

# 放线菌和霉菌菌种保藏研究报告

方善康

(山东大学微生物系, 济南 250100)

**摘要** 用砂管法室温保藏放线菌 244 株 29 年。其存活率(%)为: 6 年 96; 9 年 91; 11 年 88; 14 年 78; 15 年 76; 17 年 74; 20 年 70; 22 年 59; 25 年 47; 27 年 40; 29 年 37。保藏 29 年尚存活的放线菌的抗菌活性与保藏前基本相同。用麸曲法室温保藏木霉、曲霉和青霉等 12 属共 216 株, 存活率因种而异。保藏 12 年, 不同种属霉菌的存活率为 0—100%; 保藏至 16 年, 全部失活。

**关键词** 放线菌; 霉菌; 菌种保藏

微生物菌种保藏的方式方法因微生物的种类不同而异, 国内外已有许多介绍<sup>[1-4]</sup>。在国内普遍应用的保藏方法有: 斜面低温, 矿油斜面, 麸皮或小米, 砂土管和冷冻干燥; 目前也有试用液氮保藏等。这些方法一般都在低温下进行保藏。本文是作者 1980 年《室温下放线菌和霉菌菌种保藏报告》<sup>[5]</sup>的后续, 记载了从 1964 年至今, 29 年中用砂管法室温保藏 244 株放线菌, 及 1972 年用麸曲法室温保藏 12 属霉菌 216 株的研究结果。

## 材料和方法

### (一) 菌种

1. 放线菌: 山东拮抗性放线菌 (*Actinomyces*) 244 株 (本室分离)。
2. 霉菌: 产纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶霉菌 216 株<sup>[6]</sup>, 其中包括木霉、曲霉、青霉、根霉、毛霉、镰刀菌、拟青霉、毛壳菌、茎点霉等 12 个属和其它霉菌。

### (二) 培养基

1. 高氏合成一号斜面<sup>[7]</sup>: 移植放线菌菌种用。
2. 土豆汁斜面<sup>[7]</sup>: 移植霉菌菌种用。
3. 保藏放线菌用砂管: 取普通河沙 60 目过筛, 以磁铁除去沙中铁屑等杂质, 用自来水漂洗干净, 烘干分装入硬质玻璃小试管 (10×

100mm) 中。每管装纯沙约至 2/5 高度, 加棉塞, 高压灭菌 (1.5kg/cm<sup>2</sup>) 半小时, 灭菌 2 次, 烘干经无菌检查后备用。

4. 保藏霉菌用麸曲: 取新鲜麸皮经孔径 1mm 过筛。以麸皮: 自来水=1:1 拌匀, 分装入小试管中。每管约装至 1/3 高度 (需干麸皮 5g 左右), 加棉塞, 高压灭菌 (1.5kg/cm<sup>2</sup>) 半小时, 经无菌检查后备用。

### (三) 放线菌沙管保藏法

将在高氏合成一号斜面上生长良好的放线菌孢子, 以干法接入无菌的沙管中搅匀 (注意不要接入培养基), 置于盛有氯化钙的干燥器中, 室温保藏。

### (四) 霉菌麸曲保藏法

将生长在土豆汁斜面上的霉菌菌种, 移种至无菌的麸曲管中。移种时注意尽量捣匀小管中的麸皮, 使呈疏松状态。28℃ 恒温培养 5—7 天, 待良好生长后即为麸曲。此时麸曲已经干燥结成团粒, 置于盛有氯化钙的干燥器中, 室温保藏。

### (五) 保藏期间菌种生理活性检查

1. 放线菌抗菌活性检查: 采用与保藏前相同的筛选模型和琼脂移块法<sup>[7]</sup>。
2. 霉菌纤维素酶的活性用 CMC 酶活性测定法<sup>[6]</sup>。

## 结 果

### (一) 放线菌

1. 存活率: 在室温下用砂管法保藏 244 株放线菌 29 年尚存活 91 株, 存活率为 37%。从历年的存活情况 (表 1 和图 1) 看出, 放线菌存活率在保藏 20 年后有突然下降趋势。

表 1 室温沙管保藏 244 株放线菌的结果

保藏时间 (年)	存活株数	存活率 (%)
6	234	96
9	222	91
11	214	88
14	190	78
15	185	76
17	180	74
20	170	70
22	143	59
25	114	47
27	97	40
29	91	37

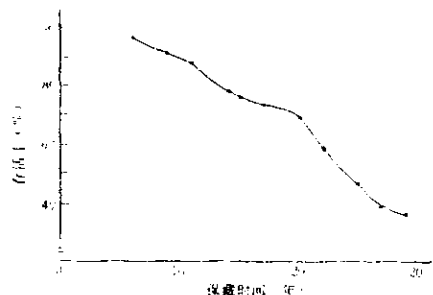


图 1 放线菌的存活率曲线

2. 抗菌活性: 从尚存的 91 株中随机抽取 10 株检查其抗菌活性 (表 2), 可见保藏 29 年的放线菌的抗菌活性及抗菌谱与保藏前基本相同。

表 2 保藏 29 年放线菌的抗菌活性\*

抗 菌 活 性 放 线 菌	测 定 菌	测定菌					
		金黄色葡萄球菌	枯草杆菌	大肠杆菌	分枝杆菌	白色念珠菌	青霉菌
SA26	18	**	20	11	12	10	9
	17		21	11	13	9	10
SA35	18		22	10	9	8	11
	19		22	9	9	9	11
SA42	20		21	10	—	9	10
	19		20	10	—	9	10
SA56	16		19	11	9	—	9
	17		20	10	10	—	10
SA67	21		22	11	—	8	—
	20		21	10	—	8	—
SA105	21		19	12	9	—	9
	21		20	11	8	—	8
SA126	19		21	10	—	9	—
	20		20	9	—	8	—
SA166	21		21	8	11	8	—
	20		21	8	12	8	—
SA213	21		22	11	—	—	9
	20		22	10	—	—	10
SA225	22		19	11	8	8	9
	21		20	11	9	8	8

