

中国十三省市土壤中非共生固氮微生物 菌种资源研究

孙建光, 徐 晶, 胡海燕, 张燕春, 刘 君, 王文博, 孙燕华
(农业部作物营养与施肥重点实验室; 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

摘要: 从全国 13 个省市自治区的 70 份土样中分离、采集到了非共生固氮微生物资源 181 份。从形态特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析表明,采集到的菌种资源在科学分类上属于 24 属 66 种,大约占到已报道非共生固氮微生物属的一半,具备一定的多样性和代表性。资源在分类学上的特点是分类地位相对集中,有 65 株菌属于类芽孢杆菌属,占总量的 36%; 52 株菌属于芽孢杆菌属,占总量的 29%; 19 株菌属于节杆菌属,占总量的 11%; 这 3 个属菌株合计占采集资源总量的 76%。随地域和作物种类分布的特点是芽孢杆菌和类芽孢杆菌两个属的菌种资源具有很强的地域广泛性和作物广泛性,即从采自全国各地、各种作物的土壤样品几乎都可以分离到这两类菌种。这个研究结果对微生物肥料菌种选育和生产应用具有指导意义。

关键词: 非共生; 生物固氮; 微生物资源; 系统发育

中图分类号: S154.38 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2009)06-1450-16

Collection and investigation on asymbiotic nitrogen-fixing microbial resources from 13 provinces over China

SUN Jian-guang, XU Jing, HU Hai-yan, ZHANG Yan-chun, LIU Jun, WANG Wen-bo, SUN Yan-hua
(Ministry of Agriculture Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization/ Institute of Agricultural Resources and Regional Planning,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: One hundred and eighty one asymbiotic nitrogen-fixing bacterial strains were isolated from 70 soil samples collected from 13 provinces over China. Results based on the determination of morphology, physiology and chemical properties, together with 16S rDNA sequencing, indicated that these strains belong to 66 species of 24 genera, which account for about a half of currently reported genera of asymbiotic nitrogen-fixing bacteria. Taxonomic distribution of these strains was relative converging, 65 strains belongs to Paenibacillus, 52 strains belongs to Bacillus and 19 strains belongs to Arthrobacter, which accounts for 36%, 29% and 11% of gross resource, respectively. Strains of these 3 groups make up 76% of gross resource. Strains of *Paenibacillus* and *Bacillus* showed significant diversity on the distribution regarding to geography and crops. Namely strains of these 2 groups could be isolated from almost every sample collected from root area of crops all over China.

Key words: asymbiotic; biological nitrogen fixation; microbial resources; phylogeny

自然界中某些原核微生物具有直接利用大气分子态氮气的的能力,可以在常温、常压下通过固氮酶的作用把氮气还原成氨供生物体利用,这就是生物固氮作用。生物固氮有三种主要类型,即自生固氮、联合固氮和共生固氮^[1]。自生固氮是微生物独立于植物,

自行将空气中的氮转化成氨,供自身营养;联合固氮指微生物定居于植物的根圈、根表,甚至进入植物体内,以植物分泌物为营养,固定空气中的氮素供自己和植物利用。有别于自生固氮和联合固氮,共生固氮微生物与植物或藻类共生,形成根瘤、异型胞等特殊

收稿日期: 2008-10-06 接受日期: 2008-12-29
基金项目: 农业部“948”项目(2007-Z1); 国家“863”项目(2006AA10Z417); 国家自然科技资源平台项目(2005DKA21201-14-1)资助。
作者简介: 孙建光(1963—),男,河北邯郸人,博士,副研究员,主要从事作物根际微生物、固氮微生物资源与微生物肥料研究。
Tel: 010-82108701, E-mail: jgsun@caas.ac.cn

的结构进行生物固氮,微生物与植物之间的关系很密切,相互依赖程度较高,往往存在寄主专一性。自生固氮与联合固氮的界限并不明显,事实上,很多联合固氮微生物也进行自生固氮,难以严格区分自生固氮微生物和联合固氮微生物。本研究的非共生固氮微生物指根瘤菌、弗兰克氏菌和蓝细菌之外的固氮微生物,主要包括自生固氮和联合固氮微生物,以及具有固氮作用的植物内生菌。

多年来,国内外学者对共生固氮的研究较多^[2],对非共生固氮研究相对较少,把非共生固氮微生物作为资源来研究的就更少,目前国内还未见报道。非共生固氮微生物可以通过生物固氮途径为水稻、玉米、小麦、棉花、蔬菜、果树等农作物提供氮素养分,在农业生产中有巨大的应用潜力。非共生固氮微生物资源是进行生物固氮基础理论研究和生产应用的重要基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

土壤样品共计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,主要取自处于生长期的大田作物根际,个别样品取自林木根际或荒地,共分离到了181份非共生固氮微生物资源。

1.2 固氮菌分离

1.2.1 固氮菌富集培养 取10g土样加入90mL无菌水中摇床振荡20min,吸取5mL加入30mL固氮菌富集培养液ACCC55^[3](蔗糖10g、K₂HPO₄·3H₂O 0.5g、NaCl 0.2g、CaCO₃ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.2g、蒸馏水1000mL,pH 7.0~7.2),在28℃、100r/min摇床振荡培养72h,然后转接于新鲜培养液继续培养,重复富集培养3次后进行固氮菌分离。

1.2.2 菌株分离、纯化 吸取上述富集培养物制成10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵稀释度,取0.1mL涂布在固氮菌分离培养基平板上(ACCC55液体培养基加入1.5%~2.0%水洗琼脂),29℃静置培养。2~3d待菌落形成后,在改良ACCC55培养基平板上(蔗糖10g、K₂HPO₄·3H₂O 0.5g、NaCl 0.2g、CaCO₃ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.2g、酵母膏0.5g、蒸馏水1000mL、琼脂1.5%~2.0%,pH 7.0~7.2)进行划线纯化,接种在斜面上,4℃保存备用。

