

氢气对刺槐根际土壤微生物种群和土壤酶活性的影响*

刘慧芬¹ 王卫卫^{1**} 曹桂林¹ 唐明²

(¹西北大学西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室 西安 710069)

(²西北农林科技大学林学部 杨凌 712100)

摘要 模拟豆科植物根瘤在固氮过程中释放氢气, 分析其对根际土壤产生的影响. 从黄土高原人工刺槐林采集有根瘤的刺槐根际土壤样品, 采用电解水产生氢气分次处理, 对处理后与未处理的土壤样品内微生物种群数量、微生物代谢强度及土壤脱氢酶、过氧化氢酶、脲酶、转化酶等指标进行比较分析. 氢气处理后的两批土样中, 氢氧化细菌数量均显著增多, 分别占9月、5月土壤微生物总量的34.9%和32.4%; 微生物在土壤中代谢强度分别增加了140.2%和57.6%; 土壤脱氢酶、过氧化氢酶、脲酶和转化酶含量均表现增加, 其中9月处理土壤分别增加36.6%、57.1%、26.6%和147.0%, 5月处理土壤分别增加37.2%、6.6%、108.8%和147.0%. 研究结果为根瘤固氮过程中产生氢气对根际土壤微环境的影响及促生机制提供了实验资料. 图2 表3 参14

关键词 氢气; 根际土壤; 氢氧化细菌; 微生物代谢强度; 土壤酶; 根瘤固氮; 刺槐

CLC S144 : S154

Effect of Hydrogen on Microbial Population and Enzyme Activity in *Robinia pseudoacacia* Rhizosphere Soil*

LIU Huifen¹, WANG Weiwei^{1**}, CAO Guilin¹ & TANG Ming²

(¹Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Northwest University, Xi'an 710069, China)

(²College of Forest, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract In the nitrogen-fixation process, hydrogen is released and affects plant rhizosphere soil. Soil samples containing locust nodules were collected from artificial *Robinia pseudoacacia* forest of the Loess Plateau in China in September 2008 and May 2009, and treated by hydrogen produced with electrolysis of water 30 days later. The number of soil microbial populations, microbial metabolisability, and soil dehydrogenase, catalase, urease and invertase contents were determined and analyzed. The results showed that the number of hydrogen-oxidizing bacteria increased distinctly in the treated soil, accounting for 34.9% in September and 32.4% in May of the total soil microorganisms. Microbial metabolism intensity in the treated soil was increased by 140.2% and 57.6% than that in the untreated soil. Dehydrogenase, catalase, urease and invertase contents in the treated soil were also increased, by 36.6%, 57.1%, 26.6% and 147.0% than those in the untreated soil in September 2008 and by 37.2%, 6.6%, 108.8%, 147.0% in May 2009. The results indicated the hydrogen produced during nitrogen-fixation would affect the rhizosphere soil micro-environment and the growth-promoting mechanism. Fig 2, Tab 3, Ref 14

Keywords hydrogen; rhizosphere soil; hydrogen-oxidizing bacteria; microbial metabolism intensity; soil enzyme; nitrogen-fixation; *Robinia pseudoacacia*

CLC S144 : S154

豆科与非豆科作物的间作、轮作会提高土壤肥力, 增加作物产量. 多数人认为这是由于豆科植物与根瘤菌共生固氮过程中根际土壤内残留氮肥产生的作用, 然而研究报告表明轮作75%的增产效果并不能用氮肥理论来解释^[1]. 豆科作物根瘤菌在固氮过程中每固定一个N₂就产生约1.5个H₂, Irvine等用抑制真菌和细菌生长的抗生素对氢富集土壤进行处理比较, 证实对氢气起氧化作用的土壤微生物是氢氧化细菌 (Hydrogen-oxidizing bacteria)^[2]. Dong等通过对固氮放氮作用的研究和根际微生物的分析, 提出了“氢肥理论”, 即不含吸氢酶的根瘤菌在固氮过程中释放的氢气能够促进根际氢氧化细菌的生长并进一步促进植物生长^[3]. 陈兴都、付博

等分离纯化出氢氧化细菌, 证实该类菌可以分泌1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨酶并促进植物生长^[4-5].

