

DOI:10.11686/cyxb2024170

http://cyxb.magtech.com.cn

张峰, 种培芳, 包新光, 等. 4株红砂根际固氮菌分离鉴定及对幼苗促生作用的研究. 草业学报, 2025, 34(3): 144—153.

ZHANG Feng, CHONG Pei-fang, BAO Xin-guang, et al. Isolation and identification of four strains of *Reaumuria soongorica* root zone nitrogen fixing bacteria and their role in seedling growth promotion. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(3): 144—153.

4株红砂根际固氮菌分离鉴定及对幼苗促生作用的研究

张峰, 种培芳*, 包新光, 王雪莹

(甘肃农业大学林学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为了获得荒漠植物根际土壤中的优良固氮菌,探究其对红砂幼苗氮代谢的影响,验证固氮菌的促生效果。本研究采用稀释涂布平板法,利用Ashby固体培养基从红砂根际土中分离得到4株固氮菌,通过形态学、生理生化特征以及16S rDNA序列分析鉴定菌株的分类地位及促生特性。结果表明,菌株Y3与Y2为芽孢杆菌,菌株P4为桑树肠杆菌,菌株N12为阴沟肠杆菌;4株固氮菌均能提高红砂幼苗叶和根中硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸合成酶(GOGAT)活性;接种菌株后红砂幼苗根长、叶片相对含水量、地上部和地下部鲜重间均有差异($P<0.05$);其中,固氮菌P4促生效果最为显著,接种P4菌株后叶和根中NR活性分别提高了31.99%、34.63% ($P<0.05$),GOGAT活性分别提高了25.63%、25.08% ($P<0.05$),GS活性分别提高了23.31%、24.30% ($P<0.05$),且根长、叶片相对含水量、地上部和地下部鲜重分别增加27.99%、20.75%、33.34%、33.25% ($P<0.05$)。综上,4株固氮菌可促进红砂幼苗的生长发育,提高其成活率,同时也为研发微生物菌剂提供了优质菌种资源。

关键词:固氮菌;分离鉴定;促生作用;氮代谢;红砂

Isolation and identification of four strains of *Reaumuria soongorica* root zone nitrogen fixing bacteria and their role in seedling growth promotion

ZHANG Feng, CHONG Pei-fang*, BAO Xin-guang, WANG Xue-ying

College of Forestry, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: The aim of this research was to isolate nitrogen fixing bacteria in the root zone soil of desert plants, investigate their effects on nitrogen metabolism of *Reaumuria soongorica* seedlings, and verify the growth-promoting effect of the isolated nitrogen fixing bacteria. In this study, four strains of nitrogen fixing bacteria were isolated from the root zone soil of *R. soongorica* by the dilution-coated plate method, using Ashby's solid medium. The taxonomic status and growth-promoting characteristics of the strains were identified by morphological, physiological and biochemical characteristics as well as by 16S rDNA sequence analysis. The results showed that strains designated Y3 and Y2 were *Bacillus* sp., strain P4 was *Enterobacter mori*, and strain N12 was *Enterobacter cloacae*. Inoculation with the four strains of nitrogen fixing bacteria increased the activities of nitrate reductase (NR), glutamine synthetase (GS), and glutamate synthetase (GOGAT) in the leaves and roots of the *R. soongorica* seedlings. There were also differences in the root length and relative water content of leaves, and above-ground and below-ground fresh weight of *R. soongorica* seedlings after inoculation with the isolated bacterial strains

收稿日期:2024-05-13;改回日期:2024-06-20

基金项目:国家自然科学基金:荒漠植物红砂根际促生细菌筛选及其抗逆性研究(32160407),甘肃省重点研发项目:典型荒漠灌木根际微生物固碳及高效菌肥资源挖掘与利用(23YFFA0065)和草业生态系统教育部重点实验室开放课题:荒漠草原植物红砂耐盐促生菌的分离筛选、鉴定及其促生效果研究(KLGE202215)项目资助。

作者简介:张峰(2000—),女,甘肃兰州人,在读硕士。E-mail: 2156830046@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhongpf@gsau.edu.cn

($P < 0.05$); among them, the nitrogen fixing bacterium P4 had the most significant growth-promoting effect, with the NR activity in leaves and roots increased by 31.9% and 34.6%, respectively ($P < 0.05$), the GOGAT activity by 25.6% and 25.1%, respectively ($P < 0.05$), and the GS activity by 23.3% and 24.3%, respectively ($P < 0.05$). Furthermore, root length, leaf relative water content, above-ground and below-ground fresh weight were increased ($P < 0.05$), respectively, by 27.9%, 20.7%, 33.3% and 33.2%. In conclusion, the four strains of nitrogen fixing bacteria exhibited ability to promote the growth and development of *R. soongorica* seedlings and improve their survival rate. The isolated strains represent high-quality resources for the development of microbial plant growth promoting agents.

Key words: nitrogen fixing bacteria; bacterial isolation and identification; plant-growth-promoting; nitrogen metabolism; *Reaumuria soongorica*

氮不仅是植物生长过程中所需的营养元素,也是蛋白质、氨基酸、植物激素、酶等多种含氮化合物的重要组成部分^[1]。固氮菌是一种具有固氮能力的有益微生物,它不仅能够将大气中的 N_2 转化为植物可以吸收和利用的含氮化合物^[2],如铵盐、硝酸盐等,还可以在固氮过程中产生有机酸等物质,改良土壤结构^[3],促进植物根系生长。固氮菌在调控氮代谢方面有着重要作用^[4],它可以增强氮代谢酶活性,提高植物对氮素的吸收率,进而促进植物的生长发育。近年来,国内学者先后在厚荚相思(*Acacia crassicarpa*)^[5]、桉树(*Eucalyptus* spp.)^[4]、杉木(*Cunninghamia lanceolata*)^[6]、茶树(*Camellia sinensis*)^[7]等植物上开展了根际固氮菌方面的研究。结果发现,接种根际固氮菌可以促进林木生长,增加叶绿素含量,促进株高、地径、根系生长以及生物量和氮含量增加等。以上研究表明,固氮菌的研究重点在经济林及农作物等方面^[8-9],而针对其在干旱和盐碱等困难立地条件下,尤其是荒漠区造林成活率提升及植被恢复方面的研究相对比较匮乏。

