

MIDI Sherlock 微生物自动鉴定系统鉴定方法的建立

——以贻贝中分离的蜡样芽胞杆菌为例

黄朱梁, 裘迪红*

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 研究了用 MIDI Sherlock 微生物自动鉴定系统对贻贝中分离的蜡样芽胞杆菌自动鉴定方法的建立, 通过培养基和取菌量的不同展开分析, 并用生理生化鉴定和 PCR 鉴定来验证其准确性。结果表明: MIDI 鉴定系统对于用 TSBA 培养基培养的蜡样芽胞杆菌鉴定的准确率比用营养琼脂培养基培养的要高, 而且取菌量为 100~120 mg 组鉴定时的准确率要高于其他取菌量的组, 说明培养基和取菌量的不同都会对该系统的鉴定结果产生影响。最后确定蜡样芽胞杆菌鉴定方法为: TSBA 培养待检微生物, 获菌量控制在 100~120 mg 之间, 生理生化鉴定和 PCR 鉴定验证了该方法的准确性。

关键词: 蜡样芽胞杆菌; MIDI 鉴定系统; 生理生化鉴定; PCR 鉴定

中图分类号: Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1001-5132 (2011) 02-0008-06

蜡样芽胞杆菌在自然界分布广泛, 常存在于土壤、灰尘和污水中, 植物和许多生熟食品中常见。已从多种食品中分离出该菌, 包括肉、乳制品、蔬菜、鱼、土豆、糊、酱油、布丁、炒米饭以及各种甜点等^[1-2]。蜡样芽胞杆菌与少数食物中毒有关(约 2%~5%), 包括严重的恶心、呕吐以及腹痛^[3]。

蜡样芽胞杆菌为革兰氏阳性大杆菌, 大小为 (1~1.3) μm × (3~5) μm , 兼性需氧, 形成芽胞, 芽胞不突出菌体, 菌体两端较平整, 多数呈链状排列, 与炭疽杆菌相似。引起食物中毒的菌株多为周鞭毛, 有动力。蜡样芽胞杆菌生长温度为 25~37 $^{\circ}\text{C}$, 最佳温度 30~32 $^{\circ}\text{C}$ 。在肉汤中生长混浊有菌膜或壁环, 振摇易乳化。在普通琼脂上生成的菌落较大, 直径 3~10 mm, 灰白色、不透明, 表面粗糙似毛玻璃状或融蜡状, 边缘常呈扩展状。偶有产生黄绿色色素, 在血琼脂平板上呈草绿色溶血。在甘露醇卵黄多粘菌素(MYP)平板上, 呈红粉色菌落。蜡样芽胞杆菌耐热, 其 37 $^{\circ}\text{C}$ 16 h 的肉汤培养物的 D80 值(在 80 $^{\circ}\text{C}$ 时使细菌数减少 90%所需的时间)为

10~15 min; 使肉汤中细菌($2.4 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$)转为阴性需 100~20 min; 其游离芽胞能耐受 100~30 min, 而干热灭菌需 120~60 min 才能杀死。

蜡样芽胞杆菌可用传统的微生物鉴定方法鉴定, 但操作步骤复杂、费时且成本较高^[4], 因而微生物鉴定自动化系统的开发和运用得到了越来越广泛的关注。常见的几种微生物鉴定系统有 API 鉴定系统、Biolog 鉴定系统和 MIDI 鉴定系统。API 鉴定系统是国际微生物学公认的快速鉴定系统, 也是国内应用最多的系统^[5]; 美国 Biolog 公司生产的 Biolog 细菌鉴定系统是一种快速、准确且标准化程度高的鉴定系统, 主要根据细菌对 95 种碳源的利用情况, 以四唑紫为指示剂, 数据经计算机处理并与数据库内已知细菌比较, 实现对待测菌的快速鉴定^[6]。

实验使用的是一套由美国 MIDI 公司开发成功的微生物鉴定自动化系统, 该系统操作安全、简单、快速, 实验成本相对较低。有研究显示, 个人在 5 d 内可以完成 200 株菌的分析工作^[7]。它主

收稿日期: 2010-06-16.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 宁波大学科研基金(XK0715046)。

第一作者: 黄朱梁(1985-), 男, 浙江舟山人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产品安全。E-mail: hzl3021995@yahoo.com.cn

