

北京郊区固氮螺菌的研究

杨洁彬 曹增良 李季伦

提要: 自北京郊区的玉米根系分离出玉62菌株, 用乙炔还原法测定其固氮酶活性比来自巴西的Sp81高60%。自高粱根系分离出高63菌株, 其形态、生理等特征都与玉62相似。两菌株均属巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*)

以玉62为出发菌株, 经亚硝酸盐处理后, 曾得到一些能在含有0.2% NH_4Ac 和 KCN (或 NaN_3) 的培养基上生长并有较高固氮酶活性的抗氮菌株。如127—6菌株在0.2% NH_4Ac 培养基上的固氮酶活性比玉62高3.5倍。但这种特性不易保持, 经过一段时间, 其酶活性下降。

曾作几个菌株接种夏玉米的小区田间试验。虽然某些菌株对产量有一定的效果, 但统计学上差异不显著。

自1976年 Döbereiner^[1] 报导在巴西从俯仰马唐根系分离得到固氮螺菌 Sp7 菌株后, 由于它与禾本科根系关系密切而受到重视。很多国家开展了对该菌的研究工作。Okon^[2] 对其生理特性、特别是与氧的关系作了研究。Krieg^[3] 对它的分类作了研究。以固氮螺菌作接种试验的也不少, 但效果不尽相同。如 Albrecht^[4] 在温室作不同温度和光照的接种试验, 接种植株的干重和总氮量均无明显增加。而 Subba Rao^[5] 在不同地点作不同作物和不同氮素水平的接种试验, 所有接种处理都增产。在我国, 湖北省微生物研究所^[6] 分离到固氮螺菌并对其特性作了研究。

为了了解这一新兴固氮资源的情况, 我们从1979年开展了以下几个主要方面的研究工作。

一、菌种的分离和鉴定

1. 菌种分离

从禾本科根系分离固氮螺菌基本上按 Döbereiner^[1] 的方法, 但有修改。在玉米 (或高粱) 油蔴期选择生长健壮、色绿的植株, 将根铲下带回实验室, 用自来水冲洗干净, 然后分两种处理:

(1) 将根剪成约0.5cm的根段, 放在含有95%酒精的培养皿中消毒2分钟, 用灭菌水洗根段5次, 将酒精洗去。然后将4个根段放入含有BTB的琥珀酸钠无氮半固体培养基的试管中, 其培养基成分为: KH_2PO_4 0.4克, K_2HPO_4 0.1克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2克, NaCl 0.1克, FeCl_3 0.01克, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002克, 琥珀酸钠5克, 洋葱 (酒精洗过) 3.5克, 0.5% BTB 5ml, 蒸馏水1000ml。

[1] 略论固氮菌参加试验辅助工作

[2] 明福同志参加1983年部分田间试验工作。

(2) 取约 5 cm 长的根段, 95% 酒精消毒 2 分钟后, 再放入含有 0.1% 升汞液的培养皿中消毒 2 分钟, 然后用灭菌水洗 5 次, 将升汞洗掉, 因升汞除将根表的微生物杀死外, 还可能杀死根段两端的微生物, 为了分离到根内的细菌, 将根段两端各剪去约 1 cm, 把剩余的根段剪成约 0.5 cm 长, 放入含有上述培养基的试管中。

以上试管于 32°C 下培养 2—3 天, 有的培养基变蓝, 在培养基表面下生成白色菌膜, 将菌膜转至上述培养基中纯化, 连续转管纯化 3—4 次, 然后挑取菌膜作稀释液, 接种于琥珀酸钠无氮培养基中 (培养基成分与上述相同, 但不加 BTB, 洋葱为 20 克)。32°C 培养 4—5 天可长出菌落, 挑取单菌落转至含葡萄糖酸钠酵母汁洋葱培养基的试管中, 此培养基为我们通过不同培养基的试验所确定, 成分如下: K_2HPO_4 0.5 克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 克, $NaCl$ 0.1 克, 葡萄糖酸钠 10 克, 10% 酵母汁 50 ml, 洋葱 20 克, 蒸馏水 950 ml。1—2 天菌苔即可生长丰满, 在无菌条件下将试管的棉塞换成胶塞, 由于胶塞不能用高温灭菌, 为了保证细菌不被污染, 我们通过试验在胶塞下约 2—3 cm 处, 先加一个灭菌的短棉塞 (约 1 cm), 然后再加胶塞, 使细菌处于无菌条件下。用注射器从试管中抽出约为试管有效容积 8% 的空气, 然后注入与抽出的空气量相等的乙炔气体。第二天即可用气相色谱测定其固氮酶活性。以后可连续或隔一天再测定 1—2 次, 从中选出酶活性较高的菌株。

