

微生物菌種保存法

東吳大學副教授

農學博士

江 晃 榮 編譯

華香園出版社

微生物菌種保存法

東吳大學副教授

農學博士

江 晃 榮 編譯

譯 序

在從事微生物學的研究工作或是與微生物有關之工業、農業、醫學等領域中，微生物菌種的保存工作是具有舉足輕重地位的。若是菌種保存方法不當，在保存期間常會引起自然變異而降低活性，在實用上就大大地減低了其價值，因此長時間保存時，應有適當方法以防止變異，使微生物隨時保持在備用狀態。

關於微生物菌株之標本培養 (type culture)，世界各國幾乎都有組織適當地管理與保存菌株。各國為求進一步合作曾於 1968 年，於聯合國教科文組織 (UNESCO) 主持下，在東京召開了國際微生物菌株保存會議 (International Conference of Culture Collection of Microorganisms, WFCC)。我國亦在 1982 年於新竹食品工業發展研究所成立了菌種保存中心，主要負責收集、保存及供給國內、外研究、教學及工業上有用的微生物菌株，並與國外著名的菌種保存機構密切聯繫，以提高我國生物科技的研究水準。

譯者從事於工業微生物的研究，多年來一直覺得菌株保存是一項非常重要的工作。尤其近年來生物技術逐漸受到重視，以基因重組技術或遺傳法改良或塑造微生物已是生物技術研究中重要的一環。但經改良或塑造後之菌株亦必須有適當方法加以保存，否則將使改良工作徒勞無功。譯者有感於此，乃利用閒暇之餘，將東日本學園大學教授根井外喜男所編著之「微生物の保存法」一書改譯成中文，希望能對從事醫、農、工及生物技術等微生物相關人員有所幫助。

本書在編譯時，承蒙葉開溫先生鼎力協助，又承華香園出版社施弘國先生之鼓勵，譯者在此謹誌謝意。

科學進步一日千里，本書疏漏不備之處，實難避免，尚盼國內外學者專家，不吝指正。

江 晃 榮

1985, 10 於東吳大學微生物學系

目 錄

I 總 論

微生物保存法

1	菌種保存的目的	1
2	繼代培養保存法	2
3	液體石蠟覆蓋保存法	3
4	載體保存法	4
4-1	土壤保存法	5
4-2	砂土保存法	6
4-3	矽膠保存法	7
4-4	磁珠保存法	7
4-5	紙錠保存法（濾紙保存法）	8
5	懸液保存法	8
5-1	蒸餾水保存法	9
5-2	糖液保存法	9
5-3	其他懸液保存法	9
6	寄主保存法	12
7	冷凍保存法	12
7-1	一般注意事項	12
7-2	低溫冰箱保存法	14
7-3	乾冰保存法	15
7-4	液氮保存法	15
8	冷凍乾燥保存法	19

2 微生物菌種保存法

8-1	冷凍乾燥法的原理	19
8-2	冷凍乾燥保存概要	20
8-3	冷凍乾燥前的培養條件	23
8-4	菌株號碼等的標記	24
8-5	安瓶的準備	25
8-6	添加保護劑（製備分散劑）	26
8-7	製備菌液	29
8-8	菌液分裝安瓶的方法	30
8-9	預冷	31
8-10	乾燥	34
8-11	二次乾燥	41
8-12	熔封	43
8-13	保存條件	46
8-14	安瓶的啓封	46
8-15	復水	47
8-16	主要的測定儀器	48
8-17	含水量的測定法	50
8-18	保存效果的短期鑑定法	52
8-19	防止突變	54
8-20	病原微生物冷凍乾燥時應注意的事項	56
8-21	冷凍乾燥有困難的微生物及其對策	58
9	冷凍乾燥以外的乾燥保存法	58
9-1	常壓乾燥保存法（風乾保存法）	59
9-2	Stamp 乾燥保存法（動物膠乾燥保存法）	59
9-3	菌片封袋乾燥保存法	60
9-4	Sordelli 乾燥保存法	62
9-5	L-乾燥保存法（真空乾燥保存法）	63

II 各論

一 動物病毒的保存法

1	前言	85
2	低溫保存法	88
3	冷凍保存法	89
4	冷凍乾燥保存法	90
5	各群病毒的保存法	91

二 植物病毒的保存法

1	前言	100
1-1	保存的預先處理	101
1-2	與保存有關的因素	101
2	冷凍保存法	102
3	乾燥保存法	103
4	冷凍乾燥保存法	103
4-1	寄主植物的種類	103
4-2	實際操作	103
4-3	保護劑	104

