

一株自生固氮菌的分离鉴定及其对不同品种香蕉的促生特性

徐云龙^{1,2}, 周游², 汪军², 郭立佳², 黄俊生², 杨腊英^{2*}

1. 海南大学植物保护学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南海口 571101

摘要: 为了筛选获得香蕉根际土壤中的高效固氮菌, 本研究利用 Ashby 无氮培养基从海南省霸王岭野生香蕉 (*Musa nana* Lour. sp) 根际土壤中分离了一株固氮菌, 并命名为 BWLY3X-6, 对其进行形态特征、生理生化、16S rRNA 和 *gyrB* 序列分析、固氮特性及对不同香蕉品种的促生能力研究。结果表明: 经鉴定, 菌株 BWLY3X-6 属于固氮菌 *Klebsiella variicola*, 其胞外分泌氨态氮含量为 $(17.98 \pm 1.88) \mu\text{g/mL}$, 固氮酶活性为 $(220.51 \pm 8.21) \text{ng/L}$; 菌株对不同香蕉品种的促生长试验结果表明, 与空白对照和 0.5% 尿素处理相比, 在 BWLY3X-6 菌体 10^6 CFU/mL 与 10^8 CFU/mL 浓度下, 南天黄与巴西蕉的各项生物量均有显著变化 ($P < 0.05$), 其中根长变化量更加明显, 分别增加 43.5% 和 54.6%。本研究筛选获得了具有良好固氮能力的固氮菌, 且该菌株对香蕉具有良好的促生作用, 为其后续在农业生产中的实际应用提供理论基础。

关键词: *Klebsiella variicola*; 胞外氨态氮; 香蕉; 促生长作用

中图分类号: S668.1; S154.3 文献标志码: A

Isolation and Identification of a Nitrogen Fixing Bacteria and Its Growth Promoting Characteristics in Different Banana Varieties

XU Yunlong^{1,2}, ZHOU You², WANG Jun², GUO Lijia², HUANG Junsheng², YANG Laying^{2*}

1. School of Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Integrated Pest Management of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: A nitrogen fixing bacteria strain named BWLY3X-6 was isolated from the rhizosphere soil of wild banana (*Musa nana* Lour. sp) in Hainan, China using Ashby nitrogen free medium, and its morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA and *gyrB* sequence analysis, nitrogen fixation characteristics and growth promoting ability to different banana varieties were studied. The strain was identified as an azotobacter *Klebsiella variicola*, and its extracellular ammonia nitrogen content was $(17.98 \pm 1.88) \mu\text{g/mL}$, nitrogenase activity was $(220.51 \pm 8.21) \text{ng/L}$. The results of the growth promoting test of the strain on different banana varieties showed that, compared with the blank control and 0.5% urea treatment, after inoculation with BWLY3X-6, under the inoculation concentration of 10^6 CFU/mL and 10^8 CFU/mL, there were significant changes in various biomass of *M. acuminata* AAA Cavendish cv. Nantianhuang and *M. acuminata* AAA Cavendish cv. Baxi ($P < 0.05$), with more significant changes in root length, with the increase ratio of 43.5% and 54.6% respectively. In this study, nitrogen fixing bacteria with good nitrogen fixing ability were screened, and this strain had a good promoting effect on banana growth, which would provide a theoretical basis for its subsequent practical application in agricultural production.

Keywords: *Klebsiella variicola*; extracellular ammonia nitrogen; banana; growth promotion

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.05.008

收稿日期 2022-11-16; 修回日期 2023-03-31

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2021YFC2600400); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630042022010); 中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队项目 (No. CATASCXTD202312)。

作者简介 徐云龙 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物资源研究与利用。*通信作者 (Corresponding author): 杨腊英 (YANG Laying), E-mail: layingyang@catas.cn。

截至2022年,中国已成为世界第二大香蕉生产国,香蕉(*Musa nana* Lour.)种植周期短、产量高、见效快、效益好,是我国热带、亚热带地区农业的支柱性产业,但当前由于环境变化以及香蕉枯萎病等问题,对香蕉产业的发展造成了持续的影响,如何促进香蕉产业绿色、安全和可持续发展已成为大家关注的热点问题^[1]。香蕉是对营养素需求最高的水果品种之一^[2],在其所需的养分中,氮元素占据着重要地位,氮能有效地影响植物光合作用过程以及光合同化物在植物各器官中的分布,影响干物质的积累、植物和果实的发育等^[3],香蕉种植者常施用氮肥以最大限度地提高生产力,如在苗期会施入大量氮肥,但是过量使用氮肥不仅会使土壤酸化、盐碱化加剧^[4],而且可能使植株更容易受到病原菌的侵害并且增加植株感病的严重程度,如香蕉枯萎病^[5]。氮肥的主要形式是铵、尿素和硝酸盐,研究表明,硝酸盐肥料降低了镰刀菌枯萎病的严重程度,而铵增加了其严重程度^[6],种种情况表明完全依赖化学氮肥终究不是长久之计。