\* 抗菌活性以抑菌圈直径 (mm) 计;

\*\* 每株放线菌的下一行数字系保藏前的抗菌活性

### (二) 霉菌

1. 存活率: 1972 年用麸曲法室温保藏木

霉、青霉和曲霉等 12 属和其他霉菌共 216 株。保藏 16 年, 各属霉菌间的存活率有很大差异

(表3)。保藏12年,不同霉菌的存活率为0—100%;保藏至16年全部失活。

2. 纤维素酶(CMC)活性:检查保藏7年

的部分霉菌的CMC酶活性,与原始菌种比较相对稳定。各株菌的酶活性波动范围仅在10%左右(表4)。

表3 室温麸曲保藏各属霉菌历年存活率

保藏菌种	株数	2年		5年		7年		9年		12年		16年	
		存活株数	存活率(%)	存活株数	存活率(%)	存活株数	存活率(%)	存活株数	存活率(%)	存活株数	存活率(%)	存活株数	存活率(%)
木霉属 ( <i>Trichoderma</i> )	90	64	71	46	51	36	40	17	20	6	7	0	0
曲霉属 ( <i>Aspergillus</i> )	54	43	80	32	59	22	41	12	22	7	13	0	0
青霉属 ( <i>Penicillium</i> )	44	44	100	21	48	18	41	10	23	4	9	0	0
根霉属 ( <i>Rhizopus</i> )	6	6	100	6	100	6	100	5	83	2	33	0	0
毛霉属 ( <i>Mucor</i> )	4	4	100	3	75	3	75	2	50	1	25	0	0
镰刀菌属 ( <i>Fusarium</i> )	4	2	50	2	50	2	50	1	25	0	0	0	0
拟青霉属 ( <i>Paecilomyces</i> )	2	2	100	1	50	1	50	0	0	0	0	0	0
毛壳菌属 ( <i>Chaetomium</i> )	1	1	100	1	100	1	100	1	100	1	100	0	0
茎点霉属 ( <i>Phoma</i> )	1	1	100	1	100	1	100	0	0	0	0	0	0
被孢霉属 ( <i>Mortierella</i> )	1	1	100	1	100	1	100	0	0	0	0	0	0
交链孢霉属 ( <i>Alternaria</i> )	2	1	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
弯孢霉属 ( <i>Cucularia</i> )	1	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
其他霉菌	6	3	50	1	17	1	17	0	0	0	0	0	0
共 计	216	173	80	115	53	92	43	49	23	21	10	0	0

讨 论

上述结果指出,用沙管法室温保藏放线菌近30年,第11年的存活率(表1)不低于用真空冷冻干燥法保存放线菌7年的存活率84%<sup>[8]</sup>,及砂土管低温保存4—5年的存活率88.5%<sup>[9]</sup>。存活菌种具有良好的遗传稳定性。用麸曲法室温保藏霉菌10余年也取得较好的效果。因此用砂管法室温保藏放线菌和用麸曲法保藏部分霉菌是安全可靠的。

参 考 文 献

1. 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》,第610—629页,科学出版社,北京,1980。
2. 李钟庆:《微生物菌种保藏技术》,第1—4页,科学出版社,北京,1989。
3. Smith d et al.: Seventh International Congress for Culture Collections, Symposium, Round Table and poster Abstracts, p. 1, Beijing, 1992.
4. 根井外喜男编:《微生物の保存法》,第7—20页,东京大学出版会,东京,1977。
5. 方善康:山东大学学报(自然科学版),15(2):108—112,1980。
6. 北京纤维素酶菌种筛选小分队:微生物学革命资料汇编(第四集),第45—51页,科学出版社,北京,1970。
7. 中国科学院微生物研究所放线菌分类组编著:《链霉菌鉴定手册》,第658—660页,科学出版社,北京,1975。
8. 中国科学院微生物研究所菌种保藏组:微生物学报,15(1):59,1975。
9. 赵仪英等:微生物学报,8(2):202,1960。

(1993-02-27 收稿)

表4 测定保藏期霉菌纤维素酶活性

菌株编号		原始CMC酶活(u/ml)	保藏7年CMC酶活(u/ml)
木霉	1740	100	93
	3344	100	90
	4976	100	98
	6539	100	92
曲霉	7465	100	95
	857	100	97
青霉	5743	100	105
	3779	100	107
根霉	1070	100	110
毛霉	802	100	98

## REPORT ON CULTURE CONSERVATION OF *ACTINOMYCES* AND MOLDS

Fang Shankang

(Department of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

The sand tube method for the preservation of 244 strains of *Actinomyces* at room temperature through a period of 29 years has been tested. The survival rates (%) of these strains were 96 for 6 yrs; 91 for 9 yrs; 88 for 11 yrs; 78 for 14 yrs; 76 for 15 yrs; 74 for 17 yrs; 70 for 20 yrs; 59 for 22 yrs; 47 for 25 yrs; 40 for 27 and 37 for 29 yrs. The antimicrobial activities and antibiograms of existing strains were identical with their original strains. The conservation of 12 genera, 216 strains of molds at room temperature for 16 yrs was carried out by moldy bran method. Their survival rates varied from 0 to 100% depending on their species. All of them deceased at 16th years.

**Key words** *Actinomyces*; Molds; Culture conservation