

土地类芽胞杆菌(*Paenibacillus terrae*)新菌株 NK3-4 及其功能

于文清 刘文志 胡广民 隋文志*

(黑龙江省农垦科学院农畜产品综合利用研究所 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:【目的】分离筛选出一株能溶解矿物磷、钾、硅,防治作物病害,具有固氮活性的细菌。【方法】从大豆(*Glycine max*)田中采集大豆根周土壤,用钾长石选择性培养基进行加富培养,从加富培养物中分离具有溶解硅酸盐矿物能力的细菌。采用平板对峙法,从分离到的菌株中筛选出一株对大豆根腐病菌尖孢镰刀霉(*Fusarium oxysporum*)抑制作用强的菌株,再通过摇瓶培养法测定该菌株溶解矿物钾、硅、磷的能力,用改良阿须贝(Ashby)无氮液体培养基培养待测菌株,测定菌株的固氮功能。依据形态观察、生理生化反应及 16S rRNA 基因序列分析结果鉴定菌株。

【结果】从健康大豆根周分离筛选出一株编号为 NK3-4 的细菌,该细菌在平皿上对尖孢镰刀霉的抑菌带宽度达到 8.0 mm;培养 24 h 后,含有钾长石的液体培养基中速效钾浓度比培养基中不含钾长石的处理浓度高 15.0 mg/L,可溶性硅浓度比不接种对照高 51.3 mg/L;在磷酸三钙为唯一磷源的液体培养基中培养 8 d 后,培养基中可溶性磷浓度是不接种对照的 4.8 倍;在改良阿须贝液体培养基中培养 15 d 后,培养基中可溶性氮浓度是不接种对照的 4.6 倍,每升培养基中菌体氮含量达到 12.7 mg。经鉴定,该菌株为土地类芽胞杆菌(*Paenibacillus terrae*)的新菌株。

【结论】NK3-4 是一株具有多种生物活性的土地类芽胞杆菌新菌株,可应用于生物农药及生物肥料的研制与开发。

关键词: 土地类芽胞杆菌(*Paenibacillus terrae*), 抑菌, 固氮, 生物农药, 生物肥料

Paenibacillus terrae new strain NK3-4 and its functions

YU Wen-Qing LIU Wen-Zhi HU Guang-Min SUI Wen-Zhi*

(Institute of Agricultural and Poultry Products Comprehensive Utilization, Heilongjiang Academy of Land Reclamation Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154007, China)

Abstract: [Objective] The aim of this paper was to obtain a bacterial strain which has the ability of degrading mineral phosphorus, potassium and silicon, controlling plant disease, and fixing nitrogen. [Methods] Soil was collected from rhizosphere of soybean (*Glycine max*), then selected medium supplemented with potash feldspar was used to enrich bacterial strains exhibiting ability of degrading silicate. Dual-culture plate method was used to gain a bacterium which had the strongest ability of antifungal activity to the soybean root rot pathogen *Fusarium oxysporum*. After that, the activity of degrading mineral potassium, silicon, and phosphorus of the bacterium was tested by shake flask method, meanwhile the optimized Ashby's medium was used to test the activity of fixing nitrogen.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(No. C201326);“十二五”农村领域国家科技计划项目(No. 2013BAD07B01);
国家公益性行业基金资助项目(No. 2007-12-1);黑龙江省农垦总局科技攻关项目(No. HNK11A)

*通讯作者: Tel: 86-454-8359928; 邮箱: suiwz@sina.com

收稿日期: 2013-04-24; 接受日期: 2013-07-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-30

The isolated strain was identified through morphology observation, physiological and biochemical tests and 16S rRNA gene sequence analysis. **[Results]** A bacteria strain named NK3-4 was isolated from rhizosphere soil of healthy soybean in field. The bacterium inhibited *F. oxysporum* growth with inhibiting belt of 8.0 mm width on plate. The concentration of dissoluble potassium in medium contained potash feldspar was 15.0 mg/L higher than that in medium without potash feldspar, and the concentration of dissoluble silicon was 131.7% higher than the un-inoculated control after cultivation for 24 hours. The concentration of dissoluble phosphorus was 4.8 times of the un-inoculated control in medium with calcium phosphate as only phosphoric source after cultivation for 8 days. The concentration of dissoluble nitrogen was 4.6 times of the uninoculated control in Ashby's medium after cultivation for 15 days, and the nitrogen content fixed in the bacterial organism was 12.7 mg in one liter of medium. The identification showed that the NK3-4 strain was a new strain belongs to *Paenibacillus terrae*. **[Conclusion]** Strain NK3-4 is a new strain of *P. terrae* with multifunctions, it can be used as a potential microorganism for exploit of biofungicide and biofertilizer.

