

# 羊草根际固氮菌的分离及其生长条件的研究

郑红丽<sup>1</sup>, 庞保平<sup>1</sup>, 樊明寿<sup>1</sup>, 刘双平<sup>2</sup>

(1. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古巴彦淖尔市植保植检站, 内蒙古 临河 015000)

**摘要:** 为了获得禾本科牧草羊草根际土壤固氮菌分布的基本情况以及优势菌株, 于羊草生长旺盛季节, 在内蒙古锡林郭勒天然草地的羊草根际土壤、原土体以及羊草根内进行了固氮细菌的分离, 并统计了数量分布。通过分离和筛选共获得 14 个固氮菌株, 这些固氮菌的分布表现为离根系越近, 土壤中固氮菌的数量越多。从 14 个固氮菌株中筛选出 4 个固氮能力相对较强的菌株, 对其进行了形态观察以及碳源、pH 值、温度等生长条件的研究, 结果表明, 在供试的碳源中, 4 个菌株能很好地利用蔗糖和葡萄糖, 但不能利用纤维素; 适宜生长的 pH 范围为 7~ 8; 适宜生长的温度范围为 25~ 35℃, 其中分离自原土体土壤的 2 个菌株耐受温度变化的能力相对较强。

**关键词:** 固氮细菌; 分离; 形态学特征; 生长条件

中图分类号: S572.106 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)01-0172-06

## Isolation of Nitrogen Fixing Bacteria from Rhizosphere of *Leymus chinensis* and Investigation on their Growth Conditions

ZHENG Hong-li<sup>1</sup>, PANG Bao-ping<sup>1</sup>, FAN Ming-shou<sup>1</sup>, LIU Shuang-ping<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China; 2. Bayan NaoEr Plant Protection Station, Linhe 015000, China)

**Abstract:** In order to get basic knowledge about abundance and distribution of N fixing bacteria in rhizosphere of *Leymus chinensis* in grassland, isolation of N fixing bacteria was conducted in midseason of *Leymus chinensis* growth in Xilinguole grassland of Inner Mongolia by culturing hydraulic extraction of soil and root samples in Doberiner's cultural media. The results showed that 14 strains of N fixing bacteria exist in the bulk soil, rhizosphere and roots of *Leymus chinensis* plants. Number of the N fixing bacteria in soil decreases gradually apart from *Leymus chinensis* plant roots. 4 strains of nitrogen-fixing bacteria with greater N fixing capacity from 14 strains, Yc<sub>1</sub> and Yc<sub>2</sub> isolated from roots and Tr<sub>1</sub> and Tr<sub>11</sub> isolated from soil, were selected by comparing their nitrogenase activities for morphological observation and investigation of their growth condition. The results about growth condition of 4 strains of bacteria showed that they all can use sucrose and glucose very well, while they can not use cellulose at all. The best temperature for the 4 strains of bacteria growth is 25~ 35℃, and the two strains isolated from soil are more tolerant to both low temperature and high temperature than the ones from plant roots. Suitable pH is 7~ 8 for growth of the strains of N fixing bacteria.

**Key words:** Nitrogen-fixing bacteria; Isolation; Morphological characteristics; Growth condition

自 1886 年 Beijerinck 首次分离共生固氮的根瘤菌起, 各种固氮微生物相继被分离鉴定, 至今已发现的固氮微生物 80 余属。一般认为自然界生物固氮可以分为共生固氮、自生固氮和联合固氮三种类型, 也有人简单地将固氮类型分为两种, 即共生固氮和非共生固氮<sup>[1-3]</sup>。不管哪一种观点都认为豆科植物

的共生固氮是生物固氮的主体<sup>[4]</sup>。关于豆科植物与根瘤菌的结瘤机制、固氮能力、固氮机理、菌剂开发应用以及结瘤固氮在天然草地的生态作用等方面国内外均有大量的研究。对于非共生固氮, 由于细菌固氮不能直接被植物利用, 90% 以上的固定氮素需在细菌死后才可被植物间接利用<sup>[5-7]</sup>, 而经常被忽

收稿日期: 2006-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(30560031); 内蒙古自然科学基金资助项目(200208020302)