红砂(*Reaumuria soongorica*)为柽柳科超旱生泌盐小灌木,在荒漠地区占据优势地位,也是建群种之一,它在改善盐碱地、防止风沙侵蚀以及保护绿洲等方面具有重要的生态意义^[10-12]。近年来,红砂苗木大量用于荒山造林中,但在红砂人工育苗过程中发现,干旱高盐碱等环境下其幼苗生长缓慢,裸根苗的移栽成活率低,这对荒漠地区的生态修复以及经济的可持续发展造成了严重影响。研究表明,固氮菌在林木抗逆性及生长方面的研究已成为我国林业行业的研究热点^[13]。它不仅可通过固氮、产氨、溶磷、产生植物激素等多种途径来增强植物自身抵御盐碱、干旱等胁迫的能力^[14-16],还可代替化肥、农药等,为植物正常生长创造良好的根际生态环境。所以,挖掘优良的固氮菌在保证林业可持续发展的同时又达到了生态修复的目的^[17]。但目前,国内外关于从荒漠植物根际土中分离筛选出的固氮菌资源鲜有报道。那么,红砂作为荒漠区的优势物种,其超强的抗逆性除了与自身的优良基因有关外,是否还与其根际固氮菌有关?这些固氮菌能否从土壤中分离出来?筛选出的固氮菌能否调控植物体内氮代谢,促进植物生长发育?这些问题亟待解决。因此,发掘有促生功能的固氮菌对荒漠植物红砂的恢复具有重要意义。

本研究以当年生红砂幼苗为材料,从红砂根际土中筛选出4株固氮能力较强的菌株,通过形态学、生理生化以及16S rDNA序列分析对菌株进行分类和鉴定。通过盆栽试验来探究菌株对红砂幼苗氮代谢的影响,进而验证其对红砂的促生效果。这一研究不仅丰富了植物促生菌种资源,也为进一步探究如何提高荒漠植物红砂幼苗成活率以及加快干旱和高盐碱环境下植被的恢复提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种的来源及筛选

本试验所用菌种筛选自石羊河流域下游民勤绿洲外围的荒漠地段青土湖红砂根际土壤,该区域干旱和盐渍化现象较为严重,地理位置39°03'09" N, 103°36'15" E。参照王琦琦等^[18]的方法从荒漠植物红砂根际土中分离和筛选菌株。将红砂土样称取1 g后溶于装有90 mL已灭菌生理盐水的三角瓶中,放入30 °C, 150 r·min⁻¹的摇床中

培养,40 min后取出静置。待土壤悬液分层后进行菌株的分离与筛选:将静置分层后的土壤悬液按照一定的梯度从 10^{-2} 依次稀释至 10^{-6} ,稀释后的土壤悬液分别吸取100 μ L后用无菌玻璃棒均匀涂布在Ashby固体培养基(甘露醇10 g、 KH_2PO_4 0.2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、NaCl 0.2 g、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、 CaCO_3 5 g、琼脂粉20 g,总体积1000 mL)上,并将其倒置放入30 $^{\circ}\text{C}$ 的细菌培养箱中,48 h后筛选出形状、颜色各不相同的单菌株,再次划线分离,将纯化后的单菌落保存在装有无菌LB固体培养基(蛋白胨10 g、酵母粉5 g、NaCl 10 g、琼脂粉20 g,总体积1000 mL)的玻璃试管中,并将其放入4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用。

菌悬液制备方法:将纯化的单菌落接种在无菌LB液体培养基中,放入摇床中培养(30 $^{\circ}\text{C}$,150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$),48 h后将其取出并用无菌生理盐水(0.9% NaCl)稀释至 OD_{600} 为1.0。

1.2 菌株的多相分类鉴定

1.2.1 形态学观察 取出斜面保存的单菌落并接种在无菌的Ashby固体培养基上,将其倒置放入30 $^{\circ}\text{C}$ 的细菌培养箱中,48 h后取出观察其特征,包括菌落的质地、表面、形态、生长速度等。

1.2.2 生理生化鉴定 参考《常见细菌系统鉴定手册》^[19],将筛选出的菌株进行试验。本研究挑选了8项生理生化试验来鉴定菌株类型,其中葡萄糖发酵、甲基红、吲哚及Voges-Proskauer试验是通过观察接菌后培养基的颜色变化,淀粉水解试验是通过观察菌落周围是否出现无色透明圈,明胶液化试验是通过观察培养基的液化状态及形状,接触酶试验是通过观察载玻片上是否有气泡产生,革兰氏染色试验是通过光学显微镜(DM750,德国)观察载玻片上菌株的颜色。

1.2.3 遗传学分类鉴定 使用NaCl方法提取细菌DNA^[20]。吸取单一菌株的上清液作为模板,使用相应引物27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')与1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增,目的获取每个待测序细菌的基因序列。PCR扩增结束后产物进行纯化,并由美格科技有限公司进行菌株的测序。在NCBI上运用BLAST软件对所获取的片段进行同源性比较,挑选与所测细菌亲缘关系最近的标准菌株,下载其基因序列并用MEGA 11.0软件,按照邻接法^[21]中的Complete Deletion模板来构建系统进化树。

1.3 红砂幼苗培育

本试验所用红砂种子于2021年采自民勤县青土湖,在2023年4月,选择大小相同且颗粒饱满的红砂种子,用1%的次氯酸钠消毒30 min,吸干水分后接着将种子播种在穴盘中,当幼苗的高度达到4~5 cm时,移栽至填充培养基质约5 kg的塑料花盆内,培养基质由土壤、砂质土、腐殖质按体积比1:2:1混合均匀而成,选择甘肃农业大学的校园实验地对红砂幼苗进行培育。当幼苗在自然环境下生长到10~13 cm时,选择大小一致且生长状况相似的红砂幼苗进行试验。

1.4 菌株的促生效果验证

选取长势相似的红砂幼苗进行5组处理,分别用100 mL 1×10^8 cfu \cdot mL⁻¹浓度(OD_{600} 为1.0)的Y3、P4、N12、Y2菌悬液均匀浇灌于红砂幼苗根部,对照组(CK)浇灌相同体积的无菌生理盐水。每隔10 d用同样的方法进行接种,共接种4次。处理期间,定期向幼苗补充适量水分保持土壤含水量。每个处理4个重复,每个重复3株幼苗,40 d后,采集红砂植株叶片和地下根系,并将其用液氮快速冷冻,以便进行氮代谢和生长指标的测定。

