

细胞脂肪酸气相色谱图鉴别细菌的研究*

周方 朱厚础 唐光江 高树德**

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

本文介绍了细胞脂肪酸毛细管柱气相色谱图的绘制方法, 对所得细菌细胞脂肪酸气相色谱图中的某些组分用气相色谱-质谱-计算机联用技术进行了分析鉴定, 并借助电子计算机对细菌脂肪酸模式进行了聚类分析。用上述方法分别对 24 株(5 种)芽孢杆菌、14 株(3 种)无芽孢杆菌、3 种弧菌和 2 株临床分离的类霍乱弧菌进行鉴别, 均得到满意结果。为微生物的分类鉴定、生理生化研究提供了一种现代分析方法。

关键词 细菌细胞脂肪酸; GC/MS-计算机系统; 聚类分析; 芽孢杆菌; 弧菌

脂肪酸是细菌细胞中一种稳定而富有的化学组分, 以细胞脂肪酸特征组分为依据的细菌气相色谱化学分类法进展十分迅速。1963 年 Able 等首先将其用于细菌的鉴定和分类^[1], 此后, Moss^[2]、Drucker^[3]和 Jantzen 等^[4]又做了大量工作。目前细菌鉴定分类的脂肪酸图形法已初步实现自动化。

气相色谱脂肪酸图形法鉴定细菌的实用范围很广, 可用于所有体外培养物, 甚至不必预先区分革兰氏阳性和阴性, 发酵和非发酵类型。用相同的步骤还能建立厌氧菌、酵母菌及原虫的快速鉴定方案。还可建立一系列参考菌株的数据库, 借助电子计算机检索。

由于这种方法要求较高的技术条件, 所以目前尚未广泛应用。为建立本实验室的鉴定系统, 我们在样品处理方法和计算机程序上做了适当改进, 并对某些新分离的菌株进行了鉴别。

材料和 方法

(一) 菌种

实验菌株中部分为参考菌株, 其它为经实验室定名菌株。

1. 炭疽杆菌及其类属菌: 炭疽芽孢杆菌

(*Bacillus anthracis*)3-10、3-15、3-25、3-49、3-54 (强毒株)、3-61、3-79、042、044、045 (疫苗株)、046 共 11 株; 蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)064、065、313、071 (参考株)、AS1.126 (中国科学院微生物研究所) 共 5 株; 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 212、213、312、314、221、AS1.88 (中国科学院微生物研究所) 共 6 株; 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)311 株; 蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides*)411 株。以上菌株除标有来源者外, 均为本室保存菌株。所有实验菌株都有表型鉴定报告^[5]及裂解气相色谱鉴别报告^[6]。

2. 马鼻疽和类鼻疽杆菌: 马鼻疽杆菌 (*Pseudomonas mallei*)350108 株; 类鼻疽杆菌 (*Pseudomonas pseudomallei*) 350102 (参考株)、350106、350112、350128、350132、350140、350142、350145 共 8 株。以上菌株保存于本实验室。

3. 布鲁氏杆菌: *Brucella melitensis* 羊种 1 型 Rev-1, *Br. abortus* 牛种 1 型 S₁₉, *Br. suis* 猪种 1 型 S₂, *Br. neotoma* 沙林鼠型 5K33, *Br. canis* 犬型 RM6/16, *Br. ovis* 绵羊型 63/290, 共 6 株。菌株系中国预防医学中心流行病学微生物学研究所保存。

4. 弧菌: 古典型霍乱弧菌 (Classical *Vibrio cholerae*) 16017, 副霍乱弧菌 (El Tor *Vibrio*

本文于 1985 年 11 月 18 日收到。

* 中国科学院科学基金资助的课题。

** 本室李银太、中国人民解放军 302 医院于玺华、中日友好医院侯林甫参加部分工作。

chalerac) SM6, 非凝集弧菌 (nonagglutinationable *Vibrio*) N53 及临床新分离菌株于(1)和于(2), N53+于(1)。临床菌株系解放军 302 医院检验科分离及常规鉴定。

(二) 鉴定样品制备

1. 炭疽芽孢杆菌及其类属菌: 干燥菌种加肉汤混合后, 取悬液接种于平板, 37℃ 过夜, 挑单菌落接种斜面上, 37℃ 过夜, 用 10ml 生理盐水洗下菌苔, 移入三角瓶中, 流通蒸汽灭活, 进行无菌检查。确实灭活的菌液于 8,000r/min 离心 15 分钟。重复洗涤 3 次后, 沉淀物真空冷冻干燥。

