



کاربرد بیومارکرهای لپیدی برای ارزیابی ساختار جمعیت میکروبی خاک

محسن برین^{۱*}، ناصر علی اصغر زاد^۲، میرحسن رسولی صدقیانی^۳

^۱ استادیار گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲ استاد گروه علوم خاک دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

^۳ دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۷

چکیده

تبادل اکولوژیک جوامع میکروبی خاک، با توجه به نقش حیاتی و محوری آن‌ها به عنوان شاخص سلامت اکوسیستم خاک، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. بهره‌گیری از روش‌های مختلف برای دستیابی به وضعیت جامعه میکروبی خاک وجود دارد. روش‌های کشت میکروبی برای این منظور مناسب نیستند، زیرا قسمت اعظم ریزجانداران قادر به رشد در محیط کشت نمی‌باشند. روش‌های مولکولی و تکنیک‌های بر پایه DNA فقط تنوع میکروبی را می‌دهند. پس یک روش سریع برای ارزیابی ساختار جامعه میکروبی در خاک استفاده از الگو اسید چرب فسفولیپیدی (PLFA) می‌باشد (زیرا بعد از مرگ سلول به سرعت توسط فعالیت آنزیم فسفاتاز تجزیه می‌شود). به علاوه PLFA می‌تواند اطلاعات وسیع از تنوع، زیست‌توده و وضعیت تغذیه‌ای- فیزیولوژیک آن‌ها فراهم آورد. PLFAهای مخصوص و معینی مثل نسبت اسید چرب فسفولیپید با موقعیت (ترانس) 16:1ω7t به اسید چرب فسفولیپید با موقعیت (سیس) 16:1ω7c (*trans/cis*)، نسبت مجموع اسیدهای چرب فسفولیپیدی سیکلوپروپیل (cy17:0 و cy19:0) به مجموع اسیدهای چرب فسفولیپیدی با یک پیوند دوگانه پیشگام 16:1ω7 و 18:1ω7 (cy/pre)، نسبت اسیدهای چرب فسفولیپیدی اشباع‌شده به غیراشباع با یک پیوند دوگانه (S/M)، نسبت اسیدهای چرب فسفولیپیدی باکتری‌های گرم منفی به اسیدهای چرب باکتری‌های گرم مثبت (G/G+) و نسبت اسید چرب فسفولیپیدی قارچ‌های ساپروفیت (18:2ω6,9) به اسیدهای چرب نشانگر باکتری‌ها (F/B)، قادرند به عنوان شاخص‌های وضعیت فیزیولوژیکی یا تغذیه در شرایط مختلف محیطی همچون خاک‌های آلوده شده به فلزات سنگین، تغییرات pH، تغییرات عمق، خشکی، شوری، مدیریت‌های مختلف کشاورزی و شرایط غرقابی، برای ارزیابی جوامع میکروبی خاک به کار می‌روند. روش تجزیه PLFA در خاک و تعیین زیست‌توده، تنوع میکروبی و وضعیت فیزیولوژیک در اینجا بررسی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب فسفولیپید، تنش‌های محیطی، ارزیابی محیط، اسیدهای چرب

نشانگر، ساختار جوامع میکروبی.

مقدمه

برای ارزیابی پاسخ به شرایط تنش به کار برده می- شدند (Kaur et al., 2005). ولی این ویژگی‌ها به اندازه کافی حساس نیستند تا تغییر در زیست بوم خاک را در مراحل اولیه پیش‌بینی کنند. از طرفی خصوصیات میکروبی خاک جواب خیلی سریع به بهم‌خوردگی و تغییرات محیط‌زیست می‌دهند. به‌طور معمول، پاسخ به تنش، با مقیاس میکروبی از نظر تعداد میکروب، شدت تنفس میکروب‌ها و فعالیت میکروبی مطالعه می‌شود (Aslani et al., 2009, 2011; Shahbazi et al., 2013). ولی این‌ها شاخص‌های خیلی حساس نیستند چون عملکردهای فراوان و برهمکنش‌های بسیار پیچیده در درون جوامع میکروبی وجود دارد (Kaur et al., 2005).

روش‌های کارآمد برای مدیریت خاک، تولیدات کشاورزی و ارزیابی کیفیت محیط-زیست، نیاز به تکنیک‌ها و روش‌هایی دارد که بتوان جوامع میکروبی خاک را شناسایی و مورد سنجش قرار داد. این تکنیک‌ها، به دو دسته تکنیک‌های بیوشیمیایی و تکنیک‌های مولکولی تقسیم می‌شوند (Kirk et al., 2004; Barin et al., 2014a). هر یک از این تکنیک‌ها دارای مزایا و معایبی هستند به‌عنوان مثال روش‌های بر پایه کشت میکروبی، نمی‌توانند میکروارگانیسم‌های غیر قابل‌کشت را مشخص کنند (همه میکروارگانیسم‌ها قادر نیستند در محیط کشت رشد کنند) (Poormazaheri et al., 2013). همچنین استخراج کل DNA یا RNA از جوامع میکروبی و متعاقب آن ارزیابی جامعه میکروبی

اکوسیستم خاک، محیطی زنده، فعال و پیچیده می‌باشد که هستی بخش توانا، مدیریت خاک را به طور طبیعی به موجودات خاکزی سپرده است و برای انجام چنین کاری توانایی لازم را در طبیعت آنها نهاده‌است. بهترین نمود این توانایی را می‌توان در اکوسیستم‌های طبیعی مصون مانده از دخالت‌های انسان مشاهده کرد که طی قرن‌های متمادی، سرسبز و پربار در حالت تعادل باقی مانده‌اند (Saleh Rastin, 2005). جوامع میکروبی خاک نقش حیاتی و محوری در تجزیه مواد آلی (Wardle et al., 2004; Barin et al., 2010)، چرخه عناصر غذایی (Sarikhani et al., 2003; Zak et al., 2014)، هموستازی (Carney & Matson 2005)، همزیستی با گیاهان (Barin et al., 2006a, 2006b; Barin et al., 2008; Rasouli-Sadaghiani et al., 2010; Barin et al., 2013)، حاصلخیزی خاک و سلامت گیاهان (Hajiboland et al., 2004; Bing-Ru et al., 2006; Barin et al., 2006b) ایفا می‌کنند. بنابراین منطقی است که تعادل اکولوژیک ساختار جوامع میکروبی خاک به عنوان شاخص سلامت اکوسیستم خاک به کار رود. شاخص‌های مورد استفاده برای بررسی وضعیت اکوسیستم خاک، باید قادر باشند تغییرات در مدیریت، آب و هوا و شرایط تنش را در اکوسیستم منعکس کنند. تا همین اواخر تغییر در خصوصیات فیزیکی شیمیایی مانند pH، EC، وضعیت عناصر قابل دسترس و کربن آلی خاک

"خاک و اسید چرب فسفولیپید" حدود ۷۰۸ مورد تحقیق علمی در این زمینه یافت شده که از حدود یک تحقیق در سال ۱۹۹۱ به بیش از ۸۰ مقاله علمی در سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۹ رسیده (شکل ۱) که نشان می‌دهد هنوز روش الگوی اسید چرب فسفولیپید یکی از روش‌های کارآمد و مفید در این زمینه می‌باشد (Frostegård *et al.*, 2011).

در یک تحقیق برای انتخاب یک روش مناسب برای برآورد جمعیت میکروبی خاک، گزارش کردند که روش PLFA نسبت به روش‌های CLPP^۵ و روش‌های مبتنی بر PCR به تغییرات رمزی جمعیت میکروبی حساس‌تر می‌باشد. آن‌ها نشان دادند که از بین ۳۲ تحقیق انجام یافته، در ۱۸ تحقیق اثر CLPP و PLFA یکسان بوده و در ۱۴ تحقیق (حدود ۴۴ درصد) PLFA بهتر بود و همچنین در ۲۵ تحقیق دیگر، در ۲۰ تحقیق اثر PLFA و روش‌های مبتنی بر PCR یکسان بوده و در ۵ تحقیق (حدود ۲۰ درصد) روش PLFA جمعیت میکروبی را بهتر برآورد کرد.

تعداد مطالعات انجام شده برای روش‌های مبتنی بر PCR بیشتر از روش PLFA می‌باشد.

با تکنیک‌هایی همچون^۱ DGGE و^۲ TGGT و یا^۳ T-RTLP، به علت تکرارپذیری کم و کارایی پایین PCR دارای معایب می‌باشد (Gelsomino *et al.*, 1999; Cardon & Gage, 2006). به علاوه این تکنیک‌های مولکولی عمدتاً کیفی هستند (Cardon & Gage, 2006). همچنین تکنیک‌های مولکولی و تکنیک‌های بر پایه PCR مستلزم صرف هزینه و وقت زیاد می‌باشند. بنابراین یک روش سریع برای ارزیابی زیست‌توده و ساختار جامعه میکروبی در خاک استفاده از الگوهای اسید چرب فسفولیپیدی (PLFA^۴) می‌باشد و نیز تکنیک‌های مولکولی به‌اندازه روش الگوهای PLFA اطلاعات وسیع از تنوع، وضعیت تغذیه‌ای - فیزیولوژیک و تنشی نمی‌دهند (Zelles, 1999; Cardon & Gage, 2006; Ramsey *et al.*, 2006; Barin *et al.*, 2013a, 2014b).

آنالیز PLFA اثر انگشتی از ساختار جامعه میکروبی را فراهم می‌نماید. تجزیه PLFA ساختار جامعه میکروبی، زیست‌توده هر گروه و وضعیت تغذیه‌ای - فیزیولوژیک جامعه میکروبی را برآورد می‌نماید (Zelles, 1999; Cardon & Gage, 2006). این روش به‌طور وسیع در مطالعات جامعه میکروبی خاک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Griffiths *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2010). در رابطه با کاربرد یا عدم کاربرد اندازه‌گیری اسید چرب فسفولیپید برای ارزیابی ساختار جامعه میکروبی، در یک وب‌گردی علمی برای

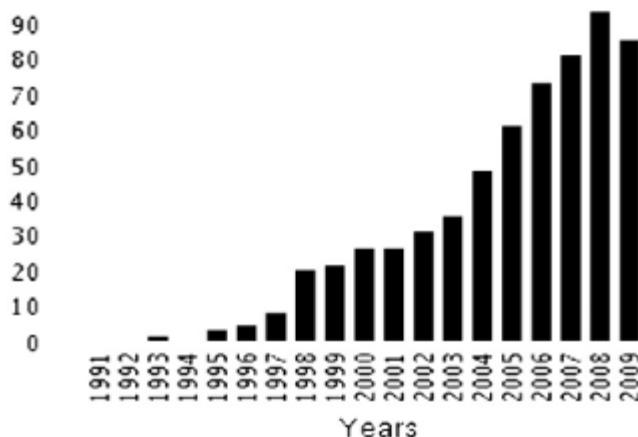
^۱ - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

^۲ - Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE)

^۳ - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

^۴ - Phospholipid fatty acids (PLFA)

^۵ - Community Level Physiological Profiles (CLPP)



شکل ۱- تعداد مقالات علمی انتشار یافته در هر سال برای ارزیابی ساختار جمعیت میکروبی خاک با روش الگوی اسید چرب فسفولیپید (Frostegård *et al.*, 2011).

