

# 紫云英根瘤菌的冻干和保藏\*

蒋亚平 徐邦衡 夏秀琴

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

根瘤菌对豆科绿肥增产效果显著, 使用比较广泛。一般使用草炭作为该菌剂的保护剂以便保存其活力。但这种方法缺点较多, 草炭来源困难, 生产过程复杂, 劳动强度较大, 且易造成污染和运输不便等。为解决这些问题, 我们采用冷冻干燥法制备根瘤菌剂, 所得冻干制品成活率达 90% 以上, 经室温存放十三年之久, 仍具有良好的固氮性能。现将冷冻干燥条件及保护剂的选择试验结果报告如下。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌种

紫云英根瘤菌 (*Rhizobium astragali*) 111 号(本所 1963 年筛选)

### (二) 保护剂

1. 死菌体: 111 号菌种经液体培养 6 天, 高压灭菌即得。

2. 10% 蔗糖 + 2% 明胶, 明胶配制后于 15 磅 30 分钟灭菌二次。

3. 10% 葡萄糖 + 2% 明胶。

4. 10% 乳糖 + 2% 明胶。

5. 10% 蔗糖。

6. 黄豆芽汁。

### (三) 菌液

用 111 号菌种, 接种于蔗糖酵母膏液体培养基浅层培养 6 天。

### (四) 菌液的分装

分装前在无菌条件下先将菌液与保护剂按 1:1 混合均匀, 然后用注射器准确吸取 1ml 加入容积为 3ml 的安瓿中。

### (五) 冷冻干燥过程

用 Rp-10 冻干机预冷 2 小时(预冷温度须低于制品的共熔点), 升华脱水 6 小时左右, 整个冻干过程在 8—10 小时内完成。

### (六) 真空封口

冷冻干燥后, 取出冻干制品放置干燥器内并迅速进行真空封口, 以免制品再吸水。

### (七) 检定方法

1. 测定冻干制品成活率: 用平板计数法。

2. 检查冻干制品真空度: 用高频火花真空测验器测定, 呈乳白色者为真空度好。

3. 测定冻干制品含水量: 用 Kare Fishbein 法<sup>[1]</sup>, 冻干制品含水量一般低于 3%。

冻干后物理性状疏松且体积不变, 并于加水后迅速溶解者, 菌的成活率高。相反, 若冻干

\* 此研究是在陈华癸教授指导下进行的, 工作中曾得到武汉生物制品所陈贻工程师的指导和帮助, 特此致谢。

制品体积萎缩、出现硬壳、加水不易溶解者，菌的成活率低，表明冻干过程中有自溶现象，这可能由于第一阶段干燥温度高出制品共融点所致。

## 试验结果

### 一、不同保护剂对冻干制品成活率的影响

表 1 不同保护剂对冻干制品成活率的影响

保护剂	菌液含菌数 (亿/ml)		成活率%
	冻干前	冻干后	
死菌体 (D)	19.2	18.7	97
	38.0	38.0	100
10% 蔗糖 + 2% 明胶 (A)	20.2	14.3	71
10% 葡萄糖 + 2% 明胶	18.3	14.6	80
	21.0	3.5	16
10% 蔗糖	21.0	2.6	12
豆芽汁	25.0	16	64
	20.0	9.6	48
10% 乳糖 + 2% 明胶	18.3	5.5	20

根据多次试验结果说明：用死菌体作保护剂时，冻干后制品成活率最高达 90%—100%，而其他保护剂冻干制品成活率多在 65% 以下。

### 二、不同温度、真空度及保存时间对冻干制品成活率的影响

由表 2 可以看出，冻干制品的真空度对冻干制品保存成活率影响很大。真空度高，保存后成活率高，反之则低。冻干制品保存的温度和时间对成活率均有影响，保存的温度高，时间长，制品成活率不断降低，一般宜保存在 10℃ 以下，保护剂对冻干制品保存后成活率影响不大。

### 三、冻干制品砂培结瘤试验

采用灭菌无氮砂培法：紫云英种子消毒催芽，然后将冻干制品 A<sub>12</sub>、D<sub>12</sub>、D<sub>14</sub>、D<sub>35</sub>、及矿

表 2 温度、真空度、保存时间对成活率的影响

冻干制品	真空度	保 存		活菌数 (亿/ml)		成活率 %
		温度℃	时间	冻干后	保存后	
D <sub>12</sub>	+++	4—30 以上	15 天	14.7	14.1	96
A <sub>0</sub>	+++	28 以上	120 天	4.3	3.12	72
D <sub>0</sub>	—	28 以上	120 天	4.3	0.02	0.04
D <sub>24</sub>	++	28 以上	30 天	7.6	4.0	52
D <sub>24</sub>	+++	10 以上	30 天	7.6	7.0	90
A <sub>25</sub>	++	10 以上	13 个月	4.6	1.38	30
D <sub>28</sub>	+	室温	7 个月	7.6	0.21	27.6
D <sub>28</sub>	+++	10 以上	7 个月	7.6	7.0	92.1
D <sub>10</sub>	++	10 以上	3 个月	5.4	4.3	80
A <sub>12</sub>	++	5—34	12.5 年	12.6	0.5	4
D <sub>12</sub>	++	5—34	12.5 年	12.3	0.49	4
D <sub>35</sub>	+++	5—34	11.5 年	12.3	0.88	6

