

厌氧菌的菌种保存

熊德鑫

(江西省科学院微生物研究所)

在临床检验和医学微生物学的研究工作中,经常分离到细菌,接触到菌种。菌种是国家重要的一种生物资源,菌种的保存不仅有利于重现已经作过的研究,证实发现新的菌属和菌种,而且也是研究、推广、开发和实际应用科研成果的基础。因此,菌种保存工作在细菌学中至关重要。

菌种保存的基本要求是:1.菌种保存中应尽可能地长时保留其活力;2.菌种保存时应尽量避免发生质的变异;3.因细菌的种类不一,保存的难易也不同,最好对不同菌属、菌种,选择最有效的多种保存方法^[1]。

厌氧菌不同于需氧菌或兼性菌。厌氧菌在大气中不能存活。氧气(或分子氧)对厌氧菌有毒性,这与厌氧菌中细胞色素氧化酶、触酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶等缺如或活性低以及菌细胞中主要结构(如DNA和mRNA)对分子氧的敏感程度、胞内酶的位置,毒性产物(如 H_2O_2 、 O_2^-)形成量等有关。同时,厌氧菌的发育还直接受环境中的氧化还原电势(Eh)的影响,厌氧菌中不少菌种只有在低Eh环境中才能发育,所以在厌氧菌的分离、培养时,既要除去小环境中的分子氧,又要尽可能地设法降低培养基的Eh。对于厌氧菌的保存,也必须注意厌氧菌不具有细胞色素酶系,不能以分子氧作为最终电子受体,且由于分子氧对其具有毒性这一重要特点,在做厌氧菌的保存工作时必须注意排除分子氧^[2]。就目前有关菌种保存的文献来看,厌氧菌菌种保存工作仍然是一个难题。尤其是国内厌氧菌的保存技术条件尚受一定限制,故不免出现有的厌氧菌菌种保存不佳的情况。这不仅给实验室诊断和研究工作带来困难,而且成为厌氧菌技术推广的障碍。下面就笔者工作以来的体会结合有关文献,论述厌氧菌保存较为有效的方法。

一、传代培养保存法^[3]

这种方法是一般的检验室都在使用的方法。从保存厌氧菌为目的来说,应注意如下事项:

1.用于传代保存厌氧菌的培养基:(1)培养基中含糖类物质的浓度在可能的范围内应尽量降低;(2)培养基中其它营养物质的浓度也只以能使生长发育为度;(3)培养基中注意添加适量还原剂如硫乙醇酸盐、L-半胱氨酸等;(4)尽可能使用新鲜或预还原处理后的培养基;(5)许多厌氧菌能酵解碳水化合物产酸,故宜预先在保存培养基中加入弱碱性物如无水碳酸钙(0.1g/20ml)或用几小片大理石代替;(6)传代培养基中加入适量的琼脂(0.1%、0.25%或0.5%,视琼脂牌号而异),既可防止保存培养基干缩,又可阻止分子氧侵入培养基

中；(7)保存培养基中加入适量的Eh指示剂如美兰水溶液或刃天青溶液(0.1—0.25%)。

2. 注意培养温度和菌种保存的温度：用于保存的菌种，一般选用稍低于厌氧菌最适温度进行培养(对人体分离菌，我们实验室采用35℃)，以避免因繁殖速度过快代谢产物浓度过高，使培养基的pH值改变而影响活菌数量。此外，保存温度以室温低于18—20℃避光保存为佳，否则极易造成保存菌株的死亡。这是因为低温时分子氧易进入培养基之故。我们曾进行过比较，至4℃冰箱中传代保存厌氧菌2个月左右，死亡约80%；而在20℃左右的室温中保存同种厌氧菌，死亡率小于20%。

