

# 基于 GC/MS 对 1 株芽孢杆菌 FJAT-13831 的鉴定

刘国红<sup>1,2</sup>, 刘波<sup>1\*</sup>, 林乃铨<sup>2</sup>, 陈峥<sup>1</sup>

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003; 2. 福建农林大学, 福州 350002)

**摘要:** **目的** 通过芽孢杆菌物质组学分析, 快速地区分亲缘关系极近的芽孢杆菌种类。 **方法** 本文利用 GC/MS 检测了芽孢杆菌 9 个模式菌株和 1 个分离菌株 FJAT-13831 的胞外物质成分, 并进行主成分和聚类分析。 **结果** 不同的芽孢杆菌种间胞外物质具有显著性差异, FJAT-13831 的胞外物质成分与其相近种类差异很大, 应是芽孢杆菌属的一个新种。 **结论** 该方法可从代谢水平上对芽孢杆菌亲缘关系相似的不同种进行区分, 为芽孢杆菌的鉴定及新种判断提供一种新的技术手段。

**关键词:** 分类鉴定; 代谢组学; 芽孢杆菌; 胞外物质

## Identification of *Bacillus* species FJAT-13831 based on the gas chromatography/mass spectrometer

LIU Guo-Hong<sup>1,2</sup>, LIU Bo<sup>1\*</sup>, LIN Nai-Quan<sup>2</sup>, CHEN Zheng<sup>1</sup>

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

2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**ABSTRACT: Objective** To rapidly identify the *Bacillus* species with close relatives, *Bacillus* metabolomics was studied in this paper. **Method** Based on Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC/MS) detection, principal component and cluster analysis were performed on extracellular substance of 10 *Bacillus* species. **Results** It was shown that the isolate FJAT-13831 might be a new species of the genus *Bacillus*, and different *Bacillus* species had a significant differences. **Conclusion** The method used in the paper may be identified *Bacillus* species with close relatives at the metabolic level, and provided a new technical means for the *Bacillus* classification and identification.

**KEY WORDS:** classification and identification; metabolomics; *Bacillus*; extracellular substance

## 1 引言

芽孢杆菌是一类革兰氏阳性、产芽孢、细胞杆状的好氧或兼性厌氧细菌, 种类繁多, 功能多样。由于某些芽孢杆菌种间相似性很高, 常用的分类方法很难将其极准确地区分开来, 这就需要一种新的方法来对这些亲缘关系极相近的种类进行分类鉴定, 确

定其分类地位。大多数芽孢杆菌种类都具有特殊功能, 在工业、农业、医药、食品甚至军事等诸多方面具有广泛的应用价值, 其分类学研究具有极其重要的意义。

代谢组学(metabolomics)是 20 世纪 90 年代后期产生的新兴学科, 是一门对某一生物或细胞所有低相对分子质量代谢产物进行定性和定量分析的学

基金项目: 国家自然科学基金(31370059); 国家 948 项目(2011-G25)

**Fund:** Supported by Natural Science Foundation of China (NSFC) (31370059) and 948 Project of Chinese Ministry of Agriculture (2011-G25).

\*通讯作者: 刘波, 研究员, 从事微生物生物技术与农业生物药物研究。E-mail: fzliubo@163.com.

\*Corresponding author: LIU Bo, Professor, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian 350003, China. E-mail: fzliubo@163.com

科<sup>[1]</sup>, 主要包括代谢谱差异分析、潜在生物标记物鉴定及代谢通路分析。与传统依赖单一标志物的细菌鉴别方法相比, 代谢组学揭示的是系列关联生物标记物的综合差异, 因此具有更高的准确性<sup>[2]</sup>。代谢组学研究通常的对象并非某些特定的物质, 而是要尽可能多地获取所有代谢产物的信息。而分析对象的大小、数量、官能团、挥发性、带电性、电迁移率等物理化学参数的差异对分析结果影响极大<sup>[3]</sup>。目前, 主要检测手段包括: 核磁共振技术(NMR)、液相色谱质谱联用技术(LC/MS)、毛细管电泳质谱联用技术(CE/MS)以及气相色谱质谱联用技术(GC/MS)。其中与 CE/MS、LC/MS、LC/NMR 等相比, GC/MS 仪器中经气相色谱柱分离后的样品呈气态, 流动相也是气体, 与质谱的进样要求相匹配, 最容易将这两种仪器联用; 它具有灵敏度高、分离效率高、易用、耐用、成本低、可选择性地分离和检测大量痕量代谢物质和同质异构体等优点<sup>[4]</sup>。由于其高标准化地应用了电子电离, 能产生广泛的和高重复性的破裂片段, 即使得到的质谱数据在数据库中不存在, 其破碎模式亦可用于获得更多关于代谢产物定性或化合物种类的信息<sup>[5]</sup>。GC/MS 已成为代谢组学中广泛应用的重要分析方法, 目前发展也较为成熟, 是复杂混合物分析的主要定性和定量手段之一。关于 GC/MS 检测芽孢杆菌胞外物质成分的进行新种判断的文献在国内还尚未见报道。

