

洋葱伯克霍尔德菌群 (Bcc) 的选择和分离培养基研究

余萌¹, 王似锦¹, 曹蕊², 马仕洪^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 100050; 2. 烟台大学, 烟台 264000)

摘要 目的: 对现有洋葱伯克霍尔德菌群 (Bcc) 选择性培养基配方进行优化和调整, 以获得更优的选择和分离培养效果, 提高 Bcc 的检出效率, 形成《中国药典》拟收载 Bcc 检查法中的选择和分离培养基。方法: 调整选择性培养基营养成分和指示剂组分, 使用分离自制药环境及产品的 Bcc 菌株, 通过计数回收、表型观察和生长曲线试验等方法, 从选择性培养基的促生长能力、指示特性、抑制能力几方面评估其配方优化后的结果。结果: 优化获得的 Bcc 选择性培养基 (BCCSA), 对 Bcc 菌株的回收优于其他选择性培养基, 生长曲线试验结果也表明 Bcc 菌株在 BCCSA 中的生长速率更快并更早到达生长稳定期; BCCSA 对 Bcc 生长的指示特性相较于其他培养基更好, 表现为培养基颜色变化更为明显, 菌落颜色更易观察; 对于美国药典中要求的抑制特性试验菌株, BCCSA 可满足其抑制能力要求。结论: 综合而言, BCCSA 表现出更优的促生长能力和指示特性, 可作为《中国药典》拟收载 Bcc 检查法中的选择和分离培养基。

关键词: 洋葱伯克霍尔德菌群; 《中国药典》; 检查方法; 选择性培养基; 培养基适用性

中图分类号: R95; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)07-0746-12
doi:10.16153/j.1002-7777.2022.07.003

Study on Selection and Subculture Agar of *Burkholderia cepacia* Complex

Yu Meng¹, Wang Sijin¹, Cao Rui², Ma Shihong^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 100050, China; 2. Yantai University, Yantai 264000, China)

Abstract Objective: To optimize and adjust the present selective medium formula of *Burkholderia cepacia* Complex (Bcc), so as to obtain a better selection and subculture agar, improve the detection efficiency of Bcc, and form the selection and subculture agar in the examination of Bcc to be included in Chinese Pharmacopoeia. **Methods:** Selective medium nutrient composition and indicator composition were adjusted, Bcc strains isolated from pharmaceutical environment and products were used to evaluate the optimized formula from the aspects of growth promoting, indication properties and inhibitory ability by counting recovery, phenotype observation and growth curve test. **Results:** The selective agar BCCSA, which optimized from existing formula, shows better recovery results for Bcc than other selective agars. Growth curves experiment of Bcc strains also exhibits faster

growth rate in BCCSA and reaches the stationary phase earlier. BCCSA has better indication characteristics for Bcc growth than other media, which shows that the color change of agar is more obvious and the color of the colony was easier to observe. For the inhibitory property test strains required by USP43-NF38<60>, BCCSA is able to meet the requirement of inhibitory ability. **Conclusion:** In general, BCCSA shows better growth promoting and indicative property, and could be used as the selection and subculture agar in the examination of Bcc to be included in Chinese Pharmacopoeia.

Keywords: *Burkholderia cepacia* Complex (Bcc); Chinese Pharmacopoeia; examination methods; selective agar; suitability of the medium

洋葱伯克霍尔德菌群 (*Burkholderia cepacia* Complex, Bcc) 隶属于伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*), 由若干种表型近似, 但基因型存在差异的菌种组成, 代表菌种为洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*, *B.c*)。Bcc是制药行业关注的不可接受微生物 (Objectionable Microorganism) 典型代表^[1], 其广泛分布于土壤、水等环境, 对营养需求低, 能够利用多种碳源作为其单一能源物质, 常见于制药水系统。Bcc对多种抗生素天然耐药, 并对部分消毒剂、抑菌剂耐受^[2], 水基质产品通常以水作为其主要的原辅料, 水分活度较高, 一旦污染Bcc, 将给患者用药安全带来较大的风险。近年来, 每年都有药品由于污染或在其生产过程 (如水系统) 中污染了Bcc而被企业召回^[3]。美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 于2017年和2021年发布建议, 提醒行业关注水基质非无菌药品的Bcc污染风险问题。2018年, 美国药典发布针对非无菌产品的Bcc检查法 (征求意见稿), 成为首个收载Bcc检查法的药典。2019年, 我国国家药典委员会对非无菌产品的Bcc检查方法进行了课题立项, 并于2021年完成课题研究, 拟将Bcc检查方法收载至《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)。

目前药典和行业标准中针对*B.c*或Bcc的检查方法仍主要为先进行纯化培养, 后通过进一步鉴定确认是否为*B.c*或Bcc。这些标准方法包括SN/T 4485-2016 进出口口腔清洁类产品中洋葱伯克霍尔德菌检验方法^[4]; SN/T 4684-2016进出口化妆品中洋葱伯克霍尔德菌检验方法^[5]; 美国药典USP43-NF38 <60>非无菌产品的洋葱伯克霍尔德菌群检查 (Microbiological Examination of Nonsterile Products-Tests for *Burkholderia cepacia* Complex) ^[6]。检测流程均按照供试液制备、增菌培养、选择和分离培

养, 以及结果判断几个环节展开。选择和分离培养是上述检测方法中的重要环节, 通过将增菌培养物接种至选择性培养基, 目标菌株在其上获得优势生长, 而非目标菌的生长被完全或部分抑制, 以达到对目标菌株有效检出的目的。