3. 其它应注意的事项：(1)从增菌培养基接种到保存培养基时，我们采用巴氏(Pasteur)吸液管吸取菌浓度 10^8 /ml以上的菌液0.2ml，直接插入保存培养基试管的底部，注意勿将气泡带入，最好在过铜柱气体喷射下操作。不能用白金环(针)接种。在大气中操作时易使厌氧菌死亡。我们认为在厌氧菌罩中接种最好；(2)一般1—3个月传代一次，不超过6个月，传代时间视所保存的菌种而异；(3)为防止保存培养基干缩，可加灭菌的20%甘油或1cm厚的灭菌液体石蜡，用异丁烯橡胶塞或螺旋盖拧紧；(4)被保存的菌株至少传种2管。我们传3—5支小试管；(5)进行保存菌株时应定时对其性状(生化性状、菌落形态、革兰氏染色性和菌体形态及色素产生等)作检查。

4. 传代培养基的选择^[4]：不同属种的厌氧菌选择相应的培养基保存。如：

(1)放线菌肉汤培养基：

磷酸钾 15.0 g 硫酸镁 0.2 g 氯化钙 0.01 g 肉膏 25.0 g
葡萄糖 5.0 g 半胱氨酸 1.0 g 酵母 5.0 g 可溶性淀粉 1.0 g
胰酶酪蛋白(trypticase) 4.0 g 蒸馏水 1 600 ml pH 6.9

(2)韦荣氏球菌培养基：

胰酶酪蛋白 5.0 g 酵母 3.0 g 乳酸钠 15.0 g 硫乙醇酸钠 0.75 g
吐温-80 0.75 g 葡萄糖 1.0 g 蒸馏水 1 000 ml pH 7.5

(3)巨球形菌培养基：

磷酸二氢钾 1.6 g 磷酸氢二钾 3.2 g 60%乳酸钠 1.6 ml 酵母 4.0 g
氯化铵 0.5 g 氯化钙 0.2 g 硫乙醇酸钠 0.45 g 氯化镁 0.2 g
琼脂 1.0 g 蒸馏水 1 000 ml pH 7.0

我们认为，芽胞厌氧菌使用庖肉培养基，一般无芽胞厌氧菌使用GAM培养基为好。无芽胞厌氧菌如用庖肉培养基，保存时短，效果也差。

(4)庖肉培养基：

新鲜制备的牛肉浸液和牛肉渣，按10:1装入，上盖3—4 mm凡士林，高压灭菌后备用。

(5)GAM培养基：

蛋白胨 10.0 g 胰蛋白胨 10.0 g 大豆胨 3.0 g 肉浸膏 2.0 g 酵母浸膏 5.0 g
可溶性淀粉 0.3 g 肝浸膏 1.2 g 0.05%氯化血红素溶液 10 ml 氯化钠 3.0 g
L-半胱氨酸 0.3 g 硫乙醇酸钠 0.3 g 磷酸二氢钠 2.5 g 葡萄糖 2 g
琼脂 1 g 蒸馏水 1 000 ml pH 7.2

5. 评价：传代保存厌氧菌的方法比较简便，操作条件和技术要求不高，容易做到和推广，效果可以。不足之处：(1)易污染杂菌或引致死亡；(2)易发生包括生化性状、菌落形态、菌体形态、色素产生、毒力、抗原结构等遗传性状的变异；(3)大批菌种保存仍然费时费

力, 定时传代也费事。菌种在传输途中不方便。

二、预还原灭菌培养基保存法

1. 方法: 预还原灭菌培养基开始由Hungate^[5]在无氧条件下创用转管法(Roll tube method), 以后又改进为气体喷射法制作。国内已有过铜柱装置, 方法都是将二氧化碳气流通过铜柱, 使其成为高度除氧, 在高纯度二氧化碳喷射下排除培养基中的氧气, 再移植或接种细菌至预还原灭菌的培养基上。其注意事项与传代保存法同。铜柱中的铜使用后, 可以通过氢气还原过程反复用。

2. 用途: 此法开始用于医学微生物生态学研究中, 后在日本等国较广泛地用于厌氧菌的保存中。一般用预还原灭菌 GAM 培养基加入几小片无菌大理石, 能保存多种无芽胞厌氧菌, 保存时间6个月至1年已获成功。尤其用于从口腔分离的产黑色素拟杆菌等, 保存效果好。我们从日本引进的参考菌种就是用此法保存的。开启上述参考菌种时, 存活率也较高。

