

# 卵黄盐水与黄氏半固体保存空肠弯曲菌适宜温度的观察

陈亢川 庄世福

(福建省流行病防治研究所,福州)

空肠弯曲菌生活力较弱,不易保存。目前国内多接种于黄氏半固体,培养后置4℃冰箱保存,此法虽简易实用,但存活期较短。作者等在试用卵黄盐水保存空肠弯曲菌的基础上,以黄氏半固体和卵黄盐水为保存培养基,观察了不同温度对菌种保存的影响,发现35℃的恒温箱内,可使其存活期增长到9个月以上,现将结果报道如下。

## 材料与方 法

1. 被试菌株系从福建省各地分离得到,经纯化并鉴定为空肠弯曲菌,计23株。其中检自腹泻病人10株,鸡、鸭、猪各4株,火鸡1株。

2. 培养基: (1) 50% 卵黄盐水: 取新鲜鸡蛋数个,常规消毒后,无菌手续去蛋白,将卵黄囊倾入装有玻璃珠的三角瓶内,加入等量(W/W)生理盐水,打碎摇匀后,分装于康氏管内,每管1.5ml,置56℃水浴50分钟后,用橡胶塞塞紧,4℃冰箱保存备用。

(2) 黄氏半固体: 按文献[1]方法,于250ml布氏肉汤加入1.25g琼脂,高压灭菌后,冷却至56℃左右,加入37.5ml溶解绵羊血,分装于康氏管内;每管约2ml,4℃冰箱保存备用。

3. 观察方法: 取检自患者的上述被试菌3株,动物的5株,共8株作不同温度下保存试验;另取检自患者的7株,动物的8株共15株,作35℃保存进一步观察。被试菌株经布氏肉汤传代后,接种于不含抗菌素的Skirrow琼脂平板上,置含5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>的微氧罐内,42℃经48小时培养后,各取菌一大环,接种于黄氏半固体和卵黄盐水管内,每株数管。接种

后的黄氏半固体置上述微氧罐内增殖24小时后,换上橡胶塞,分别置0℃,4℃,室温(8—20℃)和35℃温箱中保存,每隔1个月从每个条件中取出接种菌株的卵黄盐水和黄氏半固体各一套(每株一管),转种于Skirrow琼脂平板上,按常规方法鉴定<sup>[2]</sup>,并观察菌落和菌体形态等变化。

## 结 果

### (一) 空肠弯曲菌在不同温度下存活情况

上述不同温度条件下观察的8株被试菌,在0℃冰箱保存1个月时,卵黄盐水中仅有2株可以传代,黄氏半固体仅有3株可以传代;保存2个月时,卵黄盐水中已不复检出,黄氏半固体中仅检出1株;保存3个月时均未分离到。

4℃环境中保存的,1个月时卵黄盐水和黄氏半固体均可检出;2个月时卵黄盐水中仍全部存活,黄氏半固体中已不能检出;3个月卵

表1 8株空肠弯曲菌在不同温度下存活情况

| 培养基   | 保存时间<br>(月) | 温度<br>(℃) |   |   |   |   |
|-------|-------------|-----------|---|---|---|---|
|       |             | 1         | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 卵黄盐水  | 0           | 2         | 0 | 0 | 0 | 0 |
|       | 4           | 8         | 8 | 8 | 7 | 3 |
|       | 室温          | 2         | 0 | 0 | 0 | 0 |
|       | 35          | 8         | 8 | 8 | 8 | 8 |
| 黄氏半固体 | 0           | 3         | 1 | 0 | 0 | 0 |
|       | 4           | 8         | 0 | 0 | 0 | 0 |
|       | 室温          | 1         | 0 | 0 | 0 | 0 |
|       | 35          | 8         | 8 | 8 | 8 | 8 |

