

玉米根系联合固氮细菌的研究

湖北省微生物研究所生物固氮组

(武汉)

从我国湖北省武汉市和广西南宁市的禾本科作物的根系上,分离获得一批具有固氮酶活性的菌株,并对其中 99 菌株和 224 菌株进行了鉴定及其联合固氮特性的研究。

两株菌的主要特点是:革兰氏染色阴性;短杆状;单极单生鞭毛;能运动;在无氮的苹果酸盐培养基上生长 5—7 天,有一个到一个半螺旋的菌体出现;菌体内含折光脂肪滴;过氧化氢酶为正反应;V. P. 反应以及吲哚反应为负反应;最适生长与固氮的温度为 32℃;最适 pH 值为 6.5—7.0;在玉米的根系上能形成联合固氮。根据其形态特征和生理生化反应,鉴定为含脂刚螺菌 (*Spirillum lipoferum*)。

据盆栽回接试验证实,玉米根系与含脂刚螺菌可形成联合固氮。将采集的根样,经预培过夜,其固氮酶活力可达 600—1100 乙烯毫克分子/克干根/小时,若不加诱导即测不出酶活。

最近发现,固氮菌能同草本植物及禾谷类作物的根系形成联合固氮。Döbereiner 氏已描述过雀稗 (*Paspalum notatum*) 与自生固氮菌 (*Azotobacter paspali*)^[1]和俯仰马唐 (*Digitaria decumbens*) 的根系同含脂刚螺菌形成联合固氮^[2],其固氮率为 2 公斤氮/公顷/天,几乎能同豆科根瘤菌的固氮量相等^[3]。后又继续报道了固氮微生物同禾本科作物如玉米、小米、高粱、小麦和水稻以及某些草本植物根系的联合固氮^[4,5]。

1976 年以来,在武汉和南宁两地,对禾谷类根系联合固氮微生物进行了调查,发现有不少作物的根系上有这类微生物存在。并从其中分离纯化出酶活较高的代表性菌株。本文报道有关这类微生物的分离鉴定及其回接效果。

材料和方法

(一) 培养基

采用 Döbereiner 氏的苹果酸钠盐半固体无氮培养基,其成分如下(克): K_2HPO_4 0.1, KH_2PO_4 0.4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $NaCl$ 0.1, $CaCl_2$ 0.02,

$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002, $FeCl_3$ 0.01, 苹果酸钠 5.0, 琼脂 1.75, B.T.B 溶液取 5 毫升[取 0.5 克 B.T.B. (溴麝香草酚蓝)溶于 100 毫升的 95% 的酒精溶液中], 水 1000 毫升。用 KOH 调 pH 至 7.0 左右。

固体培养基:除半固体培养基的成分外,加琼脂 18—20 克和酵母汁 0.04%。

此培养基用于分离鉴定及测定固氮酶活力。若缺乏苹果酸钠盐或 $FeCl_3$ 时,则分别以苹果酸(每升 5 克)和 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (每升 0.5 克)代之。加苹果酸时,同时加 4.0 克 KOH。

不同碳源利用的试验,苹果酸钠则分别以其它碳源代之。形态观察用牛肉膏蛋白胨培养基和苹果酸钠盐培养基。固氮酶活力测定用半固体培养基。观察菌体产生的色素用土豆培养基。

(二) 采样及固氮酶活力的测定

在玉米等作物抽雄或扬花初期,选择光合作用强,长势旺盛的玉米杂交品系的植株,挖取粗状活根 2—3 条,剪下,立即送实验室。用自来水冲洗干净,选出健壮根样,用 A 法先测其是否具有固氮酶活性。A 法:将根样剪成 40—50 毫米的

