



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115141778 A

(43) 申请公布日 2022. 10. 04

(21) 申请号 202210875930.6

(22) 申请日 2022.07.22

(71) 申请人 广西大学

地址 530004 广西壮族自治区南宁市西乡
塘大学东路100号广西大学轻工与食
品工程学院

(72) 发明人 李全阳 张钦任 周玉盼

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

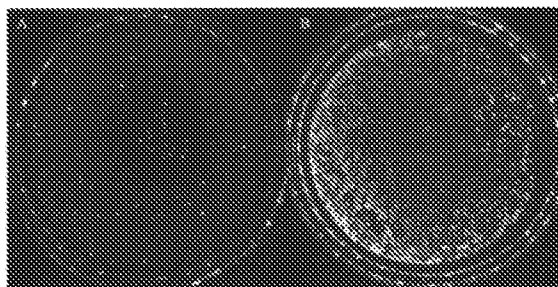
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法

(57) 摘要

嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*Akkermansia muciniphila*, 简称Akk菌) 是一类世界公认的潜在益生菌, 但由于对营养要求非常苛刻, 分离培养极其困难, 导致对该菌的分离培养、研究开发进展缓慢。本发明给出一种复合调控剂特异性筛选Akk菌的方法, 属于微生物技术领域。所述的复合调控剂包括调控剂A、调控剂B、调控剂C。采用的培养基是以脑心浸液肉汤培养基 (Brain Heart Infusion, 简称BHI) 为基础进行改良或能培养Akk菌的合成培养基。本发明的复合调控剂培养基能同时抑制粪便样品中的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 且对Akk菌基本上没有抑制作用, 还具有一定的促进生长作用, 使得其在平板表面良好生长, 降低了复杂混合样品中Akk菌的筛选难度, 对Akk菌的筛选培养具有重要意义。



1. 一种复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法, 其特征在于, 所述的复合调控剂为调控剂A、调控剂B、调控剂C。

2. 如权利要求1所述的复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法, 其特征在于, 所述的复合调控剂配方为6ug/ml 调控剂A、10ug/ml 调控剂B、12ug/ml 调控剂B。

3. 如权利要求1的复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法, 其特征在于, 所述的筛选采用的培养基为改良BHI培养基。

4. 如权利要求3所述的复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法, 其特征在于, 所述的改良BHI培养基配方为脑心浸液肉汤38.5g/L、酵母浸粉5g/L、黏蛋白2.5g/L、刃天青1mg/L、L-半胱氨酸0.5g/L、碳酸氢钠0.294g/L。

5. 如权利要求2和4所述的复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法, 其特征在于, 所述的复合调控剂改良BHI特异性培养基的配制方法为:

S1: 调控剂溶液的配制: 将调控剂A溶于无菌超纯水, 配制成6ug/ml的母液, 将调控剂B溶于无菌超纯水, 配制成10ug/ml的母液, 将调控剂C溶解于无菌超纯水, 配制成12ug/ml的母液, 过滤除菌放置4℃冰箱备用;

S2: 黏蛋白溶液的配制及纯化: 将黏蛋白溶于PH=7.4的PBS缓冲液, 浓度为1% (W/V), 室温下, 磁力搅拌2h, 待其充分溶解后再以8000rpm离心15min, 取上清, 也冷至0~2℃, 得到上清液。在上清液中加入预冷至4℃的乙醇, 至乙醇终浓度为60%, 轻轻颠倒混匀, 4℃静置2h后弃去上清, 用蒸馏水重新溶解沉淀至其纯化前的体积, 121℃高压蒸汽灭菌20min, 待其降温后分装至50mL无菌离心管中, 放置-20℃冰箱中, 备用;

S3: 刃天青的配制: 将刃天青溶解于蒸馏水, 得到0.005% (W/V) (0.05mg/mL) 的刃天青母液, 放置4℃冰箱中, 备用;

S4: L-半胱氨酸的配制: 将L-半胱氨酸溶解于蒸馏水, 得到10% (W/V) (0.1g/mL) 的L-半胱氨酸溶液母液, 过滤除菌备用;

S5: 碳酸氢钠溶液的配制: 将NaHCO₃溶于蒸馏水, 得到3% (W/V) (0.03g/mL) 的NaHCO₃母液, 过滤除菌备用;

S6: 取脑心浸液肉汤38.5g, 酵母浸粉5g, 0.005% (W/V) 刃天青4mL定容于1L蒸馏水中, 混合均匀后, 121℃高压蒸汽灭菌20min, 然后取150mL灭菌液加入50mL步骤S1的黏蛋白溶液, 混合均匀后加入1mL步骤S3的L-半胱氨酸溶液和200uL步骤S4的NaHCO₃母液, 得改良BHI培养基(若需固体培养基, 则在灭菌前添加1~1.5%琼脂);

