

# 水稻根表固氮螺菌的鉴定

曾宽容 吴杰\* 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

**摘要** 作者从水稻根表分离获得一批固氮细菌, 对其中固氮活性较高的菌株 R<sub>38</sub> (固氮活性为 429.02n·mol·C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/ml·hr.) 进行形态特征和生理生化等特征的鉴定, 确定 R<sub>38</sub> 属于巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*)

**关键词** 根表固氮细菌; 固氮活性

固氮螺菌 (*Azospirillum*) 能与禾本科作物根系形成联合固氮, 近几年来作为一种新的固氮资源, 国外进行了大量的研究<sup>[1,2]</sup>。国内也开展了此项工作<sup>[3,4]</sup>, 但是, 在水稻根表获得 *Azospirillum* 属的菌株, 国内报道尚少。

作者从水稻根表分离获得一些固氮菌株, 对其中固氮活性为 429.02n·mol·C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/ml·hr. 的 R<sub>38</sub> 号菌株进行了鉴定, 其鉴定结果报道如下。

## 材料与方 法

1. 菌株: R<sub>38</sub>, 从湖北省农科院水稻田中的水稻根系分离获得。分离方法见文献 [3]。

2. 固氮活性的测定: 采用气相色谱仪测定乙炔还原乙烯的产量而定。

3. 鉴定方法: 参考《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[5]</sup>和《一般细菌常用的鉴定方法》<sup>[6]</sup>。

4. 培养基: 菌体形态观察用牛肉膏蛋白胨固体培养基和 Döbereiner 氏苹果酸钠培养基。深层培养观察用牛肉膏蛋白胨液体培养基和 Döbereiner 苹果酸钠半固体培养基。糖醇的氧化发酵试验用 Döbereiner 无机盐培养基为基础, 以其他的碳源代替苹果酸钠进行试验。其他鉴定项目所用的培养基参考《一般细菌常用鉴定方法》。

## 结 果

### (一) 形态特征

光学显微镜观察, 培养 48 小时的菌体, 革

兰氏阴性, 杆状, 大小为 0.9—1.0×1.1—2.2μm, 两端钝圆, 单个排列, 体内含聚 β-羟基丁酸颗粒, 培养 5—7 天菌体具有 1—2 个螺旋; 电镜观察, 具有极生单鞭毛, 运动(图 1, 2)。

### (二) 培养特征

在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上, 30℃ 培养 2 天, 菌落圆形, 表面光滑, 稍突起, 边缘整齐, 乳白色微黄, 直径 28mm。在苹果酸钠平板上, 30℃ 培养 2 天, 菌落圆形, 呈同心环状, 中间部分稍突起, 表面干燥, 乳白色, 直径为 2.5mm; 7—10 天的菌落, 中间部分暗绿色。牛肉膏蛋白胨琼脂斜面上的菌苔表面平坦光滑。苹果酸钠斜面上的菌苔生长较薄, 边缘有少数小突起和缺刻。在牛肉膏蛋白胨液体深层培养中, 表面菌膜呈絮状, 培养液稍混浊, 无沉淀。在苹果酸钠半固体的培养中, 菌体只在表面生长。在马铃薯斜面上生长的菌苔呈乳黄色或肉红色, 表面凸起。在金氏 (King) B 培养基上产生水溶性黄绿色荧光色素。

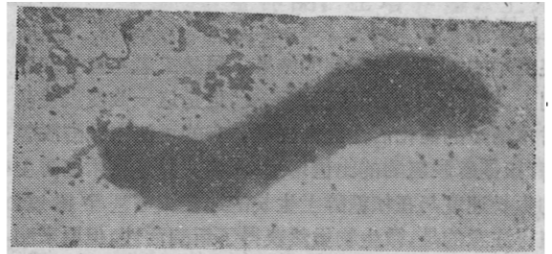


图 1 R<sub>38</sub> 菌株培养 5—7 天出现 1—2 个螺旋 (×11100)

\* 参加工作时为华中农业大学学生。

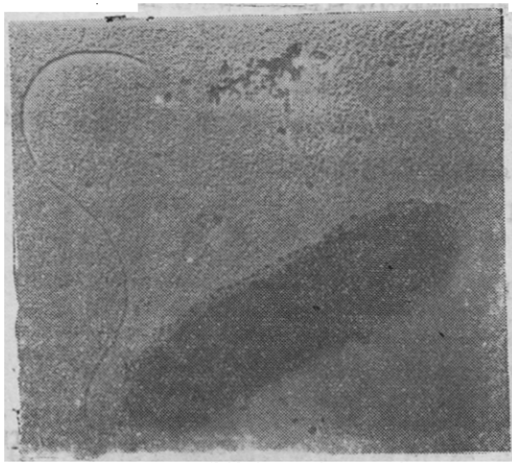


图2 R<sub>38</sub>菌株的鞭毛(×10000)

### (三) 生理生化特征

1. 氮源的利用: 试验结果见表1。

表1 氮源利用

氮源	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	酵母膏	牛肉膏	无氮
生长度	++	++	+++	+++	+

从表1可以看出, R<sub>38</sub>菌株能以 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 为唯一氮源; 在酵母膏, 牛肉膏培养基中生长更好。在无氮培养基上生长较弱。结果表明要发挥该菌株的固氮能力, 需要加少量的化合态氮作为起动力。这与 Watanabe 等人的结论一致<sup>[7]</sup>。

