

## 用数值分类法解析肠杆菌的裂解色谱图

金 天 如      谢 少 文

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

周      方

(中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

用 TRS 80 型计算机, 根据数值分类原理, 对 5 属、10 种、15 株肠杆菌的 58 张裂解气相色谱图进行解析。结果表明: 同一菌株连续多次 (2—9 次) 分析所得裂解色谱图的符合系数为 88—99%, 根据符合系数可以区分不同菌株。例如, 变形菌标准株和临床新分离株裂解色谱图的符合系数为 77—88%, 说明在相同实验条件下用标准菌株作对照, 有可能用此法对临床菌株进行鉴别。用符合系数对实验菌株的鉴别结果和传统分类法所得结果基本一致, 但也有例外情况。例如, 我们发现 3 株普通变形菌和 2 株奇异变形菌符合系数高达 77—87%, 表明二者在化学组分上极为相似, 而这两种菌和摩氏、雷氏变形菌裂解色谱图的符合系数却均较低, 这与 Brenner 根据 DNA 杂交相关性的结果将变形菌重新分类的建议是一致的。

**关键词** 数值分类法; 肠杆菌; 裂解色谱图

裂解气相色谱法 (Pyrolysis Gas Chromatography 简称 PGC) 是一种正在发展中的化学物理分析方法。自六十年代以来逐步应用于细菌的分类鉴定工作, 目前已成为形态学和血清学以外的一种重要辅助手段。

裂解气相色谱法鉴别细菌是通过裂解色谱图的解析而实现的。对少量简单的裂解色谱图用目测法既简便又经济, 但对大量复杂的裂解色谱图用目测方法识别则相当困难。近年来, 用电子计算机, 根据近代统计学的多变量分析原理解析裂解色谱图进展较快<sup>[1]</sup>。周方等人用指数相关系数和欧几里得距离法对炭疽杆菌及其主要类属菌裂解色谱图进行系统聚类分析取得初步结果<sup>[2]</sup>。本文介绍借助细菌的数值分类原理对某些肠杆菌裂解色谱图的解析结果。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株

5 属、10 种、15 株肠杆菌, 其中 11 株标准株由卫生部药品生物制品检定所提供; 4 株临床株由北京首都医院检验科提供 (表 1)。选用 37 项常规生化指标对全部菌株进行重新鉴定<sup>[3]</sup>, 其结果和菌株的定名是一致的。

### (二) 菌样制备

参照 Emswiler 法<sup>[4]</sup>制备纯培养物。按周方所用方法<sup>[5]</sup>处理分析样品, 每次分析取样  $800 \pm 20 \mu\text{g}$ 。

### (三) 实验仪器和条件

上海分析仪器厂 100 型气相色谱仪, 30 瓦居里点丝式裂解器, SWK-4C 型数字温度程序控制

本文于 1983 年 7 月 4 日收到。

数值分类方案设计王大米教授指导; 计算机程序编写及运算由赵玉峰同志指导; 临床菌株系陈玉芳等同志提供; 菌株生化鉴定承刘庆丰同志协助, 特此致谢。

表 1 实验菌株及其重复分析的符合系数  
Table 1 Strains and its matching coefficient

菌 株 Strain	分析次数 Times	图 号 No. of fig.	符合系数(%) Matching coefficient
大肠埃希氏菌* O <sub>15</sub> <i>Escherichia coli</i> O <sub>15</sub>	9	1—9	89—99
大肠埃希氏菌* O <sub>111</sub> <i>Escherichia coli</i> O <sub>111</sub>	5	10—14	94—98
大肠埃希氏菌* O <sub>124</sub> <i>Escherichia coli</i> O <sub>124</sub>	4	15—18	90—96
肺炎克雷伯氏菌* <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	19—23	88—96
甲型副伤寒沙门氏菌* <i>Salmonella paratyphi</i> A	7	24—30	93—99
伤寒沙门氏菌* <i>Salmonella typhi</i>	3	31—33	92—93
鼠伤寒沙门氏菌* <i>Salmonella typhimurium</i>	3	34—36	90—94
蜂房哈夫尼菌* <i>Haelfia alvei</i>	2	37—38	90
雷氏变形菌* <i>Proteus rettgeri</i>	7	39—45	88—99
摩氏变形菌* <i>Proteus morganii</i>	2	46—47	93
普通变形菌* <i>Proteus vulgaris</i>	2	48—49	93
普通变形菌**83 <i>Proteus vulgaris</i> 83	2	50—51	91
普通变形菌**76 <i>Proteus vulgaris</i> 76	3	52—54	92—96
奇异变形菌**4234 <i>Proteus mirabilis</i> 4234	2	55—56	92
奇异变形菌**1288 <i>Proteus mirabilis</i> 1288	2	57—58	96

