

根际土壤微生物最佳分离条件筛选研究

贾学文¹, 闫伟², 白淑兰¹, 邵东华¹, 王铁牛¹

(1. 内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古鄂尔多斯林业研究所, 内蒙古 鄂尔多斯 017000)

摘要: 试验采用培养基筛选、不同直径玻璃珠撞击, 以及化学分散剂和振荡时间等 4 个因素的正交设计对细菌、真菌、放线菌分离特性进行了研究。同时, 对放线菌的分离还增加了土样热处理温度及热处理时间两个因素的单因素试验。研究结果表明: 细菌分离培养条件的最佳组合是: 土壤浸提液+ 牛肉膏蛋白胨培养基+ 大玻璃珠($\Phi=5\sim7$ mm, 55 粒)+ 摇床振荡 90 min; 真菌分离培养条件的最佳组合是: 马丁氏培养基+ 大玻璃珠+ 1% 胆酸钠+ 摇床振荡 60 min; 放线菌分离培养条件的最佳组合是: 土壤浸提液+ 高氏培养基+ 25℃ 处理+ 大玻璃珠+ 1% 焦磷酸钠+ 摇床振荡 60 min。部分因素的单因素重复验证试验其变化规律与正交试验结果基本一致。

关键词: 土壤; 微生物分离; 培养基; 正交试验

中图分类号: S714.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)06-0147-05

Study on the Best Isolated Condition Filtration of Rhizosphere Soil Microorganism

JIA Xue-wen¹, YAN Wei², BAI Shu-lan¹, SHAO Dong-hua¹, WANG Tie-niu¹

(1. College of Forestry Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China;

2. Institute of Forestry Science of Ordos Inner Mongolia, Ordos 017000, China)

Abstract: The paper was based on traditional soil microorganism isolated culture method, it made groping research to affect bacteria, fungi and actinomycetes isolated effects several important factors selected several important influencing factors respectively though the direct cross test and single factor test. The goal is to discuss and solve present situation that isolation and culture of microorganism in soil is difficult through the practical and feasible means. The experiment has conducted the separation characteristics research of bacteria, funguses and actinomyces through culture medium screening, the different diameter of glass bead hitting, as well as chemistry dispersing agent and the duration of oscillation and so on four factors orthogonal designs. At the same time, there is two factors single factor experiments including the heat treatment temperature of soil sample and the time of heat treatment on isolation of actinomyces. The result of Researching indicated that bacteria's separating optimal combination is SABA PYJ+ Big beading ($\Phi=5\sim7$ mm, 55 grains) + no Sodium Deoxycholate+ Vibrating time 90 min; Fungi's separating optimal combination is MA PYJ+ Big bead in+ 1% Sodium Deoxycholat Vibrating time 60 min; Actinomycetes' separating optimal combination is SGA PYJ+ 25℃ treatment+ Big beading + 1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ + Vibrating time 60 min. The variational law of some factors, single and repeat tests were similar with the Direct Cross Test result.

Key words: Soil; Microorganism separation; Culture medium; Direct cross test

早在 38 亿年前微生物就在地球上发生, 但人们真正认识它们的存在也不过 300 年的历史^[1]。迄今, 尽管事实已经说明微生物是地球生命体的主要组成者, 维持着地球的生态平衡, 并起着了解地球历

史和地球生命健康, 以及开发应用生物技术潜能的关键作用。有报道显示, 1 g 土壤中就存在着多达 10^{10} 个微生物个体^[2]。它们对土壤肥力的形成、植物营养的转化、土传病害的传播、化感作用的发生起

收稿日期: 2007-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(30560122)

作者简介: 贾学文(1980-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 硕士, 主要从事微生物生物技术研究

通讯作者: 白淑兰(1960-), 女, 蒙古族, 内蒙古通辽人, 教授, 博士, 主要从事菌根基础研究和根际微生物生态研究。

着极其重要的作用。

直接从土壤中提取总 DNA, 并进行分子生物学分析来研究土壤微生物种群变化, 是近年来逐步发展起来的全新试验手段^[3]。用化学裂解和酶解相结合的方法, 从高有机物含量的堆肥中提取微生物总 DNA, 能减少 DNA 的损失, 可不经纯化直接扩增和酶切^[4]。另外, 熏蒸培养(FI) 或熏蒸提取法(FE) 能对土壤微生物总量进行较为精确的测定^[5, 6]。但是, 这些方法只能了解土壤中微生物种群和数量的变化规律, 而无法直接分离获得更多微生物, 当然也更难有效地开发土壤中潜在的微生物资源。传统分离方法最多能从土壤中分离获得其中 10% 左右的微生物类群^[7], 因此, 必须寻找一些更科学有效的途径最大限度地从土壤中分离资源微生物。一般认为, 分散土壤颗粒是从土壤中分离提取微生物的关键之一。研究表明, 焦磷酸钠作为分散剂对土壤的分散效果较好^[8], 也有研究使用蒸馏水与韦林氏搅

