

# 根瘤菌实用研究手册



上海人民出版社

# 根瘤菌实用研究手册

[英] J. M. 芬森特 著

上海植物生理研究所固氮研究室译

上海人民出版社

*A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*

J. M. Vincent

Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh

1970

根瘤菌实用研究手册

[英] J. M. 芬森特 著

上海植物生理研究所固氮研究室译

上海人民出版社出版

(上海绍兴路5号)

新华书店上海发行所发行 上海群众印刷厂印刷

开本 850×1168 1/32 印张 5 字数 124,000

1974年1月第1版 1974年1月第1次印刷

印数 1—13,000

统一书号: 16171·111 定价: 0.40元

\*C0118039\*



## 内 容 提 要

本书介绍根瘤菌研究的一些技术问题, 包括根瘤菌的分离, 鉴定, 培养, 保存和结瘤, 固氮等方面的基本方法和有关资料。同时对根瘤菌的代谢特点, 免疫反应, 噬菌体和溶原性等也作了较详细的阐述。书后附有参考文献目录, 可供读者查检有关的资料和实用方法。

目前共生固氮的研究, 除豆科植物以外, 非豆科植物的根瘤也日益受到注意。书中的一些技术方法可能对于非豆科植物根瘤的研究也有参考意义。

本书可供农业生产、科研部门的工作人员, 以及大专院校生物系和农学系师生参考。

## 毛主席语录

对于外国文化，排外主义的方针是错误的，应当尽量吸收进步的外国文化，以为发展中国新文化的借镜；盲目搬用的方针也是错误的，应当以中国人民的实际需要为基础，批判地吸收外国文化。

洋为中用。

## 译者的话

农业生产的飞速发展，迫切需要大量氮素。开拓和利用固氮生物资源，是当前和今后农业生产实践中的一项重要任务。

根瘤细菌在我国的应用已有悠久历史，它在农业生产上的重要意义早已为人们所认识。无产阶级文化大革命以来，全国各地群众性的科学实验活动迅速发展，根瘤菌肥的生产应用和科学研究也在大力加强。为了适应发展的需要，遵照毛主席关于“洋为中用”的教导，我们翻译了这本《根瘤菌实用研究手册》，介绍国外在根瘤菌研究和应用上的一些常用技术，供有关单位和从事这方面工作的同志参考。

在翻译过程中，我们着重于实用方法的介绍，并作了一些删节，如略去原书中的附录 I “根瘤菌的收集”，而把以后的几个附录顺序提升；原书中有些图版已略去；书末的索引亦未转载，以节省篇幅。