我们曾先后分离过三次玉米根系的固氮螺菌, 玉米植株采自本校农学系选种教研组的玉米试验地, 玉米品种有北七、黄 141、黄 8—4、齐 31、W552 及高赖氨酸综合种等春玉米, 夏玉米品种有北 7 和北 8。每次分离都得到很多菌株, 经多次测定固氮酶活性的初筛和复筛比较, 以玉 62 菌株的酶活性较高, 如与 Döbereiner 从巴西分离的 Sp61 菌株比较, 结果见表 1。

表 1 *Azospirillum* 玉 62 和 *Azospirillum* Sp61 的
固氮酶活性 (nmol C_2H_4 /mg 蛋白/小时)

培养基	菌株		备 注
	玉 62	Sp61	
葡萄糖酸钠酵母汁洋葱	54.25	33.82	为 5 次重复的平均值
琥珀酸钠无氮洋葱	938.93	775.07	为 8 次重复的平均值

玉 62 菌株来自只以酒精表面消毒的黄 8—4 春玉米根系。

用同样方法, 从东北旺公社马连洼大队的高粱地中采高粱根样品进行分离, 得到固氮酶活性较高的高 63 菌株。高 63 也来自只用酒精表面消毒的根段。

2. 菌种鉴定

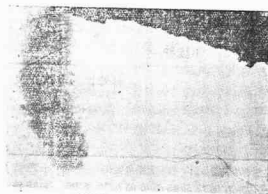
为了解在北京郊区分离到的固氮螺菌属于哪一种, 对玉 62 及高 63 菌株作鉴定, 有以下一些主要鉴定项目。

(1) 形态及培养特性

玉 62 及高 63 菌株在葡萄糖酸钠酵母汁洋葱斜面上生长较快, 32°C, 24 小时即可长出丰满的菌苔。在含有琥珀酸钠无氮洋葱培养基的培养皿中, 菌落小, 不易观察。如用低倍光学显微镜直接观察皿中菌落, 可看到细胞质均匀、边缘不很整齐的菌落, 有的菌落有 2—8 层或

更多层颜色较深的同心圆。在葡萄糖酸钠酵母汁洋葱培养基上菌落较易观察，为圆形、白色、边缘整齐。培养3—4天菌落即成红色，9天时整个菌落呈红色，说明有非水溶性色素产生。在牛肉膏蛋白胨洋葱培养基上，其红色不如在上述培养基中明显。在老培养体上有皱褶。

菌体形态为杆状，略有弯曲。菌体为 $0.5-0.9 \times 2-3 \mu\text{m}$ ，有的更长些。革兰氏染色阴性。培养1天的菌体染色均匀，3天以上的菌体着色即不均匀。能运动，用Caraway^[7]的培养基，即琥珀酸蛋白胨硫酸胺液体培养基，作电子显微镜摄影可看到弯曲状的菌体及单极生鞭毛（见图一）。用上述培养基培养、制备鞭毛染色涂片，用光学显微镜观察两菌株的染色鞭毛，可清楚地看到单极生鞭毛（见图二）。



图一 玉米62菌株鞭毛的电子显微镜照片



图二 玉米62菌株鞭毛染色涂片并经放大的照片

（2）生理特性

按细菌学常规方法作菌株对糖的利用和一些生化反应，结果见表2和表3。

表2 两菌株对糖的利用*

糖	菌 株	
	玉62	高63
葡 萄 糖	++	++
阿拉伯糖	++	++
甘 露 醇	++	++
蔗 糖	+	+
乳 糖	+	+

* +++反应强烈

++反应较强

+正反应

-无反应

表3 两菌株的生化反应*

项 目	菌 株	
	玉62	高63
柠檬酸利用	++	++
水解七灵叶	+++	++
水解淀粉	+	+
硝酸盐还原	+++	+++
产 氨	+	+
过氧化氢酶	+	+
MR	-	-
VP	-	-
明胶产生	-	-

