

产尿素酶大肠杆菌

杨正时 张振奎* 王晓新 张秀文

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

本文系统地报告产尿素酶的大肠杆菌。这类菌株在马群中的分离率达 21.2%; 骡群中次之, 为 9.7%; 而来源于人的为 0.9%。带有脲酶的大肠杆菌的马、骡占受检动物的 30.9%。作者讨论了马中毒性肠炎和产尿素酶大肠杆菌存在的关系, 并提出了在大肠埃希氏菌属中建立以产尿素酶和不发酵甘露醇为特征的亚属的问题。

根据肠杆菌科细菌菌属定义, 大肠杆菌不产生尿素酶^[1, 2]。在防治马属动物中毒性肠炎, 调查马、骡直肠粪便中大肠杆菌菌型时, 检出产尿素酶的菌株分别为 21.2% 及 9.7%。如此高的阳性百分率, 未见文献记载, 因此引起了我们的注意, 遂又分离检定了不同动物来源大肠杆菌的尿素酶活性。本文报告产尿素酶大肠杆菌的发现及其生物学特性。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌株

任选 1978 年从河北地区 97 匹马骡中分离的大肠杆菌 572 株, 测定尿素酶; 1979 年又从马、骡、牛、猪、兔及鸡、羊等禽畜粪便中分离的大肠杆菌 584 株(基本上每头分离 3 株), 同时也测定了 ϕ rskov 教授^[3]赠送的 O₁₋₁₆₄, H₁₋₅₄ 标准菌株 212 株, 共计 1368 株。

2. 尿素培养基

(1) 克 (Christensen) 氏尿素琼脂 (克): 蛋白胨 1、氯化钠 5、葡萄糖 1、磷酸二氢钾 2、琼脂 15, 蒸馏水 900 毫升, 融化后调节 pH 7.0, 加入 1:500 酚红溶液 6 毫升, 121℃ 灭菌 15 分钟(灭菌后 pH 下降到 6.8—6.9), 待冷到 50—55℃, 然后加入 20% 除菌过滤的尿素溶液 100 毫升, 混合, 分装灭菌试管, 倒成高底斜面。

(2) 罗-斯 (Rustigian and Stuart) 二氏液体尿素培养基 (克): 磷酸二氢钾 9.1、磷酸氢二钠 9.5、酵母浸膏 0.1、酚红 0.01, 蒸馏水 900 毫升, 121℃ 灭菌 15 分钟, 冷后加入 20% 除菌过滤的尿素溶液 100 毫升, 分装灭菌小管备用。

(3) 检定所液体尿素培养基 (克): 蛋白胨 1、氯化钠 5、磷酸二氢钾 2、葡萄糖 1、尿素 2, 用蒸馏水 100 毫升溶解、煮沸, 用 1N NaOH 调正 pH 6.9, 加入 0.2% 酚红溶液 6 毫升, 分装于灭菌试管内, 高压蒸气灭菌 8 磅 10 分钟。

(二) 方法

在麦康凯琼脂平板上分离, 挑取红色菌落, 测定 IMViC 反应, 确定为大肠杆菌后, 再在伊红美蓝琼脂平板上分离纯化, 挑取紫黑色的大肠杆菌典型菌落, 按我所方法^[4]进行 O、H 抗原鉴定定型。血清学定型的菌种接种克氏尿素琼脂斜面, 在此培养基上尿素酶阳性的菌株再接种检定所液体尿素培养基对照比较, 37℃ 培养 7 天。任取 100 株菌株比较不同 pH 尿素培养基上的反应, 取部分阳性菌株进行系统的生化学检查。

结 果

(一) 各种尿素培养基的比较试验

用 100 株大肠杆菌同时接种 pH 6.6、6.8、6.9、7.0、7.2 的克氏尿素琼脂培养基和

本文于 1980 年 2 月 22 日收到。

* 北京军区兽医防治检验所。

罗-斯二氏液体尿素培养基，97 株均阴性，3 株均阳性，因此这两种培养基本上是一致的。在分解尿素的时间上稍有所不同，这可能是由于我们接种上述液体尿素培养基时接种菌量较少的缘故。用三株变形杆菌作对照时结果也是一致的。由于罗-斯二氏液体尿素培养基营养成分很少，细菌生长发育不良，变色反应不够强烈。269 株大肠杆菌接种于 pH6.8 的克氏尿素培养基和检定所的液体尿素培养基，二者相符率为 98.5%（表 1）。上述试验说明这三种尿素培养基基本上是一致的，均可使用。

