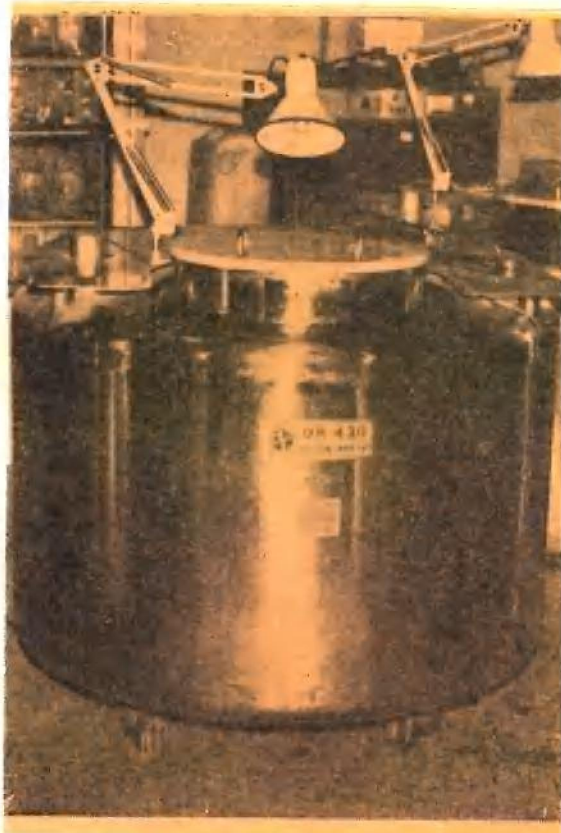


微生物学技术丛书

微生物菌种 保藏技术

李钟庆 编著



3-336

科学出版社

内 容 简 介

《微生物菌种保藏技术》一书是微生物学技术丛书的一个分册。内容包括：定期移植保藏法、冷冻真空干燥、L-干燥、液氮超低温冻结保藏技术、矿油封藏法、其他干燥保藏法、重要微生物菌种的培养条件和保藏法等9部分，分别介绍了菌种的各种保藏方法。书末附有三个附录，为读者提供了培养基、保护剂、低温保护剂的配制方法和使用范围。

本书可供从事菌种保藏的科技工作者及大专院校有关专业师生参考。

微生物学技术丛书 微生物菌种保藏技术

李钟庆 编著

责任编辑 范淑琴

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

河北省迁安印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1989年4月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1989年4月第一次印刷 印张：3 7/8

印数：0001—3,220 字数：83,000

ISBN 7-03-000987-8/Q·154

定价：3.10元

丛书编辑委员会名单

主 编 张树政

副主编 余茂效

编 委 王大耜 王祖农 王 岳

刘 肃 余茂效 李季伦

张树政 张启先 焦瑞身

前 言

中国微生物学会编辑出版工作委员会于1983年11月4—6日在苏州召开了第一次工作会议。会议决定组织编辑出版一套“微生物学技术丛书”，后经微生物学会常务理事会通过，正式成立了编辑委员会。

本丛书主要目的是为了适应“四化”需要，为广大微生物学工作者提供适用的工具书，以便提高技术水平和实验手段。主要对象为具有大专程度的微生物学科技工作者以及大专院校师生及研究生等。丛书由编委会邀请有实践经验的微生物学专家编写。内容力求新颖，但也考虑到国内条件，要便于使用，易见实效。要求作者本人有亲身经验，简要叙述原理，着重介绍具体操作，实验结果及本人心得体会，便于读者应用。

会议并初步确定了一些分册的选题，如：普通微生物学操作技术、微生物分类学技术、微生物菌种保藏技术、微生物生理代谢实验技术、酶学研究技术、微生物遗传学实验技术、微生物细胞学实验技术、免疫学实验技术、病毒及噬菌体实验技术、抗生素实验技术等。这是微生物学会组织编写的第一套技术丛书，由于缺乏经验，缺点错误在所难免，希望读者批评指正。

另外，由于要求作者具有亲身经验，故在选题及内容方面，就有一定的局限性。涉及的方面可能不够广，或者方法不够先进。也希望读者提出改进意见。随着学科的发展和技术的进步，新的分册和新的内容将不断增加，继续出版下去，使这套丛书成为微生物学工作者的得力助手，更好地为“四化”建设服务。