S7: 待上述混合好的改良BHI培养基冷却至40~50℃左右, 分别添加调控剂A、调控剂B、调控剂C母液200uL到改良BHI培养基中, 摇晃均匀, 在其凝固前倒平板, 得到复合调控剂改良BHI特异性筛选培养基。

6. 如权利要求1所述的复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法, 其特征在于, 所述的筛选培养基为pH值为6.5。

7. 如权利要求1所述的复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法, 其特征在于, 所述的筛选培养采用的培养温度为37℃。

8. 如权利要求1所述的复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法, 其特征在于, 所述的筛选培养采用的混合气体配比为90%N₂、5%H₂、5%CO₂。

一种复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及一种复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法。

背景技术

[0002] 嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*, Akk菌) 存在于人体肠道内,作为人体肠道的常驻民,占人体微生物群落的3~5%,其标准菌株MucT于2004年由Derrien分离,为卵圆形,革兰阴性的厌氧菌,是疣微菌门的代表。Akk菌是一种粘蛋白分解细菌,将黏蛋白作为碳、氮元素和能量的唯一来源,即利用位于肠上皮的杯状细胞所分泌的黏蛋白“为食”,从而促进肠上皮干细胞的增殖,维持肠屏障功能完整性。近年来大量的人类和动物研究已经解决了Akk菌丰度与各种疾病的关系问题。Akk菌丰度被认为与代谢紊乱以及炎症性疾病呈负相关,包括肥胖、II型糖尿病、炎症性肠病 (IBD)、渐冻症、癫痫、自闭症和特异反应性等。

[0003] Akk菌最初由荷兰瓦格宁根大学的Derrien分离得到,国内的南方医科大学彭永正教授团队依靠Derrien团队的方法从中国南方人群中分离到22株Akk菌。江南大学翟齐啸教授团队通过改进Derrien团队的方法,发明了一种Akk菌特异性筛选培养基,可使Akk菌筛选的阳性率高达70%。这三个团队的方法都是先采用只含有纯化的猪胃黏蛋白的富集培养基进行富集培养,然后再选择出现浑浊度最低的富集培养液进行分离培养,其中会涉及到配制添加碱性溶液、酸性溶液、无机盐溶液,纯化黏蛋白等步骤,不仅实验步骤繁琐,还存在一些试剂稀有、价格昂贵等的问题,不利于实验室中快速准确地筛选分离Akk菌。另有吉林大学杨勇军教授团队采用万古霉素固体培养基的方法从健康小鼠粪便中筛选分离到两株Akk菌,其平板分离法简化了Akk菌筛选分离的步骤,但发明人在具体实施时,发现在万古霉素固体培养基上面生长出很多杂菌,其中以产臭菌株为主,很难从这些菌株中筛选出Akk菌。分析发现万古霉素只能抑制革兰氏阳性菌,对于不是Akk菌的革兰氏阴性菌并无抑制效果,因此找到能够抑制这些革兰氏阴性菌,且不抑制Akk菌的抗生素调控剂目前还未见报道。

[0004] 中国专利号CN201910721005.6公开了一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,所述的培养基为改良BHI培养基中添加Mucin和Yeast Extract,能使Akk菌在平板表面生长,且使得Akk菌的生长速度由使用普通黏蛋白培养基(BHI+黏蛋白)的3~4d降为24~36h,极大的缩短了培养时间,符合快速分离筛选的要求。因为该方法能使Akk菌快速生长,所以本发明中涉及到的改良BHI培养基是参考该专利方法,实际实施时只要能够培养Akk菌的培养基都能采用,其中Akk菌的生长速率则由培养基的特性决定。所以为了提高筛选成功率,将复合调控剂与改良BHI培养基相结合,发明一种特异性筛选Akk菌的方法,使得研究人员能够快速准确地筛选到Akk菌,以便进行深入研究。

发明内容

[0005] 针对现有技术存在的上述缺点,本发明提供了一种复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋

白阿克曼氏菌的方法。

[0006] 一种复合调控剂特异性筛选嗜黏蛋白阿克曼氏菌的方法,所述的复合调控剂为调控剂A、调控剂B、调控剂C。调控剂A为窄谱抗生素,仅对革兰氏阳性菌有效。调控剂B为广谱氨基糖苷类抗生素,对革兰氏阴性细菌,葡萄状球菌和其它的革兰氏阳性细菌有抑制作用。调控剂C能抑制革兰氏阴性及阳性菌。

[0007] 进一步的,所述的复合调控剂为调控剂A、调控剂B、调控剂C。

[0008] 进一步的,所述的复合调控剂配方为6ug/ml 调控剂A、10ug/ml 调控剂B、12ug/ml 调控剂B。

[0009] 进一步的,所述的改良BHI培养基配方为脑心浸液肉汤38.5g/L、酵母浸粉5g/L、黏蛋白2.5g/L、刃天青1mg/L、L-半胱氨酸0.5g/L、碳酸氢钠0.3g/L。

