

# SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2660—2010

---

## 食品微生物实验室菌种保藏方法

Preservation methods for culture collection in foodstuff microbiology laboratory

2010-11-01 发布

2011-05-01 实施

---

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张海滨、高旗利、张霞、刘培、王乃福、张海英、吴冬雪。

# 食品微生物实验室菌种保藏方法

## 1 范围

本标准规定了食品微生物实验室常用的菌种保藏的定义、技术原则、技术要求和技术方法。  
本标准适用于食品微生物实验室菌种的保藏。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

病原微生物实验室生物安全管理条例

人间传染的病原微生物名录

动物病原微生物分类名录

## 3 定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**菌种保藏** culture preservation

将微生物菌种用各种适宜方法妥善保藏,避免死亡、污染,保持其原有性状基本稳定。

### 3.2

**定期移植法** periodical subculturing

又称传代培养保藏法,包括斜面培养、穿刺培养、液体培养等。将菌种接种于适宜的培养基中,最适条件下培养,待生长充分后,于4℃~6℃进行保存并间隔一定时间进行移植培养的一种菌种保藏方法。

### 3.3

**液体石蜡法** preservation in liquid paraffin

又称矿物油保藏法,定期移植保藏法的辅助方法。将菌种接种在适宜的斜面培养基上,在最适条件下培养至菌种长出健壮菌落后注入灭菌的液体石蜡,使其覆盖整个斜面,再直立放置于低温(4℃~6℃)干燥处进行保存的一种菌种保藏方法。

### 3.4

**瓷珠保藏法** porous beads preservation

将培养好的微生物细胞或孢子制成悬浮液,转入装有无菌多孔玻璃珠(或瓷珠)的无菌瓶中,使其吸附于玻璃珠表面,去除多余悬浮液,低温冷冻保存的一种菌种保藏方法。

### 3.5

**冷冻干燥保藏法** freeze-drying

原理是微生物细胞在冷冻、减压条件下,发生“升华”脱水,细胞的生理活动趋于停止,得以长期维持存活状态。

### 3.6

#### 液氮超低温保藏 preservation in liquid nitrogen

将微生物菌种保藏在 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的液氮中,或保藏在 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的气相氮中。其原理是微生物在 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下新陈代谢趋于停止,因而能长期、有效地保藏。

### 3.7

#### $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保藏 preservation at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

将微生物菌种保藏在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱的一种保藏方法。原理是低温条件可减缓微生物的新陈代谢,以达到长期有效地保藏微生物。

## 4 基本原则

4.1 微生物菌种的实验室操作应符合《病原微生物实验室生物安全管理条例》、《人间传染的病原微生物名录》、《动物病原微生物分类名录》及 GB 19489 的有关要求。

4.2 针对微生物菌种特性选择适宜的保藏方法,宜采用两种或两种以上方法保存,以保持菌种的原有性状稳定和避免损失。

4.3 微生物菌种保藏工作不能对周围环境造成污染和危害。

## 5 技术要求

5.1 微生物菌种保藏所使用的器皿要求清洁、透明、无破损、无裂痕。

5.2 根据微生物菌种保藏需要选择适合培养基。

5.3 微生物菌种保藏过程中应注意无菌操作,避免污染。

5.4 微生物菌种移植过程,要对菌株编号及培养基分别进行核对,避免发生错误。

5.5 微生物菌种培养至稳定期或成熟期后进行保藏。

5.6 微生物菌种移植培养后,应与原保藏菌株的培养特性和菌株登记信息对照,检查无误后再存放。

5.7 微生物菌种保藏期间,要定期检查菌种存放设施的温度和湿度、菌株有无污染、棉塞有无霉变,如发现异常应重新移植培养后更换。

5.8 微生物菌种保藏应建立和保存其所有菌种的收集、储藏、保存和确认试验的记录。管理记录中还应包括(但不限于)以下内容:

- a) 从原始菌种传代到工作菌种的代数;
- b) 菌种生长的培养基及孵育条件;
- c) 菌种生存条件。

相关记录参见附录 A。

## 6 技术方法

### 6.1 定期移植法

#### 6.1.1 适用范围

本方法适用于大多数细菌和真菌。

#### 6.1.2 原理

低温保藏可减缓微生物菌株的代谢活动,抑制其繁殖速度,达到减少菌株突变、延长菌株保藏时间

的目的。保藏培养基一般含较多有机氮,糖分总量不超过2%,既能满足菌株生长繁殖的需要,又可防止因产酸过多而影响菌株的保藏。

### 6.1.3 操作步骤

具体操作见附录B。

## 6.2 液体石蜡法

### 6.2.1 适用范围

本方法适用于部分在有氧状态下生长良好的细菌、酵母、霉菌及放线菌,如芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、布鲁氏菌属(*Brucella* spp.)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、巴斯德氏菌属(*Pasteurella* spp.)、变形杆菌属(*Proteus* spp.)、沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)、志贺氏菌属(*Shigella* spp.)、链球菌属(*Streptococcus* spp.)等。但也有不宜采用本方法保存的,如乳酸杆菌属(*Lactobacillus* spp.)、明串珠菌属(*Leuconostoc* spp.)、分枝杆菌属(*Mycobacterium* spp.)、毛霉属(*Mucor* spp.)、根霉属(*Rhizopus* spp.)等。

### 6.2.2 原理

在液体石蜡的覆盖下,微生物菌种的生物代谢受到抑制,细胞老化被推迟。此方法可阻止氧气进入,使好氧菌不能继续生长,也可防止因培养基水分蒸发而引起的菌体死亡,达到延长微生物菌种保藏时间的目的。

### 6.2.3 操作步骤

具体操作见附录C。

## 6.3 瓷珠保藏法

### 6.3.1 适用范围

本方法适用于大多数微生物,如无芽孢的细菌或葡萄球菌(*Staphylococcus* spp.)以及噬菌体、放线菌、丝状真菌、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、霉菌等的保藏。

