

一种简便的厌氧菌培养法

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

李忠元 张旭帆 张秀琴 胡淑敏 刘秉阳

厌氧菌分为有芽胞和无芽胞两大类，七十年代以前对无芽胞菌类报道很少。近年来，由于厌氧培养技术的改进，发现厌氧菌类在正常人肠道菌群中占重要位置，其中绝大多数是无芽胞的厌氧菌，它们中不少能导致临床感染。据国内文献报道，在某些腹泻病人中，不少患者与肠道菌群失调有关。因此，我们重点地对我国儿童和成人肠道中厌氧菌类进行了分离培养工作。由于目前我国对厌氧菌的工作做的不多，有关文献介绍的也少，故主要参考国外分离培养厌氧菌的如下三种方法：1. 转管法；2. Gaspak法；3. 厌氧装置法。根据我所的实际情况，试验改用“干燥缸”内放钢丝绒法作厌氧培养，获得初步成功。现介绍如下：

材 料

一、粪便标本来源：

1. 幼儿园健康儿童粪便；
2. 儿童医院门诊病儿粪便；
3. 解放军某部战士粪便。

从上述每份标本中取约3克，放置冰壶内当天送实验室。

二、器材：

1. 玻璃干燥缸，容量8~10公斤；
2. 铁屑或细钢丝绒（后者为上海川沙县花木公社蔡家农机五金工厂出品）；
3. 真空泵1/4马力；CO₂钢瓶；氧气袋。

三、溶液制备：

1. 粪便稀释液：PBS400毫升、pH7.4 L-半胱氨酸0.2克、VC0.1克、硫乙醇酸钠0.3克。
2. 无游离氧指示剂：N/10氢氧化钠0.6毫升加水至10毫升；0.5%亚甲蓝水溶液0.3毫升加水至10毫升；葡萄糖0.6克加水至10毫升。当培养厌氧菌时，将上述三种溶液等量混合加入试管内，放置煮锅里煮沸，使液体变成无色，取出立即放入厌氧缸内（新配的指示剂好）。

3. 酸性硫酸铜溶液：硫酸铜18克、吐温-80 6毫升、普通水1,800毫升、2N硫酸27毫升，充分混合后，立即将细钢丝绒浸于液中待用。

四、培养基 [1,3]：

1. 伊红美蓝培养基；
2. 肠球菌培养基(EC)：胰胨2克、肉膏0.5克、葡萄糖0.2克、磷酸氢二钠0.4克、磷酸二氢钾0.4克、NaN₃ 0.04克、TTC 0.01克、蒸馏水100毫升、琼脂2.5克。先将前6种成分溶解，调pH至7.4，8磅15分钟灭菌冷至55°C时，加TTC后倒成平板。
3. 双歧杆菌培养基(BL)：氯化钠5克、蛋白胨10克、琼脂20克，溶于1,000毫升精制水中，用NaCO₃调pH至7.5，高压灭菌15磅20分钟，制成基础培养基。然后向每100毫升基础培养基中加葡萄糖1克、50%蛋白胨4毫升及1%苯胺蓝3毫升。8磅20分钟灭菌，冷至55°C后加无菌兔血(5~10%)，制成平板。

4. 拟杆菌培养基(Bd)：蛋白胨20克、肉膏10克、葡萄糖5克、盐酸半胱氨酸0.5克、磷酸氢二钠4克、琼脂20克、蒸馏水1,000毫升，高压灭菌15磅20分钟，为基础培养基。当培养基温度降至55°C时，向每100毫升中加新霉素硫酸盐粉35毫克、脱纤维无菌兔血使成5%，摇匀倾注平皿。

5. 庖肉培养基：牛肉浸液5毫升(pH7.6)，牛肉渣1克，装于试管中，高压灭菌15磅30分钟后，待用。

五、生化反应及抗菌素敏感实验：

1. 各种半固体糖管：阿拉伯糖、核糖、木糖、果糖、糖原、菊糖、肌醇、蔗糖、乳糖、甘露糖、甘露醇、山梨醇、水杨素、纤维二糖、海藻糖、苦杏仁苷、麦芽糖、胨水、葡萄糖、鼠李糖、棉子糖、赤藓醇、密二糖、七叶苷、含硝酸盐培养基、明胶培养基。
2. 抗菌素敏感实验：拟杆菌培养基中，分别加入规定浓度的抗菌素，即：青霉素(2单位/毫升)、红霉素(60微克/毫升)、万古霉素(5微克/毫升)、卡那