[0010] 进一步的,所述的复合调控剂改良BHI培养基配制方法为:

[0011] S1:调控剂溶液的配制:将调控剂A溶于无菌超纯水,配制成6ug/mL的母液,将调控剂B溶于无菌超纯水,配制成10ug/mL的母液,将调控剂C溶解于无菌超纯水,配制成12 ug/mL的母液,过滤除菌放置4℃冰箱备用;

[0012] S2:黏蛋白溶液的配制及纯化:将黏蛋白溶于PH=7.4的PBS缓冲液,浓度为1% (W/V),室温下,磁力搅拌2h,待其充分溶解后再以8000rpm离心15min,取上清,也冷至0~2℃,得到上清液。在上清液中加入预冷至4℃的乙醇,至乙醇终浓度为60%,轻轻颠倒混匀,4℃静置2h后弃去上清,用蒸馏水重新溶解沉淀至其纯化前的体积,121℃高压蒸汽灭菌20min,待其降温后分装至50mL无菌离心管中,放置-20℃冰箱中,备用;

[0013] S3:刃天青的配制:将刃天青溶解于蒸馏水,得到0.005% (W/V)的刃天青母液,放置 4℃冰箱中,备用;

[0014] S4:L-半胱氨酸的配制:将L-半胱氨酸溶解于蒸馏水,得到10% (W/V)的L-半胱氨酸溶液母液,过滤除菌备用;

[0015] S5:碳酸氢钠溶液的配制:将NaHCO₃溶于蒸馏水,得到3% (W/V)的NaHCO₃母液,过滤除菌备用;

[0016] S6:取脑心浸液肉汤38.5g,酵母浸粉5g,0.005% (W/V) 刃天青母液4mL定容于1L蒸馏水中,混合均匀后,调节培养基的pH为6.5±0.2,121℃高压蒸汽灭菌20min,然后取150 mL灭菌液加入50mL步骤S1的黏蛋白溶液,混合均匀后加入1mL步骤S3的L-半胱氨酸溶液和200uL步骤S4的NaHCO₃母液,得改良BHI培养基(若需固体培养基,则在灭菌前添加1~1.5%琼脂)。

[0017] S7:待上述混合好的改良BHI培养基冷却至40~50℃左右,分别添加调控剂A、调控剂 B、调控剂C母液200uL到改良BHI培养基中,摇晃均匀,在其凝固前倒平板,得到复合调控剂改良BHI培养基。

[0018] 进一步的,所述的筛选培养采用的培养温度是37℃。

[0019] 进一步的,所述的筛选培养采用的混合气体配比为90%N₂、5%H₂、5%CO₂。

[0020] 采用本发明的技术方案,具有如下有益效果:

[0021] 1、本发明的复合调控剂方法能够有效抑制粪便样品中的杂菌,调控剂A抑制革兰氏阳性菌,调控剂B抑制调控剂A无法抑制的革兰氏阴性菌,调控剂C同时抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,三种调控剂的联合使用形成有效的互补作用,降低了粪便样品中Akk菌筛

选分离的难度,并且在Akk菌纯化培养时,三种复合调控剂的使用能有效促进Akk菌的生长,对Akk菌的扩大培养和深入研究具有重要意义。

[0022] 2、采用本发明的筛选培养方法,可以使得不需采用含有黏蛋白的富集培养基进行富集培养,而可以直接将粪便样品进行梯度稀释,然后进行平板稀释涂布,在固体培养基的表明就能形成典型的菌落形态,便于挑选菌落进行分离鉴定,具有快速准确、操作简单的特点,适用于Akk菌的特异性筛选。

附图说明

[0023] 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解,构成本发明的一部分,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0024] 图1是同一粪便样品在有无调控剂组合下的平板筛选图;其中,A图为含调控剂筛选平板,B图为不含调控剂筛选平板;

[0025] 图2是本发明所分离的Akk菌落形态图;其中,A图为菌液稀释涂布,B图为菌落平板划线;

[0026] 图3是本发明所分离的Akk菌的1000倍普通光学电子显微镜下的革兰氏染色图;

[0027] 图4是本发明实施例2中所分离的Akk菌PCR扩增分子鉴定条带图;其中,电泳道从左至右分别是分子量为500bp的Maker,平板上面挑选的疑似菌落1-8,空白对照CK;

[0028] 图5是本发明实施例4中Akk菌在有无复合调控剂下的生长曲线图。

具体实施方式

[0029] 下面将结合本发明中的附图,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动条件下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0030] 下面实施例中的黏蛋白购自Sigma公司的Mucin from porcine stomach, type II, Sigma, M2378;脑心浸液肉汤(BHI)购自青岛海博生物技术有限公司;酵母浸粉、L-半胱氨酸、碳酸氢钠、大豆蛋白胨、N-乙酰葡萄糖胺购置北京澳博星生物技术有限公司;粪便来自广西壮族自治区河池市某县的长寿老人。

