

大豆根际高效自生固氮菌分离鉴定与特性研究

王超群,刘 帅,王晓璐,陈慧文,吴勇军,王志刚

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:采用无氮培养基,从大豆根际土壤中分离获得4株具有固氮能力的菌株:LS01、LS04、LS05和LS06。根据菌落的形态特征及16S rDNA序列比对分析,结果表明:LS01属于*Microbacterium* sp.,LS04属于*Streptomyces* sp.,LS05属于*Micromonospora* sp.,LS06属于*Sarocladium* sp.,在无氮液体培养基中培养64 h生物量均达到最大且能够分泌吲哚乙酸(IAA)。利用乙炔还原法对4种菌的固氮酶活性进行测定,固氮酶活性测定结果表明4种菌均具有较高的固氮酶活性。因此,*Microbacterium* sp. LS01,*Streptomyces* sp. LS04,*Micromonospora* sp. LS05和*Sarocladium* sp. LS06具有一定的固氮能力并能分泌IAA,在制备大豆生物菌肥方面具有较好的应用前景。

关键词:大豆;自生固氮菌;固氮酶活性;乙炔还原法;吲哚乙酸

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0850

Isolation, Identification and Characteristics of Authigenic Azotobacters from the Rhizosphere of Soybean

WANG Chao-qun, LIU Shuai, WANG Xiao-lu, CHEN Hui-wen, WU Yong-jun, WANG Zhi-gang

(Department of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Agricultural production in China is facing the challenges in high yield with high quality and environment protection. Authigenic azotobacter can promote plant growth, increase crop yield and quality, and have no contamination to environment, therefore, it will have broad applications in agricultural production. At present, it is a hot project to screen plant growth promoting rhizobacteria from specific crops as biological fertilizers. In the study, four strains were isolated and identified from plant rhizosphere, and named as LS01, LS04, LS05 and LS06, respectively. The analysis of enzyme activity found that all of them had capability on nitrogen fixation. The characteristics of morphology and 16S rDNA sequence analysis revealed that strain LS01 was classified as *Microbacterium* sp., strain LS04 was classified as *Streptomyces* sp., strain LS05 was classified as *Micromonospora* sp., and strain LS06 was classified as *Sarocladium* sp. The characteristics of their growth indicated that the maximum biomass were reached in 64 hours in no nitrogen medium. The further analysis showed that the four authigenic azotobacter had higher nitrogenase activity by use of acetylene reduction method. In the meantime, IAA quantitative analysis showed that they could secrete indole acetic acid. The data obtained in our study suggest that the four strains will have promising applications in producing bio-bacterial fertilizers and in promoting plant growth.

Keywords: Soybean; Authigenic azotobacter; Nitrogenase; Acetylene reduction method; IAA

我国的农业生产正在面临着实现高产优质的同时还要保障环境友好的挑战。大豆是食用油和蛋白食品的主要原料。随着经济的发展,居民生活水平的提高,我国对大豆的需求量不断增大^[1]。东北黑土地地区是我国重要的商品粮生产基地,是我国大豆、玉米的主产区,仅黑龙江省大豆的种植面积和产量就占全国的1/3^[2]。虽然大豆根瘤的固氮量占总氮吸收量的50%~60%,但仍必须补充适量氮肥以完全满足大豆对氮的需求^[3]。目前,黑土区过量施用氮肥的现象比较普遍,长期过量施用化肥不仅造成了黑土土壤有机质降低,土壤理化性状恶化及肥力下降,同时也污染了环境^[4]。而施用使用固氮微生物制作的生物菌肥可以有效地解决以上问题^[5-6]。因此,筛选特定作物的根际促生菌株,从而

为生产生物肥料提供有效生物源,已经成为研究热点^[7-8]。自生固氮菌作为植物根际促生菌的重要组成部分,近年来,国内专家学者对自生固氮菌的筛选和应用进行了大量研究,但有关我国东北黑土区大豆根际自生固氮菌的研究还鲜有报道。因此,本研究以东北黑土区大豆根际土壤微生物为研究对象,对大豆根际自生固氮菌进行了分离和固氮酶活性的测定,并对具有较高固氮酶活性的菌株进行了研究,旨在为进一步研制适合东北黑土区的大豆促生菌肥料提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

采取黑龙江省克山县黑土的大豆根际土壤混

收稿日期:2015-01-30
基金项目:黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201410221005);齐齐哈尔大学大学生学术科技创新团队项目(2014070103)。
第一作者简介:王超群(1993-),男,学士,主要从事微生物学。E-mail:1165899068@qq.com。
通讯作者:王志刚(1980-),男,博士,副教授,硕士,主要从事土壤微生物学研究。E-mail:wzg1980830@sina.com。

