

极端嗜盐菌的保藏研究

周宇光

(中国科学院微生物研究所中国普通微生物保藏管理中心 北京 100080)

摘要 研究了在极端嗜盐菌的液氮超低温冻结保藏和真空冷冻干燥保藏中,不同种类的保护剂和保护剂的不同盐浓度对存活性的影响。结果表明:在极端嗜盐菌的保藏中,一定浓度的 NaCl 是保护剂中不可缺少的组成成分之一,但保护剂的盐浓度没有必要达到或接近生长需要的最适盐浓度(20%~25%NaCl);在真空冷冻干燥保藏中,用6%的海藻糖代替脱脂牛奶作为保护剂,可以得到较高的细胞存活率。77株嗜盐古细菌保藏12个月后检测,全部存活,其中19株菌保藏24个月,检测结果为全部存活。

关键词 极端嗜盐菌,超低温冻结保藏,真空冷冻干燥保藏,保护剂

分类号 Q93-336 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0201-203

PRESERVATION OF HALOPHILIC ARCHAEOBACTERIA

Zhou Yuguang

(Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Viability of the frozen cultures and freeze-dried cultures of 3 strains by using different concentrate of salt and different protectant was examined. The result clearly show that the protectant should contain sodium chloride for preservation of extreme halobacteria. But it is not necessary that the salt concentration of protectant must be the same as it for growth. And 6% trehalose as a protectant for freeze-drying is more better than skimmed milk. Viability of the frozen and freeze-dried cultures of 77 strains after one year and 19 strains after two years was 100%.

Key words Halophilic archaeobacteria, Freezing, Freeze-dry, Protectant

极端嗜盐菌作为一类特殊的微生物类群,最显著的特征就是它们必须在高浓度 NaCl (20%~25%)存在下才能很好生长,而且,需要一定浓度的 NaCl 维持完整的细胞膜结构^[1]。为更有效地保藏这类特殊的微生物,本文探讨了不同浓度的 NaCl 对保藏极端嗜盐菌存活性的影响,比较了脱脂牛奶和海藻糖两种保护剂,在真空冷冻干燥保藏极端嗜盐菌中的保护效果。

1 材料和方法

1.1 菌种

本中心保藏的 AS 1.2044、AS 1.2148

(*Haloferax gibbonsii*) 和 AS1.2150(*Haloferax volcanii*) 及其他的 74 株极端嗜盐菌(*Haloarcula* sp.、*Halobacterium* sp. 以及 *Haloferax* sp.), 均由中国科学院微生物研究所周培瑾教授提供。

1.2 培养基

CM 培养基^[2]。

1.3 保护剂

1.3.1 超低温冻结保护剂:用不同 NaCl 浓度的水溶液配成的 10% 甘油溶液。NaCl 浓度分别

为0.5%、10%、15%和20%。

1.3.2 真空冷冻干燥保护剂:用5%NaCl水溶液配成的不同浓度的海藻糖溶液,海藻糖的浓度分别为0.2%、4%、6%和8%;用不同NaCl浓度的水溶液配成的10%脱脂牛奶,NaCl浓度分别为0.5%和15%;用不同NaCl浓度的水溶液配成的6%海藻糖溶液,NaCl浓度分别为5%和15%。对照为15%的NaCl水溶液。

1.4 菌种的培养和收集

实验菌种用CM液体培养基,于37℃恒温摇床180r/min培养4d,离心收集菌体,用15%的NaCl水溶液洗涤3次,调整菌悬液浓度为10⁹~10¹¹个细胞/mL,按照实验设计,等量分装菌悬液于无菌离心管中,离心,弃上清液,用等量的不同种类的保护剂重新悬浮菌体,充分混匀,分装入冻结安瓿(1.7mL/安瓿)和冻干安瓿(0.5mL/安瓿)中。

1.5 超低温冻结和冷冻干燥

按照常规方法^[3,4]进行。

1.6 菌株的恢复培养和存活率的测定

从液氮生物存储器中取出冻结的安瓿,即置38℃水浴中振荡融化备测。在冻干安瓿中加入2.0mL液体培养基,使菌体充分混匀备测。

分别取0.5mL菌液接种于3支盛有4.5mL液体培养基的试管中,其中一支置4℃作为对照,其余两支于37℃恒温摇床180r/min振荡培养3d,用分光光度计在600nm处测定菌体生长量,以培养液OD值的大小作为相对存活率,比较保藏的效果。同时接种固体斜面培养基,37℃培养,观察生长情况。

