

毛竹及浙江淡竹根际联合固氮的研究*

顾小平 吴晓丽

摘要 对毛竹和浙江淡竹利用 N_2 回充法测定根系固氮活性,分别可达 9.9 和 2.1 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{g 干根} \cdot \text{h})$;用半固体培养基富集后的根系固氮活性范围在 20~100 $\text{nmol C}_2\text{H}_4/(\text{g 鲜根} \cdot \text{h})$ 的占 40% 以上。对浙江淡竹根际各部位固氮菌数采用乙炔还原—MPN 法测定结果是根际土壤 3.4×10^5 菌数/g 干土;根表、根内分别为 2.2×10^5 、 3.0×10^4 菌数/g 干根。采用划线法在浙江淡竹根际分离到 3 株具较高活性的固氮菌,经鉴定 G-4 属肺炎克雷伯氏菌。G-7 和 G-12 菌的形态和培养特征相同,目前尚未确定种属。对 G-4 和 G-7 的固氮特性研究表明:培养 18~24 h 后固氮酶活性最高;从 pH4.5~9.2 固氮酶活性都很高,最适值分别为 6.5 和 7.5 左右;培养温度以 30 $^{\circ}\text{C}$ 为最适,均可利用多种碳源固氮。

关键词 毛竹、浙江淡竹、联合固氮菌、固氮酶活性、肠杆菌科

自从 70 年代 Döbereiner 报道了含脂刚螺菌 (*Spirillum lipoferum*) 与玉米根系具有联合固氮作用以来,引起了国内外学者的广泛注意。目前已先后从玉米、小麦、高粱、甘蔗、水稻和牧草等多种禾本科作物根系分离出一些固氮微生物,因此人们认为禾本科植物具有和一些微生物联合固氮的习性。并对禾本科作物的联合固氮进行了大量的研究^[1-4]。

竹类植物是我国南方重要森林资源,种类多、分布广、面积大,在分类学上也归属于禾本科。然而它是否和其它禾本科作物一样也存在根际联合固氮作用呢?至今还未见有报道。本文通过对毛竹 (*Phyllostachys pubescens* Mazel ex H. de Lehaie) 和浙江淡竹 (*Ph. meyeri* McClare) 根系固氮活性的测定,对浙江淡竹的根际土壤、根表和根内各部位联合固氮菌的计数和固氮细菌的分离鉴定,首次发现竹类植物根际也存在着联合固氮体系。

1 材料和方法

1.1 根系固氮酶活性测定

1.1.1 材料 为毛竹和浙江淡竹的根系。毛竹生长在本所山地红壤,浙江淡竹生长在富春江边沙土地上。

1.1.2 培养基 采用修改的 Döbereiner 无氮培养基,每升含苹果酸、蔗糖、葡萄糖各 5 g,其中:半固体培养基含琼脂 0.2%,固体培养基含琼脂 2%。

1.1.3 测定方法 用 N_2 回充法和半固体培养基富集法处理^[5],在气相色谱仪上利用乙炔还原法测定固氮酶活性。

1.2 根际不同部位稀释液制备,固氮菌计数

1994-02-25 收稿。

顾小平助理研究员,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)。

* 本文为中国林科院亚热带林业研究所 1991 青年科研基金资助课题内容。

1.2.1 根际土壤稀释液的制备 从浙江淡竹竹株基部顺竹蔸连土挖取竹根,除去根表浮土,选带土健壮竹根剪成1~2 cm根段,放入盛有45 mL无菌水并预先称重的三角瓶中轻轻振动,洗下泥土,拣出根段,泥土定量至5 g,然后逐级稀释至 10^{-8} 。

1.2.2 根表菌稀释液的制备 将洗去表面泥土的根剪成1~2 cm,用无菌水冲洗数次,滤纸吸干后称取5 g,投入含45 mL无菌水的三角瓶中,振荡10 min,取出根段,然后逐级稀释至 10^{-8} 。

1.2.3 根内菌稀释液的制备 对除去根表细菌的5 g根样,用无菌水冲洗数次,滤纸吸干后,放入75%酒精中灭菌5 min,再用无菌水冲洗数次,滤纸吸干,放入无菌研钵中研磨,根渣转入45 mL无菌水中,然后逐级稀释至 10^{-8} 。

1.2.4 根际各部位固氮菌计数 采用乙炔还原—MPN法。即取上述各部位不同级别的稀释液0.1 mL,接种于装有2 mL半固体培养基的青霉素小瓶中,32℃培养24 h后,加入0.8 mL乙炔反应3 h,测乙炔还原活性,3次重复,乙炔还原活性大于1 nmol C₂H₄/(瓶·h)者记为阳性,MPN法计数^[6]。

