

# 气相色谱检出和鉴定厌氧菌方法的改进

陈立茵 周 方 朱厚础

\*(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

**摘要** 用程序升温毛细管气相色谱法分析厌氧菌代谢产物中的有机酸丁酯, 有可能代替常规方法中的两步色谱分析, 简化了实验程序, 缩短了时间, 初步验证结果表明改进方法的可行性。

**关键词** 毛细管气相色谱法; 厌氧菌

气相色谱检出和鉴定厌氧菌的方法已被许多实验室采用<sup>[1,2]</sup>, 但目前常用的程序是两步色谱法, 即直接分析挥发性有机酸, 非挥发有机酸需经甲酯化之后再行色谱分析<sup>[3]</sup>。这种方法适用简易价廉的色谱仪, 但培养物用量较大, 费时, 且不利于结果的计算机自动解析。我们在 MOSS 等报告的有机酸丁酯分析方法基础上<sup>[4,5]</sup>, 将常用两步法改用一步法, 通过对水肿梭菌、生孢梭菌和破伤风梭菌等培养物的分析, 初步验证了改进方法的可行性。

## 材 料 和 方 法

### (一) 混合有机酸参考试剂

用 19 种已知有机酸参考试剂配制混合有机酸参考试剂, 其中包括丙酸 ( $C_{3:0}$ )、异丁酸

( $IC_{4:0}$ )、丁酸 ( $C_{4:0}$ )、异戊酸 ( $IC_{5:0}$ )、戊酸 ( $C_{5:0}$ )、异己酸 ( $IC_{6:0}$ )、己酸 ( $C_{6:0}$ )、庚酸 ( $C_{7:0}$ )、苯乙酸、苯丙酸浓度为 0.4 meq/100ml; 甲酸 ( $C_{1:0}$ )、乙酸 ( $C_{2:0}$ )、苯甲酸、丁二酸、丙酮酸、戊二酸、己二酸、对羟基苯甲酸浓度为 1.0 meq/100ml; 乳酸浓度为 2.0 meq/100ml。

### (二) 实验菌种及培养物

由中国医学细菌菌种保藏管理中心提供的参考菌种为水肿梭菌 (*Clostridium oedematiens*), 生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*) 和破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)。培养物制备和处理的详细方法见气性坏疽病原菌特征代谢物的检测<sup>[6]</sup>。

### (三) 有机酸丁酯衍生物的制备

取上述混合有机酸参考试剂 1.0ml, 酸化

至 pH2, 提取, 提取液内加 14% 三氟化硼丁醇液酯化, 丁酯衍生物用无水硫酸钠干燥后即可进样分析。绘制混合有机酸标准参考图。

各取菌种培养物上清液 1.0ml, 按上述方法处理, 绘制相应的色谱图。

#### (四) 色谱仪及工作条件

本实验采用美国 Perkin-Elmer SIGMA 115 model Gas Chromatographic System. 气化室温度 270℃, 鉴定器 (FID) 温度 270℃, 12m 交联甲基硅酮石英毛细管柱 (HP Co.) 初始炉温 60℃, 5 min 后以 8℃/min 速率升至 250℃, 持续 10min. 载气 (高纯氮) 2ml/min, 氢气 30ml/min, 空气 300ml/min。

### 结果和讨论

图 1 是 19 种已知有机酸混合物丁酯衍生物的色谱图, 这些有机酸为常见微生物代谢产物的一部分。其中某几种成分可能是这种微生物代谢产物中的有机酸组分, 另几种成分可能又是另一种微生物的有机酸组分。一般用这一标准试剂色谱图来核准某一种菌有机酸色谱图中各个组分的名称。

