



研究报告

3 种水稻土中 7 株固氮蓝细菌的分离与特征

靳海洋^{1,2,3} 王慧^{1,3} 张燕辉^{1,3} 胡天龙^{1,3} 林志斌^{1,3} 刘本娟^{1,3} 蔺兴武¹ 谢祖彬^{*1}

1 中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 江苏 南京 210008

2 河南省农业科学院小麦研究所 河南 郑州 450002

3 中国科学院大学 北京 100049

摘要:【背景】蓝细菌是水生和陆地生态系统中生物固氮的主要贡献者。【目的】增加对稻田土壤固氮蓝细菌的了解,获得用于进一步研究的可培养固氮蓝细菌菌株。【方法】选择 3 种具有不同固氮能力的水稻土,采用 BG11-N 培养基分离培养固氮蓝细菌菌株,对新分离菌株进行形态特征观察,通过基因组 DNA 的 *nifH* 基因扩增明确其固氮潜力,进一步采用乙炔还原法和 ¹⁵N₂ 示踪法定量测定其固氮能力,通过基因组 DNA 的 16S rRNA 基因序列比对进行鉴定。【结果】在光照培养条件下,采用 BG11-N 培养基共分离纯化得到自养菌株 7 株,细胞呈圆形或椭圆形、单列、无分枝、丝状和念珠状,在固体培养基上形成团垫状菌落。新分离菌株在 BG11-N 培养基中生长状况良好,以基因组 DNA 为模板可扩增出 *nifH* 基因,乙炔还原法和 ¹⁵N₂ 示踪法测定结果显示具有较高固氮能力,同时具有铁载体生成能力。结合 16S rRNA 基因序列比对和形态特征,7 株菌被初步鉴定隶属于念珠藻科(*Nostocaceae*)。【结论】从水稻土中分离到在稻田生物固氮中发挥重要作用的蓝细菌(念珠藻科)菌株,可培养固氮蓝细菌菌株固氮能力较高,兼具铁载体生成能力,可作为进一步深入研究的微生物资源,具有潜在的研究应用价值。

关键词: 生物固氮, 蓝细菌, 念珠藻, 乙炔还原法, ¹⁵N₂ 示踪法

Isolation and characterization of seven nitrogen-fixing cyanobacteria from three paddy soils

JIN Haiyang^{1,2,3} WANG Hui^{1,3} ZHANG Yanhui^{1,3} HU Tianlong^{1,3} LIN Zhibin^{1,3}
LIU Benjuan^{1,3} LIN Xingwu¹ XIE Zubin^{*1}

1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210008, China

2 Wheat Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Cyanobacteria are key contributors to biological nitrogen fixation in aquatic and terrestrial ecosystems. [Objective] To increase our knowledge of nitrogen-fixing cyanobacteria in paddy

Foundation items: Special Project on the Basis of National Science and Technology of China (2015FY110700); National Natural Science Foundation of China (31870500, 41501273, 42177333)

*Corresponding author: E-mail: zbxie@issas.ac.cn

Received: 10-01-2021; Accepted: 21-05-2021; Published online: 17-06-2021

基金项目: 国家科技基础性工作专项(2015FY110700); 国家自然科学基金(31870500, 41501273, 42177333)

*通信作者: E-mail: zbxie@issas.ac.cn

收稿日期: 2021-01-10; 接受日期: 2021-05-21; 网络首发日期: 2021-06-17

soil and obtain culturable nitrogen-fixing cyanobacterial strains for further studies. **[Methods]** Three paddy soils with different nitrogen fixation capabilities were selected to isolate nitrogen-fixing cyanobacterial strains with BG11-N medium. The morphological characteristics of newly isolated strains were observed. The *nifH* gene amplification of genomic DNA was used to clarify their nitrogen fixation potential, acetylene reduction assay and $^{15}\text{N}_2$ tracer method were used to quantitatively determine their nitrogen fixation activity. Preliminary identification of the newly isolated strains were determined through 16S rRNA gene sequence comparison. **[Results]** Seven autotrophic strains were isolated and purified with BG11-N medium under light conditions. All cells were round or elliptical, uniseriate, unbranched, filamentous and moniliform, and formed mat-like colonies on solid medium. The newly isolated strains grew well in BG11-N medium, were positive for *nifH* gene amplification of genomic DNA, had high nitrogen fixation activity measured by acetylene reduction assay and $^{15}\text{N}_2$ tracer method, and had capabilities of siderophore production. Through 16S rRNA gene sequence comparison and morphological features, all the seven strains could be preliminarily identified as belonging to *Nostocaceae*. **[Conclusion]** The cyanobacterial (*Nostocaceae*) strains that plays important role in biological nitrogen fixation were isolated from paddy soil. The culturable nitrogen-fixing cyanobacterial strains have high nitrogen fixation and siderophore production ability, which could be used as microbial resources for further studies and have potential research and application value.

Keywords: biological nitrogen fixation, cyanobacteria, *Nostocaceae*, acetylene reduction assay, $^{15}\text{N}_2$ tracer method

蓝细菌(Cyanobacteria)是一种古老的光合原核生物。固氮蓝细菌可以与满江红、苏铁等植物共生固氮,也可以进行自由生活的非共生固氮^[1],是水生和陆地生态系统中生物固氮的主要贡献者^[2]。采用乙炔还原法估算水稻土生物固氮量的分析结果显示,以蓝细菌为主要固氮微生物的表层土壤中每克土壤每天的固氮量可达 $8\ \mu\text{g}$ ^[3]。田间 $^{15}\text{N}_2$ 标记技术测定水稻生长期 70 d 生物固氮量的分析结果显示,不施氮肥的植稻土壤至少能固定 $45\ \text{kg-N/hm}^2$,不植稻的淹水土壤至少能固定 $14\ \text{kg-N/hm}^2$,其中自养生物固氮(主要通过固氮蓝细菌)对总生物固氮量的贡献分别为 51%和 67%^[4]。前人利用高通量测序技术研究表明,稻田生物固氮量与蓝细菌念珠藻目(*Nostocales*)的丰度呈正相关^[5-6]。除固氮作用外,蓝细菌同时还具有改善淹水/灌溉稻田的土壤理化特性和植物病原菌的生物防治等作用^[7-8]。随着人们对农业可持续发展的日益关注,固氮蓝细菌逐渐成为重要的微生物资源。

