

海洋固氮微生物与环境因子关系综述*

黄小芳^{1,2,3} 董俊德^{1,2**} 张燕英^{1,2} 凌娟^{1,2,3} 陈蕾^{1,2,3}

(¹中国科学院南海海洋研究所海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广州 510301; ²中国科学院海南热带海洋生物实验站, 海南三亚 572000; ³中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 海洋微生物的固氮作用是海洋氮素循环中一个关键的环节, 对海洋生态系统的氮素供给和初级生产力的提高有着重要的意义。本文从海洋生物固氮的研究历史着手, 详述了海洋固氮微生物的多样性及固氮活性研究方法, 同时从环境因子的角度, 总结了 CO₂ 浓度、季节变化、营养盐浓度、污染物及生物物种等环境因子对固氮微生物固氮活性的影响, 并对海洋固氮微生物的研究前景进行了展望。

关键词 海洋; 固氮微生物; 多样性; 固氮活性; 环境因子

中图分类号 Q938.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)4-1028-06

Relationships between marine nitrogen-fixing microorganisms and environmental factors: A review. HUANG Xiao-fang^{1,2,3}, DONG Jun-de^{1,2**}, ZHANG Yan-ying^{1,2}, LING Juan^{1,2,3}, CHEN Lei^{1,2,3} (¹*Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China*; ²*National Experiment Station of Tropical Marine Biology, Sanya 572000, Hainan, China*; ³*Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(4): 1028–1033.

Abstract: Marine microbial nitrogen-fixation is a key part of marine nitrogen cycle, which plays an important role in the introduction of nitrogen into marine ecosystem and the improvement of the ecosystem primary productivity. This paper reviewed the research advances on the marine biological nitrogen-fixation, with the focus on the diversity of nitrogen-fixing microorganisms and the main research methods, and summarized the effects of environmental factors (CO₂, seasonality, nutrients, pollutants, and biological species) on the activities of nitrogen-fixing microorganisms. The prospects of the studies on marine biological nitrogen-fixation were also proposed.

Key words: marine; nitrogen-fixing microorganism; diversity; nitrogen-fixing activity; environmental factor.

氮素循环是生物圈内基本的物质循环之一。其中, 微生物的固氮作用在氮素的地球化学循环中起着重要的作用。所谓生物固氮就是指大气中的氮在固氮微生物的作用下被还原成氨的过程。在生物固氮中, 60% 由陆生固氮生物完成, 40% 则是由海洋固氮生物完成的(周德庆, 2002)。1888 年, Beijerinck 第一次分离出具有固氮活性的微生物, 1893 年 Glatz 分离出厌氧型的固氮梭菌。这些工作开创了研究生

物固氮和固氮微生物的科学领域。20 世纪 50 年代以来, 由于乙炔还原法(Stewart *et al.*, 1967) 和同位素标记技术(Montoya *et al.*, 1996) 的应用, 证实了许多原核生物都能固氮。20 世纪 70 年代以来, 由于能源危机和环境危机严重威胁着人类的生活, 鉴于人工合成化学氮肥需要大量的能源, 因而在全世界范围内掀起一次生物固氮研究热潮。20 世纪 80 年代以来, 人们研究发现, 生物固氮在海洋、湖泊等生态系统的氮、碳贡献有着至关重要的作用, 对生态系统的群落结构、演替和生产力持续发展有重要影响(Karl *et al.*, 1997; Montoya *et al.*, 2004), 海洋微生物固氮还在吸收大气 CO₂、减缓温室效应方面发挥着不可替代的作用(Gruber & Galloway, 2008), 全球

* 国家科技支撑计划项目(2009BAB44B03)、国家自然科学基金项目(40776069 和 40676091)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-G-12 和 KSCX2-YW-G-075-10)和国家重点基础研究计划项目(2010CB833800)资助。