*通讯作者: 裘迪红(1966-), 女, 浙江舟山人, 副教授, 主要研究方向: 水产品安全。E-mail: qjudihongxl@163.Com

要根据不同种类微生物细胞膜中磷脂脂肪酸 (Phospholipid Fatty Acid, PLFA) 的类型和含量具有种的特异性、指示性和遗传稳定性等特殊性能对微生物进行全自动鉴定和分析, 菌体脂肪酸组成相对稳定, 不受生化反应变异及质粒丢失等因素的影响。此外, 磷脂脂肪酸可以代表微生物群落中“存活”的那部分群体^[8]。脂肪酸分型法一般可通过单次试验比较准确地将微生物鉴定到种^[9]。该系统备有图谱识别软件和迄今为止微生物鉴定系统中最大的数据库资源, 包括嗜氧菌 1100 余种, 厌氧菌 800 余种, 酵母菌和放线菌约 300 种, 共计超过 2200 种。但 Sherlock MIS 系统主要用于医学、防疫学或出入境检验检疫等领域, 在土壤、农业、环境科学等领域的应用很少。Piotrowska-Seget 等运用该系统鉴定了重金属污染土壤中的耐性菌^[10]。Oka 等对该系统在鉴定土壤或根际微生物中的效果予以了肯定^[11]。但有关阐述 Sherlock MIS 系统在微生物鉴定条件方面的文献还未见详细报道, 而且该系统在我国土壤微生物鉴定中的应用几乎空白。

笔者运用 Sherlock MIS 微生物鉴定系统鉴定贻贝中分离的蜡样芽胞杆菌, 探讨了培养基以及取菌量等因素对鉴定结果的影响, 并通过 PCR 菌种鉴定方法和传统微生物生理生化鉴定方法检验该系统菌种鉴定的准确性, 为 Sherlock 微生物鉴定系统鉴定蜡样芽胞杆菌提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

蜡样芽胞杆菌从贻贝中分离, 在宁波大学生命学院食品安全实验室保存。

1.1.2 试剂

有机试剂均为 HPLC 级, 无机试剂均为优级纯。皂化试剂: 混合 150 mL 去离子水和 150 mL 甲醇, 加入 45 g NaOH, 搅拌至完全溶解。甲基化试剂: 325 mL $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸加入到 275 mL 甲醇中, 混合均匀。萃取试剂: 加 200 mL 甲基叔丁基醚到 200 mL 正己烷中, 混合均匀。碱洗液: 在 900 mL 去离子水中加入 10.8 g NaOH, 搅拌至完全溶解。饱和 NaCl 溶液: 在 100 mL 去离子水中加入 40 g NaCl。亚硝酸盐试剂、V-P 试剂。

1.1.3 仪器与设备

Agilent 6850 气相色谱仪、Sherlock MIS 系统、10 mL 带聚四氟乙烯塞的玻璃瓶、恒温水浴箱、快速蒸汽灭菌锅(天津超拓制造)、无菌操作台、SHP-250 型生化培养箱、电子天平(上海精宏实验设备有限公司)。

1.1.4 培养基

TSBA 培养基: 将 7.5 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (Trypticase soy broth, TSB)、3.75 g 琼脂(Granulated agar)和 250 mL 去离子水加入到 500 mL 锥形瓶里。加热并搅拌至完全混合和琼脂完全溶解, 在温度 121°C 、0.103 MPa 下高压灭菌 15 min, 在水浴中冷却至 60°C 。加 20~25 mL 溶解的琼脂, 分装至无菌直径为 90 mm 的培养皿中, 琼脂须有 2.5~3.2 mm 深。允许琼脂在室温下凝固, 但如果培养基需储存一段时间, 必须在 24 h 内包装在无菌装置中。

营养琼脂培养基: 将 7 g 营养琼脂和 200 mL 蒸馏水混合在 500 mL 的锥形瓶里, 加热搅拌至完全混合和琼脂完全溶解, 在温度 121°C 、0.103 MPa 下高压灭菌 20 min, 在水浴中冷却至 60°C 。加 20~25 mL 溶解的琼脂分装至无菌直径为 90 mm 的培养皿中, 琼脂须有 2.5~3.2 mm 深。允许琼脂在室温下凝固, 但如果培养基需储存一段时间, 必须在 24 h 内包装在无菌装置中。