尽管非培养的分子生物学方法有助于揭示固氮微生物群落结构^[9-10],分离培养工作仍然是微生物系统分类学和菌种资源利用的必要前提^[11]。与

异养固氮微生物相比,可培养固氮蓝细菌的分离和表征研究相对较少。周宏斌等^[12]从不同土壤样品中分离到 4 株单细胞固氮蓝细菌菌株,并通过乙炔还原法证实了其具有固氮活性。Zhang 等^[13]从盐渍化草地土壤中分离纯化 20 株能够在无氮培养基上生长的蓝细菌菌株。蓝细菌分类命名的不系统性,也与当前纯培养的菌株较少有关,更多可培养蓝细菌菌株的分离有利于推进蓝细菌的系统分类和应用研究。稻田土壤的淹水环境为蓝细菌提供了较为适宜的生长条件^[3,14],可作为固氮蓝细菌分离的重要来源。鉴于此,本研究试图从 3 种典型水稻土中分离培养固氮蓝细菌菌株,以期为进一步研究利用稻田生物固氮提供微生物材料。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

选用紫色土发育水稻土、下位砂姜土发育水稻土、红壤发育水稻土 3 种水稻土类型作为固氮蓝细菌的分离来源,土壤样品分别采自四川省盐亭县($31^{\circ}16'14''\text{N}$, $105^{\circ}28'27''\text{E}$)、江苏省扬州市江都区($32^{\circ}35'48''\text{N}$, $119^{\circ}42'49''\text{E}$)、江西省鹰潭市($28^{\circ}12'28''\text{N}$, $116^{\circ}56'13''\text{E}$),代表我国水稻主产区

的 3 种典型水稻土类型。Wang 等^[6]研究表明, 紫色土发育水稻土固氮能力较强(42 d 生物固氮量 20.1 kg-N/hm²), 下位砂姜土发育水稻土固氮能力中等(42 d 生物固氮量 9.4 kg-N/hm²), 红壤发育水稻土固氮能力较低(42 d 生物固氮量 2.2 kg-N/hm²)。

1.2 培养基

自养固氮菌株的分离与培养选用 BG11-N 培养基(未添加 NaNO₃)^[15], 固体培养基另加琼脂糖 10.0–15.0 g/L。

1.3 主要试剂和仪器

FastDNA Spin Kit for Soil, MP Biomedicals 公司; Premix Taq、DL2000 DNA Marker, TaKaRa 公司; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; BigDye Terminator V3.1 测序试剂盒, Applied Biosystems 公司。

激光共聚焦显微镜, Zeiss 公司; FastPrep Instrument, MP Biomedicals 公司; 气相色谱仪, Shimadzu 公司; Whatman 玻璃微纤维过滤器, GE Healthcare 公司; NanoDrop 1000、元素分析仪-同位素质谱仪, Thermo Scientific 公司; 3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems 公司。

1.4 固氮蓝细菌的分离与纯化

取土壤 10 g 于 250 mL 无菌三角瓶中, 加入含有 100 mg/L 环己酰亚胺(Cycloheximide)的液体 BG11-N 培养基至 100 mL, 28 °C 恒温光照培养箱中光暗交替(14 h:10 h)培养, 培养 15–20 d 直至液面出现有色菌团(绿色、褐色等)。转接 10 mL 菌液到 90 mL 新的液体 BG11-N 培养基中进一步富集培养, 重复继代 3–4 次后在固体 BG11-N 培养基上进行稀释涂板。同时, 在富集培养过程中用接种环挑取菌液中肉眼可见的有色菌团于固体 BG11-N 培养基上划线, 28 °C 光暗交替(14 h:10 h)倒置培养 10–15 d, 然后用接种环挑取菌丝, 平板划线法接种于新的固体 BG11-N 培养基单独纯化培养, 多次继代划线培养直至得到纯化的菌株。将纯化菌株接种于 LB 培养基于黑暗条件下 28 °C 培养, 检验是否含有伴生细菌, 若有则进一步纯化, 直至得到以 N₂ 作为

唯一氮源的自养固氮菌株。

多次划线纯化的菌株平板可暂存于 4 °C。菌株接种于液体 BG11-N 培养基, 28 °C 光暗交替(14 °C:10 h)静置培养至 2 周龄, 可在弱光下短时间保存, 定时进行继代培养, 或加入等体积 30% 无菌甘油充分混匀后长期保存于–80 °C^[16]。

1.5 菌株细胞形态的显微观察

载玻片上滴加 5 μL 无菌水, 枪头挑取菌落涂于水滴中铺开, 加上盖玻片, 利用激光共聚焦显微镜在 40×物镜下观察自养菌株的细胞形态与排列方式, 同时在 561 nm 波长激发光下观察自发荧光。

1.6 菌株的 *nifH* 基因扩增

取固体 BG11-N 培养基上培养 2 周的纯化菌株, 采用 FastDNA Spin Kit for Soil 和 FastPrep Instrument 提取细菌基因组 DNA。ddH₂O 溶解洗脱 DNA。用 NanoDrop 1000 进行 DNA 样品的定量和纯度检测。

采用引物 Pol-F (5'-TGCGAYCCSAARGCBGA CTC-3')和 Pol-R (5'-ATSGCCATCATYTTCRCCGGA-3')^[17]对菌株基因组 DNA 的 *nifH* 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: TaKaRa Premix Taq 25 μL, 模板 DNA 50–100 ng, 正、反向引物(20 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。以 ddH₂O 和大肠埃希菌(*Escherichia coli*)基因组 DNA 作为阴性对照, 阳性对照为已进行全基因组测序含有 *nifH* 基因的褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum*) ATCC 9043^T 基因组 DNA。PCR 扩增后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 菌株固氮能力的定量测定

1.7.1 乙炔还原活性测定

将对数生长期(2 周龄)的菌液加入 125 mL 玻璃瓶中, 密封后用注射器将瓶内 10% (体积分数)的空气置换为高纯乙炔^[18–20]。28 °C 继续培养 24 h (14 h:10 h 光暗交替), 收集瓶内气体, 用带有氢火焰离子化检测器(Flame Ionization Detector, FID)

的气相色谱仪分析乙烯浓度, 色谱柱为 Porapak T 4 mm×2 m 填充柱。色谱柱温度设置为 60 °C, 进样器温度设置为 120 °C, FID 检测器温度设置为 220 °C, 载气为高纯氮气^[21-22]。通过测定菌液的叶绿素含量来表征其生物量^[23], 超声波细胞破碎仪破碎细胞, 乙醇提取叶绿素, 测定样品提取液在 750、663、645、630 nm 的吸光度, $\text{Chlorophyll } (\mu\text{g/mL}) = 11.64 \times (OD_{663} - OD_{750}) - 2.16 \times (OD_{645} - OD_{750}) + 0.10 \times (OD_{630} - OD_{750})$ 。计算单位时间、单位质量叶绿素的乙烯生成速率 $[\text{nmol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 / (\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{chlorophyll})]$ 。

