

禾本科植物联合固氮的研究现状及应用前景

胡梦媛, 李雅颖, 葛超荣, 张迎迎, 姚槐应

Research status and application prospects of combined nitrogen fixation in gramineous plants

HU Mengyuan, LI Yaying, GE Chaorong, ZHANG Yingying, and YAO Huaiying

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.210317>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[固氮蓝藻的农业应用研究进展](#)

Research progress in agricultural application of nitrogen-fixing cyanobacteria

中国生态农业学报(中英文). 2018, 26(4): 574–583

[新开垦土壤上构建玉米/蚕豆-根瘤菌高效固氮模式](#)

Construction of efficient nitrogen-fixing cropping pattern: Maize/faba bean intercrop with rhizobium inoculation in reclaimed low-fertility soils

中国生态农业学报(中英文). 2018, 26(1): 62–74

[玉米/大豆、玉米/花生间作对作物氮素吸收及结瘤固氮的影响](#)

Effects of maize/soybean and maize/peanut intercropping systems on crops nitrogen uptake and nodulation nitrogen fixation

中国生态农业学报(中英文). 2019, 27(8): 1183–1194

[豆科作物与禾本科作物轮作研究进展及前景](#)

Progress and perspective of legume-gramineae rotations

中国生态农业学报(中英文). 2018, 26(1): 57–61

[施氮量对玉米/大豆套作系统土壤微生物数量及土壤酶活性的影响](#)

Effects of nitrogen application rate on soil microbial quantity and soil enzymes activities in maize/soybean intercropping systems

中国生态农业学报(中英文). 2017, 25(10): 1463–1474

[腐植酸与氮肥配施对冬小麦氮素吸收利用及产量的影响](#)

Effect of combined application of humic acid and nitrogen fertilizer on nitrogen uptake, utilization and yield of winter wheat

中国生态农业学报(中英文). 2017, 25(3): 365–372



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.210317

胡梦媛, 李雅颖, 葛超荣, 张迎迎, 姚槐应. 禾本科植物联合固氮的研究现状及应用前景[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2021, 29(11): 1815-1826
HU M Y, LI Y Y, GE C R, ZHANG Y Y, YAO H Y. Research status and application prospects of combined nitrogen fixation in gramineous plants[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2021, 29(11): 1815-1826

禾本科植物联合固氮的研究现状及应用前景*

胡梦媛^{1,2}, 李雅颖², 葛超荣^{1**}, 张迎迎², 姚槐应²

(1. 武汉工程大学 武汉 430074; 2. 中国科学院城市环境研究所 厦门 361021)

摘要: 氮是限制农业生产的最重要因素之一。随着人工固氮技术的发展, 氮肥的施用为提高作物产量、解决人类温饱问题的同时, 导致了土壤板结、酸化、氮素流失及温室气体排放(N_2O)等环境问题。与人工合成氮相比, 生物固氮是一种绿色经济的固氮方式, 其包括共生固氮和非共生(自生固氮及联合固氮)固氮, 且每年固定的氮可占总固定量的50%以上。与共生固氮相比, 非共生固氮存在范围广, 如甘蔗、水稻、玉米和小麦等禾本科作物均能进行非共生固氮(联合固氮)。本文主要从禾本科植物的联合固氮菌种类及其作用机理、固氮活性及调控方式以及联合固氮菌的资源及应用3个方面进行综述, 发现相比较共生固氮而言, 联合固氮菌易受到土著微生物、氮素水平等环境因素影响, 其研究难度更大, 需要筛选纯化更多的联合固氮菌, 为其固氮机制研究提供良好材料; 氮、磷、钼、铁等肥料的适量添加可有效促进固氮菌的固氮效率; 固氮菌不仅可以提高土壤固氮量, 而且有利于植物根系激素调节, 从而增加植物抗病抗逆能力, 促进植物更健康的生长。本文最后对禾本科植物联合固氮的农艺管理措施及固氮菌剂的实际应用方面做了展望, 以期为提高禾本科植物联合固氮效率及推动生物固氮菌在农业生产中的应用提供理论依据。

关键词: 禾本科植物; 联合固氮; 固氮菌种类; 固氮活性; 固氮菌应用

中图分类号: S144.5

开放科学码(资源服务)标识码(OSID):



Research status and application prospects of combined nitrogen fixation in gramineous plants*

HU Mengyuan^{1,2}, LI Yaying², GE Chaorong^{1**}, ZHANG Yingying², YAO Huaiying²

(1. Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China; 2. Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China)

Abstract: Nitrogen is one of the most important factors restricting agricultural production. With the development of artificial nitrogen fixation technology, the application of nitrogen fertilizers can increase crop yields and solve problems related to the fulfilment of the basic human needs of food and clothing. However, it has also caused environmental problems, such as soil compaction, acidification, nitrogen loss, and greenhouse gas emissions (e.g., nitrous oxide, N_2O). Compared with synthetic ammonia, biological nitrogen fixation is a green and economical nitrogen fixation method, which entails symbiotic nitrogen fixation and non-symbiotic nitrogen fixation (autogenous nitrogen fixation and combined nitrogen fixation, respectively). Annually, biologically fixed nitrogen can account for more than 50% of the total fixed amount. Compared with symbiotic nitrogen fixation, non-symbiotic nitrogen fixation

* 国家重点研发计划项目(2017YFD0200102)和国家自然科学基金项目(41877051)资助

** 通信作者: 葛超荣, 主要研究方向为环境微生物。E-mail: chaorongge@wit.edu.cn

胡梦媛, 主要研究方向为土壤氮素循环。E-mail: hmy.222@foxmail.com

收稿日期: 2021-05-25 接受日期: 2021-06-25

* The study was supported by the National Key Research and Development Project of China (2017YFD0200102) and the National Natural Science Foundation of China (41877051).

** Corresponding author, E-mail: chaorongge@wit.edu.cn

Received May 25, 2021; accepted Jun. 25, 2021

exists in many plants, for example, sugarcane, rice, maize, wheat, and other gramineous crops that carry out non-symbiotic nitrogen fixation (combined nitrogen fixation). This article reviewed the species of combined nitrogen-fixing bacteria in gramineous plants and their mechanism of action and nitrogen-fixing activity and regulation methods, as well as the resources and applications of these combined nitrogen-fixing bacteria. Compared with symbiotic nitrogen fixation, combined nitrogen-fixing bacteria are more vulnerable to indigenous microorganisms. Research on combined nitrogen-fixing bacteria is more difficult owing to the influence of environmental factors, such as nitrogen levels. It is necessary to screen and purify more combined nitrogen-fixing bacteria to provide optimum materials for research into the nitrogen fixation mechanism. Appropriate levels of nitrogen, phosphorus, molybdenum, iron, and other fertilizers can promote the nitrogen fixation efficiency of bacteria. Nitrogen-fixing bacteria not only increase the extent of soil nitrogen fixation but also facilitate the regulation of plant root hormones, thereby increasing plant disease resistance and stress resistance, promoting healthier plant growth. Finally, agronomic management measures for combined nitrogen fixation through gramineous plants and the practical application of the nitrogen-fixing bacteria are proposed to provide a theoretical basis for improving the efficiency of combined nitrogen fixation through gramineous plants and to promote the application of the nitrogen-fixing bacteria in agricultural production.