Figure 1- Number of scientific articles published each year for evaluate soil microbial community structure using phospholipid fatty acid pattern (Frostegård *et al.*, 2011).

از این رو به نظر می‌رسد که PLFA بهترین روش برای روشن کردن و برآورد تغییرات ساختار جامعه میکروبی باشد. همچنین PLFAs معین می‌توانند به‌عنوان نشانگر زیستی برای گروه‌های میکروبی خاص مورد استفاده باشند در این روش اسید چرب به طور مستقیم از محیط کشت باکتری یا از نمونه‌های محیطی استخراج و بعد از متیله شدن، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی می‌شود. به طور معمول چندین اسید چرب فسفولیپیدی وجود دارند که به‌عنوان نشانگر گروه‌های بخصوص میکروبی مورد استفاده هستند. تجزیه اسید چرب به‌طور موفقیت‌آمیز برای خصوصیات جامعه میکروبی خاک‌های کشاورزی و محل‌های آلوده به فلزات سنگین، ترکیبات حلقوی، خاک‌های اسیدی و بازی و دیگر محیط‌های متنوع و غیرمتشابه بکار

قدرت تفکیک روش PCR نسبت به PLFA محدودتر است چون از نظر آماری اطلاعات کمتری از الگوی اثر انگشت روش‌های PCR نسبت به الگوی PLFA بدست می‌آید. به عنوان مثال در یک تجزیه DGGE معمولی ممکن است ۲۰-۵۰ باند قابل آشکارسازی یا قابل سنجش متنوع وجود داشته باشد (به‌علت محدودیت آشکارسازی و شناسایی حداکثر محدوده ۱۰ الی ۱۰۰ برابر)، در صورتی‌که در یک الگوی PLFA بیشتر از ۷۰ پیک متنوع به صورت پیوسته در یک محدوده حداقل ۱۰۰۰ برابر آشکار می‌شوند. از این رو کمی کردن تغییر در فراوانی جمعیت یک موجود زنده نیاز به تجزیه‌های دیگر و اضافی (نظیر PCR کمی گونه یا گروه بخصوص) برای تایید دارد (Ramsey *et al.*, 2006).

های شماره ۹ و ۱۰ از انتهای متیل مولکول و در ساختار سیس است. پیشوندهای *acy* و *di* و *a* به ترتیب نشان‌دهنده *branching cyclopropyl* (سیکلوپروپیل شاخه‌ای)، *anteiso* و *iso* dicarboxylic هستند (شکل ۳). اعدادی که قبل از *Me* می‌آیند نشان‌دهنده موقعیت گروه متیل می‌باشند. به‌عنوان مثال 10Me16:0. پیشوند α و β نشان‌دهنده گروه هیدروکسیل اسید چرب می‌باشند که در موقعیت دو یا سه قرار دارند (Frostegård *et al.*, 1993; Piotrowska-Seget *et al.*, 2003; Denich *et al.*, 2003; Barin *et al.*, 2013a).

روش‌های استخراج PLFA

روش استخراج اسید چرب در خاک و گیاه در سال ۱۹۹۱ ارائه گردید (Frostegård *et al.*, 1991). این روش شامل چندین مرحله به شرح زیر می‌باشد:

مرحله اول: استخراج چربی

در یک لوله سانتریفیوژ ۳ گرم خاک (۳۰ میلی‌گرم پودر خشک گیاه) ریخته و سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول شامل (کلروفرم: متانول: بافر سیترات (۰/۱۵) مولار اسید سیتریک در $\text{pH} = 4$ با هیدروکسید سدیم) به ترتیب به نسبت حجمی ۱:۲:۰/۸ اضافه کرده و بعد از ورتکس و سانتریفیوژ، محلول روایی جدا می‌گردد.

می‌روند (Frostegård *et al.*, 1993; Aliasgharзад *et al.*, 2010).

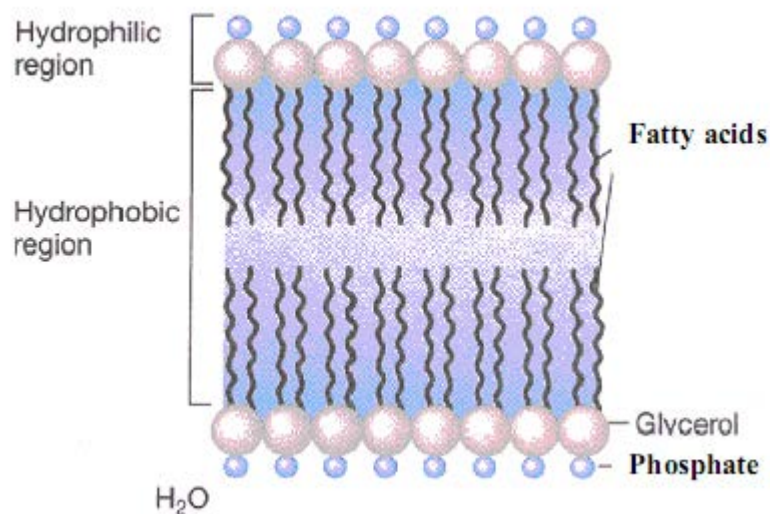
اسید چرب فسفولیپید (PLFA)

فسفولیپید متشکل از یک گروه فسفات و یک لیپید، که یک قسمت ضروری از غشاء سلول‌ها می‌باشند و بعد از مرگ سلول به سرعت توسط فسفاتازها تجزیه می‌شوند (Baath *et al.*, 1998; DeGroot *et al.*, 2004; Allison *et al.*, 2005) (شکل ۲). بنابراین به‌نظر می‌رسد فسفولیپیدها یک شاخص خوب برای ساختار جوامع میکروبی فعال باشند. اسیدهای چرب غشاء میکروب‌ها عموماً ۱۴-۲۰ اتم کربن دارند (Russell, 1995). گونه‌های میکروبی، الگوهای اسید چرب فسفولیپیدی ویژه‌ای در غشاء سلول خود دارند که به آن اصطلاحاً اسیدهای چرب نشانگر^۱ گویند (Allison *et al.*, 2005).

نام‌گذاری اسیدهای چرب

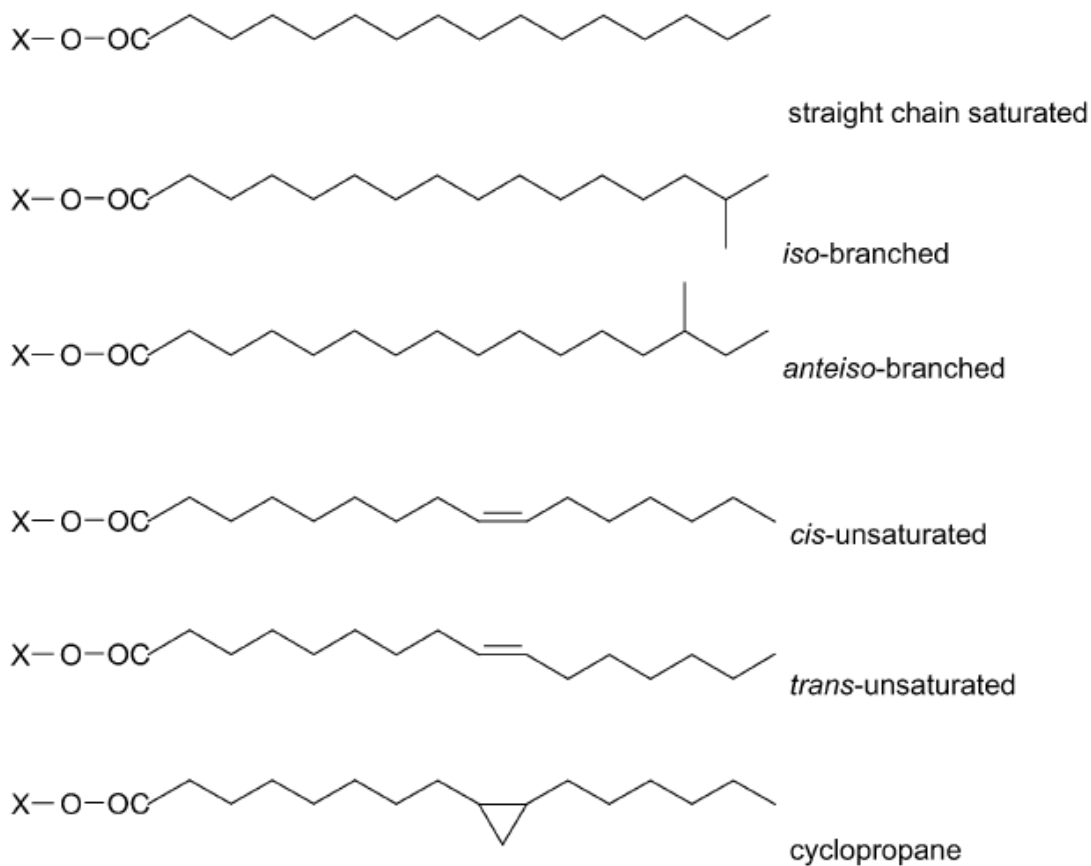
یکی از روش‌های نام‌گذاری اسیدهای چرب، روش امگا (ω) می‌باشد. در این روش اسیدهای چرب به وسیله تعداد کلی اتم‌های کربن و سپس به واسطه تعداد کلی باندهای دوگانه و موقعیت شروع باند دوگانه از سر متیل خود نام‌گذاری می‌شوند. ویژگی باندهای دوگانه با توجه به موقعیت سیس (*cis*) یا ترانس (*trans*) تعیین می‌شود. برای مثال 18:1 ω 9c اسید چربی است که دارای ۱۸ اتم کربن، یک باند دوگانه بین کربن-

¹ Signature fatty acids



شکل ۲- موقعیت فسفولیپید در غشاء سلول‌های زنده (Kaur *et al.*, 2005).

Figure 2- Position of the phospholipids in the membrane of living cells (Kaur *et al.*, 2005).



شکل ۳ - ساختمان اسیدهای چرب مختلف (Denich *et al.*, 2003).

Figure 3- Structure of different fatty acids (Denich *et al.*, 2003).

مولار در متانول اضافه می‌گردد. سپس برای جدا شدن کامل دو فاز، محلول هگزان:کلروفرم (به نسبت حجمی ۴ به ۱)، اسید استیک یک مولار و آب مقطر به نمونه‌ها اضافه و سپس ورتکس و سانتریفیوژ می‌گردند. در اینجا محلول به دو فاز تفکیک می‌شود که فاز رویی شامل (اسید چرب فسفولیپیدی/اسید چرب خنثی، تولوئن و هگزان) و فاز پایینی شامل (آب، متانول و هیدروکسید پتاسیم) می‌باشد که به کمک پیپت پاستور به دقت فاز رویی برداشت می‌شود.

