

化感物质对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 在厌氧条件下的生长及反硝化作用的影响

马瑞霞, 冯 怡, 李 萱

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要: 研究由秸秆腐解产生的化感物质: 阿魏酸(t-FA)、对羟基苯甲酸(p-HA)和苯甲酸(BA)在不同浓度下对厌氧培养的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的生长及其反硝化活性的影响。结果表明, 3种浓度的阿魏酸(5.15、2.58、0.26mmol/L)均表现出对枯草芽孢杆菌的生长有抑制作用。对羟基苯甲酸(0.36、3.62、7.24mmol/L)对生长影响不明显。8.19mmol/L和4.09mmol/L的苯甲酸有一定的刺激作用, 而0.41mmol/L的苯甲酸与对照无差别。实验表明枯草芽孢杆菌不仅能转化 NO_3^- 生成 NO_2^- , 而且还能转化 NO_2^- 生成 N_2O 。3种化感物质对 NO_3^- 的转化均表现抑制作用, 其抑制作用强弱依次为阿魏酸>对羟基苯甲酸>苯甲酸。高浓度的抑制作用强于低浓度。阿魏酸在5.15mmol/L和2.58mmol/L浓度下, 其抑制作用的差异显著性分别为 $P<0.01$, $P<0.05$ 。 NO_2^- 的生成与 NO_3^- 的减少相互有关联, 第3天测定时, 各处理中 NO_3^- 急剧减少, 而 NO_2^- 急剧增加。在阿魏酸、苯甲酸处理中的 NO_2^- 积累高峰在第3天、第4天, 然后下降。而在对羟基苯甲酸的处理中 NO_2^- 的积累一直上升, 在第6天的观察中仍未出现下降趋势。3种化感物质均能抑制 N_2O 的生成, 至于在田间的抑制效果尚需进一步试验。

关键词: 化感物质; 枯草芽孢杆菌; 硝化作用

Effects of allelochemicals on growth of *Bacillus subtilis* and its denitrification under anaerobic condition

MA Rui-Xia, FENG Yi, LI Xuan (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085 China)

Abstract: The effects of allelochemicals, such as trans-ferulic acid (t-FA), phydroxbenzoic acid (p-HA) and benzoic acid (BA), isolated from decomposed wheat straw on the growth of *Bacillus subtilis* and its denitrification were investigated. The growth and denitrification of *Bacillus subtilis* was significantly inhibited by t-FA at the concentrations of 5.149mmol/L, 2.575mmol/L and 0.257mmol/L respectively. However, the effects of p-HA at concentrations of 0.362, 3.620, 7.240mmol/L on growth of *Bacillus subtilis* were not observed. The growth of *B. subtilis* was stimulated by BA at concentrations of 4.09 and 8.189mmol/L. The denitrification of *B. subtilis* was inhibited by both of p-HA and BA. The sequence of their inhibition was t-FA>p-HA>BA. The inhibition of allelochemicals at a higher concentration was stronger than that at the lower one. Emission of N_2O was inhibited by the above three allelochemicals. The effects of inhibition of allelochemicals in the field remain to be investigated.

Key words: allelochemicals; denitrification; *Bacillus subtilis*; growth

文章编号: 1000-0933(2000)03-0452-06 中图分类号: Q945, X171 文献标识码: A

“秸秆还田”是植物营养元素循环利用的有效措施, 也是保证我国农业的持续稳定发展的重要途径^[1]。秸秆腐解过程中会产生大量有益的和有害的化感物质^[2]。在土壤中局部有机物周围, 有时可产生高浓度游离态酚酸, 对植物有生理毒害^[3]。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39790100)和中国科学院资助项目(KZ952-SI-230)

