

噬菌蛭弧菌简易保藏方法的研究

秦生巨 司 犍东*

(江苏省卫生防疫站,南京)

摘要 本文报道了细菌寄生虫——噬菌蛭弧菌在自来水宿主软琼脂中于4℃冰箱至少可存活3个月以上,一般为5—8个月左右,最长可达18个月。但在自来水宿主双层琼脂平板上形成的噬斑数目,随着保存时间的延长,则有不同程度的减少。

关键词 噬菌蛭弧菌;自来水宿主软琼脂;噬斑

噬菌蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*, 以下简称蛭弧菌)保藏方法的研究,最早见于1962年 stolp 等^[1]的报道。20多年来,许多实验室进行了探索。尤其对于蛭弧菌存活的时间及温度,各家的结果很不一致。一般实验室习惯于宿主软琼脂室温保存,每月转种一次的方法。为了探索蛭弧菌有效的更为简便的保存方法,我们对1981年^[2]于我国自然水(或泥)体中分离、纯化的蛭弧菌株任择其中12株,在实验室条件下,对蛭弧菌在自来水宿主软琼脂中存活的时间及其数目的变化进行了观察。现将得到的结果报道如下。

材料与 方法

(一) 菌株

宿主菌:大肠杆菌 C600 为中国科学院微生物研究所供给,由本站保存。

蛭弧菌: 12株试验用蛭弧菌均为本站由外环境水(或泥)中分离、纯化所得,并保存。来源见表1。

表1 12株蛭弧菌株的来源

蛭弧菌	来源	蛭弧菌	来源
Bd32	河水	Bd83	河水
Bd40	河泥	Bd98	河水
Bd59	海水	Bd112	河水
Bd64	海水	Bd125	河水
Bd76	湖水	Bd127	河水
Bd81	河水	Bd295	河水

(二) 培养基

灭菌自来水,灭菌蒸馏水,豚-肉膏液,固体、半固体琼脂均见前报道^[1]。灭菌自来水软琼脂: 琼脂粉4g,自来水1000ml, pH7.6, 高压灭菌供用。

(三) 菌悬液的制备

1. 宿主菌悬液: 豚-肉膏琼脂克氏瓶斜面培养16—20小时的菌苔,用蒸馏水或自来水洗下,经离心洗涤,制成浓度约为400亿/ml的菌悬液,使加入于平板时直接呈半透明的背景。

2. 蛭弧菌悬液: 自来水宿主双层琼脂, 25℃培养40—48小时的噬斑,用自来水洗涤上层琼脂,静置2—4小时,上清液即为蛭弧菌悬液。

(四) 蛭弧菌噬斑的检查及计数

按文献[2]方法进行。取4℃保存的0.5—1.0ml 蛭弧菌-宿主-软琼脂,置2—3ml 灭菌自来水中,于25℃浸泡4—6小时,以自来水宿主琼脂双层平板检查蛭弧菌噬斑的形成并计数。

(五) 蛭弧菌培养物的保存

蛭弧菌接种在自来水宿主琼脂双层平板中,于25℃培养40—48小时,取蛭弧菌单噬斑

* 另址: 中国科学院上海植物生理研究所

数个,于灭菌自来水液中浸泡4小时以上,吸取0.5—1.0ml上清液,0.3—0.5ml 宿主菌悬液加到8ml的自来水软琼脂中,充分混匀,于25℃培育16—20小时,取出放4℃冰箱中保藏。每隔1—3月检测一次蛭弧菌的存活情况(噬斑数的形成)。

结 果

自来水宿主软琼脂4℃保存对蛭弧菌活力的影响

从12株蛭弧菌(Bd32、Bd40、Bd59、Bd64、Bd76、Bd81、Bd83、Bd98、Bd112、Bd125、Bd127、Bd296)在自来水宿主软琼脂中,于4℃冰箱保存的时间来看。发现蛭弧菌在自来水宿主双层琼脂平板上,保存91天后,均可形成噬斑;保存157和188天,有11株形成噬斑;240天有8株;315天有7株;372天有6株;411天有3株;548天有2株可形成噬斑。以保存91天形成噬斑的蛭弧菌株数(12株)为100%,则保存157和188天、240、315、372、411和548天形成噬斑的菌株存活率分别为91.7,66.7,58.3,50.0,25.0和16.7%。保存600天以上全部菌株均检不出噬斑(表2)。

