

# 用电子计算机对枯草杆菌的一些菌株所做的 数值分类分析\*

徐浩 江慧修 乔宝义

(中国科学院微生物研究所, 北京)

对我所保藏的已定名的枯草杆菌共 63 株, 用数值分类方法进行了整理, 选出了中心株和代表株, 根据诸单连锁的平均相似值 ( $\bar{S}$ ), 建立了三维模型。对中心株和构筑模型之间的关系作了讨论。对枯草杆菌作为一个较大的种群的庞杂性, 对我们取用的 63 株菌株中某些菌株的同一性, 均根据数据分析, 予以讨论。

数值分类(或称数码分类)是近十几年来中发展起来的一种新的分类方法<sup>[1]</sup>。在手段上, 它依靠电子计算机; 在原则上, 依据等重衡量原则(近来也不排斥部分项目的加权衡重)。它由建立单连锁群开始, 通过簇群分析, 或寻出代表株或中心株, 建立模型, 从而对菌株进行分类研究。这种分类方法的工作量本来是极其巨大的, 手工整理方法是很繁重的, 但是由于采用电子计算机, 使计算自动化了, 从而使得过去难以从事的工作, 变得较易进行, 在细菌分类中收到了很大的实效。我们工作的目的是找出即将使用的菌株里的中心株, 建立从事这类解析工作的常规方法, 通过模型观察各菌株间的关系。

对我所保藏的 63 株枯草杆菌进行了一些生理、生化、形态、生长等方面的测定, 并借助于电子计算机\* 对结果作了数值分类分析, 选出了两株代表株(其中一株是中心株), 并建立了一些有代表性的不同平均  $S$  值的菌株的模型。虽则数值分类的道路可以通向解决多方面的问题<sup>[2]</sup>, 但是限于工作目的, 我们未对诸单连锁群作详尽无遗的分析, 而仅限于解决我们即将面临的工作问题。

枯草杆菌是芽孢杆菌属的模式菌, 它代表着一个庞大的种群。因此, 对它所做的种以下分类操作单位(O. T. U.)的数值分类分析方法, 亦可应用于类似的微生物材料。数值分类方法同样也可用于高等植物(甚至动物)育种杂交前的选定亲本, 以便减少杂交中的尝试性, 以节约人力, 物力, 取得更好的效果。

## 材料与方 法

所用菌株系我所保藏组保藏共计 63 株, 经鉴定为枯草杆菌, 其菌号依次序为: 1.15; 1.74; 1.88; 1.91; 1.106; 1.107; 1.108; 1.140; 1.179; 1.198; 1.199; 1.210; 1.215; 1.240; 1.257; 1.263; 1.265; 1.266; 1.284; 1.287; 1.308; 1.311; 1.337; 1.338; 1.339; 1.341; 1.354; 1.372; 1.377; 1.385; 1.387; 1.388; 1.396; 1.397; 1.398; 1.400; 1.401; 1.414; 1.415; 1.460; 1.504; 1.522; 1.762; 1.763; 1.769; 1.770; 1.771; 1.772(B); 1.772(W); 1.774; 1.775; 1.776; 1.795; 1.811; 1.814; 1.820; 1.822; 1.831; 1.834; 1.836; 1.865; 1.882; 1.883

\* 由中国科学院数学研究所计算站赵文智同志编制程序, 特此致谢。

本文 1974 年 10 月 24 日收到。

1.772(B) 是在牛肉汁斜面上一度变为黑色, 但传代后又恢复至正常白色。1.772(W) 始终是白色的菌株。以上菌种在试验前均经牛肉汁平皿划线纯化。

对以上菌种进行了形态、生长状况、革兰氏染色, 细胞的显微及亚微形态, 对溶菌酶敏感度, 生理特征, 生化特征诸方面的测定。分 80 项登记阳性或阴性反应。其中淀粉酶、硝酸盐还原反应、及溶菌酶敏感度反应, 由于系多态特征, 经符号化后, 记成下列 5 级<sup>[2]</sup>, 即: +++; ++-; +-+; +-; -; 淀粉酶和硝酸盐还原反应虽然分 4 项记录, 但在电子计算机计算时, 乘 0.25 系数还原到正常衡重水平。而溶菌酶敏感度反应结果, 分做 4 项记录及计算, 亦即作  $\times 4$  加权衡重。

