

分离土壤放线菌的方法

游 长 芬

(中国科学院土壤研究所)

用稀释平板法测定土壤中放线菌的数量通常是在淀粉铵培养基上进行的,但是采用这种方法在分析某些土壤时,常因细菌和真菌的迅速蔓延,妨碍放线菌发育,以致影响结果的准确性,同时也不易从中得到纯菌。针对这一问题,国内外许多研究工作者曾在修改培养基成分^[1,2],选择抑制剂和运用离心原理^[1]将放线菌和细菌、真菌分离的方法等进行过较多的工作。尽管在不同程度上这些方法应用于某些土壤确能获得较好的效果,但是对另一些土壤则未能达到既消除真菌和细菌污染,又不致影响放线菌发育的目的。近来,我们在研究水稻土和红壤中放线菌时,发现高斯合成 1 号培养基中^[3]加入一定量重铬酸钾对性质极不相同的土壤基本上能达到消除细菌和真菌对放线菌的干扰。

一、试验材料和方法

试验选用南京附近下蜀系母质上发育的水稻土,苏北石灰性冲积土及海南红壤。分别将土壤悬液用刮刀涂布在高斯 1 号,克氏 1 号^[4]淀粉铵盐琼脂^[5]上,这三种培养基各分两份,一份加 60 ppm, 100 ppm, 130 ppm 重铬酸钾,另一份不加,作为对照。放置 28°C 恒温室中培养 7—10 天,计数后将菌落移植于高斯 1 号斜面上。按照高斯的方法鉴别放线菌的种组。

二、结果和讨论

1. 培养基比较

试验结果(表 1, 图 1)表明,凡在未加重铬酸钾的培养基上均有细菌和霉菌干扰,加重铬酸钾后在淀粉铵上有霉菌出现。

表 1 不同土壤及不同培养基上放线菌数量

土 壤*	培 养 基 (加 100 ppm $K_2Cr_2O_7$)	放 线 菌 数 (万/每克干土)
下蜀系母质上发育的水稻土	高 斯 1 号 克 氏 1 号 淀 粉 铵	107 主要生长细菌 73
石灰性冲积土	高 斯 1 号 克 氏 1 号 淀 粉 铵	21 主要生长细菌 1
红 壤	高 斯 1 号 克 氏 1 号 淀 粉 铵	11 主要生长细菌 1

* 除下蜀系母质上发育的水稻土外,其他均为风干土。

克氏 1 号上几乎全部长满了细菌, 唯有在高斯 1 号上不仅消除了真菌和大部分细菌的干扰, 所获得的放线菌数、种组以及各种组中出现的菌株数量也都较其他培养基为多, 而且菌落特征也更为明显(如图 1 戊)。

