

水稻根际固氮菌分离及最适培养条件研究

葛江丽, 施汉钰, 刘桂棋, 刘芳, 曹昊

(黑龙江省牡丹江林业科学研究所, 黑龙江 牡丹江 157009)

摘要:本研究从水稻根际土壤中筛选高效固氮菌,通过乙炔还原法选出一株固氮能力较强的菌株G3,其固氮酶活性为 $1.875 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。通过革兰氏染色和形态观察发现,G3为革兰氏阴性菌。对G3的最适培养条件进行研究,结果表明:G3生长的最适温度是 35°C ;最适生长pH是7;1%的NaCl为G3的最佳生长浓度;当铵离子浓度达到 1 mmol/L 时,能够很好地生长。

关键词:水稻;固氮菌;分离;最适培养条件

中图分类号:S511

文献标识码:A

文章编号:1003-8701(2018)04-0053-04

Isolation and Studies of Optimum Growth Condition of Nitrogen Fixation Bacteria in Rice

GE Jiangli, SHI Hanyu, LIU Guiqi, LIU Fang, CAO Hao

(Mudanjiang Institute of Forestry Science of Heilongjiang Province, Mudanjiang 157009, China)

Abstract: High efficiency nitrogen fixation bacteria were isolated from rice soil. The most effective strain G3 was selected ($1.875 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) by acetylene reduction method. Based on the morphological characters, G3 strain was gram negative bacteria. The optimal growth of G3 was studied. The experimental results showed that the optimal temperature and pH were 35°C and 7, respectively. The optimal concentration of NaCl was 1%, and optimal NH_4^+ was 1 mmol/L .

Key words: Rice; Nitrogen fixation bacteria; Isolation; Optimal growth condition

随着化学肥料的大量施用,土壤板结、土壤微生物群落结构发生变化。化肥中所含的一些重金属元素会对人体健康产生危害,从而引发食品安全问题和环境污染问题^[1]。然而化肥的有效利用率还不到50%,导致大量化肥流失到江河湖泊中造成水体污染^[2]。作为植物主要营养元素之一的氮素,自然界中以分子态氮的形式存在,而植物只能利用化合态氮,固氮微生物能够固定大气中的氮素从而被植物利用。生物每年在温和条件下的固氮量约有1亿t,大约是工业固氮量的两倍以上。生物菌肥的出现可以减少化学肥料的用量,避免环境污染,同时还可以提高农作物的产量和质量^[3]。由于生物菌肥中含有多种非病原微生物,因此在生长繁殖过程中能够抑制作物病原菌的生长,从而提高作物的抗逆性^[4-5]。

我国是水稻的种植和食用大国,氮素对水稻

的影响非常大,仅次于水^[6],氮肥的费用约占总成本的4.5%^[7]。因此,筛选一株适合黑龙江当地气候和土壤环境的高效固氮菌,对提高我省水稻生产能力,保护和改善生态环境,促进我省水稻产业的可持续发展具有重要的经济和社会效益。本研究从水稻根际分离具有固氮能力的高效菌株,并进行培养条件的研究,为水稻接种固氮菌剂和微生物菌肥的开发提供优良的菌株和技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 土壤样品采集

土壤样品于2017年6月采自黑龙江省牡丹江市宁安水稻田,采样深度在0~20 cm,用灭菌塑封袋装好带回实验室。

1.2 水稻根际固氮菌株的分离

称取土壤样品10 g,装入250 mL的锥形瓶中,加入适量玻璃珠和100 mL无菌水,静置浸泡20 min后,在恒温摇床中200 r/min振荡30 min,形成菌悬液母液,然后依次稀释,得到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释度的样品溶液。取各稀释

收稿日期:2018-03-27

基金项目:黑龙江省森工总局应用研究项目(sgzjY2015004)

作者简介:葛江丽(1981-),女,工程师,硕士,研究方向为微生物、细胞生物学和植物生理生化。

浓度的菌悬液 100 μ L 涂布在阿须贝无氮固体平板培养基上,37 $^{\circ}$ C 恒温生化培养箱培养 7 d。再从平板培养基上挑取长出的单菌落,采用平板划线法在阿须贝无氮固体培养基中进行纯化培养,将纯化菌株接种到 LB 斜面培养基上,于冰箱中 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 固氮酶活性测定

