

细菌-植物联合固氮研究进展*

王 子 芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

生物固氮过程对农业生产的重要意义是众所周知的。工业固氮一年约提供 4 千万吨氮肥, 而生物固氮则每年贡献约 1 亿吨^[1]。

从生态学观点看, 自然界存在三种固氮体系: 自生固氮(如自生固氮菌), 共生固氮(如根瘤菌和豆科植物共生)和联合固氮(如雀稗和雀稗固氮菌的联合)。本文只介绍联合固氮体系的研究进展。

联合固氮体系是自生固氮和共生固氮体系的中间类型。固氮细菌与相应联合的植物之间具有较密切的相互影响, 但又不像形成根瘤那样具有共生结构。在联合固氮体系中, 固氮细菌居住于植物根际、根表, 有的甚至进入根的皮肤细胞中^[2,3], Hardy 和 Holsten 将这种现象称为“联合”(association)固氮作用。

联合固氮作用在自然界广泛存在。各种作物和热带、亚热带牧草的根际和根表等均有联合固氮微生物存在, 它们在提供土壤和作物氮素方面的作用, 值得深入地研究和认真估价。

研 究 方 法

固氮微生物新种的发现和深入研究, 与新技术的发展和创建有密切关系。四十年代中期, 测定固氮作用的方法是将可能固氮的生物经纯培养后测定其总化合态氮的增加, 这种方法既费时, 又不灵敏。四十年代后期, 由于同位素 $^{15}\text{N}_2$ 的应用, 使方法的灵敏度提高了 1 千倍。六十年代中期, 几位科学家在不同国家分别同时创建了乙炔还原法, 使测定固氮酶活性的灵敏度达到 10^{-9} 克分子。由于这一方法的建立, 使生物固氮研究方法取得了重要突破^[4-6]。乙炔还原法用于研究联合固氮作用, 具体方法有以下几种:

一、根系离体培养法

从土壤中取出待测植物根系, 洗净, 表面灭菌, 切成小段置培养基中, 培养 24 小时后测定其乙炔还原强度^[7]。

二、土柱法

用直径 10cm、高 16.5cm 的金属筒, 从田间取出整个带有植被的土柱, 置密封罐中, 测定乙炔还原强度^[6]。

三、原位测定法

用密封塑料袋将整株植物笼罩, 注射乙炔, 测定乙炔产量^[8,9,10]。

四、固氮细菌纯培养法

用特定的培养基从植物根际或根表分离固氮细菌, 经纯培养后, 测定其乙炔还原强度^[11]。

近几年来, 为了探讨联合固氮细菌在植物组织内的部位, 利用 2, 3, 5-三苯基四唑氯化物在还原状态呈现红色的特性, 证实了固氮细菌的存在^[3,11]。利用荧光抗体法也同样可以证实^[12,13]。

几种联合固氮体系

在联合固氮体系中, 细菌和植物二者都是重要的。固氮细菌广泛地生活在植物根际和根表, 当进行固氮时, 需要能量和碳素, 植物根系的分泌物便能提供。下面就几种主要作物及热带、亚热带牧草的固氮体系来进行分析。

一、玉米和高粱

玉米和高粱这两种重要谷类作物都是光合作用 C_4 植物。用切根预培养的方法, 从巴西里约热内卢州的水稻田中生长的玉米和高粱中获得高固氮酶活性, 达 $9000\text{nM C}_2\text{H}_4/\text{g 根/h}$ 。其它研究者用同样方法测得为 $100-2000\text{nM C}_2\text{H}_4/\text{g 根/h}$ 。然而, 从用土柱法和原位测定法所得结果看, 却酶活很低, 甚至没有酶活。

在巴西, 有固氮作用的玉米和高粱的根系中大量居住着产脂螺菌 (*Spirillum lipoferum*)^[14], 在美国的某些地区的玉米根系中也分离到这种细菌, 而另一些州则未分离到。

