

^{13}C -PLFA 分析方法及其在土壤微生物研究中的应用

陈琢玉^{1,2} 涂成龙^{1,3,*} 何令令^{1,4}

(1.中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室,贵阳 550081; 2.中国科学院大学,北京 100049;
3.贵州医科大学 环境污染与疾病监测教育部重点实验室,贵阳 550025; 4.贵州大学,贵阳 550025)

摘要: 磷脂脂肪酸(PLFA)是重要的生物标志物之一,能够提供有关微生物群落结构的信息。将 PLFA 分析与稳定性同位素 ^{13}C 示踪技术结合(^{13}C -PLFA),可以指示微生物群落对于环境变化的响应及微生物群落间的相互作用。该技术在土壤生态系统的研究中已得到广泛应用。本文主要基于 ^{13}C -PLFA 技术的研究现状,介绍了该技术的原理和分析方法,举例阐述了 ^{13}C -PLFA 技术在土壤微生物生态学中的应用,包括植物-土壤系统中碳的微生物利用、外源碳的微生物利用、污染物的微生物降解以及在甲烷氧化菌等特定微生物群体的应用。同时分析了 ^{13}C -PLFA 技术在应用中的优缺点,并展望了其未来应用。

关键词: 土壤微生物; 磷脂脂肪酸; 同位素标记; 甲烷氧化菌

中图分类号: P593 文献标识码: A 文章编号: 1672-9250(2019)04-0537-09 doi: 10.14050/j.cnki.1672-9250.2019.47.068

传统的土壤微生物研究通常需要分离纯培养微生物,再通过微生物菌落的形态特征、生化性质及基因对微生物进行分类和计数,但是通过纯培养获得的土壤微生物菌落的数量仅占微生物总数的 0.1%~1%^[1],所以传统培养方法研究土壤微生物群落结构具有很大的局限性。随着微生物学研究技术的发展,出现了一系列基于微生物生物化学和分子生物学的研究方法。其中,磷脂脂肪酸(Phospholipid fatty acids, PLFA)作为生物标识物的方法,在微生物群落结构研究中应用十分广泛^[2]。磷脂脂肪酸(PLFA)存在于所有活体细胞的细胞膜中,周转速率极快且随细胞死亡而迅速降解,不同的微生物群落具有其特异的磷脂脂肪酸,可描述微生物群落的结构概况^[3-5]。但是,该方法无法将土壤微生物群落组成与其功能相联系。近年来的研究表明将稳定同位素 ^{13}C 标记与分子生物学相结合是解决这一问题的关键途径。其基本原理是将环境样品暴露于稳定同位素 ^{13}C 富集的基质中,样品中的某些微生物便能以基质中稳定同位素 ^{13}C 为碳源进行代谢生长,稳定同位素进入微生物体内并参与合成如核酸(DNA和RNA)和细胞膜脂肪酸(磷脂脂肪酸、中性脂肪酸)等物质,通过提取、分离、纯化、

分析这些被标记的生物标记物,从而了解微生物群落的代谢功能^[6]。虽然基于DNA和RNA的标记技术(^{13}C -DNA/ ^{13}C -RNA)能够提供比 ^{13}C -PLFA更丰富的有关微生物遗传学的信息^[7],但是 ^{13}C -PLFA以其操作简单、能快速处理大量样品、灵敏度高被广泛用于微生物的研究中^[8]。本文分析总结了碳同位素标记磷脂脂肪酸的分析方法,并对其在微生物生态研究中的应用发展趋势进行探讨。

1 标记和分析方法

微生物在生长过程中会利用不同的外来碳源,进而合成不同的PLFA。通多对不同时段PLFA浓度和类别变化的监测,可以判断外来碳源转化过程中优势微生物群落结构的变化,结合对PLFA碳同位素组成(^{13}C -PLFA)的分析,建立与外来碳源同位素组成的相互关系,可进一步识别不同碳源在其转化过程中的方向和速率。另外,在较长时期的实验中,标记物还可能进入微生物食物网中,从而研究外源碳在土壤中的动态变化再通过分离提纯并测定 ^{13}C -PLFA,从而研究有机质碳源在土壤中的动态变化和转化方向^[9]。

稳定同位素的标记方法主要有两大类:直接

收稿日期: 2018-10-25; 改回日期: 2018-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(41573012、41571130041、41563013); 水利部公益性项目(201401050)。

第一作者简介: 陈琢玉(1995-)女,硕士研究生,主要从事土壤微生物生态学研究。E-mail: chenzyu@mail.gyig.ac.cn.

* 通讯作者: 涂成龙(1978-)男,博士,研究员,主要从事表生地球化学过程研究。E-mail: chenglongtu@163.com.

标记法和植物标记法。直接标记法是直接用富集 ^{13}C 的碳源基质培养土壤微生物;植物标记法通过 ^{13}C 标记植物后从而间接标记土壤微生物^[10]。直接标记法一般是将土壤样品直接暴露于富集 ^{13}C 的基质中,研究以该种基质为碳源的微生物,可使用固、液、气三种状态的稳定同位素富集基质。例如通过 ^{13}C 标记葡萄糖来研究土壤微生物对葡萄糖这类简单碳源的利用^[11];通过 ^{13}C 标记有机化合物探究土壤微生物对多环芳烃(PAHs)等持续性有机污染物(POPs)的降解^[12];利用 ^{13}C 标记甲烷对各类甲烷氧化菌的研究,此外还可以将标记的植物残渣或生物炭加入土壤样品中培养从而探究土壤微生物对复杂碳源的利用。植物标记法多用于研究根际土壤微生物,以此追踪碳在植物-土壤系统中的流动,以及土壤环境变化对碳流的影响,这类标记最常见的方式是使用气态 $^{13}\text{CO}_2$ 脉冲标记或连续标记,其基本原理是将植物暴露于富含 $^{13}\text{CO}_2$ 的空气中,植物通过光合作用同化碳之后将其传输到植物根部,然后以根系分泌物的形式释放到土壤中从而被根际微生物利用^[13]。利用 ^{13}C -PLFA方法便可分析参与利用根际沉积碳的土壤微生物的类型、功能等。如图1是研究水稻根际微生物利用光合同化碳的室内培养实验示意图。另一类植物标记法是将标记的碳源直接注入植

