



辛翀,王淑珍,王龙,等.辣椒叶际固氮菌分离筛选及抑菌活性[J].黑龙江农业科学,2023(5):62-66.

# 辣椒叶际固氮菌分离筛选及抑菌活性

辛 翀<sup>1</sup>,王淑珍<sup>2</sup>,王 龙<sup>2</sup>,郭青云<sup>2</sup>

(1.赣南医学院 医学信息工程学院,江西 赣州 341000; 2.赣南师范大学 生命科学院,江西 赣州 341000)

**摘要:**为后续研制叶面微生物菌肥提供优良固氮菌种,以辣椒为研究对象,利用选择性培养基分离、筛选辣椒叶际固氮细菌,测定其固氮能力和植物病原菌的拮抗能力并对性能优良的菌株进行 16S rDNA 分子生物学鉴定。研究表明,从辣椒叶际共分离得到 2 株具有高效固氮性能的自生固氮菌 LJ-1 和 LJ-2,分别鉴定为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)和根瘤菌(*Rhizobium* sp.),固氮酶活性分别达 93.26 和 102.23  $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。两株菌具有广谱抗真菌活性和耐酸碱能力,对油菜核病菌、番茄灰霉病菌和棉花立枯病菌抑制效果可达 50% 以上。因此,辣椒叶际固氮菌 LJ-1 和 LJ-2 是具有固氮和生防作用的多功能细菌,可为进一步研发优良的叶际固氮菌肥提供微生物资源。

**关键词:**辣椒;叶际固氮菌;分离筛选;培养特性;抑菌

氮素是植物生长过程中需求量最大的营养元素,也是农业生产的重要限制因子<sup>[1]</sup>。目前,农作物对氮素的需求主要依赖于化肥的施用,全球性能源缺乏使化学氮肥的生产成本逐年增加,而多年连续施用化肥会造成土壤板结、肥力下降等弊端,因此固氮微生物肥料的研究与应用日益受到重视<sup>[1-2]</sup>。筛选高效、抗病固氮微生物菌种是微生物菌肥生产应用的基础<sup>[2-4]</sup>。植物叶际存在大量的固氮微生物,能固定空气中的氮气为植物生长提供氮素,还可拮抗植物病原菌提高植物的抗病能力<sup>[3-6]</sup>。叶际固氮菌具有非专一性,且不易受化肥的影响,具有巨大的应用潜力。大量研究证实叶际固氮菌具有促进作物增产增质的效果,如在玉米叶面喷施固氮菌肥,可增产 30%~37%,与施用化肥相当,还可产生抗菌物质,降低玉米大、小斑病的发病率,间接促进作物生长发育<sup>[2]</sup>。将多粘类芽孢杆菌微生物肥料喷施于茶树叶面,可显著提高茶叶产量和品质<sup>[7]</sup>。植物叶际固氮菌大多为细菌,目前已分离出固氮菌属(*Azotobacter*)、气杆菌属(*Aerobaeter*)、拜氏固氮菌属(*Beijerinckia*)、黄杆菌属(*Flavobaeterium*)、假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、分枝杆菌属

(*Myeobaeterium*)、克氏杆菌属(*Klebsiella*)、螺菌属(*Spirillum*)等<sup>[3-5]</sup>。固氮菌被广泛用于生物肥中,在取代氮肥的施用上具有广阔前景,但目前固氮菌肥的研究主要集中于土壤基肥,对叶面固氮菌肥研究较少。且植物叶际固氮菌的分离主要集中在小麦、玉米、大豆、茄子、西红柿等农作物上,对辣椒叶际固氮菌报道相对较少<sup>[2-6]</sup>。本研究对辣椒叶际固氮菌进行分离,筛选出具有高效固氮和抗植物病害的功能菌,可为开发叶面生物菌肥提供菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试辣椒于 2021 年 9 月采自赣南师范大学周边农民自种蔬菜园,每个样品随机选取 5 株植株的地上叶片,所取叶片位于新叶与老叶之间,避免沾染泥土引起试验误差,将采集到的叶片混合放入无菌培养皿中,24 h 内对叶片进行处理。

