

荚膜红细菌的分离鉴定及其协同固氮作用

朱美珍 吴永强

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘要: 从上海南汇县的水稻根系中分离得到一株光合固氮菌 SDH2, 经形态、细胞膜结构、生理生化等特征的分析鉴定, 以伯杰细菌鉴定手册第九版和 JF Imhoff 的光合硫细菌和绿硫细菌的生理学和分类^[1]一文为依据, 确定该菌为荚膜红细菌 *Rhodobacter capsulatus*。同时, 发现该菌与水稻根表的其它固氮菌之间具有协同生长和协同固氮效应。

关键词: 荚膜红细菌, 水稻根系, 协同固氮

中图分类号: N39, Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-05-0342-03

STUDIES ON THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *RHODOBACTER CAPSULATUS* AND THE ACCELERATION OF ITS NITROGEN FIXATION

ZHU Meizhen WU Yongqiang

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200032)

Abstract: A pure culture (strain SDH2) of N_2 -fixing photosynthetic bacteria was isolated from the rice root in the suburb of Shanghai. On the bases of morphological, physiological and biochemical characteristics, as well as the analysis of the structure of internal photosynthetic membrane we propose the strain SDH2 for *Rhodobacter capsulatus* according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (ninth edition) and JF Imhoff's Taxonomy and physiology of Phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria. Growth and nitrogen fixation activity of SDH2 were accelerated in co-cultures with other two nitrogen-fixing bacteria, SDB4 and SDB6.

Key word: *Rhodobacter capsulatus*, Rice root, Associative nitrogen fixation

光合细菌在农业上的应用研究引人关注。据报道有些光合菌具有氧化硫化氢的特性, 可能对防治水稻黑根有利, 同时光合菌分泌的一些物质, 能促进花蕾和果实的形成, 并使果实长得更丰满^[2]。光合菌具有固氮酶活性, 在改善土壤氮素营养方面亦起到积极作用。本文从上海郊区水稻的根表分离了光合菌, 进行了属和种的鉴定。同时, 研究了这株光合菌与依附于水稻根表的其它固氮菌在生长和固氮活性上的协同作用。

1 材料与方法

1.1 菌种的分离

从上海南汇县的稻田中, 选拔长势好的水稻植株。洗净后取其根系, 再用无菌水洗, 将根系压碎后放入 Rr 培养基中, 光照厌氧培养富集后涂平皿纯化菌落。光合菌单菌落在厌氧罐中纯化培养, 获得了 SDH2 菌株。另外还筛选出

收稿日期: 1998-07-10, 修回日期: 1998-11-09

两株非光合固氮菌菌株 SDB4 和 SDB6, 它们能在无氮培养基上生长, 目前尚未做分类鉴定。

1.2 培养基和培养条件

培养 SDH2 采用 RCVBN(简称 Rr)培养基^[3], 光照(光照强度 2000~2500xL)或暗好氧培养; 培养 SDB4 和 SDB6 用蔗糖无氮培养基^[4]静止培养, 或加铵盐好氧培养; YPS 培养基按文献^[5], 培养温度均为 28℃。

1.3 酶活性测定

用气相层析法测定固氮酶和氢酶活性^[6]。

1.4 形态观察

用电子显微镜(型号 JEM-100CX II)确定个体形态大小、繁殖方式、鞭毛及内膜结构类型。用光学显微镜观察排列方式。

1.5 细胞吸收光谱的测定

细胞悬浮于 60% 的蔗糖溶液中, 于贝克曼 DU-70 分光光度计上扫描, 扫描波长为 300~900nm。

1.6 生理生化特性鉴定

有机碳源利用和生长因子需求试验按吴永强^[5]的。硫化物或硫代硫酸钠无机电子供体的利用参照杨淑萍^[7], 培养基中含 0.5mmol/L 硫酸盐, 0.1% 氯化铵, 0.1% 碳酸氢钠, 0.01% 酵母膏和 0~2mmol/L 硫化物或硫代硫酸钠。硫酸盐的同化试验, 以铵盐为氮源的不含硫酸根的 Rr 培养基, 加 0~0.5mmol/L 硫酸盐, 观察生长情况。DNA 的 G+Cmol% 按 EP Geiduschek^[8]方法测定, 以 51% 甲醇为溶剂。其它采用细菌常规方法测定^[9]。

1.7 菌株

浑球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)菌株 601 由澳大利亚 JM Pemberton 博士惠赠, 菌株 6001 是带 R_{if} 抗性的 601 菌株; 荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)菌株 B10 由 P M Vignais 博士惠赠^[10]。

2 结果与讨论

2.1 菌种的鉴定

2.1.1 形态和培养特征: 菌株 SDH2 为革兰氏阴性细菌, 光合内膜结构呈囊状, 细胞以二分

裂繁殖, 短杆形, 体积 0.5~0.8μm × 1.0~2.0μm, 靠极生鞭毛运动。在光学显微镜下观察到: 好气培养的细胞呈单或两个和多个叠在一起排列; 厌氧光照培养的细胞则以两个或多个成链状排列, 有荚膜。

SDH2 在 YPS 培养基平皿上生长, 4d 菌落大小 1mm 左右, 圆而光滑, 呈玫瑰红色。以 Rr 为培养基, 光照厌氧下培养液呈紫红棕色, 好氧下呈淡红棕色。

2.1.2 色素成份: 以菌株 6001 和 B10 为对照样品, 进行活细胞吸收光谱分析, 测得 SDH2 的吸收光谱图与 6001 和 B10 的完全相同。在 378, 590, 802 和 856nm 处有吸收峰, 说明存在细菌叶绿素 a; 同时在 511 和 478nm 处吸收峰及在 455nm 处有一峰肩, 说明出现类胡萝卜素的吸收光谱特征。