Keywords: Gramineae; Combined nitrogen fixation; Species of nitrogen-fixing bacteria; Nitrogen fixation activity; Application of nitrogen-fixing bacteria

氮素对于植物生长至关重要,据估计,全球植物每年需要大约 1.5 亿至 2 亿 t 矿物氮,其中大约 1 亿 t 氮是通过 Haber-Bosch 工艺生产的。每生产 1 kg 氮肥会产生 3.6 kg CO₂。除此之外,化肥过量施用导致土壤板结、土壤酸化并增加土壤氮素流失等诸多环境问题。生物固氮则能有效地避免这些问题,固氮菌可以将大气氮转化为植物可利用氮,且不会造成环境污染及氮素流失等问题^[1]。据估计全球每年固定的活性氮量为 (2.03±0.5) 亿 t,其中约 1/3 来自陆地生态系统,2/3 来自海洋生态系统^[2]。因此,生物固氮是生物圈总氮量的主要贡献者之一。Herridge 等^[3]关于不同生态系统生物固氮研究表明,目前全球农作物、草地、森林系统的生物固氮量每年为 0.5 亿~0.7 亿 t,且农业的生物固氮量接近工业化前的生物固氮量。虽然共生固氮单位固氮量高 [150~300 kg(N)·hm⁻²],但其只存在于豆科 (Leguminosae) 植物中^[4],而禾本科 (Poaceae) 植物的固氮作用往往依赖于非共生固氮,虽然其单位固氮量低 [63~69 kg(N)·hm⁻²]^[5],但分布广泛,在大多数粮食作物 [如水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*) 和小麦 (*Triticum aestivum*) 等] 中均发现非共生固氮菌株。所以非共生固氮对总固氮量的贡献 (尤其是农业生态系统中) 也不容忽视,且其在减缓全球温室气体排放及农业可持续生产方面有重大潜力。

非共生固氮包括自生固氮和联合固氮。自生固氮菌是指能在土壤中独立进行固氮的细菌,其分布广、种类多,虽然单位固氮量低,但总固氮量高,蓝藻 (Cyanobacteria)、圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*)、棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 等是土壤主要的自生固氮菌。联合固氮主要存在于禾本科植

物根际,与植物互惠互利,但其不与植物宿主形成特异分化组织^[6]。它们主要依赖植物表面分泌物或定殖于植物体内获得能源,在氧浓度合适的微环境中固氮,并为植物提供氮素营养。

2050 年,预计全球人口达 100 亿,而农业产量需提高 56% 才能满足人口对粮食的需求^[7]。为避免大量施用化肥造成的环境问题,实现生态环境可持续发展,研究禾本科植物中联合固氮菌的作用机理及其调控机制对提高氮素固定量,减少肥料施用具有重要意义。本综述主要以禾本科植物,如甘蔗 (*Saccharum officinarum*)、水稻、玉米和小麦体系为例,在联合固氮菌的种类及机理、固氮酶的活性与调控及固氮菌的资源与应用方面进行综述,旨在为农业氮管理提供指导意见,并且评估固氮菌在农业生态系统中的应用潜力。

1 联合固氮菌的种类及固氮机理

1.1 联合固氮菌的发现

1958 年, Döbereiner 和 Ruschel 从甘蔗根中分离出固氮菌拜叶林氏菌属 (*Beijerinckia fluminensis*), 该研究证明禾本科植物中固氮菌的存在^[8]。随后研究者发现蓝藻也具有固氮的能力^[9]。1975 年 Döbereiner 等^[10]在牧草及谷物的根系发现了固氮螺菌属菌株 (*Azospirillum* sp.), 该菌株为兼性内生菌,可在植物根际或根内部定居。然而,在某些植物组织中也存在一些专性内生菌。根据禾本科植物联合固氮细菌的生理生态特征可将其大致分为:根际固氮菌和内生固氮菌。根际固氮菌主要通过产生对宿主植物有益的植物激素等促生长因子而改变根系形态而促进植物生长,主要包括雀稗固氮菌 (*Azotobacter paspali*)、

拜叶林克氏菌 (*Beijerinckia* spp.) 等。内生固氮菌又分为两种: 兼性内生固氮菌和专性内生固氮菌, 兼性内生固氮菌既能在根内生长也可以定殖在根系表面和土壤中, 主要的兼性内生固氮菌为固氮螺菌属的细菌, 如产脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*)、巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*)、亚马逊固氮螺菌 (*Azospirillum amazomense*) 等。而专性内生固氮菌在土壤中生存能力弱, 甚至不能生存, 它们主要存在于植物组织内。这类细菌包括 α -变形杆菌醋酸固氮菌 (*Acetobacter diazotrophicus*)、 β -变形杆菌固氮弧菌 (*Azoarus* spp.)、织片草螺菌 (*Herbaspirillum seropedicae*)、红苍白草螺菌 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) 和伯克霍尔德菌 (*Burkholderia* spp.) 等。这些细菌通过植物根表皮细胞或次生根形成处的细胞间隙感染植物, 然后通过蒸腾作用经木质部扩散到植物地上部分^[11]。联合固氮菌可以产生植物激素包括生长素 (IAA)、类细胞分裂素 (CTK) 及类赤霉素 (GA), 从而影响植物根的呼吸速率和代谢, 也能刺激根毛和次生根的形成, 增加根毛和次生根数量。另外联合固氮菌还可以增加宿主根的质子流, 从而刺激宿主植物对矿物质的吸收, 并提高三羧酸循环和糖酵解途径中的有关酶的活性, 从而增强植物根的抗菌能力^[12]。

1.2 联合固氮菌在禾本科植物中的主要类群

甘蔗是一种多用途作物, 主要用于生产糖、能源和生物乙醇。它的生长需要大量氮素, 研究发现, 甘蔗中的固氮菌主要分布在甘蔗根部及根际, 地上部分固氮菌分布较少。Lima 等^[13] 和 Kruasuwan 等^[14] 发现, 甘蔗中的联合固氮菌主要为变形菌门 (Proteobacteria, 97.23%) 和厚壁菌门 (Firmicutes, 2.78%)。1988 年研究人员在甘蔗根部发现了内生固氮菌醋酸杆菌 (*Acetobacter diazotrophicus*), 它们寄生在植物组织内部, 不会引起任何疾病症状。但这种细菌不能在土壤中自由生活, 必须依赖植物提供的营养物质生长繁殖^[15]。

水稻是全球半数人口的主要粮食来源, 其生产受氮肥限制, 在生长季时, 水稻对施入氮的吸收率不足 50%, 大部分则以淋溶或气体形式损失, 不仅带来严重的环境问题, 也造成经济损失。关于水稻中固氮的研究较多为变形菌门、蓝藻。其中 α -变形菌门中的慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 是优势属, 厚壁菌门和放线菌门 (Actinomycetes) 的含量相对较少^[16-18]。固氮菌主要在水稻根部固氮, 在地上植物部分和叶子部分, 固氮菌的固氮量较少^[19]。除此之外, 研究发现小麦根际固氮菌主要由变形菌门、疣粒菌

门 (Verrucomicrobia) 和蓝藻组成, 在分蘖期, 镰孢菌科 (Scytonemataceae) 和红环菌目 (Rhodocyclales) 相对丰度高, 扬花阶段, 伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderiales*) 和慢生根瘤菌属相对丰度更高。小麦的优势菌属同样为隶属于 α -变形菌门的慢生根瘤菌属^[20-21]。

玉米中的固氮菌不仅仅存在于玉米根际, 还存在于气生根粘液处^[22]。Abadi 等^[23] 发现, 玉米叶圈也可以固氮, 从玉米叶圈分离的 242 株菌株中有 31.82% 菌株为固氮菌。这些固氮菌隶属于厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 4 个细菌门, 其中短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 为优势种。泛菌属 (*Pantoea*)、微杆菌属 (*Microbacterium*) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 次之。其他的被鉴定出来的还有红球菌属 (*Rhodococcus*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、杆菌属 (*Brachybacterium*)、棒形杆菌属 (*Clavibacter*)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*) 等。玉米叶圈内存在大量不同种类的固氮细菌, 可以为植物提供氮素营养。

目前对于禾本科作物中联合固氮菌的研究还在进一步探索, 其在植物体内的分布及群落组成不仅与农作物种类有关, 作物不同生长期也会影响固氮菌的类型 (表 1)。固氮菌主要分布在植物根际、植物组织的表面或内部等不同部位中, 在根际和根的表面, 固氮菌分布密度最大。当它们定植于内生组织时, 它们在根内的比例会更高^[24]。另一方面, 高通量测序表明许多 *nifH* 基因序列不属于已分离得到的菌种, 说明目前对土壤中固氮菌的研究尚不深入, 还需要更多地筛选土壤中固氮菌或者进行宏基因组测序^[25]。另外, 在水稻和小麦等禾本科植物中均检测到慢生根瘤菌, 该菌株的联合固氮作用会在下文详细介绍。

