

根际微生物的研究 及反硝化细菌的生态分析

李振高 李良谟 潘映华

(中国科学院南京土壤研究所)

摘 要

本文对根际微生物研究的历史和现状作一简单回顾, 综合分析了根际微生物的功能特性及其在农业生产中的意义; 论证了不同土壤、不同作物各主要生育期根际反硝化细菌的生态分布、优势种和酶活性与氮素转化的关系。

根际是土壤微生物的特殊生态环境。为了区分植物根和土壤微生物之间的影响范围, 有些研究者将根际中不包括土壤的植物表面, 称为根面; 有些则将受根直接影响的根表和紧贴根表的土壤称为根面; 将根面同根周围的土壤称为根际。根面与根际的微生物分别称为根面微生物和根际微生物。不同的研究者对根际的划分有不同的见解。但是, 一般所谓根际是指根及其影响下的土壤范围。

由于植物根系与微生物共居于土壤, 其中根系分泌物为微生物提供了重要营养和能量来源, 其成分和数量影响着根际微生物的种类和繁殖。根际微生物的代谢作用, 直接促进或抑制根的营养吸收和生长, 也影响根际土壤中的物质转化。因此, 植物—土壤—微生物间存在着相互依赖、相互作用的复杂的三边关系。其中, 根际微生物的生命活动起着十分重要的作用。本文概要的对根际微生物研究的历史和现状以及我们的部分研究结果作一简介。

一、根际微生物研究的回顾

早在19世纪中期, 由于细菌学的诞生, 导致了植物病理学、土壤微生物学等新学科的创立。到19世纪末期, 在元素生物循环的土壤微生物学研究中, 就含有根际微生物区系研究的内容。迄今, 根际微生物的研究几乎已有100多年的历史。但我国起步较晚。土壤细菌学家(Hiltner, 1904)在研究豆科植物时, 首先指出根周围土壤中微生物生长旺盛, 为代谢活性最高的区域, 并命名为“根际”^[1]。

到了20年代, 土壤微生物学的研究取得了显著进展, Waksman 和 Starkey^[2]就土壤微生物对高等植物的影响问题指出, 微生物分解土壤中的有机物, 为植物提供 NH_4^+ 、 NO_3^- 等无机养料; 微生物产生的碳酸气、有机酸使难溶性的无机养料溶解; 随着微生物的呼吸, 土壤中的氧分压降低; 微生物吸收土壤中的 NH_4^+ 、 NO_3^- 和其它无机养料进行增殖, 使土壤中无机养料浓度减少; 以及微生物产生维生素、植物生长激素等, 促进植物生长。另外, Starkey^[3]就高等植物的根对根际微生物的影响曾指出: 植物根吸收了 NH_4^+ 、 NO_3^- 和其它无机养料, 使土壤中无机养料减少; 根吸收水分, 使土壤干燥; 从植物根放出碳酸气; 植物根向微生物提供有机物质。

60年代,许多研究者对在不同条件下高等植物与微生物的关系进行了下列因素的研究:(1)高等植物的种类、生育期、抗病性和根的部位;(2)土壤的类型、pH、水分、施肥和农药使用情况等;(3)微生物的种类、数量、活性、生理特性和营养要求等。阐明了因环境条件不同,植物提供的有机质含量和成分不同,根际微生物也发生变化。但这些研究主要是对静态现象的观测分析。

60年代以后,由于透射及扫描电镜、放射性同位素、根际模拟和繁殖动力学等新方法的应用,出现了就高等植物的根与根际微生物的关系从生理学、生物化学和生态学方面进行研究的新倾向。主要内容是,向根际、根面移植微生物及其增殖机制;植物根际、根面上微生物的生存状态及其相互关系;根际、根面上的能量平衡等。尤其是木村真人等^[4,5]长期来对水稻根际微生物的特性进行了大量而深入的研究,取得了不少的进展。由于乙炔还原法的建立,使生物固氮研究方法有了进展。100多年来,豆科植物和根瘤菌共生固氮的研究一直是生物间共生关系的一个重大研究课题。特别是近十几年来,根瘤菌资源的调查和分类、优良菌种的选育、人工接种技术的改进和应用、接种剂的生产技术和产品质量、弗兰克氏菌和非豆科宿主植物的共生固氮、根瘤菌遗传学和生态学以及高效菌株的构建研究等,都已取得了可喜的进展,并在实践中获得明显的增产效益。

