·临床探讨·　DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2021.16.027

两种测定微生物生长速率的实验方法比较*

赵　旋[1]，龙　燕[2]

武汉大学：1.实验室与设备管理处；2.武汉大学生命科学学院，湖北武汉 430072

摘　要：目的　比较全自动生长曲线分析仪和多功能酶标仪检测微生物生长速率的优劣，为本科生及研究生的微生物实验教学提供借鉴。**方法**　以酿酒酵母为实验材料，分别用全自动生长曲线分析仪和多功能酶标仪，检测在衣霉素处理条件下酿酒酵母的吸光度$(A)_{600}$值，绘制生长曲线。**结果**　全自动生长曲线分析仪得出的生长曲线为典型的S型趋势；多功能酶标仪得出的生长曲线总体上看与预期一致，但是曲线的波动较大。**结论**　全自动生长曲线分析仪检测精度更高，适合于研究生开展比较精密的实验项目，多功能酶标仪则适合本科生开展相对简单的定性实验。

关键词：微生物；　生长速率；　比较实验

中图法分类号：R-33；Q93-3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9455(2021)16-2401-03

检测微生物生长速率是微生物学和微生物检验实验教学中的重要内容，其在实际应用中也非常广泛，如耐药菌株的鉴定、抗菌药物的筛选等[1-2]。尽管目前实验教学中有多种检测微生物生长速率的实验方法[3]，如克隆形成法、比色法、MTT法，但是在实际运用中均存在测定精度不高、实验成本高、实验时间冗长、容易造成样本污染等缺点[4-6]。因此，结合实验室的实际条件，找到一种适合所在实验室开展实验研究，既能提高实验精度，又能锻炼学生实验技能的可行性方案是非常有必要的。笔者在微生物检验实验教学实践中，结合本实验室实际情况，以酿酒酵母为实验材料，比较全自动生长曲线分析仪和多功能酶标仪两种检测酿酒酵母生长速率的实验方法，为本科生和研究生微生物检验实验教学提供借鉴。

1　材料与方法

1.1　材料　野生型酵母菌株和对照组酵母菌株（对衣霉素敏感菌株）为本实验室保存，酵母膏胨葡萄糖（YPD）平板和YPD液体培养基按照文献[3]制备。

1.2　仪器与试剂　全自动生长曲线分析仪（Bioscreen C，美国），多功能酶标仪（BioTek SYNERGY H1，美国），恒温摇床（博讯，中国）。

1.3　方法

1.3.1　实验材料准备　提前2 d把低温冻存的野生型酵母菌株、对照组酵母菌株通过划线的方法接种在YPD平板上。实验前1天晚上再分别挑取单克隆划线于新的YPD平板上。

1.3.2　实验步骤　（1）在1.5 mL离心管中加入200 μL无菌双蒸水。（2）用无菌枪头在YPD平板上分别刮取适量酵母菌，放入步骤（1）的EP管中，充分混匀。（3）吸取50 μL步骤（2）中的酵母菌悬液，用1 mL无菌双蒸水稀释，分别取500 μL用酶标仪测定吸光度$(A)_{600}$值。（4）用含有1.5 μmol衣霉素的液体YPD培养基把步骤（3）中的野生型酵母菌株、对照组酵母菌株分别稀释成A_{600}为0.1。（5）吸取步骤（4）中的酵母悬液分别放置于100孔培养板（用于全自动生长曲线分析仪，液体体积为400 μL）和48孔培养板中（用于多功能酶标仪，液体体积为600 μL）。（6）100孔培养板放置于全自动生长曲线分析仪中，全自动生长曲线分析仪的设定程序为：30 ℃，振荡培养，每2 h自动测定一次A_{600}值，持续48 h[7-8]。（7）48孔培养板放置于30 ℃恒温的水平摇床内，转速为100 r/min，每间隔2 h将48孔培养板取出，放置于多功能酶标仪中，测定A_{600}值（每次充分摇匀），测定时设定光程校正（自动转化为标准1 cm的光程）。每次测定完毕，立刻放回恒温水平摇床内继续培养。（8）记录、分析数据，在Excel中绘制生长曲线。

