

水稻根际反硝化细菌生态分布的研究

李振高 万焕楣 吴留松 乔凤珍

(中国科学院南京土壤研究所)

摘 要

本文报道了三种土壤中水稻根际反硝化细菌的生态分布及两种作物对根际反硝化细菌的影响。结果表明：水稻各生育期菌数均以根面大于根际，又大于根外，R/S值为10—100以上。水稻与大麦的根面及根际反硝化细菌与细菌总数均以抽穗期最多，成熟期菌数明显下降，但水稻不同生育期菌数高于大麦相应时期的菌数。其优势种根面比根际者单纯；同一土壤中不同作物根面反硝化细菌优势种有明显差异；不同土壤中同一作物根面、根际反硝化细菌优势种差异不明显。

根际是微生物、植物与土壤三者构成的一个特殊生境，其与作物生长的关系极为密切，一直为国内外学者们所重视^[1,4,8,11]，但迄今对于禾本科植物根面和根际反硝化细菌的分布及其优势种的报道尚属不多。本工作在进行水稻根际微生物数量和组成调查研究的基础上，着重探讨了水稻根际反硝化细菌的生态分布特征，试图为深入研究根际生态条件与微生物之间的相互关系，有效地发挥有益微生物的作用和防治有害微生物提供依据。

一、材料与方 法

(一) 供试土壤 无锡东亭大队的黄泥土，南京郊区十月公社的马肝土，溧阳老河口的白土。供试土壤的主要性质列于表1。

表1 供试土壤的主要性质*

Table 1 The main properties of the soils used in experiment

| 土壤类型 Soil type | pH | 有机质 (%) O. M. | 全 氮 (%) Total N | 全 磷 (%) Total P | 全 钾 (%) Total K |
|---------------------------------|------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 黄泥土 (Permeable paddy soil) | 6.07 | 2.88 | 0.18 | 0.12 | 1.23 |
| 马肝土 (Side bleaching paddy soil) | 6.13 | 2.28 | 0.15 | 0.15 | 1.48 |
| 白 土 (Albic paddy soil) | 6.54 | 1.64 | 0.11 | 0.07 | 1.18 |

* 用常规分析法测定^[2]。

(二) 盆栽试验 在温室内进行，每盆钵装土3千克，并拌入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.38克作为基肥。水稻品种为原丰早，预先经浸种，催芽，分别在上述三种土壤中育苗。选取长势基本一致的健壮秧苗移栽，每盆钵三穴，每穴三株，重复三次，并设不种水稻作为对照(根外土)，统一管理。

(三) 分析鉴定方法 取样：分别于水稻分蘖期、抽穗期和成熟期进行采样。将来自盆栽的带土的水稻植株，先去掉根上大土块，然后用无菌镊子剔除渣滓，轻轻刮下粘在根上的土壤，混匀后，称取

10 克于盛有 100 毫升无菌水的三角瓶中, 振荡 15 分钟, 制成土悬液, 即为根际土样品。

将取过根际土壤的水稻根系用自来水冲洗至根上基本无土, 再用无菌水洗数次, 直到肉眼见不到土粒为止, 将根系上水滴用无菌滤纸吸去, 然后用消毒剪刀将根系剪成 1 厘米长的小段, 混匀后称取 10 克于盛有 100 毫升无菌水和 15 克玻璃珠的三角瓶中, 振荡后制成菌悬液, 即为根面样品。根外土样品仍用常规法。

分离: 细菌总数测定采用稀释平板法, 培养基为肉汁蛋白胨加 25% 土浸汁。反硝化细菌数量测定是从高稀释度 (10^{-7}) 的平皿中挑取所有菌落, 移植于斜面。纯化后, 分别培养于含 KNO_3 肉汁蛋白胨培养液中, 定期用格里氏试剂, 奈氏试剂及二苯胺鉴别具有还原硝酸盐能力的菌株并计数, 换算成每克干土或干根的菌数。

鉴定: 依文献^[9,12]对所分离出的优势菌株进行培养性状, 生理生化及生态等特性的鉴定。

二、结果与讨论

(一) 水稻各生育期根际反硝化细菌数量的变化

从表 2、表 3 可以看出, 水稻根面及根际土壤中的细菌一般有 35—70% (有的甚至达 75% 以上者) 具有还原硝酸盐为亚硝酸盐、氨盐及游离氮的能力, 我们广义称其为反硝化细菌。水稻在整个生育期间, 随着根系在土壤中伸展, 微生物含量从根面向根外渐趋减

