

# 杉木林土壤中固氮功能细菌的生长特性研究

刘彩霞<sup>1,2</sup>, 赵京京<sup>1</sup>, 焦如珍<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;

2. 湖南省林业科学院, 湖南 长沙 410004)

**摘要:** [目的] 研究固氮功能菌株的生长特性, 探索适地适菌原则。 [方法] 本研究以 103 株固氮功能细菌为研究对象, 以 pH 值及培养温度为考量指标, 分别研究了 8 个温度梯度、10 个 pH 值梯度对菌株生长的影响。 [结果] 表明: 经检测, 含有 *nifH* 基因的菌株有 103 株; 菌株的最适生长条件为温度 28℃、pH=7, 各菌株的温度适宜生长区为 20、28、37℃, 大量菌株生长的适宜 pH 值为 4、5、7、8; 在低温、碱性土中的适用菌株为 6003, 在高温、碱性土中的适用菌株有 09ul27、1010、2024、2029、7002、lk2-1c(2) 和 zk3-1, 在酸性及碱性土中均适宜生长的菌株为 1012 和 2025。根据菌群不同生长特性, 对所有菌株进行非层次聚类, 使用 SSI 算法得出最优分类为 9 类, 其中, 第 5 类和第 7 类全部属于伯克霍尔德属, 第 2 类基本为芽孢杆菌属, 其它类别中各菌属没有出现明显的聚类现象, 且生长条件分类与菌种的初步鉴定分类没有明显的相关性。 [结论] 固氮功能菌株的适宜生长环境较一致, 最适宜的生长条件为温度 28℃、pH=7。筛选出适合在特殊环境生长的固氮功能细菌 10 株, 各菌株初步鉴定为枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、*Chitinophaga pinensis*、*Burkholderia xenovorans*、*Burkholderia phymatum*、*Burkholderia bannensis*。通过生长条件聚类分析及所有菌株的 16S rDNA 鉴定比对得出, 菌株的生长特性与其生物学特征不完全相关。

**关键字:** 固氮细菌; 温度; pH 值

中图分类号: S714

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)04-0098-06

## Studies on the Growth Characteristics of Nitrogen-fixing Bacterium in Soil of *Cunninghamia lanceolata* Forest

LIU Cai-xia<sup>1,2</sup>, ZHAO Jing-jing<sup>1</sup>, JIAO Ru-zhen<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree

Breeding and Cultivation of State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Hu'nan Academy of Forestry,

Changsha 410004, Hu'nan, China)

**Abstract:** [Objective] To study the growth characteristics of functional strains and to explore the principles of suitable bacteria. [Method] In this study, the effects of 10 pH gradients and 8 temperature gradients on the growth of 103 strains of nitrogen-fixing bacteria were researched. [Result] There were 103 bacterial strains containing *nifH* gene. The most suitable growth conditions of these strains were 28℃, pH=7. The temperature ranges suitable for growth were 20, 28 and 37℃, the pH values were 4, 5, 7 and 8. The strain 6003 was suitable to grow in low temperature alkaline soil, while the strains 09ul27, 1010, 2024, 029, 7002, lk2-1c(2) and zk3-1 were suitable to grow in high temperature alkaline soil. The strains suitable for growth in acid and alkaline soils were 1012 and 2025. According to the different growth characteristics of the bacteria, all the strains were classified into 9 categories by using SSI algorithm. Both the fifth and seventh categories belonged to *Burkholderia*, the second category belonged to *Bacillus*. There was no obvious clustering phenomenon in the other categories, and there was no significant

收稿日期: 2016-10-11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0600302)资助

作者简介: 刘彩霞(1989—), 女, 博士. 主要研究方向: 土壤微生物. E-mail: lcaixia1989@163.com

\* 通讯作者: 焦如珍.

correlation between the growth condition classification and the strains identification. [ **Conclusion** ] The suitable growth environment of the nitrogen-fixing bacteria is similar, and the most suitable growth conditions of these strains are 28°C, pH = 7. 10 strains of nitrogen-fixing bacteria suitable in special environment are screened out. These strains are initially identified as *Bacillus subtilis subsp*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Chitinophaga pinensis*, *Burkholderia xenovorans*, *Burkholderia phymatum*, and *Burkholderia bannensis*. The results also show that the growth characteristics of the strains are not completely correlated with their biological characteristics by growth condition cluster analysis and 16S rDNA identification.

