

生物固氮研究方法

F. J. 伯杰森 主 编



科学出版社

生物固氮研究方法

F. J. 伯杰森 主编

陈冠雄 戴祥鹏 周礼凯 译
张成刚 吕安国 王雨勤

陈冠雄 等 校

科学出版社

1987

内 容 简 介

本书是由澳大利亚著名科学家F. J. 伯杰森主编的关于生物固氮研究方法的一本专著, 内容包括固氮微生物的培养、鉴定, 固氮作用的直接测定和间接测定, 固氮酶的分离提纯及其性质, 非豆科植物固氮, 固氮菌遗传学, 田间试验的设计及结果评价, 以及各种豆类接种剂的生产和质量管理等。书中各章分别由各国著名专家撰写, 操作方法叙述详细具体, 特别注重实用。书后附有大量参考文献。

本书可供大专院校师生、研究生, 从事微生物、微生物生理生化和生物固氮研究的科技人员以及菌剂生产、管理及田间应用的技术人员参考。

F. J. Bergersen
METHODS FOR EVALUATING BIOLOGICAL
NITROGEN FIXATION
John Wiley and Sons, 1980.

生 物 固 氮 研 究 方 法

F. J. 伯杰森主编

陈冠雄 戴祥鹏 周礼凯 译
张成刚 吕安国 王雨勤

陈冠雄 等 校

责任编辑 吴铁双 赵甘泉

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1987年8月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1987年8月第一次印刷 印张: 23 1/8

印数: 9001—2,000 字数: 538,000

统一书号: 13031·3639

本社书号: 4730·13—10

定价: 5.50 元

译 者 的 话

生物固氮在农业生态、森林生态系统和许多其他自然生态系统中起着重要的作用。现在生物固氮研究领域日趋扩大，从事生物固氮研究的科技人员日益增多，但是缺乏较完整的研究方法专著。为适应这种情况，澳大利亚著名科学家F. J. Bergersen博士主编了《生物固氮研究方法》一书。

本书一出版就得到了很高的评价。英国ARC固氮研究所所长J. R. Postgate教授曾在《自然》杂志上发表的书评中指出，这本书汇集了固氮研究方法的精华，内容十分丰富，包括试验设计、实验室研究方法和田间应用技术。全书共分三篇十六章，各章均由从事该项工作多年的专家撰写，方法叙述详细、具体、系统，并附有大量参考文献，是一本很有价值的参考书。

由于原书篇幅较大，从我国生物固氮研究工作的实际情况出发，我们只选择了十一章。这些方法在微生物、生物化学、农业化学、环境保护等研究工作中也都有应用价值。

在本书的翻译过程中，我们得到了张宪武教授的热情指导，并得到有关同志的支持和帮助，在此一并致谢。

由于水平有限，译文难免有不妥之处，恳请读者提出宝贵意见。

目 录

译者的话

第一篇 绪论..... (1)

方法、偶然事件和设计..... (1)

第二篇 实验室方法..... (6)

第一章 固氮微生物的培养..... (6)

第二章 固氮作用的直接测定..... (47)

第三章 固氮作用的间接测定..... (78)

第四章 非豆科植物的根瘤系统..... (98)

第五章 研究固氮酶的方法..... (117)

第六章 鉴定固氮微生物菌株的方法..... (155)

第七章 固氮微生物的遗传学研究..... (175)

第三篇 田间应用方法..... (216)

第一章 豆科作物和豆科牧草的试验——原理与实践..... (216)

第二章 豆类接种剂的生产与质量管理..... (267)

第三章 天然植物群落和土壤的固氮作用..... (301)

参考文献..... (320)

第一篇 绪 论

方法、偶然事件和设计

1. 固氮研究中的方法学与研究间的历史关系
2. 试验设计
3. 日益增长的固氮研究
4. 其他的技术资料来源

1. 固氮研究中的方法学与研究间的历史关系

从18世纪下半叶英国和法国的伟大化学家发现氮是陆地空气的主要组成, 经过19世纪初围绕“植物空气营养学说”的论争时期, 直至19世纪末证实了微生物和结瘤豆科植物能固定空气中的氮, 所有这些进步几乎完全取决于适宜的研究方法和实验技术的发展。的确, 在许多情况下, 理论的发展大大地超出了适于检验这些理论的技术能力。值得指出的是, 除了所述问题在农业上的重要意义以外, 在英国, 对于水路和水源的农业污染、工业污染和生活污染的关注, 在某种程度上也激励人们研究氮素化合物的新的化学分析方法。在法国, Boussingault (1853) 曾经指出, 巴黎的河水就象一堆厩肥! 我们倾向于认为, 对环境的关注, 是一种近代的现象。