\* 标准株 (Type cultures)

\*\* 临床株 (Clinical cultures)

仪。

裂解丝为纯铁丝,裂解温度 770℃,裂解时间 12.5 秒;载气(高纯氮气),流量 20ml/分;氢焰电离鉴定器(FID),氢气流量 20ml/分,空气流量 300 ml/分。不锈钢色谱柱长 2m,内径 4mm。填充物为涂 5% FFAP 的“上试 101”白色担体(80—100 目)。柱温程序:起始温度 80℃,终止温度 200℃,升温速率 8℃/分。记录纸速 0.5cm/分。每个菌样分析次数见表 1,共绘制裂解色谱图 58

张。

#### (四) 数值分类方法

在裂解色谱图中按保留时间递增的顺序标出 18 个特征峰或峰群(图 1),分别计算每个色谱峰或峰群的面积,然后再和总面积相除得到百分面积(即每一个面积占总面积的百分数)。根据每一特征部分百分面积在 58 张裂解色谱图中的均数,来确定它们在统计学分析中所占有的指标数(表 2),共得到 90 项指标。借助细菌数值分类的

表2 裂解图中 18 个色谱峰的平均百分面积和指标数

Table 2 Average % area and character number of 18 peaks in pyrochromatograms

峰号 No. of peaks	保留时间(分) RT (min.)	平均百分面积 Average of % area	指标数 * Character number
1	2.6	5.39	5
2	3.0	10.32	7
3	3.7	2.97	3
4	4.5	12.31	9
5	5.6	2.68	3
6	6.6	6.61	6
7	7.5	1.79	2
8	8.4	2.38	3
9	9.2	9.14	9
10	10.0	2.43	3
11	10.7	0.93	1
12	11.4	13.31	10
13	12.2	2.88	3
14	13.3	6.74	6
15	15.0	1.88	2
16	16.2	3.35	4
17	17.1	4.53	5
18	18.1	10.47	9

\* 合计指标数 (total number): 90

定量指标递加编码方法<sup>[4]</sup>, 对全部指标进行编码。用 TRS 80 型电子计算机和 BASIC 语言计算得出的每 2 张裂解色谱图之间的百分符合系数, 作归群处理。

## 结 果

在本实验条件下, 所得肠杆菌的裂解色谱图彼此间的区别在于不同的峰高或峰面积。从归群后所得三角矩阵(表 3) 可以看到如下结果。

1. 同一菌株连续分析 2—9 次, 其符合系数的范围在 88—99% (表 1), 绝大多数在 92—96% 之间。

2. 归群后的三角矩阵反映了受试菌株间的亲缘关系, 绝大多数和传统分类系统是一致的。

大肠杆菌 O<sub>86</sub> 株和 O<sub>124</sub> 株的符合系数为 72—84%, 而它们和克雷伯氏菌、3 株沙门氏菌、蜂房哈夫尼菌、雷氏变形菌、摩氏变形菌的符合系数绝大多数均低于