固氮菌可提高土壤肥力,以分子态氮为氮素营养,将其还原为 NH_3 ,再合成氨基酸、蛋白质,其包括自生固氮菌、共生固氮菌和联合固氮菌3种^[7]。其中共生固氮菌与相应植物形成的固氮共生体系,被认为是自然界中固氮效率最高的自然固氮系统,但是只有与植物互利共生时,才能固定空气中的分子态氮,存在一定的限制性;联合固氮菌是必须生活在植物根际、叶面或动物肠道等处才能进行固氮作用;自生固氮菌广泛存在于自然界的土壤和水中,包括多种生理类型的种类,如光能自养、好氧性的念珠蓝细菌属(*Nostoc*),光能自养、专性厌氧的着色菌属(*Chromatium*),光能异养、兼性厌氧的红螺菌属(*Rhodospirillum*),化能异养、好氧性的固氮菌属(*Azotobacter*),化能异养、专性厌氧的巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*)和化能异养、兼性厌氧的克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)等。相比于其他类型的固氮菌,自生固氮菌虽然固氮效率较低,但其对环境适应能力强,不依附于植物而生存,自身能从空气中吸收氮气,繁殖后代,并且死亡后,细胞蛋白质在土壤中矿化,仍然有助于植物的氮素利用,自生固氮菌作为植物促生菌(PGPR)^[8],不仅可以通过固氮作用提高氮的利用率促进植物生长^[9],还能提高对磷素的利用率^[10],更有研究表明,

固氮菌的存在能影响土壤中碳元素和硫元素的含量比重,加速土壤中残留有机物的矿化,从而减少植物根系对土壤中重金属离子的吸收^[11],此外,固氮菌还可以通过合成植物相关生长激素直接影响植物生长,这些激素不仅可以促进植物生长和养分吸收,还可以间接保护宿主植物免受植物病原菌的影响,并刺激其他有益的根际微生物^[12-13],对于改良土壤有机氮含量,增加农作物产量有着不可忽视的作用。

本研究从海南省霸王岭野生香蕉(*Musa nana* Lour. sp)根际土壤中分离出一株自生固氮菌BWLY3X-6(本实验室自主命名),通过对其分离纯化、固氮酶基因*nifH*的检测、16S rRNA序列及*gyrB*序列鉴定,明确其种属关系;通过靛酚蓝-分光光度法和微生物固氮酶试剂盒分别测定其固氮能力和酶活,并以不同香蕉品种作为试验对象,研究其在一定浓度范围内对香蕉生长的促生影响,以期为该菌株的田间应用提供理论依据和科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 自生固氮菌BWLY3X-6分离自以“Z”字型取样法挖取的海南省霸王岭的野生香蕉(*Musa nana* Lour. sp)根际土壤^[14]。

1.1.2 供试香蕉品种 供试香蕉品种为五叶一心的巴西蕉(*Musa acuminata* AAA Cavendish cv. Baxi)与南天黄(*M. acuminata* AAA Cavendish cv. Nantianhuang)杯苗,均由中国热带农业科学院种苗组培中心提供。

1.1.3 培养基 LB培养基:胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 10 g、琼脂粉15 g、ddH₂O定容至1000 mL,调节pH至7.0~7.2。

Ashby无氮培养基:甘露醇10 g、KH₂PO₄ 0.2 g、MgSO₄·7H₂O 0.2 g、NaCl 0.2 g、CaSO₄·2H₂O 0.1 g、CaCO₃ 5 g、琼脂粉15~20 g、ddH₂O定容至1000 mL,调节pH至7.2~7.4。

生理生化鉴定所用培养基配制参照《微生物学实验》^[15]中的方法。

1.1.4 主要试剂 2×Taq PCR Mix购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA maker购自天根生化科技(北京)有限公司;Goldview核酸染料、5×TBE溶液,均购自biosharp生物科技有限公司;微生物固氮酶(nitrogenase)ELISA试剂盒购自

炼石商城;其余所用试剂均为分析纯。

1.1.5 主要仪器 梅特勒-托利多电子天平 PL303-IC, 单人单面超净工作台 SW-CJ-1FD, 智能生物显微镜 NI/E, 透射电子显微镜 HT7700, 台式冷冻离心机 Eppendorf 5810R, 紫外分光光度计 UV2600, 微量紫外分光光度计 ND2000C, 梯度 PCR 仪 Arktik96, 凝胶成像系统 Fire Read, 电泳仪电源 DYY-6C。

