



棉花根表固氮细菌的分离与鉴定

宁林夫 岑英华 龚汉英 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

自七十年代, Döbereiner 报道在雀稗的根表分离出固氮酶活性很强的 *Azotobacter paspali*^[1] 和从玉米等禾谷类作物的根表分离到具有固氮能力的 *Spirillum lipoferum*^[2] 以来, 联合固氮菌引起了人们很大的兴趣。在国外相继出现大量报道^[3,4], 在国内也有许多研究, 如从玉米、小麦、高粱、小米、水稻、甘蔗等根表分离到 *Azospirillum brasilense*^[5]; 从水稻中分离到 *Alcaligenes faecalis* 和 *Enterobacter cloacae*^[6]; 从玉米根际中分离到 *Klebsiella pneumoniae*^[7]。但从棉花根表分离固氮细菌的报道至今尚未见到。我们于 1982 年从棉花根表中分离出了一株固氮酶活性较强的细菌, 经鉴定为群栖肠杆菌 (*Enterobacter agglomerans*), 编号 8214。该菌的分离鉴定结果及固氮酶活性等报道如下。

材料与方 法

1. 取样和回接的棉花品种: 分离样品采自江西省波阳县棉种场波棉 2 号杂种棉开花时的根系, 回接的棉花品种来自湖北省农科院的“84”。

2. 培养基: 菌株分离用 Ashby 无氮培养基, 菌株保藏和一般测定均用 YMA 培养基*, 用无机盐替换 YMA 中的酵母粉为 M 培养基。

3. 菌株分离方法: 将棉花根系洗净后剪成约 4cm 长的根段, 用 95% 酒精浸泡 1 分钟, 再用 0.2% HgCl₂ 浸泡 5 分钟, 随即以无菌水洗换 6 次, 剪成约 1cm 长的小根段, 平放在 Ashby 无氮培养基皿上, 32℃ 培养, 从切口处长出的菌苔上挑取菌体划线培养, 再挑取单菌落进一步分离纯化。

4. 固氮酶活性的测定: 将分离纯化的菌株转接在 YMA 斜面上, 28℃ 培养 14 小时, 待菌

生长丰满时, 注入试管 1/10 容积的乙炔, 转化 13 小时, 用气相色谱仪测定固氮酶活性。

5. 盆栽方法: 用无菌沙培作回接试验; 用不灭菌的沙培测定接种 8214 菌液对棉花生长的影响, 每盆 3 株, 重复 3 次。

6. 菌株鉴定方法: 测定项目基本按文献 [8] 进行; 菌种名称鉴定参考文献 [9]。

结果与讨论

从棉花小根段切口处长出的菌体, 经分离纯化, 获得 40 株纯菌, 经固氮酶活性的测定, 筛选出一株固氮能力最强的 8214 菌株。

(一) 8214 菌株的固氮酶活性

1. 在不同培养基上的固氮酶活性: 8214 菌在 pH 7.2、28℃ 培养 14 小时注入乙炔的情况下, 在含 0.01% 酵母粉的 YMA 培养基斜面上固氮酶活性较高; 在 Ashby 无氮培养基上虽然也能固氮, 但活性很低; 在含 1、5、10nM 的醋酸铵或硫酸铵的 M 培养基上, 未能测出固氮酶活性(表 1)。8214 菌在 Ashby 培养基上的固氮酶活性远远低于含 0.01% 酵母粉的 YMA 培养基, 这可能与该菌在固氮时需要少量的启动氮有关。至于在醋酸铵含量较高的 M 培养基上不固氮, 是由于氨的阻遏作用, 这是自然界各种自生固氮微生物的共同特点。

2. 8214 菌在不同 pH 条件下的固氮酶活性: 该菌接种在含 0.04% 酵母粉的 YMA 培养基上, 在 pH 4—10 情况下, 其固氮酶活性见表

刘爱萍同志参加采样, 周亿圭同志测定固氮酶活性, 文中图片为本所电镜组拍摄, 特此致谢。

* YMA 培养基成分 (g): 甘露醇 10, K₂HPO₄ 0.5, NaCl 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.2, 酵母粉 0.4, 微量元素液 4ml (H₃BO₃ 2.5g, NaMoO₄ 2.5g 溶于 500ml 水中), 水 1000ml。

表 1 8214 菌在不同培养基上的生长和固氮情况

培养基	菌生长情况	固氮酶活性 (nM C ₂ H ₄ /管/小时)
Ashby	+	10.36
YMA (含酵母粉%)		
0.005	+	69.25
0.01	++	126.77
0.04	+++	109.57
M (含醋酸铵 nM)		
1	+++	0
5	+	0
10	-	0
M (含硫酸铵 nM)		
1	+++	0
5	+	0
10	+	0

“+”菌生长微弱,“++”生长较好,“+++”生长丰满。

表 2 8214 菌在不同 pH 条件下的生长和固氮情况

pH*	菌体生长情况	固氮酶活性 (nM C ₂ H ₄ /管/小时)
4	-	0
5	++	7.58
6	+++	75.84
7	+++	131.77
8	+++	143.45
9	+++	147.97
10	+++	157.77

* pH 值为灭菌前测定

2。

从表 2 结果看出,8214 菌在 pH7—10 的条件下固氮能力较强。

另外,在测定该菌固氮酶活性时,注入乙炔之前未抽出空气,试管中有氧,在此情况下仍能测出固氮酶活性,说明该菌在有氧条件下能进行固氮作用。

(二) 8214 菌对棉花生长的影响

将 8214 菌液回接在表面已灭菌的棉花种子上,在无菌沙培下,棉花苗期的根表可普遍分离到细菌,经纯化所得各单菌落,大多数都能测出固氮酶活性。而不接种的对照,其根表虽然也能分离到菌落,但绝大部分测不出固氮酶活性。可见 8214 菌在棉花根表能占据优势。

