

好氧性分解纖維素細菌的薄层 沉淀纖維素計数法

王祖農 高培基 宋榮祥*

(山东大学生物系, 濟南)

統計自然基質中存在的好氧性分解纖維素細菌数目的方法, 主要有两类: 一类計算相对百分数; 另一类則計算具体的菌数。后一类的計数法中根据作为唯一碳源的纖維素的状态, 大体上又可分为两小类。

第一小类的方法, 目前通用的有滤紙矽胶平板^[1]或滤紙洋菜平板涂抹法^[3]。主要是根据細菌生长之后, 在滤紙片上呈現各种不同顏色的斑点, 根据斑点的多寡統計菌数。准确度极高, 基本上沒有誤差, 許多著名的前輩如 Winogradsky、Omeliansky、Waksman 等都曾推荐过。但是, 这个方法也有很大的缺点: (1) 細菌极难在其上形成孤立的菌落。(2) 出現的分解纖維素細菌的种类比較少, 往往只限于少数种类的細菌^[6,8]。最近出現的 Charpentier^[4] 改良法, 技术上虽有一定程度的改进, 但主要缺点仍未克服。1928年 Dubos 首先使用的滤紙条液体培养基稀释計数法, 出現的菌种更少, 差誤也較大。

第二小类的方法, 可以統称之为沉淀纖維素或纖維素可溶性衍生物平板法。就是一般的傾注平板計算法, 以經過物理化学方法处理过的滤紙或棉花或纖維素的衍生物为碳源。在前一类底物中, Kellerman & McBeth (1912) 首先以銅鉍为溶剂, Kransky (1914) 用氯化鋅、Scales (1915)、Harmsen (1946) 用硫酸、Northrop (1919) 用三氯化鉄为溶剂, 先使滤紙或棉花溶解, 再使之沉淀出来, 即得沉淀纖維素。Hungate (1950)^[7] 主张在經盐酸处理之后, 繼之以研磨, Pochon 等 (1950)^[9] 則认为以純粹研磨为佳。纖維素可溶性衍生物, 1950年之后开始在分解纖維素細菌計数中应用, 但目前仍不广泛。这一类計数法的主要优点是可以形成孤立菌落, 便于計数。但是依据菌落周围水解圈的有无来判断是否为分解纖維素細菌, 誤差极大。

第一类方法判断是否分解纖維素細菌是其所产生的特有的顏色, 准确无誤; 第二类方法能形成孤立的菌落, 計数很方便, 如果能把两类方法的优点結合起来, 安排一个新的好氧性分解纖維素細菌的計数法, 既准确又便于計数, 則对今后分解纖維素細菌的計数工作必将有所帮助。本文的目的就在于此。

應該知道, 由于游离氧供应的不足等因素, 好氧性分解纖維素細菌在第二小类培养基上通常是不能很好地或者完全不能形成色素的, 因此, 要把两类方法的优点融而为一, 首先必須使分解纖維素細菌在沉淀纖維素平板上生长之后, 依然可以产生其特有的顏色, 并且十分鮮明, 为此应設法改进游离氧的供应情况。由于我們的目的不只要使細菌产生鮮

* 現在山东师范学院生物系工作。

本文为中国微生物学会 1963 年学术年会轉稿。

明的色泽,更重要的是使其能以形成孤立的集落,因此不能简单地希望通过减低培养基的厚度,以制成薄层来达到目的。应该顺序地从沉淀纖維素的含量、洋菜的浓度和培养基的厚度等三方面来改进旧有的沉淀纖維素計數法。

方法和結果

(一) 培养基中沉淀纖維素含量对好氧性分解纖維素細菌生长和形成色素的影响

沉淀纖維素的制备：加 500 毫升 6N H₂SO₄ 于容积为 2,000 毫升的烧杯中,加热至沸,加入剪成約 1 平方厘米大小的滤紙块或棉花,繼續加热煮沸,不时攪拌約 10 分钟,冷却至室温后,傾入盛有大量自来水的玻璃缸中,靜置待已水解成粉末状的纖維素下沉后,傾去上清液,如此反复加自来水冲洗,直至呈中性反应为止。然后用布氏漏斗抽漏去水分,置真空干燥器中干燥至恆重,即得沉淀纖維素粉。使用前最好先加少量水使成浓厚的纖維素悬液(30—40%),放在盛有小玻璃球的玻璃瓶中,在 1150 轉/分的振荡机上,振荡 20—30

