

## 细菌超低温冻结保藏的研究

马延生

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道 10 属 19 种 19 株细菌超低温冻结保藏试验的结果。从细胞存活率看, 冻结保藏 8 个月, 10% 甘油、10% 二甲基亚砷保护剂保藏效果优于蒸馏水作保护剂, 少数菌株三种保护剂保藏效果相近。快速冻结与慢速冻结对细胞存活率影响不显著。恶臭醋杆菌混浊变种 (*Acetobacter rancens* var. *turbidans*) AS 1.41, 产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*) AS 1.844, 细胞悬液浓度大, 细胞存活率有增高趋势。电镜观察, 超低温冻结细胞死亡率高的产气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) AS 1.489 有胞壁破裂、胞质溢出现象, 是细胞死亡原因之一。

冻结融化后直接测定, 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) AS 1.557 乳酸生成力下降 3.4—13.8%、溶壁小球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) AS 1.634 对溶菌酶敏感性下降 14—23%。冻结融化后移接 2 代测定, 钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS 1.998 产 L-异亮氨酸, 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) AS 1.76 产青霉素酰化酶酶活力, 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) AS 1.647 产 2-酮基-L-古龙酸, 植物乳杆菌产乳酸均与冻结前相近。

**关键词** 细菌菌株; 超低温冻结和融化

对细菌进行超低温冻结保藏的研究, 国外虽有报道, 但多限于对个别属种的观察<sup>[1,2]</sup>。我们就 10 属 19 种细菌对超低温冻结后的反应, 进行了包括若干生理活性的研究。

### 材料和方法

#### (一) 菌种

10 属 19 种 19 株细菌(见表 1)。

#### (二) 保护剂

蒸馏水; 10% 二甲基亚砷水溶液; 10% 甘油水溶液。

#### (三) 超低温冻结条件

-195℃ 液氮气相区。

#### (四) 冻结融化及测定方法

1. 冻结及融化: 将菌种制成上述三种保护剂悬液, 分别以快速(直接入液氮储存器气相区)或慢速(先从室温以每分钟下降 1℃ 速率至 -40℃, 再置液氮储存器气相区)进行冻结试验<sup>[3]</sup>。从液氮储存器取出冻试菌株悬液, 即置 38℃ 水浴中融化

备测。

2. 不同浓度悬液: 用 721 型分光光度计(640 nm 波长)无菌测配, 以吸光率 A 表示。

3. 细胞存活率用平板计数法。

4. L-异亮氨酸生成能力测定:

(1) 菌种见表 2。

(2) 发酵培养基(%): 葡萄糖 10, 硫酸铵 4,  $K_2HPO_4$  0.1, 玉米浆 0.75, 豆饼水解液 0.5,  $CaCO_3$  4.5, pH 7.2。

(3) 发酵: 250ml 三角瓶装 10ml 培养基, 按斜面菌种, 28℃ 振荡培养 (220r/min) 3 天。

(4) 测定: 茚三酮溶液显色法<sup>[4]</sup>。

5. 2-酮基-L-古龙酸生成能力测定:

(1) 菌种见表 2。

(2) 发酵培养基(%): L-山梨糖 1, 葡萄糖 0.5, 酵母膏 0.1,  $K_2HPO_4$  0.07,  $KH_2PO_4$  0.03,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01, 甘油 0.2,  $CaCO_3$  0.5, pH 7.0。

本文于 1984 年 10 月 11 日收到。

承李钟庆同志指导; 本所电镜组协助摄制电镜照片, 在此一并致谢。

表 1 超低温冻结融化后细菌细胞存活率

Table 1 The survival rate of bacterial cells subjected to ultra-low temperature freezing and thawing

