

肺炎球菌生长培养基和菌种保存方法的研究

钱 海 伦 李 静

(中国药科大学,南京)

摘要 肺炎球菌一般在含血液培养基上才能生长。本文对适合肺炎球菌生长的国外无血液半合成培养基“C + Y”进行改良和借鉴,研制出一种 BYGP-glu 代用培养基,其组分简单,操作方便,便于推广使用。

肺炎球菌存在自溶酶,不易长期保存。本文还试验了在不同低温条件下,几种保护剂保存菌种的效果。结果证明 40% 甘油在 -20°C 保存效果较好,可使肺炎球菌存活 3 个月以上。该法适于实验室保存和使用。

关键词: 肺炎球菌;无血液培养基;低温菌种保存;保护剂

肺炎球菌属链球菌属,常寄生于正常人的鼻咽腔中。致病性肺炎球菌可引起肺炎、脑膜炎和中耳炎等疾病^[1,2]。

肺炎球菌营养要求较高,在普通培养基上生长不良。只有在含血液或血清的培养基上才能生长,但又不能长期保存。由于肺炎球菌不易培养和保存的特点给研究工作带来诸多不便和麻烦,为此,本文对上述两方面进行了研究。本实验的目的是寻找适合于肺炎球菌生长的组分简单、操作方便的无血液培养基,并找出便于肺炎球菌保存和使用的有效方法。

材 料 和 方 法

(一) 培养基

1. C + Y 培养基^[3]: 由下列七种贮备液按一定比例混合而成。

A. Pre-C: 醋酸钠 29, 豚豚(进口) 5g, L-色氨酸 5 mg, L-半胱氨酸 50 mg, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.4—7.6。

B. Supplement: 三合一盐溶液 20 ml, 20% 葡萄糖 40 ml, 50% 蔗糖 2 ml, 腺苷(2mg/ml) 40 ml, 尿苷(2 mg/ml) 40 ml。其中三合一盐溶液为 $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100g, 无水 CaCl_2 0.5g, 0.1M $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 ml, 加入蒸馏水 1000 ml。

C. 谷氨酰胺溶液(1 mg/ml)。

D. Adams III: Adams I 64ml, Adams II 16 ml, 天冬酰胺 800 mg, 胆碱 80 mg, 1% CaCl_2 64ml, 蒸馏水 400 ml。其中 Adams I 为生物素(0.5 mg/ml) 0.06 ml, 菸酸 30 mg, 吡哆醇·HCl 35 mg, 泛酸钙 120 mg, 硫胺素 32 mg, 核黄素 14 mg, 蒸馏水 200 ml。Adams II 为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg, $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, 浓 HCl 1 ml, 蒸馏水 100 ml。

E. 2% 丙酮酸钠溶液。

F. 磷酸缓冲液(pH 8.0)。

Y. 5% 酵母浸膏粉(进口)溶液。

各贮备液比例为: A:B:C:D:E:F:Y = 400:13:10:10:5:15:10。C + Y 液体培养基加琼脂即为固体 C + Y 培养基。

2. C + Y 培养基中各贮备液不同组合构成的培养基: I 至 IX 共 9 种。

3. 实验培养基: 共 16 种, 下面列出 6 种配方, 其余从略。

(1) BYG: 牛肉膏 0.5 g, 蛋白胨 1g, 酵母粉 0.5 g, 葡萄糖 0.1 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 100 ml, pH 7.4—7.6。

(2) BYGP: 牛肉膏 0.5 g, 蛋白胨 1g, 酵母粉 0.5 g, 葡萄糖 0.1 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 0.368g, KH_2PO_4 0.132g, 蒸馏水 100 ml, pH 7.4—7.6。

(3) BGY-glu: 牛肉膏 0.5 g, 蛋白胨 1g, 谷氨酰胺 0.1 g, 酵母粉 0.5 g, NaCl 0.5 g, 葡萄糖 0.1 g, 蒸馏水 100 ml, pH 7.4—7.6。

(4) BYGP-glu: 牛肉膏 0.5 g, 蛋白胨 1g, 酵母粉 0.5 g, NaCl 0.5 g, 葡萄糖 0.1 g, 谷氨酰胺 0.1 g, K_2HPO_4 0.368 g, KH_2PO_4 0.132 g, 蒸馏水 100 ml, pH 7.4—7.6。

(5) BYGA-glu: 牛肉膏 0.5g, 蛋白胨 1g, 酵母粉 0.5 g, NaCl 0.5 g, 葡萄糖 0.1 g, 大牛血清白蛋白 0.1 g, 谷氨酰胺 0.1 g, 蒸馏水 100 ml, pH 7.4—7.6。

