

具喙田菁茎瘤菌培养基的 最适碳源和氮源

曹景勤 姚惠琴 陈碧云

(中国科学院南京土壤研究所)

摘 要

具喙田菁茎瘤菌在甘油、酵母膏培养基上,培养2~3天,菌落可达2毫米左右,菌落呈乳白色突起,生长茂盛,大小整齐,在斜面上培养48小时后,菌苔丰富;液体培养24小时,菌液明显变浊。经测定,代时为114分钟。

具喙田菁(*Sesbania rostrata*)具有营共生固氮作用的茎瘤和根瘤,是一种固氮量较高的一年生豆科作物^[1-3]。

现已发现有两种菌能与具喙田菁营共生固氮作用,一种叫*Azorhizobium*,能使寄主作物形成茎瘤和根瘤;一种叫*Rhizodium*只能使寄主形成根瘤。前者的专性很强,它只在具喙田菁上形成根瘤和茎瘤。所以,凡是引种具喙田菁都需接种*Azorhizobium*。

据初步观察,*Azorhizobium*在葡萄糖、酵母膏培养基上生长不良;在乳酸钠、琥珀酸钠、酵母膏培养基^[4]上则菌落较小,仅为1毫米左右。这究竟是该菌株固有的特性?抑或与培养基碳源、氮源种类有关?为此,我们对19种碳源和11种氮源分别进行对比试验,目的在于选择最适合*Azorhizobium*要求的碳源和氮源,为制备最佳的合成培养基提供依据。

一、材料与方法

(一)材料

1. 菌株*Azorhizobium* 我所生物固氮组分离。

2. 无碳源基础培养组成: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g; NaCl 0.1g; $CaCO_3$ 1.5g; 酵母膏 1g; 硼酸 20mg; 钼酸钠 20mg; pH7.0; 水1000ml, 加13g 琼脂粉即为固体培养基。

3. 供试碳源: (1) 葡萄糖; (2) 麦芽糖; (3) 蔗糖; (4) 木糖; (5) 葡糖; (6) D—果糖; (7) 乳糖; (8) 棉子糖; (9) 山梨糖; (10) 1—鼠李糖; (11) 1—阿拉伯糖; (12) 淀粉; (13) 甘油; (13—5) 甘油 5g; (14) 甘露醇; (15) 乙酸钠; (16) 柠檬酸钠; (17) 乳酸钠; (19) 琥珀酸钠; (19) 无碳; (20) 谷氨盐钠; (21) 乳酸钠 5g、琥珀酸钠 5g、谷氨酸钠 0.5g。

以上碳源除(5)一(13)和(21)以每毫升培养基加入的毫克量计算外,其它都按每毫升培养基加入10毫克标准配制。

4. 无氮源基础培养基组成: 甘油 5g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g; NaCl 0.1g; $CaCO_3$ 1.5g; 硼酸20mg; 钼酸钠20mg; 水1000ml; pH为7.0; 加13g 琼脂粉即为固体培养基。

5. 供试氮源:(1) 硫酸铵;(2) 硝酸铵;(3) 硝酸钾;(4) 草酸铵;(5) 谷氨酸钠;(6) 尿素;(7) 酵母膏;(8) 氯化铵;(9) 蛋白胨;(10) 硝酸钠;(11) 磷酸氢二铵;(12) 无氮。

以上氮源除(7)按每毫升培养基中含酵母膏 1 毫克;(9)含蛋白胨 1 毫克外;其它都按每毫升培养基加入 1 毫克纯氮配制。

(二) 方法

1. 菌落生长情况的观察。液体培养待菌液变浊时,用稀释平板法计数,重复 2 次,于28℃恒温室中培养 4 天,取出观察菌落生长情况,分不生长(-);微量生长(+);生长中等(++);旺盛生长(+++) 4 等级。

2. 菌数的测定。分别接一环菌到不同碳源的酵母膏培养液中和不同氮源的甘油培养液中进行培养,用稀释平板法在甘油、酵母膏琼脂培养基上计数。

3. 具喙田菁茎瘤菌生长代时的测定。培养基为甘油、酵母膏培养液, pH为7.0。起始接种量为0.1, (A420), 28℃培养, 在长过程中定时取样, 用国产 721 分光光度计测定 420nm 波长的吸光值, 绘制出生长曲线, 以吸光值增长 1 倍所需的时间作为 *Azorhizobium* 的代时。

二、结果和讨论

(一) 对碳源的利用

具喙田菁茎瘤菌对不同碳源的利用试验结果(表 1)表明, 甘油为具喙田菁茎瘤菌的最适的碳源(每公升用 5 克甘油测定菌数); 可利用的碳源有乳糖、棉子糖、鼠李糖、果糖、淀粉、甘露醇、谷氨酸钠(菌数测定以甘露醇为代表); 利用有限的碳源有葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、乙酸钠、琥珀酸钠(菌数测定以葡萄糖为代表); 不能利用的碳源有山梨糖、木糖、柠檬酸钠、乳酸钠(菌数测定以乳酸钠为代表。)