作者简介: 郑红丽(1966-)女, 内蒙古土默特左旗人, 副教授, 在读博士研究生, 主要从事农业微生物研究

通讯作者: 樊明寿(1965-)男, 内蒙古四子王旗人, 教授, 主要从事植物营养和植物生理研究工作。

略。近些年来,国内外对甘蔗、水稻等作物的非共生固氮对植物氮素营养的贡献正在引起广泛的关注<sup>[8-10]</sup>,但关于草地非共生固氮的研究一直未受到足够重视。然而即使在极地以及沙漠等特殊环境也存在着活跃的非共生固氮<sup>[11-13]</sup>。因此非共生固氮在草地氮素营养中的地位不容忽视。内蒙古天然草地植被以禾本科牧草占优势,约为62.8%,莎草科占14.5%,菊科占6.8%,豆科只占5.7%,其他科占10.2%<sup>[14]</sup>。虽然不同地区植被组成有所不同,但总的趋势是豆科植物特别是豆科牧草在草原生态系统中占的比重很小,由此看来,在天然草地生态系统中,不仅要关注豆科植物的共生固氮,更应该关注非共生固氮。研究阐明非共生固氮在天然草地生态系统氮素循环中的贡献,量化非共生固氮在氮素收支中的份额,对于充分发挥草地生产潜力,合理制定草场载畜量具有重要指导意义。

羊草(*Leymus chinensis*)为禾本科赖草属多年生根茎疏丛状草本,常与其他植物伴生,形成以羊草为主的地带性植被。羊草极耐寒冷,其营养价值高,适口性好,是锡林郭勒草原重要牧草之一。然而,羊草根际或羊草体内是否存在非共生固氮菌,固氮能力如何?目前我们知之甚少。本试验从锡林郭勒天然草地和羊草根际土壤分离固氮细菌,并观察研究其生长特性、固氮能力和影响其生长的环境因素,以期为进一步研究非共生固氮在天然草地生态系统氮素循环中的贡献以及固氮菌的开发利用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 取样

土样于2005年7月采自于内蒙古锡林浩特市天然草原。锡林浩特市位于内蒙古中东部,海拔1000m以上,年降水量350mm左右,年平均气温0.4℃,土壤以栗钙土为主,pH值在8以上。在锡林浩特市东和西10km范围内选取2个样区,每个样区内每隔1km选取1个样点,共8个样点。分别取距离羊草根系10cm以外的土壤和羊草根系周围2cm范围内土壤连同羊草根系一同带回实验室供分析,各样点样品混合处理后用于分离固氮细菌。

### 1.2 培养基

细菌分离采用Doberiner's无氮培养基,生长条件研究采用LB培养基和液体Doberiner's无氮培养基。

### 1.3 方法

1.3.1 固氮细菌的分离 自由土体中固氮细菌的分离:土壤中固氮细菌的分离采用稀释平板分离法。准确称取无植被自由土体土壤10g,放入装有90mL

无菌水的三角瓶,充分震荡,作为原液。取装有9mL无菌水的试管6只,依次编号为 $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ ,从原液移取上清液1mL,注入 $10^{-1}$ 号无菌水中,轻轻振荡成 $10^{-1}$ 的菌悬液,然后再从 $10^{-1}$ 的菌悬液移取上清液1mL,注入 $10^{-2}$ 号无菌水中,依此一直将菌悬液稀释到 $10^{-6}$ 。然后分别从 $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ 梯度中取0.1mL菌悬液在Doberiner's无氮培养基上涂平板,每个梯度重复3皿,置于28℃培养箱中培养5d,采用平板计数法统计土壤中固氮菌的数量,计算公式:土样含菌数(个/g)=同一稀释度每皿菌落平均数×稀释倍数×10。然后将菌株纯化保存备用。

根际土壤中固氮细菌的分离:采用抖土法羊草根系充分抖动,使附着在根表的土壤抖落于塑料布内,混匀后准确称取10g放入装有90mL无菌水的三角瓶,充分振荡,作为原液,固氮菌的分离方法同上。

根体内固氮细菌的分离:将羊草根用自来水反复冲洗后,浸入75%乙醇5min,再用0.1%HgCl<sub>2</sub>表面消毒5min,剪成1~2mm长的小段放入盛有10mL无菌水的试管中,充分振荡,吸取0.1mL浸泡液在Doberiner's无氮培养基上涂平板。重复3次。待长出菌落并经纯化后转接于斜面培养基上,保存备用。

