

菌种保藏手册

中国科学院微生物研究所
《菌种保藏手册》编著组

科学出版社

内 容 简 介

本书从保藏菌种、管理微生物资源角度出发,介绍了组成培养基的化学成分及其根据;汇集了有关分离、纯化、鉴定或鉴别、保存等所用的培养基成方、配法共406种。书中阐述了获得纯培养的理论和技术;几类微生物的分离法。分别介绍了有关的细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌等274种的形态特征、培养特征、生理生化特征和应用。重点介绍了13种保藏菌种的方法的原理和操作。分节说明了动物病毒、植物病毒、噬菌体、好气性细菌、嫌气性细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌等的保藏法。还介绍了菌种的收集、供应等管理制度。在附录中收集了常用的试剂,缓冲液、氧化还原指示剂,研究微生物的某些方法等。可供从事菌种保藏的科学工作者及大专院校师生参考。

菌 种 保 藏 手 册

中国科学院微生物研究所
《菌种保藏手册》编著组

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中 国 科 学 院 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1980年2月第 一 版 开本:787×1092 1/32

1980年2月第一次印刷 印张:26 1/2 插页:2

印数:0001—5,680 字数:610,000

统一书号 13031·1150

本社书号:1609·13—9

定 价: 4.45 元

目 录

I. 概论	1
II. 培养基	5
一、概述	5
二、培养基的主要类别	9
(一) 天然培养基	9
(二) 半合成培养基	13
(三) 合成培养基	13
(四) 液体培养基、固体培养基和半固体培养基	14
(五) 繁殖和保存培养基	16
(六) 加富培养基	16
(七) 选择性培养基和鉴别培养基	18
(八) 测定生理特性的培养基	19
(九) 种子培养基和发酵培养基	20
三、培养基的一般制法和灭菌	20
四、各种培养基的配方、配法和用途	31
III. 纯培养技术	176
一、纯培养的含义和意义	176
二、基本的设备、要求和操作	177
(一) 无菌的概念	177
(二) 工作间或无菌室	178
(三) 接种工具	178
(四) 玻璃器皿和其他设备	179
(五) 移植、划线和穿刺	180
(六) 悬浮液及其混匀法	182
(七) 稀释法	182

(八) 倾注平板法·····	184
三、获得纯培养的理论和方法·····	185
(一) 样品与采样·····	186
(二) 集菌培养·····	187
(三) 纯化·····	202
(四) 分离法·····	205
(五) 纯培养的验证·····	209
四、一些微生物的分离和培养法举例·····	210
(一) 某些自养微生物的分离和培养·····	210
(二) 某些肠道细菌的分离·····	214
(三) 乳酸细菌的分离·····	218
(四) 醋酸菌的分离·····	220
(五) 梭状芽孢杆菌的分离·····	223
(六) 放线菌的分离·····	224
(七) 酵母菌的分离·····	229
(八) 霉菌(小型丝状真菌)的分离·····	232
(九) 担子菌的分离·····	233
IV. 工农业常用菌种的主要特征·····	237
一、细菌·····	237
二、放线菌·····	312
三、酵母菌·····	344
四、霉菌(小型丝状真菌)·····	490
五、担子菌·····	586
V. 保藏菌种的各种方法·····	610
一、定期移植保藏法·····	610
(一) 方法与步骤·····	610
(二) 要求的条件·····	611
(三) 注意事项·····	612
二、液体石蜡法·····	612
(一) 方法与步骤·····	613

(二) 要求条件·····	613
(三) 注意事项·····	613
(四) 适用的菌种·····	614
三、沙管保藏法·····	614
(一) 方法与步骤·····	614
(二) 适用的菌种·····	615
四、土壤保藏法·····	615
(一) 方法与步骤·····	616
(二) 适用的菌种·····	616
五、硅胶保藏法·····	616
(一) 方法与步骤·····	617
(二) 适用的菌种·····	617
六、滤纸保藏法·····	617
(一) 方法与步骤·····	618
(二) 适用的菌种·····	618
七、明胶片保藏法·····	618
(一) 方法与步骤·····	619
(二) 适用的菌种·····	619
八、麸皮保藏法·····	619
(一) 方法与步骤·····	620
(二) 适用的菌种·····	620
九、梭氏 (Sordelli) 真空干燥保藏法·····	621
(一) 方法与步骤·····	621
(二) 适用的菌种·····	622
十、液体直接干燥保藏法·····	622
(一) 方法与步骤·····	624
(二) 适用的菌种·····	625
十一、蒸馏水保藏法·····	626
(一) 方法与步骤·····	626
(二) 适用的菌种·····	627