菌 名 Names of bacteria	超低温冻结 8 个月细胞存活率(%) The survival rate of bacterial cells subjected to ultra-low temperature freezing for 8 months					
	水 Water		10%甘油 10% glycerol		10%二甲亚砜 10% DMSO	
	快 冻 Rapid	慢 冻 Slow	快 冻 Rapid	慢 冻 Slow	快 冻 Rapid	慢 冻 Slow
罗旺醋杆菌 <i>Acetobacter lovaniensis</i> AS 1.36	44.3	38.5	46.7	54.7	65.2	61.7
黑色醋杆菌 <i>A. melanogenum</i> AS 1.93	30.5	35.5	29.4	33.9	27.2	32.2
恶臭醋杆菌混浊变种 <i>A. rancens</i> var. <i>turbidans</i> AS 1.41	18	20.6	20.7	21.8	32.4	27.6
亚氧化醋杆菌 <i>A. suboxydans</i> AS 1.110	23.2	20.5	30.9	24.7	33.2	32.4
产气气杆菌 <i>Aerobacter aerogenes</i> AS 1.489	6.5	7.4	24	15.7	8.3	6.5
阴沟气杆菌 <i>A. cloacae</i> AS 1.242	29.5	25.4	54.8	50.3	55.1	40.3
简单节杆菌 <i>Arthrobacter simplex</i> AS 1.94	6.8	8.2	45.5	45.7	12.4	10.5
产氨短杆菌 <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> AS 1.844	13.4	7.9	33.7	28.5	26.6	16.5
黄色短杆菌 <i>B. flavum</i> AS 1.818	20.2	21.1	25.7	24	33	31.8
短杆菌属 <i>B. sp.</i> AS 1.777	29.8	29	46	43.7	39.5	41.7
钝齿棒杆菌 <i>Corynebacterium crenatum</i> AS 1.998	15.8	14.3	45.1	44.4	35.5	35.7
谷氨酸棒杆菌 <i>C. glutamicum</i> AS 1.805	8.3	8.5	27.9	29.1	10.4	10.8
北京棒杆菌 <i>C. pekinense</i> AS 1.299	6.8	5.5	31.8	30.2	28.4	28.3
噬夏孢欧文氏菌 <i>Erwinia uredovora</i> AS 1.1215	25.9	26	37.3	39.3	38.6	34.8
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i> AS 1.76	34.2	30.5	60.8	52.2	49.5	47.1
植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> AS 1.557	26.7	14.6	39.4	34.5	53.5	52
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> AS 1.104	7.7	4.7	38.4	30.2	36.6	32.3
溶表微球菌 <i>Micrococcus lysodeikticus</i> AS 1.634	26.2	24.8	35.5	36.2	34.4	32.2
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AS 1.647	20.9	17.6	37.9	25.2	23	22.6

注: 细胞存活率为 5 次试验平均值。菌悬液浓度为 0.05A。

表 2 超低温冻结融化后细菌的生理活性  
Table 2 Physiological activities of bacteria subjected to ultra-low temperature freezing and thawing

冻速 Freezing rate		冻结前 Not frozen	水 Water		10%甘油 10% glycerol		10%二甲基亚砜 10% DMSO	
生理活性 Physiological activity	菌株 Culture		快冻 Rapid	慢冻 Slow	快冻 Rapid	慢冻 Slow	快冻 Rapid	慢冻 Slow
L-异亮氨酸生成力 Ability for L-iso leucine production	产氨短杆菌 <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> AS 1.998	100	109	105	104	107	109	111*
2-酮基-L-古龙酸生成力 Ability for 2-keto-L-gulonic acid production	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AS 1.647	100	103	100	96.6	103	96.6	100*
青霉素酰化酶活力 Penicillin acylase activity	大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i> AS 1.76	100	106	107	104	108	102	98*
乳酸生成力 Ability for lactic acid production	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> AS 1.557	100	103 86.2	110 96.6	101 89.7	105 87.9	97.3 89.7	100* 87.9 <sup>a</sup>
细胞对溶菌酶敏感性 Sensitivity of cells to lysozyme	溶表微球菌 <i>Micococcus lysodeikticus</i> AS 1.634	100	100 77	95 86	95 77	100 86	95 77	100* 86 <sup>a</sup>

\* 移接 2 代后测定结果  
<sup>a</sup> 冻结融化后直接测定结果

(3) 发酵：每只试管装 5ml 培养基，于 28℃ 振荡培养 (220r/min) 3 天。

(4) 测定：2ml 发酵液加 2ml 浓硫酸，100℃ 水浴 15 分钟，加 100ml 蒸馏水，1% 可溶性淀粉为指示剂，用 0.1*N* 碘液滴定。

6. 青霉素酰化酶活力测定：

- (1) 菌种见表 2。
- (2) 测定按 NIPAB 法<sup>[5]</sup>。

7. 乳酸生成量测定：

- (1) 菌种见表 2。
- (2) 方法：中和法。

8. 溶壁小球菌细胞壁对溶菌酶敏感性测定：

- (1) 菌种见表 2。
- (2) 方法：测光密度法<sup>[6,7]</sup>。

9. 超低温冻结后细胞破损状况，用透射电镜观察。

10. 各项生理活性采用冻结融化后直接测定或移接 2 代后再测定。

结 果

(一) 超低温冻结和融化后细胞存活

率(见表 1)

