

从福州土壤中分离出一个固氮菌新种*

陈 绍 芳

(福建农学院土壤农化系)

Виноградский 把所有的好气性固氮菌分为两类：一类是专性的固氮菌，如 *Azotobacter*，另一类是非专性固氮的腐生菌。后者在缺乏化合态氮时不能生长，固氮作用微弱，并且不稳定^[1]。

除 *Azotobacter* 属的各种固氮菌外，其他学者在自然界中也相继发现具有固氮作用的细菌。Stapp 和 Krassilnikov 分离得 *Azotomonas* 属的细菌也具有不同的固氮能力^[2]。上述这些细菌均属于专性的好气性固氮菌，由于它们能够在无氮培养基上很好地生长发育，同时进行固氮作用。

关于固氮菌的分类问题，各学者的意见颇不一致。根据 Красильников 的分类系统^[2]，他把 *Azotobacter* 属列于杆菌科 (Bacteriaceae) 中，而把 *Azotomonas* 属归于假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)。根据 Bergey 的分类系统^[3]，他把固氮菌独立列为一科，命名为固氮菌科 (Azotobacteriaceae)，其中包括 *Azotobacter* 和 *Azotomonas* 两个属。最近 Рубенчик 按照 Bergey 的分类系统，把固氮菌科 (Azotobacteriaceae) 分为 *Azotobacter*、*Beijerinckia* 和 *Azotomonas* 三个属^[4]。虽然各学者对于固氮菌的分类法有所不同，但根据文献所记载的固氮菌，不外有下列几种^[2-4]：*Azotobacter Chroococcum* (1901)，*Azotobacter agile* (1901)，*Azotobacter vinelandii* (1904)，*Azotobacter indicum* (*Beijerinckia indica*) (1939)，*Azotobacter galophilum* (1945)，*Azotobacter nigricans* (1949)，*Azotobacter macrocytogenes* (*Beijerinckia macrocytogenes*) (1955)，*Azotomonas insolita* (1940) 和 *Azotomonas fluorescens* (1947) 等。

作者于 1956—1957 年进行福州地区固氮菌的调查研究时，从 131 个土样中分离得自生固氮菌 62 个菌株，经鉴定结果，其中有一株的形态、生理以及培养特征均与上述各种固氮菌有所不同，作者认为是固氮菌的一个新种，曾称为 123 固氮菌^[5]。本文仅就这种固氮菌的分离和鉴定报告于下。

一、菌种的分离

本工作的土壤样本是 1957 年 8 月间从福州魁岐附近稻田中采集的。分离时，首先将土样接种于 Ashby 甘露醇培养液中，在 28—30°C 进行丰富培养，几天之后培养物大量繁殖，在培养液表面生成一层菌膜，然后挑取菌膜少许，用平板稀释法进行分离，当获得该菌种单独菌落后，再用 Ashby 甘露醇琼脂培养基，以平板稀释法进行纯化，而得到纯种。

* 本文曾于 1962 年 6 月全国土壤学会学术会议上宣读。参加本项工作者尚有吴章琴和陈振玉同志，并蒙陈秀明同志代拍照片，福建农业科学院吴怀蕪和张开驹同志代为测定氮，谨此致谢。

二、菌种的描述

(一) 菌种形态特征的描述

这种固氮菌是一种較大的杆状菌(图 1),大小为 $0.7-1.5 \times 2.1-5.0$ 微米,老幼細胞形状不变,通常单生或双生。細胞內含有強烈折光的顆粒体,一般 3—5 个,苏丹 III 染色为阴性。細胞壁外具有粘韌的厚荚膜,无芽胞, Liefson 染色法为周生鞭毛菌, 格兰氏染色負反应。