合样。采样时去掉土壤表层枯枝落叶层和根,以避免植物对土壤样品的影响。取土后立即采用无氮液体培养基(磷酸二氢钾0.2 g,硫酸镁0.2 g,氯化钠0.12 g,蔗糖10 g,碳酸钙1.0 g,水1 000 mL,pH7.2),37℃,120 r·min⁻¹震荡富集培养,然后于无氮固体培养基上进行分离纯化。

1.2 方法

1.2.1 硅酸盐细菌的分离与鉴定 植物根际混和土样经梯度稀释后,采用无氮培养基分离固氮菌,通过透明圈大小选择优势菌株,进行形态学和16S rDNA序列分析对菌株进行鉴定^[9-11]。菌株的重组克隆由上海美吉生物医药科技有限公司测序。包括细菌基因组DNA的抽提、电泳检测、PCR扩增、PCR产物的电泳检测、测序切胶纯化测序、分析结果和拼接序列。PCR试剂:EX Taq酶(TaKaRa),dNTP(TaKaRa),引物(Invitrogen合成),Marker:DL2000。PCR反应体系:(10×Ex Taq buffer 2.0 μL,2.5 mmol·L⁻¹ dNTP Mix 1.6 μL,5.0 pmol·L⁻¹ Primer 1 0.8 μL,5 pmol·L⁻¹ Primer 2 0.8 μL,Template 0.5 μL,5U·L⁻¹ Ex Taq 0.2 μL,ddH₂O 14.1 μL)总体积20 μL。PCR反应条件:95℃预变性5 min,接着进行24个循环(95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min),72℃后延伸10 min。测序结果在NCBI的Gen Bank数据库中进行Blast比对。

1.2.2 生长曲线的测定 菌株生长曲线的测定采用比浊法,以将菌株接种到LB培养基(蛋白胨10.0 g,酵母膏5.0 g,氯化钠8.0 g,水1 000 mL)中为起始,每隔4 h用紫外分光光度计测量波长为600 nm的菌液的OD值。

1.2.3 IAA分泌量的测定 将4种自生固氮菌分别接种于含有L-色氨酸(200 mg·L⁻¹)的LB液体培养基中,37℃,180 r·min⁻¹摇床中培养。每隔1 d取一定量的菌液于10 000 r·min⁻¹下离心10 min,取上清液加入等体积的Salkowski比色液,避光静置30 min,测定其OD₅₃₀值。计算发酵液中IAA的含量(μg·mL⁻¹)。

1.2.4 固氮菌的固氮酶活性测定 根据乙炔还原法,采用气相色谱仪测定自生固氮菌的固氮酶活性(ARA)^[12]。在150 mL的小锥形瓶中加入50 mL的半固体无氮培养基,在121℃下灭菌20 min后在超净工作台里接种1 mL的待测菌种,在28℃下培养48 h后,用无菌胶塞密封并且抽出总体积10 mL的空气,然后注入10 mL的乙炔气体继续培养并在24 h时取1 mL气样在气相色谱仪上测定生成的乙烯峰值。以培养物在单位时间内产生的乙烯量C₂H₄(nmol·mL⁻¹·h⁻¹)表示固氮酶的活性。乙炔还原活性计算方法:ARA=[实际C₂H₄峰面积×标准气浓度×(试管体积-样品体积)]/(标准气峰面积×进样量×封闭时间×接种量)。

1.3 数据分析

采用MEGA 5.2软件对自生固氮菌的16S rDNA序列在NCBI的GenBank数据库中Blast比对结果进行多序列同源性分析,并构建系统发育树(Bootstrap=1 000)。

采用Excel 2007软件整理原始数据,并用Origin 8.0软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 自生固氮菌的鉴定

在固体培养基上,自生固氮菌的形态和菌落特征见表1,这4种菌均为G⁻,不产生芽孢,LS01、LS04和LS05为杆菌,LS06为丝状。由图1可以看出,LS01菌株与*Microbacterium* sp. 2761的16S rDNA序列同源性达到99%,LS04与*Streptomyces* sp. CC5的16S rDNA序列同源性达到100%,LS05菌株与*Micromonospora* sp. M24的16S rDNA序列同源性达到99%,LS06菌株与*Sarocladium* sp. AL31的16S rDNA序列同源性达到100%。结合菌体形态和菌落特征,将LS01菌株鉴定为*Microbacterium* sp. LS01。将LS04菌株鉴定为*Streptomyces* sp. LS04,将LS05菌株鉴定为*Micromonospora* sp. LS05,将LS06菌株鉴定为*Sarocladium* sp. LS06。

