

УДК 547.1

*Памяти профессора, члена-корреспондента РАН
Виктора Евгеньевича Васьковского (1935–2016),
выдающегося исследователя в области
липидологии, чья помощь и поддержка
были очень важны для этой работы, посвящается*

ЛИПИДНЫЕ БИОМАРКЕРЫ В ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ПОЧВЕННОЙ БИОТЫ: АНАЛИЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2019 г. О. А. Розенцвет¹, Е. В. Федосеева², В. А. Терехова^{3, 4, *}

¹Институт экологии Волжского бассейна РАН,
Тольятти, Самарская обл., Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия

³Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
Москва, Россия

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

*E-mail: vterekhova@gmail.com

Поступила в редакцию 21.05.2018 г.

После доработки 22.10.2018 г.

Принята к публикации 22.10.2018 г.

Критически проанализированы возможности и ограничения биомаркерной роли липидов в характеристике биоразнообразия и жизнеспособности почвенной биоты. Рассмотрен вклад представителей разных групп живых систем (растений, животных, микроорганизмов) и экологических условий в состав липидных компонентов почв, а также достижения, касающиеся эффективности выделения липидов из почв, донных отложений и прочих твердых субстратов. Обобщены современные сведения о способах дериватизации и основных методах анализа жирных кислот (ЖК) для количественной характеристики липидных компонентов как источников органического углерода почв. Основное внимание уделено анализу ЖК полярных липидов, чаще фосфолипидов (PLFA – phospholipid-derived fatty acids) и анализу общих ЖК, называемому полным анализом, к которому отнесены вариации, предусматривающие получение метиловых эфиров ЖК (FAME – fatty acids methyl ether, EL – ester linked, MIDI – Microbial ID Inc., TFA – total fatty acids). Отмечается, что критичным для эффективности биомаркерной функции является выбор способа липидного анализа почв при разных экологических условиях: под разными типами растительности, при разных условиях обогащенности углеродом, влажности, видах землепользования. В зависимости от используемых методов анализа состав липидов может свидетельствовать о наличии в исследуемом образце либо смеси жизнеспособной и детритной биомассы, либо только об активно функционирующих представителях почвенной биоты. В частности, профили ЖК, полученные методами PLFA, тесно связаны с жизнеспособным микробным сообществом, тогда как общие профили ЖК, полученные по методу TFA, характерны одновременно для живой и неживой биомассы.

Ключевые слова: биоразнообразие, микроорганизмы, биоиндикация, липидомика почв, методы анализа липидных компонентов

DOI: 10.1134/S0042132419020078

ВВЕДЕНИЕ

Липидные компоненты почв представляют собой неспецифические органические вещества, содержание которых варьирует по почвенным горизонтам и типам почв. Доля липидов в минеральных горизонтах почв колеблется от 2–14 до

10–12% от общего содержания органического вещества, тогда как в органогенных горизонтах и торфах липиды накапливаются в больших количествах (до 15–20%) (Орлов, 1992; Лисовицкая, Можарова, 2013). В серых лесных, каштановых почвах и черноземах с высокой степенью гуми-

фикации доля липидов минимальна (2–4%). Однако даже в таких количествах липиды играют важную роль в реализации почвами их экологических функций, во многом определяя сорбционные свойства почвенных частиц, скорость превращения органического вещества и энергетические процессы, структуру и функционирование микробного комплекса в трофической сети (Janzen, Wiesenberg, 2017).

Источниками липидов в естественных почвах служат остатки вышедших растений, почвообитающие животные, микроорганизмы. В почвах агроценозов масса и спектр липидных компонентов может расширяться за счет органических добавок, так называемых почвоулучшителей. В техногенно-преобразованных почвах к липидным компонентам естественного происхождения добавляются определенные фракции поллютантов (Гордеев и др., 2014).

Липиды по сравнению с другими органическими соединениями (например, белками, нуклеиновыми кислотами или углеводами) обладают относительно более высокой термодинамической устойчивостью, что позволяет их надежно идентифицировать в почве, почвогрунтах и донных отложениях (White, Ringelberg, 1998; Peacock et al., 2001; Pennanen, 2001). С помощью липидного анализа можно идентифицировать почвенные микроорганизмы, которые не могут быть охарактеризованы традиционными методами микробиологического посева. Согласно опубликованной информации, 90–99% видов прокариотных микроорганизмов относятся к разряду некультивируемых, они не способны расти на стандартных питательных средах (Aslam et al., 2010). Наконец, липиды в почвенных образцах представляют собой смесь соединений, характеризующих жизнеспособную и/или детритную биомассу (мортмассу), что предоставляет новые возможности для понимания механизмов трансформации органического вещества между живой и неживой биомассой (Gleixner, Kramer, 2006; Willers et al., 2015).

С химической точки зрения липидами считают природные производные жирных кислот (ЖК) (Васьковский, 1997). В этой связи наиболее распространенным методическим приемом для характеристики липидов в природных средах является анализ ЖК. Метод хемодиагностики ЖК часто используется для определения структуры и динамики сообществ микроорганизмов (Bobbie, White, 1980; Osipov, Turova, 1997; Olsson, 1999; Verkhovtseva et al., 2002; Poputnikova, Terekhova, 2010; Hahn, Quideau, 2013; Sherysheva et al., 2015).

На результаты липидного анализа влияет тип растительности, обогащенность почвы углеродом и влагой, условия землепользования и многие другие факторы (Фридланд, 1982; Верховцева и др., 2015; Diné et al., 1992; Jandl et al., 2004; Wiesenberg et al., 2009; Mueller et al., 2012). Надеж-

ность и информативность данных о составе липидов при оценке почвенных процессов напрямую зависят от применяемых методов анализа.

Цель настоящего обзора обобщить современные сведения о биохимическом подходе к анализу почвенной биоты с использованием липидов. Особое внимание уделено методам извлечения липидов, их идентификации и количественного анализа, интерпретации результатов для характеристики сообществ и экологической оценки экосистем.

СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Липиды – очень разнородная группа органических соединений. Чаще всего липиды описываются как гидрофобные или амфипатические малые молекулы, которые легко растворяются в органических растворителях, таких как хлороформ, простые эфиры или спирты (Christie, 2003). Принято разделять липиды на три группы: простые, сложные и оксипирины (Васьковский, 1997). ЖК в составе простых липидов представляют собой одну длинную углеводородную цепь. Спирты, альдегиды и углеводороды считают химическими предшественниками или производными ЖК, а сфингозиновые основания – биохимическими производными ЖК и серина. Исключение составляют углеводороды, у которых нет функциональной группы. Свободных ЖК в клетках живых организмов немного, их основная роль – быть строительными блоками для сложных липидов или предшественниками оксипиринов.

ЖК в составе сложных липидов представляют строительные блоки полярных липидов, которые являются основными структурными компонентами биологических мембран. Двумя главными классами сложных липидов, которые включают ЖК, являются глицеролипиды и сфинголипиды. Основой глицеролипидов является трехатомный спирт глицерин. ЖК прикрепляются с помощью сложных или простых эфирных связей к первому и второму атомам углерода глицериновой молекулы. Полярная головка у третьего атома углерода может содержать углеводный фрагмент – как в гликолипидах, или фосфатный – как в фосфолипидах. Третий класс глицеролипидов, в котором полярной головкой служит четвертичный аминокислотный спирт, связанный простой эфирной связью с диацилглицериновым фрагментом, являются липиды бетаинового типа (Rozenstvet, 2004). Если все три углерода глицерина связываются с ЖК, то образуются триглицерины. Если же ЖК присоединены не к глицерину, а с помощью N-ацил-связи к сфингозину, то образуется основной строительный блок сфинголипидов (Нельсон, Кокс, 2011). Еще одной широко распространенной группой

соединений, содержащих ЖК, являются воски. Это относительно неполярные липиды образуют компоненты нейтральной липидной фракции и состоят из длинноцепочечных ЖК и спиртов с четным числом атомов углерода C_{12–32}. Полимерные производные ЖК и их эфиров образуют кутин и суберин растений (Kolattukudy, 2001; Mueller et al., 2012). Липиды в составе мембран архей содержат две очень длинные алкильные цепи (32 атома углерода), связанные простой эфирной связью с глицерином обоими концами — это диалкилглицеринтетраэфиры (DGDТs) (Peterse et al., 2011).

Таким образом, ЖК входят в состав простых и сложных липидов и могут существовать в свободном и связанном виде. В зависимости от типа связи ЖК липиды разделяются на омыляемые и неомыляемые. Структурные блоки омыляемых липидов связаны между собой сложноэфирной связью. Эти липиды легко гидролизуются в воде под действием щелочей с образованием ЖК. К ним относятся фосфолипиды, гликолипиды, бетаиновые липиды и моно-, ди-, триглицерины. К неомыляемому типу липидов, в состав которых входят ЖК, относятся плазмалогены (содержат простые эфирные связи), сфинголипиды и другие аминоклипиды, а также липополисахариды и GDGTs (glycerol dialkyl glycerol tetraether).

Но независимо от степени “связанности” все природные ЖК представляют собой одноосновные кислоты нормального или разветвленного строения, насыщенные или ненасыщенные с различным числом двойных связей или функциональных групп. Наиболее распространены ЖК с 10–22 атомами углерода в молекуле.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЛИПИДОВ

В качестве биомаркеров функционального разнообразия почвы и почвенной биоты используется широкий спектр липидных молекул (Dalsgaard et al., 2003; Imbs et al., 2015). В частности, ЖК связаны с таксономическими или функциональными группами микроорганизмов (Frostegard, Baath, 1996; Steward et al., 1996).