(二) 菌种培养特征的描述

在 Ashby 甘露醇琼脂平板上,菌落为黄色或金黄色,以后色素微微加深,色素不渗入培养基。菌落直径 10—17 毫米,凸起有光泽,呈不规则圆形,边缘不整齐,表面皱褶,从中央向边缘作辐射状(图 2),有的菌落表面光滑,不透明,韌度非常大,板結似橡皮,用接种环不容易挑起。在培养基下层的菌落,往往钻出培养基呈棱状凸起(图 3)。斜面培养,菌苔呈横条状凸起或呈光滑状凸起。在 Ashby 甘露醇培养液中生长,液面生成一层黄色皱褶的厚菌膜,并沿瓶壁上爬。应该特別指出的,这种固氮菌在 Ashby 甘露醇培养液中生长时,如果随时搖动,培养几周之后,固氮菌大量繁殖,使全部培养液成为凝胶状,表面凹凸似波浪状(图 4),此种特征与其他固氮菌显然不同。

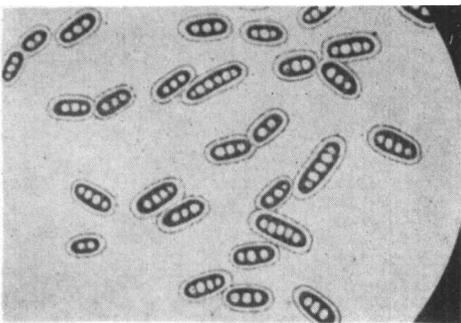


图 1 *Azotobacter fushouensis* 的細胞形态

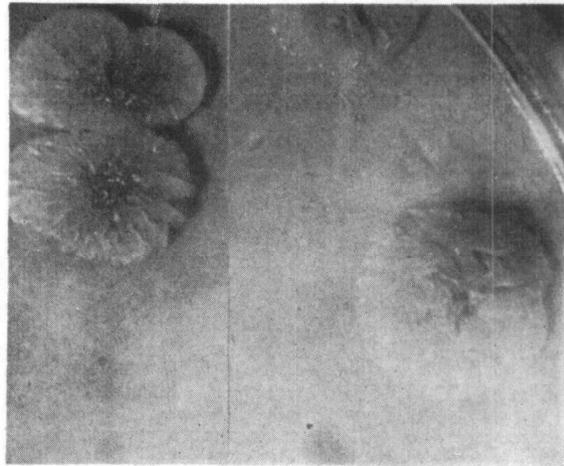


图 2 *Azotobacter fushouensis* 在甘露醇琼脂平板上的菌落形状

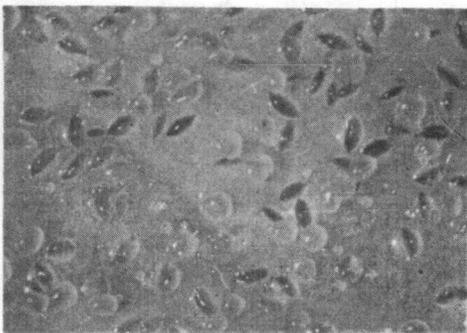


图 3 *Azotobacter fushouensis* 在甘露醇琼脂平板下层的菌落钻出表面呈棱状凸起

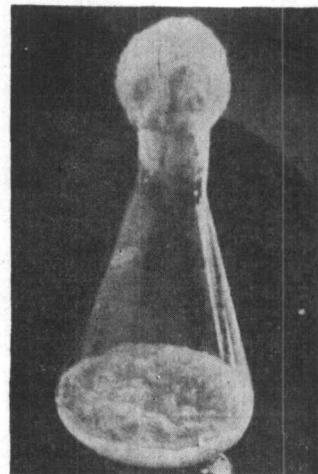


图 4 *Azotobacter fushouensis* 液体培养时培养液成为凝胶状,表面呈波浪状

(三) 菌种生理特性的研究

这种固氮菌在肉汁蛋白胰琼脂上不能生长。在 Ashby 甘露醇明胶培养基上穿刺培养不能把明胶液化,但能在表面生成一层紅褐色縐褶厚菌膜,并沿試管壁上爬。馬鈴薯块斜面培养菌苔呈褐色。在 Ashby 甘露醇铵盐斜面培养基上生长很好,菌苔呈金黄色。在柠檬酸鉄琼脂培养基上穿刺培养,不产生硫化氢。在 Ashby 甘露醇硝酸盐培养液中培养,能还原硝酸盐。于含有各种碳源并加入溴麝香草酚蓝培养基(除碳源的种类不同外,一切成分与 Ashby 甘露醇培养基相同)上培养,能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、木糖、棉子糖、甲醇、乙醇、丁醇、甘油、甘露醇、乳酸鈣和琥珀酸鈉。本菌利用上述各种碳源并能产酸;但不能利用淀粉、糊精和安息香酸鈉。

为了探討某些环境条件对于本菌的生长发育和固氮作用的影响,进行了下列試驗。

1. 温度对于本菌生长发育的影响

文献記載一般固氮菌均属于中温性类型^[6,7]。为了探討温度对于本菌生长发育的影响,曾把它接种在 Ashby 甘露醇琼脂斜面上,分別置于 15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、45°C 一系列不同的温度下进行培养,3 天后观察其生长发育情况,茲将观察結果列于表 1。