表 1 因素及处理

Tab. 1 Factors and treatments

项目 Item	因素 Factors	处理 1 Treatment 1	处理 2 Treatment 2	处理 3 Treatment 3	处理 4 Treatment 4
细菌 Bacteria	培养基	ABA	SEA	SABA	SPA
真菌 Fungi		MA	SEA	SMA	PDA
所有土样 All samples	物理处理	CK	BB	BB+ SB+ STB	BB+ SB
细菌 Bacteria	胆酸钠/ %	0	0. 5	1. 0	1. 5
真菌 Fungi	焦磷酸钠/ %	0	0. 5	1. 0	1. 5
放线菌 Actinomycetes	振荡时间/ min	10	30	60	90
所有土样 All samples	热处理温度/ °C	25	60	90	120
放线菌 Actinomycetes	热处理时间/ min	10	30	60	90

注: ABA. 牛肉蛋白胨培养基; SEA. 土壤浸提液培养基; SABA. 土壤浸提液+ 牛肉膏 (2.5 g/L) + 蛋白胨 (6 g/L) 培养基; SPA. 黄豆粉培养基; MA. 无孟加拉红的马丁氏培养基; SMA. 土壤浸提液+ 马丁氏培养基; PDA. 马铃薯葡萄糖培养基; CK. 没有任何物理处理; BB. 直径为 5~ 7 mm 大玻璃珠; SB. 直径为 1.0~ 1.5 mm 的小玻璃珠; STB. 直径为 3 mm 的钢珠, 下同

Note: ABA. Extract broth substrate; SEA. Soil drench substrate; SABA. Extract broth mixed with soil drench substrate (beef extract 2.5 g/L; peptone 6 g/L); SPA. Soybean powder substrate; MA. Martin substrate; SMA. Martin mixed with soil drench substrate; PDA. Potato dextrose substrate; CK. No treatment; BB. $\Phi=5\sim7$ mm beading; SB. $\Phi=1.0\sim1.5$ mm beading; STB. $\Phi=3$ mm steel ball, the same as below

1.2.2 放线菌各处理组合试验设计方法 放线菌除培养基、玻璃珠、化学分散剂、振荡时间 4 个因素外, 还增加了土样热处理温度及热处理时间两个因素(共 6 个因素)。其中, 培养基设计成单因素试验, 分别为黄豆粉培养基(SPA)、土壤浸提液培养基(SEA)、高氏+ 半腐麦秸浸汁培养基(GSDSA)、半腐麦秸浸汁培养基(SDSA)、高氏+ 土壤浸提液培养基(SGA)、高氏一号培养基(GA) 等 6 种。另外 5 个因素采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计, 处理组合分别见表 1 及注释。由于热处理研究结果与司美茹等^[11] 研究结果相矛盾, 所以, 对放线菌分离培养又做了热处理单因素验证试验。以上试验每个因素各设 4 个处理(表 1), 每个处理 3 次重复。

试验选用 500 mL 的三角瓶, 根据设计进行编

拌器对土壤颗粒分散效果也较好^[9], 所以, 目前对土壤颗粒分散的物理及化学处理的最优条件尚无定论。本研究是在传统微生物分离培养方法的基础上进行了适当的改进, 旨在探索出更有效地分离土壤微生物的途径, 为土壤中潜在微生物资源的开发与利用提供有价值的技术支撑。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试土壤样品采集于内蒙古大青山油松、虎榛子混交林虎榛子根际。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌、真菌各处理组合试验设计方法 细菌和真菌分别选择培养基、玻璃珠、化学分散剂和振荡时间 4 个因素, 采用 $L_{16}(4^4)$ 正交设计^[10]。处理组合分别见表 1 及注释, 每个因素各设 4 个处理, 每个处理 3 个重复。

号, 装入 90 mL 蒸馏水, 并按试验设计放入玻璃珠, 121 °C 高压灭菌 30 min, 无菌条件下加入 10 g 混匀的土样和化学分散剂, 摇床上振荡 (160 r/min), 无菌条件下以 10 倍浓度梯度稀释, 抽取稀释 10^{-4} 的土壤悬液 0.1 mL 置于相应的培养基内, 然后用灭过菌的玻璃涂棒均匀地涂抹在培养基表面涂布分离, 每个处理各设 3 个重复。细菌、真菌、放线菌分别培养 2, 3~ 4, 7 d 后进行观察计数。

