



PLFA技术原理及应用

分子生物学实验室
微生物资源与生态组
所级公共技术中心

李 旭
2024. 12. 4



PLFA是什么？

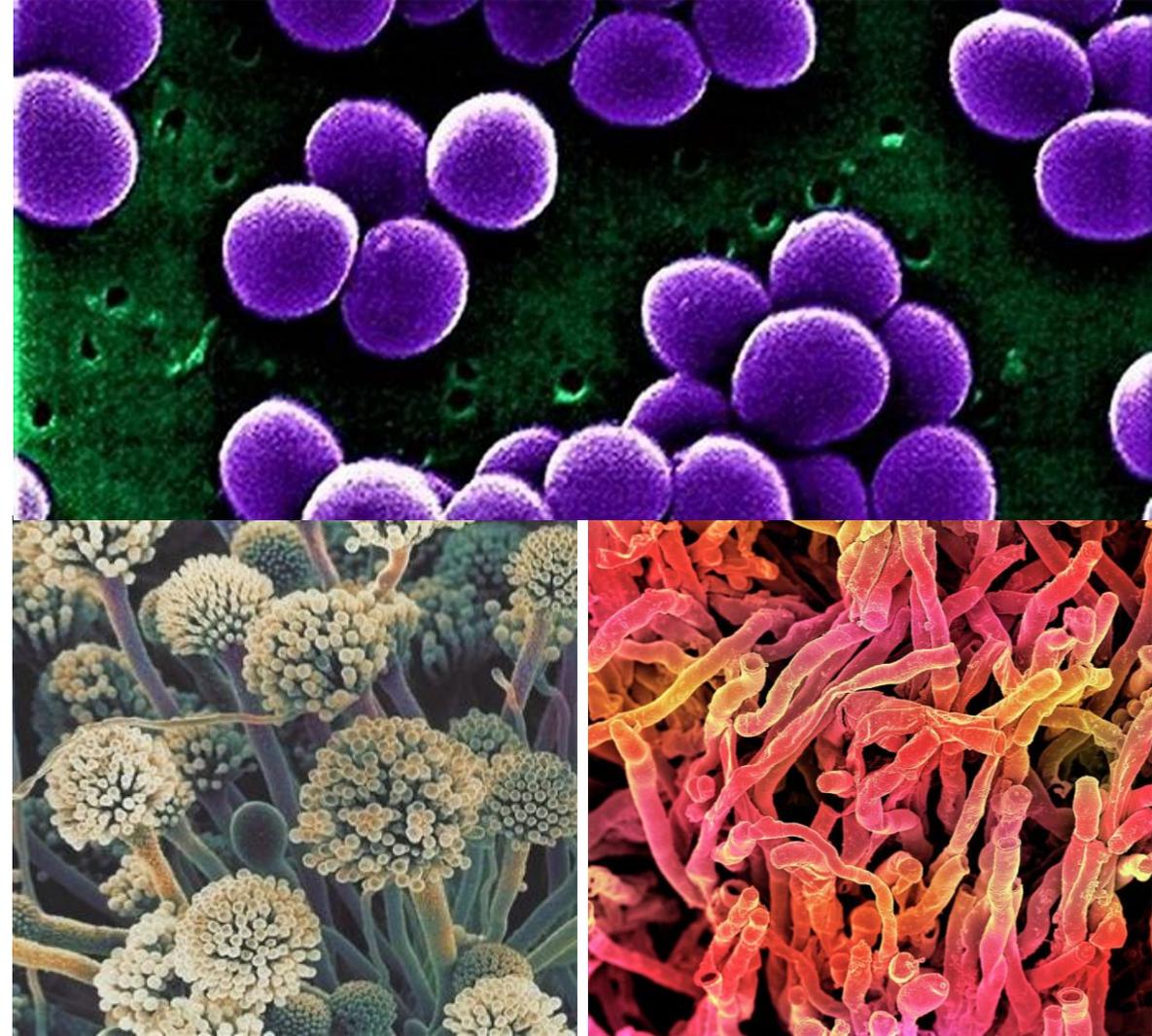
PLFA是**磷脂脂肪酸**（phospholipid fatty acid）的英文缩写，是活微生物**细胞膜**的重要组分。

脂肪酸的基本分子式： $\text{CH}_3[\text{CH}_2]_n\text{COOH}$

测定**纯菌**的PLFA，可以对菌种进行初步**鉴定**。

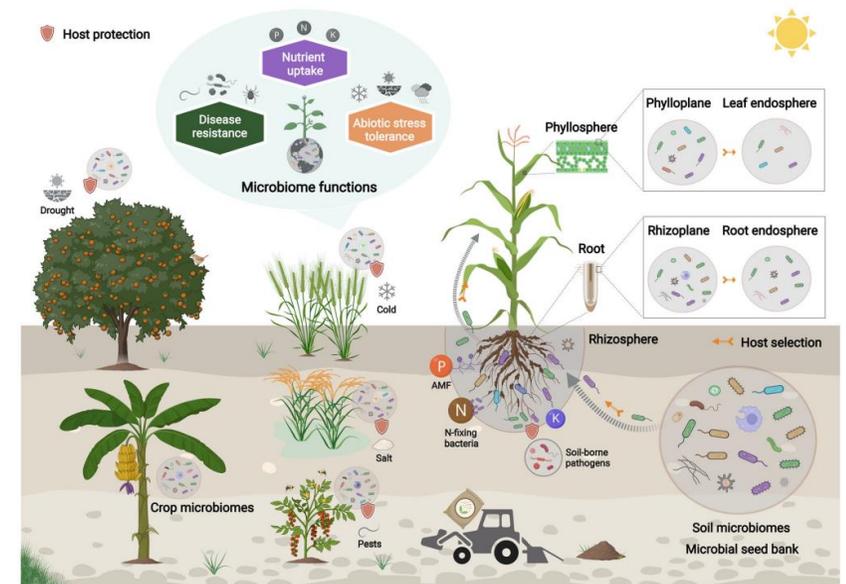
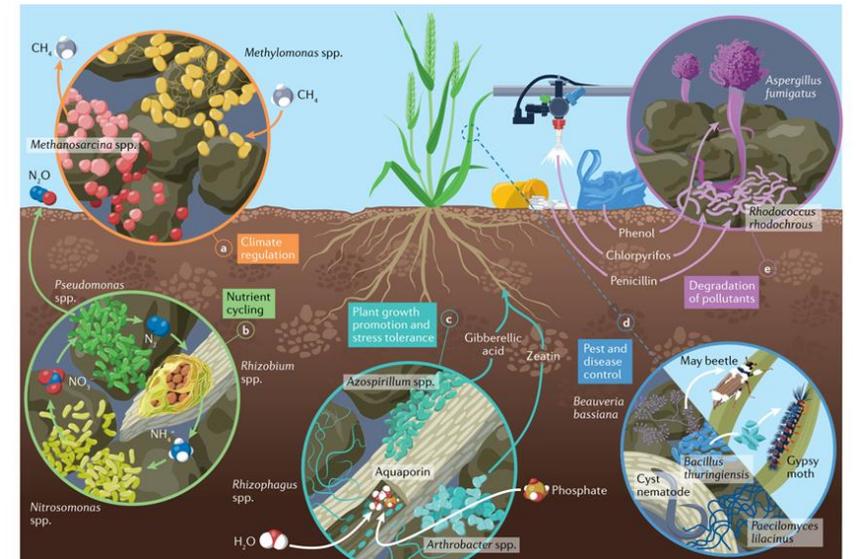
测定**环境样品**的PLFA，可定量反映样品中活体微生物不同类群的生物量及总生物量。

- 微生物是一切肉眼看不见或看不清的微小生物，个体微小，结构简单，通常要用光学显微镜和电子显微镜才能看清楚的生物，统称为微生物。
- 它们既包括细菌、放线菌、立克次氏体、支原体、衣原体、蓝细菌等原核微生物，也包括酵母菌、霉菌、原生动物、微型藻类等真核微生物，还包括非细胞型的病毒和类病毒。因此，“微生物”不是分类学上的概念，而是一切微小生物的总称。



土壤微生物的功能

- 气候调节：调节陆地碳通量，参与CO₂、CH₄、N₂O代谢。
- 分解有机质，释放出营养元素，**提高土壤肥力**。
- 产生粘合剂、CO₂等物质，改善土壤结构，**增加土壤通气性和保水性**。
- 抑制病原菌的生长繁殖，**保护植物健康**。
- 对生存的微环境十分敏感，能对环境胁迫做出反应，导致群落结构发生变化。**指示土壤质量变化**。