**Keywords:** nitrogen-fixing bacteria; temperature; pH value

自生固氮功能细菌是指在常温常压环境中可以将空气中的氮气转化为植物可以吸收的铵态氮的一类细菌,由其所执行的生物固氮过程是土壤中重要的生态过程,也是生态系统最初的氮素来源<sup>[1]</sup>。功能性细菌具有较高的研究价值,首先,固氮功能细菌分布广泛,从温带生态系统到热带雨林均有分布<sup>[2-3]</sup>;其次,自生固氮功能细菌不需要特定的寄主,在微生物肥料的研究中被大量应用<sup>[4-5]</sup>。在生产实践中,保障功能菌株发挥作用的重要前提是菌株的良好生长,且符合适地适菌原则,所以,研究功能菌株的生长特性具有重要意义。

本研究中,通过限氮培养基大量收集土壤中的自生固氮功能细菌,根据菌落形态特征进行基础筛选,并验证了菌种的 *nifH* 基因,共得到固氮功能细菌 103 株。本研究以 103 株菌株为研究对象,以培养基的 pH 值及培养温度为考量指标,研究自生固氮功能细菌的生长特性,并对各菌株进行 16S rDNA 测序,初步进行菌种鉴定。本研究的目的是:探讨应用各固氮功能菌株的适宜地域及季节,为固氮微肥的使用提供指导;根据功能细菌生长指标的跨度分析,筛选极端环境菌株;根据生长特性差异将自生固氮菌株进行分类,并研究生长特性与菌株系统发生位置的关系。

## 1 采样地概况

采样地位于江西省大岗山东北侧的山下林场(27°30'~27°45'N,114°30'~114°45'E),该地区属低山丘陵地貌,母岩以千枚岩为主,土壤为黄、红壤,地带性植被为常绿阔叶林。日最高气温 39.9°C,最低气温 -8.3°C,年均气温 17.9°C;年降水量 1 593.7 mm,集中在 4—7 月;无霜期 268 d<sup>[6]</sup>。采样地土壤本底情况为,有机质含量 25.36 g·kg<sup>-1</sup>,全氮含量 1.27 g·kg<sup>-1</sup>,速效磷含量 4.63 mg·kg<sup>-1</sup>,速效钾含量 78.12 mg·kg<sup>-1</sup>。试验区林木为 4 年生杉木

(*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.) 幼龄林,其平均树高 4.35 m,胸径 5.37 cm,冠幅 2.6 m,郁闭度为 0.3。

## 2 试验方法

采集试验区杉木林地中的土壤,通过限氮培养基筛选出固氮功能细菌。为了验证各细菌的固氮功能,所有培养过程均采用无氮培养基<sup>[7]</sup>。在菌株最适 pH 值研究中,每菌株生长的 pH 值梯度为:3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,每处理 3 个重复,使用 NaOH 和 HCl 调节 pH 值,培养温度为 28°C;在菌株最适温度的研究中,每菌株生长温度的梯度为:4、10、20、28、37、45、50、60°C、每处理 3 个重复,培养基的 pH 值为 7。菌株 *nifH* 基因检测中使用的正向引物为 *nifH*-1:5' AAGTGCCTGGAGTCCGGTGG 3';反向引物为 *nifH*-2:5' GTTCGGCAAGCATCTGCTCG 3'。PCR 体系为:93°C 3 min;93°C 45 s,62°C 32 s,72°C 2 min,33 循环;72°C 7 min;4°C ∞。使用 CTAB 法提取固氮功能细菌的 DNA,通过细菌通用引物(27F 和 1492R)进行 PCR 扩增,扩增产物由华大基因使用 Sanger 测序法测序<sup>[8]</sup>。结果序列拼接后在 NCBI 序列库中比对,将功能菌株进行基础的鉴定与分类。

