

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^①

刘艳青^{1,2}, 尧水红¹, 王庆海¹, 李辉信^{2*}

(1 北京草业与环境研究发展中心, 北京 100097; 2 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

Effects of Fresh and Freeze-Dried Soil Sample Treatments on Soil Microbial Community Structures

LIU Yan-qing^{1,2}, YAO Shui-hong¹, WANG Qing-hai¹, LI Hui-xin²

(1 Beijing Research and Development Center for Grass and Environment, Beijing 100097, China;

2 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

摘要: 用新鲜土样和冻干土两种不同样品处理方法提取磷脂脂肪酸 (PLFAs), 分析河滨缓冲带 3 种水生植物下土壤的微生物群落结构。结果表明: 用冻干土测定的河滨缓冲带土壤微生物群落结构分布与用新鲜土样测定结果密切相关 ($r = 0.972$, $p < 0.0001$), 但 3 种水生植物下, 用冻干土测得的 PLFAs 总量、种类及回收率都比新鲜土样大, 且从变异系数来看, 冻干土测得的 PLFAs 总量的变异系数小于新鲜土样, 其数据精确度较高。因此, 利用 PLFAs 法分析河滨缓冲带土壤微生物群落结构时采用冻干土测定更为适合。

关键词: 河滨缓冲带; 土壤微生物群落结构; 磷脂脂肪酸; 新鲜土样; 冻干土

中图分类号: S154.3

河滨缓冲带是水陆间生态交错的重要生态系统, 在降雨量大、洪水泛滥的季节, 经常被水淹没, 反复的“固”、“液”(干、湿)交替状态导致其土壤微生物群落独具特点。但由于传统微生物纯培养方法的局限性, 解析其土壤微生物的群落结构和多样性还很困难。河滨缓冲带土壤微生物群落结构及其多样性对控制水体向富营养化发展、保障饮用水源安全、提高生态系统质量具有十分重要的意义。

磷脂脂肪酸 (PLFAs) 是活体微生物细胞膜的重要组成部分, 不同类群的微生物可通过不同的生化途径合成不同的 PLFAs。因此, PLFAs 的组成模式可作为反映微生物生物量和群落结构变化的理想“生物标记”^[1]。在微生物生态学研究, 由于 PLFAs 方法能克服传统培养基法的不足, 且操作流程相对简单、反映信

息完整, 被越来越多地用于定量地描述各种生境内微生物的群落结构。PLFAs 经 GC-MS 检测, 其检测限可达到 10^{-9} mol/g 样品的处理方式对其分析结果的精确性有一定的影响。目前, 用于 PLFAs 提取的样品通常有新鲜和冻干两种形态。新鲜样品常用于分析草地^[2-3]、林地^[4-5]和玉米地^[4]等“固相”土壤的微生物群落, 而湿地^[6-7]、水稻土^[8]和海洋沉积物^[9]等“液相”土壤的微生物群落则一般用冻干样品。

本文针对河滨缓冲带的生境特点, 比较冻干和新鲜两种样品处理方法下河滨缓冲带 3 种水生植物土壤 PLFAs 分析结果的差异, 以揭示河滨缓冲带土壤微生物群落结构和多样性特征, 明确河滨缓冲带这一“固”、“液”交替的特殊生境下, 土壤微生物群落多样性分析应采用的较优的样品处理方式, 进而提高

①基金项目: 农业部社会公益项目 (2060302) 和中国博士后科学基金项目 (20090460410) 资助。

* 通讯作者 (huixinli@njau.edu.cn)

作者简介: 刘艳青 (1984—), 女, 山西泽州人, 硕士研究生, 主要从事土壤生态研究。E-mail: liuyanqing1984@tom.com

PLFAs 法分析的精度, 为人工调节与优化河滨缓冲带生态系统提供理论支撑, 并为类似研究提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地描述

2008 年 7 月 12 日于山东省莒南县株边镇清水涧河水库河滨缓冲带 (绿色农业示范基地, 118°49'E,

35°10'N) 采取土壤样品 (土壤体积含水量为 26.4%)。河滨缓冲带年平均气温 12.4℃, 年降水量 838.1 mm。采样点海拔 200 m 左右, 坡度: 5°~7°。供试土壤类型为: 潮棕壤, 质地组成: 砂粒 (>0.05 mm) 572.9 g/kg, 粉粒 (0.05~0.002 mm) 239.4 g/kg, 黏粒 (<0.002 mm) 187.7 g/kg。供试土壤的基本理化性质见表 1。