表1 自生固氮细菌的菌落特征

Table 1 The colony characteristics of azotobacter

菌株编号	菌落形态	菌落颜色	菌落表面	菌体形态	革兰氏染色	芽孢
Number of strains	Shape of colony	Colony colour	Colony surface	Bacteria shape	Gram	Endospore
LS01	圆形光滑透明	透明	湿润	杆状	-	-
LS04	圆形光滑不透明	白色	干燥	杆状	-	-
LS05	圆形光滑不透明	红色	湿润	杆状	-	-
LS06	伞形光滑不透明	白色	湿润	丝状	-	-

+ 表示阳性;- 表示阴性。

+ Positive;- Negative.

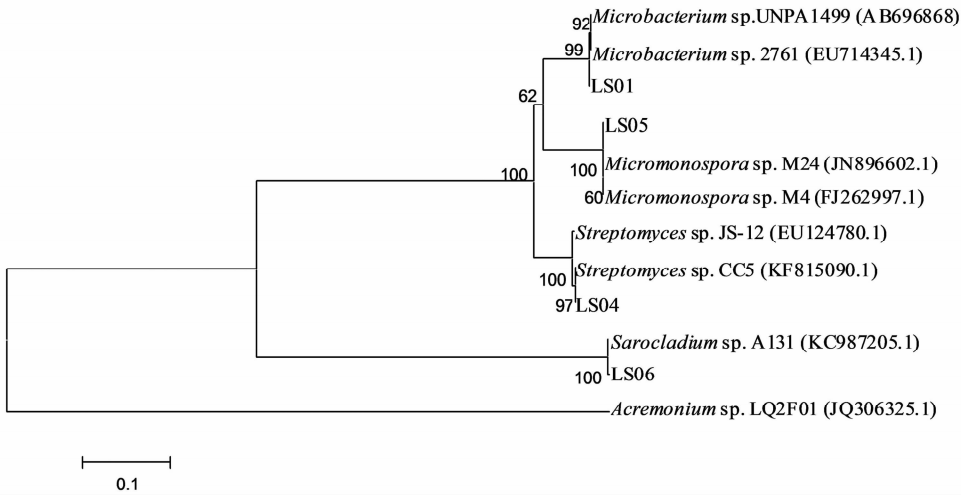


图1 LS01、LS04、LS05 及 LS06 菌株的进化树分析
Fig. 1 Evolutionary tree of LS01, LS04, LS05 and LS06

2.2 菌株的生长曲线

由图2可知LS05、LS06菌株的迟缓期为12 h较LS01、LS04菌株的迟缓期(16 h)要短;LS05、LS06菌株在12~24 h为对数生长期,而LS01、LS04菌株在16~56 h为对数生长期;LS05菌株在24~56 h为平缓期,LS06菌株在24~60 h为平缓期,而LS01菌株在56~64 h为平缓期,LS04菌株在56~72 h为平缓期,因此LS05、LS06菌株的平缓期比LS01、LS04菌株的平缓期要长;LS05菌株的OD₆₀₀值超过了2.5,其它3种菌株均在2.4左右。

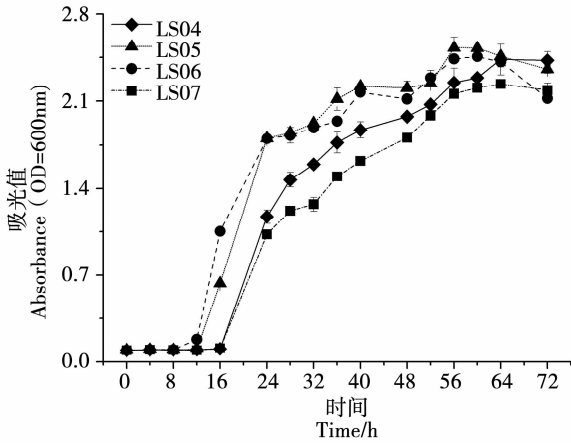


图2 菌株生长曲线
Fig. 2 Growth curve of strains

2.3 菌株的IAA分泌曲线

如图3所示,4株自生固氮菌均具有合成吲哚乙酸的能力,且合成量较高,在培养5 d时 IAA 合成量都达到最大,分别达到36.95、30、49.39和42.26 mg·L⁻¹。其中LS05菌株的合成含量最高达到49.39 mg·L⁻¹,分别比LS01、LS04和LS06高25.18%、39.25%和14.43%。

