

## 研究报告

玉米联合固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 的分离  
鉴定与固氮特性研究

李琼洁 程杰杰 孙帅欣 陈云鹏\*

(上海交通大学农业与生物学院 农业部都市农业(南方)重点实验室 上海 200240)

**摘要:**【目的】固氮微生物是生物固氮的主体,其菌种的选育更是生物固氮研究的基础。本实验室分离鉴定出一株新的固氮菌,并对其固氮相关活性进行初步研究。【方法】固氮菌采用 Ashby 无氮培养基进行分离纯化。通过形态特征分析、生理生化特征分析、16S rRNA 基因序列分析和基因组扫描对固氮菌进行鉴定。利用靛酚蓝-分光光度法检测固氮菌的泌铵能力。固氮酶活性的测定使用乙炔还原法。【结果】从玉米根部分离到一株固氮菌株 GXGL-4A,菌体短杆状,大小约为  $1.5\ \mu\text{m}\times 0.5\ \mu\text{m}$ ,单个或常见2个菌体细胞串联在一起,革兰氏染色结果为阴性。16S rRNA 基因序列分析结果表明该菌株与 *Kosakonia oryzae* Fo8A1d 16S rRNA 基因序列有95%的相似性,结合形态特征、生理生化特征和基因组扫描,将其命名为 *K. radicincitans* GXGL-4A。对其进行固氮基因 *nifH* 的检测,经 PCR 扩增得到预期的 296 bp 条带;采用靛酚蓝-分光光度法,测得发酵液中铵态氮含量为 2.5 mg/L,表明该菌株具有较好的泌铵能力。乙炔还原法测其固氮酶活性,以乙烯生产量表示,结果显示 GXGL-4A 菌株在无氮培养基上能够有效地还原乙炔,达到  $232.94\ \text{nmol}\ \text{C}_2\text{H}_4/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 。【结论】菌株 GXGL-4A 是一株可较好地分泌铵的新的固氮菌,具有很好的研究价值。

**关键词:** 玉米, 固氮菌, 分离鉴定, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A

Isolation, identification and characterization of associative  
nitrogen-fixing endophytic bacterium *Kosakonia radicincitans*  
GXGL-4A in maize

LI Qiong-Jie CHENG Jie-Jie SUN Shuai-Xin CHEN Yun-Peng\*

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Key Laboratory of Urban Agriculture (South),  
Ministry of Agriculture, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** [Objective] Nitrogen-fixing microorganisms are the main component of biological nitrogen fixation agent, and the breeding of nitrogen-fixing-bacterium provides a solid foundation for the investigation and application in biological nitrogen fixation field. A nitrogen-fixing bacterium

**Foundation item:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2015CB755702)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34206620; E-mail: ypchen7274@sjtu.edu.cn

Received: December 29, 2015; Accepted: March 23, 2016; Published online (www.cnki.net): April 14, 2016  
基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No. 2015CB755702)

\*通讯作者: Tel: 86-21-34206620; E-mail: ypchen7274@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2015-12-29; 接受日期: 2016-03-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-04-14

was identified and furthermore its nitrogenase activities were determined. **[Methods]** Ashby medium is used for the isolation and purification of nitrogen-fixing-bacterium. Morphological, physiological and biochemical analyses were conducted combining with 16S rRNA gene sequencing and genomic scanning to identify the bacteria. The ammonia-secreting capacity of bacterial cells was measured by indophenol blue spectrophotometric method and the nitrogenase activity was determined using the acetylene reduction assay (ARA). **[Results]** *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A, a Gram-negative nitrogen-fixing bacterium with the size of  $1.5\ \mu\text{m}\times 0.5\ \mu\text{m}$  was finally isolated from maize root tissues. The strain were observed to show single cell distribution and joint of two tandem bacterial cells under a microscope. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence revealed that GXGL-4A shares 95% of DNA homology with the *Kosakonia oryzae* strain Fo8A1d. Eventually, the isolate was identified as *Kosakonia radicincitans* and the stain was named as *K. radicincitans* GXGL-4A. The nitrogen-fixing gene, *nifH* was successfully amplified by PCR technique. The content of ammonia nitrogen secreted by GXGL-4A bacterial cells was assayed at 2.5 mg/L through indophenol blue spectrophotometric method. The results showed that this strain has a good capacity in ammonium secretion. The nitrogen-fixing bacterium GXGL-4A grown on nitrogen-free media can effectively restore acetylene, and its nitrogenase activity expressed in ethylene production capacity was evaluated at  $232.94\ \text{nmol}\ \text{C}_2\text{H}_4/(\text{mL}\cdot\text{h})$ . **[Conclusion]** *K. radicincitans* GXGL-4A will benefit for the research of microbial nitrogen fixation.

