落功能及环境响应等方面已经有很大的发展^[21]。¹³C PLFA 方法可以研究土壤微生物群落对环境变化的响应,提高人们对微生物群落和土壤生物地球化学循环关系的认识^[76]。相信随着技术的不断发展,改进后的 PLFA 方法在研究土壤微生物群落方面仍然有优势。

3 PLFA 法的展望

3.1 面临的挑战

随着新一代生物技术的发展,16S rRNA 基因高通量测序等方法在土壤微生物分析中被使用,使得土壤微生物群落基因多样性的研究得到飞跃性发展。Nature 新闻杂志预测,地球微生物组计划在 2016 年将公布结果,该计划对超过 20 万份微生物 DNA 样本进行测序和鉴别分析,这将让我们对全球的微生物群落有一个全新的认识^[77]。PLFA 分析可以提供微生物量、生理胁迫、群落结构的信息,以及一定程度上可以使用生物标记获得的分类学信息,DNA 分析一般通过标志基因或者元基因组的方法,这种方法能够获得物种多样性、群落结构和微生物群落功能的潜能信息^[78]。目前基因工程的发展,一般的基因公司都能完成这项测序工作,而且费用也有所降低。DNA 分析可以获得更加精细的生

物多样性信息,而且技术操作不断完善,相较于 PLFA 分析的优势越来越大,使得 PLFA 分析的方法受到了强烈的挑战。

3.2 发展与改进

PLFA 法在土壤微生物生态学的应用已经有三四十年的历史,作为经典的方法历久不衰,但是同时面临着新型技术的挑战和自身问题的困扰。但是新型方法也会有其不足,DNA 测序方法随着成本降低和方法完善,将是未来发展的趋势,但是它的使用仍然存在一些不足(表 1)。基于 DNA 分析的方法,可以全面地检测出土壤微生物的基因信息,同时包括那些休眠或死亡的个体,而基于 PLFA 的方法主要只分析有生命个体^[79]。虽然 DNA 分析已经在很多公司能够完成,但是每个公司的技术手段有所差异,所以在不同应用中应该注重技术的选择^[80]。

从不同角度对土壤微生物群落进行直接或间接研究的方法很多,但是每一种都有其优缺点。单独使用一种方法都可能会对结果产生较大偏差,我们应该试图尝试多种方法的结合分析。与多种方法结合的应用,正是 PLFA 法未来的发展方向和目标。(1) 从土壤中提取、纯化 PLFA 时,可以采用 PLFA/DNA 共提取的方法,将获得更具代表性的结果,减少单独使用一种方法的偏差,同时土壤介质引起的复杂问题将能有所改善,提供我们微生物生态学的新认识。虽然这种方法还存在一定限

制,比如获得的 DNA 的量有限而影响结果,但是研究者相信这些使用上的障碍会在广泛应用之前被克服^[78]。(2) PLFA 数据结果解读时,已经有研究把基因水平所得到系统发生学的物种信息,结合 PLFA 等经典方法得到的生态学信息共同解释土壤微生物^[25-26]。这种方法的结合,可以发挥多种方法的优势,并弥补一些单独使用一种方法时的不足。(3) PLFA 方法除了与 DNA 技术的结合,还可以结合稳定同位素技术,这方面技术的结合在分析微生物群落功能及环境响应等方面已经开展了应用^[21]。在条件允许情况下,为了能够获得更加全面的微生物多样性信息,应尽可能将多种方法结合起来。相信 PLFA 法随着方法结合和自身创新,继续在土壤微生物生态学研究 中扮演重要角色。

4 总结

尽管 PLFA 方法在土壤微生物群落研究方面仍存在一些不足。但是只要我们合理地使用,是可以利用好这个方法在功能和结构多个方面研究土壤微生物群落的属性。这个方法不仅在技术上已经相对成熟,而且国内已经有很多高校院所具备分析的硬件设施。但是应用一定要小心,特别在数据处理时注意解读分析的问题,这样才能用好这个方法。解读时应该慎重地选择 PLFA 的生物表征,明确所得到的 PLFA 数据可以表征哪些可用的信息。同时,随着技术进步,PLFA 法应与多种新型技术手段结合,特别是与 DNA 测序和稳定同位素等技术,在技术方法和结果解读有新的发展,以获得更加全面的微生物群落信息。

