



南海东海岛近海固氮细菌多样性及对菜心的促生作用

陈家欣, 谈慧娟, 林楠, 谭诗琳, 郑海彬, 曾晓燕, 袁红旭, 卢冬梅*

岭南师范学院生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048

摘要: 海洋固氮细菌在自然界氮循环中发挥着重要作用, 筛选和开发海洋固氮促生的菌种资源, 对于生物菌肥的开发应用和农业生产具有重要意义。【目的】研究海洋固氮细菌的生物多样性及对陆地作物的促生作用, 筛选优良的植物根际促生菌株。【方法】通过形态特征、生理生化试验和 16S rRNA 基因序列比对进行菌属鉴定; 将解磷、解钾、产蛋白酶和纤维素酶等性能优良的菌株作为菜心盆栽试验的组合菌液, 探究对菜心能否起促生作用。【结果】本研究从南海东海岛的海岛沉积物中筛选出 18 株固氮菌, 分布在 6 个属 9 种, 不动杆菌属 4 株, 假交替单胞菌属 1 株, 芽孢杆菌属 8 株, 嗜冷杆菌属 1 株, 海单胞菌属 1 株, 交替单胞菌属 3 株。菜心幼苗经过组合菌剂的浇灌, 在茎高、茎粗、最大叶宽和最大叶长 4 个指标均表明对菜心有显著的促生作用。其中, 以芽孢杆菌属和不动杆菌属的菌株在菜心的生长过程中起关键的促进作用, 对菜心的促生性能最佳。【结论】南海近海具有种类丰富多样的固氮细菌, 以芽孢杆菌属和不动杆菌属的菌株促生作用最为显著, 具有开发成微生物菌肥的潜力, 为优良的海洋促生微生物菌种资源的定向利用及蔬菜的无公害生产提供重要依据。

关键词: 固氮细菌, 南海近海, 种群分布, 促生作用

生态环境保护、资源的可持续利用和食品安全是当今世界农业发展面临的三大问题。工业生产氮肥需要消耗大量的非再生能源, 过量施用氮肥不仅提高了农业生产的成本, 还造成能源的浪费, 严重污染土壤及破坏生态平衡, 而生物固氮是最节能、环保和生态友好的氮素供应方式^[1-2]。同时, 某些固氮微生物除具有固氮能力, 还具有

溶磷、解钾、产蛋白酶和纤维素酶等作用, 既能促进植物生长, 又能有效抑制土传病害^[3-4]。如果将这些固氮菌做成微生物肥料, 不仅能提高农作物的产量, 而且生产成本低, 不污染环境, 还可减少化肥的使用量^[5-8]。

目前将陆生环境的固氮菌应用到促进植物生长的研究成果非常多。如李海碧从甘蔗根际土壤

基金项目: 国家星火计划项目(2013GA780077); 广东省科技厅科技型中小企业技术创新、科技金融结合项目项目(2017B010136194); 产业链协同创新类公共服务平台项目(合同编号: 湛海创 2017 C8B2); 四川省教育厅项目(CC16Z12)

*通信作者。E-mail: ludongmei@lingnan.edu.cn

收稿日期: 2019-04-16; 修回日期: 2019-07-15; 网络出版日期: 2020-01-14

中分离了优良的固氮菌菌株,用该优良菌株接种了两个不同甘蔗品种,证实了其能促进甘蔗的生长^[9];王国基从玉米根际分离和筛选出来具有解磷解钾、分泌生长素等多种能力和固氮菌酶活性高的优良固氮菌株研制成玉米专用固体菌肥,进行田间试验,结果表明固氮菌肥具有良好的促进玉米生长的作用^[10]。但是将优良的海洋固氮菌应用到植物促生方面的研究较少,开发制成生物菌肥的研究更少。

南海东海岛的岛屿沉积物的微生物资源丰富,本研究对 18 株固氮菌株进行种属鉴定及解磷、解钾、产蛋白酶和纤维素酶等性能检测,筛选出综合性能优良的固氮菌株进行菜心盆栽试验探究其促生效应,以期开发促生菌剂提供菌种资源,并为海洋促生菌与植物的互作机制研究奠定前期基础。优良的海洋固氮菌的资源开发将拥有广阔的开发前景^[11-15],其定向利用将会成为现代农业生产技术研究热点领域之一^[16]。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

从南海近海海岛沉积物(东经 110°32'22",北纬 21°0'56")中筛选出 18 株固氮菌,其编号分别记为 DHD-1、DHD-2、DHD-5、DHD-6、DHD-8、DHD-9、DHD-10、DHD-11、DHD-12、DHD-13、DHD-15、DHD-20、DHD-b、DHD-c、DHD-e、DHD-h、DHD-L、DHD-n。

1.2 培养基

西蒙氏柠檬酸盐培养基、明胶培养基和三糖铁琼脂培养基等,北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.2.1 蛋白胨水培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.6。

1.2.2 改良 2216E 海水培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0, pH 7.5, 陈海水配制。

1.2.3 脱脂牛奶培养基(g/L): 脱脂奶粉 100.0, 琼脂 30.0。

1.2.4 阿须贝氏培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.2, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCO_3 5.0, 琼脂 20.0, pH 7.0-7.2。

1.2.5 CMC 培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, MgSO_4 0.5, KH_2PO_4 1.0, NaCl 0.5, CMC-Na 10.0, 琼脂 20.0。

1.2.6 PKO 培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, NaCl 0.2, KCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, MnSO_4 0.03, FeSO_4 0.003, Yeast extract 0.5, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0, 琼脂 20.0, pH 6.8-7.0。