收稿日期: 1997-12-10; 修订日期: 1998-10-06

作者简介: 马瑞霞(1968-), 女, 副研究员。

作物生长与多种营养元素有关,其中至关重要的是氮素营养^[4]。而土壤中氮素损失的途径与微生物的硝化作用和反硝化作用密切相关。反硝化作用是造成氮素损失的基本原因^[5]。它所造成的损失估计占 10%~30%^[6]。

以往人们对土壤中反硝化作用进行了大量研究,但对秸秆腐解产生的化感物质对枯草芽孢杆菌影响的研究目前尚无报道。Jaap Van Rijin, 等研究了乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、硫酸盐、乳酸、在不同 pH 等条件下对 *Pseudomonas stutzeri*, *Paracoccus denitrificans*, *Desulfovibrio desulfuricans* 的反硝化作用的影响^[7~9]。李振高, 李良谟等研究了不同基因型小麦根系分泌物、重金属离子、西吡等对细菌、硝化和反硝化活性的影响^[10~12]。本文着重研究化感物质对枯草芽孢杆菌的生长及反硝化活性的影响。它不仅在理论上充实了反硝化作用中化学生态学的内容,而且在可持续发展农业中减少氮肥的经济损失及环境污染具有重要的实践意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),由中国科学院微生物研究所提供。

实验的化感物质在小麦秸秆腐解产生的化感物质中,选择出阿魏酸、对羟基苯甲酸、苯甲酸。

化学试剂为 N-1 萘乙二胺盐酸盐,对氨基苯磺酸,铝钾矾,亚硝酸钠,均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 首先培养细菌种子液,细菌种子液成分为硝酸盐培养基^[13](蛋白胨 1g, 硝酸钠 0.1g, 蒸馏水 100ml, pH6~7),在 500ml 三角瓶中加入 300ml 硝酸盐培养液, pH7。在无菌间内每瓶接入斜面菌种 4~5 环,接种后在 30℃ 恒温水浴摇床上振荡培养 18h。然后转入试管中(1.8cm×20cm),每管接种 4ml 细菌种子液。在装细菌种子液之前,每试管分别装入 12ml 灭过菌的硝酸盐培养液和 4ml 不同浓度的化感物质(阿魏酸 3 个浓度:5.15、2.58、0.28mmol/L, 对羟基苯甲酸 3 个浓度:7.24、3.62、9.36mmol/L, 苯甲酸 3 个浓度:8.19、4.09、0.41mmol/L),以另加入 4ml 蒸馏水的处理为对照。每试管用橡皮塞子塞紧,然后将每管的空间冲入高纯 N₂ 气,同时将管内空气排出。每处理重复 3 管。在 30℃ 恒温下连续培养至第 3 天时,开始逐日取样测定,每次每处理分别测定枯草芽孢杆菌的生长量, NO₃⁻ 的剩余量, NO₂⁻ 的生成量及 N₂O 的释放量。

1.2.2 生长量测定 在 721 分光光度计上,460nm 处以空白灭菌培养液为参照,以菌液比色得到 OD 值表示细菌密度,间接代表生长量; NO₃⁻ 的测定 采用酚二磺酸比色法^[14]; NO₂⁻ 的测定 用 N-1 萘乙二胺比色法^[14]; N₂O 的测定 用气相色谱法。气相色谱为 SP-3410 型, ECD 检测器, Ni638mic, U. S. A. Varian 公司提供, Porapak 色谱柱, 标气为 U. S. A. Mathan 0.98mg/L。

反硝化强度 % = [(原加入的 NO₃⁻ 量 - 培养后 NO₃⁻ 的剩余量) / 原加入的 NO₃⁻ 量] × 100

2 实验结果

2.1 阿魏酸对枯草芽孢杆菌厌氧条件下的生长及其反硝化强度的影响

阿魏酸对枯草芽孢杆菌的厌氧生长有一定的抑制作用(见图 1)。在不同浓度阿魏酸的处理中枯草芽孢杆菌生长缓慢,而在无阿魏酸的对照中,枯草芽孢杆菌的生长量由第 4 天起急剧上升。第 6 天菌密度的 OD 值为 0.185, 比 0.26mmol/L、2.58mmol/L、和 5.15mmol/L 阿魏酸处理的 OD 值分别高出 147%、133%、109%。