本文于 1978 年 7 月 1 日收到。

本工作得到湖北省农业科学院、广西玉米研究所及广西化工研究所的支持和帮助。

长度,重 3—5 克,投入 125—130 毫升的玻璃瓶内,盖上胶塞,用真空泵将瓶内空气抽出至压力表为 340 毫米水银柱高,再回充氮气:待瓶内压力达到平衡时,再抽出瓶内气体,如此反复 3 次后,置 32℃ 下培养 24 小时(此过程简称诱导过程)。经诱导后,再用上述操作换气三次。同时再向瓶内注入 12% 的乙炔和 5% 的空气(瓶内最后含氧量为 1%),在同样温度条件下培养一小时后,用 1 毫升注射器吸出 0.5 毫升气样,在气相色谱仪上进行乙烯产量的测量。计量单位用乙烯毫克分子/克干根/小时表示。测量后,将酶活高(即乙烯产量高)的试样,用 B 法作富集培养。再用稀释平板法分离。B 法:全部操作过程均在无菌条件下进行。将根样剪成 5—8 毫米的根段,浸于 75% 的酒精溶液中作根表处理,经 5 秒钟后取出,用无菌水洗涤 6 次以上,用镊子取 2—3 段,置于已灭菌的盛有 3 毫升半固体无氮培养基的 8 毫升血清瓶内,塞上棉塞,于 32℃ 下培养 18—24 小时。观察到培养液由绿变蓝,液面下出现 2—3 毫米厚的白色菌膜。选有菌膜的试样,注入占有有效体积的 12% 的乙炔,培养 1 小时,在气相色谱仪上测定其由乙炔还原成乙烯的数量。计量单位用乙烯毫克分子/瓶/小时。

(三) 乙烯含量的测定

乙烯含量的测定系用国产 10ZG 型气相色谱仪。柱长 1 米,内径 0.4 毫米,固定相为国产 GD × 502,柱温 50℃,用氢焰离子化鉴定器进行测量。

(四) 纯化

用 B 法作选择性富集培养后的试样,选其酶活力高者,作一系列稀释平板。培养 4—5 天后,挑取典型菌落,反复进行 3—4 次稀释平板培养,即可达到纯化目的。

结 果

(一) 形态特征

光学显微镜检查,99 菌株和 224 菌株极为相似,菌体形态为杆状(0.8—1.0 × 1.5—2.0 毫微米)。内含折光性强的脂肪滴。电子显微镜观察,培养 24 小时为短杆

状,具有单极单生鞭毛(图版 I-1),144 小时发育成具有一至一个半螺旋(图版 I-2)。此类菌株鞭毛明显地不同于 Bergey's 手册第七版中有关含脂刚螺菌章节中所描述的极性丛生(束生)鞭毛,但与 Döbereiner 氏所分离的 ATCC 29145 菌株的形态相类似(图版 I-3)。

(二) 培养特征

1. 在加有 B. T. B. 的半固体无氮培养基中,接种,然后于 32℃ 培养 24 小时,培养液开始转蓝,液面下长成 2—3 毫米厚的白色菌膜,是这类菌生长的典型特征(图 1)。



图 1 培养 24 小时,在液面下形成的白色菌膜

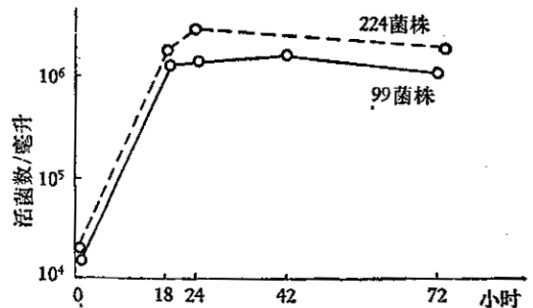


图 2 在无氮苹果酸盐培养基上 32℃ 下 99 及 224 菌株的生长曲线

2. 在加有 0.04% 酵母汁的苹果酸钠盐的琼脂平板中,表面菌落形态呈白色,圆形或不规则,表面有光泽,中心呈绿色,稍突

起。

3. 斜面菌落为白色, 有光泽, 25 天以上有淡红色色素, 菌苔紧贴琼脂, 不易刮下。

(三) 生长特性

1. 生长曲线见图 2。对数生长期在 18 小时前后, 24 小时左右转向平缓。

2. 生长最适温度为 32℃, 如图 3 所示。8 毫升的血清瓶装入 3 毫升培养基, 接种后置不同温度下培养 24 小时, 测定固氮酶以反映相应的生长情况。

虽能生长, 但由于培养环境迅速碱化, 生长会很快停止。

(四) 生化特性

表 1 表明, 纯化的 99 菌株和 224 菌株属刚螺菌属^[6-9]。

表 1 菌株的生化特性

供试菌	99 菌株	224 菌株
过氧化氢酶	+	+
吲哚	-	-
甲基红	-	-
V.P.	-	-
NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	++	++

