

研究报告

稻田高效固氮蓝细菌的筛选鉴定及其促生潜力

王慧^{1,2}, 靳海洋³, 陈哲⁴, 靳鹏辉^{1,2}, 张燕辉⁵, 胡天龙^{1,2}, 周蓉^{1,2},
张静如^{1,2}, 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 中国科学院大学, 北京 100049

3 河南省农业科学院小麦研究所, 河南 郑州 450002

4 丽水学院生态学院, 浙江 丽水 323000

5 苏州市农业科学院, 江苏 苏州 215155

王慧, 靳海洋, 陈哲, 靳鹏辉, 张燕辉, 胡天龙, 周蓉, 张静如, 蔺兴武, 谢祖彬. 稻田高效固氮蓝细菌的筛选鉴定及其促生潜力[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4043-4057.

WANG Hui, JIN Haiyang, CHEN Zhe, JIN Penghui, ZHANG Yanhui, HU Tianlong, ZHOU Rong, ZHANG Jingru, LIN Xingwu, XIE Zubin. Screening and identification of efficient nitrogen-fixing cyanobacteria with plant growth-promoting potential from paddy fields[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4043-4057.

摘要:【背景】稻田的长期淹水环境和水稻的根系分泌物为固氮微生物提供了适宜的环境条件, 其中固氮蓝细菌是稻田生物固氮的主要贡献者。【目的】获得高效固氮蓝细菌菌株, 为稻田生物固氮能力的提高提供菌种资源。【方法】采用 BG-11₀ 无氮培养基从不同水稻土中分离培养固氮蓝细菌。通过对固氮酶活性、吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)分泌能力和铁载体生成能力的测定对分离菌株进行筛选, 对筛选出的高效固氮菌株进行形态学和分子生物学鉴定, 并通过水培试验和盆栽试验评价该菌株的促生潜力。【结果】筛选出一株固氮能力高[239.27 nmol/(min·mg)]、IAA 产量大(7.70 μg/mL)和铁载体生成能力强的菌株。经鉴定, 该菌株属于念珠藻科(*Nostocaceae*) *Aliinostoc* 属, 命名为 *Aliinostoc* sp. d389-10。水培试验结果表明, 菌株 d389-10 能够显著促进水稻幼苗的生长, 施用该菌后水稻幼苗株高、根长和干重分别增加 22.42%、54.76%和 57.80%。在盆栽试验中, 接种菌株 d389-10 能够显著提高土壤固氮酶活性和水稻产量, 同时显著增加土壤有机碳、全氮和速效养分含量。【结论】菌株 d389-10 是兼具促生能力的高效固氮蓝细菌菌株, 是具有研究价值和应用潜力的微生物菌种资源。
关键词: 水稻土; 蓝细菌; 固氮酶活性; 吲哚-3-乙酸(IAA); 铁载体; 植物促生特性

资助项目: 国家自然科学基金(42177333); 国家重点研发计划(2022YFD1500201); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA28030201); 国家科技基础性工作专项(2015FY110700); 江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(20)2003]

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42177333), the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1500201), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA28030201), the Special Project on the Basis of National Science and Technology of China (2015FY110700), and the Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund (JASTIF) [CX(20)2003].

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

Received: 2024-01-22; Accepted: 2024-03-19; Published online: 2024-04-29

Screening and identification of efficient nitrogen-fixing cyanobacteria with plant growth-promoting potential from paddy fields

WANG Hui^{1,2}, JIN Haiyang³, CHEN Zhe⁴, JIN Penghui^{1,2}, ZHANG Yanhui⁵, HU Tianlong^{1,2}, ZHOU Rong^{1,2}, ZHANG Jingru^{1,2}, LIN Xingwu¹, XIE Zubin^{*1}

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

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

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

4 College of Ecology, Lishui University, Lishui 323000, Zhejiang, China

5 Suzhou Academy of Agricultural Sciences, Suzhou 215155, Jiangsu, China

Abstract: [Background] The long-term flooding conditions in paddy fields and root exudates of rice plants create a favorable environment for nitrogen-fixing microorganisms, among which nitrogen-fixing cyanobacteria are the main contributors to biological nitrogen fixation in paddy ecosystems. **[Objective]** To obtain efficient nitrogen-fixing cyanobacterial strains and provide strain resources for enhancing biological nitrogen fixation in paddy fields. **[Methods]** The BG-11₀ nitrogen-free medium was used to isolate nitrogen-fixing cyanobacteria from different paddy soil samples. The isolates were screened based on nitrogenase activity, indole-3-acetic acid (IAA) secretion ability, and siderophore production ability. The selected efficient nitrogen-fixing strain was identified by morphological observation and methods of molecular biology. The plant growth-promoting effect of the selected strain was evaluated by hydroponic and pot experiments. **[Results]** An efficient nitrogen-fixing [239.27 nmol/(min·mg)] strain with high IAA production (7.70 µg/mL) and robust siderophore secretion ability was screened out. It was identified as a strain belonging to *Aliinostoc* of *Nostocaceae* and named *Aliinostoc* sp. d389-10. This strain significantly promoted the growth of rice seedlings in hydroponic experiments, increasing the plant height, root length, and dry weight by 22.42%, 54.76%, and 57.80%, respectively. In pot experiments, inoculation with d389-10 significantly improved soil nitrogenase activity and rice yield, while significantly increasing soil organic carbon, total nitrogen, and available nutrients. **[Conclusion]** The strain d389-10 screened out is an efficient nitrogen-fixing cyanobacterial strain with rice growth-promoting effect, with research value and application potential.

Keywords: paddy soil; cyanobacteria; nitrogenase activity; indole-3-acetic acid (IAA); siderophore; plant growth-promoting property

水稻是世界上最重要的粮食作物之一，是我国 65%人口的主要粮食^[1]。氮(N)是影响水稻生产的主要限制因素之一，水稻需要 1 kg 的氮才能生产 15–20 kg 的大米^[2]。据估计，2050 年

世界人口将增长至 100 亿，农业产量需要增加 56%才能满足人类对粮食的需求^[3-4]，这就意味着农业生产中需要大量额外的氮投入。为了满足对氮的需求，农业生产在很大程度上依赖于

合成氮肥。自 1913 年 Haber-Bosch 发明工业合成氨技术以来, 合成氮肥的数量不断增加^[5]。2017 年, 全球农业生产消耗约 1.09 亿 t 氮肥^[6], 预计到 2050 年将增加到 2.49 亿 t^[7]。然而, 氮肥的过度使用和不合理的氮肥管理实践, 使得施入的肥料氮大部分以活性氮(NO_3^- 、 NH_4^+ 、 NH_3 、 N_2O 、 NO_x 等)和非活性氮(N_2)的形式流失到环境中, 降低了氮肥利用效率^[8-9]。同时, 流失到环境中的氮也会造成一系列环境问题(如空气污染、水体富营养化和土壤酸化)^[10-12], 威胁农业的可持续发展和粮食安全^[13]。因此, 在保证作物产量和减少环境负面影响的前提下, 寻找替代方案以减少合成氮肥的施用变得至关重要。

生物固氮是固氮微生物在固氮酶的作用下将空气的 N_2 转变为可利用活性氮的过程^[14], 是作物生产中一种极具潜力的替代氮源^[15-16]。在工业革命之前, 生物固氮是生物圈中活性氮的主要来源, 每年为自然生态系统提供 1.93 亿 t 氮, 其中为陆地生态系统提供约 0.4-1 亿 t 氮^[17]。

