

黄土高原子午岭林区及青藏高原海北高寒草甸嫌气性固氮菌的研究*

李家藻

(中国科学院西北高原生物研究所)

嫌气性固氮菌特别是固氮芽孢梭菌,在各类型土壤中分布广泛。除耕作土壤外,在好气性自生固氮极少或没有的林区、草地甚至瘠薄的荒地,仍有嫌气性固氮存在 (Augier, 1957; Рыбкина, 1960; Емцев, 1962; Mishustin, 1973)。作者在黄土高原子午岭林区及青藏高原海北高寒草甸进行土壤微生物区系研究中,观察到在前者土壤中,好气性自生固氮菌极少,在后者土壤中,则未能发现有好气性自生固氮菌。为查明上述土壤中大气氮素固定的主要承担者,从而寻求提高土壤肥力的途径,进行了本项研究工作。

一、材料和方法

1. 土壤样品的采集

子午岭林区分别在林地和草地采取土壤样品,采样层次深度为0—4厘米、4—23厘米、23—56厘米、56—100厘米。海北高寒草甸分别在矮嵩草甸(*Kobresia humilis* meadow)、金露梅灌丛(*Potentilla fruticosa* shrub)采集样品。采样层次深度分别为0—10厘米、10—20厘米、20—40厘米、40—60厘米。为了解森林砍伐后放荒和种植作物以及人工草场退化后对嫌气固氮菌数量的影响,还在上述样地采集了土壤样品。

2. 嫌气性固氮菌的计数

采用 Емцев (1962) 半固体培养基。其成分为:葡萄糖 20 克、蛋白胨 5 克、酵母浸膏 53 毫克、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 克、NaCl 0.5 克、 $FeSO_4$ 10 毫克、 $MnSO_4$ 10 毫克、混合微量元素溶液 (H_3BO_3 5 克、 $(NH_4)_2MoO_4$ 5 克、KI 5 克、NaBr 0.5 克、 $ZnSO_4$ 0.2 克、 $Al_2(SO_4)_3$ 0.3 克、蒸馏水 1000 毫升) 1 毫升、琼脂 2 克、蒸馏水 1000 毫升,调节 pH 到 7.0。将上述培养基分装入 15×150 毫米试管中,每管 10 毫升。灭菌后,每管加入无菌液体石蜡 2 毫升,以隔绝空气,造成嫌气条件。每管接种 10^{-1} — 10^{-10} 土壤稀释液各 1 毫升,每一稀释度接种 3 管。28℃ 培养 7 天。记录有气泡生成的试管数,查表计算嫌气性固氮菌菌数。

3. 嫌气性固氮菌的分离纯化和鉴定

分离用培养基采用经作者修改的维诺格拉德斯基(1849)培养基,其成分为:葡萄糖 20 克、 K_2HPO_4

* 承沈梅生、汪静琴、任玉岐、覃秀英等同志提供好气性菌株,任玉岐同志提供子午岭土壤有机质数据,特此致谢。

1 克、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 克、 $NaCl$ 0.25 克、 $FeSO_4$ 0.01 克、 $MnSO_4$ 0.01 克、酵母浸膏(按含氮量计算)10毫克、胡敏酸 2 毫克、 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 20 毫克、 $CaCO_3$ 5 克、蒸馏水 1000 毫升、琼脂 20 克。

——嫌气培养和菌种分离采用生物吸氧装置。将萌发的麦种置于密封性能良好的玻璃干燥器中,加水少许。将接种 10^{-1} — 10^{-2} 土壤释液的修改的维氏琼脂平板平置于嫌气干燥器中,密封,置 $28^\circ C$ 恒温箱中培养 7—10 天。挑取平板上生长的菌落,经 3—5 次纯化,接种在无糖牛肉汁琼脂培养基上好气培养和无糖牛肉汁培养基中嫌气培养,如均不生长,则表明已得到纯种。按 Bergey (1957) 细菌鉴定手册进行菌种鉴定。

固氮量和固氮作用强度(固氮率)测定按《土壤微生物分析方法手册》(中国科学院林业土壤研究所微生物室,1960)方法进行。

4. 混合培养试验

设置了巴氏芽孢梭菌 (*Clostridium pasteurianum*) 与圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*)、放线菌 (*Actinomyces*)、青霉菌 (*Penicillium*)、无芽孢细菌 (non-spore bacteria)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 的一些任选菌株在好气条件下混合培养的试验处理。在 20×200 毫米大试管中装入维氏液体培养基(不添加酵母浸膏、胡敏酸、硫化钠)10 毫升,灭菌后,接种培养 5 天的巴氏芽孢菌悬液和好气菌悬液各 0.05 毫升, $28^\circ C$ 好气培养 10 天,同时单独接种巴氏芽孢梭菌,菌悬液嫌气培养 10 天作为对照。培养结束后,分别测定其固氮量和固氮率。为模拟巴氏芽孢梭菌在土壤中的固氮作用,设置了在无菌土壤中接种巴氏芽孢梭菌和好气菌进行混和培养的试验。将表层 0—14 厘米土壤过孔径 1 毫米筛,加 1% 葡萄糖,调节土壤水分到 20%。称 20 克土壤置入三角瓶中,1.5 公斤/厘米²灭菌 2 小时。接种巴氏芽孢梭菌悬液和供试好气菌悬液各 0.5 毫升,在保温容器中 $28^\circ C$ 好气培养 30 天。测定固氮量和固氮率。

