

砂土法、矿油封藏法保存链霉菌 17 年效果的评定

李钟庆 周毓瑶 曹真

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文总结了用砂土法保存 130 个种、14 个变种、409 株链霉菌以及矿油封藏法保存其中 103 个种、11 个变种、307 株菌 17 年的效果;其中部分菌株的抗菌素产生能力和蛋白酶活力的测定结果;经矿油封藏后,死亡菌株的矿油层,用红外光谱法检查的结果。

用砂土法保存的 409 株菌,17 年后存活 384 株,存活率为 93.9%;在 144 种(包括变种)中,有 101 种(70%)保持着原来的形态特征。用矿油封藏法保存的 307 株菌,17 年后存活 256 株,存活率为 83.4%;其中 169 株(66%)保持着原来的形态特征。

产生链霉素的灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*) AS 4.181、比基尼链霉菌(*S. bikiniensis*) AS 4.569,产氯霉素的委内瑞拉链霉菌(*S. venezuelae*) AS 4.223 等菌株,用矿油封藏法比砂土法保存得到较好的效果。产生新霉素的弗氏链霉菌(*S. fradiae*) AS 4.576,用砂土法保存效果较好。

矿油封藏法保存链霉菌对保持蛋白酶活力,有着良好的效果。

经红外光谱法检查 19 株失活的菌株的矿油层,其中 17 个样品于 1710 cm^{-1} 或 1600 cm^{-1} 处有吸收带。根据红外光谱,此吸收带属于脂肪族或芳香族中 >C=C< 基的伸展振动,与 Arai 用此法保存诺卡氏菌,分枝杆菌测出的结果近似。故推测链霉菌经此法保存后,菌株死亡的原因是由于浸出了细胞中类脂所致。

砂土法和矿油封藏法对于长期大量保存链霉菌,是两种简便而且可取的方法。

链霉菌是产生抗菌素种类较多的一类微生物,也是多种酶以及维生素 B₁₂ 的产生菌。所以研究链霉菌的保藏方法,使其更有效地用于科研、教学和生产,有着现实意义。

我们曾用真空冷冻干燥法保存链霉菌 459 株 5 年存活率为 92.5%;106 株 7 年存活率为 85.84% 的结果^[1]。Lapage^[2]、Кузнецов^[3-8]、Семенов^[9]、肖永澜^[10]、Tresner^[11]、梁宗琦^[12]等也曾分别报道过用真空冷冻干燥法、矿油封藏法、砂土法、-22℃冻结法和麦粒法等保存链霉菌的结果。但是他们所试验的菌株种类少,观察的时间也较短。

我们总结了用砂土法保存 130 种、14

变种、409 株;用矿油封藏法保存 103 种、11 变种、307 株 17 年的效果。同时检查了部分菌株的生理特性;还用红外光谱法分析了经矿油封藏后的矿油层,观察其中是否有细胞中的物质浸出。

材料与方 法

(一) 菌种

链霉菌属 130 个种、14 个变种、409 株菌(见表 1)。

本文于 1979 年 8 月 15 日收到。

红外光谱由中国科学院化学研究所戴慕倪、李云阁同志协助测定;肖永澜同志曾提出宝贵意见,特此致谢。

表 1 砂土法、矿油封藏法保存链霉菌 17 年的结果

菌 种 名 称	砂 土 法				矿油封藏法			
	保存株数	存活株数	退化株数	死亡株数	保存株数	存活株数	退化株数	死亡株数
<i>Streptomyces albidus</i>	1	1			1	1		
<i>S. albidus</i> var. <i>invertens</i>	1	1			1	1		
<i>S. albus</i>	4	4	1		4	3	1	
<i>S. candidus</i>	1	1			1	1		
<i>S. novaezaesarae</i>	1	1			0			
<i>S. alboflavus</i>	1	1	1		1	1	1	
<i>S. flavus</i>	4	4			2	2		
<i>S. longisporoflavus</i>	2	2			1	1	1	
<i>S. parvus</i>	3	3			3	3	1	
<i>S. badius</i>	2			2	1	1	1	
<i>S. citreofluorescens</i>	1	1			0			
<i>S. chrysomallus</i>	6	6			2	2		
<i>S. cyaneofuscatus</i>	1	1			1	1		
<i>S. fluorescens</i>	1	1			0			
<i>S. globisporus</i>	4	4	1		2	1	1	1
<i>S. globisporus</i> var. <i>aesculinus</i>	2	2			1	1		
<i>S. globisporus</i> var. <i>caucasicus</i>	4	4	1		3	3	2	
<i>S. globisporus</i> var. <i>flavofuscus</i>	1	1			1	1		
<i>S. globisporus</i> var. <i>flavus</i>	4	4			3	3		
<i>S. globisporus</i> var. <i>roseus</i>	1	1			0			
<i>S. globisporus vulgaris</i>	3	3			3	3	1	
<i>S. griseus</i>	46	46	1		38	33	7	5
<i>S. levoris</i>	1	1			0			
<i>S. luteolutescens</i>	5	5	1		4	4	1	
<i>S. odorifer</i>	2	2	2		1	1	1	
<i>S. rubiginosohelvolus</i>	2	2			2	2	2	
<i>S. streptomycini</i>	4	4	2		1	1	1	
<i>S. subtropicus</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. sulphureus</i>	1	1			2	1	1	1
<i>S. vulgaris</i>	1	1			0			
<i>S. affine longissimus</i>	2	2			2	2	2	
<i>S. aurantiacus</i>	1	1			1	1		
<i>S. aurini</i>	2	2			0			
<i>S. carneus</i>	1	1			0			
<i>S. cinnamomensis</i>	1	1	1		1	1	1	
<i>S. erythreus</i>	1	1			2	2	1	
<i>S. fradiae</i>	11	11			9	9	3	
<i>S. janthinus</i>	1	1			0			
<i>S. lilacinorectus</i>	1	1			0			
<i>S. lilacinus</i>	6	6			4	4	1	
<i>S. longispororuber</i>	4	4			4	4	3	
<i>S. longispororuber spiralis</i>	3	3			3	3		
<i>S. longissimus</i>	6	2	1	4	5	4		1
<i>S. longissimus cinnabarinus</i>	1	1			1	1		
<i>S. microflavus</i>	4	4			1	1		