供试病原菌为棉花立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、油菜核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum* Lib)、苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria dothidea*)、葡萄炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*),均由赣南师范大学袁小勇老师实验室提供。

### 1.2 方法

1.2.1 辣椒叶际固氮菌分离筛选 将取回的新鲜叶片用自来水冲洗叶面,然后用无菌水漂洗

收稿日期:2022-12-09

基金项目:国家自然科学基金(32160314)。

第一作者:辛翀(1970—),男,硕士,副教授,从事生物检测相关研究。E-mail:1121684122@qq.com。

通信作者:郭青云(1979—),女,博士,副教授,从事生物防治和昆虫-微生物互作研究。E-mail:qingyun612@163.com。

1 次,置于装有 100 mL 无菌磷酸缓冲液(pH7.0, 含 0.1% Tween)的锥形瓶中,保证溶液完全浸没叶片,25 ℃ 200 r·min<sup>-1</sup>摇床震荡 30 min,超声波 40 kHz 超声 5 min,用镊子取出叶片,将其余的溶液转移至 50 mL 离心管中,然后以 10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,倒掉上清,收集得到沉淀菌体。吸取 100 μL 稀释液平板涂布法均匀接种到固体 Ashby 无氮培养基上,28 ℃ 培养 5 d。根据菌落形态选择长势较好、生长速度较快的不同菌落划线纯化数次,直至出现有规则的单菌落。

**1.2.2 菌株 16S rDNA 和 *nifH* 基因的 PCR 扩增** 将筛选获得的固氮菌接种于 LB 液体培养基中,于 28 ℃,200 r·min<sup>-1</sup>的摇床中过夜培养,收集菌体,用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 提取,以细菌 16S rDNA 全序列通用引物 27F/1492R<sup>[8]</sup>和固氮基因 *nifH* 特定的引物 PolF/PolR<sup>[9]</sup>分别进行 PCR 扩增,用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行验证。扩增的 PCR 产物送至北京擎科生物有限公司测序,使用 NCBI 数据库进行序列比对,利用 MEGA 7.0 软件采用最大似然(ML)算法构建系统发育树。

**1.2.3 固氮酶活性测定** 挑取单菌落至 LB 液体培养基中 28 ℃,200 r·min<sup>-1</sup>振荡培养至 OD 值约为 0.6,以 1% 接种量转接至 Ashby 无氮液体培养基中,分别于 24,48,72 和 96 h 取样,采用微生物固氮酶(NITS)ELISA 试剂盒(上海羽朵生物科技有限公司)进行固氮酶活性测定,3 次重复。

**1.2.4 菌株培养特性研究** pH:取等量的细菌培养液接种于 pH 为 5.0,6.0,7.0,8.0 和 9.0 的 LB 液体培养基中,置于 28 ℃下 180 r·min<sup>-1</sup>恒温振荡培养箱中培养 48 h。测定菌液 OD<sub>600</sub> 的平均值,确定菌株的最适生长 pH,3 次重复。

**NaCl 浓度:**取等量细菌培养液接种到含 NaCl 质量分数为 0%、1%、2%、3% 和 4% 的 LB 液体培养基中,置于 28 ℃下 180 r·min<sup>-1</sup>恒温振荡培养箱中培养 48 h,测定其 OD<sub>600</sub> 的平均值,3 次重复,确定菌株的耐盐性。

**碳源:**配制分别由麦芽糖、葡萄糖、淀粉和蔗糖代替 LB 培养基中的碳源(酵母膏)的液体培养基,取等量细菌培养液接种于上述培养基中,置于 28 ℃下 180 r·min<sup>-1</sup>恒温振荡培养箱中培养 48 h,分别测定不同碳源下菌液 OD<sub>600</sub>,3 次重复。