表 1 温度对于本菌生长发育的影响

温 度	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
生长发育情况	-	+	+++	++++	++++	++	-

从表 1 的材料可以看出,本菌在 20—40°C 范围内均能生长,尤以 30—35°C 生长发育最为良好,但在 15°C 和 45°C 則不适于它的生长。可見,这种固氮菌与一般固氮菌适应的温度范围基本一致,应该把它列为中温性的类型。

2. 微量元素对于本菌固氮作用的影响

很多文献記載微量元素可以刺激固氮菌的固氮效率^[6,8,9,10],在固氮过程中,鉬和硼起着重要的作用,环境中缺少鉬,固氮作用就不能进行或大为减弱。为了探討鉬和硼对于本菌固氮作用的影响,进行了下列試驗:用 Ashby 葡萄糖作为母液,配成含 0.0001% 鉬酸鈉,含 0.0001% 硼酸,含 0.0001% 鉬酸鈉及硼酸等三种培养液,并以 Ashby 葡萄糖培养液作为对照。用 250 毫升三角瓶盛培养液 50 毫升,灭菌后,进行接种。每种处理重复 4 瓶,置于 30°C 定温箱中培养 30 天,然后将各瓶培养物用凱氏定氮法进行測定,茲将結果列于表 2。

表 2 微量元素对于本菌固氮作用的影响

处 理	毫克 N/1 克葡萄糖	%
Ashby 葡萄糖(对照)	4.68	100
Ashby 葡萄糖 + 0.0001% 硼酸	4.90	105
Ashby 葡萄糖 + 0.0001% 鉬酸鈉	6.23	133
Ashby 葡萄糖 + 0.0001% 硼酸 + 0.0001% 鉬酸鈉	6.58	141

从表 2 的数据可以看出,鉬和硼均能刺激本菌的固氮作用。含有鉬和硼的处理比对

照的固氮效率提高41%，含鉬的处理提高33%，含硼的处理固氮效率提高較少，仅达5%。

3. 不同碳源对于本菌固氮作用的影响

文献記載不同碳源对于固氮菌的固氮作用具有一定的影响^[11,12]。为了探討不同碳源对于本菌固氮作用的影响，曾以 Ashby 母液，分別加入各种碳源（葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、木糖、棉子糖、甘露醇）。用 250 毫升三角瓶盛不同碳源的 Ashby 培养液 50 毫升，灭菌后，进行接种，每种碳源重复 4 瓶，置于 30℃ 定温箱中培养 30 天，然后将各瓶培养物用凱氏定氮法进行測定，茲将結果列于表 3。

从表 3 的数据可以看出，本菌以麦芽糖作为碳源的固氮量最多（8.12 毫克 N/1 克麦芽糖），其次为蔗糖、果糖、甘露醇和葡萄糖，再次为乳糖和棉子糖，半乳糖和木糖的利用率最小，固氮量最少。

