

甘蔗茎内两个内生菌株 16S rRNA 序列 分析及其生长特性

邢永秀¹ 杨丽涛¹ 黄思良² 李杨瑞^{2*}

(1. 广西大学农学院 南宁 530005)

(2. 广西农业科学院 南宁 530007)

摘要: 从两个甘蔗品种 GT11 和 RB86-7515 表面灭菌的茎中分离到两株具有固氮活性的菌株, 分别编号为 B11S 和 B8S。利用 16S rRNA 序列分析对其进行鉴定, 并对两个菌株的生物学特性进行了比较。结果表明: B11S 菌株与 *Stenotrophomonas maltophili* 菌株处在同一个分支, 其序列与多个 *Stenotrophomonas maltophili* 菌株的序列相似性都达到 98% 以上, 菌株 B8S 与多个土壤杆菌属细菌的序列相似性达到 100%; 两个菌株在温度 31°C、pH 为 6 左右时生长量最高; 温度 31°C、pH 为 6.5~7.0 时固氮酶活性最高; 相同浓度的蔗糖生长量大于葡萄糖, 且表达固氮酶活性也最强; 添加一定量的氮素有利于细菌生长和固氮酶活性的表达, 但随着 N 含量的增加, 抑制作用越来越明显。

关键词: 甘蔗, 内生菌, 16S rRNA, 生长特性

The 16S rRNA Gene Sequences and Growth Characteristics of Two Nitrogen Fixing Endobacteria Strains from Sugarcane Stalk

XING Yong-Xiu¹ YANG Li-Tao¹ HUANG Si-Liang² LI Yang-Rui^{2*}

(1. College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530005)

(2. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007)

Abstract: Two N₂-fixing isolates, B11S and B8S, were obtained from the surface-sterilized stalks of sugarcane variety GT11 and RB86-7515 which were bred in Guangxi, China and introduced from Brazil, respectively. Both isolates showed acetylene reduction in nitrogen free media. Classification of both B11S and B8S was made on the basis of 16S rRNA sequence analysis, and the biological characteristics of the two isolates were studied. The 16S rRNA sequence of the isolate B11S had a 98.5% sequence similarity to those of many *Stenotrophomonas maltophili* and the 16S rRNA sequence of the isolate B8S had a 100% similarity to that of *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*). For both growth and nitrogenase activity of the isolates, the optimum temperature was about 31°C. The optimum pH was about 6.0 for their growth but 6.5~7.0

their nitrogenase activity. The two strains propagated more quickly and showed higher nitrogenase activity with the increase of carbon concentration in the culture media, and the effect of sucrose was better than that of the glucose. The growth and nitrogenase activity could be detected when the two strains were cultured in the media containing different concentration NH_4^+ and NO_3^- , and they grew better and showed higher nitrogenase activity under suitable nitrogen contents, but the growth of the two isolates was hindered more and more strongly with the increasing of the nitrogen content.

Keywords: Sugarcane, Endophytic nitrogen fixation bacteria, 16S rRNA, Growth trait

甘蔗是许多热带地区的重要作物, 它不仅是最重要的糖料作物, 也是最重要的能源作物和重要的饲料作物。随着全球石油和煤炭资源的不断枯竭, 甘蔗越来越受到许多国家的青睐, 如何降低甘蔗的生产成本, 是各国科学家普遍关注的焦点。巴西有上百年的甘蔗种植史, 连续多年在低氮情况下种植甘蔗, 其产量仍可达到 180 t/hm^2 ^[1]。这种异常活跃的生物固氮不可能完全从根际群落得到, 暗示其存在不同于以往的高效生物固氮系统。有研究报道: 甘蔗可以通过 *Gluconacetobacter diazotrophicus* 的生物固氮获得大部分自身需求的氮素^[2,3]。

目前报道的联合共生固氮微生物主要有: 圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*)、棕色固氮菌 (*A. vineland*)、拜氏菌 (*Beijerinckia*)、固氮螺菌 (*Azospirillum*)、德克斯氏菌 (*Derxia*)、芽孢梭菌 (*Clostridium*)、肠杆菌 (*Enterobacter*)、多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) 和固氮醋酸杆菌 (*Acetobacter diazotrophicus*) 等^[4], 但从甘蔗组织内分离到的细菌大多属于 *Gluconacetobacter diazotrophicus*、*Herbaspirillum rubrisubalbicans* 和 *H. seropedicae*^[5]。因此, 寻找具有高固氮活性的菌株, 丰富甘蔗的内生固氮菌种类, 具有重要的意义。

