

# 分离根瘤菌用的选择培养基\*

许月蓉

(中国科学院南京土壤研究所)

在研究根瘤菌生态学时,通常需要测定接种的根瘤菌株在土壤中的数量变化,以了解其存活和消长情况。植株感染法则是常用的方法,但此法手续冗繁,周期长,近来有渐为耐药菌株和某些选择性培养基分离计数法所替代之势,但有些选择性培养基并不能完全阻止杂菌的生长,尤其是那些铺展性强的真菌能抑制根瘤菌的生长,从而影响计数;另一方面,有些选择培养基所用的抗菌素因药源紧,价格贵,而在使用上受到限制,本文推荐的选择培养基则可克服上述各缺点。

## 一、材料和方法

### (一)培养基和抑菌剂

1. 基础培养基: 用根瘤菌培养基\*\*加硫酸盐链霉素(每升培养基加硫酸盐链霉素0.5克,浓度为500ppm)。

2. 通用选择培养基 基础培养基加放线酮(每升培养基加放线酮0.15克,浓度为150ppm)。

(3)本文推荐的选择培养基 由基础培养基及五氯硝基苯(可湿性粉剂,含有效成份70%)多菌灵(可湿性粉剂含有效成份10%)和结晶紫等三种抑菌剂组成。其中除结晶紫外,其余抑菌剂均在培养基灭菌后冷却至约60℃时加入,混匀,制成平板,于45℃烘箱中除去表面冷凝水,备用。

### (二)供试菌株

1. 耐500ppm硫酸盐链霉素的苕子根瘤菌S-7130。
2. 菌落中央有一个白色的小圆点的苕子根瘤菌6034。

### (三)供试土壤

水稻土(采自无锡和南京)、黄棕壤(采自南京和山东)、红壤(采自江西)及灰壤(采自山东)。

### (四)试验方法

将菌龄5—7天的S-7130菌株斜面培养物,加灭菌水3毫升及一滴分散剂(吐温80),充分振荡摇匀,制成菌悬液。吸取0.05毫升菌悬液移入10%的土壤悬液中,振荡15分钟,吸取此液0.05毫升于琼脂平板上,用刮刀均匀涂抹,28℃培养7天左右计数。

\* 本文承李良谟同志指正, 谨致谢意。

\*\* 根瘤菌培养基成份如下:

葡萄糖10克;  $K_2HPO_4$  0.5克; NaCl 0.1克;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2克;  $CaCO_3$  1.5克; 1%钼酸钠溶液2毫升; 1%硼酸溶液2毫升; 酵母膏0.4—1.0克; 1/200刚果红5毫升; 琼脂20克; 水1000毫升, pH调至7.0。

## 二、结果和讨论

### (一) 选择培养基的组成

培养试验结果(表1、2)表明:(1)含有五氯硝基苯的培养基对真菌有明显的抑制作用,尤其是对根霉、毛霉和木霉真菌效果更佳,但对青霉、曲霉的抑制作用较少。在300毫升基础培养基中加入0.1—0.6克五氯硝基苯的条件下,其抑制真菌的能力几无差异;(2)含有多菌灵的基础培养基其抑制真菌的能力高于含五氯硝基苯的基础培养基,多菌灵含量愈高抑制作用愈大,但此培养基对根霉、毛霉和木霉等铺展性强的真菌几乎没有抑制效果;(3)含有结晶紫

表1 含抑菌剂的培养基对土壤真菌数量的影响 个/克干土

| 供试土壤    | 培 养 基 |          |       |       |            |       |       |
|---------|-------|----------|-------|-------|------------|-------|-------|
|         | 基础培养基 | 含多菌灵的培养基 |       |       | 含五氯硝基苯的培养基 |       |       |
|         |       | 0.1克*    | 0.2克* | 0.3克* | 0.1克*      | 0.2克* | 0.3克* |
| 灰壤(山东)  | 根霉铺满  | 根霉铺满     | 根霉铺满  | 根霉铺满  | 3.56       | 10.67 | 14.22 |
| 水稻土(无锡) | 201.5 | 0.11     | 0.11  | 0.25  | 4.21       | 5.00  | 3.68  |
| 黄棕壤(南京) | 10.52 | 0.14     | 0.16  | 0.23  | 9.32       | 15.68 | 8.64  |
| 红壤(江西)  | 25.38 | 0        | 0     | 0     | 0.05       | 0.50  | 0     |

\* 300毫升基础培养基加入的抑菌剂量

表2 S—7130根瘤菌株在含结晶紫的培养基平板上的数量(个/克干土)

| 培养基类型           | $\bar{x} \pm S$ | C. V. |
|-----------------|-----------------|-------|
| 基础培养基           | 38 ± 5.5        | 14.5  |
| 通用培养基           | 35 ± 3.5        | 10.0  |
| 含结晶紫1.7ppm的培养基  | 34 ± 1.9        | 5.6   |
| 含结晶紫3.4ppm的培养基  | 38 ± 1.9        | 7.6   |
| 含结晶紫6.8ppm的培养基  | 45 ± 4.6        | 10.2  |
| 含结晶紫10.2ppm的培养基 | 0               | 0     |

注:  $\bar{x}$  表示菌落平均数(个/皿), S 表示标准差, C.