1.7.2 ¹⁵N₂ 示踪法测定固氮活性

将对数生长期(2 周龄)的菌液加入 125 mL 玻璃瓶中, 密封后用注射器将瓶内 10% (体积分数)的空气置换为高纯 ¹⁵N₂。28 °C 继续光暗交替(14 h:10 h)培养 24 h, 通过 Whatman 玻璃微纤维过滤器(GF/F)过滤收集细胞, 烘干称重研磨后采用元素分析仪-同位素比质谱仪测定氮含量与 ¹⁵N 丰度^[24]。

1.8 菌株铁载体生成测定

CAS 检测液: 将 0.021 9 g 十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyltrimethylammonium Bromide, HDTMA)溶于 50 mL 蒸馏水, 将 1.5 mL 铁(Fe³⁺)溶液(1 mmol/L FeCl₃, 10 mmol/L HCl)与 7.5 mL 2 mmol/L 铬天青 S (Chromeazurol S)溶液混匀后, 加入至上述 HDTMA 溶液。称取 4.307 g 无水哌嗪(Anhydrous Piperazine)溶解于约 30 mL 蒸馏水中, 加入 6.25 mL 12 mol/L HCl 制成缓冲液, 将此缓冲液转入上述 HDTMA 溶液中, 并用蒸馏水定容至 100 mL。

将菌株培养在液体 BG11-N 培养基(去铁)中, 28 °C 光暗交替(14 h:10 h)培养至稳定期(3 周)。将菌液 10 000×g 离心 10 min, 取上清液加入等体积 CAS 检测液, 28 °C 混匀反应 1 h。以蒸馏水为空白测定 OD₆₃₀, 未接菌培养基作为参比对照, 铁载体活性单位=[(对照吸光度-样品吸光度)/对照吸光度], 大于 50%为较强^[25]。

1.9 菌株 16S rRNA 基因鉴定

使用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT T-3')^[26-27]对菌株基因组 DNA 的 16S rRNA 基因全长序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系与条件同 1.6 节 *nifH* 基因。

PCR 产物琼脂糖凝胶电泳目的条带切割后采用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段。使用 3730xl DNA Analyzer 进行 DNA 片段的序列分析, 测序使用 BigDye Terminator V3.1 测序试剂盒。双向测序结果使用 SeqMan (DNASTAR Lasergene)进行拼接, 得到接近全长的 16S rRNA 基因序列。

使用 EzBioCloud Identify Service (<https://www.ezbiocloud.net/identify>)^[28]和 NCBI Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)将 16S rRNA 基因序列结果与数据库中的 16S rRNA 基因序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与 BG11-N 培养基中的生长状态

在光照培养条件下, 采用 BG11-N 培养基从 3 种水稻土中共分离纯化得到 7 株自养菌株(表 1), 其中紫色土发育水稻土中分离得到 3 株(PB02、PB06 和 PB10), 下位砂姜土发育水稻土中分离得到 2 株(BB03 和 BB06), 红壤发育水稻土中分离得到 2 株(LRB02 和 LRB03)。新分离得到的 7 株自养菌株在 BG11-N 培养基中生长状况良好, 在固体培养基上划线 28 °C 培养可在 2 周内形成团垫状菌落。

表 1 水稻土中分离所得自养菌株

Table 1 Autotrophic strains isolated from paddy soils

菌株 Strain	来源土壤 Soil sample
PB02	紫色土发育水稻土 Entisol
PB06	紫色土发育水稻土 Entisol
PB10	紫色土发育水稻土 Entisol
BB03	下位砂姜土发育水稻土 Inceptisol
BB06	下位砂姜土发育水稻土 Inceptisol
LRB02	红壤发育水稻土 Ultisol
LRB03	红壤发育水稻土 Ultisol

在固体培养基上, 菌株呈不规则生长, 沿接种划线向周围蔓延(图 1)。从颜色上看, 菌株 PB02、BB06、LRB02 和 LRB03 为黄绿色或蓝绿色, 菌株 PB06、PB10 和 BB03 为褐色。从质地上看, 菌株 PB06、BB06 和 LRB02 菌落表面较干燥, 其余菌株菌落表面均呈湿润的黏液状。在液体培养时, 所有菌株在培养瓶底部和壁上形成生

物膜。

2.2 菌株的细胞形态与排列方式

新分离菌株的细胞形态特征均非常相似(图 2)。所有菌株细胞呈圆形或椭圆形、单列、无分枝、丝状和念珠状。通过荧光显微镜观察, 在 561 nm 波长激发光下有红色自发荧光, 不同细胞的荧光亮度不同。

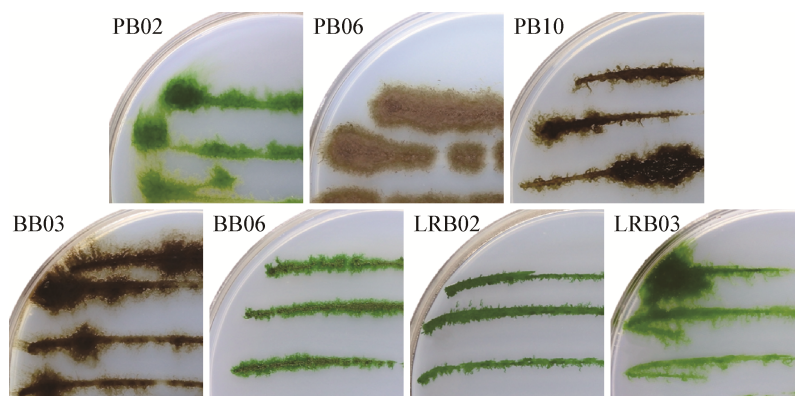


图 1 新分离菌株在固体 BG11-N 培养基上的生长状态

Figure 1 Growth status of newly isolated strains on solid BG11-N medium

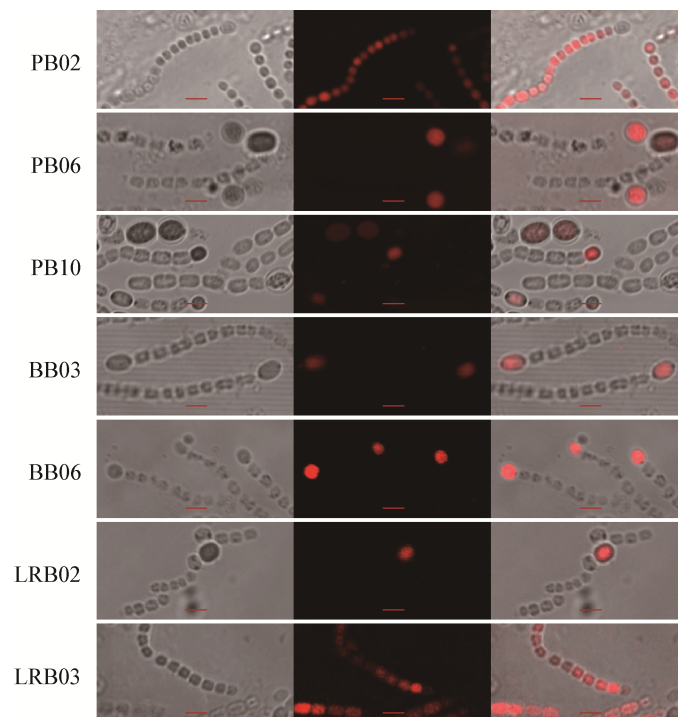


图 2 新分离菌株的细胞形态与排列方式

Figure 2 The cellular morphology and arrangement of newly isolated strains

Note: Bar=5 μ m. Bright-field (left), fluorescence (middle) and merged (right) images are shown