**1.2.5 固氮菌对植物病原真菌的抑制活性** 采用平板对峙法<sup>[10]</sup>研究固氮菌对植物病原真菌的抑制活性。将病原菌菌饼接种于 PDA 琼脂平板(d=8.5 cm)中央,在距离菌饼两侧 3 cm 处划线接种菌株,将接种后的培养皿在 28 ℃恒温培养箱中倒置培养 5 d,同时接种只含有病原真菌的 PDA 琼脂平板作为对照。

菌丝生长抑制率(%)=(对照菌落直径-对峙板菌落直径)/对照菌落直径×100

**1.2.6 数据分析** 采用 Origin 2021 和 SPSS 20.0 软件对试验数据进行统计分析和图表处理,运用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 固氮菌的分离及鉴定

从辣椒叶际分离得到 2 株能在 Ashby 无氮培养基上生长较快的菌株,编号为 LJ-1 和 LJ-2。经过 5 代的分离纯化后,菌株 LJ-1 菌落为白色,边缘整齐;菌株 LJ-2 菌落为圆形半透明,边缘整齐,表面湿润,在 100 倍光学显微镜下观察均为棒杆状(图 1)。通过扩增固氮酶基因 *nifH* 进行复筛,2 株菌均能扩增得到固氮酶基因,片段大小约为 360 bp 左右,与预期结果一致(图 2),说明 2 株细菌均具有固氮能力。

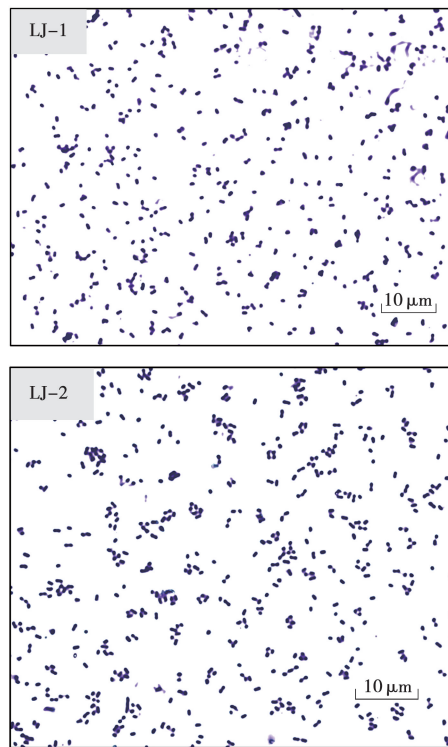
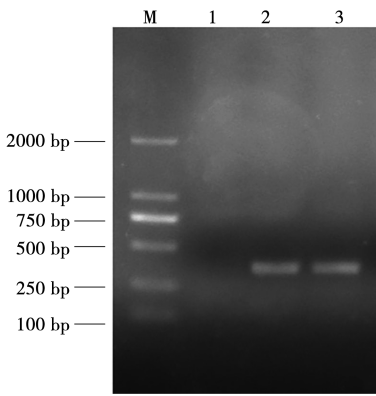


图 1 菌株 LJ-1 和 LJ-2 显微镜下的细胞形态



M. DL2000 Marker; 1. 阴性对照; 2. 菌株 LJ-1; 3. 菌株 LJ-2。

图2 *nifH* 基因 PCR 扩增图

## 2.2 菌株 16S rDNA 序列 PCR 扩增及系统发育分析

分别以 2 株叶际固氮菌的总 DNA 为模板,采用 16S rDNA 通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增,得到大小约为 1 500 bp 左右的基因片段,测序后序列提交至 GenBank 数据库,登记号为 ON778563.1 和 ON778564.1。在数据库中进行 BLAST 比对发现菌株 LJ-1 和不动杆菌 *Acinetobacter* sp. LC484792.1 亲缘关系最近,聚为一支,序列相似度大于 99%,因此将其命名为 *Acinetobacter* sp. (图 3A);菌株 LJ-2 和根瘤菌 *Rhizobium* sp. MF458873.1,亲缘关系最近,聚为一支,序列相似度为大于 99%,将其命名为 *Rhizobium* sp. (图 3B)。

