



全国高等农业院校教材

全国高等农业院校教材指导委员会审定

固氮微生物学

● 樊庆笙 主编

● 农业微生物和土壤及植物营养专业用

农业出版社

全国高等农业院校教材

固 氮 微 生 物 学

樊庆笙 主编

农业微生物和土壤及植物营养专业用

农 业 出 版 社

(京)新登字060号

全国高等农业院校教材

固氮微生物学

樊庆笙 主编

* * *

责任编辑 毛志强

农业出版社出版 (北京市朝阳区农展馆北路2号)

新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

787×1092mm 16开本 6.125印张 138千字

1993年10月第1版 1993年10月北京第1次印刷

印数 1—410册 定价 9.15元

ISBN 7-109-02690-6/Q·157

前 言

“生物固氮”是近代微生物学发展的一个新的重要领域。一个世纪来,从陆续发现固氮微生物的种类,了解它们的形态、生理和生态,进行分类的基础进而研究固氮酶结构、功能和固氮机理、深入分子水平的固氮基因分析,探讨固氮遗传,使具有丰富的科学积累,发展了微生物学的理论研究和实践应用。高等农业院校农业微生物学专业教学计划已将固氮微生物学列为专业课程之一。国外和国内有关微生物固氮的专著和论文集,近年来出版已多,但为适用于教学计划中本课程的教学大纲,编写了这本教材提供系统的理论知识,指导农业生产实践。

全书分十章和附录。前五章系基础部分。其中第一二两章概述固氮微生物和生物固氮体系,第三、四两章阐明固氮酶和固氮机理;第五章讨论固氮遗传。后五章分别论述各共生固氮体系和联合固氮体系的作用以及在农业生产中的应用,探讨了固氮微生物的演化和生物固氮研究的前景。最后附录固氮测定技术。

本书稿承陈华癸教授审校,提出了修改和补充的宝贵意见。在编写过程中,得蒙周湘泉副教授帮助整理资料,提供图表,谨此致谢。

编 者

一九九一年八月

目 录

绪 论	1
第一章 固氮微生物——固氮细菌	3
一、光合固氮细菌	3
(一) 紫色细菌群	3
(二) 绿色细菌群——绿硫菌科 (Chlorobiaceae)	5
二、化能自养固氮细菌	5
三、化能异养固氮细菌	6
(一) 自生固氮细菌	6
(二) 联合固氮细菌	10
(三) 共生固氮细菌	11
第二章 固氮微生物——固氮蓝细菌	16
一、蓝细菌的形态	16
二、蓝细菌的生理	17
三、固氮的蓝细菌	17
四、固氮蓝细菌的固氮效率	20
五、蓝细菌的固氮体系	21
第三章 生物固氮机制	23
一、固氮酶	23
二、电子供体和电子载体	26
三、ATP提供能量	27
四、固氮酶催化可还原的底物	27
五、固氮反应的历程	28
第四章 固氮生理和调控	29
一、能源	29
二、氧抑制和防氧保护机制	30
三、氮阻遏	32
四、ADP/ATP比率的影响	33
五、竞争性放氢和氢酶效应	33
第五章 固氮遗传	35
一、肺炎克氏杆菌 (Kp) 固氮遗传	35
二、其它自生固氮菌的固氮遗传	38
三、根瘤菌的固氮遗传	38
四、nif基因转移和组建杂交新菌株	41
第六章 根瘤菌—豆科植物共生固氮体系	46
一、共生体系	46

(一) 根瘤菌种与豆科植物种、属的共生专一性	46
(二) 识别、感染和形成侵入线	47
(三) 根瘤的发生和发育	49
(四) 类菌体的发育	49
(五) 豆血红蛋白(Leghaemoglobin)的生成和功能	50
二、共生固氮	50
(一) 根瘤菌固氮与宿主代谢的统一	50
(二) 共生固氮效率和固氮量	52
(三) 影响共生固氮的环境因素	52
三、根瘤菌剂制备和应用	55
(一) 根瘤菌剂	55
(二) 根瘤菌剂的制备和应用	57
第七章 弗氏放线菌与非豆科植物共生固氮体系	59
一、弗氏放线菌的形态	59
二、弗氏放线菌的营养和生理	60
三、弗氏放线菌的分离	61
四、根瘤的形成和形态	62
五、与弗氏放线菌共生结瘤固氮的木本植物和固氮量	64
六、共生结瘤和固氮的影响因素	66
第八章 鱼腥藻—红萍共生固氮体系	68
一、红萍的形态和生理	68
二、红萍鱼腥藻	70
三、藻萍共生体的固氮作用和影响因素	70
第九章 联合固氮体系	73
一、与植物根系联合固氮的细菌和分布	73
二、联合固氮体系中固氮细菌与植物的相互关系	76
三、联合固氮效率和影响因素	77
四、联合固氮细菌在禾本科作物根际的应用效果	79
第十章 固氮微生物的演化及生物固氮的前景	81
一、固氮微生物的演化	81
二、生物固氮的前景	83
附录 固氮测定技术	86
一、全氮量增加	86
二、乙炔还原测定	88
三、 ^{15}N 示踪法	89
主要参考文献	91

