

若干需氧芽孢杆菌芽孢脂肪酸成分分析

宋亚军 杨瑞馥 郭兆彪 彭清忠 张敏丽 周方

(军事医学科学院国家生物医学分析中心分析微生物实验室 北京 100071)

摘要: 51株需氧芽孢杆菌纯化后的芽孢培养物经处理抽提全细胞脂肪酸甲酯,用于气相色谱分析,同时以相应的繁殖体作为对照。芽孢脂肪酸成分的重现性实验发现,芽孢的脂肪酸成分比较稳定。将脂肪酸百分含量编制成原始数据矩阵,以 Statistica 5.0 统计软件进行聚类分析,得到两张分别基于芽孢脂肪酸成分和繁殖体脂肪酸成分的实验菌株树状聚类图。通过对比这两张图可以得出一些有意义的结论,同时也说明芽孢脂肪酸分析可望成为需氧芽孢杆菌化学分类的新手段。

关键词: 需氧芽孢杆菌,芽孢,脂肪酸,气相色谱,树状聚类图

中图分类号: Q939.124 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2001)01-023-07

SPORE CELLULAR FATTY ACIDS ANALYSIS OF SOME AEROBIC ENDOSPORE-FORMING BACILLI

SONG Ya-Jun YANG Rui-Fu GUO Zhao-Biao PENG Qing-Zhong
ZHANG Min-Li ZHOU Fang

(Laboratory of Analytica Microbiology, National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100071)

Abstract: A gas chromatographic analysis method was employed to determine the cellular fatty acids (CFAs) profiles of the spores of some aerobic endospore-forming bacilli. Purified spore cultures of 51 experimental strains were processed to acquire whole cell fatty acids methyl esters for the subsequent gas chromatographic analysis, and the corresponding vegetative cells were set as control. The reproducibility study of spore fatty acids revealed that, the fatty acids components of spores were stable enough for research purpose, provided under standardized experimental procedure. The dendrograms obtained by cluster analysis provided some meaningful taxonomic information of the experimental strains. The fatty acids analysis of spores seemed to be a promising supplementary tool for the chemotaxonomic research of aerobic endospore-forming bacilli.

Key words: Aerobic endospore-forming bacilli, Spore, Cellular fatty acids (CFAs), Gas chromatography, Dendrogram

需氧芽孢杆菌在医学和工农业上具有特殊意义,但其早期分类状况比较混乱。70年代以来,随着核酸分类方法与化学分类方法的建立和发展,相继有五个新属从芽孢杆菌属(*Bacillus*)中独立出来。目前,有关需氧芽孢杆菌分类的研究是系统细菌学上最活跃的领域之一^[1]。

1963年, Able 率先将气相色谱(GC)应用于肠杆菌的全细胞脂肪酸(Cellular Fatty Acids, CFAs)成分分析^[2]。周方等人也首先在国内开展了这一领域的工作^[3]。菌体脂肪酸成分分析已成为

微生物学分类方法的重要组成部分。周方等人对炭疽芽孢杆菌及其类属菌的繁殖体和芽孢进行了裂解气相色谱(Py-GC)分析,揭示了芽孢化学组分分析在分类学上的应用前景^[4]。本实验对若干需氧芽孢杆菌的芽孢脂肪酸成分进行了系统分析,并探讨了其在分类学上的意义,为需氧芽孢杆菌的分类学研究提供了新的资料。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本实验选用芽孢杆菌属(*Bacillus*),类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*),短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*),32个种共计51株需氧芽孢杆菌进行脂肪酸成分分析,细菌名称及菌株号详见图1及图2。CCTCC AB系列由武汉大学微生物与免疫学系中国模式培养物保藏中心方呈祥教授惠赠,其中菌名上标带T的为模式种,菌株号上标带T的为模式株;炭疽芽孢杆菌疫苗株sterne及疫苗株A.16R由庄汉澜教授惠赠;褐黑芽孢杆菌ATCC 9372株由本所消毒学研究室提供;170系列为本室菌种保藏中心提供。

1.2 培养条件

1.2.1 繁殖体培养:实验菌株接种于LB固体培养基,30℃培养24h。

1.2.2 芽孢培养:实验菌株接种于Mn²⁺加富的LB固体培养基,30℃培养10d。

1.3 繁殖体清洗及芽孢的纯化处理

繁殖体培养物以蒸馏水洗下,离心洗涤后冻干备用。芽孢培养物以蒸馏水洗下后,4℃冰箱贮存过夜,离心收集菌体,重悬于3.0mg/mL的溶菌酶溶液(pH8.0,50mmol/L Tris·HCl缓冲液),37℃温育1h;60W,30s超声处理3次,每次间隔1min;收集菌体,蒸馏水洗涤3次。纯化处理后的芽孢冻干备用。