注: 按细菌学鉴定常规方法。

表 2 不同碳源对菌株生长的影响

不同碳源	99 菌株		224 菌株	
	生长	酶活(乙炔微克分子/瓶/小时)	生长	酶活(乙炔微克分子/瓶/小时)
葡萄糖	+++	48	++	37
阿拉伯糖	+	8	+	4
甘油	+	14	+	14
蔗糖	+	3	+	2
甘露醇	+	7	-	-
淀粉	+	25	-	-
乳糖	-	-	+	6
苹果酸钠	+++	150	++	33

注: “+”表示可生长; “++”表示生长尚可; “+++”表示生长良好; “++++”表示生长最好; “-”表示不生长。

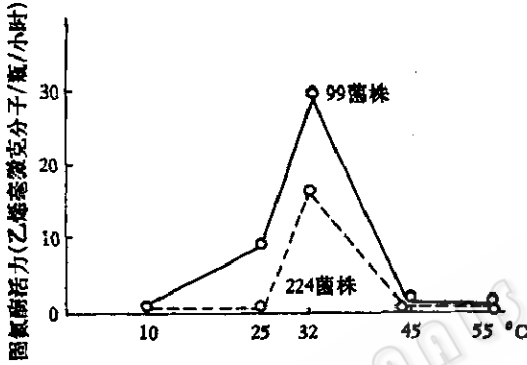


图 3 温度对 99 及 224 菌株固氮酶活力的影响

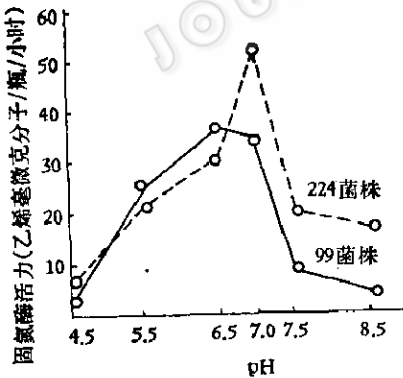


图 4 pH 对 99 及 224 菌株固氮酶活力的影响

3. 生长最适 pH: 用 0.1MKH₂PO₄ 与 0.1MK₂HPO₄ 盐溶液, 配成 pH 为 4.5、5.5、6.5、7.0、7.5 和 8.5 的溶液, 分别加入苹果酸钠盐半固体无氮培养基中。接种后, 于 32℃ 静置培养 24 小时, 测固氮酶活力。图 4 说明, 生长最适 pH 为 6.5—7.0, 7.5—8.5 时

碳源对其生长的影响列于表 2。99 菌株以苹果酸为碳源和能源时, 生长最好, 葡萄糖次之, 不能利用乳糖, 其他几种碳源可不同程度地被利用。224 菌株在葡萄糖和苹果酸上均能生长, 不能利用淀粉和甘露糖, 说明两株菌在利用碳源方面有差别。利用有机酸和单糖比其他多糖略高。

表 3 说明两株菌都可利用牛肉膏和酵母汁中的微量氮源而固氮, 可由表中固氮酶活力的数据得到证实。而对硝酸铵和硫酸铵的利用, 则只长菌体, 并不固氮(无固

表 3 不同氮源对菌株生长的影响

不同氮源	99 菌株		224 菌株	
	生长	酶活(乙烯毫克分子/瓶/小时)	生长	酶活(乙烯毫克分子/瓶/小时)
牛肉膏	++	48	+	18
硝酸铵	+++	-	+++	-
硫酸铵	+++	-	+++	-
酵母汁	++	43	+	19