1.3 固氮菌株的分离鉴定

菌株分离:取上述测定乙炔还原活性高的一级青霉素小瓶,用接种环取一环菌在固体平板上划线,纯化后分离。

菌株鉴定:主要依据参考文献[7~9]、1)进行鉴定。

生理生化特征,采用浙江省军区后勤部卫生防疫检验所生产的生化微量管进行。

1.4 不同条件下菌株固氮能力测定

几种条件下菌株固氮能力测定是以修改的Dobereiner无氮半固体培养基为基础。不同pH条件下的培养基是以1/15 M KH₂PO₄和1/15 M Na₂HPO₄·2H₂O所配制的不同pH缓冲液加入到前述培养基中配制而成;不同碳源的培养基是以该种碳源取代原培养基配方中的碳源配制而成。接种菌用培养时间在24 h内的幼龄菌,除注明反应时间外,所有测定均是在32℃培养18 h,反应3 h的条件下利用气相色谱仪测定。

2 结果与讨论

2.1 竹子根系的固氮酶活性

以N₂回充法测定的两种竹子根系固氮酶活性见表1。测定时大于1 nmol C₂H₄/(g干根·h)的样品记为有固氮酶活的样品。毛竹16个样品中最高达3.87 nmol C₂H₄/(g干根·h),有酶活的占50%。同时毛竹根系不经减压和回充N₂也可以测出固氮活性。另外,测定的毛竹根系因采自粘重的红壤,根系表面有一紧粘根表的薄土层,需长时间冲洗才能洗掉。带着这一薄层测

表1 氮气回充法测定的两种竹子根系固氮酶活性

竹种	样品数 (个)	有固氮酶 活的样品 (个)	占总数 (%)	最高比活性 [nmol C ₂ H ₄ / (g干根·h)]
毛竹	16	8	50	3.87
浙江淡竹	16	7	43.8	2.1

1)浙江省军区后勤部卫生防疫检验所,肠杆菌科细菌生化鉴定编码册。

定,其固氮活性可达到 $9.9 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/(\text{g 干根} \cdot \text{h})$,作者认为:这一薄层是毛竹根系分泌物和土的胶合层,其中含有许多有机碳源和其它营养成分,这是微生物较活跃的场所。浙江淡竹因生长在沙土上,这种胶合层不明显,水冲洗后,用 N_2 回充法测定其固氮活性较低。

以半固体培养基富集法测定的两种竹子根系的固氮酶活见表 2。从表 2 看出毛竹、浙江淡竹根系经富集培养后,绝大多数都能测出固氮活性,近一半在 $20 \sim 100 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/(\text{g 鲜根} \cdot \text{h})$ 范围内。另外,在富集培养前如用 75% 酒精灭菌 5 s 后,再用 0.1% 升汞灭菌 5 min,则几乎测不出固氮活性。

表 2 富集法测定两种竹子根系的固氮酶活性

竹种	样品数 (个)	有酶活数 (个)	占总样 (%)	固氮活性[$\text{nmol C}_2\text{H}_4/(\text{g 鲜根} \cdot \text{h})$]							
				<10 (个)	占样品 (%)	10~20 (个)	占样品 (%)	20~100 (个)	占样品 (%)	>100 (个)	占样品 (%)
毛竹	47	45	95.7	10	22	13	29	21	47	1	2
浙江淡竹	30	27	90	7	26	6	22	12	44	2	8

2.2 浙江淡竹根际固氮微生物计数

在对浙江淡竹根际土壤、根表及根内各部位的固氮菌数采用乙炔还原—MPN 法进行计数结果是,根际土壤为 3.4×10^5 菌数/g 干土;根表、根内分别是 2.2×10^5 、 3.0×10^4 菌数/g 干根。根表大于根内近一个数量级。

2.3 浙江淡竹根际固氮微生物的分离鉴定

2.3.1 菌株的来源及其固氮酶活性 对上述采用乙炔还原—MPN 法测固氮菌数的一级青霉素瓶中经培养基富集后的稀释菌液,选活性高的,采用划线法进行分离,结果得到 3 株菌具较高的固氮活性,它们分别是自根表分离的 G-4、G-7;自根际土分离的 G-12。其活性均超过了 $100 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/(\text{瓶} \cdot \text{h})$,与前人在小麦根系分离的固氮微生物活性相似^[10]。

2.3.2 菌株的形态及培养特征 因 G-7 和 G-12 菌体和菌落形态完全一致,故本实验只对 G-4 和 G-7 菌进行分析鉴定。两株菌的主要区别见表 3。

表 3 两株菌的形态及培养特征

测定项目	G-4 号 菌	G-7 号 菌
革兰氏染色	阴性	阴性
细胞形态	短杆到卵圆	短杆到卵圆
细胞排列	单个或短链	单个或短链
细胞大小	$0.7 \sim 0.9 \times 1.0 \sim 2.0$	$0.8 \sim 0.9 \times 1.1 \sim 2.0$
鞭毛	无	周生
荚膜	有	有
菌落形态	不规则、凸,边缘半透明,中心质浓	圆形有光泽和弹性,凸,边缘半透明,中心质浓
菌落颜色	肉色	肉色
菌落粘性	粘液状,用接种针挑拉不成丝	粘液状,用接种针挑可拉成长丝