1.2 方法

1.2.1 自生固氮菌的分离与鉴定 (1) 自生固氮菌的初筛与纯化。提前准备好装有 90 mL 灭菌水的三角瓶若干, 精确称取 10 g 挖取的土壤^[16], 分别置于三角瓶中, 于室温下、180 r/min 震荡 20~30 min, 震荡完毕后取出, 将其中的悬浊液稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三个数量级, 吸取不同稀释倍数的悬浊液各 100 μ L, 滴加于 Ashby 无氮固体培养基中, 涂棒涂抹均匀, 每个稀释倍数重复 3 次, 置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 2~3 d, 观察。挑取长势优的单菌落在 LB 固体培养基上对其进行纯化, 采用平板划线法进行反复划线, 培养、观察其单菌落形态, 得到纯菌落后甘油保存, 便于后续试验。

(2) 自生固氮菌的鉴定。形态学观察: 将筛选的单菌落接种于液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 10 h, 取 5 μ L 菌液吸附于铜片^[17]制片, 在透射电子显微镜下观察自生固氮菌形态。

生理生化鉴定: 对分离菌株进行葡萄糖氧化发酵试验、柠檬酸盐试验、甲基红 (M.R.) 试验、吲哚试验、硝酸盐还原试验、过氧化氢酶试验、明胶液化试验, 具体方法参照《微生物学实验》^[15]。

固氮酶基因 *nifH*、16S rRNA 序列与 *gyrB* 序列鉴定: 参考碱裂解法^[18]提取固氮菌菌株 DNA。固氮酶基因 *nifH* 扩增引物为 *nifH* P1 (5'-GGCTGCGATCCVAAGGCCGAYTCVACCCG-3') 和 *nifH* P2 (5'-CTGVGCCTTGTTYTCGCGGATSGGCATGGC-3')。16S rRNA 序列 PCR 扩增引物为 27F (5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3') 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'); *gyrB* 基因序列扩增引物为 UP-1 (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYG A-3') 和 UP-2r (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNCRCTCNGTCAT-3')。反应体系为: 模板 1 μ L, 10 mmol/L 引物各 1 μ L, 2 $\times$ Taq PCR Mix 12.5 μ L, 用 ddH₂O 补至 25 μ L。16S rRNA 序列 PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C

变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。 *gyrB* 序列 PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。反应结束后对产物分别进行回收, 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 使用 NCBI 进行序列比对, 同时通过 MEGA 7.0.26 软件对菌株构建系统发育树, 结合形态学观察结果与生理生化鉴定的结果确定菌株种属。

1.2.2 菌株固氮能力测定 采用靛酚蓝-分光光度法测定自生固氮菌的固氮能力, 参考梁剑光等^[19]优化后的方法进行测定。

(1) 检测试剂的配制。所用试剂包括氨态氮标准液、1.25%亚硝基铁氰化钠溶液、溶液 A、溶液 B。氨态氮标准液: 精确称取 0.2358 g (NH₄)₂SO₄ 溶于 100 mL 水中, 得到氨态氮含量为 500 μ g/mL 的氨态氮原液, 再将其稀释 10 倍, 得含量为 50 μ g/mL 的氨态氮标准液。

1.25%亚硝基铁氰化钠溶液: 精确称取 0.3622 g Na₂Fe(CN)₅NO $\cdot$ 2H₂O, 加水定容到 25 mL, 于 4 $^{\circ}$ C 存放, 所用试剂为国产分析纯。

溶液 A: 精确称取 5.00 g 苯酚, 量取 2 mL 1.25%亚硝基铁氰化钠溶液, 混合溶于 500 mL 水中, 遮光 4 $^{\circ}$ C 保存 (暴露光照中呈现红棕色)。

溶液 B: 精确称取 2 g C₆H₅Na₃O₇、2.50 g NaOH, 量取 3.5 mL NaClO, 混合溶于 500 mL 水中, 遮光 4 $^{\circ}$ C 存放。

(2) 氨态氮标准曲线的制定。取 11 支试管, 依次编号, 按表 1 中加入相应的各种试剂, 涡旋混合均匀, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中, 显色反应 20 min, 取出冷却至室温, 于 637 nm 波长下测定其 OD 值, 观测记录数据, 绘制氨态氮标准曲线 (图 1), 对应方程为 $y=0.0633x+0.0649$ ($R^2=0.9973$)。

(3) 样品的制备。将固氮菌菌体按照 1% 的接种量接种于 Ashby 液体培养基中, 在无氮环境下, 固氮菌会利用空气中的氮气进行固氮作用, 将大气中的氮还原成氨, 氨极易溶于水, 菌体在 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床中培养约 20 h 后, 将其取出, 吸取部分液体于 8000 r/min 下离心 10 min, 取 100 μ L 上清液, 收集至无菌 EP 管中即为待测样品, 重复 3 次^[20]。