(8) 对生物素的要求

将鉴定菌种活化后, 肉汤培养2天, 3000转/分离心20分钟, 加灭菌水洗, 再离心, 制备菌悬液。用 Tarrand^[8] 琥珀酸硫酸铵液体培养基, 其成分为: K_2HPO_4 0.5克, 琥珀酸 5.0克, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01克, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2克, $NaCl$ 0.1克, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.026克, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0克, 生物素0.0001克, 蒸馏水1000ml。将菌数相等的菌液接种于上述有(或无)生物素的培养液中, 此外, 还有接种后立即在沸水中煮20分钟的处理以杀死菌体。37℃培养两天, 以不接菌的培养液作对照, 比较其菌体生长情况, 结果见表4。

表4 两菌株的菌体生长*

处 理	菌 株			备 注
	玉 62	高 63	不接种	
无生物素	++	++	—	每处理为5次重复
无生物素, 接种后煮20分钟	±	±	—	
有生物素	++	++	—	
有生物素, 接种后煮20分钟	±	±	—	

* ++ 生长良好 ± 不生长, 但加摇动试管可见试管底部有少量菌体。 — 无菌体生长

实验表明, 在接种后立即煮20分钟的处理中, 只有原接种的少量菌体被杀死, 未繁殖。而活菌体在有或无生物素的培养液内生长都较好, 说明不需要生物素。

(4) 葡萄糖和核糖产酸试验

用 Tarrand^[8] 的培养基配方, 即含有 BTB 的无碳洋菜培养基35—40ml 倒于含有玉62(或高63)菌液的培养皿中, 轻轻摇动, 待凝固, 使成较厚的平板。用灭菌钢管打4个孔, 在孔中加10%的葡萄糖(或核糖)溶液, 以不接菌的为对照, 4个重复, 32℃培养2天, 接菌处理的培养音颜色未变黄, 说明未产酸。

从以上试验可见, 除菌体形态、培养特征附合固氮螺菌属的特征外, 根据 Krieg^[9] 的分类标准, 玉62及高63菌株不需要生物素, 自葡萄糖与核糖不产酸, 应为巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*)。

二、抗氮选种

因为氮对固氮酶的生成有阻抑作用, 为了发挥豆科作物的根瘤菌的固氮作用的措施之一是不施或少施氮肥。而固氮螺菌是与禾本科作物联合固氮, 禾本科作物需大量氮肥, 如能得到抗氮菌株, 即在施用氮肥的情况下, 使其固氮酶仍能发挥作用, 就可节省氮肥, 对农业生产有较大意义。

目前国内尚无固氮螺菌的抗氮选种的有效方法, 我们进行了一些探索性试验。以玉62为出发菌株, 用亚硝基胍处理, 然后在含0.2% NH_4Ac 并有 KCN (或 NaN_3) 的培养基上, 将生长出的少数菌落进行固氮酶活性测定, 选择固氮酶活性较强的菌株。在以上培养基上长

出的菌落应该是抗氨的, 因为 KCN 和 NaN_3 对细胞有毒害作用, 野生型细胞被杀死, 只有那些脱阻抑的突变株, 既能以 KCN (或 NaN_3) 为底物、又能在 0.2% (或 0.1%) NH_4Ac 中生长的菌株才能在此种培养基上形成菌落。

起初我们将玉62菌株用亚硝基胍处理 (100r/ml 及 200r/ml, 1 小时), 经 2 次离心并洗涤后将菌悬液接种于含有 15mM KCN (或 0.045mM NaN_3) 的琥珀酸钠无氮洋葱培养基的培养皿中, 5—7 天少数皿中可出现菌落, 转至含 0.2% NH_4Ac 的葡萄糖酸钠洋葱培养基的试管中, 待长出菌苔, 测定其固氮酶活性。用此种方法曾选出一些酶活较高的菌株, 如 127—6 来自玉62经亚硝基胍处理 (200r/ml, 1 小时) 后在含有 KCN 的培养基上长出的菌落。在含 NH_4Ac 培养基上其固氮酶活性为 508.1nmol C_2H_4 /试管。而在同样培养基上玉62的固氮酶活性为 113.8。