2.3.3 菌株的生理生化特性 G-4 和 G-7 菌的生理生化特征见表 4。

2.3.4 菌株的鉴定 根据 G-4 和 G-7 菌革兰氏染色阴性、氧化酶阴性、发酵葡萄糖产酸产气、不形成芽孢的特性,可初步确定为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)细菌,再进一步利用《肠杆菌科细菌生化编码册》和其它参考资料,鉴定 G-4 号菌为肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiclla pneu-*

moniac)。G-7 菌在形态、培养特征及生化特性上与 G-4 菌存在一定的差异,利用上述生化编码册没能确定种名,由于其 VP 反应为阴性不属于肠细菌属(*Enterobacter*),其形态也不同于 *Azospirillum* 的螺旋状,可能属欧文氏菌属(*Erwinia*),尚待进一步鉴定。

表 4 两株菌的生理生化特性

菌种	葡萄糖氧化发酵	氧化酶	接触酶	硫化氢	苯丙氨酸脱氨酶	葡萄糖酸盐氧化	靛基质	甲基红	枸橼酸盐	尿素	产气	动力	赖氨酸脱氨酶	鸟氨酸脱氨酶	棉子糖	山梨酸	侧金盏衣醇	木胶糖	氰化钾	硝酸盐还原	VP
G-4	发酵产酸	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
G-7	发酵产酸	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

2.4 菌株在不同培养条件下的固氮特性

2.4.1 不同培养时间下两菌株固氮酶活性变化 从图 1 可以看出培养时间对两菌株固氮酶活性有很大的影响。8 h 培养均未测到固氮活性。经 18~24 h 培养后测定的固氮酶活性最高。G-7 菌在 18 h 后,G-4 菌在 24 h 后固氮活性开始下降。然而两菌株经 3 d 培养,仍能测到一定的固氮活性。另外,可以看到在此培养条件下,G-7 菌比 G-4 菌固氮活性要高。

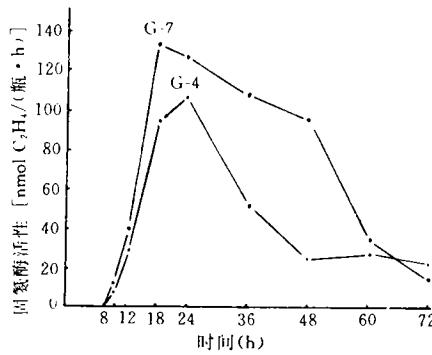


图 1 不同培养时间对菌株固氮酶活力影响

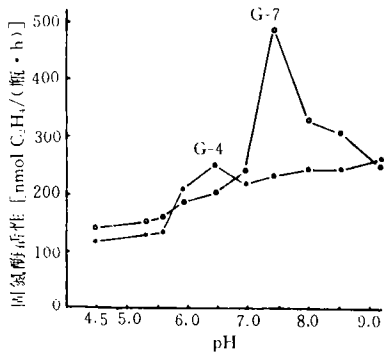


图 2 不同 pH 条件对菌株固氮活性的影响

不太明显。两菌株相对来说更适于在碱性条件下固氮,这可能和两菌株均为发酵产酸型细菌有关。

2.4.3 不同温度对两菌株固氮酶活性的影响

从图 3 可以看出,两菌株的固氮酶活性均是

2.4.2 不同 pH 条件下两菌株固氮酶活性变化 从图 2 看出两菌株在较高和较低的 pH 条件下均有较强的固氮酶活性,但似乎在碱性条件下的固氮活性比酸性条件下更高。最适 pH G-7 菌大致在 7.5 左右,G-4 菌大致在 6.5,但

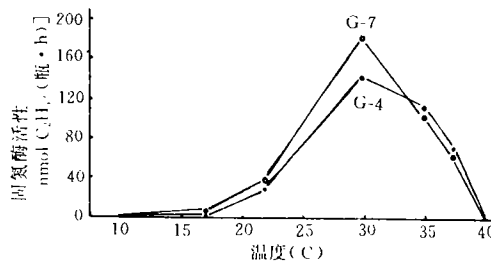


图 3 不同温度条件对菌株固氮活性的影响

在 30 ℃左右的温度下最高,37 ℃仍有较高的固氮活性,低于 17 ℃和高于 40 ℃时,固氮活性趋近于 0。

2.4.4 不同碳源对两株菌固氮酶活性的影响 从表 5 可以看出,两株菌对 6 种碳源的利用均是以甘露醇最好,而对其它碳源,两菌株喜好程度各不相同,唯有淀粉不能被 G-4 菌利用。

