

气相色谱法检出和鉴定厌氧菌的实用研究

周方 朱厚础 唐光江

(军事医学科学院微生物学流行病学研究所,北京)

何道生 于勇 王亚萍

(中国人民解放军三〇四医院,北京)

杨圣辉 张春梅

(北京市口腔医院研究室,北京)

摘要 根据目前气相色谱法检出和鉴定厌氧菌工作中存在的实际问题,本文提出了一种去除蛋白胨、酵母浸膏、葡萄糖培养基(PYG)本底干扰物的简便方法,提高了对色谱图定性和半定量解析的准确性。同时又推荐了一套简易价廉的实验仪器和实验试剂。通过对若干厌氧菌株的检出和鉴定,得到了比较满意的结果。上述工作将有利于气相色谱检测厌氧菌技术的推广和应用。

关键词 气相色谱法;厌氧菌

为提高对临床感染性疾病的诊断和治疗水平,必须进一步加强对厌氧菌快速检出和鉴定方法的研究。由于在厌氧条件下,厌氧菌能产生某些特征性很强的代谢产物(如有机酸、醇、胺等)。而这些产物的定性和定量分析结果,可以成为检出和鉴定厌氧菌的可靠指标。气相色谱法是分析这些代谢终产物的最有效方法之一,一些技术先进的细菌学实验室已相继建立该技术,并不断进行改进和完善¹⁾。

气相色谱法是一种精密的化学物理分析方法,它和普通常规检验法(如形态学、血清学和生化反应等)相比,有其特殊的要求。例如,普通培养基中常含有某些有机酸,给实验结果的判别带来困难。因此必须解决培养基本底干扰成分的去掉问题。其次,必须根据具体用途确定色谱仪的规格,和解决消耗量较大的标准试剂来源问题,以保证工作的正常进行。

针对上述问题,本文提出了去除PYG培养

基本底干扰成分的简便方法,有机酸标准液的配制方法,及推荐一套简易气相色谱仪。通过对多种临床分离的厌氧菌进行检出和鉴定,得到了比较满意的结果。本研究进一步完善了这种新的检验技术。

材料和方法

(一) 有机酸试剂

甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、乳酸、琥珀酸、苯乙酸(AR,北京化工厂);异戊酸、己酸(E Merck Damstandt);异己酸(日本东京化成株式会社);丙酮酸(上海生化试剂厂)。

(二) 色谱试剂

改性聚乙二醇 20M(色谱级),上试 101 白

军事医学科学院科学研究基金(85)20号课题。参加工作的还有第四军医大学附属口腔医院检验科杨聚才;武汉钢铁公司结核病防治院程冬娥;第一汽车制造厂职工医院申虹。

色担体(80—100目),均为上海试剂厂产品。

(三) PYG 培养基成分

蛋白胨(武汉生物制品厂),酵母浸膏(上海酵母厂),DL-半胱氨酸(上海曹杨中学化工厂),葡萄糖、氯化钙、硫酸镁、磷酸氢二钾和磷酸二氢钾(北京化工厂)。

(四) 实验菌种

实验菌种系解放军304医院和北京市口腔医院提供,其中包括参考菌株和经常规检验后初步定名的临床新分离菌株。

脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)3株,卵圆拟杆菌(*B. ovatus*)1株,吉氏拟杆菌(*B. distasonis*)3株,栖瘤胃拟杆菌(*B. ruminicala*)6株,栖瘤胃拟杆菌短亚种(*B. ruminicala* Sussp. *brevis*)1株,产黑素拟杆菌(*B. melaninogenicus*)3株,普通拟杆菌(*B. vulgatus*)4株,锐利拟杆菌(*B. praecox*)1株,牙龈拟杆菌(*B. gingivalis*)11株,腐蚀拟杆菌(*B. corrodens*)1株,口腔拟杆菌(*B. oralis*)1株,赖氏拟杆菌(*B. loeschei*)1株,不解糖拟杆菌(*B. asaccharolyticus*)13株,多形拟杆菌(*B. thetaiothromicron*)2株,躯体拟杆菌(*B. corporis*)2株,颊拟杆菌(*B. buccae*)4株;核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)1株,拉氏梭杆菌(*F. russii*)2株,变形梭杆菌(*F. varium*)1株;齿双歧杆菌(*Bifidobacterium odontolyticus*)2株;龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)2株;延缓真杆菌(*Eubacterium lentum*)3株;丙酸蛛网菌(*Arachnia propionica*)1株;二氧化碳噬纤维菌(*Capnocytophaga*)1株;韦荣氏球菌(*Veillonella* sp.)1株。

