

土壤氨氧化细菌的分离方法研究^①

胡君利^{1,2,3} 林先贵^{1,2*} 褚海燕^{1,2} 尹睿^{1,2} 张华勇^{1,2} 苑学霞^{1,2,3} 朱建国^{1,2}

(1 中国科学院南京土壤研究所 南京 210008; 2 中国科学院南京土壤研究所-香港浸会大学
土壤与环境联合开放实验室 南京 210008; 3 中国科学院研究生院 北京 100049)

ISOLATION OF SOIL AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA

HU Jun-li^{1,2,3} LIN Xian-gui^{1,2} CHU Hai-yan^{1,2} YIN Rui^{1,2} ZHANG Hua-yong^{1,2}
YUAN Xue-xia^{1,2,3} ZHU Jian-guo^{1,2}

(1 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008; 2 Joint Open Laboratory of Soil and the
Environment, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences and Hongkong Baptist University, Nanjing 210008;
3 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

摘要 氨氧化细菌是生态系统硝化过程中的一类重要微生物,但由于具有自养性、依附性和生长速率低等特性,从环境中分离氨氧化细菌存在很大困难。本研究通过改进硅胶平板的配方和制作程序,使土壤中氨氧化细菌能够快速高效地分离,有利于进一步开展对此菌的研究工作。

关键词 土壤; 氨氧化细菌; 硅胶平板; 分离

中图分类号 Q939

硝化作用是自然界 N 素循环中的关键步骤,对土壤 N 素养分的转化具有重要意义。氨氧化细菌即亚硝化细菌,在硝化作用过程中负责将铵氧化为亚硝酸盐,实现亚硝化作用,是硝化过程中必不可少的步骤,同时也是其限速反应。氨氧化细菌属革兰氏阴性专性化能自养细菌,以铵盐的氧化满足其能量需求,喜欢微偏碱性的环境,生长极为缓慢,最适 pH 值为 7.0~8.5,最适温度为 24~28℃,普遍分布在自然界的土壤、海洋及淡水中,但只占其中细菌总量的极小比例,且不同种属的氨氧化细菌所分布的环境不同^[1~4]。由于氨氧化细菌在一般的自然土壤和污水处理系统中的含量较低,具有生长在固体表面上的习性,在液体培养基中主要附着在固体颗粒和器壁上,粘连在一起,在实验室对氨氧化细菌的分离通常比较困难,以致有关它们的细菌学和生物化学的研究工作进展缓慢^[5]。李振高等^[6]研究认

为,氨氧化细菌的存在同时也是引起土壤气态 N 损失的潜在动力之一。因此,开发氨氧化细菌的富集培养技术,提高氨氧化细菌的产率,在农田生态建设和环境保护等方面均具有重要的意义^[7]。平板培养方法是一种传统的微生物学实验方法,人们通常通过在培养基上培养菌落和分离细菌细胞来鉴定微生物^[8,9]。本研究通过改进硅胶平板的配方与制作程序,来探索高效的氨氧化细菌富集分离方法,为进一步开展土壤及环境中的氨氧化细菌的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 土壤样品来源

2004 年 2 月 6 日采集江苏省无锡市安镇年余农场(中国 FACE 试验平台)麦田耕层(0~10 cm)新鲜土样共 12 份,装于塑料袋中放置于冰桶内带回

①国家自然科学基金面上项目(40271066)、国家自然科学基金重点项目(40231003)和中国科学院创新方向项目(KZCX2-408)资助。

* 通讯作者(xglin@issas.ac.cn)

实验室。土样过 2 mm 筛, 4 °C 冰箱保存。

1.2 富集分离培养基

参照文献[3, 5], 制备氢氧化细菌的液体富集培养基与固体分离培养基。培养基的配方如表 1 所示。

表 1 液体富集培养基与固体分离培养基的配方

培养基名称	培养基成分与含量		培养基处理
富集培养基	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.50 g	5%Na ₂ CO ₃ 调 pH 8.0
	KH ₂ PO ₄	0.35 g	分装 10 ml/试管
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g	灭菌 0.1 MPa × 30 min
	CaCl ₂	0.18 g	
	蒸馏水	500 ml	
分离培养液	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.00 g	5%Na ₂ CO ₃ 调 pH 7.2
	K ₂ HPO ₄	0.75 g	800 ml (添加水洗琼脂)
	NaH ₂ PO ₄	0.25 g	200 ml (用于硅胶平板)
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03 g	灭菌 0.1 MPa × 30 min
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.01 g	
	CaCO ₃	5.00 g	
	蒸馏水	1000 ml	
营养补充液	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.50 g	灭菌 0.1 MPa × 30 min
	蒸馏水	100 ml	