1.3.2 形态学特征观察 形态学特征观察包括芽孢、荚膜、革兰氏染色反应、菌体大小以及菌落特征,均按常规方法进行。

### 1.3.3 培养条件对固氮菌生长的影响

1.3.3.1 pH值对固氮菌生长情况的影响 以液体Doberiner's培养基为基础,通过1mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和NaOH调节培养基pH值,分别制备pH值为5,6,7,8,9,10的6种培养基。在这6种培养基中分别接种供试菌株,重复3次,28℃下培养4d,在540nm波长下测定吸光值。

1.3.3.2 碳源对固氮菌生长情况的影响 以LB培养基为基础,在500mL培养基中,分别用蔗糖、乳糖、淀粉、纤维素替换葡萄糖,共制备成5种培养基。其中蔗糖、乳糖、淀粉、纤维素和葡萄糖各5g。在这5种培养基上采用涂抹法分别接种供试菌株,28℃下培养,每隔24h观察1次,观察5d,测量菌落直径,重复3次。

1.3.3.3 温度对固氮菌生长情况的影响 将供试菌种接于LB培养基,设置10,15,20,25,30,35,40,45℃8个温度条件进行培养,重复3次,培养4d时观察菌落大小。

1.3.4 固氮菌固氮活性的测定 将待测固氮菌接种于50mL三角瓶内的Doberiner's无氮培养基,并

于28℃条件下培养48h后,将瓶口封口膜改用橡胶塞密封,用无菌注射器抽出5mL的气体,注入5mL C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>气体反应72h。然后,用注射器抽取瓶内气体注入气相色谱仪,测定乙烯产生的量,并用乙烯生成量表示固氮酶活性大小,其中反应体系中乙烯浓度按下式计算:

$$N = \frac{h_x CV}{24.9 h_{st}}$$

其中,  $h_x$ : 样品峰值;  $h_s$ : 标准 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 峰值; C: 标准 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 浓度 (nmol/mL); V: 培养容器体积 (mL); 24.9: 常数,  $t$ : 样品培养时间 (h); N: 产生的 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 浓度 (nmol/(h·mL))。

于28℃条件下培养48h后,将瓶口封口膜改用橡胶塞密封,用无菌注射器抽出5mL的气体,注入5mL C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>气体反应72h。然后,用注射器抽取瓶内气体注入气相色谱仪,测定乙烯产生的量,并用乙烯生成量表示固氮酶活性大小,其中反应体系中乙烯浓度按下式计算:

## 2 结果与分析

### 2.1 固氮细菌的分布和固氮活性

采用平板计数法统计试验土壤的固氮菌数如表1。由于平板菌落计数法要求用于计数的每一稀释度重复间的菌落数相差不能悬殊,且数量应在30~300个菌落/培养皿,因此,对根际土样选择10<sup>-4</sup>稀释度用于计算菌数,自由土体土样选择10<sup>-2</sup>稀释度。据此,根际土样含固氮菌数(个/g) = 76.7 × 10<sup>4</sup> × 10 = 7.7 × 10<sup>6</sup>个,每克自由土体土样含固氮菌数(个/g) = 81.7 × 10<sup>2</sup> × 10 = 8.17 × 10<sup>4</sup>。可见,羊草根际土壤中固氮菌数量远大于自由土体,是自由土体中固氮菌数的10<sup>2</sup>倍。

表1 羊草根际土壤的固氮菌数

Tab. 1 Number of N fixing bacteria in rhizosphere soil of *Leymus chinensis* and bulk soil

土样 Soil samples		土样稀释度 Dilution degree				
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
根际 Rhizosphere	1	-	326	68	4	0
	2	-	345	74	3	0
	3	-	361	88	7	0
	平均数	-	344(0.05)	76.7(0.13)	4.7(0.45)	
土体 Soil	1	62	10	4	0	0
	2	94	12	4	1	0
	3	89	18	6	0	0
	平均数	81.7(0.21)	13.3(0.31)	4.7(0.24)	0.3(1.73)	-

注: 括号内数字为相应平均数的变异系数 CV

Note: Data in parentheses is coefficient of variance

表2 菌株固氮活性的测定(乙炔还原法)

Tab. 2 Nitrogenase activities of N fixing bacteria strains isolated from soil and roots of *Leymus chinensis*