1.3 固氮酶活性测定

1.3.1 乙炔还原法测定固氮酶活性 参考许齐放的方法^[4],在15mm×150mm螺口试管中加入5mL上

述改良固氮培养基制成斜面,接种固氮菌分离物。28℃培养72h后换橡胶塞,注入乙炔气体使终浓度为10%,继续培养72h,取100μL反应气体用气相色谱仪测定乙烯生成量。按照下列公式计算菌株固氮酶活性:

固氮酶活性[nmol/(mg·h)]=C₂H₄(nmol)/[菌体蛋白量(mg)×反应时间(h)]

式中: C₂H₄ nmol = 1000 × C₂H₄ 体积(μL) × 273 × P/[22.4 × (273 + t) × 760]^[5]; P为气压(mm汞柱),t为反应温度(℃)。

1.3.2 菌体蛋白测定 用5mL生理盐水洗涤、收集上述固氮酶测定后的斜面菌体,加入3mL 0.5mol/L NaOH煮沸5min,加入3mL 0.5mol/L HCl,离心,取上清1.0mL加入5mL考马斯亮蓝,混合、显色3min,测定595nm处吸光值A_{595nm}。根据牛血清白蛋白标准曲线计算菌体蛋白。

1.4 菌种形态特征、生理生化特征测定

在分离培养基上接种上述固氮菌分离物,观察菌落、菌体形态。参考《常见细菌系统鉴定手册》^[6]和《微生物学实验》^[7]测定固氮菌生理生化特征。

1.5 16S rDNA序列测定与系统学分析

培养固氮菌,提取细胞总DNA作为基因扩增模板。引物为27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。反应体系采用上海生物工程公司PCR扩增试剂盒。反应程序: 95℃变性30s、55℃退火1min、72℃延伸2min,共30个循环。DNA测序由北京三博远志生物技术公司完成,序列拼接及相似性分析使用DNASar软件完成,基因比对通过美国国家生物技术信息中心NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)在线完成。

2 结果与分析

2.1 非共生固氮微生物资源采集

经过富集培养、固氮菌分离纯化和固氮酶活性测定,共采集到非共生固氮微生物资源300余份。多数菌株检测到了固氮酶活性,在C₂H₄ 1~21nmol/(mg_{pro}·h)之间,部分菌株表现出较高的固氮酶活性和接种固氮效能。

2.2 固氮微生物形态特征、生理生化特征与初步鉴定

对其中的181份资源进行了深入研究。该资源全部为细菌,在无氮培养基平板上菌落呈圆形、半透明或不透明,表面光滑湿润有光泽,易挑起,边缘整齐。菌体多数为杆状,大小0.75~1.2μm×2.5~

5.5 μm ,部分菌株产芽孢,革兰氏阳性菌居多。多数菌株表现接触酶反应阳性、氧化酶反应阴性,糖醇类发酵产酸多样性,部分菌株具有较强的抗逆性,能够在4、60℃生长,耐受6%~10% NaCl。根据16S rDNA序列测定和分析比对,这些菌株与美国NCBI GenBank数据库中菌株的基因序列相似性大于97%,结合形态特征和生理生化特征初步鉴定为相关属种。采集资源的菌株编号、样品来源、生理生化特征及初步鉴定结果分别归类列表如下:表1为采自北京的非共生固氮微生物,共计72株;表2为采自内蒙古的菌株共计66株;表3为采自其他省市的菌株共计43株。

2.3 资源的分类地位和系统学分析

采用35株参比菌,包括无色杆菌 *Achromobacter xylosoxidans*; 节杆菌 *Arthrobacter arilaitensi*、*A. globiformis*、*A. oryzae*、*A. oxydans*、*A. pascens*; 芽孢杆菌 *Bacillus circulans*、*B. flexus*、*B. funiculus*、*B. licheniformis*、*B. megaterium*、*B. nealsonii*、*B. pichinotyi*、*B. racemilacticus*; 短芽孢杆菌 *Brevibacillus choshinensis*、*B. parabrevis*; 柄杆菌 *Caulobacter henricii*; 鞘氨醇杆菌科 *Chitinophaga ginsengisegetis*; 屈挠杆菌科 *Dyadobacter fermentans*、肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*; 黄杆菌 *Flavobacterium anhuiense*; 红螺菌科 *Inquilinus ginsengisoli*; 黄单孢菌科 *Lysobacter antibioticus*; 类芽孢杆菌 *Paenibacillus alginolyticus*、*P. alkaliterrae*、*P. amylolyticus*、*P. barengoltzii*、*P. glycanilyticus*、*P. sabina*; 叶杆菌 *Phyllobacterium ifriqiense*; 假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*; 假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas mexicana*; 鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium siyangensis*; 寡养单孢菌 *Stenotrophomonas maltophilia*; 伯克霍尔德氏菌科 *Variovorax paradoxus* 进行的16S rDNA序列同源性分析清晰地显示了采集资源的分类地位概况(图1)。由这张系统进化树状图可以看出,采集的菌株资源被分成7个类群:群1是类芽孢杆菌 *Paenibacillus*,包含了6株参比菌;群2是短芽孢杆菌 *Brevibacillus*,2株参比菌在其中;群3是芽孢杆菌 *Bacillus*,8株参比菌全部聚在其中;群6是节杆菌 *Arthrobacter*,全部5株参比菌位于其中;这4个类群包括了大部资源菌株。群4包含了假单胞菌、无色杆菌、假黄单胞菌、肠杆菌、寡养单孢菌等;群5是叶杆菌、柄杆菌等;群7是鞘氨醇杆菌等。分类地位属于4、5、7三个类群的菌种资源数量相对较少。

2.4 采集资源在分类学上的分布特点

对181份菌种资源的分类地位进行统计,全部菌株隶属于24属66种。分布特点是分类地位相对集中,有65株菌属于类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*,占全部菌株的36%;52株菌属于芽孢杆菌属 *Bacillus*,占总量的29%;19株菌属于节杆菌属 *Arthrobacter*,占11%。这3个属的菌株合计占到了总量的76%(表4)。

