

# 微生物菌种保藏方法的研究

## 第一报：几种保藏方法对比试验及砂土管法保藏“5406”菌种的效果

宋明芝 张宏 张树人 王瑞霞

(吉林省农业科学院土壤肥料研究所)

随着微生物的生产应用与研究工作的进展,保藏微生物菌种资源的工作也正在不断发展和受到重现,特别是近20年来,菌种保藏在世界上逐渐成为微生物学领域的一个重要方面。菌种保藏方法方面最广泛应用的有斜面传代法低温(4℃)保藏、冻干法、矿物油法,近年来新发展的方法有封闭藏法、室温真空干燥法、超低温(-150~-196℃)保藏法。菌种保藏单位长期采用某些保藏方法保藏菌种,对用不同方法保藏菌种后的活力变化及其利弊的研究报导较少。微生物菌种保藏方法的研究关系到保藏菌种的实用价值,这是微生物学领域值得重视并开展研究的课题之一。

我们自1971年以来陆续收集保藏了部分微生物菌种,除供应菌种外,对微生物菌种保藏方法开始作了一些研究工作,现将1977年的测定结果初步总结报告如下:

### 一、微生物菌种保藏方法

我们采用了以下几种方法:

- 1、琼脂斜面法(4℃保藏):将微生物接种于适宜的琼脂斜面培养基上,在适宜的温度下培养后,于4℃保藏,定期移置。
- 2、封闭保藏法:将微生物接种于适宜的琼脂斜面培养基上,在适宜温度下培养到最大生长时,把试管的棉塞取出,换以灭菌的胶皮塞,室温保藏。
- 3、矿物油法:将微生物接种于适宜的斜面培养基上,在适宜的温度下培养后,拔开棉塞,加入灭菌的液体石蜡,塞上棉塞,室温保藏。
- 4、干燥法: (1)沙土管法。取河沙过60号筛,10%盐酸处理后用水洗净,烘干。取黄土,用水洗数次,取漂浮于水中的细黄土沉淀烘干。取三份河沙一份黄土混匀后装入试管,灭菌后,将培养物接入沙土管内,将沙土管放在装有氯化钙的容器内,室温保藏。(2)麸皮管法。将小麦麸皮加等量水拌匀后装入试管,灭菌后,接种微生物在适宜温度下培养,待孢子形成后,将试管放在装有氯化钙的容器内,室温保存。

### 二、试验结果及分析

#### 1、几类微生物菌种采用不同保藏方法的效果

1973年以来,我们将几类微生物菌种分别采用了不同的保藏法,1977年采用斜面接种

法，测定其存活状况，结果列于表1。

表1 不同方法保藏几类微生物菌种的效果

菌种类别	项目	保藏方法	保藏时间(月)	调查存活		备注	
				菌株数	株数 %		
酵母菌		琼脂斜面法(4℃)	19—30	46	46	100.0	
		封闭法(室温)	19—30	46	32	69.5	
霉菌		琼脂斜面法(4℃)	33—38	54	53	98.1	链孢霉不长 桔青霉不长
		麸皮管法(室温)	33—38	54	53	98.1	
		沙土管法(室温)	23—33	54	54	100.0	
担子菌		琼脂斜面法(4℃)	25—33	29	29	100.0	
		矿物油法(室温)	25—33	29	23	79.3	
细菌	无芽孢	琼脂斜面法(4℃)	20—34	27	27	100.0	
		封闭法(室温)	20—34	27	27	100.0	
	有芽孢	封闭法(室温)	20—36	5	5	100.0	
		沙土管法(室温)	20—36	12	12	100.0	
放线菌		沙土管法(室温)	18—38	15	11	73.0	

由表1结果看出，酵母菌琼脂斜面法4℃保藏比封闭法保藏为好。封闭法保藏19~30个月存活率仅有69.5%，用沙土管法在室温条件下保藏霉菌有良好的效果，54个菌株保藏23~33个月全部存活，而琼脂斜面法及麸皮管法则各有一株死亡。担子菌用矿物油法保藏效果较差，29个菌株保藏25~33个月，存活率为79.3%，用琼脂斜面法保藏全部存活。细菌用封闭法在室温条件下保藏有良好的效果，32个菌株保藏20~36个月全部存活。用沙土管法保藏有芽孢细菌也有良好的效果。放线菌用沙土管法保藏的效果较差，15个菌株保藏18~38个月，存活率为73%。

## 2、沙土管法保藏“5406”菌种的效果

我们从1971年开始用沙土管法保藏“5406”菌种，为了明确其效果，除用接种斜面培养的方法测定其存活状况外，1977年又从中国农科院引进现用的“5406”菌株，比较其对黑曲霉、固氮菌、钾细菌和磷细菌的抑制或刺激作用，以鉴定其活力，结果列于表2、表3。

表2 保藏不同年限“5406”沙土管菌种长势测定

“5406”沙土管制作日期	保藏时间(月)	存活情况	斜面长势
1971年11月	65	存活	+++
1972年7月	57	存活	++++
1973年6月	47	存活	++++
1974年4月	36	存活	++++
1976年1月	16	存活	++++

表 3

沙土管法保存“5406”菌种的活力测定

项 目 菌 种	抑制作用(抑菌圈m、m)			刺激作用(刺激圈m、m)			
	黑 曲 霉		固氮菌8004	固氮菌NO <sub>3</sub>	钾 细 菌		磷细菌
	I	II			I	II	
保藏57个月沙土管	2.7	4.6	3.1	7.0	6.7	1.9	7.0
“ “ 47 “ “ “ “ “	2.5	10.3	2.3	7.0	11.5	1.8	5.4
“ “ 36 “ “ “ “ “	3.0	9.3	4.1	7.0	8.0	1.66	5.6
“ “ 16 “ “ “ “ “	1.5	6.3	2.1	6.0	8.0	1.50	6.0
新 引 进 菌 种	1.0	8.66	5.5	8.0	7.5	2.25	4.0
“ “ “ “ “ “ “	1.5	6.20	5.2	7.0	10.0	2.00	7.3

注：测定方法：用直径1厘米的滤纸片，沾取“5406”液体培养液，放在接有不同菌种的平板培养基上，培养后测定抑菌圈或刺激生长圈的大小。

由表2结果看出，保藏不同时间的“5406”沙土管菌种全部存活，但保藏期限最长的65个月的“5406”菌种斜面长势较差，其余正常。由表3结果看出经过沙土管长期保存的“5406”菌种与新引进的“5406”菌种相比较，在对黑曲霉和自生固氮菌的抑制作用和对钾细菌、固氮菌和磷细菌的刺激作用没有太大差异，说明用沙土管法保藏“5406”菌种取得比较满意的结果，在室温条件下保藏4~5年菌种活力基本不变。

### 三、小 结 及 讨 论

由以上初步试验结果看出，用沙土管法保藏霉菌及有芽孢的细菌有良好的效果；用封闭法保藏无芽孢细菌也有良好的效果；用沙土管法保藏“5406”效果良好，室温下保存4~5年保持活力。在担子菌的保藏过程中，我们发现采用琼脂斜面法传代，菌苔长势易于产生变化，某些菌株长势逐渐减弱，采用矿油法保藏2~3年后有部分菌株死亡，存活的菌株长势也并不显优。因此，担子菌的保藏方法值得进一步研究。在放线菌的保藏过程中，采用琼脂斜面传代的方法更容易表现退化，甚至有4℃保藏的菌株比室温保藏更易退化和死亡，而沙土管法保藏也有某些菌株死亡的现象，因此放线菌的保藏方法也应该进一步研究。