(五) 仪器及工作条件

四川分析仪器厂SC-3A型简易气相色谱仪,带有热导鉴定器(TCD)和氢焰离子鉴定器(FID)。不锈钢柱长2.3m,内径4mm,填充物为涂15%改性聚乙二醇20M的上试101白色担体(80—100目)加1%磷酸。柱温140℃,气化室温度和鉴定器温度为180℃。TCD桥流80mA,衰减1;FID衰减为1/4。纸速5mm/min。载气(高纯氮)流量为28ml/

min;空气300ml/min;氢气30ml/min。

(六) 酵母浸膏中干扰成分的去方法

根据实验证明,利用现有原料配制的PYG培养基中干扰成分主要来自酵母浸膏。该干扰成分的处理方法是:取再生的新鲜阴离子树脂500ml加入1000ml三角瓶内,再加500ml10%酵母浸膏水液,混合振摇30分钟,分出酵母液。按同法再处理一次。将处理过的酵母浸膏水液置4℃备用。

PYG培养基的制备:用未经处理和处理过的酵母浸膏水液分别按下述方法配制,取10%酵母浸膏水液100ml,蛋白胨20g,半胱氨酸0.5g,葡萄糖10g,VPI盐溶液40ml,加蒸馏水至1000ml,pH调至7.2,分装于10ml大试管内,加塞,15磅灭菌15分钟,冷却后放4℃备用。

(七) 有机酸标准液配制

按VPI手册规定方法配制有机酸标准液时发现分子量稍大的有机酸不易在水中溶解,尤其配制贮备液时更明显。我们的方法是按规定分别加入精确量有机酸后,加蒸馏水约至98ml,再用1mol/LNaOH水溶液调pH至7.0,最后用蒸馏水稀释至刻度,制备1meq/100ml的挥发性和非挥发性有机酸标准液。分别用热导鉴定器和氢焰鉴定器绘制标准曲线,对各种不同浓度有机酸提取液,TCD每次进样14μl,FID每次进样1μl,FID对甲酸无响应值。

(八) 细菌培养和培养物的分析

按常规法采集临床标本,分离培养所得纯菌落增菌后接种在PYG培养基内。培养物按常规方法初步鉴别定名后,再进行气相色谱分析。在相同条件下,每种菌重复培养3次,每次均设空白对照培养管,同时分析。

参照VPI厌氧菌实验手册提供的实验程序^[2],首先将PYG培养液酸化、离心。上清液的乙醚提取物用于测定挥发性有机酸即甲酸、乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸、己酸等。另取部分上清液经甲酯化后,以其氯仿提取液测定非挥发性有机酸即乳酸、丙酮酸、琥珀酸、苯乙酸等。通过色谱图中有机酸色

谱峰保留时间和峰高(或峰面积)的测量进行定性和半定量分析。半定量结果用英文大写字母表示时,其含量大于 1meq/100 ml 即大量;用英文小写字母表示时,其含量小于 1 meq/100 ml 即小量;用小写字母加括号表示时,说明有时可检出。

