

应用两相分离技术研究红壤微生物组成的探讨*

李妍¹ 倪德军² 胡红青¹ 向万胜³ 李学垣¹

(1 华中农业大学亚热带农业资源与环境农业部重点实验室, 武汉 430070)

(2 华中农业大学生命科技学院, 武汉 430070)

(3 中国科学院亚热带农业生态研究所, 长沙 410125)

摘要 采集了鄂南不同母质和利用现状的6个红壤样,用2% PEG+6% Dextran两相分离技术(Aqueous two-phase partitioning technique, 简称为A2PP)纯化细菌,测定细菌生物量,研究两相分离技术在土壤微生物研究领域的可应用性。结果表明:(1)采用0.1%胆酸钠、钠型离子交换树脂、玻璃珠与土壤一起在4e下振荡2h,能较好地分散土壤细菌。供试土样细菌分离率介于0.41~0.60之间,不同母质发育的红壤相比,细菌分离率高低依次为:砂页岩>花岗岩>第四纪红色粘土;(2)A2PP技术能较好地纯化土壤中的细菌。6个供试原样的细菌多与土壤颗粒及有机质结合在一起,而两相分离技术能够得到较为纯净的细菌个体,土样细菌大多被分离存在于PEG相中,纯化率为63%~78%;细菌提取率介于0.131~0.148,不同母质发育土壤细菌提取率顺序与细菌分离率顺序相同;(3)供试土样的细菌形态都以小球状、小杆状细菌为主。

关键词 红壤;两相分离技术;细菌纯化

中图分类号 S15 **文献标识码** A

土壤微生物是土壤中最活跃的因子之一^[1],其生物类群主要有细菌、真菌、藻类等,在土壤生态系统中具有非常重要的作用,是土壤养分的库和源^[2],也是土壤有机质和相关养分转化和循环的动力^[3],已成为土壤培肥、耕作制度改革和作物栽培实践中的重要理论依据之一^[4]。土壤微生物通常紧密地粘附于土壤粘土矿物和有机质颗粒上,很难分离,从土壤中提取与纯化具有代表性的微生物,对研究土壤微生物的群落结构组成、土壤养分的迁移转化以及细胞生理学等都具有重要意义^[5]。由于土壤微生物组成的复杂性,要对其群落结构组成进行定量描述或者测定不同种类微生物的相对比例还存在许多困难。到目前为止,至少有95%以上土壤微生物在种的水平上还无法分离和培养。

两相分离技术最早形成于20世纪50年代,其分离原理是:当两种互不相溶的聚合物以一定浓度溶于水时,便可形成体积不同的两相,被分离组分由于其与两相的亲合力不同,分别进入不同相从而达到分离的目的。近些年该技术被广泛应用于生物化学、细胞生物学等领域,是一种分离、纯化生物大分子、细胞、病毒的方法^[6,7],该技术现逐步发展成

为一种温和的生物分离方法,相对于原始的纯化手段具有过程简单、纯化时间较短等特点,应用领域广泛^[8,9]。目前应用最普遍的是PEG(聚乙二醇)/Dex2tran(葡聚糖)系统和PEG/无机盐(磷酸盐或硫酸盐)系统。对于不同的两相组分,分离时间不尽相同^[5,10]。

红壤是亚热带地区的主要土壤类型,也是我国粮食及经济作物和林业、畜牧业发展的重要资源。本实验采集了湖北几种有代表性的红壤,利用两相分离技术分散、提取和纯化细菌,研究不同母质发育的红壤微生物组成,以期明确红壤的微生物形态,为两相分离技术的应用和揭示红壤肥力演变特征提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土壤样品 供试土壤均采自湖北省东南部。各样品采于0~20 cm表层,混匀,部分样品置冰箱内保存使处于新鲜状态,部分样品风干用于理化分析。供试土壤样品采样点基本情况见表1。

