

菌种保存方法对冰核细菌冰核活性的影响

朱 红 孙福在 张永祥

(中国农科院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要 本文测定了5种保存方法及3种保存温度,对4株代表3个属4个种(变种)的冰核细菌冰核活性的影响。结果表明,不同保存方法对冰核细菌的存活力和冰核活性存在着不同程度的影响;保存温度越高,对冰核活性的影响越大;不同菌种对保存的敏感性不同,所适合的保存方法也不同。真空冷冻干燥和灭菌水于-20℃冷冻保存对各菌株的存活力和冰核活性的影响都较小,适用于一般冰核细菌的长期保存。而10%甘油冷冻保存则不适用于冰核细菌的保存。

关键词 冰核细菌;冰核活性;菌种保存

大量附生于植物表面,并在-2至-5℃以下具很强冰核作用的冰核细菌,是引起植物霜冻的主要因素之一^[1,2],在人工降雨,雪及人工制冰和生物免疫学检测方法中均有很高的应用价值^[3],从而引起多种学科的重视。自1987年以来我们对冰核细菌作了多方面的研究,从工作中发现菌种保存对冰核活性有较大影响,因此有必要将几种常用的保存方法对冰核活性的影响作一比较,选择出适于冰核细菌的最佳保存方法,此项工作国外尚未见报道,我们经过三年时间进行此项工作,其结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 供试菌株

选择代表3个属4个种(变种)的冰核细菌: IHM 4 (*Erwinia herbicola*)、ISCu6 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)、ISSo1 (*Ps. syringae* pv. *pisi*)和 Xt-24 (*Xanthomonas campestris*),在NAG培养基上于20℃培养48小时后供保存用。

(二) 保存方法

据文献[4]选用5种常用的细菌保存方法进行比较。

1. 真空冷冻干燥:以含1%谷氨酸钠的10%脱脂牛乳为分散剂将供试菌稀释成 1×10^8 细菌/ml。每支安瓿管装1ml菌液,冷冻干燥后于-20、4、20℃下保存。

2. 10%甘油冷冻保存:菌液浓度 1×10^8 细菌/ml,每管1ml,-20℃下冷冻保存。

3. 灭菌水保存:菌液浓度 1×10^8 细菌/ml,每管1ml,于-20、4、20℃下保存。

4. 石蜡油覆盖法:于4、20℃下保存。

5. NAG斜面保存:于4、20℃下保存。

(三) 检测方法

1. 存活力:用移菌环挑出一环菌液或菌苔于NAG平板上划线(冷冻干燥保存的菌种先加1ml灭菌水于4℃下活化12小时),以未经长期保存的同种菌种作对照。划线平板于20℃培养48小时后调查存活力。设三个重复。

2. 冰核活性:调查存活力后将菌种转接到NAG斜面上,于20℃培养4天,稀释到 5×10^6 和 5×10^6 细菌/ml。采用由Vali发明由Lindow改进的小液滴冻结法^[5]测定冰核活性,即将一定浓度的菌液,用定量移液管滴在喷有1%液体石蜡的二甲苯溶液于55℃下烘干后的铝箔纸上,再将该铝箔纸漂浮在恒温水浴槽中的酒精上,测定液滴在-3℃下的结冰率。每滴10 μ l,每处理10滴,重复三次。

结 果 与 讨 论

各种处理的冰核细菌的存活力和冰核活

性每年检测一次。保存三年后显示出明显差异(表1),以第三年的检测数据用于分析。

从表1结果可见,(1)各处理的菌种在 5×10^8 (细菌/ml)浓度下的冰核活性没有变化,但在 5×10^6 (细菌/ml)浓度下的冰核活性出现明显变化。说明菌种保存三年内冰核活性不会完全丧失,但会有不同程度的减弱。也说明了不同的保存方法对冰核活性的影响是有差异的。

(2)保存温度对冰核活性的影响趋势是随温度升高而增大。

(3)同一保存方法对某些冰核菌的存活力和冰核活性具有不同的影响,对某一菌种存活力影响小的方法可能对其冰核活性影响很大,如ISCu6的甘油冷冻保存,其存活力为“+++”,而冰核活性却降至为“-”(5×10⁶细菌/ml)。相反对存活力影响大的保存方法可能对冰核活性影响很小,如ISSo1的灭菌水20℃保存,其存活力为“+”,而冰核活性为“++++”。因此在冰核菌的保存中应全面考虑到存活力和冰核活性两个因素。

