

红树林固氮微生物及其生态功能研究进展

董俊德^{1,2,3,4}, 黄小芳^{1,2,4,5}, 龙爱民^{1,5}, 王友绍^{1,2,4}, 凌娟^{1,2,4}, 杨清松^{1,2,4}

1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301;
2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458;
3. 海南省热带海洋生物技术重点实验室, 三亚海洋生态环境工程研究院, 中国科学院海南热带海洋生物实验站, 海南 三亚 572000;
4. 中国科学院南海生态环境工程创新研究院, 广东 广州 511458;
5. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 微生物固氮是红树林生态系统中氮素循环的一个关键环节, 其产生的新氮源对红树林生态系统的氮素营养供给和初级生产力的提高有着重要意义。本文聚焦红树林固氮微生物的研究历史和现状, 综述了红树林固氮微生物的群落结构、固氮速率及其测定方法, 探讨了固氮微生物在红树林生态修复中的应用及其对红树林生境的指示作用, 阐述了固氮微生物在耦合红树林碳、氮、硫元素循环的重要角色, 并展望了红树林固氮微生物的研究前景和新视角。

关键词: 红树林; 微生物固氮; 固氮速率; 生态修复; 环境指示

中图分类号: P735.51 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2023)04-0001-11

Progress on the nitrogen-fixing microorganisms and their ecological functions in mangroves

DONG Junde^{1,2,3,4}, HUANG Xiaofang^{1,2,4,5}, LONG Aimin^{1,5}, WANG Youshao^{1,2,4}, LING Juan^{1,2,4}, YANG Qingsong^{1,2,4}

1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, Guangzhou 510301, China;
2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China;
3. Key Laboratory of Tropical Marine Biotechnology of Hainan Province, Sanya Institute of Ocean Eco-Environmental Engineering, Tropical Marine Biological Research Station in Hainan, Chinese Academy of Sciences, Sanya 572000, China;
4. Innovation Academy of South China Sea Ecology and Environmental Engineering, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 511458, China;
5. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Microbial nitrogen fixation is a crucial part of nitrogen cycling in mangrove ecosystems, it plays an essential role in the nitrogen nutrient supply and primary productivity improvement of ecosystem. This paper reviewed the diazotrophic community structure, nitrogen fixation rate, and the main measurement methods of nitrogen fixation in mangrove ecosystems. We also explored the application of nitrogen-fixing microorganisms in mangrove restoration and the ecological indicators of nitrogen-fixing microorganisms for mangrove habitats, emphasized the vital roles of diazotrophs in coupling carbon, nitrogen, and sulfur cycles in mangrove wetlands, and highlighted new perspectives for nitrogen-fixing microorganisms in the mangrove ecosystem.

收稿日期: 2022-07-20; 修订日期: 2022-08-15。姚衍桃编辑

基金项目: 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402); 广东省科技计划项目(2020B1212060058、2021B1212050023); 中国科学院南海生态环境工程创新研究院创新发展基金项目(ISEE2021ZD03)

作者简介: 董俊德(1965—), 研究员, 从事微生物海洋学及资源利用研究。email: dongjd@scsio.ac.cn

通信作者: 董俊德。email: dongjd@scsio.ac.cn

Received date: 2022-07-20; Revised date: 2022-08-15. Editor: YAO Yantao

Foundation item: Key Special Project for Exotic Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou) (GML2019ZD0402); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (2020B1212060058, 2021B1212050023); Innovation Academy of South China Sea Ecology and Environmental Engineering, Chinese Academy of Sciences (ISEE2021ZD03)

Corresponding author: DONG Junde. email: dongjd@scsio.ac.cn

Key words: mangrove; microbial nitrogen fixation; nitrogen fixation rate; ecological restoration; environmental indicators

氮循环(nitrogen cycling)是生物圈内基本的物质循环之一,全球的氮循环系统对生物多样性、全球气候变化、水环境质量状况和人类健康具有重要影响(Galloway, 2005; Capone et al, 2006)。氮循环作为红树林生态系统中生源要素物质循环的重要组成部分,氮素是限制红树植物生长发育的必需营养元素之一(Inoue et al, 2011)。红树林湿地作为全球生产力最高的生态系统之一,其沉积物的有机质含量较高,可以为红树林生境及其毗邻水域的生物群落提供可持续利用的营养物质和能量来源(Zhang et al, 2017)。然而,由于受到周期性潮汐的冲刷(Inoue et al, 2020)和红树林区域较活跃的硝酸盐还原作用(Nie et al, 2021)等原因,红树林的无机氮水平较低,低 N/P 值表明红树林通常处于氮限制的状态(Jing et al, 2015; Lin et al, 2019)。红树林生态系统的氮素输入主要通过生物固氮作用,也有一小部分氮素输入是通过地下水渗透、点源和非点源输入、大气氮沉降输入等方式进行(Purvaja et al, 2008)。红树林生态系统中的固氮微生物通过固氮酶的作用,将 N_2 还原成可被生物利用的氨(图 1),其固氮量约占红树林生态系统所需总氮量的 40%~60%(Holguin et al, 2001),可以为红树林提供“新”氮源,驱动海洋碳的同化和封存,对维持红树林初级生产力和氮收支平衡至关重要(Luo et al, 2021)。本文基于红树林固氮微生物的最新研究进展,对固氮微生物群落、固氮活性及其在红树林生态修复方面的应用进行全面的阐述,旨在阐明红树林固氮微生物及其生态功能研究的历史背景、现状和未来研究新视角,为今后开展红树林固氮微生物研究和红树林保护与修复提供方向和理论依据。

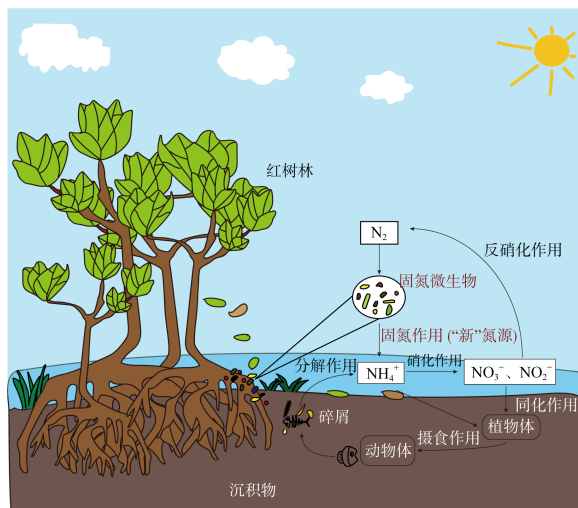


图 1 红树林生物固氮作用

Fig. 1 Biological nitrogen fixation in mangrove ecosystem

1 红树林生物固氮的研究历史和现状

1888 年荷兰学者 Beijerinck 首次从陆地环境中分离获得具有固氮活性的微生物(根瘤菌)。1889 年德国学者 Frank 发现水生环境中的蓝藻可能具有固氮活性,但直到 1928 年德国微生物学家 Drewes 才通过两种固氮蓝藻(多形鱼腥藻、点念珠藻)的纯培养物首次对其加以证实(董俊德 等, 2002)。以上工作为开创固氮微生物和生物固氮作用科学研究的新领域奠定了坚实的前期基础。当前对全球生物固氮量的估算在不断增加,据 Galloway 研究推测,由于人口的增加和人类活动加剧的影响,到 2050 年,全球固氮速率估计值最低达 $240Tg \cdot a^{-1}$,而最大预测值将达 $940Tg \cdot a^{-1}$ (Galloway, 2005)。传统的观点普遍认为,海洋生物固氮主要是由两种蓝藻细菌来介导的,即自由生活的丝状蓝藻束毛藻属(*Trichodesmium*)和与硅藻共生的植生藻属(*Richelia*)。然而,现代研究技术的应用使得更多的固氮微生物新类群被发现,意味着对生物固氮的类群、调控和预测都有待重新认识和评价(Zehr et al, 2020)。

