

毛竹根际分离的多粘芽孢杆菌 固氮特性的研究*

顾小平 吴晓丽

摘要 对从毛竹根际分离到的菌号为GW-1、GW-5、GW-10、GW-16的4株菌进行鉴定和固氮特性研究,从其菌体形态及生理生化特性确定为多粘芽孢杆菌。它们固氮的最适温度:GW-1为30~35℃,GW-5、GW-16为30℃,GW-10为35℃,最适固氮pH GW-1、GW-10为7.5左右,GW-5为7.0左右,GW-16为6.0~7.5之间。4株菌都可利用多种碳源固氮,但以葡萄糖、蔗糖、苹果酸3种碳源混合时固氮活性最大。4株菌的最高固氮能力GW-1、GW-5培养96h时分别为156.90、89.37 nmol (C₂H₄)/(h·瓶),GW-10、GW-16培养72h时分别为56.63、83.64 nmol (C₂H₄)/(h·瓶)。

关键词 毛竹 多粘芽孢杆菌 联合固氮 固氮活性

1994年作者首次发现并证实竹类植物根际存在着联合固氮作用,并从浙江淡竹(*Phyllostachys meyeri* McClare)根际分离到肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae* Trevisan)后^[1],目前又从毛竹(*Phyllostachys pubescens* Mazel ex H. delehaie)根际分离到多株芽孢杆菌,经测定有较高的固氮活性。本文就菌号为GW-1、GW-5、GW-10、GW-16 4株菌的鉴定及固氮特性进行报道。

1 材料与方 法

1.1 材料 研究材料为生长在本所虎山山地红壤上的毛竹根系。

1.2 细菌分离 将毛竹根顺竹兜连土挖起,带土拿回实验室后抖掉浮土,再用自来水冲净泥土,挑选健壮活根剪成小于1cm的根段,用无菌水冲洗6次,然后用70%酒精浸泡5min,再用无菌水冲洗6次后用无菌滤纸吸掉多余水分,称取1g鲜根段放入装有2mL修改的半固体D氏培养基的青霉素小瓶中,30℃培养2d后测定固氮活性,选有活性且较高的样品用接种针挑取培养液在固体平板上划线,然后挑取单菌落并多次纯化,对纯化的细菌再接入装有D氏半固体培养基的青霉素瓶中,测定固氮活性,对有固氮活性的细菌进行进一步鉴定。

1.3 细菌鉴定 细菌鉴定根据参考文献[2~7]进行。

1.4 固氮菌固氮特性研究 用乙炔还原法在气相色谱仪上测定。

不同温度对固氮菌固氮的影响是用2mL D氏半固体培养基在青霉素小瓶中接种后,预培养24h再注入0.7mL乙炔培养24h测定的。

不同pH的培养基是在不含苹果酸的D氏培养基中加入1/15 mol/L Na₂HPO₄和1/15

1997—09—02 收稿。

顾小平副研究员,吴晓丽(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

* 本文为1995~1997年浙江省自然科学基金资助项目的研究内容。细菌鉴定得到中国科学院微生物所蔡妙英研究员及陈潇、周黎的帮助,在此表示感谢。

mol/L KH_2PO_4 混合的 pH 缓冲液配制的,测定方法同前。

不同碳源的培养基是以 D 氏培养基为基础,以参试碳源取代原培养基配方中的碳源 5 g/L,三糖培养基是基础培养基中的碳源以蔗糖、葡萄糖、苹果酸 3 种碳源代替各 5 g/L, pH 7.0, 测量方法同上。

不同培养时间对固氮菌固氮的影响是以和温度测定相同的培养基接种后立刻注入 0.7 mL 乙炔, 30 培养, 起初每 4 h 测定一次, 以后每 12 h 测定一次。

2 结果与讨论

利用以上方法共分离到具固氮活性的菌株 36 株, 初步镜检其中 20 多株为杆状并具芽孢, 而 17 株菌可在前述培养基中大量生长, 本文就其中 4 株菌进行报道。