续表 1

菌 种 名 称	砂 土 法				矿油封藏法			
	保存株数	存活株数	退化株数	死亡株数	保存株数	存活株数	退化株数	死亡株数
<i>S. purpurascens</i>	1	1			0			
<i>S. pluricOLORescens</i>	1	1	1		1	1	1	
<i>S. roseoalutaceus</i>	2	2			0			
<i>S. roseoflavus</i>	7	7	2		4	4	1	
<i>S. roseolus</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. sindenensis</i>	1	1			0			
<i>S. splendens</i>	2	2			0			
<i>S. violaceus</i>	7	7			7	6	3	1
<i>S. lavendulae</i>	24	22	8	2	18	12	5	6
<i>S. lavendulae</i> var. <i>chromogenes</i>	1	1	1		0			
<i>S. lavendulae</i> var. <i>galactosus</i>	1	1			1	1		
<i>S. lavendulae</i> var. <i>grasserius</i>	1			1	1			1
<i>S. lavendulae</i> var. <i>inositus</i>	1	1			1	1		
<i>S. lavendulae</i> var. <i>xylosus</i>	1	1			0			
<i>S. lavendulae</i> var. <i>correctus</i>	1			1	1	1		
<i>S. lavendulae</i> var. <i>streptinus</i>	1	1	1		1			1
<i>S. roseochromogenes</i>	1	1			3	2	1	1
<i>S. rubrolavendulae</i>	1	1			1	1		
<i>S. venezuelae</i>	7	6		1	6	5	2	1
<i>S. venezuelae</i> var. <i>inulinus</i>	1	1			1	1		
<i>S. virginiae</i>	1	1	1		1			1
<i>S. viridinus</i>	1	1			1	1		
<i>S. coeruleofuscus</i>	2	2	1		0			
<i>S. corulcofuscus</i>	3	3			0			
<i>S. coeruleus</i>	3	1		2	0			
<i>S. glaucescens</i>	2	2			0			
<i>S. glaucoviolaceus</i>	3	3			4	2	2	2
<i>S. viridochromogenes</i>	15	15	1		8	7	3	1
<i>S. albogriseolus</i>	1	1			1	1		
<i>S. albogriseus</i>	1	1			1			1
<i>S. bikiniensis</i>	3	3			3	3		
<i>S. cinereogriseus</i>	7	7			6	6	2	
<i>S. flexuogriseolus</i>	1	1			0			
<i>S. griseolus</i>	4	4			3	3		
<i>S. griseolutes</i>	1	1	1		1			1
<i>S. griseomacrosporus</i>	6	6			5	5	3	
<i>S. griseosegmentosus</i>	1	1			1	1		
<i>S. nitrosporeus</i>	1	1			1			1
<i>S. rochei</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. scabies</i>	2	2			2	2	1	
<i>S. raomyceticus</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. flavovirens</i>	3	3			3	3		
<i>S. flavoviridis</i>	6	6			6	6	2	
<i>S. fulvoviridis</i>	5	5			2	2		
<i>S. olivoviridis</i>	3	3	2		1	1	1	

