

简报

从海洋中分离的一个固氮菌新变种

陈世陽 李 萱

(山东海洋学院)

在文献中尚很少記載关于海洋中固氮菌的资料,本文是报导我們从海洋中分离好气性固氮菌的方法及对所得菌株进行鉴定的初步結果。

由于我們对海洋固氮菌的分布及生态特征尚不够了解,所以在分离过程中,先后多次采取胶州湾不同地区的各层海水作为检样,先以細菌过滤器将海水进行浓缩,继以海水制备的 Ashby's 培养基用液体法和固体法进行丰富培养,但都没有成功,只是在平面上出现几个类似一般需少氮微生物 (Oligonitrophiles) 的无色小菌落。后来又采取低潮綫下的沉积泥沙为样品,用土粒接种法在上述无氮琼脂平面上进行丰富培养,經 4—5 天后,在个别土粒旁边开始出现黄白色的菌落,培养一周后,涂片检查发现有革兰氏阴性反应的较大球形菌,但混杂有大量的弧菌和小杆菌等。

在純化过程中,我們利用各种碳源对固氮菌发育有不同影响的特点,选用多种碳源作了比較,結果发现在含有 0.2% 安息香酸鈉的培养基上,虽生长情况較其他碳源为差,但經 6—7 天后,即有白色,中間高凸周围变黑的典型菌落出现,此种菌落經涂片染色检查,大都为革兰氏阴性的球形菌,杂菌則較少見。因此我們认为在初分离海洋需氧性自生固氮菌时,以 0.2% 的安息香酸鈉作碳源較适宜,可能对杂菌有一定的抑制作用,而便于菌落的識別与純化。

我們用这种方法从胶州湾浅海泥沙中分离到 3 个类似的菌株,这 3 个菌株在形态、大小、色素和对各种碳源的利用情况都很相似,因此,最后只选择了其中一个菌株作进一步的研究。

鉴定菌种所用的培养基有:

1. 綜合修正培养液: 甘露醇 10 克、 K_2HPO_4 0.5 克、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 克、 $CaCO_3$ 5 克、过滤海

水 1,000 毫升, pH 7.8。

2. 各种碳源琼脂平面: 分別以甘露醇、葡萄糖、蔗糖、甘油、乙醇、糊精、淀粉、褐藻酸鈉、酒石酸鈉、醋酸鈣和安息香酸鈉等 11 种作为碳源,以綜合修正培养液为基础配制成琼脂平面,其中除安息香酸鈉用量为 0.2% 外,其余碳源均为 1.0%, 10 磅压力, 30 分钟灭菌。

3. 常用的 Ashby's 培养基(淡水制备的)。

4. 海水蛋白胨肉湯。

5. 不同含盐量 (NaCl) 和 pH 值的綜合修正培养液。

經过鉴定,我們从海洋中分离到該种海洋需氧性自生固氮菌的主要特征是:

細胞呈圓形或橢圓形,直径为 1.8—2.5 微米,单个或两两相联,革兰氏阴性反应,有荚膜,暗視野下观察动力极强。

在正常的 Ashby's 培养基上不生长,在綜合修正培养基上发育迅速而丰富。在 25℃ 培养 36 小时后,即有黄白色粘稠菌落出现,菌落的顏色和大小随时间的增加而变化,一周后呈黑褐色,一般能增大至 8—10 毫米左右;所产生的色素在培养初期即开始渗入培养基中,使菌落的周围染成相应的顏色,如将后期培养物置于低温下則色素更为加深。在液体静置培养时,液面很快形成一层灰白色的浮膜,4 日后培养液即呈黄褐色的混浊液,能不同程度地利用各种不同碳源,每同化 1 克甘露醇可以固定 9.61—10.15 毫克氮素。

該菌株固氮作用的最适温度为 20—25℃,高于 30℃ 或低 10℃ 則固氮作用减弱;在培养基中最适 pH 值为 7.6 左右,最适含盐量 (NaCl) 为 3%,甚至含盐量增加到 6% 时仍能生长,在海水蛋白胨肉湯中生长微弱,但在淡水制备的培养基

上却完全不生长。

一般认为海洋细菌，特别是近海区生活的海洋细菌，有很大一部分是来自陆地或淡水中，由于它们逐渐适应了新的环境而得以在海洋中定居生活，我们从海洋中分离到这种固氮菌在形态上与 *Azo. galophilum* Suschkina 相似，但其固氮能力显然较强，而且能在海洋环境中适应生活。

根据 А. Е. Красс (1954) 对海洋细菌定名的意见，即是细菌主要特征与鉴定书上描述的种基本一致时便应属于此种，因此我们将分离到的这种海洋固氮菌定名为嗜盐自生固氮菌海洋变种

(*Azotobacter halophilum* var. *marinus* n. var.)。

参考文献

- [1] Waksman, S. A., Hotchkiss, M., Carey, C. L.: Marine bacteria and their rôle in the cycle of life in the sea, II. Bacteria concerned in the cycle of nitrogen in the sea. *Biol. Bull.*, **65**: 137—167, 1933.
- [2] Пшенин, Л. Н.: Количественное распределение азотфиксирующих бактерий и их экология в районе филофорного поля Зернова в Черном Море. *Микробиология*, **28** (6): 927—932, 1959.