不同浓度的阿魏酸对枯草芽孢杆菌的反硝化作用均有抑制(图 2)。在加入等量硝酸盐时,第 3 天的样品中,对照的反硝化强度为 95.7%, 加入 0.26mmol/L 阿魏酸的反硝化强度与对照无甚差别,而加入 5.15mmol/L、2.58mmol/L 阿魏酸的样品反硝化强度分别为 58.6%、71.4%。与对照相比反硝化强度分别减少 37.1% 和 24.3%。在第 4、5、6 天的样品中均表现出阿魏酸浓度越高, NO₃⁻ 的剩余量越多, 加入的阿魏酸规律为: 5.15mmol/L > 2.58mmol/L > 0.26mmol/L > 对照, 表明阿魏酸对枯草芽孢杆菌反硝化作用的抑制随其浓度增加而增大。抑制作用的差异显著性 5.15mmol/L、2.58mmol/L 分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 。

图 3 显示, 阿魏酸浓度为 5.15mmol/L 的处理时, 对枯草芽孢杆菌反硝化过程中 NO₂⁻ 的生成量比对照, 0.26mmol/L 和 2.58mmol/L 等处理的明显低。第 4 天时, 5.15mmol/L 处理中 NO₂⁻ 生成量为

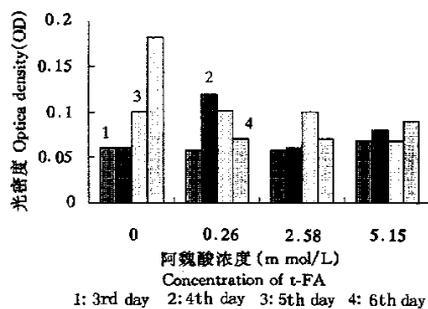


图1 阿魏酸对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig. 1 Influence of t-FA on growth of *Bacillus subtilis*

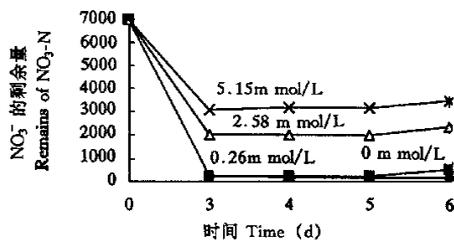


图2 阿魏酸对 NO_3^- 转化的影响

Fig. 2 Influence of t-FA on variety of NO_3^-

2.2 对羟基苯甲酸对枯草芽孢杆菌厌氧条件下的生长及其反硝化活性的影响。

从图4中看出,对羟基苯甲酸在0.36mmol/L浓度下,对枯草芽孢杆菌的厌氧生长有一定的抑制,而在3.62mmol/L浓度下则有一定的促进作用,在第4、5天的生长量均比对照高。在7.24mmol/L浓度下,第3天菌量最多,但在第4、5天时菌量下降,第6天又上升,对枯草芽孢杆菌的厌氧生长的影响无规律性,仍需进一步实验。

225.2 $\mu\text{mol/L}$, 而对照 0.26mmol/L 和 2.58mmol/L 处理中的生成量分别为 432.3、443.7、和 450.0 $\mu\text{mol/L}$, 这可能与 5.15mmol/L 中 NO_3^- 剩余量多有关。但在其它浓度中, NO_2^- 生成量与对照无明显差别,这可能由于阿魏酸在 2.58 和 0.26mmol/L 情况下对亚硝酸还原酶有一定抑制作用,使 NO_2^- 保留时间较长。