### 6.3.2 原理

细胞或孢子可以有效地吸附于瓷珠表面,在营养缺乏、干燥的条件下代谢活动减缓,繁殖速度受到抑制。此方法可减少菌株突变,延长存活时间。

### 6.3.3 操作步骤

具体操作见附录D。

## 6.4 冷冻干燥保藏法

### 6.4.1 适用范围

本方法适用于大多数细菌、放线菌、病毒、噬菌体、立克次氏体、部分丝状真菌和酵母菌等的保藏,但不适用于藻类和原虫等的保藏。

### 6.4.2 原理

微生物细胞在减压冷冻条件下,发生脱水,细胞的生理活动趋于停止,得以长期维持存活状态。

#### 6.4.3 操作步骤

具体操作步骤见附录 E。

### 6.5 低温冷冻保藏法

#### 6.5.1 适用范围

大部分微生物。

#### 6.5.2 原理

微生物在 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下新陈代谢趋于停止,或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下减缓其新陈代谢,以达到长期有效保藏微生物。

#### 6.5.3 操作步骤

具体操作步骤见附录 F。

**附录 A**  
**(资料性附录)**  
**菌种资源描述方法**

**A.1 菌种资源共性描述**

菌种资源共性描述记录内容可参见表 A.1。

**表 A.1 菌种资源共性描述表**

护照信息			
平台资源号* (1)		菌株保藏编号* (2)	
中文名称(3)		属名* (4)	
种名加词(5)		其他保藏中心编号(6)	
来源历史(7)		收藏时间(8)	
原始编号(9)		原产国(10)	
标记信息			
资源归类编码* (11)		模式菌株* (12)	1 模式菌株;2 非模式菌株
主要用途* (13)	1 分类;2 研究;3 教学;4 分析检测;5 生产;6 其他		
基本特征特性描述信息			
特征特性(14)			
具体用途(15)			
生物危害程度* (16)	1 一类;2 二类;3 三类;4 四类;5 不清楚		
寄主名称(17)			
致病对象(18)	1 人;2 动物;3 人畜共患;4 植物;5 微生物;6 无;7 不清楚		
致病名称(19)		传播途径(20)	
分离基物(21)		采集地(22)	
培养基编号* (23)		培养温度* (24)	
其他描述信息			
基因元器件(25)			
记录地址(26)		图像(27)	
收藏单位信息			
机构名称* (28)		机构名称缩写(29)	



表 A.1 (续)

隶属单位名称* (30)	中国检验检疫科学研究院
资源保藏类型* (31)	1 培养物;2 二元培养物;3 基因;4 其他
保存方法* (32)	1 液氮超低温冻结法;2 -80℃冰箱冻结法;3 真空冷冻干燥法;4 矿物油法; 5 定期移植法;6 其他
实物状态* (33)	1 有实物;2 无实物
共享信息	
共享方式* (34)	1 公益性共享;2 公益性借用共享;3 合作研究共享;4 知识产权性交易共享; 5 资源纯交易性共享;6 资源租赁性共享;7 资源交换性共享;8 收藏地共享; 9 行政许可性共享
提供形式* (35)	1 斜面培养物;2 冻干物;3 冻结物;4 其他
获取途径* (36)	1 邮件;2 现场获取;3 网上订购;4 其他
联系方式* (37)	
源数据主键(38)	

## A.2 菌种资源描述

菌种资源描述内容可参见表 A.2~表 A.5。

表 A.2 肠杆菌科细菌菌种资源描述表

基本信息			
学名		中文名称	
资源归类编码		菌株保藏编号	
其他保藏机构编号		来源历史	
分离人		分离时间	
原始编号		鉴定人	
鉴定人所在单位		收藏时间	
原产国或地区		采集地区	
分离基培养物		采集地生境	
生物危害等级		培养基	
培养条件		培养时间	
模式菌株		分类地位	
生物学特征特性信息			
个体形态特征	形状		大小
	排列		鞭毛
	染色方法及结果		菌毛
	荚膜或包膜		其他形态特征



表 A.2 (续)

培养特性	生长培养条件		菌落大小		
	菌落形态		菌落表面		
	菌落边缘		动力		
	溶血		其他培养特性		
肠道杆菌科细菌的共同特性	氧化酶		触酶		
	还原硝酸盐		葡萄糖产酸产气		
	肠道菌共同抗原(ECA)				
种、属鉴别特性	靛基质		甲基红实验		
	V-P 实验		柠檬酸盐实验		
	赖氨酸脱羧酶		精氨酸双水解酶		
	鸟氨酸脱羧酶		硫化氢产生		
	尿素分解		苯丙氨酸脱氨酶		
	脂酶水解		DNA 水解酶(25℃)		
	发酵乳糖		明胶水解(22℃)		
	蔗糖		甘露醇		
	卫矛醇		水杨苷		
	肌醇		阿东醇		
	山梨醇		阿拉伯糖		
	棉子糖		鼠李糖		
	麦芽糖		木糖		
	海藻糖		蜜二糖		
	ONPG 实验		纤维二糖		
	氰化钾		七叶灵		
	粘液酸		酒石酸盐		
	丙二酸盐		葡萄糖胺利用实验		
	醋酸盐利用实验		其他:苦杏仁苷		
	抗原分型方法		感染致病性或毒性		
	抗原分型	O	传播途径		
	其他生理生化特性	结果	H		
			K		
致病与季节关系			传播方式		
组织嗜性			所致疾病地理分布		
对热的抵抗力			宿主致病病理变化		
对抗生素的敏感性			对消毒剂的敏感性		
免疫保护性		其他生理生化特性			
基因型信息	DNA 碱基组成 (G+Cmol%)		基因序列(GenBank 注册号)		
其他描述信息					
保藏方法					
图像信息					
参考文献					