张树政

1985年10月

目 录

第一章 绪论	1
一、目的和意义	1
二、培养基	2
三、培养条件	3
四、培养物菌龄	8
五、纯培养	8
第二章 定期移植保藏法	9
一、说明	9
二、设备	9
三、方法与步骤	10
四、保存	11
五、优缺点	12
第三章 冷冻真空干燥法	13
一、说明	13
(一) 原理	13
(二) 条件要求	15
二、设备	15
(一) 冷冻真空干燥装置和真空熔封装置	15
(二) 安瓿管	18
(三) 保护剂	19
三、方法与步骤	19
(一) 安瓿管及保护剂的准备	19
(二) 菌种的培养和细胞悬浮液的制备	20
(三) 分装	20

(四) 冷冻真空干燥·····	21
(五) 真空下密封·····	23
四、冻干样品含水量的测定·····	23
(一) 失重法·····	23
(二) Karl Fisher 氏化学滴定法·····	24
五、保存·····	26
六、复苏培养·····	28
七、冷冻真空干燥保藏菌种制作程序流程图·····	28
八、影响生物存活的因素·····	29
(一) 生物的分类·····	30
(二) 培养条件和菌龄·····	31
(三) 悬浮液的浓度·····	31
(四) 保护剂·····	32
(五) 冻结·····	33
(六) 干燥程度·····	34
(七) 真空度·····	34
(八) 保存条件·····	35
(九) 复苏培养·····	35
第四章 L - 干燥法 ·····	36
一、说明·····	36
二、设备·····	36
三、保护剂·····	37
四、方法与步骤·····	38
五、保存·····	39
六、复苏培养·····	40
七、L - 干燥其他制备法·····	40
(一) Annear 氏法·····	40
(二) NCIB 法·····	41
(三) IFO 法·····	41

八、效果	42
第五章 液氮超低温冻结保藏技术	44
一、说明	44
(一) 低温生物学中所遇到的几个温度范围	45
(二) 冻结和解冻	45
(三) 低温对生物膜的影响	49
(四) 冻结和解冻后细胞存活力	49
(五) 冻结损伤的机理	51
二、设备	52
(一) 液氮发生器	52
(二) 液氮贮存罐	52
(三) 液氮生物贮存罐	52
(四) 控制冷却速度装置	53
(五) 安瓿瓶	56
(六) 铝夹	56
三、低温保护剂	57
四、慢速冻结与快速冻结	58
五、方法与步骤	59
(一) 准备工作	60
(二) 细胞悬浮液的制备	60
(三) 分装	61
(四) 冻结	61
(五) 保存	61
六、解冻及复苏培养	61
七、防护	62
第六章 矿油封藏法	64
一、说明	64
二、设备	64
三、方法与步骤	65

四、注意事项·····	66
第七章 其他干燥保藏法·····	68
一、砂或土壤保藏法·····	68
二、明胶片保藏法·····	70
三、袋装薄片干燥法·····	71
四、梭氏 (Sordelli) 干燥保藏法·····	72
五、硅胶保藏法·····	73
六、麸皮保藏法·····	75
七、滤纸保藏法·····	76
第八章 蒸馏水或其他溶液保藏法·····	78
一、说明·····	78
二、方法与步骤·····	79
第九章 重要微生物菌种的培养条件和保藏法·····	80
一、细菌·····	80
二、放线菌·····	83
三、酵母菌·····	87
四、小型丝状真菌·····	89
五、担子菌·····	96
附录 I 培养基·····	97
附录 II 保护剂·····	109
附录 III 低温保护剂·····	110
参考文献·····	111