挑取纯化的固氮菌株接种到 LB 液体培养基中,于恒温摇床中 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 5 d。取 5 mL 菌悬液在血清瓶中 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h,然后换成胶塞封闭小瓶。用注射器从瓶中抽出 1 mL 空气,再向瓶中注入等量乙炔,28 $^{\circ}$ C 条件下反应 48 h。然后用微量进样器从反应瓶中抽取混合气体 0.2 mL,注入气相色谱仪中检测乙炔的生成量。根据下列公式计算固氮酶活性: $N(\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})=[\text{样品峰值}\times\text{标准乙炔浓度}(\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1})\times\text{培养容器体积}(\text{mL})]/[\text{标准乙炔峰值}\times\text{样品培养时间}(\text{h})\times 24.9]$ 。

1.4 菌落形态学鉴定

将筛选出来的固氮能力最强的菌株接种在阿须贝无氮固体平板上培养,观察其菌落的形状、大小、颜色、透明度、边缘特征等。然后用接种环挑取单菌落进行革兰氏染色。

1.5 培养条件研究

将固氮菌接种到 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 5 d。

1.5.1 温度对菌株生长的影响

将菌种接种到阿须贝无氮液体培养基中,分别置于 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、48 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C,200 r/min 振荡培养 5 d,然后紫外分光光度计测定菌悬液的 OD₆₀₀ 吸光值。

1.5.2 pH 对菌株生长的影响

将菌种接种到 pH 4、5、6、7、8、9、10、11 的阿须贝无氮液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 5 d,然后紫外分光光度计测定菌悬液的 OD₆₀₀ 吸光值。

1.5.3 渗透压对菌株生长的影响

将菌种接种到 NaCl 浓度 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11% 的阿须贝无氮液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 5 d,然后紫外分光光度计测定菌悬液的 OD₆₀₀ 吸光值。

1.5.4 铵离子浓度对菌株生长的影响

将菌种接种到 NH₄Cl 浓度 0 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L 的阿须贝无氮液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 5 d,然

后紫外分光光度计测定菌悬液的 OD₆₀₀ 吸光值。

2 结果与分析

2.1 水稻根际固氮菌的筛选

从水稻根际土壤中共分离得到 10 株固氮菌,通过测定固氮酶活性筛选出 1 株固氮能力较强的菌株,编号为 G3(表 1)。其培养液的固氮酶活性为 1.875 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

表 1 筛选菌株的固氮酶活性

菌株	固氮酶活性($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
G1	0.639
G2	0.585
G3	1.875
G4	0.732
G5	0.426
G6	0.834
G7	0.347
G8	0.095
G9	0.173
G10	0.479

2.2 菌株的形态鉴定

筛选得到的菌株在阿须贝无氮平板培养基上菌落形态见图 1,白色,不透明,边缘光滑。菌体为杆状,大小为 (1~4) $\mu\text{m}\times(0.1\sim 1)\mu\text{m}$,为革兰

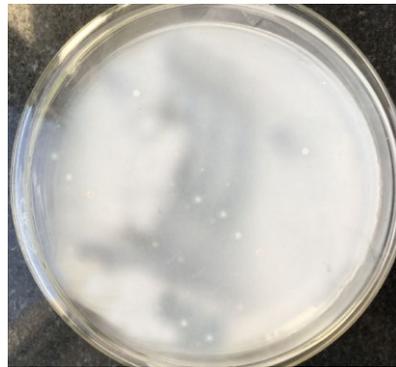


图 1 G3 在阿须贝无氮平板培养基上菌落形态



图 2 G3 在显微镜下的形态

氏阴性菌(图2)。

2.3 菌株培养条件优化

2.3.1 不同温度对固氮菌生长的影响

由图3可见,温度在35℃时,生长量最高。在20~35℃之间时,生长量不断增加;而当温度超过35℃时,生长量开始下降,直到温度达到60℃时,菌株停止生长。说明G3的生长温度范围较广,为20~55℃;最适生长温度是35℃。