十二、液态氮冰箱超低温保藏菌种法	627
(一)方法与步骤	627
(二)适用的菌种	629
十三、冻结真空干燥保藏法(冷冻干燥法)	629
(一)原理和要求	630
(二)一般程序	633
(三)各种装置及其操作步骤	639
(四)影响生物存活的因素	648
(五)样品中残留水分的测定法	653
VI. 各类微生物的保藏法	657
一、动物病毒的保藏法	657
二、植物病毒的保藏法	664
三、噬菌体的保藏法	677
四、好气性细菌的保藏法	681
五、厌气性细菌的保藏法	692
六、放线菌的保藏法	698
七、酵母的保藏法	704
八、丝状真菌的保藏法 (I)	
藻状菌、子囊菌和曲霉、青霉	710
九、丝状真菌的保藏法 (II)	
担子菌和半知菌类	731
VII. 菌种的管理	739
一、收集菌种的手续	739
二、菌种的档案与资料	741
三、菌种的交流和供应	749
四、劳动保护	752
附录	755
一、国外菌种保藏情况的介绍	755
二、研究微生物的一些方法	760
(一)细菌的几种染色法	760

(二) 细菌的几项生理生化实验.....	765
(三) 丝状真菌的观察法.....	773
(四) 酵母菌的鉴定方法.....	775
三、常用的药品和试剂	782
四、常数对照表	799
主要参考资料	804
培养基索引	809
培养基英文名称索引	817
菌名索引(拉丁文)	827

I. 概 论

微生物在自然界起着极复杂而又重要的作用，它们的生命活动对于人类和动植物的生存有着密切关系。没有微生物的存在，没有它们对各种物质所进行的各种转化，其他生物的生命也将终止。虽然某些微生物危害人，引起疾病，但是不少微生物对人类是有益的。近年来，人们在工农业生产、医药卫生事业以及科学实验等方面广泛地利用微生物并取得了很大成绩。现在微生物已不仅是人类战胜疾病，征服大自然的有力工具，而且也是现代工业的重要手段。例如微生物法石油脱蜡；微生物酶制剂在食品、纺织、印染、皮革、造纸各方面的应用；微生物对于有机化合物的催化与合成；细菌浸矿等，均为其他方法所不能比拟的。

菌种即微生物的种子。微生物在实践中的应用都是通过它们的种子来实现的。另外，菌种还在科研和教学中发挥“活标本”或“活图书馆”的作用。人们在长期的生产斗争和科学实验中，获得了许多宝贵的菌种，为了使这些菌种的生命得以延续，并保持它们原有的生物特征和性状，以备再实践，每个国家的有关工厂、医院、学校、科研、检疫等部门都保存了或多或少的菌种。目前，菌种已成为每个国家的一项重要生物资源，目前世界各国对这项资源都给予了极大的重视。

在微生物学尚未形成一门学科之前，人们在利用微生物方面就以感性知识做了保存菌种的工作。在我国，一千四百多年以前北魏时期，在贾思勰所著的《齐民要术》中已记载有详细的制曲法。从微生物学观点来看，曲既是发酵的种子或

酿造的酶制剂，也是以干燥形式保藏酿造用的微生物制品。又如八百多年前的宋代，已有预防天花种痘的方法，而痘苗也是微生物的种子。这说明菌种保藏并非新鲜的课题。随着微生物学的实践和理论不断发展，人们对保藏菌种的方法也逐渐增多，保存的种类也越来越广泛。

