

摘要 作者对水稻根表固氮细菌的生态与分布进行了研究。分别从武汉大学、华中农业大学和湖北省农科院土肥所水稻田里采集水稻根系样品。研究了水稻根系固氮活性与作物生育期的关系。检测到水稻在抽穗期根系固氮活性最高, 同时在此期间分离到的固氮菌株最多。不同碳源对同一根系的固氮活性也有影响。所分离获得的 20 株固氮细菌的纯培养经过鉴定分别属于 *Azospirillum brasilense* 和 *Klebsiella pneumoniae* 两个种。分别以 R_{39} 和 R_{20} 为代表株。

关键词 水稻根表; 固氮活性; 植物生育期; 固氮菌株

近年来, 禾本科作物根系与固氮细菌的联合固氮作用引起了广泛的注意。国外学者 Döbereiner, Schank, Milan, Eskew, Kring, Harris 和 Tarrand 等人在巴西、秘鲁、美国、尼加拉瓜、哥伦比亚、厄瓜多尔、委内瑞拉、塞内加尔、瑞典等地, 从玉米、小米、高粱、甘蔗、水稻、牧草等作物根系分离获得一批固氮螺菌菌株, 并研究它们的生态分布、分类、生理和联合固氮作用^[1]。为了寻找固氮资源, 我国学者也先后从玉米、小米、高粱和甘蔗等作物分离获得固氮螺菌^[2]。此文报道水稻根表固氮细菌的研究。

材料与方 法

(一) 样品来源

采自武汉大学生物系、华中农业大学和湖北省农业科学院土壤肥料研究所三个单位的农场。采集水稻分蘖期、抽穗期、成熟期的根系。

(二) 分离培养基

采用 Döbereiner 氏培养基^[3]。

(三) 菌株的分离

采用富集培养法和稀释平板法^[3]。

(四) 固氮活性的测定

采用乙炔还原法在气相色谱仪上测定根系 (0.1 克样品置于 3ml 半固体培养基中) 和固氮细菌的固氮活性。以 $n \cdot \text{mol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 / \text{ml} \cdot \text{hr}$ 表示。

(五) 菌种鉴定

采用常规鉴定方法^[4,5]。

结果与讨论

(一) 水稻根系固氮活性与作物生育期的关系

分别从不同品系的水稻的三个不同生育期 (即分蘖期、抽穗期和成熟期) 采集水稻的根系样品共 39 个, 测定其固氮活性见表 1。表 1 结果表明, 不同生育期的水稻根系的固氮活性是不同的。从采集到的 13 个水稻品系看, 在三个生育期中, 均是抽穗期的根系固氮活性最高, 而成熟期根系的固氮活性最低, 其中 97A、农垦 58、广闽 $\times$ 7533bF₁、包选 2、广陆矮、包 $\times$ 广 F₁ 及 IR28 在这期间则完全没有固氮活性。这种现象与水稻生长发育规律相吻合。在水稻整个生长发育过程中, 自返青后到分蘖期, 植物营养器官形成, 需要大量营养, 根系分泌的物质相对地减少, 菌株的繁殖受到营养物质缺乏的影响。而在水稻的孕穗期和抽穗期, 主要生殖器官形成了, 植株生长达到最高度, 这时植株代谢旺盛, 根系分泌物相对地增多, 刺激根系周围的微生物生长发育和繁殖。因此固氮活性在抽穗期最高。到成熟期, 水稻整个发育阶段完成, 根系代谢亦减弱, 因而固氮活性降低。

(二) 水稻不同生育期根系上分离出的固氮菌株的比例

从 39 个样品中分离出细菌 253 株, 其中固

本文样品由武汉大学肖朝华老师、华中农业大学农场及湖北省农科院农场提供, 特致以谢意。

表1 水稻不同生育期根系的固氮活性
(武汉大学生物系农场)

