

真空冷冻干燥法保存菌种

中国科学院微生物研究所菌种保藏组

(北 京)

我们测验了在室温(波动为 5—36℃)贮藏 4 年半—8 年,用脱脂牛奶作保护剂,真空冷冻干燥保存的 559 种 2010 株细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌的存活力,以及其中部分菌株的主要生理特性。贮存在室温的真空冷冻干燥法保存的 84 种 484 株细菌,180 种 565 株放线菌,59 种 459 株酵母菌和 236 种 502 株丝状真菌的存活力分别是 467 (96.5%)、516 (91.33%)、394 (85.83%) 和 439 (87.45%)。

我们还观测了贮藏在 5℃,1957 年真空冷冻干燥法保存的细菌。在这种条件下保存 16 年的 32 种 126 株细菌,103 株 (81.74%) 保持着活力,除个别菌株外,没有任何种的死亡。

所测定的 17 株真空冷冻干燥保存的菌种的生理特性,与定期移植保存的同一菌株对比结果,除两株大肠杆菌,其中 1 株谷氨酸脱羧酶活力减退外,其他菌株都没有明显的变化。

菌种是国家重要的生物资源,它在国民经济建设中,对工农业生产、科学实验、教学等都起着一定的作用。因而,研究菌种的保藏,使为各种目的所应用的菌种能存放的周期长,少变异,有着现实意义。微生物的种类很多,保存方式方法也有多种,然而每种方法都有程度不同的局限性或缺点。本文是就我们实验室所采取的保藏方法之一——真空冷冻干燥法,保存各类菌种效果的总结。

真空冷冻干燥法保藏菌种已有六十多年的历史,早期用此法只是就少数细菌进行试验,四十年代以后,才广泛地用来保存菌种。Wickerham 等 (1942)^[1] 是最早用它保藏不同属种酵母菌的;Raper 等人 (1945—1958)^[2-4] 曾连续观察过保存曲霉属、青霉属的菌株 2—15 年的效果;Hesseltine 等 (1960)^[5] 报道过属于毛霉目、虫霉目、子囊菌纲、半知菌纲和少数放线菌等,共 363 株菌种的保存结果;他们都是用马血清作保

护剂,贮藏条件为 5℃。1969 年,英国国立标准菌种收藏所 (NCTC) 总结了他们用马血清加 7.5% 葡萄糖作保护剂,就 42 属 209 种细菌保存 3 个月至 10 年,少数属种 15 至 18 年的情况^[6]。

影响冷冻干燥法保藏微生物存活的因素很多,李笃唐等 (1964)^[7] 观察过冻干条件对细菌复苏的影响。此外菌龄^[8]、保护剂^[9]、干燥的程度^[8]、真空度、贮藏条件等都是重要环节,是采用此法保存菌种时必须考虑的。我们用脱脂牛奶^[10]作保护剂,就细菌、放线菌、酵母菌和丝状真菌等 109 属 559 种 2010 株菌种,经真空冷冻干燥后,于室温(四季波动为 5—36℃)贮藏 4 年半至 8 年后进行了观测,同时也检查了用此法保存细菌 13 属 32 种 126 株,于 5℃ 贮藏 16 年的效果。另外还观察了少数菌种的生理特性,并且与斜面定期移植保存的同一

本文 1974 年 4 月 26 日收到。

株菌作了对比。

材料和方法

一、菌种 2010 株微生物, 包括 109 属 559 种。

细菌 22 属 84 种 484 株, 保藏 16 年的有 13 属 32 种 126 株。

放线菌 链霉菌属 180 种 565 株。

酵母菌 17 属 59 种 459 株。

丝状真菌 69 属 236 种 502 株。

二、真空冷冻干燥

培养 各类微生物分别用其最适斜面培养基, 并且于最适温度, 细菌培养二天, 酵母菌培养三天, 放线菌和丝状真菌培养七至十天。

保护剂(分散媒) 脱脂牛奶^[10]。

细胞(或孢子)悬液 将斜面培养物(14×140 毫米试管)各注入 3 毫升无菌脱脂牛奶, 洗下培养物, 制成悬液。再将悬液分装入无菌安瓿管中, 每管 0.2 毫升。

冻结 将装有悬液的安瓿管置 -35 至 -40℃ 低温冰箱中预冻 1 小时。

低压抽干 经冻结后的安瓿管样品, 于 10⁻¹ 托低压冷冻抽干器中, 保持 -15 至 -5℃ 抽干(约 8 至 10 小时)。

密封 将上述抽干后的安瓿管装在多歧管上, 于 2×10⁻¹ 托真空下用火焰封闭管口。

水分 用 Karl Fischer 法^[11] 测定抽干后的样品含水量。在上述条件下抽干的样品含水量为 2.5—3%。

复苏培养 将 1 毫升麦芽汁(或肉汁)注入开启后的冷冻干燥管中, 融化酥丸(干后的样品)使成悬液, 然后根据微生物的类别移植于相适应的斜面培养基上, 经培养后观察其存活。

三、生理特性的检查*

乳杆菌对维生素的敏感性 测定核黄素对干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) AS 1.104、AS 1.483 菌株产酸的敏感性, 和烟酸对阿拉伯聚糖乳杆菌 (*L. arabinosus*) AS 1.3, AS 1.550 菌株产酸的敏感性。用 Price 法测定^[12]。

大肠杆菌谷氨酸脱羧酶活力 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) AS 1.505、AS 1.506 菌株, 谷氨酸脱羧酶活力以释放 CO₂ 微升/毫克细胞(丙

酮干粉)/小时表示^[13]。

酵母菌的呼吸强度与发酵力 用 Warburg 检压计法^[14] 测定啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) AS 2.399、卡尔斯伯酵母 (*S. carlsbergensis*) AS 2.604、魏氏酵母 (*S. willianus*) AS 2.1189 等菌株的耗氧率, 并以消耗 O₂ 微升/10⁶ 细胞为单位作纵坐标, 以时间(分钟)作横坐标制图, 观察 60 分钟的呼吸强度。用发酵栓法测定发酵力^[15]。

糖化型淀粉酶活力和蛋白酶活力 丝状真菌(菌种见表 7 和表 8)的糖化型淀粉酶活力和蛋白酶活力的测定, 用固体培养后浸提酶液, 次亚碘酸法^[15] 定糖, Folin-Phenol 法^[16] 测定酪氨酸量。

保存结果

一、细菌

真空冷冻干燥法保存细菌贮藏于 5℃, 16 年的结果列于表 1。由表 1 可见, 126 株菌种中保持活力的有 103 株, 存活率为 81.74%。就种来说, 没有死亡。就不同菌株来说, 不易保存的有: 黑色醋酸杆菌 (*Acetobacter melanogenum*)、弱氧化醋酸杆菌 (*A. suboxydans*)、恶臭醋酸杆菌 (*A. rancens*)、乳杆菌 (*Lactobacillus*)、大豆根瘤菌 (*Rhizobium japonicum*)、豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*) 等。而芽孢杆菌 (*Bacillus*) 100% 的存活。

用此法保存细菌于室温(5—36℃), 贮藏 4 年半至 7 年的结果列于表 2。保存的 484 株细菌仅 17 株死亡, 存活率为 96.5%。然而保存 7 年的 58 株, 存活 58 株(100%); 保存 6 年的 103 株, 存活 100 株(97.08%); 保存 5 年的 89 株, 存活 89 株(100%); 保存 4 年半的 234 株, 存活 220 株(94.01%)。就种而言, 死亡的只有纤维二糖乳杆菌 (*L. cellobiosus*)、羽扇豆根瘤菌 (*R. lupini*) 二个

