

脂肪酸甲酯谱图分析方法及其在微生物学领域的应用

王秋红^{1,2}, 蓝江林¹, 朱育菁¹, 肖荣凤¹, 葛慈斌¹, 林营志¹, 陈亮², 刘波¹

(1. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003;

2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 脂肪酸甲酯谱图分析方法 (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) 是鉴于脂肪酸可作为生物标记物而发展起来的分析技术。本文介绍了 FAME 谱图分析方法及其在微生物学领域的应用, 包括在微生物检测、鉴定和微生物多样性研究中的应用。

关键词: FAME 谱图分析; GC/GC-MS; 微生物鉴定; 微生物多样性

中图分类号: Q 93-33

文献标识码: A

Fingerprint analysis on methyl fatty acid and its applications in microbial study

WANG Qiu-hong^{1,2}, LAN Jiang-lin¹, ZHU Yu-jing¹, XIAO Rong-feng¹, GE Ci-bin¹, LIN Ying-zhi¹,
CHEN Liang², LIU Bo¹

(1. Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Fatty acid is an important biomarker. Its application in biology research has become increasingly popular. The method of FAME fingerprint analysis is based on fatty acid's utilization as a biomarker. This paper describes the FAME fingerprint analysis and its applications for microbial studies, including identification of unknown microbes and assessment of microbial diversity.

Key words: FAME fingerprint analysis; GC/GC-MS; microbial identification; microbial diversity

脂肪酸是生物体内不可缺少的能量和营养物质, 是生物体的基本结构成分之一, 在细胞中绝大部分脂肪酸以结合形式存在, 构成具有重要生理功能的脂类, 它是构成生物膜的重要物质; 是有机体代谢所需燃料的贮存形式; 作为细胞表面物质与细胞识别、种族特异性和细胞免疫等密切相关^[1-2]; 具有结构多样性和高的生物学特异性, 是特别有效的生物标记物^[3]。目前脂肪酸作为一类重要的生物活性物质, 已经引起了国内外同行的相当重视。

脂肪酸甲酯 (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) 谱图分析方法是鉴于脂肪酸可作为生物标记物而发展起来的分析技术。FAME 谱图分析方法是在细胞组分水平上研究微生物的重要技术, 通过分析微生物细胞膜上磷脂脂肪酸 (Phospholipid Fatty Acid, PLFA) 的组分来鉴定微生物的种属、分析微生物多样性, 是一种简便、可靠的分析方法。由于用于 FAME 谱图分析的脂肪酸多为磷脂

脂肪酸, 所以该方法又称为 PLFA 谱图分析方法。

1 FAME 谱图分析的原理与方法

1.1 原理

FAME 谱图分析方法的原理是基于脂类几乎是所有生物细胞膜的重要组成部分, 不同微生物体内往往具有不同的磷脂脂肪酸组成和含量水平, 其含量和结构具有种属特征或与其分类位置密切相关, 能够标志某一类或某种特定微生物的存在, 是一类最常见的生物标记物^[3-5]。但是古生菌不能使用 FAME 谱图进行分析, 因为它的极性脂质是以醚而不是酯键的形式出现^[6]。此外, 磷脂不能作为细胞的贮存物质, 一旦生物细胞死亡, 其中的磷脂化合物就会马上消失, 因此, 磷脂脂肪酸可以代表微生物群落中“存活”的那部分群体^[7]。

1.2 方法

FAME 谱图分析首先要提取出磷脂脂肪酸,

收稿日期: 2007-03-15 初稿; 2007-04-26 修改稿

作者简介: 王秋红 (1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究。

通讯作者: 刘波 (1957-), 男, 博士, 研究员, 从事生物农药和生物技术研究 (E-mail: laeptb@163.com, fzliubo@163.com)。

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA10A211); 福建省发展和改革委员会重点项目 [闽农产 (2006) 10 号]; 福建省青年科技人才创新项目 (2003.J046)

