

肠道菌鉴定培养基的研究进展

王玉, 田军川, 燕秋

王玉, 齐齐哈尔医学院 黑龙江省齐齐哈尔市 161006
田军川, 大连开发区卫生监督所和疾病预防控制中心 辽宁省大连市 116600
燕秋, 大连医科大学生化教研室 辽宁省大连市 116044
中国博士后科学基金资助项目, No. 20100471453
作者贡献分布: 王玉主要查阅有关利用糖代谢、氨基酸代谢进行检验的资料; 田军川提供O/SIM培养基的资料; 燕秋主要指导。
通讯作者: 田军川, 116600, 辽宁省大连市, 大连开发区卫生监督所和疾病预防控制中心. tjcdzxx@163.com
收稿日期: 2010-12-22 修回日期: 2011-03-02
接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-04-18

Advances in development of biochemical culture media for identification of intestinal bacteria

Yu Wang, Jun-Chuan Tian, Qiu Yan

Yu Wang, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China
Jun-Chuan Tian, Dalian Development Area Center for Disease Prevention and Control, Dalian 116600, Liaoning Province, China
Qiu Yan, Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China
Supported by: the China Postdoctoral Science Foundation, No. 20100471453
Correspondence to: Jun-Chuan Tian, Dalian Development Area Center for Disease Prevention and Control, Dalian 116600, Liaoning Province, China. tjcdzxx@163.com
Received: 2010-12-22 Revised: 2011-03-02
Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-04-18

Abstract

Recently, great advances have been made in bacterial classification and identification; however, bacterial classification and identification still greatly depend on biochemical reactions in clinical setting. Identification of bacteria with all-in-one multi-use chromogenic media represents a new approach. It is easy to handle, has a high specificity, can improve the application of bacterial identification in clinical setting, and represents a promising tendency for bacterial identification.

Key Words: Chromogenic media; Intestinal bacterial identification; Classification

Wang Y, Tian JC, Yan Q. Advances in development of biochemical culture media for identification of intestinal bacteria.

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(11): 1165-1168

摘要

目前, 细菌学的分类和鉴定技术有了很大的发展, 但是, 临床上肠道菌鉴定主要还以生化反应为主。单管多用的显色培养基筛选微生物是一种较新的技术, 其操作简便、特异性强, 能提高微生物细菌鉴定在临床上的地位, 单管多用的显色培养基的开发、应用是今后的发展趋势。

关键词: 显色培养基; 肠道菌鉴定; 分类

王玉, 田军川, 燕秋. 肠道菌鉴定培养基的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(11): 1165-1168
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1165.asp>

0 引言

大肠菌群是评价食品卫生质量的重要指标之一, 快速检测及鉴定食品和污染物中的大肠杆菌是目前基层工作中的重点。随着社会发展, 病原微生物对人类的威胁越来越大。准确、快速、灵敏的快速检验方法是社会的迫切需要。大肠菌群不是细菌学上的分类命名, 而是根据卫生学方面的要求, 提出来的与粪便污染有关的一组细菌, 这些细菌在生化及血清学方面并非完全一致。是指一群需氧及兼性厌氧、在37℃能分解乳糖产酸产气的革兰氏阴性无芽孢杆菌。有些工作者又通过氨基酸代谢和糖分解等实验将这组细菌再分为大肠埃希氏菌、柠檬酸杆菌、产气克雷白氏菌和阴沟肠杆菌等。本文主要介绍肠道菌中重要的大肠杆菌的特性及鉴定方法。

1 大肠杆菌的特性

1.1 大肠杆菌的致病性 大肠杆菌是人和动物肠道内的正常菌群, 正常情况下, 他能合成B、K族维生素, 产生大肠菌素对人有利。但当机体抵抗力下降或当侵入肠外器官和组织时, 就会引起疾病。大肠杆菌能产生内毒素, 破坏机体的防御体