本研究对象为目前主要应用的Bcc选择性培养基, 分别是BCSA (USP<60>收载)、Oxoid BCA (本文中称BCA), 以及针对上述两种培养基的不足, 进一步优化形成的BCCSA选择性培养基。各国药典对选择性培养基要求进行适用性试验, 试验项目包括促生长能力、指示特性和抑制能力。本研究以Bcc标准菌株的回收率、Bcc菌株的生长特征以及选择性培养基对非Bcc菌株的抑制能力来综合表征各选择性培养基对Bcc的检出能力, 并扩展使用生长曲线考察Bcc菌株在各选择性培养体系中的生长速率, 以反映其促生长能力。

1 仪器与材料

1.1 仪器

电子天平CPA2202S-DS, 德国Sartorius公司; 生物安全柜NU-437-600S, 美国Nuair公司; 生化培养箱INC821C, 日本Yamato公司; 高压灭菌器SQ810C, 日本Yamato公司; 全自动生长曲线分析仪FP-1100-C, 芬兰Bioscreen公司; Omnilog自动生化鉴定系统, 美国BIOLOG公司。

1.2 试剂及培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基 (Trypsin Soybean Agar, TSA), 美国BD公司; 胰酪大豆胨液体培养基 (Trypsin Soybean Broth, TSB), 德国Merck公司; 洋葱伯克霍尔德菌选择性琼脂培养基 (*Burkholderia cepacia* Selective Agar, BCSA)、洋葱伯克霍尔德菌群选择性培养基添加剂, 北京三药科技开发公司; *Burkholderia cepacia* Agar (BCA)、BCA添加剂, 英国OXOID公司; 蛋白

豚, 美国BD公司; 酵母浸粉, 安琪酵母股份有限公司; 蔗糖、乳糖、氯化钠、磷酸二氢钾, 国药集团化学试剂有限公司; 丙酮酸钠、酚红、结晶紫, 美国Sigma-Aldrich公司。

1.3 试验菌株

标准菌株: 其中CICC编号菌株均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心; CMCC(B)编号菌株均来自中国食品药品检定研究院, CGMCC编号菌株均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心; 其他菌株分离自临床、制药环境和样品。对上述

菌株通过生化、16S rRNA序列分析、看家基因序列分析、核糖体分型、MLST等确认其种水平。涉及Bcc共60株(表1), 种水平上包括*B.c*(24株)、*B.cenocepacia*(11株)、*B.multivorans*(1株)、*B.stabilis*(2株)、*B.ambifaria*(1株)、*B.vietnamiensis*(3株)、*B.pyrrrocinia*(1株)、*B.aenigmatica*(13株)、*B.contaminans*(4株)。

非Bcc菌株共9株。包括《中国药典》微生物限度检查用革兰氏阳性、阴性菌代表, Bcc近缘菌株, 以及水系统常见分离菌株。

表1 试验菌株

类别	名称	菌株编号
目标菌株 (60株)	<i>Burkholderia cepacia</i> (n=24)	CICC10857, CMCC(B)23005, CMCC(B)23002, CICC20700, CICC21926, YP20180127, YP20180128, YP20180135, YP20180137, LC20180157, LC20180158, YP20190193, YP20200287, YP20190196, YP20190192, YP20190197, YP20190195, YP20190194, YP20190187, YP20190188, YP20210467, YP20210468, YP20210469, YP20210471
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (n=11)	CMCC(B)23006, CMCC(B)23001, ATCC BAA-245, CGMCC1.3077, YP20180147, YP20180148, YP20180149, YP20180154, YP20180155, YP20190177, YP20190168
	<i>Burkholderia aenigmatica</i> (n=13)	CMCC(B)23010, YP20190199, CMCC(B)23007(M416), CMCC(B)23009(MS3), CMCC(B)23008(M2-3), YP20190175, YP20190176, YP20190169, YP20190179, YP20190180, YP20210465, YP20210466, YP20210470
	<i>Burkholderia contaminans</i> (n=4)	CICC23882, YP20200286, YP20190191, YP20190167
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (n=3)	CGMCC1.2982, YP20200288, YP20200289
	<i>Burkholderia stabilis</i> (n=2)	CGMCC1.2872, LC20180156
	<i>Burkholderia multivorans</i> (n=1)	CGMCC1.3058
	<i>Burkholderia pyrrrocinia</i> (n=1)	CGMCC1.3816
	<i>Burkholderia ambifaria</i> (n=1)	CGMCC1.10511
	非目标菌株 (9株)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=1)
<i>Escherichia coli</i> (n=1)		CMCC(B)44102
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=1)		CMCC(B)26003
<i>Burkholderia gladioli</i> (n=1)		CICC10574
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (n=1)		YP20190200
<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> (n=1)		YP20190202
<i>Ralstonia pickettii</i> (n=1)		YP20190203
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=1)		DT17
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (n=1)		YP20200404

2 方法

2.1 培养基制备

按照脱水培养基制备说明制备BCSA、BCA琼脂培养基。

BCCSA培养基配方：蛋白胨10 g，丙酮酸钠7 g，氯化钠5 g，蔗糖2 g，酵母提取物1.5 g，磷酸二氢钾1.54 g，酚红0.02 g，结晶紫0.001 g，多粘菌素B 600000 U，庆大霉素10 mg，万古霉素2.5 mg，琼脂14 g。除琼脂、多粘菌素B、庆大霉素和万古霉素外，加纯水至1 L，混合上述配方成分，溶解后调节pH至 (6.2 ± 0.2) (25°C)，然后加入琼脂，混匀， 121°C 灭菌15 min，冷却至 $45\sim 50^{\circ}\text{C}$ 加入抗生素，混匀，倾注平皿。