Примеры эффективных биохимических маркеров липидной природы приведены в таблице 1. Большинство зубактерий продуцируют насыщенные (не содержат двойных связей) или мононенасыщенные (содержат одну двойную связь) ЖК с длиной цепи от 10 до 18 атомов углерода (Salomonová et al., 2003). Мононенасыщенные ЖК, особенно *цис*-вакценовая кислота (18:1 ω 7c), характерны и уникальны для зубактерий, кластридий, лактобактерий, стрептококков, псевдомонад и некоторых других бактерий, обладающих анаэробно-десатуражным путем биосинтеза ЖК. Среди них немало относящихся к группе грамотрица-

тельных (Dobbs, Findlay, 1993). Отмечается, что некоторые зубактерии (*Mycobacterium*, *Vibrio*, *Flexibacterium*) продуцируют и полиненасыщенные ЖК, которые в целом нехарактерны для этой группы (Осипов, 2010; Chemical ..., 1985). В отдельных случаях полиненасыщенные ЖК встречаются в цианобактериях (Осипов, 2010). Что касается углеводородной цепи, то для прокариотных организмов характерной считается длина до 18 атомов углерода. При этом у стафилококков диагностируется наличие изо- и антеизо-нонадекановой кислоты (19:0), у псевдомонад и энтеробактерий — циклононадекановой (19 сус), у франциселл — ЖК с длиной цепи от 21 до 24 атомов углерода. Для эукариотных микроорганизмов характерно большое содержание ЖК с длиной цепи 20–24 атомов углерода, в которых от трех до шести двойных связей (Zelles, 1996; Henderson et al., 1998; Navarrete et al., 2000).

Хорошими биомаркерами являются относительно редкие ЖК, специфичные для узкой группы организмов такие как гидроксил- и циклопропилсодержащие кислоты, а также ЖК с разветвленной цепью. Кислоты с разветвленными и циклическими углеводородными цепями специфичны примерно для половины зубактериальных видов, как грамположительных, так и грамотрицательных, особенно из родов *Bacillus*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Legionella* (Осипов, 2010; Kerger et al., 1986; Gleixner, Kramer, 2006). Такие ЖК со сложными углеводородными цепями при идентификации зубактериальных таксонов имеют большую индикаторную значимость, чем ЖК с прямой цепью. Многочисленные виды актинобактерий (представители родов *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*) также способны к синтезу кислот с разветвленными углеводородными цепями (Kaneda, 1991). Наличие метильной группы на десятом атоме углерода в молекуле ЖК можно считать специфическим маркером актиномицетов (Kroppenstedt, 1985; Willers et al., 2015). Наличие 10-метилоктадекановой (10Me 18:0) кислоты с локализацией метильной группы у 10-го атома углерода характерно для коринебактерий и микобактерий. Есть указания на то, что в клеточной стенке родококков присутствует 10-метил-гексадекановая кислота (10Me 16:0) (Осипов, 2010; Chemical ..., 1985). α - и β -гидроксикислоты преимущественно встречаются в липидах грамотрицательных бактерий рр. *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Bordetella* (Осипов, 2010). ЖК с циклопропильным заместителем преобладают в клетках ряда грамотрицательных бактерий, а также некоторых анаэробных штаммов грамположительных бактерий (Feng, Simpson, 2009; Pollierer et al., 2012). К особой группе специфических биохимических маркеров можно отнести 16:1d11 (11-гексадеценую кислоту) — маркер железоредукторов, встречающийся у представителей родов *She-*

Таблица 1. Липидные маркеры, характерные для представителей определенных таксонов и функциональных групп биоты

Липидный маркер*	Таксоны и функциональные группы	Источник
i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 5, i17:0, 17:0, 18:1 ω 7	Универсальные маркеры большинства бактерий	Tunlid, White, 1992; Frostegård et al., 1993; Malave-Orengo et al., 2010
Разветвленные жирные кислоты	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	Harwood, Russel, 1984; Осипов, 2010
16:1 ω 8c, 16:1 ω 6c, 18:1 ω 8c, 18:1 ω 8t, 18:1 ω 6c	Метанотрофные бактерии	Nichols et al., 1985
10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0	Актиномицеты (из родов <i>Rhodococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Corynebacterium</i>)	Kroppenstedt, 1985; Chemical..., 1985; Осипов, 2010; Willers et al., 2015
15:1, 17:1	Род <i>Desulfobulbus</i> грамотрицательных бактерий; род <i>Clostridium</i> грамположительных бактерий; род <i>Mycobacterium</i> актиномицетов, род <i>Candida</i> сахаромицетов	Parkes, Calder, 1985; Осипов, 2010
изо-формы (i15:1, i16:1, i17:1, i19:1)	Грамотрицательные бактерии (из родов <i>Desulfovibrio</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Afipia</i>)	Green, Scow, 2000; Осипов, 2010
антеизо-форма (a13, a15, a17:0, a19)	В основном грамположительные бактерии и актиномицеты (из родов <i>Corynebacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Bacillus</i> , некоторых других); некоторые грамотрицательные бактерии	Осипов, 2010
cy15:1, cy17:0, cy18:0, cy19:0	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	Feng et al., 2010; Pollierer et al., 2012
cy18:0(ω 7,8)	Род <i>Desulfobacter</i> грамотрицательных бактерий	Dowling et al., 1986
cy15:1	Класс Clostridia грамположительных бактерий	Vestal, White, 1989
cy17:0, cy19:0	Анаэробные формы бактерий	Vestal, White, 1989
16:0, 16:1 ω 7, 16:4 ω 3, 18:1 ω 9, 18:0	Цианобактерии	Volkman, 1986; Wakeham, 1995; Li, Watanabe, 2001
14:0, 16:0, 16:1 ω 3t, 16:1 ω 7, 17:0, 18:0, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 20:5 ω 3, 22:6 ω 3	Диатомовые водоросли	Volkman et al., 1989; Dunstan et al., 1994; Saito et al., 2002; Mock, Kroon, 2002; Rousch et al., 2003
16:1 ω 13t, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3, 16:4 ω 3	Зеленые водоросли	Volkman, 1986; Dunstan et al., 1992
16:1 ω 5	Арбускулярные микоризные грибы	Olsson, 1999
18:2 ω 6c, 18:3 ω 6c, 18:3 ω 3c	Грибы	Frostegård, Baath, 1996; Kaiser et al., 2010; Pollierer et al., 2012
20:2 ω 6, 20:3 ω 6, 20:4 ω 6	Простейшие	White, 1988
18:1 ω 9, 18:1 ω 11, 18:3 ω 3, 20:5 ω 3, 26:0	Высшие растения	Gonzalez-Perez et al., 2011; Mueller et al., 2012; Pollierer et al., 2012

* Обозначение жирных кислот приведено в соответствии с номенклатурой ЮПАК: число атомов углерода в цепи, число двойных связей, положение двойных связей от метильного конца молекулы (ω); префиксы i, a и cy – изо-, антеизо- и циклические жирные кислоты; 10 Me – метильная групп на 10-м углероде от карбоксильного конца молекулы; c – *цис*-форма, t – *транс*-форма.

wanella, *Desulfuromonas*, *Geobacter*, *Geovibrio* (Ше-рышева, Осипов, 2013).

Известен подход, при котором бактериальная биомасса оценивается по соотношению биомассы грибов и бактерий. Бактериальная биомасса рассчитывается как сумма ЖК 15:0, 17:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, 16:1 ω 7, cy17:0, 18:1 ω 7 и cy19:0 ω 8. Грибная биомасса рассчитывается на основании содержания 18:2 ω 6,9 (Frostegard, Baath, 1996; Marschner et al., 2005; Miura et al., 2017).

К диагностически значимым для оценки разнообразия почв относят и ряд других липидных компонентов. Так, фитостерины, чаще всего кампестерин (C₂₈H₄₈O), стигмастерин (C₂₉H₄₉O) и ситостерин (C₂₉H₅₀O), характеризуют растительный источник липидов в почвах (Volkman, 2003; Sinninghe Damsté et al., 2012). Холестерин (C₂₇H₄₆O) считается основным стеринном животных и используется как биомаркер поступления микрофауны в почву (Peterse et al., 2011; Pollierer et al., 2012). Эргостерин (C₂₈H₄₄O) является метаболитом грибов и применяется в качестве грибного биомаркера в почвах (Ruzicka et al., 2000). Брассикастерин является типичным маркером микродорослей (Volkman, 2003; Benveniste, 2004; Gonzalez-Perez et al., 2011). Биомаркерным эффектом обладают триацилглицерины, обнаруженные в качестве основного компонента липидов в биомассе микромицета *Cladosporium* sp. (Dowling et al., 1986). Наличие в почвенном субстрате липидов бетаинового типа может свидетельствовать о присутствии бактерий, водорослей, грибов (Rozentsvet, 2004; Geiger et al., 2010). Важное диагностическое значение имеют липиды, характеризующие мембраны архей – GDGTs. Разветвленные GDGTs характерны для анаэробных почвенных бактерий (Weijers et al., 2006), *Acidobacteria* (Pancost et al., 2003; Buyer, Sasser, 2012), а изопреноидные GDGTs – для азотокисляющих археобактерий (Leininger et al., 2006; Pitcher et al., 2009).

Подчеркнем, что липиды, извлекаемые непосредственно из почвенных образцов, представляют собой сложную смесь компонентов, присутствующих в клетках разных организмов. Интерпретация полученных данных во многом зависит от способа подготовки проб, их дериватизации и идентификации результатов анализа.

МЕТОДЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ, ДЕРИВАТИЗАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЛИПИДОВ ИЗ ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ

Методы анализа липидов в почве включают несколько этапов: подготовка проб почвы, извлечение липидов, количественный анализ, дериватизация, анализ и идентификация дериватов в виде метиловых эфиров ЖК (FAME – methyl ester

fatty acids) физико-химическими методами. Рассмотрим детально отдельные стадии липидного анализа, поскольку подробной поэтапной сводки сопоставления методических приемов извлечения липидных компонентов из почв в современной литературе нет.

Экстракция липидов. Липиды извлекаются, как правило, из высушенных и тщательно растертых образцов почв с помощью органических растворителей (гексан, бензол, хлороформ, этанол и другие) (Dinel et al., 1998). В зависимости от степени полярности растворителя уже на стадии выделения из почв можно разделить липиды путем последовательной экстракции различными растворителями: неполярные липиды извлекаются гексаном, малополярные – с помощью хлороформа, сильно полярные – смесью растворителей. Для извлечения липидов из почвы часто применяется метод Блайя и Дайера или его модификации с использованием однофазной экстрагирующей смеси хлороформа, метанола и воды (1 : 2 : 0.8, v/v/v) (Bligh, Dyer, 1959; Macnaughton et al., 1997; Lewis et al., 2000; Malave-Orengo et al., 2010). Вместо воды возможно использование фосфатного (Wakeham, 1995) или цитратного буферов (Frostegard, Baath, 1996). Альтернативными методами экстракции липидов из почвы является использование смеси хлороформа и метанола (2 : 1, v/v) (Jeannotte et al., 2011) или дихлорметана и метанола (3 : 1, v/v) (Rushdi et al., 2015). При необходимости исследования группы легкоэкстрагируемых липидов методами ¹H и ¹³C ЯМР применяют гексан (Szajdak et al., 2015).

