

蛋黄琼脂培养基用于白喉杆菌的培养

陈怀珍 李玉冰

(广东医药学院, 广州)

白喉, 是一种严重影响人民健康的传染病。白喉杆菌的分离培养, 是准确诊断以及进行流行病学调查的重要手段。自从吕氏血清斜面、白氏鸡蛋斜面及血碇盐平板等培养基应用以来, 对白喉杆菌的检查和研究, 起了重要的推动作用和良好效果。在上述培养基的基础上, 我们加以简化, 制成蛋黄琼脂培养基, 现介绍如下:

材 料

(一) 培养基

1. 吕氏血清斜面培养基及血碇盐平板: 按常规制备(略)。

我院流行病教研组吴振强等同志, 协助将培养基用作现场带菌调查, 特此致谢。

2. 蛋黄琼脂斜面培养基: 无菌手续取新鲜蛋黄, 置玻璃珠瓶中打碎, 加入等量盐水, 摇匀后以三层纱布过滤, 制成 50% 蛋黄盐水悬液, 经 56℃ 水浴 30 分钟处理后, 按 10% 量加于溶化的无菌牛肉浸液琼脂中, 摇匀、分装制成斜面, 置冰箱保存备用。

3. 蛋黄琼脂硝盐平板:

(1) 蛋硝平板①: 将上述蛋黄琼脂按常量加入亚硝酸钾溶液制成。

(2) 蛋硝平板②: 以牛肉膏汤代替牛肉浸液, 如上法制备。

(二) 菌种

白喉杆菌为本实验室保存之轻型毒株, 经转种吕氏血清斜面增殖后用作试验。

方法及结果

(一) 蛋黄琼脂斜面用于繁殖纯菌试验:

取白喉杆菌吕氏血清斜面 18 小时培养物一环, 接种于蛋黄琼脂斜面, 37℃ 孵育 6 及 24 小时后, 观察细菌生长情况及涂片染色检查细菌形态, 同时以吕氏血清斜面同法接种培养作对照 (图 1、2)。细菌生长情况按++++ (菌苔浓厚)、+++ (菌苔较厚)、++ (菌苔明显)、+ (可见细菌生长)、- (无菌生长) 记录之。异染颗粒形成程度按形成异染颗粒菌数占总菌数的百分比表示。结果见表 1。

(二) 白喉杆菌在蛋黄琼脂硝盐平板上生长情况观察

取白喉杆菌吕氏血清斜面 18 小时培养物, 以无菌盐水洗下并稀释至约 20 亿/ml 浓度, 然后以无菌肉汤进一步稀释成 1:10、1:100、1:1000、1:1 万、1:10 万、1:100 万。分别取菌液

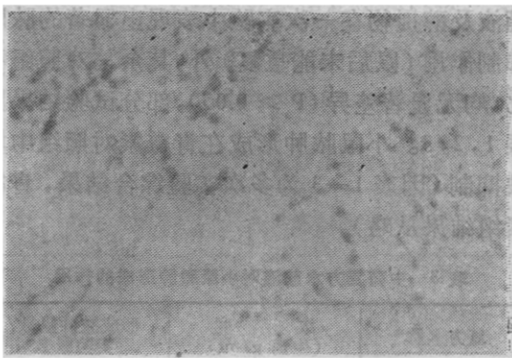


图 1 蛋黄琼脂斜面培养物



图 2 吕氏血清斜面培养物

一环接种于两种蛋黄琼脂硝盐平板及血硝盐平板, 37℃ 培养 12 及 24 小时观察结果, 按++++ (满布细菌)、+++ (格中 2/3 区域有细菌生长)、++ (格中 1/2—1/3 区域有菌生长)、+ (原始部位有散在细菌生长)、- (无菌生长) 等记录之。结果见表 2。

(三) 不同成份蛋黄琼脂培养基对白喉杆菌生长影响的观察

取蛋黄琼脂硝盐平板及血硝盐平板各 5 个, 并按表 3 所列成份制成各种蛋黄琼脂斜面培养基, 如上法接种培养并观察结果。见表 3 及表 2。

表 1 白喉杆菌在蛋黄琼脂斜面上培养结果

培养基	培养时间 (小时)	生长情况	镜 检 形 态		
			形 态	排 列	异染颗粒
蛋黄琼脂斜面	6	++	杆状稍粗	字母形明显	60—80%
	24	++++			
吕氏血清斜面	6	+	细长杆状	字母形明显	70%
	24	+++			

表 2 白喉杆菌在蛋黄琼脂硝酸盐平板上培养结果

培养基	时 间 (小时)	菌 液 浓 度 及 生 长 情 况						
		原 液	1:10	1:100	1:1000	1:1 万	1:10 万	1:100 万
蛋硝平板①	12	3.6	2.8	2.0	1.2	1.0	1.0	1.0
	24	4.0	4.0	4.0	3.0	2.6	2.0	2.2
蛋硝平板②	24	4.0	3.8	3.8	2.8	2.4	2.4	2.8
血硝盐平板	12	4.0	2.4	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	24	4.0	4.0	3.8	3.0	3.0	2.4	2.2