表 2 水稻各生育期根面、根际细菌总数和反硝化细菌的数量*

Table 2 Total amount of bacteria and content of denitrifying bacteria in rhizosphere and on rhizoplane in different growing period of rice

| 土壤类型 Soil type | 生育期 The growing period | 处 理 Treatmen ^t | 细菌总数 Total amount of bacteria | 反硝化细菌 Denitrifying bacteria | 反硝化细菌/细菌 (%) |
|---------------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| | | | 百万/克干土(根) $10^6/g$ dry soil (root) | | |
| 黄 泥 土 permeable Paddy soil | 分 蘖 期 | 根 | 885.25 | 419.35 | 47 |
| | | 面 际 | 220.86 | 166.06 | 75 |
| | 抽 穗 期 | 根 | 1162.79 | 488.37 | 42 |
| | | 面 际 | 659.13 | 459.43 | 70 |
| | 成 熟 期 | 根 | 520.83 | 187.50 | 36 |
| | | 面 际 | 113.53 | 58.22 | 51 |
| 马 肝 土 Side bleaching paddy soil | 分 蘖 期 | 根 | 967.74 | 354.84 | 37 |
| | | 面 际 | 235.30 | 147.06 | 62 |
| | 抽 穗 期 | 根 | 1216.22 | 451.61 | 37 |
| | | 面 际 | 746.80 | 398.30 | 53 |
| | 成 熟 期 | 根 | 660.87 | 243.48 | 37 |
| | | 面 际 | 86.70 | 67.42 | 78 |
| 白 土 Albic paddy soil | 分 蘖 期 | 根 | 683.76 | 239.32 | 35 |
| | | 面 际 | 86.70 | 47.69 | 55 |
| | 抽 穗 期 | 根 | 826.45 | 330.58 | 40 |
| | | 面 际 | 380.96 | 226.89 | 60 |
| | 成 熟 期 | 根 | 709.09 | 272.72 | 38 |
| | | 面 际 | 180.00 | 90.00 | 50 |

* 根面菌数为百万/克干根; 根际菌数为百万/克干土。

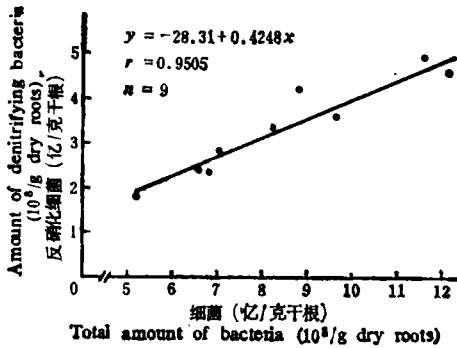


图 1 水稻根面反硝化细菌
与细菌总数的相关性

Fig. 1 Correlation between total amount of denitrifying bacteria and bacteria in rice rhizoplane

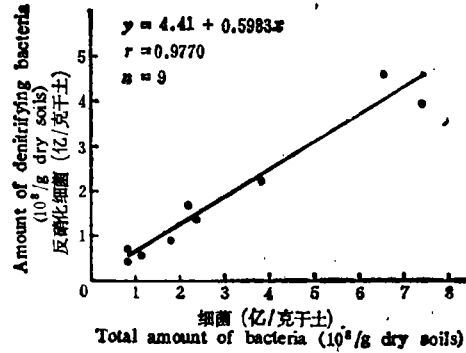


图 2 水稻根际反硝化细菌
与细菌总数的相关性

Fig. 2 Correlation between total amount of denitrifying bacteria and bacteria in rice rhizosphere