物的叶子或根茎,这类碳源通常是低分子量化合物如碳酸盐类、尿素、氨基酸等,这种方法最大的优势是可以标记需要较大标记空间的植物,如树木,并且能够原位标记单株植物^[14]。以上两种方法均可用于原位实验和培养实验中。采用原位标记实验可能会受到环境中复杂因素的影响;而采用培育标记,因其与微生物生活的真实环境存在差异,也会导致其与纯天然环境下的生物地球化学过程的差异,所以研究者应根据自身需求来调节标记方式。

磷脂脂肪酸的提取方法通常分为三步:脂质提取、脂质分离和脂质甲基化。即先通过Bligh-Dyer浸提液^[15]氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲溶液(体积比为1:2:0.8)萃取浸提土壤微生物脂肪酸,再通过硅胶柱纯化及甲基化作用得到脂肪酸甲酯(FAMES)。研究发现提取剂的种类及用量、土壤量及土壤类型等因素能够影响PLFA的提取效率。Nielsen等^[16]比较了不同提取剂对PLFA提取效果的影响,发现三氯甲烷+甲醇+柠檬酸缓冲液(pH为4.00)对磷脂脂肪酸的提取效率最高,而二氯甲烷+甲醇+磷酸缓冲液(pH为7.40)的提取效率最低。Fuhrmann等^[17]研究了不同的氯仿稳定剂(乙醇或2-甲基-2-丁烯)对提取效率的影响,发现使用乙醇稳定氯仿可以防止某些脂肪酸的丢失,而2-甲基-2-丁烯作为氯仿稳定剂时部分不饱和

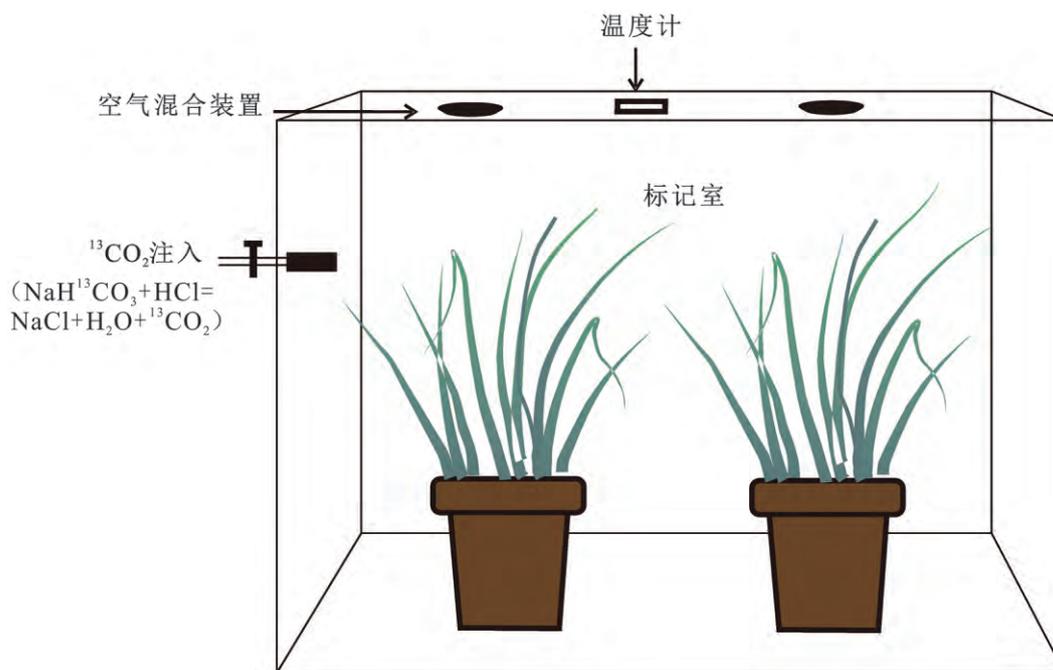


图1 ^{13}C 标记水稻根际微生物实验示意图

Fig.1 Schematic diagram of ^{13}C labeled rice rhizosphere microorganism

脂肪酸和真菌标志物会丢失,并且磷脂脂肪酸总量也会减少。刘艳青等^[18]使用新鲜土壤和冷冻干燥土壤对河滨缓冲带的土壤微生物群落结构进行研究,发现冷冻干燥土壤样品的 PLFA 总量、微生物类型均比新鲜土壤样品多,由此推断用冷冻干燥样品更适合河滨缓冲带土壤 PLFA 的提取。此外,Drenovsky 等^[19]研究了土壤量对结果的影响,发现要得到可靠的 PLFA 图谱,提取 PLFA 的土样量必须要 $\geq 1.1\text{ g}$ 因为土壤量过低可能会导致某些脂肪酸含量过低而达不到检出限度。

PLFA 甲酯化后形成相应的脂肪酸甲酯(FAME),用气相色谱-燃烧-同位素质谱仪(GC-C-IRMS)进行 FAMEs 分析及 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定^[20]。图2为 GC-C-IRMS 主要组成部分示意图^[21]。通过气相色谱柱对 FAMEs 进行分离,进入氧化柱,转化成二氧化碳,然后利用同位素质谱仪测定相对于国际标准(PDB)的同位素比值,由此推算各 FAME 组分的 δ 值。