1.3 联合固氮菌的固氮机理

固氮基因簇的大小约为 11~64 kb, 包含合成固氮酶基因、电子传递链和氧保护机制等。迄今为止, 已鉴定出 4 种固氮酶, 根据金属离子的不同, 分为铁钼固氮酶、钒铁固氮酶、铁铁固氮酶以及新型固氮酶^[30]。前 3 种固氮酶的结构蛋白和辅因子生物合成序列高度保守, 但对氧极不稳定^[31]。其中 *nifH* 基因由于高保守型, 通常用于鉴定固氮菌。钒铁固氮酶和铁铁固氮酶是选择性固氮酶, 仅存在于少数的固氮菌中, 选择性固氮酶往往与钼铁固氮酶共存。3 种固氮酶中固氮效率最高的是钼铁固氮酶, 其次是钒铁固氮酶和铁铁固氮酶^[32]。

钼铁固氮酶结构蛋白由钼铁蛋白 (固氮酶) 和铁

表 1 禾本科植物中联合固氮菌种类
Table 1 Species of associated nitrogen-fixing bacteria in grasses

宿主 Parasitifer	联合固氮菌种类 Combined nitrogen-fixing bacteria species	参考文献 Reference
甘蔗 Sugarcane	伯克霍尔德氏菌属、肠杆菌属、假单胞菌属、泛菌属、寡养单胞菌、芽孢杆菌属 <i>Burkholderia</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pantoea</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	[13]
	克雷伯氏菌属、柠檬酸杆菌属 <i>Klebsiella</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp.	[26]
	草螺菌属、固氮螺菌属、葡糖醋杆菌 <i>Herbaspirillum</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp., <i>Gluconacetobacter</i> sp.	[27]
	链霉菌属、小双孢菌属、马杜拉放线菌属、不动杆菌属、小单胞菌属、类芽孢杆菌、葡萄球菌、赖氨酸芽孢杆菌属、微球菌 <i>Streptomyces</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Lysinibacillus</i> , <i>Micrococcus</i>	[14]
水稻 Rice	鞘丝藻属、念珠藻属、蓝丝菌属、固氮螺菌属、慢生根瘤菌属、甲基孢囊菌属、地杆菌属、脱硫叶菌属、脱硫弧菌属 <i>Leptolyngbya</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Cyanothece</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Methylocystis</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Desulfobulbus</i> , <i>Desulfovibrio</i>	[28]
	甲基弯曲菌、根瘤菌属 <i>Methylosinus trichosporium</i> , <i>Rhizobium</i> sp.	[29]
玉米 Maize	短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、泛菌属、微杆菌属、不动杆菌属、红球菌属、微球菌属、杆菌属、棒形杆菌属、短小杆菌属、肠杆菌属、金黄杆菌属 <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Chryseobacterium</i>	[23]
小麦 Wheat	慢生根瘤菌属、伯克霍尔德氏菌属、地杆菌属、脱硫杆菌属、太阳杆菌属、磁螺菌属、甲基球菌属、固氮弧菌属、解纤维素菌属 <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Heliobacterium</i> , <i>Magnetospirillum</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Azoarcus</i> , <i>Cellulosilyticum</i>	[21]

蛋白(固氮酶还原酶)组成。铁蛋白是由 *nifH* 基因编码的 γ_2 型同源二聚体。每个亚基之间有 1 个单一的 $[\text{Fe}_4\text{-S}_4]$ 簇连接。钼铁蛋白由 1 个 $\alpha_2\beta_2$ 型的四聚体组成,由 *nifDK* 基因编码。每个 $\alpha\beta$ 二聚体中包含两个独特的金属簇: P 簇和 M 簇。 α - 和 β - 亚基位于 P 簇 $[\text{Fe}_8\text{S}_7]$ 的界面上,底物在 M 簇 $[\text{MoFe}_7\text{S}_7\text{C-R-高柠檬酸}]$ (FeMo-co) 处被还原。其中 *nifK* 基因编码 α 亚基, *nifD* 基因编码 β 亚基。NifENXBQV 参与 FeMo-co 的合成以及嵌入; NifMWZ 参与铁蛋白、钼铁蛋白的成熟; NifUS 参与 Fe-S 簇的形成; *nifJF* 基因编码电子传递蛋白, *nifJ* 基因编码铁氧还蛋白, *nifF* 基因编码黄氧还蛋白将电子传递给钼铁蛋白固氮酶进行固氮反应。在每个缔合/解离步骤中,每个转移的电子会水解两个 MgATP 分子^[33-35]。具体构造如图 1A。固氮过程为铁蛋白与 Mg-ATP 结合后,被黄素氧还蛋白或铁氧还蛋白还原,并与钼铁蛋白暂时结合以传递电子。铁蛋白每传递一个电子,同时伴随两个 Mg-ATP 的水解。在这一催化反应中,铁蛋白反复氧化和还原,电子和质子依次通过铁蛋白和钼铁蛋白,最终传递给 N_2 ,使它们还原成 NH_3 。

Thaweenut 等^[36]通过 $^{15}\text{N}_2$ 稀释法测定甘蔗植株中联合固氮菌的固氮作用,他们在甘蔗茎组织中检测到 *nifH*-mRNA,鉴定后发现,表达该基因的主要联合固氮菌的序列与慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium* sp.) 和固氮根瘤菌 (*Azorhizobium caulinodans*) 相似,这表明慢生根瘤菌属可能是甘蔗中固氮的主要内生固氮菌,该菌株主要在甘蔗茎组织细胞间质外体定殖,可以

通过同化甘蔗分泌的糖、有机酸和氨基酸等物质来生长繁殖,并进行氮的固定。

研究发现在水稻、小麦等作物中均存在较多的慢生根瘤菌。其在自由状态下,可在富含碳源和能量源的质外体的微氧环境下固定 N_2 ,形成类似于豆科植物根瘤共生体系统^[37]。具体固氮方式见图 1B。1975 年 Pagan 等^[38]和 Kurz 等^[39]均发现某些根瘤菌,如慢生根瘤菌可以在自由生存状态下表达固氮酶活性。自由固氮微生物,如克雷伯氏菌 (*Klebsiella*),在贫瘠的环境中微量地固定 N 为 NH_4^+ 。而根瘤菌则相反,其必须在有特定的糖、有机酸和氮源(谷氨酰胺或氨或硝酸盐)的存在下,才能将 N_2 固定为 NH_4^+ ,并输出体外。根瘤菌在微氧的条件下, N_2 的固定非常活跃,且不受高浓度 NH_4^+ 的抑制。但是会受到谷氨酰胺合成酶将固定的 N (NH_4^+) 同化为谷氨酰胺的作用的抑制,因为谷氨酰胺合成酶腺苷酰化,并在低 pH (5.3~5.6) 条件下排泄到质外体中,质外体中的氨可能被植物细胞吸收同化^[40]。

Greetatorn 等^[41]最近研究了慢生根瘤菌 SUTN9-2 (*Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2) 菌株在水稻中形成内生组织的固氮机理。研究发现,加入水稻提取物后,慢生根瘤菌 SUTN9-2 的细胞增大, DNA 含量增加,从而增加了该固氮菌的固氮量。可能的原因是水稻提取物中的某些因素诱导了细胞增大和固氮基因的表达。从转录组分析差异表达基因 (DEGs) 可知, SUTN9-2 受水稻提取物和 *bclA* 基因缺失的影响。上调的 DEGs 编码一类氧化还原酶,它们与氧原子作