二、结果和讨论

1. 嫌气培养装置和土壤中嫌气性固氮菌的计数。

在嫌气培养方法方面,作者对几种产生嫌气条件的方法即化学吸氧、生物吸氧和抽成真空等几种方法进行了比较试验,其结果列于表 1。从表 1 的结果可以看出,三种嫌气培养方法中,以生物吸氧法效果较好。萌发的麦种和酿酒酵母在吸氧的同时,释放出嫌气性固氮梭菌生长所需要的 CO_2 。碱性焦性没食子酸溶液吸氧较快,但同时也吸收了容

表 1 几种嫌气培养方法的比较

Table 1 Comparison of several anaerobic culture methods

嫌气培养方法 Anaerobic culture method		生物吸氧法 Oxygen absorbed by organisms		抽真空法 Oxygen exhausted by vacuum pump
化学吸氧法 Oxygen absorbed by chemicals		用萌发的麦种吸氧 O ₂ absorbed by budding wheat seeds	用酿酒酵母吸氧 O ₂ absorbed by <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
用碱性焦性没食子酸溶液吸氧 O ₂ absorbed by alkaline Pyrogallol acid solution				
美蓝退色时间(小时) decoloration time of methylene blue (hr.)	48	84	—	3
菌落生长情况 Growth of colony	微弱 weak	良好 good	良好 good	极微弱 very weak

器中的 CO₂, 并产生不利于固氮梭菌的 CO。抽真空法能在较短时间排除 O₂, 但同时也抽出了 N₂ 和 CO₂, 故菌落生长极为微弱。在一般缺少较先进的嫌气培养系统, 即在抽成真空后, 又能充入一定比例的 N₂ 和 CO₂ 的设备的实验室, 生物吸氧法仍不失为分离培养嫌气性固氮菌的一种较好的方法。为便于操作和进行较大的培养, 作者采用萌发麦种吸氧法。

土壤中嫌气性固氮菌的计数, 一般采用无氮培养基, 但嫌气性固氮菌, 多系生长素异养型, 需有微量生长素方能良好生长 (Parker, 1954; 克拉西里尼柯夫, 1958)。Emuev (1962) 采用加有蛋白胨、酵母浸膏的半固体培养基测定土壤中嫌气性固氮梭菌, 比用无氮培养基测得的数量高一百多倍。作者进行的试验, 得到同样的结果。为了检验在该培养基上生长的菌落是否系嫌气性固氮菌, 挑取了在该培养基平板上生长的 140 个菌落, 移植在无氮琼脂培养基斜面上嫌气培养。结果除 3 管不生长外, 137 株均生长良好, 说明在该培养基上生长的 98% 的菌落均系嫌气性固氮菌, 用该培养基进行土壤中嫌气性固氮菌计数是适宜的。

2. 子午岭土壤和海北土壤中嫌气性固氮菌的计数

子午岭林地、草地及海北高寒草甸土壤嫌气性固氮菌数量测定结果 (表 2、3) 可以看出, 海北高寒草甸土壤中嫌气性固氮菌的数量远日子午岭林区土壤中为多。从上述两个地区分别来看, 子午岭林区林地森林灰褐土中嫌气性固氮菌菌数又明显高于草地原始黑垆土中的菌数; 海北高寒草甸植被为金露梅灌丛的高山灌丛草甸土中的嫌气性固氮菌菌数又显著高于植被为矮嵩草草甸的高山草甸土中的菌数。这种差异主要和土壤有机质含

表 2 黄土高原子午岭林区土壤嫌气性固氮的数量 (10⁴个细胞/克干土)

Table 2 Number of anaerobic nitrogen-fixing bacteria in soil of Ziwuling forest region of Loess Plateau (10⁴cells/g dry soil)

试验处理 Experimental treatment	土壤类型 Soil type	土壤层次深度(厘米) Soil horizon depth (cm)			
		0—4	4—23	23—56	56—100
林地 Forest land	森林灰褐土 Gray brown forest soil	6.057	0.173	0.001	0
草地 Grass land	原始黑垆土 primitive dark loessial soil	0.284	0.110	0.029	0.034

表 3 青藏高原海北高寒草甸土壤嫌气性固氮菌的数量 (10⁴个细胞/克干土)

Table 3 Number of anaerobic nitrogen-fixing bacteria in soil of Haibei alpine meadow of Qinghai-Xizang Plateau (10⁴cells/g dry soil)

试验处理 Experimental treatment	土壤类型 Soil type	土壤层次深度(厘米) Soil horizon depth (cm)			
		0—4	10—20	20—40	40—60
矮嵩草草甸 <i>Kobresia humilis</i> meadow	高山草甸土 Alpine meadow soil	39.20	14.10	1.44	0.57
金露梅灌丛 <i>Potentilla fruticosa</i> meadow	高山灌丛草甸土 Alpine scrubby meadow soil	7688.00	3330.00	2.19	0.21

