

磷脂脂肪酸分析中内标物的使用及数据处理建模

李范 周星梅 蒋海波 李娜* 陈建中

(中国科学院成都生物研究所 中国科学院山地生态恢复与生物资源利用重点实验室 生态恢复与生物多样性
保育四川省重点实验室 四川 成都 610041)

摘要：【目的】评估未知样品内标进样量的参考范围，优化数据处理方法。【方法】采用 C19 为内标，不同进样量进行分析；编写数据分析程序优化数据处理模型。【结果】随着内标进样量的增加，检测到的 PLFA 数量和响应值等指标均有增加，但进样量超过 16 nmol/g 时反而下降；25 组数据显示采用响应值计算 PLFA 含量比百分比值计算所得含量略高；采用 Dot Net C#语言编写数据分析模型。【结论】初步确定了未知样品内标进样量的参考范围，得出最优处理方法；采用响应值计算 PLFA 含量可避免由于百分比值缺失带来的误差；校准系数的引入可减少仪器参数条件改变等因素带来的误差；通过编写谱图数据分析程序获得一定自动化操作，提高了数据分析效率和准确性。

关键词：磷脂脂肪酸，内标物，数据处理

Using of internal standard and modeling the data processing of phospholipid fatty acids

LI Fan ZHOU Xing-Mei JIANG Hai-Bo LI Na* CHEN Jian-Zhong

(Key Laboratory of Mountain Ecological Restoration and Bioresource Utilization & Ecological Restoration Biodiversity Conservation Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: [Objective] To estimate the reference range of internal standard amount of unknown samples and optimize the method of data processing. [Methods] The different amount use of Methyl Nonadecanoate as internal standard was studied and discussed. The data analysis model of fatty acids was established to optimize the data processing of PLFA. [Results] The number and response values of detected PLFA were advanced with the increased of amount of internal standard, but both reduced when the amount over 16 nmol/g. Twenty-five sets of PLFA data showed that the PLFA contents calculated by response value were higher than by percentage value. A data analysis model of PLFA was established using Dot Net C# language. [Conclusion] The reference range of internal standard amount of unknown samples was preliminary estimated and optimized. Calculation of PLFA content by response value can avoid the error caused by the lack of percentage value. The use of calibration coefficient can reduce the system error. Data processing was automated by the data analysis mode. It

基金项目：中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(No. Y2C6011100, Y3C6011100)

*通讯作者：Tel: 86-28-82890983; 信箱: lina@cib.ac.cn

收稿日期：2014-02-22；接受日期：2014-08-08；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2014-08-19

improves the efficiency and accuracy of data analysis.

Keywords: PLFA, Internal standard, Data processing

磷脂脂肪酸(Phospholipid fatty acids, PLFAs)是微生物细胞膜的重要组成部分,可作为生物标记物来表征微生物。PLFA 谱图分析方法^[1-4]作为现代生物化学和分子生物学方法之一,可以获取更加丰富的微生物信息,很好的克服了传统微生物研究技术的局限性。Microbial Identification System (MIS)以火焰离子检测器反复测定的标准脂肪酸保留时间为基础,用标准混合脂肪酸保留时间锁系统进一步校准,可快速测定气相色谱中保留时间介于 C9:0 和 C20:0 之间的短链脂肪酸的组成和含量,自动校正数据以消除误差。目前,磷脂脂肪酸分析(PLFA)以其快速、直接、有效地提供较为客观可靠的土壤微生物含量、组成及群落信息等优点,被广泛用于微生物的量化、微生物群落结构以及土壤多样性研究。

但是 PLFA 分析中内标样的使用,以及内标使用对待测样品的影响,尚无深入研究。数据分析方法无统一定论,不同的数据处理方法所得结果存在差别。由于 PLFA 种类繁多,筛选、分类、计算工作量大,易出错。林营志等^[5]开发了分析程序 PLFA Eco,扩展了 Sherlock 系统在微生物群落分析方面的功能,避免了手工分析磷脂脂肪酸数据提取、数据矩阵构建、统计计算等复杂而繁重的工作,具有操作方便、速度快等特点,已在烟田土壤、发酵床养猪场垫料的微生物群落分析中得到了验证。但是该软件以 Perl 语言编制,需 Perl 运行环境及相关组件、R 统计语言包、MySQL 数据库系统,且该系统只能在 Windows XP 和 Vista 系统运行,为使用带来不便。2012 年 MIDI 公司在 Sherlock 系统中新增了群落分析功能模块,该功能必须依附于系统软件,且价格高昂。