2.4 菌株的固氮酶活性

对4株自生固氮菌进行固氮酶活性的测定结果

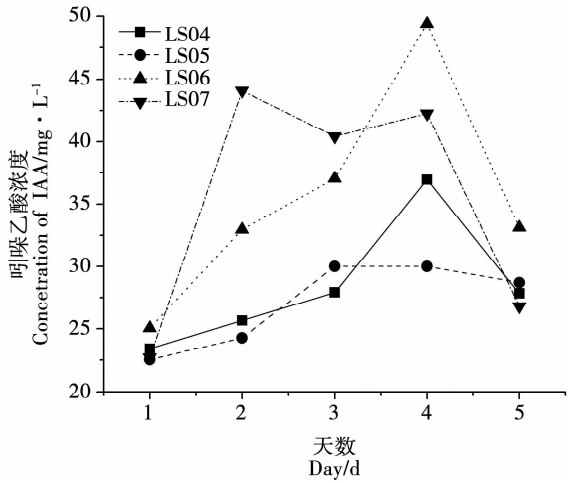


图3 自生固氮菌的IAA分泌曲线
Fig. 3 IAA curve graph

如图4所示。四株自生固氮菌的固氮酶活性差异较大,其中:LS01菌株的固氮酶活性最高,达到了263.40 nmol·mL⁻¹·h⁻¹,LS04菌株的固氮酶活最小,为183.09 nmol·mL⁻¹·h⁻¹。

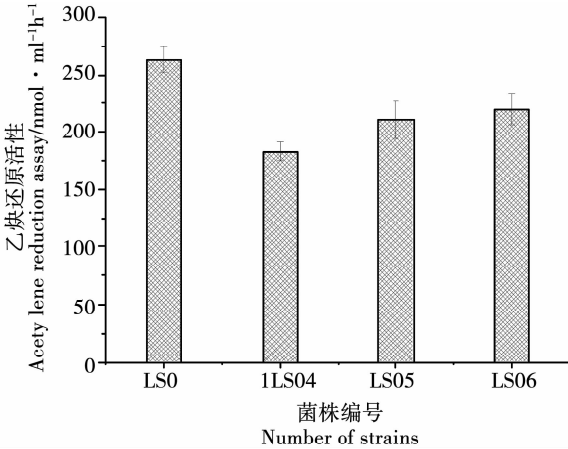


图4 固氮菌的固氮酶活性比较
Fig. 4 Comparison of nitrogenase activity of azotobacter

3 结论与讨论

本研究在植物根际土壤中成功分离出 4 种自生固氮菌,经 16S rDNA 鉴定分别为 *Microbacterium* sp. (LS01)、*Streptomyces* sp. (LS04)、*Micromonospora* sp. (LS05)、*Sarocladium* sp. (LS06)。在无氮培养基中生长迅速且具有一定的固氮能力,同时能分泌 IAA,在促进植物生长及制备生物菌肥方面具有较好的应用前景。