2 结果与讨论

2.1 NaCl浓度对极端嗜盐菌超低温冻结存活率的影响

超低温冻结和融化后细胞的存活率见表1。极端嗜盐菌依赖高盐环境维持其细胞结构的稳定和功能的正常发挥。我们的试验结果同样说明,在极端嗜盐菌的超低温冻结保藏中,保护剂应含有一定浓度的NaCl,否则,保藏后的菌株全部死亡。当保护剂中NaCl浓度从5%到20%发生改变时,细胞存活率没有明显的变化。

2.2 NaCl浓度对极端嗜盐菌真空冷冻干燥存活率的影响

表1 不同NaCl浓度(ρ,%)对超低温冻结存活率(OD₆₀₀)的影响

菌株	对照*	NaCl(ρ,%)			
		5	10	15	20
AS 1.2148	0	0.50	0.47	0.50	0.43
AS 1.2150	0	0.19	0.21	0.19	0.18
AS 1.2044	0	0.18	0.20	0.20	0.25

* 各处理均为甘油10%(φ)

试验结果(表2)同样说明,在极端嗜盐菌的冷冻干燥保藏中,同样需要一定浓度的NaCl维持细胞膜结构的完整,不含有NaCl的保护剂和保护剂系统中仅含15%NaCl时,冷冻干燥后菌株全部死亡。由于高浓度NaCl导致蛋白质变性,脱脂牛奶的保护作用受到很大的影响,而用海藻糖作为保护剂,可以大幅度提高细胞存活率,与郑从义等人的报道一致^[5]。另外,不论是10%脱脂牛奶还是用6%的海藻糖与一定浓度的NaCl组成保护剂系统,均是低浓度NaCl的存活率明显高于高浓度NaCl的存活率。

表2 不同保护剂系统对冷冻干燥存活率(OD₆₀₀)的影响

菌株	15%NaCl(ρ)	10%脱脂奶(ρ)	10%脱脂奶(ρ)	10%脱脂奶(ρ)	6%海藻糖(ρ)	6%海藻糖(ρ)
			5%NaCl(ρ)	15%NaCl(ρ)	5%NaCl(ρ)	15%NaCl(ρ)
AS 1.2148	0(-)	0(-)	0.02(+)	0.005(+)	0.31(+)	0.24(+)
AS 1.2150	0(-)	0(-)	0.01(+)	No	0.25(+)	0.16(+)
AS 1.2044	0(-)	0(-)	0.03(+)	0.01(+)	0.17(+)	0.13(+)

注: (-) 斜面培养不生长; (+) 斜面培养生长

2.3 海藻糖浓度对极端嗜盐菌冷冻干燥存活率的影响

对于不同的菌株,可以较大幅度提高冻干存活率的海藻糖浓度并不一致,对于 AS 1.2148 和 AS 1.2044 两株菌,2%的海藻糖即可大幅度提高细胞存活率,而对于菌株 AS 1.2150,当海藻糖浓度达到6%时,细胞存活率的提高方趋缓(保护剂系统中 NaCl 的浓度为5%)。

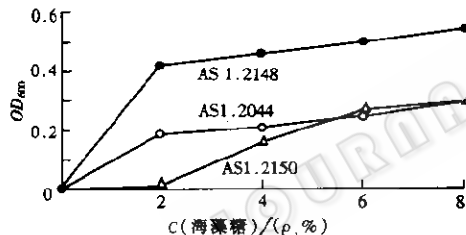


图1 海藻糖浓度对极端嗜盐菌冷冻干燥存活率的影响

试验结果说明,液氮超低温冻结和真空冷冻干燥用于极端嗜盐菌的保藏是安全有效的。NaCl 是保护剂系统的必要组成成分之一,但其

浓度没有必要达到或接近极端嗜盐菌生长需要的最适盐浓度(20%~25%NaCl),只需达到维持完整细胞膜结构需要的盐浓度即可,我们选定的 NaCl 浓度为5%;另外,用6%海藻糖代替10%脱脂牛奶作为冷冻干燥的保护剂,可以提高细胞存活率。77株极端嗜盐菌用两种方法保藏一年全部存活,其中19株菌保藏两年全部存活。

参 考 文 献

- [1] Larsen H. Halobacteriaceae Gibbons, 1974. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I. (N R Krieg, J G Holt, eds.) Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, 261~267.
- [2] Gochnauer M B, Kushner D J. Can J Microbiol, 1969, 15:1157~1165.
- [3] 李钟庆. 微生物菌种保藏技术. 北京: 科学出版社, 1989, 44~62.
- [4] 马德江, 元 伟, 李钟庆. 微生物学通报, 1983, 10(3): 133~135.
- [5] 郑从义, 屈三甫, 张珺珍等. 微生物学通报, 1994, 21(4): 247~250.