

# 一株拮抗病原真菌的固氮菌 *Paenibacillus* sp. GD812

陈倩, 高淼, 胡海燕, 徐晶, 周义清, 孙建光

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 / 农业部作物营养与施肥重点实验室, 北京 100081)

**摘要:**【目的】筛选具有拮抗病原真菌功能的固氮菌, 研究菌株的固氮酶活性、*nifH*、生理生化特征、菌株抗逆性与接种效果等, 并对该菌株进行鉴定, 为微生物肥料生产筛选菌种资源。【方法】采用无氮培养基富集、筛选固氮菌, 用对峙法筛选拮抗菌; 乙炔还原法测定固氮酶活性, PCR扩增 16S rDNA和*nifH*; 通过形态、生理生化特征和 16S rDNA序列分析鉴定菌种; 采用温室盆栽小白菜试验接种效果。【结果】筛选到 1 株固氮菌GD812, 该菌株固氮酶活性达到 30.661 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg蛋白, 同时具有拮抗麦类赤霉病菌 (*Gibberella zeae*) 和棉花黄萎病菌大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 功能, 抑菌率分别达到 59.5%和 49.3%; 根据形态、生理生化特征和 16S rDNA序列分析结果, GD812 被鉴定为类芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp.; 该菌株的 *nifH*基因长度 300 bp, 与 *Paenibacillus* sp. Bs57 *nifH*基因序列相似性 98%; GD812 可以利用 35 种供试碳源中的 20 种, 耐酸碱pH4—11, 在 4—50℃均可生长, 盆栽试验接种比对照小白菜鲜重增加 52%。【结论】固氮菌GD812 被鉴定为类芽孢杆菌, 该菌株利用碳源广泛, 抗逆性强, 具有较高的固氮酶活性和拮抗病原真菌能力, 盆栽试验显示较好的接种效果, 可望进一步研发成为优良的固氮微生物肥料生产菌种。

**关键词:** 生物固氮; 类芽孢杆菌; 菌种筛选; 微生物肥料

## A Nitrogen-Fixing Bacterium *Paenibacillus* sp. GD812 Antagonistic Against Plant Pathogenic Fungi

CHEN Qian, GAO Miao, HU Hai-yan, XU Jing, ZHOU Yi-qing, SUN Jian-guang

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization of Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of this study is to screen nitrogen-fixing bacteria antagonistic against plant pathogenic fungi and research nitrogenase activity, *nifH*, physiological and biochemical characteristics, identification, stress resistance of the functional strains and inoculation effect on plant and to prepare strains for microbial fertilizer production. 【Method】 Nitrogen-free medium was used to isolate nitrogen-fixers and confrontation method was used to screen antagonistic bacteria against plant pathogenic fungus. Nitrogenase activity was determined with acetylene reduction assay. 16S rDNA and *nifH* were amplified with PCR. Strain identification was carried out based on the morphology, physiology, and biochemical test and 16S rDNA sequence analysis. Microbial inoculation effect on plant was tested with a pot culture in green house. 【Result】 One strain designated as GD812 was selected, which showed nitrogenase activity 30.661 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg protein, and strongly antagonistic against plant pathogenic fungi *Gibberella zeae* and *Verticillium dahliae* with the inhibition rate of 59.5% and 49.3%, respectively. *nifH* of GD812 is 300 bp sharing 98% sequence identity with that of *Paenibacillus* sp. Bs57. GD812 was identified as *Paenibacillus* sp. based on the results of morphology, physiology and biochemical test and 16S rDNA sequence analysis. Further investigations showed that GD812 could use 20 of the 35 tested carbon sources, could grow under temperature ranging from 4 to 50℃, and could grow in range of pH4

收稿日期: 2011-01-20; 接受日期: 2011-06-03

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2011-33)、国家 863 项目 (2009AA06Z316)

联系方式: 陈倩, Tel: 010-82108701; E-mail: qcchen@163.com. 通信作者孙建光, Tel: 010-82108701; E-mail: jgsun@caas.ac.cn

to11. Pot culture result showed that fresh weight of Chinese cabbage inoculated with GD812 increased by 52% compared with the control. 【Conclusion】 The newly selected *Paenibacillus* sp. GD812 showed high nitrogenase activity, strong antagonism against plant pathogenic fungi, extensive carbon source utilization, stress resistance and good inoculation effect, which is a candidate to be further developed for microbial fertilizer production.