生理生化试验采用一般的标准方法<sup>[3]</sup>, 糖试验用软琼脂穿刺(加溴甲酚红紫作指示剂)法, 淀粉酶用平皿碘液法, 硝酸盐还原试验用对氨基苯磺酸—萘胺法, 运动性用相差观察结合软琼脂穿刺法。

溶菌酶敏感度的测定将活化 24 小时的菌种斜面接入牛肉汁培养基中, 35℃ 摇床振荡培养 22 小时, 4000 转/分离心 10 分钟, 收集菌体。用磷酸缓冲液(0.05 M, pH6.5)洗涤 1 次, 同法离心收集, 再加入 5 毫升的 40Mg/毫升的溶菌酶(中国科学院上海生物化学研究所办东风试剂厂出品)及 1M 的山梨醇, 在 35℃ 水浴中保温振荡 30 分钟, 然后相差显微镜镜检原生质球形成情况。

所用的电子计算机为国产 DJS-21 机。采用 Algol 语言程序。由 DJS-21 机给出 63 株菌的 1953 个单连锁数据。平均  $S$  值是根据三角矩阵数据用国产长城牌 102 型台式电子计算机计算的。电镜照片绝大部分用本所的国产 DX-2 型电子显微镜摄影, 制片时用国产 DM-300A 型镀膜机, 铬投影。

为了叙述方便, 模型制作法随实验结果一并说明。

## 实验结果

生理、形态、生长等等各项测定分列成 80 项, 如表 1 所示。其中 0 表示阴性反应, 1 表示阳性反应, 2 表示疑似项(即 NC=

not considered)。表中横向由左向右依次排列各项测定的结果, 共列 80 项。由上至下依次排列菌株 63 株, 次序见材料与方法。

各项特征自左至右依次为: ①菌落皮膜状; ②菌落膏状; ③质地粘韧; ④质地腻软; ⑤有褶皱; ⑥茸粉状; ⑦闪光; ⑧无光; ⑨菌落微带黄色; ⑩菌落白色; ⑪菌落厚; ⑫菌落薄; ⑬菌落扩展; ⑭菌落局限; ⑮生长快速; ⑯生长中度; ⑰生长缓慢; ⑱在半液体培养基上均膜状; ⑲在半液体培养基上表面光; ⑳在液体培养基上生菌膜; ㉑在液体培养基上生菌岛; ㉒在液体培养基上生菌环; ㉓培养液混浊; ㉔培养液清澈; ㉕培养液底部有沉淀; 18—25 项分 24 小时及 7 天结果两类, 分成 16 项记录, 从而达到 33 项; ㉖—㉗生长 48 小时的 pH 变化, 分  $< 5.0$ ;  $5.1-6.9$ ;  $> 7.0$  三类记录; ㉘运动; ㉙—㉚生长 7 天的 pH 变化, 分  $< 5.0$ ;  $5.1-6.9$ ;  $> 7.0$  三类记录; ㉛在液体中呈粉状; ㉜在液体中分散成小块; ㉝革兰氏阳性; ㉞革兰氏阴性; ㉟革兰氏不定; ㊱细胞细长; ㊲细胞短杆; ㊳细胞长杆; ㊴无鞭毛; ㊵鞭毛丰富; ㊶鞭毛稀少; ㊷生孢子(在牛肉汁培养基上 24 小时培养情况); ㊸细胞圆端; ㊹细胞方端; ㊺细胞单生; ㊻细胞成链; ㊼—㊽对溶菌酶的敏感度; ㊾半乳糖产酸; ㊿半乳糖产气; ①葡萄糖产酸; ②葡萄糖产气; ③果糖产酸; ④果糖产气; ⑤木糖产酸; ⑥木糖产气; ⑦蔗糖产酸; ⑧蔗糖产气; ⑨山梨糖产酸; ⑩山梨糖产气; ⑪—⑬淀粉利用; ⑭—⑯硝酸盐还原。

以上记录结果经过穿孔, 上机, 由电子计算机将 63 株菌株两两成对的进行比较, 共得到 1,953 个单连锁数据, 亦即 1,953 个相似百分数( $S$  值), 详细结果见下面的三角矩阵(表 2)。

