

林标声,陈意,罗茂春,等. 巨菌草内生固氮菌 *Klebsiella variicola* GN02 的毒理性与固氮能力[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):258-261.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.058

巨菌草内生固氮菌 *Klebsiella variicola* GN02 的毒理性与固氮能力

林标声^{1,2}, 陈意¹, 罗茂春¹, 张浣星⁴, 林占熿^{2,3}

[1. 龙岩学院生命科学学院,福建龙岩 364012; 2. 福建农林大学生命科学学院,福建福州 350002;
3. 国家菌草工程技术研究中心,福建福州 350002; 4. 奥兰多(杭州)实业有限公司,浙江杭州 310051]

摘要:为了研究巨菌草内生固氮菌(*Klebsiella variicola*)GN02 的毒理性与固氮能力,通过小鼠经口毒性和大鼠经皮毒性试验,并以克雷伯菌(*K. pneumoniae*)特异性引物对 GN02 菌株进行血清型分型。结果表明,GN02 菌株无明显的经口毒性和经皮毒性,不是临床上流行肺炎克雷伯氏菌已有分型的强毒力菌株;GN02 菌株在不同生长时期巨菌草根茎叶中均具有一定的固氮能力,其在各成熟期固氮率可达 15%~27.27%,与其他禾本科植物所报道的固氮菌固氮效率基本相当。总之,GN02 菌株安全、无毒,具有一定的固氮能力,可在农业生产中使用。

关键词:巨菌草;内生固氮菌;*Klebsiella variicola*;毒理性;固氮

中图分类号: Q945.13;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)24-0258-04

Klebsiella variicola GN02 是从巨菌草(*Pennisetum sinense* Roxb)成熟期根部分离得到的一株具有较高固氮酶活性[378.22 nmol/(mL·h),以 C₂H₄ 还原量计]的内生固氮菌,前期试验表明其具有良好的溶磷、产氨、产铁载体、分泌抗生素等促生性能,是制备微生物复合菌肥的潜在良好菌株来源^[1]。*K. variicola* GN02 属于肠杆菌科克雷伯氏菌属菌株,而克雷伯氏菌属的多类菌株是重要的条件致病菌和医源性感染菌,因而人们对 *K. variicola* 在农业上的应用一直存在一定的疑虑^[2]。多年来,农业微生物和工业污染治理等方面的研究表明,克雷伯氏菌对植物本身不表现致病性,而且还是一种有效的绿色菌肥和高效净化剂^[3];但也有人认为与植物联合固氮的 *K. variicola* 菌株和人源 *Klebsiella* spp 菌株之间的遗传差异较小,都有 *K. pneumoniae* 的致病相关因子,因此将其制备成微生物菌肥在田间施用具有一定的风险^[4]。因此,有必要对 *K. variicola* GN02 进行非致病性安全性鉴定,明确其是否安全、无毒。

植物内生固氮菌与植物在长期进化和系统发育过程中建立了一种联合的关系^[5],大量研究表明,禾本科植物接种内生联合固氮菌后能行固氮作用,但由于固氮菌株、植物类型、生长环境等条件的不同,其固氮量存在较大的差异(4.5%~21.2%)^[6]。¹⁵N 同位素稀释法能准确区分和测定植物不同生长时期、不同来源的氮源,成为了植物内生固氮菌固氮量测定的、较为准确和常用的方法^[7],目前在许多豆科植物和禾本科植物中都有应用^[8-9],但尚未发现其在巨菌草中固氮菌的研究中应用。

因此,本研究以 GB 15670—1995《农药登记毒理学试验方法》为依据^[10],对 *K. variicola* GN02 进行系统的毒理性试验研究,并以 *K. pneumoniae* 不同血清型特异性靶基因序列设计相应引物,对 *K. variicola* GN02 进行血清型分型,进一步明确其和临床上传染性 *K. pneumoniae* 之间的联系。此外,本研究还采用了 ¹⁵N 同位素稀释法评价 GN02 菌株在巨菌草不同生长时期根茎叶中的固氮效率,以期在生产上以 GN02 菌株制备微生物固氮菌肥,并在巨菌草及其他禾本科植物中的实际应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基及供试动物