菌株 Strains	固氮酶活性 Activity of nitrogenase	菌株 Strains	固氮酶活性 Activity of nitrogenase
Tr <sub>1</sub>	146.90	Yc <sub>1</sub>	164.10
Tr <sub>2</sub>	72.62	Yc <sub>2</sub>	49.12
Tr <sub>3</sub>	28.71	Yc <sub>3</sub>	49.12
Tr <sub>4</sub>	59.82		
Tr <sub>5</sub>	43.49		
Tr <sub>6</sub>	100.10		
Tr <sub>7</sub>	84.40		
Tr <sub>8</sub>	29.70		
Tr <sub>9</sub>	53.05		
Tr <sub>10</sub>	51.10		
Tr <sub>11</sub>	128.00		

经初步分离,得到了14个固氮菌株,其中从羊草根际和土体土壤分离到11个,分别命名为Tr<sub>1</sub>, Tr<sub>2</sub> …… Tr<sub>11</sub>, 根体内得到3个,分别命名为Yc<sub>1</sub>, Yc<sub>2</sub>, Yc<sub>3</sub>。进一步采用乙炔还原法测定了分离到的14株固氮菌的固氮活性,结果见表2。根据各菌株固氮活性和生长速度,筛选出4个固氮能力相对较的菌株(表3)进行进一步的观察和研究。

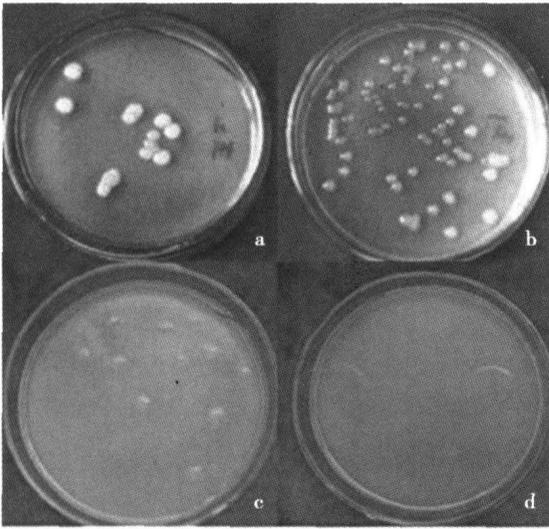
### 2.2 形态学特征

对筛选出的4个固氮活性较大的菌株(图1)进行了形态观察,相关描述和形态学指标列入表3。菌落特征见图2。

表3 菌株及菌落形态学特征描述

Tab. 3 Morphological description of the 4 strains of N fixing bacteria selected and their colonies

菌株 Strains	形态 Morphology	菌体大小/μm Size of strains	革兰氏染色 Gram staining	荚膜 Capsule	芽孢 Spore	菌落特征 Characters of colony
Tr <sub>1</sub>	初期短杆状 后期球状	0.68~0.87 × 1.65~2.91	G <sup>-</sup>	有	无	有无初期质地均匀,不透明,后期粘稠且变为褐色,周围出现褶皱
Tr <sub>11</sub>	球杆状	0.29~0.49 × 1.07~1.26	G <sup>-</sup>	有	无	生长初期质地均匀,透明,后期变浑浊
Yc <sub>1</sub>	长杆状	0.51~0.65 × 0.84~1.11	G <sup>-</sup>	无	无	生长初期菌落质地均匀,不粘稠,透明;后期菌落变浑浊
Yc <sub>2</sub>	长杆状	0.88~1.11 × 3.60~4.10	G <sup>-</sup>	有	无	生长初期菌落相对较大,透明;后期菌落粘稠且有些浑浊



