

• 论 著 •

两种菌种保藏方法对金黄色葡萄球菌抗力影响的研究*

杨春晓, 方艳梅, 黄辉涛, 林毅雄

广东省珠海市疾病预防控制中心, 广东珠海 519060

摘要:目的 研究菌种保藏管法和冷冻真空干燥保藏法中对金黄色葡萄球菌抗力的影响。方法 菌种分别用以下两种保存方法进行保存:冷冻真空干燥保藏法 4℃保存和菌种保藏管法-80℃保存。测试速干手消毒液对不同菌种保藏方法的金黄色葡萄球菌的杀菌率。结果 随着保存时间延长,菌种保藏管法的金黄色葡萄球菌抗力下降明显,而冷冻真空干燥保藏法的金黄色葡萄球菌抗力未见明显变化。采用菌种保藏管法保存 6 个月、1 年、3 年,消毒液对金黄色葡萄球菌的杀菌率分别为 99.076%、99.193%、99.968%,差异有统计学意义($P < 0.05$);采用冷冻真空干燥保藏法保存 6 个月、1 年、3 年,消毒液对金黄色葡萄球菌杀菌率分别为 99.025%、99.039%、99.063%,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 随着菌种保存时间延长,冷冻真空干燥保藏法对金黄色葡萄球菌抗力影响较小,保存效果优于菌种保藏管法。

关键词:菌种保藏管法; 冷冻真空干燥保藏法; 金黄色葡萄球菌; 杀菌试验; 抗力

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.06.007 **中图法分类号:**R117

文章编号:1673-4130(2022)06-0668-04 **文献标志码:**A

Influences by the two methods of microbial strain preservation on the resistance variety of *Staphylococcus aureus**

YANG Chunxiao, FANG Yanmei, HUANG Huitao, LIN Yixiong

Zhuhai Center for Disease Prevention and Control, Zhuhai, Guangdong 519060, China

Abstract: Objective To study the influence by the microbial preservation tube and vacuum freeze-drying microbial preservation of microbial strain preservation on the resistance variety of *Staphylococcus aureus*.

Methods The strains were preserved by the following two preservation methods: vacuum freeze-drying microbial preservation method at 4℃ and microbial preservation tube method at -80℃. The suspension quantitative germicidal test was used to observe the resistance of *Staphylococcus aureus* with the two different methods of microbial strain preservation. **Results** Compared with *Staphylococcus aureus* on the vacuum freeze-drying microbial preservation, the resistance variety of the microbial preservation tube was significantly decreased as time goes on. The bactericidal rates of disinfectants against *Staphylococcus aureus* were 99.076%, 99.193% and 99.968%, after the microbial preservation tube method was used for 6 months, 1 year and 3 years. Differences were statistical significance ($P < 0.05$). The bactericidal rates of disinfectants against *Staphylococcus aureus* were 99.025%, 99.039% and 99.068%, after the vacuum freeze-drying microbial preservation was used for 6 months, 1 year and 3 years, but there were no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** It was relatively little impact on the *Staphylococcus aureus*' resistance variety of the vacuum freeze-drying microbial preservation as time goes on. The effect of the vacuum freeze-drying preservation is better than that of microbial preservation tube.

Key words: microbial preservation tube; vacuum freeze-drying microbial preservation; *Staphylococcus aureus*; germicidal test; resistance

菌种的科学保藏和管理直接关系到微生物资源的保存和利用,选择最适宜的保藏方法,可保证微生物在保藏和传代过程中免于变异、衰退、活力减弱及死亡^[1]。菌种保存,无论是标准菌株传代保存还是有

* 基金项目:广东省珠海市科技计划医疗卫生项目(重大项目)(ZH2201200004HJL);广东省珠海市科技计划医疗卫生项目(一般项目)(ZH22036201210188PWC)。

作者简介:杨春晓,女,副主任技师,主要从事微生物检验方面的研究。

本文引用格式:杨春晓,方艳梅,黄辉涛,等.两种菌种保藏方法对金黄色葡萄球菌抗力影响的研究[J].国际检验医学杂志,2022,43(6):