表 A.3 弧菌科细菌菌种资源描述表

基本信息			
学名		中文名称	
资源归类编码		菌株保藏编号	
其他保藏机构编号		来源历史	
分离人		分离时间	
原始编号		鉴定人	
鉴定人所在单位		收藏时间	
原产国或地区		采集地区	
分离基培养物		采集地生境	
生物危害等级		培养基	
培养条件		培养时间	
模式菌株		分类地位	
生物学特征特性信息			
菌体形态特征	形状		大小
	排列		鞭毛
	染色方法及结果		菌毛
	荚膜或包膜		其他形态特征
培养特性	生长培养条件		菌落大小
	菌落形态		菌落表面
	菌落边缘		动力
	溶血		其他培养特性
弧菌科细菌的共同特性	氧化酶		Na <sup>+</sup> 刺激生长
	还原硝酸盐		葡萄糖产酸产气
	在 TCBS 上生长		触酶
种、属鉴别特性	脲基质		甲基红实验
	V-P 实验		弹性硬蛋白酶
	赖氨酸脱羧酶		精氨酸双水解酶
	鸟氨酸脱羧酶		淀粉酶
	43℃生长		明胶酶
	七叶苷		脂酶
	乳糖		甘露糖
	蔗糖		甘露醇
	卫矛醇		水杨苷
	肌醇		阿东醇
	山梨醇		阿拉伯糖
	棉子糖		鼠李糖
	麦芽糖		木糖
	海藻糖		蜜二糖
	ONPG 实验		0/129
纤维二糖		150 μg	

表 A.4 乳杆菌、乳球菌属、链球菌属、肠球菌属菌种资源描述表

基本信息																
拉丁学名				中文名称												
资源归类编码				菌株保藏编号												
其他保藏机构编号				来源历史												
分离人				分离时间												
原始编号				鉴定人												
原产国				收藏时间												
分离基物				采集地区												
生物危害等级				培养基												
模式菌株				培养温度												
生物学特征特性信息																
表型信息	个体形态特征	革兰氏染色		阳性		阴性		生理特征	需氧性	兼性厌氧生长						
		细胞形状	杆状							微好氧生长						
			球状							厌氧生长						
			多形态													
		细胞排列方式	成对				温度生长实验/℃		0%							
			成链						10%							
			四联						15%							
			鞭毛(运动性)						35%							
		形成内生芽孢					45%									
		生化特性	接触酶			氧化酶				NaCl 生长实验	4%					
	精氨酸水解			V-P 实验			7.5%									
	葡萄糖产气			葡萄糖酸钠			8%									
	碳水化合物产酸:			F6PPK 酶			10%									
	葡萄糖			松三糖			18%									
	葡萄糖酸钠			蜜二糖			4.5%									
	苦杏仁苷			棉子糖			7.0%									
	阿拉伯糖			鼠李糖			9.2%									
	纤维二糖			核糖			9.6%									
	七叶灵			水杨苷												
	代谢产物	果糖			山梨醇			L-乳酸								
半乳糖			蔗糖			D-乳酸										
乳糖			海藻糖				DL-乳酸									
麦芽糖			木糖						乙酸							
甘露醇			淀粉							乳酸:乙酸						
甘露糖			菊糖								m-DAP	Orn				
甘油			凝固酶									L-Lys	MK-7			
													MK-8	MK-9		
														主要脂肪酸		
基因型信息		G+Cmol%		16SrRNA 基因序列(Genbank 注册号)												
其他特征信息		与人类的关系		血清反应		抗生素敏感实验										

表 A.5 假单胞菌科、产碱杆菌科细菌菌种资源描述表

基本信息			
学名		中文名称	
资源归类编码		菌株保藏编号	
其他保藏机构编号		来源历史	
分离人		分离时间	
原始编号		鉴定人	
鉴定人所在单位		收藏时间	
原产国或地区		采集地区	
分离基培养物		采集地生境	
生物危害等级		培养基	
培养条件		培养时间	
模式菌株		分类地位	
生物学特征特性信息			
菌体形态特征	形状	大小	
	排列	鞭毛	
	染色方法及结果	菌毛	
	荚膜或包膜	其他形态特征	
培养特性	生长培养条件	菌落大小	
	菌落形态	菌落表面	
	菌落边缘	动力	
	溶血	其他培养特性	
假单胞菌科、产碱杆菌科共同特性	氧化酶	触酶	
	需氧生长	葡萄糖产酸产气	
种、属鉴别特性	42℃生长	4℃生长	
	靛基质	亚硝酸盐还原	
	V-P 实验	硝酸盐还原	
	赖氨酸脱羧酶	精氨酸双水解酶	
	鸟氨酸脱羧酶	硫化氢产生	
	尿素	O/F	
	果糖	柠檬酸盐	
	乳糖	明胶水解	
	蔗糖	甘露醇	
	卫矛醇	水杨苷	
	肌醇	阿东醇	
	山梨醇	阿拉伯糖	
	棉子糖	鼠李糖	
	麦芽糖	木糖	
	海藻糖	蜜二糖	
	ONPG 实验	纤维二糖	
氰化钾	七叶灵		

表 A.5 (续)

种、属鉴别特性	DNA 酶		麦康凯生长	
	丙二酸盐		苯丙氨酸脱氨酶	
	色素		其他	
	抗原分型方法		感染致病性或毒性	
	抗原分型 结果	O		传播途径
H				
K				
其他生理 生化特性	致病与季节关系		传播方式	
	组织嗜性		所致疾病地理分布	
	对热的抵抗力		宿主致病病理变化	
	对抗生素的敏感性		对消毒剂的敏感性	
	免疫保护性			
基因型信息	DNA 碱基组成 (G+Cmol%)		基因序列(GenBank 注册号)	
其他描述信息				
保藏方法				
图像信息				
参考文献				