1.5 指标测定

与氮代谢相关的指标有谷氨酸合成酶(glutamate synthetase, GOGAT)、硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)以及谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)活性,其活性的大小都按照酶免试剂盒(Solarbio,中国北京索莱宝生物科技有限公司)的说明书进行测定,试剂盒购自中国北京索拉生物科技有限公司。运用WinRHIZO扫描法^[22]测定植物根长,将采集后的红砂茎和叶片进行称重记为地上部分鲜重,根系称重作为地下部鲜重,用加热干燥法测定叶片相对含水量。

1.6 数据处理与分析

使用Microsoft Excel 2021对氮代谢与生长指标数据进行基本处理,采用SPSS 26.0软件对已整理好的数据进行单因素方差分析(ANOVA),每组数据3个重复,最终数据为3个重复数据的平均值。将显著性水平设定为 $P < 0.05$,运用Duncan多重比较检验法将处理后的数据进行对比与分析,柱形图的绘制使用Origin 2022软件,系

统发育树在 MEGA 11.0 软件中进行绘制。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及筛选

利用 Ashby 固体培养基从荒漠植物红砂根际土中分离得到 15 株能正常生长的菌株,并进行固氮能力分析。结果表明,只有 Y3、P4、N12、Y2 菌株能在 Ashby 固体培养基上出现透明水解圈(图 1),表明这 4 株菌具有较强的固氮能力。

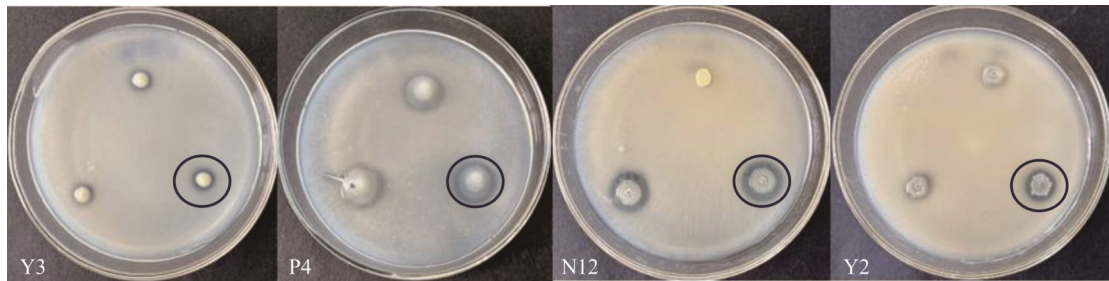


图 1 菌株的固氮能力定性分析

Fig. 1 Qualitative analysis of the nitrogen fixation capacity of strains

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 形态学观察 如图 2 所示,在 Ashby 固体培养基上将 4 株固氮菌进行划线分离纯化,倒置培养 48 h 后观察并记录菌落的特征。记录结果见表 1,菌落 Y3、P4、N12 均呈圆形,表面光滑,生长速度快,不透明且易挑取;菌落 Y2 形态不规则,表面粗糙,边缘不整齐。

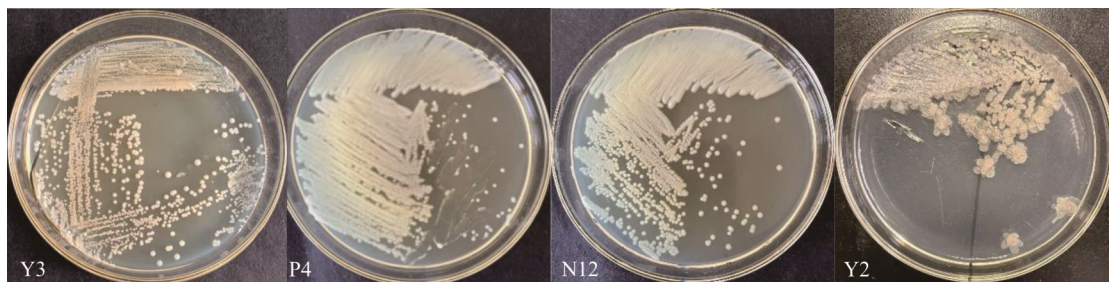


图 2 菌株的划线纯化

Fig. 2 Lineage purification of strains

表 1 菌落的特征

Table 1 Characterization of colonies

菌株编号 Strain number	形态 Form	质地 Texture	表面 Surface	颜色 Colour	边缘 Edge	生长速度 Growth rate	大小 Size	干湿情况 Dry and wet conditions	高度 Height	透明度 Transparency	与培养基结合程度 Level of integration with culture medium
Y3	圆形 Orbicular	均匀 Uniform	光滑 Smoothness	乳黄 Milk yellow	整齐 Neatly	快 Fast	小 Small	干燥 Dry	隆起 Swell	不透明 Opaque	易挑取 Easy picking
	P4	圆形 Orbicular	均匀 Uniform	光滑 Smoothness	乳白 Opaline	整齐 Neatly	快 Fast	小 Small	湿润 Wet	隆起 Swell	不透明 Opaque
N12		圆形 Orbicular	均匀 Uniform	光滑 Smoothness	乳白 Opaline	整齐 Neatly	快 Fast	小 Small	干燥 Dry	隆起 Swell	不透明 Opaque
	Y2	不规则 Irregular	均匀 Uniform	粗糙 Roughness	乳黄 Milk yellow	不齐 Untidy	快 Fast	中 Medium	湿润 Wet	隆起 Swell	不透明 Opaque

2.2.2 生理生化特征 4株固氮菌的生理生化特性如表2所示。葡萄糖发酵试验中接种菌株Y3、P4、N12、Y2的培养基均呈黄色,为阳性;淀粉水解试验中菌株Y3与Y2均能在培养基平板上产生无色透明圈,为阳性;4株固氮菌均不能使滴有甲基红的培养基呈红色,为阴性;Voges-proskauer试验中4株固氮菌均为阳性;4株固氮菌均不能使滴有吲哚的培养基呈红色,为阴性;明胶液化试验中4株固氮菌均为阳性;接触酶试验中菌株P4与N12均能在载玻片上出现气泡,为阳性;菌株P4与N12在革兰氏染色试验中呈红色,为阴性。

表2 菌株的生理生化特征

Table 2 Physiology and biochemistry characteristics of strains

菌株编号 Strain number	葡萄糖发酵 Glucose fermentation	淀粉水解 Starch hydrolysis	甲基红 Methyl red	乙酰甲基甲醇 Voges-proskauer	吲哚 Indole	明胶液化 Gelatin liquefaction	接触酶 Catalase	革兰氏染色 Gram stain
Y3	+	+	-	+	-	+	-	+
P4	+	-	-	+	-	+	+	-
N12	+	-	-	+	-	+	+	-
Y2	+	+	-	+	-	+	-	+

注:“+”呈阳性,“-”呈阴性。

Note: “+” indicates a positive reaction, and “-” indicates a negative reaction.

