

醋酸铅棉球法筛选口腔产硫化氢细菌的研究

孙崇奎, 卢礼兵, 朱 砾, 龚其美, 肖晓蓉, 肖丽英, 周学东, 李 燕

(口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 对口腔常见细菌的产硫化氢能力进行筛选, 期望找到主要的口臭致病菌, 分析致臭菌与龋病和牙周病的关系。方法 以醋酸铅棉球法间接定性链球菌属、放线菌属、乳杆菌属的 8 种可疑致龋菌以及卟啉单胞菌属、普雷沃菌属、梭杆菌属等 9 种牙周可疑致病菌产硫化氢的能力。结果 9 种牙周病可疑致病菌均可产生硫化氢。在致龋菌中, 格氏链球菌、内氏放线菌、溶牙放线菌、嗜酸乳杆菌产硫化氢, 变异链球菌、表兄链球菌、黏性放线菌和发酵乳杆菌不能产生硫化氢。结论 产硫化氢的细菌大多数为革兰阴性厌氧菌, 致臭菌与牙周病、牙髓病的发生发展存在着相关性。约半数的致龋菌能产生硫化氢, 导致口臭的发生。

[关键词] 硫化氢; 醋酸铅; 口臭; 致龋菌; 牙周病

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.05.004

Preliminary study of screening oral bacteria producing hydrogen sulfide by cotton balls with lead acetate

SUN Chong-kui, LU Li-bing, ZHU Zhu, GONG Qi-mei, XIAO Xiao-rong, XIAO Li-ying, ZHOU Xue-dong, LI Yan.
(State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To screen common oral bacteria which produce hydrogen sulfide, and expect to find the main source of bad breath. To analyze the relationship between halitosis and oral caries, periodontal diseases.

Methods Based on the color reaction between hydrogen sulfide and lead acetate, we use indirect experimental method by cotton-wool to detect 8 bacteria as *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* which are about caries and 9 bacteria as *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* which are about periodontal to identify the ability to produce hydrogen sulfide. **Results** All of the 9 bacteria about periodontal disease can produce H₂S. In the bacteria group about caries, only *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Lactobacillus acidophilus* can produce H₂S while *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus fermentatae* can not. **Conclusion** Most of the bacteria which can produce H₂S are gram-negative anaerobic bacteria. The bacteria that produce halitosis have relationship with the occurrence and development of periodontal disease, pulpitis. And almost one half of the cariogenic bacteria can produce hydrogen sulfide, which can result halitosis.

[Key words] hydrogen sulfide; lead acetate; halitosis; cariogenic bacteria; periodontal disease

口臭在日常生活中十分常见, 严重地影响人们的生活质量, 且发病原因具有多元性, 难以治愈。迄今, 尚无口臭的确切定义。Miyazaki 等^[1-2]认为, 口臭是一种由特异的细菌或特异的产硫化物的基因或酶引起的疾病; 曹钟义等^[3-4]则认为, 口臭更多的体现为一种与多种细菌和疾病相关联的症状, 与多种口腔和胃部疾病密切相关。可以

肯定的是, 口臭与口腔细菌关系密切^[2, 5-6]。潜伏在牙面、舌背的兼性或专性细菌发酵口腔内残余物, 诸如唾液、血液、龈沟液和上皮细胞碎片等^[7], 进一步分解其中的蛋白质、肽和氨基酸, 产生带臭味的挥发性硫化物(volatile sulphide compound, VSC)^[8-9]。硫化氢是细菌分解含硫氨基酸, 如半胱氨酸和蛋氨酸后产生的, 与另一产物甲基硫醇一道占 VSC 体积分数的 90%。其中, 硫化氢产生的酶反应式如下:



因此, 硫化氢既是口臭气体的主要成分, 也是口臭检测的重要指标。本研究旨在通过简便、

[收稿日期] 2009-10-19; [修回日期] 2010-03-23

[基金项目] 口腔疾病研究国家重点实验室自主研究基金资助项目 (SKLOD PI 012)

