

霍乱弧菌的简易和长期保藏法的研究

谢正场 蔡燕刚 吴艳芳 谢建祥 马冀 叶天星

(第二军医大学微生物学教研室, 上海)

保藏细菌的方法很多^[1,2]从保藏的温度来说,有深低温(干冻)、中低温(冰箱)、室温(26℃左右)保藏法。对霍乱弧菌的保藏方法的研究报道较少,一般习惯于冰箱中保存。至于霍乱弧菌存活温度各家观察记载不一致^[3]。也未见有系统的仔细的研究报告。我们观察发现,霍乱弧菌存活的最适温度是26℃左右,若在0.01M pH8.0 PBS 稀释的淡薄的碱性胨水中并于室温中(22—28℃)保藏,可存活2—3年以上。现将研究结果报道如下。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 从军事医学科学院等单位索取。
2. 培养基: 保藏菌种半固体培养基,按一般配方制成,每管装2厘米。
3. 稀释剂用灭菌的 pH8.0, 0.01M 磷酸盐缓冲液(PBS)。
4. 分离鉴定培养基: 糖双洗琼脂平皿(简称双洗)由上海市卫生防疫站购得。

(二) 方法

将经鉴定的古典生物型和 eltor 生物型霍乱弧菌,接种于半固体培养基,于37℃培养15—18小时后,于其上加入0.5—1.0cm高的液体石蜡,分别置于4—8℃冰箱,24—28℃及35—37℃孵箱中,经不同时间保存后,分别移种于肉汤培养基及半固体培养基培养,进行存活、形态学、生物学特性及血清凝集性观察。

用 PBS 作保护剂,在不同温度下保存的效果观察: 将经鉴定的两种生物型霍乱弧菌鉴定后,接种于碱性胨水,置37℃培养15—18小时后,计数活菌数,用 pH8.0, 0.01M PBS 稀释成

10^{-6} 的 PBS 菌液,分装于灭菌疫苗瓶中,分别置于冰冻、4—8℃、24—28℃及35—37℃四种温度中保存,经不同时间保存后分别移种于“双洗基”及普通琼脂培养基培养,进行计数、形态、培养特性及血清凝集性的观察。

结 果

(一) 在半固体培养基中经不同温度不同时间保存的霍乱弧菌存活率

eltor 和古典生物型霍乱弧菌在半固体培养基中,在4—8℃保藏一个月后,分别为8/10及5/5存活,保存至3个月均死亡;在24—28℃保藏3个月,分别为51/51和8/8存活,保藏至14个月,分别为41/51和3/8存活;在35—37℃中保藏,eltor 弧菌保藏至24个月,有5/10存活,古典生物型霍乱弧菌保藏至6个月,有1/9存活(表1)。

(二) 在半固体培养基中经不同温度保藏10个月的霍乱弧菌移种培养于不同温度的存活率(表2)

表2结果指出,28℃中保藏10个月,两种生物型霍乱弧菌无论移种培养于28℃或37℃,均分别为45/51和4/8存活。在37℃中保藏10个月移种培养于28℃和37℃的存活率也一样,亦均为41/51和4/8存活(表2)。

(三) 在半固体培养基经不同温度和时间保藏后,移种培养的次代培养物特性的检查结果

经4、28及37℃保存一定时间后,将移种存活的次代培养物用革兰氏染色观察其形态,用碱性胨水和普通琼脂平皿培养观察其生物学特性;用对应抗体进行血清凝集观察其凝集性。

表 1 霍乱弧菌经不同温度和不同时间保藏的存活情况

保藏温度 (°C)	实验菌型	保 藏 不 同 时 间 (月) 的 存 活 株 数						
		1	3	6	10	14	18	24
4—8	eltor	8/10	0/10	0/10	0	0	0	0
	古典	5/5	0/5	0/10	0	0	0	0
24—28	eltor	51/51	51/51	45/51	45/47	41/51	0/10	0
	古典	8/8	8/8	4/8	4/8	3/8	0/8	0
35—37	eltor	48/48	32/48	34/48	22/48	5/10	5/10	5/10
	古典	9/9	3/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0