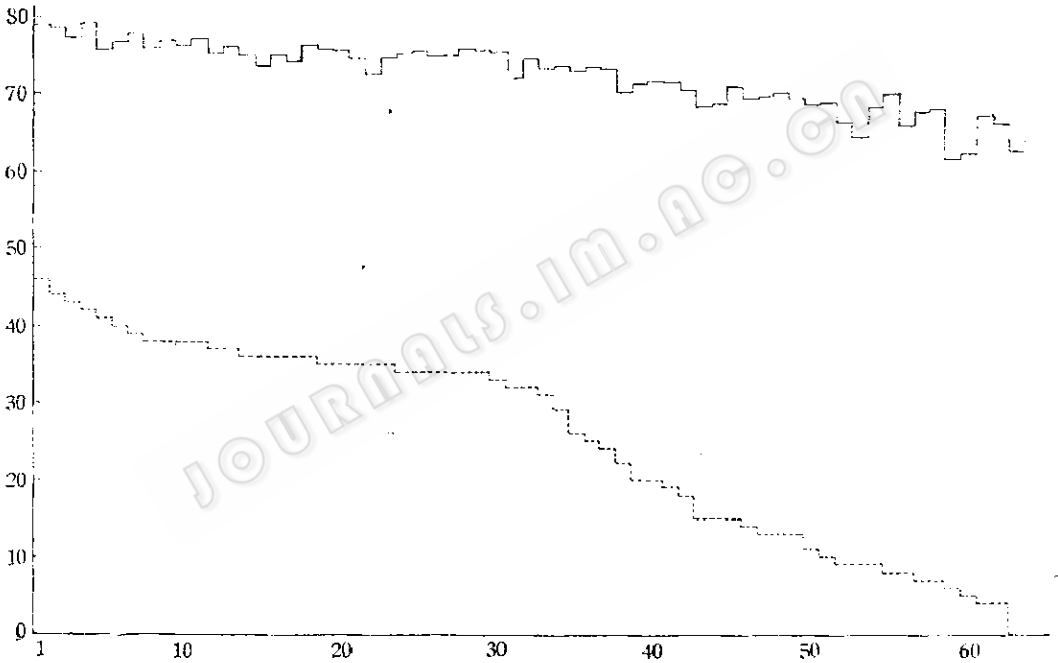
从以上的结果中可以看出, 有些菌株, 例如 1.831 和 1.834, 在与其它菌株比较时



所列的  $S$  值,求出了平均  $S$  值(即  $\bar{S}$  值)。 $\bar{S}$  值<sup>[5]</sup>是指三角矩阵中一切尽含某一菌株的诸连锁值的平均数。例如尽含 1.397 的 62 个单连锁的平均数是由 1.397 列由下而上逐一相加直到 100(100 本身不加在内),再左拐弯逐一相加直到 1.397 行的最左方的一个值,亦即全部倒 L 形上的一切  $S$  值的平均值。另外统计了超过 0.75 的  $S$  值的个数,结果见图 1。

$S > 75\%$  及  $\bar{S}$  值菌株排列表的菌株次序见右:

1.820; 1.263; 1.354; 1.397; 1.769;  
1.338; 1.415; 1.265; 1.460; 1.771; 1.774;  
1.772(B); 1.776; 1.107; 1.198; 1.199; 1.762;  
1.770; 1.772(W); 1.795; 1.831; 1.882;  
1.883; 1.257; 1.387; 1.400; 1.401; 1.504;  
1.814; 1.15; 1.88; 1.834; 1.377; 1.811;  
1.865; 1.522; 1.396; 1.388; 1.74; 1.414;  
1.763; 1.341; 1.106; 1.215; 1.308; 1.385;  
1.140; 1.179; 1.775; 1.398; 1.284; 1.108;  
1.266; 1.836; 1.91; 1.287; 1.198; 1.822;  
1.372; 1.240; 1.337; 1.339; 1.311。



.....  $S > 75\%$ ; —— 平均  $S$  值(%); 横轴代表菌株  
图 1  $\bar{S}$  值及  $> 0.75$  的  $S$  值个数图

