

## 经验交流

## 介绍一种长期保存细菌的合成保养液

李洪敏 刘 军 林明贵 李素梅 佟爱华

(中国人民解放军309医院结核中心 北京 100091)

**摘要:** 合成保养液具有细菌生存所需要的各种营养物质, 并能提供新陈代谢中的能量, 使细菌保存10年之久, 是一种长期保存细菌良好的培养基。

**关键词:** 细菌, 合成, 培养基

**中图分类号:** Q93-3 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0105-03

RECOMMENDATION OF A KIND OF SYNTHETIC MEINTENANCE  
LIQUOR TO PRESERVE BACTERIUM LONG

LI Hong-Min LIU Jun LIN Ming-Gui LI Shu-Mei TONG Ai-Hua  
(PLA 309 Hospital, Beijing 10091)

**Abstract:** This Synthetic Meintenance Liquor contains all kinds of nutritive substance that subsist the bacterium, and can preserve the bacterium for nearly ten years by providing energy needed by metabolism. It is a favorable culture medium to preserve bacterum long.

**Key words:** Bacterium, Synthesis culture, Medium

细菌的生存主要依靠培养基的各种营养物质, 培养基质量的优劣直接关系到细菌寿命的长短、生长的状况和是否产生变异。一般培养基保存细菌的时间是1~3年, 到期后必须重新转种, 带来大量工作的同时, 多次转种不同质量的培养基, 也可使细菌产生变异。现介绍一种长期保存细菌10年以上的合成保养液。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

培养基的制备: 硫酸铵 0.5g, 硫酸镁 0.005g, 硫酸锌 0.001g, 硫酸铜 0.001g, 氯化钙 0.0005g, 麸氨酸-钠盐 0.5g, 枸橼酸钠 0.1g, 盐酸吡咯醇 0.001g, 磷酸氢二钠 2.5g, 磷酸二氢钾 1.0g, 蛋白胨 1.0g, 葡萄糖 1.0g, 蒸馏水加至 900mL。

### 1.2 方法

**1.2.1 分装:** 依次加入上述各成分, 待溶解后加 10%肉汤液 100 mL。调 pH 值至 7.4, 高压  $0.7 \times 10^5$  Pa 20min 灭菌, 待冷却后分装小瓶备用。

**1.2.2 接种:** 把细菌接种在小瓶中, -20℃冰冻保存。每5年取出一瓶复苏转种于普通培养基中, 观察其生长情况, 并做生化反应, 无明显变化既可继续保存。

**1.2.3 特殊细菌的保存:** 可根据细菌的特殊需要, 对部分成分进行加减补充。例如, 嗜血杆菌保存时, 应加生长因子 0.0001g。

**1.2.4 结核杆菌保养液:** 把蛋白胨去掉, 换上甘油 2mL。制作方法改成先将蒸馏水 900mL 与甘油 2mL 混合后, 再依次加入各成分, 待溶解后以 10% HCl 调 pH 值至 6.6, 高

压  $0.7 \times 10^5 \text{ Pa}$  20min 灭菌, 待冷却至  $50^\circ\text{C}$  加 5% 小牛白蛋白 100 mL 和触酶 ( $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 2 mL 混合后, 分装小瓶备用。

1.2.5 保养液对比实验: 确诊为结核病的临床分离株 104 例, 以  $10^2 \text{ g}/\text{L}$  菌悬液 0.5mL 接种于①结核杆菌长期菌种保养液, ②7H10 培养液 (美国), ③L-J 固体培养液中, 每种培养液接种 3 瓶,  $-20^\circ\text{C}$  冰柜中保存。每年取出 1 瓶复苏后进行实验分析, 连续观察 3 年。实验分析项目包括: 结核杆菌活动率、菌落计数、抗酸染色、培养液外观变化、生化指标 (I. 硝酸盐还原实验 II. 尿素酶实验)。