我国广西、湖北等省种植的玉米和高粱根系中也曾分离到产脂螺菌, 其纯培养的固氮酶活性为 $300-1500\text{nM C}_2\text{H}_4/\text{瓶/h}$ ^[15]。

在玉米根中除分离出产脂螺菌外, 还分离出阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)^[16]。

* 本文经陈华癸教授指正, 谨致衷心感谢。

二、水稻

生物固氮作用在保持土壤肥力方面起了很大作用,如菲律宾国际水稻研究所历时11年的实验中证明,从未施肥的稻田共收获23季水稻,土壤中氮肥水平却无明显下降,收获的谷粒和稻草,每季带走的氮素是45—60kg/公顷。Watanabe 曾用灌水排藻法,在水稻开花期分析过土壤植物系统,由于存在非藻类的固氮微生物,每公顷约可固定50—200g 氮。Balandreau^[9]曾报道,非藻类固氮微生物在生长季节能固定25—30kg 氮/公顷。

实验结果表明,拜叶林克氏菌(*Beijerinckia* sp.)和阴沟肠杆菌是水稻根际中最常见的固氮细菌。我国亚热带水稻根系上曾分离到阴沟肠杆菌和粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)^[11]。

三、小麦

在著名的英国 Broadbalk 小麦连续种植实验中,从1843—1967年进行了氮素平衡研究,结果表明,每公顷土壤中每年增加34kg 氮,其中24kg 从谷粒和蒿秆中带走。然而,用乙炔还原法测定土柱所得到的数据较之上述结果要低得多,仅为2—3kg 氮/公顷/年,长有小麦的土柱的固氮酶活性,比裸露的土壤要高得多^[6]。

分析美国俄勒冈小麦土柱上所得的结果是2g 氮/公顷/天^[18]。在巴西里约热内卢小麦土柱分析表明,固氮酶活性很高,为38—506g 氮/公顷/天。

在前述 Broadbalk 实验中,根系的固氮酶活性是属于嫌氧和兼性厌氧的固氮细菌的^[6]。从俄勒冈小麦根系上分离的固氮菌是阴沟肠杆菌,浸麻芽孢杆菌(*Bacillus macerans*)、和多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)。从巴西不同地区的小麦根系上,用苹果酸盐半固体培养基加富培养的方法得到的固氮细菌都是产脂螺菌。武汉病毒研究所生物固氮研究组从我国湖北省小麦根系上同样获得大量螺菌属细菌。

Larson 等^[19]描述过兼性固氮的芽孢杆菌和小麦二倍染色体代换系专一性的关系。该种芽孢杆菌自种植过30年小麦而没有施过氮肥的土壤中分离得到。它与根系密切结合,并深入到根的皮层细胞间。Rovira 等曾用电子显微镜观察,证明开花期的小麦根的皮层内有芽孢杆菌和其它细菌存在^[20,21]。

四、雀稗和马唐

雀稗是热带草本光合作用 C₄ 植物。它与固氮细菌联合固氮的研究进行得最早。五种生态型的雀稗与雀稗固氮菌(*Azotobacter paspali*)表现了专一性的联合。用乙炔还原法计算一种雀稗-雀稗固氮菌体系的固氮酶活性为310g 氮/公顷/天;用¹⁵N₂ 法测定,酶活

为110g 氮/公顷/天。雀稗固氮菌定居于雀稗根的皮层内。

马唐是一种热带的重要牧草,常见的是府仰马唐(*Digitaria decumbens*)。在田间生长两夏一冬,其固氮量为1500g/公顷/天。用土柱法分析,其固氮酶活为880g 氮/公顷/天。