2 应用到植物-土壤系统中碳转化的动态研究

植物-土壤系统中碳的流动及交换是碳循环的重要组成部分,这一过程十分复杂,包括植物光合产物在土壤中的运转及分解、植物和根际微生物相互作用、植物枯枝落叶层转化成土壤有机质等^[22]。本节主要概述了利用 ^{13}C -PLFA 法追踪植物光合作用固定的碳输入到土壤的过程,监测微生物群落结构的动态变化,以评价环境条件对碳流的影响,并确定此过程中利用光合同化碳的优势土壤微生物种群。植物光合作用将碳固定后转移到植物根系,再以根际沉积物形式将部分光合同化碳输入到土壤,这类碳源是土壤微生物重要的碳源之一。这类研究通常采用气态 $^{13}\text{CO}_2$ 标记法。Butler 等^[23]首先利用 $^{13}\text{CO}_2$ 脉冲标记来鉴定微生物群落利用的植物光合同化碳,发现不同标记时间对黑麦草根际微生物

利用光合同化碳有很大的影响。与第一标记期(植株处于根系活跃生长和枝条快速生长的过度时期)比起来,革兰氏阳性菌(特征 PLFA 为 i15:0 和 a15:0)在第二标记期(枝条生长期后9天)利用根际沉积碳的活性降低,而革兰氏阴性菌(特征 PLFA 为 16:1 ω 5c)活性增大,在两个阶段中,真菌(特征 PLFA 为 18:2 ω 6,9c)利用光合同化碳的活性都较高,同时还发现根际土壤微生物利用光合同化碳与非根际土壤微生物利用光合同化碳差异不明显。Treonis 等^[24]在野外条件下应用了类似的标记方法,得出了一致的结论,即最新的植物同化物主要是被革兰氏阳性菌和真菌利用。稻田研究对世界粮食生产至关重要,稻田土壤微生物驱动着水稻生长的生物地球化学过程及养分的利用,因此 ^{13}C -PLFA 技术被广泛应用在研究水稻根系分泌物的微生物利用中。Yao 等^[25]利用 $^{13}\text{CO}_2$ 连续标记,发现在有水稻种植的土壤中根际微生物 PLFA 主要是 16:0, 18:1 ω 7 和 18:1 ω 9,而在未种植水稻的土壤中,指示革兰氏阳性细菌的 PLFA i15:0 和 a15:0 相对更丰富。此外,他们还发现土壤微生物对水稻光合同化碳的利用受水稻淹水状况的影响,在持续淹水条件下,光合同化碳主要被水稻根际微生物中的革兰氏阴性菌(18:1 ω 7 和 16:1 ω 7c)利用,在受控淹水(土壤持水量为80%)条件下,碳主要被真菌(18:2 ω 6,9)和需氧菌(18:1 ω 6)利用。而 Tian 等^[26]的研究结果与其相反,他们发现水稻光合作用固定的碳主要是被根际土壤中的革兰氏阳性菌利用,而革兰氏阴性菌和真菌是在非淹水和干湿交替状态下利用水稻光合同化碳的主要微生物群落。Wang 等^[27]发现氮肥施用显著增加了 PLFA 的 ^{13}C 标记量,Ge 等^[28]的研究结果与其一致,但是研究都表明氮素对根际沉积碳的微生物利用的影响是由根部沉积量增加导致的。此外,研究还发现水稻根际沉积碳的土壤微生物利用还受到臭氧浓度^[29]、水

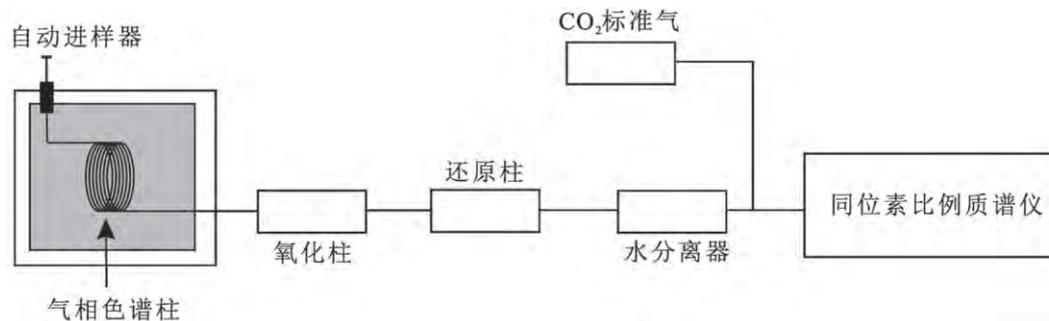


图2 GC-C-IRMS 系统组成示意图

Fig.2 Schematic diagram of a typical GC-C-IRMS system

稻种类及肥料类型^[30]的影响。¹³C-PLFA法还被应用到其他植物-土壤系统中,例如Dias等^[31]利用该方法发现转基因马铃薯和普通马铃薯品种根系活性微生物种类显著不同;Karlowsky等^[32]利用¹³C在PLFA中的标记量来说明不同类型草地对干旱胁迫的抗性和恢复力;An等^[33]利用该方法研究了塑料膜覆盖和化肥使用对土壤微生物利用玉米光合同化碳的影响。

植物碳输送到土壤中的另一种研究方法是利用C₃植物和C₄植物在光合途径中对¹³C的分馏不同来进行的。通常情况下,利用C₃途径进行光合碳同化的植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值约为-32‰~-22‰(平均约为-27‰),而C₄途径进行光合作用的植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值约为-17‰~9‰(平均约为-13‰)^[34]。这一过程相当于稳态标记,结合PLFA分析,可以用于研究在更换作物之后新固定的碳与更换作物之前所固定的碳的微生物利用^[35-36]。这对于估计土壤有机碳库十分重要。综上,研究表明不同植物种类、植物发育期、生长环境及农业土壤改良措施等是影响植物根系微生物利用光合同化碳的重要因素,这可能与光合同化碳形成的根际沉积物的组成有关。