红树林作为水陆环境的交界区,具有较高的生物固氮活性和丰富的固氮微生物多样性。1978 年, Zuberer 等研究发现佛罗里达的红树林沉积物中固氮速率要高于无植被的区域,并证实了固氮微生物能够利用红树植物根系分泌物或根细胞脱落物作为其固氮的能量来源(Zuberer et al, 1978)。1992 年 Holguin 等从红树林根际分离获得两株具有固氮能力的菌株(曼利斯顿氏菌 *Listonella anguillarum* 和坎普氏弧菌 *Vibrio campbellii*) (Holguin et al, 1992)。随着现代微生物分子生态学技术的兴起和进步,如变性梯度凝胶电泳技术(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、高通量测序技术(high-throughput sequencing)和宏基因组测序技术(metagenomics sequencing)等广泛应用,极大地推动了红树林固氮微生物的多样性、群落组成、固氮速率和生态功能等研究的发展。例如 2007 年 Flores-Mireles 等率先利用 RFLP 技术分析墨西哥红树林根际的微生物固氮酶基因(*nifH*)的分子多态性,结果发现了大量未被培养的新固氮基因(Flores-Mireles et al, 2007)。2015 年 Jing 等将焦磷酸测序技术应用于新加坡热带红树林根际沉积物固氮微生物多样性的研究,发现了硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)在红树林生物固氮中占据主导地位(Jing

et al, 2015)。这些研究有助于揭示红树林独特的固氮微生物群系和基因多样性。

我国的红树林固氮微生物研究起步较晚,但经过国内学者们的不懈努力,目前已取得丰硕的科研成果。例如, Zhang 等在国际上首次利用 DGGE 技术揭示了海南省三亚红树林沉积物固氮微生物多样性及其菌群分布特征(Zhang et al, 2008)。2010 年,凌娟等从红树林根际沉积物中分离获得 1 株固氮菌——短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*),并对其进行了形态学、生理生化和分子生物学等多项分类学鉴定及固氮活性测定,这在国内属首次利用可培养技术对固氮菌进行的研究,为海洋微生物菌剂研发奠定了基础(凌娟等, 2010)。2012 年,何雪香等从不同红树植物根际分离出固氮菌和解磷菌,并率先探讨了这些菌株对秋茄(*Kandelia candel*)幼苗的促生效果研究,结果表明固氮菌和解磷菌之间存在一定的协同增效作用(何雪香等, 2012)。同年, Liu 等创新性地将分子生态学 RFLP 技术与传统的无氮培养基分离培养技术相结合,揭示了海南省东寨港红树林根际沉积物固氮微生物的系统发育多样性,并发现了大量的新的固氮微生物类群(Liu et al, 2012)。这些开创性的研究,对我国红树林固氮微生物资源的开发和利用具有重要的意义。

由于气候变化、围塘养殖等人类活动、外来物种入侵等诸多因素,红树林遭受了严重的退化,全球红树林面积在过去的 50 年间消失了 20%~35%(Goldberg et al, 2020)。近年来,我国对红树林的保护力度逐渐加强,在福建、广东和海南等沿海地区陆续开展了一系列红树林生态修复工程。据文献报道,2000—2015 年期间,华南沿海的红树林面积明显增加,从 18702hm² 增加到 22419hm² (Ma et al, 2021)。固氮微生物作为驱动红树林氮循环的重要引擎,它们提供的新氮源对红树林生态系统发育至关重要,是红树林生态系统重要的功能微生物类群,在红树林生态修复中具有巨大的应用前景。因此,国内外学者对红树林固氮微生物的生态功能进行了深入的研究,发现红树林生态修复过程中的固氮微生物动态变化与碳、氮、硫等生源要素的变化存在紧密的耦合关系(Huang et al, 2022a),揭示了红树植物与固氮微生物的互作机制(Alfaro-Espinoza et al, 2015; Huang et al, 2022b),探索了固氮菌作为植物促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)在红树林生态修复中的应用(Shakilabanu et al, 2012; 王荣丽等, 2015; Mukherjee et al, 2019)等。相关研究也是目前红树林固氮微生物研究的前沿领域。

2 红树林固氮微生物的类群、群落组成和分布规律

2.1 固氮微生物的主要类群

2.1.1 固氮微生物的生态类群

固氮微生物在红树林生态系统中分布广泛,在红树林凋落物、气生根、沉积物、树皮和蓝藻垫等都发现了丰富的固氮微生物类群(Zhang et al, 2017)。根据固氮微生物与红树植物之间的相互关系,可将固氮微生物分为三种类型:自生(asymbiotic)固氮菌、联合(associative)固氮菌和共生(symbiotic)固氮菌(Pahari et al, 2021)。红树林区的自生固氮菌是能够独立进行固氮作用的微生物,主要是固氮蓝藻(蓝细菌),如束毛藻属(*Trichodesmium*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、微鞘藻属(*Microcoleus*)、节球藻属(*Nodularia*)、隐球藻属(*Aphanocapsa*)和聚球藻属(*Synechococcus*)等(Bashan et al, 1998; Alvarenga et al, 2015; Singh et al, 2019)。此外,红树林区自生固氮微生物还包括好氧性的固氮菌属(*Azotobacter*)和厌氧性的梭菌属(*Clostridia*)等(Shridhar, 2012)。联合固氮菌是介于自生和共生固氮菌之间的一种类型,这类固氮微生物能够独立生活,它们定植在红树植物根系沉积物或根内部,依靠红树根系分泌物生长,同时提供固定的氮素以满足红树植物生长需要,但是不与红树形成类似根瘤的特异结构,因此与红树植物有着既亲密又松散的关系(周海霞等, 2013; Haskett et al, 2022)。固氮螺菌属(*Azospirillum*)是典型的联合固氮微生物(Shridhar, 2012),它们普遍分布于热带、亚热带的红树根际沉积物中,经常作为植物根际促生菌(plant-promoting rhizobacteria, PGPR)用以促进植物的生长发育(Inoue et al, 2020; Shiau et al, 2021)。共生固氮菌是必须和红树林中另一种生物密切生活在一起才能进行固氮的微生物,二者形成紧密互利的关系。Trindade-Silva 等系统地报道了一株分离自红树林生态系统中船蛆(Shipworm)体内共生的固氮细菌 *Teredinibacter turnerae* 的生理特性,它可以利用纤维素为唯一碳源,并在微好氧条件下进行固氮作用(Trindade-Silva et al, 2009)。Lechene 等则通过稳定性同位素 ¹⁵N₂ 标记技术和透射电子显微镜(TEM)扫描技术证实了船蛆依赖固氮微生物获取氮素(Lechene et al, 2006)。另外,红树林生态系统中还存在与其他微生物类群形成共生体的固氮菌。例如, Yu 等研究发现丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)与固氮细菌形成的共生体可以促进红树林生态系统的生物固氮作用(Yu et al, 2021)。