微生物学的分科很多，因而保藏菌种也有专业分工。例如工业、农业、医学、兽医、乳品、林业、海洋等微生物菌株都有专门的保藏机构。在我国，医用微生物的菌种保藏工作开展得较早，而且对传染病的防治或诊断，对疫苗、菌苗、抗血清、类毒素等生物制品的生产，对科学研究都作出了贡献。目前，北京药品生物制品检定所已成为全国医用菌种保藏中心。他们的业务面向全国，为各省市有关部门提供医用菌种起了积极作用。关于工业微生物学或农业微生物学所涉及到的菌种，解放前只有零星的菌株分散在少数实验室或工厂中，没有专门保藏菌种的单位。解放后，随着生产的发展，尤其是文化大革命以来，群众性的微生物科学实验搞的轰轰烈烈，因此对菌种的需要也逐日增加。为适应形势的发展，在一些研究机构内增设了菌种保藏。目前全国除中国科学院微生物研究所集中保藏菌种外，在各大区的有关单位都设立了菌种保藏研究机构。例如：哈尔滨、沈阳、天津、德州、济南、南京、上海、杭州、宜春、广州、成都、武汉、郑州、武功、石家庄等地的有关的研究单位；各地的有关的大专院校实验室，各专区或县级的菌种站等。仅从以上举出的来看，菌种保藏已广泛地分布在全国主要地区。对应用微生物学的发展，为群众性的科学实验，将提供更多方便。

在国外，1963年，国际微生物学会协会成立了“菌种保藏分会”。1966年7月联合国教科文组织在巴黎召开了一次会议，讨论了世界菌种保藏联合会的筹建、菌种保藏人员的培

养、发展中国家菌种保藏机构的建立等问题。会议决定对世界各保藏机构及其保藏菌种的情况进行调查,以便编制《世界菌种保藏名录》。1968年10月,在日本东京召开了第一届国际菌种保藏会议[International Conference on Culture Collections (ICCC-I)]。会上除进行了学术讨论外,还就编制《世界菌种保藏名录》作了详细的设计。1970年,在墨西哥城举行的国际微生物学会协会上,将菌种保藏分会改组为“世界菌种保藏联合会 [World Federation for Culture Collections (WFCC)]”,并决定每四年召开一次国际菌种保藏会议。为了了解各国菌种保藏机构的情况,在澳大利亚布里斯班市昆士兰大学微生物学系成立了情报中心。到1972年该会曾向世界55个国家352个机构进行了调查,而且编写出《世界菌种保藏名录》。名录中介绍了所调查的国家各菌种保藏机构的情况;同一种微生物在哪些机构中有保藏;同一种酵母菌哪些机构采用着异名;一种丝状真菌的几个异名等等。这对互相交流大有帮助。1973年,在圣保罗(San Paulo)举行了第二届国际菌种保藏会议(ICCC-II)。1976年3月,在孟买召开了第三届国际菌种保藏会议(ICCC-III),并且在孟买大学药学院,由3月1—19日,举办了菌种保藏训练班,为参加会议的一些发展中的国家,从事菌种保藏的人员,开设了几门专题讲演。

从以上介绍可以看出,菌种保藏是一项意义深远的事业,为使它更好地为社会主义建设服务,有待做大量平凡的工作。就其业务而言,各类微生物经过长期的保存后,要达到比较理想的目的,如不死亡,不污染杂菌,不发生或少发生变异等等,需要通过不断地实验来总结有效的保藏条件和方法。而从事这些工作,涉及到微生物的分离、培养、纯化、分类鉴定、生理或生化等多方面的知识。此外,菌种保藏不仅局限于保存活着的微生物,还肩负着管理这些生物资源的问题。如只保存

几种或几十种应用的菌种则比较单纯,而保存的类别多、数量大,又经常向外供应菌种,就必须注意管理的方式方法。

在我们日常工作中,对于某种微生物的收集,应采取的保藏方法、管理的方式,保藏后查对的凭据,诸如此类的问题,经常遇到,同时有关的参考资料也比较分散,因而对于初参加这项工作的同志,尤其感到有些困难。为弥补这一缺欠,现将我们平时收集的材料和经验汇编成手册,仅供我国从事菌种保藏工作的同志们参考。根据这种设想,本书选编的内容包括了培养基、微生物纯培养技术、工农业常用菌种的主要特征、各种保藏方法和菌种的管理等。

