

## 第二章 菌种的保藏与复壮

- 菌种衰退的基本原因是变异，变异是不可避免的，而减缓变异速度则是可能的。变异速度与菌种所处的环境有密切的关系，不良环境条件能促进变异，频繁或过多传代也是造成衰退变异的重要原因。为菌种创造良好条件，减缓菌种衰退，这就是菌种保藏与复壮工作。

# 第二章 菌种的保藏与复壮

- 一、菌种保藏
- 二、菌种的提纯与复壮

# 一、菌种保藏

- 工业微生物菌种保藏与其他目的的菌种保藏要求有所不同。工业微生物菌种保藏，是要使菌种生产能力和与生产工艺相适应的优良性状保持稳定，当然做不到绝对不变，只是力求把这种衰退现象推迟减缓到最低限度。

# 菌种保藏

- 菌种保藏有许多方法，其共同的目标是把菌株的优良性状保存下来，防止退化、死亡或杂菌污染。保藏的一般程序是选取优良的纯菌种，最好是用其分生孢子或芽孢等休眠体，在其休眠和停止生长的条件下保藏。微生物生长要求适宜的温度、水分、空气和营养物质等，如将菌种处于低温、干燥、无氧和缺乏营养的条件下，就可以使菌种暂时处于休眠状态。

# 菌种保藏

其中低温是保藏菌种的重要因素，也是常用的一种简单易行的方法。在作低温保藏时，注意尽量不损伤细胞。在缓慢冷冻时，胞外基质一般较快结冰而形成冰晶使基质浓度增高，造成细胞水分外渗而大量脱水，可能使细胞死亡。如快速降温，胞内也很快形成冰晶，胞内外渗透压基本平衡，同时胞内冰晶较小，对细胞及原生质膜的损伤也较小，菌株不易死亡，影响也较小。与低温相关的保藏方法，如冷冻干燥法、超低温保藏法等，都是利用低温条件下细胞与环境的特殊平衡原理而设计的。

# 一、菌种保藏

现行的菌种保藏方法有下列诸种：

- (一)低温保藏法
- (二)低温定期移植法
- (三)石蜡油低温保藏法
- (四)干燥保藏
- (五)甘油管保藏法
- (六)真空冷冻干燥法
- (七)液氮超低温保存

## (一)低温保藏法

- 这是一种常用的简便方法。一般的斜面孢子、液态孢子、斜面种子以及用麸皮、大米、小米或碎玉米制成的孢子，可以放在4℃冰箱内保藏，这种温度条件下不能使菌体进入休眠，而仅是抑制微生物的生命活动。因此，保藏时间不宜过长，一般不超过1~2个月为宜。本方法虽然简便，但由于菌株处于较高的水平活性下，这对保藏株的生产性状是不利的，因此，生产菌种一般不采用此法保藏。



## (二)低温定期移植法

- 把培养好的斜面菌种放在低温干燥处保存，定期移植，一般3~6个月移植一次(视菌种特征而定)。也可以用穿刺培养，定期移植法保藏细菌，其效果也较好。穿刺培养是将含0.6%~0.8%的琼脂培养基装试管灭菌后直立冷凝后，用接种针尖挑取少量菌体，垂直刺入琼脂培养基中心，放在适当温度下培养，待菌长好后即可放低温保存，此法较斜面保存有利，大肠杆菌可保藏2年以上不发生明显变异。



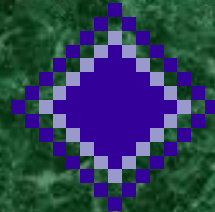


## (二)低温定期移植法

- 斜面定期移植与穿刺移植法有其缺陷，即容易发生遗传变异；连续传代可使一些生产性状丢失或减弱，也易于污染杂菌。因此，一些贵重菌株及生产优良菌株不宜用此法保藏。

## (三)石蜡油低温保藏法

- 本方法的原理是在长好的斜面菌上覆盖灭菌的液体石蜡，达到菌体与空气隔绝，使菌处于生长和代谢停止状态，同时石蜡油还防止水分蒸发，在低温下达到较长期的保藏菌种的目的。保藏温度要求在 $-4\sim 4^{\circ}\text{C}$ 下。液体石蜡法适用于不产孢子的菌种。