表 1 纖維素含量对土壤中纖維素細菌計数的影响

纖維素量 %	菌数 (千/克土)	3 天	5 天	7 天	10 天	15 天*				生长情况
						合計	琥珀黄	淡黄	杏仁黄	
0.2		0	0	0	16	16				放线菌、霉菌和杂菌大量生长,纖維素細菌生长微弱,顏色极浅,至 15 天水解圈仍不明显
0.5		0	4	4	16	16				” ”
1		0	28	36	44	44				” ”
2		0	12	20	42	42				” ”
3		32	52	64	72	72	4	4**	28	放线菌、霉菌和杂菌仍然生长,但纖維素細菌的生长相对的好,顏色也較深
4		64	88	88	100	100	6	0**	40	” ”
5		60	120	136	140	140	7	6**	64	” ”
6		80	132	144	176	176	44	44	88	放线菌及霉菌很少,纖維素細菌生长良好,色彩鮮明,孤立菌落明显
7		124	184	204	240	240	76	68	96	” ”
8		156	200	216	240	240	72	64	104	” ”
9		152	192	204	204	204	44	80	80	由于纖維素含量高,不易做成薄层平板
10		124	180	196	212	212	60	100	52	” ”

* 菌落顏色均系根据中国科学院編譯出版委员会所編“色譜”一书而定。

** 本处由于菌落顏色不够鮮明,仍难确切地把琥珀黄和淡黄两类分开。

分鐘,以打碎干燥过程中粘結成的小顆粒。

傾注平板的制备: 通过預先的摸索,在这个实验中,我們采用的土壤是山大农场楊士。洋菜浓度为 0.5%,变化纖維素的含量从 0.2—10%,共 12 級,各五个重复,先后做了三次試驗,平均結果見表 1。

这个实验結果証明: 第一,一般土壤微生物手册上^{11,2)}推荐的沉淀纖維素浓度(0.2—1%)失之太低,远远不是最理想的。采用这个浓度則分解纖維素細菌生长較慢,菌数很少,而放綫菌、霉菌和其它杂菌則大量繁殖,区别困难,大大地干扰統計分解纖維素細菌工作的进行。纖維素的浓度低只有一个好处,即利于水解圈的出現。第二,加大纖維素的浓度,既可增加分解纖維素細菌接触到纖維的机会,使长成的菌落加多。又由于纖維素含量愈大,則背景愈白,愈不透明,杂菌菌落的干扰亦愈小,而分解纖維素細菌反而由于能形成孤立的菌落,呈現各种顏色而愈易識別。纖維素浓度愈大,菌数愈多,菌落的色泽愈鮮明,愈易区别菌种。如纖維素含量在 2% 以下时,菌种之間无法区别,在 3—5% 时可区别出两种,当 6% 以上时,可把三种完全区分开来。把纖維素含量加大到 7—8%,則出現的分解纖維素細菌菌数更比纖維素含量为 0.2—1% 时多 15 倍。第三,理論上纖維素含量愈高愈利于計数,但纖維素含量高于 8%,将不利于技术操作,亦非得宜。

