

## 空肠弯曲菌的保存方法研究

吴采菲 张河战 辜清吾

(中国药品生物制品检定所,北京)

**摘要** 空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 目前已被确认是重要的肠道致病菌之一。由于本菌生活力弱,易于死亡,不好保存,在一般常用的培养基上存活时间极短约 3—5 天,给实际工作造成不少困难,如何保存菌种是一个急待解决的问题。为了提供一种较好的保存空肠弯曲菌的方法,作者选用了五种培养基,比较观察了 18 株空肠弯曲菌保存在不同条件下的存活期及变异情况,其结果表明:用 1、2 号培养基的培养物保存若放置 4—10℃ 冰箱,前者经 130 天,后者经 80 天其存活率均为 100%;在保存 210 天时,两种培养基的培养物仍有 50% 以上菌株存活,其保存期限远远超过文献所介绍的方法,同时对保存 210 天后仍存活的菌株进行了主要特征鉴定,包括菌落、菌体形态、动力、触酶、氧化酶、在三糖铁斜面上与醋酸铅纸条法的硫化氢产生试验,在 1% 甘氨酸培养基与 3.5% NaCl 培养基上的生长试验,在 25℃ 生长试验及萘啶酮酸敏感试验等与保存前比较,未发现有变异情况。这两种培养基制作简单、保存方便而实用,是目前用于保存空肠弯曲菌的有效方法,这对一些没有深低温冰箱及冷冻干燥设备的实验室和基层单位开展空肠弯曲菌工作有促进作用。

**关键词** 空肠弯曲菌;脱纤维绵羊血;FBP

空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 目前已被确认为人类特别是儿童的重要肠道致病菌,已引起人们的高度重视。由于该菌生活力弱,易于死亡,不好保存,在常用的含血琼脂斜面或平板上,一般只能存活 3—5 天,给实际工作造成不少困难,因此,菌株如何保存是一个急待解决的问题。

为了提供一种较好的保存空肠弯曲菌的方法,作者选用了五种培养基,比较观察了 18 株空肠弯曲菌保存在不同条件下的存活期及变异情况,结果报告如下。

## 材料与 方法

### (一) 培养基

1 号培养基:脱纤维绵羊血 100ml 按 0.05% 加入硫酸亚铁 (F),偏重亚硫酸钠 (B) 与丙酮酸钠 (P) [简称 FBP,下同]

2 号培养基:脱纤维绵羊血与布鲁氏肉汤各 50ml,按 0.05% 加入 FBP。

3 号培养基:布鲁氏肉汤 85ml,甘油 15ml,按 0.05% 加入 FBP。

4 号培养基:布鲁氏肉汤 85ml,甘油 15ml。

5 号培养基:布鲁氏肉汤 100ml,琼脂 0.5g,脱纤维羊血 15ml,按 0.05% 加入 FBP。

### (二) 菌株

用于试验的空肠弯曲菌共 18 株均为本实验室冷冻干燥保存,其菌号为:22001,22005,22012,22014,22023,22024,22025,22026,22027,22028,22029,22030,22032,22034,22039,22040,22043,22044。除 22001 来自日本外,其余均来自美国 CDC。

### (三) 方法

1. 接种与培养:取新鲜培养物接种于各种培养基,其中 1、3、5 号培养基均接种双份培养物,置 42℃ 微氧环境培养 18—20 小时取出。

2. 保存条件:将上述培养物加封液体石蜡,并换上橡皮塞。将 1—5 号培养物置冰箱 (4—10℃) 保存;1、3、5 号培养物的另一份置室温 (25—35℃) 保存。

3. 观察保存情况:分别保存到第 80 天,130 天,185 天和 210 天时,取培养物传代于含血 Camp-BAP 琼脂,观察各株菌存活情况,菌落、菌体形态、触酶及氧化酶试验;并对保存 210 天仍然生长的 11 株空肠弯曲菌作了全面

的生化特性鉴定。

结果与讨论

(一) 空肠弯曲菌的存活情况

空肠弯曲菌在各种培养基内的保存情况见表 1。

表 1 空肠弯曲菌在各种培养基内保存的存活率

培养基	保存条件	存活率 (%)			
		80 天	130 天	185 天	210 天
1 号	冰 箱	100	100	61	56
	室 温	11	0	—	—
2 号	冰 箱	100	94	67	50
3 号	冰 箱	0	—	—	—
	室 温	0	—	—	—
4 号	冰 箱	6	6	6	6
5 号	冰 箱	94	39	28	28
	室 温	0	—	—	—

从表 1 可以看出：用 1 号与 2 号培养基保存空肠弯曲菌，置于冰箱，保存 80 天的存活率为 100%；130 天的存活率分别为 100% 与 94%；185 天的存活率分别为 61% 与 66%；210 天后仍有 50% 以上存活。5 号培养基置于

冰箱保存，也取得较好的结果。保存 80 天存活率为 100%，而 130 天仅有 39% 存活。空肠弯曲菌在 4 号培养基内置于冰箱保存，80 天时只存活一株，该菌株保存至 210 天仍存活。3 号培养基置于冰箱保存，第 80 天时无一株菌存活。1—5 号培养基培养的菌株在室温下保存，80 天已绝大部分死亡。

