

# 类芦和狗牙根内生固氮菌初步研究

冯 宏<sup>1</sup>, 郭彦彪<sup>1</sup>, 林日强<sup>2</sup>, 彭桂香<sup>1</sup>, 谭志远<sup>3\*</sup>

(1. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642; 2. 广东省土壤肥料总站, 广州 510500;

3. 广东省植物分子育种重点实验室, 华南农业大学农学院, 广州 510642)

**摘要:**为探索水土保持禾草的固氮能力, 利用乙炔还原法(ARA)对类芦(*Neyraudia reynaudiana*)和狗牙根(*Cynodon dactylon*)植株内生固氮菌的固氮酶活性进行研究。结果表明:在类芦茎部和狗牙根叶片中存在高固氮酶活性的内生固氮菌群;这些菌群在无氮培养基上经划线分离纯化得到40个菌株, 其中26株有微弱固氮酶活性, 14株检测不到固氮酶活性;从类芦茎部和狗牙根叶片中筛选到的固氮菌群在兼性厌氧的环境中有较高的固氮酶活性, 且在石蜡油密封条件下, 两者的固氮酶活性均最高;在不改变自然界微生物之间的协同关系情况下, 混合菌群均具有较高的固氮酶活性, 而人为组配混合得到的菌群固氮酶活性较低。

**关键词:**类芦; 狗牙根; 内生固氮菌; 固氮酶活性; 水土保持

中图分类号: Q945.13

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)05-0465-06

## Preliminary Studies on Endophytic Diazotrophs from *Neyraudia reynaudiana* and *Cynodon dactylon*

FENG Hong<sup>1</sup>, GUO Yan-biao<sup>1</sup>, LIN Ri-qiang<sup>2</sup>, PENG Gui-xiang<sup>1</sup>, TAN Zhi-yuan<sup>3\*</sup>

(1. College of Resources and Environment, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong General Station for Soil and Fertilizer, Guangzhou 510500, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The nitrogenase activities of endophytic diazotrophs in *Neyraudia reynaudiana* and *Cynodon dactylon*, which are the pioneer grasses for soil and water conservation, were studied by acetylene reduction assay (ARA). The results showed that the communities of the endophytic diazotrophs isolated from the stems of *Neyraudia reynaudiana* and the leaves of *Cynodon dactylon* showed high nitrogenase activities. Forty strains were isolated and purified on nitrogen-free medium, in which twenty-six strains showed weak nitrogenase activities, and fourteen had no nitrogenase activities. The natural communities of endophytic diazotrophs showed high nitrogenase activity under facultative anaerobic conditions or covered by paraffine. The communities of endophytic diazotrophs under laboratory-cultured showed lower nitrogenase activity than that of the natural communities.

**Key words:** *Neyraudia reynaudiana*; *Cynodon dactylon*; Endophytic diazotrophs; Nitrogenase activity; Soil and water conservation

植物生长过程中需要大量的氮素营养, 生物固氮为全球的植物提供了约75%的氮素<sup>[1]</sup>。但是水土流失地区立地条件恶劣, 土壤贫瘠, 氮素缺乏往往成为植被恢复的限制因子。生物固氮系统分为共生固氮、联合固氮和自生固氮3种。其中植物内生固氮菌(Endophytic diazotrophs)定殖在植物体内,

并能起固氮作用, 为宿主提供氮元素<sup>[2]</sup>。内生固氮菌除了具有联合固氮作用<sup>[3-5]</sup>外, 还能产生植物激素, 促进根系有效吸收土壤中的水分和养分<sup>[6-9]</sup>, 有些内生固氮菌可以分泌有机酸, 提高磷的有效性<sup>[10-11]</sup>, 还能增强植物抗病能力<sup>[12-13]</sup>。在水稻(*Oryza sativa*)<sup>[14]</sup>、玉米(*Zea mays*)<sup>[15]</sup>和甘蔗

收稿日期: 2008-11-03 接受日期: 2009-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770001); 国家自然科学基金青年基金项目(40801099); 广东省农业攻关项目(2007B020711004)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