本实验室从土壤中分离到一株芽孢杆菌 FJAT-13831, 根据 16S rRNA 序列相似性分析发现, 与蜡状芽孢杆菌类群相似皆达 99%以上, 但其表型特征差异很大<sup>[6]</sup>。故本研究利用 GC/MS 对 FJAT-13831 及其 16S rRNA 系统发育分析得出的亲缘关系较近芽孢杆菌种类的标准菌株<sup>[7]</sup>胞外物质成分进行检测, 通过分析不同芽孢杆菌种间的胞外物质成分差异, 对未知菌株进行分类鉴定, 建立芽孢杆菌的代谢组学分类方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 供试菌株

*Bacillus marisflavi* DSM 16204<sup>T</sup>, *Bacillus kribbensis* DSM 17871<sup>T</sup>, *Bacillus aurantiacus* DSM 18675<sup>T</sup>, *Bacillus aquimaris* DSM 16205<sup>T</sup>, *Bacillus ginsengihumi* DSM 18134<sup>T</sup>, *Bacillus mycoides* DSM 2408<sup>T</sup>, *Bacillus pseudomycoides* DSM 12442<sup>T</sup>, *Bacillus cereus*

DSM 31<sup>T</sup>, *Bacillus boroniphilus* DSM 17376<sup>T</sup>, 以上 9 种芽孢杆菌为标准菌株, 引自于德国微生物菌种保藏中心 DSMZ。菌株 FJAT-13831 为本实验室(福建省农业科学院农业生物资源研究所)土壤分离菌株。

### 2.2 芽孢杆菌分泌性可溶胞外物质的提取方法

10 种芽孢杆菌接种于 TSB(BD, 美国)液体培养基基于 30 °C、170 r/min 摇床培养 24 h 后, 用细菌过滤器(滤膜直径 0.2 μm)除去菌体后进行检测。

### 2.3 芽孢杆菌分泌性可溶胞外物质的 GC/MS 检测

用 GC (Agilent Technologies, 6890N Network GC System)/MS (Agilent Technologies, 5973 Network, Mass selective Detector) 对胞外物质进行定性分析。气相色谱柱: ab-5-MS 石英毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm, J&W Scientific, Agilent Technologies, USA)。GC 程序升温条件: 初始温度 50 °C, 以 20 °C/min 的速率升至 180 °C, 保持 4 min, 然后以 10 °C/min 升到 220 °C, 保持 15 min。载气: 氦气, 流速: 0.8 mL/min。GC 进样口温度: 280 °C, 电子恒流控制, 无分流进样, 进样体积: 1 μL。MS: 离子轰击源 (70 eV), 接口温度: 250 °C, 离子源温度: 200 °C, Emission Current: 150 μA, Det: 500v。全扫描, 扫描速度 0.4 s/次, 扫描范围: m/z 29-450。GC/MS 全扫描分析, 采用 Xcalibur1.2 版本软件、NIST98 谱图库兼顾色谱保留时间定性。

### 2.4 数据分析

利用生物统计软件 SPSS16.0, 采用邻接法和切比雪夫距离以芽孢杆菌种类为样本、胞外物质成分为变量进行统计分析。

切比雪夫距离(Chebychev): 两个样本之间的 Chebychev 距离是各样本所有变量值之差绝对值中的最大值。若二个向量或二个点  $p$ 、and  $q$ , 其座标分别为  $p_i$  及  $q_i$ , 则两者之间的切比雪夫距离定义如下:

$$D_{\text{Chebychev}}(p, q) := \max(|p_i - q_i|).$$

$p$  和  $q$  分别代表两种不同芽孢杆菌种类,  $p_i$  及  $q_i$  分别为相应种类胞外物质成分相对含量。

## 3 结果与分析

### 3.1 基于 GC/MS 芽孢杆菌分泌性可溶胞外物质检测数据提取分析

通过计算机自动在质谱数据库中查找, 对混合

物中的组分进行了鉴定和峰面积归一化法计算各组分相对百分含量, 分离出鉴定出 36 种化合物(匹配率 70%以上), 具体见表 1。其中 Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,