2 结果与分析

2.1 不同因素对细菌分离效果的影响

由表 2 正交试验极差分析结果表明, 培养基的选择对细菌分离效果影响最大, 极差值约为其他处理的 2 倍, 玻璃珠、胆酸钠和振荡时间之间无显著差

异。由图 1 显示,土壤浸提液培养基(SEA)分离数量最少,只有 2.8×10^6 个/g;牛肉蛋白胨培养基(ABA)次之;而 SABA 和 SPA 分离细菌数量均较多,分别可达 4.8×10^6 个/g 和 4.6×10^6 个/g,但在 SPA

中长势稍差。这可能是因为 SABA 培养基,一方面具有丰富的营养,另一方面更接近微生物生存的原生态,适宜根际细菌的生长与繁殖。

表 2 正交试验极差结果
Tab. 2 Range results of direct cross test

处理 Treatments	培养基 PYJ	玻璃珠 Beading	胆酸钠 Sodium deoxycholate	振荡时间/ min Shaking time
细菌 Bacteria	19.9a	9.9b	12.0b	10.3b
真菌 Fungus	13.6a	8.4b	4.3c	7.8b

处理 Treatments	热处理温度/℃ Heat treatment temperature	热处理时间/ min Heat treatment time	玻璃珠 Beading	焦磷酸钠 Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	振荡时间/ min Shaking time
放线菌 Actinomycetes	48.5a	7.4d	13.1c	14.3cb	17.9b

注: 同一行内字母不同表示多重比较差异显著(p= 5%)
Note: The same letters appearing in the row indicated significant at (test p= 5%)

物理处理方法中以采用大玻璃珠振荡分离效果最好,数量可达 4.3×10^6 个/g。加入小玻璃珠和钢珠的处理分离效果较差,这说明参入小玻璃珠和钢珠时虽然能增加土壤悬液的撞击强度,但同时可能会对细菌菌体产生破坏作用。未使用任何填充物的分离效果最差,只能达到 3.3×10^6 个/g。

差是使用化学处理的 3 倍(表 2)。马丁氏培养基分离出真菌数量最多,达 2.4×10^4 个/g,与其他 3 种培养基存在显著差异。PDA 培养基真菌分离效果最差,只分离出真菌 1.3×10^4 个/g(图 2)。

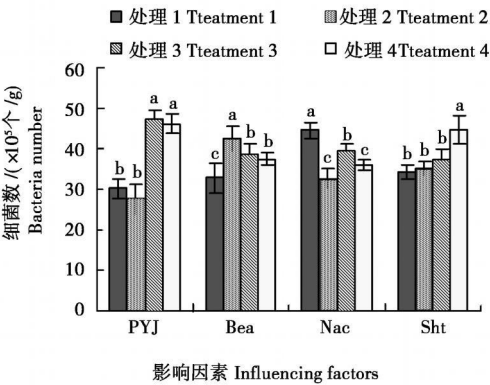


图 1 各因素及处理对细菌分离效果的影响
Fig. 1 Results for bacteria separation of different factors and treatments

由图 1 可知,未使用胆酸钠处理的细菌分离数量最多,是使用 0.5% 胆酸钠处理的 1.4 倍,说明胆酸钠可能对细菌生长具有抑制作用。另外,细菌分离数量随着振荡时间的延长呈逐渐增加的趋势,90 min 时相对较好,这可能是振荡时间越长土粒分散的越小,黏附在土壤胶体上的细菌就会越多的被释放出来,但由于试验设计中振荡时间最长设 90 min,所以,是否还有更长时间有益于细菌的分离,有待于进一步探讨。

2.2 不同因素对根际土壤真菌分离的影响

真菌分离中,培养基对其分离结果影响最大,极

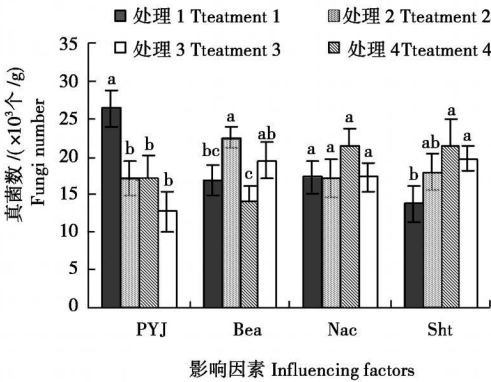


图 2 各因素及处理对真菌分离效果的影响
Fig. 2 Results for fungi separation of different factors and treatments

