

生物固氮的秘密

SHENGWUGUDANDEMIMI

姜涌明 编著

36



科学出版社

内 容 简 介

本书以较通俗的语言重点介绍了生物固氮机理,同时,对固氮微生物、共生固氮机理、固氮酶生物合成的自动调节、固氮基因工程、化学模拟生物固氮,也作了具体的介绍,最后,还简要地叙述了生物固氮研究的历史、现状及前景。

本书为科普读物,可供高中以上文化程度的干部、青年阅读,亦可供农业生物学、微生物学及生物化学的教学与科技工作者参考。

生物固氮的秘密

姜涌明 编著

责任编辑 高小琪

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

*

1981年12月第一版 开本:787×1092 1/32

1981年12月第一次印刷 印张:4 3/8

印数:0001—5,660 字数:84,000

统一书号:13031·1761

本社书号:2399·13—10

定价: 0.58 元

前 言

人类对粮食的需要量日益增长。要使粮食作物大幅度的增产,就必须提供大量的氮肥。生物固氮的研究是与氮肥生产密切相关的。如何使氮肥厂的生产工艺由高温高压改成常温常压?如何给非豆科农作物(特别是主要粮食作物)的每个植株“兴建”一个小小的“氮肥厂”?这是摆在我们面前的两项长远的战略任务。为此,我们就必须彻底揭开生物固氮的秘密。这就要弄清楚下列几个重大问题:固氮微生物为什么能够在常温常压下固氮?它们是怎样固氮的?根瘤菌对豆科宿主植物为什么有选择性?它们脱离豆科宿主植物为什么就不能够固氮?固氮微生物为什么能够产生固氮酶?固氮酶的生物合成是怎样自动调节的?等等。

生物固氮的研究,已有一百多年的历史了。1960年,取得了重大突破。从此以后,国际上固氮生物化学的研究,进展甚为迅速。在生物固氮机理、固氮分子遗传、共生固氮等方面,已取得了许多重大的成果。我国从五十年代起,也开展了这方面的工作,并取得了一些成果。

生物固氮的研究虽然已有很大的进展,但是,这只是万里长征走完了第一步。为了让更多的人了解、支持并参加生物固氮研究,所以编写了《生物固氮的秘密》这本小册子。

本书主要从生物化学角度，介绍国内外最近几年来在生物固氮的几个主要研究领域里的研究成果，并从理论上加以分析综合，其中，还提出了本人的一些初浅的见解与设想。

在本书的写作过程中，得到了我校系、室领导及固氮组的许多同志的支持与帮助，全稿经中国科学院沈阳林业土壤研究所张宪武先生审阅，大部分插图由尹广有同志绘制，在此一并表示感谢！

由于本人水平有限，书中一定有不少的缺点与错误，敬请读者批评指正。

编著者

1979.1.1

目 录

第一章 形形色色的固氮微生物.....	1
一、共生固氮微生物	1
二、自生固氮微生物	9
第二章 生物固氮的秘密.....	17
一、固氮微生物为什么能够固氮	17
二、固氮微生物是怎样固氮的	52
第三章 固氮酶生物合成的自动调节.....	81
一、固氮酶的生物合成	81
二、固氮酶生物合成的自动调节	85
第四章 前程似锦的固氮基因工程.....	96
一、固氮的生物化学条件	96
二、对固氮基因受体的分析	98
三、固氮基因转移	99
第五章 绝妙的共生固氮.....	110
一、根瘤菌与豆科植物之间的相互辨认	110
二、根瘤菌离开宿主植物为什么不能固氮	111
三、扩大根瘤菌的宿主范围	114
第六章 化学模拟生物固氮.....	117
一、氨的重要性	117
二、工业合成氨及其缺点	117
三、化学模拟生物固氮	118

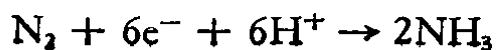
第七章 生物固氮研究的历史、现状及前景	126
一、生物固氮研究的历史与现状	126
二、生物固氮研究的前景	132

第一章 形形色色的固氮微生物

一、共生固氮微生物

(一) 豆科植物为什么不需要施氮肥?