a. Tr<sub>1</sub>; b. Tr<sub>11</sub>; c. Yc<sub>1</sub>; d. Yc<sub>2</sub>

图2 菌落形态

Fig 2 Characteristics of N fixing bacteria colonies

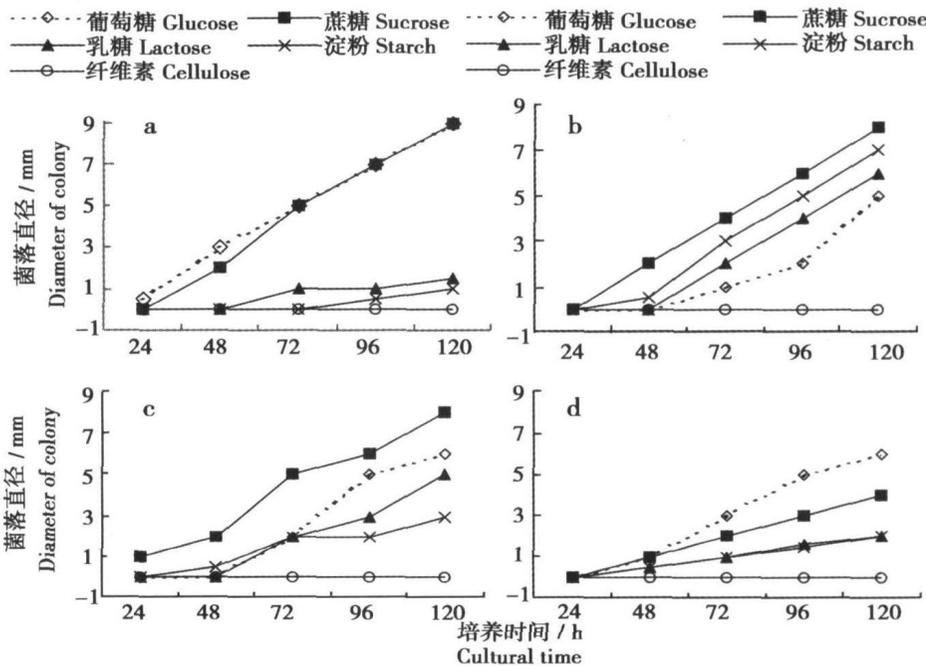
### 2.3 不同碳源对固氮菌生长的影响

图3是关于4个菌株在含有不同碳源培养基上

的生长繁殖情况。在供试的碳源中,4个菌株对蔗糖和葡萄糖的利用均较好,即在以蔗糖和葡萄糖为碳源的培养基中,菌株的菌落较大。从图3还可清晰地看出,4个菌株在以纤维素为碳源的培养基上均不能很好地生长,意味着它们都不能利用纤维素。除菌株 Tr<sub>11</sub>外,其他菌株对淀粉的利用能力也较差,而且在乳糖培养基中的生长较在蔗糖或葡萄糖培养基中的生长慢。

### 2.4 温度对菌株生长的影响

由表4可知: Yc<sub>1</sub>, Yc<sub>2</sub>, Tr<sub>1</sub>, Tr<sub>11</sub> 4个菌株在25~35℃之间都能良好生长。但其耐受高温和低温的能力却不一致。Tr<sub>1</sub>, Tr<sub>11</sub>在15℃的低温和45℃高温下均能生长,适宜生长的温度范围相对较宽。Yc<sub>1</sub>, Yc<sub>2</sub>在低于20℃的温度条件下则不能生长,仅在25~40℃才能生长, Yc<sub>2</sub>在45℃条件下有微弱生长。从土壤中分离得到的 Tr<sub>1</sub>, Tr<sub>11</sub>之所以耐受高温和低温的能力较强,可能与长期适应土壤环境有关,因土壤温度变化较植物体温度变化相对剧烈。



a. Tr<sub>1</sub>; b. Tr<sub>11</sub>; c. Yc<sub>1</sub>; d. Yc<sub>2</sub>

图3 碳源对不同菌株生长的影响

Fig 3 Influence of carbon resources on growth of N fixing bacteria

### 2.5 pH对固氮菌生长的影响

图4为4个菌株在不同pH介质中的生长情况,从该图可清晰地看出pH对4个菌株生长的影响是很明显的。在pH<6的情况下,菌株几乎没有生长,pH>6时,生长速度逐渐加快,pH=7~8时各菌株的生长最快。而pH>8时,菌株生长又开始减弱。pH>9时,从土壤中分离到的2个菌株的生长几乎停止。说明 Yc<sub>1</sub>, Yc<sub>2</sub>, Tr<sub>1</sub>, Tr<sub>11</sub> 4个菌株适宜在