霉素(1毫克/毫升)、多粘菌素B(10微克/毫升)、利福平(15微克/毫升)。含胆汁琼脂培养基:拟杆菌培养基中加入20%无菌猪胆汁液,制成平板备用。

分离与培养

一、分离:

从新鲜粪便的端部选取0.5克,放入4.5毫升稀释液管内,以10倍稀释,即由 10^{-1} 稀释到 10^{-8} 。管从 10^{-8} 管吸出0.2毫升,分别加入拟杆菌培养基和双歧杆菌培养基表面。挑单个菌落分别接种于“B1”、“Bd”培养基。对在厌氧环境下生长者进行生化反应、药敏试验、庖肉培养和气液相色谱检查;在有氧环境下不生长者为严格厌氧菌。从 10^{-7} 管中吸取0.1毫升加入伊红美蓝培养皿上;再从 10^{-6} 管吸取0.1毫升加入肠球菌培养基上,最后用“L”玻璃棒涂满整个平皿。

二、培养:

一般需氧菌按常规方法分离、培养、鉴定。而严格厌氧菌,需要玻璃“干燥缸”培养,缸内容量为10公斤,加入经酸性硫酸铜溶液浸泡过的细钢丝绒300克及无游离氧指示剂,然后将培养皿放置缸内,盖好盖,抽真空10分钟后,立即将 CO_2 气体输入缸内,当缸内压力达到与外界环境中气体基本平衡时,把缸放置 $37^{\circ}C$ 恒温箱内,培养3天观察结果(当缸内分子氧消失时,指示剂变成无色;若有分子氧存在,指示剂保持蓝色)。

结 果

1. 10份大便标本,接种于选择性培养基上,分别生长出较多的拟杆菌菌落及双歧杆菌菌落(表1)。

表1 拟杆菌和双歧杆菌菌落生长情况

标本编号	拟 杆 菌		双 歧 杆 菌	
	总菌落数/克	以 log10 计	总菌落数/克	以 log10 计
1	3.3×10^{11}	11.52	2.9×10^{10}	10.46
2	4.2×10^{11}	11.62	4.4×10^{10}	10.64
3	2.3×10^{11}	11.36	1.8×10^{10}	10.26
4	2.9×10^{11}	11.46	2.3×10^{11}	11.36
5	6×10^9	9.78	1.2×10^{11}	11.08
6	6×10^9	9.78	3×10^9	9.48
7	1.3×10^{10}	10.11	1.2×10^{11}	11.08
8	2.4×10^{10}	10.38	1.9×10^{10}	10.28
9	9×10^9	9.95	7.2×10^{10}	10.86
10	9.7×10^{10}	10.99	2.3×10^{11}	11.36
对数平均值 $\pm 2 \times$ 标准差		10.70 ± 1.43	10.69 ± 1.17	

2. 采用上述方法,检查10份标本,每份标本均能检出厌氧菌1~4种,共20株(表2)。

3. 厌氧指示剂变色时间:我们配制的指示剂变色时间为4小时38分钟,与美国B.B.L.Gaspak出品的美蓝指示剂变色时间(3小时33分钟)接近。

4. 不同肠道厌氧杆菌的生长情况及其特征:我们分离鉴定出一些兼性厌氧和严格厌氧菌。前者在有氧和无氧条件下均可生长,但以厌氧条件生长尤好;后者则只能在厌氧条件下生长。它们的集落特征列于表3。

讨 论

工作实践使我们初步认识到,肠道正常菌群是一

组处于复杂环境、对气体要求不同而又相互联系的微生物群体。文献报道[2],人粪便中按重量计54%为菌重,其中90%以上为厌氧菌,严格厌氧菌的种类繁多,它们对分子氧敏感。企图采用现有实验室方法将全部菌种都培养出来,尚有困难。我们体会到,如欲提高其检出率,主要取决于:①新鲜粪便的选取及运送;②厌氧培养条件的进一步改进、提高;③培养基种类的增加及某些选择性培养基的进一步改良;④提高菌种检出数,即可提高单个菌落挑取数;⑤对各种不同厌氧菌集落的识别能力。

