

八株芽孢杆菌菌株的分类及固氮活性的测定

许齐放 黄秀梨

(北京师范大学生物系 北京 100875)

陈廷伟

(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)

摘要 从8个省市的不同土壤分离了200个菌株,筛选出8株(JR₁, JR₂, JR₅, ZZ₃, ZZ₁₂, ZZ₁₆, M₁, K₄)能在无氮培养基上生长良好的典型的芽孢杆菌,其中6株(JR₁, JR₂, JR₅和 ZZ₃, ZZ₁₂, ZZ₁₆)具有较高固氮活性。根据形态学和36个生理生化实验及G+C含量测定,3株(JR₁, JR₂, JR₅)鉴定为固氮芽孢杆菌(*Bacillus azotofixans*),但过氧化氢酶反应弱阳性,水解淀粉能力强,产结晶糊精;对0.001%溶菌酶具有抗性特征不同于ATCC 35681;其余3株(ZZ₃, ZZ₁₂, ZZ₁₆)在形态学上和生理生化反应上与两标准菌株的性质差别较大,11个特性不同于ATCC 35681,7个特性不同于ATCC 842:1株(M₁)在所有测试项目上都与ATCC 842相符,因而将其归入*Bacillus polymyxa*; K₄细菌糖发酵弱,水解淀粉、酪素,抗盐性弱不同于ATCC 35681。JR₁与ATCC 35681有相同的生长曲线,而ZZ₁₂延缓期短,具有不同的生长曲线。

关键词 芽孢杆菌固氮菌株,乙炔还原活性,鉴定,多粘芽孢杆菌,固氮芽孢杆菌

分类号 Q93-939

近年来,由于氮肥的匮乏及土壤因大量施用化肥所造成的污染,世界各国对生物固氮或菌肥越来越重视。由于一般的无芽孢固氮菌在自然界土壤中大量存在,在实验室条件下易得到分离菌株,固氮活性高容易测定,因而对其研究较早也较深入。有芽孢固氮菌包括固氮的芽孢梭菌和固氮的芽孢杆菌^[1,2],自1958年,Hino从日本土壤中分离到一株能有效固氮的芽孢杆菌后,许多国家陆续从土壤中分离到一些固氮芽孢杆菌^[4-5]。土壤中新发现的芽孢杆菌固氮菌株的种类越来越多,可能意味着此类菌在自然界氮素的供应上起着重要作用^[5-6,10]。

我国目前对有芽孢固氮菌的研究较少,所用芽孢菌肥均限于菌种的解磷解钾作用。本文以对农业提供高效固氮的芽孢杆菌为目的,从我国土壤中筛选有较高固氮活性的芽孢杆菌菌株,测定其乙炔还原活性,进行种水平上的分类。

1 材料与方 法

1.1 土壤及菌株来源

北京、江西、浙江、安徽、四川的旱地及水田土,陕西、河南、河北的农田土,共30个样品。

菌株 ATCC35681(*Bacillus azotofixans* P3L-5), ATCC842(*Bacillus polymyxa*) 来自美国菌种保藏中心;菌株92076(*Bacillus polymyxa*) 来自武汉大学微生物室;菌株96094(*Azotobacter chroococcum*) 为中国农业科学院土壤肥料研究所保存菌种;JR₁, JR₂, JR₅, ZZ₃, ZZ₁₂, ZZ₁₆, M₁和 K₄为土壤分离菌。

1.2 菌株的分离与纯化

常规方法分离得到菌落后,从无氮Hino培养基^[3]转接到0.01%酵母膏Hino培养基斜面

* 现在国家饲料质量监督检测中心(北京)

上,扩增,涂片,用碱性复红染色,镜检为单一形态,4℃冰箱保存。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态学特征及生理生化实验:一般形态学特征及生理生化实验指标见参考文献 Gordon等^[7]。所有形态学实验均以 ATCC 35681 (*Bacillus azotofixans*)和 ATCC 842 (*Bacillus polymyxa*)为参照菌株。

