

5406 抗生素肥料作用机制的研究

IV. 抗生素在土壤中和作物根围活动情况的研究

尹莘耘 張均康 荀培琪

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京)

在菌剂保存工作中发现与 5406 抗生素同一种组 (*Streptomyces fradiae*) 的 G₄ 号放线菌, 在饼土肥料中于室温下保存八年, 尚不失去活力。又在多年的、不同地区、不同作物, 以 5406 菌肥拌种或沟施的试验中, 反映出明显的防病和刺激增产效果^[1-5]。特别在早期播种烂种缺苗严重的情况下, 或在有机质丰富的或有效磷缺乏的地区, 效果尤为明显。有时只经少量拌种, 其作用一直持续到作物生长的后期。因此, 5406 放线菌能否在土壤中生长, 能否在作物根系周围繁殖, 并与根系建立一种特殊的共生关系等, 这一系列与农业增产和农业科学基本理论有重要关联的问题, 不得不引起我们的注意。为此, 围绕上述问题进行了以下的研究。

材 料 和 方 法

以 5406 抗生素在 1:10 饼土中, 经固体发酵, 复经细筛筛过, 得到混有细土粒的孢子粉, 其中每克约有活的孢子二十万亿左右。以相当于小麦(或黄豆)种子重量 4% 的孢子粉, 与种子混拌均匀后, 播于田间。然后, 于不同生长季节, 在拌菌粉、拌饼土和不拌种的不同处理中平均取样, 以稀释平板法^[6], 在高氏一号培养基上进行分离与计数。

分析小麦与黄豆之根土、根际与根系 5406 抗生素的存活和分布情况:

根土微生物的分离 将根小心挖出后, 在土穴中, 取靠近根部的土壤 10 克, 置于盛有 90 毫升无菌水及少量石英砂的 300 毫升锥形瓶中, 振荡 20 分钟, 稀释至 10^{-4} 及 10^{-5} 两个稀释度, 进行平板分离。

根际微生物的分离 将小心挖取之根(根上带有土粒不抖掉)称取 10 克置于如上述之锥形瓶中, 振荡 20 分钟, 然后稀释分离。

根系微生物的分离 取出上述根际微生物分析用锥形瓶中的根, 以滤纸将水吸干, 称重后取一克于 300 毫升的锥形瓶中, 用灭菌水洗滌 5 次, 在无菌条件下研磨, 进行稀释分离。

5406 抗生素的鉴别, 根据其菌落形态, 即菌落最初生长为表面稍湿润的黄色小点, 复长出白色的气生菌丝, 菌落逐渐变干硬呈白粉团型。待生孢子时, 菌落正面稍具粉红色, 菌落背面初呈黄色, 后变黄褐色, 色素并不扩散到培养基中。从这些菌落的特征, 容易与其它红色或白色的不同类型之放线菌区分。

在显微镜下观察 5406 号抗生素菌丝呈放射状, 产生孢子时呈螺旋卷曲, 一般为 3—4 个螺旋, 很少到 5 个, 孢子为椭圆形。为了进一步证明它的可靠性, 在盛有马铃薯洋菜培养基的培养皿中, 于其一侧划线接种所分离的抗生素, 于另一侧划线接种棉花立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*), 洋麻炭疽病菌 (*Colletotrichum hibisci*), 黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*), 进行抗拮性测定, 并与原有 5406 菌种作对比。

根分泌物的获得是将田间样品取回后,用自来水将根系之土壤冲洗干净,然后浸于2倍植株重量的蒸馏水中,浸提2—4小时,取出浸提液在水浴上浓缩后,以光电比色计,蒽酮比色法及纸谱分析法测定根分泌物中的可溶性全糖的含量和氨基酸的种类^[7]。

