

## 实验技术与方法

# 弯曲菌菌种冷冻保存及复苏方法的研究

骆海朋 陈倩

(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

**摘要:**目的 探索一种简单、方便、有效的弯曲菌菌种保存方法。方法 采用含30%甘油的脑心浸液肉汤,将实验室保存的19株弯曲菌于-30℃和-70℃分别保存,每个菌株3个菌种管。1年后,采用5%脱纤维羊血的布氏肉汤进行增菌,然后转种哥伦比亚血平板,比较存活效果。结果 -30℃条件下采用多管法保存弯曲菌可以获得与-70℃条件下保存相当的效果。结论 采用多管法(每株菌3个菌种管)于-30℃冷冻保存弯曲菌是一个简单、方便、有效、实用的方法。

**关键词:**弯曲杆菌属;保存;生物学;低温保存

## Studies of Methods of Freezing Storage of Campylobacter and Recovery of Frozen Storage Strain

LUO Hai-peng, CHEN Qian

(Beijing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

**Abstract:** **Objective** To find an easy and effective method for the storage of campylobacter. **Method** Campylobacter strains were stored in the content of 30% glycerine brain heart broth. 19 isolates were used in this study and stored at -30℃ and -70℃ and every strain had 3 copies. After one-year store, the frozen strains were recovered in the content of 5% sheep blood preston broth for 24 hours, and then were subcultured on the Columbia blood plate. **Results** In one-year store, the storage of the strains in the temperature of -30℃ had the same effect as the storage of strains in the temperature of -70℃. **Conclusion** The method of storage of campylobacter in multi tubes in the temperature of -30℃ may be an easy and effective method.

**Key word:** Campylobacter; Preservation, Biological; Cryopreservation

应、毒素、噬菌体敏感性、药敏性等方面都存在一定的变异<sup>[7]</sup>,易于造成漏检。食品中的霍乱弧菌含量相对较少,且有一定程度的损伤和(或)抑制,致使检测更加困难。副溶血性弧菌的检测同样存在着上述类似的问题。荧光PCR的高灵敏度、高特异性,特别是如果从食品样品直接提取DNA则3h左右能出结果的快速性,能有效地解决以上困难,很好地满足对食品中致病性弧菌快速检测的需要。

### 参考文献

[1] 郁庆福. 现代卫生微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995, 1401.

[2] F. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, R. 布伦特, 著. 颜子颖, 王海林, 译. 精

编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2001, 22-23, 104-105.

[3] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔, 著. 黄培堂, 汪嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京:科学出版社, 2002, 68-105, 618-628.

[4] 卫生部疾病控制司霍乱防治手册编写组. 霍乱防治手册[M]. 第5版:北京:卫生部疾病控制司, 1999.

[5] SN/T 1022—2001. 出口食品中霍乱弧菌检验方法[S].

[6] 王家豪. PCR技术应用于霍乱监测的效果探讨[J]. 中国公共卫生学报, 1999, 18(5): 260-262.

[7] 蒋小皖. O139霍乱弧菌生物学特性分析[J]. 江苏预防医学, 1999, 10(4): 28-29.

[收稿日期:2007-07-25]

中图分类号:R15;Q93-33;R446.5 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2007)06-0514-05

作者简介:骆海朋 男 主管技师 硕士



弯曲菌是一类对生长条件要求非常苛刻的细菌,需要在微需氧的环境下(约 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>)才能良好地生长。弯曲菌也是一类保存比较困难的细菌,用一般的方法保存有一定的困难,在实际菌种保藏工作中如操作不当极易造成菌种的死亡。有效的保存分离菌株是对弯曲菌进行研究的基础。在过去的研究中,采用的保存方法种类比较多,文献[1,2]采用真空冷冻干燥技术进行保存菌种,在 FDA 的方法<sup>[3]</sup>中,介绍冷冻培养基 - 70 冷冻保存以及半固体保存方法,在国标<sup>[4]</sup>中短期采用 4 冰箱微需氧保存,长期保存用冻干法。在上述方法中最稳定有效的方法是真空冷冻干燥技术,但是该方法较为复杂,还需要冷冻干燥设备。而半固体和新鲜菌落于微需氧条件下保存的时间比较短。- 70 冷冻保存方法相对简单,但是 - 70 冰箱价格昂贵,基层单位比较少。