表 1 269 株大肠杆菌在两种培养基上产尿素酶的结果比较

比 较	尿素培养基		株数	%
	克氏琼脂	检定所液体		
一致	+	+	56	98.5
	-	-	209	
不一致	+	-	3	1.5
	-	+	1	

（二）产尿素酶大肠杆菌在各种禽畜中的检出率

1978 年从河北地区 97 匹马、骡直肠粪便中有 36 匹（37%）分离出产尿素酶大肠杆菌。其中在 440 株马粪来源的大肠杆菌中，在克氏尿素琼脂上阳性的有 92 株，占 20.9%。132 株骡粪大肠杆菌中，阳性 11 株，占 8.3%。若包括 1979 年从其它禽畜粪便分离的大肠杆菌，则从各种动物来源的大肠杆菌共 1156 株，克氏尿素琼脂上阳性率为 11.6%。其中以马粪中大肠杆菌的检出率最高，1978、1979 年二批标本的阳性率均各在 20% 左右，骡粪中约占 10%。猪、兔粪便来源大肠杆菌中也有部

分菌株阳性，而牛粪来源的 164 株大肠杆菌中则未见分解尿素者。主要来源于人的各型 O、H 标准菌株 212 株，阳性率仅 0.9%。阳性的二株大肠杆菌分别为 O₁₄₁、O₁₅₇，原始来源于猪^[5,6]（表 2）。

表 2 不同来源大肠杆菌在克氏尿素琼脂上产尿素酶频率

菌株来源	检查数 (株)	阳性数 (株)	阳性率 (%)
动物	马	472	100
	骡	248	24
	牛	164	0
	猪	119	4
	兔	150	7
	羊	1	0
	鸡	3	0
	小计	1,156	135
标准株	O ₁ -O ₁₄₄	159	2
	H ₁ -H ₅₄	53	0
共计		1,368	137
			10.0

（三）产尿素酶菌株的血清型

1978 年分离的 103 株尿素酶阳性大肠杆菌，经血清学定型的有 80 株，分布于 27 个 O 抗原，33 个 O、H 血清型（表 3）。

出现同一血清型菌株的马、骡都分布于同一地区。例如，分离出 O₃:H₋ 菌株的三匹马都是在山海关地区马场，8 株 O₆₉:H₄₃ 都分自正定县。我们从河北省许多地区马、骡收集的菌株中均有尿素酶阳性株，尿素酶菌株的出现似和地理区分的关系不大。

产尿素酶菌株的血清型和马匹有一定关系，从同一马（骡）分离的同型菌株，产生尿素酶的结果一般是一致的。一匹马中

表 3 103 株产尿素酶大肠杆菌的 O:H 血清型

血清型	分离阳性菌株马匹数	株 数
O ₁ :H ₋	3	13
O ₄ :H ₋	1	1
O ₅ :H ₈	1	5
O ₂₄ :H ₋	1	1
H ₇	1	1
H ₈	1	1
O ₃₄ :H ₋	1	1
O ₃₉ :H ₋	2	2
O ₄₄ :H ₃₁	1	1
O ₄₅ :H ₋	2	5
O ₅₀ :H ₋	2	4
H ₇	2	2
O ₅₁ :H ₉	1	3
O ₆₃ :H ₋	1	1
O ₆₉ :H ₁₉	1	1
H ₄₃	4	8
O ₇₁ :H ₋	1	2
O ₇₆ :H ₋	1	2
O ₈₄ :H ₂₈	1	1
O ₁₁₃ :H ₋	1	1
O ₁₁₉ :H ₋	1	1
O ₁₂₄ :H ₂₈	1	1
O ₁₂₈ :H ₂₈	1	1
O ₁₃₀ :H ₋	1	4
O ₁₃₂ :H ₃₁	1	1
O ₁₃₄ :H ₋	2	2
O ₁₃₉ :H ₋	2	2
H ₃₁	2	3
O ₁₅₃ :H ₂₉	1	1
O ₁₅₄ :H ₋	1	1
O ₁₅₆ :H ₇	2	5
自凝	9	11
未定型	9	12