2.1.2 固氮微生物的物种类群

按照微生物分类可以将红树林固氮微生物分为固氮细菌类(Bacteria)和古菌类(Archaea)(Han et al, 2020), 其中红树林固氮细菌还可进一步分为自养固氮蓝藻、异养固氮细菌和光合细菌类(董俊德 等, 2002)。红树林固氮蓝藻组成类别多样, 包括浮游型的束毛藻属、鱼腥藻属、节球藻属、颤藻属(*Oscillatoria*)、席藻属(*Phormidium*)、底栖的眉藻属(*Calothrix*)、螺旋藻属(*Spirulina*), 以及和红树植物共生的隐球藻属、鞘丝藻属(*Lyngbya*)、真枝藻属(*Stigonema*)等(Alvarenga et al, 2015)。目前在红树林区域已经报道的异养固氮细菌有: 除硫单胞菌属(*Desulfuromonas*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、脱硫盒菌属(*Desulfarculus*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、地杆菌属(*Geobacter*)、克雷伯杆菌属(*Klebsiella*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)等(Rameshkumar et al, 2009; Jing et al, 2015; Zhang et al, 2017; Luo et al, 2021)。红树林的光合类固氮细菌包括着色菌属(*Chromatium*)、红螺菌属(*Rhodospirillum*)等(Huang et al, 2022a)。着色菌属主要以硫化氢、硫代硫酸盐等作为电子受体且为专性厌氧菌; 红螺菌属的光合细菌能利用有机物进行光能异养(Ghosh et al, 2009)。目前对红树林固氮古菌研究较少, 已报道的红树林固氮古菌主要为隶属于广古菌门(*Euryarchaeota*)的甲烷微菌纲(*Methanomicrobia*)(Luo et al, 2021), 以及一些古菌新类群, 如硫古菌纲(*Theionarchaea*)、深古菌门(*Bathyarchaeota*)和隶属于广古菌门的*Altiaarchaeales*等(Liu et al, 2018)。另外, 大部分产甲烷古菌如甲烷叶菌属(*Methanobacter*)、甲烷丝菌属(*Methanobacter*)和甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)都具有固氮作用, 它们的主要代谢产物为甲烷(Shiau et al, 2021)。

随着微生物高通量分离筛选技术(Zhang et al, 2021)、基于细菌共现网络的定向分离技术(Xian et al, 2020)等新兴技术的发展, 将会有越来越多新的红树林固氮微生物物种被揭示。据不完全统计, 2000—2020年, 从红树林生态系统中分离得到的固氮菌约 31 种, 分属于叶杆菌属(*Phyllobacterium*)、固氮菌属、弧菌属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)、假单胞菌属、固氮螺菌属、海杆菌属(*Marinobacterium*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、短波单胞菌属

(*Brevundimonas*)等 20 个属, 其中新属、新种约 10 种, *Swaminathanian*、*Mangrovibacter*、*Mangrovibacterium* 为 3 个新属固氮菌(表 1)。以上可培养固氮菌及新属种的发现, 对深入研究固氮菌的生理生化特性、生物固氮的代谢通路和分子机制及微生物菌剂研发与应用等具有重要意义。

2.2 固氮微生物的群落组成和分布规律

红树林的固氮微生物以变形菌门细菌(*Proteobacteria*)为主, 占固氮细菌相对丰度的 90%以上, 其中以 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)和 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)细菌居多(Jing et al, 2015; Zhang et al, 2017; Luo et al, 2021)。不同红树树种的固氮微生物群落组成及优势类群存在很大差异, 这可能是由于不同红树树种分泌不同根系分泌物进而招募不同的固氮微生物类群。例如, Zhang 等(2017)对我国三亚河红树林自然保护区的三种典型红树——正红树(*Rhizophora apiculata*)、白骨壤(*Avicennia marina*)、角果木(*Ceriops tagal*)的根际固氮微生物多样性进行研究时发现, 不同红树树种的沉积物固氮微生物区系有明显差异。Liu 等(2020)的研究结果表明, 红树植物外来种(无瓣海桑 *Sonneratia apetala* 和拉贡木 *Laguncularia racemosa*)引种后对本地红树植物的固氮微生物群落组成造成显著影响, 例如可诱发根瘤形成的中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)在拉贡木根内部明显富集, 其相对丰度高达 35%, 这也可能是由于不同的固氮微生物类群特异性地为其宿主红树植物提供有利条件。此外, Huang 等(2022b)研究发现, 外来种无瓣海桑和三种本地红树树种(桐花树 *Aegiceras corniculatum*、榄李 *Aegiceras corniculatum* 和正红树)相比, 固氮菌生态共现网络中关键类群(如脱硫叠球菌属 *Desulfosarcina* 和栖沉积物菌属 *Sedimenticola*)的相对丰度显著提高, 这些关键固氮菌类群可能通过选择性调节作用(如植物的定向选择)来影响固氮微生物的群落结构和功能。此外, 同一红树树种的不同部位的固氮微生物类群都存在一定差异。例如, 与根内生的固氮微生物相比, 红树根际沉积物的 Alpha 多样性(Shannon 和 Chao1 指数)显著提高, 其优势类群是脱硫弧菌属和慢生根瘤菌属, 而中华根瘤菌属、慢生根瘤菌属等根瘤菌细菌和红螺菌属则是红树根内生固氮菌的主要类群(Liu et al, 2020)。值得一提的是, 红树林固氮微生物的群落组成和分布是与红树的生境(如光照、盐度、pH、TC、TN、TS、 NH_4^+ 、 NO_3^- 浓度)等关键环境因子密切相关的, 它们的群落结构及动态变

表 1 2000—2020 年红树林生态系统分离的固氮微生物
Tab. 1 Nitrogen-fixing microorganisms isolated from mangrove ecosystems from 2000–2020

