

一株无毒脆弱拟杆菌的分离鉴定

张季阶* 于丽娟 徐灵芝 王文玉 张洪经 潘忠华 张洪正
指导者: 刘秉阳 陈廷祚

脆弱拟杆菌是一群与人类健康密切相关的革兰氏阴性无芽胞的厌氧细菌, 是肠道菌群中数量最多的一类, 该菌群的数量可以作为儿童健康的指标^[1,2]。但是, 近年在某些疾病的感染中又比较常见。因此, 对该菌的分离、鉴定及分类具有重要意义。

在我们研究正常菌群的过程中, 于1983年9月从一个发育非常良好的婴儿粪便中分离出量大而又较纯的细菌, 经一系列的鉴定、基础试验和临床应用观察, 属于脆弱拟杆菌群中一株无毒菌, 是人体的益生菌, 定名为BF839菌株。此菌对儿童有促进生长发育和提高免疫力的作用, 对消化道和呼吸道某些常见病和多发病有明显的治疗效果。现将该菌分离鉴定的有关资料报告如下。

材料和方法

菌种来源: 大连市西岗区妇幼保健院体检时采自一个发育非常良好的婴儿粪便。

方法: 按“正常菌群检查法”^[3]称取0.5克大便, 置于先装有4.5ml生理盐水的试管中, 以此连续稀释成 10^{-1} ~ 10^{-8} , 由高稀释度向低稀释度滴注到Bd培养基平板上, 用充气法进行厌氧培养。置37℃, 48小时开缸检查。选不同的菌落进行纯培养、革兰氏染色、培养特性、生理生化、色谱分析DNA的G+C测定和毒力试验, 并送交中国科学院微生物研究所和中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所进行鉴定, 同时送大连医学院病理教研室做毒力鉴定。

*通讯处: 大连市西岗区八一路194号五楼4号, 邮编116013

试验结果

一、培养特性: Bd培养基平板上生长出较纯的大小两种菌落, 0.5~2mm, 圆形, 光滑, 灰白色, 隆起, 半透明。菌量为 $10^{11.8}$ /克便。两种菌落之比约20:1。镜下观察均为革兰氏阴性无芽胞的杆菌和短杆菌。细胞中有不着色的空胞, 但不是芽胞。不运动。超薄切片电镜观察未发现荚膜。对大小不同的两种菌落连续三次分别划线培养, 同时作好氧培养对照。小菌落能产生大菌落, 大菌落也能产小菌落。好氧培养未生长。两种菌体大小形态相当。革兰氏染色镜检, 3%KOH和3%NaOH拉丝试验均为革兰氏阴性菌。

二、生理生化试验: 主要根据《伯杰氏鉴定细菌学手册》第7、8版和《厌氧菌手册》第4版所描述的方法测定了氧化酶、接触酶、联苯胺靛基质, 进行了硝酸盐还原、七叶灵分解、20%胆汁刺激生长试验及某些碳水化合物产酸产气试验。结果见附表。

三、代谢终末产物的分析: 气相色谱法对厌氧菌的葡萄糖终末代谢产物的分析是鉴定厌氧菌重要依据之一。我们在厌氧菌分类鉴定工作中, 使用的气相色谱主机为日本津岛公司产GC-7AG型, 记录仪为日本津岛产C-R1B积分仪。

将BF839菌株进行纯化, 取纯化的菌落接种于PYG肉汤, 厌氧培养48小时(36℃), 分别提取挥发性脂肪酸和非挥发性脂肪酸。同时设了VFA、NVFA标准液对照和空白PYG肉汤对照。

结果: 非挥发性脂肪酸中主要是琥珀酸(S),

附表 BF₈₈₈和脆弱拟杆菌生理
及生化性状的比较

性状	脆弱拟 杆菌	BF ₈₈₈	性状	脆弱拟 杆菌	BF ₈₈₈
苦杏仁苷	-	a	鼠李糖	-	-
阿拉伯糖	-	a [*]	水杨酸	-	-
纤维二糖	-	-	淀粉	a	a
七叶灵	V	a	蔗糖	a	a
果糖	a	a	海藻糖	-	-
葡萄糖	a	a	木糖	a	a
糖原	a [*]	a	半乳糖	a	a
肌醇	-	-	硝酸盐还原	-	-
乳糖	a	a	碱基质	-	-
麦芽糖	a	a	接触酶	-	-
甘露糖	-	-	运动性	-	-
甘露醇	a [*]	a	20%胆盐生长	+	+
松三糖	-	-	七叶灵水解	+	+
棉子糖	a	a	甘油	-	-
明胶消化	-	-	牛乳凝固	c	c

