

研究报告

多点接种方法计数土壤细菌生理类群的研究

高云超¹ 朱文珊² 陈文新²(广东省农业科学院生物技术研究所 广州 510640)¹ (中国农业大学微生物系 北京 100094)²

摘要: 多点接种计数方法是根据细菌分解固体培养基上不同的有机化合物的能力确定为不同的生理类群, 由有机化合物的降解点数和根据 MPN 方法进行计数。对不同的耕作方法进行测定表明, 秸秆覆盖免耕能够明显提高土壤中分解淀粉、木聚糖、纤维素、果胶、几丁质、卵磷质、脂类和蛋白质类群的细菌数量。

关键词: 多点接种计数方法, 细菌生理类群, 秸秆覆盖免耕

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0001-05

MULTIPOINT METHOD FOR QUANTIFICATION OF VARIOUS PHYSIOLOGICAL GROUPS OF BACTERIA IN STRAW MULCH NO-TILLAGE SOILS

GAO Yun-Chao

(Research Institute of Biotechnology, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640)

ZHU Wen-Shan CHEN Wen-Xin

(Department of Microbiology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: A modified multipoint method for enumeration of bacteria capable of various biochemical degradation reactions in soil is described. After continuous two-crop winter wheat and summer corn rotation with no-tillage for many years, the counts of hydrolysis of starch, xylan, pectin, protein, cellulose, chitin, lecithin and lipids bacteria were all increased significantly in no-tillage 0-10 cm soil depth compared to conventional tillage and direct drilling.

Key words: Multipoint method, Bacterial physiological grouping, Straw mulch no-tillage soil

应用不同组成和浓度的培养方法形成细菌细胞菌落是土壤细菌群落研究的常规技术, 早期对土壤细菌生理类群的研究主要是分离细菌后进行分类和生理功能分析^[1], 七十年代又发展到应用多元统计分析方法对土壤细菌进行功能分组, 以后 Kauri^[2]提出多点接种计数方法确定土壤细菌的生理类群, 并测定不同条件下的土壤各个生理类群的变化。本文介绍和应用修改的多点接种计数方法, 并对长期秸秆覆盖免耕条件下的土壤进行细菌生理类群分析。

1 材料与方法

1.1 土壤细菌生理类群分析方法

土壤样本用水或 Winogradsky's 标准盐溶液^[3]制成 10^{-2} , 10^{-3} , 2×10^{-4} , 10^{-4} , 2×10^{-5} , 5 个稀释度, 稀释时用 10mL 土壤悬液加入 90mL 或 40mL 水中可分别制成以

上悬液。转移土壤悬液于 ELESA 多孔板中, 形成 5 个土壤悬液浓度、5 次重复共有 25 个接种点的母接种盘。多点接种器^[1]有 25 个不锈钢接种平底针, 每针长 20mm, 径粗 1mm。各种培养基制备好后标明接种标志, 多点接种器插入母接种盘内, 然后轻轻转移接种到各种培养基表面, 5 次重复。接种完后的培养皿用封口胶封住双碟或置入封口的聚乙烯塑料袋中, 倒置培养 14~60d 后记录每种培养基的生长正点数, 只要围绕接种点有分解区或生长即记录为正点。查 MPN 值计算土壤细菌各生理类群的数量。

1.1.1 修改的 Winograsky's 标准盐溶液: K_2HPO_4 3.8g, KH_2PO_4 1.2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.1g, NaCl 2.5g, $Fe_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$ 0.05g, $Mn_2(SO_4)_3 \cdot 4H_2O$ 0.05g, 水 1000 mL。

1.1.2 纤维素分解群: 下层培养基: NH_4NO_3 2g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 20mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 20mg, $MnSO_4$ 20mg, Yeast extract 0.2g, 蛋白胨 0.2g, 琼脂 18g, 蒸馏水 1000 mL。上层培养基: 纤维素粉用正磷酸溶解, 在冰浴中沉淀, 洗到 pH 7.0, 加底层培养基使纤维素含量为 1%, 加琼脂 0.5%, 放线菌酮 $70\mu g/mL$, $20^\circ C$ 培养 60d。

1.1.3 几丁质分解群培养基: KH_2PO_4 0.03g, KNO_3 4g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.05g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03g, 几丁质 3g, 琼脂 18g, 水 1000mL, 放线菌酮 $70\mu g/mL$, $20^\circ C$ 培养 60d。

1.1.4 木聚糖分解培养基: NH_4NO_3 1g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.2g, $FeCl_3$ 0.02g, 木聚糖 10g, 琼脂 18g, 水 1000mL, 放线菌酮 $70\mu g/mL$, $20^\circ C$, 培养 60d。
木聚糖制做: 稻草 $80^\circ C$ 烘干粉碎, 加水洗涤到无色, 再用酒精洗到无色, 100g 干粉加 2000 mL 1 N NaOH 浸 24h, 周期振荡, 过滤后再浸提 24h, 滤液加醋酸调 pH 为 7.0, 再加等体积的 96% 乙醇液, 木聚糖便沉淀, 离心收集, 用增加乙醇浓度洗出, 再用乙醚真空干燥。

