

陆依琳,赵晴雨,彭学. 2株固氮菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(16):298-302.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.055

2株固氮菌的分离与鉴定

陆依琳,赵晴雨,彭学

(江苏师范大学生命科学学院,江苏徐州 221116)

摘要:氮是植物生长过程中不可或缺的元素,目前人们主要采用化学方法生产氮肥,但是这种方法存在很多缺陷。固氮菌(nitrogen-fixing bacteria)作为一种有机营养型细菌,由于其具有严格好氧的特点,每年都可以固定得到1亿t以上的氮肥,在解决氮素来源问题上显示出了巨大的潜力。旨在以葡萄糖为唯一碳源,以江苏师范大学的校园土壤为研究对象,在Ashby培养基上进行固氮菌的分离。结果表明,从江苏师范大学校园土壤中共分离得到2株固氮菌,分别命名为菌株610、611;根据革兰氏染色和生理生化分析结果,菌株610、611均为革兰氏阴性菌,菌株610生长的最适温度为35℃,最适pH值为7,菌株611生长的最适温度为30℃,最适pH值为8。2株菌株的16S rDNA测序结果显示,菌株610与*Arthrobacter nitrophenolicus*(硝基酚类节杆菌)的相似度为99.49%,菌株611与*Pseudomonas fulva*(黄褐假单胞菌)的相似度为98.95%。试验结果为今后高效生产固氮菌生物肥料提供了参考。

关键词:固氮菌;分离;鉴定;硝基酚类节杆菌;黄褐假单胞菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)16-0298-04

植物在生长过程中对氮素的需求量极大,因为氮是组成氨基酸的基本元素,而氨基酸则是构成蛋白质的基本单位。氮气(N₂)体积约占空气总体积的80%,且氮在空气中主要以游离状态存在,而生物体只能吸收利用化合态氮,因此需要依靠某些微生物体内的固氮酶来固定空气中游离的氮^[1]。1972年,巴西的Dobereine在研究禾本科植物根际时发现了具有固氮作用的固氮菌,它能利用体内的固氮酶把空气中植物无法吸收的氮气转化成氨态氮,并将其固定为植物可以直接利用的氮肥,该发现立即吸引了众多科研工作者的目光,他们因此对固氮菌展开了各方面的研究并获得了令人满意的成果^[2]。

固氮菌主要有自生固氮菌、共生固氮菌和联合固氮菌3种类型。目前,人们对固氮菌的研究主要集中在固氮菌形态学、细胞学和生理生化特征等几个方面,有些科学家则致力于研究适合固氮菌生长的营养条件、生长方式等。固氮菌除了具有基本的固氮功能外,还能产生维生素、生长素,进而促进农

作物的生长发育,改善农作物质量^[3]。Kumar等通过设计许多试验研究固氮菌对谷物的作用,结果表明,固氮菌在多数情况下都能提高谷物的产量^[4]。固氮菌肥与化学肥料相比,具有安全环保的生态效益,施用固氮菌肥可以节约大量原料,并在一定程度上避免对环境造成污染^[5]。不断加强土壤固氮菌的筛选、改良、驯化等应用研究,对于减少化学肥料的使用量、促进农业的绿色可持续发展、优化土壤质量等具有重大意义。目前,通过基因工程技术将固氮基因转移至植物体内从而使植物能够发挥固氮作用已经成为一项世界性的热点课题。许多国家的科学家都热衷于运用现代生物技术进行固氮菌的固氮机制和转移微生物固氮能力等方面的研究,并取得了不错的成果,展现出用固氮菌进行生物固氮的良好前景^[6]。

本试验以从江苏师范大学校园环境分离纯化得到的固氮菌为研究对象,探究其生理生化特性,以期后续生产高质量的固氮菌肥提供基本的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用材料为江苏师范大学校园内土壤。

1.2 试剂

KH₂PO₄(上海生工,纯度≥99.0%),MgSO₄·

收稿日期:2019-08-05

基金项目:江苏师范大学科研创新计划校立项目(编号:2019XKT402)。

作者简介:陆依琳(1996—),女,江苏南通人,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail:1985376940@qq.com。