3. 评价: 本法因接种、培养过程都在高纯度的二氧化碳气中进行, 在厌氧菌的分离、分纯、培养时使用外, 还用于菌种的保存。此法要求一定设施, 操作仍较繁杂, 实验室如具备上述条件即能应用。

Justesen等^[6]发现, 在纯二氧化碳环境中, 几乎完全抑制了梭状芽胞杆菌属中的产气荚膜杆菌的生长, 此外消化链球菌属如暴露于其中经1h也可受到抑制或杀死, 对脆弱拟杆菌则无影响。因此, 在保存梭菌属和消化链球菌属时, 用此法则应注意其不良后果。

三、低温保存法^[4,7,8]

对于易致死亡较难保存的无芽胞厌氧菌, 最好选用低温保存法。用此法, 有时可保存厌氧菌长达数年。

1. 预冻措施: 厌氧菌在低温保存过程中, 容易形成菌细胞外部和内部冻结, 视冷冻速度被保存的菌细胞大小及种类而异。因此, 使用低温时应尽可能避免细胞内冻结。一般都应预冻。此外, 对数期生长繁殖的菌细胞最好使用低温保存, 因它们对低温抗力强, 例如我们对脆弱拟杆菌菌株用24—48h的培养物, 真杆菌属则选用36—72h的培养物为好。同时, 还选择较高菌浓度来保存。菌浓度越高, 存活率越高, 保存期也长。我们将要保存的菌选用最佳增菌培养基, 先增菌后再保存。准备用低温保存的菌液, 一般不宜加电解质(如氯化钠)。即使要加入, 也应尽量把含量控制在最小范围内, 因为氯化钠的共晶点为 -21.6°C 。如用含有较大浓度氯化钠的菌液, 在达到共晶温度时, 菌细胞易处于盐的有害作用致细胞变性。

2. 防冻剂和分散剂的选择: 低温保存厌氧菌过程中, 为防止胞内或胞外冻结, 宜在保存的菌液中入适量的防冻剂。常用的防冻剂有: (1)15—20%灭菌甘油, 可防止胞外冻结; (2)10%二甲基砒(DMSO), 也有防冻作用; (3)上述浓度的甘油、二甲基砒(DMSO)以1:1的比例加入, 防冻效果更好。添加防冻剂时宜注意: 防冻剂加入浓菌液时宜先静置15min左右, 后尽快地预冻。

分散剂是用于菌种细胞在冷冻干燥过程中免受破坏的某些物质, 它们也具有防冻作用, 常用的有: (1)脱纤维羊血, 兔血或马血: 美国疾病控制中心常用脱纤维羊血; 日本光冈等^[2]常用脱纤维马血, 我们用脱纤维兔血和羊血, 效果都不错。(2)脱脂牛乳: Sutter^[9]、铃木、

上野^[7]等常用灭菌的20%脱脂牛奶,加入浓菌悬液或直接从培养皿上刮菌加入,他们用此法保存过许多厌氧菌株,即使难于保存的具核梭杆菌和产黑色素拟杆菌等,用此法作分散剂,也能存活2年以上;韦荣氏球菌可存活10年。我们用20%脱脂牛奶加入0.1%谷氨酸钠和0.03% L-半胱氨酸,或单一地用20%脱脂牛奶,保存了脆弱拟杆菌、普通拟杆菌、消化链球菌、具核梭杆菌等10多种厌氧菌菌株,9个月后仍证明存活。(3)含7.5%葡萄糖的马血清。(4)等量的脱纤维羊血和脱脂牛奶,效果也不错。

3.评价:低温保存厌氧菌菌种方法比较简便易行,只要有低温冰箱(我们用的是-30℃低温冰箱)就可行。它比传代保存法优越,保存时间较长,且不易发生污染和变异。此法不如用液氮保存法存活率高,但是较液氮保存法节约。如采用得法,效果是好的。