**Key words:** biological nitrogen fixation; *Paenibacillus*; strain screening; microbial fertilizer

## 0 引言

【研究意义】全球性能源缺乏使化学氮肥的生产成本逐年增加, 固氮微生物肥料的研究与应用受到世界各国政府的普遍重视。另一方面, 中国农田土壤有益微生物种群数量和生物活性普遍较低, 特别是设施农田有益微生物缺乏导致土传病害严重, 迫切需要增加有益微生物类群调节土壤微生态环境。菌种是微生物肥料的技术核心, 筛选高效、抗病、抗逆的固氮微生物菌种是微生物肥料生产应用的技术关键。【前人研究进展】具有生物固氮能力的微生物都是原核生物, 多为细菌, 有 100 多个属, 占到细菌系统发育分支的一半以上<sup>[1]</sup>。高效固氮菌的分离与鉴定国内外均有大量研究, 国外不断有新种如 *Burkholderia nodosa*<sup>[2]</sup>、*Gluconacetobacter kombuchae*<sup>[3]</sup>、*Novosphingobium nitrogenifigens*<sup>[4]</sup>、*Pseudacidovorax intermedius*<sup>[5]</sup>、*Phytobacter diazotrophicus*<sup>[6]</sup>等被陆续发现, 国内也有相关报道<sup>[7-8]</sup>。【本研究切入点】对具有拮抗病原真菌能力的固氮菌报道很少。【拟解决的关键问题】本研究拟在分离、筛选高效固氮菌的基础上, 采用平板对峙法进一步筛选拮抗麦类赤霉病菌 (*Gibberella zeae*) 和棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 的功能菌, 同时研究菌株的 *nifH*、抗逆性、接种效果等, 以期为微生物肥料生产筛选菌种资源。

## 1 材料与方法

本试验于 2009 年 1 月至 2010 年 12 月在中国农业科学院农业资源与农业区划研究所完成。

### 1.1 菌株、样品与试剂

1.1.1 菌株 圆褐固氮菌 *Azotobacter chroococcum* ACCC11103 来源于前苏联, 是固氮微生物肥料生产常用菌种, 现保藏于中国农业科学院农业资源与农业区划研究所微生物资源与利用研究室, 在本研究中用作阳性对照菌株。植物病原菌麦类赤霉病菌和棉花黄萎病菌由中国农业科学院农业资源与农业区划研究所牛永春研究员提供。

1.1.2 样品与试剂 原始土样 70 份分别采自北京、

内蒙古、河北、辽宁、山东、陕西、宁夏、广东、新疆、福建、贵州、四川、黑龙江等 13 个省市自治区, 主要取自生长期大田作物根际。试剂购自北京化学试剂公司和 Sigma 公司。

### 1.2 固氮菌分离及固氮酶活性测定

固氮菌的分离采用无氮培养基: 蔗糖 10 g, NaCl 0.12 g,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.5 g,  $CaCO_3$  1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2。固氮酶活性测定方法详见文献[9]。

### 1.3 拮抗病原真菌的固氮菌筛选

采用两点对峙法<sup>[10]</sup>。在 PDA 平板上距离中心 2 cm 的两点上分别接种作物病原真菌 (麦类赤霉病菌或棉花黄萎病菌) 和固氮菌菌株, 每个筛选处理 3 个重复, 以只接病原真菌不接固氮菌的平板为对照。28℃ 恒温培养, 15 d 后用毫米刻度尺测量对峙平板上病原真菌沿被测固氮菌方向的菌落半径  $r_1$ 、及对照平板上病原真菌的菌落半径  $r_0$ 。病原真菌生长抑制率 (%) = (对照半径  $r_0$  - 对峙培养病原真菌菌落半径  $r_1$ ) / 对照半径  $r_0$  × 100%。

### 1.4 形态、生理生化特征测定及 16S rDNA 序列分析

形态及生理生化特征测定方法参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[11]</sup>和《微生物学实验》<sup>[12]</sup>。16S rDNA 测序与系统发育分析参考文献[7], 基因序列在线比对采用 EzTaxon 和 NCBI 数据库, 系统发育分析采用 MEGA 软件系统。

### 1.5 *nifH* 基因扩增与同源性分析

方法参考文献[13]。培养供试菌 18 h, 挑取少许菌落作为 PCR 模板。正向引物: 5'-GGCTGCGATCC (CGA)AAGGCCGA(CT)TC(CGA)ACCCG-3', 反向引物: 5'-CTG(GCA)GCCTTGTT(CT)TCGCGGAT(CG)GGCATGGC-3'。反应体系: 2×mixTaq 25 μL, 引物 (20 μmol·L<sup>-1</sup>) 2 μL, 模板菌落, 用水补到 50 μL 体系。反应程序: 95℃ 变性 1 min、58℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环。DNA 序列分析及同源性分析方法同 16S rDNA。

