

沙土管保藏抗生素产生菌 36 年或 38 年的存活性试验

刘红宇 陈 睦 朱海燕 赵仪英

(中国医学科学院协和医科大学医药生物技术所 北京 100050)

摘要: 采用沙土管保藏方法对部分抗生素产生菌进行保藏, 36~38 年后检查保藏效果, 结果表明 36 年总存活率高达 83% 以上, 对其中部分真菌测活, 存活菌株都保持原活性。

关键词: 沙土管保藏, 抗生素产生菌, 存活

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0057-04

VIABILITY OF ANTIBIOTICS PRODUCING STRAINS STORED IN SOIL

LJU Hong-Yu CHEN Mu ZHU Hai-Yan ZHAO Yi-Ying

(Chinese Academy of Medical Sciences, Union Medical College,

Institute of Medicinal Biotechnology, Beijing 100050)

Abstract: Antibiotics producing strains (92 Actinomycetes, 42 *Penicillium chrysogenum*) stored in Soil for 36 to 38 years, about 83% were viable, the ability producing penicillin was maintained. We believe it is effective for Culture Collection to preserve antibiotics producing strains by soil.

Key words: Viability, Antibiotics producing strains, Stored in soil

沙土管保藏法是一种使用较早的菌种保藏方法, 适用于很多类型微生物的保存, 是一种简便有效的保藏方法, 据报道可以保存放线菌 25~30 年^[1], 本文将 1964~1966 年间沙土管法保藏的部分抗生素产生菌复壮, 发现此法保藏的放线菌 (包括部分稀有放线菌)、真菌经过 36 年的保存总存活率高达 83% 以上, 对于部分真菌测活, 仍然保持了原抗菌活性, 可以满足专业菌种中心复份保藏机构的低成本要求。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

放线菌: 小单孢菌属 2 株, 钦氏菌属 1 株, 诺卡氏菌属 3 株, 糖多孢菌属 1 株, 链霉菌属 85 个种, 真菌: 产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 42 株, 均来源于本所菌种保藏中心。

1.2 保藏方法

沙土管保藏法^[2,3]。

1.3 菌种复壮方法

沙土管中加少量无菌水搅拌, 然后取菌悬液涂在斜面上, 28℃ 培养。

1.4 放线菌、真菌传代斜面^[4]

放线菌采用高氏一号培养基和依莫松 (Emerson's) 培养基, 真菌培养基采用巧比克培养基 (Czapek agar)。

1.5 真菌活性检测

发酵培养基：葡萄糖 40g，乳糖 30g，Na₂SO₄ 2.5g，MgSO₄ 0.05g，CaSO₄ 4g，水定容至至1,000mL，以 1g 苯乙酸钠为前体，pH 5.3 ~ 5.8，10Pa 灭菌。

检定培养基：蛋白胨 5g，肉膏 3g，K₂HPO₄ 3g，NaCl 5g，琼脂 20g，水定容至1,000mL pH 7.8 ~ 8.0，15Pa 灭菌。

2 结果与讨论

2.1 放线菌保藏 36 年或 38 年后存活率检查

沙土管中加少量无菌水搅拌然后取菌悬液，涂在高氏一号培养基和依莫森培养基上 28℃培养 20d 以上，观察其生长情况。见表 1。

表 1 放线菌保藏 36 年或 38 年后存活率

菌种名称	38 年	36 年	菌种名称	38 年	36 年
<i>Micromonospora</i> L-161	*	+	<i>S. coelicolor</i>	+	
<i>Micromonospora</i> H-19-78	*	+	<i>S. cyaneogriseus</i>		+
<i>Chainia antibiotica</i>	+		<i>S. cyaneogriseus</i>	-	
<i>Nocardia albospora</i>	*	+	<i>S. diastaticus</i>	*	+
<i>Nocardia odorifer</i>	+		<i>S. echinatus</i>	*	+
<i>Nocardia parvus</i>	*	+	<i>S. ehimensis</i>	*	-
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	*	+	<i>S. flaveolus</i>		+
<i>S. abikoensis</i>	*	+	<i>S. flaveolus</i>	-	
<i>S. albireticuli</i>	*	-	<i>S. flavochromogenes</i>	*	+
<i>S. albochromogenes</i>	*	+	<i>S. flavovirens</i>	*	+
<i>S. albogriseolus</i>	*	+	<i>S. flavus</i>	+	
<i>S. albus</i>	*	+	<i>S. fluorescens</i>	+	
<i>S. anulatus</i>	+		<i>S. fradiae</i>		+
<i>S. antibioticus oleandomycini</i>	+		<i>S. fulvoviridis</i>	+	
<i>S. aureofaciens</i>	*	+	<i>S. fumosus</i>	+	
<i>S. badius</i>	*	+	<i>S. glaucoviolaceus</i> var. <i>Pallens</i>	*	+
<i>S. bikarenensis</i>	*	+	<i>S. glaucinilaceus</i>	+	
<i>S. bobiliae</i>	*	+	<i>S. gougeroti</i>	+	
<i>S. cacaoi</i>	*	+	<i>S. griseochromogenes</i>	*	-
<i>S. californicus</i>	*	+	<i>S. noursei</i>	-	
<i>S. candidus</i>	*	+	<i>S. novaeceasareae</i>	*	
<i>S. carnosus</i>	*	+	<i>S. olivaceus</i>	*	+
<i>S. cellulosa</i>	*	+	<i>S. olivaceus</i>	-	
<i>S. chromogenes</i>	*	+	<i>S. parvullus</i>	+	
<i>S. chrysomallus</i>	*	+	<i>S. halstedii</i>	+	
<i>S. chrysomallus</i>	+		<i>S. hygrosopicus</i> var. <i>violaceus</i>	+	
<i>S. griseoflavus</i>	*	+	<i>S. hominis</i>	*	+
<i>S. griseolus</i>	*	+	<i>S. hygrosopicus</i>	*	+
<i>S. griseoluteus</i>	-		<i>S. intermedius</i>	+	
<i>S. glaucoviolaceus</i> var. <i>Pallens</i>	*	+	<i>S. janthinus</i>	-	
<i>S. griseomacropsorus</i>	*	+	<i>S. lavendulae</i>	+	
<i>S. griseus</i>	+		<i>S. lavendula</i> var. <i>glaucescens</i>	*	+
<i>S. cinnamomensis</i>	*	+	<i>S. levoris</i>	*	+

