

DOI: 10.5846/stxb201404240810

郑棉海, 陈浩, 朱晓敏, 毛庆功, 莫江明. 矿质养分输入对森林生物固氮的影响. 生态学报, 2015, 35(24): - .

Zheng M H, Chen H, Zhu X M, Mao Q G, Mo J M. Effects of the addition of mineral nutrients on biological nitrogen fixation in forest ecosystems. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(24): - .

矿质养分输入对森林生物固氮的影响

郑棉海^{1,2}, 陈浩^{1,2}, 朱晓敏^{1,2}, 毛庆功^{1,2}, 莫江明^{1,*}

1 中国科学院华南植物园, 中国科学院退化生态系统植被恢复与管理重点实验室, 广州 510650

2 中国科学院大学, 北京 100039

摘要:生物固氮是森林生态系统重要的氮素来源, 并且在全球氮循环中占有重要的地位。近代以来, 因人类活动加剧而导致氮沉降的增加以及其它矿质养分元素(如磷、钼、铁等)输入的改变已成为影响森林生态系统生物固氮的重要因素之一, 并引起了学术界的普遍关注。本文系统地综述了国内外关于森林生物固氮对矿质养分输入的响应及机理。主要包括: (1) 森林生物固氮的概念及主要的测定方法; (2) 矿质养分输入对森林生物固氮的影响。整体上讲, 氮素输入抑制了森林生物固氮, 磷和其他营养元素输入则表现为促进作用。氮和磷、磷和微量元素同时添加均提高了森林的固氮量; (3) 矿质养分改变森林生物固氮的机理。包括生物作用机制(如改变地表层固氮菌的数量或群落丰度、改变结瘤植物的根瘤生物量和附生植物的丰度或盖度)和环境作用机制(如引起土壤酸化、改变碳源物质的含量); (4) 探讨了矿质养分输入对森林生物固氮影响研究中所存在的问题, 并对未来该领域的研究提出建议。

关键词:矿质养分输入; 生物固氮; 氮沉降; 森林; 固氮酶活性

Effects of the addition of mineral nutrients on biological nitrogen fixation in forest ecosystems

ZHENG Mianhai^{1,2}, CHEN Hao^{1,2}, ZHU Xiaomin^{1,2}, MAO Qinggong^{1,2}, MO Jiangming^{1,*}

1 Key Laboratory of Vegetation Restoration and Management of Degraded Ecosystems, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: Biological nitrogen fixation (BNF) in forest ecosystems plays a very important role in global nitrogen (N) cycling, because forest ecosystems cover 30% of the global land area and represent nearly half of the N fixation that occurs in terrestrial ecosystems. Additionally, these ecosystems harbor abundant N-fixation microbes, including both symbiotic and free-living N-fixation bacteria. It is generally believed that environmental conditions (e.g. temperature, moisture, and light intensity) and nutrient availability are the most important factors regulating BNF in ecosystems. Among these factors, the effects of nutrient availability have recently received increasing attention. In the last several decades, anthropogenic activities have greatly modified the global biogeochemical cycles of N and other mineral nutrients. For example, the quantity of global N deposition increased from 41 Tg N year⁻¹ in 1950 to 103 Tg N year⁻¹ in 2000. Long-term N deposition may exert direct effects on forest BNF by reducing the competitive advantage of free-living N-fixation bacteria or by reducing the energy allocated to symbiotic N-fixation bacteria. N deposition may also lead to imbalances in mineral nutrient proportions that play vital roles in the growth of N-fixation bacteria. Phosphorus (P), for example, is thought to be a major component of microbial cell membranes and also to be directly related to the formation of adenosine triphosphate (ATP), which is very

基金项目:国家自然科学基金(41273143); 国家重点基础研究发展计划 973 项目(2011CB403204)

收稿日期:2014-04-24; **网络出版日期:**2015- -

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: mojm@scib.ac.cn

important for nitrogenase function. In addition, many rock-derived nutrients (e.g. Ca, K, Mo, and Fe) are depleted and their availability becomes poor during forest succession. Deficiency of these mineral nutrients may consequently influence forest BNF by limiting the growth of N-fixation bacteria. In recent decades, mineral nutrient addition experiments (in the lab or *in situ*) have been widely used in Europe and North America to investigate how nutrient availability influences forest BNF. However, little information on how forest BNF responds to nutrient addition is available from China, although N deposition is projected to increase with the rapid growth of the Chinese economy in the future. In this paper, we review the impacts and underlying mechanisms of mineral nutrient addition on forest BNF, based on the available literature. The objectives were to enhance our understanding of how mineral nutrient addition regulates forest BNF and to provide scientific data for sustainable forest management. This review focuses on the following four aspects: (1) The concept of forest BNF and the principal measuring methods; (2) The effects of mineral nutrient addition on forest BNF, including the N fixation by free-living organisms occurring in the upper soil, the lichens and mosses growing on the litter layer, and symbiotic N fixation via relationships with root nodule plants (e.g., legumes). In general, N addition decreases forest BNF, whereas addition of P or other nutrients has a positive impact. In addition, the combined addition of N and P, or P and other mineral nutrients, increases forest BNF; (3) The mechanisms underlying forest BNF can be divided into biotic (e.g., variance in the abundance or richness of N-fixing bacteria, the cover or richness of epiphytes, and the biomass of root nodule plants) and abiotic mechanisms (e.g., soil acidification and changes in the available carbon content); (4) The limitations of the current research and our suggestions for further research on forest BNF.

Key Words: mineral nutrient addition; biological nitrogen fixation; nitrogen deposition; forest; nitrogenase activity

生物固氮是森林生态系统重要的氮素来源。据估计,陆地生态系统每年通过生物固定的有效氮大约为 110 Tg,远远高于闪电固氮(3 Tg N a^{-1})^[1-2]。这意味着每年有超过 97%的“新”氮素是通过生物固氮进入陆地生态系统中^[3]。值得注意的是,森林是固氮微生物分布最为广泛的生态系统,如在土壤、凋落物、植物叶片、苔藓、地衣和豆科植物的根瘤等均可以发现固氮菌的存在。地球上森林的覆盖面积占整个陆地面积 30%^[4],并且固氮量达到了陆地生态系统固氮总量的近一半^[5]。通过生物固定的有效氮不仅可以提高森林的生产力,还会进一步影响生态系统的结构和功能。因此,了解森林生物固氮的影响因素将有助于我们更好地认识生物固氮对森林氮循环的影响。

一般认为环境因子(如温度、水分和光照等)的变化和矿质养分的输入均会影响生物固氮。其中矿质养分的输入,尤其是人类活动引起的氮沉降增加已成为普遍关注的焦点^[3,6]。近 30 年来,随着工业的发展和人口增加,化石燃料的过度使用已经悄然改变了全球氮循环的格局。据统计,目前全球多数地区的氮沉降速率已经超过 $10 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$,远远高于生态系统的自然氮沉降($< 0.5 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)^[6]。许多研究发现,长期氮沉降可能通过增加森林土壤有效氮的含量而减弱固氮菌的竞争优势,或者通过改变固氮附生植物和结瘤植物的氮素获取方式,从而减少对固氮菌的能量分配,进一步降低森林的固氮量^[7,8]。

此外,长期氮沉降可能导致生态系统养分失衡,进而使固氮菌的生长受到其他矿质养分(如磷、钼、铁、钴等)的限制。磷元素参与微生物(包括固氮菌)细胞膜的合成、酶的活化以及信号的转导^[9],同时也是固氮菌能源物质 ATP 的主要成分^[10],因此其含量的高低直接关系到固氮菌的生长和繁殖。但土壤磷起源于岩石风化,在没有外来磷素输入的情况下,会逐渐被生物吸收消耗或形成可溶性的有机磷而流失^[11]。长期氮沉降也会通过加剧土壤磷的限制^[12]进一步抑制森林的固氮能力。另外,其他营养元素的限制,尤其是构成固氮酶蛋白的重要微量元素(如钼、铁、钴等)的缺乏,也可能会影响固氮酶蛋白的生物合成及相关功能的表达,进而制约生物固氮的过程^[13-15]。

