

## 簡便的菌种冷冻干燥保藏方法\*

高守一\*\*

在微生物学工作中，菌种的保存是一项很繁琐和十分重要的工作。菌种保存的不好，微生物不但容易丧失生活能力，而且易于变异。目前有很多事实证明，在培养基上保存微生物时常发生变异。这是因为培养基物理化学性质并不是严格恒定的，同微生物的代谢过程有关的环境改变，也就影响了微生物的生物学特性<sup>[1]</sup>。因此菌种保存的原理，乃在于设法尽量使微生物少受外界环境条件的影响，尽量减低其自灭过程，使其生命活动处于暂时的中止（甦生）<sup>[2]</sup>，从而可以长期地保留着微生物的生活力及其原有特性。在各种保存菌种的方法中以冷冻干燥法最为理想。因为在冻结状态下干燥和真空封闭并保存于低温的微生物，已失去其代谢所必需的水分、氧气和适宜的温度，这就构成了保持微生物的性质长久不变的良好条件。

冷冻干燥设备的样式虽多，但原理均相一致。我们为保存較大量的菌种，曾设计一較簡單的利用化学干燥剂吸湿的冷冻干燥装置。今将其作一簡單介紹，对目前国内采用冷冻干燥法保存菌种尚嫌不够广泛的情况下，或可供一般实验室的参考。

菌种干燥操作中和开启真空封闭的菌种安瓶时，对于干燥材料的被污染和工作人员的被感染等问题，是值得特別注意的。Stein 与 Rodgens 二氏<sup>[3]</sup>以無菌脫脂牛乳制成細菌悬液，分装 1 毫升于 4 毫升的安瓶中，利用低温凝結干燥法干燥时，曾从凝結在冷凝器内的水蒸气（自冻结的被干燥材料升华的）中，培养出被干燥的微生物。Reitman 氏等<sup>[4]</sup>亦曾作过类似的試驗，用肉湯或牛乳等制成細菌悬液，分装 2 毫升于 5 毫升的安瓶中，經干冰丙酮壳層冻结后，利用低温凝結干燥法干燥，結果在干燥完了时，冷凝器、多枝管和橡皮管等部分，均受到严重的污染，从多枝管上拔下安瓶时，操作者的手亦可受染。

由此可见，在干燥过程中，被干燥的細菌可随水蒸气的急速移动而飞散至干燥设备的各个部分，以致造成对于操作者的感染和被干燥菌种間交叉污染的可能性。因此，为

\* 1956年5月11日收到。

\*\* 現在北京流行病学研究所。

了安全的目的, 应在不致严重地影响干燥效能的条件下, 尽量設法阻止細菌自安瓶中向外飞散。我們曾利用本文所介紹的裝置, 試驗了安瓶頸部加棉塞的方法預防細菌飞散的效能。

## 用具及用具的安裝

1. 安瓶: 頸長 120 毫米, 腔徑 6 毫米, 球部內容積 0.8—1.0 毫升和壁厚 1 毫米的長頸球形硬質玻璃安瓶。
2. 除湿器: 將粒狀無水硫酸鈣, 盛于口徑約為 20 厘米的真空干燥器和 500 毫升容積的濾過瓶中, 作為吸濕之用。
3. 真空泵: 可達 0.0001 或 0.01 毫米汞柱真空度的油閉式旋轉真空泵。
4. 真空計: 能測 1—0.0001 毫米汞柱真空度的麥氏真空計 (McLeod gauge) 或簡單的 U 形管汞柱真空計 (后者虽不适于測定 2—3 毫米汞柱以下的真空度, 但在沒有前者和確知真空泵的效能可達要求時, 完全可以用來作概略的測定)。