三 噬菌體的保存法

1	前言	124
1-1	一般注意事項	124
1-2	噬菌體懸液的製備	124
2	低溫保存法	125
3	冷凍保存法	126
4	液氮保存法	126

4 微生物菌種保存法

5	冷凍乾燥保存法	127
6	L-乾燥保存法	127
7	其他保存法	128

四 病原細菌的保存法 (I)—醫學領域

1	前言	133
1-1	病原細菌的保存目的	133
1-2	菌株保存法	134
2	繼代培養保存法	134
3	冷凍保存法	135
4	冷凍乾燥保存法	135
4-1	細菌懸液的準備	136
4-2	安瓶滅菌和冷凍乾燥	137
4-3	冷凍乾燥樣品的保存	138
4-4	冷凍乾燥樣品的復原	138
4-5	復水液	138
4-6	在冷凍乾燥保存法中存在的問題	138
5	Stamp 氏動物膠乾燥保存法	139
5-1	培養菌	139
5-2	保護劑	141
5-3	石蠟濾紙	141
5-4	乾燥法	142
5-5	保存法	142
5-6	保存菌的復原	143
5-7	其他注意事項	143

五 病原細菌的保存法 (II)—獸醫學領域

1	前言	174
---	----	-----

2	繼代培養保存法	175
3	冷凍保存法	175
4	冷凍乾燥保存法	175
4-1	菌懸液的製備	176
4-2	保護劑和保存溫度	176
4-3	冷凍乾燥菌株的變異	176
4-4	冷凍乾燥菌的復原	177
5	動物膠片乾燥保存法	177

六 植物病原細菌的保存法

1	前言	188
2	繼代培養保存法	189
3	液體石蠟覆蓋保存法	189
4	土壤保存法	190
5	水液保存法	190
6	冷凍保存法	191
7	冷凍乾燥保存法	191

七 非病原需氧性細菌的保存法

1	前言	207
2	繼代培養保存法	207
2-1	洋菜斜面培養基密封保存法	208
2-2	軟洋菜法	209
3	液體石蠟覆蓋保存法	209
4	土壤保存法	211
4-1	芽孢桿菌芽孢的土壤保存法	211
4-2	根瘤菌孢囊的土壤保存法	211
5	矽膠保存法	212

6 微生物菌種保存法

6	磁珠保存法	212
7	懸液保存法	213
8	冷凍保存法	214
9	冷凍乾燥保存法	215
10	Sordelli 氏乾燥保存法	218
11	L-乾燥保存法	219
12	其他乾燥保存法	220
12-1	Stamp 氏乾燥保存法 (動物膠片乾燥保存法)	220
12-2	Kerr 氏乾燥保存法	220
12-3	常壓乾燥保存法 (風乾保存法)	220
12-4	Brown 氏乾燥保存法	220
12-5	袋裝尼龍薄膜片乾燥保存法	221

八 厭氧菌的保存法

1	前言	287
2	繼代培養保存法	288
3	液體石蠟覆蓋保存法	289
4	PRAS (預先還原無氧滅菌的) 培養基的繼代培養法	289
5	冷凍保存法	290
5-1	去纖維羊血保存法	291
5-2	脫脂乳保存法	291
6	冷凍乾燥保存法	292
7	動物膠片乾燥保存法	293

九 放線菌的保存法

1	前言	317
1-1	需氧性和兼性厭氧放線菌的保存	317
1-2	生產菌株的保存	318

1-3	遺傳標識的保存	319
1-4	放線菌類各屬的保存	319
2	繼代培養保存法	319
2-1	維持培養基	319
2-2	放線菌類用洋菜培養基一覽	322
3	液體石蠟覆蓋保存法	322
4	土壤保存法	323
5	乾麴保存法	323
6	冷凍保存法	323
6-1	厭氧性放線菌類的冷凍保存法	324
6-2	液氮保存法	324
7	冷凍乾燥保存法	324

十 *Mycoplasma* 的保存法

1	前言	340
2	冷凍保存法	340
2-1	菌懸浮液的配製法	341
2-2	<i>Mycoplasma</i> 的菌量測定	341
2-3	保護劑和保存溫度	341
3	冷凍乾燥保存法	343
3-1	菌懸浮液的配製法	343
3-2	保護劑	343
3-3	冷凍乾燥菌株的保存	344
3-4	冷凍和冷凍乾燥菌株的變異	344
3-5	冷凍乾燥的復原	345

十一 病原螺旋體的保存法

1	前言	359
---	----	-----

8 微生物菌種保存法

2	<i>Leptospira</i> 的保存法	359
2-1	繼代培養保存法	359
2-2	冷凍保存法	360
2-3	冷凍乾燥保存法	361
3	<i>Treponema</i> 的保存法	361
3-1	繼代培養保存法	362
3-2	冷凍保存法	362
3-3	冷凍乾燥保存法	362
4	<i>Borrelia</i> 的保存法	363
4-1	繼代培養保存法	363
4-2	冷凍保存法	363
4-3	冷凍乾燥保存法	364