** 通讯作者 E-mail: dongjunde@vip.163.com

收稿日期: 2011-09-07 接受日期: 2011-12-05

海洋氮储库的变化与气候的变化有着密切的关系 (Altabet *et al.*, 1995)。另外,海洋微生物的固氮作用分布广泛,不仅存在于贫营养海域,同时在上升流等富营养海域中也有发现 (Voss *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2011)。因此,进行固氮微生物对生态系统碳、氮循环和全球气候环境的影响研究,成为目前生物固氮研究的前沿领域。本文就海洋生物固氮、固氮微生物多样性、固氮活性及其环境因子作较全面的阐述,旨在阐明海洋固氮微生物研究的历史背景、现状和最新研究动态,为今后开展海洋氮循环研究提供理论基础。

1 海洋固氮微生物

1.1 固氮微生物种类

目前发现能进行固氮作用的微生物只有原核生物,根据固氮微生物的固氮特点以及与植物的关系,可以将它们分为自生固氮微生物、共生固氮微生物和联合固氮微生物 3 类。海洋中固氮菌的种群比较复杂,多数集中于海洋沉积物中,也有少数一部分存在于水体中 (Bergman *et al.*, 1997)。目前已发现的海洋固氮微生物主要包括蓝藻类、光合细菌类和异养细菌类。

1.1.1 蓝藻类 目前已知的固氮蓝藻约有 30 余种,其中束毛藻属 (*Trichodesmium*) 是海洋中分布最广的一类蓝细菌,Dugdale (1961) 通过¹⁵N₂示踪培养法首次证实了北大西洋马尾藻海区束毛藻固氮作用的存在,束毛藻自此被视为贫营养盐海洋生态系统中初级生产力的主要贡献者。有关束毛藻固氮作用的研究已步入了比较成熟的阶段,迄今为止,对束毛藻的研究主要集中在其种群、分布与固氮能力方面。例如:Westberry 和 Siegel (2006) 对束毛藻的时空分布进行研究,结果表明,束毛藻水华现象主要发生在热带太平洋东部以及阿拉伯海区,在水华情况下束毛藻的固氮速率达 42 Tg N · a⁻¹,比非水华情况下的平均固氮速率 (20 Tg N · a⁻¹) 高出 1 倍,因此推测束毛藻对海洋的氮平衡有着重要的贡献。Dong 等 (2008) 也对三亚湾的束毛藻分布进行了研究,发现铁氏束毛藻 (*T. thiebautii*) 是浮游蓝藻的优势种,并发现受季节及地域影响,束毛藻的多样性也有着较大差异。另外,某些浮游蓝藻如颤藻属 (*Oscillatoria*)、假膜藻属 (*Katagnymene*)、浮丝藻属 (*Pelagothrix*) 以及聚胞藻属 (*Synechocystis*)、聚球藻属 (*Synechococcus*) (Spiller & Shanmugam, 1987; Lai-

choubi *et al.*, 2011) 也具有固氮酶活性。此外,一些固着在海底、岩石上以及与其他生物共生的蓝藻,如眉藻属 (*Calothrix*)、鱼腥藻属 (*Anabaena*)、胶须藻属 (*Rivularia*)、节球藻属 (*Nodularia*)、单歧藻属 (*Tolypothrix*)、蓝枝藻属 (*Hyella*) 等同样具有固氮活性。

1.1.2 光合细菌类 海洋中一些光合细菌类也能进行生物固氮,如红螺菌 (*Rhodospirillum*) 和红硫菌 (或称紫硫菌,如着色菌科 *Chromatiaceae*)。它们既能进行光合作用,又能和其他生物进行联合固氮作用。目前有关海洋中光合细菌在生物固氮方面的报道仍很少,因此利用分子生物学等新技术去挖掘更多尚未被发现的光合固氮菌是必要的。

1.1.3 异养细菌类 目前已发现的异养固氮细菌主要有芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、梭菌属 (*Clostridium*)、弧菌属 (*Vibrio*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、产气肠杆菌属 (*Enterobacter*)、克氏杆菌属 (*Klebstella*) 等属中的一些种。其中弧菌可能是海洋生态系统中数目最多的异养性固氮菌,近些年来新的固氮弧菌种类不断地被人们发现,如 Rameshkumar 等 (2010) 就从红树林根际土壤分离到一株固氮细菌 MSSRF38^T,并通过多相分类方法鉴定 MSSRF38^T 是弧菌属 (*V. rhizosphaerae*) 的一个新种。