[0031] 实施例1

[0032] 复合调控剂改良BHI培养基的配置

[0033] 虽然中国专利号CN201910721005.6公开了一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,但是其Mucin溶液使用方法不准确,缺少黏蛋白纯化的步骤,使得该Mucin溶液即使高压蒸汽灭菌都难以消灭干扰物质,往往导致改良BHI液体培养基在添加该Mucin溶液(两者都经过高压蒸汽灭菌)后,由一开始的澄清状态变为浑浊状态(该现象将严重影响后续的分选培养效果),故培养基的浑浊使得筛选培养试验严重受阻,因此,需先对Mucin溶液进行纯化,然后灭菌,再添加到改良BHI培养基中。

[0034] 1、调控剂溶液的配制:将调控剂A溶于无菌超纯水,配制成6ug/mL的母液,将调控剂B溶于无菌超纯水,配制成10ug/mL的母液,将调控剂C溶解于无菌超纯水,配制成12ug/mL的母液,过滤除菌放置4℃冰箱备用;

[0035] 2、黏蛋白溶液的配制及纯化：将黏蛋白溶于PH=7.4的PBS缓冲液，浓度为1% (W/V)，室温下，磁力搅拌2h，待其充分溶解后再以8000rpm离心15min，取上清，也冷至0~2℃，得到上清液。在上清液中加入预冷至4℃的乙醇，至乙醇终浓度为60%，轻轻颠倒混匀，4℃静置2h后弃去上清，用蒸馏水重新溶解沉淀至其纯化前的体积，121℃高压蒸汽灭菌20min，待其降温后分装至50mL无菌离心管中，放置-20℃冰箱中，备用；

[0036] 3、刃天青的配制：将刃天青溶解于蒸馏水，得到0.005% (W/V) 的刃天青母液，放置4℃冰箱中，备用；

[0037] 4、L-半胱氨酸的配制：将L-半胱氨酸溶解于蒸馏水，得到10% (W/V) 的L-半胱氨酸溶液母液，过滤除菌备用；

[0038] 5、碳酸氢钠溶液的配制：将NaHCO₃溶于蒸馏水，得到3% (W/V) 的NaHCO₃母液，过滤除菌备用；

[0039] 6、取脑心浸液肉汤38.5g，酵母浸粉5g，0.005% (W/V) 刃天青母液4mL定容于1L蒸馏水中，混合均匀后，调节培养基的pH为6.5±0.2，121℃高压蒸汽灭菌20min，然后取150mL灭菌液加入50mL步骤S1的黏蛋白溶液，混合均匀后加入1mL步骤S3的L-半胱氨酸盐酸盐溶液和200uL步骤S4的NaHCO₃母液，得改良BHI培养基（若需固体培养基，则在灭菌前添加1~1.5%琼脂）。

[0040] 7、待上述混合好的改良BHI培养基固体培养基冷却至40~50℃左右，分别添加调控剂A、调控剂B、调控剂C母液0.2mL到改良BHI培养基中，摇晃均匀，在其凝固前倒平板，得到复合调控剂改良BHI培养基。

[0041] 实施例2

[0042] 复合调控剂特异性筛选Akk菌的方法

[0043] 具体步骤如下：

[0044] 1、材料来源

[0045] 广西壮族自治区某县粪便样品3份，样品采集自2020年9月25号，样品分装于无菌2mL离心管中，-80℃冻存储用，样品编号为DL-01，DL-02，DL-03。

[0046] 2、样品梯度稀释及平板涂布

[0047] 从-80℃冰箱中取出冷冻保藏的粪便样品，室温下解冻，准备好灭菌的磷酸盐缓冲液稀释管，每个稀释管为9mL含L-半胱氨酸盐酸盐的磷酸盐缓冲液，取1g粪便样品加入灭菌9mL含L-半胱氨酸盐酸盐的磷酸盐缓冲液中，斡旋混匀，记为10⁻¹稀释梯度，然后吸取1mL混匀液到下一个9mL稀释管中，斡旋混匀，记为10⁻²稀释梯度，依次向下操作至10⁻⁴稀释梯度。

[0048] 选取10⁻²、10⁻³、10⁻⁴三个梯度，各吸取100uL到复合调控剂改良BHI琼脂平板上面进行稀释涂布，每个梯度稀释涂布两个平板，将其放入厌氧工作站（90%N₂、5%CO₂、5%H₂）中，37℃恒温厌氧培养48-72h。

[0049] 3、镜检观察及菌落PCR鉴定

[0050] 在生长有菌落的平板取出，在超净工作台中，挑选周围无杂菌、水滴状，边缘光滑的菌落进行革兰氏染色，在普通光学显微镜下面进行观察，挑选出革兰氏阴性（呈红色）、圆形或椭圆形的菌株。

