

# 一株具有固氮功能的烟草根际微生物的鉴定及其初步效应

刘剑君<sup>1</sup>, 王豹祥<sup>2</sup>, 张朝辉<sup>1</sup>, 席淑雅<sup>1</sup>, 刘天翔<sup>1</sup>, 曹育博<sup>1</sup>, 邱立友<sup>1\*</sup>

(1 河南农业大学生命科学学院, 河南郑州 450002; 2 湖北中烟工业有限责任公司, 湖北武汉 430051)

**摘要:** 应用 16S rDNA 序列分析构建系统发育树, 结合生理指标、生化反应, 对分离自烤烟根际的固氮菌菌株 N05 进行了分类鉴定, 并通过小区试验探讨其对烤烟生产的效应。结果表明, 自生固氮菌 N05 属于产碱菌属 (*Alcaligenes*), 粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*)。将固氮菌 N05 制成菌肥, 烤烟移栽时施入 (30 kg/hm<sup>2</sup>) 同时施用 80% 的氮肥 (B + 80% N), 与全量施用氮肥 (FN) 相比, B + 80% N 烤烟根际固氮菌的数量平均提高 3.6 倍, 放线菌的数量显著降低; 圆顶期烤烟根际土壤中除 Mg 元素的有效性略有降低外, P、K、Ca、Cu、Zn、Fe 和 Mn 等元素的有效性均有不同程度的提高, 提高幅度在 2.51%~46.08%。烤烟杀青样中 N 的平均含量也高于 FN。在减施氮肥的情况下, 应用固氮菌肥可提高烤烟根际固氮菌数量和矿质元素的有效性。

**关键词:** 烤烟; 固氮菌; 16S rDNA; 矿质元素

中图分类号: S154.37

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2011)05-1237-06

## Identification and effect of a nitrogen-fixing bacterium in flue-cured tobacco rhizosphere

LIU Jian-jun<sup>1</sup>, WANG Bao-xiang<sup>2</sup>, ZHANG Chao-hui<sup>1</sup>, XI Shu-ya<sup>1</sup>, LIU Tian-xiang<sup>1</sup>, CAO Yu-bo<sup>1</sup>, QIU Li-you<sup>1\*</sup>

(1 College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2 China Tobacco Hubei Industrial Company Ltd., Wuhan 430040, China)

**Abstract:** The Azotobacter N05 isolated from flue-cured tobacco rhizosphere is identified as *Alcaligenes* sp, likely *Alcaligenes faecalis*, by using the phylogenetic tree constructed from 16S rRNA gene sequences, its physiological indexes and biochemical reactions. To our knowledge, this is the first report on azotobacter *Alcaligenes faecalis* in flue-cured tobacco rhizosphere. Applying to transplanted flue-cured tobacco, the numbers of azotobacter under the combination of N05 azotobacter fertilizer (30 kg/ha) and 80% N dosage of the full fertilizer amount (B + 80% N) are 3.6 times of those of the full N fertilizer (FN) treatment, while the numbers of actinomycetes under the combination treatment are significantly deceased. In addition, compared to the FN, the soil available contents of P, K, Ca, Cu, Zn, Fe, and Mn in tobacco rhizosphere at the tobacco toping stage under the B + 80% N are increased by 2.51%–46.08%. The average contents of N in de-enzyme tobacco leaves at different growth stages under the B + 80% N are higher than those under the FN. These results indicate that the amount of azotobacter and availability of mineral elements are enhanced by using azotobacter fertilizer in flue-cured tobacco production when N dosage is reduced moderately.

**Key words:** flue-cured tobacco; azotobacter; 16S rDNA; mineral element

收稿日期: 2010-08-23 接受日期: 2011-04-04

基金项目: 湖北中烟工业有限责任公司项目(2007YL0366-1)资助。

作者简介: 刘剑君(1972—),男,内蒙古土左旗人,博士研究生,主要从事烟草栽培生理生化研究。

Tel: 0371-6355 5175, E-mail: yanye-zz@163.com.

