

# 磷酸盐缓冲液菌种保藏法

诸 葛 健

(无锡轻工业学院,无锡)

本文报道采用磷酸盐缓冲液保藏常见常用微生物 24 属 51 种的结果,并以胶塞斜面和胶

塞矿油保藏法作比较。保藏 3 年的结果表明,磷酸盐缓冲液法保藏效果高于其它二法。测定

表 1 三种方法保藏细菌效果比较

供试菌株	存活情况*			供试菌株	存活情况		
	胶塞	胶塞矿油	磷酸盐缓冲液		胶塞	胶塞矿油	磷酸盐缓冲液
<i>Escherichia coli</i>	+		+	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> 1.844	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> W117	+	-	+	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> 1.587	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> K <sub>12</sub> F <sub>2</sub>	+	-	+	<i>Corynebacterium crenatum</i>	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> K <sub>12</sub> SF	+	-	+	<i>C. pekinensis</i>	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> K <sub>12</sub> Sgal <sup>-</sup>	+	-	+	<i>C. pekinensis</i> var.	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	-	+	<i>C. sp.</i> 7328-1	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	-	+	-	<i>C. sp.</i> B <sub>9</sub> -3	-	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	+	-	+	<i>Bacillus natto</i> ATCC351	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168	+	+	+	<i>Achromobacter liquefaciens</i>	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168 SR 22	+	+	+	<i>Arthrobacter simplex</i>	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168 Ki-2	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168 2-26	+	+	+	<i>B. macerans</i>	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168 SH-16	+	+	+	<i>B. megaterium</i>	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168 SCR 2165	+	+	+	<i>B. sphaericus</i>	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168 S-34	+	+	+	<i>B. thuringiensis</i>	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168 1398	+	+	+				

\*“+”生长,“-”不生长

了某些种的个别性状,没有发现明显变化。

## 材 料 和 方 法

### (一) 供试菌株

菌名见结果部分(表1-3)。多数菌株由中国科学院微生物研究所提供,其余由有关研究所、工厂及我院工业发酵教研室菌种保藏室提供。

### (二) 磷酸盐缓冲液

磷酸盐试剂为 A. R. 型或 C. P. 型, 0.2 M, pH7.0。

### (三) 保藏培养基与斜面培养基

1. 细菌: (1) 保藏培养基(g): 胰蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, 葡萄糖 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, 琼脂 2.0, 水 100ml, pH7.0。

(2) 斜面培养基(g): 蛋白胨 1.0, 牛肉膏 1.0, 葡萄糖 2.0, NaCl 0.5, 琼脂 2.0, 水 100ml, pH7.2。

表 2 三种方法保藏酵母效果比较

供试菌株	存活情况			供试菌株	存活情况		
	胶塞	胶塞矿油	磷酸盐缓冲液		胶塞	胶塞矿油	磷酸盐缓冲液
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2001	+	+	+	<i>Hansenula anomala</i> 2.297	-	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2.109	-	+	+	<i>Hansenula anomala</i> 2.338	-	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2.558	+	+	+	<i>H. saturnus</i>	-	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2.604	-	+	+	<i>Cryptococcus burentii</i>	-	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2.500	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	+
<i>Candida</i> sp. 2002	+	-	+	<i>Endomycopsis fibuligera</i>	-	-	+
<i>C. tropicalis</i>	+	-	+	<i>Geotrichum candidum</i>	+	+	+
<i>C. lambica</i>	-	-	+	<i>Kloeckera apiculata</i>	+	+	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	<i>Pichia farinosa</i>	-	+	+
<i>C. lipolytica</i>	+	-	-	<i>P. membranaefaciens</i>	+	+	+
<i>C. utilis</i>	+	+	+	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+	+
<i>Hansenula anomala</i> 2.470	+	+	+	<i>Saccharomyces mellis</i>	+	+	+
<i>Hansenula anomala</i> 2.300	+	+	+				