绪 论

100年前,根瘤菌作为第一个固氮细菌从豌豆根瘤中被分离出来,阐明了豌豆所以能赖根瘤利用空气中游离氮素为营养的实质,从而引起人们对固氮微生物和生物固氮作用的极大兴趣,成为微生物学研究的重要内容,为农业生产开辟了氮肥的自然来源。50年代兴起的生物化学提供了为开展固氮酶结构和功能研究的理论和手段,使能深入探讨固氮作用的机理。近20年来,微生物固氮研究更深入到分子遗传分析,进行固氮基因克隆、定位、调控和组合的实验,改造和组建新的固氮微生物。生物固氮研究经历了三个阶段,由整体细胞、酶到分子遗传三个水平上的进展,积累了丰富的理论知识和实验结果,建立了系统的科学理论,并展示了实践的重要意义,在微生物学内形成了一个分支学科——固氮微生物学。

固氮微生物学是阐明固氮微生物的类型和生态,固氮生理和固氮机制,以及分析生态环境因素的影响,以提高固氮酶活性,发挥各类微生物固氮体系的固氮效率为基本内容,深入探讨生物固氮的遗传,实现固氮基因的转移、组合和表达,构建新的生物固氮体系,丰富植物的氮素营养源,为促进农林业生产服务。理论与实践相结合,也为探讨生命起源以及生物进化中蛋白质合成的氮素来源和形态,提供理论依据。

生物圈内存在的氮素物质,有在大气层内存量很大的分子态氮(N_2);有在土壤和水域中的无机氮化物:铵态氮(NH_4^+)和硝态氮(NO_2^- , NO_3^-),以及构成生物体的各种有机氮化物,氨基酸、蛋白质、核酸等。大气中的分子态氮是不能被动植物和绝大部分微生物用作氮素营养的。最初进入生物营养链的氮素物质是能为微生物和植物吸收利用的无机氮化物,被同化成氨基酸等简单有机氮化物后,合成各种复杂有机氮化物,构成这些生物体的生命物质而生长繁衍。动物是不能直接利用无机氮化物的,有赖于微生物和植物体提供的各种有机氮化物为营养,经消化和同化,构成它们躯体中的各种含氮结构物质而生长发育。各类生物在代谢活动中的分泌物和排泄物,以及死亡后遗体中的各种有机氮化物,在微生物引起的腐败分解中,氨化后以氨(NH_3)的形态释放出来,恢复至进入生物氮素营养链的起始形态,是自然界氮素循环中有效营养化的重要一环(图0-1)。大气中的分子态氮在高空闪电时产生的高温、高压催化中,能被氧化成硝态氮,随雨水下降地面。微生物的硝化作用也能将铵态氮氧化成硝态氮,是土壤和水域中硝态氮的主要来源,也为植物和微生物提供有效态氮,但当处于缺氧环境中,硝态氮将在一些嫌气性和兼嫌气性细菌的还原和脱氮作用中转化成分子态氮,向大气中逸散,则是氮素循环中有效态氮的损失。微生物的种类不同,在自然界的氮素循环中,分别在各个环节起了主导作用。发挥固氮微生物的潜力,增强将大气中的大量分子态氮还原成氨的生物固氮作用,使能以更多的有效态氮投入生物的氮素营养链,丰富生物圈的氮素资源,促进农林渔牧业生产的发展。

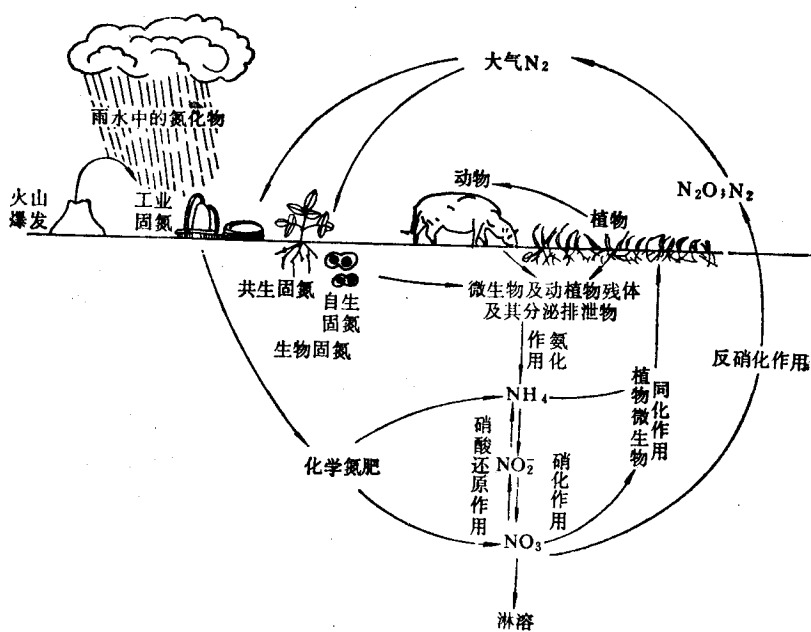


图 0-1 氮素循环图

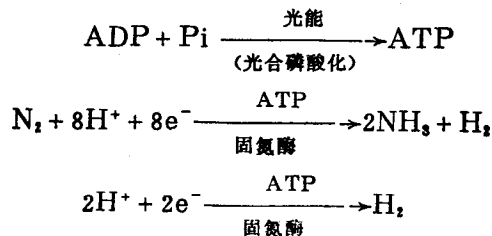
第一章 固氮微生物——固氮细菌

固氮微生物有固氮细菌和固氮蓝细菌（固氮蓝藻）两大类，都是原核生物，各具不同形态和不同生理性状，以含有固氮酶系统，进行还原分子氮为氨的固氮作用，自给氮素营养而生长发育为共同特性，构成了一个特殊生理类群。它们在固氮作用中需要的能量，有因含有光合色素利用光能进行光合固氮，有利用还原性无机或有机物质时产生的化能进行化能固氮。它们也分别表现了对不同生态环境的适应，虽然大多数种类都是自然生活在土壤、水域或地面的其它地方，在它们生命活动中，独立地固定氮素，是自生固氮类型，但也有与其它一些生物生活在一起时固氮，因相互联系程度的不同，建立了联合固氮体系和共生固氮体系。以下分别介绍各类固氮微生物以及它们所处的生态固氮体系。