[作者简介] 孙崇奎(1985—), 男, 山东人, 硕士

[通讯作者] 李 燕, Tel: 028-85501317

经济的醋酸铅棉球法对口腔中产硫化氢的细菌进行广泛筛选，确定主要的口臭致病菌，为口臭的防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株及其培养

本研究使用的 17 种标准菌株，均由口腔疾病研究国家重点实验室(四川大学)提供。

1.1.1 阳性对照组 大肠杆菌 *E.coli* 25926。

1.1.2 致龋菌组 变异链球菌 ATCC 25175、表兄链球菌 ATCC 33478、格氏链球菌 ATCC 10588，内氏放线菌 ATCC 12104、黏性放线菌 ATCC 15987，溶牙放线菌 ATCC 17929，嗜酸乳杆菌 ATCC 4356、发酵乳杆菌 ATCC 14913。

1.1.3 牙周病和牙髓病及根尖周等疾病致病菌组 牙髓卟啉单胞菌 ATCC 35406、牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277，中间普雷沃菌 ATCC 25611、变黑普雷沃菌 ATCC 33563、人体普雷沃菌 ATCC 33457，具核梭杆菌 ATCC 25586、可变梭杆菌 ATCC 8501，微小消化链球菌 ATCC 33270。

1.1.4 菌株培养 取链球菌属细菌复苏并将其接种于 TPY 平板培养基上，再将 TPY 平板置于厌氧罐中，37℃，体积分数 80%的氧化氮和 20%的二氧化碳的兼性厌氧环境下孵育 24 h；将放线菌属、乳杆菌属以及牙周、牙髓、根尖周疾病致病菌组细菌涂布于脑心浸液培养液(brain heart infusion, BHI)平板，加入海绵明胶和体积分数 1%的兔血，其中黏性放线菌、溶牙放线菌和嗜酸乳杆菌可不加，再将 BHI 平板置于含体积分数 80%氧化氮、10%二氧化碳和 10%氢的厌氧环境中培养 48 h。对复苏后的细菌进行革兰染色，鉴定为纯培养后传代备用。

1.2 醋酸铅棉球的制备

参照醋酸铅培养基中醋酸铅的体积分数^[8]，用过滤除菌方法配制体积分数为 0.2%的醋酸铅溶液。将灭菌的棉球分别浸泡在灭菌双蒸水(阴性对照)和醋酸铅溶液(试验组)中备用。

1.3 斜面固体培养基的制备

TPY 培养基由 15 g·L⁻¹ 胰蛋白胨、4 g·L⁻¹ 酵母提取物、10 g·L⁻¹ 葡萄糖、6 g·L⁻¹ 磷酸二氢钾、2 g·L⁻¹ K₂HPO₄·3H₂O、2 g·L⁻¹ Na₂CO₃、2 g·L⁻¹ NaCl、12.5 g·L⁻¹ 琼脂和 dH₂O 配制而成。BHI 培养基由 47 g·L⁻¹ BHI 琼脂培养基、10 m·L⁻¹ 氯化血红蛋白-维生素 K₁、1%脱纤维兔血和 dH₂O 配制而成。

将高压灭菌后的 TPY 和 BHI 培养基冷至 50~60℃ 之后，TPY 培养基可直接使用，BHI 中则需要加入氯化血红蛋白-维生素 K₁ 和体积分数 1%的兔血；将 TPY 和 BHI 培养基分别分装于小试管中，倾斜搁置，待培养基冷却凝固后即成为斜面固体培养基。