表 3 不同碳源对于本菌固氮作用的影响

碳 源	毫克 N/1 克糖 (或醇)
麦 芽 糖	8.12
蔗 糖	5.69
果 糖	5.05
甘 露 醇	4.90
葡 萄 糖	4.68
乳 糖	3.36
棉 子 糖	3.36
半 乳 糖	2.80
木 糖	2.66

表 4 pH 值对于本菌固氮作用的影响

pH 值	固 氮 量	
	毫克 N/1 克葡萄糖	%
4.05	2.35	100
5.00	4.12	175
6.05	4.34	184
7.02	4.56	194
8.04	5.23	222
9.01	5.55	236
10.00	4.98	212
11.04	3.13	133

4. pH 值对于本菌固氮作用的影响

一般固氮菌适宜于中性或微碱性的环境，仅有少数品种（*Az. indicum* 和 *Az. macrocytogenes*）适于酸性环境^[11,13]。固氮菌的固氮作用与环境的 pH 值具有一定关系^[14]。为了探討 pH 值对于本菌固氮作用的影响，曾进行下列試驗：配制 pH 值不同的培养液（Ashby 葡萄糖母液），每个 250 毫升三角瓶盛培养液 50 毫升，灭菌后，进行接种，每种 pH 值重复 4 瓶，置于 30℃ 定温箱中培养 30 天，然后用凱氏定氮法进行測定，茲将結果列于表 4。

从表 4 的数据可以看出，本菌适应的 pH 值范围甚广，从 pH 4.05—11.04 均显示不同程度的固氮作用。其中以 pH 9.01 时的固氮量最高（5.55 毫克 N/1 克葡萄糖），pH 4.05 时的固氮量最低（2.35 毫克 N/1 克葡萄糖）。若換成百分比，pH 9.01 时的固氮量为 pH 4.05 时的 236%，固氮量增加一倍以上。根据試驗材料可以看出，此种固氮菌的耐酸性与耐碱性均比一般固氮菌为強。这种特性在农业实践上具有一定的意义。

三、本菌与其他固氮菌的比較

分布于土壤中的好气性自生固氮菌主要有 *Azotobacter* 和 *Azotomonas* 两个属。本菌与此二属相比較：（1）*Azotomonas* 属的固氮菌是小而直的杆菌，細胞內不含顆粒体，一般无荚膜，并为端生鞭毛菌；而本菌是一种較大的杆菌（0.7—1.5 × 2.1—5.0 微米），細胞內含有明显的顆粒体（一般 3—5 个），具有厚荚膜，并为周生鞭毛菌，与 *Azotobacter* 属

