

氧化-发酵试验的高倒管法——休-利夫森氏法的改良

马俊春 晏碧君* 马予行

(上海卫生职工学院微生物学教研组)

用于测定细菌对糖代谢的氧化-发酵试验已日益引起重视。国内外一直沿用休-利夫森(Hugh-Leifson)二氏的氧化发酵试验法^[1-4](以下简称 H-L)。即接种两支含低蛋白胨(0.2%)的 H-L 培养基,1 支用石蜡加封观察发酵反应,1 支不加封代表氧化反应。作者等应用于非发酵菌的研究中^[5],常发现封闭管近石蜡处液体变酸而难于判断。故尝试于液体培养基中放入小倒管以代替封闭管,并经实验取得小倒管规格 40mm × 4mm 为最佳方案。已在实际工作中使用千余次,认为完全可以代替休-利夫森二氏的原法用于鉴定革兰氏阴性杆菌对糖类的氧化-发酵作用。改良法的结果观察比较稳定,将发酵管和氧化管合为一管,节省了时间和培养基,特别避免了用石蜡封闭造成的清洗麻烦,为革兰氏阴性杆菌的鉴定提供了方便。

材料与方 法

(一) 培养基

1. 对照管用 H-L 法 O-F 试验的半固体培养基(H-L 培养基)按原法配制并加入 1% 葡萄糖,分装后分别以液体石蜡和固体石蜡加封及不加封三管对照。

2. 高倒管法 O-F 试验培养基除不加琼脂外余均按原方配制。分装于: ① 含有内径为 4mm, 长度分别为 20、30、40mm 倒管的 13 × 100mm 试管中。② 含有长度为 40mm, 内径分别为 2.5mm, 3mm, 4mm, 5mm 倒管的试管。8 磅 15 分钟灭菌待用。

* 上海第一医学院华山医院检验科。

(二) 试验菌株均来自临床标本中分离

1. 非发酵菌 37 株: 包括铜绿色假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 20 株; 无硝不动杆菌 (*Acinetobacter anitratum*) 10 株, 粪产硷杆菌 (*Alcaligenes faecalis*) 7 株。

2. 发酵菌 10 株: 包括大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 2 株, 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 枸橼酸杆菌 (*Citrobacter freundii*), 阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*), 产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*), 奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*), 亚利桑那沙门氏菌 (*Salmonella arizona*) 和哈夫尼亚菌 (*Hafnia alvei*) 各 1 株。

(三) 方法

以上菌株分别接种于固体石蜡加封、液体石蜡加封及不加封的三支 H-L 培养基及含有不同长度和口径倒管的 H-L 培养基。35℃ 培养, 记录 24 小时及 48 小时的结果。

结果与讨论

(一) 倒管长度的比较: 氧化葡萄糖的硝酸盐阴性杆菌 10 株在含有内径为 4mm, 长度分别为 20, 30, 40mm 三种倒管的 H-L 培养基中培养 24 小时和 48 小时, 可以看出长度低于 30mm 倒管。在 24 小时后, 10 株硝酸盐阴性杆菌有 4 株倒管外的氧化产酸已影响到倒管内变酸。48 小时后则所有菌株都在倒管内外同时变酸。而 30mm 和 40mm 两种长度的倒管培养 48 小时后倒管内仍保持不变, 没有发现可疑或假阳性反应。通常用于糖发酵试验的倒管长度为 25mm, 故不适用于本试验, 以 40mm 长度倒管为妥。

(二) 倒管内径的比较: 各种试验菌株分别接种于含有长度为 40mm, 内径分别为 2.5、3、4、5mm 倒管的 H-L 培养基, 经 24 小时及 48 小

表 1 O-F 试验高倒管法倒管内径的比较

测定菌	倒管长度 (mm)	倒 管 内 产 酸 反 应							
		24 小时				48 小时			
		5	4	3	2.5	5	4	3	2.5
绿脓杆菌 20 株		0*	0	0	0	0	0	0	3
硝酸盐阴性杆菌 10 株		0	0	0	0	0	0	0	0
产硷杆菌 7 株		0	0	0	0	0	0	2	7
肠杆菌科 10 株		10	10	10	10	10	10	10	10

表中 0 示倒管内不产酸; 数字示倒管内产酸的菌株数。

表 2 高倒管法与 Hugh-Leifson 原法的比较

菌 名	试验菌株数	Hugh-Leifson 原法				高 倒 管 法			
		24 小时产酸		48 小时产酸		24 小时产酸		48 小时产酸	
		0*	F	0	F	0*	F	0	F
绿脓杆菌	20	19	0 (11)	20	0 (18)	15	0	20	0
硝酸盐阴性杆菌	10	10	0 (10)	10	8 (2)	10	0	10	0
粪产硷杆菌	7	0	0	0	0 (7)	0	0	0	0
肠杆菌科	10	10	10	10	10	10	10	10	10

注 * H-L 原法中 0 表示开放管, F 管表示发酵管。

▲ 高倒管法中 0 代表倒管外氧化反应, F 管表示倒管内发酵反应。

() 其中数字代表反应可疑的菌株数。

时培养结果如表 1, 说明不同倒管口径对倒管内反应有影响。培养 24 小时, 除肠杆菌科外, 其余 37 株非发酵菌四种不同口径倒管内均不现酸性反应。48 小时后绿脓杆菌及硝酸盐阴性杆菌在 3mm 口径以下的倒管内部分出现酸性反应, 4mm 口径以上倒管仍不变, 故以 4mm 内径倒管为宜。

(三) 高倒管法与 H-L 氏原法比较: 综上所述, 以内径为 4mm, 长度为 40mm 的高倒管法与 H-L 原法进行比较, 结果见表 2。改良法倒管外的液体与原法开放管相似。其氧化反应应该一致。表 2 中绿脓杆菌 20 株中有 4 株比原法推迟氧化产酸, 是由于加有倒管的培养基因液面低于倒管而减少接触空气所致, 因此分装时液面应高于倒管(图 1)。

用液体石蜡封闭的发酵管不能正确反映非发酵菌对糖类不发酵情况。培养 24 小时后, 绿脓杆菌有 55%(11/20) 菌株显示可疑反应。48 小时后增至 90%(18/20)。其他菌株也出现类似现象(表 2) 使判断发生困难。

但改良法的高倒管内 24 小时后, 除肠杆菌科外其余非发酵菌都不产酸。可清楚看到倒管内仍保持绿色。48 小时后虽有个别倒管下端开口处变黄, 但并不影响结果判断。用固体石蜡封闭管虽比液体石蜡为优, 但仍有制备麻烦, 清洗困难等缺点。

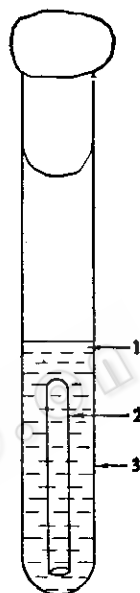


图 1 O-F 试验高倒管法

1. O-F 培养基液面高于倒管 5mm,
2. 4×40mm 高倒管, 3. 13×100 mm 试管

参 考 文 献

- [1] Hugh, R. and E. Leifson: *J. Bacteriol.*, **66**: **24**, 1953.
- [2] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 1978 年, 第 139—141 页。
- [3] Washington, J. A.: *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*, pp. 218—220, Springer-Verlag, Berlin, 1981.
- [4] Fingold, S. M. and W. J. Martin: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 2ed 6, pp. 249—250, C. V. Mosby Company, 1982.
- [5] 马子行等: 中华医学检验杂志, **6**(3): 173—176, 1983.