Условия проведения экстракции могут влиять на количество и профиль липидов (Papadopoulou et al., 2011). Обычно на 1 г почвы (или 1 мг любого клеточного материала) расходуют 1 мл хлороформа при сохранении соотношения хлороформ:метанол:фосфатный буфер равным 2 : 1 : 0.8, v/v/v. Для почвы с высоким содержанием органического вещества требуется больший объем растворителя и большее число экстракций. Образцы липидов после высушивания в атмосфере N₂ хранятся при низких температурах (–20 – –80°C) в растворе неполярных растворителей или их смесях (Jeannotte et al., 2011; Oates et al., 2017). Если извлеченные липиды подвергаются лизису, то по количеству фосфата можно судить о содержании фосфолипидов и соответственно об общей биомассе микроорганизмов (Green, Scow, 2000).

Применяется также классический метод экстракции липидов из твердых веществ конденсированными парами кипящего растворителя в аппарате Сокслета. В этом случае исключается стадия отделения твердых частиц почвы (фильтрация или центрифугирование). Модификация данного метода позволяет в одну стадию проводить выделе-

ние и дериватизацию липидов (Dinel et al., 1998; Jandl et al., 2004; Graber, Tschansky, 2010).

Получение метиловых эфиров жирных кислот

Следующий этап в анализе липидов связан с получением производных липидов, пригодных для последующей идентификации и количественной оценки. Традиционно липиды анализируют с помощью газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) в виде их производных, чаще всего в виде FAME. Их получение осуществляется либо прямой реакцией этерификации, либо переэтерификацией сложных липидов в среде метилового спирта с применением кислотных или щелочных катализаторов.

Выбор катализатора определяется целью исследования. В присутствии щелочных катализаторов, таких как КОН или NaOH, в мягких низкотемпературных условиях получают FAME из омыляемых сложных липидов. В отличие от щелочных кислотных катализаторов — HCl или H₂SO₄ в метаноле или BF₃, требуют нагрева и более длительного времени реакции, чем основные катализаторы, но могут этерифицировать свободные ЖК и одновременно переэтерифицировать сложные липиды (Carrapiso, Garcia, 2000). Кроме того, кислотный метанолит эффективен при получении FAME из неомыляемых липидов, в которых ЖК связаны простыми эфирными или амидными связями (Carrapiso, Garcia, 2000; Palmquist, Jenkins, 2003), что приводит к более высокой концентрации большинства ЖК, чем при щелочном методе (Chowdhury, Dick, 2012). Однако при этом возможна модификация нативных ЖК, таких как гидрокси- и циклопропилсодержащих ЖК (Liu, 1994). Методы щелочного катализа сохраняют кислотно-чувствительные компоненты, но часто недостаточны для освобождения амид-связанных и гидроксил-содержащих ЖК и кислот в составе нейтральных триацилглицеридов (Zelles, Bai, 1993). В качестве примера отметим, что гидроксилсодержащая кислота C—OH—14:0, обнаруженная в качестве основной в неферментирующих бактериях *Sphingomonas*, выделена из неомыляемых липидов (Balkwill et al., 1997). Многими авторами подчеркивается, что выбор метода метилирования ЖК может существенно влиять на результаты диагностики почвенной биоты (Schutter, Dick, 2000; Drenovsky et al., 2004; Fernandes et al., 2013).

Анализ жирных кислот

Как отмечалось ранее, ЖК могут присутствовать в почве в связанном виде в составе сложных липидов, в свободном виде, а также в виде солей. Первый тип характеризует клеточные ЖК в со-

ставе полярных липидов и в составе жиров и восков. Метод анализа ЖК фосфолипидов (PLFA — phospholipid-derived fatty acids) один из наиболее распространенных методических приемов для характеристики липидов микробной биомассы и структуры широких функциональных групп микроорганизмов. Фосфолипиды — компоненты клеточных мембран, как правило, составляют малую часть клетки и быстро деградируют после гибели клеток (около двух дней в анаэробных условиях и 12–16 дней в аэробных условиях) (Фридланд, 1982; Harvey et al., 1986). Следовательно, анализ PLFA характеризует жизнеспособную бактериальную биомассу (Zelles, 1999).

Метод PLFA включает несколько последовательных стадий. После экстракции из почвенного образца и удаления растворителя липиды разделяют на нейтральные и полярные (глико- и фосфолипиды) компоненты с использованием колонной хроматографии на кремниевой кислоте и элюентов — хлороформа, ацетона и метанола. Фракция фосфолипидов далее подвергается мягкому щелочному гидролизу в среде метанола для получения метиловых эфиров ЖК. Этим методом из липидов высвобождаются только ЖК, связанные сложноэфирной связью (О-ацильные) (Zelles, 1999), не затрагивая неомыляемые липиды. Поскольку методы щелочного катализа часто недостаточны для высвобождения амидированных, гидроксильированных кислот, был разработан расширенный метод PLFA. В нем сочетаются процедуры последовательного щелочного и кислотного омыления и промежуточного разделения на хроматографической колонке (Zelles, Bai, 1993; Zelles, 1996). Благодаря мягким условиям на начальном этапе и последовательному дифференциальному применению более жестких условий гидролиза становится возможным выделение разного типа ЖК с сохранением нативной структуры, что чрезвычайно важно при выделении уникальных ЖК, характерных для определенных групп организмов.

Метод PLFA был разработан для анализа фосфолипидов микробной (грибной и бактериальной) биомассы. При исследовании почвенной микробиоты этот метод широко используется для сравнения почв с различающимися растительными сообществами, экологическими условиями и режимами землепользования. Успешное применение метода PLFA в целом ряде исследований позволило характеризовать структуру микробного сообщества и фиксировать его изменения в зависимости от экологических почвенных условий (Drenovsky et al., 2004; Oates et al., 2017). Основными недостатками данного метода является длительность его проведения, иногда продолжающегося в течение недели, а также необходимость использования, как правило, большого количества почвенного образца. Он не обеспечивает каких-ли-

бо признаков изменений в популяциях отдельных видов. Использование данных PLFA для классификации микроорганизмов иногда затрудняется отсутствием информации о качественном и количественном распределении ЖК среди микробных таксонов (Zelles, 1999; Drenovsky et al., 2004; Oates et al., 2017). Свообразной модификацией метода PLFA являются методы низко- (37°C) и высокотемпературного (65°C) эфирного связывания (EL—Ester-Linked) (Nierop et al., 2003; Acosta-Martinez et al., 2010; Vallejo et al., 2012) с применением щелочных катализаторов. Они также используются для характеристики живого микробного сообщества, но в отличие от PFLA-метода исключается предварительная экстракция и фракционирование липидов. В этом случае наряду с ЖК фосфолипидов извлекаются ЖК в составе нейтральных ацилглицеридов и эфиров стеридов (Schutter, Dick, 2000).

Вторым по значимости методом хемодиагностики почвенной биоты является метод MIDI (Microbial ID Inc.), разработанный как более простая альтернатива трудоемкому анализу PLFA для быстрой экстракции общих липидов и их дериватизации (Graham et al., 1995; Ibekwe, Kennedy, 1998; Drenovsky et al., 2004; Marschner et al., 2005; Oates et al., 2017). Стандартный анализ проводится с использованием четырех реагентов и состоит из четырех этапов: омыление, метилирование, экстракция и отмывка метиловых эфиров. Омыление липидов происходит при температуре 100°C в условиях щелочного катализа в водно-метанольной среде. Метилирование ЖК осуществляется с использованием кислотного катализатора. Перед ГЖХ экстракт FAME промывают для удаления следов кислоты.

В отличие от метода PLFA, в котором кислоты извлекаются из фракции фосфолипидов, методом MIDI извлекаются и этерифицируются все ЖК непосредственно из образцов почвы. Особенности метода обеспечивают низкие потери липидов и экспрессность (Oates et al., 2017), что, однако, не исключает некоторые недостатки.

Подчеркнем, что этот метод первоначально был предназначен для идентификации таксономической принадлежности микроорганизмов, выделенных в чистую культуру. Для этой же цели он также успешно применяется в современных работах с микроорганизмами, изолированными на питательные среды (Sherysheva et al., 2015). Некоторые авторы акцентируют внимание на том, что поскольку метод анализа FAME не предполагает очистку и фракционирование проб, продукты дериватизации могут включать липидоподобные соединения, экстрагированные из органического вещества почвы. Это может исказить расшифровку структуры микробных сообществ и оценку их биомассы. По мнению (Oates et al.,

2017), метод MIDI обычно используется только для ориентировочного качественного описания липидов почвы. Метиловые эфиры в методе MIDI могут быть получены как из живой, так и неживой биомассы (Zelles, 1999).

Используемая в настоящее время для идентификации микроорганизмов хроматографическая система MIDI Sherlock автоматически определяет состав комплекса ЖК, а затем идентифицирует его, сравнивая с комплексами ЖК известных микроорганизмов, которые хранятся в обширной базе данных. Это позволяет быстро, точно и с минимальными затратами произвести определение видовой принадлежности исследуемого микроорганизма (Ibekwe, Kennedy 1998; Marschner et al., 2005). Часто система автоматически настроена на определение ЖК с определенной длиной цепи от 9 до 20 атомов. Как показывает сравнение двух методов, методом MIDI экстрагируется гораздо меньше длинноцепочечных компонентов ЖК из почв, чем методом PLFA (Schutter, Dick, 2000), тем самым исключается возможность определения длинноцепочечных ЖК, характерных для фитобионтных компонентов. Иногда экстрагируется большее количество ЖК, но с меньшей воспроизводимостью (Drenovsky et al., 2004). Реакции метилирования могут идти не до конца, поскольку применяется водный агент метилирования (Huguet et al., 2010). При применении данного метода вместе с ЖК извлекаются альдегиды, углеводороды, диметилацетали и стериды (Осипов, 1997; Marseille et al., 1999; Osipov, Verkhovtseva, 2011).