1.3 主要仪器

超净工作台, SW-CJ-1G 型, 苏州净化设备有限公司; 生化培养箱, SPL-250 型, 天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; 可见分光光度计, 723N 型, 上海精科实业有限公司; 冷冻离心机, 1-14K 型, 德国 Sigma 公司; 扩增仪, T100 型, 美国 Bio-Rad 公司; 紫外透射仪, WFH-201B 型, 上海精科实业有限公司; 电泳仪, DYY-6C 型, 北京六一生物科技有限公司。

1.4 固氮菌的分离纯化与鉴定

1.4.1 海泥细菌的分离纯化: 将改良 2216E 海水培养基上出现的单菌落挑取到阿须贝氏固体培养基上划线纯化, 直至获得纯培养物^[17-18]。观察菌落形态特征及革兰氏染色特性和进行生理生化检验。

1.4.2 16S rRNA 基因序列比对与种属鉴定: 按照

PCR 扩增试剂盒操作说明提取固氮菌基因组, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行双向测序。将所得的序列测序结果在 NCBI 进行 BLAST 同源性比对, 最后利用软件 MEGA6.0 分析并构建系统发育树(Neighbor-joining), 选用 Bootstrap (1000 次重复)法检验发育树, 分析其系统发育地位。确定其所在属种, 进行种群多样性分析。

1.5 固氮菌的促生特性检测

1.5.1 溶钾能力定性试验: 将供试菌株活化后接种到阿须贝氏固体培养基上置于 30 °C 培养 10 d, 观察培养基上是否有透明环形成, 判断该菌株溶钾能力的大小^[19]。

1.5.2 产蛋白酶定性试验: 将供试菌株接种在脱脂牛奶培养基上, 30 °C 培养 3 d 后, 观察菌落周围透明圈大小, 判断菌株产蛋白酶能力^[20]。

1.5.3 产纤维素酶定性试验: 将供试菌株接种在 CMC 培养基平板上, 30 °C 培养 3 d 后, 在长出菌落的培养基上覆盖浓度 4 mg/mL 的刚果红溶液, 1 h 后倾去, 加入浓度 1 mol/L 的 NaCl 溶液, 1 h 后倾去, 加入 5% 的醋酸。此时, 产纤维素酶的菌落周围出现透明圈。观察菌落周围透明圈大小, 判断菌株产生纤维素酶能力^[20]。

1.5.4 溶磷能力定性测定: 将供试菌株活化后接种到 PKO 培养基上置于 30 °C 培养 10 d, 观察培养基上是否有透明环形成, 判断该菌株溶磷能力大小^[19]。

1.6 菜心促生实验

盆栽实验于 2018 年 7-8 月进行, 供试土壤来自于广东省湛江市赤坎区岭南师范学院附近农田。供试作物为菜心种子, 根据实验 3 的结果挑选出解磷、解钾、产蛋白酶和纤维素酶等综合性

能最佳的 8 株菌株, 共分为 5 组混合菌剂, 即 A 组(DHD-h、DHD-c); B 组(DHD-12、DHD-h、DHD-n); C 组(DHD-15、DHD-c、DHD-L); D 组(DHD-12、DHD-13、DHD-15、DHD-h、DHD-c、DHD-n); E 组(DHD-1、DHD-12、DHD-13、DHD-15、DHD-h、DHD-c、DHD-n、DHD-L)。每个小组进行 3 个重复, 每个重复处理各 6 个平行组。

各供试菌株组活化后置于改良 2216E 海水培养基摇床培养 24 h, 用无菌水调节菌悬液 OD_{600} 约 1.0, 采用灌根方式进行接种, 接种量 0.5 mL/株, 设改良 2216E 海水培养基处理为对照组(CK)。自然条件下室外培养, 每隔 6 d 重复处理 1 次, 测定茎高、茎粗、最大叶宽和最大叶长, 取平均值, 计算各阶段的 4 项指标增长率^[19]。

2 结果和分析

2.1 固氮菌的分离纯化与鉴定

如表 1 所示, 东海岛岛屿沉积物中的固氮菌菌体和菌落的形态特征丰富多样, 菌落多为较小, 少数较大; 多呈白色, 少数为半透明或灰褐色, 质地均匀, 表面多光滑湿润, 易挑起; 菌体多为短杆状和短棒状, 部分为球状和椭圆形; 大部分为革兰氏阳性菌, 少数为革兰氏阴性菌。

18 株固氮菌的生理生化测定结果如表 2 所示, 不动杆菌属的菌株 DHD-1、DHD-11、DHD-n 和 DHD-h 均能分解蛋白胨中的色氨酸产生吲哚, 能使明胶液化, 三糖铁琼脂试验为阳性, 其中以 DHD-11 的代谢能力最强; 交替单胞菌属的菌株 DHD-2、DHD-8 和 DHD-b 的代谢能力普遍较弱, DHD-2 和 DHD-8 均能将葡萄糖分解为丙酮酸后