我国作为全球氮沉降最严重的三大地区之一(欧洲、北美和中国),氮沉降以每年 0.41 kg/hm^2 的速率增加,且在 2000 年的记录就达到了 $21.1 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ ^[6,16]。大量的干、湿沉降势必会威胁到我国森林的固氮能

力,并通过加剧其他矿质养分的失衡进一步干扰森林生物固氮的进行。但是,目前我国关于生物固氮的研究主要集中在农业方面,而在森林方面的报道仅有 5 篇,且内容主要集中在 2 个方面:前者只是对森林中某种结瘤植物的固氮能力进行初步报道^[17-18],缺乏对森林生物固氮的系统研究及影响因素的探索;后者主要关注环境因子(如温度、湿度等)对森林附生植物^[19]或结瘤植物^[20-21]固氮的影响,却忽视了矿质养分在森林固氮中的重要性。因此,本文综述国内外关于矿质养分输入对森林生物固氮影响的研究现状,同时归纳和总结相应的机理,以期人们更好地认识森林生物固氮在全球氮循环中的重要性,进而为国内开展森林生物固氮的相关研究提供理论基础和参考。

1 森林生物固氮的概念及研究方法

1.1 森林生物固氮的概念

生物固氮现象最早发现于豆科作物中,随后主要被用于提高粮食的产量。到了 1894 年,林业上也开始进行豆科树种和其他结瘤固氮树种的选育,并利用植物固氮的“施肥”作用来提高森林的生产力^[22]。按照目前普遍的定义,生物固氮是指固氮微生物将大气中的分子态氮固定下来,进一步转化为可以被其他生物有效利用的化合态氮的过程^[23]。在森林生态系统中,固氮微生物广泛分布于不同的组织层次,如地表的土壤和凋落物、豆科植物的根瘤及冠层的附生植物等。根据固氮方式的差异,森林生物固氮主要为共生固氮和自由固氮两种形式。由于固氮微生物与植物之间存在复杂的关系,所以关于生物固氮的分类并没有很明确的标准^[24]。目前普遍把具有根瘤结构的固氮植物归入共生固氮的范畴,除此之外的其他固氮形式,如土壤、凋落物、植物叶片以及附生植物(苔藓和地衣)等固氮菌进行的固氮统称为自由固氮^[5,24]。

1.2 生物固氮的研究方法

衡量森林生物固氮的主要指标为固氮酶活性,通过固氮酶活性可以进一步计算森林的固氮量。随着对生物固氮的深入研究,目前已有多种方法可以有效测定固氮酶活性。如,乙炔还原法、¹⁵N 同位素稀释法、¹⁵N 自然丰度法、总氮差值法、酰脲估算法等^[25-26]。在森林固氮的研究中,以采用¹⁵N 同位素稀释法和乙炔还原法较多,因此以下主要对这两种方法进行介绍。

¹⁵N 同位素稀释法主要用于固氮植物的研究。使用该方法首先需要选取生长条件相近的非固氮植物作为参照植物。在相同条件下施加含有¹⁵N 同位素的氮肥,同时保证没有其他外源氮素的干扰。随着实验的进行,参照植物从土壤中吸收含¹⁵N 的氮素,而固氮植物不仅吸收土壤中的¹⁵N,还通过固氮作用吸收来自大气的¹⁴N。因为¹⁴N 的“稀释”作用,经过一段时间后固氮植物体内¹⁵N/¹⁴N 比例低于参照植物。通过两种植物的¹⁵N 原子百分比差值以及参照植物体内的总 N 含量,即可计算出固氮植物的固氮量。但因为该方法需要选取参照植物,而参照植物选取的适当与否直接关系到结果的精确性,再加上¹⁵N 同位素价格昂贵,所以该方法使用并不多。相比之下,乙炔还原法具有操作简单,价格便宜等优点^[27]。

早在上世纪 60 年代,Hardy 等^[27]通过室内和野外实验发现固氮酶不仅可以固定空气中的氮气,还具有将乙炔(C₂H₂)还原为乙烯(C₂H₄)的能力。因此,利用固氮酶还原乙炔的能力,测定单位时间内乙炔减少量或者乙烯生成量即可得知固氮酶的活性。目前,在森林生物固氮的研究中普遍采用该方法,具体操作如下:将待测样品置于密闭性良好的培养瓶中,用气密注射器抽出 10% 的空气,同时注入相应体积的高纯度乙炔。在室内恒温条件或者野外环境下培养数小时后,用注射器抽出部分气体并收集于真空采气管中。48 小时内用气相色谱仪测定待测气体中 C₂H₄ 生成量,然后计算得到固氮酶活性(nmol C₂H₄g⁻¹h⁻¹)。理想条件下,固氮酶每还原 3 mol C₂H₂ 与固定 1 mol N₂ 等价,所以部分研究直接采用理想比例 3:1(C₂H₂:N₂)换算成生物固氮量(kg N hm⁻² a⁻¹)^[28-29]。但由于不同森林的环境条件及固氮菌种类存在差异,导致转换比例也有所不同。因此,目前多数研究结合¹⁵N 同位素方法对转换值进行校准,从而得到实际的固氮量^[30-31]。Anderson 等^[32]对乙炔还原法和¹⁵N 同位素吸收法进行比较,认为只有通过¹⁵N 同位素技术进行校准才能精确地估算森林的固氮量。

2 矿质养分输入对森林生物固氮的影响

2.1 氮素输入对森林生物固氮的影响

目前,关于氮素输入影响森林固氮的研究主要集中在“富”氮的热带森林(见 表 1)。多数施肥试验表明,长期或短期施加氮肥均会降低固氮菌的竞争优势(如降低固氮酶的活性),从而减少森林的固氮量。例如,Barron 等^[15]在巴拿马热带成熟林的研究发现,长达 7 年的氮肥添加($125 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)使土壤固氮酶活性降低了 75%。Crews 等^[33]在热带 3 个铁心木成熟林中的研究也发现,施加氮肥($100 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)降低了凋落物固氮酶活性,并且在年龄最老的成熟林中的抑制作用达到极显著水平。在波多黎各热带森林中,Cusack 等^[34]对森林不同组织层次的生物固氮进行研究,发现短期施加氮肥($50 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)同时降低了土壤、凋落物、附生植物叶片和苔藓的固氮酶活性。在温带森林的研究也有类似的结论,如在瑞典一个火烧后 355 年的温带成熟林中,短期内施加不同水平的氮肥($0.56 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ wk}^{-1}$ 或 $3.18 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ wk}^{-1}$)分别使苔藓(*Pleurozium schreberi*)固氮量降低为 $2.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ 和 $3.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$,且作用均达到极显著水平($P < 0.001$)^[30]。但也有少数研究结果表示施加氮肥对生物固氮的影响不大^[13,35]。