1.3.2 抗性标记实验:常规方法。

1.3.3 DNA提取和 Tm 分析

提取:改进的 GB 培养基:甘露醇 10g,蛋白胨 5g,牛肉膏 1g,酵母膏 1g,NaCl 5g,无离子水 1L,pH 7.0。用甘露醇代替葡萄糖和蔗糖,可避免因产生大量粘液而影响菌体的收集及破壁。DNA 提取方法按 Marmur^[2],并稍有改进。

测定:DNA 的 G+C 含量用热变性法测定。G+C 含量用 Marmur 和 Doty 公式^[6]计算。共分析了 4 株菌株的 DNA 的 Tm 值。这些菌株为 JR₁, ZZ₁₂, M₁, K₄。同时还参照了对照 ATCC 842 和 ATCC 35681 菌株的 Tm 值。无蛋白质并用 RNase 处理后的 *E. coli* DNA 作对照,其 Tm 值为 74.3℃,相当于 G+C 含量为 49.8mol%。

1.3.4 固氮能力的测定

乙炔还原活性的测定^[5]。以 *Azotobacter chroococcum* 96094 和 ATCC 35681 作为阳性对照,*B. polymyxa* 92076 为阴性对照。测定每管乙烯生成量,并测其各管菌体的蛋白量,计算出菌的固氮效率(nmolC₂H₄ / mg 蛋白 · h)。

总氮量的测定^[10]。凯氏定氮实验有厌氧与好氧两个对照处理。

1.3.5 固体斜面上菌体的蛋白量的测定:用生理盐水将斜面菌体洗下,制成菌悬液。取 100μl 悬液加入 100μl 0.5mol / L NaOH 沸水浴 5min 后,加入 100μl 0.5mol / L HCl,再加 5mlG₂₅₀ 考马斯亮蓝染液染色,振荡均匀,显色 5min 后,在 752C 型分光光度计上 A_{595nm} 测蛋白浓度,计算出每一管斜面的蛋白量。

2 结果

选择了六株有高固氮活性的芽孢杆菌

(JR₁, JR₂, JR₅ 和 ZZ₃, ZZ₁₂, ZZ₁₆)及一株现今在农业生产上推广使用的钾细菌菌株(K₄)和一株与 ATCC 842 极其相似的芽孢杆菌(M₁)作为研究对象。这八株菌株菌体均为杆状,形成芽孢,属芽孢杆菌属。分为两类,一类具高固氮活性,又根据其形态学特征分为两组, JR 类和 ZZ 类;另一类为弱固氮活性,从形态学特征得到两种,钾细菌类(K₄)和 M₁类。

2.1 分类学特征

2.1.1 形态学特征: JR 类菌在 0.01% 酵母膏 Hino 琼脂斜面上,菌落半透明,30h 后菌落中间就有白色斑点出现,此斑点由大量孢子囊或芽孢组成,培养一周后,斜面上菌基本变成白色块状,完全形成芽孢。ZZ 类菌在 0.05% 酵母膏 Hino 培养液中,菌体大量繁殖,以短杆状或链状存在。30h 后形成芽孢。在 0.1% 酵母膏平皿上,菌落隆起,光滑,带金属光泽。在肉汤培养液和葡萄糖营养液 (GB) 中菌体梭形或卵圆形,生长浑浊,出现絮状沉淀;肉汤琼脂培养基上菌落小,带金属光泽。M₁ 菌株在扫描电镜下芽孢具有明显的纵沟。含有少量酵母膏时(0.01% 或 0.05%),生长旺盛,菌落大,培养基内有 0.5% 酵母膏时,菌落白色,厚而有皱折,边缘整齐,有三到五个同心圆。K₄ 为典型的钾细菌,菌体外有大荚膜,原生质体内有不着色颗粒。在 0.5% 酵母膏 Hino 培养基或肉汤培养基和肉汤培养液中均不生长,此菌在很多液体或半固体培养基中均生长不好。0.05% 酵母膏 Hino 培养液中,菌体外只有小荚膜或没有。

