

# 玉米根际高效固氮菌 *Sphingomonas* sp. GD542 的分离鉴定及接种效果初步研究\*

孙建光 张燕春 徐 晶 胡海燕

(农业部作物营养与施肥重点实验室 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

**摘 要** 固氮微生物菌种选育是固氮微生物肥料生产应用的基础。本研究从玉米根际土壤分离到 1 株高效固氮菌株 GD542, 菌体短杆状,  $0.4\ \mu\text{m}\times 1.0\sim 1.5\ \mu\text{m}$ , 革兰氏阴性; 固氮酶活性为  $5.046\ \text{nmol}(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})$ ; 利用碳源较广泛, 抗逆性较强, 既可在  $4\ ^\circ\text{C}$  低温生长, 也可以在  $37\ ^\circ\text{C}$  下生长, 耐盐性高达 10%。16 S rDNA 序列分析结果表明, 该菌株与鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas azotifigens* 的 16 S rDNA 序列有高达 96% 的同源性, 结合形态特征和生理生化特征等, 将其初步鉴定为鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp.。接种小白菜的温室盆栽试验表明, 菌株 GD542 具有很好的固氮效能, 与无氮对照相比, 接种 GD542 处理植株干重增加 206%, 含氮量增加 230%, 达到统计学显著差异水平, 开发应用前景较好。

**关键词** 玉米根际 固氮菌 分离鉴定 鞘氨醇单胞菌 GD542

中图分类号: Q939.96 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2010)01-0089-05

## Isolation, identification and inoculation effect of nitrogen-fixing bacteria *Sphingomonas* GD542 from maize rhizosphere

SUN Jian-Guang, ZHANG Yan-Chun, XU Jing, HU Hai-Yan

(Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization, Ministry of Agriculture; Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract** Breeding of nitrogen-fixing bacteria is the basis for nitrogen-fixing microbial fertilization. A high efficiency nitrogen-fixing bacteria *Sphingomonas* GD542 was isolated from maize rhizosphere — a short rod of  $0.4\ \mu\text{m}\times 1.0\sim 1.5\ \mu\text{m}$ , G<sup>-</sup>, with  $5.046\ \text{nmol}(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{protein})$  nitrogenase activity, that can grow from 4 to 37 and resistant to 10% NaCl. Phylogeny based on 16 S rDNA sequence shows that GD542 shares 96% DNA homology with *S. azotifigens*. Based on the analysis results of morphology, physiology, chemical property, and 16 S rDNA sequencing, strain GD542 is identified as *Sphingomonas* sp. Green house test shows a statistically significant increase in dry weight and nitrogen content in pakchoi inoculated with GD542 strain, indicating high nitrogen fixing ability of GD542 strain. There is 206% increase in dry weight and 230% increase in plant nitrogen content of pakchoi compared with the control. Hence GD542 strain holds a good prospect for future applications.

**Key words** Maize rhizosphere, Nitrogen-fixing bacteria, Bacteria isolation and identification, *Sphingomonas* GD542

(Received Dec. 5, 2008; accepted March 30, 2009)

农业生产需要大量氮肥, 且主要靠化肥提供。化学氮肥的生产靠工业合成氨, 通过高温、高压、催化剂把空气中的  $\text{N}_2$  合成为  $\text{NH}_3$ , 进一步制成化学氮肥, 这一过程消耗大量能源。自然界某些原核微生物具有直接利用大气中分子态  $\text{N}_2$  的能力, 可以在常温、常压下, 通过固氮酶的作用把空气中的  $\text{N}_2$  还原成氨, 这就是生物固氮作用。由于能源紧张和环

境问题, 世界各国都在加强生物固氮的基础与应用研究。

目前发现的具有生物固氮能力的微生物多为细菌, 有 100 多个属, 占到细菌系统发育分支的一半以上<sup>[1]</sup>。多年来, 国内外学者对根瘤菌等共生固氮微生物研究较多, 而对自生固氮和联合固氮等非共生固氮微生物研究相对较少, 特别是对非共生固氮微

\* 农业部引进国际先进农业科学技术项目(2007-Z1)、国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10Z417)资助

孙建光(1963-), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为作物根际微生物、固氮微生物资源与微生物肥料。E-mail: jgsun@caas.ac.cn

