

不同培养基对湖泊氨氧化细菌 MPN 计数的影响

邱珊莲 周易勇*

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要: 本文研究了培养时间、培养基类型、硫酸铵浓度对湖泊沉积物与水中氨氧化细菌(AOB)MPN 计数的影响。结果表明, MPN 值随培养时间的延长而增大, 且趋于稳定。对不同样品而言, 培养 40 d 后, MSF 培养基均给出稳定的 MPN 值。在 3 种不同类型的培养基(XZ-AOB、MSF、SW)中, MSF 产生的 MPN 值最大。此外, 培养基中的硫酸铵浓度对 MPN 计数亦有重要影响, 与沉积物 AOB 相比, 湖水 AOB 对硫酸铵浓度更为敏感。

关键词: 氨氧化细菌, MPN, 培养时间, 培养基类型, 硫酸铵浓度

Effect of Different Media on MPN Estimation of Ammonia-oxidizing Bacteria in Lakes

QIU Shan-Lian ZHOU Yi-Yong*

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: The MPN method was used to enumerate ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in water and sediments of several shallow lakes. The suitable incubation time, medium types and substrate (ammonium sulphate) concentrations were studied. The results showed that, MPN values increased with the incubation time, reaching a stable maximum at some time stages, which was 40 days in all the samples for MSF medium. Among the three media used (XZ-AOB, MSF, SW), MSF give the highest MPN value. In addition, ammonium sulphate concentration in medium was an important factor affecting MPN estimation of AOB. Compared to AOB in lake sediments, AOB in lake water was more sensitive to ammonium sulphate concentration.

Keywords: Ammonia-oxidizing bacteria, MPN, Incubation time, Medium types, Ammonium sulphate concentration

硝化作用是湖泊氮循环的重要过程^[1], 其基本步骤有二, 氨氧化细菌将氨氮氧化为亚硝态氮, 亚硝酸盐氧化细菌再将亚硝态氮氧化为硝态氮。显然, 前者常为氮转化过程的限制性步骤^[2]。因此, 氨氧化细菌在湖泊氮循环过程中的作用极其重要, 氨氧化

细菌是以氨氮作为唯一能量来源的自养细菌, 生长极其缓慢, 其数量不能用平板计数法测定, 故最大或然法(most probable number, MPN)已成为测定特殊微生物生理类群的常用方法^[3-6], 它已广泛应用于土壤、水体等环境中氨氧化细菌的测定^[7-13]。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(No. 2008CB418005); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KZCX2-YW-426-01); 中国科学院知识创新工程重大交叉项目(No. KZCX1-YW-14-1)

* 通讯作者: Tel: 027-68780709; E-mail: zhouyy@ihb.ac.cn

收稿日期: 2008-03-21; 接受日期: 2008-05-23

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

然而，目前尚未见用于氨氧化细菌 MPN 计数的国际通用培养基，用不同的培养基培养同一样品往往产生明显不同的 MPN 值。本文讨论了 3 种不同的培养基对 5 个湖泊氨氧化细菌 MPN 计数的影响。这一工作旨在选取适宜的培养基与培养条件，进而深入揭示湖泊氮循环的机理，为湖泊富营养化的治理提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

湖泊沉积物和水样取自保安湖、后官湖、月湖、巢湖、东湖，见表 1。

1.2 方 法

1.2.1 培养基：实验采用的培养基(表 2)包括 XZ-AOB 培养基^[14]、MSF 培养基^[15]与 SW 培养基^[16]。

微量元素溶液 No.44 配方：EDTA 2.5 g/L, ZnSO₄·7H₂O 10.95 g/L, FeSO₄·7H₂O 5 g/L, MnSO₄·H₂O 1.54 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.392 g/L, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.248 g/L, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.177 g/L。

1.2.2 MPN 法：用 1 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2)对沉积物和湖水水样进行 10 倍梯度稀释，选取不同稀释梯度，每个稀释度设置 5 个重复，接种到 5 mL 的液体培养基中，28℃ 黑暗培养，用 Griess 试剂进行检测，根据检测结果查 MPN 表^[17]，推算每克干沉积物和每毫升水样中氨氧化细菌的数量^[18]。