(二) 对氮源的利用

具喙田菁茎瘤菌对酵母膏、蛋白胨、谷氨酸钠等氮源利用最好(表 2, 菌数测定以酵母膏

(下转第 325 页)

表 1 具喙田菁茎瘤菌对不同碳源的利用概况 (1987)

编号	碳源名称	生长情况	菌落直径 (mm)	数量 (个/lm)
1	葡萄糖	+	< 1	478.8×10^8
2	麦芽糖	+	< 1	478.8×10^8
3	蔗糖	+	< 1	478.8×10^8
4	木糖	-	-	353.3×10^8
5	菊糖	++	1	225.4×10^9
6	D-果糖	+	< 1	478.8×10^8
7	乳糖	++	1	225.4×10^9
8	棉子糖	++	1	225.4×10^9
9	山梨糖	-	-	353.3×10^8
10	L-鼠李糖	++	1	225.4×10^9
11	L-阿拉伯糖	+	< 1	478.8×10^8
12	淀粉	++	1	225.4×10^9
13	甘油	+++	2	248.4×10^{10}
14	甘油	+++	2	248.4×10^{10}
15	甘露醇	++	1 (产酸)	225.4×10^9
16	乙酸钠	+	< 1	478.8×10^8
17	柠檬酸钠	-	-	353.3×10^8
18	乳酸钠	-	-	353.3×10^8
19	琥珀酸钠	+	< 1	478.8×10^8
20	CK 无碳	-	-	-
21	谷氨酸钠	++	1	225.4×10^9
22	乳酸钠、琥珀酸钠各 5 克、谷氨酸钠 0.5 克	++	1	225.4×10^9

- [9] 万洪富, 灌溉水的碱害指标及其与土壤碱化的关系, 土壤学进展, 第3期, 1—10页, 1990。
 [10] 万洪富等, 黄淮海平原土壤碱化分级的初步研究, 土壤学报, 第20卷, 第2期, 129—139页, 1983。
 [11] 俞仁培等, 碱化土壤分级的探讨, 中国盐渍土分类论文集, 128—134页, 江苏科技出版社, 1988。

(上接第315页)

为代表), 磷酸氢二铵、尿素、硝酸钾、硝酸钠、硫酸铵和硝酸铵等为可利用的氮源(菌数测定以硝酸铵为代表); 草酸铵和氯化铵等为不能利用的氮源(菌数测定以草酸铵为代表)。

表2 具喙田菁茎瘤菌对不同氮源的利用概况 (1988)

编 号	氮源种类	生 长 情 况	菌落直径 (mm)	数 量 (个/ml)	备 注
1	硫酸铵	+	< 1	101×10^8	3 天出现菌落
2	硝酸铵	++	1	660×10^7	3 天出现菌落
3	硝酸钾	+	< 1	101×10^8	3 天出现菌落
4	草酸铵	-	-	320×10^3	
5	谷氨酸钠	+++	1~2	248×10^{10}	2 天出现菌落
9	尿素	+	< 1	101×10^8	3 天出现菌落
7	酵母膏	+++	2	248×10^{10}	2 天出现菌落
8	氯化铵	-	-	320×10^3	
9	蛋白胨	+++	1.5~2	248×10^{10}	2 天出现菌落
10	硝酸钠	-	-	320×10^3	
11	磷酸氢二铵	++	1	660×10^7	3 天出现菌落
12	无氮	-	-	-	

根据上述试验结果, 我们认为下列合成培养基较适合于具喙田菁茎瘤菌的需要:

甘油 5 g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g; NaCl 0.1g; $CaCO_3$ 1.5g; 硼酸 20mg; 钼酸钠 20mg; 酵母膏 1g; 水 1000ml, 培养基的最终 pH7.0。加琼脂粉 13g 即为固体培养基。

参 考 文 献

- [1] 姚惠琴、曹景勤、陈碧云, 具喙田菁茎瘤的固氮作用, 土壤, 第5期, 263页, 1986。
 [2] 殷永刚、姜无忌, 毛茛田菁茎瘤形成和固氮活性的研究, 南京农业大学学报, 第2期, 63~67页, 1987。
 [3] 曹景勤, 一种有发展前途的豆科绿肥——具喙田菁, 农业科技通讯, 第5期, 31页, 1987。
 [4] A. H. Gibson et al, Current Perspective in Nitrogen Fixation, Australian Academy of Science Canberra, Australia P. 471. 1981.