Метод TFA (total fatty acids) представляет собой способ анализа всех форм ЖК, включая свободные формы и соли (Graber et al., 2009; Graber, Tsechansky, 2010). В отличие от двухстадийного метода MIDI применяется только один метилирующий агент — метанольный раствор HCl и один температурный режим. TFA-метод позволяет анализировать и длинноцепочечные ЖК из почв и донных отложений, но уступает методам, специально предназначенным для профилирования почвенных микробных сообществ (Graber, Tsechansky, 2010). Сравнение нескольких методов экстракции и определения ЖК из почв и донных отложений проводилось неоднократно (Zelles, 1996; Graber, Tsechansky, 2010; Fernandes et al., 2013; Miura et al., 2017). При сравнении кислотного (HCl/MeOH) и щелочного (KOH/MeOH) способов метилирования ЖК фракции фосфолипидов была обнаружена большая концентрация одноименных ЖК, полученных с помощью HCl/MeOH-метода. С другой стороны, оказалось, что HCl/MeOH-метилирование не приводило к обнаружению ЖК, имеющих метильные заместители в углеводородной цепи, таких как 18:1 ω 7c 11Me, 18:0 10Me, 17:0 10Me и 16:0 10Me — важных для индикации актиномицетов из-за стереохимических особенностей реакции переэтерификации. Это привело к выводу,

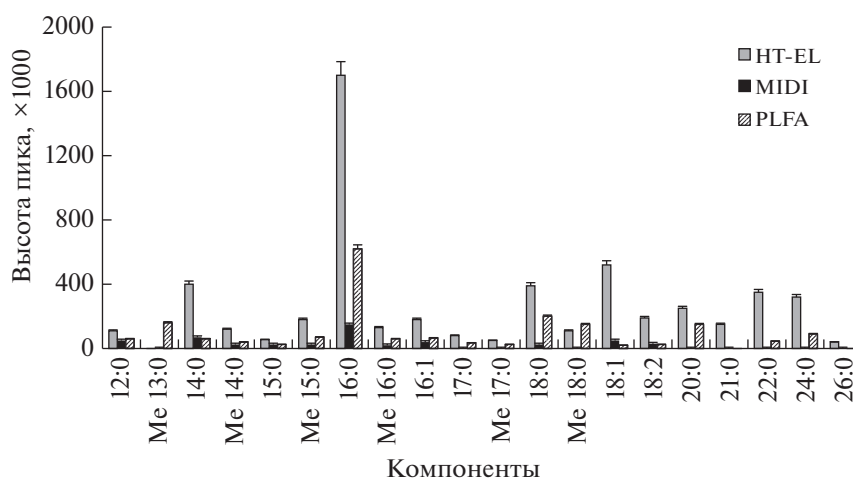


Рис. 1. Сравнение методов HT-EL, MIDI и PLFA по эффективности извлечения жирных кислот и метиловых эфиров жирных кислот (Me) из образцов супесчаной почвы (по Graber, Tsechansky, 2010, с модификациями). По оси ординат – высота пика хроматограммы для идентифицированного метилового эфира ЖК относительно общего иона (TI-total ion), среднее значение для трех повторностей. По оси абсцисс – извлеченные компоненты; Me – относится к метил-разветвленному компоненту.

что метод КОН/MeOH-переэтерификации является более предпочтительной процедурой для поиска профиля PLFA. Более того, удобство и быстрота щелочного метода имеют большое преимущество для смешанных липидных образцов, если они не содержат неомыляемые компоненты или для одиночных классов липидов (фосфолипиды), которые имеют эфир-связанные ЖК (Chen et al., 2010).

На рис. 1 приведены наборы ЖК, выявленные тремя разными методами (Graber, Tsechansky, 2010). При высокотемпературном одностадийном методе (high-temperature ester linked – HT–EL) с использованием щелочного катализатора экстрагируются большие концентрации компонентов по сравнению с двухстадийным методом MIDI и методом PLFA. Методы PLFA и MIDI могут различаться как с точки зрения числа компонентов, так и количества одного компонента.

Метод EL воспроизводит аналогичные результаты PLFA в случае, когда сравниваются бактериальные сообщества различных почв. Однако для сравнения грибных сообществ более пригоден метод PLFA. Это связано с тем, что на качество экстрактов оказывают влияние дополнительные факторы, такие как физиологическое состояние грибов и присутствие гуминовых веществ (Miura et al., 2017). Идентификация пиков осуществлена на основании масс-спектрометрии, времени удерживания и библиотеки NIST98 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD).

По площади пика в масс-спектральных анализах судят о концентрации определенного биомаркера и обогащенности почвенного образца теми или иными клетками. С помощью установленных стандартов, условных значений содержания ЖК в

клетках бактерий, грибов и других организмов, рассчитывают либо биомассу, либо относительную долю представителей конкретных таксонов в почвенной пробе.

Получение FAME является наиболее распространенным методом дериватизации. Наряду с этим для ГЖХ-анализа применяются триметилсиллильные производные ЖК (Graham et al., 1995).

Для определения только свободных ЖК рекомендован другой подход – флуоресцентное детектирование (Buyer, Sasser, 2012). Для разделения ЖК этим способом получали их производные с флуоресцентно-меченым реагентом, которые впоследствии определяли при возбуждении лазером. Метод предназначен для определения только свободных ЖК и заметно отличается от других по набору реагентов и аппаратуры.

В табл. 2 обобщены основные преимущества и недостатки каждого из описываемых методов, представление о которых можно получить из проанализированной литературы. Ни один из них не является идеальным и исчерпывающим. Если методы PLFA, EL являются приемлемыми для характеристики живого почвенного сообщества и оценки количественных изменений в структуре сообщества, но требуют больших временных затрат, то методы TFA характеризуют все липидные компоненты в почве. Метод MIDI при использовании чистых культур дает информацию о видовой специфичности ЖК, но при анализе почвы может включать нелипидные компоненты.

TFA-метод более пригоден для выделения свободных ЖК или их солей. Наиболее эффективным способом, на наш взгляд, является парал-

Таблица 2. Основные преимущества и недостатки методов извлечения и анализа жирных кислот

Методы анализа	Преимущества	Недостатки
PLFA	Аналогичен ПЦР-методу, специфичен для живых организмов, позволяет выявлять долю живой биомассы	Многостадийный, длительный, не обнаруживаются гидроксил-содержащие и свободные жирные кислоты
EL	Менее трудоемкий, определяет все жирные кислоты в омыляемых нейтральных и полярных липидах. Высокотемпературный вариант более воспроизводимый, извлекается большее количество жирных кислот	Не является специфичным для фосфолипидов. В большей степени применим к анализу бактериальных сообществ, чем грибных
MIDI	Экспрессный, позволяет анализировать меньшие по сравнению с другими методами массы образцов. Предпочтителен для работы с чистыми культурами, но может использоваться в скрининговых исследованиях для ориентировочного качественного описания липидов почвы	Двухстадийный, не определяются длинноцепочечные жирные кислоты, метилирование может идти не полностью, не дифференцирует живую и неживую микробиоту
TFA	Одностадийный, выделяется большее количество жирных кислот	Возможна модификация нативных жирных кислот

тельное применение методов PLFA/EL и MIDI/TFA. Это позволяет оценить распределение между эфир-связанными и свободными ЖК и их солями, тем самым предоставляет новые возможности для понимания механизмов распределения ЖК между живой и неживой биомассой в почвах, отложениях и осадочных породах. В работах российских исследователей (Шерышева и др., 2011; Шерышева, Осипов, 2013; Shekhovtsova et al., 2003; Sherysheva et al., 2015) предложена оптимизированная методика пробоподготовки, предполагающая использование 12%-го раствора HCl в метаноле. На этой стадии из связанных липидов микроорганизмов и других клеток смеси высвобождаются ЖК и альдегиды в виде метиловых эфиров. После экстрагирования гексаном и обработки BSTFA получают триметилсилильные эфиры окси-кислот, спиртов и стероидов, то есть выделяется весь спектр ЖК, в том числе и 10Me-разветвленные. Следует отметить также появившиеся в последнее время работы, в которых объединяются элементы PLFA- и MIDI-анализов, что позволяет использовать преимущества обоих методов и минимизировать недостатки. Для этого перед выполнением MIDI-анализа первоначально извлекаются органические растворимые компоненты, включая липиды, а после проведения метанолиза проводится этап очистки FAME. Полагают, что этот протокол обеспечивает баланс между скоростью и точностью (Oates et al., 2017). Однако этот метод может быть непригоден, если требуется высокая степень чистоты (например, для ^{13}C -анализа, или при анализе фосфолипидов и нейтральных липидов по отдельности). Тем не менее, во многих случаях он позволяет выявлять реакции микробного

сообщества на условия окружающей среды с большей чувствительностью, чем методы на основе ДНК (Duncan et al., 2016).

Для характеристики липидов археобактерий используется более сложная техника, в которой сочетаются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. В этом случае для анализа используется экстракт извлеченных по методу Блайя и Дайера липидов без предварительной дериватизации (Sinninghe Damsté et al., 2012; Szajdak et al., 2015).

Конечно, помимо выбора адекватных методов экстракции и деривации, для успешного проведения анализа PLFA необходимо грамотное ведение и других аналитических этапов, например, транспортировка и хранение образцов. Особенно это актуально в том случае, когда немедленное извлечение или замораживание образцов липидов не представляется возможным, что может привести к изменениям в составе микробного сообщества. Авторы (Schnecker et al., 2012) предлагают хранение образцов при температуре 4°C. Стоит, однако, отметить, что при таком способе хранения все равно отмечались изменения в составе и количестве ЖК, являющихся грибными биомаркерами, тогда как биомаркеры других микробных групп остались без изменений. Разработана методика подготовки 96 почвенных образцов за 1.5 дня с 4- или 5-кратным увеличением пропускной способности за счет использования 96-луночной твердофазной экстракционной пластины после экспресс-сушки образцов в центробежном испарителе, что может быть полезным для лабораторий, выполняющих большое количество анализов PLFA (Buyer, Sasser, 2012).

