

烟草根际微生物研究

刘训理, 王超, 吴凡, 薛东红, 陈凯

(山东农业大学林学院, 泰安 271018)

摘要: 利用选择性培养基, 对土壤肥力肥沃、中等、贫瘠的烟区根际细菌、真菌和放线菌进行了分离和测数。根据菌体形态及培养特征、生理生化指标及 16S rDNA 部分序列分析等, 对根际自生固氮菌、磷细菌、钾细菌进行了鉴定和分类。主要结果为: 土壤肥沃的烟区根际细菌的数量最多, 土壤贫瘠的烟区数量最少; 土壤贫瘠烟区根际真菌的数量较多, 中等和肥沃烟区的较少; 根际放线菌的数量随土壤肥力的降低而依次减小。从不同肥力烟区分离的根际自生固氮菌、磷细菌、钾细菌以革兰氏阴性杆菌为主, 分别属于 10 个属。土壤的肥沃程度对根际 3 类细菌的种类和数量都有影响, 总体上看, 土壤肥沃和中等的条件下, 细菌类群的多样性和丰富度较大, 而贫瘠土壤细菌类群的优势度较大。

关键词: 烟草; 根际微生物; 多样性

文章编号: 1000-0933(2006)02-0552-06 中图分类号: Q143, Q398 文献标识码: A

Studies on tobacco rhizosphere microbes

LIU Xun-Li, WANG Chao, WU Fan, XUE Dong-Hong, CHEN Kai (Forestry College, Shandong Agriculture University, Taian, 271018 China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(2): 552 ~ 557.

Abstract: The rhizosphere soils were obtained by five point sampling method from brown tobacco soils with different fertilities in Yishui County of Shandong Province. The tobacco variety was k368. Rhizosphere bacteria, fungi and actinomycetes in samples from fertile, medial fertile, and infertile soils were isolated and cultivated by the plate cultivation method with selective media. Specifically, azotobacter, phosphobacteria and potassium-bacteria were isolated and identified by their morphology, growth, and physiochemical characteristics, and by sequence analysis of their 16S rDNAs. The main results were as follows: the quantities of total rhizosphere bacteria, azotobacter, phosphobacteria and potassium-bacteria were the largest in fertile soils and were the lowest in infertile soils. In soils of the same fertility, the quantity of potassium-bacteria was the largest, that of phosphobacteria the second, and that of azotobacter the least. The quantities of rhizosphere fungi in infertile soils were significantly more than those in medial fertile or fertile soils, and the quantity of actinomycetes showed a declining trend along with the decrease in soil fertility.

Azotobacter, phosphobacteria and potassium-bacteria isolated from all three types of soils consisted of mainly Gram-negative bacilli, belonging to ten genera. The azotobacter fell into four genera: *Bacillus*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* and *Azomonas*. The phosphobacteria were from genera *Bacillus*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* and *Pseudomonas*. The potassium-bacteria were from genera *Bacillus*, *Erwinia*, *Sinorhizobium*, *Pseudomonas*, *Proteus* Hauser and *Micrococcus*.

The diversity index and evenness index of potassium-bacteria in fertile soils and in medial fertile soils were the largest; the diversity index of azotobacter in all three types of soils was the lowest. These results were consistent with tobacco plants' high demand for potassium. The diversity index and richness index of azotobacter decreased along with the decrease in soil fertility, accompanied by an increase in the domination index. The diversity index and evenness index of phosphobacteria decreased as soil fertility decreased. The diversity index and the evenness index of potassium-bacteria were greater in medial fertile soils than in the

基金项目: 山东省科技攻关计划资助项目(02201010102)

收稿日期: 2005-01-30; **修订日期:** 2005-10-20

作者简介: 刘训理(1961~), 男, 山东青岛人, 博士, 教授, 主要从事应用微生物研究. E-mail: xliu@sdau.edu.cn

Foundation item: The project was supported by the Committee of Science And Technology of Shandong Province(No. 02201010102)

Received date: 2005-01-30; **Accepted date:** 2005-10-20

Biography: LIU Xun-Li, Ph. D. candidate, Professor, mainly engaged in research of applied microbiology. E-mail: xliu@sdau.edu.cn

other types.

