

九龙江口红树林鹧鸪菜藻体自生固氮细菌^{*}

张瑜斌^{1,2*} 林鹏² 邓爱英¹ 庄铁诚²

(¹ 广东海洋大学海洋资源与环境监测中心, 广东湛江 524088; ² 厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005)

摘要 初步研究了福建九龙江口秋茄 (*Kandelia candel*) 红树林红藻鹧鸪菜 (*Caloglossa leprieurii*) 藻体异养自生固氮菌数量的季节变化和微生物区系。结果表明: 鹧鸪菜上异养自生固氮细菌数量以春季最多 (1.033×10^4 cfu·g⁻¹), 冬季最少 (0.567×10^4 cfu·g⁻¹), 固氮菌的季节变化模式表现为春季 > 秋季 > 夏季 > 冬季; 鹧鸪菜藻体氮含量也以春季最高 (22.08 g·kg⁻¹), 冬季最低 (16.63 g·kg⁻¹), 二者差异显著 ($P < 0.05$), 且藻体含氮量的季节变化模式与固氮细菌数量一致; 这与鹧鸪菜的生长和物质积累密切相关, 鹧鸪菜与其藻体上的自生固氮菌可能存在着互惠互利的关系, 这种关系同时也受到环境温度和水分等因子的综合影响; 对 9 株固氮菌的初步鉴定结果显示, 它们分属于固氮菌属 (*Azotobacter*) 与拜叶林克氏菌属 (*Beijerinckia*)。

关键词 固氮菌; 氮含量; 季节变化; 鹧鸪菜; 红树林

中图分类号 X172 Q934.3 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2007)09-1384-05

Abiogenous azotobacter on the body of *Caloglossa leprieurii* growing in *Kandelia candel* mangrove forest in Jiulongjiang estuary of Fujian Province ZHANG Yu-bin^{1,2}, LIN Peng², DENG Ai-ying¹, ZHUANG Tie-cheng² (¹ *Monitoring Center for Marine Resources and Environments Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088 Guangdong, China;* ² *School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005 Fujian, China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(9): 1384-1388

Abstract The study on the seasonal changes of heterotrophic abiogenous azotobacter on the body of *Caloglossa leprieurii* growing in the *Kandelia candel* mangrove forest in Jiulongjiang estuary indicated that the quantity of this kind of azotobacter was the most in spring (1.033×10^4 cfu·g⁻¹) and the least in winter (0.567×10^4 cfu·g⁻¹), with a seasonal pattern of spring > autumn > summer > winter. The nitrogen concentration of *C. leprieurii* also had the same seasonal pattern, being the highest in spring (22.08 g·kg⁻¹) and the lowest in winter (16.63 g·kg⁻¹), which was closely related to the growth and matter accumulation of the seaweed. There was probably a kind of special cooperative relation between the azotobacter and the seaweed, which was influenced simultaneously by the environmental factors such as temperature, water, and others. The preliminary identification of isolated nine strains azotobacter showed that they were belonged to *Azotobacter* or *Beijerinckia*.

Key words azotobacter; nitrogen concentration; seasonal change; *Caloglossa leprieurii*; mangrove

1 引言

生物固氮是由固氮微生物完成的氮的生物地球化学循环中的重要一环。许多滨海海洋环境存在着生物固氮现象 (Herbert 1999)。Zuberer 等 (1975) 首次报道了红树林区的固氮研究, 随后陆续有不同

红树林群落的氮固定报道 (Potts 1984; van der Valk & Attw ill 1984; Toledo *et al.*, 1995)。已发现在红树叶和根的凋落物、活根系以及周围的沉积物中有各种固氮生物存在 (van der Valk & Attw ill 1984)。氮的固定在红树林氮转化过程中研究得最详细 (Alongi *et al.*, 1992), 近年来, 红树林区有关固氮微生物的研究主要集中在固氮微生物与红树植物间的关系 (Toledo *et al.*, 1995; Bashan *et al.*, 1998

