

文章编号: 1001-1498(2008)01-0101-05

广东箬竹内生固氮菌生理特性及促生效果研究

侯伟¹, 彭桂香², 许志钧¹, 陈仕贤¹, 谭志远^{1*}

(1. 广东省植物分子育种重点实验室, 华南农业大学农学院, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:从广东箬竹中分离、筛选得到 5 株固氮酶活性高且稳定、生长势强的内生固氮菌株, 对其生理特性、环境适应性及其对植物的促生效果进行了系统研究。结果表明: 在无氮培养、温度 18~40 ℃ 时, 菌株均能生长且有固氮酶活性, 其最适生长及固氮的温度为 26~37 ℃; 在偏酸 (pH 值 5.0) 和偏碱 (pH 值 8.0) 的条件下, 菌株均能保持较强的生长势和较高的固氮酶活性, 并能通过调节自身代谢适应环境的酸、碱变化, 使培养液趋近中性; 培养液中 NaCl 浓度在 0.5~2.5 g·L⁻¹、(NH₄)₂SO₄ 浓度在 0.05~0.50 g·L⁻¹ 时, 菌株均能保持旺盛生长且有较高的固氮酶活性。接种水稻试验表明: 菌株对植物的生长有一定的促进作用。

关键词:内生固氮菌; 接种效应; 生理特性; 固氮酶活性; 箬竹

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

Growth-promoting Effects and Physiological Property of Endophytic Diazotrophs Isolated from Guangdong Bamboo (*Bambusa blumeana*)

HOU Wei¹, PENG Gui-xiang², XU Zhi-jun¹, CHEN Shi-xian¹, TAN Zhi-yuan^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China; 2. College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

Abstract: Five endophytic diazotrophs with high and stable nitrogenase activity screened from Guangdong bamboo (*Bambusa blumeana* J. A. et J. H. Schult f.) were studied by physiological test, the adaptability to environments and the growth-promoting effects on rice. The results showed that these strains could grow well at 18—40 ℃ and had nitrogenase activity at 26—37 ℃ for optimum growth under nitrogen-free medium. Strains also showed nitrogenase activity at a pH range of 5.0 to 8.0, at a saline (NaCl) concentration range of 0.5—2.5 g·L⁻¹ and at a range of 0.05—0.50 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄. Strains can secrete acid or alkali substance as neutralizer at pH 8.0 and 5.0 respectively. Experiments of inoculation on rice showed that strains had obviously effects on promoting the growth of plants.

Key words: endophytic diazotroph; physiological test; growth-promoting effects; nitrogenase activity; *Bambusa blumeana*

植物内生固氮菌 (endophytic diazotroph) 是指那些定殖在植物体内, 与宿主植物进行联合固氮的一类微生物^[1]。固氮微生物都含有固氮酶, 但内生固

氮菌不需要形成特化结构^[2], 并以相当高的数量存在植物组织内, 几乎可以在宿主植物的各种营养器官内发挥固氮作用, 从而为植物提供氮源, 而不会引

收稿日期: 2005-10-11 修回日期: 2007-08-30

基金项目: 国家自然科学基金 (30470002) 和广东科技攻关计划 (2007B020711004)

作者简介: 侯伟 (1980—), 女, 硕士研究生, 主要从事植物内生固氮菌的研究。

*通讯作者 Corresponding author, Email: zytan@scau.edu.cn Tel: 020-38604857, 31458280

起宿主任何不良反应^[3]。大量试验表明,在各种环境和土壤条件下,接种固氮菌对牧草和谷物是有益的,热带地区联合固氮菌对禾本科植物的固氮量每年可达 $30 \sim 40 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ ^[4]。然而,联合固氮菌接种剂由于受土著微生物的竞争及结合态氮、氧、植物基因型差异和环境条件的变化等众多因素的影响而产生接种增产效果不稳定的问题^[5],在很大程度上制约了固氮菌接种剂在农业生产中的应用。本实验从广东籼竹的根、叶中筛选出固氮活性较高且稳定的 5 株内生固氮菌,探讨不同温度、酸碱度、渗透压、铵等环境因子对这些菌株的生长及固氮酶活性的影