本书译稿完成后，曾请复旦大学生物系的有关同志进行校阅，谨致谢意。

由于我们水平有限，实践经验不足，译文中还会存在错误之处，请读者予以批评指正。

上海植物生理研究所固氮研究室

1973 年 5 月

# 目 录

|                 |    |
|-----------------|----|
| I. 根瘤菌的培养、分离和保存 | 1  |
| 一、培养            | 1  |
| 材料的灭菌           | 1  |
| 污染的排除           | 2  |
| 常规复合性培养基        | 3  |
| 选择性和指示性培养基      | 4  |
| 特定培养基           | 4  |
| 二、分离            | 6  |
| 从根瘤中分离根瘤菌       | 6  |
| 从土壤中分离根瘤菌       | 8  |
| 分离物或提供的培养物的鉴定   | 8  |
| 三、保存            | 9  |
| 琼脂培养物           | 9  |
| 干燥处理的培养物        | 10 |
| 培养物的记载          | 12 |
| II. 根瘤菌的定性特性    | 14 |
| 一、概述            | 14 |
| 二、用光学显微镜鉴定      | 15 |
| 光源及其控制          | 15 |
| 相差显微镜           | 15 |
| 简单的水封片          | 16 |
| 水在油中的封片         | 16 |
| 单染色             | 16 |
| 革兰氏染色           | 17 |
| 特殊染色            | 18 |
| 嗜苏丹颗粒           | 18 |
| 异染色粒            | 19 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 鞭毛染色.....           | 19 |
| 类核体.....            | 19 |
| 根瘤中细菌的检定.....       | 19 |
| 根瘤结构.....           | 20 |
| 培养细胞的电子显微镜技术.....   | 22 |
| 根瘤的电子显微镜技术.....     | 23 |
| 根瘤细胞中脱氧核糖核酸的测定..... | 23 |
| 三、培养特征和代谢特征.....    | 24 |
| 在酵母汁-甘露醇琼脂上的生长..... | 24 |
| 在石蕊牛奶中的生长及反应.....   | 24 |
| 碳源的利用.....          | 24 |
| 维生素的刺激作用.....       | 25 |
| 四、抗原特性.....         | 25 |
| 抗血清的发生.....         | 26 |
| 血液的收集和抗血清的贮藏.....   | 28 |
| 抗血清吸附的原理.....       | 29 |
| 长凝集试验.....          | 29 |
| 短凝集试验.....          | 31 |
| 盘皿凝集法.....          | 32 |
| 用压碎的根瘤汁做凝集测定.....   | 33 |
| 用于凝集反应的吸附试验.....    | 33 |
| 凝胶免疫扩散法.....        | 33 |
| 做凝胶扩散的吸附抗血清.....    | 38 |
| 用荧光抗体反应鉴定.....      | 39 |
| 五、噬菌体和溶原性.....      | 39 |
| 噬菌体的证明.....         | 39 |
| 噬菌体的分开.....         | 40 |
| 根瘤菌噬菌体的分离.....      | 40 |
| 噬菌斑的形成.....         | 40 |
| 纯化.....             | 41 |
| 噬菌体和寄主的分类.....      | 41 |
| 吸附.....             | 42 |
| 溶原性.....            | 42 |



|                         |    |
|-------------------------|----|
| 培养基                     | 42 |
| 六、根瘤菌的鉴别                | 44 |
| 从根瘤中分离的培养物              | 44 |
| 提供的培养物                  | 44 |
| 来自一混合菌株的培养物             | 44 |
| III、计数                  | 48 |
| 一、概述                    | 48 |
| 二、总生长的测定                | 48 |
| 总细胞计数                   | 48 |
| 浊度测定                    | 52 |
| 三、活根瘤菌的计数               | 52 |
| 平板计数                    | 52 |
| 稀释液的制备                  | 53 |
| 常规的平板计数                 | 55 |
| Miles 和 Misra 液滴平板计数    | 55 |
| 间接“植物感染”计数              | 56 |
| 基于 Fisher 和 Yates 的密度测定 | 57 |
| “最可几数”(“最大或然性”的测定)      | 66 |
| 应用植物感染计数时的限制            | 69 |
| IV. 结瘤和固氮的鉴定            | 70 |
| 一、概述                    | 70 |
| 二、有效性的指标                | 71 |
| 三、温室和光照室方法              | 71 |
| 用幼苗琼脂或营养液培养的方法          | 71 |
| 在幼苗琼脂上的封闭式培养            | 72 |
| 在幼苗琼脂上的部分封闭培养           | 78 |
| 其他介质                    | 81 |
| 大型装置                    | 82 |
| 环境的控制                   | 90 |
| 研究植物-根瘤菌相互关系的特殊技术       | 92 |
| 精细的固氮研究方法               | 92 |
| 四、田间试验                  | 92 |
| 位置的选择                   | 93 |

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 实验操作·····                   | 94  |
| 播种前的准备·····                 | 94  |
| 肥料的施用·····                  | 95  |
| 接种·····                     | 95  |
| 测定·····                     | 96  |
| 敏感性·····                    | 96  |
| 菌株的鉴定·····                  | 97  |
| 用凝聚反应鉴定菌株·····              | 99  |
| 菌株的凝胶扩散法鉴定·····             | 100 |
| V. 对豆科植物接种需要的估计分析·····      | 101 |
| 一、田间观察·····                 | 101 |
| 不接种的豆科植物的结瘤·····            | 101 |
| 氮状况的表现征状·····               | 101 |
| 二、自然状况下的根瘤菌·····            | 102 |
| 初步估计·····                   | 102 |
| 详尽的研究·····                  | 103 |
| 从已长成或播种的豆科植物中直接分离·····      | 103 |
| 三、田间条件下对接种的反应·····          | 104 |
| 概述·····                     | 104 |
| 试验的变数·····                  | 104 |
| 关于处理的说明·····                | 104 |
| 设计与重复·····                  | 105 |
| 观察记录与收获·····                | 106 |
| 预防措施·····                   | 107 |
| 用土心作的试验·····                | 108 |
| VI. 豆科植物接种剂的生产、检查控制和应用····· | 109 |
| 一、培养的方式和生产·····             | 109 |
| 培养方式·····                   | 109 |
| 菌株的选择和保藏·····               | 110 |
| 多菌株的接种剂·····                | 110 |
| 琼脂培养物·····                  | 111 |
| 液体培养物·····                  | 112 |
| 泥炭(土壤-泥炭)载体培养物·····         | 112 |

