

pH、温度、NH₄⁺和盐度对圆果雀稗 内生固氮菌固氮特性的影响

申磊, 曾风云, 谭志远*

(华南农业大学农学院, 广州 510642)

摘要: 采用乙炔还原法对从圆果雀稗(*Paspalum orbiculare*)根、茎中分离到的 5 株内生固氮菌(POJy11、POG12、POGy22、POGy612、POG4)的固氮特性进行了研究。结果表明, POGy612、POG4 固氮的 pH 适应范围是 6.0-10.0, 其余 3 株菌为 6.0-8.0; POGy22 固氮的最适温度为 35℃, 其余 4 株菌为 30℃; 随着 NH₄⁺ 浓度和 NaCl 浓度的升高, 菌株固氮活性总体呈下降趋势, 其中 POGy22 的固氮活性受 NH₄⁺ 抑制最明显, NH₄⁺ 浓度为 1.0 mmol/L 时, 已无固氮活性, 但 POGy612 在 NH₄⁺ 浓度为 2.5 mmol/L 时的固氮活性最高, 达到 1 045.0 nmol ml⁻¹h⁻¹, POJy11、POGy22 在 NaCl 浓度为 0.5% 时的固氮活性最高, 分别达到 735.5 nmol ml⁻¹h⁻¹、703.0 nmol ml⁻¹h⁻¹。

关键词: 内生固氮菌; 圆果雀稗; 乙炔还原活性; 固氮

中图分类号: Q939.113

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)01-0040-05

Effects of pH, Temperature, NH₄⁺ and Salinity on Acetylene Reduction (Nitrogen Fixation) in Endophytic Diazotrophs from *Paspalum orbiculare*

SHEN Lei, ZENG Feng-yun, TAN Zhi-yuan*

(College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Five endophytic diazotroph strains, including POJy11, POG12, POGy22, POGy612 and POG4 from rhizosphere and stalks of *Paspalum orbiculare*, were studied in acetylene reduction activity (ARA). ARA was maximal at pH 6.0-10.0 in POGy612 and POG4 strains and did at pH 6.0-8.0 in POJy11, POG12 and POGy22 strains. The maximum activity occurred at 35℃ in POGy22 strain and did at 30℃ in the other strains. The activity in those strains remarkably declined as NH₄⁺ or NaCl concentration increased. ARA was mostly inhibited by NH₄⁺ in POGy22 strain and lost over 1.0 mmol/L NH₄⁺. ARA showed a peak of activity at 2.5 mmol/L NH₄⁺ in POGy612 strain and did at 0.5% NaCl in POJy11 and POGy22 strains.

Key words: Endophytic diazotroph; *Paspalum orbiculare*; Acetylene reduction activity; Nitrogen fixation

生物固氮是指自然界中的某些微生物能直接将大气中的氮气通过固氮酶还原成能被植物利用的 NH₄⁺ 的过程, 利用生物固氮是为农作物提供氮素的重要途径之一, 而且可以为因过量施用化肥所造

成的环境污染等问题提供一个良好的解决方法。自 20 世纪 70 年代, 巴西 Döbereiner 实验室发现并提出联合固氮的概念以来, 引起了国内外学者的广泛关注, 为生物固氮研究开辟了一个新的领域^[1],

收稿日期: 2006-06-19 接受日期: 2006-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300001, 30470002); 教育部科学技术研究重点项目 (205111); 华南农业大学校长基金项目资助