响,以明确菌株对不同环境条件的适应性及其作为接种剂的可行性。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

在 2004—2005 年利用乙炔还原法从广东籼竹 (*Bambusa blumeana* J. A. et J. H. Schult f) 根、叶中分离筛选到 5 株具有较高固氮酶活性的内生固氮菌株 (表 1)。内生固氮菌株的来源及分离、纯化的方法和 16S rDNA 序列分析确定的分类地位见参考文献 [6]。

表 1 供试菌株

菌株代号	培养条件	固氮酶活性 / ($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	16S rDNA 序列相似性
Z2	好氧	870	与巴西固氮螺菌 (<i>Azospirillum brasilense</i> Tarrand J J) 99% 相似性
Zy7	兼性好氧	3 370	与塞内加尔埃希菌 (<i>Escherichia senegalensis</i> Mbengue M) 98% 相似性
Z13	好氧	2 150	与外来水螺菌 (<i>Azospirillum peregrynium</i> Skeman V B D) 99% 相似性
Z31	好氧	1 430	与假产碱假单胞菌 (<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> Skeman V B D) 98% 相似性
Z43	好氧	1 230	与恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i> Skeman V B D) 97% 相似性

1.2 方法

1.2.1 菌株的活化及固氮酶活性的测定 将保存在冰箱中的菌株接种到 VM-Ethanol 固体培养基中活化,在 28 ℃、湿度 85% 条件下,分别进行厌氧 (仪器为: YQX-1 型厌氧培养箱) 及好氧培养。

VM-Ethanol 固体培养基的主要成分是: Döbereiner-basic 溶液 $10.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, Fe-EDTA (0.66%) $1.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母粉 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2PO_4 -缓冲液 $3.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ (分开灭菌), 无水乙醇 $6.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ (过滤灭菌), 琼脂粉 $17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Döbereiner-basic 溶液配制: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $2.64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (分开灭菌), $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;

Fe-EDTA (0.66%) 配方: Na_2EDTA $3.72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $2.78 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;

K_2PO_4 缓冲液配置: KH_2PO_4 $146.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $187.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 6.8。

将已活化的菌株再次接入盛有 NFb^[7] 无氮半固体培养基的试管内,密封后置于 28 ℃、湿度 85% 的人工气候箱内进行培养; 24 h 后,向管内注入 10% 体积的乙炔气体,在同样条件的人工气候箱内培养 24 h,用乙炔还原法测定其固氮酶活性 (测定仪器为

北分 SP-2100 气相色谱)。气相色谱柱温 50 ℃,进样器 150 ℃,FD 180 ℃。

1.2.2 生理特性试验 在 NFb 培养基上,在 pH 值 7.0、温度 28 ℃、NaCl 浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准条件下,分别进行温度、渗透压、铵浓度和 pH 值等各单因子对菌株生长量和固氮酶活性的影响试验。培养温度设 18、26、28、30、32、35、37、40 ℃ 共 8 个水平, NaCl 浓度设 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、50.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 6 个水平,硫酸铵浓度设 0.05、0.25、0.50、2.50、5.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 5 个水平, pH 值设 4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0、10.0 共 8 个水平;各水平设 3 个重复,菌株接种量为 2% (预配 OD_{600} 值 1.0 菌悬液,每 10 mL 培养基中接种 0.2 mL 菌悬液)。菌株在 NFb 无氮液体培养基上振荡培养,用 UV-1201 型分光光度计在 600 nm 波长处测定各菌悬液的光密度值,作为菌株生长量指标。不同水平下供试菌株的固氮酶活性测定在 NFb 半固体 (含 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂) 培养基上进行,采用 1.2.1 节中的乙炔还原方法,固氮酶活性计算方法见参考文献 [8]。