1.4 全细胞脂肪酸甲酯的抽提

参照Sherlock微生物鉴定系统(美国MIDI公司,ver2.95)推荐方法进行^[5]。

1.5 气相色谱分析系统及分析条件

气相色谱条件设定参见Mukwaya等人的工作^[6]。Sherlock系统同时根据流出组分的等值碳链长度(ECL,Equivalent Chain Length)值进行脂肪酸成分的定性和相对定量^[5]。

1.6 芽孢脂肪酸成分的重现性评价

随机选择球形芽孢杆菌CCTCC AB 92073^T作为测试对象。取该菌株不同时间,相同条件下制备的3批芽孢,各称取5mg干粉,分析菌体脂肪酸成分,以评价批间重现性;同时从其中一批重复3次称取5mg干粉,分析菌体脂肪酸成分,以评价批内重现性。

1.7 树状聚类图的绘制

将由Sherlock系统分析所得各菌株繁殖体和芽孢脂肪酸组成百分归一化结果编制成原始矩阵,使用Statistica 5.0(ver5.0 StatSoft, Inc, Tulsa, OK)统计软件进行处理,分别绘制实验菌株基于繁殖体和芽孢脂肪酸成分的树状聚类图。

2 结果与讨论

2.1 芽孢培养和纯化

气相色谱分析脂肪酸成分是一种灵敏度较高的分析方法,为真实再现芽孢的脂肪酸组成,有必要对所收获的芽孢培养物进行提纯处理,以排除繁殖体的干扰。本实验中采取的一系列措施尽可能

达到清除繁殖体的目的。从孔雀绿染色的镜检结果可以看到,纯化后的芽孢培养物基本已清除繁殖体,效果较为理想。本实验所建立的芽孢纯化方法也完全适用于有关芽孢的其他研究领域。

2.2 芽孢脂肪酸成分的重现性

在同一批次制备的球形芽孢杆菌 CCTCC AB 92073^T 芽孢中分 3 次称取 5mg 干粉,分析所得主要脂肪酸成分(含量在 1% 以上)及其简单统计数据见表 1。

不同时间,相同条件下制备的 3 批球形芽孢杆菌 CCTCC AB 92073^T 芽孢的主要脂肪酸成分见表 2。

从表 1 可以看到,同批次球形芽孢杆菌 CCTCC AB 92073^T 株芽孢的脂肪酸组分变异系数在 0.34% 到 3.89% 之间,其中最主要的组分 iso-15:0 脂肪酸的变异系数仅为 0.34%。表 2 显示的是 3 批不同时间,相同实验条件下制备的球形芽孢杆菌 CCTCC AB 92073^T 株芽孢的主要脂肪酸组成情况,其中各组分的变异系数在 0.82% 到 4.37% 之间,iso-15:0 脂肪酸的变异系数为 0.82%。结合两表可以看出,芽孢脂肪酸组成的批间差异略大于批内差异,但两者各成分的变异系数处于可接受的范围之内。通过这一结果可以认为,在标准化的实验条件下,需氧芽孢杆菌芽孢脂肪酸分析的重现性较为理想。

表 1 同批次球形芽孢杆菌 CCTCC AB 92073^T 芽孢的主要脂肪酸成分

实验对象 及统计值	脂 肪 酸 成 分									
	il4:0	il5:0	al5:0	al 17:1 ω 7c	il6:0	n16:0	il7:0	al7:0	mix3	mix5
样品 1	6.07	44.28	8.66	7.20	18.20	1.45	5.42	2.23	2.12	1.14
样品 2	5.97	44.26	8.53	7.35	18.42	1.47	5.56	2.12	2.00	1.15
样品 3	6.18	44.53	8.71	7.22	18.02	1.40	5.32	2.08	1.97	1.13
平均值	6.07	44.36	8.63	7.26	18.21	1.44	5.43	2.11	2.03	1.14
标准差	0.105	0.150	0.093	0.081	0.200	0.036	0.121	0.026	0.079	0.010
变异系数	1.73%	0.345	1.08%	1.12%	1.10%	2.50%	2.23%	1.24%	3.89%	0.88%

注:表中所示数值为百分含量,mix3 为因保留时间接近而不能准确性的 iso-16:1 ω 7c 脂肪酸以及 3OH-14:0 脂肪酸 mix5 为因保留时间接近而不能准确性的 iso-17:1 ω 7c 脂肪酸及 ante-17:7c 脂肪酸

