

长江流域水稻根际芽孢杆菌属固氮菌株的分离与鉴定

谢光辉 苏宝林 崔宗均

(中国农业大学农学系 北京 100094)

关键词 水稻, 根际, 固氮菌, 芽孢杆菌属, ^{15}N 示踪

分类号 Q393.9

生物固氮资源的研究、开发和利用有利于发展持续农业, 水稻田的氮素肥力比一般旱地高得多, 活跃的生物固氮被认为是主要因素之一。苏宝林、崔宗均等系统地研究了我国北方稻区的固氮菌资源, 分离鉴定出 8 属 18 种共 35 株固氮菌^[1]。在此基础上, 我们对长江流域水稻根际异养固氮菌资源进行了系统研究。本文报道芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 固氮菌株分离与鉴定的结果。

1 材料和方法

1.1 稻田根际土样的采集

1995 年 3~8 月由长江流域的四川南川, 湖南益阳、花垣和浏阳, 湖北武汉, 安徽肥东, 江苏扬州, 江西南昌, 浙江杭州共选 10 点, 取各点稻田正常稻株 4~5 穴带土稻根。

1.2 固氮菌的分离及纯化

以改良的 Döbereiner 培养基进行固氮菌的分离及纯化, 培养基的组成为: 蔗糖 10.0g、苹果酸 5.0g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.4g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、NaCl 0.1g、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02g、FeCl₃ 0.01g、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002g、琼脂 18g、蒸馏水 1000ml, 不加蛋白胨为无氮培养基, 加 0.2g 蛋白胨为低氮培养基, 加 5g 蛋白胨为高氮培养基, 以 NaOH 调 pH 为 7.2。

将采回的水稻根际土混匀, 称取 10g 研碎, 加无菌水至 100ml, 按 10 倍稀释法稀释, 共三个重复。取 10^{-4} 和 10^{-5} 两个浓度的土壤悬液各 0.1ml, 均匀涂于无氮培养基平皿中。30℃ 下培养 2~3 天后将不同菌落接出, 在改良 Döbereiner 低氮培养基斜面上测其乙炔还原活性 (ARA)。选乙炔还原活性较高的菌落进行分离纯化, 直到选出有稳定 ARA 的纯培养有芽孢菌株。

1.3 乙炔还原活性 (ARA) 测定

在改良的 Döbereiner 低氮斜面培养基上接种后, 30℃ 下培养 18~24h, 将棉塞换为橡皮塞密封, 注入 1.6ml C_2H_2 , 继续培养 24~36h 后, 取 100 μl 气样在气相色谱仪上测定乙烯峰值, 标准气 C_2H_4 的浓度为 138mg/ml。气相色谱仪的工作条件设置为检测室温度 100℃, 柱温 60℃, 进样口 60℃, 柱长 1m, 表头载气压力氮气为 0.95kg/cm², 氢气为 0.8kg/cm², 空气为 0.6kg/cm²。乙炔还原活性计算方法为:
$$\text{ARA} = (\text{实际 } \text{C}_2\text{H}_4 \text{ 峰高} \times \text{标准气含量} \times \text{试管容积}) / (\text{标准气峰高} \times \text{进样量} \times \text{培养时间} \times \text{样品量})$$

1.4 ^{15}N 示踪法对菌株固氮能力的测定^[2]

以上海化工研究院生产的 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (^{15}N 丰度为 10.12%) 制备 N_2 备用。在 25ml 三角瓶中注入低氮半固体培养基 10ml, 灭菌后穿刺接种, 以橡皮塞密封。抽出培养瓶中的空气后加 O_2 和 $^{15}\text{N}_2$, 使 O_2 含量为 8%, $^{15}\text{N}_2$ 含量为 10%~15%。30℃ 培养 2d, 80℃ 烘干。

