

硝化细菌的分离纯化

宋鸿遇 严君华 张娅珍

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

硝化细菌是一类化能自养细菌, 包括亚硝化细菌和硝化细菌两群。硝化细菌的分离纯化颇为困难。其原因主要有: 1) 硝化细菌生长缓慢, 而伴生菌生长迅速, 因此常在数量上后者会超过前者; 2) 硝化细菌有长在固体表面的习性, 即使在液体中培养, 也往往附着在固体颗粒表面或容器壁上, 不易分散, 因而不易纯化; 3) 硝化细菌的唯一固体培养基是硅胶, 它的制备较困难, 菌落长得极小 ($100\mu\text{m}$ 左右), 在大量伴生菌中难以挑取。

针对这些困难, 有许多人曾设计了多种方法。Имшенецкий 和 Рубан^[1] 应用微口吸管, 滴分富集培养液, 纯化了亚硝化杆菌。Ульянова^[2] 用此法纯化了亚硝化杆菌。但是在富集自养菌及改善其分散程度方面仍无明显的改进措施。

我们用连续供给能源 (NH_4^+ , NO_2^-) 的措施建立富集培养, 以提高培养液内氧化产物 (NO_2^- , NO_3^-) 浓度, 抑制伴生菌繁殖, 从而提高了富集培养内的自养菌数; 用 CO_2 通气或用匀浆器轻微研磨的方法使自养菌与碳酸钙颗粒分开; 同时在整个富集过程中用平板计数, 观察富集培养内异养伴生菌数目的变动, 当异养菌数减少时用微口吸管进行分离纯化, 获得了较满意的结果。现将方法及结果介绍如下。

亚硝化杆菌的分离纯化

一、材料与方法

1. 培养基: 采用 Виноградский 培养基
2. 硅胶平板的制备: 以比重 1.09 的盐酸与等体积硅酸钠(比重 1.10)溶液混合, 混合时须徐徐加入, 均匀搅拌。透析 48 小时, 换水 6—8 次, 透析袋以容纳 100—200ml 硅酸钠溶液为

宜, 否则会发生凝结。透析后溶液无色透明, 过滤或 120°C 蒸汽灭菌。备用。在制备平板前, 应准备以下溶液:

(1) 基本培养液: 内含 NaCl 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, Na_2HPO_4 12%, KH_2PO_4 6%, FeSO_4 0.01%, MnSO_4 0.01%, NaHCO_3 1%;

(2) 5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液;

上述溶液分别灭菌后, 取溶液(1)和(2)各 1ml, 菌液 1ml 和硅酸钠溶液 10ml, 在灭菌培养皿内混合, 待其凝固。制备好的平板置于密封的玻璃器皿中, 以防干涸。

3. 亚硝化作用的检测: 以 Griess-Ilosvay 试剂^[3] 检测 NO_2^- 的形成, 同时用 Nessler 试剂^[4] 检测剩余 NH_4^+ 。以此表示亚硝化杆菌的亚硝化作用。亚硝酸的定量测定用 Snell 和 Snell 比色法。

二、操作

取新采集的土壤 0.5—1.0g 置 100ml 三角瓶中, 瓶内盛有 15ml Виноградский 培养液。 28°C 保温, 每隔 2—3 天检测 NO_2^- 的形成。当检出 NO_2^- 形成后, 取 0.1ml 培养液接种同种新鲜培养液, 继续培养并检测 NO_2^- 。如此多次移植传代, 但第二次传代后, 接种量要减少, 以 1 小滴为宜。经过 7 次传代后, 开始连续供给能源, 每隔 3—5 天于富集培养液内添加 5% 硫酸铵溶液 1ml, 并加入适量碳酸钙。经此过程后亚硝化杆菌的数量显著增加。

将待分离的富集培养液通入 CO_2 半小时, 静置 20 分钟左右, 用微口吸管吸取上清液少许, 以管尖轻微接触灭菌的 50ml 三角瓶瓶底(倾斜三角瓶使内含的培养液流向一侧露出瓶底)。

置 28℃ 培养 1 个月，检测亚硝化杆菌生长情况。然后再进行第二次纯化。反复多次即可分离纯化。

三、分离效果

用肉汤蛋白胨平板计数，可见移植 7 次后的富集培养液内伴生菌数量的变化情况(表1)。在移植后最初 3—5 天，伴生菌数量迅速上升，然后即逐渐下降。这可能是由于亚硝化杆菌繁殖而使 NO₂⁻ 浓度增加，从而抑制了伴生菌的生长。

当连续供给 5%(NH₄)₂SO₄ 作为能源后，亚硝化杆菌数量显著增加，而伴生菌数量可减至 5×10⁶/ml，此时即开始亚硝化杆菌的纯化。在用微口吸管接种的 184 瓶中，有 132 个瓶内培养物可形成 NO₂⁻。然后用 11 种鉴定培养基

表 1 七次移植后亚硝化细菌富集培养液内伴生菌在培养过程中的数量变化

培养时间(天)	每 ml 伴生菌数量
0	5×10 ³
3	6.7×10 ⁷
5	3.9×10 ⁷
8	2.6×10 ⁷
11	1×10 ⁷

(肉汁蛋白胨液体和斜面，肉汁蛋白胨加 1% 酵母膏，肉汁葡萄糖斜面，麦芽汁，麦芽汁斜面，马铃薯铵盐斜面，马铃薯葡萄糖斜面，马铃薯块，石蕊牛奶，硝酸盐营养液) 检查这些培养物。28℃ 培养 10 天后，发现有 5 个培养物在麦芽汁和马铃薯培养基上不生长，表明它们是基本纯化的亚硝化杆菌。再进行多次纯化和反复鉴定，肯定其中两个培养物是纯化的。

