

稻根联合固氮细菌的研究

1. 菌种的分离和鉴定

丘元盛 周淑萍 莫小真

(广东省微生物研究所, 广州)

王大帮 洪俊华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从水稻根内分离到两株固氮能力较强的细菌, A-15 和 E-26。经鉴定, A-15 的表观性状与粪产碱菌的性状相符, 但其 DNA 中 GC 含量为 62.95—63.93 克分子%, 略高于文献报道的 58.9 克分子%。由于缺乏粪产碱菌的模式株, 暂将 A-15 归属于粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*)。E-26 的表观性状与阴沟肠杆菌属相符, 因此将 E-26 归属于阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)。据报道, 在玉米根际曾分离到固氮的阴沟肠杆菌, 却未见到有分离出固氮的粪产碱菌者。

水稻根区存在着颇为活跃的固氮作用, 这已为许多室内和田间试验所证实, 且多认为这是一类与水稻联合固氮的细菌所致。近十几年来, 从水稻根际分离到的固氮细菌种类很多, 关于它们在根区联合固氮活动中的作用也正在研究^[1-3]。1977 年, 我们从广东的水稻根中分离到两株固氮细菌, A-15 和 E-26。它们在水稻根中较为常见, 乙炔还原活性较强, 用总氮测定法和 ¹⁵N 示踪法均肯定了它们的固氮性能, 特别是它们的固氮产物能够迅速地被水稻直接吸收利用, 因此, 在稻根联合固氮活动中, 这两种细菌的作用是值得注意的。本文报道这两株细菌的分离和初步鉴定结果。

材料和方 法

(一) 菌种的分离

1. 培养基: (1) Ashby 无氮蔗糖培养基: 用蔗糖取代原配方中的甘露醇。可添加 0.2% 琼脂制成半固体培养基, 或添加 2% 琼脂制成固体

培养基。

(2) Döbereiner 无氮苹果酸半固体培养基^[4]; 琼脂用量改为 0.2%, 后期工作中改用乳酸代替苹果酸。

(3) 混合无氮培养基: 将上述两种培养基等量混合, 但蔗糖和苹果酸在混合培养基中仍保持原浓度。

将上述(1)、(2)、(3)培养基分装于容积为 13 毫升的小瓶中, 每瓶装 3 毫升, 用 1 公斤/厘米²压力的蒸汽灭菌 30 分钟, 灭菌后 pH 为 6.5—6.8。

(4) 苯甲酸盐培养基: 苯甲酸盐 10 克, KH₂PO₄ 0.2 克, MgSO₄·7H₂O 0.2 克, NaCl 0.2 克, CaSO₄·2H₂O 0.2 克, 5% 钼酸钠水溶液 1 毫升, 1% 硫酸亚铁水溶液 1 毫升, 1% 硫酸锰水溶液 1 毫升, 琼脂 18—20 克, 蒸馏水 1000 毫升, pH 6.8—7.0。1 公斤/厘米²蒸汽灭菌 20—30 分钟。

2. 分离方法: 用自来水洗净水稻根样品, 浸于 95% 乙醇中片刻, 再经 0.1% 升汞水浸泡两分钟进行表面消毒, 用无菌水冲洗 6 次, 剪成长约 1 厘米的小段, 选取数条根段放入装有混合半固体无氮培养基的小瓶中进行富集培养。于 33℃ 培

本文于 1980 年 4 月 15 日收到。

养 1—2 天，然后测乙炔还原活性，选其中活性高者，用前述(1)、(2)、(3)三种无氮平板进行划线分离。

3. 菌种保存：分离到的菌种分别保存于 Ashby 蔗糖培养基和 Döbereiner 苹果酸培养基上，30—33℃ 培养 24 小时到 48 小时，存放于冰箱中，每周移种一次。鉴定时所用菌种用上述无氮培养基或苯甲酸钠无氮培养基。