2.1 固氮菌的菌体形态、菌落形态及生理生化特性

对这些菌进行细胞形态、大小、芽孢等的镜检观察, 并在 dōbereiner 培养基上对菌落形态进行比较, 结果显示: 虽然 4 株菌在菌落形态上有一些差异, 但都是具芽孢的杆菌。见表 1。

表 1 4 株菌的菌体及菌落形态

菌号	菌体形态	菌体大小 (μm)	芽孢形态	菌落形态	胞内 PHB 颗粒
GW-1	杆状	0.7~0.8×3.0~3.5	椭圆, 膨大, 端生到亚端生	乳白, 半透明, 圆、凸、边缘齐, 直径 5 mm	无
GW-5	杆状	0.8×3.0~5.0	椭圆, 膨大, 中生或次端生	乳白, 半透明, 圆、边缘齐, 色浓, 直径 15 mm	无
GW-10	杆状	0.7×2.0~4.0	椭圆, 膨大, 次端生	圆、边缘齐, 边缘半透明中间为深黄褐色, 直径 5 mm	无
GW-16	杆状	0.7~0.8×3.0~3.5	椭圆, 膨大, 端生到亚端生	透明, 圆、亮、湿、凸、边缘齐, 直径 8 mm	无

根据中国科学院微生物所专家对 GW-1 和 GW-16 号菌株的鉴定, GW-1 号菌株的菌落形态为: 菌落小, 突起, 光滑, 点状, 乳酪色, 大小为 1~2 mm。GW-16 号菌株的菌落形态为: 菌落圆形, 光滑, 透明, 低凸, 薄, 大小为 2~3 mm。和我们的描述有所不同, 这主要是因为所使用的培养基不同所致。

4 株菌的主要生理生化特性见表 2。对 4 株菌的菌体形态、菌落形态及生理生化特性的观察测定, 根据参考文献 [2, 3] 可将这 4 株菌定名为多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa* Macé)。但是根据参考文献 [4] (1994 年) 将多粘芽孢杆菌转入多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa* Ash)。因此, 这 4 株菌也可定名为多粘类芽孢杆菌。GW-1 和 GW-16 号菌株经我们鉴定后又送中国科学院微生物所进行了进一步确认。

表 2 4 株菌的生理生化特性

菌号	革兰氏反应	运动性	接触酶	氧化酶	卵磷脂酶	溶菌酶	厌氧生长	VP 反应	最高生长温度 (°C)	5% NaCl 生长	pH 5.7 生长	产酸产气				利用柠檬酸盐	从 NO_3 产生 NO_2	二羟基丙酮	吲哚	苯氨酸脱氨	丙氨酸	石蕊牛奶	分解酪胺
												葡萄糖	阿拉伯糖	木糖	甘露醇								
GW-1	+	+	+	-	-	+	+	+	45	-	+	⊖	⊖	⊖	⊖	+	-	+	-	-	-	A	+
GW-5	+	+	+				+	+	40	-	+	⊖	⊖	⊖	⊖	+	-	+	-	-	-	A	
GW-10	+	+	+				+	+	45	-	+	⊖	⊖	⊖	⊖	+	-	+	-	-	-	A	
GW-16	+	+	+	-	-	+	+	+	45	-	+	⊖	⊖	⊖	⊖	+	-	+	-	-	-	A	+

注: ①A 为产酸, 其它项目未做记录。⊖为产酸产气, + 为阳性, - 为阴性。

2.2 各菌株固氮特性研究

2.2.1 不同温度条件下各菌株的固氮活性 不同温度条件下各菌株的固氮活性见图 1。从图 1 可以看出 GW-1 的最适固氮温度为 30~35℃, GW-5 和 GW-16 的最适固氮温度为 30℃ 左右, GW-10 的最适固氮温度为 35℃ 左右; 20℃ 以下, 40℃ 以上 4 株菌都不固氮或很低。