表 1 各采样点的基本特征 Table 1 Characters of sampling sites				
时间 Time	地点 Site	气温 Temperature (°C)	水深 Depth (cm)	透明度 Transparency (cm)
2006.4.10	保安湖	22	120	45
2006.4.18	后官湖	27	250	100
2006.6.20	月湖 12#	33	170	23
2006.10.12	月湖 16#	26	100	30
2006.12.22	月湖 2#	8	175	54
2007.4.29	巢湖	28	—	77
2007.5.21	东湖	29	—	—

表 2 氨氧化细菌的 3 种培养基 Table 2 Three culture media for growth of ammonia-oxidizing bacteria			
培养基成分 Ingredient	XZ-AOB	MSF	SW
蒸馏水 Distilled water (mL)	1000	1000	1000
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	2	0.5	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.03	0.05	0.04
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0.75	0.5	
KH ₂ PO ₄ (g/L)			0.2
NaH ₂ PO ₄ (g/L)	0.25		
MnSO ₄ ·4H ₂ O (g/L)	0.01		
CaCO ₃ (g/L)	5	14.29	
NaCl (g/L)		2	
CaCl ₂ ·H ₂ O (g/L)		0.02	
CaCl ₂ ·2H ₂ O (g/L)			0.04
KHCO ₃ (g/L)		0.02	
NaMoO ₄ ·2H ₂ O (mg/L)		0.0024	
Fe-EDTA (mg/L)			0.5
微量元素溶液 Trace elements mixture (mL)		1	1

2 结 果

2.1 培养时间对湖泊氨氧化细菌 MPN 计数的影响

用 3 种培养基接种 10 d 后检测氨氧化菌，此后

每 7 天检测 1 次，止于第 66 天。如图 1 所示，MPN 值均随时间的延长而增大，且逐渐趋于稳定。此外，不同培养基给出的 MPN 稳定值不尽相同。就 XZ-AOB 培养基而言，6 种样品 MPN 值达到稳定所需的时间差异明显，最短者为 24 d(图 1C、图 1D)，

