

元素分析法分类大豆根瘤菌

盛世淑 金人慈

(军事医学科学院仪器测试中心,北京)

葛诚 樊蕙 徐玲玫 陶天申

(中国农科院土肥所微生物研究室,北京)

摘要 用自动元素分析仪,测定细胞成分 N、C 含量,以 N/C 比值,将大豆根瘤菌分为三个不同的类群。第一群为快生型大豆根瘤菌, N 含量为 2.74—4.33%, C 含量为 50.82—52.73%, N/C 比值 < 10; 第二群为慢生型大豆根瘤菌, N 含量为 5.52—9.00%, C 含量为 45.14—50.32%, N/C 比值为 11.43—20.94; 第三群为超慢生型大豆根瘤菌, N 含量为 10.45—11.53%, C 含量为 42.56—45.31%, N/C 比值为 24.16—25.44。分析结果表明,本技术为大豆根瘤菌的分类,提供了可靠的数据。

关键词 元素分析;大豆根瘤菌

作者等探索应用元素分析法测定细菌细胞成分中的 N、C 含量,以 N/C 比值作为细菌分类鉴定的一种指标^[1,2]。结果表明指标直观,可信,具有一定的优越性,显示这一方法有进一步扩大应用的前景。本文在以前工作的基础上,对土壤中分离出的 58 株大豆根瘤菌的分类进行了研究,实验结果显示大豆根瘤菌可分为三个类群,与其表型特征(菌落大小)和生理生化特征(代时, pH) 相一致。进一步说明用元素分析法,将对各类生物体样品的分类,提供一种新的快速而简便的有用工具。

表 1 58 株供试菌株及来源

菌种	菌株	来源
快生型大豆根瘤菌	2047, 2048, 2050, 2051, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, USDA, 191, 192, 193, 194, 201, 205, 206, 208, 214, 217, 257。	徐玲玫等分离自辽宁 KeYSer 等分离自中国,引自北京农业大学生物学系微生物教研组
慢生型大豆根瘤菌	Kj24, C ₃₃ , USDA110 B ₁₃ , A TCC 10324, USDA31, TAL:11, Hup ⁺ , 113-2, 2028, 305, USDA138, 61A, 88A, SM ₃ , 61A88, SM ₃₃ , SM ₃₁ , SM ₃ , SM ₃ , TAL377, E ₄₁ , 2040, 3LiB142。	
超慢生型大豆根瘤菌	2060, 2061, 2062, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2063。	徐玲玫等分离自辽宁

材料与方 法

(一) 供试菌株及来源(表 1)

(二) 仪器

- 1.4431 型微量电子天平(西德 Sartorius)
- 2.1500 型自动元素分析仪(意大利 CarLo Erba 公司)
3. DP110-PRC 自动积分仪(意大利 CarLo Erba 公司)

(三) 实验方法

- 1.元素分析法原理及方法: 参见文献 [1, 2]。

2.本方法精确度试验: 以标准化学品非那西汀测试。

3.空白值试验: (1) 干燥后的培养基测 N/C 比值。(2) 培养菌体后的离心液经冷冻干燥后,测 N/C 比值。(3) 第四次洗液, 取样冷冻干燥后测 N/C 比值。

4.批间差异试验: 以不同的 5 株菌分 2 批培养,测其 N/C 比值。

5.不同培养时间的菌体分别以 48、72、120 小时进行培养,测其 N/C 比值。

结果与讨论

(一) 元素分析法的精确度(见表 2)

表 2 标准品非那西汀的 N、C 含量

理论值	N%	C%	偏差	
	7.82	67.01	N	C
实测值 1	7.83	66.98	0.05	0.03
2	8.00	66.89	0.12	0.06
3	7.73	66.53	0.15	0.42
4	7.84	66.93	0.16	0.02
5	7.77	67.00	0.11	0.05
6	7.90	66.99	0.02	0.04
7	7.88	66.88	0.00	0.07
8	7.84	67.06	0.04	0.11
9	8.04	66.94	0.16	0.01
10	7.96	67.26	0.08	0.31
平均值	7.88	66.95	0.125	0.112

从表 2 结果看出, 用元素分析法测标准品非那西汀的 N、C 含量, 其精确度 N 为 $0.125/7.88 \times 100 = 1.58\%$; C 为 $0.112/66.95 \times 100 = 0.17\%$ 。