黄土高原是我国也是全球土壤侵蚀最严重的地区之一. 多年实践已证明, 生物防护是防止土壤侵蚀的根本措施^[6], 豆科植物刺槐具有适应各种恶劣环境的特性, 广泛应用于防风固沙、防治水土流失, 同时它木质优良, 在木材加工业倍受青睐, 因此对黄土高原刺槐植被的研究将显示出良好的生态、经济和社会效益. Jiamil等已从豇豆植物根际土壤中分离并鉴定出黄杆菌属和伯克氏菌属的氢氧化细菌, 用于促进豆科植物的生长^[7]. 但是, 根瘤在固氮过程中释放氢气、促进植物生长的研究尚在初期, 促生机制还未明确, 当前相关报道也较少.

植物-微生物的互作关系维系和主宰着陆地生态系统的功能^[8], 土壤酶活性的测定是评价土壤肥力、鉴别土壤类型和土壤熟化程度以及评价各种农业措施效果的一种有效

收稿日期: 2009-12-11 接受日期: 2010-01-29

*国家自然科学基金重点项目 (No. 30630054) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30630054)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wwwang@nwwu.edu.cn)

手段^[9]。因此本实验从研究根际土壤微生物种群出发,模拟根瘤在固氮作用时放氢,用微量的氢气处理黄土高原豆科植物刺槐根际土壤,分析比较氢气处理前、后土壤微生物种群结构的改变,并测定土壤中4种重要土壤酶含量的变化,以期研究根瘤固氮过程中产生的氢气对根际土壤微环境的影响以及促生机制提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

样品采集:2008年9月和2009年5月,在陕西省永寿县五丰村人工刺槐林内,选取长势旺盛、有大量根瘤的刺槐植株,采集距离根瘤5 mm以内根际土壤。同时采集当地土壤做空白对照。

矿质盐培养基(MSA):NaNO₃ 2.0 g, K₂HPO₄ 1.2 g, MgSO₄ 0.5 g, KCl 0.5 g, KH₂PO₄ 0.14 g, Fe₂(SO₄)₃·H₂O 0.01 g, 酵母膏0.02 g, 琼脂 15 g, 水 1 L; pH 7.2。

氢气处理土壤装置:磷酸水溶液中加入两个碳棒作为惰性电极,与稳压器相连,通过调节电流产生 4.16×10^{-5} mol L⁻¹的氢气。电解水产生的气体由橡皮管输送到密封箱内,同时箱口用另一橡皮管通向窗外(图1)。使用该装置处理土壤样品30 d。

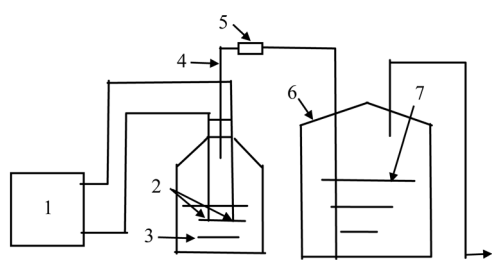


图1 氢氧化细菌富集培养装置

Fig. 1 Enrichment culture device for hydrogen-oxidizing bacteria

1: 稳压器; 2: 碳棒; 3: 磷酸溶液; 4: 气体输送管; 5: 气压显示表; 6: 密封箱; 7: 土壤

1: Manostat; 2: Kryptol; 3: Phosphoric solution; 4: Gas pipeline; 5: Variometer; 6: Sealed box; 7: Soil

1.2 分析方法

1.2.1 土壤主要微生物类群的计数 分别利用MSA培养基检测氢氧化细菌数量;牛肉膏蛋白胨培养基检测细菌数量;淀粉琼脂培养基检测放线菌数量;马铃薯-蔗糖琼脂培养基检测真菌数量。