摘 要

介绍用简便的缸内法培养厌氧菌,方法是用干燥

表 2

10份粪便标本查出厌氧菌情况

标本号	革兰氏染色	菌种名称		菌种数
		拉丁文	中文	
118	G ⁻	<i>Bact fragilis</i>	脆弱拟杆菌	4
	G ⁻	<i>Bact vulgatus</i>	普通拟杆菌	
	G ⁻	<i>Bact multiaacidus</i>	趋巨拟杆菌	
	G ⁺	<i>Bifido adolescentis</i>	青春双歧杆菌	
119	G ⁻	<i>Bact vulgatus</i>	普通拟杆菌	2
	G ⁺	<i>Bifido adolescentis</i>	青春双歧杆菌	
121	G ⁻	<i>Bact fragilis</i>	脆弱拟杆菌	3
	G ⁻	<i>Bact vulgatus</i>	普通拟杆菌	
	G ⁺	<i>Bifido adolescentis</i>	青春双歧杆菌	
122	G ⁺	<i>Bifido adolescentis</i>	"	1
123	G ⁺	<i>Bifido adolescentis</i>	"	1
125	G ⁺	<i>Bifido adolescentis</i>	"	1
126	G ⁻	<i>Bact fragilis</i>	脆弱拟杆菌	3
	G ⁺	<i>Bifido adolescentis</i>	青春双歧杆菌	
	G ⁺	<i>Prop acnes</i>	疮疱丙酸杆菌	
128	G ⁻	<i>Bact distasonis</i>	吉氏拟杆菌	2
	G ⁺	<i>Bifido longum</i>	长双歧杆菌	
129	G ⁻	<i>Bact fragilis</i>	脆弱拟杆菌	1
131	G ⁻	<i>Bact fragilis</i>	"	2
	G ⁺	<i>Lact plantarum</i>	植物乳杆菌	
合计				20

表 3 选择性培养基菌落生长情况

菌种名称	生长情况		菌落形态	革兰氏染色	菌体形态
	需氧	厌氧			
植物乳杆菌	+	++	灰白色、光滑、隆起圆形1.5~2mm	G ⁺	杆菌
双歧杆菌	-	+	褐色、光滑、隆起圆形1~2mm	G ⁺	分叉杆菌
疮疱丙酸杆菌	-	+	浅褐色、光滑、隆起圆形1.5~2.5mm	G ⁺	大杆菌
吉氏拟杆菌	-	+	灰白色、光滑、隆起圆形1~2.5mm	G ⁻	短杆菌
趋巨拟杆菌	-	+	灰白色、光滑、隆起圆形1~2.5mm	G ⁻	细杆菌
脆弱拟杆菌	-	+	灰白色、光滑、隆起圆形、溶血、1~2.5mm	G ⁻	杆菌
普通拟杆菌	-	+	乳白色、光滑、隆起圆形1.5~2.5mm	G ⁻	杆菌

注：“++”为生长旺盛；“+”为生长；“-”为不生长

试剂的耐压玻缸，其底部置铁屑或钢丝绒，通过化学反应吸收游离氧，在输入适量CO₂后密封置温箱内培养肠道厌氧菌，此法无需特殊设置，一般试验室即可应用。我们自制的无氧指示剂与国外的B.B.L.Gaspak厌氧指示剂，在变色反应时间上表现一致。

我们应用缸内法培养粪中厌氧无芽胞菌类均获成功。一份标本中至少检出菌属1~4种，例如拟杆菌活菌数为10.70±1.43/克粪，双歧杆菌为10.69±1.17/克粪。我们在工作中发现粪中厌氧菌在“Bd”培养基上菌落外表相似时，鉴定时菌种可能不同。

ABSTRACT

A simple technic of cultivating anaerobes was presented. By utilizing a large-sized desicator with suitable amount of steel wool or iron filings at the bottom of jar, & through certain chemical reactions, free O₂ being absorbed, together with appropriate amount of CO₂ introduced after the cultures(Plates, tubes)were put into the desicator,

anaerobic bacteria have been successfully cultivated from stool specimens. There is no need of special equipment and anyone can make use of this method in an ordinary laboratory. The 'anaerobic' Indicator we prepared has been found comparable to GasPak (BBL) Indicator as far as the time of discoloration was concerned.

