

椰毒假单胞菌酵米面亚种新鉴别培养基的研究

王淑真 杨宝兰 王淑颖 周桂莲

(卫生部食品卫生监督检验所)

摘要: 本文报导了适于椰毒假单胞菌酵米面亚种生长的银耳琼脂和卵黄银耳培养基, 该菌在这两种培养基上不仅生长快, 菌落大, 且滑润, 可形成露珠状菌落, 并在卵黄琼脂上出现明显的特殊虹彩环现象。在由

变质银耳食物中毒的病原菌。目前分离原因多采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA), 由于马铃薯来源受季节限制, 且在不同批马铃薯所制备的培养基上菌株生长状况不一致; 近几年来由变质银耳中毒样品中分离到此菌在不断增多, 为了有利于该菌的分离和鉴定, 我们试验了多种营养条件和影响下生长的因素, 研制出有利于该菌生长的银耳琼脂和鉴别性较好的银耳卵黄琼脂, 并通过40株中毒细菌和一份中毒样品的验证, 证明其生长情况显著优于对照培养基, 具有易于鉴别的特点。

材 料 和 方 法

一、菌株来源: 从中毒酵米面和中毒变质银耳中分离的40株椰毒假单胞菌, 其中血清Ⅲ型10株, Ⅳ型6株, Ⅴ型9株, Ⅵ型10株, 未定型5株。

二、中毒样品: 中毒酵米面一份。

三、培养基:

1. 对照培养基:

(1) 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)①

(2) 酵母膏葡萄糖琼脂(YDA)②

(3) 卵黄营养琼脂①

2. 试验研制培养基:

(1) 培养基的最适酸碱度

常规应用的PDA培养基不需调节PH值, 为了解椰毒亚种菌的最适生长条件, 选用10株代表株以PDA为基础, 比较了四种

培养基上的生长性状, 从而确定适于该菌生长的最适银耳用量。

(3) 银耳卵黄培养基

利用卵磷脂酶, 产生特殊的虹彩环是该菌的一个生化特点; 目前一般用营养卵黄琼脂来观察该菌的这一特性; 我们采用银耳琼脂加入卵黄的方法与营养卵黄琼脂进行比较, 观察该菌在这两种培养基上对卵磷脂酶的利用情况, 根据虹彩环出现的显著程度和阳性数等特点来确定培养基的鉴别性能。

结 果

一、PH值对椰毒亚种菌生长的影响

(表1)

表1 不同酸碱度对椰毒亚种菌生长的影响

菌型	菌株数	试验次数	菌落数	pH (菌落直径平均值mm)			
				6.4	7.0	7.5	8.0
Ⅲ	2	3	60	0.66	0.98	1.10	1.12
Ⅳ	2	3	60	0.79	1.19	1.38	1.30
Ⅴ	2	3	50	1.12	1.22	1.21	1.27
Ⅵ	3	4	100	1.28	1.39	1.46	1.43
未定	1	2	20	1.10	1.27	1.13	1.25
总计	10	15	290	1.00	1.21	1.26	1.27

从表1 290个菌落直径的平均值来看,在PH6.4的PDA培养基上生长的菌落偏小,PH7.0上稍大,呈光滑型。PH7.5和8.0上多为粗糙型菌落,而培养基的底色变暗,有的变为褐色而影响对菌落形态的观察。PH6.4和7.0的培养基底色不变,为淡黄色半透明,易观察菌落形态,试验证明PH7.0为较适宜椰毒亚种菌生长的酸碱度。

二、椰毒亚种菌在不同浓度银耳培养基上生长情况的比较(表2)

表2 椰毒亚种菌在不同浓度银耳培养基上生长情况

菌型	菌株数	试验次数	菌落数	菌落直径平均值(mm)			
				对照	不同浓度银耳培养基		
				PDA	A	B	C
Ⅰ	2	4	80	1.23	1.14	1.10	1.05
Ⅳ	2	3	60	1.19	1.63	1.67	1.82
V	2	3	60	1.17	1.18	1.29	1.33
Ⅵ	3	3	90	1.20	1.40	1.63	1.63
未定	1	4	40	1.20	1.95	2.14	2.19
总计	10	17	330	1.20	1.46	1.57	1.60

采用统一PH7.0,以PDA为对照与三种不同浓度的银耳培养基进行比较:从330个菌落直径平均结果来看,在银耳培养基上生长的菌落比PDA上生长的菌落大而光滑,湿润透明与半透明凸起,呈露珠状。B和C组比A组的菌落生长明显增厚,所以选择B组浓度为适宜用量。

三、椰毒亚种菌在七种不同培养基上生长性状的比较(表3)

由表3所示试验结果综合比较,椰毒亚种菌在银耳培养基上生长最好,多为光滑透明与半透明凸起的露珠状菌落,其他培养基上生长多为粗糙型菌落。

四、椰毒亚种菌在卵黄银耳琼脂与营养卵黄琼脂培养基上产生虹彩环现象的比较(表4)

表4 椰毒亚种菌在两种不同卵黄琼脂上产生虹彩环的比较

培养基	菌株数	观察总次数	观察时间(小时)	产生虹彩环的情况	
				阳性数	阳性率%
银耳卵黄	40	106	24	82	77.4
			48	105	99.1
营养卵黄	40	106	24	46	43.4
			48	90	84.9