注: 同表 2。

氮酶活性)。在做大量液体培养时,加入少量的酵母汁和牛肉膏,对促其生长是有利的。

硝酸盐被还原成亚硝酸盐后,是继续还原成 N_2 , 还是亚硝酸盐累积,是应注意的一个问题。用亚硝酸盐试剂[4%的磺胺盐酸和 0.08% N. E. D. HCl (N-1-Naphthyl ethylenediamine dihydrochlorido)]^[10]检查了由半固体培养的 99 菌株和 224 菌株。表 4 结果表明,两菌株的培养液在不同的培养时间内均有红色反应,证实两株菌均累积亚硝酸盐。

表 4 两株菌对亚硝酸盐试剂的反应

菌株	培养时间(小时)		
	24	48	72
99	+	++++	++++
224	+	++++	++++
对照	-	-	-

注: (-)无红色反应; (+)红色反应弱; (++++)红色反应最强。

(五) 回接效果(盆栽试验)

采用灭菌砂培和不灭菌的土培方法,观察 99 菌株的回接效果。种子用 0.2% $HgCl_2$ 作表面灭菌,洗净催芽后,移植到砂培和土培的容器中。接菌方法分:种子拌菌和用种子拌菌,播种一周后再追施菌液两种。以不拌菌只加培养基作对照。

试验结果见表 5。植株长势、叶色、干物质重量无差异,但接菌处理的根系于减

低氧分压诱导后,即能测出较高的酶活力。说明固氮刚螺菌已在玉米植株根系上定居。另将接菌处理的根系经自来水冲洗干净,用 Burris 氏的最大可能数量算法^[11],测得每克鲜根的固氮刚螺菌数在 10^6 以上,也可证明在植株根系上建立了群落。

表 5 不同施肥方式对固氮酶活力的影响

处理	项目	酶活力(乙烯毫克分子/克干根/小时)	干物质(克)
		99 菌株	拌菌
	拌菌追施菌肥	1077	16.10
对照		0	16.40

注: 数字为三个重复的平均值;根系酶活力的测定见减低氧分压的诱导处理。

土培接菌与不接菌的玉米植株在长势、叶色方面都无差异。检查其根系的固氮酶活性,结果列于表 6。不诱导是拔取根系立即测定,接菌与否均可测出一定的酶活力,可能是实验过程中土壤未灭菌,由其它的固氮微生物参与的结果。而接菌处理的,诱导与不诱导的酶活力,前者较后者增长近 15 倍,可能是减低氧分压,有利于固氮酶的活化。结果与 Döbereiner 氏报道的一致。

表 6 土培玉米根系的固氮酶活力

处理	酶活力(乙烯毫克分子/克干根/小时)	
	不诱导	诱导
99 菌株	42.9	672.4
对照	61.8	26.5

小 结

1. 含脂刚螺菌分布广泛。目前已从南北美洲、非洲、印度等地的玉米、高粱、小米、小麦和水稻的根系上分离到这类微生物^[12],我们已从武汉($N^{\circ}30$)、南宁($N^{\circ}23$)

两地的玉米、高粱和小米等作物的根系中分离到。在武汉检查了67个玉米品系的根系,只有一个品系 OH 43 × 195-3 的根样在富集培养后,其酶活力超过 100 乙烯毫微克分子/瓶/小时,并从其中纯化出 99 菌株为代表株。在南宁检查了 399 个玉米品系,富集培养后,酶活力超过 100 乙烯毫微克分子/瓶/小时的,只有 39 个品系。说明含脂刚螺菌对植物的根系似有一定的选择性。这点对于今后研究含脂刚螺菌的生态分布是有参考意义的。