与府仰马唐联合的固氮细菌通常是螺菌,该类细菌同样是栖居于根的皮层内。

几种联合固氮细菌的特性

一、雀稗固氮菌

雀稗根瘤菌对雀稗表现严格的专一性,它们只存在几种生态型的点状雀稗的根际中。据 Brown^[22]报道,用这种细菌接种几种植物根系没有成功。它们的生长对培养基 pH 值的适应范围狭窄(6.0—7.0),但可存在于生长在 pH 为4.9的土壤中的点状雀稗根系上,点状雀稗根系的分泌物对该菌有刺激作用。此菌的大部分菌株不能还原硝酸盐,其固氮酶能耐20mM 的 NO₃⁻,生长在 NH₄⁺ 中,细胞的固氮酶脱阻遏作用和10mM 硝酸盐中和不加硝酸盐时是相同的。0.1mM 的亚硝酸盐阻止细胞生长,1mM 浓度时则抑制细胞的固氮酶活性。

二、拜叶林克氏菌

此属细菌耐酸,故在酸性土壤中可与其它微生物相竞争,在中性土壤中则竞争不过其它微生物。在巴西,97% 甘蔗田中可发现这种细菌。从形态上看,它被一种坚韧的胶套包围,这种结构起着氧保护作用;在生理特性上,其固氮酶作用要求大量 C₂H₂(40—80%)以满足酶的需要。在 N₂:O₂:CO₂(95:4.5:0.5) 的混合气体中,营养体迅速生长,但没有 CO₂ 时便不能生长。印度拜叶林克氏菌(*B. indica*) 在10mM 的 NO₃⁻ 中培养60小时后只保持原有固氮酶活性的30%,如加10mM NH₄⁺,其酶活性只保持10—20%。相反,维涅兰德固氮菌(*Azotobacter vinelandii*) 在同样浓度下,1—3小时即丧失其全部固氮酶活性。弗留明拜叶林克氏菌(*B. fluminensis*) 在培养6小时后不受 NO₃⁻ 影响,甚至培养3天后仍保持50%的固氮酶活性。它们即使在高浓度无机氮的培养基中也有固氮能力,这具有重大的生态学和实践意义。

三、产脂螺菌

此菌分布极广,在许多谷物植株及热带牧草根系上都有,在细菌-植物联合固氮体系中起着重要作用。近年来对它作过详细的研究,现简述如下:

(一) 生态分布

从表 1 可见其分布概况。表 2 可见各种植物对产脂螺菌在根系上存活的影响。它们在土壤中的存活,既依赖于土壤的 pH,更取决于植物的选择性。

表 1 世界各地产脂螺菌在植物根上和土壤中的分布

地区及纬度	牧草根		土壤	
	样品数	有菌样品 (%)	样品数	有菌样品 (%)
欧洲,北纬 48—58°	—	—	48	8
美洲,北纬 43—47°	62	11	6	17
非洲,北纬 6—15°	45	58	53	79
拉丁美洲,北纬 3°	54	43	—	—
巴西(热带),南纬 0—23°	926	61	192	62
巴西(亚热带),南纬 30°	226	22	—	—

表 2 各种植物根上产脂螺菌的存在情况

植 物	采样地点数	样品数	有菌样品 (%)	固氮酶活性 nM C ₂ H ₄ /h. /瓶(培养物)
(少肥或无肥)				
羊 草	6	60	92	91±8
狼 尾 草	6	60	47	65±17
马 唐	5	60	43	37±17
(施磷、钾、钼肥)				
玉 米	1	57	100	550±60
高 粱	2	85	96	347±42
小 麦	2	122	86	198±98
黑 麦	1	45	98	233±40

(二) 生理特性

1. 氧的效应: 产脂螺菌的固氮酶对氧敏感,但氧又是产生 ATP 所必需的。对于好氧固氮微生物,这是一个共同性问题。产脂螺菌是否有氧保护机制,尚不清楚。它们在好氧条件下旺盛生长,但只在微好氧条件下固氮。Okon 等^[23]采用恒氧器保持恒定的氧分压,获得产脂螺菌最适氧分压是 0.01—0.02 大气压之间的结果。实际工作证明,半固体培养基对于保持最适氧分压是最简单的方法。细菌细胞为阻止氧的渗透,细胞浓缩形成一层薄膜,每当这层薄膜受到破坏时,固氮酶活性即降低或消失。