收稿日期: 2008-12-05 接受日期: 2009-03-30

生物的菌种选育工作的研究报道更少。非共生固氮微生物不受寄主植物的限制,对玉米、小麦、棉花、蔬菜、水果等非豆科农作物具有重要意义,但由于土壤环境的复杂性和“氮阻遏”等因素的影响,自然状态下的自生及联合固氮微生物能够为作物提供氮素养分的效率普遍不高。由于菌种筛选工作不足,目前我国农业生产实际中可供使用的非共生固氮微生物菌株较少,因此,选育高效固氮微生物菌种并研究其生物学特性对我国固氮微生物肥料生产和应用意义重大。本研究从农田玉米根际分离到 1 株高效固氮菌株 GD542,并对其进行了初步鉴定和接种效果研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

原始土样采自内蒙古太仆寺旗玉米根际。固氮类芽孢杆菌 *Paenibacillus azotofixans* ATCC35681、多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* ATCC842 来源于美国,圆褐固氮菌 *Azotobacter chroococcum* ACCC 11103 源于前苏联,是固氮微生物肥料生产常用菌种,在本项工作中用作阳性对照参比菌株。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 固氮菌的富集培养** 取 10 g 土样放入 90 mL 无菌水中摇床振荡 20 min,吸取 5 mL 放入 30 mL 固氮菌富集培养液 ACCC55<sup>[2]</sup>(成分为蔗糖 10 g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.5 g、NaCl 0.2 g、 $CaCO_3$  1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 7.0~7.2), 28 ℃、100 r·min<sup>-1</sup> 摇床振荡培养 72 h 后换新鲜培养液继续培养,重复培养 3 次后进行固氮菌分离。

**1.2.2 固氮菌的分离、纯化** 吸取上述固氮菌富集培养物制成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  稀释度,取 0.1 mL 涂布在固氮菌分离培养基平板上(ACCC55 液体培养基加入 1.5%~2.0% 水洗琼脂),29 ℃ 静置培养。2~3 d 菌落形成后在改良 ACCC55 培养基平板上(成分为蔗糖 10 g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.5 g、NaCl 0.2 g、 $CaCO_3$  1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g、酵母膏 0.5 g、蒸馏水 1 000 mL、琼脂 1.5%~2.0%,pH 7.0~7.2)划线纯化。

**1.2.3 高效固氮菌的筛选** 固氮酶活性测定参考许齐放等<sup>[3]</sup>的方法略有改动。在 15 mm×150 mm 螺口试管中加入 5 mL 上述改良固氮培养基制成斜面,接种固氮菌分离物,28 ℃ 培养 72 h 后换橡胶塞,注入乙炔气体使终浓度为 10%,继续培养 72 h,取 100 μL 反应气体用气相色谱仪测定乙烯生成量。计算菌株固氮酶活性:固氮酶活性[nmol( $C_2H_4$ )·h<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>(蛋白)]= $C_2H_4$ (nmol)/[菌体蛋白量(mg)×反应时间(h)],其中  $C_2H_4$ (nmol)= $C_2H_4$  体积(μL)×273×P/[22.4×(273+t )

×760]<sup>[4]</sup>,P 为气压(mm 汞柱),t 为反应温度。不接种空白斜面为阴性对照,固氮类芽孢杆菌 ATCC35681 和圆褐固氮菌 ACCC11103 为阳性对照,3 次重复。用 SPSS 软件分析数据。菌体蛋白测定:用 5 mL 生理盐水洗涤、收集上述固氮酶测定后的斜面菌体,加入 3 mL 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 煮沸 5 min,加入 3 mL 0.5 mol·L<sup>-1</sup> HCl,离心取上清 1.0 mL 加入 5 mL 考马斯亮蓝,混合、显色 3 min,测定 595 nm 处吸光值  $A_{595}$ 。根据牛血清白蛋白标准曲线计算菌体蛋白。盆栽选育高效固氮菌:用口径 10 cm、高 8 cm 的塑料盆栽灭菌土 250 g 种植小白菜,接种高固氮酶活性固氮菌,在光照培养箱内培养,根据植株长势选育高效菌株。