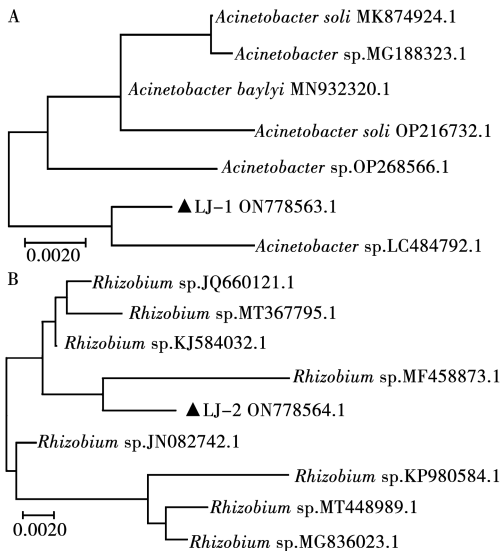


图3 基于 16S rDNA 序列的固氮菌 LJ-1(A)和 LJ-2(B)菌株的系统发育进化树

## 2.3 辣椒叶际固氮菌的固氮酶活性

固氮酶活性是评价固氮菌性能的重要指标。菌株 LJ-1 和 LJ-2 均有较高的固氮能力,菌株 LJ-2 的固氮能力优于 LJ-1。在 Ashby 无氮液体培养

基中,菌株 LJ-1 在培养 48 h 时固氮酶活性最高,达到  $93.26 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,随着培养时间的增加,固氮酶活性呈下降趋势。菌株 LJ-2 固氮酶活性随着培养时间的增加而升高,在培养 72 h 达到最大值,为  $102.23 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,之后随着培养时间的延长,固氮酶活性变化不大(图 4)。