مرحله چهارم: کروماتوگرافی گازی (GC)

برای انجام کروماتوگرافی گازی، ۲۵ میکرولیتر از نمونه را داخل ویال مخصوص دستگاه ریخته و سپس درب ویال را با انبر مخصوص محکم بسته و در فریزر تا زمان کروماتوگرافی گازی نگهداری می‌گردد. دستگاه کروماتوگرافی گازی استر متیله شده اسید چرب را داخل ستون سیلیکون وارد می‌نماید. با عبور دادن گاز نیتروژن و حرارت دادن تدریجی ستون، استرهای متیل اسید چرب به صورت بخار درآمده و یکی پس از دیگری از ستون خارج می‌شوند. در انتهای ستون (که بر اساس خاصیت یونیزه شدن گازها در حرارت زیاد ساخته شده است)، دستگاه خروج گازها را به صورت منحنی‌ها ترسیم می‌کند (شکل ۴ و ۵).

برای جداکردن فازها، به محلول حاصل از سانتریفیوژ، کلروفرم و بافر سیترات اضافه و بعد ورتکس کرده تا دو فاز به خوبی از هم جدا شوند. فاز بالا شامل آب، متانول و مواد محلول در آب همچون کربوهیدرات‌ها و پروتئین و غیره، اما فاز پایین شامل فاز کلروفرم محتوی چربی می‌باشد. سپس به کمک پیپت پاستور، فاز پایین به دقت برداشت گردد.

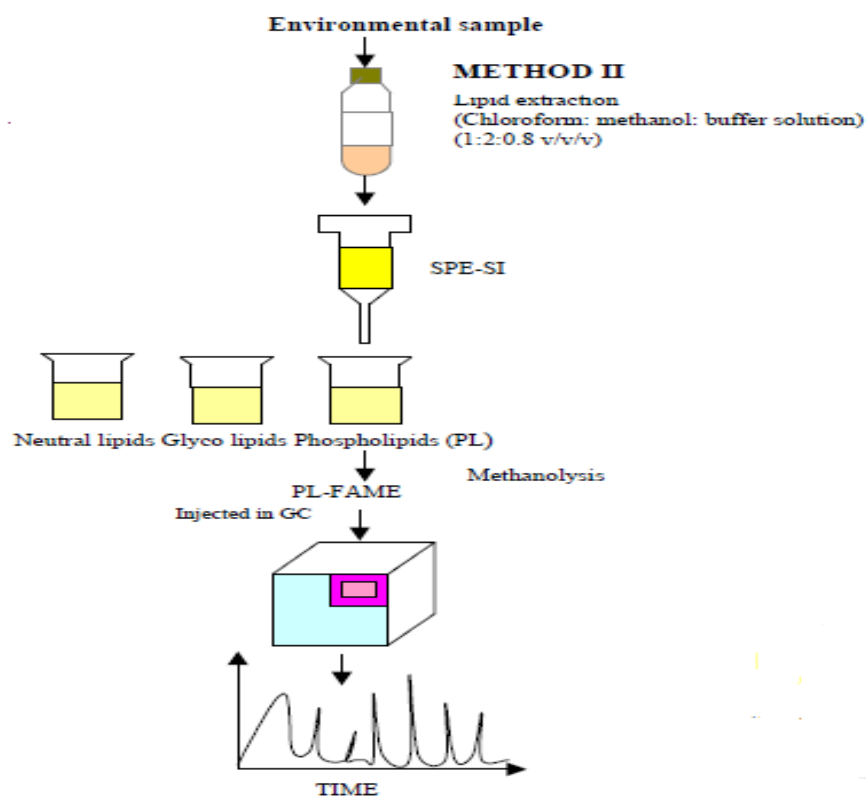
مرحله دوم: جدا سازی چربی‌ها

مواد حاصل از مرحله قبل، به ستون سیلیکا منتقل گردیده و برای جدا کردن چربی‌های خنثی، گلیکولیپید و فسفولیپید، به ترتیب کلروفرم، استون و متانول به ستون سیلیکا اضافه می‌گردد. سپس تمام مواد خروجی در لوله‌های جداگانه جمع‌آوری می‌شود. ادامه آزمایش روی اسید چرب خنثی و اسید چرب فسفولیپیدی بصورت جداگانه انجام می‌شود.

مرحله سوم: متیلاسیون و تشکیل اسید چرب متیل استر (FAME)

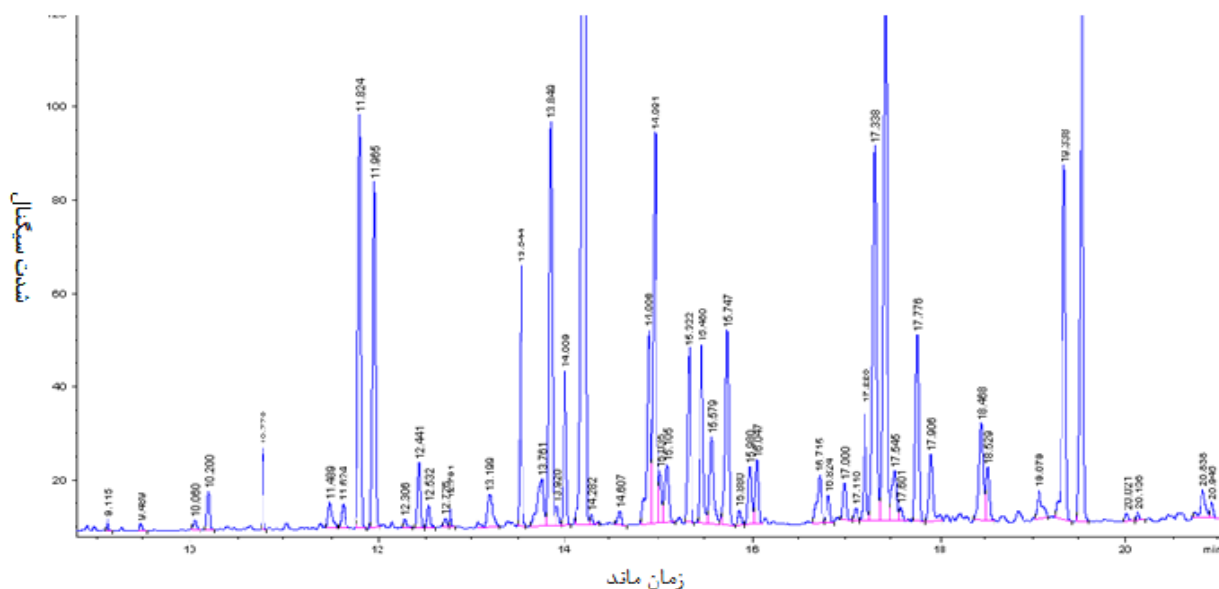
برای آنالیز چربی خنثی و فسفولیپیدی باید زنجیره اسید چرب از گروه فسفات و چربی خنثی، تفکیک و به متیل استر تبدیل شوند بدین منظور اسید چرب متیل استر ۱۹ کربنه (۱۹:۰) (اسید چرب ۱۹ کربنه در طبیعت وجود ندارد) به عنوان استاندارد به نمونه‌های مرحله قبلی اضافه می‌گردد. سپس به نمونه‌ها محلول تولوئن: متانول (۱:۱ حجمی/حجمی) و هیدروکسید پتاسیم ۲٪

¹ Fatty acid methyl ester



شکل ۴- نمایش شماتیک از مراحل استخراج اسید چرب فسفولیپید (Kaur et al., 2005).

Figure 4- Schematic view of the phospholipid fatty acid extraction (Kaur et al., 2005).



شکل ۵- طیف‌های اسید چرب جدا شده با روش کروماتوگرافی گازی (Barin et al., 2013a).

Figure 5- Fatty acid spectrum of separated by gas chromatography method (Barin et al., 2013a).

محسوب شدند (Frostegård & Baath 1996; Olsson, 1999; Aliasgharзад *et al.*, 2010; Barin *et al.*, 2013a).

فراوانترین اسیدهای چرب فسفولیپیدی مورد استفاده برای باکتری‌های گرم منفی شامل: *cy19:0* و *cy17:0*، *18:1 ω 7*، *16:1 ω 7t* صورتی که فراوانترین اسیدهای چرب فسفولیپیدی مورد استفاده برای باکتری‌های گرم مثبت شامل *a17:0*، *i16:0*، *a15:0*، *i15:0*، *i14:0* و *i17:0* می‌باشند. اسیدهای چرب فسفولیپیدی *10Me18:0* و *10Me17:0*، *10Me16:0* به‌عنوان نشانگرهای زیستی برای اکتینومیسیت‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. اسید چرب فسفولیپیدی مورد استفاده برای قارچ‌های ساپروفیت *18:2 ω 6,9* بوده در حالیکه اسید چرب فسفولیپید و نوترال لیپید *16:1 ω 5* به‌عنوان شاخص قارچ-ریشه‌های آربوسکولار مورد استفاده قرار گرفت. نسبت بین اسید چرب فسفولیپید و نوترال لیپید *16:1 ω 5* برای تشخیص بین قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار و باکتری‌ها استفاده شد که این نسبت در قارچ‌ریشه‌ها بالا است (۱ تا ۲۰۰) ولی در باکتری‌ها کمتر از یک می‌باشد (Frostegård & Baath 1996; Kieft *et al.*, 1997; Bossio & Scow, 1998; Olsson, 1999; Green & Scow, 2000; Piotrowska-Seget & Mrozik, 2003; Kucera & Dick, 2008; Olsson *et al.*, 2010; Aliasgharзад *et al.*, 2010, 2011; Barin *et al.*, 2013a, 2013b, 2014b).

تشخیص اسیدهای چرب و برآورد مقدار آن‌ها دستگاه کروماتوگرافی گازی مقدار هر اسید چرب را بصورت پیک نشان می‌دهد و به همراه پیک در فایل، نام و سطح هر پیک با توجه به زمان ماند (Retention Time (RT) که برابر است با زمانی (بر حسب دقیقه) که یک پیک نسبت به زمان شروع ظاهر می‌شود) داده می‌شود. بعد از تشخیص پیک مربوط به هر اسید چرب، مساحت هر پیک به واحد وزن (نانو مول بر گرم خاک خشک و یا نانومول بر گرم ریشه) تبدیل می‌شود (Olsson, 1999; Frostegård *et al.*, 1993; Barin *et al.*, 2013a, 2013b).

اسیدهای چرب نشانگر (اسید چرب فسفولیپیدی) برای برآورد زیست‌توده میکروب‌های خاک

اسید چرب فسفولیپیدی، به دو گروه بزرگ تقسیم می‌شوند یک گروه شامل نشانگرهای زیستی عمومی (نشان‌دهنده زیست‌توده کل) و گروه دیگر شامل نشانگرهای زیستی اختصاصی (نشان‌دهنده وجود و حضور میکروارگانیسم معین و مشخص می‌باشند) (Evgrafova *et al.*, 2008) (جدول ۱-۲).