除了采用施肥试验研究森林生物固氮,更多的试验是利用时间序列(如森林的不同演替阶段)代替施肥的方法实现大时间尺度的研究。目前多数研究认为,不管是在热带地区还是温带地区,处于演替初期的森林固氮速率(即固氮酶活性或固氮量)最高,随着演替的进行固氮速率开始下降。如在热带地区,Crews 等^[33]对夏威夷群岛 6 个不同演替史的森林进行研究,发现处于演替初期的森林凋落物具有最高的固氮酶活性($4.6\text{—}9.4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)。Skujinš 等^[36]对不同演替阶段的森林土壤和植物固氮进行综合分析,结果表明演替末期的云杉林固氮量最低($0.32 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)。在巴拿马热带森林,四种不同类型森林(自然成熟林、受干扰的成熟林、45 年生次生林和季节性海岸森林)的印加树(*Inga sp.*)根瘤固氮存在差异,即两个成熟林的印加根瘤生物量显著低于次生林和季节性海岸森林,其中自然成熟林的根瘤固氮酶活性基本为零^[37]。除了热带森林,在温带森林也有见到类似的报道。如在瑞典北部两个温带森林中,DeLuca 等^[38]使用“交互移植试验”研究依附于苔藓(*Pleurozium schreberi*)的蓝藻固氮情况,结果表明处于演替初期(土壤有效 N 含量低)的森林其蓝藻固氮酶活性高于演替末期。Hope 和 Li^[39]的研究也得出类似结论,即 70—80 年生的黄杉树林其凋落物和树枝固氮速率均高于 450 年生的黄杉林。因此,多数研究认为生物固氮主要在森林演替初期发挥作用^[39-40],但也有少部分研究否定了该结论。例如,在夏威夷山地雨林,Matzek 和 Vitousek^[41]发现沿着不同土壤年龄梯度(300—4,100,000 年),苔藓(*Bazzania*)、地衣(*Pseudocyphellaria crocata*)和腐木的固氮量均没有发生显著变化。Vitousek^[42]甚至发现凋落物固氮酶活性随着土壤年龄梯度的增加而增加。Lagerström 等^[43]研究也认为,苔藓(*Pleurozium schreberi* 和 *Hylocomium splendens*)固氮在森林演替末期发挥重要作用。这些研究说明土壤氮素含量可能不是影响森林固氮的唯一因素。

2.2 磷素输入对森林生物固氮的影响

关于磷素对生物固氮起重要作用的认识主要来源于热带森林的研究。因为热带森林多数表现为磷素限制^[44],因此研究磷素输入对热带森林生物固氮的影响具有重要的意义。目前,许多研究认为磷素输入促进了固氮细菌的生长,进而提高热带森林的固氮酶活性或固氮量(见 表 1)。例如,Barron 等^[15]在巴拿马热带成熟林的研究发现,7 年的磷肥添加($50 \text{ kg P hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)使土壤固氮酶活性增加了约 2 倍($P < 0.007$)。在热带合欢成熟林中,Binkley 等^[45]利用乙炔还原法和¹⁵N 同位素稀释法均证实了施加磷肥(5 g/pot CaHPO_4)显著增加结瘤植物(*Facaltaria moluccana*)的固氮量。在哥斯达黎加热带成熟林,Reed 等在 2010 年^[46]和 2013 年^[23]先后报道了不同磷肥试验(长期施肥 $150 \text{ kg P hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ 和单次施肥 $844 \mu\text{g P g}^{-1}$)的结果:施加磷肥的凋落物固氮酶活性分别是对照的 3 倍和 2 倍。Grove 和 Malajczuk^[28]在澳大利亚一个红桉树林进行 3 年的磷肥试验也发现,施加低浓度($30 \text{ kg P hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)和高浓度($200 \text{ kg P hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)磷肥使林下层豆科植物的根瘤固氮量分别增加了 59% 和 99%。此外,在热带其他成熟林^[33,35,47]和次生林^[48]的研究中也都得出了类似的结论。除了热带

地区,少数温带地区的研究同样发现磷素输入可以提高森林的固氮量。如在克拉斯马斯温带森林, Yelenik 等^[31]发现 2 年施加磷肥 ($150 \text{ kg P hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$) 不同程度地提高了土壤和凋落物层的固氮量。在瑞典一个赤松和云杉混合成熟林(355 年)中,短期施加磷肥($0.42 \text{ kg P hm}^{-2} \text{ wk}^{-1}$)也会轻微提高苔藓(*Pleurozium schreberi*)的固氮量^[30]。

尽管大多数研究结果均表明施加磷肥可以提高森林的生物固氮,但仍有少部分研究认为添加磷肥对生物固氮的影响不大。如在热带地区, Vitousek 和 Hobbie^[13]通过对铁心木成熟林进行长期(>10 年)的磷肥添加试验,发现来自对照样方的凋落物置于施加磷肥的样方中其固氮酶活性并没有增加,这与 Silvester^[49]研究结论一致。在温带地区,也有相关报道认为施加磷肥不一定会提高结瘤植物^[31]或者苔藓^[50]的固氮量。

2.3 其他矿质养分输入对森林生物固氮的影响

除氮素和磷素以外,有研究表明其他矿质养分(尤其是微量营养元素)的输入也会影响森林的生物固氮,并且多数表现为促进作用(见表 1)。矿质养分(除 N 和 P 外)输入促进森林固氮的现象在热带地区和温带地区均可以发现。在热带地区,如 Barron 等^[15]对巴拿马一个成熟林进行营养元素(包括 Mo, S, Cu, B, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg 等)添加处理,发现长期施肥($25 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)的土壤固氮酶活性大约是对照的 2 倍($P < 0.013$)。Vitousek^[47]在美国一个铁心木(*Metrosideros polymorpha*)成熟林的研究证明,施加混合营养元素(除 N、P 外的所有营养元素)同时提高了根瘤和凋落物的固氮酶活性。通过对 3 个不同土壤年龄的热带森林进行研究, Crews 等^[33]也发现施加营养元素均增加了 3 个森林的凋落物固氮酶活性,其中在土壤年龄最小(300 年)和年龄最大(4,100,000 年)的森林中促进作用均达到极显著水平($P < 0.001$)。在温带森林的研究也有类似的结论,如 Silvester^[49]也发现添加微量营养元素可以促进凋落物固氮,其中施肥处理的固氮酶活性($15.2 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)显著高于对照($4.1 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)。此外,也有少数研究得出添加微量营养元素对森林固氮影响不显著的结论^[13, 23, 50]。

在影响生物固氮的众多微量营养元素中,钼(Mo)成为关注的焦点。微量元素钼和铁共同参与合成固氮酶蛋白中的钼固氮酶(也称钼铁蛋白)^[10, 14]。而钼固氮酶几乎存在于所有的固氮细菌中,且参与生物固氮的过程^[51]。在热带和温带森林的研究均表明,添加钼元素促进了土壤或凋落物的固氮酶活性。在热带森林,如 Barron 等^[15]发现钼肥添加提高了土壤固氮酶活性,并且高浓度($504 \mu\text{g Mo kg}^{-1}$)比低浓度($42 \mu\text{g Mo kg}^{-1}$)的促进作用更加明显;而长达 7 年的钼添加试验进一步证明,施加钼肥($0.01 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)的土壤固氮酶活性比对照增加了 4 倍。同样在巴拿马热带森林, Wurzbarger 等^[14]对 6 个具有不同磷含量的森林进行研究,发现在磷饱和的森林中施加钼肥($667 \text{ mg Mo kg}^{-1}$)可以使土壤的固氮酶活性增加 3 倍。Vitousek^[47]也认为,添加营养元素引起凋落物固氮酶活性的增加很可能与钼元素有关。钼元素输入对温带森林固氮的影响研究甚少,目前仅有 Silvester^[49]进行过相关的报道,即钼添加处理使黄杉成熟林的凋落物固氮酶活性增加 2—3 倍。

2.4 氮、磷及其他矿质养分的交互作用

总体上讲,单独施加氮肥会抑制森林生物固氮,施加磷肥则起到促进作用。氮肥和磷肥同时施加对森林固氮的影响仅在热带地区进行过报道,且氮素和磷素之间可能不存在交互作用。例如,在巴拿马科罗拉多岛的一个露天温室中, Batterman 等^[52]进行了不同梯度氮肥(0, 30, 60 $\text{g N m}^{-2} \text{ a}^{-1}$)和磷肥(0, 20, 40 $\text{g P m}^{-2} \text{ a}^{-1}$)的析因设计试验,结果发现单独施加氮肥或者磷肥对印加(*Inga punctata*)的根瘤固氮分别起到抑制($P < 0.001$)和促进作用($P < 0.001$),而氮肥和磷肥同时施加虽然也促进了印加的根瘤固氮,但其交互作用并不显著。Binkley 等^[45]在夏威夷热带森林中的研究也发现,同时施加氮肥和磷肥($5 \text{ g/pot NH}_4\text{NO}_3 + 5 \text{ g/pot CaHPO}_4$)对豆科树种(*Facaltaria moluccana*)的根瘤固氮没有交互作用,但却提高了根瘤固氮酶活性和单位植株的根瘤固氮量。此外, Reed 等^[35]在哥斯达黎加热带森林中的研究也得到类似的结论,即同时施加氮肥和磷肥($150 \text{ kg N hm}^{-2} \text{ a}^{-1} + 150 \text{ kg P hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)也会提高凋落物和土壤的固氮酶活性。这表明磷素对生物固氮的促进作用可能比氮素的抑制作用更加强烈。