2.3 菌株的 *nifH* 基因扩增

编码固氮酶铁蛋白亚基的 *nifH* 基因在固氮微生物中高度保守, 通过检测新分离菌株基因组 DNA 的 *nifH* 基因可以明确其是否具有固氮潜力。琼脂糖凝胶电泳后, 阳性对照和 7 株菌株基因组 DNA 的 *nifH* 基因 PCR 扩增产物在 250–500 bp 之间均出现明亮条带(图 3), 而阴性对照 *Escherichia coli* 与 ddH₂O 无明显条带, *nifH* 基因的多次 PCR 扩增检测结果一致。

2.4 菌株的乙炔还原活性

由于固氮酶同时具有乙炔还原活性, 而且乙炔比氮气具有更高的固氮酶亲和力, 采用乙炔还原法 (Acetylene Reduction Assay, ARA) 能够快速、简便地定量测定菌株固氮能力。使用乙炔还原法测定了新分离菌株在液体 BG11-N 培养基中的乙炔还原活性, 结果显示, 新分离菌株在 10% (体积分数) 乙炔中培养期间具有较高乙烯生成速率(表 2)。在 7 株新分离菌株中, 菌株 BB06 的乙烯生成速率最高, 为 340.12 nmol-C₂H₄/(min·mg-chlorophyll), 其次是菌株 PB06 [264.88 nmol-C₂H₄/(min·mg-chlorophyll)], LRB03 的乙烯生成速率最低。

2.5 菌株的固氮活性

¹⁵N₂ 示踪法是菌株固氮能力定量测定的直接方法, 使用 ¹⁵N₂ 示踪法测定了新分离菌株在液体 BG11-N 培养基中的固氮活性, 结果与乙炔还原活性测定结果较为一致(图 4), 7 株新分离自养菌株均具有较高的固氮速率, 其中菌株 BB06 的固氮速率较高, 为 62.07 nmol-N₂/(min·mg-chlorophyll)。

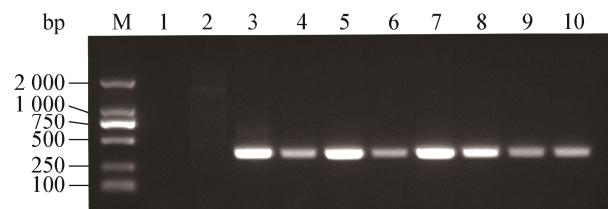


图 3 新分离菌株的 *nifH* 基因 PCR 扩增结果

Figure 3 *nifH* gene PCR amplification of newly isolated strains

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: ddH₂O; 2: *Escherichia coli*; 3: *Azotobacter chroococcum*; 4: PB02; 5: PB06; 6: PB10; 7: BB03; 8: BB06; 9: LRB02; 10: LRB03

表 2 新分离菌株的乙炔还原活性

Table 2 Acetylene reduction activity of newly isolated strains

菌株 Strain	乙烯生成速率 Ethylene production rate [nmol-C ₂ H ₄ /(min·mg-chlorophyll)]
PB02	175.51±13.08cd
PB06	264.88±27.64b
PB10	147.05±20.48cd
BB03	142.16±26.53d
BB06	340.12±35.14a
LRB02	187.33±22.55c
LRB03	92.14±20.72e

注: 表中数值代表平均值±标准差, 相同字母表示差异未达显著水平 ($P>0.05$)

Note: Values are means±standard deviations. Same letters indicate no significant differences at 0.05 level

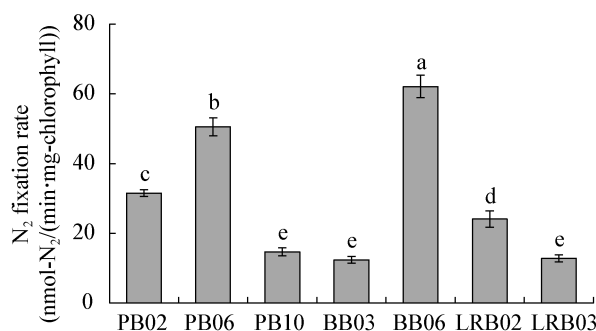


图 4 新分离菌株的固氮活性(¹⁵N₂ 示踪法)

Figure 4 Nitrogen fixation activity of newly isolated strains (¹⁵N₂ tracer method)

注: 图中误差线代表标准差, 相同字母表示差异未达显著水平 ($P>0.05$)

Note: Error bars represent standard deviations. Same letters indicate no significant differences at 0.05 level

2.6 菌株的铁载体生成

铁载体的合成和释放是促生微生物的重要特征之一, 部分固氮微生物能够在铁限制条件下合成铁载体。为充分了解新分离固氮蓝细菌菌株的促生潜力, 定量测定了其铁载体生成能力。结果表明, 7 株新分离菌株中, 菌株 PB06、PB10、BB03 和 BB06 具有较强的铁载体生成能力, 而菌株 PB02、LRB02 和 LRB03 的铁载体生成能力较弱(图 5)。产铁载体微生物能够在铁限制条件下促进作物对铁的吸收, 利于作物生长^[29-30], 但铁载体

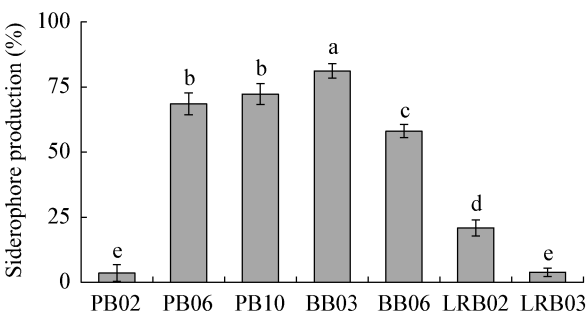


图 5 新分离菌株的铁载体生成
Figure 5 Siderophore production of newly isolated strains
注：图中误差线代表标准差，相同字母表示差异未达显著水平 ($P>0.05$)
Note: Error bars represent standard deviations. Same letters indicate no significant differences at 0.05 level