**附 录 B**  
**(规范性附录)**  
**定期移植法**

**B.1 设备与材料**

- B.1.1 高压灭菌器。
- B.1.2 玻璃试管。
- B.1.3 培养箱:30℃~37℃,25℃~28℃。
- B.1.4 冰箱:4℃~6℃。

**B.2 培养基制备**

- B.2.1 培养基选择与制备参见附录 G。
- B.2.2 根据需要选择适宜的培养基,并按照相应培养基制备要求调节 pH 值和高压灭菌。
- B.2.3 培养基配方既要保证菌种细胞生长良好,又要使碳水化合物的浓度在可能的范围内应尽量降低,培养基器皿宜采用胶塞以防止培养基干燥脱水或棉塞霉变,适宜时在培养基表面加一层液体石蜡。

**B.3 接种**

以无菌操作将菌株纯培养物接种到固体培养基(斜面)或液体培养基中,接种固体培养基可采用点接、划线或穿刺等方法。

**B.4 培养**

在所保藏菌种的最适培养条件下将细胞培养至稳定期或成熟期,并进行纯度检查。

**B.5 保藏**

培养好的菌种于 4℃~6℃保存,也有需室温保存的菌种,如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)需在室温(25℃)下保存。

**B.6 保藏周期**

- B.6.1 每 3 个~6 个月移植一次。某些菌种,如芽裂酵母、阿舒假囊酵母、棉病囊霉等,应 1 个~3 个月移植一次。
- B.6.2 宜保藏于相对湿度为 50%~70%的环境中。

## B.7 注意事项

注意事项包括：

- a) 在生物安全柜中进行菌种保存和复苏等操作；
- b) 保存过程中棉塞易发霉或污染，可在接种培养后用胶塞封存；
- c) 反复传代后，菌株可能发生变异，在使用前应确认，并定期进行生化特性检查；
- d) 斜面菌种应保藏相继三代的培养物以便对照，防止因意外和污染的损失。



附录 C  
(规范性附录)  
液体石蜡法

C.1 设备与材料

- C.1.1 高压灭菌器。
- C.1.2 干燥箱;40℃或160℃~170℃。
- C.1.3 培养箱;30℃~37℃,25℃~28℃。
- C.1.4 玻璃试管。
- C.1.5 液体石蜡;化学纯。

C.2 液体石蜡的准备

C.2.1 选用优质化学纯液体石蜡,将液体石蜡分装到试管中,加塞,并用牛皮纸包好,采用以下两种方式进行灭菌:

- a) 121℃湿热灭菌30 min,置40℃恒温箱中干燥3 d,或170℃条件下干燥1 h~2 h蒸发水分,直至澄清透明;
- b) 160℃干热灭菌2 h。

C.2.2 将灭菌的液体石蜡冷却至室温,进行无菌检查,如有杂菌应重新灭菌。

C.3 斜面培养物的制备

见附录 B。

C.4 灌注石蜡

将无菌的液体石蜡在无菌条件下注入刚培养好的新鲜斜面培养物上,液面高出斜面顶部1 cm左右,使菌体与空气隔绝。

C.5 保藏

注入液体石蜡的菌种斜面以直立状态置低温(4℃~6℃)干燥处保存,也有需室温保存的菌种,如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)需在室温(25℃)下保存。

C.6 保藏周期

- C.6.1 保藏时间2年~10年。
- C.6.2 保藏期间应定期检查,当液体石蜡减少露出培养基斜面时,应及时补充灭菌的液体石蜡。如发现异常应重新培养后补上空缺。

### C.7 恢复培养

常用培养基参见附录 G。恢复培养时,挑取少量菌体转接在适宜培养基上,生长繁殖后,挑取单菌落再重新转接一次。

### C.8 注意事项

注意事项包括:

- a) 在生物安全柜中进行菌种保存和复苏等操作;
- b) 在使用接种环操作时,液体石蜡可能与培养物一同飞溅,应注意防护;
- c) 液体石蜡为易燃化学品,使用过程中应注意防火。



**附 录 D**  
**(规范性附录)**  
**瓷珠保藏法**

**D.1 设备与材料**

- D.1.1 低温冰箱：-70℃。
- D.1.2 高压灭菌器。
- D.1.3 多孔玻璃珠(或素烧瓷珠)：直径2 mm~3 mm。
- D.1.4 商业化细胞冻存管(可选)。

**D.2 操作步骤**

- D.2.1 将直径为2 mm~3 mm的瓷珠分装到小螺帽瓶中(每瓶最多装30粒)制成冷冻管，高压灭菌。
- D.2.2 标记冷冻管。
- D.2.3 在无菌状态下打开冷冻管。
- D.2.4 在所保藏菌种的最适培养条件下将细胞培养至稳定期或成熟期，进行纯度检查后，将菌株新鲜培养物加入到培养基中制成混悬液，无菌操作将混悬液转入到冷冻管中。
- D.2.5 封好冷冻管并颠倒四至五次乳化菌种培养基混悬液。切勿涡旋振荡。
- D.2.6 菌种吸附于瓷珠上后，将多余的混悬液吸出。
- D.2.7 也可使用商业化的细胞冻存管，此时应按照产品说明书进行操作。

**D.3 保藏**

将冷冻管存于-70℃。

**D.4 保藏周期**

可保存10年。

**D.5 恢复培养**

- D.5.1 常用培养基参见附录G。在无菌条件下打开冷冻管，用无菌针或接种环取出一粒瓷珠。封好冷冻管并尽快将其送回低温条件下保存。
- D.5.2 菌种保藏瓷珠可直接接种于固体培养基或适量的液体培养基中。

**D.6 注意事项**

注意事项包括：

- a) 为使菌种长期稳定保存，在冷冻管使用过程中要注意无菌操作；
- b) 在生物安全柜中进行菌种保存和复苏等操作；
- c) 在处理应用过的冷冻管时应注意生物安全。

**附 录 E**  
**(规范性附录)**  
**冷冻干燥保藏法**

### **E.1 设备与材料**

- E.1.1 低温冰箱： $-40\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- E.1.2 程序控制降温仪(选配)。
- E.1.3 冷冻干燥机。
- E.1.4 高压灭菌器。
- E.1.5 冷冻干燥管或安瓿管。

