

5 种干粉培养基对鼠疫耶尔森菌生长的影响

冯建萍^{1,2}, 郭文涛^{1,2}, 杨建国^{1,2}, 李存香^{1,2}, 赵海红^{1,2}, 金星^{1,2}, 辛有全^{1,2},
金丽霞^{1,2}, 熊浩明^{1,2}, 祁芝珍^{1,2}

1 青海省地方病预防控制所, 西宁 811602; 2 青海省鼠疫防控及研究重点实验室, 西宁 811602

摘要: **目的** 观察不同干粉培养基对鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)的生长作用, 筛选优质干粉培养基。**方法** 分别按照 5 种干粉培养基(赫氏培养基、营养琼脂、亚硫酸钠琼脂基础、溶血琼脂基础和赫金格尔干粉培养基)说明制作培养基, 倾注平皿。将 0.1 ml 鼠疫菌悬液涂布于制备好的平皿中, 于 28 ℃ 48 h 培养后进行活菌计数, 观察鼠疫菌在 5 种干粉培养基中的生长效果。**结果** 鼠疫菌在赫氏培养基、营养琼脂、亚硫酸钠琼脂基础培养基中的生长情况相互间差异无统计学意义($P>0.05$); 在溶血琼脂基础、赫金格尔干粉培养基组间差异无统计学意义($P>0.05$); 鼠疫菌在溶血琼脂基础和赫金格尔干粉培养基中的生长效果优于赫氏培养基、营养琼脂和亚硫酸钠琼脂基础培养基, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 5 种干粉培养基均可用于鼠疫菌的分离培养, 但溶血琼脂基础干粉和赫金格尔干粉培养基中鼠疫菌的生长效果优于其他 3 种干粉培养基。

关键词: 干粉培养基; 鼠疫耶尔森菌; 效果评价

中图分类号: R378.6; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2018)03-0303-02

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2018.03.022

Evaluation on the growth of *Yersinia pestis* on 5 kinds of culture medias

FENG Jian-ping^{1,2}, GUO Wen-tao^{1,2}, YANG Jian-guo^{1,2}, LI Cun-xiang^{1,2}, ZHAO Hai-hong^{1,2}, JIN Xing^{1,2},
XIN You-quan^{1,2}, JIN Li-xia^{1,2}, XIONG Hao-ming^{1,2}, QI Zhi-zhen^{1,2}

1 Qinghai Institute for Endemic Disease Control and Prevention, Xining 811602, Qinghai Province, China;

2 Key Laboratory for Plague Prevention and Control of Qinghai Province

Corresponding authors: QI Zhi-zhen, Email: qzz7777@163.com; XIONG Hao-ming, Email: hm.1@163.com

Supported by the Key Laboratory for Plague Prevention and Control of Qinghai Province (No. 2017-ZJ-Y22)

Abstract: **Objective** To observe the growth of *Yersinia pestis* on different kinds of culture media and screen for high quality culture media. **Methods** Make 5 kinds of culture media (Hiss Agar, Nutrient Agar, Sulfite Agar base, Hemolysis Agar Base, and Agar Hottinger nutrient) according to the instructions and pour into plates. Inoculating 0.1 ml *Y. pestis* suspensions on the prepared plate, calculating viable bacteria after 48-hour cultivation under 28 ℃ and observing the growth of *Y. pestis* on different culture media. **Results** There is no significant difference among Hiss Agar, Nutrient Agar and Sulfite Agar base. And the difference between Hemolysis Agar Base and Agar Hottinger nutrient was not significant either. The first three culture media and the following two culture media were also not significantly different. Hemolysis Agar Base and Agar Hottinger nutrient were superior to other culture media Hiss Agar, Nutrient Agar, Sulfite Agar base on growth of *Y. pestis*. **Conclusion** All the five culture media can be used for culture of *Y. pestis*, but Hemolysis Agar Base and Agar Hottinger nutrient were superior to the others.

Key words: Culture media; *Yersinia pestis*; Effect evaluation

鼠疫疫源地的证实及疫情的判定均主要依赖于鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)的分离^[1], 而鼠疫菌的分离需要优质培养基, 培养基在鼠疫疫情检验中起至重要作用。干粉培养基制备程序简便, 无需成套设备, 免去了现场制作携带较多试剂和设备的不便^[2]。我国经多年研制, 有较多的干粉培养基在不同行业广泛应用^[3]。其优点在于使用方便、节省时间、易储藏运输, 干粉培养基的应用利于微生物相关研究, 也是培养基专业发展的必然趋势。本研究选择 5 种干粉

培养基进行鼠疫菌活菌计数, 经统计分析筛选出鼠疫菌优质干粉培养基, 为鼠疫科研及检验工作提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 鼠疫菌株(编号: EV₇₆ paris)由青海省地方病预防控制所提供。

1.2 试剂 赫氏培养基、亚硫酸钠琼脂基础培养基和溶血琼脂基础培养基为北京陆桥技术有限责任公司产品; 营养琼脂培养基为北京双旋微生物培养基

基金项目: 青海省鼠疫防控及研究重点实验室项目(2017-ZJ-Y22)

作者简介: 冯建萍, 女, 副主任医师, 主要从事鼠疫病原学研究, Email: fjp6286350@163.com

通信作者: 祁芝珍, Email: qzz7777@163.com; 熊浩明, Email: hm.1@163.com

网络出版时间: 2018-04-11 14:11 网络出版地址: http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=