BCSA、BCCSA液体体系配制：不添加琼脂、酚红、结晶紫，其他制备方法同BCSA、BCCSA琼脂培养基。

2.2 菌株活化

将上述菌株接种至TSB中， 33°C 培养24 h，备用。

2.3 碳源利用

将活化后的菌株划线接种至TSA， 33°C 培养24~48 h，按照Omnilog仪器使用说明进行碳源代谢试验。

2.4 菌落计数

将活化后的Bcc代表菌株以0.9%无菌氯化钠溶液为稀释液，逐级稀释至不大于 $100\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，非Bcc菌株稀释至不小于 $10^4\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，分别涂布至TSA和3种选择性培养基，每个样本在每种培养基上涂布2个平皿， 33°C 培养24~72 h，观察生长情况，并点计菌落数，取平均值计算回收率。以选择性培养基对Bcc代表菌株的回收率作为其促生长能力的表征之一，以选择性培养基对非Bcc代表菌株的回收情况作为其抑制能力的表征。

$$\text{回收率} = \frac{\text{选择性培养基菌落数}}{\text{TSA菌落数}} \times 100\%$$

2.5 划线培养

将活化后的菌株划线接种至3种选择性培养基， 33°C 培养24~72 h，观察生长情况，以Bcc菌株的生长情况和表型特征作为其促生长能力和指示特性的表征；以非Bcc菌株在选择性培养基上的生长情况和表型特征作为其抑制能力的表征。

2.6 生长曲线

将活化后的Bcc代表菌株以0.9%无菌氯化钠溶液为稀释液，逐级稀释至约 $10^5\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，以 $20\ \mu\text{L}$ 菌液与 $180\ \mu\text{L}$ 选择性液体培养基混合，置于生长曲线仪中， 33°C 培养至72 h，读取培养孔 OD_{600} 值，每个样本有4个平行孔，以4个孔的平均值进行曲线拟合。

3 结果

3.1 Bcc菌株对碳源的利用

试验菌株的Omnilog结果显示(表2)，Bcc无法利用的碳源包括D-麦芽糖、D-纤维二糖、D-松二糖、 α -D-乳糖、L-鼠李糖、肌苷和D-乳酸甲酯；能利用的碳源有 α -D-葡萄糖、D-半乳糖、L-岩藻糖和葡萄糖醛酰胺。*B.ambifaria*相较于其他Bcc，可利用的碳源种类较少，某些碳源如D-甘露糖、D-果糖、D-葡萄糖-6-磷酸、D-果糖-6-磷酸、D-葡萄糖酸和L-苹果酸都无法被其利用，而试验中的其他Bcc菌株均可利用这些底物。在9个Bcc种水平成员中，*B.c.*、*B.cenocepacia*和*B.aenigmatica*试验菌株数量较多，对于该种水平成员的碳源代谢情况更具统计代表性。这3个种水平成员中的大部分菌株能够利用试验中的多数碳源底物，但菌株间存在差异。

根据上述菌株的碳源代谢特征，对Bcc选择性培养基进行了配方的调整优化。Bcc试验菌株均不能利用 α -D-乳糖，多数菌株可利用蔗糖；根据《伯杰氏系统细菌学手册》^[7]，Bcc成员均可利用丙酮酸钠，因此在BCCSA配方中使用了蔗糖、丙酮酸钠作为碳源，用蛋白胨和酵母浸粉作为氮源，并以氯化钠维持渗透压。仍采用酚红作为指示剂，为使培养基接种前后颜色变化易于观察，按照酚红的指示范围，将培养基初始pH调节为 6.2 ± 0.2 ，使其呈现黄色。在前期研究中，分别使用磷酸、磷酸二氢钾及磷酸二氢钾与磷酸氢二钠缓冲对3种方式调节pH，一方面保证培养基的初始及配制灭菌前后pH的稳定，另一方面保证在接种Bcc后，当菌株代谢产生碱性产物时，培养基的pH能够快速升高，并体现在其颜色变化上发挥指示作用。在达到上述要求的基础上，再结合方便配制的要求，最终确定以磷酸二氢钾作为缓冲剂和pH调节剂。表3为试验用3种选择性培养基的配方。

表2 Bcc 对部分碳源的利用情况

碳源	Bcc菌种									
	<i>B.c</i> (n=24)	<i>B.cenocepacia</i> (n=11)	<i>B.stabilis</i> (n=2)	<i>B.multivorans</i> (n=1)	<i>B.ambifaria</i> (n=1)	<i>B.vietnamiensis</i> (n=3)	<i>B.pyrrrocinia</i> (n=1)	<i>B.contaminans</i> (n=4)	<i>B.aenigmatica</i> (n=13)	
D-麦芽糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-(10),B(3)	
D-海藻糖	B(7),-(17)	+(8),-(3)	-	B	-	-	-	+(1),B(2),-(1)	-(9),B(4)	
D-纤维二糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
龙胆二糖	+(2),B(2),-(20)	B(1),-(10)	-(1),B(1)	B	-	-	-	-	-(10),B(3)	
蔗糖	+(17),-(4)	+(9),B(1),-(1)	-	-	-	+	-	+	+(8),B(4),-(1)	
D-松二糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-(9),B(4)	
α -D-乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
β -甲酰-D-葡萄糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-(12),+(1)	
D-水杨苷	+(2),B(15),-(7)	+(9),-(2)	-	-	-	-	+(1),-(3)	+(4),B(4),-(5)	-	
N-乙酰-D-葡萄糖胺	+(20),B(1),-(3)	+(9),B(1),-(1)	-(1),B(1)	+	-	+(1),B(2)	-	+(1),B(1),-(2)	+(6),B(4),-(3)	
α -D-葡萄糖	+(22),-(2)	+(10),B(1)	+	+	+	+	+	+	+	
D-甘露糖	+(19),B(2),-(3)	+(10),-(1)	+	+	-	+(1),B(2)	B	+(3),B(1)	+(8),B(3),-(2)	
D-果糖	+(22),-(2)	+(10),-(1)	+	+	-	+(2),B(1)	+	+(3),B(1)	+(8),-(2)	
D-半乳糖	+	+(10),B(1)	+	+	+	+	+	+	+	
3-甲酰葡萄糖	-	+(2),-(9)	-(1),B(1)	-	-	-	-	-	-	
D-岩藻糖	+(2),B(6),-(16)	+(2),B(1),-(8)	-(1),B(1)	-	-	+(1),B(2)	-	B	+(2),B(6),-(5)	
L-岩藻糖	+(23),B(1)	+(10),-(1)	+	+	+	+(1),B(2)	+	+	+(12),B(1)	
L-鼠李糖	+(5),-(19)	B(1),-(10)	-(1)	-	-	B(1),-(2)	-	-	-	
肌苷	B(1),-(23)	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-山梨醇	+(17),B(4),-(3)	B(9),-(2)	+(1),-(1)	B	-	+(1),B(2)	-	+(3),B(1)	+(9),B(2),-(2)	
D-甘露醇	+(17),B(4),-(3)	+(8),B(1),-(2)	+(1),-(1)	B	-	+(1),B(2)	-	+(3),-(1)	+(7),B(3),-(3)	
D-阿拉伯醇	+(12),B(7),-(5)	+(9),-(2)	+(1),-(1)	B	-	B(2),-(1)	-	+(2),B(1),-(1)	+(2),B(4),-(7)	