量有关。土壤有机质含量增高,能明显提高嫌气性固氮菌数量,土壤有机质含量是影响土壤中嫌气性固氮菌的主要因素之一(Емцев, 1962, Возняковская, 1954)。子午岭森林灰褐土0—23厘米土壤中有有机质含量为3.85%,明显高于原始黑垆土中有有机质含量(仅为1.83%)。海北高山灌丛草甸土0—20厘米土壤有机质含量明显高于高山草甸土0—20厘米土壤中有有机质含量,前者为14.77%,而后者仅为7.28%。所以子午岭森林灰褐土的嫌气性固氮菌数(3.115×10^4 个细胞/克干土)明显高于原始黑垆土中的菌数(0.197×10^4 个细胞/克干土);海北高山灌丛草甸土中嫌气性固氮菌数(5509×10^4 个细胞/克干土)显著高于高山草甸土中的菌数(26.65×10^4 个细胞/克干土)。

试验结果还表明,森林砍伐后放荒,引起嫌气性固氮菌大量减少,而相同的迹地翻耕后种植作物,则导致菌数剧增。如试验测得0—15厘米林地土壤中嫌气性固氮菌数为 0.33×10^4 个细胞/克干土,森林砍伐放荒后同样深度土壤中的菌数仅为 0.18×10^4 个细胞/克干土,而相同的迹地翻耕种植作物后菌数剧增为 32.81×10^4 个细胞/克干土。在海北高寒草甸,退化了的垂穗披碱草草场0—10厘米土壤中嫌气性固氮菌数(0.58×10^4 个细胞/克干土)也显著地低于未退化的垂穗披碱草草甸同样深度土壤中的菌数(5.78×10^4 个细胞/克干土)。

3. 嫌气性固氮的分离和纯化

一些国外的科学工作曾用不同的方法分离得到嫌气性固氮梭菌纯种(维诺德格拉斯基, 1849; Parker, 1954; Работнова; 1952, Рыбалкина, 1957)。方法虽互有差异,但都采用无氮培养基。作者在研究工作中注意到,用无氮培养基可以成功地从耕作土壤和肥力较高的土壤中分离到嫌气性固氮梭菌。但用无氮培养基从极为贫瘠的土壤(如子午岭原始黑垆土)中分离嫌气性固氮梭菌,却难以奏效。作者采用修改的无氮培养基,添加微量刺激嫌气性固氮梭菌生长和降低培养基氧化还原电位的物质如酵母浸膏、胡敏酸、硫化钠溶液或邻苯二酚溶液等,对菌种分离都有一定的良好作用,但以添加酵母浸膏(按含氮量计算,100毫升培养基中添加1毫克)、胡敏酸(100毫升培养基中添加0.2毫克)、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (100毫升培养基中添加2毫克)效果最佳。这种培养基的优点在于添加酵母浸膏补充了嫌气性固氮梭菌对生长因子的需要,添加硫化钠降低了培养基的氧化还原电位,添加胡敏酸可刺激嫌气性固氮梭菌的生长发育。在此培养上生长的菌落,经3—5次纯化,即可获得纯种。

4. 菌种鉴定

分离得到的嫌气固氮梭菌的形态生理特征基本相同。48小时培养物细胞呈杆状,大小为 $0.7 \times 1.5 - 4.6$ 微米。能运动。细胞单个,成对,有时呈短链。老年培养物(培养15天)细胞呈梭状,大小为 $1.7 - 1.9 \times 3.1 - 5.4$ 微米。孢子卵圆形,位于细胞中央或一端,大小为 1.5×2.0 微米。碘液染色呈正反应。革兰氏染色呈正反应。葡萄糖明胶不液化。硝酸盐不还原,不生成脲基质。产生丁酸和乙酸。石蕊牛乳还原,微变红,但不凝固,不发酵。葡萄糖琼脂表面菌落微隆起,粘稠,湿润,圆形,边沿整齐,微乳黄色,有光泽。在碳源利用方面,能发酵葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、棉子糖、甘露醇。不能利用乳糖、木糖、水杨素、甘油、糊精和淀粉。和贝捷氏鉴定手册中记载的9种嫌气性固氮芽孢梭菌即 *Clostr-*

表 4 巴氏芽孢梭菌的固氮活性

Table 4 Nitrogen fixation activity of *Clostridium pasteurianum*

菌株号 Strain number	葡萄糖耗用量 (克葡萄糖/10毫升培养基) Glucose consumed (g glucose/10 ml culture Medium)	氮的净增量 (毫克氮/10毫升培养基) N net increased (mg N/10ml culture medium)	固氮率 (毫克氮/克葡萄糖) Nitrogen fixation activity (mg N/g glucose)
<i>Cl. pasteurianum</i> No. 1	0.183	0.665	3.634
<i>Cl. pasteurianum</i> No. 2	0.183	0.570	3.115
<i>Cl. pasteurianum</i> No. 3	0.180	0.652	3.622
<i>Cl. pasteurianum</i> No. 4	0.181	0.563	3.108
<i>Cl. pasteurianum</i> No. 5	0.183	0.672	3.672
<i>Cl. pasteurianum</i> No. 6	0.183	0.577	3.153
<i>Cl. pasteurianum</i> No. 7	0.183	0.573	3.131
<i>Cl. pasteurianum</i> No. 8	0.181	0.626	3.459
<i>Cl. pasteurianum</i> No. 9	0.178	0.582	3.270