(*Saccharum officinarum*)<sup>[16-17]</sup>等禾本科农作物内生固氮菌研究表明,禾本科植物内蕴藏着遗传多样性丰富的内生固氮菌资源。近年来,从卡拉牧草(*Leptochloa fusca*)<sup>[18]</sup>、圆果雀稗(*Paspalum orbiculare*)<sup>[19]</sup>和糖蜜草(*Melinis minutiflora*)<sup>[20]</sup>等禾本科牧草中分离到内生固氮菌。禾草植物往往作为先锋植物在植被恢复中起着举足轻重的作用,挖掘禾草植物内生固氮菌资源,对促进水土流失地区植被恢复具有重要实践意义。

类芦(*Neyraudia reynaudiana*)<sup>[21]</sup>和狗牙根(*Cynodon dactylon*)均为多年生禾本科草本植物,具有耐旱、耐瘠薄等特性,是良好的水土保持先锋植物,本研究初步探索类芦和狗牙根内生固氮菌的固氮酶活性,为内生固氮混合菌群的开发利用及其在水土保持植被恢复中的应用提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

类芦(*Neyraudia reynaudiana*)和狗牙根(*Cynodon dactylon*)于 2007 年 11 月采于华南农业大学校园内。

### 1.2 固氮酶活性测定及培养基配方

固氮酶活性测定采用乙炔还原法<sup>[22]</sup>。

NFb 培养基(1 L):DL-苹果酸 5 g,  $K_2HPO_4 \cdot H_2O$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g,  $CaCl_2 \cdot H_2O$  0.02 g, NaCl 0.1 g, 1.64%  $Fe_{(3)}$ -EDTA 4 mL, 0.5% 溴百里香酚蓝指示剂(0.2 mol/L 氢氧化钾溶解), 2 mL 微量元素贮备液 2 mL, 维生素混合液 1.0 mL, KOH 4.5 g, pH 6.8。微量元素贮备液成分: $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.2 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.3 g,  $H_3BO_3$  0.28 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.08 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.024 g 溶于 200 mL 蒸馏水中。维生素混合液(1 L)成分:生物素 100 mg, 盐酸吡哆辛 200 mg。

DN 培养基(1 L):蔗糖 10 g, 苹果酸 5 g, NaCl 0.1 g,  $K_2HPO_4 \cdot H_2O$  0.1 g,  $KH_2PO_4 \cdot H_2O$  0.4 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g(分开灭菌),  $CaCl_2 \cdot H_2O$  0.02 g(分开灭菌),  $FeCl_3$  0.01 g,  $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$  0.002 g。pH 7.0。

以上两种培养基中加入 20 g 琼脂配制成固体培养基,加入 2 g 琼脂配制成半固体培养基。

### 1.3 内生固氮菌群的筛选

将采集的新鲜植株用蒸馏水洗净,剪下根、茎、叶分别置于已灭菌的 3 个培养皿中,用 3% 的双氧

水( $H_2O_2$ )浸泡 4 min(以除去根、茎、叶表面的腐烂物质),无菌水洗涤 1 次,再用 0.1% 的升汞( $HgCl_2$ )浸泡 5 min,无菌水中振动洗涤 5~7 次,每次 5~10 min,将最后一次洗涤液涂布于固体培养基,以检测消毒是否彻底。将表面消毒完全的根、茎、叶用灭菌手术刀切碎,分别穿刺接种到 DN 和 NFb 半固体培养基中,胶塞密封后,置于 28℃ 的人工培养箱内进行培养,3 次重复。整个操作均在无菌条件下完成。待长出菌体后,向管内注入 1/10 体积 10% 乙炔气体(终浓度为 1%),在相同条件下再培养 24 h,测定其固氮酶活性。

### 1.4 内生固氮菌的分离纯化

将筛选到具有固氮酶活性的试管用接种环将菌悬液接至不同的固体培养基上,平板划线分离,在 28℃、相对湿度 85% 下进行好氧培养。将分离得到的单菌落再进行划线分离直到获得纯的菌株,最后镜检,革兰氏染色,进一步观察其形态及确定纯化与否。将已纯化的菌株分别接种至相应的半固体培养基试管中,以检测固氮酶活性。

分离纯化培养基为 NFb 和 DN 培养基以及稀释培养基 1/5DN 和 1/10DN。稀释培养基是 DN 培养基中的碳源(蔗糖和苹果酸)减至 1/5 和 1/10,其他成分不变。

