

## 根瘤菌新载体及其接种效果的研究

熊春林\* 黄隆广 丁磊\*\*

(江苏省农业科学院土肥所,南京)

**摘要** 以海藻酸盐为载体固定根瘤菌细胞,并测定根瘤菌在载体上和土壤中存活状况。在颗粒微环境中,根瘤菌菌数在24天内一直增加,在土壤中增加速度更快,接种固定化颗粒的花生和大豆,产量明显比对照高,有的达到极显著差异。这些结果表明固定化细胞技术在农业微生物中具有良好的应用前景。

**关键词** 固定化颗粒;根瘤菌

固定化细胞技术是70年代迅速发展中的一个新科技领域,也是近代工业微生物技术的重要革新内容<sup>[1]</sup>。在农业微生物方面,固定化细胞技术的研究仅有过一些报道<sup>[2]</sup>,但在应用上还未有实例,特别是根瘤菌接种剂方面,由于土壤不象发酵罐那样能有恒定的条件,干扰因素较多,共生固氮又涉及到一些有关植物与微生物等许多问题;在其应用上亦受许多条件限制。因此研究固定化的根瘤菌菌剂,对根瘤菌的应用效果和um提高作物产量具有十分重要意义。

包埋法是固定化细胞技术中应用最广泛的一种方法<sup>[3]</sup>。常用的载体较多,由于海藻酸盐具有操作方便、细胞生长快、成本低等优点。本文采用了海藻酸盐为载体固定化根瘤菌细胞,并对根瘤菌在载体上和土壤中的存活状况、结瘤能力以及对作物的影响效果进行了研究。

## 材料与amp;方法

### (一) 材料

1. 供试菌株和植物: 花生根瘤菌 97-1 (*Rhizobium* spp. 97-1)、三叶草根瘤菌 (*Rh. trifolii*) 和大豆根瘤菌 (*Rh. japonicum*)。植物: 花生为徐花1号,地三叶草,大豆为准豆1号。

2. 培养基: 甘露醇酵母浸出液琼脂培养基<sup>[4]</sup>。

3. 固定化细胞: 按方法1制备。

### (二) 方法

1. 根瘤菌固定化颗粒的制备: 供试菌株在甘露醇酵母浸出液琼脂培养基上增殖后,以无琼脂培养液洗下菌苔,加海藻酸钠溶液,用玻棒搅拌均匀,用7号针头滴入CaCl<sub>2</sub>溶液中,即成根瘤菌固定化颗粒,大小约为2mm,每毫升海藻酸溶液可滴60粒,即60粒固定化颗粒相当于1ml菌液的菌数,依此类推。

2. 根瘤菌在载体上存活状况的测定: 隔不同时间对固定化细胞进行平板计数,作出生长曲线,并进行固定化颗粒的切片观察。

3. 固定化根瘤菌在土壤中存活状况的测定: 将固定化根瘤菌施于菜园土(保持含水量为25%左右)内,隔不同时间取固定化细胞和靠近其周围及离颗粒3cm处的土壤进行根瘤菌平板计数,并作出曲线。

4. 盆栽试验方法: 用过40目筛的水洗砂,每盆500g,加水75ml。试验分三组:(1)用不同量的根瘤菌固定化细胞颗粒与地三叶草种子一起播种在盆内;(2)以与固定化颗粒含菌量相同的菌液作比较,(3)以不加任何菌为空白对照。每盆播10粒地三叶草种子,重复4次。

5. 田间试验方法: 试验在泰兴县农科所进行。花生为徐花1号,菌株是花生根瘤菌97-1;大豆为准豆1号,菌种是大豆根瘤菌。土壤为砂壤,全氮0.057%,P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 2.8ppm, K<sub>2</sub>O 14.61

\* 现在南昌市溶剂厂工作

\*\* 江苏泰兴县农科所

ppm, 有机质 1.24%, 前茬作物为小麦。试验分三组: (1) 把植物种子与不同量的根瘤菌固定化颗粒一起播种; (2) 以与固定化颗粒含菌量对应相等的菌液与种子一起播种; (3) 以不加菌的空白作对照。每处理重复八次(即八个穴), 花生每穴播 3 粒种子, 大豆每穴 4 粒。