\* 通讯作者 Tel: 0371-6355 5175, E-mail: qliyou@henau.edu.cn

50% 以上氮肥由于挥发作用、脱氮作用和淋失,造成严重的能源浪费和环境问题<sup>[1]</sup>。应用生物固氮技术补充或取代化学氮肥是解决这些问题的有效途径<sup>[2]</sup>。近 20 年来,对与非豆科植物关系密切的自生固氮菌的研究也越来越受到重视<sup>[3-4]</sup>。在植物的根际或体内生活着大量的自生固氮菌,它们利用植物的分泌物或脱落物生长繁殖并固氮,其中研究较多的有固氮菌属 (*Azotobacter*)、固氮螺菌属 (*Azospirillum*)、梭菌属 (*Clostridium*)、醋酸杆菌属 (*Acetobacter*)、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、草螺菌属 (*Herbaspirillum*) 和根瘤菌属 (*Rhizobium*) 中的固氮菌株<sup>[2]</sup>,其中肠杆菌科的粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) 是我国水稻根际的优势固氮菌<sup>[5]</sup>。将这些自生固氮菌用于禾本科作物生产能够显著提高产量和降低化肥氮的用量。然而,大量试验表明,自生固氮菌的作用受到许多因素的影响,如作物的品种和生长期、土壤类型、土壤含氮量、氮肥施用量、土壤中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $(\text{PO}_4)^{3-}$  浓度和菌株来源等,贫瘠土壤、低氮肥施用量以及分离自植物根际的土著菌对该植物的效果最好<sup>[6]</sup>。

自生固氮菌在烤烟生产中的应用报道较少。我们从烤烟根际分离到一株固氮活性较高的自生固氮菌株—固氮菌 N05,在烤烟移栽时施入根际取得了在减施肥料的情况下提高烤烟产质量的效果<sup>[7]</sup>。本文主要报道该菌株的分类鉴定结果及其对烤烟根际微生物区系和矿质元素有效性的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株鉴定

供试固氮菌 N05 为分离自环神农架烟区烤烟根际土壤,其固氮酶活力为  $\text{C}_2\text{H}_4$ , 451 nmol/(mL·h),由河南农业大学生命科学学院微生物中心提供。

1.1.1 菌体和菌落形态结构观察 将菌株划线分离,形成单菌落。接种于 LB 中 28℃ 220 r/m 培养 16~18 h,于对数生长期进行革兰氏染色观察。接种于阿须贝培养基平板,28℃ 培养 7 d,观察菌落形态。

1.1.2 生理生化鉴定 生理生化鉴定采用 VITEK 系统(法国 biosMerieux 公司),按其说明书的方法进行。

1.1.3 细菌 16S rDNA 鉴定 按 Weisburg 等的方法<sup>[8]</sup>。收集 LB 培养液中培养的菌体,采用 CTAB 法提取细菌的总 DNA。利用 16S rDNA 通用引物进

行 PCR,PCR 产物纯化后和 T 载体连接,转化大肠杆菌,从转化子中提取重组质粒进行测序,得到 16S rDNA 部分序列。

### 1.2 固氮菌肥制备及肥效

将固氮菌 N05 接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中,28℃、160 r/m 摇瓶培养至对数生长末期,和适量草炭混合制成<sup>[9]</sup>,菌肥含活菌数  $> 1 \times 10^9$  cfu/g。