蛋白质和核酸是构成生物体的主要成分。没有蛋白质和核酸,就没有一切生命。氮素(氮元素)是构成蛋白质和核酸的主要成分,是农作物生长发育不可缺少的三个要素之一,是农作物增产的关键因素之一。人不吃饭不行,庄稼不施氮肥也不行。可是,大豆、花生、绿豆、赤豆、蚕豆和豌豆等绝大多数豆科植物,不施氮肥,照样长得很好,而且,还能提高土壤肥力,为下一季农作物创造良好的氮素营养条件。难道豆科植物不需要氮素吗?不是的。豆科植物与非豆科植物一样,需要氮素。那么,它们所需要的氮素是从哪里来的呢?那是从空气中来的。空气中含有大量的自由氮素(N_2),可是,一般的农作物并不能利用它,只能“望氮兴叹”!然而,豆科植物却有一种奇特的本领,就是能够在常温常压下将空气中的氮分子(N_2)转化成氨(NH_3)。由氮分子变成氨的反应就叫固氮反应,简称固氮。



这一反应,如果是由生物体中的固氮酶催化的,就叫生物固氮;如果是由其它的化学催化剂催化的,就叫化学固氮。

豆科植物为什么能有这种固氮本领? 如果你从田野里拔起一棵大豆植株, 你就能够看到大豆根系长着许许多多像珍珠似的根瘤 (图 1-1)。生物固氮就是在根瘤中进行的。但是, 必须指出, 真正有固氮本领的并不是根瘤本身, 而是生活在根瘤里的根瘤菌类菌体 (图 1-2)。

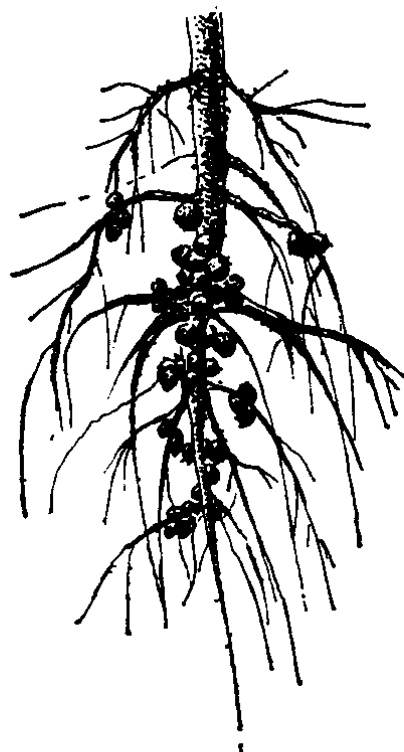


图 1-1 大豆的根瘤

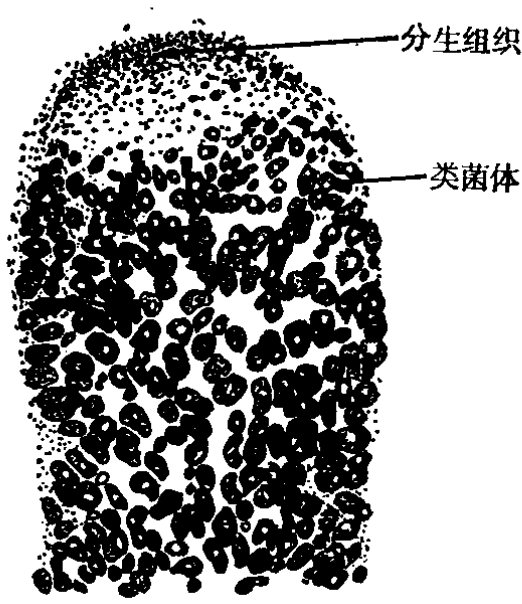


图 1-2 旺盛时期的根瘤

根瘤菌是一种细菌。它能侵入豆科植物的根内部, 与植物共生, 形成根瘤, 因此, 叫它根瘤菌。

(二) 根瘤菌的形态变化

在根瘤中生活的根瘤菌, 有三种主要的形态 (图 1-3):

- (1) 在幼小根瘤中生活的根瘤菌，呈细小的短杆状。
- (2) 随着根瘤的发育，菌体逐渐长大，染色后，菌体呈环节状。有时，一端膨大或分叉，成为梨形、棒锤形、“T”形或“Y”形。这种形态的菌体，叫类菌体。
- (3) 到根瘤的衰败阶段，类菌体崩裂，形成许多短杆状和球状的细菌。