续表 2

碳源	Bcc菌种									
	<i>B.c</i> (n=24)	<i>B.cenocepacia</i> (n=11)	<i>B.stabilis</i> (n=2)	<i>B.multivorans</i> (n=1)	<i>B.ambifaria</i> (n=1)	<i>B.vietnamiensis</i> (n=3)	<i>B.pyrocinia</i> (n=1)	<i>B.contaminans</i> (n=4)	<i>B.aenigmatica</i> (n=13)	
D-葡萄糖-6-磷酸	+(22),-(2)	+(10),-(1)	+	+	-	+	+	+	+(12),B(1)	
D-果糖-6-磷酸	+	+(10),B(1)	+	+	-	+	+	+	+	
D-天冬氨酸	+(13),-(11)	-	+(1),-(1)	-	-	-	-	+(3),B(1)	-	
D-丝氨酸	+(21),-(3)	-	+(1),-(1)	-	-	-	-	+(3),B(1)	+(10),B(2),-(1)	
L-丙氨酸	+(20),B(2),-(2)	+(10),B(1)	+(1),-(1)	+	-	+(2),B(1)	-	+	+(11),B(1),-(1)	
L-精氨酸	+(20),-(4)	+(9),-(2)	+(1),-(1)	+	-	+(2),-(1)	-	+	+(11),B(1),-(1)	
L-天冬氨酸	+(19),B(2),-(3)	+(9),-(2)	+(1),-(1)	+	-	+(2),B(1)	-	+(3),B(1)	+(6),B(4),-(3)	
L-谷氨酸	+	+(10),B(1)	+(1),-(1)	+	-	+	B	+	+(12),-(1)	
L-丝氨酸	+(16),B(5),-(3)	+(9),B(1),-(1)	+(1),B(1)	+	-	+(2),B(1)	-	+(3),B(1)	+(9),B(3),-(1)	
D-半乳糖醛酸	+(22),B(2)	+(10),-(1)	+	-	+	+(2),B(1)	+	+	+(9),B(4)	
L-半乳糖醛酸内酯	+(13),B(4),-(7)	+(3),B(1),-(7)	B(1),-(1)	-	B	+	+	+(3),B(1)	+(11),B(1),-(1)	
D-葡萄糖	+(20),B(2),-(2)	+(9),B(2)	+	+	-	+	+	+(4)	+	
D-葡萄糖醛酸	+(23),B(1)	+(10),B(1)	+	+	+	+(2),B(1)	+	+(4)	+(10),B(3)	
葡萄糖酰胺	+(15),B(9)	+(9),B(2)	+(1),B(1)	+	+	+	+	+(3),B(1)	+(11),B(2)	
丙酮酸甲酯	+(4),B(11),-(9)	+(7),B(1),-(3)	+(1),-(1)	+	-	+(2),B(1)	-	+(2),B(2)	+(4),B(3),-(6)	
D-乳酸甲酯	-	-	-	-	-	B(1),-(2)	-	-	-	
L-乳酸	+(21),-(3)	+(2),B(2),-(7)	+(1),-(1)	-	-	+	B	+	+(11),B(1),-(1)	
α-酮戊二酸	B(1),-(23)	B(1),-(10)	+(1),-(1)	-	-	B(1),-(2)	-	-	-	
D-苹果酸	B(6),-(18)	B(2),-(9)	+(1),-(1)	-	-	+(1),B(1),-(1)	-	+(1),B(3)	+(2),-(11)	
L-苹果酸	+(22),-(2)	+	+	+	-	+	+	+	+	

注：“+”表示对于该碳源，菌株 Ommillog 反应孔均显示阳性；“-”表示对于该碳源，菌株 Ommillog 反应孔均显示阴性；“B”表示对于该碳源，菌株 Ommillog 反应孔读值为临界值。

表3 选择性培养基配方(每1000 mL)