酚红葡萄糖培养基: 牛肉膏 2 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 2 g, 葡萄糖 30 g, 蒸馏水 200 mL, pH 6.5, 121°C 灭菌 20 min。

硝酸盐还原培养基: 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, KNO_3 (分析纯) 2 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4, 121°C 灭菌 20 min^[12]。

另有培养基: L-酪氨酸营养琼脂培养基、溶菌酶营养培养基、改良 V-P 培养基、动力培养基、胰酪胨大豆羊血琼脂(TSSB)、甘露醇卵黄多粘菌素(MYP)培养基。

1.2 方法

1.2.1 Sherlock 鉴定系统鉴定蜡样芽胞杆菌

采用 MIDI 推荐的方法: 蜡样芽胞杆菌培养 - 获取 - 皂化 - 甲基化 - 萃取 - 气相分析。

1.2.2 传统生理生化鉴定蜡样芽胞杆菌

通过葡萄糖发酵试验、硝酸还原试验、V-P 试验、L-酪氨酸分解试验、溶菌酶试验、卵磷脂酶试

验、动力试验、根状生长试验、溶血试验和蛋白质结晶毒素试验等 10 项生理生化试验结果与《伯杰氏细菌鉴定手册》进行对比来鉴定以上培养的蜡样芽孢杆菌^[13]。

1.2.3 不同培养基对蜡样芽孢杆菌 MIDI 鉴定结果影响实验

用不同的培养基来培养待鉴定的蜡样芽孢杆菌,实验选用 MIDI 推荐使用的 TSBA 培养基和实验室经常使用的营养琼脂培养基,然后通过 MIDI 推荐的方法对样品进行前处理,最后上机检测结果,比较不同培养基对鉴定结果的影响。

1.2.4 不同取量对蜡样芽孢杆菌 MIDI 鉴定结果影响实验

选取以下 5 个梯度: 40 mg、80 mg、100 mg、120 mg、140 mg 通过取菌量的变化检测最后对鉴定准确性的影响。

1.2.5 PCR 菌种鉴定方法鉴定蜡样芽孢杆菌

实验直接用菌体作模板,不进行基因组 DNA 的提取步骤,操作如下:

用无菌移液枪枪头挑取适量经活化的单菌落,放入 20 μL PCR 水中,充分振荡后稍离心(使在离心管壁上的菌体进入水中),作为 PCR 模板,其反应体系见表 1。

表 1 PCR 反应体系

反应液成分	体积/ μL
10 \times Buffer	2.5
MgCl ₂	1.5
dNTPs	2.0
27F	0.5
1492R	0.5
Taq DNA 聚合酶	0.2
细菌 DNA 模板	1.0
ddH ₂ O	16.8
总反应体积	25.0

循环参数为: 94 预变性 3 min; 94、60 s (变性), 50、60 s (退火), 72、2 min (延伸), 循环 30 次; 72 延伸 10 min. 反应完毕取 5 μL 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统下分析结果。

目的片段的回收采用 Biospin 胶回收试剂盒。

目的片段与载体的连接: 参照宝生物工程(大连)有限公司的 pMD18-T Vector 试剂盒说明书。

在微量离心管中配制下列连接反应体系(表 2), 总量为 5 μL , 16 过夜。

表 2 连接反应体系

反应液成分	体积/ μL
pMD18-T Vector	0.5
Insert DNA	2.0
Solution (连接反应液)	2.5
总反应体积	5.0

重组质粒的转化: 从超低温冰箱中拿出 1 管冻存的感受态细胞,冰上解冻→将 5 μL 的过夜连接反应液加入到 30 μL 感受态细胞中,冰中放置 30 min→离心管静置与 42 水浴 45 s, 再在冰中放置 1 min→加入 300 μL LB(Amp-)培养液, 37、140 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 60 min。

阳性克隆的初步筛选: 将 120 μL 菌液加入含有 Amp 的 LB 琼脂平板上, 用无菌玻璃涂布器均匀涂布于培养基表面, 待接种物完全被吸收后, 倒置于 37 培养箱中, 12~16 h 后, 观察有无白色单菌落生长。