K. variicola GN02:由笔者所在实验室从巨菌草成熟期根部分离,并经 16S RNA 和促生性能鉴定后在中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏(CGMCC 1.13619);肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)购自杭州滨和微生物试剂有限公司,菌种保藏号 CMCC46117;Ashby 无氮培养基:甘露醇 10 g/L, KH₂PO₄ 0.2 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, NaCl 0.2 g/L, CaSO₄·2H₂O 0.1 g/L, CaCO₃ 5.0 g/L, pH 值 7.0~7.2;昆明小鼠,体质量 18~20 g;Wistar 成年大鼠,体质量 200~300 g,均购自福建省闽侯县吴氏实验动物贸易有限公司;供试菌液为 1.5×10⁸ CFU/g GN02 菌株培养液(或对数生长期培养 16~20 h)。

1.2 主要试剂和仪器

¹⁵NH₄Cl,丰度 30.15%,上海化工研究院合成;DNA marker,各限制性内切酶购自天根生化科技(北京)有限公司。石蜡切片机,莱卡 RM2016,徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;研究型正置显微镜,尼康 DS-Fi2,尼康仪器(上海)有限公司;PCR 仪,ABI-2720,美国 Applied Biosystems 公司;电泳仪,Mini Pro 300V Power Supply,赛默飞世尔科技(中国)

收稿日期:2018-10-03

基金项目:中央引导地方科技发展专项(编号:2018L3003);福建省大学生创新创业训练计划(编号:201811312007)。

作者简介:林标声(1980—),男,福建连城人,博士研究生,副教授,从事微生物学研究。Tel: (0597) 2797255; E-mail: 150391768@qq.com。

通信作者:林占熿,研究员,博士生导师,从事菌草技术研究。Tel: (0591) 83789223; E-mail: lxjuncao@163.com。

有限公司。

1.3 *K. variicola* GN02 急性毒性试验

1.3.1 小鼠急性经口毒性试验 按最大限量法选择健康昆明小鼠 40 只,雌雄各半,平均分成对照组和试验组。试验组将准备好的 GN02 菌株供试菌液按 0.1 mL/10 g 经口灌胃给予小鼠(对照组用同等浓度生理盐水灌胃),灌胃前动物隔夜禁食、自由饮水。灌胃后给予正常饮食,观察 14 d,记录小鼠中毒体征及死亡情况,按 GB 15670—1995《农药登记毒理学试验方法标准》中所列参考依据评定 GN02 菌株毒性。同时,将两组小鼠随机抽取 3 只分别进行呼吸道解剖和肺部的石蜡切片观察,进一步确定 2 组小鼠接种 GN02 菌株的病理变化情况。

1.3.2 大鼠急性经皮毒性试验 按最大限量法,选择 Wistar 成年大鼠 20 只,雌雄各半,平均分成对照组和试验组。先将 2 组大鼠分别北部剃毛,面积 20 cm² (4 cm×5 cm)。试验组在略小于剃毛面积内用灭菌棉签涂抹 GN02 菌液(0.1 mL/10 g BW 用量),对照组用同等浓度生理盐水敷药,后用保鲜膜覆盖剃毛区域,并用胶布固定,防止大鼠舔食菌液,涂药时间持续 4 h,其间观察并记录 2 组大鼠是否有中毒现象。涂药结束后,用温水彻底清洗大鼠涂抹皮肤上的菌液,再继续观察 14 d,再次观察和记录 2 组大鼠的中毒体征及死亡情况。按上述的国家标准判断 GN02 菌株毒性,同样对 2 组大鼠进行呼吸道解剖和肺部石蜡切片观察,进一步确定 2 组大鼠接种 GN02 菌株的病理变化情况。

1.4 GN02 菌株血清型检测

GN02 菌株 DNA 的提取采用细菌基因组提取试剂盒[天根生物化科技(北京)有限公司],采用 PCR 扩增相关基因,以固氮菌特异性基因 *NiH* 和肺炎克雷伯氏菌临床上最为流行的 7 种分型(K1、K2、K3、K5、K20、K54 和 K57)设计特异性引物进行鉴定。7 种分型的引物序列参考相关文献,由上海铂尚生物技术有限公司合成;NiH 特异性引物为:引物 F,5′-AATGACCATGCGTCAATGC-3′;引物 R,5′-GTGAGGATCCTGTGCTCAG-3′。将提取 DNA 统一浓度为 100 ng/μL 作为 PCR 反应体系模板,以无菌去离子水作为阴性对照;同时提取临床上常见的 *K. pneumoniae* CMCC46117 基因组 DNA,同样以 7 种分型特异性引物进行鉴定作为对比。PCR 反应体系(25 μL):DNA 模板 0.5 μL,H₂O 7.5 μL,引物 F(10 μmol/L)

