

# 喀斯特生境台湾相思根瘤菌的生物学特性研究

吕成群\* 陆俊锟 黄宝灵 孙以树 李小华

(广西大学林学院 南宁 530004)

**摘要:** 从广西喀斯特地区台湾相思树采集根瘤并分离纯化获得 15 个根瘤菌株, 对其生物学特性进行了研究, 结果表明: 这些根瘤菌均具有典型的根瘤菌的个体形态特征。3-酮基乳糖反应、牛肉膏蛋白胨生长均呈阴性; 淀粉水解、柠檬酸盐利用等均呈阳性; 在 BTB 反应和石蕊牛奶反应均产酸; 都能利用磷酸二氢铵和所供试的 7 种糖类; 11 个菌株能使硝酸盐还原; 有 14 个菌株能在 3.0% 和 4.0% 浓度的 NaCl 下生长良好或较好; 39℃ 下有 14 个菌株能生长; 有 13 个菌株在 pH12 条件下能生长, 4 个菌株在 pH4 的酸性条件下能生长; 15 个菌株都能在  $\leq 10\%$  的  $\text{CaCO}_3$  浓度下生长, 其中有 11 个菌株能在 10%~30% 的钙浓度内生长。表现出在喀斯特环境下, 根瘤菌的生理生化特性及抗逆性的多样性。

**关键词:** 台湾相思, 根瘤菌, 生物学特性, 喀斯特

## Biological Characteristics of the Rhizobia Isolated from *Acacia confusa* Grew in the Karst Environment

LV Cheng-Qun\* LU Jun-Kun HUANG Bao-Ling SUN Yi-Shu LI Xiao-Hua

(Forest College Guangxi University, Nanning 530004)

**Abstract:** The paper is about the systematic studies of biological characteristics of 15 stains rhizobia isolated purified from *Acacia confusa* grew in Guangxi karst environment. The results showed that there were typical characteristics of rhizobia .there were negative reaction about use of 3-ketolactose and beef extract peptone nutrient agar medium ,and positive reaction about use of starch and citrate medium ,and produce acid in reaction of BTB and litmus milk medium,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  was used as nitrogen sources and both four mono-saccharides and three disaccharides could be utilized as carbon sources in 15 strains rhizobia isolated *Acacia confuse* .Among the 15 strains for the tests, 11 strains could deoxidize the nitrate of medium into nitrite, 14 strains could grow well on NaCl solution concentration 3.0 % ~ 4.0 % , 14 strains could grow at 39℃, 13 strains may grow on highest pH12 and 4 strains on lowest pH4 cultrue medium. 15 strains can grow in 10% and 11 strains in 10%~30% of  $\text{CaCO}_3$  solution concentration.

**Keywords:** *Acacia confuse*, Rhizobia, Biological characteristics, Karst

台湾相思(*Acacia confusa*)为豆科常绿乔木。原产我国台湾, 现主要分布于台湾、福建、广东、广

西、云南等省区,在菲律宾、印尼、斐济也有分布<sup>[1]</sup>。由于台湾相思根系发达,适应性强,生长迅速,萌芽能力强,耐砍伐;同时台湾相思具有根瘤,它可以在一定的程度上提高土壤颗粒间团聚,改善土壤结构性能。因此,在我国南方热带亚热带高温多雨、岩石裸露、土壤贫瘠、水土流失严重的喀斯特生境,能充分发挥其森林保护和改善生态环境的作用,是优良的水土保持植物之一。

抗逆性在根瘤菌的生产应用中直接影响其应用效果,这在农作物和牧草的根瘤菌研究中已有大量报道<sup>[2~5]</sup>,但对树木根瘤菌抗逆性的研究很少<sup>[6]</sup>。台湾相思可以在喀斯特地区的恶劣生境条件下很好地生长,这可能与它具有根瘤,能结瘤固氮有关。因此,对生长在喀斯特生境的台湾相思根瘤菌研究,是十分必要的。本文从喀斯特生境生长的台湾相思树木采集根瘤,分离纯化获得 15 个根瘤菌菌株,以已知的台湾相思根瘤菌作对照,对其生理生化特性进行研究,以了解根瘤菌在喀斯特生境下的生长适应性,为今后深入研究和生产应用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 根瘤菌的采集、分离和纯化

台湾相思林样地布设在广西崇左市,样地表面大部分岩石裸露,土壤浅薄,土壤以棕色石灰土为主且贫瘠,水土流失很严重。从上、中、下坡采集新鲜、饱满、个大的根瘤。用自来水冲洗干净,于 75% 的酒精中浸泡 1 min 后,无菌水冲洗 3 次,在 0.1% 酸性氯化汞溶液中表面消毒 8 min,无菌水冲洗 5~6 次。

