

应用微生物译文集

(固氮专集)

I

河北省科学院微生物研究所情报资料室

一九八六年十月

固氮生物的生物学

作者: Janet W. Spreen (Dundee 大学)

翻译: 倪广平

出版编辑: 王文英

目 录

第一章 固氮生物的范围	2
一、引言	2
二、固氮生物的范围	4
三、细菌	5
四、兰藻	11
五、细菌共生	16
六、兰藻共生	37
1、地衣	37
2、苔藓植物	39
3、蕨类植物——满江红	41
4、苏铁	42
5、被子植物	46
6、硅藻	47
7、对兰藻共生的总评述	47(1)
第二章 生物固氮的代谢问题	47(2)
一、引言——问题	47(2)
1、固氮酶：能量需求	47(2)
2、固氮酶的底物多样性	51
3、供给还原剂	52
4、总的考虑	52

二. 解决办法	53
1. 无氧生活	53
2. 放氧光合作用和固氮作用的空间隔离	56
3. 光合作用和固氮作用的时间间隔	57
4. 学会有氧生活	59
5. 与耗氧生物一起生活——联合共生	61
6. 真核细胞如何解决固氮代谢的问题	62
7. 铵同化	65
第三章 固氮和农业	71
一. 引言	71
二. 豆科植物	71
1. 影响根瘤活性的一般因素	76
2. 豆科植物固氮作用的效率	79
3. 固氮能满足植物对氮素的需要吗?	80
4. 饲料、牧草豆科植物	82
5. 食用豆科植物	87
6. 环境对豆科植物固氮的影响	95
三. 自生细菌	106
四. 联合共生现象(细菌——被子植物)	108
五. 兰藻	109
六. 共生兰藻的联合——满江红 <i>Azolla</i>	110
七. 非豆科植物共生	111
第四章 固氮与林业	112

一、森林中氮素的要求量及预算	112
二、固氮植物的直接利用	113
1. 豆科植物	113
2. 非豆科植物	115
三、共生被子植物作为树木氮源	115
1. 非豆科植物	115
2. 其它非豆科植物	119
3. 豆科植物	120
4. 其它豆科植物	121
四、森林中自生微生物固氮作用	123
第五章 自然生态系统中的固氮作用	127
一、前言	127
二、水生系统	127
1. 淡水	127
2. 海水	132
3. 港湾地区	133
4. 水生系统内联合固氮	135
三、陆生系统	139
1. 土壤	139
2. 叶面	145
3. 根际联合	146
4. 开拓联合	146

5. 三者共生现象	154
第六章 进化、过去和未来	160
一. 固氮酶在远古时候的作用	160
二. 现代各种固氮生物的进化	162
三. 创造新的固氮生物的可能性	164
1. 造成新的共生作用	164
2. 将固氮基因 <i>Nif</i> 结合到其他生物各类中去	166
四. 改进现有种类中固氮作用的潜力	167
五. 短期展望	169
六. 氢的使用	170
附录 测定固氮的一些方法	171
1. 以重量表示生长	171
2. 总氮	172
3. C 和 N 同时分析	173
4. 同位素法	173
5. 乙炔还原测定	177
6. 各种测定方法进行比较的基础	179
7. 其它方法	180

固氮生物与生物学

Janet I. Sprent (Dundee 大学)

前言

多年来生物学家和农学家对固氮过程很有兴趣。近来，煤炭能源使用浪费和供水的污染，氮肥的应用费用已很昂贵。加之人们对高蛋白植物食品的要求，在固氮研究领域产生新的局面。这方面成果已在许多出版物报道，在过去十年中，大约每年一次的国际会议都讨论过这一课题。专家们写了一些包括综述性文章的优秀论文。不过对于大学生，有关农业、林业、生态研究领域的人员，甚至对新进入固氮研究领域的人来说，这些论文太深、太繁琐。为此，本书就是为这些人而写的。

作者首先概述了固氮生物，然后考虑它们在细胞水平上如何固氮。再讨论固氮与农业、林业和生态的关系。最后，对固氮系统的过去和将来进化作了粗略考虑。附录包括了测定固氮的方法。这些章节根据需要长短、重点有所不同，这种不同反映了某些集中研究侧面——例如在农业上的豆科。文献是很多的，至今没有人试图将所有文献都包括进去。作者宁可最近出版物中选择一些资料来阐明某个观点，以作为入门的先导。

我应该很好的感谢我的朋友和同事，他们鼓励我写这本书，并送给我未发表的手稿。没有 Anyela Gallacher 的打字，Yvonne Jones 的照相和 Grant Mac Farlane 的制图帮助，整个写作将无法进行。