1.4 硫化氢的检测

用接种环挑取各试验细菌在斜面培养基上 S 形划线接种，用无菌镊子将醋酸铅棉球水分挤干塞入斜面培养基小试管口。注意不要让棉球碰到培养基，再塞上试管塞。阳性对照组接种产硫化氢的大肠杆菌。阴性对照组接种同种试验细菌并将其塞入双蒸水棉球的试管。将各管置于兼性厌氧环境或厌氧环境中 37℃孵育 24~48 h 后观察结果。若棉球没变黑，结果为阴性，记录为(-)；若棉球略微变黑或是明显变黑，结果为阳性，记录为(+)

2 结果

分别对阳性对照菌以及致龋菌组、牙周牙髓根尖周疾病致病菌进行检测，结果见图 1：试验组细菌产硫化氢棉球变为黑色，阴性对照组棉球则为白色；不产生硫化氢的细菌棉球为白色。其他致病菌的试验结果见表 1。



A: 变异链球菌; B: 大肠杆菌; C: 具核梭杆菌;

O: 阴性对照组, 棉球用双蒸水湿润; Pb: 试验组, 棉球用醋酸铅湿润。

图 1 试验代表菌种的产硫化氢检测结果图

Fig 1 Result of the experiment about the representative bacteria

用十字形坐标图对各菌结果进行分类：把各细菌以培养环境为标准分为兼性厌氧和专性厌氧培养，结果所有的专性厌氧菌都产硫化氢(图2)；把各细菌以革兰染色结果为标准分为革兰阳性菌和革兰阴性菌，结果所有革兰阴性菌都产硫化氢(图3)。

表 1 试验菌种产硫化氢的检测结果
Tab 1 Result of the screened bacteria

相关致病菌	菌属	菌种(革兰染色)	试验所用培养条件	结果
致龋菌	链球菌属	变异链球菌(G ⁻)	TPY培养基兼性厌氧	-
		表兄链球菌(G ⁺)	TPY培养基兼性厌氧	-
		格氏链球菌(G ⁺)	BHI培养基兼性厌氧	+
		内氏放线菌(G ⁺)	BHI培养基专性厌氧	+
	放线菌属	黏性放线菌(G ⁺)	BHI培养基兼性厌氧	-
		溶牙放线菌(G ⁺)	BHI培养基兼性厌氧	+
	乳杆菌属	嗜酸乳杆菌(G ⁺)	BHI培养基兼性厌氧	+
		发酵乳杆菌(G ⁺)	BHI培养基兼性厌氧	-
致牙周和牙髓及根尖周疾病菌	卟啉单胞菌属	牙龈卟啉单胞菌(G ⁻)	BHI培养基专性厌氧	+
		牙龈卟啉单胞菌(G ⁻)	BHI培养基专性厌氧	+
	普雷沃菌属	中间普雷沃菌(G ⁻)	BHI培养基专性厌氧	+
		变黑普雷沃菌(G ⁻)	BHI培养基专性厌氧	+
		人体普雷沃菌(G ⁻)	BHI培养基专性厌氧	+
	梭杆菌属	具核梭杆菌(G ⁻)	BHI培养基专性厌氧	+
		可变梭杆菌(G ⁻)	BHI培养基专性厌氧	+
	消化链球菌属	微小消化链球菌(G ⁺)	BHI培养基专性厌氧	+

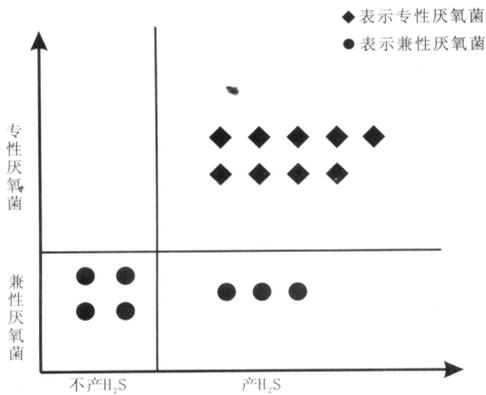


图 2 专性厌氧菌与兼性厌氧菌的区别示意图

Fig 2 Sketch map of difference between obligate anaerobes and facultative anaerobes