注: a为pH<6.5, a^{*}为pH5.6~6.0之间, -为pH>6.1或阴性; +为阳性, V为可变, C为凝固

挥发性脂肪酸中测出的以乙酸(c₁)为主。

四、DNA的G+C mol%测定:

应用热变性温度法(T_m值法)和DNA在pH3.0的吸光率方法测定BF₈₈₈菌株DNA中G+C含量, 以鉴定该菌的遗传型特征, 为该菌的分类提供依据。所用仪器为Perkin—Elmer, Lambda 7 uv/vis Spectrophotometer (λ 7 uv/vis光谱仪)。

方法按中国微生物学会, 第一届分析微生物学术讨论会资料: 细菌DNA G+C mol%测定和DNA—DNA核酸分子杂交技术——细菌分类鉴定的新方法进行。

结果: BF₈₈₈菌株DNA的G+C mol%测定为40—65%与国际公布的标准拟杆菌属G+C mol%的碱基测定值40~45之间的范围相符。

五、毒力试验:

1. 小鼠急性毒力试验: 取体重22±2克cfw小鼠雌雄20只分成高剂量组和低剂量组, 每组各10只。高剂量组按4200亿/支灌胃, 低剂量组按840亿/支灌胃, 观察7天。未发现异常改变, 未见致死, LD测不出。

2. 大白鼠毒力试验: 取体重135克±20克Wistar近交系大鼠60只, 雌雄各半。按体重搭配分为3组: 高3低剂量组和对照组。每组20只。高剂量每日每只给菌380亿/5ml, 相当于拟入量的230倍; 低剂量组每日每支给菌38亿/0.5ml, 相当于拟入量23倍; 对照组每日每支给1%明胶5ml, 均进行灌胃。观察3天后, 同时测大白鼠血象、肝、肾功能、心电图。试验期间观察动物的一般状态, 连续给药两周。停药后24小时, 再测血象、肝、肾功能及心电图。然后取心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、睾丸和卵巢, 进行肉眼及切片的病理学检查。

结果: 三组动物的体重, 外周血象(血红素、红白细胞计数及分类), 肝、肾功能(血中尿素氮、谷、丙转氨酶), 心电图, 病理检查(心、肝、肾、胃、肠、睾丸及卵巢), 均无明显差别。

3. 狗长期毒力试验: 取体重为10±2kg狗12只, 雌雄各半, 按体重搭配分为3组, 每组四支。设高低两个剂量组, 均于每日晨进食前将药物与少量食物拌均喂饲, 待食尽后, 再给其余饲料。高剂量组每日每支给42000亿/50ml(约相当于拟入的临床剂量的350倍)。低剂量组每日每只给4200亿/5ml(相当于拟入的临床剂量的35倍), 另设对照组以每日50ml的1%明胶液按相同方法喂饲, 连续两周。经上述分组后, 先观察1周, 同时测心电图, 肝、肾功和血常规, 然后按上述给药量, 喂饲两周。停药后24小时测心电图。于处死动物时, 采血测肝、肾功, 血尿常规, 并立即做病理剖检观察, 同时心、肝、脾、肺、肾、胃等脏器做切片显微镜下检查。

结果: 和大白鼠毒力试验相同, 与对照组比较, 均无明显改变。即按拟入临床用药量的350倍(4200亿/50ml/日只)和35倍(4200亿/5ml/日只)给菌14天, 与对照组(只给1%明胶50ml/日只)相比较无明显毒力反应。