(二) 洋菜含量对好氧性分解纖維素細菌生长和形成色素的影响

表 2 洋菜含量对土壤中好氧性分解纖維素細菌計数的影响

洋菜含量 (%)	菌数 (千/克土)	2 天	3 天	4 天	5 天	7 天	10 天			
							合計	琥珀黃	淡茵黃	杏仁黃
0.2	150, D. 5—6 毫米*	已扩展成片								
0.3	250, D. 3—4 毫米	290, D. 10 毫米	290, D. 20 毫米	已扩展成片						
0.4	≈300, D. 1 毫米	420, D. 5 毫米	420, D. 10 毫米	420, D. 10 毫米	420, D. 10 毫米	420, D. 10—15 毫米	420**			
0.5	微見生长	400, D. 1—2 毫米	400, D. 5 毫米	400, D. 5—7 毫米	400, D. 5—7 毫米	400, D. 5—7 毫米	425	86	100	239
0.6	0	微見生长	300, D. 1 毫米	400, D. 2 毫米	400, D. 2—3 毫米	410	93	100	217	
0.7	0	0	50, 放綫菌及 霉菌开始生长	50, 放綫菌及 霉菌增多	50, 放綫菌及 霉菌大量生长	50***				
0.8	0	0	25, 放綫菌及 霉菌开始生长	25, 放綫菌及 霉菌增多	25, 放綫菌及 霉菌大量生长	25***				
0.9	0	0	55, 放綫菌及 霉菌开始生长	55, 放綫菌及 霉菌增多	55, 放綫菌及 霉菌大量生长	55***				
1.0	0	0	0, 放綫菌及 霉菌开始生长	20, 放綫菌及 霉菌增多	20, 放綫菌及 霉菌大量生长	20***				

* D. 代表菌落直径;

** 指菌落顏色很浅,并已扩展相連,难以分清不同类羣;

*** 由于放綫菌及霉菌大量生长,布满皿面,难以分清不同类羣。

試驗所采用的土样,仍旧为山大农場褐土。操作技术同前,只是把纖維素含量固定为 8%,变动洋菜的含量(0.2—1.5%,共 9 級),各五个重复,三次試驗平均結果如表 2。

由表 2 可以看出:(1) Pochon^[1] 所倡議的 1.5% 和 Имщенецкий^[2] 所采用的 0.7—0.8% 的洋菜含量确实大了一些,虽然出現有分解纖維素細菌的单个集落,但为数过少,而且很小,加上湿度較低,利于放綫菌和霉菌的迅速漫延,有碍于分解纖維素細菌的繼續发育,显得十分不利于統計分解纖維素細菌的菌数。(2)洋菜含量愈低愈利于分解纖維素細菌的生长,如洋菜含量为 0.2%—0.4% 时,第二天菌落即鮮明可見,增至 0.6% 时菌落的出現便延迟一天,增至 1% 以上又延长一天。但是,洋菜含量愈低,愈利于細菌的运动和扩散,菌落出現后,易于漫延成片,看来洋菜含量也不应过低,以 0.4—0.5% 为最适宜,在此种用量下,孤立的菌落数比用量为 1.5% 时多 40 余倍,比 0.7—0.8% 也多 10 倍左右。

(三) 培养基厚度对好氧性分解纖維素細菌生长和形成色素的影响

通常制做傾注平板时,系用直径 9—10 厘米的培养皿,加 20 毫升培养基,厚度約为 3—3.5 毫米¹⁾。为了确定一个最适于細菌产生色素的培养基厚度,仍然采用一种土样(山大苗圃褐土),分成 3 个不同的处理,即在直径为 9 厘米的培养皿中分别加入 5 毫升、10 毫升和 20 毫升的培养基进行試驗。結果如表 3:

表 3 培养基厚度对土壤中好氧性分解纖維素細菌計数的影响

培养基厚度*	菌数 (千/克土)						10 天			生长情况
	3 天	4 天	5 天	6 天	7 天	8 天	合計	琥珀黄	淡黄	
5	4	6	8.5	9	9	9	9	5	4	
10	0	0	0	4	4.5	4.5	4.5	4.5		放綫菌及霉菌大量生长,布满皿面,难以把两类区分开
20	0	0	0	0.5	1.5	2.5	2.5	2.5		” ”

* 培养基厚度系按向直径为 9 厘米的皿中加入的培养基毫升数計。

这个試驗說明,为了适于纖維素細菌产生色素,通常用的培养基失之太厚,应该是愈薄愈好。但是太薄則操作困难,以每皿加入 5 毫升培养基(厚約 0.8 毫米)最佳,既利于色素的产生,又便于操作。