表 5 本菌与 Azotobacter 属的各种固氮菌特征的比较

菌种 特征	Azotobacter 属						本菌	
	<i>Azotobacter Chroococcum</i>	<i>Azotobacter agile</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>	<i>Azotobacter nigricans</i>	<i>Azotobacter galophilum</i>	<i>Azotobacter indicum</i>	<i>Azotobacter macrocytogenes</i>	
细胞形状	初杆状后圆形	圆形或椭圆形	短杆状或卵圆形	初杆状后圆形	初杆状后圆形	卵圆形或长椭圆形	圆形或长椭圆形	
形态特征	荚膜	一般没有	一般没有	有	有	一般没有	有	
	颗粒体	有	无或极少	有	有	有	无	
细胞排列	成对, 单独或入迭	单独或成链	单独	单个或 3-4 个联结一起	成对	单独	常联结呈入迭状	
运动性	能运动	运动极活跃	运动活跃	能运动	能运动	能运动	能运动	
培养特征	菌落圆形凸起, 粘稠, 扩散或糊状, 光滑或微褶, 无色或染成褐色; 液体培养初期为乳白色, 后期呈褐色沉淀	菌落光滑, 干燥, 湿润, 不常产生色素, 但在含有有机酸的培养基上产生黄褐色或绿色色素, 渗入培养基中而现萤光; 液体培养呈流浊状	菌落光滑, 光泽, 粘稠, 能产生蓝绿色, 色素渗入培养基中而现淡绿色; 液体培养初期混浊, 后期淡绿色	菌落光滑或微褶, 粘稠, 黑色, 色素渗入培养基中使之变黑; 液体培养初期混浊, 后期呈黑色	菌落粘稠, 板结如粘膏, 黑褐色, 色素渗入培养基中, 使之变黑褐色; 液体培养初期混浊, 后期呈黑色	菌落凸起, 粘稠, 有弹性, 可拉成长丝, 不产生色素, 陈旧培养呈褐色; 液体培养呈混浊状	菌落凸起, 粘稠, 产生粉红色, 色素渗入培养基, 而现淡红色; 液体培养初期混浊, 后期呈淡红色	菌落凸起, 微褶或光滑, 韧度很大, 板结似橡皮, 黄色或淡黄色; 液体静止培养在液面产生一层厚菌膜, 振荡培养能使全部培养液呈凝胶状
	生理特性	在蛋白质培养基上不生长或生长很差, 在中性或微碱性环境中生长	在蛋白质培养基上能生长, 在中性或微碱性环境中生长	个别培养物能在蛋白质培养基上生长, 在中性或微碱性环境中生长	在蛋白质培养基上不生长, 在中性或微碱性环境中生长	在蛋白质培养基上不生长, 耐酸性, 能在盐渍化环境中生长	在蛋白质培养基上不生长, 耐酸性, 能在较酸的环境中生长	在蛋白质培养基上不生长, 耐酸性, 能在较酸的环境中生长

相同。(2) *Azotomonas* 属的固氮菌,在蛋白质培养基、无机氮培养基以及无氮培养基上均能生长良好;而本菌仅在无氮培养基和无机氮培养基上生长良好,不能在蛋白质培养基上生长发育,此也与 *Azotobacter* 属相同。可见在形态特征和生理特性方面本菌都不同于 *Azotomonas* 属,而与 *Azotobacter* 属相同。因此作者认为本菌应属于 *Azotobacter* 属。

根据 Красильников 的分类系统^[2],他把 *Azotobacter* 属的固氮菌分为: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter agile*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter nigricans*, *Azotobacter galophilum*, *Azotobacter indicum* 等 6 种。不久以前 Jensen (1955) 又分离得 *Azotobacter macrocytogenes*^[13]。兹将本菌与上述 7 种固氮菌列表进行比较(表 5)。

从表 5 可以看出,本菌与 *Azotobacter* 属的 7 种固氮菌主要的区别在于:(1)本菌是一种较大的杆菌,其细胞形状不随培养时间而变化,而其他固氮菌的形状,一般初期为短杆状,后期呈圆形或椭圆形。此外,本菌具有明显而厚的荚膜,细胞内的颗粒体排列呈链状,此种特征与其他固氮菌亦有所不同。(2)本菌的菌落主要特征,是韧性非常大,板结似橡皮,用接种环不容易挑起,这与其他固氮菌也显然不同。(3)本菌在液体培养基中培养时,能使培养液呈凝胶状,表面呈皱褶状,这种特异性也是其他固氮菌所没有的。

根据上述这些特征的差别,作者认为本菌是 *Azotobacter* 属的一个新种,因其从福州土壤中分离出,定名为 *Azotobacter fuzhouensis* n. sp.

四、摘 要

1. 1957年从福州土壤中分离出一个固氮菌新种,按其形态特征和生理特性的描述,显然与 *Azotomonas* 属有所区别,若与 *Azotobacter* 属进行比较,无论在形态特征或生理特性方面都很类似,但这种固氮菌与前人所发现的 *Azotobacter* 属的七个菌种不同。作者认为是 *Azotobacter* 属的一个新种,因其从福州土壤中分离得,定名为 *Azotobacter fuzhouensis* n. sp.