## (三)石蜡油低温保藏法

- 具体操作是：菌种为斜面培养菌种，斜面不宜过长；选择纯净优质石蜡油，置三角烧瓶中经过121℃高压蒸汽灭菌1~2h，将其放烘箱中(160℃左右)干热处理，去除灭菌时渗入的水分，待石蜡油变得清澈透明后冷却即可加入斜面，斜面上不能出现气泡，液蜡添加量以高出斜面顶部约1cm左右为宜。

## (四)干燥保藏

- 微生物生长需要水分，干燥法是使菌处于干燥条件下停止生长及处于休眠状态，达到较长期保藏的目的。此法用于细菌芽孢或产分生孢子的菌种，是现在发酵工业生产中较常用的菌种保藏方法。为了转接方便，控制接种量以及对菌种的保护作用，通常将菌种的分生孢子、芽孢，甚至菌丝体吸附于一些载体表面放至干燥容器里进行常压干燥或真空干燥，所用载体有沙土、滤纸、硅胶及大(小)米等。



# 1. 沙土管法

取河(海)沙, 过0.78mm(24目)筛, 用10%盐酸浸泡24h, 倒去盐酸用清水冲洗至pH呈中性, 去水烘干或晒干。取菜园或果园土粉碎过筛, 把烘干的沙土按3: 2或1: 1混合装入指形管或高100mm, 直径为10mm的小试管中, 高约1cm(约2g), 塞棉塞121℃灭菌1h, 也可用170℃2h干热灭菌(或蒸汽三次间歇灭菌), 蒸汽灭菌后需烘干。经肉汤检查确实证明无菌即可使用。将要保存的斜面菌种制成浓孢子悬液( $\geq 10^6/\text{ml}$ ), 用灭菌滴管或吸管吸取孢子悬液滴入无菌沙土上, 每管约0.3~0.5ml, 用接种环将其混合均匀。

# 1. 沙土管法

- 也可将真菌分生孢子用接种环从斜面直接挑取放入沙土中。然后将沙土管抽真空干燥。这时管内砂土松散，表明已干燥。将干燥的砂土管放置在干燥器或密闭容器内、干燥器下部放置变色硅胶等干燥剂，于4℃下保存。从斜面取出的孢子放入沙土管中混匀后，可以不抽真空直接放干燥器内保存。

# 1. 沙土管法

- 在沙土保藏初期，菌死亡率高，以后逐渐减慢，存活下来的孢子在以后保存期间稳定性较好，保藏的有效时间与菌种存活率的关系见图2-10。用沙土管保藏的某些抗生素产生菌保藏期可达18年(土霉素和链霉素产生菌)到22年(新霉素产生菌)，但对利福霉素、卡那霉素、四环素等容易产生变异的菌种，就不适合作长期的沙土管保存。