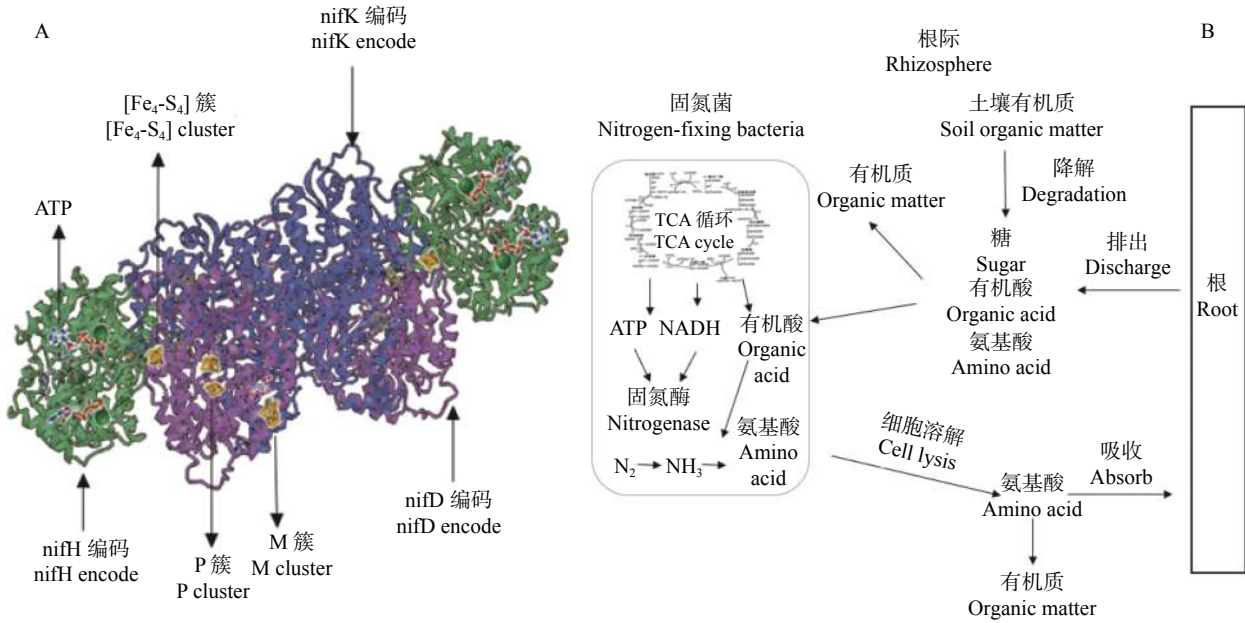


图 1 根瘤菌固氮系统

Fig. 1 Nitrogen fixation system of rhizobia

A 为固氮酶结构图; B 为慢生根瘤菌属在非豆科植物根际固氮方式。Figure A shows the structure of nitrogenase; and Figure B shows the nitrogen fixation mode of *Bradyrhizobium* spp. in the rhizosphere of non-leguminous plants.

用, 猜测该基因可以调控固氮酶固氮时的氧含量, 之后是固氮酶功能所需的 GroESL 伴侣蛋白。这些结果表明, SUTN9-2 在水稻提取物中, 固氮作用是由 GroESL 伴侣蛋白和氧化还原酶的集体效应引起的。即使 *bclA* 发生突变, 抗微生物肽转运体 (antimicrobial peptide transporter, sapDF) 的敏感性表达也会被上调, 导致细胞分化。这一结果表明, 水稻产生的防御素类抗菌肽 (DEFs) 与豆科植物产生的根瘤特异性富半胱氨酸 (NCR) 肽相似, 这影响了细菌细胞的分化。

2 联合固氮菌的活性和调控

提高联合固氮菌在禾本科植物中的固氮率, 不仅能改善土壤因大量施入化肥造成的环境问题, 还对提高土壤抗病菌能力、土壤肥力具有重要意义。因此, 了解影响联合固氮菌的环境因素, 通过改善农艺管理措施来提高联合固氮菌固氮活性, 可为植物提供更多的氮素营养。固氮是一个极度耗能的过程, 需要消耗大量的碳源、氮源, 因此环境中营养元素的含量对于联合固氮菌固氮具有重要作用。

2.1 施加碳源

由于大量化肥施用造成了土壤板结、酸化、生物多样性降低等问题, 因此, 为缓解因为化肥施加过量造成的环境问题, 有机物添加是改善土壤环境的有效选择。施加秸秆、生物炭、根系分泌物以及粪肥等可以提升土壤养分, 为土壤中微生物提供碳源,

从而改善土壤环境, 提高土壤综合能力, 是增加土壤碳源的重要方式, 而添加有机碳也可以为固氮菌提供能量。

Liu 等^[42]发现 *nifH* 基因丰度与土壤有机碳呈正相关, 他们将生物炭和小麦秸秆施加至碱性土壤中, 发现生物炭的添加增加了土壤中联合固氮菌的 *nifH* 基因丰度, 添加秸秆和生物炭均增加了土壤固氮速率, 但相比较而言, 施加生物炭处理组的固氮速率更高, 最高可升高 52.73% 左右; 施加秸秆固氮速率仅增加 8.5% 左右; 进一步探究发现施加生物炭不仅增加了土壤中有机碳含量, 还增加了土壤中有效磷的含量。Hu 等^[43]在中性黑土中施用 35 年肥料, 发现仅施加粪肥显著增加了 *nifH* 基因丰度, 而全部施加化肥和施加部分粪肥的土壤中, *nifH* 基因丰度比对照土壤显著降低, 且土壤中主要的联合固氮菌为 α -变形菌。

2.2 施加氮素营养

大量研究认为, 过度施用无机氮肥会降低土壤微生物的固氮活性, 长期氮肥施用会改变土壤固氮菌群落结构, 导致联合固氮菌多样性降低^[44-46]。其主要原因是当环境中存在可利用氮时, 固氮菌的固氮作用被抑制, 且不需要自身固氮来维持所需氮源。Wang 等^[47]在酸性玉米农田土壤中施无机肥 25 年后, 发现施氮和施氮磷钾处理的土壤中 *nifH* 基因拷贝数均显著降低, 而施加磷钾处理的玉米生物量和 *nifH*

拷贝数显著增加;但施加生石灰可以有效缓解氮肥的抑制作用。说明施加氮肥会导致土壤 pH 降低,土壤酸化对联合固氮菌的影响较大。但也有试验表明,添加少量化肥或化肥与有机肥配合施用,可提高土壤中 *nifH* 基因丰度,并增加氮素利用率,减少氮素流失^[45-46]。当环境中施用少量氮肥时,氮素可以促进固氮菌生长,从而增加固氮菌含量及多样性并增加固氮活性。Wang 等^[48]通过研究施肥量对长期稻田土壤固氮微生物的影响表明,固氮菌多样性随着长期施肥而增加,但随着施肥量的增加而逐渐减少,氮磷钾肥(NPK)处理的固氮菌多样性最高,3倍 NPK 处理的土壤中固氮菌多样性与对照无显著差异。Pereira 等^[49]研究氮肥和联合固氮菌的施加对甘蔗茎、糖产量和经济指标的影响,发现施加低剂量(50 kg·hm⁻²)氮肥和联合固氮菌的甘蔗产量和经济效益最高。Zhou 等^[50]研究长期施肥对小麦联合固氮菌群的影响,发现加入低剂量氮肥没有降低小麦联合固氮菌的多样性,但高剂量氮肥输入导致联合固氮菌的多样性降低。因此氮肥的添加并不完全抑制固氮菌固氮作用。但毫无疑问,过量氮肥的施入一定会造成大量氮损失,并且减少固氮菌多样性,因此考虑适量氮肥与生物肥的配施,或许能更好地提高固氮效果。

2.3 施加其他矿物元素

钼是固氮酶中心元素,在土壤中适当添加钼可有效增加联合固氮菌固氮量。2008年 Barron 等^[51]发现微量元素钼限制了巴拿马低地森林土壤中固氮菌的固氮作用,他们发现在施用了含有钼的磷肥后,该森林土壤的固氮作用急剧增加,而施加没有钼的磷肥,土壤中固氮作用增加较少。Ma 等^[18]也发现,在不施氮的条件下,施用钼显著提高了水稻土的固氮量,增加了 *nifH* 基因拷贝数和蓝藻相对丰度。