PCR 法直接筛选重组阳性克隆: (1)菌落 PCR 模板的制备: 同前, 只是挑取的是单菌落放入 10 μL 无菌双蒸水中。(2)菌落 PCR 法鉴定阳性克隆: 以(1)为模板, PCR 反应体系和反应程序与 PCR 扩增相同。(3)PCR 产物做凝胶电泳检测以筛选重组阳性克隆。

序列测定: 将经过鉴定后认为符合的阳性菌落加到含 Amp 的 LB 培养液中过夜培养, 800 μL 的菌悬液中加入 400 μL 浓度为 60% 的甘油, 由上海英骏生物技术有限公司测定序列。

2 结果与分析

2.1 MIDI 鉴定系统推荐方法的鉴定蜡样芽孢杆菌结果

MIDI 操作手册指明, 当鉴定结果第一选择的相似指数(Similarity Index, SI) 在 0.500 以上, 且第一选择和第二选择的 SI 差值大于 0.100, 则可以认为鉴定成功, 鉴定结果为第一选择所列的菌种名。若 SI 值在 0.300 到 0.500 之间, 且第一选择和第二选择的 SI 差值大于 0.100, 则表明第一选择与第二选择分开, 鉴定可能成功, 但是第一选择所列的菌种为非典型的菌株。当 SI 值小于 0.300 时, 则认为该菌株不存在于数据库中, 但软件会给出一个最

相关的菌株. 表 3、表 4 分别为 MIDI 推荐方法的鉴定结果和用普通营养琼脂培养基培养的蜡样芽孢杆菌的鉴定结果, 其第一选择的 SI 值范围分别为 0.641~0.805 和 0.292~0.444. 所有鉴定的菌种皆成功鉴定为蜡样芽孢杆菌, 但培养基为营养琼脂的取菌量为 40 mg 的 SI 值仅为 0.292 (小于 0.300). 说明 MIDI Sherlock 鉴定系统鉴定蜡样芽孢杆菌是准确可行的.

表 3 MIDI 推荐方法的蜡样芽孢杆菌鉴定结果

取菌量/mg	SI 值	鉴定结果
40	0.641	蜡样芽孢杆菌
80	0.797	蜡样芽孢杆菌
100	0.802	蜡样芽孢杆菌
120	0.805	蜡样芽孢杆菌
140	0.778	蜡样芽孢杆菌

表 4 营养琼脂培养基下蜡样芽孢杆菌 MIDI 鉴定结果

取菌量/mg	SI 值	鉴定结果
40	0.292	蜡样芽孢杆菌
80	0.370	蜡样芽孢杆菌
100	0.425	蜡样芽孢杆菌
120	0.444	蜡样芽孢杆菌
140	0.373	蜡样芽孢杆菌

2.2 不同培养基对蜡样芽孢杆菌 MIDI 鉴定结果的影响

由于 TSBA 培养基价格较为昂贵, 因此, 考虑是否能用普通的营养琼脂培养基来代替. 通过表 3 和表 4 的比较, 我们发现用 TSBA 作为培养基的蜡样芽孢杆菌通过鉴定系统的 SI 值普遍高于用营养琼脂培养基的蜡样芽孢杆菌的 SI 值(平均值 $0.765 > 0.381$), 可见 MIDI Sherlock 系统对 TSBA 培养基培养的细菌的鉴定效果要大于普通营养琼脂培养基的效果. 虽然普通营养琼脂培养基的鉴定结果均为蜡样芽孢杆菌, 但其 SI 值较低, 平均小于 0.500, 并不能确保鉴定一定成功, 可见不同培养基对 MIDI 鉴定系统的鉴定结果有明显影响. 这可能与 MIDI Sherlock 系统中微生物数据库是创建于指定培养基培养的微生物直接有关. 普通营养琼脂培养基中的微生物不同于 TSBA 培养基, TSBA 培养基中除了含有琼脂外还加入了蛋白胨大豆肉汤, 这可能造成了普通营养琼脂培养基鉴定结果 SI 值偏低.

因此, 确定利用 MIDI Sherlock 系统鉴定蜡样芽孢杆菌时应选用 TSBA 培养基培养细菌.