2. 马鼻疽和类鼻疽杆菌: 用 4% 甘油琼脂罗氏瓶培养 48—72 小时, 用生理盐水洗下培养物后加 3 倍体积冷丙酮 (-50°—-70℃), 置冰箱内过滤。用冷丙酮洗 3 次, 抽干。

3. 布鲁氏杆菌: 肝琼脂斜面培养 48 小时, 用无菌蒸馏水洗下培养物, 3,000r/min 离心 30 分钟。沉淀物再用蒸馏水洗 2 次, 灭活后冷冻干燥。

4. 弧菌: 菌种接种于普通斜面上, 培养 18—24 小时, 用 3ml 普通肉汤洗下, 合并后加入罗氏瓶内, 37℃ 培养 24 小时。用无菌生理盐水洗下培养物放入试管内, 56℃ 水浴灭活 30 分钟。用普通平皿进行 3 次分离培养, 检查灭活效果。用无菌生理盐水洗下培养物, 4,000r/min 离心 20 分钟, 重复 3 次, 真空冷冻干燥。

(三) 全细胞脂肪酸甲酯

精确称取冷冻干燥菌粉 10mg, 放于 30ml 磨口玻璃试管内, 加 5% 氢氧化钠甲醇溶液 5ml, 加塞于 100℃ 水浴 30 分钟。冷至室温后, 用 6mol/L 盐酸酸化至 pH2, 加 14% 三氟化硼甲醇液 4ml, 塞紧, 100℃ 水浴 30 分钟。冷至室温后加饱和氯化钠溶液 10ml。用 10ml 氯仿-己烷(1:4)混合试剂提取 2 次, 合并提取液, 加无水硫酸钠 1g, 放置。用干燥氮气吹干提取液, 用重蒸馏正己烷溶至 0.1ml, 每次取 2μl 作色谱分析或气相色谱-质谱分析。

标准脂肪酸甲酯试剂: 配制 1μg/ml 的 $C_{10:0}$ — $C_{14:0}$ 直链饱和脂肪酸甲酯 (SIGMA) 己烷液。自制油酸甲酯和亚油酸甲酯。

(四) 仪器和工作条件

1. 气相色谱仪为 Perkin-Elmer SIGMA 115 型

微机控制气相色谱仪, 双氢焰鉴定器。除 SIGMA 15 数据台之外, 还配有 Hewlett-Packard 3390A 电子积分器同步工作。色谱柱为 12m 高效弹性石英毛细管(交联甲基硅酮, Hewlett-Packard), 以及 20 mOV-10i 石英毛细管柱(石油化学研究院综合研究所)。柱温 80°—(4℃/min)—160°—(8℃/min)—250℃, 汽化室 270℃, 鉴定器 270℃。载气(高纯氮) 2ml/min, 空气 300ml/min, 氢气 30ml/min, 进样分流比 20:1。

2. 气相色谱-质谱仪联用系统为 Finnigan 4021 型 GC/MS/DS, 25m 石英毛细管柱 (OV-101)。质谱分析系统采用电子轰击电离 (EI) 方式, 电子能量 70eV, 灯丝发射电流 0.2mA, NIH/EPA3.1K 质谱谱库对被分析色谱峰自动检索, 可同时提供 3 个参考化合物。

3. 电子计算机: H89 型微机。

结 果

在本实验条件下, 二阶程序升温(80°—160°—250℃)得到的脂肪酸色谱图能得出 150 多个色谱峰。目前许多研究者都选柱温 160°—250℃ 左右, 在此我们也仅对这个范围的色谱峰($C_{10:0}$ — $C_{24:0}$) 进行解析。用癸酸甲酯到二十四烷酸甲酯 16 种饱和直链标准脂肪酸甲酯作内标物, 和样品液同时混合进行供色谱分析, 在色谱图中标识出饱和直链脂肪酸甲酯位置, 再借助 GC/MS 确认上述结果。并用油酸甲酯、亚油酸甲酯等不饱和脂肪酸甲酯会同 GC/MS 结果对其余某些色谱峰进行鉴定。根据色谱峰位置及归一化的峰高百分值列出实验菌株细胞脂肪酸成分表(表 1, 2), 未鉴别的色谱峰在表中以符号 X 表示。用电子计算机对表 1 所列数据进行聚类分析, 进一步揭示菌株间的亲疏关系。

所有菌株细胞脂肪酸色谱图中都显示有共同特征(见图 1), 即 $C_{12:0}$ — $C_{14:0}$ 区间内有 4 个色谱峰, 它们的百分含量总和约为 35% 以上。我们发现, 它们与 N- 乙酰

