

水稻、玉米、甘蔗根系联合固氮菌的分离和鉴定

何福恒 章锦秋 金世芳 姜秋菊

(浙江省农科院微生物研究所,杭州)

据近十几年来的研究发现,各种作物和热带、亚热带牧草的根际和根表,有的甚至在根的皮肤细胞中均有联合固氮微生物存在^[1]。我们从本省的实际情况出发,以水稻、玉米、甘蔗三种作物为对象,进行了根系联合固氮菌的分离和鉴定,为固氮微生物资源利用提供资料。本文仅以上述三种作物根系分离到的具有明显固氮酶活性的108株菌的鉴定结果和它们在作物根系中的组成,以及不同分离方法对联合固氮菌的分离效果等方面作了初步报道。

材料和方法

1. 分离培养基: 根系联合固氮菌的分离培养基有 Döbereiner 苹果酸钾盐或琥珀酸钠盐^[2],慢型快长根瘤菌培养基^[3],修改伯克氏培养基^[4]。

2. 取样和菌株分离: 取样时期: 早稻(20个品系)和晚稻(15个品系)为孕穗期;春、夏玉米(各2个品系)为抽雄蕊和抽花丝期;甘蔗(2个品系)为分蘖、伸长和收获前3个时期。取样地点: 水稻、玉米为本院试验场,甘蔗为杭州市郊笕桥镇新联村。根系样品的采集和处理,以及细菌的分离方法等均照文献[5]记载的方法进行。本实验的细菌分离方法有:根系研磨法、富集法、根段法等3种。

3. 固氮酶活性的测定: 采用国产102G型气相层析仪测定菌株酶活,测定方法参照文献[5]进行。

4. 菌株鉴定方法: 按《一般细菌常用鉴定方法》^[4]进行。菌株属的鉴定,主要根据《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第七、八版)^[6,7],并参考克拉西里尼科夫的《细菌和放线菌的鉴定》^[8],王

大相编著的《细菌分类基础》^[9],以及 V. B. D 斯克尔曼著的《细菌属的鉴定指导》^[10]。

结果和讨论

在水稻、玉米、甘蔗三种作物41个品种(或品系)54个样品中,共分离到907株菌。其中,有固氮酶活性的556株,占总数的61.3%;有明显固氮酶活性的108株,占总数的12%。酶活最高的菌株为196nMC₂H₄/管/小时,最低的为5nMC₂H₄/管/小时。在有明显酶活的108株菌中,来自早稻的2株,晚稻的90株,夏玉米的5株,甘蔗的11株。从分离部位分,来自根系表面和根系组织内的46株(系用研磨法分离),根系表面的45株(系用富集法分离),根系组织内的14株(系用根段法分离),近根际土壤的3株(系用常规法分离)。

(一) 菌株属的鉴定

在108株菌中,其中100株经鉴定分别属于以下10个属。

1. 产碱菌属 (*Alcaligenes*) 30株,其编号为: 2、199、246、270、344、373、409、431、456、492、532、533、568、583、584、635、651、663、681、691、711、714、724、767、783、798、805、812、186、892。均为无芽孢杆菌,周生鞭毛运动,菌落无特殊色素,革兰氏阴性,呼吸代谢,大多数能利用简单的碳源,不能利用无机氮,氧化酶阳性。其中373和783菌株,不从碳水化合物产酸,石蕊牛奶产碱,应属粪产碱菌 (*A. faecalis*)。

2. 肠杆菌属 (*Enterobacter*) 27株,其编号为: 269、288、466、467、487、502、503、553、554、556、579、596、665-3、732、737、738、

749、763、764、775、777、804、807、819、332、526、880。均为无芽孢杆菌,以周生鞭毛运动,革兰氏阴性,不抗酸,强烈发酵葡萄糖产酸产气,氧化酶阴性,还原硝酸盐,甲基红阴性,V-P阳性,能利用柠檬酸盐和无机氮,精氨酸双水介酶阳性,石蕊牛奶产酸、凝固、有时还原。在以上菌株中,对466、467、502、503、554、579、749、775、804、526、807、880等固氮酶活性较高的菌株进行种的鉴定,这12株菌,发酵甘油和肌醇均不产气,能液化明胶,具有精氨酸双水解酶,不具有苯丙氨酸脱氨酶和赖氨酸脱羧酶。因此,应定为阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)。