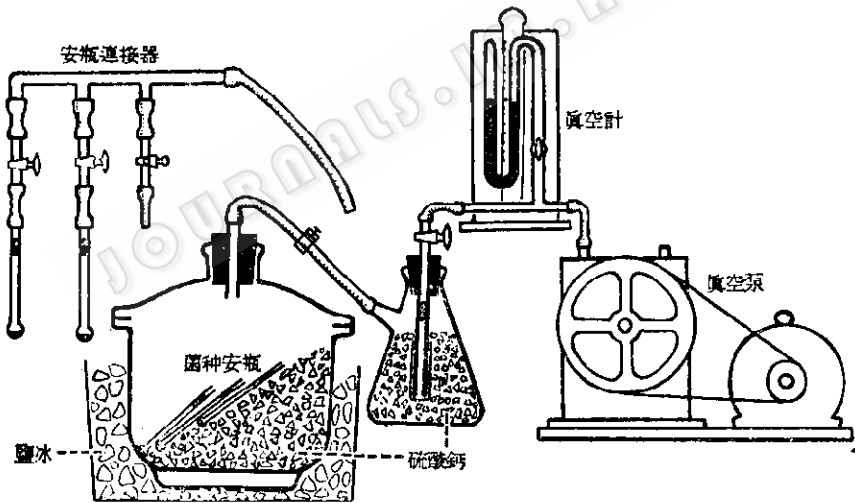


圖 1 簡便的冷凍干燥裝置示意圖。

5. 安瓶連接器: 在 L 形玻璃連通管上, 用橡皮管連接數個一端帶有橡皮管的玻璃活塞 (如圖 1), 作為真空封閉時連接安瓶之用, 可將安瓶連接器固定于鐵支架上。

安裝用具 (圖 1) 時, 應注意下列各點, (1) 橡皮管、橡皮塞和玻璃活塞等同其接觸部分的連接處必須嚴密。干燥器的磨口處, 可塗以凡士林。為使橡皮管或橡皮塞同玻璃器具的密接, 必要時可塗少許的蓖麻油。 (2) 盡量縮短真空系統的綫路; 干燥器內裝好干燥劑和被干燥的菌種安瓶後, 勿剩過多的空間, 以便易于抽空。必須注意, 勿使水蒸

气的移动通路受阻，干燥器与滤过瓶之间的导管部分的隙径，应尽量粗些和避免曲折。

(3) 滤过瓶中的玻璃活塞，从其下端开口塞入一些干燥棉花(疏松地)，并用铜纱或纱布包扎其开口处，以防干燥剂的粉末被抽至真空泵内。(4) 用具安装完了后，须进行抽气试验，检查有无漏气和能否达至所要的真空度。

## 菌种冷冻干燥操作过程

1. 制备菌液和分装安瓶：一般将普通琼脂或血琼脂培养基上的新鲜培养物，用无菌脱脂牛乳作为保护剂，制成浓厚的均等悬液。为简便计，亦可注入 0.5—1.0 毫升牛乳于琼脂斜面上，将培养物洗下制成细菌悬液。用消毒毛细吸管吸取菌液，分装至数个无菌安瓶内各 0.2 毫升。然后，将安瓶颈部通过火焰灭菌，并且用无菌镊子取少许干燥的消毒棉花塞入安瓶口内。

制备干燥指示剂：如用牛乳作悬液时，可制成 1—2% 的氯化钴牛乳溶液(呈粉红色)，同样将其分装至一安瓶内 0.2 毫升。

2. 利用干冰酒精作菌液的预备冻结：将取干冰用的帆布袋(约 13 × 26 厘米)，套在二氧化碳钢筒的开口部，抽紧袋口，旋开钢筒的活门，轻轻敲打布袋，片刻，干冰即可布满袋内。迅速解下布袋，将干冰(勿用手取)倾入纯酒精缸中，温度遂可降至 -70°C 以下。然后，将菌液安瓶和干燥指示剂安瓶，均置于干冰酒精内 1—2 分钟，菌液即可冻结。所需干冰酒精的数量，视材料多少而定。一般冻结 100 支以内的安瓶，使用口径约 17 厘米的玻璃缸，内盛 3—4 厘米深的酒精，加入 400—500 克的干冰即可。为防止碰破安瓶，玻璃缸内可铺以纱布四层。

3. 真空干燥：在进行干燥之前至少 1 小时，将连接完善和装好干燥剂的真空干燥器，置于合适的容器中，其周围填加按重量 1 与 3 之比的盐冰，预先降低干燥器的温度，以使后来放入的被干燥材料易于维持冻结状态。

取出预备冻结完了的安瓶，用干纱布擦去附于安瓶外部的酒精，尽速将其置于干燥器内放成斜面的干燥剂上(安瓶口向斜上方，干燥指示剂安瓶应放在自干燥器外易于窥视的部位)，盖紧干燥器盖，立即开动真空泵抽气。此时，应时刻注意检查真空度的上升情况和被干燥材料的冻结状态。一般在抽气开始后，如能迅速达至较高度的真空(如 5 分钟内达 1 毫米汞柱以下)，则被干燥材料即不致融化。

一般在真空干燥进行 3 小时后，即可将维持冻结的盐冰撤去，继续在室温中干燥。当氯化钴牛乳自粉红色完全变成蓝色时，仍需再继续干燥的时间为氯化钴牛乳全变蓝色以前所需时间之半<sup>[5]</sup>。例如，干燥开始后 4 小时氯化钴牛乳全变蓝色，即需再干燥 2

