几种保藏细菌方法的检测

马 延 生

(中国科学院微生物研究所，北京)

Devay 等人[1]和 Mcginnis 等人[2]，用蒸馏水法保藏细菌、酵母、丝状真菌和好气放线菌的一些属种；Soriano[3] 用梭氏（Sordelli）真空干燥法保藏细菌、酵母、丝状真菌等某些属种，获得了较好的效果；Grivell 等人[4]和 Trollope[5]，分别做了用硅胶保藏法，保存了细菌和真菌结果的报道。

我们用上述方法，并就梭氏法加以改良，对未曾试验过的其它种类的一些细菌菌株进行了保藏试验，以便观察它们的实用价值。我们检测了 14 属 27 种 62 株细菌的存活与部分菌株的生理活性。其中用蒸馏水法于 5—32℃，保存 5 年半至 7 年，共 14 属 24 种 25 株；改良梭氏法于 5℃ 保藏 9 年，共 4 属 9 种 18 株；硅胶法于 5℃，保藏 9 年，共 4 属 8 种19株。现将测定结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、菌种

用上述各法保存的细菌（见表 1）。

二、保藏方法

1. 蒸馏水保藏法[6]。

2. 改良梭氏真空干燥保藏法：将原梭氏真空干燥保藏法[7]的安瓿底部装入少许脱脂棉，将直径 0.3 厘米的玻璃珠放入安瓿（2—4 个），加棉塞，15 磅 30 分灭菌。将欲保藏细菌以平板培养，无菌条件下使玻璃珠在平板培养物上滚动，用摄子将附有菌体的玻璃珠回装入安瓿，真空干燥熔封，于 5℃ 保存。

3. 硅胶保藏法[8]。

三、恢复培养

取少许蒸馏水菌悬液或硅胶、玻璃珠于新鲜斜面上，培养后观察其存活。测定生理活性的菌株再活化两次。

四、生理特性的检查

1. 谷氨酸生成能力：用脱羧酶法测定，检测蒸馏水法保藏的北京棒状杆菌 AS 1.299、黄色短杆菌 AS 1.495 生成谷氨酸的能力。

2. 大肠杆菌谷氨酸脱羧酶活力：用 Warburg 检压计法测定，检测蒸馏水法保藏的大肠

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

杆菌 AS 1.505 谷氨酸脱羧酶活力。

3. 醋酸生成能力：用中和法测定，检测用改良梭氏法、冷冻干燥法保藏的恶臭醋酸杆菌混浊变种 AS 1.41 生成醋酸的能力。

4. L-天门冬酰胺酶活力：参照 Peterson 法[9]测定，检测蒸馏水法保存和冷冻干燥法保藏的大肠杆菌 AS 1.590 L-天门冬酰胺酶活力。

5. 产 5′-肌苷酸能力：用小柱快速分析法，检测蒸馏水法和冷冻干燥法保存的谷氨酸棒杆菌 AS 1.805；改良梭氏法、硅胶法及冷冻干燥法保藏的产氨短杆菌 AS 1.587 产 5′-肌苷酸能力。

试验结果

一、存活情况（见表 1）

1. 蒸馏水法保藏的细菌 14 属 24 种 25 株，置室温 8°—32℃ 保藏 5 年半有 18 株存活，存活率为 72%。保存 7 年尚存活 17 株，存活率为 68%。置 5℃保藏 5 年半仅有 12 株存活，存活率为 48%。不易存活的有：罗旺醋杆菌、黑色醋杆菌、恶臭醋杆菌混浊变种、褐球固氮菌、黄色短杆菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、耐辐射微球菌。

2. 改良梭氏真空干燥法保藏细菌，共 4 属 9 种 18 株，置 5℃ 保存 9 年有 16 株存活，存活

表 1 几种方法保藏细菌存活情况

细菌名称	蒸馏水法				改良梭氏法		硅胶法	
	保存株数	8°—32℃ 5 年半存活株数	8°—32℃ 7 年存活株数	5℃ 5 年半存活株数	保存株数	存活株数	保存株数	存活株数
罗旺醋杆菌 *Acetobacter lovaniensis*	1	0		0	1	1	1	0
黑色醋杆菌 *A. melanogenum*	1	0		0	3	3	4	0
恶臭醋杆菌混浊变种 *A. rancens* var *turbidans*	1	0		0	1	1	1	0
粪产碱杆菌 *Alcaligenes faecalis*	1	1	1	0				
节杆菌属 *Arthrobacter sp*	1	1	1	1				
褐球固氮菌 *Azotobacter chroococcum*	1	0		0				
维涅兰德固氮菌 *A. vinelandii*	1	1	1	0				
产氨短杆菌 *Brevibacterium ammoniagenes*	1	1	1	1	5	5	5	4
黄色短杆菌 *B. flavum*	1	1	0	1				
钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum*					1	1	1	0
谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicus*	1	1	1					
北京棒杆菌 *C. pekinensis*	1	1	1	1	3	3	4	3
简单棒杆菌 *C. simplex*	1	1	1	1				
大肠杆菌 *Escherichia coli*	2	2	2	1				
嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*	1	0		0				
干酪乳杆菌 *L. casei*	1	0		0				
肠膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides*	1	1	1	1				
耐辐射微球菌 *Micrococcus radiodurans*	1	0		0				
耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis*	1	1	1	1				
铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*	1	1	1	1	1	0		
荧光假单胞菌 *P. fluorescens*	1	1	1	1				
卵状假单胞菌 *P. ovalis*					2	2	2	0
沟槽假单胞菌 *P. striata*					1	0	1	1
假单胞菌属 *P. sp*	1	1	1	1				
花生根瘤菌 *Rhizobium arachis*	1	1	1	0				
大豆根瘤菌 *R. japonicum*	1	1	1	0				
粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*	1	1	1	1				

