

土样保藏与其存活菌量

吕人豪 白素娥 江 光 孙建民

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 本文研究了土样在不同温度保藏下影响好氧异养菌和厌氧菌——硫酸盐还原菌存活菌量变化因素。结果表明,菌量随土样水分、有机物含量、保藏温度和菌种而别。文中讨论并提出了采掘土样进行存活菌量分析的建议。

土样采集后到开始进行微生物分析往往视其采样点距实验室远近不同,有一定间隔时间。为进行菌量分布调查,了解土样保藏条件对其存活菌量的影响就十分重要。早在 30 年代,一些土壤微生物学家曾注意到此问题^[1,2]。多数认为采样后数小时内应完成菌量分析;但也有人提出保藏两周后分析反而菌量能恢复到原始水平^[3,4]。甚至有学者^[5,6]提出室温或 10—15℃ 下允许贮存 3—4 周。60 年代后,一些学者^[7,10]虽都倾向于不超过 24 小时,但也缺乏统一意见。所以存在以上这些矛盾,除土壤本身的复杂性和采用方法的差异外,更重要的是缺乏较系统研究^[8]。本文从调查土壤中腐蚀微生物分布的角度,研究了土样保藏与其存活菌量间的关系。

材 料 和 方 法

- 1. 土样: 考虑到主要影响微生物活力的含水量、有机物、总氮等因素,在收集土样种类时,尤其偏重于含水量的差别。我们按其自然土含水量情况采取北京郊区的土样共七个(见表 1)。采样深度 50—60 公分,采用四分法收集于无菌聚乙烯塑料袋中保藏。
- 2. 土样保藏: 土样用塑料袋紧密包扎,尽量减少土样中水分损失。土样均分别保藏在 5℃ 及 20℃ 温度下。
- 3. 土壤主要理化特性,主要按南京土壤所编的土壤理化分析^[11]的方法,测定土样中的含水量、pH、总盐(用电导率表示)、有机物、总氮

量等。

4. 微生物存活量测定: 分析了两类菌,一类是好氧菌,用稀释肉汁平板计其好氧异养菌总数。另一类,分析了代表厌氧菌的硫酸盐还原菌,在 Starkey 液体培养基中按最大可能菌数法^[12]测定。除采样后 1 小时内测定原始菌量外,随着保藏时间推移间隔 6、12、24、48 小时或更长时间,定期测定其存活菌量,试验持续了 18 天。

平均菌量的比值,是指土样在保藏时间多次测定菌量的平均值同该土样原始菌量之比值。

试 验 结 果

(一) 试验土样的性质

一些主要影响细菌存活的生态因子归纳于表 1—2,结果表明所试的土样中除 5 号、7 号稻田土是重壤土外,其他都是中壤, pH 中性偏碱。从电导率看总盐量不高,而提供菌作主要 C 源营养的有机物含量都较高,尤其是 3 号、7 号土样,总氮也较丰富。 所以从土样物化性质和菌的 C、N 营养看,所采用的土壤都是有利于微生物生长繁殖的。

(二) 保藏温度对菌存活量的影响

从所得结果(图 1, 2) 看,土壤中好氧异养菌总量 20℃ 下保藏平均都比 5℃ 下保藏的菌量高。表 3 所列的七个土样中, 7 次及 14 次平均菌量测定比值表明, 除水过饱和的 7 号样外, 20℃ 比之 5℃ 下菌量都高 1.5—10 倍。厌氧的

表 1 土样的主要理化性质

土样号	来 源	质 地	pH	含水量 (%)	电导率 $\mu\Omega^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	有机物 (%)	总氮量 (%)
1	北京航院荒地土	中壤土	9.05	7.8	8.1×10^1	0.56	0.04
2	清华园荒地土	中壤土	8.45	10.8	6.5×10^1	1.02	0.03
3	清华园种植土	中壤土	8.15	15.7	2.1×10^1	2.20	0.07
4	钢院麦田土	中壤土	8.72	16.2	9.35×10^1	1.25	0.06
5	圆明园稻田土	重壤土	8.20	23.5	1.5×10^2	1.43	0.08
6	圆明园荒地土	中壤土	9.1	30.1	2.82×10^2	1.51	0.09
7	西苑稻田土	重壤土	8.2	45.5	1.71×10^2	4.92	0.25

