

小麦根系联合固氮微生物的研究

1. 菌种的分离和鉴定*

刘荣昌 李凤汀

(河北省科学院微生物研究所, 保定)

我们从 1979 年研究小麦根系联合固氮的微生物, 结果发现小麦根系固氮微生物有较高的固氮酶活力。本文报道从小麦根系固氮微生物中分离的菌株及其鉴定。

材料和方法

1. 培养基: 修改的 Döbereiner 无氮培养基(以下称无氮培养基), 其组成如下(g/L): 苹果酸氢钠 4.3, 葡萄糖 5.0, 蔗糖 5.0, 酵母膏 0.2, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, FeCl_3 0.01, Na_2MoO_4 0.002, 蒸馏水 1000 ml, pH 6.5—7.0。以溴代麝香草酚兰(B. T. B.) 作指示剂, 加 0.3% 或 2% 琼脂制成半固体或固体培养基, 121℃ 灭菌 30 分钟, 备用。

2. 取样与菌株分离: 将小麦根系样品用水洗净, 浸入 0.2% 酸性 HgCl_2 溶液中, 杀菌 3—5 分钟, 用无菌水漂洗五次, 在无菌条件下剪成 1cm 长的根段。分不同部位, 定量地将其分装在有培养基的疫苗瓶里, (以无培养基的作对照) 抽出 10% 的空气, 注入等量的乙炔, 25℃ 培养 24—48 小时。取样测定乙炔还原酶活力。选酶活力高的样品, 在无氮琼脂平板上分离, 至获得纯菌株。未加培养基的样品加无菌水研磨, 取匀浆液划线分离菌株, 转接至斜面, 置冰箱中保存。

3. 菌株鉴定方法: 用无氮培养基(并去掉碳源) 作基础培养基, 分别加 1% 的不同碳源、0.05% 的无机氮和 0.1% 有机氮, 进行碳水化合

物产酸产气、同化及氮源利用试验。生理生化鉴定按文献^[1] 进行, 并根据伯杰氏鉴定细菌学手册(第八版)^[2] 进行鉴定。

结果和讨论

在 102 个小麦品种的 307 个样品中, 有固氮酶活力的达 175 个, 占 56.1%。分离得到的 595 个纯菌株中, 45 株具有明显固氮酶活力, 占 7.5%。现对其中的 43 号、43-2 号、91 号菌株分别进行鉴定, 其酶活力分别为 155.92、143.07、143 ($\text{nM C}_2\text{H}_4/\text{管}/\text{小时}$), 报道如下。

一、菌株的特征

1. 形态特征: 43、43-2、91 号菌株均为革兰氏染色阴性, 无芽孢杆菌, 细胞大小分别为 1.0×1.5 — 3.0 、 0.8 — 1.0×1.5 — 2.0 、 0.5 — 0.6×1.2 — 2.0 nm (见图 1)。

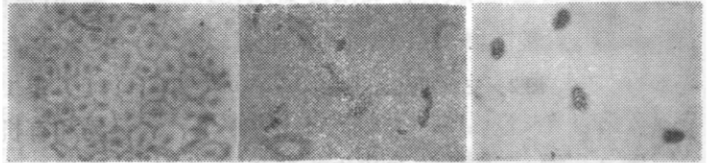


图 1 细胞形态(800×)

左图为 43 号菌; 中为 43-2 号菌; 右为 91 号菌。

其中 43 号菌生厚荚膜, 不运动, 43—2、91 号菌, 周生边毛, 运动。

2. 培养特征: ①在加有 B. T. B 的半固

* 本鉴定工作承河北大学宋尚直同志指导, 曾广琴、牛复文、李春辉、姚惠芬同志参加部分工作。

体无氮培养基中, 接种培养 24 小时后, 43 和 43-2 菌株的培养基变黄, 在表面生成厚菌膜, 91 菌株培养基变蓝, 表面生成乳白色菌膜。穿刺接种时 43 和 43-2 菌株沿穿刺线生长, 产气。91 号菌只在表面生长。②在无氮琼脂平板上, 43 号菌菌落无色, 圆形, 微突起, 表面光滑, 半流质, 3—6mm; 43-2 菌菌落乳白色, 圆形, 微凸起, 有光泽, 0.8—1.0mm; 91 号菌菌落灰黄色, 圆形, 微凸起, 边缘整齐, 周围有透明圈, 1.0—1.5mm。在营养琼脂平板中 43 和 91 号菌菌落稍小, 43-2 菌菌落略大。③43 号菌在斜面上菌苔无色, 半透明, 半流质; 43-2 号菌呈乳白色, 有光泽, 产非扩散性黄绿色素; 91 号菌为灰黄色, 周围有白晕。液体培养时 43 和 43-2 号菌均匀混浊, 无菌膜和沉淀产生; 91 号菌则有很薄的膜、闪光。