表3 简化的符合系数(%)矩阵\*

Table 3 Simplified matching coefficient matrix of strains

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	89—99														
2	74—83	92—96													
3	78—86	83—82	93												
4	67—81	77—84	80—88	91											
5	73—83	77—82	83—87	82—87	92										
6	72—84	68—74	70—76	64—73	63—69	90—96									
7	71—77	82—83	80	80—84	76—83	67—72	96								
8	59—70	76—80	71—77	73—77	70—76	61—69	77—81	88—96							
9	54—64	71—78	68—76	66—76	63—71	49—59	67—71	66—72	88—99						
10	52—60	63—68	54—60	54—58	50—57	53—63	62—66	68—70	56—70	93—99					
11	57—67	67—72	61—64	52—60	52—61	60—72	59—64	69—77	61—71	76—86	92—93				
12	61—68	64—67	63—66	54—59	57—58	70—76	58	60—67	54—62	67—70	73—81	93			
13	49—56	54	61—49	52—47	50—49	56—52	59—56	53—59	44—58	71—76	70—77	68—70	94—98		
14	59—68	61—70	56—63	51—59	53—59	60—68	67—72	57—64	49—66	71—79	73—80	76—79	78—82	90—94	
15	58—70	69—76	61—69	59—67	54—63	59—72	68—76	64—70	54—62	56—61	62—69	56—61	54—62	63—68	90

\* 1. *E. coli* O<sub>86</sub>; 2. *P. vulgaris* 76; 3. *P. vulgaris*; 4. *P. vulgaris* 83; 5. *P. mirabilis* 4234; 6. *E. coli* O<sub>124</sub>; 7. *P. mirabilis* 1288; 8. *K. pneumoniae*; 9. *P. rettgeri*; 10. *S. paratyphi* A; 11. *S. typhi*; 12. *P. morganii*; 13. *E. coli* O<sub>111</sub>; 14. *S. typhimurium*; 15. *H. alvei*.

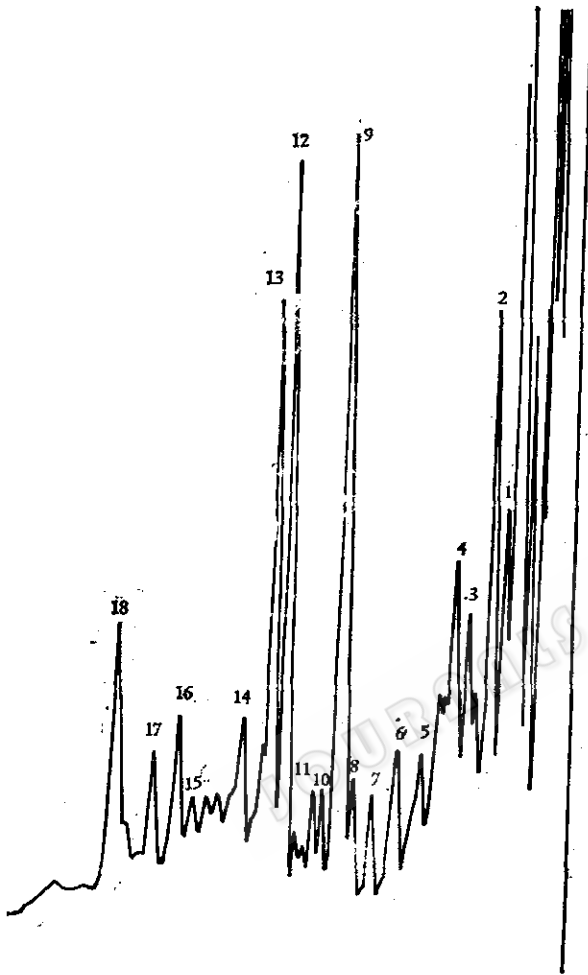


图1 裂解色谱图 (*E. coli* O<sub>111</sub>)  
Fig. 1 Pyrochromatogram (*E. coli* O<sub>111</sub>)

70%，仅极少数为72—74%。但这两株菌和大肠杆菌 O<sub>111</sub> 株的符合系数低于60%，我们应用恒温裂解气相色谱法和另一套仪器系统也得到同样结果；大肠杆菌 O<sub>8</sub> 株、O<sub>124</sub> 株和普通变形菌(包括临床株和标准株)、奇异变形菌的符合系数可达