表 3 水稻根际反硝化细菌的 R/S 值

Table 3 R/S ratio of denitrifying bacteria in rice rhizosphere

| 土壤类型 Soil type | 生育期 The growing period | 根际土 Rhizosphere soil | 根外土 Non-rhizosphere soil | R/S 值 Ratio |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| | | 百万/克干土 10 ⁶ /g dry soil | | |
| 黄泥土 Permeable paddy soil | 分蘖期 | 166.06 | 3.56 | 46.65 |
| | 抽穗期 | 459.43 | 4.50 | 102.10 |
| | 成熟期 | 58.22 | 3.29 | 17.70 |
| 马肝土 Side bleaching paddy soil | 分蘖期 | 147.06 | 3.05 | 48.22 |
| | 抽穗期 | 398.30 | 3.80 | 104.82 |
| | 成熟期 | 67.42 | 2.85 | 23.66 |
| 白土 Albic paddy soil | 分蘖期 | 47.69 | 1.78 | 26.79 |
| | 抽穗期 | 226.89 | 3.53 | 64.27 |
| | 成熟期 | 90.00 | 2.77 | 32.50 |

少,形成一个微生物梯度。其数量,以黄泥土为例,水稻各生育期平均根面为 365 百万/克干根;根际为 228 百万/克干土;根外为 3.8 百万/克干土。这是由于根系产生的分泌物能够刺激一定距离内微生物向根面移动,当微生物与根接触后,相适应的种类开始大量繁殖^[4]。所以一般来说,根面微生物受根系的影响较大,数量最多。说明水稻根面及根际营养丰富,生境良好,具有适合反硝化细菌生存的条件。

另外,我们还可以看到在同一土壤中,水稻不同生育期,其根面、根际反硝化细菌的数量消长和细菌总数类似。细菌总数与反硝化细菌的相关性分析表明,二者呈正相关(图 1, 2),细菌总数多,反硝化细菌数亦多($P < 0.01$)。从分蘖期以后,菌数逐渐上升,到抽穗期达到高峰,成熟期菌数显著下降,这与文献报道结果一致^[1]。而且在黄泥土、马肝土和白土上有同样趋势。这可能由于水稻在抽穗期生长旺盛,根系发达,分泌物较多,细菌生命活动所需要的营养物质和能源充分得到满足,这就促使细菌的繁殖速度大为增加,从而

在抽穗期显示出最高的细菌数量。到成熟期,因植株衰老,根际效应减弱,菌数下降。

表 2 还表明,任何一种供试土壤上的水稻,于三个生育期中反硝化细菌占细菌总数百分数均以根际土大于根面。

据 Garcia (1973) 报道,水稻根际反硝化细菌 R/S 值[根际(R)和根外(S)土中菌数之比]一般为 1—514,这种差异因土壤类型而异,我们的试验结果也相类似(表 3),R/S 值一般为 10—100 以上。而且在三种土壤中也可以看出,在水稻抽穗期黄泥土、马肝土和白土的 R/S 值分别为 102.1, 104.8, 64.3; 在成熟期它们相应的 R/S 值分别为 17.7, 23.7 和 32.50。由此看来,根分泌物多的抽穗期较分泌物少的各时期的 R/S 值宽;肥力高的黄泥土和马肝土较肥力低的白土(表 1) R/S 值窄。说明 R/S 值的变化,受作物生育期影响的程度大于受土壤肥力等条件的影响。

以上结果说明,水稻根面、根际有大量的反硝化细菌,在适合反硝化作用的条件下,会造成氮素的大量损失^[5]。

(二) 水稻根际反硝化细菌优势种的分布

我们对分离获得的经常出现的和数量高的优势反硝化细菌进行了鉴定。结果表明其优势属类有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、不动细菌属(*Acinetobacter*)和肠细菌属(*Enterobacter*)等,其中主要是格兰氏阴性杆菌,以假单胞菌属的菌数最多,反硝化作用能力最强。根面又以 *Ps. aeruginosa* 为主,根际以 *Acinetobacter* sp.、*Ps. fluorescens* 和 *Ps. stutzeri* 等较多(见表 4),这说明水稻各生育期根面比根际反硝化细菌种的组成单纯,其原因可能是由于根的分泌物对根面反硝化细菌的吸引有更强的选择性。

(三) 不同作物对根际反硝化细菌的影响

我们在同一土壤中,进行水稻和大麦根面与根际反硝化细菌数量及种类的比较分析,其结果示于图 3,表明在马肝土和白土上分别种植两种作物各生育期的菌量变化趋势恰相一致,菌数高峰均在抽穗期,但水稻根面、根际反硝化细菌数量一般高于大麦根面和根际的反硝化细菌数量。据陈华癸研究^[4]这一方面是因为反硝化细菌属于兼性类群,它们在有氧和缺氧条件下都能旺盛地生长繁殖,另一方面水田土壤中放线菌和真菌的数量低于旱地,因此,水田中细菌能够获得更多的养料有利于其生长繁殖。据此看来,这可能是水稻根面、根际反硝化细菌数量高于大麦的原因。

