

微生物的保藏方法

Company
LOGO

主要内容

1

常用的保藏方法

2

保藏原理

3

注意事项

菌种保藏的原因

通过分离纯化得到的微生物纯培养物，还必须通过各种保藏技术使其在一定时间内不死亡，不会被其他微生物污染，不会因发生变异而丢失重要的生物学性状，否则就无法真正保证微生物研究和应用工作的顺利进行。

菌种保藏就是根据菌种特性及保藏目的的不同，给微生物菌株以特定的条件，使其存活而得以延续。

菌种保藏原理

- 根据微生物的菌种生理、生化特性，在人工创造的条件下尽量降低微生物细胞的代谢强度，使细胞基本处于休眠状态，生长繁殖受到抑制但又不至于死亡，以减低菌种的变异率。低温、干燥、缺氧、缺乏营养等环境条件都有抑制微生物的代谢作用。
- 低温、干燥、真空是用于菌种保藏的重要手段。

美国标准生物保藏中心

ATCC是美国标准生物品收藏中心。ATCC的成立可追溯到1925年，一个科学委员会认识到科学研究对于微生物的大量需求而萌发了创建一个微生物相关制品供应中心的想法。ATCC以生命科学领域全方位知识的获取，分类，汇总，完善进而广泛传播为己任，以期为推动生物原料，生物信息，生物技术，知识产权，规范等相关领域的前沿性、合法化、实用性发挥一定的作用。

ATCC拥有目前世界上最大的、品种最丰富的微生物、细胞系以及重组DNA原料，同时它也是科研工作者公认的提供世界级的可靠的研究材料的供应商。

美国标准生物保藏中心

美国典型微生物菌种保藏中心,
American Type Culture Collection(ATCC)

ATCC 主要从事农业、遗传学、应用微生物、免疫学、细胞生物学、工业微生物学、菌种保藏方法、医学微生物学、分子生物学、植物病理学、普通微生物学、分类学、食品科学等的研究。

该中心保藏有藻类111株, 细菌和抗生素16865株, 细胞和杂合细胞4300株, 丝状真菌和酵母46000株, 植物组织79株, 种子600株, 原生动物1800株, 动物病毒、衣原体和病原体2189株, 植物病毒1563种。另外, 该中心还提供菌种的分离、鉴定及保藏服务。该中心保藏的菌种可出售。

中国菌种保藏管理中心

- 中国菌保会是国际认可的菌种保藏机构，下设7个全国性菌种保藏管理中心：
 - (1) 普通微生物菌种保藏管理中心；
 - (2) 农业微生物菌种保藏管理中心；
 - (3) 工业微生物菌种保藏管理中心；
 - (4) 医学微生物菌种保藏管理中心；
 - (5) 抗生素菌种保藏管理中心；
 - (6) 兽医微生物菌种保藏管理中心；
 - (7) 林业微生物菌种保藏管理中心。
- (1984 年增加)

中国标准生物保藏中心

我国唯一的国家级工业微生物菌种资源保藏管理中心，中国微生物菌种保藏管理委员会和国际菌种保藏联合会成员之一，隶属于中国食品发酵工业研究院，专业从事工业微生物菌种资源保藏管理的公益基础性资源保藏机构，负责全国工业生产与研究应用微生物菌种资源的收集、整理、鉴定、保藏、供应与国际交流。

中国工业微生物菌种保藏管理中心（CICC）保藏各种工业微生物菌种资源包括：细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌和大型真菌，共67个属251种，近3000株，库藏备份80000余支。

中国标准生物保藏中心

中国农业微生物菌种保藏管理中心

Agricultural Culture Collection of China
(ACCC)

ACCC是中国国家级农业微生物菌种保藏管理专门机构,负责全国农业微生物菌种的收集、鉴定、评价、保藏、供应及国际交流任务. 库藏菌种2490株,其中细菌1004株,放线菌69株,丝状真菌355株,酵母菌124株,食用菌582.