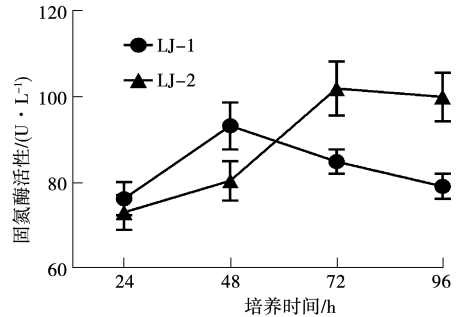


图4 菌株 LJ-1 和 LJ-2 固氮酶活性

## 2.4 辣椒叶际固氮菌的培养特性

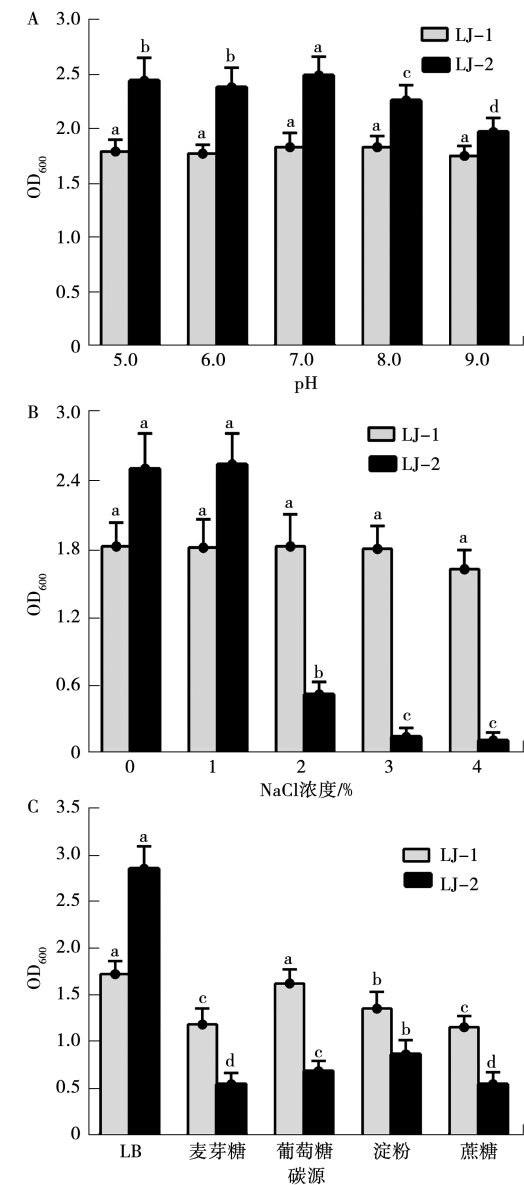
两株菌在初始 pH 为 5.0~9.0 的培养条件下均能生长,说明辣椒叶际分离得到的固氮菌具有较强的适应能力,其中菌株 LJ-1 的最适 pH 为 8.0, LJ-2 的最适 pH 为 7.0(图 5A)。

菌株 LJ-1 在 0%~4% NaCl 浓度下均能生长,具有较广的盐度适应性。NaCl 浓度对菌株 LJ-2 的生长影响显著,菌株的生长速率随 NaCl 浓度的增大而减小,在 NaCl 浓度为 0% 和 1% 时吸光值  $\text{OD}_{600}$  相当,达到最大值 2.52,浓度为 4% 时菌株 LJ-2 几乎不生长,吸光值仅为 0.15,说明该菌株对盐度敏感(图 5B)。

碳源对菌株生长的影响差异显著。菌株 LJ-1 对各碳源均能利用,其中以麦芽糖和蔗糖为碳源时生长较差。碳源对菌株 LJ-2 的生长影响较大,当酵母粉被各碳源替代后生长量仅大约为 LB 培养基的 25%,说明该菌株的碳源谱较窄(图 5C)。

## 2.5 固氮菌对植物病原真菌的抑制活性

辣椒叶际固氮菌 LJ-1 和 LJ-2 对多种植物病原菌具有较好的抑制活性。其中菌株 LJ-1 对油菜菌核病菌的抑制效果最好,其抑制率达到 70.59%,其次是番茄灰霉病菌(62.51%)和棉花立枯病菌(52.55%),对苹果轮纹病菌抑制率最低,仅为 18.75%,对其他供试病原菌的抑制活性均在 20% 以上,具有广谱抗真菌活性。菌株 LJ-2 对番茄灰霉病菌和棉花立枯病菌抑制率可达 50% 以上,对苹果轮纹病菌无抑制活性,总体抑菌活性低于菌株 LJ-1。与对照组相比,各试验组的抑菌圈边界清晰,抑菌圈周围菌丝生长缓慢。



A. pH 对菌株生长的影响; B. NaCl 浓度对菌株生长的影响; C. 碳源对菌株生长的影响。

图 5 pH、NaCl 浓度和碳源对固氮菌株 LJ-1 和 LJ-2 生长的影响

注:不同小写字母表示不同处理间在  $P<0.05$  水平差异显著。

表 1 固氮菌株 LJ-1 和 LJ-2 对不同植物病原真菌的抑制率

供试菌株	抑制率/%	
	LJ-1	LJ-2
棉花枯萎病菌	20.18±2.12	21.11±3.75
葡萄炭疽病菌	42.86±4.33	38.05±4.31
苹果轮纹病菌	18.75±2.17	-
番茄灰霉病菌	62.51±6.12	55.78±6.18
油菜菌核病菌	70.59±7.88	35.29±3.43
棉花立枯病菌	52.55±4.97	50.43±4.65
稻瘟病菌	27.78±3.21	35.93±2.26

