

乙炔还原-MPN(最可能数)法测水稻根系固氮菌数的研究

吴文礼 黄 鹏* 陈汉清

(福建农学院食品工程系微生物研究室)

摘要 本文重点介绍了乙炔还原-MPN 法测定水稻根系固氮菌数的结果,并与经典方法滤纸条-MPN 法及 TTC-MPN 法进行了比较。乙炔还原-MPN 法具有实验周期短、专一性强和判断客观等优点,是一种快速准确地测定水稻根系固氮菌数及初步筛选高活性固氮菌株的有效手段。

关键词 乙炔还原-MPN 法;固氮菌数

生物固氮作用在提高土壤肥力、改善作物营养中的作用是众所周知的。固氮菌数量多少及活动强度高是固氮作用大小的反映。因此探讨简便有效的固氮菌数测定方法,对深入研究固氮作用具有一定的理论和实用价值。

60年代以前,多用平板法及滤纸条-MPN 法测定固氮菌数^[1]。70年代中期 Döbereiner 等改用添加一定量的氯化 2, 3, 5-三苯基四氮唑 (TTC) 于无氮培养基中,根据固氮酶可使 TTC 还原呈现红色的特性,作为判断阳性的依据,检测生脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferrum*) 的存在和菌数^[2,3]。1966 年发现固氮菌具有还原乙炔的特性后,灵敏快速和操作简便的乙炔还原法即被广泛应用于固氮研究中。我们在水稻根系联合固氮的研究中,利用乙炔还原法测定固氮酶的活性,结合 MPN 法测定根系固氮菌数,取得了良好的效果。本文介绍乙炔还原-MPN 法与滤纸条-MPN 法和 TTC-MPN 法测定固氮菌数的结果比较。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 水稻根系: 圭福 3 号水稻植株的根系 (采自本院遗传育种研究室试验田)。

2. 固氮菌株: 维涅兰德固氮菌 230 (*Azotobacter vinelandii* 230) 由中国科学院林业土壤研究所提供;胶德克斯氏菌 15994 (*Derxia gummosa* ATCC 15994) 引自美国 ATCC; 固

氮菌 2208 S₁ 由本室从水稻根系分离的固氮菌株(待鉴定);维氏固氮菌 As. 1207 (*Azotobacter vinelandii* As. 1207) 引自中国科学院微生物研究所。

3. 试剂: 氯化 2, 3, 5-三苯基四氮唑 (TTC)。

4. 100 型气相色谱仪: 上海分析仪器厂产,不锈钢柱 1m, 固定相为 Apiezon M, 载体为 Al₂O₃ (60—80 目), 氢焰检测器。工作条件: N₂ 30ml/分, H₂ 30ml/分, 空气 400ml/分, 柱温 90℃, 检测室温度 110℃, 灵敏度 1×1000, 进样量 100μl。

(二) 方法

1. 首先将固氮菌株 *A. vinelandii* 230, *D. gummosa* 15994, 维氏 As. 1207 及 2208S₁ 的纯培养物分别稀释成 10⁻¹—10⁻⁸ 系列浓度的菌悬液。

2. 水稻根系菌悬液的制备包括:

(1) 根际土壤菌悬液: 取根系上附着的土壤 1g, 放入装有 100ml 无菌水和 30 粒玻璃珠的三角瓶中, 200r/min 振摇 15 分钟, 将所得菌悬液用无菌水稀释成 10⁻¹—10⁻⁸ 系列浓度。

(2) 根表菌悬液: 用自来水冲洗根系至流下的水无混浊后, 再用无菌水冲洗三次, 灭菌滤纸吸干表面水分, 在灭菌接种箱内称取完整根段 1g, 用(1)法 200r/min 振摇 15 分钟后稀释

* 黄鹏: 现为中国人民大学商品学系研究生。陈娟和赵梅娜同志参加了本研究, 做了大量具体工作。

成 10^{-2} — 10^{-8} 系列浓度的菌悬液。

(3) 根内菌悬液: 取洗净根段用 0.1% 升汞溶液表面灭菌 5 分钟, 再用无菌水洗去残留消毒液, 灭菌滤纸吸干, 称取 1g 根段剪细研磨成浆后, 稀释成 10^{-2} — 10^{-8} 系列浓度的菌悬液。

3. 乙炔还原-MPN 法测定固氮菌数: 培养基(双料)组分: K_2HPO_4 0.2g; 甘露醇 10g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g; NaCl 0.1g; K_2SO_4 0.2g; 酵母膏 2.0g; $FeCl_3$ 10mg; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 2.0mg; $MnSO_4$ 2.0mg; H_3BO_3 2.5mg; 加水至 500ml, pH6.8。

取 1ml 培养基放入容量为 22ml 的疫苗瓶中, 灭菌后分别接入上述三种 10^{-2} — 10^{-8} 系列浓度菌悬液各 1ml, 每种菌悬液每种浓度作三个重复。以接入无菌水作为空白对照。32℃ 恒温培养 2 天, 用灭菌反口橡皮塞换下疫苗瓶的棉塞, 用注射器从疫苗瓶中抽出空气 2ml, 再注入 2ml 乙炔, 置 32℃ 50r/min 摇床培养 5 小时后, 即可测定乙炔还原活性, 以产生乙炔量 $1nmolC_2H_4/g \cdot h$ 以上者为阳性。记录测试结果, 按 McCrady 氏的“三次重复数量指标计算细菌数量统计表”^[4] 得出数量指标和菌的近似数, 再乘以稀释度和水分系数即求得相应的固氮菌数。

