

空肠弯曲菌生长条件的研究

路文彬 孟 璞 刘 园 王凤荣

(北京市卫生防疫站)

在国内外,空肠弯曲菌对人的致病性已被反复证明。从腹泻病人已大量分离出该菌。但是由于空肠弯曲菌是一种微嗜氧菌,培养需要特殊条件。因此基层开展培养工作有一定困难。为研制更适合基层使用的方法,对弯曲菌的有关生长因素^[1]作进一步探讨是非常必要的,以对该菌特性有进一步的深入了解,从而以便提供研制空肠弯曲菌无血液分离培养基创造条件^[2,3,4]。

材料和方法

(一) 培养基

1. 九种基础培养基(g): 在 $0.2K_2HPO_4$, $0.2KH_2PO_4$ 和蒸馏水 100ml 中, 加入 0.3 牛肉膏, pH7.5, 称为牛肉膏汤(BE); 加入 0.5 酪朊, 称为酪朊汤(CA); 加入 0.5 酵母膏, 称为酵母膏汤(YE); 加入 0.3 牛肉膏, 0.5 酪朊, 称为牛肉膏酪朊汤(BC); 加入 0.5 酵母膏, 0.5 酪朊, 称为酵母膏酪朊汤(YC); 加入 0.3 牛肉膏, 0.5 酪朊, 0.2 淀粉, 称为牛肉膏酪朊淀粉汤(BCS); 加入 0.3 牛肉膏, 0.5 酵母膏, 0.5 酪朊, 称为牛肉膏

酪朊酵母膏汤(BCY); 对照用培养基 Muller-Hinton(MH) 和布鲁氏肉汤(BB)。

2. 酵母膏、酪朊组合培养基(g): 在 100m YC 培养基中, 加入 0.1 琼脂, 称为 YCA₁; 加入 0.3 琼脂, 称为 YCA₂; 加入 0.5 琼脂, 称为 YCA₃; 加入 0.2 淀粉, 称为 YCS₁; 加入 0.1 琼脂, 0.2 K_2HPO_4 , 0.2 KH_2PO_4 , 0.2 淀粉, 称 YCS₂; 加入 0.2 淀粉, 0.2 K_2HPO_4 , 0.2 KH_2PO_4 , 0.15 硫酸铵和 0.1 琼脂, 称 YCS₃。

3. 各种蛋白胨培养基(g): 在 $0.2K_2HPO_4$, 0.15 硫酸铵, 0.5 酵母膏, 蒸馏水 100ml, pH7.5 中(为 YKS), 加入 0.5 酪朊(西德), 称 CKS; 加入 1.0 蛋白胨(英国), 称为 PKS; 加入 1.0 胰胨(英国), 称为 TKS; 加入 1.0 豚胨(英国), 称 PrKS; 加入 1.0 多价胨(日本), 称 PYKS; 加入 1.0 精解胨(上海), 称 PSKS; 加入 1.0 武汉胨(武汉), 称 PWKS。

4. 各种蛋白胨与酵母膏组合培养基(g): 在 0.5 酵母膏, $0.2K_2HPO_4$, 0.15 硫酸铵, 蒸馏水 100ml, pH7.5 中(YKS), 加入 0.5 酪朊(西德), 称 YCK; 加入 1.0 蛋白胨(英国), 称 YPK;

加入 1.0 胰胨(英国),称 YTK; 加入 1.0 豚胨(英国),称 YPrK; 加入 1.0 多价豚(日本),称 YPYK; 加入 1.0 精解豚(上海),称 YPSK; 加入 1.0 武汉豚(武汉),称 YPWK。

5. 不同浓度氯化钠培养基: 在 YCS₂ 培养基中,加入 0.3, 0.5, 0.7, 1.1, 1.5, 2 和 2.5% 氯化钠,琼脂浓度提高到 2%, pH7.5, 高压灭菌,制成平板备用。以不加氯化钠的 YCS₂ 为对照。

6. 不同 pH 值培养基: 将 YCS₂ 培养基,用 KOH 调 pH 值为 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5; 琼脂浓度提高到 2%, 高压灭菌,制成平板。以 pH7.5 的 YCS₂ 为对照用培养基。