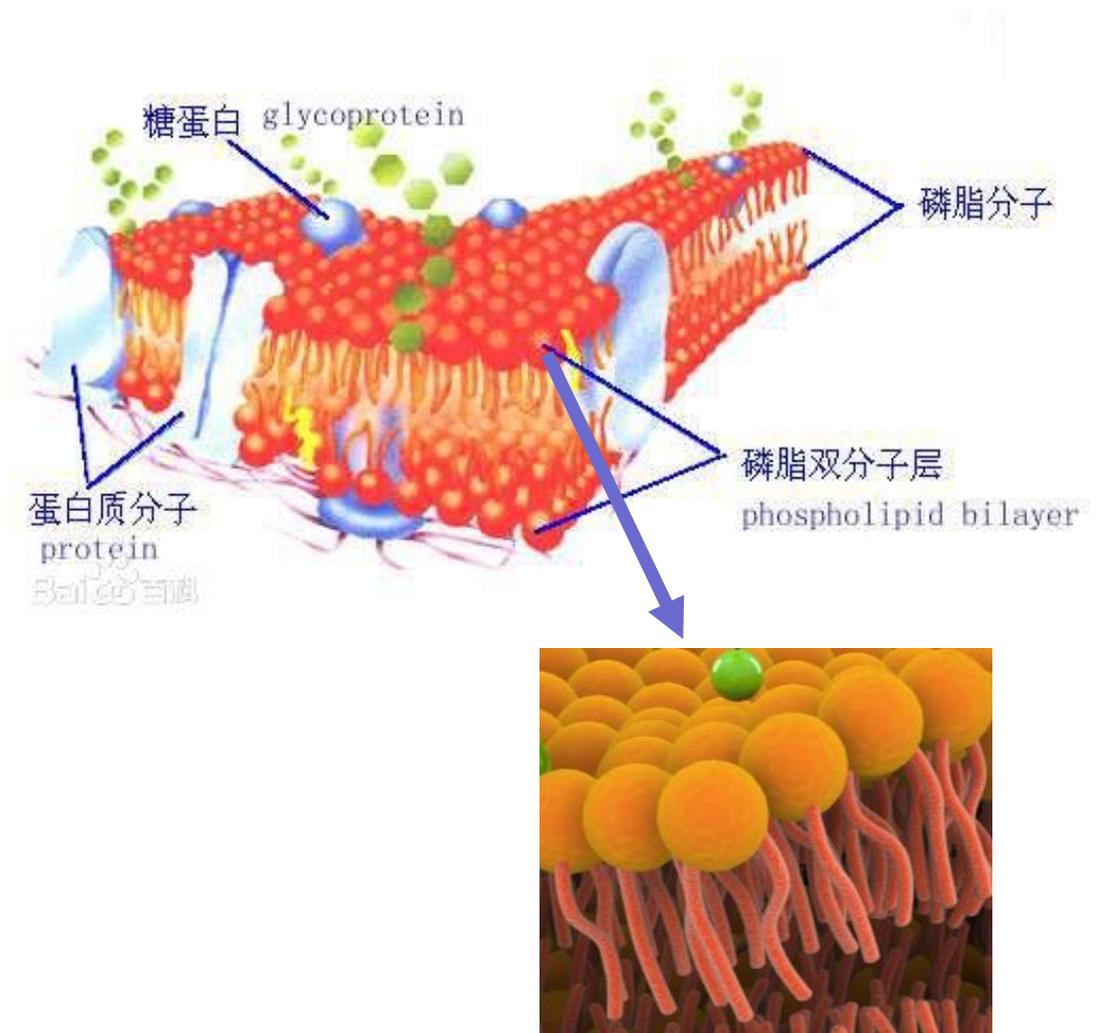
微生物群落结构研究方法

- 20世纪70年代以前：依赖传统的培养分离方法，依靠形态学、培养特征、生理生化特性的比较进行分类鉴定和计数。
- 70-90年代：微生物化学成分分析
- 90年代后：现代分子生物学技术（以DNA为目标物）

PLFA在细胞中的定位及特征

磷脂是生物活细胞细胞膜重要的组分，约占细胞干质量的**5%**。

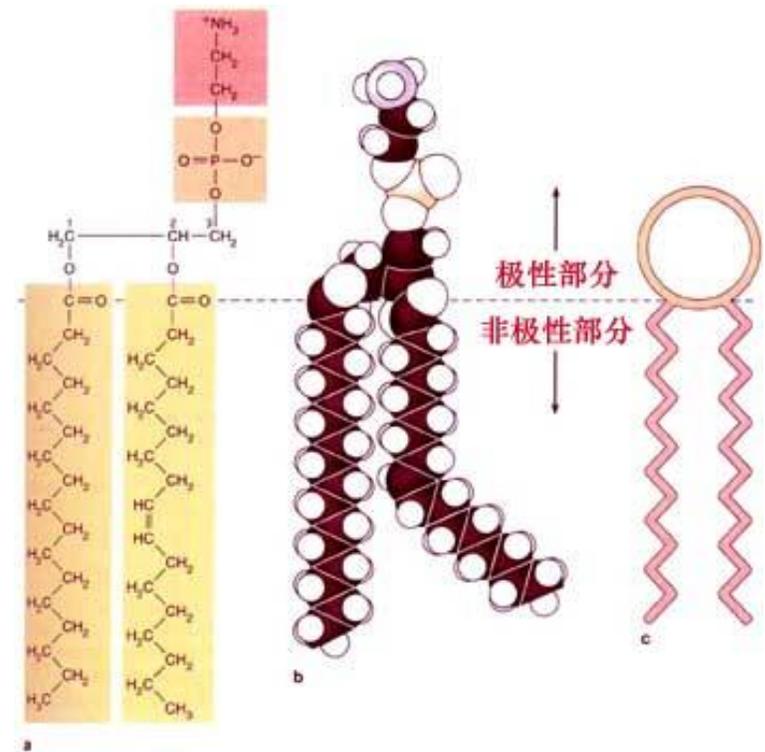
- 多样性：微生物细胞内有300多种脂肪酸成分
- 稳定性：成分相对稳定
- 差异性：不同的微生物菌株具有不同的脂肪酸图谱（指纹图谱）



磷脂的构成

磷脂是一类含有磷酸的脂类，机体中主要含有两大类，即甘油磷脂和鞘磷脂。

PLFA是磷脂脂肪酸
(phospholipid fatty acid)
的英文缩写，由连接在甘油
上的脂肪酸组成，是构成细
胞膜的重要组分。





PLFA方法理论基础

- PLFA是微生物细胞的重要组分，其总量与微生物量呈正相关；
- 不同类群的微生物能通过不同的生化途径合成不同的PLFA；
- 部分PLFA总是出现在同一类群微生物中，而在其它类群的微生物中很少出现；

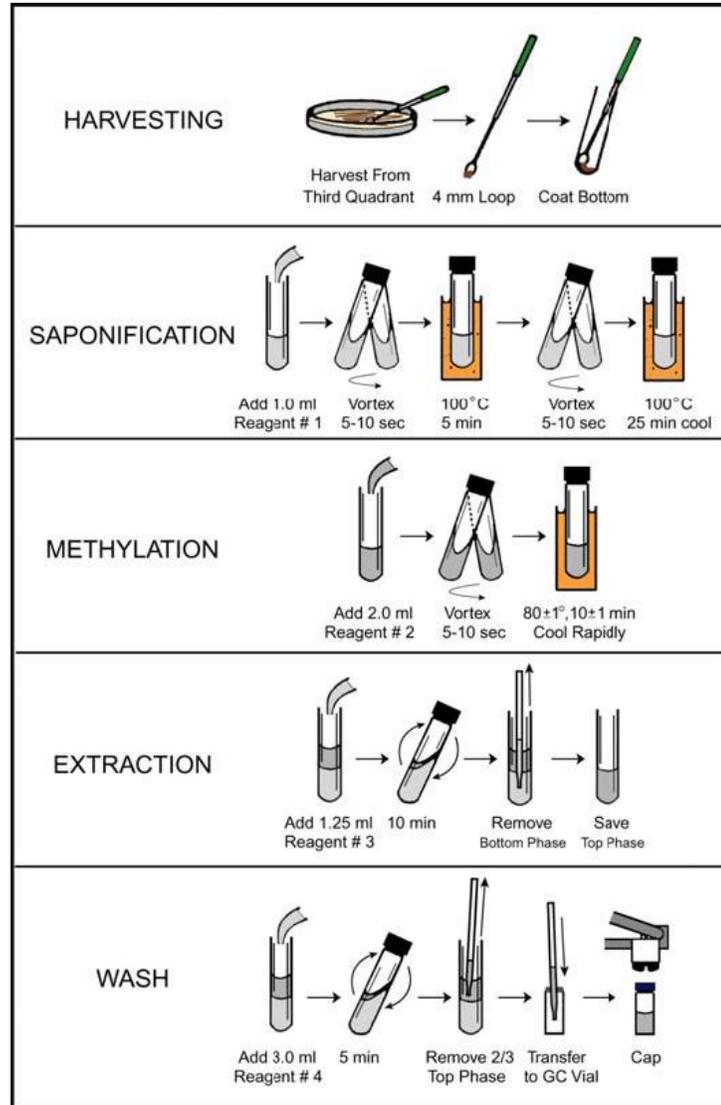
脂肪酸 i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1co9, 16:1c07t, i17:0, a17:0, 17:0, cy17:0, 18:1co7, and cy19:0 等用来表征细菌；
18:2 ω 6 等用来指示真菌；
10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0 等用来指示放线菌



PLFA方法理论基础

- 磷脂在细胞死亡后快速降解, 死亡细胞中半衰期为2.7天 (Reimo Kindler, 2009), 故用以表征微生物群落中“存活”的那部分群体, 适合于微生物群落的动态监测
- 通过对PLFA的定量测定可完成对微生物活细胞生物量的测定, 对PLFA 的种类进行分析可了解土壤微生物群落结构。