即利用有机溶剂将样品中的脂肪酸浸提出来, 然后进行分离纯化, 将磷脂脂肪酸甲基化转化成脂肪酸甲酯, 最后利用标记脂肪酸, 通过气相色谱等仪器分析, 得到样品的磷脂脂肪酸组成图谱, 进而得到不同脂肪酸的含量和种类, 即所谓的 FAME 谱图 (图 1)。根据谱图中脂肪酸甲酯的多样性, 利用相关的数据库和相关的计算机分析软件, 便可鉴定出样品中微生物的种类或得到样品中微生物群落结构

组成多样性、比例以及微生物生物量等方面的信息。对于该研究, 主要是通过气相色谱 (Gas Chromatography, GC), 以及气相色谱 - 质谱 (Gas Chromatography - Mass Spectrum, GC - MS) 联用实现的, 由于脂肪酸本身挥发性较小, 所以要将脂肪酸甲基化转化成脂肪酸甲酯以增加脂肪酸的挥发性, 供 GC 或 GC - MS 分析利用。

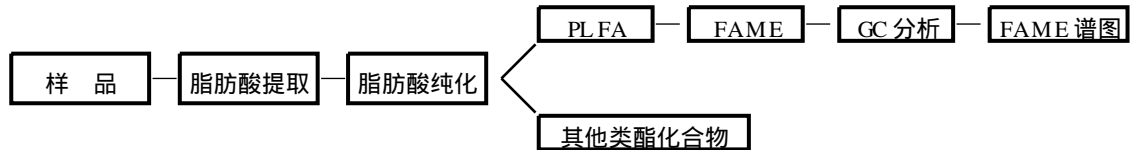


图 1 FAME 谱图分析的一般流程

Fig 1 The general procedures of FAME fingerprint analysis

FAME 谱图的形成是源于样品中微生物的组成和生物量的多少, 生物体内细胞中磷脂的含量通常可认为相对显著恒定^[4]。不过, 磷脂含量并非绝对不变, 例如温度的变化就会影响膜脂。温度的增加会带来磷脂双分子层流动性的增加, 这会导致形成磷脂非双分子层相, 进而影响细胞膜的渗透性。磷脂脂肪酸成分发生适应性变化以改变膜的流动性变化是生物体内消除这些影响的机制之一, 在细菌中常常通过增加不饱和脂肪酸的含量来调节膜脂的变相温度以维持膜脂的流动性^[8]。营养状况的变化也有可能改变磷脂的含量, 有学者对此进行了相关研究^[9], 不过目前还很少见到这方面的报道。总之, 脂肪酸是一种可随着培养环境的变化发生改变的细胞成分, 因此分析过程的条件选择和质量控制则显得非常重要。

2 FAME 谱图分析方法在微生物学领域的应用

2.1 FAME 谱图分析方法在微生物鉴定中的应用

目前所知道的微生物已经超过了 10 万种, 这还是一个正在急剧扩大着的数字^[10]。快速、准确鉴定微生物日益成为临床、环境和工业领域的迫切需要。通常把鉴定微生物的技术分成 4 个不同的水平: 细胞的形态和习性水平; 细胞组分水平;

蛋白质水平; 基因或 DNA 水平。在微生物分类学发展的早期, 主要的分类鉴定指标尚停留在细胞的形态和习性水平。传统的微生物鉴定根据细胞的形态及表型进行分类, 一旦某些表型和生化特征发生变化, 其命名就容易出现错误^[11]; 运用分子技术, 通过 DNA 或 RNA 对细菌进行分类和鉴定。

但这种方法操作比较复杂, 且局限于具典型性已鉴定的菌株^[12]。现代微生物学研究表明: 微生物细胞结构中普遍含有的脂肪酸成分与微生物 DNA 具有高度的同源性, 各种微生物具有其特征性的细胞脂肪酸指纹图谱^[13], 脂类作为标志物用于细菌鉴定早在 20 世纪 60 年代就开始了^[3]。利用 GC 或 GC - MS 分析微生物细胞的脂肪酸分布, 是从细胞组分水平上鉴定微生物的重要内容, 开辟了一个微生物检测 and 鉴定的新途径。