续下页表

续上表

<i>S. cinnamonensis</i>	-		<i>S. longispororuber</i>	+	
<i>S. citreofluorescens</i>	*	+	<i>S. purpurascens</i>	*	-
<i>S. mitakaensis</i>	*	+	<i>S. reticuli</i>	*	-
<i>S. mobaraensis</i>	*	+	<i>S. rimosus</i>	*	-
<i>S. nigrificans</i>	*	+	<i>S. rochei</i>	*	+
<i>S. nitrosporeus</i>	*	+	<i>S. roseochromogenes</i>	*	+
<i>S. niveus</i>	*	+	<i>S. ruber</i>	*	+
<i>S. luteolutescens</i>	*	+	<i>S. rubescens</i>	*	+
<i>S. microflavus</i>	*	+	<i>S. rubiginosohelvolus</i>	*	+
<i>S. phaeofaciens</i>	*	-	<i>S. rutgersensis</i>	*	+
<i>S. phaeochromogenes</i>		+	<i>S. pluricolorrecenes</i>	-	
<i>S. phaeochromogenes</i>	-		<i>S. praecox</i>	*	-
<i>S. scabies</i>	+		<i>S. salmonicida</i>	*	-

注：* 表示未测，+ 表示生长，-表示不生长

接种抗生素产生菌 92 株，其中稀有放线菌小单孢属 2 株存活 36 年以上；钦氏菌属 1 株存活 38 年以上；糖多孢菌属 1 株存活 36 年以上；诺卡氏菌属 3 株均存活，1 株存活 38 年以上，2 株存活 36 年以上；链霉菌菌属 85 个种，其中 17 株存活 38 年以上，45 株可以存活 36 年以上；3 株存活 36~38 年。

2.2 青霉素产生菌菌株存活和活性测定结果

沙土管中加少量无菌水搅拌，然后取菌悬液，涂在巧比克（Czapek agar）培养基上 28℃培养 20d，观察其生长情况，然后发酵、测活。活性测定采用管碟法进行，检定菌采用金黄色葡萄球菌 209P，结果见表 2。

以上 42 株为产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*），沙土管保藏 37 年后存活 39 株，存活率达 93%，其中大部分菌株接种 3d 后就已生长旺盛，存活的菌株保持了原活性的 10%~92%，不同菌株保持的活性大小不同。

2.3 讨论

随着实验手段的发展菌种保藏的（下转第 44 页）

表 2 青霉素产生菌菌株存活和活性测定结果

菌 株 编 号	存 活 情 况			保藏后 活性 (%)		菌 株 编 号	存 活 情 况			保藏后 活性 (%)
	3 (d)	5 (d)	7 (d)				3 (d)	5 (d)	7 (d)	
p-1	+			66		p-28	+			-
p-3	+			43		p-29	+			92
p-4	+			75		p-31	+			10
p-5	+			76		p-32	+			34
p-6	+			91		p-33	+			16
p-7	+			85		p-34	+			35
p-8	+			45		p-36	+			45
p-9	+			51		p-38	+			50
p-11	+			49		p-40	+			27
p-12	+			51		p-42	+			12
p-13	+			50		p-43	+			80
p-14	+			78		p-44	+			85
p-15	+			75		p-46	+			-
p-16	+			46		p-48		+		-
p-17	+			10		p-49	+			-
p-20	+			40		p-50			+	43
p-21		+		-		p-53			+	-
p-23	+			22		p-54	+			-
p-25	+			23		p-55			-	
p-26	+			83		p-56			-	
p-27	+			25		p-57			-	

注：+ 表示生长，-表示未生长、未测

(上接第 59 页)

方法已有冷冻法 (-20°C 、 -80°C)、冷冻干燥法、液氮超低温保藏法等多种保藏方法, 这些保藏方法各具特色, 冷冻干燥法便于携带邮寄, 但操作复杂, 需要很多较昂贵的仪器; 液氮超低温保藏法保藏菌种存活率高, 菌种变异小、但需要长期补氮, 运输不方便; 而沙土管保藏法作为一种较老的保藏方法却具有操作简单等优势, 综合 134 个不同菌株的存活率和部分青霉素产生菌的生物活性测定结果表明: 沙土管保藏法保藏放线菌 (包括稀有放线菌)、真菌 36 年总存活率可达 83% 以上, 并保持了原活性, 对于放线菌及霉菌的长期保藏仍是有效的方法, 与现在常用的冷冻干燥法及液氮法相比具有低成本的优势, 尤其是可以解决专业菌种中心复份保藏机构的低成本要求。

参 考 文 献

- [1] Pridham T G, Lyons A J. Viability of Actinomycetes Stored in Soil, *Applied Microbiology*, 1973, 441 ~ 442.
- [2] 根井外喜男编. 微生物保存法. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.5 ~ 7.
- [3] 菌种保藏手册编写组. 菌种保藏手册. 北京: 科学出版社, 1980.615 ~ 616.
- [4] 张纪中. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990.153 ~ 154.