注:“-”表示无抑制性。

### 3 讨论

植物叶际营养物质丰富,存在大量固氮微生物,目前已从多种植物叶际分离出多种高效固氮微生物用于农业生物菌肥<sup>[3-6]</sup>。如大豆喷施叶面固氮菌的增产率可达 13% 以上,玉米在苗期和孕穗期喷施叶际固氮菌可增产 10% 以上<sup>[6]</sup>。自生固氮菌因其不与植物形成宿主关系且适应能力强,具有增加农作物产量以及绿色环保等优点,已成为 21 世纪新型肥料发展的重要方向之一。

本研究从辣椒叶际分离到 2 株自生固氮菌 LJ-1 和 LJ-2,经 16S rDNA 序列比对分别鉴定为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)和根瘤菌(*Rhizobium* sp.),且具有高固氮酶活性,分别达 93.26 和 102.23 U·L<sup>-1</sup>。其中不动杆菌有解钾、解磷和固氮作用的多功能促生特性,已被大量分离研究<sup>[11-12]</sup>。根瘤菌作为广泛分布于土壤中一类固氮微生物,不但可以与豆科植物共生,也可以作为植物内生菌存在于非豆科植物体内,而且还可以在土壤中长期以腐生菌的状态存在,目前根瘤菌作为生物菌肥已被开发利用。此外,已有文献报道,根瘤菌可在植物内部进行迁移,定殖于植物内部,并通过气孔进入叶际表面,成为叶际附生微生物<sup>[13-14]</sup>。罗娜等<sup>[15]</sup>从湖南省各地分离的辣椒内生固氮菌中鉴定为根瘤菌,本研究也从辣椒叶际分离出具高效固氮能力的附生根瘤菌。

在碳源的利用方面,本研究分离的不动杆菌 LJ-1 基本与同属细菌利用情况相似,在淀粉为碳源或者无氮条件下都能生长良好,能耐受高浓度的盐类,因此可在生产应用中简化培养条件并降低生产成本;而根瘤菌 LJ-2 对碳源和盐度适应范围较窄,具体的发酵条件有待进一步优化。两株菌都能够在 pH5.0~9.0 的环境下生长,与一般的在酸性或碱性环境下难以生存的菌株形成差异,在菌肥应用中能更好适用于不同酸碱度施用环境,因此有望开发为微生物菌肥更广泛地应用在农业生产中。

生防能力是评价微生物功能的一个重要方面。本研究分离不动杆菌(LJ-1)根瘤菌(LJ-2)具有广谱抗植物真菌病害作用,与已有的研究报道基本一致<sup>[11-14]</sup>。蔺经等<sup>[11-12]</sup>从樟树中分离的鲍曼不动杆菌,抑制了梨黑斑病、轮纹病和炭疽病等真菌性病害,起到了较好的防治作用。大量研究报道根瘤菌在多种病原真菌有一定的抑制作用,能够诱导作物产生系统抗病性,王媛媛等<sup>[13]</sup>



从大豆根瘤中分离的费氏中华根瘤菌对大豆胞囊线虫和大豆根腐病菌等多种植物病害具有抑制作用。因此,本研究从辣椒叶际筛选的2株叶际固氮菌不仅具有固氮功能,还有拮抗病原真菌生防能力,具有作为叶际固氮生物肥料优良菌种的光明前景,可高效地应用于固氮菌剂中进行资源化利用。

#### 4 结论

从辣椒叶际筛选到2株固氮菌 LJ-1 和 LJ-2, 经 16S rDNA 基因比对结果和形态特征鉴定为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)和根瘤菌(*Rhizobium* sp.)。两株菌具有固氮酶活性高,对油菜菌核病菌、番茄灰霉病菌和棉花立枯病菌等多种植物真菌病害均有抑菌作用,有望进一步研发优良的叶面固氮微生物肥料。

#### 参考文献:

[1] 仝倩倩,祝英,崔得领,等.我国微生物肥料发展现状及在蔬菜生产中的应用[J].中国土壤与肥料,2022(4):259-266.