2.5 资源随地域和作物种类分布特点

统计结果显示,采集到的非共生固氮微生物资源随地域和作物种类分布的最大特点是分类地位属于芽孢杆菌 *Bacillus* 和类芽孢杆菌 *Paenibacillus* 两个属的菌株具有很强的地域广泛性和作物广泛性,即从采自全国各地、各种作物的土壤样品几乎都可以分离到这两类菌种资源(表5)。第二个特点是采集资源随作物种类的分布相对平均,从1%~14%,从13种作物根际土壤样品中收集的菌种资源总计占资源总量的71%,反映了所收集资源对作物的广泛适应性。与此对应的是所采集资源随采集地域相对集中,从北京、内蒙古两地采集的资源量占总量的76%,这是因为从该地区采集的样品数量相对较多,并不意味着这两地区的非共生固氮微生物资源显著高于其他省市。此外,数据似乎显示分类地位属于节杆菌 *Arthrobacter* 的菌种资源随作物种类分布较平均,而随地域分布较集中,但目前收集到的该类资源数量仍然偏少,需要收集更多资源后进一步分析验证。

3 讨论

非共生固氮微生物是一类重要的微生物资源,在科学研究和农业生产中具有重要价值。近年来,由于资源短缺和能源危机,世界各国都对生物固氮予以高度重视,非共生固氮微生物资源成为研究热点,不断有新的种属被发现。自2007年以后报道的新种属就有 *Azospira restricta*^[8], *Azospirillum canadense*^[9], *Azospirillum zeae*^[10], *Burkholderia nordosa*^[11], *Gluconacetobacter kombuchae*^[12], *Novosphingobium nitrogenifigens*^[13], *Pseudacidovorax intermedius*^[14], *Paenibacillus donghaensis*^[15], *Paenibacillus forsythiae*^[16], *Paenibacillus sabinae*^[17], *Paenibacillus taiwanensis*^[18], *Paenibacillus zanthoxyli*^[19], *Phytobacter diazotrophicus*^[20], *Pseudoxanthobacter soli*^[21], *Rhizobium oryzae*^[22], *Vibrio porteresiae*^[23], 共计16种。本研究也采集到了一些近年来发现的新种,如类芽孢杆菌

表 1 采自北京的非共生固氮微生物
Table 1 Asymbiotic nitrogen-fixing bacteria from Beijing

菌株 Strain	样品来源 Sample source	初步鉴定 Identification	生理生化特征 Physiological and chemical characteristics																			
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
7001	小麦 Wheat	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
7003	芹菜 Celery	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus alkalierrae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7005	水沟 Ditch	屈挠杆菌科 <i>Dyadobacter fermentans</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
7007	枣园 Jujube	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
7009	水沟 Ditch	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7010	大葱 Onion	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
7012	水沟 Ditch	藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
7015	枣园 Jujube	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
7022	藕田 Lotus	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus alkalierrae</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7027	水沟 Ditch	弯曲芽孢杆菌 <i>Bacillus flexus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
7032	水沟 Ditch	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus agarexodens</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
7034	水沟 Ditch	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
7038	水沟 Ditch	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus alginolyticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7042	枣园 Jujube	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7043	稻田 Rice	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
7057	枣园 Jujube	氧化节杆菌 <i>Arthrobacter oxidans</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
7068	稻田 Rice	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
7081	白菜 Pakchoi	蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7082	白菜 Pakchoi	节杆菌 <i>Arthrobacter globiformis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
7088	水沟 Ditch	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
7100	水沟 Ditch	芽孢杆菌 <i>Bacillus edaphicus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	/	+	-
7101	水沟 Ditch	藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7102	水沟 Ditch	弯曲芽孢杆菌 <i>Bacillus flexus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
7106	枣园 Jujube	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
7107	水沟 Ditch	短芽孢杆菌 <i>Brenibacillus formosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-

续表 1

菌株 Strain	样品来源 Sample source	初步鉴定 Identification	生理生化特征 Physiological and chemical characteristics															
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
7112	白菜 Pakchoi	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
7121	白菜 Pakchoi	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
7124	芹菜 Celery	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
7133	白菜 Pakchoi	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus polymyxa</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
7137	白菜 Pakchoi	节杆菌 <i>Arthrobacter pascens</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
7138	白菜 Pakchoi	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus agarexedens</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
7143	枣园 Jujube	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
7144	水沟 Ditch	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7156	农田 Field	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
7157	枣园 Jujube	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus agarexedens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
7161	水沟 Ditch	短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus choshinensis</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
7162	大葱 Onion	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus validus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
7165	白菜 Pakchoi	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus daejeonensis</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
7166	白菜 Pakchoi	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
7175	白菜 Pakchoi	节杆菌 <i>Arthrobacter pascens</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
7178	白菜 Pakchoi	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7184	白菜 Pakchoi	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
7185	白菜 Pakchoi	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7195	白菜 Pakchoi	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
7198	藕田 Lotus	芽孢杆菌 <i>Bacillus nealsonii</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
7199	枣园 Jujube	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus graminis</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
7200	枣园 Jujube	节杆菌 <i>Arthrobacter globiformis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
7202	枣园 Jujube	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7203	水沟 Ditch	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
7211	白菜 Pakchoi	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

