

A talaj-mikrobióta vizsgálata foszfolipidek alapján II. A foszfolipidek kémiai analízise

A kémiai analitika az elválasztások tudománya. A biokémiai markerek – így a foszfolipidek – vizsgálata kivonás (extrakció), elkülönítés (izoláció) és elválasztás (szeparáció) lépései révén valósulhat meg. Talajból a lipidek kivonása legtöbbször a talaj-homogenizációt követő módosított (WHITE et al., 1979) egyfázisú Bligh–Dyer módszerrel (lipidek víztartalmú mintákból való kinyerésére fejlesztett extrakciós eljárás: BLIGH & DYER, 1959) történik. Az extrakció azon alapul, hogy a kloroform elegyedik a vízzel metanol segédoldószer megfelelő mennyisége mellett: a kloroform–foszfát-puffer–metanol 5:4:10 arányú elegye egy fázist alkot. Az extrakciót követően kloroform és víz hozzáadásával két fázisra oszló elegy kloroformos fázisában koncentrálnak a neutrális, gliko-, foszfo-, éter- (stb.) lipidek. FROSTEGÅRD és munkatársai (1991) különböző extrakciós pufferek alkalmazásakor, eltérő extrakciós és feltárási idő mellett, a vizsgált talaj és a feltárt lipidek mennyiségének változtatásával tesztelték a módszert. Vizsgálataik alapján a lipidekből a lipid-foszfát kinyerhető mennyiségét az extrakció során alkalmazott puffer milyensége nagyban meghatározza. A nátrium-citrát-puffer (0,15M, pH=4,0) használatával nagyobb mennyiségű lipid-foszfát volt extrahálható, mint a nátrium-acetát- (0,15M, pH=4,0), Tris- (0,15M, pH=7,5) vagy kálium-foszfát-puffer (0,05M, pH=7,4), illetve víz esetében. Kivételt képeztek a kis szervesanyag-tartalmú homoktalajok, ahol citrát- és foszfát-puffer alkalmazása ugyanazt az eredményt mutatta. Ez rávilágít arra, hogy a lipid-foszfát mennyisége, függ ugyan a lipidextrakció során használt puffertől, de kevésbé meghatározó, mint a vizsgált talaj szervesanyag-tartalma. NIELSEN és PETERSEN (2000) a kálium-foszfát-puffernél (0,05M, pH=7,4) a nátrium-citrát-puffert (0,15M, pH=4,0) nyolc talaj közül kettőnél találták hatékonyabbnak, függetlenül a talajok pH-jától, ugyanakkor a citrát-puffer esetében magasabb interferáló humuszsav-mennyiséget tapasztaltak. A kloroform a legtöbb esetben hatékonyabb kivonószernek bizonyult a kevésbé toxikusnak tartott diklór-metánnál. Bár a különböző kivonási módszerek között jelentős hatékonyságbeli eltérések nem tapasztalhatók, különböző kivonószerrel kapott eredmények összevetésénél az eltérő hatékonyság okozta hibát figyelembe kell venni.

Az elkülönített fázist szűrőpapíron, kovaföldön át szűrik, majd víztelenítik. Az egyfázisú elegy extrakciója rázatással, ultrahangos kezeléssel, gyorsított oldószeres eljárással (ASE: accelerated hot solvent extractor) segíthető elő. Utóbbinál automatizált technikával változatlan kinyerési hatékonyság mellett lényeges idő- és munkamegtakarítás érhető el (MACNAUGHTON et al., 1997). Itt említjük meg azt a lehetőséget, hogy az ismertett lipidextrakcióval egyben szerves szennyezők (például poliaromás szénhidrogének: PAH) is extrahálhatók és elkülönítve analizálhatók ugyanabból a mintából,

megfelelő kinyerési hatékonyság mellett (FANG & FINDLAY, 1996). A lipidextrakció maradék vizes-metanolos fázisából lipopoliszaccharidok és nukleinsavak nyerhetők ki (KEHRMEYER et al., 1996). A költség- és munkahatékonyság növelése mellett fontos megemlíteni, hogy így nemcsak az átlagértékek, hanem ugyanazon mintából különböző vizsgálatokkal kapott egyedi adatok statisztikai összevetésére is lehetőség nyílik.