70年代初,自巴西学者 Döbereiner 报道了从雀稗根面分离到固氮活性强的固氮菌以来,根际联合固氮引起国内外许多研究者的极大兴趣,对水稻、小麦、玉米、高粱、甘蔗和棉花等根际进行了研究^[6,7]。从固氮效率和应用效果上看,虽然不及共生固氮效能高,但对发掘和有效利用根际联合固氮微生物资源是一个新的启示。可以认为,非豆科作物固氮已是今后生物固氮研究的新方向,也是现代农业科学中富有挑战性的前沿课题,目前已受到国内外广泛关注^[8]。

近年来,国内外还应用单一或组合有益根际微生物制成菌剂,作为生物肥料或生物农药施入作物根际,为根际引进和富集这些有益的种类,发挥它们促进植物营养和抑制致病菌的作用,获得增产和防病的效果。增产菌的应用就是其中一例。看来,将存在根际的有益微生物菌株经筛选或遗传处理接种于根系,也是一种促进植物生长的方法。在菌根研究方面,自 Frank 于1885年首次发现菌根以来,已逐步发展成为一个相当活跃的研究领域,特别是近20年来,研究深度和广度都有较大进展^[9]。

综观土壤微生物学的发展,从广域分布的微生物向微域(根际)内微生物研究的方向发展,已成为当今土壤微生物学研究的一大特点。这也可以从14届国际土壤学大会论文中看出^[10],这方面的研究有了很大的进展:(1)土壤生物技术中的联合和寄生微生物;(2)根际微生物过程及其对植物营养吸收的影响;(3)微域环境中的土壤微生物生态学;(4)生物固氮在稳产农业中的作用;(5)合成有机物质在土壤中的降解等。

二、根际反硝化细菌的生态

(一)根际反硝化细菌的分布

反硝化细菌大部分是异养菌,氧化有机质以取得能源,以 NO_3^- 作为电子受体。其反应途径为, $\text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{硝酸还原酶}} \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{亚硝酸还原酶}} (\text{NO}) \rightarrow \text{N}_2\text{O} \xrightarrow{\text{氧化亚氮还原酶}} \text{N}_2$ 。这是一类具有还原硝酸盐为亚硝酸盐、氨盐及游离氮能力的细菌,广义称其为反硝化细菌。据资料表明,从根际土壤分离的细菌,65%具有反硝化能力。Garcia(1973)报道,水稻根际的反硝化细菌数量达18百万/克土,其R/S(根际土/非根际土)值一般为1—514,这种差异因土壤类型而异。

在我们的试验中也获得类似结果^[11],从水稻根际土壤中分离获得的反硝化细菌占细菌总数的50—70%以上,并且两者呈正相关($P<0.01$)。由此说明反硝化细菌没有专一性,可以认为大多数根际土壤中的细菌是潜在的反硝化细菌。随着作物的生长,各生育期根际中氨化菌和反硝化细菌均呈梯度分布,即根面>根际>根外,存在着明显的根际效应,R/S值在10—100以上(表1)。而且不同生育期有所不同,水稻在抽穗期生长旺盛,根系发达,分泌物增多,根际细菌大量繁殖;到成熟期,植株衰老,根际效应减弱,菌数显著下降。

(二)根际反硝化细菌的优势种

60年代初,王美群等^①进行了根际反硝化细菌的分离及其细菌学性状的初步研究,认为从水稻根际分离的优势脱氮细菌种类中有70—80%的菌株为星集群。近年来,我们对水稻、麦类作物根面、根际和不同土壤的优势反硝化细菌进行了分离与鉴定,结果表明,其中主要是革兰氏阴性杆菌,以*Pseudomonas*的菌数最多。水稻根面以*Ps. aeruginosa*为主;根际以*Ps. fluorescens*和*Ps. stutzeri*等较多。大麦根面的优势种为*Ps. fluorescens*和*Ps. stutzeri*;根际除了*Ps. fluorescens*外,还出现*Ps. mendocina*和*E. cloacae*等。说明作物根面、根际反硝化细菌种的组成较单纯,而且在同一土壤上生长的水稻和大麦,其根面和根际反硝化细菌的优势种不完全一样,而不同土壤上同一作物,其优势种差别不明显。这可能由于根系分泌物的质和量不同,对反硝化细菌的吸引有更强的选择作用,而与土壤类型的关系较小。

三、根际酶活性与氮素损失

众所周知,所有生物学过程都是由酶的催化作用来完成的。土壤作为一个有机—生物—无机的复合体,其酶系是多种多样的,特别是根际土壤中酶的来源更为复杂。从与氮素转化有关的酶分析来看,在小麦扬花期前,根际脲酶活性>根外土壤的,而在成熟期又以根外脲酶活性>根际,前者为后者的4—6倍。在两合土上的小麦各生育期的根际硝酸还原酶活性明显高于在红砂土上者。红砂土中几乎没有该酶活性,即使有酶活性,也是极微弱的,形成的 NO_2^--N 只有0.009—0.014 $\mu\text{g/g}$ 干土·时。小麦根际土中的硝酸还原酶活性低于根外土壤者,随着小麦的生长,根际中该酶活性显示出下降趋势(表2)。看来小麦根系对硝酸还原酶活性没有明显的促进作用。

