

茄子叶际固氮菌的分离鉴定·培养特性及抑菌活性

幸聃¹, 郭青云^{2*}

(1. 赣南医学院医学信息工程学院, 江西赣州 341000; 2. 赣南师范大学生命科学学院, 江西赣州 341000)

摘要 采用 Ashby 无氮培养基从茄子叶际分离得到 1 株具有高效固氮性能的生固氮菌 QZ-1, 经 16S rDNA 序列鉴定, 该菌株与克雷伯氏菌属各菌株同源性高达 99% 以上, 初步鉴定为克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.), 其在酵母粉为碳源、pH 为 5.0 时生长最好。菌株 QZ-1 具有广谱抗真菌活性, 对油菜菌核病、葡萄炭疽病、番茄灰霉病抑制效果可达 40% 以上。生固氮菌 QZ-1 具有固氮和生防作用, 可为进一步研发优良的叶际固氮菌肥提供微生物资源。

关键词 茄子; 叶际固氮菌; 克雷伯氏菌; 分离鉴定; 培养特性; 抑菌活性

中图分类号 S182 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)10-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.10.001

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation, Identification, Cultural Characteristics and Antibacterial Activity of Nitrogen-fixing Bacteria from Phyllosphere of *Solanum melongena* L.

XING Chong¹, GUO Qing-yun² (1. School of Medical and Information Engineering, Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000; 2. College of Life Sciences, Gannan Normal University, Ganzhou, Jiangxi 341000)

Abstract A nitrogen-fixing bacteria strain QZ-1 in the phyllosphere of *Solanum melongena* L. was screened using Ashby nitrogen-free medium. By 16S rDNA sequence analysis, the homology between strain QZ-1 and *Klebsiella* isolated was up to 99%, thus, the isolated strain was identified as *Klebsiella* sp.. The growth of strain QZ-1 was better with yeast powder as carbon source at pH 5.0. Strain QZ-1 had broad-spectrum antifungal activity, with an inhibitory effect of over 40% on *Sclerotinia sclerotiorum*, grape anthracnose and *Botrytis cinerea*. The autotrophic nitrogen fixing bacterium QZ-1 had nitrogen fixation and biocontrol effects, which could provide microbial resources for the further development of nitrogen-fixing bacteria fertilizer.

Key words *Solanum melongena* L.; Nitrogen-fixing bacteria from phyllosphere; *Klebsiella* sp.; Isolation and identification; Cultural characteristics; Antifungal activity

植物叶际存在许多有益的微生物种群,在一定程度上促进植物生长、拮抗植物病原菌。固氮菌可以定殖在植物叶际,通过固定空气中的氮气为植物生长提供必需营养物质,促进植物生长繁殖,在自然生态系统氮循环中发挥着重要的作用^[1-2]。固氮菌是植物叶际的主要微生物类群,大多为细菌,目前已分离出的叶际固氮菌主要包括固氮菌属 (*Azotobacter*)、气杆菌属 (*Aerobaeter*)、拜氏固氮菌属 (*Beijerinckia*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、假单胞杆菌属 (*Pseudomonas*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、克氏杆菌属 (*Klebsiella*)、螺菌属 (*Spirillum*) 等^[2-4]。研究发现叶际固氮菌不仅具有较高的固氮能力,还能促进作物生长,提高作物产量。如将森林植物叶际分离出 *Flavobacterium* sp. TK2, 接种于玉米叶际,可使产量提高约 1/3^[5]。水稻叶际固氮菌具有溶磷作用并能产生吡啶乙酸,可促进水稻生长^[6]。叶际固氮菌还能产生抗菌物质,降低玉米大、小斑病的发病率,提高植物抗病能力,间接促进作物生长发育^[3-4]。因此,固氮菌被广泛用于生物菌肥中,在取代氮肥的施用具有广阔前景。