偏碱性的介质中生长,这可能也与长期适应生存环境有关,因内蒙古草原地处我国北方,土壤多为石灰性土壤,pH较高。

## 3 讨论

研究表明,在羊草生长的锡林郭勒草原土壤存在着较为丰富的固氮菌资源,而且离羊草根系越近,其土壤中的固氮菌数量越大。按照普遍的观

表 4 温度对菌株生长的影响

Tab 4 Influence of temperature on growth of strains of N fixing bacteria

温度/ °C Temperature	Yc <sub>1</sub>	Yc <sub>2</sub>	Tr <sub>1</sub>	Tr <sub>11</sub>
10	-	-	-	-
15	-	-	+	+
20	+	+	+	+
25	++	++	+++	+++
30	+++	++	+++	+++
35	+++	+++	++	+++
40	+	+	++	++
45	+	-	+	+

注：“+++”长得好“++”中度生长“+”微弱生长“-”不能生长

Note: +++ Grow well; ++ Grow mediumly + Grow slightly; - No growth

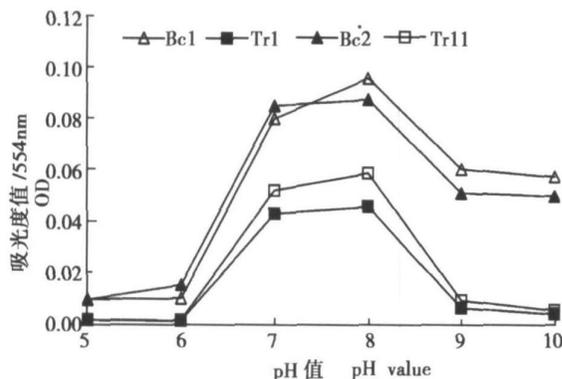


图 4 介质 pH 对不同菌株生长的影响

Fig 4 Influence of media pH on growth of N fixing bacteria 点<sup>[15]</sup>, 这些固氮菌应属于自生固氮菌一类。由于自生固氮菌不与植物形成共生关系, 直接利用土壤中的碳源, 因此, 土壤中自生固氮菌的数量可以反映土壤 C 源或有机质的丰富程度。该研究取样时间为 7 月, 是一年中水热条件最好的时期, 水分和温度不是固氮菌生长繁殖的限制因素, 因此, 不难推断锡林郭勒天然草地有机质含量或 C 源不足是远离羊草根系土壤固氮菌少的原因, 是固氮菌群落发展的重要限制因素。同时也可看出, 羊草根系的分泌物数量较大, 为根际固氮菌生长提供了相对较为充足的 C 源, 以致在根际土壤固氮菌数量是远离根系土壤的 10<sup>2</sup> 倍。尽管人工草地目前普遍使用化学氮肥以提高草地草量, 但对于大面积的天然草地, 人工施用化学氮肥目前难以实现, 因此, 生物固氮仍然是草地氮素的重要来源。又由于内蒙古草原豆科植物较少, 刘书润报道内蒙古锡林郭勒草原约由 629 种植物组成, 其中豆科植物只占 5.7%, 针毛、洋草等是优势种<sup>[14]</sup>。因此, 挖掘草地自生固氮的潜力应成为草地氮素营养的重要研究内容。本研究结果提示, 要提高草地自生固氮菌的数量, 增加土壤的 C 源是

重要环节, 否则挖掘固氮潜力将成为空谈。

本研究还发现羊草根内存在联合固氮菌。有研究报道联合固氮菌固定的氮, 至少有 5% 进入植物<sup>[15,16]</sup>。在水稻、甘蔗、玉米等禾本科植物上的一些研究表明, 这种联合固氮菌可增加植株的生物产量和籽粒产量<sup>[17,18]</sup>, 虽然有人认为这种效应是固氮菌的促生作用(PGPR), 但不排除有改善植株氮素营养的作用<sup>[19]</sup>。用<sup>15</sup>N 稀释法研究的结果表明, 感染内生固氮菌的甘蔗可由生物固氮获得总氮量 60% 的氮素<sup>[20,21]</sup>。由于羊草是多年生牧草, 不同于一年生水稻、甘蔗、玉米等作物, 即使体内固氮菌所固定的氮素当年不能被植物利用, 当菌体死亡后仍可被植物在下一个生长季利用。因此, 研究植株体内这种联合固氮菌在羊草氮素营养中的贡献显得更具有实际意义, 而且今后的研究要着眼其长期效应。