氮分析方法的发展是非常惊人的。但是, Lawes和Gilbert (1851) 指出, 这些方法不足以测出加到1英亩*土壤中的100磅*氮, 即使该土壤已因连续种植而使氮素遭到明显的耗竭。因此, 分析方法的进步在很大程度上取决于实验技术的进一步发展。

1840—1890年围绕植物氮素营养, 特别是围绕它们利用空气氮的能力的争论, 给实验设计、分析方法和人们对有关科学家的评论提供了许多有益的借鉴。从Wilson (1940)和Aulie (1970)的著述中, 我们或许能得到很好的说明。人们最好也阅读一下Lawes等 (1861) 和Lawes与Gilbert (1892) 的两篇原著。但是, 许多读者也许不能找到原著。因此, 简短地重述一下它们是必要的。

豆科植物在农业中的价值, 曾在古老的文献中有过很好的论述。这些知识, 通过罗马作家如Varro, Cato和Columella的僧侣抄本, 经由中世纪而保留下来。然而, 直至19世纪末, 这种价值才得到了理论上的阐明。在作物轮作制中引入豆科植物的做法, 看来是由Richard Weston爵士引入英国的。他于1639年访问佛兰德斯时, 对三叶草在种植系列中的良好作用有很深的印象 (Aulie, 1970)。所述做法于1731年得到了确立, 并

本章作者F.J.Bergersen (澳大利亚堪培拉, 联邦科学工业研究组织植物工业研究所)

• 1英亩=4,047平方米。1磅=0.4536kg。——译者

由Jethro Tull进行了叙述——在种植系列中引入三叶草、驴喜豆和苜蓿(Aulie, 1970)。通过实验观察(其标准是采用这种做法的农场是否受益), 证明是有益的。在这种经验的基础上, 作物轮作遍及了欧洲。那里的粮食生产于18世纪增长了40—50%。探索豆科植物产生效益的原因, 成了早期农业化学发展的科学研究的课题。

Dumas (1834) 提出的测定有机质中碳、氢、氧和氮的可靠方法, 径直地使人们对上述问题的了解进入了下一阶段。Boussingault于1838—1844年用饲料作物进行了试验。从试验中发现, 豆科植物的良好作用及其较高的营养价值, 与其氮含量有关。1841年, 他发表了使人困惑的分析结果, 即在最初因连续种植谷类作物而耗竭了的土地里, 在五年轮作期间, 积累的氮超过了以厩肥形式加入的氮。这些过剩的氮难道能得自空气吗(Aulie, 1970)?

大约在同时(1840), Liebig男爵提出了植物如何获得氮的简单解释。他认为, 由腐败作用释至空气中的氨随雨水回到了土壤, 并能被植物叶片从空气中吸收(Aulie, 1970)。这是对早在1804年就由其他欧洲学者推测性地提出的理论所作的简单推理。分析表明, 空气中有氨。但是, Liebig的理论之所以得到承认, 主要是因为他作为有机化学家的崇高声誉。当时, 并不具备氮源足够植物生长的可靠依据。早在1838年, Boussingault就意识到测定空气中氨的浓度是重要的, 并认为更为重要的是测定氨释至空气和回到生命物质中的速度。但是, Dumas法不适于此目的, 其他方法也不充分(Aulie, 1970)。直到1853—1854年, 他才应用浓缩、蒸馏和滴定法(该法的准确度达0.03—0.04毫克 NH_3 /升), 发表了雨水、河水和井水中的氨含量值。大约同时, 在英国的洛桑(Rothamsted), John Lawes爵士和J.H. Gilbert博士(他刚从Liebig那里获得了博士学位)着手测定雨水中的氨和硝酸(Lawes和Gilbert, 1854)。他们应用了基本上相似的方法来严格地评价其结果的准确性。他们得出结论: 从空气中溶解出来的氨不足以说明测得的作物产量。他们不认为他们测定硝酸盐的方法足以导出可靠的结论。但是, Thomas Way (1856) 清楚地表明, 空气中的硝酸盐和氨不能满足植物对氮的需要。这些方法证明, 必须进一步了解氮素的转化过程, 从而导致了人们对于空气氮的固定过程的研究。