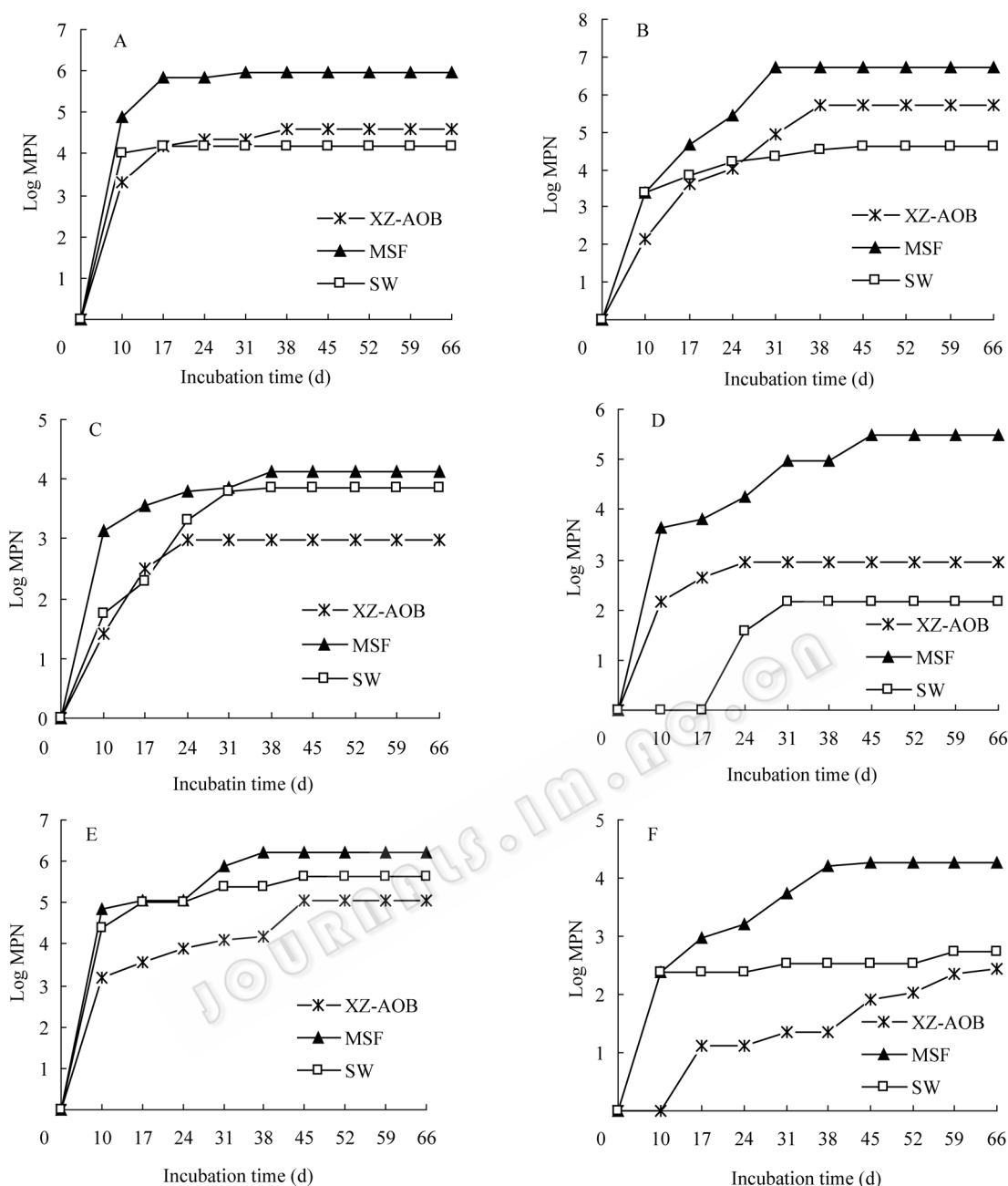


图1 培养时间对三种不同培养基中湖泊氨氧化细菌 MPN 计数的影响

Fig. 1 Effect of incubation time on the MPN enumeration of AOB in lakes in three different media

注：A：月湖沉积物(2006.6.20)；B：保安湖沉积物(2006.4.10)；C：后官湖沉积物(2006.4.18)；D：巢湖沉积物(2007.4.29)；E：东湖沉积物(2007.5.21)；F：月湖水样(2006.10.12)

Note: A: sediment of Lake Yuehu(June 20, 2006); B: sediment of Lake Baohan(April 10, 2006); C: sediment of Lake Houguan(April 18, 2006); D: sediment of Lake Chaohu(April 29, 2007); E: sediment of Lake Donghu(May 21, 2007); F: water of Lake Yuehu(Oct 12, 2006)

最长者超过 60 d (图 1F)；就 SW 培养基而言，6 种样品 MPN 值达到稳定所需的时间亦在 17 d (图 1A)与 66 d (图 1F)之间变动；就 MSF 培养基而言，培养 40 d 后所有样品的 MPN 值均趋于稳定。

2.2 不同培养基对沉积物氨氧化细菌 MPN 计数的影响

由表 3 可知，就所有样品而言，MSF 培养基给出

的 MPN 值均高于 XZ-AOB 培养基和 SW 培养基给出的相应值。简言之， MPN_{MSF}/MPN_{XZ-AOB} 的比值范围为 1.75~329.67， MPN_{MSF}/MPN_{SW} 的比值范围为 2.00~2000.00。SW 培养基与 XZ-AOB 培养基给出的 MPN 值的对比关系较为复杂。因此，MSF 可作为氨氧化细菌 MPN 计数的最佳培养基，培养时间为 40 d (参见 2.1)。

表 3 不同培养基对湖泊氨氧化细菌 MPN 计数的影响
Table 3 Effect of different medium types on the MPN enumeration of AOB in lakes

采样点 Sampling sites	MPN 培养基 MPN medium			不同培养基 MPN 比值 MPN ratio		
	XZ-AOB	MSF	SW	MSF/XZ-AOB	MSF/ SW	SW/XZ-AOB
月湖沉积物(2006.6.20) Sediment of Lake Yuehu	39000	940000	15000	24. 10	62.67	0.38
保安湖沉积物(2006.4.10) Sediment of Lake Baoan	540000	5400000	42000	10.00	128.57	0.08
后官湖沉积物(2006.4.18) Sediment of Lake Houguan	930	14000	7000	15.05	2.00	7.53
巢湖沉积物(2007.4.29) Sediment of Lake Caohu	910	300000	150	329.67	2000.00	0.16
东湖沉积物(2007.5.21) Sediment of Lake Donghu	110000	1600000	420000	14.55	3.81	3.82
月湖水样(2006.10.12) Lake water of Lake Yuehu	280	18000	540	64.29	33.33	1.93
月湖水样(2006.12.22) Lake water of Lake Yuehu	20	3500	80	175.00	43.75	4.00
月湖沉积物(2006.12.22) Sediment of Lake Yuehu	280000	490000	110000	1.75	4.45	0.39