纯菌样品PLFA提取流程



1.获菌 培养菌液（对数生长后期，脂肪酸种类及含量最稳定）→离心收集菌体→冻干→**40mg菌种冻干粉**

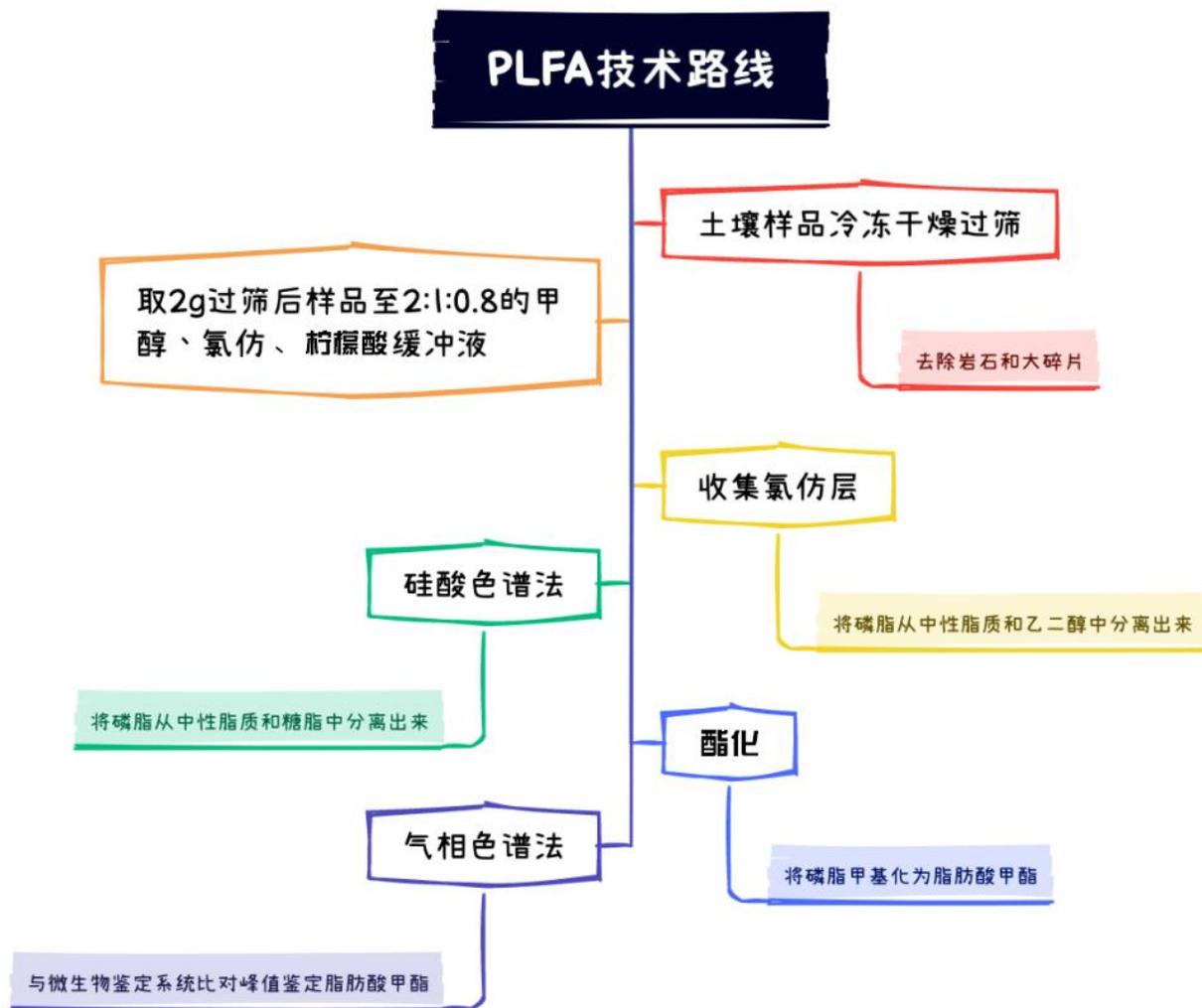
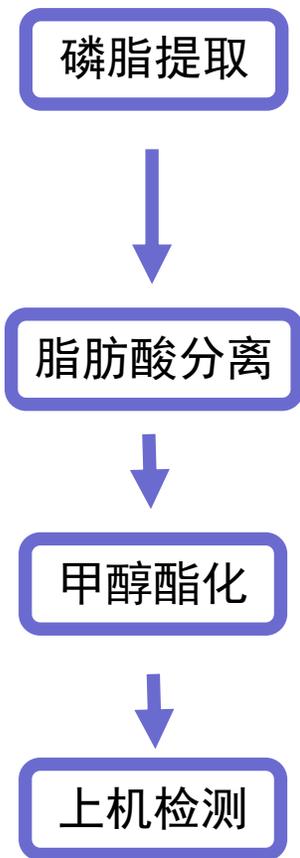
2.皂化 破裂细菌，释放脂肪酸并形成钠盐。

3.甲基化 甲基化脂肪酸形成脂肪酸甲酯 (**fatty acid methyl esters**),以增加脂肪酸的挥发性以利于**GC**分析。

4.萃取 将脂肪酸甲酯从酸性亲水相转移到有机相

5.碱洗涤 除去有机萃取相中的残余试剂。

土壤样品PLFA提取流程





土壤样品PLFA提取流程

- 1. 磷脂提取
- 2. 脂肪酸分离
- 3. 甲醇酯化

① 磷脂提取

(1) 称取相当于**4克干重**的土壤，置于离心管中



(2) 加入提取液**30.4ml**(三氯甲烷:甲醇:柠檬酸缓冲



(3) 振荡**2.5 h**，离心**10分钟** (**4000转/分**)



(4) 上层离心液倒入分液漏斗中，下层土壤重复提取一次，离心液转入分液漏斗并加入三氯甲烷、柠檬酸缓冲液各**16ml**



(5) 摇匀，静置过夜



(6) 将漏斗中氯仿层溶液接入试管中，**30 °C**，**N₂**吹干

土壤样品PLFA提取流程

② 脂肪酸分离：

(7) 用三氯甲烷调节硅胶柱

(8) 转移脂肪酸到硅胶柱

(9) 用三氯甲烷和丙酮洗脱杂质，弃去洗脱液

(10) 用甲醇洗提极性脂，N₂吹干



SPE固相萃取柱

③ 甲醇酯化：

(11) 脂肪酸溶于1:1甲醇:甲苯，加入0.2M KOH, 35°C 15分钟

(12) 加入正己烷，乙酸和纯水萃取

(13) 收集上层萃取液，下层用正己烷再萃取一次

(14) 室温下N₂吹干，-20°C储存。



PLFA的鉴定方法

- Sher lock®全自动微生物鉴定系统
- 气相色谱质谱联用 (GC-MS)
- 液相色谱质谱联用 (HPLC-MS)



Sherlock®全自动微生物鉴定系统

MIDI公司依据20世纪60年代以来对微生物细胞脂肪酸的研究经验，开发的一套的根据微生物特定短链脂肪酸（C9—C20）的种类和含量（定性和定量）对微生物进行鉴定和分析的软件。



Sherlock 全自动微生物系统的构成

系统由硬件GC和软件MIDI构成：

- ◆ Agilent Technologies
gas chromatographs (GC)
- ◆ MIDI pattern recognition
software (脂肪酸识别软件)
- ◆ MIDI microbial databases
(微生物脂肪酸数据库)



气相色谱仪





MIDI系统的菌库

菌库分类	菌种数量
嗜氧菌库	大于1500种, 其中593种来自于临床
厌氧菌库	约800种菌种
酵母菌库包含酵母菌、放线菌、真菌	约300种
PLFA群落分析	可准确鉴定的PLFA有165种

- 菌种水平: 迄今为止自动微生物鉴定系统中最大的细菌库
- 群落水平: 第一套商业化的PLFA群落分析产品, 涵盖绝大多数微生物群落分析的分子标记物



纯菌样品PLFA检测报告

Sample Profile Information

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.572	4.662E+8	0.025	----	7.039	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
3.005	752	0.026	1.147	10.000	10:0	0.12	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
4.051	21604	0.028	1.050	11.418	10:0 3OH	3.23	ECL deviates -0.004	
4.571	25989	0.031	1.022	12.000	12:0	3.78	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
5.067	485	0.032	1.005	12.440	11:0 3OH	0.07	ECL deviates 0.002	
5.931	39276	0.034	0.981	13.172	12:0 2OH	5.49	ECL deviates -0.005	
6.080	390	0.034	0.979	13.282	12:1 3OH	0.05	ECL deviates -0.006	
6.304	37276	0.035	0.975	13.449	12:0 3OH	5.17	ECL deviates -0.005	
7.046	2879	0.036	0.964	13.999	14:0	0.40	ECL deviates -0.001	Reference 0.001
9.915	63927	0.043	0.948	15.813	Sum In Feature 3	8.63	ECL deviates -0.009	16:1 w7c/16:1 w6c
10.225	218661	0.040	0.948	16.001	16:0	29.50	ECL deviates 0.001	Reference 0.002
11.311	445	0.044	0.947	16.631	17:0 iso	0.06	ECL deviates 0.001	Reference 0.002
11.585	2067	0.045	0.947	16.790	17:1 w8c	0.28	ECL deviates -0.002	
11.747	8563	0.047	0.947	16.884	17:0 cyclo	1.15	ECL deviates -0.004	
11.945	2943	0.043	0.947	17.000	17:0	0.40	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
13.203	3105	0.045	0.947	17.716	Sum In Feature 5	0.42	ECL deviates -0.004	18:2 w6,9c/18:0 ante
13.291	10669	0.045	0.947	17.767	18:1 w9c	1.44	ECL deviates -0.002	
13.389	256140	0.047	0.947	17.822	Sum In Feature 8	34.55	ECL deviates -0.001	18:1 w7c
13.700	7291	0.049	0.947	17.999	18:0	0.98	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
15.270	30200	0.045	0.945	18.898	19:0 cyclo w8c	4.07	ECL deviates -0.004	
16.118	1069	0.068	0.943	19.388	20:4 w6,9,12,15c	0.14	ECL deviates -0.007	
16.722	467	0.040	0.940	19.737	20:2 w6,9c	0.06	ECL deviates 0.005	
----	63927	---	----	----	Summed Feature 3	8.63	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	3105	---	----	----	Summed Feature 5	0.42	18:2 w6,9c/18:0 ante	18:0 ante/18:2 w6,9c
----	256140	---	----	----	Summed Feature 8	34.55	18:1 w7c	18:1 w6c

ECL Deviation: 0.004
Total Response: 735705
Percent Named: 99.80%

Reference ECL Shift: 0.001
Total Named: 734201
Total Amount: 706575

Number Reference Peaks: 7

Summary Area

主要由RT（保留时间）和Response（峰值）两个参数进行数据库内搜索匹配。



纯菌样品PLFA检测报告

相似指数 (similarity index) 值

Library Matches		
Library	Sim Index	Entry Name
CLIN6 6.00	0.954	Pseudomonas-aeruginosa
	0.699	Pseudomonas-aeruginosa-mucoid strains

“相似指数”不同于“可能性”，更科学，更严谨。

第一个SI > 0.5并且与比第二个SI大0.1，为Good Match

第一个SI < 0.3,即可认为本数据库中也没有这种菌

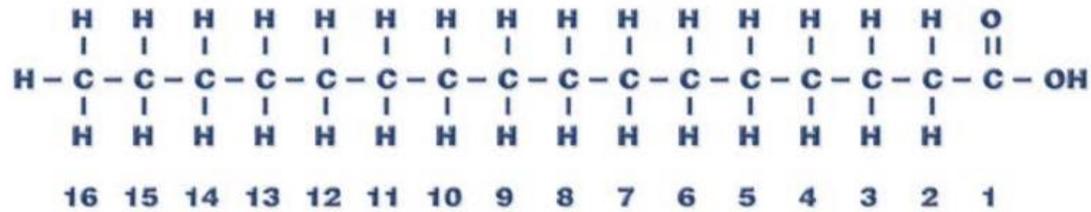


脂肪酸的命名

- PLFA一般以总碳数：双键数和双键距离分子末端的位置来命名
- c和t分别表示顺式和反式
- iso和ante iso分别表示支链的异构
- 10-methyl表示羧基端第10个碳原子上有一个甲基基团
- Cyclo表示环丙烷脂肪酸

脂肪酸的命名

Straight Chain

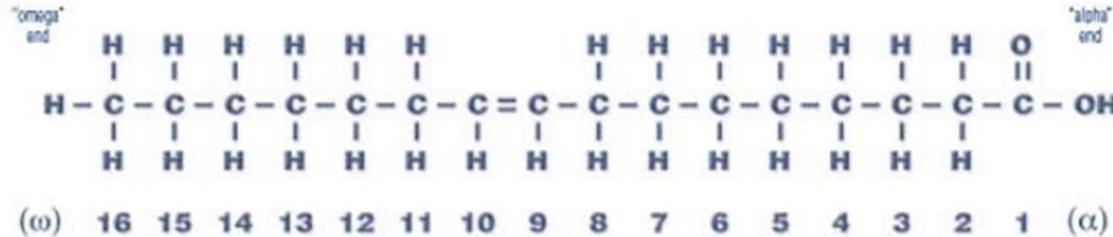


The figure above represents the straight chain fatty acid palmitic acid, written as 16:0. The "16" represents the number of carbons in the compound. The number after the colon indicates the number of double bonds in the carbon chain, in this case none. The carboxyl group (COOH) is at the right.