由表 4 和表 5 看出,同一土壤上生长的水稻和大麦,其根面、根际反硝化细菌的优势种类不完全一样。大麦根面的优势种为 *Ps. fluorescens*, *Ps. stutzeri*; 根际除了 *Ps. fluorescens* 外,还出现 *Ps. mendocina* 和 *E. cloacae* 等,然而不同土壤上的同一作物,其根面及根际的优势种类差别却不显著。这是由于不同作物的根际微域生态环境(如 pH、氧化还原电位、通气状况等)大不相同^[6],且其根系代谢物的量和种类也可能各异,从而不仅导致两者菌数上的差异,而且也影响到根面及根际优势种类的不同,这说明根面和根际反硝化细菌的优势种类主要取决于作物种类,而与土壤类型的关系较小。

综上所述,水稻根面及根际聚集了大量的反硝化细菌,但这并不表明任何条件都适合反硝化作用。据报道,有些反硝化细菌甚至能合成大量维生素类和刺激素类物质^[7],促进作物生长,所以本试验只是证实了作物根际蕴藏着一个巨大的反硝化潜力;调查了反硝化

表 4 水稻各生育期根面、根际反硝化细菌优势种的分布

Table 4 Distribution of dominant species of denitrifying bacteria on rhizoplane and in rhizosphere in each growing period of rice

| 土壤类型 Soil type | 生 育 期 The growing period | | 优 势 种 类 Dominant species |
|------------------------------------|-----------------------------|------------|--|
| 黄 泥 土 Permeable paddy soil | 分 蘖 期 | 根 面 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> sp. |
| | 抽 穗 期 | 根 面 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> sp. |
| | 成 熟 期 | 根 面 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> sp. |
| 马 肝 土 Side bleaching paddy soil | 分 蘖 期 | 根 面 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Ps. aeruginosa</i> |
| | 抽 穗 期 | 根 面 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> <i>F. lutescens</i> <i>Ps. fluorescens</i> <i>Ps. mendocina</i> |
| | 成 熟 期 | 根 面 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Ps. stutzeri</i> <i>Ps. fluorescens</i> |
| 白 土 Albic paddy soil | 分 蘖 期 | 根 面 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Ps. fluorescens</i> |
| | 抽 穗 期 | 根 面 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Ps. stutzeri</i> |
| | 成 熟 期 | 根 面 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Ps. aeruginosa</i> |

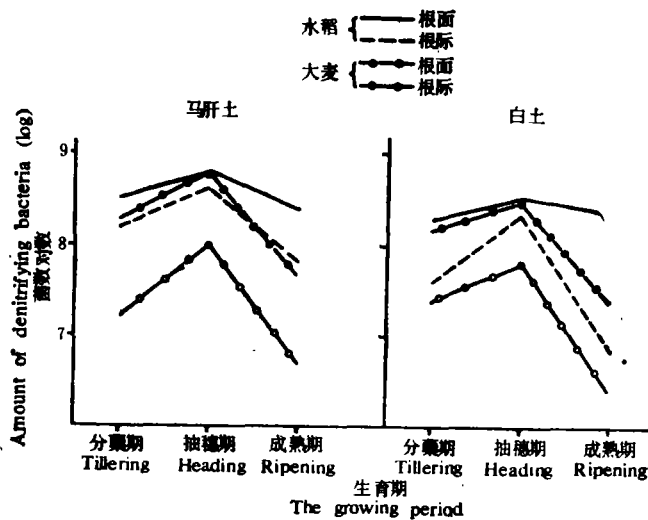


图 3 不同作物各生育期根际反硝化细菌数量变化

Fig. 3 Change in content of denitrifying bacteria of rhizosphere in each growing period of various crops

细菌的优势种类及其分布状况。由于反硝化细菌的专性不强，只有在适合反硝化作用的条件下，才会引起强烈的反硝化作用，造成土壤氮素损失，由于氮素供应的不协调，以致作物产量受到影响。至于究竟采用何种措施可以改变根际生态条件，从而调控根际反硝化细

