

尿素酶试验的最佳 pH

潘若男 汪建民 陈淑萍

(南昌市医学科学研究所微生物研究室)

何晓青

(江西省卫生防疫站中心实验室,南昌)

尿素酶试验过去一直用来鉴别变形杆菌。由于变形杆菌的尿素酶活性很强,对于实验条件无特殊要求。除变形杆菌外,具有较强尿素酶活性的细菌还有克雷伯氏菌,耶尔森氏菌。而柠檬酸杆菌和阴沟杆菌,则被认为是尿素酶阴性的细菌,或少数为阳性或迟缓阳性,在菌属鉴定中,未被认为有何种意义。本文探讨尿素酶试验的最佳 pH 及其在细菌学诊断中的意义。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 供试验的菌种均经生化鉴定,共 1042 株(表 1)。

2. 尿素培养基: 按 Christensen 氏尿素琼脂处方配制,即: 蛋白胨 1g,氯化钠 5g,葡萄糖 1g, kH_2PO_4 2g,琼脂 16g,蒸馏水 900ml,融化后以 pH5-3 型酸度计分别调整 pH 至 6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6,加入 1:500 酚红溶液 6ml, 121℃ 左右,加入 20% 除菌过滤的尿素溶液 100ml,混合后以无菌手续分装灭菌试管内使成斜面。

(二) 方法

经生化鉴定的菌株 18 小时普通斜面纯培

表 1 供试验的菌种

菌名	株数
弗劳地氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	353
沙门氏菌属 <i>Salmonella</i> spp.	239
志贺氏菌属 <i>Shigella</i> spp.	53
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	228
产气克雷伯氏菌 <i>Klebsiella aerogenes</i>	51
产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	26
阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloaca</i>	83
变形杆菌 <i>Proteus</i> spp.	7
沙雷氏菌属 <i>Serratia</i> sp.	1
哈夫尼亚菌属 <i>Hafnia</i> sp.	1
合计	1042

养物每株菌同时接种 pH6.4、6.6、6.8、7.2、7.4 的尿素琼脂斜面各一支,置 37℃ 培养 4—8 小时和 24 小时观察结果,阴性结果继续培养每天观察记录结果至第 6 天。

结果

(一) 弗劳地氏柠檬酸杆菌

共试验弗劳地氏柠檬酸杆菌标准株 32 株,地方株 321 株,结果表明尿素培养基的 pH 在 7.2—7.4 之间最好,观察 4 天,阳性率达 94.1—95.2%。即使观察 2 天,亦可有 93.2—93.5% 的

阳性率(表 2)。培养基的 pH 下降,在 pH6.4 时,两天阳性率仅有 20.1%,观察 6 天,阳性率也只有 33.7%,仅有总阳性率的三分之一。因此,柠檬酸杆菌尿素培养基的最适 pH 应为 7.2—7.4。

表 2 353 株柠檬酸杆菌的尿素酶试验结果

尿素培养基的 pH	不同时间出现的阳性株数(天)						合计	
	1	2	3	4	5	6	阳性株数	%
7.4	317	13	4	2			336	95.2
7.2	318	11	2	1			332	94.1
7.0	289	19	6	3	2		319	90.4
6.8	124	47	13	5	11	2	202	57.2
6.6	83	53	20	11	7	3	177	50.1
6.4	35	36	21	17	7	3	119	33.7

(二) 沙门氏菌属和志贺氏菌属

共试验沙门氏菌属 239 株,志贺氏菌属 53 株,在 pH7.2—7.4 尿素培养基中,均为阴性反应。培养后,培养基的 pH 下降并转为黄色。

(三) 埃希氏菌属

大肠埃希氏菌属标准株 144 株,有 3 株呈现尿素酶阳性反应,在各种 pH 的尿素培养基中结果均相同。地方株 84 株在 pH7.2—7.4 的培养基中有 12 株呈现尿素酶阳性反应,大多都在两天内出现阳性反应,但在 pH6.4 时仅有 8 株为阳性反应(表 3),阳性出现时间延长。

(四) 产气克雷伯氏菌和产气肠杆菌

这里的产气克雷伯氏菌,产气肠杆菌,都是赖氨酸脱羧酶阳性菌,有区别于阴沟肠杆菌。产气克雷伯氏菌是鸟氨酸脱羧酶阴性、无动力的菌株共 51 株,在 pH 7.4 的尿素培养基上均呈阳性结果。产气肠杆菌是鸟氨酸脱羧酶阳性的菌株共 26 株,其中无动力的 10 株在 pH7.4 的

表 3 大肠埃希氏菌的尿素酶试验结果

试验菌株数	不同 pH 尿素培养基阳性株数					
	7.4	7.2	7.0	6.8	6.6	6.4
228	12 (5.3)	12 (5.3)	10 (4.4)	9 (3.9)	9 (3.9)	8 (3.5)