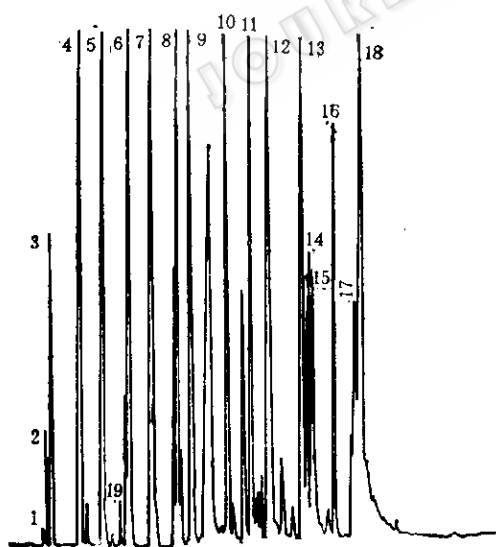


图 1 标准有机酸丁酯色谱图

1.  $C_{11:0}$  2.  $C_{3:0}$  3.  $C_{5:0}$  4.  $IC_{4:0}$  5.  $C_{7:0}$  6.  $IC_{3:0}$  7.  $C_{9:0}$  8.  $IC_{6:0}$  9.  $C_{10:0}$  10.  $C_{12:0}$  11. 苯甲酸 12. 苯乙酸 13. 苯丙酸 14. 丁二酸 15. 丙酮酸 16. 戊二酸 17. 对羟基苯甲酸 18. 乙二酸 19. 乳酸

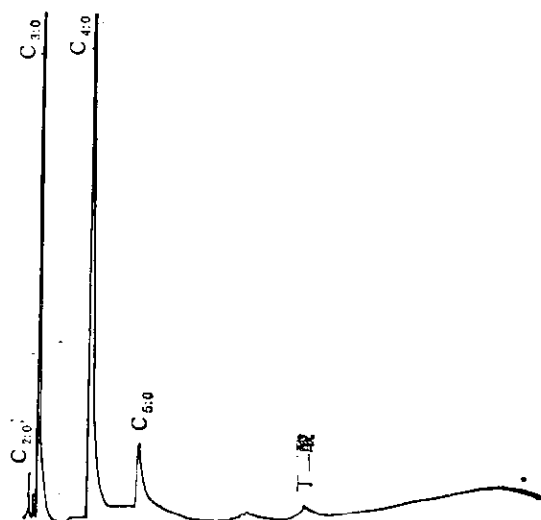


图 2 水肿梭菌



图 3 生孢梭菌

通过和标准有机酸色谱图的对比, 水肿梭菌有机酸色谱图(图 2)中的成分是乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和琥珀酸(丁二酸); 生孢梭菌的有机酸(图 3)为乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、异己酸、琥珀酸和苯丙酸; 破伤风梭菌的有机酸(图 4)为乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、异己酸、苯甲酸、琥珀酸和苯丙酸。

以上结果和两步色谱法所得结果基本相符<sup>[6]</sup>。采用一步酯化法同时检测细菌培养物中的挥发性和非挥发性有机酸, 不仅可简化操作

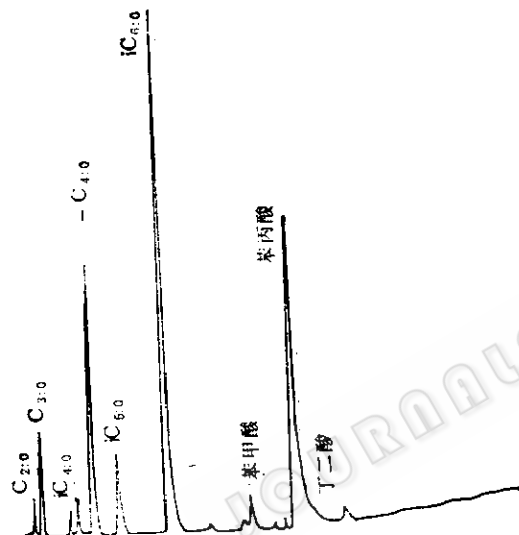


图 4 破伤风梭菌

手续,减少样品用量,缩短报告时间,而且还为数据处理的自动化创造了有利条件,同时还有可能用于细菌性感染和病毒性感染的鉴别诊

断。有时用本法检测时,乙酸和琥珀酸成分与两步法结果稍有差异,这两种成分是很多厌氧菌的主要代谢产物,且对厌氧菌的检出有一定价值<sup>[7]</sup>,因此本法尚须改进,使之能更好地应用于厌氧菌的检出和鉴定。

### 参 考 文 献

1. Holdeman L V et al.: *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. Southern Printing Co., Virginia, 1977.
2. Krieg N R et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London, 1984.
3. 周方等: *微生物学通报*, 16: 343—347, 1989.
4. Lambert M A and Moss C W: *J. Chromatogr.* 74: 335—338, 1972.
5. Moss, C. W. and Nunez-Monreal, O. L.: *J. Clin. Microbiol.*, 2: 308—311, 1982.
6. 陈立茵等: *微生物学通报*, 19(5): 284, 1992.
7. 陈聪敏,王文凤编: *厌氧菌及其感染*, p. 264—276, 上海医科大学出版社,上海, 1989.

(1991-3-14 收稿)