* 测定生理特性的冷冻干燥保存的菌株, 重新培养后都不再经活化培养直接使用。

表1 真空冷冻干燥保存细菌于5℃贮藏16年的结果

微 生 物 名 称	保 存 株 数	存 活 株 数	微 生 物 名 称	保 存 株 数	存 活 株 数
纹膜醋酸杆菌 <i>Acetobacter aceti</i>	2	2	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	10	10
<i>A. lovaniense</i>	1	1	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	4	3
黑色醋杆菌 <i>A. melanogenum</i>	4	3	阿拉伯聚糖乳杆菌 <i>Lactobacillus arabinosus</i>	1	1
中氧化醋杆菌 <i>A. mesoxydans</i>	2	2	干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>	2	2
恶臭醋杆菌 <i>A. rancens</i>	6	5	戴氏乳杆菌 <i>L. delbrückii</i>	1	1
恶臭醋杆菌混浊变种 <i>A. rancens</i> var. <i>turbidens</i>	3	2	发酵乳杆菌 <i>L. fermenti</i>	1	1
弱氧化醋杆菌 <i>A. suboxydans</i>	14	12	胚芽乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	2	2
醋杆菌 <i>A. sp.</i>	16	14	乳杆菌 <i>L. sp.</i>	7	5
产气气杆菌 <i>Aerobacter aerogenes</i>	1	1	葡聚糖明串珠菌 <i>Leuconostoc dextranicum</i>	1	1
阴沟气杆菌 <i>A. cloacae</i>	1	1	肠膜状明串珠菌 <i>L. mesenteroides</i>	2	2
放射形土壤杆菌 <i>Agrobacterium radiobacter</i>	1	1	啤酒足球菌 <i>Pediococcus cerevisiae</i>	1	1
褐色球形自生固氮菌 <i>Azotobacter chroococcum</i>	5	5	酚假单胞菌 <i>Pseudomonas phenolica</i>	1	1
腊状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	1	1	大豆根瘤菌 <i>Rhizobium japonicum</i>	12	5
地衣形芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	1	1	豌豆根瘤菌 <i>R. leguminosarum</i>	10	4
巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	1	1	苜蓿根瘤菌 <i>R. meliloti</i>	3	3
多粘芽孢杆菌 <i>B. polymyxa</i>	1	1	三叶草根瘤菌 <i>R. trifolii</i>	2	2
			金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	4	4
			粪链球菌 <i>Streptococcus faecalis</i>	2	2

* 不同来源的菌株。

种;就不同属来看,不易保存的属于醋酸杆菌(*Acetobacter*)、乳杆菌、根瘤菌(*Rhizobium*)等属,与在5℃贮藏16年的结果相符合。

二、放线菌

用真空冷冻干燥法保存放线菌,在室温贮藏5—7年的结果见表3。565株菌种存活516株,存活率为91.32%。其中保存7年的106株,存活91株(85.84%);保存5年的459株,存活425株(92.59%)。就种而言,死亡的仅青色变色链霉菌(*Streptomyces glaucovarians*)、诺尔斯氏链霉菌(*S. noursei*)、五霉素链霉菌(*S. pentaticus*)、李色链霉菌可溶变种(*S. prunicolor* var. *solubilis*)4个种。就菌株而言,不易活者属于不吸水链霉菌(*S. ahydrosopicus*)、拟双轮丝链霉菌(*S. biverticillatopsis*)、淡天蓝链霉菌(*S. coerulescens*)、青色链霉菌(*S.*

glaucus)、浅灰天蓝链霉菌(*S. griseolocolicolor*)、吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*)、吸水链霉菌紫色变种(*S. hygroscopicus* var. *violaceus*)、薰衣草链霉菌(*S. lavendulae*)、赭色轮丝链霉菌(*S. ochraceoverticillatus*)、玫瑰暗黄链霉菌(*S. roseofulvus*)、红色薰衣草链霉菌(*S. rubrolavendulae*)、紫色链霉菌(*S. violaceus*)等种中的菌株,其中大都是保存7年的菌株失活,而保存5年的菌株仍然活着。其他种保存5或7年后,再培养时则生长良好。

三、酵母菌

在室温(5—36℃)贮藏真空冷冻干燥的酵母菌4年半至6年,结果见表4。459株菌种保存4年半以上,其存活率为85.83%。其中保存6年的166株,存活145株(87.34%);保存5年的19株,存活15株(78.94%);保存4年半的274株,存活234

表2 真空冷冻干燥保存细菌于室温贮藏4年半至7年的结果

微生物名称	保存时间(年)	保存株数	存活株数	微生物名称	保存时间(年)	保存株数	存活株数
纹膜醋酸杆菌 <i>Acetobacter aceti</i>	7	1	1	多粘芽孢杆菌 <i>B. polymyxa</i>	5	1	1
<i>A. lovaniense</i>	7	1	1	”	4½	1	1
黑色醋酸杆菌 <i>A. melanogenum</i>	7	3	3	生尘芽孢杆菌 <i>B. pulvifaciens</i>	4½	1	1
”	6	1	0	短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>	6	6	6
”	5	8	8	”	5	1	1
中氧化醋酸杆菌 <i>A. mesoxydans</i>	7	2	2	”	4½	2	2
恶臭醋酸杆菌 <i>A. rancens</i>	7	1	1	球形芽孢杆菌 <i>B. sphaericus</i>	7	2	2
”	5	5	5	”	6	3	3
恶臭醋酸杆菌混浊变种 <i>A. rancens</i> var. <i>turbidans</i>	7	3	3	”	5	1	1
”	5	3	3	”	4½	3	3
弱氧化醋酸杆菌 <i>A. suboxydans</i>	7	4	4	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	7	12	12
”	5	11	11	”	6	76	76
”	6	1	0	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	5	32	32
<i>A. suboxydans</i> var. <i>biourgianum</i>	5	1	1	”	4½	15	15
<i>A. suboxydans</i> var. <i>hoyerianum</i>	5	2	2	枯草芽孢杆菌甚黑变种 <i>B. subtilis</i> var. <i>aterrimus</i>	7	2	2
产气气杆菌 <i>Aerobacter aerogenes</i>	4½	2	2	”	5	1	1
阴沟气杆菌 <i>A. cloacae</i>	4½	5	5	枯草芽孢杆菌黑色变种 <i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i>	6	1	1
放射形土壤杆菌 <i>Agrobacterium radiobacter</i>	4½	1	1	苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	5	1	1
粪产碱杆菌 <i>Alcaligenes faecalis</i>	4½	1	1	杆菌 <i>Bacterium</i> sp.	4½	1	1
活跃自生固氮菌 <i>Azotobacter agile</i>	4½	1	1	黄色短杆菌 <i>Brevibacterium flavum</i>	4½	1	1
褐色球形自生固氮菌 <i>A. chroococcum</i>	4½	13	9	北京棒状杆菌 <i>Corynebacterium pekinensis</i>	4½	1	1
维氏自生固氮菌 <i>A. vinelandii</i>	4½	3	3	简单棒状杆菌 <i>C. simplex</i>	4½	1	1
自生固氮菌 <i>Azotobacter</i> sp.	4½	1	1	<i>Corynebacterium</i> sp.	7	2	2
腊状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	6	5	5	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	6	1	1
”	4½	19	19	”	4½	17	16
腊状芽孢杆菌草状变种 <i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	7	1	1	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	4½	3	3
”	5	1	1	阿拉伯聚糖乳杆菌 <i>L. arabinosus</i>	4½	2	2
”	4½	2	2	短乳杆菌 <i>L. brevis</i>	5	1	1
环状芽孢杆菌 <i>B. circulans</i>	7	1	1	布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>	6	1	0
”	6	1	1	”	5	1	1
凝结芽孢杆菌 <i>B. coagulans</i>	4½	1	1	”	4½	1	1
地衣形芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	5	3	3	干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>	7	1	1
”	4½	4	4	”	5	7	7
软化芽孢杆菌 <i>B. macerans</i>	7	6	6	干酪乳杆菌非乳糖变种 <i>L. casei</i> var. <i>alactosus</i>	5	1	1
巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	7	2	2	纤维二糖乳杆菌 <i>L. cellobiosus</i>	4½	1	0
”	4½	5	5	戴氏乳杆菌 <i>L. delbrückii</i>	4½	1	1
胶冻样芽孢杆菌 <i>B. mucilaginosus</i>	4½	3	3	发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>	4½	1	1
多粘芽孢杆菌 <i>B. polymyxa</i>	7	8	8	乳酸乳杆菌双乙酰醋变种 <i>L. lactis</i> var. <i>diacetiactis</i>	4½	1	1
”	6	2	2				

* 不同来源的菌株。

表 2 (续)