以后, 为了更有效地得到抗氨菌株并减少工作量, 将用亚硝基胍处理后的菌液直接接种在既含有 0.2% (或 0.1%) NH_4Ac , 又含有 12mM KCN (或 0.23mM NaN_3) 的葡萄糖酸钠洋葱培养基中, 通过测定固氮酶活性筛选。43 菌株来自只用亚硝基胍 150r/ml 处理玉62 40 分钟后, 含有 0.1% NH_4Ac 的葡萄糖酸钠洋葱培养基。55 菌株来自玉62 经亚硝基胍 150 r/ml 处理 40 分钟后, 含有 0.1% NH_4Ac 和 NaN_3 的培养基。

此方法中, KCN 和 NaN_3 的浓度很难掌握, 过多会杀死所有细菌, 过少不能杀死野生型细菌。此外, 由于在培养过程中 KCN (或 NaN_3) 的被消耗和损失, 要保持恰好有极少数菌落生长的浓度也是很困难的。为了寻找适宜的 KCN 和 NaN_3 的浓度, 我们曾作过很多次试验。此外, 虽然用这种方法选出一些菌株, 但我们发现, 其固氮酶活性不稳定, 经过一段时间后酶活性下降。如以 127—6 菌株为例, 其固氮酶活性变化见表 5。

表 5 127—6 菌株的固氮酶活性变化

测定年月	培养基中 NH_4Ac 的含量	固氮酶活性 (nmol C_2H_4 /试管)
1981.1.	0.2%	127
1982.3.	0.2%	16.5
1981.11.	0.1%	508.1
1982.3.	0.1%	46.4

总之, 抗氨选种对固氮螺菌在农业生产中有较大意义, 但目前尚无有效的方法, 仍需作更多的工作。

三、接种试验

在分离菌种及抗氨选种的基础上, 曾用珍珠砂作盆栽试验, 进一步确定不同菌株的效果。以后又作过两次小区田间试验, 观察接种固氮螺菌对夏玉米的增产效果。

1. 不同氮肥水平下固氮螺菌的接种效果

1981 年在滦县城东坊公社农场作夏播玉米接种试验, 共 4 个处理: 对照 (施灭茬草炭)、Sp81、玉62 及 127—6 等草炭菌剂接种。每种处理均有三种不同的氮肥水平:

N₀: 不施氮肥,

N₁: 每亩30斤碳酸氢氮 (15斤作种肥, 15斤作追肥),

N₂: 每亩60斤碳酸氢氮 (30斤作种肥, 30斤作追肥)。

每处理8次重复, 共36个小区, 小区面积为0.05亩。玉米品种为农大54, 于6月20日播种, 9月22日收获, 生长期共计94天。在生长期中, 两次取根段样品 (7月18日和8月25日)、将根段洗净、放于含有琥珀酸钠无氮半固体培养基的试管中, 培养2—8天测定各小区根段的固氮酶活性。收获时, 称每小区的玉米鲜重, 并从每小区取6个玉米称鲜重, 待风干后称干重并将小区产量折算成干重, 再折算成各处理的亩产量。玉米产量列于表6。

表6 不同氮肥水平下各处理的玉米产量 (三个重复的平均值)

氮肥水平	对 照 (斤/亩)	Sp81		127-6		玉62	
		斤/亩	增减产(%)	斤/亩	增减产(%)	斤/亩	增减产(%)
N ₀	380	429	+12.7	370	-2.8	423	+11.1
N ₁	429.8	469	+9.1	514.4	+19.7	417.8	-2.8
N ₂	465.2	472.8	+1.6	429.8	-7.6	453.6	-2.5

关于固氮酶活性的测定, 以每管中 C_2H_4/C_2H_2 的比值计算, 每小区取2个根段样品, 每处理为3个重复, 所以, 表7中所列的固氮酶活性为6个数字的平均值。

表7 不同处理及采样时期的固氮酶活性

接种菌株	氮肥水平		N ₀		N ₁		N ₂	
	采样时间		7月18日		8月25日		7月18日	
			7月18日	8月25日	7月18日	8月25日	7月18日	8月25日
CK			0.2823	1.669	0.1569	1.441	0.1067	1.337
Sp81			0.19	2.178	0.2027	1.052	0.220	1.348
127-6			0.2993	1.038	0.3192	2.411	0.156	1.029
玉62			0.2083	1.471	0.252	1.18	0.2559	1.236

在播种前曾取试验地的平均土样作土壤含氮量测定, 收获后在对照、Sp81及127-6的处理中取土壤测其含氮量, 每样品三次重复。但播种前和收获后不同处理的土壤的含氮量差异不大。