### 1.5 固氮菌群的需氧特性测定

将有固氮酶活性试管中的菌悬液分别接种到半固体培养基、液体培养基、液体培养基 + 0.5 cm 厚的石蜡油密封,30℃ 培养 24 h,测定固氮酶活性。

### 1.6 培养方式对固氮酶活性的影响

从类芦茎部和狗牙根叶片中筛选出来的内生固氮菌群,采用不同培养方式,测定其固氮酶活性。实验共设 4 个处理,每个处理 3 次重复。对照:植株样品接种到 DN 半固体培养基试管中;T1:用接种环从对照中将菌悬液接种到 DN 半固体培养基中;T2:用接种环从对照中将菌悬液划线接到 DN 固体培养基上,培养 2~3 d,再用接种环将固体平板上长出的所有菌混合刮入 DN 半固体培养基中;T3:将纯化分离到的所有内生菌等量组合接种到 DN 半固体培养基中。

## 2 结果和分析

### 2.1 内生固氮菌群的筛选

类芦和狗牙根不同部位的固氮菌群的酶活性

见表1。可以看出,从类芦的根、叶和狗牙根的根、茎分离的内生菌群均没有检测到固氮酶活性,而在

类芦茎部和狗牙根叶片中分离的内生菌群固氮酶活性较高,均大于  $500 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ 。

表1 类芦和狗牙根不同部位分离的固氮菌群酶活性

Table 1 The activities of endophytic diazotrophs isolated from different parts of *N. reynaudiana* and *C. dactylon*

植物 Species	部位 Part	培养基 Medium	固氮酶活性 Nitrogenase activity ( $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ )
类芦 <i>Neyraudia reynaudiana</i>	茎 Stem	DN	802.11
	茎 Stem	NFb	695.19
	根、叶 Root, Leaf	DN, NFb	-
狗牙根 <i>Cynodon dactylon</i>	叶 Leaf	DN	662.84
	叶 Leaf	NFb	613.26
	根、茎 Root, Stem	DN, NFb	-

-: 未检测到。Not detected.

从类芦茎和狗牙根叶片中分离的内生菌群在 NFb 和 DN 半固体培养基中培养 24 h 后均能检测到固氮酶活性,表明内生固氮菌群能利用苹果酸和蔗糖。NFb 半固体培养基颜色均由绿色变为黄色并伴有气泡产生(图1),表明从类芦茎和狗牙根叶片中筛选到的内生固氮菌群均产酸产气,且从培养基颜色变化来看,含有类芦茎组织的半固体培养基的黄色较为浓郁,表明类芦茎中的固氮菌群具有较强的产酸能力,这些菌群可能会促进磷酸盐的溶解,其溶磷作用有待进一步研究。

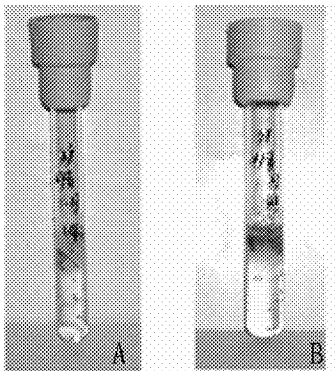


图1 内生固氮菌群在 NFb 半固体培养基上的生长情况

Fig. 1 Endophyte diazotroph community cultured in NFb semisolid medium  
A: 类芦茎 *N. reynaudiana* stems; B: 狗牙根叶片 *C. dactylon* leaves

## 2.2 固氮菌株的分离及固氮酶活性

用不同浓度营养物的培养基可以从环境中分离获得不同种类的细菌<sup>[23]</sup>,本研究采用 NFb、DN、1/5DN 和 1/10DN 培养基进行菌株分离纯化。从类芦茎和狗牙根叶中共分离到 40 个菌株,其中 26 株有微弱固氮酶活性,14 株无固氮酶活性(表2)。从

表2可以看出,不同宿主植物的内生固氮菌的种群和数量不一样,类芦茎分离出 25 个菌株,其中 16 株有固氮酶活性,为  $1.62 \sim 7.57 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ 。狗牙根叶片中分离出 15 个菌株,其中 10 株有固氮酶活性,为  $0.73 \sim 3.10 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ 。