* 国家自然科学基金项目(40271070)和华中农业大学大学生科技创新基金资助

- 通讯作者, E-mail: hqhu@mail.hzau.edu.cn

作者简介:李妍(1979~),硕士,现在天津市农业科学研究院工作

收稿日期:2005-10-14;收到修改稿日期:2006-04-21

表 1 供试土壤的采样点、植被和母质类型

Table 1 Vegetations and parent materials at the soil sampling sites

土壤编号 Soil No.	采样点 Sampling site	植被 Vegetation	母质 Parent material
1	温泉 Wenquan	茶园 Tea garden	砂页岩 Sandstone
2	贺胜桥 Heshengqiao	茶园 Tea garden	第四纪红色粘土 Q ₂ deposits
3	温泉 Wenquan	菜园 Vegetable	砂页岩 Sandstone
4	贺胜桥 Heshengqiao	菜园 Vegetable	第四纪红色粘土 Q ₂ deposits
5	通城 Tongcheng	菜园 Vegetable	花岗岩 Granite
6	狮子山 Shizishan	林地 Forest	砂页岩 Sandstone

11112 实验试剂 PEG(分子量 8 000 Da) 购于 Amresco 公司, Dextran(平均分子量 500 000) 购于 Pharmacia 公司, 胆酸钠购于北京市海淀区微生物培养基制品厂。所有玻璃器皿均经过酸和蒸馏水洗涤, 150 e 烘干备用。

112 研究方法

11211 土壤性质的测定 土壤 pH 值采用 pH 计法(水土比 21.5B1)。土壤质地采用吸管法。有机质采用重铬酸钾-浓硫酸外加热法。交换性酸采用 1 mol L⁻¹ KCl 交换) 中和滴定法。微生物量磷采用熏蒸提取法(FE 法) 测定^[11]。

11212 样品前处理 新鲜土样去除可见动植物残体和石块, 磨细过 2mm 筛, 加水至田间持水量的 40%, 置入 4e 冰柜保存备用。试验前取适量土样于密闭塑料桶中, 内置一小杯 1 mol L⁻¹ NaOH 溶液吸收土壤呼吸产生的 CO₂, 置于 25 e 培养箱中培养 7~ 15 d, 每隔 3 d 揭盖换气一次。培养后的土样立即分析。

11213 红壤中细菌的分离 (1) 土样分散。取过 2mm 筛的新鲜土样 5 g(烘干基) 于三角瓶中, 加入钠型离子交换树脂 5 g、0.1% 胆酸钠 20 ml 和直径

4 mm 玻璃珠 3 g, 在 4e 下振荡 2 h。处理后的土壤悬液通过 20~ 30 Lm 孔径的滤膜, 真空抽滤, 取适量滤液进行纯化。

(2) 细菌纯化。分别溶解 PEG 与 Dextran 使其在两相分离系统中的比例分别为 2% 和 6% (w/w), 加入适量的土壤滤液及无菌蒸馏水使分离系统的总质量为 100 份。经充分混合后静置一定时间, 即可形成上下层的两相分离系统, 用吸管将上层 PEG 相转移出来。加入相同质量的 PEG 溶液对残留的细菌重复提取纯化 3 次, 所有操作均在 4e 下进行。将提取的 PEG 相合并, 混匀, 放入离心管中。按以上相同步骤做一份空白对照。

11214 细菌生物量的测定 采用异硫氰酸盐荧光染色(FITC) 方法^[12]。

(1) 土样细菌生物量的测定: 土样制成 1% 悬液, 取 10 L1 悬液于载玻片上成 1 cm², 干燥, 稍加热固定, 滴加 FITC 染色液 3 min 后, 置 0.15 mol L⁻¹ 碳酸钠缓冲液浸泡 10 min, 再用 5% 焦磷酸钠浸 2 min, 水冲, 干燥后用 5 ml 2 mol L⁻¹ Na₂CO₃ 和 45 ml 甘油制成的封片剂封片, 根据表 2 在 OLMPUS BX51 荧光显微镜下记录亮绿色细菌颗粒的大小与数量。

表 2 土壤细菌大小的分级与平均体积^[9]

