

# 氰化钾四唑盐半固体培养基

潘 天 太

(河南省信阳肉类联合加工厂)

氰化钾抑制试验是鉴定肠杆菌科的重要生化试验之一<sup>[1]</sup>。氰化钾的抗性试验主要用于鉴别弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 和亚利桑那菌 (*Arizona*)。肠杆菌科中对氰化钾有抗性的其它细菌可用尿素酶、V-P、吲哚等生化试验加以鉴别。Kauffman 等推荐,对在 24 小时内不发酵乳糖的肠杆菌科细菌的鉴别可使用 KCN 试验,当细菌在三糖铁或 K 氏双糖铁琼脂上呈典型反应时,亚利桑那菌、沙门氏菌与弗氏柠檬酸杆菌的鉴别,可用

他们推荐的做赖氨酸脱羧酶和 KCN 试验来正确地检出。Edwards 等发现,除少数菌例外,典型的沙门氏菌在 KCN 中均不生长,而柠檬酸杆菌在 24 小时内能旺盛地生长<sup>[2]</sup>。

氰化钾抑制试验是世界卫生组织 (WHO) 沙门氏菌调查研究中心鉴别沙门氏菌五个亚属的重要生化项目,除亚属 IV, V 外,典型的沙门氏菌均为阴性<sup>[3]</sup>。在我国和许多国家也将此试验作为鉴别沙门氏菌属的重要试验之一<sup>[4]</sup>。但由于该培养基没有生长指示剂,结果不易判定,

接种前后密封不严以致 KCN 分解,浓度降低,常造成假阳性的结果。使用时稍有不慎或接种量稍大也常引起错误的判断,而且不易保存(一般 4℃ 下,不超过两周)。故在许多商品的肠杆菌科快速生化鉴定系统中都没采用 KCN 试验<sup>[5]</sup>。

Kelly 等在半固体培养基中加入 0.005% 的四唑盐 (TTC),有助于结果的判定,减少误差,勿需与未接种的培养基比较。四唑盐是无色的可溶性化合物,当细菌生长时,TTC 进入菌体细胞内,在酶催化作用的部位被还原,释放出溶解的红色色素甲臍,故红色仅在细菌生长的培养基区域形成。

KCN 试验敏感的细菌在 0.001M 浓度的氰化钾溶液中受到抑制,导致细菌细胞电子传递的阻断和细菌呼吸的停止,形成不了红色的甲臍化合物。

我们用鉴定过的 463 株肠杆菌科细菌(地方菌株)接种于 KCN-TTC 半固体培养基上,

37℃ 孵育 48 小时,结果如下: KCN 试验阴性的典型的 *Salmonella*、*Escherichia*、*Shigella*、*Yersinia*、*enterocolitica* 在 KCN-TTC 中,生长受到抑制,而 KCN 阳性菌 *Enterobacter cloacae*、*Citrobacter*、*Serratia*、*proteus* 等一般可生长并产生红色甲臍化合物。

KCN-TTC 比 KCN 肉汤 (Edwards 氏)或硝酸盐-KCN 肉汤更利于结果的观察和正确的判定,且不受接种量大小的影响。我们将该培养基在 4℃ 下保存 40 天后,对 KCN 阴性的细菌仍有良好的抑制作用。

KCN-TTC 半固体培养基的配方:基础肉汤 (pH7.6): 多价蛋白胨或 3<sup>#</sup> 胨 3g,氯化钠 5g,磷酸二氢钾(无水) 0.225g,磷酸氢二钠 (2H<sub>2</sub>O) 5.64g,蒸馏水 1000ml。在 1 升基础肉汤中加琼脂 2.2g(不同牌号略有增减),121℃ 高压灭菌 15 分钟,冷至 50℃ 时加用冷水重新配制的 0.5% KCN 溶液 15ml,加 TTC (10% 溶液) 5.5ml,使氰化钾的最终浓度为 1:13300。

表 1 463 株肠杆菌科细菌 KCN-TTC 试验结果

菌 属 名 称	菌 株 数	KCN+	KCN-	文献资料 <sup>[2]</sup>		
				符号	%+	(%+)*
<i>Salmonella</i> 沙门氏菌	149	0	149	-	0.3	(0.3)
<i>Escherichia</i> 又希氏菌属	171	0	171	-	2.4	
<i>Y. enterocolitica</i> 小肠结肠炎耶尔森氏菌	6	0	6			
<i>Enterobacter cloacae</i> 阴沟肠杆菌	28	25	3	+	98	
<i>Serratia</i> 沙雷氏菌属	10	10	0	+	99.1	
<i>Citrobacter</i> 柠檬酸杆菌属	44	41	3	+	96.2	(0.9)
<i>Proteus</i> 变形杆菌属	19	18	1	+	98.2	
<i>Shigella</i> 志贺氏菌属	4	0	4	-	0	
<i>Klebsiella</i> 克雷伯氏菌属	2	2	0	+	97.9	
<i>Providencia</i> 普罗菲登斯菌属	30	28	2	+	98.7	

\* 括弧中数字表示迟缓反应 (3 天以上)

混匀后分装无菌试管立即加灭菌液体石蜡盖封,以利存放。

使用时用接种针取 18—24 小时的斜面培养物,从中央穿刺试管琼脂的 3/4,要接种足够量的接种物使肉眼可见接种物痕迹。37℃ 培养 48 小时。KCN 阳性试验:细菌生长伴有指示剂还原,沿中心穿刺线产生红色。阴性试验:细菌不生长、没有红色和沉淀物。而未加 KCN 的 TTC 半固体对照管(可做动力观察)细菌生长伴有红色沉淀物。

KCN 有剧毒应妥善保存,使用时格外小心,所有 KCN 试管,不管用过与否,高压灭菌前必须加入结晶硫酸亚铁和 40% KOH 0.1ml 破

坏其毒性,以免中毒和污染环境。

### 参 考 文 献

- [1] Kauffmann F: Bacteriol of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen, 1966.
- [2] P·R 爱德华和 W·H 爱文著(郝士海等译): 肠杆菌科的鉴定,上海科技出版社,上海, p 23—45, 1964。
- [3] WHO Collaborating Centre for reference Research on Salmonella: Distinguishing characters of the Sub-genera of Salmonella, 1980.
- [4] 中华人民共和国卫生部: 食品卫生检验方法〈微生物学部分〉,技术标准出版社,北京, p 8—17, 1976。
- [5] D. Amato: Tests included in Various Systems for the identification of Enterobacteriaceae System, Table I. 1981.