

非共生生物固氮微生物分子生态学研究进展

徐鹏霞^{1,2} 韩丽丽^{2,3} 贺纪正^{2,3} 罗 锋¹ 张丽梅^{2,3*}

(¹西南大学资源环境学院, 重庆 400716; ²中国科学院生态环境研究中心城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085; ³中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要 氮是限制生态系统生产力的主要元素,生物固氮是自然生态系统中氮的主要来源。生物固氮包括共生、联合和自生固氮3种类型,其中联合固氮和自生固氮统称为非共生固氮。相对于共生固氮而言,非共生固氮速率虽然较低,但其不需要与其他生物形成共生体系就可以生存并进行固氮,在时空分布上更加广泛,因此对生态系统氮循环特别是素输入具有重要贡献。本文对近年有关非共生固氮微生物的多样性、土壤和叶际固氮微生物的分布特征及影响因素等研究进展进行了综述,并在此基础上阐述了现有研究中存在的问题和发展前景。

关键词 联合固氮菌; 自生固氮菌; 土壤; 叶际

Research advance on molecular ecology of asymbiotic nitrogen fixation microbes. XU Peng-xia^{1,2}, HAN Li-li^{2,3}, HE Ji-zheng^{2,3}, LUO Feng¹, ZHANG Li-mei^{2,3*} (¹College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China; ²State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; ³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China).

Abstract: Nitrogen is the main limiting factor in the productivity of ecological system, and biological nitrogen fixation is the main nitrogen source in the natural ecosystem. Biological nitrogen fixation includes 3 types: symbiotic, associate and free-living nitrogen fixation. Associate and free-living nitrogen fixations are collectively called asymbiotic nitrogen fixation. Compared with symbiotic system, asymbiotic nitrogen fixation rate is lower, but asymbiotic nitrogen fixation microorganisms can survive and fix nitrogen without forming symbiotic structure with plants, therefore play an important role in nitrogen cycling, especially nitrogen input in ecosystems, due to their wide distribution and high adaptability to different environments. In this review, we mainly introduced the research progress of asymbiotic nitrogen fixation microorganisms in terms of diversity, distribution characteristics, the factors influencing asymbiotic nitrogen fixation efficiencies in soils and phyllosphere, and also highlighted the existing problems and future perspectives in this research field.

Key words: associate nitrogen-fixing bacteria; free-living nitrogen-fixing bacteria; soil; phyllosphere.

生物固氮是自然生态系统中氮的主要来源,陆地生态系统中通过生物固氮输入的氮约 $110 \text{ Tg} \cdot \text{a}^{-1}$,对全球生态系统氮素循环平衡起着关键作用。根据微生物与植物之间的关系,可将生物固氮分为共生、联合和自生固氮3种类型,其中联合固氮和

自生固氮统称为非共生固氮。共生固氮指固氮微生物在与高等植物或其他生物共生时才能进行固氮,如根瘤菌与豆科的共生固氮。联合固氮指微生物生活在植物根际、叶面或动物肠道等处进行固氮,与植物有密切关系,但不与宿主形成特异分化结构的固氮形式^[1]。自生固氮指固氮微生物对植物没有依存关系,能独立进行固氮,如圆褐固氮菌、蓝藻等^[2]。相比于共生固氮,非共生固氮速率虽然较低(表1),但其在时空分布上更加广泛,在不施肥、没有或豆科植物很少的系统中,非共生固氮可能是氮素的主要来源^[3]。如在许多热带森林中,尤其在缺乏大量共生固

本文由中国科学院战略先导专项 B(XDB15020200)和国家自然科学基金项目(41322007)资助 This work was supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences B(XDB15020200) and the National Natural Science Foundation of China(41322007)。

2017-01-16 Received, 2017-06-24 Accepted.

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhanglm@rcees.ac.cn

表 1 不同生态系统生物固氮率估算
Table 1 Estimates of N₂ fixation rate in different ecosystems (kg N · hm⁻² · a⁻¹)

环境 Environment	非共生固氮 Asymbiotic N ₂ fixation rate	共生固氮 Symbiotic N ₂ fixation rate	自生固氮 Free-living N ₂ fixation rate	联合固氮 Associate N ₂ fixation rate	文献 Reference
玉米/水稻/小麦(全球平均) Maize/ rice/ wheat (global average)	13/22/13				[4]
长期种植小麦不施氮肥(澳大利亚) Long-term planting wheat with no nitrogen fertilizer (Australia)	20				[5]
谷类作物(澳大利亚) Cereal crop (Australia)	<10				[6]
豆科作物(豌豆、鹰嘴豆、大豆、苜蓿) Legume crop (pea, chickpea, soybean, clover)		20~230			[2]
内生菌-甘蔗 Endophyte-sugarcane				25	[2]
温带草地 Temperate grassland	0.1~21	0.1~10			[7]
潮湿的冻原和高山冻原 Moist tundra and alpine tundra	0.4~3.0	1.0~4.9			[7]
热带草原 Tropical savanna	3~30	3~90			[7]
热带常绿森林 Tropical evergreen forest	0.1~60	5.5~16			[8]
温带森林 Temperate forest	0.01~12	1~160			[9]
热带河漫滩 Tropical floodplain	4.1~12	14~28.5			[7]
热带落叶森林 Tropical deciduous forest	3.3	7.5~30			[7]
地中海灌木林 Mediterranean shrubland	1.0	0.1~10			[7]
热带土壤 Tropical soil	0~36				[10]
洛桑试验站 Rothamstead research station	30				[11]
沙漠 Desert	0.01~13				[12]
木本类(刺槐、皂荚、银合欢等) Trees (Acacia, Gliricidia, Leucaena, Sesbanis, etc.)		50~300			[2]
赤杨 Alder		50~300			[2]
木麻黄 Casuarina		75			[2]
鼠李 Ceanothus		10~100			[2]
土壤、腐烂木材落叶、生物结皮 Soil, decaying wood and litter, biological soil crusts			1~10		[2]
红萍-蓝藻 Azolla-cyanobacteria				33	[2]

氮植物的森林中,自生固氮对于满足植物的高氮需求和平衡氮素损失极其重要^[4].此外,联合固氮菌通过聚集在根表或经根部伤口定殖到根内,从宿主获得的根际分泌有机物作为碳源和能源,并将其固定的氮和分泌的生物活性物质供给植物利用,在禾本科植物(包括草类和谷类) 占优势的生态系统中起着重要作用^[7].

除土壤中的微生物外,叶际承载着地球上最大的生物表面积(约超过 108 km²[13]), 栖居着大量微生物,这些叶际微生物对氮素固定起着重要贡献,尤

其在湿热地带森林生态系统中,叶际微生物固氮是氮素输入的重要来源^[14].