Key words: tobacco; rhizosphere microbes; species diversity

植物根际是一个很特别的微区域,由于受根系的影响,其周围的微域在物理、化学和生物方面与土壤主体不同。根际土壤是陆地生态系统中生物(尤其是土壤微生物)多样性最丰富的场所之一。研究表明,在离根表 1~2mm 土壤中细菌数量可达 10^9 个/cm³, 几乎是根际土的 10~100 倍^[1]。根际微生物与根系组成了一个特殊的生态系统,根际微生物繁殖速度快、数量多、代谢能力强,对土壤有机质的分解、无机质的转化、氮的固定以及提供植物营养、保持土壤肥力都具有重要作用,微生物种群结构失衡也是导致作物减产、土壤质量下降的主要原因之一。

近年来,将土壤微生物种群、数量及分布作为评价土壤生态环境质量的重要指标,越来越受到重视^[2,3],有关玉米、茶树、棉花、哈密瓜等根际微生物的研究已有较多报道^[4-6]。烟草是我国重要的经济作物,由于过量施用化肥和化学农药带来的对环境的污染、对非靶标生物的影响和土质的下降等问题日益突出。本文以不同肥力的烟区土壤为研究对象,研究了烟草根际细菌、真菌和放线菌的数量变化,并对根际有益菌群进行了研究,以期为进一步弄清土壤肥力与根际微生物的关系并合理利用有益菌群提供参考。

1 材料和方法

1.1 土壤样品采集与主要营养成分测定

选择山东省临沂市沂水县不同肥力的棕壤烟区,烟草品种为 k368,采样时间为 7 月份,烟草株高 70~80cm,采用 5 点取样法,采样时铲去表土,将根系及黏附其上的土壤一起装入无菌袋中并编号。

土样带回实验室后,将同一烟区的 5 个样品混合,轻轻抖动根系并去除黏附根系上的较大颗粒土,将根系及黏附其上的土壤分 2 份,分别用于根际微生物分析、含水率与营养成分测定。

土样主要营养成分速效氮、速效磷、速效钾和有机质含量的测定,分别采用碱解法、钼蓝比色法、火焰光度法和重铬酸钾容量法-外加加热法^[7]。

根据有效成分的含量,将土样分为肥沃、中等和贫瘠 3 个等级。供试土样主要营养成分含量测定结果如表 1。

1.2 根际土壤主要微生物的分离与培养

细菌的分离采用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,真菌的分离采用马丁氏琼脂培养基,放线菌的分离采用高氏一号琼脂培养基。固氮菌的分离采用 Ashby 无氮琼脂培养基,解磷细菌和解钾细菌的分离采用选择性培养基:Ca₃(PO₄)₂ 琼脂培养基和钾铝硅酸盐琼脂培养基。

微生物的培养采用平板梯度稀释培养法^[8]。

1.3 菌株的鉴定

主要鉴定指标包括菌体形态(革兰氏染色、鞭毛染色、运动性、芽孢染色等)和菌落特征培养观察(形状、大小、边缘、表面、隆起形状、透明度、菌落颜色等)、生理生化指标测定(葡萄糖氧化发酵试验、需氧性测定、碳源利用、硝酸盐还原、接触酶试验、V-P 试验、明胶液化等)和 16S rDNA 部分序列分析,具体方法参照文献^[7,8]。

1.4 根际微生物的多样性测度

参照文献^[9],选用 Shannon-Wiener 指数(H)、丰富度指数(S)、Pielou 指数(J)和 Simpson 优势度指数(D),讨论根际环境的微生物多样性特征。

多样性指数 H 的计算公式为:

表 1 供试土样的主要有效成分含量测定结果

Table 1 The analysis of main nutrient components in experimented soils

土壤肥力 Soil fertility	速解 N Quick-acting nitrogen (mg kg ⁻¹ dry soil)	速效 P Quick-acting phosphorus (mg kg ⁻¹ dry soil)	速效 K Quick-acting potassium (mg kg ⁻¹ dry soil)	有机质 Soil organic matter (%)
肥沃 Fertile soil	92.33	48.84	215.36	1.53
中等 Medial soil	82.89	40.56	138.57	1.34
贫瘠 Infertile soil	80.24	13.01	96.65	1.82

$$H = - \sum P_i \ln P_i$$

式中, $P_i = N_i/N$, N_i 为属 i 的单菌落数量, N 为土样的总单菌落数量。

均匀度指数 J 的计算公式为:

$$J = - \sum P_i \ln P_i / \ln S$$

式中, S 为属 i 所在土样中属的数目。

采用 Simpson 优势度指数测定群落内不同物种所起的作用和所占的地位, 其公式为:

$$D = \sum P_i^2$$

2 结果与分析

2.1 不同肥力烟区根际细菌的数量变化

不同肥力烟区根际细菌的数量变化结果见图 1。不同肥力条件下, 根际细菌的数量以肥沃土壤中最多, 中等土壤次之, 贫瘠土壤最少。

不同肥力烟区根际 3 类促生细菌的数量变化如图 2。根际自生固氮菌、磷细菌和钾细菌数量均以肥沃土壤中最多, 中等土壤次之, 贫瘠土壤最少; 不同肥力烟区钾细菌数量的差异最大, 磷细菌数量的差异次之, 自生固氮菌数量的差异最小; 相同土壤肥力的烟区, 钾细菌的数量最大, 磷细菌的数量次之, 自生固氮菌的数量最小。

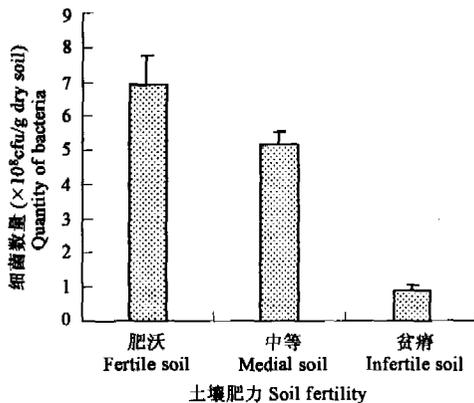


图 1 不同肥力条件下烟草根际细菌数量变化

Fig. 1 Quantitative difference of bacterium detected from tobacco rhizosphere soils with different fertilities

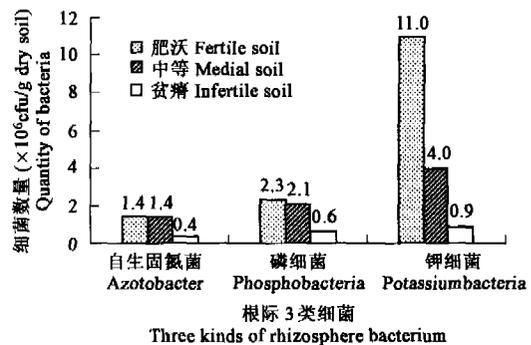


图 2 不同肥力烟区根际 3 类细菌的数量变化

Fig. 2 Quantitative difference of three kinds of bacterium detected from tobacco rhizosphere soils with different fertilities

烟草与其它的植物相比, 对钾的需求量较大, 而实际生产中, 往往钾肥的施用量不足, 氮肥的用量较大, 这使得钾细菌的生长、繁殖活跃, 数量较大, 而自生固氮菌数量较小。

2.2 不同肥力烟区根际真菌的数量变化

不同肥力烟区根际真菌的数量变化见图 3。根际真菌数量以贫瘠土壤最多, 肥沃土壤次之, 中等土壤最少。但总体看, 不同肥力烟区根际真菌数量差别不如根际细菌明显。根际真菌的数量一般与其生长所需基质 (纤维素等) 的含量有关, 同时土壤含水率、土壤 pH 等也有一定影响。

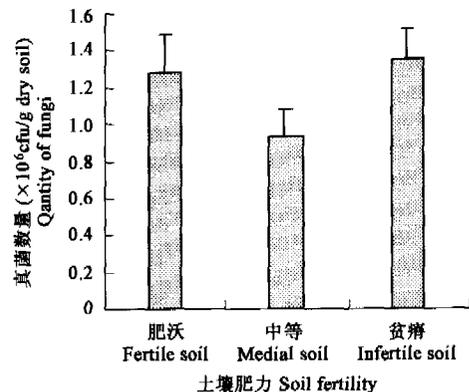


图 3 不同肥力条件下烟草根际真菌数量变化

Fig. 3 Quantitative difference of Fungi detected from tobacco rhizosphere soils with different fertilities