中国标准生物保藏中心

中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心成立（英文缩写：CGMCC，设立在中国科学院微生物研究所） 1985年，开始用于专利程序的微生物保存 1995年，获得布达佩斯条约国际保藏中心（IDA）的资格 1995年，加入中国科学院典型培养物保藏委员会 宗旨和任务。

作为一个非赢利性、公益性、服务性技术支撑机构，CGMCC的宗旨是广泛收集国内外的微生物资源，妥善保存，以公开的保藏机构的名义为工农业生产、卫生健康、环境保护、科研教育提供标准化的实验材料，在保证生物安全和保护知识产权的前提下，为第三者能够自由地利用各种微生物材料提供服务，最大限度的实现微生物资源的保护、共享和持续利用。

德国与韩国标准生物保藏中心

德国微生物菌物保藏中心(DSMZ)，保藏有9400种细菌、2400种真菌、500种酵母菌、300种质粒、500种动物细胞、500种植物细胞、170种动物杂肿瘤、600种植物病毒、90种细菌病毒等（德文，英文）。

韩国国家农业生物技术研究——农业微生物菌种保藏（KACC），保藏有细菌890种、真菌1581种、酵母菌62种、cDNA 600种（英文）。

法国标准生物保藏中心

法国国家历史自然博物馆——Algotheque du 实验室
菌种保藏中心

Algotheque du Laboratoire de Cryptogamie, Museum
National d'Histoire Naturelle (ALCP)

ALCP隶属于法国国家历史自然博物馆，主要从事于工业微生物学，应用微生物学，微生物系统分类学，培养和保藏方法等方面的研究，以及藻类等微生物的分离，鉴定，保藏工作。保藏有藻类600种、细菌200种。该中心保藏的菌种可出售。

各国标准生物保藏中心

法国巴斯德研究所L'Institut Pasteur菌物保藏中心
Collection de L'Institut Pasteur Of Institut
Pasteur(CIP)

加拿大国家微生物健康实验室微生物菌种保藏中心
National Microbiology Laboratory Health Canada
Culture Collections (NML-HCCC)

日本生物技术研究所微生物菌种保藏中心
Marine Biotechnology Institute Culture Collection,
Marine Biotechnology Instituten(MBIC)