(二) 鉴定方法

除说明者外，均采用一般常用方法^[1]。1. 碳

源利用测定：在液体无氮培养基中添加 1% 不同碳源。用液体菌种接种后，分别在普通大气中和约含 3% 氧的大气中培养一周，用光电比色计比浊以判定是否生长。

2. DNA 中 GC 含量测定用 T_m 值法^[6]。

结 果

(一) 菌种分离

1977 年，在广东省 13 个地方采集了 47 个水稻品种的不同生育期的稻根样品

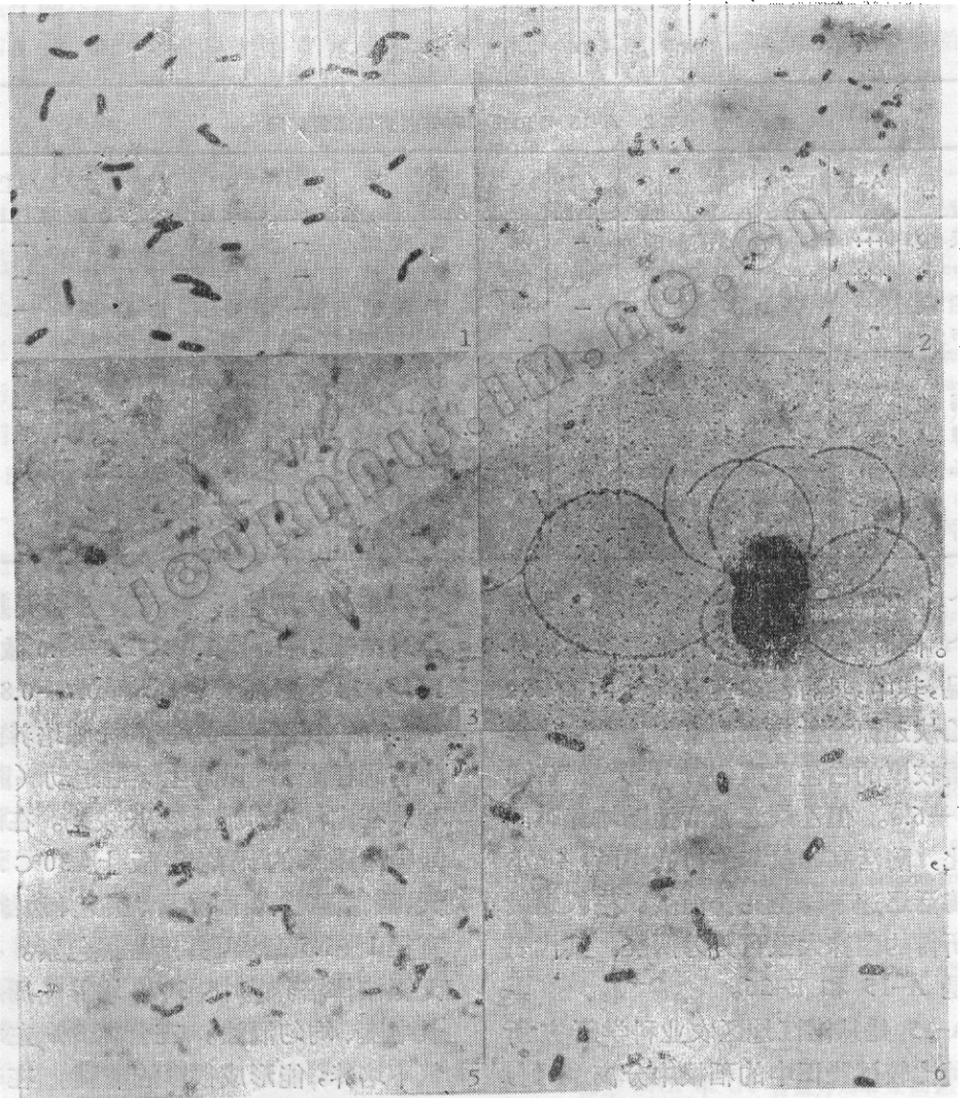


图 1 粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) A-15 的形态特征

- 1. 杆状菌体 (12 小时培养物)； 2. 短杆状菌体 (24 小时培养物)； 3. 鞭毛染色照片 (12 小时培养物)； 4. 电子显微镜照片 (8,000×)。阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) E-26 的形态特征； 5. 杆状菌体； 6. 鞭毛染色照片。