(四) 三种計数方法和四个土样中的好氧性分解纖維素細菌分布的比較

上述的三个試驗,各只以一种方法,一个土样为准,因此难以避免試驗上的誤差,为了进一步驗證我們所安排的薄层沉淀纖維素計数法是否确有一定的优点,特以薄层(厚度約为 0.8 毫米)沉淀纖維素平板計数法(洋菜浓度 0.4%,沉淀纖維素含量为 7.5%)、滤紙平板涂抹法和滤紙条稀释法等三个方法,用四个土样(城阳滨海盐土、山大农場褐土、山大苗圃褐土、千佛山褐土)进行了比較研究,結果如表 4。

比較表 4 的結果,可以看出:(1) 三种方法所得結果完全一致,即山大农場土中菌数較多,山大苗圃土次之,千佛山土又次之,城阳滨海盐土中最少。(2)薄层沉淀纖維素平板計数法比滤紙平板法优越,首先是前一个方法得到的菌数全都比后一方法的多,其次呈现

1) 根据計算圓柱体积的公式推算而来。

表 4 3 种計数方法計算土壤中好氧性分解纖維素細菌的比較

土 类	菌数 (千/克土)	滤纸条 稀释法	滤 紙 平 板 法					薄层沉淀纖維素法						
			合計	琥珀黄	迎春黄	淡苗黄	杏仁黄	桔橙	合計	琥珀黄	迎春黄	淡苗黄	杏仁黄	桔橙
城阳滨海盐土	0.202		1.638		0.756		0.693	0.189	1.847		0.630		0.756	0.461
山大农場褐土	465		208.5	80			125*	3.5	332	95		85	150	1
山大苗圃褐土	10		3	2			1.5		7.5	5		2.5		
千佛山褐土	4.7		2.394	0.114			2.28		6.982	0.142			6.84	

* 指在滤紙平板上难以把两类确切分开。

的菌种也較多(以山大农場褐土为例,在前一个方法中只能区别出两类,而后一方法則可区别出三类)。(3)薄层沉淀纖維素法和稀释法相比,从出現的菌数来看,互有长短(山大农場土和苗圃土是稀释法多,而其余两种土样則以薄层沉淀纖維素法为多),但从呈現的菌种的組成来看,薄层沉淀纖維素法要比稀释法优越得多。

(五) 三种計数方法对四属五种純种分解纖維素細菌計数的比較

上面的实验用的是土壤,虽然結果基本上已經可以肯定,但所得数字究竟还是相对的,应该进一步用純种分解纖維素細菌做验证,为此,我們选用了自己分离到的四属五种純种分解纖維素細菌 (*Cellulomonas caesia*、*Cellulomonas ferruginea*、*Cellovibrio flavescens*、*Cytophaga* sp.、*Sporocytophaga* sp.), 預先分別計数,不等量的混合在一起,制成均匀的混合悬液,做为計数材料,同时以三种方法进行比較研究,結果如表 5。

表 5 三种計数方法計算几种純种好氧分解纖維素細菌的比較

方 法	菌数 ($\times 10^6$)	合計	<i>Cellovibrio flavescens</i>	<i>Cellulomonas caesia</i>	<i>Cellulomonas ferruginea</i>	<i>Cytophaga sp.</i>	<i>Sporocyt- phaga</i> sp.	备 注	
								滤纸条稀释法	430
滤紙平板法	123	60	30		20	10	3	<i>Cellovibrio</i> 扩展很快,难以确切計数	
薄层沉淀纖維素法	173	100	30	30	30	10.5	2.5	不同菌种形成顏色不同的孤立菌落,易于計数	

这个試驗結果說明,就細菌的数目来看,还是以滤纸条稀释法所得数字最大,但是这种方法只能出現一种細菌 (*Cellovibrio flavescens*),因而要想同时观察到菌种的組成是办不到的。滤紙平板法不只菌数最少,而且生长快、运动活泼的菌种(如 *Cellovibrio flavescens*) 易于蔓延,不易形成孤立的菌落,并且又影响到其它菌种的計数,甚不易准确。薄层沉淀纖維素計数法出現的菌数既多,种类又比較全,孤立的菌落又十分鮮明,因而还是以薄层沉淀纖維素計数法比較理想。