Keywords: *Paenibacillus terrae*, *Fusarium oxysporum*, Nitrogen fixation, Biofungicide, Biofertilizer

氮、磷、钾是植物生长必需的大量营养元素，土壤耕作层中全磷含量为 0.1–2.0 g/kg，其中无机磷占全磷总量的 15%–80%，大部分是难溶性的无机磷化合物，很难被植物直接利用；土壤耕作层中全钾含量为 0.5–45.0 g/kg，其中矿物性钾占全钾的 90%–98%，也难被植物直接利用；农业生产上施用氮肥、磷肥和钾肥的利用率分别为 30%–35%、10%–25%和 35%–50%，由于作物对其利用率低、容易流失、造成严重的浪费和环境污染^[1]。另外，人类对农产品的需求不断增加，导致农作物连作障碍持续发生，连作会引起土壤理化性状和生物学性状发生变化，土壤微生物群落中有益微生物的生长受到抑制，有害微生物迅速繁殖，土壤微生物的自然平衡遭到破坏，作物病虫害发生越来越严重^[2–3]。据统计，连作减产中由病害原因造成的占 75%以上，而农业生产者只能靠传统的防治方法，不断加大药量和频繁用药来控制，这不仅不能解决植物病害问题，相反带来了严重的副作用，造成环境和农产品的严重污染，降低了农产品产量和品质^[4]。可见，农药、化肥过量施用是农业生产中造成污染的重要来源，它引起的环境问题和食品安全问题日趋严重^[1,3–4]。

新型生物肥料、生物农药的应用，对解决传统农药、化肥过量施用产生的问题具有积极作用，并因其具有无残留、不污染环境、不损害人畜健康等优点，成为当前研究的热点^[5–6]。国内外已从

环境中分离筛选到大量能够溶解矿物磷、钾，抑制植物病原菌，固氮等功能的微生物资源，如从堆肥中分离到的一株 *Paenibacillus koreensis* 能够产生抗菌物质^[7]，*Paenibacillus sabinae* 具有固氮功能^[8]，*Paenibacillus azotofixans* 的一个菌株除固氮外还可以溶解有机磷、抑制病原菌^[9]，节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) 菌株 YB6 对番茄青枯病 (*Ralstonia solanacearum*) 具有拮抗作用^[10]，短小芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) MH1 菌株及枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) MH25 菌株对棉花青枯病具有抑制作用^[11]。多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 的功能则更为多样，有的菌株对镰刀霉 (*Fusarium oxysporum*)、黑胫茎点霉 (*Leptosphaeria maculans*)、荔枝霜疫霉菌 (*Peronophythora litchi*)、番茄早疫病 (*Alternaria solani*) 等具有抑制作用^[12–17]，有的菌株还能产生 IAA、植物激素、吲哚及酚类物质^[18]，促进植物生长^[19]，有的菌株还能够诱导植物抗旱性^[19–20]。虽然国内外学者已经分离筛选到了大量具有生物农药及生物肥料功能的微生物，但分离筛选新的微生物资源，用于微生物农药及微生物肥料生产始终是一个永恒的课题。

本文分离到了一株具有抑制作物病原菌功能的细菌，并对其固氮、溶解矿物磷、钾、硅等功能进行了测定，通过 16S rRNA 基因同源性比对及生理生化特性分析，对该菌株进行了鉴定。这株具有生物农药及生物肥料双重功能的微生物菌株有望

用于研制具有抗病、促生、增产的新型微生物制剂及含有其活性成分的生物农药及生物肥料。

1 材料与方法

1.1 土样采集及菌株分离

2005 年 7 月,在黑龙江省佳木斯市黑龙江省农垦科学院实验田内(46°46′02.8″N;130°25′44.5″E)重茬 4 年的大豆实验田中,将生长健壮的大豆植株连根拔出,收集根周土壤,装入无菌的封口聚乙烯袋中,置于冰盒内带回实验室,称取上述土壤样品 1.0 g,放入选择性钾长石液体培养基(选择性钾长石液体培养基配方为:蔗糖 10 g、K₂HPO₄ 0.2 g、MgSO₄·7H₂O 0.2 g、NaCl 0.2 g、CaCO₃ 5 g、钾长石粉 1 g、CaSO₄ 0.1 g、酵母粉 2 g 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min)进行加富培养(30℃, 200 r/min, 培养 24 h),加富培养后将培养液梯度稀释,无菌操作吸取每个稀释梯度稀释液 100 μL 涂布法接种于选择性钾长石琼脂平板,每个梯度 3 个重复,30℃ 培养 48 h 后选择单一菌落进行纯化,显微镜观察菌落的单一性,对不纯的进一步纯化,直至得到纯菌株。