2. 最适温度: 产脂螺菌生长温度一般在 32°—36℃ 之间,但没有人比较过在温带和热带分离的菌种在生长温度上的差异。33°—40℃ 之间固氮酶活性最高,33℃ 以下和 40℃ 以上酶活性明显降低,45℃ 时所有菌株完全丧失酶活。

3. 最适 pH: 在土壤中的最适 pH 为 7.0,纯培养和无细胞制剂中则为 6.8—7.8。

4. 氮代谢: 产脂螺菌参与各种氮素转化过程,它能利用各种有机氮、铵盐及硝酸盐。Neyra 等对 51 株菌进行测定,将产脂螺菌对硝酸盐的利用分为三群。第一群(包括 Sp. 7)不积累亚硝酸盐,产生 N₂O; 第二群积累部分亚硝酸盐,同时产生 N₂O; 第三群大量积累亚硝酸盐,不产生 N₂O^[24]。从这些资料看来,产脂螺菌是已知唯一在固氮的同时将 NO₃⁻ 还原为 N₂ 的微生物,有必要深入研究。该菌在含 0.25% NH₄Cl 的培养基中生长良好,但固氮酶的活性受到抑制^[23]。在好氧情况下,供给 NH₄⁺ 时,细胞生长比在 N₂ 中快 5 倍^[25]。

5. 碳代谢: 产脂螺菌在含苹果酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐或丙酮酸上生长最好,固氮酶活性最高。上述有机酸盐可提高细胞悬液或无细胞提取液对 O₂ 的吸收。产脂螺菌的呼吸商是固氮菌的 10—20%,而与离体培养的根瘤菌的相同。另外,葡萄糖、果糖、半乳糖及葡萄糖-6-磷酸都不能提高产脂螺菌无细胞提取液对 O₂ 的吸收,说明该菌的糖酵解和戊糖磷酸化途径不重要。

6. 固氮酶活性: 美国威斯康辛大学一个小组深入研究了产脂螺菌无细胞提取液的固氮酶活性。发现固氮酶的作用需要一个产生 ATP 的系统,以及连二亚硫酸盐, Mg²⁺ 和厌氧条件^[23]。后来又发现,它还需要锰离子作为活化因子,而这种活化因子对深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 固氮酶的铁蛋白活化也是必需的。由产脂螺菌得到的粗提取物也能活化深红螺菌无活性的纯铁蛋白。维涅兰德固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 与产脂螺菌的固氮酶组分也有互补作用。

1978 年 Schering 报道,维涅兰德固氮菌除含铁蛋白及钼铁蛋白外,还有一种 FeS 蛋白组分,它具有在好氧条件下保护固氮酶活性的作用。产脂螺菌是否具有某种氧保护机制,尚待深入研究。

7. 固氮效率: Okon 等^[23]用恒氧器试验,其固氮效率最高达 12mg (氮)/g (苹果酸盐)。在半固体静止培养中,为 10—25mg (氮)/g (碳源)^[26]。这两种不同方法所得结果相当一致。

(三) 分类

1923 年 Beijerinck 把螺菌描述为螺旋固氮菌 (*Azotobacter spirillum*), 后因菌种失传,所以在第 8 版 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 中未描述该菌。Döbereiner^[27] 从马唐根系上分离到产脂螺菌,它已成为标准菌种,美国菌种保藏中心的编号为 ATCC 29145。Tarrand 等 1978 年把螺菌属更名为固氮螺菌属 (*Azospirillum*)。根据对葡萄糖、核糖和生长素的需求情况,将它们分为二个种。由葡萄糖或核糖产酸,需要生长素的定名为产脂固氮螺菌 (*A. lipoferum*), 由葡萄糖或核糖不产酸,不需要生长素的定名为巴西

