



菌种鉴定及保藏的技术要点

中国兽医药品监察所
菌种保藏与检测室

田野

2024.08



CONTENTS

01

我国兽医微生物菌毒种保藏的发展历程

02

细菌分类、鉴定常用的概念

03

细菌鉴定的技术要点

04

菌种保藏的技术要点

发展历程



CVCC

国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心

National Center for Veterinary Culture Collection



中国兽医药品监察所



我国于1951年成立了全国性的微生物菌(毒)种保藏管理委员会

1951

1952

农业部设立中监所并由中监所负责保存、供应兽医生物药品制造用的菌种毒

成为具有实体的保藏机构

1953

原国家科委建立了一批病原微生物菌(毒)种保藏中心和专业实验室

1979

国家成立中国微生物菌种保藏管理委员会，下设7个专业性保藏管理中心，兽医微生物菌种保藏管理中心是其中之一。

1980

兽医微生物菌种保藏管理中心，机构设置在中监所。指定职责是从事兽医微生物菌种的收集、保藏、管理、交流和供应。

1984

中监所成立菌种保藏室，具体承担兽医微生物菌种保藏管理中心的工作。



发展历程



CVCC

国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心

National Center for Veterinary Culture Collection



中国兽医药品监察所



中华人民共和国农业农村部公告

第 336 号

为进一步加强动物病原微生物菌(毒)种保藏管理,更好地保护和利用我国微生物资源,推进生物科学技术发展,有效防范和化解生物安全风险,我部依据《中华人民共和国动物防疫法》《病原微生物实验室生物安全管理条例》《兽药管理条例》《动物病原微生物菌(毒)种保藏管理办法》等法律法规规定,指定国家动物病原微生物菌(毒)种保藏机构。各保藏机构要严格按照有关法律法规和农业农村部相关规定要求,做好菌(毒)种保藏管理。我部对保藏机构实行动态管理,将根据保藏管理情况及检查评估结果,适时调整保藏机构名单。

现予以公告。

附件

国家动物病原微生物菌(毒)种保藏机构名单

一、国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心

在中国兽医药品监察所设立国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心。主要负责菌(毒)种和样本的收集、筛选、分析、鉴定、保藏和管理,以及各分中心和保藏专业实验室所保藏菌(毒)种的统一编目。

5个分中心、29个专业实验室

2011年,我国依托9个保藏机构建立起国家微生物资源平台,分别以中国农业、医学、药用、工业、兽医、普通、林业、典型培养物、海洋9个国家专业微生物菌种管理保藏中心为核心单位。



发展历程



中华人民共和国生物安全法

2020-10-18 08:53 来源：新华社

【字体：大 中 小】 打印 分享 更多

- 国家安全
- 生物安全风险
- 人民生命健康 生物资源 生态环境
- 生物技术健康发展
- 人类命运共同体
- 人与自然和谐共生



发展历程



中华人民共和国生物安全法

2020-10-18 08:53 来源：新华社

【字体：大 中 小】 打印 分享 更多

新华社北京10月17日电

第六十八条：国家统筹布局全国生物安全基础设施建设。国务院有关部门根据职责分工，加快建设生物信息、人类遗传资源保藏、菌(毒)种保藏、动植物遗传资源保藏、高等级病原微生物实验室等方面的生物安全国家战略资源平台，建立共享利用机制，为生物安全科技创新提供战略保障和支撑。



兽医微生物菌毒种资源



CVCC

国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心
National Center for Veterinary Culture Collection



中国兽医药品监察所



兽医微生物菌(毒)种资源

是指经过国家保藏机构**鉴定、分类**并予以固定编号的微生物及相关信息，是国家微生物菌种资源的重要组成部分。

- 动物疫病的防治和畜牧业发展
- 食品安全与人类健康
- 动物及动物产品贸易
- 科研与教育发展
- 生物安全 and 国家经济安全稳定



CONTENTS

01

我国兽医微生物菌毒种保藏的发展历程

02

细菌分类、鉴定常用的概念

03

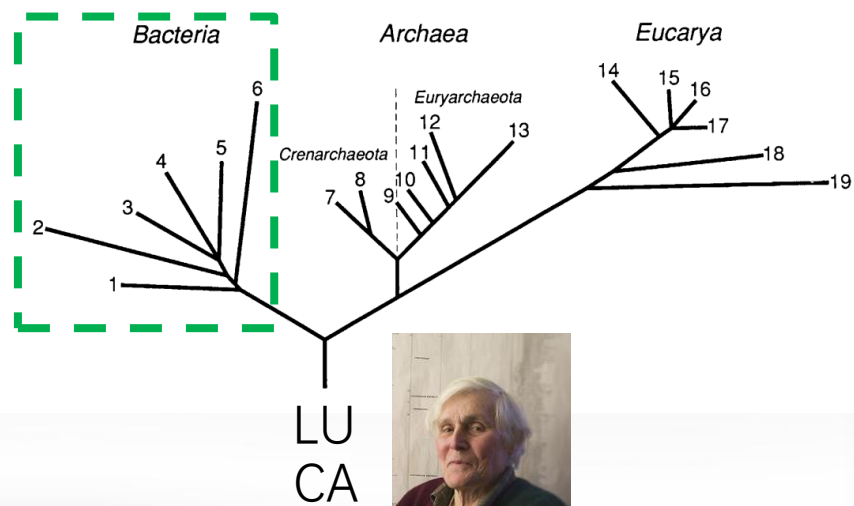
细菌鉴定的技术要点

04

菌种保藏的技术要点



地球生命之树-二域论和三域论之争



Woese et al. 1977,
1990, PNAS

生命之树为二域分类系统，而非三域分类系统

郭良栋

(中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101)

Williams等(2013)在Nature上发表了关于生物分类系统研究的综述文章(<http://www.nature.com/nature/journal/v504/n7479/full/nature12779.html>), 通过对近30余年研究结果的总结分析指出, 目前广泛

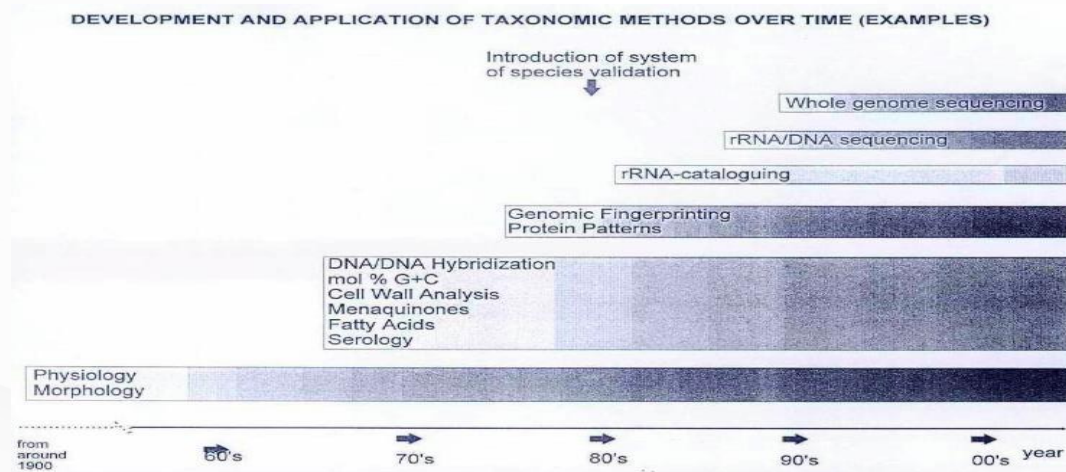
基因、单基因和多基因的组合, 以及不同系统演化模型对生物分类系统构建的影响。(2)新古菌进化分支和真核生物起源。随着泉古菌近源的新的古菌类群如初古菌门(Korarchaeota)、奇古菌门(Thaum-



细菌分类的历程



荷兰贸易商与科学家，光学显微镜之父	形态分类	表型分类 形态、染色、培养、细胞壁结构、生理生化、抗原性等特征	数值分类 借助计算机，将拟分类的细菌按其性状相似程度归类定位	化学分类	分子分类	多相分类 气相-液相质谱分析细菌的脂肪酸谱（恒定的）	基因组分类
1683 1695	1773	1870	1950'	1960'	1980'	1990'	2010'
Antonie Philips van Leeuwenhoek	Otto Friedrich Muller (1730-1784)	Ferdinand Julius Cohn (1828-1898)	PH Sneath & RR Sokal Nature, 1962		R. R. Colwell JB, 1970		