本试验以广西本地品种 GT11 和从巴西引进的甘蔗品种 RB86-7515 为材料, 从其茎中分离具有乙炔还原的内生菌株, 利用 16S rRNA 基因对其进行鉴定, 并研究了不同培养条件对该菌的生长和固氮酶活性的影响。

1 材料与方 法

1.1 菌株的分离与培养

按照邢永秀等方法^[6]。

1.2 培养基

培养基配方: sucrose 100 g/L、NaCl 0.2 g/L、 MgSO_4 0.2 g/L、 CaCO_3 1 g/L、 Na_2MoO_4 0.005 g/L。

固体培养基加入 15 g 琼脂。

1.3 固氮酶活性的测定

按照邢永秀等方法^[6]。

1.4 两个菌株的 16S rDNA 扩增和基因序列测定

采用单菌落裂解法制备模板 DNA。用于 16S rDNA 扩增的 PCR 反应引物按照文献[2]设计, 由上海生物工程公司合成。PCR 反应体系 (50 μL) 为: ddH₂O 36 μL 、10 \times buffer 5 μL 、2.5 mmol/L dNTPs 4 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 2 μL 、提取的细菌总 DNA 1 μL 、PyrobestTM DNA Polymerase 0.15 μL 。PCR 反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 4 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 56 $^\circ\text{C}$ 40 s, 72 $^\circ\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 6 min。PCR 产物纯化按照试剂盒说明进行, 测序由大连保生物工程公司完成。将测定的序列用 Blast 软件与 GenBank 中已知的 16S rRNA 序列进行同源性比较。用 DNAMAN 4.0 软件进行系统发育树分析。

1.5 不同温度对菌株 B8S 与 B11S 生长的影响

将浓度为 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL 的菌液 0.1 mL 接种于装有 5 mL 上述培养基的小瓶内, 分别培养于 7 $^\circ\text{C}$ 、10 $^\circ\text{C}$ 、13 $^\circ\text{C}$ 、16 $^\circ\text{C}$ 、19 $^\circ\text{C}$ 、22 $^\circ\text{C}$ 、25 $^\circ\text{C}$ 、28 $^\circ\text{C}$ 、31 $^\circ\text{C}$ 、34 $^\circ\text{C}$ 、37 $^\circ\text{C}$ 和 40 $^\circ\text{C}$ 系列培养箱内, 2 d 后测定待测菌株的 OD_{600} , 以 OD_{600} 表示该菌株的生长量 (下同), 每个处理重复 3 次。

1.6 不同 pH 对菌株 B8S 与 B11S 生长的影响

用灭菌的 1 mol/L NaOH 或 HCl 将上述培养基分别调节成 pH 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 每个小瓶分装 5 mL 后接入 0.1 mL 菌悬浮液, 置于 30 $^\circ\text{C}$ 、120 r/min 的摇床上培养, 2 d 后测定其 OD_{600} 。

1.7 不同葡萄糖和蔗糖浓度对菌株 B8S 与 B11S 生长和固氮酶活性的影响

将上述培养基中的蔗糖去掉作为基本培养基, 每个三角瓶分装 50 mL 后, 分别加入过滤灭菌的 30% 葡萄糖母液与蔗糖母液, 使其终浓度分别为 1%、5%、10% 和 15%, 然后接入 0.1 mL 菌悬浮液,

置于 30°C、120 r/min 的摇床上培养, 2 d 后测定固氮酶活性和 OD_{600} 。每个处理 3 次重复。

1.8 不同硝酸钾和氯化铵浓度对菌株 B8S 与 B11S 生长和固氮酶活性的影响

以上述培养基为基本培养基, 三角瓶分装 50 mL 后, 分别加入灭菌的 100 g/L 硝酸钾和氯化铵母液, 使其终浓度分别为 0 g/L、2 g/L、4 g/L、6 g/L 和 10 g/L。接入 0.1 mL 菌悬浮液, 置于 30°C、120 r/min 的摇床上培养, 2 d 后测定固氮酶活性和 OD_{600} 。每个处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 两个菌株的固氮酶活性检测

