

小麦根际微生物的研究

II. 微嗜氮细菌在根际的分布及其对小麦幼苗生长的影响

張元龍 万金精

(河南农学院, 郑州)

我們在郑州浅色草甸土壤小麦根际微生物的研究中,两年来重复用蔗糖 Ashby 氏无氮琼胶培养基以稀释平板法沒有发现 *Azotobacter* 大量存在^[1-2], 但却发现有大量的微嗜氮细菌(由于它們能在极端缺乏氮素化合物的培养基上生长,所以我們认为它是微嗜氮细菌)。經鉴定得知,其为稀有固氮极毛杆菌 (*Azotomonas insolita* Stapp, 1940), 放射形农杆菌 (*Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck and van Delden) Conn, 1942) 和反硝化极毛杆菌 (*Pseudomonas denitrificans* Bergey et al., 1923) 三个种。根据文献^[11,12,17], 除前一种外, 后两种尚无人肯定它們能固定分子态氮, 但因它們在根际中大量存在, 則对小麦生长发育不无影响。为此, 我們就其对小麦种子发芽和幼苗生长的影响作了初步研究。

方法与結果

(一) 微嗜氮细菌在小麦根际分布状况及数量变化

用以蔗糖为碳源并加有刚果紅的 Ashby 氏无氮琼胶培养基, 經稀释平板法由南大 2419 小麦根表、根际和根外土壤中, 分期(即分蘖、返青、拔节、抽穗和黄熟等时期)进行細菌数量的測定, 所用稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 。每一稀释度接种 1 毫升, 重复三次, 于 28℃ 培养 3—4 天, 計算各主要类型菌落数量和总数量, 并換算成每克干土或湿麦根的数量。結果如表 1。

由表 1 可以看出, 两种細菌数量变化状况与我們过去所作根际細菌总数量的变化曲线大致相同^[1], 即在小麦生长季节中有两个高峰, 而在小麦抽穗时期則更为明显。

(二) 微嗜氮细菌对于各种碳源和氮源的利用情况

鉴于細菌生理特性与小麦生长有密切关系, 特别是其对碳源和氮源的利用又直接关系到其在根际大量存在的原因。为此, 我們在获得了純培养之后, 又进行了其对碳源和氮源利用情况的研究。

利用改良的 Burk 氏培养基^[3]为基础培养基, 其成分如下。

K_2HPO_4	0.8 克;	KH_2PO_4	0.2 克;
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 克;	$CaCl_2$	0.1 克;
$FeSO_4$	0.015 克;	$Fe_2(SO_4)_3$	0.005 克;
$NaMnO_4$	0.005 克;	蒸馏水	1000 毫升。

表 1 小麦各生育期中微嗜氮细菌的数量(万/克干土或湿麦根)

测定时期 (日/月)	<i>Azotomonas insolita</i>			<i>Agrobacterium radiobacter</i>		
	根 表	根 际	根外土壤	根 表	根 际	根外土壤
分蘖期(30/XI)	34.12	10.45	6.47	29.70	73.46	2.71
返青期(22/II)	13.46	1.70	1.37	5.86	6.04	1.43
拔节期(28/III)	90.01	80.53	51.48	43.08	94.15	17.02
抽穗期(2/V)	173.25	153.14	93.05	152.85	213.67	92.03
黄熟期(6/VI)	49.06	43.56	20.34	51.86	58.33	21.46

注：由于 *Pseudomonas denitrificans* 经常与表中两种细菌相伴生，不易形成单独菌落，故未列出。

碳源系根据性质之不同，在灭菌前加入（包括一般糖类，羧基羧酸和苯甲酸等的钠盐），或灭菌以后以无菌手续加入（酒精、乙酸等）。其量均按 1% 计算，不再加入氮源。在关于氮源种类的试验中，分别按 0.1% 加入不同氮素化合物，并加入适当的能源（碳源）物质。结果如表 2 和表 3。

表 2 三种细菌对各种碳源的利用

碳 源 种 类	<i>Azotomonas insolita</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Pseudomonas denitrificans</i>
乙 酸	+	+	+++
酒 石 酸	-	+	-
檸 檬 酸	-	±	±
苹 果 酸	±	-	-
琥 珀 酸	++	-	++
苯 甲 酸	++	-	-
葡 萄 糖	++	++	++
蔗 糖	++	++	++
乳 糖	++	++	++
牛 乳 糖	+	±	±
果 糖	+	++	++
麦 芽 糖	+++	+++	+++
甘 露 糖	+	+	++
木 糖	-	±	±
棉 籽 糖	+	-	-
甘 油	++	++	+

注：“-”不生长；“±”未能确定；“+”生长一般；“++”生长较好；“+++”生长丰盛；表中符号，以下均同。

由表 2 得知，各种简单糖类，特别是麦芽糖是三种细菌最好的碳源和能源；其次是有有机酸类和多元醇类。

由表 3 得知，三种细菌均能利用硝酸盐、铵盐、蛋白胨和尿素为良好的氮源。*Azotomonas insolita* 能利用的氮源则更为广泛。

(三) 菌液浸种对小麦发芽和幼苗生长的影响

用 Ashby 氏无氮培养基培养 7 天的菌液浸泡经清水连续洗过的小麦种子历 24 小时，

表 3 三种細菌对各种氮源的利用

氮 源	碳源和能源	<i>Azotomonas insolita</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Pseudomonas denitrificans</i>
鉍 盐	蔗 糖	+	++	+++
硝 酸 盐	蔗 糖	++	++	++
尿 素	蔗 糖	+++，产氮	++，产氮	++，产氮
蛋 白 胰	蛋 白 胰	++，不产氮	++，不产氮	+++，不产氮
丙 氨 酸	丙 氨 酸	++	++	++
甘 氨 酸	甘 氨 酸	+	-	+
麸 氨 酸	麸 氨 酸	++	-	-
天門冬氨酸	天門冬氨酸	+	-	-
天門冬酰胺	天門冬酰胺	++	+	±
明 胶	明 胶	++	++	++
酪 氨 酸	酪 氨 酸	+	-	+

然后水洗 4—5 次,排列于湿润的沙盘中,并以清水浸种和用灭菌的 Ashby 氏无氮培养液浸种作为对照。結果如表 4 和表 5。

由表 4 知,菌液浸种虽均較清水浸种发芽率为高,但与用培养液浸种則无大差別。

由表 5 可以看出, *Pseudomonas denitrificans* 培养液浸种略表现出有利的影响。

表 4 菌液浸种 24 小时,小麦种子的發芽率 (400 粒平均)

处 理	种 子 发 芽 率 (%)
<i>Azotomonas insolita</i> 培养液浸种	87.50
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 培养液浸种	85.75
<i>Pseudomonas denitrificans</i> 培养液浸种	89.25
无菌 Ashby 氏无氮培养液浸种	87.75
清水浸种	79.50

表 5 菌液浸种对小麦幼苗生长的影响

处 理	苗高(厘米)	干 物 质 重 量 (克/百株)		
		根	叶	总干重
<i>Azotomonas insolita</i> 培养液浸种	19.0	1.33	0.85	2.18
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 培养液浸种	19.5	1.33	0.82	2.15
<i>Pseudomonas denitrificans</i> 培养液浸种	21.0	1.39	0.89	2.28
清水浸种(对照)	19.5	1.32	0.84	2.16

(四) 大量生活細菌对小麦幼苗生长的影响

在盛有 Bonner 氏培养液^[6]的大号試管中,以无菌手續种入小麦种子及供試細菌,并在严格控制不使杂菌污染的条件下观察生活細菌对小麦幼苗生长的影响。結果如表 6。

由表 6 看出,小麦与細菌联合培养,根系发育明显受到抑制,即根系短、膨大、发育不良、呈黄色、分枝稀少或不分枝。不接菌的培养液中,小麦根系发育良好,呈白色,多分枝。

(五) 少量細菌对小麦幼苗生长的影响

为使細菌在培养液中不致大量繁殖,我們改用了 Knop 氏缺氮培养液^[8]。在盛有 Knop 氏缺氮培养液的大号試管中,以无菌手續种入小麦种子,并分別加入蔗糖 Ashby 氏无氮培养液培养 7 天的活菌液,經高压蒸汽灭菌杀死細菌后的菌液和在 50℃ 24 小时自溶

表 6 小麦和細菌在 Bonner 氏液中联合培养时的生长状况

重复	处 理	苗 高 (厘米)	根 系 数 目	根系总长度 (厘米)	单根长度 (厘米)	根 系 生 长 状 况
I	<i>Azotom. insolita</i>	10	9	37.5	4.2	黄色, 无分枝
	<i>Agrob. radiobacter</i>	17	7	31.0	4.4	黄色, 下部略有分枝
	<i>Ps. denitrificans</i>	18	7	30.0	4.3	黄色, 下部略有分枝
	对 照	23	6	45.0	7.5	白色, 多分枝
II	<i>Azotom. insolita</i>	14	5	—	5.0	黄色
	<i>Agrob. radiobacter</i>	16	9	—	4.0	黄色
	<i>Ps. denitrificans</i>	16	9	—	5.5	黄色
	对 照	19	7	—	7.0	白色, 多分枝
III	<i>Azotom. insolita</i>	10	8	—	2.0	黄色
	<i>Agrob. radiobacter</i>	11	9	—	4.5	黄色
	<i>Ps. denitrificans</i>	12	6	—	4.0	黄色
	对 照	25	6	—	8.0	白色, 多分枝

的菌液(經检查无活菌)各 1 毫升。随后記載小麦幼苗生长状况及植株干物质的重量。結果如表 7。这样, 三种处理的小麦根系发育均較对照为好, 其中以接种活細菌更为显著。

表 7 小麦在 Knop 氏缺氮培养液中的生长状况 (生长時間 3 周, 10 株平均)

处 理		苗 高 (厘米)	干 物 质 重 量 (克/百株)		
			根	叶	总干重
高压蒸汽灭菌菌液	<i>Azotom. insolita</i>	18.6	0.65	1.60	2.25
	<i>Agrob. radiobacter</i>	18.5	0.65	1.68	2.37
	<i>Ps. denitrificans</i>	20.2	0.63	1.75	2.38
自 溶 菌 液	<i>Azotom. insolita</i>	18.0	0.68	1.50	2.18
	<i>Agrob. radiobacter</i>	20.1	0.80	2.02	2.82
	<i>Ps. denitrificans</i>	23.6	0.75	1.80	2.55
生 活 細 菌	<i>Azotom. insolita</i>	14.5	0.95	1.58	2.53
	<i>Agrob. radiobacter</i>	19.5	0.93	1.05	2.98
	<i>Ps. denitrificans</i>	18.0	0.81	1.95	2.76
对 照		18.8	0.60	1.74	2.34

我們又用 Knop 氏完全培养液, 以生活細菌接种, 結果如表 8。

Agrobacterium radiobacter 和 *Pseudomonas denitrificans* 对于小麦幼苗的生长发育仍表現有較好的影响, 特别是对根系的发育表現更为突出。

表 8 小麦在 Knop 氏完全培养液中生长状况 (時間 3 周)

处 理		苗 高 (厘米)	干 物 质 重 量 (克/百株)		
			根	叶	总干重
<i>Azotomonas insolita</i>		14.8	0.62	1.22	1.80
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		20.8	0.80	2.16	2.96
<i>Pseudomonas denitrificans</i>		18.5	0.63	1.76	2.39
对 照		18.1	0.50	1.67	2.17

討 論

近年来关于根际微生物的研究,一般均集中于两个方面:一是高等植物对根际微生物种类的选择作用^[1,2,7,8,9,10,11,12];另一是不同根际微生物种类对高等植物的影响^[5,7,8,9,13]。我們在以 Ashby 氏无氮培养基发现小麦根际优势微生物种类 *Azotomonas insolita*, *Agrobacterium radiobacter* 和 *Pseudomonas denitrificans* 之后,进行了如上一系列的实验。証明 *Azotomonas insolita* 能更广泛地利用氮源和能源。以往研究者发现在小麦根系有较多的醋酸、苹果酸、丙氨酸、天门冬氨酸、麸氨酸和棉子糖等物质^[14] 均能为其利用,可能成为其在小麦根表有较大数量存在的重要原因。但它的存在以及其细胞自溶物质对于小麦生长并没有表现出良好的影响,这与以往学者所提出的^[7,15,16] 固氮菌的含氮分泌物并不能完全为高等植物所利用而与改善其氮素营养条件有关;当然,要作出更确切的结论尚待进一步深入研究。

根际微生物产生生活物质刺激植物的生长发育,近年来引起了普遍的重视^[7],并已发现小麦根际有不少的微生物对小麦生长有刺激作用^[5,13],从本试验中用 Knop 氏缺氮培养液或完全培养液均可以証明 *Agrobacterium radiobacter* 和 *Pseudomonas denitrificans* 对小麦幼苗生长有一定的刺激作用,但自溶菌液和经高压蒸汽灭菌菌液没有生活细菌所表现的刺激作用显著,这可能由于热力破坏了生活物质的活性所致。至于生活细菌的大量累积,反不利于植物生长的现象,这与根际细菌大量累积时将会对植物产生抑制作用一样,是值得注意的问题。

結 論

1. 用 Ashby 氏无氮培养基发现在小麦根际细菌中主要是 *Azotomonas insolita*, *Agrobacterium radiobacter* 和 *Pseudomonas denitrificans* 三个种。后一种经常与前二种伴生,不易形成单独菌落。*Azotomonas insolita* 愈近根表愈多,而 *Agrobacterium radiobacter* 则在根际土壤中较多。

