

Isolation and Identification of Contamination Strains from Microbiological Laboratory in Universities

Wei Zhang Fan Li Jie Zha Wenyan Ding

Anqing Medical and Pharmaceutical College, Anqing, Anhui, 246052, China

Abstract

Objective: Isolation of pollution strains from microbiological laboratories of universities, classify and identify them, lay the foundation for controlling laboratory pollution. **Method:** Randomly select specimens of microbiological experimenters from different professional classes in the author's school for cultivation, four dominant bacteria were isolated, and their taxonomic status was determined by morphological observation, gram staining, drug sensitivity test and 16S rDNA identification. **Result:** The identification of four strains of bacteria were *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus luteus*. **Conclusion:** The isolated strains are widely distributed in nature and human beings, generally not pathogenic, some basic measures are difficult to control the experimental strains of their pollution, the future can consider the drug sensitivity of strains on pollution, in addition the appropriate antibiotics to inhibit the growth of experimental bacteria culture medium.

Keywords

laboratory; contamination; bacterium

高校微生物实验室污染菌株的分离与鉴定

张伟 李帆 查洁 丁文渊

安庆医药高等专科学校, 中国·安徽 安庆 246052

摘要

目的: 从高校微生物实验室分离出污染菌株, 对其进行分类鉴定, 为控制实验室污染奠定基础。**方法:** 随机选取笔者所在学校不同专业班级的微生物实验人员标本进行培养, 分离得到四株优势菌, 经形态观察、革兰染色、药敏实验和16S rDNA鉴定, 确定其分类地位。**结果:** 经鉴定四株优势菌分别是假白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*)、山羊葡萄球菌 (*Staphylococcus caprae*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 和藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)。**结论:** 分离得到的污染菌种在自然界和人体分布广泛, 一般不致病, 一些基本措施很难控制其污染实验研究的菌种, 根据污染菌株的药物敏感性, 在实验菌种培养基中加入相应抗生素来抑制它们的生长。

关键词

实验室; 污染; 菌

1 引言

随着中国高等教育的发展, 高校实验室也在不断的发展壮大, 与此同时, 高校微生物实验室的污染问题也越来越严重。目前, 招生人数在逐年增加, 实验室的数量相对紧张, 平均每学期实验室的开课数也在不断增长^[1], 造成人员流动密集, 微生物的传播概率大大增加; 具有潜在的传染病扩

散危险; 实验室是一个相对的封闭环境, 微生物在其中容易积聚集中, 再加上平时消毒不严, 学生的非规范性操作等原因, 更是加重了实验室中微生物的污染情况^[2], 然而当前并没有引起足够的重视^[3]。就笔者所在学校微生物实验室而言, 由于实验室污染造成的实验结果不准确、实验菌种污染的事件时有发生。为了保证实验研究的准确性和科学性, 保证实验室的生物安全, 控制实验室微生物污染已成为实验室重要的安全管理工作^[4]。论文随机选取笔者所在学校不同专业班级的微生物实验人员标本进行培养和分析, 旨在了解当前高校实验室中常见的污染菌种类型, 并希望以此为基础, 开展相应的预防措施。

【基金项目】安徽省质量工程教学研究重大项目(项目编号: No.2020jyxm1116); 安徽省质量工程教学团队项目(项目编号: No.2020jxtd158)。

【作者简介】张伟(1976-), 男, 中国安徽芜湖人, 本科, 副教授, 从事病原生物学与免疫学研究。

2 实验材料

①哥伦比亚血琼脂培养基(上海柯玛嘉生物科技有限公司)。

②电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)。

③药敏纸片(杭州滨和微生物试剂有限公司)。

3 实验方法

实验室污染的常见影响因素有空气、桌面、皮肤、飞沫等,在合理使用紫外线消毒的基础上,手指皮肤是主要的污染因素^[5]。随机采集笔者所在学校的护理、药学、临床、检验4个不同专业10个班级100名同学的手指皮肤标本,接种于血平板,平行标本分别置于28℃恒温箱中培育72h和37℃恒温箱中培育24h,经形态观察、革兰染色、药敏实验和16SrDNA鉴定,确定其分类地位。