在培养基一章中,介绍了组成培养基的化学成分及其根据、培养基的主要类别及各类培养基的用途、制备的程序;并汇集了有关分离、纯化、鉴定或鉴别、保存等所用的各种培养基的成分及配法406种。在纯培养技术一章中,介绍了基本设备、要求和操作;获得纯培养的理论和方法;几类微生物分离法的举例。在工农业常用菌种的主要特征一章中,选择了一些细菌、放线菌、酵母菌、小型丝状真菌、担子菌等,介绍它们的形态特征、培养特征、生理生化特征和应用。在保存菌种的各种方法一章中,除重点介绍了13种保藏方法的具体操作步骤外,还讨论了该法适宜保存哪些微生物。在菌种的管理一章中,介绍了收集与档案材料、菌种的发放和供应手续以及劳动保护等。在附录中,收集了常用的试剂、缓冲液、氧化还原指示剂、研究微生物的某些方法,一些常数对照表等等。此外还介绍了一些国外保藏机构的情况。

由于编者思想和业务水平所限,编写的内容能否达到上述目的以及错误之处,希望广大读者提出宝贵意见,以便改正和补充。

李 钟 庆

II. 培 养 基

一、概 述

培养基是微生物的食物。培养基和容纳它的器皿一起是人工繁殖微生物的场所。人们种植农作物需要土壤、肥料、灌溉等等；喂养动物需要饲料；养殖水产需要池塘、湖、海等；培植菌种则需要制备培养基。根据各类微生物生长的不同要求，我们可以利用动植物组织或器官以及它们的浸出液，也可采取各种化学药品制成培养基。从营养角度分析，培养基中一般都含有水分、碳源、氮源、无机盐类和生长素。

水分 水是构成微生物细胞的成分之一，其含量为 70—90%。各种营养物质必须先溶解于水中，才能扩散到细胞内。而且在细胞内所进行的各种生化反应如合成代谢、分解代谢，都是在水溶液状态中完成的。

碳源 碳素是微生物细胞组成成分的主要元素。凡能供给微生物碳素营养的物质统称为碳源。碳水化合物（淀粉和各种糖类）、脂肪、蛋白质、有机酸、醇类、醛类和碳氢化合物（石油），都可以作为碳源。然而微生物的种类不同，所利用的碳源的种类也各有差异。

根据微生物对于碳源同化能力的不同，可将它们分为无机营养型（自养型）和有机营养型（异养型）。藻类和一小部分细菌属于无机营养型。其他微生物都属于有机营养型。

无机营养型的微生物以二氧化碳作为碳素营养，在细胞内合成有机物质，不需要由外界供给现成的有机碳化合物，而是

将没有能量的二氧化碳在细胞内同化为有能量的有机物质，这是一种吸收热能的反应，所以只有得到热能的供给时这一反应才能完成。一般无机营养型的微生物按其取得能量的方式又分为光能型和化能型两类。属于前类的微生物细胞中必须含有光合的色素，如藻类和紫色硫细菌，通过这类色素利用光能进行光合作用来同化二氧化碳；属于后一类的微生物，能氧化一定的无机化合物释放出化学能，并通过化学能来还原二氧化碳为有机碳化合物，例如亚硝化单孢杆菌（*Nitrosomonas*）和贝氏硫细菌（*Beggiatoa*）属。

有机营养型的微生物，只能利用现成的有机碳化合物为碳素营养，并从中取得能量。它们利用在分解有机化合物的过程中所释放的能量在细胞内合成有机物质。有机营养型的微生物又可分为腐生和寄生两类；凡是能生活在死的有机体或其制备物上的称为腐生型微生物；凡是生活在活的动植物体上的称为寄生型微生物，动植物的病原菌都属此类。腐生型微生物在自然界占大多数，工农业生产常用的菌种都属于这种类型。某些寄生型微生物既能生活在活的生物体中，又能生活在死的有机体中，称为兼性寄生。有些寄生型微生物则只能在一定的生物器官中生活，称为专性寄生。