续表 1

菌 种 名 称	砂 土 法				矿油封藏法			
	保存株数	存活株数	退化株数	死亡株数	保存株数	存活株数	退化株数	死亡株数
<i>S. viridis</i>	2	2			2	2	2	
<i>S. albocyanus</i>	1	1			0			
<i>S. coelicolor</i>	4	3		1	4	4		
<i>S. cyaneogriseus</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. cyaneocalbus</i>	1	1			0			
<i>S. agglomeratus</i>	1	1			1	1		
<i>S. asparaginosviolaceus</i>	1	1			1	1		
<i>S. aurantiacogriseus</i>	1	1			0			
<i>S. bruncoaurantiacus</i>	1	1			1			1
<i>S. californicus</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. erythrorchromogenes</i>	1	1			0			
<i>S. fulvoviolaceus</i>	1	1	1		0			
<i>S. griseoruber</i>	1	1			1			1
<i>S. vinaceus</i>	1	1			0			
<i>S. violochromogenes</i>	2	2			1	1		
<i>S. castaneus</i>	2	2	1		2	2	1	
<i>S. chromofuscus</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. chromogenes</i>	3	2		1	2	1		1
<i>S. cylindrosporus</i>	2	1		1	1	1		
<i>S. erythroprecipitatus</i>	1	1	1		1	1	1	
<i>S. fumosus</i>	2	2			2	2		
<i>S. globosus</i>	2	2			2	2	2	
<i>S. globosus spiralis</i>	1	1	1		1	1		
<i>S. halstedii</i>	2	2			2	1	1	1
<i>S. microsporus</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. nigrificans</i>	5	5			5	4	2	1
<i>S. phaeochromogenes</i>	2	1	1	1	2			2
<i>S. ahygroscopicus</i>	9	8	3	1	9	6		3
<i>S. antibioticus</i>	3	3	1		3	2	2	1
<i>S. aureochromogenes</i>	4	4			3	3		
<i>S. aureofaciens</i>	2	1		1	3	2	2	1
<i>S. aureus</i>	2	1		1	0			
<i>S. cellulosa</i>	4	4	1		4			4
<i>S. flaveolus</i>	3	3			3	2		1
<i>S. flaveolus var. rectus</i>	3	3			3	3	1	
<i>S. flavochromogenes</i>	2	2			1	1		
<i>S. flavoglobosus</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. flavomacrosporus</i>	1	1			0			
<i>S. gibsonii</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. gougeronii</i>	1	1			1	1		
<i>S. gramineus</i>	4	4	1		4	3	1	1
<i>S. griseochromogenes</i>	0				1			1
<i>S. melanochromogenes</i>	1	1			1	1		
<i>S. olivaceus</i>	3	3	1		2	2		
<i>S. parvullus</i>	2	2			2	1	1	1

续表 1

菌 种 名 称	砂 土 法				矿油封藏法			
	保存株数	存活株数	退化株数	死亡株数	保存株数	存活株数	退化株数	死亡株数
<i>S. rimosus</i>	3	3			2	2		
<i>S. tanashiensis</i>	3	2		1	2	2		
<i>S. atrolaceus</i>	1	1			0			
<i>S. hygroscopicus</i>	9	8		1	7	7	1	
<i>S. hygroscopicus</i> var. <i>angustmyceticus</i>	1	1			1	1	1	
<i>S. aureoverticillatus</i>	1	1			1			1
<i>S. griseoverticillatus</i>	1	1			1			1
<i>S. rubroverticillatus</i>	1		1	1	1	1		
<i>S. viridoflavus</i>	3	1	1	2	3	1	1	2
总 计	409	384	44	25	307	256	87	51
百分率(%)	100	93.9	10.8	6.1	100	83.4	28.3	16.6

注: 退化菌株数中包括不形成孢子的和培养特征、形态特征退化以及有疑问的菌株。

(二) 矿油封藏法

将保存的链霉菌菌株接种于适宜的斜面培养基, 于 28℃ 培养 7 天后注入无菌矿油, 其量以淹没斜面 2 厘米为宜。置干燥处室温 (5—33℃) 保存。

(三) 砂土法

取河砂过 60 目筛, 用 10% HCl 处理 2 小时, 水洗至中性, 烘干备用。取肥沃土壤过筛, 将细土与砂按 1:2 (W/W) 混合, 分装入安瓿管内约 2 厘米高, 加棉塞, 15 磅 30 分钟灭菌 3 次, 经检查确认无菌。将培养好的菌种, 在无菌条件下刮取孢子并拌入砂土管中, 置真空干燥器内, 用氯化钙作干燥剂, 抽至真空后置 5—8℃ 冷库中保存。

(四) 存活和生理特性的测定

1. 存活力检查: 将砂土管或矿油封藏管中保存的菌种移接于该菌所适合的斜面培养基上, 培养后观察存活情况, 再将存活的菌株移接于几种鉴别培养基上观察培养特征和形态特征。

2. 拮抗性测定:

菌种: 见表 2。

测定菌: 枯草芽孢杆菌 AS 1.88, 金黄色葡萄球菌 AS1.89, 埃希氏大肠杆菌 AS 1.90。

培养基: 土霉素产生菌培养基成份 (%): 玉米粉 1, 葡萄糖 1, 蛋白胨 0.3, NaCl 0.25, CaCO₃ 0.2, 用 1% 黄豆饼粉浸汁配制。氯霉素产生菌培养基成份 (%): 可溶性淀粉 9, 肉膏 0.5, 蛋白胨 0.5, NaCl 1, 琼脂 2。新霉素产生菌培养基成份

(%): 葡萄糖 1, 蛋白胨 0.3, NaCl 0.25, CaCO₃ 0.2, 用 1% 黄豆饼粉浸汁配制, 琼脂 2。链霉素、灰霉素、放线菌素 D 产生菌的培养基成份同新霉素产生菌的。