### 1.6 菌株的碳源利用与抗逆性

1.6.1 碳源利用 将碳源过滤灭菌后加到细菌基础

培养基<sup>[14]</sup> ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.5 g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、蒸馏水 1 000 mL、琼脂 20 g, pH 6.5) 中, 终浓度为 1%, 制成测试平板。培养收集供试菌株菌体, 用生理盐水离心洗涤 3 次, 调整菌悬液 OD<sub>600</sub> 为 1.0, 每个平板接种 10 μL 菌液, 培养、观察记录生长情况。供试碳源共 35 种, 以葡萄糖为阳性对照, 无碳培养基为阴性对照, 每个处理 3 次重复。

1.6.2 温度适应性 采用无氮培养基, 分别在 4、28、37、60℃ 培养、观察、记录菌株的温度适应性, 每个处理 3 次重复。

1.6.3 耐盐性 采用无氮培养基, 调整 NaCl 浓度分别为 2%、5%、7%、10%, 每个处理 3 次重复, 培养、观察、记录菌株耐盐性。

1.6.4 耐酸碱性 采用无氮培养基, 调整 pH 分别为 3、4、5、6、7、8、9、10、11, 每个处理 3 次重复, 培养、观察、记录菌株耐酸碱性。

### 1.7 接种效果试验

2010 年 5—6 月以盆栽方式在中国农业科学院农业资源与农业区划研究所温室进行, 方法同文献[7]。

## 2 结果

### 2.1 拮抗病原真菌的高效固氮菌筛选

经过大量的富集培养和分离、纯化, 共分离到能够在无氮培养基上生长的分离物 103 株。经过固氮酶活性测定和病原真菌对峙试验, 从上述分离物中筛选到固氮酶活性较高、拮抗病原真菌能力较强的菌株 1 株, 编号为 GD812。该菌株固氮酶活性高达 30.661 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg 蛋白, 统计分析显著高于阳性对照菌株圆褐固氮菌 ACCC11103 的固氮酶活性 (9.741 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg 蛋白)。对峙试验结果表明, GD812 对麦类赤霉病菌和棉花黄萎病菌均有明显的拮抗作用, 抑菌率分别达到 59.5% 和 49.3% (图 1、图 2)。

### 2.2 形态生理特征与菌种鉴定

2.2.1 形态及生理生化特征 菌株 GD812 在无氮培养基上菌落透明、表面光滑湿润、边缘整齐。菌体杆状, 1.2 μm × (2.5—6.0) μm, 产芽孢, 椭圆形孢囊, 具有较厚的荚膜, 革兰氏染色阴性。生理生化特征如表所示。

2.2.2 16S rDNA 序列分析及菌种初步鉴定 菌株 GD812 的 16S rDNA 基因片段约 1.5 kb (图 3), 与 NCBI 和 EzTaxon 数据库中已公开的 16S rDNA 序列进行在线同源性比对, 结果显示 GD812 与类芽孢杆菌

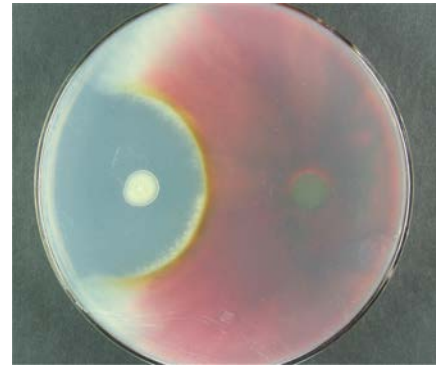


图 1 GD812 对麦类赤霉病菌抑制作用

Fig. 1 Suppression of GD812 to *Gibberella zeae*

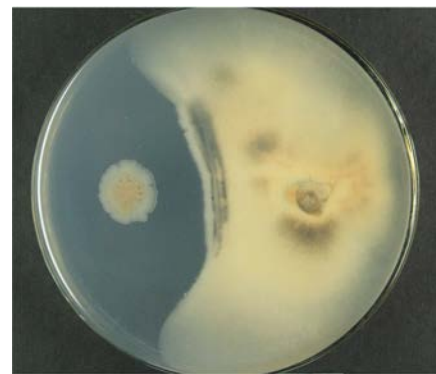
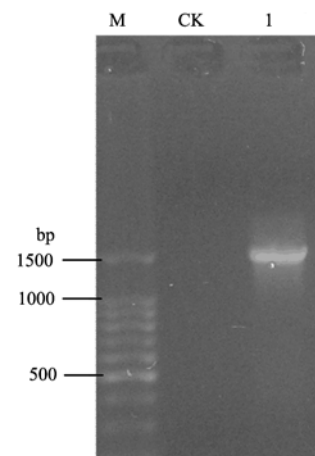