了解了碳源与微生物生长的关系后，在制备培养基时可根据它们的生理特性，选择适宜的含碳化合物作为碳源。例如在培养藻类或硫细菌的培养基中不需加入碳源，它们可以利用空气中的二氧化碳；培养腐生型的微生物多选用各种糖类为碳源；而培养专性寄生菌则往往需要某种生物的活的组织或器官。一般工农业生产中常用的菌种大多能利用葡萄糖、蔗糖（或砂糖）、麦芽糖、淀粉、纤维素等为碳素营养。

氮源 氮素是构成活细胞的基本物质，即组成蛋白质的主要元素。根据微生物利用不同含氮化合物的能力可以将它

们分为氨基酸自养型和异养型两个主要类型。氨基酸自养型的微生物只需要无机氮化物如铵盐、硝酸盐等就能生活,它们也能利用有机氮化物如尿素、氨基酸甚至更复杂的蛋白质为氮源。工农业生产中常用的某些菌种多数属于这一类型。在这一类型中,有些种还能利用分子状态的氮(大气中的 N_2)作为氮源,如某些蓝藻、固氮菌、根瘤菌等。氨基酸异养型的微生物,它们在利用含氮化合物合成蛋白质时,某些氨基酸不能自制,必须供给现成的。所以在培养它们时,要求加入特殊的氨基酸作为氮源。例如干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 需要胱氨酸、亮氨酸、色氨酸、酪氨酸、门冬酰胺,产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*) 需要精氨酸、组氨酸、亮氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸等。

制备培养基时常用的氮源是: 蛋白胨、牛肉汤、各种氨基酸、酵母膏、花生饼粉、豆饼粉、硫酸铵、硝酸钠等等,可根据菌种的生理要求选用。某些氨基酸自养型微生物也能利用亚硝酸盐,例如宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*)、琉球曲霉 (*Aspergillus luchuensis*) 等。但是一般不采用亚硝酸盐作培养基,因为它的浓度稍高时就会产生生理毒害作用。

无机盐类 微生物生长除需要碳源、氮源外,还需要灰分养料,其来源主要是溶解在水中的某些盐类,例如磷酸盐、硫酸盐以及含钾、钠、钙、镁、铁、钼、锰、铜、钴、锌、铝等的盐类。微生物对它们的需要量虽然很小,但是它们在微生物生长中是不可缺少的。如磷和硫是构成蛋白质和核酸的必要元素,磷酸盐还具有维持酶活性和调节酸碱度的作用; 钾、钠、钙、镁、铁、钼等一方面也参与原生质和酶的组成,另一方面与原生质膜的渗透性有重要关系。

由于微生物对无机盐类需要量较小,所以有人称这些物质为微量元素。在制备合成培养基时,按照菌种生理要求,加

入适量的盐类。而制备天然培养基时,往往不必加这些盐类,或只加一部分,因为它们本身就含有这些元素。

生长素 生长素是微生物酶的组成部分,具有维持其代谢的功能。目前已经知道生长素大部分为维生素。例如乙族维生素中的硫胺素(B_1)、核黄素(B_2)、泛酸(B_3)、氨基嘌呤磷酸盐(B_4)、菸酸、吡醇素(B_6)、生物素(B_7)、肌醇、叶酸、钴胺素(B_{12})和丙种维生素(抗坏血酸)以及对氨基苯甲酸等。还有一些微生物,我们还不清楚它们所需要的生长素属何种物质。所以,用人工方法还不能培养它们。

各类菌种所需要的生长素的种类及其量有很大差别。如硫细菌、亚硝化单孢杆菌和能在察贝克合成培养基上生长的青霉、曲霉等等,不需要现成的维生素,它们在代谢过程中能自己合成各种维生素。有些微生物则不能自己合成,或只能合成一种或几种维生素,这样在培养它们时,培养基中就需要加入现成的维生素,例如布拉克须霉需要硫胺素;粪链球菌需要叶酸、生物素、吡醇素;干酪乳杆菌需要叶酸、菸酸、泛酸、核黄素、吡醇素;粗糙脉孢菌某些生理缺陷型的菌株则需要对氨基苯甲酸、生物素、硫胺素、菸酸等;某些啤酒酵母需要生物素、肌醇、硫胺素、吡醇素、泛酸等。微生物对维生素的要求,在实践中也有很大意义,如我们可以利用某一菌株对某种维生素的敏感性能定量地分析这种维生素,在应用微生物学中称这种分析方法为微生物测定法。