[0051] 将观察到具有此特性的菌株使用嗜黏蛋白阿克曼菌特异性引物进行菌落PCR，两

对引物为上游引物 Akk1 (CAGCACGTGAAGGTGGGGAC), 下游引物 Akk2 (CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT)。PCR采用50uL体系,以平板上面生长的单克隆菌落为模板,加入2uL上游引物,2uL下游引物,25uL Taq酶,并用ddH₂O补足至50uL。加好体系之后用移液枪反复吹吸混合液进行混匀,混匀后在小离心机上面离心。

[0052] 表1 PCR反应体系

Template	单菌落
Primer1	2 uL
Primer1	2 uL
2×MasterMix	25 uL
ddH ₂ O	up to 50 uL

[0054] 离心好后放入梯度PCR仪上进行PCR反应。

[0055] 表2 PCR反应程序

温度	时间	循环
94 °C	3 min	1
94 °C	30 sec	30 cycles
55 °C	30 sec	
72 °C	500-2000/1 min	
72 °C	5 min	1

[0057] 取2.0g琼脂糖粉末到100mL的1×电泳缓冲液中,搅拌溶解均匀后放入微波炉中加热至沸腾,而后取出晃荡摇匀,再次放入微波炉中加热至沸腾,重复上述操作2~3次至琼脂糖完全溶解。从微波炉中取出静置在通风橱中,待其冷却至40~50 °C时,加入10uL4S GelRed核酸染料混匀,倒入插有梳子的水平板中,待其冷却凝固制得凝胶。将凝胶板放入电泳缓冲液中,从左到右依次加入6uLMaker、不同菌落样品的PCR反应产物、阴性对照。设置电压100 V开始跑电泳,20~30min后取出凝胶板进行照胶观察,目标条带为327bp的片段,根据目标片段的有无来判断该菌株是否为嗜黏蛋白阿克曼菌。

[0058] 4、划线纯化及保藏

[0059] 把观察到具有目标条带的菌株在改良BHI固体培养基上面进行划线纯化,在划线纯化2~3代之后,获得纯化的单克隆菌株,将其接种到10mL改良BHI液体培养基中进行增菌培养,待其浑浊后,吸取1mL菌液与1mL 40%甘油进行混匀,放置于-80 °C冰箱中保藏。

[0060] 实施例3

[0061] 复合调控剂添加到不同的培养基上面的筛选效果

[0062] 1、不同培养基的配置

[0063] 采取三种Akk菌筛选培养基,来试验通过复合调控剂的添加下的筛选效果,三种筛选培养基如下:①改良BHI培养基:38.5g脑心浸液肉汤、2.5g黏蛋白、5g酵母浸粉、2.5g L-半胱氨酸、1mg刃天青、0.294g碳酸氢钠,蒸馏水定容至1L,若用固体培养基则添加1.5%琼

脂。②普通黏蛋白培养基:38.5g脑心浸液肉汤、4g黏蛋白、0.5g L-半胱氨酸,蒸馏水定容至1L,若用固体培养基则添加1.5%琼脂。③合成培养基:38.5g脑心浸液肉汤、16g大豆蛋白胨、11.3g葡萄糖、5.5g N-乙酰葡萄糖胺、4g L-苏氨酸、0.5g L-半胱氨酸,蒸馏水定容至1L,若用固体培养基则添加1.5%琼脂。除调控剂采用0.22 μ m无菌滤膜过滤外,其余组分均在搅拌均匀后121℃,灭菌20min,冷却至50℃左右,在超净工作台内将培养基倒培养皿,静置1h,使培养基完全凝固且散干水分后备用。

[0064] 2、复合调控剂作用下的筛选效果

[0065] (1)通过控制复合调控剂的添加与否来设置含调控剂和不含调控剂的实验对照,待涂布平板准备好后,按照实施例2进行粪便样品中的Akk菌筛选实验。待培养皿长出菌落后,观察同一粪便样品的同一稀释度在含有调控剂和不含调控剂的筛选平板上面的生长效果。

[0066] (2)通过形态学观察、革兰氏染色和PCR鉴定,计算出不同筛选平板上面的Akk菌阳性率。以培养基①为例,对比试验发现,复合调控剂筛选平板能辅助排除掉杂菌的干扰,提高筛选成功率,其Akk菌筛选阳性率为50%。而无调控剂筛选平板的Akk菌筛选阳性率仅为20%。本发明方法对Akk菌的分离筛选效果具有显著提升。