结 果

(一) 标准有机酸试剂分析

1. 混合酸图谱绘制: 图 1 为混合酸标准试

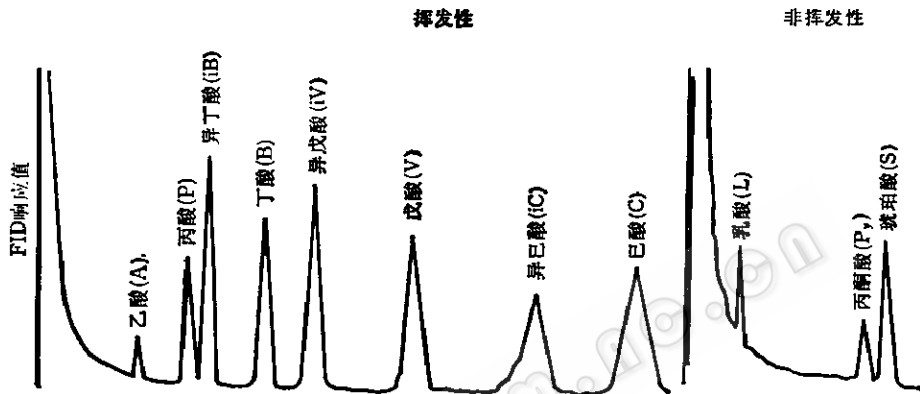


图 1 标准有机酸混合物的气相色谱图

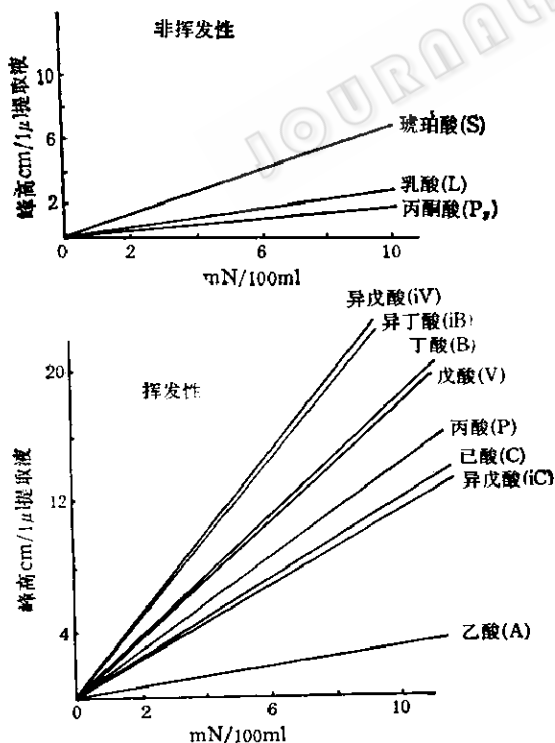


图 2 标准有机酸试剂的标准曲线

剂色谱图, 图中各成分的保留时间可供厌氧菌培养液色谱图中成分峰的定性测定。

2. 标准曲线的绘制: 根据各种标准液不同浓度的分析结果, 分别绘制每种成分的标准曲线, 图 2 为 FID 响应值的各种成分标准曲线, 供厌氧菌培养液色谱图中成分峰半定量分析用。

(二) PYG 培养基中干扰成分的去 除 效 果

图 3 表明, 未经处理的培养基中含有大量

乙酸、琥珀酸, 少量丙酸、甲酸和乳酸; 处理过的培养基中只有微量乙酸, 适用于厌氧菌代谢产物的分析工作。

(三) 参考菌株和临床分离菌株代谢产物分析

实验菌株包括已知参考株和初步定名的临床分离株近 100 株, 它们遍布 10 属 28 种。表 1 为拟杆菌属各菌株 3 次培养物的分析结果。在它们的代谢产物中, 大多数含有大量乙酸(A)和琥珀酸(S), 但不解糖拟杆菌产生大量乙酸和丁酸(B), 牙龈拟杆菌产生大量丁酸和异戊酸(iV), 还有小量苯乙酸(Pa)。多数经常规法初步定名的菌株色谱结果和文献值相符合^[3,4], 但也有个别菌株不完全符合, 如牙龈拟杆菌 17B-5 株未测出苯乙酸, 个别不解糖拟杆菌产物中未见丁酸。通过代谢产物的分析, 有的菌株得到了进一步鉴别, 例如栖瘤胃拟杆菌可区分为短亚种和瘤胃生亚种, 从产黑素拟杆菌菌群中又分出中间型拟杆菌, 在初步定名为

