

Biolog 微生物自动分析系统 ——酵母菌鉴定操作规程的研究*

李金霞 程 池 姚 粟 胡海蓉

(中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心, 北京, 100027)

摘 要 Biolog 微生物自动分析系统是美国 Biolog 公司研制开发的新型自动化快速微生物鉴定系统, 以酵母菌与 96 孔微平板上多种脱水碳源进行氧化实验和同化实验为基础进行鉴定, 将菌体生长所产生的特征性代谢图谱与标准数据库作比对, 从而得出鉴定结果。该系统目前已成为国际上酵母菌多相分类鉴定常用的技术手段。文中在总结实践经验的基础上, 参阅最新 Biolog 系统操作手册 4.2 版和国家微生物资源平台技术规程的统一格式, 研究制定了酵母菌鉴定的操作规程, 以提高我国 Biolog 系统对酵母菌的鉴定应用水平。

关键词 Biolog 微生物自动分析系统, 酵母菌鉴定, 操作规程

随着仪器分析技术的进步和计算机的广泛应用, 微生物菌种鉴定逐渐由传统的形态学观察和人工生理生化实验鉴定发展进入了基于仪器自动化分析的鉴定系统阶段^[1]。近年来, 相关的酵母菌快速鉴定系统不断面市, 如 API 20C, ATB 32C, VITEK YBC 和 API Candid 系统等^[2,3]。这些快速鉴定系统大多数是应用于临床酵母菌的鉴定, 如假丝酵母属、隐球酵母属等, 针对性较强, 能鉴定的酵母菌种类较少, 其中 API 20C 能鉴定的酵母菌种类为 37 种, ATB 32C 能鉴定的酵母菌种类为 69 种。

Biolog 微生物自动分析系统是美国 Biolog 公司从 1989 年开始推出的一套微生物鉴定系统, 最早进入商品化应用的是革兰氏阴性好氧细菌鉴定数据库 (GN), 其后陆续推出革兰氏阳性好氧细菌 (GP)、酵母菌 (YT)、厌氧细菌 (AN) 和丝状真菌 (FF) 鉴定数据库。Biolog 系统 6.01 版数据库共包括 1 973 种微生物, 其中酵母菌 52 个属、267 个种。与其他鉴定系统相比, Biolog 微生物自动鉴定系统能鉴定的酵母菌种类多, 数据量大, 适用范围广, 可用于环境、食品、工业和临床某些病原菌的鉴定分析。目前 Biolog 微生物自动分析系统已成为国际上酵母菌多相分类鉴定常用的技术手段之一。Praphailong 等人用该系统对 72 株酵母进行了 154 次鉴定实验, 结果表明 Biolog 系统对 *Candida krusei*、*C. parapsilosis*、*Debaryomyces hansenii*、*Dekkera bruxellensis*、*D. naardenensis*、*Kloeckera apiculata*、*Pichia anomala*、*Saccha-*

romyces cerevisiae、*Schizosaccharomyces pombe* 和 *Yarrowia lipolytica* 等常见酵母准确鉴定到种的概率达到 100%, 取得了良好结果^[2]。Kang, Heui-yun 等人成功地运用 Biolog 系统和 18S rRNA 序列分析 2 种方法, 对 1 株木糖醇高产菌株 *C. tropicalis* HY200 进行了鉴定^[4]。台湾的 Shan-Hua Yang 等人将酵母菌对 Biolog 微平板 (Microplate) 上不同碳源利用的结果作为生理生化反应结果, 结合形态观察等其他实验方法, 对 2 株 *Cryptococcus* 菌和一株 *Candida* 菌进行了鉴定^[5]。

目前我国已累计引进 Biolog 微生物自动分析系统有 100 余台, 但主要是应用于细菌的鉴定分析^[6-9], 应用于酵母菌鉴定的研究成果很少^[10]。为提高我国 Biolog 系统对酵母菌的鉴定应用水平, 我们在采用该系统对大量酵母菌菌种进行复核和鉴定实验的基础上, 根据 Biolog 系统操作手册 4.2 版^[11]和国家微生物资源平台技术规程的统一格式^[12], 研究制定了《Biolog 微生物自动分析系统——酵母菌鉴定操作规程》。

酵母菌鉴定操作规程的内容包括范围、术语和定义、原理、操作步骤以及附录。

1 范 围

本规程规定了 Biolog 微生物自动分析系统酵母菌鉴定的操作程序和方法。

本规程适用于 Biolog 微生物自动分析系统对酵母菌的鉴定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规程。

第一作者: 硕士, 工程师。

* 国家科技基础条件平台建设项目 (2004DKA30590)