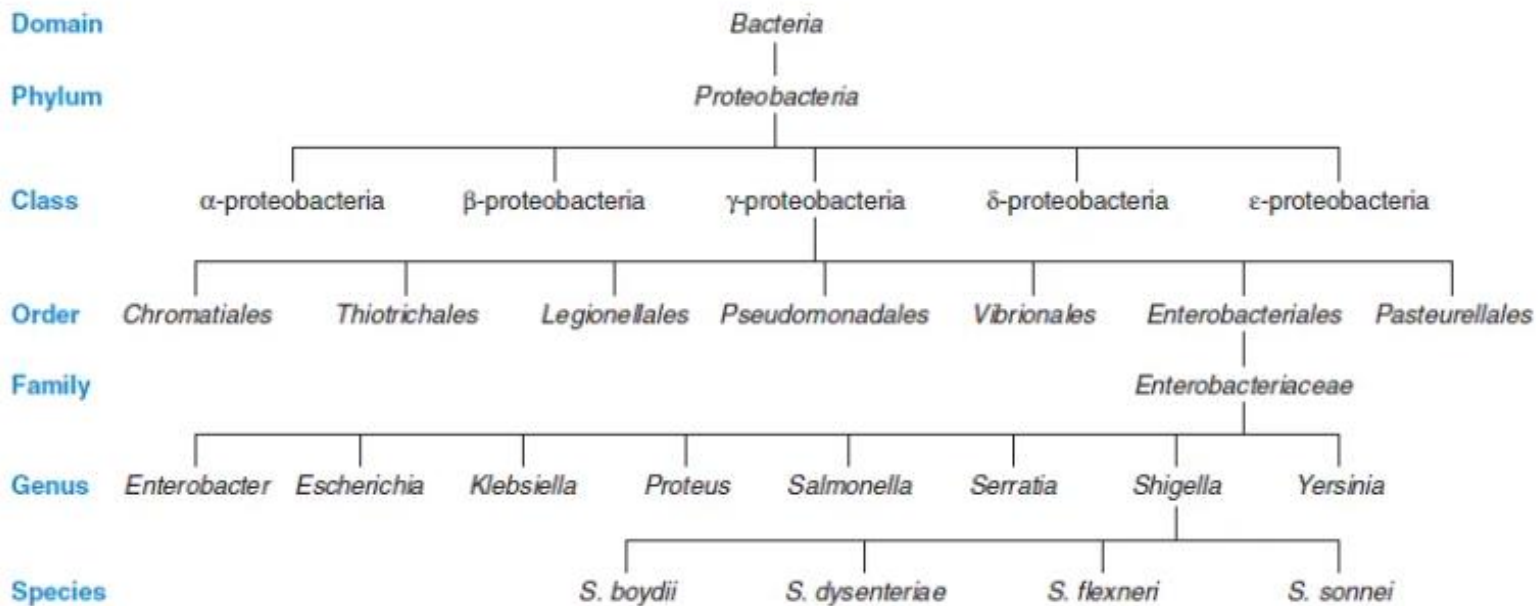
×舍本逐末



分类学中的结构层次



域
门
纲
目
科
属
种



属 (genus)：是具有共性的若干种的组合，与其他属有明显差异。16S核糖体RNA序列差异应大于5%-7%。

种 (species)：16S rRNA 序列的异同可作为定种的依据，同源性大于98.65%的两株细菌即可确定为同一种。



细菌的分类、命名与鉴定



分类 (Classification)：按照一定的原则对微生物进行分群归类，根据相似性或相关性水平排列成系统，并对各个分类群的特征进行描述。 **(根据现有数据建立系统的过程)**

命名 (Nomenclature)：是根据国际细菌命名法规给细菌分类单元以科学名称。

随着国际微生物系统分类学技术的不断提高，细菌的分类学名称和地位是**不断变化的**。

- **猪链球菌**(荚膜抗原差异)曾分为35个血清型 (1-34及1/2) ， 32、34型为鼠口腔链球菌， 20、22、26型为副猪链球菌、33型为反刍动物链球菌
- 标准菌株 **ATCC16404** 被列入包括《美国药典》在内的各类标准中,原为黑曲霉，现为巴西曲霉



细菌的鉴定



鉴定（ Identification）： 是确定一个新的分离物属于已经命名的分类单元的过程。借助于现有的微生物分类系统，通过特征测定，确定其所应归属类群。

（根据现有系统确定微生物分类归属的过程）





细菌的种、亚种与菌株



种 (Species)：细菌中的“种”是指一群表型特征高度相似、亲缘关系极其接近、与同属内其他种有着明显差异的菌株的总称。



亚种 (Subspecies)：根据一致的表型变异或序列相似度区别的，一个种可以被分为两个或多个的亚种。亚种是命名规则涵盖的最低的分类学等级，并在命名中有正式的分类学地位。



菌株 (Strain)：指纯培养物中由一个独立分离的单细胞繁殖而成的后代，通常由最初从单菌落分离得到的一系列培养物组成。





模式菌



模式菌株 (type strains) 是在给微生物定名、分类记载和发表时，以纯菌状态所保存的菌种，是微生物分类学的标准参考物质，也是理想的生物技术研究工具，具有重要的科研和产业价值。在微生物中，一个种只能用该种内的一个典型菌株当其具体代表。

如 *Bacillus subtilis* DSM10^T

模式菌株应送交**两个不同国家**的菌种保藏机构保藏。





CONTENTS

01

我国兽医微生物菌毒种保藏的发展历程

02

细菌鉴定常用的概念

03

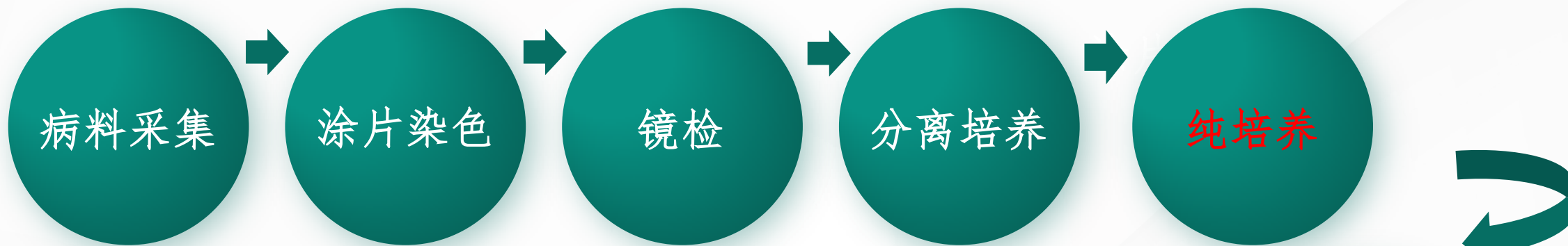
细菌鉴定的技术要点

04

菌种保藏的技术要点



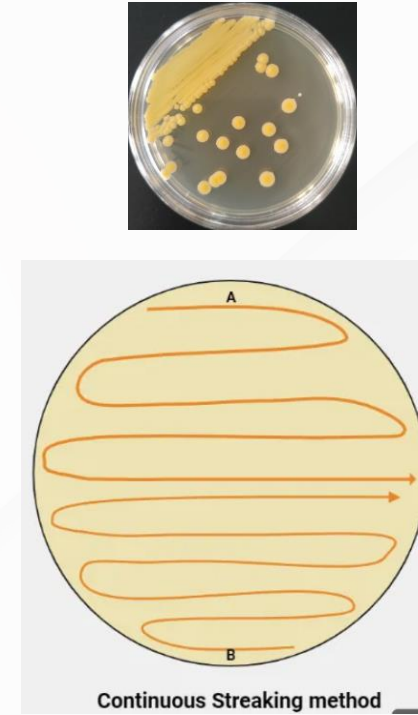
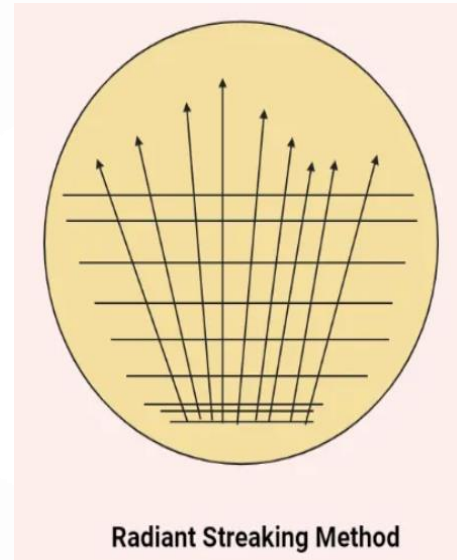
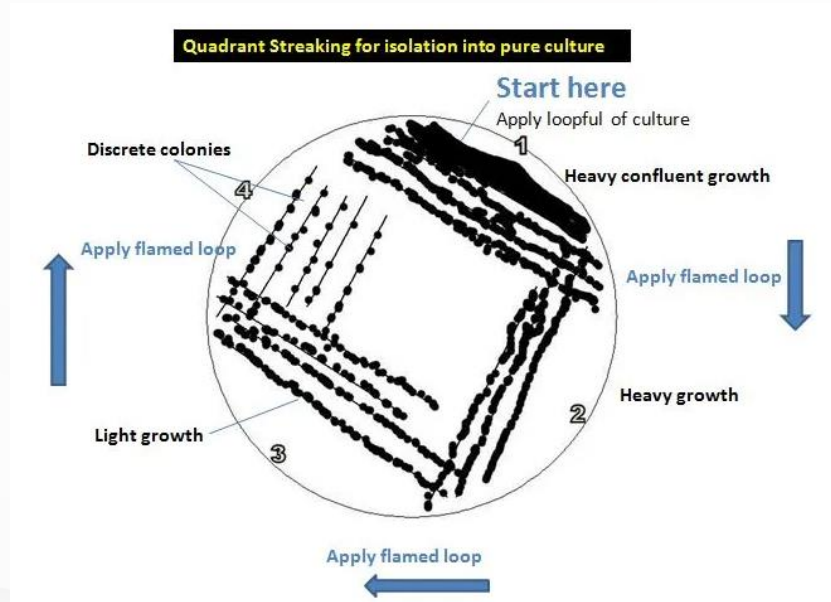
细菌鉴定的经典程序



