

## 实验九 API20E 和 16S 鉴定细菌

学号：19300740005 姓名：程礼彬 时间：2021 年 5 月 15 日

### 【结果和讨论】

#### 一、16S 鉴定结果



图1 斜面接种结果

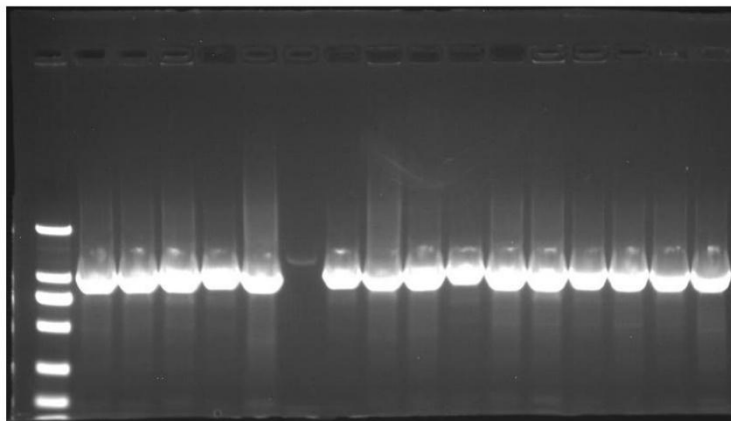


图2 扩增结果

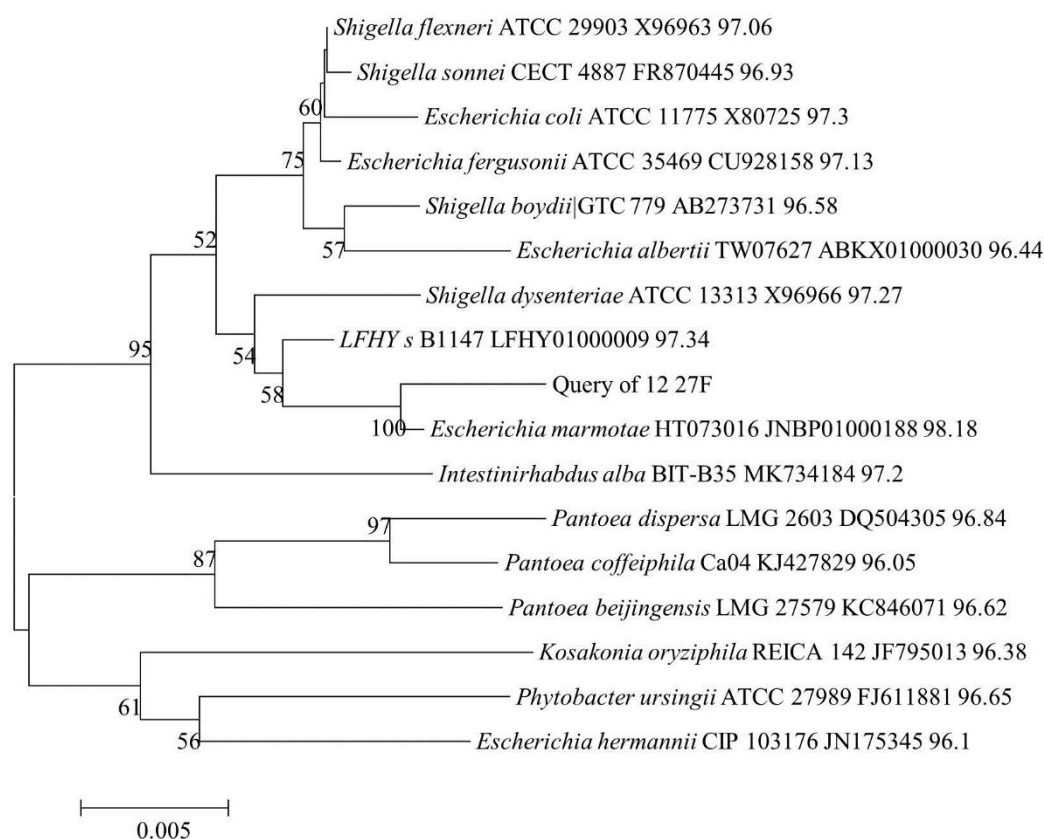


图3 菌株Xi5的16S rRNA基因序列(978核苷酸)的系统进化树(neighbor-joining法, 自展重复数500,自展数>50%标注在分支处。标尺, 每1核苷酸0.002个替换)