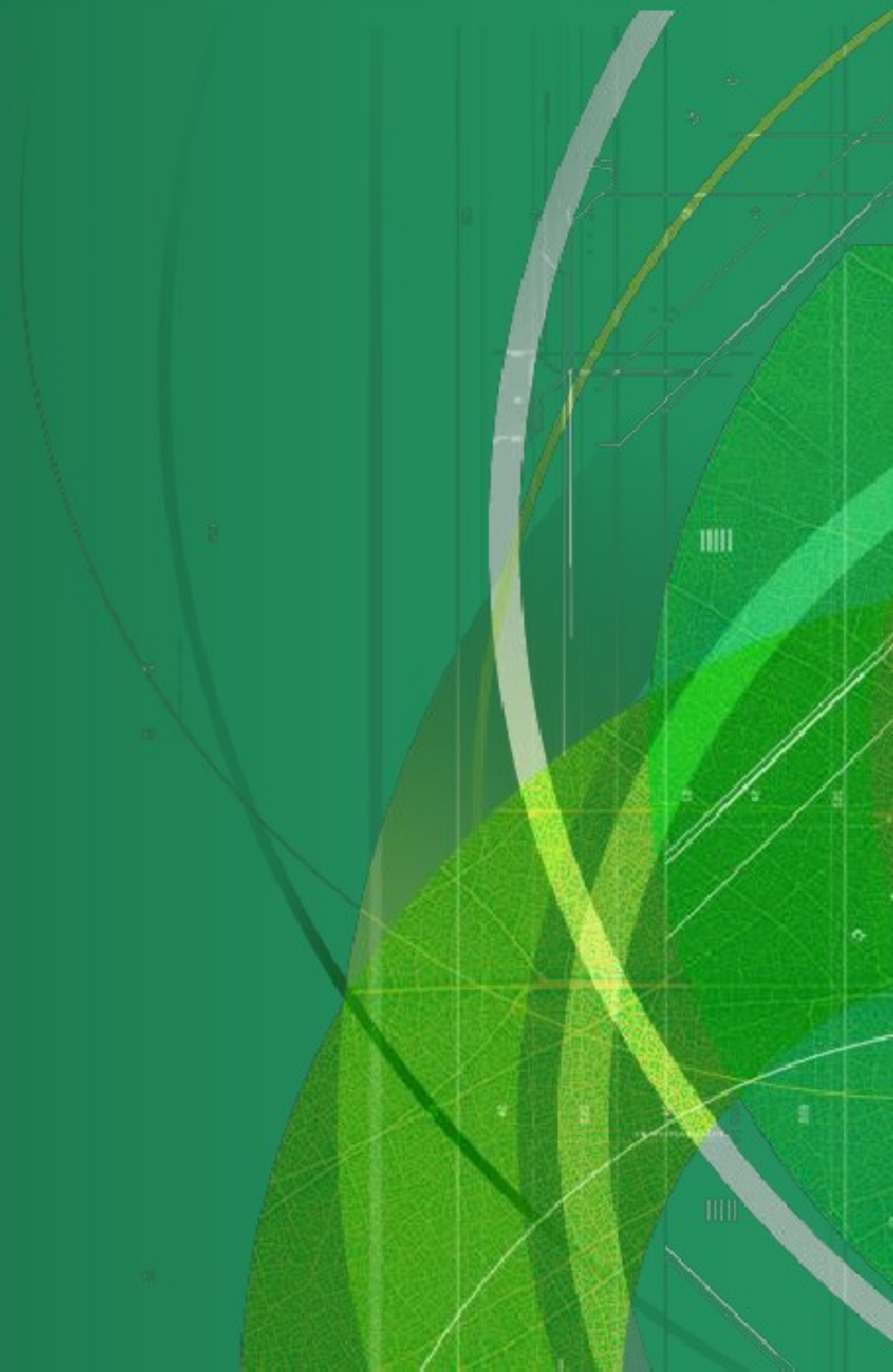
表 7-13 7 种常用菌种保藏方法的比较

方 法	主 要 措 施	适宜菌种	保藏期	评 价
冰箱保藏法(斜面)	低温(4°C)	各大类	约 1~6 月	简便
冰箱保藏法(半固体)	低温(4°C), 避氧	细菌, 酵母菌	约 6~12 月	简便
石蜡油封藏法*	低温(4°C), 阻氧	各大类**	约 1~2 年	简便
甘油悬液保藏法	低温(-70°C), 保护剂 (15%~50% 甘油)	细菌, 酵母菌	约 10 年	较简便
砂土保藏法	干燥, 无营养	产孢子的微生物	约 1~10 年	简便有效
冷冻干燥保藏法	干燥, 低温, 无氧, 有保护剂	各大类	>5~15 年	繁而高效
液氮保藏法	超低温(-196°C), 有保护剂	各大类	>15 年	繁而高效

* 用斜面或半固体穿刺培养物均可, 一般置 4°C 下。

** 对石油发酵微生物不适宜。

传代培养保藏



一、传代培养保藏

1

原理

2

优缺点

3

注意事项

传代培养的原理

有些微生物当遇到冷冻或干燥等处理时，会很快死亡，因此在这种情况下，只能求助于传代培养保存法。传代培养就是要定期进行菌种转接、培养后再保存，它是最基本的微生物保存法，例如酸奶等常用生产菌种的保存。

传代培养优缺点

传代培养保存法虽然简便，但其缺点也很明显，如：①菌种管棉塞经常容易发霉；②菌株的遗传性状容易发生变异；③反复传代时，菌株的病原性、形成生理活性物质的能力以及形成孢子的能力等均有降低；④需要定期转种，工作量大；⑤杂菌的污染机会较多。