1.2 菌株对大豆根腐病抑菌效果测定

将上述纯菌株与大豆根腐病菌尖孢镰刀霉(*Fusarium oxysporum*)进行抑菌实验,从中筛选出对大豆根腐病的主要致病菌尖孢镰刀霉具有良好拮抗作用的优良菌株,尖孢镰刀霉由黑龙江省农垦科学院植物保护研究所提供。采用平皿对峙培养法,首先用无菌的打饼器取已涂布接种于 LA 培养基

上,30℃ 培养 2 d,菌苔一致的,直径为 8 mm 的供试菌株的菌饼,置于含有 PDA 固体培养基,直径为 9 cm 的培养皿中心,再用相同方法取事先点接种于 PDA 培养基上,25℃ 培养 5 d 的尖孢镰刀菌菌饼,将菌饼置于以培养皿圆心为中心的等边三角形 3 个顶点上,尖孢镰刀霉菌饼中心与待测菌菌饼中心相距 30 mm,使待测供试菌株与尖孢镰刀菌形成对峙培养局面(图 1)。共设 5 次重复,28℃ 培养 36 h 后测量抑菌带宽度,筛选出对尖孢镰刀菌抑制效果最好的菌株。

1.3 菌株溶解矿物钾、磷、硅及固氮功能测定

对 1.2 中筛选出对根腐病菌抑制作用最强的菌株,测定其是否具有溶解矿物钾、硅、磷及固氮功能(表 1)。

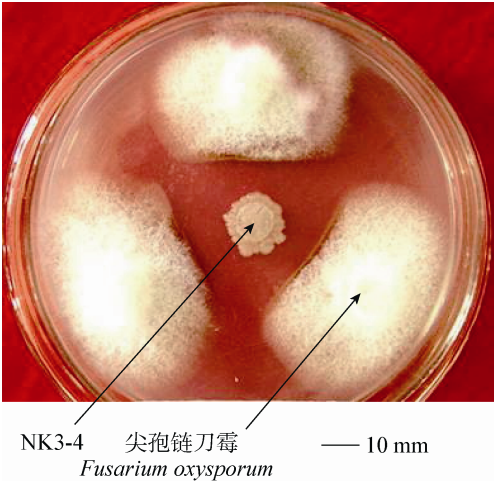


图 1 NK3-4 菌株对根腐病尖孢镰刀菌的平板拮抗效果
Figure 1 Antagonistic effect of NK3-4 strain to soybean root rot pathogen *Fusarium oxysporum* on plate

表 1 培养基及菌体中钾、硅、磷、氮浓度/含量 Table 1 Concentration/content of K, Si, P and N ($\bar{x}\pm s$, mg/L)							
处理 Treatment	可溶性钾 Dissoluble K	菌体钾 Bacterial organism K	处理 Treatment	可溶性硅 Dissoluble Si	可溶性磷 Dissoluble P	可溶性氮 Dissoluble N	菌体氮 Bacterial organism N
培养基含钾长石 Medium contained potash feldspar	127.3±0.8a	22.00±1.08a	接菌 Cultivation with bacterial inoculum	140.0±7.9a	64.0±2.9a	9.7±0.8a	12.7±3.6a
培养基不含钾长石 Medium without potash feldspar	112.3±1.3b	17.3±1.0b	不接菌 Cultivation without bacterial inoculum	88.7±3.8b	13.3±1.1b	2.1±0.07b	0b

注：同一列不同字母代表差异显著($P=0.05$).
Note: Different letters in the same row means the difference was significant ($P=0.05$).