茄子 (*Solanum melongena* L.) 是我国广泛种植的蔬菜作物,营养丰富,食用方法多样,深受人民喜爱。茄子生长周期长,需要大量的营养物质,氮素是限制茄子生长的主要营养元素^[7]。合理施用氮肥可以使茄子增产增收,但多年连续施用氮肥,不仅会增加农业种植成本,还会污染环境,造成土壤

板结、肥力下降,甚至威胁人体健康。生物固氮具有成本低、高效、无污染等优点被广泛用于生物菌肥中,大多数农作物施用叶际固氮菌剂后,可以促进养分的吸收,减少氮肥和农药的用量,提高作物的产量和品质^[7-8]。茄子叶际存在大量固氮微生物,与茄子生长发育密切相关,该研究利用传统微生物学方法分离筛选茄子叶际固氮菌,并对其培养特性和抗菌活性进行研究,可为生物菌肥生产提供固氮菌种资源,对农业的生产发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料 供试茄子样品于 2021 年 9 月采自农民自种蔬菜园,取样时每个样品随机选取 5 株植物,戴上无菌手套进行采集,选取地上叶片,所取叶片位于新叶与老叶之间,避免沾染泥土引起试验误差,将采集到的叶片混合放入无菌培养皿中,24 h 内对叶片进行处理。

1.2 供试病原菌 棉花立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、黄瓜灰霉病菌 (*Botrytis cinerea* Pers.)、油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib.)、苹果轮纹病菌 (*Botryosphaeria dothidea*)、葡萄炭疽病菌 (*Colletot-richum gloeosporioides*)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 均由赣南师范大学生命科学学院袁小勇教授提供。

1.3 茄子叶际固氮菌分离筛选 将取回的新鲜叶片置于装有 100 mL 无菌磷酸缓冲液 (pH 7.0, 含 0.1% Tween) 的锥形瓶中,保证溶液完全浸没叶片,25 °C 200 r/min 摇床振荡 30 min,超声波 40 kHz 超声 5 min,用镊子取出叶片,将其余的溶液转移至 50 mL 离心管中,然后以 10 000 r/min 离心

基金项目 国家自然科学基金项目 (32160314)。

作者简介 幸聃 (1970—), 男, 江西南康人, 副教授, 硕士, 从事生物检测研究。* 通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事生物防治、昆虫-微生物互作研究。

收稿日期 2022-07-29

10 min, 倒掉上清, 收集得到沉淀菌体。吸取 100 μL 稀释液平板涂布法均匀接种到固体 Ashby 无氮培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d。根据菌落形态选择长势较好、生长速度较快的不同菌落进行划线纯化, 直至出现有规则的单菌落。

1.4 菌株 16S rDNA 和 *nifH* 基因的 PCR 扩增 将筛选获得的固氮菌接种于 LB 液体培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的摇床中过夜培养, 收集菌体, 用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 提取, 以细菌 16S rDNA 全序列通用引物 27F/1492R^[9] 和固氮基因 *nifH* 特定的引物 PolF/PolR^[10] 分别进行 PCR 扩增, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行验证。扩增的 PCR 产物送至北京擎科生物有限公司测序, 使用 NCBI 数据库进行序列比对, 利用 MEGA 7.0 软件采用最大似然 (ML) 算法构建系统发育树。

1.5 固氮酶活性测定 按照微生物固氮酶 (NITS) ELISA 试剂盒说明书操作测定。取 96 孔酶标板, 分别依次加入待测样本 10 μL , 样本稀释液 40 μL , 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min, 弃去液体, 然后加入 200 μL 洗涤缓冲液洗板 5 次, 加入显色液 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min, 加入终止液 50 μL 终止反应于 15 min 内在 450 nm 波长处测定 OD 值。同时以不同标准活性的标准品为对照绘制标准曲线, 依据标准曲线计算样本固氮酶活性。每个样本至少重复 3 次。