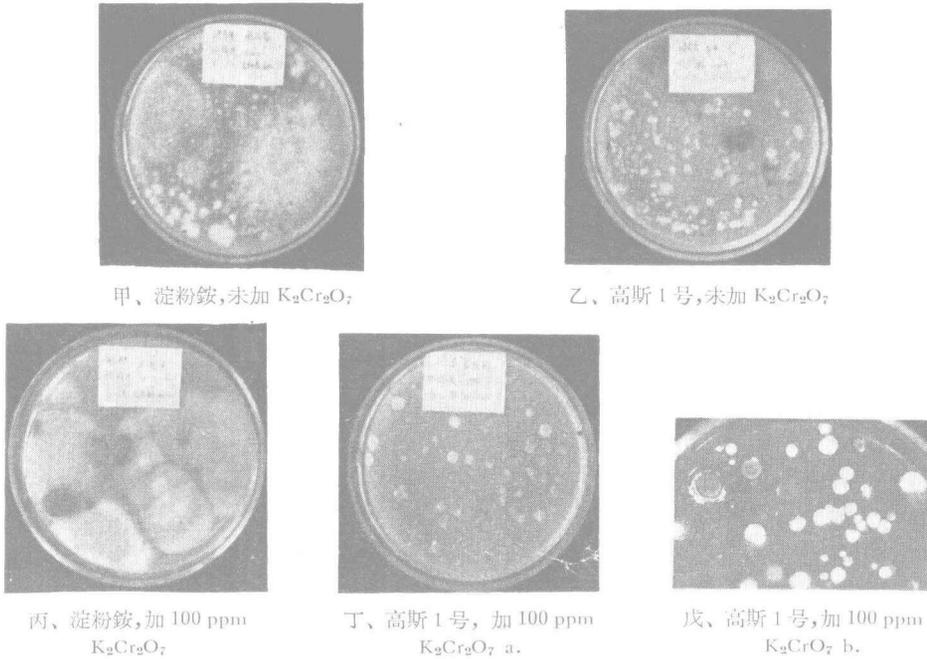


图 1 淀粉铵和高斯 1 号培养基中加入重铬酸钾的效果

表 2 高斯 1 号与淀粉铵培养基上放线菌数量、种类及污染情况比较
(供试土壤: 广州湛江砖红壤性粘土)

培养基	菌株数	种 组 和 数 量	种组总数	污染百分数(%)	
高斯 1 号	153	<i>Aureus</i>	25	10	0.6
		<i>Griseus</i>	24		
		<i>Coerulescens</i>	17		
		<i>Chromogenes</i>	14		
		<i>Violaceus</i>	8		
		<i>Nigrescens</i>	7		
		<i>Helvolus</i>	6		
		<i>Fradiac</i>	5		
		<i>Fuscus</i>	1		
		<i>Roseoviolaceus</i>	1		
		<i>Stirelis</i>	24		
		未接种	19		
		污染	1		
淀粉铵	52	<i>Aureus</i>	3	7	36
	<i>Griseus</i>	6			
	<i>Coerulescens</i>	3			
	<i>Chromogenes</i>	5			
	<i>Violaceus</i>	8			
	<i>Nigrescens</i>	3			
	<i>Fradiac</i>	1			
	<i>Stirelis</i>	4			
	污染	19			

2. 重铬酸钾浓度比较

为了求得在高斯 1 号培养基上加入重铬酸钾的最适浓度, 我们作了不同浓度重铬酸

鉀的比較試驗,得到的結果(图 2)說明,加 60 ppm 重鉻酸鉀的處理有較多的細菌生長,加 130 ppm 的處理,細菌雖然几乎絕迹,但放綫菌生長亦受到影響,唯有加入 100 ppm 的處理中細菌受到明顯抑制,放綫菌却生長良好,而且菌落特征明顯。