除提供氮素外,非共生固氮菌还可以通过分泌生长激素、促进溶磷和秸秆降解、增强抗病性和抗逆境等间接促进植物生长^[15].但目前对于其多样性、作用机理和影响因素等的认识远远落后于共生固氮微生物^[15].本文对非共生固氮微生物的种类、多样性、分布特征及影响固氮效率的因素等进行了总结论述;并着重介绍了叶际非共生固氮菌的种类、分布特征、影响因素及添加应用效果;同时对目前存在的

问题及发展趋势进行了展望,以期引起人们对非共生固氮研究和应用的重视.

1 土壤非共生固氮微生物的多样性及其分布

自 1893 年 Sergei Winogradsky 从土壤中分离到第一株自生固氮菌-厌氧的巴斯德菌(*Pasteurella*)和 1901 年 Beijerinck 分离到好气性固氮菌——圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)至今^[16],已发现多种自生固氮菌,分布于变形菌门(Proteobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)等.根据其需氧的需求可分为:需氧性、厌氧性和兼性厌氧固氮菌.需氧性固氮菌包括固氮菌属(*Azotobacter*)、拜氏固氮菌属(*Azotobacterbeijerinckii*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、螺菌科(Spirillaceae)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等;厌氧性固氮菌包括梭菌属(*Clostridium*)、脱硫肠状杆菌属(*Desulfotomaculum*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、红螺菌属(*Rhodospirillum*)、红硫菌属(*Chromatium*)等;兼性厌氧固氮细菌包括克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)等.

联合固氮菌的发现始于 1958 年,巴西学者 Döbereiner 首次从甘蔗根际分离到固氮细菌拜叶林克氏菌(*Beijerinckia fluminensis*)^[17-18],并证明了禾本科植物也具有生物固氮潜能.1975 年 Döbereiner 再次从甘蔗组织中分离得到与其联合共生的固氮菌,命名为巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*),并提出根际联合固氮的概念^[17-18].1976 年 Döbereiner 等^[1]在禾本科植物点状雀稗的根部发现雀稗固氮菌(*Azotobacter paspali*),之后又从小麦、玉米、高粱等禾本科植物中相继分离出巴西固氮螺菌属(*Azospirillum*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、产碱菌(*Alcaligenes*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)等联合固氮菌,分属于 α 、 β 、 γ 变形菌纲.

基于纯培养方法分离和鉴定固氮菌不仅费时费力,且土壤中只有约 1% 的微生物能在实验室进行培养,很多固氮菌甚至优势菌群不能被有效分离^[19],以固氮酶基因为靶的分子生态学研究较好地弥补了培养方法的缺陷,提供更加完整的群落组成和多样性信息^[20].固氮酶包含 3 种同工酶,根据活性中心的金属原子不同分为:钼铁(酶的标准形式)、钒铁和铁铁固氮酶(可替代固氮酶),其中行使固氮功能的关键酶是钼铁固氮酶^[21].编码钼铁固氮酶多肽的基因包括 *nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifB*、*nifE*、*nifN*、

nifX、*nifU*、*nifS*、*nifV*、*nifW*、*nifZ*,其中 *nifH* 是编码铁蛋白组分的基因且高度保守,在固氮微生物中都能检测到,因此常作为固氮菌的分子标记基因.Shu 等^[22]通过 qPCR 结合 DGGE 技术研究发现,许多土壤系统中的优势固氮菌为未培养菌.Zhang 等^[23]也发现,*nifH* 基因克隆测序得到的 54% 序列与数据库中已知固氮菌的序列相似性小于 70%,可能代表固氮群落中新的种属.更多通过免培养方法研究检测到的含 *nifH* 基因的固氮菌具有高度多样性,包含了变形菌门(Proteobacteria)中的 α 、 β 、 γ 和 δ 纲、厚壁菌门(Firmicutes)、螺旋体门(Spirochaetes)、蓝细菌(Cyanobacteria)等(图 1)^[24].其中, α 变形菌纲中的固氮菌主要分布于根瘤菌目(Rhizobiales), β 变形菌纲中的固氮菌主要分布于红环菌目(Rhodocyclales),蓝藻主要分布于念珠藻目(Nostocales).

2 非共生固氮微生物在土壤中的分布特征及影响因素

2.1 非共生固氮微生物在土壤中的分布特征

非共生固氮微生物在农业、森林和草地土壤等生态系统中分布广泛,且群落结构和固氮活性受营养元素、pH、气候因子、农业管理措施等因素的影响.不同土壤条件下固氮微生物的组成和特征明显不同(表 2),但无论农业、草地还是森林土壤,变形菌门都是固氮菌群落的优势类群,并以 α 变形菌为主.

2.2 影响土壤非共生固氮微生物和固氮效率的因素

非共生固氮微生物是固定大气氮素的重要贡献者,其固氮效率受土壤中氮素水平、碳源可利用性、矿质养分、土壤水分和温度等多种土壤和环境因子的综合影响.

2.2.1 氮素水平 施肥对固氮微生物群落多样性和结构有显著的影响,目前普遍认为,高氮水平会降低生态系统对非共生固氮菌的依赖性,抑制固氮效果.如 Silva 等^[25]发现,增加铵态氮和硝态氮会降低荷兰地区不同质地的农耕土壤中 *nifH* 基因的拷贝数.在澳大利亚放牧林地土壤中,固氮酶活性和 *nifH* 基因丰度与总氮量呈负相关^[7].在巴西种植高粱的土壤中,非共生固氮菌的丰度在低氮水平下比高氮水平下高 30%^[26].对长江三角洲平原典型水稻土壤研究也发现,固氮微生物的丰度和群落结构与速效 N 含量呈负相关,氮肥会抑制固氮微生物的生长,显著降低水田 α 变形菌纲固氮微生物的相对丰度^[27].