1.3.1 解钾、溶硅功能测定:用接种环挑取少量斜面菌种,接种于钾长石液体培养基,同时接种不含钾长石粉的上述培养基,以不接菌的培养基作为空白对照,试验设4个重复,30℃、200 r/min 培养24 h后,取培养物稀释10倍,用火焰光度法测液体培养基中速效钾的浓度^[21],另取菌液5 mL于100℃水浴加热30 min,使菌体破碎释放钾,冷却后稀释10倍,测定液体中速效钾的浓度,此次测定的是培养基与菌体钾浓度之和,这个值减去直接测定的值,即为每升液体中菌体钾的浓度。取上述钾长石培养基培养后的菌液稀释10倍后过滤,得澄清液体,用硅钼蓝分光光度法测定滤液中速效硅的浓度^[22]。

1.3.2 溶磷功能测定:挑取少量斜面培养物接种于解磷培养液中(该培养液配方为:葡萄糖10 g, NaCl 0.3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KCl 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 10 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌30 min),以不接菌作为对照,设4次重复,30℃、200 r/min 培养8 d后,用钼蓝比色法测定培养液中速效磷的浓度^[21]。

1.3.3 固氮功能测定:挑取少量斜面培养物接种于改良阿氏无氮液体培养基中(该培养基配方为:蔗糖10 g、 K_2HPO_4 0.2 g、 K_2SO_4 0.2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、NaCl 0.2 g、 CaCO_3 5 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.0–7.2, 1×10^5 Pa 灭菌30 min),以不接菌作为对照,设4次重复,30℃、200 r/min 培养15 d,过滤,用无氨水稀释10倍,参考GB-11894-89用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法测定培养液中可溶性氮浓度^[23]。取培养液5 mL于50 mL 消煮管中,加入5 mL 浓硫酸,经320℃消煮至澄清后定容,用分光光度法测氮浓度,测得氮浓度为菌体与培养液中氮浓度的和,用此值减去培养液中氮浓度,即为菌体中固定的氮。

1.4 菌株鉴定

通过菌株菌落形态,菌体形态,生理生化反应,对碳、氮源的利用情况进行测定,结合16S rRNA 基因同源性分析,对菌株进行鉴定。在NCBI-BLAST中,对比菌株的亲缘关系,构建系

统发育树。菌体DNA提取采用生工SK1201-UNIQ-10柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒,按照说明书提取。引物采用细菌16S rDNA 通用引物,引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司提供并合成,上游引物和下游引物名称和序列分别为7f(5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')和1540r(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。PCR体系为25 μL ,其中模板(基因组DNA)1 μL ,上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL ,下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL ,dNTPs mix(各10 mmol/L)0.5 μL , $10 \times \text{Taq}$ buffer 2.5 μL , Taq 聚合酶(5 U/ μL)0.2 μL ,加水至25 μL 。PCR程序为:94℃5 min;94℃30 s,55℃35 s,72℃1 min,35个循环;72℃8 min。PCR产物经电泳,切割DNA目的条带,用胶回收试剂盒回收纯化后测序,序列提交GenBank,并用DNAMAN软件(DNAMAN version 5.2.2.0, Lynnon BioSoft)构建系统发育树。

1.5 数据分析

数据统计分析使用的软件为SPSS (SPSS 13.0, Inc., Chicago, USA)。各指标在不同处理之间的差异采用单因素方差分析(SPSS, One-Way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 菌株功能测定结果

从土壤中分离到细菌193株,从中筛选出一株对大豆根腐病抑制效果最好并具有溶解矿物磷、钾、硅,固氮等功能的菌株,菌株编号为NK3-4,其对大豆根腐病菌的抑菌带宽度达到8.0 mm(图1);在含有钾长石液体培养基中培养24 h后,培养基中速效钾浓度较不含钾长石的培养基高15.0 mg/L;每升培养基中由菌体中的钾含量较不加钾长石的处理高4.8 mg;接菌处理中,培养基中可溶性硅浓度较不接种对照高51.3 mg/L。以磷酸三钙为唯一磷源,培养8 d后,接菌处理培养液中速效磷的浓度是不接种对照的4.8倍。在无氮培养基中培养15 d后,接菌处理培养液中可溶性氮浓度达9.7 mg/L,不接种对照浓度为2.1 mg/L,前者是后者的4.6倍,接菌的处理

中，每升培养基中由菌体中固定的氮达到 12.7 mg。这些结果表明，NK3-4 菌株具有溶解活化矿物磷、钾、硅，固氮及抑制大豆根腐病菌的功能。可应用于生物农药及生物肥料的研制与开发。

