

噬菌蛭弧菌在灭菌自来水中存活时间的研究

秦生巨 司稚东*

(江苏省卫生防疫站中国医学细菌种中心弧菌噬菌体专业实验室,南京)

摘要 本文报道了噬菌蛭弧菌用灭菌自来水于4℃保存,可存活4个月以上,最长可达8个月以上;25℃保存不及4℃。定时添加宿主菌和不加宿主菌对噬菌蛭弧菌的存活时间无显著影响。该菌的存活数随保存时间的延长而减少。

关键词 噬菌蛭弧菌;灭菌自来水;存活时间;噬斑;次代培养物

噬菌蛭弧菌 (*Bdellovibrio bacteriovorus*, 以下简称蛭弧菌)的保存方法,国外研究报道较少。一般习惯于在室温软琼脂中保存^[1]。至于蛭弧菌的存活温度及存活时间,各实验室报道的结果很不一致。目前国内尚未见有这方面的研究报道。为了探讨蛭弧菌菌株良好的保存方法,本文观察了作者从外环境自然水(或泥)体中分离、纯化的部份蛭弧菌菌株^[2]在灭菌自来水中的存活时间、存活温度及与宿主菌含量的关系。现将结果报道如下。

材料与方 法

(一) 菌株

1. 宿主菌: *E. Coli* C 600 由中国科学院微生物研究所提供,本站保存。

2. 蛭弧菌: 7株蛭弧菌 Bd32, 81, 98, 112, 296 自河水中分离, Bd 59, 64 自海水中分离。

(二) 培养基

培养基的制备方法见文献[2]。

(三) 菌悬液的制备

宿主菌悬液和蛭弧菌悬液的制备方法见文献[2]。

(四) 蛭弧菌噬斑的检查及计数

根据文献[2]方法,取蛭弧菌保存液作适当稀释(一般选用 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}),接种于自来

水宿主双层琼脂平板上(每个稀释度作2只平板),在25℃培育48小时,初记蛭弧菌噬斑形成数,72小时计数蛭弧菌噬斑的形成总数,阴性(无蛭弧菌噬斑形成)平板观察7天。

(五) 蛭弧菌培养物的保存

将适量(10^3 — 10^7 pfu/ml)的蛭弧菌及大肠杆菌(20亿/ml)悬液混合均匀,涂布于自来水琼脂平板表面,待干,置25℃培育40—48小时,待形成肉眼可见融汇成片的噬斑时,加入5—10ml的灭菌自来水,浸泡1—2小时,洗下表面培养物。吸取洗涤液于三角烧瓶中,静置2—4小时,取上清液,并检测上清液中蛭弧菌的数目。取检测后的上清液分装在长颈试管中,分别置4℃冰箱和25℃培养箱内保存。每种温度分设两组:一组是在培养过程的始终不再加入宿主菌细胞;另一组是每月定时加入大肠杆菌悬液(最终浓度约为10亿/ml),以保持宿主菌的一定含量。各组每隔2个月用自来水宿主双层琼脂平板检测一次蛭弧菌菌数。

结 果

(一) 不同温度对蛭弧菌存活时间的影响

不同温度对7株蛭弧菌于灭菌自来水中的存活时间有明显影响(表1)。4℃冰箱中保存,

* 中国科学院上海植物生理研究所。本文承本站陈宗兰同志协助整理。

表 1 宿主菌加或不加及不同温度对蛭弧菌存活时间的影响

蛭弧菌	保存温度(°C)	加有宿主菌组的存活时间(月)					不加有宿主菌组的存活时间(月)				
		0	2	4	6	8	0	2	4	6	8
Bd 32	4	4.99×10^6	1.41×10^4	1.18×10^3	192	30	4.99×10^6	1.26×10^4	1.07×10^3	300	5
	25	4.99×10^6	4.30×10^3	2.46×10^2	42	0	4.99×10^6	3.26×10^3	496	16	0
Bd 59	4	5.60×10^7	1.08×10^4	1.25×10^4	3.73×10^3	187	5.60×10^7	1.05×10^4	9.17×10^2	4.14×10^3	126
	25	5.60×10^7	2.98×10^3	176	56	10	5.60×10^7	3.47×10^3	589	121	3
Bd 64	4	6.81×10^6	1.41×10^4	1.22×10^3	325	73	6.81×10^6	1.26×10^4	1.91×10^3	277	36
	25	6.81×10^6	2.78×10^3	300	52	0	6.81×10^6	2.76×10^3	860	1	0
Bd 81	4	1.17×10^7	1.21×10^4	9.96×10^2	250	0	1.17×10^7	4.13×10^4	1.04×10^3	264	9
	25	1.17×10^7	1.0×10^3	0	0	0	1.17×10^7	1.56×10^3	2	0	0
Bd 98	4	3.45×10^6	1.81×10^3	1.20×10^3	64	0	3.45×10^6	1.48×10^3	1.40×10^3	40	0
	25	3.45×10^6	640	19	0	0	3.45×10^6	640	58	10	0
Bd 112	4	1.59×10^7	2.06×10^4	3.13×10^3	78	0	1.59×10^7	2.05×10^4	4.61×10^3	134	0
	25	1.59×10^7	2.45×10^3	186	14	0	1.59×10^7	3.19×10^3	121	31	0
Bd 296	4	6.56×10^6	1.75×10^4	3.74×10^3	1.17×10^3	400	6.56×10^6	2.09×10^4	2.52×10^3	1.36×10^3	864
	25	6.56×10^6	860	480	40	0	6.56×10^6	1.36×10^3	300	117	0