图 2 GD812 对棉花黄萎病菌抑制作用

Fig. 2 Suppression of GD812 to *Verticillium dahliae*



CK: 阴性对照; 1: GD812。图 5 同

M: DNA marker; CK: Negative control; 1: GD812. The same as Fig.5

图 3 菌株 GD812 的 16S rDNA PCR 扩增

Fig. 3 16S rDNA PCR amplification of strain GD812

表 固氮菌 GD812 的生理生化特征

Table Physiological and biochemical characteristics of strain GD812

生理生化特征 Physiological and biochemical characteristic	试验结果 Result	生理生化特征 Physiological and biochemical characteristic	试验结果 Result
接触酶反应 Catalase reaction	+	糖醇类发酵产酸 Sugar fermentation	
氧化酶反应 Oxidase reaction	-	D+葡萄糖 D+glucose	+
VP 反应 VP test	-	D+蔗糖 D+ sucrose	+
吡啶实验 Idol test	+	D+乳糖 D+ lactose	+
明胶液化 Gelaune liquefaction	+	D+半乳糖 D+ galactose	+
淀粉水解 Starch hydrolyzation	+	D+核糖 D+ribose	+
卵磷脂酶 Lecithinase test	-	L+阿拉伯糖 L+ arabinose	+
硝酸盐还原 Nitrate Reduction	+	D+果糖 D+ fructose	+
甲基红 Methyl red test	-	D+甘露醇 D+ mannitol	+
石蕊牛奶反应 Litmus milk	+	D+山梨醇 D+ sorbitol	+
柠檬酸盐利用 Citrate test	+	D+麦芽糖 D+ maltose	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	D+纤维二糖 D+cellobiose	+
产二羟基丙酮 Dihydroxyacetone test	+	甘油 Glycerol	+
葡萄糖产气 Gas production on glucose	+		
pH 5.7 生长测定 Growth at pH5.7	+		
0.001%溶菌酶 Lysozyme test	+		

“+”表示阳性，“-”表示阴性 “+”mean positive,“-”mean negative

属 *Paenibacillus polymyxa* E681 (GenBank 登录号 CP000154.1)<sup>[15]</sup>、*Paenibacillus peoriae* DSM 8320<sup>T</sup> (GenBank 登录号 AJ320494.1)<sup>[16]</sup>、*Paenibacillus jamilae* CECT 5266<sup>T</sup> (GenBank 登录号 AJ271157.1)<sup>[17]</sup> 的同源性均在 99% 以上。选取同源性大于 95% 的类芽

孢杆菌属内各种模式菌株的 16S rDNA 序列, 采用 MEGA 软件构建 16S rDNA 系统发育树 (图 4)。从图 4 中可见, 菌株 GD812 与已报道的多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* E681 亲源关系最近, 有 99.80% 的相似性。

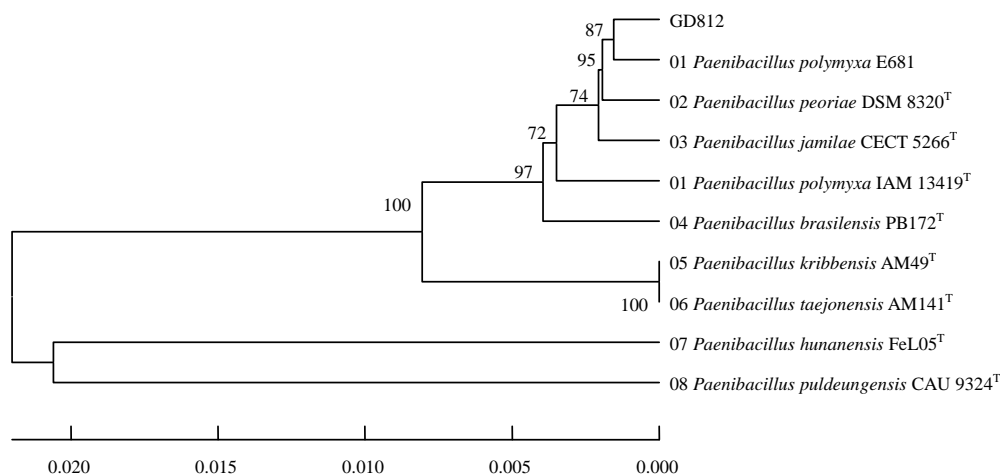


图 4 固氮菌 GD812 的 16S rDNA 系统发育树图

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain GD812 based on 16S rDNA sequences