1.2 固氮速率与通量

生物固氮测定方法主要有乙炔还原法间接测定 (Capone, 1993) 和¹⁵N 同位素示踪法 (Montoya *et al.*, 1996) 直接测定。乙炔还原法优点是灵敏度高、操作简单、费用低,因此在海洋固氮速率测定时得到较广泛的应用 (Stewart *et al.*, 1967; Montoya *et al.*, 1996), 缺点是所测得的固氮效率需转换比值,目前 C₂H₂ 与 N₂ 的转换比值普遍是 3 : 1 或 4 : 1 (Capone, 1993)。与乙炔还原法相比,稳定同位素¹⁵N 示踪法灵敏度高、准确度高,是固氮研究中确认菌株有无固氮能力最直接最可靠的方法,缺点是费用高、测定手段繁琐,易受大气和海水中的¹⁵N 的干扰 (Stewart *et al.*, 1967)。Zehr 等 (2001) 利用¹⁵N 示踪法测定了各种固氮蓝藻的固氮能力,结果发现,在亚热带的北太平洋海域具有丰富的单细胞蓝藻,包括一些已知的属种 (如束毛藻属) 和很多分类地位尚不确定的种类,均能表达固氮基因 *nifH* 并能固氮。现代研究技术的应用提供越来越多的证据表明,生物固氮比早先估计的更广泛,意味着对生物固氮的概念、调控和模型结构都有待重新评价 (Karl, 2000)。

乙炔还原法和稳定同位素技术对固氮活性测定

具有高灵敏度,但不易检测到那些低丰度的固氮微生物,而分子生物学技术(如核酸杂交和基因扩增等)则可以弥补这点不足。以通用的 *ni*/H 为引物,通过 PCR 技术扩增 DNA 片段并进行测序,就可在固氮酶基因的 DNA 水平上检测固氮生物的存在,还可以鉴定这些固氮菌的类型,不足的是,不能检测其固氮速率(Zehr *et al.*, 2000)。Farnelid 等(2011)建立了深海固氮微生物群落固氮酶基因库,研究结果表明,非蓝藻细菌占固氮微生物总数的 42%,这意味着非蓝藻细菌在海洋生态系统中同样行使着重要的固氮功能。Montoya 等(2004)也利用分子生物学手段发现了具有固氮能力的单细胞蓝细菌和浮游细菌在微微级和微级的分布,它们不但具有高固氮能力,且昼夜都可以固氮,但是以上分子生物学方法的局限在于只能表明该微生物拥有固氮基因,而不能说明这些基因是否表达,因此需要采用 RT-PCR(反转录 PCR 技术)去检测其是否转录,或者再结合乙炔还原法和同位素示踪法等固氮测定方法检测是否具有固氮活性。因此,将不同的固氮研究方法结合起来,互为补充、互相支持,对发现新的具有固氮能力的微生物种类具有十分重要的作用。

现有观点认为,全球海洋生物固氮速率约为 $150 \text{ Tg N} \cdot \text{a}^{-1}$,主要存在热带海域表层或次表层(Fernandez *et al.*, 2011)。随着固氮测定方法精确度的提高,当前对全球海洋生物固氮速率的估量也在不断增加,目前的最大估量值为 $200 \text{ Tg N} \cdot \text{a}^{-1}$ (Kolber, 2006),生物固氮在支持海洋初级生产力中的作用远远超于人们的想象。另一方面,由于人类生产和生活活动(如农田施肥和化石燃料的燃烧等)带来大量的人工氮,现代人工增加的固氮量在不断上升。据 Galloway (2005) 研究推测,到 2020 年,人工增加的固氮量将达 60% (Galloway *et al.*, 1995);到 2050 年,由于人口的增加和人类活动加剧,固氮速率最低估计值达 $240 \text{ Tg N} \cdot \text{a}^{-1}$,最大预测值将达 $940 \text{ Tg N} \cdot \text{a}^{-1}$ 。但实际上哪个估量值都存在不确定性,原因在于生物固氮速率实测值不足、固氮生物的水华贡献难以定量、固氮微生物种类的不确定性等(张润和陈敏, 2010)。

