

田间接种固氮类芽孢杆菌对小麦的增产效应

石皓文¹ 李永斌¹ 李鹏飞¹ 王志敏² 陈三凤^{1*}

(1. 中国农业大学 生物学院,北京 100193;

2. 中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 为了解固氮类芽孢杆菌对小麦的增产效果,对实验室分离保存的4株固氮类芽孢杆菌菌株1-18、1-33、1-43及1-49,在固氮酶活性、吲哚乙酸(IAA)分泌量及接种小麦后的增产效果进行了比较。结果表明,这4株固氮类芽孢杆菌接种小麦后,比不接种固氮菌剂的对照增产5.1%~26.9%,其中菌株1-18的增产效率最高(增产26.9%),其次是菌株1-49(增产18.7%)。相应地,这2株菌株的固氮酶活性也比其他2株菌株高,菌株1-18固氮酶活性为1 043.6 nmol/(mg·h),菌株1-49为969.5 nmol/(mg·h),但分泌的IAA量低于其他2个菌株,菌株1-18分泌IAA量为24.95 μg/mL,菌株1-49分泌IAA量为26.34 μg/mL。结果说明用于本研究的固氮芽孢杆菌在固氮酶活性、IAA分泌量及对小麦的增产效果方面存在差异。

关键词 固氮类芽孢杆菌;小麦产量;固氮酶活性;吲哚乙酸

中图分类号 S 512.1; S 144.5

文章编号 1007-4333(2016)06-0052-04

文献标志码 A

Effect of nitrogen-fixing *Paenibacillus* spp. on wheat yield

SHI Hao-wen¹, LI Yong-bin¹, LI Peng-fei¹, WANG Zhi-min², CHEN San-feng^{1*}

(1. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Four nitrogen-fixing *Paenibacillus* strains 1-18, 1-33, 1-43 and 1-49 are used to inoculate wheat, and the wheat yields are analyzed to determine the effect of these strains on wheat yields. The results showed that wheat yields were increased by 26.9%, 9.7%, 5.1% and 18.7%, respectively. Furthermore, the nitrogenase activities and IAA amounts produced by these 4 strains were analyzed. Of these 4 strains, strain 1-18 exhibited the highest nitrogenase activity (1 043.6 nmol/(mg·h)) and the activity (969.5 nmol/(mg·h)) of strain 1-49 is higher than the rest 2 strains 1-33 ((565.9±3.0) nmol/(mg·h)) and 1-43 ((904.5±4.3) nmol/(mg·h)). However, the IAA amounts produced by strains 1-18 ((24.95±1.2) g/mL) and 1-49 ((26.34±4.2) g/mL) are lower than those produced by strains 1-33 ((27.73±1.8) g/mL) and 1-43 ((49.91±3.6) g/mL). Our study provided fundamental information for strain improvement of nitrogen-fixing strain for microbial fertilizer.

Keywords nitrogen-fixing *Paenibacillus*; wheat yield; nitrogenase activity; IAA

氮元素是农作物生长所必需的营养元素。为解决土壤氮肥力不高、粮食产量低的问题,我国在粮食作物的种植上大量使用氮肥^[1]。少数原核微生物能将空气中的氮气还原成铵,供植物生长所用,称为生

物固氮。生物固氮在自然生态系统氮素循环中起着非常重要的作用^[2]。国内外都非常重视固氮类微生物肥料的研究和田间应用。如:美国、阿根廷、巴西及我国都在豆科植物广泛接种根瘤菌菌剂^[3];巴基

收稿日期:2015-08-31

基金项目:国家“863”项目资助(2013AA102802-04)

第一作者:石皓文,硕士研究生,E-mail:shw_126@126.com

通讯作者:陈三凤,教授,主要从事生物固氮和生物能源研究,E-mail:chensf@cau.edu.cn

斯坦、菲律宾、印度等在小麦、水稻等禾本科植物接种联合固氮菌剂——巴西固氮螺菌^[4]。

类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)在分类上属于厚壁菌门、芽孢杆菌纲、芽孢杆菌目(*Bacillales*)。1993年,根据16S rRNA同源性,类芽孢杆菌属从芽孢杆菌属(*Bacillus*)中独立出来成立为一个新属^[5]。目前,类芽孢杆菌属包括130个种,只有20多个种属于固氮菌,其中10个固氮类芽孢杆菌新种是本实验室分离、鉴定和命名的^[6-13]。类芽孢杆菌属的成员分布范围广:土壤、植物根际、淡水和动植物体内等。