序号	属名	种名	分离地点	是否为 新属种	文献来源
1	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Phyllobacterium</i> sp.	墨西哥下加利福尼亚州	否	Rojas et al, 2001
2	<i>Swaminathania</i>	<i>S. salitolerans</i>	印度泰米尔纳德邦	是	Loganathan et al, 2004
3	<i>Azotobacter</i>	<i>A. chroococcum</i> , <i>A. virelandii</i> , <i>A. beijerinckii</i> , <i>A. vinelandii</i> , <i>A. chroococcum</i>	印度帕兰吉佩泰	否	Ravikumar et al, 2004; Kathiresan et al, 2006; Xiong et al, 2016
4	<i>Vibrio</i>	<i>V. porteresiae</i> , <i>V. mangrovi</i> , <i>V. plantiponsor</i>	印度泰米尔纳德邦	是	Rameshkumar et al, 2008; Rameshkumar et al, 2010b; Rameshkumar et al, 2011
5	<i>Teredinibacter</i>	<i>T. turnerae</i>	巴西塞佩蒂巴湾	否	Trindade-Silva et al, 2009
6	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>	中国三亚市	否	凌娟 等, 2010
7	<i>Mangrovibacter</i>	<i>M. plantisponsor</i>	印度泰米尔纳德邦	是	Rameshkumar et al, 2010a
8	<i>Sporosarcina</i>	<i>S. aquimarina</i>	印度泰米尔纳德邦	否	Janarthine et al, 2012
9	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.			
10	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i> sp.			
11	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas</i> sp.	中国三亚市	否	Liu et al, 2012
12	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.			
13	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp.			
14	<i>Azospirillum</i>	<i>A. lipoferum</i> , <i>A. brasilense</i> , <i>A. irakense</i> , <i>A. halopraeferens</i> , <i>A. amazonense</i>	印度泰米尔纳德邦/中国湛江市	否	Ravikumar et al, 2012; Xiong et al, 2016
15	<i>Marinobacterium</i>	<i>M. mangrovicola</i>	奥地利维也纳	是	Alfaro-Espinoza et al, 2014
16	<i>Mangrovibacterium</i>	<i>M. diazotrophicum</i>	中国三亚市	是	Huang et al, 2014
17	<i>Ochrobactrum</i>	<i>O. anthropi</i>	中国湛江市	否	Xiong et al, 2016
18	<i>Synechococcus</i>	<i>S. moorigangaii</i>	印度孙德尔本斯	是	Singh et al, 2019
19	<i>Draconibacterium</i>	<i>D. mangrovi</i>	中国泉州市	是	Hu et al, 2020
20	<i>Maribellus</i>	<i>M. sediminis</i>	中国泉州市	是	Huang et al, 2020

化受多种环境因子共同驱动 (Shiau et al, 2021; Huang et al, 2022a)。环境因子如何影响红树林固氮微生物群落组成, 进而形成对红树植物生长发育有利的红树-固氮微生物互作关系(Huang et al, 2022b), 是目前红树林生态系统研究的一个热门问题, 需要结合微生物分子生态学、固氮菌定向分离筛选和红树-固氮菌共培养实验搭建等多学科交叉技术, 以深入揭示植物-微生物互作机制及环境驱动机制。

3 红树林生态系统的生物固氮能力

3.1 生物固氮测定方法

准确地测定红树林固氮速率, 对于红树林生物地球化学氮循环认知及氮通量估算至关重要。固氮速率的常用测定方法包括乙炔还原法(David et al, 1980)和¹⁵N 同位素示踪法(Montoya et al, 1996)。乙炔还原法的原理是依据固氮酶具有还原乙炔为乙烯的活性, 通过气相色谱法测定乙烯生成量, 从而作为固氮速率的间接测定方法。乙炔还原法始于 20 世纪 60 年代(Stewart et al, 1967), 到了 1978 年, Zuberer 等首次将乙炔还原法应用于佛罗里达红树林沉积物、根系、植物的生物固氮效率测定(Zuberer et al, 1978)。该方法操

作简单、灵敏度高, 因此在世界各地的红树林固氮速率测定中得到了广泛的应用(Pelegri et al, 1998; Lugomela et al, 2002; Inoue et al, 2020; Luo et al, 2021)。乙炔还原法既可以用于红树林原位测定(Shiau et al, 2017), 也可以用于红树林分离的纯培养固氮菌株的测定(凌娟 等, 2010)。缺点是所测得的固氮速率需要转换比值, 理论上根据反应式可用转换系数 C₂H₂:N₂ = 3:1 来计算固定的 N₂ 量, 但实测值往往与理论值不一致, 不同培养条件及测定条件等都会使转换系数发生一定变化, 因此影响推导出的固氮量的准确性(Stewart et al, 1967; Seitzinger et al, 1987; Lee et al, 2006)。与乙炔还原法相比, ¹⁵N 同位素示踪法准确度高, 是确定固氮速率最为直接的方法, 因此也常用作乙炔还原法的校正方法(Seitzinger et al, 1987)。该方法的原理是通过向生物固氮系统(例如红树幼苗+固氮菌体系)添加定量的 ¹⁵N₂ 作为底物, 被固定的 N₂ 转化成颗粒有机态, 从而测定 ¹⁵N₂ 结合到颗粒有机相的快慢计算固氮速率(France et al, 1998)。Inoue 等通过 ¹⁵N 同位素示踪技术证实, 大气中的 N₂ 通过红树气生根表面的皮孔进入气生根, 并扩散到深埋地下的根系, 从而

被固氮微生物固定(Inoue et al, 2019)。该方法能测定野外条件或室内实验条件下的固氮量, 缺点就是 $^{15}\text{N}_2$ 价格较贵, 并需要复杂的质谱仪来进行测定, 测定流程较为繁琐。Das 等于 2018 年提出了一种基于微生物培养的新测定方法——微生物检定法(“microbial bio-assay”), 该方法主要通过采用特定的培养基和培养条件, 经过一定的间隔时间后, 通过高温催化氧化测定样品中固氮菌的固氮量, 该方法计算的固氮速率与通过乙炔还原法计算的固氮速率呈显著正相关, 表明该方法可以作为乙炔还原法的一种替代或者补充方法(Das et al, 2018)。也有学者通过荧光定量 PCR 检测固氮微生物固氮酶 *nifH* 基因的拷贝数来反映固氮活性, 因为 *nifH* 基因拷贝数和固氮速率有一定的相关性(Liu et al, 2020)。这两种方法的缺点是预测值只能在一定程度上间接反映固氮速率的高低, 准确度仍有待提高, 优点是费用较低, 不需要依赖昂贵的仪器(如气相色谱仪)和专门的基础设施。另外, 先进的纳米二次离子质谱技术(NanoSIMS)和荧光原位杂交(FISH)、扫描电子显微镜(SEMs)、 ^{15}N 同位素标记等被联合使用于测定海水中硅藻-蓝藻共生体的单细胞固氮速率及其氮代谢和转运过程, 能够实现在原位实时观察微生物的种群分布及代谢特征, 具有极高的灵敏度和准确性(Foster et al, 2011; Thompson et al, 2012)。

3.2 固氮速率的时空变化规律

红树林生态系统表现出较高的固氮速率, Lee 等对伯利兹海岸的红树林生态系统的固氮及反硝化速率进行了估算, 发现其年均固氮量为 $55.7\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$, 年均脱氮量为 $9.9\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$, 其固氮速率远大于反硝化速率, 该区域的年均氮素净积累通量约为 $45.7\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$ (Lee et al, 2006)。红树林的沉积物、支柱根、凋落物和微藻垫等检测到的固氮速率往往各不相同。Pelegrai 等分析来自佛罗里达州南海岸三种不同红树植物的落叶、呼吸根及沉积物的固氮速率发现, 腐烂的落叶中能检测到较高的固氮速率($7.3\sim 538.8\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), 而呼吸根和沉积物的固氮速率范围为 $0\sim 31.3\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Pelegrai et al, 1997)。此外, 红树林固氮速率通常还与地理位置、季节变化和昼夜交替等因素密切相关, 具有明显的时空分布特征(Lee et al, 2006; Purvaja et al, 2008)。例如, Shiau 等对台北港淡水河河口的红树林沉积物的固氮速率进行了较为系统的研究, 发现其固氮速率沿水流方向逐渐增加, 范围在 $0.2\sim 15.6\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 并通过室内模拟实验证实固氮速率受沉积物盐度影响很小, 表明红树林固