2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 菌体形态：NK3-4 菌株为革兰氏阳性菌，菌体为杆状，大小 $(1.0-1.2) \mu\text{m} \times (3.0-4.0) \mu\text{m}$ ，能形成芽胞，形成芽胞时菌体近端膨大，胞囊明显膨胀，芽胞椭圆形，位于胞囊一端(图 2A)。

2.2.2 菌落形态：NK3-4 在硅酸盐蔗糖无氮培养基平板上，培养 5-7 d 形成直径为 1-2 mm 左右的圆形菌落，单菌落中间可呈现乳头状隆起，边缘不整齐，表面湿润，透明，菌苔浓稠，易挑起(图 2B)。该菌株在钾长石酵母粉培养基上菌落呈乳白色，半个玻璃珠状，圆形菌落，菌苔量多而粘，培养至后期菌落边缘不整齐，由于菌落内部产生气体，使菌落上方呈泡状鼓起，甚至破裂，生长物也可生长至培养基内部，使培养基裂开(图 2C)。

2.2.3 遗传特性：将 16S rRNA 基因序列提交 GenBank，获得序列登录号 JX914567，对序列进行比对分析表明，NK3-4 与土地类芽胞杆菌(*Paenibacillus terrae*) AM141 菌株(登录号为 AF391124)亲缘关系最为接近，相似性为 99%，但

与 *P. terrae* AM141 相比存在明显的不同。NK3-4 为革兰氏染色阳性，菌体长度为 $(1.0-1.2) \mu\text{m} \times (3.0-4.0) \mu\text{m}$ ，不能利用甘露醇，在 2% NaCl 中不生长；而 *P. terrae* AM141 革兰氏染色可变，菌体长度为 $(1.3-1.8) \mu\text{m} \times (4.0-7.0) \mu\text{m}$ ，能利用甘露醇，在 2% NaCl 中生长^[24]。因此，判定 NK3-4 为土地类芽胞杆菌种的一株新菌株。基于 16S rRNA 基因，对同源性关系最为接近的已知菌株构建的系统发育树表明，NK3-4 与土地类芽胞杆菌属于同一种，图 3 为 NK3-4 菌株及与其亲缘关系较近的菌株的系统发育树。

2.2.4 生理生化特性：NK3-4 革兰氏染色阳性，吲哚反应阴性，M.R 试验阴性，V.P 试验阳性。在硅酸盐蔗糖无氮培养基上生长良好。该菌株能很好的利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、羧甲基纤维素钠、腐殖酸等作为碳源，能水解淀粉，不利用甘露醇；利用葡萄糖和蔗糖时产酸产气，利用乳糖、羧甲基纤维素钠、腐殖酸时产酸不产气，一般培养后基质 pH 降低 0.8-1.5。能利用大多数氨基酸中的氮，能使明胶液化，使牛奶酪化，在 1% NaCl 中生长。最适生长温度 30-32 °C，4 °C 生长缓慢。生长最适 pH 为 6.5-7.5。表 2、表 3 和表 4 分别为 NK3-4 的部分生理生化性状及对碳、氮源的利用情况。

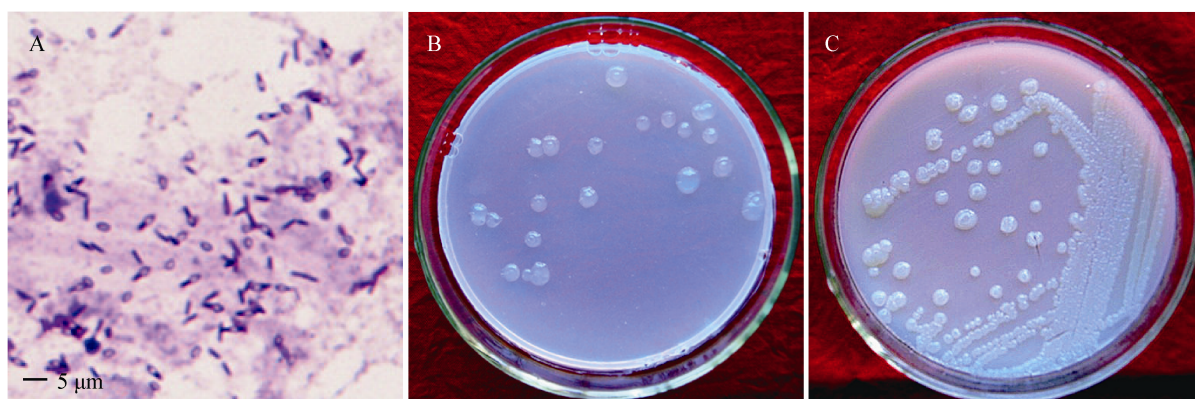


图 2 NK3-4 菌株的菌体及芽胞的显微形态、在硅酸盐及钾长石平板上的菌落形态

Figure 2 Morphological cell and spore of NK3-4 under microscope, colony form of NK3-4 grows on silicate medium and potash feldspar medium