V. 表示变异系数

的基础培养基对细菌的抑制能力随其浓度而异,浓度高时,所有细菌几乎均不能在其上生长;浓度低时,对任何细菌均无杀伤能力;只有在浓度适中时,即浓度在3.4—6.8ppm时抑制作用方有选择性。

根据上述试验结果,本文所推荐的选择培养基的组成规定为:每300毫升基础培养基加入1%结晶紫溶液0.1—0.2毫升;五氯硝基苯(可湿性粉剂)0.1克和多菌灵(可湿性粉剂)0.1克。

### (二) 选择培养基的优点

1. 抑制真菌生长 从S—7130根瘤菌株及各种土壤悬液接种在基础培养基、通用培养基和本文推荐的选择培养基的平板上的根瘤菌和土壤真菌的生长情况(表3)来看,以选择培养基抑制真菌的能力最强,从而为S—7130根瘤菌的生长发育提供了有利的环境,因而数量较多;而通用培养基和基础培养基的抑制真菌能力较差,真菌迅速生长发育而影响了根瘤菌的生长。

试验还表明(表4),在选择培养基平板上,真菌的数量不仅少,而且其单菌落长势也受到抑制。从四种土壤中分离到的真菌菌株,分别接种在基础培养基和选择培养基平板上,其中竟有70%的菌株不能在选择培养基平板上生长;其余虽能生长,但菌落较基础培养基平板上的小得多,菌丝亦不发达。

2. 有利根瘤菌的生长与计数 S—7130根瘤菌在选择培养基平板上的回收量界于通用培

表3

土壤真菌、S-7130根瘤菌在三种培养基平板上的数量

| 供试土壤名称 | 土壤采集地点 | 真菌数量 (千个/克干土) |        |       | S-7130根瘤菌数量 (万个/克干土) |       |       |
|--------|--------|---------------|--------|-------|----------------------|-------|-------|
|        |        | 基础培养基         | 通用培养基  | 选择培养基 | 基础培养基                | 通用培养基 | 选择培养基 |
| 水权土    | 无锡     | 201.5         | 125.82 | 0.79  | ×××                  | ×××   | 6.16  |
| 水权土    | 南京     | 58.13         | 2.39   | 0.30  | ×××                  | ×××   | 8.37  |
| 黄棕壤    | 南京     | 10.52         | 2.87   | 1.13  | 3.96                 |       | 2.83  |
| 黄棕壤    | 山东     | 13.58         | 1.93   | 0.99  | ×××                  | 30.05 | 51.40 |
| 黄棕壤    | 山东     | 13.37         | 3.94   | 1.77  | ×××                  | 18.61 | 26.94 |
| 灰壤     | 山东     | 根霉、木霉铺满       | 9.77   | 1.55  | ×××                  | 1.66  | 5.95  |
| 红壤     | 江西     | 25.38         | 0      | 0     | ×××                  |       | 0.47  |

注：“×××”表示真菌多，根瘤菌无法计数

表4

四种土壤的真菌在基础培养基和选择培养基平板上的生长量

| 供试菌株               | 真菌菌落直径(厘米) |       | 供试菌株               | 真菌菌落直径(厘米) |       |
|--------------------|------------|-------|--------------------|------------|-------|
|                    | 基础培养基      | 选择培养基 |                    | 基础培养基      | 选择培养基 |
| <i>Rhizopus</i>    | <9         | 3.3   | <i>Aspergillus</i> | 5.2        | —     |
| <i>Trichoderma</i> | <9         | —     | <i>Myrothecium</i> | 2.0        | —     |
| <i>Trichoderma</i> | <9         | —     | <i>Fusarium</i>    | 1.4        | —     |
| <i>Alternaria</i>  | 3.7        | 1.6   | <i>Fusarium</i>    | 4.7        | 4.6   |
| <i>Penicillium</i> | 1.4        | —     | <i>Fusarium</i>    | 8.0        | 0.7   |
| <i>Penicillium</i> | 1.7        | —     | <i>Gliocladium</i> | 3.0        | 0.9   |
| <i>Penicillium</i> | 2.6        | —     | <i>Curvularia</i>  | 2.1        | 1.7   |
| <i>Penicillium</i> | 1.0        | —     | <i>Sterilia</i>    | 7.2        | —     |
| <i>Penicillium</i> | 3.5        | —     | No7                | 6.4        | 0.3   |
| <i>Penicillium</i> | 3.0        | —     | No18               | 5.3        | 0.6   |
| <i>Aspergillus</i> | 2.8        | —     | No20               | 8.0        | —     |
| <i>Aspergillus</i> | 5.3        | —     | No21               | 7.5        | —     |
| <i>Aspergillus</i> | 1.2        | —     | No22               | 1.5        | —     |
| <i>Aspergillus</i> | 1.3        | —     |                    |            |       |

