

一种新的钩端螺旋体保护液

彭 魁 杰

(湖南医学院流行病学教研室,长沙)

摘要 本文介绍了一种新的保存钩体菌的保护液。以往保存钩体菌惯用柯氏培养基作为经典培养基;为了探讨对钩体菌的长期保存,免除1—2月转种一次及容易污染的弊端,其保护液是非常重要的。我们选用了三种浓缩的保护液,进行了对比试验,结果一致。但自配的新的保护液,成分简单,配制方便,保存效果好,省时省力,经济效益高,有实用价值,可广泛应用。

关键词 新的保护液;保护液;复苏;繁殖

钩体菌的保存,无论用什么方法,其保护液是关键的一环。本文中采用了三种类型的浓缩保护液保存钩体菌种,并作对比试验,结果一致;尤以新的保护液,成分简单,配制方便,保存效果好,省时省力,经济效益高,有实用价值,可广泛应用。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

来源于北京生物制品研究所应用的与诊断血清相适用的钩体菌种,计13群15型标准菌株。

56601—黄疸出血群,	澳尔登型,
56602—爪哇群,	爪哇型,
56603—犬热群,	犬热型,
56604—拜伦群,	拜伦亚型,
56605—七日热群,	七日热亚型,
56606—秋季热群,	秋季热亚型,
56607—澳洲群,	澳洲亚型,
56608—波摩那群,	波摩那型,
56609—流感伤寒群,	流感伤寒型,
56610—热原群,	热原型,
56612—巴达维亚群,	巴叶赞型,
56613—豕群,	豕亚型,
67020—奎耗群,	奎耗二型,
67024—七日热群,	乌尔夫型,
67071—七日热群,	活血型,

(二) 保护液

1. 新的保护液:生理盐水400ml, CaCl_2 0.1g, 琼脂 0.4g, pH7.2。取360ml保护液装入三角瓶中,15磅15分钟灭菌后,再加40ml已灭活的小牛血清,作无菌试验,置冰箱

备用。临用时每3ml分装安瓿。

2. 柯索夫氏(Rorthof's)保护液:蛋白胨1g, NaCl 1.7g, 1% KCl 5ml, 1% NaHCO_3 2.5ml, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.316g, 琼脂 0.4g, pH = 7.2。制备方法同(1);仅灭菌后加入40ml已灭活的正常兔血清。

3. 威氏(Veyvoort's)保护液:林格氏原液* 200ml, 蒸馏水 200ml, 蛋白胨 0.4g, 琼脂 0.4g, pH = 7.2。制备方法同(2)。

(三) 方法

1. 将13群15型标准钩体菌株接种在柯索夫氏培养基中,于28℃恒温下培养7—10天,达到每高倍视野40—100条之后,各型菌株分别各用2ml菌液,加入已装有浓缩保护液的安瓿中,火封;存放在室温中,以备逐月复苏之用,检查在室温情况下,各种浓缩保护液对各型钩体菌存活率所起作用的情况。

2. 保存在三种保护液中的钩体菌,分别在第3、6、9、12、15、18、21、23个月时复苏一次;在复苏过程中,发现钩体菌在浓缩保护液中,在3及6个月复苏时,菌体繁殖不丰富;而在9及12个月复苏时,菌体繁殖茂盛,活力充沛。从保存的情况看(见表1),保存时间愈长,菌数愈少,甚至找不到细菌,所以非经1—3次传代不可,即是盲目传代也是要的。

* 林格式原液处方(g): KCl 0.2, CaCl_2 0.2, NaCl 8, H_2O 1000ml, pH7.4。

结果与讨论

(一) 钩体菌在三种保护液中保存复苏结果

两年中, 历次复苏的结果见下表。

(二) 讨论

1. 从表中复苏结果来看, 采用三种不同类型的浓缩保护液保存钩端螺旋体菌, 其结果大致相同, 菌种在室温条件下, 保存两年多, 均可以复苏, 并经 1—2 次传代, 菌体繁殖茂盛, 活力充沛。新的保护液与柯氏、威氏保护液相比; 新的保护液具有成分简单 (仅需用两种试剂), 制备方便, 省时又省人力, 经济效益较其他二种保护液为高, 很有实用价值。

2. 本文所采用 10% 小牛血清, 有市售, 较普遍, 来源丰富。试验结果也表明, 使用小牛血清效果好。是否钩体菌有容易适应牛血清的能力, 尚不清楚, 有待进一步探讨。

