

根际酶的研究概况

李良谟 范晓晖

(中国科学院南京土壤研究所)

摘 要

本文综述了植物根际固氮酶、硝酸还原(反硝化)酶、脲酶和磷酸酯酶分布、活性、影响因素及其在养分有效性中的作用。

根据生物学观点,推动着土壤中新陈代谢过程的,是土壤微生物的酶促反应和各种酶的生化反应。土壤中积累的酶来源于微生物、植物和动物。相对于非根际来说,植物根际酶的这些来源更为丰富。首先,植物根系本身向根外分泌各种酶;其次,根系对微生物数量分布和微生物生物量都有明显的根际效应,是根际酶的主要微生物来源。第三,根际对原生动物亦有根际效应,一些原生动物如蚯蚓能分泌酸性和碱性磷酸酶。由此可以认为,根际中酶活性对土壤中物质转化及植物营养有着不可忽视的作用。

一、根际固氮酶

从生态学观点看,自然界生物固氮过程有三种固氮体系,自生固氮、共生固氮及联合固氮。以下仅介绍根际联合固氮的研究概况。

联合固氮体系是自生和共生固氮体系的中间类型,是由存在于某些植物根际中或根面上,甚至进入根的皮层细胞中的固氮菌进行的固氮作用。固氮细菌与相应联合的植物之间具有较密切的相互影响,但又不同于典型的共生固氮作用,因为它不形成像根瘤那样的共生特殊结构^[1]。也不同于自生固氮作用,因为具有较强的寄主专一性,并且固氮效率比在自然条件下高,故又称半共生固氮作用。

由于60年代中期乙炔还原法测定固氮酶活性(ARA)研究方法的突破,对推动根际联合固氮酶活性的研究及联合固氮种群的发现,以及生态研究等有长足进展。

(一)几种联合固氮体系

已知的几种联合固氮体系列于表1。

(二)影响联合固氮酶活性的因素

1. 植物的遗传型:由于植物的遗传型对它的根际微生物,特别是固氮微生物的影响很大。在相同的田间条件下栽培20个不同的水稻品系,其根系固氮酶活性差异悬殊^[3];水稻品系Cigalon的30个突变体,17天秧龄的乙炔还原活性的变幅可达861—7368nmolC₂H₄/克根/小时。不同遗传型玉米的根系固氮酶活性可相差10—20倍。不同品系的小麦、点状雀稗及狼尾草的固氮活性也因遗传型不同而有很大差异。

2. 施肥:土壤中加入NH₄⁺-N会降低根际固氮作用,与不加NH₄⁺-N的对照相比,下

表 1

几种联合固氮体系

联合固氮体系	固 氮 菌	固 氮 酶 活 性	备 注
雀稗和马唐	巴西固氮螺菌	340g N ha ⁻¹ d ⁻¹ (ARA法) 110g N ha ⁻¹ d ⁻¹ (¹⁵ N ₂ 法) 880g N ha ⁻¹ d ⁻¹ (土柱法)	巴 西
大黍、紫狼尾草、牛鞭草、狗牙草	生脂固氮螺菌		
玉米和高粱	生脂固氮螺菌	9000n mol C ₂ H ₄ g ⁻¹ 干根 h ⁻¹ 100-200 n mol C ₂ H ₄ g ⁻¹ 干根h ⁻¹	巴 西
	阴沟肠杆菌	300-1500 n mol C ₂ H ₄ g瓶 ⁻¹ h ⁻¹	中 国
甘 蔗	巴西固氮螺菌	17%来自生物固定 (¹⁵ N ₂ 法) 25—50 kg N ha ⁻¹ 年 ⁻¹	巴 西
小 麦	芽孢杆菌、其它细菌	2gN ha ⁻¹ d ⁻¹ (土柱法)	美 国
	巴西固氮螺菌	38—50g Nha ⁻¹ d ⁻¹ (ARA法)	巴 西
水 稻	拜叶林克氏菌	50—200gN ha ⁻¹ 季 ⁻¹ (非藻固氮) 25—30kgNha ⁻¹ 季 ⁻¹	菲 律 宾
	阴沟肠杆菌、粪产碱菌		中 国 ^[2]
	巴西固氮螺菌	5—10kgN ⁻¹ ha ⁻¹ 季 ⁻¹ (ARA)	菲 律 宾
休 闲 地	双子叶野草根际固氮	估计39—49kgN ha ⁻¹ 年 ⁻¹ (1982年起不种作物, 生长天然植被)	洛 桑 实 验 站