表 1 森林生物固氮对矿质养分输入响应
Table 1 Responses of biological nitrogen fixation to mineral nutrients addition in forest ecosystems

处理 Treatment	气候 类型 Climatic type	地点 Location	植被类型 Vegetation type	施肥时间 Fertilization period/ yr	生物固氮的响应情况 Responses of biological nitrogen fixation						研究方法 Method	参考文献 Reference
					非共生固氮 Non-symbiotic N-fixation			共生固氮 Symbiotic N-fixation				
					土壤 Soil	凋落物 Litter	植物叶片 Leaf	苔藓 Moss	地衣 Lichen	根瘤 Nodule		
+ N	热带	美国	合欢和柳叶桉林	—						— a, b	ARA, ¹⁵ N isotope	[45]
		美国	铁心木成熟林	> 10		— a					ARA	[13]
		美国	铁心木成熟林	1, 3, 9		↓ a					ARA	[33]
		美国	热带雨林	3		— a					ARA	[35]
		波多黎各	热带雨林、山地雨林	2—4		↓ a, b	↓ a, b	↓ a	— a, b		ARA	[34]
		巴拿马	热带成熟林	7		↓ a					ARA	[15]
		瑞典	欧洲赤松和挪威云杉成熟林	< 1				↓ a			ARA	[30]
		美国	热带雨林	3	↑ a	↑ a					ARA	[35]
		美国	铁心木成熟林	> 10		— a, ↑ b					ARA	[13]
		美国	铁心木成熟林	1, 3, 9		↑ a					ARA	[33]
+ P	温带	美国	铁心木成熟林	4		↑ b					ARA	[47]
		美国	合欢和柳叶桉林	—						↑ a, b	ARA, ¹⁵ N isotope	[45]
		美国	热带山地雨林	15				↑ b			ARA	[53]
		哥斯达黎加	低地热带雨林	—		↑ a					ARA	[23]
		哥斯达黎加	低地热带雨林	5		↑ a					ARA	[46]
		巴拿马	热带成熟林	7	↑ a						ARA	[15]
		巴拿马	低地热带成熟林	—	— a						ARA	[14]
		澳大利亚	红桉树林(林下豆科植物)	3						↑ b	ARA	[28]
		澳大利亚	红桉树林(林下相思灌木)	< 1						↑ a, b	ARA	[48]
		美国	黄杉次生林和成熟林	< 1		— a					ARA	[49]
+其他营养元素 Other nutrients	热带	美国	针叶、阔叶混交林	2	↑ b	↑ b				— b	ARA, ¹⁵ N isotope	[31]
		加拿大	低地森林和高地森林	< 1				— b			ARA	[50]
		瑞典	欧洲赤松和挪威云杉成熟林	1—5				↑ a			ARA	[30]
		美国	铁心木成熟林	> 10		↑ a					ARA	[13]

续表

处理 Treatment	气候 类型 Climatic type	地点 Location	植被类型 Vegetation type	施肥时间 Fertilization period/ yr	生物固氮的响应情况 Responses of biological nitrogen fixation						研究方法 Method	参考文献 Reference
					非共生固氮 Non-symbiotic N-fixation			共生固氮 Symbiotic N-fixation				
					土壤 Soil	凋落物 Litter	植物叶片 Leaf	苔藓 Moss	地衣 Lichen	根瘤 Nodule		
		美国	铁心木成熟林	1, 3, 9	↑ a						ARA	[33]
		美国	铁心木成熟林	4	↑ b						ARA	[47]
		巴拿马	低地热带成熟林	—	↑ a						ARA	[14]
		巴拿马	热带成熟林	7	↑ a						ARA	[15]
		澳大利亚	红桉树林(林下豆科灌木)	< 1						— a, b	ARA	[48]
		哥斯达黎加	低地热带雨林	—	— a						ARA	[23]
温带		美国	黄杉次生林和成熟林	< 1	↑ a						ARA	[49]
		加拿大	低地森林和高地森林	< 1				— b			ARA	[50]

(1) ARA:乙酰还原法 Acetylene Reduction Assay; ¹⁵N isotope: ¹⁵N 同位素稀释法 ¹⁵N uptake method.

(2) 其他营养元素包括: Mo、Fe、Co、S、K、Ca、Mg 等, 但不包括 N 和 P. Other nutrients include Mo, Fe, Co, S, K, Ca, Mg et al., but don't include N or P.

(3) a: 表示固氮酶活性 (nmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹, 或者 μmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹); b: 表示生物固氮量 (kg N hm⁻² a⁻¹). ‘a’, represents nitrogenase activity (nmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹ or μmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹), while ‘b’ represents amounts of BNF (kg N hm⁻² a⁻¹).

(4) ↑、↓、—: 分别代表该研究中国氮酶活性(或者生物固氮量)的上升、下降和没有显著变化; ———: 表示该文献没有提及相应的内容. ‘↑’, ‘↓’, ‘—’ represent the increase, decrease and no significant change of nitrogenase activity (or amounts of BNF), respectively; ‘———’ represents lack of relevant contents.

相比之下,磷和其他矿质养分同时添加对热带森林固氮的影响表现出交互作用。如,在美国热带森林中, Vitousek 和 Hobbie^[13]通过凋落物分解试验发现,来自对照样方的凋落物置于单独施加磷肥或 T 肥(T 肥:除 N、P 外的所有营养元素)的样方中,其固氮酶活性没有发生显著变化;但置于同时施加磷肥和 T 肥的样方后固氮酶活性显著增加,并且磷和 T 的交互作用达到极显著水平($P < 0.001$)。Silvester^[49]通过室内实验分析也发现,相比对照($1.0\text{--}1.6\text{ nmol C}_2\text{H}_4\text{ g}^{-1}\text{ h}^{-1}$),单独施加磷肥对凋落物固氮酶活性没有影响($1.1\text{--}1.2\text{ nmol C}_2\text{H}_4\text{ g}^{-1}\text{ h}^{-1}$),施加除氮以外的所有营养元素(包括磷等)却可以显著提高固氮酶活性($4.6\text{--}5.1\text{ nmol C}_2\text{H}_4\text{ g}^{-1}\text{ h}^{-1}$)。Wurzbarger 等^[14]在巴拿马两个磷受限的热带森林(Zetek 和 Rio Paja)进行了钼和磷的添加试验,结果也表明同时添加钼(667 mg Mo kg^{-1})和磷(283 mg P kg^{-1})会使土壤固氮酶活性增加 1.5—4 倍,并且钼和磷的交互作用达到显著水平。此外, Vitousek^[47]和 Reed 等^[23]通过研究也先后得到类似的结论,这说明热带森林生物固氮可能同时受到磷素和其他矿质养分的限制。而温带森林目前仅有 Markham^[50]进行过相关报道,即磷和微量营养元素同时添加对两种苔藓(*Sphagnum capillifolium* 和 *Pleurozium schreberi*)固氮的影响均不存在交互作用。

3 矿质养分输入影响森林生物固氮的机理

综合目前国内外的研究,矿质养分(主要为氮素和磷素)输入影响森林生物固氮的机理可以分成生物作用机制和环境作用机制两个部分。

3.1 生物作用机制

森林的不同组织层次均有固氮菌的分布,然而它们对矿质养分输入的响应机制却存在差异。因此,本文将从森林地表的土壤及凋落物层、结瘤植物和冠层附生植物 3 个不同层次阐述矿质养分输入对森林固氮的影响机制。