微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保 存 株 数	存 活 株 数	微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保 存 株 数	存 活 株 数
赖氏乳杆菌 <i>Lactobacillus leichmannii</i>	6	1	1	酚假单胞菌 <i>P. phenolica</i>	4½	1	1
胚芽乳杆菌 <i>L. plantarum</i>	7	1	1	假单胞菌 <i>P. pseudomallei</i>	4½	1	1
” ”	6	1	1	臭味假单胞菌 <i>P. putida</i>	4½	1	1
” ”	5	9	9	条纹假单胞菌 <i>P. stutzeri</i>	4½	1	1
” ”	4½	4	4	花生根瘤菌 <i>Rhizobium arachis</i>	4½	1	1
<i>L. viridescens</i>	4½	1	1	紫云英根瘤菌 <i>R. astragali</i>	7	5	5
<i>Lactobacillus</i> sp.	4½	18	18	紫云英根瘤菌 <i>Rhizobium astragali</i>	6	3	3
葡聚糖明串珠菌				大豆根瘤菌 <i>R. japonicum</i>	4½	3	3
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	4½	1	1	豌豆根瘤菌 <i>R. leguminosarum</i>	4½	15	14
肠膜状明串珠菌 <i>L. mesenteroides</i>	4½	3	2	羽扇豆根瘤菌 <i>R. lupini</i>	4½	2	0
金色小球菌 <i>Micrococcus aureus</i>	4½	1	1	苜蓿根瘤菌 <i>R. meliloti</i>	4½	8	7
溶表小球菌 <i>M. lysodeikticus</i>	4½	1	1	菜豆根瘤菌 <i>R. phaseoli</i>	4½	3	3
<i>Micrococcus</i> sp.	4½	2	2	三叶草根瘤菌 <i>R. trifolii</i>	4½	4	4
偶然分枝杆菌				黄色八叠球菌 <i>Sarcina flava</i>	4½	1	1
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	4½	2	2	藤黄八叠球菌 <i>Sarcina lutea</i>	4½	4	4
耻场分枝杆菌 <i>M. smegmatis</i>	4½	1	1	亚黄色八叠球菌 <i>S. subflava</i>	4½	4	4
啤酒足球菌 <i>Pediococcus cerevisiae</i>	4½	1	1	尿素八叠球菌 <i>S. ureae</i>	4½	1	1
<i>Pediococcus</i> sp.	4½	2	2	粘质赛氏杆菌 <i>Serratia marcescens</i>	4½	1	1
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	4½	2	2	白色葡萄状球菌 <i>Staphylococcus albus</i>	4½	2	2
铜绿色假单胞菌				金黄色葡萄状球菌 <i>S. aureus</i>	4½	3	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4½	5	5	粪链球菌 <i>Streptococcus faecalis</i>	4½	8	8
凸形假单胞菌 <i>P. convexa</i>	4½	3	3	乳酸链球菌双乙酰醋变种			
荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	4½	4	3	<i>S. lactis</i> var. <i>diacetiactis</i>	4½	1	1
连结假单胞菌 <i>P. geniculata</i>	4½	3	1				

* 不同来源的菌株。

株(85.40%)。在这样条件下不易活的酵母有：亚热带假丝酵母乳糖变种(*Candida pseudotropicalis* var. *lactosa*)、最美假丝酵母(*C. pulcherrima*)、产脲假丝酵母(*C. utilis*)、橙黄红酵母(*Rhodotorula aurantiaca*)、未见球拟酵母(*Torulopsis inconspicua*)、罗多纳汉逊酵母(*Hansenula rhodonensis*)、汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)、鲁氏酵母(*Saccharomyces rouxii*)以及阿什比假囊霉(*Eremothecium ashbyii*)等。Hesseltine^[5]报告中指出,掷孢酵母(*Sporobolomyces*)不易存活,而我们保存的5株掷孢酵母都保持着活力。隐球酵母(*Cryptococcus*)、类酵

母(*Saccharomycodes*)、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)用此法保存也很少失败,这一点与 Haynes 等^[17]的结果一致。

四、丝状真菌

在室温贮藏的502株冷冻干燥法保存的真菌,结果列于表5。保存5—8年存活率为87.45%;其中保存8年的225株菌种,存活187株,存活率为83.11%;保存7年的200株,失活者18株,存活率为91%;保存6年的47株,失活4株,存活率为91.48%;保存5年的27株,失活3株,存活率为88.88%;保存4年半的3株,存活100%。保存5年失活的3株菌种中,有2

表3 真空冷冻干燥保存放线菌于室温贮藏5至7年的结果(部分菌株)

微生物名称	保存时间(年)	保存株数	存活株数	微生物名称	保存时间(年)	保存株数	存活株数
团孢链霉菌 <i>Streptomyces agglomeratus</i>	7	1	1	红霉素链霉菌 <i>S. erythreus</i>	5	1	1
不吸水链霉菌 <i>S. ahyscopicus</i>	5	11	9	束丛链霉菌 <i>S. fasciculus</i>	7	1	1
微白链霉菌 <i>S. albidus</i>	7	2	2	浅黄小孢丝链霉菌			
白黄链霉菌 <i>S. alboflavus</i>	5	1	1	<i>S. flaveolomicrosporophorus</i>	7	1	1
白浅灰链霉菌 <i>S. albogriseolus</i>	5	1	1	浅黄链霉菌 <i>S. flaveolus</i>	5	8	7
白色链霉菌 <i>S. albus</i>	5	2	1	浅黄链霉菌直丝变种			
产二素链霉菌 <i>S. ambofaciens</i>	7	1	1	<i>S. flaveolus</i> var. <i>rectus</i>	7	1	1
圆卷产色链霉菌 <i>S. ansochromogenes</i>	7	1	1	黄色产色链霉菌 <i>S. flavochromogenes</i>	5	1	1
抗菌素链霉菌 <i>S. antibioticus</i>	5	5	5	黄色毛状链霉菌 <i>S. flavopilosus</i>	7	1	1
黑绿链霉菌 <i>S. atroviridis</i>	5	2	2	可溶黄色链霉菌 <i>S. flavosolubilis</i>	7	1	1
黑色链霉菌 <i>S. atrus</i>	5	2	2	黄色刺孢链霉菌 <i>S. flavosporosporus</i>	7	1	1
金色产色链霉菌 <i>S. aureochromogenes</i>	7	1	1	黄疣链霉菌 <i>S. flavoverrucosus</i>	7	1	1
金霉素链霉菌 <i>S. aureofaciens</i>	5	4	1	黄绿链霉菌 <i>S. flavoviridis</i>	7	1	1
金色横隔分裂链霉菌				" "	5	12	11
<i>S. aureosegmentosus</i>	7	1	1	黄色链霉菌 <i>S. flavus</i>	5	4	4
金色链霉菌 <i>S. aureus</i>	7	1	1	萤光链霉菌 <i>S. fluorescens</i>	5	1	1
金红色素链霉菌 <i>S. aurini</i>	5	1	1	弗氏链霉菌 <i>S. fradiae</i>	7	1	1
栗褐链霉菌 <i>S. badius</i>	7	1	1	弗氏轮丝链霉菌 <i>S. fradioverticillatus</i>	7	1	1
比基尼链霉菌 <i>S. bikiniensis</i>	5	3	3	暗黄绿链霉菌 <i>S. fulvoviridis</i>	7	2	1
似双轮丝链霉菌 <i>S. biverticillatopsis</i>	7	1	0	" "	5	2	2
" "	5	2	2	烟薰色链霉菌 <i>S. fumanus</i>	7	1	1
加尼福尼亚链霉菌 <i>S. californicus</i>	5	2	2	烟色链霉菌 <i>S. fumosus</i>	7	1	1
纯白链霉菌 <i>S. candidus</i>	7	1	1	青黄色链霉菌 <i>S. glaucoflavus</i>	7	1	1
栗色浑圆链霉菌 <i>S. castaneoglobosus</i>	7	1	1	淡青链霉菌 <i>S. glaucescens</i>	5	3	3
栗色链霉菌 <i>S. castaneus</i>	7	1	1	青色吸水链霉菌 <i>S. glaucohygroscopicus</i>	7	1	1
顶旋链霉菌 <i>S. cephalospiralis</i>	7	1	1	青色变色链霉菌 <i>S. glaucovarians</i>	7	1	0
产色黄色链霉菌 <i>S. chromoflavus</i>	7	1	1	青紫链霉菌 <i>S. glaucoviolaceus</i>	7	1	1
产色褐色链霉菌 <i>S. chromofuscus</i>	5	4	4	青色链霉菌 <i>S. glaucus</i>	7	1	0
烬灰天蓝色链霉菌 <i>S. cinereocoelicolor</i>	7	1	1	" "	5	5	5
烬灰链霉菌 <i>S. cinereogriseus</i>	7	1	1	球孢链霉菌 <i>S. globisporus</i>	7	1	1
烬灰吸水链霉菌				" "	5	4	3
<i>S. cinereohygroscopicus</i>	7	1	1	球孢链霉菌七叶灵变种			
烬灰轮丝链霉菌 <i>S. cinereoverticillatus</i>	7	1	1	<i>S. globisporus</i> var. <i>aesclinius</i>	5	1	1
肉桂地链霉菌 <i>S. cinnamomensis</i>	5	1	1	球孢链霉菌黄褐变种			
天蓝色链霉菌 <i>S. coelicolor</i>	7	1	1	<i>S. globisporus</i> var. <i>flavofuscus</i>	5	2	2
" "	5	3	2	浑圆链霉菌 <i>S. globosus</i>	5	3	3
浅蓝褐链霉菌 <i>S. coerulescens</i>	7	1	1	螺旋浑圆链霉菌 <i>S. globosus spiralis</i>	5	1	1
淡天蓝链霉菌 <i>S. coerulescens</i>	7	1	0	球团产色链霉菌			
" "	5	2	1	<i>S. glomerochromogenes</i>	7	1	1
蓝褐链霉菌 <i>S. cyaneofuscatus</i>	7	1	1	球团微黄链霉菌 <i>S. glomeroflavescens</i>	7	1	1
蓝色链霉菌 <i>S. cyaneus</i>	7	1	1	禾粟链霉菌 <i>S. gramineus</i>	5	4	4
柱形孢链霉菌 <i>S. cylindrosporus</i>	7	1	1	灰橙链霉菌 <i>S. griseoaurantiacus</i>	5	4	4

