

两种厌氧培养法对人粪中某些厌氧菌分离结果的比较

李忠元 张旭帆 张秀琴 刘秉阳

(中国预防医学中心流行病学微生物学研究所,北京)

肠道正常菌群是一个复杂的生态系统,人和动物在出生不久,肠道就有微生物定居。有的微生物是常住菌,另一些微生物是过路菌。这些在肠道内定居的微生物,它们之间以及它们对宿主都保持着生态平衡,同时,并对人或动物宿主产生一定影响。近年来国内外学者对正常菌群,特别是对正常肠道菌群中占绝大多数的厌氧细菌的研究愈来愈重视。

为了反映肠道内菌群情况,首先需要有简便易行的检查方法。我们采用了缸内厌氧及生

物厌氧两种方法,并作了初步比较,现将结果报告如下:

材 料 与 方 法

(一) 材料

1. 取门诊儿童粪便少许(约 3g 左右),置冰壶内送检。
2. 耐真空玻璃干燥缸,容量 10kg; 搪瓷盘(50 × 35cm)。

3. 真空泵 1/4 马力; CO₂ 钢瓶; 氧气袋; 固体石蜡, 熔点 180 度; “L” 形玻璃棒。

4. 细钢丝绒或铁屑(前者较好, 由上海川沙县花木公社蔡家农机五金工厂出品)。

5. 菌种: 大肠杆菌从北京正常人粪中分离。蜡芽芽孢杆菌 DM428 (大连医学院赠)。

6. 溶液:

① 粪便稀释液的配制: P. B. S (pH7.4) 400ml 中含有维生素 C 0.1g、L-半胱氨酸 0.2g、硫乙醇酸钠 0.3g。

② 无游离氧状态指示剂: N/10 的 NaOH 溶液 0.6ml 加蒸馏水至 10ml; 0.5% 亚甲基蓝溶液 0.3ml 加蒸馏水至 10ml; 葡萄糖 0.6g 溶于 10ml 蒸馏水中。将上述三种溶液等量混合加进试管内, 于水浴中煮沸, 排除溶液中的游离氧后形成无色液体, 立即将此管放入耐压的玻璃缸内。此指示剂以新配的为好。

③ 酸性硫酸铜溶液: 硫酸铜 18g、吐温 80 6ml、普通水 1800ml、2N H₂SO₄ 溶液 27ml, 充分混合加温溶化后即将细钢丝绒浸泡于此, 备用。

7. 培养基^[1]:

① 双歧杆菌培养基“BL”(基础培养基)的制备: 取氯化钠 5g、蛋白胨 10g、琼脂 20g, 溶于 1000ml 蒸馏水中, 用 Na₂CO₃ 调 pH 至 7.4, 过滤、分装、高压灭菌。于每 100ml 基础培养基中再加入葡萄糖 1g、50% 蛋白胨 4ml、1% 苯胺蓝水溶液 3ml。灭菌后待培养基温度下降到 60℃ 左右, 再加脱纤维的无菌兔血 5—10ml, 摇匀后倾注平皿。

② 庖肉培养基: 牛肉浸液 3ml (pH7.6), 牛肉渣 0.1g 装于小试管内, 高压灭菌。

③ 生化反应应用培养基: 各种含糖半固体管包括阿拉伯糖、核糖、果糖、木糖、糖元、菊糖、肌醇、蔗糖、乳糖、甘露糖、甘露醇、山梨醇、水杨素、纤维二糖、海藻糖、苦杏仁苷、麦芽糖、半乳糖、淀粉、鼠李糖、赤藓醇、棉子糖、松三糖、七叶苷、蛋白胨水、硝酸盐培养基、明胶培养基(厌氧菌用)。

(二) 方法

1. 生物厌氧法: 将已溶化的普通营养琼脂注入搪瓷盘中, 厚为 0.5cm, 凝固后, 将每毫升各含 10 亿个的大肠杆菌和蜡芽芽孢杆菌溶液按 1:1 比例混合, 然后滴注琼脂表面分布均匀, 放 37℃ 培养 2 小时; 称 0.5g 粪便, 加入 4.5ml 粪便稀释液中, 10 倍稀释至 10⁻⁸, 取其 0.1ml 布满“BL”培养皿表面, 然后把平皿扣于搪瓷盘内的任何位置; 再将溶化的石蜡倒入搪瓷盘中(石蜡的温度要保持在 70℃ 左右), 使其流入平皿周围的每个空隙, 凝固后置 37℃ 培养 36—48 小时, 启开平皿观察结果。