培养特性
DNA鉴定
生理生化鉴定
分型鉴定
动物试验



传代-平板划线法





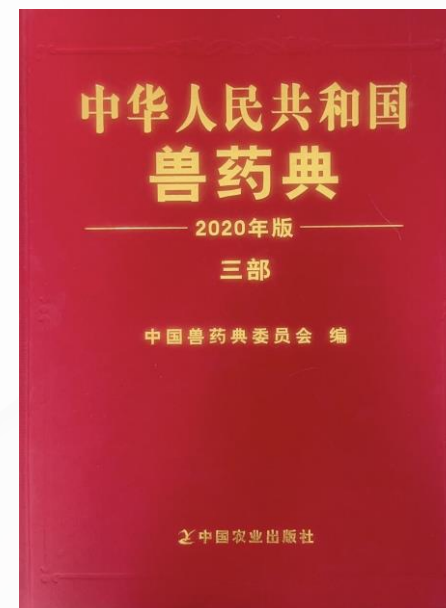
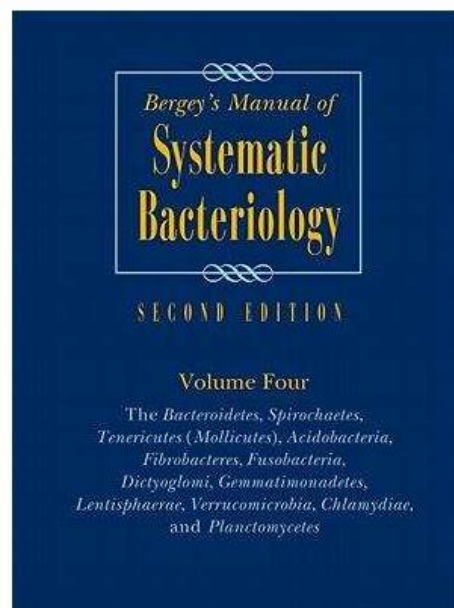
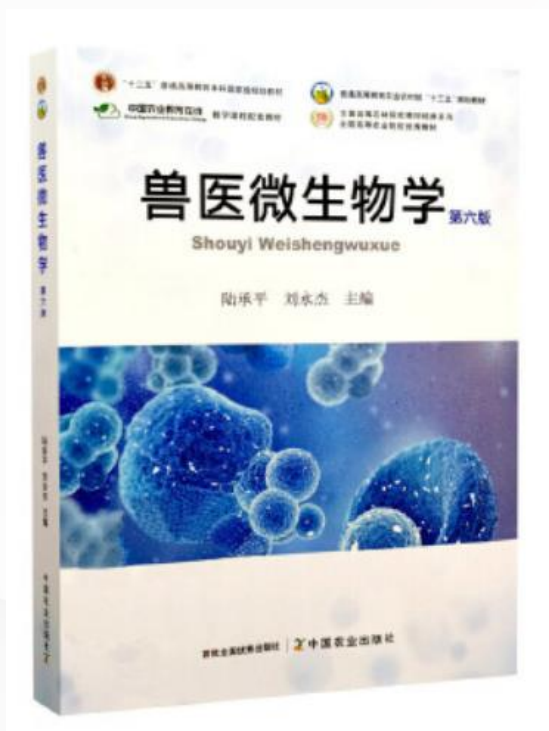
使用鉴别培养基、选择培养基的关键点



- 从培养皿中获得的单一克隆并不一定是**纯**的菌体，污染菌不在鉴别、选择培养基上生长，但会随着所要分离的菌株一起传代
- 最终的分离物须在**完全培养基**上进行检测



鉴定依据





鉴定-形态学鉴定



特征		不同类群的区别
菌落特征		如菌落的形状、大小、颜色、隆起、质地、光泽、表面形状、边缘结构等（球菌、鞭毛、荚膜、芽孢、产色素）
细胞形态	形状	球状、杆状、螺旋状、弧形、丝状、分枝及特殊形状
	大小	其中最重要的是细胞的长宽或直径
	排列	单个、成对、成链或其他特殊排列方式
特殊的细胞结构	鞭毛	有无鞭毛、数量及排列
	芽孢	有无芽孢、形状、着生位置、胞囊是否膨大
	荚膜	有无荚膜
染色反应		单染色法（美兰染色）、复染色法（革兰染色、抗酸性染色、姬姆萨染色等）、特殊染色法（荚膜、鞭毛、芽孢染色）