随着人们确信空气中的结合态氮不是植物的重要氮素来源, 便进入了试验研究氮素固定的重要阶段。Aulie (1970) 对1850—1856年Boussingault与Ville在法国科学院的争论作了有趣的简述。前者根据在封闭系统中进行的严格控制的试验得出结论说, 植物不能利用空气中的分子氮; 而后者则得出结论, 认为植物能够如此。Ville认为, 这种争论的产生是缘于实验仪器的设计和实验技术的不同。尽管Boussingault作了精细的工作, 法国科学院却支持了Ville的结论。

在洛桑, Lawes等(1861)曾于1844—1859年检验了Boussingault, Ville和其他学者的工作; 有些试验是按他们自己设计的方案进行的。文章开始综述了他们用豆科和禾本科植物进行的田间试验, 这些试验清楚地表明了豆科植物在轮作制中供应氮的效果。他们还讨论了“我们知道是存在的并在陆地、水、动植物中和空气中流通的相当大量的结合态氮”作为氮源的可能性。在1857—1859年间, 试验是在一封闭系统中进行的。对该系统的结构与应用曾进行了详细的描述。禾本科植物长得很好, 但豆科植物有时长得不好。尽管如此, 作者还是认为, “结果并不说明有游离氮的任何同化”。他们指

出，相当多的现有结合态氮能起什么样的作用，仍不很清楚。

Lawes等(1861)的文章有力地否定了植物能利用空气中氮的可能性。他们的试验设计得很好，并进行得很好，可惜却将人引入了误区。微生物的固氮作用(当时还不知道这一点)曾被小心地排除，因为先前十来年的经验曾强调了从空气、水、土壤和装置的内表面中除去所有形态的结合态氮的重要性。当时，没有一个科学家注意到采用煅烧的土壤与负结果间的联系，或指出是否有根瘤和豆科植物。豆科植物根瘤的显微镜研究，是早在1858年由Lachmann进行的(Fred等，1932)，并认为其中含有微生物。

20多年过去了，丝毫没有进展。直到在新建立的康涅狄格州立试验站工作的W.O. Atwater (Wilson, 1963)进行了温室试验，事情才有了转机。他在温室里将豌豆种在加有不同数量营养物质(包括结合态氮)的盆钵里。试验结束时获得的平衡表明，植物获得的氮超出了供应的氮。虽然意识到‘植物能吸收游离氮是与通常的信念和有关的卓越学者的研究结果不一致的…’，Atwater仍继续坚持这一点(Atwater, 1885)。虽然并不清楚反应的基础是物理学的还是生物学的，但他确信，植物与此有关(Atwater, 1886)。

与此同时，在1883年，德国两位植物化学家Hellriegel和Wilfarth开始研究氮肥施用量对作物产量的影响。三年之后，他们获得了三点肯定的结论：①在注有除氮以外的完全营养液的砂培中，禾本科植物的生长与加入硝酸盐的量成比例；②豌豆常常显示了能从另一个未知来源获得氮；③在不加硝酸盐的对照处理中，一些豌豆植株发黄，发育缓慢，而另一些则发绿，生长旺盛。他们认为，所述结果可解释为细菌从空气中进入了灭菌盆钵，偶然地侵染了根使之结瘤，从而使某些豌豆植株得以利用空气中的游离氮。为了证明这一点，他们用菜园土的浸提液侵染种有豌豆的灭菌盆钵。第一个试验失败了，因为用了不合适的砂。第二个试验得到了明晰的结果：生长在灭菌砂中用消毒棉花防止污染的豌豆在不加结合态氮时长得不好；加了土壤浸提液的豌豆却长得很旺盛。在所有情况下，良好的生长均与根上存在着许多根瘤有关。就象对硝化作用的研究业经作过的那样，对于固氮研究，农业化学与微生物学间又有了联系(Warrington, 1883)。试验结果在1886年于德国科学家会议的实验农业组里进行了令人难忘的论证(Hellriegel和Wilfarth, 1888)，会议主席是洛桑的Gilbert。