# 1. 沙土管法

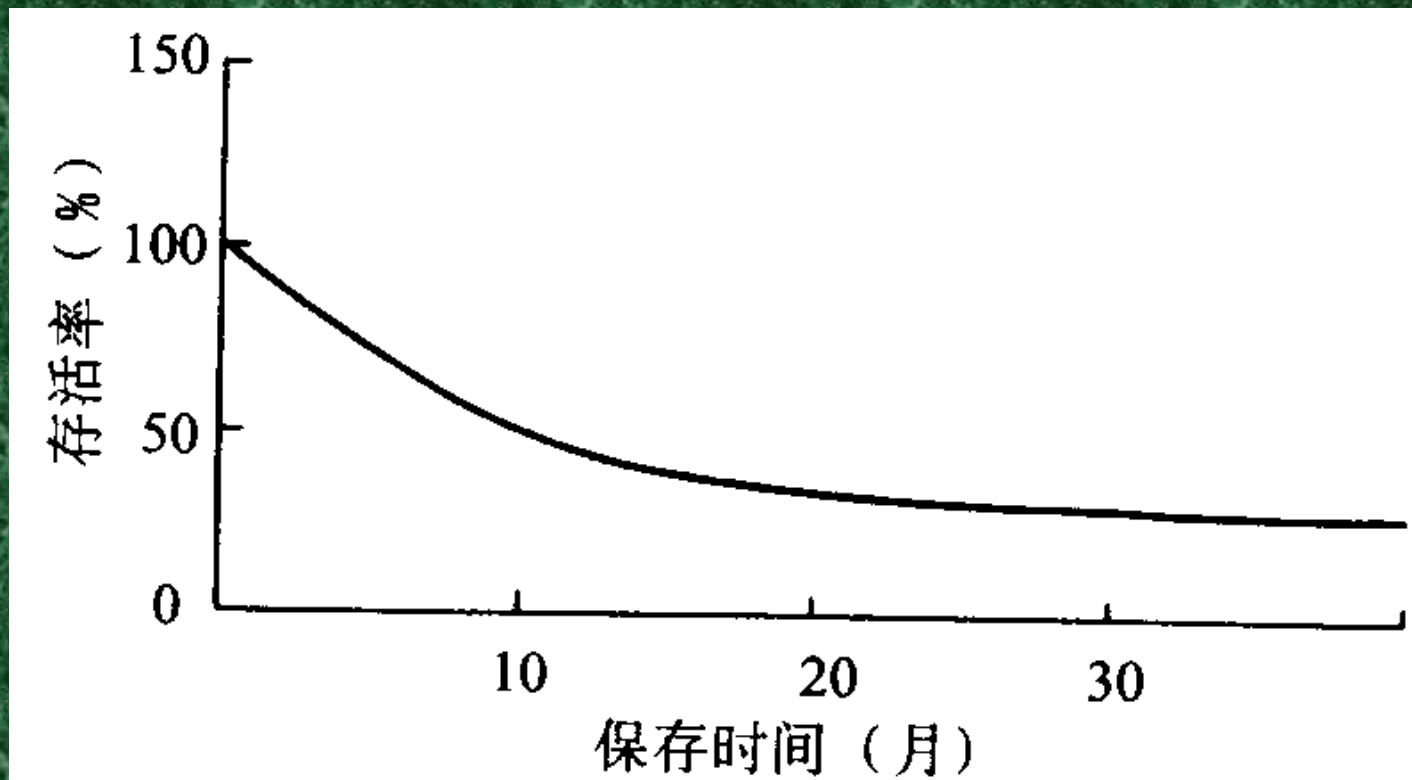


图 2-10 沙土保藏时间与菌种存活率的关系



## 2. 滤纸保藏法

- 本法是将要保藏的微生物细胞或孢子吸附在灭菌滤纸上，干燥后冷藏。其方法是3#滤纸剪成5mm×50mm的小条，放入干燥的培养皿中灭菌。将培养好的菌种用灭菌脱脂乳或奶粉复原乳制成孢子悬液，用灭菌镊子将准备好的滤纸条在灭菌操作下浸入菌悬液中，充分吸附菌细胞，取出后放入灭菌小试管或安瓿管中，在真空干燥机上抽干，真空条件下火焰熔封，冷藏。

### 3.大(小)米保藏法

- 是根据我国制曲原理加以改进的一种方法。此法是将曲霉等大量产生孢子的菌直接培养在大(小)米培养基上，待孢子充分成熟后干燥后保藏。



## (五) 甘油管保藏法

- 本法也是利用微生物在甘油中生长和代谢受到抑制的原理达到保藏目的。其方法是，将80%的甘油高压蒸汽灭菌待用。将培养好的斜面菌种用无菌种用无菌水制成高浓度的菌悬液( $10^8 \sim 10^{10}/\text{ml}$ )。取1ml灭菌甘油放入与甘油充分混匀，使甘油浓度约为40%，于 $-20^\circ\text{C}$ 下冻存。