(二) 鉴定结果

1. 空肠弯曲菌菌落、菌形及动力检查结果：10 株空肠弯曲菌在 1、2 号培养基上保存 210 天后，其菌落典型，菌体形态为革兰氏阴性多形杆菌，在暗视野观察动力试验阳性；与保存前比较，未发现有明显变异情况。

2. 空肠弯曲菌保存前后的生化反应结果（见表 2）。

从表 2 可以看出，空肠弯曲菌在 1、2 号培养基中保存 210 天后，存活菌株的生化反应和保存前相符。

空肠弯曲菌是一种微需氧菌，营养要求复杂，在一般常用的培养基上存活时间极短，一些学者曾对其保存方法进行过研究。1980 年 Wang 报告用改良布氏含血琼脂培养基采集运送和保存空肠弯曲菌，可存活 3 周，这是目前国内外用得较多的一种培养基<sup>[1]</sup>。也可用冷冻干

表 2 空肠弯曲保存前后的生化反应结果

试验  菌号	硫化氢产生						1%			3.5%			25℃ 生长			萘啶酸敏感			氧化酶			触酶		
	TSI			醋酸铅纸条			甘氨酸生长			NaCl 生长														
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
22005	—	—	/	—	—	/	+	+	/	—	—	/	—	—	/	+	+	/	+	+	/	+	+	/
22014	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22024	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22025	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22027	—	/	—	—	/	—	+	/	+	—	/	—	—	—	/	+	/	+	+	/	+	+	/	+
22028	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22029	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22039	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22040	—	/	—	—	/	—	+	+	/	—	—	/	—	—	/	+	+	/	+	+	/	+	+	/
22043	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22044	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“1”为保存前；“2”为在一号培养基保存七个月后；“3”为在二号培养基保存七个月后。  
“+”为阳性、生长、敏感。“—”为阴性、不生长；“/”为未试验。

燥深低温 ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) 或液氮保存, 可取得较长存活时间, 但目前国内基层单位不易做到。Chan 于 1982 年报道用他新设计的培养基保存空肠弯曲菌可存活一个多月<sup>[2]</sup>。Nair 曾进行了多种保存培养基的研究, 报道以鸡蛋为基础的保存培养基 (EM) 最好, 室温可存活 20 天,  $4^{\circ}\text{C}$  可存活 3 个月<sup>[3,4]</sup>。在我们实验室除冷冻干燥保存外, 一般试验用菌株均采用 Wang 方法保存, 此法虽不复杂, 但存活时间较短, 需每隔 2—3 周传代一次; 我们也曾用鸡蛋培养基, 其保存时间更短。本文比较了五种不同培养基在不同条件下保存空肠弯曲菌的结果表明: 用 1、2 号培养基保存, 放置  $4-10^{\circ}\text{C}$  冰箱, 80 天时存活率为 100%; 130 天时, 1 号培养基的存活率为 100%, 2 号培养基则为 94%; 210 天后仍有 50% 以上菌株存活, 其保存时间远远超过文献所介绍的方法。同时对保存 210 天后仍存活的菌株进行了形态和生化特性等的鉴定, 未发现变异情况。我们认为 1、2 号培养基制作简单使用方便, 保存时间长, 是目前用于保存空肠弯曲菌的一种较有效的方法。

5 号培养基是一种改良的 Wang 培养基, 即在 Wang 培养基加入硫酸亚铁、偏重亚硫酸钠、丙酮酸钠, 也取得较 Wang 培养基为好的结果, 若在冰箱保存, 经 80 天后其存活率达 94%, 也是一种简便实用而保存时间较长的方法。

关于保存温度, 我们用 1、3、5 号培养基培

养不同菌株, 比较了冰箱与室温保存效果, 发现室温保存效果不佳, 保存到 80 天时, 菌株绝大部分死亡。

用 4 号培养基的培养物保存于冰箱, 只有 1 株可存活 210 天, 其余则少于 80 天, 由此可见, 空肠弯曲菌的存活除与培养基、保存条件等因素有关外, 尚与菌株的特性有关。

## 小 结

本文试用了 5 种不同的培养基, 比较观察了 18 株空肠弯曲菌保存在不同温度下的存活期及变异情况。结果表明, 用 1 号或 2 号培养基保存于普通冰箱, 前者经 130 天, 后者经 80 天均 100% 存活; 保存 210 天两者均有 50% 菌株存活; 存活期较长, 经菌落形态及血清学检查未发生变异, 这两种培养基制作简单, 保存方便而实用, 是目前用于保存空肠弯曲菌的有效方法, 将对一些基层单位、没有深低温冰箱及冷冻干燥设备的实验室开展空肠弯曲菌工作有促进作用, 值得推广应用。

## 参 考 文 献

- [1] Wang, W. L. L. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 12: 479—480, 1980.
- [2] Chan, F. T., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 15: 12—15, 1982.
- [3] Nair, G. B., et al.: *Ind. J. Med. Res.*, 76: 692—695, 1982.
- [4] Nair, G. B., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 19: 298—299, 1984.