磷的有效性经常限制固氮菌的固氮作用,磷输入可以满足三磷酸腺苷合成和固氮酶蛋白的磷需求,从而改善固氮菌群^[52-53]。在土壤中,只有 0.1% 的总磷供植物吸收。因此有效磷的添加对联合固氮菌固氮有重要意义。Xiao 等^[54]在喀斯特草地进行了养分添加试验,即氮、磷和氮磷共添加,发现联合固氮菌多样性和群落组成对磷的添加比对氮的添加更敏感,磷的加入显著增加了固氮菌的丰富度、多样性和群落组成,但固氮速率没有明显增加,磷可能具有唤醒休眠中某些联合固氮菌的作用。Stanton 等^[55]发现,磷在抑制植物冠层中存在的蓝藻总氮固定中起主要作用,而钼在决定单个细胞的固定率方面发挥了次要作用。Li 等^[56]将固氮菌和解磷菌共接种发现,共

接种显著提高了植物生物量(长度、鲜重和干重)、含氮量和含磷量;与单独接种固氮菌相比,共接种还显著提高了土壤全氮、速效磷和固氮酶活性,共接种使 *nifH* 基因在芽和根中的表达加倍。有效磷的添加对固氮菌丰度、多样性及固氮量的增加均有效。

除了钼和磷外,有效铁和钾的应用也至关重要。Thompson^[57]研究发现固定氮的 Fe-N₂ 催化剂可以质子化形成中性的 Fe(NNH₂) 中间体,在进一步质子化后,该中间体杂化分裂 N-N 键,释放 [Fe^{IV}≡N]⁺ 和 NH₃, 该试验证明铁对生物固氮的重要意义。Trovero 等^[58]发现在缺铁时,固氮菌 *Herbaspirillum seropedicae* Z67 失去了固氮能力。Ma 等^[19]通过¹⁵N₂ 标记的方法发现,在土壤中种植水稻会增加固氮量,可能是由于水稻种植吸收了土壤中的氨态氮,降低了土壤氮含量,且水稻种植的土壤中有有效铁(Fe²⁺)含量高于休耕土壤,这些变化有利于生物固氮;此外,还发现根部的固氮量高于地上部植物部分和叶子部分。Alahari 等^[59]发现钾缺乏可导致多种代谢损伤,并导致丝状、异囊性、固氮蓝藻的停止生长。因此适当添加铁和钾元素对固氮菌生长及固氮有重要作用。

3 联合固氮菌的资源与应用

为寻找可替代氮肥的生物肥料,研究者们将目光投至菌剂研发中,力求通过分离筛选高效固氮菌,大规模培养投入农业中,以解决大量工业氮肥施加所造成的环境影响。然而,目前固氮菌的施加有很多未解决的问题,例如,固氮量不稳定、成本高,与土著微生物间存在竞争^[6];或者筛选的固氮菌可能是潜在致病菌等。目前这些问题还没有很好的解决方法,但研究者们仍在不断努力筛选高效固氮菌,研究基因改造以及了解菌群协作方式等,以期通过这些方式提高固氮菌在田间的固氮效率。

3.1 施加固氮菌增加固氮量

随着生物固氮研究的深入,研究者筛选出的高效固氮菌种类繁多,并将其应用于土壤及植物组织中进行固氮的研究。Singh 等^[60]从甘蔗根际分离出 22 种生物防治能力及固氮能力强的固氮芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* 和 *Bacillus mycoides*),并将它们接种至甘蔗中,发现这些菌种成功在甘蔗根际定殖,大部分位于根和叶中,且接种后甘蔗的固氮能力增加,还提高了甘蔗对病原体的耐受性,增强了甘蔗的生物防治。这些菌株在保护甘蔗、适应环境压力和提供养分方面发挥了重要作用,且该菌具有较厚细胞壁,对外界环境耐受能力较强,更能适应不同环境。

狄义宁等^[61]将分离出的内生菌接种至不同基因型的甘蔗中,发现甘蔗的农艺性状及生理指标均优于未接种甘蔗。Song 等^[62]研究发现,在水稻田中接种固氮蓝藻和施肥不仅增加氮肥利用效率,降低总溶解氮的淋失率,而且接种蓝藻比单独使用尿素在水稻种植后期有更大的氮素保持率,因为固氮蓝藻具有拦截、修复和延迟释放氮的特性。Banik 等^[63]在水稻种植中接入内生固氮菌 [*Azotobacter* sp. strain Avi2 (MCC 3432), AzA] 后,发现无论在盆栽和大田试验中, AzA 替代一半化肥对水稻产量无显著影响,说明该菌株可显著减少氮肥用量。之前研究人员从小麦中分离出类芽孢杆菌 *Paenibacillus triticisoli*, 命名为 BJ-18, 该菌具有较强的固氮能力,可以固定氮素,并产生促生长激素、铁载体和吡啶乙酸促进植物生长,目前该菌株已被验证可以促进玉米和小麦的生长^[40,64-65]。

除了单一菌株接种外, Li 等^[56]发现同时接种溶磷菌 (*Paenibacillus* sp. B1) 和内生固氮菌克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella* sp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 等,可显著增加小麦产量以及 *nifH* 基因表达量,其联合接种影响比单独接种更显著。试验人员在巴西接种巴西固氮螺菌菌株 Ab-V5 和 Ab-V6 到玉米和小麦种子中,发现与未接种对照相比, Ab-V5 和 Ab-V6 使玉米平均增产 27%, 小麦平均增产 31%; 进一步研究发

现 Ab-V5 和 Ab-V6 菌株提高生产力的主要原因是植物激素的合成,促进根系生长,增加水分和养分吸收,并提高了对非生物胁迫的耐受性^[66]。Gómez-Godínez 等^[67]将分离到的具有固氮能力的几种固氮菌接种至玉米植株中,发现接种固氮菌的玉米产量增加,固氮量增加,但加入混合固氮菌相比较加入单菌种固氮菌可以为玉米提供更多的氮素,说明接种的促植物生长的菌株之间存在着相互作用,猜测可能是其他细菌促进固氮菌的固氮能力。Droge 等^[68]发现当在水稻中接种固氮螺菌 (*Azospirillum* spp.) 菌株后并不表达 *nifH* 基因,但当接入其他促生长菌后,该菌种的 *nifH* 基因表达,并提高固氮量。

除了接种分离到的野生菌与通过菌群协作提高固氮量外,还可以通过基因改造的方式,解除固氮菌氮抑制,使菌剂中的固氮菌更容易在环境中存活,并提高固氮率。Bloch 等^[69]通过识别和分离与关键作物密切相关的联合固氮菌,然后通过基因编辑中断连接氮敏感、固定和同化的调控网络,使该固氮菌的固氮能力、铵耐受性以及铵排出能力增强。该重组固氮菌与野生型固氮菌相比,其能在外源氮充足的环境中固氮,从而解除了野生型菌株的氮抑制作用。表 2 总结了接种固氮菌对固氮酶活性和产量提高的作用效果。

表 2 施加固氮菌对禾本科植物固氮酶活性或产量的影响
Table 2 Effects of nitrogen-fixing bacteria on nitrogenase activity or yield of Poaceae plants

植株 Plant	施加菌株 Bacteria	固氮酶活性提高率 Increase rate of nitrogenase activity (%)	作物产量提高率 Increase rate of crop yield (%)	参考文献 Reference
甘蔗 Sugarcane	巨大芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus mycoides</i>	21~35	—	[60]
	枯草芽孢杆菌 B9 <i>Bacillus subtilis</i> B9	—	29.84~95.51	[61]
水稻 Rice	固氮鱼腥藻 <i>Anabaena azotica</i> (FACHB-119)	—	25	[62]
	固氮菌 <i>Azotobacter</i> sp. strain Avi2 (MCC 3432)	—	6.3~10.7	[63]
玉米 Maize	多粘芽孢杆菌 <i>Paenibacillus triticisoli</i> BJ-18	12.9~36.4	—	[65]
	固氮螺菌属 <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5和Ab-V6	—	27	[66]
	多粘芽孢杆菌 <i>Paenibacillus triticisoli</i> BJ-18	—	16.9	[36]
小麦 Wheat	溶磷菌、内生固氮菌、假单胞菌 <i>Paenibacillus</i> sp. B1, <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i>	26~163	—	[56]
	巴西固氮螺菌 Ab-V5 和 Ab-V6 <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 and Ab-V6	—	31	[66]

