

L-干燥法和冷冻真空干燥法保藏放线菌效果的比较

王熾芝 陈丽

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 L-干燥法和冷冻真空干燥法保藏不同放线菌效果是不一致的。在低温5℃多数放线菌用L-干燥法保藏,无论是干燥后及保存11个月以后其成活率均比冷冻真空干燥法高,但L-干燥法对温度较敏感,在温度37℃保藏成活率有下降的趋势。而冷冻真空干燥法在短期内保藏受温度影响较小。两种方法使用三种保护剂:10%脱脂牛奶粉,3%谷氨酸钠,1%蛋白胍+10%蔗糖,其中以10%脱脂牛奶粉为最理想。因此,采用L-干燥法以10%脱脂牛奶粉为保护剂,在低温5℃长期保存放线菌是较理想的方法之一。两种方法三种保护剂保存11个月对葡萄糖异构酶活性影响不大。

关键词 L-干燥法,冷冻真空干燥法,保护剂

人们在长期的实践中对放线菌菌种的保藏建立了许多方法,如:斜面菌种保藏法,载体保藏法,矿油保藏法,冷冻真空干燥法^[1-4] L-干燥法^[5-8]液氮法等。各种方法所适用的微生物种类和效果各有差异。为寻找出更省力,更简便,而又安全可靠的放线菌种保藏方法,本文就冷冻真空干燥法和L-干燥法对22种30株放线菌在不同温度(5℃、37℃)不同保藏时间(30天、60天、330天)用不同保护剂的条件下,对其保藏效果进行了探讨。