注：A：NK3-4 菌体及芽胞的显微形态；B：NK3-4 在硅酸盐平板上的菌落形态；C：NK3-4 在钾长石平板上的菌落形态。

Note: A: Morphological cell and spore of NK3-4 under microscope; B: Colony form of NK3-4 grows on silicate medium; C: Colony form of NK3-4 grows on potash feldspar medium.

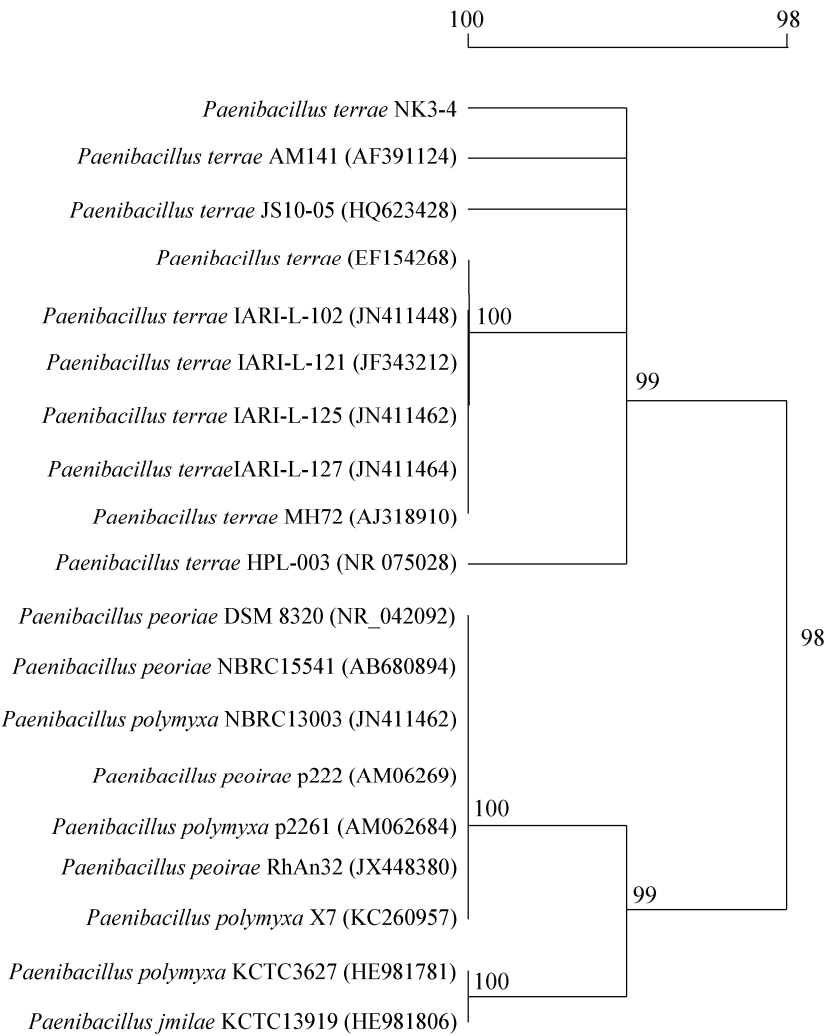


图 3 菌株 NK3-4 基于 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree of strain NK3-4 based on 16S rRNA gene sequence

注：括号内为序列的 GeneBank 登录号；分支点数字代表步长值；标尺代表序列间分歧度。
Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. Numbers at each branch points indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis; Bar 98–100 represents sequence divergence.