2 影响固氮速率的环境因素

2.1 大气 CO_2 浓度

氮循环与碳循环和气候变化的响应是非常密切的,全球氮循环系统的改变会对全球气候变暖产生

严重的影响(Gruber & Galloway, 2008)。Sambrotto 等(1993)在对北大西洋真光层的碳汇和氮汇研究后指出,利用经典 Redfield 比 6.6 : 1 外推,严重低估了真光层中有机碳的输出,更低估海洋浮游植物对大气 CO_2 的沉降作用。据了解,海洋吸收大气 CO_2 每年达 $1 \sim 2 \text{ Gt C} \cdot \text{a}^{-1}$ (Karl *et al.*, 2002)。生物固氮作用可以提高海洋吸收 CO_2 的能力,进而直接影响到整个海洋的碳汇和全球气候的变化(Capone, 2001),反过来,由于大气尘埃是铁元素的重要来源,这是固氮酶活性不可缺少的成分,全球气候的变化会影响尘埃中铁元素的供应或者影响上层海洋水体的分层,进而影响生物固氮速率(Karl *et al.*, 2002)。现有观点认为,工业生产释放的氮在大气中快速传播,最终停留在土壤层并通过固氮作用转化成容易被植物吸收利用的形式,因此,促进了植物的生长,而生长的植物可从大气中吸收更多的 CO_2 ,以提高自身初级生产力,因此促进海洋对 CO_2 的吸收,北半球碳沉降现象可以为这一推测提供支持(Gruber & Galloway, 2008)。然而,有研究者通过实验模型研究氮增加对北半球碳循环的影响,又得出相矛盾的结论,即实际上氮气浓度的升高对碳沉降的影响很小,因此引发了学术界很大的争议(Hyvönen *et al.*, 2008)。生物固氮是连结海洋与大气之间的氮循环的重要桥梁,有关大气 CO_2 浓度-气候-生物固氮的藕联关系研究仍存在很多空白与不足,相矛盾的结论可能是由于现有研究手段的不足,导致很多研究结果都带着很大不确定性;另一方面就海洋这个特定的生态系统而言,既可以是一个碳源也可以是一个碳汇,是碳源还是碳汇还与环境因素有关(Karl *et al.*, 2002)。有关“C 循环-N 循环-气候”之间的藕联作用机制尚待进一步探讨,比如生物可利用氮以及生物固氮的关系,以及温室气体的“源”与“汇”等问题,都有待于学者们的进一步探索。

2.2 营养盐

目前有关营养盐对海洋生物固氮的限制作用研究主要集中在氮、磷和铁这 3 个元素的作用,氮、磷、铁的浓度都会影响到微生物的固氮速率。

Redfield N : P 比值 (16 : 1) (Takahashi *et al.*, 1985) 常被用来揭示浮游植物或微生物生长对营养盐的潜在需求。当环境中的氮磷比化学计量达到 Redfield 值时,微生物呈现迅速生长和营养饱和状态,而正偏离或负偏离 Redfield 值时微生物的生长

都会出现营养盐限制的现象 (Karl *et al.*, 1997)。Vitousek 和 Howarth (1991) 研究营养盐限制现象的机理发现, 在陆地、淡水以及海洋生态系统中, 氮限制现象是由于氮的生物地球化学循环发生变化, 结果抑制了固氮微生物的活性。磷增加能够提高固氮速率, 增加固氮微生物的多样性和固氮基因 *nifH* 丰度 (Reed *et al.*, 2010), 然而有关微生物群落结构的变化是如何影响到微生物自身固氮活性, 该机制尚未完全清楚。Whigham 等 (2009) 也报道过氮增加对微生物活性的影响, 结果显示, 红树林共附生固氮微生物较红树林对氮增加的反应更加敏感; 此外, 氮增加导致反硝化速率增加, 生物固氮速率下降, 说明氮负荷的增加会对微生物的固氮作用有着一定的限制作用。有研究显示, 在冰河世纪, 虽然营养储量有所增加, 但是总体初级生产力并没有随之增加 (Ganeshram *et al.*, 2002), 这很好地解释了过剩的营养供应会一定程度上限制固氮作用这一现象, 这也是固氮微生物的一种自我调节功能, 因而避免细胞内物质和能量的浪费, 并不断适应变化的外界环境。