生物固氮主要分为共生固氮、联合固氮和自生固氮, 其中联合固氮和自生固氮又称为非共生固氮^[18]。非共生固氮不需要微生物与植物发生共生关系就能独立进行固氮作用, 是非豆科作物的主要生物固氮途径^[19-20]。据估算, 非共生固氮为玉米、水稻和小麦作物提供了 24% 的氮素^[21]。大量研究表明, 接种非共生固氮菌能够提高土壤生物固氮能力, 促进作物生长和增加产量, 并减少合成氮肥的投入^[22-24]。然而, 目前有效应用到农业生产中的菌株较少, 原因在于筛选出的菌株类型相对单一, 竞争适应能力不强, 导致接种效果不佳^[25-26]。因此, 迫切需要加强非共生固氮菌的分离和筛选工作, 寻找高效、稳定的固氮菌株。

在合成氮肥出现之前, 稻田能在不施氮肥

的条件下一年复一年地维持作物产量, 其主要原因是稻田通过生物固氮来补充土壤养分^[2]。Ladha 等^[21]估算出非共生固氮每年为水稻贡献 22 kg/hm^2 。Bei 等^[27]通过田间原位 $^{15}\text{N}_2$ 标记生长箱对水稻进行 70 d 的培养, 估算出在不施氮肥的情况下, 稻田生物固氮量为 45 kg/hm^2 。稻田的长期淹水环境和水稻的根系分泌物为固氮微生物提供了适宜的生存条件^[28-29], 有利于稻田生物固氮。传统认为稻田生物固氮主要来源于内生菌, 但近期研究结果表明稻田生物固氮主要由光合固氮细菌贡献^[27], 并主要来自念珠藻属(*Nostoc*)、细鞘丝藻属(*Leptolyngbya*)和微鞘藻属(*Microcoleus*)^[30-33]。固氮蓝细菌一方面可以固定空气中的氮气, 减少氮肥施用^[34-35]; 另一方面它能够同化多余的活性氮, 减少氮的损失, 从而提高氮肥利用效率^[1,36]。不同固氮蓝细菌的固氮能力不同, 因此寻找高效固氮蓝细菌对提高稻田生物固氮能力和减少氮肥施用具有重要意义。

我国水稻土面积广泛、类型众多, 是固氮菌株分离的重要来源。本研究拟从不同地方水稻土中筛选固氮蓝细菌, 通过进一步筛选获得兼具固氮、吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)分泌和铁载体生成功能的高效固氮蓝细菌菌株, 并通过水培试验和盆栽接种试验评价其固氮促生潜力, 以期为固氮菌肥的研发和应用提供高效菌株材料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 土壤样品和水稻种子

用于筛选菌株的 3 个土壤样品分别采自河北省唐山市(39°26'37.32"N, 118°9'22.68"E)、辽宁省营口市(40°26'29.76"N, 122°18'18.00"E)和贵州省遵义市(27°35'1.68"N, 106°46'45.48"E)的

水稻田耕作层, 风干过 2 mm 筛后室温保存, 对应的土壤编号分别为 d389、b346 和 f299。

用于盆栽接种试验的土壤样品采自江苏省扬州市江都区小纪镇良种场(32°35'5"N, 119°42'0"E)的水稻田耕作层。该地区的水稻土类型为下位砂姜土, 质地为砂壤。土壤基本性质为: pH 5.38, 土壤有机碳(soil organic carbon, SOC)含量 13.17 g/kg, 全氮(total nitrogen, TN)含量 1.43 g/kg, 全磷(total phosphorus, TP)含量 0.71 g/kg, 全钾(total potassium, TK)含量 6.59 g/kg, 碱解氮(alkali-hydrolyzed nitrogen, AN)含量 54.92 mg/kg, 有效磷(available phosphorus, AP)含量 12.84 mg/kg, 速效钾(available potassium, AK)含量 76.55 mg/kg。

用于水培试验和盆栽试验的水稻种子淮稻 5 号购自江苏天丰种业有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

FastDNA Spin Kit for Soil, MP Biomedicals 公司; Premix Taq、pMDTM19-T 载体, TaKaRa 公司。化学试剂均为国药分析纯。

气相色谱仪, Shimadzu 公司; 光学显微镜, Nikon 公司; NanoDrop 1000 紫外分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司; 超微量微孔板分光光度计, BioTek Instruments 公司; 元素分析仪, Elementar Analysensysteme GmbH 公司。

1.1.3 培养基

BG-11₀ 培养基(未添加 NaNO₃)参考文献[37]配制, 固体培养基时需另加琼脂粉 10–15 g/L。

1.2 固氮蓝细菌的筛选及功能测定

称取 10 g 风干土壤样品于 250 mL 无菌三角瓶中, 瓶内加入 100 mL 含有环己酰亚胺(100 mg/L)的液体 BG-11₀ 无氮培养基, 随后将样品置于 28 °C 恒温光照培养箱中, 光暗交替(14 h:10 h)条件下静置培养。当液面出现有色菌落时用接种环挑取有色菌落在固体 BG-11₀ 无氮培养基上划线培养, 待菌丝生长明显则用接

种环挑取菌丝, 划线接种于新的固体无氮培养基上, 如此重复直至获得纯化的固氮蓝细菌菌株。将纯化菌株接种于液体 BG-11₀ 无氮培养基, 28 °C 光暗交替(14 h:10 h)条件下静置培养, 2 周后重新接种以进行继代培养或者加入等体积 30% 无菌甘油后置于一80 °C 长期保存^[38]。

固氮酶活性的测定: 采用乙炔还原法测定菌株的固氮能力^[39-40]。将对数生长期(2 周龄)的菌株接种于 125 mL 的无菌玻璃瓶中, 瓶内含有 15 mL 无菌液体 BG-11₀ 无氮培养基, 28 °C 光暗交替条件下静置培养 2 周后用橡胶塞密封瓶口, 随后用无菌注射器将瓶内 10% 的空气置换为纯化后的乙炔气体, 继续静置培养 24 h。从每个培养瓶中抽取 1.0 mL 气体样品并注入配备有氢火焰离子检测器的气相色谱仪中以测定产生的乙烯浓度。同时 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入 100% 乙醇提取叶绿素, 4 °C 避光放置 24 h 后测定提取液在 630、645、663 和 750 nm 波长处的吸光度。叶绿素 a 的计算公式为: 叶绿素 a (μg/mL)=11.64×(OD₆₆₃-OD₇₅₀)-2.16×(OD₆₄₅-OD₇₅₀)+0.10×(OD₆₃₀-OD₇₅₀)^[41]。纯菌株的固氮能力以乙烯生成速率[nmol/(min·mg)]表示。

IAA 分泌能力的测定: 采用 Salkowski 比色法测定菌株的 IAA 分泌能力^[42]。将对数生长期(2 周龄)的菌株接种于含有色氨酸(0.5 g/L)的液体 BG-11₀ 无氮培养基中, 28 °C 光暗交替条件下静置培养 3 周后 10 000 r/min 离心 10 min 获得上清液, 取 1.0 mL 上清液加入等体积 Salkowski 显色液, 充分混匀, 避光反应 30 min 后测定混合液在 530 nm 波长处的吸光度。用不同浓度的 IAA 标准品绘制标准曲线, 根据标准曲线计算菌液的 IAA 含量。