不同微生物的脂肪酸在组成和含量上有较大差异, 它和微生物的遗传变异、耐药性等有着极为密切的关系。大多数革兰氏阳性菌 (G^+) 中支链 C15-0 脂肪酸丰度很高, 而在大多数革兰氏阴性菌 (G^-) 菌中 C16-0 丰度较高^[14]。一些细菌如考克斯氏体属、土拉弗朗西丝菌属^[15]、假单孢菌属和结核分枝杆菌属细菌^[16]有其特殊的脂类, 可经磷脂脂肪酸分析实现鉴定。短链脂肪酸已经用于陆源厌氧细菌的鉴定。Toshi K 成功地测定了分枝杆菌属 4 个菌株的脂肪酸, 确定其主要由 16 种脂肪酸组成, 并分析了它们之间的差异^[17]。张文君等报道海洋细菌不同属的脂肪酸甲脂链的长短、双键位置及取代长度会各有差异, 这意味着甲脂化可以作为海洋细菌的分类和鉴定的一种方法^[18]。

根据微生物细胞脂肪酸的组成, 一般可通过单次试验比较准确地将微生物鉴定到种, 但是脂肪酸是一种可随着培养条件变化而发生改变的细胞组分, 并且气相色谱、质谱等是高精密度的分析仪器, 因此, 分析过程的条件选择和质量控制则显得非常重要, 必须对培养基成分、微生物培养条件、微生物纯化、菌龄、色谱条件等实验条件进行标准

化, 否则会严重影响方法的准确度和重复性。目前已有一种商业化的微生物 FAME 气相色谱分析系统, 即 Sherlock MIS 微生物自动鉴定系统 (美国 MIDI 公司开发), Sherlock MIS 微生物自动鉴定系统从微生物的培养、菌落的收集、微生物细胞皂化释放脂肪酸、脂肪酸甲基化、脂肪酸甲酯的萃取和洗涤, 到最后的鉴定、结果的判断都有一套完整的标准化程序, 可以避免上述不利条件的影响。微生物在标准的培养条件下培养和收获, 经过氢氧化钠和甲醇试剂皂化和甲基化, 通过正己烷和叔丁基乙醚的萃取, 再经氢氧化钠洗涤后, 注入 GC 系统中分析。系统根据各脂肪酸组分保留时间计算等链长 (ECL) 值, 确定目标组分的存在, 采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量, 再将二者与系统谱库中的标准菌株数值匹配计算相似度 (Similarity Index, SI), 从而给出一种或几种可能的菌种鉴定结果。一般以最高 SI 的菌种名称作为鉴定结果, 但当其报告的几个菌种的 SI 比较接近时, 则根据色谱图特征及菌落生长特性进行综合判断。Sherlock MIS 微生物自动鉴定系统分析的脂肪酸的碳

原子数是介于 9~20 之间, 碳原子数小于 9 或者大于 20 的脂肪酸不被该系统分析。Sherlock MIS 微生物自动鉴定系统具有分析周期短、操作简单、准确度高等优点, 目前国内外已有将 Sherlock MIS 应用于微生物鉴定的文献报道。吴愉萍等以 10 种已知菌株为例, 检测 Sherlock MIS 系统的细菌鉴定准确率, 除苏云金杆菌外 MIDI 鉴定出来的菌株均与已知菌株相符合, 且有些结果达到了亚种或是变种的水平, 表明该系统的细菌鉴定准确率很高^[19]。Ozbek A 等应用该技术分析了 67 个分枝杆菌菌株, 其 SI 都在 0.800 以上 (SI 在 0.500 以上则认为鉴定成功)^[20]。刘志辉等应用传统鉴定方法和 Sherlock MIS 微生物自动鉴定系统对 700 多个分枝杆菌菌株进行鉴定, 传统方法鉴定为结核分枝杆菌、牛分枝杆菌的 625 株中, 应用脂肪酸分析方法有 45 株鉴定为非结核分枝杆菌, 对结核分枝杆菌鉴定的正确率为 93%; 对传统方法鉴定为非结核分枝杆菌的 102 株菌株, 脂肪酸分析法亦全部鉴定为非结核分枝杆菌, 但其中 7 株的菌种鉴定结果不同, 其鉴定正确率为 93%^[13]。

