

冷冻干燥法对固氮螺菌保藏及其 固氮活性(C₂H₂)的影响

李选成 张桂芝 张宏

(吉林省农科院土肥所)

材 料 和 方 法

(一) 菌株:

本室分离固氮螺菌10株即马唐₃、马唐₆、马唐₁₇、马唐₂₀、G₁、G₄、玉米₂、玉米₅、玉米₆、玉米₁₁，进行冷冻干燥保藏。

(二) 固氮螺菌冷冻干燥处理:

1. 保护剂: 脱脂牛乳的制备: 取新鲜牛奶经4,000转/分, 离心10分钟, 进行2次, 灭菌0.8磅/10分钟。

2. 固氮螺菌经冷冻干燥处理:

将10支用NFB培养基(琥珀酸5克、KOH4克、K₂HPO₄0.5g、MgSO₄·7H₂O 0.2g、NaCl0.1g、CaCl₂0.02g、FeSO₄·7H₂O0.01g、NaMoO₄·2H₂O0.002g、MnSO₄·H₂O0.01g水1立升, pH6.8, 琼脂1.75克, BTB(0.5%)2毫升, 培养的菌株在无菌条件下, 经牛乳保护剂的稀释。分装冻干管中在DF—01E型冻干机(予冻—拉冷—真空干燥—升华—真空熔封)处理即成保藏菌株样本。

(三) 经过保藏一年的菌株的几种培养特性及生理特性的观察与测定:

1. 采用半固体的NFB培养基观察表面下1—2毫米有无菌膜生成。

2. 固氮螺菌对不同碳源的利用和产酸情况, 以NFB培养基为基础, 碳源利用葡萄糖、核糖和果糖。

3. 石蕊牛乳接菌后的反应:

石蕊牛乳的配制: 新鲜牛乳加热脱脂, 称石蕊2.5克, 蒸馏水100毫升, 配成石蕊溶液。牛乳石蕊的比例为100:4, 灭菌0.6公斤/20分钟。

(四) 固氮活性的测定:

固氮螺菌在NFB半固体培养基中培养48—72小时。试管拔出棉花塞换上反口橡皮塞。加10%乙炔, 28℃保温培养6小时用气象色谱仪(102G型, 色谱柱填充物为GD×501, 柱温50—60℃, 氢火焰鉴定器)测定乙烯量, 用乙烯标准曲线计算。

结 果

(一) 真空冷冻干燥保藏后活性

10株固氮螺菌经冷冻干燥法保藏1年后均能移接成活。菌体特征无异常表现。但以斜面试管法保藏108天后移接均不生长, 结果见表1。

表1 10株固氮螺菌经冷冻干燥法保藏1年后存活比较

方法	保藏时间(天)	存活情况									
		马唐 ₂₀	马唐 ₁₇	马唐 ₁₅	马唐 ₃	玉米 ₂	玉米 ₃	玉米 ₆	玉米 ₁₁	G ₁	G ₄
斜面试管法	108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
冷冻干燥法	367	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

注：①“-”表示移接后不能生长，“++”表示生长但不好。

②马唐₂₀经48小时培养生长较弱，在96小时生长正常。

③“++++”表示生长良好。

从表1可以表明，10株固氮螺菌在室温下用冷冻干燥法保藏一年是可行的。相反在室温下斜面试管法保藏108天后便全部失活。同时也表明马唐₂₀在经冷冻干燥过程中有所变化。

(二) 培养特性的观察：

采用半固体的NFB培养基进行48小时培养观察结果如表2。结果表明上述10株菌株均能使培养基变碱，半固体培养基表面下1—2毫米，长一菌膜，同保藏前是一致的，唯马唐₂₀表现生长较慢。

表2 冻干后化膜情况的比较

菌株处理	马唐 ₂₀	马唐 ₁₇	马唐 ₁₅	马唐 ₃	玉米 ₂	玉米 ₃	玉米 ₆	玉米 ₁₁	G ₁	G ₄
冻干前	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
冻干后	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