1.2.3 水稻接种试验 以籼型水稻华航 1 号 (*Oryza sativa* L. Subsp. *indica* Kato cv. Huahang No. 1 Chen ZQ) 进行菌株接种试验。根据水稻种子发芽的时间,将菌株活化好,保证菌株在对数生长期,制成菌悬液 (10^8 细胞 $\cdot \text{mL}^{-1}$) 浸泡水稻苗 24 h; 然后分别转接到装有水稻无氮营养液^[9] 的大试管里

(以滤纸为衬质),放在人工气候箱中光照(10 000 lx)培养 12~14 h·d⁻¹,以不接种的水稻苗为对照;设置 3 个重复,并及时观察、添加营养液。培养 14 d 后,将水稻苗从试管中取出,照相;同时分别测定水稻株高及根长。数据采用 SAS 软件进行分析,多重比较采用 Duncan 法。

2 结果与分析

2.1 温度对广东籼竹内生固氮菌株生长及固氮酶活性的影响

由图 1、2 可见:在 pH 值 7.0、NaCl 浓度 0.1 g·L⁻¹ 的条件下,菌株 Z2、Zy7、Z13、Z31、Z43 在 18~40 范围内均能生长,且固氮酶有活性,其中在 26~37 下菌悬液的 OD₆₀₀ 值和固氮酶活性都维持在较高的水平,低于 26 或高于 37 时菌株的生长量和固氮酶活性都明显下降。这说明 5 株固氮菌对温度的适应性较广,其最适生长及固氮温度为 26~37。

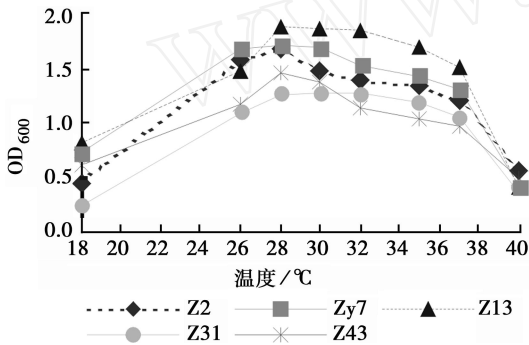


图 1 不同温度对供试菌株生长量 (OD₆₀₀) 的影响

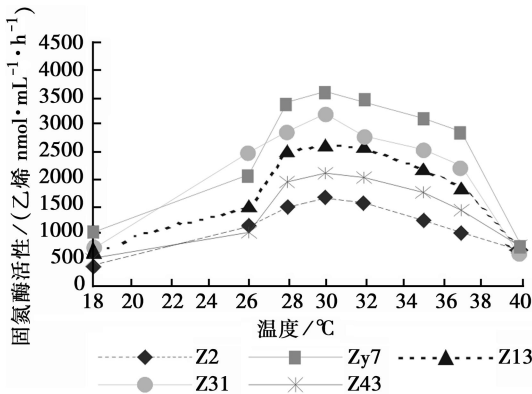


图 2 不同温度对供试菌株固氮酶活性的影响

2.2 酸碱度对广东籼竹内生固氮菌株生长及固氮酶活性的影响

由图 3、4 可知:5 个菌株在 28℃、pH 值为 5~8 的培养液内保持了较高的生长量和固氮酶活性,其

中,在 pH 值为 5.5~6.5 时生长势最强,而 pH 值为 6~7 时固氮酶活性最高。由此可见,菌株 Z2、Zy7、Z13、Z31、Z43 具有较广的酸碱度适应范围。由接种各菌株后培养液的 pH 值变化结果 (表 2) 可知:无论在酸性还是碱性环境下,供试菌株的生长繁殖均能改变介质的 pH 值,使之趋近中性,以利于自身的生长繁殖;其中,接种菌株 Zy7 培养液的 pH 值变化最大,分别从 5 上升到 5.8 和从 9.5 下降到 7.2。