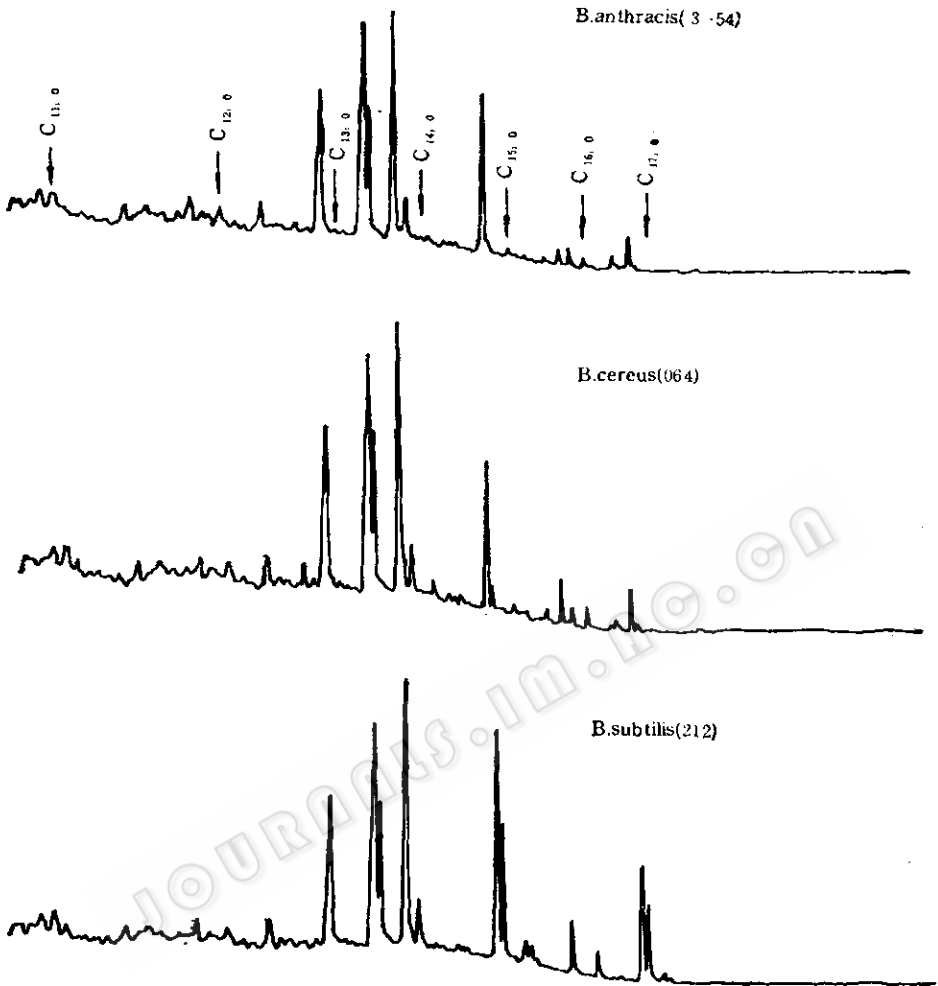


图 1 3 种芽孢杆菌细胞脂肪酸气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatograms of cellular fatty acids of three *Bacillus* spp.

神经氨(糖)酸(N-acetylneuraminic acid)水解并脂化后,所得色谱图中的4个色谱峰非常相近。此外,其它色谱峰在不同程度上显示了菌种间的差别。

1. 炭疽芽孢杆菌及其类属菌: 5种需氧芽孢杆菌,即 *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, 和 *B. mycooides*。其中以 *B. subtilis* 的特征最明显,特点是(1)未测出十四烷酸;(2)有2种十五烷酸异构体,其中 *aC*_{15:0} 占8%以上。*B. pumilus* 和

B. subtilis 相近,两者区别仅在于前者的 *C*_{16:0} 含量甚微,未测出 *C*_{16:10}。*B. mycooides*, *B. anthracis* 和 *B. cereus* 很相近,三者的区别在于 *B. mycooides* 的 *C*_{13:0} 异构体 X 3.3 含量为2%,而后两者却低于2%。*B. cereus* 和 *B. anthracis* 细胞脂肪酸成分很相似,只是 *B. cereus* 棕榈酸(*C*_{16:0})含量较高(>2%)。从表1还发现菌株314虽列入枯草芽孢杆菌范围,但在 *C*_{12:0} 以前未测出其它成分,也未测出 X4.5 峰。