采用两种普通分离培养基和稀释培养基均没有纯化得到高固氮酶活性的菌株,其原因可能一是采用平板划线法分离纯化菌株时,具有高活性的内生固氮菌株没有成为优势菌落,在无氮的固体平板上不能长成肉眼可见的菌落,故经多次划线分离无法得到高固氮酶活性的菌株。二是原菌群中各菌株间相互促进,有共生或互生作用,经分离纯化后的单一菌株不具有原菌群协同固氮能力。

## 2.3 固氮菌群的需氧特性分析

将分离到的内生固氮菌群分别刮入半固体培养基、液体培养基和液体培养基+0.5 cm 石蜡油密封3种不同氧分压条件下检测固氮酶活性。表3显示:固氮菌群在液体培养基中的酶活性高于半固体培养基,液体培养基试管底部有肉眼可见的菌团出现,并有微小气泡从试管底部缓缓向上移动,而液体培养基和液体培养基+石蜡油处理的固氮酶活性较高,分别达  $1\ 004.93$  和  $1\ 212.83 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ ,是半固体培养基中的 1.56 和 2.82 倍。由此可见,从类芦茎和狗牙根叶片中筛选到的固氮菌群在兼性厌氧的环境中能较好的表达固氮酶活性。氧分压的高低直接影响着内生固氮菌固氮酶活性的高低,而且一般情况下,氧分压越高则对固氮酶活性的抑制作用越强<sup>[24]</sup>。

表 2 分离菌株的固氮酶活性

Table 2 Nitrogenase activities of endophytic strains

植物 Species	菌株 Strain	培养基 Medium	酶活性 Activity (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )	植物 Species	菌株 Strain	培养基 Medium	酶活性 Activity (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )
类芦	L1	NFb	2.66	狗牙根	G1	NFb	3.10
<i>Neyraudia</i>	L2	NFb	4.02	<i>Cynodon</i>	G2	NFb	1.05
<i>reynaudiana</i>	L3	NFb	1.82	<i>dactylon</i>	G3	DN	2.63
	L4	NFb	2.81		G4	DN	1.89
	L5	DN	4.90		G5	1/5 DN	1.57
	L6	DN	1.95		G6	1/5 DN	1.40
	L7	DN	3.36		G7	1/5 DN	1.24
	L8	DN	1.84		G8	1/10 DN	1.91
	L9	DN	3.68		G9	1/10 DN	1.25
	L10	1/5 DN	2.19		G10	1/10 DN	0.73
	L11	1/5 DN	2.11		G11 ~ G15	DN	-
	L12	1/5 DN	2.63				
	L13	1/10DN	5.72				
	L14	1/10DN	3.32				
	L15	1/10DN	7.57				
	L16	1/10DN	1.62				
	L16 ~ L25	DN	-				

- : 未检测到。Not detected.

表 3 内生固氮菌群在不同培养条件下的固氮酶活性

Table 3 Nitrogenase activities of endophyte diazotroph community under different medium

培养条件 Culture condition	固氮酶活性 Nitrogenase activity (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )	
	类芦 <i>N. reynaudiana</i>	狗牙根 <i>C. dactylon</i>
半固体培养基 Semisolid medium	642.33	430.78
液体培养基 Liquid medium	726.43	636.99
液体培养基 + 石蜡油 Liquid medium + paraffine	1004.93	1212.82

表 4 不同混菌方式内生固氮菌群的酶活性

Table 4 Nitrogenase activities of endophyte diazotroph Communities from different mixed cultures

处理 Treatment	固氮酶活性 Nitrogenase activity (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )	
	类芦 <i>N. reynaudiana</i>	狗牙根 <i>C. dactylon</i>
对照 Control	802.11	662.84
T1	663.39	445.03
T2	642.33	430.78
T3	3.46	1.95

## 2.4 不同混菌方式内生固氮菌群的固氮酶活性

从表 4 可以看出类芦茎和狗牙根叶片中的固氮菌群在不同培养条件下具有类似的固氮酶活性表现。与对照相比, T1 仍保持较高的活性, 混合菌群在脱离植株组织仍能保持较高的固氮酶活性, 表明混合菌群和植株之间没有共生关系, 初步推断此混合菌群是联合或自生固氮菌群。而 T1 的活性低于对照可能是混合菌群需经过一段时间适应新环

