

谷子根系联合固氮菌分离鉴定及其初步应用

刘荣昌 汪文燕 李凤汀 郝正然 杨则爱 张春莉

(河北省科学院微生物研究所,保定)

从河北省石家庄地区农田采集谷子根系样品,经表面消毒后,分离得到固氮酶活性较高(1502.9—2893.5 nmolC₂H₄/g 鲜菌体/h)的四株细菌 M-II-1222、M-II-931、M-I-1021、M-I-941。经细胞形态、培养特征、生理生化特性、DNA 中 G + C 克分子含量测定等方面研究,前三株菌应归属克雷伯氏菌属土生克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella terrigena*)。

将这四株菌分别培制成液体菌剂,回接谷子,结果表明均能促进谷子生长发育,提高单位面积产量 5.4—11.4%,经生物学统计差异达到极显著标准。

关键词 谷子;土生克雷伯氏杆菌;联合固氮

自巴西学者 Döberner 发现带脂螺旋菌与禾本科农作物根系联合固氮以来,谷子根系联合固氮菌 *Azospirillum* 及其回接作用国外已有报道^[1]。

我们从我国河北省石家庄地区谷子田里采集根系样品,经表面消毒后,从中分离得到具有较高固氮酶活性的菌株,对其进行了分类鉴定和回接谷子的研究。本文报道这方面的研究结果。

材料和方法

(一) 培养基

修改的 Döberner 无氮培养基,其成份如下(g/L): 苹果酸氢钠 4.3、葡萄糖 5.0、蔗糖 5.0、KH₂PO₄·H₂O 0.4、K₂HPO₄·3H₂O 0.1、MgSO₄·7H₂O 0.2、NaCl 0.1、CaCl₂·2H₂O 0.02、FeCl₃ 0.01、Na₂MoO₄·2H₂O 0.002、酵母汁 0.2,蒸馏水 1000 ml, pH 6.5—7.0, B.T.B 作指示剂。固体或半固体培养基再添加 15g 或 3g 琼脂。

(二) 分离方法

采集谷子根系样品,洗净后用 0.2% 酸性 HgCl₂ 消毒,在无菌条件下剪成 1 cm 长根段,接入有上述半固体培养基青霉素瓶中,塞好胶帽,从中抽出 10% 空气,注入等量乙炔气,置 28℃ 温箱

中培养 24h,取气样测定固氮酶活性。同时选活性高的根系样品在固体培养基平板上划线分离菌种,直至得到纯菌株,再测定固氮酶活性。

(三) 固氮酶活性的测定

用上海生产 102G 型气相层析仪测定乙烯和乙炔峰值,计算乙炔生成量,以 nmol C₂H₄/g 鲜菌体/h 表示。

(四) DNA 中 G + C 含量测定

DNA 中 G + C 含量测定系采用热变性温度法^[2],并以大肠杆菌 (*E. coli*) 1.353 菌株作对照。

(五) 菌株鉴定方法

采用一般细菌常用鉴定方法^[3],并依据《伯杰氏鉴定细菌学手册》和《肠杆菌科新种研究进展》进行分类鉴定^[4]。

(六) 田间小区接菌对比试验

田间小区接菌对比试验设 M-II-1222、M-II-931、M-I-1021、M-I-941、对照(培养基)五个处理,三次重复,随机排列,小区面积 20m²。前茬作物小麦,亩产 250 kg 左右,土质为壤土,含氮量 0.08%。供试谷子品种为铁杆苋,按亩播种量 1.5 kg,拌液体菌剂 50ml(含菌量 13 亿/ml)计算小区的播种量和接菌量,对照采用等量培养基。谷子成熟后进行考种并按小区单收单打计实产。