通信作者:彭学,博士,教授,主要从事环境微生物学研究。E-mail:pengxueinchina@aliyun.com。

7H₂O(上海生工,纯度≥99.0%),NaCl(上海生工,纯度≥99.5%),CaSO₄·2H₂O(北京寰宇科创生物科技发展有限公司,纯度≥99.0%),CaCO₃(上海生工,纯度≥99.0%),葡萄糖(上海生工,纯度≥99.5%),琼脂(上海生工),LB 肉汤(上海生工),草酸铵结晶紫(上海生工),番红(上海生工),无水乙醇(上海生工,纯度≥99.7%),碘液(上海生工),95%乙醇(用无水乙醇配制),细菌基因组抽提试剂盒(宝日医生物技术有限公司),琼脂糖(宝日医生物技术有限公司),50×TAE(自配),1×TAE(自配),DNA marker(宝日医生物技术有限公司),DNA loading buffer(宝日医生物技术有限公司),Gold View(宝日医生物技术有限公司),16S rDNA 扩增试剂盒(宝日医生物技术有限公司)等。

1.3 菌株分离

以葡萄糖为唯一碳源,在 Ashby 培养基^[7]上分离菌株。首先在液体培养基中进行富集培养,然后经平板涂布、三区划线之后,获得固氮菌的单菌落。将菌液与 80% 甘油水溶液按 1:1 体积比混合后保存于 -80℃ 冰箱中。

1.4 菌种的鉴定

1.4.1 革兰氏染色 对菌株进行革兰氏染色^[8],并在显微镜下观察鉴定。若菌落呈紫色,则为革兰氏阳性菌;若呈红色,则为革兰氏阴性菌。

1.4.2 16S rDNA 测定 用试剂盒提取固氮菌的全基因组 DNA,并以此为模板进行 16S rDNA 扩增^[9]。

PCR 反应体系见表 1,混匀后放入 PCR 仪中进行扩增,PCR 程序如下:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,30 次循环;72℃ 保温 10 min。PCR 结束后,取 2 μL 反应液与 2 μL DNA loading buffer 混匀,并以 3 μL DNA marker 作为对照进行琼脂糖凝胶电泳,检测 PCR 扩增是否成功。扩增成功后将 PCR 反应液纯化,然后送到至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 最适温度的筛选

在 3 mL LB 液体试管中过夜培养固氮菌,转移 100 μL 菌液于 100 mL LB 液体培养基中,设 3 个锥形瓶为 1 组平行,将各组同时放入转速为 180 r/min 的摇床中,并设置不同的温度梯度,5 h 后测定 $D_{600\text{ nm}}$ ^[10]。

1.6 最适 pH 值的筛选

在 3 mL LB 液体试管中过夜培养固氮菌,转移 100 μL 菌液于 100 mL 具有不同 pH 值梯度的 LB 液

表 1 PCR 反应体系

反应物	体积(μL)
10×PCR buffer	5
dNTP mix	5
MgCl ₂	4
Primer(27F)	3
Primer(1492R)	3
模板 DNA	2
Taq DNA 聚合酶	0.2
ddH ₂ O	加至 50 μL

体培养基中,以 3 个锥形瓶为 1 组平行,将各组同时放入转速为 180 r/min 的摇床中,5 h 后测定 $D_{600\text{ nm}}$ ^[11]。

1.7 生理生化反应

在 3 mL LB 液体试管中过夜培养固氮菌。取 1 套生理生化管,用砂条割开后,在每根生理生化管中均滴入 3 滴菌液,置于转速为 180 r/min 的恒温摇床中,24 h 后观察各管反应前后的颜色变化。

1.8 数据分析

在最适温度和最适 pH 值的筛选试验中,先对每组 3 个平行样取平均值,再根据平均值用 Excel 作出柱形图。

2 结果与分析

2.1 2 株菌株的形态特征

以江苏师范大学的校园土壤为样品,在以葡萄糖为唯一碳源的 Ashby 培养基上培养并筛选得到 2 株固氮菌,分别命名为菌株 610、菌株 611。其中菌株 610 的菌落形态为圆形、无色透明、边缘整齐、表面光滑、湿润凸起,而菌株 611 的菌落形态为卵圆形、较小、呈乳白色、表面湿润、边缘较整齐、中间隆起、含有菌丝。如图 1、图 2 所示,经革兰氏染色并在油镜下观察发现,菌株 610 为短棒状,菌株 611 为圆球状,两者都呈“8”字形,且呈现红色,进一步证明本研究分离的固氮菌属于革兰氏阴性菌,如图 1、图 2 所示。