2.3 不同肥力烟区根际放线菌的数量变化

不同肥力烟区根际放线菌的数量变化见图 4。土壤肥力对根际放线菌数量的影响明显,其数量随土壤肥力的降低而依次减小,与根际真菌相比,其数量要高 1~2 个数量级。

2.4 不同肥力烟区根际 3 类促生细菌的种类及多样性特征

从烟草根际土壤中分离的 3 类促生细菌的鉴定结果如表 2 所示。3 类根际促生细菌以革兰氏阴性杆菌为主,分别属于 10 个属。其中,自生固氮菌有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、拜叶林克氏菌属 (*Beijerinckia*)和氮单胞杆菌属 (*Azomonas*)。磷细菌有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。钾细菌有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、变形菌属 (*Proteus Hauser*)、微球菌属 (*Micrococcus*)。

3 类根际促生细菌的多样性、丰富度、均匀度及优势度指数见表 3。从表中可以看出,肥沃和中等肥力烟区的细菌多样性指数和均匀度指数均以钾细菌的最大,而 3 类土壤固氮菌的多样性指数均较低,这一结果与烟草的高需钾特性相吻合。不同肥力烟区自生固氮菌的多样性指数和丰富度指数随着烟区肥沃程度的降低依次减小;优势度指数随着烟区肥沃程度的降低依次增大。磷细菌多样性指数和均匀度指数随着烟区肥沃程度的降低依次减小;钾细菌多样性指数和均匀度指数以中等烟区的最大。

总的来讲,土壤肥沃和中等的条件下,细菌类群的多样性和丰富度较大,但类群的优势度较贫瘠土壤低,这可能是由于贫瘠烟区营养物质缺乏,只有少量生命力较强的类群可以定殖,因此类群的优势度也较大。

3 讨论

国内外的研究资料表明,植物根系和根际微生物的生理活动对土壤性状、养分吸收及植物生长都有明显影响^[10]。根际微生物种群与植物的健康状况也有关系^[6],通过改善根际微生态环境来促进植物生长以及从根际微环境中筛选具有良好促生和抗菌作用的有益菌群,日益为人们所重视^[11,12]。土壤中三大类微生物比例是土壤肥力的一个衡量指标,土壤中细菌、

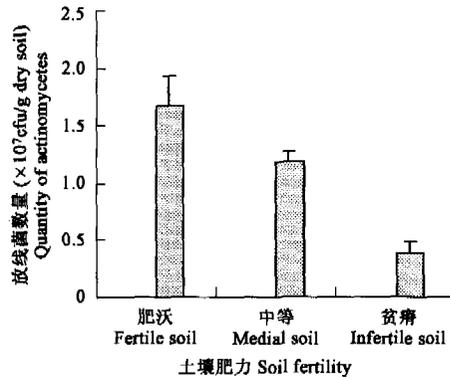


图 4 不同肥力条件下烟草根际放线菌数量变化

Fig. 4 Quantitative difference of actinomycetes detected from tobacco rhizosphere soils with different fertilities

表 2 不同烟地根际三类细菌分离及鉴定结果

Table 2 The isolation and identification results of three kinds of bacteria in different tobacco rhizospheres