本文针对 PLFA 检测技术的上游和下游两个重要内容展开了相关研究:(1) 内标的使用,以及内标使用对待测样品的影响,得出最优处理方法;(2) 下游数据分析方法优化,以 Sherlock 微生物鉴

定系统为基础,创建微生物群落脂肪酸数据生态学分析模型系统,提供更加便捷的数据分析途径,从而提高相关领域的科研效率。

1 材料与方法

1.1 材料

试验土样取自中国科学院茂县山地生态系统定位研究站,位于四川省阿坝藏族羌族自治州茂县凤仪镇静州村境内,地理坐标(103°53'E, 31°41'N),属暖温带亚高山季风气候,冬季寒冷干燥、夏季多雨,年平均温度为 8.9 °C,年降水量 919.5 mm。取土壤表层 0–20 cm 土壤,随机选择 4 个点取土后混合作为一个土样,过 2 mm 筛,去掉石块、植物残根等杂物,装入塑封袋后置于放有冰袋的泡沫箱运回实验室,于–70 °C 冷冻保存。正己烷(色谱纯, Sigma),正十九烷酸甲酯(色谱纯, Sigma), C9–C20 脂肪酸混合标准品(批号 112280, MIDI), 甲醇、甲苯、氯仿、丙酮、乙酸等其他试剂均为分析纯(成都科龙化工)。

仪器设备: MIDI Sherlock[®] Microbial Identification System (MIS)系统,其中:气相色谱仪,全自动进样装置、石英毛细管柱及氢火焰离子化检测器,美国 Agilent 6850。

1.2 方法

测定时从–70 °C 取出经冷冻干燥的土样,称取 5 g 土样于 50 mL 特氟隆离心管中,用氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲液(1:2:0.8, 体积比)振荡提取脂类^[6-7];通过硅胶柱层析法分离得到磷脂脂肪酸,并 N₂ 吹干。样品溶解于 100 µL 正十九烷酸甲酯(25 mg/L, 溶剂为正己烷),转移到色谱瓶,上机检测。

色谱分析条件:色谱柱为 Agilent 19091B-102E 毛细管柱(25 m×0.2 mm×0.33 µm),气相色谱各参数由 MIDI Sherlock 程序(MIDI, Inc. Newark, DE)设置调用,进样口温度 250 °C,进样口压力 9.5 Psi,

柱温箱温度 170 °C，检测器温度 300 °C。升温程序：5 °C/min 室温升至 260 °C，再以 40 °C/min 升温至 310 °C，持续 1.5 min，恒压模式，尾吹气 N₂ (30 mL/min)；进样量 2 μL，分流比 100:1。美国 MIDI 公司 Sherlock System 6.1 MIDI 微生物数据库和 MIDI 图谱识别软件。

1.3 内标样的选择

气相色谱法分析使用的内标物一般选取分子量、沸点与待测物接近，而且出峰位置与待测样品峰位置不重叠，且不能差太远。本方法中使用 C19 内标法，C19 提供生物量计算的精确度和精密度，

结果比较准确；可直接计算不同样本和土壤类型之间的提取效率的差异；可直接计算磷脂脂肪酸提取过程中的损失。同时，C19 为内标是因为在正常自然界(土壤样本)中不含有的，不会干扰样本测定，与被测样本同属于脂肪酸类别(相同性质)；C19 已成为国内外广泛使用的内标物，商业化产品容易购买。