3. 假单胞菌属(*Pseudomonas*) 14株,其编号为:234、239、262、366、381、417、453、600、675、682、712、725、773、816。均为无芽孢杆菌,细胞直径在 $1\mu\text{m}$ 以内,以极生鞭毛运动,革兰氏阴性,氧化酶阳性,氧化葡萄糖产酸,呼吸代谢,在蛋白胨培养基上生长良好。除234、239、262、381、675等菌苔黄色外,其余菌株菌苔无明显色素。以上菌株大多产萤光或产水溶性色素。

4. 土壤杆菌属(*Agrobacterium*) 10株,编号为:562、585、665-2、708、718、299、305、522、934、894。均为无芽孢杆菌,稀周生鞭毛,革兰氏阴性,好氧,在牛肉膏蛋白胨培养基上生长迅速,大多产生菌膜,能利用多种碳水化合物和无机氮、氧化葡萄糖产酸,氧化酶阳性,还原硝酸盐,不液化明胶。其中299、305、934和894等4株产3-酮基乳糖。

5. 黄杆菌属(*Flavobacterium*) 6株,编号为:268、283、284、385、595、927。特性是:无芽孢杆菌,周生鞭毛,革兰氏阴性,菌苔产黄色素,色素不溶于培养基,菌落圆形,边缘整齐,低凸面,光滑,半透明或不透明,氧化碳水化合物产酸,但产酸能力微弱,接触酶阳性,氧化酶阴性。

6. 节杆菌属(*Arthrobacter*) 6株,编号为:346、439-2、722、744、745、351。其特性:细胞形态有周期性的变化,老龄菌体完全或大部份是类球状细胞,当转接到新鲜培养基上时,类球状细胞开始膨胀,然后从细胞一处或二处萌发出

杆状细胞。这些杆菌的直径一般小于膨大的类球状细胞,在生长和分裂过程中,一部份杆菌彼此成一定角度或八字形排列,在老培养中杆状菌又变为类球状细胞。革兰氏染色难着色,不抗酸,呼吸代谢,从葡萄糖不产酸或产微酸,接触酶阳性。

7. 芽孢杆菌属(*Bacillus*) 2株,其编号为:371、393。均为革兰氏阳性杆菌,大小为 $0.47-0.70 \times 1.17-1.75\mu\text{m}$,细胞着色均匀,无类脂颗粒,周生鞭毛,形成椭圆形的内生芽孢,芽孢的宽度不超过营养体,菌落表面粗糙,奶油色不透明,氧化糖类产酸、接触酶阳性,不水解淀粉,液化明胶,不还原硝酸盐,石蕊牛奶产酸、凝固、然后还原。根据上述特性,该2株菌应属芽孢杆菌属的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilis*)。

8. 固氮菌属(*Azotobacter*) 2株,编号为:439、323。其细胞呈近球状或杆状,有孢囊,周生鞭毛。细胞大小,439为 $0.94-1.29 \times 2.35-7.17\mu\text{m}$,323为 $1.14-1.76 \times 1.76-3.76\mu\text{m}$ 。在无氮培养基上细胞质均匀,在含有机氮的综合培养基上细胞内布满折光力强的类脂物,也有少量空泡。在肉汁蛋白胨培养基上细胞呈明显的多形态。在无氮培养基上生长良好,幼培养菌苔乳白色半透明,老培养粉红色。在牛肉膏蛋白胨上生长极差,其中439几乎不生长。二菌株都从葡萄糖产酸,439不利用甘露醇及鼠李糖,323不利用鼠李糖。接触酶阳性,还原硝酸盐。