2. 三种细菌在小麦根际数量变化与我们过去所得根际细菌总数量变化曲线略同,即在小麦越冬前和抽穗期出现两次高峰。

3. 许多简单糖类、有机酸类、无机氮化物和氨基酸等大都能被这三种细菌所利用。*Azotomonas insolita* 所能利用的碳源和氮源则更为广泛,这与其在小麦根表大量存在可能有一定的关系。

4. 利用三种细菌培养液浸种,对小麦种子发芽和幼苗生长均无显著影响。

5. 将小麦栽培于细菌大量生长的营养液中对根系的发育有明显的抑制作用。

6. 细菌的固氮产物或其含氮代谢产物似乎不能直接为小麦所利用。

7. *Agrobacterium radiobacter* 和 *Pseudomonas denitrificans* 对小麦幼苗生长有一定的刺激作用。

参 考 文 献

[1] 张元龙、万金精:微生物学报,9(2):178—185,1963。

- [2] 张元龙、万金精：河南农学院学报，1962 (4): 37—41, 1962。
- [3] Белозерский, А. Н., Зайцева, Г. Н., Гаврилова, Л. П. и Минеева, Л. В.: *Микробиол.*, 26(4): 409—417, 1957.
- [4] Возняковская, Ю. М.: *Микробиол.*, 17(6): 458—462, 1948.
- [5] Гебгардт, А. Г.: 細菌肥料的制备和应用, 凌毅, 凌渭清译, 农业出版社, 47—56, 1962。
- [6] Красилинников, Н. А.: *Микроорганизмы почвы и высшие растения*, изд. АН СССР, 1958.
- [7] Сандрак, Н. А.: *Из. ТСХА.*, 3(28): 81—94, 1959.
- [8] Сказкин, Ф. Д., Ловчиновская, Е. И., Красносельская, Т. А., Миллер, М. С. и Аникиев, В. В.: *Практикум по физиологии растений*, Госу. изд. "Советская наука", 1953.
- [9] Смалий, В. Т.: *Микроорганизмы и эффективное плодородие почвы*, Москва, 284—291, 1961.
- [10] Федоров, М. В. и Понтош, Д.: *Микробиол.*, 27(6): 714—719, 1958.
- [11] Худяков, Я. П. и Ю. М. Возняковская: *Микробиол.*, 25(2): 184—190, 1956.
- [12] Breed, R. S., Murray, E. G. and Smith, N. R.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Bailliere, Tindall and Cox, Ltd. London, 1957.
- [13] Georges Pantos: *Sixième congrès de La science du sol.*, Paris, 1956, C. 225—230.
- [14] Katznelson, H., Lochhead, A. G., Timonin, M. I.: *The Bot. Rev.*, 14(9): 543—587, 1948.
- [15] Katznelson, H., Rountt, J. W. and T. M. B. Poyné: *Sixième congrès de La science du sol.*, Paris, C, 151—156, 1956.
- [16] Rivière, J.: *Ann. L'Inst. nat. rech. agron., ser. A, Ann. Agronomiques*, 1960(4): 397, 1960.
- [17] Waksman, S. A.: *Principles of soil microbiology*, 1932.

A STUDY OF THE MICROORGANISMS IN THE RHIZOSPHERE OF WHEAT

II. THE DISTRIBUTION OF OLIGONITROPHILIC BACTERIA IN THE RHIZOSPHERE AND THEIR INFLUENCE ON THE GROWTH OF THE YOUNG SEEDLINGS OF WHEAT

CHANG YUAN-LUNG WANN JIN-JING

(Honan Agriculture Institute, Chengchow)

The bacteria isolated from the rhizosphere of wheat by Ashby's nitrogen-free medium are mainly *Azotomonas insolita*, *Agrobacterium radiobacter* and *Pseudomonas denitrificans*. Among them, *Pseudomonas denitrificans* are frequently found to exist associately with the other two, and are not readily to form an independent colony. In various stages of the development of wheat, the variation of their number is about the same as that described by the curve generalized formerly for the variation of the total number of rhizosphere bacteria, i.e., there occur two climaxes or peaks before overwintering and during spiking period of wheat respectively.

Many sugars, organic acid, inorganic nitrogen compounds, and amino acids may be utilized largely by these three types of bacteria, while the sources of carbon and nitrogen that may be utilized by *Azotomonas insolita* are still more abundant.

To soak the seed of wheat in the culture solutions from which these three types of bacteria had been cultured respectively does not significantly influence the germination of the seed as well as the growth of the seedlings. If the seedlings of wheat are planted in a medium in which only a small number of bacteria are present, it can be seen that both *Pseudomonas denitrificans* and *Agrobacterium radiobacter* may have a certain stimulating effect on the growth of the seedlings of wheat. But as the bacteria are present in large amount, the development of the root system of wheat is significantly deterred.