表 1 A-15 号和 E-26 号菌生理生化性状

菌株	测定项目																						
	革兰氏染色	鞭毛	氧化发酵试验	氧化酶	接触酶	与氧的关系	甲基红试验	V.P. 反应	吲哚	产生硫化氢	硝酸盐还原	明胶液化	脲酶	精氨酸双水解酶	鸟氨酸脱氨酶	苯丙氨酸脱氨酶	赖氨酸脱羧酶	有氢化钾生长	石蕊牛奶	乳糖生酸	阿拉伯糖生酸	甘油产气	
A-15 号	阴性	周生	产碱	+++	+	微嗜氧	-	-	-	-	+++	(+)	+	-	-	-	-	-	产碱				
E-26 号	阴性	周生	发酵产气	-	+	兼性厌氧	+++	-	-	-	+++	+	-	++	+	-	-	+	产碱凝固还原	+	+	-	

表 2 A-15 号和 E-26 号菌对碳源的利用

碳源	A-15	E-26	碳源	A-15	E-26	碳源	A-15	E-26	碳源	A-15	E-26
苹果酸	+++		粘质酸	-	++	葡萄糖	-	+++	甘油	-	+++
乳酸	+++	+++	葡萄糖		+++	果糖	-	+++	甘露醇	-	++
琥珀酸	+++	+++	谷氨酸	-	++	半乳糖	-	++	山梨糖	-	++
苯甲酸	+++	-	丙氨酸	-	-	甘露醇	-	++	卫矛醇	-	-
乙酸	++	+++	半胱氨酸	-	+++	木糖	-	++	棉子糖	-	-
丙酮酸	++	-	脯氨酸	-	++	阿拉伯糖	-	++	阿东糖醇	-	-
柠檬酸	-	+++	丝氨酸	-	±	乳糖	-	++	纤维二糖	-	++
丙二酸	-	++	七叶灵	-	+	蔗糖	-	++	密二糖	-	+
甲酸	-	-	水杨酸	-	++	麦芽糖	-	++			
酒石酸	-	+++	肌	-	+	海藻糖	-	++			

260 个，其中具有乙炔还原活性的样品有 127 个。同时，测定了 464 个稻根富集培养的样品，其中，具有乙炔还原活性的有 390 个。乙炔还原活性较高的富集培养物能形成一层较厚的白色菌膜，并产生大量气体。pH6.5—6.8。但乙炔还原活性随培养时间而变化，酶活高峰仅能维持数小时，40 小时后酶活迅速下降至完全消失。平板划线分离所得的菌株大致可分为两类，其代表菌株是 A-15 和 E-26。

A-15 是从湛江地区农业科学研究所的品种比较试验田中的稻根中分离得到，E-26 是从从化县农业科学研究所品种比较试验田中的稻根中分离得到。

(二) A-15 号菌的性状

革兰氏阴性杆菌，在无氮培养基上 12 小时菌体为杆状，1.0 × 2.0—3.0 微米(图 1-1)，24 小时后为短杆状，0.7—0.8 × 1.1—1.4 微米(图 1-2)。在肉汁胨培养基上菌体有同样变化，以周生鞭毛运动(图 1-3、4)。在肉汁胨琼脂上生长较差。在以苯甲酸盐为碳源的无氮平板上，30℃ 培养 5 天，菌落圆形、表面光滑、突起、边缘整齐，直径 1—1.5 毫米，并产生黑色素。在这种无氮液体培养基中，30℃ 培养一周后，生长中度、均匀混浊。在含氮 3% 左右的大气下培养，能形成很厚的菌膜。在半固体培养基中于表面下形成带状生长物。在厌氧条件下不生长，但在有硝酸盐的情况下可厌氧生长。其生理生化性状见表 1，对

不同碳源的利用情况见表 2。DNA 中 GC 含量为 62.95—63.93 克分子 %*。

(三) E-26 号菌的性状

革兰氏阴性菌, 0.7—0.8 × 1.2—2.5 微米(图 1-5), 具周生鞭毛(图 1-6)。在肉汁胨平板上生长良好, 菌落圆形、光滑、凸起、边缘整齐, 直径 2 毫米左右。在无氮培养基斜面上菌苔丰厚、略粘。在无氮液体培养基中生长中度、均匀混浊、无沉淀。其生理生化性状见表 1, 对碳源利用情况见表 2。DNA 中 GC 含量为 55.5 克分子 %。