培养: 振荡培养为 200 转/分; 土霉素产生菌于 37℃ 培养 110 小时, 氯霉素产生菌于 28—30℃ 培养 68 小时, 新霉素产生菌培养 120 小时。平板培养是将斜面培养的孢子, 刮下后均匀地涂于琼脂平板上, 置 28℃ 培养 7 天。

测定:

(1) 发酵液扩散法: 将直径 8 毫米的圆形滤纸片浸入离心后的培养液中, 再将圆形滤纸片放在接有测定菌的平板上。置于测定菌适宜生长的温度下, 经 18—24 小时后观测抑菌圈大小。

(2) 琼脂块法: 将在琼脂平板上生长良好的培养物, 用内径 7 毫米的打孔器切取带菌苔的琼脂块, 并移置接有测定菌的平板上, 经适温培养后观测抑菌圈的大小。

(3) 纸层析:

滤纸: 新华 1 号 (层析土霉素时经 0.1M 乙二胺四乙酸钠-EDTA 处理)。

溶剂:

① 土霉素为正丁醇: 醋酸: 水 = 4:1:5。

② 氯霉素为正丁醇: 醋酸: 水 = 50:25:25。

③ 新霉素、链霉素为正丁醇: 甲醇: 对-甲苯磺酸: 水 = 10 毫升: 40 毫升: 1 克: 20 毫升。

表 2 10 株链霉菌拮抗性测定结果

测定方法与测定菌		发酵液扩散法[抑菌圈直径(毫米)]									琼脂移块法[抑菌圈直径(毫米)]								
		枯草芽孢杆菌			金黄色葡萄球菌			埃希氏大肠杆菌			枯草芽孢杆菌			金黄色葡萄球菌			埃希氏大肠杆菌		
菌种名称及菌号	所产生的抗菌素	定期移植法	砂土法	矿油封藏法	定期移植法	砂土法	矿油封藏法	定期移植法	砂土法	矿油封藏法	定期移植法	砂土法	矿油封藏法	定期移植法	砂土法	矿油封藏法	定期移植法	砂土法	矿油封藏法
<i>Streptomyces rimosus</i>	土霉素	24	24	21	23	21	20	19	17	18									
AS 4.69		20	22	21	19	21	20	14	19	17									
AS 4.72	土霉素																		
<i>S. griseus</i>	链霉素	12	17	24	11	16	26	9	12	22	18	21	32	16	20	31	13	15	24
AS 4.181		16	17	12	12	13	11	13	19	12	25	28	27	18	22	22	16	19	19
AS 4.139	链霉素																		
<i>S. bikiniensis</i>	链霉素	11	11	27	9	9	21	9	9	19	14	12	28	12	10	27	10	9	21
AS 569																			
<i>S. fradiae</i>	新霉素	22	21	19	19	18	17	17	16	14	27	27	23	24	25	22	17	18	15
AS 4.576																			
<i>S. venezuelae</i>	氯霉素	9	9	16	13	13	16	12	11	14	11	10	14	11	10	16	11	9	15
AS 4.223																			
<i>S. griseus</i>	灰霉素										19	18	18	19	18	16	11	9	15
AS 4.136																			
<i>S. streptomycini</i>	灰霉素										16	20	9	18	19	10	14	18	9
AS 4.149																			
<i>S. melanochromogenes</i>	放线菌素 D										30	30	20	25	26	16			
AS 4.186																			

显色剂:

土霉素为15% SbCl₃氯仿溶液,喷雾后于70℃

加热 2—5 分钟;氯霉素、新霉素、链霉素为 0.2% 的 2, 7-二氯荧光素乙醇溶液。

3. 蛋白酶活力测定:

菌种: 见表 3。

酶液: 将表 3 所列的菌种接种于黄豆饼粉浸汁培养基(同新酶素产生菌培养基)中,在 28℃ 培养 120 小时,过滤,滤液即酶液。

测定方法: 以 0.5% 酪素液为底物,加酶液后于 37℃ 反应 15 分钟,用福林 (Folin) 试剂显色。以每分钟水解酪素产生 1 微克酪氨酸为 1 单位计算酶活力。

4. 死亡菌株矿油层的测定法: 选择经矿油封藏后死亡菌株和少数存活菌株共 13 种 27 株,经滤纸滤出其矿油层。用红外分光光度计分析矿油浸出物。测定过的样品经丙酮和 0.1N KOH 乙醇溶液处理,然后再分别测其红外光谱。

结 果

(一) 砂土法保存效果

用砂土法保存 17 年的链霉菌属 130 个种、14 个变种共 409 株中存活 384 株(表 1),存活率为 93.9%;在存活菌株中有 44 株 (11.5%) 的形态和培养特征,不同程度地发生了退化。保存 17 年的 144 个种(包括变种)中,有 101 个种 (70%) 没有发生死亡和退化;故此法对于保持链霉菌原有的形态和培养特征效果良好。菌株全部死亡或退化的有 17 个种 (其中有 13 个种每种仅保存了一株菌)。明显不适于砂土法保存的种有栗褐链霉菌 (*S. badius*)、土味链霉菌 (*S. ordorifer*)、极长链霉菌 (*S. longissimus*)、浅天蓝链霉菌 (*S. coerulescens*) 和绿黄链霉菌 (*S. viridoflavus*)。