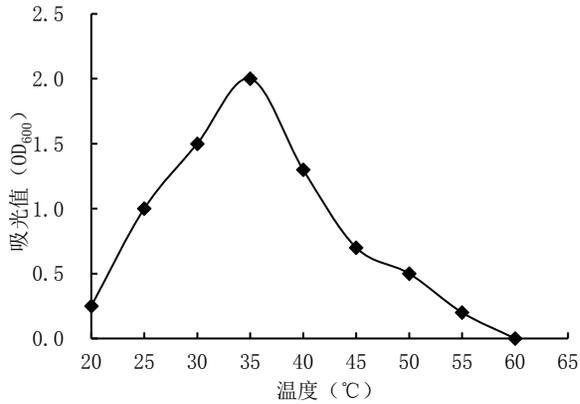


图3 G3在不同温度下的生长情况

2.3.2 不同pH对固氮菌生长的影响

从图4可知,菌株可以生长的pH范围较大。在PH为4时,菌株开始生长;当pH大于9时,菌株生长量较低。而当pH是7时,菌株的生长量最大。所以,G3的最适生长pH是7,生长pH范围是4~9,表明G3对酸碱性环境的适应性很广。

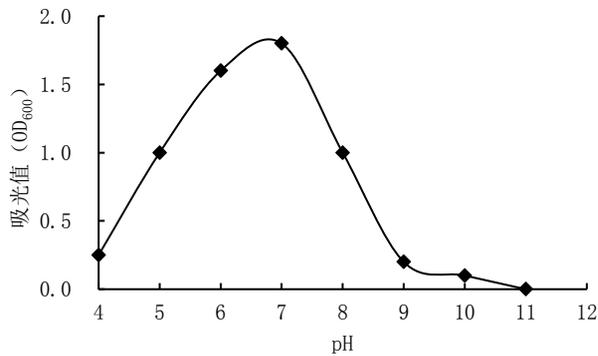


图4 G3在不同pH值下的生长情况

2.3.3 不同渗透压对固氮菌生长的影响

从图5中可以看出,NaCl浓度在0%~1%时,生长量随着NaCl浓度的增加而增加,NaCl浓度到1%时达到最大生长量,当浓度超过1%时生长量开始下降,大于5%时生长量极低。因此,G3的生长NaCl范围是0%~5%。