表 1 Sherlock MIS 试验结果
Table 1 Fatty acid model of Sherlock MIS

RT	Response	Ar/ Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment	Note
1. 668	3. 919E + 8	0. 027	- - -	7. 023		- - -	< min rt	
2. 256	659	0. 022	- - -	8. 130		- - -	< min rt	
3. 921	332	0. 023	1. 165	10. 919	Sum In Feature 2	0. 26	ECL deviates 0. 005	12:0 ALDE ?
4. 454	501	0. 032	- - -	11. 494		- - -		
7. 550	5861	0. 038	0. 984	13. 999	14 0	3. 88	ECL deviates - 0. 001	Reference - 0. 002
9. 965	12188	0. 042	0. 937	15. 490	Sum In Feature 2	7. 68	ECL deviates 0. 002	14 0 3OH/ 16 1 ISO I
10. 525	48949	0. 041	0. 929	15. 819	Sum In Feature 3	30. 59	ECL deviates - 0. 003	16 1 w7c/ 15 0 2OH
10. 832	44130	0. 042	0. 925	16. 000	16 0	27. 46	ECL deviates 0. 000	Reference - 0. 002
12. 397	2675	0. 047	0. 908	16. 890	17 0 CYCLO	1. 63	ECL deviates 0. 002	Reference 0. 000
12. 680	3927	0. 049	0. 905	17. 050	16 1 2OH	2. 39	ECL deviates 0. 002	
13. 013	1008	0. 037	0. 902	17. 237	16 0 2OH	0. 61	ECL deviates 0. 004	
14. 060	33420	0. 046	0. 894	17. 824	18 1 w7c	20. 10	ECL deviates 0. 001	
14. 373	1397	0. 042	0. 892	17. 998	18 0	0. 84	ECL deviates - 0. 002	Reference - 0. 003
16. 304	7707	0. 048	0. 879	19. 092	18 1 2OH	4. 56	ECL deviates 0. 003	

注:表内数据系本所实验室用 Sherlock MIS 微生物自动鉴定系统测定某一细菌脂肪酸试验结果,图 2 为所测定的脂肪酸色谱图。

表 1 和图 2 给出的是本实验室用 Sherlock MIS 微生物自动鉴定系统测定某一未知细菌脂肪酸的试验结果和脂肪酸色谱图。试验结果给出了每种脂肪酸的保留时间 (RT)、面积峰高比 (Ar/ Ht)、等链长 (ECL)、脂肪酸命名 (Peak Name)、百分含量 (Percent) 等信息。除第 1 个溶剂波峰外, 其

余每一个波峰代表一种脂肪酸, 系统给出的菌种鉴定结果为 *Ralstonia solanacearum* (Burkholderia, Pseudomonas), 即青枯雷尔氏菌, SI = 0.780。从图 2 可以看出, 青枯雷尔氏菌脂肪酸含量较高的 6 种脂肪酸及其 RT 分别为: C14 0, 7.550 min; C14 0 3OH/ C16 1 ISO I, 9.965 min; C16