100 = 0.17%。

(二) 空白值试验

液体培养基浓缩干燥后, 测其 N、C 含量分别为 0.76% 及 37.28%, 培养菌体后的离心液, N 未测出, C 含量仅为 3.63%, 离心后的第 4 次洗液, 干燥后无培养基的残留物, 说明洗涤彻底不会影响测定结果(见表 3), 上述试验结果均为两次重复的平均值。

表 3 空白值试验

样品名	N%/C% × 100	N/C 比值
原培养基(干燥)	0.71/37.24 × 100	1.90
	0.81/37.32 × 100	2.10
离心后母液(干燥)	0/3.62 × 100	0
	0/3.65 × 100	0
第四次洗涤滤液(干燥)	无物	0
	无物	0

(三) 批间差异实验

批间差异实验的 N/C 比值测定结果, 见表 4。

表 4 批间差异试验的 N/C 比值

菌号	制备日期	N%/C% × 100	N/C 比值	二批间差异
205	1985年12月	3.47/51.79 × 100	6.70	1.08
	1986年1月	4.10/52.70 × 100	7.78	
2047	1985年12月	2.74/51.97 × 100	5.27	0.76
	1986年1月	3.14/52.16 × 100	6.01	
113-2	1986年1月	6.58/45.35 × 100	14.50	0.40
	1986年5月	6.89/48.82 × 100	14.10	
2071	1986年3月	9.89/42.91 × 100	23.04	1.12
	1986年1月	10.45/43.25 × 100	24.16	
2057	1985年12月	3.98/51.62 × 100	7.66	0.09
	1986年8月	4.02/51.82 × 100	7.75	

(四) 不同培养时间的菌体 N/C 比值测定(见表 5)

表 4、5 结果表明, 不同菌种的 5 批分期制备的样品, 批间差异最高为 1.12, 说明在培养条件稳定的情况下, 重复性良好, 而不同培养时间的菌体 N/C 比值变化不大, 因此样品的收获时间, 对本方法的测定结果影响不大。

(五) 58 株大豆根瘤菌 N/C 比值的测定结果

58 株大豆根瘤菌中 23 株快生型的 N/C 比

值 < 9(表 6a), 23 株慢生型的 N/C 比值在 11—20 之间(表 6b), 12 株超慢型的 N/C 比值在 20—25 之间(表 6c)。

综上所述, 元素分析法有以下几方面的优点:

1. 从上述 58 株大豆根瘤菌的 N/C 比值测定结果显示, 大豆根瘤菌可分为快生型、慢生型、超慢生型三个类群, 而多年来一直认为与大豆共生的根瘤菌仅大豆根瘤菌一个种, 属慢生型大豆根瘤菌。1982 年正式报道了快生型大

表5 不同培养时间的 N/C 比值

菌号	培养时间(h)	N/C 比值
205	48	$4.10/52.70 \times 100 = 7.78$
	72	$4.29/52.63 \times 100 = 8.15$
	120	$3.97/53.26 \times 100 = 7.45$
2047	48	$3.14/52.16 \times 100 = 6.01$
	72	$3.20/53.03 \times 100 = 6.03$
2057(1)	48	$4.22/51.12 \times 100 = 8.25$
	72	$4.02/51.82 \times 100 = 7.75$
2057(2)	48	$4.28/51.54 \times 100 = 8.30$
	72	$3.86/50.41 \times 100 = 7.66$
	120	$3.97/52.41 \times 100 = 7.57$
T37	48	$8.02/43.14 \times 100 = 18.59$
	72	$8.40/44.10 \times 100 = 19.04$

表6a 大豆根瘤菌的 N、C 含量及 N/C 比值(快生型)