表 2 土样中主要离子含量

编 号	K ⁺ (%)	Na ⁺ (%)	Ca ⁺⁺ (%)	Mg ⁺⁺ (%)	SO ₄ ²⁻ (%)	Cl ⁻ (%)	HCO ₃ ⁻ (%)	CO ₃ ²⁻ (%)
1	0.0007	0.0122	0.0074	0.0039	0.033	0.015	0.024	0
2	0.0012	0.0008	0.0029	0.0022	0.0023	0.006	0.026	0
3	0.0018	0.0038	0.0074	0.0035	0.026	0.013	0.024	0
4	0.0003	0.0008	0.0043	0.003	0.0023	0.005	0.031	0
5	0.0004	0.0004	0.0033	0.0037	0.009	0.007	0.038	0
6	0.0084	0.009	0.0025	0.0042	0.054	0.021	0.046	0
7	0.0026	0.0104	0.013	0.0041	0.0615	0.010	0.029	0

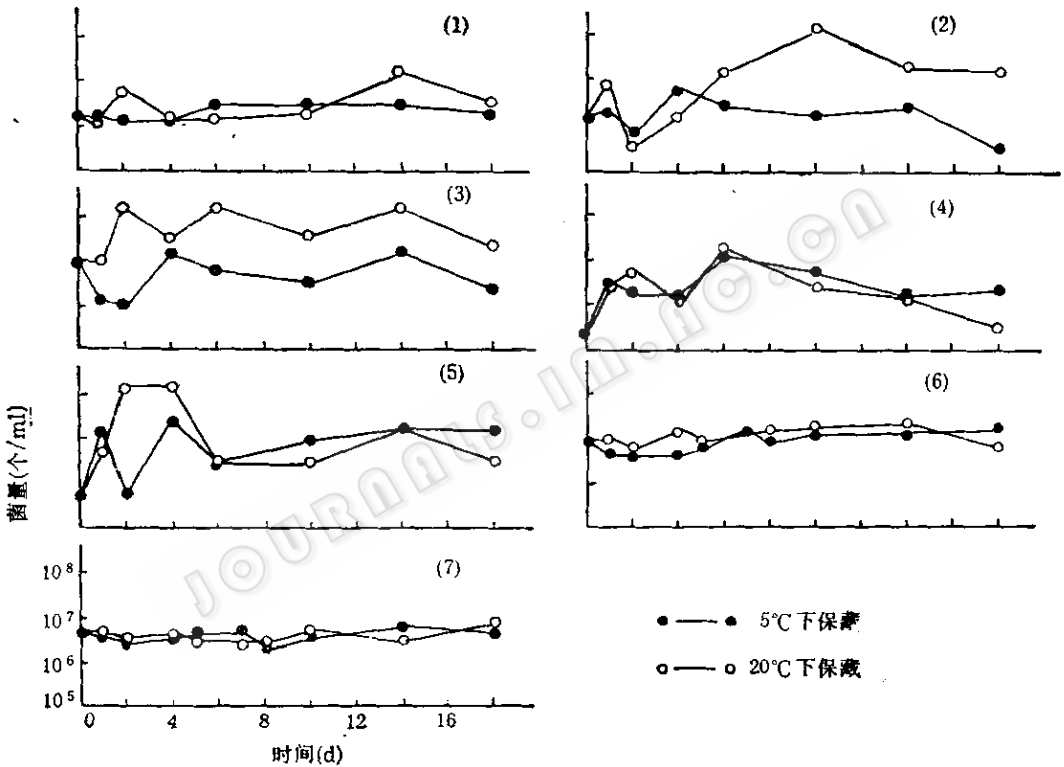


图 1 异养菌存活菌量随时间的变化

硫酸盐还原菌在两种温度下比值是 0.7—2.35, 说明温度从 5℃ 提高到 20℃ 对硫酸盐还原菌存活菌量影响比异养菌小。但这在高含水量的 6 号和 7 号土样, 由于氧因子的制约差别不明显。

(三) 土壤含水量对其存活菌量的影响

从图 1-4 中可看出, 无论在 5℃ 还是 20℃ 下保藏的土样中, 存活菌量随着含水量从 8% 上升到 23%, 好氧菌量随之提高; 但含水量上

升到 30% 就又很快下降, 这主要是氧成为好氧菌限制因子所致。硫酸盐还原菌在含水量 15% 的 3 号土存活菌量最高, 再提高含水量菌量倾向稳定。因此土样保藏中存活菌量提高或下降同菌类型及含水量范围有密切联系, 好氧菌同厌氧菌有其自己增殖的最适含水量范围。