* 通讯作者 Corresponding author

1986年以后, Döbereiner 实验室又相继从多年生作物甘蔗(*Saccharum officinarum*)根、茎内分离到一些具有独特生理、生态特性的固氮菌, 这类固氮菌能提供给宿主相当高的氮素, 它们在土壤中不能生存或生存能力很差, 而以相当高的数量存在植物组织内, 且不会引起宿主产生任何不良反应, 现在称这类固氮菌为内生固氮菌^[2]。由于植物和内生固氮菌的联合不形成分化的结构, 联合固氮的效率受到土壤微生物、结合态氮、氧和环境条件的变化等多种因素的影响^[3], 影响其在实际生产应用中的效果。圆果雀稗 (*Paspalum orbiculare*) 是一种广泛分布于热带、亚热带、温带等地区的禾本科牧草, 可以在草丛、沟边沙湿地、荒地、开阔地等多种生境下茂盛生长, 作为一种优良的牧草, 具有较好的水土保持能力, 而且还具有一定的药用价值^[4]。本研究从 pH、温度、 NH_4^+ 浓度、渗透压等方面对从圆果雀稗中分离到的 5 株内生固氮菌的固氮能力进行分析, 初步了解这 5 株菌对环境的适应能力, 以探讨这些菌株在实际生产应用中的潜力, 为后续微生物接种剂或菌肥的研制与应用提供菌种资源与理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验菌株

从禾本科牧草圆果雀稗(*Paspalum orbiculare*)根中分离得到菌株 POGy612、POG4、POG12、POGy22, 茎中分离得到菌株 POJy11。

圆果雀稗采集地华南农业大学位于广州市天河区, 地理位置处于北回归线以南, 属南亚热带季风气候。年平均气温 21.8℃, 1 月平均气温 13.3℃, 7 月平均气温 28.4℃, 日照时间长, 雨量充沛, 平均相对湿度 79%。

1.2 菌株培养基

采用 Döbereiner 改良无氮培养基(含蔗糖 10.0 g L⁻¹; 苹果酸 5.0 g L⁻¹; K₂HPO₄·H₂O 0.1 g L⁻¹; KH₂PO₄·H₂O 0.4 g L⁻¹; NaCl 0.1 g L⁻¹; FeCl₃ 0.01 g L⁻¹; NaMoO₄ 0.002 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0.2 g L⁻¹ (分开灭菌); CaCl₂·H₂O 0.02 g L⁻¹ (分开灭菌), 用 NaOH 调节 pH 至 7.0±0.2) 作为基础培养基。

在基础培养基上进行以下试验。

pH 影响试验 将未加 NaOH 的 Döbereiner 改良无氮培养基灭菌, 然后加入灭过菌的 NaOH 溶

液, 调节 pH 至分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 并定容。对固氮活性测试完后的菌液 pH 值进行测定。

pH 测定采用 Thermo orion 410A⁺ 型 pH 计(全华科学仪器有限公司, 广州)进行。

温度影响试验 将固氮菌分别在 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 下培养, 考察温度对固氮菌的影响。

NH_4^+ 影响试验 所用铵盐为 NH_4Cl , NH_4^+ 浓度分别为 0、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.5 mmol/L、5.0 mmol/L、7.5 mmol/L。

渗透压影响试验 用 NaCl 调节培养基的渗透压, NaCl 浓度分别为 0.01%、0.25%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%。

除温度影响试验外, 均在 30℃ 条件下培养。

1.3 固氮活性的测定

采用国际通用的乙炔还原法 (Acetylene reduction) 对各菌株的固氮活性进行测定, 首先将各试验菌株制备成菌悬液, 使其 OD₆₀₀ 为 1 (细胞约 1×10^8 个 ml⁻¹), 将菌液按 2.5% 的接种量接入各试验设计的培养基中, 每个指标设置 3 个重复, 培养 24 h 后, 注入 1/10 体积的 10% 乙炔气体, 继续同等条件下培养 24 h, 在气相色谱上测定乙烯的生成量以确定其固氮性能, 按公式计算固氮活性^[5]。

$$N = (hx \times C \times V) / (hs \times 24.9 \times t)$$

其中, hx 为样品峰值; hs 为标准 C_2H_4 峰值; C 为标准 C_2H_4 浓度 (nmol ml⁻¹); V 为培养容器体积 (ml); t 为样品培养时间 (h); N 为产生的 C_2H_4 浓度 (nmol ml⁻¹h⁻¹)。

2 结果和分析

2.1 pH 的影响

2.1.1 pH 对菌株固氮活性的影响

培养基的 pH 值会影响菌株的生长, 从而影响其固氮活性。供试的 5 株菌在 pH 4.0 和 pH 11.0 时都没有固氮活性。除菌株 POGy22 在 pH 5.0 时仍无固氮活性外, 其余 4 株菌在 pH 5.0–10.0 的范围内均有固氮活性, 其中菌株 POGy612、POG4 在 pH 6.0–10.0 范围内的固氮活性较高, 在 pH 7.0 时固氮活性达到最高, 分别为 978.2 nmol ml⁻¹h⁻¹、945.4 nmol ml⁻¹h⁻¹, POJy11、POG12、POGy22 的固

氮适应 pH 范围是 6.0–8.0 (图 1), 表明这 5 株菌具有较广的 pH 适应范围。

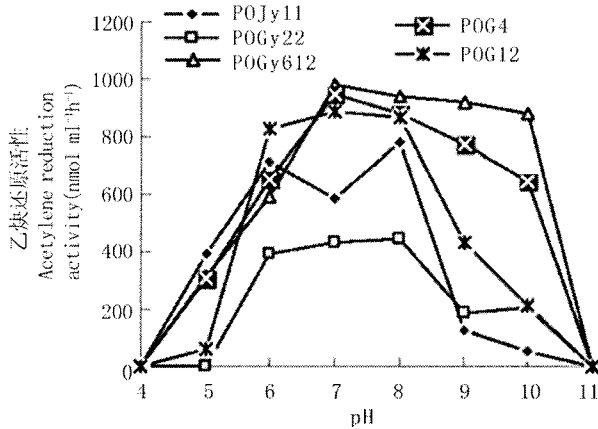


图 1 pH 对不同菌株固氮活性的影响

Fig. 1 Effects of pH on acetylene reduction activity in the 5 strains

2.1.2 培养基的 pH 变化

在 pH 4.0 和 11.0 的培养基中菌株几乎不生长, 无固氮活性, 所以未测定菌液最终 pH 值。

培养基的最终 pH 与起始 pH 值有较大差异。供试的 5 株菌除在 pH 5.0 的培养基上培养后, 培养基的 pH 值略有上升外, 在 pH 6.0–10.0 范围内均使培养基 pH 值降低, pH 为 10.0 的起始培养基在培养后也能降到 7.0 以下, 其中 POGy22 使培养基 pH 下降最明显, 最终测定 pH 为 6.2 (图 2), 表明这 5 株菌的生长能够改变环境的酸碱度, 使之趋向于适宜自身生长的微酸性环境, 从而表达出较高的固氮活性。

2.2 温度的影响

将供试菌株放在不同温度下培养, 试验结果显

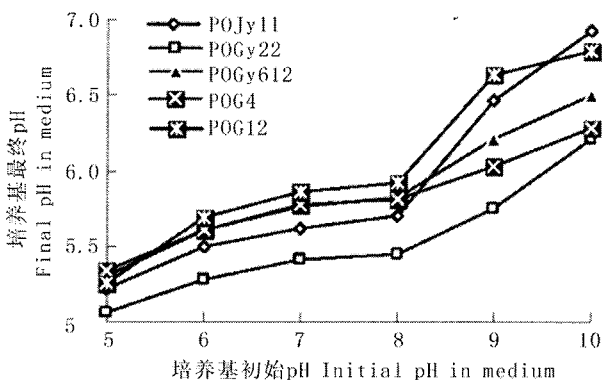


图 2 培养基 pH 值变化情况

Fig. 2 Changes in pH of culture medium

示, 供试的 5 株菌在 40°C 下培养的固氮活性明显比在 20°C 下高, 除菌株 POGy612 在 20°C 培养时的固氮活性较高, 有 216.8 nmol ml⁻¹ h⁻¹ 外, 其余 4 株菌在此温度下培养的固氮活性都很弱, 表明这 5 株菌对高温的忍耐能力明显高于对低温的忍耐能力。其中菌株 POJy11、POGy612、POG4、POG12 在 30°C 培养时的固氮活性最高, 除 POJy11 固氮活性较低, 只有 569.4 nmol ml⁻¹ h⁻¹ 外, 其余 3 株菌此温度下培养的固氮活性都在 900.0 nmol ml⁻¹ h⁻¹ 以上; 菌株 POGy22 在 35°C 培养时的固氮活性最高, 达 814.6 nmol ml⁻¹ h⁻¹ (图 3)。

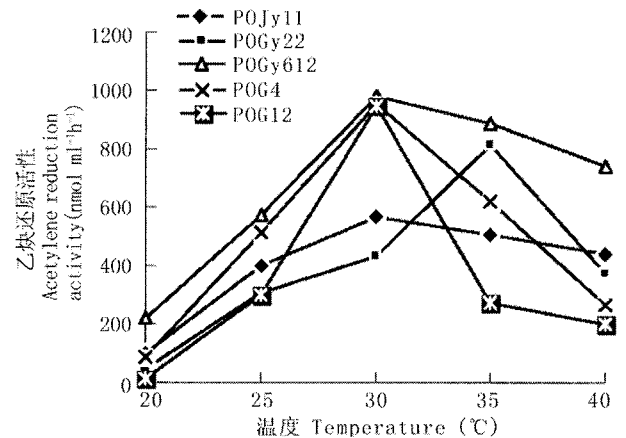


图 3 温度对不同菌株固氮活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on acetylene reduction activity in the 5 strains

2.3 NH₄⁺浓度的影响

NH₄⁺浓度抑制固氮菌的固氮活性。供试菌株中有 1 株菌 (POGy612) 的固氮活性随 NH₄⁺浓度的增加略有上升, NH₄⁺浓度为 2.5 mmol/L 时其固氮活性最高达到 1 045.0 nmol ml⁻¹ h⁻¹, 之后显著下降。其余 4 株菌的固氮活性随着 NH₄⁺浓度的增加, 均呈明显下降趋势, 尤以 POGy22 受 NH₄⁺的影响最大, NH₄⁺浓度达到 1.0 mmol/L 时已检测不到固氮活性。除 POGy612、POG12 在 NH₄⁺浓度达到 5.0 mmol/L 时有一定固氮活性外, 其余菌株均无固氮活性。所有菌株在 NH₄⁺浓度达到 7.5 mmol/L 时都无固氮活性 (图 4)。

2.4 渗透压的影响

用 NaCl 来调节培养基的渗透压, 随着 NaCl 浓度的升高, 菌株固氮活性总体上呈下降趋势。但供试菌株中 POJy11、POGy22 在 NaCl 浓度为 0.01%–0.5% 范围内的固氮活性略有上升, 在 NaCl 浓度为

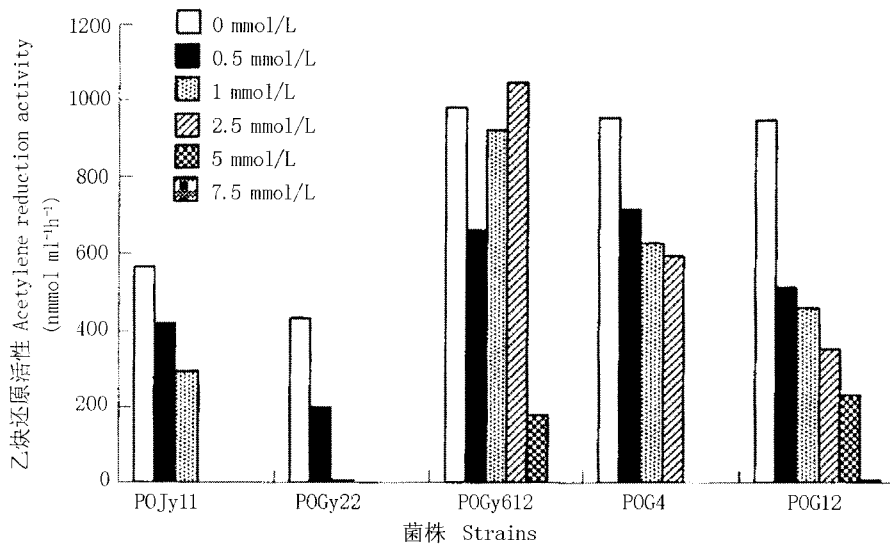


图 4 NH₄⁺对不同菌株固氮活性的影响

Fig. 4 Effects of NH₄⁺ on acetylene reduction activity in the 5 strains

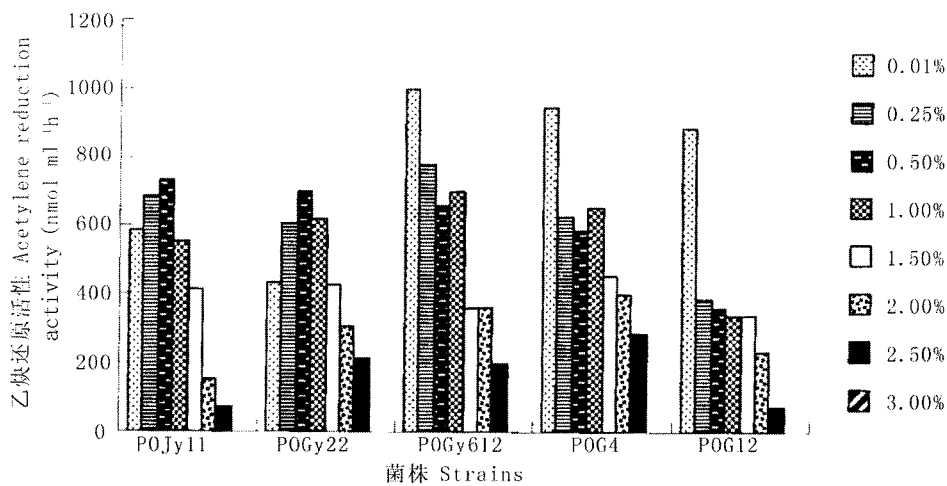


图 5 渗透压对不同菌株固氮活性的影响

Fig. 5 Effects of salinity on acetylene reduction activity in the 5 strains

0.5% 时达到最高, 分别为 735.5 nmol ml⁻¹h⁻¹、703.0 nmol ml⁻¹h⁻¹, 表明这两株菌最适合在这个渗透压下生长并固氮。所有菌株在 NaCl 浓度达到 3% 时皆无固氮活性表达(图 5)。

3 讨论

乙炔还原法主要是依据固氮酶具有还原分子氮或利用其它底物的能力, 使乙炔还原为乙烯, 作为固氮活性的间接测定方法, 具有灵敏度高、操作简单等优点, 可快速确定固氮作用的存在与否, 是目前应用最为广泛的测定固氮菌固氮能力的方法^[6]。Deslippe 等^[7]采用该法研究了模拟气象条件变

化对加拿大北极区固氮生物群体结构和活性的影响。李凤霞等^[8]对高寒地区燕麦(*Avena sativa*)根际 PGPR 菌的培养条件进行了研究。

本试验的研究结果显示:

(1) 从 pH 影响试验结果来看, 这 5 株菌对酸碱度的适应范围较广, 能对环境的酸碱度进行调节以达到适宜自身生长所需条件。目前对 pH 影响的研究虽然报道较多, 但是对于菌株生长过程中对环境酸碱度的调节却很少分析。本文的研究表明, 菌株可能首先分泌某种物质以调节环境的酸碱度, 使环境达到适宜自身生长的条件, 然后才表达出较高的固氮酶活性。

(2) 从温度影响试验中发现,这 5 株菌的固氮活性对温度的适应范围较广,且对高温的忍耐能力明显高于对低温的忍耐能力,这表明菌株的固氮活性可能与菌株生长的环境以及菌株分离的季节相关。本试验所用菌株是在南方炎热的夏季分离得到的,所以菌株的耐热性明显强于耐寒性,在高温时仍有较高的固氮活性。

(3) NH_4^+ 影响试验结果表明,这 5 株菌的耐铵能力都不高,只有两株菌 (POG12、POGy612) 在 5.0 mmol/L NH_4^+ 浓度下仍有一定的固氮活性。试验中发现菌株 POGy612 在 NH_4^+ 浓度为 2.5 mmol/L 时的固氮活性达到最高,这与许齐放等^[9]对两株固氮芽孢杆菌的研究结果一致,表明一定浓度的 NH_4^+ 存在不仅有利于某些菌株的生长,而且有利于固氮作用。

(4) 本试验的 POJy11、POGy22 菌株在 NaCl 浓度达到 0.5% 时的固氮活性达到最高。目前国内对渗透压影响菌株固氮活性表达的研究较少,而 Howard 等^[10]在研究中发现了 1 株固氮菌属细菌,它在 NaCl 浓度为 1.5%–2.5% 时的固氮活性最高,表明有些菌株能在一定的渗透压下进行固氮。

由于本文只从 pH、 NH_4^+ 、渗透压、温度等 4 方面对这几株内生固氮菌的固氮特性进行初步的研究,对于环境中可能存在的其它影响因素尚未进行分析,加上乙炔还原法本身的一些限制性因素^[11],所以对菌株的固氮特性只是一个初步的了解,要在实际生产上应用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Zhang L M(张立梅), Fang P(方萍), Ji T W(季天委). Adaptability of a nitrogen-fixing strain W12 to the diverse environmental factors [J]. J Zhejiang Univ (Agri Life Sci)(浙江大学学报·农业与生命科学版), 2002, 28(6):664–668.(in Chinese)
- [2] Li J D(李久蒂), An Q L(安千里). Advances in associated nitrogen fixation research [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 1997, 14(3):14–21.(in Chinese)
- [3] Zuberer D A. Soil and rhizosphere aspects of N_2 -fixing plant-microbe associations [J]. In: Lynch J M. The Rhizosphere [M]. New York: John Wiley & Sons, 1991. 317–353.
- [4] Ma G H(马国华), Zhao N X(赵南先), Hu X Y(胡晓颖), et al. Pollen morphology and poly-aperture in *Paspalum* [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2001, 9(3):201–204.(in Chinese)
- [5] Yao T(姚拓), Long R J(龙瑞军), Wang G(王刚), et al. Isolation and characteristics of associative symbiotic nitrogen bacteria from rhizosphere of wheat in saline soil in Lanzhou area [J]. Acta Pedol Sin(土壤学报), 2004, 41(3):444–448.(in Chinese)
- [6] Chen C X(陈朝勋), Xi L Q(席琳乔), Yao T(姚拓), et al. Research progress on biological nitrogen fixation measurement methods [J]. Grassland Turf(草原与草坪), 2005, 109(2):24–26.(in Chinese)
- [7] Deslippe J R, Egger K N, Henry G H. Impacts of warming and fertilization on nitrogen-fixation microbial communities in the canadian high arctic [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2005, 53(1):41–50.
- [8] Li F X(李凤霞), Zhang D G(张德罡), Yao T(姚拓). Study on cultural conditions of plant growth promoting rhizobacteria in rhizosphere of oat in alpine region [J]. J Gansu Agri Univ(甘肃农业大学学报), 2004, 39(3):316–320. (in Chinese)
- [9] Xu Q F(许齐放), Huang X L(黄秀梨), Chen T W(陈廷伟). Affection of four facts on nitrogen-fixing *Bacillus* strains [J]. Microbiology(微生物学通报), 1999, 26(1):7–10.(in Chinese)
- [10] Dicker H J, Smith D W. Effects of salinity on acetylene reduction (nitrogen fixation) and respiration in a marine *Azotobacter* [J]. Appl Environ Microbiol, 1981, 42(4):740–744.
- [11] Fan H(樊慧). Restrictive factors of acetylene reduction assay on nitrogen fixation measurement [J]. Microbiology(微生物学通报), 1995, 22(4):235–238.(in Chinese)