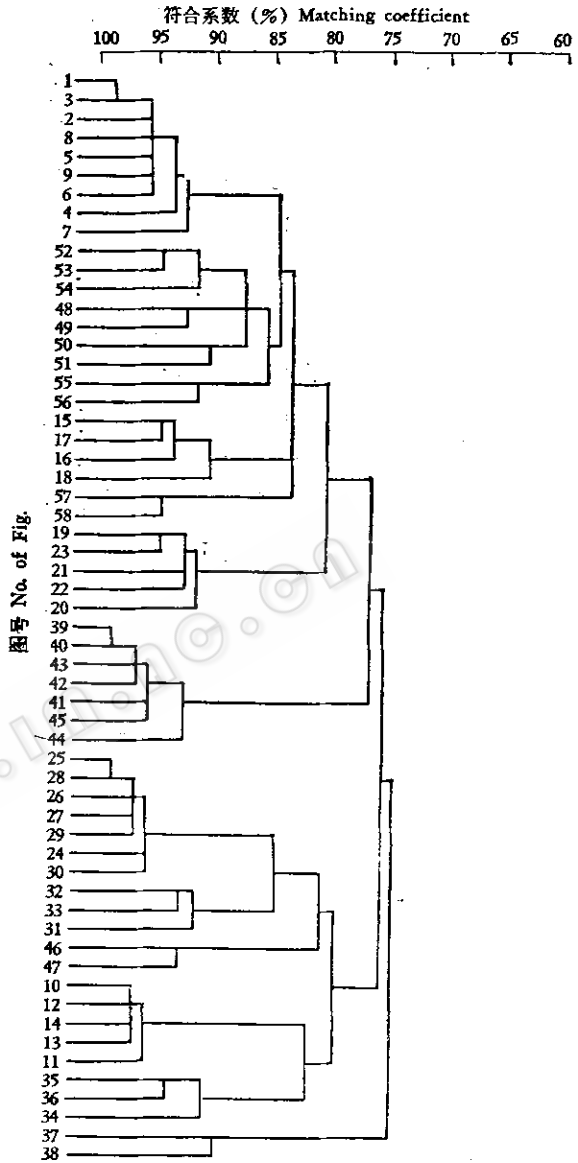


图2 树状谱  
Fig. 2 Dendrogram

66—83%，表明这两株大肠杆菌和变形菌在鉴别时有一定交叉。

另外，3株沙门氏菌之间的符合系数为71—86%，和绝大多数其它受试菌株间的符合系数为51—70%之间。但伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和摩氏变形菌以

及一株变通变形菌临床株的符合系数可达 71% 以上(表 3)。唯有甲型副伤寒沙门氏菌和沙门氏菌以外的 11 株菌(大肠杆菌  $O_{15}$  株除外)的符合系数均低于 71%; 3 株沙门氏菌和大肠杆菌  $O_{15}$  的符合系数则为 70—82%。

此外, 摩氏变形菌和其余 3 种变形菌间的符合系数均低于 67%; 雷氏变形菌和 2 株奇异变形菌的符合系数为 63—71%, 而和 3 株普通变形菌的符合系数为 66—78%。

值得指出的是, 普通变形菌标准株和 2 个临床株间的符合系数, 以及临床株相互间的符合系数可达 77—87%, 2 个奇异变形菌临床株之间的符合系数为 76—83%。由此表明, 用这种方法有可能将临床菌株区分至株的水平。但 3 株普通变形菌和 2 株奇异变形菌之间的符合系数亦为 77—87%, 说明这 2 种菌在化学组分上可能极为相近, 在此条件下难以区分。

从绘制的三角矩阵(表 3)、阴影图和树状谱(图 2)可以看出, 大肠杆菌  $O_{15}$  和  $O_{124}$  株、3 株普通变形菌、2 株奇异变形菌在 82% 符合水平上形成一个表观群; 肺炎克雷伯氏菌和雷氏变形菌独自形成一群; 3 株沙门氏菌、大肠杆菌  $O_{15}$  株及摩氏变形菌在 77% 符合水平上形成一个表观群; 蜂房哈夫尼菌和所有其它菌株相距较远, 独自成一群。

## 讨 论

用 PGC 法对细菌进行分类鉴定, 解析裂解色谱图是重要环节之一。随着实验仪器和条件的不断改进, 色谱图上色谱峰的数目将会越来越多。所以借助电子计算机利用统计学方法解析裂解色谱图是很必要的, 展示了气相色谱-计算机联机应用自