此外,从表3结果来看,根外土壤的 NO_3^- 还原为 N_2O 的酶活性>根际土壤者,随着小麦生长期延长,差异尤为明显。两合土中的酶活性明显高于红砂土,看来小麦根系对反硝化活性没有正刺激效应,可能由于植物吸收 NO_3^--N ,根际土中 NO_3^- 浓度减少,而导致根际 NO_3^- 还原为 N_2O 的酶活性下降。有资料证明,水稻根际的 N_2O 还原酶活性为根外土壤的14倍^[12,13]。密闭体系中 ^{15}N 标记肥料试验结果还表明,种植水稻促进了施入肥料氮的反硝化作用^[14]。从上述可知,作物根际是反硝化细菌集中的场所,在有硝酸盐、易溶性有机物(根

表1 水稻各生育期根面、根际反硝化细菌的数量

土 壤	生育期	根 面	根 际	根 外	R/S值
		×10 ⁶ /克干土			
黄泥土	分蘖期	419.4	166.1	3.6	46.1
	抽穗期	488.4	459.4	4.5	102.1
	成熟期	187.5	58.2	3.3	17.6
马肝土	分蘖期	354.8	147.1	3.1	47.5
	抽穗期	451.6	398.3	3.8	104.8
	成熟期	243.5	67.4	2.9	23.2
白 土	分蘖期	239.3	47.7	1.8	26.5
	抽穗期	330.6	226.9	3.5	64.8
	成熟期	272.7	90.0	2.8	32.1

① 王美群等, 1964年土壤微生物学专业会议专题报告及研究报告摘要集, 研39—43, 1964。

表 2

小麦根系对脲酶*和硝酸还原酶**活性的影响

酶 类	土 壤	处 理	生 育 期					
			分蘖期	拔节期	孕穗期	抽穗期	扬花期	成熟期
脲 酶	两合土	根际	17.0	16.8	21.6	12.0	4.3	13.3
		根外	17.4	8.2	—	8.7	0.9	54.1
	红砂土	根际	34.2	22.3	23.6	19.5	19.1	2.6
		根外	21.7	4.0	2.6	3.5	27.0	13.1
硝 酸 还原酶	两合土	根际	2.38	1.46	0.007	0.013	0.018	0.014
		根外	5.98	2.38	0.014	0.007	0.013	0.220
	红砂土	根际	—	—	0.011	—	0.009	0.009
		根外	—	—	0.011	—	0.006	0.009

* $\text{NH}_3\mu\text{g/g干土}\cdot 24\text{时}$; ** $\text{NO}_2^-\text{N}\mu\text{g/g干土}\cdot \text{时}$ 。

表 3 小麦根系对 NO_3^- 还原为 N_2O 酶活性的影响

土 壤	处 理	生长时间(天)		
		15	22	30
两 合 土	根际	2.54	3.24	2.34
	根外	5.98	6.28	9.50
红 砂 土	根际	—	0.00	0.00
	根外	—	2.67	2.33

表 4 水稻根际和根外土壤氮素损失率比较
(分蘖期取土, 加 $\text{K}^{15}\text{NO}_3-\text{N}40\text{mg}/100\text{g土}$, 淹水培育 2 周)

土壤	处理	剩余 ^{15}N	相差	损失 (%)
		mg/100g土		
黄泥土	根际	1.24 ± 1.06		89.3
	根外	3.44 ± 3.48	2.20*	70.3
白 土	根际	0.85 ± 0.34		92.6
	根外	2.57 ± 0.84	1.72*	77.8

注: K^{15}NO_3 中 ^{15}N 丰度为 28.9%。

系分泌物、脱落物)及缺氧条件下,反硝化细菌的数量与反硝化作用强度呈正相关。因此,

从反硝化细菌的生理学和生态学观点看,根际具备了上述良好的条件,就是说根际的反硝化作用是最活跃的。朱兆良等^[15]用间接法证明,太湖地区土壤中氮素损失的主要途径是生物反硝化作用。我们的研究表明^[16],从水稻根际土和根外土氮素损失率比较来看,黄泥土和白土两种供试土壤上施用 K^{15}NO_3 ,根际土壤中氮素损失率比根外土壤分别多 19% 和 15% ($P < 0.05$, 表 4)。说明水稻根系对反硝化作用有刺激效应,这是个不利因素。但是,从自然界氮素循环角度考虑,它又是不可缺少的一种有益作用。因此,如何改变根际生态条件,调控反硝化细菌的反硝化作用,有助于减少或防止土壤氮素损失和环境的氮污染问题。