试验在湖北省房县湖北中烟工业有限责任公司实验基地进行。设:施用 80% 的常规氮肥用量配施固氮菌肥处理(B+80% N)和常规施肥处理(全量氮肥, FN)二个处理。B+80% N 处理施肥方案是饼肥 148.5 kg/hm<sup>2</sup>、烟草专用肥 742.5 kg/hm<sup>2</sup>、硫酸钾 312.5 kg/hm<sup>2</sup>、过磷酸钙 1010.0 kg/hm<sup>2</sup>、硝酸钾 445.0 kg/hm<sup>2</sup>,固氮菌肥 30 kg/hm<sup>2</sup>。FN 处理施肥方案是饼肥 742.5 kg/hm<sup>2</sup>、烟草专用肥 742.5 kg/hm<sup>2</sup>、硫酸钾 312.5 kg/hm<sup>2</sup>、过磷酸钙 1010.0 kg/hm<sup>2</sup>、硝酸钾 445.0 kg/hm<sup>2</sup>。每个处理设 3 次重复,按随机区组排列。小区面积为 39.6 m<sup>2</sup>。试验地土壤类型是黄棕壤,基础肥力指标是有机质 25.69 g/kg、全氮 0.23 g/kg、速效磷 24.98 mg/kg、速效钾 150.78 mg/kg。烤烟品种为云烟 87(湖北烟科所提供)。植烟行距 120 cm,株距 55 cm。菌肥于烤烟移栽时溶于生根水中等量施入每个烟株。硝酸钾平分 2 份用作追肥,分别在移栽后 10 和 20 d 进行,其他肥料作基肥。

### 1.3 测定项目与方法

采用稀释平板计数法,分别于团棵期、旺长期、现蕾期和圆顶期测定根际土壤微生物数量。细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基,28℃ 培养 2 d;放线菌采用高氏一号合成培养基,28℃ 培养 5 d;真菌采用马丁氏培养基,28℃ 培养 5 d;自生固氮菌采用阿须贝培养基,28℃ 培养 2 d;解钾菌采用硅酸盐细菌培养基,28℃ 培养 2 d;解磷菌采用磷酸三钙为唯一磷源的培养基,28℃ 培养 10 d<sup>[10]</sup>。

于圆顶期测定土壤中 P、K、Ca、Mg、Cu、Zn、Fe 和 Mn 全量和有效态含量,常规方法<sup>[11]</sup>。烤烟根际土壤矿质元素有效性是矿质元素的有效态含量占其全量的百分比。

试验数据利用 DPS 统计软件进行分析<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌肥菌种固氮菌 N05 的鉴定

接种于 LB 中 28℃ 220 r/m 培养 16~18 h,于

对数生长期进行革兰氏染色观察。结果看出,固氮菌 N05 是无芽孢的革兰氏阴性菌,棒状,长×宽为  $1.65 \times 0.41 \mu\text{m}$ , 偶见细胞链状排列。接种于阿须贝培养基上培养,菌落圆形,边缘整齐,表面光滑,半透明,粘稠并产生色素。

采用 VITEK 鉴定系统 GNI + 鉴定卡,鉴定结果表明(表 1),固氮菌 N05 生理生化反应与粪产碱菌 (*A. faecalis*) 和博特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*) 相近,伯杰氏细菌手册指出,这两个菌株生理生化反应极为相似,很难区分<sup>[13]</sup>。

表 1 固氮菌 N05 VITEK 鉴定系统 GNI + 鉴定结果  
Table 1 Identification of azotobacter N05 using the GNI + of VITEK system