■背景资料

我国在一管多用培养基方面的研制还比较薄弱, 尚未开发出国产化的快速检测一管多用培养基, 食品、医药卫生行业所用的显色培养基基本上是国外产品, 因此开发出具有自主知识产权的一管多用培养基显色培养基具有重要意义。

■同行评议者

任晓峰, 教授, 东北农业大学动物医学学院微生物室

■研发前沿

显色培养基鉴定微生物是在生化反应的基础上开发的新技术,也是国内外研究的热点。

制;产生肠毒素等,能引起人类泌尿系统感染,还有胆囊炎、肺炎及新生儿腹泻和脑膜炎等疾病。

1.2 大肠杆菌的生物学特性 大肠杆菌在分类上属于肠杆菌属。为革兰氏阴性两端钝圆无芽孢杆菌(接近球形),长约2-3 μm ,宽0.6 μm ,单个排列或成对排列,大多数菌株周身有鞭毛、菌毛、荚膜。一般用悬滴法或半固体培养基穿刺接种观察其动力,细菌之间有明显的移位才能判断有运动性,在原地颤动为布朗氏运动。

2 大肠杆菌的鉴定

食品安全问题越来越受人们重视,与食品安全密切相关的食品污染,尤其是微生物造成的污染在自然界中处处可见。微生物检测已成为保障食品安全的重要举措。开发各种新型微生物快速检测技术,提高微生物检测的速率和质量,是有效预防和控制各种微生物感染。

随着分子生物学的发展,细菌鉴定的手段多种多样如PCR检测、ELISA检测和免疫荧光检测等^[1-3],其特异性和准确性较传统的鉴定方法有了较大的提高,但难以做到简便和价廉,不适合大多数基层医疗卫生单位的需要。目前我国实际情况是,在基层单位,细菌培养和生化实验仍是细菌鉴定过程中必不可少。肠道菌的种类和数量在分类上占很大的比例,也是和人类生活紧密相关的一类细菌,对他们进行鉴定区分是一项繁琐复杂的操作程序。为了缩短时间和简化操作程序,节省人力、物力确保临床诊断的快速、准确,肠道菌培养基得到了快速研发和应用。

显色培养基鉴定微生物是在生化反应的基础上开发的新技术,也是国内外研究的热点^[4]。其原理是将微生物胞内酶的种类及反应条件作为微生物分类鉴定的主要依据,通过在分离培养基中加入微生物特异酶的底物,该底物由发色基团和微生物可代谢物质组成,通常无色,但在特异性酶作用下游离出发色基团并显示一定颜色,直接观察菌落颜色即可对菌种作出鉴定,减少了对菌种进行纯培养和进一步生化鉴定的步骤^[5-7]。目前显色培养基主要应用在糖代谢、氨基酸代谢鉴定方面。

2.1 大肠杆菌糖代谢的鉴定

2.1.1 葡萄糖代谢类型鉴别实验: (1)原理:细菌在分解葡萄糖的过程中,必须有分子氧参加的,称为氧化型;能进行无氧降解的为发酵型;不分解葡萄糖的细菌为产碱型。发酵型细菌无论在

有氧或无氧环境中都能分解葡萄糖,而氧化型细菌在无氧环境中则不能分解葡萄糖。本实验又称氧化发酵(hugh-leifson, HL)实验,可用于区别细菌的代谢类型; (2)方法:挑取少许纯培养物(不要从选择性平板中挑取)接种2支HL培养管中,在其中一管加入高度至少为0.5 cm的无菌液体石蜡以隔绝空气(作为密封管),另一管不加(作为开放管)。置35 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱孵育48 h以上; (3)结果:两管培养基均不产酸(颜色不变)为阴性;两管都产酸(变黄)为发酵型;加液体石蜡管不产酸,不加液体石蜡管产酸为氧化型; (4)应用:主要用于肠杆菌科与其他非发酵菌的鉴别。肠杆菌科、弧菌科细菌为发酵型,非发酵菌为氧化型或产碱型。也可用于鉴别葡萄球菌(发酵型)与微球菌(氧化型)。