材料和方法

(一) 菌种

本所保藏放线菌(见表1)。

(二) 培养基

高氏培养基^[1]。

(三) 保护剂

1. 10%脱脂牛奶粉。

2. 3%谷氨酸钠(用0.1mol/l磷酸缓冲液配制)。

3. 1%蛋白胍+10%蔗糖。

以上三种保护剂,每支试管各分装1ml备用。

(四) 方法

1. 干燥管的制备^[1]。

2. 测菌悬液中菌数:定量稀释法测定。

3. 测干燥管中活菌数:定量稀释法测定。

结果与讨论

(一) L-干燥法和冷冻真空干燥法在低温5℃对保藏放线菌的影响

采用22种30株放线菌,以两种方法制成干燥管,同时测定0时和保藏11个月以后的成活率,结果列于表1。

李钟庆同志审阅文稿并提意见,特此致谢。

表1 两种保藏方法对放线菌保存效果的比较

成活率 (%)	保护剂	10% 脱脂牛奶粉				3% 谷氨酸钠				1% 蛋白胨 + 10% 蔗糖			
		L-干燥法		冷冻真空干燥法		L-干燥法		冷冻真空干燥法		L-干燥法		冷冻真空干燥法	
<i>S. globisporus</i>	4.90	5.0*	4.5**	3.1*	3.1**	7.6*	7.5**	3.8*	3.8**	11.6*	11.4**	2.5*	0.5**
<i>S. globisporus</i>	4.91	1.4	1.4	3.4	3.4	0.98	0.54	4.2	3.3	1.53	1.5	3.9	3.7
<i>S. bacillaris</i>	4.107	14.4	10.6	0.34	0.25	9.6	7.1	0.5	0.5	14.2	8.5	0.74	0.14
<i>S. lavendulae</i>	4.210	0.016	0.016	13.0	2.9	0.004	0.004	4.9	4.9	0.012	0.012	4.4	4.2
<i>S. violaceus</i>	4.226	15.4	15.4	0.095	0.09	12.2	12.2	0.3	0.3	18.3	9.4	0.43	0.16
<i>S. viridochromogenes</i>	4.228	26.2	15.69	0.43	0.43	19.1	14.07	5.2	2.2	21.1	9.7	4.01	2.25
<i>S. griseomacrosporus</i>	4.353	25.67	25.67	7.9	5.9	20.7	16.5	13.0	13.0	24.5	23.97	8.0	0.92
<i>S. viridochromogenes</i>	4.488	30.0	9.17	14.5	14.5	19.9	19.4	12.5	6.5	24.7	14.76	12.7	8.7
<i>S. parvullus</i>	4.499	14.3	14.3	1.3	1.3	11.3	11.3	4.6	0.9	18.2	18.2	2.1	1.9
<i>S. rubrolavendulae</i>	4.592	0.57	0.24	0.085	0.014	0.7	0.259	0.065	0.017	0.88	0.44	0.021	0.009
<i>S. lavendulae</i>	4.624	29.8	0.3	16.7	16.7	16.8	0.14	34.4	6.5	36.2	27.3	14.7	2.5
<i>S. coeruleus</i>	4.656	11.0	8.4	0.07	0.013	8.3	6.5	0.04	0.007	13.7	9.8	0.08	0.049
<i>S. lilacinorectus</i>	4.690	3.1	0.0	18.7	18.7	4.5	1.2	22.8	17.8	3.2	0.14	22.5	22.5
<i>S. fumans</i>	4.720	22.8	22.8	2.0	1.7	16.4	16.4	1.7	1.7	11.6	11.6	7.2	0.42
<i>S. coeruleus</i>	4.729	13.8	6.0	2.9	1.8	16.9	16.9	3.2	0.66	17.6	0.13	1.0	1.03
<i>S. parvullus</i>	4.781	17.2	17.2	11.8	11.8	14.6	14.6	19.8	6.1	18.1	17.4	35.3	13.4
<i>S. flavochromogenes</i>	4.792	28.6	—	1.8	1.8	34.0	—	0.66	0.66	10.6	—	1.3	1.3
<i>S. nigrificans</i>	4.804	0.2	0.27	5.8	5.8	0.1	0.022	16.0	14.0	0.53	0.42	32.0	14.1
<i>S. nigrificans</i>	4.805	11.89	11.89	15.9	15.9	8.89	8.89	22.6	20.7	12.0	10.67	41.1	30.0
<i>S. roseofulvus</i>	4.951	25.0	—	0.86	0.23	24.0	17.56	2.9	2.9	24.0	9.45	3.1	3.1
<i>S. roseorubens</i>	4.954	44.6	43.0	0.92	0.92	17.75	17.75	1.2	1.11	33.3	33.3	1.5	0.87
<i>S. violorubens</i>	4.957	3.2	2.9	8.4	3.3	2.1	1.2	6.3	6.3	3.9	3.9	8.1	7.2
<i>S. griseoruber</i>	4.967	21.0	21.0	3.8	2.5	16.0	16.0	2.9	2.9	21.0	21.0	14.6	8.1
<i>S. malachitofuscus</i>	4.970	26.9	—	25.0	25.0	21.0	—	11.3	11.3	24.7	—	16.0	16.0
<i>S. coeruleus</i>	4.990	35.5	35.5	0.69	0.67	39.8	38.4	3.0	2.7	35.3	0.25	3.0	1.9
<i>S. roseofulvus</i>	4.1002	1.5	1.5	4.4	4.4	14.0	11.96	5.8	5.8	20.0	6.75	13.7	6.6
<i>S. variabilis</i>	4.1035	23.9	19.6	2.5	2.5	19.0	14.2	6.1	6.1	29.5	6.1	3.5	3.5
<i>S. cinnamofuscus</i>	4.1099	28.3	22.3	3.7	3.7	35.8	12.7	4.5	4.5	34.2	26.3	3.9	3.9
<i>S. ansochromogenes</i>	4.1106	7.1	—	3.4	3.2	15.8	—	6.0	1.7	19.7	—	11.55	11.55
<i>S. chromogenes</i>	4.1108	69.0	69.0	1.3	1.2	26.0	20.7	4.0	1.4	37.8	26.3	57.7	15.6

* 干燥后的成活率

** 干燥后保存 11 个月的存活率

从表 1 中看出, 30 株菌中有 23 株菌用 L-干燥法制得干燥管, 无论在 0 时和经低温保存 11 个月以后的成活率均比冷冻真空干燥法高。这些菌是:

<i>S. globisporus</i>	4.90
<i>S. violaceus</i>	4.226
<i>S. griseomacrosporus</i>	4.353
<i>S. lavendulae</i>	4.624
<i>S. fumans</i>	4.720