2.3 底物浓度对湖泊氨氧化细菌 MPN 计数的影响

月湖不同时期水样对各培养基中的硫酸铵浓度均较敏感,就 XZ-AOB 培养基而言,适宜硫酸铵浓度为 0.5 g/L,该值为培养基原配方浓度的 1/4;就 MSF 培养基而言,适宜硫酸铵浓度为 0.5 g/L,该值等同于原配方中的相应浓度;就 SW 培养基而言,适宜硫酸铵浓度为 0.05 g/L,该值为原配方浓度的 1/10,亦为上述两种培养基最适浓度的 1/10。水样中氨氧化细菌对高浓度(5 g/L)硫酸铵较为敏感,以至无法检测(图 2A、图 2B)。

就 XZ-AOB 培养基而言,适于沉积物氨氧化细菌培养的硫酸铵浓度为 2 g/L,即培养基原配方浓度;就 MSF 培养基而言,适于沉积物的硫酸铵浓度为 0.5 g/L,即培养基原配方浓度;就 SW 培养基而言,适于沉积物的硫酸铵浓度亦为 0.05 g/L,该值为原配方浓度的 1/10(图 2C、图 2D)。总之,沉积物氨氧化细菌对培养基中的硫酸铵浓度不甚敏感,各培养基在最高浓度的硫酸铵培养基中均能检测到一定数量的氨氧化细菌。

综上所述,在 XZ-AOB、MSF、SW 三种培养基中,仅 MSF 原始配方中硫酸铵浓度可兼用于沉积物与水样中的氨氧化细菌的适宜培养。就水样而言,XZ-AOB 和 SW 原始配方中硫酸铵浓度均偏高;就沉积物而言,SW 原始配方中硫酸铵浓度亦偏高,选用时应适度调整。

3 讨论

用于 MPN 计数的培养时间不尽相同,如 2 周^[14]、3 周^[19-21]、4 周^[10]、5 周^[15]、6 周^[22,23]以及 8 周或更长时间等^[7,8]。本项研究表明,针对采自不同湖泊的沉积物和水样,MSF 培养基均能在 40 d 给出稳定的 MPN 值。这一结果为不同湖泊相关研究的比较提供了共同的实验基础。

不同类型的培养基已广泛用于氨氧化细菌的计数培养,且各自产生不同的 MPN 值。例如,在 4 种培养基中,WT 培养基不适于污水氨氧化细菌的培养与 MPN 计数,其原因可能在于培养基较弱的缓冲能力限制底物被氧化^[17]。SW 培养基给出的 MPN 值均小于 MSF 培养基给出的相应值(表 3),前者可能缺乏碳酸钙的缓冲,氨氧化将不断产生 H⁺,导致周围环境的酸化,进而抑制嗜微碱性环境(pH 7.0~8.5)的氨氧化细菌的生长^[24]。此外,XZ-AOB 培养基给出的 MPN 值均小于 MSF 培养基给出的相应值,前者包含的较高浓度的硫酸铵(2 g/L)可能抑制氨氧化细菌的生长。

实验证明^[7,8,10,11,21,22],不同环境中的氨氧化细菌对硫酸铵的敏感性不尽相同。Hasting 等^[7]认为,Esthwaite 湖水中的氨氧化细菌对硫酸铵浓度较为敏感,它仅在低浓度硫酸铵(0.67 mmol/L)的培养基中行使硝化作用,而高浓度的硫酸铵(12.5 mmol/L)则对沉积物氨氧化产生刺激作用。Whitby 等^[11]亦证明,