4-dione,hexahydro-和 Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-是 10 种芽孢杆菌共同的胞外物质种类, 在总物质中占的相对含量比例较大。

表 1 芽孢杆菌的胞外物质 GC/MS 相对含量分析结果  
Table 1 The relative content of of *Bacillus* extracellular substance based on GC/MS

| 胞外物质  | <i>Bacillus mycooides</i> | FJAT-13831 | <i>Bacillus pseudo-mycoides</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus murlisflavi</i> | <i>Bacillus kiribensis</i> | <i>Bacillus aurantiacus</i> | <i>Bacillus aquimaris</i> | <i>Bacillus humi</i> | <i>Bacillus ginsengii</i> | <i>Bacillus boroni</i> | <i>Bacillus phily</i> |
|---|---------------------------|------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| 1,3-Cyclopentadiene,1,2,3,4-tetramethyl-5-methylene-(1,2,3,4 - 四甲基-5-甲基 1,3 - 环戊二烯) | 1.38                      | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| Butylated Hydroxytoluene(二丁基羟基甲苯)   | 0.49                      | 1.13       | 0                               | 0                      | 0.13                        | 0.27                       | 0.24                        | 0.28                      | 0.28                 | 0                         | 0                      | 0                     |
| Oxime-, methoxy-phenyl-   | 5.62                      | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-   | 44.48                     | 52.99      | 10.07                           | 7.18                   | 5.20                        | 6.74                       | 4.45                        | 4.02                      | 7.82                 | 6.15                      | 0                      | 0                     |
| Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-                     | 2.10                      | 0          | 3.39                            | 1.29                   | 8.83                        | 9.17                       | 6.66                        | 5.77                      | 7.50                 | 0                         | 0                      | 0                     |
| Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-                       | 0.66                      | 0.64       | 2.31                            | 1.38                   | 4.18                        | 5.12                       | 4.02                        | 2.79                      | 3.96                 | 2.12                      | 0                      | 0                     |
| 1-Naphthalenemethanamine(1-萘甲胺)   | 0                         | 0          | 0.60                            | 0                      | 0.39                        | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| Propanenitrile, 3-(1-azepanyl)-3-oxo-   | 0                         | 0          | 0.26                            | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| 3-Aminopiperidin-2-one(3 -氨基哌啶- 2-酮)  | 0                         | 0          | 4.16                            | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| 2,5-Piperazinedione, 3-methyl-  | 0                         | 4.85       | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl-   | 0                         | 0.50       | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0.59                        | 0                         | 0.62                 | 0                         | 0                      | 0                     |
| 3-Isoxazolamine, 5-methyl-  | 0                         | 0.63       | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| Pyrrole-2-carboxamide   | 0                         | 1.16       | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| Phenol 苯酚   | 0.70                      | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0.63                        | 0.83                      | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| Butanoic acid, 2-methyl-(2-甲基丁酸乙酯)  | 0                         | 0          | 0                               | 4.75                   | 0                           | 3.52                       | 0                           | 0                         | 0                    | 6.23                      | 0                      | 0                     |
| Pantolactone(泛内酯)   | 0                         | 0          | 0                               | 0.22                   | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 2.50                      | 0                      | 0                     |
| Benzeneethanamine(苯乙胺)  | 0                         | 0          | 0                               | 0.40                   | 3.32                        | 3.19                       | 2.51                        | 1.67                      | 2.59                 | 0                         | 0                      | 0                     |
| Pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl-   | 0                         | 0          | 0                               | 0.75                   | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| 1,2,3,4-Tetrahydro-cyclopenta[b]indole  | 0                         | 0          | 0                               | 0.34                   | 0                           | 0.33                       | 0.39                        | 0.32                      | 1.16                 | 0.38                      | 0                      | 0                     |
| 2(3H)-Furanone, dihydro-3-hydroxy-4,4-dimethyl-, (+/-)-                             | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0.45                      | 0                      | 0                     |
| Ornithine(鸟氨酸)  | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 1.48                      | 0                      | 0                     |
| Phenol, 2,6-dimethoxy-(2,6-二甲氧基酚)   | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0.25                 | 0.23                      | 0                      | 0                     |
| 6-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline  | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0.29                        | 0                          | 0                           | 0                         | 0.48                 | 0.11                      | 0                      | 0                     |
| Butanoic acid, 3-methyl-(3-甲基丁酸环己基酯)  | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 4.83                 | 0                         | 0                      | 0                     |
| Hexanoic acid, 2-methyl-(2-甲基己酸)  | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 3.27                 | 0                         | 0                      | 0                     |
| Pyrazine, 3,5-dimethyl-2-propyl-  | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0                         | 0.46                 | 0                         | 0                      | 0                     |
| Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl-(1, 2, 4, 5-四甲苯)                                       | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0.45                        | 0.51                       | 0                           | 0.59                      | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| 6H-Purin-6-one, 2-amino-1,7-dihydro-  | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0.30                      | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| 1,2,3,4-Tetrahydro-cyclopenta[b]indole  | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0                          | 0                           | 0.31                      | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| 9H-Pyrido[3,4-b]indole, 1-methyl-   | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0.26                        | 0.27                       | 0.17                        | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| Quinoline, 5,6,7,8-tetrahydro-3-methyl-   | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0                           | 0.65                       | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-(4-甲基-4-羟基-2-戊酮)                                    | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0.36                        | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| 4-Vinyl-imidazole   | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 2.09                        | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| dl-Ornithine(DL-鸟氨酸)  | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 3.38                        | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| l-Alpha-amino-epsilon-caprolactam   | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 1.99                        | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |
| Pyridine, 3-phenyl-   | 0                         | 0          | 0                               | 0                      | 0.92                        | 0                          | 0                           | 0                         | 0                    | 0                         | 0                      | 0                     |