四、液氮保存法

这是保存厌氧菌种最好的方法。其存活率高,操作又较简便,只要具备液态氮,使用此法最可靠。

1.方法:(1)预冻措施一般以每分钟温度下降1℃左右的速度预冻,最好置于95%乙醇干冰中预冻,时间大约30—60min。我们曾先置普通冰箱(4℃)经10min,再移入-30℃低温冰箱中经20min,再置液氮瓶中,效果较好。(2)置液氮瓶罐中,液氮瓶分大小两种,小瓶最大10 l,大瓶100 l以上。装罐时可将一般安瓿(一定要能耐低温的)放入L型挂筒中,也有人^[10](用塑料安瓿的,我们用的是螺旋盖特制玻璃安瓿)把挂杆压于液氮瓶口的竖沟内,压紧盖即可。大液氮罐一般分贮藏槽和液氮槽两部分,中间有通气道,装罐方法同上。(3)液氮罐加样后,应根据液位计和试样测温器添加液氮和调节槽温。

2.注意事项:(1)装罐时,操作者要预防在操作时被冻伤。(2)注意保存菌的安瓿要熔封密闭。(3)安瓿管一般应用含硅玻璃等特制,或使用塑料管、聚脂袋盛装样品。(4)注意液氮的残存量,宜定时、定量添加,一般估计每周可蒸发1/10容量,适当添加液氮。

我们用脱纤维羊血、脱纤维羊血加牛乳、20%脱脂牛奶和脱纤维兔血以及甘油等作分散剂和防冻剂,封好安瓿置液氮罐中,已保存普通拟杆菌、脆弱拟杆菌、消化链球菌、真杆菌等10多种厌氧菌,历时11个月,存活情况良好。最近我们又用此法保存了二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophaga*)的三个菌种几个菌株,以及产黑色素拟杆菌等几个菌株,半年内存活情况良好。

表 1 脆弱拟杆菌液氮保存法存活情况

保存时间	脱纤维羊血	脱纤维羊血 + 牛奶	牛奶	脱纤维兔血	脱纤维兔血 + 20%牛奶	15—20% 甘油	兔血清
一个月后	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
三个月后	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
六个月后	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++

注:“+++”示存活良好,“++”示存活尚好。

3.评价:液氮保存厌氧菌的方法是目前最好的保存方法,与其它方法相比,此法技术操作简单,保存效果最好。但需具备液氮罐,且由于液氮蒸发较快,每周都需注意定量添加液

氮,这在基层单位是难于办到的。液氮价格较贵,如需长期保存菌种,有的单位也难于坚持施行。相比之下,低温保存法比液氮法较方便,适于在基层单位推广。

五、冷冻干燥保存法^[4,8]

1.原理:已冷冻的厌氧菌在减压时,因升华除去水分,菌细胞大部分在除去水分后,其生理活动处于最微弱的状态,被保存的菌株能长期维持存活状态。

2.注意事项:(1)选择营养丰富的培养基增菌,使准备以冷冻干燥法保存的菌株的浓度达 10^9 — 10^{10} /ml以上。(2)一般用静止期菌细胞冷冻干燥。(3)分散剂:主要用10—20%脱脂牛奶或含7.5%葡萄糖的血清、10%乳糖(加入0.1%谷氨酸)溶液、干燥合剂(见下配制法)等。分散剂使用前置沸水中煮沸15min驱逐气体后立即冷却,含血清的分散剂要在滤过灭菌后置厌氧环境中预还原24h以后备用。(1)含7.5%葡萄糖血清的配法:不含水的葡萄糖3.0g,加于不含防腐剂自然凝固后的无菌马血析出血清40ml中,用蔡氏滤菌器灭菌。(2)干燥合剂的配法:葡萄糖3.0g,普通肉汤粉(Difco)0.13g,加蒸馏水10ml,徐徐地加入不含防腐剂的马血清30ml,混合均匀,滤过灭菌后分装安瓿。(3)我们使用的分散剂是20%脱脂牛奶加入0.1%谷氨酸钠和0.03%L-半胱氨酸,也有保存效果。(4)迅速地预冻:可选用干冰(固相 CO_2)、95%乙醇或在 -30°C 以下的低温冰箱中进行,应尽快地将要保存的菌株处于冻结状态。我们一般将它们置于 -30°C 低温冰箱中30—60min。(5)冷冻干燥机和干燥剂的选择:冷冻干燥过程一般是在冷冻干燥机内进行,我们使用的LC-3型多用冷冻干燥机(宁波市庄桥机电厂制造)冷冻时间虽稍长些,但效果尚好。冷冻干燥时的温度宜在 -30°C 或 -40°C 以下。干燥剂可选用:(1)无水硫酸钙(其再生温度为 230 — 250°C);(2)硅胶和活性氧化铝(其再生温度为 150°C 和 175°C);(3)无水氯化钙或五氧化二磷(干燥作用强,但不能再生);(4)我们使用的是钙5A型分子筛(上海分子筛厂生产)效果较好(其再生温度为 210 — 230°C)。一般说来对厌氧菌的存活,冷冻干燥时间越短越好。干燥终点的判定,我们以一盛有1—2%氯化钴的安瓿来判断。当安瓿呈深蓝色时则判为干燥已达终点。有时我们也可从冷冻干燥机孔来进行观察,一旦干燥成可脱落的块状时也认为已达干燥终点;(6)菌种干燥后应在同时抽真空的情况下,用真空度检测器测管呈显紫红色光时,则封口。已干燥好的菌种管置暗处冷藏为宜。有人试验在不同温度下与已冷冻干燥的菌种管内的存活关系,证明冷藏比室温下保存前者的存活率要高。