孔号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
项目 Item	DP3	OFG	GC	ACE	ESC	PLI	URE	CIT	MAL	TDA	PXB	LAC	MLT	MAN	XYL	RAF
结果 Result	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
孔号 No.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
项目 Item	SOR	SUC	INO	ADO	COU	H <sub>2</sub> S	ONP	RHA	ARA	GLU	ARG	LYS	ORN	OXI	TLA	
结果 Result	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注 (Note): + 一生长或反应阳性 Growth or positive reaction; - 一表示不生长或反应阴性 Not growth or negative reaction. DP3—三氯新 Sanlvxing; OFG—葡萄糖氧化 Glucose (oxidative); GC—阳性生长控制 Growth control; ACE—乙酰氨 Acetamide; ESC—七叶树昔 (七叶灵) Esculin; PLI—植树尿蓝母 Plant indican; URE—尿素 Urea; CIT—枸橼酸盐 Citrate; MAL—丙二氨酸 Malonate; TDA—苯丙氨酸 Phenylalanine; PXB—多粘菌素 B Polymyxin B; LAC—乳糖 Lactose; MLT—麦芽糖 Maltose; MAN—甘露醇 Mannitol; XYL—木糖 Xylose; RAF—棉子糖 Raffinose; SOR—山梨醇 Sorbitol; SUC—蔗糖 Sucrose; INO—肌醇 Inositol; ADO—侧金盏花醇 Adonitol; COU—香豆酸 p-Coumaric; H<sub>2</sub>S—硫化氢; ONP— $\beta$ -半乳糖苷酶 ONPG; RHA—鼠李糖 Rhamnose; ARA—阿拉伯糖 Arabinose; GLU—葡萄糖发酵 Glucose (Fermentative); ARG—精氨酸 Arginine; LYS—赖氨酸 Lysine; ORN—鸟氨酸 Ornithine; OXI—氧化酶 Oxidase; TLA—10% 乳糖 10% lactose.

测序得到固氮菌 N05 的 16S rDNA 部分序列,共 1495 bp 碱基,提交 GenBank,登录号为 HM854372。将固氮菌 N05 的 16S rDNA 序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行序列分析和同源性比较。该菌株序列与产碱杆菌属中粪产碱菌、木糖氧化产碱菌 (*A. xylosoxidans*) 和无色杆菌属 (*Achromobacter*) 中木糖氧化无色杆菌 (*Ac. xylosoxidans*)、反硝化无色杆菌 (*Ac. denitrificans*) 的同源性均达到 99%。

从 GenBank 中获取同源性较高的相邻的种、属的 16S rDNA 序列,同时查找相邻种、属中模式种 (type species) 的 16S rDNA。从构建系统发育树 (图 1) 中可以看出,固氮菌 N05 与粪产碱菌、木糖氧化产碱菌和木糖氧化无色杆菌、皮氏无色杆菌 (*Ac. piechaudii*) 在同一分支,表明固氮菌 N05 与产碱杆菌属和无色杆菌属的亲缘关系较近。

## 2.2 固氮菌肥对烤烟根际微生物的影响

团棵期、旺长期、现蕾期和圆顶期分别取烤烟根际土壤测定土样中细菌、放菌、真菌和固氮菌的数量。图 2 看出,两处理各种微生物数量均出现先升高后降低的现象,这与烤烟生长周期和微生物之间的活动有关。在旺长期根际细菌的数量 B + 80% N 处理明显低于 FN,其他时期差异不明显;而 4 个生

长时期根际放线菌的数量也是 B + 80% N 处理明显低于 FN,各生长期分别比 FN 处理降低 16.3%、57.4%、27.5% 和 76.6%,平均降低 48.5%,差异显著。施用固氮菌肥对烤烟根际真菌的数量影响较小,烤烟不同生长期根际自生固氮菌数量 B + 80% N 与 FN 处理相比分别提高 289.4%、448.6%、418.4% 和 178.32%,平均提高了 3.6 倍,其中在烤烟生理活性高的旺长期固氮菌数量达到峰值。

## 2.3 固氮菌肥对烤烟根际土壤矿质元素有效性的影响

烤烟生长圆顶期测定烤烟根际土壤中 8 种重要矿质元素的含量,结果表明,与 FN 相比,B + 80% N 处理,除 Mg 元素的有效性略有降低外,其他元素的有效性均有不同程度的提高,提高幅度在 2.51%~46.08%,其中 P、K、Cu 和 Mn 的有效性差异达到显著水平 (表 2),可为烤烟生长提供更多的营养元素。