1. 以蒸馏水作保护剂，快速冻结 8 个月融化，细胞存活率从 AS 1.489 的 6.5% 到 AS 1.36 的 44.3%。慢速冻结融化后，细胞存活率从 AS 1.104 的 4.7% 到 AS 1.36 的 38.5%。以 10% 甘油水溶液为保护剂，快速冻结 8 个月融化，细胞存活率从 AS

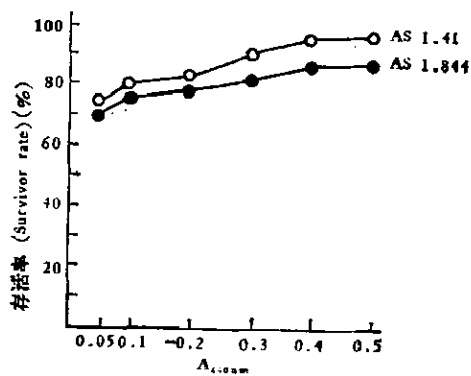


图 1 细胞悬液浓度和存活率  
Fig. 1 The concentration of cell suspension and survival rate

1.41 的 20.7% 到 AS 1.76 的 60.8%。慢速冻结融化后, 细胞存活率由 AS 1.489 的 15.7% 到 AS 1.36 的 54.7%。采用 10% 二甲基亚砜为保护剂, 快速冻结 8 个月后

融化, 细胞存活率从 AS 1.489 的 8.3% 到 AS 1.36 的 65.2%。慢速冻结融化后, 细胞存活率从 AS 1.489 的 6.5% 到 AS 1.36 的 61.7%。

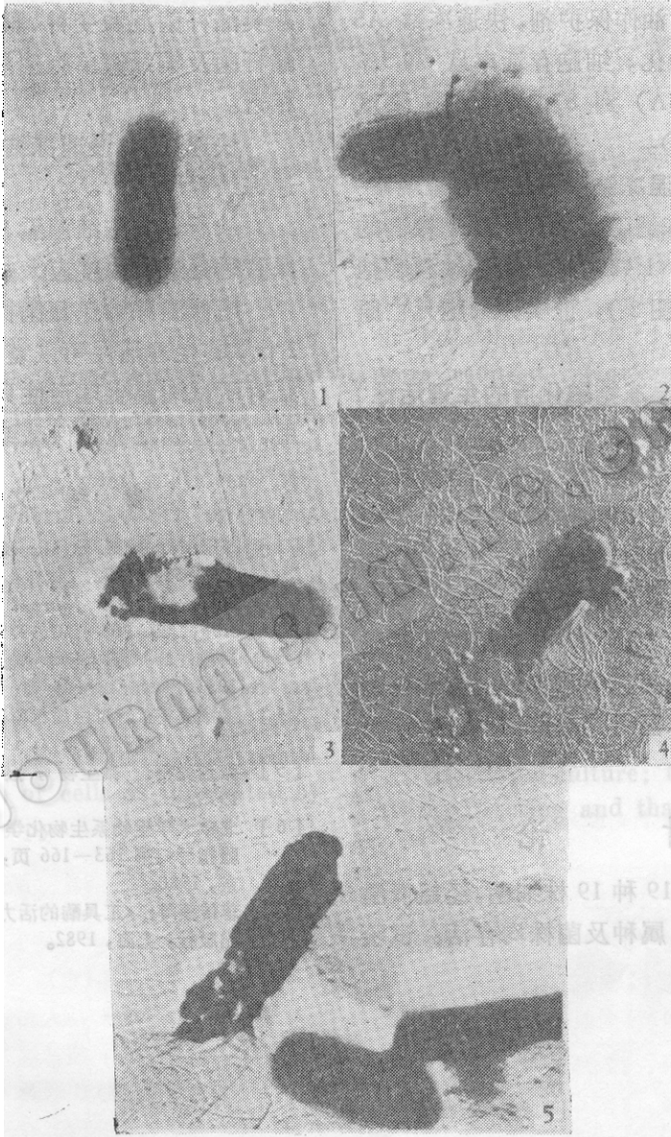


图 2 产气气杆菌 AS 1.489 经超低温冻结融化后的电镜照片

1. 冻结前细胞(9,000 $\times$ ); 2. 水作保护剂慢速冻结(10,000 $\times$ ); 3. 10%甘油作保护剂快速冻结(12,000 $\times$ ); 4. 10%甘油作保护剂慢速冻结(7,000 $\times$ ); 5. 10% 二甲基亚砜作保护剂快速冻结(12,000 $\times$ )。

Fig. 2 The electron micrographs of *Aerobacter aerogenes* AS 1.489 subjected to ultra-low temperature freezing and thawing

1. Cell before freezing; 2. Slow freezing, protected with water; 3. Rapid freezing, protected with 10% glycerol; 4. Slow freezing, protected with 10% glycerol; 5. Rapid freezing, protected with 10% DMSO.