3.2 固氮菌对土传真菌病原体具有拮抗作用

研究人员发现当植物有病原菌入侵时,植物根际会刻意招募某些特定的土壤微生物,从而改变土壤微生物群落,抑制土传真菌病原体。类似的现象出现在不同地理区域的不同土壤中,表明疾病的抑

制是通过相似机制发生的。一些研究表明,植物通过产生化合物来吸引一套有益微生物来应对病原体的攻击^[70-71]。Yin 等^[72]对小麦接种水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) AG8,发现在种植周期内,小麦根际的细菌群落与未侵染根际形成的菌群明显不同;

连续栽培和施用 AG8 后,某些联合固氮菌属,包括固氮假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*) 等的相对丰度显著增加。分离后发现,这些菌属均对该病原菌有拮抗作用。Zhou 等^[73]筛选出几株固氮蓝藻菌株,发现其对水稻纹枯病控制效果显著,最高可达 54.5%;另外他们还发现固氮蓝藻的加入可以有效地抑制番茄红素和己二酸二异辛酯的分泌,还可以产生水杨酸、生长素和细胞因子等植物激素促进植物生长,诱导植物抗病,并改善土壤养分含量以支持植物生长。综上所述,这些研究结果表明植物中的微生物群落与病原菌侵染之间存在着密切的联系,植物通过招募特定微生物以应对病原菌侵染。而联合固氮菌通常具有抗病抗逆能力,在固氮的同时能为植物提供更安全的生长环境。植物激素平衡的调节是促进植物根系结构改变和吸收更多营养的最重要的机制^[56-57],固氮菌的加入有利于植物根系激素调节,从而促进植物更健康生长。

不同理化性质或不同地点的土壤中固氮菌种类的不同或许和该土壤中不同菌群协作方式有关,今后对于菌群分布的研究或许能更进一步为土壤改善以及谷物增产提供指导性的建议。固氮菌的接种不仅可以提高植物固氮量,还可以提高产量,可促进植物生长提高植物抗逆性。其促进机制主要有:1) 直接促进。通过菌株的固氮、溶磷、解钾和铁螯合作用,提高土壤中植物可利用氮、磷、钾、铁元素;还可以分泌生长素 (IAA)、赤霉素 (GA) 和细胞分裂素 (CTK) 等植物激素促进植物生长。2) 间接促进。通过改善植物光合作用,调节植物体酶的活性,与病原菌竞争营养和空间来抑制病原菌,从而提高植物抗病能力。

3.3 固氮菌可能是潜在的人类病原菌

目前,大多数固氮菌还处于未培养或未分离的状态,分离出来的固氮菌中,大多数为促生长细菌,但也有研究表明,从谷物中分离的联合固氮菌中,有人类病原体或潜在的人类病原体^[74],如洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) 和肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella variicola*) 等^[75-77]。洋葱伯克霍尔德菌复合体包括 17 种,其中一些可导致免疫受损或囊性纤维化患者的致命肺部感染,另一些是动植物感染的病原体^[77]。这种复合体通常定居于根际,并具有促进植物生长的特性^[78-80]。克雷伯氏菌是从几种不同的植物中分离出来的。*K. variicola* 342 具有参与处理植物源纤维素和芳香族化合物的基因,可用于将效应蛋白分泌到真核细胞的细胞质中,促进真核细胞的

感染,但没有编码效应蛋白的基因,它对抗生素具有抗药性。然而在小鼠身上进行的致病性测试实验中,肺炎克雷伯氏菌 342 与临床分离株 C3091 一样还会引起尿路感染,但肺部感染的水平比较低^[81]。

另一方面,其他与植物相关的细菌,如固氮螺菌、草本菌 (*Herbaspirillum*)、重氮葡萄糖乙酰杆菌 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)、固氮菌 (*Azoarcus*)、固氮蓝藻等被认为是安全的^[82-85],它们被用作农业中的接种剂,且固氮蓝藻的施加不仅可以固氮,还可以降低土壤中氮素流失率^[65,86]。大量研究人员开展了固氮菌接种试验,并发现固氮菌的接种成功提高了植物的固氮作用,并有效地提高植物的抗病抗逆能力。因此,筛选和应用合适而安全的固氮菌对农业生产至关重要,某些对植物有益的固氮菌或许是潜在的人类致病菌,菌种安全问题也需要进一步探索。

距第一个固氮菌的分离已有一百多年历史了,但到现在为止,高效的促生长固氮菌的筛选仍然是研究的热点,筛选出可高效固氮、溶磷解钾的固氮菌对农业生产仍有巨大的吸引力。目前为止,可培养联合固氮菌还很少,高效促生长固氮菌的分离和筛选,对农业生产及环境生态息息相关,固氮菌的应用对生态可持续发展有重要的意义。

4 结论

本文从禾本科植物的联合固氮菌种类及其作用机理、固氮活性及调控方式以及联合固氮菌的资源及应用 3 个方面进行综述,通过介绍禾本科植物联合固氮菌的种类及作用机理,了解联合固氮菌的作用方式,发现对联合固氮菌的种类和作用机理研究还在不断深入,但因为联合固氮菌很容易受到环境因素的影响,如土著微生物竞争以及环境中营养元素变化等问题,因此相较共生固氮而言,其研究难度更大。另外目前还有很多未鉴别的联合固氮菌,尤其水稻中的未分类固氮菌占比最大,因此今后还需要通过分离筛选和宏基因组测序等手段,认识更多联合固氮菌种类,提供联合固氮菌的研究材料,更好地推动联合固氮菌的发展。在固氮活性及调控方式方面,本文综述了目前可用于农业生产生活中的调控措施,总的来说碳、氮、磷、钾、钼和铁等均对固氮菌有较大的影响,适量添加可有效促进固氮菌的固氮效率,但其具体施用量以及元素间精确配比仍然不清楚,今后需要加大对该方面的研究,提出切实有效的农艺改良措施。固氮菌不仅可以改变菌群,

提高土壤中固氮量, 还能增加植物抗病抗逆能力。然而, 其提供的氮量相对于植物生长所需氮量仍然不够, 且生物固氮受环境因素影响很大, 其固氮量不稳定等问题还需要进一步研究解决。

5 展望

1) 农艺管理与调控。目前关于营养元素对土壤固氮菌的影响已经有很多的研究, 但不同研究中, 营养元素的添加起到的效果不同, 这与土壤性质、环境因素等有关。因此, 今后还需要多开展大尺度试验, 了解不同地区不同土壤性质对固氮菌的影响, 构建拟合模型, 了解最关键影响因素, 为农业管理措施提供更精准的指导意见。2) 菌剂应用。目前研究发现, 与不添加固氮菌相比, 添加固氮菌仅能少量增加土壤中固氮酶活性及作物产量。虽然在田间施加固氮菌能有效增加土壤固氮率和氮素留存量, 但施加固氮菌对作物的生长仍然没有直接施加尿素等化肥的效果明显。因此, 筛选高效固氮菌, 探究固氮菌的施用方式及其影响因素是目前亟待解决的问题。联合固氮菌的菌群协作、基因改造以及肥料配施均能有效增加植物氮素利用率, 在这一方面研究人员还需进一步定量分析, 为农业生产提供指导意见; 另一方面, 对于高效固氮菌的筛选还需要关注其安全性问题, 要筛选出既能促进植物生长, 又对人类无害的联合固氮菌。