注: “相对含量”是指各组分在 GC/MS 分析中出峰面积占总峰面积的比例%。

### 3.2 基于 GC/MS 芽孢杆菌胞外物质主成分分析

利用 SPSS16.0 统计软件对 10 种芽孢杆菌的胞外物质进行主成分分析, 由图 1 和表 2 可知, 前 8 种物质是芽孢杆菌聚类分析的主要因子, 其分别为 1,3-Cyclopentadiene, 1,2,3,4-tetramethyl-5-methylene-, Butylated Hydroxytoluene、Oxime-, methoxy-phenyl-, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-, Pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-, 1-Naphthalenemethanamine 和 3-(1-azepanyl)-3-oxo- Propanenitrile。

### 3.3 基于 GC/MS 芽孢杆菌聚类分析

利用 SPSS 16.0 生物统计软件, 以芽孢杆菌种类为样本、胞外物质成分含量为数据计算 10 种芽孢杆菌种间物质成分的切比雪夫距离 (Chebyshev distance)<sup>[8]</sup>, 具体见表 3。切比雪夫距离值越小说明两种菌间的亲缘关系越近。从切比雪夫距离来看, 菌株 FJAT-13831 和 *B. mycooides* 之间的切比雪夫距离值为 8.51, 说明这两种菌间的亲缘关系最近, 与其他芽孢杆菌种类的距离均在 40-50 之间, 亲缘关系较远。由表 3 还可以得出两种芽孢杆菌间的切比雪夫距离最小值为 1.24, 说明分离菌株 FJAT-13831<sup>T</sup> 可能是一个新的物种。

采用 Between-groups linkage 方法将 10 种芽孢杆菌的胞外物质成分进行聚类分析, 切比雪夫距离值约为 5 时, 可以分为两大类群: 类群 I 由 8 种芽孢杆菌组成, 类群 II 包含 FJAT-13831 和蕈状芽孢杆菌 *B. mycooides*。由图 2 可以看出 10 种芽孢杆菌中两种菌最短的中间距离为: 1.24 (*B. aurantiacus* 与 *B. aquimaris*), 最长的种间距离为 48.97 (*B. aquimaris* 与 FJAT-13831)。由此可以说明, 菌株 FJAT-13831 足以代表一个种分类单位, 与其他种类区别开来。

### 3.4 芽孢杆菌种类标志物的分析

由以上分析可知, FJAT-13831 和蕈状芽孢杆菌 *B. mycooides* 亲缘关系最近, 两种菌通过 GC/MS 共检测出 11 个匹配率 70% 以上的物质, 其中共有的物质成分仅有 3 个, 分别为: Butylated Hydroxytoluene, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-和 Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-。