2.2 菌株 610、611 的 16S rDNA 电泳结果

以提取得到的菌株 610、611 的全基因组 DNA 为模板,以 27F、1492R 为引物,对 2 株固氮菌的 16S rDNA 基因进行扩增。由图 3 可以看出,所得条带大约在 1 500 bp 处,且单一明亮。

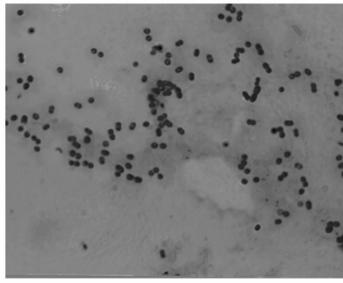
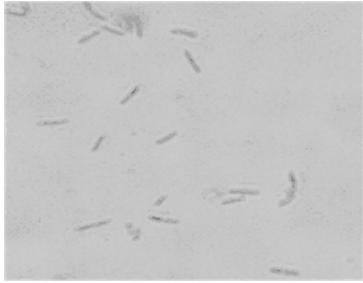
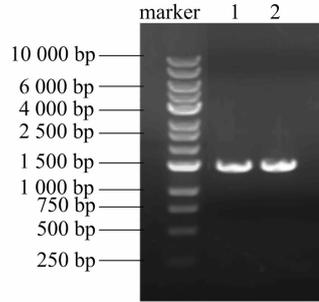


图1 菌株 610 的革兰氏染色结果

图2 菌株 611 的革兰氏染色结果

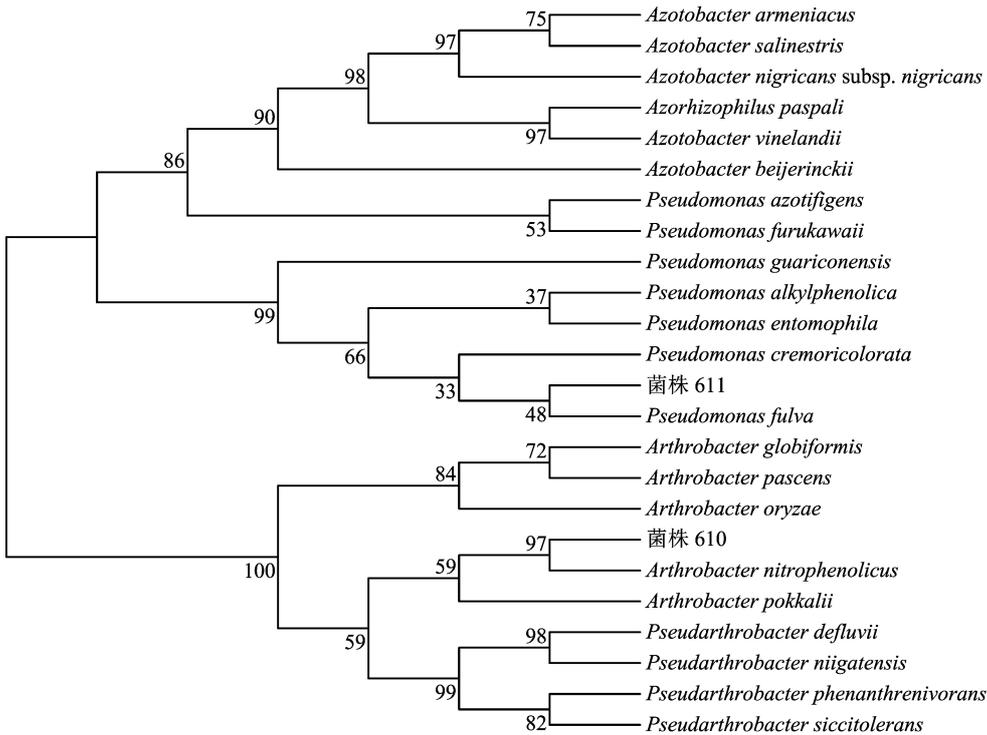


1—菌株 610 的 16S rDNA; 2—菌株 611 的 16S rDNA
图3 菌株 610、611 的 16S rDNA 的电泳结果

2.3 菌株 610、611 的测序结果及系统进化树的构建

将菌株 610、611 的 16S rDNA PCR 反应液纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,获得对应序列,再将测序结果提交到模式菌株数据库(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify>)中,检