Table 2 Classification of soil bacteria in size and average volume

分级 Class	形状 Form	大小 Size (Lm)	平均体积 Average volume (10 ⁻¹² cm ³)
N̄	小球 Small ball	< 112	0.3
ò	球状 Medium ball	112~ 116	1.4
ó	大球 Big ball	> 116	4.2
ô	小杆 Small rod	< 2 @ < 1	0.8
õ	杆状 Medium rod	2~ 4 @ 1~ 11.4	2.4
ö	大杆 Big rod	> 4 @ > 11.4	10.0

(2) 滤液及 PEG 相细菌生物量的测定: 取 10 L 悬液于载玻片上成 1 cm², 稍加热固定, 干燥后滴加 80% 丙酮溶液浸泡 15 min, 水冲。干燥后, 滴加 FITC 染色 3 min, 水冲, 干燥后同上法记录亮绿色细菌颗粒的大小与数量。

113 结果计算

$$\text{细菌数量 Ng(个 g}^{-1}\text{)} =$$

$$\frac{\text{数量/视域} \times 100 \times 100 \times \text{湿土重}}{\text{视域面积(mm}^2\text{)} \times 0.01 \times \text{干土重}}$$

$$\text{细菌生物量 Cg(mg g}^{-1}\text{)} = \text{Ng} \times \text{细菌体积(Lm}^3\text{)} \times \text{比重(111)} \times \text{干重(0.12)} \times \text{碳含量(0.45)} \times 10^{-6}$$

$$\text{细菌的分离率} = \frac{\text{滤液中的细菌生物量}}{\text{土样中的细菌生物量}}$$

$$\text{细菌的纯化率} = \frac{\text{纯化液中的细菌生物量}}{\text{滤液中的细菌生物量}}$$

2 结果与分析

211 供试土壤的基本理化性质

由表 3 可见, 供试 6 个土样 pH 在 3.85~5.63 之间, 均为酸性土壤, 菜园土(3~5 号土)的 pH 较茶园和林地土高。贺胜桥和通城菜园土的交换性酸量小于 0.180 cmol kg⁻¹, 其余土样的交换性酸总量较高, 尤其是温泉茶园土, 高达 8.104 cmol kg⁻¹。6 个土样有机质含量为 1.413~2.813 g kg⁻¹, 普遍较高。微生物量磷含量为 1.013~5.115 mg kg⁻¹, 其中 1、2、3 号土含量较低, 6 号土的最高。颗粒组成中, 1、2 号土的粘粒含量高于 30%, 3、4 号土则在 26%~28%, 5、6 号土的粘粒含量最低, 仅为 6%~7%。

表 3 供试土壤的基本理化性质

Table 3 Basic properties of the soils examined

土壤编号 Soil No.	pH (H ₂ O)	有机质 OM (g kg ⁻¹)	微生物磷 Microb. P (mg kg ⁻¹)	颗粒组成		交换性酸		
				Particle constituents (%)		Exch. acid (cmol kg ⁻¹)		
				20~2Lm	<2Lm	H ⁺	Al ³⁺	总量 Sum
1	3.85	2.016	1.315	26.191	32.167	0.164	7.4	8.04
2	4.31	1.615	1.212	32.19	33.82	0.134	5.161	5.95
3	4.73	1.413	1.013	33.133	27.181	0.107	4.117	4.24
4	5.29	1.618	2.94	49.108	26.176	0.112	0.168	0.80
5	5.63	1.815	2.313	3.192	6.176	0.106	0.108	0.14
6	4.21	2.813	5.115	21.192	6.124	0.137	4.145	4.82

212 红壤中细菌的分离效果

由表 4 可见, 发育于砂页岩的红壤(1 号、3 号、6 号土样)细菌分离率为 0.156~0.160, 发育于第四纪红色粘土母质的红壤(2 号、4 号土样)最低只有 0.141~0.142, 供试土样从高到低依次为: 1 号土 U3 号土 U6 号土\ 5 号土 > 2 号土 U4 号土。相同母质发育的 1、3 和 2、4 号土样, 均以茶园土的分离率大于菜园土。