(二) 矿油封藏法保存效果

表 3 21 株链霉菌蛋白酶活力测定结果

菌种名称	菌 号	蛋白酶活力(酪氨酸·微克/分)		
		定期移植法	砂 土 法	矿油封藏法
<i>Streptomyces albus</i>	AS 4.566	30.0	28.8	30.0
<i>S. griseus</i>	AS 4.4	24.6	29.4	27.6
<i>S. griseus</i>	AS 4.18	32.0	32.4	35.6
<i>S. griseus</i>	AS 4.30	20.4	24.0	26.6
<i>S. griseus</i>	AS 4.42	22.0	24.0	26.6
<i>S. griseus</i>	AS 4.139	39.0	44.0	48.2
<i>S. fradiae</i>	AS 4.142	26.6	27.6	27.6
<i>S. fradiae</i>	AS 4.253	27.6	26.6	24.6
<i>S. microflavus</i>	AS 4.61	28.8	17.6	25.6
<i>S. venezuelae</i>	AS 4.223	21.2	21.2	21.2
<i>S. venezuelae</i>	AS 4.648	15.6	16.6	19.4
<i>S. flavovirens</i>	AS 4.21	24.6	29.4	22.0
<i>S. cylindrosporus</i>	AS 4.315	20.4	18.4	17.6
<i>S. castaneus</i>	AS 4.174	31.0	25.6	29.4
<i>S. nigrificans</i>	AS 4.162	24.0	31.0	24.2
<i>S. flaveolus</i> var. <i>rectus</i>	AS 4.440	42.0	69.0	20.4
<i>S. flavochromogenes</i>	AS 4.574	17.6	15.6	24.0
<i>S. olivaceus</i>	AS 4.231	28.6	30.6	34.6
<i>S. rimosus</i>	AS 4.69	28.8	22.0	32.6
<i>S. rimosus</i>	AS 4.72	20.4	16.6	27.6
<i>S. tanashiensis</i>	AS 4.631	15.6	16.6	16.6

经矿油封藏法保存 17 年的链霉菌属 103 个种、11 个变种共 307 株中存活 256 株(表 1), 存活率为 83.4%; 在存活菌株中有 87 株(34%)退化。此法保存链霉菌其死亡率和退化率都比砂土法高; 不适合用此法保存的种有: 球孢链霉菌 (*S. globisporus*)、球孢链霉菌高加索变种 (*S. globisporus* var. *caucasicus*)、锈赤蜡黄链霉菌 (*S. rubiginosohelvolus*)、硫黄链霉菌 (*S. sulphureus*)、近似极长链霉菌 (*S. affine longissimus*)、青紫黑链霉菌 (*S. glaucovioatratus*)、绿色链霉菌 (*S. viridis*)、浑圆链霉菌 (*S. globosus*)、郝斯泰德链霉菌 (*S. halsedii*)、金霉素链霉菌 (*S. aureofaciens*)、纤维素链霉菌 (*S. cellulosa*)、小小链霉菌 (*S. parvulus*)、暗色产色链霉菌 (*S. phaeochromogenes*) 和绿黄链霉菌。此外, 还有 11 个种

各保存 1 株, 结果都死亡; 有 20 个种各保存 1 株, 结果都退化。但是有些种用砂土法保存效果较差, 用矿油封藏法保存效果却较好。如: 用砂土法保存的 6 株极长链霉菌, 结果死亡 4 株, 退化 1 株; 而用矿油封藏法保存 5 株, 仅死亡 1 株, 其余 4 株都保持着原有的特征。又如: 用砂土法保存的 4 株天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*), 结果死亡 1 株; 而用矿油封藏法保存的 4 株, 结果全部存活, 并且其形态和培养特征都比砂土法保存的更为典型。此外, 还有一些种的个别菌株, 如吸水链霉菌 (*S. hygrosopicus*) AS 4.557, 不吸水链霉菌 (*S. ahysgrosopicus*) AS 4.120, 螺旋红色长孢链霉菌 (*S. longispororuber spiralis*) AS 4.471 和浅黄链霉菌 (*S. flaveolus*) AS 4.22, 用矿油封藏法保存较土壤法保存更为可取。

(三) 拮抗性测定结果

7 个种 10 株抗菌素产生菌拮抗性的测定,是以定期移植法保存的曾传代 66 次的同一株菌作对照,结果列于表 2。表 2 结果表明,对于保持灰色链霉菌 AS 4.181、比基尼链霉菌 AS 4.569 产生链霉素和委内瑞拉链霉菌 AS 4.223 产生氯霉素的能力来说,矿油封藏法保存明显地优于砂土法。对于保持弗氏链霉菌 AS 4.576 产生新霉素和链霉素链霉菌 (*S. streptomycini*) AS 4.149 产生灰霉素的能力来说,则砂土法保存效果较好。