2 结果与分析

2.1 内标进样量分析

以浓度为 25 mg/L 的 C19 作内标，进样体积取 60–240 μL，设 5 个梯度，检测结果见表 1。

表 1 不同内标进样量对磷脂脂肪酸含量的影响					
Table 1 Effect of different injection volume of internal standard on the concentration of PLFA					
PLFA 含量 The concentration of PLFA (nmol/g)	内标进样量 Injection volume of internal (μL)				
	60	100	120	200	240
11:0 iso 3OH	0.282±0.147	0.279±0.054	0.277±0.161	0.263±0.165	0.265±0.083
Unknown 12.484	ND	0.151±0.013	0.153±0.016	ND	ND
i14:0	0.134±0.027	0.137±0.014	0.136±0.023	ND	ND
14:1 w5c	0.155±0.025	0.153±0.021	0.148±0.019	ND	ND
14:0	0.287±0.035	0.283±0.032	0.279±0.027	0.273±0.043	ND
Unknown 14.502	0.181±0.026	0.177±0.018	0.175±0.023	ND	ND
i15:0	1.833±0.108	1.781±0.096	1.732±0.080	1.616±0.085	1.578±0.087
a15:0	1.623±0.094	1.574±0.018	1.527±0.076	1.425±0.065	1.405±0.077
15:0	0.249±0.041	0.246±0.008	0.255±0.037	0.252±0.029	ND
i16:0	1.639±0.109	1.561±0.095	1.486±0.087	1.387±0.069	1.352±0.063
a16:0	0.346±0.047	0.348±0.061	0.331±0.036	0.264±0.041	ND
16:0	6.976±0.227	6.954±0.222	6.778±0.145	6.665±0.181	6.424±0.231
17:1 iso w9c	1.890±0.123	1.862±0.111	1.750±0.069	1.633±0.114	1.629±0.076
15:0 3OH	0.520±0.065	0.495±0.060	0.471±0.052	0.468±0.057	0.405±0.079
i17:0	0.950±0.072	0.891±0.064	0.836±0.045	0.780±0.055	0.746±0.063
a17:0	1.726±0.103	1.709±0.093	1.600±0.051	1.509±0.100	1.516±0.087
cy17:0	0.704±0.058	0.658±0.042	0.616±0.026	0.575±0.042	0.567±0.045
17:0	0.266±0.021	0.255±0.010	0.245±0.018	0.253±0.015	ND
16:1 2OH	0.729±0.056	0.680±0.039	0.635±0.021	0.593±0.044	0.608±0.038
10Me17:0	0.265±0.048	0.247±0.032	0.230±0.027	0.184±0.037	ND
18:2 w6, 9c/18:0 ante	2.125±0.152	2.090±0.135	1.940±0.076	1.810±0.140	1.805±0.086
18:0	3.274±0.259	3.217±0.234	3.179±0.149	2.880±0.219	2.688±0.244
10Me18:0	1.481±0.096	1.368±0.085	1.364±0.044	1.180±0.094	1.198±0.062
i19:0	1.298±0.107	1.292±0.102	1.194±0.069	1.114±0.089	1.056±0.085
19:0 cyclo w8c	4.511±0.036	4.441±0.037	4.399±0.384	4.106±0.183	3.637±0.266
18:1 2OH	2.833±0.209	2.800±0.191	2.684±0.107	2.412±0.194	2.387±0.211

注：ND 表示没有检测到。

Note: ND means not detected.

由表 1 可见, 当 C19 内标进样量升至 200 μL 时, 有 Unknown 12.484、i14:0、4:1 w5c、Unknown 14.502 四种含量偏小的 PLFA 未被检测到, 当进样量升至 240 μL 时, 又有 14:0、15:0、a16:0、17:0、10Me17:0 五种 PLFA 未被检测到, 说明随着内标进样量的增加检测到的 PLFA 种类在减少。

随着 C19 进样量的增加, PLFA 最小检测值增加近一倍, PLFA 总含量和种类在进标量超过 120 μL 时呈明显减少趋势, 单个目标 PLFA 含量则基本持平, 表明内标量越小, 目标 PLFA 的检测限会更低。分析原因: 对于质量型检测器(以 FID 为例), 其检测限通常以 $D=2NW/A$ 计算, (式中, D : 检测限, 单位 g/s ; N : 基线噪声, 单位 A ; A : 标准物质中溶质的峰面积, 单位 A_s ; W : 标准物质的进样量, 单位 g)^[8-9], 当内标物含量增大时, 使得某些含量较低的 PLFA 检测值低于检测限而未被检出。16:0 的响应值则随内标进样体积的增多而减少, 含量也随之变小, 如表 2 所示。