洛桑的学者们仍持怀疑态度(Lawes和Gilbert, 1889)，直到他们完成了他们自己的新试验，才消除了这种怀疑。正如期望的那样，他们的试验与早先的负试验一样，曾有过详尽的叙述，并肯定地证明了结瘤豆科植物的固氮能力(Zawes和Gilbert, 1890, 1892)。与德国的试验不同，洛桑的工作注意了详细的氮素分析和根瘤发育的观察。

2. 试 验 设 计

前面简要地论述早期争论的问题，在这里，是作为一个实例以说明实验技术、实验及科学基本原理与试验者的个人观点和洞察力间在科学上的相互作用。研究工作中所采用的方法只不过在整个实验过程中具有重要作用，试验设计却是如何用实验来回答所提出的问题。当然，实验方法也会对得到的解答带有一些限制因素。这些限制因素必须用

适当的对照和比较加以明确。整个设计必须考虑到偶然出现的情况，而这往往会使试验者感到迷惑不解，或使其受到启发。

有时，某些方法可能盛行一个时期，结果发生使用不当的情况。例如，在测定结瘤植物或固氮菌的实验室培养物的固氮能力时，仅限于用气相色谱仪进行固氮酶的乙炔还原试验，是没有充分理由的。在许多情况下，使用上一世纪发明的某一方法来测定试验中全氮的实际增长量既容易，也更合适。

从上节引用的历史文献中，我们可以领悟下列的试验设计原理。其中一些较为明显，但为了帮助了解使用的方法在整个设计中所占的适当位置，我们把这些原理列举如下：

①查出什么是已经知道的，切勿把调查局限在熟悉的杂志上或同一学科上，要重视野外工作者的观察结果，即便他们不是科学家。另外，最为重要的是要谨防先入为主，尤其是在这些意见没有实验数据支持时更应如此，即便有实验数据，也要持怀疑态度。

②确定问题，并仔细地拟出试验中需要回答的问题。在做的过程中，你可能没有充分的资料去查询相应的问题。因此，允许出现未预料到的试验结果。

③尽早进行统计，修改设计方案，这比重复试验要容易。

④为保证试验目标，确定需要有什么样的对照和比较试验。

⑤选择使用方法，考查你使用这些方法的能力，确定它们是否适合试验目标。

⑥检查一下你们的资源（材料）是否能在完成试验设计所要求的时间内，满足取样和分析的需要。

⑦即使有了这些预防措施，若试验进行得不好也不要失望，继续试验！

3. 日益增长的固氮研究

毫无疑问，从事固氮研究的科学家已大大增多，并将继续增加。例如，仅豆科共生研究的论文摘要（由私人发行的“根瘤菌通讯”摘编的）就由1968年的85篇上升到1976年的450篇（Gibson，个人通讯）。1972—1976年，有45个国家300种杂志发表了这方面的论文。同样，其他方面的固氮研究也日益增加。固氮研究的日益扩大是有多种原因的。自1973年出现能源危机以来，由于石油价格上涨而使氮肥成本大幅度上升，农业系统的生物固氮作用又重新得到了重视。据介绍（如Anon，1977a），在某些国家，固氮研究的投资已增多。实验技术和方法也得到显著地改进，这样就能进行新的研究。Hardy等（1973）曾指出，在他们的论文发表之前，乙炔还原技术在固氮酶活性分析中的应用成指数地增长。这就证实了Wilson和Fred（1935）的预测：除非有某些新的因素促进固氮研究出现另一个指数增长的时期，在1965—1970年间，将会出现一个高峰，每年发表的固氮研究的论文数目可达100篇左右。这些因素包括研究固氮酶的遗传学、酶学及生理学的技术能力的协调一致的发展，以及发现一些新的被认为可能具有实际意义的固氮体系。

目前，固氮研究正在几个领域内展开。这个过程可能是有益的，也可能是有害的。应该强调固氮作用在农业和粮食生产上的作用；也应重视生物固氮在自然生态系的氮素经济中的地位。许多自然生态系是自然保护方面要努力进行研究的课题。白蚁体内的固氮