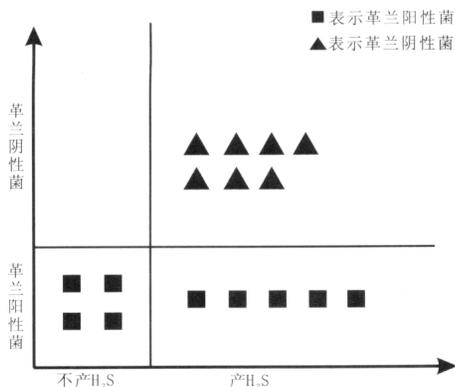


图 3 革兰阳性菌与革兰阴性菌的区别示意图

Fig 3 Sketch map of difference between Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria

3 讨论

3.1 口腔细菌与口臭的关系

本试验对口腔常见的 16 种细菌进行产硫化氢测定, 从试验结果和十字形坐标图中可以看出, 主要的产硫化氢细菌是革兰阴性厌氧菌。这些细菌主要为卟啉单胞菌属、普雷沃菌属和梭杆菌属等, 与牙周、牙髓和根尖周疾病有关。在培养过程中, 这些细菌都具有难闻的恶臭气味, 因此可以认为, 革兰阴性厌氧菌与口臭的关系更为密切。

林育华等^[10-11]亦发现, 口臭与牙周疾病高度相关。本研究在对已知的牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和具核梭杆菌等牙周致病菌的筛选发现, 这几种细菌都具有较强地产生硫化氢能力, 含有醋酸铅的试验组棉球都明显的深度变黑。其致病机制是, 以硫化氢为主要成分的挥发性硫化物能够增大黏膜的通透性, 从而引发炎症^[12]。本研究中的多种革兰阴性厌氧菌, 大多能产生胞壁脂多糖, 而脂多糖是牙髓、根尖周疾病的重要致病因子。周学东等^[13]认为, 牙髓卟啉单胞菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和具核梭杆菌等都是牙根管内的优势菌。本研究同样证实的口臭与牙周、牙髓和根尖周疾病密切相关的结论, 对于综合研究口腔疾病具有一定意义, 对于联合防治口臭具有重要的作用。

在本研究中，变异链球菌和表兄链球菌都不具有产硫化氢的能力；而溶牙放线菌和嗜酸乳杆菌等有产硫化氢的能力，但其能力远不如牙龈卟啉单胞菌等专性厌氧菌。这说明，龋病与口臭的关系相对而言不是很密切，但口臭并非由单一的细菌引起，而是与口腔多种疾病相关。要治疗口臭，就必须考虑口腔整体的微生态环境，考虑患者的具体情况，以便综合快速的治疗。

3.2 醋酸铅棉球检测硫化氢的试验方法

口腔细菌产硫化氢的检测有多种方法。传统的可使用醋酸铅平板法或硫酸亚铁平板法。这是一种间接、客观的检测方法，原理是利用某些细菌分解含硫氨基酸产生硫化氢，硫化氢再与培养基中的铅盐或是亚铁盐反应，产生黑色的硫化铅或硫化亚铁，从而在结果上显示硫化氢生成试验阳性^[9,14]。该方法所需时间较长，取决于试验细菌的培养周期，故对临床应用来说实用性不强，主要应用于科学研究。

目前在临床上，便携式硫化物监测仪 Halimeter 和便携式气相色谱口臭测量仪可快速检测口臭的程度。Halimeter 是以口腔气体中 VSC 的体积分数来表达口臭程度的。其核心元件是一块电化学半导体感应器，原理是利用感应膜与硫物质间可逆的氧化-还原反应改变半导体的电阻，从而将口腔气体中硫化物的体积分数以数值的形式表现出来^[15]，可为口臭的测评、治疗效果评价提供量化的指标。便携式气相色谱口臭测量仪在技术上使用金属膜-氧化铟感应器，结合气相色谱分离和半导体感应器检测技术，可定性定量检测 VSC 中的硫化氢、甲基硫醇等^[16]。与 Halimeter 一样，气相色谱口臭测量仪具有较高的特异性和准确性。上述两种检测方法均简便、快速，可满足现场检测等要求。