### **E.2 冷冻干燥管的选择与清洗**

#### **E.2.1 冷冻干燥管的选择**

冷冻干燥管一般采用耐温度骤变,耐压,管壁厚度均一并且为中性玻璃的安瓿管。管的内径为8 mm左右,长度不小于100 mm。

#### **E.2.2 冷冻干燥管的清洗**

清洗安瓿管时,先用2%盐酸浸泡过夜,然后用自来水冲洗三次以上,最后用蒸馏水冲洗,浸泡至pH中性,然后干燥。

### **E.3 标签的准备**

#### **E.3.1 管外侧标记**

常用以下两种方式:

- 采用标签机直接在安瓿管上打印菌种编号,保藏日期,大小为 $1\text{ cm}\times 3\text{ cm}$ 左右。
- 将胶布剪成大约1 cm宽, $3\text{ cm}\sim 4\text{ cm}$ 长的小条,在上面填写菌种编号,保藏日期,贴在安瓿管外。

#### **E.3.2 管内标记法**

选择滤纸或吸水纸(大小为 $1\text{ cm}\times 3\text{ cm}$ 左右)记录菌种的编号,保藏日期,然后装入安瓿管内。

### **E.4 保护剂的选择和准备**

保护剂用来减少冷冻干燥引起的微生物细胞的损伤。保护剂的选择与配制因所保藏的菌种的不同有所变化。配制保护剂时应注意保护剂材料的搭配,保护剂的浓度及pH(一般保护中性)。常用的保护剂为脱脂乳。一般微生物保存常用的保护剂参见附录H。厌氧微生物冷冻干燥所用的保护剂在使用前应在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的沸水中煮沸15 min左右,脱气后放入冷水中急冷,以除掉保护剂中的溶解氧。

## E.5 菌种的准备

### E.5.1 一般要求

在所保藏菌种的最适培养条件下将细胞培养至稳定期或成熟期,进行纯度检查后与保护剂混合均匀,分装。

### E.5.2 用斜面培养物制备菌液

取 1 mL~2 mL 保护剂,加到试管斜面培养物上,用较长的滴管轻轻涂擦斜面,制备均匀的细胞悬液,注意不宜泡沫过多或刺挖琼脂。然后尽快分装到安瓿管中。

### E.5.3 用液体培养物制备菌液

离心收集液体培养物中的菌体,弃去上清液,加入保护剂(每毫升培养物加 1 mL~2 mL)。将培养物与保护剂混匀,分装于管内。此方法适用于冷冻干燥和低温冷冻法。

### E.5.4 其他方法

培养物的平皿培养形成菌落后,用无菌打孔器从平板上切取大小均匀的直径约 5 mm~10 mm 的菌块(对真菌来说,最好取菌落边缘的菌块),与保护剂混匀后加入管内或冻存管内。此方法适用于低温冷冻法。

## E.6 分装与加棉塞

分装菌液应在无菌条件下操作。采用较长的滴管,直接将菌液滴入安瓿管或冻存管底部,注意不要溅污上部管壁,每管分装量约 0.1 mL~0.2 mL。若是球形安瓿管,装量为半个球部。一般 2 mL~2.5 mL 菌液可以分装 10 个~15 个安瓿管。分装后用脱脂棉堵住安瓿管管口,注意不要过紧或过松。分装时间尽量要短,最好在 1 h~2 h 内分装完毕并预冻。

## E.7 预冻

一般预冻 2 h 以上,温度达到 $-40^{\circ}\text{C}$ 左右。目前常用降温方法有以下三种:

- 程序控温降温法。应用程序控制降温仪,可以稳定连续降温,能很好地控制降温速率;
- 冷冻干燥机自行冷冻。某些冷冻干燥机具有冷冻功能,在真空泵不开启的情况下,可将菌种冷冻到 $-40^{\circ}\text{C}$ 左右;
- 将菌种放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冻。预冻速度控制在每分钟下降 $1^{\circ}\text{C}$ ,使样品冻结到 $-35^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 。

## E.8 冷冻干燥

采用冷冻干燥机进行冷冻干燥。将预冻后的样品安瓿管迅速置于已充分预冷的冷冻干燥机样品舱内,关闭放气阀,打开真空泵开始冷冻干燥,接近干燥完成时,适当升温(按冷冻干燥机的具体要求进行操作),确认冷冻干燥完毕后,缓慢打开放气阀,取出样品管置于干燥器内,备用。冷冻干燥时间一般为 8 h~20 h。判断冷冻干燥已完全的指标:

- 管内冻干物呈酥松块状或松散片状;



- b) 真空度接近空载时的最高值；
- c) 冷冻干燥机显示的样品温度与舱内温度接近；
- d) 蒸馏水对照管中的水分已完全挥发掉或 1%~2%氯化钴的对照管已呈深蓝色。

#### E.9 安瓿管封口及真空检验

从干燥器中取出冷冻干燥完全的安瓿管,在距管口 5 cm 左右用喷射火焰(喷灯,焊枪)将管拉细,然后将管口连接到与真空安瓿管泵相连的橡皮管上,打开真空泵,在真空下(一般真空度达到 0.13 Pa),用喷射火焰对准管细颈部加热熔封。熔封后的干燥管可采用高频电火花真空测定仪检测真空度。

#### E.10 保藏

封口完全的冷冻干燥管保存于 4℃~10℃。

#### E.11 质量检查

一般封口后 1 d、7 d、30 d 随机抽取若干支冷冻干燥管进行各项指标检查,如存活率、生产能力、形态变异、杂菌污染等。

#### E.12 保藏周期

一般在 10 年左右。

#### E.13 复苏方法

先用 70%酒精棉擦拭管的上部,将管顶部烧热,用无菌棉签沾灭菌水,在顶部擦一圈,顶部出现裂纹,用锉刀或镊子颈部轻叩一下,敲下已开裂的管的顶端。或直接用玻璃刀划开用灭菌水或培养液溶解菌块,使用无菌吸管移入新鲜培养基,进行培养。常用培养基参见附录 G。