(6) BYGPP-glu: BYGP-glu 加入丙酮酸钠 0.025 g。

以上蛋白胨均为进口豚豚 proteose-peptone, oxid; 酵母粉均为 yeast extract, oxid。

4. 不同蛋白胨及其类似物培养基

(1) 用下列成分取代 C + Y 贮备液 A 中的

进口豚豚： 加入上海豚称为 SA，加入天津豚称为 TA，加入国产干酪素称为 CA，加入进口水解酪蛋白 (casein acid Hydrolysate, sigma) 称为 HA。

(2) 用下列成分取代 BYGP-glu 培养基中的进口豚豚：加入上海豚、天津豚、国产干酪素和进口水解酪蛋白 分别称为 SYGP-glu, TYGP-glu, CYGP-glu 和 HYGP-glu。

(二) 实验菌株

肺炎球菌 13 株： 31001、31002、31003、31212、31205、31209、31261、31247、31239、31224、31206、31228、31201。 实验中按顺序用 1—13 表示。均由北京药品生物制品检定所供给。

(三) 实验方法

1. 培养基生长实验:

(1) 液体培养法： 取出 -20℃ 保存菌种，接种 C + Y 培养基。 37℃ 培养过夜至明显混浊，再取此菌液接种实验培养基，并以 C + Y 作为对照。 37℃ 培养 5 小时 (肺炎球菌易自溶，需掌握适当时机，因菌而异)，观察液体培养基是否混浊。

(2) 平板计数法^[4]： 取出 -20℃ 保存菌种，接种 C + Y 活化一次(同上)，然后再接种 C + Y 培养至 10⁸ 活菌/ml、用 721 型分光光度计测定 OD_{660nm} 为 0.2—0.4，然后进行 10 倍稀释，配制药液浓度为 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²活菌/ml，接种实验培养基，接种量 10 μl。 37℃ 培养 18—24 小时，观察菌落数和生长情况。

2. 菌种保存试验:

(1) 加入保护剂的低温保存法： 将生长良好的肺炎球菌培养液(约 10⁸ 活菌/ml)，用甘油和二甲基亚砷 (DMSO) 各含 10% 和 40% 两种浓度作为保护剂，分别在 4℃ 和 -20℃ 保存，

每月定期用液体培养基做菌种存活 的检查。

(2) 液体石蜡过冷保藏法： 用液体石蜡覆盖液体培养物，然后搅拌成乳化层，放 4℃ 及 -20℃ 冰箱保存。

结 果

(一) C + Y 贮备液不同组合构成的培养基对肺炎球菌生长的影响

肺炎球菌在 9 种由贮备液不同组合构成的培养基中生长状况均不及 C + Y。由此证明，各贮备液缺一不可。

(二) 16 种实验培养基对肺炎球菌生长的影响(表 1)

从表 1 结果看出，肺炎球菌 31206 接种在 16 种培养基中，仅 BYG、BYGP、BGY-glu、BYGP-glu、BYGPP-glu 和 BYGA-glu，六种培养基较适合于肺炎球菌的生长。

(三) 13 株肺炎球菌在 BYG 等六种培养基中生长情况

实验结果证明，13 株肺炎球菌在 BYG、BYGP、BGY-glu、BYGP-glu、BYGPP-glu 和 BYGA-glu 六种培养基上均可生长。

(四) 用平板计数法比较肺炎球菌在六种培养基中的生长情况

从表 2 结果可知： 在六种培养基上，两株肺炎球菌的菌落数均与 C + Y 近似，但多数菌落小，不典型，生长状况不佳。只有BYGPP-glu 和 BYGP-glu 两种培养基上的菌落不仅数量多，而且菌落大，两者之间没有明显差别，可与 C + Y 培养基上的菌落相比。

(五) 不同蛋白胨及其类似物对肺炎球菌生长的影响

13 株肺炎球菌接种在 SA、TA、CA、HA 培养基和 SYGP-glu、TYGP-glu、CYGP-glu、

表 1 肺炎球菌在 16 种培养基中生长情况

培养基	BY	BS	BPYG	BYG	BYGP	BA	BYA	BPY	仿 BFA	BPY-glu	BGY-glu	BG	BM	BYGP-glu	BYGPP-glu	BYGA-glu	C + Y
菌株 31206	+	-	++	+++	++++	-	+	++	+	++	+++	-	++	+++	++++	++++	++++