表 1 供试土壤基本理化性质

土壤	有机质 (g/kg)	pH	全 N (g/kg)	全 P (g/kg)	全 K (g/kg)	速效 K (mg/kg)	碱解 N (mg/kg)	速效 P (mg/kg)
潮棕壤	6.92	6.7	0.21	0.23	14.37	13.85	16.32	2.75

1.2 样品采集

河滨缓冲带划分为 3 个区域, 依次种植 3 种植物: 水生鸢尾 (*Iris pseudacorus* Linn.)、菖蒲 (*Acorus calamus* Linn.) 和千屈菜 (*Lythrum salicaria* Linn.)。在各区域的植株行间按 5 点梅花状采集 0~20 cm 深土壤、混匀, 每个区域内采 3 次重复。将土样带回实验室, 迅速去除可见的石块、动物和植物残体, 过 2 mm 筛, 混合均匀后置于湿热灭菌后的自封袋中, 置于 4℃ 冰箱内保存 (保存时间一星期内) 作为新鲜土样; 鲜样放在 -70℃ 的冰箱中速冻后, 再进行冷冻干燥作为冻干土样。

1.3 PLFAs 分析

1.3.1 新鲜土样 PLFAs 按 Bligh-Dyer 修正法提取, 酯化 C23:0 为内标, 具体流程如下^[10-12]: 称取鲜土 2.5 g 左右 (相当于 2.000 g 干土) 置于具塞试管中, 加入 12 ml 的 50 mmol/L 缓冲液: 甲醇: 氯仿 (0.8: 2: 1) 的浸提液, 于涡旋仪上涡旋 1 min 后, 静置 2 h, 收集上清液。原离心管中再加入 10 ml 的浸提液, 涡旋 1 min 后, 静置 1 h, 收集上清液与前一次的上清液混合。在收集的上清液中加入 5.8 ml 的柠檬酸缓冲液, 5.8 ml 的氯仿, 将混合液涡旋 1 min 后, 静置 1 h, 然后将下层氯仿相转移至离心管中, 置于离心旋转蒸发器中 1 h 蒸干, 将蒸干样品加盖密封后, 置于 4℃ 冰箱中保存过夜。次日取出, 恢复到室温, 样品中预注入 2 ml 氯仿溶解样品。

称取 5 g 试剂级硅胶 (60 目, 400℃ 下活化 4 h) 装入直径 0.8 cm, 柱长 20 cm 的玻璃柱中, 湿柱法装柱, 用 6 ml 三氯甲烷淋洗硅胶柱中的杂质。然后将离心管中的样品转移至处理好的硅胶柱中, 再吸取 0.5 ml 氯仿冲洗离心管, 并将冲洗液也转入硅胶柱, 重复 3 次。加 5 ml 氯仿洗出硅胶柱中样品的中性脂,

用 20 ml 丙酮洗出糖脂, 洗出液弃去。再用 12 ml 甲醇洗出磷脂, 洗出液收集至新管, 40℃ 蒸干。配制新鲜的 NaOH/甲醇溶液 (0.6 mol/L)。每个样品依次加入 0.5 ml 的二氯甲烷和 1 ml NaOH/甲醇溶液混匀, 50℃ 酯化 10 min 后, 依次加入 2 滴 1 mol/L 醋酸、2 ml 饱和氯化钠和 6 ml 正己烷, 涡旋 30 s, 置于离心机 3000 r/min, 离心 5 min, 吸取下层液体弃去, 加入 1 g 固体硫酸钠粉末吸附残留的下层液体, 小心地将上层清液转移至新的浓缩管, 再在原玻璃管中加入 3 ml 正己烷冲洗硫酸钠, 并将上层有机相清液与浓缩管中清液混合。用 N₂ 吹干, 用 50 μl 正己烷溶解样品, 晃匀后移入 Vial 瓶中上 GC 仪测定, GC 仪为: 岛津 GC2010。