(二) 实验用菌株

213 号空肠弯曲菌,系世界卫生组织赠。本实验室编为 1 号, 2 号菌为中国医学科学院流行病学微生物学研究所赠。其他 3—9 号菌系从患者分离得到。

(三) 实验方法

1. 将 1 号菌接种于不含抗生素的 Camp-BAP 培养基,微嗜氧条件, 42℃ 培养 48h,刮取菌苔,按常规法配制 16×10^8 活菌/ml, 用肉汤连续 10 倍稀释,以 16,000 和 1,600 活菌/ml 两种浓度,接种九种基础培养基,微嗜氧条件下培养,观察生长情况。

2. 按上述方法,配制菌液为 160,000, 16,000, 1,600, 160 和 16 活菌/ml。接种 7 种酪朊, 酵母膏组合培养基上,在微嗜氧条件下培养,观察生长情况。

3. 按方法 1 将供试菌株 1—9 号,配制成一定浓度的菌液,接种在各种蛋白胨培养基上,培养后,从每种培养基各吸取 0.1ml 菌液,接种平板, L 棒涂布,同上培养,观察生长情况。

4. 按上述方法观察各种蛋白胨和酵母膏组合培养基对空肠弯曲菌生长的影响。

5. 空肠弯曲菌对不同浓度氯化钠的耐受力试验。将 1—9 号菌,按上述制成一定浓度的菌液,然后各取 0.1ml 接种在不同浓度的氯化钠琼脂平板和对照平板, L 棒涂布,微嗜氧培养,观察结果。

6. 不同 pH 值对空肠弯曲菌生长的影响,

实验方法同上。

结果和讨论

(一) 基础培养基对空肠弯曲菌生长影响 (表 1)

表 1 空肠弯曲菌在九种基础培养基中的生长情况

培养基	菌液浓度(菌/ml)	
	16,000	1,600
BE	-	-
CA	-	-
YE	-	-
BC	-	-
YC	+++	++
BCY	+++	-
BCS	-	-
MH	+++	-
BB	-	-

从表 1 看出,在九种基础培养基中,用 1 号菌,以两种浓度 16,000 和 1,600 活菌/ml,接种培养基; 16,000 活菌/ml,在 YC, BCY, MH 上均能生长,而以 YC 生长最好; 1,600 活菌/ml, 仅于 YC 中有中度生长,其他培养基均为阴性。但 16,000 和 1,600 活菌/ml 两种浓度细菌,于布鲁氏肉汤 (BB) 中均未见生长。可见布鲁氏肉汤,不适宜空肠弯曲菌的增殖使用。

(二) 空肠弯曲菌在合成培养基中生长情况 (表 2)

表 2 空肠弯曲菌在七种合成培养基中生长情况

培养基	菌液浓度(菌/ml)				
	160,000	16,000	1,600	160	16
YC	+++	++	-	-	-
YCA ₁	+++	++	-	-	-
YCA ₂	++	+	-	-	-
YCA ₃	++	-	-	-	-
YCS ₁	+++	++	-	-	-
YCS ₂	+++	+++	++	-	-
YCS ₃	+++	+++	+++	++	+

从表 2 结果看出,用 1 号菌的 5 种不同菌液浓度接种于酵母膏、酪朊组合的七种不同培养基上,其中以 160,000 活菌/ml 菌液浓度,在 YC, YCA₁, YCA₂, YCA₃, YCS₁, YCS₂ 和 YCS₃ 中,均

能生长,而以 YCS₁, YCS₂ 和 YCS₃ 生长较好; 16,000 活菌/ml, 在 YC, YCA₁, YCA₂, YCS₁, YCS₂ 和 YCS₃ 中生长较好, 而在 YCA₃ 中不长; 而以 YCS₃ 中生长最好。但菌液浓度减至 1,600 活菌/ml, 160 活菌/ml, 16 活菌/ml 时, 仅在 YCS₃ 中生长, 其他 6 种培养基中均不生长。可见 YCS₃ 适合作为空肠弯曲菌的基础培养基。对促进空肠弯曲菌的生长比布鲁氏肉汤和 MH 培养基要好得多。