小时。这样可以认为被干燥菌种已达至充分干燥。

干燥完了后,先将干燥器和滤过瓶上的活门关闭,然后停止抽气,再自真空計上的活塞徐徐放入空气,使真空泵和真空計内恢复常压。保持在真空状态的干燥器和滤过瓶可置室温过夜,待次日晨封闭安瓶。如安瓶数量较少时,亦可即时取出进行熔封。

4. 封闭安瓶: 将干燥器上的橡皮管活门微微放开,造成橡皮管内有一隙通路,然后稍微旋开滤过瓶上的玻璃活塞,使空气通过滤过瓶徐徐地进入干燥器内。待干燥器内压与大气压相同时,即可关闭干燥器上橡皮管的活门,并自滤过瓶上拔下此橡皮管,使干燥器与滤过瓶分开。最后将安瓶连接器连在滤过瓶上,准备封闭安瓶。开启干燥器,取出三支安瓶,将其分别插入安瓶连接器的每个橡皮管内,旋开玻璃活塞,开动真空泵抽气,安瓶内很快即可达至较高度的真空(在0.5毫米汞柱以下者为佳)。然后在关闭了活塞的安瓶颈部中央进行火焰封闭,其余的安瓶仍可继续抽气。封好之后,将留在连接器橡皮管内的安瓶残部拔出,投至消毒缸内。再自干燥器内取出菌种安瓶插入此橡皮管内,旋开活塞排气。继续将另一个已抽好真空的安瓶活塞闭上进行熔封,如此轮流封闭。封闭后的安瓶,可用真空测定器(Spark coil vacuum tester)检查其真空状态,将合格者置冰箱中保存。

5. 干燥菌种安瓶开启方法: 将准备开启的安瓶颈部用酒精棉拭擦消毒待干后,置安瓶尖端于酒精灯上烧热(勿使安瓶内干燥物滑至尖端),然后稍离开火焰,下面放置消毒缸,将以毛细吸管吸取的天菌蒸馏水,滴加数滴于已烧热的安瓶尖端(边滴边旋转安瓶),使其炸裂。俟安瓶冷却后,再用八层无菌纱布包裹已炸裂的安瓶尖端,轻轻折断。使用另支已灭菌的毛细吸管(其尖端可达安瓶球部者)吸取0.5毫升肉汤或葡萄糖肉汤,加入安瓶内,用毛细吸管混匀使干燥物全部溶解。然后吸出接种于肉汤和琼脂平皿培养基各一枚。根据菌种的不同,应选择适宜的培养基。

利用上述设备和方法,我们曾经干燥了肺炎球菌、链球菌、脑膜炎球菌、淋球菌、葡萄球菌、沙门氏菌、痢疾杆菌、大肠杆菌、肺炎杆菌、变形杆菌、炭疽杆菌、巴氏杆菌、布氏杆菌、霍乱弧菌、绿脓杆菌、白喉杆菌、结核杆菌、肉毒杆菌和白色念珠菌等,迄今已逾期一年,经培养检查证明,各种菌种均能生长良好。但此等干燥菌种究能保存多久,尚待继续检查。

## 干燥过程中的污染问题

(防止细菌飞散的棉塞试验结果)

利用在安瓶内塞入棉塞的方法以检查被干燥细菌的飞散情况。将福氏痢疾杆菌和

綠膿杆菌的 20 小时普通琼脂培养物，分別用無菌脫脂牛乳、灭活羊血清和含 7.5% 葡萄糖的血清肉湯(血清与肉湯之比为 3:1) 制成濃厚的細菌悬液，分裝至無菌安瓶內 0.1—0.2 毫升各 5 支。分裝后的安瓶頸部通过火焰充分灭菌。然后，用無菌小錘子取兩小塊干燥的無菌棉花塞入安瓶內。塞于安瓶頸部中央者称第 I 棉塞，接近于安瓶口部者称第 II 棉塞。經冷冻干燥(历时 6—9 小时)后，以無菌手續取出每个安瓶中的第 I 和第 II 棉塞分別投入肉湯管中。經 37°C 培养一晝夜，次日將有細菌生長的肉湯管作普通琼脂平皿分离；完全透明的肉湯管則再經一晝夜的培养，視其有無細菌生長。鑒定平皿上生長的細菌，福氏痢疾杆菌是用同名血清作玻片凝集反应；綠膿杆菌則观察其色素形成，必要时作塗片染色檢查。每次試驗所用塞安瓶的棉花和每次干燥好的菌株，均作肉湯培养以資对照。茲將 4 次的棉塞試驗(每次 30 支共計 120 支安瓶)結果总结如表 1。