表 5 巴氏芽孢梭菌与圆褐固氮菌混合培养的固氮活性

Table 5 Nitrogen fixation activity of mixed culture of *Clostridium pasteurianum* with some strains of *Azotobacter chroococcum*

试验处理 Experimental treatment	葡萄糖耗用量 (克葡萄糖/10毫升培养基) Glucose consumed (g glucose/10ml culture medium)	氮的净增量 (毫克氮/10毫升培养基) N net increased (mgN/10 ml culture medium)	固氮率 (毫克氮/克葡萄糖) Nitrogen fixation activity (mg N/g glucose)
<i>Az. chroococcum</i> No. 12	0.037	0.264	7.135
<i>Az. chroococcum</i> No. 12 + <i>Cl. pasteurianum</i>	0.112	1.732	15.464
<i>Az. chroococcum</i> No. 16	0.090	0.845	9.398
<i>Az. chroococcum</i> No. 16 + <i>Cl. pasteurianum</i>	0.105	1.170	11.142
<i>Az. chroococcum</i> No. 21	0.022	0.074	3.364
<i>Az. chroococcum</i> No. 21 + <i>Cl. pasteurianum</i>	0.104	1.040	10.000
<i>Az. chroococcum</i> No. 22	0.017	0.105	6.176
<i>Az. Chroococcum</i> No. 22 + <i>Cl. pasteurianum</i>	0.111	0.892	8.036
<i>Az. chroococcum</i> No. 15	0.018	0.126	7.000
<i>Az. chroococcum</i> No. 15 + <i>Cl. pasteurianum</i>	0.108	0.983	9.102
<i>Az. chroococcum</i> No. 4	0.015	0.115	7.667
<i>Az. chroococcum</i> No. 4 + <i>Cl. pasteurium</i>	0.116	1.236	10.655
<i>Az. chroococcum</i> No. 19	0.077	0.625	8.117
<i>Az. chroococcum</i> No. 19 + <i>Cl. pasteurianum</i>	0.113	1.227	10.858
<i>Az. chroococcum</i> No. 9	0.080	0.697	8.713
<i>Az. chroococcum</i> No. 9 + <i>Cl. pasteurianum</i>	0.116	1.282	11.052

idium pasteurianum, *Clastridium butyricum*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium madisonii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium lactophilum*, *Clostridium*

表 6 巴氏芽孢梭菌与放线菌混合培养的固氮活性

Table 6 Nitrogen fixation activity of mixed culture of *Clostridium pasteurianum* with some species of *Actinomyces*

试验处理 Experimental treatment	葡萄糖耗用量 (克葡萄糖/10毫升培养基) Glucose consumed (g glucose/10ml culture medium)	氮的净增量 (毫克氮/10毫升培养基) N net increased (mgN/10ml culture medium)	固氮率 (毫克氮/克葡萄糖) nitrogen fixation activity (mg N/g glucose)
巴氏芽孢梭菌+红淡紫灰放线菌 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Act. rubrolavendulae</i>	0.115	0.365	3.174
巴氏芽孢梭菌+灰变异放线菌 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Act. griseovariabilis</i>	0.115	0.401	3.487
巴氏芽孢梭菌+生二孢放线菌 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Act. ambofaciens</i>	0.115	0.252	2.191
巴氏芽孢梭菌+浅灰黄放线菌 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Act. flaveolus</i>	0.115	0.225	1.957
巴氏芽孢梭菌+弗氏放线菌 No. 117 <i>Cl. pasteurium</i> + <i>Act. fradiae</i> No. 117	0.115	0.878	7.635
巴氏芽孢梭菌+弗氏放线菌 No. 57 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Act. fradiae</i> No. 37	0.115	0.429	3.730

表 7 巴氏芽孢梭菌与真菌混合培养的固氮活性

Table 7 Nitrogen fixation activity of mixed culture of *Clostridium pasteurianum* with some strains of fungi

试验处理 Experimental treatment	葡萄糖耗用量 (克葡萄糖/10毫升培养基) Glucose consumed (g glucose/10ml culture medium)	氮的净增量 (毫克氮/10毫升培养基) N net increased (mg N/10ml culture medium)	固氮率 (毫克氮/克葡萄糖) Nitrogen fixation activity (mg N/g glucose)
巴氏芽孢梭菌+青霉菌 No. 36 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Penicillium</i> sp. No. 36	0.115	0.428	3.722
巴氏芽孢梭菌+青霉菌 No. 21 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Penicillium</i> sp. No. 21	0.115	0.434	3.774
巴氏芽孢梭菌+青霉菌 No. 24 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Penicillium</i> sp. No. 24	0.115	0.444	3.861
巴氏芽孢梭菌+青霉菌 No. 5 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Penicillium</i> sp. No. 5	0.115	0.476	4.139
巴氏芽孢梭菌+青霉菌 No. 34 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Penicillium</i> sp. No. 34	0.115	0.461	4.009
巴氏芽孢梭菌+毛束霉种 <i>Cl. pasteurium</i> + <i>Trichurus</i> sp.	0.115	0.414	3.600
巴氏芽孢梭菌+漆斑菌种 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Myrothecium</i> sp.	0.115	0.332	2.887