Lipid-extraktumból a foszfolipidek kvantitatív meghatározása történhet (1. ábra):

1. a foszfolipidek oszlopkromatográfiás elválasztását követően a foszfolipid-foszfát spektrofotometriás meghatározásával,
2. oszlopkromatográfiás elválasztást követően az átészterésített foszfolipid-zsírsavak gázkromatográfiás (GC) analizisével,
3. folyadékkromatográf/electrospray ionizáció/tömegspektrométer (HPLC/ESI/MS) segítségével.

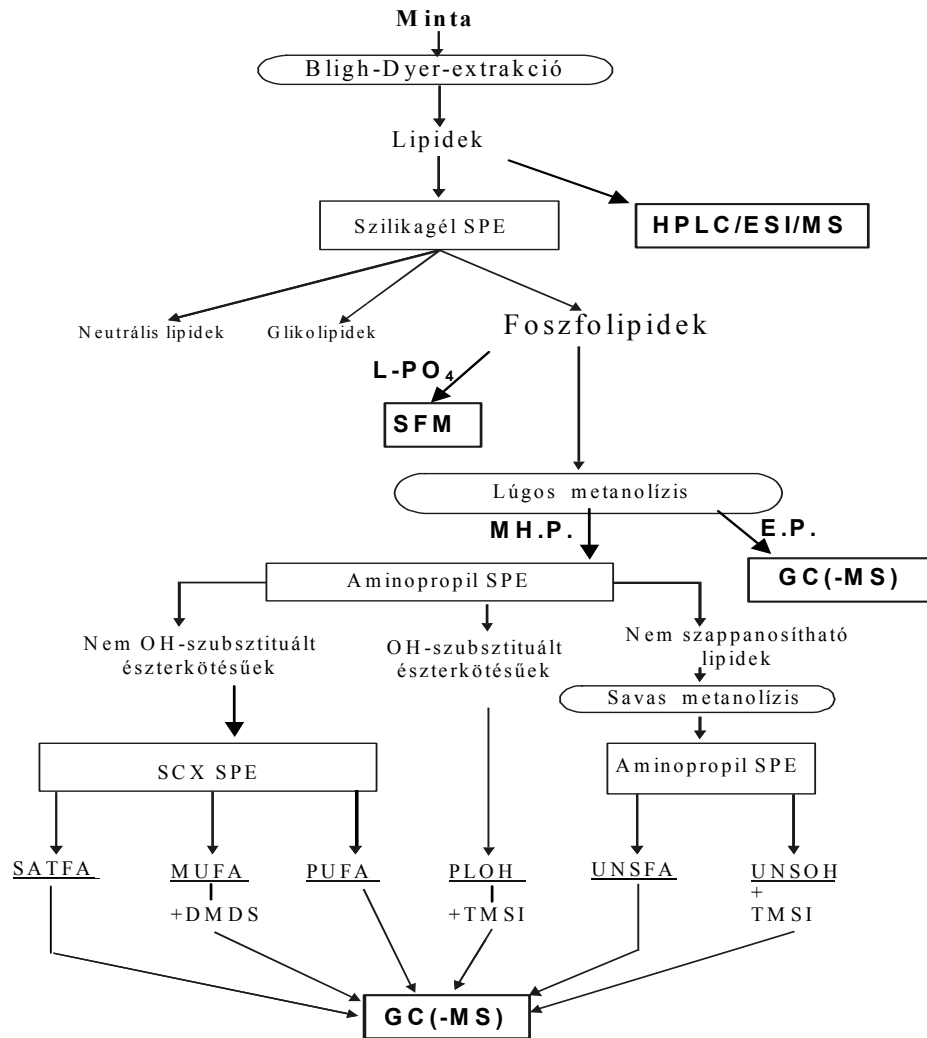
Ezen analitikai módszereket a következőkben ismertetjük.

