

## 水稻根际联合固氮细菌的研究

海伟力 王耀东 尤崇杓

(中国农业科学院原子能利用研究所,北京 100094)

周慧玲

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

从我国南方水稻根部分离到3株氧化型革兰氏阴性细菌,编号为A1601、A1701和A1702。经 $^{15}\text{N}$ 示踪实验证明,它们均有较高的固氮能力。在无氮培养基中加入少量稻根浸出液进行培养后,可使固氮酶活性明显提高。根据菌株的形态和生理生化等特征鉴定,3株菌均为产碱菌属的细菌,分别为争论产碱菌(*Alcaligenes paradoxus* A1601),反硝化产碱菌木糖氧化亚种(*Alcaligenes denitrificans* subsp. *xyloxydans* A1701)和反硝化产碱菌反硝化亚种(*Alcaligenes denitrificans* subsp. *denitrificans* A1702)。这是继粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)之后,发现的产碱菌属中另外3株未见报道的固氮细菌。

**关键词** 水稻根际;联合固氮细菌;产碱菌属

活跃在水稻根部种类繁多的细菌构成了根际微生态系统。虽然各种细菌在保持根际微生态的平衡中的效应不同,但固氮作用仍然被视为改善根际微生态条件,促进植物生长的主要因素<sup>[1,2]</sup>。粪产碱菌是我国首次发现的产碱菌属中可以固氮的细菌<sup>[3]</sup>。继粪产碱菌之后,我们又发现了3株活跃在水稻根际的固氮菌,并通过 $^{15}\text{N}$ 示踪实验确定了它们的固氮性能。经鉴定,这些细菌仍归属产碱菌属。培养中发现,当在培养基中加入少量稻根浸出液后,乙炔还原活性增加,提高了固氮性能。这些发现,不但说明我国存在大量有待开发的生物资源,同时也表明,作为高产作物的水稻,其根际微生态系统中固氮作用所占有的地位。阐明这些潜在氮源的特性及作用,可以指导我们有效地利用各种固氮菌肥。现将我们分离和鉴定的结果报告如下。

### 材料和方法

#### (一) 菌株

分离培养基为修改过的Döbereiner氏无氮乳酸培养基<sup>[4]</sup>及Ashby氏无氮培养基。参照丘元盛等<sup>[3]</sup>的方法获得从水稻根内分离的菌株,并经反复纯化获得菌落形态和镜检细胞形态一致的纯菌,编号分别为A1601、A1701和A1702。

#### (二) 鉴定方法

主要根据《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[5]</sup>、《伯杰系统细菌学手册》<sup>[6]</sup>、《链霉菌鉴定手

本文于1992年1月13日收到。

中国农业科学院原子能利用研究所宋未同志参加 $^{15}\text{N}$ 示踪实验的部分工作,特此致谢。

册》<sup>[7]</sup>及有关文献中所介绍的方法。

1. 培养特征: 菌落形态观察是在无氮平板上培养 6 天后进行。个体形态的光学显微镜观察是将菌体培养至对数生长期, 染色后于 Olympus BH-2 显微镜上进行。电子显微镜观察是用磷钨酸钠对菌体进行染色后于日立 H-500 透射电子显微镜上进行。

2. 生理生化特性: 菌株生理生化特性测定项目见表 2。

3. DNA 中 G+C 含量测定: 采用解链温度法 ( $T_m$ ) 测定<sup>[8]</sup>, 对照菌株为大肠埃希氏菌 K12。

### (三) 固氮活性测定

<sup>15</sup>N 测定按照尤崇杓<sup>[9]</sup>方法进行, 菌体在半固体培养基(加 0.2% 琼脂)中培养, 气相为 80% <sup>15</sup>N<sub>2</sub> (丰度 95.7%), 20% O<sub>2</sub>, 持续培养 3 天后在 MAT-251 型质谱仪上测定 <sup>15</sup>N<sub>2</sub> 丰度。乙炔还原法测定在 Varian SP-6000 气相色谱仪上进行<sup>[10]</sup>, 并在半固体培养基中加入 5% 新鲜稻根浸出液。将稻根匀浆 (0.2g 稻根/ml 蒸馏水) 后离心, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后, 加入培养基中。

## 结 果

### (一) 形态和培养特征

菌株形态及培养特征见表 1。在 LB 培养基上, 菌落特征无明显差异, 均呈圆形, 光滑, 低突及边缘整齐。但在无氮培养基上, 菌落的大小, 中间突起的程度及边缘向外扩展的形状等特征有所不同, 因而得以分离。菌株的革兰氏染色, 均为阴性。细胞均为杆状, 单个或成对排列。3 株菌株均为稀周毛, 能运动。图 1 表示菌体形态及鞭毛特征。

表 1 菌株培养特征

Table 1 Cultural features of strains from *Alcaligenes* sp.