用纸层析所测定的几种抗菌素的发酵液和相应的标准样品对比,其 R_f 均一致:产链霉素的菌株 AS 4.181, AS 4.139, AS 4.569, $R_f = 0.69$; 产氯霉素的菌株 AS 4.223, $R_f = 0.9$; 产土霉素的菌株 AS 4.69, AS 4.72, $R_f = 0.51$; 产新霉素的菌株 AS 4.576, $R_f = 0.73$ 。

(四) 蛋白酶活力的测定

保存 17 年后的 14 种 21 株链霉菌蛋白酶活力的测定,并以定期移植法保存的曾传代 66 次的同一株菌作对照,结果列于表 3。测定结果表明,灰色链霉菌,委内瑞拉链霉菌、黄色产色链霉菌 (*S. flavochromogenes*)、橄榄色链霉菌 (*S. olivaceus*)、龟裂链霉菌 (*S. rimosus*) 等 6 种,特别是灰色链霉菌,保存的 5 株中有 4 株,矿油封藏法保持着较高的蛋白酶活力。砂土法仅对黄微绿链霉菌 (*S. flavovirens*)、浅黄链霉菌直丝变种 (*S. flavecoulus var. rectus*) 和黑化链霉菌 (*S. nigrificans*) 3 种,保持着较高的蛋白酶活力。

(五) 死亡菌株矿油层的测定结果

用红外光谱法检测了 13 种 27 株菌 (其中 8 株为保存 17 年仍然存活的菌,其余 19 株菌为保存 17 年后死亡的菌,见表 4) 的矿油样品。测定结果,19 个死亡菌株的

样品中,除极长链霉菌 AS 4.531 和产色链霉菌 (*S. chromogenes*) AS 4.313 两株菌外,其余 17 株在 1710 cm^{-1} 或在 1600 cm^{-1} 有吸收带 (见图 1—4)。而且,灰色轮丝链霉菌 (*S. griseovercillatus*) AS 4.660 和金色轮丝链霉菌 (*S. aureovercillatus*) AS 4.664 二者在这两个波段均有吸收带 (见图 4)。

保存 17 年存活的 8 株菌中,6 株在 1600 和 1710 cm^{-1} 均无吸收带。只有灰色链霉菌 AS 4.18 在 1600 及 1710 cm^{-1} 各有一吸收带,不吸水链霉菌在 1600 cm^{-1} 有一吸收带。

将在上述两波段有吸收带的样品,经

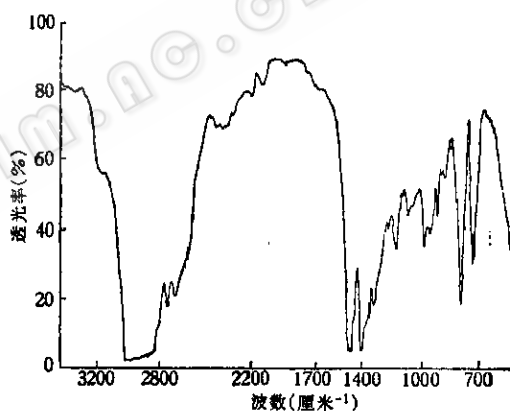


图 1 矿油的红外光谱

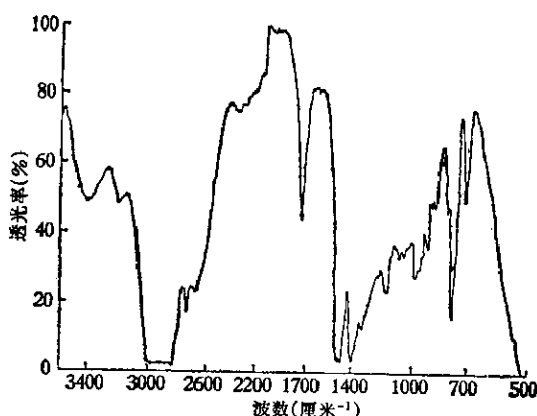


图 2 封注紫色链霉菌 AS 4.387 的矿油层的红外光谱 (菌株死亡)

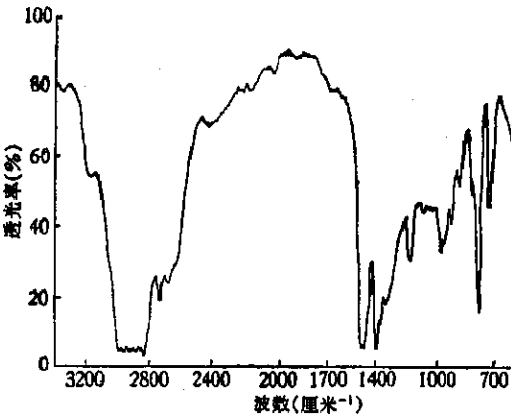


图 3 封注淡紫灰链霉菌 AS 4.404 的矿油层的红外光谱(菌株存活)