取上述不同处理的样品,以马铃薯蔗糖培养基,平板分离根土、根际和根系微生物的数量和组成。每一处理,每一稀释度,每次分析皆作3个重复,然后取其平均值。

試 驗 結 果

以5406拌种的試驗地,两年来对5406抗生素在小麦和黄豆的根土、根际和根系的活动,进行了8次分析。結果指出,虽然是以少量的5406放线菌,拌种施入土中,仍能在根土、根际和根系生长和繁殖,并能持續到整个小麦的生长期8个月以上。菌含量以根系中为最多,其菌落数每克根中可达 1.2×10^6 个,根际次之,根土中最少。这里不难看出,5406抗生素的生长与根系活动間有着比較密切的关系。

于1962年的小麦田间試驗中,我們进行了5406抗生素的分析,表明5406抗生素能随小麦根系的延伸而扩展。并且在拌空白培养基和不拌种对照的分离中,从沒有发现有5406抗生素存在(见图1和表1)。

表1 5406 抗生素拌种后在小麦根土、根际和根系活动情况的分析 (1962年)

分 离 时 期		分离部位	每克土壤或根组织内的 5406 菌落数		
次 数	日/月		5406 菌肥(4%)拌种	空白培养基(4%)拌种	不拌种对照
I	1/IV	根 际	16,910	0	0
II	17/V	根 际	13,150	0	0
III	4/VI	根 土	2,150	0	0
III	4/VI	根 际	14,300	0	0
III	4/VI	根 系	345,000	0	0

为了验证所分离的5406型菌株的可靠性,曾以5406的原菌种作为对照,在平皿内测定各个新菌株对試驗菌种(棉花立枯病菌等)的拮抗性。結果証明,新从不同处理的試驗材料中分离出来的5406型菌株与拌种施入的5406原菌种无异(表2)。

表2 从小麦根系分离的5406菌株与其原菌种在平皿内对檢驗菌种所反应的拮抗性

檢 验 菌 种	拌种的 5406 原菌种			新从麦根分离的 5406 菌株		
	测定株数	抑菌范围 (半径毫米)	平均抑菌半径(毫米)	测定株数	抑菌范围 (半径毫米)	平均抑菌半径(毫米)
棉花立枯病菌 (<i>Rhizoctonia solani</i>)	2	4.0—9.0	6.5	23	3.0—9.0	5.5
洋麻炭疽病菌 (<i>Colletotrichum hibisci</i>)	2	8.0—10.0	9.6	14	7.9—14.1	11.3
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	2	18.0—18.2	18.1	6	17.5—19.0	17.8
枯草杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	4	14.4—20.0	18.5	18	15.0—21.1	19.2

同年在黄豆試驗地中,也进行了上述分析,結果証明5406抗生素能随黄豆的根土和根系生长和发展(表3)。

1963年复进行了小麦田间試驗的分析工作,所得結果与1962年一致,更加验证了5406抗生素的增殖与根羣的扩展相互之間的密切关系。同时,也証明了抗生素于拌种

表 3 5406 抗生素拌种后在黄豆根土和根系生长和发展情况的分析

分离时期		分离部位	每克根表土壤或根系组织内 5406 菌落数		
次数	日/月		5406(4%)拌种	空白培养基(4%)拌种	不拌种
I	30/VII	根 土	10,540	0	0
		根 系	82,700	0	0
II	7/IX	根 土	700	0	0
		根 系	2,450	0	0

表 4 5406 抗生素拌种后在小麦根土、根际、根系活动情况的分析 (1962—1963 年)

分离时期		分离部位	每克土壤或根组织内所含 5406 的菌落数		
次数	日/月		5406 (4%) 菌肥拌种	空白培养基 (4%)拌种	不 拌 种
I (分蘖)	25/XI (1962 年)	根 土	5,100	0	0
		根 际	65,200	0	0
		根 系	2,031,200	0	0
II (返青)	10/IV (1963 年)	根 土	24,322	0	0
		根 际	547,860	0	0
		根 系	3,692,022	0	0
III (花穗)	15/V (1963 年)	根 土	12,655	0	0
		根 际	19,980	0	0
		根 系	257,300	0	0
IV (成熟)	13/VI (1963 年)	根 土	9,965	0	0
		根 际	18,749	0	0
		根 系	16,444	0	0