**Keywords:** Maize, Nitrogen-fixing bacterium, Isolation and identification, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A

空气中约有 80% 氮气, 但植物不能直接利用, 而固氮微生物却可以将空气中的氮转化为植物可用的氨, 称之为微生物固氮过程<sup>[1-2]</sup>。微生物固氮过程是通过固氮菌体细胞内的多种固氮酶, 在常温和常压的条件下, 将空气中的氮气( $\text{N}_2$ )还原成氨( $\text{NH}_3$ )的生化过程<sup>[3-4]</sup>。所以, 研究固氮酶的特性对研究生物固氮是有重大意义的。

目前, 发现具有生物固氮能力的微生物多为细菌, 有 100 多个属, 占细胞系统发育分支的一半以上<sup>[5]</sup>。而已经发现的植物内生固氮菌主要集中在固氮螺菌属 (*Azospirillum*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、草螺菌属 (*Herbaspirillum*) 等, 其宿主植物有甘蔗、玉米、水稻、甘薯、香蕉、菠萝、牧草等<sup>[6]</sup>。2015 年有研究发现, 在意大利的水稻根部分离到具有植物促生作用的内生菌株 *Kosakonia oryzae* KO348<sup>[7]</sup>; 同年, 瑞士的 Bergottini 在巴拉圭圣冬青山的巴拉圭茶根部分离出一株也具有植物促生作用的菌株 *Kosakonia radicincitans* strain YD4<sup>[8]</sup>, 该菌株存在促进植物生长活性的基因。

本研究从采集的玉米根系中分离筛选出一株

具有固氮能力的内生细菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A, 对其进行了形态学、生理生化及分子生物学鉴定, 并在此基础上对其泌铵能力和固氮酶活性进行了测定。到本文撰稿前, 仅国外对 *Kosakonia oryzae* 有研究报道, 且只发现其具有植物促生作用, 未见其有固氮能力相关的研究报道。而本研究经过大量实验, 首次证实了 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 具有固氮基因和固氮能力, 对固氮微生物的研究具有重要的理论和现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

样品: 玉米根及根际土壤样品共 106 份, 分别采集自上海、广东、广西及江西地区。

试剂: PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;  $2\times\text{Taq}$  Master Mix 购于北京康维试剂生物技术公司(产品组成为:  $0.1\ \text{U}/\mu\text{L}$  *Taq* polymerase,  $500\ \mu\text{mol/L}$  dNTP each,  $20\ \text{mmol/L}$  Tris-HCl (pH 8.3),  $100\ \text{mmol/L}$  KCl,  $3\ \text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ , 其他稳定剂与增强剂); 细菌基因组提取纯化试剂盒购自美国普洛麦格生物产品(上海)有限

公司; PCR 产物回收试剂盒购于德国凯杰生物技术(上海)有限公司; 其它化学试剂为国产分析纯或进口分装。

## 1.2 固氮菌的富集培养、分离、纯化

**1.2.1 根际土壤:** 称取附着在玉米根上的土 5 g, 放入 45 mL 无菌水中, 28 °C、180 r/min 振荡 30 min, 静置 10 min, 制得  $10^{-1}$  稀释液, 用无菌水 10 倍系列稀释, 各取 0.1 mL 涂布于 Ashby 平板<sup>[9]</sup>, 28 °C 培养 2–3 d 后, 选取菌落形态不同的单菌落反复进行平板划线分离, 得到纯菌落后保存以备鉴定和实验使用<sup>[10]</sup>。

**1.2.2 玉米根:** 取根系, 用水洗净, 在 70% 酒精中浸泡 30 s, 无菌水洗 3 次, 再在加入 1 滴表面活性剂的 5%–20% NaClO 溶液中浸泡 5–10 min, 在 70% 酒精中浸泡 30 s, 无菌水洗 5 次, 最后一次的无菌水涂布平板。如无菌生长说明消毒彻底, 反之则重新取样分离。将灭菌的材料及 10 mL 磷酸缓冲液放入灭菌的研钵内磨碎, 静置 5 min, 取上清液 1 mL (作为原始液), 用无菌水做 10 倍稀释, 再分别取 0.1 mL 涂布于 Ashby 平板, 28 °C 培养 2–3 d 后, 选取菌落形态不同的单菌落反复进行平板划线分离, 得到纯菌落后保存以备鉴定和实验使用<sup>[8]</sup>。