3.评价:冷冻干燥法适于大多数厌氧菌种的保存,有利于贮存和输送,国外菌种保藏中心如ATCC(美)、NTCT(英)都使用此法保存厌氧菌株。从目前国内情况来看,用此法保存厌氧菌菌种,存活情况一般尚不够理想,这可能与如下几点有关:(1)选择分散剂不够理想,厌氧菌中许多不能抵抗冷冻干燥过程而死亡;(2)预冻和干燥时间过长,尤其是后者,冷冻干燥过程长,对需氧菌影响不大,可是厌氧菌不能耐受分子氧的毒性作用。目前不少国产的菌种干燥机,干燥过程需要36h以上,效果不好;(3)菌种管封口时接触大气时间较长,或由于封后的菌种管内真空度不够。尤其是干燥终点尚未达到的菌种管易致死亡。分子氧对厌氧菌的毒性作用表现在:厌氧菌细胞膜的DNA合成部位,由于合成DNA受阻而致死;(4)干燥后的菌种管未置暗处避光冷藏。菌种复苏时,除了选择最佳的培养基外,操作应尽可能避免在大气中进行。若有条件,在厌氧罩中操作较好。总之,厌氧菌的冷冻干燥过程比

一般需氧菌要求特殊、严密,重要原则是:每一个环节都应尽量缩短与大气接触的时间,只有这样才能保证冷冻干燥后的厌氧菌株有较高的存活率。

我们曾做过传代保存、低温保存、冷冻干燥保存和液氮保存等法,保存脆弱拟杆菌等10余种厌氧菌菌种,并作了比较(表2)。

表2 4种菌种保存方法效果的比较

保存时间	传代保存法			低温保存法				冷冻干燥法	液氮保存法			
	BHI 培养基	GAM 培养基	肉 培养基	牛奶	羊血	羊血与 牛奶	兔血	牛奶与 分散剂	牛奶	甘油	牛奶与 羊血	兔血
一个月后	7/10	6/10	5/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
三个月	5/10	5/10	3/10	9/10	8/10	8/10	7/10	18/20	10/10	9/10	10/10	10/10
六个月	3/10	3/10	2/10	9/10	7/10	8/10	7/10	66/70	10/10	9/10	10/10	10/10
九个月	☆	☆	☆	☆	☆	☆		16/20	5/5	4/5	5/5	10/10

注:表中分母数字代表开启后复苏的菌株数,分子数字代表存活的菌株数;

• 由于此时参加全国厌氧菌数值考核鉴定工作,需要提供菌株,影响了传代保存的菌株数;

☆此时因我们的科研大楼实验室中停电8天以致死菌太多,未能进行比较试验。

从表2中可见厌氧菌最好的保存方法是液氮法,其存活率最高,但需定期地添加液氮,既不经济也较烦琐,尤其是携带运输不便,这是其不足。低温保存法存活率也好,它比液氮法方便,但它受电源供应的影响,我们就曾因此造成不可弥补的损失。冷冻干燥法存活率虽不如上两法,但它远比传代保存法优,携带运输也方便。不难理解,传统的传代保存法对于厌氧菌种的保存显得弊多利少一些。我们认为虽各法有其长短,但在实验室中一个菌种如能利用上述方法中的几种方法保存就可截长补短,较稳妥无误。

