

李忠玲,周晓伦,王卫星,等. 1 株具促生作用的氢氧化细菌的分离及鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):500-503.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.144

1 株具促生作用的氢氧化细菌的分离及鉴定

李忠玲¹, 周晓伦², 王卫星², 牛李莹², 万建新³, 王卫星²

(1. 陕西省科学院酶工程研究所, 陕西西安 710600; 2. 西北大学生命科学学院, 陕西西安 710069; 3. 平凉医学高等专科学校, 甘肃平凉 744000)

摘要:为了从沙打旺(*Astragalus adsurgens* Pall.)根际土壤分离具有促生潜力的氢氧化细菌,鉴定其种属并研究其促生机制,利用连续通氢装置分离筛选氢氧化细菌,Salkowski 比色法测定产吡啶乙酸(IAA)能力,2,4-二硝基苯肼法测定 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氢酶活性,通用 CAS 平板法检测铁载体产生,再结合 16S rDNA 序列分析和生理生化试验结果鉴定细菌种属。结果表明,筛选出 1 株具有较高促生潜力的氢氧化细菌 SDW-16,该菌株具有分泌铁载体的能力,产 IAA 的量为 21.62 $\mu\text{g/mL}$,ACC 脱氢酶活性为 8 694.55 nmol/(mg·h)。结合生理生化和 16S rDNA 序列(GenBank 登录号:KF835389)分析,鉴定其为荧光假单胞菌。菌株 SDW-16 具有多项促生特征且均高于或达到了其他报道中相关水平,说明菌株 SDW-16 有较高的促生潜力和研究价值,同时也初步阐明氢氧化细菌的促生机制。在荧光假单胞菌中发现氢氧化细菌尚属首次,丰富了人们对氢氧化细菌分类地位的认识。

关键词:氢氧化细菌;铁载体;IAA;ACC 脱氢酶

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0500-03

定植于植物根际、能对植物生长发育产生积极促进作用的细菌称为植物根际促生菌^[1-2]。植物根际促生菌有直接和间接 2 种方式促进植物生长,直接方式包括固氮作用、产生植物生长激素、分泌铁载体、溶磷、合成 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氢酶等,间接方式包括产生抗生素、与病原菌竞争根际有限的营养与空间、增强植物抗性等^[3]。鉴于植物根际促生菌在农业生产领域的巨大应用潜力,优势植物根际促生菌的分离鉴定已经成为非常有价值的一项工作。

豆科作物的轮作、间作效益多被归功于根瘤菌的固氮作用,而已有研究表明,仅有约 25% 的增产效益与固氮作用相关^[4-5]。王瑾等通过对固氮过程中放氢现象和根际微生物群落变化的研究,提出了“氢肥”的概念,即不含吸氢酶(without uptake hydrogenase, HUP-)的根瘤菌在固氮过程中释放的氢气能促进根际氢氧化细菌的生长进而促进植物生长^[6-7]。氢氧化细菌已被归类为植物根际促生菌,在农业生产上有广阔的应用前景,因此开展与其相关的研究工作很有必要。

但是,目前关于氢氧化细菌的研究工作并不充分,虽然以前也有关于氢氧化细菌的研究,但是把氢氧化细菌作为一类植物根际促生菌,并进一步分析其促生特征的研究鲜有报道。本研究利用气体循环培养体系从豆科植物沙打旺(*Astragalus adsurgens* Pall.)根际土壤分离氢氧化细菌,从吡啶乙酸(IAA)、铁载体、ACC 脱氢酶等方面探究其促生机制,结合 16S rDNA 序列分析和生理生化分析确定其分类地位,以期发现有潜在促生价值的菌株,以及氢氧化细菌的促生机制探

究作出一定贡献。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 SDW-16,笔者所在实验室从沙打旺根际土壤分离。

1.1.2 主要试剂和仪器 ACC、D-葡萄糖酸、 α -丁酮酸,购自 Sigma-Aldrich 公司;其他试剂均为国产分析纯。VIS-7220N 可见光分光光度计,购自北京瑞利分析仪器公司。