固氮细菌因利用的能源不同，分光合固氮细菌和化能固氮细菌两类。

一、光合固氮细菌

光合固氮细菌以含有菌绿素（bacteriochlorophyll）在缺氧环境中进行不产氧（ O_2 ）的光合作用，并表现固氮酶活性为特征。这类细菌的细胞内只有光合系统I，同化 CO_2 所需的 H^+ 不是来自光氧化水分子，而是以还原性的无机物（如 H_2S ）或有机物为氢供体，故在光合作用中没有氧的释放。它们的多数种类在利用光能进行光合作用时，能进行固氮作用。这类细菌按照含有的菌绿素结构和在细胞中的存在形式，以及表现的菌体颜色，分为紫色细菌和绿色细菌两群。前者含有的光合色素结合在细胞膜上，以菌绿素a和b为主，并有芳香基类胡萝卜素，菌体悬液呈紫红色；后者含有的光合色素，贮存在特殊的光合器——类囊体（thylakoid）内，以菌绿素c、d或e为主，菌绿素a次之，也有多种芳香基类胡萝卜素，菌体悬液呈黄绿色或褐色。光合细菌在有光照，但缺氧的环境中，能合成多量光合色素，并合成固氮酶。在进行光合作用过程中，由光合色素捕获的光能进行光化学转化，在环式光合磷酸化中产生ATP，供作同化 CO_2 的能量，同时也为固氮酶提供能量，使还原分子氮成氨，出现固氮作用，并还原周围的氢离子（ H^+ ），生成（ H_2 ）而释放。固氮酶同时催化固氮和放氢这两个还原作用，都要消耗ATP，因此当这类细菌的光合磷酸化作用旺盛，提高细胞内的ATP含量，发挥的固氮效率也大（表1-1）。



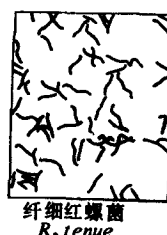
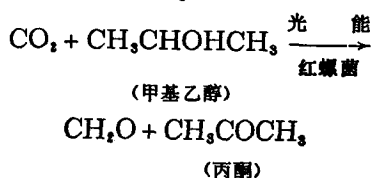
（一）紫色细菌群 紫色细菌群在光合作用中以简单碳化物为供氢体（还原剂）同化 CO_2 为碳水化合物。大多数不能以还原性硫化物作为光合作用的唯一电子供体，细胞内不留

表 1-1 光合细菌的分科

科	菌悬液颜色	营养型	生活条件	元素硫颗粒	菌绿素	色素	氢供体
红螺菌科 Rhodospirilla- ceae	紫红, 黄绿	光能异养	光厌氧或好氧	-	a, b	结合在 质膜上	有机物质
红硫菌科 Chromatiaceae	紫 红	光能自养	光—厌氧	+ (在细胞内)	a, b	结合在 质膜上	H ₂ S, H ₂
绿硫菌科 Chlorobiaceae	黄绿或褐色	光能自养	光—厌氧	+ (在细胞外)	c, d, e	存在于 类囊体内	H ₂ S, H ₂

存元素硫,是光能异养型,称紫色非硫细菌。有的则以H₂S和H₂为光合作用的氢供体,且在细胞内(外)积累元素硫,并可进一步氧化为硫酸,是严格的光能自养型,称紫色硫细菌。这两群光合细菌分类为两个科,前者为红螺菌科(Rhodospirillaceae),后者为红硫菌科(亦称着色菌科)(Chromatiaceae)。

1. 红螺菌科(Rhodospirillaceae): 这科的光合细菌都是单细胞,螺旋形或卵形,具端生或周生鞭毛,能运动,光能异养型,能利用的有机化合物包括糖类、有机酸类和多元醇类(图1-1)。

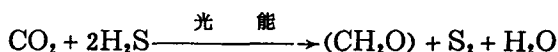
图 1-1 四种红螺菌 *Rhodospirillum*

对H₂S过敏,在光照缺氧环境中生活时能固氮。它们具有好氧的电子传递链而有呼吸能力,许多种类也能在黑暗中进行正常的好气性生长,但不能固氮。这类细菌以富于有机物质,而没有或只有很低浓度的硫化物的淡水湖泊或池塘为生活场所。本科有三个属,形态特征见表1-2。

表 1-2 红螺菌科属的形态特征

特 征	红 螺 菌 属 <i>Rhodospirillum</i>	红 假 单 胞 菌 属 <i>Rhodopseudomonas</i>	红 微 菌 属 <i>Rhodomicrobium</i>
代 表 种	深红红螺菌 (<i>R. rubrum</i>)	荚膜红假单胞菌 (<i>R. capsulata</i>)	万尼氏红微菌 (<i>R. vannielii</i>)
细 胞 形 状	螺 旋 状	柱形或卵形	卵 形
鞭毛及运动	丛生端鞭毛	单生端鞭毛	周 生 鞭 毛
繁 殖 方 式	裂 殖	裂 殖	芽 殖