2.1.2 生理生化特性(表 2): JR 类菌在 4 个实验上(过氧化氢酶反应弱阳性,水解淀粉能力强,产结晶糊精,对 0.001% 溶菌酶具有抗性)不同于 ATCC 35681;11 个特性(均属阴性):过氧化氢酶反应,发酵乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、甘油,水解明胶,从甘油产二羟丙酮,分解卵磷脂,还原硝酸盐不同于 ATCC 842,其 G+Cmol% 为 45.5。ZZ 类菌在 8 个项目上不同于 ATCC842:幼菌革兰氏染色阴性,发酵山梨醇产酸产气,弱水解淀粉,弱水解酪氨酸,不水解酪素,利用柠檬酸盐,耐 5%、7%NaCl 培养液;在

表1 四类分离菌株及两标准菌株的形态学特征

	ATCC 842	ATCC 35681	JR	ZZ	M ₁	K ₄
菌体	杆状,具运动性,革兰氏染色可变,0.8—1.2 × 2.6—3.5 μm	直杆状,革兰氏染色可变,0.8—0.9 × 3—6 μm	直杆状,具运动性,革兰氏染色可变,0.8—0.9 × 2.7—3.4 μm	短杆状,具运动性,革兰氏染色阴性,0.3—0.7 × 1.7—2.5 μm	直杆状,具运动性,革兰氏染色可变,0.7—1.2 × 2.7—3.5 μm	直杆状,大荚膜,革兰氏染色阳性,1.0—1.5 × 3.1—3.6 μm
孢子囊	膨大,成梭形	膨大,梭形,有荚膜	膨大,梭形,有荚膜	膨大不明显	微膨大,梭形	膨大不明显
芽孢	C—T	C—ST	C—ST	C—T	C—T	
菌落	小,透明,隆起,有时分枝状	半透明,粘性,奶油状质地,一周后变厚变浑浊,有三到五个同心圆,圆形微不规则	透明,奶油状质地,隆起,边缘整齐或有分枝状扩展,三天后,菌落变厚白色,三到五个同心圆	大,透明,隆起,边缘整齐或稍不规则,一周后中间出现浑浊,渐变白变厚,有同心圆	小,透明,隆起,有时有分枝状扩散	透明,成半玻璃珠状,粘稠,隆起
肉汤培养	生长弱,有沉淀	不生长	生长极弱或不生长	生长弱,出现沉淀	生长弱,有沉淀	不生长
液生长	生长弱	不生长	不生长	生长弱	生长弱	不生长
肉汤琼脂	生长弱	不生长	不生长	生长弱	生长弱	不生长
斜面						

C—T: 中生到端生, C—ST: 中生到次端生, CT—T: 次端生到端生

* 在无氮培养基或0.01%酵母膏培养基上的菌落形态

JR——江西, ZZ——浙江, M₁, K₄——北京

15个实验上(除幼菌革兰氏反应阴性,其余均为阳性)不同于ATCC35681: 发酵乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、甘油, 水解明胶, 从甘油产二羟丙酮, 分解卵磷脂, 利用柠檬酸盐, 还原硝酸盐, 对5%、7% NaCl的抗性, 对0.001%溶菌酶的抗性, G+Cmol%为58.5。M₁在所有生理生化指标上均与ATCC 842一致, G+Cmol%为41.8。K₄发酵所有的糖都弱, 20d后才弱变色(对照不变色), 专性好氧生长, 其余6项指标(均为负特征)不同于ATCC 842: 水解明胶, 从甘油产二羟丙酮, 分解卵磷脂, 还原硝酸盐, 在1% NaCl、2% NaCl培养液中生长情况; 有三项不同于ATCC 35681: 水解淀粉, 水解酪素, 不耐盐, G+Cmol%为35.6。

在对青霉素钠、链霉素的抗性实验中, ZZ₁₂和K₄细菌在有4单位/ml青霉素钠培养基上生长旺盛, 对青霉素钠具有抗性, 而对链霉素抗

性弱, 只在平皿上形成小而稀的菌落; M₁及ATCC 842对两种抗生素均无抗性, JR₁和ATCC 35681在两种抗生素培养基上只有微弱生长, 菌落小。

2.2 固氮

2.2.1 菌株的乙炔还原活性(表3):