分类	BCA	BCSA	BCCSA
主要营养物质	蛋白胨 5 g	胰蛋白胨 10 g	胰蛋白胨 10 g
	丙酮酸钠 7 g	乳糖 10 g	丙酮酸钠 7 g
	酵母浸粉 4 g	蔗糖 10 g	蔗糖 2 g
		酵母浸粉 1.5 g	酵母浸粉 1.5 g
无机盐	硫酸镁 0.2 g		
	硫酸铵 1 g	氯化钠 5 g	氯化钠 5 g
	硫酸亚铁铵 0.01 g		
pH 调节 / 缓冲剂	磷酸二氢钾 4.4 g	无	磷酸二氢钾 1.54 g
	磷酸氢二钠 1.4 g		
pH 指示、显色剂	酚红 0.02 g	酚红 0.08 g	酚红 0.02 g
	结晶紫 0.001 g	结晶紫 0.002 g	结晶紫 0.001 g
凝固剂	琼脂 12 g	琼脂 14 g	琼脂 14 g
抑菌成分	替卡西林 100 mg	万古霉素 2.5 mg	万古霉素 2.5 mg
	多粘菌素 B 150000 U	多粘菌素 B 600000 U	多粘菌素 B 600000 U
	庆大霉素 5 mg	庆大霉素 10 mg	庆大霉素 10 mg
	胆盐 1.5 g		
pH	6.2 ± 0.2	6.8 ± 0.3	6.2 ± 0.2

3.2 选择性培养基的促生长能力

对4株Bcc代表菌株在BCA、BCSA、BCCSA培养基上7次计数结果的回收率进行比较,如图1所示。对于CICC10857,BCA、BCSA、BCCSA三种选择性培养基的回收率中位值分别为83%、69%、93%;对于CMCC(B)23005,三者的回收率中位值分别为82%、68%、94%;对于CMCC(B)

23006,三者的回收率中位值分别为72%、66%、83%;对于CMCC(B)23010,三者的回收率中位值分别为69%、56%、92%。上述结果表明,三种选择性培养基对Bcc的回收率均满足50%要求,但BCCSA培养基相较于其他两种培养基,回收率优势显著。

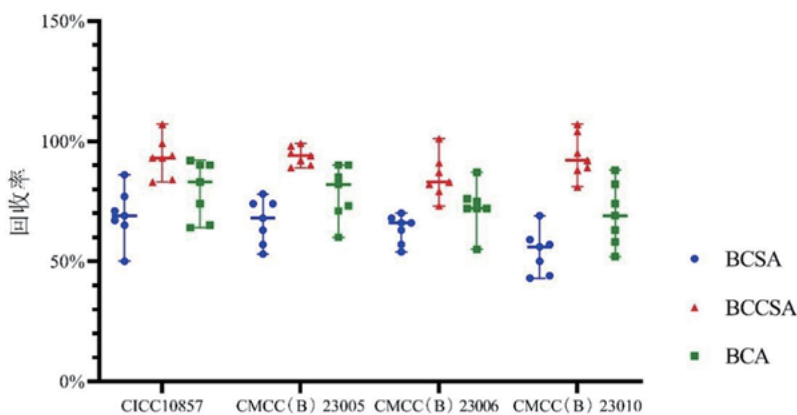


图1 Bcc菌株在选择性培养基上的回收率

取60株来源于环境、样品、临床的Bcc菌株，分三区连续划线接种至三种选择性培养基，培养24 h时，Bcc菌株在三种培养基上的生长情况如图2所示，BCA、BCCSA、BCSA上出现三区生长的菌株数量分别为47、49、40；出现二区生长的菌株数量分别为9、8、15；出现一区生长的菌株数量分别为3、3、5；只有一株*B.cenocepacia*菌株在BCA上

24 h未生长。培养至48 h时，上述菌株在三种选择性培养基上均生长良好。试验中划线接种Bcc量约为 10^6 cfu，且菌株均处于生长对数期，若以24 h出现三区生长作为培养基促生长能力的判定标准，则BCA、BCCSA、BCSA的促生长能力分别为78%、82%、67%。