Janet I. Sprent

1978年3月

第一章固氮生物的范围

一、引言

我们吸入的气体中，78%是氮。遗憾的是，我们呼出的气体78%仍然是氮。在这方面我们与动植物界——或真核生物其它种类一样——即自身不能将这极稳定的气体转化成为生物有用形式。所有能利用氮的生物属于原核生物界，在所有的情况下，固氮的基本反应看来似乎是相同的，即在固氮酶复合体的帮助下，将氮还原为氨。虽然这说来简单，但它包含着可用各种方法处理的各类问题。本书意在描述能还原或固氮的生物，来告诉你这些生物如何对付和解决固氮中的各种问题，并试图估价它们的全部意义和潜力。

首先，让我们把固氮作用放入图1·1的透视图，这个图简单描写人们熟悉的氮循环，其中设为三个部分。外面是大气，中间是土壤水的环境，里面是生物。假如我们承认（并非每个人都这样）世界蛋白质短缺，则很清楚需要从内圈增加输入而减少其支出。首先取其最后一点：我们知道一些土壤，尤其在森林顶极植被下的土壤，含有抑制硝化作用中特殊步骤的物质，这样有助于保存氮。现已生产并在农业中已开始使用一些合成的抑制剂。同时也减少渗漏损失，因为硝酸盐是氮化合物中最容易渗漏的。

为了增加圈内的输入，必须产生对活细胞可接受的氮化合物，这需要相当的能量。该能产自大气放电（或发动机内部燃烧），造成氮和氧的化合。幸运的是，我们还不能够控制雷电，尽管在世界上某些地区相当多的氮素是通过这一途径固定的——据报道固氮量达30公斤/公顷——在可预见的未来，这可能仍无法预言此种固氮的前景。通过Haber - Bosch法，使氮和氢化合形成氨，氮用作肥料，但是必须消耗煤灰燃料。制造1公斤的纯氮化肥并运送到农场需要1.5

公斤燃料。

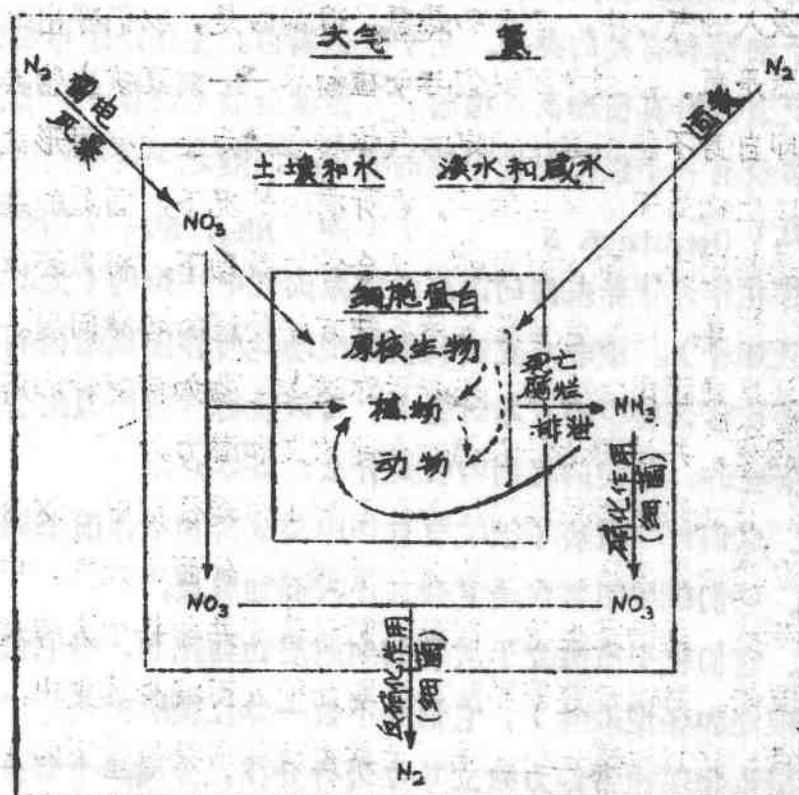


图1.1 氮循环的主要反应

由于固氮生物就地直接或间接的用光能来产生氮，所以不必花费运往田间的费用。生物固氮到最终产物氮，这种储存能量的潜力很重要。第三方面，它还没有充分估价，从实际出发生物固氮需要微生物菌制作，不像应用的化肥，它完全不能直接应用。通过渗漏的化肥损失，不仅浪费能源和金钱，而且是环境污染源，尤其污染供应的淡水。这样固氮的经济学和社会学方面在最近几年已增加了研究的动力。