3. 生长特性: ①生长曲线(图 2): 在无氮培养基中, 28℃ 培养。

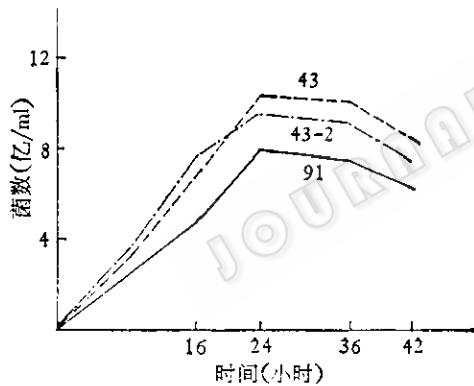


图 2 三株菌的生长曲线

图 2 表明, 三株菌的对数生长期在 16 小时左右, 24 小时后转向平缓。②生长最适温度: 43 和 43-2 号菌为 25℃, 91 号菌为 30℃。作法是: 25ml 疫苗瓶装 5ml 培养基, 接种后置不同温度下培养 24 小时, 测定固氮酶活力, 结果见图 3。③生长最适 pH: 用 0.1M KH_2PO_4 与 0.1M K_2HPO_4 溶液, 配成 pH 4.5、5.8、6.5、7.0、7.4、8.0 和 8.5 的溶液, 分别加入无氮培养基中, 将 43 和 43-2 菌株接种后, 于 25—28℃ 静置培

养 24 小时, 测酶活力(见图 4)。

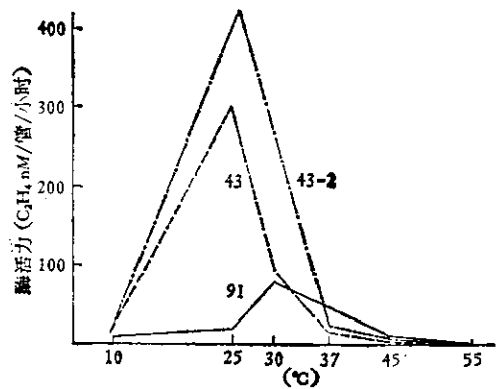


图 3 温度与产酶活力的关系

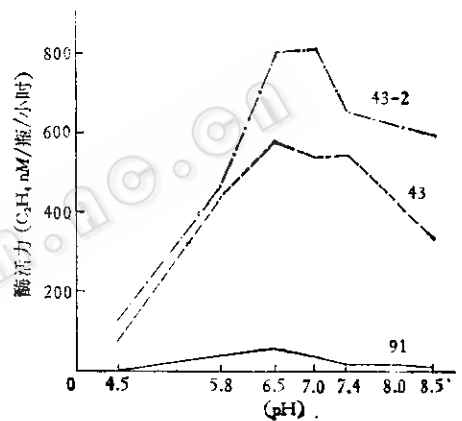


图 4 pH 与酶活力的关系

三个菌株耐受的最适无机盐浓度为 0.5%, 将无机盐量提高到 6.5%, 43、43-2 号菌生长较差, 91 号菌则不生长。

4. 生化特性: 见表 1。

表 1 说明, 43、43-2 菌株能利用糖、醇、淀粉和有机酸, 91 号菌株只能利用苹果酸、乙醛苯甲酸等有机酸。氮源的利用是采用固体斜面, 接种后注入 10% 乙炔, 培养 24 小时取样测定固氮酶活力(见表 2)。

表 2 结果说明, 当蛋白胨、酵母膏添加量大于 0.3% 时, 会抑制固氮酶活力。而牛肉膏添加到 0.5% 仍保持较高活性。但当铵离子浓度为 136ppm 时, 91 号菌株失去酶活力, 43、43-2 菌株仍保持高于无氮源培养时的酶活力。而铵离子浓度增加到 372ppm 时, 43、43-2 菌株失去酶