注：表中所列数字为蛭弧菌形成的噬斑数 (Pfu/ml)

大部份蛭弧菌(如 Bd32, Bd59, Bd64, Bd 296) 存活 8 个月以上, Bd 81, Bd 98, Bd 112 存活 6 个月以上。25°C 培养箱中保存, 70% 的蛭弧菌菌株可存活 4—6 个月, 部份菌株仅存活 2 个月, 极少数菌株保存 8 个月还可检出几个噬斑。

(二) 自来水中宿主菌的含量对蛭弧菌存活时间的影响

在自来水中定时添加宿主菌(每次添加宿主菌的最终浓度为 10 亿/ml) 和不加宿主菌对 7 株蛭弧菌存活时间的影响结果见表 1。可以看出, 定时添加宿主菌, 保持宿主菌的一定浓度, 并不能使蛭弧菌不断增殖而延长存活时间(如 Bd 81 在 4°C 时, 定时添加宿主菌组存活 6 个月, 而始终不加宿主菌组同样存活 6 个月)。反之, 不加宿主菌, 也并不因宿主菌数的减少, 而使蛭弧菌的存活时间缩短。

(三) 蛭弧菌菌数的变化

7 株蛭弧菌的菌数在自来水中随保存时间的延长而逐渐减少。如表 1 中 Bd 81 4°C 保存 6 个月, 菌数由 1.17×10^7 pfu/ml 减少到 250 pfu/ml; 25°C 保存 2 个月, 菌数由 1.17×10^7 pfu/ml 减少到 1.0×10^3 pfu/ml。4 个月则有

些菌株的菌数减少到数个或 0。

(四) 蛭弧菌菌株保存后的生物学特性

蛭弧菌经 4 和 25°C 保存一定时间后, 将存活的次代培养物接种于自来水宿主双层琼脂平板上, 观察其生物学特性。结果证实, 蛭弧菌经不同温度和时间保存后, 次代培养物对宿主细胞有同样的寄生和裂解能力。如 25°C 培育 48 小时即可形成透明噬斑, 噬斑的形态、大小、特征均与原菌株相似, 无明显改变。

讨 论

蛭弧菌的存活温度及时间, 各实验室观察的结果不一致。秦生巨^[3]报道蛭弧菌在河水、海水、污水及盐碱水中可长期生存。Москвитинва 等^[4]报道, 蛭弧菌在高压灭菌自来水中可生存 160 天以上, 污水中存活 100 天, 河水中存活 75 天, 但没有报道蛭弧菌存活的温度。Burger 等^[5]报道, 蛭弧菌在室温中保存 36 天, 其菌数可由 10^8 pfu/ml 减少到 10 pfu/ml。Huang 等^[6]报道, 蛭弧菌培养物在 4°C 冰箱中可存活 4—8 个月。这一结果和本文结果一致。

由此看出蛭弧菌存活的最佳温度为 4°C。

秦生巨报道, 蛭弧菌在外环境河水中一年四季均可检出, 但其数量随季节不同而变动, 以7—9月份数量最高, 然后又逐渐减少, 12—次年2月份其菌量较少。如以夏季的含菌量为100%, 则秋、冬和春季的含量分别为77.74%, 3.62%和22.20%。Москвитина 等^[4]报道, 夏季蛭弧菌在河水中的检出率为100%, 在冬、春季河水中检出率可分别为16.6%及44.8%。蛭弧菌含菌量和检出率随气温而变化。这一现象, 对利用蛭弧菌净化水中致病菌, 控制或减少肠道病的发生是很有意义的。

本试验结果还证明, 宿主菌的添加与否对蛭弧菌的保存时间无明显影响。因而说明在灭菌自来水中保存蛭弧菌培养物无须较高浓度的

宿主菌。这一结果可为保存蛭弧菌节省较多的物力和人力。

本试验结果证实, 室内4℃冰箱中用灭菌自来水保存蛭弧菌菌株的方法, 简便易行, 节省人力物力。次代培养物不易突变。

参 考 文 献

- [1] Starr MP et al.: *Adv in microbiol Physiol* 8, 215, 1972.
- [2] 司穉东、秦生巨: *中华微生物学和免疫学杂志*, 2(1): 12, 1982.
- [3] 秦生巨: *中国公共卫生*, 6(3): 139, 1987.
- [4] Москвитина ЭА ИЛР: *ЖМЭИ*, 5:3, 1979.
- [5] Burger A et al.: *Arch microbiol.* 61: 261, 1968.
- [6] Huang J et al.: *Bact. Proc.* 41, 1969.