同时也是铜、镍、锌、铝等多种重金属的螯合剂^[29]，可能会提高土壤重金属的生物活性^[31-32]，增加污染地区重金属在作物体内的富集风险，进一步应用时应根据土壤重金属含量水平综合评估。

2.7 菌株的 16S rRNA 基因鉴定

16S rRNA 基因是编码原核生物 rRNA 的基因序列，基于其高度保守性和特异性，广泛运用于原核生物的物种鉴定。通过测序获得了 7 株新分离菌株的近全长 16S rRNA 基因序列，将序列提交到 GenBank 数据库中，获得登录号为 MW448691–MW448697。与数据库中的序列进行比对，16S rRNA 基因相似性高的有效命名菌株均为念珠藻科 (*Nostocaceae*) 的物种 (表 3)。除菌株 BB06 和 LRB03 外，其他 5 株菌均与 *Aliinostoc morphoplasticum* NOS 具有较高的相似性 (95.84%–97.85%)。结合形

态特征，新分离的 7 株自养菌株经鉴定隶属于念珠藻科 (*Nostocaceae*)，属种水平的分类鉴定有待进一步研究。

3 讨论与结论

稻田土壤的水土界面附生着大量的蓝细菌，其中，念珠藻科 (*Nostocaceae*) 的鱼腥藻属 (*Anabaena*) 和念珠藻属 (*Nostoc*) 是稻田土壤中主要的固氮蓝细菌类群^[33-35]，受土壤环境因子的影响，也有一些稻田土壤中固氮蓝细菌丰度较低^[36]。研究表明，蓝细菌的物种组成分布与土壤 pH、水分、养分、有机质、可溶盐含量等土壤理化因子显著相关^[37-38]，低 pH 值和低磷环境不利于念珠藻 (如 *Nostoc sphaeroides*) 的生长^[39]，念珠藻相对丰度与土壤粘粒含量、无定形铝和有效态铁含量呈负相关关系^[6]。在本研究中，3 种不同类型的水稻土中均分离出了归类于念珠藻科的菌株，未观察到分离培养固氮蓝细菌菌株与土壤理化性质的关联，可能与所用培养基的选择性培养有关。

基于田间 ¹⁵N₂ 标记技术^[4]和高通量测序技术的前期研究表明，蓝细菌，尤其是念珠藻 *Nostocales*、*Nostocaceae* 和 *Nostoc* 在稻田生物固氮中发挥着重要作用^[5-6]，念珠藻目 (*Nostocales*) 和真枝藻目 (*Stigonematales*) 是稻田生物固氮的主要贡献者^[40]。Pham 等^[41]采用 BG11 培养基从越南水稻土中分离鉴定了 13 株念珠藻 (*Nostoc*)。Nayak 等^[42]对来自印度不同水稻土中的 67 株鱼腥藻 (*Anabaena*) 进行了分离、形态表征和多样性分析。相比较而言，国

表 3 新分离菌株的分类鉴定
Table 3 Taxonomic identification of newly isolated strains

菌株 Strain	最大相似有效命名菌株 Top-hit valid strain	相似性 Similarity (%)	分类 Affiliation
PB02	<i>Aliinostoc morphoplasticum</i> NOS	95.84	<i>Nostocaceae</i>
PB06	<i>Aliinostoc morphoplasticum</i> NOS	97.85	<i>Nostocaceae</i>
PB10	<i>Aliinostoc morphoplasticum</i> NOS	97.19	<i>Nostocaceae</i>
BB03	<i>Aliinostoc morphoplasticum</i> NOS	97.19	<i>Nostocaceae</i>
BB06	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	96.42	<i>Nostocaceae</i>
LRB02	<i>Aliinostoc morphoplasticum</i> NOS	95.96	<i>Nostocaceae</i>
LRB03	<i>Desikacharya soli</i> BHU2-PS	96.49	<i>Nostocaceae</i>

内学者根据不同的试验目的对温泉^[43]、虾池^[44]、港口^[45]、湖泊^[46]等水体中的蓝细菌进行了较多的分离表征工作,而稻田固氮蓝细菌资源的分离收集和特性研究工作未见系统报道。与其他有益细菌一样,蓝细菌在农业和环境越来越多地被用作微生物接种剂^[8]。研究表明,接种蓝细菌可改善土壤物理性状,提高土壤肥力,促进植物生长^[47-50]。与蓝细菌共接种可提高异养固氮菌和促生菌的存活率^[51]。另外,蓝细菌接种是干旱半干旱地区生物土壤结皮形成的有效技术,可进一步恢复生态系统^[52]。本研究采用琼脂糖对培养基进行固化以尽量创造无氮条件,分离得到7株念珠藻科(*Nostocaceae*)固氮蓝细菌菌株,是前期研究中确定的稻田生物固氮重要微生物^[5-6],可进一步用于稻田生物固氮的微生物调控,具有较大的开发和应用潜力。

采用乙炔还原法测定菌液的乙炔还原活性是间接表征菌株固氮能力的重要方法^[53-54]。与¹⁵N₂示踪法相比,乙炔还原法具有操作简便、分辨率高、检测成本低的特点,但作为间接的方法,定量计算时需要确定换算系数 *R* 值(乙烯生成速率/固氮速率),根据 C₂H₄ 的生成速率来估计固氮速率^[55]。在以往的报道中,换算系数 *R* 值是高度可变的^[21,56],从小于 1^[19,55,57]到大于 20^[58-59]、大于 30^[60],甚至在海洋浮游生物固氮测定中出现过大于 50 的报道^[61]。本研究中,在同一条件下同时采用乙炔还原法和¹⁵N₂示踪法定量测定了7株蓝细菌菌株的生物固氮能力,根据结果计算得到的乙烯生成速率与固氮速率换算系数 *R* 值如表4所示。系统发育关系较近的蓝细菌菌株之间的换算系数 *R* 值最大相差约 1 倍(5.25–11.52)。由此可知,乙炔还原法和¹⁵N₂示踪法定量测定生物固氮能力的结果具有相关性,但换算系数 *R* 值受很多因素的影响,如果盲目使用理论换算系数,势必会高估或低估生物固氮能力,在使用乙炔还原法定量测定生物固氮能力的研究中需要谨慎,应通过试验明确该条件下的换算系数 *R* 值。

表4 乙烯生成速率与固氮速率的换算系数 *R* 值

Table 4 The *R* ratio of ethylene production rate to N₂ fixation rate

菌株 Strain	<i>R</i> 值(乙烯生成速率/固氮速率) <i>R</i> ratio (ethylene production rate/N ₂ fixation rate)
PB02	5.57±0.39d
PB06	5.25±0.53d
PB10	10.05±1.39b
BB03	11.52±2.01a
BB06	5.49±0.55d
LRB02	7.83±1.08c
LRB03	7.23±1.50c