续表 1

菌株 Strain	样品来源 Sample source	初步鉴定 Identification	生理生化特征 Physiological and chemical characteristics																			
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
7212	白菜 Pakchoi	黄单孢菌科 <i>Lysobacter gummosus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
7213	白菜 Pakchoi	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
7214	枣园 Jujube	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus forsythia</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
7216	水沟 Pitch	短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus choshinensis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
7220	白菜 Pakchoi	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
7221	白菜 Pakchoi	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
7225	白菜 Pakchoi	节杆菌 <i>Arthrobacter pascens</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
7228	油菜 Rape	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus kobensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
7229	枣园 Jujube	芽孢杆菌 <i>Bacillus pichinotyu</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
7230	藕田 Lotus	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus daejeonensis</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
7231	玉米 Maize	产碱菌科 <i>Pusillimonas terrae</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
7240	白菜 Pakchoi	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7241	枣园 Jujube	坚强芽孢杆菌 <i>Bacillus firmus</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
7242	枣园 Jujube	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
7243	枣园 Jujube	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
7245	水沟 Ditch	芽孢杆菌 <i>Bacillus niacinu</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
7248	白菜 Pakchoi	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
7249	白菜 Pakchoi	寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7251	白菜 Pakchoi	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus kobensis</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
7252	水沟 Ditch	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7259	白菜 Pakchoi	芽孢杆菌 <i>Bacillus pichinotyu</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
7260	白菜 Pakchoi	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus validus</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

注 (Note): 01—接触酶反应 Catalase reaction; 02—氧化酶反应 Oxidase reaction; 03—4℃生长 Growth at 4℃; 04—37℃生长 Growth at 37℃; 05—60℃生长 Growth at 60℃; 06—2% NaCl Growth in 2% NaCl; 07—5% NaCl Growth in 5% NaCl; 08—7% NaCl Growth in 7% NaCl; 09—10% NaCl Growth in 10% NaCl; 10—苯丙氨酸脱氨酶试验 Phenylalanine deaminase test; 11—柠檬酸盐试验 Citrate test; 12—水解淀粉 Starch hydrolyzation; 13—卵黄卵磷脂酶 Lecithinase test; 14—甲基红试验 Methyl red test; 15—VP 试验 VP test; 16—pH 5.7 生长 Growth at pH 5.7; 17—葡萄糖发酵产酸 Glucose fermentation; 18—甘露醇发酵产酸 Mannitol fermentation; 19—乳糖发酵产酸 Lactose fermentation; 20—蔗糖发酵产酸 Sucrose fermentation. “+”表示阳性 Mean positive, “-”表示阴性 Mean negative.

表 2 采自内蒙古的非共生固氮微生物

Table 2 Asymbiotic nitrogen-fixing bacteria from Inner Mongolia

菌株 Strain	样品来源 Sample source	初步鉴定 Identification	生理生化特征 Physiological and chemical characteristics															
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
7013	马铃薯 Potato	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus caespitius</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
7017	马铃薯 Potato	鞘氨醇杆菌科 <i>Pocheonia soli</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7018	油菜 Rape	氧化节杆菌 <i>Arthrobacter oxydans</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7023	小麦 Wheat	节杆菌 <i>Arthrobacter ramosus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7031	农田 Field	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7035	大麦 Barley	节杆菌 <i>Arthrobacter pascens</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7036	林地 Tree	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7037	小麦 Wheat	节杆菌 <i>Arthrobacter polychromogenes</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7047	农田 Field	类短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus parabrevis</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7049	农田 Field	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7052	小麦 Wheat	红螺菌科 <i>Inquilinus ginsengisoli</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7053	小麦 Wheat	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
7058	油菜 Rape	柄杆菌 <i>Caulobacter henricii</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7059	小麦 Wheat	胶质芽孢杆菌 <i>Bacillus mucilaginosus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7061	小麦 Wheat	节杆菌 <i>Arthrobacter pascens</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7062	油菜 Rape	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
7063	油菜 Rape	鞘氨醇杆菌 <i>Sphingobacterium siyangensis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7071	小麦 Wheat	节杆菌 <i>Arthrobacter pascens</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
7072	油菜 Rape	鞘氨醇杆菌 <i>Chitinophaga ginsengisegetis</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7073	油菜 Rape	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
7074	油菜 Rape	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7075	油菜 Rape	氧化节杆菌 <i>Arthrobacter oxidans</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7076	油菜 Rape	土壤短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus agri</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7077	油菜 Rape	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+

续表 2

菌株 Strain	样品来源 Sample source	初步鉴定 Identification	生理生化特征 Physiological and chemical characteristics															
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
7078	油菜 Rape	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7079	油菜 Rape	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus kobensis</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7086	小麦 Wheat	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
7087	玉米 Maize	鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas azotifigens</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
7093	油菜 Rape	屈挠杆菌科 <i>Dyadobacter fermentans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
7094	小麦 Wheat	红螺菌科 <i>Inquilinus ginsengisoli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
7098	油菜 Rape	土壤短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus agri</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
7109	油菜 Rape	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus barengoltzii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
7110	油菜 Rape	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
7118	玉米 Maize	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
7119	油菜 Rape	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7120	马铃薯 Potato	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
7125	小麦 Wheat	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
7126	油菜 Rape	节杆菌 <i>Arthrobacter ramosus</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7127	大麦 Barley	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
7132	油菜 Rape	节杆菌 <i>Arthrobacter oryzae</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7134	玉米 Maize	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
7135	小麦 Wheat	氧化无色杆菌 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
7149	小麦 Wheat	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
7150	小麦 Wheat	节杆菌 <i>Arthrobacter arilaitensis</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
7151	油菜 Rape	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7163	小麦 Wheat	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus polymyxa</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7173	大麦 Barley	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7181	油菜 Rape	伯克霍尔德菌科 <i>Variovorax paradoxus</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
7186	马铃薯 Potato	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus caespitis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-

续表 2

菌株 Strain	样品来源 Sample source	初步鉴定 Identification	生理生化特征 Physiological and chemical characteristics															
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
7187	油菜 Rape	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
7190	马铃薯 Potato	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus caespitis</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
7194	小麦 Wheat	节杆菌 <i>Arthrobacter polychromogenes</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
7206	油菜 Rape	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
7207	油菜 Rape	节杆菌 <i>Arthrobacter pascens</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
7208	小麦 Wheat	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus caespitis</i>	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
7210	小麦 Wheat	鞘氨醇杆菌 <i>Chitinophaga ginsengisegetis</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7218	农田 Field	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7233	小麦 Wheat	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus graminis</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
7234	大麦 Barley	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus validus</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
7235	油菜 Rape	节杆菌 <i>Arthrobacter globiformis</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
7236	马铃薯 Potato	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus caespitis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
7244	马铃薯 Potato	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus caespitis</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
7246	小麦 Wheat	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
7254	油菜 Rape	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
7257	油菜 Rape	伯克霍尔德菌科 <i>Varonox paradoxus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
7258	小麦 Wheat	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-