A foszfolipid-foszfát mérési lehetőségei

A foszfolipidekből feltárt lipid-foszfátok (L-PO₄) vizsgálata a különböző szervesanyag-tartalmú talajok mikrobiális biomasszájának becslésére használt módszer. A foszfolipid-frakcióból a lipid-foszfát perklórsavval (WHITE et al., 1979), vagy a nagyobb érzékenység érdekében kálium-perszulfáttal (FINDLAY et al., 1989) szabadítható fel. A mennyiségi meghatározás spektrofotometriásan történik, melynek kimutathatósági határa 10 nmol, illetve 0,1 nmol. WHITE és munkatársainak (1979) az életközösségi szintű foszfolipid-kutatásban úttörő vizsgálatai azt igazolják, hogy a L-PO₄ alapján történő foszfolipid-vizsgálattal becsült mikrobiális biomassza mennyisége jó korrelációt mutat más mikrobiális meghatározásokkal (ATP-tartalom meghatározása, SIR). ZELLES és munkatársai (1992) ennek ellentmondó eredményeket kaptak, mikor különböző mezőgazdasági hasznosítású talajok mikrobiális biomasszájának becslésére SIR-, L-PO₄-, valamint PLFA-meghatározást alkalmaztak. Nem volt szoros korreláció a L-PO₄ mennyiségi meghatározása, valamint a másik két módszer között. Ennek egyik oka a háttér-foszfáttartalom lehet, ami torzíthatja az eredményt. A PLFA-analízis és a SIR között jó korreláció volt tapasztalható.

A foszfolipid-zsírsavak vizsgálati lehetőségei

Más biokémiai markerekhez képest a PLFA-összetétel kémiai analízise megfelelő érzékenységű, megbízhatóságú, kevesebb analitikai problémával terhelt. A lipid-extraktumból a foszfolipidek oszlopkromatográfiával (SPE) polaritásuk alapján elkülöníthetők. A foszfolipidek zsírsavaiból átészterésítéssel (a zsírsavakat glicerin helyett metanolhoz kapcsolva) zsírsav-metilészterek képezhetők, melyek gázkromatográfiás analízishez már eléggé alacsony forráspontúak. Ez az ún. egyszerű preparálás (simple extraction; WHITE et al., 1979), amely további fracionálásos és derivatizációs lépésekkel bővíthető a precízebb minőségi meghatározás érdekében (ún. meghosszabbított preparálás, extended extraction; ZELLES & BAI, 1993).



1. ábra

A foszfolipidek analízis-lehetőségei, ZELLES & BAI, 1993 nyomán

Jelmagyarázat: DMDS: dimetil-diszulfid; E.P.: egyszerű preparálás (a mintától E.P.-n át a GC-ig); GC: gázkromatográf; ESI: electrospray-ionizáció; HPLC: nagyfelbontású folyadékkromatográfia; L-PO₄: lipid-foszfát; MH.P.: meghosszabbított preparálás (a mintától MH.P.-n át a GC-ig); MUFA: egyszeresen telítetlen zsírsav(-metilészter); MS: tömegspektrométer; PLOH: hidroxil-szubsztituált zsírsav(-metilészter); PUFA: többszörösen telítetlen zsírsav(-metilészter); SATFA: telített zsírsav(-metilészter); SCX: ezüst-ionkromatográfiára alkalmas oszlop; SFM: spektrofotométer; SPE: szilárd fázisú extrakció; TMSI: trimetil-szilil; UNSFA: nem elszappanosítható foszfolipidek zsírsav-metilésztere; UNSOH: nem elszappanosítható foszfolipidek hidroxil-szubsztituált zsírsav-metilésztere

Az egyszerű preparálás (simple extraction, WHITE et al., 1979)

Ezt a gyors és megbízható preparálási eljárást gyakran használják mikrobiális közösségben történt változások követésénél (FROSTEGÅRD et al., 1993), függetlenül attól, hogy az egyszerű preparáláson alapuló PLFA-analízissel csupán az észtereszíthető zsírsavakat lehet meghatározni. A kivont lipidek közül a foszfolipideket oszlopkromatográfiával különítik el aktivált szilikagél-oszlopon, majd az ún. lúgos metanolízis („szappanosítás” metanolos KOH-oldat vagy metanolos nátrium-metoxid reagenssel: CHRISTIE, 2003) eredményeként a foszfolipidekből felszabaduló zsírsavak metilészterei képződnek. Ezek tisztítása és töményítése után kapott oldat gázkromatográfián, FID, illetve MS detektorral mérhető.