表 2 3 批球形芽孢杆菌 CCTCC AB 92073^T 芽孢的主要脂肪酸成分

实验对象 及统计值	脂 肪 酸 成 分									
	il4:0	il5:0	al5:0	al 17:1 ω 7c	il6:0	n16:0	il7:0	al7:0	mix3	mix5
第 1 批	6.18	44.52	8.71	7.25	18.06	1.4	5.39	2.14	1.99	1.18
第 2 批	5.86	44.02	8.85	7.47	18.42	1.49	5.56	2.02	2.12	1.12
第 3 批	6.34	44.73	8.93	7.08	18.02	1.37	5.22	2.08	2.01	1.15
平均值	6.12	44.42	8.83	7.26	18.17	1.42	5.39	2.08	2.04	1.15
标准值	0.244	0.365	0.111	0.195	0.220	0.062	0.170	0.060	0.070	0.030
变异系数	3.975	0.83%	1.26%	2.66%	1.21%	4.37%	3.15%	2.89%	3.43%	2.61%

注:表中所示数值为百分含量,mix3 为因保留时间接近而不能准确性的 iso-16:1 ω 7c 脂肪酸以及 3OH-14:0 脂肪酸,mix5 为因保留时间接近而不能准确性的 iso-17:1 ω 7c 脂肪酸及 ante-17:7c 脂肪酸

2.3 实验菌株基于脂肪酸成分的树状聚类图

根据脂肪酸成分编制原始矩阵,使用 Stastica 统计软件进行系统聚类分析,绘制需氧芽孢杆菌实验菌株分别基于芽孢和繁殖体脂肪酸成分的树状聚类图,分别见图 1 和图 2。