根据菌株的形态特征、生理生化特性，及 16S rDNA 基因比对结果，参照《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》<sup>[18]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》，菌株 GD812 被鉴定为类芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp.。

### 2.3 *nifH* 及其同源性分析

菌株 GD812 的 *nifH* 基因长度 300 bp (图 5)，经过 DNA 测序和 NCBI 数据库在线比对，该基因与 *Paenibacillus* sp. Bs57 (GenBank 登录号 GU328708) 的 *nifH* 基因相似性达到了 98%。图 6 列出了与 GD812 菌 *nifH* 同源性较高的固氮菌菌株。

### 2.4 菌株 GD812 对碳源的利用及抗逆性

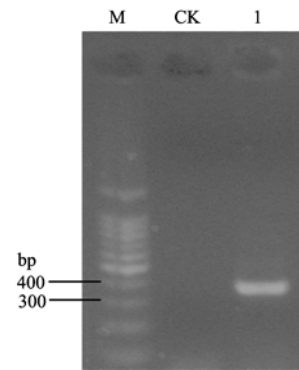


图 5 菌株 GD812 *nifH* PCR 扩增

Fig. 5 *nifH* PCR amplification of strain GD812

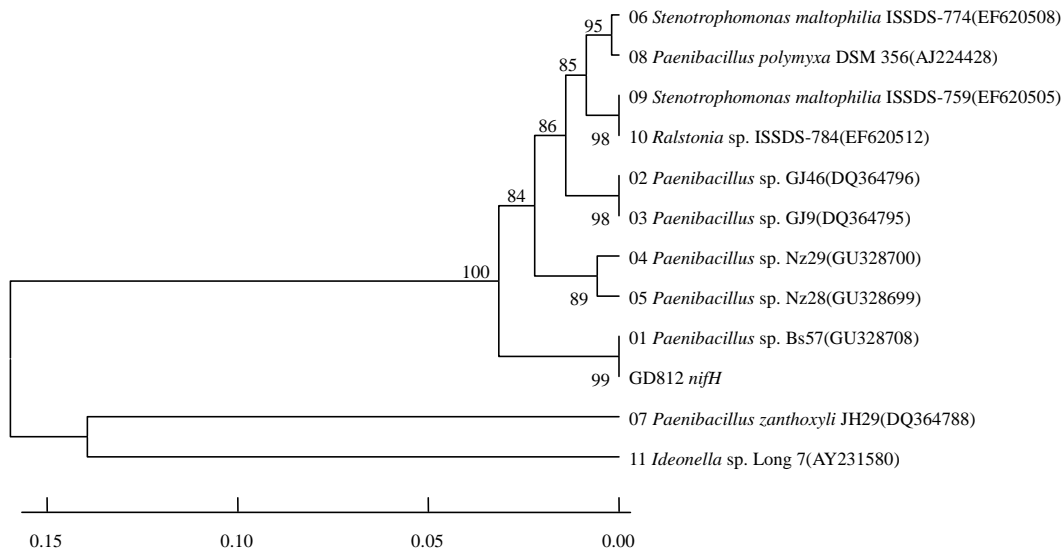


图 6 固氮菌 GD812 *nifH* 基因系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of strain GD812 based on *nifH* gene sequences

**2.4.1 碳源利用** 菌株 GD812 的碳源利用能力较强，在以 L-丙氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、甘油、D-山梨醇、D-木糖为唯一碳源的培养基上生长很好，菌落大于等于以蔗糖为碳源的阳性对照；在以 L-阿拉伯糖、L-天门冬酰胺、D-纤维二糖、D-果糖、D-半乳糖、肌醇、 $\alpha$ ,D-乳糖、麦芽糖、D-核糖、蔗糖和 D-海藻糖为唯一碳源的培养基上生长良好，菌落略小于以蔗糖为碳源的阳性对照；在以糊精、D-甘露醇、D-甘露糖和 L-鼠李糖为唯一碳源的培养基上弱生长，菌落明显小于以蔗糖为碳源的阳性对照；在以柠檬酸、乙酸、L-天门冬氨酸、木糖醇、D-葡萄糖醛酸、L-谷氨酸、L-苯