注 (Note): 01—接触酶反应 Catalase reaction; 02—氧化酶反应 Oxidase reaction; 03—4℃生长 Growth at 4℃; 04—37℃生长 Growth at 37℃; 05—60℃生长 Growth at 60℃; 06—2% NaCl Growth in 2% NaCl; 07—5% NaCl Growth in 5% NaCl; 08—7% NaCl Growth in 7% NaCl; 09—10% NaCl Growth in 10% NaCl; 10—苯丙氨酸脱氨酶试验 Phenylalanine deaminase test; 11—柠檬酸盐试验 Citrate test; 12—水解淀粉 Starch hydrolyzation; 13—卵黄卵磷脂酶 Lecithinase test; 14—甲基红试验 Methyl red test; 15—VP 试验 VP test; 16—pH 5.7 生长 Growth at pH 5.7; 17—葡萄糖发酵产酸 Glucose fermentation; 18—甘露醇发酵产酸 Mannitol fermentation; 19—乳糖发酵产酸 Lactose fermentation; 20—蔗糖发酵产酸 Sucrose fermentation. “+”表示阳性 Mean positive; “-”表示阴性 Mean negative.

表 3 采自其他省区的非共生固氮微生物
Table 3 Asymbiotic nitrogen-fixing bacteria from other provinces

菌株 Strain	样品来源 Sample source	初步鉴定 Identification	生理生化特征 Physiological and chemical characteristics															
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
7002	河北塘泥 Sludge, Hebei	假黄单胞菌 <i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
7004	宁夏农田 Field, Ningxia	弯曲芽孢杆菌 <i>Bacillus flexus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
7008	辽宁农田 Field, Liaoning	芽孢乳杆菌 <i>Sporolactobacillus laevolacticu</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
7016	黑龙江大豆 Soybean, Heilongjiang	越南伯克氏菌 <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
7019	宁夏番茄 Tomato, Ningxia	芽孢杆菌 <i>Bacillus racemilacticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
7025	黑龙江水稻 Rice, Heilongjiang	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
7028	宁夏黄瓜 Cucumber, Ningxia	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
7029	辽宁农田 Field, Liaoning	芽孢杆菌 <i>Bacillus racemilacticus</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
7030	黑龙江玉米 Maize, Heilongjiang	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus stelleri</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
7044	河北番茄 Tomato, Hebei	产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
7048	宁夏黄瓜 Cucumber, Ningxia	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus thailandensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7050	辽宁松树 Pine, Liaoning	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium brassicacearum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
7054	黑龙江大豆 Soybean, Heilongjiang	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus kobensis</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
7055	河北番茄 Tomato, Hebei	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
7060	黑龙江稻田 Rice, Heilongjiang	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7064	黑龙江大豆 Soybean, Heilongjiang	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculul</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
7065	广东香蕉 Banana, Guangdong	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus panacisoli</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7070	黑龙江稻田 Rice, Heilongjiang	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus agarexodens</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
7083	河北番茄 Tomato, Hebei	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
7084	辽宁农田 Field, Liaoning	芽孢杆菌 <i>Bacillus racemilacticus</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
7085	宁夏农田 Field, Ningxia	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus sabina</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
7089	河北番茄 Tomato, Hebei	黄杆菌 <i>Flavobacterium anhuiense</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
7090	黑龙江大豆 Soybean, Heilongjiang	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+

续表 3

菌株 Strain	样品来源 Sample source	初步鉴定 Identification	生理生化特征 Physiological and chemical characteristics															
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
7096	黑龙江大豆 Soybean, Helongjiang	芽孢杆菌 <i>Bacillus yunchengensis</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
7108	陕西菜园 Garden, Shaanxi	芽孢杆菌 <i>Bacillus pichinoti</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
7117	辽宁松树 Pine, Liaoning	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
7131	黑龙江玉米 Maize, Helongjiang	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
7146	河北番茄 Tomato, Hebei	黄杆菌 <i>Flavobacterium anhuiense</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
7148	陕西菜园 Garden, Shaanxi	芽孢杆菌 <i>Bacillus pichinoti</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
7167	山东菜园 Garden, Shandong	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus agarexedens</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
7177	宁夏黄瓜 Cucumber, Ningxia	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus thailandensis</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
7182	辽宁农田 Field, Liaoning	芽孢杆菌 <i>Bacillus vireti</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
7192	山东菜园 Garden, Shandong	环状芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
7196	辽宁松树 Pine, Liaoning	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium brassicaearum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
7197	内蒙古松树 Pine, Inner Mongolia	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus humicus</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
7204	宁夏番茄 Tomato, Ningxia	短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus formosus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
7205	黑龙江稻田 Rice, Helongjiang	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus agarexedens</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
7215	辽宁松树 Pine, Liaoning	芽孢杆菌 <i>Bacillus funiculus</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
7217	辽宁农田 Field, Liaoning	芽孢乳杆菌 <i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
7219	黑龙江玉米 Maize, Helongjiang	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus stellifer</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
7237	黑龙江稻田 Rice, Helongjiang	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
7247	新疆农田 Field, Xinjiang	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium brassicaearum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
7253	宁夏番茄 Tomato, Ningxia	短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus choshinensis</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+