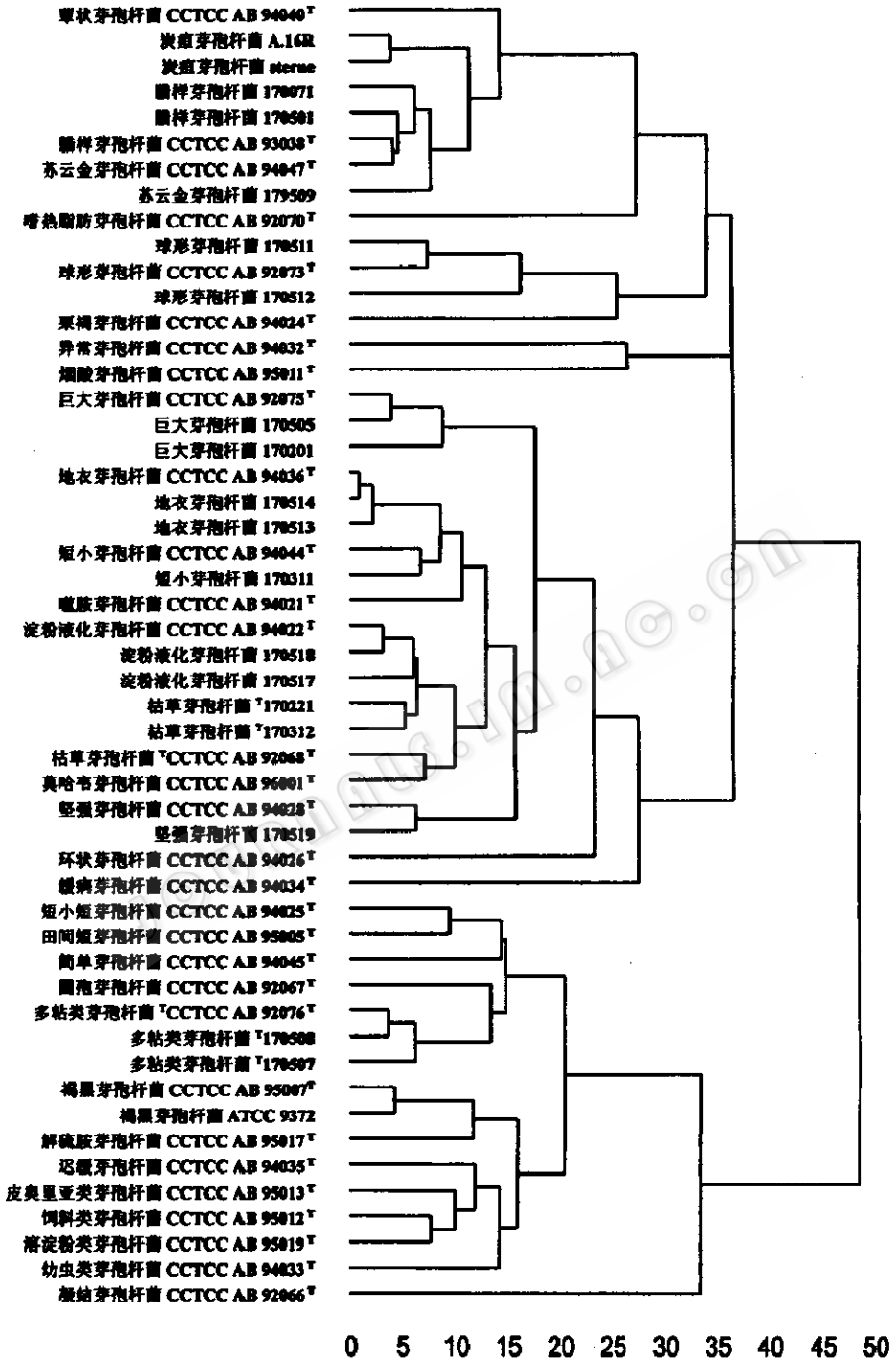


图 1 51 株实验菌株基于繁殖体脂肪酸成分的树状聚类图
 聚类方法为欧氏距离,非加权配对平均法,图示横坐标为欧氏距离

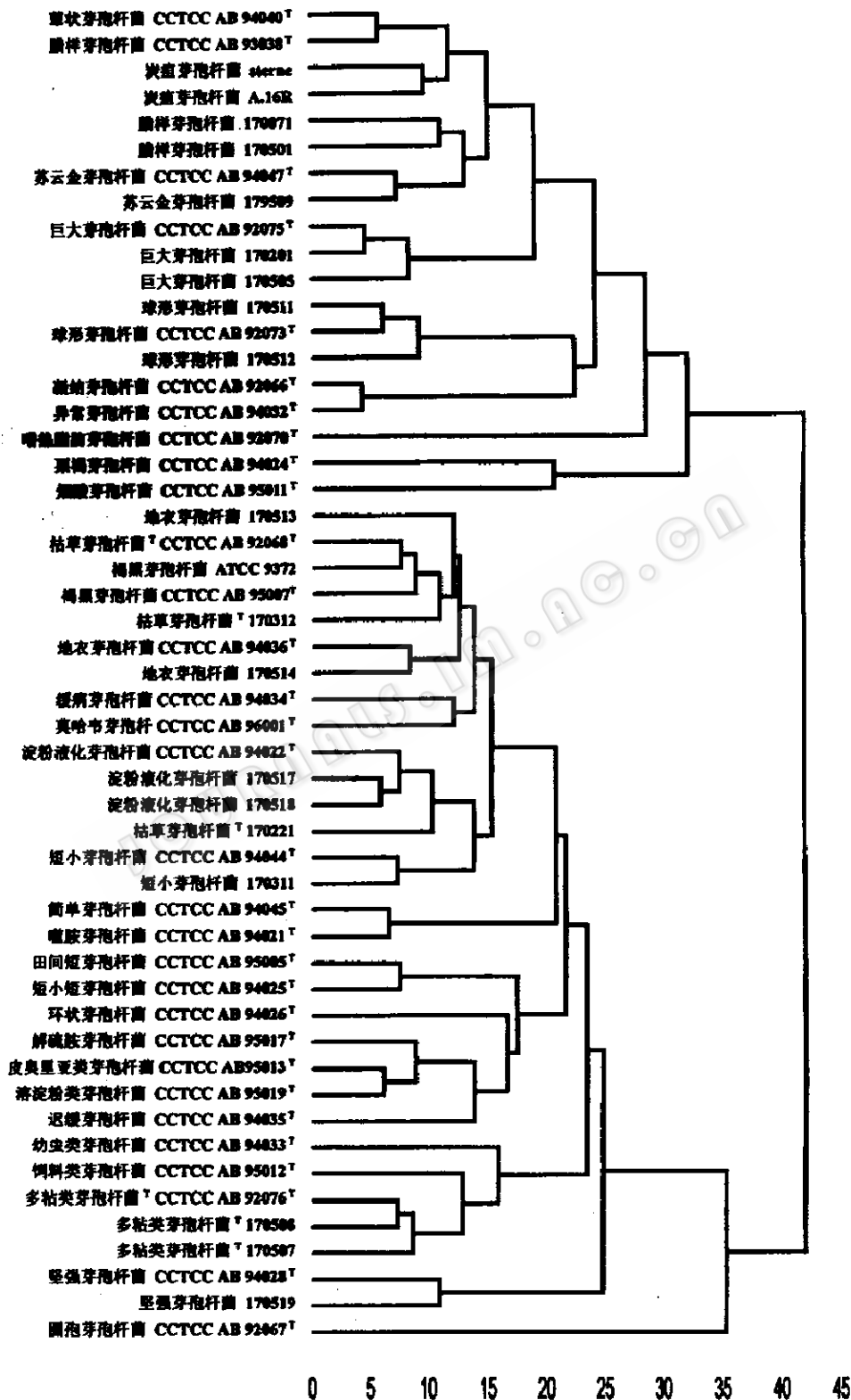


图 2 51 株实验菌株基于芽孢脂肪酸成分的树状聚类图

聚类方法为欧氏距离,非加权配对平均法.图示横坐标为欧氏距离

2.4 芽孢脂肪酸成分在分类学上的意义初探

如图1所见,51株受试需氧芽孢杆菌根据其繁殖体的脂肪酸成分可以大致为3群:第1群以蜡样芽孢杆菌为代表,包括炭疽芽孢杆菌与其分类地位十分相近的种;第2群以芽孢杆菌属的模式种枯草芽孢杆菌为代表,还有一些与其相近的种;第3群主要包括类芽孢杆菌属的细菌。

图2为各实验菌株基于芽孢脂肪酸成分的树状聚类图,它虽然不象图1将各菌株分为明显的3群,但仍保持了前者那样的规律性,而某些菌株的聚类情况发生了一些变化。褐黑芽孢杆菌的两个菌株在图1中被聚到第3群中,与类芽孢杆菌属相类似,而在图2中它与枯草芽孢杆菌的模式株 CCTCC AB 92073^T 距离很近。褐黑芽孢杆菌是由枯草芽孢杆菌黑色变种升格而来,其表型特征与枯草芽孢杆菌非常接近^[7]。对于褐黑芽孢杆菌而言,芽孢脂肪酸的聚类结果更符合其目前的分类地位。

莫哈韦芽孢杆菌是1994年确立的新种,其性状描述与枯草芽孢杆菌几乎完全一致^[8]。在图1中,它与枯草芽孢杆菌的模式株 CCTCC AB 92073^T 距离很近,聚在一起;而图2显示,它虽仍处于枯草芽孢杆菌这一大群中,但与枯草芽孢杆菌距离已经较远。图2的聚类结果可以印证确立这一新种的合理性。

在两张树状聚类图中,解硫酸芽孢杆菌 CCTCC AB 95017^T 都被归于类芽孢杆菌属这一群中。最近 Shida 等人根据 16S rRNA 测序结果,建议将其转至类芽孢杆菌属^[9],本实验的结果可为这一建议做有益的补充。

第2张树状聚类图与图1相比,聚类情况变化较大的还有圆孢芽孢杆菌 CCTCC AB 92067^T, 嗜麦芽孢杆菌 CCTCC AB 94021^T, 异常芽孢杆菌 CCTCC AB 94032^T 等菌株。