菌在维持某些森林生态系和热带草原生态系的分解循环中可能具有重要的作用(French等, 1976)。在废物处置系统中, 固氮作用可能是有益的, 但往往会发生一些问题, 例如恶臭, 它是糖料废物特有的, 在这种废物里, 象*Klesbsiella* spp. 这类的生物极易生长。蓝藻在生活污水和工业污水蓄水池和渔业生产系统中也常常引起一些问题。据Jutono (1973) 报道, 爪哇 (Java) 的古建筑物石头表面的主要定殖生物为三个属的蓝藻, 它们对石头表面的损坏起着重要的作用。这类实例说明固氮研究正应用于日益广阔的技术领域。

4. 其 他 的 技 术 资 料 来 源

随着固氮研究的日益增多, 很需要编写一本有关这一课题研究方法的书。1966—1974年间的国际生物学规划 (IBP) 看到了这方面的需要。一部用途广泛而有重要价值的、用于豆科根瘤菌研究的方法手册已经问世 (Vincent, 1970)。Parkinson等 (1971) 在他们合著的土壤微生物生态学手册中包括了固氮菌, 而Allen等 (1973) 曾编辑一本根瘤菌菌种的IBP名录。在本书中, 我们的目的是想在更广泛的基础上完成相似的任务。我们将提供充分的基础资料以便使这些方法在现有知识水平上易于理解。此外, 还附有大量的参考文献, 从中可获得其他方面的资料。最近已出版了许多有关固氮知识现状的评论和书籍 (如Postgate, 1971; Lie和Mulder, 1971; Quispel, 1974; Burns和Hardy, 1975; Hardy, 1976—1978; Newton和Nyman, 1976; Stewart, 1975; Nutman, 1975; Dalton和Mortenson, 1972; Stewart, 1973; Burris, 1974; Eady和Postgate, 1974; Dilworth, 1974; Evans和Barber, 1977)。只有少量的著作详细论述了固氮研究的方法学。一些比较老的著作, 如Fred等 (1932) 和Wilson (1940) 的著作虽然曾就这方面作了论述, 但现在已难于得到, 其中许多方法也已过时。在目前的研究报告中, 对方法的叙述往往比较简略, 这使得初学者难以甚至不能重复所描述的试验。

本书介绍的某些方法引自其他方法丛书中的有关部分 (如Glick, 1954—1964; Paech和Tracey, 1959—1964; Colowick和Kaplan, 1955—1980; Norris和Ribbons, 1969—1973; Norris, 1976; Booth, 1971)。然而, 绝大部分的方法散见于文献中, 而且有些方法在这以前还没有介绍过。我们认为, 如果把这些方法汇编在一本书里, 那么它们的价值是很明显的。

周礼凯 译

陈冠雄 校

第二篇 实验室方法

第一章 固氮微生物的培养

1. 固氮微生物的分类学、分类及鉴定的概述

- (1) 好氧微生物
- (2) 兼性厌氧微生物
- (3) 厌氧微生物

2. 培养基

- (1) 根瘤菌属培养基
- (2) 固氮菌属培养基
- (3) 固氮螺菌属培养基
- (4) 脱硫弧菌属培养基
- (5) 梭菌属培养基
- (6) 黄色分枝杆菌培养基
- (7) 克氏杆菌属培养基
- (8) 多粘芽孢杆菌培养基
- (9) 自养型棒状杆菌(自养黄细菌)培养基
- (10) 氧化亚铁硫杆菌培养基
- (11) 荚膜甲基球菌培养基
- (12) 培养基的制备——液体培养

3. 培养方法

- (1) 批次培养
- (2) 连续培养

4. 专门培养技术

- (1) Pankhurst管
- (2) 半固体琼脂技术
- (3) 尼龙袋技术

5. 菌种来源

6. 菌种保藏

- (1) 冷冻干燥保藏
- (2) 灭菌土壤保藏
- (3) 液氮保藏
- (4) 在玻璃球上于 -70°C 保藏

本章作者H. Dalton (英格兰考文垂, 沃里克大学生物科学系)