1.2 培养基

MSA 培养基参考文献[8]配制;KingB-Trp 培养基参考文献[9]配制,并添加终浓度为 100 mg/L 的 L-Trp;DF 无氮培养基参考文献[10]配制;DF 含氮培养基即在 DF 培养基中加入 3.0 mmol/L ACC;CAS 铁载体检测培养基参考文献[11]配制;MKB 培养基参考文献[12]配制。

1.3 氢氧化细菌的分离筛选

取 10 g 土样转移到装有 90 mL 无菌水的锥形瓶中,置于摇床中,180 r/min、30 min 摇匀,吸取 0.1 mL 上层悬浮液加入 0.9 mL 无菌水中混匀,进行一系列 10 倍梯度的稀释,最终稀释倍数为 10^{-12} 。从每个梯度取 0.1 mL 土壤稀释液于 MSA 无机盐平板培养基上稀释涂布,每个梯度 3 个重复。平板倒置于连续通氢装置(电解水制氢,浓度为 0.416 ~ 2.42 mmol/L)中,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 14 d。分离的氢氧化细菌进行植物促生试验,筛选出具有较高促生潜力的氢氧化细菌,进一步研究其促生特性。

1.4 促生特征的鉴定

1.4.1 吡啶乙酸含量检测 将待测菌株接种于 5 mL LB 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 24 h,取 1.0 mL 菌液离心(5 000 r/min、10 min)后弃上清,用无菌水洗涤 2 次,然后用无菌水稀释 10 倍。从上述菌悬液取 0.1 mL(约 10^7 CFU)接种到 50 mL KingB-Trp(L-Trp 终浓度为 100 mg/L)培养基,

收稿日期:2015-06-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:41571243)。

作者简介:李忠玲(1973—),女,黑龙江讷河人,硕士,副研究员,研究方向为生物技术。E-mail:610253095@qq.com。

通信作者:王卫星,博士,教授,主要从事豆科植物-根瘤菌共生固氮生态生理学及根际微生物多样性研究。E-mail:wwwang@nwnu.edu.cn。

于 30 ℃、180 r/min 摇床中避光培养 72 h。

IAA 含量测定根据文献[13]中的 Salkowski 比色法。菌株培养液于 10 000 r/min 离心 10 min,取 2.0 mL 上清液加入避光的冻存管中与 2.0 mL Salkowski 试剂(1.015 g FeCl₃·6H₂O,150 mL H₂SO₄,250 mL ddH₂O)混匀,室温暗处放置 20 min,然后在 530 nm 波长下测定吸光度。IAA 浓度计算参照 IAA 标准曲线(浓度 10~100 μg/mL),每株菌 3 个重复。

1.4.2 ACC 脱氨酶活性检测 ACC 脱氨酶阳性菌株的筛选根据其能否利用 ACC 为唯一氮源生长,这被看作细菌具有 ACC 脱氨酶活性的特征。待测菌株分别接种到 DF 含氮培养基和 DF 无氮培养基,于 30 ℃培养 3 d。无法在 DF 无氮培养基上生长,但能在添加 3.0 mmol/L ACC 为唯一氮源的 DF 含氮培养基上生长的细菌则视为 ACC 脱氨酶阳性菌株。 α -丁酮酸标准曲线的制作及 ACC 脱氨酶活性的定量测定参照文献[10]中的 2,4-二硝基苯肼比色法,ACC 脱氨酶活性以 1 mg 菌体蛋白 1 h 利用 ACC 产生的 α -丁酮酸的量表示。

1.4.3 铁载体检测 细菌分泌铁载体的定性检测参照通用 CAS 平板法^[14],并加以改进,将检测培养基分为 2 层,下层为供细菌生长的 MKB 无铁培养基,上层为 CAS 检测培养基,细菌在 MKB 无铁培养基产生明显菌落后,将 CAS 检测培养基倒入上述平板,放置一段时间后可见平板颜色从蓝色变为橘黄色,证明有铁载体产生,对照为不接菌的检测平板。