سیزده نشانگر زیستی اسیدهای چرب مورد استفاده برای باکتری‌ها شامل: *a15:0*، *i14:0*، *a17:0*، *16:1 ω 7*، *16:1 ω 9*، *i16:0*، *15:0*، *a15:0*، *a17:0*، *17:0*، *cy17:0*، *18:1 ω 7* و *cy19:0* بوده که مجموع آن‌ها به‌عنوان زیست‌توده باکتری‌ها

شاخص‌های تنش فیزیولوژیکی یا تغذیه

اسیدهای چرب فسفولیپید مورد استفاده برای تنش‌های فیزیولوژیک و تغذیه‌ای شامل نسبت اسیدهای چرب فسفولیپیدی اشباع شده به غیراشباع با یک پیوند دوگانه (S/M)، نسبت مجموع اسیدهای چرب فسفولیپیدی سیکلوپروپیل (cy17:0 و cy19:0) به مجموع اسیدهای چرب فسفولیپیدی با یک پیوند دوگانه پیشگام^۱ (16:1ω7 و 18:1ω7) (cy/pre)، نسبت اسید چرب فسفولیپیدی قارچ‌های ساپروفیت به مجموع اسیدهای چرب فسفولیپیدی باکتری‌ها (F/B)، نسبت اسیدهای چرب فسفولیپیدی باکتری‌های گرم منفی به باکتری‌های گرم مثبت (G-/G+) و همچنین نسبت اسیدهای چرب فسفولیپیدی با یک پیوند دوگانه ترانس به سیس بوده است (Guckert *et al.*, (trans/cis) 1986; Kaur *et al.*, 2005; Aliasghar zad *et al.*, 2010; Barin *et al.*, 2013a, 2014b (جدول ۱).

کاربرد بیومارکرهای لیپیدی تحت شرایط مختلف محیطی

اسید چرب فسفولیپیدی به‌طور وسیع برای ارزیابی ساختار جوامع میکروبی خاک تحت شرایط مختلف شامل غلظت بالای عناصر سنگین، تغییرات pH، تغییرات عمق، خشکی، شوری، مدیریت‌های مختلف کشاورزی، شرایط غرقابی و آلودگی‌های خاک، مورد استفاده قرار

می‌گیرد یکی از فواید این روش پوشش دادن محدوده وسیعی از گروه‌های میکروبی شامل قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌باشد (Kaiser *et al.*, 2010; Barin *et al.*, 2013a, 2014b).

مدیریت‌های کشاورزی

مدیریت‌های مختلف کشاورزی می‌توانند روی اسیدهای چرب فسفولیپیدی غشای میکروب‌های خاک مؤثر باشند. اسید چرب فسفولیپیدی خاک همبستگی بالا ($r=0/82$) با مقدار کربن آلی دارد (Barin *et al.*, 2013a). همچنین نسبت قارچ به باکتری با مقدار کربن آلی همبستگی بالایی ($r=0/94$) داشت (Frostegard & Baath, 1996). مقدار اسید چرب فسفولیپید 18:2ω6,9 (به‌عنوان نشانگر قارچ‌های ساپروفیت) در اراضی تحت کشت و کار نسبت به اراضی آیش کمتر می‌باشد زیرا شخم رشد قارچ‌ها را مختل می‌کند و مقدار اسیدهای چرب نشانگر باکتری‌ها در زمین‌های آیش نیز بیشتر بود (Hedlund, 2002; Zornoza *et al.*, 2009).

اسید چرب فسفولیپید 16:1ω5 نشانگر مربوط به قارچ‌ریشه در خاک جنگلی (مخصوصاً جنگل سوزنی برگ) کمتر از اراضی کشاورزی می‌باشد زیرا گیاهان میزبان در بین محصولات کشاورزی بیشتر می‌باشند (Hedlund, 2002).

¹ Precursor

جدول ۱- گروه‌های میکروبی به همراه اسیدهای چرب اختصاصی.

Table 1- Microbial communities along with specific fatty acids.

گروه‌های میکروبی Microbial groups	نشانه‌گرهای اسید چرب Markers of fatty acid	مرجع Reference
Most of bacteria	i14:0, i15:0, a15:0, i15:0, i16:0, 9ω16:1, 16:1ω7, i17:0, a17:0, i17:0, cy17:0, i18:1ω7 و cy19:0	Frostegard & Baath, 1996, Barin <i>et al.</i> , 2015
Gram-negative bacteria	Monounsaturated and cyclopropane PIFAs (16:1ω7t, i18:1ω7, cy17:0 و cy19:0)	Aliasgharzad <i>et al.</i> , 2010
Gram-positive bacteria	iso and anteiso FAs (Sum of i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, and a17:0) (Branched PLFAs)	Frostegard & Baath, 1996; Barin <i>et al.</i> , 2013a
Fungi	18:2ω6,9	Olsson, 1999
Actinomycetales	10Me16:0, 10Me17:0 و 10Me18:0	Aliasgharzad <i>et al.</i> , 2010
Mycorrhizal fungi	16:1ω5	Aliasgharzad <i>et al.</i> , 2011; Barin <i>et al.</i> , 2013b
Methanotrophs	16:1ω8c, 16:1ω8c	Boschker & Middelburg, 2002
<i>Desulfovibrio</i>	i17:1 ω 7c, i15:1 ω 7c, i19:1 ω 7c	Edlund, 1985
<i>Desulfolobus</i>	17:1 ω 6, 15:1	Guckert, 1986
Clostridia	cy15:1	Salomonová <i>et al.</i> , 2003
Aerobes	16:1 ω 7, 16:1 ω 7t, 18:1 ω 7t	Hill <i>et al.</i> , 2000
Diatoms	16:1 ω 3t, 20:5 ω 5, 20:5 ω 3	Salomonová <i>et al.</i> , 2003
Green algae	16:1ω13t, 18:3ω3, 18:1ω9	Salomonová <i>et al.</i> , 2003
Higher plants	18:1ω9, 18:1ω11, 18:3ω3, 20:5ω3, 26:0	Salomonová <i>et al.</i> , 2003
<i>Thiobacillus</i>	i17:1ω5, 10Me18:1ω6, 11Me18:1ω6	Kerger, 1986
Protozoa	20:2 ω 6, 20:3 ω 6, 20:4 ω 6	Hill <i>et al.</i> , 2000
Microbial stress indicators		
cy/pre ratio	(cy17:0+cy19:0)/(16:1ω7+18:1ω7)	Kucera & Dick, 2008; Barin <i>et al.</i> , 2014, Barin <i>et al.</i> , 2015
S/M ratio	Saturated/Monosaturated PLFAs*	Kieft <i>et al.</i> , 1994;
(trans/cis)	16:1ω7t/16:1ω7c	Guckert <i>et al.</i> , 1986; Frostegard & Baath, 1996
G-/G+	Gram negative bacteria /Gram positive bacteria PLFAs	Barin <i>et al.</i> , 2013a, Barin <i>et al.</i> , 2015
F/B	Saprophytic fungi/ bacteria PLFAs	Bossio & Scow 1997; Kaur <i>et al.</i> , 2005

* (Saturated PLFAs) 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0

* MONO (Monosaturated PLFAs) i16:1, 16:1ω11, 16:1ω7, 16:1ω5, 17:1ω9, a17:1, 17:1ω8, 18:1ω9, 18:1ω7, 18:1ω5, 11Me18:1ω7

شوری

شاخص‌های بیولوژیک مانند تنفس و زیست‌توده میکروبی، با افزایش شوری کاهش می‌یابند (Aliasgharzad *et al.*, 2001; Wichern *et al.*, 2006; Barin *et al.*, 2013a; Barin *et al.*, 2015). با افزایش تنش شوری، اسیدهای چرب سیکلو پروپیل (cy17:0 و cy19:0) و اسیدهای چرب ترانس (16:1 ω 7t) افزایش می‌یابد (Kaur *et al.*, 2005) و نیز در تحقیقی نسبت اسید چرب نشانگر باکتری‌های گرم منفی به اسید چرب نشانگر باکتری‌های گرم مثبت و همچنین نسبت اسید چرب اشباع (بدون پیوند دوگانه) به اسید چرب با یک پیوند دوگانه افزایش یافت (Barin *et al.*, 2013a) (شکل ۶). آن‌ها بیان داشتند که احتمالاً به‌نظر می‌رسد که افزایش در اسیدهای چرب سیکلو پروپیل، ترانس و اشباع در غشاء، سبب سازگاری و افزایش مقاومت و پایداری نسبت به آن شرایط تنشی در میکروب می‌شود. بقای بیشتر باکتری‌های گرم منفی تحت شرایط تنش می‌تواند مربوط به حضور و وجود اسید چرب سیکلو در غشاء آن‌ها و لایه لیپوپلی ساکارید خارجی باشد که می‌تواند شرایط تنش را بهتر تحمل کنند (Kaur *et al.*, 2005) و نیز باکتری‌های گرم منفی فاقد اسیدهای چرب شاخه‌ای هستند اما محتوی مقدار زیادی اسیدهای چرب سیکلو پروپان، اشباع شده و اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه می‌باشند (Denich *et al.*, 2003; Barin *et al.*, 2013a).

او همچنین معتقد بود که برای هر گونه تغییر در اکوسیستم گیاهی نه تنها مدیریت جامعه گیاهی بلکه عکس‌العمل جامعه گیاهی و میکروارگانیسم‌ها هر دو مهم می‌باشند. Mubyana-John *et al.* (2007) نشان دادند که آتش‌سوزی سبب تغییر غالبیت جمعیت میکروبی از باکتری‌ها به قارچ‌ها و اکتینومیست می‌شود. آن‌ها بیان داشتند که اسید چرب فسفولیپید 18:2 ω 6,9 (نشانگر قارچ ساپروفیت) و 10Me16:0 (یکی از نشانگرهای اکتینومیست) افزایش یافت. تحقیقی در ۴۲ مکان در کالیفرنیا، روی چند نوع کاربری اراضی شامل مراتع و چمنزارهای طبیعی و مصنوعی، زمین‌های شخم‌خورده و زمین‌هایی با حداقل شخم، انجام شد. آن‌ها نشان دادند که بیشترین مقدار کربن، نیتروژن و زیست‌توده میکروبی (PLFAs) در چمنزارهای طبیعی وجود دارد. همچنین گزارش کردند که در یک نوع کاربری اراضی ساختار جوامع میکروبی به خصوصیات و عوامل مدیریتی وابسته می‌باشد (Steenwertha *et al.*, 2003). Hedlund (2002) نشان داد که پس از دو سال تغییر در مدیریت زمین‌های کشاورزی و کاشت گیاهان مرتعی و لگوم علوفه‌ای به‌جای گیاهان زراعی، جمعیت باکتری‌ها و قارچ‌های ساپروفیت افزایش یافته‌است و همچنین با اندازه‌گیری تنفس نشان داد که فعالیت میکروبی و زیست‌توده نیز افزایش یافته‌است.