* 国家自然科学基金资助项目 (30270272)。

** 通讯作者 E-mail: microyubin@163.com

收稿日期: 2006-10-10 接受日期: 2007-05-15

Lugmela & Bergman, 2002; Ravikumar *et al.*, 2004); 固氮微生物与其他微生物的作用 (Holgoin & Bashan, 1996); 以及固氮酶活性的变化 (Sengupta, 1991; Woitchik *et al.*, 1997), 但这些研究多集中于能固氮的蓝细菌, 对异养性的固氮细菌的研究仅见 Ravikumar 等 (2004) 的报道。在红树林区, 大型藻类前人已有研究 (Tanaka 1987; 林鹏等, 1997), 但对大型藻类藻体上的微生物研究仅见于庄铁诚等 (2000) 的报道, 对大型藻类上的自生固氮菌研究未见报道。在以往的研究中, 庄铁诚等 (2000) 发现不同季节和红藻生长情况对藻体上异养微生物数量有明显的影响, 红藻生长繁殖愈好, 微生物数量愈多。本文研究了九龙江口秋茄林的红藻鹧鸪菜藻体上的异养自生固氮菌数量的季节变化, 对藻体上的异养自生固氮菌作了初步的鉴定, 并探讨了自生固氮菌与鹧鸪菜之间的关系, 以期为进一步研究红树林生态系统内的藻菌关系以及藻-菌-红树植物之间的相互关系奠定基础。

2 研究地区与研究方法

2.1 样地概况

藻样采于福建省九龙江口南岸的龙海市浮宫镇草埔头村的秋茄 (*Kandelia candel*) 林, 位于 $24^{\circ} 29' N$, $117^{\circ} 23' E$ 。样地的气候属南亚热带海岸气候, 年平均气温为 $21.1^{\circ} C$, 年降水量为 $1475.2 mm$, 最冷月 1 月平均气温为 $13.0^{\circ} C$, 气温平均年较差 $15.8^{\circ} C$, 相对湿度 79.5% , 年日照时数为 $2040.5 h$ 。秋茄林沿九龙江口南岸呈带状分布, 宽度约 $40 m$, 主要位于中、高潮带。该群落为 1962 年人工营造的秋茄纯林, 林缘有少量桐花树 (*Aegiceras corniculatum*) 和白骨壤 (*Avicennia marina*) 伴生, 林相整齐, 郁闭度在 0.9 以上, 树高 $5.5\sim 6.0 m$, 在大洪潮时, 外缘树干基本被淹没, 仅露出林冠, 植株密度大, 且枝下高较高, 林内具不发达的板状根, 外缘有小型支柱根或板状根。

2.2 藻样的采集

藻样以红藻中的鹧鸪菜 (*Caloglossa leprieurii*) 为材料。鹧鸪菜属于红藻门 (Rhodophyta), 真红藻纲 (Florileophyceae), 仙藻目 (Ceramiales), 红叶藻科 (Declessericaceae), 其藻体小型, 呈紫红色或暗紫色, 扁平窄长椭圆形, 叉状分枝, 在分枝处常缢缩, 单轴型。鹧鸪菜是一种泛亚热带性藻类, 在中国从浙江至广东沿海都有分布, 尤喜生长在河口附近的高、

中潮带 (李伟新等, 1982)。在福建红树林区也是一类普遍存在的优势红藻, 在本项研究的秋茄林内极为常见 (林鹏等, 1997)。采集藻样时, 在靠外滩的红树林边缘选择生长茂盛的红藻区为采样地段, 用镊子或小刀采集近泥面处红树基部的附生鹧鸪菜 (注意弃除树皮等杂物, 尽可能不沾泥), 装入无菌袋内混合均匀。所有采样用具都经无菌处理。采集的藻样立即带回实验室作微生物学分析, 另取一部分藻样, $80^{\circ} C$ 烘干研细, 按实验要求过筛, 贮存供分析藻样氮含量。另外, 再取少量样品于 $105^{\circ} C$ 烘干至恒重, 求含水量与干质量。藻样采集时间依次为秋季 2000 年 11 月 6 日, 冬季 2001 年 1 月 3 日, 春季 2001 年 4 月 11 日, 夏季 2001 年 7 月 9 日。

2.3 藻体自生固氮菌数量测定

自生固氮菌数量测定采用稀释平板法。称取混合均匀的样品 $5 g$ 盛于无菌研钵中, 加入少量无菌水 (从已定容的三角瓶中倒出), 充分研磨后, 倒回三角瓶中 (瓶中装有小玻璃珠), 置旋涡混合器上振荡混匀, 静置分层后, 取上层悬浊液按要求进行梯度稀释, 接种培养与计数。自生固氮细菌的分离培养基为阿须贝氏 (Ashby) 培养基, 使用葡萄糖作碳源, 用蒸馏水配制, 添加 $NaCl$ 使其浓度为 $15 g \cdot kg^{-1}$, 使用人工海水作无菌稀释水。自生固氮菌数量以每克干质量的平板菌落数计算 ($cfu \cdot g^{-1}$)。