表 5 不同碳源对两株菌固氮活性的影响 [单位:nmol C₂H₄(瓶·h)]

菌号	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	甘露醇	苹果酸	淀粉
G-4	37.033 8	12.643 0	14.319 3	57.298 5	44.138 8	0
G-7	64.532 4	79.176 9	2.885 8	117.161 5	36.102 6	21.122 3

3 结 语

竹林在我国是集约经营程度较高的森林生态系统,为使竹林保持较高的生产力,以往在经营活动中都是通过施肥来维持地力。但就我国国情来看,在山区对大面积竹林施用化学 N 肥,无论从成本、化肥的供应状况以及对环境保护方面看都是不现实的。由于生物固氮是使大气中氮素向森林生态系统中输入的一个重要途径,因此,随着集约农业的发展,人们已开始重视对生物固氮的研究,以期通过建立高效的生物固氮体系,实现生物自我营养的目的。

本文首次提出竹类植物根际存在着联合固氮体系以及从竹类植物根际分离到两株具较高活性的固氮菌,为今后开展竹类植物固氮领域的研究及其利用带来了希望。此外,研究发现,联合固氮菌种类及固氮活性一方面取决于植物种类,另一方面也决定于所使用的培养基。改进培养基是进一步发现联合固氮能力强的竹类植物和利用价值高的固氮微生物的重要途径。

参 考 文 献

- 1 Yoshida T, Ancajas R R. Nitrogen fixation by bacteria in the root zone of rice. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 1971, 35: 156~158.
- 2 Douerques Y, Balanoreau J, Rinaudo G, et al. Non-symbiotic nitrogen fixation in the rhizospheres of rice, maize and different tropical grasses. *Soil Biol. Biochem.* 1973, 5: 85~89.
- 3 星和浩, 吉田富男. 水稻根に分布する共同窒素固定細菌について. *日本土壤肥科学雑誌*, 1989, 60(1): 47~51.
- 4 海伟力, 王耀东, 尤崇杓, 等. 水稻根际联合固氮细菌的研究. *微生物学报*, 1993, 33(2): 79~85.
- 5 窦新田. 春小麦根系固氮活性与联合固氮细菌类群分析. *黑龙江农业科学*, 1984, (1): 35~41.
- 6 许光辉, 郑洪元. *土壤微生物分析方法手册*. 北京: 农业出版社, 1986.
- 7 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.
- 8 Krieg N K, Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1*. Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1984.
- 9 朱建国. *临床常用细菌鉴定手册*. 北京: 医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1993.
- 10 刘荣昌, 李凤汀. 小麦根系联合固氮微生物的研究. *微生物学通报*, 1982, 9(5): 205.

A Study on Associative Nitrogen Fixation of Bamboo Rhizosphere

Gu Xiaoping Wu Xiaoli

Abstract The N_2 -fixation activities of *Phyllostachys pubescens* and *Ph. meyeri*'s roots have been determined by N_2 -backfilling and enrichment culture method respectively. In N_2 -backfilling method, two kinds of bamboo can reach 9.9 and 2.1 nmol C_2H_4 per gram of dry roots per hour respectively. When tested by enrichment culture method, the activities of over 40% of the roots are within the range of 20~100 nmol C_2H_4 per gram of fresh roots per hour. The amount of N_2 -fixation bacterium in *Ph. meyeri*'s rhizosphere soil on the surface and in the roots have been determined by the method of acetylene reduction-MPN, the results of which are 3.4×10^5 bacterium per gram in dry soil and 2.2×10^5 (surface) and 3.0×10^4 (roots) bacterium per gram of dry roots.

The diazotroph of *Ph. meyeri* rhizosphere have been isolated by streaking, three strains with rather high N_2 -fixation activities have been isolated and identified, which belong to Enterobacteriaceae with number of G-4, G-7 and G-12 respectively. Further studies show that G-4 belong to *Klebsiella pneumoniae*; G-7 and G-12 are of the same kind of bacterium, but their genus has not been determined in this study. It shows that these two associative diazotrophs have the highest N_2 -fixation enzyme activities after being cultivated in the improved Döbereiner medium (without nitrogen) for 18~24 hours and they can suit wide pH, from 4.5~9.2, but for the bacteria G-7, the optimum pH value is around 7.5 and for G-4, pH 6.5 seems to be the best. When the incubation temperature is about 30 °C, their highest nitrogen fixing activities can be measured, and many kinds of carbon sources can be used by these associative diazotrophs.

Key words *Phyllostachys pubescens*, *Phyllostachys meyeri*, associative diazotrophs, N_2 -fixation enzyme activity, Enterobacteriaceae