2. 酵母: 保藏培养基 (g): 蛋白胨 0.35, 酵母膏 0.3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2, 葡萄糖 2.0, 琼脂 2.0, 水 100ml, pH5-5.5。斜面培养基: 除酵母膏为 0.6 外, 其余同。

3. 丝状真菌: 毛霉目: 马铃薯浸汁 100ml, 葡萄糖 1.0g, 琼脂 2.0g, pH5.0; 曲霉目: 察氏培养基, 以葡萄糖代替蔗糖。

#### (四) 保藏方法

100×12mm 试管装磷酸缓冲液 2 ml, 1 kg/cm<sup>2</sup> 蒸汽灭菌 30 分钟。冷却后, 挑取斜面菌体或孢子 2—3 环, 塞胶塞于 10℃ 或室温保藏。

## 结果和讨论

### (一) 细菌保藏结果

共试验保藏 7 属 14 个种 32 个菌株, 保藏时间为 3 年。胶塞法保藏 31 株存活 29 株, 存活率 93.5%; 胶塞矿油法保藏 30 株, 存活率为 80.0%。磷酸盐缓冲液法为 96.88% (表 1)。从上述结果看出, 矿油法保藏大肠杆菌效果不佳, 而磷酸盐法几乎对所有供试菌株均适用。

### (二) 酵母保藏效果

共试验 11 个属 19 个种共 26 株。胶塞法存活率为 57.69%, 矿油法为 68.0%, 磷酸盐法为 92.30%。保藏结果见表 2。

### (三) 丝状真菌保藏效果

共试验保藏 4 属 18 个种 21 株, 胶塞法保藏存活率 55.0%, 胶塞矿油法存活 86.67%, 磷酸盐缓冲液法存活达 90.0%。说明磷酸盐缓冲液保藏丝状真菌效果也很好 (表 3)。

表3 三种方法保藏丝状真菌效果比较

供试菌株	存活情况			供试菌株	存活情况		
	胶塞	胶塞矿油	磷酸盐缓冲液		胶塞	胶塞矿油	磷酸盐缓冲液
<i>Aspergillus</i> sp. B <sub>1</sub>	+	+	+	<i>Asp. ochraceus</i>	-	-	+
<i>Asp. oryzae</i> 3.800	+	+	+	<i>Asp. nidulans</i>	-	+	+
<i>Asp. oryzae</i> 3.042	-	-	+	<i>Asp. flavus</i>	+	+	+
<i>Asp. amstelodami</i>	-	+	+	<i>Asp. tamaris</i>	-	+	-
<i>Asp. carbonarius</i>		+	+	<i>Asp. panicilloides</i>	-		+
<i>Asp. clavatus</i>	+	+	+	<i>Absidia glauca</i> 3.58	-		+
<i>Asp. fumigatus</i>	+		+	<i>Absidia glauca</i> 3.59	+		+
<i>Asp. niger</i>	+		+	<i>Actinomucor elegans</i>	+	+	+
<i>Asp. oryzae</i> 3.584	-	+	-	<i>Absidia coerulea</i>	-	+	+
<i>Asp. paraciticus</i>	+	+	+	<i>Mucor spinosus</i>	+		+
<i>Asp. candidus</i>	+	+	+				

蒸馏水保藏法<sup>[1]</sup>和盐水保藏法<sup>[2]</sup>的简易性及保藏效果是值得注意的,但由于不同地区、不同设备制备的蒸馏水水质及pH有一定差异,有可能影响菌种的保藏效果。鉴于磷酸缓冲液有恒定的pH,能保持一定的渗透压,制备方便,因此,用于菌种长期保藏,具有一定的应用价

值。

#### 参 考 文 献

- [1] McGinnis, M. R. et al.: *Appl. Microbiol.*, **28**: 218, 1974.  
 [2] Chance, H. L.: *J. Bact.*, **85**: 719, 1963.