

微生物鉴定中常用的生理生化实验

王元红 (山东鲁抗医药股份有限公司, 山东 济宁 272000)

摘要: 微生物生理生化鉴定是微生物鉴定和分类的常规方法, 其目的是为了了解细菌生理生化反应原理以及在细菌鉴定中的重要作用, 以此掌握其基本的鉴别不同细菌的方法。现阶段, 微生物鉴定中常用的生理生化实验多采用微生物微量发酵管开展实验内容。本文通过对微生物鉴定中常用的生理生化实验的方法及原理、操作步骤进行阐述, 并分析微生物原有生理生化鉴定方法及优点, 提出实验改进的方法。

关键词: 微生物; 生理生化; 鉴定方法

1 微生物种类鉴定的方法及原理

微生物种类繁多, 不同的微生物中存在的酶系统各不相同, 除此之外, 不同的微生物, 在其代谢类型上也存在较大的差异, 主要表现为三方面的不同, 其一是大分子糖类的分解能力, 其二是蛋白质的分解能力, 其三是分解代谢的最终产物, 这几类的差异性可以反映出不同的微生物的酶系以及生理特征的不同, 差异性所呈现出来的特征可以被作用为细菌鉴定和分类的内容。

其中。大分子物质包括: 淀粉、蛋白质和脂肪等类别。胞外酶主要为水解酶, 其原理主要是借助加水的方法, 将裂解大分子物质裂解为较小化合物, 最终将胞外酶的分解的物质再运输到细胞内。较为常见的例子有: 淀粉酶水解淀粉为小分子的糊精、双糖和单糖。而脂肪酶通过水解之后, 将脂肪分解为甘油和脂肪酸, 蛋白酶水解之后, 将蛋白酶分解为蛋白质, 上述此类的实验, 微生物鉴定中常用的生理生化实验反应, 这类方法对肠道细菌的鉴定尤为有效。

其实, 绝大多数的细菌在进行分解时都可以通过糖类作为碳源进行分解, 但是不同的细菌在分解糖类物质时的能力千差万别, 有些细菌在分解糖类物质时, 能够产生有机酸和气体, 而有些细菌在分解糖类物质时只能产生有机酸, 不能产生气体。通过对不同的细菌酶进行分解实验, 看其反应, 可以鉴别不同的微生物种类。^[1]

2 微生物鉴定中常用的生理生化实验内容

对微生物进行生理生化实验的目的是为了能够对不同的微生物种类及进行区分, 鉴定微生物的不同。在实验中包括的材料有三大类。其一是菌种, 其二是试剂, 其三是仪器和其他的用品。

菌种包括: 枯草芽孢杆菌干、大肠杆菌、产气肠杆菌、普通变形杆菌、铜绿假单胞菌以及金黄色葡萄球菌。所采用的试剂包括: 固体油脂培养基三个、固体淀粉培养基两个、葡萄糖发酵培养基试管三支、乳糖培养基试管三支、蛋白胶水培养基、葡萄糖蛋白胶水培养基、革兰氏染色卢戈氏碘液、甲基红指示剂、乙醚、吡啶试剂等等。所使用的仪器及其其他的用品包括: 无菌平皿、无菌试管、接种环、试管架等等。

针对不同的微生物鉴定中的生理生化实验所采用的方法也有诸多的不同。以大分子水解实验为例, 因所有

的生活细胞都存在代谢的特征和功能, 而在代谢的过程中主要是由酶促进反应的过程, 而酶分为胞内酶和胞外酶, 不同的酶系统可以利用生理生化实验进行鉴定的细菌种类也是不同的。大分子水解实验是微生物鉴定中最常见的生理生化实验。

其实验的步骤为: 首先, 对淀粉水解进行实验。第一步是: 配置固体淀粉培养基, 先将温度价高到 121 度, 并对淀粉进行高温蒸汽灭菌, 时间为 20min, 之后降高温, 将培养基进行冷却, 温度到达 50 度时, 进行无菌操作, 并制成平板。第二步是: 对制成的平板进行标记, 分别在平板的地步标记成 1、2、3、4、第三步是: 进行无菌操作, 将枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和普通变形杆菌进行点种, 并设置在不同的区域内, 对每一个点种进行签纸, 并在贴标上著名不同的区域所对应接种的菌种。第四步是: 将平板倒置, 并且在 37 度的温箱中培养 1-2 天。第五步是: 实验者观察所点种的细菌的生长情况, 根据情况打开平板盖子, 并在其中滴入少量的卢戈氏碘液, 将卢戈氏碘液通过旋转平板的方式, 将其均匀的铺平在这个平板当中。

需要注意的是, 如果在实验的过程中, 菌苔周围如果出现了无色透明圈, 这也意味着淀粉已经被水解, 而且其结果为阳性。我们可以通过透明圈的大小对细菌水解淀粉能力进行初步的判定, 从中可以获知产生胞外淀粉酶活力究竟如何。

其次, 对油脂水解进行实验。第一步是: 配置固体油脂培养基, 先将温度价高到 121 度, 并对油脂进行高温蒸汽灭菌, 时间为 20min, 之后降高温, 将培养基进行冷却, 温度到达 50 度时, 进行无菌操作, 并制成平板。第二步是: 对制成的平板进行标记, 分别在平板的地步标记成 1、2、3、4。第三步是: 进行无菌操作, 将枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和普通变形杆菌进行十字接种, 并设置在不同的区域内, 对每一个点种进行签纸, 并在贴标上著名不同的区域所对应接种的菌种。第四步是: 将平板倒置, 并且在 37 度的温箱中培养 1-2 天。第五步是: 实验者观察所接种的菌苔颜色。需要注意的是, 如果在实验的过程中, 菌苔出现红色斑点, 这也意味着脂肪已经被水解, 而且其结果为阳性。