JR类菌及ZZ类菌能有效地还原乙炔, 在无氮培养基上值范围为410—781 nmol C₂H₄ / 5ml · h, 每毫克蛋白还原的乙烯量为935.3—4693.1 nmol / h; 而在0.01%酵母膏Hino培养基上, 值范围为537.7—1586.3 nmol C₂H₄ / 5ml · h, 每毫克蛋白还原乙烯量为1726.4—6755.5 nmol / h, 与标准菌株ATCC 35681相差不大。由于JR类、ZZ类菌株在斜面上好氧生长情况明显好于ATCC 35681, 平均每管蛋白量(238.4—415.6 μg)大于ATCC 35681(101.4 μg), 因而每管培养物的乙炔还原活性高于标准菌株。JR

表2 六菌株的生理生化实验

	ATCC 842	ATCC 35681	JR	ZZ	M ₁	K ₄
过氧化氢酶反应	+	+	微弱阳性	+	+	+
革兰氏染色反应*	+	+	+	-	+	+
糖发酵实验						
D(+)-蔗糖	++	++	++	++	++	+/-
D(+)-葡萄糖	++	++	++	++	++	+/-
D(+)-果糖	++	++	++	++	++	+/-
D(+)-甘露醇	++	++	++	++	++	+/-
D(+)-麦芽糖	++	++	++	++	++	--
D(+)-山梨醇	--	++	++	++	--	+/-
D(+)-乳糖	++	--	--	++	++	+/-
D(+)-半乳糖	++	++	++	++	++	+/-
L(+)-阿拉伯糖	++	--	--	++	++	+/-
D(-)-木糖	++	--	--	++	++	+/-
D(+)-核糖	++	--	--	++	++	+/-
甘油	++	--	--	++	++	--
D(+)-纤维二糖	++	++	++	++	++	--
淀粉水解	+(强)	菌落下水解	+(强)	菌落下水解	+	+
产结晶糊精	-	-	+	-	-	+
M.R.实验	+	-	-	+	+	+
V.P.实验(pH)	+(4.3)	+(6.3)	+(6.3)	+(4.5)	+(4.3)	+(5.3)
明胶水解	+	-	-	+	+	-
甘油产二羟丙酮	+	-	-	+	+	-
酪氨酸水解	-	-	-	菌落下水解	-	-
酪素水解	+	-	-	+	+	-
卵磷脂实验	+	-	-	+	+	-
石蕊牛奶反应	酸凝	还原	还原	酸凝	酸凝	还原
柠檬酸盐利用	-	-	-	+	-	-
硝酸盐还原耐盐性实验	+	-	-	+	+	-
1%NaCl	+	+	+	+	+	+
2%NaCl	+	+	+	+	+	-
5%NaCl	-	-	-	+	-	-
7%NaCl	-	-	-	+	-	-
0.001%溶菌酶抗性	+/-	-	+	+	+/-	-
好氧生长情况	兼性	兼性	兼性	兼性	兼性	好氧
生长在pH5.7培养基上	+	+	+	+	+	-
DNA的G+Cmol%	45.6 (43.1~45.6)	51.6 (47.9~52.5)	45.4	58.5	41.8	35.6

实验结果为2次实验3个重复的现象和数据。*革兰氏染色为18h幼菌的反应 ++, 产酸产气; +/-, 产酸不产气; ---, 不产酸也不产气。+, 阳性; -, 阴性; +/-, 生长较弱。

类、ZZ类及 ATCC 35681 在 0.01% 酵母膏培养基上乙炔还原活性较在无氮培养基上为高。M₁和 K₄ 细菌只有弱乙炔还原活性, 为 6.8—29.2nmolC₂H₄ / 5ml / hr 并且活性不稳定。
2.2.2 凯氏定氮法测总氮量: 选择 JR₁, ZZ₁₂ 测