微量的 K₂HPO₄ 和硫酸铵, 少量琼脂, 对空肠弯曲菌有促进生长的作用。

(三) 不同蛋白胨对弯曲菌生长的影响(表 3)

在用各种蛋白胨制备的培养基中, 9 个菌株在豚豚中均能生长; 8 个菌株在 PKS 中能够生长; 6 个菌株能在 TKS 中生长; 5 个菌株能在 CKS 中生长; 3 个菌株能在 PWKS 中生长; 2 个菌株在 PSKS 中生长, 仅 1 个菌株能在

PYKS 中生长。因而不难看出, 英国豚豚最适合空肠弯曲菌的生长。其次为英国豚豚和英国蛋白胨, 而在对照培养基中 (YKS), 有 7 个菌株仅有 (+) 的轻度生长; 而有 2 个菌株不能生长。

(四) 蛋白胨、酵母膏组合培养基对空肠弯曲菌生长的影响(表 4)。

9 个菌株在对照培养基中, 仅有 (+) — (++) 的生长。YPSK 中仅有 3、5、8 和 9 号菌有 (+++) — (++++) 的生长, 其余各种蛋白胨和酵母膏组合培养基, 对 9 个菌株的生长都达到同样好的结果。可见七种豚豚单独制备培养基, 除 PKS 和 PrKS 外, 对 9 个菌株都有不同程度的抑制作用。但与酵母膏组合, 除上海精解豚豚外, 其他六种豚豚都达到比较理想的结果。

(五) 不同浓度氯化钠对空肠弯曲菌生长的影响(表 5)。

空肠弯曲菌对不同浓度的氯化钠耐受力的

表 3 不同蛋白胨对空肠弯曲菌生长的影响

培养基	菌 号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
YKS	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CKS	++	-	-	++	+	+++	-	++	-
PKS	++++	++++	+	+	++++	++++	++++	++++	+
TKS	++++	-	+	-	++++	++++	-	++++	+
PrKS	++++	++	++	++	+++	++++	++	++	++
PYKS	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
PSKS	-	-	-	-	-	-	-	++++	+
PWKS	-	-	-	-	-	+	+	+	-

注: +: 生长 1—10 个菌; ++: 生长 11—50 个菌; +++: 生长 51—100 个菌; ++++: 生长 101 个菌以上

表 4 蛋白胨、酵母膏组合培养基对空肠弯曲菌生长的影响

培养基	菌 号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
YKS	+	+	+	+	++	++	+	+	++
YCK	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
YPK	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
YTK	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
YPrK	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
YPYK	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
YPSK	-	-	++++	-	++++	-	-	++++	++++
YPWK	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

比较中, 9个菌株在不加氯化钠的对照培养基中都达到了(+++)的生长水平; 而于0.3%氯化钠培养基中, 却达到(++++)的生长水平; 0.5%氯化钠, 对9个菌株产生不同程度的抑制生长, 其中6号菌仅达到(+)的生长, 3、4号菌有(++)的生长, 1、2、9号菌有(+++)的生长, 5、7、8号菌能达到(++++)的生长; 在0.7%氯化钠培养基中, 1—6号菌仅有(+)的生长, 8、9号菌有(++)的生长, 仅7号菌能达到(++++)的生长;

在1.1%氯化钠培养基中, 2、3、4、6号菌未见生长, 1、5、8、9号菌仅有(+)生长, 7号菌有(++)生长; 在1.5%氯化钠培养基中, 仅7号菌有(+)生长, 其他8个菌株均被抑制; 在2%和2.5%氯化钠培养基中, 9个菌株都被抑制。

(六) 不同 pH 值对空肠弯曲菌生长的影响 (表 6)

当 pH 值为 5.5 时, 9 个菌株有 8 个不能生长, 仅 6 号菌有 (+) 生长; pH 值为 6.0 时,

表 5 不同浓度氯化钠对空肠弯曲菌生长的影响

氯化钠(%)	菌 号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0.3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.5	+++	+++	++	++	++++	+	++++	++++	+++
0.7	+	+	+	+	+	+	++++	++	++
1.1	+	-	-	-	+	-	++	+	+
1.5	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 6 不同 pH 值对空肠弯曲菌生长的影响

pH 值	菌 号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5.5	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6.0	+++	+++	+++	+++	+	+++	-	-	-
6.5	++++	++++	++++	++++	++	++++	-	-	-
7.0	++++	++++	++++	++++	++	++++	++	++	-
7.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8.0	++++	++++	++++	++	+	++++	++	++++	-
8.5	++++	++++	++	++	+++	-	-	+	-