1.1.5 淀粉分解群培养基: 可溶性淀粉 2g, K_2HPO_4 1g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $CaCO_3$ 0.03g, $FeCl_3$ 0.03g, 琼脂 18g, 水 1000mL, 放线菌酮 $70\mu g/mL$, $20^\circ C$ 培养 14d。

1.1.6 果胶分解群培养基: 果胶 5g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, NaCl 0.2g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.01g, Yeast extract 1g, 琼脂 18g, 水 1000 mL, 放线菌酮 $70\mu g/mL$, $20^\circ C$ 培养 21d。

1.1.7 蛋白、脂类、卵磷脂分解群: 营养琼脂培养基: 牛肉膏 10g, 乳糖 10g, 琼脂 18g, 水 1000 mL。鸡蛋黄盐水液: 鸡蛋 2 个洗净, 在 70% 酒精中浸泡 20min, 取出鸡蛋干燥后无菌操作打开鸡蛋, 倾去蛋白将卵黄加到同体积灭菌的 0.9% 生理盐水中混合, 制成 80-100mL 卵黄液, 加入灭菌的营养琼脂培养基中, 再加放线菌酮 $70\mu g/mL$, 点种后 $20^\circ C$ 培养 21d。检测: (A) 溶蛋白: 培养基透明。(B) 溶卵磷脂: 产生强的扩散的乳光 (菌落周围产生一个较宽的乳白色沉淀晕), 不能用饱和 $CuSO_4$ 染色。(C) 溶脂作用: 产生限定的弱的乳光 (菌落周围有一个宽度为 2~4mm 的沉淀晕) 和珍珠层 (菌落用斜射光检查发彩虹光现象), 用饱和 $CuSO_4$ 染色成蓝绿色 (染色 20min 后倒去 $CuSO_4$ 干燥后观察)。

1.1.8 接种体积的计算: 母接种盘内置蒸馏水, 剪纸称重放入培养皿内, 用多点接种器

接种蒸馏水于纸上称重,那么接种体积为水重的1/25,计算接种体积为 1.9×10^{-3} mL。
1.1.9 MPN的计算:根据 Fisher & Yates^[2]可以得到公式: $Y = n (e^{-\lambda} + e^{-\lambda/a} + e^{-\lambda/ab} + e^{-\lambda/abc} + e^{-\lambda/abcd})$, 其中 λ 是每个正点的细菌 MPN 值, Y 是负点的总数, n 是每稀释度接种点数 ($n = 5$), a、b、c、d 是接种悬液的系列稀释因数,实际稀释浓度为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 2×10^{-4} 、 10^{-4} 、 2×10^{-5} ,因而系列稀释因数为 10、5、2、5,由之可以得到表 1。 $\log \lambda$ 的平均变异为 $1/n \log_2 \log [(a+b+c+d)/4]$,经计算 $\log \lambda$ 的平均变异值为 0.045,而 λ 的变异平均值为 1.1,所以估值是满意的。

表 1 五重复五浓度的正点数和相应的细菌 MPN 值

正反应点数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MPN 值	0.19	0.42	0.71	1.09	1.61	2.41	3.70	5.64	8.12	11.2	14.9	19.6
正反应点数	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
MPN 值	25.6	33.4	43.3	55.7	71.2	90.8	117	153	208	301	470	806

1.1.10 结果计算:根据每皿正反应点数,确定 MPN 值,再由接种体积 1.9×10^{-3} mL,土样含水百分率计算菌数。菌数(个/g.干土) = MPN 值 $\times 10^2 / 1.9 \times 10^{-3} /$ 干土百分率。

1.2 供试土壤

供试土壤为位于北京的中国农业大学校内试验田,为草甸褐土,质地轻壤,取样后立即进行分析。试验处理为:(1)秸秆覆盖免耕(简称免耕);(2)无覆盖直播(简称铁茬);(3)常规耕作(简称翻耕)。

2 结果与讨论

应用多点接种方法测定土壤细菌生理类群的结果见表 2。可见不同耕作方法对生理类群数量的变化有明显的影响,免耕能够显著地提高 0~10cm 表土层各生理类群细菌的数量,而翻耕能够明显地提高 10cm~20cm 土层各生理类群细菌的数量。0~10cm 土层内与翻耕相比免耕可分别平均提高淀粉、木聚糖、果糖、蛋白质、纤维素、几丁质、卵磷脂和脂类分解群 3 倍、2.4 倍、6.1 倍、1.7 倍、2 倍、4.2 倍、3.4 倍和 3.5 倍。从动态变化上看,纤维素分解者变化幅度很小,并且不同土层深度间变化也很小,说明纤维分解群是相对稳定的。淀粉分解群在不同土层间变化很大,随季节变化也很大,在秋季数量上升而在夏季数量降低。几丁质分解群在不同耕作间差异很大,免耕表层明显增多,动态变化表明,秋季具有几丁质分解菌的高峰,而在春季却很少。果胶与木聚糖分解群表现出差异的相似性,可能是由于它们代表了降解半纤维素的相近生态群,它们在秋季表层土壤具有较大的数量,而在春季具有较低的数量。