参 考 文 献

- [1] Hargreaves SK, Hofmockel KS. Physiological shifts in the microbial community drive changes in enzyme activity in a perennial agroecosystem[J]. *Biogeochemistry*, 2014, 117(1): 67-79
- [2] Hungria M, Franchini JC, Brandão-Junior O, et al. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 42(3): 288-296
- [3] Santos VB, Araújo ASF, Leite LFC, et al. Soil microbial biomass and organic matter fractions during transition from conventional to organic farming systems[J]. *Geoderma*, 2012, 170: 227-231
- [4] Bardgett RD, van der Putten WH. Belowground biodiversity and ecosystem functioning[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 505-511
- [5] Wang CT, Wang GX, Wang Y, et al. Urea addition and litter manipulation alter plant community and soil microbial community composition in a *Kobresia humilis* meadow[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2015, 70: 7-14
- [6] Xu G, Chen J, Berninger F, et al. Labile, recalcitrant, microbial carbon and nitrogen and the microbial community composition at two *Abies faxoniana* forest elevations under elevated temperatures[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 91: 1-13
- [7] Yuan Y, Dai XQ, Xu M, et al. Responses of microbial community structure to land-use conversion and fertilization in southern China[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2015, 70: 1-6
- [8] Chen DM, Mi J, Chu PF, et al. Patterns and drivers of soil microbial communities along a precipitation gradient on the Mongolian Plateau[J]. *Landscape Ecology*, 2015, 30(9): 1669-1682
- [9] Dong WY, Zhang XY, Dai XQ, et al. Changes in soil microbial community composition in response to fertilization of paddy soils in subtropical China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 84: 140-147
- [10] Shi P, Wang SP, Jia SG, et al. Effect of 25-year fertilization on soil microbial biomass and community structure in a continuous corn cropping system[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2015, 61(9): 1303-1317
- [11] Zhang Q, Zhou W, Liang GQ, et al. Distribution of soil nutrients, extracellular enzyme activities and microbial communities across particle-size fractions in a long-term fertilizer experiment[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 94: 59-71
- [12] Zhang XY, Wang W, Chen WL, et al. Comparison of seasonal soil microbial process in snow-covered temperate ecosystems of Northern China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92985
- [13] Du ZH, Wang W, Zeng WJ, et al. Nitrogen deposition enhances carbon sequestration by plantations in Northern China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87975
- [14] Zeng WJ, Wang W. Combination of nitrogen and phosphorus fertilization enhance ecosystem carbon sequestration in a nitrogen-limited temperate plantation of Northern China[J]. *Forest Ecology and Management*, 2015, 341: 59-66
- [15] Wang SG, Hou YL. Application of phospholipid fatty acid method in soil microbial analysis[J]. *Microbiology China*, 2004, 31(1): 114-117 (in Chinese)
王曙光, 侯彦林. 磷脂脂肪酸方法在土壤微生物分析中的应用[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(1): 114-117
- [16] Yan H, Cai ZC, Zhong WH. PLFA analysis and its applications in the study of soil microbial diversity[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(5): 851-859 (in Chinese)
颜慧, 蔡祖聪, 钟文辉. 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[J]. *土壤学报*, 2006, 43(5): 851-859
- [17] White DC, Davis WM, Nickels JS, et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate[J]. *Oecologia*, 1979, 40(1): 51-62
- [18] Federle TW, Ventullo RM, White DC. Spatial distribution of microbial biomass, activity, community structure, and the biodegradation of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) and Linear Alcohol Ethoxylate (LAE) in the subsurface[J]. *Microbial Ecology*, 1990, 20(1): 297-313
- [19] Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. Use and misuse of PLFA measurements in soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(8): 1621-1625
- [20] Willers C, van Rensburg PJJ, Claassens S. Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities—a review of interpretations and recent applications[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(5): 1207-1218
- [21] Watzinger A. Microbial phospholipid biomarkers and stable isotope methods help reveal soil functions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 86: 98-107
- [22] Adam IKU, Miltner A, Kästner M. Degradation of ¹³C-labeled pyrene in soil-compost mixtures and fertilized soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22): 9813-9824