1 μL,引物 R(10 μmol/L)1 μL,2×*Taq* PCR Master Mix 10 μL;PCR 反应条件:94 ℃ 4 min;94 ℃ 45 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s,30 个循环;72 ℃ 2 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 *K. variicola* GN02 对巨菌草生物固氮的影响

1.5.1 采用 ¹⁵N 同位素稀释法 将温室中培养好的巨菌草小苗(5~10 cm)从秧苗培育盘中取出,将根部清洗干净,在超净台上将苗用 2% 次氯酸钠表面消毒 5~10 min,再用无菌水清洗,用灭菌小刀轻划根系,再浸入对数生长期的 GN02 菌株培育菌液中 30 min,同时以无菌水蒸馏水浸泡为对照。

将试验用土过筛、高压灭菌后分装于 16.5 cm×11 cm 的塑料盆(购自鑫腾花卉专营店,江苏宿迁),每盆施入 1.5 g ¹⁵NH₄Cl,对照组和试验组各栽 11 盆,共 22 盆,每盆栽巨菌草苗各 3~5 株。用无菌水配制无氮培养基营养液,每隔 5 d 浇无菌水 600~800 mL/桶,每隔 10 d 浇此营养液 600~800 mL/桶,直至试验结束。

1.5.2 固氮量和固氮率的测定 分别在巨菌草生长的苗期、分蘖期、拔节期和成熟期 4 个时期,将塑料桶剪开,除去植株根部泥土、洗净,每时期取样 3 桶,包括根、茎和叶,剪碎、混匀,60~70 ℃ 烘干,各样品分别取 1 g 送至上海化工研究院测定全氮含量和 ¹⁵N 原子百分超。按下列公式计算植株的固氮量和固氮率,并对所得数据进行统计学差异分析(SPSS 17.0 软件)。

$$N_{\text{dfa}}(\text{固氮率}) = (1 - \frac{{}^{15}\text{N}_{\text{试验组}}}{{}^{15}\text{N}_{\text{对照组}}}) \times 100\%$$
 ; 固氮量 = $N_{\text{全氮量}} \times N_{\text{dfa}}$ 。

2 结果与分析

2.1 GN02 菌株急性毒性试验

小鼠急性经口毒性试验和大鼠急性经皮毒性试验表明,小鼠灌胃和大鼠经皮涂菌后,动物均未发现明显的中毒现象,连续观察 14 d,也均未发现动物死亡现象(表 1),试验结束后,动物解剖也未发现异常,动物呼吸道(特别是肺部)没有发现明显的病变(图 1);与对照组相比,试验组的肺部石蜡切片不同部位的对比观察也未发现明显的异常(图 2)。按 GB 15670—1995《农药登记毒理学试验方法标准》中所列参考依据评定 GN02 菌株毒性为微毒以下,无明显毒性,可在农业生产上应用。

表 1 GN02 菌株急性毒性试验结果

试验名称	组别	剂量	动物数 (只)	死亡数 (只)	LD ₅₀ (mg/kg)	毒性分级
小鼠急性经口毒性试验	对照组	0.1 mL/10 g BW	20	0	>5 000	微毒
	试验组	0.1 mL/10 g BW	20	0	>5 000	微毒
大鼠急性经皮毒性试验	对照组	0.1 mL/10 g BW	10	0	>2 000	微毒
	试验组	0.1 mL/10 g BW	10	0	>2 000	微毒