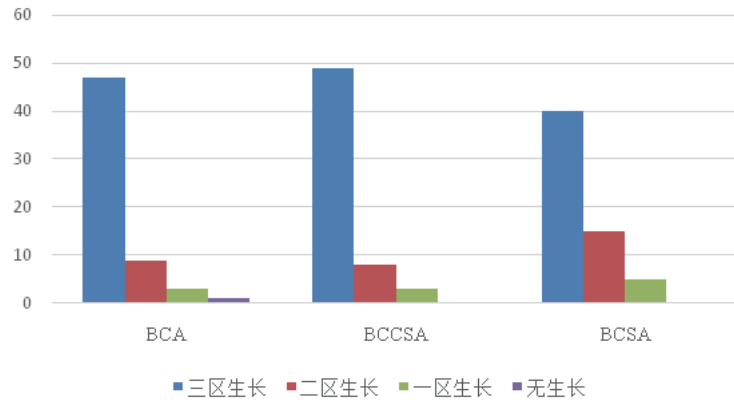
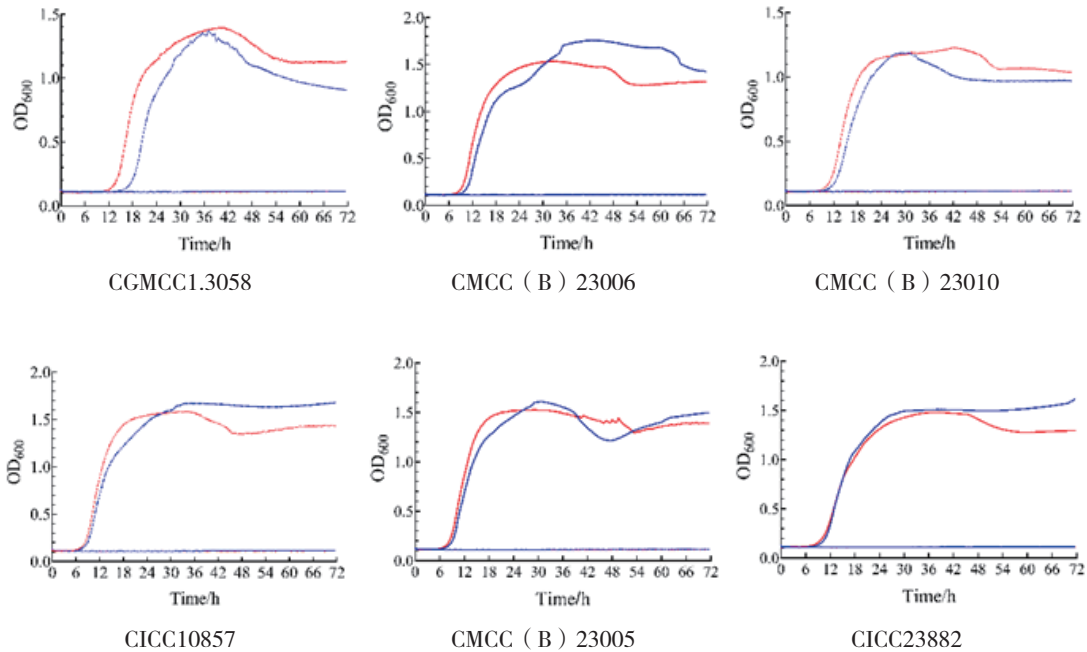
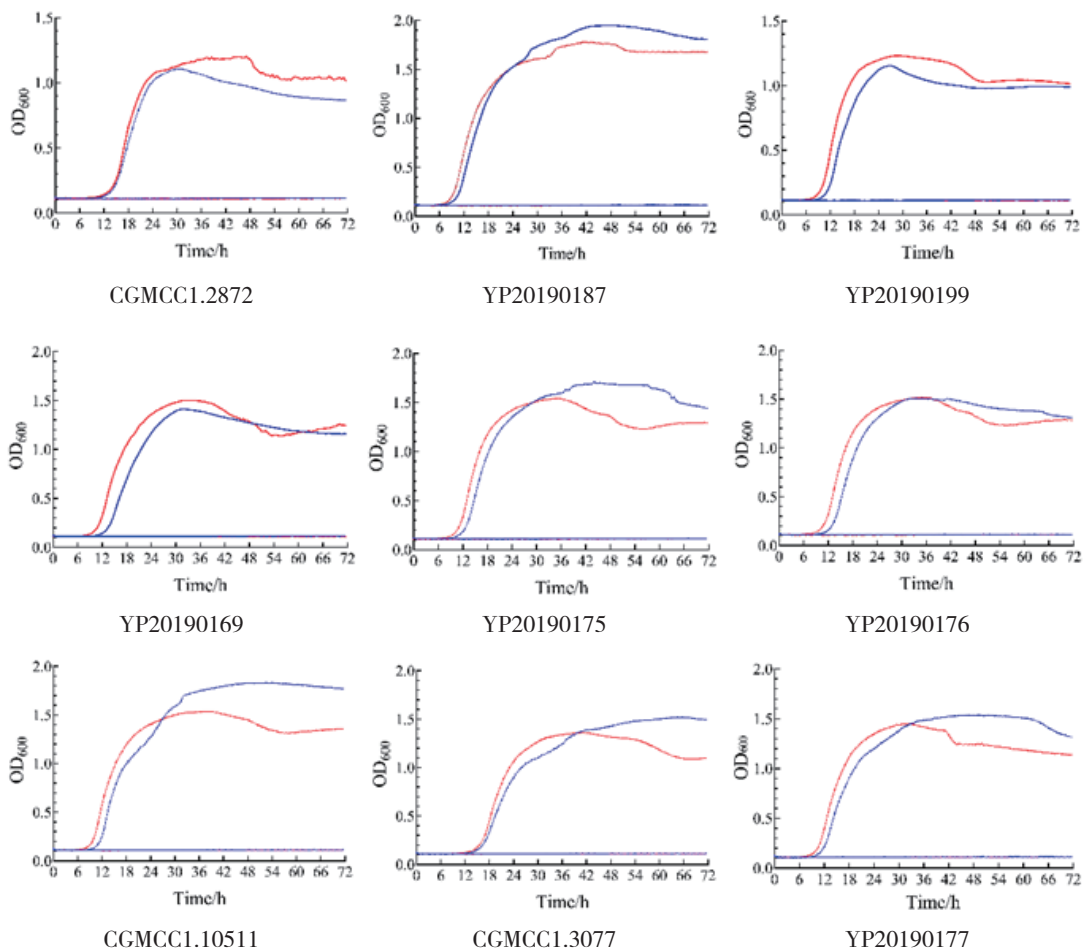


图2 Bcc在三种选择性培养基上生长情况统计

Bcc在BCSA和BCCSA培养基液体体系中的生长曲线如图3所示。试验菌株在两种培养基中均生长良好。15株Bcc菌株中，14株在BCCSA液中生长曲线的斜率均略大于BCSA，提示这些菌株在BCCSA