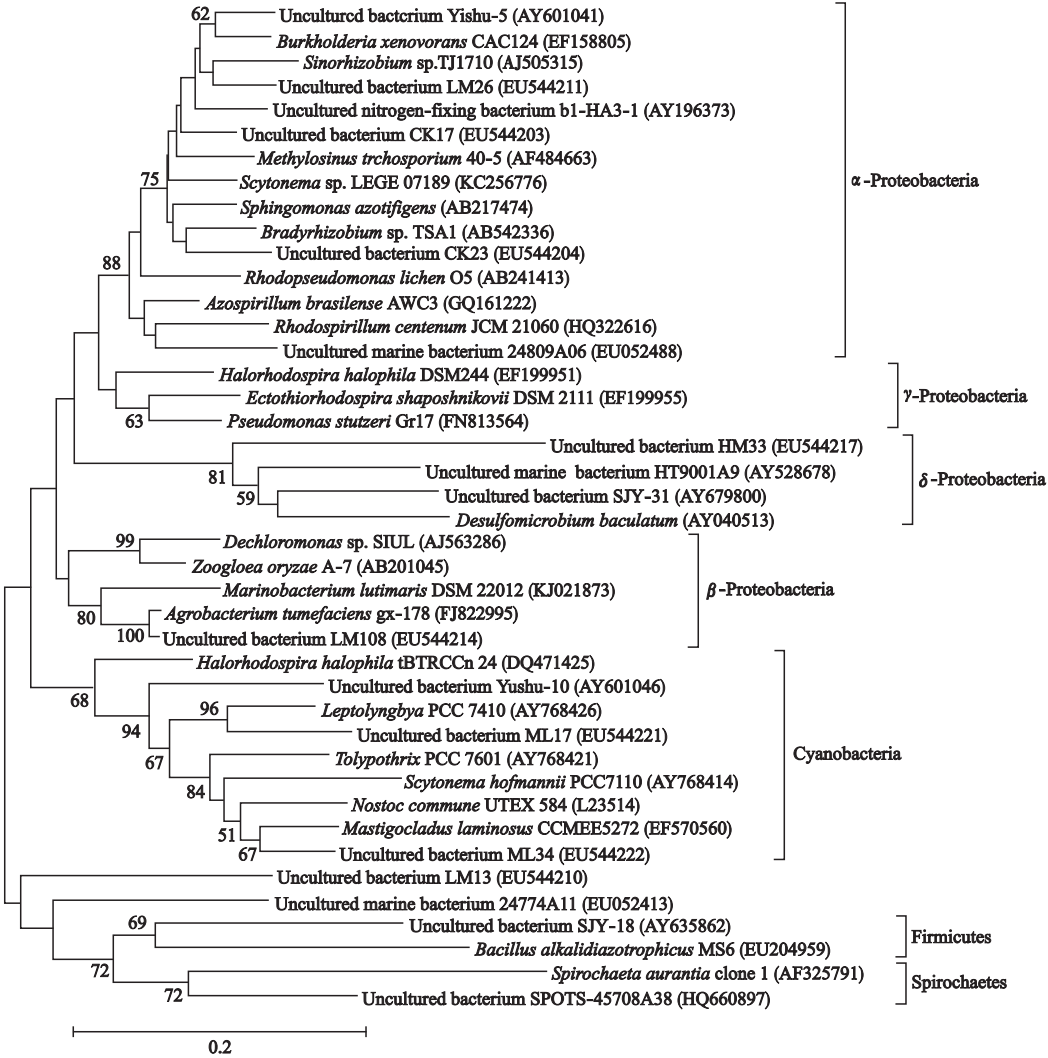


图 1 基于 *nifH* 基因的固氮微生物系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of nitrogen fixing microbiology based on *nifH* gene sequences^[23, 28-29].

尽管大部分研究报道,施加氮肥抑制固氮微生物活性并降低固氮效率,但仍有部分研究有不同的结论.如 Coelho 等^[26]发现,高水平氮肥仅降低根际固氮,而对非根际固氮作用无影响.Wang 等^[20]对江苏常熟水稻小麦长期轮作试验地调查发现,铵态氮对固氮菌群落结构具有显著影响,总氮和硝态氮含量与群落结构无显著相关关系.Wakelin 等^[30]发现,在澳大利亚新南威尔士州种植玉米的农业系统中添加氮肥仅提高了硝态氮,对非共生固氮并无影响.

不同研究获得不一致结论的原因,可能在于施肥对土壤特性产生多种次生效果,即施肥后引起土壤碳、pH、可利用氮等的改变,其他因素如作物、土壤湿度、土地利用方式和土壤类型等不同也会导致肥料对固氮菌群落影响效果的不一致^[20].如 Orr 等^[31]发现,轮作对 *nifH* 基因的影响超过施肥管理,

轮作通过改变根系分泌物从而影响微生物群落.Izumi 等^[32]也发现,固氮微生物多样性在非豆科植物参与轮作的土壤中比单一种植豆科植物高,这是由于非豆科植物可有效利用并消耗土壤中的矿质氮,维持低氮水平从而为固氮菌提供适宜的低氮环境.

2.2.2 碳源可利用性 生物固氮是一个耗能还原过程(打破 $N \equiv N$),因此更偏爱以还原态碳作为能量源的基质,添加秸秆、凋落叶、粗木质残体或根系分泌物等可提高固氮速率^[7].

对澳大利亚放牧林地和农业土壤的研究发现,固氮酶活性和 *nifH* 基因丰度与有效态 C 含量呈正相关^[7],提高谷类作物种植密度,秸秆覆盖和保护耕作均能提高非共生固氮速率^[6].有机农业措施如秸秆还田也显著促进 *nifH* 基因的丰度^[33].Wakelin 等^[30]也发现,向澳大利亚种植玉米的农田中添加秸

表 2 不同土壤系统中非共生固氮微生物的组成和分布
Table 2 Community composition of asymbiotic nitrogen fixation microbes under different soil conditions

