

研究报告

根际优势菌耐药菌株的获得及其¹⁵N 标记

吴胜春 李良谟 李振高 潘映华

中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008

摘要 对两株具有反硝化活性的根际优势细菌进行了耐药性和¹⁵N 标记;研究了该双标记菌株在土壤中的动态及其活性;结果表明,所用双标记方法是可行的,应用标记菌株可以追踪其在土壤中的消长;结果还表明,标记¹⁵N 菌株的¹⁵N 丰度与供试培养基中氮源的¹⁵N 丰度相近;标记菌株的反硝化活性与出发菌株的相同。

关键词 根际细菌, 耐药菌株, ¹⁵N 标记, 双标记菌株, 反硝化活性

在微生物生态学及微生物对物质转化的研究中,选育和应用具有特殊标记的菌株对追踪土壤中各种微生物过程的动态研究^[1],不失为一种有效、可取的方法。目前在实验中关于应用经耐药性标记的基因工程菌、根瘤菌^[2,3]、固氮菌的报道较多,而对作物根际优势菌同时进行耐药性标记和¹⁵N 标记的双标记研究还比较少见。本工作的目的在于获得双标记菌株,并了解该菌株在土壤中的存活状况、群体数量的变化与外部条件的关系;同时,通过菌株的¹⁵N 标记,可以跟踪微生物生物量氮的转化及去向^[4],为进一步研究微生物生物氮这一营养库在微生物、土壤、植株之间的物质流提供一种手段。

1 材料与方法

1.1 出发菌株

从小麦根际分离获得的原始出发菌株:(1) *Bacillus* sp. (12[#]), (2) *Pseudomonas* sp. (20[#])。

1.2 培养基

菌株耐药标记用培养基: LB^[5] + 不同浓度(5、20、50、1200. μg/ml)的盐酸盐链霉素。

菌株¹⁵N 标记用培养基: 葡萄糖2.5g, 柠檬酸2m mol/L, 硫酸铵-¹⁵N 10m mol/L, 氯化钾

10m mol/L, 磷酸二氢钠1m mol/L, 硫酸钠2m mol/L, 氯化镁1.25m mol/L, 氯化钙0.02m mol/L, 氧化锌4mg, 氯化铁54mg, 氯化锰20mg, 氯化铜2mg, 氯化钴5mg, 磷酸0.6mg, 钼酸钠0.1μmol/L, 蒸馏水1000ml, pH7.0。

1.3 供试土壤

河南封丘的黄潮土,江苏泗洪的砂姜黑土。

1.4 耐药菌株的获得

将两种菌12[#]、20[#]分别接种于LB 液体培养基中进行两次活化,然后测定它们在LB 液体培养基中的生长曲线。分别在各自生长对数期的中期,吸取1ml 菌液涂布于含5 μg/ml 链霉素的固体LB 培养基上,置28℃恒温室中培养2天。挑取在平板上出现的菌落至含20 μg/ml 链霉素的LB 液体培养基,28℃恒温条件下进行振荡培养。当培养基出现浑浊时,再接种至含50 μg/ml 链霉素的LB 液体培养基,振荡培养。以此类推,最后涂布于含药的LB 平板,待长出菌落,挑取保存于斜面,由此获得抗1200 μg/ml 链霉素的菌株(12[#]Str 和20[#]Str)。

1.5 稳定性试验

抗药菌株能否应用于研究,还必须验证所

获性状的遗传稳定性。因为细菌具有抗药性是其基因发生突变的结果，而且对链霉素的抗性突变为单基因突变。为此，进行了下述3项试验：

1.5.1 将抗药菌株在链霉素的含量依次升高的LB固体培养基上连续传代6次，观察其是否始终有菌落出现。

1.5.2 将抗药菌株接种至不含链霉素的LB液体培养基中，连续接种培养3—5次，然后将其涂布于含1200 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的LB固体培养基上，观察其是否有菌落出现。

1.5.3 将抗药菌株置于4 $^{\circ}\text{C}$ 的低温中保藏3—4个月，然后接种于含1200 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的LB液体培养基中进行培养，观察是否会变浑浊，并在含链霉素的LB固体培养基上划线培养。

经过上述不同方法的试验，结果都有丰满完整的抗药菌株出现，充分证明所获菌株具有良好的抗药稳定性。

1.6 耐药菌株的 ^{15}N 标记

将经过活化的抗药菌株，接种到上述 ^{15}N 标记用培养基中。在28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下，静置培养和200 r/min振荡培养，分别测定其生长曲线。当细菌生长进入稳定期后，即停止培养。将菌悬液用高速离心机于4000r/min下离心15分钟，倾出上清液，注入适量的生理盐水，搅匀，再

离心，如此反应用生理盐水洗2—3次，同时用奈氏试剂检测，直到将游离的铵离子全部洗净为止。所得沉淀物即为双标记菌菌体。该样品于80 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干，研碎，分析其全氮含量，同时用质谱仪测定菌体的 ^{15}N 丰度。