1.5 菌株的鉴定

1.5.1 细菌形态特征和生理生化特征鉴定 细菌的形态和生理生化特征鉴定参照文献[15~16]中的标准步骤进行。

1.5.2 16S rDNA 序列测定 待测菌株送至生工生物工程(上海)服务有限公司进行测序。将得到的 16S rDNA 序列录入 NCBI 网站,与已知的序列比对并分析同源性。用 MEGA

5.1 软件和邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。

2 结果分析

2.1 氢氧化细菌的分离纯化

根据氢氧化细菌独特的代谢特点,选取不含碳源的 MSA 无机盐培养基分离筛选氢氧化细菌,在 H₂、CO₂、O₂ 组成的混合气体环境中,只有氢氧化细菌才能利用 H₂ 为能源固定 CO₂ 为碳源进行化能自养生长。在 MSA 无机盐固体平板上于 30 ℃培养 14 d 后,从平板上挑取不同形态的单菌落进一步划线纯化,按照文献[17]中的 TTC 试验法对其进行吸氢酶的定性检测,得到 15 株氢氧化细菌,根据促生试验结果筛选出 *Pseudomonas fluorescens* SDW-16 具有较高的促生潜力。

2.2 吲哚乙酸含量的检测

IAA 是一种重要的植物激素,在调节植物生长发育中起重要作用,很多植物根际促生菌能分泌 IAA 对植物生长产生积极的影响。在 KingB-Trp 培养基中于 30 ℃培养 72 h 后,按上述方法测得菌株 SDW-16 产生 IAA 的量为 (21.62±0.30) μg/mL。

2.3 ACC 脱氨酶活性的检测

如果细菌不能在无氮源的 DF 基本培养基上生长,却能在添加 3.0 mmol/L ACC 为唯一氮源的 DF 基本培养基上生长,则认为具有 ACC 脱氨酶活性。对符合此特征的菌株 SDW-16 检测发现,其 ACC 脱氨酶活性高达 (8 694.55±

664.85) nmol/(mg·h)。

2.4 铁载体检测

在铁缺乏的条件下对菌株 SDW-16 进行铁载体检测,结果显示:接种有 SDW-16 的 CAS 检测平板在 3 d 后从蓝色变为橘黄色,证明菌株 SDW-16 具有产生铁载体的能力(图 1)。

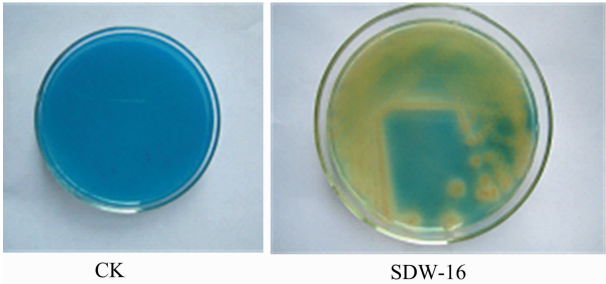


图1 SDW-16 铁载体检测结果

2.5 菌株的鉴定

2.5.1 细菌形态特征和生理生化特征鉴定 菌株 SDW-16 的形态特征和生理生化特征见表 1。

表 1 菌株 SDW-16 的形态特征和生理生化特征

生理生化特征	结果	生理生化特征	结果	形态特征	结果
甲基红试验	-	接触酶反应	+	革兰氏染色	-
VP 试验	-	苹果酸试验	+	运动性	+
淀粉水解	-	果聚糖试验	+	菌体形态	杆状
柠檬酸试验	+	荧光	+	孢子染色	-
硝酸盐还原	+	D-果糖	+	培养温度 4 ℃	+
吲哚试验	-	D-木糖	+	培养温度 37 ℃	+
反硝化作用	+	葡萄糖	+	培养温度 41 ℃	-
氧化酶反应	+	明胶液化	+		

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

2.5.2 16S rDNA 序列分析 氢氧化细菌 SDW-16 的 16S rDNA 片段长度为 1 526 bp,GenBank 登录号为 KF835389。从以 SDW-16 16S rDNA 序列为基础构建的系统发育树(图 2)可以看出,SDW-16 菌株与荧光假单胞菌在系统发育树上位于相同的发育分支,且同源性为 99%;同时结合其生理生化特征结果,鉴定菌株 SDW-16 为荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)。