2. 红硫菌科 (Chromatiaceae): 这科的菌体形态多样, 有球形、弧形、柱状、螺旋状, 单生或由少数细胞排列成板状、八叠状或网状。具荚膜, 有鞭毛能运动, 分裂繁殖, 少数种类出芽繁殖。光合自养型, 严格厌氧性, 以 H_2S 为供氢体, 同化 CO_2 为碳水化合物。氧化生成的元素硫积存在细胞内, 表现为反光性强的颗粒状, 个别种也将硫分泌到细胞外 (图1-2)。



这科有10个属30多种, 形态差别较大, 表明来源的多元性。着色菌科主要属和代表种见 (表1-3)。



图1-2 奥氏着色菌 (奥氏红硫菌) *Chromatium okenii* 示细胞内硫磺粒

表1-3 红硫菌科主要属和代表种的特征

特 征	红硫菌属 <i>Chromatium</i>	荚硫菌属 <i>Thiocapsa</i>	囊硫菌属 <i>Thiocystis</i>	外硫红螺菌属 <i>Ectothiorhodospira</i>	可变杆菌属 <i>Amoebobacter</i>
代表种	转紫红硫菌 <i>C. violascens</i>	普氏荚硫菌 <i>T. pfennigii</i>	紫囊硫菌 <i>T. violacea</i>	沙氏外硫红螺菌 <i>E. shaposhnikovii</i>	玫瑰色可变杆菌 <i>A. roseus</i>
菌体形状	球形、粗短杆状稍弯曲、不形成菌胶团	球形或卵状有时呈四聚体或不规则菌胶团	球形至卵状形成菌胶团	弯曲圆杆状或螺旋状	球形或卵状
荚 膜	+	+	+	+	不明显
气 泡	-	-	-	-	+
细胞内积存元素硫	+	+	+	细胞外积集硫粒	+
光合作用	以 H_2S 为H供体	以 H_2S 为H供体	以 H_2S 为H供体	以 H_2S 为H供体	以 H_2S 为H供体
DNA G+C mol%	48—70.4	63.3—69.9	61.3—67.9	62.2—69.9	64.3—65.3



图1-3 泥生绿菌
(泥生绿硫菌)
Chlorobium limicola

(二) 绿色细菌群——绿硫菌科 (Chlorobiaceae) 绿色硫细菌都以 H_2S 和 H_2 为光合作用的氢供体, 系严格光能自养型, 氧化还原性硫化物, 生成的元素硫颗粒分泌在细胞外, 不积存在细胞内。菌体小杆状, 无鞭毛, 不运动, 单生、成链状或聚结成网格 (图1-3)。细胞内色素存在于类囊体内, 有气泡或无, 并利用光能固氮。它们分布在硫化物丰富、缺氧、透光的水体层内, 和紫色硫细菌处在相同的生活环境, 主要有四个属 (表1-4)。

二、化能自养固氮细菌

化能自养细菌, 好气性, 以还原性无机化合物或甲烷和简单甲基化合物为能源, 在氧化中营化能自养生活。这类细菌中有固氮能力的, ①在硫化菌科中有氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*), 是革兰氏阴性小杆菌, 能运动。能在氧化还原性硫化物时获得能量, 利用亚铁化合物作为电子供体, 营自养生活, 并在微氧条件下固定少量氮素。

表 1-4 绿硫菌科主要属特征

特 征	绿硫菌属 <i>Chlorobium</i>	暗网菌属 <i>Pelodictyon</i>	突柄绿菌属 <i>Prosthecochloris</i>	格状绿菌属 <i>Clathrochloris</i>
代表种	泥生绿硫菌 <i>C. limicola</i>	微黄暗网菌 <i>P. luteolum</i>	江口突柄绿菌 <i>P. aestuarii</i>	硫格状绿菌 <i>C. Sulphurica</i>
细胞形状及排列	直或弯杆状, 单生或短链	杆状到卵形	卵形、单生或短链	短杆状、聚集成松散网格
营养型	光能自养、厌氧	光能自养、厌氧	光能自养、厌氧	光能自养、厌氧
气 泡	-	+	-	+
鞭 毛	-	-	-	-
氢供体	H ₂ S, H ₂	H ₂ S, H ₂	H ₂ S, H ₂	H ₂ S
DNA G+Cmol%	49.0—58.1	48.5—58.1	50.0—56.1	-

在含有亚硫化合物和亚铁化合物的培养基平板上发育的菌落中和菌落周围形成硫酸铁的棕色沉淀, 可作为该菌的诊断特征。耐酸性很强, 生长的最适pH在1.8—5.8范围内。②在甲基单胞菌科 (Methylo pseudomonadaceae) 中以菌体形状分有甲基球菌属 (*Methylococcus*)、甲基杆菌属 (*Methylobacter*) 和甲基弯曲杆菌属 (*Methylosinus*)。它们以甲烷或简单甲基化合物为能源, 同化CO₂合成碳水化合物, 营自养生活, 其中有些种如荚膜甲基球菌 (*Methylococcus capsulatus*) 和毛孢甲基弯曲杆菌 (*Methylosinus trichosporium*) 等能固定氮素。③在贝日阿托氏菌科 (Beggiatoaceae) 中有贝日阿托氏菌 (*Beggiatoa*), 是丝状硫细菌, 细胞直径大, 且联结成丝状体, 在淹水土壤、淤泥或其他水域有H₂S的地方, 能氧化H₂S在体内积存元素硫, 能固定氮素, 习惯称硫磺细菌 (表1-5)。