(四) 土壤有机物对存活菌量的影响

从所得的结果看, 土壤中的有机物对好氧的异养菌影响不明显; 而对厌氧菌影响是显著

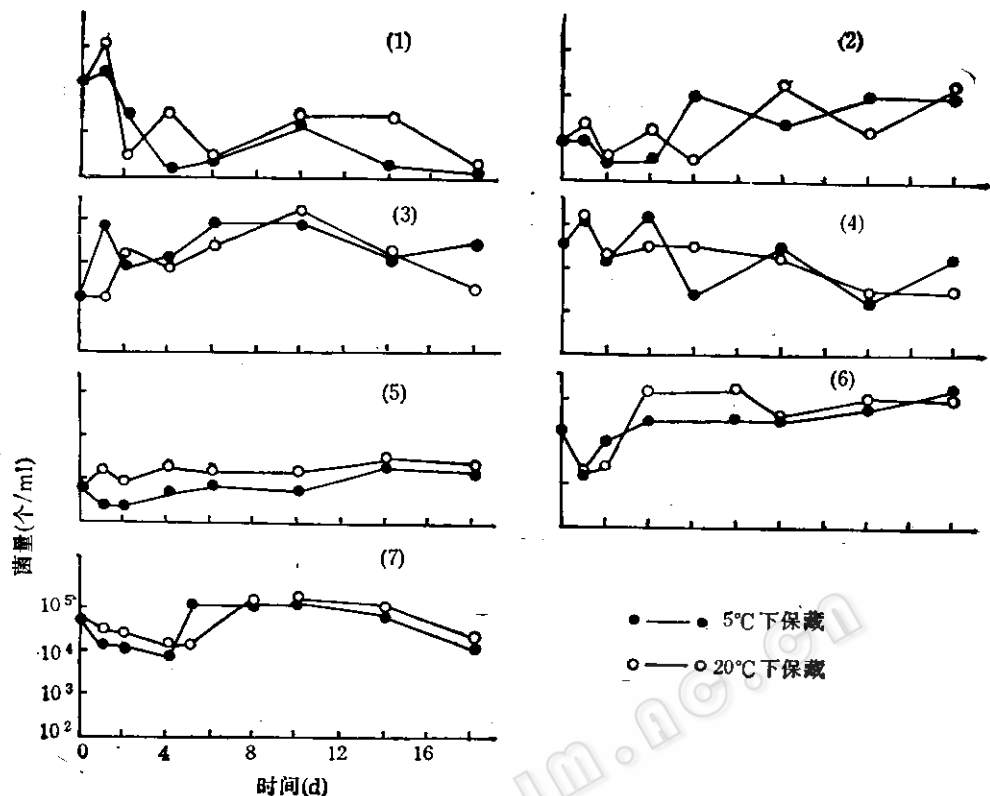


图2 硫酸盐还原菌存活菌量随时间的变化

表3 不同土样在5℃和20℃保藏18天平均菌量变化比值

土 样	含水量 (%)	好氧异养菌			硫酸盐还原菌		
		5℃	20℃	20℃/5℃比值	5℃	20℃	20℃/5℃比值
1	7.8	1.77	3.2	1.8	0.79	1.6	1.3
2	10.8	2.12	8.18	9.3	5.31	5.6	1.1
3	15.7	0.69	7.21	10.4	33.7	33.4	1.0
4	16.2	18.0	25.77	1.4	1.0	0.7	0.7
5	23.15	21.9	56.4	2.6	1.7	4.0	2.4
6	30.1	0.89	1.31	1.5	2.29	3.35	1.46
7	45.5	0.80	0.79	1.0	0.93	1.15	1.2

1—5号土样是7次测定的平均比值

6, 7号土样是14次测定的平均比值

的。如3号和4号土,它们所含水量、总氮量差别很小,唯有机物含量相差近一倍,其硫酸盐还原菌存活菌量在有机物含量高的3号土,不论在5℃还是20℃下保藏,菌增殖明显,一直保持高菌量,其平均菌量同初始菌量的比值(表3)分别高达33.7和33.4。在有机物相对低的