在中国农业科学院原子能利用研究所电镜质谱试验室的 MU-1305 型质谱议上, 测定样品中 ^{15}N 同位素的丰度。质谱议精度为 0.5%, 测定时样品中加浓硫酸 5ml, 催化剂混合物 ($\text{K}_2\text{SO}_4:\text{Se} = 500:1$) 2ml, 消

化 8h, 用 0.025mol/L 的 H_2SO_4 吸收。

1.5 菌株鉴定方法

在中国科学院微生物研究所细菌分类研究室, 依据《伯杰鉴定细菌学手册》^[3] 进行菌株鉴定, 具体按《一般细菌常用鉴定方法》^[4] 及《芽孢杆菌属》^[5] 的方法进行。

2 结果和分析

2.1 分离的菌株及其乙炔还原活性

经分离纯化, 共获得有芽孢的菌株 16 株, 乙炔还原活性见表 1。

表1 分离的芽孢菌及其乙炔还原活性

取样地点	菌株号	乙炔还原活性 ($nmolC_2H_2 \cdot h^{-1} \cdot ml^{-1}$)	取样地点	菌株号	乙炔还原活性 ($nmolC_2H_2 \cdot h^{-1} \cdot ml^{-1}$)	
四川南川	NC2	2.01	湖北武汉	WH4	18.71	
	NC5	1.00		安徽肥东	HF1	76.67
	NC6	107.55		江西南昌	NCH1	1.73
	NC12	74.48			NCH2	15.33
湖南益阳	YY3	4.02			NCH3	0.94
	YY4	1.55	NCH4	1.03		
湖南花垣	XX3	37.6	NCH5	27.02		
湖南浏阳	LY1-1	0.82	浙江杭州	HZH3	1.55	

2.2 ^{15}N 同位素示踪法对菌株固氮能力的测定

^{15}N 同位素示踪法对固氮酶活性的测定结果见表 2, 两个对照的 ^{15}N 百分含量基本接近而略高于天然丰度值 (0.365%), 说明结果可靠。本研究分离的有芽孢菌株的 ^{15}N 原子百分超在 0.0297%~0.4714% 范围内。通常认为, 培养物的 ^{15}N 原子百分超为 0.015% 以上时, 即可确定有固氮酶活性^[6], 根据这些标准, 可以认为本研究分离的 16 株菌均为固氮菌。

表2 ^{15}N 同位素示踪法对菌株固氮能力的测定结果

菌株	样品重 (g)	总氮量 (mg)	含氮量 (mg/g干重)	固氮率 (%)	^{15}N 含量 (%)	^{15}N 原子超 (%)
CK1*	0.4784	0.4335	0.91		0.3711	
CK2*	0.4618	0.613	1.33	45.87	0.3815	
XX3	0.1656	0.189	1.14	25.42	0.4112	0.0297
LY1-1	0.4133	0.483	1.17	28.42	0.4749	0.0934
HF1	0.446	0.548	1.23	35.02	0.5149	0.1334
NCH1	0.3464	0.483	1.39	53.22	0.4975	0.116
NCH2	0.4334	0.743	1.71	88.39	0.6054	0.2239
NCH3	0.4392	0.613	1.40	53.38	0.5029	0.1214
NCH4	0.4573	0.646	1.41	55.24	0.7035	0.322
NCH5	0.4326	0.743	1.72	88.74	0.8529	0.4714
WH4	0.4853	0.646	1.33	46.28	0.6512	0.2697
YY3	0.4167	0.58	1.39	52.95	0.6038	0.2223
YY4	0.4149	0.515	1.24	36.40	0.4757	0.0942
HZH3	0.4405	0.515	1.17	28.48	0.518	0.1365
NC2	0.4346	0.613	1.41	55.00	0.4647	0.0832
NC5	0.5003	0.548	1.10	20.37	0.4233	0.0418
NC6	0.4394	0.515	1.17	28.80	0.4975	0.116