大肠杆菌能利用乳糖做碳源,将其分解为葡萄糖-丙酮酸-甲酸,使培养基的pH下降。乳糖发酵培养基加的指示剂不同,产酸后培养基的颜色也不同:培养基中加酸性复红变红,产酸后从无色变为红色。培养基中加溴麝香草酚蓝,产酸后从草绿色变为黄色。培养基中加溴甲酚紫,产酸后从紫色变为黄色。90%的大肠杆菌能分解乳糖产酸、产气10%的大肠杆菌能分解乳糖产酸、不产气^[8]。

目前开发的显色培养基常用酶底物有5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D葡萄糖苷酸、邻硝基酚- β -D葡萄糖苷酸,底物被Gud酶水解后使菌落呈现特殊的蓝色或黄色^[9]。大约96%-98%的大肠杆菌产生 β -D葡萄糖苷酸酶,绝大部分沙门氏菌、志贺氏菌和耶尔森氏菌不能产生Gud,因此利用Gud酶底物可以有效地检测大肠杆菌^[10,11]。

沙门氏菌是一类重要的食源性致病菌,其能水解乙二醇产酸,不能水解5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D半乳糖吡喃糖苷酸,在德国产的Rambach agar显色培养基上产生特殊的红色菌落^[4]。

对于从临床病例中分离产超广谱 β 内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamase, ESBL)的肠杆菌,法国产的ESBL-Bx培养基是一种具有敏感性和特殊性的显色培养基,其主要的优点在于显色的特点和他的敏感性和选择性,能在24 h内作出判断,减少了27%工作量^[12]。除了肠杆菌的分离,主要的非发酵革兰氏阴性菌如绿脓假单胞菌和嗜麦芽窄食单胞菌也被鉴定出,因为这些被分离的无色的菌落在ESBL-Bx培养基上不扩展生长,在混合的菌群中他们互不干扰。并且通

过菌落的形式或者快速的假设验证实验,这些分离的非发酵菌在显色培养基上很容易被认出.因此ESBL-Bx培养基是一种具有敏感性和特殊性的能做到快速检验的显色培养基.

2.1.2 注意事项: (1)平皿法的糖类试验在临床用得特别少,除了真菌同化试验推荐采用外,对于细菌的糖类分解试验一般不推荐采用,特别是以氧化形式利用糖类的非发酵菌及在氧气充足情况下以氧化分解为主的兼性厌氧菌,其氧化产物主要是CO₂在平皿上极易逸散,而导致假阴性;再则由于琼脂对于糖类产酸将会产生影响(有一定的缓冲作用和酸性物质扩散局限作用),这对于产酸较弱的细菌在微量反应单元中采用少量的软琼脂可令酸性物质在局部聚集而增加灵敏度,但过硬的琼脂含量又由于缓冲作用较大而降低灵敏度,平皿法的糖类实验培养基由于采用硬琼脂配方,灵敏度是较低的,通常只能用作粗略观察,精确的糖类分解实验应采用试管法(微量管或安培均可)或鉴定卡法; (2)对于血培养物不推荐直接用作生化反应,而应先传代后再进行.主要原因是由于血培养中细菌要受到来自抗生素和血液中抗体、补体、白细胞释放的如溶菌酶等物质的影响,生化反应极不典型,需要传代恢复后其结果才能准确; (3)至于传代的问题,主要是血培养和脓液培养的问题比较突出,其他标本就是用药以后的大便培养的问题.一般在不接触抗生素的情况下,传1-3代即可.例如金葡菌主要观察其色素和溶血特征恢复典型即可,而大肠杆菌则观察其菌落的大小和黏度-L型变异的大肠杆菌菌落较小,生长相对较慢,菌落较黏,对糖类的发酵能力也较弱.粪便中的沙门菌和志贺菌则观测他们的抗原的恢复情况,从不凝集或较弱转为典型凝集,即表示稳定-不同细菌有不同的办法,要具体分析.