<i>S. roseorubens</i>	4.954
<i>S. griseoruber</i>	4.967
<i>S. variabilis</i>	4.1035
<i>S. ansochromogenes</i>	4.1106
<i>S. rubrolavendulae</i>	4.592
<i>S. bacillaris</i>	4.107
<i>S. viridochromogenes</i>	4.228 4.488
<i>S. parvullus</i>	4.499
<i>S. coeruleus</i>	4.656 4.729

<i>S. flavochromogenes</i>	4.792
<i>S. roseofulvus</i>	4.951 4.1002
<i>S. coeruleus</i>	4.990
<i>S. cinnamofuscus</i>	4.1099
<i>S. chromogenes</i>	4.1108
<i>S. malachitofuscus</i>	4.970

以下 8 株菌用冷冻真空干燥法保藏成活率较高,它们是:

<i>S. luvendulae</i>	4.210
<i>S. lilacinorectus</i>	4.690
<i>S. violorubens</i>	4.957
<i>S. globisporus</i>	4.91
<i>S. parvullus</i>	4.781
<i>S. nigrificans</i>	4.804 4.805

因此可以看出不同种放线菌采用不同方法保藏在同一温度下成活率是不一致的。两种方法比较,在低温 5℃ 通常以采用 L-干燥法成活率偏高,对低温 5℃ 保藏放线菌是一种比较好的方法。它具有比较简便,易于掌握,节省时间等优点。

(二) L-干燥法和冷冻真空干燥法使用不同保护剂制作干燥管对放线菌保藏的影响

试验分别采用 10% 脱脂牛奶粉、3% 谷氨酸钠和 1% 蛋白胨 + 10% 蔗糖三种保护剂进行。

1. L-干燥法制干燥管保藏放线菌:从表 1 中看出 22 种 30 株菌经 L-干燥法制干燥管,0 时测定成活率,同一菌株使用三种不同保护剂时,其中 1% 蛋白胨 + 10% 蔗糖保护剂最好,成活率较高的菌有 16 株,其次是 10% 脱脂牛奶粉保护剂有 11 株菌成活率较高,最差的是 3% 谷氨酸钠保护剂,仅有 4 株菌表现较高成活率。再从不同菌株使用同一保护剂比较结果来看,成活率达 10% 以上的菌:1% 蛋白胨 + 10% 蔗糖保护剂有 24 株菌,10% 脱脂牛奶粉保护剂有 21 株菌,3% 谷氨酸钠保护剂有 20 株菌。

经低温 5℃ 保藏 11 个月后,三种保护剂干燥管菌的成活率都有不同程度的下降。从表 1 中得到成活率下降最少的是 10% 脱脂牛奶粉

保护剂成活率达 90% 以上的菌有 20 株(以干燥管 0 时成活率为 100% 计算保存 11 个月后的成活率,下同)。其次是 3% 谷氨酸钠保护剂成活率达 90% 以上的菌有 16 株,而下降最多的是 1% 蛋白胨 + 10% 蔗糖保护剂,成活率达 90% 上的菌仅 11 株。因此,1% 蛋白胨 + 10% 蔗糖保护剂虽然在制作干燥管过程中起到很好的保护作用,但在低温长期保存过程中降低了它的保护性能,造成死亡率增高,这种保护剂是不够理想的。而 10% 脱脂牛奶粉做为在低温 5℃ 长期保存菌种的保护剂,其性能较其他两种保护剂稳定,是一种比较好的保护剂。

2. 从表 1 可看出冷冻真空干燥法制干燥管,在低温 5℃ 保藏放线菌 11 个月后结果与 L-干燥法保藏在同样条件下是一致的,菌成活率下降最少的是以 10% 脱脂牛奶粉作保护剂。

(三) 温度和时间对两种方法保藏放线菌效果的影响

温度对放线菌保藏影响是较大的,尤其是 L-干燥法保藏菌种显得更为突出,保藏时间越长影响也就越大,我们分别进行了 5℃ 和 37℃ 存放对比试验,结果如下:

从图 1 至图 3 中的三种放线菌温度试验的比较,表明在 5℃,L-干燥法和冷冻真空干燥法保藏三株菌的成活率,在二个月之内变化不大,保存 60 天比 30 天略低。当 3 株菌保藏在 37℃,用 L-干燥法保存这三株菌时情况则相反,仅保存 30 天成活率就呈直线下降,60 天以后成活率很低,如 AS4.107 菌降至为零。三株菌采用蛋白胨 + 蔗糖为保护剂,30 天已全部死亡。表明 L-干燥法保藏放线菌对温度是很敏感的,高温是不适宜的。

而冷冻真空干燥法保存放线菌虽不如前一种方法好,但从图 1、2、3 中的三个菌表明在短期内温度的影响,除用蛋白胨 + 蔗糖做保护剂成活率下降较大外,其他两种保护剂保存放线菌成活率一般保存 30 天后稍有降低,30—60 天则趋向稳定,曲线呈水平状。

综上所述,在低温 5℃ 长期大量保藏放线菌 L-干燥法是简单可靠的方法。这与 Kozabu-

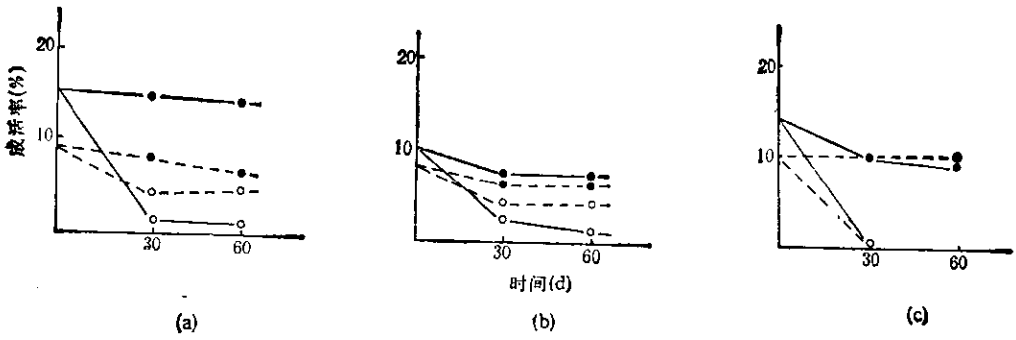


图1 不同保藏方法、保护剂、温度、时间对4.170菌成活率的影响

— L-干燥法 - - - - - 冷冻真空干燥法
 ● — ● 5°C 保藏 ○ — ○ 37°C 保藏
 ● ····· ● ○ ····· ○
 保护剂: a. 10% 脱脂奶粉 b. 3% 谷氨酸钠 c. 1% 蛋白胨 + 10% 蔗糖

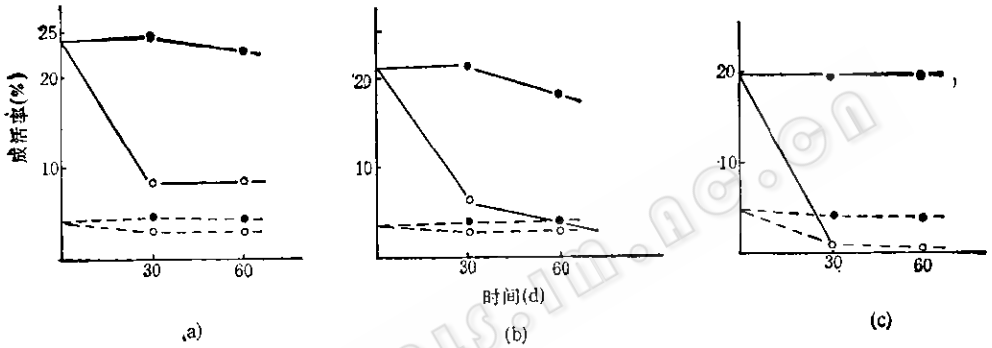


图2 不同保藏方法、保护剂、温度、时间对4.970菌成活率的影响

— L-干燥法 - - - - - 冷冻真空干燥法
 ● — ● 5°C 保藏 ○ — ○ 37°C 保藏
 ● ····· ● ○ ····· ○
 保护剂: a. 10% 脱脂奶粉 b. 3% 谷氨酸钠 c. 1% 蛋白胨 + 10% 蔗糖