统计结果表明不同土样的细菌分离率存在显著差异。在土样分散过程中, 母质类型对土壤细菌的分离有很大影响。在本试验中, 供试 3 种母质土样的细菌分离率为: 砂页岩 > 花岗岩 > 第四纪红色粘土, 这与 Hopkins 等的研究结果相吻合^[13]。但本试验的分离率更高些, 可能是由于土壤类型、利用方式、微生物群落结构等不同所导致土壤理化性质的差异造成的。

表 4 供试红壤细菌分离率、纯化率、提取率及显著性差异

Table 4 Bacteria separation, purification and extraction rates of the six red soil samples tested

土壤编号 Soil No.	细菌分离率 ¹⁾ Separation rate	细菌纯化率 Ratio of purification			细菌提取率 Extraction rate
		滤液生物量 Biomass in filtrate (C Ig g ⁻¹)	纯化液生物量 Biomass in purified solution (C Ig g ⁻¹)	纯化率 Purification rate	
		1	0.160a	2.800	
2	0.142b	2.654	1.9911	0.175ab	0.137ab
3	0.158a	1.3115	9.210	0.170ab	0.143ab
4	0.141b	1.4114	1.0819	0.177ab	0.131b
5	0.155ab	2.059	1.2917	0.163b	0.143ab
6	0.156a	4.203	3.2719	0.178a	0.144a

1) 相同字母为统计检验差异不显著(p > 0.05), 不同字母表示统计检验差异显著(p < 0.05) The same letters mean no significant difference (p > 0.05), whereas different letters represent significant difference (p < 0.05)

土样经分散抽滤后,滤液中的细菌生物量为 C 13115~ 42013 Lg g⁻¹干土,从高到低依次为:6 号土 > 1 号土 > 2 号土 > 5 号土 > 4 号土 > 3 号土。滤液经过 2% PEG 和 6% Dextran 纯化后,纯化液中的细菌生物量从 C 9210~ 32719 Lg g⁻¹干土,仍以 6 号土最高,3 号土最低,细菌生物量高低顺序与纯化前相同。细菌纯化率除 5 号土只有 63% 外,其余土样均在 70%~ 78%,从高到低依次为:6 号土 > 1 号土 > 4 号土 > 2 号土 > 3 号土 > 5 号土,说明两相分离技术对供试红壤样都能得到较好的纯化。另外,统计检验表明供试 6 个土样的纯化率存在差异,滤液在进入两相分离系统纯化过程中,可能是由于细菌与土壤颗粒及有机质结合紧密程度不同导致的。

供试土样的细菌提取率为 0131~ 0148,从高到低顺序为 1 号土 > 6 号土 > 3 号土 = 5 号土 > 2 号土 > 4 号土。总的来说,红壤细菌提取率在不同母质的顺序依次为:砂页岩 > 花岗岩 > 第四纪红色粘土,与细菌分离率的顺序相同。该提取率比密度逐级离心法的细菌提取率低,而与振荡-超声波分散-低速离心法相接近^[13, 14]。

213 两相分离技术(A2PP)研究红壤细菌形态和数量

图 1 为供试红壤样品经 A2PP 纯化前后土壤细菌的对比照片(土样 3、4、6 号照片未列出)。左侧为

1%土壤悬液中的细菌经过 FITC 染色后拍摄的效果图(稀释 5 000 倍,放大 2 500 倍),右侧为土样经过分散)提取纯化后,将上层清液荧光染色后的图片(稀释和放大倍数同上),图中的绿色亮点为细菌菌体。左侧图片显示出原土样中的细菌经染色后观察到的细菌是与有机质、土壤颗粒以及其他杂质结合在一起的,而右侧的土样经纯化染色后个体形态较明显,在显微镜下能够清晰观察到。这表明,对于供试红壤样品,用 2% PEG 和 6% Dextran 组成的两相分离体系纯化能得到较纯净的菌体。