- 易于观察和比较，尤其是具有特殊形态结构的细菌。
- 许多形态学特征依赖于多基因的表达，具有相对的稳定性。



鉴定-形态学鉴定



产气肠杆菌



肺炎克雷伯菌



副猪格拉菌



产气荚膜梭菌



大肠埃希菌



副鸡禽杆菌



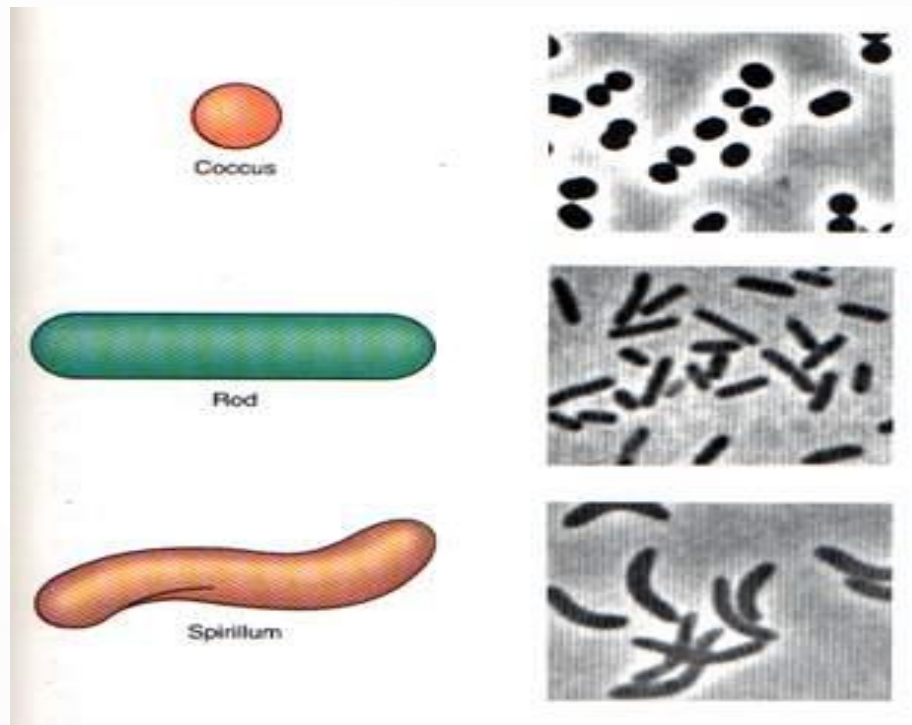
细胞形态较单一

基本形态

球状 coccus

杆状 rod/bacillus

螺旋状 spirillum



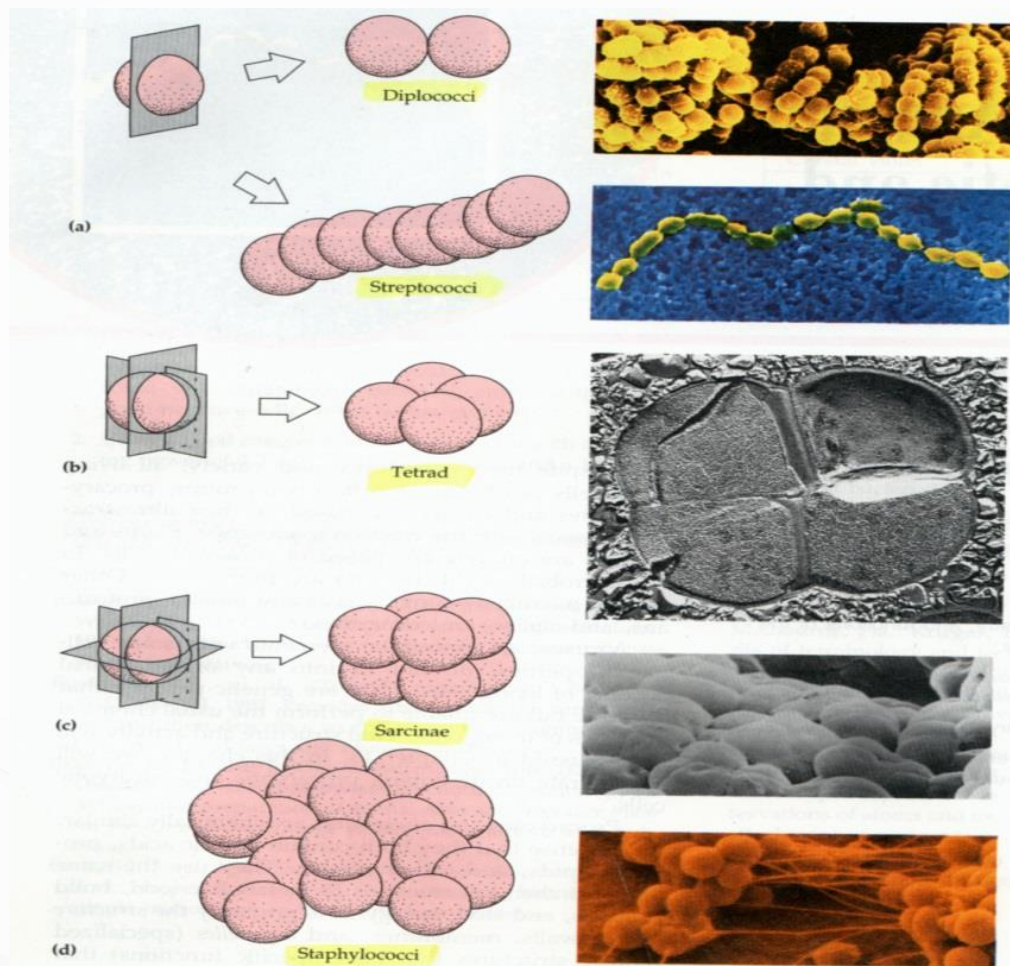


鉴定-形态学鉴定



球状

细胞个体呈球形或椭圆形，不同种的球菌在细胞分裂时会形成不同的空间排列方式。



双球菌

链球菌

四联球菌

八叠球菌

葡萄球菌

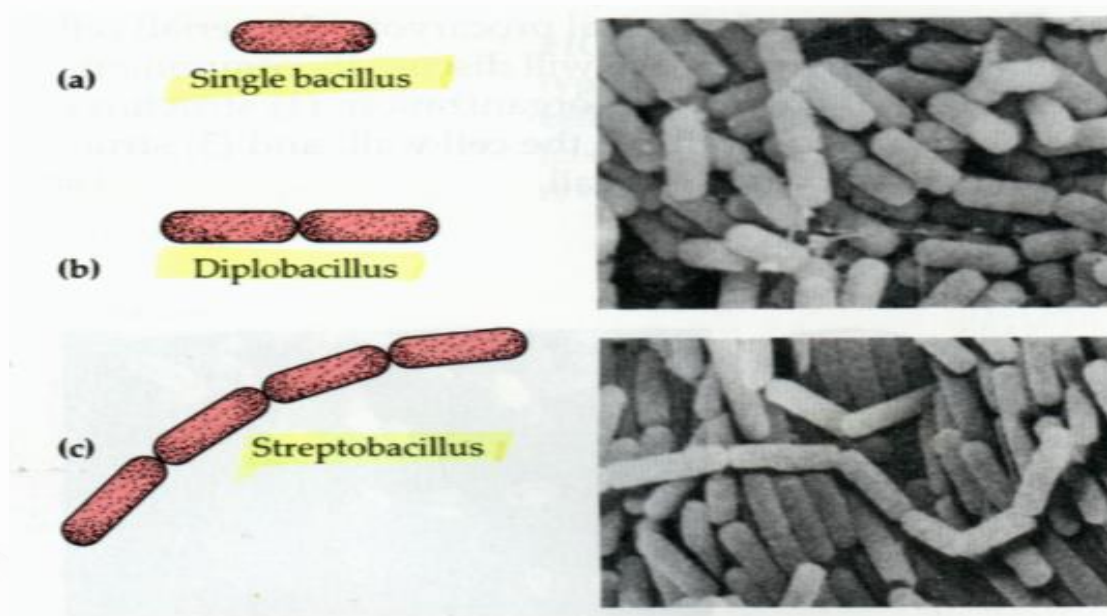


鉴定-形态学鉴定



杆状

细胞呈杆状或圆柱形，一般其粗细（直径）比较稳定，而长度则常因培养时间、培养条件不同而有较大变化。



单杆菌

双杆菌

链杆菌

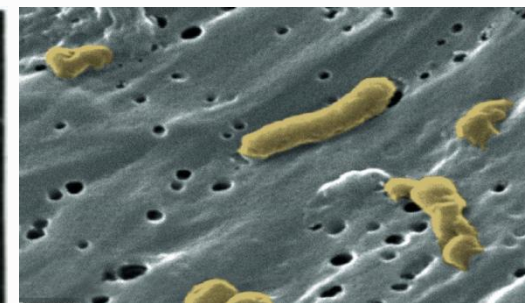
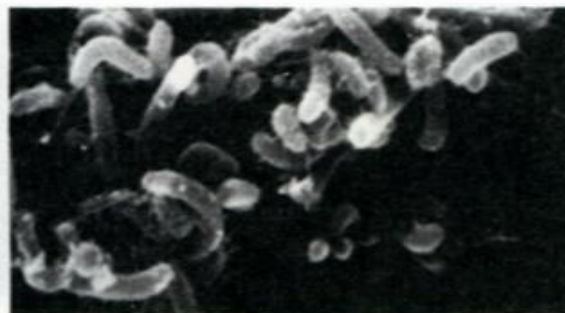
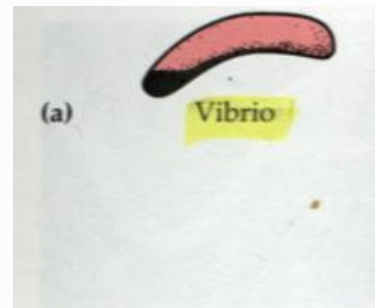


鉴定-形态学鉴定



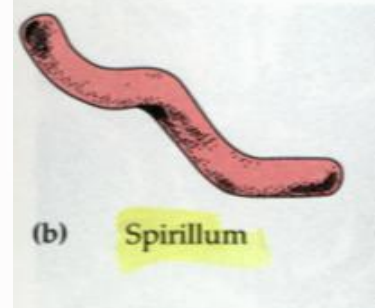
螺旋状

菌体称弯曲
或螺旋状的
圆柱形



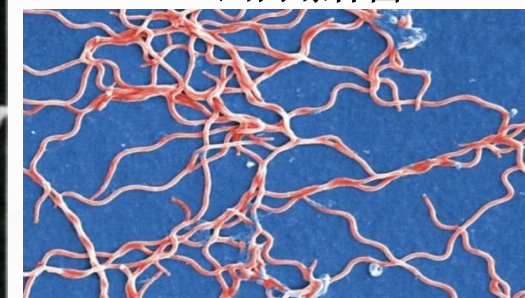
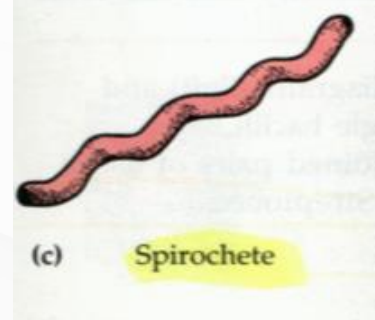
弧菌

