

## 微生物菌种传代与保藏

### 一、菌种保藏的意义

菌种是从事微生物学及生命科学研究的基本材料，在医学领域中，诊断制品的制备，菌苗的生产、微生物致病性研究，药物的抑菌试验及药品微生物检验等都有一套完整的菌种。微生物具有生命活力，在传代过程中易发生变异甚至死亡，因此菌种保藏是一项重要的基础工作，是微生物学基础工作的一项重要内容，也是药品微生物工作中的一项常用技术。

如药品中的控制菌检查使用的阳性对照菌须防止因多次传代而使阳性对照菌的典型生物学特征发生变化及菌株的死亡，保证达到菌种长期正确的形态；

如药品微生物学检验过程中，检出的可疑致病菌须妥善保藏，以达到进一步鉴定的目的，保证用药安全。

### 二、菌种代号的意义

国内药品微生物检验所用的菌种代号是

CMCC (F) 或 CMCC (B)

CMCC —— 中国医学菌种保藏中心

B —— 代表细菌，

F —— 代表真菌。

大肠杆菌 [CMCC (B) 44102]

乙型副伤寒沙门杆菌 [CMCC (B) 50094]

铜绿假单胞菌 [CMCC (B)10104]

金黄色葡萄球菌 [CMCC (B)26003]

生孢梭菌[CMCC(B)64941]

白色念珠菌[CMCC(F)98001]

### 三、常用菌种保藏方法

#### (一) 菌种保藏的原理

根据微生物的菌种生理、生化特性，在人工创造的条件下尽量降低微生物细胞的代谢强度，使细胞基本处于休眠状态，生长繁殖受到抑制但又不至于死亡，以减低菌种的变异率。低温、干燥、缺氧、缺乏营养等环境条件都有抑制微生物的代谢作用。因此，低温、干燥、真空是用于菌种保藏的重要手段。

选择保藏方法时，首先应考虑方法能否长期地保持菌种原有的特性，同时也应兼顾到方法的经济和简便。在实际工作中，往往多种条件同时使用，以提高保藏效果。

#### (二) 菌种保藏步骤

- ① 挑选特征典型的纯菌菌落；
- ② 确定保藏合适菌体形态；
- ③ 选择最适宜的保藏方法；
- ④ 定期对保藏菌种进行检查，观察是否发生变化，若有变化，须改变保藏方法。保藏期满应及时进行移种。

### 1. 琼脂斜面低温保存法

(1) 方法：将经常使用的菌种的典型菌落接种在斜面（某些特殊菌种可用液体培养基）上，按规定的温度和时间培养，待充分生长后，把培养好的新鲜菌种用牛皮纸包好，为减缓培养基的水分蒸发，延长保藏时间，可将菌种保藏管的棉花塞换成橡胶塞。放在 4℃ 左右的冰箱中保藏。每隔 2~3 个月移种一次，继续进行保藏。若用半固体高层培养基穿刺培养，一般可保藏半年 ~ 一年。有的甚至更长时间。

(2) 适用范围：细菌、酵母菌、霉菌保藏。

菌种	培养基	保存温度	传种时间
细菌	一般多用于营养琼脂或根据菌种规定选用培养基	4~6℃	芽孢杆菌 3~6 个月，其它细菌每个月
酵母菌	一般用麦芽汁琼脂或麦芽汁酵母膏琼脂	4~6℃	一般 4~6 个月
丝状真菌	一般用 PDA 琼脂、蔡氏琼脂或麦芽汁琼脂等	4~6℃	每 4 个月移植一次（每 2 个月移植一次）

(3) 特点：

优点是——简便，易于推广；一般不需要另选择保藏用培养基；对大多数微生物都适用。

缺点是——保藏期太短；传代次数多，易发生变异及污染。

(4) 注意事项：

- 保藏的菌种应是生命活力旺盛的新鲜培养物，至少应是第三代的培养物。
- 保藏时，破伤风杆菌可用庖肉培养基；生孢梭菌用流体硫乙醇酸盐培养基。
- 必须定期检查保藏菌种冰箱的温度、湿度以及菌种管的棉塞是否松动或生霉，如有异常应及时处理。
- 每次移植后，应与原菌种的编号、名称逐一核对，确证培养基特征和纯度无误后再继续保藏。
- 保藏菌种的培养基应无糖，其他菌类含糖小于 2% 为宜，以免产酸过多，影响菌种存活。
- 铜绿假单胞菌在冰箱中易发生菌体自溶而死亡，不宜用本法保存。