氮微生物对河口的盐碱环境具有较强的适应性(Shiau et al, 2017, 2021)。Inoue 等也报道了红树林沉积物的固氮速率从林内(平均 $46.8\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-3}$)到林外滩涂(平均 $7.9\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-3}$)呈现大幅度下降的趋势(Inoue et al, 2020)。红树林固氮速率除受地理分布影响外, 还与时间因素有密切关系。红树林生境中以异形胞蓝藻为主的微藻垫在白天比在夜晚具有更高的固氮速率, 异形胞蓝藻能分化产生异形胞以提供微氧条件进行固氮作用, 因此可以同时进行光合固氮作用(Lee et al, 2006)。另外, 固氮速率在不同季节也呈现显著的差异, 受环境理化因子(如水体溶解氧和沉积物 NH_4^+-N 浓度)调控(Lee et al, 2006)。有研究对毗邻坦桑尼亚桑给巴尔镇的红树林生态系统的固氮速率进行了原位测定, 结果发现, 只有在干旱季节不同位点的固氮速率才具有显著差异, 而在雨季不同位点的红树林固氮速率在统计学上无显著差异, 这也表明了红树林的固氮速率是受到地理位置和季节等环境因素的综合影响(Kyaruzi et al, 2003)。另外, 固氮速率还与沉积物的深度有关, 呈现明显的垂直分布特征, 如 Luo 等系统地研究了不同红树林沉积物深度($0\sim 100\text{cm}$)的固氮速率发现, 深层沉积物($50\sim 100\text{cm}$)较表层沉积物($0\sim 50\text{cm}$)相比具有更高的固氮速率, 最高可达 $0.2\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 这可能与深层沉积物的寡营养环境和低氧条件有关(Luo et al, 2021)。

4 红树林固氮微生物研究新视角

4.1 固氮微生物在红树林碳氮硫元素循环的耦合作用

近年来, 越来越多的研究不再是仅仅关注红树林固氮微生物的单一固氮功能, 而是聚焦固氮微生物在红树林生态系统碳、氮、硫循环耦合中的连接作用(Lin et al, 2019; 方安琪 等, 2020)。有研究表明, 在互花米草湿地生态系统中, 铁循环(主要是铁氧化细菌 iron-oxidizing bacteria, FeOB)和硫循环微生物类群(包括硫氧化细菌 sulfide-oxidizing bacteria, SOB 和硫酸盐还原菌)在固氮微生物中的相对丰度占比达 17%, 碳循环微生物类群(主要是产甲烷菌 methane-producing bacteria, MPB)在固氮微生物中占比达 15%, 表明微生物介导的氮循环是与碳循环、硫循环和铁循环等过程是紧密耦合的(Kolton et al, 2020)。此外, 我们最新的研究结果也系统地解析了红树林沉积物的固氮微生物作为“多面手(functionally versatile microbes)”在驱动红树林生态系统的碳、氮、硫和铁元素生物地球化学循环中的关键作用(Huang et al, 2022b)。

红树林沉积物中硫含量较高是红树林湿地的一个

重要生境特征(Lin et al, 2019), 而栖居在沉积物中的 SRB 菌则是主导沉积物氮循环过程(包括固氮作用、硝化作用等)的优势类群(Jing et al, 2015; Zhang et al, 2017; Liu et al, 2020; Nie et al, 2021)。例如, Liu 等对广东海陵岛国家红树林湿地公园的根际固氮微生物多样性进行研究时发现, SRB 菌如脱硫弧菌属、脱硫盒菌属、脱硫叶菌属 (*Desulfobulbus*)、*Pseudodesulfobacter*、*Desulfatibacillum* 等是红树林根际的主要固氮菌类群(Liu et al, 2020)。因此, SRB 菌同时承担了固氮和硫酸盐还原的双重作用, 它们可能在红树林氮和硫元素的生物地球化学循环耦合中起着关键作用(Zhang et al, 2017)。

4.2 固氮微生物对红树林生态环境的指示作用

红树林水体或沉积物理化特征的改变势必会影响栖居其中的微生物的群落结构组成、生物多样性及其功能。例如, 通过对不同修复年限的红树林生态系统研究, 发现沉积物碳氮硫等生源要素的动态变化能够重塑固氮微生物群落结构, 固氮微生物类群能够有效地指示红树林生态修复进程或修复效果(Huang et al, 2022a)。与天然红树林和人工修复的红树林相比, 受城市化影响或者受损的红树林生态系统的水体和沉积物理化参数和生物固氮速率都受到一定程度的影响, 如 pH 和盐度升高、固氮速率下降(Vovides et al, 2011), 因此固氮微生物及其固氮活性起到了指示红树林健康状况和评价红树林生态修复效果的作用(Holguin et al, 2006)。此外, 外来物种(如互花米草 *Spartina alterniflora*、东亚壳菜蛤 *Musculista senhousia*)入侵下的红树林生态系统的固氮微生物多样性和固氮功能也会发生相应的变化, 因此固氮微生物也可以作为红树林生境外来物种入侵影响评估的指示微生物(Moseman et al, 2009; Huang et al, 2022a)。以上这些研究都表明固氮微生物及固氮活性对红树林生态环境具有指示作用, 为红树林固氮微生物的应用研究提供新视角。

4.3 固氮微生物的促生效应及其在红树林生态修复中的应用

植物根际促生菌 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)是指自由生活在沉积物或者定植于植物根系的有益微生物, 它们通过促进植物生长、促进植物对矿质营养的吸收利用或者拮抗病原菌等途径使植物受益(Shakilabanu et al, 2012)。红树林固氮菌可以作为 PGPR 被进一步开发为微生物菌肥或菌剂, 广泛地应用于促进红树幼苗生长或者农作物生长等。

目前已经报道的红树林来源的 PGPR 菌株主要有固氮螺菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、固氮菌属、根瘤菌属、肠杆菌属(*Enterobacter*)等(Hartmann et al, 2009; do Carmo et al, 2011; Shakilabanu et al, 2012; Castro et al, 2018)。培育获得红树壮苗是提高红树林的种植成活率的关键环节。研究表明, 在培育红树林幼苗时接种具有固氮功能的 PGPR(原型微鞘藻 *Microcoleus chthonoplastes*), 可明显促进红树幼苗的生长, 提高红树林造林存活率(Bashan et al, 1998)。Ravikumar 等从红树林生境分离获得 3 株固氮菌属菌株 (*A. chroococcum*、*A. virelandii* 和 *A. beijerinckii*), 并建立红树幼苗和固氮菌共培养体系, 结果表明固氮菌的添加能使根系生物量提高 98.2%, 根长提高 48.5%, 地上生物量提高 29.5%, 总叶绿素和类胡萝卜素分别提高 151.0%和 158.7%, 因此固氮菌属细菌是生产海洋生物肥料的理想菌株(Ravikumar et al, 2004)。此外, 分离自红树林的 PGPR 也有被应用于其他植物造林项目上。例如, 从红树林根际分离的具有耐盐特性的固氮螺菌属菌株 *Azospirillum* spp.能显著促进盐生植物海蓬子 (*Salicornia bigelovii*)幼苗的生长(Bashan et al, 2000)。Castro 等从红树林中共分离获得细菌 115 株, 并对其固氮、溶磷、产吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)等促生特性进行分析, 结果发现一株同时具有固氮、溶磷活性的肠杆菌属菌株 *Enterobacter* sp. MCR1.48, 该菌株能显著促进一种植物造林常用树种——金合欢 (*Acacia polyphylla*)的生长(Castro et al, 2018)。目前, 关于红树林 PGPR 的研究尚处于起步阶段, 稳定性差是影响 PGPR 菌剂在复杂多变的红树林原位大规模应用的主要问题。另外, PGPR 菌株定植能力也是影响菌剂施用效果的关键因素(Sun et al, 2022)。这些热点问题都将是未来红树林 PGPR 菌剂应用开发亟待解决的技术瓶颈。