These compounds may also be written with the letter "C" in front of the number. For example 16:0 can be equivalently written C16:0. The letter "C" stands for carbons in the compound.

Unsaturated

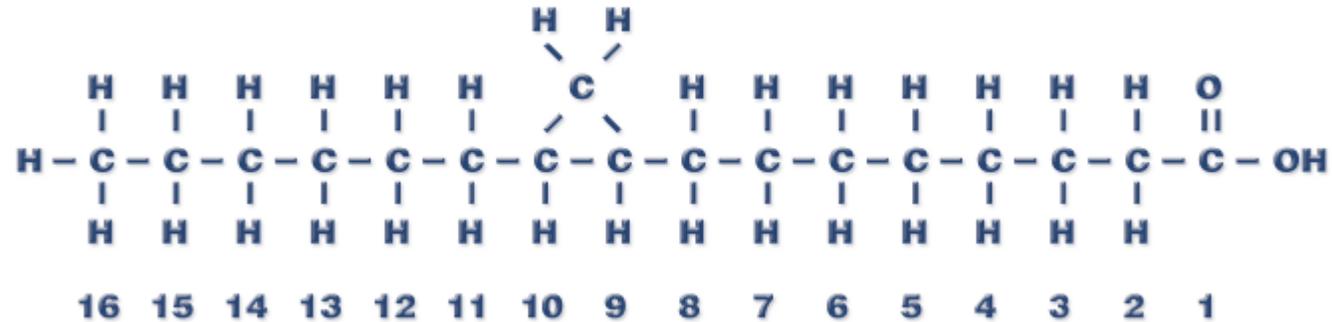
1. cis conformation



The designation 16:1 indicates that the compound has 16 carbons and 1 double bond. The figure above represents the unsaturated fatty acid 16:1 w7c. Note that both hydrogens at the double bond are on the same side in cis conformation. The "w7c" notation refers to the 7th carbon from the "omega" or "ω" end of the chain; the carboxyl group is located at the "alpha" end. This compound may have been represented as 16:1 cis 9 in other literature.

脂肪酸的命名

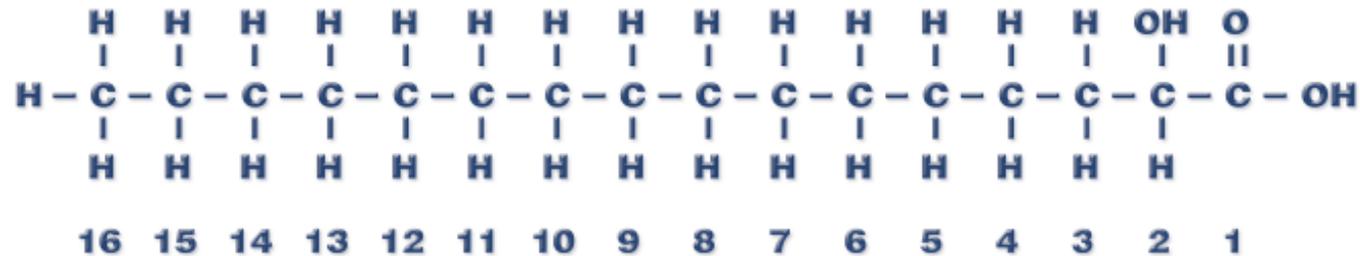
Cyclopropane



This represents the fatty acid **17:0 CYCLO w7c**. In other literature it may be named as **17:0 CYCLO 9-10**. This compound is made from 16:1 w7c with the addition of the carbon group at the double bond position.

Hydroxy

1. The 2-hydroxy



This figure represents the fatty acid **16:0 2OH**. A hydroxyl group was added at the 2 (alpha) position.



纯菌样品PLFA检测报告

Sample Profile Information

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.572	4.662E+8	0.025	----	7.039	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
3.005	752	0.026	1.147	10.000	10:0	0.12	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
4.051	21604	0.028	1.050	11.418	10:0 3OH	3.23	ECL deviates -0.004	
4.571	25989	0.031	1.022	12.000	12:0	3.78	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
5.067	485	0.032	1.005	12.440	11:0 3OH	0.07	ECL deviates 0.002	
5.931	39276	0.034	0.981	13.172	12:0 2OH	5.49	ECL deviates -0.005	
6.080	390	0.034	0.979	13.282	12:1 3OH	0.05	ECL deviates -0.006	
6.304	37276	0.035	0.975	13.449	12:0 3OH	5.17	ECL deviates -0.005	
7.046	2879	0.036	0.964	13.999	14:0	0.40	ECL deviates -0.001	Reference 0.001
9.915	63927	0.043	0.948	15.813	Sum In Feature 3	8.63	ECL deviates -0.009	16:1 w7c/16:1 w6c
10.225	218661	0.040	0.948	16.001	16:0	29.50	ECL deviates 0.001	Reference 0.002
11.311	445	0.044	0.947	16.631	17:0 iso	0.06	ECL deviates 0.001	Reference 0.002
11.585	2067	0.045	0.947	16.790	17:1 w8c	0.28	ECL deviates -0.002	
11.747	8563	0.047	0.947	16.884	17:0 cyclo	1.15	ECL deviates -0.004	
11.945	2943	0.043	0.947	17.000	17:0	0.40	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
13.203	3105	0.045	0.947	17.716	Sum In Feature 5	0.42	ECL deviates -0.004	18:2 w6,9c/18:0 ante
13.291	10669	0.045	0.947	17.767	18:1 w9c	1.44	ECL deviates -0.002	
13.389	256140	0.047	0.947	17.822	Sum In Feature 8	34.55	ECL deviates -0.001	18:1 w7c
13.700	7291	0.049	0.947	17.999	18:0	0.98	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
15.270	30200	0.045	0.945	18.898	19:0 cyclo w8c	4.07	ECL deviates -0.004	
16.118	1069	0.068	0.943	19.388	20:4 w6,9,12,15c	0.14	ECL deviates -0.007	
16.722	467	0.040	0.940	19.737	20:2 w6,9c	0.06	ECL deviates 0.005	
----	63927	---	----	----	Summed Feature 3	8.63	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	3105	---	----	----	Summed Feature 5	0.42	18:2 w6,9c/18:0 ante	18:0 ante/18:2 w6,9c
----	256140	---	----	----	Summed Feature 8	34.55	18:1 w7c	18:1 w6c

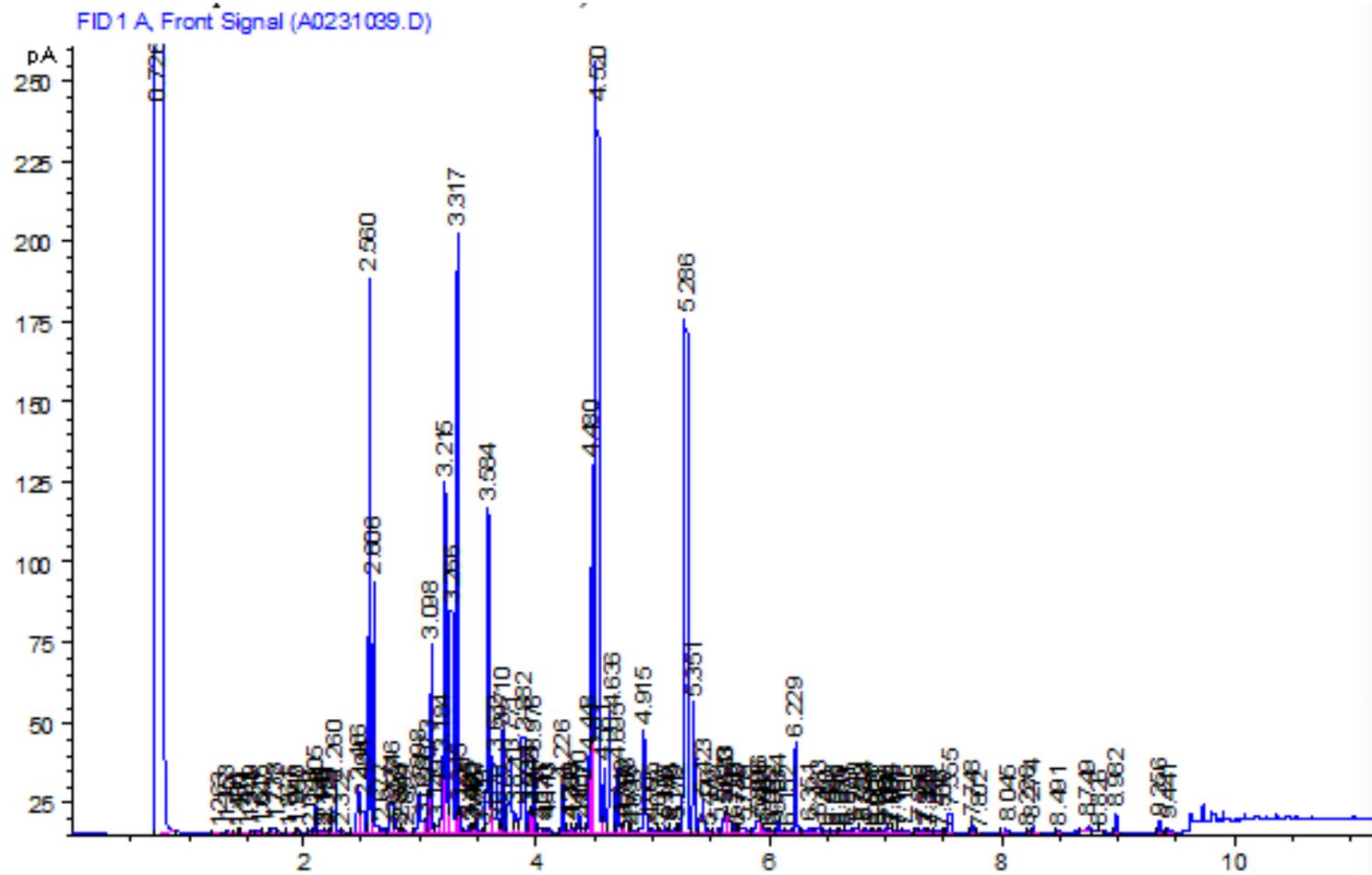
ECL Deviation: 0.004
Total Response: 735705
Percent Named: 99.80%