多点接种测定土壤细菌生理类群的方法是简便的,同时皿内可检测基质的降解强度。由于微生物对于某些基质分解缓慢,所以实验需要较长时间。本方法除了使用上述培养基测定相应的生理类群以外,我们还可以应用这种方法自己设计培养基测定诸如各种污染物、有机化合物、农药等细菌生理类群的数量和类型。如果同时测定土壤细菌总数则可计算出每种生理类群的相应比例。由于一种细菌可以具有分解很多化

合物的能力,因而每种生理类群所占的比例可能很高,并有各生理类群相互交叉现象,所以一个土样所有生理类群细菌数量之和要大于细菌总数。

不同的土壤利用状况,土壤细菌生理群的组成与特征是不同的,Goodfellow^[4]、Kauri^[5]分别研究了森林土壤细菌生理类群的组成,他们认为森林土壤中数量最大的细菌是木聚糖和果胶分解群,纤维素和几丁质分解群是好气性细菌中的一少部分,并且分解这些基质的细菌类群波动很小。而淀粉和蛋白质分解群则数量变化较大。

表 2 不同耕作方法土壤细菌生理群的数量变化($\times 10^6/\text{g}$ 干土)(1994~1995)

测定日期 日/月	细菌生理群	翻耕土壤 (cm)			铁茬土壤 (cm)			免耕土壤 (cm)		
		0~10	10~20	20~30	0~10	10~20	20~30	0~10	10~20	20~30
10/8	淀粉分解群	4.3	13.8	3.7	9.8	7.6	4.5	17.3	9.7	6.3
	木聚糖分解群	9.3	14.5	6.7	15.3	11.4	9.7	23.6	17.1	7.4
	果胶分解群	0.56	0.98	0.45	1.32	0.86	0.40	2.70	1.09	0.35
	蛋白质分解群	4.3	7.6	3.5	9.7	7.4	4.3	15.4	11.6	3.7
	纤维素分解群	6.1	9.7	5.4	9.2	6.5	5.8	13.6	7.5	5.6
	几丁质分解群	0.56	1.14	0.43	2.10	0.82	0.40	3.10	0.74	0.43
	卵磷脂分解群	1.1	2.4	0.8	3.1	1.8	0.9	4.5	3.1	0.9
	脂类分解群	0.9	1.6	0.6	3.8	1.3	0.6	5.4	2.9	0.7
8/11	淀粉分解群	7.7	29.8	9.5	16.1	16.1	7.7	30.9	15.4	14.7
	木聚糖分解群	11.5	28.3	8.1	23.9	13.3	11.5	39.2	12.6	14.3
	果胶分解群	0.86	1.40	0.73	1.60	0.45	0.33	6.10	1.40	0.84
	蛋白质分解群	7.7	11.6	5.7	11.8	90.1	5.3	20.6	11.2	7.7
	纤维素分解群	7.5	10.8	6.0	12.9	11.6	6.5	22.6	9.1	8.2
	几丁质分解群	0.84	1.30	0.96	2.60	0.94	0.45	4.40	0.98	0.53
	卵磷脂分解群	1.3	3.1	0.9	3.4	2.7	1.5	5.7	4.3	1.7
	脂类分解群	1.5	2.7	0.9	4.3	3.1	1.7	6.7	3.8	2.1
8/4	淀粉分解群	1.3	4.6	2.7	3.5	1.3	0.9	5.7	3.2	1.7
	木聚糖分解群	2.4	4.5	1.7	4.7	2.8	1.3	7.5	4.6	1.3
	果胶分解群	0.25	0.34	0.15	0.93	0.54	0.21	1.35	0.46	0.27
	蛋白质分解群	1.32	3.74	1.15	4.67	1.34	0.68	6.46	2.47	0.77
	纤维素分解群	2.0	3.5	1.1	4.6	2.7	1.3	7.3	3.5	1.4
	几丁质分解群	0.15	0.23	0.11	0.31	0.17	0.11	0.46	0.17	0.11
	卵磷脂分解群	0.80	0.95	0.64	1.11	0.75	0.62	1.75	0.80	0.69
	脂类分解群	0.23	0.43	0.13	0.56	0.37	0.18	0.79	0.41	0.20

参 考 文 献

- [1] Bowie I S, Loutit M W, Loutit J S. *Canadian Journal of Microbiology*, 1969, 15: 297~302.
- [2] Kauri T. *Soil Biol Biochem*, 1980, 12: 125~130.
- [3] Dabek-Szeniewska M, Hattori T. *J Gen Appl Microbiol*, 1981, 27: 517~518.
- [4] Goodfellow M J. *Soil Science*, 1968, 19 (1): 154~167.
- [5] Kauri T. *Soil Biol Biochem*, 1983, 15 (1): 45~50.