

8 种不同方法保藏病原菌效果的对比观察

边藏丽 涂献玉

(湖北省卫生职工医学院 荆州 434000)

摘要: 采用 8 种不同的菌种保藏方法, 对 18 种常见病原菌的保藏时间及生物学特性的影响进行了对比观察。结果表明: 冷冻干燥法保藏菌种时间最长(本实验室已保存 15 年); 肉浸汤琼脂平板法保藏菌种时间最短(2~3 月)。保藏时间由长到短依次为: 冷冻干燥法 > 半固体冷冻法 ≥ 半固体斜面加液体石蜡覆盖法 > 半固体斜面法 > 肉浸汤加液体石蜡覆盖法 > 血琼脂平板法 > 肉浸汤法 > 肉浸汤琼脂平板法。且相同方法对不同菌种保藏时间不同。保藏时间在 1 年以内的菌种, 其生物学特性无明显变异; 而经冷冻干燥法保藏时间较长的白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌、甲型副伤寒沙门氏菌及乙型副伤寒沙门氏菌的生物学特性有不同程度改变。

关键词: 菌种, 保藏, 观察

中图分类号: R37 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0208-04

COMPARATIVE OBSERVATION ON EIGHT PRESERVATION METHODS OF PATHOGENIC BACTERIA

BIAN Zang-Li TU Xian-Yu

(Hubei Medical Staff College, Jingzhou 434000)

Abstract: Eight different preservation methods for eighteen common pathogenic bacteria were compared for their preservation time and their influences upon their biological characteristics. The results indicated: freeze-drying method could do the longest preservation (at least 15 years) while beef broth agar plate method did the shortest (only 2 to 3 months). If the preservation time was put into order, it went like this: freeze-drying method > semisolid freeze method ≥ semisolid slope covered with paraffin oil method > semisolid slope method > beef broth covered with paraffin oil method > blood agar plate method > beef broth agar plate method. However, even the same method had different preservation time for different pathogenic bacteria. The pathogenic bacteria whose preservation time was within a year had no changes in their biological characteristics while some pathogenic bacteria such as *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, which was preserved by means of freeze-drying method, had some changes in their biological characteristics.

Key words: Pathogenic bacteria, Preservation, Observation

菌种是一项重要的生物资源, 在科研和教学中发挥“活标本”或“活图书”的作用。为了使菌种的生命更好地得以延续, 并保持它们原有的生物学特性, 以备再实践, 本文就实验室常用的 8 种菌种保藏方法对 18 种常见致病菌的保藏时间及生物学特性的影响进行了对

比观察, 现报告如下:

1 材料与方法

1.1 菌种

收稿日期: 1999-01-11, 修回日期: 1999-05-28

由武汉生物制品研究所和湖北省临床检验中心提供,见表 1。

表1 18种菌种名称

菌名
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) ATCC25923
表皮葡萄球菌 (<i>Staph. epidermidis</i>) ATCC12228
乙型溶血性链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>)
肺炎链球菌 (<i>Strep. pneumoniae</i>)
粪肠球菌 (<i>Strep. faecalis</i>) ATCC19433
伤寒沙门菌 (<i>Salmonella typhi</i>)
甲型副伤寒沙门氏菌 (<i>S. paratyphi A</i>)
乙型副伤寒沙门氏菌 (<i>S. paratyphi B</i>)
鼠伤寒沙门氏菌 (<i>S. typhimurium</i>) ATCC14028
福氏志贺氏菌 (<i>Shigella flexneri</i>) ATCC12022
鲍氏志贺氏菌 (<i>sh. boydii</i>)
白喉棒状杆菌 (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>)
蜡状芽胞杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) ATCC25922
普通变形杆菌 (<i>Proteus vulgaris</i>) ATCC13315
阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>) ATCC23355
反硝化产硷菌 (<i>Alcaligenes denitrificans</i>)
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) ATCC27853

1.2 仪器

Vitek 全自动化微生物分析系统 (AMS), 美国梅里埃公司生产。

1.3 培养基

肉浸汤培养基、肉浸汤琼脂培养基、血琼脂培养基、肉浸汤半固体斜面培养基、肉浸汤半固体培养基。常规方法配制^[2]。

1.4 保藏方法

采用肉浸汤琼脂平板法 (A)、采用保藏金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、普通变形杆菌、大肠杆菌和蜡状芽胞杆菌。采用肉浸汤法 (B)、肉浸汤加液体石蜡覆盖法 (D)、半固体斜面法 (E)、半固体斜面加液体石蜡覆盖法 (F) 保藏上述 6 种细菌及乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌、白喉棒状杆菌。采用血琼脂平板法 (C) 保藏金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肺炎链球菌、乙型溶血性链球菌和白喉棒状杆菌。采用半固体冷冻法 (G) 保藏鼠伤寒沙门氏菌、阴沟肠杆菌、蜡状芽胞杆菌、普通变形杆菌、粪肠球菌、福氏志贺氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌和反硝化产硷菌。