由上图中可以看到 1.397 的  $\bar{S}$  值是 79.16%, 超过 75% 的  $S$  值个数是 42 个; 1.820  $\bar{S}$  值是 78.96%, 超过 75% 的  $S$  值个数是 46 个。因此可把 1.397 当做中心株, 而 1.397 和 1.820 均可为代表株。由于许多株  $\bar{S}$  值小于 75%, 可以看出枯草杆菌是一个很大的种群。

有了中心株以后, 就可对包括中心株在内的, 不同  $\bar{S}$  值的菌株, 构制三维模型,

观察各菌株间的相互关系。我们取的不同  $\bar{S}$  值水平的菌株是: 1.74( $\bar{S} = 0.71$ ); 1.108( $\bar{S} = 0.66$ ); 1.266( $\bar{S} = 0.64$ ); 1.341( $\bar{S} = 0.70$ ); 1.372( $\bar{S} = 0.61$ ); 1.397( $\bar{S} = 0.79$ )。

构制模型时首先列出所选的 6 个菌株的诸单连锁  $S$  值(见 35 页左上第一矩阵)。然后依公式<sup>[6]</sup>  $d = \frac{1}{S} - 1$ , 算出各菌株间的相对距离, 以分米为单位列表如下(见 35

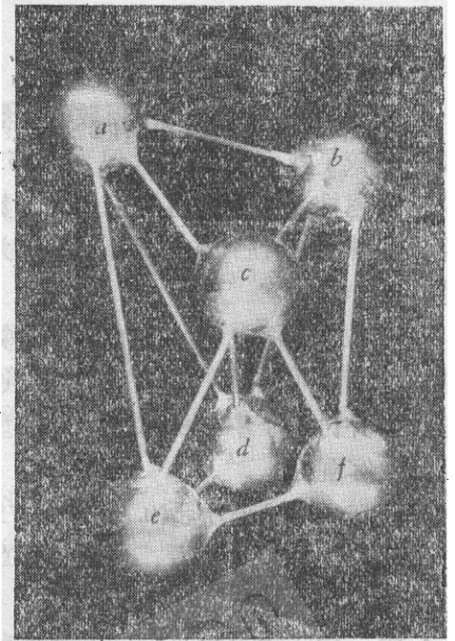
页左上第二矩阵)。

1.74	1					
1.108	0.635	1				
1.266	0.615	0.764	1			
1.341	0.669	0.520	0.541	1		
1.372	0.615	0.764	0.784	0.456	1	
1.397	0.75	0.682	0.649	0.730	0.649	1
1.74	1.108	1.266	1.341	1.372	1.397	

1.74	0					
1.108	0.57	0				
1.266	0.63	0.31	0			
1.341	0.49	0.92	0.85	0		
1.372	0.63	0.31	0.28	1.19	0	
1.397	0.33	0.47	0.54	0.37	0.54	0
1.74	1.108	1.266	1.341	1.372	1.397	

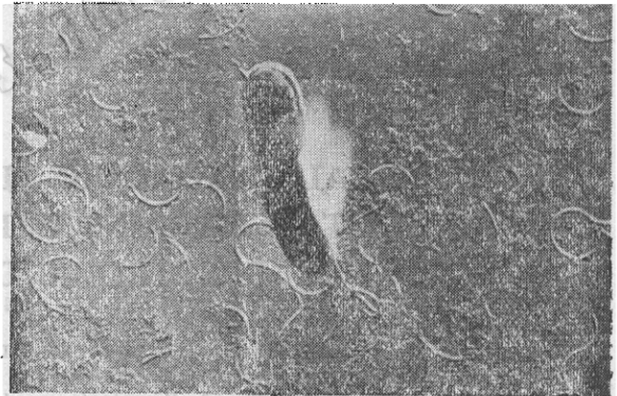
根据以上结果，我们制做了三维模型(图 2)。在这个模型中优先表现了诸菌株与中心株的关系。由模型中或由  $d$  值表中均可以看到，在这几个被取样的菌株中，以  $\bar{s}$  值最高的 1.397 作为中心株是合理的，因为其它各株间的距离由 0.28 分米到 1.19 分米，而各株对中心株的距离幅度要小得多，仅由 0.33 分米到 0.54 分米。这样也就证明了数值分类分析的客观性和选出中心株的必要性。 $d$  值表中打框数字在模型中未能表示出来。

