

亚硝酸氧化细菌分离方法的比较

郑忠辉 刘月英 许正平* 黄克服

(厦门大学生物系, 福建厦门 361005)

摘要 试验对亚硝酸氧化细菌的三种分离方法—稀释法, 硅胶平板分离法和富集培养-微口吸管滴分法进行了比较, 结果表明稀释法最简便易行, 分离效果最好。

关键词 亚硝酸氧化细菌; 分离

亚硝酸氧化细菌在土壤氮素养分的转化及自然界的氮素循环中起着重要的作用; 此外, 它还可以用来组装亚硝酸微生物传感器, 这种传感器在环境监测中可用于测定大气中二氧化氮的浓度及水中亚硝酸的浓度等。

由于亚硝酸氧化细菌是化能自养菌, 其生长极其缓慢, 且培养过程中常伴有大量的异养细菌生长, 分离时难以除去等原因, 所以很难分离纯化, 这给有关亚硝酸氧化细菌的研究和应用带来了一定的困难。经过人们长期的研究探索, 目前已建立了多种分离方法, 如: 稀释法^[1], 硅胶平板分离法^[2], 富集培养-微口吸管滴分法^[3]和富集培养-硅胶平板分离法^[4]等。这些方法的难易程度和分离效果各有差异。为了寻找出分离周期短, 操作方法简便及分离效果好的分离方法, 我们在分离亚硝酸氧化细菌(用于组装亚硝酸微生物传感器)时, 对稀释法, 硅胶平板分离法和富集培养-微口吸管滴分法等三种方法进行了比较, 现将结果报道如下。

材料与方法

(一) 土样

采自厦门杏林合成氨厂周围的土壤。

(二) 稀释法

参照文献[1]的培养基与方法进行。分离时用 10^{-6} , 10^{-7} 二个稀释度各接 20 瓶, 于 28℃ 培养三周后, 用格里斯氏试剂检测 NO_2^- 的减少, 用二苯胺-硫酸试剂检测 NO_3^- 的形成, 用纯度检测培养基^[5] 检查 NO_3^- 检测阳性瓶中的培养物是否有异养菌污染。

(三) 硅胶平板分离法

硅胶平板的制备按文献[3]进行, 培养基及分离方法基本参照文献[2]进行。分离时共涂抹 20 个平板, 培养后从中挑取 40 个菌落分别接于 40 个培养瓶中, 培养三周后, 按上述方法检测 NO_2^- 、 NO_3^- 及异养菌。

* 本系微生物专业毕业生。

(四) 富集培养-微口吸管滴分法

参照文献[3]的培养基与方法进行。分离时共滴分 40 瓶,培养后同上述方法检测 NO_2^- 、 NO_3^- 及异养菌。

结果与讨论

用三种不同的方法:稀释法,硅胶平板分离法和富集培养-微口吸管滴分法,从同一种土样中分离亚硝酸氧化细菌。结果(表 1)表明,硅胶平板分离法和富集培养-微口吸管滴分法都未能分离到纯培养物,只有稀释法能够分离到。这些培养物的细胞呈杆状,大小和形态基本上均匀一致。革兰氏染色阴性。用其中 2 个培养物组装亚硝酸微生物传感器,其响应强度与一定范围的 NO_2^- 浓度成线性关系,而且传感器的选择性良好(另文待发表)。因此,可以认为这些培养物是纯化的亚硝酸氧化细菌。

表 1 三种分离方法分离效果的比较

分离方法	分离总瓶数	NO_2^-		纯度检测培养基*	
		阳性	阴性	生长	不生长
稀释法	40	28	12	21	7
硅胶平板分离法	40	21	19	21	0
富集培养-微口吸管滴分法	40	17	23	17	0

* 含有多多种有机物的培养基。在此培养基中能生长表明分离瓶中的培养物不纯,有异养菌存在;不生长则是基本纯的培养物。

采用硅胶平板分离法和富集培养-微口吸管滴分法在我们的试验条件下未能成功地分离到纯的亚硝酸氧化细菌,我们认为前者的主要原因是:(1)亚硝酸氧化细菌在硅胶平板上的菌落极小(多数小于 $100\mu\text{m}$),又没有明显的特征,即使在低倍镜下也不易辨认,要准确挑取较困难;(2)平板接种量较大(0.2ml)带入了相当数量的杂菌及一些有机物(培养基中含有土壤带来的有机物),致使平板上有大量杂菌生存,

挑取菌落时就可能染上杂菌。后者的主要原因是:(1)培养液中多数菌吸附在碳酸钙颗粒的表面上(培养液中含有 1% 的碳酸钙)而沉淀于底部^[3],尽管滴分前采用 CO_2 通气处理,但分散效果仍不理想,结果上清液中亚硝酸氧化细菌的数量减少,而杂菌不发生吸附,多数仍存在于上清液中,使上清液中杂菌所占的比例相当大,滴分时就易污染;(2)滴分时接种量不容易控制,而接种量的多少又直接影响到分离的效果。因此这二种方法都不容易一次分离成功。

采用稀释法分离效果好的原因,我们认为主要是由于培养基中不加碳酸钙,培养液无沉淀,既有利于菌的分散,又便于观察计数。分离时可根据菌量多少来控制稀释度(每毫升稀释液含菌量为 $0.5-0.7$ 个细胞),稀释液又可定量移取,所以分离很容易成功。

此外,就操作方法和分离周期而言,硅胶平板法虽然分离周期较短(9 周左右),但平板的制备相当麻烦;富集培养-微口吸管滴分法由于富集培养时需要多次移接和多次流加亚硝酸钠溶液,所以操作麻烦,分离周期也较长(13 周左右),而且富集培养过程对亚硝酸氧化细菌有选择作用^[4];而稀释法整个操作过程较简便,分离周期也较短(8 周左右)。

综上所述,稀释法具有操作简便,分离周期短,分离效果好等优点,我们认为它是分离亚硝酸氧化细菌的较理想的方法。

参 考 文 献

1. Schmidt E L and L W Belser: Nitrifying bacteria, In A L Page (ed), Methods of soil analysis, Part 2, 2nd., p. 1027-1036, American of Agronomy Inc., Wisconsin, 1982.
2. (日)土壤微生物研究会编,叶维青等译:土壤微生物试验法, p. 299-300, 科学出版社,北京,1983 年。
3. 宋鸿遇等:微生物学通报,9(3): 139-141, 1982.
4. Meiklejohn J: J. Gen. Microbiol., 4:185-191, 1950.

THE COMPARISON ON METHODS FOR ISOLATION OF NITRITE OXIDIZERS

Zheng zhonghui Liu yueying Xu zhengping Huang kefu

(Department of Biology, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005)

Three methods for isolation of nitrite oxidizers—dilution method, silica-gel plate method and enrichment culture-capillary pipette method were compared. Among them the dilution method was most feasible and efficient.

Key words nitrite oxidizer; isolation