收稿日期: 2006-05-24

2.1 Biolog 微生物自动分析系统

由美国 Biolog 公司生产的用于微生物菌种鉴定的自动分析系统,可鉴定包括需氧细菌、厌氧细菌、酵母菌和丝状真菌在内的 2 000 余种微生物,几乎涵盖了微生物学不同领域中比较重要的菌种,所涉及领域包括制药、生物技术、化妆品、兽医和临床医学、农业和环境科学、食品加工和安全,也可应用于微生物代谢、特性和群落等的分析研究。

Biolog 微生物自动分析系统包括:读数仪、数据库软件、浊度仪、菌落放大灯、八头电动加液器以及计算机等配件。

2.2 纯培养

仅包含 1 种微生物菌种的培养物。

2.3 BUY 培养基

即 Biolog Universal Yeast Agar,指 Biolog 公司生产的适用于酵母菌培养所用的专用培养基。配制方法见附录 I。

2.4 接种液

制备菌悬液使用的稀释液。酵母菌所用接种液为无菌蒸馏水。

2.5 微平板

Biolog 系统所采用的鉴定平板,有 96 孔,每孔中均含 1 种或几种脱水碳源,横排编号为 1~12,纵排编号为 A~H。用于酵母鉴定的微平板类型为 YT, A1 孔和 D1 孔为空白对照,其中 A~C 行每孔中均含有四唑类氧化还原染色剂和胶质,D~H 行每孔中不含四唑类氧化还原染色剂。详见附录 II。

2.6 微平板反应

酵母菌对微平板中的碳源的利用情况,其中 A~C 行为颜色反应,D~H 行为浊度反应,结果分为阴性值、阳性值和边缘值 3 种。

2.7 浊度

透光率的值,用以表示接种细胞的浓度。

2.8 浊度标准品

对应不同浊度的标准品。酵母菌浊度标准品为 47% T/YT。

2.9 接种液

制备菌悬液使用的稀释液,酵母菌所用接种液为无菌蒸馏水。

2.10 阅读器模式

通过读数仪记录微平板反应结果的软件模式。

2.11 手动模式

通过人工观察记录微平板反应结果的软件模式。

3 原理

Biolog 自动微生物分析系统主要根据酵母菌对糖、醇、酸、酯、苷和大分子聚合物等多种碳源的利用情况进行鉴定,其中 A~C 行基于显色反应原理,D~H 行基于浊度差异原理。酵母菌利用碳源进行呼吸时,会将 A~C 行内的四唑紫(Tetrazolium Violet TV)染色剂从无色还原成紫色,同化 D~H 行的碳源进行生长时,细胞浊度增加,从而在鉴定微平板上形成该菌株特征性的反应模式或“指纹图谱”,通过纤维光学读取设备——读数仪来读取颜色变化,由计算机通过概率最大模拟法将该反应模式或“指纹图谱”与数据库相比较,将目标菌株与数据库相关菌株的特征数据进行比对,获得最大限度的匹配,可以在瞬间得到鉴定结果,确定所分析的菌株的属名或种名。

4 操作步骤

4.1 酵母菌的纯培养

用于鉴定的酵母菌必须为纯培养物,可将菌种分离纯化获得单菌落,使用菌落放大灯观察菌落形态判断是否为纯培养物。

酵母菌纯培养所用培养基为 BUY 培养基,也可以用 YNB、MEA 等培养基代替^[2],培养温度为 26~28℃,培养时间不宜过长,一般为 48~72 h。

4.2 富集培养

酵母菌的富集培养必须用 Biolog 专用培养基——BUY 培养基,培养温度为 26~28℃,培养时间不超过 48 h。

4.3 菌悬液制备

4.3.1 操作步骤

4.3.1.1 取无菌棉签在接种液中蘸湿。

4.3.1.2 将棉签在菌落表面滚动,粘取菌体,注意不要带出培养基。

4.3.1.3 在接种液管液面上沿内壁转动棉签,使菌体附着在内壁上,同时将菌体均匀打散。

4.3.1.4 倾斜接种液管,用棉签将菌体分散于接种液中。如果有小的菌团,应使之沉到管底。

4.3.1.5 调整浊度

(1)关闭浊度计电源,调整指针至“0”刻度;

(2)用吸水纸擦干净空白接种液管外壁,置于浊度计中,接通电源,调整指针至 100% T;

(3)使用 YT 浊度标准品检查浊度计的准确性,并调整至 47% T;

(4) 擦干菌悬液管外壁, 插入浊度计, 读取菌悬液浊度值;