其固氮量, JR₁ 在完全好氧时固氮量为 2.64mg N / g 葡萄糖, 而厌氧时为 3.42mg N / g 葡萄糖, 比好氧时高 29.5%; ZZ₁₂ 在完全好氧时固氮量为 2.15mg N / g 葡萄糖, 厌氧时则为 2.83mg N / g 葡萄糖, 比好氧时高 31.6%。可见

表3 各固氮菌株的乙炔还原活性

菌株	无氮培养基		0.01%酵母膏培养基		凯氏定氮量 mgN/ g 葡萄糖
	nmolC ₂ H ₄ / 5ml · h	nmolC ₂ H ₄ / mg 蛋白 · h	nmolC ₂ H ₄ / 5ml · h	nmolC ₂ H ₄ / mg 蛋白 · h	
35681	432.2±71.4	2337.0±194.4	1009.3±455.5	9767.5±4418.8	3.8*
JR ₁	509.2±85.8	4693.1±953.5	1586.3±562.4	6755.5±3110.0	3.42
JR ₂	410.3±111.4		1390.9±479.2	4233.9±2032.3	
JR ₃	579.2±315.8		1245.1±255.6	3416.0±2354.8	
ZZ ₃	718.4±825.3				
ZZ ₁₂	781.3±573.6	935.3±213.8	537.9±174.7	1746.4±576.2	2.83
ZZ ₁₆	421.9±321.7		703.8±315.8	1924.5±566.5	

数据为五次实验的平均值±方差

*见文献[1]

两菌株在半固体培养基上完全好氧时也能有效地固定大气中的氮气。

2.3 生长曲线

在 Hino 培养液中可见 JR₁、ATCC 35681 有相同的生长曲线,而 ZZ₁₂ 延缓期短,浊度大,具有不同的生长曲线。

3. 讨论

3.1 四类菌的分类地位

JR 类菌株虽然 4 个生化特征不同于 ATCC 35681,但其形态学特征与 ATCC 35681 一致,具有不能发酵 4 种糖及甘油等 *B. azotofixans* 的典型生化特征,GC 含量与 *B. azotofixans* 的 GC 含量相近,两者都具有高固氮活性及相同的生长曲线,因而 JR 类菌归入 *B. azotofixans* 种是合理的。*B. azotofixans* 种的菌株除了在巴西、日本、埃及等国家的土壤中存在外,在我国土壤中也有存在,说明 *B. azotofixans* 在自然界广泛存在。因而将这一群与 *B. polymyxa* 相近但在糖发酵及高固氮活性方面又与 *B. polymyxa* 不同的菌株另立为一个种是合理的^[11]。

ZZ 菌在许多主要生化反应上与 ATCC 842 一致,但 GC 含量较 *B. polymyxa* 种 GC 含量高,好氧固氮,并且在菌体形态上亦与 *B. polymyxa* 不一致。其分类学特性与伯杰氏系统手册上描述的任何种都不一致^[9],因而 ZZ 类菌的分类学地位还有待于进一步的研究。

M 类菌体无论在形态学上还是所做的生理

生化实验上均与 ATCC 842 一致,乙炔还原能力弱,不稳定,因而将 M 类归于 *B. polymyxa*。此类 M 菌的发现并鉴定,说明 *B. polymyxa* 菌在土壤中广泛存在着,并且其分类学特征相当稳定,并不随区域的巨大差异而变化,这些与 Sedin^[11] 报道的结果一致。这些结论也为 *B. azotofixans* 种的建立提供了另一方面的证据。

我国北方土壤中广泛存在着一种在无氮或硅酸盐培养基上产生大量粘液的芽孢杆菌菌株,由于其能解磷解钾而将其命名为钾细菌。在我国菌种目录上为胶冻样芽孢杆菌硅酸盐亚种 (*Bacillus mucilaginosus* sp.), 菌种标号为 ATCC 10012(10013、10014)^[12]。本实验结果表明钾细菌在许多生化反应上不同于 ATCC 842,GC 含量也不符合,因而不属于 *B. polymyxa*。但其菌体和芽孢较大,原生质体内有不着色颗粒,专性好氧生长,这些基本特性与巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 相同,并且 K₂ 的 G + Cm1% 为 35.6,刚好落在巨大芽孢杆菌的 GC 含量范围(33~38)内^[9],但 V.P 阳性这个主要特征区别于巨大芽孢杆菌,因而钾细菌的归属问题也有待于进一步研究。