在制备培养基时,除合成的培养基需加入各种化学纯的维生素外,一般不需要特别地加这些维生素,因为在自然的材料或制品中,如酵母膏、花生饼粉、豆饼粉、玉米浆、蛋白胨、肉汤、麦芽汁中都含有维生素,尤其是酵母膏中所含的种类和量都很丰富。

以上四类物质是培养微生物时必须考虑的因素。在保存

菌种时,应根据微生物生理特性选择适当的碳源、氮源、无机盐、生长素或天然材料制备培养基,这样既符合菌种的要求又能取得良好效果。

二、 培养基的主要类别

根据制备时所用的物质,可将培养基归纳为天然培养基、半合成培养基、合成培养基三类。根据使用的方式,又可将培养基分为液体培养基、固体培养基和半固体培养基。另外,根据使用目的也可以将培养基归纳为繁殖培养基、保存培养基、加富培养基、分离培养基、选择性培养基、鉴别培养基、测定生理特性的培养基、种子培养基和发酵培养基等等。

(一) 天然培养基

凡是利用生物的组织、器官以及它们的抽提物或制品而制成的培养基,称为天然培养基。植物的根、茎、叶、花、果实、种子和动物的心脏、肝脏、脑、卵、肌肉等都是制备天然培养基的好材料。常用的有胡萝卜、马铃薯、大豆、棉籽、向日葵籽、麸皮、花生饼粉、豆饼粉、微生物菌体(如酵母)、酿造啤酒的麦芽汁、鸡蛋、牛肉、乳汁、奶酪、鱼粉、蛋白胨、明胶等等。选用这些物质作原料,主要是考虑到它们含有丰富的蛋白质、碳水化合物和维生素。现将几种材料的化学分析情况列于表1、2、3,以便于说明。

表 1 鲜牛肉的分析

成 分	含 量 %	成 分	含 量 %
氨基酸类	8.96	乳酸	23.04
α-氨基丙酸	1.27	乙醇酸	2.34
天门冬氨酸	0.25	琥珀酸	0.88
谷氨酸	0.78	肉毒碱	3.45
甘氨酸	0.25	尿素	0.68
异亮氨酸	0.24	氨	0.37
亮氨酸	0.63	无机物	27.50
赖氨酸	0.07		(8.95%K;7.3%P ₂ O ₅)
蛋氨酸	0.21	还原糖	2.10
苯丙氨酸	0.40	带色物质	15.80
丝氨酸、苏氨酸和门冬酰胺	2.59	维生素	(微克/克)
酪氨酸	0.21	钴胺素	0.3—1.0
氨基乙磺酸(牛胆碱)	1.67	硫胺素	0.9—3.0
缬氨酸	0.39	核黄素	1.8—3.5
肽(缩氨酸)	5.98	菸酸	24—102
胍类	10.20	泛酸	4.9—15.0
嘌呤	1.46	吡哆素	0.77—4.0
有机酸类	26.26	胆碱	760

表 2 酵母膏的分析

成 分	含 量 %	成 分	含 量 %
总氮	7.5—10.5	镁	0.20
氨基氮	3.4—4.8	铜	0.005
氯化物	0.07—1.3	锌	0.005
水分	30	锰	0.0005
五氧化二磷	3.8	钴	0.0005
碳水化合物	8.2	氨基酸类	%
嘌呤氮	0.27	丙氨酸	3.4
脂肪	迹量	精氨酸	2.0
钠	5.6	天门冬氨酸	4.5
钾	3.0	胱氨酸	0.45
钙	0.01	谷氨酸	6.7
铁	0.005	甘氨酸	2.3