**1.2.4 高效固氮菌的鉴定** 菌落及菌体形态观察:在固氮菌分离培养基平板上培养高效固氮菌株 2~3 d,观察其菌落形态;取菌体涂片,经革兰氏染色后,在普通光学显微镜下观察菌体形态。生理生化特性测定:参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[5]</sup>和《微生物学实验》<sup>[6]</sup>测定固氮菌生理生化特性。16 S rDNA 序列分析:采用天根生化科技公司试剂盒提取该菌株的基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板,采用细菌通用引物 27f 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'、1492r 5'-TACGTTACCTTGTTACGACTT-3' 进行 16 S rDNA 扩增。扩增反应体系采用上海生物工程公司 PCR 扩增试剂盒。反应程序:95 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 2 min,共 30 个循环。扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测正确,送北京三博远志生物技术公司进行测序。序列拼接及相似性分析使用 DNASTar 软件完成,最后将所测定的 16 S rDNA 序列,通过美国国家生物技术信息中心 NCBI 数据库 <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast> 进行在线比对,在 Genbank 数据库中进行同源性分析和相关信息检索,采用 DNASTar 软件构建系统发育树。

**1.2.5 高效固氮菌温室盆栽接种效果试验** 供试土壤选用中国农业科学院实验地菜园土(黄褐土,20 cm),由国家化肥测试中心测得全氮 0.88 g·kg<sup>-1</sup>,有效磷 10.6 mg·kg<sup>-1</sup>,速效钾 111.5 mg·kg<sup>-1</sup>。过 2 mm 土壤筛,121 ℃ 间歇灭菌 3 次,每次 1 h,放置 1 周后备用。试验设 4 个处理,即无氮对照处理(CK1)、化学氮肥处理(CK2)、选育菌种接种处理(GD542)和阳性对照参比菌处理(记作菌号如 ATCC35681 等)。每处理 3 次重复,完全随机排列。小白菜移栽 2 d 后进行处理:无氮对照处理(CK1)每盆浇 50 mL Fahraeus 无氮植物营养液<sup>[4]</sup>(成分为  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  0.15 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.12 g、柠檬酸铁 0.005 g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 g、 $KH_2PO_4$  0.1 g、Gibson 微量元素 1 mL、H<sub>2</sub>O

1 000 mL, pH 6.5~7.0。Gibson 微量元素液成分为  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.86 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.08 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2.03 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.26 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 000 mL); 化学氮肥处理(CK2)每盆浇 50 mL 有氮全营养液(成分为在 1 000 mL Fahraeus 无氮植物营养液中加入 0.12 g 尿素); 选育菌种接种处理培养收集 GD542 菌体, 用 Fahraeus 无氮植物营养液洗涤菌体, 稀释到  $\text{OD}_{600}$  1.5, 每盆浇 50 mL; 阳性对照参比菌处理分别培养收集 ATCC35681、ATCC842 和 ACCC11103 菌体, 用 Fahraeus 无氮植物营养液洗涤菌体, 稀释到  $\text{OD}_{600}$  1.5, 每盆浇相应的菌液 50 mL。试验在温室中进行, 采用直径 13 cm、高 12 cm 的塑料盆, 每盆装土 700 g, 定植小白菜 1 株, 常规方法管理, 30 d 后收获并分析测试。植株含氮量测定: 采用 KDY-9820 型定氮仪, 参考《土壤农业化学分析方法》<sup>[7]</sup>测定。数据分析采用 SPSS 统计分析软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 固氮菌的富集、分离、筛选结果

经过富集培养后, 采用无氮培养基分离纯化, 获得多株可自生固氮的菌株, 其中 1 株固氮酶活性相对较高, 编号为 GD542。菌株 GD542 固氮酶活性可达  $5.046 \text{ nmol} (\text{C}_2\text{H}_4) \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{蛋白})$ , 显著高于目前微生物肥料生产中使用的圆褐固氮菌 ACCC11103 的固氮酶活性  $1.635 \text{ nmol} (\text{C}_2\text{H}_4) \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{蛋白})$ , 与固氮类芽孢杆菌 ATCC35681 的固氮酶活性无统计学差异(表 1)。

实验室盆栽试验结果也表明, 菌株 GD542 接种小白菜效果较好, 可初步确定为高效固氮菌。

### 2.2 高效固氮菌的鉴定结果

**2.2.1 菌株 GD542 的菌落及菌体形态观察** 菌株 GD542 在无氮培养基平板上形成菌落圆形凸起, 淡黄色, 半透明, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 易挑起。