表 1 120 支安瓶中染菌的棉塞数

悬液	菌 株	染有該安瓶內細菌的棉塞数	
		第 I 棉塞	第 II 棉塞
牛 乳	福 氏 桿 菌	19/20	1/20
	綠 膿 桿 菌	20/20	1/20
血 清	福 氏 桿 菌	20/20	0/20
	綠 膿 桿 菌	18/20	0/20
含 糖 血 清 肉 湯	福 氏 桿 菌	4/20	0/20
	綠 膿 桿 菌	5/20	0/20

注：表中所示分数系指 20 支安瓶的第 I 或第 II 棉塞(分母)中染有該安瓶內細菌的棉塞数(分子)。

自表 1 可以看出，用牛乳、血清或含葡萄糖的血清肉湯所制成的細菌悬液，在冷冻干燥过程中，被干燥的細菌均可向安瓶外飞散，致使前二种悬液安瓶中的第 I 棉塞，几乎全部染有該安瓶內的細菌。甚至有兩個安瓶的第 II 棉塞，因該安瓶的第 II 棉塞塞得过松而同样受到飞出的細菌污染。至于其余的第 II 棉塞，除 5 个染有帶芽胞的革蘭氏陽性杆菌之外，均未受到細菌的污染。从而可以得出結論：在安瓶內塞一合适的棉塞即可防止細菌的飞出和避免杂菌的污染。所用的二种菌株之間，在細菌的飞出上，未見有显著的差别。

## 討 論

利用本法干燥，一次可制出 100 支安瓶的干燥菌种，如每株菌种分裝三支安瓶，則每次即可干燥 30 余株菌种。由于被干燥材料同干燥剂相距甚近，自材料升华的水蒸气

易被硫酸鈣所吸收，故干燥所需時間較短。干燥完了的菌种安瓶，虽然不能在原有的真空状态下封閉，但是經過二次抽空亦可在較短的時間內熔封完畢。如果只需干燥数支安瓶时，更可直接利用安瓶连接器进行干燥，这样即可一次封閉。本法所用器具多为普通實驗室所常有（如無干冰，可采用鹽冰或低温冰箱作材料的預备冻结），不需購置特殊設備，故对一般實驗室用作菌种的干燥保存甚为方便。

在菌种的冷冻干燥过程中，从被冻结材料升华的水蒸气迅速地向外流出，这可能將含有細菌的干燥微粒一同帶出。Cowan<sup>[6]</sup>氏曾利用螢光示踪物进行干燥試驗，观察示踪物在干燥过程中从干燥管内飞出的情况。結果証明，用水比用血清制成悬液的示踪物飞出的更多，有时血清悬液中的示踪物不現飞出。管内内容物較多者其飞出的亦多，0.1毫升約为避免飞出的最大容量，但縱然如此小量有时亦可飞出。Fry与Greaves<sup>[7]</sup>二氏在用含有7.5%葡萄糖的血清肉湯（血清与肉湯之比为3:1）作悬液进行干燥时，几乎沒有微生物随水蒸气排至管外者，但在蒸馏水中干燥的微生物則常随水蒸气排出，以致滿布于整个干燥器中。根据我們的棉塞試驗結果可以看出，用7.5%葡萄糖血清肉湯制成的細菌悬液，在防止細菌的飞散上，确較牛乳或血清悬液为佳，但是仍然約有1/5安瓶中的細菌呈現飞散。如果，在安瓶內塞一适宜松紧的棉塞，則可防止任何一种悬液內的細菌在干燥过程中飞出安瓶外的危險。但必須指出，塞入安瓶中的棉塞，应当是最小地妨碍蒸气流而出而最大地阻止干燥微粒飞出者。棉塞过紧將影响水蒸气的排出，过松則起不到阻止細菌飞出的作用。我們所用棉塞的松紧程度是同一般塞于毛细吸管口部的棉塞相似，用錘子可以容易地將其取出而并非过松或过紧者。安瓶內塞入棉塞，不仅可以阻止被干燥細菌的飞出，同时还可避免干燥过程中的污染杂菌和安瓶間的交叉污染。