3 土壤微生物对外来碳源的利用

外来碳源的微生物利用是土壤有机质(SOM)形成、稳定、分解的关键过程,这类碳源主要来自植物根际沉积时丢失的低分子量有机碳、农业管理、植物枯枝落叶层等。¹³C-PLFA是调查土壤有机质微生物利用的有效方法,该方法可以模拟土壤微生物对外来碳源矿化产物或植物残渣利用的生化途径。研究植物根际沉积丢失的碳和农业管理产生的简单碳源时通常是将富集¹³C的低分子量化合物,如葡萄糖、谷氨酸、丙氨酸、乙酸盐、尿素等与土样混合进行培养。Ziegler等^[11]发现在培育初期大部分葡萄糖¹³C掺入到了革兰氏阳性菌的特征PLFA(a15:0)中,在葡萄糖耗竭后¹³C富集在标志放线菌的PLFA(10Me18:0)中,表明放线菌可能在葡萄糖碳再循环中起重要作用。整个研究结果说明¹³C标记的时间动态对微生物的利用有影响。Lemanski等^[37]通过¹³C-PLFA发现不同取样时间利用葡萄糖的微生物群落不同。在早期阶段,指示真菌和细菌的PLFA中 $\delta^{13}\text{C}$ 在加入葡萄糖两周后达到最大值,实验后期则降低,革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的比值在葡萄糖加入后的前两周最低,六周后,其比

值增加了61%。同时,他们还发现氮磷钾肥的添加增加了真菌利用葡萄糖碳的效率,而草地的植物组成(植物功能组比例)对于土壤微生物利用葡萄糖碳的影响较小。Apostel等^[38]通过位置特异性标记和¹³C-PLFA技术分析了丙氨酸和谷氨酸在土壤中的生化途径,发现微生物对氨基酸不同官能团上的¹³C的利用有所不同。例如两种氨基酸的羧基碳都被微生物迅速氧化并转化成微生物生物量,而其被利用合成为PLFA的量极少,当丙氨酸和谷氨酸残留分子中的甲基碳和氨基碳脱离分子后才开始合成微生物磷脂脂肪酸。另外,外来碳源的利用还可能受到土壤pH的影响,Arao^[39]发现土壤pH为4.6时抑制了土壤微生物利用¹³C-乙酸盐,当pH为7~8时,能够促进微生物对乙酸盐的利用;Wang等^[40]也发现土壤pH能影响微生物对尿素¹³C的利用,pH越高,PLFA中来自尿素的¹³C越多,同时,他们还发现,不同的土壤类型对微生物利用尿素¹³C也有很大影响。对于这些简单碳源,文献大多研究了不同土壤环境条件对微生物利用简单碳源的影响或是对比了在相同环境条件下不同碳源的微生物利用^[41-42],而且这些简单碳源的微生物利用受取样时间的显著影响。枯枝落叶层和秸秆还田是复杂碳源的主要来源,主要研究方法是将落叶凋零物和根残渣及其他难以被分解的物质添加到土壤,以探究复杂碳源的微生物利用。Williams等^[43]首次将¹³C标记的深红三叶草和黑麦草的根和秸秆作为底物添加到土壤中,发现部分PLFA(16:1 ω 5, 10Me17:0)中¹³C含量很低(约0~5%),只有很少一部分能够利用根和秸秆残渣,而另一些微生物(PLFA:16:0; 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 9)在整个培养过程中均能利用根和秸秆残渣,并由此指出残渣的特性和环境条件会影响微生物对底物的利用。Zhu等^[44-45]对比了水稻秸秆、根与根际沉积碳、微生物同化碳的微生物利用,发现水稻秸秆和根中的¹³C在培养初期真菌和放线菌的利用量增高,革兰氏阳性菌的利用量减少,而根际沉积碳和微生物同化碳的利用则较低,指出利用水稻秸秆、根的微生物组成会随着时间发生明显变化,而利用根际沉积碳和微生物同化碳的变化较小,不同的底物能够影响微生物的群落结构及其对碳的稳定性。Bai等^[46]通过添加¹³C标记的不同小麦残渣(根、叶子、谷粒),发现残渣主要是被革兰氏阴性菌(16:1 ω 7c, 18:1 ω 7c)和真菌(10Me16:0)所利用。Arcand等^[47]

比较了微生物群落对不同农作方式土壤中小麦残渣的利用,发现与传统管理的土壤相比,有机质改良的土壤中真菌和放线菌对小麦残渣碳的利用更为显著。生物炭是生物质在无氧或缺氧状态下经高温裂解而产生的固态产物,将其加入到土壤中能够显著增加土壤有机碳的储存,是当前研究的热点。Steinbeiss 等^[48]通过添加¹³C 标记的葡萄糖和酵母热液热解产生的生物炭证明其可以增加土壤中的碳储量,并指出生物炭在土壤中的停留时间取决于土壤类型和生物炭特性。此外,微生物群落的功能、大小和结构还受底物的组成和可用性的强烈影响,如 Pan 等^[49]对比了水稻秸秆及其衍生生物炭的微生物利用情况,发现¹³C 生物炭主要是被革兰氏阴性菌(8:1ω7c,cy17:0)所利用,而水稻秸秆主要是被放线菌、革兰氏阳性菌和真菌利用,而且水稻秸秆的掺入率比生物炭的掺入率高。

综上所述,植物残渣、根系残留物、生物炭、由植物根际沉积丢失的典型化合物等都已成功追溯到土壤 PLFA 库中,并且研究结果表明这些碳源的添加明显提高了土壤肥力和微生物群落对碳的利用,同时发现不同的土壤环境、土壤类型、取样时间均对微生物群落利用土壤有机质有不同程度的影响,可能原因是不同土壤微生物在特定条件下所能利用的碳源成分不同。