[2] GIRI S, PATI B R. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* sp. & *Flavobacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer [J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2004, 51(1/2):47-56.

[3] VORHOLT J A. Microbial life in the phyllosphere [J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(12):828-840.

[4] 潘建刚,呼庆,齐鸿雁,等.叶际微生物研究进展[J].生态学报,2011,31(2):583-592.

[5] 沙小玲,梁胜贤,庄绪亮,等.植物叶际固氮菌研究进展[J].微生物学通报,2017,44(10):2443-2451.

[6] 刘荣昌,李凤汀.植物叶际固氮与农业生产[J].微生物学杂志,1985,5(1):56-59.

[7] MADHAIYAN M, ALEX T H H, NGOH S T, et al. Leaf-residing methylobacterium species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8:222

[8] 李瑞芳,赵玉峰,薛雯雯,等.一株芽孢杆菌 16S rRNA 的基因序列测定和系统进化分析[J].广东农业科学,2011,38(3):121-122.

[9] ROSCH C, MERGEL A, BOTHE H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil [J]. Applied Environmental Microbiology, 2002, 68:3818-3829.

[10] 王家和.烟草根病拮抗真菌的分离与筛选[J].中国生物防治,1998,14(1):29-32.

[11] 蔺经,杨青松,李晓刚.一株不动杆菌次生代谢活性产物的抑菌作用及对果树病害的防治效果[J].江西农业学报,2010,22(10):78-79.

[12] 蔺经,杨青松,李晓刚,等.鲍曼菌素对梨轮纹病菌的毒力及其药效评价[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2011,37(1):52-54.

[13] 王媛媛,段玉玺,陈立杰.拮抗性根瘤菌对大豆根部病原物的影响研究[J].植物病理学报,2008(6):607-612.

[14] 余涵霞,梁浩林,王子轩,等.戴甘菊根际可培养固氮菌和氨化细菌的分离鉴定与促生作用[J].微生物学报,2022,62(5):1851-1863.

[15] 罗娜,肖海兰,鲁颂,等.辣椒内生固氮菌的分离鉴定与多样性分析[J].作物杂志,2014(6):52-56.

## Isolation and Screening of Nitrogen-Fixing Bacteria from Leaves of Pepper and Antifungal Activity

XING Chong<sup>1</sup>, WANG Shuzhen<sup>2</sup>, WANG Long<sup>2</sup>, GUO Qingyun<sup>2</sup>

(1. School of Medical and Information Engineering, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China;

2. College of Life Sciences, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, China)

**Abstract:** In order to provide excellent nitrogen-fixing bacteria strains for the subsequent development of biofertilizer, the leaves of pepper were taken as the research object and the selective incubation culture medium was used to separate and screen phyllosphere nitrogen-fixing bacteria, and determine their ability to N fixation, antagonistic ability against plant pathogenic. The species of strains were identified based on morphological characteristics and the phylogenetic analysis of partial 16S rDNA sequence. The results showed that two nitrogen-fixing strains of LJ-1 (*Acinetobacter* sp.) and LJ-2 (*Rhizobium* sp.) were isolated from the leaves of pepper and the nitrogenase activity was 93.26 and 102.23  $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The two strains had broad-spectrum antifungal activity and acid-alkali resistance, and the inhibitory effects against *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* were more than 50%. The phyllosphere nitrogen-fixing strains LJ-1 and LJ-2 had nitrogen fixation and biocontrol functions, which could provide microbial resources for development of phyllosphere nitrogen-fixing bacteria fertilizer.

**Keywords:** pepper; phyllosphere nitrogen-fixing bacteria; isolation and screening; culture conditions; antifungal activity