十二 立克次氏體的保存法

1	前言	372
2	冷凍保存法	373
3	冷凍乾燥保存法	374
3-1	材料	374
3-2	保護劑	375
3-3	應用	375

十三 病原真菌的保存法

1	前言	377
2	繼代培養保存法	378
2-1	真菌保存用培養基	378
2-2	繼代間隔	379
2-3	保存場所應具備的條件	379
2-4	移植時應注意的事項	380

3	礦油覆蓋保存法（液體石蠟覆蓋保存法）	381
4	土壤或砂保存法	382
5	蒸餾水保存法	383
6	冷凍保存法	383
7	冷凍乾燥保存法	383
8	防止變異應注意的事項	384
9	在保存中防止污染的方法	385

十四 酵母菌的保存法

1	前言	388
2	繼代培養保存法	388
3	液體石蠟覆蓋保存法（礦油覆蓋保存法）	389
4	土壤保存法	390
5	蒸餾水保存法	391
6	冷凍保存法	391
6-1	冷凍前的培養條件	391
6-2	冷凍和融解速度	393
7	冷凍乾燥保存法	395
7-1	冷凍乾燥的保護劑	395
7-2	冷凍乾燥前的各種條件	395
7-3	冷凍和乾燥條件以及冷凍乾燥後的保存條件	397
8	其他乾燥保存法	397
9	適合於酵母菌長期保存的保存法	398

十五 絲狀菌的保存法（I）

麴黴屬、青黴屬和孢子囊菌類、藻菌類

1	前言	405
2	繼代培養保存法	405

10 微生物菌種保存法

3	礦油覆蓋保存法（液體石蠟覆蓋保存法）	405
4	土壤保存法	406
5	矽膠保存法	406
6	冰箱保存法	406
7	液氮保存法	407
8	冷凍乾燥保存法	407
9	其他乾燥保存法	408

十六 絲狀菌的保存法（II）

擔子菌類和不完全菌類

1	前言	447
2	擔子菌類的保存法	447
3	不完全菌類的保存法	450
3-1	繼代培養保存法	450
3-2	液體石蠟覆蓋保存法	451
3-3	土壤保存法	451
3-4	矽膠保存法	451
3-5	風乾保存法（自然乾燥保存法）	452
3-6	冷凍保存法	452
3-7	液氮保存法	453
3-8	冷凍乾燥保存法	453
3-9	L-乾燥保存法	453

十七 微小藻類的保存法（I）

微小藻類的繼代保存法

1	前言	501
2	繼代培養保存法	501
2-1	藻株的性狀	502

2-2	維持培養基	503
2-3	培養條件和保存條件	503
2-4	移植間隔	503
2-5	討論	504

十八 微小藻類的保存法 (II)

微小藻類的冷凍和冷凍乾燥保存法

1	前言	535
2	冷凍乾燥保存法	535
3	冷凍保存法	537

十九 病原原生動物的保存法

1	前言	544
2	<i>Trypanosoma</i> 的冷凍保存	546
3	<i>Leishmania</i> 的冷凍保存	547
4	<i>Trichomonas</i> 的冷凍保存	547
5	<i>Entamoeba</i> 的冷凍保存	548
6	<i>Plasmodium</i> 的冷凍保存	549
7	<i>Toxoplasma</i> 的冷凍保存	550

二十 非病原原生動物的保存法

1	前言	559
2	冷凍保存法	560

微生物學名索引	562
---------	-----

I 總 論

微生物保存法

1 菌種保存的目的

利用微生物進行研究工作時，微生物材料就是「菌種」。

每一菌種都具有不同之特性。因此，不論進行基礎研究、應用研究或病原微生物的研究，除非使用同一菌種，否則無法獲得相同的實驗數據和結果。在微生物學的領域中，只有研究報告和所使用的菌種二者齊備，實驗結果才能有再現性，因此，在研究工作告一段落之後，為了便於其他研究人員重複試驗，必須把菌種保存下來。這也就是說，菌種的保存是微生物學最基礎且重要的工作。

菌種的意義，每一菌株除了具有已研究發現的知識之外，還可當作鑑定分離株的對照株，驗證研究結果，以及生產某些有用的微生物產物。同時，必須記住，它的某些性狀目前尚未完全知曉，但是隨著往後的研究進展，不斷地積累新的知識和新的發現，最後便能發展出新的理論。