2.2 对羟基苯甲酸对枯草芽孢杆菌厌氧条件下的生长及其反硝化活性的影响。

从图4中看出,对羟基苯甲酸在0.36mmol/L浓度下,对枯草芽孢杆菌的厌氧生长有一定的抑制,而在3.62mmol/L浓度下则有一定的促进作用,在第4、5天的生长量均比对照高。在7.24mmol/L浓度下,第3天菌量最多,但在第4、5天时菌量下降,第6天又上升,对枯草芽孢杆菌的厌氧生长的影响无规律性,仍需进一步实验。

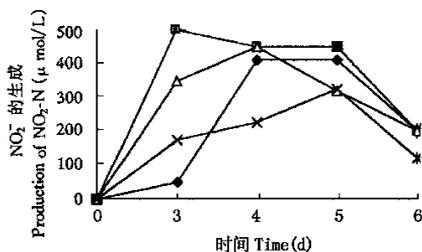


图3 阿魏酸对 NO_2^- 生成的影响

Fig. 3 Influence of t-FA on production of NO_2^-

◆ 0 mmol/L ■ 0.26 mmol/L △ 2.58 mmol/L × 5.15 mmol/L

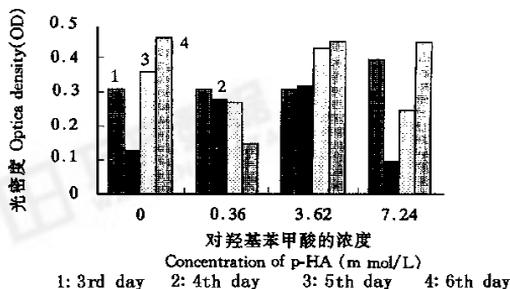


图4 对羟基苯甲酸对枯草芽孢杆菌生长的影响

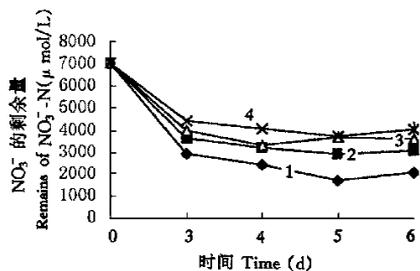
Fig. 4 Influence of p-HA on growth of *Bacillus subtilis*

从图5看出,第3天时对照的反硝化强度为58.6%,低浓度0.36mmol/L对羟基苯甲酸的反硝化强度为57.1%,与对照相近,几乎无抑制作用,浓度为3.62mmol/L和7.24mmol/L的反硝化强度分别为42.8%和32.9%,表现出一定的抑制作用。以上3种浓度,由低到高,反硝化强度与对照相比,分别减少1.5%、15.8%和25.7%。

从图6看出,第3天和第4天的测定结果显示了化感物质处理中 NO_2^- 的生成量与对照相近,第5天 NO_2^- 的生成量明显低于对照,第6天略少于对照。

2.3 苯甲酸对枯草芽孢杆菌厌氧条件下的生长及其反硝化强度的影响

从图7看,0.09mmol/L的苯甲酸对枯草芽孢杆菌的厌氧生长有促进作用。培养第3天时,菌密度OD值为0.31,而对照只有0.047,是对照的6.6倍;4.09mmol/L的苯甲酸也表现出一定的促进作用,第3

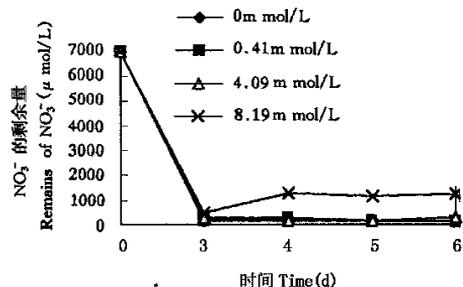
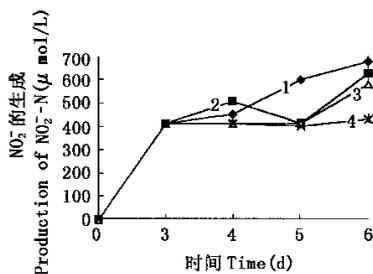
图5 对羟基苯甲酸对 NO_3^- 转化的影响Fig. 5 Influence of p-HA on variety of NO_3^-