4号土,5℃和20℃下保藏的菌量比值只有1.0和0.7。与此相类似的1号、2号土其他条件也较相近,但2号土样中有机物为1号土样的2倍,其平均菌量变化比值也因此出现明显差异。

(五) 存活菌量随土样保藏时间的变化过程

图1, 2结果表明好氧异养菌总量在低含水量(8—15%)的1—3号土样5℃下保藏, 除开始4—6天有波动, 以后的6—14天内比较平稳, 菌量接近原始水平。平均菌量同原始菌量比值(表3)在0.7—2.1范围内变动。中等含水量的4号、5号土样的菌量明显升高, 平均菌量比值达18—21.9, 菌量也是在6天内波动大。在高含水量(30—45%)的6号、7号土样, 菌量都在略低于原始菌量范围变化, 在18天保藏

期内菌量变化很小。菌量比值是0.8—0.89。在20℃保藏的好氧异养菌量除总的菌量增殖都高于5℃下外, 其不同土样中菌量变化规律同5℃下基本相似。

硫酸盐还原菌存活菌量随时间的变化, 在低含水量的1号土样, 由于在采样过程中, 土壤含氧量提高, 致使菌量明显下降。2号土样菌量下降幅度没有前者大, 而在一周内又回升, 这可能归因于好氧菌的活动又提高了环境的厌氧性。3号土样菌量明显上升, 其平均菌量比值达33以上, 这不仅与含水量提高到15%有联系, 更重要是同高有机物含量提供了丰富的供氢体密切相关。高含水量(23—45%)的6、7号土样, 菌量在初始8天内有不同程度下降; 但以后都有上升并趋向稳定, 其量几乎接近土样原始菌量水平。所以总的来说硫酸盐还原菌除含水量过低的1号土样和高有机物的3号样外, 菌量普遍开始阶段下降, 保藏6天后又回升。因此从菌定量着眼, 若不是采样后数小时内完成计量, 还不如保藏6—8天后再进行计量, 将取得更接近土样原始菌量的结果。

讨 论

从土壤微生物生态调查的菌计量测定结果表明, 土样保藏中温度明显影响菌量变化, 异养菌20℃下比5℃下保藏菌量提高1.5—10倍之多, 而对厌氧菌——硫酸盐还原菌影响就小得多。个别土样温度提高也有菌量下降的情况, 5℃下保藏除4、5号土样(含水量16—23%)外, 平均菌量均接近初始水平, 而提高到室温保藏将大大增加了菌的含量。以往一些学者^[43, 44]主张采用室温保藏, 显然会对一般好氧异养菌计量增加误差。

土壤有机物的多寡影响着土壤中菌的世代时间^[8]。从我们所得的结果证明, 有机物含量高的土壤比有机物低的菌量可高几倍到几十倍, 而这种影响对硫酸盐还原菌尤为明显。

