

副溶血性弧菌长期保存方法探讨

李艳嫦¹, 蔡芷荷¹, 卢勉飞¹, 田亮¹, 吴清平^{2*}, 李兴¹

(1. 广东环凯微生物科技有限公司 广东 广州 510663)

(2. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)

摘要: 目的: 针对实验室采用低温冻存法不能长期保存副溶血性弧菌的问题, 探寻适合副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)长期稳定保存的简易方法。方法: 采用 3.5%氯化钠半固体室温保存法保存副溶血性弧菌, 定期活化, 观察生长情况, 并进行生化确认。结果: 副溶血性弧菌采用 3.5%氯化钠半固体加液体石蜡密封室温保存法保存期达 24 个月以上, 且基本生物学特性均保持稳定。结论: 此法操作简便, 适宜副溶血性弧菌的长期保存且生物学特性稳定。

关键词: 副溶血性弧菌 长期保存 稳定

Study on the method of long-term preservation for *Vibrio parahaemolyticus*

LI Yan-chang¹, CAI Zhi-he¹, LU Mian-fei¹, TING Liang², WU Qing-ping^{2*}, LI Xing¹

(1. Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the method of long-term preservation for *Vibrio parahaemolyticus* for overcome the difficult of long-term preservation under low temperature. **METHODS:** *V. parahaemolyticus* were preserved in 3.5% NaCl Semi-solid Medium at room temperature, revived in fixed period, observed growth, and performed biochemical identification. **RESULTS:** *V. parahaemolyticus* were preserved in 3.5% NaCl Semi-solid Medium, covered with liquid paraffin, at room temperature for over 24 months, and grew well in 3% NaCl Tryptose Soya Agar while revived from storage status, biological characteristics remained stable. **CONCLUSIONS:** This method is suitable for *V. parahaemolyticus* preservation in a long-term time, and the biological characteristics stability.

KEY WORDS: *V. parahaemolyticus*; preservation; stability

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是海洋及盐湖极为广泛的一种致病性嗜盐菌, 若

作者简介: 李艳嫦, 女, 硕士, 助理工程师, 主要从事微生物快速检测技术的研究工作, E-mail: li1986changyan@163.com

通讯作者: 吴清平, 男, 博士, 研究员, 主要从事微生物研究工作, E-mail: wuqp203@163.com.

人进食被副溶血性弧菌污染的食物，会引起突发性、腹痛、呕吐、腹泻及水样便等胃肠炎症状食物中毒，重者为黏液便和黏血便。此菌常在夏秋季海产品及其制品中检出，冬季不易检出^[1]。目前，此菌引起的食品安全问题，备受国内外相关卫生组织的关注。而在该病原菌检测和研究的的相关工作中菌株是非常重要的实验材料，因此，菌种保存是开展该菌检测与研究的先决条件。

目前大多数实验室菌种长期保存多采用 4℃ 液体石蜡保存法、-20℃ 脱脂牛奶保存法、超低温甘油冻存法、冷冻真空干燥保存法，以及从国外引进的多孔瓷珠超低温冻存法。虽然大多数细菌菌株都可以采用低温法长期保存，但对于在低温环境中能变成另一种存活形式（即活的非可培养状态）的霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌等细菌^[2]，采用常规的 4℃ 斜面或半固体保存法、4℃ 液体石蜡保存法、-20℃ 甘油保存法时，只能保存两三周^[3]。另外，有研究表明：不同种类弧菌存活力差异较大，海鱼弧菌比较难保存^[4]。为了延长此类菌株的保存期，硬件设施条件比较优越的科研和检验单位采用-80℃超低温冷冻法，保存期一般为半年至一年，但是超低温冰箱价格贵，能耗高，不适宜普通实验室使用。因此，研究一种适合副溶血性弧菌菌种长期保存且适宜大多数实验室使用的简便方法，解决副溶血性弧菌不能在低温条件下长期保存的问题，对相关的研究和检验工作发展具有现实意义。

本研究采用 3.5%氯化钠半固体添加石蜡密封和不添加石蜡两种处理在室温条件下保存副溶血性弧菌，在不同的时间观察比较两种处理保存副溶血性弧菌的效果，探寻适宜副溶血性弧菌长期保存的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

3.5%氯化钠半固体培养基、3%氯化钠胰蛋白琼脂培养基、弧菌显色培养基、氧化酶试纸、革兰氏染色液均由广东环凯微生物科技有限公司提供。

1.1.2 菌种

副溶血性弧菌 *V. parahemolyticus* ATCC17802（标准菌株）、FSCC2302084（分离菌株）、FSCC2302085（分离菌株）、FSCC2302086（分离菌株）、FSCC2302090（分离菌株）均来源于广东环凯微生物科技有限公司，上述菌种实验前经鉴定生化特征符合副溶血性弧菌特性。

1.1.3 仪器设备

日本 Hirayama HVE-50 高压灭菌锅；北京泰亚赛福 BSC-1360 II A2 生物安全柜；德国赛多利斯 PB-10 酸度计；Niko 50i 显微镜；HKP-9172A 培养箱。

1.2 方法

1.2.1 菌种保存处理 将菌种穿刺接种于 3.5%氯化钠半固体培养基中，每个菌种接种 50 管， $36\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h；每个菌种取 25 管，在无菌条件下，将灭菌并已蒸发掉水分的液体石蜡注入培养好的菌种半固体管上，石蜡油层高出半固体培养基顶端 1 cm，使培养物与空气隔绝。最后，将石蜡液封和无石蜡液封的菌种半固体保存试管直立，置于室温下保存。