也有以醋酸铅试纸检测空气中硫化氢的方法，但以滤纸条代替棉球时会大大降低其敏感度。有些细菌产硫化氢的量不多，且硫化氢与醋酸铅在干燥环境中反应较慢，而棉球较滤纸条更易保持水分，因此，采用棉球较滤纸条更敏感、更准确。

由于口臭与口腔致口臭菌产硫化氢酶和相关基因有关^[6]，故要想在治疗口臭上有所突破甚至是治愈口臭，就必须从深层次上了解口臭的致病机制。从科学研究角度而言，以细菌培养法为基

础的醋酸铅棉球法对于后续试验的意义更大。

4 参考文献

- [1] Miyazaki H, Arao M, Okamura K, et al. Tentative classification for halitosis patients and its treatment needs[J]. Niigata Dental J, 1999, 29(1) :11-15.
- [2] Haraszthy VI, Zambon JJ, Sreenivasan PK, et al. Identification of oral bacterial species associated with halitosis [J]. J Am Dent Assoc, 2007, 138(8) :1113-1120.
- [3] 曹钟义, 危由春, 蒋泽先, 等. 口臭与口腔内、胃内幽门螺杆菌的关系及治疗探讨[J]. 江西医学院学报, 2003, 43(2) :100-101.
- [4] 沈子晶. 幽门螺杆菌感染与口臭的相关性探讨[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2003, 13(11) :638-639.
- [5] Porter SR, Scully C. Oral malodour(halitosis)[J]. BMJ, 2006, 333(7569) :632-635.
- [6] Nakano Y, Yoshimura M, Koga T. Correlation between oral malodor and periodontal bacteria[J]. Microbes Infect, 2002, 4(6) :679-683.
- [7] 胡 贇, 胡德渝, 郑雷蕾, 等. 口臭研究模型的建立及其对口腔致臭菌的确定[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(3) :226-229.
- [8] Washio J, Sato T, Koseki T, et al. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour[J]. J Med Microbiol, 2005, 54(Pt 9) :889-895.
- [9] Vazquez J, Pilch S, Williams MI, et al. Clinical efficacy of a triclosan/copolymer/NaF dentifrice and a commercially available breath-freshening dentifrice on hydrogen sulfide-forming bacteria[J]. Oral Dis, 2005, 11(Suppl 1) :64-66.
- [10] 林育华, 冯希平. 口臭与牙周病的关系[J]. 口腔材料器械杂志, 2008, 17(3) :139-140.
- [11] 刘 怡, 黄海云, 章锦才, 等. 牙周炎患者龈下菌斑与口臭相关性的研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(6) :466-470.
- [12] 卞金有. 预防口腔医学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2005 :166-169.
- [13] 周学东, 肖晓蓉. 口腔微生物学[M]. 成都:四川大学出版社, 2002 :250-257.
- [14] Williams MI, Vazquez J, Cummins D. Clinical comparison of a new manual toothbrush on the level of hydrogen-sulfide-forming bacteria on the tongue[J]. Compend Contin Educ Dent, 2004, 25(Suppl 2) :17-21.
- [15] 陈 曦, 林育华, 孙立洲, 等. 便携式气相色谱仪与感官法、硫化物检测仪检测口臭的相关性研究[J]. 上海口腔医学. 2008, 17(4) :372-375.
- [16] 倪 娜, 冯希平. 口腔中可挥发性含硫化化合物的检测系统[J]. 广东牙病防治, 2006, 14(3) :239-240.

(本文编辑 汤亚玲)