境后才进行固氮作用。

与对照和 T1 相比, T2 仍能保持较高的固氮酶活性, 表明固氮菌群中的主要固氮菌株都能在固体平板上生长, 但是单一菌株固氮酶活性均不高, 由此可见, 固氮菌群的酶活性的表达, 不是单一菌株的作用, 而是混合菌群在起作用。

从人为组合的固氮菌群的固氮酶活性来看, 将分离纯化的所有单一菌株等量混合后其固氮酶活

性比较微弱,可见人为的组配破坏了自然界中微生物间的相互关系,影响了原菌群的固氮能力。崔宗均等<sup>[25]</sup>认为纯培养在保持纤维素分解能力上都存在一些问题,混合菌的作用逐渐得到重视。马静静等<sup>[26]</sup>研究表明,秸秆发酵中乳酸菌复合系 SFC-2 对杂菌的抑制作用高于复合系分离的单一菌株和单一菌株人工组合菌群。

韩善华等认为,到目前为止,已知多种内生菌与相应植物共生都能固氮,而且常常是几种细菌同时存在于同一植物体中,因此这种植物表现出来的固氮作用很可能是几种细菌共同作用的结果。在这几种固氮细菌中,到底是哪一种细菌在固氮过程中起着最重要的作用,至今仍不十分清楚<sup>[27]</sup>,但是需氧性试验结果表明,主要是一些厌氧菌或兼性厌氧菌大量生长后才表现固氮作用。有待于采用分子克隆测序的方法测定其序列,根据序列结果,有意识地通过不同菌株之间进行组配等方法来进一步研究。

本研究在不破坏自然界中微生物相互关系的情况下,在实验室中较容易培养得到高固氮酶活性的菌群。它们固氮能力强,性能稳定,在排除存在致病菌和机会性致病菌的情况下,开发混合固氮菌群接种到水土保持植物上具有重要的实践意义。

### 3 结论

研究表明类芦茎和狗牙根叶片中存在内生固氮菌群;筛选到的固氮菌群经划线分离纯化获得的单一菌株可以在无氮培养基上生长,但固氮酶活性微弱,有少数菌株检测不出固氮酶活性;筛选到的固氮菌群在兼性厌氧的环境中具有更高的固氮酶活性。在不改变自然界微生物之间相互关系情况下,类芦茎部和狗牙根叶片中的混合菌群均具有较高的固氮酶活性,而人为组配混合得到的固氮菌群活性较低。今后应重视混合菌群在水土保持实践中的开发应用。

### 参考文献

[1] Han W W, Shen S H, Jing Y X. Proteomics in biological nitrogen fixation[J]. J Agri Biotechn, 2004, 12(4): 464-469.  
 [2] Baldani J I, Olivares F L, Hemery A S, et al. Nitrogen-fixing endophytes: Recent advances in the association with graminaceous plants grown in the tropics [M]// Elmerich C, Kordorosi A, Newton W E. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997: 203-206.  
 [3] Wang L W(王伦旺), Li Y R(李杨瑞), He W Z(何为中), et al.

