



元素分析法鉴定细菌初报

盛世淑 金人慈

(军事医学科学院仪器中心室, 北京)

细菌分类鉴定的方法, 越来越趋向于与现代化的分析仪器相结合, 如细菌裂解气相色谱法 (PGC), 细菌 DNA 中 G + C mol% 测定法等, 已成为现代细菌分类鉴定的常用方法。

长期以来, 采用经典的元素分析法, 测定氮、碳、氢三元素含量, 十分烦琐^[1]。1963 年, Simon 等应用反应气相色谱原理^[2], 使元素分析走向仪器化。国外自 70 年代改进为全自动元素分析仪^[3], 国内于 1981 年底, 也试制成同类型产品 (北京分析仪器厂 SQ-201 型)。本文报道应用自动元素分析仪对细菌细胞化学成分进行元素分析, 了解各元素之间的比值与细菌类别的关系, 以探索细菌分类鉴定的新途径, 本法在国内外尚未见报道。

材料和方法

一、供试菌种

1. 假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 及鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*) 各 1 株, 土拉热弗朗西丝氏菌 (*Francisella tularensis*) 4 株, 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 2 株, 炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 4 株, 腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 1 株, 马鼻疽假单胞菌 (*Pseudomonas mallei*) 1 株, 类鼻疽假单胞菌 (*Pseudomonas pseudomallei*) 5 株, 共计 19 株样品。样品制备方法见文献^[4]。

2. 三种不同条件培养的志贺氏菌属的 A、B、C、D 四群痢疾杆菌: 痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) 3 株, 弗氏菌 (*Sh. flexneri*) 8 株, 宋内氏菌 (*Sh. sonnei*) 2 株, 鲍氏菌 (*Sh. boydii*) 2 株, 共计 15 株, 每株样品用三种不同条件培养:

A. 培养 21 小时, B. 培养 44 小时, 培养基均为武汉豚加肉膏; C. 培养 21 小时, 培养基为贺氏消化液。

培养后的细菌, 均用盐水洗三次, 用去离子水洗两次, 冷冻干燥后备用。

3. 重复测定试验: 以马鼻疽假单胞菌及类鼻疽菌为例, 分批测定, 观察其结果。

1. 马鼻疽假单胞菌: 菌号 350018 及 C-67-1。

2. 类鼻疽假单胞菌: 菌号为 350101、350102、350106、350112、350120、350132、350140、350145 等 10 株。

二、使用仪器设备

1. Sartorius 4431 型分析天平。
2. Carlo Erba 1106 型元素分析仪, 附自动进样器。
3. 2000C 型终端数据处理机。
4. Omni Scribe 记录器。

三、方法原理

样品在载气氮加 3% 的氧气流下, 经过高温分解, 及催化剂的氧化还原等反应, 使样品中的 C 转成 CO₂, H 转成 H₂O, N 转成 N₂, 在载气流中呈混合气体, 经色谱柱分离, 由热导池检测, 所得的 N₂, CO₂, H₂O 的色谱图, 由记录器绘出。