## 结果与讨论

### (一) 根瘤菌在载体上的存活状况

根瘤菌经海藻酸盐固定化后, 颗粒内菌的消长规律见表 1 和图 1。

表 1 根瘤菌在载体上的消长规律

时间 (天)		0	4	8	11	14	18	24	30
固定化颗粒含菌量 ( $\times 10^9$ 个/粒)	在 $\text{CaCl}_2$ 溶液中	530	970	1200	1340	1330	1300	1760	900
	在土壤中	530	520	3930	18300	11500	—	—	—

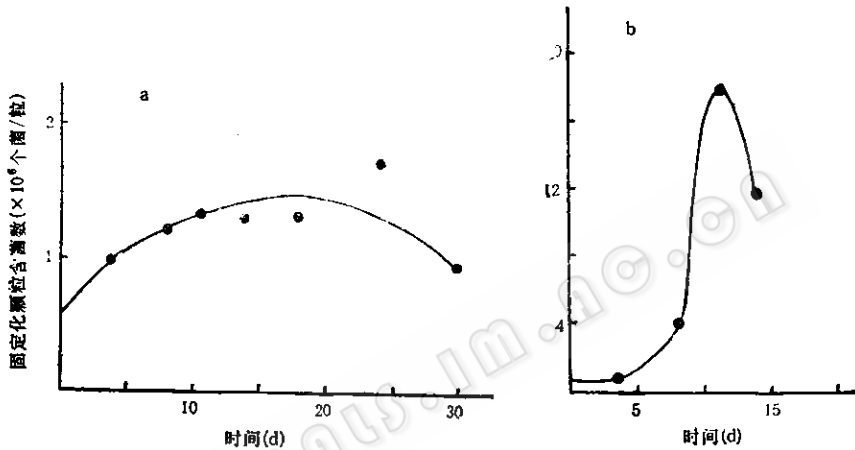


图 1 根瘤菌在载体上的增长曲线

a. 在  $\text{CaCl}_2$  溶液中(图中曲线的回归方程为  $y = -0.0038x^2 + 0.12x + 0.53$ ,  $r = 0.94$ ) b. 在土壤中

从表 1、图 1 结果看出, 根瘤菌被包埋在藻胶中后, 利用胶中的营养能迅速繁殖, 其生长规律符合微生物生长曲线, 呈偏常态分布。前阶段增加较快, 后阶段缓慢递减。30 天后每一颗粒仍含有 90 万个细胞, 比开始包埋时增加 1.7 倍。

菌体在颗粒中的分布, 不同时期是有差异的。通过显微镜观察切片的菌体密度与平板计数的结果一致, 在后期菌体的密度显著增大, 几乎填充整个颗粒(如图 2)。

### (二) 根瘤菌在土壤中的生存状况(表 2, 图 3)

从表 2、图 3 结果看出, 固定化根瘤菌在土壤中的存活状况是, 46 天数量仍很大, 为  $1.52 \times 10^8$  个菌/g 干土, 开始的第四天是

$4.14 \times 10^8$  个菌/g 干土; 离颗粒中心半径 3 cm 处, 第四天是  $1.02 \times 10^8$  个/g 干土, 46 天是  $1.64 \times 10^8$  个菌/g 干土, 可见固定化技术能提高根瘤菌在土壤中的存活率。

土壤是一个复杂的微生物生存环境, 因此以往使用泥炭、琼脂和油菌剂等为载体接种到土壤中后, 根瘤菌被转移到新的环境, 有一个生长适应阶段, 所以根瘤菌数量往往是急剧减少<sup>[5,6]</sup>。Burton (1975)<sup>[7]</sup> 曾测得, 大豆根瘤菌接种到大豆种子上, 接种时菌数为  $1.01 \times 10^7$  个菌/g 种子, 3 周后下降到  $4.6 \times 10^4$  个菌/g 种子, 即下降了 99.5%。

从表 2 结果来看, 根瘤菌固定化颗粒在接种后 36 天内菌数一直是增加, 从  $4.14 \times 10^8$  个菌/g 干土, 增加到  $8.39 \times 10^8$  个菌/g 干土, 只