表 8 巴氏芽孢梭菌与无芽孢细菌混合培养的固氮活性

Table 8 Nitrogen fixation activity of mixed culture of *Clostridium pasteurianum* with some strains of non-spore bacteria

试验处理 Experimental treatment	葡萄糖耗用量 (克葡萄糖/10毫升培养基) Glucose consumed (g glucose/10ml culture medium)	氮的净增量 (毫克氮/10毫升培养基) N net increased (mg N/10ml culture medium)	固氮率 (毫克氮/克葡萄糖) Nitrogen fixation activity (mg N/g glucose)
巴氏芽孢梭菌+无芽孢细菌 No. F1 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacterium</i> sp. No. F1	0.115	0.391	3.400
巴氏芽孢梭菌+无芽孢细菌 No. F2 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacterium</i> sp. No. F2	0.115	0.184	1.600
巴氏芽孢梭菌+无芽孢细菌 No. P2 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacterium</i> sp. No. P2	0.115	0.382	3.322
巴氏芽孢梭菌+无芽孢细菌 No. G3 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacterium</i> sp. G3	0.115	0.353	3.070
巴氏芽孢梭菌+无芽孢细菌 No. G4 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacterium</i> sp. G4	0.115	0.325	2.826

表 9 巴氏芽孢梭菌与芽孢杆菌混合培养的固氮活性

Table 9 Nitrogen fixation activity of mixed culture of *Clostridium pasteurianum* with some strains of *Bacillus*

试验处理 Experimental treatment	葡萄糖耗用量 (克葡萄糖/10毫升培养基) Glucose consumed (g glucose/10ml culture medium)	氮的净增量 (毫克氮/10毫升培养基) N net increased (mg N/10ml culture medium)	固氮率 (毫克氮/克葡萄糖) Nitrogen fixation activity (mg N/g glucose)
巴氏梭菌+芽孢杆菌 No. 3001 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacillus</i> sp. No. 3001	0.115	0.334	2.904
巴氏梭菌+芽孢杆菌 No. 4008 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacillus</i> sp. No. 4008	0.115	0.462	4.017
巴氏梭菌+芽孢杆菌 No. 5005 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacillus</i> sp. No. 5005	0.115	0.340	2.957
巴氏梭菌+芽孢杆菌 No. 8019 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacillus</i> sp. No. 8019	0.115	1.236	10.748
巴氏梭菌+芽孢杆菌 No. 6008 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacillus</i> sp. No. 6008	0.115	0.355	3.087
巴氏梭菌+芽孢杆菌 No. 7001 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacillus</i> sp. No. 7001	0.115	0.458	3.983
巴氏梭菌+芽孢杆菌 7007 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacillus</i> sp. No. 7007	0.115	0.424	3.687

klugveri、*Clostridium tetanomorphum* 的形态生理特征相比较,除对甘油的利用有差异可能系由于生长发育阶段和培养条件差异所引起 (Емиев, 1962) 之外,和巴氏芽孢梭菌的形态生理特征基本相同,应为巴氏芽孢梭菌 (*Clostridium pasteurianum* Winogradsky)。

5. 巴氏芽孢梭菌及其与好气菌混合培养的固氮活性

巴氏芽孢梭菌的固氮活性及其与圆褐固氮菌、放线菌、真菌、无芽孢细菌和芽孢杆菌的一些菌株混合培养的固氮活性的试验结果列于表 4—9。

表 4 的数据表明,所分离得到的巴氏芽孢梭菌不同菌株的固氮率(毫克氮/克葡萄糖)为 3.108—3.672,但巴氏芽孢梭菌与其他好气菌混合培养,则固氮率一般均有较大幅度的提高。有的混合培养的组合与巴氏芽孢梭菌单独培养相比较,差异达到显著和极为显著的水平(表 10)。如巴氏芽孢梭菌与圆褐固氮菌不同菌株混合培养,其固氮率(毫克氮/克葡萄糖)最高达 15.464,平均为 10.789;圆褐固氮菌单独培养,其固氮率最高为 9.389,平均为 7.195。巴氏芽孢梭菌单独培养,其固氮率最高仅为 3.672,平均为 3.352。巴氏芽孢梭菌与圆褐固氮菌混合培养的固氮率,与巴氏芽孢梭菌或圆褐固氮菌单独培养的固氮率比较,其差异均达到显著性水平。巴氏芽孢梭菌与真菌菌株混合培养,除 1 株菌株即漆斑菌种外,均比巴氏芽孢梭菌单独培养为高,其差异也达到显著性水平。巴氏芽孢梭菌与放线菌株混合培养,其固氮率与巴氏梭菌单独培养相比,有高有低,t-检验无显著性差异。但有的放线菌菌株如弗氏放线菌 (*Actinomyces fradiae*) No. 117 与巴氏芽孢梭菌混合培养,其固氮率明显提高。巴氏芽孢梭菌与芽孢杆菌混合培养情况与放线菌类似,虽 t-检验无显著性差异,但个别菌株如芽孢杆菌种 (*Bacillus* sp.) No. 8019 与巴氏梭菌混合培养其