[0067] 实施例4

[0068] 有无复合调控剂下Akk菌的生长曲线图

[0069] 1、Akk菌株生长曲线的测定,以脑心浸液肉汤为基础培养基,添加复合调控剂为实验对照组,测定Akk菌分别在普通培养基和调控剂作用下的生长曲线图。吸取2mL种子液加入至200mL液体培养基中,37℃厌氧培养36h。每3h测定一次OD_{600nm}的吸光度,根据OD 值绘制Akk菌的生长曲线图。

[0070] 2、比较Akk菌在有无调控剂作用下的生长曲线图,分析显著差异性。

[0071] 实施例5

[0072] Akk菌株的抗生素药敏试验

[0073] 为了探究Akk菌对常见抗生素的药敏性,以改良BHI培养基为基底,利用Kirby-Bauer 药敏纸片琼脂扩散法(K-B法),测定Akk菌对9类12种常见抗生素的耐药性。采用的12种抗生素为:四环素、利福平、氯霉素、青霉素、红霉素、卡那霉素、万古霉素、庆大霉素、诺氟沙星、制菌霉素、盐酸阿霉素、甲硝唑。吸取100 μ L浓度为10⁸CFU/mL的菌悬液均匀涂布在改良BHI固体培养基中,待菌液完全吸收后,在其上方均匀放置3枚抗生素药片,放入37.0℃厌氧工作站,倒置培养48h后,测量并记录抑菌圈的直径,每种抗生素做三组平行。

[0074] 根据美国临床实验室标准化协会(Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI)的执行标准(见表1),判定菌株对抗生素为敏感(S)、中介(I)及耐药(R),结果如表2所示。

[0075] 表1 CLSI抗微生物药敏试验执行标准

	种类	调控剂名称	纸片含药量 ($\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$)	抑菌圈直径/mm		
				S (敏感)	I (中介)	R (耐药)
[0076]	氨基糖苷类	硫酸链霉素	10	≥ 15	13 ~ 14	≤ 12
		庆大霉素	10	≥ 15	13 ~ 14	≤ 12
		卡那霉素	30	≥ 18	14 ~ 17	≤ 13
	β -内酰胺类	青霉素	10	≥ 29	~	≤ 28
	氯霉素类	氯霉素	30	≥ 18	13 ~ 17	≤ 12
	糖苷类	万古霉素	30	≥ 17	15 ~ 16	≤ 14
	大环内酯类	红霉素	15	≥ 23	14 ~ 22	≤ 13
		制菌霉素	15	≥ 19	14 ~ 17	≤ 13
	利福霉素类	利福平	5	≥ 20	17 ~ 19	≤ 16
	四环素类	四环素	30	≥ 19	15 ~ 18	≤ 14
	喹诺酮类	诺氟沙星	10	≥ 16	14 ~ 15	≤ 13
	硝基咪唑类	甲硝唑	30	≥ 32	9 ~ 31	≤ 8

[0077] 表2 Akk菌对抗生素的耐药性

	种类	调控剂名称	Akk1		Akk2	
			抑菌圈直径/mm	判断	抑菌圈直径/mm	判断
[0078]	氨基糖苷类	硫酸链霉素	12.4 $\pm$ 0.14	I	19.55 $\pm$ 2.90	S
		庆大霉素	0.00	R	0.00	R
		卡那霉素	0.00	R	0.00	R
	β -内酰胺类	青霉素	21.45 $\pm$ 2.19	R	27.2 $\pm$ 0.14	R
	氯霉素类	氯霉素	24.9 $\pm$ 0.42	S	25.65 $\pm$ 0.92	S
	糖苷类	万古霉素	0.00	R	0.00	R
	大环内酯类	红霉素	38 $\pm$ 0.28	S	22.3 $\pm$ 0.71	I
		制菌霉素	0.00	R	0.00	R
	利福霉素类	利福平	27.55 $\pm$ 1.63	R	31.7 $\pm$ 1.84	R
	四环素类	四环素	33.65 $\pm$ 0.92	S	14.45 $\pm$ 2.19	I
	喹诺酮类	诺氟沙星	0.00	R	13.4 $\pm$ 0.14	I
	硝基咪唑类	甲硝唑	0.00	R	0.00	R

