

空肠弯曲菌保存方法的研究

卫生部食品卫生监督检验所 李莹 白克玉

自从1972年在比利时第一次确定空肠弯曲菌是腹泻疾患的常见致病菌以来,对它的研究越来越广泛、深入,由于空肠弯曲菌营养条件要求高,不易存活,给检验工作带来很大的不便。为了找出比较简便、经济、保存时间比较长的方法,我们选用三种培养基在三种不同温度下进行保存。

材料与方 法

一、保存液

甲保存液:含25%卵黄的布氏肉汤

乙保存液:含50%卵黄的布氏肉汤

丙保存液:含75%卵黄的布氏肉汤

二、保存温度

-70℃:在此温度下保存的三种培养基,各加10%二甲亚砷。

-14℃:在此温度下保存的三种培养基各加15%甘油。

4℃:放普通冰箱

三、菌株 比利时Cj22、Cj23、Cj26三株标准菌株,购自中国预防医学科学院微生物学流行病学研究所。

四、方法

1. 将三株菌的新鲜培养物分别接种于甲、乙、丙三种保存培养基中,于42℃微需氧条件(烛缸法)下培养18~20小时。

2. 所有菌株管均换上橡皮塞,分别置于-70℃、-14℃、4℃冰箱保存。

结果与讨论

一、存活情况

表1 三株菌在4℃时不同保存液下的存活情况:

	34天 (1个月)	64天 (2个月)	72天 (3个月)	95天 (3个月)	108天 (4个月)	120天 (4个月)
甲保存液	3	0				
乙保存液	3	3	3	2	1	0
丙保存液	3	3		0		

表3 三种方法的均方误差比较

y _i	x _i mg 标准值	方 法 1			方 法 2			方 法 3		
		\bar{x}_{1i} (mg)	$x_i - \bar{x}_{1i}$	$(x_i - \bar{x}_{1i})^2$	\bar{x}_{2i} (mg)	$x_i - \bar{x}_{2i}$	$(x_i - \bar{x}_{2i})^2$	\bar{x}_{3i} (mg)	$x_i - \bar{x}_{3i}$	$(x_i - \bar{x}_{3i})^2$
0.077	0.2	0.14	0.06	0.0036	0.24	-0.04	0.0016	0.20	0	0
0.166	0.4	0.31	0.09	0.0081	0.357	0.043	0.001849	0.374	0.026	0.000676
0.318	0.6	0.58	0.02	0.0004	0.579	0.021	0.000441	0.61	-0.01	0.0001
0.466	0.8	0.85	-0.05	0.0025	0.787	0.013	0.000169	0.799	0.01	0.0001
0.639	1.0	1.165	-0.165	0.0272	1.029	-0.029	0.000841	0.989	0.011	0.000121

$$\sqrt{\sum(x_i - \bar{x}_{1i})^2} = \pm 0.20$$

$$\sqrt{\sum(x_i - \bar{x}_{2i})^2} = \pm 0.07$$

$$\sqrt{\sum(x_i - \bar{x}_{3i})^2} = \pm 0.03$$

2.2 本方法可考虑应用于类似甲醇测定中浓度和吸光度呈非线性关系的方法中。

参 考 文 献

1. 中华人民共和国标准·食品卫生检验方法·理化部

分·北京,中国标准出版社,228,1986

2. 陈国珍,等·紫外可见分光光度法·上册·北京,原子能出版社,1983,156~160

3. R. 考尔卡特·康靖文译·分析化学实用统计学·陕西省环境保护科技情报网,1988,109~168

表2 三株菌在-14℃时不同保存液下的存活情况

	2个月	4个月	6个半月	9个月	10个月
甲保存液	3	3	3	1	0
乙保存液	3	3	3	3	0
丙保存液	3	3	3	1	0

表3 三株菌在-70℃时不同保存液下的存活情况

	3个月	5个月	7个月	8个月	9个月	10个月
甲保存液	3	3	3	3	0	冰箱坏
乙保存液	3	3	3	3	3	
丙保存液	3	3	3	3	3	

从表1可以看出：在温度为4℃时，甲液

1个月的存活率为100%，2个月全部死亡；乙液2个半月全部存活，3个月的存活率为75% 4个月全部死亡；丙液2个月的存活率为100%，3个月全部死亡。表2表明，在-14℃保存的菌株6个半月全部存活，9个月，甲、乙两液各存活33.3%，乙液全部存活，10个月全部死亡。从表3看出：在-70℃保存的菌株，8个月全部存活，9个月甲液保存的菌株全部死亡，乙、丙两液保存的菌株仍全部存活，但由于-70℃冰箱损坏未能继续观察。

二、鉴定结果

表4 三株菌在保存前后的生化鉴定结果比较

	H ₂ S产生	其酰胺敏感	氧化酶	过氧化氢酶	马尿酸钠水解	甘氨酸生长	TTC 动力	0.5%NaCl 生长	3.5%Na 生长
Cj22 保存前	+	+	+	+	+	+	+	+	-
保存后	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cj23 保存前	±	+	+	+	+	+	±	+	-
保存后	±	+	+	+	+	+	+	+	-
Cj26 保存前	+	+	+	+	+	+	+	+	-
保存后	±	+	+	+	+	+	+	+	-

保存后的菌株经传代后，菌落形态典型，革兰氏染色阴性，经涂片镜检，呈典型的螺旋、弯曲、海鸥状。保存前后生化鉴定，结果大致相同，说明菌株未发生变异。

由结果看出，空肠弯曲菌在4℃保存，乙液可存活2个半月，丙液可存活2个月。在-14℃保存，三种保存液都可存活半年以上乙液9个月存活率仍为100%，这在一般的实验室是切实可行的。而在-70℃冰箱中保存，乙、丙两液保存9个月仍全部存活，我们用乙保存液于87年11月保存三株分离的空肠弯曲菌(流1、流18、流19)，至冰箱89年4月坏为止，17个月仍然全部存活。所以，这对于有条件的实验室确是一种较好的方法。

比较三种保存液可以看出，乙液效果最好，丙液次之，甲液较差。

目前，国内外许多学者对空肠弯曲菌的保存方法进行了研究。Butzler¹指出：冷冻干燥法保存，18个月复苏，但活力不肯定，

国内许多人都研究此方法，但效果很不满意。Nair²等报道，用鸡蛋作基础的EM培养基4℃保存，可存活3个月。但我们做了重复试验，菌株两个月就全部死亡。吴采菲³等报道，用脱纤维羊血+0.05%的FBP(硫酸亚铁(F)+偏重亚硫酸钠(B)+丙酮酸钠(P))补充物，4℃保存130天全部存活。施培福⁴等报道，用FMPG培养基，4℃保存，菌株在46天全部死亡。河南长葛县卫生防疫站⁵报道，含5%脱脂羊血的Cay-Blair运送培养基，4℃可保存60天。用-14℃保存空肠弯曲菌的方法，目前尚未见报道。

由于卵黄的营养比较适合空肠弯曲菌的生长，且卵黄可耐低温，用于保存弯曲菌，效果比较满意。

小结

本实验通过对三种不同的培养基在三种不同温度下对空肠弯曲菌的保存时间进行研