降54%^[4], 并影响出现根际固氮活性的根际范围^[5]。用¹⁵N₂示踪法研究的结果表明, 施用化合态氮, 使水稻根际固氮活性下降, 但是, 与适量有机质结合施用, 并不产生负作用。

3. 碳源及能源: 碳源和能源是固氮作用必不可少的因素, 也是影响固氮效率(每消耗1克碳水化合物所固定氮的毫克数)的重要因子。

4. 温度: 温度对植物根际微生物的发育影响很大, 如生脂固氮螺菌需要较高温度, 故热带地区对它生长发育更为有利, 从马唐根系上分离到的这种菌的固氮酶, 在25℃以下, 活性受到抑制。从玉米和马唐根系上分离到的该菌在最适温(31℃)下, 固氮酶活性相同, 但在22℃时, 前者固氮酶活性是后者的5倍。说明不同植物上分离的同一种菌, 对低温的耐受性不同, 这很可能是长期与相应植物联合共生的结果。根据Day和Dobereiner的研究, 生脂固氮螺菌在32—40℃时ARA值最大, 超过40℃活性明显下降^[6]。

5. 氧浓度和水分状况: 固氮酶系统对氧极为敏感。Rice等(1967)和Magdoff等(1970)报道了在自然环境中, 好气和嫌气界面的出现有利于提高固氮酶活性。生长在淹水稻田的水稻根际固氮酶活性显著高于非淹水稻田, 而水分亏缺会导致根际固氮作用中止^[7]。Trolldenier用田间生长的和水培的水稻根系所作试验证明, 固氮酶活性在空气中或完全无氧时均受到抑制, 只有在氧浓度为3%时活性最高。马唐、玉米和高粱根系的最高固氮酶活性所要求的氧分压是1—2kPa, 雀稗中的则为4kPa^[8]。

6. 生物因子: 凡影响植株生长的植物病原、根系的发育以及光合作用、光合产物的运转及渗出作用, 以及活跃于根际的非固氮的其他微生物等都会影响到根际联合固氮作用。

7. 土壤类型: 根际联合固氮的酶活性受土壤类型的影响。研究表明, 21天秧龄的水稻品种Sefa 319G, 在塞内加尔土壤上的根际固氮酶活性为在菲律宾的Maahas粘土和Maligaya粘

土上活性的3.8倍和2.8倍；上述水稻品系在法国的 Camargue 土壤上，其根际固氮酶活性则为塞内加尔的 Boundoum 土壤上的32倍^[7]。

8. 根际固氮酶活性的季节变化与日变化：(1) 固氮酶活性的季节变化。田间生长的玉米有两个固氮酶活性高峰，一在吐丝期，一在灌浆初期；高粱的最高固氮酶活性在开花期，开始灌浆时酶活性即降低；水稻的最高酶活性在抽穗阶段，然后迅速下降。(2) 固氮酶活性的日变化。各种植物根际固氮酶活性在一天中的不同时间是不同的。点状雀稗、高粱、羊草和玉米的第一个固氮酶活性高峰出现在中午，第二个高峰在晚上。水稻的固氮酶活性只是在白天9—10时有一个高峰^[9]。

二、根际硝酸还原（反硝化）酶

这里是指由 NO_3^- 还原至 N_2 的一系列还原酶。近年来国内外学者注意研究土壤—植物系统中的硝化和反硝化作用，特别注意研究根际的反硝化作用。

生物反硝化作用是微生物一系列硝酸还原酶类的生化反应，这些酶包括 NO_3^- 还原酶、 NO_2^- 还原酶、 NO 还原酶和 N_2O 还原酶^[10]。研究者们尤为注意水稻根际的反硝化作用，这是因为水稻具有通过叶和茎输送氧气至根部的能力。氧从根部扩散进入根周围，环绕根周形成薄的氧化层，会导致水稻根际的硝化—反硝化作用。Raimbault 用特殊装置所作研究表明，水稻根际的 N_2O 还原酶活性为无根土壤的14倍^[11]。有人用乙炔抑制法测得水生植物水稻、慈菇和灯心草根系的反硝化活性分别为4.8、4.7和5.0微克N/小时/克干根，以半边莲根系中的活性最低，只有0.9微克N/小时/克干根。Reddy在排除 NO_3^- 为限制因子的情况下，对水稻施用 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ，研究水稻根际中的反硝化活性，结果表明，仅仅由于根际的影响损失的氮量为 $143\text{mgN/m}^2 \cdot \text{天}$ ，占加入 ^{15}N 的18%^[12]。我们施用 K^{15}NO_3 的淹水培育试验表明，水稻根际土中 ^{15}N 损失量大于非根际土壤，相差15—19%；在含 KNO_3 的基质中培育未消毒根系， NO_3^- —N消失率达33—90%，接种消毒根系者， NO_3^- —N消失率只有1—10%，并证明消失的 NO_3^- —N并非为根系所吸收，这就表明水稻根面附有大量反硝化细菌，一旦条件适宜，反硝化酶的酶促反应强烈^[13]。Smith用乙炔抑制法研究水稻根际反硝化作用，结果表明，只是在表施尿素后的最初两天产生的 $(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ —N量大于不种水稻者，施肥后4—6天，种与不种水稻处理间产生的 $(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ —N量几无差异。由于该试验中用的是尿素，还涉及水稻根际的脲酶活性及硝化活性的影响，问题就更为复杂了。近年Prade等(1990)对通气组织不同的植物(水稻与小麦)的根际反硝化作用作比较研究，认为植物的通气组织并不影响反硝化作用^[14]。