内标进样量对磷脂脂肪酸微生物测定结果有直接影响, 当我们期望的检测值越低时, 对内标量的要求就更为精确, 这对于一些微量 PLFA 的检测至关重要。对于沙土等 PLFA 含量较低的样品, 更低

的检测限是很有必要的。当需要统计样品中 PLFA 的种类时, 期望一个较低的检测限是很有必要的。根据仪器的具体运行情况, 和特定参数的设定, 进样体积既要满足充分溶解最后一步氮吹干的物质需要, 又要满足上机的需要, 置内衬管上机一般在 100–200 μL 比较适宜。当预设目标 PLFA 最低响应值范围 150–250、C19 的响应值范围在 15 000–30 000、PLFA 最低检测值为 0.05–0.10 nmol/g , 据此可初步估定未知样品的内标量, 见表 3。

2.2 PLFA 数据处理分析

2.2.1 百分比与响应值计算 PLFA 含量比较: 内标法计算 PLFA 含量主要使用百分比(1)或响应值(2)^[10-11]。

$$C_x = \frac{k \times P_x}{P_i} \quad (1) \quad C_x = \frac{k \times R_x}{R_i} \quad (2)$$

其中, k 为内标系数, P_x 为目标 PLFA 的百分比, P_i 为 C19 的百分比; R_x 为目标 PLFA 的响应值, R_i 为 C19 的响应值。以 100 μL 、25 mg/L 的正十九烷酸甲酯作内标为例, 利用 25 组不同样品 PLFA 数据分别采用百分比值(1)和响应值(2)计算 PLFA 含量, 结果见图 1。

表 2 不同内标进样量对检测值及 16:0 的响应值的影响					
Table 2 Effect of different injection volume of internal standard on the detection value and response value of 16:0					
内标进样量 Injection volume of internal standard (μL)	检测值 Detection value (nmol/g)	磷脂脂肪酸含量 The total concentration of PLFA (nmol/g)	16:0 响应值 The response value of 16:0	16:0 含量 The concentration of 16:0 (nmol/g)	C19 内标响应值 The response value of C19
60	0.134–6.796	35.785 \pm 3.007	30 563	6.976 \pm 0.227	21 030
100	0.137–6.954	35.651 \pm 2.839	18 986	6.954 \pm 0.222	21 842
120	0.136–6.778	34.910 \pm 2.111	14 656	6.778 \pm 0.145	20 758
200	0.252–6.665	31.340 \pm 2.275	8 669	6.665 \pm 0.181	20 811
240	0.265–6.424	29.266 \pm 2.235	6 786	6.424 \pm 0.231	20 282

表 3 对于未知样品内标使用量的估定			
Table 3 The assessed for amount of internal standard of the unknown sample			
最低响应值 The minimum response	C19 响应值 The response of C19	PLFA 最低检测值 The detection of PLFA (nmol/g)	应加内标量 The amount of internal standard (nmol/g)
150–250	15 000–30 000	0.05	3–10
		0.10	6–20

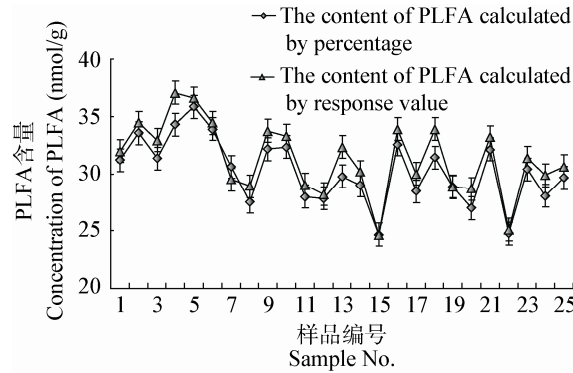


图1 PLFA 含量计算结果

Figure 1 The results of PLFA calculated by percentage and response value

从图1可知,采用响应值比百分比计算得到的PLFA含量结果整体偏大,编号4、13、18三组数据含量差值明显。这是由于在气相色谱原始数据中,目标PLFA在comments>max ar/Ht; comments<min ar/Ht; Peak name为unknown等情况下没有百分比值,导致参与计算的百分比值存在缺失的情况,而响应值则没有。因而,使用响应值计算目标PLFA含量可以更加全面的反映待测物性质。