3.1.1 改变地表层固氮菌的数量或群落丰度

自由固氮菌主要分布于森林的土壤和凋落物层,所以其数量或群落丰度很容易受到土壤氮、磷等养分的影响。

长期的氮素输入可能通过减少固氮菌的数量或者群落丰度,进而降低森林的固氮量。目前普遍认为,固氮菌在氮素限制的森林中具备较强的竞争优势,所以固氮酶活性比较高^[33]。然而,长期的氮素输入不断提高了土壤的氮素含量和生物总量^[54],并加剧微生物之间的竞争。此时继续通过耗能方式进行固氮将不利于固氮菌的生存^[10],因此固氮菌的数量逐渐减少。如在 Harvard 森林, Compton 等^[55]研究认为长期施加氮肥增加了松林土壤固氮基因(*nifH*)扩增的困难性。这意味着施加氮肥可能减少了土壤固氮菌的数量,进而抑制固氮基因的表达。Kolb 和 Martin^[56]通过研究也发现,施加氮肥降低了土壤根际固氮菌与总细菌的比例,同时也显著降低了固氮酶的活性。此外,长期的氮素输入可能不利于对高氮环境耐受性较弱的固氮菌生存,从而降低了固氮菌的群落丰度。如, Piceno 和 Lovell^[57]通过氮肥添加试验研究土壤固氮基因的变化,结果发现长期施加氮肥使土壤中原本具有的优势固氮基因消失,同时也降低了土壤的生物固氮量。在长期的增温和施加氮肥控制试验中, Berthrong 等^[58]发现施加氮肥降低了松林土壤固氮基因的丰度和多样性。Freedman 等^[59]同样发现氮沉降降低了北方阔叶林土壤固氮基因的丰度。这表明氮素的输入通过减少固氮菌的群落丰度,进而抑制森林的生物固氮。

相反,磷素的输入可能促进固氮菌的生长并增加其群落的丰度,群落丰度的增加可以提高森林的固氮总量。如在哥斯达黎加热带雨林, Reed 等^[46]发现长期施加磷肥($150\text{ kg P hm}^{-2}\text{ year}^{-1}$)使凋落物产生新的固氮基因。这表明磷素的输入导致新的固氮菌(如喜磷固氮菌等)出现。此外, Reed 等^[46]研究还证明了磷肥添加可以显著地提高凋落物固氮基因的丰度和固氮量,且固氮基因的丰度与固氮量之间存在显著的正相关关系($P = 0.025, r^2 = 0.35$)。

3.1.2 改变结瘤植物的根瘤生物量

根瘤固氮是结瘤植物最主要的氮素来源^[8],因此根瘤的生长很大程度上受到结瘤植物的调控。矿质养

分的输入可能会引起土壤养分的失衡,进而改变结瘤植物对氮素的需求,导致根瘤的生物量和固氮量发生变化。

长期的氮素输入可能会减少结瘤植物对根瘤的生物量分配,从而降低根瘤的固氮量。对于结瘤植物而言,通过根瘤固氮方式获取氮素需要消耗能量^[10]。当大量氮素进入土壤时,固氮植物会减少对根瘤的生物量分配,部分转向耗能较少的获取方式,即土壤有效氮素的吸收^[8,31]。虽然有研究表明,在土壤氮含量丰富的情况下,单位根瘤的固氮酶活性并没有发生显著变化,但是植物总的根瘤固氮量却降低了^[60]。这说明在共生固氮系统中,外来氮素的输入可能是通过减少根瘤的生物量来降低植物的固氮总量。例如,Ekblad 和 Huss-Danell^[61]通过温室实验分析,发现添加氮素使桤木(*Alnus incana*)的根瘤生物量和固氮量同时降低。Barron 等^[37]采用时间序列的方法也发现类似的结论,即成熟林(有效氮含量高)的印加树根瘤生物量和固氮量均低于次生林,这表明土壤有效氮的增加会抑制根瘤的生长和固氮。

磷素的输入可能增加了结瘤植物对氮素的需求,因此结瘤植物通过增加根瘤的生物量(如根瘤的数量、干重和密度等)来提高根瘤的固氮总量。例如,Yang^[62]通过磷添加试验发现,添加磷素(0.1—1.0 uM KH_2PO_4)促进了木麻黄(*Casuarina cunninghamiana*)及其根瘤的生长。通过温室实验的研究,Hingston 等^[48]发现不同浓度的磷添加(4 mg P kg^{-1} soil 或 10 mg P kg^{-1} soil)虽然都降低了两种结瘤植物(*Acacia pulchella* 和 *Kennedia prostrata*)的根瘤固氮酶活性,但均提高了单位植株的根瘤数量、干重和固氮量。Grove 和 Malajczuk^[28]的研究也表明,不同的施肥量(30 kg P hm^{-2} a^{-1} 或 200 kg P hm^{-2} a^{-1})分别使豆科植物(*Bossiaea laidlawiana*)的根瘤固氮量提高了 59%和 99%,并认为固氮量的增加主要是因为施加磷肥显著增加了根瘤的密度。因此,磷是限制结瘤植物生长及固氮的主要原因^[60]。

3.1.3 改变附生植物的丰度或盖度

冠层附生植物(苔藓和地衣)的营养元素主要来源于大气环境^[63],或者间接通过寄主植物叶片和树皮的淋溶析出获得^[64]。所以,短期的林下层施肥对附生植物没有直接影响,但长期的矿质养分输入可能通过改变寄主植物的营养状况,进一步影响附生植物的生长和固氮。

目前,有两种机制可以解释氮素输入对附生植物固氮的影响:(1)长期的氮素输入可能对附生植物造成毒害,进而降低其固氮能力。有研究认为,长期施加氮肥导致的过量 NH_4^+ 累积会对附生植物产生毒害,从而抑制附生植物的生长^[7]。其次,大量氮素的累积也会通过抑制附生植物的光合作用^[65],进而减少光合产物并影响固氮过程对能源的需求;(2)长期的氮素输入同时也减少了附生植物的丰度。例如,在瑞典温带森林,Forsum 等^[7]进行了 8 年的氮肥添加试验(50 kg N hm^{-2} a^{-1}),发现施加氮肥显著降低了苔藓(*Hylocomium splendens*)的丰度,这与 Rönnqvist^[66]研究结论一致。Gordon 等^[67]研究也发现,长期施加氮肥(50 kg N hm^{-2} a^{-1})使地衣的丰度减少了一半。附生植物丰度的降低在一定程度上减少了植物的固氮总量。

相比之下,长期的磷素输入反而促进了附生植物的生长并提高其丰度或者盖度,进而增加森林的固氮量。如,在夏威夷热带雨林,Benner 等^[68]进行了长达 14 年的磷肥(100 kg P hm^{-2} a^{-1})添加试验,发现施加磷肥显著提高了固氮地衣(*Pseudocyphellaria crocata*)的丰度和固氮酶活性;通过进一步的研究发现,长期施加磷肥使地衣的固氮量增加了将近 30 倍,并认为这是由于地衣的丰度增加所导致的^[53]。Gordon 等^[67]发现 8 年施加磷肥(5 kg P hm^{-2} a^{-1})使苔藓(*Dicranum scoparium* 和 *Polytrichum juniperinum*)的盖度增加 13—16%,并且在植物功能群中的比例也增加了一倍。附生植物盖度的增加很可能与寄主植物磷含量的提高有关。如,Benner^[69]在夏威夷森林的研究中发现,固氮地衣盖度较高的寄主乔木,其叶片和树皮的磷含量也相对较高($P < 0.001$)。这暗示了磷的输入可能通过提高寄主植物磷的含量,进而增加附生植物的盖度。附生植物盖度的增加也会提高森林的固氮总量。