## (六)真空冷冻干燥法

- 真空冷冻干燥保藏法是兼具低温、干燥、除氧三方面菌种保藏的主要因素，除不宜于丝状真菌的菌丝体外，对病毒、细菌、放线菌、酵母及丝状菌孢子等各类微生物都适用，不宜用冻干法保存的微生物不到2%。冷冻干燥保存的菌种存活时间长、效果好，一般菌种可保存5年以上，有的可保藏15年以上不发生变异。还具有体积小、不易污染、便于运输等优点，是一种用得最为广泛的菌种保藏方法。

## (六)真空冷冻干燥法

- 冷冻干燥法是在低温下快速将细胞冻结，然后在真空条件下干燥，使微生物的生长和酶活动停止。为了防止在冷冻和水分升华过程中对细胞的损害，要采用保护剂来制备细胞悬液，使菌在冻结和脱水过程中起到保护作用的溶质，通过氢键和离子键对水和细胞所产生的亲和力来稳定细胞成分的构型。

# (六)真空冷冻干燥法

- 1. 冷冻干燥的基本原理

即是使样品中的水分在冰冻状态下，抽真空减压，使冻结的冰直接升华为水蒸气，使样品达到干燥。干燥后的微生物在真空下封装，与空气隔绝，达到长期保藏的目的。

- 2. 设备

冷冻干燥备有不同型号和类型，但都由四个部分组成：干燥箱、蒸汽捕集器、真空泵、冷冻系统。干燥箱可控制温度范围为 $-40\sim 40^{\circ}\text{C}$ 。

## (六)真空冷冻干燥法

- 3.操作方法
- (1)安瓿管准备 选取规格约直径为8mm，高100mm的中性玻璃安瓿管，先用2%盐酸浸泡8~10h，再经自来水冲洗多次，用蒸馏水涮洗2~3次，烘干；在每管内放入打好菌号及日期的标签，字面朝向管壁，管口塞好棉塞，灭菌备用。

## (六)真空冷冻干燥法

分 类	名 称
酸性化合物	谷氨酸、天冬氨酸、苹果酸、乳糖酸
中性化合物	葡萄糖、乳糖、蔗糖、鼠李醇、木糖醇、肌醇、DL-苏氨酸
碱性化合物	赖氨酸、精氨酸
高离子化合物 及其分解产物	白蛋白、明胶、各种蛋白胨、肉膏、酵母膏、可溶性淀粉、糊精、葡萄糖、羟甲基纤维素、聚乙烯吡
天然混合物	咯烷酮、果胶、阿拉伯胶
其他	脱脂牛奶、血清、脱纤维素血清 维生素C、半胱氨酸、氨基脲



## (六)真空冷冻干燥法

- (2) 保护剂的选择及制备 冷冻干燥保藏法使用的保护剂种类很多，列于表2-8，效果不尽相同，通常采用高分子化合物与低分子化合物混合使用效果更好。在配制时注意比例、浓度、PH和灭菌方法。一些对热敏感的保护剂如血清等用过滤除菌，牛奶、葡萄糖及乳糖等要控制灭菌温度。一般情况下，多数菌种可以用脱脂乳糖等要控制灭菌温度。一般情况下，多数菌种可以用脱乳为保护剂。

## (六)真空冷冻干燥法

- (3)菌种准备及分装 菌种要求为生长良好的纯种，菌龄以处于稳定期为好，孢子是新鲜的。每支长好的斜面加2~3ml保护剂，用接种环将菌苔轻轻刮起(注意勿刮起培养基)，制成菌悬液。如用液体培养的菌种，则需经离心收集和用灭菌生理盐水洗涤细胞，收集的菌体用保护剂悬浮制成菌悬液。悬液中菌数要求达到 $10^8 \sim 10^{10}$  cfu/ml为宜。悬液制备完成尽快分装和冻结。分装安瓿时可用灭菌的长滴入安瓿管底部，装量可依据冷冻干燥机效能而定。