FJAT-13831 特有的物质为 3-methyl-2,5-Piperazinedione, 1,2,3,4-tetramethyl-Benzene、5-methyl-3-Isoxazolamine 和 Pyrrole-2-carboxamide。蕈状芽孢杆菌特有的物质为 1,2,3,4-tetramethyl-5-methylene-1,3-Cyclopentadiene, Oxime-, methoxy-phenyl-, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-和 Phenol。

## 4 讨论

微生物的代谢物是基因表达的最终产物, 基因和蛋白表达的微小变化可以在代谢物上得到放大。因此对微生物细胞提取物进行分析可以更准确地区分不同物种间的差异。史怀等<sup>[9]</sup>利用 LC/Q-TOF-MS 对不同种的芽孢杆菌胞内物质进行分析, 结果表明不同芽孢杆菌种间的物质成分具有显著差异。本研究通过 GC/MS 测定了 10 种芽孢杆菌的胞外物质成分, 从检测结果可以得出, 芽孢杆菌胞外物质种类多, 包含多种有机物, 不同种类含有的胞外物质成分差异很大。根据胞外物质成分分析结果表明分离菌株 FJAT-13831 应该是芽孢杆菌属的一个新物种, 进一步的分类鉴定研究得出 FJAT-13831 为芽孢杆菌属的一个新种即兵马俑芽孢杆菌<sup>[7]</sup>, 从而验证了本研究的可行性和准确性。

代谢物是生理调控过程的终产物, 是基因型与环境共同作用的综合结果, 在生物体的传统表型分类和基因型分类发生矛盾时, 通过分析样品的代谢物, 可获得更多信息。芽孢杆菌的代谢物研究已有多篇报道, 但其研究对象局限于某一特定组成, 如挥发性物质<sup>[10,11]</sup>、脂肪酸<sup>[12]</sup>、发酵液中的代谢物<sup>[13]</sup>等。基于 GC/MS 的芽孢杆菌代谢组学分析用于芽孢杆菌新种判断文献尚未见报道。不同物种具有自身特殊的物质成分, 分别各占有一定比例, 作为该物种的生物标识物。本文分离菌株 FJAT-13831 与其最相似性菌株相比含有的特有物质为 3-methyl-2,5- Piperazinedione、5-methyl-3-Isoxazolamine 和 Pyrrole-2-carboxamide, 3-methyl -2,5-Piperazinedione。目前, 已有很多文献报道了芽孢杆菌和某些原菌的自身物质标记, 如 Foxa 等<sup>[14]</sup>利用 GC/MS 和 LC/MS 分析发现 6 种碳水化合物(3 种 GC/MS 和 3 种 LC/MS)成分可以成为枯草芽孢杆菌类群鉴定的一种有效工具手段。Li 等<sup>[15]</sup>研究发现利用 GC/MS 检测化学物质 3-methyl-2-butenic acid methyl ester, 可以快速鉴定炭疽芽孢杆菌并能将其与蜡状芽孢杆菌类群其他菌种区分开来。Marcinowska 等<sup>[16]</sup>

表 2 芽孢杆菌胞外物质方差分解主成分分析  
Table 2 Total Variance Explained of *Bacillus* extracellular substances