3.2 环境作用机制

3.2.1 引起土壤酸化

固氮微生物一般倾向于生活在中性的环境中,如多数需氧型固氮菌在中性或者偏碱性的环境具有较高的

固氮酶活性^[70-72]。外源氮素的输入可能增加了土壤 NH_4^+ 和 NO_3^- 含量并引起土壤酸化。当固氮菌处于酸性的环境时,参与固氮酶水解的发色团会发生改变,进而影响固氮反应的正常运行^[73]。因此,氮素输入引起土壤的酸化在一定程度上抑制了森林的生物固氮。Yamanaka 等^[74] 研究发现,日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)凋落物的固氮酶活性显著高于其他两个树种(*Pinus densiflora* 和 *Quercus serrata*),认为这可能与柳杉凋落物具有较高的 pH 有关。Zahran^[75] 也认为酸性的土壤环境不利于豆科植物的生长,尤其是当 $\text{pH} < 5.0$ 时,植物的结瘤效率降低,进而减少了植物的共生固氮。

长期的氮素输入除了降低土壤 pH,还会导致土壤中的大量交换性阳离子(K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 等)流失,同时增加了土壤可交换性 Al^{3+} 的浓度^[76]。大量 Al^{3+} 累积引起的铝毒效应也会进一步抑制豆科植物的生长和根瘤固氮的进行^[77]。例如,Wood 等^[78] 研究发现,当 $\text{pH} < 5.0$ 时,根瘤菌的生长和根瘤的形成都会受到抑制,而在酸性条件下同时进行添加铝处理则使两者在 $\text{pH} < 6.0$ 就开始受到抑制。Igual 等^[79] 也发现添加铝处理($> 440 \mu\text{M Al}$)会降低木麻黄(*Casuarina cunninghamiana*)的根瘤干重,并且在高铝处理下($880 \mu\text{M Al}$)的固氮效率降低为原来的一半。

此外,氮素输入引起土壤酸性的增加还可能影响土壤 Mo 的含量。一般在酸性条件下土壤 Mo 含量很低^[15,49],而微量元素 Mo 限制生物固氮的结论在许多研究中^[14-15,49] 也已经得到证明。

3.2.2 改变碳源物质的含量

多数固氮微生物在生长和固氮过程均需要从环境中获取有效的碳源,因此碳源物质的含量也是影响森林地表层(土壤和凋落物)生物固氮的重要因素。在森林生态系统中,矿质养分(如氮素)的输入主要通过影响凋落物的分解,进而改变有效碳源物质的含量^[80]。

长期的氮素输入减少了凋落物中纤维素和半纤维素的含量,同时导致木质素累积,进而减少了可被固氮微生物有效利用的碳源。目前已有多数研究证明,当外源氮素进入土壤时,微生物会提高纤维素水解酶(如 β -1,4-葡萄糖苷酶和纤维素二糖水解酶等)的活性,并降低木质素氧化酶(如多酚氧化酶和过氧化物酶等)的活性,导致纤维素、半纤维素等可被利用的碳源物质越来越少^[81-82]。有效碳源的减少不仅影响了固氮微生物的生理代谢,还会阻碍其生物固氮的过程。

虽然没有证据表明碳源物质的减少会直接抑制森林地表层的生物固氮,但目前已有许多研究认为土壤或凋落物的固氮酶活性与有机碳含量之间存在正相关性。例如,在哥斯达黎加热带森林中,Reed 等^[35] 发现土壤和凋落物固氮量在夏季最高,认为这可能是夏季湿度较高的情况下,凋落物层的可溶性有机碳增加,从而提供给固氮菌丰富的有效碳源。Wurzburger 等^[14] 通过研究土壤剖面不同深度的固氮酶活性,发现有机质含量丰富并且含氮量较低(也即有最高的 C/N)的土壤表层固氮酶活性最高。在夏威夷热带森林,Vitousek^[42] 的研究也发现凋落物的自由固氮酶活性与其获取的能量(碳源)有关。Pérez 等^[83] 在温带成熟林中的研究也表明,若凋落物含有较高的 C/N,相应的固氮酶活性也比较高。

4 问题与展望

4.1 空间尺度的局限性

从现有的研究来看,多数森林固氮的研究对象只是局限于某些固氮能力较强的植物,而这种局部性的研究并不能代表整个森林或者区域的固氮情况^[3]。其次,在森林的不同组织层次均有固氮植物或者固氮微生物分布,但多数研究的对象只是局限于森林中某个类群,比如苔藓、地衣、豆科固氮植物,或者局限于某个组织层次,如土壤层、凋落物层,而缺乏对整个森林的系统估算。目前,国外如 Cusack 等^[34] 对森林生物固氮进行过比较系统的报道,而国内还未在该领域进行系统的研究。从全球尺度上讲,目前有关陆地生态系统生物固氮的报道主要集中在欧洲和北美等少数地区,在豆科植物广泛分布的亚洲、非洲和南美洲等地区的研究却相当缺乏^[5]。中国固氮植物资源丰富,因此加强和开展国内森林共生固氮和自由固氮的研究将有助于我们认识全球变化(如氮沉降等)对我国森林氮循环的影响。

4.2 时间尺度的局限性

森林生物固氮会呈现一定的日变化或者季节变化,因此某个时间点的采样结果并无法代表森林的实际固氮量^[29]。其次,短时间尺度的研究也可能会误导我们对森林固氮的认识。比如短期添加营养元素对某些附生植物的影响可能不明显,但长期施肥通过间接方式改变了附生植物的固氮速率^[68,84]。所以,目前多数短期施肥的控制性试验的研究(特别是温室实验)无法完全反映森林的真实固氮。在美国、瑞典、智利等部分区域采用空间代替时间的方法研究大时间尺度下的森林固氮差异,然而这样的研究方法在其他地区(如亚洲地区)的应用却非常少。我国具备从热带至寒带不同气候条件的森林生态系统,随着中国生态系统研究网络(CERN)的建立和逐步完善,该网络体系将有助于我们实现不同区域或年龄段森林生物固氮的合作研究,更好地理解森林生物固氮的机理。

4.3 研究方法的局限性

关于固氮酶活性的测定方法有很多种,但是不同的方法各有其优缺点。例如,¹⁵N 同位素稀释法虽然可以比较精确地测定固氮酶活性,但该方法主要运用在固氮植物的研究,对土壤或者凋落物等自由固氮并不适用。乙炔还原法虽然操作简单,但其测定值只能反映固氮酶在理想条件下的最高活性,因此可能会高估森林实际的固氮量^[85]。其次,在森林固氮量的换算中,部分研究直接采用理想比例(3:1)进行计算无法反映实际的固氮情况。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,也会使不同森林固氮量之间缺乏可比性。因此,加强我国生物固氮相关测定方法的研究并与国际上的新方法接轨,可以更为精确地估算不同森林类型的生物固氮量。

4.4 研究的深度不足

国内外对森林固氮的研究仍然停留在固氮酶活性的分析。引起固氮酶活性变化的更深层次机理还不清楚,尤其在固氮菌群落结构和功能方面的研究甚少。目前,国际上已有部分研究利用分子生物学的方法,证明了养分添加影响森林固氮菌群落的丰度^[55,58,59],但在国内仍未见到相关的报道。其次,养分的输入究竟是影响了森林中哪些类群的固氮菌生长,以及哪些固氮菌对森林固氮量的贡献最大等都还没有得到有效的鉴定。随着我国分子生物学的发展,基于 PCR 技术的 RFLP、t-RFLP、DGGE 和基因探针杂交等方法将有助于我们对固氮菌的群落结构进行深入分析。因此,利用分子技术研究森林生物固氮将会是今后国内研究的一个重点。

参考文献(References):