综上所述,植物是根际微生物发育的根本动力,不同植物根际各具有特征性的根际微生物优势种。根际微生物既是植物根部营养的施惠者,又是争夺者。值得注意的是植物根际聚集着大量的细菌中大多是反硝化细菌,孕育着一个巨大的反硝化潜力。条件适宜,将造成氮素损失,同时还可能对环境质量产生不利影响。因此,随着新技术的发展和应用,在加深对反硝化细菌的生理生化及其遗传学、生态学等研究的同时,积极开展原位根际土壤中硝化一反硝化作用的动态研究,具有重要的理论和实际意义。

参 考 文 献

- [1] Hiltner, L., Arb. Deut. Landw. Ges., 98: 59—78, 1904.
- [2] Waksman, S. A. and Starkey, R. L., "The Soil and the Microbe", John Wiley and Sons, Inc., New York, 181, 1931.

[3] Starkey, R. L., Soil Sci., 27: 319. 1929.

[4] 木村真人等, 水稻根圏に關る研究(第2、3報), 根圏土壤の微生物学的性質(この1, 2)。日本土肥志, 48:91—99, 111—114, 1977。

[5] 木村真人等, 水稻根圏に關る研究(第7報), 水稻根面の微生物と(この1), 日本土肥志, 51:154—172, 1980。

[6] 王子芳, 細菌-植物聯合固氮研究進展, 微生物學通報, 9(4):179—181, 1982。

[7] 吉田富男, 化學と生物, 13(2), 1975。

[8] 陳廷偉, 非豆科作物固氮研究進展, 中國農業科技出版社, 1989。

[9] 郝文英, 80年代以來VA菌根研究進展, 土壤學進展, 19(2):1—8, 1991。

[10] 趙其國, 為人類生存及改善環境不斷加強土壤科學研究——從第14屆國際土壤學大會看土壤學的發展前景, 土壤, 22(6):281—286, 1990。

[11] 李振高等, 水稻根際反硝化細菌生態分布的研究, 土壤學報, 24(2):120—124, 1987。

[12] Garcia, J. L., Soil Biol. Biochem. 7: 139—141, 1975。

[13] Raimbault, M., et al., Soil Biol. Biochem, 9: 193—196, 1977。

[14] Stefanson, R. C., Soil Sci., 121: 353—363, 1976。

[15] 蔡貴信、朱兆良等, 水稻田中碳銨和尿素的氮素損失的研究, 土壤, 17(5):225—229, 1985。

[16] 李良漠等, 水稻根系對氮素損失的影響, 土壤, 16(1):5—10, 1984。

(上接第 262 頁)

[6] Linehan, D. J. Sinclair, A. H. and Mitchell, M. C., Plant and Soil 86: 147—149, 1985。

[7] Zhang, F. S. Mobilisierung und Aufnahme von Zink bei verschiedenen pflanzenarten in Abhängigkeit vom Zinkversorgungsgrad. Dissertation of Hohenheim University, BRD, 1989。

[8] Bienfait, H. F., J. Plant Nutr. 11: 605—629, 1988。

[9] Maas, F. M. van de Wetering, D. A. M. van Beusichem, M. L. and Bienfait, H. F., Plant physiол. 87:167—171, 1988。

[10] Bienfait, H. F. Letty A. DE Weger and D. Kramer., Plant Physiол. 83: 244—247, 1987。

[11] Marschner, H. Roemheld, V. and Kissel, M., J. Plant Nutr. 9: 695—713, 1986。

[12] Roemheld, V. and Marschner, H., Plant Physiol. 80: 175—180, 1986。

[13] Cakmak, I. van de Wetering, D. A. M. Marschner, H. and Bienfait, H. F., Plant Physiол. 85: 310—314, 1987。

[14] Marschner, H., Mineral Nutrition in Higher Plants. Academic Press, 1986。

[15] Takagi, S. Nomoto, K. and Takemoto, T., J. Plant Nutr. 7: 469—477, 1984。

[17] Marschner, H. Roemheld, V. and Kissel, M., physiол. Plant 71: 157—162, 1987。

[18] Mori, S. Hachisuka, M. Kawai, S. Takagi, S. and Kishi-Nishizawa, N., J. Plant Nutr. 11: 653—662, 1988。