

液氮超低温冻结保藏细菌十年效果的检测

周宇光

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘要 采用液氮超低温冻结保藏法保藏 39 属、128 种、1060 株细菌。储藏 10 年(部分 7 年)后,检测存活率为 97.83%。

关键词 液氮超低温冻结保藏,细菌

细菌的液氮超低温冻结保藏,国外已有报道,但多限于对个别种属的保藏结果^[1,2]。我室曾于 1986 年报告了液氮超低温冻结保存 10 属、19 种、19 株细菌 8 个月后的细胞存活率和若干生理活性的研究结果^[3]。本文报道以 10%甘油水溶液为保护剂,液氮超低温冻结保存 39 属、128 种、1060 株细菌 10 年(部分 7 年)的检测结果。

1 材料与方 法

1.1 菌种

中国普通微生物菌种保藏中心保藏的 39 属、128 种、1060 株细菌(表 1)。

1.2 培养基

试验中采用了 PYG、MRS、醋酸菌培养基、固氮菌培养基以及 2216 海水培养基。不同属种的菌株选择相应的培养基。

1.3 保护剂

10%甘油水溶液。

1.4 超低温冻结条件

液态氮的气相区。

1.5 冻结和解冻

将生长良好的菌种,分别悬浮于装有保护剂的安瓿中,直接放入液氮生物储存器的气相区(快速冻结)保存。从液氮生物储存器中取出安瓿后,即置 40℃ 水浴中振荡,使其迅速融化备测。

1.6 存活测定

根据菌株属种的不同,将融化后的菌悬液接种于相应的培养基斜面上,于最适温度培养 24~48h 后,观察生长情况。

2 结果与讨论

所检测的 39 属、128 种、1060 株细菌,经液氮超低温冻结保存 10 年(部分菌株保存 7 年)后,保持活力的有 1037 株,存活率为 97.83% (表 1)。就种来说,有一个种死亡,即发亮弧菌 (*Vibrio splendidus*),该种所保藏的三株菌种全部死亡。就不同的属来看,弧菌属不易保藏死亡较严重,9 种、34 株弧菌菌种中死亡 14 株,存活率仅为 58.82%。在死亡的 23 株菌种中,弧菌属 14 株占 60.87%;6 株是尚未定名的菌种占 26.49%;另外三株分别是生黑醋杆菌 (*Acetobacter melanogenus*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 和多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*)。

关于用液氮超低温冻结保存的菌种的生理活性问题,根据我们实验室以前的研究结果,凡经冻结保藏一段时期,融化后经培养保持存活力的菌株,一般都保持着冻结保藏前的生理活性^[3~7]。结果说明,以 10%甘油水溶液作保护剂,液氮超低温冻结保藏法是长期保藏细菌的有效手段之一,其存活率高于目前采用的另一种主要的保藏方法——真空冷冻干燥保藏法(表 2)。

今后,将对弧菌属菌种和其它死亡菌种的保藏,从保护剂的种类、浓度、冻结速度、细胞培养时间和有效保藏时间等多个方面作深入的专题研究。

表 1 39属、128种、1060株细菌经液氮超低温冻结保藏7~10年的结果

微生物名称	保藏7年(株)	保藏10年(株)	微生物名称	保藏7年(株)	保藏10年(株)
<i>Acetobacter aceti</i>	3		<i>B. sphacricus</i>	8	18
<i>A. melanogenum</i>	7	11(1)	<i>B. stearothermophilus</i>		1
<i>A. mesoxydans</i>	1	1	<i>B. subtilis</i>	73	90
<i>A. pasteurianus</i>	1		<i>B. thuringiensis</i>	4	76
<i>A. rancens</i>	9	2	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	3	41
<i>A. roseum</i>	1		<i>B. flavum</i>	3	4
<i>A. suboxydans</i>	10	8	<i>B. sp.</i>		6
<i>Achromobacter diquefaciens</i>		2	<i>Cellulomonas flavigena</i>		1
<i>A. rerosis</i>	1	1	<i>C. varians</i>		1
<i>Aerobacter aerogenes</i>	1	1	<i>Citrobacter freundii</i>		1
<i>A. cloacae</i>	5		<i>Corynebacterium crenatum</i>	1	3
<i>Aeromonas hydrophila</i>		1	<i>C. deparaffinicum</i>		1
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		1	<i>C. diphtheroides</i>	1	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	3	<i>C. glutamicus</i>		1
<i>Aquaspirillum tuomuerense</i>		1	<i>C. pekinensis</i>	4	3
<i>Arthrobacter paraffineus</i>		1	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	1	
<i>A. simplex</i>	1	3	<i>C. sp.</i>		1
<i>A. sp.</i>	1		<i>C. thermophilum</i>		1
<i>Azotobacter agilis</i>		2	<i>Dipareforma spartinacae</i>	1	
<i>A. chroococcum</i>	3	9	<i>Enterobacter cloacae</i>		2
<i>A. sp.</i>	1		<i>Erwinia aroideae</i>	1	
<i>A. vinelandii</i>	2	5	<i>E. carotovora</i>		1
<i>Bacillus cereus</i>	25	15	<i>E. uredovora</i>		1
<i>B. circulans</i>		3	<i>Escherichia coli</i>	9	35
<i>B. coagulans</i>		1	<i>Flavobacterium antheracidum</i>		1
<i>B. diffusus</i>		1	<i>F. oryzae</i>		2
<i>B. firmus</i>		1	<i>Hafnia alvei</i>		1
<i>B. larvae</i>	1	1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3	
<i>B. laterosporus</i>		1	<i>L. brevis</i>	3	
<i>B. licheniformis</i>	2	23	<i>L. buchneri</i>	3	
<i>B. macerans</i>	6		<i>L. casei</i>	15(1)	
<i>B. megatherium</i>	3	8	<i>L. cellobiosus</i>	1	
<i>B. mucilaginosus</i>		4	<i>L. coprophilus</i>	1	
<i>B. polymyxa</i>	9	8(1)	<i>L. fermentum</i>	1	
<i>B. pulvifaciens</i>		2	<i>L. lactis</i>	1	
<i>B. pumilus</i>	4	13	<i>L. leichmannii</i>	2	
<i>B. sp.</i>	1	4	<i>L. plantarum</i>	17	2

