

北京地区水稻根际联合固氮菌的分离鉴定 及其固氮酶活性的研究

杜千有 关秀清 范成英 王发珠

(中国科学院植物研究所,北京)

摘要 从北京地区 16 个水稻品种的根际分离筛选出两株固氮酶活性较高的菌株 D-12 和 D-25。对这两个菌株进行了分类鉴定和固氮酶活性的测定。根据形态特征和理化特性的测定,菌株 D-12 属于肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 菌株 D-25 类似于克雷伯氏菌但又有区别,因此暂放在肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)。两个菌株均在厌氧条件下固氮酶活性最高。在 Hill's 无氮蔗糖培养基中 30℃ 条件下,其固氮酶活性的高峰出现在第 16 至第 18 小时。

关键词 水稻根际;联合固氮

近年来,禾谷类农作物根际联合固氮问题引起了固氮研究者的重视,先后已有许多关于水稻、小麦、玉米、谷子、甘蔗等根际联合固氮的报道^[1,2]。世界上有五分之三的人口以稻米为主食,中国亦是重要的水稻生产国之一,为寻找能同我国栽培水稻建立联合固氮关系的优良菌株,我们自北京地区不同水稻品种的根际分离出两类固氮菌。本文报道了两类固氮菌的代表菌株 D-12 和 D-25 的分离、鉴定和自生固氮的一些特性。

材 料 和 方 法

(一) 培养基

1. Ashby's 无氮蔗糖培养基^[3]
2. Döbereiner's 无氮苹果酸培养基^[4]
3. Hill's 无氮蔗糖培养基^[5]

(二) 菌种的分离

将田间整穴水稻连根挖起,洗净,再用自来水冲洗根样 20—30 分钟,将根样剪成 0.5cm 的小段备用。培养基 1 和培养基 2 各取 4ml 加入 10ml 小瓶中。再接入根段,塞上橡皮塞,置 30℃ 培养箱中培养 2 天。经气相色谱测定后,选取乙炔还原活性高的样品,用其中悬浮液分别在培养基 1 和培养基 2 的平板上划线分离。

(三) 菌种的鉴定

参照 Bergey's 细菌学鉴定手册^[6] 进行。测其对碳源的利用情况,以 Hill's 培养基为基础,附加 5% 的不同碳源。分别在液体培养基和琼脂培养基上作平行试验。在抽真空充氮气条件下 30℃ 培养 48 小时进行检查。在琼脂培养基上,以菌落是否形成和菌落大小分级。在液体培养基中以培养液的混浊度分级。浊度 < 0.1 为不能利用,浊度 > 1.0 为能利用。

(四) 乙炔还原活性的测定

培养后的菌悬液抽真空,充氮气,注入乙炔,使其浓度为10%,30℃振荡30分钟。在做氧分压对固氮酶活性影响的测定时,氮气采用高纯氮,并注入不同浓度的氧气。中止反应后用上海102G型气相色谱仪测定。

结 果

(一) 菌种的分离

自北京地区采到17种水稻根样中有16个样品都有乙炔还原活性。经划线分离,16个样品的培养液中基本都含有两类固氮菌,一类是在Ashby's无氮蔗糖培养基上形成白色粘稠菌落,而在Döbereiner's无氮苹果酸培养基上形成透明流动性菌落。另一类是在Ashby's无氮蔗糖培养基上形成透明流动性菌落,而在Döbereiner's无氮苹果酸培养基上形成白色粘稠菌落。两类固氮菌在这两种培养基上生长时,其固氮酶活性都很低,注入乙炔后,反应30分钟,用气相色谱仪测定,都很难检测出乙炔还原活性。当改用Hill's无氮蔗糖培养基时,两类菌的乙炔还原活性则可提高数十倍乃至百倍。前一类中选出代表菌株D-12,其乙炔还原活性最高可达335 n mol C₂H₄/h/ml,后一类中选出D-25代表菌株,其乙炔还原活性最高可达310 n mol C₂H₄/h/ml。

(二) 菌株D-12和D-25的形态特征和生化特性(见图1和表1,2)



图1 菌株D-12(a)和D-25(b)的形态(×10000)

(三) D-12和D-25菌株的乙炔还原活性与氧含量的关系

接种后的菌悬液在厌氧充氮条件下按上述

表1 D-12和D-25菌株的形态特征和生化特征

测定项目	D-12	D-25
革兰氏染色	阴性	阴性
细胞形状及排列	杆状、单个或成对	杆状、单个
细胞大小(μm)	0.6—0.8×1.9—2.2	0.4—0.5×1.5—2.0
芽胞	无	无
荚膜	有	无
鞭毛	无	周生
葡萄糖氧化发酵	发酵、产酸、产气	发酵、产酸、产气
氧化酶	阴性	阴性
接触酶	弱阳性	弱阳性
甲基红	阴性	阴性
V-P	阳性	阳性
淀粉水解	阴性	阴性
明胶	阴性	阳性
自三糖铁产H ₂ S	阴性	阳性
苯丙氨酸脱氨酶	阴性	阴性
利用丙二酸	利用	利用
水解七叶灵	阳性	阳性
生酸试验	产酸、产气	产酸、产气
硝酸盐还原	阳性	阳性