1.2.2 土壤微生物代谢强度测定 密闭静置培养测CO₂法^[9]:将盛有20 g土壤的培养皿底和盛有100 mL 0.5 mol L⁻¹ KOH溶液的250 mL锥形瓶置于一有盖容器中,用注射器通入1 mL氢气后密封,静置于室温下培养15 d,培养过程土壤微生物产生的CO₂便吸收在碱液中。取出锥形瓶,加入过量BaCl₂溶液,

直到不再有新的沉淀出现,以酚酞为指示剂,用1 mol L⁻¹ HCl滴定剩余的KOH,滴定终点由微红刚好变为无色。

KOH溶液中CO₂的量(mL)=(碱浓度×加碱量-酸浓度×滴定耗酸量)×22.4×100/62

产生的CO₂净量=V-V_{ck}

1.2.3 土壤酶活性测定 参照土壤与环境微生物研究法^[9],本实验采用改良的脱氢酶活性测定方法。

脱氢酶活性测定:TPF(三苯基甲腈)比色法;①称取两份5 g土样,分别置于50 mL离心管中,另取一个50 mL离心管不加土样作为无土对照。②在一个加土样管和无土对照管中加入5 g L⁻¹ TTC(氯化三苯基四氮)溶液5 mL,另一个加土样管加入5 mL 0.2 mol/L Tris-HCL(pH 7.4)缓冲液作为无基质对照。③三个离心管中均加入0.1 mol/L葡萄糖2 mL,充分振荡后塞紧。于37℃培养箱内放置24 h。④培养结束后,加2滴浓硫酸中止反应。然后加入5 mL甲苯,在摇床上振荡30 min。⑤4 500 r/min离心5 min,取上层溶液在485 nm波长处以不加TTC的溶液为对照比色测定各样品溶液的光密度(在比色皿中需稳定2 min),计算样品溶液的TPF含量。⑥标准曲线绘制:配置50、100、200、300、400 mg L⁻¹一系列不同浓度的TTC溶液,各取5 mL放入刻度试管中,分别加入5 mL乙酸乙酯和少许Na₂S₂O₄粉末(约2 mg,各试管中量要一致),充分振荡后产生红色的TPF。转移到乙酸乙酯层,待有色液层分离后,补充5 mL乙酸乙酯,振荡后静置分层,取上层乙酸乙酯液,以空白调零,测定485 nm处的吸光值。以TPF浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。酶活性以TTC的还原产物TPF生成量表示[TPF, μg g⁻¹(干土)(24 h)⁻¹]。土壤脱氢酶活性[TPF, μg g⁻¹(干土)]=C×V/dwt; C为滤液中TPF的浓度(μg mL⁻¹); V为滤液体积(mL); dwt为烘干土壤重量(g)。

过氧化氢酶活性的测定:高锰酸钾滴定法;土壤过氧化氢酶活性[KMnO₄, mL g⁻¹(干土)]= (V₀-V)/dwt; V₀、V为空白滴定和样品滴定0.2 mol L⁻¹高锰酸钾毫升数(mL); dwt为烘干土壤重量(g)。

脲酶活性的测定:靛酚蓝比色法;土壤脲酶活性[NH₄⁺-N, mg g⁻¹(干土)(24 h)⁻¹] = (C×10)/dwt; C为土壤滤液中酶活性值(NH₄⁺-N, mg mL⁻¹); 10为土壤溶液稀释倍数; dwt为烘干土壤重量(g)。