固氮螺菌 (*A. brasiliensis*)^[28]。按此标准, 前述螺菌 sp. 7 应为巴西固氮螺菌。

影响联合固氮作用的因素

一、季节和一天中固氮酶活性的变化

谷类作物最高的固氮酶活性出现在繁殖阶段。田间玉米有两个固氮酶活性高峰期。一个是在吐丝期, 另一个是灌浆初期。在抽穗期以前和灌浆中期以后, 该酶活性最低。田间高粱的最高固氮酶活性在开花期, 开始灌浆时酶活即降低。水稻的最高酶活在抽穗阶段, 然后迅速降低。

各种植物根系固氮酶活性在一天之中的不同时间也不同。点状雀稗、高粱、羊草^[9]和玉米^[1]的第一个固氮酶活性高峰出现在中午, 第二个高峰在晚上。晚上出现该酶活性高峰是因为植物白天合成的碳水化合物水解、转运和分泌到根际促进了固氮微生物的活动^[4]。水稻的固氮酶只是在白天 9—10 时有一个高峰, 晚上则不出现第二个高峰^[29]。有人认为水稻的固氮酶活高峰在下午三时^[30]。

二、温度

温度对植物根际微生物的发育影响很大, 如产脂固氮螺菌需较高温度, 故热带地区对它的生长发育更为有利^[3]。从马唐根系上分离的该菌的固氮酶, 在 25℃ 以下活性即受到抑制。从玉米和马唐根系上分离的该菌, 在最适温度 (31℃) 下固氮酶活性相同, 但在 22℃ 时, 前者固氮酶活性是后者的 5 倍。这说明从不同植物上分离的同一种菌, 对低温的耐受性不同, 这很可能是长期与相应植物联合共生的结果。

三、氧分压

固氮酶系统对氧极敏感^[31]。氧对固氮细菌纯培

养的固氮作用也有影响^[46]。联合固氮细菌固氮酶的最适氧分压大大低于空气中的氧分压。马唐、玉米和高粱根系的最高固氮酶活所要求的氧分压是 0.01—0.02 大气压; 雀稗中则为 0.04 大气压, 从雀稗根系上分离的产脂螺菌的纯培养, 也要求相同的氧分压^[46]。

Troldenier^[30] 用田间生长和水培的水稻根系进行实验, 证明固氮酶在空气中或完全无氧时均受到抑制, 只有在氧分压为 0.03 大气压时最高 (表 3)。

除氧分压外, 在水培水稻根系实验中, 水培中的氧化还原势 (Eh) 也强烈影响固氮酶活性。当氧化还原势开始下降时, 固氮酶活性达最高值, 但氧化还原势继续下降, 酶活性也迅速下降 (表 4)。

表 3 氧分压对水培水稻根系乙炔还原活性的影响^[30]

乙炔还原活性 [nM(C ₂ H ₄)/g (鲜根)]	氧分压 (大气压)	0.21	0.03	0
测定时间				
3 小时后		1.4	100.3	61.8
14 小时后		11.9	654.8	549.0

表 4 氧化还原势对水培水稻根系乙炔还原活性的影响

氧化还原势 (mV)	乙炔还原活性 [nM(C ₂ H ₄)/g(根)/h]
+381	9.0
+350	34.5
+66	146.3
+39	8.8

四、结合态氮

Balandreau 等^[9]报道, 在播种期应用不同量的 (NH₄)₂SO₄, 对水稻幼苗的固氮作用有明显影响, 用量过大, 其酶活明显下降。在水培水稻进行的实验中, 不同浓度的尿素对根系固氮酶活性也有很大影响 (表 5)。