2. 以 10% 二甲基亚砷为保护剂,不同浓度(以 A 值表示)菌悬液快速冻结 1 周后融化, AS 1.41 细胞存活率从 74.9% (细胞浓度 0.05A) 到 95.1% (细胞浓度 0.05 A)。以 10% 甘油作保护剂,快速冻结 AS 1.844 4 周后融化,细胞存活率从 70.5% (细胞浓度 0.05A) 到 87.7% (细胞浓度 0.05A)(见图 1)。

### (二) 超低温冻结和融化后电镜观察

经超低温冻结融化后,死亡率较高的产气杆菌 AS 1.489,有细胞壁破裂和胞质溢出现象(见图 2),证实为细胞死亡原因之一。

### (三) 超低温冻结融化后的生理活性(见表 2)

冻结融化后移接 2 代测定,钝齿棒杆菌产 L-异亮氨酸;铜绿假单胞菌产 2-酮基-L-古龙酸;大肠埃希氏菌产青霉素酰化酶活力;植物乳杆菌乳酸生成;溶壁微球菌对溶菌酶敏感性,与冻结前无明显差异。冻结融化后直接测定,植物乳杆菌产酸及溶壁微球菌对溶菌酶敏感性有下降。

## 讨 论

所试 10 属 19 种 19 株细菌,经超低温冻结 8 个月后,属种及菌株均存活。试验

证明,超低温冻结可作为细菌保藏手段之一。

从保护剂看,10% 甘油、10% 二甲基亚砷保护效果优于蒸馏水。但罗旺醋杆菌、恶臭醋杆菌混浊变种、黑色醋杆菌、弱氧化醋杆菌及铜绿假单胞菌用 3 种保护剂效果相近。

快速冻结,慢速冻结效果相近,采用快速冻结简而易行。

从所试 2 株细菌看,采用超低温冻结保藏时菌悬液浓度应大些。

超低温冻结保藏菌株融化后只需移接 2 代,其生理活性可恢复冻结前水平,超低温对所试细菌生理活性只有短暂抑制作用,为超低温冻结保藏细菌提供了依据。

## 参 考 文 献

- [1] Smittle, R. E. et al.: *Appl. Microbiology*, 24: 551-554, 1972.
- [2] Bullen, J. J.: *Journal of General Microbiology*, 89: 205-207, 1975.
- [3] 马德江等: 微生物学通报, 10(3): 133-135, 1983.
- [4] 潘家秀等: 《蛋白质化学研究技术》, 第 27-28 页, 科学出版社, 北京, 1973.
- [5] 张启先等: 微生物学报, 19(3): 302-308, 1979.
- [6] 北京大学生物系生物化学教研室: 《生物化学实验指导》, 第 163-166 页, 人民教育出版社, 北京, 1980.
- [7] 蒋传葵等: 《工具酶的活力测定》, 上海科学技术出版社, 上海, 1982.

## A STUDY ON ULTRA-LOW TEMPERATURE FREEZING OF BACTERIAL CULTURES

Ma Yansheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

In this paper, response of the 19 bacterial strains belonging to 19 species in 10 genera subjected to liquid nitrogen freezing and thawing was reported. According to the cell survival rate, the protective efficiency of 10% glycerol and 10% DMSO was superior to distilled water after preservation at frozen state for 8 months. Only a few strains showed similar survival rate when they were protected with glycerol, DMSO or water. Rapid or slow freezing has no distinct effect on their viability. The high survival rate may be obtained with dense cell suspensions of *Acetobacter rancens* var. *turbidans* AS 1.41 and *Brevibacterium ammoniagenes* AS 1.844. *Aerobacter aerogenes* AS 1.489 was sensitive to freezing resulting to the lysis of cells as illustrated by electron microscopy.

After freezing and thawing, it was shown that the suspensions were transferred into test media, the lactic acid producing ability of *Lactobacillus plantarum* AS 1.557 and the sensitivity of *Micrococcus lysodeikticus* AS 1.634 to lysozyme were reduced. However, the ability of *Corynebacterium crenatum* AS 1.998 for L-isoleucine production, *Escherichia coli* AS 1.76 for penicillin acylase activity, *Pseudomonas aeruginosa* AS 1.647 for 2-keto-L-gulonic acid, and *Lactobacillus plantarum* AS 1.557 for lactic acid were not reduced when the frozen and thawed strains were activated.

### Key words

Bacterial culture; Ultra-low temperature; Freezing and thawing