

一种微量快速的硝酸盐还原试验方法

唐细良 刘加吾 唐紫林 湖南省卫生防疫站 (410005)

硝酸盐还原试验常被作为鉴定细菌的一项重要客观生化指标。然而现在所通用的硝酸盐还原试验方法,^{〔1〕}不但耗时长,而且假阴性多。给微生物实验室鉴定带来了一定的困难。有时甚至由此导致错误,造成不必要的损失。本着微量快速、准确简便的宗旨,我室就此项生化试验进行了较深入的研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 从本站流行病科细菌室获得标准菌株 24 株。其中沙门氏菌属 4 株、志贺氏菌属 2 株、变形杆菌 4 株、非 O1 弧菌 2 株、大肠杆菌 4 株、耶尔森氏菌 1 株、蜡样芽胞杆菌 2 株、枸橼酸杆菌、肺炎克雷伯、水弧菌、产气杆菌、绿脓杆菌各 1 株。

1.2 培养基及试剂

硝酸钾 0.2g 蛋白胨 5g 琼脂 15g 蒸馏水 1000mL 溶解、校正 pH 至 7.2 ± 0.1 , 分装试管、每管约 0.5mL, 121℃ 高压灭菌 15min, 或于高压灭菌后、冷却至 55℃ 左右、倾注平皿。

硝酸盐还原试剂

甲液 将对氨基苯磺酸 0.8g 溶解于 5mol/L 乙酸溶液 100mL 中。

乙液 将甲萘胺 0.5g 溶解于 5mol/L 乙酸溶液 100mL 中。

标准对照用培养基及制法完全同“国标法”。^{〔1〕}

1.3 方法 采用双盲对照实验方法。先将标准菌株编号、再由 2 人分别完成未知标准株的微量快速硝酸盐还原试验及标准对照试验。分别记录实验结果。

1.4 微量快速法分为平板法和试管法。

平板法 将平板等分为 10 ~ 15 个区, 用接种环挑取不同菌液分别点种于各区中央, 37℃ 培养 4 ~ 6h 平板上可见薄层菌斑即可。挑取菌落或带菌落的培养基约绿豆大小、置于直径约 1cm 大小的滤纸片中央、先后滴加硝酸盐还原试剂甲液和乙液各 1 滴、挑取物或滤纸立即呈鲜红色者为阳性、无色者为阴性。

试管法 按严格无菌操作技术要求, 将待检菌凭接种环点种于培养基表面、于 37℃ 培养 4 ~ 6h, 培养基表面可见薄层菌斑即可。其余步骤同平板法。

标准硝酸盐还原试验法 每个菌株均同时接种至 5 支硝酸盐还原试管中, 每管含培养基 5mL。37℃ 培养, 分别于 4 ~ 6、24、48、72、96h 取出、分别滴加适量硝酸盐还原试剂甲液和乙液、立即或数分钟内显鲜红色者为阳性、不显色者为阴性、介于二者之间者为可疑。

2 结果

2.1 微量快速法与标准法硝酸盐还原试验结果比较

从表 1 可看出, 微量快速法与标准法硝酸盐还原试验比较有如下优点: 其一是时间明显缩短。微量快速法 4 ~ 6h 就能明确判断结果、而标准法一般需 24h 才能显示出正确结果。其次, 微量快速法的灵敏度高于标准法。标准法只能判为硝酸盐还原试验可疑的菌株, 而微量快速法可明确地判为阳性。此外, 标准法硝酸盐还原试验中, 同一株菌在不同时间里试验结果可能不一致。有的菌株 24h 表现为阳性, 而 48h 后表现为阴性。有的菌株 72h 内表现为阴性, 而 96h 表现为

阳性。实验工作者究竟应在什么时间加入硝酸盐还原剂,恐怕只能凭工作经验而定。对于尚缺乏工作经验的人来说,就更难办了,无疑误判的可能性较大,假阴性率较高。而微量快速法不会出现上述情况。其三、微量快速法判断结果的准确率不低于标准法。二者最终判断的结果完全一致。

表1 微量快速法与标准法硝酸盐还原试验结果比较 h

菌 株	微量快速法 / 标准法				
	4 ~ 6	24	48	72	96
伤寒沙门氏菌	+/-	+/- ±	+/+	+/+	+/+
鼠伤寒沙门氏菌	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
波茨坦沙门氏菌	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
沙门氏菌 B	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
致病性大肠杆菌 (I)	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
致病性大肠杆菌 (II)	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
致病性大肠杆菌 (III)	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
普通大肠杆菌	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
奇异变形杆菌 (I)	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
奇异变形杆菌 (II)	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
莫根氏变形杆菌	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
雷极氏变形杆菌	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
福氏痢疾杆菌	+/-	+/- ±	+/+	+/+	+/+
宋内氏痢疾杆菌	+/-	+/+	+/+	+/-	+/-
非 O1 弧菌 (内蒙)	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
非 O1 弧菌 (儿)	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-
耶尔森氏菌	+/-	+/-	+/-	+/- ±	+/+
蜡样芽胞杆菌 (I)	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+
蜡样芽胞杆菌 (II)	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-
绿脓杆菌	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-
枸橼酸杆菌	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
肺炎克雷伯菌	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
水弧菌	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
产气杆菌	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