水稻品系	不同生育期根系的固氮活性 ($n \cdot \text{mol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{ml} \cdot \text{h}$)		
	分蘖期	抽穗期	成熟期
97A	124.62	265.53	0
97B	188.63	307.12	1.21
7532	382.72	422.90	13.27
97A×7532F ₁	305.20	755.76	1.51
广阔×7533bF ₁	121.40	794.35	0
农垦 58	342.32	386.83	2.01
农垦 8	408.43	443.81	0
农垦 58×农垦 8F ₁	465.39	—	6.23
包 选2	175.45	413.00	0
广 陆 矮	239.34	562.80	0
包×广 F ₁	273.36	334.82	0
IR28	68.00	710.73	0
IR24	79.00	797.57	6.03

氮菌株 26 株。自不同生育期采集到的样品中分离到的固氮细菌菌株的比例见表 2。

表2 从水稻不同生育期根系分离菌株数
(武汉大学生物系农场)

生育期	样品数 (个)	分离菌株数 (株)	固氮细菌株 数(株)	固氮细菌占 总菌株(%)
分蘖期	13	77	5	6.5
抽穗期	13	161	21	13.0
成熟期	13	15	0	0

表 2 的结果指出, 不同生育期所获得的固氮菌株数是不同的, 分蘖期 5 株, 抽穗期 21 株, 成熟期没有。这种现象说明了固氮细菌在根表的存活与繁殖和水稻的生育期有着密切的关系。如果试图获得较多的和较高固氮活性的菌株, 必需选择适当的作物生育期采集样品。

(三) 不同培养基对水稻根系固氮活性的影响

由于土壤中各种营养成分丰富, 适合于各种微生物的生长和繁殖, 实验室配制的各种培养基都有其局限性。因此我们在分离水稻根表细菌的时候, 采用了两种不同碳源的培养基, 即以 Döbereiner 氏培养基为基础, 其中碳源分别采用苹果酸钠(A)和蔗糖(B)。比较结果见表 3。

表3 不同培养基对固氮活性的影响
(湖北农科院土肥所农场)

样品号	水稻品系	在不同培养基上固氮活性 ($n \cdot \text{mol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{ml} \cdot \text{h}$)	
		A	B
1	I-1 当选晚 2 号 A×晚恢 3 号	2.90	104.48
2	I-2 玖 A×反五-2	11.54	170.09
3	I-3 鄂 3120A×反五-2	11.01	7.29
4	I-4 农 6209A×77302-9	11.85	26.73
5	I-5 3269A×77302	11.99	29.73
6	I-8 矮九早 A×梗恢 30	1.21	8.50
7	I-9 双百×农天	17.16	0
8	I-10 CK ₁ 105	22.17	0.61
9	I-11 农虎 3-2 CK ₂	20.50	75.33
10	II-12 当选晚 2 号 A×晚恢 3 号	50.42	43.74
11	II-13 京 3120A×反五-2	17.62	14.58
12	鄂晚 3 号	6.07	48.60
13	鄂晚 5 号	7.59	34.02
14	测 48	16.10	6.38
15	6107	46.17	4.56
16	837923	3.34	0
17	837906	38.57	4.86
18	黎 四	43.74	34.02
19	837930	51.03	14.56
20	838008	33.41	21.87

从表 3 的结果看出, 同一根系在不同的培养基上表现的固氮活性不同, 说明不同种属的菌株需要或喜欢不同的培养基。如固氮螺菌比较喜欢苹果酸钠, 而大肠杆菌科的菌喜欢蔗糖。某种环境对一些细菌发展有利, 而另一种环境则对另一些细菌发展有利。如 1 号根样, 在培养基 A 上的固氮活性只有 $2.90n \cdot \text{mol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{ml} \cdot \text{hr.}$, 而在培养基 B 上则为 $104.48n \cdot \text{mol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{ml} \cdot \text{hr.}$, 再如 15 号样品, 在培养基 A 上为 $46.17n \cdot \text{mol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{ml} \cdot \text{hr.}$, 而在培养基 B 上只为 $4.56n \cdot \text{mol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{ml} \cdot \text{hr.}$ 。这是由于当时在两种培养基上生长分布的菌种和菌量以及固氮能力不同所致。这些结果告诉我们, 在进行微生物生态工作时, 注意培养基的成份是很重要的。