表 1 菌株的生化特性*

结果 项目	菌株号			结果 项目	菌株号		
	43	43-2	91		43	43-2	91
接触酶	+	+	+	侧金盏花醇	⊕	⊕	-
氧化酶	-	-	+	甘油产气	+	+	-
氧化发酵试验	+	+	-	淀粉	⊕		-
氯化钾试验	+	+	-	柠檬酸盐	+	+	-
硝酸盐还原	+	+	+	D-酒石酸盐	+	-	-
阿拉伯糖	⊕	⊕	-	丙二酸盐	+	+	-
乳糖	⊕	⊕	-	M. R.	-	-	-
麦芽糖	⊕	⊕	-	V. P.	+	+	-
蔗糖	⊕		-	明胶液化	-	-	-
海藻糖	⊕	⊕	-	TST 产 H ₂ S	-	-	-
鼠李糖	⊕		-	吲哚	+	+	-
七叶灵	+	+	-	尿素水解	+	+	-
卫茅醇	-	-	-	苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-
吡醇	⊕	⊕	-	赖氨酸脱羧酶	+	+	-
甘露醇	⊕		-	精氨酸双水解酶	-	-	+
山梨醇	⊕	⊕	-	石蕊牛奶	产酸、凝固	产酸、凝固	产碱、还原

* 表中“+”阳性反应；“-”阴性反应；“⊕”产酸产气。

表 2 菌株对氮源的利用*

结果 菌株号	氮源名称		KNO ₃		牛肉膏		蛋白胨		酵母汁		无氮源	
	生长	酶活力	生长	酶活力	生长	酶活力	生长	酶活力	生长	酶活力	生长	酶活力
43	+++	18.62	+++	52.81	+++	242.80	+++	195.68	+++	90.66	++	8.45
43-2	+++	60.11	+++	75.39	+++	142.89	+++	268.73	+++	134.60	+	7.51
91	+++	0	+++	1.58	+++	51.46	+++	133.51	+++	77.35	+	21.84

* 表中“+”生长较差；“++”生长较好；“+++”生长良好。酶活力单位为(μM C₂H₄/管/小时)。

活力。当硝酸盐浓度为 306 ppm 时, 91 号菌株保持原有固氮酶活力的 7.3%, 43 和 43-2 号菌株同样高于无氮源培养时的酶活力, 而硝酸盐浓度增加到 900ppm 时, 会抑制细胞的固氮酶活力, 可见三个菌株的固氮酶活力在不同条件下是不同的。所以在自然条件下可能存在耐高浓度铵离子的固氮菌。

二、菌株属种的确定

根据 43 号菌株的细胞形态、培养特征和生理生化性状, 应属于肠杆菌科的克雷伯氏菌属肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)。按照 Henriksen 1964 年指出的 M·R⁻、V·P⁺、柠檬

酸盐阳性、尿素阳性、明胶和吲哚反应不定者为肺炎克雷伯氏 I 或 II 型菌株的意见, 43 号菌株应属于肺炎克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) I 或 II 生物型菌株^[2]。43-2 菌株的各种性质与 43 号菌株相似, 但根据细胞形态特征应属于肠杆菌科肠细菌属, 鉴于它甘油产气、水解七叶灵、赖氨酸反应阳性, 精氨酸双水解阴性, 该菌属于产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)^[2]。91 号菌株在石蕊牛奶培养基上产碱, 不利用碳水化合物产酸等性状, 结合细胞形态, 培养特征分析, 鉴定为粪产碱菌 (*Alealigenes faecalis*)^[2]。

从小麦根系获得的具有固氮酶活力的粪产碱菌在伯杰氏“鉴定细菌学手册”中没有记载。

而近几年报道的小麦根系固氮微生物有浸麻芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*)、多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*)、巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*)、生脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*)、肺炎克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)^[3-5]，仍没有粪产酸菌、产气肠细菌、肺炎克雷伯氏杆菌 I 或 II 生物型菌株的报道。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著：一般细菌常用鉴定方法，1978年11月第一版，北京，科学出版社出版，1978。
- [2] Breed, R. S.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8TH. 273—275. 321—324, 1974.
- [3] Мишустин, Е. Н.; Кротовиг, В. Л.: *Серия биологическая*, 3: 470—474, 1980.
- [4] Kamimandan, S. R. and Sabbarao, N. S. et al.: *Microbiology Abstracts Section* 13(10): 69, 1978.
- [5] W. L. Pedersen et al.: *Applied and Environmental Microbiology* 35: 129—135, 1978.