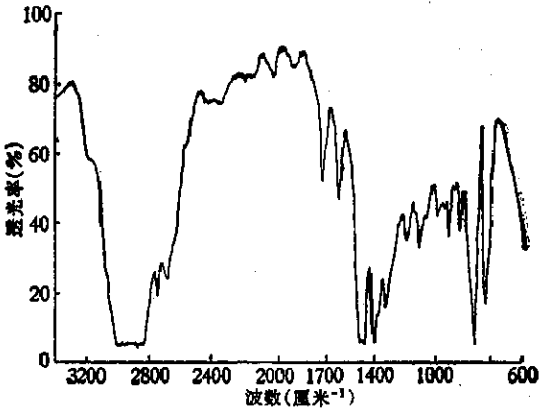


图 4 封注金色轮丝链霉菌 AS 4.664 的矿油层的红外光谱(菌株死亡)

表 4 经矿油封藏后死亡与存活菌株的矿油层样品红外光谱吸收带的对比

菌 种 名 称	菌 号	死亡菌株矿油样品		存活菌株矿油样品	
		1600 厘米 ⁻¹	1710 厘米 ⁻¹	1600 厘米 ⁻¹	1710 厘米 ⁻¹
<i>Streptomyces griseus</i>	AS 4.18			+	+
<i>S. griseus</i>	AS 4.135	-	+		
<i>S. longissimus</i>	AS 4.531	-	-		
<i>S. violaceus</i>	AS 4.370			-	-
<i>S. violaceus</i>	AS 4.387	-	+		
<i>S. lavendulae</i>	AS 4.404			-	-
<i>S. lavendulae</i>	AS 4.196	+	+		
<i>S. lavendulae</i>	AS 4.201	+	-		
<i>S. lavendulae</i>	AS 4.208	+	-		
<i>S. lavendulae</i>	AS 4.242	+	-		
<i>S. venezuelae</i>	AS 4.223			-	-
<i>S. venezuelae</i>	AS 4.244	-	+		
<i>S. bikiniensis</i>	AS 4.194			-	-
<i>S. nigrificans</i>	AS 4.678	+	-		
<i>S. chromogenes</i>	AS 4.311			-	-
<i>S. chromogenes</i>	AS 4.313	-	-		
<i>S. cellulosae</i>	AS 4.85	+	-		
<i>S. cellulosae</i>	AS 4.87	+	-		
<i>S. cellulosae</i>	AS 4.88	+	-		
<i>S. cellulosae</i>	AS 4.437	-	+		
<i>S. ahygroscopicus</i>	AS 4.120			+	-
<i>S. ahygroscopicus</i>	AS 4.116	+	-		
<i>S. ahygroscopicus</i>	AS 4.123	+	-		
<i>S. antibioticus</i>	AS 4.189			-	-
<i>S. antibioticus</i>	AS 4.567	-	+		
<i>S. griseoverticillatus</i>	AS 4.660	+	+		
<i>S. aureoverticillatus</i>	AS 4.664	+	+		

注：“+”有吸收带；“-”无吸收带。

丙酮和 0.1N KOH 乙醇溶液煮沸处理后,再用红外光谱法测定,则这两处的吸收带消失。因而根据红外光谱,此吸收带属于脂肪族 $C=O$ 和 $>C=C<$ 的伸展振动。所以矿油层中的浸出物应为类脂。

总结与讨论

矿油封藏法保存酵母菌和部分霉菌效果良好,而对于放线菌则因存活率、形态及培养特征的保持效果不如砂土、土壤、真空冷冻干燥等方法,故有些菌种保藏机构多不采用此法保存放线菌。

从我们检查,保存 17 年的 307 株(103 种、11 变种)链霉菌的结果来看,矿油封藏法的存活率为 83.4%,虽然低于砂土法(93.9%),但是该方法对于保持一些菌株产生抗菌素的能力或蛋白酶活力,却比砂土法优越。而且对于链霉菌属的个别种或个别菌株的形态和培养特征的保存效果,也有优于砂土法的(例如极长链霉菌和天蓝色链霉菌)。所以我们认为矿油封藏法保存链霉菌,特别是保存某些菌株的生理特性是一种较好的方法。

砂土法保存 409 株(130 种、11 变种)链霉菌,17 年后存活率为 93.9%,而且 70% 的种都保持着原有的形态特征。该法对于保持链霉菌生理特性,虽逊于矿油封藏法,然而也有例外,如对于保持弗氏链霉菌 AS 4.576 产生新霉素,链霉素链霉菌 AS 4.149 产生灰霉素,浅黄链霉菌直丝变种 AS4.440 和黄微绿链霉菌 AS 4.21 的蛋白酶活力的能力却都比矿油封藏法好。

砂土法和矿油封藏法对于保存栗褐链霉菌、土味链霉菌、绿黄链霉菌以及暗色产色链霉菌等都不适宜。

保藏菌种无论采取哪种方法,如用它保存大量的而且不同种的菌株时,都会出

现一定的优缺点。所以只能在长期的考验中选择利多弊少的方法用于实践。砂土法和矿油封藏法比真空冷冻干燥或液态氮超低温冻结保存法等简便易行,不需专门设备;从保存链霉菌 17 年的结果看,无论存活率或保持一些菌株的生理特性,都有一定效果,所以这两种方法对于大量保存链霉菌是可取的。