## 1.3 固氮菌的筛选、鉴定

**1.3.1 菌落及菌体形态观察:** 在固氮菌分离培养基平板上培养初步筛选的菌株 2–3 d, 观察其菌落形态; 取菌体涂片, 经革兰氏染色后, 在普通光学显微镜下观察菌体形态; 根据参考文献<sup>[11]</sup>处理扫描样品, 用 LB 液体培养基<sup>[9]</sup>过夜培育 GXGL-4A 菌株, 吸取 1 mL 菌液加入已灭菌的 1.5 mL 离心管, 室温 4 000 r/min 离心 2 min, 吸出上清液, 加无菌水重悬沉淀, 立即吸取少量菌液于铜板上, 置于空气中干燥, 干燥固定后的样品用扫描电镜 (Tecnai G2 spirit Biotwin, 120 kV Bio-TEM) 观察固氮菌形态。生理生化特性的测定参考《微生物学实验教程》<sup>[12]</sup>。固氮菌生理特性的测定参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>。

**1.3.2 固氮酶基因 *nifH* 的检测:** 用试剂盒提取菌

株的基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板, 上游引物为 *nifH* P1 (5'-GGCTGCGATCCVAAGGCCGAYTCVACCCG-3'), 下游引物为 *nifH* P2 (5'-CTGVGCCTTGTT YTCGCGGATSGGCATGGC-3')。25  $\mu$ L PCR 反应体系: DNA 模板 1  $\mu$ L, 20  $\mu$ mol/L 引物 P1 1  $\mu$ L, 20  $\mu$ mol/L 引物 P2 1  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq Master Mix 12.5  $\mu$ L, 双蒸水 9.5  $\mu$ L。扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经 1.0%–1.2% 琼脂糖电泳检测。

**1.3.3 16S rRNA 基因鉴定:** 用试剂盒提取菌株的基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板, 上游引物为 f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3'), 下游引物为 r (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC-3')。16S rRNA 基因的 PCR 扩增采用 25  $\mu$ L 反应体系 (同 *nifH* 基因扩增体系), 扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖电泳检测正确, 送上海生物工程公司进行测序。所得基因序列通过美国国家生物技术信息中心 NCBI 数据库进行 BLAST 在线序列比对, 运行软件绘制系统发育树。

## 1.4 序列拼接与基因组分析

菌株 GXGL-4A 基因组 DNA 按照试剂盒说明书进行制备。制备的基因组 DNA 通过 Illumina HiSeq 2500 进行双向测序, 所得序列通过 Velvet v. 1.2.09 软件进行组装, 获得基因组草图。利用 ZetaBio 原核基因组注释系统进行标注, 根据预测模型的基因表型由基于同源的 UniProt 数据库的蛋白质命名。

## 1.5 铍载体基因 *nrgA* 的克隆分析

选取铍载体基因 *nrgA* 进行 PCR 克隆。 *nrgA* 基因的 PCR 引物为 *nrgA*-F (5'-CGGGATCCATGAAA AACACAACATTAAAAACAGGTC-3') 和 *nrgA*-R (5'-CCCAAGCTTTCAGGCGTTGTAGGCGTTTTC GCCG-3')。PCR 扩增以细菌基因组总 DNA 为模板, 采用 25  $\mu$ L 反应体系 (同 *nifH* 基因扩增体系),

扩增程序为：94 °C 5 min；94 °C 1 min，55 °C 1 min，72 °C 1.5 min，30 个循环；72 °C 10 min。扩增产物经 1.0%–1.2%琼脂糖凝胶电泳纯化回收，连接到 pMT-19T 载体，并转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，经 PCR 鉴定出阳性转化子后进行测序并确认。测序所得基因序列提交 GenBank 数据库进行比对分析。

1.6 靛酚蓝-分光光度法测定菌株分泌氨态氮含量

1.6.1 标准曲线的制定：配制标准液：精确称取 0.235 8 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶于水，定容至 100 mL，获得含氨态氮量为 500 mg/L 原液，稀释 10 倍得氨态氮含量为 50 mg/L 的标准液。

配制检测试剂：1.25%亚硝基铁氰化钠溶液(二水亚硝基铁氰化钠 0.362 2 g，加水定容至 25 mL)，溶液 A (苯酚 5.00 g，1.25%亚硝基铁氰化钠溶液 2.0 mL，加水定容至 500 mL)，溶液 B (NaOH 2.50 g，柠檬酸三钠 2.0 g，NaClO 3.5 mL，加水定容至 400 mL)。

