

## 菌种保藏

# 微生物菌种的简易保藏

李 振 高

(中国科学院南京土壤研究所)

近几年来,随着微生物在工农业生产上的广泛应用和群众性科学实验活动的蓬勃开展,菌种保藏已成为其中的一个重要环节。由于在人工培养条件下,菌种容易发生遗传变异或生理上的老化,以至丧失其应用价值。因此选用适当的保藏方法防止菌种退化,在微生物研究和应用中都是十分必要的。为了适应广大农村保存菌种的需要,现选择几种常用菌种保藏的简易方法介绍于后,以供参考。

### 一、菌种保藏的基本原理

微生物菌种的保藏方法很多,各有不同程度的局限性或缺点,但是无论那种方法,其基本原理不外乎是根据微生物生理、生化特性,一般利用它们的芽孢或孢子人为地以低温、干燥和缺氧等条件(特别是低温),使微生物的代谢作用处于最不活跃的休眠状态,以达到能够较长时间保藏的目的。

### 二、菌种保藏的简易方法

#### (一)斜面低温保藏法

即将菌种移植于斜面培养基上,待生长丰满后置低温保藏,这个方法适用于各类微生物的保存,而且简单易行,便于使用。但缺点是菌种在丰富培养基上容易退化,也易于被杂菌污染,而且保存时间短。

1. 电冰箱保藏:将生长丰满的斜面菌种,用牛皮纸或塑料纸包扎管口后,置 $4^{\circ}\text{C}$ 左右冰箱中保存。温度不能太低,否则斜面培养基结冰脱水,加速菌种死亡和特性衰退。按不同菌类每隔一段时间(一般细菌二个月,酵母菌四个月,芽孢细菌、放线菌和霉菌六个月)重新移接一次。

2. “土冰箱”保藏:将斜面菌种装在塑料袋内密封,然后埋入盛有50%硝酸铵或尿素的饱和溶液(最好每隔12小时左右更换一次,用后仍可作肥料)的保温瓶里,置于地洞或阴凉处。

也可将菌种管口棉塞用纸包扎后(或用橡皮塞在95%酒精中消毒15分钟来代替棉塞)涂上蜡烛油密封,装在塑料袋内包扎好,吊在井壁上;或装在瓦罐内埋在阴凉较深的土层中,但要经常检查,及时转管,以防受潮发霉。

#### (二)矿物油封藏法

此法是将矿物油(又称石蜡油,液体石蜡)覆盖于菌种斜面上,简便易行,保护性能好,既可防止培养基水分蒸发,又可隔绝空气。除石油微生物外,适用于酵母菌、霉菌、细菌和放线菌的保存。现已成为国外某些较大菌库保藏菌种的常规方法。但菌种管需始终保持垂直,使贮运和移种带来不便,也给清除油管时,洗涤带来麻烦。

1. 取矿物油分装于三角瓶中,经高压蒸气灭菌(15磅/30分钟)或用蒸锅间隙灭菌2—3次,每次一小时。灭菌后因有水气进入,石蜡油变浑浊,对菌种保存质量有影响,因此需在40°C温箱中或在室温下放置一段时间待水气蒸发,石蜡油又成为无色透明时即可。

2. 将灭菌矿物油接在空白斜面上,28°—30°C培养2—3天,保证灭菌完全后方可使用。

3. 将菌种斜面朝下(斜面应短些,以便节省用油量),该矿物油用无菌吸管吸取或直接注入菌种管内,满过斜面顶端1—1.5厘米,用纸包好管口,直立于低温干燥处保存。

4. 使用时倒去矿物油或直接从斜面上挑取少量菌体移接到新鲜斜面上,培养后即可应用。

安徽省肥东县龙塘公社“920”小组曾用灭过菌的煤油代替矿物油保存“920”菌种四个多月,未发现菌种污染、退化等现象。

### (三)固体曲保藏法

这是根据我国劳动人民传统制曲经验改进的方法,又称麸皮法。适用于保存产生大量孢子的霉菌,如曲霉、毛霉、根霉及“920”菌等。操作方便,设备简单,取材容易,适宜推广应用。