表2 D-12和D-25菌株对碳源的利用

菌株	碳源													
	中性酒石酸钠	乳糖	葡萄糖	甘露醇	丁三醇	丙三醇	苹果糖	木糖	果糖	苯甲酸钠	柠檬酸钠	麦芽糖	酒花糖	阿拉伯糖
D-12	++	+	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	-	+++	+	+
D-25	-	-	+++	+++	+++	+	-	+++	-	+++	-	++	-	-

注:“-”不能生长;“+”微弱生长;“++”中度生长;“+++”生长良好

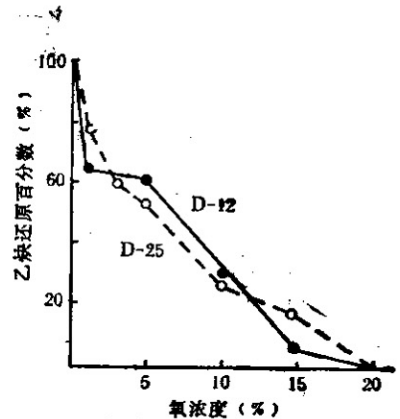


图2 D-12和D-25菌株在不同氧含量时的乙炔还原活性方法测其乙炔还原活性。结果表明D-12和

D-25 菌株都是固氮菌, 它们的固氮酶活性高峰出现在厌氧条件下。有 1% 的氧含量即可使乙炔还原活性几乎降低一半。在 1—5% 的氧含量条件下乙炔还原活性随氧含量的增加而迅速降低。当氧含量增加到 20% 时, 其乙炔还原活性完全被抑制(图 2)。

(四) D-12 和 D-25 菌株的乙炔还原活性同培养时间的关系

D-12 菌株在 Hill's 无氮蔗糖培养基中 30℃ 厌氧条件下, 乙炔还原活性的恢复较 D-25 菌株快, 在接种后第 16 小时达到最大值, D-25 菌株在同样条件下需在接种后第 18 小时才达到最大值(图 3)。

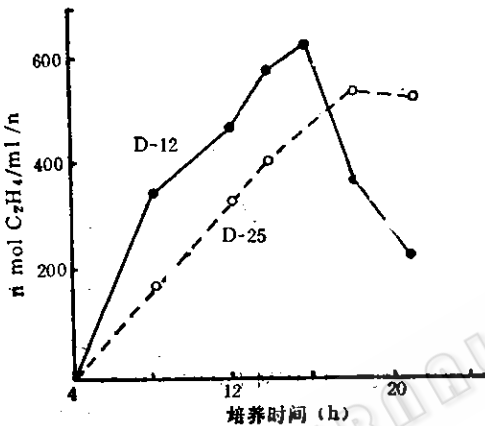


图 3 D-12 和 D-25 菌株在不同培养时间的固氮酶活性

小 结

1. 根据菌株 D-12 的形态特征和生化特性, 参照 Bergey's 细菌学鉴定手册, 归属于肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)。

2. 菌株 D-25 属革兰氏阴性兼性厌氧杆菌, 以有机化能为营养, 能发酵葡萄糖等碳水化合物, 产酸产气, 接触酶阳性, 氧化酶阴性。依此特征, 该菌应归属肠杆菌科 (Enterobacteria-

ceae), 但划归哪个属还未确定。根据它的主要生理生化特性同克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 相似, 但它不能利用阿拉伯糖和木糖, 能从 TSI 产生 H₂S, 这点又不同于克雷伯氏菌。因此暂放在肠杆菌科, 待进一步鉴定。

3. 丘元盛等自广州的水稻根际分离到阴沟杆菌和粪产碱菌^[1], 何福恒等自浙江的水稻根际也分离到粪产碱菌^[7], 而本文自北京的水稻根际却未分离到粪产碱菌。这种现象是否与南北方土壤的不同性质(如 pH 等)有关, 尚待研究。

4. 在本文测定条件下, 菌株 D-12 和 D-25 在自生条件下的固氮活性同丘元盛等报道的粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) A-15 的固氮活性相当^[1]。但是, 当 D-12 和 D-25 混合培养时未表现出丘元盛等报道的 A-15 和 E-26 的协同固氮作用。这可能与 D-12 和 D-25 生长所需碳源相近有关, 但不等于它们同水稻共生时也无互利的关系。在田间自然条件下水稻根际的微生物种类很多, D-12 和 D-25 菌株同水稻根际中的其它微生物之间是否存在相互促进的作用, 尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 丘元盛等: 微生物学报, 21(4): 468—472, 1981。
- [2] 罗孝扬等: 微生物学报, 23(1): 68—72, 1983。
- [3] Aira Sen and S. P. Sen: *J. Gen. Microbiol.* 41 (1): 1—6, 1965。
- [4] Von Bülow, F. W. and J. Döbereiner: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 2389, 1975。
- [5] Dalton, H.: In "Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation" Pub: Chichester New York Brisbane. p. 37. 1980。
- [6] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Fifth Edition. Pub: The Williams and Wilkins Company. Baltimore. p. 290—325. 1974。
- [7] 何福恒等: 微生物学通报, 13(1): 2—6. 1986。