注：马唐₂₀在48小时生长较差，在96小时生长正常。

(三) 几种理化性质比较

1. 在不同碳源上产酸情况比较：10株固氮螺菌经冻干法保藏后对葡萄糖、核糖和果糖利用中是否产酸同保藏前结果是一致的(见表3)。

2. 石蕊牛乳上生长情况结果：石蕊作酸、碱指示剂和氧化还原指示剂来测定上述10株菌株同保藏前反映结果的比较，表4的结果表明是比较一致。除马唐₂₀有部分变化，其余是正常的。

(四) 固氮活性的测定(C₂H₂-C₂H₄)法：

比较冷冻干燥后同冷冻干燥前还原乙炔的能力，表5的结果说明，经过冻干保藏仍能保持菌种的固氮活性，有的在冻干后活性下降有的升高，但总的趋势高的仍较高，低的仍较低。

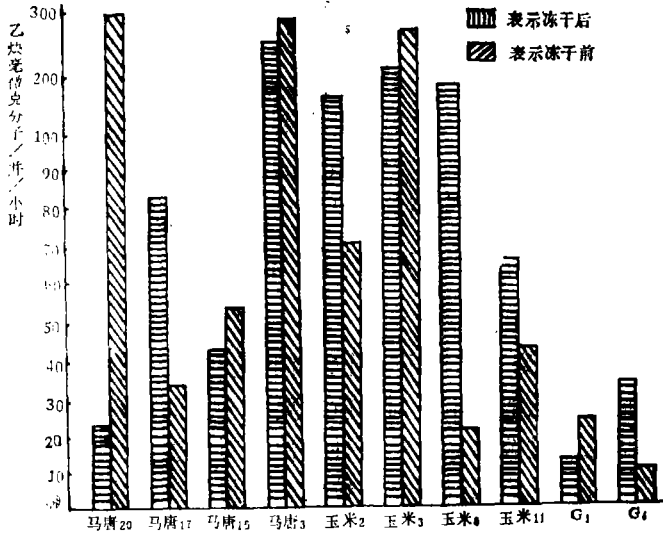
表3 在不同碳源上产酸情况比较

菌株	处理	葡萄糖	核糖	果糖
马唐 ₂₀	前后	-	+	+
马唐 ₁₇	前后	-	+	+
马唐 ₁₅	前后	-	+	+
马唐 ₃	前后	-	+	+
玉米 ₂	前后	-	+	+
玉米 ₃	前后	-	+	+
玉米 ₆	前后	-	+	+
玉米 ₁₁	前后	+	+	+
G ₁	前后	-	+	+
G ₄	前后	-	+	+

注：+为产酸，-为不产酸

菌株 处 理	马唐20	马唐17	马唐15	马唐3	玉米2	玉米3	玉米11	G ₁	G ₄
冷冻干燥前	微产碱	微产碱	微产碱	微产碱	微产碱	微产碱	还原	产碱	产碱
冷冻干燥后	——	微产碱	微产碱	微产碱	微产碱	微产碱	还原	产碱	产碱

注：马唐21表现不明显。



注：培养72小时乙炔还原6小时，此时马唐20生长微弱

图 还原乙炔能力比较

讨 论

本文对固氮螺菌在冻干保藏后部分生理生化性质进行研究，其中较令人感兴趣是在一年保藏试验后，仍具有较高的固氮活力，甚至各别菌菌株经保藏后还原乙炔能力有所增加。这就初步解决了固氮螺菌的保藏方法。可以推测出固氮螺菌在真空条件下，以牛乳为保护剂中的螺旋结构得以有相当稳定的构象，这与固氮螺菌具有半厌氧的特性的结果一致。此外马唐20比较冷冻前生长速度变慢，固氮活力下降并不意为整个固氮螺菌构象发生了完全不可逆的破坏，而只是发生了某种不利于冷冻条件中某种温度的变化，当温度适宜时，可以部分地恢复。冻干保藏后与冻干保藏前各项生物学指标基本一致，说明冻干法对固氮螺菌生物特性具有保护作用。