铁载体生成能力的测定: 采用铬天青 S (chrome azurol sulphonate, CAS) 比色法测定菌株的铁载

体生成能力^[43]。将对数生长期(2周龄)的菌株接种于液体 BG-11₀ 无氮培养基(去铁)中, 28 °C 光暗交替条件下静置培养 3 周后, 10 000 r/min 离心 10 min 获得上清液, 取 1.0 mL 上清液加入等体积 CAS 反应液, 充分混匀, 避光反应 1 h 后测定其在 630 nm 波长处的吸光度, 未接种的液体 BG-11₀ 无氮培养基为参比对照。铁载体生成能力以铁载体活性单位表示。

铁载体活性单位(%)=[(对照吸光度-样品吸光度)/对照吸光度]×100。

1.3 菌株的形态特征及分子生物学鉴定

1.3.1 细胞形态特征的观察

用接种环挑取少量菌丝于干净载玻片上, 滴加 10 μL 无菌水使菌丝平铺开, 盖上盖玻片, 在光学显微镜 40 倍目镜下观察菌株的细胞形态。

1.3.2 菌株的 16S rRNA 基因序列分析和系统发育树的构建

使用 FastDNA Spin Kit for Soil 提取纯化菌株的基因组 DNA, 使用 NanoDrop 1000 紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度后置于 -20 °C 保存。使用通用引物 27F (5'-AGAGTTT GATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3')^[44]对纯化菌株 DNA 的 16S rRNA 基因全长序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μL): Premix Taq 10 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 0.75 μL, DNA 模板(20 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 补足 20 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 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后割胶纯化, 纯化产物连接到 pMDTM19-T 载体后采用一代测序技术进行双向测序。将获得的 16S rRNA 基因全长序列在 EzBioCloud 数据库中进行 BLAST 比对^[45], 根据比对结果选择同源性较高的模式参考菌株序列进行系统发育分析。使用 MEGA 6.0 软件构

建基于 neighbor-joining 法的系统发育树^[46], 根据 Kimura's two-parameter model 计算进化距离^[47], bootstrap 值为 1 000 次^[48]。

1.4 菌株对水稻的促生试验

1.4.1 蓝细菌接种物的准备

将在无氮培养基上培养 2 周的菌株接种于无菌液体 BG-11₀ 无氮培养基, 28 °C 光暗交替 (14 h:10 h) 条件下静置培养 2 周后 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 无菌水冲洗 3 次后置于 4 °C 待用。

1.4.2 水培接种试验

选取大小一致、籽粒饱满的水稻种子放入无菌三角瓶中, 加入 75% 乙醇浸泡 5 min, 倒去乙醇后用无菌水冲洗 3 遍, 再用 2% 次氯酸钠溶液浸泡 2 min, 并用无菌水多次冲洗直至将次氯酸钠冲洗干净^[49]。随后将消过毒的种子摆放在有湿润滤纸的玻璃培养皿中, 在 28 °C 恒温黑暗培养箱中催芽。一周后, 将萌发长势相似的水稻幼苗(幼芽长度 3 cm 左右)移入 1.5 mL Eppendorf 离心管中, 这些管子预先减去底部 0.5 cm 并插在水培桶(直径 7 cm, 高度 8 cm)上方的塑料透明板上^[50]。每个水培桶中倒入 300 mL 的无菌液体 BG-11₀ 无氮培养基, 并在每个桶事先插好的 5 个离心管中各移栽 1 棵水稻幼苗。试验设置接种和不接种 2 个处理。接种处理是在 BG-11₀ 无氮培养基中一次性加入 0.02 g 新鲜的蓝细菌接种物(含水量 90% 左右), 未接种的加入同样体积的无菌水, 每个处理设置 3 个重复。所有水培桶均置于 28 °C 恒温光照培养箱中光暗交替(14 h:10 h)培养, 4 周后测定水稻幼苗的株高、根长、茎叶干重和根干重。

1.4.3 盆栽接种试验

称取 7.2 kg 过 5 mm 筛的下位砂姜土装入盆钵中, 淹水 10 d 后每盆移栽 2 株长势相似的水稻幼苗并将盆钵移到水稻田中。移栽前, 每盆只

施磷肥(70 kg/hm² P₂O₅)和钾肥(70 kg/hm² K₂O), 不施氮肥。磷肥和钾肥以水溶液的形式加入钵中。试验设置接种和不接种 2 个处理。水稻幼苗移栽成活后, 在接种处理的水稻盆中一次性加入新鲜蓝细菌接种物 5.6 g (含水量 90%左右), 不接种蓝细菌的水稻盆作为对照, 每个处理设置 3 个重复。试验持续水稻种植的整个生育期, 在成熟期采集水稻植株样品和土壤样品。植株样品用于株高和生物量的测定, 土壤样品用于土壤固氮酶活性和理化性质的测定。

土壤固氮酶活性的测定: 采用乙炔还原法测定土壤的固氮酶活性^[39-40]。在水稻收获期称取 10 g 新鲜土壤(0-1 cm)于 125 mL 玻璃瓶中, 瓶口用橡胶塞密封。随后用注射器把瓶内 10% 的空气置换为纯化后的乙炔气体, 在 28 °C 光暗交替条件下静置培养 24 h。从每个培养瓶中抽取 1.0 mL 气体样品并注入配备有氢火焰离子检测器的气相色谱仪中以测定产生的乙烯浓度。土壤固氮酶活性以乙烯生成速率[nmol/(h·g)]表示。

土壤理化性质的测定: 根据参考文献[51]进行土壤理化性质的测定。采用重铬酸钾法测定土壤有机碳(SOC)。使用元素分析仪测定土壤全氮(TN)。采用碱解扩散法测定土壤碱解氮(AN)。土壤样品经 H₂SO₄-HClO₄ 消解后, 用钼锑抗比色法测定全磷(TP)。土壤样品经 HF-HClO₄ 消解后, 用火焰光度计测定全钾(TK)。有效磷(AP)用 NaHCO₃ (0.5 mol/L, pH 8.50)浸提后用钼锑抗比色法测定。速效钾(AK)用 NH₄OAc (1.0 mol/L)提取后用火焰光度计测定。

1.5 数据分析

使用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析, 对菌株固氮酶活性、IAA 生成能力和铁载体生成能力进行单因素方差分析和 Duncan 法多重比较($P < 0.05$)。使用 *t* 检验比较水培试验和盆栽试

验中两组数据间的差异($P < 0.05$)。用 GraphPad Prism 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的固氮酶活性

采用 BG-11₀ 无氮培养基从 3 个水稻土中共筛选出 8 株蓝细菌, 其中从河北省唐山市的水稻土中分离出 3 株(d389-02、d389-03 和 d389-10); 从辽宁省营口市的水稻土中分离出 3 株(b346-02、b346-06 和 b346-08); 从贵州省遵义市的水稻土分离出 2 株(f299-01 和 f299-02)。使用乙炔还原法对分离菌株的固氮能力进行测定, 结果如图 1 所示, 筛选出的蓝细菌菌株均具备一定的固氮能力。菌株 d389-10 的乙烯生成速率最高, 为 239.27 nmol/(min·mg), 显著高于其他菌株; 其次是菌株 b346-08, 乙烯生成速率为 195.01 nmol/(min·mg); 菌株 b346-06 的乙烯生成速率最低, 为 27.52 nmol/(min·mg)。