啓开真空封閉的菌种安瓶时，应当特別注意安全問題。Cowan氏<sup>[6]</sup>和Smadel氏<sup>[8]</sup>均曾指出，当啓开真空封閉的干燥菌种或毒种安瓶时，可因吸入飞出的干燥微粒而引起人的感染。Reitman氏等<sup>[9]</sup>的實驗也已証明，如將安瓶頸部銼出一溝，再从溝的背面加压力折断真空封閉的菌种安瓶时，將有大量微生物飞散至周圍环境中。为此他們用70%酒精棉包裹在安瓶尖端的銼痕上，然后再折断安瓶，这样就大大地减少了污染的危險。Cowan氏<sup>[6]</sup>为了同样目的，將棉塞封閉在接近于封閉端的安瓶內，当啓开安瓶时（銼痕在尖端与棉塞之間），空气可通过棉塞进入安瓶，同时可防止干燥微粒的飞出。我們認為，將蒸馏水滴加至燒热的安瓶尖端周圍，造成許多細微的裂隙，使空气通过它緩徐地进入安瓶，这样在防止安瓶内容物的飞出上或許更为安全，同时在操作方法上也較为簡便。

在菌种冷冻干燥过程中,各种因素(如悬液的組成、預备冻结的速度、干燥时间和制品的含湿度等)对細菌的影响以及硫酸鈣的性能和再生方法等問題,已在另文中述及<sup>[10]</sup>。

## 总 結

1. 本文介紹一种比較簡單的、利用化学干燥剂(硫酸鈣)吸湿的菌种冷冻干燥法。所用的器材,大部分均为普通实验室內所常有。利用本法干燥,每次可制出 100 支安瓶的干燥菌种。

2. 利用本法干燥的各种菌种(包括腦膜炎球菌和淋球菌),置冰箱中保存,可以維持其生活力在一年以上。

3. 棉塞試驗的結果証明:用牛乳、血清或含 7.5% 葡萄糖的血清肉湯(血清与肉湯之比为 3:1)作为保护剂制成的細菌悬液,在冷冻干燥过程中,被干燥的細菌均有向安瓶外飞散的可能;如在安瓶內塞一合适的棉塞,即可防止这种危險和避免污染杂菌。

4. 啓开真空封閉的菌种安瓶时,应该特別注意安全,不能采取啓开一般藥品安瓶时所用的办法,文內对于菌种安瓶的啓开方法略作討論。

本文承沈陽中國医科大学袁冠华副教授、北京中央衛生研究院方綱先生指导和校正,謹此致謝。

## 参 考 文 献

- [1] Колесов, С. Г.: Высушивание микроорганизмов и биопрепаратов. Москва, Сельхозгиз, стр. 3, 1952.
- [2] Соколов, М. И.: *Ж. М. Э. Б.*, 1954, 5: 13. (微生物学譯报 2(5): 337).
- [3] Stein, C. D. & Rodgers, H.: *Am. J. Vet. Res.*, 11: 339, 1950.
- [4] Reitman, M., Moss, M. L., Harstad, J. B., Alg, R. L. & Gross, N. H.: *J. Bact.*, 68: 541, 1954.
- [5] 傳染病研究所学会編, 細菌学實習提要. 改訂第一版, 第 117 頁, 1951. (天津勁騰書店影印)
- [6] Cowan, S. T.: Infection and drying techniques. Freezing and drying (Symposium held in London). *Inst. of Biol.*, p. 127, 1951.
- [7] Fry, R. M. & Creaves, R. I. N.: *J. Hyg. Camb.*, 49: 220, 1951.
- [8] Smadel, J. E.: *Am. J. Pub. Health.* 41: 788, 1951.
- [9] Reitman, M., Moss, M. L., Harstad, J. B., Alg, R. L. & Gross, N. H.: *J. Bact.*, 68: 545, 1954.
- [10] 高守一: 微生物学材料的冷冻干燥, 尚未發表。

## A SIMPLE METHOD FOR PRESERVING BACTERIAL CULTURES BY FREEZE-DRYING

KAO SHOU-GI

1. A simple method, using anhydrous calcium sulphate as desiccant, for freeze-drying of bacterial cultures is described. The apparatus may be easily assembled from equipments readily obtainable in most laboratories. Using this assembly, as many as 100 ampoules of cultures can be dried in one run.

2. Bacterial cultures (including *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*) dried by this method and stored in the refrigerator have kept their viability for at least a year.

3. Tests with cotton plugs placed in the neck of the ampoule have shown that when milk, serum, or serum-broth (ratio 8:1) containing 7.5% glucose were used as protective medium for the drying culture, there is in all cases a possibility for the organism being dried flowing out of the ampoule during the drying process. These experiments have also shown that a suitable cotton plug placed in the neck of the ampoule has been found capable of trapping this flow as well as avoiding extraneous contamination.

4. For the sake of safety to the operator, special attention should be exercised when opening an ampoule containing dried culture and proper technique have been briefly described.