土壤类型 Soil type	地点 Location	组成 Composition	附加信息 Supplemental information	文献 Reference
休耕 30 余年的土壤 Soil fallow for more than 30 years	美国伊萨卡岛	根瘤菌目红游动菌属、未知的 β 变形菌、放线菌门	检测到未知的可能代表变形菌门中新固氮菌,首次证明放线菌门中除放线菌目外其他固氮菌的存在	[34]
种植玉米的红壤 Red soil growing corn	江西鹰潭	α 、 β 、 γ 变形菌,厚壁菌门,蓝藻门,疣微菌门,伯克氏菌属等	蓝藻门是红壤中的主要固氮菌	[35]
土豆-非豆科作物轮作 Soil with potato and non-leguminous crop rotation	荷兰沙质土、粘壤土	α 、 β 、 γ 、 δ 变形菌,厚壁菌门	固氮菌群落组成在不同土壤质地或同种质地不同地点均不同,且随时间变化,变化程度约 60%	[25]
崇明岛水稻土 Paddy soil in Chongming Island	上海	丰度由高到低依次为 α 变形菌、 β 变形菌、 γ 变形菌;主要目类为根瘤菌目、假单胞菌目、着色菌目、红环菌目	没有检测到蓝藻和厚壁菌门中的固氮菌,可能由于引物的局限性所致	[22]
草地土壤 Grassland soil	内蒙古呼伦贝尔	大部分属于 α 变形菌,慢生根瘤菌属是主导菌群		[36]
草原和森林土壤 Grassland and forest soil	青海三江源保护区	一些属于变形菌门的 α 、 β 、 γ 、 δ 亚群,大多为未培养菌类群		[23]
温带杨树、松树林土壤,沼泽地 Temperate poplars and pine forests soils, swamps	美国	主要为地杆菌属,其次为 α 变形菌		[37]
森林酸性土壤 Acid forest soil	德国科隆	变形菌门占优势		[38]
毛竹林土壤 <i>Phyllostachys heterocycla</i> forest soil	浙江省遂昌县	得到的序列与 GenBank 中不可培养的固氮菌 <i>nifH</i> 基因片段具有高度相似度,且与 α 变形菌的慢生根瘤菌具有较近的亲缘关系		[39]
包括从苔原到热带的 20 种生态系统 20 ecosystem types across tundra to tropic	美国(阿拉斯加、夏威夷、犹他州、佛罗里达州)	90% 以上的固氮菌属于变形菌门,其次为蓝藻,固氮螺菌属在 4 个地点的丰度都超过 22%	宏基因组学分析表明,12.7% 的 <i>nifH</i> 基因序列出现移码突变,80% 的 <i>nifH</i> 基因序列与已知序列的一致性高于 95%,说明水平基因转移使这些区域氨基酸序列多样性受到了限制	[40]
天山冰川 Tianshan glacier	新疆	α 、 β 、 γ -变形菌,蓝藻,厚壁菌门,疣微菌门及未培养菌	蓝藻是优势种群,且相对丰度随土壤年龄系列增加	[41]

秆提高总碳、有机碳、总氮,降低硝态氮,对铵态氮无影响,并使非共生固氮菌丰度增加一倍.侯海军等^[27]对水稻田的研究也发现,固氮微生物的丰度和群落结构与有机质呈正相关,稻草还田使 *nifH* 基因丰度较常规施肥增加 53%;玉米秸秆还田较焚烧显著增加 *nifH* 基因的丰度,且使全氮含量提高 10 倍.

除外加碳源外,根际效应包括根系分泌物、土壤矿质养分水平和根际微生物呼吸增加引起的氧气浓度下降也是影响固氮微生物的重要因素,其中根系分泌物的影响更为重要^[22].增加人工制备的根系分泌物可以促进非共生固氮^[42].水稻根际固氮微生物占根表总微生物区系的 76%,离根系越远所占比例越小;不同种类的作物或同种作物的不同生长阶段,

根系分泌物的种类和数量均存在差异,这种差异直接影响着根际微生物(包括固氮菌)的种类、数量、生物活性及丰度^[43].

Shaffer 等^[44]发现,伐木通过降低碳输入显著降低固氮微生物多样性、固氮酶活性和氮贡献量,在伐木林地氮平衡受到破坏,虽然施肥短期内在一定程度上恢复了其平衡,但是会增加环境治理的成本.类似地,草地系统中增加割草(不移除)频次可提高非共生固氮效率,这可能由于落叶可以提高根际碳沉积从而为微生物提供有效碳,同时也提高了生物呼吸从而降低细胞周围氧浓度,使其更有利于固氮过程的发生^[7].Keuter 等^[42]也发现,向德国温带草地短期内施肥对非共生固氮没有影响,而每年 3 次的

割草频率对非共生固氮效率的提高幅度大于每年 1 次。

Wang 等^[20]发现,土壤深度、取样时间和施肥制度对固氮菌群落结构都有重要影响,但土壤深度是最主要的影响因素,*nifH* 基因丰度随着土壤深度增加而降低,这可能是由于有机碳等碳源不易淋失到深层土壤所致。同样地,Reardon 等^[45]发现,*nifH* 基因丰度随土层深度变化,10~20 cm 层的丰度小于上层。总体来说,非共生固氮主要发生在高碳/氮比的有机质层,表层的固氮微生物群落与亚表层土壤中显著不同,且比亚表层具有更高的多样性^[23,46]。

2.2.3 其他矿质元素 钾是固氮微生物重要的营养元素,钾缺乏会抑制固氮酶活性^[47]。此外,在钾不足的情况下,添加钾可以提高植物的生产力,从而通过增加根系分泌物提高对固氮微生物的碳供应,并在短时间内改变环境中的渗透压来影响非共生固氮过程^[47]。已有研究发现,种植甘蔗的土壤中生物固氮依赖于钾和微量元素特别是铝的有效性^[48]。

钼是固氮酶的关键蛋白质组分——铁钼蛋白的中心元素,其有效性是固氮酶活的重要驱动因素。在高度风化的土壤中钼容易淋失或被有机物质络合以及被铁氧化物吸附,增加的 CO₂ 浓度也会降低土壤中钼的有效性,从而导致土壤钼限制普遍存在从而影响固氮作用^[49]。此外,细胞生长和 ATP 合成都需要大量磷元素,因此磷的有效性同样影响生物固氮过程^[50]。如 Reed 等^[51]在美国科罗拉多州的研究发现,添加磷肥可使草地固氮量至少提高 2 倍。然而,Pérez 等^[52]在智利奇洛埃岛温带雨林的研究却发现,磷不是限制林冠落叶固氮活性的主要因素,向落叶中添加磷对固氮活性并无影响。Barron 等^[46]也发现,在巴拿马科罗拉多岛热带森林土壤中,单独磷缺乏不能限制固氮,但单独钼缺乏则有明显的限制作用,因此他们认为,钼的有效性对热带森林的非共生生物固氮具有正向效应。Wurzbarger 等^[53]也得到相同的结论,磷充足的热带森林土壤中,钼可以限制非共生固氮,仅磷缺乏并不能起限制作用。

碳、氮、磷等元素除单独影响外,碳/氮和碳、氮的动态平衡也直接影响土壤中固氮菌的组成和分布^[48]。有研究发现,智利温带雨林土壤中固氮酶活性和 *nifH* 基因丰度与碳/氮呈正相关^[7],且此研究区内木质素含量较高的落叶(高碳/氮)中,非共生固氮菌较其他菌更有竞争优势,碳/氮较低的混合落叶中的固氮速率低于这些高碳/氮的单种落叶^[52]。然而,在上海崇明岛氮投入较多的农业系统中,*nifH*

基因的丰度与氮、碳含量呈正相关,与碳/氮呈负相关;在有机农业栽培管理下,水稻田中碳/氮逐渐下降,总碳、氮含量逐渐升高且高于常规管理,固氮菌丰度持续增加^[22]。此外,虽然磷和钾对固氮有促进作用,但有研究发现,施加 NPK 复合肥会降低非共生固氮,只有低氮时才能促进固氮;在高氮条件下,提高磷含量并不能提高非共生固氮,氮、磷产生相反的效应,磷产生的促进作用被氮产生的抑制作用抵消了^[54]。