出现了尿素酶阳性株，则其它血清型菌株也往往是尿素酶阳性。表 4 列举了三匹马（骡）直肠粪便中不同血清型大肠杆菌均可产生尿素酶。这在其它所有马匹中均为如此。

（四）产尿素酶菌株的生化特性

任选 31 株产尿素酶菌株系统地测定生化反应，从表 5 的结果可按照甘露醇发酵

表 4 同一马（骡）直肠粪便中不同大肠杆菌血清型与产尿素酶的关系

马号	血清型	分离数(株)	检查数(株)	阳性数(株)
正 2	O ₁₆ :H ₋	1	1	1
	O ₂₆ :H ₇	1	1	1
	O ₂₆ :H ₈	2	1	1
	O ₆₉ :H ₄₃	1	1	1
	O ₇₁ :H ₋	2	2	2
	O ₉₆ :H ₁₉	1	1	0
	O ₄ *	1	—	—
	小计	9	7	6
邯鄂 4	O ₃₉ :H ₋	1	1	1
	O ₁₃₂ :H ₃₁	1	1	1
	O ₁₃₀ :H ₃₁	1	1	1
	O ₈₆ :H ₁₉	1	1	0
	O ₄₄ :H ₋	1	—	—
	O ₁₃₂ :H ₂₁	4	—	—
	O ₁₄₄ :H ₁₉	1	—	—
	小计	10	4	3
山马 14	O ₁₃₄ :H ₋	1	1	1
	O ₁₃₉ :H ₋	1	1	1
	O ₁₀₁ :H ₋	3	3	0
	小计	5	5	2

* O₄ 表示自凝。—表示未检查。

与否分为二群。其中的 17 个血清型 22 株发酵甘露醇，产酸产气。这部分菌株除产生尿素酶外，其余生化反应均符合大肠埃希氏菌属定义，少数菌株发酵肌醇，个别菌株发酵侧金盏花醇和不产生靛基质；另外 8 个血清型的 9 株菌株除产生尿素酶外，尚不发酵甘露醇，其余生化反应也均符合大肠埃希氏菌属定义，这部分菌种中除一株外余均无动力。

表5 产尿素酶大肠杆菌的生化反应

株号	血清型	生化反应																								
		动	硫化氢	苯丙氨酸	铵盐葡萄糖	柠檬酸铵	明胶	V P	甲基红	靛基质	硝酸盐	靛定所尿素	克氏尿素	棉子糖	蕈糖	蔗糖	葡萄糖	甘露醇	乳糖	肌酐	水杨酸	麦芽糖	鼠李糖	木糖	阿拉伯糖	山梨醇
78-674	O ₃ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-740	O ₃ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-732	O ₃ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-675	O ₄ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-62	O ₃ :H ₈	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-571	O ₃₉ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-804	O ₄₈ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-78	O ₄₉ :H ₁₉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-25	O ₄₉ :H ₄₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-235	O ₄₉ :H ₄₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-389	O ₁₆ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-886	O ₄₈ :H ₃₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-691	O ₁₃ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-200	O ₁₄ :H ₂₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-683	O ₁₄ :H ₂₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-576	O ₃₂ :H ₃₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-715	O ₁₃₄ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-569	O ₁₅₉ :H ₃₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-806	O ₁₅₀ :H ₃₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-32	O ₁₅₁ :H ₉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-387	O ₁₅₆ :H ₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-907	O ₁₅₆ :H ₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		O ₁ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		O ₂₄ :H ₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		O ₃₄ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		O ₄₉ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		O ₇ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		O ₁₁₉ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		O ₁₃₀ :H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-28		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-362		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-114		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-50		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-317		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-23		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-669		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78-41		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

讨 论

肠杆菌科中某些菌属的细菌能产生尿素酶，分解培养基中的尿素产氨，改变了培养基的酸碱度，当 pH 到达 8.1 时，培养基中的指示剂酚红变成红色，即为尿素酶试验阳性，用以证明该菌产生尿素酶^[7]。大肠埃希氏菌属定义规定其所属菌株不产生尿素酶。当尿素酶试验阳性而其它生化反应符合大肠埃希氏菌时仍可以被允许认为是大肠杆菌，在国际上确认的标准菌株中 O₁₄₁, O₁₅₇ 株即能产生尿素酶 (O₁₄₉ 株在检定所液体尿素培养基上也呈阳性反应)，这样的菌株以往是罕见的，在 O、H 标准菌株中仅占 0.2%，我们^[8]以往检查主要来自婴儿腹泻粪便中的大肠杆菌 1836 株，分解尿素的菌株也仅占 0.4%。这说明即使大肠杆菌能产生尿素酶，其频率是很低的。