1. 0mmol/L; 2. 0.36mmol/L; 3. 3.62mmol/L; 4. 7.24mmol/L

天的菌密度OD值是对照的1.2倍,第7天的菌密度OD值是对照的2.8倍。0.41mmol/L苯甲酸的处理中的生长量与对照无甚差别。

从图8看出,加入苯甲酸4天后,各次测定结果均显示其对枯草芽孢杆菌反硝化强度有明显的抑制作用,尤其是高浓度(8.19mmol/L)者抑制效果更明显,第3~6天对照中的反硝化强度为100%,而在8.19mmol/L处理中,反硝化强度为89%~72%。苯甲酸对 NO_3^- 转化的抑制作用随浓度的增大而增大。

从图9看出,在供试3种浓度的苯甲酸处理中,高浓度(8.19mmol/L)的苯甲酸在第3天至第6天测定中, NO_2^- 生成量均比对照少,这与它的 NO_3^- 的剩余量比对照多有一定的关系。其它浓度的测定结果与对照差异不显著。

图8 苯甲酸对 NO_3^- 转变化的影响Fig. 8 Influence of BA on variety of NO_3^- 图6 对羟基苯甲酸对 NO_2^- 生成的影响Fig. 6 Influence of p-HA on production of NO_2^-

图例同图5 Legend see fig. 5

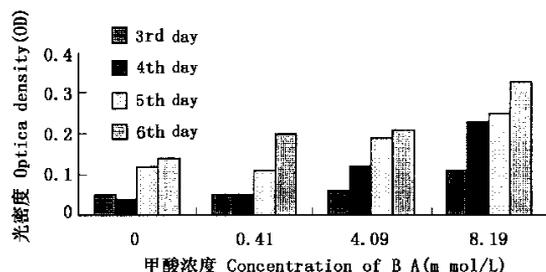
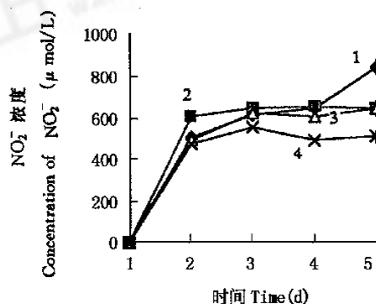


图7 苯甲酸对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig. 7 Influence of BA on growth of *Bacillus subtilis*图9 苯甲酸对 NO_2^- 生成的影响Fig. 9 Influence of BA on production of NO_2^-

1. 0mmol/L, 2. 0.41mmol/L, 3. 4.09mmol/L, 4. 8.19mmol/L

2.4 3种化感物质对生成 N_2O 的影响

结果如表1所示,加入化感物质后,在第2和第3天时影响不明显,第4天测定时,加入阿魏酸、对羟基苯甲酸、苯甲酸的各处理中,所生成的 N_2O 的量分别是对照的35%、18%、37%。说明3种化感物质均抑

制 N_2O 的释放。前期影响不明显可能与加入化感物质后 NO_3^- 与 NO_2^- 之比不同,而影响到 N_2O 的形成。

表 1 化感物质对 N_2O 生成量($\mu g/L$)的影响

Table 1 Influence of allelocamicals on production of N_2O

取样时间 Time (d)	阿魏酸 Ferulic acid	对羟基苯甲酸 P-hydroxybenzoic acid	苯甲酸 Benzoic acid	对照 Control
2	381.0	334.0	343.3	315.0
3	300.3	280.9	213.1	290.6
4	529.3	279.8	559.5	1527.3

* 阿魏酸、对羟基苯甲酸、苯甲酸的浓度分别为 2.58、3.62、4.09mmol/L. The concentration of t-FA, p-HA and BA were 2.58, 3.62 and 4.09mmol/L, respectively.