按照表 1 依次加入各种试剂，充分混合后，放入 37 °C 水浴显色 20 min，取出后用水冷却至室温，在 637 nm 下测定其 OD 值<sup>[14]</sup>。

1.6.2 样品的检测：将 GXGL-4A 菌株在 LB 培养基中于 37 °C、180 r/min 培养过夜，培养液按 10<sup>5</sup> 倍稀释后涂布至 Ashby 无氮固体培养基上生长 4 d。在无氮条件下，固氮菌 GXGL-4A 会利用空气中的氮气进行固氮作用，并将其固定的部分氮最终以氨态氮形式分泌到胞外。因此，可用移液枪(无菌条件下，用单片刀切去 Tip 头部)吸取略带粘稠的分泌物，加入 10 倍体积的无菌水稀释后，稀释液通

过 0.45  $\mu$ m 无菌滤膜除菌，收集到无菌 Eppendorf 管中即为待测样品。样品中氨态氮的浓度采用靛酚蓝-分光光度法进行测定。

1.7 乙炔还原法(ARA)<sup>[15]</sup>测定固氮酶活性

以瓦斯兰德固氮菌(*Azotobacter vinelandii*，瓦斯兰德固氮菌是本实验室从中国微生物保藏中心购买的一株革兰氏阴性菌，实验前期对其进行过研究)为对照。将菌株接种在橡胶塞封口的 50 mL 三角瓶中，在 28–30 °C 下培养 24–48 h 后，用无菌注射器抽出 2 mL 的气体，然后再给每瓶注入 2 mL C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>，再置培养箱中培养 12–48 h。从各培养瓶中取气样 200  $\mu$ L，注入日本岛津公司生产的 GC-2010 型号气相色谱仪中，测 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 的生成情况。从气相色谱仪显示屏的 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 峰值判断有无 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 的产生，以接种但未注入 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 的培养瓶作为对照 1，以未接菌但注射 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 的培养瓶做对照 2。以 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(mL·h) 表示固氮酶活性(N)。

2 结果与分析

2.1 固氮菌筛选、形态观察及生理生化特征

经 Ashby 无氮培养基多次筛选后得到 GXGL-4A 菌株。GXGL-4A 的菌落在无氮培养基上为无色透明，表面湿润，圆形，不易挑起；在 LB 培养基上为淡黄色，湿润，边缘清晰，圆形，易挑起。革兰氏染色结果显示为阴性。电镜下观察为杆状，有荚膜，能泌铵和胞外多糖类黏性物质，周生鞭毛或一端生单鞭毛，易脱落，菌体大小约为 1.5  $\mu$ m $\times$ 0.5  $\mu$ m (图 1)，单个或常见 2 个菌体细胞串联在一起。不运动，兼性厌氧，葡萄糖氧化发酵阳性，柠檬酸盐利用阳性，发酵葡萄糖产

表 1 标准曲线的制定											
Table 1 The development of the standard curve											
Reagents	Blank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solution A (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Standard solution ( $\mu$ L)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Sterile water ( $\mu$ L)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
The amount of ammonium ( $\mu$ g)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
Solution B (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

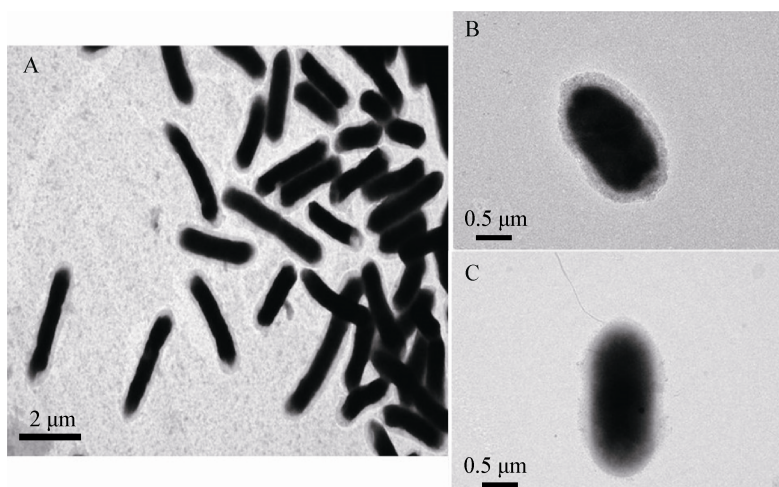


图1 GXGL-4A 固氮菌电镜照片

Figure 1 TEM analysis of the nitrogen-fixing bacterium strain GXGL-4A

酸产气，M.R 试验阴性，产吲哚实验阴性，硝酸盐还原实验阳性，接触酶阳性，属于 *Kosakonia radicincitans*。

## 2.2 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

菌株 GXGL-4A 的 16S rRNA 基因片段条带单一，经检测序列长度约为 1.2 kb，其固氮酶基因 *nifH* 的 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶上有清晰条带显示(图 2)，序列长度为 296 bp。根据 16S rRNA 基