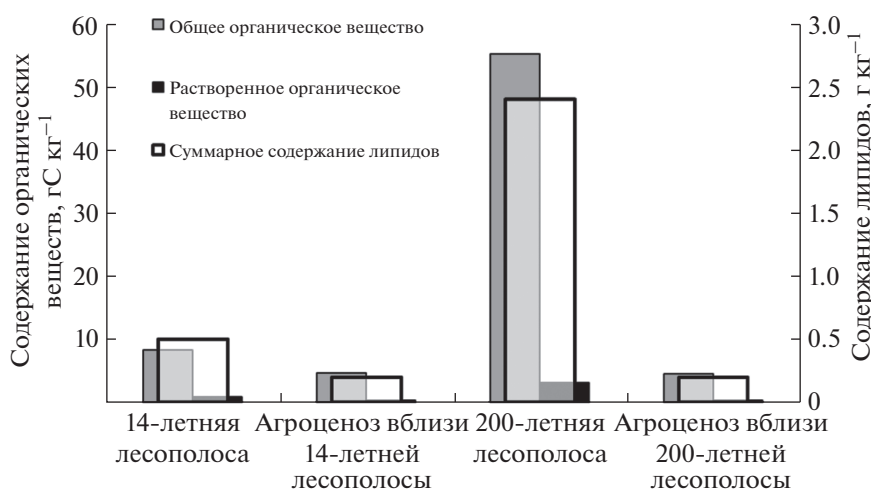


Рис. 2. Соотношение содержания липидов и органического вещества (растворенного и общего) в смешанных образцах верхнего (гумусового, 0–20 см) горизонта окультуренных (агроценоз) и природных (лесополоса) почв. Данные получены для почвенной пробы, усредненной из 10 единичных проб, отобранных стандартным способом с каждой обследуемой пробной площадки (по Szajdak et al., 2015).

БИОМАРКЕРНАЯ РОЛЬ ЛИПИДОВ В ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ПОЧВЕННОЙ БИОТЫ

В почвоведении липидные маркеры использовались на протяжении многих десятилетий, и их применение экспоненциально увеличивается (Feng, Simpson, 2009; Wu et al., 2010; Jeannotte et al., 2011). Липидные компоненты как важная составляющая органического вещества всех природных объектов привлекают внимание при изучении динамики физико-химических свойств почв, палеопедологических исследованиях, при оценке биоразнообразия и экологического качества почв (Joergensen, Wichern, 2008; Silva et al., 2010). Многие авторы уделяли и уделяют внимание структуре органического вещества почв, композиции гуминовых кислот и фульвокислот, фенольных соединений, и особенно часто лигнину и различным фракциям его трансформации как неспецифическим соединениям почв для общей их характеристики (Орлов, 1992; Нельсон, Кокс, 2011). Однако в них не рассматриваются липидные компоненты, в частности, ЖК, как биомаркеры разнообразия биоты.

Анализ количества публикаций по базе данных Web of Science показал, что за одно десятилетие (2007–2016) упоминание лишь одного из методов анализа липидов – PLFA встречается в 1525 работах, посвященных оценке биоразнообразия с помощью молекулярных маркеров животного и микробного происхождения в почвах (Jansen, Wiessenberg, 2017).

Ряд исследований показывает, что распределение растительного углерода между компонентами почвенной микробиоты и характеристики энергетических потоков между разными трофическими уровнями экосистем определяются со-

ставом липидов (Joergensen, Wichern, 2008; Zocatelli et al., 2012; Pollierer et al., 2012; Dippold, Kuzyakov, 2016; Reiffart et al., 2016). Убедительным примером такой зависимости является работа, в которой сравнивали содержание липидов и углерода в лесных почвах разновозрастных растительных насаждений – 200-летних и 14-летних лесополос с использованием ЯМР-спектроскопии в сочетании с изотопным анализом (^1H и ^{13}C) (Szajdak et al., 2015). Оказалось, что содержание углерода в почве было тем выше, чем выше содержание липидов: коэффициенты корреляции Пирсона между данными по содержанию липидов и общим содержанием органического вещества, а также содержанием растворенного органического вещества равны более 0.998. Самое высокое содержание липидов было характерно для почвы под растениями 200-летней лесополосы. В почвенных образцах постоянно возделываемых участков на полях, прилегающих к разновозрастным лесополосам, содержание и липидов, и углерода было одинаковым и существенно ниже, чем в почве лесополос (рис. 2).

Во многих работах показано, что липиды существенно влияют на свойства почв, стабильность ее агрегатного состояния (Dinel et al., 1992; Jandl et al., 2005, 2007; de Blas et al., 2010). Выявлены связи между липидными компонентами и гидроморфизмом почв (Franco et al., 2000; Lodygin, Beznosikov, 2003; Graber et al., 2009). Так, при исследовании образцов подзолистых и болотно-подзолистых почв ^{13}C ЯМР-анализ не выявил существенных изменений в качественном и количественном составе липидной фракции в пределах одной почвы. Однако усиление степени гидроморфизма приводило к увеличению доли непредельных компонентов ($-\text{C}=\text{C}-$; $-\text{Ar}$). По-

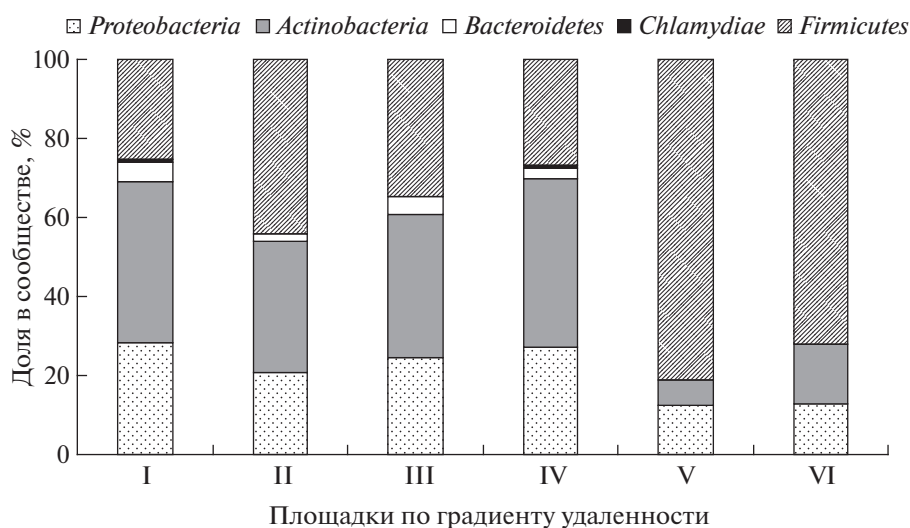


Рис. 3. Структура микробного сообщества (доля каждой из пяти таксономических групп, %) в образцах урбаноземов (г. Киров), отобранных на площадках по мере удаленности от автотрассы: I–V – загрязненные тяжелыми металлами площадки на расстоянии 5, 30, 50, 150, 200 м, VI – условно чистая площадка на расстоянии 2000 м от автотрассы (Верховцева и др., 2015).

добная тенденция обусловлена слабым процессом разложения растительных остатков, обогащенных ароматическими структурами лигнина, в гидроморфных почвах (Lodygin, Beznosikov, 2003).

Присутствие разных типов липидных компонентов может свидетельствовать о способах обработки почв (Dinel et al., 1992; Bull et al., 1998). Отмечено, что в верховом торфе заметно повышается содержание липидов и антиоксидантов при механохимической обработке. Липиды отличаются высоким содержанием функциональных групп, унаследованных от растений-торфообразователей и преобразованных в результате биохимических процессов в торфяной залежи. При исследовании влияния различных условий механохимической обработки на количественное содержание, физические, химические свойства верхового торфа установлено, что на условия его обработки в первую очередь откликается реакционная активность жирорастворимых компонентов (Иванов и др., 2004).

Особенности структуры органических веществ почв и степень их трансформации в почвах также зависит от количественного и качественного состава липидов (Naafs et al., 2004; Filley et al., 2008; Vogts et al., 2009; Wiesenberg et al., 2009). Накопление липидов в гумусовых горизонтах почв обычно находится в обратной зависимости от степени гумификации и содержания гуминовых кислот. В серых лесных, черноземах, каштановых почвах с высокой степенью гумификации органического вещества доля липидов минимальна (2–4%). В тундровых, подзолистых и полупустынных почвах она повышается в 2–3 раза. В естественных почвах источниками липидов служат расти-

тельные остатки, микроорганизмы и органические добавки, так называемые почвоулучшители. Роль основного поставщика липидов в почвы под растительностью выполняют высшие растения (Фридланд, 1982; Dinel et al., 1992; Jandl et al., 2007; Simpson M.J., Simpson A.J., 2012; Jansen, Wiesenberger, 2017), поэтому и состав липидов в таких почвах определяется главным образом массой и особенностями состава поступающих в почву растительных остатков (Gleixner, Kramer, 2006; Trendel et al., 2010).

В техногенно-преобразованных почвах к липидным компонентам естественного происхождения (из растений, животных и микроорганизмов) добавляются определенные фракции поллютантов или продукты их превращений, существенно влияющие на почвенные свойства и таксономическую структуру биоты. Изменения в структуре микробных сообществ, диагностируемые с помощью липидного анализа, неоднократно фиксировались в почвах, подверженных как разным способам сельскохозяйственного воздействия, так и химическому (тяжелыми металлами) или смешанному видам загрязнения (Верховцева и др., 2008; Попутникова, Терехова, 2010; Лисовицкая, Можарова, 2013; Гордеев и др., 2014; Верховцева и др., 2015).

В частности, исследования образцов почв, отобранных в городской черте Кирова, показали, что на пробных площадках урбаноземов, в разной степени удаленных от оживленной автотрассы и, как следствие, в разной степени загрязненных транспортными выбросами, в частности, тяжелыми металлами, процентное соотношение пяти выявленных групп микроорганизмов, заметно различается (рис. 3).

Метод хемодиагностики с использованием жирных кислот и их производных дает возможность установить различия в структуре микробиоты городских почв и имеет определенное биоиндикационное значение не только в санитарно-эпидемиологическом отношении, но и для экологической оценки природных сред.

Таким образом, хемодиагностика, основанная на молекулярных методах анализа липидных маркеров, способствует совершенствованию экологического мониторинга почв. Без традиционных микробиологических посевов можно отслеживать тенденции в трансформации почвенной микробиоты, динамике биоразнообразия при техногенных воздействиях, а также изменения ряда других почвенных характеристик, среди которых — особенности агрохимических свойств, гидроморфизма или последствий механо-химической обработки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время резко возрос интерес к исследованию биомаркерной функции липидных компонентов почв. Пристальное внимание к изучению липидов как почвенных маркеров объясняется их большей устойчивостью к внешним воздействиям по сравнению с белками, нуклеиновыми кислотами или углеводами, что позволяет их надежно идентифицировать в почве, почвогрунтах и донных отложениях.