表 5 大麦各生育期根面、根际反硝化细菌优势种的分布

Table 5 Distribution of dominant species denitrifying bacteria on rhizoplane and in rhizosphere in each growing period of barley

| 土壤类型 Soil type | 生 育 期 The growing period | | 优 势 种 类 Dominant species |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----|---|
| 马 肝 土 Side bleaching paddy soil | 分 蘖 期 | 根 面 | <i>Ps. fluorescens</i> |
| | | 根 际 | <i>Ps. fluorescens</i> |
| | 抽 穗 期 | 根 面 | <i>Ps. fluorescens Ps. stutzeri</i> |
| | | 根 际 | <i>Ps. fluorescens Ps. mendocina E. cloacae</i> |
| | 成 熟 期 | 根 面 | <i>Ps. fluorescens Ps. stutzeri</i> |
| | | 根 际 | <i>Ps. fluorescens</i> |
| 白 土 Albic paddy soil | 分 蘖 期 | 根 面 | <i>Ps. fluorescens</i> |
| | | 根 际 | <i>Ps. fluorescens F. rigense</i> |
| | 抽 穗 期 | 根 面 | <i>Ps. fluorescens</i> |
| | | 根 际 | <i>Ps. fluorescens Pseudomonas sp.</i> |
| | 成 熟 期 | 根 面 | <i>Ps. fluorescens</i> |
| | | 根 际 | <i>Ps. aeruginosa</i> |

菌的反硝化作用,达到减少氮素损失,促进某些根际细菌的有益作用是一个有待研究的问题。

参 考 文 献

- [1] 陈子英, 1963: 水稻根系微生物的主要特性。微生物学报, 第 9 卷 2 期, 186—192 页。
- [2] 中国科学院南京土壤研究所, 1978: 土壤理化分析。上海科学技术出版社。
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著, 1978: 一般细菌常用鉴定方法。科学出版社。
- [4] 陈华癸、李阜棣等, 1979: 土壤微生物学。上海科学技术出版社。
- [5] 李良谟、潘映华等, 1984: 水稻根系对氮素损失的影响。土壤, 第 16 卷 1 期, 5—10 页。
- [6] 于天仁等编著, 1976: 土壤的电化学性质及其研究法(修订本)。科学出版社。
- [7] 娄隆后编, 1962: 微生物在土壤养分转化中的作用。科学出版社。
- [8] 木村真人、和田秀德、高井康雄, 1977: 水稻根圏に関する研究(第 2, 3 報), 根圏土壤の微生物学的性質(その 1, 2)。日本土壤肥科学雜誌, 48: 91—95, 111—114。
- [9] 木村真人、和田秀德、高井康雄, 1980: 水稻根圏に関する研究(第 7 報), 水稻根面の微生物(その 1)。日本土壤肥科学雜誌, 51: 85—89。
- [10] Starkey, R. L., 1958: Interrelations between microorganisms and plant roots in the rhizosphere. Bacterial. Rev, 22: 154—172.
- [11] Woldendrop, J. W., 1963: The influence of living plants on denitrification. Meded Landbhogesch, Wageningen, 63:1—100.
- [12] Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 1974: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eighth edition The Williams & Wilkins Company Baltimore.

STUDIES ON THE ECOLOGICAL DISTRIBUTION OF DENITRIFYING BACTERIA IN RHIZOSPHERE OF RICE

Li Zhengao, Wan Huanmei, We Liusong and Qiao Fengzhen

(Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing)

Summary

The ecological distribution of denitrifying bacteria in the three soils on rhizoplane and in rhizosphere of rice and barley was studied. Results showed that the total amount of bacteria was larger on rhizoplane than in rhizosphere and non-rhizosphere soil in each growing period of rice. The ratio of R/S was above 10—100. The total amounts of bacteria or denitrifying bacteria in rice and barley rhizosphere attained to the maximum during heading period, however, there was a marked dropping in ripening period. It was clear that the amount of bacteria in rhizosphere of rice was higher than that in rhizosphere of barley in each corresponding period.

The dominant species of bacteria on the rhizoplane were simpler than those in rhizosphere. The dominant species of denitrifying bacteria on rhizoplane were significantly different among various crops on the same soil, but there was not significant difference in the dominant species of denitrifying bacteria on rhizoplane or in rhizosphere of a same crop on various soils.