经过分散和 A2PP 提取、纯化处理后,土壤中的细菌数和细菌生物量都发生了变化(表 5)。原土细菌数从高到低依次为 1 号土 > 6 号土 > 2 号土 > 4 号土 > 5 号土 > 3 号土,变化范围为 25017 @10⁷~ 75313 @10⁷个 g⁻¹干土。纯化后仍以 1 号土最高,3 号土最低,变化范围为 7218 @10⁷~ 34813 @10⁷个 g⁻¹干土。原土细菌生物量从高到低依次为 6 号土 > 2 号土 > 1 号土 > 4 号土 > 5 号土 > 3 号土,纯化后仍然是 6 号土的最高,3 号土最低。供试土样纯化后不仅细菌数减小,细菌生物量也随之减小。细菌数减少量 8711 @10⁷~ 40510 @10⁷个 g⁻¹干土,细菌生物量减少量为 C 12411~ 41716 Lg g⁻¹干土,减少幅度超过 50%。

表 5 纯化前后土壤细菌数及细菌生物量的变化

Table 5 Changes in number and biomass of soils bacteria before and after purification

土壤编号 Soil No.	细菌数 Number (@10 ⁷ g ⁻¹)		细菌生物量 Biomass (C Lg g ⁻¹)	
	原土 Before	纯化后 After	原土 Before	纯化后 After
1	75313	34813	45618	21814
2	43310	22214	54310	19911
3	25017	7218	21611	9210
4	36818	16014	35617	10819
5	33414	24713	30512	12917
6	51211	27710	74515	32719

图 2 显示了经 A2PP 分离纯化后的土壤细菌的形态组成。可以看出,砂页岩发育的 1、3、6 号土纯化前后的细菌形态分别是,1 号土以小球状细菌为主,3 号土以小杆和小球状细菌为主,6 号土以小杆状细菌为主。从细菌生物量来看,1 号土纯化前后以小球状细菌为主,3 号土纯化前以小杆细菌为主,纯化后小杆和中杆状细菌生物量相当,是主要组成部分,6 号土纯化前大杆状细菌生物量最高,而纯化

后小杆细菌的生物量要高于大杆细菌。纯化前后细菌总数从高到低依次为:1 号土 > 6 号土 > 3 号土,细菌总生物量为:6 号土 > 1 号土 > 3 号土。

第四纪红色粘土发育的 2、4 号土,从细菌的数量来看,纯化前后 2 号土以小球、小杆状细菌为主,4 号土以小球细菌为主,其次是小杆细菌。对于细菌生物量,2 号土纯化前以大杆细菌生物量最高,纯化后大杆、小杆和小球状细菌生物量相当。4 号土纯

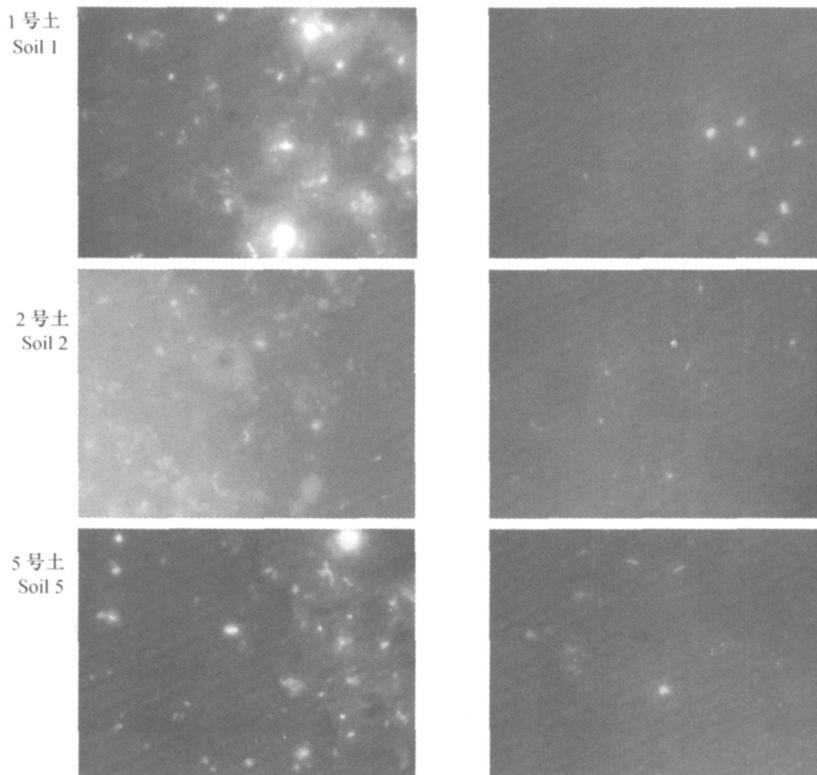


图1 供试土样两相分离纯化前后细菌的对比图(左:原土;右:纯化后。放大 1125×10^7 倍)