乙炔还原法是检测固氮酶活性的一个重要方法, 本实验中两个菌株的固氮酶活性都很高, 尤其是 B11S 菌株的该酶活性多达 1456.23 nmol $C_2H_4/(h \cdot mL)$ (表 1)。

表 1 两个甘蔗茎分离菌株的固氮酶活性
Table 1 The nitrogenase activity of the two isolates from sugarcane stalk

菌株 Isolate	固氮酶活性 Nitrogenase activity[nmol $C_2H_4/(h \cdot mL)$]
B8S	309±11.86
B11S	1456.23±127.53

2.2 两个菌株的 16S rRNA 基因序列分析

16S rRNA 基因是目前应用于细菌系统发育分析中使用最多的一个指标。在本试验中对菌株 B11S 与 B8S 的 16S rRNA 基因进行扩增、测序后进行同源性分析, 结果如下: 菌株 B11S 的 16S rRNA 基因片段长度为 1455 bp, 在 GenBank 中的登录号为 DQ141193; 菌株 B8S 的 16S rRNA 基因片段长度为 1403 bp, 在 GenBank 中的登录号为 AY850392。采用 DNAMAN4.0 和 GenBank 中的 Blast 工具, 分别将两个菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已登录的部分菌株的 16S rRNA 序列进行相似性比较, 结果发现: B11S 菌株与 *Stenotrophomonas maltophilia* 菌株处在同一个分支, 其序列与多个 *Stenotrophomonas maltophilia* 菌株的序列相似性都达到 98% 以上, 因此我们将菌株 B11S 归在 *Stenotrophomonas maltophilia*。菌株 B8S 的 16S rRNA 序列与菌株 *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) (AY513492、AY513491 和 AY568505)、*Agrobacterium*

tumefaciens (AJ389907、AJ389908 和 AJ130719) 的相似性高达 100%, 表明菌株 B8S 是土壤杆菌属的一个种。两个分离菌株的系统进化树状图分别见图 1 和图 2。

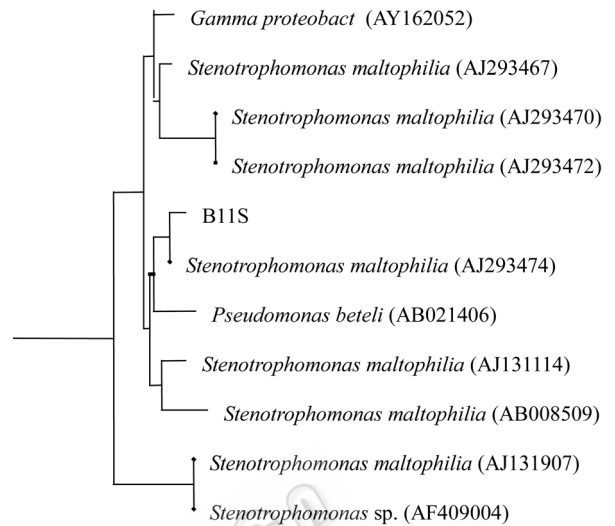


图 1 利用 DNAMAN4.0 分析软件绘制的 *Stenotrophomonas maltophili* 系统发育树状图

Fig. 1 Phylogenetic tree showed the relationship of strain B11S with the other strains in GenBank

2.3 不同温度和不同 pH 对菌株 B8S 与 B11S 生长和固氮酶活性的影响

从图 3 至图 6 可以看出: 两个菌株的温度生长范围为 10°C~40°C, 适宜生长温度在 31°C 左右; 高于 40°C, 两个菌株均不生长。两个菌株生长的最适 pH 值为 6.0 左右。菌株 B8S 在 pH 3 时几乎不生长, 但在 pH 9 时仍可生长; 菌株 B11S 在 pH 值低于 3 时仍可生长, 但在 pH 9 时不生长。不同温度和 pH 对两个菌株的固氮酶活性影响趋势相同, 都在温度 31°C 左右、pH 6.5~7.0 时固氮酶活性最高。