3 讨论

植物根际促生菌能有效促进植物生长,且不会像传统化学肥料引起环境污染等问题,其在世界上一些地区的实际应用中取得了良好的效果,在农业生产应用中有巨大的潜力,与其相关的研究已得到重视^[18]。王瑾等的研究已经证实,氢氧化细菌也属于一类根际促生菌,而且通过大田试验和实际农业生产应用证实了氢氧化细菌的促生能力^[6]。氢氧化细菌独特的代谢特点使其成为根际促生菌家族中的独特种群,豆科植物中有很多是重要的经济作物,其根瘤附近的富氢环境非常适宜氢氧化细菌生长,因此笔者选择豆科植物沙打旺根际土壤为研究材料,通过连续通氢装置模拟豆科植物根际的富氢环境,并利用不含碳源的 MSA 无机盐培养基对其进行富集和分离,高促生潜力氢氧化细菌的研究工作对农业增产尤其是豆科作物的增产有广阔的应用前景。

结合 16S rDNA 序列及生理生化特征结果进行分析,氢氧化细菌 SDW-16 被鉴定为荧光假单胞菌(*P. fluorescens*),

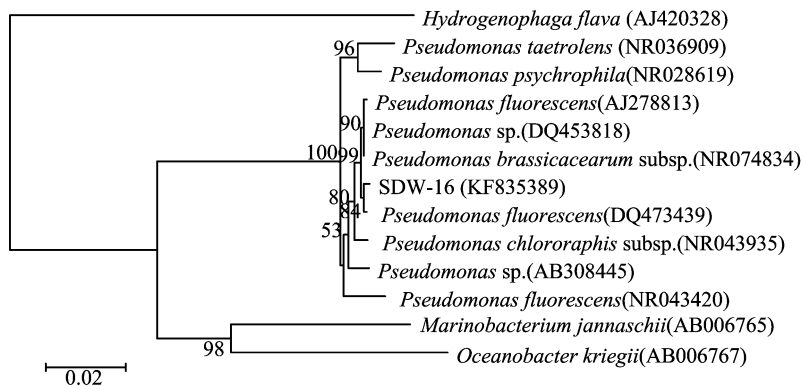


图2 以菌株SDW-16 16S rDNA序列为基础构建的系统发育树

在荧光假单胞菌中发现氢氧化细菌尚属首次,这一发现能丰富人们对氢氧化细菌分类地位的认识。荧光假单胞菌是一种重要的植物根际促生菌,SDW-16 的促生特征分析很好地印证了这一点,其具有多项植物根际促生菌具备的重要促生特征,尤其是具有很高的 ACC 脱氨酶活性,植物在干旱、水灾、盐碱等逆境条件中会产生过量乙烯抑制其生长,ACC 脱氨酶能裂解乙烯的前体 ACC 为氨和 α -丁酮酸,降低植物体内乙烯水平,减轻对植物生长的损害,所以产生 ACC 脱氨酶是重要的促生机制之一^[19]。氢氧化细菌 SDW-16 的 ACC 脱氨酶活性高达 8 694.55 nmol/(mg·h),远高于魏素娜等研究中 AS [1 116 nmol/(mg·h)、CS (1 002 nmol/(mg·h)) 2 菌株^[20];高于 Grichko 等研究中所有的 ACC 脱氨酶阳性菌株^[21-22];高于 Rashid 等研究中 68% 的 ACC 脱氨酶阳性菌株,与菌株 YsS3 [8 580 nmol/(mg·h)] 的酶活相当^[23]。本研究表明,ACC 脱氨酶活性在 2 100~5 200 nmol/(mg·h) 之间的菌株能明显促进番茄和油菜的生长,并显著增加其抗涝性和耐盐性^[21,24],而吉云秀等研究中证实 PGPR 的促生效果与 ACC 脱氨酶活力呈显著正相关性^[22],可见就 ACC 脱氨酶活性而言氢氧化细菌 SDW-16 有很高的促生潜力。