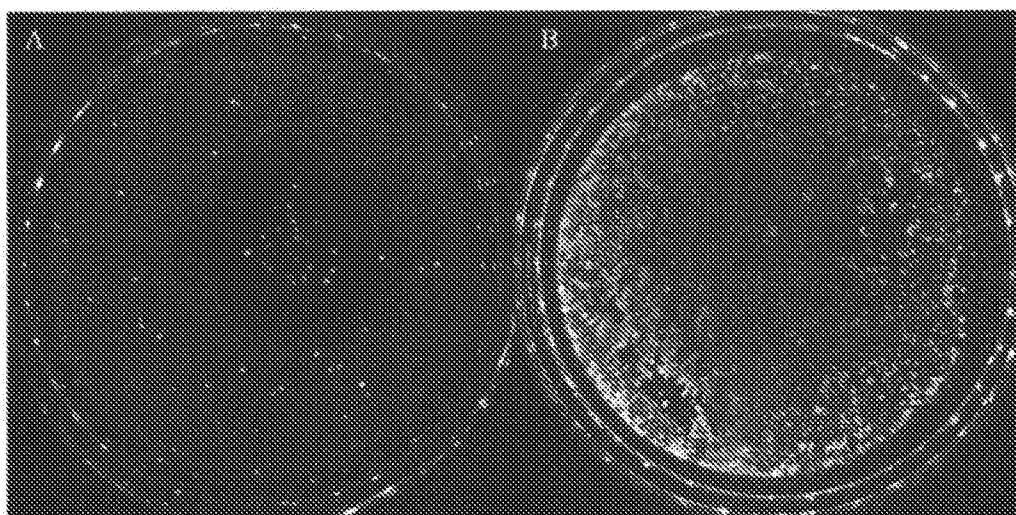


图1

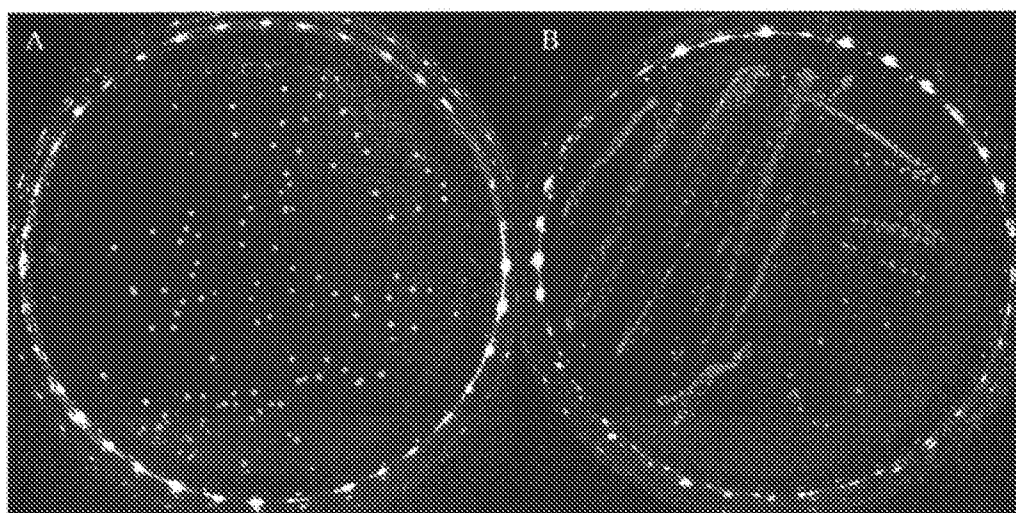


图2

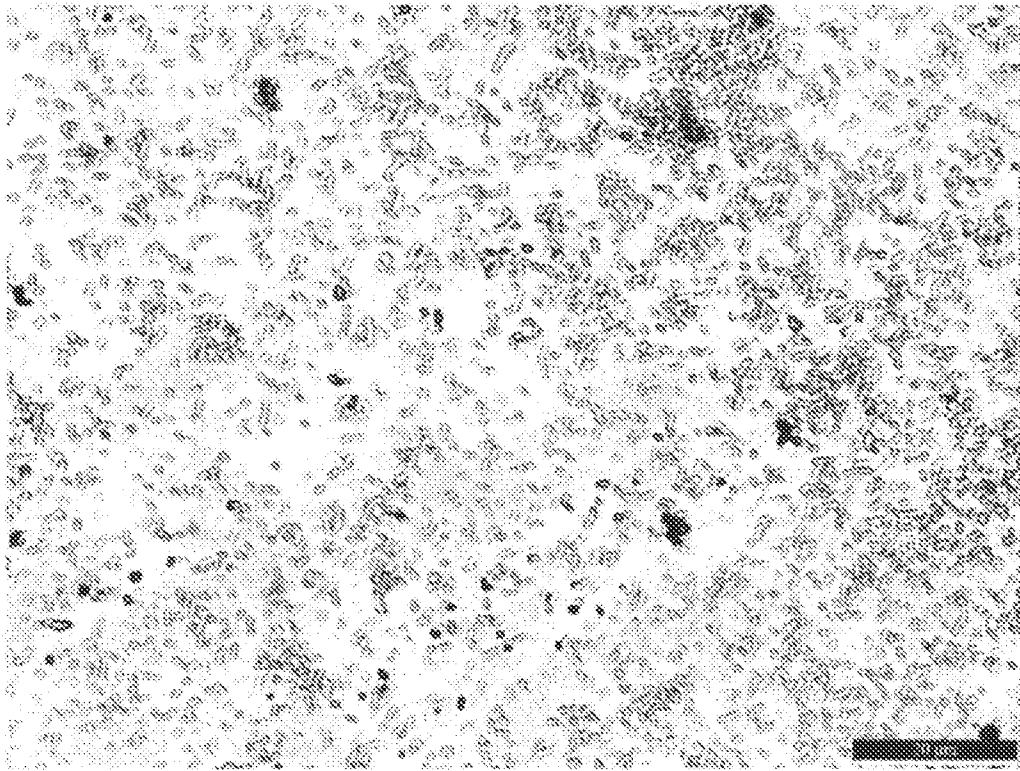