2.2 同一平板上不同细菌混合点种试验结果有无干扰的观察

实验结果表明,微量快速法中、平板法与试管法硝酸盐还原试验结果完全一致,且 4 ~ 6h 均能明确判断结果。当有大批待鉴定细菌地、平板法尤为适合、可较大幅度地减少实验人员的工作量。至于在同一平板上同时接种不同的细菌、就硝酸盐还原试验而

言,结果有无相互干扰,详见表 2。

表2 同一平板上硝酸盐还原试验
阴性和阳性株混合点种结果

两菌斑距离 (mm)	37℃ 培养 时间 (h)	阴 性 株 ⁽¹⁾		阳 性 株 ⁽²⁾		
		次数 (+)	次数 (-)	次数 (+)	次数 (-)	次数 (-)
5	6	10	0	10	10	0
5	24	10	0	10	10	0
10	48	10	1	9	10	0

注: (1) 绿脓杆菌; (2) 肺炎克雷伯菌

由表 2 可知,若保证两菌斑之间的距离,且严格控制培养时间,同一平板上硝酸盐还原试验阴性和阳性株不表现出相互干扰作用。

3 讨论

3.1 微量快速法较标准法硝酸盐还原试验时间明显缩短 微量快速法只需 4 ~ 6h 就能明确判断结果、而标准法一般需要 24h,个别菌株甚至需要 96h 才能显示出正确结果、并且同一菌株在不同时间可表现出相反结果。如福氏痢疾杆菌 24h 结果为可疑、48h 结果为阳性、72h 后结果则表现为阴性。这是因为 24h 内产生的亚硝酸盐浓度很低、不足以显色,而 72h 后亚硝酸盐分解生成氮和氨的原故。无疑标准法的假阴性率较高,而微量快速法不会出现上述情况,一旦培养基表面形成肉眼可见的薄层菌斑,试验结果就准确无误、对个别可疑的菌株在 37℃ 继续培养几小时、重复试验、即可消除疑虑。若保证培养时间不超过 24h,不会出现假阴性结果。

3.2 微量快速法较标准法硝酸盐还原试验的灵敏度高 某一培养时间里,标准法只能判断某些菌株硝酸盐还原试验结果可疑,而微量快速法在 4 ~ 6h 就能明确地判断为阳性。这是因为微量快速法系采用固体培养基、点种菌液在培养基表面、细菌迅速繁殖形成菌斑,产生的代谢产物亚硝酸盐高浓度地分布于菌斑周围、越近菌斑、其浓度越

高。挑取带菌落的培养基置于洁净干燥的滤纸片上、水份被迅速吸收,亚硝酸盐的浓度就更高。加入试验试剂就能立即显示出鲜红色。

3.3 微量快速法与标准法硝酸盐还原试验的最终结果完全相符 两种方法的实验原理完全一致、就标准法而言、若要保证此项生化试验结果准确无误、同一株菌必须同时接

种 4 支硝酸盐还原试验试管、每隔 24h 检测一次结果、无疑工作量很大、又浪费试剂。

4 参考文献

1 中华人民共和国国家标准. 食品卫生检验方法(微生物部分). 第1版. 北京: 中国标准出版社 1986.131

微分电位溶出法测定食品中铜

陈 兵 万永平
张德超 陆 娟

通州市卫生防疫站站(226300)

目前食品中铜的分析普遍采用原子吸收法或铜试剂法、〔1〕前者仪器昂贵、后者灵敏度低且操作繁琐。近年来利用微分电位溶出法 (DPSA) 作微量元素分析已有报道。〔2〕笔者在文献〔2〕的基础上、对实验底液的组成、实验条件的选择进行了进一步的探讨、认为玻碳汞膜电极的汞膜容易脱落、使测得的数据重现性较差、而银基汞膜电极的汞膜不易脱落、重现性好、结果准确可靠。针对以上问题、提出了铜的实用测定方法。

1 技术与方法

1.1 仪器

MP—1 型溶出分析仪、MCP—1T 极谱工作台及银电极 (均为山东电讯七厂生产)。

222 型饱和甘汞电极、弯型铂电极。

玻璃器材 均用 1+1HNO₃浸泡过夜、用无离子水冲洗干净、阴干、备用。

1.2 试剂

镀汞液 (0.012mol/L Hg²⁺) 称取 HgCl₂22.7g, 溶于水中、加入 0.63mL 浓硝酸、加水定容至 1000mL, 摇匀。

底液 (0.06mol/L NH₃~ 0.1mol/L NH₄⁺) 称取 5.3gNH₄Cl, 溶于水中、加入浓氨水 4.3mL 定容至 1000mL, 摇匀。

铜标准溶液 称取 1.000g 金属铜、溶于 20mLHNO₃ (1+1) 中、并用水定容至 1000mL。此液 1.00mL 含 1.00mg 铜。用时稀释成 1.0mL 含 10.0μg 铜的标准应用液。

水 去离子水再经亚沸蒸馏器蒸馏。

1.3 分析步骤

仪器操作条件列于表 1。

表 1 仪器操作条件		
	镀汞	测定
电解电位 (V)	-1.0	-0.94
溶出记录上限电位 (V)	-0.8	-0.80
溶出记录下限电位 (V)	-0.2	-0.20
搅拌时间 (s)	40	120
灵敏度 (S)		10 或 20
电极转速 (r/min)	2500	2500

银电极预镀汞膜 将银电极以 50% 硝酸浸洗、水冲干净后、插入镀汞液中、使用 3 电极系统、按表 1 设定操作条件、镀汞一溶出反复进行 3 次、此汞膜可连续使用