2.2.4 土壤水分和温度等 固氮酶对氧高度敏感,氧的存在可使大多数固氮菌的固氮酶不可逆失活,土壤水分通过调节微环境中氧的水平而影响着非共生固氮的效率。对加拿大草地系统的研究发现,高水分通过降低土壤的通气性从而减少对固氮酶活性的抑制,最高的固氮速率出现在水分饱和时^[7,42]。Wei 等^[55]对加拿大不列颠哥伦比亚森林系统的研究也发现,水分是影响森林木质残体土壤固氮活性的最重要因素。在瑞典北部自然森林中,水分也是非共生固氮的驱动因素,相对于凋落物的添加,灌溉处理对固氮作用的影响更加明显^[56]。极端干旱能够降低森林的固氮能力,灌溉则可以提高固氮能力;老龄林土壤固氮菌群落结构对于水分变化的敏感性及固氮速率均高于幼龄林^[57]。但 Burgoyne 等^[58]发现,春季解冻带来的高水分厌氧条件会降低固氮速率,因而 5 月(高水分)土壤的固氮速率小于 8 月。

除水分外,温度也是影响固氮群落的最重要环境因子之一^[59]。英国东北部农田中最适宜固氮菌生长和活性的温度是 10~25 ℃(6—9 月),田间 3 月温度约为 4.5 ℃会抑制固氮活性,甚至到 6 月还难以恢复^[8]。肥力相关的因素影响固氮微生物的群落,但不同的取样时期影响因素不同^[60],且取样时期对 *nifH* 基因丰度的影响大于施肥制度^[20]。同一生长季中固氮菌的动态差异可能是由不同时期的有效氮^[10]、铵态氮、温度和植物生长等引起的^[20]。

其他环境因素如海拔、土壤理化特性等也会影响固氮菌的活性和群落。如青藏高原不同海拔下,非共生固氮菌群落组成差异较大,采样地点越近,土壤理化性质越相近,固氮菌群落也越相似^[23]。多数研究表明,pH 是驱动土壤细菌、真菌和古菌群落组成的主要因子^[61],同样,pH 也是影响土壤非共生固氮菌的重要参数,pH(4.4~7.4)越高 *nifH* 基因丰度越高^[25],提高土壤 pH(3.71~5.61)会增加 *nifH* 基因丰度^[62]。在荷兰马铃薯种植区,pH(4.1~7.7)与固氮菌丰度呈正相关,并可解释固氮群落变异量的

20.7%^[60].

综上所述,土壤中碳、氮、磷的可利用性,以及钾、钼等营养元素和水分、温度等环境条件共同影响着非共生固氮微生物群落结构、基因丰度及其固氮效率,不同农业管理包括施肥、还田、轮作等通过影响营养元素的可利用性和比例以及 pH、水分等对非共生固氮有着重要的调控作用.

3 叶际固氮微生物的多样性及其对氮的贡献

早在 18 世纪,人们就认识到叶面存在微生物,但那一时期对叶际研究的兴趣主要集中在植物致病菌上,对非致病菌研究甚少^[63]. 1956 年, Ruinen^[64]首次从印度尼西亚热带潮湿地区的植物叶际分离出固氮拜叶林克氏菌,并提出叶际固氮菌可为生长在贫瘠土壤上的植物提供丰富的氮素来源,此后众多学者纷纷致力于叶际微生物的研究. 1981 年, Blackman^[65]首次提出叶际微生物的概念,将其定义为附生或寄生于植物叶表面生境(即叶面)的微生物. 而 Lindow 提出,叶、茎、花、果等都是植物的地上有效部分,其环境条件一致,由其组成的生境统称为叶际,生存在其表面和内部的微生物,都被称为叶际微生物^[66-67].

叶际环境对于微生物非常严苛,如可利用营养较少、昼夜温差大、湿度波动大、紫外线较强等. 即使在如此恶劣的条件下,叶际承载着地球上最大的生物表面积约超过 10^8 km^2 ^[13,63],寄居着细菌、真菌、酵母和原生动物等,其中细菌丰度最高可达 $10^6 \sim 10^7 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-2}$ ^[68]. 另有保守估计,全球叶际寄居着至少 10^{26} 个细菌^[63]. 通过分子生物学方法也发现,叶际寄居的微生物多样性虽比土壤或海洋环境低,但与人类消化道相似^[69]. 这些数量庞大的叶际微生物可对宿主产生抑制作用如导致植物病害^[69],或产生促进作用如抵御病害、改变宿主微环境及固氮等功能,对植物生长或生态系统生产力都具有极其重要的作用. 就固氮而言,叶际对生态系统氮素输入有重要的贡献. 1984 年, Bentley^[70]通过同位素示踪试验发现,叶附生生物可为其宿主提供 10% ~ 25% 的氮源. Wanek^[71]同样发现,叶附生固氮微生物是哥斯达黎加热带雨林中有效氮的重要来源. Abril 等^[72]发现,在湿热带生态系统中叶际固氮是最主要的氮输入机制. 但目前对其研究还远落后于对根际微生物的研究.

叶际固氮微生物主要为细菌,也包含一部分古菌,目前已分离出的固氮菌包括固氮菌属 (*Azotobac-*

ter)、螺菌属 (*Spirillum*)、固氮单胞菌属 (*Azotomonas*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*)、眉藻属 (*Calothrix*)、念珠藻属 (*Nostoc*) 和伪枝藻属 (*Scytonema*) 等^[73]. 利用免培养分子生物学技术研究也发现,叶际 *nifH* 基因序列具有高度多样性,拿马草属和闭鞘姜属叶际主要的固氮菌是蓝藻念珠藻属 (*Nostoc* spp.)、单歧藻属 (*Tolypothrix*)、侧生藻属 (*Fischerella* spp.) 等,锦葵科植物的叶际除蓝藻外,主要为 γ 变形菌^[14].

4 影响叶际微生物分布和固氮的因素

与土壤环境相比,叶际生态系统相对简单,碳水化合物丰富而有效态氮含量相对较低,这种高碳/氮的条件更有利于固氮微生物的活性表达,因而叶际固氮作用广泛存在,在热带、亚热带、温带,甚至寒冷地带的植物叶面都有固氮菌的分布. 但植物叶片的营养成分如磷浓度和碳/氮在很大程度上影响着非共生固氮作用的速率^[74]. 如低浓度磷会抑制叶际 *nifH* 基因的表达,进而影响固氮速率^[75];增加氮肥(如 $26.25 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 氮素时)同样可使水稻叶际固氮酶活性降低 40%^[73]. 拜叶林克氏菌是叶际主要的固氮菌,有研究发现,叶片浸出液中碳/氮大于 10 才具有固氮活性,但也有研究表明,碳/氮低于 10 时,叶际仍然具有较高的固氮活性^[67].