另外,将 8214 菌液接种在不经表面灭菌的

棉花种子上,并在不灭菌的沙培下,发现对棉花苗期的生长有一定促进作用。例如,1982 年 12 月 1 日播种的一次盆栽试验,次年 2 月 3 日测定,其结果见表 3 和图 1。棉花苗期的病害(立枯病,炭疽病等)较多,若能接种 8214 菌的类似有益微生物,在棉苗根际繁殖占据优势,对防治棉苗病害可能有一定作用,有待进一步研究。

表 3 8214 菌液对棉花苗期生长的影响(平均值)

处理	株高		真叶数	
	cm	%	片	%
接种	13.75	123.20	5.40	124.71
对照	11.16	100.00	4.33	100.00



图 1 接种 8214 菌液对棉花苗期生长的影响

(三) 8214 菌株的形态特征和生化特性

1. 形态特征: 菌体杆状,大小为 0.7—1.0×1.4—2.5 μm, 无芽孢, 周生鞭毛(图 2), 革兰氏

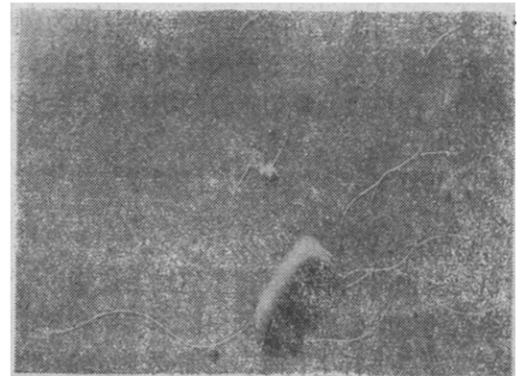


图 2 8214 菌株的形态

表4 8214菌株主要的形态特征与生理生化特性

菌种	8214菌株	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. cloacae</i>
革兰氏染色	—	—	—
鞭毛	周生	周生	周生
细胞色素氧化酶	+	+	—
M. R.	+	+	—
V. P.	+	+	+
产酸产气:			
葡萄糖	+	+	+
甘露醇	+	+	+
蔗糖	+	+	+
甘油	—	±	—
利用醋酸盐	+	+	+
利用乳糖	+	+	+
利用柠檬酸盐	+	+	+
硫化氢产生	—	—	—
液化明胶	+	+	—
固氮酶	+	±*	—**

* 15个菌株中约1/3有固氮酶。

** 标准菌株无固氮酶,有的报道其中个别菌株也有固氮酶。

阴性。在YMA培养基上,菌落圆形,隆起,边缘整齐,半透明,不产生荧光。

2. 生理生化特性: 8214菌株在28—37℃生长良好。在YMA固体培养基上,28℃培养12小时生长丰满,但在37℃下比28℃生长更快。该菌在pH4.5—11.0均能生长,但在YMA培养基上pH6—10范围内生长较好。该菌耐盐性,在加有0.5%NaCl的YMA培养基中可正常生长。该菌在有氧或缺氧(石蜡油封闭的YMA液体培养基)条件下均能生长。

该菌在以葡萄糖、蔗糖、甘露醇为碳源的培养基上均生长良好,并产酸产气;以甘油为碳源也能较好地生长,但不产酸产气;在以乳糖、苹果酸钠、柠檬酸钠等为碳源的培养基上生长较

慢。该菌能水解淀粉,液化明胶,V. P. 试验和M. R. 试验均为阳性,细胞色素氧化酶试验和硫化氢产生试验都是阴性,过氧化氢酶试验为阳性。

该菌的形态特征和生理生化特性,与Kleeberger等^[9]所述群栖肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)、阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)比较(见表4),8214菌株与群栖肠杆菌一致。还有Väisänen等^[10]报道*E. agglomerans*的各个菌株分为两个生物群,第一群的固氮基因在105—125Md的大质粒上,我们按Hirsch等^[11]方法从8214菌株中分离到一个分子量约为120Md的质粒,其大小与Väisänen等的报道一致。因此,他们将8214菌株定名为*Enterobacter agglomerans*。

参 考 文 献

- [1] Döbereiner, J. and Day, J. M.: Proc. I. nt. Symp. Nitrogen Fixation. Ist. (W. E. Newton and C. J. Nymen eds) 518—538, 1976. Washington State Univ. Press. Pullman.
- [2] Döbereiner, J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **22**(10): 1464—1473, 1976.
- [3] Walter, A. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **29**: 860—862, 1983.
- [4] Wani, S. P. et al.: *Plant and Soil*, **82**: 15—29, 1984.
- [5] 湖北省微生物研究所生物固氮组:微生物学报, **19**(2): 160—165, 1979.
- [6] 邱元盛等:微生物学报, **21**(4): 468—472, 1981.
- [7] 蒋有铨等:微生物学报, **23**(4): 380—383, 1983.
- [8] 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.
- [9] Kleeberger, A. et al.: *Arch Microbiol.*, **136**: 306—311, 1983.
- [10] O. Väisänen et al.: *Arch Microbiol.*, **141**: 123—127, 1985.
- [11] Hirsch, P. R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **120**: 403—412, 1980.