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 培养物所需的标准·····               | 117 |
| 二、检查控制的方法·····              | 117 |
| 肉汤培养物的质量·····               | 118 |
| 成品的检查·····                  | 119 |
| 种子上根瘤菌的数目·····              | 120 |
| 三、种子接种的方法·····              | 121 |
| 培养物的种类·····                 | 121 |
| 应用接种剂的用量·····               | 121 |
| 球化种子·····                   | 122 |
| 附录                          |     |
| 附录一 氮素测定·····               | 127 |
| 附录二 改良的 Fåhræus 氏载玻片技术····· | 134 |
| 附录三 一种手工操作的无菌播种器·····       | 136 |
| 附录四 豆科植物参考材料的收集·····        | 140 |
| 参考文献 ·····                  | 143 |

# I. 根瘤菌的培养、分离和保存

## 一、培 养

根瘤菌是异养细菌，能够利用范围很广的碳水化合物。无机结合态氮( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ )通常对于它们的生长是足够的。但是，为了使它们生长良好，各种菌株尚需一种或几种氨基酸和维生素(或两者之一)。它们是好氧的，通常在  $25\sim 30^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}6\sim 7$  范围内能很好地生长。一般，甚至在综合培养基中也要加入大量的无机元素，但除镁、钙、钴以外，这种需要还没有弄清楚。

两方面的细菌学技术是本章及以后各章的基础：(i) 培养基和玻璃器皿的灭菌；(ii) 在传代培养以及其他操作过程中污染的排除。这些在本章只简单地涉及。

## 材 料 的 灭 菌

培养基和溶液中的微生物营养体，通过  $100^\circ\text{C}$  加热几分钟就能被杀死。但如果要杀死芽孢，则需要更加强烈的处理。因此，保证无菌的可靠方法是使用高压蒸汽灭菌锅。家用的压力锅对于小量培养基的灭菌是可以使用的，但在实际操作时必须加以某些安全措施。

下表所指为蒸汽压与温度之间的关系，但在放气时，应把容器中的全部空气预先排除。

这里不可能对所有类型灭菌锅的操作都作详细的说明，但在人工控制部分的操作方面，必须注意以下几点：

1. 在蒸汽产生或通入前要使灭菌锅盖确保十分安全。
2. 在关闭放气阀以前，要让蒸汽自由地放出，并且持续几分钟，以便排除全部空气。

表 1

| 标准压力<br>(磅/平方吋) | 温度*<br>(°C) |
|-----------------|-------------|
| 10              | 115         |
| 15              | 121         |
| 20              | 126         |

3. 按所要的时间加压后,关闭热源或蒸汽,让灭菌锅冷却,以便使压力下降到零。

4. 然后,才慢慢地打开阀门并移开锅盖。

干燥的玻璃器皿的灭菌是在烘箱里进行的。应按照烘箱内玻璃器皿数量的不同,在 160~170°C 范围内灭菌 1~2 小时。突然加热或冷却都会引起器皿破损。

#### 灭菌的控制

对于高压灭菌来说,当使用相当高的温度处理时,一些粘胶狭带就显示出暗色。另外,还有一些装有液体的安瓿瓶随着受热情况而改变它的颜色。安瓿瓶有不同的类型,可适用于热空气灭菌或高压蒸汽灭菌。