第一章 绪 论

一、目的和意义

所谓微生物乃是包括病毒、类病毒、细菌、蓝绿藻、真菌、地衣、微小藻类和原生动物等类群的生物统称。而微生物菌种 (microorganism cultures) 则是指这些生物的种子。确切地说是指这些生物的纯培养(株)。随着科学技术的进展,微生物菌种所起的作用已渗透到国民经济建设的各个角落。例如对于农业的土壤肥力、生物防治、水产养殖、作物病害;对于工业,化工试剂的制备,金属矿物的开采,食品、饮料、副食的生产;对于医学,药品、疫苗的生产,疾病的诊断;对于环境保护,污水的处理等等,很多方面都是利用微生物菌种的参与才能实现的。近年来,新的生物工程、发酵工程、遗传基因工程的兴起,也是利用微生物为材料进行试验而逐步发展起来的。所以微生物菌种对现代微生物学的科学研究和生产实践是不可缺少的物质基础。它与人类生活密切相关。

微生物菌种能否长期有效地发挥其功能,关键在于保持它们形态特征、生理特性、遗传性状的稳定。例如微生物的分类鉴定,常以模式种(type culture)为依据,或者与典型株(type strain)相对照;生化分析皆用标准菌种(standard culture)进行测定;生产中都使用高产菌株。如果使用的菌种丧失了它原有的特性,其后果可想而知。因此,人们在科学试验或生产中,当分离到一株有用的微生物时,总是想方设法将它加以保藏,使之不死、不污染其他微生物,尽可能不发生变异,保持着原

有性状,较长时期存活,便于以后应用。为此,人们曾创建了一些(如本书目录中所列的)保藏微生物菌种的技术。

二、培 养 基

微生物菌种经保藏后能否保持其原有特征和特性,受内在因素和外界条件的影响。欲保存的微生物株,其培养物(菌体、细胞或孢子)本身健壮与否,是内在因素。微生物的内在因素决定着经保藏技术处理后,细胞存活数量的多少和残存时期的长短。而健壮的细胞又取决于培养基成分、培养条件、培养的时间(细胞年龄或菌龄)等。所谓外界条件是指保藏技术施加给微生物的理化因素和保藏物制备后所存放的环境条件。有关外界条件的细节,将在各章中分别说明。

由于微生物种类众多,各种微生物所需的营养成分也不尽相同,所以培养微生物的培养基,五花八门。但是以保藏为目的培养微生物时,可根据以下原则选择培养基:(1)在该种培养基上易产生孢子,例如细菌的芽孢,放线菌的各种孢子,真菌的卵孢子、孢囊孢子、接合孢子、子囊孢子、担孢子、粉孢子、分生孢子、厚垣孢子等等,(2)对于自养型微生物,其培养基中无需含有机物,只用无机盐类,以便保持它自身的合成能力,(3)能利用无机氮者,不使用有机氮源,(4)对生理缺陷型(如维生素、氨基酸、核苷缺陷型)微生物,其培养基中必须含有这种物质,(5)不需维生素而能生长的微生物,则使用合成培养基,(6)对耐某种药物的微生物株,培养基中必须含有一定浓度的该种药物。总之,既要得到健壮的培养物,又无需对所有的菌种都使用营养丰富的培养基。

虽然不同的微生物株对营养的要求可能存在着差异,但是也有共性,即大多数相同的种属,趋向于在类似组成的培养

基上都能生长良好。例如一般细菌可用营养琼脂培养,醋酸菌用葡萄糖-酵母膏-碳酸钙琼脂,乳酸菌用西红柿汁琼脂或酪蛋白水解物-吐温80 (Tween 80) 琼脂,固氮菌用无氮培养基,硫杆菌用硫代硫酸盐培养基,由海洋分离的细菌用海水组成的培养基,病原细菌用血琼脂,脑、心浸提物琼脂或脑、肝、心浸提物琼脂;枝原体(Mycoplasmas)用 PPLO (类胸膜肺炎微生物 pleuropneumonia-like organism) 培养基,巴贝尔(Barber)培养基,泰勒(Taylor)培养基;放线菌类常用高斯(Gause)氏合成1号培养基,门冬酰胺琼脂,燕麦粉琼脂,酵母膏淀粉琼脂,希开-柴斯纳(Hickey-Tresner)琼脂;酵母菌用麦芽汁琼脂,酵母膏麦芽膏琼脂;毛霉目(Mucorales)菌种用综合马铃薯-葡萄糖琼脂;曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)菌种用察氏(Czapek)琼脂;木腐菌用玉米粉琼脂;纤维素分解菌用滤纸培养基,羧甲基纤维素(CMC)培养基;病原真菌用萨布德(Sabourand)琼脂;微小藻类用德特默(Detmer)琼脂,布里斯托(Bristol)琼脂,小球藻(*Chlorella*)琼脂,新月藻(*Closterium*)琼脂,眼虫藻(*Euglena*)琼脂,团藻(*Volvox*)琼脂等等不一一列举。本书在第九章将列出具体的微生物所适合的培养基,附录 I 列出各种培养基的组成成分。