基丙氨酸、琥珀酸、D,L-乳酸、D,L-苹果酸、苯甲酸、硼酸、溴代丁二酸、 $\beta$ -环式糊精和吐温 80 为唯一碳源的培养基上不生长。

**2.4.2 抗逆性** 菌株 GD812 抗逆性较强，可以在 4—50℃ 环境下生长，耐酸碱 pH4—11，耐 2% NaCl。

### 2.5 接种效果

温室盆栽试验显示，小白菜接种固氮菌 GD812 后，植株生长健壮，叶片大，色泽浓绿，高于对照。接种处理单株平均鲜重 2.68 g/株，对照组 1.76 g/株，试验处理平均鲜重比对照组增加了 52%，差异显著。

### 3 讨论

肥料是农业生产最重要的生产资料,在3大类肥料中,化学肥料浓度大,体积小,便于储存运输和使用,可以为作物生长发育直接提供大量的营养元素,是提供养分的主力,但需要好的土壤条件才能充分发挥效能;有机肥料能够改善土壤结构,提高土壤活性,通过土壤微生物的作用为作物提供长效营养,是提高土壤综合肥力的主力,但体积大,养分少;微生物肥料能够推动土壤中的物质转化,通过菌种的抗病作用等功能营造有利于作物生长的根际环境,是提高土壤活力、改善土壤生态环境的主力,但直接提供的养分有限。所以,3类肥料各有特点,它们的关系相辅相成,相互不可替代,共同作用达到保证作物生产丰收和维护土壤肥力稳定、提高。特别是微生物肥料所具有的调节作物根际微生态环境、拮抗作物病原菌等非养分作用对于保障作物生产、充分发挥化学肥料和有机肥料的作用具有重要意义。

麦类赤霉病菌无性世代为禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*),是粮食作物的重要致病菌。中国小麦赤霉病有95%是麦类赤霉病菌引起的,是长江中下游冬麦区和东北春麦区的重要病害,发病时经常造成20%—30%的产量损失。此外,该菌还侵染玉米、水稻、大麦等作物,引起苗枯、茎腐、基腐、穗腐等。棉花黄萎病菌以土壤传播为主,寄主范围很广,除侵染棉花引起黄萎病外,还侵染经济作物烟草、油料作物大豆、花生、向日葵、芝麻、蔬菜作物马铃薯、茄子、辣椒、番茄、黄瓜、西瓜,以及林木、花卉等,危害严重,造成巨大经济损失。本试验筛选到的高效固氮菌GD812对麦类赤霉病菌抑菌率达到59.5%,对棉花黄萎病菌抑菌率达到49.3%,在增加作物氮素营养的同时,还可以防止作物土传病害,具有重要意义和应用前景。鉴于本试验结果都是来自实验室,菌株GD812对小麦、棉花等农作物的抗病、促生长作用的研究和田间试验将是下一步要做的工作。

典型非共生固氮微生物类群主要有固氮菌属(*Azotobacter*)、固氮单胞菌属(*Azomonas*)、拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia*)、德克斯氏菌属(*Derxia*)、黄杆菌属(*Xanthobacter*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、水生螺菌属(*Aquaspirillum*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、克氏杆菌属(*Klebsiella*)、埃氏杆菌属(*Escherichia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)、甲

烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、硫杆菌属(*Thiobacillus*)、红螺菌属(*Rhodospirillum*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、红硫菌属(*Chromatium*)、绿硫菌属(*Chlorobium*)等<sup>[19]</sup>。近年来研究发现<sup>[9]</sup>,从采自全国13个省市13种作物根际的70份土样中分离到的181株固氮菌,其中有65株属于类芽孢杆菌,占测试菌株总量的36%,52株菌属于芽孢杆菌属,占总量的29%,两者合计达到65%;而且几乎从所有取样地区、所有作物根际都可以分离到这2类固氮微生物,说明类芽孢杆菌和芽孢杆菌是作物根际固氮微生物的主要类群,而且具有地域广泛性和作物广泛性。近年来,大量具有固氮能力的类芽孢杆菌新种在世界范围内被发现,如*P. donghaensis*<sup>[20]</sup>、*P. forsythiae*<sup>[21]</sup>、*P. sabinae*<sup>[22]</sup>、*P. taiwanensis*<sup>[23]</sup>、*P. zanthoxyli*<sup>[24]</sup>、*P. riograndensis*<sup>[25]</sup>、*P. sophorae*<sup>[26]</sup>、*P. jilunlii*<sup>[27]</sup>、*P. sonchi*<sup>[28]</sup>等,从另一个方面印证了具有生物固氮功能的类芽孢杆菌在自然界分布很广泛。固氮菌在土壤中的竞争适应能力对于固氮菌剂的接种效果至关重要<sup>[7]</sup>,所以好的固氮菌不仅要固氮酶活性高,而且还要竞争适应能力强,最具竞争力的固氮生物肥料菌种应该出自类芽孢杆菌属和芽孢杆菌属。