注:表中数值代表平均值±标准差,相同字母表示差异未达显著水平($P>0.05$)

Note: Values are means±standard deviations. Same letters indicate no significant differences at 0.05 level

在大多数情况下,固氮酶活性与环境中的无机氮含量呈负相关,较低的生物可利用氮有利于生物固氮作用^[62-63]。有研究表明,氮肥施用对稻田固氮蓝细菌的生长具有一定的负面影响,与未施肥稻田相比,施肥稻田中固氮蓝细菌显著减少^[34];施加氮肥对生物固氮具有抑制作用^[64],35 年的施肥处理使生物固氮下降约 50%^[65]。也有研究发现,在一定条件下,高浓度硝酸盐(800 μmol/L)对固氮蓝细菌(*Crocospaera watsonii*)的固氮活性没有明显的抑制作用,与无机氮含量相比,固氮酶活性更大程度上与碳氮比和氧浓度水平有关^[66]。因此,通过基因工程等途径解除固氮微生物的氮抑制,通过田间管理措施进行稻田生物固氮的调控,值得进一步深入研究^[67]。

由于在自然界中的表现类似藻类(*Algae*),蓝细菌最初通常被认为是藻类,被称为蓝藻(*Cyanophytes*)或蓝绿藻(*Blue-Green Algae*)。最初作为植物学家和生态学家研究对象,蓝细菌的传统分类基于其形态学和生态学特征^[68]。然而,基于形态学和生态学特征的分类结果与系统发育信息很不一致,随着分子生物学技术的发展,蓝细菌的分类正在进行广泛的修订^[69-70]。作为原核生物,尽管蓝细菌的分类命名理应遵循原核生物国际命名规则(International Code of Nomenclature of

Prokaryotes, 之前称为 International Code of Nomenclature of Bacteria) 在 1978 年已经被提议^[71], 蓝细菌的新物种命名依然同时遵循藻类、真菌和植物国际命名规则 (International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants, 之前称为 International Code of Botanical Nomenclature)^[72-74]。细菌学和植物学的双重分类命名系统造成了当前蓝细菌分类系统的混乱^[75]。由于当前蓝细菌分类命名的不系统性, 很多广泛使用的名称依据原核生物国际命名规则是未有效发表的 (Invalid Name), 如 *Nostoc* 等。考虑到当前细菌学和植物学双重分类命名系统下蓝细菌分类系统的混乱^[75], 蓝细菌的系统分类势必会在不久的将来进行大规模修订, 因此本研究未进行新分离蓝细菌菌株的物种水平鉴定, 基于多相方法的物种鉴定尚需进一步研究。

综上所述, 本研究以 3 种具有不同固氮能力的水稻土为来源, 分离得到在稻田生物固氮中发挥重要作用的蓝细菌(念珠藻科 *Nostocaceae*) 菌株, 新分离的可培养固氮蓝细菌菌株固氮能力较强, 兼具铁载体生成能力, 可作为进一步深入研究的微生物资源, 具有潜在的研究应用价值。

REFERENCES

- [1] Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. *Plant and Soil*, 2008, 311: 1-18
- [2] Vitousek PM, Cassman K, Cleveland C, Crews T, Field CB, Grimm NB, Howarth RW, Marino R, Martinelli L, Rastetter EB, et al. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation[J]. *Biogeochemistry*, 2002, 57: 1-45
- [3] Rinaudo G, Balandreau J, Dommergues Y. Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils[J]. *Plant and Soil*, 1971, 35: 471-479
- [4] Bei QC, Liu G, Tang HY, Cadisch G, Rasche F, Xie ZB. Heterotrophic and phototrophic $^{15}\text{N}_2$ fixation and distribution of fixed ^{15}N in a flooded rice-soil system[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 59: 25-31
- [5] Ma J, Bei QC, Wang XJ, Liu G, Cadisch G, Lin XW, Zhu JG, Sun XL, Xie ZB. Paddy system with a hybrid rice enhances cyanobacteria *Nostoc* and increases N_2 fixation[J]. *Pedosphere*, 2019, 29(3): 374-387
- [6] Wang XJ, Liu BJ, Ma J, Zhang YH, Hu TL, Zhang H, Feng YC, Pan HL, Xu ZW, Liu G, et al. Soil aluminum oxides determine biological nitrogen fixation and diazotrophic communities across major types of paddy soils in China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 131: 81-89
- [7] Prasanna R, Singh RN, Joshi M, Madhan K, Pal RK, Nain L. Monitoring the biofertilizing potential and establishment of inoculated cyanobacteria in soil using physiological and molecular markers[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23: 301-308
- [8] Singh JS, Kumar A, Rai AN, Singh DP. Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 529
- [9] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(4): 669-685
- [10] Song TY, Lin ZM, Zheng WW, Lotta M, Ulla R. Analysis on the species diversity of cyanobacteria in paddy field by comparison between normal culture and DGGE method[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2005, 13(3): 140-143 (in Chinese)
宋铁英, 林智敏, 郑伟文, LOTTA Martensson, ULLA Rasmussen. DGGE 法与常规培养法对稻田蓝细菌多态性分析结果比较[J]. *中国生态农业学报*, 2005, 13(3): 140-143
- [11] Overmann J. Significance and future role of microbial resource centers[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2015, 38(4): 258-265
- [12] Zhou HB, Chen TW. The isolation, purification and efficiency of nitrogen fixation for unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa* spp.[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1991, 31(5): 405-409, 418 (in Chinese)
周宏斌, 陈廷伟. 单细胞蓝细菌粘球藻的分离培养及固氮能力研究[J]. *微生物学报*, 1991, 31(5): 405-409, 418
- [13] Zhang W, Feng YJ. Characterization of nitrogen-fixing moderate halophilic cyanobacteria isolated from saline soils of Songnen Plain in China[J]. *Progress in Natural Science*, 2008, 18(6): 769-773
- [14] Rao VR, Kalininskaja TA, Miller IuM. Study of the activity of nonsymbiotic nitrogen fixation in rice field soils using $^{15}\text{N}_2$ [J]. *Mikrobiologiya*, 1973, 42(4): 729-734
- [15] Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*)[J]. *Bacteriological Reviews*, 1971, 35(2): 171-205
- [16] Wolk CP. Purification and storage of nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria[J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 167: 93-95
- [17] Poly F, Monrozier LJ, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil[J]. *Research in*