| 主成分 | 特征值       |             |              | 被提取的载荷平方和 |             |              | 转轴平方和负荷量 |             |              |
|-----|-----------|-------------|--------------|-----------|-------------|--------------|----------|-------------|--------------|
|     | 总和        | 方差百分比/<br>% | 累积值百分比/<br>% | 总和        | 方差百分比/<br>% | 累积值百分比/<br>% | 总和       | 方差百分比/<br>% | 累积值百分比/<br>% |
| 1   | 8.48      | 23.54       | 23.54        | 8.48      | 23.54       | 23.54        | 6.38     | 17.72       | 17.72        |
| 2   | 6.49      | 18.04       | 41.58        | 6.49      | 18.04       | 41.58        | 5.98     | 16.60       | 34.32        |
| 3   | 5.33      | 14.81       | 56.39        | 5.33      | 14.81       | 56.39        | 5.24     | 14.54       | 48.86        |
| 4   | 4.35      | 12.07       | 68.46        | 4.35      | 12.07       | 68.46        | 4.25     | 11.80       | 60.67        |
| 5   | 3.467     | 9.63        | 78.09        | 3.47      | 9.63        | 78.09        | 3.93     | 10.91       | 71.58        |
| 6   | 2.91      | 8.08        | 86.16        | 2.90      | 8.08        | 86.16        | 3.13     | 8.70        | 80.29        |
| 7   | 2.36      | 6.56        | 92.73        | 2.36      | 6.56        | 92.73        | 3.10     | 8.61        | 88.89        |
| 8   | 1.66      | 4.61        | 97.34        | 1.66      | 4.61        | 97.34        | 3.04     | 8.44        | 97.34        |
| 9   | .958      | 2.66        | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 10  | 1.35E-15  | 3.75E-15    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 11  | 6.13E-16  | 1.70E-15    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 12  | 4.53E-16  | 1.26E-15    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 13  | 4.18E-16  | 1.16E-15    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 14  | 3.71E-16  | 1.03E-15    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 15  | 3.20E-16  | 8.89E-16    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 16  | 2.38E-16  | 6.60E-16    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 17  | 2.06E-16  | 5.73E-16    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 18  | 1.36E-16  | 3.78E-16    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 19  | 1.19E-16  | 3.32E-16    | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 20  | -1.33E-17 | -3.68E-17   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 21  | -2.49E-17 | -6.90E-17   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 22  | -5.37E-17 | -1.49E-16   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 23  | -8.79E-17 | -2.44E-16   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 24  | -1.04E-16 | -2.88E-16   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 25  | -1.28E-16 | -3.55E-16   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 26  | -1.96E-16 | -5.45E-16   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 27  | -2.47E-16 | -6.85E-16   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 28  | -2.96E-16 | -8.22E-16   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 29  | -3.32E-16 | -9.21E-16   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 30  | -4.09E-16 | -1.14E-15   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 31  | -5.04E-16 | -1.40E-15   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 32  | -5.79E-16 | -1.61E-15   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 33  | -6.78E-16 | -1.88E-15   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 34  | -7.38E-16 | -2.05E-15   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 35  | -1.03E-15 | -2.87E-15   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |
| 36  | -2.04E-15 | -5.68E-15   | 100.00       |           |             |              |          |             |              |

提取方法: 主成分分析。

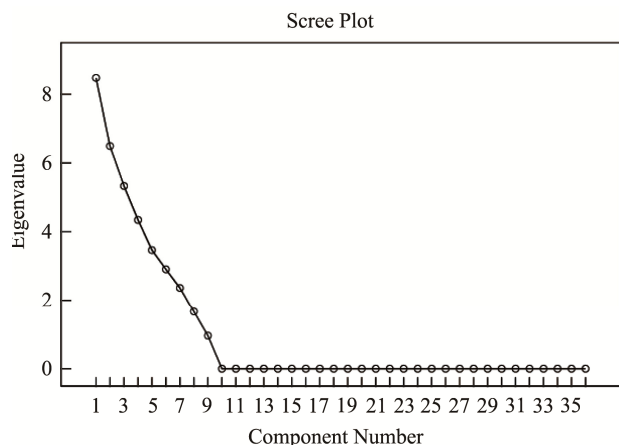


图 1 芽孢杆菌胞外物质的因素陡坡图

Fig. 1 Extracellular substance scree plot of *Bacillus* species

研究证明代谢产物可以作为多种微生物鉴定的一种快速方法, 生物医学材料需要稳定地保持活性, 在保存过程中可能会被病原菌感染以致实效或者对人类有生命危险, Wunschel 等<sup>[17]</sup>发现用 GC/MS 检测小分子的碳水化合物可以确定生物材料的稳定活性。 Bourne 等<sup>[18]</sup>采用代谢组学分析手段对链球菌与葡萄球菌属的 312 个菌株进行鉴定, 与其他鉴定手段的吻合率达到 92%。李森等<sup>[19]</sup>利用代谢组学对常见致龋菌鉴定进行了初步研究, 结果表明代谢组学技术有望应用于口腔细菌的快速鉴定。