* 不同来源的菌株。

表 3 (续)

微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保* 存 株 数	存 活 株 数	微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保* 存 株 数	存 活 株 数
微褐灰链霉菌 <i>S. griseobrunescens</i>	7	1	1	小链霉菌 <i>S. parvus</i>	5	2	1
浅灰天蓝链霉菌 <i>S. griseolocoelicolor</i>	7	1	0	五霉素链霉菌 <i>S. pentaticus</i>	7	1	0
” ”	5	1	1	暗色产色链霉菌 <i>S. phaeochromogenes</i>	5	2	1
浅灰链霉菌 <i>S. griseolus</i>	5	6	4	李黑色链霉菌 <i>S. pruniniger</i>	7	1	1
灰藤黄链霉菌 <i>S. griseoluteus</i>	5	2	2	李黑链霉菌褐色变种			
灰色链霉菌 <i>S. griseus</i>	7	2	2	<i>S. pruniniger</i> var. <i>fuscus</i>	7	1	1
” ”	5	64	56	李色螺旋链霉菌 <i>S. prunispiralis</i>	7	1	1
吸水链霉菌 <i>S. hygrosopicus</i>	7	1	0	李色链霉菌可溶变种			
” ”	5	14	14	<i>S. prunicolor</i> var. <i>solubilis</i>	7	1	0
吸水链霉菌狭霉素变种 <i>S. hygrosopicus</i> var. <i>angustmycelicus</i>	5	1	1	浅绛红链霉菌 <i>S. purpurascens</i>	5	1	1
吸水链霉菌紫色变种 <i>S. hygrosopicus</i> var. <i>violaceus</i>	7	1	0	龟裂链霉菌 <i>S. rimosus</i>	5	2	2
” ”	5	1	1	玫瑰皮黄链霉菌 <i>S. roseoalutaceus</i>	7	1	1
薰衣草链霉菌 <i>S. lavendulae</i>	7	1	0	玫瑰产色链霉菌 <i>S. roseochromogenes</i>	7	1	0
” ”	5	19	14	玫瑰暗黄链霉菌 <i>S. roseofulvus</i>	5	1	1
薰衣草链霉菌产色变种				” ”	5	1	1
<i>S. lavendulae</i> var. <i>chromogenes</i>	7	1	1	浅玫瑰色链霉菌 <i>S. roseolus</i>	5	1	1
直丝薰衣草链霉菌 <i>S. lavendulae</i> rectus	7	1	1	锈赤蜡色黄链霉菌			
制酵母链霉菌 <i>S. levoris</i>	5	2	2	<i>S. rubiginosohelvolus</i>	7	1	1
丁香直丝链霉菌 <i>S. lilacinorectus</i>	7	1	1	红色薰衣草链霉菌 <i>S. rubrolavendulae</i>	7	1	0
丁香轮丝链霉菌 <i>S. lilacinovercillatus</i>	7	1	1	” ”	5	1	1
丁香色链霉菌 <i>S. lilacinus</i>	7	1	1	红色轮丝链霉菌 <i>S. rubroverticillatus</i>	5	4	4
黄色长孢链霉菌 <i>S. longisporoflavus</i>	7	1	1	链霉素链霉菌 <i>S. streptomycini</i>	7	2	2
” ”	5	1	0	硫黄链霉菌 <i>S. sulphureus</i>	5	1	1
红色长孢链霉菌 <i>S. longispororuber</i>	5	1	1	田无链霉菌 <i>S. tanashiensis</i>	5	2	2
极长链霉菌 <i>S. longissimus</i>	5	3	2	变异链霉菌 <i>S. variabilis</i>	7	1	1
藤黄浅藤黄链霉菌 <i>S. luteolutescens</i>	5	2	2	变色链霉菌 <i>S. varians</i>	7	1	1
灰色大孢链霉菌 <i>S. macrosporogriseus</i>	5	3	3	委内瑞拉链霉菌 <i>S. venezuelae</i>	7	1	1
细黄链霉菌 <i>S. microflavus</i>	7	1	1	” ”	5	5	5
小孢链霉菌 <i>S. microsporus</i>	7	1	1	紫斑链霉菌 <i>S. violaceomaculatus</i>	7	1	1
黑化链霉菌 <i>S. nigrificans</i>	7	1	1	紫色直丝链霉菌 <i>S. violaceorectus</i>	7	1	1
诺尔斯链霉菌 <i>S. noursei</i>	5	1	0	” ”	5	2	2
橘色轮丝链霉菌				紫绛红链霉菌 <i>S. violaceopurpureus</i>	7	1	1
<i>S. ochraceovercillatus</i>	7	1	0	紫色链霉菌 <i>S. violaceus</i>	7	1	0
” ”	5	2	2	” ”	5	6	5
土味链霉菌 <i>S. odorifer</i>	7	1	1	紫色产色链霉菌 <i>S. violochromogenes</i>	5	2	2
橄榄灰链霉菌 <i>S. olivaceogriseus</i>	5	2	2	绿色链霉菌 <i>S. viridis</i>	7	1	1
橄榄色链霉菌 <i>S. olivaceus</i>	5	4	4	绿色产色链霉菌 <i>S. viridochromogenes</i>	7	1	1
				” ”	5	8	7
				普通链霉菌 <i>S. vulgaris</i>	5	2	1