2.4 不同葡萄糖和蔗糖浓度对菌株 B8S 与 B11S 固氮酶活性和生长的影响

不同浓度的葡萄糖和蔗糖对两个菌株生长和固氮酶活性的测定结果如图 7、图 8 所示。B8S 和 B11S 都可以利用蔗糖和葡萄糖并表达固氮酶活性, 在所试验浓度范围内, 随着葡萄糖和蔗糖浓度的增大, 两个菌株的固氮酶活性都升高; 两个菌株的生长量都是在 10% 蔗糖和葡萄糖时最大, 且相同浓度的蔗糖生长量大于葡萄糖的生长量, 相同浓度的蔗糖培养条件下, B8S 的生长量大于 B11S, 生长量较大的菌株 B8S, 其表达的固氮酶活性也较高。

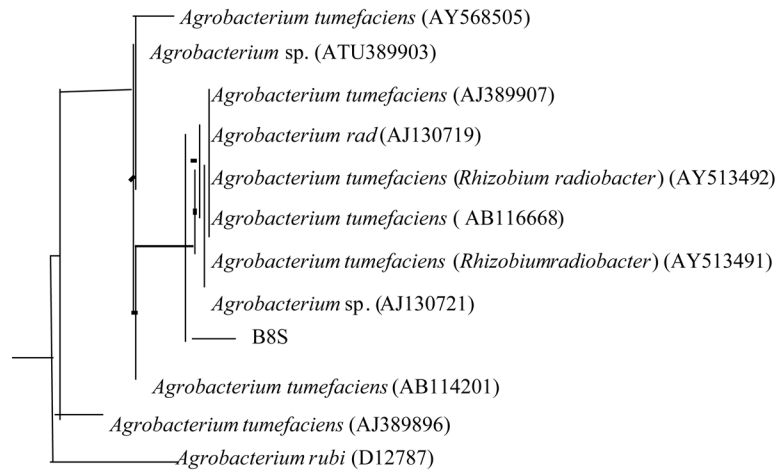


图2 利用 DNAMAN4.0 分析软件绘制的土壤农杆菌的系统发育树状图

Fig. 2 Phylogenetic tree showed the relationship of strain B8S with the other strains in GenBank

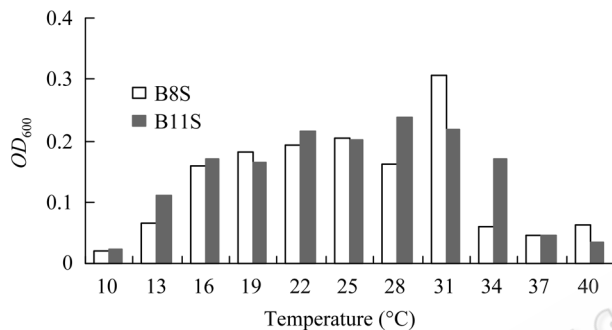


图3 不同温度对菌株 B8S 与 B11S 生长的影响

Fig. 3 Effect of different temperature on growth of the strains B8S and B11S

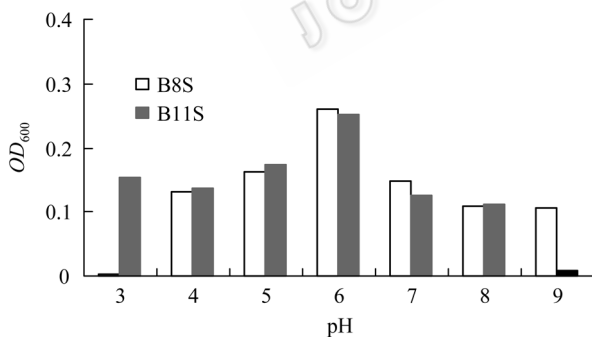


图4 不同 pH 对菌株 B8S 与 B11S 生长的影响

Fig. 4 Effect of different pH on growth of the strains B8S and B11S

2.5 不同硝酸钾和氯化铵浓度对菌株 B8S 与 B11S 生长和固氮酶活性的影响

在不同氯化铵和硝酸钾浓度下, B8S 菌株和 B11S 菌株的生长量及固氮酶活性的结果如图 9 和图 10 所示。从图可知, 培养液中 NH_4^+ 浓度和 NO_3^- 浓度在 0 g/L~4 g/L 范围内, 两个菌株的生长量随着