菌体革兰氏染色为阴性, 短杆状, 大小  $0.4 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ 。

**2.2.2 生理生化特性测定** 菌株 GD542 的碳源利用比较广泛, 抗逆性较强, 既可以在 4℃ 低温生长, 也可以在较高温度 37℃ 下生长, 耐盐性高达 10%。生理生化特性测定结果见表 2。

**2.2.3 16 S rDNA 序列分析** 菌株 GD542 扩增出的 16 S rDNA 片段条带单一(图 1), 经测序得到长度约 1.5 kb 的序列。将此序列与 GenBank 中已发表的 16 S rDNA 序列进行同源性比较, 结果显示 GD542 与鞘氨醇单孢菌 *Sphingomonas azotifigens* 的同源性达到 96%。选取 NCBI 数据库中同源性在 95% 以上的相关菌株和固氮微生物肥料常用菌种的 16 S rDNA 序列构建系统发育树, 可知菌株 GD542 与鞘氨醇单孢菌 *S. azotifigens* 的亲缘关系最近, 而与根瘤菌、固氮菌、固氮螺菌和类芽孢杆菌等亲缘关系较远(图 2)。

综合菌株 GD542 的形态特征、生理生化特征, 以及 16 S rDNA 序列分析结果, 参照参考文献[5,8], 将其初步鉴定为鞘氨醇单孢菌 *Sphingomonas* sp.。

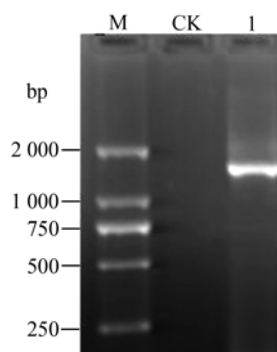


图 1 固氮菌 GD542 的 16 S rDNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of GD542 16 S rDNA

M: DNA 标尺 DNA marker; CK: 阴性对照 Negative control; 1: GD542.

表 1 菌株 GD542 的固氮酶活性及其接种固氮效能  
Tab. 1 Nitrogenase activity and inoculation effect of GD542

处理 Treatment	菌株名称 Strain name	菌株来源 Source	固氮酶活性 Nitrogenase activity [nmol(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ) · h <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> (蛋白)]	接种后小白菜生长情况 Inoculation effect on pakchoi growth			
				植株干重 Dry weight (g · 盆 <sup>-1</sup> )	干重增加率 Increase (%)	植株含氮量 Plant N (g · 盆 <sup>-1</sup> )	含氮量增加率 N increase (%)
CK1				0.32a		0.927a	
CK2				0.74ab	131	3.567b	284
GD542	鞘氨醇单孢菌 <i>Sphingomonas</i> sp.	新分离 New isolate	5.046ab	0.98b	206	3.063b	230
ATCC35681	固氮类芽孢杆菌 <i>P. azotifigens</i>	美国 USA	135.362b	0.77ab	140	2.807b	202
ATCC842	多粘类芽孢杆菌 <i>P. polymyxa</i>	美国 USA	NT	0.43ab	34	1.933ab	108
ACCC11103	圆褐固氮菌 <i>A. chroococcum</i>	前苏联 Russia	1.635a	1.04b	225	3.573b	285

表中同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。NT 为未检测。Different small letters mean significant difference at 5% levels. NT stands for "not test".

表 2 固氮菌 GD542 的生理生化特征  
Tab. 2 Physiological and chemical characteristics of strain GD542

生化特征	GD542	生理特征	GD542	生理特征	GD542
Biochemical character		Physiological character		Physiological character	
接触酶反应 Catalase reaction	+	糖醇类发酵产酸 Sugar fermentation		生长温度 Growth temperature	
氧化酶反应 Oxidase reaction	-	D+葡萄糖 D+glucose	+	4 ℃	+
VP 反应 VP test	-	D+蔗糖 D+sucrose	+	28 ℃	+
吲哚实验 Idol test	-	D+乳糖 D+lactose	-	37 ℃	+
明胶液化 Gelaune liquefaction	+	D+半乳糖 D+galactose	-	60 ℃	-
淀粉水解 Starch hydrolization	-	D+核糖 D+ribose	+	耐盐性 Salt tolerance	
卵磷脂酶 Lecithinase test	+	L+阿拉伯糖 L+arabinose	-	2%	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction test	+	D+果糖 D+fructose	-	5%	+
甲基红 Methyl red test	-	D+甘露醇 D+mannitol	+	7%	+
石蕊牛奶反应 Litmus milk reaction	+	D+山梨醇 D+sorbitol	-	10%	+
柠檬酸盐利用 Citrate test	-	D+麦芽糖 D+maltose	-		
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase test	-	D+纤维二糖 D+cellobiose	+		
产二羟基丙酮 Dihydroxyacetone test	+	甘油 Glycerol	+		
葡萄糖产气 Gas production by glucose	-				
pH5.7 生长测定 Growth at pH5.7	+				
0.001%溶菌酶 Lysozyme test	+				