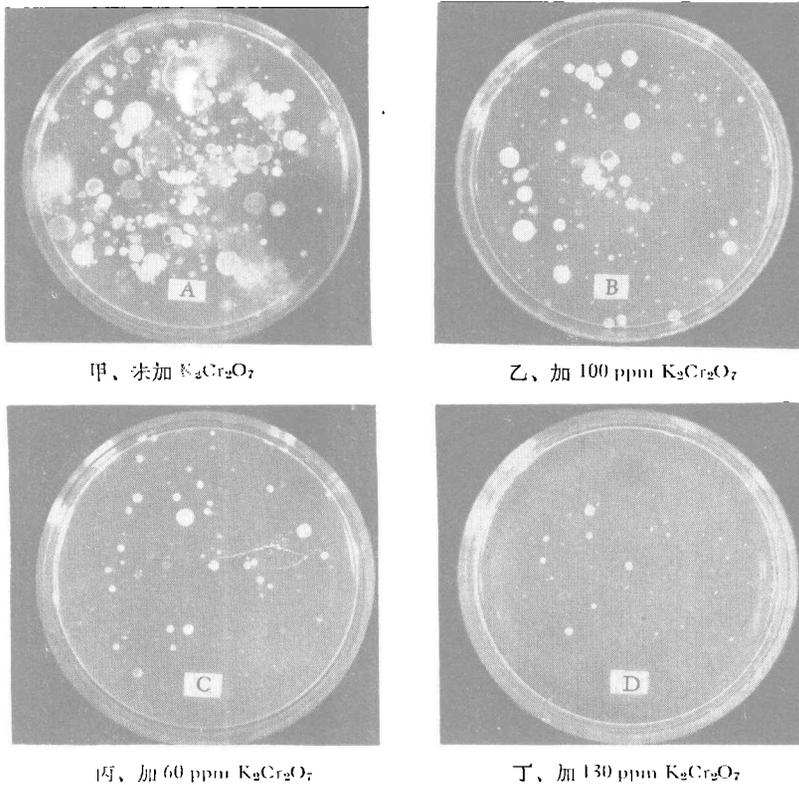


图 2 高斯 1 号添加重鉻酸鉀量的比較

一般認為分離放綫菌理想的培養基應具有兩個特點：(1)能避免細菌和真菌的干擾；(2)放綫菌在此培養基上的數量和種類應較其他培養基為豐富。因此在我們擬定培養基時，不僅要考慮它們的營養條件：如最易被放綫菌吸收利用的氮源和碳源，尚須為它們創造迅速繁殖的環境，如適宜的酸度、電位、培養基、濕度等。高斯 1 號加 100 ppm 重鉻酸鉀後能夠顯著的抑制細菌和真菌的生長而不影響放綫菌的正常發育並因此獲得較多的放綫菌數量和種類，這點我們推測與重鉻酸鉀加入培養基後提高了培養基的氧化性進而促進放綫菌的發育有較大的關係，而在澱粉鈹與克氏 1 號上未能獲得類似的效果則可能與培養基的氮源中 NH_4-N 與 NO_3-N 以及碳源中澱粉與葡萄糖的差異有關。

3. 重鉻酸鉀對放綫菌菌落顏色的影響

在研究土壤放綫菌組成時，由於雜菌污染的緣故，即使初步歸并菌株通常亦需將皿中菌落移植到斜面上進行純化觀察，工作量較大。根據以上結果，放綫菌能在有適當濃度重鉻酸鉀的高斯 1 號培養基上良好的生長，而且菌落特征明顯，我們認為如果這種特征與未加重鉻酸鉀的高斯 1 號斜面上的特征相似，則不僅有可能根據其特征直接歸并某些菌株，而且亦有可能鑒別種組。為此，我們把一些土壤中常見的放綫菌純培養分別接種在有重

鉀的高斯 1 号琼脂平板上, 和未加重鉀的高斯 1 号琼脂斜面上进行孢子絲和营养菌絲体的顏色特征比較。

表 3 重鉀对放线菌顏色特征的影响

菌株号	种 組 名	未加重鉀		加有重鉀		对重鉀 鉀的反应
		孢子絲顏色	营养菌絲体顏色	孢子絲顏色	营养菌絲体顏色	
6019	<i>Coerulescens</i>	浅天蓝色 (J ₀)	无 色	浅天蓝灰色	微 黄 色	-
7006	„	浅天蓝色	浅 黄 色	浅天蓝色	浅 黄 色	-
6009	„	浅天蓝灰色	浅 黄 色	浅天蓝灰色	黄 色	-
6013	„	浅天蓝灰色	橘 黄 色	浅天蓝灰色	橘 黄 色	-
6408	<i>Aureus</i>	灰色 (a ₁)	黄 色	灰 色	黄 色	-
7004	„	灰色	黄 褐 色	灰 色	浅 黄 褐 色	+
6023	„	浅灰色	黄色(带紫)	灰 色	黄色(带紫)	-
6123	„	灰色	黄色(带紫)	灰 色	黄色(带紫)	+
6215	<i>Fradiae</i>	紅色 (H ₁)	黄 褐 色	紅 色	黄 褐 色	-
6147	„	粉紅色	黄 色	粉紅色	紫 色	+
6399	„	紅色	黄色(带紫)	紅 色	蓝 紫 色	-
6338	<i>Helvolus</i>	綠黄色 (K ₃)	褐 色	綠黄色	黄 褐 色	-
6348	„	灰綠黄色	黄 色	灰黃綠色	黄 色	-
6315	<i>Roseoviolaceus</i>	紅色 (H ₄)	紫 色	紅 色	紫色(带黄)	-
6376	„	紅色	紫 色	粉紅色	紫 色	-
6388	<i>Violaceus</i>	灰色	紫 色	灰 色	紫 色	-
6349	„	灰色	紫 色	灰 色	紫 色	-
6036	„	灰色	紫 色	灰 色	紫 色	-
6166	<i>Albosporus</i>	白色 (J ₃)	黄 色	白 色	黄 色	-
6167	„	白色	黄 色	白 色	褐 黄 色	-
6293	<i>Ruber</i>	浅粉紅色	紅 色	浅粉紅色	紅 色	-
6267	<i>Chromogenes</i>	灰色	褐 色	灰 色	褐 色	-
6016	„	灰色	褐 色	灰 色	褐 色(带黄)	+
6021	„	灰色	紫 褐 色	灰色(带烏紫)	紫 褐 色	-
6216	<i>Griseus</i>	灰色	无 色	灰 色	无 色	-
6248	„	灰色	无 色	灰 色	浅 黄 色	+
6159	„	灰色	无 色	灰 色	浅 黄 色	+
6303	„	灰色	无 色	灰 色	黄 色	+
6017	<i>Chrysomallus</i>	浅灰色	綠 褐 色	浅灰色	綠 褐 色	-
6218	„	灰色	綠 褐 色	灰 色	綠 褐 色	-
6231	<i>Laevdulae</i>	紅色 (H ₄)	无 色	紅 色	黄 紫 色	+
6299	„	紅色	无 色	紅色(带灰)	黄 色	+