三、培养条件

微生物在培养过程中必须提供它生长所需要的最适条件,才能得到健壮的培养物。温度、水活度、pH、氧、光等是必须考虑的主要因素。最适条件的选择则是根据生物的生境和习性来确定。现分别将这几个条件结合一些微生物作必要的说明。

(一)温度 根据微生物对温度的适应情况,可将微生物

分为四种类型,即嗜冷微生物(psychrophiles)、低温营养型微生物(psychrotrophs)、嗜温微生物(mesophiles)、嗜热微生物(thermophiles)。嗜冷微生物对温度适应范围为 $-5-20^{\circ}\text{C}$,最适生长温度为 $12-15^{\circ}\text{C}$ 。低温营养型微生物对温度适应范围为 $-5-35^{\circ}\text{C}$,最适温度为 $18-25^{\circ}\text{C}$ 。嗜温微生物对温度适应范围为 $5-45^{\circ}\text{C}$,最适温度为 $26-37^{\circ}\text{C}$ 。嗜热微生物温度适应范围为 $30-80^{\circ}\text{C}$,最适温度为 $45-70^{\circ}\text{C}$ 。嗜冷和低温营养型微生物多出现在下列属种中。细菌中:不动杆菌属(*Acinetobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、色杆菌属(*Chromobacterium*)、柠檬酸细菌属(*Citrobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、微球菌属(*Micrococcus*)、变形杆菌属(*Proteus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、弧菌属(*Vibrio*)。酵母菌中:假丝酵母属(*Candida*)、隐球酵母属(*Cryptococcus*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、球拟酵母属(*Torulopsis*)。丝状真菌中:出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)、葡萄孢属(*Botrytis*)、头孢霉属(*Cephalosporium*)、金孢霉属(*Chrysosporium*)、枝孢属(*Cladosporium*)、巴恩正青霉(*Eupenicillium baarnense*)、埃及正青霉(*Eup. egyptiacum*)、腐皮镰孢(*Fusarium solani*)、易脆毛霉(*Mucor fragilis*)、冻土毛霉(*M. hiemalis*)、密丛毛霉(*M. plumbeus*)、紧密毛霉(*M. strictus*)、沙门柏干酪青霉(*Penicillium camembertii*)、圆弧青霉(*P. cyclopium*)、指青霉(*P. digitatum*)、常现青霉(*P. frequentans*)、微紫青霉(*P. janthinellum*)、变紫青霉(*P. purpurescens*)、托姆青霉(*P. thomii*)、茎点霉属(*Phoma*)、侧孢霉属(*Sporotrichum*)、枝霉属(*Thamnidium*)等。大多数微生物属于嗜温微生物。此处不

作举例。嗜热微生物出现在下列属种中：烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、嗜热溶淀粉芽孢杆菌 (*B. thermoamylolyticus*)、嗜热毛壳 (*Chaetomium thermophile*)、溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*)、嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*)、嗜热高温放线菌 (*Thermoactinomyces thermophilus*)、弯曲高温单孢菌 (*Thermomonospora curvata*)、水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*)、嗜热栖热菌 (*T. thermophilus*) 等等。以上例子说明不同种类微生物对温度要求有着差异，在培养时一定要了解具体的属种所需的最适温度，尤其对生孢子的真菌，只有在温度适宜时才能形成人们所希求的孢子，从而达到培养的目的。