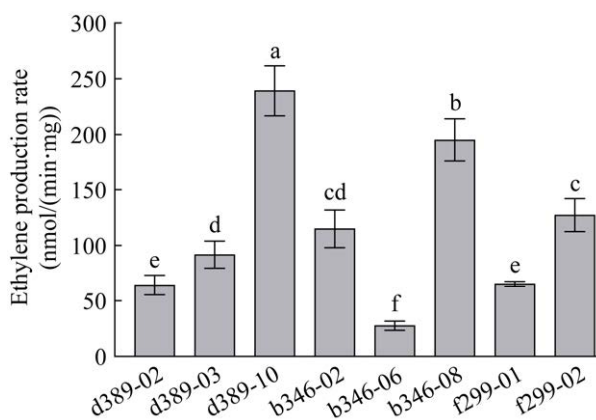


图 1 分离菌株的固氮酶活性(乙烯生成速率表示) 图中误差线代表标准差($n=3$), 不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)

Figure 1 Nitrogenase activity of isolated strain (expressed as ethylene production rate). The error bars in the figure represent the standard deviation ($n=3$), and different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

2.2 分离菌株的 IAA 分泌和铁载体生成能力

IAA 分泌和铁载体生成能力是促生菌普遍具有的特征。如表 1 所示, 菌株 f299-02 和 d389-10 的 IAA 产量较高, 分别达到 9.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 7.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。铁载体活性大于 50% 的菌株通常被认为是生成能力较强的菌株^[52-53]。测定结果表明, 菌株 d389-03、d389-10、b346-02 和 f299-01 的铁载体生成能力较强, 测定值均大于 60%。因此, 结合固氮酶活性测定的结果, 我们认为菌株 d389-10 是具应用潜力的高效固氮菌株, 可用于水培和盆栽接种试验进一步验证促生效果。

2.3 菌株 d389-10 的形态特征和分子生物学鉴定结果

筛选出来的高效固氮菌株 d389-10 在固体 BG-11₀ 无氮培养基上培养 2 周后, 菌落呈黄褐色, 表面较湿润; 通过显微镜观察发现, 菌株细胞呈圆形或者椭圆形、丝状、无分枝(图 2)。通过一代测序技术获得了菌株 d389-10 的 16S rRNA 基因全长序列, 提交到 NCBI 数据库中 GenBank

表 1 分离菌株的 IAA 分泌和铁载体生成能力

Table 1 IAA production and siderophore production ability of isolated strains

Strain No.	IAA production ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Siderophore production (%)
d389-02	6.79 \pm 0.40c	39.91 \pm 1.75d
d389-03	1.80 \pm 0.06e	74.12 \pm 3.31a
d389-10	7.70 \pm 0.12b	67.84 \pm 0.67b
b346-02	1.89 \pm 0.21e	76.54 \pm 4.17a
b346-06	6.85 \pm 0.35c	45.03 \pm 3.78c
b346-08	6.96 \pm 0.39c	8.08 \pm 1.47e
f299-01	3.85 \pm 0.15d	72.37 \pm 3.95ab
f299-02	9.33 \pm 0.67a	5.26 \pm 1.20e

表中数据代表平均值 \pm 标准差($n=3$), 同列数据小写字母不同表示处理间差异显著($P<0.05$)

The data in the table represents the mean \pm SD ($n=3$), while different lowercase letters in the same column of data indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

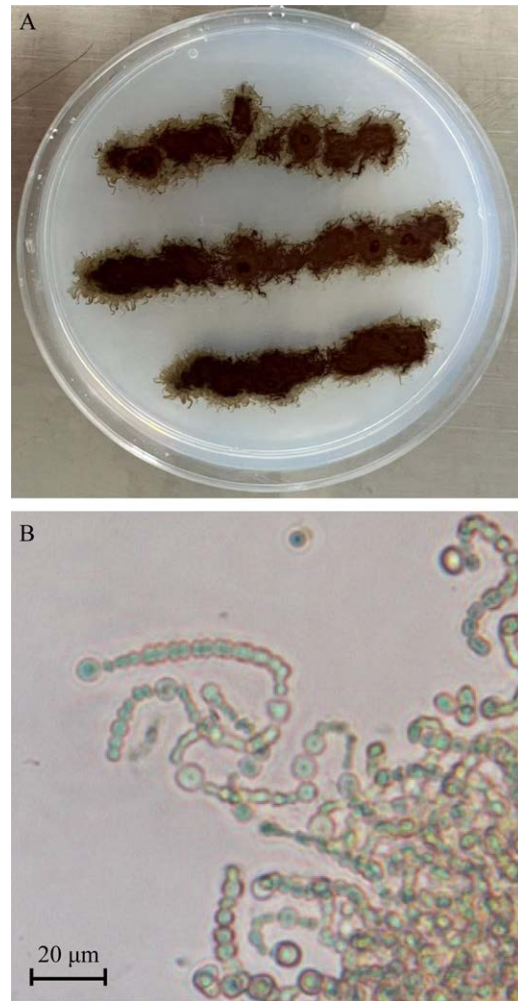


图 2 菌株 d389-10 的菌落(A)和细胞(B)形态 标尺=20 μm

Figure 2 Colony (A) and cell (B) morphology of strain d389-10. Bar: 20 μm .

登录号为 PP152228。将该序列在 EzBioCloud 数据库中进行 BLAST 比对, 结果显示, 该菌株与 *Aliinostoc catenatum* SA24^T 的亲缘关系最近, 相似度达到 100%。在基于 neighbor-joining 法构建的 16S rRNA 基因系统发育树中也发现了相似的结果, 如图 3 所示, 菌株 d389-10 与 *Aliinostoc catenatum* SA24^T 的系统发育距离最近, 说明该菌株属于念珠藻科(*Nostocaceae*) *Aliinostoc* 属, 并将其命名为 *Aliinostoc* sp. d389-10。