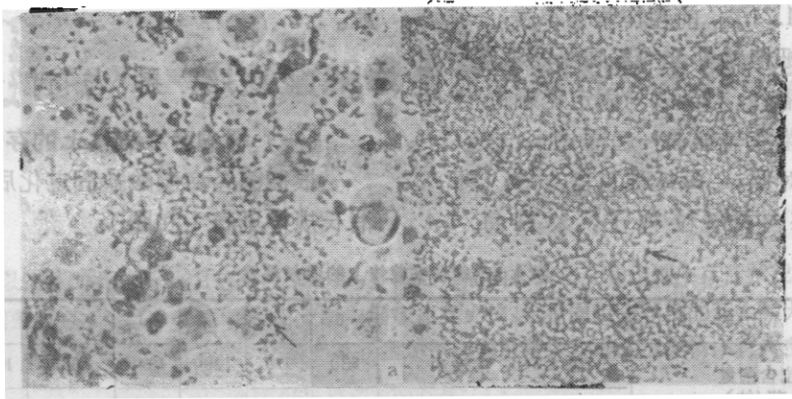


图2 根瘤菌在载体上的分布图

a. 8天; b. 24天。箭头指向为根瘤菌细胞(1000×)

表2 固定化根瘤菌在土壤中的存活状况

时间(天)		0	4	8	14	20	26	36	46	
取土样部位	颗粒中心	$\times 10^8$ 个菌/g 湿土	0	3.09	5.60	5.20	5.63	5.50	6.67	1.15
		$\times 10^8$ 个菌/g 干土	0	4.14	7.68	7.02	7.04	7.41	8.39	1.52
	离颗粒中心3cm处	$\times 10^8$ 个菌/g 湿土	0	0.76	1.68	1.15	1.30	1.76	4.17	1.24
		$\times 10^8$ 个菌/g 干土	0	1.02	2.29	1.55	1.64	2.37	5.24	1.64
土壤含水量(%)			25.34	26.67	25.88	20.50	25.73	20.50	24.31	

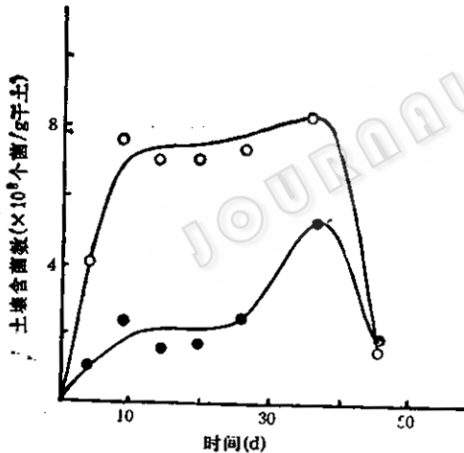


图3 固定化根瘤菌在土壤中的消长规律

○……颗粒中心取土样 ●……离颗粒中心3cm处取土样

有到36天后菌数才有减少趋势。在离固定化颗粒3cm处,根瘤菌菌数的变化同前。可见根瘤菌在固定化颗粒这个小环境中能有较长的一段时间增殖,随后释放于土壤中,并有较好的移动性。

固定化根瘤菌在土壤中比它在CaCl<sub>2</sub>溶液中繁殖更快,这可能是土壤中有有机营养成分

渗透到颗粒中,促进了根瘤菌增殖,这有利于接种根瘤菌同土著根瘤菌的竞争,为提高结瘤和增加作物产量打下较好的基础。

### (三) 盆栽试验

盆栽试验处理及结果见表3。

表3 根瘤菌固定化细胞与其菌液的结瘤效果比较

处理	测定项目	结根瘤数	叶片数	植株鲜重
		(个/10株)	(片/10株)	(g/10株)
固定化颗粒(粒/盆)	20	200	99	88.3
	200	235	107	143.6
菌液(ml/盆)	0.5	179	91	109.7
	5.0	283	145	174.2
对照		25	60	23.5

从表3结果可以看出,各种处理均比对照结瘤多,植株的叶片数和鲜重比对照均有明显地提高。在20粒/盆的处理中,无论是根瘤数还是叶片数都高于含等菌量的菌液处理,可见固定化颗粒能不断释放根瘤菌,侵染寄主植物,达到有效地多结瘤。

#### (四) 田间试验

田间试验处理及结果见表4。

表4 根瘤菌固定化颗粒与其菌液的结瘤数比较(田间试验)