3 讨论

3.1 化感物质对枯草芽孢杆菌生长的影响

阿魏酸各种浓度均对枯草芽孢杆菌的生长有抑制作用,并随浓度增大而增强;对羟基苯甲酸影响的规律性不明显;而苯甲酸对枯草芽孢杆菌的生长有刺激作用,但对 NO_3^- 的转化不但不起刺激作用反而起抑制作用,浓度越大 NO_3^- 的转化越少,剩余量越多,这一结果可能是不同化感物质对枯草芽孢杆菌所分泌的硝酸还原酶抑制效果不同所致。也有一些报道如 Terry 等^[5]得出,反硝化速度与反硝化微生物量之间没有可信赖的联系。Gilbert 等的研究也表明,环境中富含碳素化合物时,使反硝化微生物的数量增加,但释放出的含氮气态化合物的量并不增加^[5],说明对反硝化作用并无刺激效果。

3.2 枯草芽孢杆菌具有的硝酸还原酶系统

在反硝化作用的过程中,氮氧化物还原的途径一般认为是: $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ ^[15,16],在参与该还原反应的细菌中,有些仅生成 N_2 ,有些产生 N_2O 和 N_2 的混合物,还有的细菌仅产生 N_2O ^[17~19]。在本实验的培养液中只接入枯草芽孢杆菌一种细菌,在产物中不仅分析出 NO_2^- ,而且有 N_2O 的产生,产生浓度也较高,说明枯草芽孢杆菌既有硝酸还原酶又有亚硝酸还原酶,它可将 NO_3^- 还原成 NO_2^- ,还可使 NO_2^- 进一步还原成 N_2O 。因气相色谱条件所限,未能测出 NO 和 N_2 。Kypakoba^[5]的研究也发现同一种微生物能进行多种反应过程,甚至是两种完全相反的过程。如大部分固氮菌,除了有固氮作用还有反硝化作用。

3.3 3种化感物质对 NO_3^- 的转化的抑制作用

在反硝化过程中的每一步都有相应的酶催化,对不同的酶抑制可造成反硝化过程中不同产物的积累^[20,21]。本实验结果看出,在阿魏酸处理中 NO_3^- 的剩余量多,可能因阿魏酸抑制了硝酸还原酶的活性而引起底物 NO_3^- 转化量的减少,对羟基苯甲酸也有一定的抑制作用,但效果低于阿魏酸,苯甲酸的抑制作用最低。上述3种化感物质对 NO_3^- 转化抑制的强弱顺序为阿魏酸>对羟基苯甲酸>苯甲酸。抑制效果与浓度有关,浓度高的大于浓度低的。在 NO_3^- 还原过程中 NO_3^- 作为电子受体,化感物质作为电子供体,3种化感物质所含电子及电子流不同,因而使它们作为电子供体的贡献不同,所以导致它们对 NO_3^- 还原的抑制程度不同^[7]。苯甲酸还表现出抑制的迟滞期(图8)。

3.4 N_2O 的释放

N_2O 的释放量在各处理的第2,3,4天中,占原加入 NO_3^- 的38.3%~76.6%,在不加化感物质的对照中,第4天时超过原加入 NO_3^- 的1倍多(209.0%),说明枯草芽孢杆菌在厌氧条件下,反硝化作用相当强,所造成的气态损失极其严重。在对照中大于原加入 NO_3^- 量的原因,可能是枯草芽孢杆菌将培养液中的蛋白胨转化为无机氮,进而转化成 N_2O 所致。Hirofumi shoun^[22]等称这种作用为共反硝化作用(Co-denitrification)。

N_2O 的释放是造成氮素气态损失的重要途径之一,因此抑制气态产物的生成,可减少反硝化过程造成的氮素损失。本实验结果表明,3种化感物质对 N_2O 的释放均有一定的抑制作用。其中以对羟基苯甲酸