使用 R 语言(版本 3.0.0)进行热图制作及聚类分析,使用 spss 进行标准差计算。

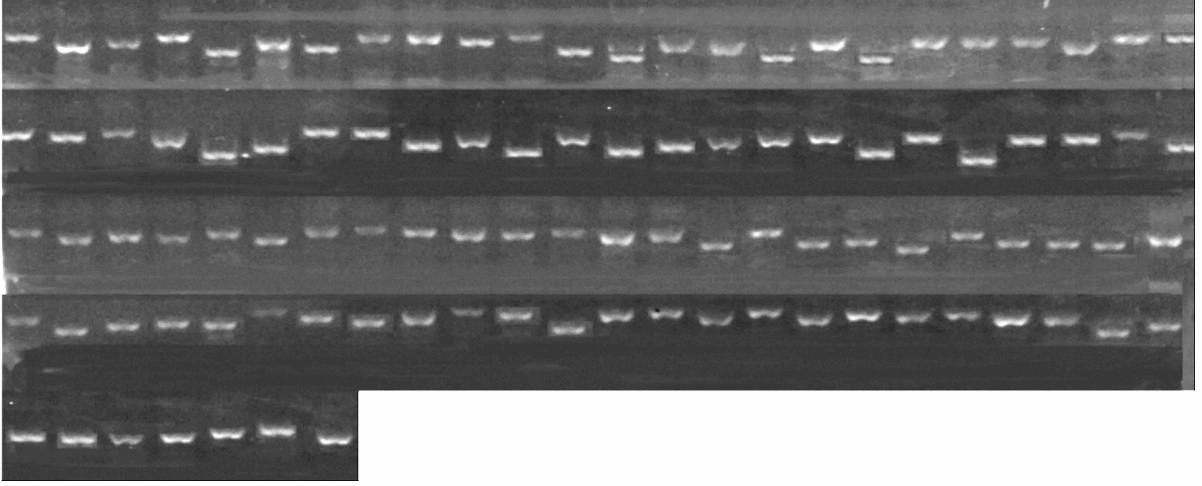
## 3 结果与分析

### 3.1 固氮功能菌株的分离与 *nifH* 基因检测

采集试验区杉木林地中的土壤,通过限氮培养基筛选出具有固氮功能的细菌菌株 220 株。对筛选出的菌株进行初步的分离纯化,提取纯化菌株的 DNA。对纯化菌株的 DNA 进行基因水平的检测-*nifH* 基因检测,根据电泳条带共得到固氮功能菌株 103 株,其菌株编号分别为:1001、1002、1003、1004、1005、1006、1008、1009、1010、1011、1012、1013、

1014、1015、1016、1017、1018、1019、1020、1021、2001、2002、2004、2006、2007、2010、2011、2012、2013、2014、2015、2016、2018、2019、2020、2021、2022、2023、2024、2025、2026、2027、2028、2029、2030、2031、2032、2033、2107、3-a、3-b、3-c、3-d、3-e、3-f、3-i、3-j、3-k、3-l、3-m、3-n、3-o、3-p、3-q、3-r、3-s、

4001、4002、4003、4005、4006、4007、4008、4010、6001、6002、6003、6004、6005、6006、6007、6008、6009、6010、7001、7002、7004、7006、7008、7009、7010、7012、7014、7015、zk3-1、09ul27、09ul8、lk3-3fh2、lk3-1fh1、lk2-1c(2)、lk1-2a(1)、lk1-2f、lkhfh(图1)。



注:第1排(从左到右):3-c、2018、7006、1001、3-q、2024、6005、09ul27、3-f、3-l、2012、7014、6010、6009、1014、1009、7002、1003、1004、2021、4003、6007、3-p、2013;第2排(从左到右):lk3-1fh1、2029、lk3-3fh2、1015、1019、2006、2010、2028、1016、2022、1002、3-i、6008、2030、2020、3-d、7001、3-e、7012、3-m、2032、3-o、4006、6003;第3排(从左到右):2023、2015、2001、1005、3-a、6004、3-s、6001、3-b、09ul8、2011、4001、6006、lkhfh、2025、1011、2026、2031、1012、2033、2016、2014、1010、lk2-1c(2);第4排(从左到右):2107、4002、1021、1020、2027、1013、1006、4008、4007、3-n、2004、7004、7015、1018、6002、2019、4005、7008、3-j、lk1-2a(1)、lk1-2f、2007、7009、2002;第5排(从左到右):1017、3-k、4010、3-r、7010、zk3-1、1008