效保存新分离菌株,都是细菌学检验、教学科研机构及有关生产单位的重要工作之一^[2]。在保存菌种的过程中,除了保证菌株存活外,还应该在保存过程中保持其固有的各种生物性状及抗原特性。应针对不同的菌株确定适宜的保藏方法,同一菌株应选用两种或者两种以上方法进行保藏^[3-5]。传统保藏菌种的方法较多,其中公认最好的方法是冷冻真空干燥保藏法^[6-9]。而菌种保藏管法是近年来使用较多的新型保存方法^[10],是用一种商品化的菌种保藏管中的瓷珠保存菌种,由于操作方便和实用性强倍受大家青睐,为微生物菌种保藏提供了新的方式^[11]。基于此,本文通过杀菌试验对冷冻真空干燥保藏法和菌种保藏管法保存的金黄色葡萄球菌抗力进行研究,以探讨两种菌种保藏方法的保存效果。

1 材料与方法

1.1 材料 试验菌株为金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC6538),由广东省微生物菌种保藏中心提供,经复苏培养后保种。菌种分别用以下两种保存方法进行保存:冷冻真空干燥保藏法 4 ℃ 保存和菌种保藏管法 -80 ℃ 保存。试验用消毒剂为某品牌速干手消毒液(以下简称消毒液),主要成分为 0.10%~0.14% 过氧化氢和 72%~82% 乙醇。

1.2 方法

1.2.1 试验菌悬液制备 从第 1 支菌种保藏管(-80 ℃ 保存 6 个月)中取出 1 粒瓷珠,加入适量营养肉汤,37 ℃ 培养 24 h,用 10 μL 一次性接种环挑取一环划线接种于营养琼脂平板,37 ℃ 培养 24 h,挑取平板中单个典型菌落,接种于营养琼脂斜面,37 ℃ 培养 24 h,取新鲜斜面培养物,用 0.3 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗下斜面上的菌苔,将其稀释配制成浓度为 $1 \times 10^8 \sim 9 \times 10^8$ cfu/mL 试验菌悬液。按相同方法从第 2 支菌种保藏管(-80 ℃ 保存 1 年)和第 3 支菌种保藏管(-80 ℃ 保存 3 年)分别取出瓷珠制成试验菌悬液。

用 2 mL PBS 溶解第一瓶用冷冻真空干燥保藏法

保存的冻干粉(4 ℃ 保存 6 个月),待完全溶解分散后混匀,加入适量营养肉汤,37 ℃ 培养 24 h,用 10 μL 一次性接种环挑取一环划线接种于营养琼脂平板,37 ℃ 培养 24 h,挑取平板中单个典型菌落,接种于营养琼脂斜面,37 ℃ 培养 24 h。按上述的方法配制成 $1 \times 10^8 \sim 9 \times 10^8$ cfu/mL 试验菌悬液。取第 2 瓶冻干粉(4 ℃ 保存 1 年)和第 3 瓶冻干粉(4 ℃ 保存 3 年),按同法制成试验菌悬液。

1.2.2 中和剂鉴定试验 试验设定 8 个试验组^[12],按照中和剂鉴定试验的要求进行操作。第 1 组为试验结果为无试验菌,或有极少数试验菌菌落生长;第 2 组的试验菌菌落较第 1 组多,但较第 3、4、5 组少;第 3、4、5 组试验菌菌落生长量相似,其组间误差率不超过 15%;第 6~8 组无菌落生长。试验重复 3 次。

1.2.3 杀菌试验 在无菌试管内加入 0.5 mL 试验菌悬液和 0.5 mL 小牛血清,再加入 4 mL 消毒液(对照组用 PBS 代替),迅速混匀,盖严试管塞后作用 3 min,立即吸取 0.5 mL 混合液转移至盛有 4.5 mL 中和剂的试管中,迅速混匀。作用 10 min 后作适当稀释,然后取其中 2~3 个稀释度,分别吸取 0.5 mL,置于两个灭菌平皿中,倾注 40~45 ℃ 的营养琼脂培养基 15~20 mL,转动平皿使其充分均匀,琼脂凝固后翻转平皿,37 ℃ 培养 48 h,进行活菌计数,计算杀菌率。试验重复 5 次。