由表4结果表明,两者的效果有明显不同,在106次试验中于银耳卵黄琼脂上24小时出现虹彩环的阳性数为82次(77.4%),48小时为105次(99.1%),而对照培养基上24小时阳性数仅为46次(43.4%),48小时为90次(84.9%),在银耳卵黄琼脂上出现的虹彩环不仅比对照培养基出现的快而大,菌落光滑湿润凸起,呈黄色露珠状菌落外带一个较大的虹彩环,明显易辨。同时比较了卵磷脂酶阳性的耶尔森氏菌和葡萄球菌在银耳卵黄琼脂上生长的情况。结果表明耶尔森氏菌

表3 椰毒亚种菌在七种不同培养基上生长性状的比较

菌落形态	营养琼脂	PDA	YDA	玉米浆琼脂	玉米浆蛋白琼脂	银耳琼脂	银耳蛋白琼脂
直径mm	0.86	1.35	1.30	1.60	1.52	1.70	2.02
光滑	+/-	+/-	-/+	+/-	-/+	+	-/+
粗糙	-/+	-/+	+/-	-/+	+/-	-	+/-
色素产生	+	+	-	+	+	+	+
露珠状	-	-	-	-	-	+	-

注: +: 阳性 - : 阴性 多数/少数

和葡萄球菌在银耳卵黄琼脂上菌落小,虹彩环细,不产生色素,与椰毒亚种菌明显不同。通过中毒样品检验,得到较满意的结果。以上结果表明银耳卵黄培养基是一个能鉴别分离椰毒亚种菌的培养基。

讨 论

1. 椰毒亚种菌在营养卵黄琼脂上,虽然大部分具有产生虹彩环的性能,但与在银耳卵黄琼脂上所产生的虹彩环相比有明显不同,在这两种培养基上曾接种同样菌量进行比较,根据单个菌落上出现虹彩环的现象。有的菌株在营养卵黄琼脂平板上48小时出现虹彩环的菌落仅约1/2左右,而在银耳卵黄平板上除2~3个单个菌落未出现之外,均有明显的虹彩环。证明银耳卵黄优于营养卵黄,但有个别细菌菌落小,虹彩环出现稍慢的不一致现象。

2. 关于椰毒亚种菌所需要营养条件,我们曾考虑到,由酵米面引起食物中毒的很多,因玉米是制做酵米面的原料,故选用了玉米淀粉代替马铃薯,但试验结果证明该菌在这种培养基上不生长,说明玉米淀粉不是该菌生长的适宜条件。

(上接9页)

有可比性,所测定的本底或污染调查样品结果均可采用,进行综合统计处理可作为制定食品中微量氟卫生标准的依据。

4号、11号实验室经原因分析,4号实验室由于灰化用的高温炉受污染而造成结果偏高。11号实验室是由于采用氧瓶燃烧吸收法(不是协作组统一方法),取样量小,砷吸收液未经净化去氟,可能造成结果的异常。

参 考 文 献

[1] 王淮洲等. 中华预防医学杂志 1980; 14(4), 238~243.

[2] UNEP/FAO/WHO. Food Contamination monitoring Programme, Analytical Quality Assurance Studies 1985~1987, 5.

我们发现长期保存的菌株在PDA上的菌落形态变为粗糙型,经多次传种也无法恢复其光滑型,将这些菌株接种到银耳琼脂上时则由粗糙型而变为光滑型菌落,如将此菌再转回PDA上时,仍生成粗糙型菌落,经反复试验证明,我们认为银耳中含有适于椰毒亚种菌生长的营养成份;而当在银耳琼脂中加入蛋白胨后,菌落虽然长的较大,但又变为粗糙,这是否由于条件不适或营养过于充足造成尚不能肯定。

3. 用银耳卵黄培养基对一份酵米面中毒样品进行了分离,很快在该培养基上挑选出易辨认的光滑凸起黄色露珠状带有虹彩环的菌落,可直接检出可疑中毒的细菌,因此我们认为卵黄银耳琼脂可做为直接分离椰毒假单胞菌酵米面亚种的鉴别培养基。但由于目前没有更多的中毒样品,无法做更多的验证。

参 考 文 献

(1) 中华人民共和国, 国家标准检验方法, 微生物部分GB4789.1~4789.28-84

(2) 王 夏, 酵米面黄杆菌形态与产毒性能的研究 1985年12月 内部资料

(上接17页)

亡率越高,即肝癌死亡率高的启东县和泰兴县玉米均达主食60%以上,而肝癌死亡率低的灌云县和赣榆县玉米则占主食的36.8%和42.4%。这与玉米易受AFTB₁污染有关,因此,必须要做好玉米的防霉去毒工作。

参 考 资 料

1. 中华医学会访美肿瘤考察团汇报, 国外医学, 5: 193, 1987

2. 广西医学院肿瘤研究小组: 黄曲霉毒素的危害及预防, 3, 1977.

3. 周树南: 黄曲霉毒素, 江苏医药, 9: 31, 1978

4. Shank Re et al: Fd Cosmet Toxicol 10: 71, 1972

5. Peers FG et al: Birt J Cancer 27: 473, 1973

6. 詹绍康等: 肺癌病因逐步回归分析、启东肝癌研究. P13, 1972.