参考文献 References

- [1] DALTON H. The fundamentals of nitrogen fixation[J]. *Febs Letters*, 1983, 162(1): 207–207
- [2] FOWLER D, PYLE J A, RAVEN J A, et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century: introduction[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1621): 20130165
- [3] HERRIDGE D F, PEOPLES M B, BODDEY R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. *Plant and Soil*, 2008, 311(1/2): 1–18
- [4] SIMONSEN A K, DINNAGE R, BARRETT L G, et al. Symbiosis limits establishment of legumes outside their native range at a global scale[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14790
- [5] 李旭, 董炜灵, 宋阿琳, 等. 秸秆添加量对土壤生物固氮速率和固氮菌群落特征的影响[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(5): 980–991
- LI X, DONG W L, SONG A L, et al. Effects of straw addition on soil biological N₂-fixation rate and diazotroph community properties[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(5): 980–991
- [6] 徐鹏霞, 韩丽丽, 贺纪正, 等. 非共生生物固氮微生物分子生态学研究进展[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(10): 3440–3450
- XU P X, HAN L L, HE J Z, et al. Research advance on molecular ecology of asymbiotic nitrogen fixation microbes[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(10): 3440–3450
- [7] SEARCHINGER T, WAITE R, HANSON C, et al. Creating a sustainable food future: A menu of solutions to feed nearly 10 billion people by 2050[C/OL].//Final Report, 2019: 42. [2014-01-01] https://www.researchgate.net/profile/Richard-Waite-2/publication/280755107_Creating_a_sustainable_food_future_A_menu_of_solutions_to_sustainably_feed_more_than_9_billion_people_by_2050_World_resources_report_2013-14_interim_findings/links/55f18e3008aedecb69005914/Creating-a-sustainable-food-future-A-menu-of-solutions-to-sustainably-feed-more-than-9-billion-people-by-2050-World-resources-report-2013-14-interim-findings.pdf
- [8] BALDANI J, CARUSO L, BALDANI V L D, et al. Recent advances in BNF with non-legume plants[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, 29(5/6): 911–922
- [9] FRANCHE C, LINDSTRÖM K, ELMERICH C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants[J]. *Plant and Soil*, 2009, 321(1/2): 35–59
- [10] DÖBEREINER J, DAY J M, NEWTON W E, et al. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites[EB/OL]. 1976
- [11] 张丽梅, 方萍, 朱日清. 禾本科植物联合固氮研究及其应用现状展望[J]. *应用生态学报*, 2004, 15(9): 1650–1654
- ZHANG L M, FANG P, ZHU R Q. Recent advances in research and application of associated nitrogen-fixation with graminaceous plants[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(9): 1650–1654
- [12] KENNEDY I R, 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): 447–457
- [13] LIMA D R M, SANTOS I B, OLIVEIRA J T C, et al. Genetic diversity of N-fixing and plant growth-promoting bacterial community in different sugarcane genotypes, association habitat and phenological phase of the crop[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(3): 1089–1105
- [14] KRUSASUWAN W, THAMCHAIPENET A. Diversity of culturable plant growth-promoting bacterial endophytes associated with sugarcane roots and their effect of growth by co-inoculation of diazotrophs and actinomycetes[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2016, 35(4): 1074–1087
- [15] CAVALCANTE V A, DOBEREINER J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane[J]. *Plant and Soil*, 1988, 108(1): 23–31
- [16] CHAKRABORTY A, ISLAM E. Temporal dynamics of total and free-living nitrogen-fixing bacterial community abundance and structure in soil with and without history of arsenic contamination during a rice growing season[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(5): 4951–4962
- [17] WU C F, WEI X M, HU Z Y, et al. Diazotrophic community variation underlies differences in nitrogen fixation potential in paddy soils across a climatic gradient in China[J]. *Microbial Ecology*, 2021, 81(2): 425–436
- [18] MA J, BEI Q C, WANG X J, et al. Impacts of Mo application

- on biological nitrogen fixation and diazotrophic communities in a flooded rice-soil system[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 649: 686–694
- [19] MA H L, MAO P P, IMRAN S, et al. Rice planting increases biological nitrogen fixation in acidic soil and the influence of light and flood layer thickness[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2021, 21(1): 341–348
- [20] LI Y, LI T, ZHAO D Q, et al. Different tillage practices change assembly, composition, and co-occurrence patterns of wheat rhizosphere diazotrophs[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 767: 144252
- [21] LIU Y, GUO Z H, XUE C, et al. Changes in N₂-fixation activity, abundance and composition of diazotrophic communities in a wheat field under elevated CO₂ and canopy warming[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 165: 104017
- [22] VAN DEYNZE A, ZAMORA P, DELAUX P M, et al. Nitrogen fixation in a Landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota[J]. *PLoS Biology*, 2018, 16(8): e2006352
- [23] ABADI V, SEPEHRI M, RAHHMANI H A, et al. Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(2): 898–912
- [24] COMPANT S, SAMAD A, FAIST H, et al. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application[J]. *Journal of Advanced Research*, 2019, 19: 29–37
- [25] 谢祖彬, 张燕辉, 王慧. 稻田生物固氮研究进展及方向[J]. *土壤学报*, 2020, 57(3): 540–546
- XIE Z B, ZHANG Y H, WANG H. Advances and perspectives in paddy biological nitrogen fixation[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57(3): 540–546
- [26] MAGNANI G S, DIDONET C M, CRUZ L M, et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2010, 9(1): 250–258
- [27] SAHARAN B S, NEHRA V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review[J]. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011, 21(1): 1–30
- [28] MA J, BEI Q C, WANG X J, et al. Paddy system with a hybrid rice enhances cyanobacteria *Nostoc* and increases N₂ fixation[J]. *Pedosphere*, 2019, 29(3): 374–387
- [29] LIU J M, HAN J J, ZHU C W, et al. Elevated atmospheric CO₂ and nitrogen fertilization affect the abundance and community structure of rice root-associated nitrogen-fixing bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 628108
- [30] BELLENGER J P, XU Y, ZHANG X, et al. Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 69: 413–420
- [31] SICKERMAN N S, RETTBERG L A, LEE C C, et al. Cluster assembly in nitrogenase[J]. *Essays in Biochemistry*, 2017, 61(2): 271–279
- [32] 荆晓妹, 丁燕, 韩晓梅, 等. 联合固氮菌的合成生物学研究进展[J]. *微生物学报*, 2021. DOI: 10.13343/j.cnko.wsx.20200796
- JING X S, DING Y, HAN X M, et al. Advances in synthetic biology of associated nitrogen-fixation bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021. DOI: 10.13343/j.cnko.wsx.20200796
- [33] HOFFMAN B M, LUKOYANOV D, YANG Z Y, et al. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(8): 4041–4062
- [34] HU Y L, RIBBE M W. Biosynthesis of nitrogenase FeMoco[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2011, 255(9/10): 1218–1224
- [35] YONEYAMA T, TERAKADO-TONOOKA J, BAO Z, et al. Molecular analyses of the distribution and function of diazotrophic rhizobia and methanotrophs in the tissues and rhizosphere of non-leguminous plants[J]. *Plants*, 2019, 8(10): 408–429
- [36] THAWEENUT N, HACHISUKA Y, ANDO S, et al. Two seasons' study on nifH gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of nifH genes similar to those of rhizobia[J]. *Plant and Soil*, 2011, 338(1/2): 435–449
- [37] YONEYAMA T, TERAKADO-TONOOKA J, MINAMISAWA K. Exploration of bacterial N₂-fixation systems in association with soil-grown sugarcane, sweet potato, and paddy rice: a review and synthesis[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2017, 63(6): 578–590
- [38] PAGAN J D, CHILD J J, SCOWCROFT W R, et al. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium[J]. *Nature*, 1975, 256(5516): 406–407
- [39] KURZ W G W, LARUE T A. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host[J]. *Nature*, 1975, 256(5516): 407–409
- [40] LI Y B, WANG M Y, CHEN S F. Application of N₂-fixing *Paenibacillus triticisoli* BJ-18 changes the compositions and functions of the bacterial, diazotrophic, and fungal microbiomes in the rhizosphere and root/shoot endosphere of wheat under field conditions[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2021, 57(3): 347–362
- [41] GREETATORN T, HASHIMOTO S, MAEDA T, et al. Mechanisms of rice endophytic bradyrhizobial cell differentiation and its role in nitrogen fixation[J]. *Microbes and Environments*, 2020. DOI: 10.1264/jsme2.me20049
- [42] LIU X Y, LIU C, GAO W H, et al. Impact of biochar amendment on the abundance and structure of diazotrophic community in an alkaline soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 688: 944–951
- [43] HU X J, LIU J J, ZHU P, et al. Long-term manure addition reduces diversity and changes community structure of diazotrophs in a neutral black soil of northeast China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2018, 18(5): 2053–2062
- [44] FENG M M, ADAMS J M, FAN K K, et al. Long-term fertilization influences community assembly processes of soil diazotrophs[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 126: 151–158
- [45] MENG X T, LIAO H K, FAN H X, et al. The geographical scale dependence of diazotroph assembly and activity: Effect of a decade fertilization[J]. *Geoderma*, 2021, 386: 114923
- [46] FAN K K, DELGADO-BAQUERIZO M, GUO X S, et al.