图1 筛选出的功能菌株的 niFH 基因电泳条带

Fig. 1 niFH gene bands of Functional strains

### 3.2 固氮功能菌株的最适生长条件

各菌株的生长特性(图2)表明:28℃、pH=7为

大部分菌株的最适生长条件;各菌株适宜的生长区温度为20、28、37℃;大量菌株生长的适宜pH值为5

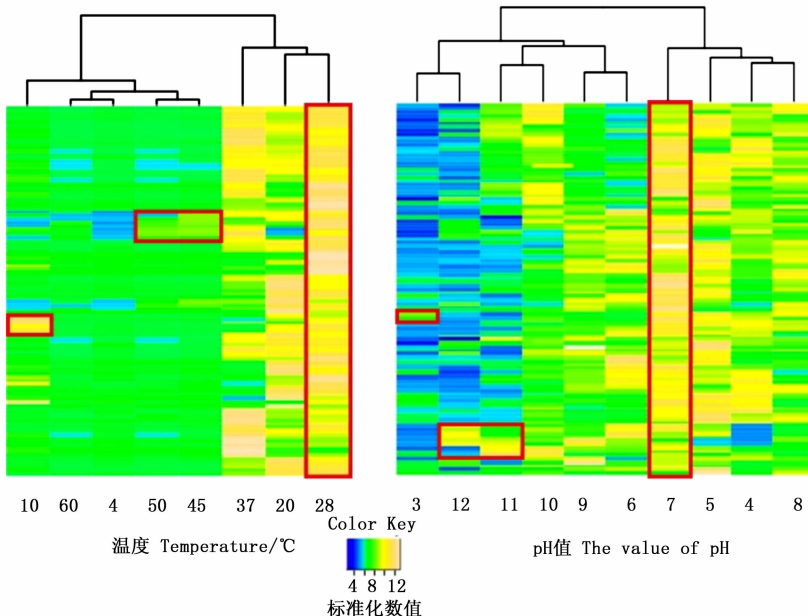


图2 各菌株在相同 pH=7 不同温度和同一温度 28℃ 不同 pH 值下的生长热图

Fig. 2 The heatmap of each bacterial growth in pH=7 different temperatures and T=28℃ different pH values

~7。研究还发现:部分菌株可以在高温(45、50℃)或低温(10℃)条件下生长良好,也有部分菌株可以在极碱性环境(pH = 11 和 12)或酸性环境(pH = 3)下生长。

### 3.3 特殊环境下生长良好的固氮功能细菌

由图2可知:在4℃培养时,菌株生长均极其缓慢,培养后 $OD_{600}$ 值均小于0.05;10℃培养后, $OD_{600}$ 值大于0.1的菌株有20株,而生长良好、 $OD_{600} > 0.2$ 的菌株有7株(表1)。在60℃培养后,能生长的菌株有11株, $OD_{600} > 0.1$ 的有7株(表1)。在pH = 3的极酸性培养基中, $OD_{600} > 0.1$ 的菌株有26株,而生长良好、 $OD_{600} > 0.2$ 的菌株有11株;在pH = 12的极碱性培养基中, $OD_{600} > 0.2$ 的菌株有26株(表2)。由表1、2可知:在低温、碱性土中适用的菌株为

表1 在pH = 7、极端温度下菌株的生长情况( $OD_{600}$ 值)

Table 1 The growth of special bacteria in pH = 7 and extreme culture temperature ( $OD_{600}$ 值)