NH_4^+ 浓度和 NO_3^- 浓度的增大而增大; 继续增大两种氮源的浓度, 两个菌株的生长量都下降, 添加硝酸钾更有利于两个菌株的固氮酶活性表达。

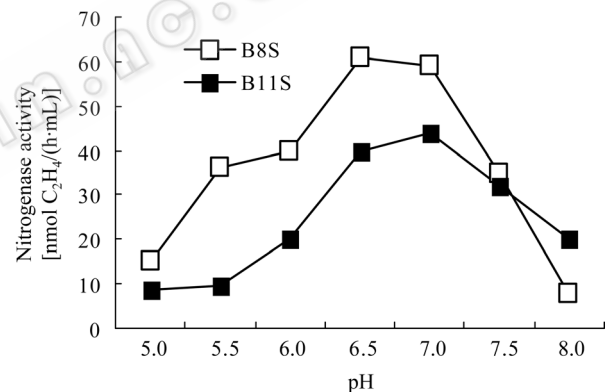


图5 不同 pH 对菌株 B8S 与 B11S 固氮酶活性的影响

Fig. 5 Effect of different pH on nitrogenase activity of the strains B8S and B11S

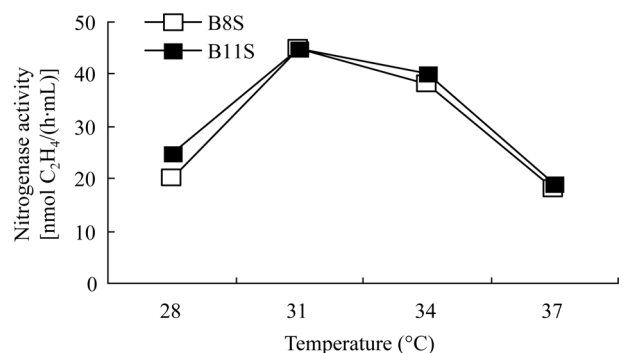


图6 不同温度对菌株 B8S 与 B11S 固氮酶活性的影响

Fig. 6 Effect of different temperature on nitrogenase activity of the strains B8S and B11S

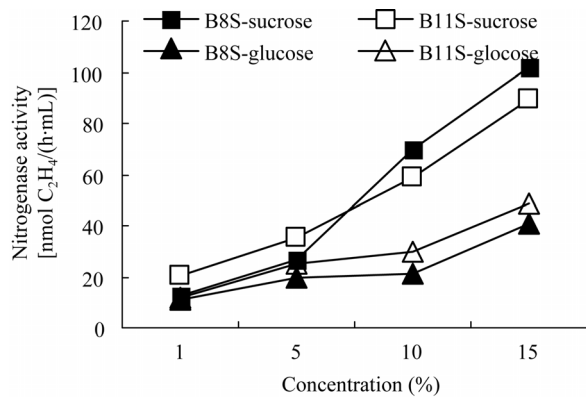


图7 不同葡萄糖和蔗糖浓度对菌株 B8S 与 B11S 固氮酶活性的影响

Fig. 7 Effect of different concentrations of glucose and sucrose on nitrogenase activity of the strains B8S and B11S

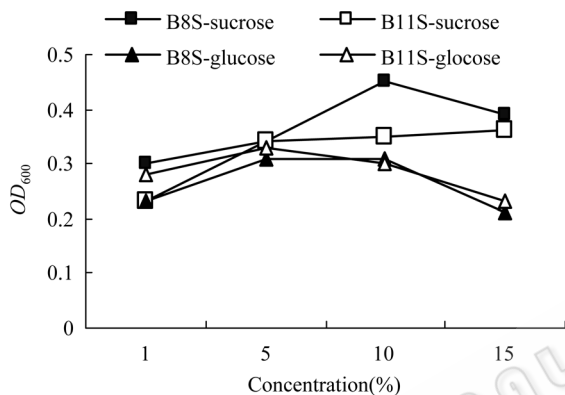


图8 不同葡萄糖和蔗糖浓度对菌株 B8S 和 B11S 生长的影响

Fig. 8 Effect of different concentrations of glucose and sucrose on growth of the strains B8S and B11S