The preliminary trials we made with the above mentioned technic in cultivating fecal anaerobic bacterial flora indicated that at least 2-4 bact. spp. of nonsporing strict anaerobes could be cultivated out of each specimen, the average figures for living Bacteroides Per Gram of feces being

10.70±1.43; & that of Bifidobacteria 10.69±1.17. It was revealed that the growth of colonies on 'Bd' medium, one might find different species of anaerobic bacilli with apparently similar outward appearance.

参 考 文 献

1. 康白: 菌群失调与菌群分析, 内部资料, 1979.
2. Alison MS et al: J Med Microbiol, 13(1): 45, 1980.
3. 大连医学院正常菌群实验室: 正常肠菌群检查法(一), 内部资料, 1982.

巧家县首次发现钩端螺旋体病人

云南省巧家县卫生防疫站 朱志德 沈发安 邹应祥

我县临床上从无钩体病例报告, 历史上亦无记载。1974年, 在我县一部分猪肾中分离出钩端螺旋体, 证实我县有钩体病原存在。但门诊采血培养未获成功, 亦未被血清学手段证实。

今年7~9月, 我们又采集猪肾标本83份, 分离培养, 检出钩端螺旋体5株, 又在捕获的家鼠(黑线

姬鼠)中分离到一株。同时, 在医院门诊对疑似病人采血20人份, 用Korthof氏培养基培养, 检出钩端螺旋体3株。病原学证实我县确有钩端螺旋体病例存在。猪和家鼠为动物宿主已确认无疑。至于本病在我县的流行程度和分布情况及菌株群别, 尚须进一步通过流行病学调查证实。

鼠型斑疹伤寒30户家庭爆发血清流行病学调查

河南省焦作市卫生防疫站 于明志 陈昌黎 河南省焦作矿务局医院 张秉乾

1980年8月~1981年2月, 在焦作市郊区安阳城公社的山底、前夏庄、义庄三个大队发生了一批不明热病人。根据症状体征、外斐氏反应、补体结合、豚鼠接种、分离立克次体试验等证实为鼠型斑疹伤寒。为进一步证实鼠型斑疹伤寒是否能引起家庭爆发流行, 在流行半年后(1981年7月)进行了回顾性血清流行病学调查。

1. 临床症状与体征: 多突然发病, 体温可达39~40°C, 剧烈头痛, 四肢酸困, 腓肠肌疼痛及皮疹(疹色淡红、小米粒大, 多在发病3~5日内出现, 分布于前胸、背部、腹部, 压之退色, 于2~3日内消退)。临床症状轻微, 未出现昏迷、谵语等精神症状。

2. 流行特征: 发病急、传播快, 短期内发生很多类似病人。山底、前夏庄、义庄三个大队的发病率分别为14.4%、19.0%、12.3%。流行高峰为40天左右。疫户发生两例以上病例的现象并不罕见, 三个大队发

生2例者43户、3例者20户、4例者10户、5例者4户、8例者1户, 共78户, 占疫户总数29.0%, 占病例总数50.0%。30个疫户共有201人, 发病91人, 第一代发病64人, 第二代发病27人, 家庭二代续发率平均为13.4%。按每户同一潜伏期发病者共统计84人, 占发病数92.3%。

3. 血清学检查: 30个疫户先后作补结者67人, 莫氏抗体阳性者66人(98.5%), GMT为1:234.62; 普氏抗体阳性者64例(95.52%), GMT为1:126.12; 莫氏高于普氏2~8倍。外斐氏反应共作59人, OX₁₀阳性44例(74.6%), GMT为1:179.9)。

4. 病原分离: 用5例患者全血作豚鼠接种, 结果分离到莫氏立克次氏体。

综合上述情况, 说明本次发生的鼠型斑疹伤寒属家庭爆发流行。本文还讨论了该病的传染源、传播途径、人群易感性等问题。