本实验室长期从事固氮类芽孢杆菌资源、遗传等研究工作,在前期研究工作中,筛选出近千株固氮类芽孢杆菌,本试验选用4株固氮类芽孢杆菌的固氮酶活性、IAA分泌量及田间接种对小麦产量的影响进行比较研究。

$$\text{固氮酶活性} = \frac{\text{所测乙烯峰面积} \times \text{瓶子上方体积(mL)}}{1 \text{ nmol 标准乙烯峰面积} \times \text{进样气体体积(mL)} \times \text{蛋白含量(mg)} \times \text{反应时间(h)}}$$

1.3 吲哚乙酸(IAA)测定

吲哚乙酸(IAA)的测定参考文献^[16]。

1.4 田间接种试验

小麦试验田在河北吴桥中国农业大学试验站,冬小麦(衡4399)于每年10月份播种。在小麦返青后,分别接种固氮类芽孢杆菌1-18,1-49,1-33及1-43,每公顷接种量为375升菌剂(菌剂含菌量 $\text{cfu}=1.0 \times 10^8$ 个/mL)。试验设置5个处理,每个处理0.033 hm²,其中4个处理分别施用4种菌剂,1个处理施用相同量培养基作对照,每个处理设置3个重复,试验分别于2013—2015年连续3年在吴桥实验站进行。

1.5 小麦试验地施肥情况

底肥施用复合肥($m(\text{N}) : m(\text{P}) : m(\text{K}) = 21 : 17 : 17$)600 kg/hm²及尿素150 kg/hm²,菌剂于小麦返青期施用,小麦不再追施化肥。待小麦成熟时测产,对比各处理产量。

2 结果与分析

2.1 4株固氮类芽孢杆菌固氮酶活性的比较

对本试验中对4株固氮类芽孢杆菌菌株1-18、1-33、1-43及1-49的固氮酶活性进行了测定,以3株固氮类芽孢杆菌(*P. jamilae*DSM 13815^T, *P. brasilensis*DSM 13188^T及*P. polymyxa* ATCC

1 材料与方法

1.1 材料

固氮类芽孢杆菌菌株1-18、1-33、1-43及1-49由本实验室分离和保存。菌株1-18分离自小麦根际、菌株1-33分离自杨树根际、菌株1-43和1-49均分离自玉米根际^[14]。固氮菌剂的发酵培养基为:蛋白胨10 g,酵母粉5 g,氯化钠2.5 g,葡萄糖10 g,水1 L,调整pH 7.0。将培养好的菌液稀释至 $\text{OD}_{600} = 1$ (对应的细菌数量约为 $\text{cfu}=1.0 \times 10^8$ 个/mL),直接灌根或喷雾接种。

1.2 固氮酶活性测定

利用乙炔还原法测定固氮酶活性,方法见文献^[15]。

固氮酶活性[nmol/(mg·h)]的计算公式为:

842^T)作对照,结果见表1。这4株固氮芽孢杆菌的固氮酶活性差异很大,其中菌株1-18活性最高(1 043.6 nmol/(mg·h)),菌株1-49的活性(969.5 nmol/(mg·h))高于另外2个菌株(菌株1-43的活性为904.5 nmol/(mg·h)),菌株1-33的活性为565.9 nmol/(mg·h))。

表1 7株固氮类芽孢杆菌菌株固氮酶活性比较

Table 1 Nitrogenase activity of 7 *Paenibacillus* strains

菌株 Strain	固氮酶活性/(nmol/(mg·h)) Nitrogenase activity
<i>P. jamilae</i> DSM 13815 ^T	149.3±10.3
<i>P. brasilensis</i> DSM 13188 ^T	545.7±9.1
<i>P. polymyxa</i> ATCC 842 ^T	455.1±12.8
1-18	1 043.6±12.9
1-49	969.5±5.2
1-33	565.9±3.0
1-43	904.5±4.3