将金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌、白喉棒状杆菌、铜绿假单胞菌、普通变形杆菌、大肠杆菌、蜡状芽胞杆菌分别接种于肉浸汤培养基、肉浸汤半固体斜面培养基内。于肉浸汤琼脂培养基内分别接种上述除乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌、白喉棒状杆菌以外的 6 种细菌。前 5 种革兰氏阳性菌还分别接种于血琼脂培养基。将鼠伤寒沙门氏菌、阴沟肠杆菌、蜡状芽胞杆菌、普通变形杆菌、粪肠球菌、福氏志贺氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、反硝化产硷菌分别接种于肉浸汤半固体培养基内,均用无菌橡皮塞封口,35℃ 培养 24h 后 (在所需加的培养管内加入无菌液体石蜡覆盖),除 G 法于 - 20℃ 下保藏外,均置 4℃ 冰箱保藏。

采用冷冻干燥法 (H) 保藏金黄色葡萄球菌 (保藏时间 1985 年 2 月)、乙型溶血性链球菌 (保藏时间 1991 年 4 月)、白喉棒状杆菌 (保藏时间 1986 年 11 月)、肺炎链球菌 (保藏时间 1988 年 10 月)、铜绿假单胞菌 (保藏时间 1991 年 3 月)、伤寒沙门氏菌 (保藏时间 1992 年 7 月)、乙型副伤寒沙门氏菌 (保藏时间 1992 年 9 月)、甲型副伤寒沙门氏菌 (保藏时间 1983 年 5 月) 上述冷冻干燥菌种直接从武汉生物制品研究所购买,置 - 20℃ 冰箱保藏,于 1998 年 5 月开封转种。对所保藏的各菌种每隔一段时间用肉浸汤培养基、肉浸汤琼脂培养基或血琼脂培养基进行转种、观察生长现象、染色性、形态,并用 AMS 分析鉴定,必要时作血清学鉴定。

2 结果

2.1 8 种保藏方法保藏菌种的时间

上述 18 种细菌在不同方法的保藏下,其存活时间各不相同,见表 2、表 3。

表2 不同方法对菌种保藏的时间

菌种	保藏时间(月) (4℃)					
	A法	B法	C法	D法	E法	F法
<i>Staphylococcus aureus</i>	>3	>4	>4	>5	>6	>12
<i>Staph. epidermidis</i>	>3	>4	>4	>5	>6	>12
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	—*	>1	>3	>4	>5	>10
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	>4	>3	>5	>5	>10
<i>Strep. pyogenes</i>	—	>1	>3	>4	>5	>10
<i>Escherichia coli</i>	>2	>4	—	>5	>5	>12
<i>Proteus vulgaris</i>	>2	>4	—	>4	>5	>12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>2	>2	—	>4	>5	>12
<i>Bacillus cereus</i>	>3	>4	—	>5	>6	>12

* 表示未用此法保藏

表3 不同方法对菌种保藏的时间

菌 种	G法保藏	菌 种	H法保藏
	时间(年) (-20℃)		时间(年) (-20℃)
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1	<i>Staphylococcus aureus</i>	>13
<i>Enterobacter cloacae</i>	>1	<i>Strep. pyogenes</i>	>7
<i>Bacillus cereus</i>	>1	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	>12
<i>Proteus vulgaris</i>	>1	<i>Strep. pneumoniae</i>	>10
<i>Strep. faecalis</i>	>1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>7
<i>Shigella flexneri</i>	<1	<i>S. typhi</i>	>6
<i>S. paratyphi B</i>	<1	<i>S. paratyphi B</i>	>6
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	<1	<i>S. paratyphi A</i>	>15