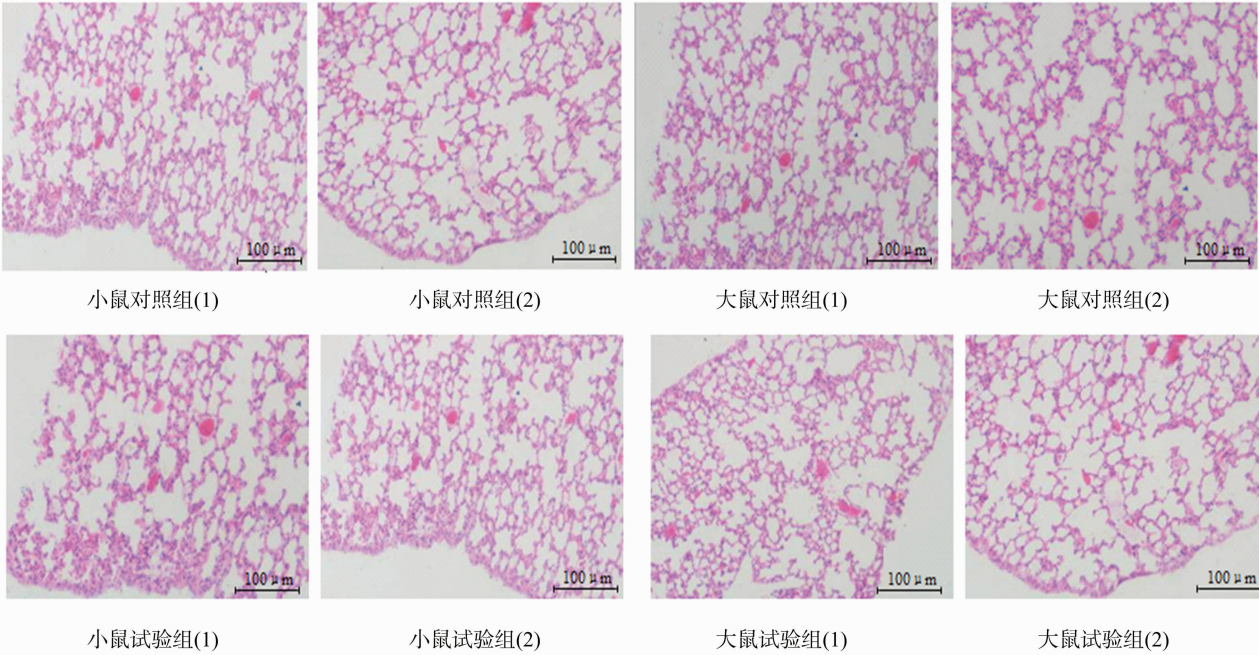
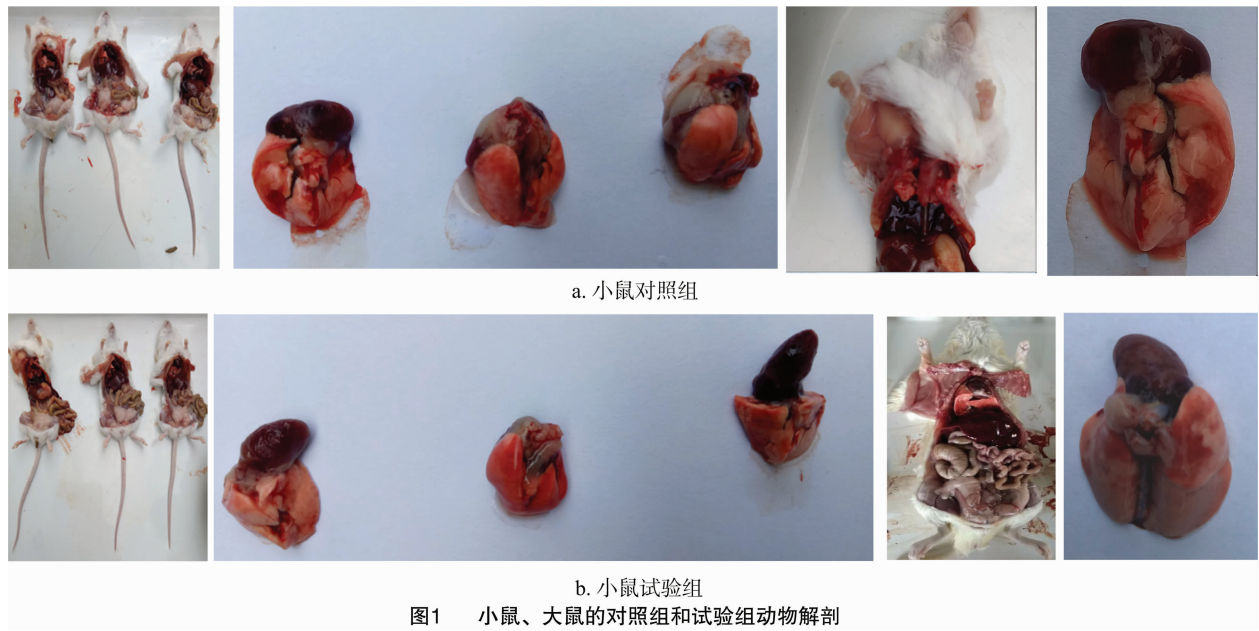
2.2 GN02 菌株血清分型的结果

以肺炎克雷伯氏菌临床上最为流行的 7 种分型引物对 GN02 菌株进行鉴定,结果如图 3 所示,以 GN02-DNA 为模板,NiH 引物扩增为阳性;分别以 H₂O、GN02-DNA 为模板,7 种分型引物扩增均为阴性;以 *K. pneumoniae* CMCC46117-DNA 为模板,7 种分型引物扩增鉴定为 K2 分型。该研究结