1.6 菌株培养特性研究

1.6.1 pH 对菌株生长的影响。 取等量的细菌培养液接种于 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 的 LB 液体培养基中, 每个 pH 至少做 3 个平行试验, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下 180 r/min 恒温振荡培养箱中培养 48 h, 测定菌液 OD₆₀₀ 的平均值, 确定菌株的最适生长 pH。

1.6.2 NaCl 浓度对菌株生长的影响。 取等量细菌培养液接种到含 NaCl 质量分数为 0%、1%、2%、3% 和 4% 的 LB 液体培养基中, 至少做 3 个平行试验, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下 180 r/min 恒温振荡培养箱中培养 48 h, 测定其 OD₆₀₀ 的平均值, 确定菌株的耐盐性。

1.6.3 碳源对菌株生长的影响。 配制分别由麦芽糖、葡萄糖、淀粉和蔗糖代替 LB 培养基中的碳源 (酵母粉) 的液体培养基, 取等量细菌培养液接种于上述培养基中, 至少做 3 个平行试验, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下 180 r/min 恒温振荡培养箱中培养 48 h, 分别测定不同碳源下菌液 OD₆₀₀。

1.7 固氮菌对植物病原真菌的抑制活性 采用平板对峙法^[11-12] 研究固氮菌对植物病原真菌的抑制活性。将病原菌菌饼接种于 PDA 琼脂平板 ($d=8.5$ cm) 中央, 在距离菌饼两侧 3 cm 处划线接种菌株, 将接种后的培养皿在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 5 d, 同时接种只含有病原真菌的 PDA 琼脂平板作为对照。用十字交叉法测量菌落直径, 根据以下公式计算菌丝生长抑制率: 菌丝生长抑制率 = (对照菌落直径 - 对峙板菌落直径) / 对照菌落直径 \times 100%。

2 结果与分析

2.1 固氮菌的分离及鉴定 从茄子叶际分离到 1 株能在

Ashby 无氮培养基上生长较快的菌株。经过 5 代的分离纯化后, 其菌落为圆形半透明, 边缘整齐, 表面湿润, 不易挑起, 能够产生黏液。在显微镜下观察为棒杆状 (图 1)。通过扩增固氮酶基因 *nifH* 进行复筛, 扩增得到大小约为 360 bp 的基因片段 (图 2), 与预期结果一致, 将其编号为 QZ-1。运用 ELISA 法测定其固氮酶活性, 菌株 QZ-1 的固氮酶活性为 78.79 IU/L, 结合 *nifH* 基因扩增和固氮酶活性测定确定菌株 QZ-1 具有固氮能力。菌株 QZ-1 的 16S rDNA 序列 1 437 bp, 序列提交至 GenBank 数据库, 登记号为 ON778565。在数据库中进行 BLAST 比对发现, 菌株 QZ-1 和克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 亲缘关系最近, 聚为一支, 序列相似度大于 99%, 因此将 QZ-1 命名为 *Klebsiella* sp. QZ-1 (图 3)。

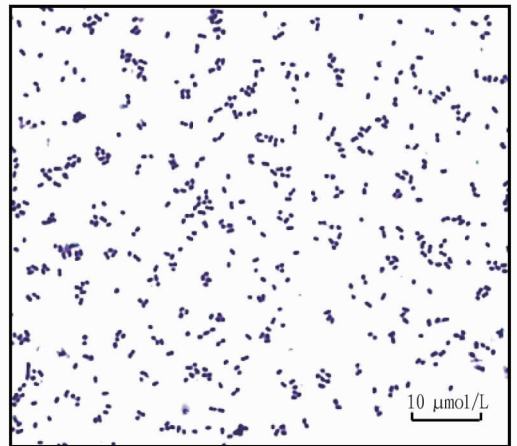


图 1 显微镜下的细胞形态

Fig.1 Cell morphology under microscope

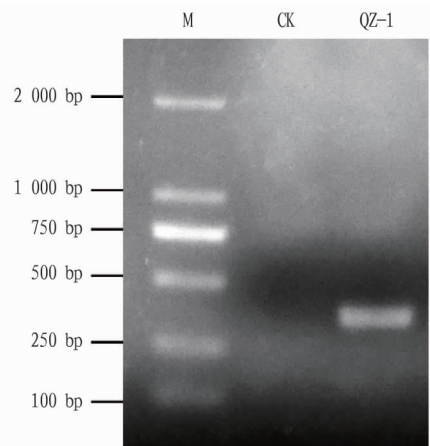


图 2 *nifH* 基因 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of *nifH* gene