IAA 在植物生长发育过程中起重要作用,微生物包括细菌、真菌也能产生 IAA。氢氧化细菌 SDW-16 产生 IAA 的量为 21.62 μ g/mL,达到了较高水平,高于 Jalili 等研究中全部菌株的产量^[24],高于 Tsavkelova 等研究中 63.6% 的 IAA 阳性菌株^[25],而本研究中添加的 Trp 终浓度为 200 mg/L。在 KingB-*Trp* 培养液中加入 IAA 的前体物质色氨酸可以促进 IAA 的产生。IAA 含量测定选在菌株培养 72 h 后,因为此时细菌处于稳定期,培养液中 IAA 含量最高,IAA 见光易分解,所以相关步骤采取避光措施以减少对试验结果的干扰。

铁载体是细菌在铁缺乏环境中分泌的一种对 Fe^{3+} 有很强特异螯合作用的低分子量化合物,在铁胁迫环境中铁载体产生菌可以分泌铁载体螯合周围的 Fe^{3+} ,从而促进自身生长^[26];同时还能抑制病原菌吸收 Fe^{3+} ,通过抑制病原菌的生长间接促进植物生长。CAS 检测平板由蓝色变为橘黄色表明,菌株 SDW-16 具有分泌铁载体的能力。

综上所述,氢氧化细菌 SDW-16 具有分泌 IAA、产铁载体和 ACC 脱氨酶 3 项重要的促生特征,从已发表文献中相关菌株的比较来看,其分泌 IAA 能力和 ACC 脱氨酶活性均高于或达到相关菌株的水平,说明氢氧化细菌 SDW-16 有很高的促生潜力和研究价值。氢氧化细菌对植物的促生能力可能与

IAA、产铁载体、ACC 脱氨酶有关,后续工作要开展验证其实际促生效果的研究,如盆栽和田间试验等,为以后将其作为生产微生物肥料的优质菌种和应用于实际农业生产提供理论依据。

参考文献:

- [1] Ji S H, Gururani M A, Chun S C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars [J]. Microbiological Research, 2014, 169 (1): 83-98.
- [2] Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective [J]. Journal of King Saud University - Science, 2014, 26 (1): 1-20.
- [3] Montanez A, Blanco A R, Barlocco C, et al. Characterization of culturable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro [J]. Applied Soil Ecology, 2012, 58: 21-28.
- [4] Maimaiti J, Zhang Y, Yang J, et al. Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9 (2): 435-444.
- [5] McLearn N, Dong Z. Microbial nature of the hydrogen-oxidizing agent in hydrogen-treated soil [J]. Biology Fertility of Soils, 2002, 35: 465-468.
- [6] 王瑾, 王喆之, 董忠民. 土壤氢氧化细菌促进作物生长机理研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2012, 8 (5): 853-861.
- [7] 付博, 王卫卫, 唐明, 等. 一株产 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶的氢氧化细菌的分离鉴定及酶活力测定 [J]. 微生物学报, 2009, 49 (3): 395-399.
- [8] Yu J, Dow A, Pingali S. The energy efficiency of carbon dioxide fixation by a hydrogen-oxidizing bacterium [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2013, 38: 8683-8690.
- [9] 李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 等. 珠芽蓼内生菌 ZS 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定 [J]. 草业学报, 2010, 19 (2): 61-68.
- [10] Penrose D M, Glick B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118: 10-15.
- [11] 赵翔, 陈绍兴, 谢志雄, 等. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp. f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究 [J]. 微生物学通报, 2006, 33: 95-98.
- [12] 王平, 董颺, 李卓棣, 等. 小麦根围细菌铁载体的检测 [J]. 微生物学通报, 1994, 21 (6): 323-326.
- [13] Glickman E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of

张建丽,吴娟子,钱晨,等. 不同品系象草的生物产量及木质纤维素乙醇生产潜力研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):503-505.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.145

不同品系象草的生物产量及木质纤维素乙醇生产潜力研究

张建丽,吴娟子,钱晨,钟小仙,刘智微,潘玉梅

(江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏南京 210014)