按 1.2.2-(2) 中所述, 取待测样品, 加入相应试剂, 显色测定其 OD₆₃₇ 值。

表 1 氨态氮标准曲线的构建
Tab. 1 Establishment of ammonia nitrogen standard curve

编号 No.	标准液 Standard solutions/ μL	溶液 A Solution A/ mL	溶液 B Solution B/ mL	无菌水 Sterile water/ mL	氨氮量 Ammoniacal nitrogen content/ μg
CK	0	5	5	100	0
1	10	5	5	90	0.5
2	20	5	5	80	1.0
3	30	5	5	70	1.5
4	40	5	5	60	2.0
5	50	5	5	50	2.5
6	60	5	5	40	3.0
7	70	5	5	30	3.5
8	80	5	5	20	4.0
9	90	5	5	10	4.5
10	100	5	5	0	5.0

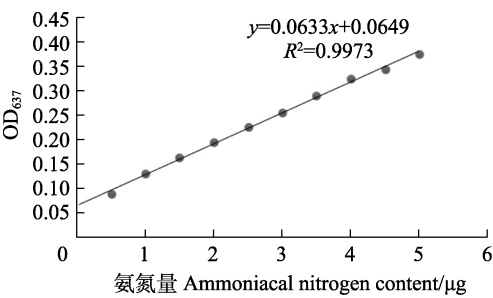


图 1 氨态氮标准曲线
Fig. 1 Ammonia nitrogen standard curve

1.2.3 固氮酶活性的测定 采用微生物固氮酶（nitrogenase）ELISA 试剂盒（酶标生物）测定菌株固氮酶活性，按试剂盒说明书进行测定。

1.2.4 自生固氮菌对香蕉的促生作用 （1）自生固氮菌 BWLY3X-6 的培养。处理方法参考程杰杰等^[21]的方法，略有改动，将供试菌株接种于灭菌液体 LB 培养基中，接种量为 1%，置于 37℃、180 r/min 摇床中摇培约 10 h（涂布 LB 平板计算其浓度约为 3.73×10^8 CFU/mL），然后在冷冻离心机中以 4000 r/min 离心 10 min，弃上清液，以无菌水重悬菌体沉淀，重复 2 次，最后将重悬的菌液稀释为 10^4 、 10^6 、 10^8 CFU/mL 三个不同浓度梯度，备用。

（2）不同香蕉品种的接种处理。不同香蕉品种之间分别设置 5 个处理：空白对照、0.5% 尿素、固氮菌菌液 3 个浓度梯度（ 10^4 、 10^6 、 10^8 CFU/mL），每个处理 5 株苗，重复 3 次。处理期间每天按时向杯苗中补充适量水分，保证其土壤的湿润环境，

每隔 3 d 对试验香蕉的茎基部施加 1 次固氮菌菌液，每次每株为 1 mL，空白对照施加等量无菌水，尿素处理施加等量 0.5% 尿素，共计接种 14 次。香蕉盆栽杯苗经处理 60 d 后，测定每株香蕉的株高、茎高、茎围、根长、地上部鲜重与地下部鲜重^[22]。

1.3 数据处理

利用 Excel、SPSS 26 软件进行试验数据统计与差异显著性分析，利用 MEGA 7 软件构建系统发育树，利用 GraphPad Prism 8 软件制图。

2 结果与分析

2.1 固氮菌的分离与鉴定

2.1.1 固氮菌分离、形态观察及生理生化特征 在野生香蕉根际土壤中经 Ashby 无氮固体培养基多次筛选后得到菌株 BWLY3X-6。菌落在 LB 平板上呈淡黄色不透明状，外表圆形且湿润，边缘清晰，易挑起（图 2）。透射电镜下观察到菌体为杆状，有荚膜，无鞭毛，菌体大小约为 $2.78\ \mu\text{m}\times 1.14\ \mu\text{m}$ （图 3）。葡萄糖氧化发酵试验阳性，柠檬酸盐试验阳性，硝酸盐还原试验阴性，产吡啶试验阳性，接触酶试验阳性，明胶液化试验阳性，甲基红（M.R）试验阴性。



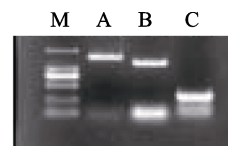
图 2 菌株 LB 平板形态
Fig. 2 LB plate morphology of strains



图 3 菌株透射电镜照片
Fig. 3 Transmission electron micrograph of the strain

2.1.2 固氮酶基因 *nifH* 的检测及基于 16S rRNA 与 *gyrB* 序列的系统发育分析 利用固氮酶基因 *nifH* 引物从 BWLY3X-6 菌株基因组序列中扩增获得 307 bp 的片段 (图 4)。BWLY3X-6 菌株的 16S rRNA 与 *gyrB* 序列长度分别为 1445、1187 bp。采用邻位法构建生物系统发育树, 基于 16S rRNA 序列构建的系统发育树中, 与菌株同源性最高的是 *Klebsiella variicola* strain 03-311-0071, 相似度达 99.65% (图 5); 基于 *gyrB* 序列构建的系统发育树中, 与菌株同源性最高的是 *K. variicola* strain LMG 23571, 其相似度达 99.83% (图 6)。

综合形态特征、生理生化特征、*nifH* 基因检测及 16S rRNA、*gyrB* 序列的分析结果, 将 BWLY3X-6 菌株鉴定为 *Klebsiella variicola*。



M: DL2000 DNA marker; A: 16S rRNA; B: *gyrB*; C: *nifH*.