2.2 4株固氮类芽孢杆菌分泌IAA的能力的比较

对4株固氮类芽孢杆菌菌株的IAA(Indole-3-acetic acid)量进行了比较测定(表2),发现在这4株

固氮菌中,菌株 1-43 产生的 IAA 量最高(49.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。但这 4 个固氮菌产生的 IAA 量却比对照菌株巴西固氮螺菌低 20~30 倍。巴西固氮螺菌是目前公认的产生 IAA 量高的微生物,说明不同微生物分泌的 IAA 量差异很大。

表 2 固氮类芽孢杆菌的 IAA 分泌量

Table 2 Amount of IAA produced by N_2 -fixing *Paenibacillus* strains

菌株 Strain	IAA/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$ Amount of IAA
1-18	24.95 \pm 1.2
1-33	27.73 \pm 1.8
1-43	49.91 \pm 3.6
1-49	26.34 \pm 4.2
<i>A. brasiliense</i> SP7(CK)	715.4 \pm 12.6

表 3 不同固氮类芽孢杆菌菌株对小麦产量影响

Table 3 Effect of nitrogen-fixing *Paenibacillus* strains on wheat yields

指标 Index	产量/ (kg/hm^2) Yield	增产量/kg Increased yield	相对增产率/% Relative increase rate
培养液(CK)	508.1	—	—
1-18	644.9	136.8	26.9
1-49	603.1	95.0	18.7
1-33	557.2	49.1	9.7
1-43	534.2	26.1	5.1

注:产量、增产量及相对增产率为 3 次重复的平均值。

Note: Yield, increased yield and relative increase rate are the average values of three repetitions.

3 结论与讨论

类芽孢杆菌中的成员种类多,虽然固氮类芽孢杆菌在农业生产中具有潜在的应用价值,但过去一直没有受到重视。本研究通过田间小麦接种 4 株固氮类芽孢杆菌菌株,发现这些菌株都能促进植物生长、提高小麦产量,研究结果与以前报道多粘类芽孢杆菌(*P. polymyxa*)能分泌激素、促进植物生长的结果相一致^[17-18]。多粘类芽孢杆菌具有很广泛的抗菌谱,是具有生防作用的 PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 主要成员之一^[19]。康地蕾得是我国登记的 0.1 亿 cfu/g 多粘类芽孢杆

2.3 4 株固氮类芽孢杆菌对小麦产量的增产效果

4 株固氮类芽孢杆菌接种小麦后,都能提高小麦产量,但增产效率不同(表 3)。菌株 1-18 增产效率最高(26.9%),菌株 1-49 增产效率为 18.9%,菌株 1-33 增产效率为 9.7%,而菌株 1-43 增产效率仅为 5.1%。试验结果说明固氮类芽孢杆菌菌株间的促生长效果存在明显差异。菌株 1-18 的固氮酶活性比其他菌株高,但菌株 1-18 产生的 IAA 量确比其他菌株的低。除菌株 1-18 外,菌株 1-49 的增产效果也达 18.9%,该菌株的固氮酶活性也比较高,产生的 IAA 量也比较低。虽然菌株 1-18 和 1-49 增产效率与固氮酶活性呈正相关,但菌株 1-43 的固氮酶活性比菌株 1-33 高,但其增产效率低于后者,说明固氮类芽孢杆菌的增产效果是否与固氮酶活性呈正相关性,还需要进一步研究。本试验中没有发现这些固氮类芽孢杆菌的增产效率与其产生的 IAA 量呈正相关性,可能与类芽孢杆菌产生的 IAA 量少有关。

菌细粒由华东理工大学研发,是一种防治青枯的微生物杀菌剂,通过产生抗菌物质、根际位点竞争、诱导植物产生抗病性和促进植物生长等达到防病效果^[20]。本研究结果将会为固氮微生物肥料的制备提供菌株资源贮备。