1.2.6 各类菌对比实验: 细菌种类包括金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、大肠杆菌、假单胞菌、福氏痢疾杆菌等 5 种常见致病菌, 分别接种于 a. 长期菌种保养液 b. 普通基础培养液 c. 肉汤培养液中, 每种培养液接种 2 瓶共 10 例菌,  $-20^\circ\text{C}$  冰柜中保存。接种及观察方法同上 (无生化指标), 观察时间为 1 年。

### 2 结果

3 年中, 3 种培养液生化指标、菌落计数、抗酸染色差异不大, 结核杆菌活动率和培养液外观变化差异显著 (表 1)。①长期菌种保养液外观变化不大。②培养液复苏化冻后, 部分水分脱出, 培养基变软。培养液出现 12% 干裂现象。以 10 例菌株均值计算, 3 种培养液外观变化差异显著 (表 2)。其中 b 培养液 20% 干裂现象, c 培养液出现总量减少现象。细菌活动率中的金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌差别不大, 而 C. D. E. 3 种杆菌差异显著。

表 1 TB 接种于保养液中的对比实验

年份	培养基种类	外观完好率	TB 菌活动率	抗酸染色	菌落计数	生化指标 I	生化指标 II
1999	a	100%	95%	++++	++++	+	+
	b	100%	92%	++++	++++	+	+
	c	98%	90%	++++	++++	+	+
2000	a	100%	88%	++++	++++	+	+
	b	98%	82%	++++	+++	+	+
	c	95%	75%	+++	+++	+	+
2001	a	100%	80%	++++	+++	+	+
	b	94%	72%	+++	+++	+	+
	c	88%	60%	+++	+++	+	+

表 2 各类菌对比实验

实验项目	A			B			C			D			E		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
外观完好率%	100	80	90	100	80	90	100	70	80	100	70	80	100	70	80
细菌活动率%	98	88	90	95	90	92	95	60	88	94	68	90	96	65	82
革兰氏染色	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
菌落计数	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

### 3 讨论

细菌依靠各种营养物质合成菌细胞本身的成分及其代谢产物, 并提供新陈代谢中的能量, 同时, 也依靠营养物质维持酶的活性或参与酶的组成。培养基的研制就必须考虑到细菌所需要的各种营养物质, 如碳源、氮源、无机盐类和生长因子, 以维持细菌长期在半休眠状态期下的营养。碳源和氮源是合成细菌蛋白质、糖类、脂类的必备原料, 无机盐类是合成菌体结构成分 (如磷脂、核酸、核蛋白、多种辅酶和辅基) 的材料, 也能起到储存和运送能量 (氧化磷酸化) 作用, 还有一些微量元素是细菌酶的辅基成分或是酶的激活剂。所以, 良好的培养基是细菌长期保存必不可少的条件。合成保养液就是基于细菌的特点合理组配研制而成。从上述对比实验得知, 长期菌种培养基随着时间的延长, 越来越显示出它的优势 (见表 1、表 2)。说明培养基质量的优劣, 决定菌种存活率的高低。在细菌长期菌种培养基中, 球菌比杆菌存活率高, 可能与球菌自身保护力较杆菌强有关。从表中还可看出各组培养基细菌活动率均有下降,

可能与细菌的自然死亡有关。一般临床细菌菌株是有选择的长期保存,为临床分析、考证、追踪和基础研究提供实验的标本来源和临床第一手资料。特殊细菌菌株则有极其珍贵的保存价值,是重要的史料。保存细菌的工作,得到越来越广泛的重视。21世纪是信息的世纪,谁掌握尽可能全面的信息,谁就会多几分成功的把握。研制良好的菌种培养基,保存各类不同的细菌菌株,为各单位、各专业提供微生物学方面的信息交流,让各种微生物为人类效力。

### 参 考 文 献

[1] 李洪敏,于玺华,马彦,等.微生物学通报,1999,26(4):280~281.

[2] Wendy M, Gross J Y. *Chin Microbiol*, 1985, 21: 565~569. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>