图 4 菌株 BWLY3X-6 的 16S rRNA、*gyrB* 及固氮酶基因 *nifH* 的 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplification results of 16S rRNA, *gyrB* and *nifH* of nitrogenase gene of BWLY3X-6

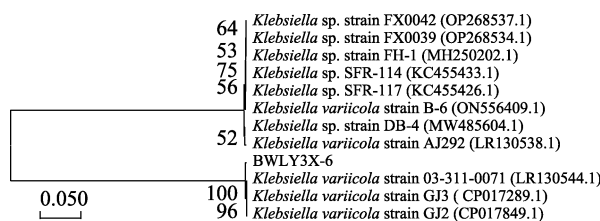


图 5 菌株基于 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strains based on 16S rRNA

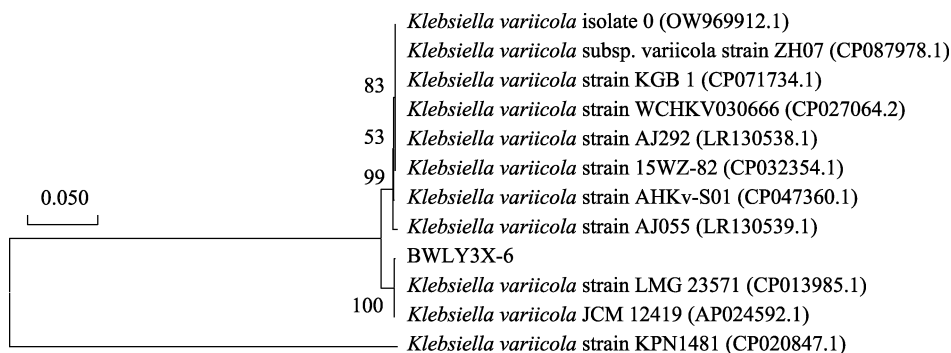


图 6 菌株基于 *gyrB* 序列构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of strains based on *gyrB* sequences

2.2 菌株固氮能力

2.2.1 菌株分泌氨态氮含量 通过测得吸光度, 代入标准曲线得到氨态氮含量, 经计算, 菌株分泌的氨态氮含量为 $(17.98 \pm 1.88) \mu\text{g/mL}$ 。

2.2.2 菌株固氮酶活性 经固氮酶活性测定, 菌株 BWLY3X-6 的固氮酶活性为 $(220.51 \pm 8.21) \text{ng/L}$, 表明该菌株有较强的自生固氮能力。

2.3 菌株 BWLY3X-6 对不同香蕉品种的促生作用

如表 2 所示, 施用菌液浓度为 10^6CFU/mL 时对南天黄香蕉的促生作用最明显, 与 CK 相比, 除茎高与地下部鲜重外, 其余生物量指标间均呈显著差异, 其中株高增加 25.9%, 茎围增加 18.2%, 根长增加 43.5%, 地上部鲜重增加 46.3%; 与尿素处理相比, 呈显著差异的生物量指标中, 施用菌液浓度为 10^6CFU/mL 的株高增加 25.5%, 茎围增加 19.0%, 根长增加 53.8%, 地上部鲜重增加 54.7%,

地下部鲜重增加 37.7%, 高浓度时促生效果反而有所下降。

而对于巴西蕉而言, 如表 3 所示, 菌液低浓度时促生效果不明显, 甚至与 CK 相比在一定程度上有所抑制, 而施用菌液浓度在 10^6 、 10^8CFU/mL 时均有明显促生作用, 与 CK 相比, 各项生物量指标均呈显著差异, 其中 10^8CFU/mL 处理的株高增加 37.8%, 茎高增加 26.3%, 茎围增加 28.5%, 根长增加 54.6%, 地上部鲜重增加 68.6%, 地下部鲜重增加 84.3%; 与尿素处理相比, 呈显著差异的生物量指标中, 10^8CFU/mL 处理的茎围增加 11.7%, 根长增加 69.6%, 地上部鲜重增加 29.6%, 地下部鲜重增加 49.7%。表明菌株 BWLY3X-6 对南天黄和巴西蕉均具有显著促生长作用, 且对巴西蕉的促生作用较南天黄更有优势, 而各项生物量变化中, 根长变化量最明显, 菌株 BWLY3X-6 对植株根部的作用效果显著。

表 2 不同处理下香蕉品种南天黄的生物量

Tab. 2 Biomass of banana variety *M. acuminata* AAA Cavendish cv. Nantianhuang under different treatments