2.3 结论与讨论

2.3.1 结论: (1) NK3-4 菌株具有抑制大豆根腐病原菌,溶解矿物磷、钾、硅,固氮功能;(2) NK3-4 菌株是土地类芽胞杆菌的新菌株;(3) NK3-4 革兰氏染色阳性,吲哚反应阴性,M.R 试验阴性,V.P 试验阳性。NK3-4 菌株在硅酸盐蔗糖无氮培养基上生长良好。能很好的利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、羧甲基纤维素钠、腐殖酸等作为碳源,能够水解淀粉、使明胶液化,使牛奶酪化;除葡萄糖、乳

糖、蔗糖外,还能利用羧甲基纤维素钠和腐殖酸;能利用大多数氨基酸中的氮,在 1% NaCl 中生长。最适生长温度 30–32 °C,4 °C 生长缓慢。生长最适 pH 为 6.5–7.5。
2.3.2 讨论: NK3-4 作为类芽胞杆菌属 *P. terrae* 的新菌株,具有多种生物活性。与本文相关研究还表明,以该菌株为有效活菌制成的生物有机肥,在大豆、玉米等作物上应用可提高作物产量,减少化肥施用量,提高农业生产经济效益^[25],可

见以该菌株的活菌体为活性成分制成的生物制剂具备生物农药与生物肥料的双重功能。从环境中筛选功能微生物，应用与防治作物病害，可提高作物产量和品质，遵循大自然内在循环规律，保护生态安全，对减轻化学农药及化学肥料对环境的污染，保障农产品安全具有重要意义。

表 2 菌株 NK3-4 部分生理生化特性 Table 2 Part physiological and biochemical characters of strain NK3-4		
项目 Items	结果 Results	
革兰氏染色反应 Gram stain	+	
吲哚反应 Indole reaction	-	
M. R 反应 M. R reaction	-	
V. P 反应 V. P reaction	+	
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	
H ₂ S 产气 Produce H ₂ S	-	
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	
牛奶胨化 Peptonize milk	+	
油脂水解 Lipin hydrolysis	-	
肉汤培养基生长 Grows in LB	+	
阿氏无氮培养液生长 Grows in Ashby's liquid medium	+	
硅酸盐培养基生长 Grows in silicate medium	+	
1% NaCl 生长 Grows in 1% NaCl	+	
2% NaCl 生长 Grows in 2% NaCl	-	

表 3 菌株 NK3-4 对部分碳源的利用情况 Table 3 Utilization of partly C source by strain NK3-4		
碳源 C source	产酸 Produce acid	产气 Produce gas
葡萄糖 Glucose	+	+
乳糖 Lactose	+	-
蔗糖 Sucrose	+	+
甘露醇 Mannitol	-	-
羧甲基纤维素钠 Carboxymethylcellulose sodium	+	-
腐殖酸 Humic acid	+	-

表 4 菌株 NK3-4 对部分氮源的利用情况 Table 4 Utilization of part N source by strain NK3-4		
氮源 N source	产碱 Produce alkali	生长 Growth
甘氨酸 Glycine	+	-
L-苯丙氨 L-Phenylalanine	+	+
L-缬氨酸 L-Alanine	+	+
L-赖氨酸 L-Lysine	+	+
L-天冬氨 L-Asparticacid	+	+
L-亮氨酸 L-Leucine	+	+
L-异亮氨 L-Isoleucine	-	+
L-精氨酸 L-Arginine	+	+
L-组氨酸 L-Histidine	+	+
L-甲硫氨酸 L-Methionine	-	+
L-酪氨酸 L-Tyrosine	-	+
L-脯氨酸 L-Proline	-	+
L-苏氨酸 L-Threonine	+	-
L-丙氨酸 L-Alanine	+	-
L-色氨酸 L-Tryptophan	-	+
L-谷氨酸 L-Glutamicacid	+	+
L-胱氨酸 L-Homocystine	+	+
L-半胱氨酸 L-Cystine	-	+
盐酸硫胺 Thiamine hydrochloride	+	+
维生素 C Vitamin C	+	+
6-苄氨基嘌呤 6-Benzylaminopurine	-	-

土地类芽胞杆菌是 2003 年在印度发现的新种^[24]，目前有 6 个功能菌株被报道，其中 AM141 菌株可作为水藻收获的絮凝剂^[24]，木聚糖酶产生菌 HPL-003 菌株的全基因序列得到了研究^[26]，在蚯蚓内脏中发现了一株能产生 N₂O 的 MH72 菌株^[27]。最近在深海环境分离到 3 株具有代谢木质素衍生的芳香族化合物的菌株^[28]。本文筛选到的土地类芽胞杆菌新菌株及其固氮、溶磷、解钾、活化硅、抑制尖孢镰刀菌等功能在国内外未见报道，可为新生物制剂的研发提供新的微生物资源。下一步将对其作用机理进行深入研究，以期将这株多功能菌株在生物农药及生物肥料生产中的应