表 10 巴氏芽孢梭菌及其与好气菌混合培养固氮率差异的 t-检验

Table 10 t-test of the difference of nitrogen fixation activity between the culture of *Clostridium pasteurianum* associated with some other aerobic microorganisms and the culture of *Clostridium pasteurianum*

试验处理 Experimental treatment	自由度 Degree of freedom	t 值 t-value	概 率 Probability	显著性水平 Significance level
巴氏芽孢梭菌+圆褐固氮菌与巴氏芽孢梭菌比较 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Az. Chroococcum</i> compare with <i>Cl. pasteurianum</i>	n' = 15	10.253	P<0.001	极为显著 Very significant
巴氏芽孢梭菌+放线菌与巴氏芽孢梭菌比较 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Actinomyces</i> compare with <i>Cl. pasteurianum</i>	n' = 13	0.507	P>0.05	无显著意义 No significant meaning
巴氏芽孢梭菌+真菌与巴氏芽孢梭菌比较 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Fungi</i> compare with <i>Cl. pasteurianum</i>	n' = 14	2.217	P<0.05	显著 Significant
巴氏芽孢梭菌+无芽孢细菌与巴氏芽孢梭菌比较 <i>Cl. pasteurianum</i> +non-spore bacteria compare with <i>Cl. pasteurianum</i>	n' = 12	1.951	P>0.05	无显著意义 No significant meaning
巴氏芽孢梭菌+芽孢杆菌与巴氏芽孢梭菌比较 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacillus</i> compare with <i>Cl. pasteurianum</i>	n' = 14	1.219	P>0.05	无显著意义 No significant meaning
巴氏芽孢梭菌+圆褐固氮菌与圆褐固氮菌比较 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Az. chroococcum</i> compare with <i>Az. chroococcum</i>	n' = 7	4.103	P<0.01	极为显著 Very significant

固氮率竟高达 10.748 毫克氮/克葡萄糖,比巴氏梭菌单独培养高 2.2 倍。

为了模拟巴氏芽孢梭菌与好气菌在土壤中的固氮作用,进行了土壤接种试验,其结果列于表 10。将土壤接种试验的数据与表 4—9 的数据进行比较后可以看出,在无菌土壤中混合培养的固氮率一般都比在液体培养基中混合培养的固氮率高。从氮的净增量来看,除圆褐固氮菌 No. 12 外,巴氏芽孢梭菌与弗氏放线菌、青霉菌、芽孢杆菌在无菌土壤中混合培养氮的净增量都明显高于相同菌株在液体培养基中混合培养的氮的净增量。从固氮率看,除巴氏芽孢梭菌与芽孢杆菌 No. 8019 在土壤中混合培养与在液体培养基中的固氮率相仿之外,巴氏芽孢梭菌与弗氏放线菌、青霉菌土壤混合培养的固氮率也显著高于液体培养基中混合培养的固氮率。

表 11 无菌土壤混合接种巴氏芽孢梭菌和好气菌的固氮活性

Table 11 Nitrogen fixation activity of sterilized soil inoculated with cultures of *Cl. pasteurianum* and aerobic microbes

试验处理 Experimental treatment	葡萄糖耗用量 (克葡萄糖/20 克干土) Glucose consumed (g glucose/20g dry soil)	氮的净增量 (毫克氮/20 克干土) Net N increased (mg N/20g dry soil)	固氮率 (毫克氮/克葡萄糖) Nitrogen fixation activity (mg N/g glucose)
巴氏芽孢梭菌+圆褐固氮菌 No. 12 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Az. chroococcum</i> No. 12	0.204	1.460	7.157
巴氏芽孢梭菌+弗氏放线菌 No. 57 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Act. fradiae</i> No. 57	0.204	2.091	10.250
巴氏芽孢梭菌+青霉菌 No. 36 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Penicillium</i> sp.No. 36	0.204	1.168	5.725
巴氏芽孢梭菌+芽孢杆菌 No. 8017 <i>Cl. pasteurianum</i> + <i>Bacillus</i> sp. No. 8017	0.204	1.971	9.662

Емцев (1960) 曾报道 *Bacterium closteriodes* 对巴氏芽孢梭菌的固氮有刺激作用。Бабуева (1977) 和 Кононков (1979) 分别报道某些油脂酵母 (*Lipomyces*) 和细菌以及某些真菌和细菌混合培养有固氮作用,虽然其固氮量不高,但表明土壤中的固氮作用,是由某些微生物类群联合进行的。作者的工作表明混合培养优于单独培养。从细菌肥料的角度来看,从土壤中分离固氮率高的巴氏芽孢梭菌优良菌株,与其他好气菌混合培养,筛选出固氮率高而又适于土壤接种的高效的巴氏芽孢梭菌与好气菌混合培养复合体,有可能成为一种高效的新型细菌肥料。

