

固氮菌 (*Azotobacter*) 伴生菌的研究*

王毓庆 罗国威

(华南农学院)

由于固氮菌 (*Azotobacter*) 的荚膜上常粘附着一些革兰氏阴性的小杆菌, 使在分离及纯化固氮菌时增加了困难。有许多文献资料报导了固氮菌的伴生菌的种类, 和它们对固氮菌的发育与固氮作用的影响。记载较多的伴生菌种是 *Agrobacterium radiobacter*^[11,13]。Gray^[2] 曾分离了伴随圆褐固氮菌的革兰氏阴性杆菌菌株 14 个, 大部分为极毛杆菌属 (*Pseudomonas*) 及 1—2 个无色杆菌 (*Achromobacter*), 但未作种的鉴定。并认为大部分的伴生菌在无氮培养基上对固氮菌有抑制生长的作用; 而极毛杆菌属的一些种且有破坏固氮菌细胞的能力。

Anderson^[1] 也报导在美国许多酸性和碱性土壤中有一种与固氮菌相伴生的小杆状菌, 有固氮作用, 命名为 *Pseudomonas azotocolligans*。

作者在研究广州耕作土壤中固氮菌属的过程中, 也发现多种伴生在固氮菌荚膜上的革兰氏阴性小杆状菌, 它们也在缺乏固氮菌的土壤中存在, 都可以在牛肉膏蛋白胨培养基上生长良好, 其中也有能在 Ashby 氏无氮培养基上生长的两个种。根据它们生长培养特性来看, 显然都不是 *radiobacter*。因此对于这些固氮菌的伴生菌进行了分离、纯化和鉴定工作。

实验方法及结果

自水稻土及菜园土采取表土 (5—15 厘米) 接种于 Ashby 氏无氮培养基内 (甘露醇 1%, K_2HPO_4 0.5%, $MgSO_4$ 0.2%, $NaCl$ 0.2%, $CaSO_4$ 0.1%, $CaCO_3$ 0.5%) 在 28—30°C 中, 经过丰富培养 3—5 天后, 当表面生长出菌膜后, 吸取培养液, 用平面稀释法或平面划线法于 Ashby 氏无氮刚果红琼脂培养基上进行分离。

在广州地区耕作土壤中分离的固氮菌, 只有圆褐固氮菌一个种, 但自培养特征来看, 可以分为二个菌系, 一个在 Ashby 氏无氮培养基上发育的菌落为褶皱型并产生褐色色素的典型圆褐固氮菌, 另一个则发育有光滑型菌落并产生淡黄色色素, 至于其形态和生理特征以及生化反应则与典型的圆褐固氮菌相同。

将在无氮刚果红琼脂培养基上生长的固氮菌的菌落, 用平面稀释法或平面划线法反复进行纯化 (3—5 次)。然后作涂片在显微镜下检查时, 一般均显得纯净, 不易发现伴生菌的存在。但若将上述纯化的固氮菌接种于牛肉膏蛋白胨培养基内, 往往能发现大量革兰氏阴性的杆菌菌落生长。

利用上述分离方法, 将在显微镜下显示纯净的固氮菌培养, 以平面稀释法接种于牛肉

* 本文蒙樊庆莹教授、刘萃杰教授修改指正, 特此致谢。

膏蛋白胨琼脂培养基上,由此获得占优势的伴生菌 4 个菌株,其中 2 个可以在 Ashby 氏无氮培养基上生长。

根据 Bergey 氏 (1957) 细菌鉴定手册、Skerman (1959) 细菌属的鉴定指导及 Paul 和 Newton (1961) 的资料,将此四个菌株分别鉴别如下:

I. 菌株 E 菌体杆状或球杆状,单生或对生,大小为 $0.65\mu \times 0.8-1.3\mu$,有荚膜,无芽孢,鞭毛极生,革兰氏阴性。

牛肉膏琼脂菌落:菌落圆形,大小 2—4 毫米,白色,光滑,微隆起,有光泽及粘性,不透明。在含葡萄糖的牛肉膏蛋白胨的培养基上后期产生黄色色素,并渗至培养基内。

牛肉汤:混浊生长,沿管壁有环状菌膜。

马铃薯培养基:乳白色。

不液化明胶,石蕊牛乳产酸。

在含葡萄糖、乳糖、甘露醇、果糖、蔗糖、甘油、麦芽糖的牛肉膏培养基内产酸产气。

硝酸盐还原,微量产生硫化氢,不产生吲哚,形成氨,微量水解淀粉。

能利用铵盐,能在费美氏和孔氏培养基内生长,能在 Ashby 氏无氮培养基上生长,菌落微白色。

pH 范围 4.5—9.5。

利用 1 克葡萄糖能固定 2.4 毫克氮。

根据上述形态特征、培养习性以及生物化学反应等与 Bergey 氏 (1957) 所描述的 *Axotomonas insolita* 相同,除牛奶反应例外。

II. 菌株 A 此菌为最主要的固氮菌伴生菌,并广泛分布在各种耕作土壤中,数量极多。

菌体杆状,单生,大小为 $0.6\mu \times 0.7-1.2\mu$,有荚膜,无芽孢,能运动,革兰氏阴性。

在 Ashby 氏无氮培养基上生长,菌落圆形,大小为 2—3 毫米,无色,光滑,透明,隆起,水滴状,后期菌落微带白色。

在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上生长形成菌落,直径 2—4 毫米,圆形,光滑,灰白色,后期菌落微带黄色。

在 Ashby 氏无氮液体培养基内生长良好,呈絮状沉淀生长。

牛肉膏液体培养基内生长混浊,液面沿管壁略现环状菌膜,在含糖的牛肉膏液体培养基面形成黄色菌膜。

不液化明胶。石蕊牛乳于 10 天内产生碱性反应,上层有黄色菌膜生长。

在含葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露醇、麦芽糖的牛肉膏蛋白胨培养基内不产酸不产气或微产酸。培养 3 天后培养基酸度由 pH 7.0 降至 pH 6.6,一星期后回升至 6.8 左右。

在含葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露醇、麦芽糖的 Ashby 氏无氮液体培养基内产酸不产气,培养基内酸度自 pH 7.2 下降至 4.8 左右。

能在柠檬酸盐培养基上生长。

硝酸盐还原,产生硫化氢微少,不产生吲哚,产生氨, M.R. 及 V.P. 反应阴性。

pH 范围 5.0—8.8。

利用 1 克葡萄糖能固氮 1.4—2.0 毫克。

根据上述形态特征、培养习性及生化反应等,除石蕊牛乳反应及糖发酵反应外,其他反应基本上与 Paul 和 Newton (1960) 所描述的 *Pseudomonas azotogensis* 相似。

III. 菌株 Mi 杆状菌,单生或成对,大小 $0.6\mu \times 1.3-1.8\mu$, 无荚膜及芽孢,能运动,革兰氏阴性。

牛肉膏琼脂菌落: 菌落点状,大小 0.8—1 毫米,微隆起,光滑,有光泽及微弱绿色荧光,半透明,微黄色。

不液化明胶,石蕊牛乳胰化。

在含葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘油、阿拉伯糖、蔗糖的牛肉膏蛋白胨培养基中不产酸不产气。

硝酸盐还原,不形成硫化氢,不形成吲哚,不水解淀粉,形成氨。

pH 范围 3.8—10.4。

不能在 Ashby 氏无氮培养基上生长。

此菌系与荧光板光杆菌 *Pseudomonas fluorescens* 相似。

IV. 菌株 Y 杆状,单生,大小 $0.3-0.6\mu \times 0.6-1.3\mu$, 无荚膜,不生芽孢,能运动,革兰氏阴性。

牛肉膏琼脂菌落: 圆形,大小 2—4 毫米,凸起,光滑,有光泽,胶粘状,草黄色菌落。

于含有葡萄糖的牛肉膏琼脂斜面上生长呈橙黄色,马铃薯斜面上菌苔橙黄,马铃薯变褐色。

液化明胶呈杯状,石蕊牛乳胰化。

在含葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇的牛肉膏蛋白胨培养基内不产酸不产气。

硝酸盐不还原,产生硫化氢及氨,不形成吲哚,水解淀粉微弱。

不能在 Ashby 氏无氮培养基上生长。

这一菌系暂定为极毛杆菌的一个种 *Pseudomonas* sp。

为了阐明伴生菌对固氮菌发育的影响,曾进行了下列实验。

1. 将伴生菌和固氮菌混合接种于 Ashby 氏无氮培养液中,在 28—30°C 中培养观察其生长情况,结果见表 1。

表 1 伴生菌和固氮菌混合接种的生长情况

时间(小时)	菌 种		固 氮 菌	<i>Pseudo. azotogensis</i>	固氮菌细胞形态
	菌数 单位(万)				
48			212	342	无变化
96			328	548	细胞较大
144			472	784	细胞较大
对照			764		
对照				600	