表 1-5 化能自养固氮细菌的特征

特 征	氧化亚铁硫杆菌 <i>Thiob. ferrooxidans</i>	荚膜甲基球菌 <i>M. capsulatus</i>	贝日阿托氏菌属 <i>Beggiatoa</i>
形 态	小 杆 状	球状、成对排列	毛发状、细胞内含硫粒
鞭 毛	+, 极生、能运动	-	-, 靠菌体屈、伸滑行运动
革兰氏染色	G ⁻	G ⁻	G ⁻
孢子或孢囊	-	+	-
		(不成熟孢囊)	
能 源	亚铁化合物	甲烷、甲醇、甲酸	H ₂ S

三、化能异养固氮细菌

化能异养细菌中有固氮能力的种类多。它们以有机物质 (糖类、多元醇类、有机酸等) 为能源, 在呼吸过程中, 由氧化磷酸化方式生成ATP, 还原分子氮为氨而自给氮素营养。生存于土壤或水域中的腐生性种类称自生固氮细菌, 与植物共生的种类称共生固氮细菌。

(一) 自生固氮细菌 有许多种类分属在不同的科、属中, 以有机质分解中产生的简单有机碳化合物为能源进行固氮作用。它们各自适应不同的生态环境, 分布在不同气候条件下的各类土壤和水域中。有些种类的固氮能力强, 在藁草还田的中性土壤中, 因提供有较

丰富的能源物质，可发挥它们的固氮效率，提高土壤含氮量。

1.需氧性固氮细菌：典型的有固氮菌科 (Azotobacteriaceae) 的五个属：固氮菌属 (*Azotobacter*)、氮单胞菌属 (*Azomonas*)、拜氏固氮菌属 (*Beijerinckia*)、德氏固氮菌属 (*Derxia*) 和黄杆菌属 (*Xanthobacter*)，广泛分布在各处土壤中，是最大的一个好气性固氮细菌群。其它的一些科的属内，主要如芽孢杆菌属、假单胞菌属、固氮螺菌属、产碱杆菌属和分枝杆菌属等，都有一些能固氮的种，固氮效率高低不一。

(1) 固氮菌科：是革兰氏阴性、能运动的短杆状菌，各个种的固氮能力都较高，典型的一个种——圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 广泛分布于世界各地耕作土壤内，在好气培养的无氮培养基中，每消耗1克葡萄糖能固氮20mg以上。在这个科的五个属中，固氮菌属和氮单胞菌属以细胞呈粗短杆状或卵形，生长迅速（世代时间3h左右），产生一些粘质在胞外，过氧化氢酶阴性为特征。固氮菌属则以能形成孢囊，胞外粘质形成荚膜区别于氮单胞菌属。拜氏固氮菌属和德氏固氮菌属都是小杆状，生长较慢（世代时间3h以上），胞外粘质坚韧，不形成孢囊，细胞内含有聚- β -羟基丁酸酯颗粒 (PHB) 限于热带环境，适应酸性土壤而不同于前两个属，并以类脂体在细胞内的分布状况和过氧化氢酶有无互相区别。拜氏固氮菌的细胞两端各有一个反光性强的聚- β -羟基丁酸酯颗粒，过氧化氢酶阳性；德氏固氮菌细胞内分散有多数类脂体，过氧化氢酶阴性。黄杆菌属是新并入固氮菌科的一个属，与前述四个属有较大区别，以自养黄杆菌 (*Xanthobacter autotrophicus*) 为模式种。它们是兼性自养的杆状菌，周生鞭毛或无，能利用 H_2 为能源自养生长，也能利用乙醇或其它有机物营养生活，形成黄色菌落，微需氧固氮 (表1-6)。

表 1-6 固氮菌科各属的特征

特 征	固氮菌属 <i>Azotobacter</i>	氮单胞菌属 <i>Azomonas</i>	拜氏固氮菌属 <i>Beijerinckia</i>	德氏固氮菌属 <i>Derxia</i>	黄杆菌属 <i>Xanthobacter</i>
代 表 种	圆褐固氮菌 <i>A. chroococcum</i>	活泼氮单胞菌 <i>A. agilis</i>	印度拜氏固氮菌 <i>B. indicum</i>	胶德氏固氮菌 <i>D. gummosa</i>	自养黄杆菌 <i>X. autotrophicus</i>
菌体形状	粗短杆状，卵圆形，较大	短杆状至卵圆形，较大	短杆状，较小 两端含类脂体	短杆状，较小含 散生的多数类脂体	杆状，在不同碳源的培 养基上生长，形状多变化
鞭 毛	周 生	周生、排列多变化	周 生	单鞭毛、端生	周生或无鞭毛
孢 囊	形成厚壁孢囊	无	无	无	无
营 养 型	异 养	异 养	异 养	异 养	兼自养，能利用 H_2 为能源
生长速度	快	快	慢	慢	
胞外粘质	粘稠形成荚膜	粘 稠	胶状稠韧	胶状坚韧	有(但也有无粘质菌株)
过氧化氢酶	+	+	+	-	+
适宜pH	中性或偏碱性 环境，对酸性敏感	温带及亚热带 中性土壤及水域	3.0—7.0 热带酸性土壤	5.5—9.0 热带微酸性土壤	5.8—9.0 广泛存在于土壤、污 泥和水中
菌 落	乳白至棕色	不透明、闪 光、光滑、凸起	巨大、富粘 液物质	暗 褐 色	黄 色
荧 光	±绿色	+ 白色	-	-	-
DNA G+C mol%	63—67.5	52—58.6	54.7—60.7	69—73	65—70