表 1 试验菌株的细胞
Table 1 Cellular fatty acid compo

菌株 Strains	脂 肪															
	X ^b 1.1	C _{11:0} ^a	X2.1	X2.2	X2.3	X2.4	X2.5	X2.6	X2.7	X2.8	C _{12:0}	X3.1	X3.2	X3.3	X3.4	C _{13:0}
<i>B. anthracis</i>																
3-49	— ^d	—	—	1.362	—	1.321	—	—	1.276	1.014	1.276	2.324	—	—	10.991	—
3-10	—	—	—	1.803	0.805	1.610	—	0.907	2.510	0.816	1.279	2.687	0.690	—	11.760	0.667
064	—	—	—	1.634	—	0.839	—	0.971	2.475	1.085	1.044	2.538	—	—	11.510	—
3-54	—	—	—	1.705	—	1.170	—	—	2.388	1.003	1.830	2.936	—	1.001	12.639	—
046	—	—	0.655	1.509	1.218	1.542	1.274	1.299	2.409	1.330	1.736	2.435	0.671	0.596	9.831	T
3-25	—	—	—	1.584	0.690	1.399	0.979	0.883	1.573	0.616	1.269	2.319	0.701	1.312	9.738	—
3-15	—	—	—	—	—	—	—	—	2.686	—	—	2.907	—	—	13.976	—
044	—	—	—	2.056	1.427	2.038	1.426	0.944	1.959	0.847	1.189	2.564	T	0.556	10.812	—
045	—	—	—	1.888	—	1.142	—	—	—	—	—	2.237	—	—	12.765	—
3-79	1.508	1.979	1.182	1.465	0.629	1.207	—	T	1.398	0.628	1.239	2.599	0.804	0.754	10.255	—
3-61	1.519	1.905	1.012	1.282	—	1.181	—	—	1.858	0.983	1.338	2.471	—	1.032	11.608	—
<i>B. cereus</i>																
071	—	—	—	1.413	—	1.019	—	—	1.423	—	1.228	2.321	—	—	12.261	—
064	—	—	0.828	1.444	T ^c	0.948	—	0.786	1.579	1.015	1.481	2.307	0.562	1.766	11.448	—
1.126	—	—	—	1.495	—	0.914	—	0.651	—	—	1.153	2.156	—	1.628	11.264	—
313	—	—	—	1.213	—	1.273	—	—	2.140	1.222	1.663	2.357	0.515	1.916	10.855	—
065	—	—	—	1.847	—	1.249	—	1.033	1.951	1.145	1.847	2.849	—	0.937	11.635	—
<i>B. subtilis</i>																
314	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.178	—	—	11.989	—
1.88	—	—	—	—	—	—	—	—	1.808	0.929	1.224	2.268	—	—	10.485	—
213	—	—	—	1.841	—	1.427	1.223	1.133	2.408	1.382	2.039	2.819	0.739	0.560	11.148	—
221	—	—	—	2.215	—	4.331	—	—	2.522	0.962	1.330	2.671	—	—	13.872	—
212	—	—	—	1.194	—	1.149	—	T	1.033	—	—	1.796	0.656	—	9.458	—
312	0.618	—	—	0.858	—	0.846	—	—	2.208	—	—	2.469	—	—	12.273	—
<i>B. pumilus</i>																
311	—	—	—	1.330	—	1.058	—	—	1.532	—	0.925	1.799	—	—	9.483	—
<i>B. mycoides</i>																
411	—	—	—	1.339	—	0.917	—	—	1.688	0.603	—	2.043	—	2.059	10.782	—

注: a. 冒号左为碳原子数,右为双键数; b. 未鉴定峰; c. 色谱峰高百分值<0.5%; d. 未给出测量值。

Notes: a. The figure before the colon indicates number of carbon atoms in the fatty acid chain, the one less than 0.5%; d. Undetectable.