7、8、9号菌未见生长, 1—6号菌有(+)—(+++)生长。pH值为6.5时, 7、8、9号菌受到抑制, 1—6号菌有(++)—(++++)生长; pH值为7.0时, 5、7、8号菌有(++)生长, 9号菌阴性, 1、2、3、4、6号菌有(++++)生长。pH值7.5时, 9个菌株均达到(++++)生长; pH值8.0时, 9号菌阴性, 5号菌有(+)生长, 7号菌有(++)生长, 其余各号菌有(+++)—(++++)生长; pH值8.5时, 1—6号菌有(++)—(++++)生长, 7、9号菌阴性, 8号菌有(+)生长。对照培养基 YCS₂, 9个菌株均达到(++++)生长的水平。

从上述试验结果看出, 在九种基础培养基中, 以酵母膏和酪朊组成的培养基最适合空肠弯曲菌的生长。比享有盛名的 MH 好些, 更优于布鲁氏肉汤。因而以 YC 培养基为基础, 可组成一些适合空肠弯曲菌生长的培养基。如, 我们新研制的无血液培养基 (BFA), [处方 (g): 酵母膏 5, K₂HPO₄ 2, 硫酸铵 1.5, 活性炭 4, 丙酮酸钠 0.25, 硫酸亚铁 0.25, 蒸馏水 1,000 ml, pH 7.5。这些成份除活性炭、琼脂外, 都加入 1,000ml 蒸馏水中, 煮沸溶解, 调 pH 7.5, 然后再加入活性炭和琼脂, 高压灭菌, 冷却至

60℃, 加入 TMP 抗生素溶液 10ml (万古霉素 10mg, 多粘菌素 B 2,500IU, 两性霉素 B 2mg, 头孢菌素 15mg, TMP 5mg)] 通过 200 例痢疾患者、接触者和健康人的大便标本检查, 同时与美国 Difco 公司的培养基 (DCA) 和上海的干燥培养基 (SCA) 比较。共检出 24 份阳性标本, 其中我们研制的 BFA 培养基也检出 24 份阳性标本, 阳性率为 12%, DCA 检出 15 份阳性标本, 阳性率为 7.5%, SCA 检出 8 份阳性标本, 阳性率为 4%。可见新研制的 BFA 平板, 对空肠弯曲菌的阳性检出率比 DCA 和 SCA 效果好, 值得推广应用。

小 结

1. 酵母膏、豚豚, 可溶性淀粉是空肠弯曲菌必要的营养成分。0.2% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 和 0.15% $(NH_4)_2SO_4$, 在 0.1% 琼脂培养基中, 有助于空肠弯曲菌的生长。

2. 在含微量磷酸钾及硫酸铵中, 加入不同

种的国内外蛋白胨的不同组合, 证明以英国的豚豚、豚豚和蛋白胨, 对空肠弯曲菌有促进生长的作用。

3. 在含有酵母膏及酪朊的上述基础培养液中, 加入不同豚的培养基, 对空肠弯曲菌有促进生长作用, 仅上海产精解豚的培养基对某些空肠弯曲菌有抑制生长的作用。

4. 培养基中氯化钠的用量以 0.3% 为宜。

5. 培养基的制品 pH 值以 7.5 效果较佳。

6. 我站研制的 BFA 无血液培养基, 实验证明有其优点, 可以推广使用。

参 考 文 献

- [1] Mehiman, I. & A. Romero.: *Applied and Environmental Microbiol.*, 43(3): 615—618, 1982.
- [2] Bolton, F. J. & D. Coates.: *J. Appl. Bacteriol.*, 54(1): 115—125, 1983.
- [3] Bolton, F. J. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 19(2): 169—171, 1984.
- [4] 赵汉良等: 公共卫生与疾病控制杂志, 3(3): 57—58, 1984.