### 2、液体石蜡保存法：

本法是用石蜡将培养物与空气隔绝，以降低菌种的生理生化水平，并可防止水分蒸发，

从而延长菌种的保藏期。

(1) 方法:

- 将菌种接种于斜面或穿刺于 0.3~0.5% 琼脂半固体高层培养基中，培养好备用。  
取化学纯的液体石蜡装在试管中，每管 10~15ml，加棉塞，瓶口包上纸，121℃ 高压灭菌 30min，取出置 37℃ 温箱或 110~170℃ 烤箱中 1~2 h 或干燥器内除去液体石蜡中的水分。
- 将上述液体石蜡加入培养好的菌种试管内，液体石蜡液面以高出培养基最上端 1 cm 为宜，将试管直立，放入 4℃ 冰箱中保藏。
- 适用范围：适用于保藏部分霉菌，酵母菌和放线菌，对细菌保藏效果较差。

(2) 液体石蜡对各类菌种保藏效果

菌种	菌株数	保存时间 (年)	存活率 (%)
细菌	87	5	20.9
霉菌	586	5	83.6
酵母菌	400	2	88.9
放线菌	380	4	91.3

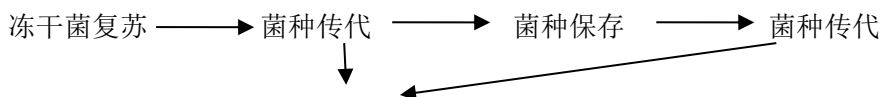
(3) 特点 本方法简便易行，是实验室常用的一种保藏方法，该法主要使菌种与空气隔绝。

(4) 注意事项:

- ① 保藏时，用新鲜培养物接种，应检查纯度和特征后，方可进行保藏。
- ② 保藏过程中，需经常观察斜面是否干燥，如干燥，需重新移种。
- ③ 使用菌种时，先将菌种管倾斜使液体石蜡流至一边，再用接种针挑取培养物接种到新鲜斜面上培养，待长出新培养物后，再移种一次到新斜面上即可使用。
- ④ 将沾有少量液体石蜡的接种针浸于 95% 酒精中片刻，再烧灼灭菌，以免直接在酒精灯下烧灼时，液体石蜡四溅，引起污染。
- ⑤ 液体石蜡在菌种管中高出培养基的高度要严格控制，如太多，会影响菌种交换气体，使保藏效果不好；如太少，斜面容易干燥，将缩短保藏期。一般以高出斜面 1 cm 为宜。
- ⑥ 制备无菌液体石蜡时，每管装量不能太多，否则分装到菌种培养基中易造成污染。

#### 四、试验用菌种的培养传代方法

程序:



制备菌悬液 ——> 适宜浓度的稀释菌液

- 检定用标准菌种，由中国药品生物检定所提供，为冷冻干燥菌种。
- 菌种的复苏与保存在专用无菌室或超净工作台内进行。
- 菌种传代次数不应超过 5 次。

## 1、菌种的复苏

- 把冻干菌种管、灭菌 1ml 滴管、双碟、镊子、营养肉汤培养基、营养琼脂斜面数支，移入接种室或净化工作台。
- 先用砂轮将冻干菌种安瓶颈部挫出刻痕，再将冻干菌种管外壁用碘酒擦洗消毒、稍干，用 75% 乙醇棉擦净，放在灭菌双碟内，待干。点燃酒精灯，将菌种管的封口一端在火焰上，烧灼红热，用灭菌滴管吸取营养肉汤培养基，滴在灼热的菌种管封口一端，使骤冷而炸裂。
- 取灭菌镊子，在火焰旁，将炸裂的管口打开，放入灭菌双碟内，另取 1 支灭菌滴管，在火焰旁吸取营养肉汤少许，加至菌种管底部，将冻干菌搅动促使溶解，随即吸出管内菌液，分别接种至营养琼脂斜面及普通肉汤内，并将滴管及菌种管投入消毒液内，将已接种的营养肉汤及营养琼脂斜面置 35~37℃ 培养 22~24 h。
- 取出培养物，仔细观察菌苔形态、有无杂菌、涂片、革兰氏染色镜检，呈典型菌落后，转种 3 代即可应用。如发现菌型不典型，可进行平板分离单菌落。