9. 克雷伯氏菌属(*Klebsiella*) 2株,编号为:478、493。478是无芽孢杆菌,有荚膜,无鞭毛,不运动,革兰氏阴性,发酵葡萄糖产酸产气,能利用柠檬酸盐和丙二酸盐,接触酶、V-P、脲酶、赖氨酸脱羧酶均为阳性。氧化酶、甲基红、吲哚阴性。不水解明胶。根据以上特征,该菌应属肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)。

493的形态(呈短杆状,细胞较小)以及吲哚、V-P反应不同于478,但因其主要特征均符合克雷伯氏菌属,因此亦划归于该属。

10. 螺菌属(*Spirillum*) 1株,编号796。在牛肉膏蛋白胨培养基上呈直或弯曲的杆状菌,

表1 水稻、玉米、甘蔗根系联合固氮菌(有明星固氮酶活)的组成

细菌属名	从三种作物根系分离到的各属菌株*					玉米	甘蔗
	水 稻						
	籼 稻	杂 交 稻	粳 稻	糯 稻			
产碱菌属 <i>Alcaligenes</i>	2 (rs)	246 (r)	583 (r)	651 (r)	892 (rs)	186 (rs)	
	199 (rs)	270 (r)	584 (r)	668 (r)			
	373 (r)	344 (ri)	635 (r)	681 (r)			
	409 (r)	492 (rs)	711 (ri)	691 (r)			
	431 (r)		714 (ri)	724 (rs)			
	456 (ri)		767 (rs)	783 (rs)			
	532 (rs)			798 (rs)			
	538 (rs)			805 (rs)			
	568 (rs)			812 (rs)			
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>		269 (r)	596 (r)		880 (ri)	332 (r) 526 (rs)	
	553 (rs)	288 (r)	732 (rs)				
	554 (rs)	466 (rs)	737 (rs)	665-3(r)			
	556 (rs)	467 (rs)	738 (rs)	804 (rs)			
	579 (rs)	487 (rs)	749 (rs)	807 (rs)			
		502 (rs)	763 (rs)	819 (rs)			
		503 (rs)	764 (rs)				
			775 (rs)				
			777 (rs)				
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	366 (r)	234 (r)	600 (r)	675 (r)			
	381 (r)	239 (r)	712 (ri)	682 (r)			
	417 (r)	262 (r)	773 (rs)	725 (ri)			
	453 (ri)			816 (rs)			
土壤杆菌属 <i>Agrobacterium</i>	562 (rs)		585 (r) 708 (rs) 718 (rs)	665-2 (r)	894 (rs)	299 (r) 305 (r) 522 (rs) 934 (s)	
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>		268 (r) 283 (r) 284 (r)	595 (r)			927 (s)	
	385 (r)						
节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	439-2 (r)	346 (ri)	744 (rs) 745 (rs)	722 (ri)		351 (ri)	
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	371 (r)						
	393 (r)						
克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i>		478 (rs) 493 (rs)					
固氮菌属 <i>Azotobacter</i>	439 (r)					323 (r)	
螺菌属 <i>Spirillum</i>				796 (rs)			

* (s) 示从根际土壤分离, (r) 示从根系表面和根组织内分离,

(rs) 示从根面分离, (ri) 示从根内分离。

有的具有 0.5—1 螺旋卷, 细胞长短不一。在 Döbereiner 培养基上细胞呈直或弯曲的杆状菌, 大小为 $1.06—1.29 \times 2.82—4.7\mu\text{m}$, 单极毛, 细胞扭动或旋转运动, 不形成孢囊, 不产粘液, 革兰氏阴性, 接触酶、氧化酶阳性。V-P、甲基红、吡噪均阴性。还原硝酸盐, 不液化明胶, 尿素水解, 能利用柠檬酸盐, 老培养物呈粉红色。

(二) 水稻、玉米、甘蔗根系联合固氮菌(指具有明显固氮酶活性)的组成

在水稻、玉米、甘蔗等作物的根表或根内都普遍存在着联合固氮细菌(见表 1)。在水稻根系, 分离到有明显酶活的 87 株菌中, 以产碱菌属和肠杆菌属居多, 各占 32.2% 和 27.6%, 以下依次为: 假单胞菌属占 16%, 土壤杆菌属、黄杆菌属和节杆菌属各占 5.7%, 芽孢杆菌属、克雷伯氏菌属各占 2.3%, 固氮菌属、螺菌属均很少, 各占 1.1%。由于玉米和甘蔗根系中分离到具有明显酶活的联合固氮菌数量较少, 所以对 3 种作物之间联合固氮菌的组成是否存在差异, 本实验尚不能证实, 但几个主要属的菌株在上述 3 种作物根系中均存在。本研究结果与目