注 (Note): 01—接触酶反应 Catalase reaction; 02—氧化酶反应 Oxidase reaction; 03—4℃ 生长 Growth at 4℃; 04—37℃ 生长 Growth at 37℃; 05—60℃ 生长 Growth at 60℃; 06—2% NaCl Growth in 2% NaCl; 07—5% NaCl Growth in 5% NaCl; 08—7% NaCl Growth in 7% NaCl; 09—10% NaCl Growth in 10% NaCl; 10—苯丙氨酸脱氨酶试验 Phenylalanine deaminase test; 11—柠檬酸盐试验 Citrate test; 12—水解淀粉 Starch hydrolyzation; 13—卵磷脂酶 Lecithinase test; 14—甲基红试验 Methyl red test; 15—VP 试验 VP test; 16—pH 5.7 生长 Growth at pH 5.7; 17—葡萄糖发酵产酸 Glucose fermentation; 18—甘露醇发酵产酸 Mannitol fermentation; 19—乳糖发酵产酸 Lactose fermentation; 20—蔗糖发酵产酸 Sucrose fermentation. “+”表示阳性 Mean positive; “-”表示阴性 Mean negative.

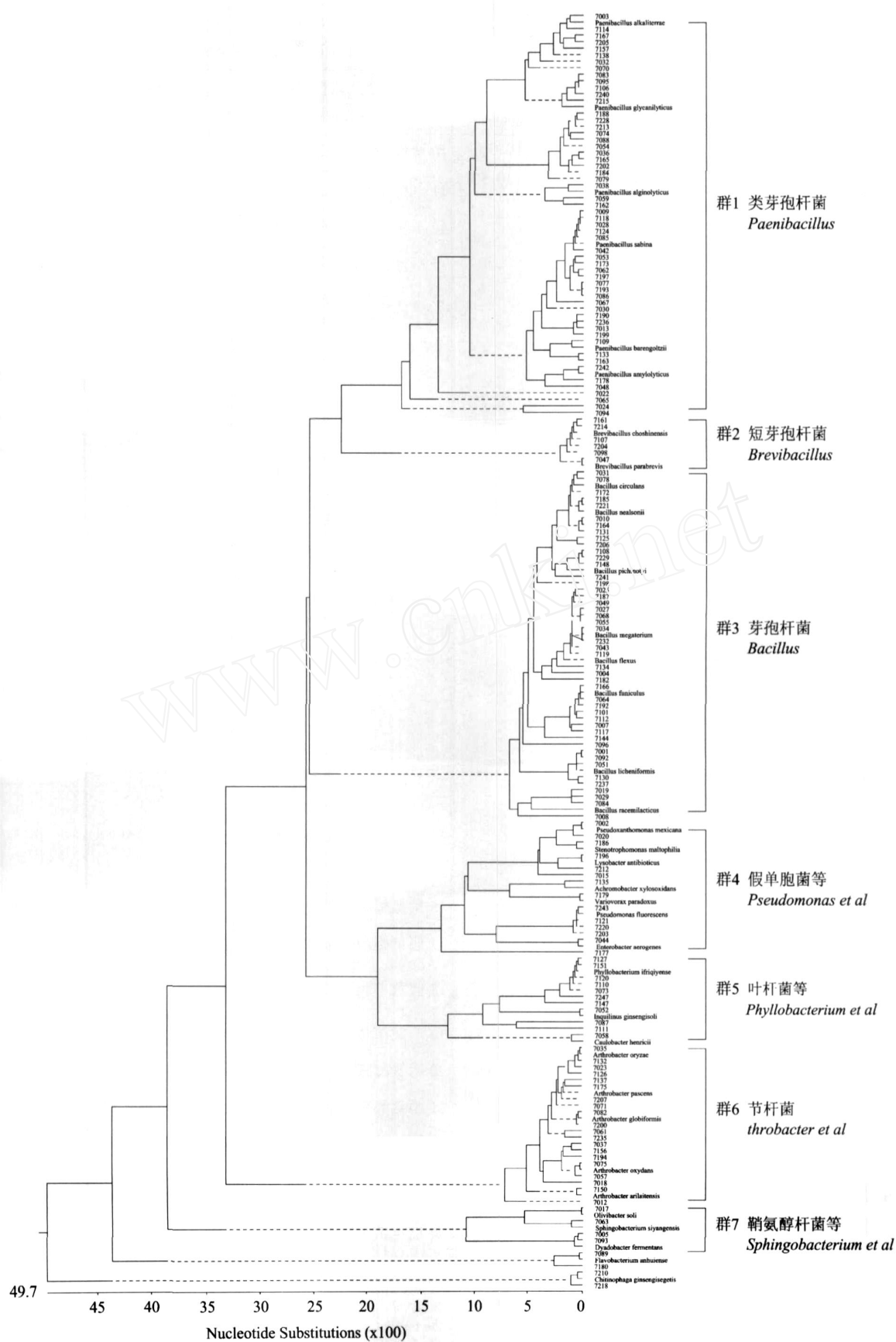


图1 新采集固氮菌系统进化分析

Fig.1 Phylogenetic tree of collected nitrogen-fixing bacteria

表 4 非共生固氮微生物资源的分类学分布特点
Table 4 Taxonomic distribution of asymbiotic nitrogen-fixing microbial resources