Reference ECL Shift: 0.001 Number Reference Peaks: 7
Total Named: 734201
Total Amount: 706575

Summary Area



土壤样品PLFA检测报告





土壤样品PLFA检测报告

- Response-峰面积
- ECL-碳链长度
- Percent-百分比
- Peak name-脂肪酸名称
- Total name-已命名脂肪酸的峰面积
- Total amount-校正的峰面积
- Percent name-命名百分比

RT	Response	AvHt	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.469	4.272E+8	0.020	---	7.035	SOLVENT PEAK	---	< min rt	
1.701	147	0.022	---	7.553		---	< min rt	
2.691	7269	0.596	---	9.764		---	> max ardt	
3.593	137	0.019	---	11.205		---		
3.888	435	0.029	---	11.558		---		
4.017	758	0.029	---	11.713		---		
4.250	1290	0.030	1.058	11.993	12:0	0.67	ECL deviates -0.007	Reference -0.004
4.347	1840	0.025	1.054	12.085	11:0 iso 3OH	0.95	ECL deviates -0.004	
4.491	1358	0.027	---	12.222		---		
5.012	907	0.028	1.028	12.714	13:0 anteiso	0.45	ECL deviates 0.012	Reference 0.013
5.178	347	0.034	---	12.871		---		
5.311	481	0.030	1.017	12.997	13:0	0.24	ECL deviates -0.003	Reference -0.002
5.718	264	0.026	---	13.316		---		
6.100	1083	0.032	0.996	13.614	14:0 iso	0.53	ECL deviates -0.005	Reference -0.005
6.229	957	0.035	0.993	13.715	14:0 anteiso	0.46	ECL deviates 0.008	Reference 0.007
6.312	1184	0.057	---	13.780		---		
6.591	11968	0.033	0.985	13.998	14:0	5.74	ECL deviates -0.002	Reference -0.003
6.842	418	0.035	---	14.170		---		
7.231	691	0.040	0.973	14.437	15:1 iso G	0.33	ECL deviates -0.003	
7.499	8094	0.035	0.968	14.621	15:0 iso	3.82	ECL deviates -0.002	Reference -0.004
7.632	5474	0.035	0.966	14.712	15:0 anteiso	2.58	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
7.794	564	0.043	---	14.823		---		
8.047	3780	0.048	---	14.997	15:0	---	ECL deviates -0.003	
8.137	303	0.037	---	15.054		---		
14.587	2670	0.039	0.904	18.903	19:0 cyclo w8c	1.92	ECL deviates 0.001	
14.758	17604	0.045	0.904	19.003	19:0	12.63	ECL deviates 0.003	Reference -0.002
15.327	1003	0.045	---	19.336		---		
15.435	1261	0.053	0.902	19.399	20:4 w6,9,12,15c	0.90	ECL deviates 0.004	
15.943	2274	0.042	---	19.697		---		
16.059	2073	0.077	0.901	19.765	20:1 w9c	1.48	ECL deviates -0.005	
16.457	807	0.042	0.900	19.998	20:0	0.58	ECL deviates -0.002	Reference -0.006
16.924	535	0.049	---	20.271		---	> max rt	
17.138	6048	0.072	---	20.397		---	> max rt	
17.513	884	0.061	---	20.617		---	> max rt	
17.609	4129	0.050	---	20.673		---	> max rt	
---	7206	---	---	---	Summed Feature 3	5.36	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
---	2416	---	---	---	Summed Feature 4	1.78	17:1 iso I/anteiso B	17:1 anteiso B/iso I
---	2969	---	---	---	Summed Feature 5	2.15	18:2 w6,9c/18:0 ante	18:0 ante/18:2 w6,9c
---	8648	---	---	---	Summed Feature 8	6.26	18:1 w7c	18:1 w6c
---	6747	---	---	---	Summed Feature 9	4.96	17:1 iso w9c	16:0 10-methyl

ECL Deviation: 0.004
Total Response: 148084
Percent Named: 91.64%

Reference ECL Shift: 0.006
Total Named: 135711
Total Amount: 125950

Number Reference Peaks: 15



土壤样品PLFA检测报告

WGT文件

		RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1	Vc									
2	Se	VGT								
3	Se	ChemDraw/Excel 17 详细信息								
4	Se	8	3.000E+07	0.040	0.000	6.828	SOLVENT PEAK	0.00	< min rt	
5	ID#	3625	1.374	241	0.020	1.000	10.705	11:0 anteiso	0.45	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
6	Bottle:	0	1.619	533	0.020	1.000	11.710	12:0 anteiso	0.99	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
7	Seq#	3625	1.938	306	0.020	1.000	12.709	13:0 anteiso	0.57	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
8	SampType	sample	2.303	228	0.020	1.000	13.614	14:0 iso	0.43	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
9	Method	PLFAD1	2.348	245	0.020	1.000	13.716	14:0 anteiso	0.46	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
10	Start Time	2016/11/4 10:49	2.470	630	0.020	1.000	14.000	14:0	1.18	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
11	Prof Method	PLFAD1	2.698	214	0.020	1.000	14.439	15:1 iso w6c	0.40	ECL deviates 0.000
12	Total Response	53542.25415	2.790	2074	0.020	1.000	14.617	15:0 iso	3.87	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
13	Total Named	53542.25415	2.839	1660	0.020	1.000	14.711	15:0 anteiso	3.10	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
14	Percent Named	100	2.943	224	0.020	1.000	14.913	15:1 w5c	0.42	ECL deviates 0.000
15	Total Amount	53542.25415	2.989	324	0.020	1.000	15.000	15:0	0.60	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
16	Comment		3.258	255	0.020	1.000	15.451	15:0 DMA	0.48	ECL deviates 0.000
17			3.333	1200	0.020	1.000	15.576	16:3 w6c	2.24	ECL deviates 0.000
18			3.359	1122	0.020	1.000	15.620	16:0 iso	2.09	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
19			3.416	231	0.020	1.000	15.715	16:0 anteiso	0.43	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
20			3.481	2860	0.020	1.000	15.824	16:1 w7c	5.34	ECL deviates 0.000
21			3.533	752	0.020	1.000	15.911	16:1 w5c	1.41	ECL deviates 0.000
22			3.586	5404	0.020	1.000	16.000	16:0	10.09	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
23			3.863	1569	0.020	1.000	16.420	16:0 10-methyl	2.93	ECL deviates 0.000
24			3.915	10536	0.020	1.000	16.498	17:1 iso w9c	26.49	ECL deviates 0.000
25			3.998	561	0.020	1.000	16.624	17:0 iso	1.05	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
26			4.061	689	0.020	1.000	16.720	17:0 anteiso	1.29	ECL deviates 0.000
27			4.112	290	0.020	1.000	16.797	17:1 w8c	0.54	ECL deviates 0.000
28			4.176	1252	0.020	1.000	16.894	17:0 cyclo w7c	2.34	ECL deviates 0.000
29			4.246	255	0.020	1.000	17.000	17:0	0.48	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
30			4.276	345	0.020	1.000	17.043	17:1 w7c 10-methyl	0.64	ECL deviates 0.000
31			4.533	220	0.020	1.000	17.407	17:0 10-methyl	0.41	ECL deviates 0.000
32			4.655	311	0.020	1.000	17.580	18:3 w6c	0.58	ECL deviates 0.000
33			4.758	990	0.020	1.000	17.727	18:2 w6c	1.85	ECL deviates 0.000
34			4.792	1994	0.020	1.000	17.775	18:1 w9c	3.72	ECL deviates 0.000
35			4.829	2307	0.020	1.000	17.827	18:1 w7c	4.31	ECL deviates 0.000
36			4.951	1308	0.020	1.000	18.000	18:0	2.44	ECL deviates 0.000 Reference 0.000
37			5.013	248	0.020	1.000	18.085	18:1 w7c 10-methyl	0.46	ECL deviates 0.000
38			5.239	932	0.020	1.000	18.395	18:0 10-methyl	1.74	ECL deviates 0.000
39			5.615	873	0.020	1.000	18.910	19:0 cyclo w7c	1.63	ECL deviates 0.000
40			5.681	25600	0.020	0.000	19.000	19:0	0.00	ECL deviates 0.000
41			5.979	239	0.020	1.000	19.403	20:4 w6c	0.45	ECL deviates 0.000
42			6.038	256	0.020	1.000	19.482	20:5 w3c	0.48	ECL deviates 0.000
43			6.718	341	0.020	1.000	20.397	20:0 10-methyl	0.64	ECL deviates 0.000
44			7.113	343	0.020	1.000	20.926	21:1 w4c	0.64	ECL deviates 0.000