2. 本菌在 20—40℃ 范围内均能生长发育,尤以 30—35℃ 生长最旺盛,应把它列为中温性的类型。

3. 钼和硼可以促进本菌的固氮作用,含有钼和硼的处理可提高固氮效率 41%,含钼的处理可提高 33%,含硼的处理仅提高 5%。

4. 不同碳源对于本菌的固氮作用具有一定的影响。以麦芽糖作为碳源的固氮量最多(8.12 毫克 N/1 克麦芽糖),其次为蔗糖、果糖、甘露醇和葡萄糖,再次为乳糖和棉子糖,半乳糖和木糖最少。

5. 本菌适应的 pH 值范围较广, pH 4.05—11.04 均有不同程度的固氮作用。以 pH 8.04—9.01 时的固氮作用最强, pH 4.05 时最弱。可见,本菌的耐酸性与耐碱性比一般固氮菌来得强,这对农业实践具有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Родина, А. Г.: Водные спиралилы фиксирующие молекулярный азот. Микробиология, том XXV, вып. 2, 1956.
- [2] Красильников, Н. А.: Определитель бактерий и актиномицетов. Изд.-во АН СССР, 1949.
- [3] Bergey's: Manual of determinative bacteriology. 6th. ed., 1948.

- [4] Рубенчик, Л. И.: К систематике бактерий из семейства Azotobacteriaceae. Микробиология, том XXVIII, вып. 3, 1959.
- [5] 陈紹芳等: 福州市郊自生固氮菌的研究。微生物学通讯, 第1卷 第1期, 1959。
- [6] Рубенчик, Л. И.: Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. Изд.-во АН УССР, 1960.
- [7] Пошон, Ж. и Баржак, Г. Де.: Почвенная микробиология. Изд.-во иностранной литературы, 1960.
- [8] 黄有馨等: 自生固氮菌的固氮效率初步試驗。土壤微生物学通讯, 14—15, 1957。
- [9] Horner, C. K., Burk, D., Allison, F. E. and Sherman, M. S.: Nitrogen fixation by Azotobacter. *J. Bact.*, 47, 1944.
- [10] Федоров, М. В.: Биологическая фиксация азот атмосферы. Сельхозгиз, М., 1952.
- [11] Starkey, R. L. and De, P. K.: A new species of Azotobacter. *Soil sci.*, 47, 1939.
- [12] Федоров, М. В.: Продуктивность фиксации азота атмосферы азотобактера на различных источниках углерода. Микробиология. том XIV, вып. 2, 1945.
- [13] Jensen, H. L.: *Azotobacter macrocytogenes* n. sp., a nitrogen-fixing bacterium resistant to acid reaction. *Acta agric., Scand.* 5, No. 2—3. 1955.
- [14] 王祖衣等: 需氧自生固氮菌的耐酸性。植物学报, 第5卷 第3期, 1956。

A NEW SPECIES OF AZOTOBACTER ISOLATED FROM THE SOIL OF FOOCHOW DISTRICT

S. F. CHEN

(Department of Soils and Fertilizer, Agriculture College of Fukien)

(SUMMARY)

This paper gives a detailed morphological and physiological description of *Azotobacter fuzhouensis* n. sp. isolated from the soil of fuzhou (Foochow) in comparison with other members of the genus.

The new species is a mesophilic form. It is active within the temperature 20—45°C, and shows greatest activity at 30—35°C.

Both molybdenum and boron are effective in promoting the nitrogen fixation of *Azotobacter fuzhouensis* n. sp. The nitrogen fixed increases about 41% with the treatment of a culture medium containing 1 ppm. Mo and 1 ppm. B. Separated treatments of 1 ppm. Mo and 1 ppm. B increase 33% and 5% of its nitrogen fixing capacity respectively.

Different carbon hydrates as energy sources vary in their effect on the amount of nitrogen fixing capacity of the said species. Maltose gives best result, having 8.12 mg N/1g. maltose. Fructose, mannitol and glucose come to the next, while galactose and xylose are poor carbon sources.

This species grows at pH 4.05—11.04. The most favorable pH for its nitrogen fixation ranges 8.04—9.01.