4 土壤污染物的微生物降解

人类活动引起的土壤污染已经成为全球面临的重要环境问题之一,当土壤中的有害物质过多且超过土壤的承受能力时,土壤的结构功能就会发生变化,导致其自净能力降低,从而使有害物质在土壤中积累并进入植物、水体,以及食物链中,最终危害到人体健康。微生物降解污染物是治理土壤污染的有效方法之一。它们能将污染物进行快速降解,或钝化使其不进入水体或人畜的食物链。有机污染物是土壤中主要的污染物之一且难以被降解,所以通常将¹³C 标记的有机污染物加入到土壤中来模拟研究它们的微生物降解过程。Hanson 等^[50]首次将¹³C 标记甲苯作为底物加入土壤中,发现有 27% 的 PLFA 能够被¹³C 标记,并指出¹³C-PLFA 能够用于研究复杂环境中污染物的微生物降解。Mauclair 等^[51]也证明了¹³C-PLFA 能够有效示踪甲苯的微生物代谢途径。Mellendorf 等^[52]研究了菜籽油对土壤中菲降解的影响,发现菜籽油增加了土壤

总 PLFA 的含量,改变了微生物群落组成,在菜籽油使用下¹³C 在 PLFA(i14:0,15:0,18:0,18:1ω5 和 18:2ω6,9)中较为富集,与未添加菜籽油的样品相比,菜籽油处理的土壤中可萃取的菲净含量降低,由此推测菜籽油的使用会促进菲的微生物降解。Adam 等^[53]研究了¹³C 标记多环芳烃在有机肥土壤和堆肥土壤中的微生物降解,发现施用堆肥或长期施用有机肥能够促进菲的微生物降解,革兰氏阴性菌(16:1(x),16:1(y),16:(9)cis)、革兰氏阳性菌(i15:0,i17:0)、放线菌(10Me18:0)和其它菌落(18:1(11)cis 和 18:0)等是利用¹³C 菲的主要微生物群落,说明发挥降解作用的微生物并不是某个单一的微生物,而是很多微生物群落共同作用的结果。土壤中的污染物通常不止一种,其微生物降解便会受到其他污染物的影响,Wawra 等^[54]利用土壤改良剂辅助植物修复方法研究了土壤中菲(PHE)和金属元素混合污染物的降解。发现在混合污染的土壤中,革兰氏阴性菌(18:1ω9c,18:1ω7c)和放线菌(10+12Me18:0)是降解 PHE 的主要微生物。除了对有机污染物降解的研究外,也有少部分研究了无机污染物的微生物降解。近年来,人工纳米材料越来越广泛,但其对环境也有潜在的毒性。Berry 等^[55]研究了 C₆₀富勒醇在土壤中的微生物降解,通过追踪富勒醇¹³C 掺入到 PLFA 的情况,发现纳米材料衍生的 C 主要是被真菌和革兰氏阴性菌降解利用。但是,有机污染物的毒性会对脂肪酸生物合成产生抑制作用并改变微生物群落结构,所以在使用¹³C 标记时,应该对 PLFA 图谱的变化做出更为详细的解释^[56]。

5 甲烷氧化菌

甲烷是一种导致全球气候变化的温室气体,土壤中甲烷氧化菌的生物氧化是重要的甲烷汇。PLFA 分析和稳定同位素标记技术结合可将甲烷氧化菌与土壤功能联系起来,从而了解在不同土壤环境下甲烷氧化菌的结构与功能。Boschker 等^[6]将淡水沉积物暴露于同位素标记的¹³CH₄中并提取 PLFA,发现 PLFA:16:1ω9c/5t,16:1ω6c/7c/8c(I 型甲烷氧化菌)被¹³C 标记,证明 I 型甲烷氧化菌是淡水沉积物中氧化甲烷的主要微生物。随后 Nold 等^[57]在研究湖泊沉积物时得到了相同的结论,并且发现铵离子的浓度会抑制微生物群落对¹³C-CH₄的利用。Knoblauch 等^[58]研究了西伯利亚

东北部受永久冻土影响的苔原土壤中甲烷氧化菌的丰度、活性及其对温度变化的响应。用 $^{13}\text{C-CH}_4$ 在不同温度下培育土壤,发现 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 时,有83%的PLFA 16:1(I型甲烷氧化菌)被标记,而PLFA 18:1(II型甲烷氧化菌)仅有2%被标记,由此推断受冻土影响的苔原土壤在原位条件下利用甲烷的土壤微生物主要是I型甲烷氧化菌。稻田生态系统中根际的甲烷氧化菌减弱了甲烷向大气的排放,Shrestha等^[59]研究发现I型和II型甲烷氧化菌的标记量都随时间变化,但总体来说,指示I型甲烷氧化菌的PLFA(16:1 ω 7,16:1 ω 6和16:0)的标记量比II型甲烷氧化菌的特征PLFA(18:1 ω 7,18:1 ω 9和18:0)更多,由此可以说明水稻根际利用甲烷的主要微生物是I型甲烷氧化菌。Chen等^[60]研究了酸性泥炭中甲烷氧化菌的特征, ^{13}C 标记的磷脂脂肪酸的分析表明I型甲烷氧化菌是该环境中主要的甲烷氧化菌。然而,Maxfield等^[61]的研究发现,高山草地土壤的 ^{13}C 主要在II型甲烷氧化菌特征的PLFA 18:1 ω 7c中富集,Singh等^[62]在研究新西兰牧场土壤时也发现了相同的结果。Bengtson等^[63]发现松树林土壤的 $^{13}\text{C-CH}_4$ 主要富集在PLFA 18:1 ω 7c中,指示其为II型甲烷氧化菌,其他一些森林系统的研究也得到了类似的结论^[64]。此外,Menyailo等^[65]发现树种的差异不会改变甲烷氧化菌的群落组成,但会显著改变于甲烷氧化的活性。以上研究表明森林、草地和非淹水耕地土壤中II型甲烷氧化菌占主导地位,而在甲烷浓度较高的环境,如湿地和稻田土壤中,I型甲烷氧化菌则占主导。Crossman等^[66]则发现,在几个垃圾填埋场覆盖的土壤中, $^{13}\text{C-CH}_4$ 主要是被II型甲烷氧化菌利用。综上可知,不同生态环境中甲烷氧化菌的类型,活性存在差异性。