叶际环境特殊的物理状态条件如温度、湿度、光照、大气氧的变化等对固氮微生物都有直接或间接的影响^[73],也使得其与周围土壤中的微生物群落组成明显不同^[13]. Freiberg^[76]发现,即便微气候发生极小变化,尤其湿度变化,也会影响叶际微生物的群落结构. 干旱处理(尤其夏季)会提高叶附生微生物群落丰度,这与干旱引起的叶面碳/氮增高有很大关系^[13]. 增加热带雨林的光照水平能够提高冠层叶片的非共生固氮^[74]. 此外,在森林生态系统中,叶际的物理和营养条件存在高变异,使得其中的附生生物在近距离的同种植物之间短期或同一生长期也会出现很大不同. 即便相同叶龄叶片上的微生物群落结构也不同,但叶际固氮微生物的群落结构总体受季节和干旱的共同影响,季节变化包含了由光照、温度、湿度以及叶际提供给固氮微生物的基质等驱动的影响^[7,13]. 另外,叶片生长发育通过改变叶际的物理状态从而影响微生物群落^[73],而固氮微生物群落及其固氮功能的发展又可提高植物对环境的适应能力^[13].

除叶片营养和环境因素外,植物种类对固氮微

生物群落也有一定影响,如在较大的生态系统尺度上,叶际中蓝藻主要受环境因素的驱动,而在局部尺度则主要受植物种类的影响^[77]。

综上所述,叶际的营养状况、物理状态包括温度、湿度、光照、大气氧浓度等条件,以及由生长季节和植物生长等引起的环境条件的变化和植物种类共同影响着叶际固氮微生物的种类及其固氮效率。

5 展 望

除人为施肥外,生物固氮是生态系统最主要的氮素来源。非共生固氮菌还可以通过分泌生长激素、促进溶磷、增强抗病性和抗逆境等间接促进植物生长^[15]。此外,非共生固氮菌还具有降解纤维素、半纤维素和木质素的能力,进而促进凋落物和秸秆降解,促进土壤培肥和氮素补充^[30]。面对目前长期大量使用化学肥料带来的土壤肥力下降、面源污染和温室气体排放增加等一系列负面影响,非共生固氮作用的研究和开发利用对农业可持续发展更具特殊的意义。而目前对非共生固氮微生物的研究整体较薄弱,以下几方面的研究有待加强:

1) 研究方法的局限性。关于固氮酶活性的测定有很多种方法,但不同的方法各有优缺点。例如,¹⁵N 同位素稀释法虽可以较精确地测定固氮酶活性,但主要运用在根瘤固氮体系中,对土壤、叶际或凋落物等自由固氮体系并不适用。且近期发现,一般实验室使用的¹⁵N₂含有杂质^[4]。乙炔还原法虽然操作简单^[78],但只能反映理想条件下固氮酶的最高活性,不能真实反映多变的自然环境中的实际固氮情况。此外,方法上的不统一,如不同的培养时间、培养条件(温室或野外)、转换比例(理想比例或实际比例)等,也会使不同系统的固氮量评估结果间缺乏可比性。另外,有关非共生固氮微生物的研究多集中在基于 DNA 水平的 *nifH* 基因丰度和多样性分布特征上,DNA 水平上检测到大量 *nifH* 基因的存在,并不代表 *nifH* 基因的转录表达^[8,32],不能真实反映固氮菌的活性。未来的研究需要更多地统一¹⁵N 同位素标记评价方法和基于 RNA 分析的方法来获得更加可靠的测量数据。

2) 调控和管理。对非共生固氮微生物的研究总体落后于共生固氮,由于缺乏像共生固氮体系那样的宿主保护,非共生固氮活性和效率更易受环境条件影响。如施用肥料(尤其氮肥)、不同农业管理措施等对非共生固氮微生物的影响及其调控机制还不明确。在未来的研究中,应该加强对陆地生态系统非共

生固氮过程的定量化分析,明确影响不同土壤类型或作物非共生固氮的主导因子和调控原理,在减少氮肥投入的同时通过优化施肥、耕作管理以及可能的调控措施,最大限度地发挥非共生固氮微生物的固氮潜能,为提高陆地生态系统生产力,减少化学氮肥投入提供可行方案。

3) 菌剂应用。非共生固氮菌剂很早以来一直作为重要的根际促生菌菌剂进行生产和使用,但存在大面积推广应用困难,包括菌种扩繁和接种困难、与土著微生物存在竞争、田间效果不稳定,以及我国微生物肥料目前没有严格可操作的执行标准导致市场上微生物肥料种类繁多、质量参差不齐、价格昂贵等问题,今后应在加强土壤非共生固氮的同时积极利用叶际固氮,开发适应性广、效率高的叶面固氮菌剂及应用技术等,以充分发挥非共生固氮的贡献。

参考文献

- [1] Döbereiner J, Day JM. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Pullman, WA: Washington State University Press, 1976: 518–538
- [2] Bottomley PJ, Myrold DD. Biological N inputs. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, 2014, **3**: 365–388
- [3] Rosen CJ, Allan DL. Exploring the benefits of organic nutrient sources for crop production and soil quality. *Horttechnology*, 2007, **17**: 422–430
- [4] Chalk PM, He JZ, Peoples MB, *et al.* ¹⁵N₂ as a tracer of biological N₂ fixation: A 75-year retrospective. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, **106**: 36–50
- [5] Gupta V, Roper MM, Roget DK. Potential for non-symbiotic N₂-fixation in different agroecological zones of southern Australia. *Soil Research*, 2006, **44**: 343–354
- [6] Unkovich M, Baldock J. Measurement of asymbiotic N₂ fixation in Australian agriculture. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, **40**: 2915–2921
- [7] Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 2011, **42**: 489–512
- [8] Orr CH, James A, Leifert C, *et al.* Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, **77**: 911–919
- [9] Pérez CA, Carmona MR, Armesto JJ. Non-symbiotic nitrogen fixation, net nitrogen mineralization and denitrification in evergreen forests of Chiloé Island, Chile: A comparison with other temperate forests. *Gayana Botánica*, 2003, **60**: 25–33
- [10] Kahindi JHP, Woomer P, George T, *et al.* Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function