2.4 藻样氮含量的测定

在检测自生固氮菌数量的同时, 也测定了藻样的氮含量。藻样氮含量的测定采用硫酸过氧化氢消化, 钠氏试剂比色法 (鲁如坤, 2000)。

2.5 藻体异养固氮细菌的分类鉴定

在适当稀释平板上挑取生长良好的异养固氮细菌, 转接于以葡萄糖为碳源, 含 $NaCl$ 15% 的 Burk 培养基的试管斜面上, 经纯化后参照相关文献初步鉴定到属 (中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1978; 布坎南和吉本斯, 1984)。

2.6 数据处理

藻体含氮量春冬两季差异显著性的 T 检验采用 SPSS 10.0 统计软件完成。

3 结果与分析

3.1 藻体异养自生固氮细菌及藻体氮含量的季节变化

从红藻鹧鸪菜藻体上异养自生固氮菌的数量季节变化可知 (图 1), 自生固氮菌季节变化模式为春

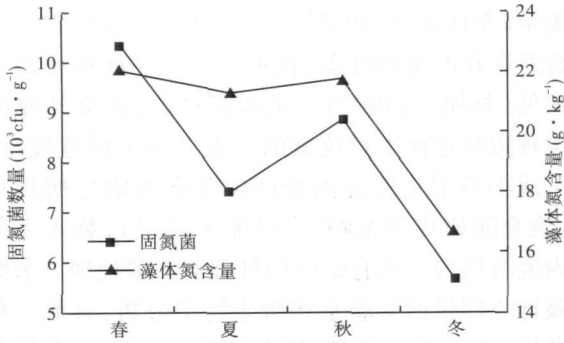


图 1 固氮菌和藻体氮含量的季节变化

Fig 1 Seasonal change of nitrogen-fixing bacteria and nitrogen concentration in algal samples

春季 > 秋季 > 夏季 > 冬季, 表现春季最多, 为 1.033×10^4 cfu · g⁻¹, 冬季最少, 为 5.670 cfu · g⁻¹。而鹧鸪菜藻体氮含量的季节变化模式也是春季 > 秋季 > 夏季 > 冬季 (图 1), 以春季的含氮量最高 (22.08 g · kg⁻¹), 冬季最低 (16.63 g · kg⁻¹), 两者差异显著 ($P = 0.0014 < 0.05$)。鹧鸪菜藻体异养自生固氮菌与藻体氮含量表现出一致的季节变化模式。

3.2 藻体异养固氮细菌的初步鉴定

分离纯化了 9 株异养固氮细菌 (依次编号为 nf01—nf09), 均对其进行了革兰氏染色、菌落特征、

表 1 固氮细菌的主要生理生化特征

Tab 1 Main physiological and biochemical characteristics of nitrogen-fixing bacteria

实验项目	菌株号								
	nf01	nf02	nf03	nf04	nf05	nf06	nf07	nf08	nf09
氧化酶	-	-	-	-	-	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	-	-	-	-
甘露醇发酵	+	+	+	+	+	+	-	-	-
鼠李糖发酵	+	+	+	+	+	-	-	-	-
乳糖利用	+	+	+	+	+	+	-	+	+
蔗糖利用	+	+	+	+	+	+	-	-	W+
苯甲酸盐利用	+	+	+	+	+	W+	+	-	-
柠檬酸盐利用	+	+	+	+	+	+	-	-	-
钒盐代替钼盐	+	+	+	+	+	-	-	-	-

“+”为阳性反应,“-”为阴性反应,“W+”为弱阳性反应。

4 讨论

Mann 和 Steinke (1993) 的研究表明, 非洲 Beachwood 红树林自然保护区能固氮的蓝绿藻夏季数量最多, 冬季最少, 季节变异明显, 与本文所述的藻体异养自生固氮细菌春季数量最多不同。通常认为温度是季节变化的原因 (尤其是在寒冷的气候带), 很少认为其他因素会起作用, 但在南非 Swart-

色素、菌体细胞形状与大小观察以及动力穿刺实验, 并对其进行了一系列生理生化实验。在所鉴定的 9 株菌株中, 革兰氏染色均为阴性, 呈杆状, 大多数菌株在光学显微镜下同时可见到类球状细胞, 所有菌株均有荚膜, 除 nf06 号菌株有单端单生鞭毛外, 其他菌株均无鞭毛, 异染粒 (Volutin) 染色仅 nf01 和 nf05 呈阳性, 其他为阴性, 各菌株菌落特征不一; 所有菌株过氧化氢酶反应呈阳性, 不能分解淀粉, 鉴定 9 株菌株的主要生理生化特征 (表 1)。