表 1. 菌体与菌落特征
Table 1. Characteristics of bacteria and colonies

Strain	Cell morphology	Gram stain	Colony characteristics
DHD-1	Spherical or oval	+	Small, white, uniform texture, wet, smooth, easy to pick it up.
DHD-2	Rhabditiform	-	Large, dense, dry, translucent, grayish brown, creased, easy to pick it up.
DHD-5	Short clavate	+	Small, white, smooth surface and edge, uniform texture, wet, easy to pick it up.
DHD-6	Short clavate	-	Small, round, white.
DHD-8	Spherical	+	Round, white, easy to pick it up.
DHD-9	Oval	+	Round, wet, white.
DHD-10	Oval	+	Large, thick, beige, round edges, easy to pick it up.
DHD-11	Oval	+	Round, white.
DHD-12	Rhabditiform	-	Small, thin, transparent, uniform texture, easy to pick it up.
DHD-13	Short clavate	-	Small, ivory, round edge, uniform texture, smooth surface, thick, easy to pick it up.
DHD-15	Short rod	+	Small, margin and surface smooth, sticky, easy to pick it up.
DHD-20	Short clavate	-	Small, thin, white, wet, uniform texture, easy to pick it up.
DHD-b	Short clavate	+	Small, translucent, uniform texture, not easy to pick it up.
DHD-c	Short clavate	+	Slightly transparent, colorless.
DHD-e	Short clavate	+	Round, white.
DHD-h	Oval or short rod	+	Large, ivory, smooth surface, wet, easy to pick it up.
DHD-n	Circular or oval	+	Small, ivory, protruding, smooth surface, easy to pick it up.
DHD-L	Short rod	+	Small, ivory, thicker, wet, sticky, easy to pick it up.

表 2. 固氮菌生理生化特征的测定结果
Table 2. Determination of physiological and biochemical characteristics of nitrogen-fixing bacteria

Strain	Enzymatic	Citrate test	Indole test	Methyl red test	Trisaccharide iron agar test	Gelatin liquefaction test
DHD-1	-	+	+	+	+	+
DHD-2	-	-	-	+	-	+
DHD-5	-	+	+	-	+	+
DHD-6	+	-	+	+	-	+
DHD-8	-	-	-	+	-	-
DHD-9	-	-	-	-	-	+
DHD-10	-	-	+	+	-	+
DHD-11	+	+	+	+	+	+
DHD-12	-	-	+	+	+	+
DHD-13	-	-	-	+	-	+
DHD-15	-	-	+	+	-	+
DHD-20	-	-	+	+	-	-
DHD-b	-	-	+	-	-	-
DHD-c	+	+	+	+	+	+
DHD-e	-	-	+	+	+	+
DHD-h	-	-	+	-	+	+
DHD-L	-	-	+	+	+	+
DHD-n	-	+	+	+	+	+

再被分解为有机酸, DHD-2 能液化明胶, DHD-b 能分解蛋白胨中的色氨酸产生吡啶; 嗜冷杆菌属菌株 DHD-5 可利用枸橼酸盐, 能分解蛋白胨中的色氨酸产生吡啶, 三铁糖试验为阳性, 能使明胶液化; 假交替单胞菌属菌株 DHD-6 有过氧化酶活性, 能分解蛋白胨中的色氨酸产生吡啶, 能将葡萄糖分解为丙酮酸后再被分解为有机酸, 能使明胶液化; 海单胞菌属菌株 DHD-9 只能使明胶液化; 芽孢杆菌属菌株 DHD-10、DHD-12、DHD-13、DHD-15、DHD-20、DHD-c、DHD-e 和 DHD-L 均能分解蛋白胨中的色氨酸产生吡啶, 能将葡萄糖分解为丙酮酸后再被分解为有机酸, 其中以 DHD-c 的代谢能力最强, 6 项试验结果均为阳性, 而 DHD-12、DHD-e 和 DHD-L 的代谢能力也较强, 均能分解蛋白胨中的色氨酸产生吡啶, 能将葡萄

糖分解为丙酮酸后再被分解为有机酸, 能使明胶液化, 三糖铁琼脂试验为阳性。

由上述可知, 不动杆菌属的代谢能力最强, 所分解及合成的产物呈多样化, 其次是嗜冷杆菌属、假交替单胞菌属和芽孢杆菌属的固氮菌株的综合代谢能力较强, 代谢能力较弱的是交替单胞菌属和海单胞菌属的固氮菌株。

2.2 固氮菌的 16S rRNA 基因序列比对和种群分布分析

由表 3 可得, 将 16S rRNA 基因序列测序结果与 Ezbiocloud 数据库内序列比对, 结果表明: 筛选菌株与数据库中的模式菌株都具有一定的同源性, 相似度为 99%–100%, 分属于 6 个属 9 种。

表 3. 固氮菌 16S rRNA 的序列分析

Table 3. Sequence analysis of 16S rRNA gene of nitrogen-fixing bacterial strains

Representative strains	Closest match	GenBank accession No.	Similarity/%
DHD-1	<i>Acinetabacter lactucae</i>	CP020015.1	99.93
DHD-2	<i>Alteromonas macleodii</i>	LT963558.1	99.93
DHD-5	<i>Psycrobacter alimentarius</i>	MH368408.1	100.00
DHD-6	<i>Pseudoalteromonas gelatinilytica</i>	NR_152003.1	100.00
DHD-8	<i>Alteromonas macleodii</i>	MK680202.1	99.93
DHD-9	<i>Oceanimonas doudoroffii</i>	NR_114185.1	100.00
DHD-10	<i>Bacillus megaterium</i>	MK618596.1	99.11
DHD-11	<i>Acinetabacter pittii</i>	MH144322.1	100.00
DHD-12	<i>Bacillus subtilis</i>	MK263004.1	100.00
DHD-13	<i>Bacillus subtilis</i>	JN707686.1	100.00
DHD-15	<i>Bacillus velezensis</i>	MK859954.1	99.93
DHD-20	<i>Bacillus subtilis</i>	KF017557.1	100.00
DHD-b	<i>Alteromonas macleodii</i>	LT963558.1	100.00
DHD-c	<i>Bacillus subtilis</i>	KX713159.1	100.00
DHD-e	<i>Bacillus subtilis</i>	MK450454.1	100.00
DHD-h	<i>Acinetobacter pittii</i>	MG462705.1	99.03
DHD-L	<i>Bacillus subtilis</i>	KX713159.1	99.93
DHD-n	<i>Acinetabacter pittii</i>	MG462705.1	100.00