2.2 固氮菌的培养特性

2.2.1 pH 对菌株生长的影响。 从图 4 可以看出, 菌株 QZ-1 在 pH 为 5.0~9.0 时生长较好, 生长速率随 pH 的增大呈减小趋势, 在 pH 为 5.0 时 OD₆₀₀ 达到最大, 说明克雷伯氏菌对 pH 有较强的酸碱适应性。在 pH 为 6.0 时比 pH 为 8.0 时生长状况好, 说明菌株 QZ-1 为中性偏酸菌。

2.2.2 NaCl 浓度对菌株生长的影响。 菌株 QZ-1 在 0~4% NaCl 浓度下均能生长, 说明菌株有较广的盐度适应性。菌株

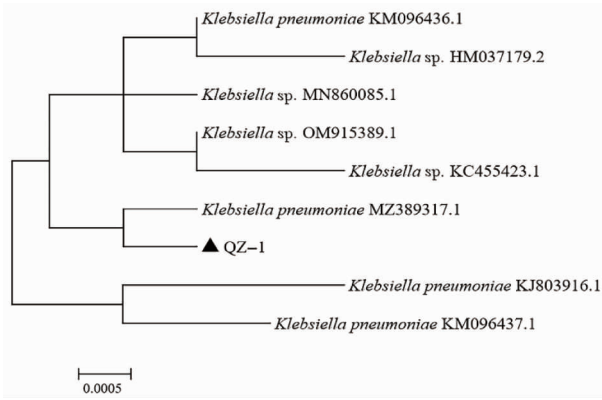


图3 基于16S rDNA序列的固氮菌QZ-1菌株的系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic evolution tree of nitrogen-fixing bacteria strain QZ-1 based on 16S rDNA sequence

的生长速率随 NaCl 浓度的增大而减小,在 NaCl 浓度为 0 时,OD₆₀₀达到最大,NaCl 浓度为 4% 时,OD₆₀₀最小(图 5)。由此可见,该菌株的最佳 NaCl 浓度为 0,较为适宜的 NaCl 浓度为 0~3%。

2.2.3 碳源对菌株生长的影响。当 LB 培养基中的酵母粉被淀粉、麦芽糖、蔗糖和葡萄糖替代后,菌株 QZ-1 对各碳源均能利用,但是酵母粉被替代后生长状况不好,在培养 48 h 后,以淀粉为碳源的菌液 OD₆₀₀最高(1.32),远低于在 LB 培养基中 OD₆₀₀(2.73),说明酵母粉为菌株的最佳碳源(图 6)。