2.3.4 不同铵离子浓度对固氮菌生长的影响

如图6所示,铵离子浓度在0~1 mmol/L范围内时,G3的生长量呈上升趋势;当铵离子浓度超

过1 mmol/L时,生长量开始下降。G3的极限铵离子浓度是0~1.5 mmol/L,最适生长铵离子浓度是1 mmol/L。

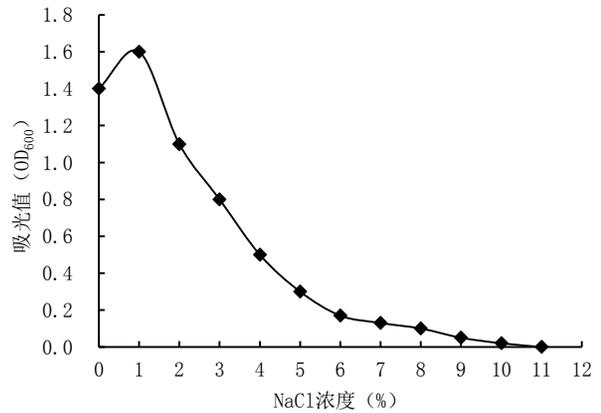


图5 G3在不同NaCl浓度下的生长情况

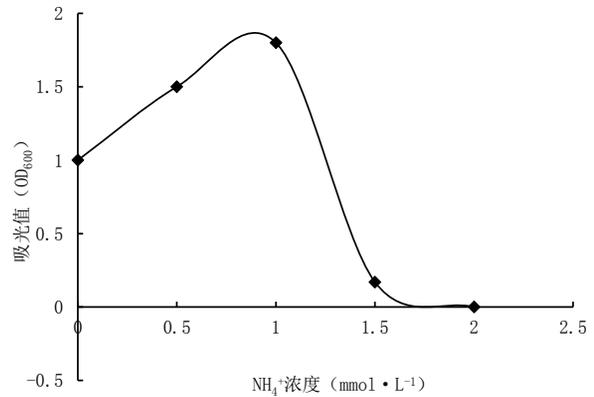


图6 G3在不同铵离子浓度下的生长情况

3 结论与讨论

由于联合固氮菌的主要宿主是粮食作物(水稻、玉米、小麦),所以研究联合固氮菌与植物之间的相互关系就成为人们关注的热点^[8]。胡文哲从野生稻分离获得34株联合固氮菌,分别属于黄杆菌属、克雷伯氏菌属、假单胞菌属、伯克霍尔德菌属、固氮螺菌属^[9]。张洪彬从甘蔗茎秆和土壤中分离筛选了35株固氮菌,鉴定表明所有菌株归属于节细菌属、芽孢杆菌属、克雷伯氏菌属、草螺菌属、鞘氨醇单胞菌属、解鸟氨酸拉乌尔菌属、泛菌属、劳尔特氏菌属、甘蔗肠杆菌属9个属,其中G1固氮酶活性最高,达1 111.36 nmol/(mL·h)^[10]。吕翻洋从6个玉米样品中共分离到171株可在无氮培养基上生长的耐热菌及内生菌^[11]。袁梅等从8个湖南水稻植株样品中分离到19株内生固氮菌^[12]。谭泽文等以广西梧县药用野生稻为材料,共分离得到27株内生固氮菌^[13]。笔者也从黑龙

江当地的水稻田中分离到10株高效的固氮菌株,利用乙炔还原法测定其还原酶最终筛选出1株固氮能力最强的菌株G3($1.875 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)。接下来将对其进行扩大培养,并与其他根际促生菌一起制成固氮微生物肥料,研究其对水稻等农作物生长的影响。

笔者对G3的培养条件进行研究,其生长温度范围为 $20 \sim 55^\circ\text{C}$,最适生长温度是 35°C ;生长pH范围是 $4 \sim 9$,最适生长pH是7;生长NaCl浓度范围是 $0\% \sim 5\%$,最佳生长NaCl浓度是 1% ;极限铵离子浓度是 $0 \sim 1.5 \text{ mmol/L}$,最适生长铵离子浓度是 1 mmol/L 。结果表明,固氮菌株G3对环境因子的适应性较广,对酸性和碱性的生长环境都有一定的适应能力,当NaCl浓度达到 1% 的较高渗透压环境下仍能旺盛地生长。铵能抑制固氮酶的活性,因此固氮菌的耐铵能力是评价固氮菌性能的一个重要指标。一般土壤中铵态氮的含量是 $10 \sim 15 \text{ mg/kg}$,而G3在铵离子浓度达到 1 mmol/L (相当于 18 mg/L)时能够旺盛生长。因此,G3在土壤中可以很好地发挥固氮作用。总之,固氮菌G3有很好的应用前景,笔者还将在菌肥开发方面做进一步的研究工作。

参考文献:

- [1] 徐志峰,王旭辉,丁亚欣,等.生物菌肥在农业生产中的应用[J].现代农业科技,2010(5):269-270.
- [2] 叶邦兴,唐海明,汤小明,等.中国农田污染的现状与防治对策初探[J].中国农学通报,2010,26(7):295-298.
- [3] Shu Y Y, Wang J, Liu Y, et al. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres[J]. J Plant Nutr Soil Sci, 2005, 51: 443-449.
- [4] 张敏,王正银.生物有机肥料与农业可持续发展[J].磷肥与复肥,2006,21(2):58-59.
- [5] 沈其荣,谭金芳,钱晓晴,等.土壤肥料学通论[M].北京:高等教育出版社,2001:288-292.
- [6] 胡雪.水稻根际促生菌的分离鉴定及其对水稻作用效果的研究[D].武汉:华中农业大学,2010.
- [7] 国家发展与改革委员会价格司.全国农产品成本收益资料汇编[M].北京:中国统计出版社,2014:117.
- [8] Dias A C F, Costa F E C, Andreote F D, et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25: 189-195.
- [9] 胡文哲.藤县药用野生稻内生固氮菌分离与鉴定[D].广州:华南农业大学,2016.
- [10] 张洪彬.甘蔗及其根际土壤固氮菌的分离和特性研究[D].广州:华南农业大学,2016.
- [11] 吕翻洋.玉米根际及不同部位内生固氮菌分离及其多样性研究[D].北京:中国农业科学院,2017.
- [12] 袁梅,谭适娟,孙建光.水稻内生固氮菌分离鉴定、生物特性及其对稻苗镉吸收的影响[J].中国农业科学,2016,49(19):3754-3768.
- [13] 谭泽文,谭志远,黄慧灵,等.梧县药用野生稻内生固氮菌分离鉴定与系统发育分析[J].应用与环境生物学报,2017,23(4):622-627.

(责任编辑:王昱)