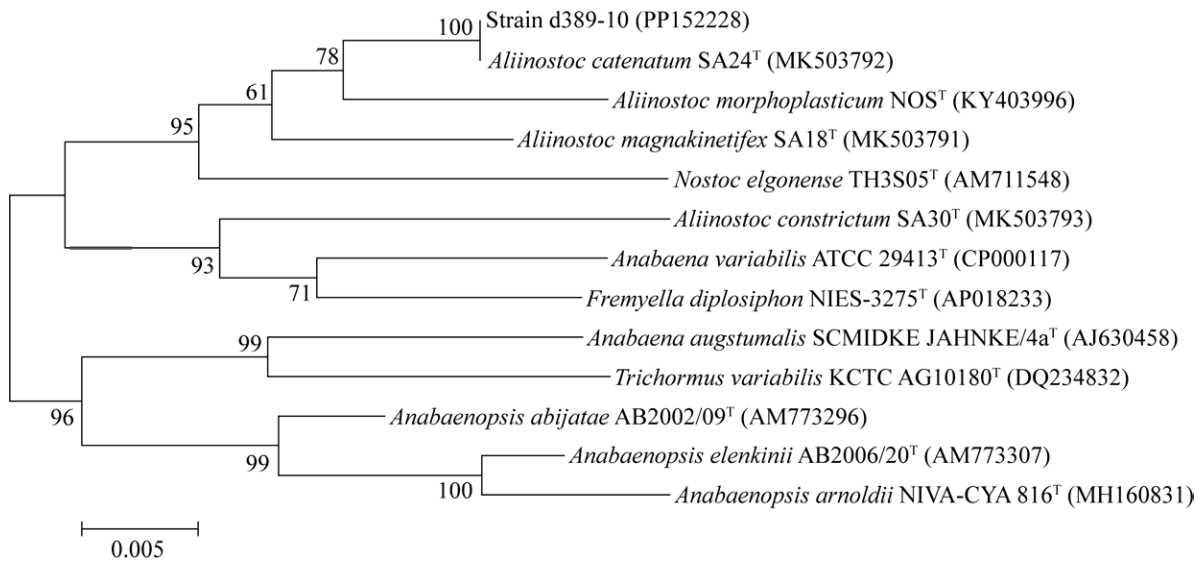


图3 基于菌株 d389-10 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中为各个菌株的 GenBank 登录号; 大于 50% 的自展值(1 000 次重复的百分比)显示在分支节点上; 标尺代表 0.5% 的序列进化差异
Figure 3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of strain d389-10. The GenBank accession numbers for each strain are given in parentheses; Bootstrap values (percentage of 1 000 repetitions) over 50% are displayed on branch nodes; Bar, 0.5% of sequence evolutionary differences.

2.4 菌株 d389-10 的水培促生效果

将菌株 d389-10 接种于萌发长势相似的水稻幼苗, 共培养 4 周后观察水稻的生长状况。结果如表 2 和图 4 所示, 菌株 d389-10 促进了水稻幼苗的生长, 相较于未接种对照, 株高、根长和植株干重显著增加, 分别增加 22.42%、54.76% 和 57.80%。此外, 菌株 d389-10 对水稻根系的影响显著高于地上部, 相较于未接种对照, 根系干重增加了 73.00%, 而地上部茎叶干重则增加 47.87%。

2.5 菌株 d389-10 的盆栽促生效果

盆栽试验结果表明, 相较于未接种对照, 蓝细菌的施入显著提高了土壤固氮酶活性(图 5)。同时还发现, 接种 d389-10 能够促进水稻植株的生长和土壤肥力的提高。如表 3 所示, 水稻植株的株高、穗重和根重均有增加, 较对照分别增加 5.53%、13.66% 和 29.27%。由表 4 可知, 加入固氮蓝细菌后, 土壤 SOC、TN 和速效养

分含量显著增加, 但对 TP 和 TK 影响不大。相较于未接种对照, 土壤 SOC 和 TN 分别增加 15.12% 和 4.55%; 速效养分中, AN、AP 和 AK 分别增加 10.05%、28.70% 和 35.70%。

表 2 菌株 d389-10 对水稻幼苗生长的影响

Table 2 Effects of strain d389-10 on the growth of rice seedlings

Indicator	CK	Strain d389-10
Plant height (cm)	9.43±0.25b	11.54±0.45a
Root length (cm)	9.76±0.52b	15.10±1.12a
Shoot dry weight (mg/plant)	34.40±4.85b	50.87±5.85a
Root dry weight (mg/plant)	22.47±4.39b	38.87±1.97a
Whole plant dry weight (mg/plant)	56.87±9.16b	89.73±7.03a

表中数据代表平均值±标准差($n=3$), 同行数据小写字母不同表示处理间差异显著($P<0.05$)

The data in the table represents the mean±SD ($n=3$), while different lowercase letters in peer data indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).



图4 菌株 d389-10 对水稻幼苗地上部和根系的影响
Figure 4 Effects of strain d389-10 on the shoots and the roots of rice seedlings.

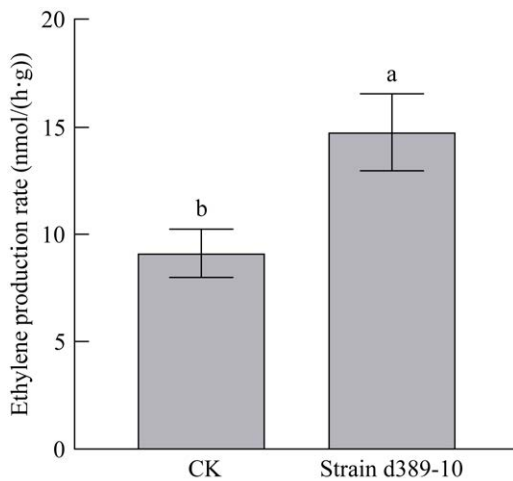


图5 菌株 d389-10 对土壤固氮酶活性的影响(乙烯生成速率表示) 图中误差线代表标准差($n=3$), 不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

Figure 5 Effect of strain d389-10 on soil nitrogenase activity (expressed as ethylene production rate). The error bars in the figure represent the standard deviation ($n=3$), and different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

表3 菌株 d389-10 对水稻生长的影响

Table 3 Effects of strain d389-10 on the growth of rice plants

Indicator	CK	Strain d389-10
Plant height (cm)	78.33±0.76a	82.67±2.75a
Spike dry weight (g/pot)	36.66±2.20b	41.67±1.67a
Straw dry weight (g/pot)	29.58±4.78a	28.22±2.45a
Root dry weight (g/pot)	6.31±0.76b	8.16±0.59a
Whole plant dry weight (g/pot)	72.55±2.70b	78.05±1.47a

表中数据代表平均值±标准差($n=3$), 同行数据小写字母不同表示处理间差异显著($P<0.05$)

The data in the table represents the mean±SD ($n=3$), while different lowercase letters in peer data indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

表4 菌株 d389-10 对土壤理化性质的影响

Table 4 Effects of strain d389-10 on soil physicochemical properties

Indicator	CK	Strain d389-10
SOC (g/kg)	13.65±0.64b	15.72±0.84a
TN (g/kg)	1.43±0.02b	1.50±0.03a
TP (g/kg)	0.56±0.07a	0.67±0.04a
TK (g/kg)	7.75±0.81a	8.14±0.36a
AN (mg/kg)	57.20±1.84b	62.95±2.29a
AP (mg/kg)	14.10±0.93b	18.14±1.66a
AK (mg/kg)	71.34±8.91b	96.80±10.10a

表中数据代表平均值±标准差($n=3$), 同行数据小写字母不同表示处理间差异显著($P<0.05$); SOC: 土壤有机碳; TN: 全氮; TP: 全磷; TK: 全钾; AN: 碱解氮; AP: 有效磷; AK: 速效钾

The data in the table represents the mean±SD ($n=3$), while different lowercase letters in peer data indicate significant differences between treatments ($P<0.05$); SOC: Soil organic carbon; TN: Total nitrogen; TP: Total phosphorus; TK: Total potassium; AN: Alkali-hydrolyzed nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium.

