

## 从芒果根际分离的一株固氮螺菌\*

段俊英 韩静淑 柴明 何秀良

唐欣昀\*\* 张宪武

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

本文报道了从海南岛地区砖红壤上的芒果根内分离的一株固氮活性较高菌株(编号 81-0024)的分类鉴定结果。

### 材料和方法

#### (一) 根样采集及菌株分离

在芒果生长的旺盛季节, 采其健壮的侧根装入塑料袋带回分析。菌株分离见参考文献[1]。

#### (二) 菌株固氮力的测定

采用微量凯氏定氮法。

#### (三) 菌种鉴定

1. 个体形态观察: 用下述几种培养基观察细胞形态: (1) NFb 半固体及固体培养基<sup>[1]</sup>; (2) SNF 培养基(即 NFb 中的苹果酸由琥珀酸钠代替); (3) PSS 培养基<sup>[1]</sup>; (4) MPSS 培养基(PSS 培养基中的蛋白胨降至 5.0g/L)。在上述培养基中培养的菌体用相差显微镜观察、摄影、测量大小; 用扫描电镜和透射电镜观察形态、鞭毛染色及β-聚羟基丁酸(PHB)颗粒染色、荚膜观察等按细菌学鉴定常用的方法<sup>[1]</sup>。

2. 培养特征: 在上述培养基和在土豆培养基上观察菌落的大小、颜色和生长特征等。

#### 3. 生理生化试验:

(1) 碳水化合物产酸: 参照 Tarand 氏法<sup>[4]</sup>。

(a) 用改进的 PSS 半固体培养基(0.6% 琼脂, 蛋白胨减少到 0.2%), 供试化合物浓度为 1.0%。穿刺法接种, 用凡士林石蜡油封口, 厌氧培养两周。

(b) 用液体培养基试验产酸情况。培养基成分如下(g/L): 酵母膏 3.05;  $K_2HPO_4$  0.25;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01;  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  0.01;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.002;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2;  $NaCl$  0.1;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.6;  $(NH_4)_2SO_4$  1.0; 生物素 0.0001; B. T. B (水), 0.7kg/cm<sup>2</sup> 压力灭菌 30 分钟。接种后, 塞上翻口橡皮塞, -760mmHg 柱抽真空 30 分钟后, 充入 Ar 气, 培养一周, 观察产酸情况, 同时作需氧培养处理。

(2) 葡萄糖为唯一碳源的生长试验: 用修改的 NFb 培养液(省去 B. T. B, 用 1% 葡萄糖代替苹果酸)分装试管(10ml), 进行试验观察。

(3) 生物素需要试验: 在以下灭菌的培养基中(g/L):  $K_2HPO_4$  0.5; 琥珀酸钠 5.0;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1;  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  0.002;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2;  $NaCl$  0.1;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.026;  $(NH_4)_2SO_4$  1.0; 生物素 0.0001。接入 0.1ml 菌悬液/5ml 培养基。观察结果, 连续移接二次。

(4) 接触酶、氧化酶、吲哚和 VP 反应、明胶液化、 $H_2S$  产生、脲酶等试验均按参考文献[3]。

(5) 厌氧还原  $KNO_3$ , 按 Neyra 氏测定法<sup>[5]</sup>。

(6) 胆酸盐或甘氨酸的生长试验: 于 PSS 培养液中加入 1.0% 胆酸盐或甘氨酸, 接种培养二周观察生长情况。

(7) 马尿酸盐水解: 于 PSS 培养液中加入 1.0% 马尿酸钠, 观察 4 天内水解情况。

(8) 磷酸化酶试验: 于 PSS 琼脂中(45—50℃)加 0.01% 过滤灭菌的对磷酸硝基苯, 倒平板, 用 24 小时培养物划线, 培养 24—48 小时, 皿盖上加 1ml 浓  $NH_4OH$ , 倒置平皿, 观察菌苔颜色变化, 若变黄色为阴性反应。

(9) 淀粉水解: 于 PSS 琼脂中加入 0.2% 可溶性淀粉, 培养 2 周, 加碘液观察水解强度。

(10) 分别在 PSS 琼脂中加入 0.2% L-酪氨酸、L-苯丙氨酸和 L-色氨酸, 划线接种, 培养, 观察水溶性色素的产生。

(11) 荧光色素: 划线接种 PSS 平板, 培养 48—72 小时, 于 253.7nm 紫外光下, 观察荧光色素。

本文于 1982 年 9 月 21 日收到。

\* 王书锦同志协助采样; 毕庶春同志协助电镜观察; 戴祥鹏同志协助气相色谱分析; 杨志勇同志协助高压液相色谱分析; 本院微生物研究所周慧玲同志对本文提出宝贵意见, 一并致谢。