5 展望

固氮微生物广泛分布于红树林生境中, 是多样性较为丰富的功能微生物类群。近年来, 人们对红树林固氮微生物的分布、类群、固氮速率及其重要功能作用都有了新的认识。然而, 关于红树林固氮菌的高效分离筛选技术、红树-固氮微生物的互作机制和固氮微生物对关键生源要素生物地球化学循环的耦合过程及其调控机制等相关研究仍然欠缺, 有必要基于固氮微生物研究的新视角开展如下研究:

1) 建立新的定向分离筛选技术, 如高通量分离培养技术、基于共现网络的关键固氮菌类群定向筛选技

术等, 挖掘更多的、尚未被培养的红树林高效固氮微生物资源。

2) 利用宏基因组、转录组、代谢组等多组学技术进一步揭示红树林生态系统中红树植物-沉积物-固氮微生物的互作机制, 阐明红树林生态修复过程中固

氮微生物的动态演替及其生态环境效应。

3) 应用稳定同位素探针(stable isotope probing, SIP)、纳米离子探针(NanoSIMS)等新技术, 探索固氮微生物在红树林湿地重要生源要素 C、N、S、Fe 等元素循环的耦合途径及其调控机制。

参考文献 References

- 董俊德, 王汉奎, 张偲, 等, 2002. 海洋固氮生物多样性及其对海洋生产力的氮、碳贡献[J]. 生态学报, 22(10): 1741–1749. DONG JUNDE, WANG HANKUI, ZHANG SI, et al, 2002. Marine nitrogen-fixing organisms and their contribution to the N and C requirement for marine biological production[J]. Acta Ecologica Sinica, 22(10): 1741–1749 (in Chinese with English abstract).
- 方安琪, 贺志理, 王成, 等, 2020. 红树林沉积物中微生物驱动硫循环研究进展[J]. 微生物学报, 60(1): 13–25. FANG ANQI, HE ZHILI, WANG CHENG, et al, 2020. Progress in studying microbially-driven sulfur cycling in mangrove sediments[J]. Acta Microbiologica Sinica, 60(1): 13–25 (in Chinese with English abstract).
- 何雪香, 李玫, 廖宝文, 2012. 红树林固氮菌和解磷菌的分离及对秋茄苗的促生效果[J]. 华南农业大学学报, 33(1): 64–68. HE XUEXIANG, LI MEI, LIAO BAOWEN, 2012. Isolation of nitrogen-fixing bacteria and phosphate-solubilizing bacteria from the rhizosphere of mangrove plants and their enhancement to the growth of *Kandelia candel* seedlings[J]. Journal of South China Agricultural University, 33(1): 64–68 (in Chinese with English abstract).
- 凌娟, 董俊德, 张燕英, 等, 2010. 一株红树林根际固氮菌的分离、鉴定以及固氮活性测定[J]. 热带海洋学报, 29(5): 149–153. LING JUAN, DONG JUNDE, ZHANG YANYING, et al, 2010. Isolation and characterization of a N_2 -Fixing Bacterium from the mangrove rhizosphere and study on its nitrogen-fixing ability[J]. Journal of Tropical Oceanography, 29(5): 149–153 (in Chinese with English abstract).
- 王荣丽, 廖宝文, 何雪香, 等, 2015. PGPB 菌剂对 5 种红树小苗的野外交菌效应[J]. 东北林业大学学报, 43(1): 103–106. WANG RONGLI, LIAO BAOWEN, HE XUEXIANG, et al, 2015. Effects of PGPB inoculation on five species of mangrove seedlings in the field[J]. Journal of North-East Forestry University, 43(1): 103–106 (in Chinese with English abstract).
- 周海霞, 刘其友, 郑经堂, 2013. 海洋微生物固氮作用研究进展[J]. 化学与生物工程, 30(11): 5–9, 30. ZHOU HAIXIA, LIU QIYOU, ZHENG JINGTANG, 2013. Research progress on marine microbial nitrogen fixation[J]. Chemistry & Bioengineering, 30(11): 5–9, 30 (in Chinese with English abstract).
- ALFARO-ESPINOZA G, ULLRICH M S, 2014. *Marinobacterium mangrovicola* sp. nov., a marine nitrogen-fixing bacterium isolated from mangrove roots of *Rhizophora mangle*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(Pt 12): 3988–3993.
- ALFARO-ESPINOZA G, ULLRICH M S, 2015. Bacterial N_2 -fixation in mangrove ecosystems: insights from a diazotroph-mangrove interaction[J]. Frontiers in Microbiology, 6: 445.
- ALVARENGA D O, RIGONATO J, ZANINI BRANCO L H, et al, 2015. Cyanobacteria in mangrove ecosystems[J]. Biodiversity and Conservation, 24(4): 799–817.
- BASHAN Y, MORENO M, TROYO E, 2000. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. [J]. Biology and Fertility of Soils, 32(4): 265–272.
- BASHAN Y, PUENTE M E, MYROLD D D, et al, 1998. In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings[J]. FEMS Microbiology Ecology, 26(3): 165–170.
- CAPONE D G, POPA R, FLOOD B, et al, 2006. Follow the Nitrogen[J]. Science, 312(5774): 708–709.
- CASTRO R A, DOURADO M N, DE ALMEIDA J R, et al, 2018. Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 49(1): 59–66.
- DAVID K A, APTE S K, BANERJI A, et al, 1980. Acetylene reduction assay for nitrogenase activity: gas chromatographic determination of ethylene per sample in less than one minute[J]. Applied and Environmental Microbiology, 39(5): 1078–1080.
- DAS S, DE TK, 2018. Microbial assay of N_2 fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay[J]. Methodsx, 5: 909–914.
- DO CARMO F L, DOS SANTOS H F, MARTINS E F, et al, 2011. Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants[J]. Journal of Microbiology, 49(4): 535–543.
- FLORES-MIRELES A L, WINANS S C, HOLGUIN G, 2007. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots[J]. Applied and Environmental Microbiology, 73(22): 7308–7321.
- FOSTER R A, KUYPERS M M M, VAGNER T, et al, 2011. Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses[J]. The ISME Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 5(9): 1484–1493.
- FRANCE R, HOLMQUIST J, CHANDLER M, et al, 1998. $\delta^{15}N$ evidence for nitrogen fixation associated with macroalgae