(2) 螺菌科 (Spirillaceae): 螺菌科中有固氮能力的种归属在新定的固氮螺菌属 (*Azospirillum*) 中, 模式种是带脂固氮螺菌 (*Az. lipoferum*), 原是 Beijerinck 于 1922 年报道为螺旋固氮菌 (*Azotobacter spirillum*), 1925 年他因这个菌细胞内含有脂粒, 改名为带脂螺菌 (*Spirillum lipoferum*)。Tarrand (1978) 又因这个螺菌具有较高固氮能力, 不同于其它螺菌, 立固氮螺菌属 (*Azospirillum*), 称带脂固氮螺菌 (*Az. lipoferum*)。

固氮螺菌生长初期为弯杆状菌, 渐增弯曲, 革兰氏阴性, 端生鞭毛能运动, 在有氮化物环境中生长很快, 是典型需氧菌, 在微氧环境中固氮。Doberienner 在巴西热带土壤中陆续发现了另两个种, 巴西固氮螺菌 (*Az. brasilense*) 和亚马逊固氮螺菌 (*Az. amazonense*), 它们都是禾本科植物根际土壤中常见的固氮细菌 (表 1-7)。

表 1-7 固氮螺菌属三个种的特征比较

特 征	带脂固氮螺菌	巴西固氮螺菌	亚马逊固氮螺菌
菌 体	较大, 直径 1.4—1.7 μ m	较大, 直径 1.0 μ m	较小, 直径 0.8 μ m
适温范围	32—40 $^{\circ}$ C	30—37 $^{\circ}$ C	
适宜 pH	6.8—7.8	6.5—7.5	较低, 对碱性敏感
糖类利用	发酵、产酸	一, 不产酸	不利用果糖
生长素	需 要	不需要	
荧 光	—	+ 黄绿色	—
DNA G+C mol%	69—70	70—71	67—68

(3) 假单胞菌科 (Pseudomonadaceae): 假单胞菌属的固氮假单胞菌 (*Ps. azotocolligans*) 和黄假单胞菌 (*Ps. flava*) 具固氮作用, 它们是革兰氏阴性杆菌, 周生鞭毛能运动, 利用糖类和有机酸生长在微氧环境中固氮, 固氮酶活性低于固氮螺菌属。

(4) 产碱菌属 (*Alcaligenes*): 贝捷氏系统细菌学手册 (1984) 中将这个属附在第 4 组 (革兰氏阴性好气性杆菌和球菌) 中, 没有归入任何一科内。粪产碱菌 (*A. faecalis*) 是能固氮的一个种, 革兰氏阴性杆状菌, 周生鞭毛, 不利用糖类, 只利用有机酸, 生长在石蕊牛奶中产碱, 在有化合态氮培养基中迅速增殖, pH 值不断升高, 在无氮和低氧压培养中固氮, 固氮率高达 40mg N₂/g 苹果酸, 能分泌氨和其它氮化物, 广泛分布在土壤和污水中。粪产碱菌的 DNA G+C mol% 为 55.9—59.4。

2. 兼性厌氧固氮细菌: 肠杆菌科和芽孢杆菌科都有兼性厌氧的固氮种类, 在厌氧生活中以有机碳化物为能源, 进行固氮作用。

(1) 肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)。都是革兰氏阴性的杆状菌, 以周生鞭毛运动或无鞭毛, 氧化酶阴性, 能利用各种糖类和有机酸发酵产酸或产酸并产气。克氏杆菌属、埃希氏杆菌属、肠杆菌属、欧氏杆菌属和柠檬酸杆菌属中, 都有一些种有固氮能力, 它们广泛分布在土壤和污水中, 从造纸厂的废液池和堆积的废渣中容易分离到, 是自然界主要的兼性厌氧固氮细菌。

① 克氏杆菌属 (*Klebsiella*): 具荚膜, 不运动, 能发酵糖类和柠檬酸产生 CO₂ 和 H₂。肺炎克氏杆菌 (*K. pneumoniae*) 是最先用以研究固氮遗传的菌种, DNA G+C mol% 56—58 可用核糖醇专性培养基选择分离。另一种产气克氏杆菌 (*K. aerogenes*) 也已证明有固氮作用。

②埃希氏杆菌属 (*Escherichia*): 直杆状菌, 具周生鞭毛, 运动活泼, 多数有荚膜, 不能以柠檬酸为碳源。中间埃希氏杆菌 (*E. intermedia*) 是主要有固氮能力的种, DNA G+C mol% 50—51。常见的大肠埃希氏杆菌 (*E. coli*) 不能固氮, 但已由基因工程将肺炎克氏杆菌的固氮基因 (*nif*) 转移至大肠埃希氏杆菌, 构建了一个有固氮能力的新株。