- [1] Gruber N, Galloway J N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 2008, 451(7176): 293-296.
- [2] Galloway J N, Schlesinger W H, Levy H, Michaels A, Schnoor J L. Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. *Global Biogeochemical Cycles*, 1995, 9(2): 235-252.
- [3] Galloway J N, Dentener F J, Capone D G, Boyer E W, Howarth R W, Seitzinger S P, Asner G P, Cleveland C C, Green P A, Holland E A, Karl D M, Michaels A F, Porter J H, Townsend A R, Vöösmary C J. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 2004, 70(2): 153-226.
- [4] Food and Agricultural Organization of the United Nations. *Global Forest Resources Assessment 2010: Main Report*. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2010.
- [5] Cleveland C C, Townsend A R, Schimel D S, Fisher H, Howarth R W, Hedin L O, Perakis S S, Latty E F, Von Fischer J C, Elseroad A, Wasson M F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N_2) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 1999, 13(2): 623-645.
- [6] Galloway J N, Townsend A R, Erisman J W, Bekunda M, Cai Z C, Freney J R, Martinelli L A, Seitzinger S P, Sutton M A. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 2008, 320(5878): 889-892.
- [7] Forsum Å, Dahlman L, Näsholm T, Nordin A. Nitrogen utilization by *Hylocomium splendens* in a boreal forest fertilization experiment. *Functional Ecology*, 2006, 20(3): 421-426.
- [8] Markham J H, Zekveld C. Nitrogen fixation makes biomass allocation to roots independent of soil nitrogen supply. *Canadian Journal of Botany*, 2007, 85(9): 787-793.
- [9] Vance C P, Graham P H, Allan D L. Biological nitrogen fixation: phosphorus-a critical future need // Pedrosa F O, Hungria M, Yates G, Newton

- W E. Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Netherlands; Springer, 2002: 509-514.
- [10] Alberty R A. Thermodynamics of the mechanism of the nitrogenase reaction. Biophysical Chemistry, 2005, 114(2-3): 115-120.
- [11] Hedin L O, Vitousek P M, Matson P A. Nutrient losses over four million years of tropical forest development. Ecology, 2003, 84(9): 2231-2255.
- [12] Braun S, Thomas V F D, Quiring R, Flückiger W. Does nitrogen deposition increase forest production? The role of phosphorus. Environmental Pollution, 2010, 158(6): 2043-2052.
- [13] Vitousek P M, Hobbie S. Heterotrophic nitrogen fixation in decomposing litter: patterns and regulation. Ecology, 2000, 81(9): 2366-2376.
- [14] Wurzbarger N, Bellenger J P, Kraepiel A M, Hedin L O. Molybdenum and phosphorus interact to constrain asymbiotic nitrogen fixation in tropical forests. PLoS ONE, 2012, 7(3): e33710.
- [15] Barron A R, Wurzbarger N, Bellenger J P, Wright S J, Kraepiel A M L, Hedin L O. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. Nature Geoscience, 2009, 2(1): 42-45.
- [16] Liu X J, Zhang Y, Han W X, Tang A H, Shen J L, Cui Z L, Vitousek P, Erisman J W, Goulding K, Christie P, Fangmeier A, Zhang F S. Enhanced nitrogen deposition over China. Nature, 2013, 494(7438): 459-462.
- [17] 丁明懋, 蚊伟民, 廖兰玉. 大叶相思 (*Acacia auriculae formis*) 和马占相思 (*Acacia mangium*) 固氮量的研究. 生态学报, 1991, 11(3): 289-290.
- [18] 姚允寅, 陈明, 马昌磷, 王志东, 侯景琴, 张丽红, 骆永云. 利用¹⁵N天然丰度法评估森林生态系统植物的固氮能力. 中国核科技报告, 1990: 814-822.
- [19] Han B, Zou X, Kong J, Sha L, Gong H, Yu Z, Cao T. Nitrogen fixation of epiphytic plants enwrapping trees in Ailao Mountain cloud forests, Yunnan, China. Protoplasma, 2010, 247(1-2): 103-110.
- [20] 丁明懋, 蚊伟民, 廖兰玉, 傅声雷, 余作岳. 生态条件对马占相思结瘤固氮的影响. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(2): 15-21.
- [21] 邓廷秀, 刘国凡. 桉木人工林结瘤固氮的时空变化及其对后续植物的效应(Ⅱ). 山地学报, 1996, 14(S1): 30-35.
- [22] Son Y. Non-symbiotic nitrogen fixation in forest ecosystems. Ecological Research, 2001, 16(2): 183-196.
- [23] Reed S C, Cleveland C C, Townsend A R. Relationships among phosphorus, molybdenum and free-living nitrogen fixation in tropical rain forests: results from observational and experimental analyses. Biogeochemistry, 2013, 114(1-3): 135-147.
- [24] Reed S C, Cleveland C C, Townsend A R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics, 2011, 42: 489-512.
- [25] Herridge D F, Peoples M B, Boddey R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil, 2008, 311(1-2): 1-18.
- [26] Boddey R M, Peoples M B, Palmer B, Dart P J. Use of the ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2000, 57(3): 235-270.
- [27] Hardy R W F, Holsten R D, Jackson E K, Burns R C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiology, 1968, 43(8): 1185-1207.
- [28] Grove T S, Malajczuk N. Nodule production and nitrogen fixation (acetylene reduction) by an understorey legume (*Bossiaea laidlawiana*) in Eucalyptus forest. Journal of Ecology, 1992, 80(2): 303-314.
- [29] Reed S C, Cleveland C C, Townsend A R. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest. Ecology, 2008, 89(10): 2924-2934.
- [30] Zackrisson O, DeLuca T H, Nilsson M C, Sellstedt A, Berglund L M. Nitrogen fixation increases with successional age in boreal forests. Ecology, 2004, 85(12): 3327-3334.
- [31] Yelenik S, Perakis S, Hibbs D. Regional constraints to biological nitrogen fixation in post-fire forest communities. Ecology, 2013, 94(3): 739-750.
- [32] Anderson M D, Ruess R W, Uliassi D, Mitchell J S. Estimating N₂ fixation in two species of *Alnus* in interior Alaska using acetylene reduction and ¹⁵N₂ uptake. Ecoscience, 2004, 11(1): 102-112.
- [33] Crews T E, Farrington H, Vitousek P M. Changes in asymbiotic, heterotrophic nitrogen fixation on leaf litter of *Metrosideros polymorpha* with long-term ecosystem development in Hawaii. Ecosystems, 2000, 3(4): 386-395.
- [34] Cusack D F, Silver W, McDowell W H. Biological Nitrogen Fixation in Two Tropical Forests: Ecosystem-Level Patterns and Effects of Nitrogen Fertilization. Ecosystems, 2009, 12(8): 1299-1315.
- [35] Reed S C, Cleveland C C, Townsend A R. Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests. Biotropica, 2007, 39(5): 585-592.
- [36] Skujiņš J, Tann C C, Börjesson I. Dinitrogen fixation in a montane forest sere determined by ¹⁵N₂ assimilation and *in situ* acetylene-reduction methods. Soil Biology and Biochemistry, 1987, 19(4): 465-471.