估计通过生物过程约固定130吨氮/年，可与工业和大气固定作用比较，少于50吨氮/年。

二、固氮生物的范围

整个上世纪，文献中出现固氮的许多报告。涉及到的微生物自生的以及与其他微生物共生联合的都有。极少例外，它们全部是原核生物，属于细菌和有关的类别。几乎全部真菌，主要是酵母例外。但也有一些更复杂的真菌和高等植物/真菌共生物（菌根——见第六章）。这些报告没有一个经得起批评性的核对。问题之一是一些微生物是微量结合氮（Combined N）（如 NH_3 , NO_3^- ）的很好清除者，结合氮存在作为培养基内的杂质或作为大气中污染物（尤其在实验室中住着吸烟者）。除非或直到我们能成功地转移固氮基因到真核生物（这方面的前景将在第六章讨论），可以设想所有固氮生物（原核生物）是安全的。该类的区别特征是什么？基本点是：

- 1、它们的核质决不被核膜自细胞质分离和不伴随基础蛋白。

- 2、它们的质膜常常是复杂的侵入到细胞质。

3、它们较少有独立于质膜的细胞质的细胞器，当它们工作时（气体液泡和各型颗粒），它们并不被一单位膜所封闭。

原核生物现在常作为独立单位进行分类，分成二个部分，青细菌和细菌。这二者的分类争论热烈。拿青细菌或蓝细菌来说——这些仍然更普遍的称为蓝藻科，常常归入植物界。可是，它们具有所有原核生物的属性，如上所列。主要特征从其它细菌区分它们，是它们进行高等植物型的光合作用，即它们用水作为电子供体，从而放出氧。它们也表现更多的细胞差别。在本书内，它们主要被认为是原核生物，它们是否是细菌还是植物的争论留给他人。可是，我们将采用“蓝藻”的普通用法。细菌部分，其分类尽可能采用最近第八版 Bergey 的“细菌鉴定手册”（1974）。

三、细菌

表1·1列举了通常已知的固氮种类。第一部分也是最大部分(a)包括非光合、非丝状型、甚至迅速的一瞥也表明代氮细菌科的范围很广。此书在出版时，可能已发现另外的一些种类：其他的可以被重新分类甚至删除。原因由于这是明显的，偶然性的出现固氮习性，可以是演化的，这方面将在第六章讨论。该属的大多数只在厌氧或微好气（即低氧浓度）条件下有活性，以及只有特殊种的少数菌株表现活力。在自生型中的固氮细菌科的种类例外，它已进化到在好氧环境中生活的几种方法，还进行固氮的严格厌氧过程。正如我们将在下章所见到一样。