“+”表示阳性,“-”表示阴性。“+” means positive,“-”means negative.

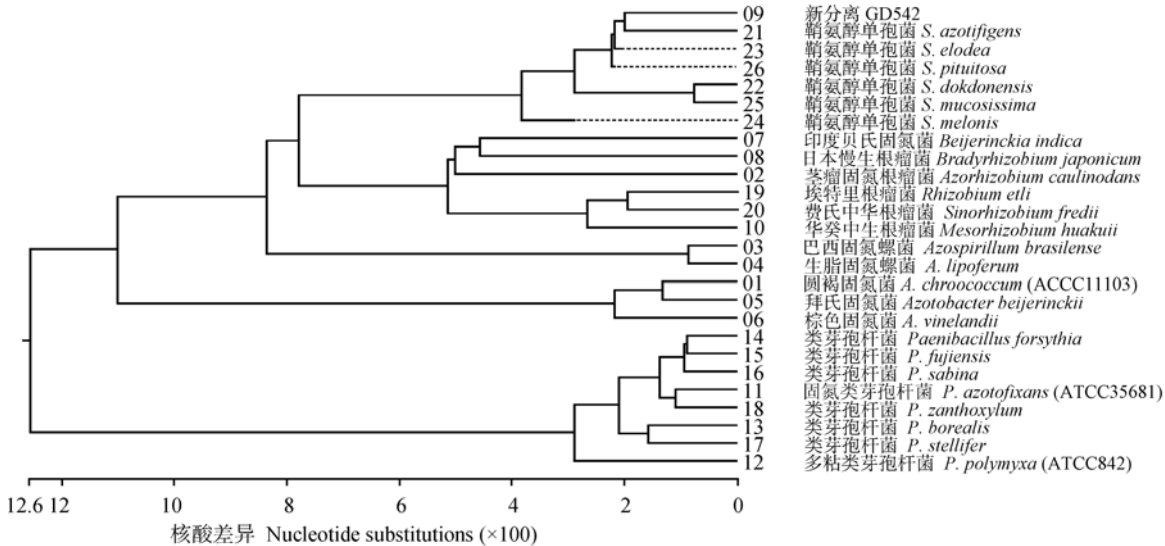


图 2 固氮菌 GD542 系统发育树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of nitrogen-fixier GD542

2.3 温室盆栽接种小白菜试验结果

盆栽小白菜接种固氮菌 GD542 的试验表明, 从长势看接种 GD542 的植株明显好于无氮对照处理 CK1 以及阳性对照参比菌处理圆褐固氮菌 ACCC11103、固氮类芽孢杆菌 ATCC35681 和多粘类芽孢杆菌 ATCC842, 甚至优于化肥对照处理 CK2。

植株生物量和全氮含量进一步揭示了菌株 GD542 的接种固氮效能, 由表 1 可知接种 GD542 处理与无氮对照处理 CK1 相比, 植株干重增加 206%, 含氮量增加 230%, 达到了统计学显著差异水平。同

时, 接种 GD542 处理达到或优于其他阳性对照参比菌处理, 与化肥对照处理 CK2 相当。

3 小结与讨论

近年来, 由于资源与环境问题加剧, 生物固氮研究与生物肥料研发受到重视, 非共生固氮研究成为热点, 新的固氮微生物种属不断涌现。据作者不完全统计, 目前已经报道的非共生固氮微生物大约有 50 多个属, 仅 2007 年以来发表的新种就有 16 个, 如 *Azospira restricta*<sup>[9]</sup>、*Azospirillum canadense*<sup>[10]</sup>、