### 污染的排除

操作者在工作时所遵循的原则是,除了灭菌过的容器以外,所有的东西都是带菌的,而他的任务就是防止它们的进入。

1. 全部容器在灭菌前都要用棉花塞、金属盖或玻璃盖盖好,以防物质颗粒随时进入。

2. 当打开容器时,操作要迅速,以减少暴露的时间,尽可能防止空气中尘埃的进入。还要小心避免与未灭菌的器具接触。

3. 接种是使用一种耐热的金属环或针进行的,把接种环烧红,并在使用前立即冷却。另外,为了特殊的目的,接种还可以使用无菌的吸管或者其他无菌器具。

\* 在海平面上。在比较高的海拔时,就需要增加标准压力,以达到特定的温度。在海拔 10,000 呎处,20 磅/吋<sup>2</sup>差不多等于海平面上 15 磅/吋<sup>2</sup>。

## 常规复合性培养基

在通常作为培养多种细菌的蛋白胨培养基上，根瘤菌不能很好地生长，但它在各种植物来源的综合抽提液上却能很好地生长。酵母一般是最合适的来源，新鲜制备的提取液或某些商品都是这样。甘露醇是常用的碳源，但它可以由几种糖中的一种来代替，如葡萄糖或蔗糖。某些细菌能在其他碳水化合物上生长良好，例如半乳糖或阿拉伯糖对于很多慢生型根瘤菌的生长是适合的。

最普遍使用的液体培养基的组成如下：

### 酵母-甘露醇培养液

|                      |        |
|----------------------|--------|
| $K_2HPO_4$           | 0.5 克  |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2 克  |
| NaCl                 | 0.1 克  |
| 甘露醇 <sup>(1)</sup>   | 10 克   |
| 酵母汁 <sup>(2)</sup>   | 100 毫升 |
| 蒸馏水                  | 900 毫升 |

在温度  $120^\circ C$  下灭菌 15 分钟<sup>(3)</sup>，如果是固体培养基(酵母汁、甘露醇、琼脂)，则每升加 15 克琼脂。

当要求有过量的中和剂时，每升可加入 3 克  $CaCO_3$ <sup>(4)</sup>。

注意：

(1) 甘露醇可以用便宜或较好的含碳化合物来代替。

(2a) 新鲜酵母提取液的制备：取 100 克常用的面包压缩酵母与 1 升冷水混合，在室温下保持 1~2 小时，灭菌 40~60 分钟，使之沉淀或进行离心，取上清液(调 pH 至 6.8)，即作酵母汁使用。

(2b) 各种商品类型的酵母膏或酵母粉对常规培养基来说都是适用的，而且是较方便的代用品，常规培养基每升加 0.4 克就行。然而研究者应该通过把这些材料和新鲜酵母汁在计数菌落的数量、生长速度和形态，以及复壮等方面进行比较，以满足他自己所需的用途。

(3) 要避免反复加热。基于这一理由，希望一次融化所用的

量来制备琼脂培养基，最好利用培养基灭菌过程本身来提供已融化了的培养基。

(4) 为了保存菌种，可以在琼脂斜面培养基中加入过量的钙(在分装时，需使其在培养基中分布均匀)，但要注意酸度的中和。这种综合培养基的其他组成成份提供的钙对于根瘤菌的有限需要是足够的。为了保证透明度，在液体培养基中就要略去钙。而在平板计数时，可在琼脂培养基中略去钙。少量可溶性钙盐的加入( $0.001\sim0.016\% \text{Ca}^{++}$ )可以延迟或抑制苜蓿根瘤菌在平板计数时菌落的发展(Vincent, 未发表)。

### 选择性和指示性培养基

加入 0.002% 的放线酮可以抑制真菌的大量繁殖(Brookwell, 私人通讯)。当从较老的根瘤中分离根瘤菌时，多半会出现这种情况。应该指出，这种物质是很毒的，使用时应十分小心地操作。

刚果红(在临装管或使用前，于无菌条件下，每升融化了的培养基中加入 10 毫升分开消毒的 0.25% 刚果红水溶液)常常能够帮助从另一类型细菌中鉴定出根瘤菌。一般说来，根瘤菌吸收染料是很微弱的，而很多其他类型的细菌吸收染料却很强烈。根瘤菌的任何特殊菌株的特征都可用经过鉴定的纯培养来确定，而且另外的菌落特征则应用来加强不同菌种间的区别，这样的区别用表面培养比深层培养更容易做到。