用矿油封藏法保存链霉菌 17 年后,经红外光谱法检测死亡菌株上所封注的矿油,结果在 1600 厘米⁻¹或 1710 厘米⁻¹处呈现有吸收带。此结果与 Arai^[13] 检查封藏一年而死亡的诺卡氏菌、分枝杆菌的矿油层所得的结果一致。说明,一些链霉菌菌株的死亡也是由于浸出了细胞内的类脂所致。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所菌种保藏组: 微生物学报, 15(1): 57-71, 1975。
- [2] Lapage, S. P. et al.: Culture collections and the preservation of bacteria. In *Methods in Microbiology* (ed. by Norris, J. R. and E. W. Ribbons), Vol. 3A, Academic Press, London and New York, 1970, p. 221.
- [3] Кузнецов, В. Д., Е. Г. Робинова: *Антибиотики*, 16:586-589, 1971.
- [4] Кузнецов, В. Д. и др.: *Антибиотики*, 20: 5-18, 1975.
- [5] ———: *Антибиотики*, 17: 30-34, 1972.
- [6] ———: *Антибиотики*, 18:1063-1069, 1973.
- [7] Кузнецов, В. Д., Е. Г. Робинова: *Антибиотики*, 15:879-883, 1970.
- [8] Кузнецов, В. Д. и др.: *Антибиотики*, 17: 790-793, 1972.
- [9] Семенов, С. М.: *Антибиотики*, 17:583-587, 1972.
- [10] 肖永渊, 林彦: 微生物学通讯, 1(1):63, 1959.
- [11] Tresner, H. D. et al.: *Appl. Microbiol.*, 8: 339-341, 1960.
- [12] 梁宗琦等: 微生物学通报, 5(2):27-28, 1978.
- [13] Arai, T. et al.: Infrared spectrophotometry of actinomycetes in relation to oil seal preservation. In *Proceedings of the First International Conference on Culture Collections* (ed. by Iizuka, H. and T. Hasegawa) University Park Press Baltimore, 1970, pp. 397-410.

AN EVALUATION OF THE EFFICACY OF SAND-SOIL ADSORPTION AND MINERAL OIL SEAL METHOD FOR PRESERVATION OF *STREPTOMYCES* CULTURES FOR 17 YEARS

Li Zhong-qing Zhou Yu-yao Cao Zhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

In the present investigation the efficacy of sand-soil (2:1) adsorption method, and mineral oil seal method for the preservation of 130 species, 14 varieties, and 409 strains of *Streptomyces* through a period of 17 years has been analyzed and compared, including the abilities of antibiosis and the activities of proteinase; and the absorption spectra of mineral oil layers of 19 dead cultures kept in paraffin oil by infrared spectrophotometry.

Viability tests of these cultures are as follows: Of the 409 cultures preserved in sand-soil for 17 years, 384 (93.9%) were viable; among 144 species (including the varieties), 101 species (70%) retained their originally morphological and cultural characteristics. Of the 307 cultures preserved under paraffin oil, 256 (83.4%) were viable; among the viable strains, 169 (66%) retained their inherent properties.

In comparison with sand-soil adsorption method or periodic transfer method, mineral oil seal for preservation of the abilities of *Streptomyces griseus* AS 4.181 and *S. bikiniensis* AS 4.569 in producing streptomycin, *S. venezuelae* AS 4.223 in producing chloramphenicol were shown to have better results.

In general, the mineral oil seal method for maintaining the activities of pro-

teinase in some *Streptomyces* cultures exhibits good results.

Infrared spectra of mineral oil layers analyzed of 19 dead cultures, 17 samples showed strong absorption bands near 1710 and 1600 cm^{-1} . According to infrared spectroscopy, the bands at 1710 and 1600 cm^{-1} indicate the stretching vibrations of $\text{C}=\text{O}$ and $>\text{C}=\text{C}<$ of aliphatic compounds, respectively. Arai and his collaborator have observed that some strains of *Nocardia* and *Mycobacterium* were found to be unable to survive for long storage periods when sealed under paraffin oil; and that the paraffin oil layers showed strong absorption bands near 1740 and 1710 cm^{-1} when analyzed by infrared spectrophotometry. They suggested that the reasons for poor longevity of *Nocardia* and *Mycobacterium* by oil seal preservation might be ascribed to the removal of cellular lipid components into oil layer. The results of the present investigation are similar to theirs. It is only different from theirs in the band at 1740 cm^{-1} . However, the absorption spectrum of $\text{C}=\text{O}$ band has a wide wave number region from 1600—1900 cm^{-1} in different carboxylic acids. The reasons for death of some *Streptomyces* cultures preserved under mineral oil were ascribed to the removal of cellular lipid components into oil layer, because *Streptomyces*, *Nocardia*,

and *Mycobacterium* are all prokaryotes, and are taxonomically related.

Based on the results mentioned above, sand-soil adsorption method for keeping the morphological characteristics of *Streptomyces* cultures can have better results. Although the viability proportion of the mineral oil sealed cultures was lower than

that of sand-soil adsorption method, the former had better result for retaining the physiological properties of some *Streptomyces* cultures. These two methods being all simple, and not requiring special equipment, and can therefore be simultaneously used to preserve *Streptomyces* cultures on a large scale.