因的 BLAST 比对结果绘制 GXGL-4A 的系统发育树(图 3)，结合基因组测序，结果表明所筛选出的玉米固氮菌 GXGL-4A 属于 *Kosakonia radicincitans*，与 *Kosakonia oryzae* Fo8A1d 16S rRNA 基因序列有 95% 的相似性。

## 2.3 固氮菌 GXGL-4A 的基因组特征分析

通过测序可得，覆盖度为 200×，拼接收获得 GXGL-4A 菌株的基因组序列，全长约为 5.64 Mb，GC 含量为 53.93%；其中编码区占整个基因组大小的 87.15%。综合菌株 GXGL-4A 的形态特征、生理生化特征、16S rRNA 基因序列及基因组测序分析结果，将其命名为 *K. radicincitans* GXGL-4A，属于  $\gamma$ -变形菌纲，肠杆菌目(Enterobacteriales)，*Kosakonia radicincitans* 种，为植物根际促生菌(PGPR)。

通过对固氮菌 GXGL-4A 基因组扫描，对其固氮相关基因，包括固氮酶结构基因和其调节基因、铵载体、一般氮代谢调控基因等进行了分析，共鉴定出 27 个相关基因。其中包括 5 个 *nif* 结构基因及其 5 个辅因子(FeMoco)；7 个一般氮代谢调控基因，包括 1 个 *ntrB*、3 个 *ntrC*、2 个 *glnD*、1 个 PII；1 个铵载体(*nrgA*)；1 个固氮酶调节基因(*nifA*)及 8 个其它 *nif* 基因。其中，铵载体基因 *nrgA* 已提交 GenBank 数据库，其 GenBank 登录号为 KU057369。

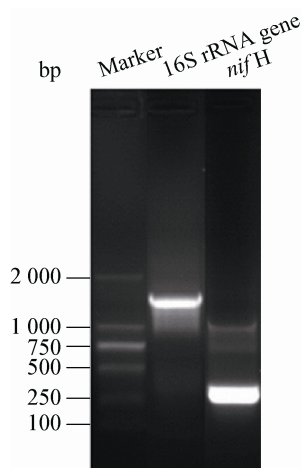


图2 固氮菌 GXGL-4A 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增及固氮酶基因 *nifH* 的检测

Figure 2 PCR amplification of 16S rRNA gene sequences from nitrogen-fixing bacterium GXGL-4A, and its detection of *nifH* gene

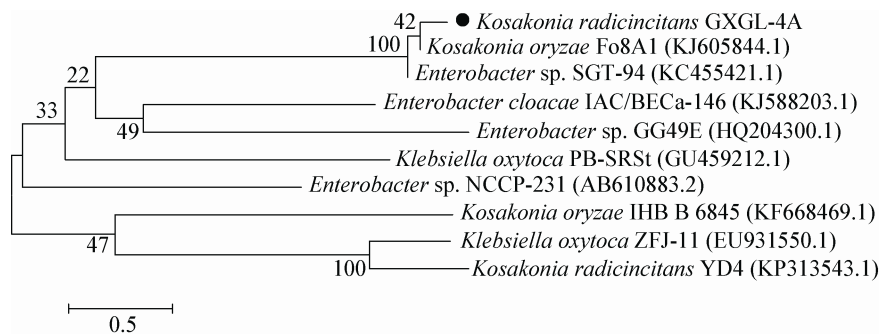


图3 GXGL-4A 固氮菌基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

Figure 3 A phylogenetic tree of the nitrogen-fixing strain GXGL-4A based on 16S rRNA gene sequence

注：图中黑色圆点为本实验分离菌株；括号中为该菌株的 GenBank 序列号；分支点上的数字表示树中每个部分的相对置信度(%)；标尺表示单位核苷酸的变化。

Note: The black dot indicates the isolated nitrogen-fixing bacterial strain in this study; GenBank accession numbers of the sampled 16S rRNA gene sequences are shown in brackets, respectively; the digital on branch point is bootstrap value (%); the staff means expected number of substitutions per site.