1.3 统计学处理 采用 Microsoft Excel 软件建立数据库,采用 SPSS25.0 软件进行统计分析。计数资料采用百分数表示,组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中和剂鉴定试验结果 试验结果表明,以含 0.1% 硫代硫酸钠及 30 g/L 吐温-80 的营养肉汤作为中和剂,可以起到有效中和试验中过氧化氢和乙醇的作用,且中和产物对试验菌生长及培养基无影响,见表 1。

表 1 消毒液中中和剂鉴定的平均回收菌落数(cfu/mL)

试验组	菌种保藏管法			冷冻真空干燥保藏法		
	6 个月瓷珠	1 年瓷珠	3 年瓷珠	6 个月冻干粉	1 年冻干粉	3 年冻干粉
1	0	0	0	0	0	0
2	63 800	42 800	43 100	78 900	75 500	71 300
3	5 690 000	5 060 000	4 050 000	8 330 000	7 730 000	7 310 000
4	5 610 000	5 220 000	4 180 000	8 090 000	7 840 000	7 550 000
5	5 990 000	5 430 000	4 360 000	8 200 000	7 900 000	7 500 000
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0

2.2 菌种保藏管法对金黄色葡萄球菌的杀菌试验结果 结果表明,消毒液作用 3 min,对菌种保藏管中保存 6 个月的金黄色葡萄球菌杀菌率为 99.076%;对菌种保藏管中保存 1 年的金黄色葡萄球菌杀菌率为 99.193%;对保存 3 年的金黄色葡萄球菌杀菌率为 99.968%。由此可见,随着菌种保藏管保存时间的延长,杀菌率明显升高,差异有统计学意义($H = 12.020, P = 0.002$)。见表 2。

2.3 冷冻真空干燥保藏法对金黄色葡萄球菌的杀菌试验结果 结果表明,消毒液作用 3 min,对冷冻真空干燥保藏法保存 6 个月的金黄色葡萄球菌杀菌率为 99.025%;对冷冻真空干燥保藏法保存 1 年的金黄色葡萄球菌杀菌率为 99.039%;对保存 3 年的金黄色葡萄球菌杀菌率为 99.063%。由此可见,随着冷冻真空干燥保藏法保存时间延长杀菌率略有增加,但差异无统计学意义($H = 0.666, P = 0.717$)。见表 3。

表 2 菌种保藏管法对金黄色葡萄球菌的杀菌试验结果

试验序号	6 个月瓷珠		1 年瓷珠		3 年瓷珠	
	平均菌落数(cfu/mL)	杀菌率(%)	平均菌落数(cfu/mL)	杀菌率(%)	平均菌落数(cfu/mL)	杀菌率(%)
1	6 499 000	99.090	5 429 000	99.213	48 190 000	99.961
2	7 529 000	99.053	4 398 000	99.099	43 880 000	99.960
3	7 560 000	99.036	5 446 000	99.229	54 360 000	99.968
4	7 599 000	99.160	5 457 000	99.197	53 570 000	99.978
5	6 438 000	99.043	4 431 000	99.225	40 210 000	99.974
平均	7 125 000	99.076	5 032 000	99.193	48 040 000	99.968

表 3 冷冻真空干燥保藏法对金黄色葡萄球菌的杀菌试验结果

试验序号	6 个月瓷珠		1 年瓷珠		3 年瓷珠	
	平均菌落数(cfu/mL)	杀菌率(%)	平均菌落数(cfu/mL)	杀菌率(%)	平均菌落数(cfu/mL)	杀菌率(%)
1	7 430 000	99.034	7 310 000	99.102	7 030 000	99.101
2	8 290 000	99.107	7 170 000	98.995	6 610 000	98.989
3	6 010 000	99.000	7 080 000	99.002	6 110 000	99.012
4	7 280 000	99.012	6 480 000	99.113	6 540 000	99.103
5	6 900 000	98.971	6 720 000	98.985	6 140 000	99.112
平均	7 182 000	99.025	6 952 000	99.039	6 486 000	99.063

