

# 从腹泻分离鉴定气单胞菌和邻单胞菌的实验室方法

徐迪诚

(哈尔滨市卫生防疫站)

蔡妙英

(中国科学院微生物研究所)

杨暑伏 郑秀英

(哈尔滨市卫生防疫站)

**摘要** 本文联系著者等近几年来时常从腹泻病人的粪便中检出嗜水气单胞菌和类志贺邻单胞菌的事实,介绍气单胞菌属和邻单胞菌属细菌的分布与分类学位置,提出在一个中小型的细菌学实验室,如何进行分离培养,按照它们的生化特性进行初步鉴定和最后鉴定的方法,指出了与近似细菌的鉴别要点和工作中应当注意的问题。

**关键词** 气单胞菌;邻单胞菌;弹性硬蛋白酶试验; O/129 敏感性试验

气单胞菌广泛分布在污水、池水及河底土壤。常从淡水鱼虾、青蛙及爬虫类等动物体内检出。此菌对于鱼、青蛙等冷血动物致病。对于人能引起败血症、腹膜炎、脑膜炎、心内膜炎、中耳炎、角膜溃疡及各种化脓性疾病。此菌可能由于病原性弱,除表现为创伤感染外,大多数呈隐性感染。六十年代初,国外有些学者提出此菌可以引起腹泻。随着对肠毒素研究的逐步深入,从腹泻检出此菌的报道日益增多。印度、泰国等地由此菌引起的肠炎比较多。深谷<sup>[1]</sup>、Burk<sup>[2]</sup> 等认为,它是引起肠炎的一类病原菌。但有些学者主张,是由于肠毒素和溶血素的活性造成的。

类志贺邻单胞菌也是广泛分布在淡水环境中的细菌。常从河水及淡水鱼体检出<sup>[3]</sup>。此菌也可以引起人的腹泻,尤其霍乱多发地区的腹泻检出率较高,多数与引起肠炎的弧菌及志贺氏菌混合感染。国外尚有引起集体食物中毒的报道<sup>[4,5]</sup>。

1983年以来,我们从哈尔滨市的腹泻病人多次检出这两种细菌。本文概述其分离鉴定的实验室方法。

## (一) 气单胞菌和邻单胞菌的分类

1. 气单胞菌属 (*Aeromonas*): 归弧菌科的一个属。大小为  $0.6 \times 1-2 \mu\text{m}$  的革兰氏阴性杆菌,也有短杆状。氧化酶阳性。兼性厌氧。发酵分解葡萄糖产酸或产酸产气。以单极毛运

动,也有无鞭毛不运动的种。在无盐陈水中能生长。DNA 的 G+C 为 57—63% 克分子。按 Popoff 的方法分类<sup>[6-8]</sup>,在 Bergey 氏手册(九版)中包括两个独立的群、四个种<sup>[9]</sup>: 第一群为嗜冷、无动力的气单胞菌——杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*),含三个亚种,即杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 (*A. salmonicida* subsp *salmonicida*)、杀鲑气单胞菌无色亚种 (*A. salmonicida* subsp *achromogenes*) 和杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 (*A. salmonicida* subsp *masoucida*); 第二群由嗜中温、有动力的三个种组成,即嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)、豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*) 和温和气单胞菌 (*A. sobria*)。

常从腹泻分离到的嗜水气单胞菌和温和气单胞菌,其鉴别特征见表 1。

表 1 从腹泻分离的两种气单胞菌的鉴别特征

鉴别项目	嗜水气单胞菌	温和气单胞菌
七叶灵水解	+(100)	-(19)
KCN 生长	+(98)	-(19)
水杨素产酸	+(86)	-(19)
葡萄糖产气	+(92)	-(14)
V-P 反应	+(92)*	-(3)**
弹性硬蛋白酶	+(92)	-(0)
		+(88)
		d(58)
		-(12)

\* 原称嗜水气单胞菌嗜水亚种; \*\* 原称嗜水气单胞菌无色亚种; “d” 因菌株而异。

由于杀鲑气单胞菌具有:无动力,有的产生水溶性褐色素,在 37℃ 肉汤中不生长,不需要

某些氨基酸(精氨酸、组氨酸、天门冬酰胺和谷氨酸)等特性,而不同于其它的种。有的学者建议归为杀蛙坏死单胞菌 (*Necromonas salmonicida*)<sup>[10]</sup>。

气单胞菌属与肠杆菌科的菌种是以氧化酶阳性和极生鞭毛等特征来区分。与弧菌属可以 O/129 敏感性和鸟氨酸脱羧酶阴性等特征来区分。与邻单胞菌属是以极毛和淀粉酶阳性等特征来区分。