脂肪酸成分表

sitions of experimental bacteria

酸				Fatty acids													
X4.1	X4.2	X4.3	X4.4	C _{14:0}	iC _{15:0}	aC _{15:0}	C _{15:0}	X6.1	X6.2	iC _{16:0}	C _{16:1}	C _{16:0}	X7.1	X7.2	iC _{17:0}	X7.3	
16.267	—	18.611	2.884	0.854	17.943	—	0.858	—	0.678	2.559	1.689	1.262	1.482	1.055	4.277	—	
15.495	10.833	18.699	3.250	0.667	13.431	—	0.561	—	0.563	1.765	1.455	1.077	—	1.168	3.649	—	
17.297	10.843	20.395	3.335	0.762	10.997	1.363	T	—	1.295	4.482	1.803	1.519	—	T	2.726	—	
18.619	11.130	20.229	3.403	—	13.748	—	—	—	—	1.385	1.595	0.937	—	1.275	3.007	—	
13.405	9.319	15.288	2.943	0.709	10.653	1.653	T	—	0.876	3.488	1.427	1.341	0.650	1.073	2.997	0.986	
14.185	9.543	16.128	3.449	1.848	9.897	1.235	0.708	—	—	4.559	1.346	2.818	—	0.792	4.241	0.812	
21.108	13.054	24.270	3.740	—	13.856	—	—	—	—	1.636	T	T	—	—	2.767	—	
15.339	11.347	17.279	3.272	0.857	10.711	1.339	—	—	T	2.603	1.174	1.189	—	0.687	2.778	0.623	
18.787	10.527	20.947	3.432	—	10.566	—	—	—	—	3.720	—	—	—	—	2.052	—	
14.847	9.738	17.039	2.887	1.138	12.470	1.284	0.596	—	0.911	4.096	1.750	1.447	—	0.770	2.916	—	
15.796	9.749	20.098	3.297	1.017	13.897	1.528	0.997	—	—	1.611	T	1.519	—	T	3.537	—	
18.436	10.960	21.296	3.180	1.343	11.422	—	T	—	—	4.648	1.719	2.696	—	—	4.634	—	
16.331	10.804	19.047	3.389	1.292	10.452	1.513	0.713	—	0.824	3.052	1.118	1.470	—	—	3.071	—	
16.085	9.947	19.734	2.996	T	12.687	3.049	T	—	—	2.101	1.592	2.246	1.568	1.204	5.572	1.961	
15.985	10.257	19.811	3.572	1.642	7.330	1.593	0.759	—	0.521	3.358	1.344	2.440	—	T	4.731	1.067	
16.992	10.708	18.994	3.096	1.486	11.631	1.394	T	—	—	4.335	0.963	2.494	—	—	3.416	—	
17.136	9.593	20.358	—	—	8.296	16.155	—	—	—	4.003	—	—	—	—	5.264	5.028	
15.088	9.642	17.910	2.666	—	7.519	14.365	—	—	—	3.612	—	1.385	—	—	4.462	4.218	
15.254	10.240	17.563	3.076	—	5.627	8.996	T	—	—	2.082	—	0.953	—	—	3.252	2.555	
22.464	7.276	15.400	2.509	—	6.607	8.695	—	—	—	2.069	—	0.609	—	—	4.041	2.428	
14.098	8.724	16.242	2.893	—	14.735	8.522	1.161	1.043	—	3.279	—	1.476	—	—	7.345	4.821	
16.416	10.353	18.783	3.192	—	7.080	10.901	—	0.792	—	2.891	—	1.143	—	—	4.723	3.326	
14.325	7.898	16.876	2.541	—	13.956	9.264	—	—	—	0.974	—	T	—	T	5.839	2.865	
15.641	10.132	19.418	3.055	1.699	8.861	1.439	—	—	—	2.892	1.153	2.771	—	—	3.030	—	

after the colon denotes the number of double bonds; b. Unidentified peak; c. The percentage of peak height

表 2 试验菌株的细
Table 2 Cellular fatty acid

菌株 Strains	脂 肪												
	X ³ .1	X3.2	X3.3	C _{13:0} ^a	X4.1	X4.2	X4.3	X4.4	X4.5	C _{14:0}	X5.1	C _{15:0}	iC _{15:0}
<i>P. mallei</i>													
350018	2.748	— ^d	14.406	—	20.979	12.790	24.769	3.969	—	4.153	—	—	—
<i>P. pseudomallei</i>													
350120	2.640	—	15.124	—	23.024	14.007	27.667	4.638	—	1.630	—	—	—
350112	3.001	—	15.393	—	24.016	14.090	29.145	4.430	—	2.056	—	—	—
350132	2.921	—	15.686	—	24.383	14.005	30.007	4.672	—	2.051	—	—	—
350140	2.866	0.913	15.349	—	22.094	14.352	26.493	4.421	—	2.192	—	—	—
El Tor <i>Vibrio cholerae</i>													
SM6	1.301	0.832	6.691	—	9.854	6.400	11.909	2.087	—	4.554	—	T	1.249
non-agglutinable <i>Vibrio</i>													
N53	1.717	0.891	8.346	—	11.335	7.912	15.393	2.866	—	3.691	—	1.247	2.003
Classical <i>Vibrio cholerae</i>													
16017	1.899	0.697	9.129	—	13.910	8.134	15.578	2.950	—	6.481	—	1.232	1.086
<i>Vibrio</i> new strains													
于(1)	1.814	1.137	8.269	—	12.165	7.969	15.016	2.500	—	2.745	—	0.731	1.215
于(2)	1.771	0.833	9.273	—	14.205	7.860	17.078	2.613	—	2.806	—	T	1.744
<i>Br. abortus</i>													
554A	1.444	—	7.193	—	11.204	6.927	14.135	2.215	1.199	—	1.365	—	—
<i>Br. suis</i>													
13305	2.145	—	10.349	—	16.113	9.933	20.637	3.511	—	—	—	—	—
<i>Br. neotoma</i>													
5K33	2.198	—	9.774	—	14.892	9.075	18.141	2.994	—	—	—	—	—
<i>Br. canis</i>													
RM6/66	2.165	—	11.124	—	15.670	9.936	19.617	2.998	—	—	—	—	—
<i>Br. melitensis</i>													
16M	2.429	—	11.457	—	17.227	11.067	20.157	3.368	—	—	—	—	—
<i>Br. oris</i>													
63/290	1.881	—	11.414	—	19.072	10.887	25.260	3.768	4.128	—	3.036	—	—