大玻璃珠的使用也能明显提高真菌的分离数量,使用小玻璃珠和钢珠时效果最差。1% 的胆酸钠对真菌分离有显著的促进作用,这与 Hopkins 等报道的采用 1% 胆酸钠处理土壤的分散效果最好结论一致(Hopkins 等)。振荡 60 min 时,分离出的根际真菌数量最多,与振荡 10 min 的存在着显著差异(图 2)。

所以,土壤真菌分离的最佳组合为:马丁氏培养基+大玻璃珠+1% 胆酸钠+振荡时间为 60 min。

2.3 不同因素对根际土壤放线菌分离的影响

由图 3 可知,土壤热处理温度对根际土壤放线菌分离影响最大,土样在 25℃ 处理时分离数量最大,60℃ 处理 30 min 时分离的放线菌明显减少。温度升高到 120℃,处理 10 min 时只能分离出极少量放线菌,处理 1 h 时无 1 个放线菌菌落出现,该结果与司美茹等^[11]报道的随着预处理温度的升高放线

菌数量和种类均明显增加,并与 120℃处理土样 1 h 分离放线菌数量最多的结果完全相反。为了弄清这一问题,我们又安排了热处理的单因素验证试验,获得了相同的结果。即土样热处理温度为 25℃、热处理时间 30 min 时对放线菌的分离最有利。

大玻璃珠的使用明显有益于放线菌的分离,极差值是未处理的 2.6 倍。从化学处理看,不使用焦磷酸钠时分离出的放线菌只有 9.7×10^4 个/g,当焦磷酸钠浓度为 1% 时分离效果最好,可分离出放线菌 2.4×10^5 个/g,然后随着焦磷酸钠浓度的增大分离数量下降,焦磷酸钠浓度为 1.5% 时分离出放线菌为 1.6×10^5 个/g。振荡 60 min 时分离数量达到最大,但与 90 min 时无差异(图 3),说明 60 min 时对放线菌的分离已达到最佳效果。

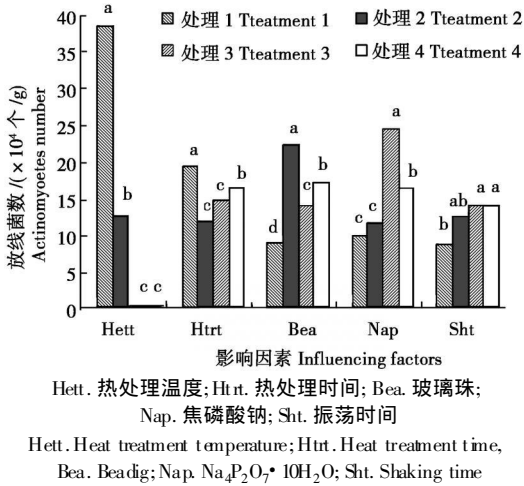


图 3 各因素及处理对放线菌分离效果的影响
Fig. 3 Results for actinomycetes separation of different factors and treatments

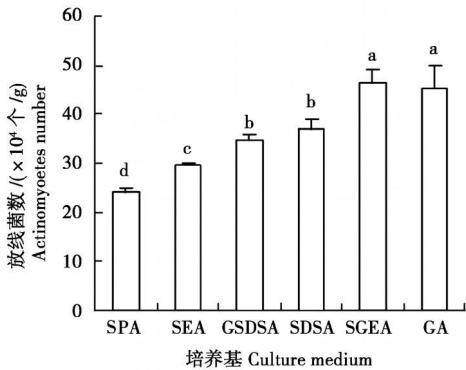


图 4 不同培养基对放线菌分离效果的影响
Fig. 4 Influencing of different substrate to actinomycetes

线菌数量最少,只有 2.4×10^5 个/g,土壤浸提液+高氏培养基(SGEA)上分离放线菌数量最多,达 4.7×10^5 个/g,近 SPA 的 2 倍。所以,根际放线菌分离条件最优组合为:SGEA+ 25℃处理+ 大玻璃珠+ 1% 焦磷酸钠+ 振荡 60 min。

3 结论与讨论

根际微生物可以分解土壤中有有机物,为植物提供无机养料,能够产生有机酸使土壤中难溶性的无机养料溶解;能够产生维生素、植物生长激素等,促进植物的生长^[12-15]。土壤微生物群落组成极其复杂,土壤中蕴藏着目前尚无法估量的微生物未知种群和资源^[16]。尤其在环境污染日益严重的今天,生物修复已是生态环境保护关注的焦点,微生物污染菌株的筛选是目前生物研究的热点^[17]。那么开发研究环境微生物资源将成为我们今后一段时间研究的重要内容。为了从研究环境中获得更多数量和种类的微生物,我们在分离土壤微生物的过程中,应根据微生物的生物学特性,通过改变分离条件,如分散剂、抑制剂的使用、微生物培养条件等多种影响因素来达到多快好省的目的,这也是挖掘土壤微生物资源最基础,最重要的技术。