转化酶活性的测定:3,5-二硝基水杨酸比色法;土壤转化酶活性,以单位土重的0.1 g L⁻¹葡萄糖毫升数表示。

1.3 数据处理

用EXCEL 2003和STATISTICA 6.0软件分析相关数据。

2 结果

2.1 土壤主要类群微生物数量

微量氢气分次处理两批刺槐根际土壤后,与处理前土

表1 10⁻⁴梯度下主要类群微生物数量

Table 1 The microorganisms of main groups in 10⁻⁴ gradient

微生物类型 Types of microorganism	处理后土壤 Treated soil (10 ⁵ g ⁻¹)		未处理土壤样 Untreated soil (10 ⁵ g ⁻¹)	
	Sep. 2008	May 2009	Sep. 2008	May 2009
氢氧化细菌 Hydrogen-oxidizing bacteria	29.1	22.5	10.3	7.8
细菌 Bacteria	21.5	18.1	147	68.3
放线菌 Actinomycetes	32.4	28.0	157	34.5
真菌 Fungi	29.5	21.2	73	24.7

样相比较, 氢化细菌数量均显著增加, 细菌、放线菌和真菌数量呈现不同幅度减少。由表1可知, 9月处理土壤中氢化细菌增加182.5%, 占微生物总量的34.9%, 各类菌分别下降85.3%、79.3%和59.6%; 5月处理土壤中氢化细菌增加188.5%, 占微生物总量的32.4%, 各类菌分别下降73.0%、17.6%和14.2%。

2.2 微生物代谢强度

微生物代谢强度可以代表土壤中微生物活跃程度。通过微生物的呼吸作用 (CO_2 的释放量为强度指标) 来衡量土壤中微生物的总活性。9月和5月处理土壤中微生物活性分别增加140.2%和57.6% (图2)。

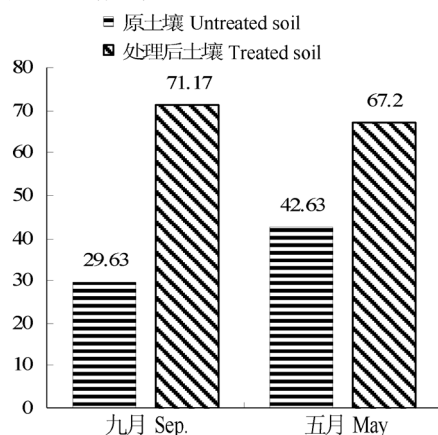


图2 土壤微生物代谢强度结果比较

Fig. 2 Comparison of microbial metabolism intensity between the untreated soil and treated soil

2.3 土壤酶活性测定

2.3.1 标准曲线 按照上述土壤酶活性测定方法, 使用721型可见分光光度计以吸光度值为纵坐标分别绘制土壤脱氢酶、脲酶和转化酶标准曲线, 并利用EXCEL 2003获得回归方程式。脱氢酶标准曲线方程式为: $y = 0.0028x + 0.0716$, $R^2 = 0.9980$; 脲酶标准曲线方程式为: $y = 0.0028x + 0.0535$, $R^2 = 0.9948$; 转化酶标准曲线方程式为: $y = 0.0022x + 0.042$, $R^2 = 0.9982$ 。

2.3.2 土壤酶活性 经测定发现, 氢气处理根际土壤后, 土壤内脱氢酶、过氧化氢酶、脲酶和转化酶含量均有所增加 (表2, 表3)。脱氢酶能催化有机物质的脱氢反应, 其活性是土壤微生物种群及其活性的重要敏感性指标; 转化酶活性的大

小可衡量土壤中碳水化合物分解和转化的速率。9月与5月两批处理土壤中脱氢酶和转化酶的含量增长比例一致, 分别约为37%和147%。过氧化氢酶能破坏土壤中生化反应生成的过氧化氢, 减轻对植物的危害; 脲酶促进土壤中含氮有机化合物尿素分子酰胺肽键的水解, 生成的氨是植物氮素营养来源之一。氢处理的土壤中过氧化氢酶和脲酶的含量变化程度较大, 9月份处理的土壤分别增长57.1%和26.6%, 而5月份处理的土壤分别增长为6.6%和108.8%。

