

菌种冷冻真空干燥保藏的研究简报*

李 选 成

(吉林省农科院土肥所)

菌种保藏工作是微生物学工作的一个重要组成部分。在生产上经常需要优良的菌株和特殊用的菌株，需要研究选择一种使它们生命力和活性不变的好方法。近几年来，对一些农用微生物如：大豆根瘤菌，自生固氮菌，磷细菌，黑曲霉，酵母，农抗产生菌“769”，庆丰霉素等进行菌种保藏方法的研究，取得了一定的结果。根据各类菌种的特性，分别用砂土、斜面低温、胶塞法、冷冻干燥法等方法进行保藏，现将部分菌种冷冻干燥保藏试验情况简介如下。

试 验 材 料 与 方 法

一、菌种

- (1) 细菌：大豆根瘤菌 C_s，美国大豆根瘤菌，自生固氮菌8004，自生固氮菌182—2，有机磷细菌Ea1，钾细菌1,153。
- (2) 放线菌：“5406”，庆丰霉素产生菌，“769”。
- (3) 霉菌：绿色本霉32.36，绿色本霉EA₃-867，黑曲霉3.4309。
- (4) 酵母菌：生香酵母，南阳混合酵母。
- (5) 担子菌：紫芝75，金顶蘑，香菇。

二、培养基

- (1) 细菌：77号无氮培养基，肉汁培养基。
- (2) 放线菌：高氏合成一号培养基。
- (3) 霉菌：土豆葡萄糖培养基。
- (4) 酵母菌：察氏培养基。
- (5) 担子菌：综合马铃薯培养基。

三、保护剂：脱脂牛奶

取新鲜牛奶，经离心机(3,000~4,000转/分)二次离心，每次10分钟，脱脂后分装于小三角瓶中，用8磅压力20分钟灭菌，备用。

四、菌种培养

用上述各类菌适合培养基进行接菌培养，细菌、霉菌、放线菌、酵母菌一般培养4天，担子菌10天。在无菌条件下，向培养管内注入10毫升脱脂牛奶(大约在每毫升内含有1亿个左右菌体)然后分装于冻干管中，每管以0.3~0.5毫升为宜。

*本试验承让守让副研究员指导，特此致谢。

五、冷冻真空干燥过程

采用DF—01E型冷冻真空干燥机(日本安宅产业株式会社制品), 首先进行预冻到零下20~22℃左右, 以记录仪表示恒定为好。拉冷到零下15~55℃, 抽真空到0.3~0.5torr, 升华到零上27~30℃左右, 逐步上升, 真空熔封口时真空度需保持在0.5torr, 至此结束全部过程。

六、存活检查

将经冷冻真空干燥而保藏的冷干管, 经过无菌操作, 移接到新鲜斜面肉汁培养基中, 进行培养观察有无杂菌。如有生长慢或者弱的菌株再移接到各种菌最适合的培养基上, 观察菌体生长情况。如有不生长者, 则进行重复, 以重复5次为止。若再不生长则说明该菌已死亡。

试验结果

对上述各类菌株用冷冻真空干燥法在常温下保藏, 分别于1979年、1980年及1981年检查存活情况, 结果见表1。

表1 各类菌株经冷冻干燥法保藏存活情况

类型	供试菌种	1979年	1980年	1981年
细菌	大豆根瘤菌C ₈	+	+	+
	美国大豆根瘤菌	+	+	+
	自生固氮菌8004	+	+	+
	自生固氮菌182-2	+	+	+
	有机磷细菌Eal	+	+	+
	钾细菌1.153	+	+	+
放线菌	"5465"	+	+	+
	"769"	+	+	+
	庆丰霉素产生菌	+	+	+
霉菌	绿色木霉32.36	+	+	+
	绿色木霉EAs-367	+	+	+
	黑曲霉3.4309	+	+	+
酵母	生香酵母	+	+*	+*
	南阳混合酵母	+	+	+
担子菌	金顶蘑	-	-	-
	紫芝75	-	-	-
	香菇	-	-	-

*生香酵母在真空熔封口时延长7小时, 吸入部分空气中水分。影响活力。(+)表示生长。(一)表示不生长。

结 语

(一) 经过3年测定结果认为, 低温冷冻真空干燥保藏法对细菌、放线菌、霉菌、酵母是一种长久、安全、可靠的好方法。至于上述各类菌最长保藏多久, 保藏菌种的生理生化特性变异如何, 均有待于今后继续观察试验。

(二) 担子菌用冷冻真空干燥法保藏(指菌株)是不适合的, 三个供试菌株测定结果无一成活, 分析原因可能是由于担子菌在人工培养基上产生气生菌丝, 经受不了外界温度急剧变化。

(三) 生香酵母经冻干保藏后测定结果反映生长缓慢。菌苔不规则, 分析原因可能因当初在真空熔封口时没有及时, 吸进部分空气中水分而影响保藏效果。

(四) 经过冷冻干燥试验结果初步分析, 认识到预冻温度、时间、真空度、升华温度上升的快、慢对不同类型微生物的存活都有影响。