根据上述实验结果, 参照“伯杰氏细菌鉴定手册” (布坎南和吉本斯, 1984), 这 9 株菌株均属固氮菌科 (Azotobacteraceae)。nf01, nf02, nf03, nf04 和 nf05 这 5 株菌株在形态特征上虽然有所差异, 但它们已鉴定的生理生化特征一致, 这些生理生化特征与固氮菌属内的维涅兰德固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 相符, 但色素和鞭毛特征与该种有些不符, 因此将这 5 株菌株初步定为固氮菌属未知种 (*Azotobacter* spp.)。nf06, nf07, nf08 和 nf09 或多或少兼有拜叶林克氏菌属 (*Beijerinckia*) 各个种的大部分特征, 初步定为拜叶林克氏菌属的未知种 (*Beijerinckia* spp.)。9 株菌株的种名确定有赖于进一步的表型和遗传特征。

kops 河口湾表面沉积物秋季有较高的固氮活性, 春夏季的固氮活性低是由于这些季节可利用的有机碳低的缘故 (Mann & Steinke 1993)。

本研究中, 温度也不是固氮菌数量季节变化的主导因子, 因为鹧鸪菜上异养固氮细菌数量最多的是春季, 而不是夏季。异养固氮细菌的季节变化模式受鹧鸪菜的生长与物质积累、温度、光照和水分的综合影响。鹧鸪菜与栖息其上的异养固氮细菌存在

着密切的关系, 鹧鸪菜一年四季的生长情况与藻体氮含量以及细菌的季节变化充分反映了这种关系(图 2)。鹧鸪菜以春、夏之交生长得最好, 春季积累的物质最多, 冬季生长得最差(林鹏等, 1997), 而藻体氮含量也是春季最多, 冬季最少, 固氮菌数量也是如此, 藻体氮含量与固氮菌数量变化的季节模式趋势相近(图 2)。光合自养的鹧鸪菜与异养的固氮细菌可能存在着互惠互利的关系, 鹧鸪菜提供给细菌碳源和能量物质, 反过来, 异养的固氮细菌提供给鹧鸪菜部分固定的氮源。这种现象在其他大型藻类也有(Head & Carpenter, 1975)。细菌-植物联合固氮共生体系(bacteria-plant associated N_2 -fixing symbioses)在盐沼草的互花米草(*Spartina alterniflora*) (Patriquin, 1978), 海草的海笔草(*Thalassia testudinum*) (Capone & Taylor, 1982), 甚至浮游植物中也存在(Martinez *et al.*, 1983)。

因此, 鹧鸪菜上异养固氮细菌春季最多, 是因为春季鹧鸪菜生长旺盛, 可以提供较多的碳源和能量物质, 加之温度也较适宜之故, 夏季数量低于春季和秋季, 可能是由于夏季温度高, 日照强度大, 蒸发量大, 鹧鸪菜生长差, 附生于红树茎基及根上的鹧鸪菜, 容易被蒸发掉水分, 这样也就影响到栖息其上的异养固氮细菌的生长发育, 此时水分可能是一个重要的生态因子。Mann和Steinke(1993)的研究中, 最高的蓝绿藻数量与最多的月降雨量的时期一致, 在所有采样期间, 白骨壤(*Avicennia marina*)呼吸根在水浸没条件下比在暴露条件下明显有更高的乙炔还原速率, 说明水分确实是一个重要的因素。冬季异养固氮细菌数量最少在较大程度上与此时的低温有关, 因为低温既不利于鹧鸪菜的生长, 也不利于细菌的活动。

综上所述, 藻菌之间存在着密切的关系, 这种关系又受到环境因子的影响, 同时红树植物及其生境又会影响到藻和菌。因此, 红树植物-藻-菌之间形成的复杂关系, 是该系统内又一个很有吸引力的、需进一步研究的领域。

Herbert(1999)总结了海岸海洋生态系统中具有固氮能力的异养细菌。在红树林生态系统, 异养的固氮细菌主要有梭菌属(*Clostridium*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*) (Herbert, 1999), Uchino等(1984)报道了木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)具瘤中的氮固定细菌, 鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、产

气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)和植生克雷伯氏菌(*Klebsiella planticola*)。在上述的属中, 固氮菌属为好氧微生物(aerobes), 梭菌属和脱硫弧菌属为厌氧微生物(anaerobes), 芽孢杆菌属、肠杆菌属(*Enterobacter*)和克雷伯氏菌(*Klebsiella*)为兼性厌氧微生物(facultative anaerobes)。