## (六)真空冷冻干燥法

- (4) 预冻 分装好的安瓿管需要进行预冻，即放在 $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$ 下冻结 $20\sim 60\text{min}$ ，也可以用干冰和无水乙醇冻 $5\sim 10\text{min}$ 。
- (5) 冷冻干燥 经预冻的安瓿放入干燥箱中开始抽真空干燥。此时干燥箱温度控制在 $-30^{\circ}\text{C}$ 以下，并尽快使真度达到 $66\text{Pa}$ 以下。此后可还渐升温以加速水分升华，但升温不宜过快，以免引起样品融化。干燥时间视冻干机效率、样品装量及性质等而定，以样品最终水分含量达到 $1\%\sim 3\%$ 为准。具体操作时是根据冻干样品呈酥块或松散片状；真空度接近空载时最高真空；样品温度与管外温度接近。干燥完毕将安瓿管在真空下用火焰烧熔密封，并用高频真空检测真空度。

## (六)真空冷冻干燥法

- (6) 保藏及冻干管的启用 密封好的冻干管在4℃或-18℃下保藏。当需用冻干菌种时，取出安瓿管用酒精表面消毒，用小砂轮在无菌条件下打开，或将安瓿顶部在酒精灯火焰上灼烧，迅速滴上冷的无菌水，使管破裂，然后用镊子等轻轻敲碎管口，加入0.3~0.5ml液体培养基溶解冻干菌块成为悬液，用无菌滴管或接种环移至斜面或液体培养基进行培养。

## (六)真空冷冻干燥法

- 4.简易冷冻干燥装置 在缺乏真空冷冻干燥机的情况下，可以自己装配一个简易冻干装置(图2-11)，它主要由歧管(玻璃或金属管制成)、冰浴、冷凝器(水汽接收)和真空泵组成。冰浴用干冰(固体 $\text{CO}_2$ )和甲基溶纤剂致冷，干燥后期也可作温度控制用。冷凝器也要置冰浴中，必要时用一根U玻璃弯管代用。安瓿管在冻干前也要预冻

## (六)真空冷冻干燥法

- 1) 菌的质量 保藏的菌种应培养地营养丰富的最适条件下，使之进入稳定期，稍老一些的菌体对环境抵抗力强。另处，作为冷冻干燥的菌悬液细胞浓度要高不同的菌对冷冻干燥的耐受程度不同，如果保存的菌液细胞浓度不高，就会使以后传种造成困难，保存期也会受到影响。

## (六)真空冷冻干燥法

- (2) 保护剂 不同种类的保护剂对不同微生物的作用是不同的，如个别菌种在脱脂乳作保护剂的情况下死亡率高达99.99%，而采用葡聚糖等混和保护剂时死亡率大大减少。一般情况下，那些容易保存的菌种对保护剂的要求不很严格，而不易保存的菌种对保护剂的要求却很苛刻。因此，选择好的保护剂是冷冻干燥保存菌种的关键因素。