比較結果如表 3 所示, 在供試的 12 个种組 32 株純培养中其中有 6 个种組 20 株純培养(66%)对重鉀不敏感, 如 *coerulescens*, *helvolus* 中几株純培养在試管或培养皿中顏色都比較稳定。其余的 6 个种組 12 株純培养受重鉀的影响較大, 如 *aureus* 种組中

7004, 6408 号菌种对重铬酸钾不敏感, 而另一部分如 6123 号菌株, 它的营养菌絲体在試管斜面上的顏色为黄色, 在培养皿中的顏色为黄带紫色, 这种紫色有的接种到試管斜面上以后就会消失, 有的則保留一代或两代。有些菌种的顏色受重铬酸钾的影响, 不仅表现在营养菌絲体上, 有时也会影响到气生菌絲, 如 *chromogenes* 种組中 6021 号菌种。与以上相类似的情况也出现在 *fradiae*, *griseus* 及 *lavendulae* 等种組中。

放綫菌的顏色受培养基的酸度, 电位, 湿度以及营养成分的影响, 因此, 高斯 1 号加重铬酸钾后引起了某些种組中菌落顏色特征的变化是可以理解的, 由初步結果看来, 采用这种培养基可以在平板上直接将相同的菌株归并, 但是用来直接鉴定种組尚須进一步观察研究。

三、摘 要

1. 高斯 1 号培养基加 100 ppm 重铬酸钾能抑制細菌和霉菌。放綫菌在此培养基上生长繁茂, 菌落特征明显, 菌数与种类亦較淀粉培养基为多而且稳定。

2. 应用此培养基, 可以直接在培养皿中归并类似的菌种, 减少挑菌的工作量。

参 考 文 献

- [1] Ржеачек, З.: 1959. Выделение актиномицетов и определение количества их спорышей в почве. Микр., том 28, вып. 2, стр. 236—241.
- [2] 土壤微生物通訊, 1955 年第 5、6 期, 8 頁。
- [3] Г. Ф. 高泽: 1959. 拮抗性放綫菌分类問題。18 頁, 科学出版社。
- [4] Красильников, Н. А.: 1950. Актиномицеты-антагонисты и антибиотические вещества. Изд. АН СССР, Москва.
- [5] 中国科学院林业土壤研究所微生物室主編: 1960. 土壤微生物分析方法手册。17 頁, 科学出版社。

A MODIFIED MEDIUM FOR THE ISOLATION OF SOIL ACTINOMYCETES

YOU CHANG-FEN

(Institute of Soil Science, Academia Sinica)

(SUMMARY)

"Gauze No. 1" medium was used as a culture medium for the isolation of soil actinomycetes with the addition of 100 ppm $K_2Cr_2O_7$. The modified medium gives larger colony numbers and more kinds of species with distinguishable characteristics in comparison with the original method, but the growth of bacteria and fungi have been largely inhibited. Using this medium, the same species may be grouped into species group, and it is possible to identify the names of species group directly on the plate.