此外,在图2中我们看到,某些菌种的不同菌株不能准确地聚在一起。可见芽孢脂肪酸成分分析在应用于一些亲缘关系十分接近的细菌时,可能会给出不完全准确的聚类结果。

以上简要探讨了芽孢脂肪酸成分分析在需氧芽孢杆菌分类中的意义,需氧芽孢杆菌作为一个高度异质性的菌群,还有许多系统分类学方面的问题亟待解决。本实验建立了芽孢培养,纯化,到脂肪酸分析的一整套的方法,可望为相关领域研究提供新的辅助工具和资料。

参 考 文 献

- [1] International Committee on Systematic Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*. 1993, **43**:185.
- [2] Able K, De Schmertaing H, Peterson J I. *J Bacteriol*, 1963, **85**:1039~1044.
- [3] 周方,朱厚础,唐光江等. *微生物学通报*, 1989, **16**:343~349.
- [4] 周方,王菊英,王绍山等. *科学通报*, 1984, **22**:1394~1397.
- [5] MIDI Inc. *Operating Manual of Sherlock Microbial Identification System. Version 6*. 1997, 37~58.
- [6] Mukwaya G M, Welch D F. *J Clin Microbiol*, 1989, **27**:2640~2646.
- [7] Nakamura D L. *Int J Syst Bacteriol*. 1989, **39**:295~300.
- [8] Roberts M S, Nakamura K L, Cohan F M. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**:256~264.
- [9] Shida O, Takagi H, Kadowadi K, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **46**:939~946.