注：(1) A、D 代表保护剂，其下脚阿拉伯数字代表冻干批数。

(2) 由 A<sub>0</sub>(D<sub>0</sub>)—A<sub>35</sub>(D<sub>35</sub>) 均系 1966 年 8 月至 1968 年元月冻干。

(3) 真空度用高频火花测验器测定时呈乳白色为最好 (+++)，其次为较好 (++)，一般 (+)，非真空 (—)。

油保存管，矿<sub>70</sub>、矿<sub>74</sub>、矿<sub>78</sub>等样品分别转接于新鲜斜面，置 28℃ 培养 3 天，各取斜面菌株一支加 9ml 无菌水制成菌悬液，浸泡已发芽的紫云英种子，用直径 12cm 的搪瓷缸进行砂培，每缸 10 株，15 天后间苗，每缸留 5 株，每个样品重复三缸，砂培结果见表 3。

表 3 搪瓷缸砂培 60 天结瘤试验结果

样 品	保 存		植 株 生 长 情 况				固氮酶活 力 C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> 毫微克分 子 / 干根 克·小时
			地上部分		地下部分		
	时间年	温度℃	鲜重	干重	鲜重	干重	
A	12.5	5—34	9.8	3.6	18.9	3.0	1797.24
D <sub>12</sub>	12.5	5—34	12.3	4.5	12.0	3.2	1942.46
D <sub>14</sub>	12.5	5—34	9.0	3.4	19.7	3.0	2664.52
D <sub>35</sub>	11.5	5—34	13.2	4.7	21.6	3.6	2962.71
D <sub>35</sub>	11.5	5—34	11.9	4.3	18.9	3.8	1786.98
矿 <sub>70</sub>	9	5—34	10.4	3.8	18.9	3.3	1009.24
矿 <sub>74</sub>	5	5—34	6.8	3.7	9.5	2.5	0
矿 <sub>78</sub>	1	5—34	6.9	3.5	10.6	2.9	0
CK	—	—	6.8	2.3	11.5	2.2	0

注：(1) 矿<sub>70</sub>、矿<sub>74</sub>、矿<sub>78</sub>代表紫云英根瘤菌 111 号分别于 1970 年、1974 年、1978 年采用矿油斜面保存。矿<sub>74</sub>、矿<sub>78</sub>、转代数比矿<sub>70</sub>、转代数多。

(2) 本表列出的数字均为三个重复数据的平均值。

表 3 说明冻干制品保存时间达 12 年以上

能保持良好的固氮性能,而矿油法保存的菌种时间久、转代次数增多,固氮能力减弱,甚至完全失去固氮能力。

取冻干制品 D<sub>12</sub>、D<sub>35</sub> 各一安瓿,在无菌条件

下,加无菌水溶解稀释成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ ,分别浸泡已发芽的种子进行试管砂培(试管 3—4cm × 20—25cm),每管 3 株,砂培结果见表 4。

表 4 试管砂培 40 天观察结瘤情况

冻干制品	冻干后活菌数(亿/ml)	保 存		各稀释度结瘤情况 结瘤管数/重复数					活 菌 数 (菌数/ml) (平板测数)
		时间(年)	温度(℃)	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	
D <sub>12</sub>	12.3	12.5	5—34	3/4	3/4	3/4	3/4	3/4	$4.9 \times 10^6$
D <sub>35</sub>	12.3	11.4	5—34	3/4	3/4	3/4	3/4	3/4	$8.8 \times 10^6$
CK	—	—	—	1/4	2/4	2/4	0/4	0/4	0

上表看出冻干制品在 5—34℃ 下保存 12 年以上,不经活化仍具有良好的结瘤性能,但活菌数大大减少。

且来源方便的物质作保护剂获得良好效果。

2. 冻干制品保存温度对结瘤性能影响不大,而对保存成活率影响较大。

## 讨 论

1. 文献报道保护剂对冻干制品的成活率影响很大,而对冻干制品保存成活率影响不大<sup>[2,3]</sup>。我们对冻干紫云英根瘤菌剂选择廉价而

## 参 考 文 献

- [1] Mitchell, J.: *Anal. Chem.* **23**: 1069—1075. 1951.
- [2] Heckly, R. J., et al.: *Appl. Microbial.* **6**: 255—261. 1958.
- [3] Heckly, R. J., et al.: *Appl. Microbial.* **8**: 52—54. 1960.