2.2.2 不同 pH 条件下各菌株的固氮活性 固氮活性和 pH 的关系见图 2。从图 2 可以看出 GW-1 固氮的最适 pH 在 7.5 左右, GW-5 固氮的最适 pH 在 7.0 左右, GW-16 固氮的最适 pH 在 6.0~7.5 之间; 以上 3 株菌固氮对 pH 的适应范围都较宽, 固氮的酸性界线在 5.5 左右, 碱性界线在 9.0 左右。而 GW-10 虽然在不同 pH 下的固氮水平都比较平稳, 但却很低, 且适应范围比较小, 最适 pH 似乎在 6.0~7.5 左右, 8.0 以上就不固氮。从 GW-10 在其它条件下的固氮活性看, 造成其固氮水平较低的原因可能为该菌株对 pH 缓冲液中的某种盐类或配比不适应, 再一原因可能是该菌株生长较慢, 培养时间未达到其最高生长期。

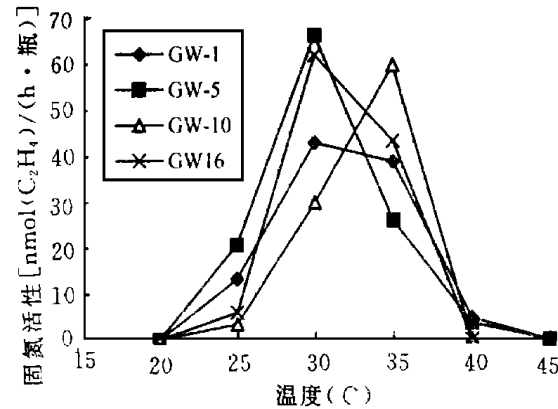


图 1 不同温度条件下各菌株的固氮活性

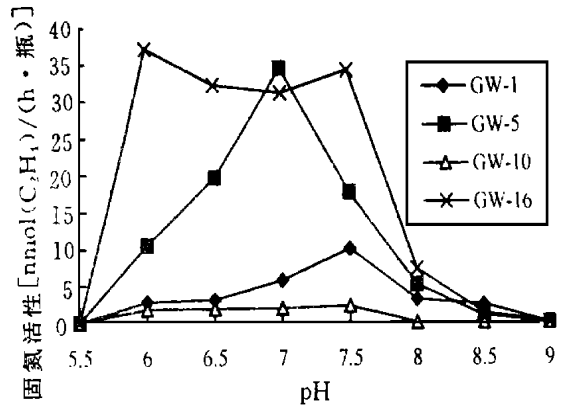


图 2 不同 pH 条件下各菌株的固氮活性

2.2.3 不同碳源条件下各菌株的固氮活性 不同碳源和 4 株菌固氮的关系见表 3。从表 3 可以看出: 4 株菌以蔗糖、葡萄糖、苹果酸的混合物为碳源时的固氮活性最高, 单独以葡萄糖为碳源时的固氮活性次之, GW-5 和 GW-10 对淀粉的利用较好, 对其它碳源的利用一般, 但 4 株菌几乎都不能利用苹果酸固氮, 那么混合碳源培养基中的高固氮活性是否和苹果酸无关, 而只是葡萄糖和蔗糖的加和作用, 有待研究。

表 3 不同碳源条件下各菌株的固氮活性

[单位: nmol (C₂H₄)/(h·瓶)]

菌号	碳源							
	混合碳源 (葡萄糖+蔗糖+苹果酸)	蔗糖	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	淀粉	苹果酸	甘露醇
GW-1	42.90	18.79	33.44	10.19	12.33	5.34	0.97	19.38
GW-5	66.17	4.76	25.82	15.89	12.83	43.02	0	0
GW-10	29.90	11.31	24.79	4.64	6.51	29.93	0	1.25
GW-16	61.88	15.78	32.70	6.08	12.15	16.13	0	1.75

2.2.4 4 株菌不同培养时间的固氮活性 不同培养时间对各菌株固氮活性的影响见图 3。从

图3可以看出随培养时间的延长各菌株的固氮活性都经历一个延迟阶段、上升阶段、稳定阶段、下降阶段,这四个阶段可能就意味着这4株菌生长的四个时期即:延迟期、对数期、稳定期和衰亡期。从图3我们可以看到在接种后最初的20~24 h 4株菌基本上都没有固氮活性,而后固氮活性开始迅速上升, GW-10、GW-16在48 h后, GW-5在60 h后, GW-1在84 h后固氮活性开始稳定, GW-16大约在72 h后,其它菌在96 h后固氮活性开始平稳下降; 4株菌的最高固氮能力 GW-1、GW-5在培养96 h时分别为: 156. 90、89. 37 nmol (C₂H₄)/(h·瓶),