با افزایش شوری اسید چرب نشانگر قارچ ساپروفیت و آرگوسترل افزایش می‌یابد (Wichern *et al.*, 2006). همچنین در بین اسیدهای چرب مختلف تشخیص داده شده، اسیدهای چرب 10Me16:0، 10Me17:0 و 10Me18:0 (به‌عنوان نشانگرهای اسید چرب اکتینومیست) و اسید چرب 16:1ω5 (به‌عنوان نشانگرهای قارچ‌ریشه) در خاک اطراف ریشه سالیکورنیا پایین‌ترین مقدار را داشتند. سهم هر یک از سه گروه اصلی اسید چرب (اشباع، اشباع شاخه‌ای و غیراشباع) برای خاک اطراف ریشه سه گیاه مختلف در شکل ۷ آمده است. سهم اسیدهای چرب اشباع شاخه‌ای در سالیکورنیا نسبت به دو گروه اسید چرب دیگر و همچنین نسبت به دو گیاه دیگر کمتر بود. بخشی از اسیدهای چرب اشباع شاخه‌ای ذکر شده مربوط به نشانگرهای اکتینومیست (10Me16:0، 10Me17:0 و 10Me18:0) و باکتری‌های گرم مثبت (i14:0، i15:0، i16:0 و a17:0) می‌باشند (Barin *et al.*, 2013a; Barin *et al.*, 2015). آن‌ها همچنین ساختار جمعیت میکروبی را در شورزارهای دشت تبریز به صورت زیر گزارش کردند: اکتینومیست‌ها > قارچ‌های ساپروفیت > باکتری‌های گرم مثبت > باکتری‌های گرم منفی

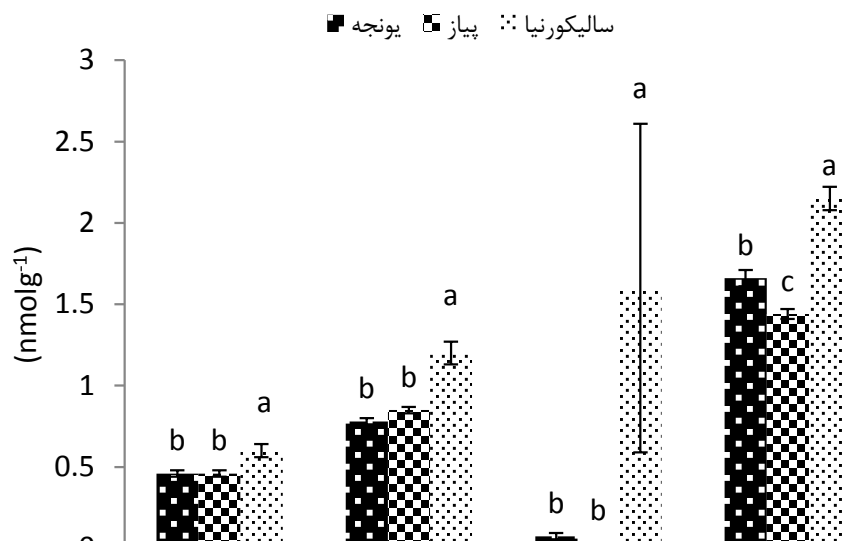
با افزایش شوری اسید چرب نشانگر قارچ ساپروفیت و آرگوسترل افزایش می‌یابد (Wichern *et al.*, 2006). همچنین در بین اسیدهای چرب مختلف تشخیص داده شده، اسیدهای چرب 10Me16:0، 10Me17:0 و 10Me18:0 (به‌عنوان نشانگرهای اسید چرب اکتینومیست) و اسید چرب 16:1ω5 (به‌عنوان نشانگرهای قارچ‌ریشه) در خاک اطراف ریشه سالیکورنیا پایین‌ترین مقدار را داشتند. سهم هر یک از سه گروه اصلی اسید چرب (اشباع، اشباع شاخه‌ای و غیراشباع) برای خاک اطراف ریشه سه گیاه مختلف در شکل ۷ آمده است. سهم اسیدهای چرب اشباع شاخه‌ای در سالیکورنیا نسبت به دو گروه اسید چرب دیگر و همچنین نسبت به دو گیاه دیگر کمتر بود. بخشی از اسیدهای چرب اشباع شاخه‌ای ذکر شده مربوط به نشانگرهای اکتینومیست (10Me16:0، 10Me17:0 و 10Me18:0) و باکتری‌های گرم مثبت (i14:0، i15:0، i16:0 و a17:0) می‌باشند (Barin *et al.*, 2013a; Barin *et al.*, 2015). آن‌ها همچنین ساختار جمعیت میکروبی را در شورزارهای دشت تبریز به صورت زیر گزارش کردند: اکتینومیست‌ها > قارچ‌های ساپروفیت > باکتری‌های گرم مثبت > باکتری‌های گرم منفی

خشکی و کمبود عناصر غذایی

تنش خشکی و کمبود عناصر غذایی در باکتری‌های *Pseudomonas aureofaciens* و

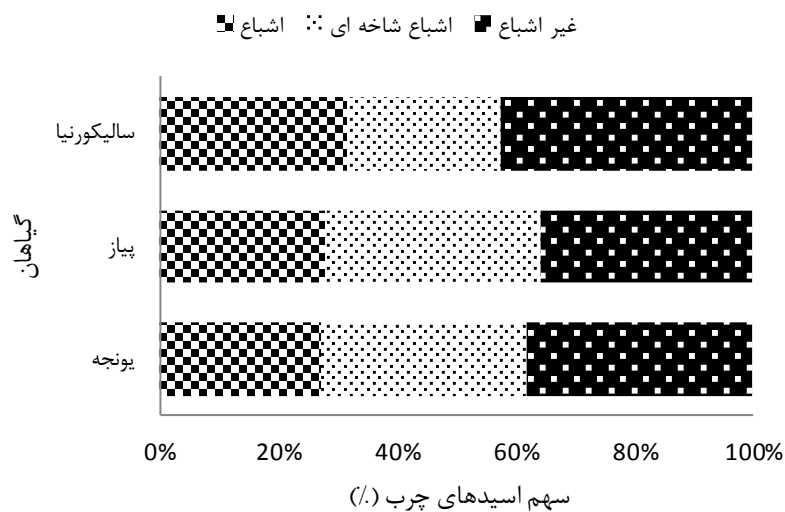
pH
 pH خاک از طریق تأثیر بر اسیدهای چرب، بر ترکیب جوامع میکروبی خاک مؤثر می‌باشد. در تحقیقی با افزایش pH خاک‌های جنگل (با افزودن خاکستر چوب و یا آهک) از حدود ۴ به حدود ۷ مشخص شد که مقدار اسید چرب 16:1ω5 (نشانگر قارچ‌ریشه) سه برابر افزایش یافت و همچنین اسیدهای چرب i14:0، i16:0، i15:0، i16:0 و a17:0 (Barin *et al.*, 2013a; Barin *et al.*, 2015). آن‌ها همچنین ساختار جمعیت میکروبی را در شورزارهای دشت تبریز به صورت زیر گزارش کردند: اکتینومیست‌ها > قارچ‌های ساپروفیت > باکتری‌های گرم مثبت > باکتری‌های گرم منفی

با افزایش pH، باکتری‌های گرم منفی افزایش و گرم مثبت کاهش، قارچ‌ها بدون تغییر و اکتینومیست‌ها افزایش یافتند (Frostegård *et al.*, 1993).



شکل ۶- مقایسه میانگین شاخص‌های تنش‌های در خاک اطراف ریشه سه گیاه یونجه، پیاز و سالیکورنیا (Barin et al., 2013a).

Figure 6- The means of stress indices in soil around the root three plants of alfalfa, onion and Salicornia (Barin et al., 2013a).



شکل ۷- سهم هریک از اسیدهای چرب اشباع، اشباع شاخه‌ای و غیر اشباع در خاک اطراف گیاهان یونجه، پیاز و سالیکورنیا (Barin et al., 2013a).

Figure 7- Proportion of fatty acids divided into saturated, branched and unsaturated soil around the roots of plants of alfalfa, onion and Salicornia (Barin et al., 2013a).

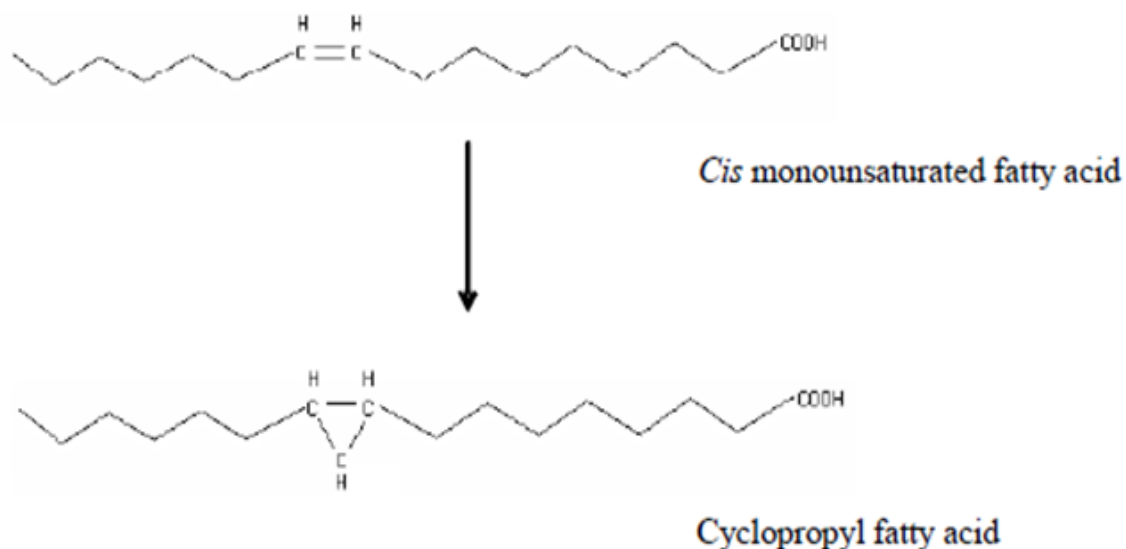
مثبت با اسید چرب فسفولیپید متیل و سیکلو همبستگی داشت این موضوع نشان می‌دهد که یکی از سازوکار مقاومت و سازگاری میکروب‌ها تبدیل اسید چرب سیس به سیکلو می‌باشد (Córdova-Kreylos *et al.*, 2006) (شکل ۸).

تاثیر آلودگی Zn بر ساختار جامعه میکروبی خاک جنگلی با مواد هوموسی بالا و یک خاک زراعی در یک دوره ۱۸ ماهه با استفاده از اسید چرب فسفولیپیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. خاک‌ها با ۱۰ غلظت مختلف (۰-۲۵۶ میلی‌مول بر کیلوگرم وزن خشک) از Zn آلوده شده و در ۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. الگوی اسید چرب فسفولیپید در چهار مرحله (بعد از دو هفته و بعد از ۲، ۶ و ۱۸ ماه) تعیین شد مقدار اسید چرب 16:1ω5 با افزایش آلودگی Zn و انکوباسیون کاهش نشان داد. نسبت اسید چرب فسفولیپید 16:1ω7t (ترانس) به 16:1ω7c (سیس) به‌عنوان شاخص گرسنگی در خاک جنگل با زیاد شدن آلودگی Zn، افزایش و با انکوباسیون کاهش یافت به‌نظر می‌رسد که تحت شرایط تنشی برای سازگاری بیشتر اسید چرب سیس به ترانس تبدیل می‌شوند (شکل ۹) به‌طور کلی مقدار کل اسید چرب فسفولیپید بعد از ۱۸ ماه کاهش یافت (Frostegård *et al.*, 1996).