土壤样品PLFA检测报告

微生物的 PLFA 表征分布	
微生物分类	特征脂肪酸
AM 真菌 AM Fungi	16:1 w5c
G-细菌 Gram Negative	10:0 2OH 10:0 3OH 12:1 w8c 12:1 w5c 13:1 w5c 13:1 w4c 13:1 w3c 12:0 2OH 14:1 w9c 14:1 w8c 14:1 w7c 14:1 w5c 15:1 w9c 15:1 w8c 15:1 w7c 15:1 w6c 15:1 w5c 14:0 2OH 16:1 w9c 16:1 w7c 16:1 w6c 16:1 w4c 16:1 w3c 17:1 w9c 17:1 w7c 17:1 w6c 17:0 cyclo w7c 17:1 w5c 17:1 w4c 17:1 w3c 16:0 2OH 17:1 w8c 18:1 w8c 18:1 w7c 18:1 w6c 18:1 w5c 18:1 w3c 19:1 w9c 19:1 w8c 19:1 w7c 19:1 w6c 19:0 cyclo w9c 19:0 cyclo w7c 19:0 cyclo w6c 20:1 w9c 20:1 w8c 20:1 w6c 20:1 w4c 20:0 cyclo w6c 21:1 w9c 21:1 w8c 21:1 w6c 21:1 w5c 21:1 w4c 21:1 w3c 22:1 w9c 22:1 w8c 22:1 w6c 22:1 w5c 22:1 w3c 22:0 cyclo w6c 24:1 w9c 24:1 w7c
甲烷氧化菌 Methanotroph	16:1 w8c
真核生物 Eukaryote	15:4 w3c 15:3 w3c 16:4 w3c 16:3 w6c 18:3 w6c 19:4 w6c 19:3 w6c 19:3 w3c 20:4 w6c 20:5 w3c 20:3 w6c 20:2 w6c 21:3 w6c 21:3 w3c 22:5 w6c 22:6 w3c 22:4 w6c 22:5 w3c 22:2 w6c 23:4 w6c 23:3 w6c 23:3 w3c 23:1 w5c 23:1 w4c 24:4 w6c 24:3 w6c 24:3 w3c 24:1 w3c 18:2 w6c
真菌 Fungi	18:2 w6c
G+细菌 Gram Positive	11:0 iso 11:0 anteiso 12:0 iso 12:0 anteiso 13:0 iso 13:0 anteiso 14:1 iso w7c 14:0 iso 14:0 anteiso 15:1 iso w9c 15:1 iso w6c 15:1 anteiso w9c 15:0 iso 15:0 anteiso 16:0 iso 16:0 anteiso 17:1 iso w9c 17:0 iso 17:0 anteiso 18:0 iso 19:0 iso 19:0 anteiso 20:0 iso 22:0 iso
厌氧菌 Anaerobe	12:0 DMA 13:0 DMA 14:1 w7c DMA 14:0 DMA 15:0 iso DMA 15:0 DMA 16:2 DMA 17:0 DMA 16:1 w9c DMA 16:1 w7c DMA 16:1 w5c DMA 19:0 cyclo 9,10 DMA 18:2 DMA 18:1 w9c DMA 18:1 w7c DMA 18:1 w5c DMA 18:0 DMA
放线菌 <u>Actinomycetes</u>	16:0 10-methyl 17:1 w7c 10-methyl 17:0 10-methyl 18:1 w7c 10-methyl 18:0 10-methyl 19:1 w7c 10-methyl 20:0 10-methyl



土壤样品PLFA检测报告

微生物类型	磷脂脂肪酸标记
假单胞杆菌 <i>Pseudomonas</i> spp.	18:1 ω 7c
好氧细菌 Aerobes	i14:0、a14:0、15:0 2OH、15:0 3OH、a15:0、i15:0、
硫酸盐还原细菌 Sulfate-reducing bacterium	10Me 16:0
黄杆菌 <i>Flavbacterium balustinum</i>	i17:1 ω 7
纤维素菌 <i>Cellulomonas</i>	11Me18:1 ω 7c
伯克霍尔德菌 Burkholderia	cy19:0 ω 8c
嗜热氢杆菌 Hydrogenobacter	18:0
原生动物 Protozoa	20:4 ω 6,9,12,15c

刘波. 微生物脂肪酸生态学. 中国农业技术出版社, 2011. 708



土壤样品PLFA检测报告

MIC文件

mic-wj-2 [兼容模式] - Microsoft Excel

文件 开始 插入 页面布局 公式 数据 审阅 视图 ChemOffice17 特色功能

剪贴板 字体 对齐方式 数字 样式

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Volume	DATA1									
2	SeqName	E165133MIC									
3	Samp#	12	RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
4	Samp ID	b73	2.000	121660	0.205	0.000	2.000	General FAME	0.00	ECL deviates 0.000	
5	ID#	4144	3.000	6861	0.205	1.000	3.000	AM Fungi	2.30	ECL deviates 0.000	
6	Bottle:	0	4.000	75955	0.205	1.000	4.000	Gram Negative	25.50	ECL deviates 0.000	
7	Seq#	4144	6.000	16190	0.205	1.000	6.000	Eukaryote	5.43	ECL deviates 0.000	
8	SampType	sample	7.000	8314	0.205	1.000	7.000	Fungi	2.79	ECL deviates 0.000	
9	Method	MICTYP	8.000	145615	0.205	1.000	8.000	Gram Positive	48.88	ECL deviates 0.000	
10	Start Time	2016/11/30 9:58	9.000	8019	0.205	1.000	9.000	Anaerobe	2.69	ECL deviates 0.000	
11	Prof Method	MICTYP	10.000	36934	0.205	1.000	10.000	Actinomycetes	12.40	ECL deviates 0.000	
12	Total Response	297887.3889									
13	Total Named	297887.3889									
14	Percent Named	100									
15	Total Amount	297887.3889									
16	Comment										
17											
18											
19											

按微生物分类



土壤样品PLFA检测报告

FAT文件

fat-wj-2 [兼容模式] - Microsoft Excel

Volume	DATA1										
SeqName	E165133FAT										
Samp#	15	RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2	
Samp ID	b76	1.000	36932	0.205	1.000	1.000	10-methyl	8.74	ECL deviates 0.000		
ID#	4147	2.000	5627	0.205	1.000	2.000	DMA	1.33	ECL deviates 0.000		
Bottle:	0	3.000	59405	0.205	1.000	3.000	Straight	14.05	ECL deviates 0.000		
Seq#	4147	4.000	5662	0.205	1.000	4.000	18:2 w6,9c	1.34	ECL deviates 0.000		
SampType	sample	5.000	148825	0.205	1.000	5.000	Branched	35.20	ECL deviates 0.000		
Method	FATYPE	6.000	67940	0.205	1.000	6.000	Other	16.07	ECL deviates 0.000		
Start Time	2016/11/30 9:58	7.000	54817	0.205	1.000	7.000	MUFA	12.97	ECL deviates 0.000		
Prof Method	FATYPE	8.000	6851	0.205	1.000	8.000	16:1 w5c	1.62	ECL deviates 0.000		
Total Response	422758.5437	9.000	13447	0.205	1.000	9.000	18:1 w9c	3.18	ECL deviates 0.000		
Total Named	422758.5437	11.000	13676	0.205	1.000	11.000	PUFA	3.23	ECL deviates 0.000		
Percent Named	100	12.000	9576	0.205	1.000	12.000	Cyclo	2.27	ECL deviates 0.000		
Total Amount	422758.5437										
Comment											

按脂肪酸结构分类



土壤样品PLFA检测数据分析

脂肪酸
种类

样品
名称

F1		13_ODMA													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
1		11_0antei	12_0	12_0antei	13_0antei	13_ODMA	14_0antei	14_1w7c	DM15_0antei	15_ODMA	15_0iso	15_1isow	15_1w7c	15_4w3c	16_
2	T117	0	2012.217	6945.585	13151.41	0	15032.18	0	32313.99	11342.38	34374.7	8661.453	11132.03	5358.91	661
3	T127	4854.829	1208.518	5176.049	7928.13	0	11331.61	0	24278.92	8676.789	24847.44	6408.37	8278.257	3920.583	48
4	T137	0	993.2583	4480.57	7038.815	0	10844.74	0	25118.61	9070.73	23945.93	6212.691	8279.251	3868.449	509
5	T147	805	2621	3530	9960	0	12869	0	29948	0	31102	11695	13602	6178	
6	T157	6544.501	2879.881	8812.771	9873.588	0	12470.27	0	24647.77	9391.867	23247.4	6866.96	8934.566	4488.982	480
7	T217	0	1701.047	4665.066	9518.561	0	10098.73	0	23451.59	9619.541	24558.42	6296.976	8269.725	4141.297	509
8	T227	0	960.9927	2072.219	6894.482	0	10709.57	0	25648.36	0	26238.4	7486.148	8183.606	3518.484	499
9	T237	0	1517.323	8379.265	10573.75	0	13101.65	0	22423.3	6461.367	22801.56	5544.819	5370.499	2781.03	530
10	T247	0	1643.389	2989.888	10113.73	0	14386.66	0	29527.46	0	31540.77	11428.15	11633.63	6425.623	546
11	T257	2521.608	948.7037	2941.089	5972.982	0	9884.858	0	22609.39	8811.468	23649.04	7482.007	8116.633	3932.595	429
12	T317	792.6421	2949.644	3754.442	9310.718	0	12635.62	0	25041.99	8685.989	23741.56	0	10854.96	0	430
13	T327	1813.467	3204.767	4296.424	10630.17	0	13359.06	0	30262.21	0	31499.7	0	10931.7	0	619
14	T337	0	2496.155	3123.324	9857.994	0	13368.35	0	27051.74	0	27291.89	0	10931.77	0	579
15	T347	2942.856	1632.811	4012.33	7110.069	0	8882.46	0	20918.19	6723.182	20354.29	5021.695	6802.891	3053.765	419
16	T357	1905.325	3630.772	5178.201	10743.69	0	12655.47	0	25054.12	0	25727.44	0	10011.38	0	501
17	T417	0	624.038	1037.569	3138.805	0	8047.033	0	24547.88	9275.591	27162.19	0	7445.652	0	556
18	T427	0	0	1559.184	5677.303	1230.938	9770.442	0	22488.26	8832.263	23500.47	0	8425.06	0	479
19	T437	0	728.4334	1843.734	5125.012	0	10413.95	0	25599.5	10243.39	25948.11	0	9310.134	0	586
20	T447	0	597.8149	773.0175	3326.145	0	9377.325	0	23633.18	0	23966.08	7555.223	9246.027	4176.713	480
21	T457	0	635.7689	872.2689	4101.135	0	9896.526	0	25173.76	10546.72	24985.15	6970.149	8959.077	4510.577	559
22	T817	0	3845	9503	18243	0	16820	0	29112	0	29613	9727	12000	6463	
23	T827	0	1900	2697	8834	2787	12409	0	24821	0	23760	7907	10571	5638	