培养基和基础培养基之间(表5)。前者为53个/皿，而后二者分别为62个/皿和4.5个/皿。另一方面，从选择培养基平板上分离的根瘤菌株与原接种的S-7130根瘤菌株的免疫血清凝集反应同属阳性反应，表明选择培养基是适用于根瘤菌计数的。

表5

根瘤菌 S-7130在选择培养基上的回收量(个/皿)

| 培 养 基 | 结 果 | 回 定 次 数         |      |                 |      |
|-------|-----|-----------------|------|-----------------|------|
|       |     | I               |      | II              |      |
|       |     | $\bar{X} \pm S$ | C.V. | $\bar{X} \pm S$ | C.V. |
| 基础培养基 |     | 42 ± 4.0        | 9.5  | 48 ± 7          | 14.6 |
| 通用培养基 |     | 67 ± 16         | 23.9 | 57 ± 22         | 38.6 |
| 选择培养基 |     | 35 ± 11         | 31.4 | 70 ± 16         | 22.9 |

注： $\bar{X}$ 表示菌落平均数(个/皿)，S表示标准差，C.V.表示变异系数

(下转第155页)

的吸附因而很容易随水淋失有关。

表5 在缺钾不缺镁土壤上镁肥对水稻吸钾量的影响 K%

| 处 理           | 1981年 |       | 1982年 |       | 1983年 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|               | 早 稻   | 晚 稻   | 早 稻   | 晚 稻   | 早 稻   |
| NP (1)        | 0.69  | 0.97  | 1.00  | 1.49  | 0.83  |
| NPMg (2)      | 0.69  | 0.80  | 0.90  | 1.45  | 0.83  |
| NPK (3)       | 1.52  | 1.80  | 2.58  | 2.08  | 2.49  |
| NPKMg (4)     | 1.39  | 1.52  | 2.33  | 2.02  | 2.49  |
| 吸 (3)-(1) (5) | 0.83  | 0.83  | 1.58  | 0.59  | 1.66  |
| 钾 (4)-(2) (6) | 0.70  | 0.55  | 1.33  | 0.53  | 1.66  |
| 量 (5)-(6)     | -0.13 | -0.28 | -0.25 | -0.06 | 0     |

(上接第149页)

分析,地形低平的槽平土不宜用此法计算,而坡地一台土比较适宜。地块选择尽量做到土层下有平整的隔水岩层。

2. 关于负蒸发的处理问题。机械地运用公式计算,是会出现蒸散量在某一时段为负的不正常现象。只要时段末期土壤含水量大于该时段降雨量与初期土壤含水量之和,负值就会出现。在我们实际观测的资料中就不止一次出现过,主要集中在秋冬季槽平土和一台土,当低温高湿或降雨多的条件下,土壤含水量过高时,则出现负蒸发值,这显然是不正确的。这可能是由于外来水补给造成的;或者是由于前后两次取样时,样本并不是在同一含水量基础上而将它们真正的差值掩盖掉造成的;或者二者兼而有之。遇到这种情况时,我们只好采取延长计算时段来消除。这也是造成计算蒸散量偏低的又一重要原因。如果采取前后时段蒸散量的中值或者令其该时段蒸散量为零也许会更好些。

#### 参 考 文 献

- (1) 施成熙, 粟宗嵩主编, 农业水文学。农业出版社, 1984。
- (2) 沈阳农学院主编, 农田水利学。农业出版社, 1980。

(上接第152页)

### 三、结 语

本文推荐的根瘤菌选择培养基有抑制真菌和细菌生长,便于根瘤菌计数,且不影响其回收量的优点。但是,不同的根瘤菌菌株对结晶紫的忍耐能力各异,此培养基用于耐药根瘤菌计数时,结晶紫的浓度应经试验确定。