Вместе с тем, накопились сведения о существенных ограничениях в распространении известных химических методов липидного анализа на исследования экологического состояния почв. Критичным является выбор способа липидного анализа почв и почвенной биоты при разных экологических условиях: под разными типами растительности, обогащенности углеродом, влажности, при разных условиях землепользования. Эти ограничения обусловлены сложными схемами извлечения и анализа почвенных липидных компонентов. В зависимости от используемых методов анализа состав липидов может свидетельствовать о наличии в исследуемом образце либо смеси жизнеспособной и детритной биомассы, либо только об активно функционирующих представителях почвенной биоты. В частности, профили ЖК, полученные методами PLFA, тесно связаны с жизнеспособным микробным сообществом, тогда как общие профили ЖК, полученные по методу TFA, характеризуют как связанные, так и свободные ЖК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-01218-а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васьковский В.Е.* Липиды // Соросовский образов. журн. 1997. № 3. С. 32–37.
- Верховцева Н.В., Ларина Г.Е., Спиридонов Ю.Я. и др.* Микробные консорциумы почв агроценозов разных природных зон России с учетом их сельскохозяйственного использования // Пробл. агрохим. и экол. 2008. № 2. С. 51–54.
- Верховцева Н.В., Терехова В.А., Пукальчик М.А. и др.* Структура сообществ микроорганизмов в урбано-земах, реконструированная по липидным маркерам // Пробл. агрохим. и экол. 2015. № 3. С. 45–53.
- Гордеев А.С., Гайнуллина Л.А., Шинкарев А.А.* Липиды пахотных почв, систематически загрязняемых поверхностным склоновым стоком с территории объектов нефтедобычи // Уч. записки Казанского ун-та. 2014. Т. 156. № 3. С. 76–86.
- Иванов А.А., Юдина Н.В., Ломовский О.И.* Механохимическая обработка верхового торфа // Химия раст. сырья. 2004. № 2. С. 55–60.
- Лисовицкая О.В., Можарова Н.В.* Влияние углеводородного загрязнения на накопление липидов в почвах // Почвоведение. 2013. № 6. С. 755–760.
- Нельсон Д., Кокс М.* Основы биохимии Ленинджера. Т. 1. Москва: Изд-во БИНОМ, 2011. 694 с.
- Орлов Д.С.* Химия почв. Издание 2-е, исправленное и дополненное. Москва: Изд-во МГУ. 1992. 400 с.
- Осипов Г.А.* Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов // Патент № 2086642 РФ. Оpubл. 10.08.1997.
- Осипов Г.А.* Химический анализ в медицинской диагностике. Москва: Наука, 2010. С. 293–368.
- Попутникова Т.О., Терехова В.А.* Установление зоны влияния полигона твердых бытовых отходов на почвы по структурно-функциональным изменениям микробных сообществ // Вестн. Московского ун-та. Серия 17: Почвоведение. 2010. № 2. С. 51–54. DOI: 10.3103/S0147687410020079
- Шерышева Н.Г., Осипов Г.А.* Трансформация структуры микробного сообщества в восстановительном процессе в донных отложениях озера Серебрянка (Самарская Лука) // Изв. Самарского НЦ РАН. 2013. Т. 15. № 3 (1). С. 489–496.
- Шерышева Н.Г., Верховцева Н.В., Осипов Г.А., Унковская Е.Н.* Бактериобентос пелагиали и зарослей высших водных растений озера Илантово (ВКГПБЗ, Татарстан) // Изв. Самарского НЦ РАН. 2011. Т. 13. № 1. С. 174–179.

- Фридланд Е.В. Некоторые особенности почвенных липидов в связи с экологическими условиями // Почвоведение. 1982. № 2. С. 38–46.
- Acosta-Martinez V., Dowd S.E., Lascano R. et al. Microbial community comparison as affected by dry land cropping systems and tillage in a semiarid sandy soil // Diversity. 2010. № 2. P. 910–931. DOI: 10.3390/d2060910
- Aslam Z., Yasir M., Khaliq A. et al. Too much bacteria still unculturable // Crop & Environment. 2010. V. 1. P. 59–60.
- Balkwill D.L., Drake G.R., Reeves R.H. et al. Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranean* sp. nov. and *Sphingomonas stygia* sp. nov. // J. Syst. Bacteriol. 1997. № 47. P. 191–201.
- Benveniste P. Biosynthesis and accumulation of sterols // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. № 55. P. 429–457. DOI: 10.1371/journal.pone.0053650
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911–917.
- Bobbie R.J., White D.C. Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters // Appl. Environ. Microbiol. 1980. V.39. № 6. P. 1212–1222.
- Bull I.D., van Bergen P.F., Poulton P.R. et al. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments: II. Soils from the Hoosfield spring barley experiment treated with different quantities of manure // Org. Geochem. 1998. № 28. P. 11–26.
- Buyer J.S., Sasser M. High throughput phospholipid fatty acid analysis of soils // Appl. Soil Ecol. 2012. № 61. P. 127–130. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.06.005
- Carrapiso A.I., Garcia C. Development in lipid analysis: Some new extraction techniques and *in situ* transesterification // Lipids. 2000. № 35. P. 1167–1177. DOI: 10.1007/s11745-000-0633-8
- Chemical methods in bacterial systematics / Eds M. Goodfello, D.E. Minnikin. London, New York, Tokyo: Acad. Press, 1985. 412 p.
- Chen X., Xiuli D., Jinmao Y. Determination of free fatty acids from soil by LC–MS with fluorescence detection and atmospheric pressure chemical ionization identification // Chromatographia. 2010. № 72. P. 171–175. DOI: 10.1365/s10337-009-1300-z
- Chowdhury T.R., Dick R.P. Standardizing methylation method during phospholipid fatty acid analysis to profile soil microbial communities // J. Microbiol. Methods. 2012. № 88. P. 285–291. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.12.008
- Christie W.W. Lipid analysis, 3rd ed. Bridgewater, UK: Oily Press, 2003. P. 97–102.
- Dalsgaard J., John M.S., Kattner G. et al. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment // Adv. Mar. Biol. 2003. № 46. P. 225–340. DOI: 10.1016/S0065-2881(03)46005-7
- de Blas E., Rodrigues-Alleres M., Almendros G. Speciation of lipid and humic fractions in soils under pine and eucalyptus forest in northwest Spain and its effect on water repellency // Geoderma. 2010. № 155. P. 242–248. DOI: 10.1016/j.geoderma.2009.12.007
- Dinel H., Levesque P.E.M., Jambu P. et al. Microbial activity and long-chain aliphatics in the formation of stable soil aggregates // Soil Sci. Soc. Am. J. 1992. № 56. P. 1455–1463.
- Dinel H., Monreal C.M., Schnitzer M. Extractable lipids and organic matter status in two soil catenas as influenced by tillage // Geoderma. 1998. № 86. P. 279–293.
- Dippold M., Kuz'yakov Ya.A. Direct incorporation of fatty acids into microbial phospholipids in soils: Position-specific labeling tells the story // Geochim. Cosmochim. Acta. 2016. № 174. P. 211–221. DOI: 10.1016/j.gca.2015.10.032
- Dobbs F.C., Findlay R.H. Analysis of microbial lipids to determine biomass and detect the response of sedimentary microorganisms to disturbance // Handbook of methods in aquatic microbial ecology / Eds P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, J.J. Cole. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. P. 347–358.
- Dowling N.J.E., Widdel F., White D.C. Phospholipid ester-linked fatty acid biomarkers of acetate-oxidizing sulfate reducers and other sulfide-forming bacteria // J. Gen. Microbiol. 1986. № 132. P. 1815–1825.
- Drenovsky R.E., Elliot G.N., Graham K.J. et al. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities // Soil Biol. Biochem. 2004. № 36. P. 1793–1800. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.05.002
- Duncan S., Olsson T.S.G., Hartley M. et al. A method to detect single molecules of RNA in *Arabidopsis thaliana* // Plant Methods. 2016. V. 12. № 1. P. 1–10. DOI: 10.1186/s13007-016-0114-x
- Dunstan G.A., Volkman J.K., Jeffrey S.W. et al. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1992. № 161. P. 115–134.
- Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M. et al. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae) // Phytochemistry. 1994. № 35. P. 155–161.
- Feng X., Simpson M.J. Temperature and substrate controls on microbial phospholipid fatty acid composition during incubation of grassland soils contrasting in organic matter quality // Soil Biol. Biochem. 2009. № 41. P. 804–812. DOI: 10.1016/j.soilbio.2009.01.020
- Feng X., Simpson A.J., Schlesinger W.H. et al. Altered microbial community structure and organic matter composition under elevated CO₂ and N fertilization in the duke forest // Glob. Change Biol. 2010. V. 16. № 7. P. 2104–2116. DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.05.008
- Fernandes M.F., Saxena J., Dick R.P. Comparison of whole-cell fatty acid (MIDI) or phospholipid fatty acid (PLFA) extractants as biomarkers to profile soil microbial communities // Microb. Ecol. 2013. № 66. P. 145–157. DOI: 10.1007/s00248-013-0195-2
- Filley T.R., Boutton T.W., Liao J.D. et al. Chemical changes to nonaggregated particulate soil organic matter following grassland-to-woodland transition in a subtropical savanna // J. Geophys. Res. 2008. № 113. G03009. DOI: 10.1029/2007JG000564
- Franco C.M.M., Clarke P.J., Tate M.E. et al. Hydrophobic properties and chemical characterisation of natural water repellent materials in Australian sands // J. Hydrol.