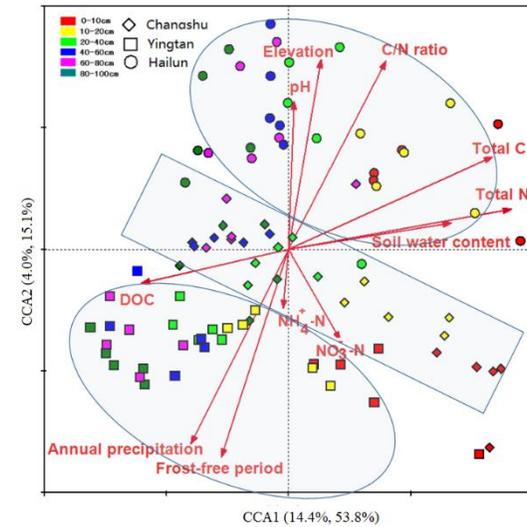
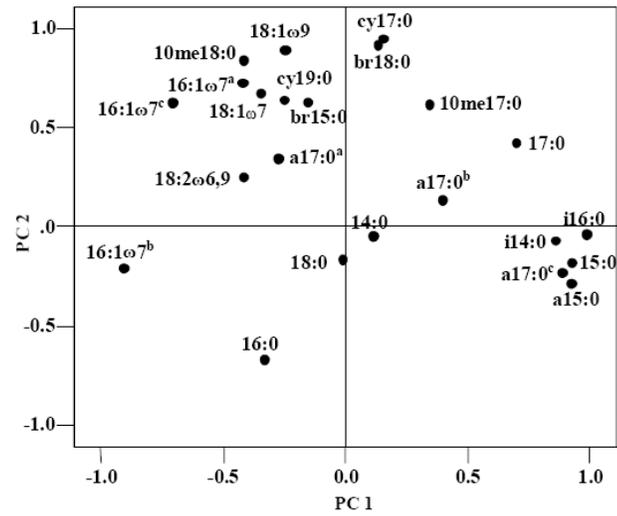
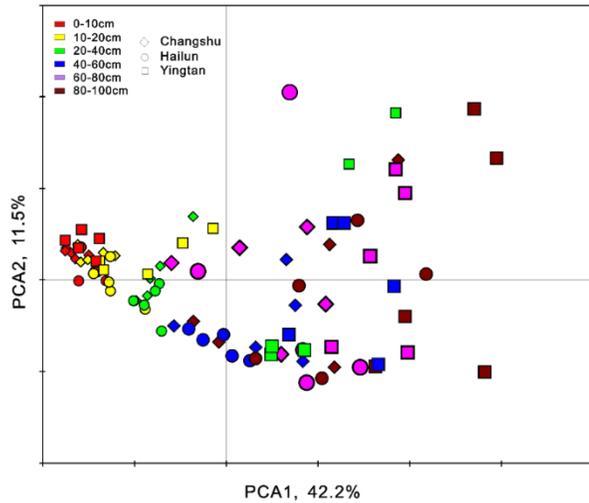
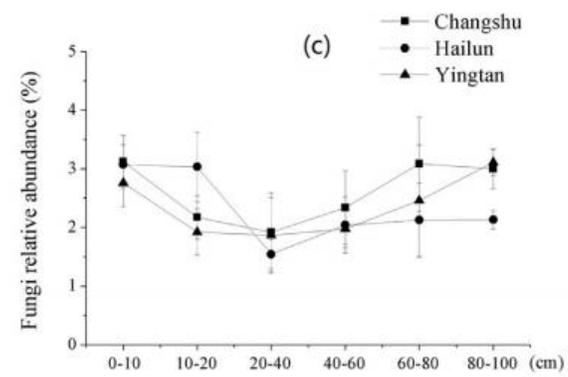
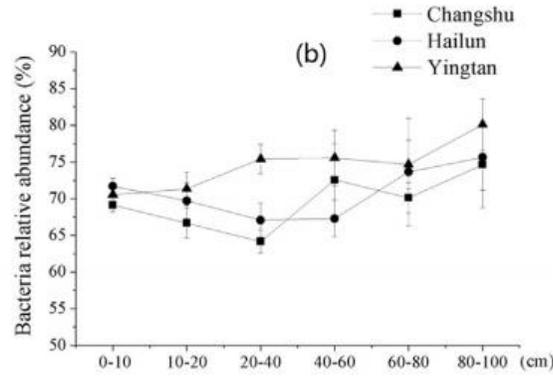
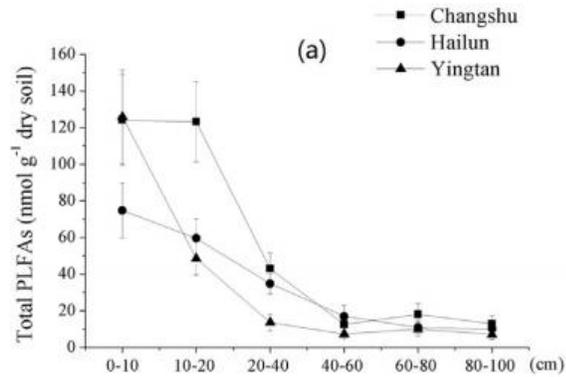


土壤样品PLFA检测数据分析

PLFA下机数据合并 (R脚本)

```
#说明: 本脚本只需修改文件路径及样品名称, 样品名称用引号和逗号隔开  
#merge.csv为整合后的输出文件  
#注意: 脚本中所有字符均为英文字符  
setwd("D:/RData")  
samplename<-c("A7_34","A7_35","A7_36","A7_37","A7_38","A7_39","  
CK_1","CK_2")  
input.1<-read.table(paste(samplename[1],".txt",sep=""),header=TRUE)  
data<-input.1  
for (i in 2:length(samplename))  
{  
input.i<-read.table(paste(samplename[i],".txt",sep=""),header=TRUE)  
data<-merge(data,input.i,all=TRUE)  
}  
write.csv(data,"merge.csv")
```

土壤样品PLFA检测数据分析



土壤样品PLFA检测数据分析

主成分分析 (PCA) (R脚本)

```
#####读取数据#####
```

```
setwd("D:/RData")
```

```
library(vegan)
```

```
spe<-read.csv("plfa.csv",row.names=1)
```

```
treatment<-read.csv("site.csv",row.names=1)
```

```
#####数据转化#####
```

```
#spe.log <- decostand(spe, "log")
```

```
spe.hel <- decostand(spe, "hellinger")
```

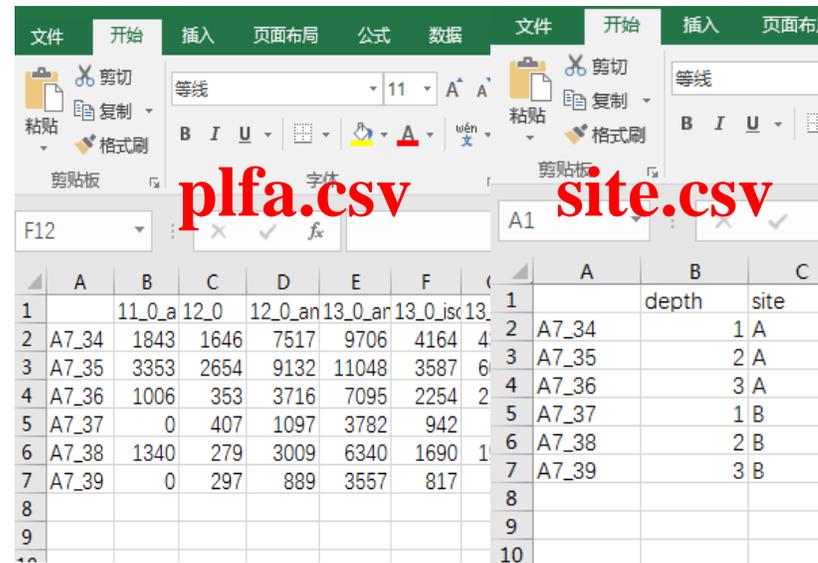
```
spe<-spe.hel
```

```
#####PCA计算#####
```

```
spe.pca <- rda(spe,scale=FALSE)
```

```
summary(spe.pca)
```

```
spe.pca.si <- scores(spe.pca, choices=1:2, display="site")
```



	A	B	C	D	E	F	G
1		11_0_a	12_0	12_0_an	13_0_an	13_0_isc	13_0_isc
2	A7_34	1843	1646	7517	9706	4164	4
3	A7_35	3353	2654	9132	11048	3587	6
4	A7_36	1006	353	3716	7095	2254	2
5	A7_37	0	407	1097	3782	942	
6	A7_38	1340	279	3009	6340	1690	1
7	A7_39	0	297	889	3557	817	

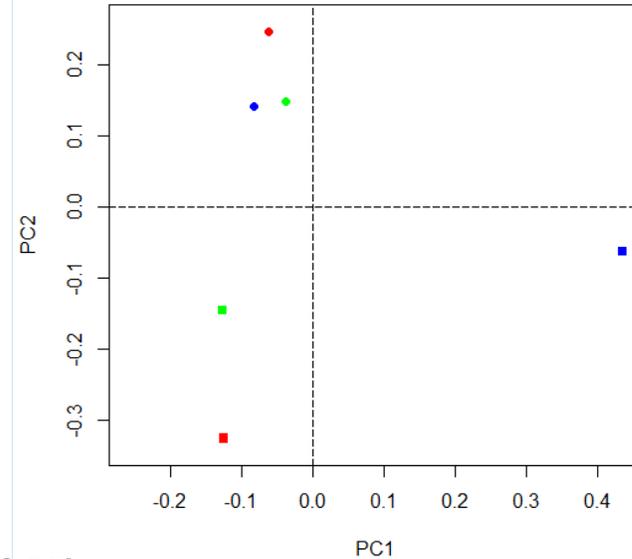
	A	B	C
1		depth	site
2	A7_34	1	A
3	A7_35	2	A
4	A7_36	3	A
5	A7_37	1	B
6	A7_38	2	B
7	A7_39	3	B