(六) 旧有的沉淀纖維素計数法和薄层沉淀纖維素計数法的比較

为了确証薄层沉淀纖維素計数法的优越性,我們和旧有的計数方法(以 Pochon^[1] 法作代表)作了比較研究,結果見表 6。

由表 6 可知,旧有的沉淀纖維素計数方法有如下的缺点: (1)由于細菌不在其上形成

表 6 两种沉淀纖維素計数法計算土壤中好氧性分解纖維素細菌的比較

土 类	Pochon 法			薄层沉淀纖維素法								
	放綫菌	霉菌	分解纖維素細菌*	放綫菌	霉菌	分解纖維素細菌						
						合計	雕叶棕	桔橙	迎春黄	杏仁黄	琥珀黄	新禾綠
山大农場褐土 (1)	**		5			1250	150	100		580	320	100
山大农場褐土 (2)	18.2	1.7	0			41.8		1.4	20.5	19.9		
城阳滨海盐土	75.6	0.9	0	1.9	0.6	18.4		4.6	6.3	7.5		

* 指确以能分解纖維素的;

** 为量甚大,未能記載确切数目。

色素,无法观察菌种組成。(2)出現真正具有分解纖維素能力的菌数太少。(3)由于沉淀纖維素的用量太低、洋菜浓度太大,因而有利于霉菌和放綫菌的生长。而薄层沉淀纖維素計数法則沒有上述缺点。

討 論 和 总 結

沉淀纖維素在研究好氧性分解纖維素細菌工作中的应用,大体上可以分为两个阶段:从开始应用到 1950 年以前,一般工作者都假定分解纖維素細菌能分泌纖維素酶,而纖維素酶是单酶,它既可以水解滤紙和棉花也可以水解沉淀纖維素或纖維素的可溶性衍生物,故当細菌在純纖維素或沉淀纖維素上长成菌落水解纖維素之后,必然在菌落周围出現水解圈,因此,可以用水解圈的有无来作判断是否为分解纖維素細菌的标准。

1953 年以后, Gilligan 和 Reese^[5] 发表了纖維素酶的多酶体系学說,謂纖維素酶体系至少有二—— C_1 和 C_x , 滤紙、棉花等具有交鏈的纖維素分子先由 C_1 水解成直鏈的脫水葡萄糖单位,然后再繼續被 C_x 水解成可以滲入細胞的小分子。真正具有全套的纖維素酶的分解纖維素細菌的数量并不多。数量上較多的,是通常不被認为具有分解纖維素能力的細菌(虽不能利用滤紙和棉花,却能很好地在沉淀纖維素上生长并在菌落周围出現水解圈),更有很多的細菌,甚至連 C_x 也沒有,但它能利用纖維素溶解过程中产生的,但无法完全洗尽的糖类,产生酸,溶去培养基中的不溶性盐类,因而也可以在菌落周围出現透明圈^[2]。所以,在沉淀纖維素平板上长成集落、周围有水解圈的細菌并不一定都是真正的分解纖維素細菌。

但是,旧有的沉淀纖維素平板法,能使在其上生长的細菌形成孤立的菌落,始終是滤紙平板法所无法达到的优点,关键在于用水解圈做为判断分解纖維素細菌的标准是不可靠的,应当設法使分解纖維素細菌能在沉淀纖維素平板上产生特有的鮮明顏色。

好氧性分解纖維素細菌对氧的要求十分严格,其生长和产生色素的能力在很大程度上由溶解于培养基中的氧决定,而氧在培养基中的分布和扩散又和培养基厚度及洋菜浓度有关,細菌要作用于纖維素必須使菌体与其接触,为此,必須調节纖維素的用量,而纖維素用量的不同又足以影响洋菜的粘度。所以,培养基厚度、纖維素用量和洋菜的浓度是相互制約的,必須全面考虑。

在旧有的沉淀纖維素計数法中,所用的沉淀纖維素浓度都很低,一般都在 1% 以下,最少竟低到只有 0.2% (重量/体积)^[1],原因是沉淀纖維素的浓度愈低,产生水解圈愈快,

愈利于旧有沉淀纖維素計数法的进行。但是,在我們的薄层沉淀纖維素計数法中,所用的沉淀纖維素量却要用到7%,原因是沉淀纖維素用量愈大,背景愈白,細菌所形成的集落愈加明显,并且愈能增加細菌和纖維相接触的机会,使能出現更多的集落。