3 讨论

氢化细菌是植物根际土壤中一个特殊的生理类群, 主要由细菌和放线菌构成。Dong等最早从根际土壤中分离纯化出氢化细菌, 并证明该类菌对植物幼根的生长有促进作用^[3], 因此氢化细菌被归类到植物根际促生菌类群 (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 中。此后, 研究者从不同植物根际土壤中分离出新的氢化细菌, 并探究菌株的促生长机制^[7, 10]。本实验首次从根际微生物种群角度研究其结构特征, 并证实刺槐根瘤在固氮过程中释放的氢气能够改变微生物种群结构, 提高土壤酶含量, 为植物旺盛生长提供了基础。

本实验采用电解水产生微量氢气处理根际土壤。气相色谱分析仪测定出1 g根瘤每天可释放 $9.59 \times 10^{-8} \text{ mol H}_2$, 因此本实验按照采集数据每 dm^3 土壤里含有0.22 g根瘤计算, 使用 $4.16 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 浓度的氢气富集 0.4 m^3 根际土壤, 比较精确地模拟了根瘤固氮过程中释放的氢气对根际土壤微生物种群的影响。30 d后测量数据, 结果表明土壤微生物种群结构发生改变, 微生物总量下降, 氢化细菌数量显著增加。但对根际微生物代谢强度测量的数据显示, 新的种群结构中, 微生物呼吸代谢强度增加, 这与土壤能够内含有更多土壤酶的关系不可分开。本实验结果与Li等的研究结果^[11]相似, 即有效改变微生物种群结构会增加微生物代谢强度。Li等已经通过4 a田间试验证明, 改变根际微生物种群结构可以提高在磷贫瘠土壤里生长的农作物产量。

土壤微生物代谢强度与脱氢酶的含量采用改良的方法测量。密闭静置培养测 CO_2 法仅使用一个密闭容器和一个锥形瓶, 简化了复杂的培养装置和设备, 达到相同精确测量的目的。氯化三苯基四氮 (TTC) 是无色且溶于水的化合物, 而三苯基甲腈 (TPF) 为红色不溶于水的化合物, 因此, 本实验

表2 2008年9月刺槐根瘤土壤中各类酶含量

Table 2 Contents of various enzymes in locust nodule soil in September 2008

土壤类型 Type of soil	脱氢酶 Dehydrogenase ($\text{A}/\mu\text{g mL}^{-1}$)	过氧化氢酶 Catalase (KMnO_4 , V/mL g^{-1})	脲酶 Urease (NH_4^+-N , $\mu\text{g mL}^{-1}$)	转化酶 Invertase ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, V/mL)
处理后 After treatment	29.66	0.22	0.271	3.3637
处理前 Before treatment	21.71	0.14	0.214	1.3637
CK	6.870	0.48	0.064	0.9091

表3 2009年5月份刺槐根瘤土壤中各类酶含量

Table 3 Content of various enzymes in locust nodule soil in May 2009

土壤类型 Type of soil	脱氢酶 Dehydrogenase ($\text{A}/\mu\text{g mL}^{-1}$)	过氧化氢酶 Catalase (KMnO_4 , V/mL g^{-1})	脲酶 Urease (NH_4^+-N , $\mu\text{g mL}^{-1}$)	转化酶 Invertase ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, V/mL)
处理后 After treatment	38.26	1.29	1.775	1.775
处理前 Before treatment	27.89	1.21	0.850	0.850
CK	13.37	0.66	0.300	0.300

使用还原剂将TTC转化为TPF后,通过乙酸乙酯提取TPF,降低色素对结果的干扰,也减少标准样品与土壤样品在比色过程中的误差^[12]。通过比较氢气处理前、后土壤酶含量变化,实验数据显示四类土壤酶均有不同程度的提高,说明新的微生物种群结构向土壤内分泌了更多的土壤酶,为植物生长提供了基础。Nicole等用氢处理不含脱氢酶(HUP)的豆科植物土壤后,也发现氢氧化细菌会向土壤分泌一些促进植物生长的物质^[13]。与人工水肥处理土壤^[14]相比较,氢气处理土壤中转化酶含量(3.636 3)比未处理土壤(1.363 7)增加约2倍,比水肥处理土壤(2.39)增加约1倍;氢气处理土壤中脲酶含量(1.775)比未处理土壤(0.850)增加2倍多,比水肥处理土壤(0.349)增加约4倍。这表明豆科植物与非豆科植物的间作、轮作增产效益会比水肥处理土壤增产效果更好,同时避免水肥过程中土壤内脲酶含量的流失。