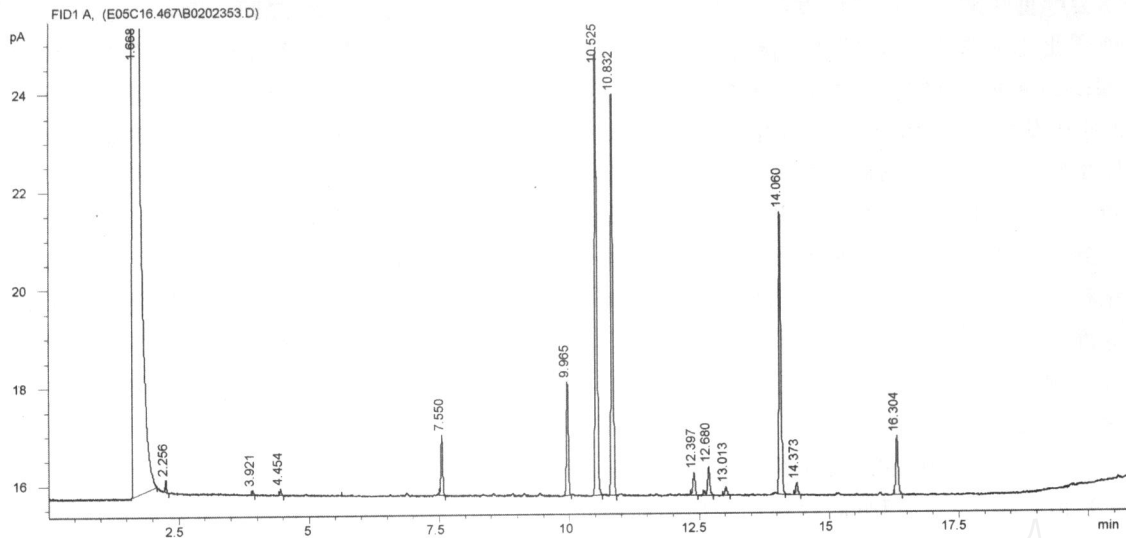


图 2 Sherlock MIS 气相色谱模式图

Fig 2 Fatty acid chromatogram by using Sherlock Microbial Identification System

注：横坐标表示色谱分析时间 (min)，纵坐标表示色谱峰高值；第 1 个色谱峰为溶剂波峰

1 发殖 15 0 糖糖 2 糖糖, 10 525 猪猡; 殖 16 0, 10 832 猪猡; 殖 18 1 冷发, 14 060 猪猡; 殖 18 1 2 糖糖, 16 304 猪猡。通过 Sherlock MIS 微生物自动鉴定系统, 不仅能确定某一未知微生物的种属, 而且可以测定出微生物具体的脂肪酸组成及其百分含量, 具有广阔的应用前景。

2.2 FAME 谱图分析方法在微生物多样性研究中的应用

生物多样性是当今国际上共同关注的问题, 它也因此日益成为学术界的热点研究领域之一。生物多样性包括物种多样性、遗传 (基因) 多样性和生态系统多样性。近年来, 基于现代生物化学技术发展起来的 FAME 谱图分析方法和传统的基于培养基的微生物分离技术以及生理学方法、分子生物学方法相比, 具有以下优点: FAME 不用考虑培养体系的影响, 亦能直接有效地提供微生物群落中的信息, 适合跟踪研究微生物群落的动态变化; 对细胞生理活性没有特殊的要求, 对样品保存时间也要求不高, 获得的信息基本上由样品中所有微生物提供; 脂肪酸成分不受质粒损失或增加的影响, 以及几乎也不受有机体变化的影响, 试验结果更为客观、可靠; 试验条件要求低、操作难度小、价格相对较低, 并且测试功能多。因此该方法在微生物多样性的研究中得到了越来越多的应用。虽然它不能在种属和株系的水平鉴别出微生物的种类, 但是能够依靠脂肪酸谱图定量描述整个微生物群落, 是一种快捷、可靠的检测方法。

土壤微生物是土壤分解系统的基本组成部分, 在生物地化循环中有极其重要的作用, 丰富多样的微生物种类不仅是维持土壤健康的重要因素, 多样性的变化也是监测土壤质量变化的敏感指标, 因此土壤微生物多样性一直是微生物生态学研究的重要内容。目前在地上部植物和动物的多样性方面开展了大量的研究^[21-23], 但对土壤生物多样性, 特别是在土壤微生物多样性方面的研究仍较薄弱。其中一个重要的原因就是土壤微生物多样性的研究方法方面还存在着较大的困难和缺陷, 很多方法还不能全面地、准确地研究土壤微生物多样性状况。近年来基于生物化学技术发展起来的 FAME 谱图分析方法对土壤微生物多样性的研究产生了极大的促进作用。