除了大分子水解实验外,糖发酵实验也是微生物鉴定中常用的生理生化实验。糖发酵实验对于肠道细菌的鉴定尤为的重要,其实验步骤共计五步。

第一步是:采用标签纸在个试管外壁上分别表明所发酵培养基的名字以及所要接种的细菌的名称。第二步是:将葡萄糖发酵培养基试管五支分别接入到两支大肠杆菌、两支普通变形杆菌中,第五支葡萄糖发酵培养基试管不接种,其目的是为了对实验结果进行对照。除此之外,再将五支乳糖发酵培养基分别接入到两支大肠杆菌、两支普通变形杆菌中,第五支葡萄糖发酵培养基试管不接种,其目的是为了对实验结果进行对照。第三步是:将所有的试管放置在 37 度的温箱中培养 1-2 天。第四步是:观察各个试管的颜色变化以及德汉式小管有无气泡。

第三个微生物鉴定中常用的生理生化实验是 IMCIC 试验,该实验分为两个,其一是吡啶实验,其二是甲基红实验。吡啶实验主要是为了检测吡啶的产生,不同的细菌所产生的酶各不相同,部分细菌可以产生氨基酸酶,在分解成蛋白胨中色氨酸,然后再产生吡啶和丙酮酸。吡啶与二甲基氨基苯甲醛进行结合,于是形成了红色玫瑰吡啶。但不同的微生物在分解色氨酸进而产生吡啶的能力各不相同,因此吡啶实验是微生物鉴定中的一项极为重要的指标。

而甲基红实验主要是用来检测由葡萄糖产生的有机酸,实验的原理也很简单,主要是看细菌代谢产生酸时,培养基就会变为黄,而其中的甲基红则会变为红色,这便是甲基红反应。虽然,无论哪一种肠道微生物都可以发酵葡萄糖而产生有机酸,但在区别大肠杆菌和产气杆菌时则具有一定的价值,主要原因在于,大肠杆菌可以一直维持酸性在 pH4,而产气杆菌在培养后期所转化的有机酸是非酸性末端产物,其 pH 值达到了 6,这意味着大肠杆菌呈阳性,而产气杆菌则为阴性。^[2]

3 微生物鉴定中常用的生理生化实验方法缺点

在微生物鉴定中常用的生理生化实验方法虽然效果显著,但不可否认存在一定的弊端。现阶段,在其实验过程中多采用微生物微量发酵管,通常情况得下,是在微量发酵管的上方大约 2cm 处,用砂轮划开,然后将已经划开部分的发酵管用酒精灯火焰进行消毒,无菌操作勾取斜面保存的菌株接入发酵管中,然后用无菌胶布封口,最后通过对恒温培养箱内的为微生物情况进行观察,得出实验的结果,再根据这一结果,对微生物的种类加以鉴别。这类方法看似简单,但却存在以下的缺点:

易污染。在实验的过程中,实验者需要反复的勾取菌种,即便操作过程极为小心,且也是按照实验的方法和规定来进行,但依旧容易将原菌株污染,会造成获取结果出现偏差。

易耗损。反复灼烧接种环时,对于酒精以及接种杯

均是一种耗损,且极为严重。

时间较长。通过对微生物鉴定中常用的三类生理生化实验内容进行详细阐述可知,实验所耗时间较长,均要达到几天的时间,尤其是在需要鉴定的微生物类别较多的情况,时间会更久一些。

实验结果准确性不定。实验主要目的是为了对微生物类别进行鉴定,但因实验过程中的操作问题极易导致接菌量不确定,时多时少,进而导致实验结果出现偏差。

4 实验方法改进

通过对原有实验的过程及结果进行分析,以便更好的解决实验过程当中问题,笔者提出一种新的微生物生理生化鉴定方法。新方法的优点有三点:其一可简化微生物生理生化实验的步骤,其二可以大大提升微生物生理生化实验的速度,其三是可以减少菌株污染风险,其四是可以大大降低微生物生理生化实验误差。

实验新方法步骤如下:

首先,进行准备工作。将分纯待鉴定菌株接种于液体培养基进行活化,时间为 24h,然后对其进行摇晃混匀,然后对工作台进行清洁和消毒,确保工作台的干净卫生,将已经混匀的培养基放置在工作台上。

其次,灭菌、消毒。先用酒精棉擦拭微生物微量发酵管表面,对其进行灭菌,然后用已经酒精消毒过的砂轮在内容物上方 2cm 的地方划开,并用酒精灯的火焰对其划开的地方进行消毒。

通过注射器吸取菌液,菌液在吸取之前摇匀,然后再通过注射器沿着管壁慢慢的加入到发酵管当中,这里我们需要注意用量的问题,每支管只需加入 0.01mL 即可。

最后,用无菌胶布封住管口,然后根据不同的微量发酵管需要的培养时间,分别将其放置在恒温培养箱中,通常时间在 24h-36h 之间。培养时间一到,就可以将微量发酵管取出,并记录实验的结果。

5 结语

需要注意的是,在新的实验方法中,笔者将原有实验当中的接种针更改为注射器,注射器容量为 1 mL,其优势在于,注射器可以进行反复使用,只需要通过高压灭菌的方法进行消毒即可。

参考文献:

- [1] 吴慧昊,王满刚,徐红伟,等.微生物生理生化鉴定实验方法的改进[J].实验教学与仪器,2018(5):34-34.
- [2] 朱旭芬.现代微生物学实验技术[M].杭州:浙江大学出版社,2011.

作者简介:

王元红(1985-),女,汉族,湖北襄阳人,工程师,本科,学士,主要研究方向:药品检测分析,药品生产过程微生物监测、控制及鉴定等。