در تحقیقی دیگر روی اسیدی شدن مراتع در جنوب سوئد، دریافتند که اسید چرب نوترال-لیپید 16:1ω5 به‌عنوان نشانگر قارچ‌ریشه آربوسکولار رابطه معنی‌دار با pH در لایه سطحی (۲۰-۱۰ سانتیمتر) نداشت هرچند در لایه پایین-تر (۳۰-۲۰ سانتیمتر) یک رابطه مثبت بین pH و اسید چرب خشی 16:1ω5 بدست آمد (Aliasgharzad *et al.*, 2010).

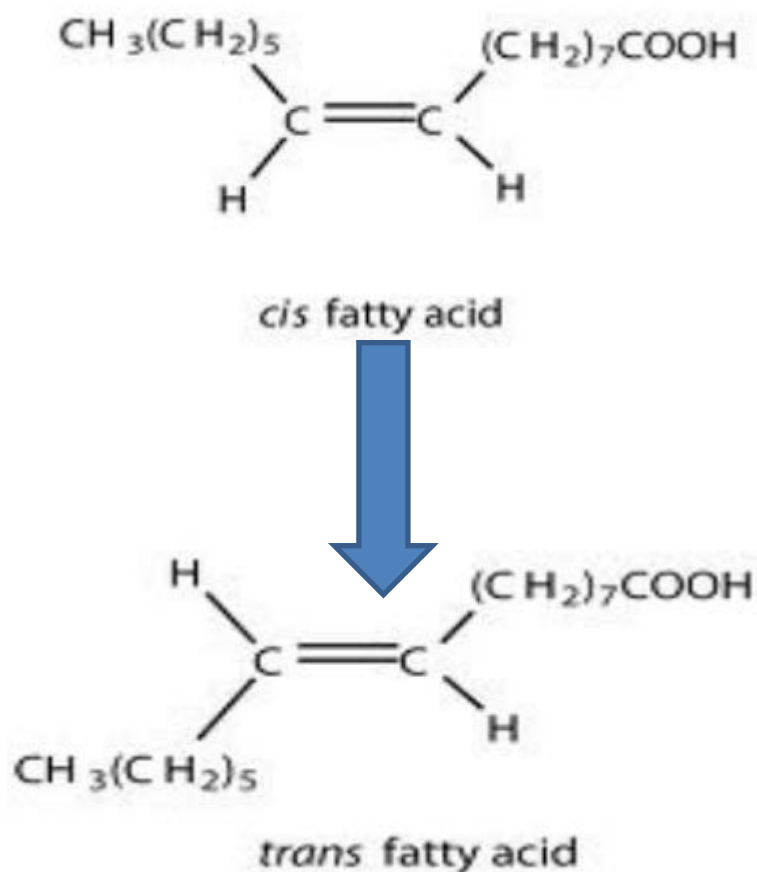
غلظت بالای عناصر سنگین

تحقیقات زیادی در مورد غلظت بالای عناصر سنگین مثل Ni, Zn, Pb, Cu, Cd و As بر زیست‌توده و ساختار جوامع میکروبی خاک صورت گرفته و نتایج جالب و درخور توجه بدست آمد (Frostegård *et al.*, 1993, 1996; Kelly *et al.*, 1999; Aliasgharzad *et al.*, 2011; Rahmanian *et al.*, 2011, 2012; Molaei *et al.*, 2012; Kazemalilou *et al.*, 2013). با افزایش غلظت عناصر سنگین در خاک، مقدار نسبی اسیدهای چرب 18:0, 17:0, 16:0, 16:1 و 16:1 افزایش یافت هرچند اسید چرب 20:4 و 18:2ω6,9 (اسید چرب قارچ-ها) کاهش نشان داد. این نشان می‌دهد که قارچ‌ها به آلودگی عناصر سنگین حساس‌تر هستند و نیز نسبت قارچ به باکتری با افزایش آلودگی کاهش نشان داد (Pennanen *et al.*, 1996) ولی غلظت-های بالاتر عناصر سنگین (Cu و Pb, Cd) به‌طور



شکل ۸ - تبدیل اسید چرب سیس به اسید چرب سیکلو پروپیل (Kaur *et al.*, 2005).

Figure 8- Conversion of cis fatty acids to fatty acid cyclopropyl (Kaur *et al.*, 2005).



شکل ۹ - تبدیل اسید چرب سیس به اسید چرب ترانس.

Figure 9- Conversion of cis fatty acids to fatty acid trans.

اکتینومیست) افزایش در صورتی که در خاک زراعی آلوده به فلز سنگین اسیدهای چرب فسفولیپید شاخه‌ای 10Me16:0 و 10Me18:0 در اکثر فلزات سنگین کاهش یافت. اسیدهای چرب فسفولیپید باکتریایی 15:0 و 17:0 در اکثر خاک-های زراعی آلوده به عناصر سنگین افزایش یافت در حالی که آن‌ها در خاک جنگلی تحت تاثیر قرار نگرفتند. اسید چرب فسفولیپید 18:2ω6,9 (به عنوان نشانگر قارچ‌های ساپروفیت) در خاک زراعی (بجز آلودگی مس) افزایش یافته در حالی- که در خاک جنگلی کاهش نشان داد (Frostegård *et al.*, 1993).

شرایط غرقابی

تحت شرایط غرقاب، اسید چرب فسفولیپید 18:2ω6,9 به عنوان نشانگر قارچ ساپروفیت بطور معنی‌دار کاهش ولی اسید چرب فسفولیپید نشانگر باکتری‌های گرم‌مثبت افزایش نشان می‌داد در صورتی که بر نشانگرهای مربوط به شاخص‌های تنشی (سیکلوپروپیل و نسبت ترانس به سیس) تاثیر معنی‌دار نداشت (Bossio & Scow 1998). مدت زمان اشباع نیز می‌تواند در گروه‌های میکروبی غالب مؤثر باشد به طوری که Langer & Rinklebe (۲۰۰۹) دو خاک یوتریک گلایسول^۱ را با مقدار مواد آلی بالا به ترتیب به صورت طولانی مدت و کوتاه مدت اشباع نموده، و گزارش کردند که نشانگر قارچ ساپروفیت (18:2ω6,9) در خاک‌های یوتریک

تحقیق دیگری در غلظت بالای Zn (کاربرد ۶۰۰۰ میلی‌گرم Zn در کیلوگرم خاک) بر جمعیت میکروبی با روش‌های شمارش کلنی (باکتری‌های قابل کشت)، زیست‌توده میکروبی (تدخین با کلروفرم)، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم دهیدروژناز و اسید چرب فسفولیپید بعد از ۴۲۰ روز انکوباسیون نشان داد که فعالیت آنزیم دهیدروژناز ۹۳ درصد کمتر از شاهد، اسید چرب فسفولیپید باکتریایی و قارچ‌ریشه کاهش ولی قارچ ساپروفیت افزایش یافت. باکتری‌های قابل کشت ۸۷ درصد کاهش و زیست‌توده میکروبی (روش تدخین) ۴۷ درصد کاهش یافت (Kelly *et al.*, 1999). در مطالعات دیگر پروفیل اسید چرب فسفولیپیدی در یک خاک هوموسی جنگلی و یک خاک زراعی آلوده شده به Pb, Ni, Cu, Cd و Zn در غلظت‌های متفاوت بررسی شد. در هر دو خاک تغییر تدریجی در الگوی اسید چرب فسفولیپیدی در سطوح غلظت عناصر سنگین مشاهده شد. تغییرات در خاک جنگلی برای همه فلزات یکسان بودند ولی در خاک زراعی برای هر فلز مختلف بود. در هر دو خاک اسیدهای چرب فسفولیپید ایزو شاخه‌ای (i15:0 و i17:0) و اسیدهای چرب فسفولیپیدی با یک پیوند دوگانه (16:1ω5 و 16:1ω7) کاهش در حالی که اسید چرب i16:0 و اسیدهای چرب شاخه‌ای br17:0 و br18:0 و اسید چرب سیکلوپروپان cy17:0 افزایش نشان داد. در خاک جنگلی آلوده به فلز سنگین اسیدهای چرب فسفولیپید شاخه‌ای 10Me16:0، 10Me17:0 و 10Me18:0 (نشانگر