索与所测菌株序列相近的已知菌株,并用 MEGA 7.0 软件绘制系统进化树。由图 4 可以看出,菌株 610 与 *Arthrobacter nitrophenolicus* (硝基酚类节杆菌)的相似性最高,相似度为 99.49%;菌株 611 与 *Pseudomonas fulva* (黄褐假单胞菌)最为相似,相似度为 98.95%。



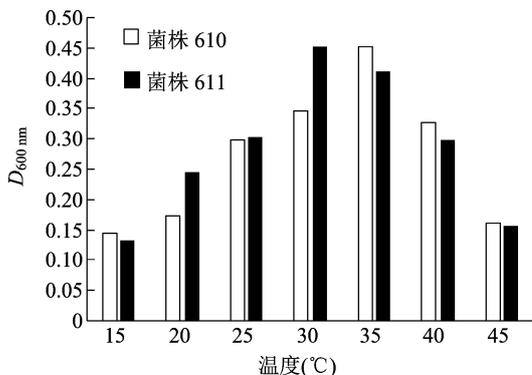
Azotobacter armeniacus—亚美尼亚固氮菌; *Azotobacter salinestr*—盐居固氮菌; *Azotobacter nigricans*—黑色固氮菌; *Azotobacter paspali*—雀稗固氮菌; *Azotobacter vinelandii*—维涅兰德固氮菌; *Azotobacter beijerinckii*—拜氏固氮菌; *Pseudomonas azotifigens*—固氮假单胞菌; *Pseudomonas furukawaii*—假单胞菌属; *Pseudomonas guariconensis*—假单胞菌属; *Pseudomonas alkylphenolica*—假单胞菌属; *Pseudomonas entomophila*—喜昆虫假单胞菌; *Pseudomonas cremoricolorata*—乳脂色假单胞菌; *Pseudomonas fulva*—黄褐假单胞菌; *Arthrobacter globiformis*—球形节杆菌; *Arthrobacter pascens*—滋养节杆菌; *Arthrobacter oryzae*—米节杆菌; *Arthrobacter nitrophenolicus*—硝基酚类节杆菌; *Arthrobacter pokkalii*—节杆菌属; *Pseudarthrobacter defluvii*—假节杆菌属; *Pseudarthrobacter niigatensis*—新潟假节杆菌; *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans*—假节杆菌属; *Pseudarthrobacter siccitolerans*—杂硅盐矿物假节杆菌

图4 基于菌株 610、611 的 16S rDNA 序列建立的系统进化树

2.4 菌株 610、611 最适生长温度的筛选

温度对菌株生长的影响较大。由图 5 所示,当温度为 15~35℃时,随着温度的上升,菌株 610 的 $D_{600\text{nm}}$ 也不断升高,到 35℃时达到最大值;当温度超

过 35℃后,随着温度的继续升高, $D_{600\text{nm}}$ 反而开始下降。由此可见,菌株 610 的最适生长温度是 35℃。菌株 611 在 30℃时的 $D_{600\text{nm}}$ 明显高于其他组,因而菌株 611 的最适生长温度为 30℃。