霍乱弧菌



幽门螺杆菌

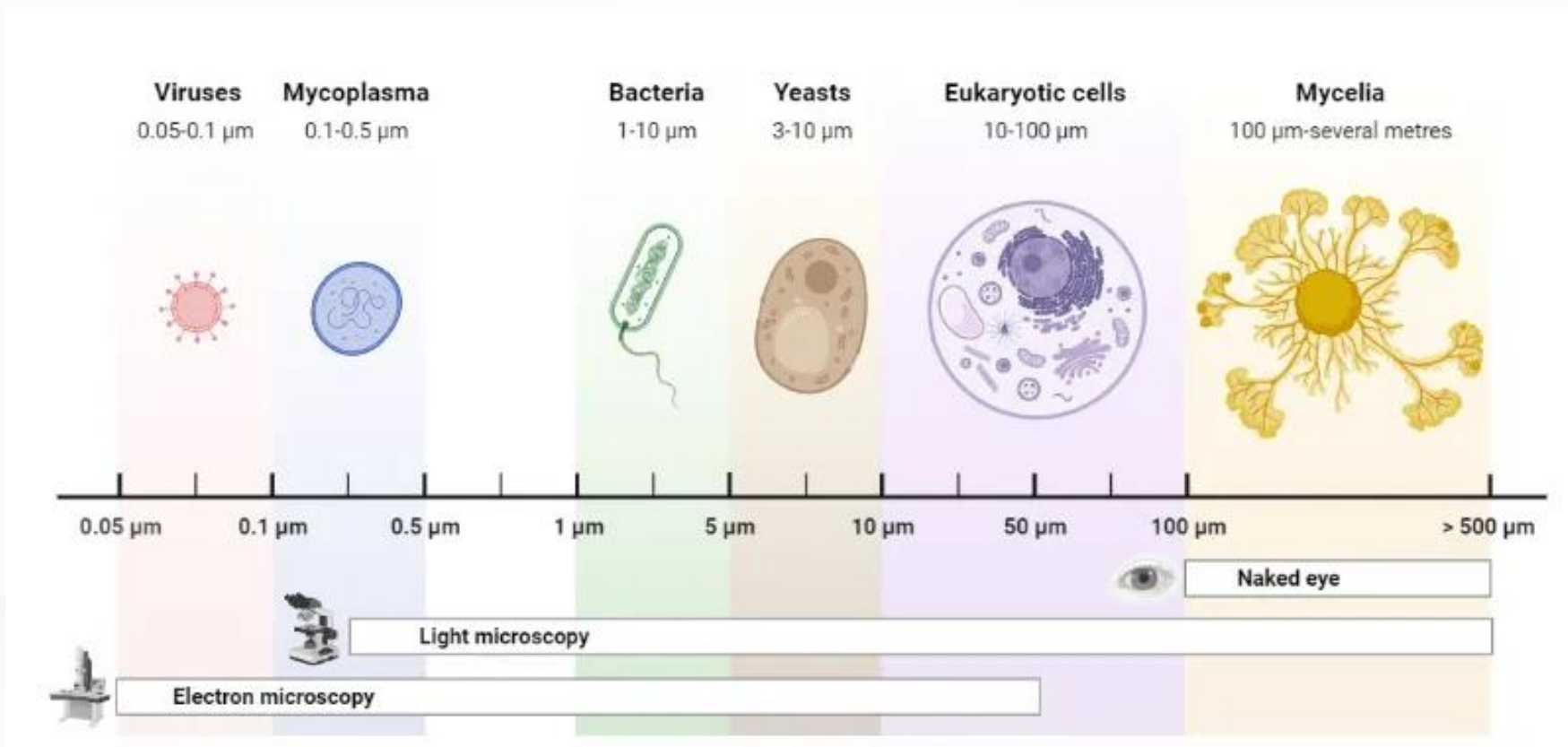
螺菌



梅毒螺旋体



细菌大小



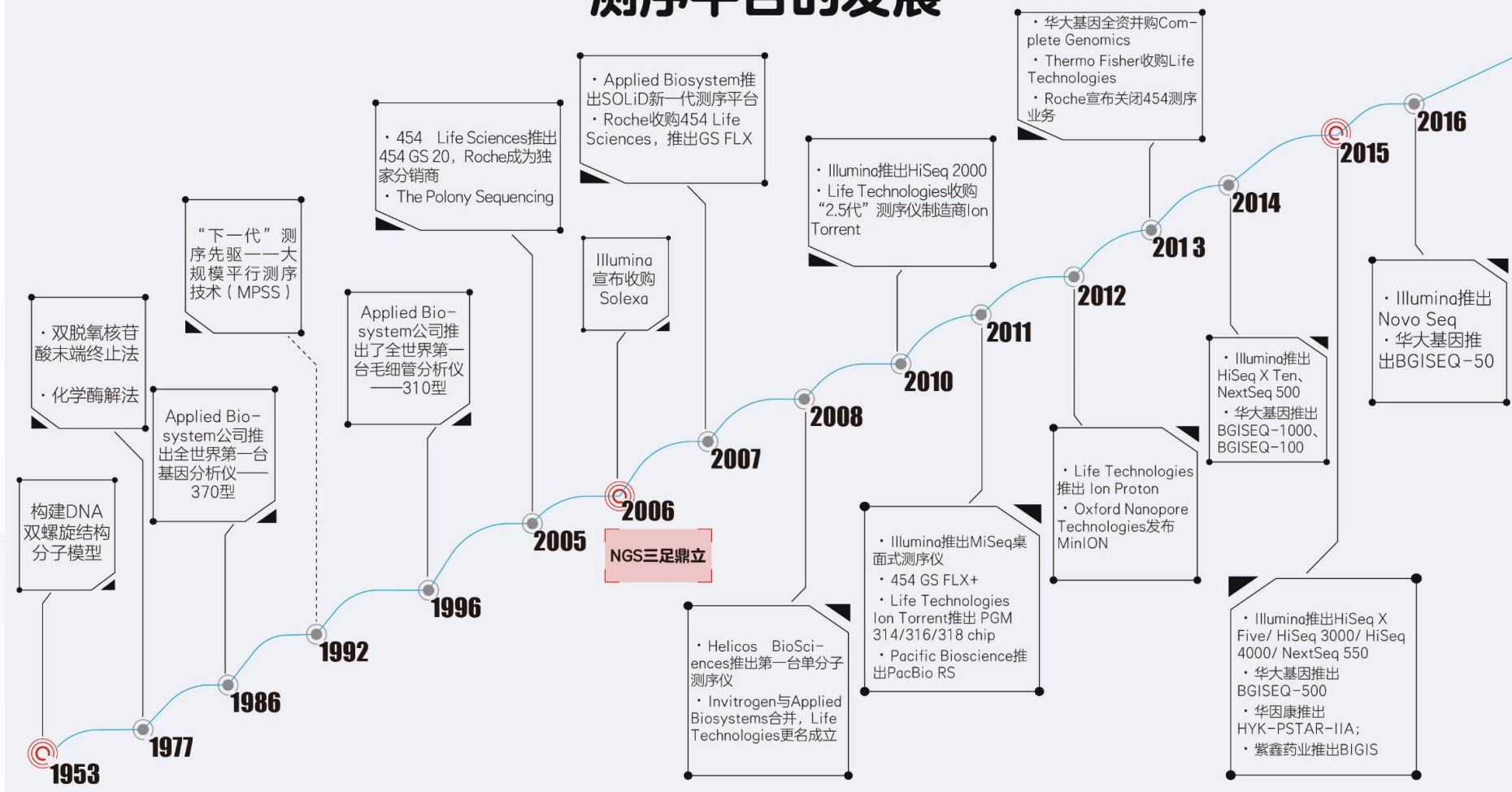
Most bacterial size range from 0.2 to 2.0 μm in diameter and 2 to 8 μm in length.



鉴定-DNA鉴定



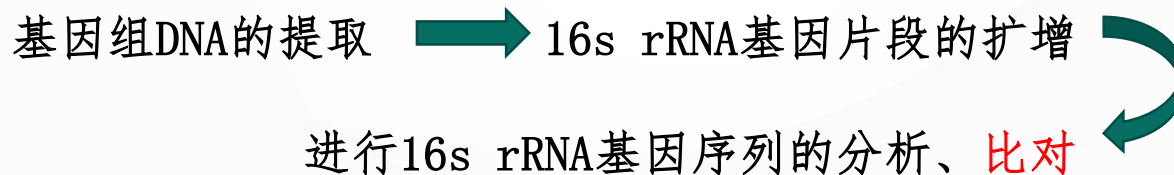
测序平台的发展





16S rRNA鉴定

- 16s rRNA具有**高度的保守性和特异性**以及该**基因序列足够长、分子量适中**
- 数据库较为完善
- 对细菌进行**快速、微量、准确简便**地分类鉴定和检测





鉴定-DNA鉴定



EZ BioCloud

DASHBOARD

APPS

TOOLS

RESOURCES

HOW TO CITE

ABOUT

HELP CENTER

SUPPORT

LICENSES



EzBioCloud Apps

[Learn more about these applications](#)

Identification of Prokaryotes



16S-based ID

Identifying a bacterial isolate using 16S rRNA

0



Genome-based ID (TrueBac ID)

Identifying a bacterial isolate using genome

Microbiome/Metagenomics



16S-based MTP

Microbiome Taxonomic Profiling



Shotgun-based MTP

Microbiome Taxonomic Profiling (Beta)

Genomics



WG

Whole Genome Analysis



CG

Comparative Genomics

1



85,290
Taxa



66,303
16S rRNAs



191,909
Qualified Genomes

- 专门针对细菌、古菌16S rRNA基因的数据库
- 人工校正、筛选



鉴定-生理生化鉴定

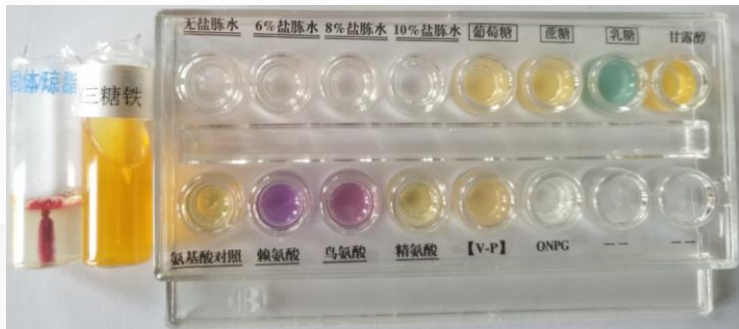


原理：不同种的细菌能够**利用的营养物质不同**，对相同营养物质的**分解产物**也不同，据此可设计特定的生化反应来鉴定细菌。

氧化酶试验 (oxidase test)、触酶试验 (catalase test)、氧化发酵 (O/F) 试验 (oxidation-fermentation test)、VP试验 (VP test)、甲基红试验 (methyl red test)、枸橼酸盐利用试验 (citrate utilization test)、吲哚试验 (indole test)、硫化氢试验 (H_2S test)、脲酶试验 (urease test)



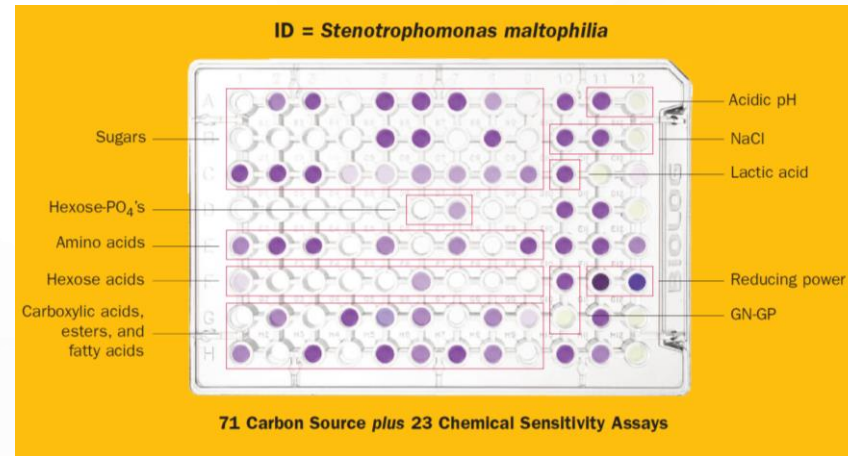
鉴定-生理生化鉴定



微量生化试验检测试剂盒



API鉴定系统-生化理论为基础，借助微生物信息编码技术



Biolog鉴定系统



BIOLOG法

BIOLOG微平板由对照孔和95孔不同单一**碳源**孔组成，进行95种唯一碳源的生化反应测试，使孔中呈现出不同的颜色变化，从而构成该种微生物特有的“**代谢指纹** (MetabolicFingerprint)”，经相应的仪器读取，与标准菌种的数据库进行比较，从而将被测菌种鉴定出来。