1. 称取一定量麸皮(或去壳小米、玉米),加水拌匀,麸皮:水=1:0.8~1.5(各菌种对水分要求不同,可适当增减),分装于试管中,约1.5厘米高,要求疏松,不应压紧,塞好棉塞,用纸包好,彻底灭菌。

2. 将菌种接入冷却的麸皮上,培养至孢子长满后,取出试管放在装有氯化钙或生石灰等吸湿剂的干燥器内,室温干燥至摇动时能发出沙沙声,然后把干燥器放在20°C以下,或用蜡封口后低温保存。

3. 使用时用接种针挑取少量带菌麸皮移到新鲜斜面上,培养即可。

又法:用大麦、豌豆、米糠、酒糟、草药等制曲原料,按一定比例和少量水拌匀做成饼块后,进行接种培养。要注意控制温度、湿度、空气等条件。应逐渐升温,缓慢干燥。选取生长均匀已形成孢子的固体发酵曲饼(整块重约0.5—1斤)用纸包好,在通风处风干,再放入底部装有吸湿剂的罐子内,置阴凉处保存。使用时剥去曲饼外层,切成小块,加少量无菌水,经培养后再行移接。

### (四)砂土管保藏法

根据微生物的习性,用人工模拟方法,将干孢子保存在灭菌的砂土中。其优点是保存期长,不易退化,是当前生产上应用最广的方法。适用于保存放线菌(“5406”,井冈霉素产生菌等等)、芽孢细菌和有孢子的霉菌(鲁保一号菌、白僵菌等)。

1. 取河砂过60—80孔筛(或用纱布代替),除去粗粒,放容器中,用10%盐酸浸泡2—4小时,或煮沸30分钟,以除去有机质。浸泡后倒去盐酸,用流水冲洗至近中性,烘干或晒干。也可采用炒砂的办法使有机质焦化,达到去除有机质的目的。除去有机质后,最好再用磁铁吸去砂中铁质。

2. 取深层瘦黄土(不含有机质),加水泡洗数次至近中性,烘干碾碎,过100孔筛,除去粗粒。

3. 按重量比,砂:土=1:1或6:4掺合均匀,装入指形管或小瓶中,每管(瓶)约1厘米高(1克左右),加棉塞,包上纸,高压灭菌20磅/1小时,干热灭菌一次,抽取砂土少许加入肉汤或豆汁培养液中,检验灭菌效果,保证灭菌完全后待用。

4. 吸3—5毫升无菌水,注入菌种管,将孢子洗下使成悬液,用无菌吸管吸取孢子悬液,每管加入约0.5毫升或使三分之二的砂土达到湿润为度,然后把砂土管放在盛有吸湿剂的干燥器内,抽气干燥至“拍之即散”为止。

如没有抽气设备,可用接种环在斜面上取3—4环干孢子,直接移入砂土管中拌匀。也有用部分砂土倒入斜面孢子上,用接种环挑动砂土在斜面上轻轻磨擦,使孢子吸附在砂土上,再将它们回接到原砂土管中,放入干燥器,让其自然干燥,但由于操作时间长,染菌机会多,因此操作时需特别注意防止污染。

5. 制好的砂土管,抽样接种在空白斜面上,检查孢子成活情况,然后放入装有吸湿剂的广口瓶或大试管内,塞上橡皮塞,用蜡严封,置阴凉干燥处或冰箱中保存。

6. 使用时,挑取少量混有孢子的砂土涂抹在斜面上培养即可。如该菌存活情况良好,原砂土管还可继续保存。

有人全用砂制管(颗粒要求细些),但保存效果不如砂土混合的好。也有全用土制管的,即取肥沃风干土(颗粒要求粗些),每管装2克,加0.4毫升水,彻底灭菌,将孢子接入后,在25°C培养7—10天,待长出白膜即可保存。

### (五)琼脂穿刺保藏法

此法又称半固体琼脂法,把细菌用穿刺法接种到含0.6%琼脂的柱状培养基内(培养基高度相当于试管长度的1/3),在37°C培养24小时后,包扎好或将试管口熔封,放冰箱或室温保存,这是一种既简便又有效的保存无芽孢细菌的方法。