总 FAME 谱图中某些特征脂肪酸分别对细菌、真菌和放线菌是特异的, 且大多数情况下磷脂脂肪酸的某专一类型在某一土壤微生物分类群中占优势^[24-25], 至今, 已经积累了大量关于微生物脂类的脂肪酸组成的数据。一般而言, 生物细胞膜中所含的 PLFA 有以下规律: 真菌大多含有多个不饱和键, C18 2w6, 9 及 C18 3w6 可作为真菌生物量的指标 (FAME fungi); 细菌往往不含有多个不饱和键的脂肪酸, 它含有的主要是链长为奇数的、带支链的, 主链上含有环丙基或羟基的脂肪酸, iC15 0、C15 0、iC16 0、C16 1w7t、C17 0、cyC17 0、cyC19 0、C18 1w7 的含量可作为细菌生物量的指标 (FAME bacteria); 10MeC18

0 代表放线菌指标; G^+ 含有较大比例的带支链的脂肪酸; G^- 含有较大比例的羟基脂肪酸。

土壤微生物中磷脂脂肪酸的提取是 FAME 谱图分析的关键步骤, 其提取主要采用简单提取、扩展提取和采用微生物鉴定系统 (美国 MIDI 公司开发) 提取等方法^[24]。简单提取是取一定量的待分析土样 (0.5 g 左右的新鲜土壤或 2~10 g 干土), 加氯仿-甲醇-柠檬酸 (1 2 0.8) 缓冲液直接抽提样品的总 PLFA, 提取的 PLFA 经硅胶柱分离为中性脂肪酸、糖脂肪酸和磷脂酸。磷脂酸溶于甲醇/甲苯 (1 1, v/v) 溶液, 然后加 0.2 mol L⁻¹ KOH, 37 酯化 15 min 后, 用 GC 或 GC-MS 分析酯链脂肪酸甲酯 (EL-FAME)。这种方法不能将非酯链脂肪酸甲酯 (NEL-FAME) 从脂类中分离和提取出来。扩展方法是在简单提取方法的基础上延伸的, 可用于提取包括 EL-FAME 和 NEL-FAME 在内的全 FAME。用与简单提取方法相同的操作酯化磷脂酸后, 接着用氨丙基键合, SPE 柱分离, 得到 EL-FAME 和不皂化脂, 不皂化脂经酸水解后, 用 SPE-NH₂ 柱分离, 可得到 NEL-FAME, 得到的 EL-FAME 和 NEL-FAME 进一步用 GC 或 GC-MS 进行定性和定量分析。采用这种方法可使多数类型的脂肪酸根据它们结合成脂类的本来情况 (酯链、非酯链) 而得到分离, 检测结果用多变量统计方法加以分析。除上述方法外, 有些学者还用 MIDI 来提取和分析脂肪酸^[21-22], 其操作方法包括用皂化/裂解液将脂肪酸从脂类中裂解出来, 加入甲醇盐酸溶液, 使脂肪酸甲基化后形成 FAME, 用有机溶剂萃取 FAME, 进行 GC 分析等, 最后用 MIDI 公司提供的自动程序软件对 FAME 进行分析。该方法主要的问题是提取的脂肪酸包括来自有生活力的细胞脂肪酸和可能部分来自于细胞外的脂类^[24]。