用 MEGA 6.0 软件构建 18 株固氮菌的系统发育树如图 1 所示。从图 1 中可以看出所有细菌共分成 2 个分类单元:变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)。变形菌门共有 5 个属、6 个种;厚壁菌门共有 1 个属、3 个种。

东海岛沉积物中筛选出的固氮菌中,变形菌门占的比例最高,占总数的 56%;变形菌门中的不动杆菌属(*Acinetobacter*)占的比例最高,占总数的 40%。菌株数量最多的属是芽孢杆菌属(*Bacillus*),共有 8 株,占 44%;其次是不动杆菌属(*Acinetobacter*),共有 4 株,占 22%;交替单胞菌属(*Alteromonas*),共 3 株,占 17%;嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、海单胞菌属(*Oceanimonas*)各 1 株。种类数量最多的属是芽孢杆菌属(*Bacillus*),共有 3 种,占 33%;其次是不动

杆菌属(*Acinetobacter*),共有 2 种,占 22%;交替单胞菌属(*Alteromonas*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、海单胞菌属(*Oceanimonas*)各有 1 种。

2.3 固氮菌的促生特性检测

由图 2 数据可知菌株 DHD-1、DHD-h、DHD-n、DHD-c、DHD-5、DHD-11 均具备解钾能力,解钾能力由大到小依次为 DHD-h、DHD-11、DHD-1、DHD-n、DHD-c 和 DHD-5。其中以菌株 DHD-h 的解钾圈最大,解钾能力最强;菌株 DHD-5 的解钾能力最弱。虽然我国的钾资源比较丰富,但是可利用的钾资源仍然不可观,其中较多为不可溶性钾资源,不能被植物直接吸收利用,因此,优良的解钾固氮菌为植物吸收钾肥提供了很大的便利。

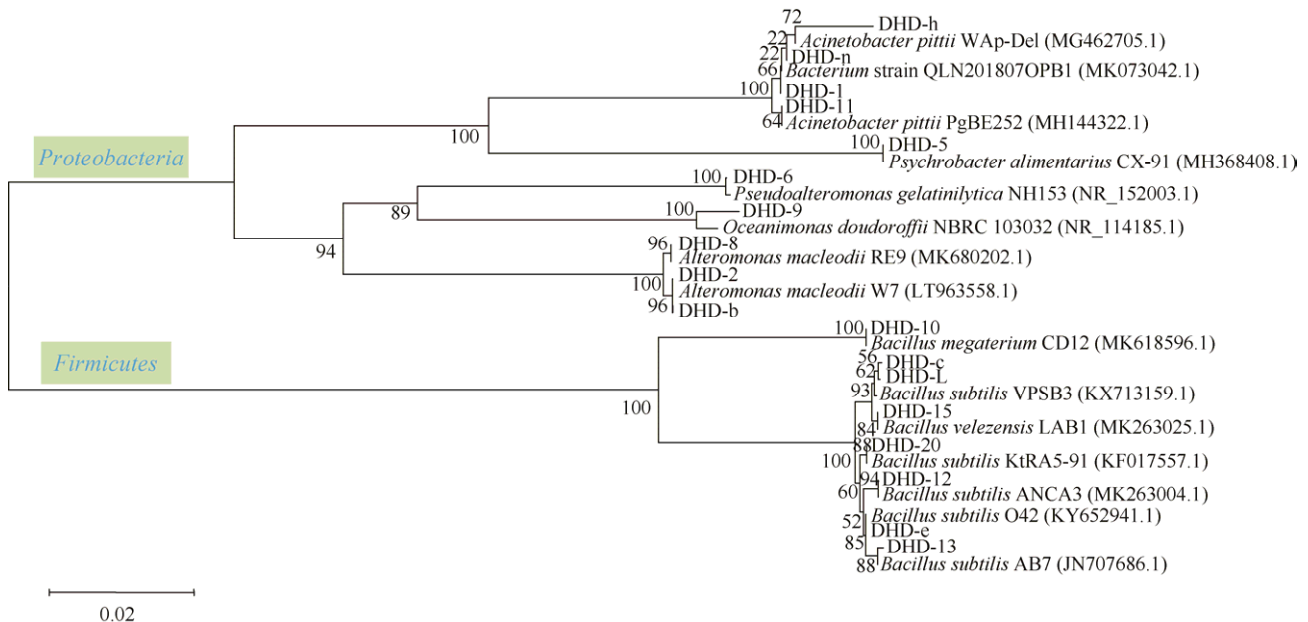


图 1. 根据 16S rRNA 基因序列构建的 18 株固氮细菌的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree of 18 strains of nitrogen-fixing bacteria based on 16S rRNA gene sequence. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap; Bar: 0.02 substitutions per nucleotide position.



图 2. 溶钾能力定性试验结果图

Figure 2. Qualitative test results of potassium dissolving capacity.