- Suppressed N fixation and diazotrophs after four decades of fertilization[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 143–153
- [47] WANG C, ZHENG M M, SONG W F, et al. Impact of 25 years of inorganic fertilization on diazotrophic abundance and community structure in an acidic soil in Southern China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113: 240–249
- [48] WANG J L, LI Q K, SHEN C C, et al. Significant dose effects of fertilizers on soil diazotrophic diversity, community composition, and assembly processes in a long-term paddy field fertilization experiment[J]. *Land Degradation & Development*, 2021, 32(1): 420–429
- [49] PEREIRA W, SOUSA J S, SCHULTZ N, et al. Sugarcane productivity as a function of nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic plant growth-promoting bacteria[J]. *Sugar Tech*, 2019, 21(1): 71–82
- [50] ZHOU J, MA M C, GUAN D W, et al. Nitrogen has a greater influence than phosphorus on the diazotrophic community in two successive crop seasons in Northeast China[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 6303
- [51] BARRON A R, WURZBURGER N, BELLENGER J P, et al. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils[J]. *Nature Geoscience*, 2009, 2(1): 42–45
- [52] PAJARES S, BOHANNAN B J M. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1045
- [53] REED S C, CLEVELAND C C, TOWNSEND A R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective[J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2011, 42(1): 489–512
- [54] XIAO D, XIAO L M, CHE R X, et al. Phosphorus but not nitrogen addition significantly changes diazotroph diversity and community composition in typical Karst grassland soil[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2020, 301: 106987
- [55] STANTON D E, BATTERMAN S A, VON FISCHER J C, et al. Rapid nitrogen fixation by canopy microbiome in tropical forest determined by both phosphorus and molybdenum[J]. *Ecology*, 2019, 100(9): e02795
- [56] LI Y B, LI Q, GUAN G H, et al. Phosphate solubilizing bacteria stimulate wheat rhizosphere and endosphere biological nitrogen fixation by improving phosphorus content[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9062
- [57] THOMPSON N B, GREEN M T, PETERS J C, et al. Nitrogen fixation via a terminal Fe (IV) nitride[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(43): 15312–15315
- [58] TROVERO M F, SCAVONE P, PLATERO R, et al. *Herbaspirillum seropedicae* differentially expressed genes in response to iron availability[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1430
- [59] ALAHARI A, APTE S K. Pleiotropic effects of potassium deficiency in a heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena torulosa*[J]. *Microbiology*, 1998, 144: 1557–1563
- [60] SINGH R K, SINGH P, LI H B, et al. Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: a comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 220
- [61] 狄义宁, 李自超, 谢林艳, 等. 接种甘蔗内生菌B9对不同甘蔗品种生长的影响[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(1): 149–158
- DI Y N, LI Z C, XIE L Y, et al. Impact of endophyte inoculation on the growth of different sugarcane varieties[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(1): 149–158
- [62] SONG X N, ZHANG J L, PENG C R, et al. Replacing nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing cyanobacteria reduced nitrogen leaching in red soil paddy fields[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2021, 312: 107320
- [63] BANKI A, DASH G K, SWAIN P, et al. Application of rice (*Oryza sativa* L.) root endophytic diazotrophic *Azotobacter* sp. strain Avi2 (MCC 3432) can increase rice yield under green house and field condition[J]. *Microbiological Research*, 2019, 219: 56–65
- [64] LI Y B, LI Q, CHEN S F. Diazotroph *Paenibacillus triticisoli* BJ-18 drives the variation in bacterial, diazotrophic and fungal communities in the rhizosphere and root/shoot endosphere of maize[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(3): 1460
- [65] ZHANG Y, REN J, WANG W, et al. Siderophore and indolic acid production by *Paenibacillus triticisoli* BJ-18 and their plant growth-promoting and antimicrobe abilities[J]. *PeerJ*, 2020, 8(2): e9403
- [66] SANTOS M S, NOGUEIRA M A, HUNGRIA M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants[J]. *Revista Brasileira De Ciência Do Solo*, 2021. DOI: 10.36783/18069657rbcs20200128
- [67] GÓ MEZ-GODÍNEZ L J, FERNANDEZ-VALVERDE S L, MARTINEZ ROMERO J C, et al. Metatranscriptomics and nitrogen fixation from the rhizoplane of maize plantlets inoculated with a group of PGPRs[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2019, 42(4): 517–525
- [68] DROGUE B, SANGUIN H, CHAMAM A, et al. Plant root transcriptome profiling reveals a strain-dependent response during *Azospirillum*-rice cooperation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 607
- [69] BLOCH S E, CLARK R, GOTTLIEB S S, et al. Biological nitrogen fixation in maize: optimizing nitrogenase expression in a root-associated diazotroph[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(15): 4591–4603
- [70] JOUSSET A, BECKER J, CHATTERJEE S, et al. Biodiversity and species identity shape the antifungal activity of bacterial communities[J]. *Ecology*, 2014, 95(5): 1184–1190
- [71] JOUSSET A, ROCHAT L, LANOUE A, et al. Plants respond to pathogen infection by enhancing the antifungal gene expression of root-associated bacteria[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2011, 24(3): 352–358
- [72] YIN C T, CASA VARGAS J M, SCHLATTER D C, et al. Rhizosphere community selection reveals bacteria associated with reduced root disease[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 86
- [73] ZHOU Y W, BAO J Q, ZHANG D H, et al. Effect of heterocystous nitrogen-fixing cyanobacteria against rice sheath blight and the underlying mechanism[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 153: 103580

- [74] BERG G, EBERL L, HARTMANN A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(11): 1673–1685
- [75] RODRÍ GUEZ-MEDINA N, BARRIOS-CAMACHO H, DURAN-BEDOLLA J, et al. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 973–988
- [76] ROSENBLUETH M, MARTINEZ-ROMERO J C, REYES-PRIETO M, et al. Environmental *Mycobacteria*: a threat to human health?[J]. *DNA and Cell Biology*, 2011, 30(9): 633–640
- [77] ROSENBLUETH M, MARTÍ NEZ L, SILVA J, et al. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(1): 27–35
- [78] MENDES R, PIZZIRANI-KLEINER A A, ARAUJO W L, et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(22): 7259–7267
- [79] FIORE A, LAESENS S, BEVIVINO A, et al. *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy[J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(2): 137–143
- [80] SAWANA A, ADEOLU M, GUPTA R S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species[J]. *Frontiers in Genetics*, 2014, 5: 429
- [81] FOUTS D E, TYLER H L, DEBOY R T, et al. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice[J]. *PLoS Genetics*, 2008, 4(7): e1000141
- [82] OKON Y, ITZIGSOHN R. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields[J]. *Biotechnology Advances*, 1995, 13(3): 415–424
- [83] DIVAN BALDANI V L, BALDANI J I, DÖ BEREINER J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 30(5/6): 485–491
- [84] MUTHUKUMARASAMY R, CLEENWERCK I, REVATHI G, et al. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter* peroxydans with wetland rice[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(3): 277–286
- [85] BARBARA R, THOMAS H. *Azoarcus* spp. and their interactions with grass roots[J]. *Plant and Soil*, 1997, 194(1/2): 57–64
- [86] ZHANG J L, SONG X N, WEI H, et al. 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: 2221–2232