1. 固氮微生物的分类学、分类及鉴定的概述

固氮能力仅限于原核生物,例如细菌和蓝绿细菌(蓝细菌科,蓝细菌)。不幸的是,除了自生固氮菌科和根瘤菌属之外,没有一个科或属全都具有固氮作用,尽管许多科都有能固氮的代表。已知的固氮微生物列于表1,其中包括了光合细菌和蓝细菌。乙炔还原法(见第二篇第三章)有助于固氮特性的鉴定,并且使人们对从前用低灵敏度方法分析的具固氮特性的一些微生物的固氮能力进行重新评价。这种测试的简便易行还意味着能够发现具有固氮酶活性的难得的新分离物。迄今为止,分离的所有固氮微生物都能自乙炔产生乙烯。倘若有氮存在时出现负结果的话,这将是具有固氮力的一个良好标志。对实验进行证实应当使用 $^{15}\text{N}_2$ 。

固氮微生物可简单地分为共生和自生两种类型。除了一些根瘤菌的菌株外,共生类型的固氮微生物在固氮条件下还不能在寄主外培养,有关它们的特性将在第二篇第四章讨论。

一般说来,固氮微生物的分布和生理受它们对分子氧反应的强烈影响,因此可作为其分类鉴定的可靠依据。

表1 固 氮 微 生 物

目	科	属	种
真细菌目 Eubacteriales	自生固氮菌科 Azotobacteraceae	自生固氮菌属 <i>Azotobacter</i>	贝氏固氮菌 <i>beijerinckii</i> 褐色球形固氮菌 <i>chroococcum</i> 雀稗固氮菌 <i>paspali</i> 棕色固氮菌 <i>vinelandii</i>
		氮单胞菌属 <i>Azomonas</i>	标记氮单胞菌 <i>insignis</i> 巨胞氮单胞菌 <i>macrocytogenes</i> 敏捷氮单胞菌 <i>agilis</i>
		贝氏固氮菌属 <i>Beijerinckia</i>	印度贝氏固氮菌 <i>indica</i> 荧光贝氏固氮菌 <i>fluminensis</i> 德氏拜叶林克氏菌 <i>derxii</i>
		德克斯氏菌属 <i>Derxia</i>	德克斯氏菌 <i>gummosa</i>
	根瘤菌科 ^a Rhizobiaceae [*]	根瘤菌属 <i>Rhizobium</i>	种(豇豆) <i>species (cow pea)</i>

续 表

目	科	属	种
			大豆根瘤菌 <i>japonicum</i>
			豌豆根瘤菌 <i>leguminosarum</i>
	杆菌科 <i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	腊状杆菌 <i>macerans</i>
			多粘杆菌 <i>polymyxa</i>
			丁酸芽孢杆菌 <i>butyricum</i>
		<i>Clostridium</i>	巴氏芽孢杆菌 <i>pasteurianum</i>
			糖丁酸梭菌 <i>saccharobutyricum</i>
			丙酮丁醇梭菌 <i>acetobutyricum</i>
			贝氏芽孢杆菌 <i>beijerinckia</i>
			<i>tyrobutyricum</i>
			丙酮丁醇梭菌 <i>acetobutylicum</i>
			费新尼亚梭菌 <i>felsineum</i>
			克氏梭菌 <i>kluverii</i>
			嗜乳酸醋梭菌 <i>lactoacetophilum</i>
			麦氏梭菌 <i>madisonii</i>
			蚀果胶梭菌 <i>pectinovorum</i>
			假破伤风梭菌 <i>tetanomorphum</i>
			丁酸芽孢杆菌 <i>butylicum</i>
	肠细菌科 <i>Enterobacteriaceae</i>	克氏杆菌属 <i>Klebsiella</i>	肺炎克氏杆菌 <i>pneumoniae</i>
			产气克氏杆菌 <i>aerogenes</i>
		肠细菌属 <i>Enterobacter</i>	产气肠杆菌 <i>aerogenes</i>