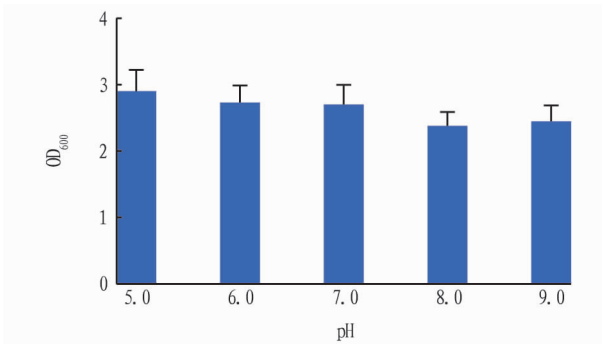


图4 pH对固氮菌株QZ-1生长的影响

Fig.4 Effect of pH on the growth of nitrogen fixing strain QZ-1

2.3 固氮菌对植物病原真菌的抑制活性 菌株 QZ-1 具有广谱抗真菌活性,对多种植物病原菌的抑制率从大到小依次为油菜菌核病菌(63.53%)、葡萄炭疽病菌(57.14%)、番茄灰霉病菌(48.75%)、稻瘟病菌(33.33%)、棉花立枯病菌(31.91%)、苹果轮纹病菌(21.88%)、棉花枯萎病菌(22.22%)、黄瓜灰霉病菌(8.57%),可见,其对油菜菌核病菌、葡萄炭疽病菌、番茄灰霉病菌活性的抑制效果较好,对黄瓜灰霉病菌活性的抑制效果最弱。与对照组相比,各试验组的抑菌圈边界清晰,抑菌圈周围菌丝生长缓慢(图 7)。

3 讨论与结论

自生固氮菌可以独立进行固定空气中分子态氮,促进植物生长,增加农作物产量,在农业生产中发挥重要作用。植物叶际存在高水平的碳水化合物和碳氮比,营养物质丰富,存在广泛的固氮作用,在自然条件下已经发现菊科、禾本科、

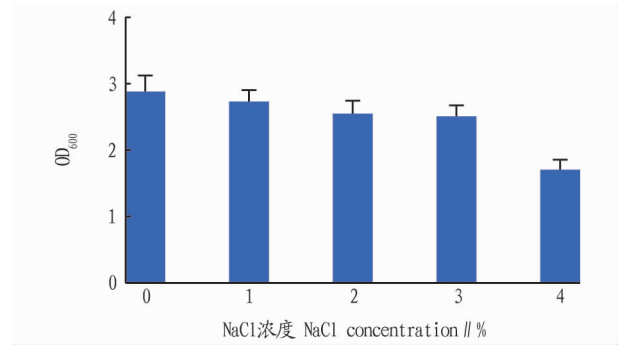


图5 NaCl浓度对固氮菌株QZ-1生长的影响

Fig.5 Effect of NaCl concentration on the growth of nitrogen fixing strain QZ-1

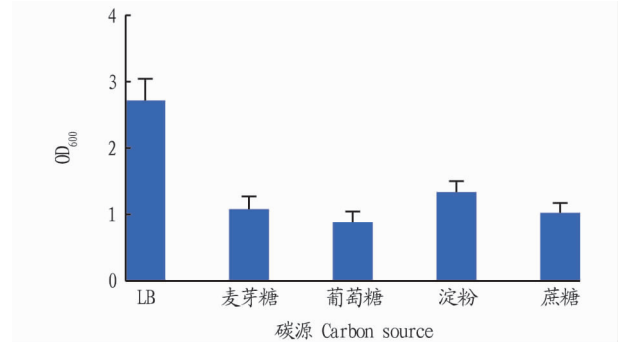


图6 碳源对固氮菌株QZ-1生长的影响

Fig.6 Effect of carbon source on the growth of nitrogen fixing strain QZ-1

十字花科、蔷薇科、杜鹃科、榆科等科的植物叶际具有较高的固氮酶活性^[2-3]。人工接种叶面固氮菌可以达到增产增收的效果,大豆喷施叶面固氮菌的增产率可达 13% 以上,玉米在苗期和孕穗期喷施叶际固氮菌可增产 10% 以上^[4]。自生固氮菌因其不与植物形成宿主关系且适应能力强,具有增加农作物产量以及绿色环保等优点,已成为 21 世纪新型肥料发展的重要方向之一。