(二) 水活度 (a_w ——Water activity) 微生物生长都需要水分，但是对需要的可利用的水含量，随微生物种或株不同而异。大多数微生物需要相当高的可利用的水含量。然而少数微生物能在低水活度 (a_w) 的条件下生长。 $a_w = P/P_0$ 其定义为：在同一温度下，基物水蒸气压力 (P) 与纯水蒸气压力 (P_0) 的比。一般腐生性的细菌在 a_w 值低于 0.91 时则不能生长。而一般腐生性的真菌可在 a_w 值低于 0.80 时仍能生长。例如不动杆菌所需的最小 a_w 值为 0.96，肠杆菌为 0.95，枯草芽孢杆菌为 0.95，大肠杆菌为 0.96，假单胞菌为 0.97，金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 为 0.86，鲁酵母 (*Saccharomyces rouxii*) 为 0.62，拟青霉 (*Paecilomyces varioti*) 为 0.84，常现青霉 (*Penicillium frequentans*) 为 0.81，黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 为 0.78，刺孢曲霉 (*A. echinulatus*) 为 0.62。在 a_w 值较低的条件能生长的微生物称嗜干微生物 (xerophiles)、嗜高渗透压微生物 (osmophiles) 或嗜盐微生物 (halophiles)。它们多出现在蜜饯的果脯和腌渍的食品中。培养这些微生物时，培养基中必须含有高浓度的糖类或盐，以便提供低 a_w 值的条件。

(三) pH 每种微生物都要求最适 pH 和能适应的 pH 范围。细菌、放线菌、藻类和原生动物等最适 pH 为 6.5—7.5, 生存限度为 pH 4—10 之间。酵母菌、丝状真菌最适为 pH 3—6, 生存限度为 pH 1.5—10 之间。微生物生长一方面要求培养基具备最适 pH, 而另一方面由于它们的代谢作用, 又会改变培养基中氢离子浓度。例如利用糖类产酸的微生物, 使培养基中氢离子浓度增加而变酸。又如水解尿素的细菌会使培养基变碱。所以在制备培养基时, 不仅要调节培养基的 pH 值, 使其适合微生物的要求, 而且要考虑如何加强培养基的缓冲作用, 以防止由于微生物的代谢产物所造成的过酸或过碱。例如在培养产酸的菌时, 培养基中加 0.5—2% 的 CaCO_3 , 它既能使培养基具有缓冲作用, 又可以不断地中和所产生的酸。磷酸盐具有较强的缓冲作用, 所以配制合成培养基时, 多用不同量的 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 搭配来缓冲培养基中 pH, 以便在培养微生物时 pH 不发生较大的变化, 使微生物在较适宜的条件下生长。

(四) 氧 根据对氧的需要情况可将微生物分为四类: 需氧微生物 (aerobes)、兼性需氧微生物 (facultative aerobes)、微需氧微生物 (microaerobes) 和厌氧微生物 (anaerobes)。

需氧微生物又称谓好气微生物, 它们在自然界中占大多数。用试管培养这类微生物时, 通过棉塞或松盖的螺旋帽, 它们可以得到充分的氧, 无需通气。

兼性需氧微生物又称谓兼性好气微生物, 它们在有氧或无氧条件下都能生长, 所以培养时不必考虑空气条件。例如欧文氏菌属 (*Erwinia*)、埃希氏杆菌属 (*Escherichia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、志贺氏属 (*Shigella*)、克雷柏杆菌属 (*Klebsiella*) 等属内一些种。

微需氧微生物也称随遇的微生物, 它们在有氧或无氧时

都能生长,但是充分的氧对它们不利,故培养时采用穿刺培养或用深层液体培养基培养。属于这一类的微生物如双球菌属(*Diplococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、丙酸细菌属(*Propionibacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)等。

厌氧微生物又称嫌气微生物,它们只能在没有空气的条件下生长,培养时必须排除空气,或将培养用的器皿中充入氮气,或充入95%N₂+5%CO₂。此外还可以在培养基中加入还原性物质,以降低培养基中氧化势能,从而减低pH值,为厌氧微生物在有空气存在时,创造了也能生长的条件。厌氧微生物中较熟悉的属种如梭菌属(*Clostridium*)、产甲烷的细菌奥氏甲烷杆菌(*Methanobacterium omelianski*)、甲烷八叠球菌(*Sarcina methanica*)等等。