果表明,GN02 菌株具有固氮菌特异性基因 *NiH*,但不属于 7 种临床上流行的肺炎克雷伯氏菌分型,不是流行的肺炎克雷伯氏菌强毒力菌株,不会引起严重的临床疾病。

2.3 GN02 菌株对巨菌草生物固氮的影响结果

将 GN02 菌株接种于巨菌草,其不同生长期根茎叶的固氮率和固氮量见表 2。结果表明,GN02 菌株在不同生长时



图中(1)(2)表示显微镜下不同的视野
图2 小鼠、大鼠的对照组和试验组动物肺部石蜡切片图示(100×)

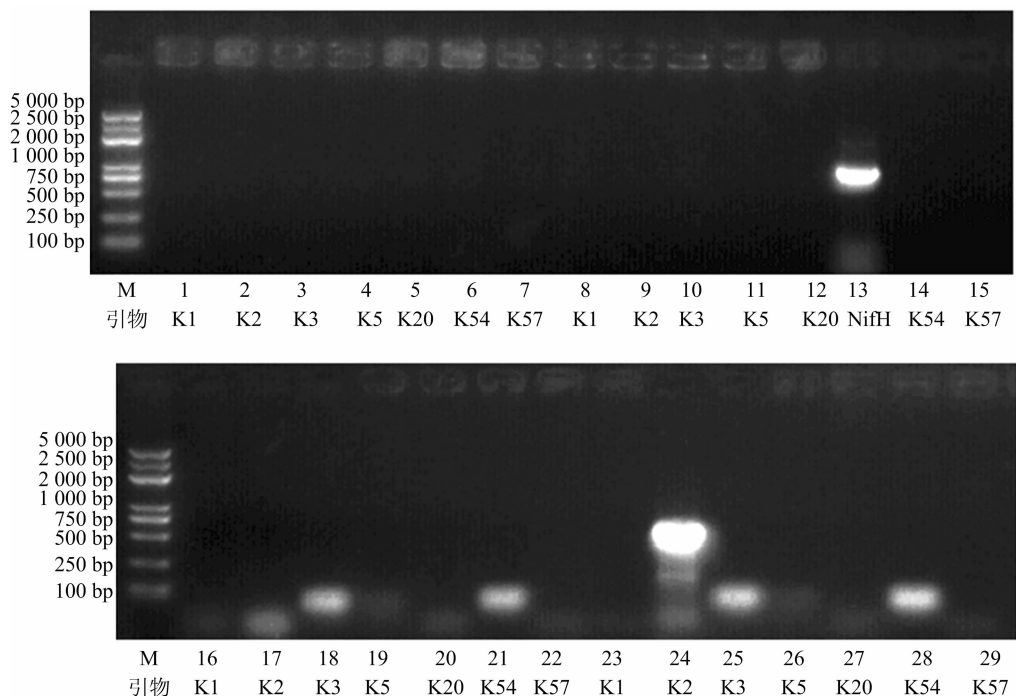
期巨菌草根茎叶中均具有一定的固氮能力;根、茎、叶固氮率和固氮量均为成熟期>拔节期>分蘖期>苗期,各成熟期固氮率可达15%~27.27%,与其他禾本科植物所报道的固氮菌固氮效率基本相当^[11-12],且各成熟期固氮率和固氮量与其他时期相比均达到了显著差异($P<0.05$),表明随着种植时间的延长,GN02固氮菌株数量逐渐增加,固氮效率也逐渐提高;而在同一生长期,不同部位的固氮率和固氮量均表现为叶>根>茎,且各生长期叶的固氮率和固氮量与根、茎相比差异叶均达到了显著水平($P<0.05$)。

3 小结

近年来,许多学者都报道了 *K. variicola* 能够在甘蔗^[13]、

石斛^[3]、香蕉^[4]等植物内部定殖,并具有良好的固氮促生性能,但同时人们对 *K. variicola* 对动物和植物的潜在致病性一直存在担忧,对其在农业上的应用持谨慎态度。