实验结论: 在 16S rRNA 基因系统发育树上, *Escherichia marmotae* (相似性 100%)、*LFHY s B1147* (相似性 97.34%) 和待测菌株 X5-2 聚集为一个分支, 因此, 菌株 X5-2 被鉴定为肠杆菌属 (*Enterobacter Hormaeche and Edwards*)

## 二、API20E 鉴定结果



图4 API鉴定结果

实验结论：经 API20E 系统鉴定，编码为 5144472，学名 *EscherichiaColi*（大肠埃希氏菌），鉴定百分数为 99.7%，T 值为 0.71，是非常好的鉴定。

#### 【思考题】

1.用 16SrRNA 基因序列鉴定细菌有什么优势，有什么局限性？

相对简单，准确度高

虽然 16SrRNA 常被用于大多数细菌的鉴定，但对于少数种属（如伯克霍尔德氏菌属）中的细菌，16SrRNA 不能区分到种的水平，此时常借助其他通用靶标来进行鉴定。

2.构建系统进化树时，选取序列应注意哪些问题？

相似与同源的区别：只有当序列是从一个祖先进化分歧而来时，它们才是同源的。

序列和片段可能会彼此相似，但是有些相似却不是因为进化关系或者生物学功能相近的缘故，序列组成特异或者含有片段重复也许是最明显的例子；再就是非特异性序列相似。

3.API20E 系统仅限于鉴定肠杆菌科和部分革兰氏阴性菌，原因有哪些？

由于反应体系的问题，范围外的结果未必正确且数据中无范围外的结果。

4.API20E 系统鉴定的微生物必须是纯培养，为什么？

如果几种菌混在一起，那可能所有的 20 个反应全部是阳性。

5. API20E 系统鉴定卡所采用的生化反应有哪些类型？反应原理是什么？

1) ONPG 试验翻译成中文是：邻硝基苯-半乳糖苷酶试验。用来检测细菌是否发酵乳糖。原理是因为乳糖发酵过程中需要乳糖通透酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶才能快速分解，但是有些细菌没有乳糖通透酶，只有半乳糖苷酶，所以会导致迟缓发酵。由此可得，如果某种细菌能够发酵乳糖，那么一定会产生 $\beta$ -半乳糖苷酶。ONPG 试验是将 ONPG 作为底物，如果细菌产生 $\beta$ -半乳糖苷酶，那么会水解 ONPG 为半乳糖和黄色的邻-硝基苯酚（ONP），培养液会变成黄色。因此试验结果为阳性。

2) ADH 精氨酸双水解酶试验：某些细菌能产生精氨酸水解酶，先水解精氨酸生成瓜氨酸和氨，再水解瓜氨酸生成鸟氨酸、氨和二氧化碳。因此使培养基呈碱性。用于阴沟肠杆菌（阳性）和产气肠杆菌（阴性）的鉴别。（氨基酸分解过程是在厌氧环境中进行的，所以要加盖石蜡油造成厌氧环境）。

3) LDC 赖氨酸脱羧酶试验：某些细菌能产生赖氨酸脱羧酶，可以将赖氨酸脱羧生成胺和二

氧化碳,但是碱性更强,使培养基呈紫色(溴甲酚紫指示剂)。用来鉴别用于产气肠杆菌(阳性)与阴沟肠杆菌(阴性)。

4) ODC 鸟氨酸脱羧酶试验:某些细菌产生鸟氨酸脱羧酶,将鸟氨酸脱羧生成胺和二氧化碳,是培养基呈碱性。用来鉴别鸟氨酸用于阴沟肠杆菌(阳性)和克雷伯菌(阴性)。

5) CIT 柠檬酸盐(又称枸橼酸盐)利用实验:当柠檬酸盐作为唯一的碳源,某些细菌能利用此碳源而分解柠檬酸盐产生碳酸盐,而使培养基呈碱性由浅绿色变成深蓝色。肠杆菌科中:沙门菌属、克雷伯菌属、粘质和液化沙雷菌及某些变形杆菌以及枸橼酸杆菌阳性;而埃希菌属、志贺菌属、爱德华菌属和耶尔森菌属均为阴性。