#### E.14 注意事项

注意事项包括:

- a) 在生物安全柜中进行菌种保存和复苏等操作；
- b) 安瓿管应采用优质的硬质玻璃；
- c) 保存芽孢菌时,在安瓿管的开口部分塞入无菌棉；
- d) 保存操作完成后,应对冷冻干燥机进行消毒。

**附 录 F**  
**(规范性附录)**  
**低温冷冻保藏法**

**F.1 设备与材料**

- F.1.1 高压灭菌器。
- F.1.2 低温冰箱： $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- F.1.3 安瓿管或冻存管。
- F.1.4 液氮罐。

**F.2 液氮超低温保藏技术**

**F.2.1 安瓿管或冻存管的准备**

宜选用耐温度骤变,耐压,管壁厚度均一并且为中性玻璃的安瓿管,或螺旋口的塑料冻存管。注意玻璃管不能有裂纹。清洗安瓿管时,先用2%盐酸浸泡过夜,然后用自来水冲洗三次以上,最后用蒸馏水冲洗,浸泡至pH中性,然后干燥。塑料冻存管用蒸馏水浸泡,冲洗干净,干燥即可,然后在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌15 min~20 min或 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干热灭菌2 h,备用。

**F.2.2 标签的准备**

安瓿管或塑料冻存管的标记一般采用专用非水溶性记号笔,记录菌种编号,保藏日期。

**F.2.3 保护剂的选择与准备**

保护剂种类要根据微生物类别选择。配制保护剂时,要注意其浓度,一般采用10%~20%甘油。参见附录H。

**F.2.4 菌种的准备**

**F.2.4.1 菌种准备**

见附录E.5。

**F.2.4.2 菌液分装**

菌液分装参见E.6。若用安瓿管分装菌液,在分装完毕后应在距管口5 cm左右用喷射火焰(喷灯,焊枪等)将其熔封,若用冻存管分装的,应立即拧紧螺帽。

**F.2.4.3 预冻**

预冻时,冷冻速度一般控制在每分钟下降 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,冻结到 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,参见E.7。

**F.2.5 保藏**

将安瓿管或塑料冻存管置于液氮罐中保藏。一般气相温度为 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,液相温度为 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。



### F.2.6 保藏周期

一般 10 年以上。

### F.2.7 复苏方法

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱或液氮中取出冻存管,立即放置在 $38\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温水中快速复苏并适当摇动,直到内部结冰全部溶解为止,一般需 $50\text{ s}\sim 100\text{ s}$ 。在无菌条件下开启塑料冻存管,将管内保藏物接种至适宜的培养基上进行培养。常用培养基参见附录 G。

### F.2.8 液氮保藏应注意事项

注意事项包括:

- a) 防止操作人被冻伤,操作时应注意安全,戴面罩及皮手套;
- b) 若用塑料冻存管保藏,一定要拧紧螺帽;
- c) 运送液氮时一定要用专用特制的容器,绝不可用一般密闭容器存放或运输液氮,切勿使用保温瓶存放液氮;
- d) 存放液氮的容器的室内要注意通风,防止过量氮气使人窒息;
- e) 防止安瓿管破裂爆炸。如液氮渗入管内,当从液氮容器中取出时,液态氮体积将膨胀约 680 倍,爆炸力很大,要特别小心;
- f) 注意观察液氮容器中液氮的残存量,定期填充液氮。

## F.3 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冷冻保藏

### F.3.1 安瓿管或冻存管的准备

宜选用耐温度骤变,耐压,管壁厚度均一并且为中性玻璃的安瓿管,或螺旋口的塑料冻存管。注意玻璃管不能有裂纹。清洗安瓿管时,先用 2% 盐酸浸泡过夜,然后用自来水冲洗三次以上,最后用蒸馏水冲洗,浸泡至 pH 中性,然后干燥。塑料冻存管用蒸馏水浸泡,冲洗干净,干燥即可,然后在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌 $15\text{ min}\sim 20\text{ min}$ 或 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干热灭菌 2 h,备用。

### F.3.2 标签的准备

塑料冻存管的标记一般为管外标记,即用专用非水溶性记号笔标记菌种编号,保藏日期。

### F.3.3 保护剂的选择与准备

保护剂种类要根据微生物类别选择。配制保护剂时,要注意其浓度,一般采用 $10\%\sim 20\%$ 甘油。参见附录 H。

### F.3.4 菌种的准备

见附录 E.5。

### F.3.5 菌液的分装

菌液分装参见 E.6。

### F.3.6 保藏

将安瓿管或冻存管置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保藏。

**F.3.7 保藏周期**

一般1年~2年。

**F.3.8 复苏方法**

见F.2.7。常用培养基参见附录G。

附 录 G  
(资料性附录)  
常用培养基

## G.1 营养琼脂

### G.1.1 成分

牛肉浸出汁	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
氯化钠	8.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### G.1.2 制法

按培养要求适当调整成分,除琼脂外,将其他各成分加热煮沸溶解冷却后,调节 pH 至 6.6~7.0,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

### G.1.3 适用菌种

适用于大部分菌种,如沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella* spp.)、耶尔森氏菌属(*Yersinia* spp.)、葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* spp.)、节杆菌属(*Arthrobacter* spp.)、微球菌属(*Micrococcus* spp.)、微杆菌属(*Microbacterium* spp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、气单胞菌属(*Aeromonas* spp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、棒状杆菌属(*Corynebacterium* spp.)、爱德华氏菌属(*Edwardsiella* spp.)、肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)等。

## G.2 营养肉汤

### G.2.1 成分

牛肉浸出汁	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### G.2.2 制法

按培养要求适当调整成分,将各成分加热溶解冷却后,调节 pH 至 6.6~7.0,121 °C 灭菌 15 min。

## G.3 埃希氏菌属培养基

### G.3.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	1.0 g

氯化钠	8.0 g
10%葡萄糖	10.0 mL
1 mol/L 氯化钙	2.0 mL
维生素 B <sub>1</sub> (10 mg/mL)	1.0 mL
琼脂	15.0 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