1.2.1 琼脂平板 氢氧化细菌的单菌落比常见细菌的要小得多, 肉眼难于观察, 往往容易被忽略, 因此对加入分离培养液的琼脂凝固剂要求较高。按培养液 2 % 的比例称取琼脂盛于玻璃杯中, 先用蒸馏水浸泡 2 ~ 3 天, 再冲洗 3 ~ 5 次, 直至琼脂呈白色透明, 然后加入装有分离培养液的三角瓶中, 灭菌后制成水洗琼脂平板。

1.2.2 硅胶平板 硅胶平板培养法是对氢氧化细菌进行生长情况观察并作为分离和鉴定的常用方法^[5]。硅胶平板是稀酸液和水玻璃中和形成的凝胶, 制作相当讲究。本研究摸索改进后的硅胶板配方和制作程序如下: 取 155 ml 蒸馏水加 5.5 ml 相对密度为 1.84 的浓硫酸, 取 185 ml 蒸馏水加 22.0 ml 相对密度为 1.19 的浓盐酸, 两者混合即为稀酸液; 取 500 ml 蒸馏水加 82.59 g 硅酸钠 (Na₂SiO₃·9H₂O), 搅拌溶解即为水玻璃; 分别吸取 12 ml 水玻璃和 8 ml 稀酸液于小烧杯中, 快速搅拌均匀, 倒入培养皿中, 静置凝固。

将凝固后的硅胶板放入水槽中, 用自来水浸洗 5 ~ 8 次, 每次 15 ~ 25 min。用 1 % 的 AgNO₃ 溶液检查 Cl⁻ 去除效果, 如呈白色则继续冲洗。当 Cl⁻ 除去之后, 硅胶板再用冷却开水浸洗 1 次, 无菌水 (或

蒸馏水) 清洗 1 次, 倒置过夜晾干。在每一硅胶板表层加入氢氧化细菌分离培养液 2 ml, 然后放入烘箱中, 35 ~ 45 °C 维持 1.0 ~ 1.5 h 至表层无营养液流动, 然后与培养皿盖子一同在紫外灯下照射 30 min, 即为用于分离氢氧化细菌的硅胶平板。

1.3 方法与步骤

1.3.1 富集培养 称取土样 1 g, 加入盛 10 ml 富集培养基的试管中, 置 28 °C 恒温室中培养 10 ~ 15 天, 用格利斯试剂在白瓷板上检测 NO₂⁻ 的生成情况。格利斯试剂能与亚硝酸反应生成一种紫红色的化合物 (C₁₀H₆NH₂-N:N-C₆H₄-SO₃H), 培养液是否变红及其颜色深浅可指示 NO₂⁻ 的生成及其浓度^[10]。

在检测显示红色后, 向试管中补加 1 ml 营养补充液, 继续恒温培养。当检测显示深红色后, 吸取 1 ml 富集液移至含新鲜培养液的试管中, 28 °C 恒温室继续培养。格利斯试剂伴随检测, 从中选取显色深的试管重复营养补充与移液富集, 提高氢氧化细菌的培养浓度, 淘汰异养杂菌。

1.3.2 分离纯化 选取显色深的富集培养试管, 吸取 0.05 ml 富集液, 采用涂布法均匀涂布在硅胶平板上, 28 °C 培养 2 ~ 4 周, 观察菌落生长状况。长出针尖大小的菌落后, 挑取单菌落到琼脂平板上划线分离, 28 °C 恒温培养。重复划线分离, 纯化细菌。

2 结果与讨论

2.1 不同接种原液与分离培养基间的比较

根据对比试验发现, 使用未经富集培养的土壤悬液直接接种到琼脂平板上, 菌落颜色与形态丰富多样, 包括有细菌、放线菌、真菌等多种类别, 其中部分可能为异养硝化微生物^[1], 即培养选择性不强; 若接种到硅胶平板上, 只有部分培养基上能够观察到数量极其稀少的针尖大小菌落。经过富集培养后接种到琼脂平板和硅胶平板上, 菌落数量多, 以圆形无色透明和略显黄色为主, 但琼脂平板培养时间稍长就往往会出现杂菌生长, 而硅胶平板容易出现失水性干裂。