传代培养的注意事项

传代保存时，培养基的浓度不宜过高，营养成分不宜过于丰富，尤其是碳水化合物的浓度应在可能的范围内尽量降低。培养温度通常以稍低于最适生长温度为好。若为产酸菌种，则应在培养基中添加少量碳酸钙。

一般地，大多数菌种的保藏温度以 5°C 为好，像厌氧菌、霍乱弧菌及部分病原真菌等微生物菌种则可以使用 37°C 进行保存，而蕈类等大型食用菌的菌种则可以室温直接保存。

二、冷冻保藏原理

适用于抗冻力强的微生物。这些微生物可在其菌体细胞外遭受冻结的情况下而不受损伤，而对其它大多数微生物而言，无论无论在细胞外冻结还是在细胞内冻结，都会对菌体造成损伤，使其代谢作用停止，可达到保藏的目的。

常用的冷冻保藏法

1

液氮保藏法

2

低温冰箱保存法

3

干冰保存法



液氮保存法

- 一、适用范围

液氮温度在 -196 以下,用于快速制冷,速冻,机械安装等,一般不用于日常生活,此法除适宜于一般微生物的保藏外,对一些用冷冻干燥法都难以保存的微生物如支原体、衣原体、氢细菌、难以形成孢子的霉菌、噬菌体及动物细胞均可长期保藏,而且性状不变异。缺点是需要特殊设备。

二、保藏方法

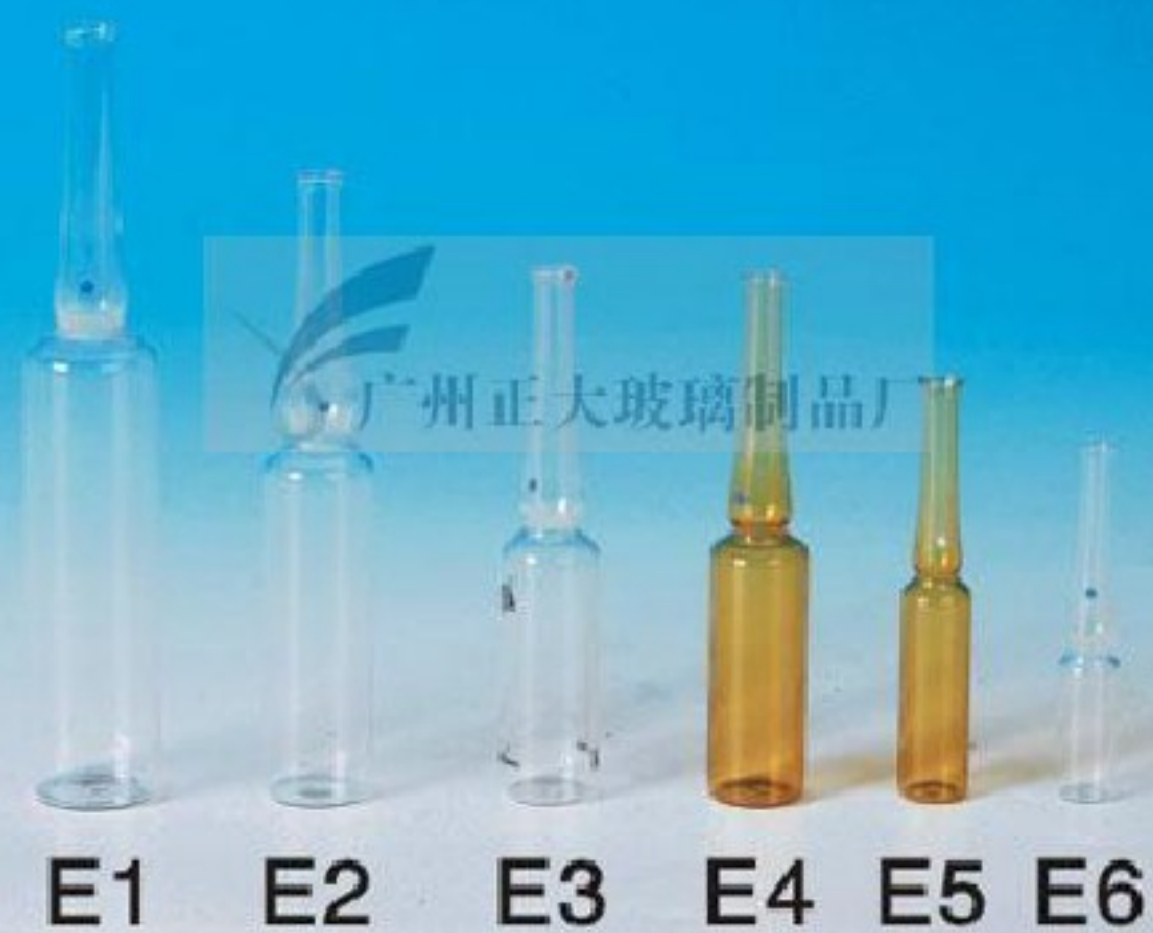
a、装安瓶管: 使用尽量浓厚的菌体悬浮于含有适当防冻剂(保存霉菌不用防冻剂)的灭菌溶液中,将 $0.2\sim 1\text{ml}$ 的这种溶液分装于安瓶中,或在装有分散剂的安瓶中直接接种,或将菌丝体琼脂块直接悬浮于分散剂中。