2. 缸内厌氧法^[1]: 在容量为 10 公升的玻璃干燥缸内, 加入经酸性硫酸铜溶液浸泡过的细钢丝绒 200g 左右, 用粪便稀释液, 将粪便 10 倍稀释至 10⁻⁸ 管, 取 0.1ml 涂满装有“BL”培养基的平皿表面, 稍干后放入缸内, 将缸盖严, 用真空泵抽出缸内气体后, 再输入 CO₂ 气体, 当缸的内、外压力达到均衡时, 将厌氧缸置 37℃ 培养 72 小时, 观察结果。

实验结果

(一) 两种厌氧法对粪内双歧杆菌的分离结果(见表 1)。

从表 1 结果可见, 用缸内厌氧法及生物厌氧法分离粪内双歧杆菌, 从所获活菌总数来看, 两种方法无多大区别, 活菌总数以对数 (log 10ⁿ) 平均值 ± 2 标准差计算, 缸内厌氧法为 11.298 ± 0.9596, 生物厌氧法为 11.141 ± 0.7594。

(二) 两种厌氧法对严格厌氧菌及兼性厌氧菌的分离结果(见表 2)。

从 10 份标本中用缸内厌氧法分离出 16 株厌氧杆菌, 其中有 10 株 (9 个种) 为严格厌氧菌, 6 株 (4 个种) 为兼性厌氧菌。有 5 个属^[2]: 丙酸杆菌属、双歧杆菌属、真杆菌属、放线菌属、乳杆菌属。以双歧杆菌属、丙酸杆菌属、放线菌属为主。包括 13 个菌种; 用生物厌氧法分离出 15 株厌氧杆菌, 其中有 10 株 (8 个种) 为严格厌氧菌, 5 株 (3 个种) 为兼性厌氧菌。共有 6 个属^[2]: 丙酸杆菌属、真杆菌属、放线细菌属、放

表 1 两种厌氧法从人粪内分离某些厌氧杆菌活菌总数之比较

标本号	缸内厌氧法		生物厌氧法	
	总菌落数/g	以 log ₁₀ 计	总菌落数/g	以 log ₁₀ 计
1	5.5×10 ¹¹	11.74	1.09×10 ¹¹	11.04
2	7.5×10 ¹⁰	10.88	1.25×10 ¹¹	11.10
3	3.49×10 ¹¹	11.54	3.75×10 ¹¹	11.57
4	5×10 ¹⁰	10.70	1.78×10 ¹¹	11.25
5	6.96×10 ¹¹	11.84	1.31×10 ¹¹	11.12
6	3.56×10 ¹¹	11.55	1.8×10 ¹¹	11.26
7	2.26×10 ¹¹	11.35	1.29×10 ¹¹	11.11
8	4.9×10 ¹¹	11.69	5.2×10 ¹⁰	10.91
9	1.88×10 ¹¹	11.27	5.4×10 ¹¹	11.73
10	2.6×10 ¹⁰	10.42	2.1×10 ¹⁰	10.32
对数平均值 ±2×标准差	11.298±0.9596		11.141±0.7594	

表 2 用两种厌氧法对 10 份人粪标本分离鉴定厌氧菌的比较

缸内厌氧法	菌种数	生物厌氧法	菌种数
疮疱丙酸杆菌 <i>Propionibacterium acnes</i>	1	疮疱丙酸杆菌 <i>P. acnes</i>	2
贪婪丙酸杆菌 <i>P. avidum</i>	3	贪婪丙酸杆菌 <i>P. avidum</i>	1
詹氏丙酸杆菌 <i>P. jensenii</i>	1	扭曲真杆菌 <i>E. contortum</i>	2
青春双歧杆菌 <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2	断链真杆菌 <i>E. fissicatena</i>	1
婴儿双歧杆菌 <i>Bif. infantis</i>	1	产亚硝酸盐真杆菌 <i>E. nitritogenes</i>	1
长双歧杆菌 <i>Bif. longum</i>	1	凸腹真杆菌 <i>E. ventriosum</i>	1
扭曲真杆菌 <i>E. ubacterium contortum</i>	1	迈氏放线细菌 <i>Actinobacterium meyeri</i>	3
凸腹真杆菌 <i>E. ventriosum</i>	1	衣氏放线菌 <i>A. israelii</i>	1
啮齿真杆菌 <i>E. ruminantium</i>	1	内氏放线菌 <i>A. naeslundii</i>	1
衣氏放线菌 <i>Actinomyces israelii</i>	1	布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>	1
内氏放线菌 <i>A. naeslundii</i>	1	反刍月形单胞菌 <i>Selenomonas ruminantium</i>	1
龋齿放线菌 <i>A. odontolyticus</i>	1		
德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrückii</i>	1		

线菌属、乳杆菌属、月形单胞菌属。以真杆菌属为主。包括 11 个菌种。

(三) 两种厌氧培养法对人粪标本分离鉴定结果 (见表 3)