## 3 讨论

结合形态特征和生理生化反应,固氮菌 N05 属粪产碱菌和博特氏菌,但粪产碱菌和博特氏菌许多表型特征均是阴性<sup>[14]</sup>,生理生化反应极为相似,很难区分,应采用其它方法加以鉴别<sup>[13]</sup>。16S rDNA

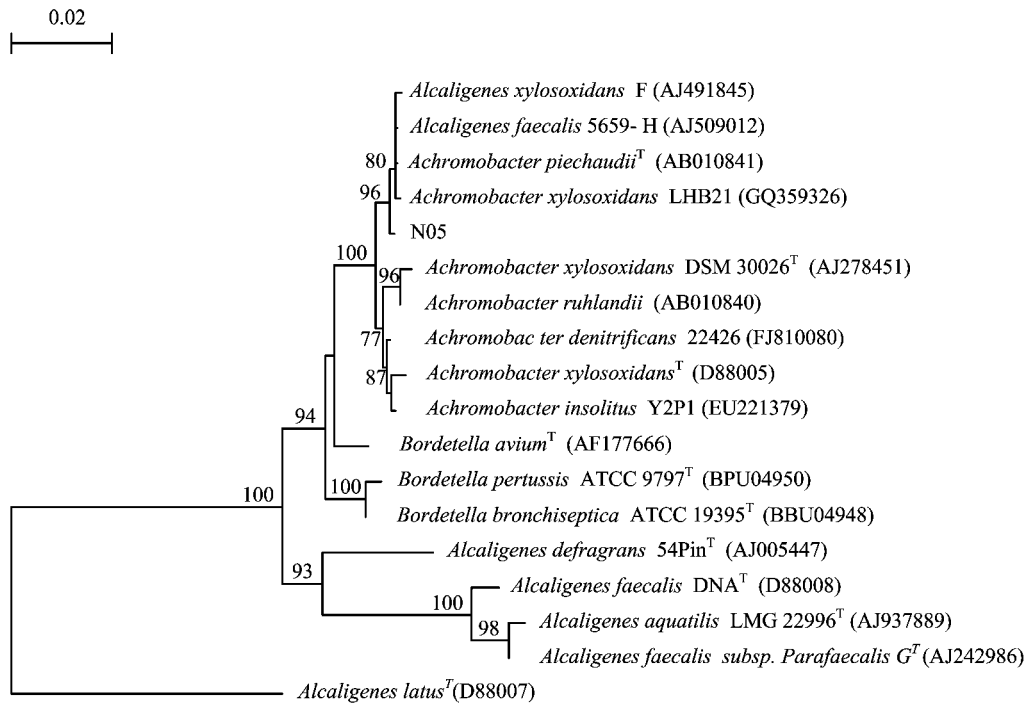


图 1 基于 16S rDNA 基因序列, 固氮菌 N05 的 Neighbour-joining 系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of azotobacter N05