Itt említjük meg, hogy a sejthártya foszfolipid-zsírsavainál egyszerűbb a sejtek összes zsírsavainak vizsgálata az ún. FAME-, pontosabban TSFAME-módszerrel (*total soil fatty acid methyl esters*), ahol a talajból kivont lipidextraktum SPE frakcionálása elmarad, és közvetlen átészterezés helyett általában két lépésben (felszabadítás, savas metilálás) történik a metilészterek képzése. Így az analízis nem korlátozódik a foszfolipidekre: a mérésre előkészített minta SPE hiányában a neutrális- és glikolipideket, a kétlépéses metilészterezésnek köszönhetően a szabad zsírsavakat is tartalmazza. Emiatt ezzel az eredetileg tiszta tenyészeteken végzett taxonómiai tesztnél szánt módszerrel nem végezhető valódi foszfolipid-analízis: az így kapott zsírsavmennyiség és -spektrum biomasszabecslésre nem, közösségi indikációra pedig problematikusán alkalmazható. A TSFAME módszer előnye, hogy a mikrobiális struktúra gyorsan és kis mennyiségű talajmintából meghatározható (tizedannyi minta elegendő, mint a PLFA-analízisnél). Többben mezőgazdasági művelés alatt álló talajok mikrobiális struktúráinak összehasonlítására használták (KLUG & TIEDJE, 1993; CAVIGELLI et al., 1995; IBEKWE & KENNEDY, 1998). Költséghatékony módszer a különböző helyszínről származó vagy különböző kezelést kapó, eltérő szervesanyag-tartalmú talajok egyszerű összehasonlítására (DRENOVSKY et al., 2004). A módszer hátránya, hogy nem korlátozódik csupán az élő sejtekre, ugyanis a talaj holt szerves frakciójában az extracelluláris glikolipidek tartósan megmaradhatnak. A sejten kívül instabil celluláris lipidek (foszfolipidek) a talaj aktuális mikrobiális közösségéről, a degradációnak ellenállóbb extracelluláris lipidek a talaj „történelméről” szolgáltatnak információt (ZELLES, 1999). Ahol az élő talajbióta fizikailag elkülöníthető, az össz-zsírsavspektrum könnyebben értelmezhető. Például RUESS és munkatársai (2002) különböző gombák és az azokkal táplált talajlakó fonalférgek zsírsavösszetételét összevetve arra a következtetésre jutottak, hogy a teljes zsírsavspektrumok vizsgálata táplálék-preferenciák, táplálékláncok felderítésére is alkalmas lehet.

A meghosszabbított preparálás (extended extraction, ZELLES & BAI, 1993)

A mintaelőkészítés a lúgos metanolízisig megegyezik az egyszerű extrakciónál leírtakkal. Ezután a tisztított termékből aminopropil oszlopon elválasztják a *nem hidroxil-szubsztituált* és *hidroxil-szubsztituált* (PLOH) frakciókban a zsírsav-metilésztereket, a *nem elszappanosítható* frakcióban a nem metanolizált (nem észterkötésű) foszfolipideket és szabad zsírsavakat (1. ábra). Ez utóbbi frakcióból ún. savas metilálással képeznek gázkromatográfiánál analízálható zsírsav-metilésztereket, melyeket szintén *nem hidroxil-szubsztituált* (UNSF) és *hidroxil-szubsztituált* (UNOH) frakciókra osz-

tanak. A hidroxil-csoportokat – helyzetük meghatározásának elősegítésére – TMSI-derivatizációval (PLOH, UNOH) jelölik.

Az *elszappanosítható nem hidroxil-szubsztituált* frakcióból SCX oszlopon elkülönítik a telített (SATFA) és az egyszeresen (MUFA), illetve többszörösen (PUFA) telítetlen zsírsav-metilésztereket. A láncközi kettős kötések helyzetének meghatározását DMDS-derivatizáció segíti (MUFA). A meghosszabbított preparálás részletes ismertetését ZELLES (1996) közli.