摘要:为探讨不同品系象草的生物产量及生物乙醇生产潜力,以不同品系象草为材料,研究不同品系象草的生物产量及利用干物质组成成分中纤维素、半纤维素含量计算乙醇理论产量,并进行比较,旨在为象草作为生物质能源开发利用的品种选择提供技术指导。结果表明,不同品系象草株高、分蘖数、茎叶比等指标均存在品系间显著或极显著差异,总体趋势是植株高大、分蘖数较少的品系生物产量高;结构组成中纤维素、半纤维素和木质素含量在不同品系间存在显著或极显著差异。综合不同品系的生物产量及生物乙醇产量表现,品系 P118、P115 和 P33 表现较好,具有较高的木质纤维素乙醇生产潜力,可作为生物质能源植物新品种开发利用。

关键词:象草;品系;生物产量;生物乙醇;生产潜力

中图分类号:S543 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0503-03

能源短缺是当前人类面临的重大挑战。生物质能是仅次于石油、煤炭和天然气而位居世界第 4 位的能源,作为一种产

量巨大的可再生能源,可以替代化石能源,缓解能源危机,因而越来越受到世界各国的高度关注^[1]。在生物质能中植物生物质能又具有基础地位,能源植物通过光合作用吸收二氧化碳,有利于气候环境的改善,使能源植物开发与利用成为世界各国的研究重点。

象草(*Pennisetum purpureum*)是禾本科狼尾草属多年生草本植物,原产于热带非洲,是热带和亚热带地区普遍栽培的牧草^[2],具有无病虫害、产量高等很多优点,已受到不少欧美国家的重视,报道预测,若欧盟 25 个国家的适当土地上都种植

收稿日期:2015-11-24

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)5011];国家自然科学基金(编号:31302025);江苏省农业三新工程项目[编号: SXGC(2015)334]。

作者简介:张建丽(1979—),女,江苏东台人,助理研究员,主要从事牧草育种工作。Tel:(025)84390239;E-mail:zhangjianli79@163.com。

the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology,1995, 61(2):793-796.

[14]Schwyn B,Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987,160:47-56

[15]沈萍,范秀容,李广武. 微生物学试验[M]. 北京:高等教育出版社,2003:26-31.

[16]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:370-380.

[17]Aragno M,Schlegel H G,Balows A,et al. The mesophilic hydrogen-oxidizing (knallgas) bacteria[M]//Balows A,Trüper H G,Dworkin M,et al. The prokaryotes:a handbook on the biology of bacteria:ecophysiology, isolation, identification, applications. Berlin: Springer-Verlag,1992:344-384.

[18]Golding A L,Zou Y,Yang X,et al. Plant growth promoting H₂-oxidizing bacteria as seed inoculants for cereal crops[J]. Agricultural Sciences,2012,3(4):510-516.

[19]Nain M L,Yadav R C,Saxena J. Characterization of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi arid deserts[J]. Applied Soil Ecology, 2012,59:124-135.

[20]魏素娜,蒋帅,黄锡云,等. 旱地小麦根际细菌中产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶菌株的分离和鉴定[J]. 微生物学通报,2011,38(5):722-728.

[21]Grichko V P,Glick B R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria[J]. Plant physiology and Biochemistry,2001,39:11-17.

[22]吉云秀,黄晓东. 不同盐分条件下植物促生菌对燕麦和黑麦草幼苗的促生效应[J]. 中国土壤与肥料,2008,2:65-68.

[23]Rashid R,Charles T C,Glick B R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. Applied Soil Ecology,2012,61:217-224.

[24]Jalili F,Khavazi K,Pazira E,et al. Isolation and characterization of ACC deaminase producing fluorescent pseudomonads,to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth[J]. Journal of Plant Physiology,2009,166:667-674.

[25]Tsavkelova E A,Cherdyntseva T A,Botina S G,et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin[J]. Microbiological Research,2007,162:69-76.

[26]Hu B,Zhao C,Yang S. Influence of iron on siderophore and photosynthetic pigments biosynthesis by siderophore-producing *Rhodospirillum rubrum* [J]. Acta Microbiologica Sinica,2014,54(4):408-416.