处理 Treatment	株高 Plant height/cm	茎高 Stem height/cm	茎围 Stem girth/cm	根长 Root length/cm	地上部鲜重 Aboveground fresh weight/g	地下部鲜重 Underground fresh weight/g
CK	20.36±3.46 ^c	8.89±1.17 ^a	2.96±0.39 ^b	16.29±3.43 ^b	9.04±3.54 ^b	2.88±0.83 ^{ab}
10 ⁴ CFU/mL	22.42±2.06 ^{bc}	8.92±0.64 ^a	2.97±0.23 ^b	17.83±2.34 ^b	8.84±1.53 ^b	2.83±0.82 ^{ab}
10 ⁶ CFU/mL	25.64±3.32 ^a	9.53±2.02 ^a	3.50±0.67 ^a	23.37±5.58 ^a	13.23±4.49 ^a	3.54±0.88 ^a
10 ⁸ CFU/mL	23.62±2.90 ^{ab}	9.25±1.36 ^a	2.95±0.32 ^b	16.23±2.06 ^b	9.39±3.15 ^b	2.37±0.58 ^b
0.5%尿素	20.43±2.96 ^c	9.32±1.03 ^a	2.94±0.25 ^b	15.19±4.75 ^b	8.55±1.77 ^b	2.57±0.81 ^b

注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

表 3 不同处理下香蕉品种巴西蕉的生物量

Tab. 3 Biomass of banana variety *Musa acuminata* AAA Cavendish cv. Baxi under different treatments

处理 Treatment	株高 Plant height/cm	茎高 Stem height/cm	茎围 Stem girth/cm	根长 Root length/cm	地上部鲜重 Aboveground fresh weight/g	地下部鲜重 Underground fresh weight/g
CK	18.09±2.79 ^c	7.86±1.79 ^c	2.53±0.38 ^c	14.35±3.88 ^{bc}	6.80±3.28 ^b	1.34±0.37 ^c
10 ⁴ CFU/mL	17.95±2.26 ^c	7.92±0.54 ^{bc}	2.31±0.15 ^c	17.38±3.38 ^b	4.33±0.61 ^c	1.25±0.23 ^c
10 ⁶ CFU/mL	21.36±2.04 ^b	8.30±1.05 ^{bc}	3.03±0.16 ^{ab}	22.19±3.35 ^a	7.86±1.38 ^b	1.33±0.10 ^c
10 ⁸ CFU/mL	24.92±2.87 ^a	9.93±0.98 ^a	3.25±0.44 ^a	15.64±3.08 ^{bc}	11.47±3.36 ^a	2.47±0.33 ^a
0.5%尿素	23.49±1.65 ^{ab}	9.11±1.19 ^{ab}	2.91±0.28 ^b	13.08±2.09 ^c	8.85±1.40 ^b	1.65±0.34 ^b

注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

生物固氮过程通过高度敏感的细菌酶将大气中的氮气转化为氨，从而提供生态上可接受的矿质氮肥的补充或替代品，本研究通过靛酚蓝—分光光度法对菌株的固氮能力进行测定，与曹晶晶^[23]所筛菌株的分泌氨态氮含量（9.8 μg/mL）和李琼洁等^[24]所筛菌株的分泌氨态氮含量（2.51 μg/mL）相比，证明本研究所筛菌株具有更强的固氮能力，在无氮环境下也能通过自身固氮作用维持自身生长，丰富了高效固氮微生物接种剂菌种资源库。

随着对固氮菌研究的深入，人们发现通过接种固氮菌，作物产量得到了显著提高^[25]。据BHATTACHARJEE等^[26]报道，在田间条件下，使用固氮菌作为生物肥料可以提高各种作物的生长和产量，与传统肥料相比，花椰菜和玉米的增幅分别高达 40%和 15%~20%。而魏春燕等^[27]、尹坤等^[28]的研究分别证明了变栖克雷伯氏菌对甘蔗、水稻具有明显的促生效应。目前，国内外关于固氮菌对香蕉品种促生长作用的报道较少，本研究从野生香蕉根际土壤中分离的自生固氮菌 *Klebsiella variicola* 分别接种于南天黄和巴西蕉盆栽苗后，多项生物量指标呈显著性差异，这与 LIN

等^[29]的研究结果相似，证明菌株 BWLY3X-6 对南天黄和巴西蕉生长具有显著的促生长作用，其中又以根长变化最为显著，分别增加 43.5%和 54.6%。香蕉根部在植株发育过程中发挥着重要作用，不仅可以吸收营养物质还能起到固定植株的作用，推测分离菌株主要通过影响香蕉根部来实现对香蕉的促生作用。

4 结论

本研究从分离的自生固氮菌 *Klebsiella variicola* 成功克隆到固氮酶基因 *nifH*，从分子水平上证明了分离菌株具有固氮的遗传基础，固氮促生试验证明了该菌株对不同香蕉品种均具有显著的促生效果，在一定程度上为固氮菌在香蕉种植管理上的应用提供参考，但由于本研究所用材料为盆栽杯苗，所以存在一定的局限性，其在大田中的应用效果还有待于进一步的验证。