讨 论

肠道微生物群在长期进化过程中与人类

宿主形成了一个较为平衡的生态系统，其中厌氧菌和需氧菌的比是1,000:1。本来人在胚胎时期是无菌的，生后3~4小时肠道开始有细菌定居，到5天时这个系统就基本达到稳定状态。它们之间在质与量上保持一定的构成比例，但也因食物、年龄、季节和个体差异等因素而有所不同。虽然波动范围较大，但仍保持着相对的稳定性^[4-6]，特别是儿童，其中脆弱拟杆菌群占主导地位。它的变化是人体健康的一个重要指标，若其数量下降，可引起需氧菌和兼氧菌的“细菌过度生长综合病”，导致肠菌群失调，形成病理状态。如霍乱腹泻时该菌可下降至10⁻⁵~10⁻¹⁰。

拟杆菌群是构成人肠道菌的主要成员。在其它动物，如牛、羊、马、猪、鸡、狗、猴、猫、貂、小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔等，拟杆菌也占绝对优势。就人而言，每克大便中可高达10⁸—10¹¹。人体内为什么这样多，它们在人体中起什么作用，这些问题引起了人们的注意。据Mizufani TL和光冈知足等研究，该菌有合成多种维生素和蛋白质，防止外来细菌入侵，刺激免疫功能等作用。Rowland IR等报告，该菌有降解肠道毒性物质的作用，可降解二苯基亚硝胺和二甲基亚硝胺^[5]。Williams JR等证明该菌能把N-羟基-4-乙酰氨基联苯还原为4-乙酰氨基联苯。肠道菌群与人的健康有着密切的关系。其中有些细菌能产生致癌和促癌物质，可是又有些细菌能分解这些物质^[6]，使其无毒而保持肠内细菌的平衡，保持人体健康，脆弱拟杆菌就是后者之中的一员。

脆弱拟杆菌的致病性和非致病性的问题是人们关心的。近来在临床标本中经常发现脆弱拟杆菌或该菌和其它厌氧菌以及需氧菌的混合感染^[10]，并证明脆弱拟杆菌的毒力因子与其脂多糖类膜层有关。但是，作为人体主要常住菌之一的脆弱拟杆菌占肠道正常菌群的32%以上，该菌伴随人的终生，对人的

营养、代谢、生长、发育和免疫有重要的影响，对人体的保健起着积极的作用。若均有毒力反应，则对人体将有难以想像的不良后果。因此，可以认为，有相当大的部份是非致病性的益生菌。与肠正常菌群中的大肠菌相同，有致病性菌株，也有非致病性菌株。此次分离的BF₈₃₃菌株，经电镜检查不具致密的类膜层，经人体和动物试验无毒力反应，并有促进儿童生长发育，防止某些疾病和提高免疫力的作用。因此对该菌的研究和应用，应当引起重视。

结 论

1983年9月从健康幼儿粪便中分离的BF₈₃₃菌株，经形态学，培养特性，生化试验，代谢终末产物分析，DNA的G+C mol% 测定和小鼠、大鼠以及狗的毒力试验等证明是一株无毒的脆弱拟杆菌。

〔中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所的李忠元主管技师和刘秉阳教授，中国科学院微生物研究所的洪俊华教授，分别对BF₈₃₃菌株进行了鉴定，特此致谢。张洪峰同志对此项工作给予大力帮助，于此一并致谢。〕

参 考 文 献

1. Finegold SM. London: Academic Press, 1977.
2. Johnson JL. Int J syst Bacteroides species, Int J syst Bacterid 1978, 28: 245
3. 康白、张季阶.正常肠菌群检查法.全国正常菌群学术讨论会专辑1982, 07~118.
4. 熊德鑫、刘秉阳.人下肠道中拟杆菌属几个微生物学问题的探讨.江西科学院, 1982.
5. Rawlomd IR et al. Appl Microbiol 1975, 29: 7~12.
6. Williams JR et al. Biochem Pharmacol 1970, 19: 173~188 1970.
7. 康白, 等.微生态学.1988:64~80.
8. 阎旭初, 刘秉阳导师.脆弱拟杆菌群的微生态学研究.中国预防医学科学院博士研究生毕业论文, 1988, 3: 26.
9. Tannock GW. American Society for Microbiology Washington, D. C, 1984:374~382,
10. Sacage DC. Annu Rev Microbiol 1977, 31: 107.