注：分母=实验菌株数；分子=存活菌株数。

表 2 在半固体基中经不同温度保藏 10 个月的霍乱弧菌移种培养于不同温度的存活株数

保藏温度	实验菌型	移种培养不同温度的存活数 (率)	
		28°C	37°C
28°C	eltor	45/51	45/51
	古 典	4/8	4/8
37°C	eltor	41/51	41/51
	古 典	4/8	4/8

结果为：不管在 4—8°C 或在 24—28°C 及 35—37°C 中保存，两种生物型霍乱弧菌的形态、生物学特性及抗体血清凝集性均属正常或基本正常。

(四) 在 pH8.0, 0.01M 的 PBS 中经不同温度和不同时间保藏的存活率

从表 4 结果看出，在冰冻和 4—8°C 中保存 15 天全部死亡；24—28°C 中保存 32 个月，eltor 弧菌的存活菌数仍 > 3,000/ml，保存至 13.5 个月，古典型弧菌仍有 2,200/ml；在 35—37°C 中保存至 13.5 个月，eltor 弧菌有 1,400/ml，保存至 3.5 个月，古典生物型弧菌仍有 > 3,000/ml。也就是说保藏在 24—28°C 中存活时间最长，比冰冻及 4—8°C 延长 13—32 倍以上，35—37°C 次之，比冰冻和 4—8°C 保存时间延长 3.5—13 倍以上(表 3)。

(五) 在 PBS 中经不同温度和时间保藏后，其次代培养物的特性检查结果：

在 PBS 中经不同温度和时间保存后，将移种存活的次代培养物用革兰氏染色观察其形态；碱性胨水和普通琼脂培养基平皿培养观察生物学特性；用对应抗体血清凝集观察其凝集

表 3 在 PBS 中经不同温度和不同时间保藏的存活数

保藏温度 (°C)	实验菌型*	保 藏 不 同 时 间 (月) 的 存 活 数 (千/ml)													
		0.5	1	2	2.5	3	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	10.5	11.5	13.5	32
冰 冻	eltor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	古 典	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4—8	eltor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	古 典	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24—28	eltor	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3
	古 典	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	2.2	0
35—37	eltor	>3	>3	>3	>3	>3	>3	2.8	3	>3	>3	2.5	>3	1.4	ND
	古 典	>3	>3	1.7	>3	>3	>3	0	0	0	0	0	0	0	0

* 实验前菌数：eltor 为 3,000/ml；古典型为 2,100/ml。0 = 未生长；ND = 未作。

表4 在 PBS 中经不同温度和时间保藏的次代培养物特性

保藏温度 (°C)	实验 菌型	保藏不同时间(月)的次代培养物特性														
		0.5			3.5			6.5			13.5			32		
		形态	培特	血凝	形态	培特	血凝	形态	培特	血凝	形态	培特	血凝	形态	培特	血凝
冰 冻	eltor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	古典	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4—8	eltor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	古典	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24—28	eltor	N	N	N	N	M ⁺	N	N	M ⁺	N	N	M ⁺	N	N	M ⁺⁺	L
	古典	N	N	N	N	M ⁺	N	N	M ⁺	N	N	M ⁺	N	N	M ⁺⁺	L
35—37	eltor	N	N	N	N	M ⁺	N	N	M ⁺	N	N	M ⁺	N	N	M ⁺⁺	L
	古典	N	N	N	N	M ⁺	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: N = 正常; M⁺ = 有少数粘性菌落; M⁺⁺ = 有较多的粘性菌落; L = 血清凝集较慢; 培特 = 培养特性; 血凝 = 血清凝集。

性。结果为: 冰冻和 4℃ 保存 15 天后无存活; 24—28℃ 保存至 13.5 个月, 两种生物型弧菌除有少数微粘性菌落出现外, 形态和血清凝集反应均正常无显著改变, 保藏至 32 个月, eltor 弧菌形态仍正常, 粘性菌较多, 血清凝集反应较迟缓; 在 35—37℃ 保存至 3.5—32 个月, 两种生物型弧菌的形态、培养特性及血清凝集性的检查结果与在 24—28℃ 中保藏培养结果类似(表 4)。