纯化的亚硝化杆菌在年幼时呈球状，常两两成对，随着培养时间延长，逐渐变为卵形。大小为 0.9—1.1×1.1—1.7 μm，运动，易被甲烯蓝、龙胆紫和复红等染色，革兰氏染色阴性。应属于亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)。纯化的该菌在 Виноградский 培养液内繁殖后不产生浑浊，瓶底碳酸钙无集聚现象，氧化铵盐的能力显著降低。它们在硅胶内可形成呈针尖状菌

落，低倍镜下可见菌落半透明，略带黄色，边缘不规则，呈棱角状(见图 1)。

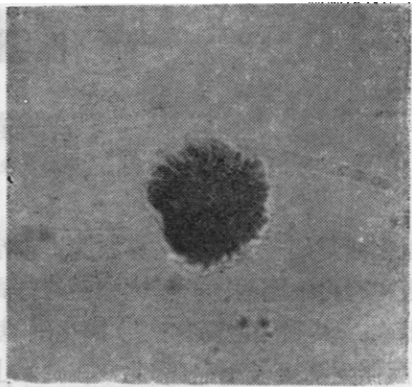


图 1 硅胶平板上的亚硝化杆菌菌落(×200)

硝化杆菌的分离纯化

除培养液不同外，富集方法与分离纯化亚硝化杆菌时相同。制备硅胶平板时，用 5% 亚硝酸钠溶液代替硫酸铵。用 Griess-Ilosvay 试剂检测亚硝酸盐的减少，用苯胺-硫酸反应^[3]测定硝酸盐的形成。

具体方法是：将新采集的土壤投入 Meiklejohn 培养液^[4]内。经 4 次移植后，再提供 NaNO₂ 溶液。在供给 4g/L 后，富集培养物内显著地增加了硝化杆菌数。伴生菌在供给 NaNO₂ 后显著减少。为了使细菌与碳酸钙颗粒分开，在通入 CO₂ 之后，用玻璃匀浆器在无菌条件下轻度处理富集培养物后再以微口吸管分滴纯化。首次接种 120 瓶，其中有 2 个培养物是纯化的硝化杆菌，再次接种 60 瓶，有 18 瓶是纯培

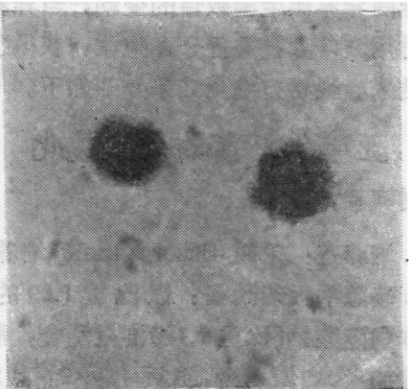


图 2 硅胶平板上的硝化杆菌菌落(×200)

养物。这些纯培养物除在 11 种亚硝化杆菌的鉴定培养基上不出现细菌的繁殖外,在胡萝卜、酵母水、Калиненко 培养液内和 Mevius 培养基^[5]上均不生长。纯化后的硝化杆菌呈梨形。随培养时间延长,形态稍有变化,平均大小在 $0.45 \times 1.1 \mu\text{m}$ 左右。细胞较难染色,能运动,革兰氏染色阴性。在硅胶深层可形成针头状菌落(见图 2),外形与亚硝化杆菌的相似。硝化杆菌的培养特征不明显,培养液无丝毫浑浊。

几点经验

1. 我们在观察富集培养物中伴生菌数量变化时发现 NO_2^- 浓度增大会抑制伴生菌生长,因此采取连续供给硫酸铵或亚硝酸铵的方法来减少伴生菌,使分离纯化较易成功。

2. 通入 CO_2 分散吸附在碳酸钙颗粒上的细菌,效果不理想。用匀浆器轻微研磨,使其更好地分散,从而提高了分离效果。

3. 判别硝化细菌的纯化与否,镜检形态和观察肉汤内繁殖与否均不可靠。由于进行硝化

作用的细菌的伴生菌具有其专一性^[2,6,7]。往往属于假单胞菌属,分枝杆菌属或堆囊粘菌属,而后两属细菌在肉汤中根本不繁殖;前一属细菌的几个种在形态上又与硝化细菌极相似,因此,我们选用了多种鉴定培养基。

4. 纯化后的亚硝化杆菌对铁盐的氧化能力显著减弱。这一现象前人早已指出,但原因不详。纯化的硝化细菌很难在实验室保持活力,甚至会突然死亡,看来伴生菌对它们有有利作用。这些问题有待进一步研究。

参考文献

- [1] Имшенецкий, А. А. и Е. Л. Рубан: *Микробиология*, **22**: 376—384, 1953.
- [2] Ульянова, О. М.: *ibid*, **29**: 813—819, 1960.
- [3] Виноградский, С. Н.: *Микробиология Почвы*, Изд-во АН СССР, Москва, 1952.
- [4] Meiklejohn, J.: *J. Gen. Microbiol.*, **4**: 185—191, 1950.
- [5] Калиненко, В. С.: *Микробиология*, **25**: 342—362, 1956.
- [6] Имшенецкий, А. А.: *ibid*, **24**: 14—21, 1955.
- [7] Meiklejohn, J.: *Nature*, **168**: 561, 1951.