(五) 光 此地所指的光是可见的普通光。根据对光照条件的要求,可将微生物分为两类,即光合型微生物和非光合型微生物。

光合型微生物:藻类、一些原生动物和光合细菌具有光合色素,能利用光能为能源,它们属于光能自养生物(photosynthetic autotroph)。然而,其中一些种类,如微小藻类、蓝绿藻、紫色硫细菌、红色非硫细菌是兼性光能自养微生物,在有光条件下行光合作用,在无光条件下行有机化能营养(chemoorganotrophy),但是培养它们时只有采取光照才能使其生长良好并保持原有特征。

非光合型微生物:绝大多数细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌和原生动物属此类,它们不能行光能自养,所以光不是它们生长必需条件。然而有许多现象反映出,光可以促进某些非光合型微生物生长和发育。例如黄萎轮枝孢(*Verticillium albo-artum*)振荡培养时光可以刺激它生长;巨大曲霉(*Aspergillus giganteus*)分生孢子梗的生长因光照而加速;闪光须霉

(*Phycomyces nitens*) 菌丝有趋光性, 向光部分较背光部的菌丝生长旺盛; 水玉霉(*Pilobolus*) 的孢子囊梗也有趋光性; 光照可促进粪壳菌(*Sordaria fimicola*) 释放子囊孢子。但是一般细菌则不适宜光照, 长期光照多引起变异。所以培养微生物时应根据具体的种类给予光照或无光照条件。

四、培养物菌龄

以保藏为目的, 为得到健壮的细胞或孢子, 培养时间(菌龄)很重要。对于细菌、酵母菌应使用对数生长期后期的细胞加以保藏, 不适宜用静止期(stationary phase)后期的细胞, 因为此时的细胞已趋向衰老。一般细菌在适温下培养16—24小时, 酵母菌培养36—60小时为宜。对于放线菌和丝状真菌以形成成熟孢子为宜, 通常培养4—7天后进行保藏处理。对于生长缓慢的种类, 往往需要培养10—14天。

五、纯 培 养

保藏的微生物菌种, 除在使用时是由二种或二种以上的生物同时发挥作用的混合培养物外, 必须是纯培养。因此在制备保藏的样品时, 首先要检查培养物中的细胞或孢子, 是否都属于生物学的同一种。发现可疑时, 应进行分离纯化, 务必得到纯培养后再作保藏制备, 否则即失去保藏的意义。

本书重点侧重对细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌的保藏。对于某一技术也适用保藏其他类群的微生物时, 也将加以说明, 以便参考使用。

无论采取那种技术保藏菌种, 在保存过程中都需要进行日常管理, 观察制备物和保存条件有无异常现象, 以便及时发现及时处理。任何一种方法保藏菌种, 都不是一劳永逸的, 相对地说都是在人工控制下进行的。

第二章 定期移植保藏法

一、说 明

定期移植 (periodic transfer) 保藏法也称传代培养保藏法。该法包括斜面培养、液体培养、穿刺培养等。它是最早使用而且现今仍然普遍采用的方法。在一些实验室或工厂中, 即便同时并用几种方法保藏同一种菌种, 而这种方法也是必不可少的。该法是将适宜的培养基上生长良好的培养物, 放置在低温处保存, 使微生物停止生长或缓慢生长。当培养基中营养成分被利用完以前或培养物尚未陈旧前, 将它重新移植在新鲜的培养基上, 再于适宜条件下培养, 生长良好后, 再置低温处保存。如此一代一代地继续下去, 故又称传代培养保藏。定期移植所间隔的时间, 因微生物种类不同而异。如一周、二周、一个月、四个月、半年不等。一般不产生芽孢的细菌间隔时间较短, 需 1—2 周, 最长 1 个月移植一次。放线菌、酵母菌和丝状真菌间隔时间较长, 每 4—6 个月移植一次即可。但是对于水霉和一些医学真菌也需 1—2 周移植一次。

二、设 备

(一) 器皿 定期移植保藏微生物菌种不需要复杂的器皿, 然而必须备有微生物学用的试管、或带螺旋帽的培养管、培养瓶等容器。此外还需备有锥形瓶、培养皿、真空干燥器等。试管的规格为 16×160mm 和 18×180mm 两种。细菌、