由图 3 数据可知菌株 DHD-12、DHD-13、DHD-L、DHD-8、DHD-b、DHD-15、DHD-h、DHD-c 和 DHD-10 均可产生蛋白酶，产酶能力由大到小依次为 DHD-12、DHD-13、DHD-L、DHD-8、DHD-b、DHD-15、DHD-h、DHD-c 和 DHD-10。蛋白酶属于水解酶类，是重要的三大工业用酶之一，应用极其广泛。优良的产蛋白酶微生物产酶量大，产酶能力强，生长快、易于繁殖和培养，分离纯化方法简单，对以后成为高产蛋白酶菌株的研究或其对促生的作用有重要的理论依据^[21]。

由图 4 数据可知菌株 DHD-12、DHD-h、

DHD-15、DHD-L、DHD-13 和 DHD-c 均可产生纤维素酶。产纤维素酶的能力由大到小依次为 DHD-12、DHD-h、DHD-15、DHD-L、DHD-13 和 DHD-c；高活力的纤维素酶可以很好地将植物根际周围的纤维素分解为可溶性的单分子葡萄糖等小分子物质，有助于植物的吸收利用，促进植物的生长发育；添加到动物饲料中，可明显提高动物对饲料的消化率和利用率，促进动物生长。所以，筛选获得高效产纤维素酶的固氮菌在农作物和动物饲养等方面均有巨大的经济效益。

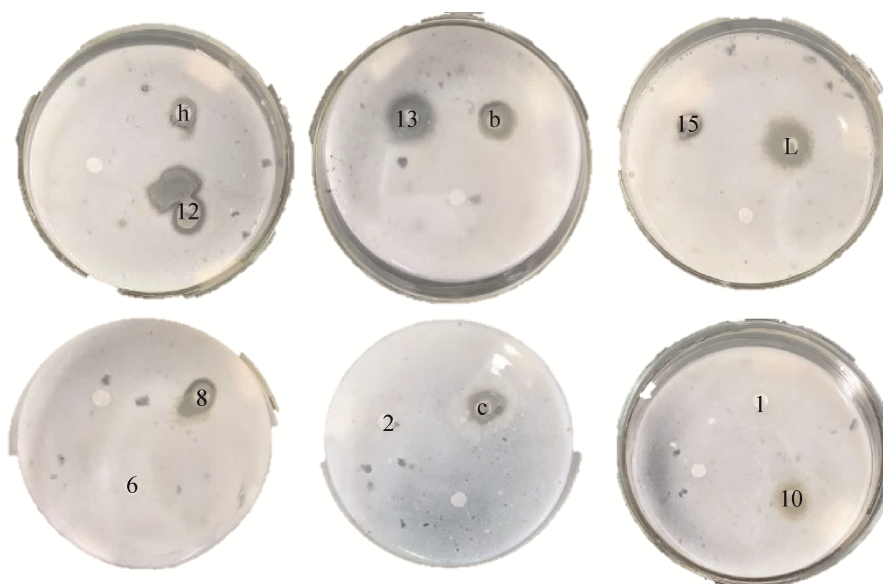


图 3. 产蛋白酶试验结果图

Figure 3. Results of protease production test.

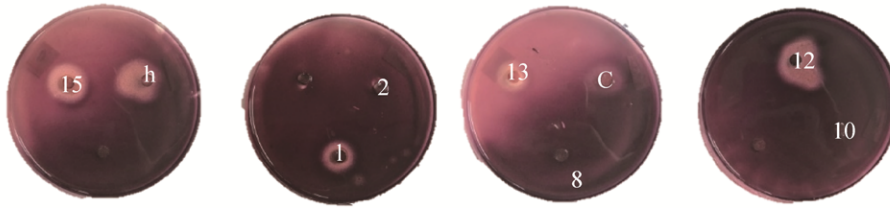


图 4. 产纤维素酶试验结果图

Figure 4. Results of cellulase production.

2.4 促生试验

菜心，十字花科芸薹属，属长日照植物，一年四季均可播种。在南方温暖肥沃疏松的土壤上生长良好，是我国南方的特产蔬菜之一。张春兰等^[22]得出施用生物有机肥能改善设施栽培黄瓜根际生态环境的理化生物性状，促进根系生长，增强作物抗性。高宝岩等^[23]认为施用生物有机肥后微生物产生 IAA、GA 及多种维生素等生理物质，均可刺激和调控植物的生长。由此可知，东海岛沉积物中的优良固氮菌可通过改善菜心根际生态环境的理化生物性状，促进根系生长。此外，菌肥里的微生物可溶磷解钾和产生蛋白酶纤维素酶等生理物质，刺激和调控菜心的生长，增强植株的根系活力。

不同组合的菌剂对菜心的促生强度不一样，如图 5 所示，在第二阶段，相较于对照组，A 到 E 组的茎高增长率为 11.67%、5.67%、1.67%、5.67% 和 12.67%，最大叶长增长率为 29.88%、14.94%、16.09%、20.69% 和 18.39%；A 到 D 组的茎粗增长率为 50.00%、50.00%、30.00% 和 30.00%。在第三阶段，相较于对照组，B 到 E 组的茎高增长率为 16.96%、10.71%、13.69% 和 20.54%，最大叶宽增长率为 6.25%、26.56%、30.47% 和 21.09%；C 到 E 组的茎粗增长率为 41.67%、50.00% 和 41.67%。可得，不同组合菌株对菜心的不同生长

指标的促进效果不同，在茎高指标上，B、D 和 E 组的促生效果最佳；在茎粗指标上，C、D 和 E 组的促生效果最佳；在最大叶宽指标上，C、D 和 E 组的促生效果最佳；在最大叶长指标上，A、D 和 E 组的促生效果最佳。综合上述结果可得，D 和 E 组混合菌剂的促生效果最佳。两组混合菌株中，DHD-12、DHD-13、DHD-15、DHD-c 和 DHD-L 属于 *Bacillus*，DHD-1、DHD-n 和 DHD-h 属于 *Acinetabacter*，因此表明，*Bacillus* 和 *Acinetabacter* 的菌株为优良的促生菌株，对促进菜心的生长有显著效果，对菜心的生长发育起重要作用。