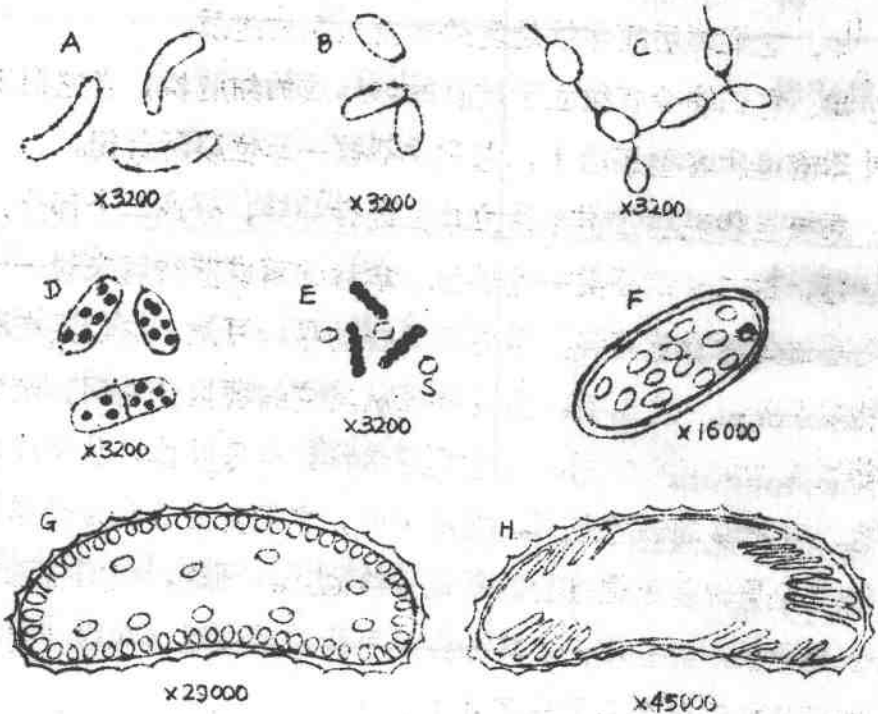


图1·2自生固氮菌的属在形状和结构上的不同

A. *Rhodospirillum molischianum*. B. *Rhodopseudomonas acidophila*. C. *Rhodomicrobium Vannielii*
D. *Chromatium Vinosum* 有内硫颗粒 E. *Chlorobium limicola* 有外硫小球 (s) F. *Azotobacter chroococcum*
(注意在N气上细胞生长内发现的伸展的内膜系统
G. 和 H. *Rhodospirillum rubrum* *Rhodospirillum molischianum* 分别在光中厌氧生长表示在细胞质内膜内的囊泡和片层堆。

(a) 非光合, 非丝状型

科 属 种	一 般 说 明
假单胞菌科 <i>Pseudomonas</i> <i>azotogensis</i>	土壤、淡水和海水 确切分类不肯定 厌氧固氮?
固氮细菌科 <i>Azotobacter</i> <i>Azomonas</i> <i>Azotococcus</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Derxia</i>	土壤、水、叶和根表面: 所有种类 好氧固氮, 但一般在低 PO_2 时更有效。碱性土壤, 一般产生一些细胞外粘液 酸性土壤, 非温带区产生很多粘液

根瘤菌科

Rhizobium

所有品种与豆科共生固氮、微嗜氧：
一些菌株无活性：生长在结合 N 的土壤
中，但已经在实验中离开豆科诱导
固氮。

leguminosarum

phaseoli

trifolii

japonicum

lupini

cowpea miscellany

在酵母膏培养基上生长迅速

详细分类
有争论

在酵母膏培养基上生长缓慢

可能是更原始根瘤菌

芽孢杆菌科

Bacillus

polymyxa

megaterium

maceraans

广泛出现，好氧或兼性厌氧

大多数菌株厌氧固氮

一般固定作用小

Clostridium pasteurianum

butyricum 或其他种

Desulfotomaculum

mesophilic 种a

土壤、淡水、海水、沉积物、肠、粪：

有些菌株厌氧或微嗜氧固氮，有些还
原后

肠、瘤胃、严格厌氧：

转化 SO_4^{2-} 为 S^0 ：有些菌株固氮。

肠道菌科

klebsiella

pneumoniae

最早全部从肠道菌丛分离，现报告自
各种生境：只有少数菌株有固氮活性。
固氮酶合成和厌氧或微嗜氧时有活力。

和其他分类不肯定的种	叶和瘤的表面、粪、瘤胃
<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>cloacae</i>	
<i>Eruinia herbicola</i>	
<i>Citrobaeter freundii</i> <i>intermedius</i>	
<i>Escherichia coli</i> <i>intermedius</i>	
螺旋菌科	专性好氧菌与牧草的根联合①那里 它可微嗜氧固氮
<i>Spirillum lipoferum</i> ^b	
未肯定科的属	
<i>Desulfovibrio Vulgaris</i> <i>desulfuricans</i> <i>gigas</i>	有机物含量高的泾土、淡水和 海水，并非所有菌株都有固氮活 性。
<i>Mettylosinus trichosporium</i>	土壤、水：利用甲烷：生长和固 氮好氧
<i>Phisbacillus ferroxidans</i>	有高的铁含量的酸水、矿质化学 营养，氧化 Fe^{+2} 和S化合物：好 氧生长和微嗜氧固氮。

a. Postgate 指出嗜温细菌都不能固氮。

b. Krieg 建议该种重新分类为新属 *Azospirillum*。 有
二个种 *lipoferum* 和 *brasiliense*。

(b) 光合型 这些属有光合色素联结着自原生质膜形成的细胞质内膜并观察到囊泡和片层堆(图1·2)。全部分类属于 Rhodospirillales 目, 它包括三个科, 每科的细菌都固氮。

科 属 种	一 般 说 明
红螺旋菌科 <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodospirillum</i> sp. <i>Rhodopseudomonas capsulata</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>	主要水生、兼性厌氧、紫色非硫菌, 当生长在结合 N, 一般微嗜氧, 假如厌氧生长, 需光以及在这些条件下有些菌株固氮。
色菌科 (Chromatiaceae) <i>Chromatium</i> sp.	潮湿和泥泞的土壤, 海水和淡水那里有高的硫化物, 严格厌氧: 紫色硫细菌、氮的固定较少
绿菌科 (Chlorobiaceae) <i>Chlorobium limicola</i>	生境如色菌: 严格厌氧: 绿硫细菌: 氮的固定较少?