微生物是长期生活在土壤这个十分复杂的环境中,形成了许多我们无法知晓的营养需求特性,虽然牛肉蛋白胨或高氏培养基能提供丰富的营养,但毕竟不同于土壤环境,如融入土壤浸提液时可能更接近于微生物原始生态环境,从而有益于更多微生物的生长,所以分离的数量较多,这种融合培养基目前尚未见报道。

土壤颗粒物理分散处理中 3 种微生物均以使用 $\Phi=5\sim 7$ mm 的大玻璃珠的分离效果最好,参入 $\Phi=1.0\sim 1.5$ mm 小玻璃珠和 $\Phi=3$ mm 的钢珠时分离效果反而不好。这可能是加入小玻璃珠和钢珠时虽然能大大增加撞击强度,但可能同时对其菌体产生破坏作用,丝状菌尤为明显。Faegri 等^[18]研究了土壤样品与离子交换树脂、玻璃珠共振荡对真菌菌丝的影响,约有 1/3 的菌丝被打碎成 $< 22.5 \mu\text{m}$ 的碎片,另有 22.5~ 50 μm 的碎片占 1/3。可见,分散过程对菌丝的机械损伤十分明显,这种损伤作用无疑会对微生物的生理生化活性产生重要影响^[9]。

Hopkins 等^[19]曾报道土壤微生物分离最好的振荡时间为 2 h。而我们的试验结果是:真菌和放线菌振荡均在 60 min 为最好。细菌分离的最佳振荡时间没有得到最终的结论,这也将成为我们进一步探讨的问题,从而完善微生物分离培养的理论。

参考文献:

- [1] 刘志恒. 放线菌—微生物药物的重要资源[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 143–145.
- [2] Rosello-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes[J]. FEMS Microbiol Reviews, 2001, 25(1): 39–67.
- [3] 陈 灏, 唐小树, 林 洁, 等. 不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究[J]. 微生物学报, 2002, 4(42): 478–4835.
- [4] 何丽鸿, 赵 勇, 陈明杰, 等. 堆肥中微生物总 DNA 的高效提取[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 162–165.
- [5] Jenkinson D S, Powlson D S. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil V. A method for measuring soil biomass[J]. Soil Biol Biochem, 1976, 8: 179–188.
- [6] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass[J]. Soil Biol Biochem, 1987, 19: 703–707.
- [7] Roosemsaleg C L, Garnier-S, Harrym. Extraction and purification of microbial and from soil and sediment samples[J]. Applied Soil Ecology, 2001, 18: 47–60.
- [8] Lindahl V, Bakken L R. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil[J]. FEMS Microbiol Ecol, 1995, 16: 135–142.
- [9] Lindahl V. Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival[J]. Microbiol Methods, 1996, 25: 279–286.
- [10] 续九如, 黄智慧. 林业试验设计[M]. 北京: 中国林业出版社, 1995: 71–86.
- [11] 司美茹, 薛泉宏, 来航线. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 61–65.
- [12] 刘子雄, 朱天辉, 张 建. 林木根系分泌物与根际微生物研究进展[J]. 世界林业研究, 2005, 18(6): 25–31.
- [13] 张 德, 闻金光. 大兴安岭南麓旱坡地土壤微生物及酶活性的研究[J]. 内蒙古农业科技, 1991(5): 21–26.
- [14] 赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫, 等. 小麦根际与非根际解磷细菌的分布[J]. 华北农学报, 2001, 16(1): 111–115.
- [15] 康萍芝, 沈瑞清, 张丽荣, 等. 湿度对新垦地土壤微生物区系影响初探[J]. 内蒙古农业科技, 2004(4): 17–18, 24.
- [16] 张瑞福, 崔中利, 李顺鹏. 土壤微生物群落结构研究方法进展[J]. 土壤, 2004, 36(5): 476–480.
- [17] 白淑兰, 房耀维, 赵春杰. 菌根技术在重金属污染修复中的研究与展望[J]. 生态环境, 2004, 13(1): 92–94.
- [18] Faegri A V, Torsvik L, Goksoyr J. Bacterial and fungi activities in soil: Separation of bacterial and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique[J]. Soil Biol Biochem, 1977, 9: 105–112.
- [19] Hopkins D W, Macnaughton S J, O'Donnell A G. A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil[J]. Soil Biol Biochem, 1990, 23: 117–225.