处理	根瘤菌固定化颗粒 (粒/穴)			菌液 (ml/穴)			CK
	150	300	750	2.5	5.0	12.5	
结瘤数(个)							
花生		39			34		35
大豆	41		58	33		74	45

施于土壤中的固定化根瘤菌能迅速繁殖,固定化颗粒被分解后,菌体释施于土壤,在数量上占有较大优势。但固定化根瘤菌是否比菌液接种或土著根瘤菌具有更好地竞争结瘤力?从我们应用固定化根瘤菌接种花生的效果来看,

每穴接种 300 粒(总菌约为  $1.83 \times 10^9$  个)时,结瘤数比合同等数量菌的菌液要多,比对照也要高。而大豆得到的结果则相反,结瘤数是菌液高于固定化颗粒。在总菌为  $6.83 \times 10^9$  个/穴时,即固定化颗粒为 750 粒,菌液为 12.5 ml 时,接种处理的结瘤数都比对照多,由此可见大豆需要较高含菌的接种量。王福生等<sup>[8]</sup>(1987)报道的结果与我们试验得到的结果基本一致,大豆种子接种菌量达到土著根瘤菌的 600 倍时,增产才达到统计学上的显著差异水平,因此加大大豆接种量能够提高大豆种子的产量<sup>[9]</sup>。

#### (五) 根瘤菌固定化细胞对作物产量的影响(表5)

表5结果说明,固定化根瘤菌对作物具有

表5 根瘤菌固定化颗粒与其菌液对作物产量的影响(田间试验)

处理	根瘤菌固定化颗粒 (粒/穴)	根瘤菌固定化颗粒 (粒/穴)					菌液 (ml/穴)					CK		
		30	75	150	300	600	750	0.5	1.25	2.5	5.0		10.0	12.5
花生	产量(斤/亩)		350.0	347.2	343.2	421.0			350.8	375.6	386.2	442.2		343.2
	与对照比		6.8	4.0		77.8**			7.6	32.4	43.0*	99.0**		
	增产(%)		1.98	1.17		22.69			2.21	9.44	12.53	28.85		
大豆	产量(斤/亩)	236.2					224.3	165.3					177.1	165.3
	与对照比	70.9*					58.9*						11.8	
	增产(%)	42.83					35.62						7.1	

花生: \* 显著  $LSD_{0.05} = 39.2$  大豆 \* 显著  $LSD_{0.05} = 53.4$  \*\* 极显著  $LSD_{0.01} = 57.1$

增产的效果。花生在 600 粒/穴和 10 ml/穴,这两种含菌量相同的处理与对照比较,增产都达到极显著水平。

大豆田间试验结果表明,固定化颗粒比菌液效果要好得多,它的两个处理都达到显著水平,而菌液的两个处理都没有表现出显著差异。由此看出固定化细胞接种大豆,效果更好,具有较好地实用性。

盆栽和田间试验中对植株长势、结瘤和产量进行了综合考察,结果一致表明根瘤菌固定化细胞对上述各性状都表现为积极的效果。

根瘤菌在固定化颗粒这一小环境中,能避免气候条件和土壤环境变化带来的干扰,按常规繁殖,接种后,可以增加土壤中根瘤菌数,更有竞争力,可以多结瘤,为作物增产提供良好的固氮条件,应该具有很好的应用前景。

然而,要推广根瘤菌固定化细胞在农业微生物中的应用,必须解决造粒繁琐等问题,因此,固定化细胞技术在农业上的应用能否象在工业上那样广泛,还有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 曲立民等: 微生物学杂志, 5 (1)43-49, 1984.
- [2] FAO, Legume Inoculants and Their Use, Rome, 1984.
- [3] 陈驹声: 《近代工业微生物学》,上海科学技术出版社, 1982.
- [4] 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》,科学出版社, 1978.
- [5] 黄隆广: 微生物学杂志, 5 (4)25-28, 1984.
- [6] Nutman, P. S: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plant, Cambridge University Press, 1976.
- [7] Vincent, J. M: Nitrogen Fixation in Legumes, Academic Press 1982.
- [8] 王福生等: 中国土壤学会 1987 年学术年会论文摘要集, 49-50, 中国土壤学会, 1987.