本研究筛选到的固氮菌GD812可以利用35种供试碳源中的20种,发酵多种糖醇类产酸,耐酸碱pH4—11,生长温度范围4—50℃,环境适应能力很强。*nifH*基因分析和固氮酶活性测定结果分别从遗传型和表型上证明了该菌株的固氮功能,拮抗病原真菌、鉴定为类芽孢杆菌和接种试验结果都预示了GD812菌株成为固氮生物肥料优良菌种的光明前景。

### 4 结论

筛选到1株固氮菌GD812,该菌株固氮酶活性高,对麦类赤霉病菌和棉花黄萎病菌均有抑菌作用;根据细菌形态学特征、16S rDNA基因比对结果和生理生化特征,GD812被鉴定为类芽孢杆菌*Paenibacillus* sp.;该菌株*nifH*基因长度300 bp,与*Paenibacillus* sp. Bs57相似性最高,支持鉴定结果;GD812发酵糖醇能力强,利用碳源广泛,适应酸碱和温度范围大,盆栽试验显示较好的接种效果,可望进一步研发成为优良的固氮微生物肥料生产菌种。

### References

- [1] 陈文新. 生物固氮//中国土壤学会. 氮素循环与农业和环境学术研

- 讨论文集. 厦门: 厦门大学出版社, 2001: 4-5.
- Chen W X. Biological nitrogen fixation// Soil Science Society of China (ed). *Proceeding of Conference on Nitrogen Cycling and Agriculture Environment*. Xiamen: Xiamen University Press, 2001: 4-5. (in Chinese)
- [2] Chen W M, de Faria S M, James E K, Elliott G N, Lin K Y, Chou J H, Sheu S Y, Cnockaert M, Sprent J I, Vandamme P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal of Systemic and Evolutional Microbiology*, 2007, 57: 1055-1059.
- [3] Dutta D, Gachhui R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systemic and Evolutional Microbiology*, 2007, 57: 353-357.
- [4] Addison S L, Foote S M, Reid N M, Lloyd-Jones G. *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater. *International Journal of Systemic and Evolutional Microbiology*, 2007, 57: 2467-2471.
- [5] Kämpfer P, Thummes K, Chu H I, Tan C C, Arun A B, Chen W M, Lai W A, Shen F T, Rekha P D, Young C C. *Pseudacidovorax intermedius* gen. nov., sp. nov., a novel nitrogen-fixing betaproteobacterium isolated from soil. *International Journal of Systemic and Evolutional Microbiology*, 2008, 58: 491-495.
- [6] Zhang G X, Peng G X, Wang E T, Yan H, Yuan Q H, Zhang W, Lou X, Wu H, Tan Z Y. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. *Archives of Microbiology*, 2008, 189: 431-439.
- [7] 孙建光, 张燕春, 徐 晶, 胡海燕. 高效固氮芽孢杆菌选育及其生物学特性研究. *中国农业科学*, 2009, 42(6): 2043-2051.
- Sun J G, Zhang Y C, Xu J, Hu H Y. Isolation and biological characteristic investigation on efficient nitrogen-fixing bacilli. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(6): 2043-2051. (in Chinese)
- [8] 张燕春, 孙建光, 徐 晶, 胡海燕. 固氮芽孢杆菌 GD272 的筛选鉴定及其固氮性能研究. *植物营养与肥科学报*, 2009, 15(5): 1196-1201.
- Zhang Y C, Sun J G, Xu J, Hu H Y. Isolation and identification and evaluation of nitrogen-fixing bacillus strain GD272. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(5): 1196-1201. (in Chinese)
- [9] 孙建光, 徐 晶, 胡海燕, 张燕春, 刘 君, 王文博, 孙燕华. 中国十三省市土壤中非共生固氮微生物菌种资源研究. *植物营养与肥科学报*, 2009, 15(6): 1450-1465.
- Sun J G, Xu J, Hu H Y, Zhang Y C, Liu J, Wang W B, Sun Y H. Collection and investigation on asymbiotic nitrogen-fixing microbial resources from 13 provinces over China. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(6): 1450-1465. (in Chinese)
- [10] 刘晓光, 高克祥, 谷建才, 杜建玲, 唐秀光. 毛白杨内生菌优势种毛壳 ND35 室内拮抗作用的研究. *林业科学*, 1999, 35(5): 57-62.
- Liu X G, Gao K X, Gu J C, Du J L, Tang X G. Testing on the antagonism of the dominant of endophytic fungi from *Populus tomentosa*, *Chaetomium* ND35 in the laboratory. *Scientia Silvae Sinicae*, 1999, 35 (5): 57-62. (in Chinese)
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- Dong X Z, Cai M Y. *Manual of Systematic Determinative Bacteriology*. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [12] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版). 北京: 高等教育出版社, 1999.
- Shen P, Fan X R, Li G W. *Microbiology Experiment (3rd Edition)*. Beijing: High Education Press, 1999. (in Chinese)
- [13] Ding Y, Wang J, Liu Y, Chen S. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99: 1271-1281.
- [14] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002.
- Zhao B, He S J. *Microbiology Experiment*. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [15] Kim J F, Jeong H, Park S Y, Kim S B, Park Y K, Choi S K, Ryu C M, Hur C G, Ghim S Y, Oh T K, Kim J J, Park C S, Park S H. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(22): 6103-6104.
- [16] Suominen I, Spröer C, Kämpfer P, Rainey F A, Lounatmaa K, Salkinoja-Salonen M. *Paenibacillus stellifer* sp. nov., a cyclodextrin-producing species isolated from paperboards. *International Journal of Systemic and Evolutional Microbiology*, 2003, 53: 1369-1374.
- [17] Aguilera M, Monteoliva-Sánchez M, Suárez A, Guerra V, Lizama C, Bennisar A, Ramos-Cormenzana A. *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. *International Journal of Systemic and Evolutional Microbiology*, 2001, 51(5): 1687-1692.
- [18] Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1st Edition)*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984-1989.
- [19] 陈文新. 土壤和环境微生物学. 北京: 北京农业大学出版社, 1990: 152-156.