# (六)真空冷冻干燥法

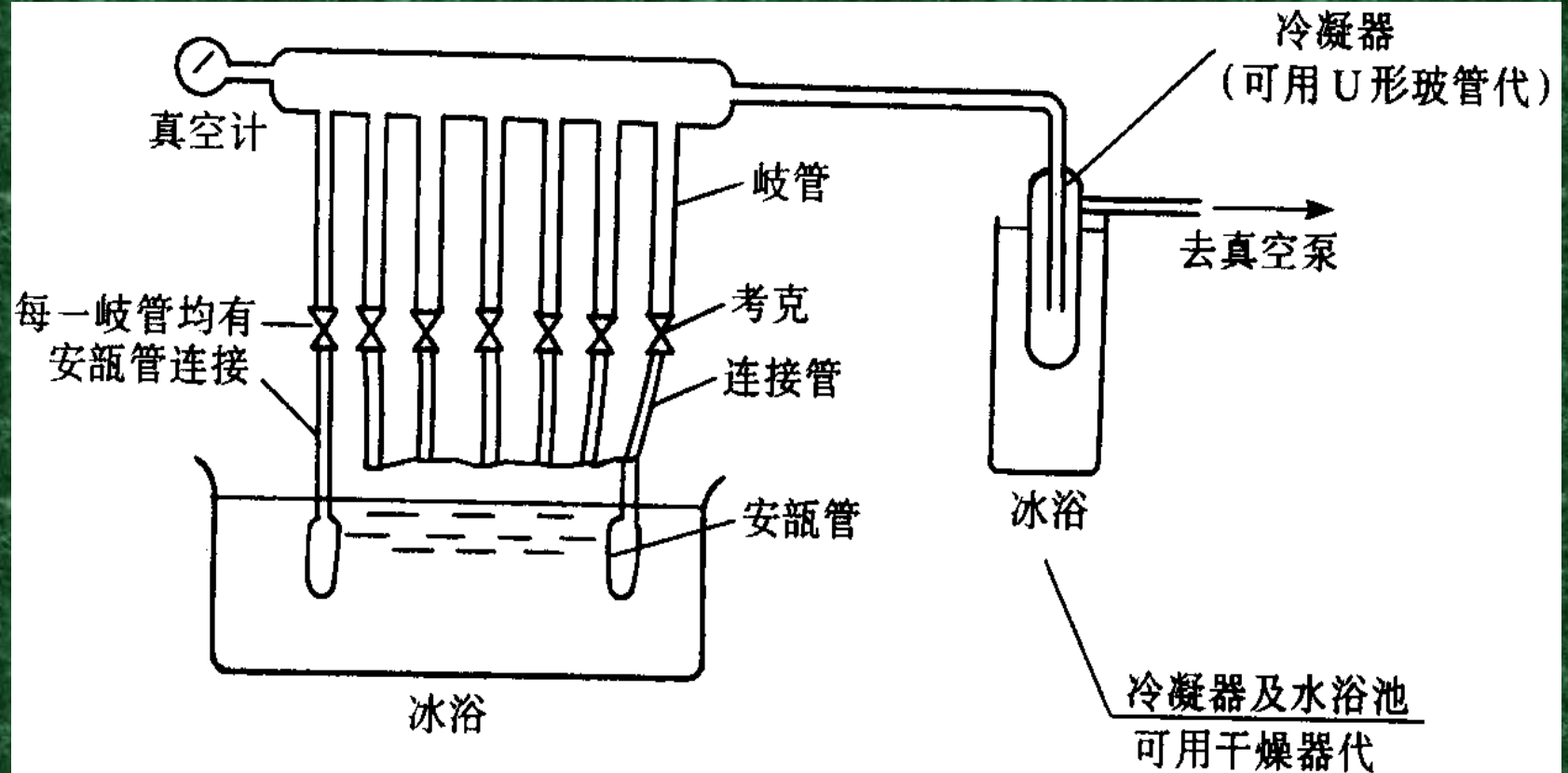


图 2-11 简易冷冻干燥装置



## (六)真空冷冻干燥法

- 3) 干燥速度 实验表明，慢速干燥比快速干燥存活率高，如青霉菌6h干燥存活率为67.3%，而3h为59%。
- (4) 空气的影响 冷冻干燥后空气对细菌细胞影响较大，可导致细胞损伤进而死亡，故在冻干后应立即在真空下融封，才有利于长期保存。

## (六)真空冷冻干燥法

- (5) 温度的影响

在干燥和真空状况下温度的影响远没有上述几项因素重要，因此可以在室温下保存，但许多微生物在4℃保存的存活率要比在室温下高1倍。

- (6) 含水量的影响

水分含量过高对菌存活不利，完全脱水也不利于保存，一般把干燥后的细胞含水量控制在3%以下(1%~3%)。

## (六)真空冷冻干燥法

- (7) 复苏培养 打开安瓿管后加入无菌水使冻干菌融化，融化速度慢比快速融化的成活率要高。
- 菌种能否适宜冻干保存，需经过实验来证明，一般是在保存1个月进行复苏培养，如果菌的成活率高于01.%，即认为可用冻干保存法保存，以后6个月、2年、5年、10年再进行检查存活情况，以确定保存期的上限。
- 冻干保藏的效果因微生物种类而异，一般是细菌 > 放线菌 > 真菌 > 藻类，而菌丝体不宜用此法保存。