注: 参见表 1。

Notes: cf. to notes in table 1.

胞脂肪酸成分表

compositions of experimental bacteria

酸 Fatty acids																	
C _{16:1}	X6.3	X6.4	C _{16:0}	X7.1	X7.2	iC _{17:0}	X7.4	C _{17:0}	C _{18:1}	X8.1	C _{18:0}	X9.1	X9.2	X9.3	C _{19:0}	X _{10:1}	X _{10,2}
—	1.866	—	5.933	—	—	—	—	—	7.002	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	6.089	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	1.847	—	—	—
—	—	—	5.877	—	—	—	—	—	1.933	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	5.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.275	—	—	—
—	—	—	6.604	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.119	—	—	—
16.685	—	—	16.866	1.842	1.347	T	—	0.829	6.059	—	2.680	—	—	—	—	—	—
15.006	—	—	14.781	0.900	1.172	1.095	—	1.382	5.659	—	1.033	—	—	1.847	—	—	—
10.237	—	—	16.042	T	1.306	—	—	T	1.340	—	0.512	—	—	—	—	—	—
15.543	—	—	12.540	1.456	0.854	1.120	—	1.555	7.070	—	2.030	—	—	—	—	—	—
15.308	—	—	13.041	—	1.017	0.931	—	1.384	6.343	—	1.470	—	—	—	—	—	—
—	—	1.925	2.757	—	0.821	—	2.616	0.892	10.668	2.599	4.252	—	1.327	T	7.960	1.400	2.698
—	—	—	3.355	—	—	—	1.123	—	16.411	—	3.964	—	—	0.866	9.081	—	2.513
—	—	—	8.894	—	0.827	—	0.856	—	11.789	—	2.964	—	—	—	5.726	—	1.729
—	1.345	—	7.003	—	—	—	—	—	26.586	—	1.904	1.652	—	—	10.109	—	2.172
—	—	—	8.244	—	—	—	T	—	8.372	—	3.747	—	—	0.921	14.334	—	—
—	—	2.459	3.762	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—

2. 马鼻疽和类鼻疽杆菌: 这两种假单胞菌的细胞脂肪酸成分和上述芽孢杆菌所含范围相近。两者的主要区别在于 $C_{14:0}$ 和 $C_{18:1}$, 马鼻疽杆菌所含 $C_{14:0}$ 比类鼻疽杆菌高一倍, 马鼻疽杆菌的 $C_{18:1}$ 含 7%, 而类鼻疽杆菌(除 350112 株外)未测出 $C_{18:1:0}$ 。在其它试验中常见到 350112 株与马鼻疽杆菌的交叉性较其他菌株强。

3. 弧菌: 这组菌株包括副霍乱弧菌 SM6 株, 古典型霍乱弧菌 16017 株, 非凝集弧菌 N53 株, 以及临床分离株于(1)和于(2)。古典型霍乱弧菌特点是 $C_{14:0}$ 含量 $>6\%$, $C_{17:0} < 0.5\%$, $C_{18:0} \approx 0.5\%$; 非凝集弧菌 N53 株 $C_{17:0} \approx 1\%$, $C_{17:1} > 1\%$, 由此可区分上述两种菌。新分离的于株被鉴定为非凝集弧菌, 此结果已被常规检验所证实。