溴麝香草酚蓝(0.5% 酒精溶液 5 毫升加在 1 升肉汤或琼脂培养基中)用来指示 pH 7 以下的还原反应。

### 特定培养基

在这种培养基中，酵母汁由无机结合态氮和一种或几种氨基酸所代替，而且一般常加一种或多种维生素。这种培养基能够用来较为专一地确定有机体对营养的需要、代谢的特点以及培养的产物。

### 结合态氮的性质

许多根瘤菌菌株可以利用硝酸盐为其唯一的氮源。 $\text{NH}_4^+$  是可利用的, 但它从培养基中被选择性地用去后, 即使提供的是  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 也会使 pH 降低到抑制水平。一种或多种氨基酸(例如谷氨酸、组氨酸、丝氨酸)是必需的或有促进作用的(见Bergersen, 1961)。其他的氨基酸, 例如甘氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸则应避免使用(Holding、Tilo 和 Allen, 1960)。

### 碳素需要的鉴定

在有硝酸盐作为氮源的鉴定培养基上, 细菌的生长量将提供有机体对碳需要的直接证据。然而, 比较复杂的培养基能够用于比较各种碳源和对对照对生长的影响。酸产量是碳的利用的一种间接而不稳定的指标, 而且在综合培养基中也许很不可靠。如果存在着对阳离子或阴离子的不同吸收的话, 甚至在简单的培养基中也会被混淆的。

### 其他营养的需要

只有使用特定培养基才能确定对维生素和无机成份的需要。完全除去混入的维生素比完全除去混入的微量无机盐类更容易做到, 而这些微量无机盐类对满足细菌的总的需要来说是充分的。生物素、硫胺素、泛酸通常是需要的(Graham, 1963)。

### 特定培养基举例

适当特定的和相当简单的培养基适于说明细菌对钙这类少量元素的需要, 它们是以硝酸盐或单一氨基酸培养基为基础的[Vincent (1962), Bergersen (1961)——均为改进 Norris (1958)的工作]。所需的微量元素, 看来在杂质中的存在量就已足够了, 这类杂质除非采用特殊的措施方能将其除去。这可用钴的情况来说明(Kliewar 等, 1964)。氮源的类型及供应的维生素似乎应根据不同的根瘤菌需要进行调整, 以便提供适合的条件。

一种特定培养基的基础成份组成如下:

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ | 1.0 克 |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 1.0 克 |



|                                            |                  |           |
|--------------------------------------------|------------------|-----------|
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | } <sup>(1)</sup> | 0.01 克    |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ |                  | 0.25 克    |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ |                  | 0.1 克     |
| 氮源 <sup>(2)</sup>                          |                  | 0.08 克(氮) |
| 糖(或其他碳源)                                   |                  | 10 克      |
| 维生素 <sup>(3)</sup>                         |                  | 1~100 微克  |
| 微量元素 <sup>(4)</sup>                        |                  | 2~50 微克   |
| 水                                          |                  | 加至 1 升    |

按照细菌和实验的要求调节 pH (通常为 6~7)。

注意:

(1) 为了避免沉淀,这三种盐与磷酸盐分开灭菌。

(2) 可采用  $\text{KNO}_3$  (0.6 克)或氨基酸,如谷氨酸钠(1.1 克),或其混合物。

(3) 一般最需要的是生物素、泛酸和硫胺素。维生素的种类及其需要量按根瘤菌的不同而加以调节。

(4) 绝大多数的培养基由于杂质的存在而有充足的微量元素。高度纯化的培养基需要钴(2 微克)或其他微量元素(诸如 Zn、Mn、Cu、Mo、B,加到 50 微克)。

## 二、分 离

### 从根瘤中分离根瘤菌

由于根瘤的来源、年龄和新鲜程度的不同,在根瘤的表面或内部会有根瘤菌以外的其他微生物的存在,所以要用未损伤的根瘤,洗净并进行表面灭菌,以除去根瘤外面的微生物。但是,这样也偶然会把根瘤内部的根瘤菌同时消灭。无论何时尽可能都要采用健康的根瘤,它们是刚从根上取下的或者是立即放在低温下贮存的根瘤。如果必须采用老的或干燥的根瘤时,要特别小心地从许多污染菌中回收根瘤菌。真菌的污染能够通过培养基中加入放线酮而选择性地被抑制(见第 4 页)。