后,菌落数量是有所增加而非立即减少(表 4)。

在上述小麦不同的生长期,不同的处理中,进行了根分泌物中可溶性全糖的测定,结果表明:小麦在不同生长期中,根分泌物中糖含量是不同的,拔节生长期中,根分泌物的糖含量最高,返青期和抽穗期较低,乳熟期为最少。5406 菌肥拌种处理的小麦,无论在返青、拔节、抽穗、乳熟任何一个生长期中,小麦根分泌物中可溶性全糖的含量,均比不拌种的对照组高,特别是灌浆生长期,每毫升根分泌物浸提液中,可溶性糖含量可高出对照 82.9%(表 5)。

表 5 5406 抗生素对小麦根分泌物的影响

分离时期		小麦根分泌物浸提液中可溶性糖含量($\mu\text{g/cc}$)		较 对 照 ($\pm\%$)
发育期	日/月	5406 菌肥拌种	对照(空白培养基)	
返 青 期	10/IV	8.70	6.30	+38.1
拔 节 期	29/IV	34.20	19.14	+78.6
花 穗 期	15/V	30.90	17.40	+73.4
灌 浆 期	24/V	25.80	14.10	+82.9
成 熟 期	13/VI	3.45	2.55	+35.3

根据表 4 可以看出,每次分离都是离根愈近,抗生素的分布愈多,而在小麦生育开始后旺盛期间尤多,成熟期则少。与表 5 中所述分泌物颇为一致,似乎菌的多少与根的分泌物之间存在着一定的相关性。

在不同的生长阶段,小麦的不同处理中,根分泌物中氨基酸的种类,5406 抗生素处理与对照间无甚差异,是否量上有所不同,此工作尚待进行(表 6)。

表 6 5406 抗生素对小麦根分泌物中氨基酸种类的影响

氨基酸种类	小麦生育期 (田间取样)											
	返青期			拔节期			花穗期			成熟期		
	(1963 年 4 月 10 日)			(1963 年 4 月 20 日)			(1963 年 5 月 15 日)			(1963 年 6 月 13 日)		
	拌5406	拌饼土	不拌	拌5406	拌饼土	不拌	拌5406	拌饼土	不拌	拌5406	拌饼土	不拌
氨基乙酸				+	+	+						
丙氨酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
苯丙氨酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
甘氨酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
谷氨酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
天门冬氨酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
酪氨酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
色氨酸				+	+	+	+	+	+	+	+	+
亮氨酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
缬氨酸										+	+	+
精氨酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
组氨酸				+	+	+	+	+	+			
赖氨酸												
脯氨酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注:表中“+”为层检纸上发现氨基酸斑块,无“+”者,未发现氨基酸斑块,也可能是浓度低的缘故。

从表 6 中可以看出,根分泌物中氨基酸的种类以拔节期为最多,花穗期次之,成熟期最少,与表 5 所述之可溶性全糖的含量的多少是一致的。亦可说明小麦生长期的不同,菌数的多少,与根的分泌物是有一定的相关性的。

关于 5406 菌肥和饼土(对照)拌种后,小麦根际微生物变化情况的分析,1963 年曾从不同处理的小麦试验区内分期取样,并以多种培养基用平板稀释法分析根际土壤中的细菌、真菌、放线菌的数量,获得表 7 的结果。