2.3 不同取菌量对蜡样芽孢杆菌 MIDI 鉴定结果的影响

为了探讨如何使鉴定结果的 SI 值更高从而提高鉴定的准确性, 我们还对不同取菌量对鉴定结果的影响做了分析(表 5). 我们发现取菌量与 SI 值之间并无相关性($P > 0.05$); 而取菌量在 100 mg 和 120 mg 时, TSBA 培养基的 SI 平均值较高, 分别为 0.6135 和 0.6245, 可见在取菌量为 100 mg 和 120 mg 时, MIDI 鉴定系统的准确率较高, 分析原因可能是取菌量太少, 也可能由于实验中不小心带入了其他磷脂成分引起脂肪酸的描绘定量上出现偏移, 干扰了脂肪酸图谱分析; 取菌量太多, 萃取结束时脂肪酸过饱和, 超出了仪器的最大上限.

因此, 确定利用 MIDI 鉴定系统鉴定蜡样芽孢杆菌时取菌量最好在 100~120 mg 之间.

表 5 2 种鉴定方法取菌量的鉴定结果对照

取菌量/mg	TABA SI 值	PCA SI 值	平均值
40	0.641	0.292	0.4665
80	0.797	0.370	0.5835
100	0.802	0.425	0.6135
120	0.805	0.444	0.6245
140	0.778	0.373	0.5755
平均值	0.765	0.381	

2.4 蜡样芽孢杆菌的生理生化鉴定

为了验证 MIDI 鉴定系统的准确性, 我们还做了关于蜡样芽孢杆菌的生理生化鉴定和 PCR 鉴定. 其生理生化鉴定结果符合蜡样芽孢杆菌的生理生化特性(表 6), 即 10 个生理生化试验皆达到预期效果.

表 6 生理生化鉴定结果

生理生化指标	结果	生理生化指标	结果
产酸	+	卵磷脂	+
产气	-	动力试验	D
硝酸还原	+	根状生长	+
V-P 试验	+	溶血	+
分解酪酸	+	分解蛋白质晶体	-
溶菌酶	+		

2.5 PCR 鉴定蜡样芽孢杆菌结果

为了验证 MIDI 鉴定系统的准确性, 我们又做了关于蜡样芽孢杆菌的 PCR 鉴定.

使用 NCBI 网站(美国国立生物技术中心网站)对该菌的 16S rDNA 序列(测序结果如下)与数据库中各种菌的 16S rDNA 序列比对. 使用 BLAST 在数据库中进行同源性搜索, 发现该菌株的碱基序列与登录号为 AE017355.1 的一株苏云金芽孢杆菌和登录号为 AY425946.1、CP000001.1、AY138278.1、AY138277.1、AY138276.1 的几株蜡样芽孢杆菌的相似度均为 99%, 且分值相同. 100AGAGTTTGA TCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGC CTAATACATGCAAGTCGAGCGAATCGATTAA GAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA200 CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAT AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT AATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTT CGAAATT300GAAAGGCGGCTTCGGCTGTCAC TTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTT GGTAAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG CGTAGCCGACCTGAG400AGGGTGATCGGCCA CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG500CCGC GTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAC TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTG AATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA GAA600AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGT GGTTTCTTAAGT700CTGATGTGAAAGCCCAC GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGG GAGGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAA TTCCATGTGTAGCGGTGAAATG800CGTAGAG ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT TTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAA AGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT 900GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCT AAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTG AAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA GTACGGCC1000AGGCTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG TGGTTTAATTCAAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACAT1100CCTCTGACAACCTT

AGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGT GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC1200CGCA ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC ATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAA1300TCATCATGCCCTTATGACCTGGGC TACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGA GCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCA TAAAACCGTTCTC1400AGTTCGGATTGTAGGC TGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCT AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT ACGTTCCCGGGCCTTGACACA1500CCGCCC GTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAG TCGGTGGGGTACTTTTTGGAGCCAGCCGCCT AAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCG1 515TAACAAGGTAGCCGT

2.6 3 种鉴定方法的比较

生理生化鉴定和 PCR 鉴定结果的成功再一次说明了 MIDI 鉴定系统的可靠性和准确性, 而且比较 3 种方法, 不难发现 MIDI 鉴定系统至少在鉴定蜡样芽孢杆菌上更加快捷、方便, 准确度也较高, 可以在微生物鉴定方面普遍应用.