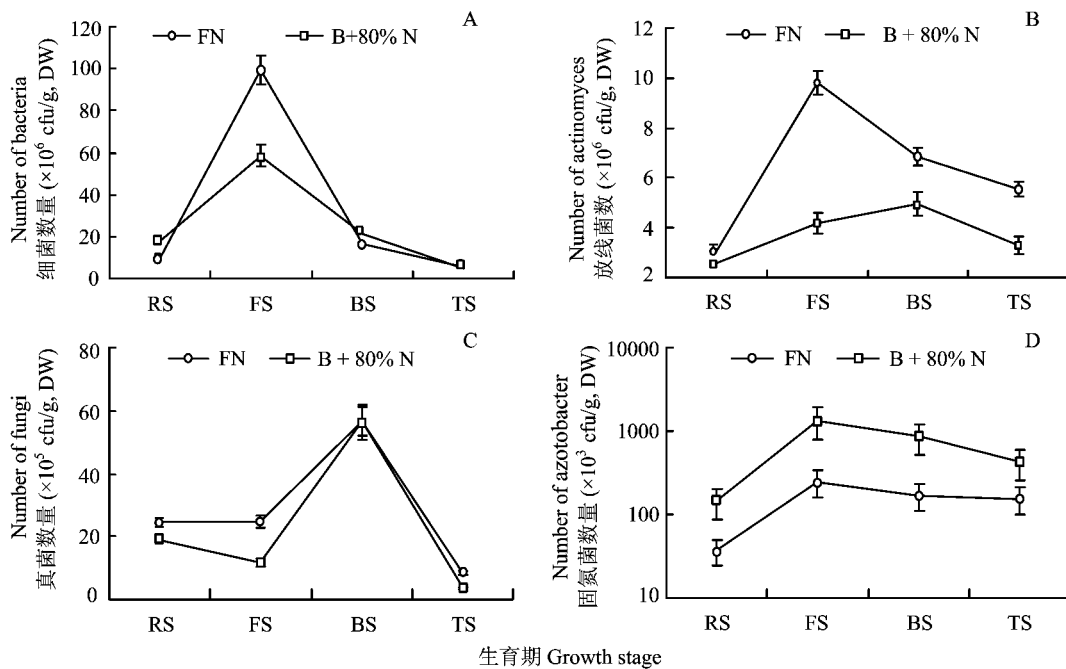


图 2 固氮菌肥对不同生长期烤烟根际微生物数量的影响

Fig. 2 Effects of the azotobacter fertilization on microbes numbers in rhizosphere at different growth stages of tobacco

[注 (Note): RS—团棵期 Resettling stage; FS—旺长期 Fast growing stage; BS—现蕾期 Budding stage; TS—圆顶期 Topping stage.]

测序分析发现, 固氮菌 N05 与产碱菌属、无色杆菌属的一些菌株的 16S rDNA 同源性高达 99%, 不易分开(图 1)。早在 1974 年, Hendrie<sup>[15]</sup> 就曾提出, 产碱菌属和无色杆菌属应归为一个属, 此提议被伯杰

细菌鉴定手册第八版收录<sup>[12]</sup>。综合以上结果, 固氮菌 N05 初步鉴定为产碱菌属的粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*)。粪产碱菌是我国首次发现的具有固氮能力的产碱菌属的菌株<sup>[16]</sup>, 广泛分布于水稻、玉米和

表 2 施用固氮菌肥对圆顶期烤烟根际土壤中几种重要矿质元素有效性的影响  
Table 2 Effects of the azotobacter fertilization on availabilities of mineral elements in rhizosphere soil at tobacco toping stage

处理 Treatment	P			K			Ca			Mg		
	全量 FC	有效态 AC	有效性 Availability	全量 FC	有效态 AC	有效性 Availability	全量 FC	有效态 AC	有效性 Availability	全量 FC	有效态 AC	有效性 Availability
	(mg/kg)		(%)	(mg/kg)		(%)	(mg/kg)		(%)	(mg/kg)		(%)
FN	740.1	9.5	1.28	19500.2	59.7	0.31	2310.3	1258.1	54.46	8970.3	78.1	0.87
B + 80% N	790.3	13.3	1.68*	16200.1	58.5	0.36*	2130.2	1193.2	56.02	8810.1	69.6	0.79

处理 Treatment	P			K			Ca			Mg		
	全量 FC	有效态 AC	有效性 Availability	全量 FC	有效态 AC	有效性 Availability	全量 FC	有效态 AC	有效性 Availability	全量 FC	有效态 AC	有效性 Availability
	(mg/kg)		(%)	(mg/kg)		(%)	(mg/kg)		(%)	(mg/kg)		(%)
FN	57.7	3.0	5.18	154.4	1.5	0.96	29396.4	74.3	0.25	787.6	45.9	5.82
B + 80% N	38.1	2.9	7.57*	138.3	1.4	0.98	29137.2	84.0	0.29	820.2	54.4	6.63*

注 (Note): FC—Full content; AC—Available content; \*— $P < 0.05$ .