在对菌种的复苏方法中,有的直接将菌种涂布平板微需氧培养<sup>[1]</sup>,有的将菌种加入增菌液中进行增菌后再涂布血平板<sup>[3]</sup>,复苏方法的差异会严重影响菌种保存的效果。为探索一套方便有效的弯曲菌菌种保存及复苏方法,本实验室用 30% 的甘油脑心浸液肉汤,分别在 - 30 及 - 70 对弯曲菌菌种进行多管(每个菌种 3 个管)冷冻保藏,复苏时用不加抗生素的布氏肉汤,于微需氧条件复苏培养 24 h,转种哥伦比亚血平板微需氧条件培养 48 h。实验的菌株为 2004 年及 2005 年分离到的弯曲菌共 19 株,其中包括空肠弯曲菌、结肠弯曲菌和红嘴鸥弯曲菌。

## 1 材料及方法

1.1 培养基 哥伦比亚血琼脂 哥伦比亚基础培养基(OXOID),按照培养基配置的说明进行配置并进行高压灭菌,将培养基保温到 45 ,然后加入 5% 的脱纤维羊血制血平板。脑心浸液肉汤 脑心浸液干粉培养基(北京陆桥技术有限责任公司)按照培养基的配置说明操作,高压灭菌。布氏肉汤 2 号营养肉汤(OXOID, Basing Stoke, Hampshire, England)按照培养基说明进行配制,高压灭菌,加入 5% 脱纤维羊血。

1.2 菌株 2004 年及 2005 年北京市疾病预防控制中心营养与食品卫生所微生物实验室从市场销售的禽肉中分离到的弯曲菌属菌株 19 株,其中包括空肠弯曲菌、结肠弯曲菌和红嘴鸥弯曲菌。

1.3 低温冰箱 - 30 低温冰箱(SANYO, Medical Freezer)、- 70 冰箱(SANYO ultra-low freezer),塑料菌种管(1.8 ml 冷冻管、彩盖硅胶垫圈)(上海嘉迪塑料制品有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 菌种制备 将弯曲菌菌种划线接种于哥伦比亚血琼脂平板,42 微需氧条件下培养 48 h,获得活力旺盛的菌体。

菌种保存 按照体积比将脑心浸液肉汤加入 30% 的灭菌甘油,分装到塑料菌种保存管中备用,也可以将其冷冻保存随用随取。用接种环刮取哥伦比亚血平板表面的菌体,溶于脑心浸液肉汤甘油中。将菌浓度调到 6 个麦氏浓度以上。将制好的脑心浸液甘油菌悬液,于 - 30 或 - 70 的冰箱中迅速冷冻。

1.4.2 菌种的复苏 将菌种管从冰箱中取出,室温放置呈为液态后,将整管的菌悬液加入到未加抗生素的布氏肉汤 10 ml 中,在微需氧的条件下培养 24 h,如菌体损伤严重,需要复苏的时间较长,培养 24 h 菌体得不到有效的复苏,需要再继续培养 24 h。将培养 24 ~ 48 h 的增菌液划线接种于哥伦比亚血平板,于微需氧的条件下培养 48 h 得到复苏的菌种。将本实验室从禽类中分离到的弯曲菌 19 株按上述方法于 2005 年 4 月保存,并于 2006 年 4 月取出,用上述方法进行复苏,检验菌种保存的效果。

## 2 结果

2.1 在 - 70 保存的菌种共 19 株,采用本方法全部存活。

2.2 在 - 30 保存的菌种共 19 株,在菌种复苏培养过程中 3 个菌种管中的弯曲菌在增菌过程中没有复苏成功,但由于在保存的过程中,1 个菌株保存了 3 管,其它菌种管保存的菌株用相同方法进行培养获得了成功。

本文采用加入 30% 甘油的脑心浸出液肉汤对弯曲菌进行菌种保存,用未加抗生素的布氏肉汤进行复苏,此方法简单、实用、有效,不需要特殊的设备,适用于基层微生物实验室日常弯曲菌菌株保存工作。

## 参考文献

- [1] 张建中,蒋秀丽,陈晶晶,等. 幽门螺杆菌的冷冻干燥保存法[J]. 华人消化杂志,1998,6(12):1075-1076.
- [2] OWEN RJ, ON SL, COSTAS M. The effect of cooling rate, freeze-drying suspending fluid and culture age on the preservation of *Campylobacter pylori*[J]. J Applied Bacteriol,1989,66: 331-337.
- [3] U S Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual Online march 2001 Chapter 7 *Campylobacter*[Z].
- [4] GB/T 4789.9—2003. 食品卫生微生物学检验 空肠弯曲菌检验[S].
- [5] 郑晓东,主编. 食品微生物学[M]. 杭州:浙江大学出版社,2001: 117-118.
- [6] Foodborne pathogens monograph number 3: *Campylobacter*. Technical support department, oxoid, unipath limited, Basingstoke, England 1998.

[收稿日期:2006-12-28]

中图分类号:R15;Q935;R378.2 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2007)06-0518-02