4. 布鲁氏杆菌: 该菌细胞脂肪酸组分至少有 12 种以上。一般在 $C_{11:0}$ — $C_{14:0}$ 区间的 6 个组分含量基本相同。和其它菌群相比, 其组分最高碳原子数可达 20。其中 *Br. ovis* 的 $C_{17:0}$ 以后的组分基本未测出, 邻近 $C_{14:0}$ 的未定峰 X4.6 含量为 4%, $C_{16:0}$ 前的未定峰 X6.4 含量为 2%, 这是该菌的主要特征; *Br. melitensis* 的 $C_{20:0}$ 附近的未定峰 X10.2 未测出; *Br. canis* 的 $C_{18:0}$ 附近未定峰 X9.1 为特有色谱峰, 和 $C_{16:0}$ 相近的 X6.3 也是特征峰; *Br. aboutus* 色谱图中显示了 $C_{20:0}$ 组分, 未定峰 X9.2 和 X10.1 均为特征色谱峰; *Br. suis* 和 *Br. neotoma* 的主要区别是前者的 $C_{19:0}$ 为 9%, $C_{16:0}$ 为 4%, 而后的 $C_{19:0}$ 为 6%, $C_{16:0}$ 为 9%。除 *Br. ovis* 外, 其它菌株的 $C_{18:1}$ 含量达 8—26%。

5. 炭疽芽孢杆菌及其类属菌细胞脂肪酸色谱图的聚类分析: 我们以 HP 3390A 积分器自动打印出的各菌株色谱图中峰高百分值为基础, 采用欧氏距离、最长距离法

作聚类分析, 即

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - X_{jk})^2}$$

式中 d_{ij} 为第 i 与第 j 个菌株之间的欧氏距离, x_{ik} 和 x_{jk} 分别为第 i 和 j 株菌的第 k 个峰的峰高百分值, m 为菌株的峰数。

所得树状谱图(图 2)中各菌株的聚类位置显示了彼此间的亲疏关系。欧氏距离 14 以下可分为 3 群, 它们是 *B. anthracis* 群(图 2 左部)、*B. cereus* 群(图 2 中部)、*B. subtilis* 群(图 2 右部)。*B. anthracis* 群中以典型株(包括强毒株)组成; 图中部 *B. cereus* 群包括所有测试的 *B. cereus* 株, 同时也包括了非典型株 *B. anthracis* (内有疫苗株), 还包括 *B. mycooides* 株; 图右部由 *B. subtilis* 株组成, 还有一株 *B. pumilus*。树状谱图明确显示了 *B. anthracis* 和 *B. cereus* 的密切关系, 而 *B. subtilis* 和两者关系较远。*B. cereus* 和 *B. mycooides*, *B. subtilis* 和 *B. pumilus* 的关系更为密切。

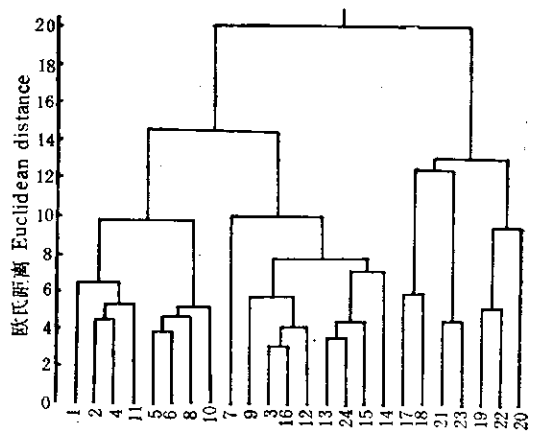


图 2 炭疽杆菌及其类属菌细胞脂肪酸成分的聚类分析树状谱

1—11. *B. anthracis*; 12—16. *B. cereus*; 17—22. *B. subtilis*; 23. *B. pumilus*; 24. *B. mycooides*.

Fig. 2 Dendrogram showing relationship of *Bacillus* sp. groups, based upon cellular fatty acid profiles, obtained by complete linkage cluster analysis.

讨 论

通过对 4 个菌群的细胞脂肪酸初步分析结果,使我们看到了它们彼此间的亲疏关系,为寻找细菌属、种的化学特征提供了基础。通过对弧菌的临床新分离菌株的细胞脂肪酸分析,进一步确认其为不凝集弧菌。本实验结果和其它常规分类鉴定结果基本一致。我们在对 *Moraxella* 和 *Legionella* 的分类研究中也得到了类似结果^[7]。

由于分析细菌细胞成分受到多种条件的限制,因此目前尚无统一的程序分析细菌细胞脂肪酸。细菌(尤其是病原菌)细胞样品受到极大限制,一般只能在微量范围内进行。还有,某些细胞脂肪酸取代基的存在,致使还没有找到一种通用方法进行样品的预处理^[8]。例如细胞的水解,在常用的碱性水解或酸性水解过程中,很可能引起细胞脂肪酸环状取代基或羟基的分解丢失,使用的酯化试剂也各有优缺点^[9]。我们选用的三氟化硼-甲醇快速酯化试剂的来源比较容易。