四、操作方法

用分析天平称量 500 μg 样品, 放入称量舟中, 将舟按顺序放入自动进样器中, 进行自动分析。一般每个样品做两次, 其结果误差不超过

本文承程知义教授审阅, 周方及林万明两同志提供样品, 周示波同志制图, 在此一并致谢。

0.3% 时,不再重复。

五、计算方法

1. 数据处理机打印出的结果为 N、C、H 的百分含量,求 C/N、C/H、N/H 值,乘以 10,观察 C/N 值之差异。

2. 图示法:为了直观清晰地表达马鼻疽假单胞菌与类鼻疽假单胞菌在元素比值上的差异,应用了表示多变量样本的雷达图方法^[5]。

结 果

一、碳氮含量及碳氮比

8 种菌经元素分析后,测得的碳氮含量及其比值,列于表 1。

表 1 8 种菌的碳氮含量及碳氮比值

菌 名	含 量 (%)		C/N×10
	N	C	
假结核耶尔森氏菌	13.96	44.82	32.11
鼠疫耶尔森氏菌	14.13	44.06	31.18
枯草杆菌			
1	11.99	43.97	36.67
2	10.44	42.19	40.41
炭疽杆菌			
1.无毒株	11.45	42.59	37.20
2.无毒株	10.96	43.64	39.82
3.无毒株	12.03	44.61	37.08
4.有毒株	10.49	46.10	43.95
腊状芽孢杆菌	10.95	46.76	42.70
马鼻疽假单胞菌	12.17	45.76	37.60
类鼻疽假单胞菌			
地区: A	9.08	45.87	50.52
B	8.90	46.02	51.71
C	8.15	46.16	56.64
D	7.64	47.16	61.73
E	6.87	45.65	66.45
土拉热弗朗西丝氏菌			
1.有毒株	7.91	42.32	53.50
2.有毒株	9.22	44.28	48.03
3.有毒株	9.78	45.34	46.36
4.无毒株	9.17	44.58	48.62

从表 1 中碳氮比值可以看出: 1. 用此法可作出鉴别的菌,如马鼻疽假单胞菌和类鼻疽假单胞菌(种间差异),两者的裂解气相色谱图上,特征峰的位置,有可定性的差别(内部交流);炭疽杆菌的有毒株和无毒株(株间差异),两者的

裂解气相色谱图上,亦有差别^[4]。

2. 用此法无鉴别作用的菌,如假结核杆菌和鼠疫杆菌,以及土拉热弗朗西丝氏菌的有毒株和无毒株,在裂解气相色谱图上,亦均无差别^[4]。

二、元素比值法与碱基含量百分值法的比较 (表 2)

表 2 8 种菌的碳氮比值与 G-C 比值对照

菌 名	C/N×10	G + C mol%*
假结核耶尔森氏菌	32.1	47.5
鼠疫耶尔森氏菌	31.2	46.8
枯草杆菌	36.7—40.4	44.6
炭疽杆菌		
无毒株	37.1—39.8	31.2
有毒株	44.0	31.9
腊状芽孢杆菌	42.7	35.3
马鼻疽假单胞菌	37.6	68.9
类鼻疽假单胞菌		
地区 A	50.5	69.5
B	51.7	69.5
C	56.6	69.3
D	61.7	69.3
E	66.4	68.0
土拉热弗朗西丝氏菌	46.4—53.5	32.4—33.6

* 数据由林万明同志提供。

从表 2 所列数据初步分析如下:

1. 假结核杆菌与鼠疫杆菌的 C/N 比值,不能区分,该两菌的 G + C mol% 值也近似。

2. 马鼻疽假单胞菌与类鼻疽假单胞菌在碳氮比值上区分显著,而 G-C 比值法却无差别。

3. 类鼻疽假单胞菌不同菌株之间的碳氮比值有区别,而 G-C 比值法无区别。

4. 炭疽杆菌的无毒株与有毒株的碳氮比值有区别,而 G-C 比值法不可区分。

5. 枯草杆菌与炭疽杆菌无毒株的碳氮比值同,而 G-C 比值法却能区分。

三、不同培养条件对碳氮比值的影响

1. 用不同培养基和不同培养时间的志贺氏菌属的 15 株培养物,分别测定细胞内碳氮、碳氢、氮氢比值,通过显著性检验求得 A、B 条件下 C/N × 10、C/H × 10、N/H × 10 的 t 值分别为 1.325、0.724 和 0.909; B、C 条件下 t 值分