续表

目	科	属	种
			阴沟肠杆菌 <i>cloacae</i>
			<i>agglomerans</i>
		欧文氏菌属 <i>Erwinia</i>	草生欧文氏菌 <i>herbicola</i>
			费氏柠檬酸杆菌 <i>freundii</i>
		<i>Citrobacter</i>	中间柠檬酸细菌 <i>intermedius</i>
		大肠杆菌属 <i>Escherichia</i>	大肠埃希氏杆菌 <i>coli</i>
			中间埃希氏菌 <i>intermedia</i>
放线菌目 Actinomycetales	分枝杆菌科 Mycobacteriaceae	分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	黄色分枝杆菌 <i>flavum</i>
			白玫瑰分枝杆菌 <i>roseo-album</i>
			<i>azotabsorptum</i>
	棒状杆菌科 Corynebacteriaceae	黄细菌属 <i>Xanthobacter</i>	自养型黄细菌 <i>autotrophicus</i>
	生丝微菌科 Hyphomicrobiaceae	红微菌属 <i>Rhodomicrobium</i>	万尼氏红微菌 <i>vannielii</i>
Hyphomicrobiales	红色无硫菌科 Athiorhodaceae	红色假单胞杆菌 <i>Rhodopseudomonas</i>	沼泽红假单胞菌 <i>palustris</i>
假单胞杆菌目 Pseudomonadales			荚膜红假单胞菌 <i>capsulata</i>
			胶质红假单胞菌 <i>gelatinosa</i>
			球形红假单胞菌 <i>spheroides</i>
			“x”红假单胞菌 “x”
		红色红螺菌属 <i>Rhodospirillum</i>	深红红螺菌 <i>rubrum</i>
	红硫菌科 Thiorhodaceae	着色菌属 <i>Chromatium</i>	酒色着色菌 <i>vinosum</i>
			最细着色菌 <i>minutissimum</i>
			着色菌
	绿杆菌科 Chlorobacteriaceae	绿菌属 <i>Chlorobium</i>	嗜硫代硫酸盐绿菌 <i>thiosulfatophilum</i>

续表

目	科	属	种
假单孢杆菌目 Pseudomonadales	外硫红螺菌科	外硫红螺菌属	沙氏外硫红螺菌
	Ectothiorhodaceae	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>shaposhnikovii</i>
	甲烷单孢菌科		
	Methanomonadaceae	<i>Methylosinus</i>	<i>trichosporium</i> <i>sporum</i>
		甲基球菌属	荚膜甲基球菌
		<i>Methylococcus</i>	<i>capsulatus</i>
	硫杆菌科	硫杆菌属	氧亚铁硫杆菌
	Thiobacteriaceae	<i>Thiobacillus</i>	<i>ferro-oxidans</i>
	螺旋菌科	固氮螺菌属	生脂固氮螺菌
	Spirillaceae	<i>Azospirillum</i>	<i>lipoferum</i>
			巴西固氮螺菌
			<i>brasiliense</i>
		水螺菌属	
		<i>Aquaspirillum</i>	<i>peregrinum</i> <i>fasciculus</i>
念珠藻目 Nostocales		脱硫弧菌属	脱硫脱硫弧菌
		<i>Desulfovibrio</i>	<i>desulfuricans</i>
			变形弧菌
			<i>vulgaris</i>
			巨大脱硫弧菌
			<i>gigas</i>
		脱硫肠状菌属	
		<i>Desulfotomaculum</i>	<i>orientis</i>
			瘤胃脱硫肠状菌
			<i>ruminis</i>
	念珠藻科	鱼腥藻属	
	Nostocaceae	<i>Anabaena</i>	
		链蓝藻形球菌属	
		<i>Anabaenopsis</i>	
		<i>Aulosira</i>	
		柱胞菌属	
		<i>Cylindrospermum</i>	
		念珠藻属	
		<i>Nostoc</i>	
胶须藻科 Rivulariaceae		眉藻属	
		<i>Calothrix</i>	
	伪枝藻科	伪枝藻属	
	Scytonemataceae	<i>Scytonema</i>	
		单枝藻属	
		<i>Tolypothrix</i>	

目	科	属	种
	颤藻科	束毛藻属	
	Oscillatoriaceae	<i>Trichodesmium</i>	
		鞘丝藻属	
		<i>Lyngbya</i>	
		席藻属	
		<i>Phormidium</i>	
		织绒藻属	
		<i>Plectonema</i>	
真枝藻目	真枝藻科	飞氏藻属	
Stigonematales	Stigonemataceae	<i>Fischerella</i>	
		软管藻属	
		<i>Hapalosiphon</i>	
		鞭枝藻属	
		<i>Mastigocladus</i>	
		真枝藻属	
		<i>Stigonema</i>	
		拟惠氏藻属	
		<i>Westiellopsis</i>	
色球藻目		粘球藻属	
Chroococcales		<i>Gloeocapsa</i>	

a. 列入的根瘤菌在培养中固氮。其他种 三叶草根瘤菌 (*R. trifolii*)、苜蓿根瘤菌 (*R. meliloti*)、羽扇豆根瘤菌 (*R. lupini*) 和菜豆根瘤菌 *R. phaseoli* 在与相应的豆科寄主共生时固氮。