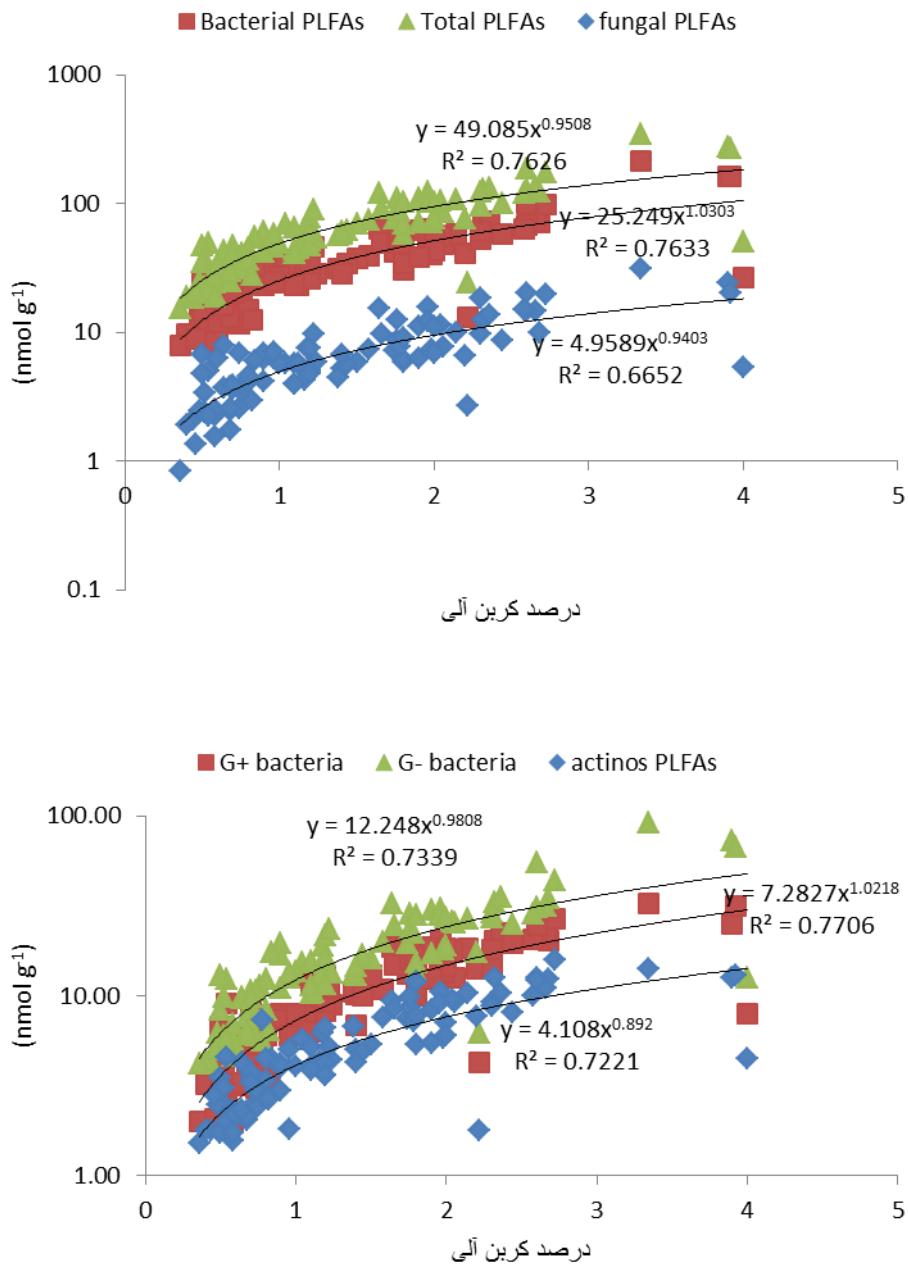
¹ Eutric Gleysol

کنند و برای تولید این ترکیبات نیاز به مقدار زیادی انرژی دارند که این انرژی را از مواد آلی کسب می‌کنند (Oren *et al.*, 1999; Hoyle *et al.*, 2008; Barin *et al.*, 2013a). این میکروارگانیسم‌ها که در محیط‌های شور تکامل یافته‌اند قادرند بر اثرات مخرب غلظت بالای نمک غلبه کنند. زیرا ترکیبات داخل سلولی، آنزیم‌ها، ریبوزوم‌ها، غشاء و ... به روش‌های مختلف تغییر می‌یابند تا بتوانند شرایط سخت را تحمل کنند (Zahran, 1997). با افزایش کربن آلی، اسیدهای چرب فسفولیپید مربوط به باکتری-ها، قارچ‌های ساپروفیت، اکتینومیست نیز افزایش یافته و همبستگی بالایی با همه و یا اکثر گروه-های میکروبی دارا می‌باشد (شکل ۱۰ الف و ب). همچنین با بررسی تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان دادند که کربن آلی، Total PLFA، Actino Bactria PLFA، Fungal PLFA، PLFA، G+ PLFA و G- PLFA دارای ضرایب مثبت بزرگ بودند علامت ضرایب عاملی جهت رابطه بین عامل و متغیر را نشان می‌دهد. بنابراین انتظار می‌رود دو متغیر با ضرایب عاملی بالا و علامت همسان در یک عامل، همبستگی مثبت با همدیگر داشته باشند (Barin *et al.*, 2013a).

گلایسول در اشباع طولانی مدت ده برابر بدست آمد. نتایج آن‌ها نشان داد که شرایط محیطی اشباع طولانی مدت (سیلاب و شرایط بدون اکسیژن) برای قارچ‌ها بیشتر مضر می‌باشد.

مواد آلی خاک

عامل اصلی کنترل‌کننده جمعیت میکروبی در خاک، کربن آلی است زیرا عموماً قابلیت دسترسی کربن آلی، تولیدات میکروبی را محدود می‌کند. Kang (۲۰۰۵) معتقد بود که کربن آلی نه فقط به‌عنوان یک ماده غذایی برای رشد میکروارگانیسم‌ها محسوب می‌شود بلکه در تعدیل شرایط محیطی خاک همچون شوری نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند. بیشترین جمعیت میکروبی (PLFA کل) همچنین بیشترین جمعیت اسیدهای چرب نشانگر باکتری‌ها و قارچ‌های ساپروفیت (حتی بیشتر از اراضی زراعی مجاور) در لجن اطراف دریاچه ارومیه بدست آمد (Barin *et al.*, 2013a). نتایج برخی محققان نشان داد که مواد آلی می‌توانند تحمل به شوری را در میکروب‌ها افزایش دهند زیرا میکروب‌ها برای مقابله با تنش شوری، اقدام به سنتز و تولید ترکیبات تنظیم‌کننده فشار اسمزی (ترکیبات آلی مثل گلوتامین، پرولین، گلايسين، بتائين و ...) می‌



شکل ۱۰-الف و ب رابطه درصد کربن آلی خاک با مقدار گروه‌های میکروبی (Barin *et al.*, 2013a).

Figure 10-A and B, Relation of soil organic carbon percentage and the amount of microbial groups (Barin *et al.*, 2013a).

عمق

با افزایش عمق، ساختار جامعه میکروبی تغییر می‌کند و همچنین نسبت سیکلوپروپیل به پیش ماده منوانوئیک و کل اسید چرب اشباع به اسید چرب با یک پیوند دوگانه با افزایش عمق افزایش می‌یابد. میکروب‌هایی که در لایه‌های پایین‌تر زیست می‌کنند نسبت به میکرب‌های لایه سطحی منابع کربن محدودتری دارند. از طرف دیگر نشانگرهای زیستی اسید چرب فسفولیپید گروه‌های مختلف میکروبی نشان داد که فراوانی نسبی باکتری‌های گرم‌مثبت و اکتینومیست با

افزایش عمق زیاد می‌شوند در حالی که فراوانی نسبی باکتری‌های گرم‌منفی و قارچ‌ها و پروتوزوا در سطح بیشتر از عمق بود (Fierer *et al.*, 2003).

در بررسی اسید چرب فسفولیپیدی در خاک‌های پادزولی جنگل‌های کاج سیبری روشن شد که زیست‌توده میکروبی در لایه یک متری خاک با افزایش عمق به تدریج کاهش پیدا می‌یابد. ضریب شباهت ساختار اسید چرب در خاک‌های جنگلی و غیر جنگلی همان محل ۰/۸۵ بود (Evgrafova *et al.*, 2008).

منابع

- Aliasgharzad N, Molaei A, Oustan S (2011). Pollution induced community tolerance (PICT) of microorganisms in soil incubated with different levels of Pb. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 60:1189-1193.
- Aliasgharzad N, Saleh Rastin N, Towfighi H, Alizadeh A (2001). Occurrence of AMF in saline soils of the Tabriz Plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. *Mycorrhiza* 11: 119-122.
- Aliasgharzad N, Hajiboland R, Olsson PA (2011). Lack of arbuscular mycorrhizal colonisation in tea (*Camellia sinensis* L.) plants cultivated in Northern Iran. *Symbiosis* 55:91-95.
- Aliasgharzad N, Mårtensson LM, Olsson PA (2010). Acidification of a sandy grassland favours bacteria and disfavours fungal saprotrophs as estimated by fatty acid profiling. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1058-1064.
- Allison VJ, Miller RM, Jastrow J D, Matamala R, Zak DR (2005). Changes in soil microbial community structure in tall grass prairie chronosequence. *Soil Science Society of America Journal* 69: 1412-1421.
- Aslani Z, Hassani A, Rasouli-Sadaghiani MH, Sefidkon F, Barin M (2011). Effect of two arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*) on growth, chlorophyll content and phosphorus uptake by basil (*Ocimum basilicum*) under drought stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research* 27: 471-486.
- Aslani Z, Hassani A, Rasouli-Sadaghiani MH, Sefidkon F, Barin M, Gheibi SA (2009). Effect of Arbuscular mycorrhizal fungi on some physiological parameters of Basil (*Ocimum basilicum*) under drought stress. *Environmental Stresses in Agricultural Sciences* 2: 109-118.

- Baath E, Diaz-Ravina M, Frostegard A, Campbell CD (1998). Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 238–245.
- Barin M, Rasouli Sadaghiani MH, RezaeiDanesh Y (2010). The effect of using organic matter and sulfur on decreasing chemical fertilizer application according to sustainable agriculture. *International Soil Science Congress on “Management of Natural Resources to Sustain Soil Health and Quality”*. May 26-28, 2010 Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey.
- Barin M, Aliasgharзад N, Olsson PA, Moghaddam M, Rasoli-Sadaghiani MH (2013a). Assessing microbial community structure influenced by salinity and plant type by in cultivated soils and salt marshes of the Tabriz plain, using lipid biomarkers. Ph.D Thesis. Tabriz’S University, Tabriz, Iran.
- Barin M, Aliasgharзад N, Olsson PA, Moghaddam M, Rasoli-Sadaghiani MH (2013b). Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil salinity around Lake Urmia in northern Iran analyzed by use of lipid biomarkers and microscopy. *Pedobiology* 56: 225-232.
- Barin M, Aliasgharзад N, Olsson PA, Moghaddam M, Rasoli-Sadaghiani MH (2015). alinity-induced differences in soil microbial communities around the hypersaline Lake Urmia. *Soil Research* 53: 494–504.
- Barin M, Aliasgharзад N, Rasoli-Sadaghiani MH, Mohayegi M, Pouryosof H, Heydari-Rikani M (2014a). Assessing AM fungi using lipid biomarkers. 13th Iranian Soil Science Congress. Jan. 28-30, 2014. Shahid Chamran University of Ahvaz.
- Barin M, Aliasgharзад N, Rasoli-Sadaghiani MH, Mohayegi M, Pouryosof H, Heydari-Rikani M (2014b). Assessing soil microbial community structure influenced by using phospholipid fatty acid profiles . 13th Iranian Soil Science Congress. Jan 28-30, 2014. Shahid Chamran University of Ahvaz.
- Barin M, Aliasgharзад N, Samadi A (2006a). Effects of NaCl-induced and salts mixture salinity on leaf proline and growth of tomato in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. *Iranian Journal of Agriculture Science* 37: 139-147.
- Barin M, Aliasgharзад N, Samadi A (2006b). Influence of mycorrhization on the mineral nutrition and yield of tomato under sodium chloride and salts mixture induced salinity levels. *Iranian Journal of Soil Research* 20: 94-105.
- Barin M, Aliasgharزاده N, Samadi A, Rasouli Sadaghiani MH (2008). Effects of rbuscular mycorrhizal fungi on mineral composition and yield of tomato under salinity condition, EUROSOIL, Aug. 25-29, 2008. Vienna, Austria.
- Bing-Ru L, Guo-Mei J, Jian C, Gang W (2006). A Review of Methods for Studying Microbial Diversity in Soils. *Pedosphere* 16: 18-24.
- Boschker HTS, Middelburg JJ (2002). Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 40: 85-95.
- Bossio DA, Scow KM (1998). Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbial Ecology* 35: 265–278.
- Cardon ZG, Gage DJ (2006). Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 459–488.
- Carney KM, Matson PA (2005). Plant communities, soil microorganisms, and soil carbon cycling: Does altering the world belowground matter to ecosystem functioning? *Ecosystems* 8: 928–940.
- Córdova-Kreylos AL, Cao Y, Green PG, Hwang HM, Kuivila KM, Lamontagne MG, Van De Werfhorst LC, Holden PA, Scow KM (2006). Diversity, Composition, and