续表 1

微生物名称	保藏 7 年(株)	保藏 10 年(株)	微生物名称	保藏 7 年(株)	保藏 10 年(株)
<i>L. sp.</i>	3		<i>Rhizobium arachis</i>	1	3
<i>L. viridescens</i>	1		<i>R. astragali</i>	2	8
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	1		<i>R. japonicum</i>		7
<i>L. mesenteroides</i>	4		<i>R. leguminosarum</i>	3	14
<i>Micrococcus aureus</i>		1	<i>R. lupini</i>		2
<i>M. lysodeikticus</i>	2		<i>R. meliloti</i>	1	9
<i>M. radiodurans</i>	1		<i>R. phaseoli</i>		3
<i>M. sp.</i>	2		<i>R. trifolii</i>	4	3
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	2		<i>Salmonella sp.</i>		1
<i>M. smegmatis</i>	1		<i>Sarcina flava</i>	1	
<i>M. tuberculosis</i>		1	<i>S. lutea</i>	2	3
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	1		<i>S. subflava</i>	2	2
<i>P. sp.</i>		1	<i>S. ureae</i>	1	
<i>Pneumococcus sp.</i>		1	<i>Serratia marcescens</i>		2
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	<i>Staphylococcus albus</i>	2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	15	<i>S. aureus</i>	1	6
<i>P. avenae</i>		1	<i>Streptococcus cremoris</i>	1	
<i>P. convexa</i>	2	1	<i>S. faecalis</i>	6	2
<i>P. fluorescens</i>	7	2	<i>S. lactis</i>	1	2
<i>P. geniculata</i>	1	1	<i>S. pernyi</i>		5
<i>P. oleovorans</i>		1	<i>S. pneumoniae</i>		1
<i>P. oleae</i>		1	<i>Vibrio alginolyticus</i>		3
<i>P. ovalis</i>		3	<i>V. campbellii</i>		2
<i>P. panici</i>		1	<i>V. fluvialis</i>		6
<i>P. phenolica</i>		1	<i>V. harveyi</i>		4(2)
<i>P. pseudomallei</i>	1		<i>V. natrigens</i>		4(2)
<i>P. putida</i>	1	1	<i>V. nereis</i>		4(3)
<i>P. setariae</i>		1	<i>V. parahaemolyticus</i>		3
<i>P. sp.</i>		4	<i>V. pelagius</i>		5(4)
<i>P. striata</i>		1	<i>V. splendidus</i>		3(3)
<i>P. stutzeri</i>		1	<i>Xanthomonas oryzae</i>		2
<i>P. wellantypicum</i>		1	<i>Zymomonas mobilis</i>		1
<i>Renoides spartinaeae</i>	1		未定名菌种	15(6)	145

注: 括号内的数字表示死亡的株数。

表2 两种保藏方法的比较

方 法	保存时间 (a)	检测菌株的 种类和数量	存活率 (%)	不易保藏 的属
液氮超低温 冻结	10	36 属、128 种、 1060 株	97.83	弧菌属
真空冷冻干 燥 ^[8]	16	13 属、32 种、 126 株 (b)	81.74	醋杆菌属、 乳杆菌属、 根瘤菌属
	4~7	22 属 84 种 484 株 (b)	96.5	

a. 部分菌种的保藏时间为 7 年

b. 检测菌种中不包括弧菌属

参 考 文 献

- [1] Tanaka Y, Yoh M, Takeda Y, *et al.* Appl Environ Microbiology, 37: 369~372, 1979.
- [2] Bullen J J. Journal of General Microbiology, 1975 89: 205~207.
- [3] 马廷生. 微生物学报, 1986, 26(2): 164~169.
- [4] 李钟庆, 元伟. 真菌学报, 1984, 3(3): 178~187.
- [5] 朱丽钊, 李钟庆. 真菌学报, 1987, 6(1): 46~50.
- [6] 谢玉梅, 从兆海. 真菌学报, 1987, 6(1): 51~57.
- [7] 陈燕妍. 真菌学报, 6(2): 1987, 110~117.
- [8] 中国科学院微生物研究所菌种保藏组. 微生物学报, 1975, 15(1): 57~71.