讨 论

关于霍乱弧菌在外界物品中存活的最适温度, 由于各家研究的物品不一样和菌株不一样, 因此结果不一致, 例如, Pollitzer^[3] 和 Felsenfeld^[4] 等的研究认为在消毒水中的存活时间, 冰箱中比室温中长。Takano^[5] 等在研究霍乱弧菌不同浓度盐溶液中的存活时间的结果指出, 室温和 37℃ 中的存活时间 (1—30 天) 比在 2—4℃ (7½ 小时—10 天) 均长。我们的实验观察结果证明, 不论在半固体培养基中或在 pH8.0 PBS 中, 室温 (24—28℃) 和 37℃ 中存活时间最长 (24—32 个月), 4—8℃ 中及冰冻中存活时间最短 (15—30 天)。因此, 两种生物型霍乱弧菌的最适存活温度是在室温 (24—37℃), 而不是在冰箱中 (8℃ 以下)。这和 Takano 等的观察是一

致的, 但我们的实验研究结果, 存活时间比他们的结果长 20—30 倍。

实验观察证明, 霍乱弧菌存活的最佳温度是: 24—28℃ > 35—37℃ > 4—8℃ > 0℃ 以下。而且观察到即是用 0.01M pH8.0 的 PBS 作保护剂, 将霍乱弧菌保存于室温 (24—28℃) 及 (35—37℃) 长时间后 (24—32 个月), 其次代培养物的生物学特性及抗原性反应均无明显的改变, 所以保藏霍乱弧菌的最适温度是室温 24—28℃ 及 35—37℃。如用半固体培养基法在此温度保藏霍乱弧菌可存 2 年以上不致变异。众所周知, 霍乱流行地区季节性强的典型的寒温带地区, 一般在夏秋季为最高峰, 冬春季是低峰或最低峰^[6]。这是何原因呢? 根据我们的实验结果观察到霍乱流行的季节性, 显然与存活温度有密切关系, 因为冬春季气温低, 霍乱弧菌容易死亡, 存活少, 人们感染机会少, 故处于流行最低峰。至于残存的霍乱弧菌如何越冬到第二年夏秋再感染人群形成流行高峰呢? 这个问题比较复杂, 但从霍乱弧菌的存活温度来看, 霍乱弧菌过冬的场所, 必定是在气温较高的人群肠道中 (如带菌者) 或处于水塘深层的带碱性有机物等外界物品中, 而绝不是气温低的外界物品或水源中。因此, 对控制病源防止霍乱流行来说, 应着重对带菌者及曾污染的水塘、水

池、港口水等水源深层而带有丰富碱性有机物地方进行重点检疫和控制。不少流行病学者的调查研究均认为带菌者，特别是慢性带菌者构成了感染的贮存宿主，至少是霍乱的地方性流行的原因^[6]。我们的研究结果，从理论上支持了这种观点，对预防和控制霍乱流行的实践工作是有指导意义。

根据我们的研究结果证明，用半固体培养基加液体石蜡或用 0.01M pH8.0 PBS 稀释的碱性胨水于 26℃ 左右保存霍乱弧菌，至少保存 1—3 年以上，移种一次也不至影响细菌的生活力。因此用此法保存霍乱弧菌是一种简便可靠

的方法，至少可以提高工作效率和节省物力 6—10 倍以上。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所《菌种保藏手册》编著组：菌种保藏手册，p. 610—731，科学出版社，北京，1980。
- [2] 谢正暘：微生物学报，7(4)：375—381，1959。
- [3] Pollitzer, R.: Cholera, p. 159—186, WHO, Geneva, 1959.
- [4] Felsenfeld, O.: The Survival of Cholera Vibrios in: edited by Dhiman Barua and William Burrows, Cholera, p: 360—364, London, 1974.
- [5] Takano, R. et al.: Studies of Cholera in Japan. p. 62—70, Geneva, 1926.
- [6] Barua, D. and Burrows, W.: Cholera, p. 367—397, London, 1974.