2 结果与讨论

2.1 获得耐药菌株的关键

在试验之初，我们为了获得较大的菌体数量，将两种菌分别接种于LB液体培养基，置于28 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温培养72小时后，再涂布于含5 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的LB固体培养基上培养，但结果不理想，几乎没有菌落出现。考虑到可能是由于培养时间过长菌体活力减退，而无法筛选到抗药菌株，所以分别测定了两种菌在LB液体培养基中；28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养条件下的生长曲线（图1）。当培养进入对数期的中期，即停止培养，立即涂布于不同浓度的药板上，培养2天后，每个培养皿内都有抗药菌落出现。从图1可以看出，12 $^{\#}$ 菌株与20 $^{\#}$ 菌株的生长曲线迥异，前者的停滞期比后者要短得多，故必须按它们各自的生长特点进行处理，才能得到比较满意的结果。可见，在对细菌进行耐药性标记时，菌体的质量要比数量更为关键。

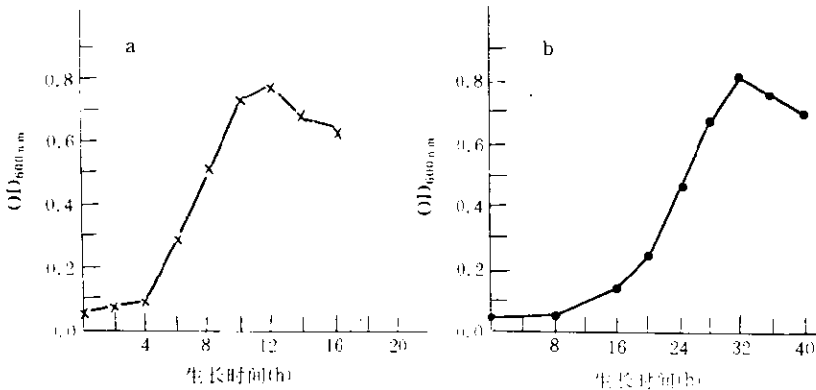


图1 出发菌株12 $^{\#}$ 及20 $^{\#}$ 的生长曲线

a. 12 $^{\#}$ 菌 b. 20 $^{\#}$ 菌

2.2 耐药菌株在土壤中的存活率

为了观察所获抗药菌株重新回接至土壤后的生长状况,了解在土壤中是否会发生回复突变,能否达到标记追踪的目的,进行了以下试验:

称取砂姜黑土和黄潮土(非灭菌土)300g于500ml 结晶皿中,加水至最大持水量的60%。然后接种入一定量的耐药菌株,置于28℃恒温室培养。每隔3天,称取土样用含链霉素的平板对土中的细菌进行分离计数(图2)。

图2表明两种菌在土壤中都有一個由增殖

到衰减的过程,与在培养基中的生长过程相类似,说明所获得的抗药菌株完全可以应用于土壤中进行追踪。同时,由表1还可以看出菌株 $20^{\#} Str^r$ 的增殖能力要比菌株 $12^{\#} Str^r$ 强得多,对环境适应性较好,在土壤中存活的时间也较菌株 $12^{\#} Str^r$ 为长,所以它的群体数目远远超过 $12^{\#} Str^r$ 菌。由于江苏泗洪的砂姜黑土中有机质含量要比河南的黄潮土低,可能不利于微生物存活,尤其不利于 $20^{\#} Str^r$ 菌,所以其微生物总量也少于黄潮土。

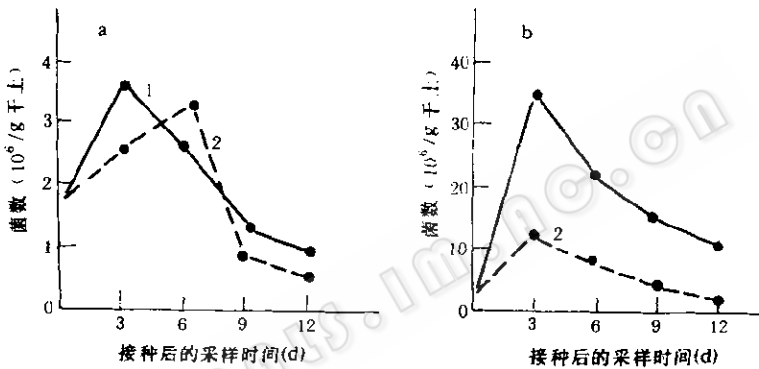


图2 双标记菌株的土壤回收结果

1. 黄潮土 2. 砂姜黑土 a. $12^{\#} Str^r$ b. $20^{\#} Str^r$

2.3 耐药菌株的反硝化活性

据报道,根瘤菌菌株发生基因突变获得抗药性后,其固氮活性往往出现下降现象。本试验中的两菌株系反硝化菌,经抗药突变后,是否会影响其反硝化活性呢?我们对两种菌的亲株及其突变株的反硝化活性强度进行了测试。具体作法是:在盛有10ml 反硝化菌培养基的血清瓶中,分别接种等量的菌悬液(约含 175×10^4 /瓶),各菌株重复4次,然后按文献[6]的方法进行培养和测定,结果如表1所示。