(四) 固氮细菌的分离与鉴定

将具有较高固氮活性的样品进行分离培养, 获得较高固氮活性的纯菌株 20 株, 其固氮

表4 固氮细菌的固氮活性

菌株号	菌株来源 (作物品系)	固氮活性 ($\mu\text{mol}\cdot\text{C}_2\text{H}_4/\text{ml}\cdot\text{hr.}$)
R ₁	I-9 双百 A×农天	21.71
R ₂	I-11 农虎 3-2 CK ₂	166.10
R ₄₋₃	I-1 当选晚 2 号 A×晚恢 3 号	138.58
R ₆	I-4 农 6209 A×77302-9	296.14
R ₁₁	I-5 3269 A×77302	116.75
R ₁₃₋₃	II-12 当选晚 2 号 A×晚恢 3 号	497.36
R ₁₄	鄂晚 3 号	129.09
R ₁₆	837930	58.37
R ₂₂	I-11 农虎 3-2CK ₂	24.32
R ₂₄₋₃	黎 四	149.97
R ₃₄	鄂晚 5 号	429.02
R ₃₅	837923	37.97
R ₃₇	838008	493.57
R ₃₈	I-4 农 6209 A×77302-9	239.19
R ₃₉	第 A×培 C-101*	1017.51
R ₄₄	第 A×轮回422*	272.07
R ₄₅	第 A×反五-2	284.75
R ₄₇	第 A×反五-2	80.68
R ₄₈	第 A×反五-2	34.17
R ₄₉	第 A×培 C-101*	341.70

活性列入表4。

将所获得的固氮活性较高的菌株经过形态、生理生化等45项特性的鉴定,这些菌株分为两种:固氮螺菌属(*Azospirillum*)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),其特征如下:

固氮螺菌属(*Azospirillum*):革兰氏阴性,杆状,培养24小时的大小为 $0.5\sim 0.6\times 0.7\sim 1.1\mu\text{m}$,培养5~15天发育成1~2个螺旋。菌体内含有聚 β -羟基丁酸的颗粒,以极生单根鞭毛运动,无粘液,呼吸代谢,在微好气条件下具有固氮能力,在苹果酸钠、琥珀酸盐培养基上生

长良好,能利用各种有机酸和糖类作为唯一碳源,氧化葡萄糖,能利用铵态氮和硝态氮为氮源。在肉汁蛋白胨培养基上生长良好,但不固氮。甲基红试验阴性,V.P试验阴性,硝酸盐还原阳性,吲哚和淀粉酶阴性,不水解果胶,不产 H_2S ,氧化酶、接触酶和脲酶阳性。生长时不要生长素,生长温度范围 $15\sim 40^\circ\text{C}$,最适生长温度 $30\sim 37^\circ\text{C}$,生长pH值范围 $5.0\sim 8.5$,最适pH为 $6.5\sim 7.5$,根据上面所述特征,此菌属于*Azospirillum brasilense*,其代表菌株为R₃₉。

克雷伯氏菌属(*Klebsiella*):革兰氏染色阴性,杆状,两端钝圆,有荚膜,大小为 $0.5\sim 0.8\times 1.2\sim 1.9\mu\text{m}$ 。不运动,没有鞭毛,氧化酶阴性,接触酶阳性,不发酵葡萄糖产酸产气,甲基红阴性,V.P阳性,吲哚阴性,脲酶、赖氨酸脱羧酶阳性,色氨酸、苯丙氨酸脱氨酶阴性,不水解明胶、淀粉和果胶,最适生长温度为 $30\sim 37^\circ\text{C}$,最适pH为7.0,在氯化钾、柠檬酸盐上可以生长,根据其形态特征,生理生化特征鉴定为*Klebsiella pneumoniae*,其代表菌株为R₂₀。

参 考 文 献

- [1] 王子芳:微生物学通报,9(4):176—181,1982。
- [2] 罗孝扬、王子芳等:微生物学报,23(1):68—72,1983。
- [3] 湖北省微生物研究所生物固氮组:微生物学报,19(2):160—165,1979。
- [4] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著:“一般细菌常用鉴定方法”,科学出版社,1978。
- [5] Buchanan R. E. & N. E. Gibbons:“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”(8-Edition), The Williams & Wilkins Company/Baltimore. p. 196—207, 1974.