此外,还有蒸馏水保藏法,据报导,有人曾在试管中加入5毫升无菌蒸馏水,制成悬液,在10°C下保存菌种可达20个月,有的甚至在室温下可保存30—40个月。

使用上述各种方法保存菌种,除斜面低温法外,不同菌种一般都可保存一年到数年。

## 三、菌种保藏的注意事项

1. 菌种保藏必须注意培养基、器具等的彻底消毒和严格的无菌操作。

2. 对保存的纯种应在新鲜斜面上长到丰满,但培养时间不宜太长,一般生长近达高峰即可。

3. 保存用培养基不宜太丰富,一般含有机氮多,少含或不含糖分,总糖量不超过2%,以适应菌种的相对稳定。使用时将菌种接种在保存前所用的同一种培养基上,效果更好。

4. 菌种保藏期间应定期检查存活率,对存活率低的菌种在使用时应加大接种量。在保存时间较长,用一般移植的方法不见菌落生长的情况下,可预先在菌种管内加少量培养液或无菌水进行增殖培养后再行移接。

5. 菌种保存到一定时候,需作斜面传代一次,然后再行保藏处理,但一般不轻易更换保藏方法。对每个菌株尽可能多保存一些,贴上标签,做好记录,以备查考。同时选择

# 《土壤理化分析》一书即将出版

土壤是农业生产的基础,掌握认识土壤的手段,对广泛开展群众性的科学实验活动,全面贯彻农业“八字宪法”,具有一定的意义。无产阶级文化大革命以来,广大农业科技工作者与贫下中农一道开展了土壤普查、鉴定,和土壤、肥料的分析化验工作,向生产的深度与广度进军,为夺取农业的更大丰收作出了贡献。为了适应农业生产发展的需要,同时更好地与从事土壤分析化验的单位和四级农业科学实验网的同志们交流经验,我们编写了《土壤理化分析》一书。

全书共约四十五万字,主要介绍土壤、植物、肥料、水质等分析方法。全书共分十章,第一章简述了土壤分析工作的基本知识;第二章到第九章为土壤化学分析部分,包括土壤、植物、肥料及土壤水化学的常用分析项目,土壤和作物诊断等;第十章为土壤物理分析部分,列举了常用的土壤物理分析项目;最后为附录,包括分析用的计算常数,指示剂配制,一般土壤、植物、肥料养分含量变幅以及实验所用的药品和设备等,供参考使用。

为考虑到读者对象不同,书中在同一分析项目中,同时并列介绍几个分析方法,其中有的需要一定设备条件,有的略较简便,可根据各自具备的化验条件和精度要求,加以选择应用。书中介绍了原子吸收分光光度计在土壤分析中的初步应用。如测定土壤和植物中铁、锰、钙、镁等元素。并介绍了离子选择性电极在土壤分析中的应用,如测定土壤可溶性氯离子、钠离子、硝酸根离子,植物(用水提取)中的钾,土壤中速效钾,土壤全铝(用氟电极间接测定),磷矿粉中氟离子,水泥窑灰钾肥中钾离子等。同时选编了土壤与作物速效养分诊断等项目,以供从事农业第一线的同志参考应用。

由于我国幅员辽阔,土壤类型千差万别,我们虽作了一些努力,以适应各级分析化验单位参考应用,但由于我们学习马列主义、毛泽东思想不够,业务水平有限,所列举的方法未尽妥善,有待在实践中进一步加以验证。书中错误和不妥之处,请提出宝贵意见,以便今后补充订正。

本书在编写过程中,得到不少有关单位和同志的大力支持和帮助,提出了许多宝贵意见,在此顺致深切感谢。

(中国科学院南京土壤研究所)

---

一个通风干燥、低温干净的贮藏菌种的场所极为重要,以防意外或污染所造成的损失。

总之,保藏菌种的方法很多,在使用时要根据具体情况因地制宜地选用,并在掌握菌种保藏原理的基础上,通过实践,不断加以改进和完善,从而创造出更多更好的保藏方法,使微生物在工农业生产中发挥更大效益。