GW-10、GW-16在培养72 h时分别为: 56. 63、83. 64 nmol (C₂H₄)/(h·瓶)。

3 结 语

以上研究的4株菌经鉴定为芽孢杆菌属的多粘芽孢杆菌,由于本文只从温度、pH、培养时间及8种碳源四个方面对其固氮活性进行研究,固氮菌对其它营养条件的要求还远未了解,因此对这4株菌的固氮能力的了解也只是初步的。据报道^[8,9]国内外都曾发现有多粘芽孢杆菌和小麦等的联合固氮作用,我们以前只测定毛竹根系具有一定的固氮能力,而从毛竹根系分离到固氮菌还是第一次,它们和毛竹之间的联合固氮还需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 顾小平,吴晓丽. 毛竹及浙江淡竹根际联合固氮的研究. 林业科学研究, 1994, 7(6): 618~622.
- 2 Sneath P H, Main N S, Sharp M E, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2. Williams & Wilkins, 1986.
- 3 Gordon R E, Brunswick N, Lii P, et al(蔡妙英,刘立太,战立克译). The genus *Bacillus*(芽孢杆菌属). 北京: 农业出版社, 1983.
- 4 Collins M D, Lawson P A, Willems A, et al. The phylogeny of the genus clostridium: Proposal of five new genera and eleven new species combination. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 812~826.
- 5 中国科学院微生物所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1983.
- 6 朱建国. 临床常见细菌鉴定手册. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1993.
- 7 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985.
- 8 葛诚. 微生物肥料概述. 土壤肥料, 1993, 6: 43~45.
- 9 Haahetela K. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by enterobacteriaceae and azospirillum strains in cold-climate spodosols. Appl. Environ. Microbiol., 1981, 41(1): 203~206.

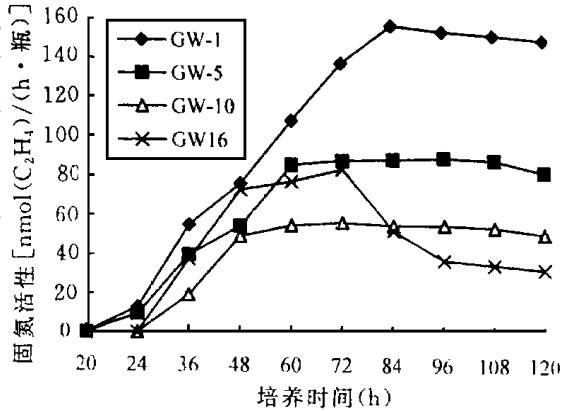


图3 4株菌不同培养时间的固氮活性

Study on Several Nitrogen Fixation Strains from *Phyllostachys pubescens* Roots

Gu Xiaoping Wu Xiaoli

Abstract Four strains GW-1, GW-5, GW-10 and GW-16 isolated from *Phyllostachys pubescens* roots are identified and studied. According to the research on morphology, physiological and biochemical character, these strains all belong to *Bacillus polymyxa*. Their optimum temperature for nitrogen fixing is 30~35 for GW-1, 30 for GW-5 and GW-16, 35 for GW-10. Optimum pH for nitrogen fixing is 7.5 for GW-1 and GW-10, 7.0 for GW-5, 6.0~7.5 for GW-16. Many carbon sources can be used by these four strains, but the highest nitrogenase activity can be obtained when the carbon sources is the mixture of glucose, sucrose and malic acid. Under different culture time condition the highest nitrogenase activity is 156.90, 89.37 nmol (C₂H₄) · h⁻¹ · bottle⁻¹ for GW-1 and GW-5 in 96 h, 56.63, 83.64 nmol (C₂H₄) · h⁻¹ · bottle⁻¹ for GW-10 and GW-16 in 72 h.

Key words *Phyllostachys pubescens* *Bacillus polymyxa* associative nitrogen fixation nitrogenase activity

Gu Xiaoping, Associate Professor, Wu Xiaoli (The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF Fuyang, Zhejiang 311400).