2.2 大肠杆菌氨基酸代谢的鉴定

2.2.1 氨基酸脱羧酶实验: (1)赖氨酸脱羧酶实验:某些细菌能产生赖氨酸脱羧酶,可以将赖氨酸脱羧生成胺和二氧化碳,但是碱性更强,使培养基呈深紫色(溴甲酚紫指示剂).用来鉴别用于产气肠杆菌(阳性)与阴沟肠杆菌(阴性); (2)鸟氨酸脱羧酶实验:某些细菌产生鸟氨酸脱羧酶,将鸟氨酸脱羧生成腐胺和二氧化碳,腐胺为碱性物质可使培养基变碱培养基呈浅紫色(溴甲酚紫指示剂)酚红指示剂呈红色为阳性.黄色为阴性.用来鉴别鸟氨酸用于阴沟肠杆菌(阳性)和克雷伯菌(阴性).

2.2.2 硫化氢实验: (1)原理:某些细菌能分解含硫氨基酸生成硫化氢,与亚铁离子或铅离子结合形成黑色沉淀物; (2)方法:将待检菌接种于含硫化物及亚铁离子的培养基或克氏双糖铁琼脂中,35℃孵育18-24 h,观察有无黑色沉淀出现.或用醋酸铅纸条,悬挂于克氏双糖铁琼脂管中(白色滤纸,根据试管大小裁剪适当,在热的50 g/L醋酸铅饱和水溶液中浸泡,然后于50℃-60℃烘干,121℃ 15 min高压灭菌备用).醋酸铅是最敏感的方法; (3)结果:有黑色沉淀物为阳性; (4)应用:主要用于鉴别肠杆菌科细菌,如沙门菌属、枸橼酸杆菌属、变形杆菌属、爱德华菌属等为阳性,其他菌属大多为阴性.但沙门菌属中亦有部分硫化氢阴性菌株,如甲型副伤寒、仙台、猪霍乱沙门菌等.

2.2.3 吲哚实验(靛基质实验): (1)原理:某些细菌有色氨酸酶,能分解色氨酸产生吲哚,吲哚与对二甲氨基苯甲醛形成红色的玫瑰吲哚; (2)方法:将待检菌接种于富含色氨酸的蛋白胨水培养基中,35℃孵育24-48 h,加入靛基质试剂,观察结果; (3)结果:红色为阳性,无色为阴性; (4)应用:主要用于肠杆菌科细菌的鉴定,如大肠埃希菌与产气肠杆菌,肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌等的鉴别.

2.2.4 运动性:在半固体培养基上的生长情况:有鞭毛的细菌,由于能运动,在半固体培养基内沿穿刺线弥漫生长,原来的穿刺线变得不清楚.无鞭毛的细菌,因不能运动,接种后仍沿穿刺线生长,穿刺线与周围界限清楚.

2.2.5 OLSIM培养基: OLSIM培养基是我们课题组正在研制的国产的一管多用的显色培养基,通过酶的催化作用可将细菌的鸟氨酸脱羧酶(ornithine, O), 赖氨酸脱羧酶(lysine, L), 硫化氢(sulfide, S), 靛基质(indole, I), 运动性(motility, M)等5种生化反应在1支试管中同时表达,无相互间的干扰,便于1次接种培养后用肉眼即可清晰判定5项反应结果.