Fig11 Photos of bacteria from the six red soil samples before and after A2PP purification (Left: before purification; right: after purification. The scale is $1 \text{BI} 2.500.000$)

化前不同形态的细菌生物量含量相近,纯化后大球细菌生物量含量最低。

花岗岩发育的5号土,小杆和小球状细菌数量均显著高于其他形态的细菌。纯化前后的细菌生物量以小杆状细菌为主,其余从高到低依次为:大杆>小球>大球>中杆>中球。

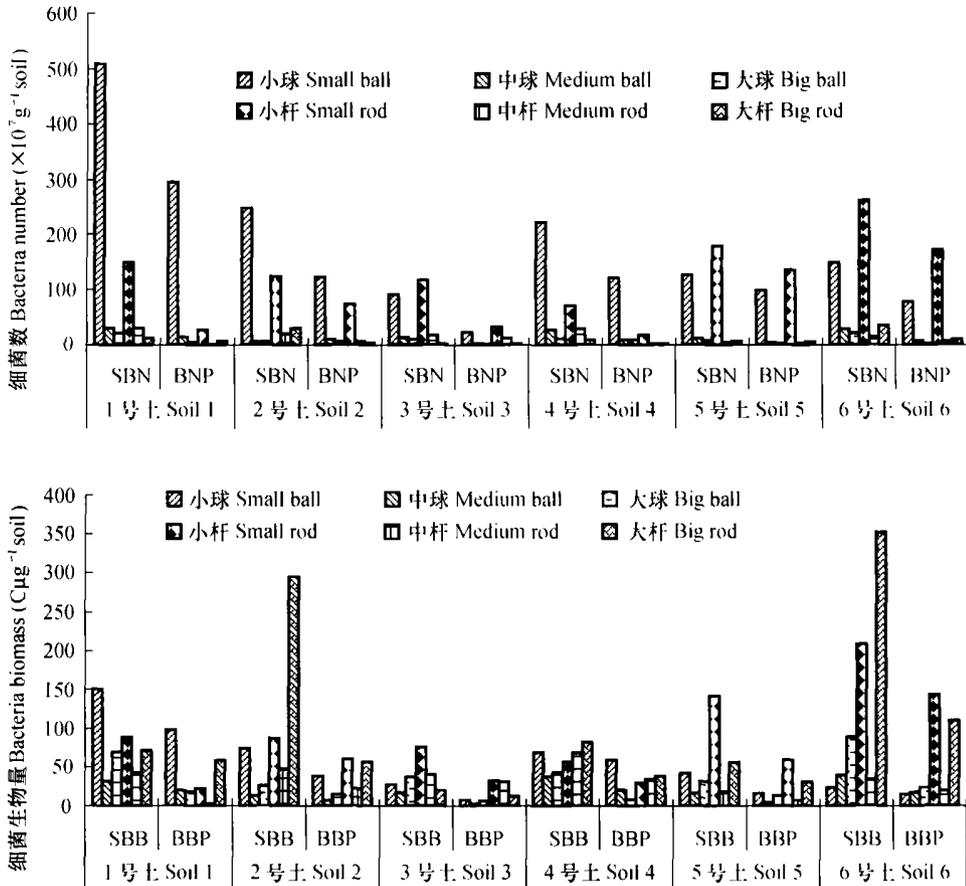
利用方式也影响细菌数量和生物量。对菜园土和林地土,从细菌数量上看,菜园土的小球状细菌数都显著高于林地,而林地的小杆状细菌数高于菜园土。从细菌生物量来看,1号土纯化前后都以小球状细菌为主,2、6号土纯化前都以大杆状细菌生物量为主,纯化后以小杆、大杆状细菌生物量为主。对菜园土,纯化前细菌总数是4号土>5号土>3号土,纯化后为5号土>4号土>3号土,细菌生物量也符合这一趋势。总体看来,对供试红壤,小球、小杆状细菌