③肠杆菌属 (*Enterobacter*): 直杆状菌, 具周生鞭毛, 不具荚膜, 能用乙酸及柠檬酸为碳源, 发酵糖类、有机酸产酸产气。常存在于粪便、污水及土壤中, 能固氮的种有阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) 和产气肠杆菌 (*E. aerogenes*)。

④欧氏杆菌属 (*Erwinia*): 周生鞭毛的革兰氏阴性直杆状菌, 能产生果胶酶, 氧化酶阴性, 过氧化氢酶阳性, 发酵蔗糖、果糖、葡萄糖、半乳糖等产酸。DNA G+C mol% 50—58。草生欧氏杆菌 (*E. herbicola*) 有固氮能力。

⑤柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*): 周生鞭毛能运动的革兰氏阴性直杆状菌, 无荚膜, 能以柠檬酸为唯一碳源, 发酵葡萄糖产酸、产气, MR阳性, VP阴性。DNA G+C mol% 50—52。弗氏柠檬酸杆菌 (*C. freundii*) 具固氮能力 (表1-8)。

表 1-8 肠杆菌科固氮菌种的生化特性比较

生化特性	肺炎克氏杆菌	中间埃希氏杆菌	阴沟肠杆菌	草生欧氏杆菌	弗氏柠檬酸杆菌
固氮酶	+	+	+	+	+
VP反应	+	-	+	+	-
鸟氨酸脱羧酶	-	+	+	-	+
赖氨酸脱羧酶	±	+	-	-	-
DNA G+C mol%	56—58	50—51	52—54	52.6—57.7	50—51

(2) 芽孢杆菌科 (Bacillaceae): 芽孢杆菌属的多粘芽孢杆菌 (*Bac. polymyxa*) 和软化芽孢杆菌 (*Bac. macerans*) 是兼性厌氧异养菌。在厌氧或极微氧环境中能进行固氮作用。革兰氏染色反应能由阳性变为阴性, 能运动, 过氧化氢酶阳性, VP试验生成乙炔甲基甲醇。多粘芽孢杆菌在葡萄糖琼脂培养基上菌落集聚大量粘质, 芽孢形态独特, 表面褶皱, 具星状横切面。DNA G+C mol% 43.2—45.6; 软化芽孢杆菌在葡萄糖琼脂培养基上菌落不是粘胶状的, DNA G+C mol% 49—51。

3. 厌氧性固氮细菌

(1) 梭菌属 (*Clostridium*): 芽孢杆菌科的梭菌属中能进行丁酸型发酵的一些种都有不同程度的固氮能力。它们是革兰氏阴性杆状菌, 周生鞭毛能运动, 在形成芽孢时菌体部分膨大呈梭状或鼓槌状, 能发酵各种碳水化合物产生乙酸、丁酸和丁醇, 过氧化氢酶阴性。巴斯德梭菌 (*Cl. pasteurianum*) 是维诺格拉特斯基 (Winogradsky, S. A.) 于1893年发现的第一个自生固氮细菌, 是厌氧性固氮细菌的典型 (图1-4)。广泛分布于世界各地土壤中, 能利用淀粉和糖类为能源, 在发酵过程中进行固氮作用, 固氮效率每消耗1g糖约固氮2—3mg,

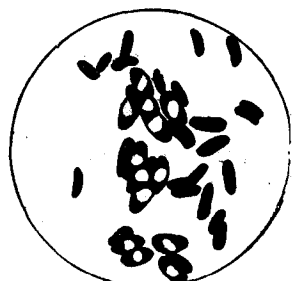


图 1-4 巴斯德梭菌
(*Clostridium pasteurianum*)

虽不及好气性固氮细菌，但因在土壤中生存的数量多，在缺氧环境中发生的作用大，是各类土壤中自生固氮的重要成员（表1-9）。

表 1-9 固氮梭菌的形态生理特征

特 征	巴斯德梭菌 <i>C. pasteurianum</i>	丁酸梭菌 <i>C. butyricum</i>	丙酮丁醇梭菌 <i>C. acetobutylicum</i>
明胶水解	-	-	+
产生2,3-丁二醇	-	-	+
发酵乳糖	-	+	+
发酵木糖	-	+	+
DNA G+C mol%	26—28	27—28	28—29

(2) 脱硫肠状杆菌属 (*Desulfotomaculum*)：有两个种有固氮能力，效率不高。它们是芽孢杆菌科中的另一个厌气性、革兰氏阳性杆状菌。周生鞭毛能运动，形成芽孢，DNA G+C mol% 41.7—45.5，具还原硫酸盐能力。瘤胃脱硫肠杆菌 (*D. ruminis*) 分离自羊的瘤胃，在土壤中也有发现，直杆状菌，体内形成的芽孢能微弱滚动；东方脱硫肠杆菌 (*D. orientalis*) 为肥胖的弯曲杆状菌，含有呈滚动和扭曲运动的圆形芽孢。

(3) 脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)：厌气性异养或自养的弧状菌。极生鞭毛，不形成芽孢，在利用有机物或 H_2 的同时，也能把硫酸盐、元素硫或硫代硫酸盐等还原成 H_2S ，DNA G+C mol% 46.1—61.2。有三个种已证明具有微弱的固氮能力，可从渍水土壤和污水中分离到（表1-10）。