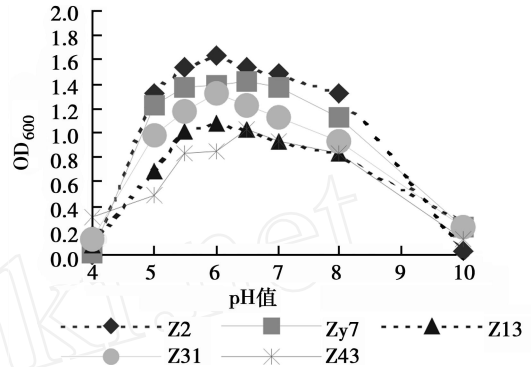


图 3 不同 pH 值对供试菌株生长量 (OD₆₀₀) 的影响

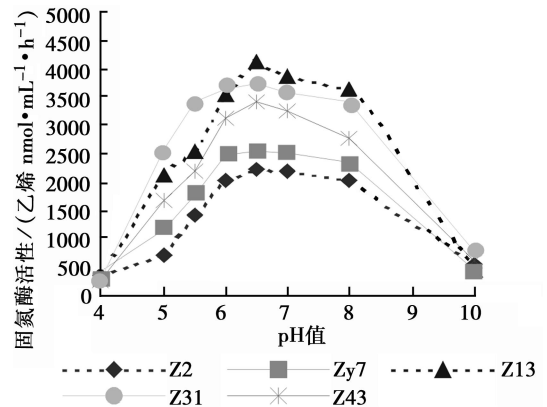


图 4 不同 pH 值对供试菌株固氮酶活性的影响

表 2 接种各菌株后培养液 pH 值的变化情况

接种菌株	培养液 pH 值					
	配置时	4	5	6	8	10
Z2	灭菌后	4.7	5.5	6.2	6.9	8.9
Zy7	接种后	4.2	5.8	6.5	7.0	7.2
Z13		4.5	5.7	6.2	7.1	7.4
Z31		4.3	5.7	6.6	6.9	7.3
Z43		4.5	5.4	6.1	6.9	7.7

2.3 渗透压对广东籼竹内生固氮菌株生长及固氮酶活性的影响

从图 5、6 可看出:在 pH 值 7.0、温度 28℃ 下,培养液中 NaCl 浓度在 0.5~2.5 g·L⁻¹ 时,5 个菌株都能保持旺盛生长且有较高的固氮酶活性;当 NaCl

浓度大于 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,固氮酶活性明显降低;当 NaCl 浓度达 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株仍可生长,但无固氮酶活性;当培养液中 NaCl 浓度达到 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株生长势极其微弱。

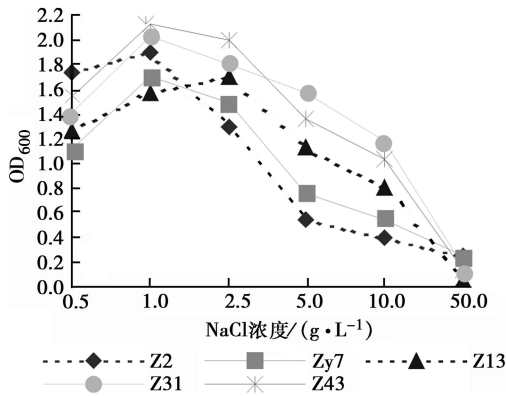


图 5 不同 NaCl 浓度对供试菌株生长量 (OD_{600}) 的影响

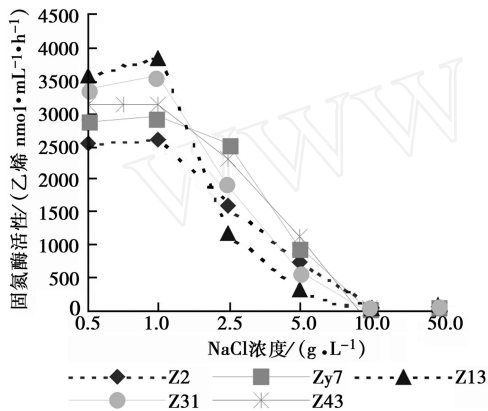


图 6 不同 NaCl 浓度对供试菌株固氮酶活性的影响

2.4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对广东籼竹内生固氮菌株生长及固氮酶活性的影响

从图 7、8 可看出:在 pH 值 7.0、温度 28°C 、NaCl 浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下,培养液中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度在 $0.05 \sim 0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,供试菌株都具有较高的固氮酶活性,且菌悬液的 OD_{600} 值维持在 $0.5 \sim 1.5$;当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度在 $0.25 \sim 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,固氮酶活性有所降低,但乙烯生成量仍能保持在 $500 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 以上;当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度超过 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌体量随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度增高急剧增加,而菌株固氮酶活性则相当微弱。