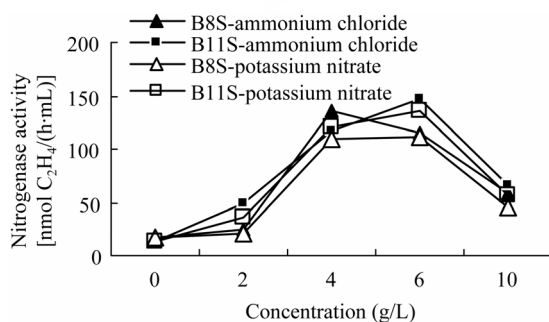


图9 不同浓度的硝酸钾和氯化铵对菌株 B8S 与 B11S 固氮酶活性的影响

Fig. 9 The effect of different concentrations of ammonium chloride and potassium nitrate on nitrogenase activities of the strains B8S and B11S

3 讨论

rRNA 是所有生物的基本要素之一, 16S rRNA

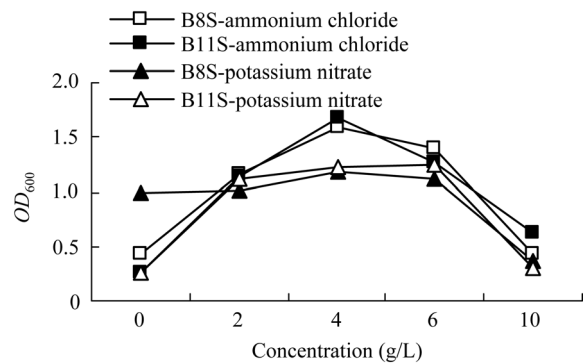


图10 不同硝酸钾和氯化铵浓度对菌株 B8S 与 B11S 生长的影响

Fig. 10 The effect of different concentrations of ammonium chloride and potassium nitrate on growth of the strains B8S and B11S

基因稳定存在于所有生物的细胞中并执行相同的功能, 在生物进化史中分子序列变化缓慢, 能跨越整个生命的进化过程。因此, 16S rRNA基因常被用于不同生物群的分类鉴定。本试验应用 16S rRNA对两个菌株进行序列分析的结果表明, 菌株B11S属于 *Stenotrophomonas maltophilia*, 菌株B8S属于土壤杆菌属。试验中分离所得到的两个菌株, 都是在检查灭菌彻底的前提下得到的, 由于其具有较高的固氮酶活性, 因此是两株内生固氮细菌。内生固氮细菌是目前研究的热点之一, 土壤杆菌具有固氮能力的报道还较少, Malik等^[7]和杨海莲^[8]等报道根癌土壤杆菌具有固氮酶活性, 但关于嗜麦芽假单胞菌的报道大多是在医学方面^[9,10], 而在甘蔗体内分离到嗜麦芽假单胞菌, 并且证明具有固氮酶活性本试验还是第一次报道, 本研究结果丰富了甘蔗内生细菌的种类。

联合固氮是生物固氮研究的热点之一, 由于乙炔还原法具有灵敏度高、操作简单等优点, 是目前应用最为广泛的方法。Deslippe^[11] 等利用该法研究了模拟气象条件变化对加拿大北极区固氮生物群落结构和活性的影响。Munusamy Govindarajan^[12]等利用该法从印度不同的甘蔗品种的根和茎内筛选出4个高固氮能力的内生菌。不同固氮微生物要求的生长和固氮的环境不同, 如拜叶林克氏菌要求偏酸性环境才能生长和固氮, 生脂固氮螺菌生长的最适pH为 6.8~7.8, 醋酸杆菌的生长和固氮最适pH为 5.5左右^[13]。本试验所得菌株的生长特性研究表明, 两株菌株的pH范围不完全相同, B8S可适应一定碱性环

境, 而B11S可适应一定的酸性环境。不同温度和pH对两个菌株的固氮酶活性影响趋势相同, 两个菌株的生长特性没有很大差异, 试验所得结论为两个细菌的培养和应用提供了一定的参考依据。