## 2、菌种的传代与保存

### 方法

#### (1): 菌斜面 ——> 菌斜面 (保存)

- 培养基应新鲜制备，如斜面已无冷凝水者，不宜再使用。标签上著名菌名及接种日期。至冰箱取出的菌种斜面，应在室温放置约 30 分钟，待温度平衡后再移入接种室或超净工作台。
- 点燃酒精灯，用左手握住菌种斜面，将管口靠近火焰旁，右手拿接种棒后端，将接种环烧红 30 秒，随后将全部接种棒金属部分在火焰上烧灼，往返通过 3 次。左手将管口在火焰上旋转烧灼，右手用无名指、小指及掌部夹住棉塞，拨开棉塞，将接种环伸入管内先在近壁的琼脂斜面上靠一下，稍冷却再移至菌苔上，刮去少量菌苔，随即取出接种棒，并将菌种管口移至火焰旁。
- 堵上棉塞，左手将菌种管放下，取营养琼脂斜面 1 支，照上述操作打开棉塞，将接种环伸入管内至琼脂斜面的低部，由底向上，将接种环轻贴斜面的表面曲折移动，使细菌划在斜面的表面上。
- 取出接种棒，在火焰旁将培养基管棉塞堵上，然后将接种过细菌的接种棒在火焰上烧灼灭菌。
- 将已接种毕的细菌管置 35~37℃ 培养 22~24 小时，霉菌管一般置 20~25℃ 霉菌培养箱内培养 7 日。取出后放入冰箱保存，一般 3 个月转种一次。

### 方法

#### (2): 菌斜面 ——> 营养肉汤 ——> 分离平板 ——> 菌斜面

如果菌落形态不典型可纯化，按下列方法传代 (分离菌落) :

用接种环取上述菌管（斜面）菌苔少许接种置营养肉汤中(5ml/支,已灭菌),置 35~37℃培养 18~24 小时后,再用接种环取培养好的营养肉汤菌悬液（浓菌液）,接种于分离平板,置 35~37℃培养 18~24 小时,用接种针选典型菌落划线于营养琼脂斜面,置 35~37℃培养 18~24 小时。一般同时接种几支管,其中一支用于以后菌种传代或接种到半固体琼脂培养基中,其它用做工作菌种。

常用分离平板:

大肠埃希菌——EMB 琼脂平板

铜绿假单胞菌——溴化十六烷三甲铵琼脂培养基

金黄色葡萄球菌——甘露醇氯化钠琼脂培养基

### 3 菌悬液的制备

取上述培养好的菌种斜面移入接种室或净化工作台,放置室温后,用接种环取菌苔少许接种置营养肉汤中(5ml/支,已灭菌),将已接种毕的细菌管置 35~37℃培养 18~24 小时,取出备用。一般于冰箱中保存可用 7 天。

### 4 对照用菌液制备

取上述培养好的营养肉汤菌悬液（浓菌液）1ml,加到 9ml 0.9%无菌氯化钠溶液混匀,为 10-1,再取另一只吸管吸取 10-1 菌液 1 ml 加到 9ml 0.9%无菌氯化钠溶液混匀,为 10-2 ……以此类推,稀释至含活菌数在 50~100 个。用平板计数。

此稀释菌液用于试验后加阳性对照,可在 1 天内使用。

## 五、菌种保管

- 菌种保管应有专人负责,保存与加锁的冰箱中或特制的白铁箱中加锁置阴暗处,确保菌种安全。因工作变动时,必须做好交接工作。
- 菌种应有详细登记本,包括名称、分离日期、鉴定日期、鉴定者、主要鉴定性能,并注意记录使用、转移及销毁情况和原因。
- 各种菌种应按规定时间定期移种。一般每移种 3 次后作一次全面鉴定。注意菌种有无污染和变异,如发现污染和变异时,应及时更换。
- 购置菌种,应有介绍信。全部保存菌种应具备清单,并定期向部门负责人报告。