表1 保存三年后各菌种的存活力和冰核活性

试验菌株	保存方法	保存温度(℃)								
		-20			4			20		
		存活力	冰核活性(-3℃)		存活力	冰核活性(-3℃)		存活力	冰核活性(-3℃)	
	5×10^8 (细菌/ml)	5×10^6 (细菌/ml)		5×10^8 (细菌/ml)	5×10^6 (细菌/ml)		5×10^8 (细菌/ml)	5×10^6 (细菌/ml)		
IHM4	真空冷冻干燥	+++	++++	++++	++	++++	++++	+++	++++	-
	10%甘油保存	+	++++	+	/	/	/	/	/	/
	灭菌水保存	+++	++++	+++	+++	++++	+	+++	++++	+
	石蜡油覆盖	/	/	/	+	++++	+	+	++++	+
	NAG斜面保存	/	/	/	+	++++	+	+	++++	+
ISCu6	真空冷冻干燥	+++	++++	++++	++	++++	++++	+	++++	++++
	10%甘油保存	+++	++++	-	/	/	/	/	/	/
	灭菌水保存	+++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	++++	++
	石蜡油覆盖	/	/	/	+++	++++	+	+++	++++	+
	NAG斜面保存	/	/	/	+++	++++	+	-		
ISSo1	真空冷冻干燥	+++	++++	++++	+	++++	++++	+++	++++	++++
	10%甘油保存	++	++++	++++	/	/	/	/	/	/
	灭菌水保存	+++	++++	++++	+++	++++	+++	+	++++	++++
	石蜡油覆盖	/	/	/	+++	++++	++++	+	++++	++++
	NAG斜面保存	/	/	/	+++	++++	++++	+	++++	++++
Xt-24	真空冷冻干燥	+++	++++	++++	+	++++	++++	+	++++	+
	10%甘油保存	+	++++	+	/	/	/	/	/	/
	灭菌水保存	+++	++++	+++	++	++++	+++	++	+++	-
	石蜡油覆盖	/	/	/	+++	++++	++++	++	++++	++
	NAG斜面保存	/	/	/	+++	++++	++	++	++++	-

1. 保存前各菌株的冰核活性:在 5×10^8 和 5×10^6 (细菌/ml)浓度下均为“++++”
2. 存活力:“+++”与对照菌株生长量相同,“++”为对照菌株的一半,“+”只有少量菌生长,“-”无菌生长
3. 冰核活性:“++++”结冰率为80-100%,”+++”结冰率为60-79%,”++”结冰率为40-59%,”+”结冰率为39%以下,“-”无冰核活性
4. “/”未做

(4)不同冰核菌种的冰核活性对保存的敏感性不同,如IHM4在除真空冷冻干燥-20和4℃保存及灭菌水-20℃保存以外的其它保存方

法中,冰核活性均有大幅度降低,而ISSo1的冰核活性却在所试的几种保存方法中都很稳定。

(5)不同冰核菌种所活应的保存方法也有差
©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

异。各冰核菌的最适保存方法是：IHM4以真空冷冻干燥 -20 和 4 ℃；灭菌水 -20 ℃保存较好；ISCu6以真空冷冻干燥 -20 和 4 ℃；灭菌水 -20 和 4 ℃保存较好。真空冷冻干燥于 20 ℃下保存的ISCu6菌种，虽然冰核活性较高为“++++”，但存活力较低“+”。用供试的几种保存方法和保存温度保存的ISSo1，其冰核活性均为“++++”，其存活力除于灭菌水，石蜡油覆盖和NAG斜面 20 ℃下保存有较大降低外，其它几种保存方法均较适用。Xt-24以真空冷冻干燥 -20 ℃，灭菌水 -20 ℃和石蜡油覆盖 4 ℃下保存较好。

在真空冷冻干燥保存的IHM4和ISSo1中， 4 ℃保存的存活力分别为“++”和“+”，而 20 ℃保存的存活力却为“+++”，我们在实验中曾多次遇到此类现象，分析其原因，我们认为主要是在密封真空菌种管时，有个别菌种管密封不严，因而造成菌种存活力降低。

综上所述，真空冷冻干燥和灭菌水(-20 ℃)两种保存方法对四种供试菌均适用。但真空冷冻干燥保存法要求较高的设备条件和较严格的操作技术，而灭菌水冷冻保存法操作简便，不受设备条件限制，所以是一般冰核细菌长期保存的最佳方法。而以10%甘油 -20 ℃冷冻保存的IHM4，ISCu6和Xt-24的冰核活性均明显降低，因此该方法不适用于冰核细菌的保存。

参 考 文 献

1. Lindow S E et al.: *Plant Physiol.* 70: 1084-1089, 1982.
2. 刘建华等: 中国农业气象, 1:1-6, 1990.
3. Gareth J. Warren: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 5(9): 107-135, 1987.
4. 根井外喜男著, 金连缘译: 微生物保存方法, 上海科学技术出版社, 1982.
5. Lindow S E et al. *Phytopathology*, 68(3): 523-527, 1978.

(1992-8-19 收稿)

THE EFFECT OF PRESERVATION ON ICE NUCLEATION ACTIVITY OF INA BACTERIA

Zhu Hong Sun Fuzai Zhang Yongxiang

(Institute of Plant Protection of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

The effect of 5 store methods at 3 different temperature on ice nucleation activity of INA bacteria were evaluated. The results showed that some store methods could decrease the ice nucleation activity. The effect increased as the temperature of increased. The effect on survival and on activity is different. Different strains had different susceptibility and adaptability. It was found that the freeze-drying method storing at -20 ℃ and freezing in sterile distilled water storing at -20 ℃ could be used for most INA bacteria. Freezing in 10% glycerin could not be used for the store of INA bacteria.

Key word Ice nucleation active bacteria; Ice nucleation activity; Bacteria preservation