- [37] Barron A R, Purves D W, Hedin L O. Facultative nitrogen fixation by canopy legumes in a lowland tropical forest. *Oecologia*, 2011, 165(2): 511-520.
- [38] DeLuca T H, Zackrisson O, Gentili F, Sellstedt A, Nilsson M-C. Ecosystem controls on nitrogen fixation in boreal feather moss communities. *Oecologia*, 2007, 152(1): 121-130.
- [39] Hope S M, Li C Y. Respiration, nitrogen fixation, and mineralizable nitrogen spatial and temporal patterns within two Oregon Douglas-fir stands. *Canadian Journal of Forest Research*, 1997, 27(4): 501-509.
- [40] Dawson J O. Dinitrogen fixation in forest ecosystems. *Canadian Journal of Microbiology*, 1983, 29(8): 979-992.
- [41] Matzek V, Vitousek P. Nitrogen fixation in bryophytes, lichens, and decaying wood along a soil-age gradient in Hawaiian montane rain forest. *Biotropica*, 2003, 35(1): 12-19.
- [42] Vitousek P M. Potential nitrogen fixation during primary succession in Hawaii Volcanoes National Park. *Biotropica*, 1994, 26(3): 234-240.
- [43] Lagerström A, Nilsson M C, Zackrisson O, Wardle D A. Ecosystem input of nitrogen through biological fixation in feather mosses during ecosystem retrogression. *Functional Ecology*, 2007, 21(6): 1027-1033.
- [44] Vitousek P M, Porder S, Houlton B Z, Chadwick O A. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. *Ecological Applications*, 2010, 20(1): 5-15.
- [45] Binkley D, Senock R, Cromack K. Phosphorus limitation on nitrogen fixation by *Facaltaria* seedlings. *Forest Ecology and Management*, 2003, 186(1-3): 171-176.
- [46] Reed S C, Townsend A R, Cleveland C C, Nemergut D R. Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. *Oecologia*, 2010, 164(2): 521-531.
- [47] Vitousek P M. Nutrient limitation to nitrogen fixation in young volcanic sites. *Ecosystems*, 1999, 2(6): 505-510.
- [48] Hingston F, Malajczuk N, Grove T. Acetylene reduction (N_2 -fixation) by jarrah forest legumes following fire and phosphate application. *Journal of Applied Ecology*, 1982, 19(2): 631-645.
- [49] Silvester W B. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in forests of Pacific Northwest America. *Soil Biology and Biochemistry*, 1989, 21(2): 283-289.
- [50] Markham J H. Variation in moss-associated nitrogen fixation in boreal forest stands. *Oecologia*, 2009, 161(2): 353-359.
- [51] Rubio L M, Ludden P W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual Review of Microbiology*, 2008, 62: 93-111.
- [52] Batterman S A, Wurzbarger N, Hedin L O. Nitrogen and phosphorus interact to control tropical symbiotic N_2 fixation: a test in *Inga punctata*. *Journal of Ecology*, 2013, 101(6): 1400-1408.
- [53] Benner J W, Vitousek P M. Cyanolichens: a link between the phosphorus and nitrogen cycles in a Hawaiian montane forest. *Journal of Tropical Ecology*, 2012, 28(1): 73-81.
- [54] Cusack D F, Silver W L, Torn M S, Burton S D, Firestone M K. Changes in microbial community characteristics and soil organic matter with nitrogen additions in two tropical forests. *Ecology*, 2011, 92(3): 621-632.
- [55] Compton J E, Watrud L S, Porteous L A, DeGroot S. Response of soil microbial biomass and community composition to chronic nitrogen additions at Harvard forest. *Forest Ecology and Management*, 2004, 196(1): 143-158.
- [56] Kolb W, Martin P. Influence of nitrogen on the number of N_2 -fixing and total bacteria in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, 20(2): 221-225.
- [57] Piceno Y M, Lovell C R. Stability in natural bacterial communities: I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecology*, 2000, 39(1): 32-40.
- [58] Berthrong S T, Yeager C M, Gallegos-Graves L, Steven B, Eichorst S A, Jackson R B, Kuske C R. Nitrogen fertilization has a stronger effect on soil nitrogen-fixing bacterial communities than elevated atmospheric CO_2 . *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(10): 3103-3112.
- [59] Freedman Z, Eisenlord S D, Zak D R, Xue K, He Z, Zhou J Z. Towards a molecular understanding of N cycling in northern hardwood forests under future rates of N deposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 66: 130-138.
- [60] Pearson H L, Vitousek P M. Stand dynamics, nitrogen accumulation, and symbiotic nitrogen fixation in regenerating stands of *Acacia koa*. *Ecological Applications*, 2001, 11(5): 1381-1394.
- [61] Ekblad A, Huss-Danell K. Nitrogen fixation by *Alnus incana* and nitrogen transfer from *A. incana* to *Pinus sylvestris* influenced by macronutrients and ectomycorrhiza. *New Phytologist*, 1995, 131(4): 453-459.
- [62] Yang Y. The effect of phosphorus on nodule formation and function in the *Casuarina-Frankia* symbiosis. *Plant and Soil*, 1995, 176(1): 161-169.
- [63] Clark K L, Nadkarni N M, Gholz H L. Retention of Inorganic Nitrogen by Epiphytic Bryophytes in a Tropical Montane Forest. *Biotropica*, 2005, 37(3): 328-336.
- [64] Goward T, Arsenault A. Cyanolichen distribution in young unmanaged forests: a dripzone effect? *The Bryologist*, 2000, 103(1): 28-37.

- [65] Van Der Heijden E, Verbeek S K, Kuiper P J C. Elevated atmospheric CO₂ and increased nitrogen deposition: effects on C and N metabolism and growth of the peat moss *Sphagnum recurvum* P. Beauv. var. *mucronatum* (Russ.) Warnst. *Global Change Biology*, 2000, 6(2): 201-212.
- [66] Rönqvist M. Long-term effects of nitrogen deposition on epiphytic lichens. Umeå: Umeå Universitet, 2013.
- [67] Gordon C, Wynn J M, Woodin S J. Impacts of increased nitrogen supply on high Arctic heath: the importance of bryophytes and phosphorus availability. *New Phytologist*, 2001, 149(3): 461-471.
- [68] Benner J W, Conroy S, Lunch C K, Toyoda N, Vitousek P M. Phosphorus fertilization increases the abundance and nitrogenase activity of the cyanolichen *Pseudocyphellaria crocata* in Hawaiian montane forests. *Biotropica*, 2007, 39(3): 400-405.
- [69] Benner J W. Epiphytes preferentially colonize high-phosphorus host trees in unfertilized Hawaiian montane forests. *The Bryologist*, 2011, 114(2): 335-345.
- [70] Soltani N, Khavari-Nejad R A, Yazdi M T, Shokravi S, Fernández-Valiente E. Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22(6): 571-576.
- [71] Gauslaa Y. The Lobarion, an epiphytic community of ancient forests threatened by acid rain. *The Lichenologist*, 1995, 27(1): 59-76.
- [72] Tsygankov A S, Serebryakova L T, Sveshnikov D A, Rao K K, Gogotov I, Hall D O. Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1997, 22(9): 859-867.
- [73] Jeng D Y, Morris J A, Mortenson L E. The effect of reductant in inorganic phosphate release from adenosine 5'-triphosphate by purified nitrogenase of *Clostridium pasteurianum*. *Journal of Biological Chemistry*, 1970, 245(11): 2809-2813.
- [74] Yamanaka T, Hirai K, Aizawa S, Yoshinaga S, Takahashi M. Nitrogen-fixing activity in decomposing litter of three tree species at a watershed in eastern Japan. *Journal of Forest Research*, 2011, 16(1): 1-7.
- [75] Zahran H H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(4): 968-989.
- [76] Lu X K, Mo J M, Gundersem P, Zhu W X, Zhou G Y, Li D J, Zhang X. Effect of simulated N deposition on soil exchangeable cations in three forest types of subtropical China. *Pedosphere*, 2009, 19(2): 189-198.
- [77] Ledgard S F, Steele K W. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil*, 1992, 141(1-2): 137-153.
- [78] Wood M, Cooper J E, Holding A J. Aluminium toxicity and nodulation of *Trifolium repens*. *Plant and Soil*, 1984, 78(3): 381-391.
- [79] Igual J M, Rodríguez-Barrueco C, Cervantes E. The effects of aluminium on nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Casuarina cunninghamiana* Miq. *Plant and soil*, 1997, 190(1): 41-46.
- [80] Mo J M, Brown S, Xue J H, Fang Y T, Li Z A. Response of litter decomposition to simulated N deposition in disturbed, rehabilitated and mature forests in subtropical China. *Plant and Soil*, 2006, 282(1-2): 135-151.
- [81] Carreiro M M, Sinsabaugh R L, Repert D A, Parkhurst D F. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology*, 2000, 81(9): 2359-2365.
- [82] Waldrop M P, Zak D R, Sinsabaugh R L, Gallo M, Lauber C. Nitrogen deposition modifies soil carbon storage through changes in microbial enzymatic activity. *Ecological Applications*, 2004, 14(4): 1172-1177.
- [83] Pérez C A, Carmona M R, Armesto J J. 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(2): 148-156.
- [84] Benner J W, Vitousek P M. Development of a diverse epiphyte community in response to phosphorus fertilization. *Ecology Letters*, 2007, 10(7): 628-636.
- [85] Welsh D T. Nitrogen fixation in seagrass meadows: regulation, plant-bacteria interactions and significance to primary productivity. *Ecology Letters*, 2000, 3(1): 58-71.