- from a seagrass-mangrove-coral reef system[J]. Marine Ecology Progress Series, 167: 297–299.
- GALLOWAY J N, 2005. The global nitrogen cycle: Past, present and future[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 48: 669–677.
- GHOSH W, DAM B, 2009. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea[J]. FEMS Microbiology Reviews, 33(6): 999–1043.
- GOLDBERG L, LAGOMASINO D, THOMAS N, et al, 2020. Global declines in human-driven mangrove loss[J]. Global Change Biology, 26(10): 5844–5855.
- HAN QIN, MA QUN, CHEN YONG, et al, 2020. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean[J]. The ISME Journal, 14(8): 1915–1928.
- HARTMANN A, BASHAN Y, 2009. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB)-Special Issue[J]. European Journal of Soil Biology, 45(1): 1–2.
- HASKETT T L, PARAMASIVAN P, MENDES M D, et al, 2022. Engineered plant control of associative nitrogen fixation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 119(16): e2117465119.
- HOLGUIN G, GONZALEZ-ZAMORANO P, DE-BASHAN L E, et al, 2006. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development-a case study[J]. Science of The Total Environment, 363(1–3): 260–274.
- HOLGUIN G, GUZMAN M A, BASHAN Y, 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. [J]. FEMS Microbiology Ecology, 101(3): 207–216.
- HOLGUIN G, VAZQUEZ P, BASHAN Y, 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview[J]. Biology and Fertility of Soils, 33(4): 265–278.
- HU YUZHONG, GUO YU, LAI QILIANG, et al, 2020. *Draconibacterium mangrovi* sp. nov., isolated from mangrove sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(8): 4816–4821.
- HUANG XIAOFANG, FENG JIANXIANG, DONG JUNDE, et al, 2022a. *Spartina alterniflora* invasion and mangrove restoration alter diversity and composition of sediment diazotrophic community[J]. Applied Soil Ecology, 177: 104519.
- HUANG XIAO-FANG, LIU YUJUAN, DONG JUN-DE, et al, 2014. *Mangrovibacterium diazotrophicum* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a mangrove sediment, and proposal of *Prolixibacteraceae* fam. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(Pt 3): 875–881.
- HUANG XIAOFANG, YANG QINGSONG, FENG JIANXIANG, et al, 2022b. Introduction of exotic species *Sonneratia apetala* alters diazotrophic community and stimulates nitrogen fixation in mangrove sediments[J]. Ecological Indicators, 142: 109179.
- HUANG ZHAOBIN, HU YUZHONG, LAI QILIANG, et al, 2020. Description of *Maribellus sediminis* sp. nov., a marine nitrogen-fixing bacterium isolated from sediment of cordgrass and mangrove[J]. Systematic and Applied Microbiology, 43(4): 126099.
- INOUE T, KOHZU A, SHIMONO A, 2019. Tracking the route of atmospheric nitrogen to diazotrophs colonizing buried mangrove roots[J]. Tree Physiology, 39(11): 1896–1906.
- INOUE T, NOHARA S, TAKAGI H, et al, 2011. Contrast of nitrogen contents around roots of mangrove plants[J]. Plant and Soil, 339(1–2): 471–483.
- INOUE T, SHIMONO A, AKAJI Y, et al, 2020. Mangrove-diazotroph relationships at the root, tree and forest scales: diazotrophic communities create high soil nitrogenase activities in *Rhizophora stylosa* rhizospheres[J]. Annals of Botany, 125(1): 131–144.
- JANARTHINE S R S, EGANATHAN P, 2012. Plant growth promoting of endophytic *Sporosarcina aquimarina* Sjam16103 Isolated from the pneumatophores of *Avicennia marina* L. [J]. International journal of microbiology, 2012: 532060.
- JING HONGMEI, XIA XIAOMIN, LIU HONGBIN, et al, 2015. Anthropogenic impact on diazotrophic diversity in the mangrove rhizosphere revealed by *nifH* pyrosequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 6: 1172.
- KATHIRESAN K, SELVAM M M, 2006. Evaluation of beneficial bacteria from mangrove soil[J]. Botanica Marina, 49(1): 86–88.
- KOLTON M, ROLANDO J L, KOSTKA J E, 2020. Elucidation of the rhizosphere microbiome linked to *Spartina alterniflora* phenotype in a salt marsh on Skidaway Island, Georgia, USA[J]. FEMS Microbiology Ecology, 96(4): fiae026.
- KYARUZI J J, KYEWALYANGA M S, MURUKE M H S, 2003. Cyanobacteria composition and impact of seasonality on their in situ nitrogen fixation rate in a mangrove ecosystem adjacent to Zanzibar Town[J]. Western Indian Ocean Journal of Marine Science, 2(1): 35–44.
- LECHENE C, HILLION F, MCMAHON G, et al, 2006. High-resolution quantitative imaging of mammalian and bacterial cells using stable isotope mass spectrometry[J]. Journal of Biology, 5(6): 20.
- LEE R Y, JOYE S B, 2006. Seasonal patterns of nitrogen fixation and denitrification in oceanic mangrove habitats[J]. Marine Ecology Progress Series, 307: 127–141.
- LIN XIAOLAN, HETHARUA B, LIN LIAN, et al, 2019. Mangrove sediment microbiome: adaptive microbial assemblages and their routed biogeochemical processes in Yunxiao Mangrove National Nature Reserve, China[J]. Microbial Ecology, 78(1): 57–69.

