

氧化松针煮汁培养基——一种选择性真菌培养基

武 覲 文

(云南林学院, 昆明)

用松树针叶煮汁加入高锰酸钾做成的培养基, 其氧化还原电位比马铃薯培养基为高, 能强烈地抑制细菌的生长, 但不抑制真菌的生长。这种选择性培养基可用于土壤真菌、植物病原真菌、昆虫寄生真菌的分离、计数和培养, 而且适用于农村科学实验工作。

用松树针叶煮汁做成的培养基具有抑制细菌而不抑制真菌生长的现象。经过试验, 初步制成了一种能强烈抑制细菌和放线菌生长, 而不抑制真菌生长的选择性培养基。这种培养基可用于土壤真菌的分离、计数, 也可用于植物病原真菌和昆虫寄生真菌的分离和培养。培养基的成分比一般选择性真菌培养基取材容易, 制备简便, 适用于农村对真菌的分离和培养。

松针培养基的制备

一、松针培养基的配方

氧化松针叶煮汁 800 毫升, 葡萄糖 10 克, 蛋白胨 5 克, K_2HPO_4 1 克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 克, 琼脂 18 克, 水 200 毫升。

二、氧化松针煮汁的制备

摘取新鲜松针叶 (油松针叶最好) 去掉叶鞘, 称量 200 克, 用水冲洗清洁后, 剪成长 1 厘米的小段, 放入铝锅或大烧杯中加水 800 毫升, 煮沸 1 小时, 不断补足蒸发掉的水分。煮好后用双层纱布过滤, 待滤液中悬浮物沉淀后, 将沉淀弃去, 加入含 0.1 克高锰酸钾的水溶液 20 毫升, 混匀。

三、其它营养液

称取葡萄糖 10 克, 蛋白胨 5 克, K_2HPO_4 1 克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 克, 放入 200 毫升水中加热溶化, 与氧化松针煮汁混匀, 放入琼脂 18 克, 加热溶化。

四、pH

未调 pH 的松针培养基, 其 pH 为 6.2 左右,

用 NaOH 溶液和 HCl 调 pH 至 7, 然后用纱布过滤, 分装三角瓶或试管中。

五、灭菌

在没有高压灭菌设备时, 培养基可放在铝锅中煮 40 分钟, 同样可以达到良好的灭菌效果。但煮时要将塞好棉塞的三角瓶或试管包以防水纸, 防止棉塞润湿。

抑制细菌试验

一、培养基放置时间和培养效果

放置较久的松针培养基可发生颜色变化, 由灰色变成紫红色。试验证明, 放置 19 天的培养基对细菌的抑制能力大大提高。接种土壤稀释液, 进行平皿计数, 结果如表 1。由表 1 可见, 随着放置时间的延长, 培养基的颜色发生变化, 抑制细菌的能力也随着增强。考虑到颜色的变化可能是松针煮汁中含有的单宁与酚类物质在空气中氧化成醌类物质的结果。因此, 在了解抑制细菌的物质时, 应当研究单宁和酚类物质的作用。

二、单宁和酚类物质的初步验证

蛋白质遇到单宁和酚类物质发生化学反应, 生成白色沉淀。将明胶加入松针煮汁中, 也发生白色沉淀。用足量的明胶处理松针煮汁制成培养基, 接种土壤稀释液, 进

本文 1974 年 7 月 3 日收到。

表 1 不同放置时间的培养基上真菌和细菌的数量

放置时间和培养基颜色	3 天, 灰白色			12 天, 黄色			19 天, 红紫色		
土壤稀释倍数	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
每个平皿中的细菌数	110	4	0	44	3	0	0	0	0
	102	5	0	46	5	0	0	0	0
	60	6	0	52	4	0	0	0	0
	107	10	0	48	5	0	0	0	0
平 均	95	6	0	48	4	0	0	0	0
每个平皿中的真菌数	—	24	11	—	27	9	—	21	4
	—	20	10	—	33	7	—	23	4
	—	25	6	—	28	7	—	26	9
	—	19	11	—	32	3	—	20	5
平 均	—	22	9.5	—	30	6.5	—	22.5	5.5

行平皿培养,结果生长了很多细菌,使抑菌力受到影响。

FeCl_3 能与酚类物质的羟基作用,可产生颜色反应。将 FeCl_3 加入到松针煮汁中便产生了蓝色反应。把与 FeCl_3 作用后的松针煮汁制成培养基,接种土壤稀释液也同样生长了很多细菌。

三、加入氧化剂、还原剂的影响

上述试验说明,松叶煮汁培养基的抑菌物质有可能是单宁和酚类物质。这两种物质都不稳定,随着培养基放置时间的增加,酚类物质可被空气中的氧化生成醌类物质,颜色便发生变化。对细菌抑制能力也是随着酚醌的转化而提高的。为了缩短松针培养基的放置时间,在配制后很快就具有高度的抑制细菌的能力,我们作了在松针煮汁培养基中加入氧化剂高锰酸钾的试验。将培养皿中加入 10^{-3} 稀释度的土壤稀释液 1 毫升,再加含不同量高锰酸钾的松针培养基,进行平皿培养并计数,结果如表 2。