6) H<sub>2</sub>S 硫化氢实验:某些细菌能分解培养基中的含硫氨基酸(如胱氨酸、半胱氨酸)生成硫化氢,遇铅或亚铁离子生成黑色硫化物;或者还原培养基中含硫化物而产生硫化氢,与二价铁生成黑色的硫化亚铁,阴性不产生黑色沉淀。肠杆菌科中沙门菌属、爱德华菌属、枸橼酸杆菌属和变形杆菌属细菌,绝大多数硫化氢阳性,其它菌属阴性。

7) URE 尿素酶实验:某些细菌能产生尿素酶分解尿素,产生大量的氨使培养基变碱。使酚红指示剂变红为阳性,不变为阴性。奇异变形杆菌和普通变形杆菌、雷极普罗威登菌和摩根摩根菌阳性,沙门菌、斯氏和产碱普罗威登菌阴性。

8) TDA 苯丙氨酸脱氨酶实验:某些细菌可产生苯丙氨酸脱氨酶,使苯丙氨酸脱去氨基,形成苯丙酮酸和游离的氨,加入三氯化铁试剂与苯丙酮酸螯合后产生绿色反应。大量接种被检菌于苯丙氨酸琼脂斜面上,35℃培养 18~24h,加入 10%三氯化铁试剂出现绿色为阳性。主要用于鉴定变形杆菌属、摩根菌属和普罗威登菌属细菌,均为强阳性,肠杆菌科中其它细菌均为阴性。

9) VP 实验:测定细菌产生乙酰甲基甲醇的能力。某些细菌如产气肠杆菌,分解葡萄糖产生丙酮酸,丙酮酸进一步脱羧形成乙酰甲基甲醇。在碱性条件下,乙酰甲基甲醇被氧化成二乙酰,进而与培养基中的精氨酸等含胍基的物质结合形成红色化合物。即 V-P 试验阳性。所以附加试剂中 VP1 是强碱性物质(KOH 溶液)。

10) GEL 明胶液化实验:某些具有明胶酶(亦称类蛋白水解酶),蛋白酶的功用在于使不能吸收的蛋白质变为可以透入菌体的多肽或氨基酸,这种酶主要为胞外酶,能将明胶先水解为多肽,又进一步水解为氨基酸,失去凝胶性质而液化,让反应孔内的黑色物质扩散,而呈阳性反应。变形杆菌、芽胞杆菌、梭菌等具有很强的胞外酶的活性。

11) IND 吲哚试验:某些细菌能够分解色氨酸生成吲哚,吲哚与试剂中的对二甲氨基苯甲醛生成玫瑰吲哚,变成红色,为阳性反应。用来检测细菌分解色氨酸的能力。

12) GLU 葡萄糖发酵试验:某些细菌发酵葡萄糖,产酸,变黄。

13) MAN 甘露醇发酵试验:某些细菌发酵甘露醇,产酸,变黄。

14) IND 肌醇发酵试验:某些细菌发酵肌醇,产酸,变黄。

15) SOR 山梨醇发酵试验:某些细菌发酵山梨醇,产酸,变黄。

16) RHA 鼠李糖试验:某些细菌发酵鼠李糖,产酸,变黄。

17) SAC 蔗糖发酵试验,某些细菌发酵蔗糖,产酸,变黄。

18) MEL 密二糖发酵试验:某些细菌发酵密二糖,产酸,变黄。

19) AMY 苦杏仁苷发酵试验:某些细菌发酵苦杏仁苷,产酸,变黄。

20) ARA 阿拉伯糖试验:某些细菌发酵阿拉伯糖,产酸,变黄。