2.5 菌株接种对水稻生长的影响

表 3 表明:接种不同菌株的水稻的株高与对照间差异均达显著水平,而根长与对照间差异达极显著水平;菌株 Z13 促进水稻根长、株高生长最明显,根长、株高比对照分别长 5.7、7.3 cm; Z13 处

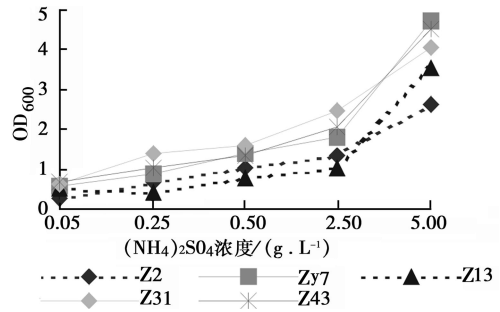


图 7 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对供试菌株生长量 (OD_{600}) 的影响

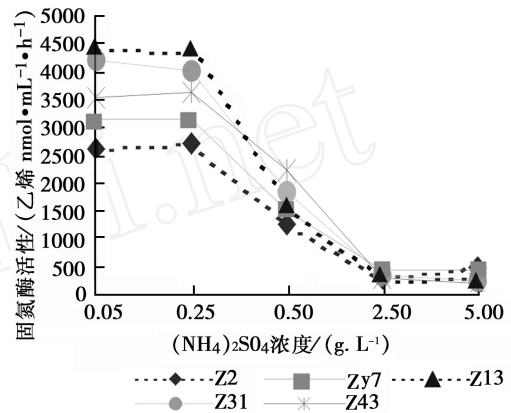


图 8 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对供试菌株固氮酶活性的影响

理的根长与其它菌株处理间差异达极显著水平。从植株的长势可见,接种不同菌株水稻的枝叶色泽更浓绿 (图 9)。

表 3 接种不同菌株 14 d 后水稻的生长特征

项目	菌株					
	对照	Z2	Zy7	Z13	Z31	Z43
根长 /cm	13.2C	16.7B	16.3B	18.9A	17.3B	16.9B
株高 /cm	30.1b	34.5a	33.7a	37.4a	35.9a	35.6a

注:表中所示数值为平均值,同行不同大写字母表示极显著性差异 ($P = 0.01$),不同小写字母表示显著性差异 ($P = 0.05$)。

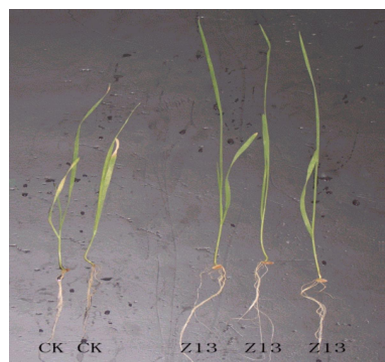


图 9 接种菌株 Z13 水稻苗的生长情况

3 小结与讨论

测定结果表明,这 5 株内生固氮菌对环境因子具有较广的适应性。无氮培养条件下,内生固氮菌在 18~40 ℃ 下均能生长且表达固氮酶活性。在 pH 值为 5~8 时,内生固氮菌均能保持较强的生长势和较高的固氮酶活性,并且能使培养液 pH 值趋近中性,说明这些菌株可以通过调节自身代谢,分泌不同的代谢产物来适应环境的酸、碱性变化^[10]。在 NaCl 浓度达 5.0 g·L⁻¹ 的渗透压下,菌株虽能旺盛生长但固氮酶活性较低。铵的存在能抑制绝大多数菌株固氮酶活性的表达,但从本试验结果可看出,菌株 Z2、Zy7、Z13、Z31、Z43 能耐受环境中存在一定浓度的铵,在 (NH₄)₂SO₄ 浓度达 0.50 g·L⁻¹ (相当于 NH₄⁺ 浓度为 7.5 mmol·L⁻¹) 时,菌株生长势旺盛且固氮酶活性仍能保持在 500 mmol·mL⁻¹·h⁻¹ 以上,表明菌株有较高的耐铵能力。基于这 5 株固氮菌株对不同环境条件所表现出的广泛适应性及较高固氮酶活性等特点,可作为农牧林业微生物菌肥开发的潜在资源。