从表 2 可以看出,当真菌数量最高时正是细菌数量最低时,以 1,000 毫升培养基中加入高锰酸钾约 0.1 克的效果最好。

将含有还原剂硫代硫酸钠的琼脂小

表 2 不同高锰酸钾含量对真菌、细菌数量的影响

1,000 毫升培养基 高锰酸钾的含量	0	0.125 克	0.25 克	0.5 克	1 克	2 克
每个平皿中的 细菌菌落数	2	0	0	3	多数	极多
	1	0	0	3	多数	极多
	2	0	0	4	多数	极多
	3	0	0	2	多数	极多
平 均	2	0	0	3	多数	极多
每个平皿中的真 菌菌落数	36	57	29	54	40	38
	40	49	51	36	31	28
	66	46	39	37	35	33
	49	55	54	43	30	29
平 均	48	52	43	42	34	32

块,置于松针培养基平皿的中央,接种从该培养基上分离得到的几种土壤真菌和细菌。经过培养,观察到与加入高锰酸钾的结果相反,在靠近还原剂硫代硫酸钠琼脂小块处细菌生长良好,而真菌被抑制;在远离琼脂小块的外围仍然生长真菌,而细菌则被抑制。

四、氧化还原电位的测定

用电位计测定松针培养基氧化还原电位,比马铃薯培养基约高 110 毫伏左右。加入 FeCl_3 和明胶的松针培养基,对细菌的抑制力下降,培养基的氧化还原电位也相应降低。根据电位的测定和培养细菌观察,

说明培养基对细菌的抑制作用与具有较高的氧化还原电位有关, 较高的氧化还原电位很可能是松叶煮汁中的单宁和酚类物质造成的。

五、pH 的作用

通常酸性的培养基能够抑制细菌生长。经试验证明, 松针培养基抑制细菌的作用不是酸性造成的。该培养基的 pH 值为 6.2—6.4, 酸度不足以对细菌产生明显的抑制作用。在培养皿中接种 10^{-5} 土壤稀释液 1 毫升, 注入用 NaOH 和 HCl 调成不同 pH 值的松针培养基, 进行培养和计数, 结果见图 1。

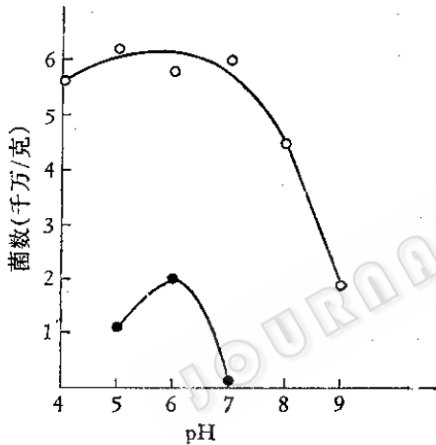
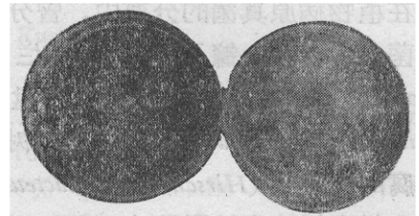


图1 不同 pH 的培养基上真菌和细菌生长数量
●—●细菌; ○—○真菌

在一般情况下, 多数细菌生长的最适酸碱度是中性和微碱性, 然而在松针培养基上, 细菌的最适 pH 值却是 5 和 6; 真菌最适 pH 值是 5、6、7。为了抑制细菌生长应将培养基的 pH 调整到 7。酚类物质易于氧化生成醌, 多元酚在碱性条件下可强烈吸收空气中的氧, 这可能是培养基在中性和碱性条件时比酸性条件时抑制细菌力更强的原因。

经过调节 pH 和加入高锰酸钾的松针培养基, 抑制细菌的能力有了大大提高。接种土壤稀释液后, 在少数情况下细菌才

长出 1—2 个菌落, 这些菌落都被局限在很小的 (直径在 1 毫米以下) 范围内, 有的菌落发育成柱状, 竖立在培养基上。把这些细菌接种到马铃薯培养基上时, 多数细菌又都生长呈广展型的菌落 (图 2)。



氧化松针培养基 马铃薯培养基
图2 氧化松针煮汁培养基和马铃薯培养基上生长的细菌菌落

六、常压灭菌试验

将能在松针培养基上生长的细菌进行染色, 发现大都是革兰氏阴性的无芽孢细菌。因此, 为简化灭菌手续适应农村进行科学实验, 在装有氧化松针培养基三角瓶和试管中接种土壤颗粒, 用铝锅常压煮沸灭菌 40 分钟, 代替半小时 15 磅高压灭菌。灭菌后三角瓶和试管置温箱中培养 5 天, 没有发现生长微生物, 说明用常压灭菌代替高压灭菌是可行的。这就为农村的真菌工作者提供了方便条件。当然高压灭菌的氧化松针培养基还是有它的优点, 经高压灭菌的该培养基颜色可较早的变成紫红色, 对细菌的抑制作用也能够强些。