土壤样品PLFA检测数据分析

主成分分析（PCA）（R脚本）

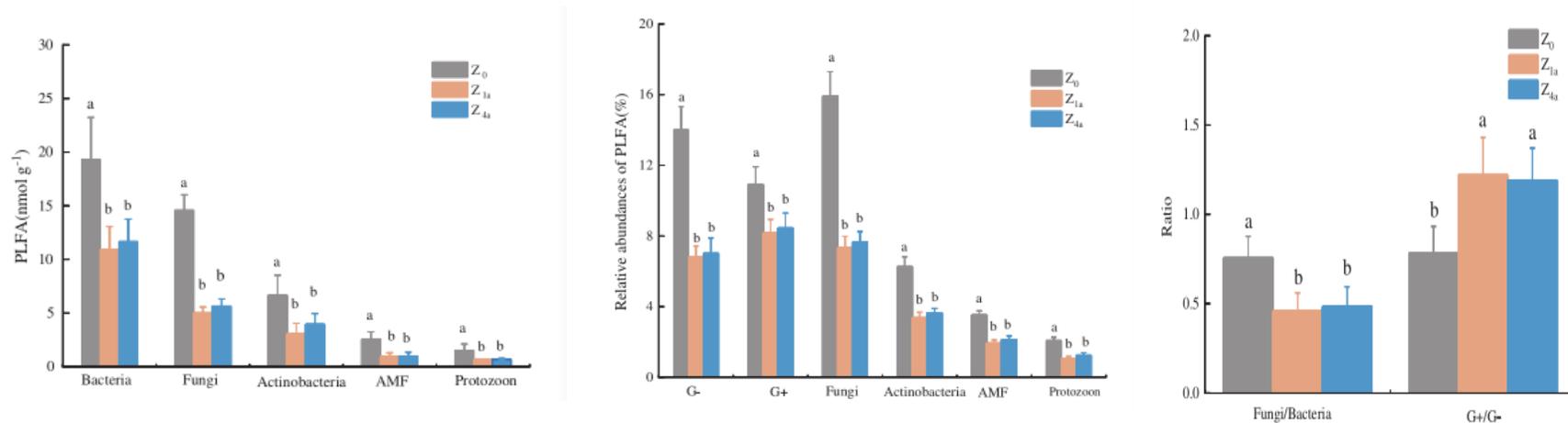
```
#####用vegan包及R自带函数作图#####  
site<-treatment$site  
depth<-treatment$depth  
x<-factor(site)  
y<-factor(depth)  
vpch<-c(21,22)  
vcol<-c("#FF0000","blue","green")  
vbg<-c("#FF0000","blue","green")  
plot(spe.pca,type="n",main="",xlab="PC1",ylab="PC2")  
points(spe.pca, pch = vpch[x],col=vcol[y],bg=vbg[y])  
abline(h=0,lty=2)  
abline(v=0,lty=2)  
#text(spe.pca.si, row.names(spe.pca.si),col=vcol[y],cex=0.8)
```



PLFA技术的应用

- Zhang等采用PLFA技术研究了土地整理 (land consolidation) 对土壤微生物的影响。结果表明, 与对照相比, 处理组PLFA含量和各微生物PLFA多样性均显著降低 ($P < 0.05$); 真菌与细菌之比 (F/B) 显著降低了35.9% ($P < 0.05$), 革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌之比 (G^+/G^-) 显著提高了56.1%。因此, 土地整理会显著影响土壤微生物PLFA多样性的组成, 降低土壤生态系统的稳定性。

(Zhang, PHYTON-INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 2022, 91 (8) , pp.1745-1756)





磷脂脂肪酸分析法优缺点

- **优点**

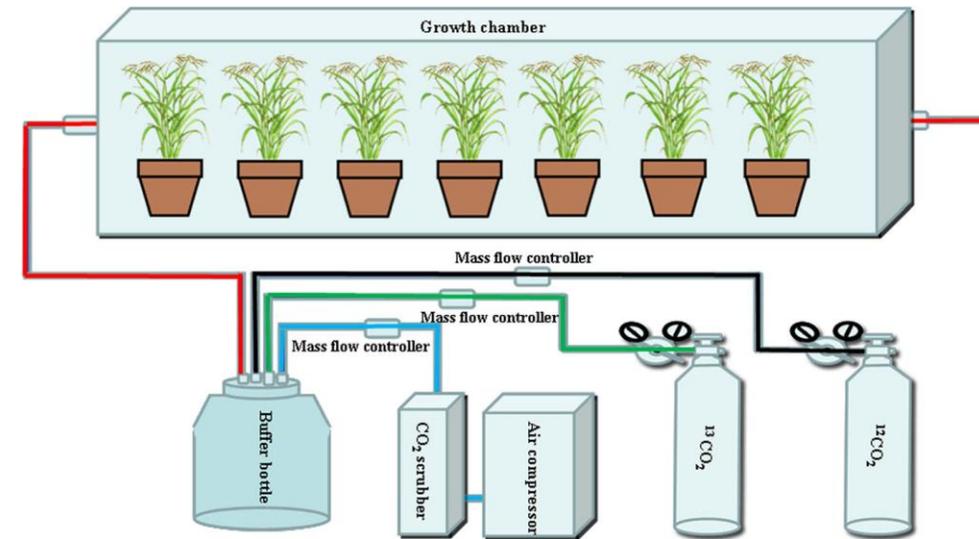
- PLFA分析技术是一种不依赖培养的方法，与传统的微生物分离培养方法相比，它得到的微生物群落组成信息更加全面。
- 适合跟踪研究微生物的动态变化。
- PLFA分析经GC-MS检测，其检测限可达到 10^{-9} mol/g, 能进行精确定量及半定量分析
- 与高通量测序技术相比，PLFA分析可以在得到群落组成信息的同时，也得到定量的数据。

- **缺点**

- 古细菌中不含PLFA，因此不能使用PLFA图谱分析古细菌。
- 通过测定纯菌PLFA进行菌种鉴定时，只能从属的水平上鉴定，不能到达种的水平。该技术用于特异微生物类群的鉴定结果还不够准确。
- 温度、饥饿和其它生理状态的变化可能影响细胞PLFA组成和含量。

PLFA稳定同位素示踪技术原理

在自然环境或培养实验中加入 ^{13}C 标记的底物（比如 CO_2 、葡萄糖、秸秆、有机污染物等），样品中的某些微生物便能以底物中稳定同位素 ^{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DNA、RNA和PLFA等物质，通过提取、分离、纯化、分析这些被标记的生物标志物（DNA、RNA、PLFA等），即可识别特定微生物类群对特定底物碳的吸收利用，从而揭示碳的流通过程。



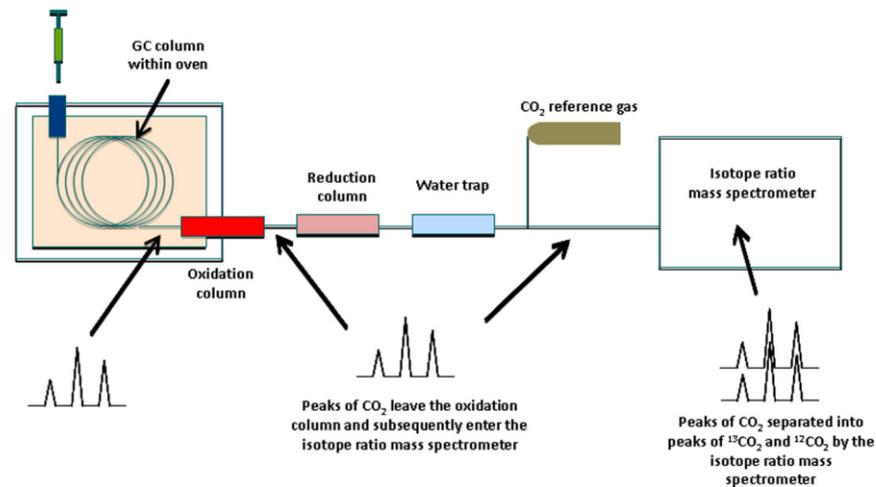
^{13}C -PLFA提取及检测

培养：自然环境或实验室内培养

提取： ^{13}C -PLFA提取方法与常规PLFA提取方法相同

检测：PLFA各组分含量----Sherlock®全自动微生物鉴定系统

PLFA各组分 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ----气相色谱-同位素比质谱仪 (GC-IRMS)





数据处理

1. 使用GC-IRMS 可测定单个FAME的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 由于在甲酯化步骤中引入了额外甲基碳, 需根据同位素质量平衡公式对结果进行校正:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA}} = \left[(n+1) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{measured}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}} \right] / n \quad (1)$$

其中n表示形成FAME 之前原始PLFA 的碳原子数

2. 使用同位素质量平衡方程来量化微生物和土壤过程之间的联系，可以计算单个PLFA中的C有多少来源于标记物质，有多少来源于土壤有机碳

$$\left\{ \begin{array}{l} m_{\text{label+soil PLFA}} F_{\text{label+soil PLFA}} = m_{\text{label PLFA}} F_{\text{label PLFA}} + m_{\text{soil PLFA}} F_{\text{soil PLFA}} \quad (2) \\ m_{\text{label+soil PLFA}} = m_{\text{label PLFA}} + m_{\text{soil PLFA}} \quad (3) \end{array} \right.$$

其中

$m_{\text{label+soil PLFA}}$ 和 $F_{\text{label+soil PLFA}}$ 表示添加标记材料后土壤中PLFA的摩尔数和 ^{13}C -PLFA百分含量

$m_{\text{label PLFA}}$ 和 $F_{\text{label PLFA}}$ 表示来自标记材料的PLFA摩尔数和 ^{13}C -PLFA百分含量

$m_{\text{soil PLFA}}$ 和 $F_{\text{soil PLFA}}$ 表示来自土壤有机质的PLFA的摩尔数和 ^{13}C -PLFA百分含量

可以计算得到标记物质在单个PLFA和总PLFA中的掺入量

$$m_{\text{label PLFA}} = m_{\text{label+soil PLFA}} (F_{\text{label+soil PLFA}} - F_{\text{soil PLFA}}) / (F_{\text{label PLFA}} - F_{\text{soil PLFA}}) \quad (4)$$

其中

$m_{\text{label+soil PLFA}}$ 和 $F_{\text{label+soil PLFA}}$ 表示添加标记材料后土壤中PLFA的摩尔数和 ^{13}C -PLFA百分含量，可以通过检测得到

$F_{\text{label FA}}$ 表示来自标记材料的 ^{13}C -PLFA百分含量

$F_{\text{soil FA}}$ 和表示来自土壤有机质的PLFA的 ^{13}C -PLFA百分含量，可以通过测量CK样品得到

由此可计算得到 $m_{\text{label PLFA}}$ 和 $m_{\text{soil PLFA}}$

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.03.019>

$$P_i = M_i \times (\delta^{13}\text{C}_{\text{Labeled}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Control}}) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{Urea}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Control}})$$

$$PLFA_{\text{PLA}} = PLFA_{\text{T}} (\delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA-PLA}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA-CK}}) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{PLA}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA-CK}})$$



^{13}C -PLFA技术的应用

Nottingham 等 (2009) 通过向土壤中添加 ^{13}C 标记的葡萄糖发现, 在土壤中检测到的 ^{13}C -PLFA大多是革兰氏阴性菌, 说明革兰氏阴性菌对外源有机C利用及 SOC 形成有重要作用。

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.03.003>

Pan 等 (2016) 对比了水稻秸秆及其衍生生物炭的微生物利用情况, 发现 ^{13}C 生物炭主要是被革兰氏阴性菌所利用, 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。

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.122>



Thank you

for your attention!