(1) 好 氧 微 生 物

自生固氮菌科

自生固氮菌科是革兰氏阴性的异养性细菌，是几年来分类学上争论的主题(见Dalton, 1974)。《Bergey手册》(第8版, 1974)根据形态特性和利用某些基质的能力列出4个属，分属两个群：第一群包括自生固氮菌属 (*Azotobacter*)和氮单孢菌属 (*Azomonas*)，第二群包括贝氏固氮菌属 (*Beijerinckia*)和德克斯氏菌属 (*Derxia*)。第一群的微生物细胞呈大卵圆形，生长迅速(世代时间大约3小时)，形成一些细胞外粘液，过氧化氢酶阳性。根据它们G+C的含量及孢囊的存在可区别到属。表2列出了第一群微生物的一些明显的不同特性。第二群微生物呈小杆状，生长缓慢(世代时间3小时以上)，形成大量粘液，具有大型的内部类脂体。这群微生物主要限于热带环境，特别是酸性土壤中，但是有一些也分离自温带地区。组成该群的两个属贝氏固氮菌属和德克斯氏属之间的主要区别特征是前者过氧化氢酶阳性，且具有两极端类脂体，而后者无过氧化氢酶，类脂体散布于细胞质中。

第二群微生物的生物化学和生理学资料甚少，表3列举了它们的一些较明显的特征。

表2 自生固氮菌科第一群的鉴定特征

特 征	自 生 固 氮 菌				氮 单 孢 菌 属		
	圆 褐	棕 色	雀 神	贝 氏	敏 捷	标 记	巨 胞
囊泡	+	+	+	+	-	-	-
mol% G + C	65—66	66	63—65	66	53—54	57—58	58—59
生长在							
淀粉	+	-	-	-	-	-	-
甘露醇	+	+	-	-	-	-	-
鼠李糖	-	+	-	-	-	-	-
运动	+	+	+	-	+	+	+
细胞外粘液	+	+	+	+	+	-	+
生境 (限于淡水中)					+	+	

表3 自生固氮菌科第二群的鉴定特征

特 征	贝 氏 固 氮 菌 属				德 克 斯 氏 菌
	运 动	印 度	荧 光	德 氏 拜 叶 林 克 氏 菌	
过氧化氢酶	+	+	+	+	-
mol% G + C	未测定	54.7	56.2	59.1	70.4
生长在					
苯甲酸盐	+	-	-	-	
阿拉伯糖	+	+	+	-	
菊 粉	15%的菌株 + 65%的菌株 +		-	-	
(Inulin)					
硝 酸 盐	+	50%的菌株 +	-	-	+

根瘤菌科

这一科包括脓杆菌属 (*Agrobacterium*) 和根瘤菌属 (*Rhizobium*)，但是只有后一属是固氮的。虽然这类微生物的某些菌株在纯培养时固氮 (藉乙炔还原试验) (见 Gibson等, 1977)，因此也可以认为是自生固氮菌，但是这类微生物通常只有当它们进入到寄主植物后才能固氮 (绝大多数情况下是豆科植物，但有一篇报告报道根瘤菌在非豆科植物 *Parasponia rugosa* 上能形成有固氮活性的根瘤，从前曾鉴定为 *Trema* sp.，Trinick, 1973; Akkermans等, 1978a)。

根瘤菌的分类在很大程度上是根据对寄主植物接种试验的专一性 (见第三篇第一章及第二章)；然而只对少数豆科植物进行过调查，对培养的研究甚至更少。根瘤菌的一种方便的初步分类方法是根据它们在酵母提取物培养基上生长的速度。所谓快生型根瘤菌，即于30℃ 3—5天后得到大量生长的根瘤菌，其中包括菜豆根瘤菌 (*R. phaseoli*)、三叶草根瘤菌 (*R. trifolii*)、豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*) 和苜蓿根瘤菌 (*R. meliloti*)，尽管最后一种微生物是在37℃生长。它们的G + C含量在59—63%之间。慢