- Chen W X. *Soil and Environmental Microbiology*. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1990: 152-156. (in Chinese)
- [20] Jeong-Hwa C, Im W T, Yoo J S, Lee S M, Moon D S, Kim H J, Rhee S K, Roh D H. *Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a xylan-degrading and nitrogen-fixing bacterium isolated from East Sea sediment. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 2008, 18: 189-193.
- [21] Ma Y C, Chen S F. *Paenibacillus forsythiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 319-323.
- [22] Ma Y C, Xia Z Q, Liu X M, Chen S F. *Paenibacillus sabiniae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 6-11.
- [23] Lee F L, Kuo H P, Tai C J, Yokota A, Lo C C. *Paenibacillus taiwanensis* sp. nov., isolated from soil in Taiwan. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 1351-1354.
- [24] Ma Y C, Zhang J, Chen S F. *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 873-877.
- [25] Beneduzi A, Costa P B, Parma M, Melo I S, Bodanese-Zanettini M H, Passaglia L M. *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60: 128-133.
- [26] Jin H J, Lv J, Chen S F. *Paenibacillus sophorae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sophora japonica*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61: 767-771.
- [27] Jin H J, Zhou Y G, Liu H C, Chen S F. *Paenibacillus jilunlii* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Begonia semperflorens*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61: 1350-1355.
- [28] Hong Y Y, Ma Y C, Zhou Y G, Gao F, Liu H C, Chen S F. *Paenibacillus sonchi* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sonchus oleraceus*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 2656-2661.

(责任编辑 岳 梅)

---

## 欢迎订阅 2012 年《中国稻米》

《中国稻米》是由农业部主管，中国水稻研究所主办，全国农业技术推广服务中心等单位协办的全国性水稻科学技术期刊。设有“专论与研究”、“品种与技术”、“各地稻米”，“综合信息”等栏目，兼具学术性、技术性、知识性、信息性等特点。据《中国科技期刊引证报告》（核心版）统计，《中国稻米》2008年的影响因子为0.611，2009年为0.422。2008年度有一篇文章被评为中国百篇最具影响的国内文章。适合水稻产区的各级技术人员及农业与粮食行政管理人员、科研教学人员和稻农阅读。本刊为双月刊，标准大16开本，单月20日出版。每期定价10.00元，全年60.00元，公开发行，邮发代号：32-31，国内刊号CN33-1201/S，国际统一刊号ISSN 1006-8082，E-mail: zgdm@163.com，网址: www.zgdm.net，欢迎新老读者到当地邮局订阅，也可直接到本刊编辑部订阅。

地址：杭州市体育场路359号（邮政编码：310006）

电话（传真）：（0571）63370271，63370368