该研究从茄子叶际分离到一株自生固氮菌 QZ-1,经 16S rDNA 序列比对分析鉴定为 *Klebsiella* 属,将其命名为 *Klebsiella* sp. QZ-1。据研究报道,克雷伯氏菌属的一些种类是重要的条件致病菌和医源性感染菌,大部分克雷伯氏菌基因组可检测出固氮基因 *nif*,说明该属细菌具有固氮的遗传基础,对植物的生长及代谢起着间接的促进作用,在农业生产中可作为一种绿色菌肥^[13]。罗霆等^[14]从甘蔗根系分离筛选到 1 株克雷伯氏固氮菌,其固氮百分率可达 29.2%。李树品等^[15]和黄磊等^[16]从小麦根系分离得到 3 株具有高固氮酶活性的克雷伯氏菌。韩梅等^[17]从玉米中分离的内生固氮菌克雷伯氏菌(*K. trevisan*),具有促进玉米生长的作用。该研究分离的自生固氮菌 QZ-1 在碳源氮源的利用方面基本与同属的固氮菌利用情况相似,在淀粉为碳源或者无氮条件下都能生长良好,能耐受低浓度的盐类,在偏酸(pH 5.0)的环境下生长良好,而现阶段报道的菌株适应的 pH 为 5.5~7.2,该试验筛选菌株与一般的在酸性环境下难以生存的菌株形成差异,在菌肥应用中能更好地用于不同酸碱度的土壤,因此可以更广泛

地应用在农业生产中。

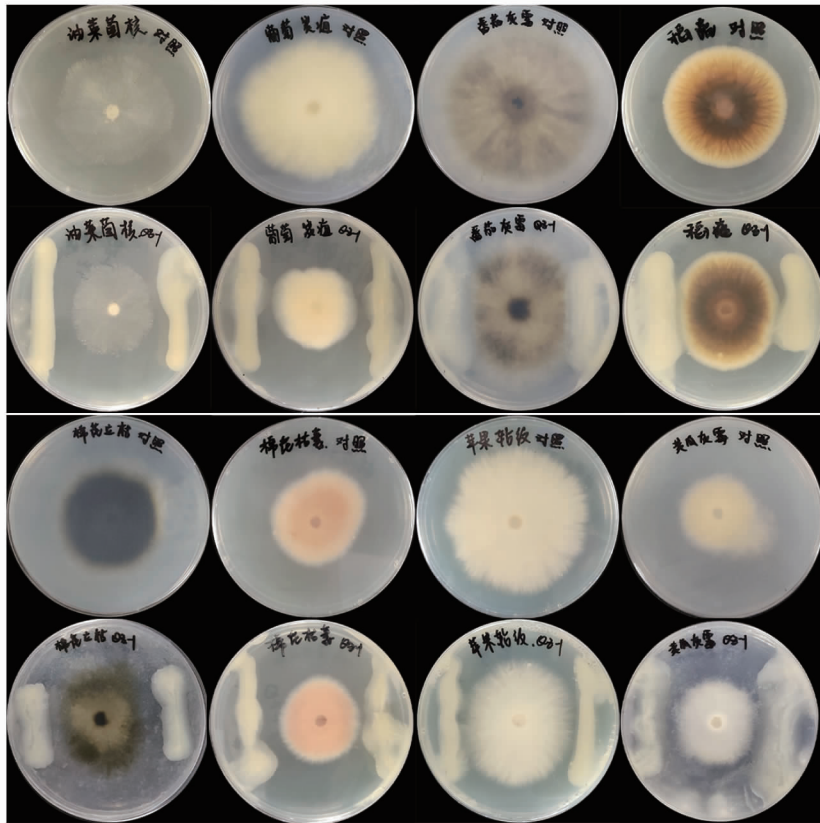


图7 菌株 QZ-1 拮抗真菌活性检测

Fig.7 Antagonistic ability detection of the strain QZ-1

克雷伯氏菌作为生防菌,对多种植物病原真菌均有抑菌活性。如 Park 等^[18] 研究发现产酸克雷伯氏菌(*K. oxytoca*)可防治胡萝卜软腐病。从石斛上分离到一株内生细菌(*K. varicola*)可防治由链格孢引起的烟草赤星病、甘蓝黑斑病和番茄早疫病等^[19]。该研究中分离的菌株 *Klebsiella* sp. QZ-1 具有广谱抗真菌活性,对油菜菌核病菌、葡萄炭疽病菌、番茄灰霉病菌抑制效果可达 40% 以上。因此,自生固氮菌 QZ-1 的筛选为叶际固氮菌的研究提供了微生物资源,由于克雷伯氏菌繁殖速度快,对环境的适应能力强,具有固氮和生防作用,繁殖过程中能够产生黏液,易于在植物叶际定殖等优点,可望高效地应用于固氮菌剂中进行资源化利用。