技术关键: (1)组分中的赖氨酸,需使用L-型的(盐酸盐); (2)培养基的最终pH不得高于6.4,因为分解赖氨酸是利用了某些细菌的适应酶,只有细菌在特异基质中的酸性环境生长才有可能进行生化反应; (3)判定赖氨酸脱羧酶产生实验后,方可加kovács试剂检查靛基质; (4)培养基中含有少量的琼脂,是半流动性的,出了便于观察运动性之外,主要目的是造成厌氧环境,有利于赖氨酸的脱羧; (5)双层培养基中加入“隔离

■应用要点

本文着重介绍大肠杆菌氨基酸代谢的检测,具有一定特色,对基层工作具有指导意义,为今后的一管多用显色培养基-OLSIM培养基的研发作铺垫,一管多用显色培养基的研发及应用是今后微生物检测的发展趋势.

■同行评价

本文为临床及实验室进行大肠菌群分离鉴定提供参考,但可读性一般。

剂”,排除同一支试管中的鸟氨酸、靛基质和赖氨酸脱羧酶实验结果的互相干扰。

3 结论

肠道菌鉴定培养基严重中存在的问题: (1)菌落是否典型; (2)假阳性率的高低; (3)特异性是否强; (4)灵敏度是否高。目前,我国在一管多用培养基方面的研制还比较薄弱,尚未开发出国产化的快速检测一管多用培养基,食品、医药卫生行业所用的显色培养基基本上是国外产品,因此开发出具有自主知识产权的一管多用培养基显色培养基-OLSIM培养基具有重要意义,其使用方便、高效灵敏及快速的特点使其具有广阔的市场前景和巨大的经济效益,将填补我国一管多用培养基的空白,推动细菌检验技术进步。

4 参考文献

- 1 Gomes AL, Silva AM, Cordeiro MT, Guimarães GF, Marques ET Jr, Abath FG. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. *J Virol Methods* 2007; 145: 76-79
- 2 van Doorn R, Klerks MM, van Gent-Pelzer MP, Speksnijder AG, Kowalchuk GA, Schoen CD. Accurate quantification of microorganisms in PCR-inhibiting environmental DNA extracts by a novel internal amplification control approach using Biotrove OpenArrays. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 7253-7260
- 3 He Q, Manopo I, Lu L, Leung BP, Chng HH, Ling AE, Chee LL, Chan SW, Ooi EE, Sin YL, Ang B, Kwang J. Novel immunofluorescence assay using recombinant nucleocapsid-spike fusion protein as antigen to detect antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 321-328
- 4 张淑红, 吴清平, 张菊梅, 郭伟鹏. 显色培养基在几种食源性致病菌快速检测中的应用. *微生物学通报* 2006; 33: 108-111
- 5 吴清平, 周艳红, 蔡芷荷. 卫生微生物特异性显色培养基的研究与应用. *中国卫生检验杂志* 2005; 15: 124-126
- 6 余晓峰, 徐慧群, 吴忠仁, 李力新, 郑海松. 从APLAC水平测试浅谈食品微生物检测的技术运用. *安徽卫生职业技术学院学报* 2003; 2: 74-75
- 7 卢汉兴, 车光, 王红, 李秀桂. 显色培养基在微生物检验初筛中的应用. *广西预防医学* 2001; 7: 74-75
- 8 卫生部. 《药品卫生检验方法》1984: 15-25
- 9 de Boer E. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. *Int J Food Microbiol* 1998; 45: 43-53
- 10 Brenner KP, Rankin CC, Roybal YR, Stelma GN, Jr, Scarpino PV, Dufour AP. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 3534-3544
- 11 Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol* 2000; 60: 205-218
- 12 Glupczynski Y, Berhin C, Bauraing C, Bogaerts P. Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 501-505

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG)被Science Citation Index Expanded (SCIE)和MEDLINE等国际重要检索系统收录,在国际上享有较高声誉和影响力。WJG在PubMed Central (PMC)统计,单月独立IP地址访问58 257次,全文网络版(HTML Full Text)下载94 888次,全文PDF下载59 694次。另外根据基本科学指标库(essential science indicators)统计,2000-01-01/2010-12-31, SCIE检索的临床医学(clinical medicine)期刊有1 105种,总被引频次排名, WJG位于第174名。(2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)