图5 不同温度下菌株 610、611 的 $D_{600\text{ nm}}$

2.5 菌株 610、611 生长最适 pH 值的筛选

由图 6 可以看出,菌株 610 可以在 pH 值为 3 ~ 11 的条件下生长,且在 pH 值为 7 时生长得最好,因

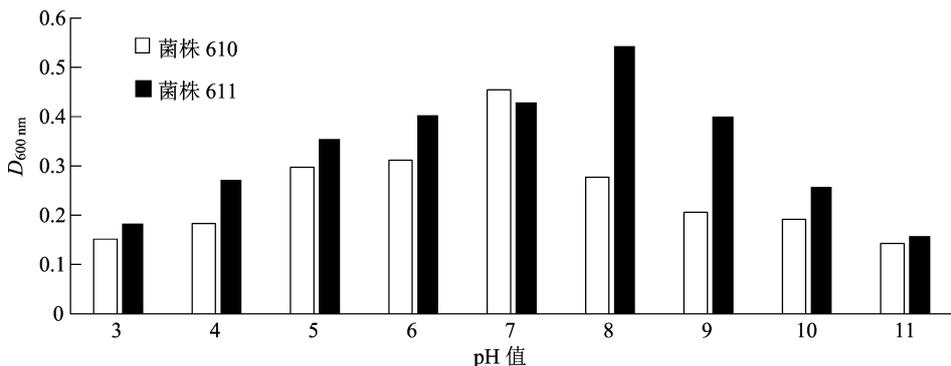
图6 不同 pH 值下菌株 610、611 的 $D_{600\text{ nm}}$

表 2 菌株 610、611 的部分生理生化特征

底物	反应结果	
	菌株 610	菌株 611
果糖	+	+
乳糖	-	-
蔗糖	+	+
D-核糖	+	-
麦芽糖	-	+
棉籽糖	-	+
山梨糖	-	+
鼠李糖	-	+
甘露醇	-	+
赖氨酸	+	+
鸟氨酸	+	+
精氨酸	+	+
尿素	-	+
七叶苷	-	-
硫化氢	-	-
丙二酸盐	+	+
ONPG(2-硝基苯- β -D-半乳糖苷)	-	-

注: + 表示可降解, - 表示不可降解。

此菌株 610 生长的最适 pH 值为 7; 而菌株 611 在 pH 值为 8 时的 $D_{600\text{ nm}}$ 明显高于其他组, 因此菌株 611 生长的最适 pH 值为 8。

2.6 菌株 610、611 的部分生理生化特征

用微量生化反应管对固氮菌株 610、611 的部分生理生化特征进行分析, 将培养好的菌液注入用砂条割开的生理生化管中培养 24 h, 观察其颜色变化。由表 2 可以看出, 菌株 610 仅能利用部分多糖物质, 如果糖、蔗糖、D-核糖等, 同时能利用一些氨基酸和有机酸, 如赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸、丙二酸盐等。而菌株 611 能利用大部分多糖物质, 如果糖、蔗糖、麦芽糖、棉籽糖、山梨糖、鼠李糖等, 同时能利用赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸等氨基酸; 此外, 菌株 611 可以利用部分有机酸, 如尿素、丙二酸盐等。

3 讨论

关于从土壤中分离固氮菌的报道已经有很多。本试验从江苏师范大学校园土壤中成功分离出 2 株固氮菌, 经鉴定, 这 2 株菌均为革兰氏阴性菌, 其中菌株 610 生长的最适温度为 35 °C, 最适 pH 值为 7; 菌株 611 生长的最适温度为 30 °C, 最适 pH 值为 8。对 2 株菌株的 16S rDNA 测序结果进行分析可知, 菌株 610 与 *Arthrobacter nitrophenolicus* 的相似度为 99.49%, 菌株 611 与 *Pseudomonas fulva* 的相似度为 98.95%。固氮菌的研究发展对农、林、牧、环境保护及能源利用等有着十分重大的理论和实际意义, 然而目前科研人员进行的生物固氮研究主要集中在共生固氮菌如根瘤菌上, 关于其他类型固氮菌的基础研究水平还需提高。

本试验对固氮菌进行了分离与鉴定, 仅完成了基础的筛菌试验, 若要进一步研究固氮菌, 还需对其固氮酶的活性进行检测, 确定有无固氮活性及其活性大小^[12]。随着生物科学技术的发展, 基因工程

梁田田,张永福,夏楠,等. 近26年和田绿洲人口对LULC时空变化分析及其生态响应[J]. 江苏农业科学,2020,48(16):302-308.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.056