测定项目 Tested item	A1601	A1701	A1702
革兰氏染色 Grams-staining	-	-	-
细胞形态 Shape of cell	杆 rod	杆 rod	杆 rod
细胞排列 Range of cell	单个, 成对 single couple	单个, 成对 single couple	单个, 成对 single couple
细胞大小 (μm) Dimensions of rods	0.6-0.8×1.0-2.0	0.5-0.6×0.6-1.2	0.3-1.0×1.4
细胞内有 PHB PHB in cell	+	-	-
运动性 Mobility	+, 稀周毛 peritrichous flagella	+, 稀周毛 peritrichous flagella	+, 稀周毛 peritrichous flagella
菌落形态 Shape of colony	圆形, 光滑, 低凸 round smooth, 整齐, D = 0.8-1.0mm near	圆形, 光滑, 低凸 round, smooth, 边缘整齐, D = 1.0-2.0mm near fringe	
菌落颜色 Colour of colony	肉色 yellowish pink	蛋壳黄 yellowish brown	



图1 菌株形态特征

Fig. 1 Morphology of strains (electron microscopy)

A. A1601 (45000 $\times$ ); B. A1701 (29000 $\times$ ); C. A1702 (25000 $\times$ ).

## (二) 生理生化特性

生理和生化特性测定结果见表 2。

## (三) 固氮活性

对分纯的 3 株菌进行乙炔还原活性测定, 结果见表 3。在无氮半固体培养基中未加入

表 2 菌株生理生化特性

Table 2 Physiological and Biochemical features of strains from *Alcaligenes* sp.

测定项目 Tested items	A1601	A1701	A1702
H&L 葡萄糖氧化发酵 Oxidation-fermentation test	氧化产酸 produce acid by oxidation	氧化产酸 produce acid by oxidation	氧化产碱 produce acid by oxidation
氧化酶 Oxidase	+	+	+
接触酶 Catalase		+	+
脲酶 Urease	-	+	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	-	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	+	-
硝酶还原 Nitrate reduction	+	+	+
反硝化 denitrification	-	+	+
利用 H <sub>2</sub> 生长 H <sub>2</sub> used for growth	-	-	+
碳水化合物产酸: Acid produced from carbohydrates			
葡萄糖 Glucose	+	+	产碱 alkaline
木糖 Xylose	+	+	产碱 alkaline
阿拉伯糖 Arabinose	+	+	产碱 alkaline
甘露醇 Mannitol	+	+	产碱 alkaline
碳源的利用: Carbon sources used for growth			
葡萄糖 Glucose	+	+	-
果糖 Fructose	+	+	-
木糖 Xylose	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose		+	-
蔗糖 Sucrose	+	+	-

续表 2

测定项目 Tested items	A1601	A1701	A1702
甘油 Glycerin	-	-	-
甘露醇 Mannitol	-	-	-
柠檬酸钠 Sodium citrate	-	-	-
乙酸钠 Sodium acetate	+	-	+
酒石酸钠 Sodium tartarate	-	-	+
乳酸 Lactate	+	+	+
丙酸 Propionic acid	+	-	+
石蕊牛奶 Litmus milk	产碱, 还原 alkaline, reduction	产碱, 还原 alkaline, reduction	产碱, 酸化, 还原 alkaline, aggregate, reduction
DNA 中 G + C mol % mol% G + C of DNA	53.6	54.4	61.4

稻根浸出液时, 菌株的乙炔还原活性不高。当在培养基中加入新鲜稻根浸出液后, 3 株菌的乙炔还原活性均有明显提高, 为原来的 2—3 倍。进一步验证菌株固氮性能的  $^{15}\text{N}$  示踪实验结果见表 4。经稻根匀浆浸出物诱导培养后, 3 株菌  $^{15}\text{N}_2\%$  a.e 测定结果表明, A1601、A1701 和 A1702 均有较高的固氮能力。