* 不同来源的菌株。

表 4 真空冷冻干燥保存酵母菌于室温贮藏 4 年半至 6 年的结果

微生物名称	保存时间(年)	保存株数	存活株数	微生物名称	保存时间(年)	保存株数	存活株数
棉病囊霉 <i>Ashbya gossypii</i> ▲	6	2	2	粘红酵母 <i>R. glutinis</i>	4½	2	2
白假丝酵母 <i>Candida albicans</i>	6	1	1	” ”	6	4	4
季氏假丝酵母 <i>C. guilliermondii</i>	6	1	1	小红酵母 <i>R. minuta</i>	6	1	1
克柔氏假丝酵母 <i>C. krusei</i>	6	1	1	胶红酵母 <i>R. mucilaginosa</i>	4½	1	1
类脱发假丝酵母 <i>C. parapsilosis</i>	6	1	1	胶红酵母 <i>R. mucilaginosa</i>	6	4	4
中型类脱发假丝酵母 <i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i>	6	1	1	深红酵母 <i>R. rubra</i>	6	1	1
亚热带假丝酵母 <i>C. pseudotropicalis</i>	6	1	1	产酸酵母 <i>Saccharomyces acidifaciens</i>	6	1	1
亚热带假丝酵母乳糖变种 <i>C. pseudotropicalis</i> var. <i>lactosa</i>	6	1	0	卡尔斯伯酵母 <i>S. carlsbergensis</i>	6	14	14
最美假丝酵母 <i>C. pulcherrima</i>	6	1	0	” ”	4½	11	8
粗壮假丝酵母 <i>C. robusta</i>	6	2	2	啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	6	34	32
热带假丝酵母 <i>C. tropicalis</i>	6	3	3	啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	4½	2	2
产朊假丝酵母 <i>C. utilis</i>	6	2	0	小椭圆啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	6	7	7
假丝酵母 <i>Candida</i> sp.	5	15	14	戴氏酵母 <i>S. delbrueckii</i>	6	3	3
罗伦氏隐球酵母 <i>Cryptococcus laurentii</i>	6	1	1	戴氏酵母蒙古变种 <i>S. delbrueckii</i> var. <i>mongolicus</i>	6	1	1
汉逊德巴利酵母 <i>Debaryomyces hansenii</i>	6	1	0	少孢酵母 <i>S. exiguus</i>	6	1	1
克氏德巴利酵母 <i>D. kloockeri</i>	6	3	3	强发酵度酵母 <i>S. logos</i>	6	1	1
肋状拟内孢霉 <i>Endomycopsis fibuliger</i>	6	1	0	小椭圆酵母 <i>S. microellipsoideus</i>	6	1	1
阿氏假囊霉 <i>Eremothecium ashbyii</i> ▲	6	2	0	卵形酵母 <i>S. oviformis</i>	6	1	1
” ”	4½	1	0	罗氏酵母 <i>S. rosei</i>	6	1	1
白地霉 <i>Geotrichum candidum</i> ▲	6	4	4	鲁氏酵母 <i>S. rouxii</i>	6	1	0
” ”	4½	4	2	” ”	5	4	1
鲁氏地霉 <i>Geotrichum ludwigii</i>	6	1	1	斯氏酵母 <i>S. steineri</i>	6	1	1
健强地霉 <i>G. robustum</i>	6	1	1	魏氏酵母 <i>S. willianus</i>	6	7	7
果香地霉 <i>G. suaveolens</i>	6	1	1	酵母属(未定种) <i>Saccharomyces</i> sp.	6	11	9
地霉 <i>Geotrichum</i> sp.	4½	79	75	” ”	4½	127	100
异常汉逊酵母 <i>Hansenula anomala</i>	6	10	10	路氏类酵母 <i>Saccharomycodes ludwigii</i>	6	2	2
罗多纳汉逊酵母 <i>H. rhodonensis</i>	4½	1	0	类酵母 <i>Saccharomycodes</i> sp.	4½	1	1
土星汉逊酵母 <i>H. saturnus</i>	6	1	1	八孢裂殖酵母			
施氏汉逊酵母 <i>H. schneegii</i>	6	1	1	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	6	1	1
少膜汉逊酵母 <i>H. subpelliculosa</i>	6	1	1	粟酒裂殖酵母			
” ”	4½	20	19	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4½	3	3
汉逊酵母 <i>Hansenula</i> sp.	4½	1	1	” ”	6	4	4
柠檬形克勒克酵母 <i>Kloeckera apiculata</i>	4½	1	1	易变裂殖酵母 <i>S. versatilis</i>	4½	1	1
” ”	6	3	3	掷孢酵母 <i>Sporobolomyces roseus</i>	6	1	1
粉状毕氏酵母 <i>Pichia farinosa</i>	4½	4	4	” ”	4½	3	3
” ”	6	3	3	赭色掷孢酵母			
膜醭毕氏酵母 <i>P. membranacefaciens</i>	4½	1	1	<i>Sporobolomyces salomonicolor</i>	6	1	1
” ”	6	1	0	无名球拟酵母 <i>Torulopsis famata</i>	6	1	1
橙黄红酵母 <i>Rhodotorula aurantiaca</i>	6	1	0	球拟酵母 <i>T. globosa</i>	6	1	1
				未见球拟酵母 <i>T. inconspicua</i>	6	1	0

* 不同来源的菌株；▲我们放酵母菌中保存的。

表 4 (续)

微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保* 存 株 数	存 活 株 数	微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保* 存 株 数	存 活 株 数
球拟酵母 <i>Torulopsis</i> sp.	6	1	0	皮状丝孢酵母 <i>T. cusanum</i>	6	4	1
球拟酵母 <i>Torulopsis</i> sp.	4½	10	9	丝孢酵母 <i>Trichosporon</i> sp.	4½	1	1
贝氏丝孢酵母 <i>Trichosporon behrendii</i>	6	1	0				

表 5 真空冷冻干燥保存丝状真菌于室温贮藏 5 至 8 年的结果(部分菌株)

微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保* 存 株 数	存 活 株 数	微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保* 存 株 数	存 活 株 数
蓝色犁头霉 <i>Absidia coerulea</i>	8	5	3	赤曲霉 <i>A. ruber</i>	6	1	1
柱孢犁头霉 <i>A. cylindrospora</i>	8	2	2	菌核曲霉 <i>A. sclerotiorum</i>	7	1	1
灰绿犁头霉 <i>A. glauca</i>	8	2	2	萨氏曲霉 <i>A. sydowii</i>	7	1	1
雅致放射毛霉 <i>Actinomucor elegans</i>	8	2	1	瘤曲霉 <i>A. tamarii</i>	7	3	3
” ”	5	1	1	土曲霉 <i>A. terreus</i>	5	1	1
链格霉 <i>Alternaria alternata</i>	8	1	0	栖土曲霉 <i>A. terricola</i>	7	5	5
<i>Alternaria</i> sp.	8	1	1	宇佐美曲霉 <i>A. usamii</i>	4½	1	1
洋葱曲霉 <i>Aspergillus alliaceus</i>	8	1	1	焦曲霉 <i>A. ustus</i>	7	3	3
阿姆斯特丹曲霉 <i>A. amstelodami</i>	8	3	3	杂色曲霉 <i>A. versicolor</i>	7	2	2
泡盛酒曲霉 <i>A. awamori</i>	8	2	2	文氏曲霉 <i>A. wentii</i>	6	3	3
白曲霉 <i>A. candidus</i>	8	4	4	出芽短梗霉 <i>Aureobasidium pullulans</i>	5	3	3
炭黑曲霉 <i>A. carbonarius</i>	8	2	2	<i>Aureobasidium</i> sp.	7	1	0
谢氏曲霉 <i>A. chevalieri</i>	8	4	4	<i>Botryotrichum</i> sp.	8	2	1
棒曲霉 <i>A. clavatus</i>	8	2	2	金字塔形葡萄孢霉 <i>Botrytis pyramidalis</i>	5	1	1
雅致曲霉 <i>A. elegans</i>	8	1	1	顶头孢霉 <i>Cephalosporium acremonium</i>	8	1	1
无花果曲霉 <i>A. ficum</i>	8	1	1	灰红头孢霉 <i>C. roseogriseum</i>	8	1	1
” ”	4½	1	1	毛喙壳霉 <i>Chaetocerotostoma</i> sp.	8	1	0
黄柄曲霉 <i>A. flavipes</i>	8	5	4	皱曲毛壳 <i>Chaetomium crispatum</i>	8	1	0
黄曲霉 <i>A. flavus</i>	8	3	3	美毛壳 <i>C. formosum</i>	8	1	1
” ”	4½	1	1	粪生毛壳 <i>C. funiculum</i>	8	1	1
烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i>	8	3	3	球孢毛壳 <i>C. globosum</i>	8	2	2
灰绿曲霉 <i>A. glaucus</i>	8	3	2	” ”	6	3	3
分解乌头酸曲霉 <i>A. itaconicus</i>	8	1	1	突孢毛壳 <i>C. murorum</i>	8	1	0
构巢曲霉 <i>A. nidulans</i>	8	3	3	” ”	7	1	1
黑曲霉 <i>A. niger</i>	8	9	6	中国毛壳 <i>C. sinense</i>	8	1	1
” ”	7	1	1	粪草根毛壳 <i>C. thielavioideum</i>	8	1	1
赭曲霉 <i>A. ochraceus</i>	8	1	1	弯毛壳 <i>C. totile</i>	8	1	0
米曲霉 <i>A. oryzae</i>	8	5	3	黄瓜芽霉 <i>Choanephora cucubitarum</i>	8	1	1
” ”	7	5	5	糙卷霉 <i>Circinella aspera</i>	8	1	1
寄生曲霉 <i>A. parasiticus</i>	7	1	1	毛霉状卷霉 <i>Circinella mucoroides</i>	8	1	1
匍匐曲霉 <i>A. repens</i>	6	4	4	伞形卷霉 <i>C. umbellata</i>	8	1	1
局限曲霉 <i>A. restrictus</i>	5	2	0	蜡叶枝孢霉 <i>Cladosporium herbarum</i>	8	3	3