表 1-10 脱硫弧菌属种的特征

特 征	普通脱硫弧菌 <i>D. vulgaris</i>	脱硫脱硫弧菌 <i>D. desulfuricans</i>	巨大脱硫弧菌 <i>D. gigas</i>
菌体细胞	单个分散典型弧状	单个分散典型弧状，可出现S状弯曲型	大的弯杆菌，常相连成链呈螺旋状
大 小	0.5—1×3—5 μ m	0.5—1×3—5 μ m	1.2—1.5×5—10 μ m
鞭 毛	单鞭毛极生	单鞭毛极生	丛毛端生，缓慢运动
DNA G+C mol%	61	55	60

(二) 联合固氮细菌 有些固氮细菌能与它们相适应的生物一起生活，彼此间相互促进和得益。固氮细菌的固氮作用为联合生活的对方提供氮素营养。联合生活的植物一方以光合产物或在分解有机物质中为固氮细菌提供碳源和能源，促进固氮细菌的生长和固氮作用。它们相互依赖的程度不是很严格的，也不形成特殊的联合结构，当它们不处于联合时，能各自独立生活，但在联合生活中，固氮细菌的固氮效率比在单独生活中高得多，联合的对方也因得到较多的氮素养分促进生长，有增产效应。

1. 需氧性和兼性厌氧固氮细菌在植物叶面的联合固氮。热带雨林的叶面常是各种细菌大量生长繁殖的基地，其中不乏许多有固氮能力的种类，最主要的是拜氏固氮菌属。亚热带

和温带的农作物和木本植物的叶面也常有固氮菌科和肠杆菌科的固氮细菌生存。叶面保持有一定湿度和分泌有少量糖类和有机酸类，适为细菌提供生活和固氮的生境。固氮细菌固定的氮素，溶于叶面水膜中可供叶的吸收或随雨水淋落土面，增加土壤对植物的氮素养分供应，Roskoski (1980) 曾估计每公顷咖啡叶子表面生长的固氮微生物，每年可固定1 kg左右的氮素。

2. 固氮细菌在植物根际的联合固氮。细菌中无论是好氧性的、兼性厌氧的和厌氧性的都有大量生存在各种植物根际，为共栖的植物根系提供氮素养料。水稻、小麦、玉米、棉花、大豆等农作物的根际有固氮菌，拜氏固氮菌、固氮螺菌、产碱菌、克氏杆菌等生长，有的菌种与某种植物根际更作专性联合。温带地区的一些水生植物如水花生、水葫芦、槐叶萍、红萍等须根的粘液鞘内，分布有圆褐固氮菌和其它一些好气性和兼厌气性的固氮细菌，发挥联合固氮作用。

(三) 共生固氮细菌 与豆科植物共生，形成根瘤或茎瘤的根瘤菌类，以及与一些非豆科木本植物形成根瘤的弗氏放线菌是两类典型的共生固氮细菌。它们与适应的宿主植物共生过程中，能充分发挥固氮效率，而当生活在土壤中呈腐生状态时，不进行固氮作用。在侵入相适应的植物根部或茎部后，增殖并刺激周围宿主细胞分裂，形成瘤状结构，贅生根上或茎旁，成为具有特殊形态结构的共生固氮场所。根瘤菌在瘤内增殖中发育成类菌体，弗氏放线菌则在菌丝顶端发育有泡囊，出现它们的固氮能力。它们生活所需的养分与固氮作用所需的能量，依赖宿主植物供应，固氮作用的产物则直接供为宿主植物的氮素营养，它们与宿主植物同处在互惠互利的共生状态中。

1. 根瘤菌科 (Rhizobiaceae): 贝捷系统细菌学手册 (1984) 根瘤菌科内有两个属，根瘤菌属 (*Rhizobium*) 和慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 能与豆科植物共生结瘤固氮。慢生根瘤菌属系 Jordan, D. C. 于1982年将原来根瘤菌属中的慢生型、产碱的菌种分出来另立的新属。1988年 Dreyfus, B. L. 将其研究的在毛萼田菁 (*Sesbania rostrata*) 上形成茎瘤固氮的一个菌种，以其严格专性的共生关系，结瘤的特异性和自生固氮能力，立了新属，称茎瘤菌属 (*Azorhizobium*)。同年陈文新在根瘤菌的数值分类研究中，根据快生型大豆根瘤菌种的性状特征有别于根瘤菌属，发表了中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 新属名，以弗氏中华根瘤菌为模式种。从此原来统一归属在根瘤菌属内的各个种，现已分别命名在四个属内 (表1-11)。

表 1-11 与豆科植物共生结瘤固氮的四个属的特征

特 征	根瘤菌属 <i>Rhizobium</i>	慢生根瘤菌属 <i>Bradyrhizobium</i>	中华根瘤菌属 <i>Sinorhizobium</i>	茎瘤菌属 <i>Azorhizobium</i>
代表种	豌豆根瘤菌 <i>R. leguminosarum</i>	大豆慢生根瘤菌 <i>B. japonica</i>	弗氏中华根瘤菌 <i>S. fredii</i>	茎瘤菌 <i>A. caulinodans</i>
生长型	快 生	慢 生	快 生	快 生
结 瘤	根 瘤	根 瘤	根 瘤	茎瘤、根瘤
鞭 毛	周 生	端生单鞭毛	端生单个或多个鞭毛	侧生单鞭毛
YMA 培养基上	产 酸	产 碱	产 酸	产 碱
糖类利用	五碳糖、六碳糖	五碳糖、六碳糖	五碳糖、六碳糖	不能利用五碳糖、蔗糖、果糖