菌株编号 Number	10℃	菌株编号 Number	60℃
1008	0.335 ± 0.060	09ul27	0.188 ± 0.013
3-n	0.621 ± 0.056	1010	0.173 ± 0.021
3-s	0.439 ± 0.011	2024	0.105 ± 0.014
4007	0.518 ± 0.058	2029	0.157 ± 0.002
6003	0.523 ± 0.095	7002	0.113 ± 0.011
7015	0.262 ± 0.021	lk2-1c(2)	0.101 ± 0.016
lk1-2f	0.480 ± 0.047	zk3-1	0.106 ± 0.005

表2 在温度28℃、极端pH值培养下菌株的生长情况( $OD_{600}$ 值)

Table 1 The growth of special bacteria in  $T = 28^\circ\text{C}$  and extreme culture pH values ( $OD_{600}$ 值)

菌株编号 Number	pH = 3	pH = 12	菌株编号 Number	pH = 12
1002	0.208 ± 0.025	-	6003	0.414 ± 0.012
1012	0.361 ± 0.012	0.219 ± 0.009	09ul8	0.587 ± 0.020
2004	0.299 ± 0.001	-	1014	0.385 ± 0.005
2010	0.442 ± 0.017	-	1017	0.567 ± 0.081
2025	0.247 ± 0.015	0.275 ± 0.090	1021	0.201 ± 0.028
2026	0.267 ± 0.015	-	2002	0.320 ± 0.019
4003	0.307 ± 0.024	-	2030	0.443 ± 0.005
4008	0.274 ± 0.009	-	2107	0.380 ± 0.020
6004	0.256 ± 0.050	-	3-m	0.246 ± 0.014
6005	0.204 ± 0.006	-	3-p	0.385 ± 0.017
7004	0.236 ± 0.033	-	6001	0.288 ± 0.009
09ul27	-	0.268 ± 0.015	6006	0.502 ± 0.010
1010	-	0.379 ± 0.003	6007	0.233 ± 0.003
2024	-	0.384 ± 0.014	6010	0.307 ± 0.051
2029	-	0.214 ± 0.012	7001	0.208 ± 0.007
7002	-	0.209 ± 0.008	7009	0.499 ± 0.011
lk2-1c(2)	-	0.297 ± 0.011	lk3-3fh2	0.281 ± 0.010
zk3-1	-	0.327 ± 0.010		

6003,在高温、碱性土中适用的菌株有09ul27、1010、2024、2029、7002、lk2-1c(2)和zk3-1,在酸性及碱性土中均适宜生长的菌株为1012和2025。

提取上述菌株的DNA,扩增后进行测序分析。通过与NCBI数据库中序列的blast比对,得出09ul27、1010、2024、7002四株菌株的序列相似性大于99%,极可能为*Bacillus subtilis* Cohn 1872的不同菌株。与6003、2029、lk2-1c(2)、zk3-1、1012、2025相似性最高的菌株分别为:*Burkholderia xenovorans* Goris et al. 2004、*Chitinophaga pinensis* V. Sangkhobol & V. Skerman 1981、*Bacillus cereus* Frankland & Frankland 1887、*Bacillus megaterium* Dde Bary 1884、*Burkholderia phymatum* Vandamme et al. 2003、*Burkholderia bannensis* Aizawa et al. 2011。

### 3.4 菌群的生长特性分类

根据菌群不同生长特性,对所有菌株进行非层次聚类,使用SSI算法得出最优分类为9类(图3)。通过K-means及K中心点算法(PAM)2种算法的轮廓宽度检验、验证最优K值(图4),其中,K-means的平均轮廓宽度为0.15,而PAM算法的平均宽度值为0.1,所以,最终确定最优分类方法为K-means算法,最佳聚类数量为9类。第一类为:09ul8、1016、2028、2029、3-f、4010、6006、7008;第二类为:09ul27、1001、1011、2024、6001、7010、7012、7015、lk1-2a(1)、lk1-2f、lk2-1c(2)、lk3-3fh2、lkhfh、zk3-1、lk3-1fh1;第三类为:1009、1013、1019、1020、2004、2013、2014、2016、2023、3-q、4002、4008、6005、6008;第四类为:1012、1014、1017、1018、2010、2018、2019、2030、2032、2033、3-r、4006、6002;第五类为:1004、2006、2007、2015、2022、2027、3-a、3-b、3-e、3-i、3-j、3-m、3-s、6010;第六类:1003、1008、1015、2012、2021、3-c、3-d、3-k、3-o、4001、4003、6004、7014;第七类:2025、7009;第八类:1002、1005、1006、1010、1021、2001、2002、2026、2031、2107、3-l、3-n、4005、6007、6009、7001、7002、7004、7006;第九类:2011、2020、3-p、4007、6003。