从表2结果可以看出,随着保存时间的延长,存活率逐渐下降,如保存91天仍为100%,372天降到50%,600天则降到0(图1)。

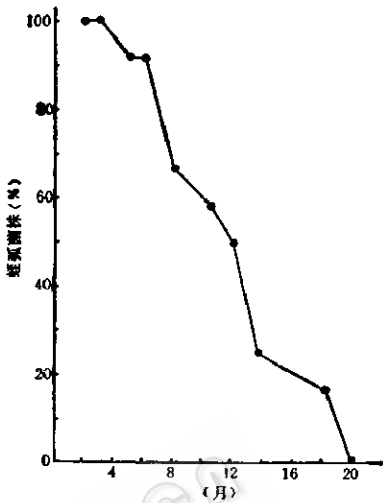


图1 自来水宿主软琼脂4℃冰箱保存蛭弧菌的存活情况

另一方面,从保存的自来水宿主软琼脂外观看,发现有部份蛭弧菌株有液化琼脂的现象,如Bd83保存60天以上可见轻微的液化,保存的时间越长,液化的现象越显著,但与蛭弧菌的存活时间无明显关系。引起液化的原因尚不清楚,有待进一步探讨。

表2 蛭弧菌在宿主软琼脂中4℃的存活情况

蛭弧菌	保存时间(d)										
	31	60	91	157	188	240	315	372	411	548	600
Bd32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Bd40	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Bd59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Bd64	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Bd76	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Bd81	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Bd83	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Bd98	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Bd112	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Bd125	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Bd127	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Bd296	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
存活率(%)	100.0	100.0	100.0	91.7	91.7	66.7	58.3	50.0	25.0	16.7	0

“+” 蛭弧菌噬斑形成阳性; “-” 蛭弧菌噬斑形成阴性

蛭弧菌的数目随着保存时间的延长,而明显下降。但存活的蛭弧菌次代培养物的生物学特性不改变。

讨 论

在研究蛭弧菌的过程中,对蛭弧菌培养物必须建立良好的保存方法。目前普遍使用的蛭弧菌保存方法是1963年 stolp 介绍的^[3],在含有宿主菌细胞的 YP (酵母浸膏-蛋白胨)或自来水琼脂中保存,每月转种培养一次的方法。1968年 Burger等^[4]发现在 YP 软琼脂中保存蛭弧菌培养物,蛭弧菌的效价很不稳定,室温保存36天后,蛭弧菌的数目由 10^8 pfu/ml减少到10pfu/ml。Huang等(1969)^[5]报道,在4℃冰箱中保存蛭弧菌培养物,4—8个月蛭弧菌在加有宿主的软琼脂中仍能保持一定的活力。秦生巨等^[6](1987)报道,蛭弧菌在灭菌自来水中于4℃

冰箱保存180—240天,大部份菌株不丧失活力。Москвитина等(1979)^[7]报道,蛭弧菌在高压灭菌的自来水中,生存时间可达160天以上,其结果和本文相近。但我们的实验结果,存活时间最长可达548天,是他们的2—3倍。

本研究结果证明,用自来水宿主软琼脂保存蛭弧菌培养物,至少可保存5个月以上,转种一次也不致影响细菌的生活力。既提高工作效率,又节省物力。因此该法是保存蛭弧菌的一种简便可靠的方法。

参 考 文 献

1. Stolp H et al.: *Phytopathol Z* 45:364, 1962.
2. 司稷东、秦生巨: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(1): 12, 1982.
3. Stolp H et al.: *Antonie van Leeuwenhoek* 29: 217, 1963.
4. Burger A et al.: *Arch Microbiol* 61: 261, 1968.
5. Huang J et al.: *Bact. Proc.* 41, 1969.
6. 秦生巨等: 微生物学通报, 15(3)115, 1988.
7. Mc© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>