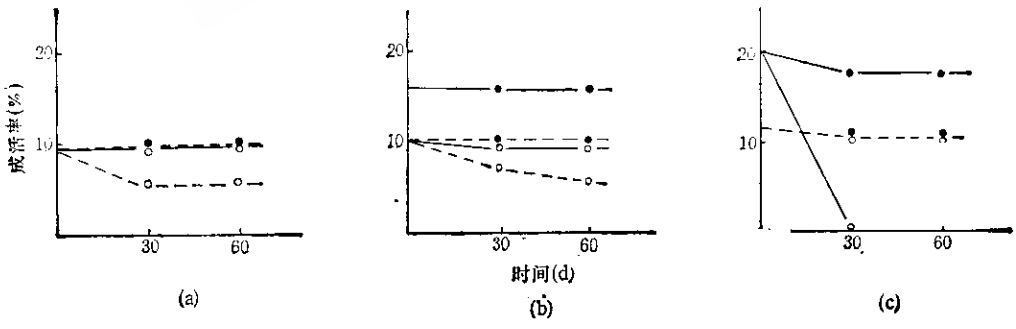


图3 不同保藏方法、保护剂、温度、时间对4.1106菌成活率的影响

— L-干燥法 - - - - - 冷冻真空干燥法
 ● — ● 5°C 保藏 ○ — ○ 37°C 保藏
 ● ····· ● ○ ····· ○
 保护剂: a. 10% 脱脂奶粉 b. 3% 谷氨酸钠 c. 1% 蛋白胨 + 10% 蔗糖

ro Mikata 等^[8]用此法保藏酵母菌的结果是一致的。同时从本试验得出在低温5°C长期保存

放线菌,采用L-干燥法,使用10%脱脂牛奶粉保护剂是较理想的方法。

表2 两种方法保藏 *Streptomyces roseotolens* 4.1002 菌 11 个月后对产葡萄糖异构酶活性的影响

保藏方法	保护剂	OD ₅₅₀	酶活 (μg/ml)
L-干燥法	10%脱脂牛奶粉	0.27	36
L-干燥法	3%谷氨酸钠	0.23	30
L-干燥法	1%蛋白胨+10%蔗糖	0.27	36
冷冻真空干燥法	10%脱脂牛奶粉	0.22	29
冷冻真空干燥法	3%谷氨酸钠	0.23	30
冷冻真空干燥法	1%蛋白胨+10%蔗糖	0.237	31

(四) L-干燥法和冷冻真空干燥法对产葡萄糖异构酶的影响

两种方法保藏 AS4.1002 菌, 在低温 5℃ 保存 11 个月后测菌产葡萄糖异构酶活性。从表 2 中表明 L-干燥法比冷冻真空干燥法保存 4.1002 菌产酶活性稍高一些, 但不很明显。说明两种方法保藏 AS4.1002 菌, 对产葡萄糖异

构酶影响不大, 对同一方法采用不同保护剂影响也不明显。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所《菌种保藏手册》编著组编: 菌种保藏手册, 科学出版社出版, 北京, 1980。
- [2] Tresner, H.D. et al.: *Appl Microbiol.*, **8**:339—341, 1960.
- [3] Heaeltine, C.W. et al.: *Mycologia.*, **52**:762—774, 1960.
- [4] Shuh-wei Hwang: *Appl Micorobiol.*, **14**:784—788, 1966.
- [5] 山里一英编: ; 冷冻干燥法的基础应用, 应用篇, 73—76, 1981。
- [6] 根井外喜男编: 微生物の保存法, 东京大学出版会出版, 1977。
- [7] Tatsuo Yokorama and Lsamu Asano: *IFO Res Comm*, **11**:47—59, 1983.
- [8] Kozaburo Mikata, Sakae Yamanchi and Isao Banno: *IFO Res Comm.*, **11**:25—46, 1983.
- [9] S. P. Lapage and Jean E. Shelton: *Methods in Microbiology. Volume 3A*:135—228, 1970.