2000. №231–232. P. 47–58. DOI: 10.1016/S0022-1694(00)00182-7
- Frostegård A., Baath E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil // *Biol. Fertil. Soils*. 1996. № 22. P. 59–65.
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. № 11. P. 3605–3617.
- Geiger O., Gonzales-Silva N., Lopes-Lara I.M. et al. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria // *Prog. Lipid Res.* 2010. № 49. P. 46–60. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.08.002
- Gleixner G., Kramer C. Variable use of plant- and soil-derived carbon by microorganisms in agricultural soils // *Soil Biol. Biochem.* 2006. №38. P. 3267–3278. DOI: 10.1016/j.soilbio.2006.04.006
- Gonzalez-Perez J.A., Gonzalez-Vila F.J., Arias M.E. et al. Geochemical and ecological significance of soil lipids under *Rhododendron ponticum* stands // *Environ. Chem. Lett.* 2011. V. 9. № 4. P. 453–464. DOI: 10.1007/s10311-010-0300-4
- Graber E.R., Tagger S., Wallach R. Role of divalent fatty acid salts in soil water repellency // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2009. № 73. P. 541–549. DOI: 10.2136/sssaj2008.0131
- Graber E.R., Tsechansky L. Rapid one-step method for total fatty acids in soils and sediments // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2010. № 74. P. 42–50. DOI: 10.2136/sssaj2009.0127
- Graham J.H., Hodge N.C., Morton J.B. Fatty acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. № 61. P. 58–64.
- Green C.T., Scow K.M. Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers // *Hydrogeol. J.* 2000. № 8. P. 126–141. DOI: 10.1007/s100400050013
- Hahn A., Quideau S. Long-term effects of organic amendments on the recovery of plant and soil microbial communities following disturbance in the Canadian boreal forest // *Plant Soil*. 2013. V. 363. № 1/2. P. 331–344.
- Harvey H.R., Fallon R.D., Patton J.S. The effect of organic matter and oxygen on the degradation of bacterial membrane lipids in marine sediments // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1986. № 50. P. 795–804.
- Harwood J.L., Russel N.J. Lipids in plants and microbes. London: Allen and Unwin, 1984. 155 p.
- Henderson R.J., Hegseth E.N., Park M.T. Seasonal variation in lipid and fatty acid composition of ice algae from the Barents Sea // *Polar. Biol.* 1998. № 20. P. 48–55.
- Huguet A., Fosse C., Metzger P. et al. Occurrence and distribution of extractable glycerol dialkyl glycerol tetraethers in podzols // *Org. Geochem.* 2010. № 41. P. 291–301. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2009.10.007
- Ibekwe A.M., Kennedy A.C. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils // *Plant Soil*. 1998. № 206. P. 151–161.
- Imbs A.B., Dang L.P.T., Rybin V.G. et al. Fatty acid, lipid class, and phospholipid molecular species composition of the soft coral *Xenia* sp. (Nha Trang Bay, the South China Sea, Vietnam) // *Lipids*. 2015. № 50. P. 575–589. DOI: 10.1007/s11745-015-4021-0
- Jandl G., Leinweber P., Schulten H.-R. et al. The concentrations of fatty acids in organo-mineral particlesize fractions of a chernozem // *Eur. J. Soil Sci.* 2004. № 55. P. 459–469. DOI: 10.1111/j.1365-2389.2004.00623.x
- Jandl G., Leinweber P., Schulten H.R. et al. Contribution of primary organic matter to the fatty acid pool in agricultural soils // *Soil Biol. Biochem.* 2005. № 37. P. 1033–1041. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.10.018
- Jandl G., Leinweber P., Schulten H.R. Origin and fate of soil lipids in a Phaeozem under rye and maize monoculture in central Germany // *Biol. Fertil. Soils*. 2007. № 43. P. 321–332. DOI: 10.1007/s00374-006-0109-2
- Jansen B., Wiesenberg G.L.B. Opportunities and limitations related to the application of plant-derived lipid molecular proxies in soil science // *Soil*. 2017. №3. P. 211–234. DOI: 10.5194/soil-3-211-2017
- Jeannotte R., Hamel C., Jabaji S. et al. Pyrolysis-mass-spectrometry and gas chromatography-flame ionization detection as complementary tools for soil lipid characterization // *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 2011. № 90. P. 232–237. DOI: 10.1016/j.jaap.2010.12.010
- Joergensen R.G., Wichern F. Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil // *Soil Biol. Biochem.* 2008. № 40. P. 2977–2991. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.08.017
- Kaiser C., Frank A., Wild B., Koranda M. et al. Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2 ω 6, 9 and 18:1 ω 9 // *Soil Biol. Biochem.* 2010. № 42. P. 1650–1652. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.05.019
- Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function and taxonomic significans // *Microbiol. Rev.* 1991. V. 55. № 2. P.288–302.
- Kerger B.D., Nichols P.D., Antworth C.P. et al. Signature fatty acids in the polar lipids of acid producing *Thiobacillus* sp.: methoxy, cyclopropyl, alpha-hydroxy-cyclopropyl and branched and normal moenoic fatty acids // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1986. № 32. P. 67–77.
- Kolattukudy P.E. Cutin from plants // *Biopolymers* / Eds A. Steinbüchel, Y. Doi. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. P. 1–40.
- Kroppenstedt R.M. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms // *Chemical Methods in Bacterial Systematics* / Eds. M. Goodfellow, D.E. Minnikin. London: Acad. Press, 1985. P. 173–199.
- Leininger S., Urich T., Schloter M. et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils // *Nature*. 2006. № 442. P. 806–809. DOI: 10.1038/nature04983
- Lewis T., Nichols P.D., McMeekin T.A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs // *J. Microbiol. Methods*. 2000. № 43. P. 107–116. DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00217-7
- Li R., Watanabe M.M. Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes // *Phytochemistry*. 2001. № 57. P. 727–731. DOI: 10.1016/S0031-9422(01)00082-6

- Liu K.S. Preparation of fatty-acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological-materials // J. Am. Oil Chem. Soc. 1994. № 71. P. 1179–1187.
- Lodygin E.D., Beznosikov V.A. The structure of the lipid fraction of humus isolated from podzolic and peaty-podzolic-gleyic soils // Eur. Soil Sci. 2003. V. 36. № 1. P. 46–50.
- Macnaughton S.J., Jenkins T.L., Wimpee M.H. et al. Rapid extraction of lipid biomarkers from pure culture and environmental samples using pressurized accelerated hot solvent extraction // J. Microbiol. Methods. 1997. № 31. P. 19–27.
- Malave-Orengo J., Borglin S.E., Hazen T.C. et al. A modified cell extraction method to access microbial community structure in soil samples by phospholipid fatty acid analysis. Current research, technology and education topics / Ed. A. Méndez-Vilas // Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol. Badajoz, Spain: Formatex, 2010. P. 1562–1573.
- Marschner P., Solaiman M.Z., Rengel Z. Growth, phosphorus uptake, and rhizosphere microbial community composition of a phosphorus-efficient wheat cultivar in soils differing in pH // J. Plant Nutr. Soil Sci. 2005. № 168. P. 343–351. DOI: 10.1002/jpln.200424101
- Marseille F., Disnar J.R., Guillet B. et al. n-Alkanes and free fatty acids in humus and Al horizons of soils under beech, spruce and grass in the Massif-Central (Mont-Lozere), France // Eur. J. Soil Sci. 1999. № 50. P. 433–441.
- Miura T., Makoto K., Niwa S. et al. Comparison of fatty acid methyl ester methods for characterization of microbial communities in forest and arable soil: phospholipid fraction (PLFA) versus total ester linked fatty acids (EL-FAME) // Pedobiologia. 2017. № 63. P. 14–18. DOI: 10.1016/j.pedobi.2017.04.002
- Mock T., Kroon B.M.A. Photosynthetic energy conversion under extreme conditions-II: the significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms // Phytochemistry. 2002. № 61. P. 53–60. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00215-7
- Mueller K.E., Polissar P.J., Oleksyn J. et al. Differentiating temperate tree species and their organs using lipid biomarkers in leaves, roots and soil // Org. Geochem. 2012. № 52. P. 130–141. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2012.08.014
- Naafs D.F.W., van Bergen P.F., Boogert S.J. et al. Solvent-extractable lipids in an acid andic forest; variations with depth and season // Soil Biol. Biochem. 2004. № 36. P. 297–308. DOI: 10.1111/j.1365-2389.2004.00633.x
- Navarrete A., Peacock A., Macnaughton S.J. et al. Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by signature lipid biomarkers // Microb. Ecol. 2000. № 39. P. 92–99. DOI: 10.1007/s002489900185
- Nichols P.D., Smith G.A., Antworth C.P. et al. Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for methane-oxidizing bacteria // FEMS Microbiol. Ecol. 1985. V. 31. № 6. P. 327–335.
- Nierop K.G.J., Naafs D.F.W., Verstraten J.M. Occurrence and distribution of ester-bound lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient // Org. Geochem. 2003. № 34. P. 719–729. DOI: 10.1016/S0146-6380(03)00042-1
- Oates L.G., Read H.W., Gutknecht J.L.M. et al. A lipid extraction and analysis method for characterizing soil microbes in experiments with many samples // J. Vis. Exp. 2017. № 125. P. e55310. DOI: 10.3791/55310
- Olsson P.A. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil // FEMS Microbiol. Ecol. 1999. № 29. P. 303–310.
- Osipov G.A., Turova E.S. Studying species composition of microbial communities with the use of gas chromatography-mass spectrometry / Microbial community of kaolin // FEMS Microbiol. Rev. 1997. V. 20. P. 437–446.
- Osipov G.A., Verkhovtseva N.V. Study of human microecology by mass spectrometry of microbial markers // Beneficial microbes. 2011. V. 2. № 1. P. 63–78. DOI: 10.3920/BM2010.0017
- Palmquist D.L., Jenkins T.C. Challenges with fats and fatty acid methods // J. Anim. Sci. 2003. № 81. P. 3250–3254.
- Pancost R.D., Sinninghe Damste J.S. Carbon isotopic compositions of prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse settings // Chem. Geol. 2003. № 195. P. 29–58. DOI: 10.1016/S0009-2541(02)00387-X
- Papadopoulou E.S., Karpouzias D.G., Menkissoglu-Spiroudi U. Extraction parameters significantly influence the quantity and the profile of PLFAs extracted from soils // Microb. Ecol. 2011. № 62. P. 704–714. DOI: 10.1007/s00248-011-9863-2
- Parkes R.J., Calder A.G. The cellular fatty acids of three strains of *Desulfobulbus*, a propionate-utilizing sulfate-reducing bacterium // FEMS Microbiol. Ecol. 1985. № 31. P. 361–363.
- Peacock A.D., Mullen M.D., Ringelberg D.B. et al. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications // Soil Biol. & Biochem. 2001. № 33. P. 1011–1019.
- Pennanen T. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH – a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog (R) and H-3-thymidine incorporation methods in field studies // Geoderma. 2001. № 100. P. 91–126.
- Peterse F., Hopmans E.C., Schouten S. et al. Identification and distribution of intact polar branched tetraether lipids in peat and soil // Org. Geochem. 2011. № 42. P. 1007–1015. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2011.07.006
- Pitcher A., Hopmans E.C., Schouten S. et al. Separation of core and intact polar archaeal tetraether lipids using silica columns: insights into living and fossil biomass contributions // Org. Geochem. 2009. № 40. P. 12–19. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2008.09.008
- Pollierer M.M., Dyckmans J., Scheu S. et al. Carbon flux through fungi and bacteria into the forest soil animal food web as indicated by compound-specific ¹³C fatty acid analysis // Func. Ecol. 2012. № 26. P. 978–990. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2012.02005.x
- Poputnikova T.O., Terekhova V.A. Establishment of a landfill impact zone on soils using structural and functional modifications of microbial communities // Moscow Univ. Soil Sci. Bull. 2010. V. 65. № 2. P. 94–97. DOI: 10.3103/S0147687410020079