2.2.3 基因序列扩增及系统发育分析 测序结果经比对发现,菌株Y3与*Bacillus* sp. TSB100(JQ864367.1)的亲缘关系最近,其相似度为99.93%;菌株P4与*Enterobacter mori* strain CX01(CP055276.1)的亲缘关系最近,其相似度为99.85%;菌株N12与*Enterobacter cloacae* strain CnLm-1(MT074035.1)的亲缘关系最近,其相似度为99.93%;菌株Y2与*Bacillus* sp. XKE7(KP872950.1)的亲缘关系最近,其相似度为100%,并根据菌落的特征及生理生化特性,鉴定菌株Y3为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),菌株P4为桑树肠杆菌(*Enterobacter mori*),菌株N12为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*),菌株Y2为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。系统进化树如图3所示。

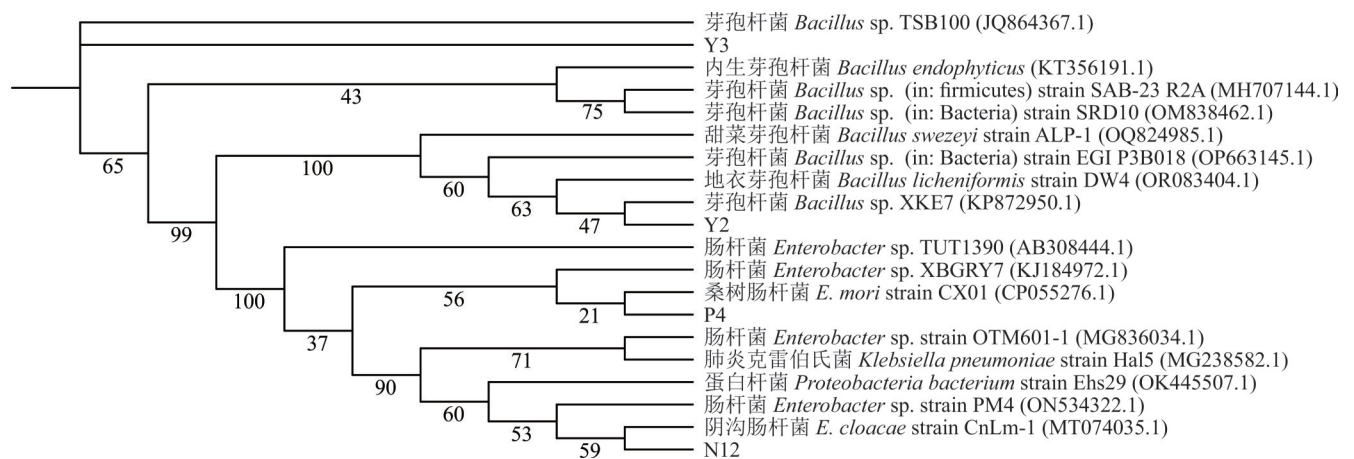


图3 基于16S rDNA基因序列构建菌株的系统进化树

Fig. 3 Construction of a phylogenetic tree for strains based on 16S rDNA gene sequences

2.3 菌株对氮代谢酶活性的影响

2.3.1 硝酸还原酶(NR)活性 由图4可以看出,与对照(CK)相比,接种固氮菌P4、N12、Y2后红砂幼苗叶中NR活性分别显著升高了31.99%、24.67%、19.73% ($P < 0.05$);根中NR活性分别显著升高了34.63%、30.58%、17.72% ($P < 0.05$),而Y3菌株在叶和根中差异不显著,活性分别升高了13.25%、10.65%;其中,P4菌株处理下的红砂幼苗叶和根中NR活性均高于菌株Y3、N12、Y2这3组处理。结果表明,4株固氮菌均能有效增强红砂幼苗叶和根中NR活性,且接种固氮菌株P4效果最为显著 ($P < 0.05$)。

2.3.2 谷氨酸合成酶(GOGAT)与谷氨酰胺合成酶(GS)活性 由图5可以看出,与对照(CK)相比,接种4株固氮菌均能提高红砂幼苗叶和根中GOGAT、GS的活性。叶中GOGAT活性分别提高了17.93%、25.63%、23.38%、20.38% ($P<0.05$),GS活性分别提高了18.90%、23.31%、20.53%、19.39%;根中GOGAT活性分别提高了17.50%、25.08%、23.30%、20.97% ($P<0.05$),GS活性分别提高了16.98%、24.30%、22.60%、20.29%。其中,P4菌株处理下的红砂幼苗叶和根中GOGAT、GS活性均显著高于菌株Y3、N12、Y2这3组处理。结果表明,4株固氮菌均能有效增强红砂幼苗叶和根中GOGAT、GS活性,且固氮菌株P4的处理效果最为显著($P<0.05$)。

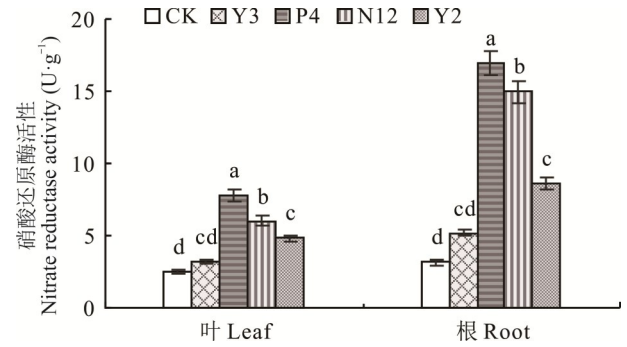


图4 固氮菌对红砂叶、根中硝酸还原酶的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen fixing bacteria on nitrate reductase in leaves and roots of *R. soongorica*

不同字母代表各处理间差异性显著($P<0.05$)。下同。Different letters represent significant differences among the treatments ($P<0.05$). The same below.