## (七)液氮超低温保存

- 本方法是近年推广使用的一种菌种保存法。大多数微生物如病毒、噬菌体，立克氏体，各种细菌、放细菌、支原体，各种丝状菌、酵母、藻类和原虫，特别是一些无法用冻干保存的微生物，都可用此法长期保存。工业微生物高产菌种也逐步采用此法保存。液氮保存的原理是微生物在 $-130^{\circ}\text{C}$ 以下温度时，它的新陈代谢作用停止，化学反应也消失，而液氮温度可达 $-196^{\circ}\text{C}$ ，在这种情况下可以长期保存。

## (七)液氮超低温保存

- 1. 保护剂 与冷冻干燥保存一样，液氮保存菌种也需要有保护物质，可以用10%的甘油，使用方便、效果好，但有些菌对甘油敏感，效果不佳，可选用其他保护剂，常用的有5%~10%(V/V)二甲基亚砷；20%二甲亚砷加1%蛋白陈；汪温80及0.4mmol聚乙烯氮戊环等，糖类也可作为一种保护剂，但浓度适当加以控制。

# (七)液氮超低温保存

- 2. 操作程序
- (1) 安瓿管 一般要求用95%料或GG17的玻璃管制作，以能承受巨大的温差变化而不破损，大小根据需要而定。用印同在管壁上书写菌号，160℃烘干，加棉塞灭菌备用。
- (2) 菌种准备 在最适培养基斜面上培养得到健壮菌种，制成悬浮液，如为不产孢子的真菌，则采用斜面或液体振荡培养，制成菌丝片段。将菌悬液分装至灭菌安瓿管中，每管0.2~0.5ml，然后用火焰将安瓿熔封。

## (七)液氮超低温保存

- 3) 冻结 将熔封后的安瓿管入大慢速冻结器上，以每分钟下降 $1^{\circ}\text{C}$ 的速度冷冻，当安瓿管温度下降至 $-35^{\circ}\text{C}$ 时，即可把安瓿管移入液氮内作长期保藏。
- (4) 菌种的复苏培养 直至全部溶化为止，当溶化后即开启安瓿移至培养基内培养，扣作时应特别注意安全，防止爆炸或冻伤，不宜戴线手套，要戴皮手套操作。



## 二、菌种的提纯与复壮

- (一)菌种的提纯
- (二)通过寄主体进行复壮
- (三)淘汰已衰退的个体



# (一)菌种的提纯

- 即从已衰退的菌种中，通过分离纯化，将尚未退化的个体分离出来，以恢复和建立具有原来生产性状的群体，继续供科研及生产使用。
- 菌种提纯：一是只要求达到菌落纯化的水平，通过稀释平板法、划线法、表面涂布法等常规操作法，该方法较为粗放，适用于菌退化不太严重的情况。另一类方法，可达到“细胞纯”的水平，采用单胞分离法，也可以二者结合，先用前一种方法获得较纯的菌种后再采用单胞分离法进一步纯化。

## (二)通过寄主体进行复壮

- 对于寄生性微生物如苏云金杆菌、白僵菌、多角体病毒等，由于长期使用，其毒力会下降，导致杀虫效率降低待衰退现象。这时可以用菌种却感染菜青虫幼虫等，然后从致死的虫体上重新分离，经过几次重复感染与分离，就可以逐步恢复和提高毒力。

## (三) 淘汰已衰退的个体

- 通过物理、化学的方法处理菌体(或孢子)，使大部分死亡(80%以上)，存活的菌多为生长健壮者，可从中选出优良菌种来。