FAME 谱图分析方法是一种快速、可靠而可重现的分析土壤微生物群落结构的方法, 可用于表征在数量上占优势的土壤微生物群落, 包括不可培养微生物。该方法最适合用作总微生物群落分析, 而不是专一的微生物种类的研究^[26-27]。但应用脂肪酸分析方法时首先应尽可能地提取脂肪酸, 否则可能失去一些重要的信息。同时在选择提取方法时必须注意避免非目标生物脂肪酸的释放, 避免偏重于那些普遍存在的脂肪酸。为了更加准确的鉴定微生物的种类, 进行主成分分析 (PCA) 是非常必要的^[24, 28-29]。另外值得注意的是因为不同属甚至不同科的微生物的脂肪酸可能重叠, 所以以磷脂脂肪

酸组成来鉴定区分关系较远的微生物有一定的困难, 因此在将来还需寻求更加可靠的分析方法以及和其他土壤微生物多样性研究方法结合起来使用, 方可得到有关土壤微生物多样性较为全面的信息。

FAME 谱图分析方法除广泛地用于土壤微生物多样性的分析外, 还应用于沉积物、地下水, 以及与水处理相关的生物膜和菌胶团等微生物群落结构和功能的研究中^[30-32]。Robert H. Findlay 等人于 1989 年用 FAME 谱图分析方法测定了深海沉积物中的微生物生物量, 为人们提供了一种分析沉积物样品生物多样性的简便方法^[33]。FAME 谱图分析可以用来指示地下水微生物在各种环境压力下的生理状况^[34]。David C. White 和 Robert H. Findlay 用磷脂脂肪酸甲酯方法和其他方法相结合, 分析生物膜上捕食 (predation) 效应对微生物生物量、群落结构、营养状况、新陈代谢活动的影响^[4]。

3 结 语

随着生物技术的不断发展和计算机技术的运用, FAME 谱图分析方法越来越多的引起了人们的重视。在现代微生物学领域研究中, FAME 谱图分析方法主要是用于微生物的检测、鉴定和微生物多样性分析中。但由于其自身的不足, 在进行微生物鉴定和微生物多样性研究中, 应该要和其他方法结合起来使用, 以获得更充足的信息。随着 FAME 谱图分析方法应用的日趋广泛, 其自身也在不断的改进和发展, 必将对微生物学研究产生极大的推动作用。

参考文献:

- [1] 张国赏, 吴文娟, 潘仁瑞. 气相色谱-质谱法检测细胞脂肪酸及其在细菌鉴定上的应用 [J]. 合肥联合大学学报, 2000, 10 (4): 92-96.
- [2] RILEY M, COOPER V, LENSKI R, et al. Rapid phenotypic change and diversification of a soil bacterium during 1000 generations of experimental evolution [J]. Microbiology, 2001, 147: 995-1006.
- [3] 杜宗敏, 杨瑞馥. 生物标记物在微生物鉴定和检测中的应用 [J]. 微生物学免疫学进展, 2003, 31 (3): 67-73.
- [4] WHITE D, FINDLAY R. Biochemical markers for measurement of predation effects on the biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial biofilms [J]. Hydrobiologia, 1988, 159: 119-132.
- [5] IBEKWE A M, KENNEDY A C. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils [J]. Plant and Soil, 1999, 206: 151-