是主要组成部分,各细菌形态的数量和生物量组成上表现为林地、茶园土>菜园土。

3 讨论

一些试验结果证明^[13,15,16],采用物理化学分散、差级离心、淘选等法分离土壤细菌时,母质类型是影响分离效果的主要因素,本研究结果与此相符。

Smith等^[10]研究认为,2% PEG和6% Dextran充分振荡能够形成上下两相体积比约为4B1的两相分离系统,富集在上层PEG相的细菌总量约达加入量的60%,而本实验在分离过程中形成上下两相体积比约为7B1,纯化效率较其高,最高可达到78%,与水解纤维酶的纯化效率相接近^[17],而低于 α 淀粉酶纯化效率^[18]。所以不同方法的分离纯化效果是不同的。



SBN: 纯化前细菌数 Soil bacteria number; BNP: 纯化后细菌数 Bacteria number after purification;
SBB: 纯化前细菌生物量 Soil bacteria biomass; BBP: 纯化后细菌生物量 Bacteria biomass after purification

图2 不同母质发育的土壤纯化前后细菌形态组成

Fig 2 Purified and unpurified bacteria components from soils derived from different parent material

另外,如何更好地使细菌与土壤颗粒分离一直是研究的热点。细菌与土壤颗粒和有机质结合紧密程度不同对整个分离纯化的效果也有影响。Smith等测定了上层PEG相中矿质颗粒总量占加入量的4%以下,本实验虽未测定,但是从纯化后的图片(图1)来看,残存的土壤颗粒很少,与Smith的研究结果基本一致。

4 结 论

本文采用两相分离技术研究了亚热带6个发育于不同母质、具有不同利用现状的红壤样品的微生物量组成,取得的主要结果有:

1) 所采用的化学分散和2% PEG+ 6% Dextran两相系统分离纯化过程能够有效提取红壤中的细菌。细菌的分离率在0.141~ 0.160之间,几种母质发育的红壤上分离率顺序为:砂页岩> 花岗岩> 第四纪红色粘土。对相同母质的土样,茶园土的分离率大于菜地。

2) 应用A2PP对供试土样细菌进行纯化,均达到了较好的纯化效果。两相分离技术能够得到较为纯净的细菌个体,纯化率为63%~ 78%。细菌的提取率介于0.131~ 0.148。不同母质发育土壤细菌提取率与细菌分离率的顺序相同。

3) 应用A2PP对土壤细菌形态结构以及数量有所改变。不同母质发育的供试红壤样的细菌形态都以小球状、小杆状细菌为主。各形态细菌的数量和生物量上,林地、茶园土大于菜园土。

参 考 文 献

- [1] Lter M B, Soethe N, Horn R, et al. Seasonal development of microbial activity in soils of Northern Norway. *Pedosphere*, 2005, 15(6): 716~ 727
- [2] Smith J L, Paul E A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: Bbag J- M, Stotzy G. eds. *Soil Biochemistry*. Vol. 6. New York: Marcel Dekker, Inc, 1991. 359~ 396
- [3] 刘满强, 胡锋, 何圆球, 等. 退化红壤不同植被恢复下土壤微