2　结　　果

2.1　全自动生长曲线分析仪检测结果　以时间为横坐标，以A_{600}值为纵坐标，在Excel中绘制出生长曲线，见图1。野生型酵母菌株与对照组酵母菌株的生长速率呈现出典型的S型趋势[9]。两种菌株都在25 h左右进入对数生长期，在35 h左右达到平台期。整体结果和预期一致，对照组酵母菌株的生长速率低于野生型酵母菌株，表明实验结果准确无误。

2.2　多功能酶标仪检测结果　以时间为横坐标，以A_{600}值为纵坐标，在Excel中绘制出生长曲线图，见图2。野生型酵母菌株和对照组酵母菌株在15 h左右进入对数生长期，尽管总体看来对照组酵母菌株的

*　**基金项目：**湖北省高等学校实验室研究项目（HBSY2018-16）；2018年湖北高校省级教学研究项目（2018016）；武汉大学实验教学中心开放实验项目（WHU-2020-XYKF-01）。

△　**通信作者**，E-mail：shiyanshi@whu.edu.cn。

本文引用格式：赵旋，龙燕. 两种测定微生物生长速率的实验方法比较[J]. 检验医学与临床，2021，18(16)：2401-2403.

生长速率低于野生型酵母菌株，但是两条曲线的波动较大，没有呈现出典型的 S 型趋势。特别是 A_{600} 到达 1.0 之后，曲线呈现出波浪形，表明此时检测结果不稳定。

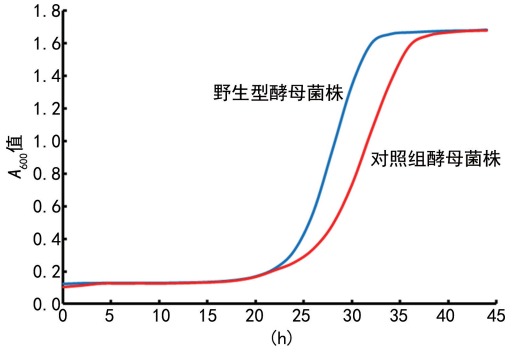

图 1　全自动生长曲线分析仪检测生长曲线图

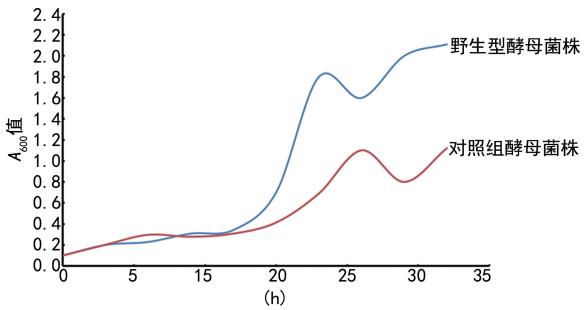

图 2　多功能酶标仪检测生长曲线图

3　讨　论

检测微生物生长速率是微生物学和微生物检验实验教学中重要的实验内容，广泛应用于基础医学和临床微生物检验。涉及的实验方法主要为平板克隆形成法和生长曲线法，但是这两种方法均存在一定的不足[10-11]。如平板克隆形成法需要的时间较长，以酿酒酵母实验为例，需要 3 d，实验前期也需要实验者经过复杂的细胞浓度计算，如果细胞浓度测定、计算、稀释出现偏差，经常会出现培养板上克隆太密的情况，无法计数。且平板克隆形成法很难以生长曲线的结果展示。生长曲线法是目前实验教学中比较常用的方法。在实验过程中，通常把微生物培养在摇菌管中，每间隔一定时间，在无菌超净工作台中取出等量的菌液，转入比色皿中进行 A_{600} 值测定。此实验操作过程较繁琐，由于需要多次取样，很容易造成样本污染。

笔者在指导学生实验时，采用全自动生长曲线分析仪法和多功能酶标仪 2 种实验方法对酵母菌株的生长速率进行检测，这两种方法均可以一次性检测大量的实验样本。结果显示，全自动生长曲线分析仪得出的生长曲线非常完美，是典型的 S 型趋势，可以观察到迟缓期、对数生长期、稳定期，没有出现异常的数据波动，实验结果与预期一致。