参考文献

[1] 邹冬梅, 范琼. 世界香蕉生产、贸易现状与产业展望[J]. 广东农业科学, 2022, 49(7): 131-140.
ZOU D M, FAN Q. World banana production, trade status

- and industry outlook[J]. Guangdong Agricultural Science, 2022, 49(7): 131-140. (in Chinese)
- [2] GANESHAMURTHY A N, SATISHA G C, PATIL P. Potassium nutrition on yield and quality of fruit crops with special emphasis on banana and grapes[J]. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 2011, 24(1): e91.
- [3] TAI Z L, ZEIGER E, MØLLER I M, MURPHY A. Plant physiology and development[M]. Sinauer Associates Inc, 2014.
- [4] 王雯清. 香蕉苗期有机氮替代部分无机氮施用效果及减氮响应研究[D]. 海口: 海南大学, 2020.
- WANG W Q. Study on the application effect of organic nitrogen replacing part of inorganic nitrogen in banana seedling stage and nitrogen reduction response[D]. Haikou: Hainan University, 2020. (in Chinese)
- [5] SEGURA-MENA R A, STOOORVOGEL J J, GARCÍA-BASTIDAS F, SALACINAS-NIEZ M, KEMA G H J, SANDOVAL J A. Evaluating the potential of soil management to reduce the effect of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in banana (*Musa AAA*)[J]. European Journal of Plant Pathology, 2021, 160(2): 441-455.
- [6] ZHOU J Y, WANG M, SUN Y M, GU Z C, WANG R R, SAYDIN A, SHEN Q R, GUO S W, CALVO A. Nitrate increased cucumber tolerance to *Fusarium* wilt by regulating fungal toxin production and distribution[J]. Toxins, 2017, 9(3): 100.
- [7] 黄淑芬, 郜晨, 刘丽辉, 谭志远, 彭桂香. 植物内生固氮菌系统发育进化新进展[J]. 微生物学报, 2018, 45(1): 181-190.
- HUANG S F, GAO C, LIU L H, TAN Z Y, PENG G X. New progress in phylogeny and evolution of endophytic nitrogen fixing bacteria in plants[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 181-190. (in Chinese)
- [8] KUMAR V, KUMAR M, SHARMA S, PRASAD R. Probiotics and plant health[M]. Singapore: Springer, 2017.
- [9] DIN M, NELOFER R, SALMAN M, ABDULLAH, KHAN F H, KHAN A, AHMAD M, JALIL F, DIN J U, KHAN M. Production of nitrogen fixing azotobacter (SR-4) and phosphorus solubilizing *Aspergillus niger* and their evaluation on *Lagenaria siceraria* and *Abelmoschus esculentus*[J]. Biotechnology Reports, 2019, 22(1): e00323.
- [10] KULANDAIVELU V, RADHA V, GAUTAM C, LATA N, ARUN K, KUMAR S A. Trichoderma-azotobacter biofilm inoculation improves soil nutrient availability and plant growth in wheat and cotton[J]. Journal of Basic Microbiology, 2019, 59(6): 632-644.
- [11] KIZILKAYA R. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* sp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils[J]. Journal of Environmental Biology, 2009, 30(1): 73-82.
- [12] ARORA M, SAXENA P, ABDIN M Z, VARMA A. Interaction between *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* governs better plant physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua* L. plants grown under *in vitro* conditions[J]. Symbiosis, 2018, 75(2): 103-112.
- [13] SAHOO R K, ANSARI M W, DANGAR T K, MOHANTY S, TUJETA N. Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement[J]. Protoplasma, 2014, 251(3): 511-523.
- [14] 凌娟, 董俊德, 张燕英, 杨志浩, 王友绍. 一株红树林根际固氮菌的分离、鉴定以及固氮活性测定[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 149-153.
- LING J, DONG J D, ZHANG Y Y, YANG Z H, WANG Y S. Isolation, identification and determination of nitrogen-fixing activity of a mangrove rhizosphere nitrogen-fixing bacteria[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(5): 149-153. (in Chinese)
- [15] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- ZHAO B, HE S J. Microbiology experiment[M]. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [16] 张军, 彭铁楠, 郭琪, 王沛雅, 李鑫, 杨晖. 杂交构树根际固氮菌的分离与特性研究[J]. 林业科学研究, 2021, 34(3): 187-193.
- ZHANG J, PENG Y N, GUO Q, WANG P Y, LI X, YANG H. Isolation and characterization of nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of hybrid *Broussonetia papyrifera*[J]. Forestry Science Research, 2021, 34(3): 187-193. (in Chinese)
- [17] 魏玉利, 邹宁. 光合细菌的透射电镜观察[J]. 生命科学仪器, 2007(5): 16-18.
- WEI Y L, ZOU N. Transmission electron microscopic observation of photosynthetic bacteria[J]. Life Science Instruments, 2007(5): 16-18. (in Chinese)
- [18] 迟原龙, 唐垚, 金璐, 张凤, 姚开, 何强. 采用碱裂解法提取 DNA 鉴定细菌和酵母菌[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 177-180.
- CHI Y L, TANG Y, JIN L, ZHANG F, YAO K, HE Q. DNA was extracted by alkaline lysis method to identify bacteria and yeasts[J]. Food Research and Development, 2018, 39(2): 177-180. (in Chinese)
- [19] 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, 2006(9): 134-137.
- LIANG J G, ZHU L, XU Z J. Study on the determination of