3 结论和讨论

从南海东海岛沉积物中筛选出 18 种固氮菌，大多数为革兰氏阳性菌，少数是革兰氏阴性菌；菌落较小，质地均匀，多呈白色，湿润粘稠易挑起；菌体为杆状、棒状和椭圆形。东海岛沉积物中的固氮菌分布在 2 个门 6 个属，其中不动杆菌属 4 株，假交替单胞菌属 1 株，芽孢杆菌属 8 株，嗜冷杆菌属 1 株，海单胞菌属 1 株，交替单胞菌属 3 株。因此表明东海岛沉积物有丰富的固氮菌微生物资源，其中变形菌门占的比例最高，芽孢杆菌属和不动杆菌属在数量和种类上均为优势菌属，种群分布多样化。

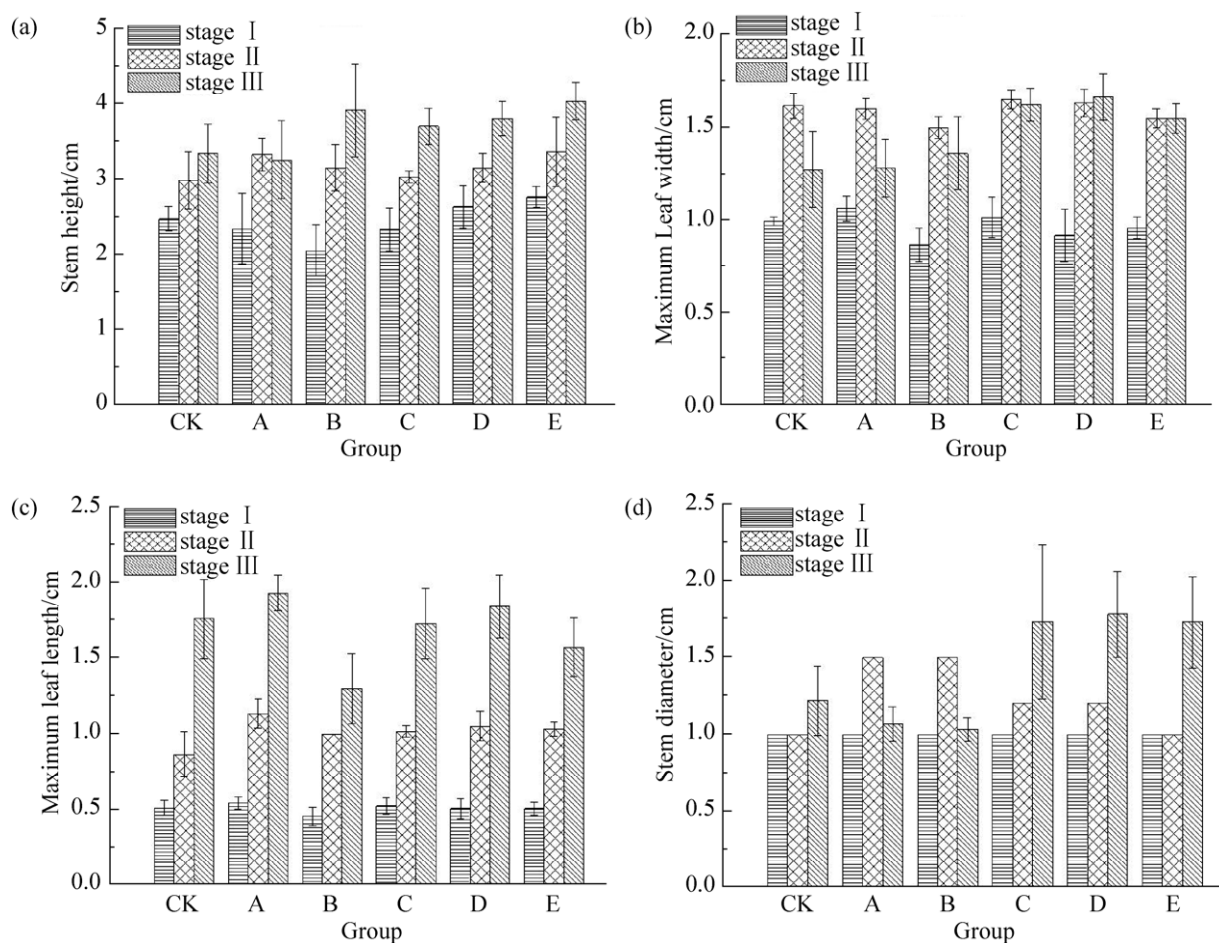


图 5. 组合菌液处理对菜心生长的影响

Figure 5. Effect of combined bacterial solution treatment on the growth of *Brassica campestris* L. a: Effect of combined bacterial solution on Stem height of *Brassica campestris* L; b: Effect of combined bacterial solution on maximum Leaf width of *Brassica campestris* L; c: The effect of combined bacterial liquid on the maximum leaf length of *Brassica campestris* L; d: The effect of combined bacterial liquid on the stem of *Brassica campestris* L. CK: control group; A, B, C, D, E: five groups of different combination of bacteria, combination types as shown in the above 4. Assays were performed in triplicate and data were reported as means±standard deviations.