4 实验结果

培养后得到10种形态一致的菌落,其中优势菌种4株,分别命名为B、D、G、H。

4.1 菌落特征

B: 细小、灰白色、湿润、圆形突起的菌落,无溶血环。

D: 白色、圆形隆起、边缘整齐、湿润、中等大小的不透明菌落,无溶血环。

G: 白色、圆形凸起、边缘整齐、表面光滑、湿润、不透明的菌落,有透明溶血环。

H: 圆形、凸起、光滑、不透明的黄色菌落,无溶血环。

4.2 革兰染色

B: 革兰染色阳性,菌体呈较小的棒状,无典型异染颗粒。

D: 革兰染色阳性,菌体球形,呈葡萄串状排列。

G: 革兰染色阳性,菌体球形,呈葡萄串状排列。

H: 革兰氏染色阳性,菌体球形,多呈四联或八叠排列。

4.3 药敏试验(K-B法)

使用15种抗菌药物纸片,即青霉素、复方新诺明、氨苄西林、利福平、头孢唑林、红霉素、万古霉素、庆大霉素、呋喃妥因、克林霉素、苯唑西林、丁胺卡那霉素、四环素、氧氟沙星、氯霉素。根据测量抑菌圈直径,计算平均值。结果见表1。

B: 对头孢唑林、丁胺卡那霉素、万古霉素、苯唑西林敏感;对青霉素、氨苄西林、复方新诺明、红霉素、四环素、克林霉素、氯霉素低敏或耐药。

D: 对青霉素、氨苄西林低敏,对其他常用抗生素都敏感。

G: 对万古霉素、利福平、呋喃妥因、丁胺卡那霉素敏感;对青霉素、红霉素、复方新诺明、氨苄西林、头孢唑林、克林霉素、苯唑西林、氧氟沙星低敏或耐药。

H: 对丁胺卡那霉素、利福平、头孢唑林、庆大霉素、四环素、氧氟沙星敏感,对青霉素、苯唑西林、红霉素、克

林霉素、呋喃妥因低敏或耐药。

表1 四种优势菌株药敏实验结果

药物	B 菌株抑菌圈直径 (mm)	D 菌株抑菌圈直径 (mm)	G 菌株抑菌圈直径 (mm)	H 菌株抑菌圈直径 (mm)
青霉素	9	11	3	6
复方新诺明	0	17	5	13
氨苄西林	1	2	2	12
利福平	11	19	17	16
头孢唑林	20	26	9	17
红霉素	5	22	8	9
万古霉素	19	25	22	14
庆大霉素	13	16	11	17
呋喃妥因	14	21	19	2
克林霉素	6	18	4	3
苯唑西林	18	23	6	6
丁胺卡那霉素	23	18	20	21
四环素	7	22	13	15
氧氟沙星	22	25	9	16
氯霉素	8	18	12	11

注: 抑菌圈直径≥15mm为敏感, 10~14mm为中度敏感, <10mm为低敏, 0mm为耐药。

4.4 16S rDNA 测序结果

B是假白喉棒状杆菌(*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*),结果见图1和表2; D是山羊葡萄球菌(*Staphylococcus caprae*),结果见图2和表3; G是表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*),结果见图3和表4; H是藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*),结果见图4和表5。

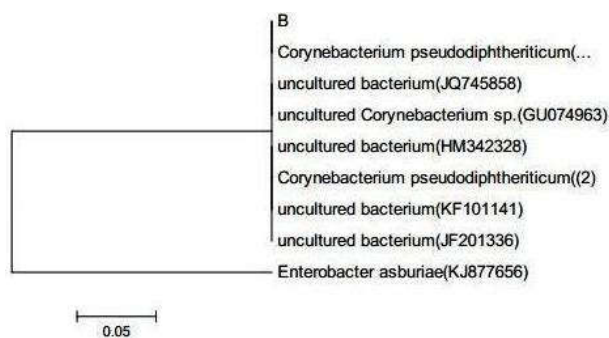


图1 菌株B系统发育树

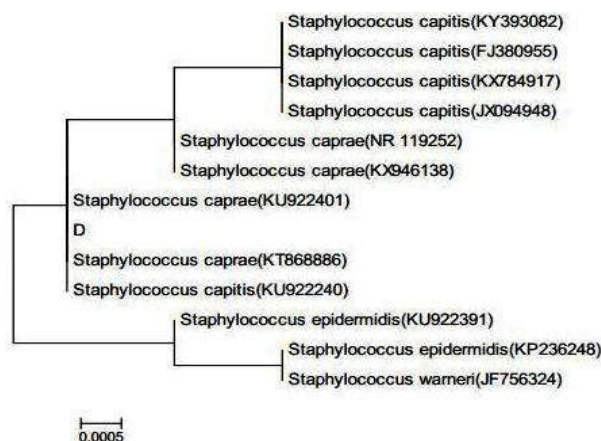


图2 菌株D系统发育树

表 2 菌株 B 鉴定结果

样品名称	扩增序列	参考物种	Accession No.	分类	同源度
B	16S rDNA	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	JX476081	Bacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Corynebacteriaceae; Corynebacterium	99%