## 讨 论

对水稻根系联合固氮菌的种类、数量进行普查, 并筛选高效菌株具有重要的应用价值。我们分离到的 3 株固氮菌 A1601、A1701 和 A1702, 根据其培养和生理生化特征的鉴定结果, 认为 3 株菌仍归属于产碱菌属。按照《伯杰系统细菌学手册》<sup>[6]</sup>所列产碱菌属种间特征差别进行种的区别, 菌株 A1701 和 A1702, 分别定名为反硝化产碱菌木糖氧化亚种 (*A. denitrificans* subsp. *xylosoxydons*) 和反硝化产碱菌反硝化亚种 (*A. denitrificans* subsp. *denitrificans*)。菌株 A1601, 其培养和生理生化特征与争论产碱

表 3 稻根浸出物对固氮酶活性的作用

Table 3 Effect of rice root extracts on the nitrogenase activity

加入稻根浸出物 Addition of rice root extracts	固氮酶活性 (nmol $\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) Nitrogenase activity		
	A1601	A1701	A1702
0	190	200	170
5% (V/V)	450	550	500

表 4 菌株中  $^{15}\text{N}$  测定  
Table 4 Determination of  $^{15}\text{N}$  in strains

菌株 Strain	总氮量 (mg) Total N	$^{15}\text{N}$ 丰度 (%) Abundance of $^{15}\text{N}$	$^{15}\text{N}$ 原子%超 Atom % $^{15}\text{N}$ excess
CK	0.483	0.383	0
A1601	0.379	7.04	6.657
A1701	0.310	4.63	4.247
A1702	0.310	7.12	6.737

菌接近,但 DNA 中 G+C 含量偏低。由于目前尚无争论产碱菌的模式菌株,不能进行其它有关试验。根据已有的结果,将 A1601 暂定名为争论产碱菌(*A. paradoxus*)。本文从分类学特征上报导了新发现的 3 株固氮菌,进一步证明了在高产作物水稻的根际微生态系统中,产碱菌属是一个值得注意和开发的宝贵资源,对于农业生产有重要价值。

在对粪产碱菌固氮能力的研究中,我们曾发现,经实验室长期培养传代后,菌株的固氮活性减弱。通过贴根实验(即将菌接回水稻根表,然后再从水稻根表分离出来)后,固氮活性可以恢复。对于 A1601、A1701 和 A1702 3 株菌株,我们采用稻根浸出物诱导固氮酶活性的方法,同样收到了明显的效果,表明稻根浸出液中含有某些可能与固氮酶活性调节有关的物质。目前对于联合固氮体系中植物的作用已有许多研究,认为植物根系的新陈代谢活动所产生及分泌的各种物质对根际微生态系统的形成是十分重要的。如根分泌物对根际固氮菌的吸引作用<sup>[1]</sup>,以及促使固氮菌对根各部位的识别和结合作用<sup>[2]</sup>。但对于增强固氮酶活性的作用,未见报道。稻根中是什么物质起到这种作用,值得深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] Bally, R. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 29: 881—887, 1983.
- [2] Barraquio, W. L. et al.: *ibid.*, 29: 867—873, 1983.
- [3] 丘元盛等: *微生物学报*, 21(4): 468—472, 1981.
- [4] Von Hülow, 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] Krieg, N. K. & J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- [7] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组: *链霉菌鉴定手册*, 科学出版社, 北京, 1975 年。
- [8] 周慧玲: *微生物学报*, 18(2): 134—139, 1978.
- [9] 尤崇杓: *水稻根际联合固氮*, 第 329—335 页, 农业出版社, 北京, 1990 年。
- [10] 尤崇杓等: *植物生理学通讯*, (3): 51—54, 1983.
- [11] Gaworzewska, E. T. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 128: 1179—1188, 1982.
- [12] Mandimba, G. et al.: *Plant and Soil*, 80: 129—139, 1986.

## STUDIES ON THE ASSOCIATIVE DIAZOTROPHS IN RICE RHIZOSPHERE

Hai Weili Wang Yaodong You Chongbiao

(Institute for Application of Atomic Energy, CAAS, Beijing 100094)

Zhou Huiling

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Three new strains of diazotrophs, namely strain A1601, A1701 and A1702, isolated from rice roots have not been reported before. They possess significant nitrogen fixation activities determined by means of the acetylene reduct on method, especially were induced by rice root extracts. Their capability of nitrogen fixation were also confirmed by  $^{15}\text{N}$  trace techniques.

The physiological and biochemical features of these associative nitrogen-fixers have been studied. As the results, strain A1601 is identified as *Alcaligenes paradoxus*, strain A1701 is identified as *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xyloxydans* and A1702 as *Alcaligenes denitrificans* subsp. *denitrificans*.

**Key words** Rice rhizosphere; Associative diazotrophs; *Alcaligenes*