4 个菌株在以蔗糖和葡萄糖为碳源的培养基上生长较好, 而在以纤维素为碳源的培养基上均不能很好生长。说明羊草根际的固氮菌只能利用可溶性的低分子碳水化合物。因此, 固氮菌的开发利用离不开其他微生物分解大分子碳水化合物提供可溶性碳源。

本研究还阐明了羊草根际固氮菌的适宜生长温度范围和 pH 值, 为利用这些固氮菌提供了重要信息。

参考文献:

- [1] Bohloul B B, Ladha JK, Garrity D P. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective [J]. Developments in Plant and Soil Sciences, 1992, 49: 1- 11.
- [2] Kennedy I R, Tchan Y T. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances [J]. Developments in Plant and Soil Sciences, 1992, 49: 93- 118.
- [3] 新楠, 连秀芬, 樊明寿. 非共生生物固氮的主要作用和研究进展 [J]. 内蒙农业科技, 2005, (2): 18- 19.
- [4] Peoples M B, Craswell E T. Biological nitrogen fixation investments, expectations and actual contributions to agriculture [J]. Developments in Plant and Soil Sciences, 1992, 49: 13- 39.
- [5] Kennedy I R and Islam N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms [J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2001, 41, 447- 457.
- [6] Manschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants [M], 2nd edition, Academic Press, London. 1995, 566.
- [7] 辉民, 王澜芳, 蒋家慧, 等. 碳水化合物和 H<sub>2</sub> 对 Gunnera/Nostoc 共生体固氮活力的影响 [J]. 华北农学报, 1994, 9(4): 1- 6.

- [ 8 ] 张丽梅, 方 萍, 朱日清. 禾本科植物来年和固氮研究及其应用现状展望[ J ]. 应用生态学报, 2004, 15(9): 1650- 1654.
- [ 9 ] Ladha J K & Reddy P M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects [ J ] Plant & Soil 2003, 252: 151- 167.
- [ 10 ] Robert M B, Segundo U, Bruno J R, Veronica R. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications [ J ]. Plant & Soil, 2003, 252: 139- 149.
- [ 11 ] Liengen T. Conversion factor between acetylene reduction and nitrogen fixation in free- living cyanobacteria from high arctic habitats [ J ]. Canadian Journal of Microbiology, 1999, 45 (3) : 223- 229.
- [ 12 ] Liengen T Nitrogen fixation by free- living cyanobacteria from different coastal sites in a high arctic tundra, Spitsbergen [ J ]. Arctic and Alpine Research, 1997, 29 (4) : 412- 418.
- [ 13 ] Zaady E, Groffman P, Shachak M. Nitrogen fixation in macro- and microphytic patches in the Negev Desert[ J ]. Soil Biology & Biochemistry, 1998, 30 (4) : 449- 454.
- [ 14 ] 刘书润, 刘钟龄. 内蒙古锡林河流域植物区系纲要——草原生态系统研究[ M ]. 北京: 科学出版社, 1988, 3: 227- 233.
- [ 15 ] 沈世华, 荆玉祥. 中国生物固氮研究现状和展望[ J ]. 科学通报, 2003, 48( 6) : 535- 540.
- [ 16 ] Okon Y & Kapalink Y. Development and function of *Azospirillum*- inoculated roots[ J ]. Plant & Soil, 1986, 90: 3- 16.
- [ 17 ] 季 良, 朱树秀, 阿米娜. 玉米大豆混作系统氮素转移特性的研究[ J ]. 华北农学报, 1996, 11( 2) 56- 61.
- [ 18 ] 许建平, 倪礼斌, 时 燕. 水稻应用耐铵型联合固氮菌的效果[ J ]. 上海农业科学, 2002, 17( 3) : 52- 56.
- [ 19 ] 方 萍, 张丽梅, 贾小明, 等. 固氮螺菌( *Azospirillum brasilense*) No40 在红壤性水稻上的接种效应[ J ]. 浙江大学学报, 2001, 27(1) : 33- 36
- [ 20 ] 尤崇杓, 方宣钧. 水稻根际固氮粪产碱菌的研究[ J ]. 农业生物技术学报, 1995, 3( 1) : 14- 20.
- [ 21 ] Bodley R M, Oliveira O C, Urquiaga S. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: Contributions and prospects for improvement[ J ]. Plant & Soil, 1995, 174: 195- 209.