前国内外的报道^[1,11]相似。

(三) 分离方法和培养基对水稻根系联合固氮菌分离效果的影响

在晚稻抽穗期取样的 15 个样品中, 分别采用 3 种分离方法和 4 种培养基进行菌株分离, 选其有阴显酶活的菌株进行菌种鉴定。其结果: 采用根系研磨法所获得菌株数最多, 有 308 株, 种类最丰富, 分属于 8 个属。但是, 有明显酶活的菌株比例却不是很大, 仅占 13.3%。采用富集法分离的菌数相对要比研磨法少, 为 189 株, 但有明显酶活的菌株并不少, 占 19.6%, 种类也较多, 分属于 7 个属。而采用根段法分离的菌数则较少, 为 48 株, 种类也少, 仅分属于 4 个属, 但有明显酶活的菌数比例却最高, 占 25.0% (见表 2)。

从表 2 分离培养基的分离效果看, 有明显固氮酶活性的菌株分离效果以慢型快长根瘤菌培养基最好, 占分离菌株数的 36.0%, 其次是琥珀酸钠盐和苹果酸钾盐培养基, 各占分离菌株数的 12.9% 和 11.6%, 修改伯克氏培养基没有分离到有明显酶活的菌株。由此看来, 选择

表 2 不同分离方法和不同培养基对晚稻根系联合固氮菌分离的影响

细菌属名	不同分离方法所分离的菌株数			不同培养基分离**的菌株数			
	研 磨 法	富 集 法	根 段 法	苹果酸钾盐	琥珀酸钠盐	慢型快长	修改伯克氏
产碱菌属	12	9	5	9	7	10	
肠杆菌属	4	20		1		23	
假单胞菌属	9	2	3	2	8	4	
土壤杆菌属	2	1	2	1	3	1	
黄杆菌属	5			1	2	2	
节杆菌属	1	2	2	1	2	2	
芽孢杆菌属	2					2	
克雷伯氏菌属		2		1		1	
固氮菌属	1					1	
螺 菌 属		1			1		
未定名菌	5			1		4	
分离*菌株数	308	189	48	146	178	139	82
有固氮酶活性菌株数	227	131	32	115	146	65	64
有明显固氮酶活性菌株数	41	37	12	17	23	50	0

* 分离菌株数不是定量分析数据, 而是从分离平板上挑取的菌落数。

** 苹果酸钾盐与琥珀酸钠盐均以 Döbereiner 培养基为基础。

有效的分离方法和培养基,对联合固氮菌的分离和高效菌株的筛选工作具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 王子芳: 微生物学通报, 9(4): 176—181, 1982。
- [2] 湖北省微生物研究所生物固氮组: 微生物学报, 19(2): 160—165, 1979。
- [3] 福建农学院微生物室结合性共生固氮组: 微生物学通报, 5(4): 3—5, 1978。
- [4] 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》, 科学出版社, 1978。
- [5] 何福恒等: 浙江农业科学, 6: 274—280, 1981。
- [6] Buchanan, R. E. et al.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition The Williams & Wilkins Company Baltimore, 1974.
- [7] Breed, R. S., et al.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th edition, Bailliere, Tindall & Cox, Ltd., 1957.
- [8] H. A. 克拉西里尼科夫著: 细菌和放线菌的鉴定, 科学出版社, 1965。
- [9] 王大稻编著: 细菌分类基础, 科学出版社, 1977 年。
- [10] V. B. D. 斯克尔曼著: 细菌属的鉴定指导, 科学出版社, 1978。
- [11] 王家玉编译: 农业科技情报 (27), 浙江省农科院科技情报研究所, 1982。