将各菌株进行16S rDNA测序,检测结果表明:与检测菌株相似性高于97%的菌种有27种,分别属于*Burkholderia* Yabuuchi et al. 1992、*Bacillus* Cohn 1872、*Paenibacillus* Ash et al. 1994、*Escherichia* Castellani & Chalmers 1919、*Agroboacterium* Conn 1942、*Pantoea* Gavini et al. 1989、*Arthrobacter* Conn & Dimmick 1947、*Chitinophaga* V. Sangkhobol & V. Skerman

1981、*Rhizobium* Frank 1889、*Novosphingobium* Balkwill *et al.* 1997、*Sphingomonas* Yabuuchi 1990、*Pseudomonas* Migula 1894 属,其中,根据生长条件分类的菌株中,第五类和第七类全部属于 *Burkholderia* 属,第

二类基本为 *Bacillus* 属,其它类别中各菌属没有出现明显的聚类现象,且生长条件分类与菌种的初步鉴定分类没有明显的相关性(表3)。

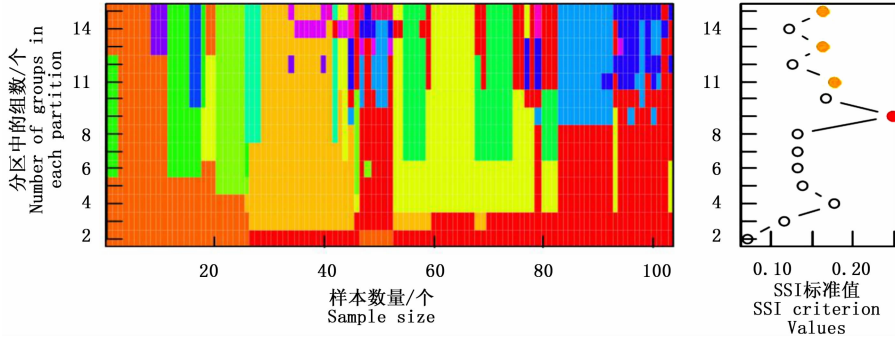


图 3 K-means 非层次聚类的分组数量

Fig. 3 Group number of K-means non hierarchical clustering

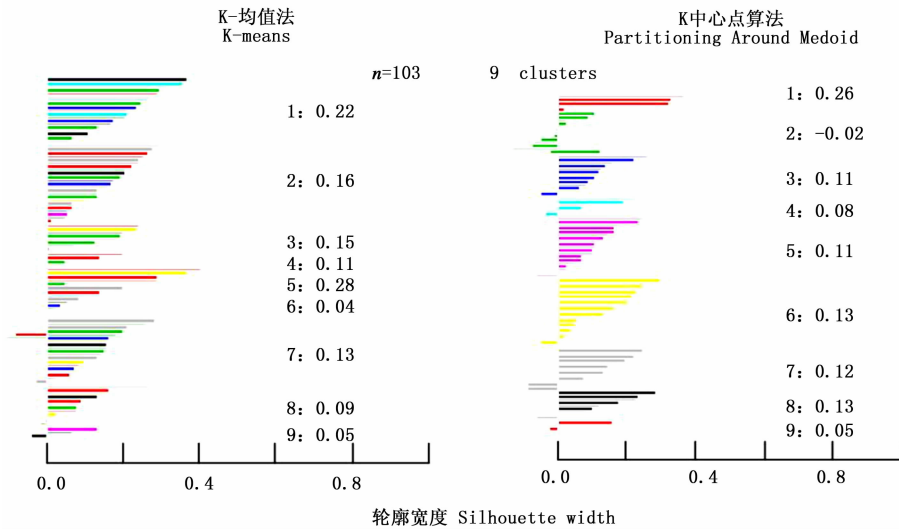


图 4 最优 K 值检验

Fig. 4 The better K value test

表 3 各类别菌株的初鉴定分属情况

Table 3 Preliminary identification of different strains in genus level

生长条件分类 Classification of growth conditions	该组别初鉴定菌株的属名 The name of preliminary identification strains in genus level
1	<i>Burkholderia</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Paenibacillus</i> 、 <i>Chitinophaga</i>
2	<i>Bacillus</i> 、 <i>Paenibacillus</i>
3	<i>Burkholderia</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Arthrobacter</i> 、 <i>Pseudomonas</i>
4	<i>Burkholderia</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Arthrobacter</i> 、 <i>Chitinophaga</i>
5	<i>Burkholderia</i>