目前,用于色谱分析样品预处理的反应试管有两种,一种是带聚四氟乙烯帽的玻璃试管,另一种是熔封玻璃安瓿。前者有混入杂质的可能,后者手续繁杂、速度慢。我们则采用带塞玻璃磨口试管,既不会将任何杂质带入反应液内,而且不需熔封管口,使用方便。

细胞脂肪酸样品溶液的浓缩,一般多用氮气吹至 2 滴,再加试剂溶解备用。这种处理方法对色谱图的开始部分影响较大,各种残留溶剂均在 5 分钟内被洗脱出来,致使色谱图开始部分失去重现性。若先用氮气吹干反应液,然后用正己烷溶解,保障了整个色谱图的重现性。

细菌细胞样品的用量和所用色谱仪性能有关。普通仪器一次约用干燥菌粉

10mg,性能较好的仪器用量可在 5mg 以内。从理论上讲,色谱图上的任何色谱峰都能用 GC/MS 进行定性鉴别。实际上,目前只能对分离较好、含量较高的成分进行定性鉴别。鉴于上述原因,我们认为用内加标尺法(即样品内加入数种标准脂肪酸甲酯在色谱图上定标,必要时再加上个别特征组分的内标),配合 GC/MS 分析,有利于色谱图的定性解析。为了迅速完成大量已知和未知菌株的归类鉴定工作,直接用电子计算机对细胞脂肪酸色谱图进行聚类分析,是一条有效的自动化途径。

细菌细胞脂肪酸分析和各种生化鉴定法一样,也需用纯培养物。脂肪酸成分有时可能受到环境因素的影响,因此欲测菌株必须和参考菌株在相同条件下培养。所用选择性培养基、温度和培养时间等条件的要求并不比生化鉴定条件高。大多数培养物样品的皂化、甲酯化和提取过程可以在 90 分钟内完成,每次进样分析却只要 4 分钟。脂肪酸提取物的分析和数据库的检索均可自动化,每天可处理 50 份样品。

应该强调指出,快速生化检验系统一般选用 20 个检验反应,得到 20 个带有主观因素的二进制指标。气相色谱分析细胞脂肪酸能得到近百个具有准确数值的定量指标,所提供的信息要丰富得多,两者的反应速度和费用差不多。在某种程度上,气相色谱法分析细胞脂肪酸有可能将菌株区分至属、种,甚至亚种的水平。

通过上述研究,我们初步建立了细菌细胞脂肪酸的气相色谱分析法,并在某些实际问题中得到应用,证实了该法的可行性。今后将继续加以完善和改进,其中包括对色谱图中前两个区间的色谱峰进行解析,努力实现工作程序的规范化,并为自动化创造条件。

参 考 文 献

- [1] Able, K. et al.: *J. Bacteriol.*, **85**: 1039—1044, 1963.
- [2] Moss, C. W. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **6**: 140—143, 1977.
- [3] Drucker, D. B. et al.: *Inter. J. System Bacteriol.*, **31**(3): 219—225, 1981.
- [4] Jantzen, E. et al.: *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, **82**: 785—798, 1974.

- [5] 高树德等: 中国人民解放军军事医学科学院院刊, (1): 41—49, 1985。
- [6] 周方等: 科学通报, **29**: 1394—1397, 1984。
- [7] 周方等: 中国科学(B辑), (10): 1051—1058, 1986。
- [8] Drucker, D. B.: *Microbiological Applications of Gas Chromatography*, Cambridge University Press, 1981.
- [9] 周方(陶宗晋主编): 《生物化学实验技术丛书, 色谱法(二)》, 科学出版社, 北京, 第110—185页, 1986。

STUDY ON THE DISCRIMINATION OF BACTERIA BY GAS CHROMATOGRAPHIC PROFILES OF CELLULAR FATTY ACIDS

Zhou Fang Zhu Houchu Tang Guangjiang Gao Shude

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

A procedure for obtaining gas chromatographic (GC) profiles of bacterial cellular fatty acids was described. Some of the unknown component peaks in these profiles were identified by a on-line GC/MS-computer system. And, based on the complete linkage cluster analysis, the interpretation of the resulting cellular fatty acids of bacteria were performed by microcomputer. By means of this method, the discrimination of 5 species (24 strains) of spore forming *Bacillus*, 3 species (14 strains) of nonspore forming

Bacillus, 3 species of *Vibrio*, and two clinical isolates of like-*Vibrio cholerae* were made. This procedure has provided a useful method for the classification and identification of microorganisms, and their physiological, and biochemical studies.

Key words

Bacterial cellular fatty acids; GC/MS-computer system; Cluster analysis; *Bacillus*; *Vibrio*