氮是农作物生长所必需的营养元素之一^[13],固氮微生物能够将大气中的分子态的氮气转化为农作物能利用的氨,进而为其提供合成蛋白质所必需的氮素营养,以达到促进植物生长的作用。由于共生固氮菌对宿主要求专一性,例如一定的根瘤菌只能用于一定的豆科植物,所以使用范围较窄,而自生固氮菌不受这些因素的限制,生产和使用起来更加方便^[14]。因此,对自生固氮菌在各方面的研究与应用受到广泛关注。吡啶乙酸是一种植物体内普遍存在的内源生长素,属吡啶类化合物。其具有广谱多用途的特点,它能诱导番茄单性结实和坐果,在盛花期以 3 000 mg·L⁻¹液浸泡花,可形成无籽番茄果,提高坐果率;促进插枝生要是它应用最早的一个方面。它还可促进作物不定根的形成,加快营养繁殖速度,促进秧苗生根,增加甜菜等的块根产量和含糖量^[15-16]。有研究结果表明自生固氮菌能够帮助作物吸收营养物质或者合成某种化合物(如生长激素)供植物利用,与作物产量和品质的形成密切相关^[17-18],并对禾谷类作物的籽粒和生物学产量有明显的作^[19-20]。植物激素在豆科植物根瘤形成和发育过程中起重要调控作用^[21]。周德明等^[22]分离得到的 16 株固氮菌中 NGJ-4 的固氮酶活最高为 264.7 nmol·mL⁻¹·h⁻¹其它 15 株菌的固氮酶活均在 57.1 ~ 237.4 nmol·mL⁻¹·h⁻¹,本实验分离得到菌株的固氮酶活性最高为 263.40 nmol·mL⁻¹·h⁻¹,最低为 183.09 nmol·mL⁻¹·h⁻¹,可见,所分离的 4 株菌的固氮酶活性较高。而在分泌 IAA 方面 LS05 分泌的 IAA 浓度达到 49.39 mg·L⁻¹明显高于周德明分离得到的固氮菌 NGX-5 分泌的 IAA 浓度 35.8 mg·L⁻¹。林丽^[23]分离得到固氮菌 *Microbacterium* sp. 16SH 具有合成分泌嗜铁素和 IAA、溶解无机磷和分解 ACC 等促进植物生长的特性。上述研究结果能与本研究结果相互补充,相互印证。高才智^[24]的研究结果表明自生固氮菌能够在城市的污泥中生长并发酵生活垃圾,加速生活垃圾的熟化。且自生固氮菌分布广泛,对营养条件要求不高,易于规模培养,因而是一类很有前景的功能菌。可

见,自生固氮菌在促进植物生长方面具有很大的潜力,然而在实际应用方面,自生固氮菌作为活性微生物,在不同环境下其生物学特征、固氮能力和增殖能力等都有可能发生变化^[25],还有待于进一步的研究。

参考文献

[1] 程国强. 当前我国粮食供求形势与中长期趋势[J]. 中国党政干部论坛, 2012(3): 6-11. (Cheng G Q. The current China's grain supply and demand situation and long-term trends [J]. The Chinese party and government cadres BBS, 2012(3): 6-11.)

[2] 丁力. 培育有竞争力的现代大豆产业体系—关于黑龙江省振兴大豆产业的调查[J]. 调研世界, 2002(8): 26-29. (Ding L. To foster a competitive modern soybean industry system-the survey on the development of soybean industry in Heilongjiang province [J]. The Research World, 2002(8): 26-29.)

[3] 刘朴方, 王宏燕. 农肥和化肥施用对大豆根瘤菌多样性的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(6): 1468-1472. (Liu P F, Wang H Y. Effects of organic and chemical fertilizer applications on the diversity of soybean rhizobia [J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(6): 1468-1472.)

[4] 孙振宁, 段兴武, 谢云, 等. 东北典型黑土供肥量与大豆肥料利用率[J]. 中国农学通报, 2012, 28(15): 46-51. (Sun Z N, Duan X W, Xie Y, et al. Nutrient supplying capacity of typical black soil and fertilizer use efficiency of soybean in Heilongjiang province [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(15): 46-51.)

[5] 刘鹏, 刘训理. 中国微生物肥料的研究现状及前景展望[J]. 农学学报, 2013, 3(3): 26-31. (Liu P, Liu X L. Current research status and prospect of microbial fertilizer in China [J]. Journal of Agriculture, 2013, 3(3): 26-31.)

[6] Nadeem S M, Ahmad M, Zahir Z A, et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments [J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(2): 429-448.

[7] 王志刚, 徐伟慧, 莫继先, 等. 东北黑土区大豆根际促生菌群落组成研究[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(5): 592-596. (Wang Z G, Xu W H, Mo J X, et al. Community structure of soybean plant growth-promoting rhizobacteria in the black soil region of Northeast China [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2012, 20(5): 592-596.)

[8] 王志刚, 钟鹏, 王建丽, 等. 东北黑土区大豆根际促生菌生长条件及促生效应[J]. 大豆科学, 2012, 31(2): 270-273. (Wang Z G, Zhong P, Wang J L, et al. Growth conditions and growth-promoting effects of soybean PGPR in the black soil region of northeast China [J]. Soybean Science, 2012, 31(2): 270-273.)

[9] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]//北京: 高等教育出版社, 2010: 123-186. (Lin G X. Study on the principle and method of soil microorganism [M]//Beijing: Higher Education Press, 2010: 123-186.)