从表1看出,经新复极差统计, $p < 0.01$,两种菌的突变菌株与其亲株的反硝化活性几乎无差异,这与有的根瘤菌突变后亦不影响其固氮活性的报道相一致^[7]。表1还表明,菌株 $20^{\#}$ 和 $20^{\#} Str^r$ 的反硝化强度远远高于菌株 $12^{\#}$ 和菌株

表1 亲株与抗药菌株反硝化活性的比较

菌株	菌株的反硝化活性 (N_2O , ng/ μ l, 培养4天)
$12^{\#}$ 亲株	10.7 ± 2.06 B
$12^{\#}$ 抗性菌	10.9 ± 1.89 B
$20^{\#}$ 亲株	127 ± 2.22 A
$20^{\#}$ 抗性菌	131 ± 9.91 A

新复极差法统计,相同字母差异不显著, $p < 0.01$

$12^{\#} Str^r$, 差异达 $p < 0.01$ 的显著性。

2.4 双标记菌株的含氮量及其 ^{15}N 丰度

对菌株进行 ^{15}N 标记,首先要考虑供试氮源的 ^{15}N 丰度,丰度低也许不容易标记成功,丰度高固然对标记有利,但供试氮源价格昂贵。为

此,先用非抗药性菌株进行了不同丰度 ^{15}N 的标记试验,然后用抗药性菌株再次进行 ^{15}N 标记,所获结果趋势完全一致。表2表明,耐药菌株标记的 ^{15}N 丰度与供试氮源的 ^{15}N 丰度十分接近,而且不同菌株标记的 ^{15}N 丰度也很相近,这可能由于菌体同化氮素时仍按供试氮源

表2 双标记菌株的含氮量及其 ^{15}N 丰度

菌 株	$12^{\#}\text{Str}^{\gamma}$	$20^{\#}\text{Str}^{\gamma}(\text{a})$	$20^{\#}\text{Str}^{\gamma}(\text{b})$
生长量 (g/L)	0.301	0.471	5.67
培养基中硫酸铵的 ^{15}N 丰度 (%)	30.36	30.36	10.07
标记菌株的 ^{15}N 丰度 (%)	29.7	28.5	9.43
菌体含氮量 (%)	9.82	5.18	9.59

中 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 的比例吸收的缘故。一般来说, ^{15}N 丰度在10%左右的材料(氮肥、标记 ^{15}N 的有机肥等)即足以用于 ^{15}N 追踪、转化和去向的研究,因此,从节约的角度考虑,用低 ^{15}N 丰度的氮源标记即可。除非对标记菌株有特殊要求,则

另当别论了。由表2还可以看出,不同菌株的菌体中全氮含量有相当差异,说明 $12^{\#}$ 菌吸收同化氮源的能力要高于 $20^{\#}$ 菌;同一种菌培养条件不同,其菌株生长量与菌体含氮量也差异明显。如表2中 $20^{\#}\text{Str}^{\gamma}(\text{a})$ 的生长量远远低于 $20^{\#}\text{Str}^{\gamma}(\text{b})$,两者相差10倍以上,这可能与前者是静置培养;后者是连续振荡培养有关,相应的菌株全氮含量也是 $20^{\#}\text{Str}^{\gamma}(\text{a})$ 低于 $20^{\#}\text{Str}^{\gamma}(\text{b})$,可见生长条件对菌株的生理指标有显著影响。

参 考 文 献

- [1] 陈华癸、李卓棣、陈文新,等编著.土壤微生物学,上海:上海科学技术出版社,1981,8.
- [2] 姚惠琴、朱增炎、曹景勤,等.土壤学报,1983,20(1):83-91.
- [3] Zelazna-Kowalska, I. Plant and Soil, Special volume, 1971, 67-71.
- [4] JA van Veen, JN Lead, JK Martin, *et al.* Soil Biol Biochem. 1987, 19(5):559-565.
- [5] 中国微生物菌种保藏管理委员会编著.中国菌种目录,北京:机械工业出版社,1992,251.
- [6] 李良谟、伍期途、周秀如,等.气相色谱测定氧化亚氮的方法及其应用.分析微生物学专辑,北京:科学出版社,1988,172-176.
- [7] 曹景勤、陈碧云、姚惠琴.土壤,1988,2:75-78.

OBTAINING STREPTOMYCIN RESISTANCE STRAIN FROM PREDOMINANT RHIZOSPHERE BACTERIA AND ITS ^{15}N LABEL

Wu Shengchun Li Liangme Li Zhengao Pan Yanghua

(Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing 210008)

Abstract Two strains of predominant rhizosphere bacteria having denitrifying activity were labelled with streptomycin and with ^{15}N - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; the dynamics and activities of these double labelled strains in soils were investigated. The results obtained showed that the double labelling method used in this paper was feasible, and that the labelled strains can be used to trace the growth and decline of them in soils. The results also showed that the ^{15}N abundance of ^{15}N -labelled strain was similar to those of the nitrogen resources in the medium tested, and that the denitrifying activities of double labelled strain and its original strain were the same.

Key words Rhizosphere bacteria, Streptomycin resistance strain, ^{15}N label, Double labelled strain, Denitrifying activity