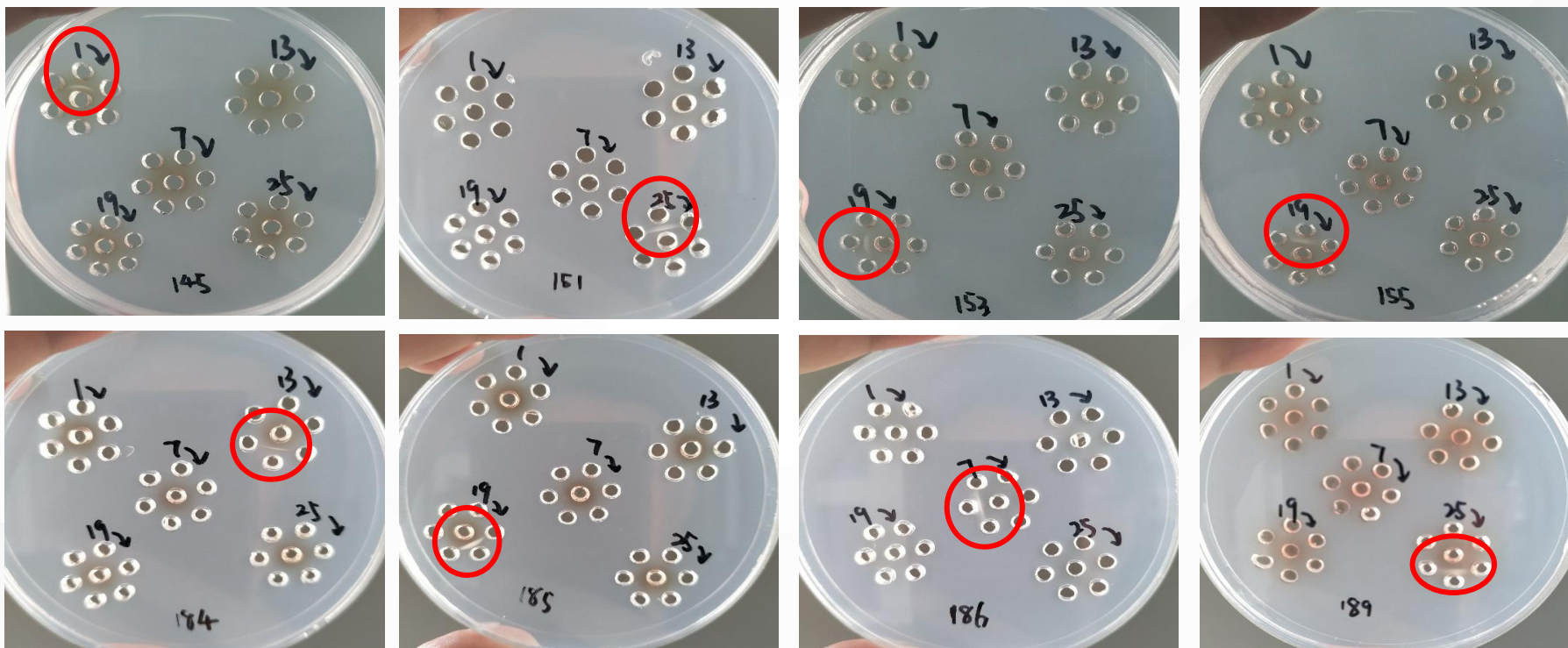
IFA、IFB、 IFC
BUG、 BUC
浊度范围
培养时间、温度



鉴定-血清型鉴定 (荚膜抗原、菌体表面抗原)



琼脂扩散试验法：副猪格拉菌 荚膜抗原的差异





鉴定-血清型鉴定 (荚膜抗原、菌体表面抗原)

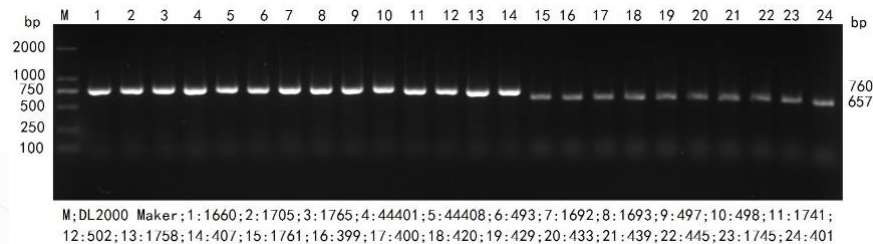
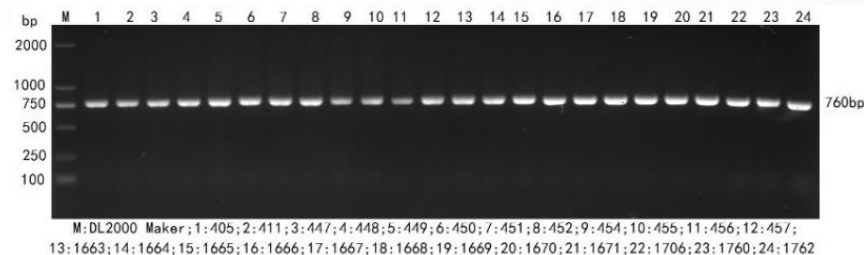
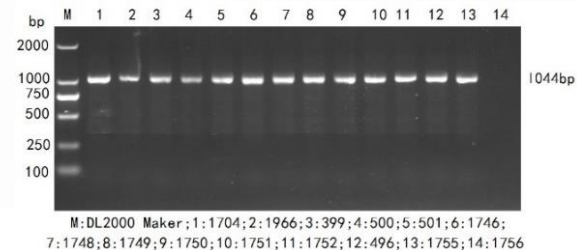


多杀性巴氏杆菌荚膜PCR分型 荚膜抗原: A B D E F

荚膜多重 PCR 扩增引物序列见表 D.1。

表 D.1 荚膜多重 PCR 扩增引物序列

检测目的	引物序列 (5'-3')	扩增大小, bp
荚膜定型	荚膜 A 型上游引物: TGC CAA AAT CGC AGT CAG	1 044
	荚膜 A 型下游引物: TTG CCA TCA TTG TCA GTG	
	荚膜 B 型上游引物: CAT TTA TCC AAG CTC CAC C	760
	荚膜 B 型下游引物: GCC CGA GAG TTT CAA TCC	
	荚膜 D 型上游引物: TTA CAA AAG AAA GAC TAG GAG CCC	657
	荚膜 D 型下游引物: CAT CTA CCC ACT CAA CCA TAT CAG	
	荚膜 E 型上游引物: TCCGCAGAAAATTATTGACTC	511
	荚膜 E 型下游引物: GCTTGCTGCTTGATTTTGTGTC	
荚膜 F 型上游引物: AATCGGAGAACGCAGAAAATCAG	851	
		荚膜 F 型下游引物: TTCCGCCGTCAATTACTCTG





鉴定-血清型鉴定 (荚膜抗原、菌体表面抗原)

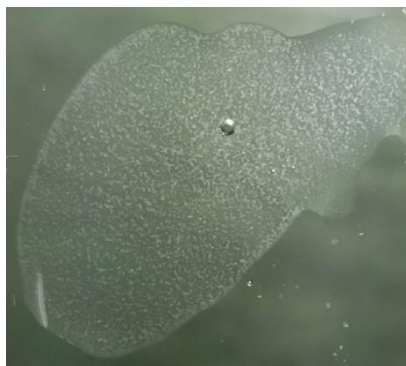


凝集试验法

每个大肠杆菌只含有一种O抗原，
可用单因子抗O血清通过凝集试验
鉴定



JS01株 (O141)



SD04株 (O138)



HN03株 (O139)

平板凝集试验



新方法-基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS)



- 是应用于临床微生物检验领域的一门新技术，是近年来发展起来的一种新型的**软电离生物质谱技术**，通过测定细菌自身独特的**蛋白质组成**，应用质谱技术将测得的**蛋白和多肽按分子量大小排列**，形成独特的**蛋白质组指纹图**，通过特征性的模式峰进行菌株的鉴定

MALDI-TOF-MS技术鉴定微生物优势

- 速度快，操作简单
- 结果不受生长培养基影响，结果不受细菌生长状态影响
- 重复性, 稳定性好。(在标准条件下进行样本制备和测量后，在不同的MALDI-TOF仪器上获取的质谱谱图具有很高的可比性。)
- 高通量，成本低。



有望成为微生物鉴定的一种重要方法

《兽药注册办法》和农业部第442号公告规定，兽用生物制品的制造应以**种子批系统**为基础。兽药典规定，兽用生物制品生产用菌（毒、虫）种应实行**种子批**和**分级管理制度**。种子分三级：原始种子、基础种子和生产种子，各级种子均应建立种子批，组成种子批系统。

原始种子：具有一定数量、背景明确、组成均一、经系统鉴定**免疫原性**和繁殖特性良好、生物学特性和鉴别特征明确、纯净的菌株。

原始种子批的建立

选用某一菌株用于兽用生物制品研制和生产后，即应建立原始种子批，以确保在制品的持续生产期内，能充分供应质量均一的种子。

基础种子：由原始种子制备、处于规定代次水平、一定数量、组成均一、经系统鉴定符合有关规定的活菌体培养物。

基础种子批的建立

基础种子由原始种子经适当方式传代扩增而来，增殖到一定数量后，将相同代次的所有培养物均匀混合成一批，定量分装（如安瓿），保存于液氮中或其他适宜条件下备用。

- 按照规定项目和方法进行**系统鉴定**合格后，方可作为基础种子使用。
- 基础种子批应达到**足够的规模(基础种子代次原则上应不超过3代，最好1代)**，以便能够保证相当长时间内的生产需要。

生产种子：由基础种子制备、**处于规定代次范围内**、经鉴定符合有关规定的活菌体培养物。

生产种子批的建立

生产种子由基础种子经适当方式传代扩增而来，达到一定数量后，均匀混合，定量分装，保存于液氮或其他适宜条件下备用。



种子批-全面鉴定



- 原始种子：繁殖或培养特性、免疫原性、血清学特性、鉴别检验及纯净性鉴定
- 基础种子：含量测定、安全或毒力试验（对本动物的致病性、人工构建菌毒株安全或稳定性试验）、免疫抑制试验、毒力返强试验、免疫原性试验（或最小免疫剂量）、纯净性检验、鉴别检验及稳定性试验（保存期、保存条件）
- 生产种子：纯净性检验、特异性检验和含量测定



基础种子的鉴定



对基础种子应进行系统的鉴定，一般应进行下列鉴定项目。

1 安全或毒力试验

- 本试验主要考察基础种子对**本动物的致病性**，为制定相应的标准提供依据，并为试验设施、生产设施、培养物灭活前或诊断试剂使用过程中应采取的**安全措施**等提供依据。
- 参照《**兽用生物制品实验室安全试验指导原则**》设计、实施安全试验。
- 对于人工构建的基因工程菌株，应该按照《农业转基因生物安全管理条例》和《农业转基因生物安全评价管理办法》有关规定进行安全或稳定性试验。