3 讨论

菌种的保藏工作是十分重要的工作,成功进行菌种保藏是利用微生物的先决条件,是良好的实验室管理和实验质量的重要保证^[13]。保存菌种的方法很多,总的来说可以分成两大类^[14]:一类是保存生长在培养基上的菌种培养物,通过控制培养条件延长菌种的存活期;另一类保存方法是除去培养基后保存菌体细胞,利用低温、干燥、无营养和隔绝空气等条件,使菌体细胞生命活动降至最低,处于“休眠”状态,从而延长菌种的保存时间。菌种保藏管法和冷冻真空干燥保藏法均属于后者。本文采用含有有效成分为过氧化氢和乙醇的消毒液对不同保存条件下金黄色葡萄球菌的杀菌率进行研究,杀菌率越高,菌株的抗性越小。本研究结果表明,在菌种保藏管法中,随着保存时间的延长,金黄色葡萄球菌抗性下降明显;而在冷冻真空干燥保藏法中,随着保存时间延长,金黄色葡萄球菌抗性未见明显变化,说明不同菌种保藏方法对金黄色葡萄球菌抗性影响不同,冷冻真空干燥保藏法对金

黄色葡萄球菌抗性影响较小,故认为需要长时间保存金黄色葡萄球菌首选冷冻真空干燥保藏法。但冷冻真空干燥保藏法操作技术难度大,需要特殊设备,由于基层微生物实验室普遍缺乏菌种冻干机,无法采用此法保存菌株。菌种保藏管法即瓷珠菌种保存管法,常用于食品微生物标准菌种和分离菌株的保存、复苏以及运输^[15]。菌种保藏管法虽然保存效果次于冷冻真空干燥保藏法,但其在规定的期限内具有良好的菌株保存效果,这种方法对实验室条件要求不高,同时具有方便经济、操作简便等优点,较好地满足了工作需求,对基层微生物实验室来说较适用,易于推广。

王凯^[16]研究了斜面低温、半固体穿刺法、液体石蜡法和冷冻干燥法保存金黄色葡萄球菌的效果,通过分析不同保存时间的细菌存活率,认为冷冻干燥法保存金黄色葡萄球菌的效果较好,保存时间长,且不影响菌株的形态和生化结构。罗成富^[17]通过对不同菌种保藏方法保存的常见葡萄球菌成活率进行比较,得出冷冻干燥法是保藏常见葡萄球菌的最佳方法,值得

推广。贾兴真等^[18]研究了 84 消毒液作用于经反复冻融后的金黄色葡萄球菌的杀菌率,结果显示用菌种保藏管保存的菌株抗力未见显著变化。而本文通过杀菌试验研究两种不同的菌种保藏方法对金黄色葡萄球菌抗力的影响,结果表明冷冻真空干燥保藏法保存效果更理想。

菌种保存温度越低,微生物的代谢越不活跃,生物活性越稳定^[19]。但本研究结果表明在超低温条件下菌种保藏管瓷珠的保存效果不如在普通低温条件下冷冻真空干燥保藏法的冻干粉。采用冷冻真空干燥保藏法-80℃保存菌株效果如何,其对消毒液的抗力变化情况仍需进一步研究。

综上所述,冷冻真空干燥保藏法保存金黄色葡萄球菌的效果优于菌种保藏管法。工作人员应根据实验室的具体条件和工作的实际要求选择一种行之有效的菌种保藏方法,以保证实验室质量控制、日常检验和科学研究等顺利开展。

参考文献

[1] 马海霞,梁慧刚,黄翠,等.我国菌种保藏机构的现状与未来[J].军事医学,2018,42(4):304-308.
 [2] 穆婷,封艳艳,宋珉,等.药品微生物检验用菌种保藏方法简论[J].母婴世界,2015,3(6):361-362.
 [3] 贾俊涛,梁成珠,马维兴.食品微生物检测工作指南[M].北京:中国标准出版社,2012:69-73.
 [4] 梁宁利.微生物菌种保藏方法概述[J].农产品加工,2012(4):117-118.
 [5] 米翠平,黄周阳.工业生产中菌种的常用保藏方法[J].山东化工,2017,46(2):76-78.
 [6] 常金梅,蔡芷荷,吴清平,等.菌种冷冻干燥保藏的影响因