2.2.2 采用校正系数计算PLFA含量比较:利用响应值计算同一样品16组平行分析PLFA含量,分别采用(3)和不采用校正系数(2)进行比较分析,结果见图2。其中, r_x 为目标PLFA校正系数, r_i 为C19校正系数,其他参数同(2)。

由图2可知,采用校正系数计算PLFA含量比未采用校正系数计算整体稍微偏大。由于校正因子不是仪器的特征值,只是某一特定仪器条件下计算含量的系数,这个系数是不固定的,随仪器条件的改变而变化,因而测定同一批次的样品时,应尽量保持仪器的条件稳定。当仪器参数改变或其他因素导致校正因子差别较大时,应引入校正因子计算PLFA含量以减少误差。

$$C_x = \frac{k \times R_x \times r_x}{R_i \times r_i} \quad (3)$$

2.3 微生物群落脂肪酸数据生态学数据分析模型系统建立

2.3.1 工作流程:系统采用Windows所见即所得的工作方式,主界面和流程示意图分别见图3、图4。用户通过“文件-加载与分析文件(Excel)”将一

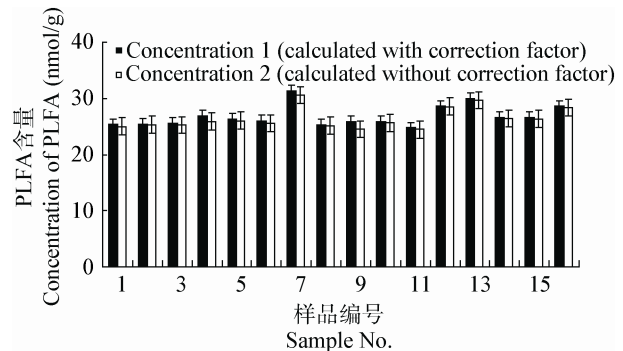


图2 校正系数对PLFA计算结果的影响

Figure 2 Impact of correction factor to the results of PLFA

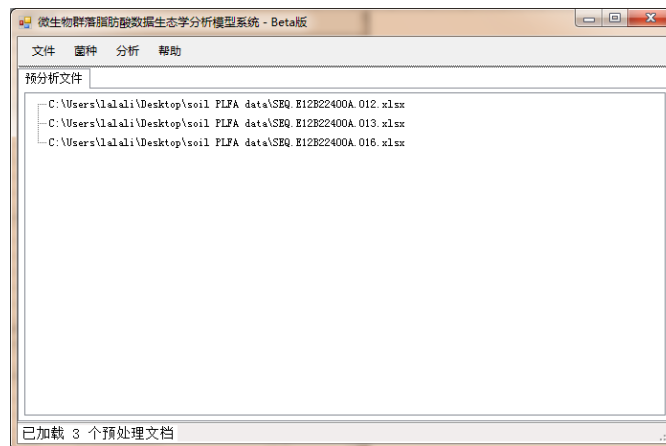


图3 脂肪酸数据分析模型主界面

Figure 3 The main interface of the data analysis model of fatty acids

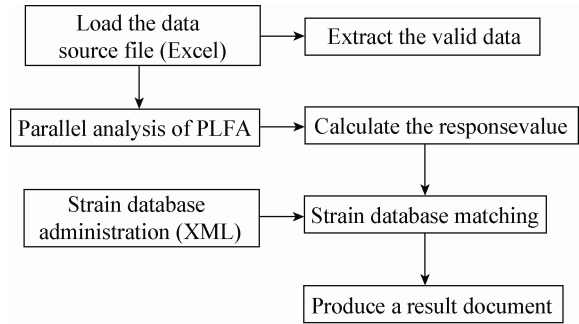


图 4 脂肪酸数据分析模型流程示意图
Figure 4 The flow diagram of the data analysis model of fatty acids

份或多份样品数据源文件导入系统；程序从 Excel 文件提取每一份数据源文件 Excel 中有效的波峰命名(Peak Name)及响应值所占比例(Percent)数据生成二维表格,并计算浓度。计算公式为 $7.999 \times (\text{Peak Name 对应的 Percent 值}) / (19:0 \text{ 对应的 Percent 值})$, 分别分析所有加载到系统的预处理数据源文件,并生成二维表格;用户可自定义多数据源文件平行的次数,并计算浓度,生成对应的总浓度值与 Peak