参 考 文 献

- [1] 杨新泉,冯锋,宋长青,等. 主要农田生态系统氮素行为与氮肥高效利用研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(3): 373-376
Yang X Q, Feng F, Song C Q, Leng S Y. Fate and efficient use of nitrogen fertilizer in main agroecosystems [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2003, 9 (3): 373-376 (in

- Chinese)
- [2] Falkowski P G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean [J]. *Nature*, 1997, 387: 272-275
- [3] 燕永亮, 李力, 李俊. 根际固氮微生物功能基因组及微生物肥料研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(5): 93-101
Yan Y L, Li L, Li J. Research progress on functional genomics of Nitrogen-fixing microorganisms and industrial development of Bio-fertilizer [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 13(5): 93-101 (in Chinese)
- [4] Llorente B E, Alasia M A, Larraburu E E. Biofertilization with *Azospirillum brasilense* improves *in vitro* culture of *Handroanthus ochraceus*, a forestry, ornamental and medicinal plant [J]. *New Biotechnology*, 2016, 33(1): 32-40
- [5] Ash C, Priest F G, Collins M D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus* [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1993, 64(4): 253-260
- [6] Ma Y, Xia Z, Liu X, Chen S. *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(1): 6-11
- [7] Ma Y, Zhang J, Chen S. *Paenibacillus zanthoxyli* sp nov, a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(4): 873-877
- [8] Ma Y, Chen S. *Paenibacillus forsythiae* sp nov, a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(2): 319-323
- [9] Hong Y, Ma Y, Zhou Y, Gao F, Liu H, Chen S. *Paenibacillus sonchi* sp nov, a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sonchus oleraceus* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(11): 2656-2661
- [10] Jin H, Lv J, Chen S. *Paenibacillus sophorae* sp nov, a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sophora japonica* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(4): 767-771
- [11] Jin H, Zhou Y, Liu H, Chen S. *Paenibacillus jilunlii* sp nov, a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Begonia semperflorens* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(6): 1350-1355
- [12] Xie J, Zhang L, Zhou Y, Liu H, Chen S. *Paenibacillus taohuashanense* sp nov, a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of the root of *Caragana kansuensis* Pojark [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2012, 102(4): 735-741
- [13] Wang L Y, Li J, Li Q X, Chen S. *Paenibacillus beijingensis* sp nov, a nitrogen-fixing species isolated from wheat rhizosphere soil [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 104(5): 675-683
- [14] Xie J B, Du Z, Bai L, Tian C, Zhang Y, Xie J, Wang T, Liu X, Chen X, Cheng Q, Chen S, Li J. Comparative genomic analysis of N₂-fixing and non-N₂-fixing *Paenibacillus* spp: Organization, evolution and expression of the nitrogen fixation genes [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(3): e1004231
- [15] Wang L, Zhang L, Liu Z, Zhao D, Liu X, Zhang B, Xie J, Hong Y, Li P, Chen S, Ray D, Li J. A minimal nitrogen fixation gene cluster from *Paenibacillus* sp WLY78 enables expression of active nitrogenase in *Escherichia coli* [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(10): e1003865
- [16] Xie B, Xu K, Xin Zhao H X, Chen S. Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis [J]. *FEMS Microbiol Letters*, 2005, 248(1): 57-63
- [17] Puri A, Padda K P, Chanway C P. Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (corn) and promote its growth? [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 89: 210-216
- [18] Puri A, Padda K P, Chanway C P. Evidence of nitrogen fixation and growth promotion in canola (*Brassica napus* L) by an endophytic diazotroph *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, doi: 10. 1007/s00374-015-1051-y
- [19] Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal S M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, 27: 9-13
- [20] 魏鸿刚, 李淑兰. 防治作物青枯病和枯萎病的微生物农药: 0.1 亿 cfu/g 多粘类芽孢杆菌细粒剂 [J]. 世界农药, 2008, 30(1): 52-53
Wei H G, Li S L. Microbial pesticide to control plant bacterial wilt and fusarium wilt: 10 000 000 cfu/g *Paenibacillus polymyxa* in granulae subtilae [J]. *World Pesticides*, 2008, 30(1): 52-53 (in Chinese)

责任编辑: 苏燕