这次检查不同禽畜大肠杆菌的尿素酶时，发现马、骡直肠粪便来源的大肠杆菌中，检出率分别高达 21.2% 和 9.7%，而且在不同时间、不同地区的二次检查中，检出率相仿，经目前常用的几种尿素培养基重复试验予以证实。带有产尿素酶大肠杆菌的马、骡占受检马、骡的 30.9%，这说明这种菌株在马、骡肠道中的存在是十分普遍的。在其它家畜中检出率不高，尤其是与饲养、生活条件十分接近的牛，其肠道中未发现此类菌株。因此，这些菌株具有特殊的生态学意义。

大肠杆菌在哺乳动物肠腔内的数量、型别与饮食、肠道生理功能，肠内菌丛有密切的关系，马骡肠道中大肠杆菌的产尿素酶特性可能与马肠腔特殊的生理环境有关。值得提出引起注意的问题是肠道致病性大肠杆菌一般引起乳幼儿或乳幼动物的腹泻，成年动物则较少。而马中毒性肠炎则经常发生于健壮成年马骡，且常以喂精

料为诱因。病马血液中非蛋白氮含量增加，这可能是由于大量精料使肠道中氮素增加，一方面外源性生成尿素的物质大量进入肠道，另一方面蛋白质摄取量的增加促使机体代谢旺盛，由血液渗入肠腔排出的尿素也相应增多，也可促使肠内细菌大量增殖。产尿素酶大肠杆菌大量分解尿素，使分解产物氨在肠腔内大量积聚，通过门脉系统吸收入血而使机体中毒，可能导致中毒性肠炎的发生。因此产尿素酶大肠杆菌在中毒性肠炎发生学上的意义看来，是一个在今后应予探讨的问题。

大肠杆菌不发酵甘露醇是罕见的。以往我们检查 1836 株大肠杆菌无一发现。最近作者见到一株标准菌株发酵甘露醇性状有变异，约有 10% 的子代不发酵甘露醇，Edwards 和 Ewing 的报告^[9]中约有 5%，但是既不发酵甘露醇，又产生尿素酶的大肠杆菌还未见报告。

由于这些菌株的生化反应基本上符合大肠埃希氏菌属，和大肠杆菌又有一致或极为密切的抗原结构，因此作者认为尚可归属于大肠埃希氏菌属内，为了和其它大肠杆菌相区别，可称为产尿素酶大肠杆菌。

但又由于这些菌株在二个基本分类的生化特征上的显著差异，作者认为现在已经有必要在大肠埃希氏菌属内建立亚属，尿素酶和甘露醇可作为区分亚属的主要标志特征。

参 考 文 献

- [1] Edward P. R. and W. H. Ewing: Identification of Enterobacteriaceae 3rd. ed., Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn. 1972.
- [2] Buchanan R. E. and N. E. Gibbons: Berger's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1974.
- [3] Ørskov I. et al.: Bacteriol. Rev., 41(3): 667—710, 1977.

- [4] 杨正时, 辜清吾: *微生物学报*, **19**(2): 187—197, 1979.
- [5] Ørskov F. et al.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **48**: 48—50, 1960.
- [6] Furowiec A. Z. et al.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Ser. B*, **80**: 441—444, 1972.
- [7] Blazevic D. J. and M. E. Grace: *Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology* USA, 1975.
- [8] 杨正时, 辜清吾: *微生物学报*, **19**(3): 321—326, 1979.

ESCHERICHIA COLI OF UREASE PRODUCTION

Yang Zhengshi Zhang Zhenkui Wang Xiaoxin Zhang Xiuwen
(Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Ministry
of Health, Beijing)

Strains of *Escherichia coli* with urease production were reported and studied systematically in the present paper. Detection rate of this kind of strains approached the level of 21.2% among horses examined. Discussions were made about the pathogenetic relationship between

equine toxic enteritis and the strains of *E. coli* with urease production. The authors raised up the question that according to both urease-production and mannitol-non-fermentability, whether it would be advisable to introduce a new subgenus under the genus "*Escherichia*".