将消毒好的根瘤置于灭菌的研钵中,将其逐个压碎,用接种环蘸上少许瘤内汁液,在加有少量 0.25% 刚果红的酵母汁甘露醇琼脂培养基平板上划线,放在 28℃ 的恒温培养箱中培养 3 d~7 d。挑选取单个菌落进一步纯化及鉴定,获得 15 个菌株,分别编号为 TW1、TW2、TW3 ..... TW15。

对照菌株分离自非喀斯特地区的台湾相思树,林地土壤为红壤。菌株的分离纯化方法与上相同。菌株编号为 TW0。

### 1.2 生理生化实验

牛肉膏蛋白胨实验、3-酮基乳糖反应实验、明胶水解实验、淀粉水解实验、硝酸盐还原反应、柠檬酸盐利用实验、氮源利用实验、碳源利用实验、石

蕊牛奶反应等实验按常规方法<sup>[7]</sup>; BTB 反应实验参照黄维南等方法<sup>[8]</sup>,在 YMA 培养液中加入 0.5% 溴麝香草酚蓝溶液 5 mL; 接种 7 d 后观察结果,以不接种为对照。按照试管封闭式接种法进行回接结瘤能力试验<sup>[9]</sup>。

### 1.3 根瘤菌抗逆性实验

以 YMA 培养基为基本培养基<sup>[9]</sup>。耐盐性实验设置 NaCl 终浓度为 0.0%、0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0% 等 11 浓度梯度;耐钙实验设 CaCO<sub>3</sub> 终浓度为 3.0%、5.0%、10.0%、15.0%、20.0%、25.0%、30.0%;酸碱实验设置 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0 等 10 个梯度。分别接种后置于 28℃ 恒温培养。温度实验设置 9、17、20、30、39、45、60℃。接种后于第 7 天观察结果。以上实验均设空白对照,3 次重复,无菌操作。

## 2 结果与分析

### 2.1 台湾相思根瘤菌的生理生化特性

16 个菌株回接后均能结瘤,其中从喀斯特地区分离的菌株结瘤率在 71.4%~100%,而对照菌株的只有 14.3%(表 1),另设不接种的试管苗作阴性对照,阴性对照苗均无结瘤。这些菌株在平板培养的菌落圆形,乳脂色或半透明,边缘整齐,表面凸起,具光泽等特征,以及各种生理生化指标的测定结果表明,这 16 个菌株为根瘤菌。

所有供试菌株在 3-酮基乳糖反应、牛肉膏蛋白胨生长均呈阴性;柠檬酸盐利用、铵盐利用均呈阳性,表明台湾相思根瘤菌都具有利用柠檬酸盐和铵盐的能力,没有利用 3-酮基乳糖、牛肉膏蛋白胨的能力(表 1)。对照菌株 TW0 不能水解淀粉、在 BTB 反应和石蕊牛奶反应均产产碱;其余 15 个菌株都能水解淀粉、在 BTB 反应和石蕊牛奶反应均产酸(表 1)。

以葡萄糖、果糖、甘露醇、木糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖 7 种糖做根瘤菌碳源利用试验的结果看,16 个菌株都能利用所供试的糖类作为碳源。对照菌株在利用这些碳源方面与其它菌株无多大差别。

### 2.2 台湾相思根瘤菌的耐盐性

从表 2 结果看,分离自喀斯特地区的台湾相思根瘤菌与对照菌株的耐盐性有很大的差别。对照菌株只能在 0.5% NaCl 浓度下生长。其余菌株,除 TW15 外,都能在 3.0% 和 4.0% 浓度下生长良好或

表 1 台湾相思根瘤菌的部分生理生化特性

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of *Acacia confuse* rhizobia

菌株 Strain	3-酮基 乳糖 3-ketol-actose	淀粉 水解 Starch hydrolysis	柠檬酸 盐利用 Citrate used	BTB 反应 BTB test	牛肉膏 蛋白胨 Beef extract peptone	石蕊牛奶 反应 Litmus milk reaction	刚果红吸 色 Congo red dye ab-sorption	明胶 水解 Gelatin liquefaction	铵盐利用 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> used	硝酸盐 还原 KNO <sub>3</sub> reduce	结瘤率 (%) 内 Nodulation rate (%)
TW1	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	+	+	+	75.0
TW2	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	+	83.3
TW3	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	+	83.3
TW4	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	+	100.0
TW5	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	+	+	+	100.0
TW6	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	—	100.0
TW7	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	+	100.0
TW8	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	+	100.0
TW9	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	+	+	+	83.3
TW10	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	+	100.0
TW11	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	+	+	—	71.4
TW12	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	+	80.0
TW13	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	+	80.0
TW14	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	+	+	—	82.0
TW15	—	+	+	产酸	—	产酸具血 清环	—	—	+	+	100.0
TW0	—	—	+	产碱	—	产碱不具 环	—	—	+	—	14.3