\*\* 山东大学生物系八二届毕业实习生。

(12) 碳源利用: 用 DBM 基础培养基<sup>[12]</sup>, 平板法进行。

(13) 碱基成分测定: DNA 提取按 Marmur 氏法<sup>[6]</sup>, 碱基成分测定用高压液相色谱法<sup>[7]</sup>。

## 结果和讨论

### (一) 菌体形态

革兰氏阴性, 在 PSS 液体培养基中培养 18 小时, 用相差显微镜观察, 细胞呈弯形、弧形, 大小为  $0.7-0.9 \times 1.8-3.2 \mu\text{m}$ , 单极毛。7 天以上的老培养物, 类胞囊体 (Cyst-like body) 数明显增加, 出现 S 形和螺旋形细胞。在 NFb 半固体和固体斜面上均形成荚膜。在 MPSS 斜面上产生波长较短的纤细周毛, 在所有培养基上培养的细胞均可看到折光性较强的颗粒, 老龄细胞尤为明显。经染色证明, 此种颗粒为 PHB 颗粒。它可使细胞变形。在 SNF 培养基中, 细胞一般较粗, 变化较大。在 MPSS 斜面上培养 24 小时的细胞扫描电镜照片见图 1。

### (二) 培养特征

在 PSS 液体中生长良好, 形成粘稠状沉淀, 表面不形成膜。在 NFb 半固体中  $30^\circ\text{C}$  培养, 24 小时内液面下 2—3 mm 处形成薄膜状或球状菌膜, 2—3 天后, 菌膜变厚并上升至表面, 呈灰白色, 产碱。在 PSS 平板上, 菌落圆形, 边缘整齐, 光滑湿润, 初期乳白, 后带蛋壳黄, 10 天时直径 1—1.7 mm, 凸起, 易挑起。在 MPSS 平板上 (加 B. T. B) 初期乳白, 后期中心变绿。在 NFb 斜面上银白色, 易长入琼脂, 2 个月后出现淡粉红色。在土豆培养基上菌落灰白色, 有光泽。生长温度范围  $16-45^\circ\text{C}$ , 最适温度  $35-37^\circ\text{C}$ 。

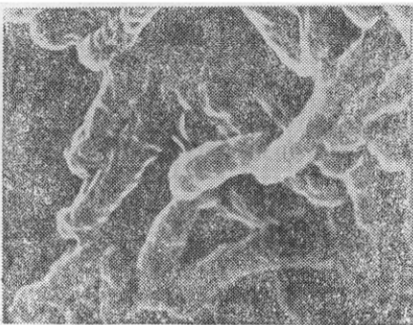


图 1 81-0024 菌株的扫描电镜照片  
(24小时,  $\times 10,000$ )

Fig. 1 SEM photograph of 81-0024 strain

### (三) 生理生化特性

在以葡萄糖为唯一碳源的无氮半固体培养基上生长。氧化酶、磷酸酶、脲酶、接触酶及 VP 反应阳性。不产生  $\text{H}_2\text{S}$ , 在 1% 胆酸盐中生长, 还原  $\text{NO}_3^-$  为  $\text{NO}_2^-$ , 厌氧  $\text{NO}_3^-$  产气, 厌氧利用  $\text{NO}_3^-$  生长。不水解淀粉, 不液化明胶, 不出现荧光色素, 水解马尿酸钠。该菌株 DNA 中 G + C 的含量为 70.7 克分子%。固氮活性为  $350-460 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/\text{小时} \cdot \text{管}$ 。固氮力为  $3.95 \text{ mgN}/100 \text{ ml}$  培养物。该菌株能利用葡萄糖、果糖、核糖、阿拉伯糖、半乳糖、木糖、甘露醇、山梨醇和甘油并产酸, 不利用乳糖、鼠李糖、纤维二糖、蜜二糖、肌醇、赤藓糖醇和卫矛醇产酸。能以丙酮酸、柠檬酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酸、苹果酸、延胡索酸、葡萄糖酸、乳酸和丙酸等有机酸为碳源而生长。上述特征与 Tarrand 等<sup>[4]</sup>所描述的生脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*) 的主要特征相符。因此, 根据 81-0024 菌株的形态, 培养特征和生理生化等特征, 其分类地位可归属于 Tarrand 等所描述的固氮螺菌属的生脂固氮螺菌。但是它们之间也有一些差异: 81-0024 菌株产  $\text{H}_2\text{S}$ , 能利用蔗糖, 并在需氧和厌氧条件下产酸, 细胞有薄层荚膜。

试验结果证明, 固氮螺菌的生态分布广泛, 除去热带牧草根系及一些农作物根系定殖外, 在北纬  $17^\circ$  热带区海南岛生长的芒果根和北纬  $42^\circ$  的辽宁地区春小麦根内, 我们也分离出了固氮螺菌。

我国地处寒温气候带, 植物资源极其丰富, 品种繁多, 充分发掘和利用根际高活性固氮微生物资源, 提高土壤肥力, 增加植物的氮素营养, 将是一项十分有意义的工作。

## 参 考 文 献

- [1] 段俊英等: 土壤通报, 6: 35—37, 1980。
- [2] Hylemon, P. B. et al.: *Int. Syst. Bacteriol.*, 23: 340—380, 1973。
- [3] 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。
- [4] Tarrand, J. J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 24: 967—980, 1978。
- [5] Neyra, C. A. et al.: *ibid.*, 23: 300—305, 1977。
- [6] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961。
- [7] 潘星时等: 微生物学报, 21(3): 339—343, 1981。