菌号	N%	C%	N%/C% × 100
191	3.44	51.22	6.72±0.34
192	3.27	52.04	6.28±0.52
193	3.09	52.29	5.91±0.72
194	3.81	51.22	7.43±0.37
201	3.48	52.40	6.64±1.04
205	3.47	51.79	6.70±0.96
206	2.99	52.03	5.75±0.84
208	3.27	52.19	6.26±1.37
214	3.06	52.52	5.82±0.44
217	3.10	52.73	5.87±0.60
257	4.33	50.82	8.52±0.64
2047	2.74	51.97	5.27±0.44
2048	3.09	51.21	6.03±0.24
2050	3.26	51.28	6.36±0.32
2051	3.25	52.06	6.24±0.48
2052	3.07	50.99	6.02±0.76
2053	2.93	52.40	5.59±0.52
2054	3.52	51.50	6.83±0.16
2055	2.91	51.93	5.60±1.29
2056	3.77	50.90	7.41±1.29
2057	3.89	51.27	7.59±1.37
2058	3.29	52.31	6.28±0.40
2059	3.24	51.66	6.27±0.24

豆根瘤菌^[3,4],说明与大豆共生的并非一种共生体,本方法 N/C 比值测定结果,亦说明了这一观点。

2. 盛世淑等^[5,2]曾报道 G + C mol% 法,不能区分马鼻疽杆菌与类鼻疽杆菌,而元素分析法可以明显区分。Jordan^[5]报道大豆根瘤菌

表6b 大豆根瘤菌的 N、C 含量及 N/C 比值(慢生型)

菌号	N%	C%	N%/C% × 100
Kj24	7.15	48.10	14.86±0.92
C33	6.44	48.11	13.88±1.33
USDA110	5.52	42.68	11.57±0.36
B15	5.53	45.47	12.16±0.64
I0324	5.11	33.41	15.29±0.84
USDA31	5.97	45.70	13.10±1.33
TAL411	8.08	46.05	17.38±1.34
Hup	9.00	44.09	20.41±1.16
113-2	6.78	47.08	14.40±1.78
2028	9.71	46.36	20.94±0.46
305	7.68	46.51	16.51±1.04
USDA138	9.00	46.22	19.47±1.84
61A88A	5.41	47.30	11.43±1.16
SM3	6.20	45.40	13.65±1.63
61A88	6.10	50.32	12.12±0.93
SM35	7.10	46.41	15.29±0.87
SM31	7.37	45.53	16.18±0.81
SM1	7.11	45.56	15.61±1.98
SM2	7.48	45.14	16.57±1.34
TAL377	7.54	47.75	15.79±1.86
E41	7.21	45.54	15.83±1.10
2040	5.42	43.59	12.34±1.47
3HBI42	6.66	45.91	14.50±1.65

表6c 大豆根瘤菌的 N、C 含量及 N/C 比值(超慢生型)

菌号	N%	C%	N%/C% × 100
2060	9.19	44.69	20.56±1.84
2061	10.82	42.56	25.42±1.57
2062	11.14	43.75	25.46±1.75
2063	10.58	44.42	23.81±1.51
2064	11.53	45.31	25.44±0.59
2065	11.02	43.81	25.15±0.92
2066	11.62	46.10	25.20±1.33
2067	10.64	43.33	24.55±1.56
2068	11.26	44.44	25.33±0.64
2069	10.23	45.52	22.47±0.87
2070	10.80	45.66	23.65±1.24
2071	10.45	43.25	24.16±0.52

用 G + C mol% 法亦不能区分。

3. 若单以细胞成分的 N、C 含量为区分的依据,不如以两元素的比值作为分类依据更能反映生物样品的特性,如作者在上千次样品的测定中,曾发现同一样品,由于冷冻干燥情况不一, N、C 含量差异很大,但比值不变。此外生

(下转第 2 页)

(上接第43页)

物样品的测定,一般来说数量较多,如取两元素的比值,可以省去称量样品的繁琐操作。

4. 本方法作为生物样品分类鉴别的观察指标之一,有其独特的优点,灵敏度高,操作简便,迅速,每个样品量仅需 0.5—1mg, 4 分钟即可测完,数据分析自动化,可信度高,不失为一种较好的细菌或其它生物样品的分类鉴定技术。

• 2 •

参 考 文 献

- [1] 盛世淑等: 微生物学通报, 11(2): 80, 1984。
- [2] 盛世淑等: 微生物学通报, 13(4): 156, 1986。
- [3] 徐玲玫等: 大豆科学, 3(2): 101—109, 1984。
- [4] 葛诚: 国外农业科技, 1: 5—9, 1986。
- [5] Jordan D. C.: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology 9ed. p. 234—254, 1983.