关于麦类的根际反硝化作用亦有不少研究。资料表明，在 NO_3^- 浓度高的情况下，燕麦根际的反硝化活性大于根外土壤，而且离根面1—2毫米以外处，反硝化活性迅速下降，据分析，这与离根不同距离处的易分解有机质含量不同有关；当 NO_3^- 浓度低时，在种植燕麦的土壤中，反硝化活性反而明显低于不种燕麦者。我们在培育条件下，用2,4-D抑制法和乙炔抑制法，分别研究了不同品系小麦幼苗根际和根外土壤的硝酸还原酶($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$)活性及 NO_3^- 还原成 N_2O 的酶活性，结果并未见根际土壤的还原酶活性大于根外土壤的^①，原因也可能与植株吸收了氮素，导致根际中 NO_3^- 浓度下降有关。有人用根盒(Rhizobox)研究大麦根区的反硝化作用，证明在生长大麦的A层中，根际土壤的反硝化势与根系生物量呈明显正相

① 李振高，潘映华，李良漠，不同基因型小麦根际细菌及其酶活性的研究。土壤学报(待刊)。

关^[15]。需要提到的是, Haider等(1985, 1987)在不断供给¹⁴CO₂的植物生长室中所作试验表明, 种植玉米和小麦土壤中的反硝化损失量并不大于未种的土壤, 根际中沉积的碳约为根系生物量碳的60%, 但是用水或2 mol Na₂SO₄提取时, 可利用的碳仅占5—7%, 对反硝化作用并不有效。另一组试验, 同样在不断提供¹⁴CO₂的生长室中进行, 并在植物生长期不断加入¹⁵NO₃-N, 以维持在种和不种植物的土壤中有相同浓度的NO₃-N, 试验过程同时分析固定的¹⁴CO₂和N¹⁵的去向, 结果表明, 即使在NO₃浓度高的情况下, 植物旺盛生长的过程中, 根系并不刺激反硝化作用。

三、根 际 脲 酶

脲酶是专性酶, 能水解尿素为NH₃和CO₂。尿素是主要的氮肥品种, 人们十分注意其使用效益, 因此, 对土壤脲酶活性及脲酶抑制剂研究较重视, 但研究根际脲酶的尚不多见。

(一)根际脲酶的分布 油菜、玉米根际中脲酶活性大于原土体, 这对于施肥与不施肥的处理, 趋势是相同的。木槿属植物的9个不同基因型根际的脲酶活性均大于根外土壤, 而且不同基因型之间酶活性差异也很大^[16]。甘蔗茎基部土壤的脲酶活性最弱, 在根际范围内离茎基部较远的土壤中脲酶活性逐渐增强, 离茎基50厘米处, 新根根尖密集, 脲酶活性最高。

(二)根际脲酶与施肥及养分含量的关系 适量施肥能增加甘蔗根际土壤的脲酶活性。有机肥与尿素配合作基肥一次施用, 不同用量均可增强花生各生育期根际土壤的脲酶活性, 并随用量的增加而增加; 花生根际脲酶活性与土壤有机质、全碳、全氮、碱解氮、速效磷含量呈显著或极显著正相关。生长黄麻属植物土壤中的脲酶与有机碳、真菌、细菌含量呈显著相关^[17]。