* 不同来源的菌株。

表 5 (续)

微生物名称	保存时间 (年)	保* 存株 数	存 活 株 数	微生物名称	保存时间 (年)	保* 存株 数	存 活 株 数
麦角菌 <i>Claviceps purpurea</i>	8	1	0	冻土毛霉 <i>M. hiemalis</i>	8	1	1
棉毛盘孢 <i>Colletotrichum gossypii</i>	8	1	1	爪哇毛霉 <i>M. javanicus</i>	7	3	2
地窖菌 <i>Coniophora cerebella</i>	6	1	0	微孢毛霉 <i>M. microsporus</i>	7	1	1
布拉氏小克银汉霉				高大毛霉 <i>M. mucedo</i>	7	3	2
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	8	3	2	小孢毛霉 <i>M. parvispora</i>	7	3	3
短刺小克银汉霉 <i>C. echinulata</i>	8	6	4	总状毛霉 <i>M. racemosus</i>	8	5	4
” ”	7	1	1	鲁氏毛霉 <i>M. rouxianus</i>	7	1	1
雅致小克银汉霉 <i>C. elegans</i>	8	4	3	刺囊毛霉 <i>M. spinosus</i>	8	2	2
新月弯孢霉 <i>Curvularia lunata</i>	6	1	1	多变毛霉 <i>M. varians</i>	7	2	2
土生翅孢壳 <i>Emerizellopsis humicola</i>	8	1	1	露湿漆斑菌 <i>Myrothecium roridum</i>	7	2	2
土色镰刀菌 <i>Fusarium argillaceum</i>	8	1	1	疣孢漆斑菌 <i>M. verrucaria</i>	7	2	2
燕麦镰刀菌 <i>F. avenaceum</i>	8	2	2	粗糙脉孢菌 <i>Neurospora crassa</i>	7	1	1
球茎状镰刀菌 <i>F. bulbigenum</i>	8	1	1	间型脉孢菌 <i>N. intermedia</i>	8	2	0
尾状镰刀菌 <i>F. caudatum</i>	8	1	0	好食脉孢菌 <i>N. sitophila</i>	7	2	2
双胞镰刀菌 <i>F. dimerum</i>	8	2	1	宛氏拟青霉 <i>Paecilomyces varioti</i>	7	2	2
木贼镰刀菌 <i>F. equiseti</i>	8	2	0	棕色青霉 <i>Penicillium avellaneum</i>	7	1	1
禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	8	1	1	短密青霉 <i>Penicillium brevi-compactum</i>	7	3	2
黑绿镰刀菌 <i>F. melanochlorum</i>	8	1	1	产黄青霉 <i>P. chrysogenum</i>	7	3	3
串珠镰刀菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	8	4	4	桔青霉 <i>P. citrinum</i>	7	2	2
尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	8	4	4	棒状青霉 <i>P. clavigerum</i>	7	1	0
接骨木镰刀菌 <i>F. sambucinum</i>	8	3	2	圆弧青霉 <i>P. cyclopium</i>	7	2	2
茄柄镰刀菌 <i>F. solani</i>	8	2	2	斜卧青霉 <i>P. decumbens</i>	7	2	0
蚀脉镰刀菌 <i>F. vasinfectum</i>	8	2	2	” ”	6	1	1
麻孢壳 <i>Gelasinospora</i> sp.	8	2	2	指状青霉 <i>P. digitatum</i>	5	1	0
稻恶苗病赤霉 <i>Gibberella fujikuroi</i>	8	1	1	常规青霉 <i>P. frequentans</i>	7	1	1
海南吉尔霉 <i>Gilbertella hainanensis</i>	7	1	1	纠缠青霉 <i>P. implicatum</i>	7	4	1
粘帚霉 <i>Gliocladium</i> sp.	8	3	1	冰岛青霉 <i>P. islandicum</i>	7	1	1
梨形卷枝霉 <i>Helicostylum piriforme</i>	8	1	1	白边青霉 <i>P. italicum</i>	7	2	1
长蠕孢霉 <i>Helminthosporium</i> sp.	8	1	0	淡紫青霉 <i>P. lilacinum</i>	7	2	2
大茎点霉 <i>Macrophoma</i> sp.	8	1	0	黑青霉 <i>P. nigricans</i>	7	3	3
菜豆壳孢 <i>Macrophomina phaseoli</i>	7	1	0	点青霉 <i>P. notatum</i>	7	2	2
瓶形黑孢壳 <i>Melanospora ampullus</i>	8	1	1	草酸青霉 <i>P. oxalicum</i>	7	1	1
刺黑乌霉 <i>Memnoniella echinata</i>	8	1	1	产紫青霉 <i>P. purpurogenum</i>	6	3	1
发白红曲霉 <i>Monascus albidus</i>	8	1	1	萎地青霉 <i>P. roquefortii</i>	5	2	2
烟色红曲霉 <i>M. fuliginosus</i>	8	1	1	菌核青霉 <i>P. sclerotiorum</i>	7	1	1
紫红曲霉 <i>M. purpureus</i>	8	3	1	小刺青霉 <i>P. spinulosum</i>	6	1	1
多量毛霉 <i>Mucor abundans</i>	8	2	2	托姆青霉 <i>P. thomii</i>	8	1	1
卷枝毛霉 <i>Mucor circinelloides</i>	8	3	3	毒青霉 <i>P. toxicarium</i>	6	1	1
草生毛霉 <i>M. foenicola</i>	8	2	2	荨麻青霉 <i>P. urticae</i>	7	1	1
易脆毛霉 <i>M. fragilis</i>	8	2	2	<i>Periola</i> sp.	7	1	0
灰蓝毛霉 <i>M. griseo-cyanus</i>	7	1	1	茎点霉 <i>Phoma</i> sp.	7	1	1
灰紫毛霉 <i>M. griseo-lilacinus</i>	7	1	1	闪光须霉 <i>Phycomyces nitens</i>	7	1	1

* 不同来源的菌株。

表 5 (续)