自表 1 可以看出,当 *Pseudomonas azotogensis* 与固氮菌混合生长于 Ashby 无氮培养液内时,固氮菌的数量较少,然细胞个体较大,而 *Pseudo. azotogensis* 的生长良好,未发现有影响。

2. 将 *Pseudo. azotogensis* 与固氮菌混合接种于 Ashby 氏无氮琼脂培养基上, 48 小时以内 *Pseudo. azotogensis* 生长较慢, 但后期迅速生长, 使圆褐固氮菌的褶皱型菌落变为粘液状, 并减少褐色色素的产生。

3. 将 *Pseudo. azotogensis* 或 *Pseudo. sp.* 接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基内, 在 28—30°C 中培养一星期, 将培养液用 Seitz 滤器过滤, 取其无菌滤液, 按不同浓度比例加于 Ashby 氏无氮培养液内, 接种固氮菌, 在 28—30°C 中培养后, 观察其生长情况, 结果如表 2。

表 2 培养过伴生菌的无氮滤液中固氮菌生长情况

过 滤 液	处 理 方 法	固氮菌生长情况(单位:万)			固氮菌细胞形态
		48 小时	96 小时	144 小时	
<i>Pseudo. azotogensis</i>	对照(加牛肉膏培养基 1 毫升)	164	388	592	比无氮培养基菌体较小
<i>Pseudo. azotogensis</i>	0.1 毫升过滤液+0.9 毫升上述培养基	204	420	568	比无氮培养基菌体较小
<i>Pseudo. azotogensis</i>	0.5 毫升过滤液+0.5 毫升上述培养基	120	308	328	菌体变小
<i>Pseudo. azotogensis</i>	1 毫升过滤液	136	248	272	菌体变小
<i>Pseudo. sp.</i>	对照(加牛肉膏培养基 1 毫升)	180	294	384	比无氮培养基菌体较小
<i>Pseudo. sp.</i>	0.1 毫升过滤液+0.9 毫升上述培养基	184	276	404	比无氮培养基菌体较小
<i>Pseudo. sp.</i>	0.5 毫升过滤液+0.5 毫升上述培养基	112	192	244	有畸形细胞出现
<i>Pseudo. sp.</i>	1 毫升过滤液	84	172	212	有畸形细胞出现

由上列实验结果可以看出, *Pseudomonas sp.* 的过滤液对固氮菌的生长不利, 过滤液浓度较高时则引起固氮菌细胞畸形; 而 *Pseudomonas azotogensis* 则由于在不同培养基上生长的过滤液对固氮菌的影响不同。在无氮培养基上生长的过滤液, 对固氮菌无显著影响, 如用生长于牛肉膏蛋白胨培养液的过滤液, 则有抑制固氮菌生长的现象。

讨 论

分离的伴生菌菌株 E, 应鉴定为 *Azotomonas insolita*, 虽然在石蕊牛乳中有产酸反应, 与 Bergey 氏手册记载为无变化有所不同, 但根据该菌既能强烈发酵乳糖产酸及产气的特性, 则在石蕊牛乳中产酸是符合其生理特性的。

伴生菌菌株 A, 根据其形态、培养及生化反应与 Anderson (1955) 所报导的伴生菌 *Pseudomonas azotocolligans* 不同。因为后者的菌落具有粘着的奶油状中心, 边缘硬, 与琼脂联结较紧, 产生淡黄或淡橙色色素, 并能液化明胶, 还原石蕊牛乳且产酸。而菌株 A 基本上与 Paul 和 Newton (1961) 在加拿大所分离的新种 *Pseudomonas azotogensis* 相同。虽然 Paul 和 Newton 报导的 *Pseudo. azotogensis* 在含糖的培养基不产酸。根据我们的实验, 该菌在含有糖的牛肉膏蛋白胨培养基内产生微量的酸, 但至生长后期酸已被中和, 如将该菌接种于含糖的无氮合成培养基内, 则可看出其强烈产酸现象。因此认为在鉴定某些能在合成培养基上生长的菌, 糖发酵试验应以无机合成培养基为基础, 否则会产生不同的结果。