对固氮生物而言另一个重要的营养盐即是微量元素铁, 催化生物固氮反应的酶是固氮酶, 固氮酶由铁钼蛋白 (Fe-Mo protein) 和铁蛋白 (Fe-protein) 组成, 铁元素是固氮酶复合体的重要组成部分, 铁的吸收利用直接影响了固氮酶的合成与表达。Kustka 等 (2002) 发现, 以 N_2 为唯一氮源的固氮微生物较利用其他氮源 (NO_3^- 、 NH_4^+) 时单位细胞铁的需求更高。在环境胁迫的状态下, 微生物会通过一些特殊的机制而“努力”使自身适应环境, 如 Saito 等 (2011) 利用蛋白质组学的方法研究铁与固氮菌金属蛋白的关系发现, 一种海洋固氮菌 (*Crocospaera watsonii*) 通过丢失自身携带的金属酶来降低自身对铁元素的需求量, 以此适应含铁量较低的生境, 或者在相同含铁量的情况下也能够提高自身生物量。

这些营养元素并不是单独地对生物固氮起着限制作用, 而是协同发挥作用。Mills 等 (2004) 通过研究发现, 热带北大西洋东部海域的生物固氮限制因子铁和磷对固氮活性的影响并不是相互独立, 相反, 它们是协同限制着海洋的生物固氮作用。不同营养元素之间的相互作用对固氮速率的影响是很关键的, 但相互作用的机制和方式尚需深入研究。

2.3 季节影响

固氮作用受到众多因素的影响, 如光照度、盐

度、pH 值、 NO_3^- 、 NH_4^+ 浓度或其他一些微量营养盐浓度等, 正是这些因素的综合作用使得固氮速率呈现出季节变化特点 (Altabet *et al.*, 1995; Voss *et al.*, 2006)。如 Lee 和 Joye (2006) 研究发现, 在潮湿季节固氮菌的固氮速率均较在干燥季节时的固氮速率高; 与之一致的是, Adame 等 (2010) 研究澳大利亚红树沉积物固氮菌时发现, 固氮微生物的活性强降雨季节较弱降雨量季节高。这可能是因为强降雨量伴随着周期性的涨潮现象, 带来了丰富的溶解性正磷酸盐 (soluble reactive phosphate, SRP)、硝酸盐 (NO_3^-)、氨盐 (NH_4^+) 等微生物可利用的营养物质, 因此能有效地提高生物固氮速率; 而在干燥季节, 由于潮位下降, 微生物所能汲取的营养成分也随之减少, 另一方面低潮位导致微生物暴露在强光下的机会增加, 强光抑制了固氮酶活性, 因此固氮速率下降。季节变化影响着固氮微生物种群的复杂性和固氮速率, 这对了解固氮微生物与气候变化的关系具有重要的意义, 值得进一步深入研究。