微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保 存 株 数	存 活 株 数	微 生 物 名 称	保 存 时 间 (年)	保 存 株 数	存 活 株 数
匍匐头珠霉 <i>Piptocephalis repens</i>	7	1	1	黑色葡萄状穗霉 <i>Stachybotrys atra</i>	7	3	3
蒂氏头珠霉 <i>P. tieghemiana</i>	7	1	1	匍柄霉 <i>Stemphylium</i> sp.	7	1	1
酒红假裸囊霉				具柄梗束霉 <i>Stysanus stemonites</i>	7	1	1
<i>Pseudogymnoascus vinaceus</i>	7	2	1	总状共头霉			
少根根霉 <i>Rhizopus arrhizus</i>	7	1	1	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	7	3	3
华根霉 <i>R. chinensis</i>	7	2	2	大孢联轭霉 <i>Syzygites megalocarpus</i>	7	1	1
科恩根霉 <i>R. cohnii</i>	7	2	2	梭孢壳 <i>Thielavia</i> sp.	7	1	1
日本根霉 <i>R. japonicus</i>	8	2	2	根串珠霉 <i>Thielaviopsis</i> sp.	6	1	0
爪哇根霉 <i>R. javanicus</i>	7	1	1	黄绿木霉 <i>Trichoderma glaucum</i>	7	1	1
米根霉 <i>R. oryzae</i>	7	9	9	康氏木霉 <i>T. kōningii</i>	7	1	1
匍枝根霉 <i>R. stolonifer</i>	7	7	7	木素木霉 <i>T. lignorum</i>	7	1	1
小麦曲根霉 <i>R. tritici</i>	7	2	2	绿色木霉 <i>T. viride</i>	7	3	3
齐整小核菌 <i>Sclerotium rolszii</i>	7	1	0	粉红单端孢 <i>Trichothecium roseum</i>	8	2	2
微红带霉 <i>Scopulariopsis rufulus</i>	7	1	1	毛束霉 <i>Trichurus</i> sp.	7	1	1
疣孢霉 <i>Sepedonium</i> sp.	7	1	1	轮枝孢 <i>Verticillium</i> sp.	7	1	1
柱隔霉 <i>Septocylindrium</i> sp.	7	1	1	莫氏接霉 <i>Zhyorhynchus moelleri</i>	7	2	2
穗霉 <i>Spicaria</i> sp.	7	1	1				

* 不同来源的菌株。

株局限曲霉 (*Aspergillus restrictus*) 和 1 株指状青霉 (*Penicillium digitatum*), 影响了存活率。Shuh-wei Hwang^[18] 曾报道过大孢联轭霉 (*Syzygites megalocarpus*) 不适用冷冻干燥法保藏, 而我们保存了 7 年尚能存活。Hesseltine^[5] 认为球孢毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) 不易用此法保存, 而我们保存 8 年的 2 株, 保存 6 年的 3 株也都活着。

五、生理特性的检查

选择上述方法保藏的部分菌株, 进行几项生理特性试验, 以观察保藏效果。

①乳杆菌对维生素的敏感性 在室温贮藏的冷冻干燥法保存的维生素测定菌, 干酪乳杆菌(5 年, 7 年)对核黄素的敏感性, 和阿拉伯聚糖乳杆菌(4 年半)对烟酸的敏感性, 分别与斜面保藏的同一菌株对比, 实验的结果见图 1 和图 2。由图 1、图 2 可知, 所测 4 株菌对维生素的敏感性无变异。因为两种方法保藏的菌株, 分别

培养在含有相同浓度的维生素培养基中, 产酸量相等, 所以两种保藏法的同一菌株产酸量, 与维生素含量关系的曲线重迭在一起。

②大肠杆菌谷氨酸脱羧酶活力 将大肠杆菌 AS 1.505、AS 1.506 接种于液体培养基(玉米浆 0.3%、K₂HPO₄ 0.1%、蛋白胨 2%、牛肉膏 3%、pH 7.2) 28℃, 摇床(120 次/分)培养 20 小时后, 利用冷(-20℃)丙酮及离心机收集细胞(即谷氨酸脱羧酶的丙酮粉酶制品)。用 Warburg 检压计法测定 CO₂ 释放量: 主室加 10 毫克分子 L-谷氨酸 1 毫升, 0.2 克分子醋酸缓冲液(pH 4.7) 1 毫升, 侧室加 1 毫升 2.5 毫克/毫升的丙酮粉悬液(0.2 M 醋酸缓冲液 pH 4.7 配制); 温度 37℃, 振荡 104 次/分。读取 10 分钟由脱羧反应所释放的 CO₂ 量, 并以释放 CO₂ 微升/毫克细胞(丙酮干粉)/小时表示酶活力。测定结果见表 6。用两种

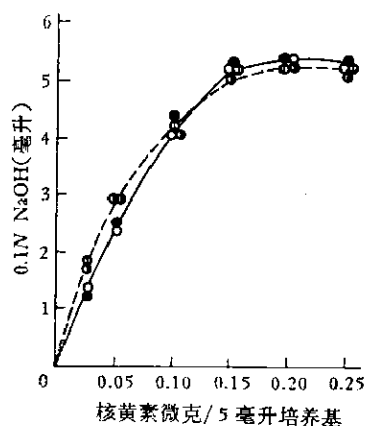


图1 对核黄素的敏感性

- 斜面保存 } AS 1.104
○冷冻干燥保存 (5年)
- 斜面保存 } AS 1.483
○冷冻干燥保存 (7年)

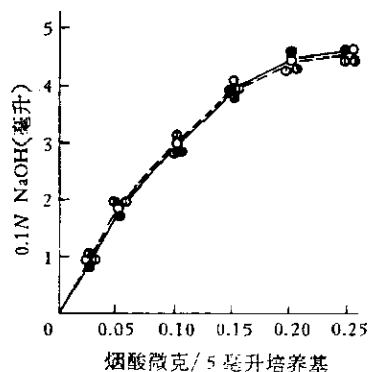


图2 对菸酸的敏感性

- 斜面保存 } AS 1.3
○冷冻干燥保存
- 斜面保存 } AS 1.550
○冷冻干燥保存

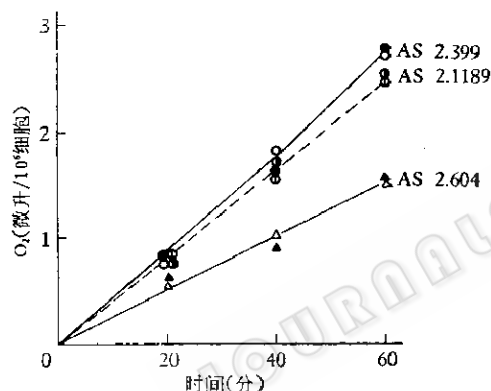


图3 耗氧率的测定

- 斜面保存 } AS 2.399
○冷冻干燥保存
- ▲斜面保存 } AS 2.604
△冷冻干燥保存
- 斜面保存 } AS 2.1189
○冷冻干燥保存

注: 气相是空气, 侧室加 0.1M 葡萄糖 1 毫升, 主室加磷酸盐缓冲液洗过的酵母悬液 1 毫升和磷酸盐缓冲液 (pH 5) 1 毫升, 中央小杯内加 15% KOH 0.2 毫升, 共 3.2 毫升, 28℃ 转速为 75 次/分。

方法保存的 2 株谷氨酸脱羧酶产生菌, AS 1.506 保持着与斜面保藏的菌株相同的酶活力, AS 1.505 酶活力则下降。

③酵母菌的呼吸强度与发酵力 保藏 6 年的啤酒酵母 AS 2.399、卡尔斯伯酵

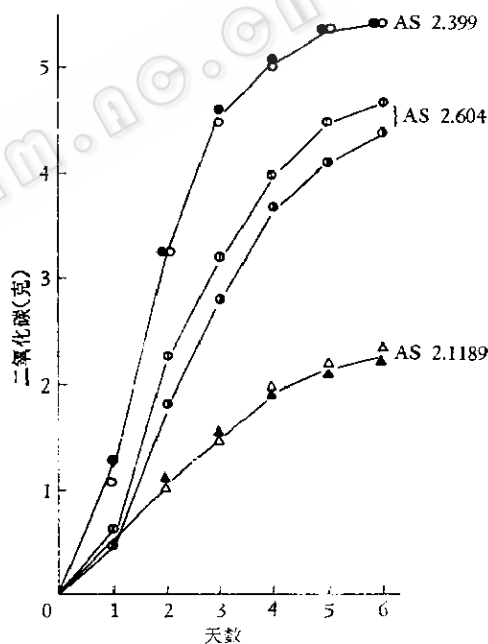


图4 发酵力的测定

- 斜面保存 } AS 2.399
○冷冻干燥保存
- 斜面保存 } AS 2.604
○冷冻干燥保存
- ▲斜面保存 } AS 2.1189
△冷冻干燥保存

母 AS 2.604、魏氏酵母 AS 2.1189, 以葡萄糖为基质时的耗氧率, 分别与斜面保藏的同菌株对比的结果见图 3。由图中结果

表 6 大肠杆菌谷氨酸脱羧酶活力测定

酶活力 保藏法	菌株	AS 1.506	AS 1.505
冷冻干燥保存		490.5	171.6
斜面保存		493.6	284.1

表明,在室温贮藏真空冷冻干燥保存的菌种,其呼吸强度没有发生变化。

这 3 株菌的发酵力,分别与斜面保存的菌株对比时,除卡尔斯伯酵母冷冻干燥保藏比斜面保藏的菌株稍强外,其他 2 株酵母没有差异,见图 4。

④糖化型淀粉酶活力和蛋白酶活力

本实验检查了米曲霉(*Aspergillus oryzae*) AS 3.384、AS 3.800,宇佐美曲霉(*A. usamii*) AS 3.758,泡盛酒曲霉(*A. awamori*) AS 3.324 和华根霉(*Rhizopus chinensis*) AS 3.947 等 5 株菌的糖化型淀粉酶活力,并与斜面保存的菌株作了对比,结果见表 7。由表中数据说明,室温冷冻干燥保藏法对糖化型淀粉酶活力没有显著的影响。