表 1 拟杆菌属菌株在 PYG 中的代谢产物

菌株	编号	代谢产物
<i>Bacteroides fragilis</i>	NCTC9343, 107,29(1),318(2), 318(3), 20, 29(3), AP1(1)	SAp(ibivlf)
<i>B. ovatus</i>	AP1(2)	SAp(ibivl)
<i>B. distasonis</i>	AP2(1), 69(4), 34(2)	SA(pibivl)
<i>B. ruminicola</i> subsp. <i>brevis</i>	106, RCB(14), RC4(21), OR6(1), OP3(6)	SA(fpibivl)
<i>B. ruminicola</i> subsp. <i>ruminicola</i>	OR6(2), OP32(4)	SA
<i>B. asaccharolyticus</i>	A9-4, A9-3, A5-B3, A5-B1, 20B-2, 18B-1, 22B-1, 22B-2,	ABpibivic(al)
<i>B. gingivalis</i>	A15-4, 19B-2, 19B-3, 19B-4, 19B-5, 19B-6, 47A-1	BiVapibspa
<i>B. corrodens</i>		SA(fibiv)
<i>B. oralis</i>		SA(ibiv)
<i>B. melaninogenicus</i>	RC2H, RC12(11),	SAibivl
<i>B. intermedius</i>	RC8(14)	SAibiv(lp)
<i>B. vulgatus</i>	11, 17, F5(7), F2(11), A15(3)	SAp(ibivl)
<i>B. loescheii</i>	ATCC15930	SA(libiv)
<i>B. corporis</i>	AC3A, ATCC33547, RC13(13)	SAibiv
<i>B. buccae</i>	RC6(6), RC6(11), RC6(13), RC17(1)	SA(pibivpyl)
<i>B. thetaiotaomicron</i>	69(6), 69(8)	SA(pibivf)

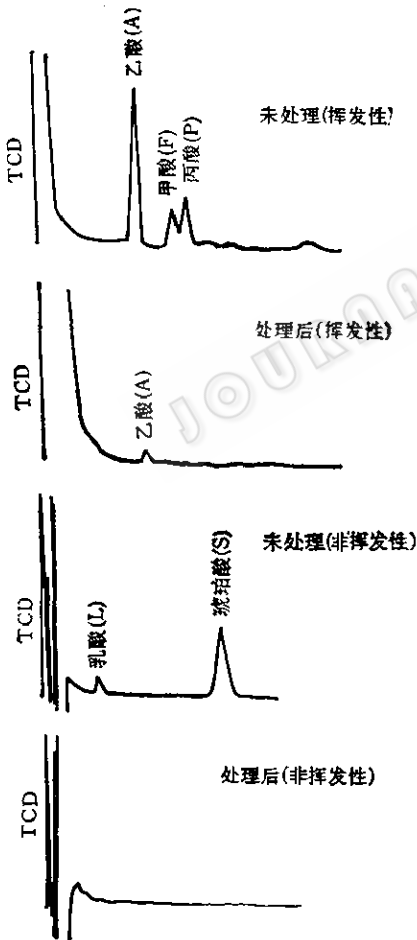


图 3 PYG 培养基处理前后气相色谱图

赖氏拟杆菌的代谢产物中发现了丁酸，类似不

解糖拟杆菌。

表 2 为其他厌氧菌株的代谢产物，梭杆菌属的核梭杆菌、拉氏梭杆菌、变形梭杆菌产大量丁酸，其他菌株产物中多产乙酸。龋齿放线菌主要产乙酸和琥珀酸，丙酸杆菌主要产丙酸、乙酸，丙酸蛛网菌主要产乙酸和少量丙酸，而迟缓真杆菌产物不太明显，只有少量乙酸、乳酸和琥珀酸。