Pseudo. azotogensis 在无氮培养条件下, 对固氮菌的影响可能不是由于代谢产物, 而是此菌繁殖速率较快, 争夺了固氮菌的营养; 同时固氮菌的代谢产物刺激了 *Pseudo.*

axotogenesis 的生长,反而影响了固氮菌本身的发育量。

在广州地区不少土壤中,缺乏固氮菌的存在,而 *Pseudo. azotogenesis* 却广泛分布,其发育量也远比固氮菌为大。为此,在本地区的土壤中,生物的固氮作用主要是固氮菌抑或是其他属的细菌,除了上述一些固氮细菌外尚有那些也能固定氮素的细菌,都值得作进一步的研究。

結 論

在广州地区的耕作土壤中分离固氮菌时,由于伴生菌的存在,造成分离纯化固氮菌的困难性。这些与固氮菌伴生的细菌,主要有 *Pseudomonas azotogenesis*, *Azotomonas insolita*, *Pseudomonas flourescens* 及 *Pseudomonas* sp.。

Pseudomonas azotogenesis 是广泛分布于本地区土壤中的一种能固定氮素的细菌,在许多不存在固氮菌的土壤中,均能发现此种菌的大量存在。

在牛肉膏蛋白胨培养基上培养的 *Pseudomonas azotogenesis* 及 *Pseudomonas* sp. 的代谢产物对固氮菌生长有不利影响。

参 考 文 献

- [1] 张宪武等: 1955. 自生固氮菌的研究. 土壤微生物学集刊, 1, 1—9.
- [2] Anderson, G. R.: 1955. Nitrogen fixation by *Pseudomonas* like soil bacteria. J. Bacteriol., 70: 129—133.
- [3] Gray, E. A.: 1953. Contamination of *Azotobacter chroococcum* by Gramnegative bacterial rods. Nature., 171:1163.
- [4] Jensen, V.: 1958. A new nitrogen fixation bacteria from a Danish water course. Arch. Mikrobiol., 29:348—353.
- [5] Proctor, M. H., and Wilson, P. W.: 1958. Nitrogen fixation by Gramnegative bacteria. Nature, 182:891.
- [6] Proctor, M. H., and Wilson, P. W.: 1959. Nitrogen fixation by *Achromobacter* spp. Arch. Mikrobiol., 32:254—260.
- [7] Paul, E. A., and Newton, J. D.: 1961. Studies of aerobic non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 7:7—13.
- [8] Ross, D. J.: 1958. Biological studies of some tussock grassland soils. V. Non symbiotic nitrogen fixing bacteria. New Zealand J. Agri. Research, 1:958—567.
- [9] Skerman, V. B. D.: A guide to the identification of the Genera of bacteria. The Williams and Wilkins Company. 1959.
- [10] Stephenson, M.: Bacterial metabolism. London, 1943.
- [11] Voetes, J. and Debacher, J.: 1956. *Pseudomonas azotogenesis* nov. spp., a new free living nitrogen fixing bacterium. Naturwissenschaften, 43:40—41.

STUDIES ON THE CONCOMITANT BACTERIA OF *AZOTOBACTER*

WANG YU-CHING AND LUO GUB-WEI

(*Southern China Agricultural College*)

(SUMMARY)

The presence of concomitant bacteria on the capsular surface introduced difficulties of obtaining pure cultures of *Azotobacter* from the cultivated soils of Canton.

Concomitant bacteria associated with *Azotobacter* include *Pseudomonas azotogensis*, *Azotomonas insolita*, *Pseudomonas flourescens* and *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas azotogensis*, also a kind of nitrogen-fixing bacteria, are found in most cultivated soils in Canton, and are present in a larger number than *Azotobacter*.

The metabolic substance produced by *Pseudomonas azotogensis* and *Pseudomonas* sp. from nutrient agar cultures depressed the growth of *Azotobacter* in nitrogen-free liquid media.