- in the tropics: The role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*, 1997, **6**: 55–76
- [11] Jenkinson D. Organic matter and nitrogen in the soils of the Rothamstead classical experiments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1973, **24**: 1149–1150
- [12] Housman DC, Powers HH, Collins AD, *et al.* Carbon and nitrogen fixation differ between successional stages of biological soil crusts in the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments*, 2006, **66**: 620–634
- [13] Rico L, Ogaya R, Terradas J, *et al.* Community structures of N₂-fixing bacteria associated with the phyllosphere of a Holm oak forest and their response to drought. *Plant Biology*, 2014, **16**: 586–593
- [14] Furnkranz M, Wanek W, Richter A, *et al.* Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *The ISME Journal*, 2008, **2**: 561–570
- [15] Laskar F, Sharma GD, Deb B. Biodiversity of diazotrophs *Derxia* and *Beijerinckia* in the rhizospheric and non-rhizospheric soils of rice plant: A review. *Assam University Journal of Science and Technology*, 2010, **5**: 154–162
- [16] Zheng H-Y (郑贺云), Feng S (冯 姝), Li C (李超). Genetic diversity analysis of nitrogen-fixing bacteria in cotton soil of the south Xinjiang. *Microbiology China* (微生物学通报), 2010, **37**(4): 503–507 (in Chinese)
- [17] Baldani J, Caruso L, Baldani VL, *et al.* Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, **29**: 911–922
- [18] Zhang L-M (张丽梅), Fang P (方 萍), Zhu R-Q (朱日清). Recent advances in research and application of associated nitrogen-fixation with graminaceous plants. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2004, **15**(9): 1650–1654 (in Chinese)
- [19] Su J-J (苏进进), Zhang Y-Q (张玉琴), Sun Y (孙莹). Diversity of culturable and unculturable bacteria in soil samples from Hoh Xil, China. *Microbiology China* (微生物学通报), 2011, **38**(7): 1132–1139 (in Chinese)
- [20] Wang J, Zhang D, Zhang L, *et al.* Temporal variation of diazotrophic community abundance and structure in surface and subsoil under four fertilization regimes during a wheat growing season. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2016, **216**: 116–124
- [21] Yang J, Xie X, Wang X, *et al.* Reconstruction and minimal gene requirements for the alternative iron-only nitrogenase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, **111**: 3718–3725
- [22] Shu W, Pablo GP, Jun Y, *et al.* Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under different duration of organic management. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, **28**: 493–503
- [23] Zhang Y, Li D, Wang H, *et al.* Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan Plateau, China. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, **260**: 134–142
- [24] Gaby JC, Buckley DH. A global census of nitrogenase diversity. *Environmental Microbiology*, 2011, **13**: 1790–1799
- [25] Silva MCPE, Schlöter-Hai B, Schlöter M, *et al.* Temporal dynamics of abundance and composition of nitrogen-fixing communities across agricultural soils. *PLoS One*, 2013, **8**(9): e74500
- [26] Coelho MRR, de Vos M, Carneiro NP, *et al.* Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, **279**: 15–22
- [27] Hou H-J (侯海军), Qin H-L (秦红玲), Chen C-L (陈春兰), *et al.* Progress of the molecular ecology on microbiological process in soil nitrogen cycling. *Research of Agricultural Modernization* (农业现代化研究), 2014, **35**(5): 588–594 (in Chinese)
- [28] Huang LN, Tang FZ, Song YS, *et al.* Biodiversity, abundance, and activity of nitrogen-fixing bacteria during primary succession on a copper mine tailings. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, **78**: 439–450
- [29] Jing H, Xia X, Liu H, *et al.* Anthropogenic impact on diazotrophic diversity in the mangrove rhizosphere revealed by *nifH* pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology*, 2015, **6**: 1172, doi: 10.3389/fmicb.2015.01172
- [30] Wakelin SA, Colloff MJ, Harvey PR, *et al.* The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, **59**: 661–670
- [31] Orr CH, James A, Leifert C, *et al.* Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, **77**: 911–919
- [32] Izumi H, Anderson IC, Alexander IJ, *et al.* Diversity and expression of nitrogenase genes (*nifH*) from ectomycorrhizas of Corsican pine (*Pinus nigra*). *Environmental Microbiology*, 2006, **8**: 2224–2230
- [33] Zhang M-M (张苗苗), Liu Y (刘 毅), Sheng R (盛 荣), *et al.* Effects of rice straw returning on the community structure and diversity of nitrogen-fixing gene (*nifH*) in paddy soil. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2013, **24**(8): 2339–2344 (in Chinese)
- [34] Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu SF, *et al.* Stable isotope probing with ¹⁵N₂ reveals novel noncultivated diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**: 3196–3204
- [35] Teng Q, Sun B, Fu X, *et al.* Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, South China. *Journal of Microbiology*, 2009, **47**: 135–141
- [36] Wen D-R-L (文都日乐). *NifH* gene diversity and community structure of soil nitrogen-fixing bacteria in