## 2.4 铵载体 *nrgA* 基因的克隆结果

对铵载体 *nrgA* 基因进行克隆，采用 PCR 法成功扩增出其全长 DNA 序列，大小为 1.26 kb，在琼脂糖凝胶电泳上可观察到一条清晰的条带(图 4)。

## 2.5 分泌物中氨态氮含量测定

2.5.1 标准曲线的制定：以标准氮氮量为横坐标、OD 为纵坐标绘制标准曲线，见图 5，该标准曲线方程为  $y=0.0686x-0.0756$ ， $R^2=0.9993$ ，表明其曲线相关性很好，可用于氨态氮的检测。

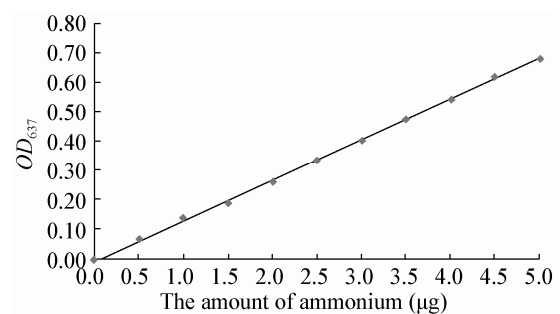
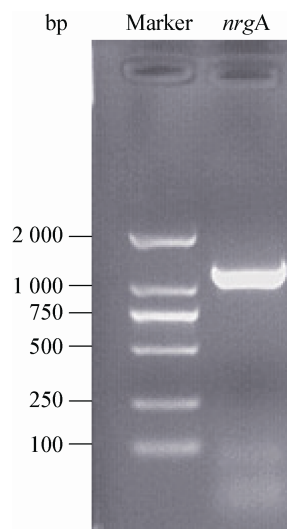


图5 氨态氮含量标准曲线

Figure 5 The standard curve of ammonia nitrogen content

图4 铵载体 *nrgA* 基因的 PCR 扩增Figure 4 The isolation of *nrgA* gene by PCR amplification

2.5.2 固氮菌胞外氨态氮含量的测定：实验进行 6 个平行样品检测，得出其吸光度，代入标准曲线可以得到其氨态氮含量，分别为 0.248、0.255、0.243、0.258、0.251、0.249 μg。经计算，可得氨态氮含量为 2.51 mg/L。

## 2.6 GXGL-4A 和瓦斯兰德固氮菌的固氮酶活性

如表 2 所示，GXGL-4A 菌株在无氮培养基上能够有效地还原乙炔，达到 232.94 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(mL·h)，但在 LB 培养基培养时其还原乙炔的活性降低，为 88.86 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(mL·h)，约为无氮培养条件下的 1/3；而瓦斯兰德固氮菌则相反，其在 LB 培养基上为 383.47 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(mL·h)，约为无氮培养条件下[76.79 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(mL·h)]的 5 倍，结果表明 GXGL-4A 菌株相比瓦斯兰德固氮菌更



表 2 固氮菌的固氮酶活性  
Table 2 Nitrogenase activities of the nitrogen-fixing bacterial strains

菌株 Strains	无氮培养基 Ashby (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /(mL·h))	LB 培养基 LB Broth (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /(mL·h))
GXGL-4A	232.94±8.82a	88.86±4.85b
瓦斯兰德固氮菌 <i>Azotobacter vinelandii</i>	76.79±12.52b	383.47±39.43c

注：数据平均值±方差；相同字母表示在 0.05 水平差异不显著。  
Note:  $\bar{x} \pm s$ ; The same letter means the difference is not significant in 0.05 level.

能适应无氮环境，而在有氮环境中菌株的固氮能力则被抑制。

### 3 讨论

近年来，随着生物固氮研究的深入，新的固氮微生物被不断发现。本研究从两广地区、上海等地采集了 106 个样品，经过多次筛选获得 6 株固氮菌，再对这 6 株菌进行固氮酶 *nifH* 的检测，最终选定 GXGL-4A 为供试菌株。对 GXGL-4A 菌株经过电镜观察及生理生化鉴定发现其体外有荚膜，并能分泌出胞外多糖类黏性物质，菌落不易挑起。*nifH* 基因是固氮酶中最保守的一个基因<sup>[16]</sup>，常用来对固氮酶进行鉴定<sup>[17]</sup>。本实验通过 *nifH* 基因引物进行 PCR 扩增得到了 GXGL-4A 的 *nifH* 基因片段，说明 GXGL-4A 是固氮菌，再结合 16S rRNA 基因进一步鉴定使得结果更精确。通过 16S rRNA 基因序列分析比对，GXGL-4A 与 *Kosakonia oryzae* Fo8A1d 16S rRNA 基因序列有 95% 的相似性，并结合基因组测序鉴定其为 *Kosakonia radicincitans* sp.，属于肠杆菌目 (Enterobacteriales)。