动化鉴别细菌的前景。

为达到对细菌分类鉴定的目的, 可以直接解析裂解色谱图。当然, 若用气相色谱-质谱-计算机联用设备, 所得结果还能在一定程度上说明特征色谱峰的化学本质, 这在细菌分类鉴定和生理、生化研究中也都是有意义的。

本文介绍的裂解色谱图的解析方法, 对图中每个色谱峰来说, 是按数值分类的同等重要原则来处理的。结果表明, 这种解析方法是可行的。因为它显示出同一菌株连续分析的符合系数基本上在 88% 以上; 根据实验菌株裂解色谱图间的符合系数, 有可能区分同种菌的不同临床株; 用这种方法得到的结果和传统方法鉴定结果基本一致, 但也有例外的情况。有的例外情况反映了目前在分类学上有争议。例如, 早在 1954 年 Kauffmann 就曾提出应将摩氏变形菌和雷氏变形菌分别作为两个独立的属<sup>[7]</sup>。特别是 Brenner<sup>[8]</sup> 在 1978 年有关肠杆菌科 DNA 杂交的报告中表明, 这两个种不应放在变形菌属内。他根据 DNA 杂交相关性提出变形菌族(Proteeae)划分 3 个属: 变形菌属(主要包括普通变形菌和奇异变形菌)、摩氏菌属(*Morganella*, 包括原摩氏变形菌)和普罗威登斯菌属 [*Providentia*, 包括产碱普罗威登斯菌(*P. alcalifaciens*)、司徒普罗威登斯菌(*P. stuartii*)和雷氏变形菌]。我们的实验结果也把普通变形菌和奇异变形菌归为一群, 和其它 2 种变形菌差异较大, 这一结果又为变形菌族的重新划分提供了新的依据。

以上实验结果是用一套比较简易的仪器系统得到的。目前又出现了更精密、更先进的裂解色谱设备, PGC 法在细菌的分类鉴定工作中将会发挥更重要的作用。

## 参 考 文 献

- [1] French, G. L. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **125**: 347, 1981.
- [2] 周 方等: 科学通报, **20**: 1309—1312, 1984.
- [3] Edwards, P. R. and W. H. Ewing: Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Co., 1972.
- [4] Emswiller, B. S. et al.: *Appl. Environ. Micro-*

*biol.*, **35**: 97, 1978.

- [5] 周 方: 微生物学通报, **7**(3): 136—141, 1980.
- [6] V. B. D. 斯克尔曼著(蔡妙英等译): 《细菌属的鉴定指导》, 科学出版社, 北京, 1980.
- [7] Kauffmann, F.: Enterobacteriaceae, Second Edition, Ejnar Munksgaard Publisher Co., 1954.
- [8] Brenner, D. J. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**: 269, 1978.

# INTERPRETATION OF ENTEROBACTERIA PYROCHROMATOGRAMS BY NUMERICAL TAXONOMY

Jin Tianru Xie Shaowei

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

Zhou Fang

(Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Sciences PLA, Beijing)

Fifteen strains of enterobacteria, belonging to five genera and ten species, were analysed by pyrolysis gas-liquid chromatography and the pyrochromatograms were analysed by electronic computer by the principle of numerical taxonomy. The basic reproducibility of successive analyses for each strain (2—9 times) were satisfactory (matching coefficients are between 88—99%). The matching coefficients between clinical and standard strains of same species of *Proteus* were 77—88%. It indicated that it is possible to use this method to identify clinical isolated strains if standard strains were analysed simultaneously. Most of the

results of grouping by computer chiefly agreed with those by traditional classification, but some divergence was still evident.

The matching coefficients (77—87%) between three strains of *P. vulgaris* and two strains of *P. mirabilis* were higher than either with *P. morganii* and *P. rettgeri* (57—78%). This result agreed with the data of DNA hybridization made by Brenner and offered new data for the classification of genus of *Proteus* and other related bacteria.

## Key words

Numerical taxonomy; Enterobacteria; Pyrochromatogram