2 免疫原性（或最小免疫剂量）试验

- **活疫苗**：用不同剂量的菌种分别接种动物
- **灭活疫苗**：用最高代次基础种子制备疫苗菌液，取不同含量的细菌悬液，按成品生产工艺制备抗原含量不同的疫苗，或用固定含量的菌液制备疫苗后，取不同剂量的疫苗，分别接种不同组的动物
- 一般采用**免疫攻毒法**进行免疫效力检验，使**90%**免疫动物获得保护的细菌量
- 若疫苗使用对象包括多种动物或多种日龄动物，应对**各种靶动物**进行测定



3 毒力返强试验(如果试用)

《兽药注册管理办法》中规定：

- 在申请注册**活疫苗**的申报资料中必须提交菌（毒、虫）种的毒力返强试验报告。
- 毒力返强试验是评估疫苗的基础种子经靶动物**连续传代后的毒力或遗传稳定性**，以确保疫苗接种动物后**不会导致毒力增强**。



基础种子的鉴定



毒力返强试验的基本要求：

试验设计：制定试验方案，试验动物品种、日龄、数量、接种时间、途径、接种量、传代方法、观察内容和时间、微生物分离鉴定方法、传代后毒力返强程度的评价标准

试验动物：SPF级或健康易感动物，试验动物日龄应对被检微生物最易感，动物数量2-5头（只），在正式试验前应测定菌种对动物的敏感性

传代方法：在适宜的时间采集含菌量最高的组织、分泌物或排泄物作为继代接种物，对于容易水平传播的可以利用接触传播的方式进行传代

继代接种物：利用适当的方法对继代接种物进行生物鉴定，以证实传代微生物中是否有被检微生物，禁止将分离的细菌在体外增殖后再进行传代

接种剂量：首次：一般采用大剂量；继代：可加大接种剂量或对分离材料进行适当浓缩



基础种子的鉴定



毒力返强试验的试验程序：

第一次接种： 基础种子的**最低代次**

细菌的重分离： 靶动物感染后菌种的**增殖高峰期**，应采取最适当的组织、分泌物和排泄物来分离

细菌的鉴定： 最适宜的方法

继代： 每次继代的途径与细菌分离的方法应**一致**；接触感染途径应在感染动物病原增殖高峰期转移至新的隔离器（或动物舍）与易感动物混合饲养



基础种子的鉴定



毒力返强试验的试验程序：

- 观察：每次继代后应在适当的时间内观察接种动物是否出现由于疫苗株毒力返强所导致的**临床症状指标和病理变化**
- 传代次数：一般应不少于**5代**
- 最后一次传代观察时间：应逐日观察至21日
- 微生物重分离失败：如继代过程中未分离到微生物，应适当增加接种剂量或试验动物数量
- 继代试验失败验证：如经进一步试验确证继代后不能重分离到接种微生物，则该毒力返强试验结果成立



基础种子的鉴定



毒力返强试验结果判定:

临床症状及病理变化比较: 比较每一代次, 尤其是**最后一代**传代动物与**第一代**传代动物

细菌病原学鉴定: 必要时应对最后一次传代的细菌进行表型和基因型鉴定, 并与基础种子进行比较, 以评估遗传稳定性和毒力返强的可能性



4 纯净性检验

- 按照《中华人民共和国兽药典》中的有关方法进行检验，必要时须自行建立方法并加以验证。
- 应无细菌、霉菌、外源病毒污染；
- 应无杂菌污染；应无支原体污染。



5 鉴别检验

- 应采用适宜方法（如荧光抗体试验、毒种的血清中和试验、菌种的试管凝集试验、菌种的玻片凝集试验或菌种的生产特性检验）**鉴别疫苗株**，并尽可能与相关毒株相区别。
- 血清学特性鉴定，应采用通行的分型方法。
- 种特异性鉴定时，应用血清中和试验；若进行进一步的血清型或亚型鉴定时，则用型或亚型特异性单克隆抗体进行中和试验、免疫荧光试验或用其他已知具有型或亚型特异性的试验进行。

6 稳定性试验

- 确定基础种子在特定保存条件下的保存期。



CONTENTS

01

我国兽医微生物菌毒种保藏的发展历程

02

细菌鉴定常用的概念

03

细菌鉴定的技术要点

04

菌种保藏的技术要点



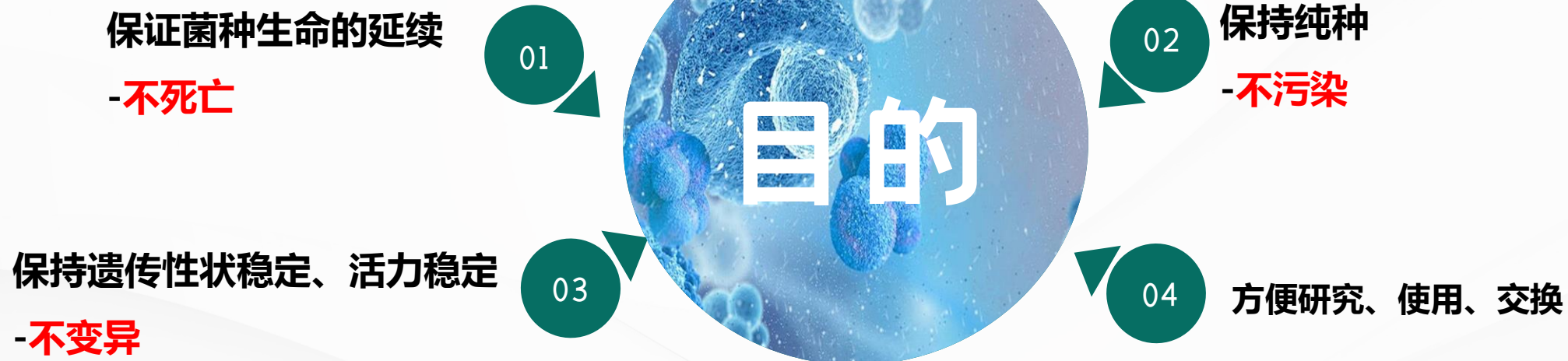
保存
(storage)

储存菌（毒）种，维持其活性和生物学特性的活动。

- 病原微生物菌（毒）种的保藏工作体现了一个行业乃至一个国家微生物资源开发、利用和管理的能力和水平，对于传染性疾病的预防控制、科学研究以及国家安全都具有十分重要的现实和战略意义！



保藏目的





根据微生物生命活动必需的各种条件（营养、环境）采取相应的措施，使其新陈代谢减缓或停止，生长繁殖受到抑制而处于（半）休眠状态。



措施：缺乏营养、干燥、低温、缺氧、避光



常用的保藏方法



- 石蜡油封藏法
- 砂土管包藏法（产芽孢的细菌）
- 斜面/半固体冷藏保藏法
- 液氮超低温保藏法
- 冷冻真空保藏法

各种微生物由于**遗传特性**不同，因此适合采用的保藏方法也不一样。一种良好有效的保藏方法，首先应能保持原菌种的**优良性状长期不变**，同时还须考虑方法的**通用性**、操作的**简便性**和设备的**普及性**。



石蜡油保藏法



技术要求

将灭菌后的液体石蜡倒入培养成熟的菌种斜面（或半固体穿刺培养物）上，石蜡油层高出斜面顶端1cm，使培养物与空气隔绝，加胶塞并用固体石蜡封口后，垂直放在室温或4℃冰箱内保藏。

菌种准备

此法广泛适用于各大类微生物菌种的中期保藏，不适用于保藏某些能分解烃类的菌种

石蜡油保藏法

保藏

主要保藏措施是低温、阻氧，一般可保存1~2年左右

特点

制作简单，不需经常移种。但必须直立放置，不便携带



砂土保藏法



技术要求

将砂与土分别洗净、烘干、过筛，按一定比例分装于小试管中，高度约1cm，121℃蒸汽灭菌1~1.5h，间歇灭菌3次

菌种准备

将待保藏的菌株制成菌悬液或孢子悬液滴入砂土管中，放线菌和霉菌也可直接刮下孢子与载体混匀，而后置于干燥器中抽真空约2~4h，用火焰熔封管口(或用石蜡封口)

砂土保藏法

保藏

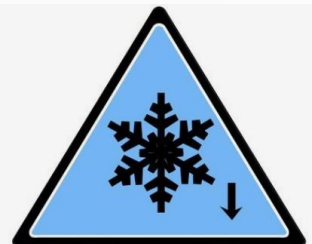
室温或4℃冰箱内保藏。
一种常用的长期保藏菌种的方法，适用于产孢子的微生物及形成芽孢的细菌。

特点

兼具低温、干燥、隔氧和无营养物等诸条件，故保藏期较长、效果较好，且微生物移接方便，经济简便。它的保藏期约1~10年。



低温生物学



经过实践验证，基于**低温生物学原理**的冷冻保存技术能够维持微生物菌（毒）种的高活性和遗传稳定性，是实现生物资源高质量和长期保存的重要方法。



低温生物学是生物科学的一个分支领域，是专门研究**0℃以下或接近0℃**的低温对生物体所产生的影响及其应用的学科，包括自然状态下生物耐寒性理论研究和通过冷冻保存维持生物样本存活状态的应用研究。

- 2022年5月10日，国家发展改革委发布《“十四五”生物经济发展规划》中明确提出，**积极发展低温生物学等保存技术，提升资源长期保存能力。**



- 低温保藏 (low temperature preservation) : 在低温条件下保存菌 (毒) 种, 使其代谢水平降低乃至完全停止生长繁殖, 达到半休眠或完全休眠状态的技术方法。
- 低温保藏条件: 冷藏 (2~8 °C) 、 低温 (-20~-40 °C) 、 超低温 (-60~-80 °C) 、 深低温 (-150~-196 °C)