肥沃程度 Soil fertility	细菌类群 Kinds of bacteria	属及菌落数 The genera and its respectively colony number
肥沃 Fertile soil	自生固氮菌 Azotobacter	芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>): 7×10^5
		固氮菌属 (<i>Azotobacter</i>): 4×10^5
		拜叶林克氏菌属 (<i>Beijerinckia</i>): 1×10^5
		氮单胞菌属 (<i>Azomonas</i>): 2×10^5
	磷细菌 Phosphobacteria	芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>): 1×10^5
		固氮菌属 (<i>Azotobacter</i>): 8×10^5
		分枝杆菌属 (<i>Mycobacterium</i>): 11×10^5
		微球菌属 (<i>Micrococcus</i>): 3×10^5
	钾细菌 Potassium- bacteria	芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>): 50×10^5
		欧文氏菌属 (<i>Erwinia</i>): 10×10^5
		中华根瘤菌属 (<i>Sinorhizobium</i>): 30×10^5
		假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>): 20×10^5
中等 Medial soil	自生固氮菌 Azotobacter	固氮菌属 (<i>Azotobacter</i>): 1×10^5
		拜叶林克氏菌属 (<i>Beijerinckia</i>): 3×10^5
		芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>): 10×10^5
	磷细菌 Phosphobacteria	微球菌属 (<i>Micrococcus</i>): 7×10^5
		芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>): 3×10^5
		假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>): 10×10^5
		分枝杆菌属 (<i>Mycobacterium</i>): 1×10^5
	钾细菌 Potassium- bacteria	芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>): 10×10^5
		欧文氏菌属 (<i>Erwinia</i>): 10×10^5
		变形菌属 (<i>Proteus Hauser</i>): 10×10^5
		微球菌属 (<i>Micrococcus</i>): 10×10^5
	贫瘠 Infertile soil	自生固氮菌 Azotobacter
固氮菌属 (<i>Azotobacter</i>): 1×10^5		
磷细菌 Phosphobacteria		假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>): 0.1×10^5
		微球菌属 (<i>Micrococcus</i>): 2.3×10^5
		芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>): 1×10^5
钾细菌 Potassium- bacteria		固氮菌属 (<i>Azotobacter</i>): 3×10^5
		芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>): 6×10^5
		欧文氏菌属 (<i>Erwinia</i>): 3×10^5
		假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>): 0.1×10^5

放线菌密度高,表明土壤肥力水平较高,真菌的数量与土壤肥力无明显的正相关关系,本试验结果也证明了这一点。

植物根际微生物在改善土壤肥力、改善根际环境、促进根系生长和防治植物病害等方面均有一定的作用^[13-17]。固氮菌、磷细菌和钾细菌(硅酸盐细菌)是近些年 PGPR(Plant Growth-Promotion Rhizobacteria)中研究较多的细菌类群。国内外在 PGPR 的研究中,探讨不同植物、不同土壤环境下,PGPR 的数量变化的较多,而探讨其种类的变化较少,因涉及到菌株的鉴定,因此,工作量较大。本研究在菌株的鉴定过程中,除了菌体形态和菌落特征培养观察、生理生化指标测定,还进行了菌株的 16S rDNA 部分序列分析,这些工作足以将菌株鉴定到属,因此,试验结果可比较准确地反映不同肥力烟区三类 PGPR 的种类和数量变化。作者此前曾进行过茶树根际微生物的研究^[5],在探讨不同植物主要根际微生物菌群种类和数量变化规律的同时,获得了一些具有研究和应用潜力的菌株,期望能为不同植物专用微生物菌肥的开发提供有益参考。

表3 不同烟区根际细菌的多样性、丰富度、均匀度及优势度指数

Table 3 The diversity index, richness index, evenness index and domination index in different tobacco rhizosphere

肥沃程度 Soil fertility	细菌类群 Kinds of bacteria	H	S	J	D
肥沃 Fertile soil	自生固氮菌 Azotobacter	1.171	4	0.845	0.357
	磷细菌 Phosphobacteria	1.120	4	0.808	0.368
	钾细菌 Potassium-bacteria	1.240	4	0.894	0.323
中等 Medial soil	自生固氮菌 Azotobacter	0.759	3	0.690	0.561
	磷细菌 Phosphobacteria	1.113	4	0.803	0.260
	钾细菌 Potassium-bacteria	1.388	4	1.000	0.250
贫瘠 Infertile soil	自生固氮菌 Azotobacter	0.563	2	0.813	0.626
	磷细菌 Phosphobacteria	1.097	4	0.791	0.373
	钾细菌 Potassium-bacteria	0.606	2	0.875	0.556

References:

- [1] Lu Y S, *et al.* Soil-Plant Nutrition. Beijing: Chemistry and Industry Press, 1998.
- [2] Fan J H, Liu M, Huang W. Comparison the Microbiology Characteristics of Green house with Vegetable Plot of South Xinjiang. Soil Fertility, 2003, (1): 31 ~ 33.
- [3] Zhang J E, Liu W G, Hu G. The relationship between quantity index of soil microorganisms and soil fertility of different land use systems. Soil and Environment, 2002, 11(2):140 ~ 143.
- [4] Philippe Lemanceau, *et al.* Elect of Tiao Plant Species, Flax and Fomatoon the Wiversity of Soilpore Populations of Fluorescent Pseudamonads. Applied and Enviromental Microbiology, 1995, (3):1004 ~ 1012.
- [5] Sun H X, Liu X L. Microbes Studies of Tea Rhizosphere. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(7):1353 ~ 1357.
- [6] Xu C L, Yang X P, Liu H L, *et al.* Studies on Microecology of Hami melon Rhizosphere and Root system. Chinese Journal of Microecology, 1997, 9(1): 45 ~ 47.
- [7] Dong X Z, *et al.* Manual of Determinative Bacteriology. Beijing: Science Press, 2001.
- [8] Compiled by Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. Research Method Of Soil Microbe. Beijing: Science Press, 1985.
- [9] Guo Z G, Wang G X, Shen Y Y, *et al.* Plant species diversity of grassland plant communities in permafrost regions of northern Qinghai-Tibet Plateau. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(1): 149 ~ 155.
- [10] Zhang S X, Gao Z Q. Continuous cropping bastacle and rhizosphere microecology II. Root exudates and phenolic acids. Chinese Journal of Applied Ecology, 2000, 11(1):152 ~ 156.
- [11] Germida J J, Walley F L. Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. Biology and Fertility of Soils, 1996, 23(2): 113 ~ 120.
- [12] Geoffrey W Zehnder, Changbin Yao, John F Murphy, *et al.* Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. BioControl, 2000, 45(1):127 ~ 137.

- [13] Johansen J E, Binnerup S J. Contribution of Cytophaga-like Bacteria to the Potential of Turnover of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus by Bacteria in the Rhizosphere of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Microbial Ecology*, 2002, (3): 298 ~ 306.
- [14] Kalyan K Mondal, Prem Dureja, Jeevan Prakash Verma. Management of *Xanthomonas campestriis* pv. *malvacearum*-Induced Blight of Cotton Through Phenolics of Cotton Rhizobacterium. *Current Microbiology*, 2001, 43(5): 0336 ~ 0339.
- [15] Shishido M, Chanway C P. Forest soil community responses to plant growth-promoting rhizobacteria and spruce seedlings. *Biology and Fertility of Soils*, 1998, 26(3): 178 ~ 186.
- [16] Gupta C, Dubey R, Maheshwari D. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 35(6): 399 ~ 405.
- [17] Beatriz Ramos, Jose A, Lucas García, Agustín Probanza, et al. Influence of an indigenous European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) rhizobacterium (*Bacillus pumilus*) on the growth of alder and its rhizosphere microbial community structure in two soils. *New Forests*, 2003, 25(2): 149 ~ 159.

参考文献:

- [1] 鲁如坤. 土壤-植物营养学. 北京: 化学工业出版社, 1998.
- [2] 范君华, 刘明, 黄伟. 南疆温室和菜地土壤微生物学特性比较. *土壤肥料*, 2003, 31(3), 31 ~ 33.
- [3] 章家恩, 刘文高, 胡刚. 不同土地利用方式下土壤微生物数量与土壤肥力的关系. *土壤与环境*, 2002, 11(2): 140 ~ 143.
- [5] 孙海新, 刘训理. 茶树根际微生物研究. *生态学报*, 2004, 24(7): 1353 ~ 1357.
- [6] 徐长伦, 杨新平, 王志方, 等. 哈密瓜根系与根际微生态分析研究. *中国微生态学杂志*, 1997, 9(1): 45 ~ 47.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 中国科学院南京土壤研究所微生物室编著. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985.
- [9] 郭正刚, 王根绪, 沈禹颖, 等. 青藏高原北部多年冻土区草地植物多样性. *生态学报*, 2004, 24(1): 149 ~ 155.
- [10] 张淑香, 高子勤. 连作障碍与根际微生态研究 II. 根分泌物与酚酸物质. *应用生态学报*, 2000, 11(1): 152 ~ 156.