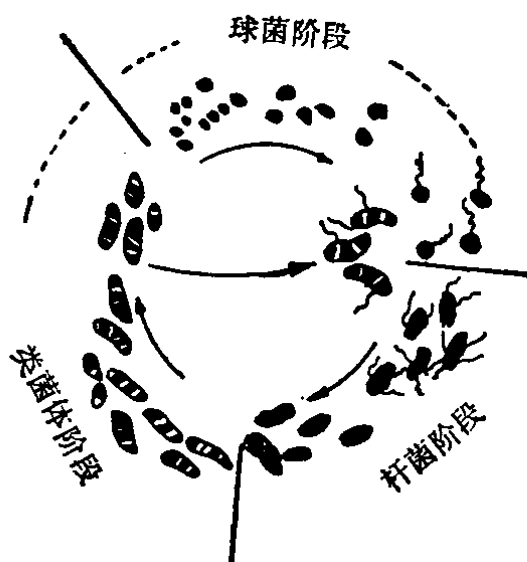


图 1-3 根瘤菌的生活史

液体培养时，在养料、温度、通气正常的情况下，一天之内菌体大多呈粗长、直杆或微弯形，两端钝圆，有一根或几根鞭毛。1—2 天，菌体大多着色不均匀，形成着色部分与不着色部分交替的环状体。2 天之后，菌体大多呈短杆或圆形。菌体形态随菌种、培养条件的不同而略有变化。

(三) 根瘤菌与豆科植物之间的相互关系

根瘤菌是怎样侵入豆科植物根内的？它与豆科植物是什

么关系？原来，小杆状的根瘤菌在土壤中过着腐生生活，缺乏固氮能力。当豆科植物的幼苗长出 2—3 个真叶的时候，根瘤菌首先进入根毛，接着，从根毛细胞进到皮层内部细胞。经过的路线叫“侵入线”，如图 1-4 所示。最后，根瘤菌从“侵入线”释放到寄主（宿主）皮层细胞后，立即被质膜所包围，形成包裹，并在其中增殖、发育、膨大为成熟的类菌体（拟菌体）。大豆根瘤中，每个包裹中有 4—6 个类菌体。在根瘤的一个细胞内，有近一万个这样的包裹。如果我们把豆科植物比作寄主，将根瘤菌比作客人，那么，这位“寄主”对于“客人”的照顾是无微不至的。“寄主”为“客人们”安排了舒适的“房间”（低浓度的氧环境），提供了各种营养“食品”（碳源、能源、无机盐）和“茶水”（水分），让客人们“有吃有喝”。客人们也不辜负寄主的“期望”。它们积极地进行固氮，所得“劳动果实”（ NH_4^+ ），

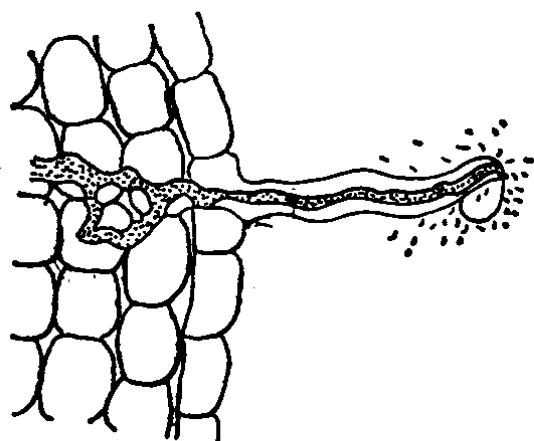


图 1-4 根瘤菌从根毛侵入，形成侵入线

除一小部分（ $1/4$ ）留给自己“食用”以外，大部分（ $3/4$ ）都送给寄主了，以满足寄主对“口粮”的需要。它们给的是那样的多，以致于寄主一时“吃”不完，不得不把“余粮”贮藏在附近的土壤里，从而提高了土壤肥力。从这里，我们可以看出，豆科植