讨 论

A-15 号菌具有如下的表现性状: 革兰氏阴性杆菌, 直径约为 0.7—1.0 微米, 周生鞭毛, 呼吸代谢, 氧化酶阳性, 不利用糖类生长, 只利用乙酸、苯甲酸、琥珀酸等几种酸生长, 石蕊牛奶产碱。根据这些性状, 显然与粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) 的性状相符。但粪产碱菌的 DNA 中 GC 含量为 58.9 克分子 %^[7], 而 A-15 号菌为 62.95—63.93 克分子 %。这一数值与文献所报道的不同。由于目前缺乏粪产碱菌的模式菌株与 A-15 号菌进行全面比较, 暂将 A-15 号菌归属于粪产碱菌。

E-26 号菌的表现性状: 革兰氏阴性杆菌, 周生鞭毛, 发酵葡萄糖产酸产气, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, 还原硝酸盐, 苯丙氨酸脱氨酶阴性, 表示它属于埃希氏菌群或肠杆菌菌群。虽然它于 30℃ 时 V. P. 反应阳性, 但 37℃ 4 天时却是甲基红阳性而 V. P. 阴性。据此似应属于埃希氏菌群。而 E-26 号菌在 KCN 培养基中生长, 利用柠檬酸盐、葡萄糖酸盐和丙二酸盐为碳源, 液化明胶, 不产吡嗪。根据这些性状以归属于肠杆菌属为宜。其 DNA 中 GC 含

量 55.5 克分子 %, 更表明不应归入 GC 含量为 50—51 克分子 % 的埃希氏菌群。又由于其从甘油产酸不产气, 赖氨酸脱羧酶阴性, 精氨酸双水解酶阳性, 而属于阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)。

原核生物中有固氮作用的种属颇为不少, 但本文所报道的种属却不多。Raju 等人^[8]于 1972 年报道从玉米根际分离到有固氮作用的阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*), 却未见有从水稻根际分离到这种菌。至于粪产碱菌有固氮作用者, 尚未见报道。

参 考 文 献

- [1] Yoshida, T.: Soil Microbiology in The International Rice Research Institute Annual Report for 1970, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, 1971, p. 47.
- [2] Balandreau, J. P. et al.: Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms, IBP Vol. 6 (ed. by Stewart, W. D. P.), Cambridge University press, 1975, pp. 57—70.
- [3] Balandreau, J. P. et al.: 1st International Symposium on Nitrogen Fixation (ed. by Newton, W. E. and C. J. Nyman), Washington State University press, 1975, pp. 611—628.
- [4] Von Bülow, F. W. and J. Döbereiner: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72: 2389, 1975.
- [5] 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, 北京, 1978年。
- [6] Mandel, M. and J. Marmur: *Methods in Enzymology*, Vol. XII, Nucleic Acids, Part B (ed. by Grossman, L.), Academic press, 1968, pp. 195—206.
- [7] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbon: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974, p. 275.
- [8] Raju, P. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 69: 3478, 1972.

* 部分 DNA 中 GC 含量为刘聿太同志协助测定, 特此致谢。

STUDY OF NITROGEN FIXING BACTERIA ASSOCIATED WITH RICE ROOT

I. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ORGANISMS

Qiu Yuansheng Zhou Shuping, Mo Xiaozhen

(*Institute of Microbiology of Guangdong Province, Guangzhou*)

Wang Dasi Hong Junhua

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

During the year 1977 two strains of bacteria which possess significantly N_2 -fixing activity were isolated from the rice root in Guangdong Province. One of them, strain A-15, has a close resemblance to *Alcaligenes faecalis* but the G + C content of DNA is 62.95—63.93 mol % which was slightly different from the content of the type species. For lack of the type speci-

men A-15 was temporarily identified as *A. faecalis*. Another strain, E-26, was identified as *Enterobacter cloacae* in which the G + C content of DNA is 55.5 mol %. *E. cloacae* has been previously found to fix N_2 in maize rhizosphere, however, N_2 -fixing activity of members of the genus *Alcaligenes* has not been reported.