2.4 污染物

海洋污染物会改变了海岸带土壤的理化性质, 如 pH、盐度、温度等, 有些污染物如重金属等还会对微生物产生毒性, 因此影响了微生物的生长与能力的发挥 (Zahran, 1999)。近年来, 随着工业的迅猛发展, 工业废料源源不断地向海洋输出, 海洋污染日趋严重, 海洋微生物在海水的自净功能中扮演着重要的角色。然而, 污染物会在较短时间内改变环境的理化条件同时严重干扰微生物与环境间的平衡关系。有研究表明, 受污染红树林区的生物固氮速率明显下降, 而通过生物修复重建后红树林的固氮速率较原始红树林无明显差异 (Vovides *et al.*, 2011)。Sjöling 等 (2005) 也曾对被砍伐红树林区的微生物多样性进行分析, 结果显示, 被砍伐区较保护区的土壤微生物多样性有着明显的下降趋势, 土壤固氮微生物的活性也明显下降。生物固氮作用的最适 pH 约为 6.5, 海洋污染物改变了土壤 pH, 因而会严重影响了固氮微生物的生长条件, 所以导致固氮效率有所变化, 因此, 固氮微生物的生理生态参数可作为检测生态系统污染状况的早期、敏感的生物学指标, 固氮生物在海洋环境的维护和生态平衡中具有重要的作用。

2.5 生物物种

由于自然入侵、或者人为地无意或有意引进某种生物会对本土生态环境和微生物活性造成一定的

影响。正确的引种可以增加引种地区的生物多样性,然而,不适当的引种则会使得缺乏自然天敌的外来物种迅速繁殖。Moseman 等(2008)研究发现,由于外来贻贝、红树等物种的入侵,导致本地红树林区的固氮微生物多样性及固氮活性都有着明显的变化,此外,不同物种的入侵及地域的差异对固氮微生物组成及其固氮活性也有着不同的影响。微生物群落结构与功能发挥息息相关,生物物种的变化会影响氮循环相关微生物的群落结构多样性,从而影响全球氮储量。如 Hawkes 等(2005)也报道过由于一些外来植物的入侵,会影响氨氧化细菌和反硝化细菌的微生物多样性,进而影响到整个氮循环系统。又如 Liao 等(2007)研究长江口互花米草入侵对该生态系统的碳储量和氮储量的影响时发现,互花米草的入侵通过影响该生态系统微生物的生理生态,最终提高了该生态系统的 C 储量和 N 储量。因此,物种入侵可能降低本地的生物活性,也有可能提高本地的生物活性,提高初级生产力(类延宝等, 2010)。

但是,排斥一切外来物种的观点也是有偏见的。生态学家 Davis 等(2011)主张,评判物种是“外来”还是“本土”,不应看其起源地,而应看这个物种对当地环境的影响,如果有益,则这个物种比起本土物种来更称得上是“本土”。此外,随着时间的推移,物种对当地环境的影响会发生变化,因此“本土”与“外来”没有明显的划分界限。物种的入侵还与气候变化有着一定的关联(Gritti *et al.*, 2006),这也在一定程度上反应了气候变化与生物固氮作用的藕联关系,由于气候的变化引起了生物物种的变迁,影响到固氮微生物的固氮活性,而生物固氮作用的变化又反过来影响着全球的气候与环境。

3 展望

海洋生物固氮是海洋氮循环的一个重要的分支,应用现代科学技术建立和完善生物固氮体系已经成为解决人类目前所面临的人口、粮食、能源和环境等问题的重要技术措施。近年来,人们对海洋生物固氮的重要性有了新的认识,但对于海洋固氮微生物多样性及其固氮活性与环境变化的关系的了解仍十分有限,有必要在如下几个方面加强研究:

1) 获取准确的固氮微生物群落结构多样性信息,不仅局限于束毛藻的研究,对于其他一些具有固氮功能的单细胞蓝细菌、蛋白细菌等也应有更深入

的了解,挖掘更多的高效固氮微生物资源。

2) 进一步探索海洋生物固氮作用与环境因子(如 CO_2 浓度升高)之间的藕联关系,深入了解各种环境因子对固氮微生物固氮活性的影响。

3) 海洋微生物功能基因组学研究尚待发展,利用宏基因组学和稳定同位素等新技术寻找高效固氮微生物是功能微生物研究的一大发展趋势。

4) 进一步了解海洋固氮微生物及其固氮速率的时空变化,深入了解固氮微生物在海洋生态系统中的功能与作用。

致 谢 中国科学院海洋微生物研究中心数据库与信息系
统对本论文给予的支持,致以衷心感谢!