- ammonia nitrogen in fermentation broth by indophenol blue spectrophotometry[J]. Food and Fermentation Industry, 2006(9): 134-137. (in Chinese)
- [20] 侯胜强. 固氮斯氏假单胞菌 A1501 铵转运基因 *amtB* 的结构分析和功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- HOU S Q. Structural analysis and functional study of ammonium transporter gene *amtB* of *Pseudomonas-stutzeri* A1501[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007. (in Chinese)
- [21] 程杰杰, 殷超凡, 萨尔山别克·热阿合曼, 孙帅欣, 陈云鹏. 固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 对玉米和水稻的促生作用及其根际定殖动态[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(2): 33-37.
- CHENG J J, YIN C F, SALSHANBEK R, SUN S X, CHEN Y P. The growth promotion and rhizosphere colonization dynamics of nitrogen fixing bacteria *Kosakonia radiocitans* GXGL-4A on maize and rice[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2018, 46(2): 33-37. (in Chinese)
- [22] 汪军, 潘江禹, 毛超, 戴青冬, 刘一贤, 张建华, 郭立佳, 黄俊生. 土壤物理因素和栽培方式对淡紫拟青霉 E7 在香蕉根际定殖和促生作用的影响[J]. 果树学报, 2013, 30(2): 274-280.
- WANG J, PAN J Y, MAO C, DAI Q D, LIU Y X, ZHANG J H, GUO L J, HUANG J S. Effects of soil physical factors and cultivation methods on the colonization and growth promotion of *Paecilomyces lilacinus* E7 in banana rhizosphere[J]. Journal of Fruit Trees, 2013, 30(2): 274-280. (in Chinese)
- [23] 曹晶晶. 极耐盐碱固氮菌的分离鉴定与固氮特性研究[D]. 宁夏: 宁夏大学, 2021.
- CAO J J. Isolation, identification and nitrogen fixation characteristics of nitrogen fixing bacteria with extreme salt and alkali resistance[D]. Ningxia: Ningxia University, 2021. (in Chinese)
- [24] 李琼洁, 程杰杰, 孙帅欣, 陈云鹏. 玉米联合固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 的分离鉴定与固氮特性研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2456-2463.
- LI Q J, CHENG J J, SUN S X, CHEN Y P. Isolation, identification and nitrogen fixation characteristics of corn associated nitrogen fixation bacteria *Kosakonia radiocitans* GXGL-4A[J]. Microbiology Bulletin, 2016, 43(11): 2456-2463. (in Chinese)
- [25] RAZMJOOEI Z, ETEMADI M, ESHGHI S, RAMEZANIAN A, ABARGHUEI F M, ALIZARGAR J. Potential role of foliar application of azotobacter on growth, nutritional value and quality of lettuce under different nitrogen levels[J]. Plants, 2022, 11(3): 406-406.
- [26] BHATTACHARJEE R, DEY U. Biofertilizer, a way towards organic agriculture: a review[J]. African Journal of Microbiology Research, 2014, 8(24): 2332-2343.
- [27] 魏春燕, 邢永秀, 林丽, 杨丽涛, 李杨瑞, 胡春锦. 接种变栖克雷伯氏菌 DX120E 对不同甘蔗品种的促生效应[J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 2085-2092.
- WEI C Y, XING Y X, LIN L, YANG L T, LI Y R, HU C J. Growth promoting effect of inoculation of *Klebsiella mutans* DX120E on different sugarcane varieties[J]. Journal of Applied Ecology, 2014, 25(7): 2085-2092. (in Chinese)
- [28] 尹坤, 阳洁, 顾文杰, 袁涛, 谭志远. 岑溪药用野生稻高效内生固氮菌分离及促生特性[J]. 微生物学通报, 2015, 42(8): 1482-1491.
- YIN K, YANG J, GU W J, YUAN T, TAN Z Y. Isolation and growth promoting characteristics of highly effective endophytic nitrogen fixing bacteria from Cenxi medicinal wild rice[J]. Microbiology Bulletin, 2015, 42(8): 1482-1491. (in Chinese)
- [29] LIN B, LIU J, LV Z, LUO M, LIN Z. Preparation and properties of immobilized particles containing highly efficient nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* GN02 cells isolated from the *Pennisetum giganteum* z. x. Lin roots[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2020, 56(1): 58-63.