- Microbiology, 2001, 152(1): 95-103
- [18] Li DJ, Zhang QS, Xiao KC, Wang ZC, Wang KL. Divergent responses of biological nitrogen fixation in soil, litter and moss to temperature and moisture in a karst forest, southwest China[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 118: 1-7
- [19] Keuter A, Veldkamp E, Corre MD. Asymbiotic biological nitrogen fixation in a temperate grassland as affected by management practices[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 70: 38-46
- [20] Hyman MR, Arp DJ. Quantification and removal of some contaminating gases from acetylene used to study gas-utilizing enzymes and microorganisms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(2): 298-303
- [21] Bellenger JP, Xu Y, Zhang X, Morel FMM, Kraepiel AML. Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 69: 413-420
- [22] Priya H, Prasanna R, Ramakrishnan B, Bidyarani N, Babu S, Thapa S, Renuka N. Influence of cyanobacterial inoculation on the culturable microbiome and growth of rice[J]. Microbiological Research, 2015, 171: 78-89
- [23] MacKinney G. Absorption of light by chlorophyll solutions[J]. Journal of Biological Chemistry, 1941, 140(2): 315-322
- [24] Bellenger JP, Wichard T, Xu Y, Kraepiel AML. Essential metals for nitrogen fixation in a free-living N₂-fixing bacterium: chelation, homeostasis and high use efficiency[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(6): 1395-1411
- [25] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56
- [26] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M]. New York: Wiley, 1991: 115-175
- [27] Gauri SS, Mandal SM, Mondal KC, Dey S, Pati BR. Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated *Azotobacter* sp. SSB81[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(18): 4240-4243
- [28] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617
- [29] Khan A, Singh P, Srivastava A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator—siderophore: a review[J]. Microbiological Research, 2018, 212/213: 103-111
- [30] Li YM, Wang QY, Tu WG, Cui YL, Zhong QD, Li LH, Chen Q, Yu XM. Growth promoting activity of siderophore secreting bacteria for peanut plant under nickel stress[J]. Microbiology China, 2017, 44(8): 1882-1890 (in Chinese)
- 李艳梅, 王琼瑶, 涂卫国, 崔永亮, 钟玘狄, 李俐珩, 陈强, 余秀梅. 镍胁迫下产铁载体细菌对花生的促生性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(8): 1882-1890
- [31] Wang YL, Lin QQ, Li Y, Yang XH, Wang SZ, Qiu RL. Application potential of siderophore-producing rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals-contaminated soils: a review[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(7): 2081-2088 (in Chinese)
- 王英丽, 林庆祺, 李宇, 杨秀虹, 王诗忠, 仇荣亮. 产铁载体根际菌在植物修复重金属污染土壤中的应用潜力[J]. 应用生态学报, 2013, 24(7): 2081-2088
- [32] Dimkpa CO, Merten D, Svatos A, Büchel G, Kothe E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(5): 1687-1696
- [33] Kim JD, Lee CG. Diversity of heterocystous filamentous cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy fields and their differential susceptibility to ten fungicides used in Korea[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(2): 240-246
- [34] Choudhary KK, Bimal R. Distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria (*Nostocaceae*) during rice cultivation in fertilized and unfertilized paddy fields[J]. Nordic Journal of Botany, 2010, 28(1): 100-103
- [35] Shariatmadari Z, Riahi H, Seyed Hashtroudi M, Ghassempour A, Aghashariatmadary Z. Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2013, 59(4): 535-547
- [36] Mårtensson L, Diez B, Wartiainen I, Zheng WW, El-Shehawey R, Rasmussen U. Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China[J]. Plant and Soil, 2009, 325: 207-218
- [37] Alghanmi HA, Jawad HM. Effect of environmental factors on cyanobacteria richness in some agricultural soils[J]. Geomicrobiology Journal, 2019, 36(1): 75-84
- [38] Osman MEH, El-Naggar A, Omar HH, Esmail GH. Distribution of different soil algal taxa in relation to physico-chemical characteristics of soil at gharbia governorate[J]. Egyptian Journal of Phycology, 2003, 4(1): 37-54
- [39] Qin HJ, Lu JJ, Wang ZC, Li DH. The influence of soil and water physicochemical properties on the distribution of *Nostoc sphaeroides* (*Cyanophyceae*) in paddy fields and biochemical comparison with indoor cultured biomass[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(6): 1737-1745
- [40] Wang XJ, Bei QC, Yang W, Zhang H, Hao JL, Qian L, Feng YC, Xie ZB. Unveiling of active diazotrophs in a flooded rice soil by combination of NanoSIMS and ¹⁵N₂-DNA-stable isotope probing[J]. Biology and Fertility of Soils, 2020,