4. 滤纸条-MPN 法: 参照文献[1]的方法进行。在 32℃ 下培养 7 天后, 观察阳性管数, 用上法计算菌数。

5. TTC-MPN 法: 参照文献[2, 3]进行, 32℃ 恒温避光培养 7 天后, 观察阳性管数, 用上法计算菌数。

结果与讨论

(一) 三种方法测定固氮菌株 MPN 值的比较

用固氮菌株 *A. vinelandii* 230, *D. gummosa* ATCC 15994, 维氏 *As. 1207* 及 2208 S_1 的纯培养物制成系列稀释的菌悬液, 用乙炔还原-MPN、滤纸条-MPN 和 TTC-MPN 三种方法测定 MPN 值, 结果见表 1。由表 1 可以看出, 固氮菌株 230、15994 及维氏 *As. 1207* 用三

种方法测得的结果基本近似。而固氮菌株 2208 S_1 所制成的系列稀释液用 TTC-MPN 法测定, 均无变红现象, 故测得的菌数为零。但将其较高浓度的菌悬液 (10^{-2}) 涂抹于平板上培养, 则能形成具有该菌培养特征的乳白、粘稠、凸起的菌落, 测得的菌数为 2500 个/ml, 与其它两种方法测得的结果较接近。该菌株为什么不能使 TTC 变成红色这一问题有待进一步探讨。由此说明以 TTC 变红色作为阳性标准似乎不能对所有固氮菌均有效。用滤纸条-MPN 法测菌数时, 接种稀释度较高的菌悬液的试管, 在滤纸条上形成的菌苔辨别不清, 用肉眼判断是否阳性较为含糊, 主观影响大。乙炔还原-MPN 法采用气相色谱仪测定产生的乙烯量来判断阳性管, 客观, 快速, 灵敏度高, 专一性强, 所测得的结果与其它两种方法较一致, 因此是简便可行的。

(二) 三种方法测定水稻根系固氮菌数结果比较(表 2)

由表 2 结果看出, 用三种方法(除滤纸条-MPN 法测苗期的固氮菌数不明显外)所测得的水稻根系各部位的固氮菌数量是比较一致的。即苗期固氮菌数根际土壤高于根表, 乳熟期根表高于根际土壤, 而苗期和乳熟期的根内均未测到固氮菌, 这与水稻的不同品种及不同生育期根分泌物不同有关^[6]。但所测菌数量多少有一定的差别, 由于滤纸条-MPN 法, 除了固氮菌外, 一些纤维素分解菌亦能在纸条上形成类似固氮菌的菌苔; 同时还观察到接种菌悬液经培养后的试管培养基会呈混浊而滤纸条上又不形成固氮菌菌苔, 致对反应难于判断, 表 2 中苗期测定中没有列出数据就属这种情况。TTC-MPN 法, 除了像上述 2208 S_1 固氮菌菌株在其上不呈红色反应外, 在实验中也观察到一些非固氮微生物的霉菌和细菌却在含 TTC 的培养基上变成红色, 因为这些菌中的脱氢酶也能还原 TTC^[7], 这些都影响实验结果。而乙炔还原-MPN 法则不存在这些弊端, 由于培养基加进酵母膏促进固氮菌生长, 缩短了实验周期。同时用这种方法可以比较不同样品在

表1 三种方法测定几个固氮菌株菌数的结果

菌数(个/ml) \ 测定方法 \ 菌株	230	15994	维氏 As. 1207	2208S ₁
滤纸条-MPN 法	4.5×10^3	2.5×10^3	1.1×10^3	1.5×10^3
TTC-MPN 法	2.5×10^3	1.5×10^3	0.75×10^3	0
乙炔还原 MPN 法	2.5×10^3	2.5×10^3	2.5×10^3	1.5×10^3

表2 三种方法测水稻根系固氮菌数的结果比较

采样日期 \ 菌数* \ 方法 \ 根区	乙炔还原-MPN 法	TTC-MPN 法	滤纸条-MPN 法
1987.8.20 苗期	根际土壤 9.2×10^3	2.3×10^4	—**
	根 表 2.5×10^3	1.5×10^4	—
	根 内 0	0	0
1987.11.2 乳熟期	根际土壤 1.7×10^3	8.2×10^3	8.2×10^3
	根 表 1.8×10^3	2.9×10^3	3.3×10^4
	根 内 0	0	0

* 菌数单位为个/克干土或个/克干根。

** 试验管无法辨别阴性或阳性。

同一处理下的乙炔还原活性的高低, 可为筛选高活性固氮菌株提供依据。

参 考 文 献

- [1] 许光耀、郑洪元: 土壤微生物分析方法手册, 农业出版社, 第119—122页, 1986。
[2] Döbereiner, J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 22:

1464—1473, 1976.

- [3] Patriquim, D.G. and Döbereiner, J.: *Can. J. Microbiol.*, 24(6):734—742, 1978.
[4] McCrady, M. H.: *J. Infect. Dis.*, 17:183—212, 1951.
[5] 李桂生等: 微生物学通报, 6(6): 22—25, 1979。
[6] 吴文礼等: 福建农学院学报, 12(2): 107—112, 1983。