黄盐水中仍全部存活,但4至5个月时菌株开始死亡(见表1)。

室温(8—20℃)保存菌在两种培养基内,均保存不到一个月就大部分死亡。

在35℃普通温箱中保存的,至5个月时,在两种培养基中8株菌仍全部存活,活菌数未见下降趋势(表1)。

## (二) 35℃保存空肠弯曲菌的存活期进一步观察

在35℃环境中,15株试验菌在黄氏半固体和卵黄盐水中保存,3个月时,全部存活,活菌数甚多;6个月时,均可检出,但卵黄盐水中有1株,黄氏半固体中有3株菌数明显减少,仅在分离平板的原始苔区生长,其余保存菌株活菌数仍然很多;9个月时,卵黄盐水中有1株,黄氏半固体中有3株不能传代,同时两种培养基各有3管活菌数较少,仅能在分离平板的原始苔区生长(表2)。在继续观察的部分保存管中,除少数污染和死亡外,大部分保存至一年以上仍然存活。

表2 35℃温箱中15株空肠弯曲菌的存活情况

| 保存时间<br>(月) | 1  | 2  | 3  | 6     | 9     |
|-------------|----|----|----|-------|-------|
| 培养基         |    |    |    |       |       |
| 卵黄盐水        | 15 | 15 | 15 | 15(1) | 14(3) |
| 黄氏半固体       | 15 | 15 | 15 | 15(3) | 13(3) |

注: ( )中数字为仅在原始苔区生长的株数

## (三) 35℃保存的黄氏半固体保种管培养基色泽变化

黄氏半固体原始管呈暗红色,接种空肠弯曲菌后,经35℃保存一周后,培养基渐呈肝红色;菌数显著减少时,培养基自上而下改变颜色,无活菌处呈巧克力色;经多次开启使用的保存管则呈番茄红色。

## (四) 菌体形态和菌落特征

在两种保存培养基中,初次传代时,在Skirrow琼脂上,菌落特征似无明显改变,但个别菌株亦可出现较为扁平的或边缘鼓起的较少见的

特征,菌体呈多形性,不如初次从宿主体内分离到典型,但在平板上连续传代2—3次后,菌体形态的变化和菌落特征均可恢复正常,不同温度保存似无差异。

## 讨论与小结

有关空肠弯曲菌保存方法的研究,国内未见报告。国外Wang氏报告,将空肠弯曲菌接种于黄氏半固体,42℃培养48小时后,置室温可存活18—49天;4℃可存活1个月以上<sup>[4]</sup>。我们复试黄氏半固体,结果4℃保存,存活期在1—2个月之间,与原作者的报告相似。但在卵黄盐水中保存,4℃条件下可保存3—4个月,部分菌株可存活到5个月,明显地长于黄氏半固体培养基。

从不同温度下保存空肠弯曲菌的结果看到,以35℃温度下保存,无论是卵黄盐水或黄氏半固体其存活期均最长,是一种简单方便,行之有效的保存方法。

在保存过程中,我们还发现,在35℃温箱内保存,空肠弯曲菌可使黄氏半固体的颜色从暗红色转为红褐色,多次启用的保存管还可变为鲜红色。其变化与黄氏半固体接种空肠弯曲菌后,置42℃微氧罐内增殖后的变化相同,唯过程较缓。可见在35℃温箱内,由于橡胶塞隔绝了外界空气,弯曲菌在利用管内有限的氧气,分解有机物,同时渐渐形成了适宜其保存的环境,随着保存时间的延长,少数保存管可自上而下地变成巧克力色,经检查此部分无活菌存在,当整管均为巧克力色时,则不能分离出保存菌。

根据细菌代谢的原理,弯曲菌在保存培养基内氧化有机物获取能量和营养的同时,必然有氧化型产物的产生和转化,而培养基中的血红素在参与作用的过程中,发生了一系列的颜色变化,其变化程度则与氧气的摄取量有关,其原理和作用机制有待进一步研究。

经35℃保存6个月以后,两种培养基中均有个别菌株死亡,分析其原因似与菌株的分离来源,生化特性无关,有关因素有待今后的菌种保存中继续观察。

参 考 文 献

[ 1 ] Wang, W. L.: *J. of Clinic Microbiol* 12(3):

479—480, 1980.

[ 2 ] Blaser, M. I.: *Campylobacter fetus ssp jejuni: A Laboratory Manual International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, 1980.*

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Wang, W. L.: *J. of Clinic Microbiol* 12(3): 479—480, 1980.
- [ 2 ] Blaser, M. I.: *Campylobacter fetus ssp jejuni: A Laboratory Manual International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, 1980.*