### G.3.2 制法

将胰蛋白胨、酵母浸膏、氯化钠在蒸馏水中加热溶解后,调节 pH 至 7.0~7.4,加入琼脂,121 ℃灭菌 15 min,再将 10%葡萄糖溶液、1 mol/L 氯化钙溶液与维生素 B<sub>1</sub> (10 mg/mL)溶液混合,0.2 μm 滤膜过滤除菌后加入上述灭菌培养基中,混匀备用。

### G.3.3 适用菌种

埃希氏菌属(*Escherichia* spp.)。

## G.4 哥伦比亚琼脂

### G.4.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
胨蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
牛心浸粉	3.0 g
玉米淀粉	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### G.4.2 制法

除琼脂外,将其他各成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 至 7.1~7.5,加入琼脂,121 ℃灭菌 15 min。

### G.4.3 适用菌种

志贺氏菌属(*Shigella* spp.)。

## G.5 M. R. S. 琼脂

### G.5.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	8.0 g
酵母浸膏	4.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温-80	1.0 mL
柠檬酸三铵	2.0 g

三水合乙酸钠	5.0 g
七水合硫酸镁	0.2 g
四水合硫酸锰	0.05 g
磷酸氢二钾	2.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### G.5.2 制法

除琼脂外,将其他各成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 至 6.0~6.4,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

#### G.5.3 适用菌种

肠球菌属(*Enterococcus* spp.)、乳杆菌属(*Lactobacillus* spp.)、乳球菌属(*Lactococcus* spp.)。

### G.6 葡萄球菌培养基

#### G.6.1 成分

蛋白胨	6.0 g
酪胨	4.0 g
酵母浸膏	3.0 g
牛肉浸出汁	1.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### G.6.2 制法

除琼脂外,将其他各成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 至 6.4~6.8,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

#### G.6.3 适用菌种

葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)。

### G.7 链球菌培养基

#### G.7.1 成分

酵母浸膏	2.5 g
胰蛋白胨	2.5 g
磷酸氢二钾	3.8 g
葡萄糖	4.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### G.7.2 制法

除琼脂外,将其他各成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 至 7.4~7.8,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

### G.7.3 适用菌种

链球菌属(*Streptococcus* spp.)。

## G.8 假单胞菌属培养基

### G.8.1 成分

磷酸氢二钾	2.5 g
磷酸二氢钾	2.0 g
氯化铵	1.0 g
七水合硫酸镁	0.5 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### G.8.2 制法

将琼脂在 500 mL 蒸馏水中加热溶解后,121℃灭菌 15 min,置水浴中恒温至 55℃;再将其他成分在 500 mL 蒸馏水中溶解,0.2 μm 滤膜过滤除菌,调节 pH 至 6.6~7.0,加热至 55℃后,加入上述灭菌培养基中,混匀备用。

### G.8.3 适用菌种

假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)。

## G.9 芽孢杆菌培养基

### G.9.1 成分

多价蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
可溶淀粉	30.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### G.9.2 制法

除琼脂外,将其他各成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 至 7.0~7.4,加入琼脂,121℃灭菌 15 min。

### G.9.3 适用菌种

芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)。

## G.10 海水琼脂

### G.10.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	1.0 g

柠檬酸铁铵	0.1 g
氯化钠	19.45 g
六水合氯化镁	8.8 g
硫酸钠	3.24 g
二水合氯化钙	2.38 g
氯化钾	0.55 g
碳酸氢钠	0.16 g
溴化钾	80.0 mg
六水合氯化锶	57.0 mg
硼酸	22.0 mg
五水合偏硅酸钠	4.0 mg
氟化钠	2.4 mg
硝酸铵	1.6 mg
十二水合磷酸氢钠	20 mg
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

#### G. 10.2 制法

将各成分除琼脂外加入蒸馏水中加热溶解,调节 pH 至 7.4~7.8,将琼脂加入,121 °C 灭菌 15 min。

#### G. 10.3 适用菌种

弧菌属(*Vibrio* spp.)。

### G. 11 3%氯化钠营养琼脂

#### G. 11.1 成分

牛肉浸出汁	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
氯化钠	30.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### G. 11.2 制法

除琼脂外,将其他各成分加热煮沸溶解冷却后,调节 pH 至 6.6~7.0,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

### G. 12 脑心浸液琼脂

#### G. 12.1 成分

小牛脑浸出粉	7.7 g
牛心浸汁	9.8 g
蛋白胨	10.0 g



氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
葡萄糖	2.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### G. 12.2 制法

将除琼脂外的各成分在蒸馏水中加热溶解,调节 pH 至 7.2~7.6,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

#### G. 12.3 适用菌种

李斯特氏菌属 (*Listeria* spp.)、阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)、巴斯德氏菌属 (*Pasteurella* spp.)。

### G. 13 脑心浸液

#### G. 13.1 成分

小牛脑浸出粉	7.7 g
牛心浸汁	9.8 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
葡萄糖	2.0 g

#### G. 13.2 制法

将各成分在蒸馏水中加热溶解,调节 pH 至 7.2~7.6,121 °C 灭菌 15 min。

### G. 14 胰酪胨大豆琼脂(TSA)

#### G. 14.1 成分

胰蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

#### G. 14.2 制法

除琼脂外于蒸馏水中加热溶解,调节 pH 值至 7.1~7.5,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

#### G. 14.3 适用菌种

弯曲菌(*Campylobacter* spp.)。

## G. 15 梭菌强化培养基

## G. 15.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉浸出汁	10.0 g
酵母浸出汁	3.0 g
葡萄糖	5.0 g
氯化钠	5.0 g
可溶淀粉	1.0 g
L-半胱氨酸盐酸盐	0.5 g
乙酸钠	3.0 g
蒸馏水	1 000 mL