6	<i>Burkholderia</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Paenibacillus</i> 、 <i>Pantoea</i> 、 <i>Arthrobacter</i>
7	<i>Burkholderia</i>
8	<i>Burkholderia</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Agrobaeterium</i> 、 <i>Rhizobium</i>
9	<i>Burkholderia</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Sphingomonas</i>

## 4 讨论

本研究中,试验区杉木林地的固氮功能菌株最适宜的生长条件为:温度 28℃、pH = 7。较为适宜生长区的温度为 20、28、37℃,pH 值为 5~7。与前人研究相比,菌株适宜生长的温度区域基本一致,但本研究中大量菌株在 pH 值为 4、5 时仍生长良好。刘晓璐等<sup>[9]</sup>研究得出,烟草根际的固氮功能菌最适生长条件为 30℃、pH = 7.5;郑红丽等<sup>[10]</sup>认为,羊草根际的固氮细菌适宜生长的温度为 25~35℃、pH 值为 7~8;杨艳红等<sup>[11]</sup>认为,多功能芽孢杆菌的最适温度为 37℃,初始 pH 值为 7.0。菌株酸性环境生长良好的原因可能为菌株是从江西省红壤区分离纯化,其土壤为酸性土,本底土壤的 pH 值为 3.97~

4.89。长期的酸性环境使当地筛选的菌株在酸性条件下生长良好。

筛选出适合在特殊环境生长的固氮功能细菌10株,且适用于高温、碱性土的菌株均属于芽孢杆菌属。这与前人的研究结果一致,李峰等<sup>[12]</sup>从盐碱地中分离出的芽孢杆菌耐碱性为pH=11;闫国宏等<sup>[13]</sup>分离的食品中枯草芽孢杆菌可以耐100℃左右的高温。其原因可能为芽孢杆菌属菌株在不良环境下可产生芽孢,而芽孢具有高含量的吡啶二羧酸,且含有厚且含水量低的多层结构,所以,其对热、化学剂和其他理化因素有较强的抵抗力<sup>[13-15]</sup>。土壤pH值是林木生长的重要指标,目前,很多极酸、极碱性土均只能种植一些特定植被,且改良的花费大,效果不理想,而该立地条件下较环保的微生物肥料也因菌种生长条件的限制使用较少<sup>[16-17]</sup>。本研究还筛选出了2株在pH值为3~12时均生长良好的菌株,pH值跨度广解决了微生物的生长限制,使其在各种本底土壤中发挥功能,并且由于其受pH值变化的影响不大,所以,在立地改良中仍可施用。

通过聚类分析得出,菌株的生长特性与其生物学特征不完全相关。分类的第二组及第五组表明,生长特性相似的菌株均为同一属,但其它类别中菌属类别与生长条件不存在相关性,即菌株的生长特性除与系统发生位置有关外,主要还是受其它因素的影响。其原因可能为同一菌株在不同环境胁迫下,基因调控及蛋白质的合成均会发生变化,从而导致菌株脂类的组成、菌株对营养物质的吸收、菌株胞外酶活性及代谢产物均表现出差异<sup>[18-19]</sup>。