本文于 1987 年 11 月 4 日收到。

结果与讨论

(一) 菌株鉴定

从河北省石家庄地区农田采集豫谷、夏谷、日本谷和谷莠子根系样品20个,经根系表面消毒,剪成根段进行增殖培养后,有固氮酶活性的根系样品豫谷占66.6%、夏谷占16.6%、日本谷占83%、谷莠子占100%,可见固氮酶活性与谷子品种基因型有关。特别是野生谷莠子表现出固氮优势,即便是同一品种谷子固氮酶活性也不同,甚至完全没有活性,这可能与栽培条件或耕作史有关系。经多次分离筛选,从有较高固氮酶活性的谷子根系获得四株固氮细菌菌株:M-II-1222、M-II-931、M-I-1021、M-I-941,它们的固氮酶活性分别为2187.7、1502.9、1789.9、2893.4 nmol C_2H_4 /g 鲜菌体/h,并对前三株菌进行分类鉴定。

1. 细胞形态特征: M-II-1222、M-II-931、M-I-1021 菌株均为直杆菌,成对或短链状排列,细胞大小分别为 $0.8 \times 1-2 \mu\text{m}$ 、 $0.8 \times 1-2.2 \mu\text{m}$ 、 $0.8-1.0 \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$,均为革兰氏阴性,无鞭毛,有荚膜,不运动。

2. 培养特征: 在加 B.T.B 半固体无氮培养基中,培养24h后,三株菌基质变黄,表面生成厚的菌膜,穿刺接种培养时沿穿刺线生长,产气。在无氮琼脂平板上培养时,三株菌菌落无色,半透明,圆顶型,边缘整齐,表面光滑闪光,半流质。M-II-1222、M-II-931、M-I-1021 菌落直径大小分别为2 mm、5 mm、2 mm。液体培养时,三个菌株均匀呈混浊,无菌膜和沉淀产生。

3. 生长特性: 三株菌在无氮培养基中28℃培养16h进入对数期,24h趋向平缓。在10℃生长,最适温度为28—30℃。

最适 pH 为6.5—7.0。

4. 生理生化特性: 三株菌生理生化特性相同,均为氧化酶阴性,接触酶阳性,不产吲哚,甲基红阴性,VP 试验阳性,氧化发酵测定阳性,硝酸盐还原,发酵葡萄糖、阿拉伯糖、乳糖、蔗糖、松三糖产酸,不利用卫矛醇,利用柠檬酸盐、丙二酸盐,44.5℃乳糖不产气,尿素水解,不水解明胶,赖氨酸脱羧酶阳性,不产生鸟氨酸脱羧酶。

5. DNA 中 G + C 克分子 % 含量: M-II-1222、M-II-931、M-I-1021 菌株 DNA 中 G + C 含量分别为55.6、56.1、57.0 mol % (T_m)。

6. 菌种鉴定: 根据上述鉴定结果,这三株菌均为直杆菌、单个、成对或短链排列,细胞为 $0.8-1.0 \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$,有荚膜,不运动,革兰氏阴性,兼性厌氧,菌落圆顶型闪光,氧化酶阴性,发酵葡萄糖产酸产气,利用柠檬酸盐,产生乙酰甲基甲醇,尿素水解,不产生鸟氨酸脱羧酶, DNA 中 G + C 克分子 % 在53—58(T_m) 范围内。这些生理生化性状和表型特征与克雷伯氏菌属相符,故这三株菌应归属肠杆菌科克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)^[4]。同时依据吲哚阴性,在10℃生长,在44.5℃从乳糖不产气和发酵松三糖的性状,菌株 M-II-1222、M-II-931、M-I-1021 均属于上生克雷伯氏菌 (*Klebsiella terrigena*)。

(二) 田间小区接菌试验结果

在田间条件下,谷子接种 M-II-1222、M-II-931、M-I-1021、M-I-941 菌株后,与不接种谷子相比苗齐、苗壮、叶色绿。据拔节期调查,株高增加不明显,茎粗增加7.1—35.0%,单株干物重增加7.1—21.0%,促进植株营养生长。谷子成熟后单收单打测实产,结果拌菌剂的亩产226.7—239.5 kg。不拌菌的215.0 kg,亩增产11.7—24.5 kg,增产率5.4—11.4%。经生物学统计,