- 56(8): 1189-1199
- [41] Pham HTL, Nguyen LTT, Duong TA, Bui DTT, Doan QT, Nguyen HTT, Mundt S. Diversity and bioactivities of nostocacean cyanobacteria isolated from paddy soil in Vietnam[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2017, 40(8): 470-481
- [42] Nayak S, Prasanna R, Prasanna BM, Sahoo D. Genotypic and phenotypic diversity of *Anabaena* isolates from diverse rice agro-ecologies of India[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(2): 165-177
- [43] Zhang YT, Jiang D, Tang J, Luo YF, Liang YM, Shah MDMR, Jin P, Daroch M. Isolation and characterization of two thermophilic *Leptolyngbyaceae* strains isolated from Huizhou area, China[J]. Microbiology China, 2019, 46(3): 481-493 (in Chinese)
张艳婷, 江东, 唐杰, 雒义凡, 梁园梅, MD Mahfuzur R. Shah, 金鹏, Maurycy Daroch. 两株采自惠州的细鞘丝藻亚科(*Leptolyngbyaceae*)嗜热蓝细菌的分离鉴定及细胞组分分析[J]. 微生物学通报, 2019, 46(3): 481-493
- [44] Nie LH, Yang DJ, Liu YQ, Han BP, Ma XL, Zha GC. Isolation, identification and effect of heavy metals on the growth of *Cylindrospermopsis raciborskii* helix from shrimp ponds[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(7): 1307-1317 (in Chinese)
聂利华, 杨东娟, 刘亚群, 韩博平, 马秀兰, 查广才. 一株虾池来源的螺旋拟柱孢藻藻株的分离鉴定及重金属离子 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对其生长的影响[J]. 微生物学报, 2019, 59(7): 1307-1317
- [45] Tang X, He LY, Dang Z, Lu GN, Yi XY, Yang C. Isolation and identification of a filamentous cyanobacterium and its tolerance for crude oil[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(10): 1992-1998 (in Chinese)
唐霞, 何丽媛, 党志, 卢桂宁, 易筱筠, 杨琛. 一株丝状蓝藻的分离鉴定及其对原油耐受性能的研究[J]. 环境科学学报, 2010, 30(10): 1992-1998
- [46] Lin S, Peng X, Wu ZX, Li RH. Physiological characteristics of *Planktothrix agardhii*: a new taxa of bloom cyanophyta in China[J]. Journal of Lake Sciences, 2008, 20(4): 437-442 (in Chinese)
林燊, 彭欣, 吴忠兴, 李仁辉. 我国水华蓝藻的新类群——阿氏浮丝藻(*Planktothrix agardhii*)生理特性[J]. 湖泊科学, 2008, 20(4): 437-442
- [47] Rana A, Joshi M, Prasanna R, Shivay YS, Nain L. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria[J]. European Journal of Soil Biology, 2012, 50: 118-126
- [48] Swarnalakshmi K, Prasanna R, Kumar A, Pattnaik S, Chakravarty K, Shivay YS, Singh R, Saxena AK. Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofertilized biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat[J]. European Journal of Soil Biology, 2013, 55: 107-116
- [49] Ranjan K, Priya H, Ramakrishnan B, Prasanna R, Venkatachalam S, Thapa S, Tiwari R, Nain L, Singh R, Shivay YS. Cyanobacterial inoculation modifies the rhizosphere microbiome of rice planted to a tropical alluvial soil[J]. Applied Soil Ecology, 2016, 108: 195-203
- [50] Malam Issa O, Défarge C, Le Bissonnais Y, Marin B, Duval O, Bruand A, D'Acqui LP, Nordenberg S, Annerman M. Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and the structural stability of a tropical soil[J]. Plant and Soil, 2007, 290: 209-219
- [51] Prasanna R, Pattnaik S, Sugitha TCK, Nain L, Saxena AK. Development of cyanobacterium-based biofilms and their *in vitro* evaluation for agriculturally useful traits[J]. Folia Microbiologica, 2011, 56: 49-58
- [52] Wang WB, Liu YD, Li DH, Hu CX, Rao BQ. Feasibility of cyanobacterial inoculation for biological soil crusts formation in desert area[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(5): 926-929
- [53] Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation[J]. Plant Physiology, 1968, 43(8): 1185-1207
- [54] Hardy RWF, Burns RC, Holsten RD. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1973, 5(1): 47-81
- [55] Saiz E, Sgouridis F, Drijfhout FP, Ullah S. Biological nitrogen fixation in peatlands: comparison between acetylene reduction assay and $^{15}\text{N}_2$ assimilation methods[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 131: 157-165
- [56] Roskoski JP. Comparative C_2H_2 reduction and $^{15}\text{N}_2$ fixation in deciduous wood litter[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1981, 13(1): 83-85
- [57] Liengen T. Conversion factor between acetylene reduction and nitrogen fixation in free-living cyanobacteria from high arctic habitats[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1999, 45(3): 223-229
- [58] Brouzes R, Mayfield CI, Knowles R. Effect of oxygen partial pressure on nitrogen fixation and acetylene reduction in a sandy loam soil amended with glucose[J]. Plant and Soil, 1971, 35: 481-494
- [59] Seitzinger SP, Garber JH. Nitrogen fixation and $^{15}\text{N}_2$ calibration of the acetylene reduction assay in coastal marine sediments[J]. Marine Ecology - Progress Series, 1987, 37: 65-73
- [60] Moisander P, Lehtimäki J, Sivonen K, Kononen K. Comparison of $^{15}\text{N}_2$ and acetylene reduction methods for the measurement of nitrogen fixation by Baltic Sea cyanobacteria[J]. Phycologia, 1996, 35(S6): 140-146
- [61] Mague TH, Weare NM, Holm-Hansen O. Nitrogen fixation in the North Pacific Ocean[J]. Marine Biology, 1974, 24: 109-119

- [62] Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2011, 42: 489-512
- [63] Norman JS, Friesen ML. Complex N acquisition by soil diazotrophs: how the ability to release exoenzymes affects N fixation by terrestrial free-living diazotrophs[J]. The ISME Journal, 2017, 11(2): 315-326
- [64] Kox MAR, Lüke C, Fritz C, Van Den Elzen E, Van Alen T, Op Den Camp HJM, Lamers LPM, Jetten MSM, Ettwig KF. Effects of nitrogen fertilization on diazotrophic activity of microorganisms associated with *Sphagnum magellanicum*[J]. Plant and Soil, 2016, 406: 83-100
- [65] Fan KK, Delgado-Baquerizo M, Guo XS, Wang DZ, Wu YY, Zhu M, Yu W, Yao HY, Zhu YG, Chu HY. Suppressed N fixation and diazotrophs after four decades of fertilization[J]. Microbiome, 2019, 7: 143
- [66] Großkopf T, Laroche J. Direct and indirect costs of dinitrogen fixation in *Crocospaera watsonii* WH8501 and possible implications for the nitrogen cycle[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 236
- [67] Xie ZB, Zhang YH, Wang H. Advances and perspectives in paddy biological nitrogen fixation[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(3): 540-546 (in Chinese)
谢祖彬, 张燕辉, 王慧. 稻田生物固氮研究进展及方向[J]. 土壤学报, 2020, 57(3): 540-546
- [68] Wilmotte A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria[A]//Bryant DA. The Molecular Biology of Cyanobacteria[M]. Dordrecht: Springer, 1994: 1-25
- [69] Komárek J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications[J]. European Journal of Phycology, 2016, 51(3): 346-353
- [70] Genuário DB, Vaz MGMV, Hentschke GS, Sant'Anna CL, Fiore MF. *Halotia* gen. nov., a phylogenetically and physiologically coherent cyanobacterial genus isolated from marine coastal environments[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(2): 663-675
- [71] Stanier RY, Sistrom WR, Hansen TA, Whitton BA, Castenholz RW, Pfennig N, Gorlenko VN, Kondratieva EN, Eimhjellen KE, Whittenbury R, et al. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1978, 28(2): 335-336
- [72] Villanueva CD, Hašler P, Dvořák P, Pouličková A, Casamatta DA. *Brasilonema lichenoides* sp. nov. and *Chroococcidiopsis lichenoides* sp. nov. (Cyanobacteria): two novel cyanobacterial constituents isolated from a tripartite lichen of headstones[J]. Journal of Phycology, 2018, 54(2): 224-233
- [73] Moreira D, Tavera R, Benzerara K, Skouri-Panet F, Couradeau E, Gerard E, Fonta CL, Novelo E, Zivanovic Y, Lopez-Garcia P. Description of *Gloeomargarita lithophora* gen. nov., sp. nov., a thylakoid-bearing, basal-branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal for *Gloeomargaritales* ord. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(3): 653-658
- [74] Shalygin S, Pietrasiak N, Gomez F, Mlewski C, Gerard E, Johansen JR. *Rivularia halophila* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria): the first species of *Rivularia* described with the modern polyphasic approach[J]. European Journal of Phycology, 2018, 53(4): 537-548
- [75] Oren A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the bacteriological code[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(5): 1895-1902