- [23] Helfrich M, Ludwig B, Thoms C, et al. The role of soil fungi and bacteria in plant litter decomposition and macroaggregate formation determined using phospholipid fatty acids[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96: 261-264
- [24] He R, Wooller MJ, Pohlman JW, et al. Methane-derived carbon flow through microbial communities in arctic lake sediments[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(9): 3233-3250
- [25] Techtman SM, Fortney JL, Ayers KA, et al. The unique chemistry of eastern Mediterranean water masses selects for distinct microbial communities by depth[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120605
- [26] Helgason BL, Kongschuh HJ, Bedard-Haughn A, et al. Microbial distribution in an eroded landscape: buried A horizons support abundant and unique communities[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2014, 196: 94-102
- [27] Zelles L, Palojärvi A, Kandeler E, et al. Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, 29(9/10): 1325-1336
- [28] Vestal JR, White DC. Lipid analysis in microbial ecology[J]. *BioScience*, 1989, 39(8): 535-541
- [29] 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
- [30] Breulmann M, Schulz E, Weißhuhn K, et al. Impact of the plant community composition on labile soil organic carbon, soil microbial activity and community structure in semi-natural grassland ecosystems of different productivity[J]. *Plant and Soil*, 2012, 352(1/2): 253-265
- [31] Ruess L, Chamberlain PM. The fat that matters: soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(11): 1898-1910
- [32] Breulmann M, Masyutenko NP, Kogut BM, et al. Short-term bioavailability of carbon in soil organic matter fractions of different particle sizes and densities in grassland ecosystems[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 497-498: 29-37
- [33] Schoug Å, Fischer J, Heipieper HJ, et al. Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* S13[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(3): 175-181
- [34] Guckert JB, Antworth CP, Nichols PD, et al. Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1985, 31(3): 147-158
- [35] Eo J, Park KC, Kim MH. Plant-specific effects of sunn hemp (*Crotalaria juncea*) and sudex (*Sorghum bicolor* × *Sorghum bicolor* var. sudanense) on the abundance and composition of soil microbial community[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2015, 213: 86-93
- [36] Liu LX, Xu M, Qiu S, et al. Spatial patterns of benthic bacterial communities in a large lake[J]. *International Review of Hydrobiology*, 2015, 100(3/4): 97-105
- [37] Bossio DA, Fleck JA, Scow KM, et al. Alteration of soil microbial communities and water quality in restored wetlands[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(6): 1223-1233
- [38] Moche M, Gutknecht J, Schulz E, et al. Monthly dynamics of microbial community structure and their controlling factors in three floodplain soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 90: 169-178
- [39] Briar SS, Fonte SJ, Park I, et al. The distribution of nematodes and soil microbial communities across soil aggregate fractions and farm management systems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(5): 905-914
- [40] Li Q, Yang Y, Bao XL, et al. Legacy effects of elevated ozone on soil biota and plant growth[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 91: 50-57
- [41] Ponder Jr F, Tadros M. Phospholipid fatty acids in forest soil four years after organic matter removal and soil compaction[J]. *Applied Soil Ecology*, 2002, 19(2): 173-182
- [42] Hamel C, Vujanovic V, Jeannotte R, et al. Negative feedback on a perennial crop: fusarium crown and root rot of asparagus is related to changes in soil microbial community structure[J]. *Plant and Soil*, 2005, 268(1): 75-87
- [43] Grayston SJ, Griffith GS, Mawdsley JL, et al. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(4/5): 533-551
- [44] Blume E, Bischoff M, Reichert JM, et al. Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season[J]. *Applied Soil Ecology*, 2002, 20(3): 171-181
- [45] Pacoysny RS, Fuller G. Mineral and lipid composition of *Glycine-Brady rhizobium* symbioses[J]. *Physiologia Plantarum*, 1988, 72(4): 733-746
- [46] Bencherif K, Boutekrab A, Fontaine J, et al. Impact of soil salinity on arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity and microflora biomass associated with *Tamarix articulata* Vahl rhizosphere in arid and semi-arid Algerian areas[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 533: 488-494
- [47] Nichols PD, Smith GA, Antworth CP, et al. Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for methane-oxidizing bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1985, 31(6): 327-335
- [48] Bowman JP, Skerratt JH, Nichols PD, et al. Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 85(1): 15-21
- [49] Contosta AR, Frey SD, Cooper AB. Soil microbial communities vary as much over time as with chronic warming and nitrogen additions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 88: 19-24
- [50] Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance[J]. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(2): 288-302
- [51] Smith AP, Marin-Spiotta E, Balser T. Successional and seasonal variations in soil and litter microbial community structure and function during tropical postagricultural forest regeneration: a multiyear study[J]. *Global Change Biology*, 2015, 21(9): 3532-3547
- [52] Mechri B, Manga AGB, Tekaya M, et al. Changes in microbial communities and carbohydrate profiles induced by the mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) in rhizosphere of olive trees (*Olea europaea* L.)[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 75: 124-133
- [53] Olsson PA, Thingstrup I, Jakobsen I, et al. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(13): 1879-1887
- [54] Nold SC, Boschker HTS, Pel R, et al. Ammonium addition inhibits ¹³C-methane incorporation into methanotroph membrane lipids in a freshwater sediment[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(1): 81-89
- [55] Ringelberg DB, Davis JD, Smith GA, et al. Validation of signature polar lipid fatty acid biomarkers for alkane-utilizing bacteria in soils and subsurface aquifer materials[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 62(1): 39-50
- [56] 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*[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(11): 1827-1834
- [57] Macintosh KA, Griffiths D. Catchment and in-stream influences on metal concentration and ochre deposit density in upland streams, Northern Ireland[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2013, 70(7): 3023-3030