参考文献

- 类延宝, 肖海峰, 冯玉龙. 2010. 外来植物入侵对生物多样性的影响及本地生物的进化响应. *生物多样性*, **18** (6): 622–630.
- 张 润, 陈 敏. 2010. 海洋生物固氮作用研究进展. *台湾海峡*, **29**(3): 428–433.
- 周德庆. 2002. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社.
- Adame MF, Virdis B, Lovelock CE. 2010. Effect of geomorphological setting and rainfall on nutrient exchange in mangroves during tidal inundation. *Marine and Freshwater Research*, **61**: 1197–1206.
- Altabet MA, Francois R, Murray DW, *et al.* 1995. Climate-related variations in denitrification in the Arabian Sea from sediment $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios. *Nature*, **373**: 506–509.
- Bergman B, Gallon J, Rai AN. 1997. N_2 fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Review*, **19**: 139–185.
- Capone DG. 1993. Determination of nitrogenase activity in aquatic samples using the acetylene reduction procedure// Kemp PF, Cole JJ, Sherr BF, eds. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Boca Raton: Lewis Publishers; 621–631.
- Capone DG. 2001. Marine nitrogen fixation: What's the fuss? *Current Opinion in Microbiology*, **4**: 341–348.
- Davis MA, Chew MK, Hobbs RJ, *et al.* 2011. Don't judge species on their origins. *Nature*, **474**: 153–154.
- Dong J, Zhang Y, Wang Y, *et al.* 2008. Spatial and seasonal variations of cyanobacteria and their nitrogen fixation rates in Sanya Bay, South China Sea. *Scientia Marina*, **72**: 239–251.
- Dugdale RC, Menzel DW, Ryther JH. 1961. Nitrogen fixation in the Sargasso Sea. *Deep Sea Research*, **7**: 297–300.
- Farnelid H, Andersson AF, Bertilsson S, *et al.* 2011. Nitrogenase gene amplicons from global marine surface waters are dominated by genes of non-cyanobacteria. *PLoS ONE*, **6**: doi:10.1371/journal.pone.0019223.
- Fernandez C, Farfas L, Ulloa O. 2011. Nitrogen fixation in denitrified marine waters. *PLoS ONE*, **6**: doi:10.1371/journal.pone.0020539.
- Galloway JN, Schlesinger WH, Levy H, *et al.* 1995. Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental re-