三、小 结

(1) 对黄土高原子午岭林区和青藏高原北海高寒草甸土壤中嫌气性固氮菌的数量及巴氏芽孢梭菌、巴氏芽孢梭菌与好气性自生固氮菌或其他好气性微生物混合培养的固氮活性等进行了研究。研究结果表明,嫌气性固氮菌的数量均以表层土壤中为最高,并随土

壤深度的加深而减少。从嫌气性固氮菌在不同地区土壤中的分布来看,子午岭森林灰褐土中的菌数明显高于原始黑垆土中的菌数;海北高山灌丛草甸土中的菌数显著高于高山草甸土中的菌数;海北高寒草甸土中的菌数又显著高于子午岭林区土壤中的菌数。上述两个不同地区和不同类型土壤中菌数的差异和土壤有机质含量不同有关。

(2) 用作者修改的无氮培养基,即在维诺格拉德斯基无氮培养基中添加酵母浸膏(按含氮量计算,100毫升培养基中添加1毫克)、胡敏酸(100毫升培养基中添加0.2毫克)和硫化钠($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$,100毫升培养基中添加2毫克),成功地从瘠薄的原始黑垆土中分离到嫌气性固氮菌纯种。按贝捷氏分类系统,鉴定为巴氏芽孢梭菌。

(3) 分得的巴氏芽孢梭菌的不同菌株,嫌气培养后经测定其固氮率为3.115—3.672毫克氮/克葡萄糖。巴氏芽孢梭菌与圆褐固氮菌、放线菌、真菌、无芽孢细菌和芽孢杆菌在好气条件下混合培养,均能固定大气氮素。某些好气菌与巴氏芽孢梭菌混合培养,能使巴氏芽孢梭菌的固氮率提高1.3—2.2倍;圆褐固氮菌与巴氏芽孢梭菌混合培养,比巴氏梭菌单独培养的固氮率提高1.4—3.6倍,比圆褐固氮菌单独培养的固氮率提高0.3—2倍。

(4) 无菌土壤中混合接种巴氏芽孢梭菌与好气性微生物,其固氮率有的较在液体培养基中混合接种同样菌株的固氮率更高。

参 考 文 献

- 中国科学院林业土壤研究所微生物室 1960 土壤微生物分析方法手册,科学出版社。
克拉西里尼柯夫,Н. А. 1958 土壤微生物和高等植物,科学出版社。
维诺格拉德斯基,С. Н. 1849 土壤微生物学·问题和方法,科学出版社。
Augier, J. 1957 Biological fixation of atmospheric nitrogen and the enumeration of nitrogen-fixing *Clostridia* in the soil. *Ann. Inst. Pasteur.* 92: 817—824.
Breed, R. S., E. G. D. Murray and N. R. Smith, 1957 *Bergey's manual of determinative bacteriology*. seventh edition, London Bailliere Tindall and Cox, Ltd.
Mishustin, E. N., V. T. Emtsev, 1973 Anaerobic nitrogen-fixing bacteria in USSR soils. *Soil Biol. Biochem.*, 5(1): 97—107.
Parker, C. A. 1954 Non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria in soil I. Studies on *Clostridium butyricum*. *Australian J. Agric. Rec.*, 5(1): 90—97.
Ross, D. T. 1958 Biological studies of some tussock-grassland soil. V. Nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria. *N. Z. Agric. Res.*, 1: 958.
Бабьева, И. П. X. Моавад и А. И. Марценко 1977 Азотфиксация в совместных культурах *Lipomyces* с бактериями. *Микробиология*, 46 (2): 270—272.
Возняковская, Ю. М. и А. С. Рыжова 1954 Докл. ВАСХНИЛ., Вып. 6. Стр. 30.
Емцев, В. Т. 1960 *Микробиология*, 29: 529.
Емцев, В. Т. 1962 Об источниках углеродного питания для азотофиксирующих микроорганизмов рода *Clostridium* *Микробиология*, 31 (1): 18—23.
Колонков, Ф. П., М. М. Умаров и Т. Т. Мирцинк 1979 Азотфиксирующие ассоциации грибов с бактериями, *Микробиология*, 48 (4): 734—737.
Рыбкына, Н. А. 1960 *Вестн. с.-х. Наука*, 7: 737.
Работнова, И. Л. 1957 О некоторых особенностях физиологии *Clostridium Pasteurianum* *Микробиология*, 21 (4): 429—437.
Рыбалкина, А. В. и Е. В. Коноченко 1957 Микрофлора почв европейской части СССР, Стр. 104.

STUDIES ON THE NUMBER AND ACTIVITY OF ANAEROBIC
NITROGEN-FIXING BACTERIA IN SOIL OF ZIWULING
FOREST REGION OF LOESS PLATEAU AND
HAIBEI ALPINE MEADOW OF QINGHAI-
XIZANG PLATEAU

Li Jiazao

(Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica)

The number and nitrogen fixation activity of anaerobic nitrogen-fixing bacteria and associated nitrogen fixation of anaerobic nitrogen-fixing bacteria with *Azotobacter* or other aerobic microorganisms were investigated in soil of Ziwuling forest region of Loess Plateau and Haibei alpine meadow of Qinghai-Xizang Plateau.