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

率为89%。不易存活的有沟槽假单胞菌和铜绿假单胞菌。

3. 硅胶法保藏的细菌，共4属8种19株。置5℃保藏9年只存活8株，存活率为42%。不易存活的有罗旺醋杆菌、恶臭醋杆菌混浊变种、黑色醋杆菌、钝齿棒杆菌、卵状假单胞菌。

二、生理活性

对各种保藏方法保存的一些菌株，进行部分生理活性的检测。以斜面保藏或冷冻干燥保藏的同一菌株做对照。用蒸馏水法于8—32℃，保藏5年半的北京棒杆菌 AS1.299 和黄色短杆菌 AS 1.495。与斜面保藏的同一菌株，产谷氨酸能力相近。蒸馏水法保藏8—32℃，5年半的大肠杆菌 AS 1.505，其谷氨酸脱羧酶活力，与斜面保藏的同一菌株相同。用改良梭氏法于5℃保藏9年的恶臭醋杆菌混浊变种 AS 1.41，与冷冻干燥法及斜面保藏的同一菌株，产醋酸能力基本相同。用蒸馏水法于8—32℃保藏7年，与冷冻干燥法保存的同一菌株，其L-天门冬酰胺酶活力相同。用改良梭氏法于5℃保藏9年的产氨短杆菌 AS 1.587，其5′-肌苷酸产生能力高于用硅胶法保藏的同一菌株，而与冷冻干燥法保藏的同一菌株，产5′-肌苷酸的能力相近。用蒸馏水法于8°—32℃保藏7年的谷氨酸棒杆菌 AS 1.805，产5′-肌苷酸的能力与冷冻干燥保藏的同一菌株相近，但低于斜面保藏（见表2）。

表2 几种方法保藏细菌生理活性测定结果*

保藏方法 \ 生理活性 / 菌株	谷氨酸生成力		谷氨酸脱羧酶活力	醋酸生成力	L-天门冬酰胺酶活力	产5′-肌苷酸能力	
	AS1.299	AS1.495	AS1.505	AS1.41	AS1.590	AS1.587	AS1.805
蒸馏水法	2.36	0.47	34		0.32		6000
改良梭氏法				5.12		6360	
硅胶法						3570	
冷冻干燥法				5.18	0.31	6150	6083
斜面	2.33	0.58	34	5.16			7450

* 1. 谷氨酸生成力，以每100ml发酵液中含谷氨酸克数表示。
2. 谷氨酸脱羧酶活力，以脱羧反应完毕所用时间(分)表示。
3. 醋酸生成力，以每100ml发酵液中含醋酸克数表示。
4. L-天门冬酰胺酶活力，以光密度（O. D）表示。
5. 产5′-肌苷酸能力，以每100ml发酵液中含5′-肌苷酸微克数表示。

讨　论

用蒸馏水法保藏细菌于8°—32℃，保藏7年存活率为68%，改良梭氏法保存细菌置于5℃ 9年，其存活率为89%，硅胶法保存细菌于5℃ 9年，存活率是42%。其中以改良梭氏法保藏效果较好，特别是所保藏的醋酸菌属3个种，蒸馏水法和硅胶法均失活，而改良梭氏法则全部存活。蒸馏水法简而易行，可应用于易存活菌株的保藏。Grivell[4] 等人的试验提出硅胶法保藏格兰氏阳性细菌，优于保藏格兰氏阴性细菌，从我们扩大的属、种进行试验结果看也是如此。我们用蒸馏水法保存细菌5年半时测定，置于室温的存活率高于低温。

从检测的7株细菌5项生理特性看，除采用硅胶法保藏的产氨短杆菌 AS 1.587，产5′-肌苷酸能力减退外，用上述各方法保藏的菌株其产谷氨酸能力、谷氨酸脱羧酶活性、产醋酸能力、L-天门冬酰胺酶活力和产5′-肌苷酸能力均无明显差异。

参 考 文 献

[1] Devay, J. E. & W. C. Schnathorst,: *Nature*. **199**: 775--777, 1963。
[2] Mcgianis, M. R. et al.: *Appl. Microbiology*. **28**:

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

218, 1974。
[3] 根井外喜男：微生物の保存法，60—62，东京大学出版会，1979。
[4] Grivell, A. R. & J. F. Jackson,: *J. Gen. Microbiol.* **58**: 423—425, 1969。
[5] Trollope, O.R.: *J. Appl. Bact.* **38**: 115—120, 1975。
[6] 中国科学院微生物研究所《菌种保藏手册》编著组：《菌种保藏手册》，626—627，1980。
[7] 同上：621—622。
[8] 同上：616—617。
[9] 邱秀宝等：微生物学报，**13**(1)：59—62，1973。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn