

固氮放线菌的研究

丁 鑑 孙惠君 苏凤岩
徐卿德 黄雅丽 林佩真

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

本文研究了我国东北的棕色森林土、黑土、黑钙土、栗钙土、草甸土和苏打盐土中固氮放线菌的生态分布。固氮链霉菌是其主要优势类群, 不同的种类在土壤中出现机率各不相同, 大多数均具有乙炔还原活性和不同程度的固氮力。土壤类型和土地的不同利用状态对链霉菌的数量分布和种的组成分布具有明显的影响。

随着研究技术的改进, 所发现的能固定大气氮素的微生物的种类日趋增多。关于土壤中放线菌固定氮素的研究过去已有一些报道。Metcalf 和 Brown^[1] 曾从放牧地土壤中分离出两株具有固氮能力的诺卡氏菌。Федоров 和 Кудряшова^[2], Novak 和 Dvorakova^[2] 等均曾获得了一些能固定大气氮素的链霉菌。Карамшук^[4] 调查了草田轮作土壤中的放线菌, 报道固氮链霉菌占链霉菌总数的 12%, 其最高固氮力达 12 毫克氮/克糖。

结合我国东北土壤中固氮微生物资源的调查, 作者等利用气相色谱技术研究了土壤中放线菌的固氮作用。发现大多数的链霉菌均具有还原乙炔活性。用全氮法复查, 一些菌株亦具有固氮能力, 因而对它们在土壤中的固氮作用值得深入研究。现仅就研究方法和结果介绍如下。

材料和方法

(一) 土样采集

从东北的棕色森林土、黑土、黑钙土、栗钙土、草甸土和苏打盐土的分布地带, 按不同土类和同一土类不同利用状态下的土壤, 在 0—10 厘米表

土层取土样 45 个。

(二) 菌种分离

用阿须具无氮培养基, 维诺格拉斯基矽胶平板法分离菌种。菌落均在无氮培养基上纯化。

(三) 固氮活性测定

链霉菌的纯培养移种在改良尼古拉斯固体斜面上 (20 毫米 × 20 厘米试管, 装培养基 10 毫升), 于 28℃ 培养一周, 盖上反口橡皮塞, 注入 2% 标准乙炔 1 毫升, 反应 16 小时。所用国产 100 型气相色谱仪, 色谱柱长 3 毫米 × 2 米, 用 6201 担体, 固定液 β , β' 氧二丙腈, 柱温为室温, 用氢火焰离子化鉴定器检测乙炔还原活性。

具有乙炔还原活性的菌株, 接种于盛 50 毫升改良尼古拉斯液体培养基的 500 毫升三角瓶中, 于 28℃ 振荡培养一周 (120 次/分钟), 然后用凯氏定氮法检测其固氮力。用 SHS 法定还原糖, 计算消耗糖量。

(四) 菌种鉴定

具有乙炔还原活性的菌株, 均接种于高氏等 15 种鉴定培养基上, 参照中国科学院微生物研究所编著《链霉菌鉴定手册》进行鉴定^[3]。

本文于 1980 年 2 月 1 日收到。

本文承张宪武教授热情指导, 特此致谢。

本文曾在 1979 年全国微生物学年会农业组上宣读。

结果和讨论

(一) 固氮放线菌在土壤中的分布

用矽胶平板法测定土壤中固氮放线菌的分布, 结果表明, 放线菌的绝大部分菌落均属链霉菌。为便于比较固氮链霉菌在土壤中的分布, 仅将分离菌株数和分群、鉴定结果列于表 1, 2。

从表 1 中可看出, 具有固氮活性的链霉菌广泛存在于各类土壤中, 但在不同类型的土壤中不同的种出现的机率并不相同。一些类群, 如链霉菌的焔灰类群, 灰红紫类群, 灰褐类群和金色类群几普遍分布于各类土壤中, 青色类群也比较广泛出现, 而其他一些类群, 如粉红孢类群, 蓝色类群, 吸水类群和轮生类群出现的机率均很少。

同一土壤在不同利用条件下对固氮链

霉菌的分布具有明显的影响。如在林地所分离到的菌株数和种类均较少。在生荒地和耕作土上所出现的链霉菌的数量和种类均较多。在旱田土壤中出现链霉菌的数量和种类就比水田中为多。在水田中不仅链霉菌数量稀少, 而且种类也很少。在草原土壤中固氮链霉菌的数量与种类均很丰富。

应特别指出, 灰褐类群是一个分布广泛的类群。在林地、草原、生荒地、耕作土、水田、旱田土壤中均普遍存在。

(二) 链霉菌的固氮能力

从矽胶平板无氮培养基上分离得到的纯菌落, 均用气相色谱乙炔还原法检测其固氮活性。共检测了 180 株链霉菌, 结果其中 120 株均具有乙炔还原活性。因此, 可以认为用矽胶平板法筛选有一定的可靠

表 1 不同类型土壤中固氮链霉菌的分布

土壤类型	样品数	菌株数	种数	类群数
棕色森林土	21	52	23	7(4, 7, 10, 11, 12, 13, 14)*
黑钙土	7	20	8	5(6, 7, 10, 11, 12)
黑土	4	10	9	5(4, 6, 7, 10, 11)
栗钙土	1	6	4	2(9, 11)
草甸土	7	16	7	7(1, 6, 7, 10, 11, 12)
苏打盐土	6	8	8	5(1, 7, 10, 11, 12)

* 括号内数字为《链霉菌鉴定手册》中类群顺序号。

表 2 不同利用条件下土壤中固氮链霉菌的分布

土壤	土地利用情况	样品数	菌株数	种数	类群数
棕色森林土	山坡落叶松林地	1	2	2	2(4, 11)*
	生荒地	4	21	10	5(7, 10, 11, 12, 14)
	耕作土	6	16	12	5(1, 4, 7, 10, 11)
暗棕色森林土	旱田	1	4	4	3(7, 10, 11)
	水田	1	1	1	1(11)
栗钙土	草原	1	6	4	2(9, 11)

* 括号内数字为《链霉菌鉴定手册》中类群顺序号。

性。用它筛选出来的链霉菌,大部分均具有固氮活性。为进一步论证其固氮活性,利用在有铵盐存在的情况下阻碍固氮酶合成的现象,将具有乙炔还原活性的链霉菌菌株均移种于含 0.2% 硫酸铵的淀粉铵培养基上,用同法检测固氮酶活性。结果在 120 株菌株中有 119 株均不出现乙烯峰。说明在有铵盐的培养基上,这些菌株固氮酶的合成受到抑制,因而不能将乙炔还原成乙烯。但绿产色链霉菌 (*S. viridochromogenes*) 42-1 为例外,它在有铵盐阻遏的情况下仍出现乙烯峰,通过产乙烯的校正试验,证明此菌为产乙烯的链霉菌。

因此,利用此法调查土壤中链霉菌的固氮性能和筛选菌种非常方便,快速。但应当指出,乙炔还原法对固氮作用的鉴定是间接证明。要确定菌株的固氮能力并便于和文献中已报道的结果相比较,我们采用了凯氏定氮法,检测了已具有乙炔还原活性的链霉菌菌株的固氮能力。现仅将其

表 3 链霉菌 (*Streptomyces*) 的固氮活性

菌 株	乙炔还原成乙烯活性		固氮力 毫克氮/克消耗糖
	无氮培养基	硫酸培养基 0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄	
<i>S. lilacinoreetus</i> 19-7	+	-	1.0
<i>S. splendens</i> 39-5	+	-	4.3
<i>S. glaucus</i> 42-11	+	-	10.5
<i>S. viridochromogenes</i> 32-10	+	-	3.75
<i>S. griseolus</i> 9-6	+	-	4.6
<i>S. griseolus</i> 22-3	+	-	5.57
<i>S. avidinii</i> 35-5	+	-	4.4
<i>S. griseovariabilis</i> 4-19	+	-	6.72
<i>S. griseovariabilis</i> 28-1	+	-	8.5
<i>S. coelicolor</i> 40-7	+	-	1.0
<i>S. pruiniger</i> 16-28	+	-	3.89
<i>S. violaceus</i> 41-12	+	-	5.2
<i>S. castaneus</i> 30-5	+	-	8.5
<i>S. chromogenes</i> 40-5	+	-	4.1
<i>S. chromogenes</i> 40-4	+	-	7.1
<i>S. chromofuscus</i> 15-54	+	-	3.5
<i>S. cylindrosporus</i> var. <i>atrus</i> 41-15	+	-	1.3
<i>S. cylindrosporus</i> var. <i>atrus</i> 45-4	+	-	2.1
<i>S. castaneoglobosus</i> 21-6	+	-	3.29
<i>S. glomerochromogenes</i> 16-38	+	-	5.0
<i>S. griseoincarnatus</i> 39-2	+	-	1.87
<i>S. olivovariabilis</i> 44-5	+	-	9.8
<i>S. rutgersensis</i> 23-6	+	-	3.5
<i>S. flaveolus</i> var. <i>rectus</i> 15-2	+	-	1.7
<i>S. galbus</i> 29-12	+	-	8.7
<i>S. griseochromogenes</i> 5-5	+	-	11
<i>S. griseochromogenes</i> 10-10	+	-	19.7
<i>S. graminearus</i> var. <i>rectus</i> 9-1	+	-	2.5
<i>S. hygrosopicus</i> 38-6	+	-	3.2
<i>S. griseovorticillatus</i> 15-6	+	-	7.3