b、熔封安瓶管: 若直接贮存于气相液氮中($-150^{\circ}\text{C}\sim -170^{\circ}\text{C}$)时,则不需熔封。

- c、检查安瓶管是否熔封良好：即在 4°C 下，将熔封安瓶管在适当的色素溶液中浸泡 $2\sim 30$ 分钟后，观察有无色素进入安瓶。
- d、缓慢冷却：将熔封安瓶管置于小罐中，然后用液氮气以约 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度冷却至 -25°C 左右，也可在 $-20^{\circ}\text{C}\sim -25^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内缓慢冷却 $30\sim 60\text{min}$ 。
- e、速冷：最后浸入液氮中快速冷却至 -196°C 。

这种方法适用范围广，而且是目前常用的较理想的，繁而高效。保藏期 $2\sim 3$ 年，甚至长达9年。





www.hbmingjie.com



低温冰箱保存法

- 一、适用范围
—20℃、—50℃或—85℃
- 二、保藏方法

低温冷冻保存时使用螺旋口试管较为方便，也可在棉塞试管外包裹塑料薄膜。保存时菌液加量不宜过多，有些可添加保护剂。此外，也可用 $\phi 5\text{mm}$ 的玻璃珠来吸附菌液，然后把玻璃珠置于塑料容器内，再放入低温冰箱内进行保存的。



干冰保存法

- 一、适用范围
— -70°C 左右

二、保藏方法

将菌种管插入干冰内，再置于冰箱内进行冷冻保存。



菌种保藏的共同注意点:

- 1、严格的无菌操作;
- 2、用于保存的微生物在生长前必须处于它生长良好的状态;
- 3、保藏过程中要防止退化的发生 (不同的保藏方法, 分别有不同的保存时间。)

注意事项

- ①要选择适于冷冻干燥的菌龄细胞；
- ②要选择适宜的培养基，因为某些微生物对冷冻的抵抗力，常随培养基成分的变化而显示出巨大差异；
- ③要选择合适的菌液浓度，通常菌液浓度越高，生存率越高，保存期也越长；
- ④最好在菌液内不添加电解质（如食盐等）；
- ⑤可在菌液内添加甘油（甘油管冷冻保藏法）等保护剂，以防止在冷冻过程中出现菌体大量死亡的现象。同样，也可添加各种糖类、去纤维血液和脱脂牛乳等具有良好保护效果的溶剂，但对有些微生物而言，不加保护剂时更有效。
- ⑥原则上应尽快进行冷冻处理，但当加入保护剂时，可静置一段时间后再进行处理。
- ⑦就动物细胞而言，应在 -20°C 范围内以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 左右的速度缓慢降温，此后必须尽快降到贮藏温度；而对绝大多