Az egyszerű és a meghosszabbított preparálás összehasonlítása

A két módszer összehasonlítására ZELLES (1999) a Gram-negatív *Phyllobacterium myrsinacearum* tenyészetét használta modellként. Az egyszerű preparálást alkalmazva 8 zsírsav volt azonosítható, összesen 2406 nmol g⁻¹ mennyiségben. A meghosszabbított preparálás során csak az észtereszíthető zsírsavakból is 16 félélt lehetett azonosítani, az előző módszernél valamivel nagyobb (2662 nmol g⁻¹) mennyiségben. Ez 72%-a volt az összes foszfolipid-zsírsav mennyiségének – a maradék 28% a savas metilálás során szabadult fel (1. táblázat). Egyes zsírsavak izomerjei is elkülöníthetők a meghosszabbított preparálás alkalmazása során. Az egyszerű preparálási módszerrel, ahol a lúgos

1. táblázat

A Phyllobacterium myrsinacearum zsírsavai az egyszerű és a meghosszabbított preparálás alkalmazásával

Zsírsav	Egyszerű preparálás nmol·g ⁻¹	Meghosszabbított preparálás nmol·g ⁻¹
12:0	4	–
14:0	18	15
16:0	215	207
16:1	57	–
16:1 ω7	–	16
17:0	17	–
18:0	141	138
18:1	1762	–
18:1 ω14	–	150
18:1 ω13	–	5
18:1 ω9	–	2
18:1 ω7	–	1880
cy19:0	191	182
Azonosítatlan	–	4
14:1 ω1	–	5
16:0 β-OH	–	2
16:0 α-OH	–	2
Azonosítatlan	–	17
18:1 α-OH	–	26
19:0 cy α-OH	–	10
Szappanosítható		
PLFA összesen:	2405	2662

metanolízist a GC-MS analízis követi, egy mintából maximálisan 72-féle PLFA volt kimutatható (SUNDH et al., 1997; ZELLES, 1999), míg a meghosszabbított preparálással egy mintából többszáz-féle PLFA-t is ki lehet mutatni (ZELLES, 1999). Ennyi PLFA-változó együttes kezelésére olyan többváltozós statisztikai módszerek használhatók, mint a klaszteranalízis, a főkomponens-analízis (PCA), a diszkriminancia-analízis, a korrespondencia-elemzés (LUDVIGSEN et al., 1997), vagy a redundancia-analízis (BOSSIO et al., 1998), általában az egyes zsírsavak mólszázalékos értékeinek (n) $\log_{10}(n+1)$ képlet szerinti transzformációját követően. PLFA-adatok értelmezéséhez mesterséges neuronhálózatok is használhatók (NOBLE et al., 2000).

A HPLC/ESI/MS alapú analízis

A szűrt talaj-lipidextraktumból a különböző foszfolipidek az R-csoport szerint (foszfátid, foszfátidil-kolin, foszfátidil-etanolamin stb.) HPLC-vel elválasztódnak, majd *electrospray*-ionizációt követően a tömegspektrométerbe jutnak. Ez a lágy ionizáció csak mérsékelten fragmentálja a foszfolipideket, így a tömegspektrum molekulaionja és főbb fragmentjei alapján a gázkromatográfiához hasonlóan nagy érzékenységgel meghatározható az adott foszfolipidek mennyisége, zsírsavösszetétele (FANG & BARCELONA, 1998). Összetett, sok foszfolipid-komponenst tartalmazó minták esetében a meghatározás problematikus lehet, feltehetően emiatt ritka jelenleg e módszer alkalmazása.

Összefoglalás

A foszfolipidek kémiai analízise történhet foszfolipid-foszfát, valamint foszfolipid-zsírsavak (PLFA) vizsgálatával. A foszfolipid-zsírsavak analízisére általában gázkromatográfot, illetve gázkromatográf-tömegspektrométert használnak. Ehhez a minta-előkészítés történhet *egyszerű preparálással*, amivel csak az észteressíthető zsírsavakat lehet meghatározni, és az összes foszfolipid vizsgálatára szolgáló *meghosszabbított preparálással*, mely nagyobb biztonságu minőségi meghatározást tesz lehetővé.