6 问题和展望

$^{13}\text{C-PLFA}$ 技术已成为研究生物地球化学系统

的有效方法之一,对于土壤微生物物质循环的研究有十分重要的意义。在植物-土壤系统的碳循环研究中,它能够准确示踪碳源的利用,包括土壤微生物利用植物光合同化碳、根际分泌物的微生物利用、复杂碳源的利用等。除此之外,研究者应用 $^{13}\text{C-PLFA}$ 分析技术确定了多种甲烷氧化菌以及土壤微生物对于污染物的降解等,在土壤微生物调节陆地生态系统碳循环方面取得重要进展。尽管使用 $^{13}\text{C-PLFA}$ 能够提供很多土壤微生物信息,但是该方法也存在一些不足。使用 $^{13}\text{C-PLFA}$ 技术主要存在的问题有:(1)PLFA特异性不高,不同的土壤微生物可能合成相同的PLFA,同种土壤微生物在不同环境条件下也可能合成不同种PLFA;(2)PLFA图谱不完全,如甲烷氧化菌特征脂肪酸的数据极少,不同的甲烷氧化菌的PLFA图谱可能重叠,导致区分困难;(3)如果培养时间过长,可能会出现交叉取食的情况,一些微生物死亡后能作为底物被其他微生物利用,使这部分微生物不能被 ^{13}C 标记,如果培养时间过短,则可能造成 ^{13}C 标记不完全;(4)使用自然丰度的标记物研究仅限于定量总微生物对底物的吸收,人工标记可以量化单个PLFA对碳源的吸收,但是底物标记程度过高会影响微生物代谢从而影响到微生物的降解及PLFA的合成。

除了PLFA外,DNA、RNA和蛋白质也是常用的生物标志物。利用核酸和蛋白质作为生物标志物可以知道土壤微生物更为详细的信息,包括微生物遗传多样性以及分子生态学信息等,但是 $^{13}\text{C-PLFA}$ 的灵敏度分别比 $^{13}\text{C-蛋白质}$ 和 $^{13}\text{C-核酸}$ 高3 000和70 000倍^[67],因此将PLFA与其他生物标志物结合使用,可能确定土壤微生物与特征脂肪酸之间的对应关系,为以后土壤微生物的研究提供了新的思路与方法。除此之外,在研究对象上应不仅限于描述土壤中的细菌或真菌,应拓展到各个营养级之间养分循环的研究中。

参 考 文 献

- [1] Davis K, Joseph S J, Janssen P H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2): 826-34.
- [2] 陈慧清, 李晓晨, 于学峰, 等. 土壤生态系统微生物多样性技术研究进展 [J]. *地球与环境*, 2018, 46(2): 204-209.
- [3] 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.
- [4] Deboz K. Phospholipid fatty acid profiles and C availability in wet-stable macro-aggregates from conventionally and organically farmed soils [J]. *Geoderma*, 1997, 78(3): 181-196.
- [5] Insam H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s [J]. *Geoderma*, 2001, 100(3): 389-402.