生长较好, TW4 菌株甚至在 8.0%浓度里也能生长较好。从各个菌株看, TW4 的耐盐性最强, 能在 0% ~ 8.0%浓度范围内生长, 其次是 TW9, 能在 0% ~ 7.0%浓度范围内生长良好或生长较好。

2.3 不同酸碱度对台湾相思根瘤菌生长的影响

从表 3 的结果看, 与对照菌株相比, 分离自喀斯特地区的台湾相思根瘤菌耐碱性较强, 都能在 pH8 ~ pH11 的偏碱条件下生长, 有许多菌株还生长良好或生长较好, 在 pH12 条件下, 有 13 个菌株能生长, 有的甚至生长良好。从各个菌株看, TW1、TW12、TW14 能在较广的 pH (4 ~ 12) 范围内生长, 而对照 TW0 菌株只能在 pH6 ~ pH7 的条件下生长。

2.4 不同温度对台湾相思根瘤菌生长的影响

从表 4 的结果可以看出, 所供试的台湾相思根瘤菌适宜在 17 ~ 30 温度范围生长, 均不能在 45

和 60 条件下生长。

2.5 不同 CaCO<sub>3</sub> 对台湾相思根瘤菌生长的影响

分离自喀斯特地区的台湾相思根瘤菌都能在 ≤ 10%的 CaCO<sub>3</sub> 浓度下生长良好或生长较好; 其中 TW1、TW2、TW3、TW4、TW5、TW7、TW8、TW10、TW11、TW12、TW13 等 11 个菌株能在 3% ~ 30% 的钙浓度范围内生长较好或良好(表 4)。这说明, 喀斯特地区的台湾相思根瘤菌对钙的适应能力很强, 在较高钙浓度下仍能生长良好。

3 结论与讨论

与对照菌株(TW0)相比, 分离自广西喀斯特地区生境的台湾相思根瘤菌在 BTB 反应和石蕊牛奶反应均产酸(表 1)。台湾相思的生长适应能力较强, 石灰岩地的土壤一般呈微碱性, 而台湾相思根瘤菌

表 2 NaCl 对台湾相思根瘤菌生长的影响

Table 2 The effects of NaCl solution concentration on growth of *Acacia confuse* rhizobia

菌株 Strain	NaCl (%)										
	0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
TW1	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-
TW2	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
TW3	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
TW4	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
TW5	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TW6	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TW7	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-
TW8	++	++	++	++	++	++	++	-	×	×	×
TW9	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	×
TW10	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TW11	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TW12	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TW13	++	++	++	++	+	++	++	+	-	-	-
TW14	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-
TW15	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
TW0	++	++	+-	×	×	×	×	×	×	×	×

注: “++”表示生长良好; “+”表示生长较好; “-”表示生长差; “×”表示不生长

Note: “++”: grow well; “+”: better growth; “-”: poor growth; “×”: no growth

表 3 不同 pH 对台湾相思根瘤菌生长的影响

Table 3 The effects of different pH on growth of *Acacia confuse* rhizobia

菌株 Strain	pH										
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
TW1	++	+	+	+	++	++	++	++	++	×	
TW2	×	—	++	++	++	++	++	++	++	×	
TW3	×	—	++	++	++	++	++	++	++	×	
TW4	×	—	++	++	++	++	++	++	++	×	
TW5	×	+	+	+	+	+	+	+	+	×	
TW6	×	—	—	—	—	+	+	—	×	×	
TW7	×	—	++	++	++	++	++	++	++	×	
TW8	×	+	++	++	++	++	++	++	++	×	
TW9	×	+	+	++	++	++	++	++	×	×	
TW10	×	—	++	++	++	++	++	++	++	×	
TW11	×	+	++	++	+	+	+	+	+	×	
TW12	+	—	+	+	+	++	++	++	++	×	
TW13	×	+	++	++	++	++	++	++	++	×	
TW14	+	+	+	+	++	+	+	+	+	×	
TW15	++	+	+	+	+	+	+	+	—	×	
TW0	×	×	++	+—	×	×	×	×	×	×	

注: “++”表示生长良好; “+”表示生长较好; “-”表示生长差; “×”表示不生长

Note: “++”: grow well; “+”: better growth; “-”: poor growth; “×”: no growth

表 4 不同温度和 CaCO<sub>3</sub> 浓度对台湾相思根瘤菌生长的影响  
Table 4 The effects of different temperature and CaCO<sub>3</sub> solution concentration on growth of *Acacia confuse* rhizobia