3. 小牛血清多来源于奶牛养饲场, 用于培养钩体菌不逊于兔血清, 但它是否具有天然抗体, 我们没有作进一步检查, 尚不清楚。

4. 这次试验, 解决了两个问题, 一是只要有好的浓缩保护液, 钩体菌就可以用安瓿长期保存, 可避免转种和污染的麻烦, 也不会损失其毒力及抗原性等, 即使有些降低, 通过动物也可恢复。二是 28℃ 是培养钩体菌的最佳温度, 过去保存菌种也以 28℃ 为准; 试验证明, 室温条件下完全可以保存钩体菌菌种。

表 1 钩体菌在三种类型浓缩保护液中保存后复苏结果

菌号	火封时菌数	保 存 时 间 (月)																							
		新 保 护 液								柯 氏 保 护 液								威 氏 保 护 液							
		3	6	9	12	15	18	21	23	3	6	9	12	15	18	21	23	3	6	9	12	15	18	21	23
56601	50	6	0	60+	20	3	1	2	100	8	2	100	20	0	20	0	20	60	7	100	20	0	2	0	60
56602	40	2	0	20	1	0	20	1	30	10	2	27	20	0	5	2	50	10	4	80	10	50	50	0	50
56603	70	1	13	80	40	3	30	10	50	5	22	60	40	40	6	30	30	30	30	100	40	90	20	60	100
56604	80	5	0	20	30	20	10	2	40	2	45	100+	20	30	4	20	20	5	5	60	20	40	30	40	50
56605	50	20	0	污染	40	20	0	6	50	3	5	40	60	10	2	30	20	8	18	80	100	0	10	0	40
56606	90	20	2	80	60	10	30	20	60	5	10	100+	5	10	1	0	20	3	10	40	60	20	10	1	40
56607	60	70	0	80	60	4	80	4	60	6	1	100+	20	40	10	30	40	20	1	80	10	10	60	0	40
56608	50	100	8	80	70	5	1	5	100	4	32	90	30	0	5	10	40	4	8	90	20	20	10	2	50
56609	70	20	2	100	80	1	20	2	50	60	12	100	2	10	5	20	20	30	5	100	100	40	30	0	40
56610	80	60	1	100+	70	20	2	20	50	70	5	100	60	20	1	1	50	30	3	100	80	90	80	20	30
56612	100	10	8	60	80	0	3	10	40	10	15	100	40	2	1	2	50	10	15	3	80	20	4	10	30
56613	100	10	2	40+	20	2	1	30	60	10	1	100	20	2	7	0	40	5	2	60	20	10	30	20	30
67020	50	10	0	64	20	5	4	20	40	10	3	100	20	3	0	5	50	10	2	80	10	5	0	5	20
67024	100	30	0	40	40	20	1	1	30	50	25	100	60	10	60	20	50	30	1	100	10	10	2	6	40
67071	100	3	0	100	60	30	40	20	70	60	0	8	2	30	1	20	40	20	1	100	2	20	0	10	50

(上接第 170 页)

- [20] Signh, M.: *Azospirillum* Genet. physiol. Ecol. (ed. by Klingmuller, W.), Birkhauser Verlag, Basel, 1982.
- [21] Cen, Y. et al.: *Appl. and Environ. Microbiol.*, 1: 233—236, 1982.
- [22] Pedrosa, F. O., M. G. Yates: *Azospirillum II* (ed. by Klingmuller, W.), Birkhauser Verlag, Basel, 1983.
- [23] Yates, M. G. et al.: Current perspective in Nitrogen Fixation (ed. by Gibson, A. H. et al.), Australian Academy of Science, Canberra, 1981, pp. 97—100.
- [24] 王子芳、曾宪容、周亿圭: 微生物学报, 25(1): 54—59, 1985.
- [25] Stephan, M. S. P. et al.: Associative N₂-Fixation (ed.

by peter, B. U.), CRC, Boca Raton Fla, 1981, pp. 1—15.

- [26] Postgate, J.: Current perspective in Nitrogen Fixation (ed. by Gibson, A. H. et al.), Australian Academy of science, Canberra, 1981, pp. 223—225.
- [27] Maier, R. J. et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 75: 3258, 1978.
- [28] Vlassak, K. and L. Reynders: Associative N₂-Fixation (ed. by Peter, B. U.), CRC, Boca Raton Fla, 1981, pp. 93—101.
- [29] Subba Rao, N. S.: ditto, pp. 137—144.
- [30] Pacovsky, R. S. et al.: *Plants and Soil*, 85: 143—148, 1985.