土壤含水量是直接影响保藏期菌量变化的重要因素, 前人^[5, 15]仅提到保藏干土土样一旦湿润会强烈增加菌量。从我们试验的结果表明,

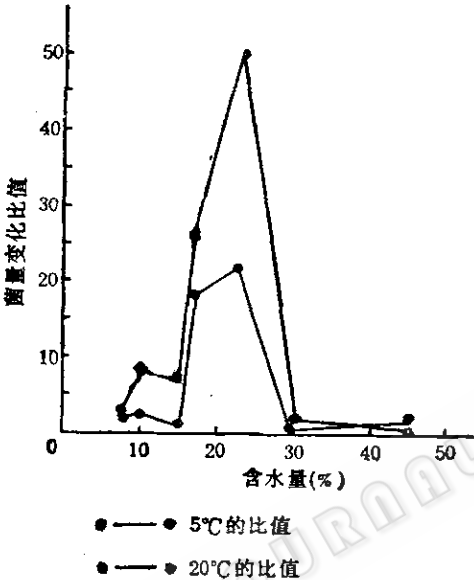


图3 不同含水量的土壤在5℃和20℃保藏温度下异养菌平均菌量变化比值

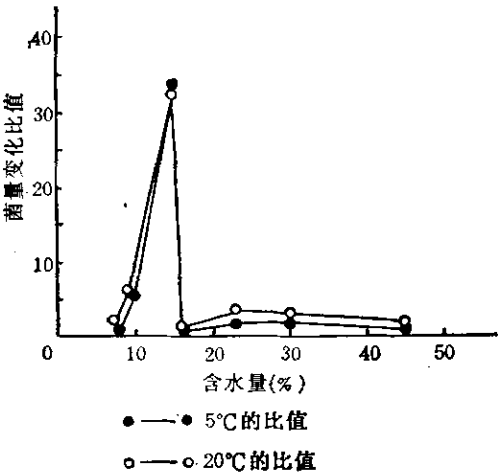


图4 不同含水量的土壤在5℃和20℃保藏温度下硫酸盐还原菌平均菌量变化比值

土样保藏中菌量变化决定于菌的类型、含水量的范围及其他制约因素。

从所得结果来分析,一般好氧异养菌在低含水量土样,5℃下保藏一周内波动较大,而后比较平稳,20℃保藏14天后趋向稳定;高含水量土样,两种温度下相对都比较平稳。硫酸盐还原菌在所试含水量、温度下,8天后趋向相对平稳。所以建议采样后好氧性异养菌计量分析若不能在24小时内进行;不如在5℃下保存7天后再分析。计量厌氧菌——硫酸盐还原菌,在低含水量土样中不能在一天内分析;高含水量不能在6小时内进行分析,不如在5℃或室温下保存8天后进行。非水饱和、有机物含量高的土样,可延长到两周后进行以上二类菌的测定。

参 考 文 献

- [1] Waksman, S. A.: Principles of soil Microbiology, p. 3—6, 1932.
[2] James, N. et al.: Can. J. Res., 17C, 72—86, 1939.

- [3] Burges, A.: Methods of Examining the Soil Population, in "Microorganisms in the Soil" p. 44—71, Hutshinson and Co. Ltd. London, 1958.
[4] Golebiowski, J.: Pedologie. J. (no. spec), 98—103, 1957.
[5] Pochon, J.: Manuel Technique D' Analyse Microbiologique du sol Masson et cie editeurs, 1954.
[6] Ziemicka, J. M.: Podologie. J. (W. Sepc.), 5—13, 1957.
[7] 中国科学院林业土壤研究所微生物室编著:土壤微生物分析方法手册, p 6, 科学出版社, 1960.
[8] Parkinson, D.: Methods for Studying the Ecology of Soil Microorganisms, Blackwell Scientific Publications Oxford, p. 5—18, 1971.
[9] Walken, N.: Soil Microbiology, P193—201, 1975.
[10] 土壤微生物研究会:土壤微生物实验法, p.1—6, 东京株式会社, 1975.
[11] 中国科学院南京土壤研究所编:土壤理化分析, 科学出版社, 1978.
[12] Нобергрудский, Д. М.: Почвенная Микробиология, 1956.
[13] Jensen, V.: Zentbl. Bakt. Parasitkb. Abt., 116: 13, 1962.
[14] Casida, L. E. Jr.: Soil Science 98(6): 371—376, 1964.
[15] Waksman, S. A.: Soil Microbiology, John wiley and sons. Inc., 25—33, 1952.

明胶-戊二醛固定化细胞的改进

寇秀芬 王祯祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 采用明胶-戊二醛在有机溶液中成球的方法制备固定化细胞,方法简便,固定化细胞酶活力为6.25—6.75单位/g(湿重)。用该固定化细胞裂解3.0—8.0%的青霉素溶液,裂解率达98.3%以上。裂解液经过浓缩后提取6-APA,产率为86.3%,不经浓缩直接提取6-APA,产品收率为72.4%,产品质量合格。

关键词 固定化细胞, 6-氨基青霉烷酸

明胶含有赖氨酸 ϵ -NH₂、N-末端氨基,为戊二醛双功能交联提供了反应基质。通过双功能试剂的作用,明胶与微生物细胞之间形成共价键,使微生物细胞彼此交联,凝集成网状结构。根据这一原理,明胶-戊二醛和细胞混合物经深冻将水份溢出,形成有弹性的凝聚体,类似于海绵。然后将其切割成方块,长条等形状用于半抗生素的生产已取得较好的结果^[1]。

该固定化细胞制备过程较为复杂,而且固定化细胞体积较大,活力偏低,使用过程中剖面处细胞容易脱落。为了克服上述缺点,我们改进了固定细胞的方法。采用明胶-戊二醛和菌体的混合物在有机溶剂中成球的方法制备固定

青霉素的裂解实验和6-APA的提取、产品分析是在华北制药厂朱军等同志的大力支持和协作下完成的,特此致谢。