本试验研究了一株从巨菌草中分离的内生固氮菌 *Klebsiella variicola* GN02 的毒性固氮能力,结果表明,GN02 菌株无明显的经口毒性和经皮毒性,不是临床上流行肺炎克雷伯氏菌已有分型的强毒力菌株;GN02 菌株在不同生长期巨菌草根茎叶中均具有一定的固氮能力,不同生长期其固氮率和固氮量均为成熟期>拔节期>分蘖期>苗期,在同一生长期其固氮率和固氮量均为叶>根>茎;根茎叶各成熟期固氮百分率可达15%~27.27%,与其他禾本科植物所报道的固氮菌固氮效率基本相当。表明GN02菌株安全、无



M—marker; 1~7—GN02 菌株, 以 H₂O 为模板; 8~22—GN02 菌株, 以 GN02-DNA 为模板; 23~29—肺炎克雷伯氏菌 CMCC46117 菌株, 以肺炎克雷伯氏菌 CMCC46117-DNA 为模板

图3 GN02 菌株血清分型鉴定

表 2 不同生长时期巨菌草根、茎、叶的固氮率和固氮量

测定项目	根		茎		叶	
	固氮率(%)	固氮量(%)	固氮率(%)	固氮量(%)	固氮率(%)	固氮量(%)
苗期	1.94 ± 0.06aA	0.24 ± 0.01aA	—	—	8.47 ± 0.12aB	3.73 ± 0.09aB
分蘖期	13.82 ± 0.32bB	2.74 ± 0.07bB	9.30 ± 0.11aA	1.82 ± 0.05aA	15.86 ± 0.26bC	8.25 ± 0.10bC
拔节期	17.48 ± 0.41bB	4.65 ± 0.08bB	13.93 ± 0.22bA	2.77 ± 0.06bA	23.64 ± 0.31bC	13.24 ± 0.26bC
成熟期	20.37 ± 0.38cB	5.81 ± 0.11cB	15.79 ± 0.21cA	3.35 ± 0.09cA	27.27 ± 0.41cC	17.45 ± 0.29cC

注:小写字母表示同一部位不同生长时期的比较,大写字母表示同一生长时期不同部位之间的比较,相同字母表示差异不显著,不同字母代表差异显著($P < 0.05$);“—”表示苗期茎还未生成,因此无测定数据。

毒,具有一定的固氮能力,可在农业生产中使用,并为将来以其为菌株资源制备固氮菌肥、挖掘应用潜能、在绿色农业可持续发展中发挥重要作用奠定理论基础^[14]。

参考文献:

[1] 林标声,汪丽芳,张凯丽,等. 巨菌草内生固氮菌与解磷菌互作效应及其混合菌肥制备[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):281-283.

[2] 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.

[3] 赵明富,李梦娇,张芬芬,等. 变栖克雷伯菌在石斛体内的定殖动态及其对石斛黑斑病的防效试验[J]. 西南林业大学学报,2015,35(3):14-19.

[4] Chen M Y, Li Y Y, Li S Y, et al. Genomic identification of nitrogen-fixing *Klebsiella variicola*, *K. pneumoniae* and *K. quasipneumoniae* [J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(S1):78-84.

[5] 黄淑芬,郇 晨,刘丽辉,等. 植物内生固氮菌系统发育进化新进展[J]. 微生物学通报,2018,45(1):181-190.

[6] 席琳乔,张德罡,姚 拓. ¹⁵N 同位素稀释法测定燕麦根际固氮菌

固氮量的研究[J]. 核农学报,2007,21(4):417-420.

[7] 周晓舟,李杨瑞,杨丽涛. ¹⁵N 同位素稀释法评估甘蔗的生物固氮量[J]. 广西植物,2012,32(6):767-773.

[8] 黄东风,翁伯琦,罗 涛. 豆科植物固氮能力的主要测定方法比较[J]. 江西农业大学学报,2003,25(S1):17-20.

[9] 姚 拓,蒲小鹏,张德罡,等. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究Ⅲ固氮菌对燕麦生长的影响及其固氮量测定[J]. 草业学报,2004,13(5):101-105.

[10] 农药登记毒理学试验方法:GB 15670—1995[S].

[11] 杨荣仲,谭裕模,桂意云,等. ¹⁵N 测定甘蔗生物固氮能力研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(24):10405-10406.

[12] 李凤汀,刘荣昌,郝正然,等. 利用 ¹⁵N 稀释法研究小麦接种肺炎克雷伯氏菌联合固氮作用[J]. 微生物学报,1989(3):200-242.

[13] Lin L, Wei C Y, Chen M Y, et al. Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E[J]. Standards in Genomic Sciences, 2015, 10(1):22.

[14] 林占焯,林标声,范锦琳,等. 一种巨菌草固氮菌肥及其制备方法:CN 107021828A[P]. 2017-08-08.