(c) 放线菌和联合的丝状型

科 属 种	一 般 说 明
<i>Mycobacterium flavum</i> ^a 和其他种	酸性土壤
<i>Corynebacterium</i> sp. <i>autotrophicum</i> ^a	土壤、泥: 几个菌株表现自养 (H ₂ CO ₂) 固氮, 和固氮存在中异养(蔗糖)固氮。
弗氏菌科 <i>Frankia</i> ^b	与非豆科被子植物共生固氮

a. 正确的分类位置未肯定

b、在 Bergey 手册，该属分若干种按结瘤寄主的属。该内寄生植物最近自 *Comptonia pergrina* 分离越过了这些专门的分界线，这似乎很清楚，该分类必须修订。

所有这些非光合属只是间接的依赖光能固氮。它们必须提供适当的碳化合物如糖或有机酸含有原来来自光合的能，但变得对呼吸途径非常有用。共生的属 *Rhizobium* 和 *Frankia* (表 1·1) 从它的寄主得到这些化合物，但自生型必须在它们的特殊环境中与其他微生物进行竞争才能得到。假如结合氮的供给很好，固氮科就没有竞争能力，由于在可用的碳化合物内相当一部分用于固氮，很少用于生长。这样，自生属一般限于富于有机碳，但结合氮低的生境。这样的条件几乎在任何环境——土壤、海水、淡水、动物的肠内零星地出现；的确，固氮菌已经差不多各地都有记录。这样，*Citrobacter* 能在白蚁肠内发现，那里有大量碳水化合物但氮极少，由于白蚁的主要食物是木头；（这是一种有效的共生者而不是一个自生型）。肠道杆菌科的细菌通常认为是哺乳类肠内的居住者，那里结合氮供给甚佳。可是，越来越多的报道指出它们还在别的地方发生，例如，在造纸厂的排出液中有大量碳水化合物但很少结合氮。这种类型生境中固氮作用的报道是最常见的，可能在未来还会增加。

大多数光合细菌（表 1·16）是自养的，这样就没有碳水化合物的供给问题。当生长在氮气中作为单一氮源它们通常是严格厌氧生活，这就相当限制它们的生境范围。细菌的光合作用不产生放氧，由于除水以外的化合物用作最后的电子供体，该还原物源通常有高度的特性。例如 *Chromatium* 能利用硫化物，在此情况，硫颗粒被沉积在细胞里面（图 1·2）。

主要固氮的丝状菌属（表 1·1c）是共生 *Frankia*。在

纯培养中至今得到的一个分离物，是分枝的，分隔的菌丝从孢子囊含有复杂结构的孢子，设想是该微生物的繁殖阶段 *My cotacterium* 和 *Corynebacterium* 的分类多少是暂定的。

自生固氮菌的生物学兴趣大量来源于它们代谢的变化和生境。这些观点将在第二和第五章论及。结构上，它们通常与细菌相符，有杆、球、弯曲型，鞭毛的数目不等和位置不同等等，代表菌在图1·2已说明。

四、蓝藻

第一次讨论豆科根瘤的重要性以后不久，在1899年报导了蓝藻的固氮。随后的研究是断断续续的，但步伐逐渐加快，直到前15年所作的非常迅速的进展和已出现几个很好的评述。蓝藻已经根据形态和解剖学分类——细胞型、分枝或不分枝菌丝等。

首先认为，所有的固氮品种属于丝状具有异形细胞的 *Nostocales* 和 *Stigonematales*。其中最广泛研究的是柱形鱼腥藻 *Anabaena*

Cylindrica，甚至被认为是蓝藻的大肠杆菌。它的结构和生理已由 Stewart 概述。重要的是，它有不分枝的菌丝含有高达三型的细胞（图1·3）。营养细胞作为一个整体来看是该类中最典型的，具有对高等植物型光合的所有要求，即用水作为最后的还原物源，通过卡尔文循环的酶固定二氧化碳和放出氧。光合色素位于细胞外区的类囊体以及——此外还有叶绿素a，胡萝卜素和叶黄素——它们有特殊的辅助色素称藻胆蛋白。除作为光—间受体作用外，藻胆蛋白明显的功能为一个很容易利用的氮贮存库。营养细胞可能也含有多角体，现在称为羧体，它是卡文循环酶，核酮糖二磷酸羧化酶的分子聚集体。作为氮贮存库，多聚糖苷体能在类囊体中找见。过多的氮贮在天门冬氨酸比精氨酸为1：1的共聚物颗粒内。此外，营养细胞可能含有气