3 讨论与结论

生物肥料作为一种环境友好和经济可行的替代方式去提高作物生产力和减少合成肥料负面影响, 在可持续农业中越来越重要^[54-55]。由

于固氮蓝细菌固氮能力强,施用后能够提高土壤肥力和促进作物产量,在各种类型的生物肥料中尤为重要^[56]。一些蓝细菌菌株,如念珠藻(*Nostoc muscorum*)、鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)、单歧藻(*Tolypothrix tenuis*)和管链藻(*Aulosira fertilissima*),被认为是有效的生物肥料^[57]。稻田生态系统为蓝细菌的生长提供了有利的环境,满足其对光、水、温度、湿度和营养物质的需求^[57],是固氮蓝细菌分离的重要来源。Pham 等^[58]使用 BG-11₀ 无氮培养基从越南水稻土中分离鉴定出 13 株念珠藻(*Nostoc*)。Bao 等^[59]从海南省白沙县的稻田中分离得到 6 株固氮蓝细菌,鉴定后发现念珠藻(*Nostoc*)和鱼腥藻(*Anabaena*)各 3 株。Hu 等^[60]从水稻土中分离得到一株在酸化和镉污染的水稻土中具有安全种植潜力的固氮蓝细菌菌株 *Aliinostoc* sp. YYLX235。本研究一共分离出 8 株固氮蓝细菌,其中 4 株的固氮酶活性高于 100 nmol/(min·mg),菌株 d389-10 的固氮酶活性最高,为 239.27 nmol/(min·mg)。Ahmed 等^[61]从稻田分离出 5 株蓝细菌,采用乙炔还原法测定发现 3 株蓝细菌(*Leptolyngbya* sp. MMG-1、*Chroococciopsis* sp. MMG-5 和 MMG-6)具有固氮能力,固氮能力分别为 0.65、0.95 和 0.76 $\mu\text{mol}/(\text{d}\cdot\text{g})$ 。Bhattacharyya 等^[62]报道了 8 株蓝细菌的固氮酶活性,其中 2 株鱼腥藻(*Anabaena*)的固氮酶活性分别为 3.47 nmol/(h· μg)和 0.18 nmol/(h· μg),2 株念珠藻(*Nostoc*)的固氮酶活性分别为 0.54 nmol/(h· μg)和 0.98 nmol/(h· μg)。与以上报道的菌株相比,本次筛选出来的固氮蓝细菌菌株具有更高的固氮能力,是具有应用潜力的高效固氮菌种,丰富了固氮微生物菌种资源。

除了生物固氮之外,固氮蓝细菌还能够合成和分泌各种植物促生激素,例如生长素、赤霉素和细胞分裂素^[63-64]。关于蓝细菌产生生长素的

研究多有报道,其中研究最广泛的是 IAA,它通常通过色氨酸依赖途径合成^[65]。IAA 是生长素家族中最丰富的激素成员,在根的生长和伸长以及与植物组织分化相关的过程中发挥作用^[66]。Hussain 等^[67]从稻田筛选出的 5 株蓝细菌均能分泌 IAA 和细胞分裂素,接种后能显著提高小麦种子萌发率、分蘖数、穗长和籽粒重。Osman 等^[68]研究发现,具有 IAA 分泌能力的 2 株蓝细菌接种豌豆后增加了其发芽率和生长参数(包括根长、地上部长度、干重和叶面积)。Chittapun 等^[69]筛选出了 2 株 IAA 分泌能力强的念珠藻用于接种试验,接种水稻后发现显著促进了水稻根系的生长。Zarezadeh 等^[70]从土壤中分离得到的 3 株蓝细菌(*Nostoc carneum* ISB88、*Nostoc punctiforme* ISB90 和 *Wollea vaginicola* ISB89)具有产生吲哚-3-乙酸、吲哚-3-丙酸和吲哚-3-丁酸的能力,接种后显著促进了洋甘菊根系的生长。本研究在水培和盆栽试验中也发现了类似的结果,蓝细菌对水稻根系生长具有很好的促生作用,具体表现为根长和根干重的增加。根系作为养分运输的重要器官,其生长状况与植株地上部前期的生长发育和后期的产量形成密切相关^[71]。菌株 d389-10 接种后使得水稻根系更长和更粗,有利于植物从土壤中吸收水分和养分,进而提高株高和地上部生物量。

作为水稻土中最早被认识的固氮微生物之一,蓝细菌有助于维持水稻土的自然肥力^[36,64]。¹⁵N 示踪技术的应用证明了蓝细菌向水稻^[72-73]和其他高等植物^[74]转移氮的过程。有报告称蓝细菌的存在促使作物产量增加约 100%,这为水稻植株利用蓝细菌固定的氮提供了间接证据^[75]。本研究中,蓝细菌接种后显著提高了土壤生物固氮能力,还增加了土壤 SOC、TN 和速效养分的含量。与缓释肥料的作用相似,固氮蓝细菌通过固氮作用将氮储存在活的个体中,在它

们死亡和分解后缓慢释放氮素促进植株生长并提高作物产量^[76]。土壤有机碳含量通常被用作确定土壤肥力的标准，蓝细菌能够通过光合作用吸收 CO₂ 实现碳的固定，增加土壤有机碳的含量^[77]。固氮蓝细菌分泌的糖类物质可以增加溶磷菌的活性，加速土壤不溶性磷的矿化，从而增加土壤 AP 含量^[73,78]。土壤生物固氮能力会受到施氮量的影响，Dash 等^[35]报道称，在施氮条件下接种蓝细菌会严重影响本土和接种蓝细菌的生长和固氮能力，需要合理施用氮肥来确保蓝细菌的贡献和水稻的高产。Zhang 等^[79]在红壤上研究不同氮肥和接种剂量比对水稻产量和土壤性质的影响，结果发现较高的氮肥替代处理不能维持稳定的水稻产量和养分吸收，30% 的氮肥替代处理可以维持水稻产量。而本研究在盆栽试验中未安排氮肥施用的试验，因此需要进一步开展试验检验菌株 d389-10 在配合氮肥施用时的效果，以寻求最合适的氮肥和接种剂量比。另外，本研究仅在水培试验中考察了蓝细菌的存活能力，在接种处理的水培桶中可以观察到菌株 d389-10 的明显扩繁现象，而且发现有大量固氮蓝细菌黏附在水稻根系上。而菌株 d389-10 施用到土壤后的扩繁情况还有待继续研究。

本试验从 3 个水稻土样品中共筛选出 8 株固氮蓝细菌。通过进一步筛选获得一株兼具促生能力的高效固氮蓝细菌菌株 d389-10，其固氮酶活性为 239.27 nmol/(min·mg)，IAA 分泌能力为 7.70 μg/mL，铁载体分泌能力大于 50%。基于 16S rRNA 基因序列比对和系统发育树分析的结果，该菌株被鉴定为念珠藻科(*Nostocaceae*) *Aliinostoc* 属。水培试验和盆栽试验的结果表明：该菌株接种后能提高土壤生物固氮能力，还能促进水稻生长和土壤养分的增加，由此可见该菌株具有很好的应用潜力。由于水培试验

的结果是在实验室条件下取得的，虽然盆栽试验是将盆钵移到稻田后再在田间条件下展开的，但与大田生长还有一定的差距，有必要进一步开展大田田间试验来验证菌株 d389-10 的接种效果。

REFERENCES

- [1] SONG XN, ZHANG JL, LI DH, PENG CR. Nitrogen-fixing cyanobacteria have the potential to improve nitrogen use efficiency through the reduction of ammonia volatilization in red soil paddy fields[J]. *Soil and Tillage Research*, 2022, 217: 105274.
- [2] LADHA JK, REDDY PM. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects[J]. *Plant and Soil*, 2003, 252(1): 151-167.
- [3] RAY DK, MUELLER ND, WEST PC, FOLEY JA. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66428.
- [4] BLOCH SE, RYU MH, OZAYDIN B, BROGLIE R. Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 181-188.
- [5] FOWLER D, COYLE M, SKIBA U, SUTTON MA, CAPE JN, REIS S, SHEPPARD LJ, JENKINS A, GRIZZETTI B, GALLOWAY JN, VITOUSEK P, LEACH A, BOUWMAN AF, BUTTERBACH-BAHL K, DENTENER F, STEVENSON D, AMANN M, VOSS M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1621): 20130164.
- [6] SHEORAN S, KUMAR S, KUMAR P, MEENA RS, RAKSHIT S. Nitrogen fixation in maize: breeding opportunities[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(5): 1263-1280.
- [7] AHMED M, RAUF M, MUKHTAR Z, AHMAD SAEED N. Excessive use of nitrogenous fertilizers: an unawareness causing serious threats to environment and human health[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(35): 26983-26987.
- [8] GU BJ, JU XT, CHANG SX, GE Y, CHANG J. Nitrogen use efficiencies in Chinese agricultural systems and implications for food security and environmental protection[J]. *Regional Environmental Change*, 2017, 17(4): 1217-1227.