- Hulunbeier Grassland, Inner Mongolia. *Chinese Journal of Ecology* (生态学杂志), 2011, **30**(4): 790–797 (in Chinese)
- [37] Berthrong ST, Yeager CM, Gallegos GL. Nitrogen fertilization has a stronger effect on soil nitrogen-fixing bacterial communities than elevated atmospheric CO₂. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, **80**: 3103–3112
- [38] Rosch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 3818–3829
- [39] He D-H (何冬华), Chen J-H (陈俊辉), Xu Q-F (徐秋芳). Effects of intensive management on abundance and composition of soil N₂-fixing bacteria in *Phyllostachys heterocycla* stands. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2015, **26**(10): 2961–2968 (in Chinese)
- [40] Wang Q, Quensen JF, Fish JA, *et al.* Ecological patterns of *nifH* genes in four terrestrial climatic zones explored with targeted metagenomics using FrameBot, a new informatics tool. *mBio*, 2013, **4**: e00592–13
- [41] Zeng J, Lou K, Zhang CJ, *et al.* Primary succession of nitrogen cycling microbial communities along the deglaciated forelands of Tianshan Mountain, China. *Frontiers in Microbiology*, 2016, **7**: 1353, doi: 10.3389/fmicb.2016.01353
- [42] Keuter A, Veldkamp E, Corre MD. Asymbiotic biological nitrogen-fixation in a temperate grassland as affected by management practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, **70**: 38–46
- [43] Zhang Q-L (张秋磊), Lin M (林敏), Ping S-Z (平淑珍). Biological nitrogen fixation and its application in sustainable agriculture. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), 2008(2): 1–4 (in Chinese)
- [44] Shaffer BT, Widmer F, Porteous LA, *et al.* Temporal and spatial distribution of the *nifH* gene of N₂ fixing bacteria in forests and clearcuts in western oregon. *Microbial Ecology*, 2000, **39**: 12–21
- [45] Reardon CL, Gollany HT, Wuest SB. Diazotroph community structure and abundance in wheat-fallow and wheat-pea crop rotations. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, **69**: 406–412
- [46] Barron AR, Wurzbarger N, Bellenger JP, *et al.* Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen-fixation in tropical forest soils. *Nature Geoscience*, 2009, **2**: 42–45
- [47] Alahari A, Apte SK. Pleiotropic effects of potassium deficiency in a heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena torulosa*. *Microbiology*, 1998, **144**: 1557–1563
- [48] Zhang D-Y (张多英), Luo J-H (雒江菡), Liu H (刘红), *et al.* Research progress on associative biological nitrogen fixation. *Journal of Microbiology* (微生物学杂志), 2009, **29**(6): 55–60 (in Chinese)
- [49] Wichard T, Mishra B, Myneni SCB, *et al.* Storage and bioavailability of molybdenum in soils increased by organic matter complexation. *Nature Geoscience*, 2009, **2**: 625–629
- [50] Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR. Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests. *Biotropica*, 2007, **39**: 585–592
- [51] Reed SC, Seastedt TR, Mann CM, *et al.* Phosphorus fertilization stimulates nitrogen fixation and increases inorganic nitrogen concentrations in a restored prairie. *Applied Soil Ecology*, 2007, **36**: 238–242
- [52] Pérez CA, Carmona MR, Armesto JJ. Non-symbiotic nitrogen fixation during leaf litter decomposition in an old-growth temperate rain forest of Chiloé Island, southern Chile: Effects of single versus mixed species litter. *Austral Ecology*, 2010, **35**: 148–156
- [53] Wurzbarger N, Bellenger JP, Kraepiel AM, *et al.* Molybdenum and phosphorus interact to constrain asymbiotic nitrogen fixation in tropical forests. *PLoS One*, 2012, **7**(3): e33710
- [54] Eisele KA, Schimel DS, Kapustka LA, *et al.* Effects of available P and N:P ratios on non-symbiotic dinitrogen fixation in tallgrass prairie soils. *Oecologia*, 1989, **79**: 471–474
- [55] Wei X, Kimmins JP. Asymbiotic nitrogen-fixation in harvested and wildfire killed lodgepole pine forests in central interior of British Colombia. *Forest Ecology and Management*, 1998, **109**: 343–353
- [56] Zackrisson O, DeLuca TH, Nilsson MC, *et al.* Nitrogen fixation increases with successional age in boreal forests. *Ecology*, 2004, **85**: 3327–3334
- [57] Gundale MJ, Gustafsson H, Nilsson MC. The sensitivity of nitrogen fixation by a feather moss-cyanobacteria association to litter and moisture variability in young and old boreal forests. *Canadian Journal of Forest Research*, 2009, **39**: 2542–2549
- [58] Burgoyne TA, DeLuca TH. Short-term effects of forest restoration management on non-symbiotic nitrogen-fixation in western Montana. *Forest Ecology and Management*, 2009, **258**: 1369–1375
- [59] Pettersson M, Baath E. Temperature dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **45**: 13–21
- [60] Silva MCP, Semenov AV, van Elsas JD, *et al.* Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, **77**: 57–68
- [61] Zhang L-M (张丽梅), He J-Z (贺纪正). Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation. *Microbiology China* (微生物学通报), 2013, **40**(1): 98–108 (in Chinese)
- [62] Nelson DR, Mele PM. The impact of crop residue amendments and lime on microbial community structure and nitrogen-fixing bacteria in the wheat rhizosphere. *Australian Journal of Soil Research*, 2006, **44**: 319–329
- [63] Delmotte N, Knief C, Chaffron S, *et al.* Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**: 16428–16433
- [64] Ruinen J. Occurrence of *Beijerinckia* species in the

- ‘phyllosphere’. *Nature*, 1956, **177**: 433–454
- [65] Blackman JP. Microbial Ecology of the Phylloplane. London: Academic Press, 1981: 520
- [66] Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 1875–1883
- [67] Pan J-G (潘建刚), Hu Q (呼庆), Bai Z-H (白志辉), *et al.* Advance in the research of phyllospheric microorganism. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2011, **31**(2): 583–592 (in Chinese)
- [68] Meyer KM, Leveau JHJ. Microbiology of the phyllosphere: A playground for testing ecological concepts. *Oecologia*, 2012, **168**: 621–629
- [69] Rico L, Ogaya R, Terradas J, *et al.* Community structures of N₂-fixing bacteria associated with the phyllosphere of a Holm oak forest and their response to drought. *Plant Biology*, 2014, **16**: 586–593
- [70] Bentley BL. Direct transfer of newly-fixed nitrogen from free-living epiphyllous microorganisms to their host plants. *Oecologia*, 1984, **63**: 52–56
- [71] Wanek WPK. Phyllosphere nitrogen relations: Reciprocal transfer of nitrogen between epiphyllous liverworts and host plants in the understory of a lowland tropical wet forest in Costa Rica. *New Phytologist*, 2005, **166**: 577–588
- [72] Abril AB, Torres PA, Bucher EH. The importance of phyllosphere microbial populations in nitrogen cycling in the Chaco semi-arid woodland. *Journal of Tropical Ecology*, 2005, **21**: 103–107
- [73] Liu R-C (刘荣昌). Phyllosphere nitrogen-fixing and agricultural production. *Journal of Microbiology* (微生物学杂志), 1986, **6**(3): 58–61 (in Chinese)
- [74] Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest. *Ecology*, 2008, **89**: 2924–2934
- [75] Orchard ED, Webb EA, Dyhrman ST. Molecular analysis of the phosphorus starvation response in *Trichodesmium* spp. *Environmental Microbiology*, 2009, **11**: 2400–2411
- [76] Freiberg E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain forest. *Oecologia*, 1998, **117**: 9–18
- [77] Rigonato J, Alvarenga DO, Andreote FD, *et al.* Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, **80**: 312–322
- [78] Zhang P (张鹏), Huang L (黄磊), Hu Y-G (胡宜刚), *et al.* Nitrogen fixation potential of biological soil crusts in Heidaigou open coal mine, Inner Mongolia, China. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2016, **27**(2): 436–444 (in Chinese)

作者简介 徐鹏霞, 女, 1989 年生, 硕士研究生. 主要从事土壤氮转化相关微生物研究. E-mail: xupengxia2014@126.com

责任编辑 肖红