碳源是细菌生长与代谢的必备因子, 也是启动固氮细菌进行固氮的能源, 不同浓度的碳源对固氮细菌的生长和固氮酶活性都有一定的影响^[14-16]。本试验表明两个菌株利用葡萄糖的能力不同, 但蔗糖更有利于供试菌株的生长, 这可能与甘蔗体内的微环境有关。氮素对细菌生长和固氮酶活性的影响与菌株的种类有关。Noel等^[16]报道, 铵离子浓度对细菌的生长和固氮酶活性的表达影响较大。Muthukumarasamy等^[17,18]报道: 氮肥使用量对草螺菌的生长和固氮的影响都不大, 但却严重抑制醋酸杆菌的生长和固氮能力。本试验也发现在适宜浓度的范围内, 两个菌株的生长量都是随着NH₄⁺浓度和NO₃⁻浓度的增大而增大, NH₄⁺更有利于菌株的生长; 当继续增大供试氮源的浓度时, 两个菌株的生长量都下降。这一结果与Stephan等^[19]报道的对菌株 *Gluconobacter diazotrophicus* 的试验结果相一致, 这也许是固氮细菌的共性, 即大量氮肥的使用对固氮微生物生物固氮作用有抑制作用。本文报道的B8S与B11S菌株具有一定的潜在应用价值, 因此有必要进行进一步的深入研究。

致谢: 在此十分感谢广西甘蔗研究所王伦望同志提供试验材料——甘蔗品种。

参 考 文 献

- [1] James EK. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, 2000, **65**: 197-119.
- [2] Boddey RM, Urquiaga S, Reis VM, *et al.* Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil*, 1995, **174**: 195-209.
- [3] Döbereiner J. Biological nitrogen fixation in the tropics. Societal and economical contributions. *Soil Bio Biochem*, 1997, **29**: 771-774.
- [4] Boddey RM, Urquiaga S, Bruno JR, *et al.* Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, 2003, **252**: 139-149.
- [5] Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, *et al.* Recent research advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochemical*, 1997, **29**: 911-922.
- [6] Xing Yong-xiu, Yang Li-tao, Li Yang-rui. Identification of a new nitrogen fixing endo-bacterium strain B8S isolated from sugarcane stem. *Sugar Tech*, 2006, **8**(1): 49-53.
- [7] Malik KA, Rakhshanda B, Rasul G, *et al.* Associative N₂-fixation in plants growing in saline sodic soils and its relative quantification based on ¹⁵N natural abundance. *Plant Soil*, 1991, **137**: 67-74.
- [8] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未, 等. 水稻内生联合固氮细菌的筛选、鉴定及其分布特性. *植物学报*, 1999, **41**(9): 927-931.
- [9] 赵 亮, 胡媛媛. 65例嗜麦芽窄食单胞菌呼吸道感染的临床及药敏分析. *实用药物与临床*, 2005, **8**(3): 54-55.
- [10] Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infections associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev*, 1999, **11**: 7-8.
- [11] Deslippe JR, Egger KN, Henry GH. Impacts of warming and fertilization on nitrogen-fixation microbial communities in the canadian high arctic. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, **53**(1): 41-50.
- [12] Govindarajan M, Kwon SW, Weon HY. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World Microbiol Biotechnol*, 2007, **23**: 997-1006.
- [13] Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can J Microbiol*, 1983, **29**: 924-929.
- [14] Luna MF, Mignone CF, Boiardi JL. The carbon source influences the energetic efficiency of respiratory chain of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**: 564-569.
- [15] 张丽梅, 方 萍, 季天委. 高效固氮菌株 W12 对环境因子的适应性研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2002, **28**(6): 66-68.
- [16] Noel A, Tejera NA, Ortega E, *et al.* Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol*, 2004, **50**: 745-750.
- [17] Medeiros AFA, Polidoro JC, Reis VM. Nitrogen source effect on gluconacetobacter diazotrophicus colonization of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil*, 2006, **279**: 141-152.
- [18] Muthukumarasamy R, Revathi G, Lakshminarasimhan C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biol Fertil Soils*, 1999, **29**: 157-164.
- [19] Stephan MP, Oliveira M, Teixeira KRS, *et al.* Physiology and nitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, **77**: 67-72.