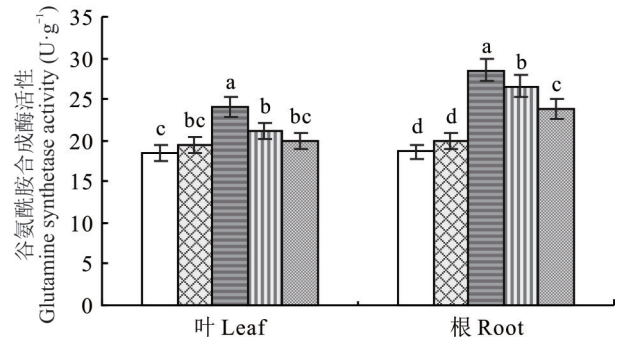
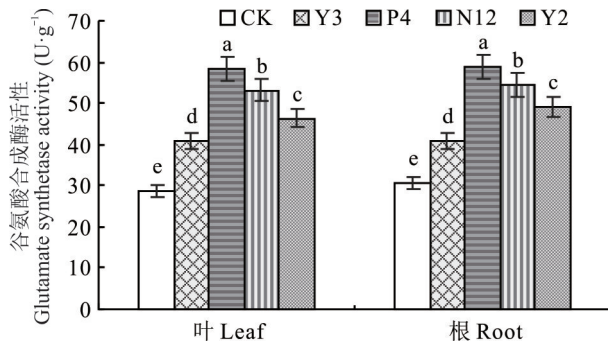


图5 固氮菌对红砂叶、根中谷氨酸合成酶及谷氨酰胺合成酶活性的影响

Fig. 5 Effects of nitrogen fixing bacteria on glutamate synthetase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of *R. soongorica*

2.4 菌株的促生效果分析

由图6可以看出,接种4株固氮菌对红砂幼苗均有促生作用。当施用菌液浓度为 1×10^8 cfu·mL⁻¹时,与对照(CK)相比,根长分别增加13.93%、27.99%、20.73%、18.94% ($P<0.05$,图7A),叶片相对含水量分别增加19.14%、20.75%、20.41%、20.12% ($P<0.05$,图7B);地上部鲜重分别增加13.86%、33.34%、19.07%、17.48% ($P<0.05$,图7C);地下部鲜重分别增加14.81%、33.25%、18.79%、16.75% ($P<0.05$,图7D)。结果表明,4株固氮菌均能促进红砂幼苗的生长,且P4菌株促生效果最为显著($P<0.05$)。

