

\*\*\*\*\*  
\* 技术与方法 \*  
\*\*\*\*\*

## 迟钝爱德华氏菌的保存方法

黄志坚 肖克宇 金燮理

(湖南农业大学水产系 长沙 410128)

**摘要** 比较了7种不同方法保存迟钝爱德华氏菌的效果。测定存活力、毒力和生物学特性的结果表明,采用30%甘油PBS液保存该菌的效果较好。

**关键词** 迟钝爱德华氏菌,菌种保存

微生物菌种保存方法因微生物种类的不同而异,国内外对此已有较多介绍<sup>[1~3]</sup>,以真空冷冻干燥法最佳。但在一般条件下,限于设备等诸多情况,常采用斜面保存法和石蜡油封存法保存菌种。1993年我们从患传染性肝病牛蛙体内分离出病原菌,确认该菌为迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*),采用上述两种常规方法保存该菌种。同年12月检查,发现菌株死亡现象。*E. tarda*菌是1962年由Hoshina在日本从鳗鲡中首次分离出的<sup>[4]</sup>。其后,国内外对该菌的分类,生物学特性、病原性等方面进行了研究,但关于该菌用常用方法保存及如何保存的研究,未见报道。为了进一步研究该菌的特性,采用7种方法保存该菌,经过21个月的比较研究,结果报道如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 供试菌种

从患病牛蛙分离出8株迟钝爱德华氏菌(EC931~EC935, EC946~EC948),选择EC932菌株用于试验。

#### 1.2 保存方法

据文献[1~4]选用下述7种常用的细菌保存方法:A.斜面;B.石蜡油;C.甘油;D.蒸馏水;E.30%甘油PBS液;F.15%甘油肉汤;G.液体肉汤。

保存前,将菌种接于普通营养琼脂斜面,28℃培养24h。各种方法保存的菌种,均采

用灭菌橡皮塞,石蜡封口。除F法于-10℃下保存外,均置4℃冰箱保存。

#### 1.3 检测方法

**1.3.1 存活力测定:**每隔一定时间用普通营养琼脂斜面接种,适温培养24h后检查存活情况,同时用平板菌落计数法计算活菌数,测定存活率。

**1.3.2 生物学特性检测:**在检查存活力的同时,进行平板划线,观察菌落,菌体形态,检测有关生化指标,比较各保存方法的菌株的生物学特性与原菌株生物学特性的差异。

**1.3.3 毒力检测:**保存菌种前用原菌种接种健康牛蛙,测定其毒力。在保种的不同阶段,再用不同方法保存的菌株感染健康牛蛙,根据感染蛙是否表现典型病症和死亡率的高低,判定保存菌株的毒力变化情况。

### 2 实验结果

#### 2.1 存活力和生物学特性

采用7种方法保存的EC932菌株在21个月试验期内,A、B、C法保存的菌种陆续死亡,只有D、E、F、G法保存的菌种存活(表1)。

通过比较,各种方法保存后的菌种的生物学特性与原菌种的主要生物学特性基本一致。

湖南省科委重点攻关课题资助项目

1995-12-04 收稿

表1 不同方法保存 EC932 菌株的存活率(%)

保存方法	保存时间(月)					
	1	2	5	10	15	20
A	46.2	0	0	0	0	0
B	53.4	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
D	93.2	87.6	83.2	79.3	75.4	72.3
E	98.9	98.8	98.8	98.6	98.7	98.6
F	98.5	97.6	97.2	96.8	96.5	94.3
G	98.7	98.2	97.3	96.8	96.7	95.6

均为革兰氏阴性短杆菌，周鞭毛。菌体大小  $0.5 \sim 1 \times 1 \sim 2 \mu\text{m}$ ，无荚膜和芽孢。菌落圆形，灰白色，边缘整齐，表面光滑，直径为  $0.5 \sim 1.0\text{mm}$ 。氧化酶阴性，过氧化氢酶阳性，还原硝酸盐，M. R 试验阳性，V.P 试验阴性；分解葡萄糖产酸产气。但有些方法保存的菌种在菌落形态特征上与原菌种存在一定的差异。D法保存的菌种菌落明显湿润，边缘较粗糙，菌落较大而厚，随着保存时间的延长，这种变化愈加明显。F法和G法保存的菌种也存在类似变化，其性状介于D法保存菌种与原菌种之间；而A、B、C、E法保存的菌种菌落特征未发生明显变化。

## 2.2 毒力测定

表2 不同方法保存 EC932 菌株保种前后的毒力比较(%)

保种方法	接种菌数(个/只)	保种前	保存时间(月)					
			1	2	5	10	15	20
A	$6 \times 10^8$	100	90	80	70	60	50	40
B	$6 \times 10^8$	100	100	80	70	60	50	40
C	$6 \times 10^8$	100	100	100	100	100	100	100
D	$6 \times 10^8$	100	100	80	80	60	40	10
E	$6 \times 10^8$	100	100	100	100	100	100	100
F	$6 \times 10^8$	100	100	100	100	100	80	80
G	$6 \times 10^8$	100	100	100	100	100	80	60

菌种在保存前毒力很强，健康牛蛙在接种后表现出传染性肝病的典型症状。病蛙精神不振，不摄食，腹部膨胀，后肢股部皮肤大块状出血。有的腹部两前肢出血，有数个小的血疙瘩，有的外表完好，不呈现任何特别明显伤口；剖检时，肌肉发黄，肿胀，变性，内脏与腹壁相粘连，有腹水，肝肿大，块状出血，充血，有纤维素；有的呈灰色，有的有点状坏死灶，胃壁树枝状充血，肠道充血，脾肿大，暗红，肾颜色深，红色，发病蛙  $1 \sim 2\text{d}$  内死亡。保存后，除E法保存的菌种外，其余各种方法保存的菌种均不同程度地出现毒力下降趋势(表2)。

## 3 讨论

本研究采用7种常规方法保存 *E. tarda* 菌，旨在查明该菌的保存特性，寻求一种简便实用的有效保存方法。结果表明，用斜面保存，石蜡油封存和甘油封存法保存菌种的存活时间均过短。用蒸馏水保存、30%甘油PBS液保存、15%甘油肉汤冻存、液体肉汤保存法保存的菌种，其存活时间在21个月以上，对牛蛙有不同程度的致病力。综合比较各种方法的优劣，30%甘油PBS液封存法是一种保存迟钝爱德华氏菌的较佳方法，为我们进一步研究牛蛙爱德华氏菌的其它特性提供了方便。

## 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. 北京: 科学出版社, 1980, 610~629.
- [2] 根井外喜男编, 金连缘译. 微生物保存法. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
- [3] 李钟庆. 微生物菌种保藏手册. 北京: 科学出版社, 1989.
- [4] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [5] Hoshina T. Japan Soc Sci Fish 1962, 28(2): 162~164.