- [9] YAN XY, XIA LL, TI CP. Temporal and spatial variations in nitrogen use efficiency of crop production in China[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 293: 118496.
- [10] GUO JH, LIU XJ, ZHANG Y, SHEN JL, HAN WX, ZHANG WF, CHRISTIE P, GOULDING KWT, VITOUSEK PM, ZHANG FS. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. *Science*, 2010, 327(5968): 1008-1010.
- [11] ZHANG WF, DOU ZX, HE P, JU XT, POWLSON D, CHADWICK D, NORSE D, LU YL, ZHANG Y, WU L, CHEN XP, CASSMAN KG, ZHANG FS. New technologies reduce greenhouse gas emissions from nitrogenous fertilizer in China[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(21): 8375-8380.
- [12] GU BJ, GE Y, CHANG SX, LUO WD, CHANG J. Nitrate in groundwater of China: sources and driving forces[J]. *Global Environmental Change*, 2013, 23(5): 1112-1121.
- [13] GUO KY, YANG J, YU N, LUO L, WANG ET. Biological nitrogen fixation in cereal crops: progress, strategies, and perspectives[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(2): 100499.
- [14] REES DC, TEZCAN FA, HAYNES CA, WALTON MY, ANDRADE S, EINSLE O, HOWARD JB. Structural basis of biological nitrogen fixation[J]. *Philosophical Transactions Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 2005, 363(1829): 971-984; discussion 1035-1040.
- [15] LADHA JK, REDDY PM. Extension of nitrogen fixation to rice: necessity and possibilities[J]. *GeoJournal*, 1995, 35(3): 363-372.
- [16] ROGERS C, OLDROYD GED. Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(8): 1939-1946.
- [17] VITOUSEK PM, MENGE DNL, REED SC, CLEVELAND CC. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1621): 20130119.
- [18] SOUMARE A, DIEDHIOU AG, THUITA M, HAFIDI M, OUHDOUCH Y, GOPALAKRISHNAN S, KOUISNI L. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture[J]. *Plants*, 2020, 9(8): 1011.
- [19] KENNEDY IR, ISLAM N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review[J]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2001, 41(3): 447.
- [20] GUPTA VVSR, ROPER MM, ROGET DK. Potential for non-symbiotic N₂-fixation in different agroecological zones of southern Australia[J]. *Soil Research*, 2006, 44(4): 343.
- [21] LADHA JK, TIROL-PADRE A, REDDY CK, CASSMAN KG, VERMA S, POWLSON DS, van KESSEL C, de B RICHTER D, CHAKRABORTY D, PATHAK H. Global nitrogen budgets in cereals: a 50-year assessment for maize, rice and wheat production systems[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19355.
- [22] KENNEDY I. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(8): 1229-1244.
- [23] da SILVA ARAÚJO AE, BALDANI VLD, de SOUZA GALISA P, ALMEIDA PEREIRA J, BALDANI JI. Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 64: 49-55.
- [24] dos SANTOS CLR, ALVES GC, de MATOS MACEDO AV, GIORI FG, PEREIRA W, URQUIAGA S, REIS VM. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* spp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 113: 96-106.
- [25] STAMENKOVIĆ S, BEŠKOSKI V, KARABEGOVIĆ I, LAZIĆ M, NIKOLIĆ N. Microbial fertilizers: a comprehensive review of current findings and future perspectives[J]. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2018, 16(1): e09R01.
- [26] DASGUPTA D, KUMAR K, MIGLANI R, MISHRA R, PANDA AK, BISHT SS. Microbial biofertilizers: recent trends and future outlook[M]//*Recent Advancement in Microbial Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier, 2021: 1-26.
- [27] BEI QC, LIU G, TANG HY, CADISCH G, RASCHE F, XIE ZB. Heterotrophic and phototrophic ¹⁵N₂ fixation and distribution of fixed ¹⁵N in a flooded rice-soil system[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 59: 25-31.
- [28] REDDY PM, JAMES EK, LADHA JK. Nitrogen

- fixation in rice[M]//Nitrogen Fixation at the Millennium. Amsterdam: Elsevier, 2002: 421-445.
- [29] PITTOL M, DURSO L, VALIATI VH, FIUZA LM. Agronomic and environmental aspects of diazotrophic bacteria in rice fields[J]. *Annals of Microbiology*, 2016, 66(2): 511-527.
- [30] MA J, BEI QC, WANG XJ, LAN P, LIU G, LIN XW, LIU Q, LIN ZB, LIU BJ, ZHANG YH, JIN HY, HU TL, ZHU JG, XIE ZB. Impacts of Mo application on biological nitrogen fixation and diazotrophic communities in a flooded rice-soil system[J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 649: 686-694.
- [31] 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 N₂ fixation[J]. *Pedosphere*, 2019, 29(3): 374-387.
- [32] WANG XJ, LIU BJ, MA J, ZHANG YH, HU TL, ZHANG H, FENG YC, PAN HL, XU ZW, LIU G, LIN XW, ZHU JG, BEI QC, XIE ZB. 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.
- [33] 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.
- [34] NAYAK S, PRASANNA R, PABBY A, DOMINIC TK, SINGH PK. Effect of urea, blue green algae and *Azolla* on nitrogen fixation and chlorophyll accumulation in soil under rice[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2004, 40(1): 67-72.
- [35] DASH NP, KUMAR A, KAUSHIK MS, SINGH PK. Cyanobacterial (unicellular and heterocystous) biofertilization to wetland rice influenced by nitrogenous agrochemical[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(6): 3343-3351.
- [36] SONG XN, ZHANG JL, PENG CR, LI DH. Replacing nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing cyanobacteria reduced nitrogen leaching in red soil paddy fields[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2021, 312: 107320.
- [37] 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.
- [38] HUSSAIN A, KRISCHKE M, ROITSCH T, HASNAIN S. Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria[J]. *Current Microbiology*, 2010, 61(5): 361-369.
- [39] HARDY RW, HOLSTEN RD, JACKSON EK, BURNS RC. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation[J]. *Plant Physiology*, 1968, 43(8): 1185-1207.
- [40] SAIZ E, SGOURIDIS F, DRIJFHOUT FP, ULLAH S. Biological nitrogen fixation in peatlands: comparison between acetylene reduction assay and ¹⁵N₂ assimilation methods[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 131: 157-165.
- [41] HUANG TL, CONG HB. A new method for determination of chlorophylls in freshwater algae[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2007, 129(1): 1-7.
- [42] SERGEEVA E, LIAIMER A, BERGMAN B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria[J]. *Planta*, 2002, 215(2): 229-238.
- [43] RASHMI V, SHYLAJANACIYAR M, RAJALAKSHMI R, D'SOUZA SF, PRABAHARAN D, UMA L. Siderophore mediated uranium sequestration by marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* BDU 130911[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 204-210.
- [44] SUZUKI MT, GIOVANNONI SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 625-630.
- [45] KIM OS, CHO YJ, LEE K, YOON SH, KIM M, NA H, PARK SC, JEON YS, LEE JH, YI HN, WON S, CHUN J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt 3): 716-721.
- [46] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [47] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120.
- [48] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.