Comparison nitrogen fixation ability of apical stem in tissue culture sugarcane seeding [J]. SW China J Agri Sci(西南农业学报), 2007, 2(1): 99-102.(in Chinese)  
 [4] Tan Z Y, Hurek T, Vinuesa P, et al. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16s-23s ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(8): 3655-3664.  
 [5] Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata* [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(12): 5437-5447.  
 [6] Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, et al. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(5): 2261-2268.  
 [7] Shen D L(沈德龙), Feng Y J(冯永君), Song W(宋未). Biological function diversity of *Enterobacter agglomerans* and its newest advance in classification [J]. J Microbiol(微生物学杂志), 2002, 22(1): 40-43.(in Chinese)  
 [8] Xi L Q(席琳乔), Yao T(姚拓), Yang J J(杨俊基), et al. Property of associative nitrogen-fixing bacteria producing IAA and its promoting growth of oat [J]. Grassland Turf(草原与草坪), 2005(4): 25-29.(in Chinese)  
 [9] Xu Y P(徐幼平), Zang R C(臧荣春), Chen W L(陈卫良), et al. Promoting plant growth and IAA analysis of *Enterobacter cloacae* B8 fermentation liquid [J]. J Zhejiang Univ (Agri Life Sci)(浙江大学学报: 农业与生命科学版), 2001, 27(3): 282-284.(in Chinese)  
 [10] Yao T(姚拓). Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region II. Phosphate-solubilizing power and auxin production [J]. Acta Pratacul Sin(草业学报), 2004, 13(3): 85-90.(in Chinese)  
 [11] Zhang G X(张国霞), Mao Q(茅庆), He Z Y(何忠义), et al. Detection of nitrogenase activity and phosphorus dissolving ability of endophytic isolates from *Oryza rufipogon* in Lingshui [J]. Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 2006, 12(4): 457-460.(in Chinese)  
 [12] Tian H X(田宏先), Cui L(崔林), Sun Z(孙振), et al. Effect of endophytic bacteria to control of potato ring rot and yield improvement [J]. Shanxi Agri Sci(山西农业科学), 2002, 30(1): 73-75.(in Chinese)  
 [13] Ma H B(马海宾), Kang L H(康丽华), Jiang Y G(江业根), et al. Inhibiting effect of associative nitrogen-fixation bacteria on bacteria wilt disease of *Eucalyptus* [J]. For Res(林业科学研究), 2007, 20(4): 473-476.(in Chinese)  
 [14] Verma S C, Ladha J K, Anil K, et al. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice [J]. J Biotechn, 2001, 91: 127-141.  
 [15] Palus J A, Borneman J, Ludden P W, et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley [J]. Plant Soil, 1996, 186: 135-142.  
 [16] James E K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis [J]. Field Crops Res, 2000, 65: 197-209.

- [17] Cavalcante V A, D bereiner J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane [J]. *Plant Soil*, 1988, 108: 23–31.
- [18] Reinhold-Hurek B, Hurek T, Gillis M, et al. *Azoarcus* gen. nov., Nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1993, 43(3): 574–584.
- [19] Shen L(申磊), Zeng F Y(曾凤云), Tan Z Y(谭志远). Effects of pH, temperature,  $\text{NH}_4^+$  and salinity on acetylene reduction (nitrogen fixation) in endophytic diazotrophs from *Paspalum orbiculare* [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 2007, 15(1): 40–44.(in Chinese)
- [20] Peng G X, Wang H R, Zhang G X, et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., A group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56: 1263–1271.
- [21] Wang W(王炜), Sun F Z(孙发政), Liu R T(刘荣堂). Effect of *Neyraudia reynaudiana* on the slope protection vegetation in Shenzhen [J]. *Grassland Turf(草原与草坪)*, 2006(4): 49–51.(in Chinese)
- [22] Yao T(姚拓), Zhang D G(张德罡), Hu Z Z(胡自治). Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region I. Isolation and identification [J]. *Acta Pratacul Sin(草业学报)*, 2004, 13(2): 106–111.(in Chinese)
- [23] Dai X(戴欣), Wang B J(王保军), Huang Y(黄燕), et al. Bacterial diversity in the sediments of Taihu Lake by using traditional nutrient medium and dilution nutrient medium [J]. *Acta Microbiol Sin(微生物学报)*, 2005, 45(2): 161–165.(in Chinese)
- [24] Lauren D B, Humberto J O, Fabio O, et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants [J]. *Microbiol Ecol*, 2003, 45: 39–47.
- [25] Cui Z J(崔宗均), Li M D(李美丹), Piao Z(朴哲), et al. Selection of a composite microbial system MCl with efficient and stability cellulose degradation bacteria and its function [J]. *Environ Sci(环境科学)*, 2002, 23(3): 36–39.(in Chinese)
- [26] Ma J J(马静静), 王小芬(Wang X F), Gao L J(高丽娟), et al. Antibacterial activity of lactic acid bacteria community SFC-2 used for fermentation of air-dried crop straws [J]. *Acta Microbiol Sin(微生物学报)*, 2008, 48(7): 879–886.(in Chinese)
- [27] 韩善华. 内生固氮细菌与禾本科植物的关系 [J]. *世界农业*, 1995(12): 23–24.