Name 的二维表格；系统重复以上所有操作，对多次实验的多份数据源文件进行筛选、Peak Name 平行、浓度计算等分析处理并生产对应的二维表格；系统完成 Peak Name 与浓度分析、计算之后将自动匹配“菌种数据库”，生成“菌种-浓度”的最终数据文件并生成 Excel 文件保存。用户可根据样品信息和计算要求,从数据文件中提取有效信息进行均值、方差、生态指数、聚类 and 主成分分析。

2.3.2 数据结构:系统运行时数据存放于计算机内存,菌种数据存于 XML 文件,样品分析后报告数据存于 Excel 文件。XML 数据文件存储菌种的 Peak Name 及名称,用户可以通过软件对菌种数据库进行自定义添加、修改、删除操作,便于软件生成分析报告数据自动匹配菌种名称,如图 5 所示。

2.3.3 程序应用实例:采用 Sherlock 测定了平行 3 个处理的土壤样品 PLFA。经提取数据,微生物群落脂肪酸数据生态学分析模型系统输出单组数据及 3 组平行数据分析结果示例见图 6。单组数据分

ID	Peak Name	Bacterial Name	Delete	Update
0	14:0 iso	革兰氏阳性细菌Gram-positive bacteria	Delete	Update
1	14:0 00	细菌Bacteria in general	Delete	Update
2	15:1 iso G	细菌Bacteria in general	Delete	Update
3	15:0 iso	革兰氏阳性细菌Gram-positive bacteria	Delete	Update
4	15:0 anteiso	革兰氏阳性细菌Gram-positive bacteria	Delete	Update
5	16:1 iso G	霍氏菌Ralstonia	Delete	Update
6	12:0 00	细菌Bacteria in general	Delete	Update
7	14:1 w5c	假单胞杆菌Pseudomonas spp.	Delete	Update
8	15:0	细菌Bacteria in general	Delete	Update
9	15:0 30H iso	革兰氏阴性细菌Gram-negative bacteria	Delete	Update
10	16:0 00	细菌Bacteria in general	Delete	Update
11	16:0 10-methyl, TBSA	放线菌Actinomycete	Delete	Update
12	16:0 anteiso	革兰氏阳性细菌Gram-positive bacteria	Delete	Update
13	16:0 iso	革兰氏阳性细菌Gram-positive bacteria	Delete	Update
14	16:0 30H	革兰氏阴性细菌Gram-negative bacteria	Delete	Update
15	16:1 w5c	甲烷氧化菌Methane-oxidizing bacteria	Delete	Update
16	17:0 anteiso	革兰氏阳性细菌Gram-positive bacteria	Delete	Update
17	17:0 cyclo	革兰氏阴性细菌Gram-negative bacteria	Delete	Update
18	17:0 iso	革兰氏阳性细菌Gram-positive bacteria	Delete	Update
19	18:0 00	嗜热解氢杆菌Hydrogenobacter	Delete	Update
20	18:1 w7c	革兰氏阴性细菌Gram-negative bacteria	Delete	Update
21	18:1 w9c	真菌Fungi	Delete	Update
22	18:3 w6c (6, 9, 12)	真菌Fungi	Delete	Update
23	19:0 cyclo w8c	伯克霍尔德菌Burkholderia cepacia	Delete	Update
24	20:0 00	细菌Bacteria in general	Delete	Update
25	19:0 iso	细菌Bacteria in general	Delete	Update

图 5 菌种数据库
Figure 5 The strain database

Figure 6 displays two screenshots of the fatty acid data analysis model output. The top screenshot shows the 'Single Parallel Data Preview' window, which lists 33 peaks with their names, concentrations, and percentages. The bottom screenshot shows the 'Multi-Parallel Data Preview' window, which lists 29 peaks categorized by taxonomic groups (Fungi, Bacteria, etc.) with their average concentrations and parallel counts.