冷藏保藏法



技术要求

用于菌（毒）种**短期**保存，无需添加低温保护剂；宜使用**一次性**无菌培养瓶或试管。如使用非一次性培养瓶或试管，清洗后于 121 °C 下高压灭菌 15 min 备用。

菌种准备

将**单个**细菌和真菌菌落接种于含相应培养基的培养瓶或试管中，在**合适的培养条件**培养。

冷藏 保藏法

保藏

待生长至**对数生长中后期**或**适宜浓度**，将培养瓶口或试管密封，保存于 **2~8 °C** 的冷藏条件。

特点

优点是**简便易行**，容易推广，存活率高；缺点是菌株仍有一定程度的代谢活动能力，**保藏期短**，**传代次数多**，菌种较**容易发生变异和被污染**。

refrigerated preservation



超低温保藏法



cryoprotectant, 保护菌种, 使其在低温保藏过程中保持活性度的物质

低温保护剂的准备

种类、浓度、灭菌

菌种准备

使用对数生长中后期培养物;

- 固体-刮取适量菌苔转移至含有无菌低温保护剂的冻存管内, 混匀, 制成菌悬液;
- 液体-振荡培养后取菌悬液与低温保护剂按一定比例混匀后分装于无菌冻存管内。

programmed cooling, 按照特定程序设计对菌种进行降温的过程。

程序降温

合理温度梯度、
可控的降温速率

保藏

保存期间应定期检查活力及杂菌情况。
建议保存周期为 1~5 年。

超低温保藏法

ultra-low temperature preservation



深低温保藏法



低温保护剂的准备

种类、浓度、灭菌

菌种准备

使用对数生长中后期培养物；

- 固体-刮取适量菌苔转移至含有无菌低温保护剂的冻存管内，混匀，制成菌悬液；
- 液体-振荡培养后取菌悬液与低温保护剂按一定比例混匀后分装于无菌冻存管内。

程序降温

- 将含菌种的冻存管置于程序降温设备中，以合适的降温速率进行降温，直到温度达到菌种悬浮液冻结点之下（通常为 5~10 °C），并维持 1~2 h。将冻存管迅速移入液氮罐中于液相（-196 °C）或气相（-150 °C）中保存。
- 如果无程序降温设备，则可将含菌（毒）种的冻存管置于（-60~-80 °C）冰箱中冷冻 2 h 后，迅速移入液氮罐中于液相（-196 °C）或气相（-150 °C）中保存。

深低温保藏法

特点

优点是操作简便、高效，且可使用各种培养形式的微生物进行保藏。其缺点是需购置超低温液氮设备，且液氮消耗较多，操作费用较高。

deep cryogenic preservation



冷冻干燥保藏法



简称冻干法，将菌种**悬浮于适宜的冻干保护剂**中，经预冻后在**高真空**状态下以升华方式除去水分，熔封管口或轧盖密封后，在冷藏保藏条件下（2~8℃）或-20℃及以下保存菌（毒）种的方法，使微生物处于**休眠**状态，而得以**长期保藏**。

- 此法适用于**各大类微生物**。
- 主要保藏措施是**低温、干燥、缺氧**，**存活率高，变异率低**，是目前被广泛采用的一种较理想的保藏方法。
- 该法操作比较**烦琐**，技术要求较高，且需要**冻干机**等设备。



冷冻干燥保藏法



安瓿的准备

安瓿管材料以**中性玻璃**为宜。清洗安瓿管时，先用**0.5-2%盐酸**浸泡过夜，自来水冲洗干净后，用蒸馏水浸泡至**pH中性**，干燥后标上菌号及时间，**干烤**备用。

lyoprotectant, 保护菌种，使其在冷冻干燥和保藏过程中保持活性的物质

冻干保护剂的准备

种类、浓度、灭菌



菌种准备

- 将低温保护剂加入培养物斜面，轻轻刮下稳定期的菌苔，制成**菌悬液**。取适量体积菌种悬液分装至灭菌安瓿管或西林瓶中，**避免溅污上部管壁**；
- 若是液体培养的菌种，应离心去除培养基，然后将培养物与冻干保护剂混匀，再分装至灭菌安瓿管或西林瓶中，并在1~2 h 内分装完毕。

预冻、冷冻干燥

以合适**降温速率**降至预冻目标温度，并预冻 2 h 以上，选择合适的冷冻干燥程序进行操作。

熔封/密封

- 干燥后，将安瓿管颈部用强火焰拉细熔封
- 或西林瓶轧盖密封

freeze-drying preservation

真空度/密封性测定

高频火花真空测定器





常用低温保护剂



常用低温保护剂	病毒	细菌	真菌
二甲基亚砷	√	√	√
甲醇			√
乙二醇			√
丙二醇		√	√
聚乙二醇		√	√
聚环氧乙烷		√	√
甘油	√	√	√
山梨糖醇	√		√
葡萄糖	√	√	√
蔗糖	√	√	√
乳糖		√	√
海藻糖	√	√	√
葡聚糖	√	√	√

常用低温保护剂	病毒	细菌	真菌
羟乙基淀粉		√	√
阿拉伯树胶	√	√	
聚乙烯吡咯烷酮	√	√	√
谷氨酸		√	
血液（去纤维化）		√	
血清	√	√	√
血清白蛋白	√	√	√
明胶		√	√
蛋白胨	√	√	√
糖蛋白		√	√
酵母抽提物		√	√
脱脂奶	√	√	√

注：√为低温保护剂已使用情况

渗透性的低温保护剂一般是小分子物质，可以与水溶剂发生水合反应，增加溶液的黏性，从而在一定程度上抑制冰晶的产生，最终达到保护细胞的效果。

非渗透性低温保护剂的作用是通过维持细胞膜的稳定来保护细胞。可以提高细胞外的渗透压，在冻存中使细胞内的水分快速向外渗出，减少细胞内的水分，从而减少细胞内冰晶形成，保护细胞减少损伤。



护常用冻干剂保

糖/醇类	聚合物类	氨基酸类	抗氧化剂类	缓冲剂类	表面活性剂类
葡萄糖	聚乙二醇	脯氨酸	微生物E	柠檬酸一水	吐温80
半乳糖	葡聚糖	甘氨酸	微生物C	磷酸	曲拉通X-100
甘露糖	羟乙基淀粉	谷氨酸	卵磷脂	乙二胺四乙酸	蔗糖脂肪酸酯
果糖	聚蔗糖	组氨酸	D-(-)异抗坏血酸	4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸	CHAPS
核糖	阿拉伯树胶	精氨酸	L-抗坏血酸钠		羟丙基-β-环糊精
木糖	凝胶	L-4-羟基脯氨酸	硫代硫酸钠	酒石酸	十二烷基硫酸钠
蔗糖	聚乙烯吡咯烷酮	L-丝氨酸	丁基羟基茴香醚	组氨酸	脂肪醇聚氧乙烯醚
乳糖	纤维素	β-丙氨酸	二丁基羟基甲苯	乙酸钾	Lubrol-px
麦芽糖	β-环式糊精	盐酸赖氨酸	棕榈酸丙酯	柠檬酸钾	Pluronic F127
海藻糖	甲基纤维素	赖氨酸	乙二胺四乙酸二钠盐二水	磷酸二氢钾	
棉籽糖	麦芽糊精860	肌氨酸		乙酸钠	
甘露醇	交联葡聚糖G200	γ-氨基丁酸		碳酸钠	
甘油	牛血清白蛋白			柠檬酸钠	
山梨醇				磷酸二氢钠	
木糖醇					
肌醇					



总结-五个基本要求



菌种信息完善明确

名称、分类学地位、来源史、生理生化特征、血清型、基因型、致病性、耐药性……

设施设备符合要求

保藏机构分区、实验室设施设备、温度和湿度、标识系统等管理，应符合相关要求

针对菌种特性选择**适宜的保存方法**，宜采用**两种或两种以上**方法保存，如只采用一种保存方法，菌（毒）种**须备份**并存放于两个独立的保存区域内

保存方法

低温（冻干） 保护剂选择合理

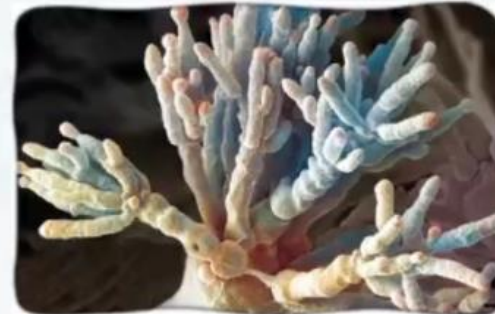
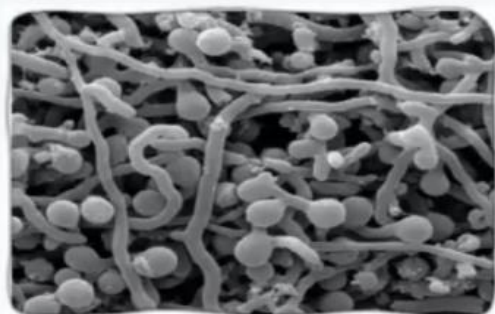
质量控制

数据：菌种信息、保藏信息要真实可靠可溯源
菌种：种子批管理制度、制定并执行相关程序文件、定期抽检

人类健康



强化兽医菌毒种资源保护意识，充分发挥兽医微生物资源在畜牧兽医科学研究、养殖业发展、食品安全、保护人民生命健康和环境以及国防等领域的重要性和其他资源不可替代的作用！





谢/谢/观/看

中国兽医药品监察所
菌种保藏与检测室

田 野

2024.08