GC 条件为: 石英毛细管柱 RTX-1701, 30 m × 0.32 mm, 膜厚 0.25 μm, 柱温 140℃, 保持 3 min; 然后以 4℃/min 升温至 200℃, 保持 2 min; 再以 2℃/min 升温至 230℃, 保持 2 min; 后以 4℃/min 升温至 260℃, 保持 10 min。进样口温度为: 250℃, 手动进样, 无分流。检测器为: FID, 温度: 270℃; 载气为: N₂, 流量为 0.8 ml/min, 柱流量 1 ml/min, 吹扫 30 ml/min, 持续时间为 10 min。峰面积通过计算机自动积分, 各脂肪酸的识别与定量分别参照脂肪酸标准谱图 (Bacterial Fatty Acid Standards) 和美国商品化的 MIDI 系统 (Microbial Identification System) 来进行。PLFAs 的种类用总碳原子数: 双键数量表示, 紧跟着后面的数字表示双键离甲基末端的位置^[10-12]。18:2 ω 6, 18:2 ω 6,9 代表真菌源 PLFAs^[13-14]; 细菌源 PLFAs 有更多的 iso-, anteiso-, 或者其他支链脂肪酸, 单一未饱和脂肪酸或环脂肪酸也是代表细菌的 PLFAs; 放线菌常在离羧基端第 10 碳原子上有一个甲基团。

1.3.2 冻干土样 基本步骤如下：首先把新鲜土壤样品放在 -70℃ 的冰箱中速冻后，再进行冷冻干燥。然后，取 2.000 g 冷冻干燥土样（相当于 2.000 g 干土），按 1.3.1 节中新鲜样品的提取方法和步骤进行测定。

1.4 土壤其他指标测定

土壤有机质含量采用 $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 氧化法测定；土壤 pH 值采用 pHS-3CT 酸度计测定；土壤全 N 含量测定采用半微量凯氏定氮法；全 P 含量测定采用 NaOH 熔融-钼锑抗比色法；土壤水分测定采用烘干称重法测定；质地分析：吸管法；其余参照《土壤农业化学分析方法》^[15]。

1.5 统计分析

对 2 种不同样品处理方法所获得的土壤微生物群落结构数据利用 SPSS13.0 软件进行方差分析（ANOVA）和相关性分析，其差异显著性水平（ $p < 0.05$ ）通过最小显著差数法（LSD）进行检验；文中图表分别在 Origin7.5 和 Excel2003 中制作完成。

2 结果与分析

2.1 两种不同样品处理方法下土壤微生物群落分析结果的相关性

河滨缓冲带 3 种水生植物下所有土壤在利用 2 种不同样品处理方法提取的磷脂类化合物脂肪酸经 GC 测定，分析出包括直链、侧链、饱和及不饱和一元酸、羟基酸、二元酸、多元酸和 4 个不具名脂肪酸在内共 52 种磷脂类化合物，碳数为：C9 ~ C24（表 2），其中

28 种细菌 PLFAs 类型^[16-17]，1 种真菌 PLFAs 类型，3 种真核生物 PLFAs 类型^[17]和 4 种放线菌 PLFAs 类型^[4,17]。对 2 种不同样品处理方法所得的 PLFAs 进行分析，探讨其土壤微生物的群落结构变化：河滨缓冲带 3 种水生植物下土壤微生物群落结构中，细菌占绝对优势（41.60% ~ 69.18%），放线菌次之（6.47% ~ 11.47%），真菌和真核生物所占比例较小（图 1）。在图 1 中，我们还比较了 2 种不同样品处理方法下河滨缓冲带土壤微生物群落结构分析结果的相关性。由图 1 可以看出，2 种样品处理方法都可以用于分析土壤微生物群落结构分布（ $r = 0.972$ ， $p < 0.0001$ ），但 2 种不同样品处理方法在土壤 PLFAs 的分析测定中各有利弊，详见表 3 ~ 5。