中的生长速率更快，在更短的时间内达到稳定期。这与培养前期（24 h内），相同培养时间下，BCCSA上菌落与BCSA相比生长更快且直径更大的结果吻合。





红色曲线代表 BCCSA；蓝色曲线代表 BCSA。

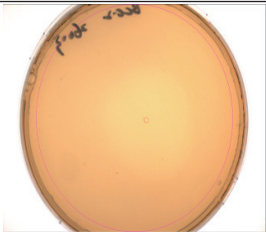
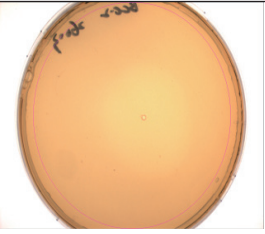
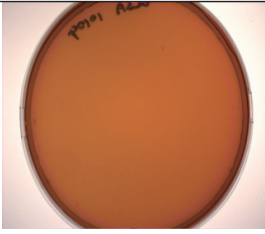
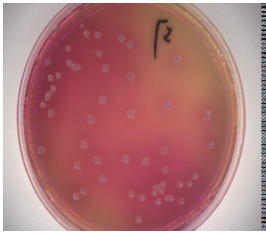
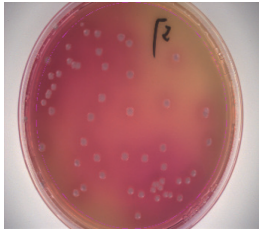
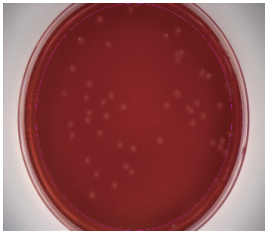
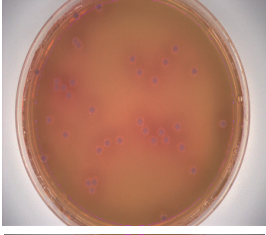
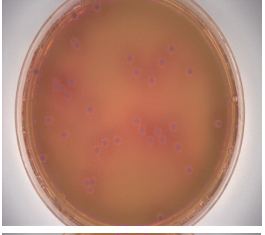
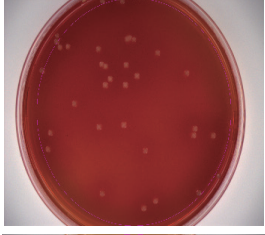
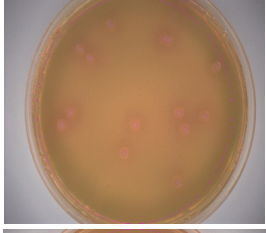
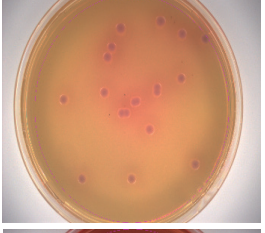
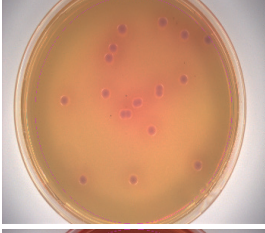
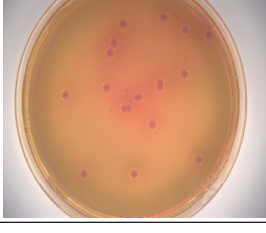
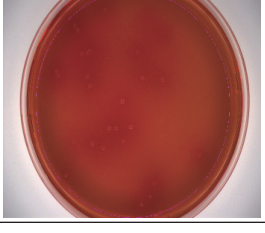
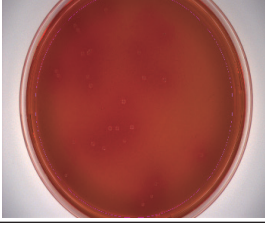
图3 Bcc菌株在BCSA和BCCSA的生长曲线

3.3 选择性培养基的指示特性

BCA、BCCSA、BCSA在未接种微生物时分别呈现黄色、黄色、橘红色。接种Bcc后，BCA和BCCSA由黄色变为橘红色或粉红色，其上生长菌落为灰白、灰粉色或（土）黄色，培养相同时间，BCCSA培养基颜色变化相较BCA更显著；BCSA则由橘红色变为红色或玫红色，其上生长菌落为灰白、黄（棕）绿色。培养24 h，Bcc菌株在BCA和BCCSA上的菌落直径约为0.8 mm，在BCSA上的菌落直径为0.5 mm或无法测量；培养至72 h，在BCA和BCCSA上的直径约为2.5~3 mm，在BCSA上的菌落直径约为2 mm。以上结果表明，相同的培养时间，BCSA上生长的菌落较小，培养24 h时，某些Bcc菌种，如*B.aenigmatica*无法通过肉眼观察其形

态特征；培养基的颜色变化是其指示特性的重要指征之一。Bcc利用培养基中的营养成分，代谢得到碱性产物，使得培养基pH升高，颜色由初始的黄色/橘红色向粉红/玫红转变，而BCA和BCCSA的颜色变化更易观察。BCA中使用的磷酸盐缓冲对不仅能对培养基的初始pH进行调节，在菌株生长后，同样能够缓冲碱性产物对pH的升高，因此只有当菌落数量和培养时间达到一定积累后，培养基的颜色才会发生显著变化。BCCSA减弱了配方中磷酸盐的含量和缓冲能力，保障了培养基的初始pH，在菌落生长时，碱性产物使pH的升高能较为迅速地反映在培养基颜色的变化上，达到良好的指示效果（表4）。

表4 Bcc代表菌株在三种选择性培养基上形态特征

菌株	BCA	BCCSA	BCSA
接种前			
CICC10857			
CMCC (B) 23005			
CMCC (B) 23006			
CMCC (B) 23010			

3.4 选择性培养基的抑制能力

参考美国药典USP43-NF38<60>,以金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌作为检测培养基抑制能力的试验菌株,各接种约 10^4 cfu CMCC (B) 26003和CMCC (B) 10104至三种选择性培养基上,均无回收,表明三种培养基均能达到抑制能力要求。

本研究补充考察了三种选择性培养基对文献报道的可能在Bcc选择性培养基上生长的菌株、水系统常见菌株以及Bcc近缘菌株的抑制能

力(表5)。非Bcc菌株*B.gladiali*、*R.pickettii*、*Sphingomonas paucimobilis*、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Pseudochrobacterum asaccharolyticum*在BCCSA上可出现生长或弱生长; *B.gladiali*、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Ochrobacterum anthropi*、*Pseudochrobacterum asaccharolyticum*在BCA上可出现生长或弱生长; *B.gladiali*、*R.pickettii*、*Stenotrophomonas maltophilia*在BCSA上可出现生长或弱生长。