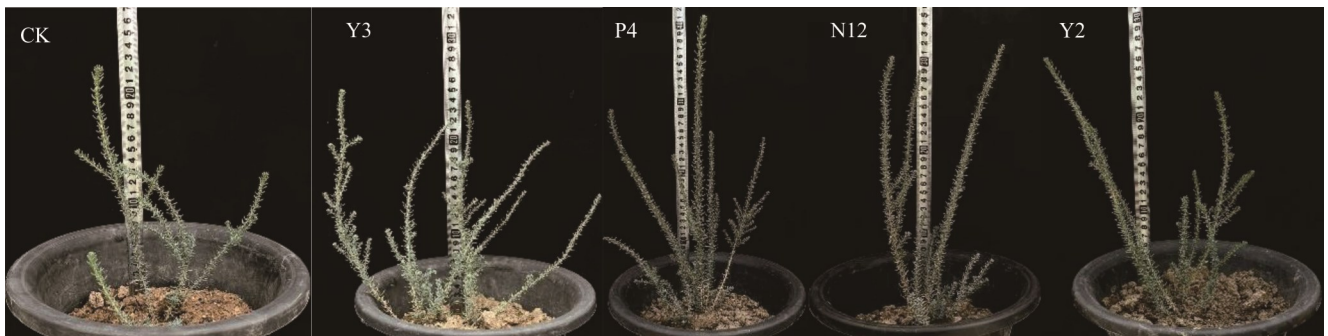


图6 40 d后红砂幼苗生长

Fig. 6 Growth of *R. soongorica* seedlings after 40 days

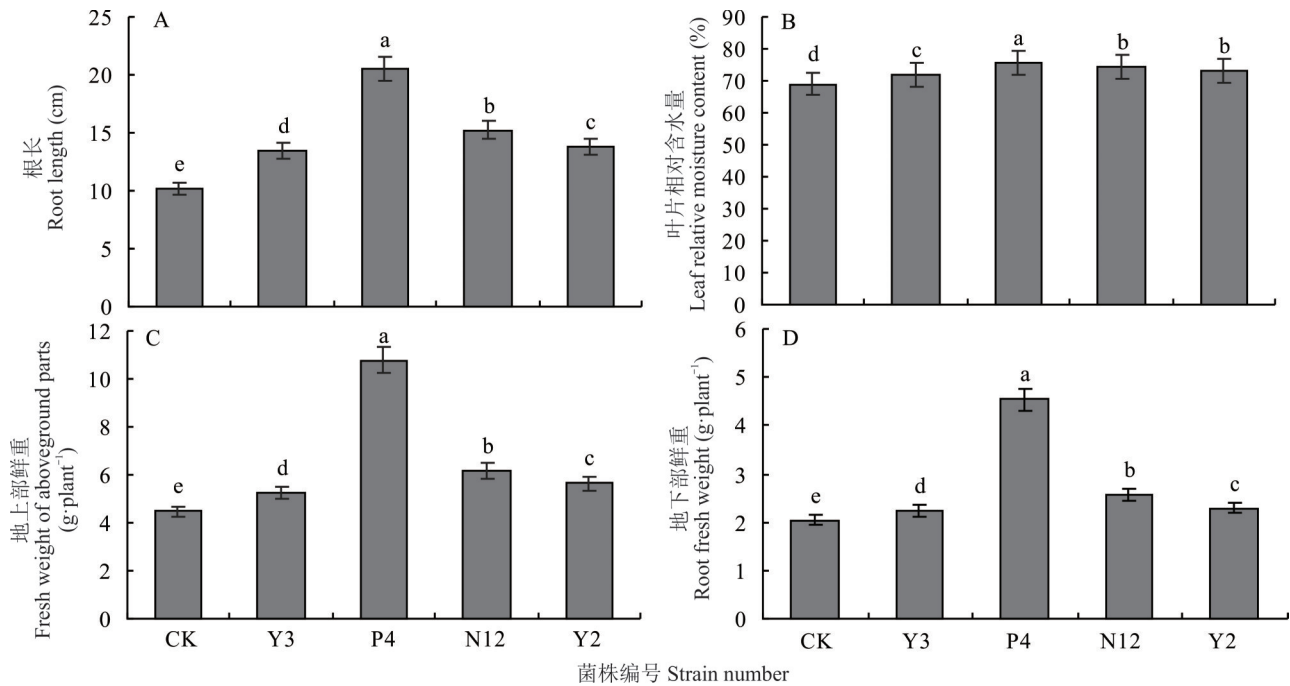


图7 固氮菌对红砂幼苗生长的影响

Fig. 7 Effect of nitrogen fixing bacteria on the growth of *R. soongorica* seedlings

3 讨论

3.1 红砂根际固氮菌的分离鉴定

目前,固氮菌的研究重点在经济林及农作物等方面,而针对其在干旱和盐碱等困难立地条件下植被恢复方面的研究相对比较匮乏。因此,从荒漠植物根际土中分离固氮菌来加快植被恢复已成为微生物菌剂开发和应用的主要研究方向。固氮菌是一种具有固氮能力的微生物,它通过自身分泌无机氮化物为植株提供所需的氮源,提高土壤肥力,促进植物生长发育^[23-25]。固氮菌肥也是最理想、发展前景最好的生物肥料,其研发应用在改良土壤荒漠化问题的基础上促进了农业的可持续发展^[26]。已有研究报道,能够提高植物氮代谢酶活性,促进植物生长的固氮菌有褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)^[27]、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)^[28]、生癌肠杆菌(*Enterobacter cancerogenus*)^[28]等。本研究从荒漠植物红砂根际土壤中分离得到4株具有较强固氮能力的菌株Y3、P4、N12、Y2,根据菌株的形态学、16S rDNA序列以及生理生化特征鉴定菌株Y3为芽孢杆菌,菌株P4为桑树肠杆菌,菌株N12为阴沟肠杆菌,菌株Y2为芽孢杆菌。4株固氮菌都具有研制微生物菌剂的潜力。

3.2 固氮菌对红砂幼苗氮代谢酶活性的影响

有研究报道,接种具有促生功能的优良固氮菌在促进幼苗生长发育的同时也能提高植物的氮代谢酶活性^[29]。氮代谢是植物体内最基本的代谢过程之一^[30],硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸合成酶(GOGAT)是较关键的氮代谢酶,其活性大小直接反映植物对氮素的吸收能力。NR是氮代谢的起始酶^[31],在代谢过程中起着关键作用,其活性是探析氮代谢水平的重要指标。NR活性的大小与氮含量紧密相关,接种固氮菌可促进植物对氮素的吸收并提高其活性^[32]。本研究发现,浇灌同一浓度菌悬液后红砂幼苗叶片和根系中NR活性均显著升高,且根系中的NR活性远高于叶片,这可能是接种固氮菌后增加了幼苗根系中氮的含量,与孙文君等^[33]的研究结果相似。表明接种固氮菌可以提高红砂幼苗根系对氮素的吸收,增强植物体内氮代谢酶活性。GS与GOGAT是氮代谢的关键酶^[34],其参与氮素同化后可促进植物生长。在植物代谢过程中,氮素的同化是 NH_4^+ 在GS的催化下形成谷氨酰胺,再由GOGAT催化谷氨酰胺形成谷氨酸,最终进入GS与GOGAT的循环途径^[35]。欧阳雪庆等^[36]研究发现,将固氮菌接种于不同品种的甘蔗(*Saccharum officinarum*)后能显著提高叶片中GS和GOGAT的活性。说明固氮菌参与了植物体内氮代谢过程,促进了氮素同化,加快了植物对氮的吸收。本研究红

砂幼苗叶片与根系中氮代谢酶活性的升高也与此有关。本试验结果发现,与不接菌相比,接种4株固氮菌均能显著提高红砂幼苗叶片和根系中GS与GOGAT的活性。表明接种固氮菌可以促进植物体内氮的同化,提高植物对氮素的吸收,增强氮代谢酶活性。

3.3 固氮菌的促生作用研究

研究表明,固氮菌是一种具有固氮能力的微生物,在固氮过程中可以产生植物激素及铁载体等^[37]物质,促进植物生长,加快植被恢复。戚秀秀等^[38]选取了5株植物根际促生菌进行试验,发现5株菌株均具有促生能力,将其接种于育苗基质后显著增加了水稻(*Oryza sativa*)幼苗的生物量、养分含量,促进了幼苗生长。孟超楠等^[28]分离出2株促生能力较强的菌株接种于青贮玉米(*Zea mays*)中,发现菌株都能显著提高植物的地上与地下部鲜重,促进了株高与根系的生长。本研究从荒漠植物红砂根际土中分离得到4株固氮能力较强的菌株,盆栽试验结果表明,接种固氮菌Y3、P4、N12、Y2对红砂幼苗生长均有促进作用,浇灌100 mL浓度为 1×10^8 cfu·mL⁻¹菌悬液后,幼苗的生物量指标间均有显著差异,幼苗的根长、叶片相对含水量、地上和地下部鲜重均高于对照处理,且固氮菌P4的促生效果最为显著。以上结果表明,从红砂根际土中分离得到的4株固氮菌均有良好的促生作用。

4 结论

本研究从红砂根际土中筛选得到4株固氮菌,Y3与Y2为芽孢杆菌,P4为桑树肠杆菌,N12为阴沟肠杆菌。接种固氮菌可以提高红砂幼苗氮代谢酶活性,促进植物生长发育。4株固氮菌可作为研制微生物菌剂的优质菌种资源。

参考文献 References:

- [1] Dechorgnat J, Francis K L, Dhugga K S, *et al.* Tissue and nitrogen-linked expression profiles of ammonium and nitrate transporters in maize. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 206.
- [2] Ma S J. Summary of biological effects involved in nitrogen cycling. *Biology Teaching*, 2021, 46(8): 67–68.
马士杰. 参与氮循环的生物作用总结. *生物学教学*, 2021, 46(8): 67–68.
- [3] Zhang L, Yuan L, Huang J G. Mobilization of potassium in soils by azotobacter. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(2): 399–405.
张亮, 袁玲, 黄建国. 自生固氮菌对土壤钾的活化作用. *土壤学报*, 2015, 52(2): 399–405.
- [4] Wang J C, Lv C Q, Qin L H, *et al.* Effect of inoculating nitrogen fixation bacteria on afforestation experiment for two *Eucalyptus* clones. *Journal of Central South University of Forestry and Technology*, 2010, 30(12): 50–55, 87.
王劲松, 吕成群, 覃林海, 等. 两个桉树无性系接种固氮菌造林试验效果初探. *中南林业科技大学学报*, 2010, 30(12): 50–55, 87.
- [5] Huang B L, Lv C Q, Qin W M, *et al.* Forestation experiment on *Acacia crassicarpa* seedlings inoculated with nodule bacteria. *Journal of Southwest Forestry College*, 2005, 25(4): 80–83.
黄宝灵, 吕成群, 秦武明, 等. 厚荚相思苗木接种根瘤菌的造林试验. *西南林业大学学报*, 2005, 25(4): 80–83.
- [6] Deng L, Li R, Liu J A, *et al.* Development of *Cunninghamia lanceolata* PGPR compound microbial fertilizer and its effect on the growth of *Cunninghamia lanceolata* seedling. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(24): 5967–5969, 5974.
邓雷, 李蓉, 刘君昂, 等. 杉木根际促生菌复合肥研制及其对苗木生长的影响. *湖北农业科学*, 2014, 53(24): 5967–5969, 5974.
- [7] Han X Y, Li Z, Zhang L X, *et al.* Screening, identification and inoculation effect of azotobacter from the soils of tea garden. *Journal of Tea Science*, 2014, 34(5): 497–505.
韩晓阳, 李智, 张丽霞, 等. 茶园土壤高活性固氮菌的筛选鉴定及接种效果初步研究. *茶叶科学*, 2014, 34(5): 497–505.
- [8] Liu F C, Ma H L, Ma B Y, *et al.* Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on photosynthetic characteristics in walnut seedlings under drought stress. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(7): 84–90.
刘方春, 马海林, 马丙尧, 等. 干旱环境下接种根际促生细菌对核桃07苗光合特性的影响. *林业科学*, 2015, 51(7): 84–90.
- [9] Xiao K, Cui Y, Gao D Y, *et al.* Screening, identification of phosphate-solubilizing walnut root-promoting rhizobacteria and its promoting effect on walnut. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2018, 41(5): 49–54.
肖坤, 崔延, 高丹阳, 等. 核桃根际解磷细菌的筛选及对核桃促生作用研究. *河北农业大学学报*, 2018, 41(5): 49–54.

- [10] Ma J, Shan L S, Wang S, *et al.* Studies on photosynthetic characteristics of C₃ plant *Reaumuria soongorica* and C₄ plant *Salsola passerina* in a mixed community under different precipitations. *Acta Agrestia Sinica*, 2019, 27(4): 921–927.
马静, 单立山, 王珊, 等. 不同降水量条件下 C₃植物红砂-C₄植物珍珠混生光合特性研究. *草地学报*, 2019, 27(4): 921–927.
- [11] Li H S, Liu Z H, Bai J. Comparative study of soil organic matter content in *Reaumuria soongorica* distribution areas of desert plants. *Gansu Science and Technology*, 2007, 23(12): 237–238, 248.
李怀省, 刘振恒, 白娟. 荒漠植物红砂分布区土壤有机质含量的比较研究. *甘肃科技*, 2007, 23(12): 237–238, 248.
- [12] Zhang H, Liu X, Yang X, *et al.* miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for miRNAs in a typical halophyte, *Reaumuria soongorica*, during seed germination under salt stress. *Plants*, 2020, 9(3): 351.
- [13] Sun Y Y, Chen J, Wang Y, *et al.* Advances in growth promotion mechanisms of PGPRs and their effects on improving plant stress tolerance. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(5): 1203–1215.
孙韵雅, 陈佳, 王悦, 等. 根际促生菌促生机理及其增强植物抗逆性研究进展. *草地学报*, 2020, 28(5): 1203–1215.
- [14] Hyder S, Rizvi Z F, los Santos-Villalobos S, *et al.* Applications of plant growth-promoting rhizobacteria for increasing crop production and resilience. *Journal of Plant Nutrition*, 2023, 46(10): 1–30.
- [15] Qin Y, Druzhinina I S, Pan X Y, *et al.* Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(7): 1245–1259.
- [16] Rigi F, Saberi M, Ebrahimi M. Improved drought tolerance in *Festuca ovina* L. using plant growth promoting bacteria. *Journal of Arid Land*, 2023, 15(6): 740–755.
- [17] Mao X, Sun B P, Zhang J F, *et al.* Effect of microbial fertilizer on soil amelioration in arid mining area. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2019, 33(2): 201–206.
毛骁, 孙保平, 张建锋, 等. 微生物菌肥对干旱矿区土壤的改良效果. *水土保持学报*, 2019, 33(2): 201–206.
- [18] Wang Q Q, Feng L, Li Y, *et al.* Screening and identification of salt-tolerant promoting bacteria of the rhizosphere of *Suaeda dendroides* in Xinjiang. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2569–2578.
王琦琦, 冯丽, 李杨, 等. 新疆木碱蓬(*Suaeda dendroides*)根际耐盐促生细菌的筛选及鉴定. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2569–2578.
- [19] Dong X Z, Cai M Y. Handbook of common bacterial system identification. Beijing: Science Press, 2001: 353–385.
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353–385.
- [20] Yun F, Liang L, Bao Y B, *et al.* Optimization of methods for genomic DNA extraction from bacteria. *Anhui Agricultural Science*, 2021, 49(10): 98–100.
云飞, 梁林, 鲍彦彬, 等. 革兰氏阳性与阴性细菌基因组DNA提取方法的优化. *安徽农业科学*, 2021, 49(10): 98–100.
- [21] Wang X G. Application of biology software in the nucleic acid sequence alignment and phylogenetic analysis. *Modern Agricultural Technology*, 2015(12): 347–348.
王小国. 生物学软件在核酸序列比对与系统发育分析中的应用. *现代农业科技*, 2015(12): 347–348.
- [22] Kong R J, Chen Q, Zhao Y. Comparison of grid crossing method and WinRHIZO scanning method in determination of plant root length. *Journal of Tianjin Normal University (Natural Science Edition)*, 2023, 43(4): 20–24.
孔茹洁, 陈清, 赵英. 网格交叉法与WinRHIZO扫描法在植物根长测定中的比较. *天津师范大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(4): 20–24.
- [23] Yang Q F, Du Y H, Liu F. Effects of peanut rhizobia fertilizer on main agronomic characters and yield of peanut. *Shandong Agricultural Science*, 2014, 46(5): 93–95.
杨庆锋, 杜迎辉, 刘峰. 根瘤菌肥对花生主要农艺性状及产量的影响. *山东农业科学*, 2014, 46(5): 93–95.
- [24] Zeng W D, Rexidai·Naijimiding, Bahaerguli·Aixirepu, *et al.* Experimental study on the control effect and yield increase of Shenhoe composite microbial fertilizer on tomato field Leedang. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2016(11): 97.
曾卫东, 热西代·乃吉米丁, 巴哈尔古力·艾西热甫, 等. 神锄复合微生物菌肥对番茄田列当的防效及增产试验. *现代农业科技*, 2016(11): 97.
- [25] Zhang K, Yao T, Zhang D G, *et al.* Effects of associative nitrogen-fixing biofertilizer on growth of *Hordeum vulgare* in alpine region. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2010, 16(3): 708–713.
张堃, 姚拓, 张德罡, 等. 高寒地区联合固氮菌肥对青稞的促生效应研究. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16(3): 708–713.
- [26] Wu Y G, Wang H X, Zhang Z, *et al.* The effect and promotion prospect of bio-organic fertilizer containing super-efficient nitrogen-fixing bacteria instead of chemical fertilizer. *Rural Economy and Science-Technology*, 2020, 31(20): 23–24.