铵载体蛋白是一类存在于细胞膜上主动转运 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的载体，普遍存在于真核生物或原核生物细胞膜上，可将细胞所处环境中的微量铵离子转运到细胞内，确保细胞内的铵库稳定和细胞氮代谢的正常运行<sup>[18-19]</sup>。第一个被克隆的铵载体蛋白基因是来自酵母 (*Sauharomyces cerevisiae*) 中的低亲合高容量铵载体基因 *mep*。有研究表明，*mep1*、

*mep2*、*mep3* 这 3 个基因在酵母基因组中表达铵转运蛋白，它们之间的协同作用能够影响酵母吸收环境中的铵离子，当外界环境中唯一的氮源只有铵离子，且铵离子浓度低于 5 mmol/L 时，同时缺失这 3 个基因的酵母突变体不能生长<sup>[20]</sup>。原核生物中第一个被克隆的铵载体基因是来自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中的 *nrgA* 基因<sup>[18]</sup>。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的铵载体编码基因 *amtB* 编码产物由 401 个氨基酸组成，与 *nrgA* 具有 42% 相似性<sup>[21]</sup>。铵通过直接调控 *nifLA* 操纵元的表达及 *nifA* 的活性抑制固氮酶活性<sup>[21]</sup>。此外，从棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*)<sup>[22]</sup>、巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*)<sup>[23]</sup> 和根瘤菌 (*Rhizobium*)<sup>[24]</sup> 中也克隆出铵载体蛋白编码基因。本研究通过对 GXGL-4A 菌株进行基因组扫描，并结合 PCR 产物的测序验证，共鉴定出该菌 27 个固氮相关基因，包括固氮酶结构基因和其调节基因、铵载体、一般氮代谢调控基因等，部分基因序列已提交到 GenBank 数据库。该菌具有较好的泌铵能力，目前我们正在进行铵载体基因的原核表达及基因敲除等工作，以期通过基因工程的方法进一步提高该菌的泌铵能力，并深入研究其泌铵和铵转运分子机制。

采用靛酚蓝-分光光度法测定固氮菌胞外分泌物中铵态氮的含量具有方法简单、经济快捷、结果可靠等特点。即使在有氮条件下，如采用包括玉米浆、酵母粉、大豆粉、蛋白胨等有机氮源作为发酵培养基主要成分，其测定结果与以硝酸钠等无机氮源培养测定的最终结果并无差异<sup>[14]</sup>，后期若获得大量的泌铵突变株可以采用此法进行初筛，再结合突变株在无氮培养条件下的生长表现即可迅速鉴定出目标突变株，加快泌铵突变株的创制进程。

### 参 考 文 献

- [1] Shen SH, Jing YX. Present status and development on biological nitrogen fixation research in China[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(6): 535-540 (in Chinese)  
沈世华, 荆玉祥. 中国生物固氮研究现状和展望[J]. 科学通报, 2003, 48(6): 535-540
- [2] Rejili M, Mahdhi M, Fterich A, et al. Symbiotic nitrogen fixation of wild legumes in Tunisia: soil fertility dynamics, field