结果分析表明, 硅胶平板与琼脂平板均可分离氢氧化细菌, 而且效果较好。在相同无菌室接种和恒温室培养条件下, 琼脂平板所需培养时间相对要短, 但容易出现杂菌生长, 影响氢氧化细菌的分离纯化; 而硅胶平板选择性强, 基本无污染, 但培养

时间长,且生长的菌落小而单一,影响对土壤中氨氧化细菌群落多样性的认识。

2.2 硅胶平板制作与培养过程中的注意事项

硅胶平板传统的制备方法均比较麻烦耗时,如透析法需要用透析袋,而且要用去离子水多次换水,花费较大;树脂柱法制备硅酸溶剂,程序复杂,而且用品较多;另外有的方法需要过滤,比较耗时。本研究通过反复尝试,摸索形成了一种简便的制作方法,能够从土壤中高效地分离到氨氧化细菌,而且分离纯度高,实验花费少,适宜在普通实验室推广。

在制作硅胶平板时,稀酸液与水玻璃的比例非常重要。实验通过反复摸索,最终确立了2:3的比例,此时硅胶板凝固速度快,具有较好的弹性。而按其他一些比例混合后,有的保持在液体状态不发生凝固,有的只能出现少量白色絮状沉淀,不能形成硅胶板,还有的虽然能够凝固,但速度极慢且不稳定。硅胶板在后期清水浸洗、添加培养液、加温固定时均较容易破损,要注意保护。同时,硅胶平板因为独特的形成过程而难以经受高温灭菌,本实验中先用无菌水预处理,最后经紫外线照射,达到了灭菌效果。

硅胶平板在28℃培养过程中容易因失水而干裂,干扰了对菌落的观察与挑取。实验探索创建了“桶水袋罩”法,先在干净小型塑料桶内加入一薄层蒸馏水,倒放一空培养皿,然后堆上硅胶平板,最后在桶口处自上而下罩一洁净塑料袋。此法既不影响桶内外空气交流,同时有效抑制水分挥发外逃,使桶内空气保持在一定湿度范围内,培养期间基本不用换水或加水,保证了培养条件的稳定性,且平板基本不裂,菌落的培养与观察均不受影响。

2.3 实验存在的问题与研究展望

本实验中,氨氧化细菌的富集培养是关键阶段。当移取富集液到新鲜培养基时需要较高的细菌基础浓度,否则经过长时间的培养仍有可能检测不到 NO_2^- ,而只有当细菌达到一定数量时,氨氧化细菌

才能够迅速利用新鲜培养液,达到富集目的。另外,氨氧化细菌对pH、温度等的改变都很敏感^[1],在适宜的条件下需24h才能完成一次分裂周期,在进行固体培养的过程中一般需半月以上才能见到菌落生长^[2],研究工作相当困难。这就要求我们深入认识氨氧化细菌的培养特性与菌落特征,进一步改进分离纯化方法。

参考文献

- 1 王一明,彭光浩.异养硝化微生物的分子生物学研究进展.土壤,2003,35(5):378~386
- 2 Wood PM. Nitrification as a bacterial energy source. In: Prosser JI. ed. Nitrification, Special Publ. Soc. Gen. Microbiol. Vol. 20. Oxford: IRL Press, 1986, 39~62
- 3 周娟,李君文,郑金来.亚硝酸细菌研究进展.环境科学与技术,2001,24(增刊):8~10
- 4 Wang Y, Zhang YP. NH_4^+ adsorption in a Eum-Orthic Anthrosol at different solution/soil ratios and temperatures. Pedosphere, 2004, 14(2): 253~257
- 5 郭爱莲,李振海,黄淑菊.硝化细菌的分离研究.西北大学学报(自然科学版),1996,26(1):83~86
- 6 李振高,俞慎,吴胜春,王俊华,潘映华.不同氮肥对水稻根圈微生物生物量及硝化-反硝化细菌的影响.土壤,2003,35(6):490~494
- 7 屈计宁,金志刚,何群彪,刘远平.硝化细菌富集技术分析及其方法研究.同济大学学报,1999,27(3):351~354
- 8 章家恩,蔡燕飞,高爱霞,朱丽霞.土壤微生物多样性实验研究方法概述.土壤,2004,36(4):346~350
- 9 马万里, Josquin Tibbits, Mark Adams. 土壤微生物多样性研究的新方法.土壤学报,2004,41(1):103~107
- 10 许光辉,郑洪元主编.土壤微生物分析方法手册.北京:农业出版社,1986
- 11 Voytek MA, Ward BB. Detection of ammonia oxidizing bacteria of beta subclass of the class proteobacteria in aquatic samples with the PCR. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 1444~1450