2. Döbereiner 等认为含脂刚螺菌同玉米根系可形成联合固氮,其固氮率为 2 公斤氮/公顷/天^[9]。我们多次回接试验的结果与美国 Tjepkema 等人的报道基本一致^[13]。含脂刚螺菌与玉米根系结合相当紧密,数量相当多,每克洗净鲜根有 10⁶ 个左右。但在自然的氧压下固氮酶活力显示不出来,而经减压诱导后才能表现出较高的活力。因此,必须进一步摸清这类微好气性固氮微生物与相应植物联合固氮的条件,才有应用的价值。但仍应指出,含脂刚螺菌是生物固氮研究领域中的一个新的重要的方面。

3. 电镜观察本菌株具有单极单生鞭毛的形态学特征,这明显地不同于 Bergey's 细菌学鉴定手册第七版中对含脂刚螺菌的描述:极性丛生鞭毛。Döbereiner 氏 1975 年的相差显微镜照片也未能显示出此形态学特征。但 99 菌株和 224 菌株与 Döbereiner 氏分离的含脂刚螺菌 ATCC 29145 的形态基本一致,因此,亦应属螺菌属的成员。最近 Krieg^[14] 以 DNA 中碱基 G + C 分子量

的百分比对固氮螺菌进行了分类,并提出将具有固氮能力的螺菌归属于 *Azospirillum* 属的建议。

参 考 文 献

- [1] Döbereiner, J., J. M. Day: *J. Gen. Microbiol.*, 71: 103—116, 1972.
- [2] Döbereiner, J. and J. M. Day: *Proceeding of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*, (ed. by Newton W. E. and C. J. Nyman), Washington State University Press, Pullman, USA, 1976, pp. 518—538.
- [3] Joachim, F. W., Von Bülow and J. Döbereiner: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2389—2393, 1975.
- [4] Döbereiner, J., J. M. Day: *Plant and Soil*, 37: 191—196, 1972.
- [5] Dommergues, Y. et al.: *Soil Biol. Biochem.*, 5: 83—89, 1973.
- [6] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md, USA, 1957, pp. 257.
- [7] Hylemon, P. B., et al.: *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23(4): 240—380, 1973.
- [8] Barber, L. B. and H. J. Evans: *Canad. J. of Microbiol.*, 22(2): 254—260, 1976.
- [9] Burris, R. H. et al.: *J. Bact.*, 127(3): 1248—1254, 1976.
- [10] Jacobson, A. and D. Gillespie: *J. Bact.*, 95: 1035, 1968.
- [11] Stephan, Y. O. et al.: *Applied and Environmental Microbiol.*, 33(1): 85—88, 1977.
- [12] Döbereiner, J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 22(10): 1464—1473, 1976.
- [13] Tjepkema, J. and P. Derkum: *Applied and Environmental Microbiol.*, 33(2): 626—629, 1977.
- [14] Krieg, N. R.: *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*, ed. by Hollaender A., New York, USA, 1977, pp. 463—472.

STUDY OF NITROGEN-FIXING BACTERIA IN ASSOCIATION WITH MAIZE BIO-NITROGEN FIXATION GROUP

Group of Biological Nitrogen Fixation, Hubei Institute of Microbiology
(Wuhan)

A number of similar microorganisms possessing active nitrogenase activity were isolated from root-systems of maize, kaoliang and millet in Wuhan and Nanning. The characteristics of the strains 99 and 224 were examined and their property of nitrogen-fixation in association with maize were briefly studied.

Both strains are Gram-negative rods possessing a single polar flagellum. Motile. On nitrogen-free malate medium, spirals 1 to 1½ rounds appear after 5—7 days incubation. Cells contain highly refractive lipid droplets. Catalase positive. V. P. and indole negative. Optimal tem-

perature for growth and nitrogenase activity 32°C. Optimal pH 6.5—7.0. Nitrogenase activities amount to 600—1100 nM C₂H₄ reduced per gram root per hour have been detected after an induction period of 24 hours. There is no nitrogenase activity without a proper induction period.

In pot culture, the associated nitrogen fixation of strain 99 and maize has been proved.

The organism is identified as *Spirillum lipoferum*, as compared with Döberienner's culture ATCC 29145 (SP7).