- 生物量季节动态及其指示意义. 土壤学报, 2003, 40(6): 937~944. Liu M Q, Hu F, He Y Q, et al. Seasonal dynamics of soil microbial biomass and its significance to indicate soil quality under different vegetations restored on degraded red soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(6): 937~944
- [4] 高云超, 朱文珊, 陈文新. 秸秆覆盖免耕土壤细菌和真菌生物量与活性的研究. 生态学杂志, 2001, 20(2): 30~36. Gao Y C, Zhu W S, Chen W X. Bacterial and fungi biomass and activities in straw mulch no tillage soils (In Chinese). *Chinese Journal of Ecology*, 2001, 20(2): 30~36
- [5] 向万胜, 吴金水, 肖和艾, 等. 土壤微生物的分离、提取与纯化研究进展. 应用生态学报, 2003, 14(3): 453~456. Xiang W S, Wu J S, Xiao H A, et al. Advances in extraction and purification of soil microorganism (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(3): 453~456
- [6] Albertsson P A. Partition of Cell Particles and Macromolecules. New York: John Wiley & Sons, 1986
- [7] Walter H, Johansson G, Brookes D E. Partitioning in aqueous two phase systems: Recent results. *Analy. Biochem.*, 1991, 197: 1~18
- [8] Raghavarao K S M S, Ranganathan T V, Srinivas N D. Aqueous two phase extraction—An environmentally benign technique. *Clean Technol. Policy*, 2003, 5: 136~141
- [9] Strom G, Palmgren U, Blomquist G. Separation of organic dust from microorganism suspensions by partitioning in aqueous polymer two phase systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53(4): 860~863
- [10] Smith N C, Stribley D P J. A new approach to direct extraction of microorganism from soil. In: Ritz K, et al. eds. *Beyond the Biomass*. London: British Soc. Soil Sci., 1994
- [11] Brookes P C, Powlson D S, Jenkinson D S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1982, 14: 319~329
- [12] Bakuk L A, Paul E A. The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial biomass of grassland soil. *Can. J. Microbiol.*, 1970, 16: 57~62
- [13] Hopkins D W, Mclaughton S J, O. Donnel A G. A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1990, 23: 217~225
- [14] Riis V, Lorbber H, Babel A. Extraction of microorganisms from soil: Evaluation of the efficiency by counting methods and activity measurements. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30: 1573~1581
- [15] Bakken L R. Separation and purification of bacteria from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, 49: 1482~1487
- [16] Macdonald R M. Sampling soil microfloras: Dispersion of soil by in exchange and extraction of specific microorganisms by elutriation. *Soil Biol. Biochem.*, 1986, 18: 399~406
- [17] Persson I, Tjemeld F, Hahn Hagerdal B. Semi-continuous production of cellulolytic enzymes with *Trichoderma resin* Rutgers C30 in aqueous two phase systems. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1991, 27: 27~36
- [18] Andersson E, Hahn Hagerdal B. High concentrations of PEG as a possible uncoupler of the proton motive force: α -amylase production with *Bacillus amyloliquefaciens* in aqueous two phase systems and PEG solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1988, 29: 329~336

PROBING COMPONENTS OF MICROBES IN RED SOILS OF CENTRAL CHINA WITH THE AQUEOUS TWO-PHASE PARTITIONING TECHNIQUE

Li Yan¹ Ni Dejun² Hu Hongqing¹ Xiang Wansheng³ Li Xueyuan¹

(1 Key Laboratory of Subtropical Agriculture Resource and Environment, MOA, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2 College of Life Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(3 Institute of Subtropical Agricultural Ecology, Chinese Academy Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract The aqueous two-phase partitioning (A2PP) technique, considered as a useful tool to separate and purify cells, virus, macromolecule, has found extensive application in biochemistry, cytobiology and other relevant fields. However, few reports are so far available on its application in the field of soil microbiology. This experiment was designed to study components of microbes in red soils with the PEG/Dextran A2PP technique. Results show that soil bacteria were well dispersed after the Dowex resin, sodium cholate, glass beads and soils were mixed into suspension, which was then shaken for 2h at the temperature of 4°C. The separation rate of bacteria ranged between 0.41~0.60 and varied with parent material in the order of sandstone> granite> Q₂ deposits. The experiments demonstrated that A2PP could separate and purify soil bacteria quite well. With the two phase technique, about 63%~78% of the bacteria in the soil samples were separated and stored in the PEG phase. With the fluorescence microscope technique, most soil bacteria were closely tied with soil clays and organic matter, whereas with the A2PP technique purer bacteria could be obtained. The bacteria extraction rate was in the range of 0.31~0.48, and varied with parent material in the same order of sandstone> granite> Q₂ deposits as was with the separation rate. For the six red soil samples examined, micrococcus and microbacilli were dominant in terms of forms of soil bacteria.

Key words Red soil; Aqueous two-phase partitioning technique; Bacteria purification