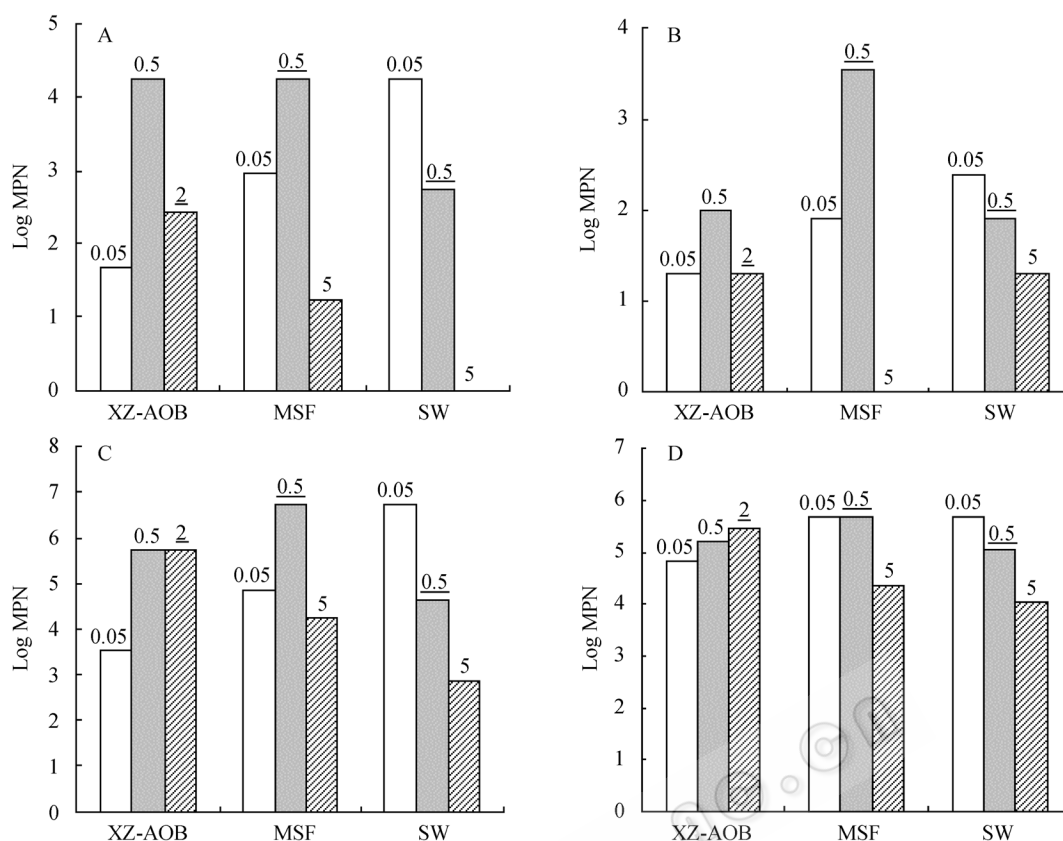


图2 底物 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对湖泊氨氧化细菌 MPN 计数的影响

Fig. 2 Effect of substrate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on the MPN enumeration of AOB in Lakes

注:柱上方数字为培养基中硫酸铵浓度(g/L),带下划线者为文献中原始浓度.其余数字为本实验设定的两个浓度. A: 月湖水样(2006.10.12); B: 月湖水样(2006.12.22); C: 保安湖沉积物(2006.4.10); D: 月湖沉积物(2006.12.22)

Note: The figures above the bars indicate the substrate concentrations in the media, among which the figures underlined indicate the concentrations mentioned in the literatures, and the remaining figures indicate the concentrations used in this experiment. A: Water of Lake Yuehu (Oct 12, 2006); B: Water of Lake Yuehu (Dec 22, 2006); C: Sediment of Lake Baoan (April 10, 2006); D: Sediment of Lake Yuehu (Dec 22, 2006)

Windermere 湖水中的氨氧化细菌仅能在低浓度(0.67 mmol/L)和中等浓度(5 mmol/L)硫酸铵培养基中行使硝化作用,而在低浓度(0.67 mmol/L)、中等浓度(5 mmol/L)以及高浓度(12.5 mmol/L)的硫酸铵培养基中,沉积物氨氧化细菌均能行使硝化作用。本项研究的结果与上述观点一致,即与沉积物氨氧化细菌相比,月湖水中的氨氧化细菌对硫酸铵的浓度更为敏感。

事实上,除以上3点培养因素会对氨氧化细菌 MPN 计数产生重要影响外,其他培养因素如培养条件(温度、pH、盐浓度)等均会影响氨氧化细菌的生长。曾国驱等^[25]研究表明,培养基中的盐浓度、培养基 pH、培养温度均对氨氧化细菌生长产生重要影响。Donaldson 等^[21]分别用 1 mmol/L 的磷酸缓冲液和去离子水用于土壤梯度稀释,稀释液接种于液体

