

# 叶面固氮菌的分离与应用

中国科学院植物研究所固氮室

(北 京)

河北省科学院微生物研究所固氮室

(保 定)

叶面固氮菌首先由荷兰学者 Ruinen<sup>[1]</sup> 在印度尼西亚的热带潮湿地区的植物叶面上发现。此后, Ruinen 和其他一些科学工作者经过调查指出<sup>[2-6]</sup>, 不仅在许多热带野生植物和农作物的叶面上和叶鞘中普遍存在固氮微生物, 在所有潮湿条件下, 如潮湿草原、荫蔽森林及湿生植物叶际也都存在着固氮微生物。迄今已进行过叶面微生物调查的地区, 有印度尼西亚的爪哇和苏门答腊、新西兰、苏里南、印度、象牙海岸、尼日利亚、波多黎各、荷兰、英国等。

我国地域辽阔, 大部分属于温带和亚热带地区。这些地区的植物, 特别是农作物的叶面上是否有固氮菌的存在, 它们在叶面上的存活状况以及对植物有哪些影响? 探明这些问题, 在理论和生产上都有一定意义。因此, 近几年来, 我们对一些主要农作物的叶面固氮菌进行了调查, 并试验了其培养物的应用效果。现将所获结果报道如下。

## 一、叶面固氮菌的分离

分离培养基: 将阿须贝氏 (Ashby) 无氮培养基中的  $\text{CaCO}_3$  去掉, 增加硫酸铁 20 毫克、钼酸钠 5 毫克, 其它成份不变。

将健康成熟的叶片, 用自来水冲洗叶面, 然后在无菌条件下用无菌水漂洗 2—3 次。用灭菌剪刀剪成大小适合试管斜面或平板的叶片, 放入上述无氮培养基的斜面或平板上。在 28℃ 下培养 6—12 小时后, 将叶片从培养基上取出, 在 28℃ 下继续培养斜面或平板。2—3 天后培养基上出现固氮菌菌落。如果分离禾谷类作物的叶面固氮菌, 则可吸取叶鞘水在平板上划线分离, 此种方法更为简便有效。将挑选出的菌

落经镜检鉴定, 继而用乙炔还原法测定固氮活性, 进行初筛和纯化。复筛后保留有较高固氮活性的菌株。

## 二、叶面固氮菌的类型与特征

由于我们仅采用了 Ashby 氏培养基, 对其它类型的分离方法, 例如 *Beijerinckia* 属和 *Klebsiella* 属的固氮菌分离方法未予采用。因此, 所分离到的固氮菌仅仅是适宜于 Ashby 氏培养基上生长的固氮菌, 其它类型的固氮菌很可能被遗漏。

我们从水稻、玉米、高粱、甘蔗、棉花和甘薯六种作物叶片上分离得到的叶面固氮菌均属于 *Azotobacter* 类型\*, 其中大部分为圆褐固氮菌 (*A. chroococcum*)。不同作物叶面固氮菌的菌落特征有些差异, 例如玉米叶面固氮菌产生的粘

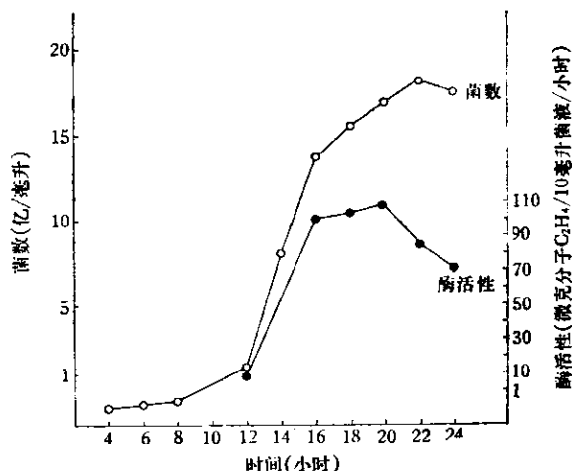


图1 玉米叶面固氮菌 2092 在培养过程中菌数和固氮酶活性的变化

\*经中国科学院微生物研究所王大相同志鉴定。

液较少,且较干涸,菌落不流动;而高粱叶面固氮菌产生大量粘液,后期菌落可流动。

这类叶面固氮菌在微酸性 (pH6.5 左右)条件下生长较好。最适生长温度为 25—32℃。通气良好的培养条件下生长最好。能利用淀粉,但不能在以苯甲酸或乙醇作唯一碳源的培养基上生长。在培养过程中,固氮酶活性变化同菌数的增长是一致的。12 小时以前没有明显的活性,12—16 小时活性呈直线上升,16—20 小时是固氮酶活性的最高峰,20 小时以后活性下降(图 1)。从不同农作物上分离到的几个代表菌株的最高酶活性基本上一致(表 1)。

表 1 不同作物叶面固氮菌的固氮酶活性比较

测定项目	作物 菌号	玉米	高粱	甘蔗	水稻	棉花
		2092	5004	7655	1403	4003
酶活性*		102.81	109.44	97.84	66.24	72.00

\* 微克分子 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/10 毫升培养液/1 小时,培养 18 小时测定。

### 三、应用效果

#### (一) 小区试验

试验作物为玉米和棉花。将叶面固氮菌培养液喷施到作物植株上,测定其对作物的生长

发育和产量的影响。试验地经过严格选择,喷施区和对照区的土质与肥力水平一致,前茬作物相同。试验面积为 0.2—0.5 亩,三次重复。每亩用固氮菌培养液 5 公斤,稀释 5—10 倍。棉花在现蕾期、花期、铃期喷施,玉米在苗期、拔节期、孕穗期喷施。整个生育期喷施 1—2 次。