分类地位(属)	分类地位(种)	菌株数	分类地位(属)	分类地位(种)	菌株数
Genus	Species	Ammount	Genus	Species	Ammount
01 无色杆菌 <i>Achromobacter</i>	<i>xylosoxidans</i> (1)	1 (0.5 %)	10 黄杆菌 <i>Flavobacterium</i>	<i>anhuiense</i> (2)	2 (1.1 %)
02 节杆菌 <i>Arthrobacters</i>	<i>arilaitensis</i> (1)	19 (10.5 %)	11 红螺菌科 <i>Inquilinus</i>	<i>ginsengisoli</i> (2)	2 (1.1 %)
	<i>globiformis</i> (3)		12 黄单孢菌科 <i>Lysobacter</i>	<i>gummosus</i> (1)	1 (0.5 %)
	<i>oryzae</i> (1)		13 微球菌 <i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i> (2)	2 (1.1 %)
	<i>oxidant</i> (3)		14 类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus</i>	<i>agarexedens</i> (6)	65 (35.9 %)
	<i>pascens</i> (7)			<i>alginolyticus</i> (1)	
	<i>polychromogenes</i> (2)			<i>alkaliterrae</i> (2)	
	<i>ramosus</i> (2)			<i>amylolyticus</i> (1)	
03 芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	<i>cereus</i> (1)	52 (28.7 %)		<i>barengoltzii</i> (1)	
	<i>circulans</i> (9)			<i>caespitis</i> (6)	
	<i>edaphicus</i> (1)			<i>daejeonensis</i> (2)	
	<i>fimus</i> (1)			<i>forsythia</i> (1)	
	<i>flexus</i> (3)			<i>glycanilyticus</i> (4)	
	<i>funiculus</i> (13)			<i>graminis</i> (2)	
	<i>licheniformis</i> (1)			<i>humicus</i> (11)	
	<i>megaterium</i> (9)			<i>kobensis</i> (4)	
	<i>mucilaginosus</i> (1)			<i>panacisoli</i> (2)	
	<i>nealsonii</i> (1)			<i>polymyxa</i> (2)	
	<i>niacini</i> (1)			<i>sabina</i> (13)	
	<i>pichinotyi</i> (4)			<i>stellifer</i> (2)	
	<i>racemilacticus</i> (3)			<i>thailandensis</i> (2)	
	<i>subtilis</i> (2)			<i>validus</i> (3)	
	<i>vireti</i> (1)		15 叶杆菌属 <i>Phyllobacterium</i>	<i>brassicacearum</i> (3)	8 (4.4 %)
	<i>yunchengensis</i> (1)			<i>ifriqiense</i> (5)	
04 短芽孢杆菌	<i>agri</i> (2)	8 (4.4 %)	16 鞘氨醇杆菌科 <i>Pocheonia</i>	<i>solis</i> (1)	1 (0.5 %)
<i>Brevibacillus</i>	<i>choshinensis</i> (3)		17 假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i> (4)	4 (2.2 %)
	<i>fomosis</i> (2)			<i>mexicana</i> (1)	1 (0.5 %)
	<i>parabrevis</i> (1)		18 假黄单胞菌 <i>Pseudoxanthomonas</i>		
05 伯克氏菌 <i>Burkholderia</i>	<i>vietnamiensis</i> (1)	1 (0.5 %)	19 产碱菌科 <i>Pusillimonas</i>	<i>terrae</i> (1)	1 (0.5 %)
06 柄杆菌 <i>Caulobacter</i>	<i>hennicii</i> (1)	1 (0.5 %)	20 鞘氨醇杆菌 <i>Sphingobacterium</i>	<i>siyangensis</i> (1)	1 (0.5 %)
07 鞘氨醇杆菌科	<i>ginsengisegetis</i> (2)	2 (1.1 %)	21 鞘氨醇单孢菌 <i>Sphingomonas</i>	<i>azotifigens</i> (1)	1 (0.5 %)
<i>Chitinophaga</i>			22 芽孢乳杆菌 <i>Sporolactobacillus</i>	<i>laevolacticu</i> (2)	2 (1.1 %)
08 屈挠杆菌科	<i>fementans</i> (2)	2 (1.1 %)	23 寡养单孢菌 <i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i> (1)	1 (0.5 %)
<i>Dyadobacter</i>			24 伯克霍罗德氏菌科	<i>paradoxus</i> (2)	2 (1.1 %)
09 产气肠杆菌	<i>aerogenes</i> (1)	1 (0.5 %)	<i>Variovorax</i>		
<i>Enterobacter</i>					

注：表中种名后括号中数字表示该种的菌株资源数，括号中的百分数指占所鉴定资源总量的百分比。
Note：The number behind the species name account for the isolate amount，the percentage account for the propotion in all isolates.

表 5 非共生固氮微生物资源随地域及作物分布特点
Table 5 Distribution of asymbiotic nitrogen-fixing microbial resources to geography and crops

菌种分类地位 Taxonomic position	资源随地域分布(株) Distribution of isolates to geography (Strain Number)											资源随作物分布(株) Distribution of isolates to crops (Strain Number)												
	北京 Beijing	内蒙古 Inner Mongolia	黑龙江 Heilongjiang	宁夏 Ningxia	河北 HeBei	天津 Tianjin	辽宁 Liaoning	山东 Shandong	陕西 Shaanxi	广东 Guangdong	新疆 Xinjiang	小白菜 Pakchoi	油菜 Rape	小麦 Wheat	枣树 Jujube	番茄 Tomoto	水稻 Rice	玉米 Maize	马铃薯 Potato	大豆 Soybean	黄瓜 Cucumber	莲藕 Lotus	芹菜 Celery	大葱 Onion
01 无色杆菌 <i>Achromobacter</i> (1)		1												1										
02 节杆菌 <i>Arthrobacters</i> (19)	6	13										4	6	7	2									
03 芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> (52)	26	10	5	2	1	3	2	1	2			9	4	3	4	2	4	2	2		2	1		1
04 短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus</i> (8)	3	3		2									2			2								
05 伯克氏菌 <i>Burkholderia</i> (1)			1										1											
06 柄杆菌 <i>Caulobacter</i> (1)		1											1											
07 鞘氨醇杆菌科 <i>Chitinophaga</i> (2)		2																						
08 屈挠杆菌科 <i>Dyadobacter</i> (2)													1											
09 产气肠杆菌 <i>Enterobacter</i> (1)	1	1			1											1								
10 黄杆菌 <i>Flavobacterium</i> (2)					2											2								
11 红螺菌科 <i>Inquilinus</i> (2)		2												2										
12 黄单孢菌科 <i>Lysobacter</i> (1)	1											1												
13 微球菌 <i>Micrococcus</i> (2)	2																							
14 类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus</i> (65)	27	23	7	5	1			1		1		9	7	5	8	1	3	3	5	2	3	2	2	1
15 叶杆菌属 <i>Phyllobacterium</i> (8)		5					2				1		1						1					
16 鞘氨醇杆菌科 <i>Pocheonia</i> (1)		1																						1
17 假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> (4)	4											2			1									
18 假黄单胞菌 <i>Pseudoxanthomonas</i> (1)					1																			
19 产碱菌科 <i>Pusillimonas</i> (1)	1																	1						