培养基进行 MPN 计数,结果表明,水稀释土壤的 MPN 值与磷酸缓冲液稀释土壤的 MPN 值差异明显。由上可见,影响 MPN 计数的因素是多方面的。

总之,本文提出了用于浅水湖泊氨氧化细菌 MPN 计数的适宜培养时间(40 d)、培养基类型(MSF)与硫酸铵浓度(0.5 g/L),它将有助于相关方法的规范、不同湖泊实验结果的比较以及富营养化湖泊氮循环机理的深入阐明。

参考文献

- [1] Bothe H, Jost G, Schlöter M, *et al.* Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**: 673–690.
- [2] Prosser JI. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv Microb Physiol*, 1989, **30**: 125–181.
- [3] Patra AK, Chhonkar PK, Khan MA. Effect of green ma-

- nure *Sesbania sesban* and nitrification inhibitor encapsulated calcium carbide(ECC) on soil mineral-N, enzyme activity and nitrifying organisms in a rice-wheat cropping system. *Eur J Soil Biol*, 2006, **42**: 173-180.
- [4] Varughese EA, Wymer LJ, Haugland RA. An integrated culture and real-time PCR method to assess viability of disinfectant treated *Bacillus* spores using robotics and the MPN quantification method. *J Microbiol Meth*, 2007, **71**: 66-70.
- [5] Liao M, Xie XM. Effects of combination of plant and microorganism on degradation of simazine in soil. *J Environ Sci*, 2008, **20**: 195-198.
- [6] Gronewold AD, Wolpert RL. Modeling the relationship between most probable number (MPN) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration. *Water Res*, 2008, doi:10.1016/j.watres.2008.04.011.
- [7] Hastings RC, Saunders JR, Hall GH, *et al.* Application of molecular biological techniques to a seasonal study of ammonia oxidation in a eutrophic freshwater lake. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 3674-3682.
- [8] Bruns MA, Stephen JR., Kowalchuk GA, *et al.* Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 2994-3000.
- [9] Deni J, Penninckx MJ. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 4008 - 4013.
- [10] Phillips CJ, Harris D, Dollhope SL, *et al.* Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 5410-5418.
- [11] Whitby CB, Saunders JR, Pickup RW, *et al.* A comparison of ammonia-oxidizer populations in eutrophic and oligotrophic basins of a large freshwater lake. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, **79**: 179-188.
- [12] Yuan F, Ran W, Shen QR, *et al.* Characterization of nitrifying bacteria communities of soils from different ecological regions of China by molecular and conventional methods. *Biol Fert Soils*, 2005, **41**: 22-27.
- [13] Li HY, Yang M, Zhang Y, *et al.* Nitrification performance and microbial community dynamics in a submerged membrane bioreactor with complete sludge retention. *J Biotech*, 2006, **123**: 60-70.
- [14] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986, p.114.
- [15] Matulewich VA, Strom PF, Finstein MS. Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. *Appl Microbiol*, 1975, **29**: 265-268.
- [16] Soriano S, Walker N. Isolation of ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. *J Appl Bacteriol*, 1968, **31**: 493-497.
- [17] Meynell GG, Meynell E. Theory and practice of experimental bacteriology. Cambridge: Cambridge University Press, 1965, pp.204-209.
- [18] Belser LW, Schmidt EL. Diversity in the ammonia-oxidizing nitrifier population of a soil. *Appl Environ Microbiol*, 1978, **36**: 584-588.
- [19] Molina JAE, Rovira AD. The influence of plant roots on autotrophic nitrifying bacteria. *Can J Microbiol*, 1964, **10**: 249-257.
- [20] Smith WH, Bormann FH, Likens GE. Response of chemoautotrophic nitrifiers to forest cutting. *Soil Sci*, 1968, **100**: 471-473.
- [21] Donaldson JM, Henderson GS. A dilute medium to determine population size of ammonium oxidizers in forest soils. *Soil Sci Soc Am J*, 1989, **53**: 1608-1611.
- [22] Suwa Y, Imamura Y, Suzuki T, *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in activated sludges. *Water Res*, 1994, **28**: 1523-1532.
- [23] Whitby CB, Saunders JR, Pickup RW, *et al.* A comparison of ammonia-oxidizer populations in eutrophic and oligotrophic basins of a large freshwater lake. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, **79**: 179-188.
- [24] 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**: 8-10.
- [25] 曾国驱, 许玫英, 梁燕珍, 等. 亚硝化细菌的分离和特性的研究. 生物技术, 2005, **1**: 27-28.