四、根 际 磷 酸 酯 酶

磷酸酯酶是水解酶类, 使有机磷化合物水解为植物可吸收的磷, 推动着农田土壤中占全磷量30—80%的有机态磷的转化。相对说是一个较活跃的研究领域。

(一)根际磷酸酯酶的分布

曾报道, 对16种豆科和非豆科植物根—土界面磷酸酯酶的分布^[18]; 对木槿属植物的9个基因型根际的磷酸酯酶活性进行了研究^[16]。几乎所有资料都表明: (1) 植物根际磷酸酯酶活性大于非根际土壤, 如云杉根际磷酸酯酶活性为非根际的2—2.5倍^[19]; (2) 离根系越远磷酸酯酶的量与活性逐渐下降, 油菜根表面的酶活性为根表以外0.2毫米处土壤中活性的8倍多; (3) 不同的磷酸酯酶在根际分布的范围不同, 油菜、小麦、三叶草和洋葱4种作物的酸性磷酸酯酶最高活性出现在离根面2.0—3.1毫米处, 而碱性磷酸酯酶的最高活性出现在离根面1.3—1.6毫米处。

(二)磷酸酯酶对有机磷的转化

资料表明, 无菌水培下生长4周的三叶草根系产生了酸性磷酸酯酶, 并且水解加入的卵磷脂和植素等有机磷化合物, 供植物吸收, 测得以无机态磷回收的磷量占加入有机磷的1—60%, 回收率随有机磷源用量的增加而下降。根际土壤磷酸酯酶活性与根际土壤有机磷的亏缺量呈极显著相关, 对于小麦, 相关系数 $r = 0.99^{**}$, 在根际1.5毫米处, 有机磷的最大亏缺量达86%; 对于三叶草, 相关系数 $r = 0.97^{**}$, 在根际0.8毫米处, 有机磷的最大亏缺量为

65%。这说明经过磷酸酯酶的酶促作用, 释放有效态磷供植物吸收; 出现了有机磷的亏缺。

(三)影响磷酸酯酶活性的因素

1. 缺磷诱导作用: 磷酸酯酶是一种适应酶, 当植物缺磷时, 磷酸酯酶活性增强。在根系生长密集的油菜根际中, 磷酸酯酶活性随磷素亏缺量的增多而上升, 曾报道, 在缺磷胁迫下, 不但荞麦根系分泌物中磷酸酯酶活性增加, 而且根系表面的酶活性也增强了, 从而提高了6-磷酸葡萄糖的水解量^[20]。

2. 土壤性质: 有人研究了理化性质极不相同的27种土壤中磷酸酯酶活性与土壤性质的关系, 表明磷酸酯酶活性与土壤有机碳、有机磷含量及细菌数量呈显著正相关; 而与土壤PH呈负相关。酸性磷酸酶与真菌数量相关性极显著, 碱性磷酸酶则与放线菌显著相关^[21]。然而, 也有的结果表明, 在生长着黄麻属植物的试验中, 碱性磷酸酶与真菌数量呈极显著相关, 而与放线菌数量无相关性; 酸性磷酸酶既不与真菌又不与有机碳有相关性^[17]。两个试验的相关项目有所不同, 看来是与种植的植物种类不同有关。

3. 植物种类: 资料表明, 几种作物的根际磷酸酯酶活性的顺序为: 三叶草 \geq 大麦 $>$ 玉米, 玉米根际中磷酸酯酶的活性只有大麦根际中酶活性的1/3。作物的不同基因型根际中的磷酸酯酶活性亦相距甚远。

4. 接种VA菌根: 为了探讨在低磷营养条件下磷酸酯酶活性是否与菌根依赖性有关, 亦为了了解不同VA菌根真菌的效果是否与其增加磷酸酯酶的能力有关, 有人对小麦、油菜和洋葱等分别接种了VA菌根真菌Glomus的3个品系, 结果表明, 所有供试植物根际土壤中磷酸酯酶的活性都显著提高, 但是, 接种不同的品系, 形成的磷酸酯酶活性各异, 接种G. geosporum和G. mosseae菌种者, 植物根系和根际磷酸酯酶活性高于接种G. monosporum的, 但后者明显增加植物的生长量^[22]。对小麦进行的进一步试验表明, 播种后25—51天, 由G. geosporum或G. mosseae侵染引起的磷酸酯酶活性增加得更明显。