旧有的沉淀纖維素計数法中所采用的洋菜浓度一般为1.5%^[1],少的也有0.7—0.8%^[2],原因是洋菜浓度愈大愈易形成孤立集落。出現的水解圈边缘愈清晰,而在我們的薄层沉淀纖維素計数法中,洋菜的浓度远低于此,只有0.4—5%,原因是洋菜浓度愈低,愈便于空气渗入和扩散,愈利于細菌色素的产生,并且在一定范围内并无碍于形成孤立的集落。

旧有的沉淀纖維素計数法所用的培养基厚度,一般都没有严格的要求,大体上是在直径9—10厘米的培养皿中加入15—20毫升培养基,原因是培养基的厚度对水解圈的出現影响不大。而我們的薄层沉淀纖維素計数法则要求把培养基的厚度減至最小(0.8毫米),以利于細菌产生色素。

通过用四属五种純种分解纖維素細菌,四种不同的土样、四个不同的計数方法比較研究的結果,証明薄层沉淀纖維素計数法确有如下的长处。(1)准确性高。我們随机挑取了400多个菌落验证結果,100%可靠,(2)出現的菌数多,(3)菌种比較齐全。

应该指出,这个方法也有两个缺点,一是在室温較低的情况下操作时,培养基易于凝固,制做薄层比較困难。二是如果培养皿皿底不平也难以制成均匀的薄层。要避免这两个缺点,低室温操作时,或者預先选择底面很平的培养皿置于温箱中升温,或者在皿底先加上一薄层(約1毫米)的无菌洋菜以使皿底平正并防止傾注时培养基过早凝固。

摘 要

安排了一个改良了的好氧性分解纖維素細菌的沉淀纖維素計数法——薄层沉淀纖維素計数法(沉淀纖維素用量7.5%、洋菜浓度0.4—0.5%,培养基厚度0.8毫米)。通过用四属五种純种分解纖維素細菌,四种不同土样,四种不同計数法,验证了这个方法的有效性。討論了这个方法的优缺点。

参 考 文 献

- [1] J. 波爽: 土壤微生物分析技术手册。1959年,科学出版社。
- [2] Имценецкий, А. А.: *Микробиология целлюлозы*. Издательство Академии Наук СССР, Москва, 1953.
- [3] Пушкинская, С. И.: *Микробиол.*, **23**: 34—36, 1954.
- [4] Charpentier, M.: *Ann. Inst. Past.*, **99**:153—155, 1960.
- [5] Gilligan, W. and Reese, E. T.: *Can. J. Microbiol.*, **1**:90—107, 1953.
- [6] Henis, Y., Keller, P., and Keynan, A.: *Can. J. Microbiol.* **7**:857—863, 1961.
- [7] Hungate, R. E.: The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria *Bact. Rev.*, **14**:1, 1950.
- [8] Keynan, A., Henis, Y., and Keller, P.: *Nature.*, **191** (4785):307, 1961.
- [9] Pochon, J., Tchaq Y. T., Wang T. L. (王祖农) et Augier J.: *Ann. Inst. Past.*, **79**:376, 1950.

NUMÉRATION DES BACTÉRIES CELLULOLYTIQUES AÉROBIES SUR LA COUCHE MINCE DE CELLULOSE PRÉCIPITÉE

WANG, T. L. KAO, P. C. SUNG, J. H.

(Université de Shungtung)

Une modification de la méthode de numération des bactéries cellulolytiques aérobies sur le milieu gélosé à cellulose précipitée a été mise au point, c'est la méthode de cellulose précipitée en couche mince: l'épaisseur du milieu, 0.8 mm; la dose de la gélose, 0.4—0.5%; la dose de la cellulose précipitée, 7.5%.

Les expériences faites avec 5 espèces appartenant aux 4 genres de bactéries cellulolytiques aérobies en cultures pures et 4 échantillons de sols différents ont montré que cette méthode est meilleure que les 3 méthodes courantes de numération. Les avantages et les inconvénients de cette méthode ont été discutés,