素[J].微生物学通报,2008,35(6):959-962.
 [7] 张甜.微生物菌种保藏方法及标准菌种管理[J].中国城乡企业卫生,2014(1):139-141.
 [8] 李华,骆艳娥,刘延琳.真空冷冻干燥微生物的研究进展[J].微生物学通报,2002,29(3):78-82.
 [9] 孙葳.浅谈微生物菌种保藏方法[J].轻工标准与质量,2021(1):95-96.
 [10] 陈露露.食源性致病菌标准菌株保藏管法保藏条件探究及优化[D].上海:上海交通大学,2015.
 [11] 陈晓燕,林光.微生物实验菌种保存方式探讨[J].临床合理用药,2014,7(10):129-130.
 [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.一次性使用卫生用品卫生标准:GB15979-2002[S].北京:中国标准出版社,2002.
 [13] 孙炜.微生物实验室菌种的保管与保存[J].医学理论与实践,2002,15(10):1231-1232.
 [14] 王秀茹.预防医学微生物学及检验技术[M].北京:人民卫生出版社,2002:975-980.
 [15] 杨文君.食品微生物实验室标准菌株的瓷珠保藏方法[J].现代食品,2020(12):47-48.
 [16] 王凯.不同方法对金黄色葡萄球菌的保藏效果研究[J].中国医药指南,2012,10(26):452-453.
 [17] 罗成富.不同方法对常见葡萄球的保藏效果研究[J].临床合理用药,2013,6(12):17.
 [18] 贾兴真,张倩,银燕,等.反复冻融对金黄色葡萄球菌抗力影响的研究[J].中国消毒学杂志,2013,30(12):1138-1139.
 [19] 中华人民共和国卫生部.中华人民共和国药典(2010年版)[M].北京:中国医药科技出版社,2010.

(收稿日期:2021-09-12 修回日期:2021-12-08)

(上接第 667 页)

[8] 周雯敏,郭乔如,王会,等.慢性阻塞性肺疾病转化为肺癌的研究进展[J].药理学报,2020,55(7):1410-1418.
 [9] 吴漫,徐兴祥.慢性阻塞性肺疾病合并肺癌的研究进展[J/CD].中华肺部疾病杂志(电子版),2019,12(5):646-649.
 [10] PARRIS B A, O' FARRELL H E, FONG K M, et al. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung cancer: common pathways for pathogenesis[J]. J Thorac Dis, 2019, 11(S17): S2155-S2172.
 [11] REN C X, LENG R X, FAN Y G, et al. MicroRNA-210 and its theranostic potential[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(11): 1325-1338.
 [12] WANG L Q, WANG C L, XU L N, et al. The expression research of miR-210 in the elderly patients with COPD combined with ischemic stroke[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(22): 4756-4760.
 [13] 马晓春,张玲,马红,等.肺癌血管内皮生长因子表达及其与血管新生和肿瘤细胞增殖关系的研究[J].中华内科杂

志,2001,40(1):32-35.
 [14] FAN J, XU G, CHANG Z, et al. miR-210 transferred by lung cancer cell-derived exosomes may act as proangiogenic factor in cancer-associated fibroblasts by modulating JAK2/STAT3 pathway[J]. Clin Sci (Lond), 2020, 134(7): 807-825.
 [15] DUAN M C, HAN W, JIN P W, et al. Disturbed Th17/Treg Balance in Patients with Non-small Cell Lung Cancer[J]. Inflammation, 2015, 38(6): 2156-2165.
 [16] SONG L, MA S, CHEN L, et al. Long-term prognostic significance of interleukin-17-producing T cells in patients with non-small cell lung cancer[J]. Cancer Sci, 2019, 110(7): 2100-2109.
 [17] 周金花,王伟,刘瑞娟. Treg/Th17 在慢性阻塞性肺疾病合并肺癌中的相关研究进展[J].中国肺癌杂志,2019,22(12):794-797.

(收稿日期:2021-09-10 修回日期:2021-12-18)