喷施叶面固氮菌的植株,一般生长势较旺,茎秆较粗,叶片宽厚,总叶绿素和全氮含量均比对照增加 10% 左右(表 2)。棉花喷施固氮菌液后,果枝和单株成铃数增加,空果枝和蕾铃脱落率显著下降。

表 2 喷施叶面固氮菌对玉米生长的影响\*

小区试验 观测项目	小区 I		小区 II	
	喷菌液	对 照	喷菌液	对 照
茎粗(厘米)	2.46	2.08	1.87	1.59
叶宽(厘米)	10	9.4	9.08	8.14
总叶绿素含量 (毫克/1克鲜重叶片)	2.18	1.9	2.13	1.89
全氮含量(%)	1.33	1.18	1.64	1.43

\* 在玉米灌浆初期测定。取玉米雌穗处叶片下部。叶绿素用 80%丙酮提取,用 Ziess 分光光度计测定吸收光谱。用克氏定氮法测定全氮含量。

#### (二) 大田试验

根据 1975—1978 年四年来的棉花和玉米田间试验表明:在 37 块棉花地试验中,增产地块占 97.3%,每亩增产皮棉 11.3—17.6 斤,增产

表 3 棉花喷施叶面固氮菌的增产效果

调查项目 年份 处 理		果 枝 (个)	成 铃 (个)	脱落率 (%)	百铃重 (克)	绒 长 (毫米)	衣 分 (%)	皮棉单产 (斤/亩)	皮棉增产 (斤/亩)	增产率 (%)
1976 年	菌 液	8.5	12.1				38.0	109.4	12.9	13.4
	培 养 液	8.1	11.4				37.5	101.6	5.1	5.3
	清 水	7.8	10.3				37.0	96.5		
1977 年	菌 液	9.0	12.9	44.6	490	29.0	37.0	130.2	12.2	10.3
	清 水	8.3	10.3	51.5	435	25.0	37.0	118.0		
1978 年	菌 液	10.4	11.7	43.0	525	29.0	37.0	94.7	14.8	18.5
	清 水	10.4	8.0	53.0	490	27.5	35.0	79.9		

率为 13.6—20.4%。其中增产 5—10 斤/亩地块占总数的 48.6%，多出现在高水肥条件的石家庄地区；增产 20 斤/亩的地块占 28.5%，多出现在衡水、保定土壤瘠薄和盐碱土地区；增产 5 斤/亩以下者，占总数的 5.7%。因此，叶面固氮菌对棉花的增产效果一般为 15% 左右。玉米增产地块占总试验地块（44 块）的 93.3%，增产率为 11.1—15%。其中增产 35—75 斤/亩的占总

数的 47.7%，这些地块同样出现在具有较高水肥条件的石家庄地区；增产 100 斤/亩以上者占 20.5%，出现在水、肥条件较差的地方；增产 25 斤/亩以下者占 18.2%。玉米喷施叶面固氮菌的效果一般为增产 10% 左右。1978 年，利用生物统计法计算的增产效果与上述结果一致。另据高邑县东张大队连续三年试验表明，棉花平均增产 14.1% 左右，而且棉绒长度增加，质量提

表 4 玉米喷施叶面固氮菌的增产效果

时 间	项 目 处 理	喷施时期	株高	茎粗	单叶面积	穗长	穗粗	秃尖长	穗粒数	千粒重	亩产	增产率
			(厘米)	(厘米)	(厘米 <sup>2</sup> )	(厘米)	(厘米)	(厘米)	(个)	(克)	(斤)	(%)
1976 年	菌液 培养液	孕穗期	232		745.6	20.6	4.4	0.7	491	383.3	706.6	8.7
			207		587.2	18.2	4.2	1.0	453	370.6	650.7	
1977 年	菌 液 清 水	孕穗期	234		677.6	22.9	4.6	0.4	565	334	590	13.6
			229		588.4	20.8	4.2	0.6	521	336.8	520	
1978 年	菌 液 清 水	苗期	128	2.9	602.4	23.2	4.7	0.3	555	349.5	631	14.1
		孕穗期	105	2.3	533.3	21.3	4.4	0.4	498	345.3	553	

高；玉米增产率为 12.1%（表 3 和表 4）。

从表 3 和表 4 中还可看出，喷菌液的棉花比喷培养液的增产 8.1%；玉米喷菌液后，无论是穗长、穗粗、穗粒数、千粒重都比喷培养液的有明显增加，增产率为 8.7%。这说明在单纯喷施培养液时，其中微量元素不能代替喷施叶面固氮菌而得到较高的增产效果。

参 考 文 献

[1] Ruinen, J.: *Nature*, 177: 220—221, 1956.

[2] Bessems, E. P. M.: *Non-symbiote nitrogen fixation newsletter*, 2(4):12, 1973.  
 [3] Bhurat, M. C. and A. Sen: *Indian J. Agric. Sci.*, 38:319—325, 1968.  
 [4] Iswaran, V. et al.: *Plant and Soil*, 39:461—463, 1973.  
 [5] Jones, K.: *Annals of Botany*, 34: 239—244, 1970.  
 [6] Rui, J.: *Nitrogen fixation in the phyllosphere*, *The Biology of Nitrogen Fixation*, (ed. by Quispel, A.), North-Holland Pub. Co., Amsterdam, Oxford American Elsevier pub. Co., INC-New-York, pp. 121—167, 1974.