爲了作到這一點，僅僅把菌株的生命保存下來是不夠的，還必須作菌株的遺傳性狀從分離時或實驗開始時就一直保持不變。微生物的特性在保存過程中極易發生變異，往往因此使得一系列的實驗失去了再現性。關於這一點不僅保管和出售多種菌種的菌種保存單位或生產單位需要注意，即使以少數特定菌種爲對象的研究人員也必須予以重視。菌種的保存，不僅要在研究結束時，採取適當的措施，就是在取得菌種開始進行研究時，也須採取適當措施，這項工作看起來沒有多大困難，但實際做起來卻是很麻煩的，既要細心注意，也要不斷地採取適當措施。

本書所論述的範圍，包括從病毒到原蟲的各種生物。即病毒、噬菌體

2 微生物菌種保存法

、各種細菌、放線菌、真菌、立克次體、螺旋體、酵母、絲狀菌、微小藻類和原蟲（請參閱各論）。

微生物必須以活的狀態保存，否則是沒意義的。而且，如上所述，由於微生物的世代時期，一般都很短促，在繼代過程中極容易發生變異。因此，就有必要選擇能夠長期穩定的保存方法。由於微生物種類不同，保存的難易亦有不同，有的比較容易，有的非常困難。

本書在總論中首先敘述過去常見且基本的微生物保存法，然後比較詳細的論述冷凍法和乾燥法。在各論中，再分別介紹各種微生物適宜的保存方法。

2 繼代培養保存法

繼代培養是從事微生物研究的單位，都要採用的基本保存法。關於繼代培養的培養基組成和製備，將在各論中加以敘述。有些微生物由於經過冷凍乾燥處理就會死亡，目前，必須依靠繼代培養來保存的菌種為數眾多。這種情況將在各論中分別敘述。繼代培養的菌種，最好每株培養二支試管以上^{63,73)}（參考各論十三）。

培養基的濃度不宜過高。特別是碳水化合物的濃度，應儘可能降低，如此對保存較有益。營養豐富的培養基不一定最適宜保存。同時，培養的溫度也應加以注意。長谷川指出⁴⁴⁾，從保存的角度來看，以繁殖速度最快或代謝產物濃度最高的生長最適溫進行培養，不如以稍低於生長最適溫進行的效果來得好¹⁰⁾。如產酸的菌種，在繼代培養的培養基中增加少量碳酸鈣為宜⁴⁴⁾。

用斜面、穿刺、或其他適當方法培養的繼代菌種，一般需要保存在5℃左右的冰箱裡^{28,79,85)}。但保存的適當溫度因微生物種類而異，有的保存溫度以室溫37℃為宜。例如，霍亂菌、淋球菌、腦膜炎球菌、腸炎弧菌等^{88,141)}，以及厭氧菌、鉤端螺旋體和一部分病原真菌⁶³⁾、蕈類等的培養菌株多以室溫保存（參閱各論四、八、十一、十三、十六）。

利用繼代培養法保存菌種時，常常發生下列情況：試管口的棉花塞發霉，或雜菌侵入試管內^{10,63,85}），關於防治雜菌的方法參閱各論十三。

雖然，繼代培養法是研究微生物時常常使用的基本方法，它可隨時接種以供復試，但從保存這個角度來看，也有下列缺點，須加注意^{28,44,71,73,85}）。

(1) 遺傳性質容易發生變異。

(2) 反復繼代時，病原性、生理活性物質的生產能力、孢子形成能力等降低的例子相當多。

(3) 往往因為培養基成分或培養溫度的微小變化，接種的菌不能繁殖，以致喪失重要菌種。

(4) 需要定期移種，尤其有些微生物需常常移種，因而需要保管多種菌株時，既費力，費用又高，並且所佔的貯存空間也多。

(5) 雜菌污染的機會較多⁷³）。

(6) 寫錯菌名或菌株號碼以及取錯菌種這類事故經常發生⁷³）。

另外，關於使用低濃度洋菜培養基的軟洋菜（Soft agar）法，請參閱各論七。

3 液體石蠟覆蓋保存法

這是繼代培養的變相方法，能夠適當的延長保存時間。主要適用於黴菌、酵母菌、放線菌、需氧性細菌等的保存。在長期保存中^{43,63}），為了防止繼代培養菌由於乾燥而死亡，同時為了限制氧的供應來減緩代謝作用^{12,28,44}），可以在培養基（斜面穿刺均可）上面覆蓋滅過菌的液體石蠟再進行冷藏（有的微生物在室溫下保存）。

黴菌和酵母菌可保存數年，甚至長達 10 年。保存時間的長短因菌種而有相當大的差異，詳細情況請參閱各論，本法的優點是：特別簡單，不需要特別裝置，不適於冷凍乾燥的微生物（如孢子形成能力極弱的絲狀菌）可嘗試本法來保存^{12,28,63,79,143}）。同時，本法是防止雜菌為害的簡便手段^{12,29}），但是，也有不能採用本法的菌種，應加注意。據 Weiss 的