多功能酶标仪的实验结果尽管总体看来和预期一致，但是两条曲线的波动较大，特别是 A_{600} 值到达 1.0 之后，曲线呈现出波浪形。导致这种波动的原因可能是因为酵母直接培养在 48 孔培养板中，随着时间的延长，酵母菌液的浓度逐渐增大，酵母菌无法均匀分布在液体中，甚至出现不均一的沉淀，尽管每次用酶标仪测定之前都会尽量摇匀 48 孔板，但是仍然无法保证菌液的均一性，导致 A_{600} 值无法精确测出。笔者也发现，在实验进行到大约 20 h 的时候，48 孔板中的菌液已经变得非常浓稠，孔的底部聚集大量沉淀，不得不终止实验。而全自动生长曲线分析仪中的菌液在实验进行到 40 h 之后，还比较均一，这可能与全自动生长曲线分析仪的振荡培养方式有关。在绘制生长曲线的时候发现，全自动生长曲线分析仪整体数值要比多功能酶标仪的数值偏低，这是因为全自动生长曲线分析仪在测量 A_{600} 值的时候，不能设定光程校正，无法转化为标准的 1 cm 光程，因此，测出的数值要低于多功能酶标仪，但是这并不影响实验数据的可靠性。

为了尽可能减轻多功能酶标仪的实验误差，建议：(1)菌液的初始浓度可以相对降低，这样酵母菌生长的不会太快，不会在短时间内形成大量的菌液沉淀。(2)在实验条件允许的情况下，可以采用 24 孔板培养菌液，因为在孔径大的实验条件下，菌液在用酶标仪测定之前比较容易混匀。(3)在摇匀培养板的时候，沿着“十”字的方向，水平均匀摇动，幅度要小，避免菌液溅到培养板盖子上。(4)培养板的空白孔里要添加无菌水，保持一定湿度，避免菌液蒸发。

本实验是结合实验室的实际情况，找到一种简单快捷测定微生物生长速率的方法，特别是实时监控液体培养微生物的生长速率。全自动生长曲线分析仪检测精度更高，无需专人值守，但是由于需要专业的设备，所以更适合于研究生开展比较精密的创新性和探索性实验项目。多功能酶标仪则适合本科生开展相对简单的定性实验，因为多功能酶标仪法需要每间隔 2～3 h 用酶标仪测量一次 A 值，需要耗费相对较多的人工时间，因此可以同时进行其他的实验，让学生在连续的数据观察和测定中，合理安排实验时间，打下良好的科研实验基础。

参考文献

[1] 李军. 临床微生物以及细菌耐药性检验在临床合理用药中应用效果分析[J]. 医学检验与临床，2018，29(7)：13-16.

[2] 王克祥，梁滋旺，曹积武. 20 种中药提取液对沙门菌的体外抑菌效果及生长曲线的影响[J]. 中国禽业导刊，2018，35(4)：54-56.

[3] SAMBROOK J，RUSSELL D. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂，王嘉玺，朱厚础，译. 北京：科学出版社，2002：1595.

[4] 杨秀平，李二超. 基于教师科研项目的本科生科研训练计划研究[J]. 实验技术与管理，2017，34(9)：16-19.

[5] 蒋海明，李侠，刘振旺，等. 厌氧微生物培养实验教学改革与实践[J]. 实验室研究与探索，2018，37(2)：165-169.

[6] 陈文倩，宋军，颜忠诚，等. 高校实验教学体系创新性构建研究[J]. 实验技术与管理 2019，36(3)：44-45.

[7] MURAKAMI C J，BURTNER C R，KENNEDY B K，et al. A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span[J]. J Gerontol，2008，63(2)：113-121.
[8] MURAKAMI C，KAEBERLEIN M. Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells[J]. J Vis Exp，2009，27：1156.
[9] 傅维洁. 关于微生物比生长速率和指数生长期的讨论[J]. 微生物学通报，1992，2(1)：114-115.
[10] 黄静芳. 微生物检验技术[M]. 南京：南京大学出版社，2015：1-15.
[11] 周俊梅. 医学微生物学实验指导[M]. 中山：中山大学出版社，2017：67-78.