- sponse. *Global Biogeochemical Cycles*, **9**: 235–252.
- Galloway JN. 2005. The global nitrogen cycle: Past, present and future. *Science in China*, **48**: 669–677.
- Ganeshram RS, Pedersen TF, Calvert SE, *et al.* 2002. Reduced nitrogen fixation in the glacial ocean inferred from changes in marine nitrogen and phosphorus inventories. *Nature*, **415**: 156–159.
- Gritti ES, Smith B, Sykes MT. 2006. Vulnerability of Mediterranean Basin ecosystems to climate change and invasion by exotic plant species. *Journal of Biogeography*, **33**: 145–157.
- Gruber N, Galloway JN. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, **451**: 293–296.
- Hawkes CV, Wren IF, Herman DJ, *et al.* 2005. Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. *Ecology Letters*, **8**: 976–985.
- Hyvönen R, Persson T, Andersson S, *et al.* 2008. Impact of long-term nitrogen addition on carbon stocks in trees and soils in northern Europe. *Biogeochemistry*, **89**: 121–137.
- Karl DM, Letelier R, Tupas L, *et al.* 1997. The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*, **388**: 533–538.
- Karl DM, Michaels A, Bergman B, *et al.* 2002. Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry*, **57**: 47–98.
- Karl DM. 2000. A new source of “new” nitrogen in the sea. *Trends in Microbiology*, **8**: 301.
- Kolber ZS. 2006. Getting a better picture of the ocean's nitrogen budget. *Science*, **312**: 1479–1480.
- Kustka A, Carpenter EJ, Sañudo-Wilhelmy SA. 2002. Iron and marine nitrogen fixation: Progress and future directions. *Research in Microbiology*, **153**: 255–262.
- Laichoubi KB, Beez S, Espinosa J, *et al.* 2011. The nitrogen interaction network in *Synechococcus* WH5701, a cyanobacterium with two PipX and two P(II)-like proteins. *Microbiology*, **157**: 1220–1228.
- Lee RY, Joye SB. 2006. Seasonal patterns of nitrogen fixation and denitrification in oceanic mangrove habitats. *Marine Ecology Progress Series*, **307**: 127–141.
- Liao C, Luo Y, Jiang L, *et al.* 2007. Invasion of *Spartina alterniflora* enhanced ecosystem carbon and nitrogen stocks in the Yangtze Estuary, China. *Ecosystems*, **10**: 1351–1361.
- Mills MM, Ridame C, Davey M, *et al.* 2004. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature*, **429**: 292–294.
- Montoya JP, Holl CM, Zehr JP, *et al.* 2004. High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature*, **430**: 1024–1027.
- Montoya JP, Voss M, Kähler P, *et al.* 1996. A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N₂ fixation. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 986–993.
- Moseman SM, Zhang R, Qian PY, *et al.* 2008. Diversity and functional responses of nitrogen-fixing microbes to three wetland invasions. *Biological Invasions*, **11**: 225–239.
- Rameshkumar N, Sproer C, Lang E, *et al.* 2010. *Vibrio mangrovi* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from mangrove-associated wild rice (*Poteresia coarctata* Tateoka). *FEMS Microbiology Letters*, **307**: 35–40.
- Reed SC, Townsend AR, Cleveland CC, *et al.* 2010. Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. *Oecologia*, **164**: 521–531.
- Saito MA, Bertrand EM, Dutkiewicz S, *et al.* 2011. Iron conservation by reduction of metalloenzyme inventories in the marine diazotroph *Crocospaera watsonii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: 2184–2189.
- Sambrotto RN, Savidge G, Robinson C, *et al.* 1993. Elevated consumption of carbon relative to nitrogen in the surface ocean. *Nature*, **363**: 248–250.
- Sjöling S, Mohammed SM, Lyimo TJ, *et al.* 2005. Benthic bacterial diversity and nutrient processes in mangroves: Impact of deforestation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **63**: 397–406.
- Spiller H, Shanmugam KT. 1987. Physiological conditions for nitrogen fixation in a unicellular marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain SF1. *Journal of Bacteriology*, **169**: 5379–5384.
- Stewart WDP, Fitzgerald GP, Burris RH. 1967. *In situ* studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **58**: 2071–2078.
- Takahashi T, Broecker WS, Langer S. 1985. Redfield ratio based on chemical data from isopycnal surfaces. *Journal of Geophysical Research*, **90**: 6907–6924.
- Vitousek PM, Howarth RW. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*, **13**: 87–115.
- Voss M, Bombar D, Loick N, *et al.* 2006. Riverine influence on nitrogen fixation in the upwelling region off Vietnam, South China Sea. *Geophysical Research Letters*, **33**: 5–8.
- Vovides AG, Bashan Y, López-Portillo JA, *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. *Restoration Ecology*, **19**: 236–244.
- Westberry TK, Siegel DA. 2006. Spatial and temporal distribution of *Trichodesmium* blooms in the world's oceans. *Global Biogeochemical Cycles*, **20**: doi, 10.1029/2005GB002673.
- Whigham DF, Verhoeven JTA, Samarkin V, *et al.* 2009. Responses of *Avicennia germinans* (Black Mangrove) and the soil microbial community to nitrogen addition in a hypersaline wetland. *Estuaries and Coasts*, **32**: 926–936.
- Zahrn HH. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**: 968–989.
- Zehr JP, Waterbury JB, Tumer PJ, *et al.* 2001. Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*, **412**: 635–638.
- Zehr JP, Carpenter EJ, Villareal TA. 2000. New perspectives on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans. *Trends in Microbiology*, **8**: 68–73.

作者简介 黄小芳,女,1989年生,硕士研究生。主要从事海洋微生物分子生态学研究。E-mail: huangxiaofang602@126.com
责任编辑 魏中青