从以上结果可以看出:

(1) Sp81在不同氮肥水平下都增产, 以N₀增产最多, 为12.7%。在N₂条件下, 127-6增产最高, 为19.7%, 在N₁条件下, 只有Sp81增产, 仅1.6%。

(2) 在N₀处理中, Sp81产量最高, 第二次测定固氮酶活最高 (第一次最低), N₁处理中, 127-6产量高, 两次测定酶活都最高, N₂处理中, Sp81产量高, 但酶活性第一次测定为第二位, 第二次为第三位, 都不是最高, 看来酶活性与产量似有一定相关性, 但不是绝对正相关。

(3) 土壤含氮量虽有些差异, 但总的说来, 含氮量很低, 而且差异不大。

2、固氮螺菌作种肥或追肥的接种效果

1983年在东北旺公社马连洼大队作夏播玉米接种试验，共6个处理；对照（施灭菌草炭）、Sp81、玉62、高63、43和55草炭菌剂。三次重复，每重复内有用作种肥和追肥的上述各种处理。播种时，除用作种肥的各小区施用菌剂外，其他各小区一律施用等量的灭菌草炭。追肥时，除追肥的小区施用菌剂外，其他小区也一律施灭菌草炭，小区面积为0.05亩，共36个小区。

玉米品种为1382，不施底肥，于7月11日播种，8月13日追肥，10月8日收获，生长期共89天。生长期中两次取根段样品测定固氮酶活性，第一次在追肥的前一天，只取施用种肥的各处理，第二次在收获的前一天，取全部小区的根段样。收获时称各小区玉米鲜重，并随机取6个玉米称鲜重，待风干后脱粒，称粒重并折算成亩产量，产量结果见表8（追肥为三个重复的平均值，种肥由于受到破坏只是两个重复的平均值）。

表8 不同菌株用作种肥和追肥的效果

菌 株	种 肥				追 肥			
	小区玉米鲜重(斤)	小 区 粒 干重(斤)	折合为亩产(斤/亩)	增减产(%)	小区玉米鲜重(斤)	小 区 粒 干重(斤)	折合为亩产(斤/亩)	增减产(%)
CK	78.5	30.39	607.92	—	76.33	28.10	562.06	—
Sp81	81	28.51	570.22	-6.21	81.66	29.62	592.52	+5.41
玉62	80.5	25.52	510.54	-16.02	77.93	28.26	565.24	+0.56
高63	77.2	27.05	541.1	-10.92	80.23	31.48	629.74	+12.04
43	81.5	31.31	626.8	+3.04	80.66	31.11	622.24	+10.7
66	85.3	33.57	671.4	+10.44	77.66	28.75	575.10	+2.32

关于收获前各处理的根段样品的固氮酶活性测定结果见表9。每小区取2个样品，三次重复，故表9中所列数为6个数的平均值。

表9 各处理的根段的固氮酶活性(nmol C₂H₄/试管)

菌 株	CK	Sp81	玉62	高63	43	55
施 肥						
种 肥	347.96	305.43	383.35	524.43	312.93	400.31
追 肥	300.37	342	620.06	628.68	587.06	480.42

从以上结果中可以看出：

(1) 用作追肥比用作种肥的效果好，追肥中所有接种处理的产量都比对照高，以高63增产较高，为12.04%，可能由于此时气温较高，而且植株有了较发达的根系，固氮螺菌可从根分泌物中得到较充分的碳源。而用作种肥的只有43和55增产，55增产较大，为10.44%。但要指出的是，从收获时的小区玉米鲜重看，除高63略低于对照外，其他各处理都高于对照，可能对照区的6个抽样玉米的成熟度较好，水分含量低，粒干重数字大，故折合亩产量亦高。

(2) 在种肥处理中, 55产量高, 固氮酶活性为第二位。追肥处理中, 高63产量高, 酶活性为第一位。另外, 在相同的处理中, 除对照外追肥比种肥的酶活都高。可见, 产量与固氮酶活性似有一定的相关性。

四、结 语

根据我们几年的工作, 可得出以下结论:

1. 在北京郊区有固氮螺菌存在。不论从玉米根系, 还是从高粱根系, 我们在几次分离中都比较容易地得到很多固氮螺菌的菌株, 说明此地有固氮螺菌存在, 这对于了解固氮螺菌在各地区的分布有一定的意义。