表 5 尿素对离体水稻根系乙炔还原活性的影响

尿素含量(含氮 ppm 量)	乙炔还原活性 [nM(C ₂ H ₄)/g(根)/h]
0	54.6
5	29.8
10	13.2
20	3.1

五、植物的遗传型

植物的遗传型对它的根际微生物, 特别是固氮微生物的活动有很大影响。用离体根系分析方法发现,

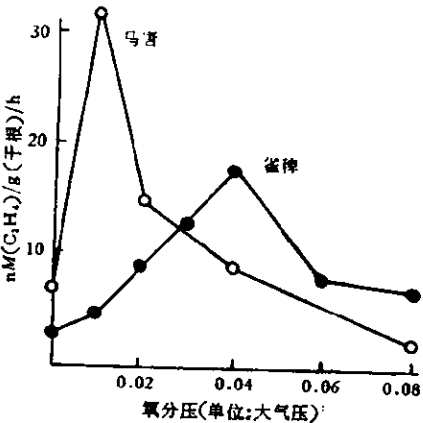


图 1 氧分压对马唐和雀稗离体根系固氮酶活性的影响

不同遗传型的玉米,其根系固氮酶活性变化很大,S₁品系的固氮酶活性平均值高于VR-1品系10—20倍。在不同品系的小麦、点状雀稗及狼尾草中,也观察到不同遗传型而表现不同的根际效应^[3,7]。

Larson 等在应用染色体工程技术研究普通小麦对根腐病抗性的过程中,发现某些发生了染色体置换的品系,其根际固氮微生物数量显著增加。这项工作指出了使生物固氮作用发挥效果的一条可能途径,因而得到了高度评价^[32]。Larson 等^[19]发现小麦遗传限定性品系根际,选择的固氮细菌为兼性生长的芽孢杆菌。这些结果揭示了与植物遗传型相对应的联合固氮细菌选择的重要性,同时,也提出了培育联合固氮作用水平高的植物品系的可能性。

联合固氮细菌的接种效果

关于产脂螺菌对玉米的接种效果,进行过大量研究,但所得结果不一致。在温室用灭菌和不灭菌土壤进行的盆栽试验表明,二者均在根系表现固氮酶活性,但植株干重或总含氮量没有增加^[15,18,33]在田间用该菌接种玉米和小麦都没有成功。

Smith 等^[34]在美国佛罗里达州用产脂螺菌接种热带谷物和牧草,都得到增产效果,当每公顷施用含 80 公斤氮的氮肥,并接种该菌时,增产 2—5%。施用一半量氮肥并接种该菌,其产量和施用含 80 公斤氮的氮肥、不接种时的几乎相同(图2)。用产脂螺菌接种羊草(PM-199),在同时施用含 40 kg/ha 氮的氮肥的处理

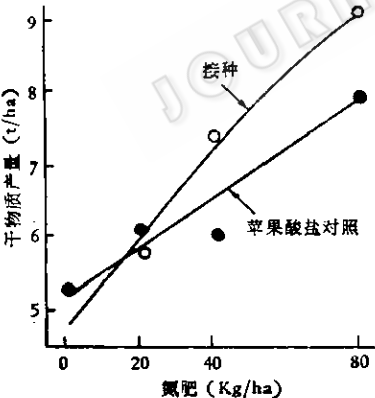


图2 施用不同氮肥量并接种产脂螺菌,对珍珠小米干物质产量的影响

中,提高产量 10%,而施用 80kg/ha 氮肥的处理,产量没有提高。

Rinaudo 等^[29]用产脂螺菌、褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)和 *Beijerinckia camargensis* 接种水稻,发现接种产脂螺菌的,每克干根每小时还原乙炔超过 15000nM,接种后两种细菌的,根系固氮酶活性反比对照低(图3)。

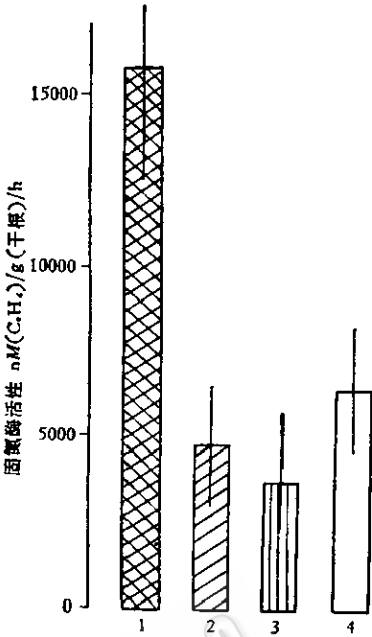


图3 接种不同固氮菌对水稻(IR8)-土壤系统固氮酶活性的影响
1: 产脂螺菌; 2: 褐球固氮菌; 3: *Beijerinckia camargensis*; 4: 对照(未接种的土壤)