3.2 菌株固氮能力的比较

目前世界上分离到的固氮菌株,应用最广泛的是 *Azotobacter* 和 *Azospirillum*。从中国农科院内土壤中分离到的一株自生固氮菌(94095),测其乙炔还原活性为 2245.6 ± 4444.7nmolC₂H₄ / 5ml · h,方差很大,表明固氮活性并不稳定,凯

氏定氮法发现黑色固氮菌 (*A. nigricans*) 与 *B. azotofixans* 有相近的固氮量^[10]。本实验所分离到的 JR 类和 ZZ 类菌株的固氮量与厌氧梭状芽孢菌株 (*Clostridium*) 和 *B. azotofixans* 的菌株的固氮量相近。另外, JR 类和 ZZ 类菌除在厌氧条件下固氮, 还能在完全好氧时固氮。

致谢: 本论文的完成得到中国科学院微生物所蔡妙英先生及中国农业科学院原子能所傅仓生先生的指导, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Winogradsky S. Arch Sci Biol, 1895, 4: 297~352.
- [2] Bredeman G. Zbl B akteriell Parasitenkd Abt, 1908, II 22: 44~89.
- [3] Hino S, Wilson P W. J Bacterio, 1958, 75: 405~408.
- [4] Marmur J. J Mol Biol, 1961, 3: 205~218.
- [5] Seldin L, Elsas V J D, Penido E G C. Plant and Soil, 1983, 70: 243~255.
- [6] Jurgensen M F. J Soil Sci, 1973, 24(4): 512~522.
- [7] Gordon R E. The Genus Bacillus Agriculture Handbook 427, 1973. Agriculture Research Service U. S. Department of Agriculture Washington D. C.
- [8] Marmur J, Doty P. Nature, 1959, 183: 1427.
- [9] Krieg N R, Holt J G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore / London, 1986, vol.2: 1114~1141.
- [10] 崔宗均, 石铁源. 第一届全国青年作物栽培作物生理学术会文集. 北京: 中国科学技术出版社, 1996. 161~164.
- [11] Seldin L, Penido E G C. Ann Acad Bras Ci, 1990, 62: 85~94.
- [12] 中国微生物菌种保藏管理委员会编著. 中国菌种目录. 北京: 轻工业出版社: 1983, 57.

THE ISOLATION IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF THE NITROGEN-FIXING ABILITIES OF EIGHT *BACILLUS* STRAINS

Xu Qifang Huang Xiuli

(Department of biology, Beijing Normal University, Beijing, 100875)

Chen Tingwei

(Institute of Soil and Fertilizer, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing, 100081)

Abstract The soils from Beijing municipality and seven provinces in Chinese were examined for the incidence of *Bacillus* nitrogen-fixer. Only six strains of two hundreds isolated strains were able to reduce acetylene. Eight strains which grew well on nitrogen-free medium. According to the morphological and thirty-six biochemical characteristics and G + Cm%, three strains (JR₁, JR₂, JR₃) were identified as *Bacillus azotofixans*, but were different to four biochemical tests from ATCC 35681; three strains (ZZ₃, ZZ₁₂, ZZ₁₅) were different from two type strains on morphological and biochemical tests, eleven characteristics it from ATCC 35681, seven tests from ATCC 842; M₁ strain was identified as *Bacillus polymyxa*, because it's taxonomical characteristics were consistent with ATCC 842; K₄ strain was deferent from ATCC 35681 on which fermentation of carbohydrates, hydrolysis of starch and casin, resistance to salt. The growth curve of JR₁ strain was identical to ATCC 35681, while the lag period of ZZ₁₂ strain was shorter and culture solution was turbier.

Key words *Bacillus* nitrogen-fixer, Acetylene-reducing activity, Identify, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus azotofixans*