在厌氧菌菌种的保存方法中,尚有明胶片干燥保存法和毛细套管保存法等。明胶片干燥法是将含有明胶的分散剂制备的浓菌液 10^9 — 10^{10} /ml滴于蜡纸上真空干燥,成大小均匀的盘状物,或将含有明胶的分散剂制备的浓菌液滴于无色硅胶(其大小:6—16目)粒上,进行干燥。此法的优点是简便。铃木^[7]曾用此法保存脆弱拟杆菌,存活2年以上。

毛细套管保存法是将浓菌液装入灭菌的小管内,再将小管装入底部置有干燥剂的大试管中,大试管用插有玻璃毛细管的硬质橡胶塞封紧,毛细管上端与真空泵连接,抽真空(10^{-2} torr左右)后封毛细管口即可。此法简便,但保存厌氧菌的时效有待详细的对比工作说明。

主要参考文献

- [1]熊德鑫译:《厌氧菌的分离和鉴定》,江西科技出版社,1986年,第42页。
- [2]光冈知足:《肠内菌の世界》,东京,丛文出版社,1980年,第30页。
- [3]Martin, S.M.: Ann.Rev.Microbiol., 18:1, 1964.
- [4]根井外喜男编,金连缘译:《微生物保存法》,上海科技出版社,1982年,第265页。
- [5]Hungata, R.E.: A Roll Tube Methods for Cultivation of Strict Anaerobes, p.177, London and New York, Academic Press, 1969.

- [6] Justesen, T. et al.; Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 84(13): 51—56, 1976.
- [7] 铃木祥一郎, 他: 《嫌气性菌》, 东京, 医学书院, 1974.
- [8] Lapage, S. P. et al.; Culture Collections and the Preservation of Bacteria, p.135 London and New York, Academic Press, 1970.
- [9] Suteer, V. L. et al.; Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, T. C. V. Mosby Company, S. J. Louis, Toronto, London, 1980.
- [10] 何道生等: 厌氧菌的液氮保存法, 《第三届全国正常微生物群学术讨论会》, 广州, 1985年.
- [11] Steel, K. J. et al.; J. Appl. Bacteriol., 26: 37, 1963.
- [12] Sourek, J.; Int. J. Syst. Bacteriol., 24: 358, 1974.

《陕西农业科学》1988年征订启事

《**陕西农业科学**》是陕西省农业科学院主办的综合性农业科学技术刊物。办刊宗旨是立足本省, 面向全国, 贯彻“双百”方针, 提高与普及兼顾, 以应用科学技术为主要内容, 突出黄土高原旱农地方特色, 反映本省农业科研和生产技术水平, 促进学术交流, 为实现农业生产现代化服务。主要栏目有: 旱农、试验研究、讨论与建议、推广与应用、国外科技、专题讲座、科技文摘等。以农业科研人员、农业院校师生、农业管理干部及基层农技推广人员为主要读者对象。本刊为双月刊16开本, 48页, 定价0.40元, 代号: 52—50, 各地邮局(所)均可订阅。编辑部地址: **陕西省杨陵镇, 陕西农业科学院。**

《宁夏农林科技》1988年征订启事

《**宁夏农林科技**》是宁夏农林科学院主办的综合性农业科技刊物, 主要反映宁夏回族自治区农业科研的新成果, 以及生产中的新技术, 新经验, 同时普及农业科学知识, 介绍国内外重要农业科技动态, 报道内容包括农业、林业、畜牧兽医、水产、农田水利、农业气象等专业, 对各级农(林、牧、渔)业科研、教学、生产单位和业务行政部门的农业科技人员都有参考价值。本刊为双月刊16开本, 56页码, 定价0.35元, 全年2.10元。刊号74—3, 银川市邮局发行, 全国各地邮局(所)均可订阅。编辑部地址: **银川市三支沟宁夏农林科学院。**