## G. 15.2 制法

将除蒸馏水以外各成分加热溶解后,调节 pH 至 6.6~7.0,121 ℃ 灭菌 15 min。

## G. 15.3 适用菌种

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)等梭菌属菌种。

## G. 16 双歧杆菌培养基

## G. 16.1 成分

## a) 基础成分

大豆蛋白胨	5.0 g
胰胨	5.0 g
酵母提取物	10.0 g
葡萄糖	10.0 g
半胱氨酸盐酸盐	0.5 g
0.1%刃天青	1.0 mL
琼脂	15.0 g
微量盐溶液	40.0 mL
蒸馏水	960 mL

## b) 微量盐溶液

氯化钙	0.2 g
七水合硫酸镁	0.48 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
碳酸氢钠	10.0 g
氯化钠	2.0 g
蒸馏水	40.0 mL

### G. 16.2 制法

除琼脂外,将其他各成分加热煮沸溶解冷却后,调节 pH 至 6.8~7.2,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

### G. 16.3 适用菌种

双歧杆菌属(*Bifidobacterium* spp.)。

## G. 17 Penessay 琼脂

### G. 17.1 成分

牛肉提取物	1.5 g
酵母提取物	1.5 g
胰蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠	3.5 g
磷酸氢二钾	4.8 g
磷酸二氢钾	1.32 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### G. 17.2 制法

除琼脂外,将其他各成分加热煮沸溶解冷却后,调节 pH 至 7.0~7.4,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

### G. 17.3 适用菌种

爱德华氏菌属(*Edwardsiella* spp.)。

## G. 18 蔗糖琼脂

### G. 18.1 成分

蔗糖	130.0 g
蛋白胨	2.0 g
磷酸二氢钾	0.3 g
磷酸氢二钠	1.4 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### G. 18.2 制法

除琼脂外,将其他各成分加热煮沸溶解冷却后,调节 pH 至 7.0~7.2,加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min。

### G. 18.3 适用菌种

肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)。

## G. 19 麦芽汁琼脂

### G. 19.1 成分

2Brix 麦芽汁	1 000 mL
琼脂	15.0 g

### G. 19.2 制法

将上述成分混合均匀,加热溶解后,121 ℃灭菌 15 min。

### G. 19.3 适用菌种

大部分酵母菌。

## G. 20 PDA 培养基

### G. 20.1 成分

马铃薯提取液	1 000 mL
葡萄糖	20.0 g
琼脂	15.0 g

### G. 20.2 制法

将上述成分混合均匀,加热溶解后,121 ℃灭菌 15 min。

### G. 20.3 适用菌种

大部分霉菌,如犁头霉属(*Absidia* spp.)、放射毛霉属(*Actinomucor* spp.)、毛霉属(*Mucor* spp.)、根霉属(*Rhizopus* spp.)、丝枝霉属(*Aphanocladium* spp.)、链格孢属(*Alternaria* spp.)、头孢属(*Cephalosporium* spp.)、毛壳属(*Chaetomium* spp.)、卷霉属(*Circinella* spp.)、镰孢属(*Fusarium* spp.)。

## G. 21 Czapek's 琼脂

### G. 21.1 成分

蔗糖	30.0 g
硝酸钠	3.0 g
七水合硫酸镁	0.5 g
氯化钾	0.5 g
七水合硫酸亚铁	0.01 g
磷酸氢二钾	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### G. 21.2 制法

除琼脂外,将其他各成分加热煮沸溶解冷却后,调节 pH 至 6.0~6.5,加入琼脂,121 ℃灭菌 15 min。

### G.21.3 适用菌种

部分霉菌,如曲霉属(*Aspergillus* spp.)、青霉属(*Eupenicillium* spp.);一部分放线菌,如小单胞菌科(*Micromonosporaceae*)。

## G.22 葡萄糖、天门冬素培养基

### G.22.1 成分

葡萄糖	10.0 g
天门冬素	0.5 g
磷酸氢二钾	0.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### G.22.2 制法

除琼脂外,将其他各成分加热煮沸溶解冷却后,调节 pH 至 7.2~7.4,加入琼脂,121 ℃ 灭菌 15 min。

### G.22.3 适用菌种

部分放线菌,如游动放线菌属(*Actinoplanes* spp.)、北里孢菌属(*Kitasatosporia* spp.)、诺卡氏菌属(*Nocardia* spp.)。

**附 录 H**  
**(资料性附录)**  
**常用保护剂及制备方法**

## H.1 常用保护剂类型及种类

### H.1.1 酸性化合物

谷氨酸、天门冬氨酸、苹果酸等。

### H.1.2 中性化合物

葡萄糖、乳糖、蔗糖、棉子糖、山梨醇、木糖醇、肌醇等。

### H.1.3 高分子物质及分解物

白蛋白、明胶、各种豚、藻类等。

### H.1.4 天然混合物

脱脂乳、血清等。

### H.1.5 其他

抗坏血酸、羟胺等。

## H.2 保护剂的制备

### H.2.1 脱脂乳的准备:

- a) 直接采用牛奶作为保护剂时,一般采用离心法去除上层油脂,分装后用常压或高压法灭菌,常压法一般在100℃间歇煮沸2次~3次,每次10 min~30 min,高压法一般在116℃灭菌20 min;
- b) 将脱脂奶粉溶于蒸馏水,浓度为20%(质量浓度),然后116℃高压灭菌15 min~20 min。灭菌后于37℃培养24 h,检查是否灭菌彻底,检验无菌后置4℃冰箱中保存备用。脱脂乳易形成粉末状,冷冻干燥或开启安瓿管时,干燥菌有逸散的可能,不适用于用作毒性较高的病原菌的保护剂。

**H.2.2 10%~20%甘油的准备:**加甘油于蒸馏水,配制浓度为10%(体积分数)或20%(质量分数)的甘油,然后121℃高压灭菌15 min~20 min。

### H.2.3 血清的准备

一般采用马血清,可选用30 g 葡萄糖于400 mL 马血清中,然后用过滤法过滤除菌,备用。

---