甘蔗等禾本科植物的根际,是重要的植物自生和内生固氮菌,以及植物生长促进细菌(plant growth-promoting bacteria,PGPB)<sup>[17]</sup>。在烤烟根际分离到这种固氮菌尚未见报道。

PGPB 菌对植物促进生长、提高产量和营养利用率的机制也可能包括 PGPB 菌的接入对植物根际土著微生物区系的影响。接入的 PGPR 通过在植物根际定殖而改变植物根际微生物区系<sup>[18-19]</sup>。本研究表明,施用固氮菌肥,烤烟根际放线菌的数量显著降低(图 2B),固氮菌数量显著提高(图 2D)。这可能是施用固氮菌肥增加了根际的固氮菌的数量,产生一些对其他微生物有抑制作用的代谢产物,在与放线菌进行的营养和空间的竞争中取得优势;也可能与本研究采用的固氮菌株是来自当地的烤烟根际,属土著烤烟根际固氮菌。

研究 PGPB 菌肥提高肥料利用效率时,多采用比较植物中矿质元素的含量间接推测 PGPB 提高矿质元素的有效性<sup>[20]</sup>。本研究表明,施用固氮菌肥并减施 20% 氮肥的条件下,烟叶中的 N 含量仍较高,固氮菌能够提高土壤中 N 素的有效性。同时,采用根际土壤矿质元素有效性为指标,证实了固氮菌还能够提高其他矿质元素的有效性。圆顶期烤烟根际土壤中,除 Mg 元素的有效性略有降低外,P、K、Ca、Cu、Zn、Fe 和 Mn 等元素的有效性均有不同程度的提高,增幅为 2.51%~46.08%(表 2)。

烤烟生产对氮肥施用量要求严格,氮肥施用量

高,烤烟生长后期仍从土壤大量吸收氮素,导致贪青晚熟,采收期延长,产质量下降<sup>[21]</sup>;施用固氮菌肥即使减施氮 30%,仍会造成烤烟生长后期氮素吸收多,采收期延长,产质量下降<sup>[22]</sup>。而在缺氮的山地土壤中,在全量施肥的情况下,施用固氮菌肥则可显著提高烤烟的产质量<sup>[23]</sup>。因此,在烤烟生产中应用固氮菌肥应根据土壤肥力合理减施氮肥。

#### 参考文献:

- [1] Wairiu M., Lal R. Soil organic carbon in relation to cultivation and topsoil removal on sloping lands of Kolombangara, Solon Islands [J]. Soil Till. Res., 2003, 70: 19-27.
- [2] Kennedy I R, Choudhury A T M A, Keckés M L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited [J]? Soil Biol. Bioch., 2004, 36: 1229-1244.
- [3] Bhattacharjee R B, Singh A, Mukhopadhyay S N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges [J]. Appl. Microbiol. Biotech., 2008, 80: 199-209.
- [4] Morrissey J P, Dow J M, Mark G L *et al.* Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture [J]. EMBO Rep., 2004, 5(10): 922-926.
- [5] 贾小明,莫文英,钱泽澍. 水稻根系联合固氮菌的种类及数量 [J]. 浙江农业大学学报,1989, 15(1): 57-60.  
Jia X M, Mo W Y, Qian Z S. Species and enumeration of nitrogen fixing bacteria in rice root system [J]. Acta Agric. Univ. Zhejiangensis, 1989, 15(1): 57-60.
- [6] Lucy M, Reed E, Glick B R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Antonie van Leeuwenhoek,