综合解磷、解钾、产纤维素酶和产蛋白酶 4 项性能，选出 8 个综合性能最佳的固氮菌株对菜心进行盆栽试验，结果表明，菜心幼苗在茎高、茎粗、最大叶宽和最大叶长 4 个生长指标较对照组均有显著提高，表明组合菌剂对菜心生长有显著的促进作用，以 *Bacillus* 和 *Acinetabacter* 在菜心的生长过程中起关键的促进作用，对菜心的促

生性能最佳。由此可得，沉积物中筛选所得的 *Bacillus* 和 *Acinetabacter* 菌株对菜心的促生效果最佳，为优良海洋固氮菌开发成微生物菌肥和应用到促进陆地农作物的生长奠定了坚实的基础；为优良海洋促生微生物菌种资源的定向利用及蔬菜的无公害生产提供重要依据。

本研究中从东海岛近海分离所得的固氮细菌

研究价值极高。其中, *Acinetobacter lactucae* 与 *Acinetobacter pittii* 十分接近, 它们都是净化环境的生物防治类型的有益菌^[1-2], 目前未见关于 *Acinetobacter* 菌属对菜心的生长起促进作用, 这对研究 *Acinetobacter pittii* 的性能多样性具有重要意义。近几年新发现的 *Oceanimonas doudoroffii* 和嗜冷微生物 *Psycrotroba alimentarius* 菌株, 目前在促生作用方面的研究成果较少, 主要集中在基因组序列方面的研究。2016年, Lee J 对从南极岩样中分离出的 *Psycrotroba alimentarius* PAMC 27889 对拟青霉 PAMC 27889 的全基因组进行了研究, 结果表明该全基因组具有萜类生物合成的非甲丙戊酸亚甲基赤藓醇磷酸途径和一个完整的降解苯甲酸的基因簇^[11]; 2017年, Brennan MA 对 *Oceanimonas doudoroffii* ATCC 27123T 的基因组序列进行测序^[13]。因此, 本实验中的 *Psycrotroba alimentarius* 和 *Oceanimonas doudoroffii* 对菜心的促生作用性能具有重大的研究价值和意义。

东海岛近海固氮菌制成的生物菌肥是通过改善栽培菜心的根际微生态环境的理化生物性状, 促进根系生长, 增强作物抗性, 增加了菜心的生物量、叶面积和叶片的叶绿素含量, 同时还增强了植株的根系活力, 有明显的增产效果。目前应用到促进陆地植物生长的固氮菌多从陆地上的土壤、植物根际或植物体内筛选出来的, 将海洋中优良固氮菌运用到促进陆地植物生长的研究较少。本研究结果表明东海岛近海优良固氮菌对菜心具有显著的促生作用。因此, 海洋优良固氮菌可以进一步制成生物菌肥并应用到陆上蔬菜促生方面, 为菜心的无公害生产及优良微生物菌种资源的定向利用提供基础依据, 为海洋固

氮菌生物菌肥应用于促进陆地蔬菜生长打下坚实的基础。

参考文献

- [1] Di FR, Song DH, Liu FL, Yang J. Isolation of marine *Acinetobacter* and its characteristics of petroleum hydrocarbon degradation. *Marine Environmental Science*, 2017, 36(6): 898-904. (in Chinese)
邸富荣, 宋东辉, 刘凤路, 杨劼. 分离海洋不动杆菌及其对石油烃降解性能研究. *海洋环境科学*, 2017, 36(6): 898-904.
- [2] 陈远. 固定化威尼斯不动杆菌与异相 Fenton 体系处理水体中柴油污染. 福建师范大学硕士学位论文, 2017.
- [3] Li J, Li SN, Guo XJ, Zhu Y, Zhu BC. Isolation and identification of antagonistic strain 7-47 against *Verticillium dahliae*. *Cotton Science*, 2009, 21(2): 156-158. (in Chinese)
李佳, 李术娜, 郭晓军, 朱莹, 朱宝成. 一株大丽轮枝菌拮抗细菌 7-47 菌株的分离与鉴定. *棉花学报*, 2009, 21(2): 156-158.
- [4] 畅涛. 生防菌莫海威芽孢杆菌 ZA1 生物学功能及其发酵工艺研究. 甘肃农业大学硕士学位论文, 2014.
- [5] Yang K, Zheng KB, Huang XH, Yuan J, Chen J. Identification and antifungal activity of marine *Bacillus velezensis* strain TCS001. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2018, 20(3): 333-339. (in Chinese)
杨可, 郑柯斌, 黄晓慧, 袁静, 陈杰. 海洋生境贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 的鉴定及抑真菌活性. *农药学报*, 2018, 20(3): 333-339.
- [6] 杨胜清. 贝莱斯芽孢杆菌 S6 的鉴定、发酵条件优化及其生防作用研究. 吉林农业大学硕士学位论文, 2017.
- [7] 王淋敏. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)促生作用的研究. 四川农业大学硕士学位论文, 2017.
- [8] Cai GL, Zhang F, Ouyang YX, Zhao CS, Peng XH, Jiang AM. Research progress on *Bacillus velezensis*. *Northern Horticulture*, 2018, (12): 162-167. (in Chinese)
蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 赵昌松, 彭宣和, 江爱明. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展. *北方园艺*, 2018, (12): 162-167.
- [9] 李海碧. 甘蔗根际假单胞菌的分离鉴定及其对甘蔗的促