2. 邻单胞菌属 (*Plesiomonas*): 与气单胞菌及弧菌很相似。氧化酶阳性, 革兰氏阴性兼性厌氧杆菌, 单杆或成对。 丛极毛 (一般 2—7 根), 有动力, 无淀粉酶、DNA 酶及各类蛋白酶, 发酵肌醇。 DNA 的 G+C 为 51% 克分子。属内仅有类志贺邻单胞菌 (*P. shigelloides*) 一个种<sup>[9]</sup>。过去曾称为 *C<sub>2</sub>*、类志贺气单胞菌 (*A. shigelloides*)、类志贺弧菌 (*V. shigelloides*)、密执安假单胞菌 (*Pseudomonas michigan*) 与类志贺弗格森氏菌 (*Fergusonia shigelloides*) 者, 后来发现在 DNA 的 G+C 含量及赖氨酸、甘露醇与肌醇等特性上, 均不同于气单胞菌, 而另设邻单胞菌属。一部分类志贺邻单胞菌具有志贺氏菌抗原, 与鲍氏或宋内氏志贺氏菌诊断血清发生凝集。

气单胞菌属和邻单胞菌属菌种的生化特性见表 2。

(二) 实验室检查方法<sup>[9-11]</sup>

采到粪便应立即接种。若需要长时间保存粪便, 可使用 1% 氯化钠甘油保存液或 Cary 与 Blair 运送培养基。检查程序是:

1. 分离培养: 急性期病人的粪便, 直接接种在麦康开琼脂平板及 SS 琼脂平板上, 多数菌落为无色、半透明, 类似志贺氏菌和沙门氏菌(迟缓分解乳糖)。但 24 小时以后, 在 SS 琼脂平板上生长的菌落较小。

使用选择性培养基 XDCA (木糖-去氧胆酸盐-柠檬酸盐琼脂) 分离培养气单胞菌; IBG (肌醇-亮绿-胆盐培养基) 分离培养类志贺邻单胞菌, 容易挑选菌落。

2. 初步鉴定: 挑取麦康开及 SS 琼脂平板

表 2 气单胞菌属和邻单胞菌属菌种的生化特性

试验项目	嗜水气单胞菌	豚鼠气单胞菌	温和气单胞菌	类志贺邻单胞菌
氧化酶	+	+	+	+
氨基酸	+	+	+	+
M-R	+	+	+	+
V-P	+	—	d	—
H <sub>2</sub> S(TSI)	—	—	—	—
柠檬酸盐(西蒙氏)	d	d	d	—
赖氨酸	—*	—*	—*	+
鸟氨酸	—	—	—	d
精氨酸	d	d	d	+
尿素酶	—	—	—	—
苯丙氨酸脱氨酶	—	—	—	—
丙二酸盐	—	—	—	—
明胶酶	+	+	+	—
KCN 生长	+	+	—	—
硝酸盐还原	+	+	+	+
葡萄糖产气	+	—	+	—
β-半乳糖苷酶	+	+	+	+
碳水化合物产酸:				
葡萄糖	+	+	+	+
乳糖	d	d	d	(+)
蔗糖	+	+	+	—
甘露醇	+	+	+	—
肌醇	—	—	—	+
阿拉伯糖	d	d	d	—
水杨素	+	+	—	d
七叶灵水解酶	+	+	—	—
弹性硬蛋白酶	+	—	—	—
DNA 酶	+	+	+	—
0%NaCl 生长	+	+	+	+
6%NaCl 生长	—	—	—	—
O/129 敏感性 (150μg)	+	—	—	+
动力	+	+	+	+

注: “+”阳性; “—”阴性; “(+)”迟缓阳性; “d”因菌株而异; “\*”一部分例外; “.”未检查。

在 37℃ 培养 18—24 小时的疑似菌落, 接种 TSI 琼脂、LIM 培养基及普通琼脂斜面。参照表 3 作初步鉴定。

检查氧化酶不能用 TSI 琼脂斜面的培养物。因为细菌分解糖以后培养基呈酸性, 易出现假阴性。必须使用普通琼脂斜面的培养物进行检查。

3. 进一步鉴定: 在 TSI 琼脂上分解葡萄糖, 氧化酶阳性的纯培养物, 可疑为气单胞菌属、邻单胞菌属及弧菌属, 进一步检查生化性

表3 气单胞菌属与类志贺邻单胞菌的初步鉴定

项 目	气单胞菌属*	类志贺邻单胞菌
TSI 琼脂		
斜面	黄(红)	红
高层	黄	黄
气体	+-	-
H <sub>2</sub> S	-	-
LIM 培养基		
赖氨酸	-**	+
胍基质	+- (少见)	+
动力	+	+
普通琼脂斜面		
氧化酶	+	+