2.2 8种保藏方法保藏菌种的时间比较

8种不同保藏方法保藏菌种的时间各不相同: A法保藏菌种时间为2~3月; B法1~4月; C法3~4月; D

法4~5月; E法5~6月; F法为10~2月; G法为1年左右; H法为6~15年。8种保藏方法保藏菌种的时间之比较见图1。

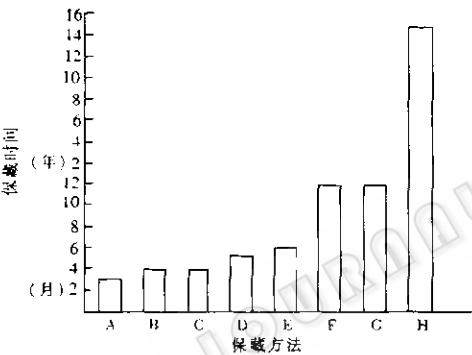


图1 8种保藏方法保藏菌种的时间比较

2.3 4种细菌在不同方法保藏下的时间比较

同一菌种在不同方法的保藏下, 其保藏时间不同。金黄色葡萄球菌、白喉棒状杆菌、肺炎链球菌、铜绿假单胞菌在不同方法保藏下的保藏时间见图2。

2.4 H法保藏的菌种某些生物学特性的改变

经A、B、C、D、E、F、G法保藏时间在1年以内的各菌种, 其染色性、形态、生化反应方面均无异常改变。而经冷冻干燥法保藏时间较长的白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌、甲型副伤寒沙门氏菌和乙型副伤寒沙门氏菌在生物学特性上有不同程度的改变, 见表4。

表4 冷冻干燥法保藏的菌种某些生物学特性的改变

菌 种	保藏时间(年)	生物学特性的改变
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	溶血现象不明显
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	12	生化反应不典型
<i>S. paratyphi A</i>	15	形态多形性
<i>S. paratyphi B</i>	6	不产硫化氢

3 讨论

图1的结果表明: 8种不同的保藏方法保藏菌种的时间各不相同, 其中以冷冻干燥法保藏菌种的时间最长(本实验室已保藏15年), 肉浸汤琼脂平板法保藏菌种的时间最短(2~3月)。8种方法保藏菌种的时间由长到短依次为: H法>G法>F法>E法>D法>C法>B法>A法。

表2, 3的结果表明: 同一方法保藏不同菌种其保藏

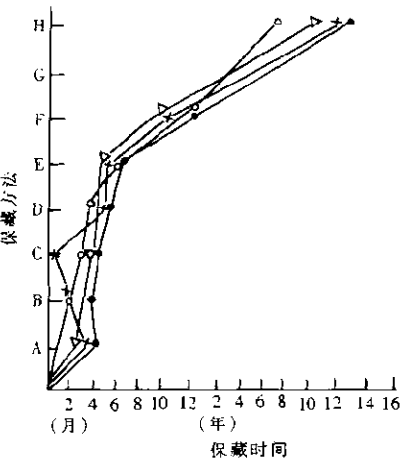


图2 4种细菌在不同方法保藏下的保存时间

1 金黄色葡萄球菌, 2 白喉棒杆菌, 3 肺炎链球菌, 4 铜绿假单胞菌

时间不同。如肉浸汤法保藏蜡状芽胞杆菌、铜绿假单胞菌、乙型溶血性链球菌分别为4月、2月、1月左右。图2结果表明:同一菌种采用不同保藏方法,其保藏的时间也不同。如白喉棒状杆菌经B法保藏时间>1月;C法>3月;D法>4月;E法>5月;F法>10月;H法>12年。

上述结果表明采用不同方法或采用相同方法保藏不同菌种,保藏时间均不相同的结论提示:在实际工作中应根据细菌的种类和需要选用不同的保藏法。如需作长期保存的菌种可选用冷冻干燥法;对常用的菌种可采用A法、B法、C法、D法和E法保藏;对于暂时用不上而在本年度可能用到的菌种,可采用F法、G法保藏。

关于冷冻干燥法保藏菌种是否引起细菌变异,各家说法不一。有认为不会引起细菌变异^[3-4];但有些报告指出“进行冷冻干燥时微生物的性质会发生变

化”^[5,6]。我们的实验结果表明,冷冻干燥法保藏时间较长的有些细菌其某些生物学特性可发生改变(见表4)。此点提示:经冷冻干燥法保藏的菌种再应用时,应作生物学特性鉴定,观察是否发生变异,以免给实际工作造成不利影响。

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,1980,1.
- [2] 李仲兴,郑家齐,李家宏主编. 临床细菌学. 北京:人民卫生出版社,1986,419.
- [3] 冯家兴,张丽君. 微生物学通报,1980,7(3):134~135.
- [4] 张丽云. 中国地方病防治杂志,1996,11(5):272~273.
- [5] 田中,吉纪,余明顺. 国外医学《微生物学分册》,1981,4:167~171.
- [6] 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,1982:54.