的抑制效果最佳。这 3 种化感物质的抑制效果,尚需在农田中进一步实验。在农业实践中,化感物质的应用还要考虑结合硝化抑制剂,以期达到减少氮素的损失。

参考文献

- [1] 刘秀芬,马瑞霞,孙思恩,等.根际区它感化学物质的分离、鉴定与生物活性的研究.生态学报,1996,16(6):1~10.
- [2] 马瑞霞,刘秀芬,孙思恩,等.小麦根区微生物分解小麦残体产生的生化它感物质及其生物活性的研究.生态学报 1996,16(6):632~639.
- [3] 莫淑勋.土壤中有机的产生、转化及土壤肥力的某些影响.土壤学进展,1986,13(4):1~10.
- [4] 赵其国.现代土壤学与农业持续发展.土壤学报,1996,33(1):1~12.
- [5] Kypakoba H T.反硝化作用在土壤氮素平衡中的作用.土壤学进展,1985,13(5):8~13.
- [6] 王小彬,Balley L D,Grant C A.保持耕作土壤体系中肥料氮的行为及氮的有效管理的探讨.土壤学进展,1995,23(2):1~11.
- [7] Jaap Van Rijn,Yossi Tal and Yoram Barak. Influence of Volatile Fatty Acids on Nitrite Accumulation by a *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology*,1996,62(9):2615~2620.
- [8] Jens K Thomsen,Torlen Geest and Raymond P Cox. Mass Spectrometric Studies of the Effect of pH on the Accumulation of Intermediates in Denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*,1994,60(2):536~541.
- [9] Tage Dalsgaard and Friedhelm Bak. Nitrate Reduction in a Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulfovibrio Desulfuricans* Isolated from Rice Paddy Soil; Sulfide Inhibition, Kinetics, and Regulation. *Applied and Environmental Microbiology*,1994,60(1):291~297.
- [10] 李振高,李良谟,潘映华,等.不同基因型小麦根系分泌物对根际反硝化细菌的影响.土壤学进展,1994,22(1):50~52.
- [11] 李良谟,臧双,周秀如,等.西吡对抑制硝化过程和其它微生物活性的影响.土壤学报,1981,18(1):58~70.
- [12] Aulakh M S,Rennie D A,Paul E A. The influence of Plant Residues on Denitrification Rates in Conventional and Zero Tilled Soils, *Soil Sci. Soc. AM • J.*,1984,48:790~794.
- [13] 方心芳.应用微生物实验法.北京:中国财政经济出版社,1962.293.
- [14] 郑洪元,张德生.土壤动态生物化学研究法.北京:科学出版社,1982.180~182.
- [15] 史蒂文森 F J.农业土壤中的氮.北京:科学出版社,1989.192.
- [16] 李振高,李良谟,潘映华.根际微生物的研究及反硝化细菌的生态分布.土壤,1993,25(5):266~269.
- [17] Stouthamer A H. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons Ltd, New York, 1988. 245~303.
- [18] Kaplan W A. *Adv. Agric. Microbiol.*, 1985,3:186~206.
- [19] Robertson L A. *Microbial Production and Consumption of Greenhouse gases: Methane, Nitrogen Oxides and Balomethanes*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1991. 189~199.
- [20] Heinzkor Ner and Walter Gn Z. Expression of Denitrification Enzymes in Response to the Dissolved Oxygen Substrate in Continuous Culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology*,1989,55(5):1670~1676.
- [21] Michael R. Betlach and James M. Tiedje. Kinetic Explanation for Accumulation of Nitrite Nitric Oxide and Nitrous Oxide During Bacterial Denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*,1981,41(7):1074~1084.
- [22] Hirofumi Shoun,Du-Hyun Kim,Hiroo Uchiyama and Junta Sugiyama. Denitrification by Fungi *Fems Microbiology Letters*,1992,92:277~282.