- nodulation and nodules effectiveness[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2012, 157: 60-69
- [3] Evans H, Burris R. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years[A]//Stacey EG, Burris RH, Evans HJ. Biological Nitrogen Fixation[C]. New York: Chapman and Hall, 1992: 41-42
- [4] Jalilian J, Modarres-Sanavy SAM, Saberali SF, et al. Effects of the combination of beneficial microbes and nitrogen on sunflower seed yields and seed quality traits under different irrigation regimes[J]. Field Crops Research, 2012, 127: 26-34
- [5] Chen WX. Biological nitrogen fixation[A]//Soil Science Society of China. Proceeding of Conference on Nitrogen Cycling and Agriculture Environment[C]. Xiamen: Xiamen University Press, 2001: 4-5 (in Chinese)  
陈文新. 生物固氮[A]//中国土壤协会. 氮素循环与农业和环境学术研讨会论文集[C]. 厦门: 厦门大学出版社, 2001: 4-5
- [6] Qin LP, Huang SL, Li YR. Research progress in *endophytic diazotrophs*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(2): 150-152, 159 (in Chinese)  
覃丽萍, 黄思良, 李杨瑞. 植物内生固氮菌的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 150-152, 159
- [7] Berger B, Wiesner M, Brock AK, et al. *K. radicincitans*, a beneficial bacteria that promotes radish growth under field conditions[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2015. DOI: 10.1007/s13593-015-0324-z
- [8] Bergottini VM, Filippidou S, Junier T, et al. Genome sequence of *Kosakonia radicincitans* strain YD4, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)[J]. Genome Announcements, 2015, 3(2): e00239-15
- [9] Qian CR, Dong BH. Microbiology Basic Knowledge and Experimental Guidance[M]. Beijing: Science Press, 1979 (in Chinese)  
钱存柔, 董碧虹. 微生物学基础知识与实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 1979
- [10] Lin L. Nitrogen-fixing bacteria associated with ROC 22 sugarcane cultivated in Guangxi[D]. Nanning: Doctoral Dissertation of Guangxi University, 2011 (in Chinese)  
林丽. 广西 ROC22 甘蔗联合固氮菌的研究[D]. 南宁: 广西大学博士学位论文, 2011
- [11] Zhu YD, Chen JN. Study of the way of preparing bacterial sample for SEM[J]. Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation, 1989, 11(2): 101-103 (in Chinese)  
朱永德, 陈嘉乃. 细菌扫描电镜样品制备方法的研究[J]. 中华物理医学杂志, 1989, 11(2): 101-103
- [12] Zhou DQ, Hu BL, Zu RF, et al. Experimental Microbiology[M]. 2nd Edition. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese)  
周德庆, 胡宝龙, 祖若夫, 等. 微生物学实验教程[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2006
- [13] Dong XZ, Cai MY. Identification of Common Bacterial Systems Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)  
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
- [14] Liang JG, Zhu L, Xu ZJ. Study on the determination of  $\text{NH}_4^+$ -N content in microbial fermentation liquor by indophenol blue spectrophotometric method[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(9): 134-137 (in Chinese)  
梁剑光, 朱玲, 徐正军. 靛酚蓝-分光光度法测定发酵液中氨态氮含量研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(9): 134-137
- [15] Yao T, Zhang DG, Hu ZZ. Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region- I isolation and identification[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2004, 13(2): 106-111 (in Chinese)  
姚拓, 张德罡, 胡自治. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究——I 固氮菌分离及鉴定[J]. 草业学报, 2004, 13(2): 106-111
- [16] Zhang YG, Wang HM, Li DQ, et al. Molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in alprairie soil of Sanjiangyuan natural reserve[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(2): 166-171 (in Chinese)  
张于光, 王慧敏, 李迪强, 等. 三江源高寒草甸土固氮基因(*nifH*)的多样性和系统发育研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 166-171
- [17] Wang YF, Yang WX, Wang CX, et al. Advances in studies on a wild plant in Gansu-*Polygonum viviparum* L.[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2005, 24(2): 24-26 (in Chinese)  
王一峰, 杨文玺, 王春霞, 等. 甘肃野生药用植物珠芽蓼[J]. 中兽医医药杂志, 2005, 24(2): 24-26
- [18] Tao WN, Xia LQ, Ding XZ, et al. Cloning and function study of *amtS* gene from *Saccharopolyspora spinosa*[J]. China Biotechnology, 2015, 35(2): 25-30 (in Chinese)  
陶文娜, 夏立秋, 丁学知, 等. 刺糖多孢菌中铵载体蛋白基因 *amtS* 的克隆及功能研究[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(2): 25-30
- [19] Dong YM, Li JD, Zhu ZQ. Molecular research progress of ammonium transporter[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2000, 17(1): 623-628 (in Chinese)  
董越梅, 李久蒂, 朱至清. 铵载体(Amt)研究进展[J]. 植物学通报, 2000, 17(1): 623-628
- [20] Deng RL, Xu HR, Cao YF, et al. The molecular basis of ammonium transporters in plants[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2007, 13(3): 512-519 (in Chinese)  
邓若磊, 徐海荣, 曹云飞, 等. 植物吸收铵态氮的分子生物学基础[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(3): 512-519
- [21] Li HS. Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000 (in Chinese)  
李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000
- [22] Meletzus D, Rudnick P, Doetsch N, et al. Characterization of the *glnK-amtB* operon of *Azotobacter vinelandii*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(12): 3260-3264
- [23] Van Dommelen A, Keijers V, Vanderleyden J, et al. (Methyl) ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(10): 2652-2659
- [24] Taté R, Riccio A, Merrick M, et al. The *Rhizobium etli amtB* gene coding for an  $\text{NH}_4^+$  transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11(3): 188-198