制品厂产品;赫金格尔干粉培养基为青海省地方病预防控制所自制。

1.3 方法

1.3.1 赫金格尔干粉培养基制备

1.3.1.1 消化液制备 取去脂肪和肌腱的牛肉 1 000 g,加入 1 500 ml 蒸馏水,煮沸 20~30 min,待冷却至约 56 ℃时加入无水碳酸钠 15 g、胰蛋白消化酶 5 g,充分混匀后用 1 mol/L 氢氧化钠或 1 mol/L 盐酸校正至 pH 值 7.8,加入三氯甲烷 15 ml,置 37 ℃振荡温箱内消化 7 d,氨基酸含量达到 500~800 mg/L 即可使用^[1,4]。

1.3.1.2 消化液氨基氮含量测定 用 1 mol/L 氢氧化钠滴定 1.4 mg 的公式计算,结果乘以 100 即为 100 ml 培养基内所含氨基氮的毫克数^[5]。

1.3.1.3 干粉培养基制备 按每 100 ml 培养基内含 75 mg 氨基氮的比例,在方瓷盘中加入制备好的消化液,按常规加入氯化钠(0.3%)和磷酸氢二钠(0.1%)。将方瓷盘置于红外线灯下干烤至液体表面出现结晶后,加入琼脂粉(2%),干燥后研磨成细粉,加入蛋白胨(0.6%)封装成每瓶 47 g 备用。使用时称取本制品 47 g 加入至 1 L 中性蒸馏水中,121 ℃ 30 min 高压灭菌,倾注平皿无菌实验后即可使用^[6]。

1.3.2 实验用培养基制备 赫氏培养基、营养琼脂、亚硫酸钠琼脂基础、溶血琼脂基础、赫金格尔干粉培

养基按产品说明分别称取 30、45、33、38、47 g 加入到 1 L 中性蒸馏水中,121 ℃ 30 min 高压灭菌,倾注平皿经无菌实验后即可使用。

1.3.3 活菌计数 取鼠疫菌 28 ℃ 24 h 培养物,用 0.9% 氯化钠溶液稀释至比浊为 7×10^8 个/ml,按常规稀释法继续稀释至 1 000 个/ml。取制备好的 5 种干粉培养基平皿,每种培养基各 50 个平皿,分别接种鼠疫菌悬液 0.1 ml,用 L 棒涂抹均匀,28 ℃ 48 h 培养后观察活菌,计数。

1.4 统计学处理 利用 SPSS 21.0 软件,采用单因素方差分析方法进行统计学检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

5 种干粉培养基对鼠疫菌的生长均有作用。赫氏培养基、营养琼脂和亚硫酸钠琼脂基础培养基间相互比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);溶血琼脂基础、赫金格尔干粉培养基组间相互比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);赫氏培养基、营养琼脂和亚硫酸钠琼脂培养基与溶血琼脂基础和赫金格尔干粉培养基组间相互比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),鼠疫菌在溶血琼脂基础和赫金格尔干粉培养基中的生长效果优于赫氏培养基、营养琼脂和亚硫酸钠琼脂基础培养基,见表 1。

表 1 5 种干粉培养基中鼠疫菌的生长效果

培养基种类	样本数 (份)	平均菌落数 (个)	均数 95%CI		范围(个)	s	s _x
			下限	上限			
赫氏培养基	50	17.72	16.34	19.10	8~30	4.866	0.688
营养琼脂培养基	50	15.64	14.48	16.08	8~25	4.065	0.575
亚硫酸钠琼脂基础培养基	50	16.86	15.63	18.09	8~25	4.328	0.612
溶血琼脂基础培养基	50	25.22	22.38	24.22	16~30	3.240	0.458
赫金格尔干粉培养基	50	19.75	24.22	26.22	16~30	3.536	0.500

3 讨论

鼠疫菌的检验工作是鼠疫防控工作的重要环节,疫区现场培养基的制作速度和质量直接影响鼠疫诊断结果。为服务于鼠疫防控和方便基层工作,研制赫金格尔干粉培养基,并在鼠疫防控工作中取得了良好效益^[7]。经实验发现,鼠疫菌在 5 种培养基上均可生长,且溶血琼脂基础和赫金格尔干粉培养基培养分离鼠疫菌效果优于其他 3 种培养基。

干粉培养基为液体培养基的各种成分经过适当处理并根据鼠疫菌营养所需配方量充分混匀,最终制成的粉末状培养基。该培养基的优点是制作过程规范化,可节省培养基的制作时间,且质量稳定、保存期长,特别适用于突发公共卫生事件野外现场检验检测及设备简单的小型实验室使用。实验证实,5 种干粉培养基均可用于鼠疫菌的分离培养,但溶血琼

脂基础和赫金格尔干粉培养基可更好地促进鼠疫菌生长,更好地服务于鼠疫防控及科研工作。

参考文献

- [1] 冯建萍,李千,李胜,等.鼠疫耶尔森菌赫氏培养基的影响因素及优化研究概述[J].中国媒介生物学及控制杂志,2017,28(1):93-95.
- [2] 冯建萍,金星,李存香,等.3 种不同干粉培养基对鼠疫菌生长的影响[J].中国地方病防治杂志,2015,30(3):198.
- [3] 杜森茂,朱菊生,于志凡.干粉培养基的研制[J].中国兽医科技,1988(7):39-41.
- [4] 冯建萍,赵海红,李胜,等.两种培养基基础液对鼠疫菌生长影响的观察[J].医学动物防制,2016,32(10):1125-1127.
- [5] 毛辉青,王兆芬,王玉梅.鼠疫防治[M].西宁:青海人民出版社,2002:197-198.
- [6] 冯建萍,王梅,赵忠智,等.不同 pH 值的赫氏干燥培养基对鼠疫菌生长影响观察[J].现代预防医学,2015,42(22):4154-4155,4158.
- [7] 席亚芳,于兰香,赵凤梅,等.鼠疫细菌检验赫氏干燥培养基的研制与应用[J].青海医药杂志,1995,10(6):48.

收稿日期:2017-12-23