（收稿日期：2020-09-11　修回日期：2021-04-15）

· 临床探讨 ·　DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2021.16.028

222 株儿童血培养分离菌的临床分布特点及药敏结果分析*

朱德永，袁　雕，陆兴热

云南省文山壮族苗族自治州人民医院检验科，云南文山 663099

摘　要：目的　了解儿童血流感染菌临床分布特点及药敏情况，为指导临床合理用药提供依据。**方法**　收集该院儿童送检血培养分离的 222 株菌株的患者资料、药敏结果，并进行汇总分析。**结果**　222 株细菌中检出最高的科室为新生儿科(34.23%)，其次为儿一科(24.48%)、儿二科(22.52%)。耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌的检出率为 51.67%(31/60)，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的检出率为 27.27%(9/33)。凝固酶阴性葡萄球菌对青霉素、苯唑西林、头孢唑林、红霉素、克林霉素耐药率较高；金黄色葡萄球菌对青霉素的耐药率为 96.97%。产超广谱 β-内酰胺酶大肠埃希菌检出率为 39.02%(16/41)，产超广谱 β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌检出率为 54.55%(6/11)。大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌对氨苄西林、头孢唑林、哌拉西林、头孢噻肟的耐药率较高。沙门菌对 3、4 代头孢、喹诺酮类耐药率均较低。**结论**　临床及微生物室应及时有效进行沟通，早明确病原菌及药敏结果，合理使用抗菌药物。应加强医院感染防控措施，做好细菌耐药性监测，规范化治疗，避免耐药的进一步加重。

关键词：血流感染；　抗菌药物；　血培养；　合理用药

中图法分类号：R446.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9455(2021)16-2403-03

血流感染(BSI)是病原微生物入侵血液而导致的感染，是一种严重的全身感染性疾病，以儿童和老年人多见，且病死率高，为 20%～60%[1]。有研究结果显示，儿童和新生儿 BSI 的年发生率为 70/10 万例，病死率高达 20%[2]。儿童 BSI 病情进展迅速，早期合理有效的治疗，可改善患儿转归。血培养报告时间较长，临床医生在得到细菌鉴定及药敏报告前，需根据当地流行病学特征使用抗菌药物对患儿进行经验性治疗。本文通过回顾性分析本院 2018 年 1 月 1 日至 2020 年 9 月 30 日出生 1 d 至 13 周岁儿童血培养分离的阳性菌株临床分布特点及药敏结果，为指导临床合理用药提供参考。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　选择本院 2018 年 1 月 1 日至 2020 年 9 月 30 日出生 1 d 至 13 周岁儿童血培养分离的 222 株菌株为研究标本。纳入标准：出生 1 d 至 13 周岁；有感染相关的临床表现；血培养有明确的病原菌生长。

1.2　仪器与试剂　Bact/Alert3D 型全自动血培养仪和配套血培养瓶、Vitke2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏系统；血平板、巧克力平板、MH 平板、沙保罗平板、GN 卡、GN334 卡、GP 卡、GP67 卡、GP68 卡、YST 卡、血培养瓶、ATBTM FUNGUS3，以上仪器及试剂生产厂家均为梅里埃(上海)生物制品有限公司；药敏纸片(购自杭州天和生物有限公司)；质控菌株：金黄色葡萄球菌 ATCC29213、铅黄肠球菌 ATCC700327、铜绿假单胞菌 ATCC27853、产酸克雷伯菌 ATCC700324。

1.3　实验方法　无菌操作抽取疑似 BSI 儿童静脉血 1～3 mL 注入血培养瓶中，立即送检验科微生物室置于 Bact/Alert3D 型全自动血培养仪 37 ℃培养，血培养仪定时检测血培养瓶中二氧化碳浓度，绘制生长曲线，并判断有无细菌生长；仪器报告阳性时，取出报阳瓶，用无菌注射器取少量培养物转种血平板和巧克力平板分离病原菌，标本采集送检和药敏试验均参照《全国临床检验操作规程》(第 4 版)[3]要求进行，采用 Vitke2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏系统进行细菌鉴定及药敏试验。必要时采用纸片扩散法在 MH 培养基上对药敏结果进行复核，药敏试验结果参照美

*　**基金项目：**云南省教育厅科学研究基金教师类项目(2018JS107)。

本文引用格式：朱德永，袁雕，陆兴热. 222 株儿童血培养分离菌的临床分布特点及药敏结果分析[J]. 检验医学与临床，2021，18(16)：2403-2405.