注：表列数字为五个平板培养的平均“+”号数

表 3 不同成份蛋黄琼脂斜面用于繁殖纯菌试验结果

编 号	培 养 基 成 份	培养时间 (小时)	生长情况	镜 检 形 态		
				形 态	排 列	异染颗粒
1	50% 蛋黄盐水+牛肉汤 + 1% 日本豚	6	+	棒状稍粗	字母形明显	80%
		24	++++			
2	50% 蛋黄盐水+牛肉汤 + 1% 鱼粉豚	6	+	细长较疏松	字母形明显	20—50%
		24	++++			
3	50% 蛋黄盐水+肉膏汤 + 1% 日本豚	6	+	粗 短	字母形可见	20—50%
		24	+++			
4	50% 蛋黄盐水+肉膏汤 + 2% 鱼粉豚	6	+	杆状疏松	字母形可见	20%
		24	++++			
5	50% 蛋黄盐水+牛肉汤 + 1% 日本豚+0.5% 水介乳蛋白	6	+	粗短似类白喉菌	不 规 则	20%
		24	++++			
6	吕氏血清斜面	6	+	细 长	字母形明显	70%
		24	+++			

(四) 白喉杆菌在蛋黄琼脂斜面上传代试验

取 1 号蛋黄琼脂斜面培养基，如上法进行传代接种，同时以吕氏血清斜面作对照，观察细菌生长情况、形态、异染颗粒形成能力及对毒素产生的影响。结果证明白喉杆菌在此培养基上传至 10 代，其生长速度及产毒能力(平板毒力试验)不受影响，异染颗粒形成亦无显著差异。

表 4 不同时间保存的蛋黄琼脂斜面对白喉杆菌的培养结果

保存时间 (天)	白 喉 杆 菌 培 养 结 果	
	生长情况	镜 检 形 态
第 1 天	++++	菌体细长 异染颗粒 80%
第 15 天	++++	菌体稍粗短 异染颗粒 70%
第 30 天	++++	菌体细长 异染颗粒 70%

(五) 蛋黄琼脂斜面保存时间观察

制备好的蛋黄琼脂斜面，置 4℃ 冰箱中保存，于第 1、15、30 天分别取出两支，同上法接种培养。结果如表 4。

讨 论 与 小 结

对于白喉杆菌的培养，吕氏血清斜面及白氏鸡蛋斜面等沿用已久，效果是肯定的。但这些培养基制备较麻烦，不但需要用牛血清，还要血清凝固器间歇灭菌三天才能应用。在山东介绍用鸡蛋琼脂培养基培养流脑菌的启发下，我们作了蛋黄琼脂斜面及蛋黄琼脂硝酸盐平板用于培养白喉杆菌的观察。表 1 结果表明：白喉杆菌在此斜面培养基上生长迅速，虽然菌体稍粗，

(下转第 177 页)

(上接第 173 页)

但排列典型,且异染颗粒形成明显。若以培养基底部凝固水涂片,形态尤其典型。白喉杆菌在此培养基中传至 10 代,其生长速度及产毒能力不受影响。将培养基在冰箱中保存一月,培养结果及细菌形态无明显改变。此外,表 2 说明:蛋黄琼脂碲盐平板对白喉杆菌培养的敏感性与血碲盐平板无明显差异。用稀释的白喉杆菌接种于蛋黄琼脂碲盐平板,12 小时即生长明显,无论 12 小时或 24 小时观察,都完全达到血碲盐平板的生长水平,菌液即使稀释至 1:100 万,仍见良好生长。蛋黄琼脂碲盐平板制成后为浅黄色,生长出来的黑色菌落,比在血碲盐平板上更为鲜明易辨别。曾用此培养基作现场带菌调查,结果满意。

表 3 结果看来,用肉膏汤制备的蛋黄琼脂培养基,生长也很好,因此用作增菌是可以的,

但如要观察细菌的形态及异染颗粒,则以第一号培养基(50% 蛋黄盐水+牛肉汤+1% 日本胨)较为适宜。鉴于白喉杆菌异染颗粒主要成份是核糖核酸、多磷酸盐,富含磷、氮的纤维体,为此,我们在培养基中加入 0.5% 水解乳蛋白,企图观察增加蛋白含量与异染颗粒形成的关系,结果白喉杆菌在此培养基上生长非常快速,但形态反而粗短似类白喉杆菌,异染颗粒模糊且形成率低。蛋黄含磷、铁量高,显示了一定的刺激生长和有利于异染颗粒形成的作用,但异染颗粒的形成还受蛋白胨、肉汤等成份及含量的影响。适当控制培养基中的氮、磷成份,对白喉杆菌的培养及获得典型形态,有着重要的作用。

由于本培养基具有制作简便,生长迅速,异染颗粒明显,不易污染,容易清洗等优点,适用于临床上分离培养和教学实验使用。