表 7 丝状真菌糖化型淀粉酶活力测定

酶*活力 保藏法	菌株	AS 3.384	AS 3.800	AS 3.758	AS 3.324	AS 3.947
冷冻干燥		490	423	738	693	589
斜面		499	486	666	733	562

* 以每 100 毫升糖化液中含葡萄糖毫克数表示。

我们测定了制豆腐乳的毛霉(*Mucor*) AS 3.25,皮革脱毛用的栖土曲霉(*A. terre-*

表 8 丝状真菌蛋白酶活力测定

酶*活力 保藏法	菌株	AS 3.25	AS 3.374	AS 3.870
冷冻干燥		37.0	243	147
斜面		43.0	230	167

* 以微克酪氨酸/毫升·分钟表示。

cola) AS 3.374, 生产酱油用的米曲霉 AS 3.870 等菌株的蛋白酶活力。二种保藏法保存的菌株蛋白酶活力差异不大,见表 8。

讨 论

用牛奶作保护剂,以冷冻干燥法保存细菌,贮藏于 5℃ 16 年,存活率为 81.74%。用此法保存菌种贮藏于室温(5—36℃);细菌保持 4 年半至 7 年,存活率为 96.5%;放线菌保持 5—7 年,存活率为 91.33%;酵母菌保持 4 年半至 6 年,存活率为 85.83%;丝状真菌保存 5—8 年,存活率为 87.45%。因而在室温贮藏冷冻干燥的菌种,以细菌和放线菌的效果较好,其次是丝状真菌,酵母菌较差。

在上述第二种条件下保藏菌种,容易失活的菌种,主要取决于微生物的种类。例如,羽扇豆根瘤菌、纤维二糖乳杆菌、青色变色链霉菌、诺尔斯氏链霉菌、五霉素轮丝链霉菌、李色链霉菌可溶变种、亚热带假丝酵母乳糖变种、最美假丝酵母、产脲假丝酵母、罗多纳汉逊酵母、汉逊德巴利酵母、鲁氏酵母、局限曲霉、指状青霉等不易存活。

所检查的 17 株常用的菌种的生理特性,除在 2 株大肠杆菌谷氨酸脱羧酶,其中 1 株酶活力减退外,其他菌株的特性与斜面保藏的同一种菌株对比,皆无显著的变化。

国外采取冷冻干燥法大量保存菌种时都用血清作保护剂并且贮藏于 5℃;我们为了方便选用脱脂牛奶作保护剂,而且制得的安瓿管在室温贮藏,经保存各类微生物实验后,还是可取的;然而失活的菌种是否与此有关,尚待进一步探讨。

参 考 资 料

- [1] Wickerham, L. J., and Andreasen, A. A.: Wallerstein Labs Commun., 5:165—169,

- 1942.
- [2] Raper, K. B., and Alexznder, D. F.: *Mycologia*, 37:499—525, 1945.
- [3] Fennell, D. L., Raper, K. B., and Fliedinger, M. H.: *Mycologia*, 42:135—147, 1950.
- [4] Mehrotra, B. S., and Hesselstine, C. W.: *Appl. Microbiol.*, 6:179—183, 1958.
- [5] Hesselstine, C. W., Bradle, B. J., and Benjamin, C. R.: *Mycologia*, 52:762—774, 1960.
- [6] Lapage, S. P., et al. and Mitchell, T. G., et al.: In "Methods in Microbiology" (Ed. J. R. Norris and D. W. Ribbons) 3A, 204—221, Academic Press, London and New York, 1970.
- [7] 李笃唐等: 微生物学报, 10(4): 508—513, 1964.
- [8] Heckly, R. J.: In "Advances in Applied Microbiology" (Ed. W. W. Umbreit) 3, 1—76, Academic Press, New York and London, 1961.
- [9] Morichi, T.: In "Culture Collections of Microorganisms" (Proceedings of the International Conference on Culture Collections Tokyo, Oct. 7—11, 1968.) 351—361, (Ed. Hiroshi Iizuka and Takezi Hasegawa) University Park Press, Baltimore, Maryland and Manchester, England, 1970.
- [10] Weiss, F. A.: In "Manual of Microbiological Methods" (Ed. H. J. Conn) 99—119 McGraw-Hill, New York, 1957.
- [11] 梁树权译: 容量分析卷三, 378—412 页, 科学出版社, 1963.
- [12] Price, S. A.: In "progress in Microbiological Techniques" (Ed. C. H. Collins). 66—81. Butterworths. London, 1967.
- [13] 顾天爵等: 生物化学与生物物理学报, 2(3): 226—233, 1962.
- [14] Umbreit, W. W. et al.: Manometric Techniques and Tissue Metabolism. 1—61. Burgess Publishing Co. Minneapolis, 1949.
- [15] 方心芳: 应用微生物学实验法, 72—74, 137—144 页, 中国财政经济出版社, 1962.
- [16] Lowry, O. H., et al.: *J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.
- [17] Haynes, W. C., Wickerham, L. J. and Hesselstine, C. W.: *Appl. Microbiol.*, 3: 361—368, 1955.
- [18] Shuh-wei Hwang: *Appl. Microbiol.*, 14(5):784, 1966.

PRESERVATION OF MICROORGANISMS BY LYOPHILIZATION

RESEARCH GROUP OF CULTURE COLLECTION

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

Lyophilized cultures including 559 species 2010 strains of bacteria, actinomycetes, yeasts and filamentous fungi, protected with skim milk, stored at room temperature (from about 5 to 36°C) for 4½—8 years were tested for viability; the main physiological characteristics of some strains in these cultures were observed too. Also, some bacteria strains kept at 5°C and lyophilized prior to November 1957 were examined.

The lyophil cultures of 32 species 126 strains of bacteria kept at 5°C for 16 years, 103(81.74%) strains were viable. None of these bacteria species was dead but individual strains.

Viabilities of the lyophil cultures stored at room temperature are as follows: Of the 84 species 484 strains of bacteria, 180 species 565 strains of actinomycetes, 59 species 459 strains of yeasts and 236 species 502 strains of filamentous fungi tested, 467(96.5%) strains of bacteria, 516(91.33%) strains of actinomycetes, 394(85.83%) strains of yeasts and 439(87.45%) strains of filamentous fungi

were viable.

Cultures of *Rhizobium lupini*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Streptomyces glaucovarians*, *S. noursei*, *S. pentaticus*, *S. prunicolor* var. *solubilis*, *Candida pseudotropicalis* var. *lactosa*, *C. pulcherrima*, *C. utilis*, *Hansenula rhodonesis*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces rowrii*, *Aspergillus restrictus* and *Penicillium digitatum* were failed to survive lyophilization by our process.

Morphology of the viable strains remained constant and was even better preserved in some instances in lyophil than by periodic transfer on agar slants.

Some physiological characteristics of 17 strains of the lyophil cultures tested, remained constant. Only one of the two *Escherichia coli* strains, showed lower activity of glutamic acid decarboxylase.

The results presented show that the lyophilization, using skim milk as the suspending medium and to store the lyophil ampoules at room temperature, is an available method of preservation for most microorganism cultures.