菌株 Strain	温度( ) Temperature( )							CaCO <sub>3</sub> (%)						
	9	17	20	30	39	45	60	3	5	10	15	20	25	30
TW1	—	++	++	++	+	×	×	++	++	++	++	++	++	+
TW2	×	+	+	+	+	×	×	++	++	++	++	++	+	+
TW3	×	++	++	++	+	×	×	++	++	++	++	++	++	++
TW4	×	+	+	+	+	×	×	++	++	++	++	+	+	+
TW5	—	+	+	+	×	×	×	+	+	+	+	+	+	+
TW6	—	+	+	++	—	×	×	+	+	+	—	—	—	—
TW7	—	+	+	++	+	×	×	++	++	++	++	++	++	+
TW8	×	++	++	++	+	×	×	++	++	++	++	++	++	++
TW9	—	++	++	++	+	×	×	++	++	++	++	++	—	—
TW10	—	+	++	++	+	×	×	++	++	++	++	++	++	++
TW11	—	+	+	++	+	×	×	++	+	+	+	+	+	+
TW12	×	++	++	++	+	×	×	++	++	++	++	++	+	+
TW13	—	+	++	++	+	×	×	++	++	++	++	++	++	++
TW14	+	+	+	++	—	×	×	++	++	++	++	++	—	—
TW15	+	+	+	+	—	×	×	+	+	+	—	—	—	—
TW0	+-	+	++	++	+-	×	×							

注：“++”表示生长良好；“+”表示生长较好；“—”表示生长差；“×”表示不生长  
Note：“++”：grow well；“+”：better growth；“—”：poor growth；“×”：no growth

产酸可以中和土壤的碱性，从而达到改良土壤性质，对加快林下植被更新，增加林地植被覆盖，减少水土流失，防止石漠化等都是非常有意义的。

喀斯特地区生境的台湾相思根瘤菌的另一特点是普遍能在较偏碱的条件下生长，在 pH12 条件下，除 TW6 和 TW9 外，其余 13 个菌株都能生长，有的甚至生长良好(表 3)；有 14 个菌株都能在 3.0%和 4.0%浓度的 NaCl 下生长良好或生长较好，甚至 TW4 在 8.0%浓度下也能生长较好(表 2)；有 11 个菌株能在 3%~30%的钙浓度范围内生长较好或良好(表 4)。这表明，广西喀斯特地区具有丰富的相思树种根瘤菌种质资源。台湾相思树种能在这样的偏碱性、土壤贫瘠的地区生长良好，与它具根瘤能固氮有关。台湾相思根瘤菌的耐碱性、耐盐性和耐高浓度钙能力都比已报道的根瘤菌<sup>[10]</sup>耐性更强、适应性更广，这与其所生长的喀斯特生态条件是有关的。

台湾相思树可以在喀斯特地区的恶劣生境条件下很好的生长，这可能与它具有根瘤，能结瘤固氮有关。回接结果表明，这些根瘤菌的结瘤率显著高于对照(表 1)。通过选出生长适应性强、抗逆性好的优良根瘤菌菌株，接种台湾相思苗木用于岩溶石山地区造林，对林木生长会有促进作用，这对改善石山地区的石漠化现状，恢复石漠化地区的生态环境都有很大帮助。

参 考 文 献

[1] 蔡克强, 邹小鲁, 黄维南. 台湾相思结瘤固氮与吸氢酶活性研究. 亚热带植物通讯, 1993, 22(1): 1-6.

[2] Radin D. Influence of some ecological factors on the development of alfalfa rhizobium meliloti root-nodulating bacteria isolated from soils in Serbia and their nitrogen fixation activity. Review Res Work at the Facul Agric, 1996, 41(1): 67-75.

[3] Dowdle SF, Bohlool BB. Predominance of fast-growing Rhizobium japonicum in soybean field in the People's Republic of China. Appl Enviro Microbiol, 1985, 50(5): 1171-1176.

[4] Sudowsky MJ. Possible involvement of a megaplusmid in nodulation of soybeans by fast-growing Rhizobia from China. Appl Enviro Microbiol, 1983, 46(5): 906-911.

[5] Stowens MD. Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing Rhizobium juponicum. Plant and Soil, 1984, 77: 3-14.

[6] 黄宝灵, 吕成群, 韦原莲, 等. 相思树种根瘤菌的若干抗逆性. 南京林业大学学报(自然科学版), 2004, 28(1): 29-32.

[7] 中国科学院微生物研究所. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978, pp. 103-187.

[8] 黄维南, 蓝谷, 黄绳全, 等. 异叶银合欢根瘤菌的分离和特性. 亚热带植物通讯, 1997, 26(2): 12-17.

[9] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985, pp. 239-246.

[10] 吕成群, 黄宝灵, 韦原莲, 等. 相思树种根瘤菌的生物学特性. 微生物学通报, 2003, 30(4): 1-5.