由于氧化松针培养基对细菌的抑制力较强, 在分离和培养真菌时减少了细菌的污染。在用污染细菌较严重的样品分离植物病原真菌和昆虫病原真菌时, 一般可以不进行组织的表面消毒, 直接把患病组织的小块置于氧化松针培养基上, 也能够取得分离真菌的良好结果。

适宜生长的真菌类群

经过多次观察, 在氧化松针培养基上生长的真菌菌丝生长旺盛, 发育良好, 易于

观察和鉴定;生长的真菌类群也较广泛。用土壤稀释液接种,常见生长的真菌有毛霉、根霉、酵母、青霉、曲霉、交链孢霉、芽枝霉、镰刀霉、木霉、轮枝霉、葡萄霉、茎点霉以及束梗霉等。

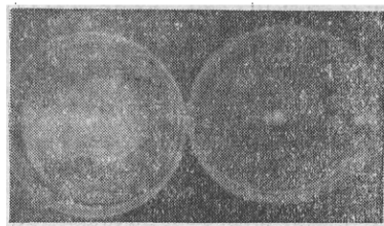
在植物病原真菌的分离中,曾分离到丝核菌、赤霉菌、镰刀菌、杨树烂皮菌(*Cytospora chrysosperma*)和松毛孢盘(*Pestalotia zahlbruckneriana*)等。用引起树木边材白腐的白囊孔(*Hirschioporus lacteus*)和引起心材腐朽的李针层孔(*Phellinus pomaceus*)的子实体进行分离,都得到了具有锁状联合的菌丝体。引起红松白色蜂窝状腐朽的真菌和引起北京西山桃根腐病的真菌,用马铃薯培养基多次分离没有成功,用氧化松针培养基便顺利地分离成功,都生长出具有锁状联合的菌丝体。桃树根腐病菌的菌丝还可在培养基中集结,形成了粗壮的根状菌索。这两种真菌还能够良好生长于用硫酸铵代替蛋白胨的氧化松针培养基上,但不能旺盛地生长于除去松针煮汁的上述培养基和马铃薯培养基上,说明促

进这两种真菌的生长因子是来自松针煮汁中。桃根腐病的生长情况见图3。需要维生素 B_1 的灵芝菌在氧化松针培养基上的生长显著比在马铃薯培养基上的好。在应用该培养基分离昆虫病原真菌时,曾在患病青杨枝天牛上分离到一种虫生真菌。在患绿僵病的金龟子虫尸上曾分离到绿僵病。在不进行虫体表面消毒的情况下,自患白僵病的松毛虫体表和体内取小块组织都分离到白僵菌。然而用马铃薯培养基这样进行分离时,则常常发生细菌污染。

讨 论

植物病原微生物主要是真菌类群,动物病原微生物主要是细菌。其原因可能是酚类物质是在植物中广泛存在的一类化合物,而动物则缺乏此类物质,从而具有重要的生态影响。在松针培养基的试验中,除采用油松针叶外,还曾用白皮松、云南松、侧柏和杨树叶进行试验,都与油松针叶有类似的抑制细菌生长作用。我们也曾用化学药品单宁、对苯二酚、邻苯二酚进行试验,得到与油松针叶煮汁有类似的抑制细菌生长的现象。

氧化松针培养基中的酚类物质,吸收空气中的氧,氧化生成醌。我们认为该培养基具有两个特点:1. 较高的氧化还原电位,2. 这种氧化还原电位,推测可能不会因真菌的生长和代谢产物的影响而过多的下降。从而有利于一些类群真菌的生长。



左: 氧化松针培养基
右: 马铃薯培养基

图3 桃根腐病菌在氧化松针和马铃薯培养基上的生长情况

THE OXIDIZED PINE-NEEDLE EXTRACT CULTURE MEDIUM —A FUNGAL SELECTIVE CULTURE MEDIUM

WU CHIN-WEN

(*Yunnan Forestry College, Kunming*)

The medium prepared from the pine-needle extract treated with KMnO_4 possesses the property of inhibiting bacteria pronouncedly yet permitting growth of fungi. Experimental results indicated that such a property may be involved with higher oxidation-reduction potential brought about by tannin and phenol substances contained in the extract.

The pine-needle culture medium is prepared as follows:

20% pine needle extract + 0.1 g KMnO_4 , 1000 ml, glucose 10 g, peptone 5 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, agar 18 g, pH 7. Sterilization 15 pounds for 20 minutes in autoclave or boiling for 40 minutes.