- 2004, 86: 1–25.
- [7] 王豹祥, 李富欣, 张朝辉, 等. 应用 PGPR 菌肥减少烤烟生产化肥的施用量[J]. 土壤学报, 2011, 48 (4): 127–136.  
Wang B X, Li F X, Zhang C H *et al.* Effect of application of PG-PR on chemical fertilizer application rate for flue-cured tobacco [J]. *Acta Pedol. Sin.*, 2011, 48 (4): 127–136.
- [8] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *J. Bacteriol.*, 1991, 173(2): 697–703.
- [9] 吴风光, 王豹祥, 汪建, 等. 抗生素肥对植烟土壤和烤烟生产的影响[J]. 土壤, 2010, 42(1): 53–58.  
Wu F G, Wang B X, Wang J *et al.* Effects of antibiotic bacterial fertilizer on soil and production of flue-cured tobacco [J]. *Soil*, 2010, 42(1): 53–58.
- [10] 吴坤, 张世敏. 微生物学实验技术[M]. 北京: 气象出版社, 2004. 11–12.  
Wu K, Zhang S M. *Microbiological laboratory technology* [M]. Beijing: China Meteorology, 2004. 11–12.
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004. 30–34.  
Bao S D. *Soil and agricultural chemistry analysis* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2004. 30–34.
- [12] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002.  
Tang Q Y, Feng M G. *Practical statistics and DPS data processing system* [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [13] Garrity G M, Bell J A, Lilburn T G. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd Ed.) [M]. New York: Springer, 2004.
- [14] 刘连沫, 刘静, 姜冬梅, 等. 从接触宠物感染支气管炎的痰液检出支气管炎博德特菌(*B. bronchiseptica*) [J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(2): 184–186.  
Liu L M, Liu J, Jiang D M *et al.* Finding of bordetella bronchiseptica in sputum from patients with bronchitis due to pet contacting [J]. *Chin. J. Health Lab. Sci.*, 2004, 14(2): 184–186.
- [15] Hendrie M S, Holding A J, Shewan J M. Emended descriptions of the genus *Alcaligenes* and of *Alcaligenes faecalis* and proposal that the generic name *Achromobacter* be rejected; Status of the named species of *Alcaligenes* and *Achromobacter* [J]. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1974, 24: 534–550.
- [16] 丘元盛, 周淑萍, 莫小真, 等. 水稻根际固氮细菌的研究[J]. 科学通报, 1980, 25 (21): 1008.  
Qiu Y S, Zhou S P, Mo X Z *et al.* Study on the azobacteria in rice rhizosphere [J]. *Sci. Bull.*, 1980, 25 (21): 1008.
- [17] James E K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis [J]. *Field Crops Res.*, 2000, 65: 197–209.
- [18] Nacamulli C, Bevivino A, Dalmastrì C *et al.* Perturbation of maize rhizosphere following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7 [J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1997, 23 (3): 183–193.
- [19] Castro-Sowinski S, Herschkovitz Y, Okon Y *et al.* Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms [J]. *FEMS Microbiol. Letter*, 2007, 276(1): 1–11.
- [20] Adesemoye A O, Kloepper J W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency [J]. *Applied Microbiol. Biotech.*, 2009, 85(1): 1–12.
- [21] 焦永鸽, 李天福, 张云贵, 等. 有机质对红壤烤烟氮素累积分配特征的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(4): 923–929.  
Jiao Y G, Li T F, Zhang Y G *et al.* Effect of organic matter on accumulation and distribution of nitrogen of the flue-cured tobacco in red soil [J]. *Plant Nutr. Fert. Sci.*, 2009, 15 (4): 923–929.
- [22] 卢江平, 李安源. 生物固氮菌在烤烟上的应用[J]. 烟草科技, 1996, (5): 36–37.  
Lu J P, Li A Y. Application of biological nitrogen-fixing bacterium on the flue-cure tobacco [J]. *Tob. Sci. Tech.*, 1996, (5): 36–37.
- [23] 阎启富. 共生性固氮菌在山地烤烟上的应用[J]. 烟草科技, 1997, (4): 39–40.  
Yan Q F. Application of symbiotic nitrogen-fixing bacterium on the flue-cure tobacco cultivated in mountain field [J]. *Tob. Sci. Tech.*, 1997 (4): 39–40.