氢气处理两批土样后发现,土壤内脱氢酶与转化酶的增加程度都保持不变,过氧化氢酶与脲酶含量的增加比例却有很大变化。这些变化可能与当月气候和植物生长季节有关,需要采集更多土壤样品并收集更多的实验数据来说明。而且,受固氮过程释放氢气的影响,根际土壤微生物多样性、丰富度是否会发生变化,是否还有尚未发现的促植物生长机制,仍有待进一步深入研究。

References

- Hesterman OB, Sheaffer EC, Beurns DK. Alfalfa dry matter and nitrogen production and fertilizer nitrogen response in leguminous-corn rotation. *Agronomy*, 1986, **78**: 19~23
- Irvine P, Smith M, Dong ZM. Hydrogen Fertilizer: Bacteria or Fungi? *Acta Hort*, 2004, **631**: 239~242
- Dong ZM, Wu L, Kettlewell B. Hydrogen fertilization of soils-is this a benefit of legumes in rotation. *Plant Cell & Environ*, 2003, **26**: 1875~1879
- Chen XD (陈兴都), Wang WW (王卫卫), Fu B (付博), Xiao LM (肖黎明), Guo Y (郭燕). Growth promoting effect of hydrogen-oxidizing bacteria in soybean rhizosphere. *Acta Bot Bor-Occid Sin* (西北植物学报), 2008, **28** (1): 136~140
- Fu B (付博), Wang WW (王卫卫), Tang M (唐明), Chen XD (陈兴都). Isolation and identification of hydrogen-oxidizing bacteria producing l-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and the determination of enzymatic activity. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2009, **49** (3): 395~399
- Meng QM (孟庆枚), Hua SZ (华绍祖), Yan WZ (阎文哲). Loess Highlands Conservation of Water and Soil. Zhengzhou, China: Yellow River Hydraulic Press (郑州: 黄河水利出版社), 1999. 96~132
- Jiamila M, Zhang Y, Yang J. Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth. *Environ Microbiol*, 2007, **9** (2): 435~444
- Lu YH (陆雅海), Zhang FS (张福锁). The advances in rhizosphere microbiology. *Soils* (土壤), 2006, **38** (2): 113~121
- Li ZG (李振高), Luo YM (骆永明), Teng Y (滕应). 土壤与环境微生物研究法. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 2008. 102~128
- Fu B (付博), Wang WW (王卫卫), Hao Y (郝莹), Wang LJ (王莉娟), Tang M (唐明), Chen XD (陈兴都). Isolation and identification of hydrogen-oxidizing bacteria in *Medicago sativa* rhizosphere. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2009, **15** (5): 650~654
- Li L, Li SM, Sun JH. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *PNAS*, 2007, **3** (104): 11192~11196
- Liang WY (梁文艳), Wang K (王珂), Wang JL (王金丽), Ruan QY (阮清鸳). Optimization and evaluation of TTC-dehydrogenase assay on a lgal viability determination. *Environ Sci & Manage* (环境科学与管理), 2009, **34** (5): 10~13
- Nicole ML, Dong ZM. Microbial nature of the hydrogen-oxidizing agent in hydrogen- treatde soil. *Biol Fertil Soil*, 2002, **35**: 465~469
- Wei ZX (韦泽秀), Liang YL (梁银丽), Inoue M (井上光弘), Zhou MJ (周茂娟), Huang ML (黄茂林), Gu JF (古建锋), Wu Y (吴燕). Effects of different water and fertilizer supply on cucumber soil nutrient content, enzymeactivity, and microbial diversity. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2009, **20** (7): 1678~1684