参 考 文 献

- [1] 王子芳、郭俊, 联合固氮细菌在生态系统循环中的意义。微生物学通报, 14:171—174, 1987。
- [2] 丘盛元、周淑萍等, 稻根联合固氮细菌的研究, II, 粪产碱菌A-15和阴沟肠杆菌E-26的固氮特性。微生物学报, 21:468—476, 1981。
- [3] Charyulu, P. B. B. N., D. N. Nayak, V. R. Rao, Plant and Soil. 59: 399—405, 1981.
- [4] Salam, M. A. Subramonian, S., Indian J. Microbiol, 28: 243—246, 1988.
- [5] Berestetskii, O. A., Shvytov, I. A., Kravchenko, L., Soviet Agricultural science. No. 7, 5—8, 1986.
- [6] Day, J. M. and J. Dobreiner, Soil Biol. Biochem., 8: 45—50, 1976.
- [7] Dommergues, Y. R., G. Rinaudo, Nitrogen and Rice. (IRRI), 241—258, 1979.
- [8] 王子芳, 细菌—植物联合固氮研究进展。微生物学通报, 9:176—181, 1982。
- [9] Balandreau, J. P., Rinaudo, G., Fares-Hamad, I. & Dommergues, Y., In: W. D. P. Stewart (Editor), Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms. Cambridge University Press. pp. 57—70, 1975.
- [10] Hochstein, L. I., Tomlinson, G. A., Ann. Rev. Microbiology. 42, 231—261, 1988.
- [11] Raimbault, M., Rinaudo, G., Garcia, J. L. and Boureau, M., Soil Biol. Biochem., 2: 193—196, 1977.
- [12] Reddy, K. R., W. H. Patrick, Jr., Soil Sci. Soc. Amer. J., 50: 649—651, 1986.
- [13] 李良漠、减双、周秀如、潘映华, 水稻根系对氮素损失的影响, 土壤, 第1期, 5—10页, 1984。
- [14] Prade, K., G. Trolldenier, Biol. Fertil. Soils. 9: 215—219. 1990.
- [15] Klemedtsson, L., P. Berg, M. Clarholm, J. Schnurer, T. Rosswall, Soil Biol. Biochem., 19: 551—558, 1987.
- [16] Tarafdar, J. C., J. Indian Soc. Soil Sci., 29: 469—472, 1981.

(下转第314页)

- [10] Xuan Jia-xiang et al., *Pedosphere*, 1: 97—108, 1991.
- [11] Kirk, G. J. D. et al., *Transactions XIV. Congress of international Soil Sci.*, Vol. II: 153—157, 1990.
- [12] Nye, P. H. *Adv. Plant Nutr.* 2: 129—153, 1986.
- [13] Junk, A. et al., *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 149: 411—427, 1986.
- [14] Junk, A. et al., *Plant and Soil*, 124: 175—182, 1990.
- [15] Mullins, G. L. et al., *J. Plant Nutr.* 12: 485—496, 1989.
- [16] Seward, P. et al., *Plant and Soil*, 124: 303—307, 1990.
- [17] Seeling, B. et al., *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 153: 301—303, 1990.
- [18] 宜家祥, 钾离子向稻根迁移的数学模型, *土壤学报*, 19: 296—303, 1982.
- [19] Kaselowsky, J. et al., *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 153: 81—91, 1990.
- [20] Silberbush, M. et al., *Comm. Soil Sci. and Plant Anal.*, 14: 286—296, 1986.
- [21] Kuchenbuch, R. et al., *Plant and Soil*, 95: 221—231, 1986.
- [22] Barber, S. A. et al., *Plant and Soil*, 124: 183—186, 1990.
- [23] Hoffland, E. et al., *Transactions XIV. Congress of the international Soil Sci.*, Vol. II: 170—175, 1990.
- [24] Barber, S. A. et al., *Transactions XIV. Congress of the international Soil Sci.*, Vol. II: 136—140, 1990.
- [25] Mullins, G. L. et al., *Soil Sci. Soc. An. J.*, 50: 1245—1259, 1986.

.....

(上接第285页)

- [3] Sharpley, A. N. et al., *Root extraction of nutrients associated with long-term soil management*, *Adv. Soil Sci.*, 19, 151—200, 1992.
- [4] 莫淑勋等, 猪粪、紫云英、稻草分解过程中氮磷转化的初步研究, *土壤通报*, NO.5, 21~25, 1976.

.....

(上接第303页)

- [7] Tarafdar, J. C., *Aust. J. Soil Res.*, 19: 181—184, 1981.
- [8] Tarafdar, J. C., Chhonkar, P. K., *Z. pflanzernaehr. Bodenk.* 141: 347—351, 1978.
- [9] Haussling, M., Marschner, H., *Biol. Fertil. Soils.* 8: 128—133, 1989.
- [10] Amann, C., *Z. pflanzernaehr. Bodenk.* 152: 181—189, 1989.
- [11] Chhorkar, P. K., *J. of the Indian Society of Soil Sci.*, 32: 266—272, 1984.
- [12] Dodd, J. C., Burton, C. C., Burns, R. G., Jeffries, P., *New Phytologist.* 107: 163—172, 1987.