GC-MS 对多种化合物具有较强、较灵敏的分析能力, 故对于鉴定比较微生物不同菌株之间的代谢物差异具有特殊的意义。结合统计学方法, 将分析中

表 3 10 种芽孢杆菌的切比雪夫距离值  
Table 3 Chebyshev distance of 10 *Bacillus* species

| Case                            | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8    | 9    | 10  |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|-----|
| <i>Bacillus marisflavi</i>      | .00   |       |       |       |       |       |       |      |      |     |
| <i>Bacillus kribbensis</i>      | 3.52  | .00   |       |       |       |       |       |      |      |     |
| <i>Bacillus aurantiacus</i>     | 3.38  | 3.52  | .00   |       |       |       |       |      |      |     |
| <i>Bacillus aquimaris</i>       | 3.38  | 3.52  | 1.24  | .00   |       |       |       |      |      |     |
| <i>Bacillus ginsengihumi</i>    | 4.84  | 4.84  | 4.84  | 4.84  | .00   |       |       |      |      |     |
| <i>Bacillus mycooides</i>       | 39.28 | 37.74 | 40.03 | 40.46 | 36.66 | .00   |       |      |      |     |
| FJAT-13831                      | 47.79 | 46.25 | 48.54 | 48.97 | 45.17 | 8.51  | .00   |      |      |     |
| <i>Bacillus pseudomycooides</i> | 5.44  | 5.79  | 5.62  | 6.05  | 4.84  | 34.41 | 42.92 | .00  |      |     |
| <i>Bacillus cereus</i>          | 7.53  | 7.88  | 5.37  | 4.75  | 6.21  | 37.30 | 45.81 | 4.75 | .00  |     |
| <i>Bacillus boroniphilus</i>    | 8.83  | 9.17  | 6.66  | 6.24  | 7.50  | 38.33 | 46.84 | 6.24 | 2.29 | .00 |

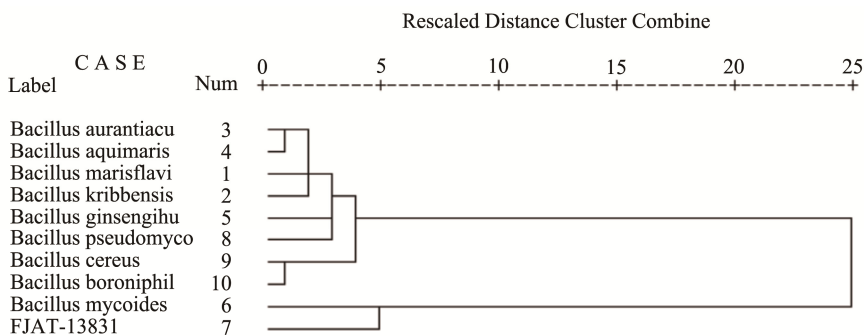


图 2 芽孢杆菌胞外物质的聚类分析

Fig. 2 Hierarchical clustering of *Bacillus* classification based on extracellular substances

存在极大差异的代谢物, 作为此微生物的生物标记物, 为其更深入的研究提供必要的基础。综上所述, 通过 GC/MS 检测物质成分可以成为一种快速检测微生物的方法。关于培养基成为对实验结果的干扰和影响需要进一步实验验证, 本研究希望可为芽孢杆菌分类及新种判断研究提供一定的理论基础。