讨 论

一、几种测定联合固氮作用方法的比较

用¹⁵N₂吸收方法测定固氮作用,方法灵敏准确,但¹⁵N₂和质谱仪价格昂贵,使它的普遍使用受到限制。

乙炔还原法既灵敏又简便。但近年来有人指出C₂H₂与N₂的比例并不都是3:1,因此此法尚需改进。此外,切根预培养和土柱分析所得数据相差很大,前者为后者的14倍,甚至20倍。看来前一方法所得结果偏高,但各种土壤对乙炔的渗透性不同,土柱法还有个延缓期,所以土柱法所得结果可能偏低。

采用原位测定方法,可以在不损伤植物的情况下获得结果,并可得知植物生长周期中固氮酶活性的变化情况。但此法目前未普遍采用,原因是密闭罩不理想。同时各种土壤物理性状不同,气体交换有差异,所得结果也相差很大。

总之,有关方法还需进一步探讨。

二、耐铵和泌氢菌株的选育

无论共生固氮或自生固氮的微生物,其固氮作用均遇到氨抑制效应的问题。虽然各种作物根系上存在大量固氮微生物,热带及亚热带牧草依赖生物固氮作用可以维持生长,但要高产,只依靠联合固氮作用所得到的氮肥,还是远远不够的。因此,在结合态氮存在条件下,如何发挥固氮作用的效果,值得深入研究。寻求

NO₃⁻ 或 NH₄⁺ 存在时仍可固氮的菌株,或缺失硝酸盐还原酶的突变菌株对农业增产将是有益的。

联合固氮细菌和自生固氮菌一样,同化 N₂ 形成的 NH₃, 通过谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合成酶的作用形成氨基酸。高浓度的谷氨酰胺或氨基酸降低谷氨酰胺合成酶的活性,限制了氨基酸的继续合成,从而限制了固氮酶合成。Gorden 和 Brill^[33] 首先使用蛋氨酸亚砷亚胺抑制谷氨酰胺合成酶,以致维涅兰德固氮菌在 NH₄⁺ 存在时有较高的固氮酶活性,同时将合成的 NH₃ 分泌到培养基中。在实验室条件下,使维涅兰德固氮菌与小米联合,前者供给后者氮素营养^[34]。(因此选育泌氮的突变株在理论和实际上均有重大意义。

三、发掘植物根际根表联合固氮微生物新资源

大量研究工作证明,一定的细菌与某一特定植物品系相联合,产生较高的固氮作用。因此,植物育种是达到植物-细菌联合并具有较强的固氮能力的有效办法。现在正在筛选谷类植物的特定品系,它们能提供给固氮微生物更多的能源和碳源。从这些植物根系中可分离到固氮能力较强的微生物,利用它们可以建立稳定的联合固氮体系。