- Geographical Distribution of Microbial Communities in California Salt Marsh Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3357-3366.
- Cordovilla MDP, Liger F, Lluch C (1999). Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *Applied Soil Ecology* 11: 1-7.
- DeGroot SH, Classens VP, Scow KM (2004). Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1427-1435.
- Denich TJ, Beaudette LA, Lee H, Trevors JT (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal Microbiology Methods*, 52: 149-182.
- Edlund A, Nichols PD, Roffey R, White DC (1985). Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxyl acid profiles from *Desulfovibrio* species. *Journal Lipid Research* 26: 982-988.
- Evgrafova SY, Santruckova H, Shibistova OB, Elhottova D, Cerna B, Zrazhevskaya G K, Lloyd D (2008). Phospholipid Fatty Acid Composition of Microorganisms in Pine Forest Soils of Central Siberia. *Biology Bulletin* 35: 452-458.
- Fierer N, Schimel JP, Holden PA (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 167-176.
- Frostegård A, Baath E, Tunlid A (1993). Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 723-730.
- Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E (2011). Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 1621-1625.
- Frostegård A, Bååth E (1996). The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility Soils* 22: 59-65.
- Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E (1993). Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3605-3617.
- Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E (1991). Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods* 14: 151-163.
- Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, van Elsas JD (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 38: 1-15.
- Green CT, Scow KM (2000). Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeology Journal* 8:126-141.
- Griffiths BS, Heckmann LH, Caul S, Thompson J, Scimgeor C, Krogh PH (2007). Varietal effects of eight paired lines of transgenic Bt maize and near-isogenic non-Bt maize on soil microbial and nematode community structure. *Plant Biotechnology Journal* 5: 60-68.
- Guckert JB, Hood MA, White DC (1986). Phospholipids esterlinked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 794-801.
- Hajiboland R, Aliasghar zad N, Mehrfar Z (2004). Ecological study of *Azotobacter* in two pastureland of the north-west Iran and its inoculation effect on growth and mineral nutrition of wheat plants. *Journal of Science & Technology in Agriculture & Natural Resources* 8:75-90.
- Hedlund K (2002). Soil microbial community structure in relation to vegetation management on former agricultural land. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1299-1307.

- Hill GT, Mitkowski NA, Aldrich-Wolfe L, Emelea LR, Jurkonie DD, Ficke A, Maldonado-Ramirez S, Lynch ST, Nelson EB (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15: 25–36.
- Hoyle F, Murphy D, Brookes P (2008). Microbial response to the addition of glucose in low-fertility soils. *Biology and Fertility Soils* 44: 571-579.
- Kaiser C, Frank A, Wild B, Koranda M, Richter A (2010). Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2 ω 6,9 and 18:1 ω 9. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1650-1652.
- Kang S (2005). Spatial structures of soil microbial communities and their Controlling factors. A Dissertation of Degree of Doctor of Philosophy. Faculty of Environmental Sciences, University of Virginia.
- Kaur A, Chaudhary A, Kaur A, Choudhary R, Kaushik R (2005). Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science India*. 89: 1103-1112.
- Kazemalilou S, Rasouli Sadaghiani, MH, Khodaverdiloo, H. Barin M (2013). Soil cd contamination and evaluation of it's effects on soil biological quality and plant growth. *Soil applied research* 1:24-40.
- Kelly JJ, HaÈggbloom M, Tate RL. (1999). Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1455-1465.
- Kerger B, Nichols PD, Antworth CP, Sand W, Bock E, Coks JC, Langworthy TA, White DC (1986). Signature fatty acids in the polar lipids of acid-producing Thiobacilli: methoxy, cyclopropyl, alpha-hydroxy-cyclopropyl and branched and normal monoenoic fatty acids. *FEMS Microbiology Ecology* 38: 67-77
- Kieft TL, Wilch E, Oconnor K, Ringelberg DB, White DC (1997). Survival and phospholipid fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1531–1542.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomoms JN, Lee H, Trevors T (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58: 169-188.
- Kucera JM, Dick RP (2008). PLFA profiling of microbial community structure and seasonal shifts of a Douglas-fir chronosequence. *Microbial Ecology* 55: 500–511.
- Langer U, Rinklebe J (2009). Lipid biomarkers for assessment of microbial communities in floodplain soils of the elbe river (Germany). *Wetlands* 29: 353–362.
- Molaei A, Aliasghar zad N, Oustan S (2012). Effect of different Pb levels on bacterial and fungal populations during soil incubation. *Water and Soil Science* 22: 173-182.
- Mubyana-John T, Wutor VC, Yeboah SO, Ringrose S (2007). Fire and its influence on microbial community structure and soil biochemical properties in the Okavango Delta, Botswana. *Scientific Research Essays* 2: 47-54.
- Olsson PA, Rahm J, Aliasghar zad N (2010). Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses is linked to carbon costs and phosphorus benefits. *FEMS Microbiology Ecology* 72: 125-131.
- Olsson PA (1999). Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 303-310.
- Oren A (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular. Biological reviews* 63: 334-348.
- Pennanen T, Frostegård Å, Fritze H, Bååth E (1996). Phospholipid Fatty Acid Composition and Heavy Metal Tolerance of Soil Microbial Communities along Two Heavy Metal-Polluted Gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 420–428.

- Piotrowska-Seget Z, Mroziak A (2003). Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms. *Journal of Environmental Studies* 12: 669-675.
- Poormazaheri H, Salehi Jouzani Gh, Khayam nekoui SM, Tabatabaei M, Maali Amiri R, Soheilvand S, Karimi E, Ghanavati H, Mirdamadian SH (2013). Evaluation of Some Native Bacteria Isolated From Composting Process. *Iranian Journal of Agricultural Biotechnology* 5:1-11.
- Powlson DS, Brookes PC, Christensen BT (1987). Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 159-164.
- Rahmanian M, Khodaverdiloo H, Rasouli Sadaghiani MH, Rezaee Danesh Y Barin M (2011). Consequence of Heavy Metal-Resistant Soil Microbes inoculation on growth as well as Pb and Cd Uptake of three pasture plants. *Journal Science and Technology of Agriculture and Natural Resources. Water and Soil Science* 15: 187-197.
- Rahmanian M, Rezaee Danesh Y, Khodaverdiloo H, Rasouli Sadaghiani MH, Barin M (2012). Potential of indigenous microbes as helping agents for phyto-restoration of a Pb-contaminated soil. *Caspian Journal of Environmental Sciences* 10: 247-255
- Ramsey PW, Rillig MC, Feris KP, Holben WE, Gannon JE (2006). Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia* 50: 275-280.
- Rasouli-Sadaghiani MH, Hassani A, Barin M, Rezaee Danesh Y, Sefidkon F (2010). Effects of AM fungi on growth, essential oil production and nutrients uptake in basil. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4: 2222-2228.
- Russell NJ (1995). Psychrotrophy and adaptation to low temperatures: microbial membrane lipids. *Proceedings of the 19th International Congress on Refrigeration. Workshop Refrigeration and Microbiology: Health, Food, Drinks and Flowers*, vol. 1, pp. 359-365.
- Saleh-Rastin N, (2005). Sustainable management from the soil biological perspective. Necessity of industrial production of biological fertilizers in the country. *Sana, Tehran, Iran*. 2: 5-31.
- Sarikhani MR, Malboobi MA, Ebrahimi M (2014). Phosphate solubilizing bacteria: Isolation of Bacteria and Phosphate Solubilizing Genes, Mechanism and Genetics of Phosphate Solubilization. *Iranian Journal of Agricultural Biotechnology* 6:77-110.
- Shahbazi F, Aliasgharzad N, Ebrahimzad SA, Najafi N (2013). Geostatistical analysis for predicting soil biological maps under different scenarios of land use. *European Journal of Soil Biology* 55:20-27.
- Steenwertha KL, Jackson LE, Calderon FJ, Stromberg MR Scow KM (2003). Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 489-500.
- Velasco AG, Probanza A, Mañero FJG, Solano BR Lucas JA (2010). Characterization of the rhizosphere microbial community from different *Arabidopsis thaliana* genotypes using phospholipid fatty acids (PLFA) analysis. *Plant and Soil* 329: 315-325
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304: 1629-1633.
- Wichern J, Wichern F, Joergensen Rg (2006). Impact of salinity on soil microbial communities and the decomposition of maize in acidic soils. *Geoderma*, 137: 100-108.
- Zahrani HH (1997). Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils* 25: 211-223.
- Zak DR, Holmes WE, White DC (2003). Plant diversity, soil microbial communities and ecosystem function: Are there any links?. *Ecology* 84: 2042-2050.

- Zelles L (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopoly-saccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29: 111 –129.
- Zornoza R, Guerrero C, Mataix-Solera J, Scow KM, Arcenegui V, Mataix-Beneyto, J (2009). Changes in soil microbial community structure following the abandonment of agricultural terraces in mountainous areas of Eastern Spain. *Applied Soil Ecology* 42: 315–323.

Using of lipid biomarkers for assessing soil microbial community structure

Barin M.^{1*}, Aliasgharzad N.², Rasoli-Sadaghiani M.H.³

¹Assistant Professor, Urmia University, Urmia, Iran.

²Professor, Tabriz University, Tabriz, Iran.

³Associate Professor, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

The ecological balance of microbial community (MC) is very important as an index of soil ecosystem health due to the pivotal and vital roles of MC. Microbial culture methods are suitable for this purpose because the majority of soil microorganisms unable to grow on synthetic media. DNA- based molecular analyses just provide microbial diversity data. Then a rapid method for the assessment of soil microbial community structure is using phospholipid fatty acid (PLFA) patterns (because they are degraded rapidly after cells death, by the action of phosphatases). Moreover, PLFA provide broad information dealing with microbial diversity, biomass and their nutritional - physiological status. Certain and specific PLFAs, viz. trans/cis ratio (monounsaturated fatty acids (16:1w7t) to 16:1w7c), cy/pre ratio (cyclopropyl (cy17:0 + cy19:0) fatty acids to precursor (16:1ω7+18:1ω7) fatty acids, S/M ratio (saturated to monosaturated fatty acids), G-/G+ ratio (Gram negative bacteria to Gram positive bacteria fatty acids), F/B ratio (saprophytic fungi to bacterial fatty acids) were able as indicators of physiological or nutritional status in different environmental conditions, such as heavy metals polluted soils, changes in pH, depth changes drought, salinity, different agricultural managements and flooding are used for evaluation of soil microbial communities. The method of PLFA analysis in soil and determining microbial diversity, biomass and their physiological status are addressed here.

Keywords: *PLFA, environmental stresses, environmental assessment, signature fatty acids, microbial community structure.*

* Corresponding Author: Barin M.

Tel: 09141472433

Email: barin.mohsen@yahoo.com