Peak Name	Concentration	Percent
16:1 20H	0.221170506912442	0.6
18:3 w6c (6,9,12)	0.121643778801843	0.33
Sum In Feature 5	1.58505529953917	4.3
18:1 w9c	1.24224101382488	3.37
Sum In Feature 8	2.10849216589862	5.72
18:1 w5c	1.10953870967742	3.01
18:00	1.48552857142857	4.03
17:0 iso 30H	1.43023594470046	3.88
18:0 10-methyl, TBSA	0.501319815668203	1.36
19:1 iso I	0.361245161290323	0.98
19:0 cyclo w6c	1.40443271889401	3.81
19:00	7.999	21.7
Peak Name共: 33个	浓度求和: 36.8580649769585	

菌种	Peak Name	Average Concentration	平行次数
真菌Fungi	18:1 w9c	0.786173721508445	2
No data	Sum In Feature 8	1.24188552691108	2
嗜热解氨杆菌Hydrogenobacter	18:00	1.23364160943265	3
No data	17:0 iso 30H	1.66134887251279	3
No data	18:0 10-methyl, TBSA	0.436561949536968	2
No data	19:1 iso I	0.54373965275637	2
伯克霍尔德菌Burkholderia...	19:0 cyclo w6c	1.35567593829202	3
No data	19:00	7.999	3
细菌Bacteria in general	12:00	1.04951009462439	2
No data	13:0 iso	0.32446399439167	2
革兰氏阳性细菌Gram-posit...	14:0 iso	0.241420812283611	2
No data	15:1 iso F	0.52612719753559	2
No data	17:1 w7c	0.453853472487943	2
Peak Name共29个	浓度求和: 33.6485563317881		

图6 脂肪酸数据分析模型输出结果示例

Figure 6 The output of the data analysis model of fatty acids

析结果显示:可被命名的波峰(Peak Name) 33 个;多平行数据分析结果显示:在 3 组平行样品测试结果分析中出现两次以上的可被命名的波峰(Peak Name)有 29 个,表明组内数据平行性好。多平行数据分析平均浓度总和 33.65 nmol/g,该结果与手动分析结果一致。图 6 仅显示初步筛分统计功能,生态学统计处理结果另文详细讨论。

3 讨论

利用磷脂脂肪酸来确定土壤微生物群落结构,是目前常用而且比较准确的方法。美国 MIDI 公司的 Sherlock 微生物鉴定系统是目前最成熟的技术。从原理上而言,待测样品浓度低,所采用的标准品的浓度也应该低,否则会造成较大的误差,本实验考查了内标进样量对未知样品磷脂脂肪酸测定结

果的影响。当预设目标 PLFA 最低响应值范围 150–250、C19 的响应值范围在 15 000–30 000、PLFA 最低检测值为 0.05–0.10 nmol/g,较为适宜的內标进样量为 3–10/6–20 nmol/g。

目前普遍使用的 PLFA 数据分析方法是以查阅文献资料为基础,手动分析特征脂肪酸的类别和响应值,再以标准品定量计算其含量。已开发的数据处理模型在使用中受到了条件限制,市售的软件价格高昂。微生物群落脂肪酸数据生态学分析模型系统通过简洁的界面和便捷的操作实现了多份平行数据的分析自动化和数据化,拓展了 PLFA 方法的应用前景。该模型在计算中采用响应值计算 PLFA 含量,并引入了校正系数 r ,以减少由于百分比缺失和仪器条件变化带来的误差。由于不同的脂肪酸指示的微生物菌群有重叠,该模型的数据库