- 生作用. 广西大学硕士学位论文, 2017.
- [10] 王国基. 根际促生专用菌肥研制及其对玉米促生作用的研究. 甘肃农业大硕士学位论文, 2014.
- [11] Lee J, Kwon M, Yang JY, Woo J, Lee HK, Hong SG, Kim OS. Complete genome sequence of *Psychrobacter alimentarius* PAMC 27889, a psychrophile isolated from an antarctic rock sample. *Genome Announcements*, 2016, 4(4): e00704–16.
- [12] Yoon JH, Yeo SH, Oh TK, Park YH. *Psychrobacter alimentarius* sp. nov., isolated from squid jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 171–176.
- [13] Brennan MA, Trachtenberg AM, McClelland WD, MacLea KS. Genome sequence of *Oceanimonas doudoroffii* ATCC 27123^T. *Genome Announcements*, 2017, 5(36): e00996–17.
- [14] Rooney AP, Dunlap CA, Flor-Weiler LB. *Acinetobacter lactuca* sp. nov., isolated from iceberg lettuce (*Asteraceae: Lactuca sativa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(9): 3566–3572.
- [15] Rogel-Hernandez MA, Guerrero G, Rincón-Molina CI, Ruiz-Valdiviezo VM, Cisneros-Pérez C, Castañón-Gonzalez JH, López-López A, Martínez-Romero E, Rincón-Rosales R. Genome sequence of *Acinetobacter lactuca* OTEC-02, isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *Genome Announcements*, 2017, 5(21): e00400–17.
- [16] Chen LY, Zhang CX, Xie XW, Feng H. The application and research status of effective biological group EM. *Journal of Microbiology*, 2000, 20(2): 54–55, 59. (in Chinese)
陈丽媛, 张翠霞, 谢玺文, 冯华. 有效微生物群 EM 的应用及研究现状. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 54–55, 59.
- [17] Zang HM, Fan JF, Wang B, Zhou YB. Research progress on marine microbial diversity. *Marine Environmental Science*, 2006, 35(3): 96–100. (in Chinese)
臧红梅, 樊景凤, 王斌, 周一兵. 海洋微生物多样性的研究进展. 海洋环境科学, 2006, 35(3): 96–100.
- [18] Ma YX, Sun T, Wang HY, Wang Y, Zhu Y. Antimicrobial activity in the epiphytic fungi on sea weed species in intertidal zone of Dalian. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, 19(1): 6–9. (in Chinese)
马悦欣, 孙田, 王海燕, 王岩, 朱莹. 大连海区潮间带海藻附生真菌的抗微生物活性. 大连水产学院学报, 2004, 19(1): 6–9.
- [19] 张洪彬. 甘蔗及其根际土壤固氮菌的分离和特性研究. 华南农业大学硕士学位论文, 2016.
- [20] Yuan M, Tan SJ, Sun JG. Isolation and biological properties of endophytic diazotrophs from rice and their influences on rice seedling Cd accumulation. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(19): 3754–3768. (in Chinese)
袁梅, 谭适娟, 孙建光. 水稻内生固氮菌分离鉴定、生物特性及其对稻苗镉吸收的影响. 中国农业科学, 2016, 49(19): 3754–3768.
- [21] Feng AJ, Ye M, Chen PR, Deng MC. Screening and identification of protease strain. *China Condiment*, 2017, 42(11): 49–52. (in Chinese)
冯爱娟, 叶茂, 陈萍柔, 邓毛程. 蛋白酶菌株的筛选与鉴定. 中国调味品, 2017, 42(11): 49–52.
- [22] Zhang CL, Lu WG, Yuan F, Zhu L. Effect of bio-organic fertilizer on reducing the obstacle of continuous cropping of cucumber in protected cultivation. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 1999, 15(6): 67–69. (in Chinese)
张春兰, 吕卫光, 袁飞, 朱林. 生物有机肥减轻设施栽培黄瓜连作障碍的效果. 中国农学通报, 1999, 15(6): 67–69.
- [23] Gao BY, Sui H, Lu W, Zhang YL, Wang DF. Analysis on the action characteristics and application prospect of bio-fertilizer. *Science and Technology of Tianjin Agriculture and Forestry*, 2000, (1): 27–28. (in Chinese)
高宝岩, 隋华, 吕伟, 张余良, 王德芳. 生物肥料的作用特性及应用前景浅析. 天津农林科技, 2000, (1): 27–28.

Diversity and growth promotion of nitrogen-fixing bacteria isolated from the offshore of Donghai Island in the South China Sea

Jiaxin Chen, Huijuan Tan, Nan Lin, Shilin Tan, Haibin Zheng, Xiaoyan Zeng, Hongxu Yuan, Dongmei Lu*

Life Science & Technology School, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] We studied the diversity and crop-growth promotion of marine nitrogen-fixing bacteria and screened for excellent plant rhizosphere-promoting strains. [Methods] We identified the representative strains by morphological, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene sequence alignment analysis. We used strains with excellent properties as the combined bacterial liquids in the pot-planting test. [Results] We isolated a total of 18 nitrogen-fixing bacteria from the offshore of Donghai Island in the South China Sea, which were classified into 9 species of 6 genera, belonging to 4 strains of the genus *Acinetobacter*, 1 strain of the genus *Pseudoalteromonas*, 8 strains of the genus *Bacillus*, 1 strain of the genus *Psycrotobacter*, 1 strain of the genus *Oceanimonas* and 3 strains of the genus *Alteromonas*. The seedlings of Chinese flowering cabbage were irrigated by combined microbial agents. Among them, the strains of the genera *Bacillus* and *Acinetobacter* had a key promoting effect in the growth process of Chinese flowering cabbage, and showed the best growth promoting effect on Chinese flowering cabbage. [Conclusion] This study provides an important basis for the targeted utilization of marine microbial resources and the pollution-free production of vegetables.

Keywords: nitrogen-fixing bacterium, South China Sea offshore, population and species distribution, growth promotion

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the State Spark Program (2013GA780077), by the Guangdong Science and Technology Department Small and Medium-sized Scientific and Technological Enterprises Technology Innovation, Science and Technology Finance Project (2017B010136194), by the Industrial Chain Collaborative Innovation Public Service Platform Project (contract number: Zhanhai 2017 C8B2) and by the Sichuan Education Bureau Project (CC16Z12)

*Corresponding author. Tel: +8613659751618; E-mail: ludongmei@lingnan.edu.cn

Received: 16 April 2019; Revised: 15 July 2019; Published online: 14 January 2020