表 3 菌株 D 鉴定结果

样品名称	扩增序列	参考物种	Accession No.	分类	同源度
D	16S rDNA	<i>Staphylococcus caprae</i>	KT868886	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus	100%

表 4 菌株 G 鉴定结果

样品名称	扩增序列	参考物种	Accession No.	分类	同源度
G	16S rDNA	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KP236248	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus	100%

表 5 菌株 H 鉴定结果

样品名称	扩增序列	参考物种	Accession No.	分类	同源度
H	16S rDNA	<i>Micrococcus luteus</i>	KY486008	Bacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Micrococcaceae; Micrococcus	100%

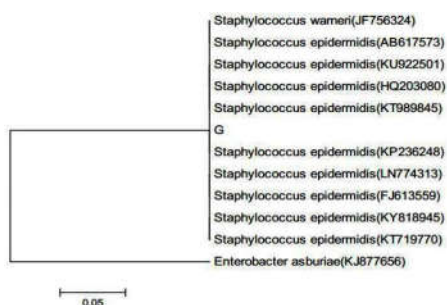


图 3 菌株 G 系统发育树

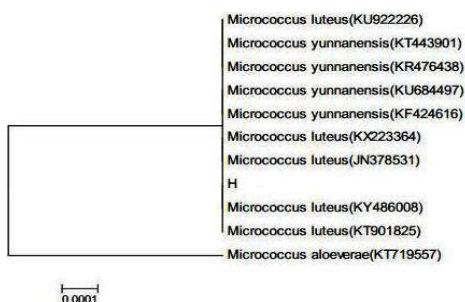


图 4 菌株 H 系统发育树

5 结语

四种菌广泛分布于空气、土壤、水、动植物体表及人体皮肤、外耳道和鼻咽喉处，对营养要求不严格，生长迅速，一般不致病，有些可引起条件致病，主要通过空气、皮肤接触、飞沫传播^[6-9]。在实验室中是主要的污染菌种。采取以下措施从一定程度上可以控制污染情况：①每天定期对实验室空气进行紫外线照射消毒；②严格实施无菌操作，加强学生的无菌意识；③每天对实验操作台用 0.5% 苯扎溴铵溶液、地面用

5% 甲酚皂溶液进行喷洒消毒；④加强实验菌种和无菌器材的隔离保存。由于多种原因，实验室无法做到严格和全面地消毒、灭菌，从而导致实验室研究的菌种污染现象非常常见，直接影响了实验的顺利开展和结果的准确性。由于这些菌的药物敏感性不同，可初步考虑在实验菌种培养基中加入相应药物来抑制它们的生长，而其具体药物和剂量需在以后的试验中进一步明确。

参考文献

- 王建民. 高校化学实验室污染控制及安全管理的研究与探索 [J]. 实验室科学, 2015, 18(3): 189-191.
- 陆海, 丁祖高. 高校实验室污染现状与处理方案研究 [J]. 环境科学导刊, 2014, 33(6): 51-53.
- 王明仕. 高校实验室污染控制分析探讨 [J]. 实验科学与技术, 2016, 14(6): 215-216.
- 李帆. 实验室微生物污染状况及控制措施 [J]. 德州学院学报, 2017, 33(2): 55-57.
- 温志国, 王全哲, 安亮. 临床实验室微生物污染情况调查与生物安全防护研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(18): 2134-2136.
- 李仲兴, 郑家齐, 李家宏. 诊断细菌学 [M]. 香港: 黄河文化出版社, 1992.
- 王悦颖. 老年性耳聋患者与健康老年人耳道菌群对比分析的研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2017.
- 刘广丽. 幼儿患者脑脊液内检出藤黄微球菌 1 例 [J]. 泰山医学院学报, 2008, 29(9): 708.
- 李万兰, 郭晨霞, 邓艳芳, 等. 住院患者医院感染病原学类型与相关因素的关系 [J]. 中华医院感染学杂志, 2012(22): 5138-5140.