参考文献

- [1] VORHOLT J A. Microbial life in the phyllosphere [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(12): 828-840.
- [2] 潘建刚, 呼庆, 齐鸿雁, 等. 叶际微生物研究进展 [J]. *生态学报*, 2011, 31(2): 583-592.
- [3] 沙小玲, 梁胜贤, 庄绪亮, 等. 植物叶际固氮菌研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(10): 2443-2451.
- [4] 王楠, 李刚强, 李云龙, 等. 固氮类芽孢杆菌的分离鉴定及其促生、抑菌活性的测定 [J]. *中国农业科技导报*, 2019, 21(5): 95-103.
- [5] GIRI S, PATI B R. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* sp. & *Flavobacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer [J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2004, 51(1/2): 47-56.
- [6] MWAJITA M R, MURAGE H, TANI A, et al. Evaluation of rhizosphere, rhi-

- zoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters [J]. *SpringerPlus*, 2013, 2: 1-9.
- [7] 奚辉, 陈喜靖, 景金富, 等. 滴灌施肥对秋茄子生长、产量及品质的影响 [J]. *浙江农业科学*, 2015, 56(7): 1000-1001, 1003.
- [8] 焦永刚, 郭敬华, 董灵迪, 等. 生物菌肥对土壤生态环境改良效果 [J]. *北方园艺*, 2017(13): 135-139.
- [9] 李瑞芳, 赵玉峰, 薛雯雯, 等. 一株芽孢杆菌 16S rRNA 的基因序列测定和系统进化分析 [J]. *广东农业科学*, 2011, 38(3): 121-122, 125.
- [10] RÖSCH C, MERGEL A, BOTHE H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(8): 3818-3829.
- [11] 王家和. 烟草根病拮抗真菌的分离与筛选 [J]. *中国生物防治*, 1998, 14(1): 28-31.
- [12] 冯蓉, 刘丽, 陈海念, 等. 解淀粉芽孢杆菌 F11 抗真菌活性研究 [J]. *农业资源与环境学报*, 2021, 38(5): 849-857.
- [13] 李梦娇, 彭晨, 徐绍忠, 等. 克雷伯氏菌在农业与环境治理上的应用 [J]. *生物技术进展*, 2014, 4(6): 415-420.
- [14] 罗霆, 欧阳雪庆, 杨丽涛, 等. 一株有固氮能力的甘蔗克雷伯氏菌的分离鉴定及固氮特性 [J]. *热带作物学报*, 2010, 31(6): 972-978.
- [15] 李树品, 蒋千里, 楚杰, 等. 产酸克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella oxytoca*) 的分离及其特性研究 [J]. *山东科学*, 1991, 4(3): 19-25.
- [16] 黄磊, 石万瑜, 董绍佩, 等. 小麦根系克雷伯氏杆菌的分离与鉴定 [J]. *新疆农业科学*, 1990, 27(1): 27-28.
- [17] 韩梅, 罗培宇, 肖亦农, 等. 玉米内生固氮菌的分离鉴定及其促生长作用研究 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2010, 41(1): 94-97.
- [18] PARK M R, KIM Y C, LEE S, et al. Identification of an ISR-related metabolite produced by rhizobacterium *Klebsiella oxytoca* C1036 active against soft-rot disease pathogen in tobacco [J]. *Pest Manag Sci*, 2009, 65(10): 1114-1117.
- [19] 李祖红, 曾嵘, 文国松, 等. 一株植物内生细菌 SH-1 及其应用: CN201310383464.0 [P]. 2014-01-01.