\* 有动力的气单胞菌; \*\*一部分例外。

状。疑为类志贺邻单胞菌时,检查甘露醇、肌醇、V-P、精氨酸及鸟氨酸;疑为气单胞菌属时,补充检查七叶灵、水杨素及弹性硬蛋白酶,做出种的鉴定。

4. 最后鉴定:气单胞菌根据七叶灵、弹性硬蛋白酶\*、V-P、水杨素及葡萄糖产气综合判定到种。必要时,可做 KCN 生长或葡萄糖酸盐氧化试验。类志贺邻单胞菌根据 TSI 琼脂与

表4 气单胞菌属和邻单胞菌属的主要鉴别特征

项目	嗜水气单胞菌	温和气单胞菌	豚鼠气单胞菌	类志贺邻单胞菌	霍乱弧菌
TSI 琼脂					
斜面	黄(红)	黄(红)	黄(红)	红	黄
高层	黄	黄	黄	黄	黄
气体	+	+	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
LIM 培养基					
赖氨酸	-*	-*	-*	+	+
胍基质	d	d	d	+	+
动力	+	+	+	+	+
普通琼脂					
细胞色素氧化酶	+	+	+	+	+
水杨素	+	-	+	d	-
肌醇	-	-	-	+	-
甘露醇	+	+	+	-	+
V-P	+	d	-	-	d
七叶灵	+	-	+	+	-
弹性硬蛋白酶	+	-	-	.	.
鸟氨酸	-	-	-	d	+
精氨酸	d	d	d	+	-

注:“+”阳性;“-”阴性;“d”因菌株而异;“-”一部分例外;“.”未检查。

LIM 培养基的性状,氧化酶、甘露醇、肌醇、精氨酸、鸟氨酸及 V-P 等试验结果鉴定到种。

气单胞菌与弧菌两个属极为相似,用赖氨酸及鸟氨酸不能鉴别时,应当检查菌株对 O/129 (150μg) 的敏感性\*\*。前者抵抗,后者敏感(表4)。

## 小 结

近年来,我们多次从哈尔滨市散发的腹泻病人中分离到气单胞菌和类志贺邻单胞菌,说明存在对人的感染。这两种细菌,许多国家已证实为腹泻及食物中毒的病原菌。希望我国的医疗预防机构的微生物实验室,也能开展这两种细菌的分布、分类和致病性等方面的调查研究工作。

## 参 考 文 献

- [1] 深谷一太·他:日本传染病会志,36: 8,1962。
- [2] Burke, V. et al.: J. infect, 148: 68,1983。
- [3] Arai, T. et al.: J. Hyg., 84: 203, 1980。
- [4] Tsukamoto, T. et al.: J. Hyg., 80: 275, 1978。
- [5] 堀道纪·他:日本传染病会志,39: 433,1966。
- [6] Schubert, R. H. W.: Int. J. Syst. Bacteriol., 17: 23, 1967。
- [7] 同上,17: 273,1967。
- [8] 同上,18: 1,1969。
- [9] Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 550, 1984。
- [10] 小栗丰子·他: Medical Technology, 10 (3): 268, 1982。
- [11] 伊藤武·他: 临床检查,27: 602,1983。

\* 弹性硬蛋白酶试验方法:用菌株的普通肉汤 37℃18—24 小时培养物浸泡抗生素药敏试验用小纸片,然后将其贴在 Sbarra 平板培养基表面。37℃ 培养 2—7 天。小纸片周围出现透明带者为阳性。Sbarra 培养基(g):甲液, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10、蒸馏水 100 ml;乙液, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4、NaCl 0.2、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.2、蒸馏水 100ml;丙液,弹性硬蛋白 10、蒸馏水 100ml。取甲液 0.5ml,乙液 0.5ml,丙液 10ml,琼脂 1.5g,与 100ml 蒸馏水混合。100℃10 分钟间歇灭菌,倒平板。

\*\* O/129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropyl pteridine) 敏感性试验方法:将 7,500μg O/129 的磷酸盐溶于 1ml 蒸馏水中,分注于每张药敏试验用小纸片各含 20μl,然后放解箱干燥。将菌株接种到一般药敏试验用平板培养基,贴上小纸片。37℃ 培养 18—24 小时以后判定结果。