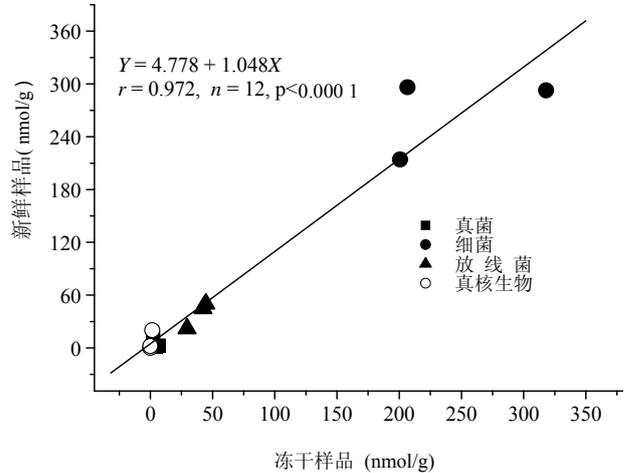


图 1 新鲜与冻干土样的微生物群落结构散点图

表 2 河滨缓冲带样品中 PLFAs 种类

峰号	组分名	峰号	组分名	峰号	组分名	峰号	组分名
1	9:0	14	15:0	27	16:0 2OH	40	18:0
2	10:0	15	14:0 2OH	28	17:0 cy	41	19:0 cy 8c
3	10:0 3OH	16	? 14.959	29	16:1 2OH	42	i19:0
4	11:0	17	14:0 3OH	30	?17.452	43	10Me 19:0
5	10:0 2OH	18	i16:0	31	18:1 ISO H	44	19:0
6	?12.484	19	?16.582	32	i18:0	45	20:4 6,9,12,15c
7	12:0	20	16:1 9c	33	a18:0	46	a19:0
8	13:0	21	16:0	34	i17:0 3OH	47	20:1 9c
9	12:0 2OH	22	i 15:0 3OH	35	10Me 18:0	48	20:0
10	12:0 3OH	23	10Me 16:0	36	18:1 9c	49	20:4 n-6
11	14:0	24	i17:0	37	18:2 6c9c	50	20:5 n-3
12	i 15:0	25	10Me 17:0	38	18:1 7c	51	22:0
13	a15:0	26	17:0	39	18:1 5c	52	24:0

表 3 2 种不同样品处理方法测定的河滨缓冲带土壤 PLFAs

采样区	鲜样				冻干样			
	总量 (nmol/g)	种类 (个)	命名率 (%)	内标回收率 (%)	总量 (nmol/g)	种类 (个)	命名率 (%)	内标回收率 (%)
千屈菜	290 ± 21	37 ± 1.5	97.36 ± 1.82	85.41 ± 1.24	341 ± 16	42 ± 1.9	92.22 ± 1.84	88.57 ± 0.93
菖蒲	539 ± 34	47 ± 1.5	96.51 ± 2.23	79.69 ± 1.05	703 ± 27	52 ± 2.1	93.47 ± 2.26	82.32 ± 1.01
水生鸢尾	369 ± 18	48 ± 1.1	93.82 ± 1.32	83.26 ± 1.17	606 ± 22	50 ± 1.3	92.79 ± 1.84	87.35 ± 1.09

表 4 2 种不同样品处理方法下土壤 PLFAs 的比率

采样区	冻干样/鲜样			
	总量	种类	命名率	内标回收率
千屈菜	1.18	1.14	0.95	1.04
菖蒲	1.30	1.11	0.97	1.03
水生鸢尾	1.64	1.04	0.99	1.05

表 5 2 种不同样品处理方法测定的土壤 PLFAs 变异系数 (%)

采样区	鲜样				冻干样			
	总量	种类	命名率	内标回收率	总量	种类	命名率	内标回收率
千屈菜	10.24	5.73	2.64	2.05	6.63	6.40	2.82	1.48
菖蒲	8.92	4.51	3.27	1.86	5.43	5.71	3.42	1.73
水生鸢尾	6.90	3.24	1.99	1.99	5.13	3.68	2.80	1.76

2.2 两种不同样品处理方法对 PLFAs 结果的影响

对河滨缓冲带 3 种水生植物下土壤分别用新鲜和冻干的样品进行处理后, 在相同的提取方法和相同的仪器条件下, 进行 PLFAs 的测定, 比较用不同样品处理方法测定的平均值和相对标准偏差。从表 3、4 可见, 3 种水生植物下经冻干的土壤样品所测得的 PLFAs 总量、种类和样品分析过程中加入的内标回收率均大于新鲜土样; 但用新鲜样品测得的 PLFAs 命名率相对冻干样品高, 这说明冻干样品处理后, 土壤中所能测得的 PLFAs 种类多于新鲜样品, 同时也增加了不具名 PLFAs 出现的概率。