- LIU JIANYIN, PENG MENGJUN, LI YOUGUO, 2012. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria and the *nifH* gene from mangrove rhizosphere soil[J]. Canadian Journal of Microbiology, 58(4): 531–539.
- LIU XINGYU, YANG CHAO, YU XIAOLI, et al, 2020. Revealing structure and assembly for rhizophyte-endophyte diazotrophic community in mangrove ecosystem after introduced *Sonneratia apetala* and *Laguncularia racemosa*[J]. Science of The Total Environment, 721: 137807.
- LIU YANG, ZHOU ZHICHAO, PAN JIE, et al, 2018. Comparative genomic inference suggests mixotrophic lifestyle for Thorarchaeota[J]. The ISME Journal, 12(4): 1021–1031.
- LOGANATHAN P, NAIR S, 2004. *Swaminathanian salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(Pt 4): 1185–1190.
- LUGOMELA C, BERGMAN B, 2002. Biological N₂-fixation on mangrove pneumatophores: Preliminary observations and perspectives[J]. Ambio, 31(7–8): 612–613.
- LUO ZHIWEN, ZHONG QIUPING, HAN XINGGUO et al, 2021. Depth-dependent variability of biological nitrogen fixation and diazotrophic communities in mangrove sediments[J]. Microbiome, 9(1): 212.
- MA XIAOXIA, JIANG ZHAO-YU, WU PENG, et al, 2021. Effect of mangrove restoration on sediment properties and bacterial community[J]. Ecotoxicology, 30(5): 1672–1679.
- MONTOYA J P, VOSS M, KAHLER P, et al, 1996. A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N(inf2) Fixation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 62(3): 986–993.
- MOSEMAN S M, ZHANG RUI, QIAN PEIYUAN, et al, 2009. Diversity and functional responses of nitrogen-fixing microbes to three wetland invasions[J]. Biological Invasions, 11(2): 225–239.
- MUKHERJEE P, MITRA A, ROY M, 2019. *Halomonas* rhizobacteria of *Avicennia marina* of Indian Sundarbans promote rice growth under saline and heavy metal stresses through exopolysaccharide production[J]. Frontiers in Microbiology, 10: 1207.
- NIE SHIQING, ZHANG ZUFAN, MO SHUMING, et al, 2021. *Desulfobacteriales* stimulates nitrate reduction in the mangrove ecosystem of a subtropical gulf[J]. Science of The Total Environment, 769: 144562.
- PAHARI A, NAYAK S K, BANIK A, et al, 2021. Biological nitrogen fixation mechanism and applications[C]//B. B. MISHRA, S. K. NAYAK, A. PAHARI. Agriculturally Important Microorganisms. 202110. 1201/9781003245841-7.
- PELEGRAÍ S P, RIVERA-MONROY V H, TWILLEY R R, 1997. A comparison of nitrogen fixation (acetylene reduction) among three species of mangrove litter, sediments, and pneumatophores in south Florida, USA[J]. Hydrobiologia, 356(1–3): 73–79.
- PELEGRAÍ S P, TWILLEY R R, 1998. Heterotrophic nitrogen fixation (acetylene reduction) during leaf-litter decomposition of two mangrove species from South Florida, USA[J]. Marine Biology, 131(1): 53–61.
- PURVAJA R, RAMESH R, RAY A K, et al, 2008. Nitrogen cycling: A review of the processes, transformations and fluxes in coastal ecosystems[J]. Current Science, 94(11): 1419–1438.
- RAMESHKUMAR N, FUKUI Y, SAWABE T, et al, 2008. *Vibrio porteresiae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a mangrove-associated wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(Pt 7): 1608–1615.
- RAMESHKUMAR N, GOMEZ-GIL B, SPRÖER C, et al, 2011. *Vibrio plantisponsor* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a mangrove associated wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka)[J]. Systematic and Applied Microbiology, 34(7): 487–493.
- RAMESHKUMAR N, LANG E, NAIR S, 2010a. *Mangrovibacter plantisponsor* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a mangrove-associated wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(Pt 1): 179–186.
- RAMESHKUMAR N, NAIR S, 2009. Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from different mangrove rhizospheres[J]. FEMS Microbiology Ecology, 67(3): 455–467.
- RAMESHKUMAR N, SPROER C, LANG E, et al, 2010b. *Vibrio mangrovi* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from mangrove-associated wild rice (*Poteresia coarctata* Tateoka)[J]. FEMS Microbiology Letters, 307(1): 35–40.
- RAVIKUMAR S, GNANADESIGAN M, IGNATIAMMAL S T M, et al, 2012. Population dynamics of free living, nitrogen fixing bacteria *Azospirillum* in Manakkudi mangrove ecosystem, India[J]. Journal of Environmental Biology, 33(3): 597–602.
- RAVIKUMAR S, KATHIRESAN K, IGNATIAMMAL S T M, et al, 2004. Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 312(1): 5–17.
- ROJAS A, HOLGUIN G, GLICK B R, et al, 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere[J]. FEMS Microbiology Ecology, 35(2): 181–187.
- SEITZINGER S P, GARBER J H, 1987. Nitrogen fixation and ¹⁵N₂ calibration of the acetylene reduction assay in coastal marine sediments[J]. Marine Ecology-Progress Series, 37(3): 65–73.
- SHAKILABANU S, KANCHANA D, JAYANTHI M, 2012. Biodiversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in mangrove ecosystem: A review[J]. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive, 3(3): 418–422.
- SHIAU Y-J, LIN MING-FEN, TAN CHEN-CHUNG, et al, 2017.

- Assessing N_2 fixation in estuarine mangrove soils[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 189: 84–89.
- SHIAU Y-J, LIN YU-TE, YAM R S W, et al, 2021. Composition and activity of N_2 -fixing microorganisms in mangrove forest soils[J]. Forests, 12(7): 822.
- SHRIDHAR B S, 2012. Review: nitrogen fixing microorganisms[J]. International Journal of Microbiological Research, 3(1): 46–52.
- SINGH T, BHADURY P, 2019. Description of a new marine planktonic cyanobacterial species *Synechococcus moorigangaii* (Order *Chroococcales*) from Sundarbans mangrove ecosystem[J]. Phytotaxa, 393(3): 263–277.
- STEWART W D, FITZGERALD G P, BURRIS R H, 1967. In situ studies on N_2 fixation using the acetylene reduction technique[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 58(5): 2071–2078.
- SUN XINLI, XU ZHIHUI, XIE JIYU, et al, 2022. *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions[J]. The ISME Journal, 16(3): 774–787.
- THOMPSON A W, FOSTER R A, KRUPKE A, et al, 2012. Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga[J]. Science, 337(6101): 1546–1550.
- TRINDADE-SILVA A E, MACHADO-FERREIRA E, SENRA M V X, et al, 2009. Physiological traits of the symbiotic bacterium *Teredinibacter turnerae* isolated from the mangrove shipworm *Neoteredo reynei*[J]. Genetics and Molecular Biology, 32(3): 572–581.
- VOVIDES A G, BASHAN Y, LÓPEZ-PORTILLO J A, et al, 2011. Nitrogen fixation in preserved, reforested, naturally regenerated and impaired mangroves as an indicator of functional restoration in mangroves in an arid region of Mexico[J]. Restoration Ecology, 19(201): 236–244.
- XIAN WEN-DONG, SALAM N, LI MENG-MENG, et al, 2020. Network-directed efficient isolation of previously uncultivated *Chloroflexi* and related bacteria in hot spring microbial mats[J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 6(1): 20.
- XIONG YANMEI, ZHANG XIAOJUN, HE XUEXIANG, et al, 2016. Species-specific effects of P-solubilizing and N_2 -fixing bacteria on seedling growth of three salt-tolerant trees[J]. Russian Journal of Ecology, 47(3): 259–265.
- YU HUANG, LIU XINGYU, YANG CHAO, et al, 2021. Co-symbiosis of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and diazotrophs promote biological nitrogen fixation in mangrove ecosystems[J]. Soil Biology and Biochemistry, 161: 108382.
- ZEHR J P, CAPONE D G, 2020. Changing perspectives in marine nitrogen fixation[J]. Science, 368(6492): eaay9514.
- ZHANG JINGYING, LIU YONGXIN, GUO XIAOXUAN, et al, 2021. High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota[J]. Nature Protocols, 16(2): 988–1012.
- ZHANG YANYING, DONG JUNDE, YANG ZHIHAO, et al, 2008. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria in mangrove sediments assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Archives of Microbiology, 190(1): 19–28.
- ZHANG YANYING, YANG QINSONG, LING JUAN, et al, 2017. Diversity and structure of diazotrophic communities in mangrove rhizosphere, revealed by high-throughput sequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 8: 2032.
- ZUBERER D A, SILVER W S, 1978. Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) associated with Florida mangroves[J]. Applied and Environmental Microbiology, 35(3): 567–575.