2.1.3 生理生化特征: SDH2 需要硫胺素作为生长因子, 能以 H₂ 为电子供体营光合自养生长; 能以硫化物但不能以硫代硫酸钠作为电子供体, 可以同化硫酸盐; 可利用丙酸盐, 但不能利用甘油等碳源生长(表 1), 这与荚膜红细菌相同而与浑球红细菌略有不同; SDH2 以铵盐或谷氨酸作为最好的氮源, 并能固定大气氮; 在光照厌氧以谷氨酸为氮源生长时, 具有固氮酶和吸氢酶活性; 其 DNAG+Cmol 含量为 66.37%。

从以上结果, 按伯杰细菌鉴定手册第九版分析结果如下, 由 SDH2 的细胞形态、生长因子、繁殖方式及光合内膜结构类型等特征决定了, 它属于 *Rhodobacter* 属。在该属中已报道的 6 个种中, 由于 SDH2 细胞运动, 不需氯化钠, 以及它的特定的碳源和生长因子利用(表 1)等性质, SDH2 应归属为荚膜红细菌(*R. capsulatus*)。

2.2 SDH2 与 SDB4 或 SDB6 的协同生长和协同固氮效应

SDH2 在无硫胺素的培养基中不能生长, 当其分别与 SDB4 或 SDB6 菌株混合培养时却能生长。说明 SDB4 和 SDB6 菌为光合菌提供了必需的生长因子硫胺素或其衍生物。其次,

表1 SDH2在各种碳源和不同维生素
培养基上生长情况*

碳源 (0.3%)	维生素**	SDH2	浑球红细菌 601	荚膜红细菌 B01
甘油	B, A, Bi, N	-	+	-
酒石酸	B, A, Bi, N	-	+	-
柠檬酸钠	B, A, Bi, N	-	-	-
甘露醇	B, A, Bi, N	-	+	-
葡萄糖酸	B, A, Bi, N	-	+	-
丙酸钠	B, A, Bi, N	+	-	+
苹果酸	B	+	-	+
苹果酸	B, A	+	-	+
苹果酸	B, A, Bi	+	-	+
苹果酸	B, Bi, N	+	+	+
苹果酸	A, Bi, N	-	-	-
苹果酸	B, A, Bi, N	+	+	+
苹果酸	无维生素	-	-	-

* +: 生长, -: 不生长 **B: 硫胺素, A: 氨基苯甲酸, Bi: 生物素, N: 菸酸

SDH2 不能利用柠檬酸、酒石酸等碳源, 当它与 SDB4 混合培养时生长良好(表略)。这表明: 光合菌不能利用的碳源经 SDB4 利用后, 其代谢产物又为光合菌所利用。试验表明混合培养的固氮酶活性也大大提高了(表 2)。

表2 不同培养条件下固氮菌共培养时的固氮活性*

生长条件**	菌 株				
	SDH2	SDB4	SDB6	SDH2+ SDB4	SDH2+ SDH6
I	0.76	0.00	0.00	3.76	1.73
II	0.00	2.10	1.04	3.37	17.52
III	0.00	0.97	1.51	1.34	1.08

* 固氮酶活性($\mu\text{mol} / \text{h}^{-1} \text{ml}^{-1}$)
** I: 光照厌氧, 用 Rr 培养基 II: 光照微好氧和 III: 暗好氧生长, 用蔗糖无氮培养基

Kobayashi 曾报道自生固氮菌或巨大芽孢杆菌对光合菌生长及固氮活性有促进作用^[2]。从以上结果可知水稻根际表面分离的非光合固

氮菌 SDB4 和 SDB6 对光合菌 *R. capsulatus* 菌株 SDH2 也有非常明显的促进生长和增加固氮作用。根际固氮菌之间的相互依存, 可能在水稻的联合固氮上具有一定的意义。各种菌种需要的营养成分不同, 不同水稻品种的根分泌物也不一样, 由此产生了固氮菌对水稻品种的选择性, 而混合菌种的协同生长有可能削弱这种选择性, 在扩大其适用性并形成高效联合固氮作用方面具有潜力。

致谢 感谢张林祥老师给予技术上的帮助, 感谢郭一松老师娴熟的电镜技能分析确定了细胞的微观形态。

参 考 文 献

[1] Imhoff J F Taxnomy and Physiology of Photorophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria In: Blankenship, R E Madigan, M T Bauer C E (eds). Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, London: Kluwer Academic Publishers, 1995, 1~15.

[2] Kobayashi M. Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototrophic Bacteria. In: Blankenship, R E Madigan, M T Bauer C E (eds). Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, London: Kluwer Academic Publishers, 1995, 1270~1271.

[3] Weaver P F, Wall J D, Gest H. Arch Microbiol, 1975, 105: 207~216.

[4] 朱美珍, 吴永强. 植物生理通讯, 1991, 27(1): 74.

[5] 吴永强, 郁金麟, 宋鸿遇; 等. 微生物学通报, 1984, 11(1): 17~20.

[6] 吴永强, 朱美珍, 梁建光等. 植物生理学报, 1996, 22(3): 209~217.

[7] 杨淑萍, 张肇铭. 微生物学报, 1996, 35(2): 91~96.

[8] Geiduschek. E P J Mol Biol, 1962, 4: 464~487.

[9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.

[10] Hubner P, Willison J C *et al.* J. Bacteriol., 1991, 173(9): 2993~2999.

致 读 者

有欲订 1999 年或以前本刊的读者, 请与编辑部联系, 电话: 62630421, 传真: 82626208