- 161.
- [6] SUNDH I, NILSSON M, BORGA P. Variation in microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 41476 - 41482.
- [7] 张家恩, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述 [J]. *土壤*, 2004, 36 (4): 346 - 350.
- [8] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. *细胞生物学* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [9] GUCKERT J B, HOOD M A, WHITE D C. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increase in trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 52: 794 - 801.
- [10] 周德庆. *微生物学教程* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [11] AKAGAWA T, MATSUSHIMA M, ITOH T, KAYAMA Y, et al. Isoprenoid quinone composition of some marine *Aeromonas*, *Marinomonas*, *Deleya*, *Pseudomonas* and *Shewanella* species [J]. *J Gen Microbiol*, 1992, 138: 2275 - 2281.
- [12] VANDAMME P, POT B, GILLIS M, et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics [J]. *Microb Rev*, 1996, 60: 407 - 438.
- [13] 刘志辉, 蔡杏珊, 竺澎波, 等. 应用气相色谱技术分子全细胞脂肪酸快速鉴定分枝杆菌 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2005, 28 (6): 403 - 406.
- [14] BASILE F, VOORHES K J, HADTLELD T L. Microorganism gram-type differentiation based on pyrolysis-mass spectrometry of bacterial fatty acid methyl ester extracts [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61 (4): 1534 - 1539.
- [15] NICHOLS P D, MAYBERRY W R, ANTWORTH C P, et al. Determination of monounsaturated double-bond position and geometry in the cellular fatty acids of the pathogenic bacterium *Francisella tularensis* [J]. *J Clin Microbiol*, 1985, 21 (5): 738 - 740.
- [16] NOBLE P A, ALMEIDA J S, LOVELL C R. Application of neural computing methods for interpreting phospholipid fatty acid profiles of natural microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 69: 694 - 699.
- [17] TOSHI K. Fatty acids in the genus *Bacillus* II. similarity in the fatty acid compositions of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus* [J]. *J Bacteriol*, 1968, 95 (6): 2210 - 2216.
- [18] 张文君, 严小军, 郑立, 等. 利用脂肪酸组成分析鉴定海洋细菌的初步研究 [J]. *科技通报*, 2006, 22 (4): 462 - 466.
- [19] 吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 等. Sherlock MIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究 [J]. *土壤学报*, 2006, 43 (4): 642 - 647.
- [20] OZBEK A, AKTAS O. Identification of three strains of *Mycobacterium* species isolated from clinical samples using fatty acid methyl ester profiling [J]. *The Journal of International Medical Research*, 2003, 31: 133 - 140.
- [21] 杨进. SSR 标记技术在植物遗传多样性研究上的应用 [J]. *农业生物技术科学*, 2006, 22 (7): 90 - 94.
- [22] WISEL Y S M, MCDONALD D B, BUSKIRK S W. Evaluation of the genetic management of the endangered black-footed ferret (*Mustela nigripes*) [J]. *Zoo Biology*, 2003, 22: 287 - 298.
- [23] GUO LI ZHOU, HAI GUO JIN, QI ZHU, et al. Genetic diversity analysis of five cattle breeds native to China using microsatellites [J]. *Journal of Genetics*, 2005, 84 (1): 77 - 80.
- [24] ZELLES L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review [J]. *Biol Fertil Soils*, 1999, 29: 111 - 129.
- [25] KAUR A, CHAUDHARY A, KAUR A, et al. Phospholipid fatty acid A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem [J]. *Current Science*, 2005, 89 (7): 1103 - 1112.
- [26] KIDD S, GARCHOW H, ODELSON D A, et al. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60 (7): 2483 - 2493.
- [27] SCHUTTER M E, DICK R P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64: 1659 - 1668.
- [28] KIRK J L, BEAUDETTE L A, HART M I, et al. Methods of studying soil microbial diversity [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58: 169 - 188.
- [29] RITCHIE N J. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 1668 - 1675.
- [30] SALOMONOV Á S, LAMAČOVÁ J, RULÍK M, et al. Determination of phospholipid fatty acids in sediments [J]. *Facultas Rerum Naturalium*, 2003, 42: 39 - 49.
- [31] 陈振翔, 于鑫, 夏明芳, 等. 磷脂脂肪酸分析方法在微生物生态学中的应用 [J]. *生态学杂志*, 2005, 24 (7): 828 - 832.
- [32] 齐鸿雁, 薛凯, 张洪勋. 磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域的应用 [J]. *生态学报*, 2003, 23 (8): 1576 - 1582.
- [33] FINDLAY R H, KING G M, WATLING L. Efficacy of phospholipid analysis in determining microbial biomass in sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55 (11): 2888 - 2893.
- [34] 潘响亮, 邓伟, 张道勇. 磷脂脂肪酸在地下水微生物生态学中的应用及存在的若干问题 [J]. *地理科学*, 2003, 23 (6): 740 - 745.

(责任编辑: 翁志辉)