- Reiffarth D.G., Petticrew E.L., Owens P.N. et al.* Sources of variability in fatty acid (FA) biomarkers in the application of compound-specific stable isotopes (CSSIs) to soil and sediment fingerprinting and tracing: a review // *Sci. Total Environ.* 2016. № 565. P. 8–27. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.137
- Rousch J.M., Bingham S.E., Sommerfeld M.R.* Changes in fatty acid profiles of thermo-intolerant and thermo-tolerant marine diatoms during temperature stress // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2003. № 295. P. 145–156. DOI: 10.1016/S0022-0981(03)00293-4
- Rozentsvet O.A.* Comparative examination of distribution of phospholipids and a betaine lipid DGTS in tropical fern species // *Biochem. System. Ecol.* 2004. V. 36. № 3. P. 303–311. DOI: 10.1016/j.bse.2003.07.003
- Rushdi A.I., Oros D.R., Al-Mutlaq K.F. et al.* Lipid, sterol and saccharide sources and dynamics in surface soils during an annual cycle in a temperate climate region // *Appl. Geochem.* 2015. № 66. P. 1–13. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2015.11.007
- Ruzicka S., Edgerton D., Norman M. et al.* The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils // *Soil Biol. Biochem.* 2000. № 32. P. 989–1005. DOI: 10.1016/S0038-0717(00)00009-2
- Saito H., Kotani Y., Keriko J.M. et al.* High levels of n-3 polyunsaturated fatty acids in *Euphausia pacifica* and its role as a source of docosahexaenoic and icosapentaenoic acids for higher trophic levels // *Mar. Chem.* 2002. № 78. P. 9–28.
- Salomonová S., Lamačová J., Rulík M. et al.* Determination of phospholipid fatty acids in sediments // *Chimica.* 2003. № 42. P. 39–49.
- Schnecker J., Wild B., Fuchslueger L. et al.* A field method to store samples from temperate mountain grassland soils for analysis of phospholipid fatty acids // *Soil Biol. Biochem.* 2012. № 51. P. 81–83. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.03.029
- Schutter M.E., Dick R.P.* Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2000. № 64. P. 1659–1668. DOI: 10.2136/sssaj2000.6451659x
- Shekhovtsova N.V., Osipov G.A., Verkhovtseva N.V. et al.* Analysis of lipid biomarkers in rocks of the Archean crystalline basement // *Proc. SPIE.* 2003. № 4939. P. 160–168.
- Sherysheva N.G., Osipov G.A., Khalko V.V.* Studying composition of bacteriobenthic communities in the sediments of water ecosystems by fatty acid markers // *Inland Water Biology.* 2015. V. 8. № 3. P. 242–249. DOI: 10.1134/S1995082915030128
- Silva L., Cachada A., Freitas A.C. et al.* Assessment of fatty acid as a differentiator of usages of urban soils // *Chemosphere.* 2010. № 81. P. 968–975. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.07.050
- Simpson M.J., Simpson A.J.* The chemical ecology of soil organic matter molecular constituents // *J. Chem. Ecol.* 2012. № 38. P. 768–784. DOI: 10.1007/s10886-012-0122-x
- Sinninghe Damsté J.S., Rijpstra W.I.C., Hopmans E.C. et al.* Intact polar and core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids of group I.1a and I.1b *Thaumarchaeota* in soil // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. № 19. P. 6866–6874. DOI: 10.1128/AEM.01681-12
- Steward C.C., Nold S.C., Ringelberg D.B. et al.* Microbial biomass and community structures in the burrows of bromophenol producing and non-producing marine worms and surrounding sediments // *MEPS.* 1996. № 133. P. 149–165.
- Szajdak L.W., Maryganova V., Skakovskii E. et al.* ¹H and ¹³C NMR spectroscopic studies of hexane-extractable lipids from soils under shelterbelts of different age and composition of plants // *Chemosphere.* 2015. № 119. P. 1422–1427. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.10.032
- Trendel J.M., Schaeffer P., Adam P. et al.* Molecular characterization of soil surface horizons with different vegetation in the Vosges Massif (France) // *Org. Geochem.* 2010. V. 41. № 9. P. 1036–1039. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2010.04.014
- Tunlid A., White D.C.* Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil / Eds G. Stotzky, J.M. Bollag // *Soil Biochem.* New York: Dekker, 1992. P. 229–262.
- Vallejo V.E., Arbeli Z., Terán W. et al.* Effect of land management and *Prosopis juliflora* (Sw.) DC trees on soil microbial community and enzymatic activities in intensive silvopastoral systems of Colombia // *Agric. Ecosyst. Environ.* 2012. № 150. P. 139–148. DOI: 10.1016/j.agee.2012.01.022
- Verkhovtseva N.V., Osipov G.A., Bolysheva T.N. et al.* Microbiology of composting. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. P. 99–108.
- Vestal J.R., White D.C.* Lipid analysis in microbial ecology // *BioScience.* 1989. V. 39. № 8. P. 535–541.
- Vogts A., Moossen H., Rommerskirchen F. et al.* Distribution patterns and stable carbon isotopic composition of alkanes and alkan-1-ols from plant waxes of African rain forest and savanna C3 species // *Org. Geochem.* 2009. № 40. P. 1037–1054. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2009.07.011
- Volkman J.K.* A review of sterol markers for marine and terrigenous organic-matter // *Org. Geochem.* 1986. № 9. P. 83–99.
- Volkman J.K., Jeffrey S.W., Nichols P.D. et al.* Fatty-acid and lipid-composition of 10 species of microalgae used in marine culture // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1989. № 128. P. 219–240.
- Volkman J.K.* Sterols in microorganisms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 60. № 5. P. 495–506. DOI: 10.1007/s00253-002-1172-8
- Wakeham S.G.* Lipid biomarkers for heterotrophic alteration of suspended particulate organic matter in oxygenated and anoxic water columns of the ocean // *Deep Sea Res. Part I: Oceanogr. Res. Papers.* 1995. № 42. P. 1749–1771.
- Weijers J.W.H., Schouten S., Hopmans E.C. et al.* Membrane lipids of mesophilic anaerobic bacteria thriving in peats have typical archaeal traits // *Environ. Microbiol.* 2006. № 8. P. 648–657. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00941.x
- White D.C.* Validation of quantitative analysis for microbial biomass, community structure, and metabolic activity //

- Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeben Limnol. 1988. № 31. P. 1–18.
- White D.C., Ringelberg D.B. Signature lipid biomarker analysis // Techniques in microbial ecology / Eds R.S. Burlage, R. Atlas, D. Stahl, G. Geesey, G. Saylor. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1998. P. 255–272.
- Wiesenberg G.L.B., Schneckenberger K., Schwark L. et al. Use of molecular ratios to identify changes in fatty acid composition of *Miscanthus giganteus* (Greef et Deu.) plant tissue, rhizosphere and root-free soil during a laboratory experiment // Org. Geochem. 2009. № 46. P. 1–11. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2012.01.010
- Willers C., Jansen van Rensburg P.J., Claassens S. Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities – a review of interpretations and recent applications // J. Appl. Microbiol. 2015. № 119. P. 1207–1218. DOI: 10.1111/jam.1290
- Wu Y., Yu X., Wang H. et al. Does history matter? Temperature effects on soil microbial biomass and community structure based on the phospholipid fatty acid (PLFA) analysis // J. Soil Sediments. 2010. V. 10. № 2. P. 223–230. DOI: 10.1007/s11368-009-0118-5
- Zelles L., Bai Q.Y. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS // Soil Biol. Biochem. 1993. № 25. P. 495–507.
- Zelles L. Fatty acid patterns of microbial phospholipids and lipopolysaccharides // Methods in soil biology / Eds F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, R. Margesin. Berlin, Heidelberg, N.Y.: Springer, 1996. P. 80–93.
- Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review // Biol. Fertil. Soils. 1999. № 29. P. 111–129.
- Zocatelli R., Marlène L., Disnar J.-R. et al. Free fatty acids in Lake Aydat catchment soils (French Massif Central): sources, distributions and potential use as sediment biomarkers // J. Soils Sediments. 2012. № 12. P. 734–748. DOI: 10.1007/s11368-012-0505-1

Lipid Biomarkers in Ecological Assessment of Soil Biota: Analysis of Fatty Acids

O. A. Rozentsvet¹, E. V. Fedoseeva², V. A. Terekhova^{3, 4, *}

¹Institute of Ecology of the Volga River Basin of RAS, Samara region, Togliatti, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow, Russia

⁴Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: vterekhova@gmail.com

Received May 21, 2018

Revised October 22, 2018

Accepted October 22, 2018

The possibilities and limitations of the biomarker role of lipids in the characterization of biodiversity and the viability of soil biota are critically analyzed. The contribution of representatives of different groups of living systems (plants, animals, microorganisms) and environmental conditions to the composition of lipid components of soils, as well as advances regarding the efficiency of lipid release from soils, bottom sediments and other solid substrates are considered. The modern data on the methods of analysis (PLFA, EL, MIDI, TFA) of lipid components, the methods of derivatization and quantitative analysis for characterizing lipids as sources of organic carbon of soils are summarized. It is noted that the choice of the method of lipid analysis of soils under different environmental conditions is critical for the effectiveness of the biomarker function: under different types of vegetation, under different conditions of carbon enrichment, humidity, land use types. Depending on the methods of analysis used, the lipid composition may indicate the presence in the test sample of either a mixture of viable and detrital biomass, or only of actively functioning representatives of soil biota. In particular, the fatty acid (FA) profiles obtained by PLFA methods are closely related to the viable microbial community, while the total TFA profiles obtained by the TFA method characterize both bound and free LCs.

Keywords: biodiversity, microorganisms, bioindication, soil lipidomics, methods of lipid components analysis