3 结论

(1) 不同培养基培养的蜡样芽孢杆菌对鉴定结果的影响较大, 而且使用 TSBA 培养基的效果要比普通琼脂培养基更好. 另外, 相关的研究表明 MIDI 鉴定系统对于用牛肉膏蛋白胨培养基培养的细菌的鉴定结果准确率也较低^[4], 所以建议在使用 MIDI 鉴定系统鉴定细菌时使用 TSBA 培养基来培养菌株.

(2) 取菌量在 100~120 mg 时, 鉴定的效果更好, 表明在鉴定蜡样芽孢杆菌时, 取菌量为 100~120 mg 时可能会使鉴定结果更加准确.

(3) 生理生化和 PCR 鉴定, 证明了 MIDI 鉴定系统鉴定结果的准确性和可靠性, 同时也表明 MIDI 鉴定系统可以在更多、更广的领域用来鉴定微生物.

(4) 确定鉴定蜡样芽孢杆菌方法为: 以 MIDI 推荐的 TSBA 为培养基, 获菌量控制在 100~120 mg

之间, 根据 MIDI 的方法对样品进行前处理, 最后上机分析结果。

参考文献:

- [1] Mäntynen V, Lindström K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(5):1634-1639.
- [2] Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food or waterborne pathogens in stools[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(11):5134-5146.
- [3] 来航线, 盛敏, 刘强. 两株蜡样芽孢杆菌的鉴定及液体培养基筛选[J]. 西北农业学报, 2004, 13(1):33-36.
- [4] 唐晓敏, 高志贤. 基因芯片快速检测常见水中致病菌的初步应用研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2003, 21(2): 94-96.
- [5] 吴国强, 常伟冰. API 系统在微生物鉴定中应注意的几个问题[J]. 江苏预防医学, 2002, 3(13):63-64.
- [6] 魏亚东, 高崇省, 赵龙章, 等. 利用 BIOLOG 鉴定系统快速鉴定菜豆萎蔫病菌的研究[J]. 植物病理学报, 1997, 27(2):139-144.
- [7] Leonard R B, Mayer J, Sasser M, et al. Comparison of MIDI sherlock system and pulsed-gel electrophoresis in characterizing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a recent hospital outbreak[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(10):2723-2727.
- [8] 章家思, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述[J]. 土壤, 2004, 36(4):346-350.
- [9] 王秋红, 蓝江林, 朱育菁, 等. 脂肪酸甲酯谱图分析方法及其在微生物学领域的应用[J]. 福建农业学报, 2007, 22(2):213-218.
- [10] Piotrowska-Seget Z, Cycoń M, Kozdrój J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil[J]. Applied Soil Ecology, 2005, 28(3):237-246.
- [11] Oka N, Hartel P G, Finlay-Moore O, et al. Misidentification of soil bacteria by fatty acid methyl ester (FAME) and biologic analyses[J]. Biology and Fertility of Soils, 2000, 32(3):256-258.
- [12] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999:205-223.
- [13] Buchanan R E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984:729-750.
- [14] 吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 等. Sherlock MIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究[J]. 土壤学报, 2006, 7(43):642-647.

Identification of *Bacillus cereus* Separated from Mussels Using MIDI Sherlock Microorganism Auto Identification System

HUANG Zhu-liang, QIU Di-hong*

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In this paper, discussions are made about the research on using the MIDI Sherlock Microbial Identification System (MIS) to identify the *Bacillus Cereus* and its accuracy. An analysis is conducted on the different kinds of cultures and the different amount of bacteria obtained. Then the accuracy of the presented method is proved by conducting both the Physiology and Biochemistry identification and PCR identification. The result shows that MIDI identification system achieves a higher correct rate on the *Bacillus cereus* incubated with TSBA than those with PCA, those obtained with bacteria amount of 100-120 mg is higher than those obtained with other amount. This finding indicates that the change of cultures and bacteria obtained amount affects the accuracy of MIDI identification system. Through the identification of Physiology and Biochemistry and PCR, the accuracy of MIDI identification system is proved, and its potential to be more widely used in identifying microbial is also validated.

Key words: *Bacillus cereus*; MIDI identification system; physiology and biochemistry identification; PCR identification

(责任编辑 史小丽)