*A. zeae*<sup>[11]</sup>、*Burkholderia bryophila*、*B. megapolitana*<sup>[12]</sup>、*Gluconacetobacter kombuchae*<sup>[13]</sup>、*G. kombuchae*<sup>[14]</sup>、*G. kombuchae*<sup>[15]</sup>、*Paenibacillus forsythiae*<sup>[16]</sup>、*P. forsythiae*<sup>[17]</sup>、*P. forsythiae*<sup>[18]</sup>、*Pseudoxanthobacter soli*<sup>[19]</sup>等。本文从玉米根际土壤中分离到 1 株固氮菌, 编号为 GD542, 经过形态学观察、生理生化鉴定和 16 S rDNA 序列分析比对, 与鞘氨醇单孢菌 *Sphingomonas azotifigens* 的 16 S rDNA 序列相似性高达 96%, 初步鉴定为鞘氨醇单孢菌 *Sphingomonas* sp.。鞘氨醇单孢菌 *S. azotifigens* 是 2006 年发表的新种<sup>[20]</sup>, 分离自水稻根际, 具有固氮能力, 目前国内未见报道。

菌株 GD542 具有较高的固氮酶活性。盆栽试验表明, 与无氮对照相比, 接种 GD542 的小白菜植株干重增加 206%, 植株全氮增加 230%, 达到了统计学显著差异水平; 与其他处理相比, 接种菌株 GD542 小白菜植株在长势、植株生物量和全氮含量等指标均达到或优于接种阳性对照参比菌圆褐固氮菌 ACCC11103、固氮类芽孢杆菌 ATCC35681 和多粘类芽孢杆菌 ATCC842, 甚至达到化肥对照处理水平。

固氮微生物肥料具有生产成本低、环境友好、减少化肥用量、培肥地力等优点, 在农业生产中的应用越来越广泛。自生固氮和联合固氮微生物不受寄主植物限制, 可以在水稻、玉米、小麦、棉花、蔬菜、果树等非豆科作物根际定植, 为作物提供氮素营养, 逐渐显示出其巨大作用和应用潜力。菌种是微生物肥料的核心, 菌种选育及其生物学特性研究是支撑微生物肥料行业发展的基础。菌种问题是目前限制我国微生物肥料行业发展的瓶颈, 选育适用农作物范围广、固氮效能高、抗逆性强、货架期长的微生物肥料生产用菌种是一项非常有意义和有价值的工作。菌株 GD542 固氮酶活性较高, 抗低温和耐盐性较强, 表现出较好接种固氮效能, 具有进一步研发的潜力和良好的应用前景。

## 参考文献

- [1] 陈文新. 生物固氮[C]//中国土壤学会. 氮素循环与农业和环境学术研讨会论文集. 厦门: 厦门大学出版社, 2001: 4-5
- [2] 中国农业微生物菌种保藏管理中心. 中国农业菌种目录[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001
- [3] 许齐放, 黄秀梨, 陈廷伟. 八株芽孢杆菌菌株的分类及固氮活性的测定[J]. 微生物学通报, 1998, 25(5): 253-258
- [4] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [5] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [6] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999
- [7] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999
- [8] Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984-1989
- [9] Bae H S, Rash A, Fred A, et al. Description of *Azospira restricta* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from groundwater[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 1521-1526
- [10] Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 620-624
- [11] Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 2805-2809
- [12] Vandamme P, Opelt K, Knöchel N, et al. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 2228-2235
- [13] Dutta D, Gachhui R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 353-357
- [14] Addison L, Foote M, Reid M, et al. *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 2467-2471
- [15] Choi J, Im W, Yoo J, et al. *Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a xylan-degrading and nitrogen-fixing bacterium isolated from East Sea sediment[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 18: 189-193
- [16] Ma Y, Chen S. *Paenibacillus forsythiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58: 319-323
- [17] Ma Y, Xia Z, Liu X, et al. *Paenibacillus sabinae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 6-11
- [18] Kämpfer P, Thummes K, Chu H, et al. *Pseudacidovorax intermedius* gen. nov., sp. nov., a novel nitrogen-fixing betaproteobacterium isolated from soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58: 491-495
- [19] Arun B, Schumann P, Chu H, et al. *Pseudoxanthobacter soli* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing alphaproteobacterium isolated from soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58: 1571-1575
- [20] Xie C, Yokota A. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56: 889-893