表5 非Bcc菌株在选择性培养基上的生长情况

菌株名称	BCSA	BCA	BCCSA
<i>B.gladiali</i>	+	+	+
<i>Paraburkholderia unamae</i>	-	-	-
<i>Paraburkholderia tropica</i>	-	-	-
<i>R.pickettii</i>	+	-	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	-	+
<i>Pseudochrobactrum</i>	-	+	+
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-

注：“+”代表有菌落生长或弱生长，“-”代表未见菌落生长。

4 讨论

自上世纪80年代初，研究者即开始研制针对Bcc分离培养的选择性培养基。1985年，Gilligan等^[8]研发了针对*B.c*的选择性培养基PCA，后续在此基础上对其配方进行了改良，调整了碳源、氮源抑菌物质的含量，并通过pH缓冲剂降低培养基的初始pH，形成商品化的Bcc选择性培养基Mast BCA、Oxoid BCA，后者被进出口检验检疫标准SN/T 4485-2016收载。1987年，David等^[9]在乳糖氧化发酵培养基的基础上，添加了用于筛选的抗生素，形成针对*B.c*的选择性培养基OFPBL，1997年Henry等^[10]在此培养基基础上进行改良，添加了蔗糖、酵母浸粉，增加了胰蛋白胍的含量，调整了抗生素的种类及浓度，最终形成了USP<60>和进出口检验检疫标准SN/T 4684-2016中收载的选择性培养基配方（BCSA）。多位研究者用上述培养基对Bcc和其近缘菌株的选择和分离培养效果进行了考察^[11-13]，不同的Bcc选择性培养基对于Bcc的选择和分离培养效果存在一定差别，某些非Bcc的近缘菌株，如*B.pseudomallei*、*B.mallei*、*B.gladiali*和*B.glumae*等也能在其上生长，而非Bcc菌株，如某些非发酵的革兰氏阴性杆菌、芽胞杆菌、酵母和霉菌也可在其

上生长。对于在选择性培养基上生长的细菌，并不能通过菌落表型来判断其是否为Bcc。选择性培养基对Bcc的检出发挥筛查作用，对于其上生长的疑似菌落，仍需通过有效的鉴定方法进一步确认是否为目标菌；而选择性培养基的筛选效果直接影响目标菌的检出结果，应尽可能保证目标菌的回收。

本研究针对目前主要应用的Bcc选择性培养基，对其配方进行调整优化，形成BCCSA选择性培养基，通过Bcc在选择性培养基上的回收及生长菌落表型特征、生长曲线，以及非Bcc在选择性培养基上的生长情况，对三种选择性培养基进行比较，结果表明，与BCA和BCSA相比，BCCSA具备更佳的促Bcc生长能力、指示特征，且能达到相应的抑制能力，可作为《中国药典》拟收载Bcc检查法的选择和分离培养用培养基。

参考文献：

- [1] Parenteral Drug Association. Technical Report No. 67 Exclusion of Objectionable Microorganisms from Nonsterile Pharmaceuticals, Medical Devices, and Cosmetics[R]. USA: Parenteral Drug Association, 2014: 1-63.
- [2] Torbeck L, Raccasi D, Guilfoyle D E, et al.

- Burkholderia Cepacia: This Decision Is Overdue[J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2011, 65 (5) : 535-543.
- [3] Scott Sutton L J. A Review of Reported Recalls Involving Microbiological Control 2004-2011 with Emphasis on FDA Considerations of “Objectionable Organisms” [J]. American Pharmaceutical Review, 2012, 15 (1) : 42-57.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口口腔清洁类产品中洋葱伯克霍尔德菌检验方法[S]. 2017: 1-10.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口化妆品中洋葱伯克霍尔德菌检验方法[S]. 2017: 1-10.
- [6] Convention U S P. United States Pharmacopieia[S]. 2021: 6454.
- [7] Garrity G M, Brenner D J, Krieg N R, et a. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. The Second Edition. USA: Springer-Verlag New York Inc, 2005: Vol. 2, 579.
- [8] Gilligan P H, Gage P A, Bradshaw L M, et al. Isolation Medium for the Recovery of Pseudomonas Cepacia from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1985, 22 (1) : 5-8.
- [9] Welch D F, Muszynski M J, Pai C H, et al. Selective and Differential Medium for Recovery of Pseudomonas Cepacia From the Respiratory Tracts of Patients with Cystic Fibrosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1987, 25 (9) : 1730-1734.
- [10] Henry D A, Campbell M E, LiPuma J J, et al. Identification of Burkholderia Cepacia Isolates from Patients with Cystic Fibrosis and Use of A Simple New Selective Medium[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35 (3) : 614-619.
- [11] Vermis K, Vandamme P A, Nelis H J. Burkholderia Cepacia Complex Genomovars: Utilization of Carbon Sources, Susceptibility to Antimicrobial Agents and Growth on Selective Media[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95 (6) : 1191-1199.
- [12] Edler C, Derschum H, Kohler M, et al. Comparison of Mast Burkholderia Cepacia, Ashdown + Gentamicin, and Burkholderia Pseudomallei Selective Agar for the Selective Growth of Burkholderia Spp[J]. European Journal of Microbiology & Immunology, 2017, 7 (1) : 15-36.
- [13] Henry D, Campbell M, McGimpsey C, et al. Comparison of Isolation Media for Recovery of Burkholderia Cepacia Complex from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37 (4) : 1004-1007.

(收稿日期 2022年1月14日 编辑 邹宇玲)