

液氮超低温保存放线菌条件研究

廖爱芳 林永珠

(国家医药管理局福建省微生物研究所 福州 350007)

摘要 用6种保护剂对28株放线菌和小单孢菌进行液氮超低温保存。保存3年4个月其存活率均达100%。拮抗性检查结果表明,肉汤和龙眼蜜保护剂对小单孢菌,牛奶保护剂对放线菌保护效果显著,保存前后其拮抗性无明显变化。

关键词 液氮超低温保存,保护剂,放线菌

分类号 Q93-336 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0272-03

CRYOPRESERVATION OF ACTINOMYCETES IN LIQUID NITROGEN

Liao Aifang Lin Yongzhu

(Institute of Microbiology State Pharmaceutical Administration of China and Fujian Province, Fuzou 350007)

Abstract Twenty eight strains of actinomycetes were stored in liquid nitrogen with six cryoprotectants. The survivals were 100% after 3 years and 4 months cryoprotection.

Key words Liquid nitrogen, Cryopreservation, Actinomycetes

液氮超低温保存微生物菌种适用范围广,保存期长,不容易变异^[1,2]。然而不同的保护剂对不同的菌种,抗冻能力各不相同。为了寻找液氮保存抗生素产生菌和用常规方法难于保存的稀有放线菌的合适条件,我们用六种保护剂对10株小单孢菌,18株放线菌和稀有放线菌进行液氮保存条件研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

不同类群和特征的小单孢菌10株,不同类群和特征的链霉菌及马杜拉,孢囊稀有放线菌等18株。

1.2 保护剂

1组 10%脱脂牛奶;2组 高氏天冬素加10%二甲亚砷;3组 营养肉汤加7.5%葡萄糖;4组 河泥土浸出液加10%龙眼蜜;5组 健康小

牛血清加10%甘油;6组 生理盐水加10%蔗糖和2%明胶。

1.3 液氮保存方法简要流程

孢子或菌丝+保护剂→安瓿→火焰封口→预冻→液氮气相²⁰→置液相保存。

将培养好的斜面刮下孢子,或将液体培养物过滤获得菌丝,分别加入6种保护剂,分装安瓿,封口后置预冻装置,控制温度每分钟下降1℃~6℃当温度降至零下35℃~40℃时,迅速将安瓿转入液氮容器气相部位(-150℃),20min后再置液相(-196℃)保存。

1.4 保存效果检查

1.4.1 复温和存活检查:将安瓿从液氮容器中取出,迅速置38℃~40℃水浴中,轻轻晃动安瓿至冰晶完全融化,开启安瓿,将内含物接种于

合适斜面,于28℃,37℃培养观察,检查存活情况。

1.4.2 拮抗性检查:取11株经存活检查后的小单孢菌和放线菌斜面,经发酵后测定其抗菌活性。发酵条件和测定方法与保存前的条件和基本一致^[1],测定菌为大肠杆菌(EC0111),金黄色葡萄球菌(SA209P)。

1.4.3 培养特征和一般生理特性检查:采用查氏蔗糖、葡萄糖、天冬素、淀粉天冬素、葡萄糖酵母膏、麦片琼脂、Emerson、纤维素、牛奶、马铃薯块加NaCl等九种培养基。放线菌置28℃,小单孢菌置37℃培养,分别于7d、14d、28d观察其特性和变化过程。

1.4.4 用高氏天冬素或淀粉B琼脂对六株代表菌株进行埋片培养(28℃,37℃5~10d),在显微镜下观察其行态特征。

2 结果与讨论

用6种保护剂保存的10株小单孢菌和18株放线菌,1个月 after 开管检查,菌株全部存活且生长情况良好。结果说明,实验过程采用的降温 and 复温速率对菌株无明显损伤。

保存6个月,1年和3年4个月检查结果,菌种全部存活。3年4个月的结果显示,小单孢菌以3组(肉汤)和4组(龙眼蜜)两种保护剂的保存效果为优,而1组保护剂(牛奶)更适合于放线菌和释放的保存。6组(生理盐水)保存效果最差,存活率为82%,且生长情况比保存前有明显衰退。孢子和菌丝两种形式相比较,二者无明显差别。

拮抗性检查结果说明(见表1),6种保护剂中,肉汤和龙眼蜜两种保护剂对小单孢菌,牛奶

表1 保存前和液氮保存3年4个月后菌种的拮抗性比较

菌种	保存前		6种保护剂保存后的活性											
	活性		1组		2组		3组		4组		5组		6组	
	SA	EC	SA	EC	SA	EC	SA	EC	SA	EC	SA	EC	SA	EC
<i>M. echinospora</i> v.nigra F19-77	17	15	20	18	13	-	26	20	18	16	13	12	13	14
<i>M. echinospora</i> F54-3	17	16	12	±	±	±	15	17	18	19	±	12	21	13
<i>M. Carbonacea</i> B576	20	-	20	-	-	-	24	-	20	-	16	-	-	-
<i>M. roseopurpurea</i> M104	17	15	13	14	±	17	16	14	19	14	18	14	16	11
<i>M. olivoasterospora</i>	18		±	±	20	±	24	19	18	±	15	-	13	±
<i>M. roseoviridospora</i> n. sp 267	19	16	20	22	18	17	18	16	14	21	18	±	12	±
<i>S. luteolutescens</i> N-45	23	20	28	14	12	±	28	12	25		17		15	
<i>S. jingyangens</i> is 5406	16	18	17	12	±	±	=	13	±	±	12	13	±	±
<i>S. coelicolor</i> c 29-57	18		16	15			±	±	±	±			-	-
<i>S. hygrosopicus</i>	13	20	15	16	±	±	=	±	±	15	17	±	±	-
<i>Nocardia</i> 10	25	-	21	±	-	-	±	±	±	±	±	13	±	-

注: - : 无活性, ±: 活性弱

保护剂对放线菌有明显的保护作用,保存前后其拮抗性无明显变化。

所检查的菌种,孢子着生及菌丝生长情况无变异,培养特征和生理生化特征与保存前的特征基本一致。

3 结论

用液氮保存10株小单孢菌,18株放线菌和

稀有放线菌,3年零4个月全部存活,且保持保存前菌种的活性和生物特征。

试验采用的预冻和复温程序适合于28株菌的液氮保存。

肉汤和龙眼蜜保护剂对小单孢菌有明显的保护作用,牛奶保护剂对放线菌有明显的保护作用。

参 考 文 献

[1] 根井外喜男. 微生物保存法. (金连缘译) 上海: 上海科学技术出版社, 1982.

[2] 中科院微生物研究所. 菌种保藏手册. 北京: 科学出版社, 1980.

[3] 林永珠, 李 彬, 林宏等. 微生物学通报, 1983, 10(5): 228.