表 7 指出,拌种 5406 菌肥后,对于根际微生物的总数并无显著的增减,但 5406 抗生素确已成为群体中新的一员(表 1, 3 的结果也是这样)。自 1962 年 10 月 6 日拌种后,始终分布在麦根的周围,到 1963 年 6 月 4 日仍不消失。拌种饼土的小麦,虽然豆饼量只占种子量的 0.4%,但对根际微生物的影响殊大,不仅总数有所减少,而且出现的根霉(*Rhizopus* sp.) 特多,在四、五、六 3 个月不同时期分离中,它始终占据绝对多数(见图 2)。这说明种子拌菌或拌肥,都能影响根际微生物的组成成分,而且一直延长到作物生长的后期。

选取小麦根际常见的真菌、放线菌、细菌共 28 种,分别培养,接入盛有无菌已发芽麦粒的试管斜面培养基上,观察麦苗生育及烂种情况。初步结果表明,在 14 种真菌中,有 8

种对麦苗表现抑制生长或引起烂根; 11 种放线菌中, 仅有 1 种表现不良作用; 3 种细菌中, 亦有一种能阻止麦根伸展。表明根际微生物对作物的影响, 不完全决定于其数量, 而与其种类有更大的关系, 详见表 8。

表 7 5406 抗生素拌种后, 小麦根际微生物变化情况分析

所分离的微生物类群		分离次数	分离日期 (日/月)	每克土壤中出现微生物的菌落数(个)		
				5406 菌肥(4%)拌种	同上量, 饼土拌种	不拌种
细菌	固氮菌	I	1/IV	1,520	2,470	4,040
		II	17/V	1,470	522	830
		III	4/VI	1,735	858	688
	无机 N 型	I	1/IV	2,718,000	2,091,500	2,457,500
	有机 N 型	I	1/IV	1,790,000	1,710,000	2,083,000
真菌	混合总数	I	1/IV	3,621	2,689	3,093
		II	17/V	4,903	4,243	4,710
		III	4/VI	9,810	4,275	6,815
放线菌	混合总数	I	1/IV	88,910	59,250	93,150
		II	17/V	174,150	138,650	177,300
		III	4/VI	145,150	115,750	128,000
	5406 抗生素	I	1/IV	16,910	0	0
		II	17/V	13,950	0	0
		III	4/VI	14,150	0	0

表 8 小麦根际优势微生物对麦苗生育的影响

接种菌类	测定总数	根际微生物对麦苗生育的影响		
		抑制者	无关者	刺激者
真菌	14	8	5	1
放线菌	11	1	7	3
细菌	3	1	2	0

在不同根际真菌的接种试验中, 发现根霉 (*Rhizopus* sp.)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、多枝粘霉 (*Gliocladium* sp.) 及数种镰刀菌 (*Fusarium* spp.), 当菌量大而条件适宜时, 都能促使小麦烂种、烂根或枯萎; 而 5406 抗生素虽大量存在, 并不使麦根腐烂, 且促进麦苗生长 (图 3)。

另在黄豆和棉花的盆栽或田间试验中, 施用饼肥后, 也有严重的烂种发生, 而以同样同量的饼肥制成 5406 菌肥后, 大大地增加出苗率。分析促成烂种的原因, 有两种青霉 (*Penicillium* spp.) 为其主要因子。通过大试管接种证明: 它们能在 3—8 日内使黄豆和棉花烂种或烂根, 其它如黑曲霉、根霉、多枝粘霉和镰刀菌等, 也有类似的作用。

5406 抗生素对上述这些害菌, 经平皿测定都有拮抗作用, 同时在稀释分离时, 发现拌了抗生素的黄豆根际土壤中, 害菌的数量远较拌同量饼土者为少。特别是青霉和曲霉等, 相差达 3—8 倍之多, 详见表 9。