注：浊度以 C + Y 是“++++”为标准进行比较。

表2 2株肺炎球菌在六种培养基上生长情况比较

菌浓度		培养基	BYG	BYGP	BGY-glu	BYGA-glu	BYGPP-glu	BYGP-glu	C+Y
31001 菌	10 ²		+	+	+	+	+	+	++
	10 ³		++	+	+	+	++	++	+++
	10 ⁴		++	++	++	++	+++	+++	+++
	10 ⁵		++++	++++*	++++	++++	++++*	++++*	++++*
	10 ⁶		++++	++++	++++	++++	++++*	++++*	++++*
31002 菌	10 ²		+	+	+	+	+	+	++
	10 ³		++	++	++	++	++	++	+++
	10 ⁴		+++	+++	+++	+	+++*	+++*	+++*
	10 ⁵		++++	++++	++++	++++	++++*	++++	++++*
	10 ⁶		++++	++++*	++++	++++	++++*	++++*	++++*

注: “+”生长 1—10 个菌落; “++” 11—50 个菌落; “+++” 51—100 个菌落; “++++” 101 以上个菌落; “*” 示菌落大而典型

表3 -20℃ 低温菌种保存结果

保存期	保护剂	菌 株													保护率(%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
一个月	甘油 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	40%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	DMSO 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	40%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
二个月	甘油 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	40%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	DMSO 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	40%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
三个月	甘油 10%	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	53.3
	40%	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	92.3
	DMSO 10%	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	69.2
	40%	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	61.5

HYGP-glu 培养基上均能生长良好。说明 BYGP-glu 和 C+Y 两种培养基中蛋白胨可采用国产蛋白胨(天津胨和上海胨)、国产干酪素或进口胨、酪蛋白水解物等多种材料代替。材料来源广泛,为基层工作提供了有利条件。

(六) 肺炎球菌保存试验

肺炎球菌于 4℃ 甘油和 DMSO 保存, 13 株菌在一个月全部死亡。液体石蜡保存于 4℃ 或 -20℃, 菌株均于一个月全部死亡。 -20℃ 甘油和 DMSO 保存的结果见表 3。

讨 论

C+Y 培养基是国外使用的无血液半合成培养基, 适于肺炎球菌的生长。但该培养基组

成复杂、操作麻烦, 故考虑对其进行改良和借鉴。从实验结果可知: C+Y 虽然有七种贮备液共 30 多种组分, 但自成体系, 贮备液缺一不可。故直接把 C+Y 简化, 仍求适合肺炎球菌生长的想法不切实际。从 C+Y 成分分析, 不难看出: 它的与众不同之处在于含有多种生长因素(氨基酸、维生素和核酸类物质), 可取代血液中的特殊营养成分, 从而迎合肺炎球菌苛刻的营养需要。在 C+Y 和其他培养基成分分析的启发下, 我们设计了 16 种不同的配方, 最后得到 6 种较好的配方, 其中 BYGP-glu 和 BYGPP-glu 可与 C+Y 相比。而前者比后者少一个组分, 更为简化。因此本文推荐使用 BYGP-glu。该培养基含有酵母膏、牛肉膏等

天然有机化合物。其中不乏各种生长因素，加上较大量的谷氨酰胺作为氮源和生长因素，酵母粉、蛋白胨作为氮源；牛肉膏、酵母粉、葡萄糖作为碳源，又有无机盐 NaCl 和磷酸盐的存在，故得到了与 C + Y 相近似的培养效果。实验中曾考虑用小牛血清或大牛血清白蛋白代替血清，结果并不理想。

从菌种保存的结果分析可以知道，40% 甘油 -20°C 的保存效果较好。可维持 92.3% 的肺炎球菌存活 3 个月以上。而 4°C 不适合该菌的保存。国外常规使用的肺炎球菌液体培养物，以 10% 甘油做保护剂 -70°C 保存效果很好，可保存细菌活力数年以上。但鉴于国情，一般基层单位不具备 -70°C 超低温冰箱，故缺乏实际意义。国内曾报道^[1]，用新鲜脱纤维羊血肉浸液做保护剂，冻干菌种效果较好。我们研

究了不需血液的 40% 甘油做保护剂的 -20°C 低温保存法。该法适于实验室保存，菌种取用方便，用后仍可放回 -70°C 继续保存，易于推广使用。

另有文献报道，过冷保藏法即利用液体石蜡和培养液一起搅拌所得到的乳化层，可保护细胞的娇嫩结构， -20°C 过冷状态又延续细胞代谢，具有很大的优越性。但本实验结果表明，该法不适于肺炎球菌的保存。

参 考 文 献

- [1] Fingold, S. et al.: Diagnostic Microbiology (第 5 版), p. 138—141, 1978.
- [2] 余震: 医学微生物学(第 2 版), 人民卫生出版社, 第 231 页, 1983.
- [3] Zighelboim, S.: Thesis in Rockefeller University, 1980.
- [4] 路文彬等: 微生物学通报, 13(5): 214—218, 1986.
- [5] 肖磊等: 微生物学通报, 12(5): 220—223, 1985.