* CK1为不接菌注 $^{15}N_2$ 对照, CK2为接菌不注 $^{15}N_2$ 对照

2.3 菌株主要特征及鉴定

菌株 YY3: 革兰氏阳性杆菌, 细胞大小为 $1.2 \sim 1.5 \times 3.0 \sim 4.0 \mu m$, 具椭圆形的中生芽孢, 孢囊不膨

人,胞内有聚- β -羟基丁酸(PHB)的颗粒累积,不能产乙酰甲基甲醇,不产卵磷脂酶,在厌氧培养基中不能生长,营好氧生活等特征,定名为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

菌株 NCH2, NC5: 革兰氏阳性,杆状,细胞大小为 $0.9 \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$, 椭圆形芽孢,孢囊不膨大,胞内有 PHB 颗粒,产乙酰甲基甲醇,产卵磷脂酶,能在厌氧培养基中生长,营兼性厌氧生活等,定名为蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)。

菌株 LY1-1, NC6: 革兰氏阳性,杆状,细胞大小为 $0.7 \sim 0.8 \times 1 \sim 1.6 \mu\text{m}$, 胞内有中生、椭圆形芽孢,孢囊不膨大,胞内无 PHB 颗粒,能在 7%NaCl 中生长,在石蕊牛奶中不产酸,能产乙酰甲基甲醇,能水解淀粉,不能在厌氧培养基中生长,营好氧生活,不能利用丙酸盐等特征,可区别于其它种,定名为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

菌株 XX3, NCH1, NCH5, WH4: 革兰氏阳性,杆状,细胞大小为 $0.5 \sim 0.8 \times 1 \sim 1.5 \mu\text{m}$, 胞内有中生、椭圆形芽孢,孢囊不膨大到稍膨大,胞内无 PHB 颗粒,能在 7%NaCl 中生长,产乙酰甲基甲醇,能水解淀粉,能在厌氧培养基中生长营兼性厌氧生活,定名为地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)。

菌株 NCH3, HZH3, NC12: 细胞呈杆状,大小为 $0.4 \sim 0.6 \times 0.8 \sim 2 \mu\text{m}$ 胞内有芽孢,无 PHB 颗粒,孢囊不膨大,能在 7% NaCl 中生长,产生乙酰甲基甲醇,不水解淀粉,不能从硝酸盐还原到亚硝酸盐,定名为短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)。

菌株 NCH4, NC2: 革兰氏阳性,杆状,细胞大小为 $0.4 \sim 0.5 \times 0.5 \sim 1 \mu\text{m}$, 胞内产椭圆形芽孢,孢囊明显膨大,对葡萄糖产酸但不产气,不能水解淀粉,接触酶阳性,不能在厌氧培养基中生长,营好氧生活,定名为短芽孢杆菌(*B. brevis*)。

菌株 HF1: 革兰氏阳性,杆状,细胞大小 $0.5 \times 0.6 \sim 1.0 \mu\text{m}$, 具中生芽孢,孢囊膨大,接触酶阴性,不产乙酰甲基甲醇,VP 的最终 pH 为 6.5, 不水解淀粉,吡啶阴性,NO₃⁻ 盐不能还原到 NO₂⁻ 盐,不产伴孢体等特征,定名为产氮芽孢杆菌(*B. azotoformans*)。

菌株 YY4: 根据细胞呈杆状,大小为 $0.3 \sim 0.4 \times 0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$, 胞内有中生到亚端生芽孢,孢囊稍膨大,接触酶阳性,氧化酶、卵磷脂酶均不产生,不产乙酰甲基甲醇和吡啶,不能厌氧生长,能在 7%NaCl 中生长,对葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇都能产酸,能利用柠檬酸而不能利用丙酸盐等主要特征与坚强芽孢杆菌相符,定名为坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)。