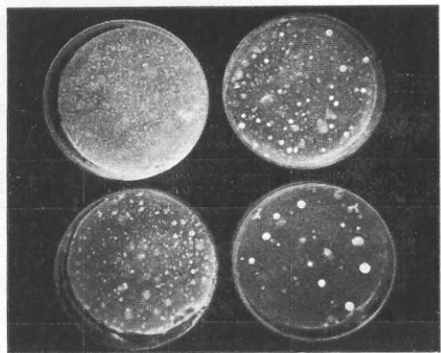


图 1 小麦根系的 5406 抗菌菌。

右: 小麦拌种 5406 菌肥, 播种 8 个月后, 从根系分离的 5406 型菌落(圆形鲜明的小白点)。
左: 同期分离对照区内的小麦根系, 其中均无 5406 型菌落。
上排稀释为 10^{-4} , 下排各为 10^{-5} 。

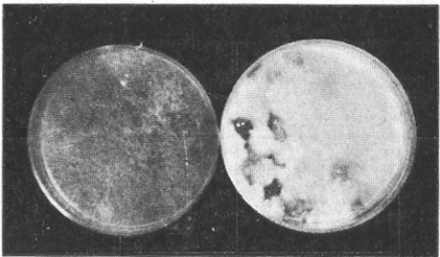


图 2 小麦拌种后根际微生物的变化。

右: 5406 菌肥拌种 8 个月后, 根霉很少, 且还出现 5406 型原菌株。
左: 饼土拌种 8 个月后, 小麦根际的根霉仍占绝对优势, 全皿变成灰黑色。

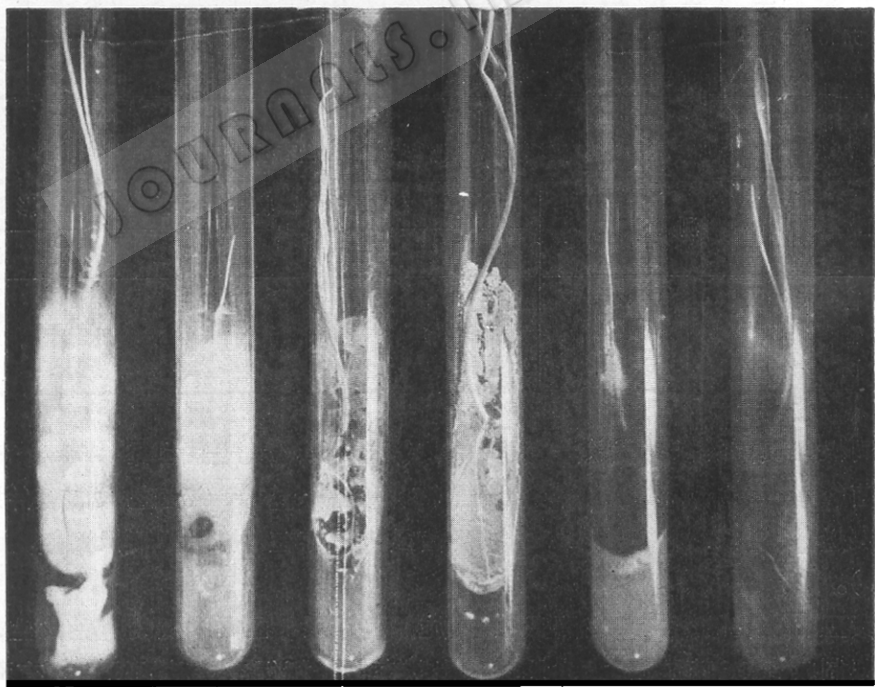


图 3 小麦根际真菌及其为害情况。

左起第 4 管为 5406 抗菌菌, 接种后并不烂根, 且还促使麦苗生长。其余各菌都有烂根或抑制生长的毒害作用。

表 9 5406 菌肥、餅土拌种后黄豆根际微生物的变化

分离微生物的种类	每克土壤中出现微生物的菌落数	
	餅土空白培养基拌种	5406 菌肥拌种
根霉菌(1号)	4,750	2,200
镰刀菌(8号)	4,400	3,720
黑曲霉菌(13号)	1,800	200
青霉菌(19号)	4,600	780
青霉菌(20号)	4,850	1,450
多枝粘霉菌(29号)	2,650	1,170