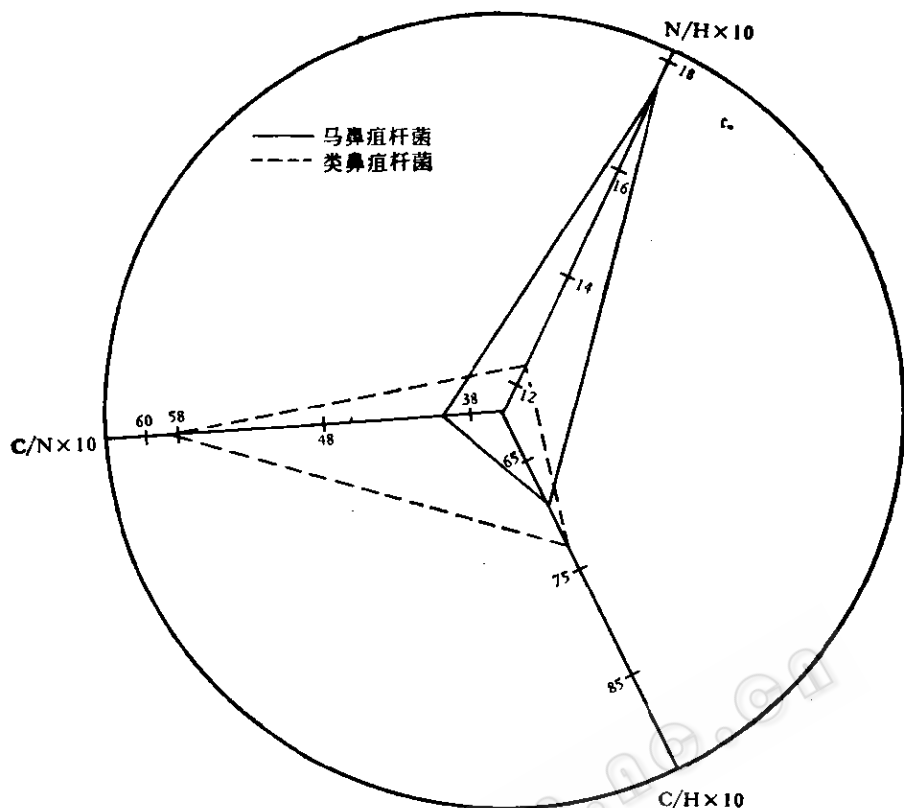


图1 马鼻疽假单胞菌和类鼻疽假单胞菌元素比值雷达图

别为 1.634、0.133 和 1.222；A、C 条件下 t 值分别为 0.400、0.319 和 0.481。显著性检验结果：志贺氏菌属四群 15 株菌在不同培养条件下，元素比值差别不显著。

2. 马鼻疽假单胞菌 2 株，在不同时间重复测定 24 次，平均值： $C/N \times 10$ 为 39.92， $C/H \times 10$ 为 69.96， $N/H \times 10$ 为 17.59；类鼻疽假单胞菌 10 株重复测定 31 次，平均值分别为 59.34、72.43、12.37 (图 1)。从图中可看出，两种菌之间元素比值差异显著。

讨 论

综上所述，用元素分析法测定细菌的主要化学元素比值，某些菌种之间有差异，如马鼻疽假单胞菌与类鼻疽假单胞菌，有可能作为菌种鉴别的依据，但各菌种有其一定的比值范围。

元素分析法如对某些菌种能作出鉴别，与 PGC 法及 $G + C \text{ mol}\%$ 法相比，虽各有所长，但元素分析法全自动化后，操作简便快速，易掌

握，重复性好，指标直观，又便于计算机储存，对生物样品测定量大的特点，有独特的优越性。

N、C、H 三元素，为细菌共有的化学成分，因此其比值，有一定的共性，如再增加氧、硫元素的测定，有可能进一步提高本方法的特异性^[6]。

本方法用于某些细菌菌种之间，或菌株之间的鉴别，是一种新的途径，有待于在更广泛的实验基础上，积累数据，作进一步的探讨。

参 考 文 献

- [1] 余仲建：有机元素定量分析，第二版，人民教育出版社，北京，1961年，第55页。
- [2] Simon, W. et al.: *Micro-Chem. J.*, 7: 422, 1963.
- [3] Belcher, R.: *Instrumental Organic Elemental Analysis*, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, pp. 75—117.
- [4] 周方：中华微生物学和免疫学杂志，2(1): 16—21, 1982。
- [5] 方开太：数学的实践与认识，3: 63, 1981。
- [6] Kirsten, W. J.: *Anal. Chem.*, 51: 1173—1179, 1979.