除了上述结果外，我们在进行电镜形态观察时，经常观察到很多菌株的电镜照片中都有较透明的、投影很短的空细胞(图 3-1, 3-2)，也就是影子型 (shadow form)。由于我们的目的不在此项观察，取样及观察数目有限，未作为特性列入统计。但是既然一再看到，显然这是一种以大概率出现的现象，它是与前人报道<sup>[7]</sup>认为枯草杆菌无影子型不一致的。

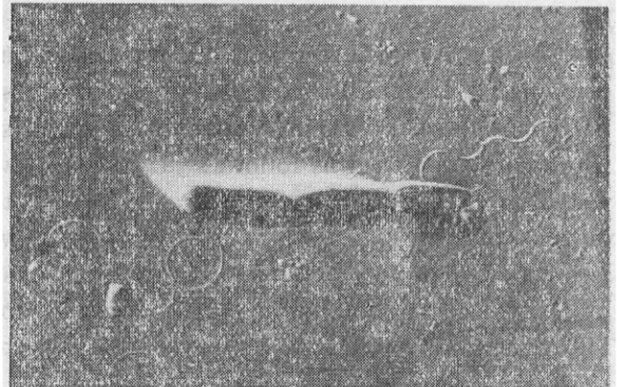


a—1.108; b—1.372; c—1.266;  
d—1.397; e—1.341; f—1.74.

图 2 三维模型



3-1 1.74 7,000×



3-2 1.108 5,000×

图 3 透明、投影很短的空细胞

## 结 论

1. 借助于电子计算机, 用数值分类法整理和比较了我们研究所内保藏的 63 株枯草杆菌菌株, 依据所得的三角矩阵数据计算出各株的  $\bar{S}$  值后, 选定了 1.397 作为这批菌株的中心株。

2. 对 6 个不同  $\bar{S}$  值水平的菌株, 算出  $d$  值后, 制做了模型。叙述了中心株选定的过程, 并讨论了中心株对于构制模型的必须性及客观性。

3. 有许多株  $\bar{S}$  值小于 0.75, 依 0.75 作为划种的一个参考水平看, 也说明枯草杆菌是一个较大的种群。

4. 由三角矩阵数据来看, 有很多菌株有颇大的同一性, 因此建议在应用这些菌株时, 无仿选一取用。

5. 影子型空壳在电镜照片中一再出现, 说明前人报道枯草杆菌无影子型这一

提法值得重新深入观察。

6. 用数值分类法整理传统分类上缺乏依据的种下归群, 或选定代表株, 应用于微生物材料极其方便, 这种方法对于高等植物的选种杂交前的选定亲本, 也可以采用。

## 参 考 资 料

- [1] 徐浩: 微生物学通报, 3 期, 32—35 页, 1974.
- [2] Lockhart, W. R. and Liston, J.: *Methods for Numerical Taxonomy*, p. 22—33, American Society for Microbiology, Maryland, 1970.
- [3] Conn, H. J.: *Manual of Microbiological Methods*, p. 140—198, McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, 1957.
- [4] Sneath, P. H. A. and Cowan, S. T.: *J. Gen. Microbiol.*, 19:551—565, 1958.
- [5] Rhodes, M. E.: *J. Gen. Microbiol.*, 25: 331—345, 1961.
- [6] Lysenko, O.: *J. Gen. Microbiol.*, 25:379—408, 1961.
- [7] Smith, N. R. et al.: *Aerobic Sporeforming Bacteria*, p. 72—74 Agriculture Monograph No. 16, United States Department of Agriculture, 1952.

## A NUMERICAL TAXONOMIC STUDY ON SOME *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS WITH THE AID OF AN ELECTRONIC COMPUTER

HSUE HAO, JIANG HUEY-SHIU AND QIAO BAO-YI

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking*)

With the aid of a home made electronic computer a numerical taxonomic study on 63 *Bacillus subtilis* strains was made. The results obtained were as follows: 1. From the data of the  $\bar{S}$  value histogram it is obvious that *B. subtilis* is a more or less large species group meriting of subdivision by means of numerical taxonomic analysis for practical purpose. 2. From the data

obtained the representative and center strains in this collection of strains were selected out. 3. On the basis of the  $\bar{S}$  values, a three dimensional model of certain strains showing their relationships was made. 4. The electron micrographs shows that the shadow form cells are also occurring in the *Bacillus subtilis* cell population.