- [6] Boshker H T S , Nold S C , Wellsbury P , et al. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers[J]. *Nature* , 1998 , 392(6678) : 801-805.
- [7] Dumont M G , Murrell J C. Stable isotope probing – linking microbial identity to function[J]. *Nature Reviews Microbiology* , 2005 , 3(6) : 499-504.
- [8] Radajewski S , Ineson P , Parekh N R , et al. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology[J]. *Nature* , 2000 , 403(6770) : 646-649.
- [9] Apostel C , Herschbach J , Bore E K , et al. Food for microorganisms: Position-specific ¹³C labeling and ¹³C-PLFA analysis reveals preferences for sorbed or necromass C[J]. *Geoderma* , 2018 , 312: 86-94.
- [10] 葛源 贺纪正 郑袁明 等. 稳定性同位素探测技术在微生物生态学中的应用[J]. *生态学报* , 2005 , 26(5) : 1574-1582.
- [11] Ziegler S E , White P M , Wolf D C , et al. Tracking the Fate and Recycling of ¹³C-Labeled Glucose in Soil [J]. *Soil Science* , 2005 , 170(10) : 767-778.
- [12] Johnsen A R , Anne W , Ulrich K , et al. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of (¹³) C-labeled cell lipids [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2002 , 68(12) : 6106.
- [13] Wardle D A , Bardgett R D , Klironomos J N , et al. Ecological linkages between aboveground and belowground biota[J]. *Science* , 2004 , 304(5677) : 1629-1633.
- [14] Epron D , Bahn M , Derrien D , et al. Pulse-labelling trees to study carbon allocation dynamics: A review of methods , current knowledge and future prospects [J]. *Tree Physiology* , 2012 , 32(6) : 776-798.
- [15] 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.
- [16] Nielsen P , Petersen S O. Ester-linked polar lipid fatty acid profiles of soil microbial communities: A comparison of extraction methods and evaluation of interference from humic acids [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2000 , 32(8) : 1241-1249.
- [17] Fuhrmann A , Gerzabek M H , Watzinger A. Effects of different chloroform stabilizers on the extraction efficiencies of phospholipid fatty acids from soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2009 , 41(2) : 428-430.
- [18] 刘艳青 尧水红 王庆海 等. 新鲜和冻干样品对河滨缓冲带土壤微生物群落结构分析的影响 [J]. *土壤* , 2010 , 42(4) : 669-673.
- [19] 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.
- [20] Esperschütz J , Gättinger A , Buegger F , et al. A continuous labelling approach to recover photosynthetically fixed carbon in plant tissue and rhizosphere organisms of young beech trees (*Fagus sylvatica* L.) using ¹³C depleted CO₂ [J]. *Plant and Soil* , 2009 , 323(1-2) : 21-29.
- [21] Yao H Y , Chapman S J , Thornton B , et al. ¹³C PLFA: A key to open the soil microbial black box? [J]. *Plant and Soil* , 2015 , 392(1-2) : 3-15.
- [22] 刘微 吕豪豪 陈英旭 等. 稳定碳同位素技术在土壤-植物系统碳循环中的应用 [J]. *应用生态学报* , 2008 , 19(3) : 674-680.
- [23] Butler J L , Williams M A , Bottomley P J , et al. Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2003 , 69(11) : 6793-6800.
- [24] Treonis A M , Ostle N J , Stott A W , et al. Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope probing of PLFA [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2004 , 36(3) : 533-537.
- [25] Yao H Y , Thornton B , Paterson E. Incorporation of ¹³C-labelled rice rhizodeposition carbon into soil microbial communities under different water status [J]. *Soil Biology & Biochemistry* , 2012 , 53: 72-77.
- [26] Tian J , Dippold M , Pausch J , et al. Microbial response to rhizodeposition depending on water regimes in paddy soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2013 , 65: 195-203.
- [27] Wang , J , Chapman S J , Yao H Y. Incorporation of ¹³C-labelled rice rhizodeposition into soil microbial communities under different fertilizer applications [J]. *Applied Soil Ecology* , 2016 , 101: 11-19.
- [28] Ge T , Li B , Zhu Z , et al. Rice rhizodeposition and its utilization by microbial groups depends on N fertilization [J]. *Biology and Fertility of Soils* , 2017 , 53(1) : 37-48.
- [29] 陈展 王效科 尚鹤. ¹³CO₂ 示踪臭氧胁迫对水稻土壤微生物的影响 [J]. *环境科学* , 2014 , 1(10) : 3911-3917.
- [30] Balasooriya W K , Boeckx P , Huygens D , et al. Effect of rice variety and fertilizer type on the active microbial community structure in tropical paddy fields in Sri Lanka [J]. *Geoderma* , 2015 , 216: 87-95.
- [31] Dias A C F , Andreote D F , Hannula S E , et al. Different selective effects on rhizosphere bacteria exerted by genetically modified versus conventional potato lines [J]. *Plos One* , 2013 , 8(7) : e67948.
- [32] Karlowsky S , Augusti A , Ingrisch J , et al. Land use in mountain grasslands alters drought response and recovery of carbon allocation and plant-microbial interactions [J]. *Journal of Ecology* , 2018 , 106(3) : 1230-1243.
- [33] An T T , Schaeffer S , Li S Y , et al. Carbon fluxes from plants to soil and dynamics of microbial immobilization under plastic film mulching and fertilizer application using ¹³C pulse-labeling [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2015 , 80(80) : 53-61.
- [34] Griffiths H. Carbon isotope discrimination and the integration of carbon assimilation pathways in terrestrial CAM plants [J]. *Plant Cell and Envi-*