近26年和田绿洲人口对LULC时空变化分析及其生态响应

梁田田,张永福,夏楠,赵娟,伊木然江·阿卜来提

(新疆大学资源与环境科学学院/新疆大学绿洲生态教育部重点实验室,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:研究人口对于绿洲地区土地利用与覆盖(LULC)变化的驱动作用对研究全球环境变化具有重要意义。对1992年和2017年的人口数据及影像文件进行处理,采用相关性分析、支持向量机等方法研究人口对研究区LULC变化的影响。结果表明:(1)26年间,和田绿洲的人口明显增加。(2)和田绿洲LULC变化明显,建设用地扩张明显,沙地面积增加,水体、未利用地、裸地面积均呈现减少趋势。(3)人口变化对和田绿洲LULC变化的驱动作用包括直接驱动和间接驱动2种。直接驱动表现为建设用地向南扩张的趋势。间接驱动表现为草地、沙地、水体面积等的变化。(4)26年间,和田绿洲生态服务价值降低,其生态环境有一定恶化的趋势,当地相关部门需加以治理。

关键词:和田绿洲;LULC;驱动力;相关性分析;SVM;生态响应

中图分类号: F323.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)16-0302-07

全球环境变化引起的一系列环境问题已然成为人类面临的严重威胁。随着全球环境变化程度的加剧和人类活动范围的扩大,土地利用与覆盖(land use and land cover, LULC)在时间及空间尺度

上都发生了剧烈变化,这种变化会对地球表层的生态系统产生直接影响,最终危及人类本身^[1-2]。由于LULC变化快且变化程度剧烈,人们已经逐渐认识到LULC变化的重要性,并展开了一系列深入研究。作为新疆典型绿洲区域,和田绿洲的资源十分有限,而绿洲人口及经济压力却越来越大,使得资源与需求之间产生了矛盾^[3]。

国内外学者在不同时空尺度上对LULC的变化

收稿日期:2019-09-19

作者简介:梁田田(1996—),女,山西吉县人,硕士研究生,主要从事国土资源利用与评价研究。E-mail:18203414670@163.com。

通信作者:张永福,硕士,副教授,主要从事国土资源评价与规划研究。E-mail:870587570@qq.com。

技术已被广泛应用,科研人员正在研究用基因工程技术将固氮基因转移从而使植物提高固氮效率,同时也在建构新的固氮微生物,开辟新的研究方向,发展前景非常广阔^[13]。

参考文献:

- [1] 韩斌,孔继君,邹晓明,等. 生物固氮研究现状及展望[J]. 山西农业科学,2009,37(10):86-89.
- [2] Mrkovački N, Milic V. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application[J]. Annals of Microbiology, 2001, 51(2):145-158.
- [3] 毛晓洁,王新民,赵英,等. 多功能固氮菌筛选及其在土壤生态修复中的应用[J]. 生物技术通报,2017,33(10):148-155.
- [4] Kumar V, Narula N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants[J]. Biology and Fertility of Soils, 1999, 28(3):301-305.
- [5] 刘晨,贾凤安,吕睿. 我国耕地重金属污染现状及固氮菌在

- 其修复中的作用[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):21-27.
- [6] 陈今朝,向邓云. 生物固氮的研究与应用[J]. 涪陵师专学报, 2000,16(2):93-96.
- [7] 赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京:科学出版社,2002:254-255.
- [8] 樊佳,林文和,郭子玮,等. 固氮菌分离及其荚膜染色综合性实验[J]. 实验技与管理,2018,35(1):66-68.
- [9] 张世清,李庆洋,高建明,等. 24株剑麻根际联合固氮菌的16S rDNA序列分析[J]. 江西农业学报,2011,23(11):132-134.
- [10] 王琦,李文涛,张沛东,等. 鳃草根际固氮菌的分离鉴定及培养条件的筛选[J]. 中国水产科学,2017,24(4):791-801.
- [11] 新楠,樊明寿,王海凤. 羊草和冰草根际高效固氮菌的分离及鉴定[J]. 天津农学院学报,2008,15(2):40-42.
- [12] Chen W H, Zheng D F, Feng N J, et al. The effects of gibberellins and mepiquat chloride on nitrogenase activity in *Bradyrhizobium japonicum*[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(1):1723.
- [13] 张武,杨琳,王紫娟. 生物固氮的研究进展及发展趋势[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2015,30(5):810-821.