代表菌株的测定结果简列于表 3。

由表 3 明显看出链霉菌的固氮能力因菌种而异, 甚至同种不同菌株间固氮力亦有很大差别。

从固氮力来看, 固氮量在 5 毫克氮/克消耗糖以上的菌株达 13 株, 占所测菌株的 20%, 其中 10 毫克氮/克消耗糖以上的菌株 3 株。最高的一株近 20 毫克氮/克消耗糖。大多数菌株的固氮力均在 5 毫克氮/克消耗糖以下。因此, 链霉菌中确实存在一些具有固定大气氮素的种。其中一些菌株的固氮能力完全可以和经典的自生固氮菌相媲美。考虑到它们在土壤中分布的广泛性和适应于各种生态条件的生活能力, 以及能利用土壤中有机质为能源的特点, 它们在土壤中能发挥的固氮效能, 可能比自生固氮菌优越得多。

小 结

1. 用无氮培养基砂胶平板法从东北的棕色森林土、黑土、黑钙土、栗钙土、草甸土

和苏打盐土中分出的具有乙炔还原活性的放线菌, 绝大部分均属链霉菌属, 共归为 10 个类群, 30 个种。

2. 固氮链霉菌广泛分布于各类不同的土壤中。链霉菌不同的种类在土壤中出现的机率各不相同。土壤类型和土壤的不同利用状态对链霉菌的数量分布和种的组成分布具有明显的影响。

3. 链霉菌的固氮活性因菌种而异, 在同种不同菌株间亦有很大差别。

参 考 文 献

- [1] Metcalfe, G. and M. E. Brown: *J. gen. Microbiol.* 17: 567—578, 1957.
- [2] Федоров, М. В. и Т. К. Кудряшова: *Докл. АН СССР*, 108(2):345, 1956.
- [3] Novok и Dvoračkova: *Биологическая фиксация Атмосферного Азота*, М. изд-во «Наука», 464—467, 1968.
- [4] Карамышук З. П.: *Микробиология*, 45 (2): 347—349, 1976.
- [5] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组编著: 《链霉菌鉴定手册》, 科学出版社, 北京, 1975 年。

STUDIES ON NITROGEN FIXATION BY ACTINOMYCETES

Ding Jian Sun Huijing Su Fengyan Xu Qingde Huang Yali Lin Peizhen

(Institute of Forestry and Pedology Academia Sinica, Shenyang)

Soil samples were taken from brown forest soil, black soil, chernozem castanozem, meadow soil and soda-saline soil of Northeastern China. Dinitrogen fixing actinomycetes were isolated from Ashby medium. The predominant colonies appeared on the Ashby plate were *Streptomyces* spp.

Dinitrogen fixing *Streptomyces* are widely distributed in various soil. The distribution area of different *Streptomyces* species is different. Soil type and agriculture treatment have a great influence

on their numbers and species. Grassland, cultivated fields are more rich in *Streptomyces* than virgin soils or forest soils.

The acetylene-reducing activity of *Streptomyces* was determined by gas chromatography. The most abundant strains have acetylene-reducing activity. The nitrogen fixing capacity was also determined by Kjeldahne method. The nitrogen fixing capacity varies among the species or strains.