- [58] Parker JH, Smith GA, Fredrickson HL, et al. Sensitive assay, based on hydroxy fatty acids from lipopolysaccharide lipid A, for Gram-negative bacteria in sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 44(5): 1170-1177
- [59] Bossio DA, Scow KM. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns[J]. *Microbial Ecology*, 1998, 35(3): 265-278
- [60] Hamman ST, Burke IC, Stromberger ME. Relationships between microbial community structure and soil environmental conditions in a recently burned system[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(7): 1703-1711
- [61] Federle TW, Dobbins DC, Thornton-Manning JR, et al. Microbial biomass, activity, and community structure in subsurface soils[J]. *Ground water*, 1986, 24(3): 365-374
- [62] Garcia-Sánchez M, Garcia-Romera I, Cajthaml T, et al. Changes in soil microbial community functionality and structure in a metal-polluted site: the effect of digestate and fly ash applications[J]. *Journal of Environmental Management*, 2015, 162: 63-73
- [63] Frostegård Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil[J]. *Biology and Fertility Soils*, 1996, 22(1/2): 59-65
- [64] Bååth E, Anderson TH. 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
- [65] Kaiser C, Koranda M, Kitzler B, et al. Belowground carbon allocation by trees drives seasonal patterns of extracellular enzyme activities by altering microbial community composition in a beech forest soil[J]. *New Phytologist*, 2010, 187(3): 843-858
- [66] Zhang HJ, Ding WX, He XH, et al. Influence of 20-year organic and inorganic fertilization on organic carbon accumulation and microbial community structure of aggregates in an intensively cultivated sandy loam soil[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92733
- [67] Parmar K, Keith AM, Rowe RL, et al. Bioenergy driven land use change impacts on soil greenhouse gas regulation under Short Rotation Forestry[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2015, 82: 40-48
- [68] Dong HY, Kong CH, Wang P, et al. Temporal variation of soil frieidelin and microbial community under different land uses in a long-term agroecosystem[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 69: 275-281
- [69] Tischer A, Blagodatskaya E, Hamer U. Microbial community structure and resource availability drive the catalytic efficiency of soil enzymes under land-use change conditions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 89: 226-237
- [70] Dierksen KP, Whittaker GW, Banowetz GM, et al. High resolution characterization of soil biological communities by nucleic acid and fatty acid analyses[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(12): 1853-1860
- [71] Bardgett R, Leemans D. Soil microbial activity on exposed mountain ridges in Snowdonia (Eryri), North Wales[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(10/11): 1533-1536
- [72] Chaudhary DR, Gautam RK, Ghosh A, et al. Effect of nitrogen management on soil microbial community and enzymatic activities in *Jatropha curcas* L. plantation[J]. *CLEAN- Soil, Air, Water*, 2015, 43(7): 1058-1065
- [73] Kaur A, Chaudhary A, Kaur A, et al. Phospholipid fatty acid—a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem[J]. *Current Science*, 2005, 89(7): 1103-1112
- [74] Pollierer MM, Ferlian O, Scheu S. Temporal dynamics and variation with forest type of phospholipid fatty acids in litter and soil of temperate forests across regions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 91: 248-257
- [75] Duan BL, Zhang YB, Xu G, et al. Long-term responses of plant growth, soil microbial communities and soil enzyme activities to elevated CO₂ and neighbouring plants[J]. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2015, 213: 91-101
- [76] Yao HY, Chapman SJ, Thornton B, et al. ¹³C PLFAs: a key to open the soil microbial black box?[J]. *Plant and Soil*, 2015, 392(1/2): 3-15
- [77] Gibney E. The science to look out for in 2016[J]. *Nature*, 2016, 529(7584): 14-15
- [78] Brewer S, Techtmann SM, Mahmoudi N, et al. Co-extraction of DNA and PLFA from soil samples[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 115: 64-66
- [79] Docherty KM, Borton HM, Espinosa N, et al. Key edaphic properties largely explain temporal and geographic variation in soil microbial communities across four biomes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e135352
- [80] Vishnivetskaya TA, Layton AC, Lau MC, et al. Commercial DNA extraction kits impact observed microbial community composition in permafrost samples[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87(1): 217-230