用提供理论依据,为化肥、农药减量化施用的可行性研究提供理论及实验支持。

参 考 文 献

- [1] 杨青林, 桑利民, 孙吉茹, 等. 我国肥料利用现状及提高化肥利用率的方法[J]. 山西农业科学, 2011, 39(7): 690-692.
- [2] 黄春生, 熊明. 连作障碍的产生原因及改善途径[J]. 上海蔬菜, 2010(5): 62-64.
- [3] 胡繁荣. 设施蔬菜连作障碍原因与调控措施探讨[J]. 金华职业技术学院学报, 2005, 5(2): 18-22.
- [4] 袁仲, 杨继远. 农药化肥污染与食品安全[J]. 农产品加工·学刊, 2009, 7: 67-69.
- [5] 杨国洪, 王玉麟, 秦艺. 生物农药与生物肥料及其应用效果初探[J]. 上海农业科技, 2010(5): 47-48.
- [6] 李勇, 杨慧敏, 李铭刚, 等. 微生物农药的研究和应用进展[J]. 贵州农业科学, 2003, 31(2): 62-63.
- [7] Chung YR, Kim CH, Hwang I, et al. *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound[J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 1495-1500.
- [8] Ma Y, Xia Z, Liu X, et al. *Paenibacillus sabiniae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 6-11.
- [9] Seldin L, Rosado AS, Cruz DWD, et al. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3860-3868.
- [10] 黄明媛, 顾文杰, 张发宝, 等. 番茄青枯病拮抗菌筛选鉴定及其发酵条件初探[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 214-220.
- [11] 杜志兵, 杜秉海, 姚良同, 等. 两株棉花立枯病拮抗菌 MH1 和 MH25 的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 204-208.
- [12] Dijksterhuis J, Sanders M, Gorris LG, et al. Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 86: 13-21.
- [13] Beatty PH, Suan EJ. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48: 159-169.
- [14] 陈海英, 林健荣, 廖富蕓, 等. 多粘类芽孢杆菌 CP7 对荔枝霜疫霉菌的抗菌活性及其作用机制[J]. 园艺学报, 2010, 37(7): 1047-1056.
- [15] 马桂珍, 王淑芳, 暴增海, 等. 多粘类芽孢杆菌 L1-9 菌株对番茄早疫病的抑菌防病作用[J]. 中国蔬菜, 2010(12): 55-59.
- [16] 马桂珍, 王淑芳, 暴增海, 等. 海洋多粘类芽孢杆菌 L1-9 菌株抗菌蛋白的分离纯化及其抗菌作用[J]. 食品科学, 2010b, 31(17): 335-339.
- [17] 马桂珍, 付泓润, 王淑芳, 等. 海洋多粘类芽孢杆菌 L1-9 菌株生产抑菌物质发酵条件及其抑菌谱的研究[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 231-235.
- [18] Leubhn M, Heulin T, Hartmann A. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* isolated from different proximity to plant roots[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 22(4): 325-334.
- [19] Timmusk S, Wagner EGH. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in arabidopsis thaliana gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 1999, 12(11): 951-959.
- [20] Figueiredo MVB, Burity HA, Martínez CR, et al. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*[J]. Applied Soil Ecology, 2008, 40(1): 182-188.
- [21] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 71, 100.
- [22] 二氧化硅(可溶性)的测定(硅钼蓝分光光度法)[S]. 中华人民共和国行业标准. SL 01.2-1994.
- [23] 水质总氮的测定[S]. 中华人民共和国国家标准. GB-11894-89.
- [24] Yoon JH, Oh HM, Yoon BD, et al. *Paenibacillus kribbensis* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* sp. nov., biofloculants for efficient harvesting of algal cells[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53: 295-301.
- [25] 田艳洪, 刘文志, 王北兰, 等. 生物有机肥在大豆和玉米上应用效果研究[J]. 现代化农业, 2011, 379(2): 8-10.
- [26] Shin SH, Kim S, Kim JY, et al. Genome sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003, a xylanase-producing bacterium isolated from soil found in forest residue[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(5): 1266.
- [27] Horn MA, Ihssen J, Matthies C, et al. *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 1255-1265.
- [28] Ohta Y, Nishi S, Haga T, et al. Screening and phylogenetic analysis of deep-sea bacteria capable of metabolizing lignin-derived aromatic compounds[J]. Open Journal of Marine Science, 2012, 2: 177-187.