括号内为阳性%率

尿素培养基上均呈现阳性结果,有动力的 16 株,在 pH7.4 的尿素培养基上均为阴性反应。

(五) 阴沟肠杆菌

阴沟肠杆菌共 83 株,在 pH7.2 和 pH7.4 的尿素培养基上有 73 株呈阳性结果,阳性率为 87.9%。

(六) 变形杆菌属

7 株变形杆菌(标准菌 3 株:奇异,雷极氏、摩根氏各 1 株,地方株普通变形杆菌 4 株),在各种 pH 的培养基上经培养 4—8 小时即全部呈现阳性结果。

讨 论

关于 Christensen 氏尿素琼脂培养基的 pH,在四十年代到五十年代初期规定为 7.4^[1,2],但到五十年代中期以后,则均改为 6.8 左右^[3-5]。从 1954 年到 1974 年的二十年间,人们对于肠杆菌科各菌属尿素酶试验结果的认识,均以后者为依据。

查阅历史文献中对于柠檬酸杆菌属尿素酶反应的记载不尽一致。1954 年,考夫曼在弗劳地埃希氏菌的定义中列述尿素不分解或迟缓分解;但在贝萨斯达-巴勒鲁普菌类的生化反应表中,则均记为尿素阴性^[3]。1966 年,考夫曼对柠檬酸杆菌属尿素酶的记述,仍与以上完全相同^[6]。1958 年肠杆菌科小组委员会报告中关于柠檬酸杆菌属的定义,为尿素酶阴性^[7];至 1962 年的报告中,则改为尿素酶阴性或阳性^[8]。爱德华与爱文于 1955 年对弗劳地埃希氏菌的描述为分解尿素缓慢或不分解^[9];但到 1972 年在柠檬酸杆菌属的生化反应表中则记为尿素酶 d*69.4(6.9)^[5]。文献记述中的不一致,很可能由于各个作者所用尿素培养基的 pH 值不一致之故。

何晓青等于 1976 年报告所收集的于 pH6.7 尿素培养基上为阴性反应的 187 株柠檬酸杆菌,当用 pH7.0 尿素琼脂试验时,有 90.9% 为阳性结果。认为 pH7.0 尿素酶可作为柠檬酸杆菌属与沙门氏菌属的鉴别试验(内部资料)。

本文揭示了不同 pH 对于柠檬酸杆菌属尿素酶测定结果的影响。即在 pH6.4 以下时,以阴性反应结果为主; pH6.6—6.8, 阳性和阴

性结果约各占一半；pH 到 7.0 及以上时，阳性率结果增加到 90% 以上，具有明显的诊断意义。

本文的实验表明，埃希氏菌属并非都是尿素酶阴性的，确有少数菌株为阳性结果。这与杨正时的结果一致^[9]。至于沙门氏菌属和志贺氏菌属，虽将培养基 pH 提高到 7.4，仍为全部一致的阴性结果。

Guo 曾以尿素酶免疫血清作交互吸收沉淀试验，证明摩根氏菌属与变形杆菌属的尿素酶不相同^[10]。本文的结果表明肠杆菌科各个属的尿素酶，在变形杆菌属，克雷伯氏菌属，阴沟肠杆菌、柠檬酸杆菌属其酶活性依次自强至弱显然不同。因此，各个菌属的尿素酶，实际上是一组同功酶。它们虽然催化同一种化学反应，但酶本身的分子结构有所不同。

本文作者认为，Christensen 氏尿素琼脂培养基的 pH 应重新规定为 pH7.2—7.4。在此条件下，尿素酶试验对于肠杆菌科各属的诊断意义如下：

1. 柠檬酸杆菌与沙门氏菌属的鉴别；2. 变形杆菌、摩根氏菌、雷极氏菌的鉴定；3. 克雷伯

氏菌——产气杆菌类的生物分型；4. 阴沟杆菌的鉴定；5. 埃希氏菌属中尿素酶阳性菌的检出。

参 考 文 献

- [1] 谢少文、郭可大等译：秦氏细菌学，第三版，中华医学学会，人民军医社，北京，1951。
- [2] 叶天星编：A Practical Guide to Bacteriological Examination, 宏文书局，上海，1950。
- [3] 考夫曼著，方景灿等译：肠杆菌科，人民卫生出版社，北京，1963。
- [4] 爱德华与爱文著，郝十海等译：肠杆菌科的鉴定，科技卫生出版社，上海，1959。
- [5] Edwards, P. R. and Ewing, W. H.: Identification of Enterobacteriaceae, 3rd ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn., 1972.
- [6] Kauffmann, F.: The Bacteriology of Enterobacteriaceae, Munksgaard, Copenhagen, 1966.
- [7] Report of the Subcommittee on Taxonomy of the Enterobacteriaceae (1958), Int. Bact. Nomen. Tax., 8: 25, 1958.
- [8] Report of the Subcommittee on Taxonomy of the Enterobacteriaceae (1962), Int. Bact. Nomen. Tax., 13: 69, 1963.
- [9] 杨正时：微生物学报，21(3): 318—323, 1981。
- [10] Guo, M. M. S. and Liu, P. V.: J. Gen. Microbiol., 38: 417, 1965.