- [49] MAZHAR S, COHEN JD, HASNAIN S. Auxin producing non-heterocystous cyanobacteria and their impact on the growth and endogenous auxin homeostasis of wheat[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(12): 996-1003.
- [50] BIDYARANI N, PRASANNA R, CHAWLA G, BABU S, SINGH R. Deciphering the factors associated with the colonization of rice plants by cyanobacteria[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(4): 407-419.
- [51] 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, 2000.
LU RK. *Methods of Soil Agrochemical Analysis*[M]. Beijing: China Agriculture Sciencetech Press, 2000 (in Chinese).
- [52] 林天兴, 唐梅, 黄明远, 管琴澜, 龚明福. 高产铁载体棉田土壤细菌 SS05 的筛选与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(5): 668-676.
LIN TX, TANG M, HUANG MY, GUAN QL, GONG MF. Screening and identification of a high yield siderophore-producing bacteria SS05 isolated from cotton soil[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(5): 668-676 (in Chinese).
- [53] 王亚军, 冯炬威, 李雅倩, 虞方伯. 高产铁载体菌 *Burkholderia vietnamiensis* YQ9 促生特性研究及其对重金属胁迫条件下种子萌发的影响[J]. *环境科学学报*, 2022, 42(2): 430-437.
WANG YJ, FENG JW, LI YQ, YU FB. Studies on growth-promoting properties of an efficient siderophore producing bacterium, *Burkholderia vietnamiensis* YQ9, and its effects on seed germination under heavy metal stress[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2022, 42(2): 430-437 (in Chinese).
- [54] RENUKA N, GULDHE A, PRASANNA R, SINGH P, BUX F. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(4): 1255-1273.
- [55] SU BY, YAN ZL, LI YH, TANG SZ, PAN XX, ZHANG XS, LI W, LI YC. Co-compost application of magnesium salts and orthophosphate adjusted biochar and cyanobacteria for fixing nitrogen, improving maize quality, and reducing field nutrient loss[J]. *Agronomy*, 2022, 12(10): 2406.
- [56] KOUR D, RANA KL, YADAV AN, YADAV N, KUMAR M, KUMAR V, VYAS P, DHALI WAL HS, SAXENA AK. Microbial biofertilizers: bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 23: 101487.
- [57] JHALA YK, PANPATTE DG, VYAS RV. Cyanobacteria: source of organic fertilizers for plant growth[M]//*Microorganisms for Green Revolution*. Singapore: Springer, 2017: 253-264.
- [58] 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.
- [59] BAO JQ, ZHUO C, ZHANG DH, LI YJ, HU F, LI HS, SU ZQ, LIANG YS, HE HZ. Potential applicability of a cyanobacterium as a biofertilizer and biopesticide in rice fields[J]. *Plant and Soil*, 2021, 463(1): 97-112.
- [60] HU T, CHEN AW, JIANG YX, SUN CM, LUO S, SHAO JH. Application of a newly recorded diazotrophic cyanobacterium in acidified and Cd contaminated paddy soil: promotes rice yield and decreases Cd accumulation[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 814: 152630.
- [61] AHMED M, STAL LJ, HASNAIN S. Association of non-heterocystous cyanobacteria with crop plants[J]. *Plant and Soil*, 2010, 336(1): 363-375.
- [62] BHATTACHARYYA DS, NAYAK B, SAHU J, DEEP P. Relative tolerance and nitrogenase activity of several heterocystous cyanobacteria to herbicide, Hiltachlor, 50 EC[J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2015, 7.
- [63] ZHOU YW, BAO JQ, ZHANG DH, LI YJ, LI HS, HE HZ. Effect of heterocystous nitrogen-fixing cyanobacteria against rice sheath blight and the underlying mechanism[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 153: 103580.
- [64] BHOOSHAN N, SINGH A, SHARMA A, VERMA C, KUMAR A, PABBI S. Cyanobacterial biofertilizer's successful journey from rural technology to commercial enterprise: an Indian perspective[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(6): 3995-4002.
- [65] TANG JT, LI YK, ZHANG LL, MU JT, JIANG YY, FU HL, ZHANG YF, CUI HF, YU XP, YE ZH. Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(8): 2077.
- [66] KHARE E, ARORA NK. Effect of indole-3-acetic acid (IAA) produced by *Pseudomonas aeruginosa* in suppression of charcoal rot disease of chickpea[J]. *Current Microbiology*, 2010, 61(1): 64-68.
- [67] HUSSAIN A, HASNAIN S. Phytostimulation and

- biofertilization in wheat by cyanobacteria[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(1): 85-92.
- [68] OSMAN MEH, EL-SHEEKH MM, EL-NAGGAR AH, GHEDA SF. Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, 46(8): 861-875.
- [69] CHITTAPUN S, LIMBIPICHAI S, AMNUAYSIN N, BOONKERD R, CHAROENSOOK M. Effects of using cyanobacteria and fertilizer on growth and yield of rice, Pathum Thani I: a pot experiment[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(1): 79-85.
- [70] ZAREZADEH S, RIAHI H, SHARIATMADARI Z, SONBOLI A. Effects of cyanobacterial suspensions as bio-fertilizers on growth factors and the essential oil composition of chamomile, *Matricaria chamomilla* L.[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(2): 1231-1241.
- [71] ZHANG ZY, FAN BM, SONG C, ZHANG XX, ZHAO QW, YE B. Advances in root system architecture: functionality, plasticity, and research methods[J]. *Journal of Resources and Ecology*, 2023, 14(1): 15-24.
- [72] IRISARRI P, GONNET S, DEAMBROSI E, MONZA J. Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(2): 237-242.
- [73] SONG XN, PENG CR, LI DH. Fate of nitrogen fixed by nitrogen-fixing cyanobacteria in rice and soil during the vegetative growth period of rice[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2022, 34(4): 2051-2061.
- [74] MAYLAND HF, MCINTOSH TH. Availability of biologically fixed atmospheric nitrogen-15 to higher plants[J]. *Nature*, 1966, 209: 421-422.
- [75] KAUSHIK MS, KUMAR A, ABRAHAM G, DASH NP, SINGH PK. Field evaluations of agrochemical toxicity to cyanobacteria in rice field ecosystem: a review[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(1): 471-489.
- [76] KAUSHIK BD. Developments in cyanobacterial biofertilizer[J]. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 2014, 80(2): 379.
- [77] GAYDON DS, PROBERT ME, BURESH RJ, MEINKE H, TIMSINA J. Modelling the role of algae in rice crop nutrition and soil organic carbon maintenance[J]. *European Journal of Agronomy*, 2012, 39: 35-43.
- [78] ALORI ET, GLICK BR, BABALOLA OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 971.
- [79] ZHANG JL, SONG XN, WEI H, ZHOU WC, PENG CR, LI DH. Effect of substituting nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing cyanobacteria on yield in a double-rice cropping system in Southern China[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(4): 2221-2232.