Experimental results showed that the number of anaerobic nitrogen-fixing bacteria was highest in the surface horizon of soil in all experimental treatments and decreased gradually in accord with the deepening of soil horizon depth. In Ziwuling region, the number of anaerobic nitrogen-fixing bacteria was obviously higher in grey brown forest soil of forest land than that in primitive dark loessial soil of grass land. In Haibei alpine meadow, the number of anaerobic nitrogen-fixing bacteria in alpine scrubby meadow soil was significantly higher than that in alpine meadow soil. The discrepancy of the number of anaerobic nitrogen-fixing bacteria in various sampling locations and different soil types was correlated with the soil organic matter content.

The land deserted after felling down the forest result in the decrease of anaerobic nitrogen-fixing bacteria, on the contrary, it increased drastically when the slash was cultivated with farm crops. Moreover, degradation of artificial cultivated grass land also resulted in reduction of anaerobic nitrogenfixing bacteria.

By the use of Winogradsky's nitrogen-free culture medium modified by author (1.0 mg yeast extract according to N content, 0.2 mg humic acid, and 2 mg $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ were added in 100 ml culture medium), pure strains of anaerobic nitrogen-fixing bacteria were successfully isolated from primitive dark loessial soil. From this very poor soil, anaerobic nitrogen-fixing bacteria could not be isolated by ordinary Winogradsk's nitrogen-free culture medium. According to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, anaerobic nitrogen-fixing bacteria isolated belong to *Clostridium pasteurianum* Winogradsky.

The nitrogen fixation activities of pure cultures of different strains of *Clostridium pasteurianum* were 3.115—3.672 mg N/g glucose. *Clostridium pasteurianum* might grow and fix atmospheric nitrogen in aerobic culture condition when associated with other aerobic microbes as azotobacters, actinomyces, fungi, non-spore bacteria and bacillus. Some strains of actinomyces and bacillus increased the nitrogen fixation activity of *Clostridium pasteurianum* by 130—220% as that of pure culture of *Clostridium pasteurianum*. *Clostridium pasteurianum* cultured with some strains of azotobacter also significantly enhanced the nitrogen fixation activity. It was approximately 1.3—3 times and 2.4—4.6 times as compared with that of pure culture of azotobacter and *Clostridium*

pasteurium respectively.

In order to simulate the nitrogen fixation in soil, *Clostridium pasteurianum* and other aerobic microorganisms were inoculated in sterilized soil and incubated at 28°C for 30 days. Experimental results indicated that the nitrogen fixation activities of some combinations of *Clostridium pasteurianum* and aerobic microorganisms were further higher than that of the same microbial combinations cultured in liquid medium.

HABIB ALPINE MEADOW OF QINGHAI
XIZANG PLATEAU

In 1955

(Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences)

The number and nitrogen fixation activity of aerobic nitrogen-fixing bacteria and associated nitrogen fixation of anaerobic nitrogen-fixing bacteria with *Clostridium pasteurianum* were investigated in soil of Xizang Plateau region. The results showed that the number of aerobic nitrogen-fixing bacteria was highest in the surface horizon of soil in all experimental treatments and decreased gradually in soil with the deepening of soil horizon depth. In Xizang region, the number of aerobic nitrogen-fixing bacteria was obviously higher in grass-covered forest soil of forest land than that in primary forest soil of grass land. In the alpine meadow, the number of aerobic nitrogen-fixing bacteria in alpine meadow soil was significantly higher than that in alpine meadow soil. The differences of the number of aerobic nitrogen-fixing bacteria in various sampling locations and different soil types was correlated with the soil organic matter content.

The land degraded after logging shows the lowest level of the decrease of aerobic nitrogen-fixing bacteria on the contrary. It increased gradually when the land was cultivated with farm crops. However, degradation of aerobic nitrogen-fixing bacteria also resulted in reduction of anaerobic nitrogen-fixing bacteria.

The use of *Wickerhamia*'s nitrogen-free culture medium modified by author (1:10) and yeast extract according to 2% content (0.2 ml yeast extract and 2 mg MgSO₄·7H₂O) were added in liquid culture medium (pure strains of aerobic nitrogen-fixing bacteria were successfully isolated from primary forest land soil). From this very poor soil, aerobic nitrogen-fixing bacteria could not be isolated by ordinary Wickerham's nitrogen-free culture medium. According to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, aerobic nitrogen-fixing bacteria isolated belong to *Clostridium pasteurianum* Wickerham.

The nitrogen fixation activities of pure cultures of different strains of *Clostridium pasteurianum* were 115-462 mg N₂/g soil/30 days. *Clostridium pasteurianum* was very active in growth and fix atmospheric nitrogen in aerobic culture condition when associated with other aerobic microbes as acetobacteria, actinomycetes, fungi, nonspore bacteria and bacillus. Some strains of actinomycetes and bacillus increased the nitrogen fixation activity of *Clostridium pasteurianum* by 150-200% as that of pure culture of *Clostridium pasteurianum*. *Clostridium pasteurianum* combined with some strains of actinomycetes and bacillus greatly enhanced the nitrogen fixation activity. It was approximately 1.5-2 times and 2.1-4.6 times as compared with that of pure culture of acetobacteria and *Clostridium*