2. 根据 Krieg 的分类标准, 我们分别从玉米和高粱根系上分离到的玉62 和高63 菌株都为巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*)。目前关于固氮螺菌与禾本科作物的关系有不同的说法。Divan 等的试验^[9]是, 玉米根上为带脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*), 小麦根上为巴西固氮螺菌。而罗孝扬等^[10]从小麦、玉米、谷子和甘蔗等作物根系分离的都是巴西固氮螺菌。这是否因不同地区的固氮螺菌的种类不同, 尚需进一步明确。

3. 夏玉米接种固氮螺菌有一定的效果。从两次小区田间试验中可以看出, 有些菌株接种夏播玉米有一定的效果。相同菌株用作追肥比用作种肥的效果较好。

五、问 题

1. 两次田间接种试验虽可看出有一定的效果, 但在统计上差异均不显著。

2. 虽然作了抗氮选种方面的探索, 也得到一些菌株, 但固氮酶活性不稳, 原因尚不清楚, 另外, KCN 和 NaN_3 是呼吸酶系的抑制剂, 可抑制呼吸链上的酶活性, 而固氮酶在菌体内, KCN 与 NaN_3 是否能到达菌体与固氮酶接触, 也还存在着一定的问题。

3. 为了更有效地发挥固氮螺菌的作用, 还需要作更多的基础工作, 如其固氮酶的特性及固氮酶所处位置、与禾本科作物的专化性, 对环境条件的要求等等。只有在更深入地了解其各方面特性的基础上, 采取有效的措施, 才能发挥其有益的作用。

参 考 文 献

1. Döbereiner J., J.M. Day (1976). Proceeding of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation (ed. by Newton W.E and C.J. Nyman). 518—538.

2. Okon Y., J. Houchins., S.L. Albrecht and R. H. Burris (1977) J. Gen. Microbiol. 98: 87—93.

3. Krieg N.R (1977). Genetic Engineering for Nitrogen Fixation (ed. by Alexander Hollaender). 463—472.

4. Albrecht, S. L., Y. Okon., R.H. Burris (1977). Plant physiol. 69: 528—531.

5. Subba Rao N.S (1980) . Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation (ed. by N.S. Subba Rao) . 411—414.

6. 湖北省微生物研究所生物固氮组(1979)。微生物学报, 19卷、第2期, 160—166。

7. Caraway, B.H and N. R. Krieg (1974) . Can. J. Microbiol. 20 : 1367—1377.

8. Tarrand J. J., N.R.Krieg and J. Döbereiner (1978) . Can. J. Microbiol. 24 : 987—980.

9. Divan V.J. and J. Döbereiner (1980). Associative N_2 —Fixation (ed. by Peter B. Vose and Alaines P. Ruschel), Vol I. Chapter 15.

10. 罗孝扬、曾宪容、蒋亚平、蔡昌建、周亿阔、杨宝玉、王子芳 (1983)。微生物学报, 23卷, 1期, 68—72。

ACTA AGRICULTURAE UNIVERSITATIS PEKINENSIS

Vol.10 No. 3

1984

STUDY OF AZOSPIRILLUM IN BEIJING DISTRICT

Yang Jie bin, Cao Zeng liang, Li Chi lun

Abstract

A strain of Azospirillum, Yu-62, was isolated from the roots of corn grown in the suburb field of Beijing. It's nitrogenase activity as tested by C_2H_2 reduction method was 60% higher than that of the Azospirillum brasilense Sp 81 which was isolated by Döbereiner in Brazil. Another strain, Gao-63, isolated from the roots of sorghum is similar to Yu-62 in morphological and physiological characters and both belong to Azospirillum brasilense.

Some NH_4^+ tolerant mutants such as 127-6, 43 and 55 were obtained by treatment of Yu-62 with NTG and selected on a medium containing NH_4Ac plus KCN (or NaN_3). The nitrogenase activity of mutant 127-6 increased 3.5 fold as compared with that of Yu-62 when grown on solid medium containing 0.2% NH_4Ac . But the NH_4^+ tolerance was unstable and decreased with time.

Inoculation experiments for various strains of Azospirillum brasilense were tested with summer corn in field conditions. Although some strains showed beneficial effect on the yield, the increment was not distinct statistically.