#### 参考文献

- [1] Van der Werf MJ, Overkamp KM, Muilwijk B, *et al.* Microbial metabolomics: Toward a platform with full metabolome coverage[J]. *Anal Biochem*, 2007, 370(1): 17–25.
- [2] Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2007, 26(1): 51–78.
- [3] 许国旺. 代谢组学—方法与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 10–11.  
Xu GW. Metabonomics—method and application[M]. Beijing: Science Press, 2008: 10–11.
- [4] 李娟, 任路静, 孙冠男, 等. 气相色谱-质谱联用技术及其在代谢组学中的应用[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(4): 434–446.  
Li J, Ren LJ, Sun GN, *et al.* Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and its application in metabolomics[J]. *Chin J Biotech*, 2013, 29(4): 434–446.
- [5] 朱来宽. 微生物代谢组学及其应用的研究进展[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2010, 20(1): 51–54.  
Zhu LK. Recent development of microbial metabolomics and its applications[J]. *Chin J Conservative Dent*, 2010, 20(1): 51–54.
- [6] 刘波, 刘国红, 林乃铨, 等. 秦始皇兵马俑 1 号坑芽孢杆菌的采集与鉴定[J]. *福建农业学报*, 2012, 27(6): 563–573.  
Liu B, Liu GH, Lin NQ, *et al.* Bacillus identification and phylogenetic analysis, isolated from the 1st pit soil of Emperor Qin's Terracotta Warrior [J]. *Fujian J Agri Sci*, 2012, 27(6): 563–573.
- [7] Liu B, Liu GH, Hu GP, *et al.* *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terracotta Warriors in China[J]. *Anton Leeuw J Microbiol*, 2014, 105: 501–510.
- [8] 卢纹岱. SPSS 统计分析 (第 4 版) [M]. 北京: 电子工业出版社, 2010.  
Lu WD. SPSS Statistical Analysis (4th Edition) [M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2010.
- [9] 史怀, 刘波, 陈峥, 等. 基于 LC/Q-TOF-MS 的芽孢杆菌代谢组学分析方法[J]. *福建农业学报*, 2012, 27(10): 1112–1119.  
Shi H, Liu B, Chen Z, *et al.* Metabonomics analysis of *Bacillus* based on LC/Q-TOF MS[J]. *Fujian J Agri Sci*, 2012, 27(10): 1112–1119.
- [10] 陈峥, 刘波, 车建美, 等. 龙眼微生物保鲜剂挥发性物质分析[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(20): 115–118.  
Chen Z, Liu B, Che JM, *et al.* Analysis on volatile components extracted from microbial fresh-keeping agent for fruit longan[J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2011, 27(20): 115–118.
- [11] 郭成栓, 欧阳蒲月, 谢和. 枯草芽孢杆菌 E20 发酵产生挥发性风味成分的 GC/MS 分析[J]. *中国酿造*, 2010, 9: 153–155.  
Guo CS, Ou Yang PY, Xie H. Analysis of volatile compounds produced by *Bacillus subtilis* E20 with GC/MS technique[J]. *China Brewing*, 2010, 9: 153–155.
- [12] 邝玉斌, 方呈祥, 张珞珍, 等. 芽孢杆菌模式菌株细胞脂肪酸组分的气相色谱分析[J]. *分析科学学报*, 2000, 16(4): 270–273.  
Kuang YB, Fang CX, Zhang LZ, *et al.* Analysis of cellular fatty acids for ten type strains of *Bacillus* by gas chromatography[J]. *J Anal Sci*, 2000, 16(4): 270–273.
- [13] 陈峥, 刘波, 车建美, 等. 龙眼微生物保鲜菌 FJAT-0809-GLX 发酵液丙酮萃取物的成分分析[J]. *福建农业学报*, 2012, 27(3): 294–298.  
Chen Z, Liu B, Che JM, *et al.* GC/MS Analysis on acetone extracts from microbial fresh-keeping agent for fruit longan[J]. *Fujian J Agri Sci*, 2012, 27(3): 294–298.
- [14] Foxa KF, Wunschela DS, Foxa A, *et al.* Complementarity of GC-MS and LC-MS analyses for determination of carbohydrate profiles of vegetative cells and spores of bacilli[J]. *J Microbiol Meth*, 1998, 33(1): 1–11.
- [15] Li D, Truong TV, Bills TM, *et al.* GC/MS method for positive detection of *Bacillus anthracis* endospores[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(3): 1637–44.
- [16] Marcinowska R, Trygga J, Hans WW, *et al.* Optimization of a sample preparation method for the metabolomic analysis of clinically relevant bacteria[J]. *J Microbiol Meth*, 2011, 87(1): 24–31.
- [17] Wunschel DS, Wahl KL, Melville AM, *et al.* Determination of post-culture processing with carbohydrates by MALDI-MS and TMS derivatization GC-MS[J]. *Talanta*, 2011, 85(5): 2352–2360.
- [18] Bourne R, Himmelreich U, Sharma A, *et al.* Identification of *Enterococcus*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus* by multivariate analysis of proton magnetic resonance spectroscopic data from plate cultures[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(8): 2916–2923.
- [19] 李森, 肖丽英, 李继遥, 等. 常见致龋菌代谢组学鉴定的初步研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2007, 2(4): 342–344.  
Li, M, Xiao LY, Li JY, *et al.* Initial study on discrimination of oral microorganisms with the metabonomics technique[J]. *West China J Stomatology*, 2007, 2(4): 342–344.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



刘国红, 博士, 主要研究方向为芽孢杆菌分类及脂肪酸系统发育研究。  
E-mail: liuguohong624@163.com



刘波, 研究员, 主要研究方向为微生物生物技术与农业生物药物。  
Email: fzliubo@163.com