(5) 通过添加菌体或空白接种液调整浊度值, 使其在相应标准浊度值的 $\pm 3\%$ 范围内。

4.3.2 注意事项

(1) 为确保浊度计读数准确, 制备酵母菌所用接种液时必须用 Biolog 专用试管。

(2) 分批制备样品菌悬液, 从菌悬液制备完成到接种微平板的时间间隔不宜超过 20 min。

4.4 微平板的接种与培养

4.4.1 微平板的接种

将制备好的菌悬液倒入加样槽中, 使用八道电动移液器, 将其接种于微平板的 96 孔中。酵母菌鉴定用 YT 微平板, 接种量为 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 。

4.4.2 微平板的培养

盖上微平板盖, 标上菌株编号, 放置于大小适宜的托盘中, 保持一定的湿度, 可将 1 块湿毛巾垫于托盘底部来保持湿度, 培养温度为 26°C 。

4.5 微平板读数

4.5.1 微平板读数时间

培养至 24 h、48 h 和 72 h 时各读数 1 次。

4.5.2 读取微平板

(1) 打开“MicroLog”应用程序;

(2) 点击“SET UP”, 启动阅读程序, 选择阅读器模式 (Reader Mode), 点击“initialize reader”, 进行初始化设置, 等到界面上红色的“NO”键变成绿色的“YES”时, 进入“DATE”界面; 如采用人工读数, 进入手动模式 (Manual Mode);

(3) 选择培养时间和微平板类型, 输入样品编号, 选择微平板类型为“YT”时, “Strain type”会自动选择为“NOT APPLICABLE”;

(4) 取下微平板盖, 放入读数仪托架上, 合上读数仪盖子, 准备读数;

(5) 按“Read Next”键开始读数。

4.5.3 保存及读取鉴定结果

(1) 在“SET UP”界面点击“output date file name”, 输入保存文件名和地址;

(2) 返回“DATE”界面点击“SAVE”, 结果保存于指定路径中;

(3) 在“SET UP”界面上选择“File”模式点击“input date file name”, 找到需要读取的文件;

(4) 打印出结果。

4.6 结果分析

Biolog 软件将读取的 96 孔微平板反应结果按照与数据库的匹配程度列出 10 个结果, 如果鉴定结果与数据库匹配良好, 将显示鉴定的结果在绿色状态栏上; 如果鉴定结果不可靠, 结果栏为黄色, 显示“NO ID”, 但仍列出最可能的 10 个结果。

每个结果均显示 3 种重要的参数, 即可能性 Probability (PROB), 相似性 Similarity (SIM) 和位距 Distance (DIS)。DIS 和 SIM 是最重要的 2 个值, DIS 值表示测试结果与数据库相应数据条的位距, SIM 值表示测试结果与数据库相应数据条的相似程度。Biolog 系统规定: 酵母菌培养 24h, 其 SIM 值 ≥ 0.75 , 培养 48 h 或 72 h 时, SIM 值 ≥ 0.50 , 系统自动给出的鉴定结果为种名, SIM 值越接近 1.00, 鉴定结果的可靠性越高; 当 SIM 值小于 0.5, 但鉴定结果中属名相同的结果的 SIM 值之和大于 0.5 时, 自动给出的鉴定结果为属名。

附录

I BUY 培养基的配制

1. 按制备 1000 mL 培养基计, 称取 60 g BUY 琼脂培养基, 1000 mL 纯净水、蒸馏水或去离子水。
2. 轻微煮沸, 搅拌以溶解琼脂和其他组份。
3. 冷却后调整 pH 值至 $5.6 \pm 0.4 (25^\circ\text{C})$ 。
4. 121°C 灭菌 15 min。
5. 冷却至 $45 \sim 50^\circ\text{C}$ 。
6. 倒平板。

II YT 微平板碳源分布 (表 1)

表 1 YT 微平板碳源分布

A1 水	A2 乙酸	A3 甲酸/蚁酸	A4 丙酸	A5 琥珀酸	A6 琥珀酸单甲基酯	A7 L-天门冬氨酸	A8 L-谷氨酸	A9 L-脯氨酸	A10 D-葡萄糖酸	A11 糊精	A12 菊糖/天然果寡糖
B1 D-纤维二糖	B2 龙胆二糖	B3 麦芽糖	B4 麦芽三糖	B5 D-松三糖	B6 D-蜜二糖	B7 异麦芽酮糖	B8 棉子糖	B9 水苏糖	B10 蔗糖	B11 D-海藻糖	B12 松二糖
C1 N-乙酰基-D-葡萄糖氨	C2 α -D-葡萄糖	C3 D-半乳糖	C4 D-阿洛酮糖	C5 L-山梨糖	C6 水杨苷	C7 D-甘露醇	C8 D-山梨醇	C9 D-阿拉伯糖醇	C10 木糖醇	C11 甘油/丙三醇	C12 吐温 80