数微生物而言，则不必如此，如结构较为复杂的原虫则可在 -35°C 范围内进行缓慢降温，而噬菌体则必需采用上述的二阶段法进行冷冻；

- ⑧若进行长期保存，则贮藏温度越低越好；
- ⑨取用冷冻保存的菌种时，应采取速融措施，即在 $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ 温水中轻轻振荡使之迅速融解。而就厌氧菌来说，则应选择静置融化的措施。当冷冻菌融化后，应尽量避免再次冷冻，否则菌体的存活率将显著下降。
- 总之，首先保持原菌优良性状长期稳定，同时考虑方法的通用性、操作的简便性和设备的普及性。

三、干燥保藏法

1、沙土管保存

2、冷冻真空保藏

沙土管保存

- 1、主要用于能形成孢子或孢囊的微生物菌种的保藏，如：芽孢杆菌、放线菌等。
- 2、方法：将菌种接种斜面，培养至长出大量的孢子后，洗下孢子制备孢子悬液，加入无菌的沙土管中，减压干燥，直至将水分抽干，最后用石蜡、胶塞等封闭管口，置冰箱保存。

沙土管保藏：用棉塞塞住安瓿管，放在能够抽真空的干燥器中，然抽干后将真空干燥器的旋塞关闭即可。不用火焰封口，用时将真空干燥器放气打开取出，剩余的继续抽真空，抽至真空后关闭旋塞保藏即可。

此法简单易行，并可以将微生物保藏较长时间，适合一般实验室及以放线菌等为菌种的发酵工厂采用。

冰冻真空保藏

原理是首先将加有保护剂的细胞样品先预冷，使其冻结，然后在减压下利用升华现象除去水分。事实上，从菌体中除去大部分水分后，细胞的生理活动就会停止，因此可以达到长期维持生命状态的目的。该方法适用于绝大多数微生物菌种（包括噬菌体和立克次氏体等）的保存。

达到干燥的样品可在真空或惰性气体的密闭环境中置低温保存，从而使微生物处于干燥、缺氧及低温的状态，生命活动处于休眠，可以达到长期保藏的目的。

用冰升华的方式除去水分，手段比较温和，细胞受损伤的程度相对较小，存活率及保藏效果均不错，而且经抽真空封闭的菌种安瓿瓶的保存、邮寄、使用均很方便。因此冷冻真空干燥保藏是目前使用最普遍、最重要的微生物保藏方法。

注意事项

a、冷冻干燥前的培养条件：首先检验菌种纯度。一般地说，将待保存的微生物在营养丰富且容易增菌的培养基上进行培养为宜；菌龄以达到对数生长期为好；若为有芽孢或孢子的微生物，则以芽孢和孢子形成以后进行保存为好；菌液浓度以高为好，如细菌应达到 $10^9 \sim 10^{10}/\text{ml}$ 。

b、菌株号码等的标记：可在安瓶外侧标记或在安瓶内封入标签。

c、安瓶的准备：将安瓶在2% HCl中浸泡过夜，自来水冲洗3次后，蒸馏水刷净，干燥，塞棉塞，贴标签，干热灭菌或湿热灭菌后， 60°C 恒温干燥。

d、添加保护剂：常用的保护剂有脱脂乳、12%蔗糖、加7.5%葡萄糖的普通肉汤以及加7.5%葡萄糖的血清等等。

总结

除上述方法外，各种微生物菌种保藏的方法还有很多，如纸片保藏、薄膜保藏、寄主保藏等。

由于微生物的多样性，不同的微生物往往对不同的保藏方法有不同的适应性，迄今为止尚没有一种方法被证明对所有的微生物适宜。

因此，在具体选择保藏方法时必须对被保藏菌株的特性、保藏物的使用特点及现有条件等进行综合考虑。对一些比较重要的微生物菌株，则要尽可能多的采用各种不同的手段进行保藏，以免因某种方法的失败而导致菌种的丧失。