讨 论

气相色谱法检出和鉴定厌氧菌的仪器系统中，由于 TCD 适用于氢气、有机酸和其他代谢产物的分析，因此为首选鉴定器。TCD 的载气最好用氦气或氢气，只是由于前者价格昂贵，后者有一定危险性，所以才用高纯氮气。通常 TCD 的灵敏度低于 FID，而且易受污染引起基线漂移和噪声升高，最好不要直接分析细菌培养物的上清液。FID 灵敏度高于 TCD，若配用填充多孔聚合物的填充柱，如 GDX-401，上试有机担体 701、Porapak Q 或 Chromsorb 103 等，可直接分析细菌培养物的上清液。上清液直接进样分析简便易行，但对仪器污染严重，降低色谱柱寿命。FID 对甲酸和氢气不适用，必要时可制备甲酸衍生物。

色谱结果的半定量解析受多种因素影响，

表2 其他厌氧菌株在 PYG 中的代谢产物

菌 株	编 号	代谢产物
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC25586	Baps(ibiv)
<i>F. russii</i>	RC2F	Ba
<i>F. varium</i>	F4(15)	BLap
<i>Actinomyces odontolyticum</i>	RC6(10), RC6(4), RC8(14)	ASlp
<i>Eubacterium lentum</i>	2(2), 354	asl
<i>Arachnia propionica</i>	299	Apl
<i>Veillonella sp.</i>	RC112(5)	ap(1)
<i>Capnocytophaga</i>	ATCC 33624	SApl
<i>Bifidobacterium odontolyticum</i>	RC13(2), (3), RC11(2)	A(1s)

注: F (甲酸), A (乙酸), P (丙酸), B (丁酸), IB (异丁酸), V (戊酸), IV (异戊酸), C (己酸), IC (异己酸), S (琥珀酸), L (乳酸), Pa (苯乙酸), Py (丙酮酸)

如培养基成分的稳定性、接种菌量多少和标准曲线的制备等。标准曲线制备程序要和培养液分析程序一致,其结果才有可比性。要严格按照规定的程序所示体积进行实验,若有改变时,必须做体积换算。例如,适用于 TCD 的标准曲线是用 14 μ l 不同浓度有机酸提取物制备的,适用于 FID 的标准曲线则为 1 μ l 不同浓度有机酸提取物制备的。

类似 SC-3A 的气相色谱仪均可用于厌氧菌的检出和鉴定。无论用何种仪器,不同的实验室必须绘制专用标准曲线和混合试剂色谱图。由于各种因素的影响,有机酸色谱峰的保留时经常出现一定程度的变化,甚至同一根色谱柱随着工作时间的增加,保留时间逐渐延长。因此必须经常用标准试剂校正,确保色谱峰化学定性的准确性。

实验结果表明,厌氧菌特征代谢产物种类繁多,绝不是局限于目前讨论的这几种。如果

进一步提高鉴定器的灵敏度,提高色谱柱的分辨力,改进实验程序,不仅可以缩短培养时间和操作时间,而且还能检出新的特征代谢物。结合革兰氏染色和形态观察,有可能对常见厌氧菌的鉴别从现有属的水平提高到种的水平,进而实现检验手段的自动化。在此基础上实现对临床标本的直接检验。对以上问题我们正在探索研究,有的已初见成效,将另文报告。

参 考 文 献

- [1] 周方、朱厚础编译: 气相色谱法在微生物学和医学中的应用,科学出版社, p. 89, 151, 171, 1984.
- [2] Holdeman, L. V. et al.: Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed., Southern Printing Co., Virginia, 1977.
- [3] Krieg, N. R. et al.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore/London, 1984.
- [4] Sutter, V. L. et al.: Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 3rd ed., California, USA, 1980.