还需进一步的验证和完善,从而使数据处理结果更加精确。

参 考 文 献

- [1] Xue D, Yao HY, Ge DY, et al. Soil microbial community structure in diverse land use systems: A comparative study using Biolog, DGGE, and PLFA analyses[J]. *Pedosphere*, 2008, 18(5): 653-663.
- [2] 刘琨毅, 卢中明, 郑佳, 等. 浓香型白酒窖泥微生物群落 PLFA 指纹图谱方法[J]. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(5): 831-837.
- [3] 吴愉萍. 基于磷脂脂肪酸(PLFA)分析技术的土壤微生物群落结构多样性的研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2009.
- [4] 刘梅, 帅燕华, 梁汉东, 等. 古菌细胞膜脂在生物地质学中的应用[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(3): 413-418.
- [5] 林营志, 刘波, 张秋芳, 等. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸生物标记分析程序 PLFA Eco[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(14): 286-290.
- [6] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911-917.
- [7] 王曙光, 侯彦林. 磷脂脂肪酸方法在土壤微生物分析中的应用[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(1): 114-117.
- [8] 关亚风, 吴大朋, 段春风. 色谱仪器微型化和检测器技术的研究进展[J]. *色谱*, 2011, 29(3): 193-198.
- [9] 吕鸿, 刘志娟, 许峰, 等. 气相色谱仪灵敏度及检测限的测量不确定度评定[J]. *化学分析计量*, 2010(1): 15-18.
- [10] 文倩, 林启美, 赵小蓉, 等. 北方农牧交错带林地、耕地和草地土壤微生物群落结构特征的 PLFA 分析[J]. *土壤学报*, 2008, 45(2): 321-327.
- [11] Wang M, Qu LY, Ma KM, et al. Soil microbial properties under different vegetation types on Mountain Han[J]. *Science China: Life Sciences*, 2013, 56(6): 561-570.

~~~~~

## 科技信息摘录

### 一次亲吻, 交换 8 000 万口腔细菌

在接吻时, 双方口腔中的细菌会随着唾液的接触而交换, 不过在此之前, 还没有人计算过这种细菌迁移究竟有多大的规模。而近期发表在《微生物组学》(Microbiome)期刊上的一项研究估计, 一次持续 10 秒的亲吻会造成大约 8 000 万口腔细菌的“迁徙”。这项研究还发现, 每日亲吻超过 9 次的伴侣会分享相似的口腔菌群。当然, 健康人口腔中的细菌大多是无害的, 在没有其他致病菌感染的情况下, 这样的“细菌交换”也不大可能导致疾病。

我们的身上有着多达 100 万亿微生物组成的生态系统, 这些微生物对于我们的食物消化、营养物质的合成以及疾病的预防都起着重要的作用。它的构成受到遗传、饮食和年龄的影响, 也同时受到我们平时接触的个体影响。口腔为 700 多种细菌提供了寄宿的场所, 因此这里的微生物也会受到我们最亲近的人的影响。

来自荷兰的研究者们对 21 对情侣进行了研究。他们首先通过问卷对受试者的接吻习惯进行了调查, 然后收集了受试者们舌部以及唾液的拭子标本来分析每对情侣的口腔微生物组成。

结果发现, 当一对情侣每日进行高频率的亲密接吻时, 他们的唾液微生物组成开始变得十分相似。平均来看, 每天至少 9 次的亲吻频率可以使情侣的口腔菌群一致率显著增高。

论文作者雷姆科·科特(Remco Kort)来自荷兰应用科学研究组织(TNO)微生物学和系统生物学部。他表示: “会有舌头接触和唾液交换的亲密接吻似乎是人类特有的一种交流方式, 而且它在超过 90% 的文化中都存在。目前对于这种人类亲密亲吻作用的解释包括口腔微生物菌群的交流, 然而亲密接吻对于菌群的确切作用目前还没有被研究过。我们希望了解, 伴侣之间通过接吻究竟有多大程度地分享了口腔菌群。结果发现, 他们亲吻的频率越高, 菌群的一致性也就越高。”

为了估算一次亲吻对菌群交流的作用, 研究者们还利用酸奶饮品进行了定量实验。研究者选取酸奶中的乳杆菌(*Lactobacillus*)和双歧杆菌(*Bifidobacteria*)作为标记细菌, 因为这两种细菌在一般人的口腔菌群中含量很少。在实验中, 伴侣中的一方先饮用酸奶饮品, 然后与对方进行一次亲吻。检测发现, 在“酸奶之吻”过后, 未饮用酸奶的一方唾液细菌中这两种细菌的比例提高了 3 倍。通过计算, 研究者估计, 在一次历时 10 s 的亲吻当中可能会有超过 8000 万口腔细菌的转移。

研究者们还发现, 舌头上的微生物组成在伴侣间相当一致, 而与唾液微生物不同, 更多的亲吻并不会造成这种相似性的进一步改变。这一结果提示, 相似的生活方式、饮食以及个人卫生习惯等因素可能也是造成口腔微生物组成相似的原因。

——摘自《中国生物技术信息网》2014-11-18  
<http://www.biotech.org.cn/information/125197>