[10] 唐亮, 张进忠, 于萍萍, 等. 硅酸盐细菌的分离、纯化、鉴定及生物学特性研究[J]. 山东农业科学, 2008(1): 71-73. (Tang

- L, Zhang J Z, Yu P P, et al. Isolation, purification and identification of silicate-dissolving bacterial strains and studies of their biological characteristics [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2008(1): 71-73.)
- [11] 张世清, 李庆祥, 高建明, 等. 24株剑麻根际联合固氮菌的16SrDNA序列分析[J]. 江西农业学报, 2013, 23(11): 132-134. (Zhang S Q, Li Q X, Gao J M, et al. 16S rDNA Swquence analusis of 24 strains of associative nitrogen fixation bacteria from rhizosphere of sisal [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2013, 23(11): 132-134.)
- [12] 罗贤安, 涂安千. 生物固氮研究中乙炔还原法的应用[J]. 微生物学通报, 1979(2): 37-40. (Luo X A, Tu A Q. The application of acetylene reduction method in biological nitrogen-fixing [J]. Microbiology China, 1979(2): 37-40.)
- [13] 柴彦君, 黄丽, 袁家富, 等. 小麦氮素高效利用的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(8): 2007-2012. (Chai Y J, Huang L, Yuan J F, et al. Advances in hight nitrogen use efficiency of wheat [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2009, 48(8): 2007-2012.)
- [14] Banik S, Dey B K. Available Phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubling microorganisms [J]. Plant Soil, 1982, 69: 353-364.
- [15] 李立芹. 番茄“美粉1号”子叶再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2011(3): 60-62. (Li L Q. Tomato “meifen 1” cotyledon regeneration system [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011(3): 60-62.)
- [16] 李彩凤. 植物生长调节物质对甜菜 (*Beta Vulgaris* L.) 抽苔调控及其机理的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003. (Li C F, Plant growth regulating substances for *Beta Vulgaris* L. bolting regulation and mechanism research [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2003.)
- [17] 卢秉林, 王文丽, 李娟, 等. 自生固氮菌的固氮能力及其对春小麦生长发育的影响[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(5): 895-899. (Lu B L, Wang W L, Li J, et al. Nitrogen fixation ability of azotobacter and its effect on growth of spring wheat [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(5): 895-899.)
- [18] Chalk P M. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes [J]. Plant Soil, 1991, 132: 29-39.
- [19] Mena-Violante H G, Olalde-Portugal V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 113(1): 103-106.
- [20] Latha P, Anand T, Ragupathi N, et al. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani* [J]. Biological Control, 2009, 50(2): 85-93.
- [21] 刘薇, 赵振芳, 冯永君, 等. 植物激素在豆科植物根瘤形成和发育过程中的调控作用[J]. 大豆科学, 2013, 32(2): 262-266. Liu W, Zhao Z F, Feng Y J, et al. Regulation of plant hormones on the formation and development of legumes root nodules [J]. Soybean Science, 2013, 32(2): 262-266.
- [22] 周德明, 李蓉. 杉木根际固氮菌筛选及其溶磷性与分泌 IAA 特性研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2012, 35(4): 562-566. (Zhou D M, Li R. Screening of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere of cunninghaimia lanceolata and investigation on their properties of phosphate-solubilizing and IAA-producing [J]. Journal of Sichuan Normal University (Natural Science), 2012, 35(4): 562-566.)
- [23] 林丽. 广西 ROC22 甘蔗联合固氮菌的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2011. (Lin L. Guangxi ROC22 sugarcane joint research of azotobacter [D]. Nanning: Guangxi University, 2011.)
- [24] 高光智, 陈辅利. 固氮菌在污泥中培养研究[J]. 农业环境保护, 2000, 19(1): 29-31. (Gao G Z, Chen F L. Nitrogen-fixing bacteria in the sludge cultivation research [J]. Agro-Environmental Protection, 2000, 19(1): 29-31.)
- [25] 张崇邦, 金则心, 施时迪. 浙江天台山几种林型下土壤细菌生理群生态分布的特性[J]. 植物生态学报, 2002, 26(3): 269-274. (Zhang C B, Jin Z X, Shi S D. The ecological distribution of different bacterial physiological groups in several forest soils in the tiantai mountain [J]. Acta Phytocologica Sinica, 2002, 26(3): 269-274.)

欢迎订阅 2016 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

《大豆科学》为双月刊,16开本,国内外公开发行,国内每期定价:20.00元,全年120.00元,邮发代号:14-95。国外每期定价:10.00美元(含邮资),全年60.00美元,国外代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅,也可向编辑部直接订购。

热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部(邮编:150086)

电话:0451-86668735

网址:www.haasep.cn

E-mail: ddkxbjb@126.com