本项研究所鉴定的菌株分别属于固氮菌属和拜叶林克氏菌属, 二者均为好氧微生物, 其中固氮菌属在红树林已有报道(Potts, 1984; Ravkumar *et al.*, 2004), 在海岸海洋沉积物中广泛存在(Herbert, 1999)。对于拜叶林克氏菌属, 虽在红树林区尚未见报道, 但在陆地生态系统广泛存在(Alexander, 1977), 红树林生态系统位于陆海生态交错区, 土壤生境同时具有陆地和海洋的性质, 鹧鸪菜生长于树干基部, 受潮水冲刷土壤的影响, 鹧鸪菜上分离到拜叶林克氏菌为正常现象。

参考文献

- 李伟新, 朱仲嘉, 刘凤贤. 1982. 海藻学概论. 上海: 上海科技出版社: 82-83
- 林鹏, 陈贞奋, 刘维刚. 1997. 福建红树林区大型藻类的生态学. 植物学报, **39**(2): 176-180
- 鲁如坤. 2000. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业出版社: 107-147.
- 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 1978. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社: 98-194
- 庄铁诚, 张瑜斌, 林鹏. 2000. 红树林区红藻体上微生物初探. 厦门大学学报(自然科学版), **39**(2): 227-234
- 布坎南 RE, 吉本斯 NE(中国科学院微生物研究所译). 1984. 伯杰细菌鉴定手册(第8版). 北京: 科学出版社: 329-340
- Alexander M. 1977. Introduction to Soil Microbiology (2nd ed). New York: John Wiley & Sons Inc 150-158
- Alongi DM, Boto KG, Robertson AI. 1992. Nitrogen and phosphorus cycles // Robertson AI, Alongi DM, eds. Tropical Mangrove Ecosystem. Washington DC: American Geophysical Union 251-292
- Bashan Y, Puente ME, Myrold DD, *et al.* 1998. In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. *FEMS Microbiology Ecology*, **26**(3): 165-170
- Capone DG, Taylor EJ. 1982. N_2 fixation in the rhizosphere of *Thalassia testudinum*. *Canada Journal of Microbiology*, **26**: 998-1005
- Head WD, Carpenter EJ. 1975. Nitrogen fixation associated with macroalgae *Codium fragile*. *Limnology Oceanography*, **20**: 815-823
- Herbert RA. 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, **23**: 563-590

- Holgün G, Bashan Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biology & Biochemistry*, **28**(12): 1651-1660
- Lugomela C, Beegun B. 2002. Biological N₂-fixation on mangrove pneumatophores: Preliminary observations and perspectives. *Ambio*, **31**: 612-613
- Mann FD, Steinke TD. 1993. Biological nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with blue-green algal (cyanobacterial) communities in the Beachood Mangrove Nature Reserve. Seasonal variation in acetylene reduction activity. *South Africa Journal of Botany*, **59**(1): 1-8
- Martinez L, Silver MW, King JM, et al. 1983. Nitrogen fixation by floating diatom mats: A source of new nitrogen to oligotrophic ocean waters. *Science*, **221**: 152-154
- Patriquin DG. 1978. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with cord grass *Spartina alterniflora* Loisel. *Ecological Bulletin*, **26**: 20-27
- Potts M. 1984. Nitrogen fixation in mangrove forests // Por FD, Dor J, eds. *Hydrobiology of the Mangal*. The Hague: DrW Junk, 155-162
- Rav Kumar S, Kathiresan K, Ignatiamal SIM, et al. 2004. Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **312**(1): 5-17
- Sengupta AC. 1991. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. *Oecologia*, **87**(4): 560-564
- Tanaka J. 1987. Species composition and vertical distribution of macroalgae in brackish water of Japanese mangrove forests. *Limnology*, **13**(4): 141-150
- Tokdo G, Bashan Y, Soelner A. 1995. In vitro colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, **41**(11): 1012-1020
- Uchino F, Hambali GG, Yatazawa M. 1984. Nitrogen-fixing bacteria from warty lenticellate bark of a mangrove tree, *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lamk. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**(1): 44-48
- van der Valk AG, Attwill PM. 1984. Acetylene reduction in an *Avicennia marina* community in Southern Australia. *Australian Journal of Botany*, **32**: 157-164
- Woitck AF, Ohowa B, Kazungu JM, et al. 1997. Nitrogen enrichment during decomposition of mangrove leaf litter in an east African coastal lagoon (Kenya): Relative importance of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, **39**(1): 15-35
- Zuberer DA, Silver WS. 1975. Mangrove-associated nitrogen fixation // Walsh SS, Teas H, eds. *Proceedings of International Symposium on Biology and Management of Mangroves*. Gainesville: University of Florida, 643-653

作者简介 张瑜斌,男,1970年生,博士,讲师。主要从事海洋微生物学与海洋生态学研究,发表论文 10 余篇。E-mail: microyubin@163.com

责任编辑 李凤芹