- ronment , 1992 , 15(9) : 1051–1062.
- [35] Ghafoor A , Poelau C , Thomas Kätterer. Fate of straw- and root-derived carbon in a Swedish agricultural soil [J]. *Biology and Fertility of Soils* , 2017 , 53(2) : 257–267.
- [36] Börjesson G , Menichetti L , Thornton B , et al. Seasonal dynamics of the soil microbial community: Assimilation of old and young carbon sources in a long-term field experiment as revealed by natural ^{13}C abundance [J]. *European Journal of Soil Science* , 2016 , 67(1) : 79–89.
- [37] Lemanski K , Scheu S. Incorporation of ^{13}C labelled glucose into soil microorganisms of grassland: Effects of fertilizer addition and plant functional group composition [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2014 , 69: 38–45.
- [38] Apostel C , Dippold M , Glaser B , et al. Biochemical pathways of amino acids in soil: Assessment by position-specific labeling and ^{13}C -PLFA analysis [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2013 , 67: 31–40.
- [39] Arao T. In situ detection of changes in soil bacterial and fungal activities by measuring ^{13}C incorporation into soil phospholipid fatty acids from ^{13}C acetate [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 1999 , 31(7) : 1015–1020.
- [40] Wang J , Thornton B , Yao H Y. Incorporation of urea-derived ^{13}C into microbial communities in four different agriculture soils [J]. *Biology and Fertility of Soils* , 2014 , 50(4) : 603–612.
- [41] Gunina A , Dippold M A , Glaser B , et al. Fate of low molecular weight organic substances in an arable soil: From microbial uptake to utilisation and stabilisation [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2014 , 77: 304–313.
- [42] Rinnan R , Baath E. Differential utilization of carbon substrates by bacteria and fungi in tundra soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2009 , 75(11) : 3611–3620.
- [43] Williams M A , Myrold D D , Bottomley P J. Carbon flow from ^{13}C -labeled straw and root residues into the phospholipid fatty acids of a soil microbial community under field conditions [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2006 , 38(4) : 759–768.
- [44] Zhu Z K , Zeng G J , Ge T D , et al. Fate of rice shoot and root residues , rhizodeposits , and microbe-assimilated carbon in paddy soil – part 1: Decomposition and priming effect [J]. *Biogeosciences* , 2016 , 13(15) : 4481–4489.
- [45] Zhu Z K , Ge T D , Hu Y J , et al. Fate of rice shoot and root residues , rhizodeposits , and microbial assimilated carbon in paddy soil – part 2: Turnover and microbial utilization [J]. *Plant and Soil* , 2017 , 416(1–2) : 243–257.
- [46] Bai Z , Liang C , Bodé S , et al. Phospholipid ^{13}C stable isotopic probing during decomposition of wheat residues [J]. *Applied Soil Ecology* , 2016 , 98: 65–74.
- [47] Arcand M M , Helgason B L , Lemke R L. Microbial crop residue decomposition dynamics in organic and conventionally managed soils [J]. *Applied Soil Ecology* , 2016 , 107: 347–359.
- [48] Steinbeiss S , Gleixner G , Antonietti M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2009 , 41(6) : 1301–1310.
- [49] Pan F , Li Y , Chapman S J , et al. Microbial utilization of rice straw and its derived biochar in a paddy soil [J]. *Science of the Total Environment* , 2016 , 559(559) : 15–23.
- [50] Hanson , J R , Macalady J L , Harris D , et al. Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 1999 , 65(12) : 5403–5408.
- [51] Mauclaire L , Pelz O , Thullner M , et al. Assimilation of toluene carbon along a bacteria – protist food chain determined by ^{13}C -enrichment of biomarker fatty acids [J]. *Journal of Microbiological Methods* , 2003 , 55(3) : 635–649.
- [52] Mellendorf M , Soja G , Gerzabek M H , et al. Soil microbial community dynamics and phenanthrene degradation as affected by rape oil application [J]. *Applied Soil Ecology* , 2010 , 46(3) : 329–334.
- [53] Adam I K U , Miltner A , Kästner M. Degradation of ^{13}C -labeled pyrene in soil-compost mixtures and fertilized soil [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2015 , 99(22) : 9813–9824.
- [54] Wawra A , Hanl F W , Puschenreiter M , et al. , Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a mixed contaminated soil supported by phyto-stabilisation , organic and inorganic soil additives [J]. *Science of the Total Environment* , 2018 , 628–629: 1287–1295.
- [55] Berry T D , Filley T R , Clavijo A P , et al. Degradation and microbial uptake of C_{60} fullerols in contrasting agricultural soils [J]. *Environmental Science & Technology* , 2017 , 51(3) : 1387–1394.
- [56] Fang J , Lovanh N , Alvarez P J J. The use of isotopic and lipid analysis techniques linking toluene degradation to specific microorganisms: applications and limitations [J]. *Water Research* , 2004 , 38(10) : 2529–2536.
- [57] Nold S C , Boschker H T S , Pel R , et al. Ammonium addition inhibits ^{13}C -methane incorporation into methanotroph membrane lipids in a freshwater sediment [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 1999 , 29(1) : 81–89.
- [58] Knoblauch C , Zimmermann U , Blumenberg M , et al. Methane turnover and temperature response of methane-oxidizing bacteria in permafrost-affected soils of northeast Siberia [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2008 , 40(12) : 3004–3013.
- [59] Shrestha M , Abraham W R , Shrestha P M , et al. Activity and composition of methanotrophic bacterial communities in planted rice soil studied by flux measurements , analyses of pmoA gene and stable isotope probing of phospholipid fatty acids [J]. *Environmental Microbiology* , 2010 , 10(2) : 400–412.

- [60] Chen Y, Dumont M G, Menamara N P, et al. Diversity of the active methanotrophic community in acidic peatlands assessed by mRNA and SIP-PLFA analyses [J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 10(2): 446-459.
- [61] Maxfield P J, Hornibrook E R C, Evershed R P. Estimating high-affinity methanotrophic bacterial biomass, growth, and turnover in soil by phospholipid fatty acid ^{13}C labeling [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3901-3907.
- [62] Singh B K, Tate K R, Ross D J, et al. Soil methane oxidation and methanotroph responses to afforestation of pastures with *Pinus radiata* stands [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(10): 2196-2205.
- [63] Bengtson P, Basiliko N, Dumont M G, et al. Links between methanotroph community composition and CH_4 oxidation in a pine forest soil [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(3): 356-366.
- [64] Maxfield P J, Powlson D S, Brennand E L, et al. Impact of land management practices on high-affinity methanotrophic bacterial populations: Evidence from long-term sites at Rothamsted [J]. *European Journal of Soil Science*, 2011, 62(1): 56-68.
- [65] Menyailo O V, Abraham W R, Conrad R. Tree species affect atmospheric CH_4 oxidation without altering community composition of soil methanotrophs [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(1): 101-107.
- [66] Crossman, Zoë M, Abraham F, Evershed R P. Stable isotope pulse-chasing and compound specific stable carbon isotope analysis of phospholipid fatty acids to assess methane oxidizing bacterial populations in landfill cover soils [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(5): 1359-1367.
- [67] Watzinger A. Microbial phospholipid biomarkers and stable isotope methods help reveal soil functions [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 86: 98-107.

A Review on the ^{13}C -PLFA Analysis Method and Its Application in Soil Microbial Researches

CHEN Zhuoyu^{1 2}, TU Chenglong^{1 3}, HE Lingling^{1 4}

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 4. Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Phospholipid fatty acids (PLFA), which can provide information about the microbial community structure, are a group of commonly used biomarkers. The method of coupling ^{13}C with PLFA analysis can reveal the response of microbial communities to environmental change as well as interactions between microbial communities, and has been widely used in the soil ecosystem research. This paper reviewed the research status of ^{13}C -PLFA, introduced the principle of this technology and illustrated applications of the ^{13}C -PLFA technique in soil microbial ecology, including microbial utilization of carbon in the plant-soil system, microbial utilization of exogenous carbon, microbial degradation of pollutants, as well as applications in the specific microbial, such as methanotrophs. In addition, this paper summarized the advantages and disadvantages of ^{13}C -PLFA technology and looked forward to its future application.

Key words: soil microorganism; PLFA; isotope labelling; methanotrophs