## 5 结论

(1) 试验区杉木林地中固氮功能菌株最适宜的生长条件为,温度28℃、pH=7。

(2) 筛选出适合在特殊环境(低温碱性、高温碱性、pH大跨度)生长的固氮功能细菌10株,各菌株初步鉴定为*Burkholderia xenovorans*、*Bacillus subtilis* subsp.、*Chitinophaga pinensis*、*Bacillus cereus*、*Bacillus megaterium*、*Burkholderia phymatum*、*Burkholderia ban-ensis*。

(3) 通过生长条件聚类分析及所有菌株的16S rDNA鉴定比对得出,菌株的生长特性与系统发生位置有一定关联,但主要还是受其它因素的影响。

## 参考文献:

[1] Wakelin S A, Gupta V, Forrester S T. Regional and local factors af-

fecting diversity, abundance and activity of free-living, N 2-fixing bacteria in Australian agricultural soils[J]. *Pedobiologia*, 2010, 53(6): 391-399.

- [2] Pérez C A, Carmona M R, Armesto J J. Non-symbiotic nitrogen fixation during leaf litter decomposition in an old-growth temperate rain forest of Chiloé Island, southern Chile: Effects of single versus mixed species litter[J]. *Austral Ecology*, 2010, 35(2): 148-156.
- [3] Barron A R, Wurzbarger N, Bellenger J P, et al. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils[J]. *Nature Geoscience*, 2009, 2(1): 42-45.
- [4] 王守宗, 杨承栋, 谢应先, 等. 细菌肥料对杨树生长效应的研究[J]. *林业科学研究*, 1996, 9(6): 654-657.
- [5] 杨承栋, 焦如珍, 孙启武, 等. 细菌肥料促进马尾松生长效应的研究[J]. *林业科学研究*, 2002, 15(3): 361-363.
- [6] 刘彩霞, 焦如珍, 董玉红, 等. 杉木林土壤微生物区系对短期模拟氮沉降的响应[J]. *林业科学研究*, 2015, 28(2): 271-276.
- [7] 周宇光. 中国菌种目录[J]. ISBN: 9787122000859. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [8] Mahmood S, Freitag T J. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 56(3): 482-493.
- [9] 刘晓璐, 杨柳青, 吕乐, 等. 烟草根际固氮菌的筛选, 鉴定及优化培养[J]. *中国烟草学报*, 2015, 21(1): 89-94.
- [10] 郑红丽, 庞保平, 樊明寿, 等. 羊草根际固氮菌的分离及其生长条件的研究[J]. *华北农学报*, 2007, 22(1): 172-177.
- [11] 杨艳红, 李世川, 胡燕, 等. 多功能芽孢杆菌AF1的生长条件与生理耐受特性研究[J]. *重庆理工大学学报: 自然科学版*, 2015, 29(8): 78-83.
- [12] 李峰, 郭瑞雪, 张林普. 芽孢杆菌属一新种的鉴定[J]. *淮北师范大学学报: 自然科学版*, 2005, 26(2): 44-47.
- [13] 闫国宏, 傅力, 肖春芳, 等. 新疆番茄酱中枯草芽孢杆菌耐热性的研究[J]. *食品研究与开发*, 2008, 29(11): 88-90.
- [14] 胡长利, 向新华, 韩晓旭, 等. 耐热芽孢杆菌(*Bacillus sporothermodurans*)的研究进展概述[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015(7): 2795-2801.
- [15] Van Pham H T, Kim J. *Bacillus thaonhiensis* sp. nov., a new species, was isolated from the forest soil of Kyonggi University by using a modified culture method[J]. *Current Microbiology*, 2014, 68(1): 88-95.
- [16] 黄耀蓉, 王强锋, 朱彭玲, 等. 土壤改良剂对酸性土壤改良的影响[J]. *西南农业学报*, 2014, 27(4): 1637-1640.
- [17] 刘鹏, 刘训理. 中国微生物肥料的研究现状及前景展望[J]. *农学报*, 2013, 3(3): 26-31.
- [18] 王秋菊. 光合细菌在土壤中存活条件及其对微生物区系影响研究[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(36): 178-181.
- [19] 张香美, 许冬倩, 闫洪波. 细菌sRNA与群体感应系统相互作用的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(8): 1822-1828.

(责任编辑:徐玉秀)