续表 5

菌种分类地位 Taxonomic position	资源随地域分布(株) Distribution of isolates to geography (Strain Number)												资源随作物分布(株) Distribution of isolates to crops (Strain Number)												
	北京 Beijing	内蒙古 Inner Mongolia	黑龙江 Heilongjiang	宁夏 Ningxia	河北 HeBei	天津 Tianjin	辽宁 Liaoning	山东 Shandong	陕西 Shaanxi	广东 Guangdong	新疆 Xinjiang	小白菜 Pakchoi	油菜 Rape	小麦 Wheat	枣树 Jujube	番茄 Tomoto	水稻 Rice	玉米 Maize	马铃薯 Potato	大豆 Soybean	黄瓜 Cucumber	莲藕 Lotus	芹菜 Celery	大葱 Onion	
20 鞘氨醇杆菌 <i>Sphingobacterium</i> (1)		1											1												
21 鞘氨醇单孢菌 <i>Sphingomonas</i> (1)		1																1							
22 芽孢乳杆菌 <i>Sporolactobacillus</i> (2)						2																			
23 寡养单孢菌 <i>Stenotrophomonas</i> (1)	1											1													
24 伯克霍尔德菌科 <i>Varionorax</i> (2)		2											2												
合计资源量(株) <i>Isolates in total</i> (Strain Number.)	72	66	13	9	6	5	4	2	2	1	1	26	25	18	15	8	7	7	7	5	3	3	2	2	
占资源总量百分比(%) <i>Percentage to all isolates</i> (%)	40	36	7	5	3	3	2	1	1			14	14	10	8	4	4	4	4	3	2	2	1	1	

注(Notes): 表中分类地位属名后括号中数字表示该属的菌株资源数 The number behind the genus name account for the isolate amount.

Paenibacillus sabinae,同时也采集到了一些目前尚未报道的具有固氮作用的菌株,这些资源具有重要的研究价值和学术意义。

据不完全统计,目前已经报道的非共生固氮微生物大约有50多个属,本研究采集的资源分布在24个属,接近一半。固氮螺菌 *Azospirillum*、草螺菌 *Herbaspirillum* 和葡萄糖醋酸杆菌 *Gluconacetobacter* 等是著名的非共生固氮微生物^[24],本项工作没有采集到这些类群,原因是在采集计划中暂时没有包括这些菌株,在以后的采集计划和资源研究中将考虑这类资源。

研究结果显示,芽孢杆菌属 *Bacillus* 和类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*,是从作物根际分离到的主要可培养非共生固氮微生物类群,具有很强的地域广泛性和作物广泛性。这个结论对于固氮微生物肥料的菌种选育和生产应用具有重要指导意义。

参考文献:

- [1] 陈文新. 生物固氮[A]. 中国土壤学会. 氮素循环与农业和环境学术研讨会论文集[C]. 厦门: 厦门大学出版社, 2001. 4-5.
- [2] 李季伦. 我国生物固氮研究的现状和对策[A]. 周光召主编. 科技进步与学科发展——科学技术面向新世纪“学术年会论文集”[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998. 144-148.
- [3] 中国农业微生物菌种保藏管理中心. 中国农业菌种目录[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [4] 许齐放, 黄秀梨, 陈廷伟. 八株芽孢杆菌菌株的分类及固氮活性的测定[J]. 微生物学通报, 1998, 25(5): 253-258.
- [5] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [8] Bae H, Brian A, Rash F, Rainey M *et al.* Description of *Azospira restricta* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from groundwater[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57: 1521-1526.
- [9] Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57: 620-624.
- [10] Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of Zea mays[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57: 2805-2809.
- [11] Chen W, Faria S, Euan J, Geoffrey E. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57: 1055-1059.
- [12] Dutta D, Gachhui R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57: 353-357.
- [13] Addison L, Foote M, Reid M, Lloyd-Jones G. *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57: 2467-2471.
- [14] Kämpfer P, Thummes K, Chu H *et al.* *Pseudacidovorax intermedius* gen. nov., sp. nov., a novel nitrogen-fixing betaproteobacterium isolated from soil[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2008, 58: 491-495.
- [15] Choi J, Im W, Yoo J *et al.* *Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a xylan-degrading and nitrogen-fixing bacterium isolated from East Sea sediment[J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2008, 18: 189-193.
- [16] Ma Y, Chen S. *Paenibacillus fonsyithiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2008, 58: 319-323.
- [17] Ma Y, Xia Z, Liu X, Chen S. *Paenibacillus sabinae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57: 6-11.
- [18] Lee F, Kuo H, Tai C *et al.* *Paenibacillus taiwanensis* sp. nov., isolated from soil in Taiwan[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57: 1351-1354.
- [19] Ma Y, Zhang J, Chen S. *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57: 873-877.
- [20] Zhang G, Peng G, Wang E *et al.* Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. [J]. Arch Microbiol., 2008, 189: 431-439.
- [21] Arun B, Schumann P, Chu H *et al.* *Pseudoxanthobacter soli* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing alphaproteobacterium isolated from soil[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2008, 58: 1571-1575.
- [22] Peng G, Yuan Q, Li H *et al.* *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice (*Oryza alta*) [J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2008, 58: 2158-2163.
- [23] Rameshkumar N, Youhei F, Sawabe T, Nair S. *Vibrio porteresiae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a mangrove-associated wild rice[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2008, 58: 1608-1615.
- [24] Bhattacharjee R, Singh A, Mukhopadhyay S. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 80: 199-209.