表 1 联合固氮菌对谷子产量的影响

Table 1 Effect of associated nitrogen fixing bacteria on yield of millet

处理 Treatment	穗长 (cm) Long ear	穗重 (g) Ear weight	千粒重 (g) Weight of 1000 seeds	亩产 (kg) Yield per mu	亩增产 (kg) Increase grainyield per mu	增产率 (%) Rate of increase yield
对照 Control	14.8	4.6	2.4	215.0	—	100.0
M-II-931	16.2	5.9	2.4	239.5	24.5	111.4
M-II-1222	15.7	5.7	2.4	226.7	11.7	105.4
M-I-1021	16.2	5.8	2.4	232.9	17.9	108.3
M-I-941	16.0	5.8	2.4	232.9	17.9	108.3
L. S. D	6.8(p = 0.05)		9.9(p = 0.01)			

接菌与对照相比产量差异均达到极显著水平,但菌株间只有 M-II-931 达到极显著水准。室内考种结果表明接菌的植株高增加 1.2—3.5 cm,构成产量的主要因素穗长增加 0.9—1.4 cm,单穗重增加 1.12—1.25g,千粒重不增加。由此可见构成增产的主要因素是穗长和穗重增加的结果(表1)。

综上所述,即生长在暖温带、有悠久耕作史、大量施用有机肥的农田中的谷子根系存有固氮酶活性,但因谷子品种而异。有些品种活性低,甚至没有活性,有些品种活性很高,特别是野生型的谷莠子草活性高,比例大,这对谷子育种工作或许有所启示。从固氮酶活性高的谷子根系分离得到的 M-II-1222、M-II-931、M-I-1021 三株菌经分类鉴定均属于土生克雷伯氏菌 (*K. terrigena*)。在国内虽有肺炎克雷伯氏菌的报道,但尚未见土生克雷伯氏菌的

报道。同时也表明在谷子生长的特定生态环境中存有优势联合固氮菌种。利用以上鉴定三株菌和 M-I-941 菌株作谷子回接试验,在田间条件下获得亩增产 11.7—24.5kg,增产率达 5.4—11.4% 的极显著效果,显示出联合固氮菌应用谷子生产的可能性。谷子接菌后增产机理分析有待今后深入研究。

参 考 文 献

- [1] Yaacov, O. et al.: *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3): 694—697, 1983.
- [2] 林万明等: *微生物学通报*, 8(5): 245—247, 1981.
- [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] Buchanan, K. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp.633—641, 1974.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ASSOCIATED NITROGEN FIXING BACTERIA FROM MILLET ROOT AND THE PRIMARY APPLICATION

Liu Rongchang Wang Wenyan Li Fengting
Hao Zhengran Yang Zeyuan Zhang Chunli
(Microbiology Institute, Hebei Academy of Science, Baoding)

The samples of millet root collected from the farmland in Shijiazhuang, Hebei province are subjected to the surface sterilization, four strains with higher nitrogenase activity (1502.9—2893.5 nmol C_2H_4/g frash bacter/h), M-II-1222, M-II-931, M-I-1021, M-I-941, are obtained by isolation. According to the analysis and the research of morphology, cultural character, physiological and biochemical characters, the determination of G+C molar recentage in DNA, etc., the first three strains belong to the *Klebsiella terrigena*.

The four strains are cultured and prepared into their respective bacterial agents,

which in turn are bacterinated on the millet, and the result shows that all of them are able to promote the growth and the development of the millet, and the per unit area yield of millet increase by 5.42—11.39%. According to the biological statistics, a remarkably high standard of difference between the yield of the crop to which the bacterial agent is applied and that of the crop to which it is not applied is reached.

Key words

Millet; *Klebsiella terrigena*; Associated nitrogen fixation