图3

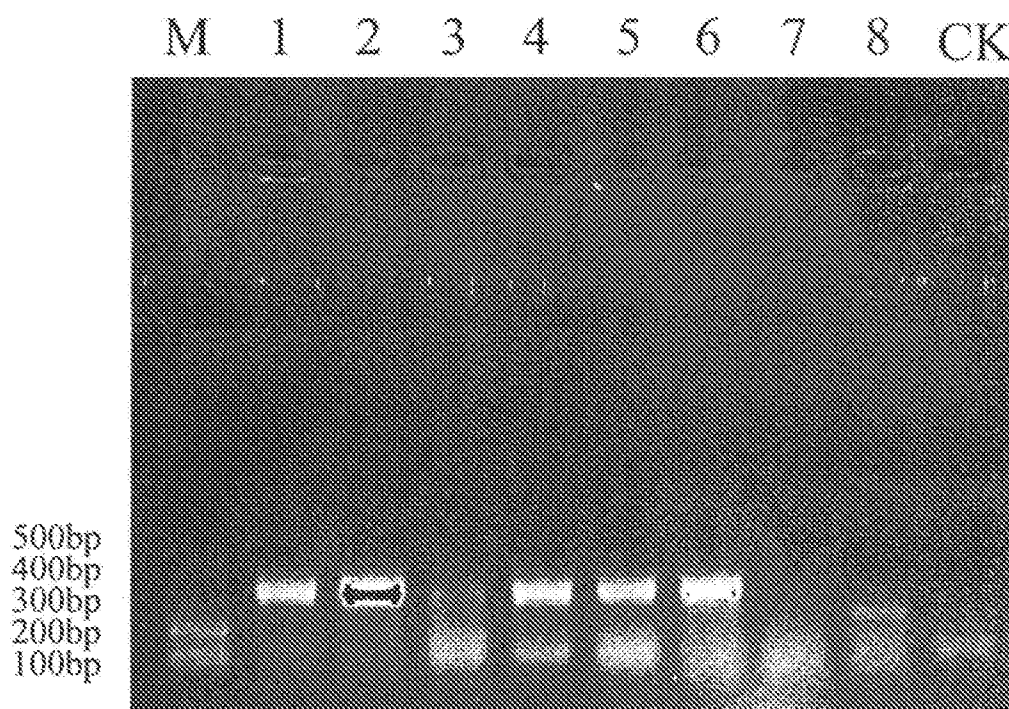


图4

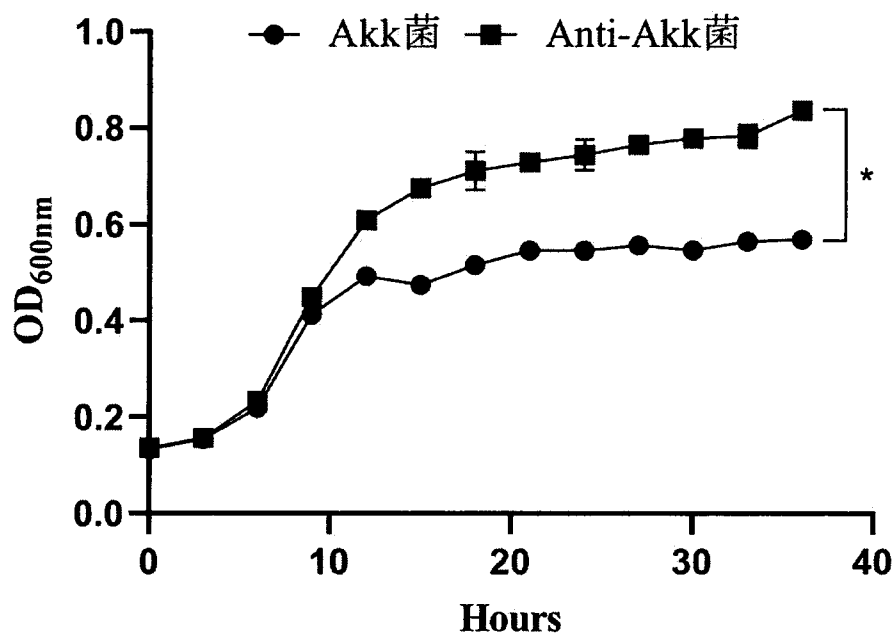


图5