- [27] Jin H Y, Wang H, Zhang Y H, *et al.* Genome-based identification and plant growth promotion of a nitrogen-fixing strain isolated from soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(10): 3249–3263.
靳海洋, 王慧, 张燕辉, 等. 基于基因组的一株土壤固氮菌分离菌株鉴定及其促生作用. *微生物学报*, 2021, 61(10): 3249–3263.
- [28] Meng C N, Zhao Y J, Chen J X, *et al.* Screening and identification of two strains of nitrogen-fixing bacteria from the silage maize rhizosphere and their roles in plant growth promotion. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(3): 174–185.
孟超楠, 赵玉洁, 陈佳欣, 等. 2株青贮玉米根际固氮菌的筛选鉴定及促生作用研究. *草业学报*, 2024, 33(3): 174–185.
- [29] Wang H, Wu Y J, An T T, *et al.* Lateral root elongation enhances nitrogen-use efficiency in maize genotypes at the seedling stage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 102(12): 5389–5398.
- [30] Xu H C, Shang J, Liu M H, *et al.* Research progress of enzymes related to nitrogen metabolism. *Anhui Agricultural Science*, 2022, 50(4): 17–20.
徐洪超, 商靖, 刘铭荟, 等. 氮代谢相关酶的研究进展. *安徽农业科学*, 2022, 50(4): 17–20.
- [31] Fan H F, Guo S R, Du C X, *et al.* Effects of exogenous NO on NO_3^- -N, NH_4^+ -N and soluble protein contents and NR activities in cucumber seedlings under NaCl stress. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(10): 2063–2068.
樊怀福, 郭世荣, 杜长霞, 等. 外源NO对NaCl胁迫下黄瓜幼苗氮化合物和硝酸还原酶活性的影响. *西北植物学报*, 2006, 26(10): 2063–2068.
- [32] Dang W, Li Q, Ye G F, *et al.* Effect NRE2 element deletion of nitrate reductase gene promoter on nitrogen metabolism in tobacco. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2022, 36(2): 322–328.
党伟, 李茜, 叶歌斐, 等. 硝酸还原酶基因启动子NRE2元件缺失对烟草氮代谢的影响. *核农学报*, 2022, 36(2): 322–328.
- [33] Sun W J, Wu J Z, Li Y. Effect of rhizobia on nitrogen metabolism of alfalfa in response to cadmium. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2024, 41(1): 222–229.
孙文君, 吴基正, 李元. Cd胁迫下接种根瘤菌对紫花苜蓿氮代谢的影响. *农业资源与环境学报*, 2024, 41(1): 222–229.
- [34] Wang Z Q, Yuan Y Z, Ou J Q, *et al.* Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(6): 695–701.
- [35] Xu X P, Fu X D, Liao H. Advances in study of ammonium assimilation and its regulatory mechanisms in plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, 51(2): 152–166.
徐晓鹏, 傅向东, 廖红. 植物铵态氮同化及其调控机制的研究进展. *植物学报*, 2016, 51(2): 152–166.
- [36] Ouyang X Q, Luo T, Yang L T, *et al.* Effects of sett-soaking with sugarcane endophytic diazotroph solution on N metabolism related enzymes activities at the early growth stage of sugarcane. *Guangxi Agricultural Science*, 2010, 41(5): 416–418.
欧阳雪庆, 罗霆, 杨丽涛, 等. 甘蔗内生固氮菌液浸种对甘蔗生长前期氮代谢相关酶活性的影响. *广西农业科学*, 2010, 41(5): 416–418.
- [37] Delaporte Q P, Lovaisa N C, Rapisarda V A, *et al.* The plant growth promoting bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Azospirillum brasilense* contribute to the iron nutrition of strawberry plants through siderophores production. *Plant Growth Regulation*, 2020, 91(2): 15.
- [38] Qi X X, Wei C, Liu X D, *et al.* Effects of plant growth-promoting rhizobacteria added in seedling substrate on rice growth. *Soils*, 2020, 52(5): 1025–1032.
戚秀秀, 魏畅, 刘晓丹, 等. 根际促生菌应用于基质对水稻幼苗生长的影响. *土壤*, 2020, 52(5): 1025–1032.