将河滨缓冲带 3 种水生植物下同一土壤样品重复测定 3 次, 经 Dixon 检验法除去离群值后, 分别计算在 2 种样品处理方法下土壤 PLFAs 测定值的变异系数 (表 5)。从表 5 中数据可以看出, 新鲜样品测得的 PLFAs 命名率和种类的数据变异系数都比冻干样品小; 而冻干样品测得的 PLFAs 总量数据变异系数显著地小于新鲜样品, 这表明用新鲜样品直接提取测得的 PLFAs 总量数据在精确度上较差, 数据间重复性低。同时由表 3 可知, 冻干样品测得的 PLFAs 内标回收率的变异系数也小于新鲜样品, 这说明样品的冻干处理

能减少杂质的干扰, 利于标记物质的回收。

3 结论

新鲜和冻干土样均可用于测定河滨缓冲带土壤微生物总量和群落结构。从预处理方法上来看, 冻干土法需要将土样进行冻干再提取, 用鲜土测定更加方便。但当测定大量土壤样品时, 用新鲜土壤样品直接分析的话, 可能会造成样品不能及时分析完的问题。而且 2 种土壤样品处理方法比较结果表明, 测定土壤中的 PLFAs 组成和含量, 采用冻干样品比新鲜样品测定值稳定、重现性好、元素流失少, 内标回收率高。总的来说, 冻干样品更加适用于利用 PLFAs 法分析测定河滨缓冲带土壤微生物的群落结构。

参考文献:

- [1] 张瑞福, 崔中利, 李顺鹏. 土壤微生物群落结构研究方法进展. 土壤, 2004, 36(5): 476-480
- [2] Williams MA, Myrold DD, Bottomley PJ. Carbon flow from ¹³C-labeled straw and root residues into the phospholipid fatty acids of a soil microbial community under field conditions. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38: 759-768

- [3] Grayston SJ, Griffith GS, Mawdsley JL, Campbell CD, Bardgett RD. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 533-551
- [4] Edoardo P, Marco N, Ettore C, Marco T, Attilio AM. A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. *Chemosphere*, 2005, 6: 1548-1557
- [5] 李潞滨, 刘敏, 杨淑贞, 刘亮, 缪崑, 杨凯, 韩继刚. 毛竹根际可培养微生物种群多样性分析. *微生物学报*, 2008, 48(6): 772-779
- [6] 刘芳, 叶思源, 汤岳琴, 滝川清, 木田建次, 吴晓磊. 黄河三角洲湿地土壤微生物群落结构分析. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(5): 691-696
- [7] 吴振斌, 王亚芬, 周巧红, 梁威, 贺锋. 利用磷脂脂肪酸表征人工湿地微生物群落结构. *中国环境科学*, 2006, 26(6): 737-741
- [8] 刘岳燕, 姚槐应, 黄昌勇. 水分条件对水稻土微生物群落多样性及活性的影响. *土壤学报*, 2006, 43(5): 828-834
- [9] 林庆梅, 陈进才, 李玉桂, 袁东星, 郑天凌, 洪华生. 海洋沉积物中磷脂类化合物中脂肪酸的 GC-MS分析. *分析仪器*, 2001(2): 19-21
- [10] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochemical. Physiology*, 1959, 37: 911-917
- [11] White DC, Davis WM, Nickels JS, King DJ, Bobbie RJ. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 1979, 40: 51-62
- [12] Petersen SO, Klug MJ. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty profile of a soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60: 72421-72430
- [13] Bååth E, Anderson TH. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA based techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35(7): 955-963
- [14] Bailey VL, Smith JL, Bohon HJr. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34(7): 997-1007
- [15] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000
- [16] Kourtev P, Ehrenfeld J, Häggblom M. Experimental analysis of the effect of exotic and native plant species on the structure and function of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35: 895-905
- [17] Joergensen RG, Potthoff M. Microbial reaction in activity, biomass, and community structure after long-term continuous mixing of a grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37: 1249-1258