A dolgozat az OTKA (T 038280 és M 041669 számú pályázat) támogatásával készült.

Irodalom

- BLIGH, E. G. & DYER, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochemistry and Physiology*. **37**. 911–917.
- BOSSIO, D. A. et al., 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb. Ecol.* **36**. 1–12.
- CAVIGELLI, M. A., ROBERTSON, G. P. & KLUG, M. J., 1995. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. In: *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity* (Eds.: COLLINS, H. P., ROBERTSON, G. P. & KLUG, M. J.) 99–113. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

- CHRISTIE, W. W., 2003. *Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. 3rd ed. The Oily Press. Bridgwater.
- DRENOVSKY, E. R. et al., 2004. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl ester (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* **36**. 1793–1800.
- FANG, J. & BARCELONA, M. J., 1998. Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. **33**. 23–35.
- FANG, J. & FINDLAY, R. H., 1996. The use of a lipid extraction method for simultaneous recovery of organic pollutants and microbial lipids from sediments. *J. Microbiol. Methods*. **27**. 63–71.
- FINDLAY, R. H., KING, G. M. & WATLING, L., 1989. Efficacy of phospholipid analysis in determining microbial biomass in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**. 2888–2893.
- FROSTEGÅRD, Å., TUNLIND, A. & BÄÄTH, E., 1991. Microbial biomass measured as total phosphate in soils of different organic content. *J. Microbiol. Methods*. **14**. 151–163.
- FROSTEGÅRD, Å., TUNLIND, A. & BÄÄTH, E., 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**. 3605–3617.
- IBEKWE, A. M. & KENNEDY, A. C., 1998. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. *Plant and Soil*. **206**. 151–161.
- KEHRMEYER, S. R. et al., 1996. Combined lipid/DNA extraction method for environmental samples. *J. Microbiol. Methods*. **25**. 153–163.
- KLUG, M. J. & TIEDJE, J. M., 1993. Response of microbial communities to changing environmental conditions: chemical and physiological approaches. In: *Trends in Microbial Ecology* (Eds.: GUERRERO, R. & PEDROS-ALIO, C.) 371–374. Spanish Society for Microbiology, Barcelona.
- LUDVIGSEN, L. et al., 1997. Correlating phospholipid fatty acids (PLFA) in a landfill leachate polluted aquifer with biogeochemical factors by multivariate statistical methods. *FEMS Microbiology Reviews*. **20**. 447–460.
- MACNAUGHTON, S. J. et al., 1997. Rapid extraction of lipid biomarkers from pure culture and environmental samples using pressurized accelerated hot solvent extraction. *J. Microbiol. Methods*. **31**. 19–27.
- NIELSEN, P. & PETERSEN, S. O., 2000. Ester-linked polar lipid fatty acid profiles of soil microbial communities: a comparison of extraction methods and evaluation of interference from humic acids. *Soil Biol. Biochem.* **32**. 1241–1249.
- NOBLE, P. A., ALMEIDA, J. S. & LOVELL, C. R., 2000. Application of neural computing methods for interpreting phospholipid fatty acid profiles of natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**. 694–699.
- RUESS, L. et al., 2002. Fatty acids of fungi and nematodes—possible biomarkers in the soil food chain? *Soil Biol. Biochem.* **34**. 745–756.
- SUNDH, I., NILSSON, M. & BORGA, P., 1997. Variation in microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**. 1476–1482.
- WHITE, D. C. et al., 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*. **40**. 51–62.
- ZELLES, L., 1996. Fatty acid patterns of microbial phospholipids and lipopoly-saccharides. In: *Methods in Soil Biology*. (Eds.: SCHINNER, F. et al.) 80–93. Springer Verlag, Berlin.
- ZELLES, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils*. **29**. 111–129.

- ZELLES, L. & BAI, Q. Y., 1993. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biol. Biochem.* **25**. 495–507.
- ZELLES, L. et al., 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**. 317–323.

Érkezett: 2005. március 18.

UZINGER NIKOLETT és
HALBRITTER ANDRÁS
MTA Talajtani és Agrokémiai
Kutatóintézet, Budapest