菌株 Zy7 采用氨苄青霉素和卡那霉素进行双抗标记接种水稻,2 周后收获水稻。将水稻植株表面消毒后,捣碎涂布于含氨苄青霉素和卡那霉素的平板培养基上,获得了大量含氨苄青霉素和卡那霉素双抗标记的菌落。随机挑一单菌落进行 16S rDNA 序列测定,所得序列与 Zy7 原有序列一致,初步表明菌株 Zy7 寄居水稻组织内。进一步的荧光标记观察菌株在水稻组织内的分布情况,正在进行中。

接种 Z2、Zy7、Z13、Z31、Z43 菌株确实对水稻植株的生长表现出一定的促进作用,说明这几株菌具有较高的应用研究价值。被接种水稻表现的接种效果,究竟是接种菌代谢产物的作用,还是接种后内生固氮菌的作用,或者是二者共同作用的结果,内生固氮菌研究者还没有定论,需要进一步研究^[11-13]。由于本试验是在人工、无菌、水培的特殊环境中进行

的,在进入应用前还需研究诸如和土著菌之间的竞争及外界其它环境条件因素的影响等问题。

参考文献:

- [1] Baldani J I, Olivares F L, Henerly A S. Nitrogen-fixing endophytes: recent advances in the association with graminaceous plants grown in the tropics[M]//Elmerich C, Kordonosi A, Newton W E. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998: 203 - 206
- [2] 吕泽勋,李久蒂,朱至清. 玉米内生固氮菌的回接分离及限菌条件下在玉米根内的定殖[J]. 应用与环境生物学报,2001,7(3): 207 - 212
- [3] Döbereiner J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants[J]. Symbiosis, 1993, 23: 1 - 13
- [4] Cojho E H, Reis V M, Schenberg A C G, et al. Interactions of *Acetobacter diazotrophius* with an amylytic yeast in nitrogen-free bath culture[J]. FEMS Microbiol lett, 1993, 106: 241 - 346
- [5] 方 萍,高丽梅,贾小明,等. 固氮螺菌 (*Azospirillum brasiliense*) NO40 在红壤性水稻土上的接种效应[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2001,27(1): 33 - 36
- [6] 侯 伟,彭桂香,许志钧,等. 广东省籼竹内生固氮菌多样性[J]. 农业生物技术学报,2007,15(2): 290 - 294
- [7] 彭桂香,王华荣,侯 伟,等. 糖蜜草内生固氮菌 IS-PCR 和 16S rRNA 基因全序列分析[J]. 华南农业大学学报,2005,26(4): 73 - 76
- [8] 姚拓,张德罡,胡自治. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究 I 固氮菌分离及鉴定[J]. 草业学报,2004,13(2): 106 - 111
- [9] Yoshida S, Fomo D A, Cock J H, et al. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice 3rd Edition[M]. Manila, Philippines: RRI, 1976: 61 - 64
- [10] 张丽梅,方 萍,季天委. 高效固氮菌株 W12 对环境因子的适应性研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2002,28(6): 664 - 668
- [11] Watanabe I, Lin C. Response of wetland rice to inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas* sp. [J]. Soil Sci Plant Nutr, 1984, 30: 117
- [12] 李久蒂,安千里. 联合固氮研究进展[J]. 植物学通报,1997,14(3): 14 - 21
- [13] 顾小平,吴晓丽. 接种联合固氮菌对毛竹实生苗生长的影响[J]. 林业科学研究,1999,12(1): 7 - 12