参 考 文 献

- [1] Burris, R. H.: Overview of Nitrogen Fixation, *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation* (ed. by Hollaender, A. et al.), Plenum Press, New York and London, 1977, pp. 9—18.
- [2] Döbereiner, J. *Recent Developments in Nitrogen Fixation* (ed. by Newton, W. E. et al.), Academic Press, London, 1977, pp. 513—522.
- [3] Döbereiner, J., I. E. Marriel and M. Nery: *Can. J. Microbiol.*, 22: 1464—1473, 1976.
- [4] Hardy, R. W. F.: *Proc. Int. Symp. Nitrogen Fixation 1st* (ed. by Newton, W. E. & C. J. Nyman), Washington State Univ. Press, Pullman, 1976, pp. 693—717.
- [5] Burris, R. H.: *The Biology of Nitrogen Fixation* (ed. by Quispel, A.) North Holland Publ., Amsterdam, 1974, pp. 9—33.
- [6] Day, J. M., D. Harris, P. J. Dart et al.: *Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms* (ed. by Stewart, W. D. P.) Cambridge University Press, London, 1975, pp. 71—84.
- [7] Day, J. M., M. C. P. Neves & J. Döbereiner: *Soil Biol. Biochem.* 7: 107—112, 1975.
- [8] Balandreau, J. P., C. R. Millier & Y. R. Dommergues: *Appl. Microbiol.*, 27: 662—665, 1974.
- [9] Balandreau, J. P., et al.: *Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms*, 1975, pp. 57—70.
- [10] Watanabe, I. & Lee, K. K.: *IRRI Res. Paper Series*, No. 3, 1977.

- [11] Patriquim, D. G. & J. Döbereiner: *Can. J. Microbiol.*, 24 (6): 734—742, 1978.
- [12] Schand, S. C. et al.: *Soil Biol. Biochem.*, 11: 287—295, 1979.
- [13] Strayer, R. F. & J. M. Tiedje: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 192—198, 1978.
- [14] Neyra, C. A. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 23: 300—305, 1977.
- [15] 湖北省微生物研究所生物固氮组: *微生物学报*, 19(2): 160—165, 1979.
- [16] Raju, P. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 3474—3478, 1972.
- [17] 邱元盛等: *微生物学报*, 21(4): 468—476, 1981.
- [18] Barber, L. E. & H. J. Evans: *Can. J. Microbiol.*, 22: 254—260, 1960.
- [19] Neal, J. L. & R. L. Larson: *Soil Biol. Biochem.*, 8: 151—155, 1976.
- [20] Rovira, A. D.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 19: 241.
- [21] Fester, R. C. & A. D. Rovira: *New Phytol.*, 76: 363—3, 1976.
- [22] Brown, M. E.: *J. Appl. Bacteriol.*, 40: 341, 1976.
- [23] Okon, Y., S. L. Abrecht & R. H. Burris: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 85—88, 1977.
- [24] Neyra, C. A. & J. Döbereiner: *Adv. Agronomy*, 29: 1—38, 1977.
- [25] Okon, Y. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 98: 87, 1977.
- [26] Day, J. M. & J. Döbereiner: *Soil Biol. Biochem.*, 8: 45—50, 1976.
- [27] Döbereiner, J. & J. M. Day: *Proc. Int. Symp. Nitrogen Fixation 1st* (ed. by Neyton, W. E. & C. J. Nyman), Washington State Univ. Press, Pullman, 1976, pp. 518—538.
- [28] Krieg, N. R.: *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation* (ed. by Hollaender, A.), Plenum Press, New York & London, 1977 pp. 463—472.
- [29] Rinaudo, G. et al.: *Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics* (ed. by Ayanaba, A. & P. J. Dart), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1977, pp. 313—322.
- [30] Trollidenier, G.: *Plant & Soil*, 47: 203, 1977.
- [31] Ljones, T.: *The Biology of Nitrogen Fixation* (ed. by Quispel, A.), North-Holland Publ., Amsterdam, 1974, pp. 617—638.
- [32] 常隘恒一郎: *自然*, 32(7): 50—56, 1977.
- [33] Albrecht, S. L. et al.: *Crop Science*, 21: 301—306, 1981.
- [34] Smith, R. L. et al.: *Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics* (ed. by Ayanaba, A. T. et al.: John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 1977.
- [35] Gordon, J. K. & W. J. Brill: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59: 967—971, 1974.
- [36] Maier, R. J. et al.: *Genetically Modified Nitrogen-Fixing Bacteria, Development in Industrial Microbiology* (ed. by Underkofler, L. A. et al.), Vol. 19, Society for Industrial Microbiology, Washington D. C., 1978, pp. 193—196.