D1 水	D2 延胡索酸	D3 L-苹果酸	D4 琥珀酸单甲基酯	D5 溴代丁二酸	D6 L-谷氨酸	D7 γ -氨基(基)酸	D8 α -酮戊二酸	D9 2-酮葡萄糖酸	D10 D-葡萄糖酸	D11 糊精	D12 菊糖/天然果寡糖
E1 D-纤维二糖	E2 龙胆二糖	E3 麦芽糖	E4 麦芽三糖	E5 D-松三糖	E6 D-蜜二糖	E7 异麦芽酮糖	E8 棉子糖	E9 水苏糖	E10 蔗糖	E11 D-海藻糖	E12 松二糖
F1 N-乙酰基-D-葡萄糖氨	F2 D-葡萄糖氨	F3a-D-葡萄糖	F4 D-半乳糖	F5 D-阿洛酮糖	F6 L-鼠李糖	F7 L-山梨糖	F8 α -甲基-D-葡萄糖苷	F9 β -甲基-D-葡萄糖苷	F10 苦杏仁苷	F11 熊果苷	F12 水杨苷
G1 麦芽糖醇	G2 D-甘露醇	G3 D-山梨醇	G4 春福寿草醇	G5 D-阿糖醇	G6 木糖醇	G7 i-赤藻糖醇	G8 甘油/丙三醇	G9 吐温 80	G10 L-阿拉伯糖	G11 D-阿拉伯糖	G12 D-核糖
H1 D-木糖/戊醛糖	H2 琥珀酸单甲基酯和 D-木糖/戊醛糖	H3 N-乙酰基-L-谷氨酸和 D-木糖/戊醛糖	H4 奎宁酸和 D-木糖/戊醛糖	H5 D-葡萄糖醛酸和 D-木糖/戊醛糖	H6 糊精和 D-木糖/戊醛糖	H7 α -D-乳糖和 D-木糖/戊醛糖	H8 D-蜜二糖和 D-木糖/戊醛糖	H9 D-半乳糖和 D-木糖/戊醛糖	H10 m-肌醇和 D-木糖/戊醛糖	H11 1,2-丙二醇和 D-木糖/戊醛糖	H12 甲基乙酰基甲醇/乙偶姻和 D-木糖/戊醛糖

参 考 文 献

- 程 池,杨 梅,李金霞,等. Biolog 微生物自动分析系统-细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5):50~54
- Praphailong W, Van Gestel M, Fleet G H, et al. Evaluation of the Bilog system for the identification of food and beverage yeasts [J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 24:455~459
- 王丽敏,李 军,胡小松. 苹果原料中酵母菌的分离鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4):14~17
- Heui Yun Kang, Yong Sung Kim, Geun Joong Kim, et al. Screening and characterization of flocculent yeast, *Candida* sp. HY200, for the production of xylitol from D-xylose[J]. J Microbiol Biotechnol, 2005, 15(2): 362~367
- Shan-Hua Yang, Pi-Han Wang. Three species of yeasts news to Taiwan[J]. Taiwan, 2003, 48(2):99~105
- 张朝华. Biolog 细菌自动鉴定系统的应用[J]. 中国进出口动植物检, 1994(3):30~32
- 谢家仪,王永力. BIOLOG 细菌自动鉴定系统的应用与研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(5):264~267
- 高崇省,魏亚东,王学令. BIOLOG 细菌自动鉴定系统操作体会[J]. 中国进出口动植物检, 1996(2):26~27
- 冯瑞华,樊 蕙,李 力,等. Biolog 细菌自动鉴定系统应用初探[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(2):36~38
- 李 运,盛 慧,赵荣华. Biolog 微生物鉴定系统在菌种鉴定中的应用[J]. 酿酒科技, 2005, 133(7):84~85.
- Micro Log System, Release 4.2 User Guide
- 顾金刚主编. 微生物菌种资源收集、整理、保藏技术规程[M]. 北京:中国农业出版社, 2005

Bilog Microbial Identification System—Study on the Operating Regulation of Yeast Identification

Li Jinxia Cheng Chi Yao Su Hu Hairong

(China Center of Industrial Culture Collection, China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

ABSTRACT Biolog Microbial Identification System, which is developed by Biolog Inc., is a new automated technology for rapid identification of microorganisms. The system is based around a 96-well microtitre tray containing a range of dehydrated carbon sources for oxidation and assimilation tests by yeast. The metabolic fingerprint provided by each isolate growth is compared to the standard profiles in the Biolog database and the identification result will be given. To date up to 100 sets of Biolog system have been introduced into China, and most of them are used for identifying bacteria while the study on yeast identification is rarely reported. Based on practical experience, and referred to Biolog User Guide 4.2 and Rules of National Infrastructure of Culture Resources, we present the operating regulation of yeast identification and hope the regulation will help improving the application of the Biolog system in China.

Key words Biolog Microbial Identification System, yeast identification, operating regulation