2. pH: R<sub>38</sub>菌在不同 pH 值中的生长情况见表2。

表2 R<sub>38</sub>在不同 pH 值中生长情况

pH	5.0	5.5	6.5	7.5	8.0	9.0	10.0
生长度	-	++	+++	+++	++	+	-

从表2可以看出 R<sub>38</sub>菌株, 生长 pH 范围为 5.5—9.0, pH6.5—7.5 为最适生长条件。

3. 生化反应: 试验结果见表3、4。

从表3可以看出, R<sub>38</sub>能利用多种碳源不产酸和气。开管比闭管生长好, 闭管主要是上部生长, 前述深层培养中该菌在上部和表面生长, 表明该菌是好气性细菌, 但在微好气情况下亦能生长。

表3 糖时氧化发酵试验

	开管			闭管		
	生长	产酸(碱)	产气	生长	产酸(碱)	产气
葡萄糖	++	-	-	+	-	-
半乳糖	++	-	-	+	-	-
果糖	++	-	-	+	-	-
阿拉伯糖	++	-	-	+	-	-
鼠李糖	++	-	-	+	-	-
山梨糖	++	-	-	+	微碱	-
乳糖	++	-	-	+	-	-
蔗糖	++	-	-	+	-	-
麦芽糖	++	-	-	+	微碱	-
淀粉	++	-	-	+	-	-
糊精	++	-	-	+	-	-
甘油	++	-	-	+	-	-
甘露醇	++	-	-	+	-	-
苹果酸钠	+++	产碱	-	++	产碱	-

注: 闭管加封石蜡油; 开管不加。闭管中菌在上部生长, 下部即使生长也十分微弱。“+”表示能生长; “++”表示生长较好; “+++”表示生长良好; “-”表示不产酸(碱)或气体。

表4 生化特征

项目	反应
氧化酶	+
接触酶	+
M. R 试验	-
V. P 试验	-
水解淀粉	-
产氨试验	+
硝酸盐还原	+
H <sub>2</sub> S 的产生	-
吲哚	-
明胶水解	-
水解果胶	-
柠檬酸盐利用	+

## 讨论

R<sub>38</sub>菌株革兰氏阴性, 培养48小时的菌体为杆状, 小大为 0.9—1.0×1.1—2.2 μm, 培养5—7天发育成1—2个螺旋; 菌体内含聚β-羟基丁酸颗粒; 以极生单鞭毛运动; 无粘液; 不从糖类产酸, 甲基红阴性, V. P 试验阴性, 硝酸盐还原阳性, 吲哚、淀粉酶阴性, 从半胱氨酸产硫化氢, 氧化酶、接触酶阳性, 好气性, 在微好气条件下固氮, 产生黄绿色荧光色素, 可利用氨盐

表5 *A. lipoferum* 和 *A. brasilense* 的区别

种	主要特点	蛋白胨 蔗糖培 养基	利用糖 类产酸 情况	特殊需要	细胞 直径 ( $\mu\text{m}$ )	螺旋出 现时间 (天)
<i>A. lipoferum</i>	发酵	由葡萄糖, 果糖, 核糖 产酸	需要生 长素 (biotin)	1.4— 1.7	1—2	
<i>A. brasilense</i>	不发酵	由葡萄糖, 果糖、核糖 不产酸	不需要生 长素	1.0	5天 以上	

作唯一氮源,不需要生长素。其形态特征和生理生化特征与“伯杰氏细菌鉴定手册”第八版中关于螺菌的描述以及 Döbereiner 等关于 *Azospirillum* 分类学研究的报道基本吻合<sup>[8]</sup>,因此可鉴定  $R_{38}$  菌株属 *Azospirillum* 属。但是 Döbereiner 等报道中,把 *Azospirillum* 分为三个种: *A. lipoferum*, *A. brasilense* 和 *A. amazonense*。它们的主要不同特征是, *A. lipoferum* 和 *A. brasilense* 的主要区别见表5<sup>[9,10]</sup>。

另一个种 *A. amazonense* 与以上两个种的主要区别是适宜的 pH 值比前者都低,耐氧性更差,不能利用果糖和柠檬酸,可以利用蔗糖作为

碳源,细胞较小,直径为  $0.8\mu\text{m}$ ,在马铃薯平板上菌落白色平扁,边缘突起<sup>[11]</sup>。

$R_{38}$  菌株与上述三种菌株比较,可以看出  $R_{38}$  菌与 *A. brasilense* 相符合,因此鉴定为 *A. brasilense*,即巴西固氮螺菌。

## 参 考 文 献

- [1] J. J. Tarrand et al.: *Can. J. Microbiol.* **24**: 967—980, 1978.
- [2] 王子芳: 微生物学通报, **9**(4), 176—181, 1982.
- [3] 罗孝扬等: 微生物学报, **23**(1): 68—72, 1983.
- [4] 段俊英等: 微生物学报, **24**(3): 290—291, 1984.
- [5] Bacharnan, R. E. et al. «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» Eighth Edition, The Williams & Wilkins Company/Baltimore p.196—207, 1974.
- [6] 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》,科学出版社,1978.
- [7] Watanabe, J. *Nature*, **777** (569): 565—566, 1979.
- [8] Jeffrey, J. et al. *Microbiology*, Vol. 24, 1978.
- [9] Postgate, J.: In «Current perspective in nitrogen Fixation» ed Australian Academy of Science Canberra, p. 223—225, 1981.
- [10] Döbereiner, J.: In «Azospirillum II» ed. Klingmuller W. Birkhauser Verlag p. 9—23, 1983.
- [11] Nair, S. K. et al.: In «Azospirillum II» ed Klingmuller, W. Birkhauser Verlag p. 29—31, 1983.