3 讨论

目前已见芽孢杆菌属的一些种的固氮作用菌株的报道。国外报道的为固氮芽孢杆菌(*B. azotofixans*)^[7]、浸麻芽孢杆菌(*B. macerans*)^[8]、多粘芽孢杆菌(*B. ploymyxa*)^[9]、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)^[10]、蜡状芽孢杆菌和丁酸芽孢杆菌(*B. butyricum*)^[11]。在国内,1986年何恒福等在浙江水稻根际发现了短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)^[12]; 1994年崔宗均等报道,在北方水稻区水稻根际分离出固氮芽孢杆菌、产氮芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*)和枯草芽孢杆菌的固氮菌株^[1]。因此,本研究分离的坚强芽孢杆菌的固氮菌株为首次发现; 蜡状芽孢杆菌的固氮菌株在我国为首次报道。

最近固氮微生物分类研究将能固氮的生芽孢菌的种重新定为新属 *Paenibacillus*, 但目前广泛应用的细菌鉴定工具书“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”第九版(1994)尚未采用,因此本研究仍以原分类方法进行。同时,有报道指出枯草芽孢杆菌、短芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌等菌中未发现 *nifH* 基因序列,因而排除这些种中的固氮菌株的可能性^[13],但本研究分离的这些种中的菌株确有明显稳定的固氮酶活性,如枯草芽孢杆菌 NC6、短芽孢杆菌 NCH4 及蜡状芽孢杆菌 NCH2 均有较高的 ¹⁵N 原子百分超,这一现象有待继续研究。

致谢 本研究承中国科学院微生物研究所蔡妙英教授指导,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 崔宗均, 苏宝林, 蔡妙英等. 中国农业大学学报, 1996, 1(3): 63.
- [2] 尤崇杓. 水稻根际联合固氮菌. 北京: 农业出版社, 1990. 329~335.
- [3] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, the Ninth Ed. Baltimore, Philadelphia, Hongkong, London, Munich, Sydney, Tokyo: the Williams & Wilkins, 1994.
- [4] 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. 北京: 科学出版社, 1978.
- [5] Gordon R E, Haynes W C, Pang C H N(蔡妙英等译). 芽孢杆菌属. 北京: 农业出版社, 1983.
- [6] Hardy R W F. Methods for Measurement of Dinitrogen Fixation. In: Hardy R W F *et al.* *A Treatise on Dinitrogen Fixation*. New York: John Wiley & Sons Inc, 1977. 451~485.
- [7] Seldin L, Van Elsas J D. *Int J Syst Bacteriol*, 1984, 34:451~456.
- [8] 王子芳. 微生物学通报, 1982, 9(4):176~181.
- [9] Peoples M B, Herridge D F, Ladha J K. *Plant and Soil*, 1995, 174:3~28.
- [10] Berge O, Heulin T, Balandreau J. *Biology and Fertility of Soil*, 1991,11(3):210~215.
- [11] F J 伯杰森(陈冠雄等译). 生物固氮研究方法. 北京: 科学出版社, 1987.
- [12] 何恒福, 章锦秋, 金世芳等. 微生物学通报, 1986, 13(1):2~6.
- [13] Lindstrom K. Taxonomy and Phylogeny of Diazotrophs. In: Elmerish C *et al.* *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Michigan: Kluwer Academic Publisher, 1998. 563.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF N₂-FIXING STRAINS OF *BACILLUS* IN RICE RHIZOSPHERE OF THE YANGTZE RIVER VALLEY

Xie Guanghui Su Baolin Cui Zongjun

(Department of Agronomy, China Agricultural University Beijing 100094)

Abstract Rice rhizosphere soil samples were collected from 10 sites of 7 provinces in the Yangzi River Valley, and from the soil samples 16 endospore-forming strains with ARA (Acetylene Reduction Activity) were isolated, the nitrogen fixing ability was tested by the method of ¹⁵N tracer and the atom ¹⁵N % excess are ranged from 0.0297% to 0.4714%. The strains were identified as *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. azotoformans*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. firmu*

Key words Rice, Rhizosphere, Nitrogen-fixing bacteria, *Bacillus*, ¹⁵N tracer