10 份人粪标本用两种厌氧培养法分离出的菌种及其菌数是不同的。例如: 1 号标本, 用缸内厌氧法未分离出厌氧菌, 而用生物厌氧法分离出扭曲真杆菌; 2 号标本用缸内厌氧法分离出贪婪丙酸杆菌, 而用生物厌氧法未分离出; 6 号标本用缸内厌氧法分离出 4 个种: 长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、龋齿放线菌、青春双歧杆菌。而用生物厌氧法分离出 3 个种: 断链真杆菌、内氏放线菌、布氏乳杆菌。可见两种方法在分离鉴定菌种方面有显著区别。

讨 论

1. 从本试验结果看, 用两种不同的厌氧培养法所分离和鉴定出的菌属结果有所不同。因此, 我们认为: 如有条件做到两法并用, 比单用一种方法为好, 可提高严格厌氧菌及兼性厌氧菌的检出率。另外, 还可根据不同需要和不同的培养菌目的来选用某一种方法。

2. 用两种厌氧方法培养同一人粪标本, 出现了不同的结果, 其原因可能与下述情况有关; 用缸内厌氧法培养时, 由于一系列的生物化学反应, 缸内的游离氧逐渐被吸收, 与氢气结合成水。微生物在培养过程中, 由于代谢作用生成了 CO₂ 气, 以及在培育前, 人工输入了适量的

表3 用两种厌氧培养方法对人类标本分离鉴定出的菌种及其数量的比较

标本号	缸内厌氧法		生物厌氧法	
	细菌分离鉴定情况	检出活菌数/g*	细菌分离鉴定情况	检出的活菌数/g*
1	未长菌		扭曲真杆菌 <i>E. contortum</i>	11.00
2	贪婪丙酸杆菌 <i>P. avidum</i>	10.88	未长菌	
3	凸腹真杆菌 <i>E. ventriosum</i>	11.26	迈氏放线菌 <i>A. meyeri</i>	10.98
	疮疱丙酸杆菌 <i>P. acnes</i>	11.20	疮疱丙酸杆菌 <i>P. acnes</i>	11.08
	贪婪丙酸杆菌 <i>P. avidum</i>	9.30		
4	啮齿真杆菌 <i>E. ruminantium</i>	10.65	未长菌	
5	扭曲真杆菌 <i>E. contortum</i>	10.45	衣氏放线菌 <i>A. israelii</i>	10.95
	德氏乳杆菌 <i>L. delbrückii</i>	9.00		
6	长双歧杆菌 <i>Bif. longum</i>	11.28	断链真杆菌 <i>E. fissicatena</i>	10.74
	婴儿双歧杆菌 <i>Bif. infantis</i>	10.30	内氏放线菌 <i>A. naeslundii</i>	10.94
	龋齿放线菌 <i>A. odontolyticus</i>	10.99	布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>	10.99
	青春双歧杆菌 <i>Bif. adolescentis</i>	11.16		
7	青春双歧杆菌 <i>Bif. adolescentis</i>	10.45	迈氏放线菌 <i>A. meyeri</i>	10.26
			产亚硝酸真杆菌 <i>E. nitritogenes</i>	10.38
8	衣氏放线菌 <i>A. israelii</i>	11.51	迈氏放线菌 <i>A. meyeri</i>	8.30
	詹氏丙酸杆菌 <i>P. jensenii</i>	11.15	反刍月形单胞菌 <i>Sel. ruminantium</i>	10.78
			凸腹真杆菌 <i>E. ventriosum</i>	10.04
9	未长菌		贪婪丙酸杆菌 <i>P. avidum</i>	11.26
10	内氏放线菌 <i>A. naeslundii</i>	9.60	疮疱丙酸杆菌 <i>P. acnes</i>	10.04

* 活菌数以 log₁₀ 计,活菌数/g 类。

CO₂ 气体。用生物厌氧法培养时,需氧的蜡芽孢杆菌和兼性厌氧的大肠埃希氏菌,在新陈代谢过程中与培养的厌氧菌共生,并促其生长。由此看出,两种厌氧法的共同特点是耗去环境中的游离氧,促进厌氧菌生长。由于两种方法所建立的气体环境和 Eh 条件不同,故生长出的厌氧菌属和菌种有明显的差异是可以理解的。

3. 生物厌氧法培养粪中厌氧菌较经济、简便,出菌时间短,不足的是菌落只能在平皿表面生长。缸内厌氧法对各种容器装的固体培养基、半固体培养基、液体培养基都能适应。

参 考 文 献

- [1] 张旭帆: 中华流行病学杂志, 3(5): 277, 1982.
 [2] 光昭知良, 藤吉南の世里 146—101 遊々社 1980.
 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>