以上这些試驗表明,以鮮餅作为种肥,在北部地区对麦、豆类的种苗都有一定的危险性,而通过 5406 抗生素的接种,就可使餅肥使用安全,发挥多性能的作用^[1,2,5]。

討 論

5406 号抗生素在适宜的条件下,以少量菌肥拌种或大量沟施,可以改变土壤中根际微生物的数量和組成。并能随根系的延伸而扩展。特别是在早播的情况下,它能抑制一些有害真菌如青霉、曲霉、镰刀菌等,从而减少烂种和烂根的危险。如仅施用餅土则常能促进这些害菌的生长。硫酸铵作为种肥施用不当,也能引起烧根;而 5406 菌肥可以促进根系发育,減輕倒伏。通过本文的研究結果和以往已报导的試驗,都表明施用 5406 菌肥在生产实践上有着广阔的前景^[1-5]。

进一步研究微生物之間相互作用,以及 5406 抗生素的分泌物对作物根系分泌物的影响,与作物根系分泌物对 5406 抗生素的影响,对闡明 5406 抗生素的防病和增产机制是十分必要的。

摘 要

5406 抗生素在小麦、黄豆根土、根际、根系活动情况的分析結果指出,5406 抗生素的生长与根系的活動有着密切的关系。5406 抗生素肥料在播种时,随同小麦少量施入土壤中,能存活繁殖 8 个月以上,并能随着小麦根系的延伸而扩展。5406 抗生素拌种后,作物根围微生物的区系也有了变化,抗生素的引入不仅可以改变微生物的数量,同时还可以改变微生物区系的組成。

参 考 文 献

- [1] 尹莘耘、杨开宇、陈驊、诸德辉、罗静玉、陈应南等: 北京农业大学学报, 3 (1): 55—65, 1957。
- [2] 尹莘耘: 抗生素肥料的应用和制造法, 120 页, 高教出版社, 1958。
- [3] 尹莘耘、刘因秋、苟培琪、曾广然、曹功懋: 抗菌素研究-IV, 57—62 页, 上海科学技术出版社, 1961。
- [4] 尹莘耘、苟培琪、邱桂英、林声远、张均康: 微生物学报, 11(2): 259—269, 1965。
- [5] 尹莘耘: 抗生素肥料及其应用, 160 页, 农业出版社, 1965。
- [6] 中国科学院林业土壤研究所微生物研究室主编: 土壤微生物分析方法手册, 87 页, 科学出版社, 1960。
- [7] 别洛杰尔斯基, A. H. 等: 植物生物化学实验指导, 403 页, 高等教育出版社, 1956。
- [8] Вавуло, Ф. П.: Тр. Ин-та почвовед Б.С.С.Р. вып 1: 206—240, 1961。
- [9] Красильников, Н. А.: Микроорганизмы почвы и высшие растения, Издательство, 1958。
- [10] Красильников, Н. А.: Вестник Московского ун-та, Биология, почвоведение, 1962 (3): 3—25, 1962。

STUDIES ON THE MECHANISMS OF ANTAGONISTIC FERTILIZER "5406"

IV. THE DISTRIBUTION OF THE ANTAGONIST IN SOIL AND ITS INFLUENCE ON THE RHIZOSPHERE

YIN S. Y., CHANG J. K. AND XUN P. C.

(Institute of Soils and Fertilizers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Peking)

The effects of the antagonist "5406" on the rhizosphere of wheat and soybean were studied both in the field and in the laboratory. It was observed that the growth of antagonist 5406 was closely related to the activities of the root system. The antagonist when applied to the soil together with the wheat at the time of sowing, could survive and multiply in soil more than eight months, and spread with the growth of the root system. The constitution of the microflora, the number of species, and the amount of growth of various microorganisms in the rhizosphere were also found to be different from those of the control when 5406 was applied before seeding time.