1.2.2 菌种存活状况和生物学特性检测

1) 菌种存活状况：按保存 1 个月、5 个月、8 个月、12 个月、16 个月、24 个月共 6 个时间段进行检查，每次挑取菌种接种于 3%氯化钠胰蛋白琼脂培养基于 $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行培养，培养 24 h 后，观察菌种的菌落形态特征及存活状态。

2) 生物学特性测试：菌种保存前和每次转接活化后，取培养物做革兰氏染色、镜检，观察其染色特征及菌体形态；并进一步做生化鉴定试验，如氧化酶试验、弧菌显色培养基显色反应，确定菌种保存状态。

2 结果与分析

2.1 不同保存形式副溶血性弧菌存活状况比较

3.5%氯化钠半固体管用石蜡液封和无石蜡液密封两种形式，分别保存 5 个编号副溶血性弧菌菌株。在室温条件下保存的存活状况：5 个编号副溶血性弧菌菌株在有石蜡液密封的 3.5%氯化钠半固体管中保存 24 个月后全部存活，但在无石蜡液密封的 3.5%氯化钠半固体管中保存 8 个月后，5 个编号副溶血性弧菌菌株的存活数量开始有不同程度的下降，16 个月后此形式保存的菌株转接在 3%氯化钠 TSA 上均已不生长（见表 1）。

表 1 副溶血性弧菌保存条件及时间

菌种	3.5%氯化钠半固体管（室温）	
	石蜡液封	无石蜡液封
ATCC17802	24 个月	8~12 个月
FSCC2302084	24 个月	8~12 个月
FSCC2302085	24 个月	12~16 个月
FSCC2302086	24 个月	8~12 个月
FSCC2302090	24 个月	12~16 个月

2.2 保存期间副溶血性弧菌基本生物学特性检测结果

3.5%氯化钠半固体管用石蜡液封和无石蜡液封两种形式保存5个编号副溶血性弧菌共250份,在保存期间将定期转接在3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂上能活化的菌株进行革兰氏染色、氧化酶试验和在弧菌显色培养基上的菌落特征确认,所有存活菌菌落特性及生化确认结果均与保存前测试的结果保持一致:镜检革兰氏染色阴性,氧化酶阳性,3%NaCl TSA 平板菌落较大、黄色湿润,弧菌显色培养基紫红色菌落。

3 讨论

曾有文献报道过,NaCl对副溶血性弧菌4℃冰箱保存有保护作用,但甘油对副溶血性弧菌的存活不利^[5]。采用含盐基质加甘油冷冻保护剂在室温、4℃或-20℃保存条件下,也只能短期保存。因此,本文采用含盐半固体为基质,比较石蜡液封与无石蜡液封的保存效果。实验结果表明;以3.5%氯化钠半固体为基质室温保存副溶血性弧菌,石蜡液封效果优于无石蜡液封,保存期达24个月以上,且基本生物学特性均保持稳定。

谢正昉等^[6]在霍乱弧菌长期保存法研究中发现:在室温(22-28℃)下霍乱弧菌保存于半固体加液体石蜡或0.01M pH 8.0 PBS 稀释的碱性胨水中可存活1-3年以上。这与我们的实验结果基本一致。对于像弧菌这类在低温环境中容易死亡或转变为不可培养状态而难以再活化的细菌,需结合细菌的生长特性及影响菌种保存的客观因素选择合适的保存条件以达到长期保存效果。实验室标准菌种的保存主要目的是保持菌种原有的生物学特性以保证科学研究、实验室质量控制及日常检验使用,因此,选择适宜的菌种保存方法长期稳定保存菌种,对药品、食品等微生物检验具有十分重要的作用^[7]。虽然-80℃冷冻保存和冻干保存法可有效长期保存大多数菌种包括弧菌,但是这两种方法需要一定的硬件设备和技术方可实现。对于条件简陋的基层实验室来说,这两种方法技术难度大、成本高,难以应用。副溶血性弧菌在3.5%氯化钠半固体加液体石蜡室温条件下保存24个月以上,操作简便且生物学特性稳定,延长标准物的采购周期,节省购买菌种的经费,保证研究工作的持续开展,可供基层微生物实验室借鉴应用。

参考文献

- [1] 邱波,姚斐,姚怡,等. 低温对常见致病弧菌菌种保存的影响[J]. 职业与健康, 2003, 19(9): 53-54.
- [2] 杜 萌,陈吉祥,孙丰蓉,等. 低温寡营养条件下副溶血弧菌形成活的非可培养状态及其复苏研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(2): 178-181.
- [3] 张永华,李怡, 范斌, 等. 副溶血性弧菌7种保存方法比较 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(10): 209 - 211.
- [4] 苏国成. 养殖对虾病原弧菌继代保存方法保存[J]. 福建水产, 1994, (4): 27-29.

- [5] 杨胜远,韦锦,李卓文,等. 副溶血性弧菌保存条件研究[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(18): 4395-4398.
- [6] 谢正昉,蔡燕刚,吴挹芳,等. 霍乱弧菌的简易和长期保存法的研究[J]. 微生物学通报,1986,(04):174-177.
- [7]陈晓燕,林光.微生物实验室菌种保存方式探讨[J]. 临床合理用药,2014,7(10):129-130.