物与根瘤菌相互帮助，共同生活。这种关系就叫共生。在共生中所进行的固氮，就叫共生固氮。

豆科植物种类繁多，根瘤菌更是形形色色。一种根瘤菌能不能与所有的豆科植物共生固氮呢？不能。根瘤菌与豆科植物之间的共生关系是有一定的选择性的。一般来说，根瘤菌只能侵染相应的豆科植物根系，进行共生固氮。例如紫云英根瘤菌只能与紫云英共生固氮；三叶草根瘤菌只能与三叶草共生固氮。它们的选择性很强。但是，也有一些根瘤菌的寄主范围较宽，即选择性较弱。例如豌豆根瘤菌能与豌豆、蚕豆、苕子、香豌豆、刀豆、鹰嘴豆共生固氮，而不能与大豆、豇豆、苜蓿、三叶草共生固氮；大豆根瘤菌能与大豆、绿豆、刀豆共生固氮；豇豆根瘤菌能与豇豆、小豆、绿豆、花生、胡枝子、猪屎豆、木豆、刺桐共生固氮（使用根瘤菌肥时，要特别注意这一特性）。不过，根瘤菌的这种选择性，不是不可以改变的。最近，国外有人发现，与豇豆共生的豇豆根瘤菌，可以与非豆科植物的小麦、菸草共生固氮；改变三叶草根瘤菌的遗传性，可以使它在大豆根系结瘤固氮。

扩大根瘤菌优良菌种的寄主范围，让根瘤菌能在小麦、玉米、高粱、棉花等非豆科农作物的根系上“安家落户”（结瘤固氮）是一个重要的研究方向。

（四）根 瘤 菌 肥

根瘤菌有惊人的固氮本领。它们为农业生产提供了大量

的氮肥。根据调查，紫花苜蓿根瘤菌每年能在每公顷土地上固定氮素 300 多公斤(相当于尿素 644 多公斤)；三叶草根瘤菌，每年能在每公顷土地上固定氮素 250 公斤（相当于尿素 536 多公斤)；羽扇豆根瘤菌每年能在每公顷土地上固定氮素 150 公斤(相当于尿素 321 多公斤)；大豆根瘤菌每年能在每公顷土地上固定氮素 60 公斤(相当于尿素 129 公斤)。

在农业上，人们早就利用根瘤菌，作为细菌肥料，使农作物获得了显著的增产。但是，在什么情况下需要施根瘤菌肥？在一向没有种过某种豆科植物的土壤中，一般不含有适合该植物的根瘤菌。例如，在从未种过紫云英的土壤中，第一年种植紫云英时，如不施用紫云英根瘤菌肥料，往往不能结瘤固氮。在经常种植某一种豆科植物的土壤中，一般含有能与这种植物共生的根瘤菌，但是，不一定是固氮效力最高的品种，也不一定有足够的数量来保证形成足够的根瘤。因此，在这种情况下，施用适当的根瘤菌肥料(根瘤菌剂)是很有必要的。而在使用根瘤菌肥料时，必须注意以下几点：

(1) 必须经常检验与筛选优良菌种。根瘤菌的不同品种之间，固氮能力相差很大。有效品种在主根附近结瘤，根瘤大，寿命长，固氮能力强，根瘤的内部组织为深红或浅红色；无效品种在根系的各部位结瘤，根瘤小，寿命短，没有固氮能力，或固氮能力很小，幼年时，根瘤内部为浅青色，衰老时，为黑色。因此，必须筛选，以便得到繁殖快，结瘤早，根瘤大而寿命长，固氮能力强，能增产的优良菌种。但是，优良菌种并不是一成不变的。它容易退化，乃至失去固氮能力。因此，还必须

经常检验,不断筛选。

(2) 根瘤菌肥料不能在太阳光直射或高温下存放。常温存放不能超过半年。不要用隔年生产的根瘤菌肥料。

(3) 一种根瘤菌肥料只能用于相应的豆科植物,用错无效。

(4) 根瘤菌肥料是用来拌种的,不能撒施作基肥或追肥。拌种时,不要与过磷酸钙一起拌(会杀死根瘤菌),可与钙、镁、磷肥一起拌,但应先拌菌,后拌钙、镁、磷肥。根瘤菌拌种的种子,不要在晴天中午播种,宜在傍晚和阴天撒播。拌种后稍稍阴干就应播种。稻田,水要放干,晒 1—2 天,才能播种;旱田,要在下雨前后条播,盖一薄层土。

(5) 必须同时满足豆科植物及其根瘤菌对环境条件的要求。土壤中含氮量过高,或者施用大量的氮肥,对于豆科植物本身是合适的;但是,对于根瘤菌的共生固氮是不利的。因为过量的 NH_4^+ 会阻碍固氮酶的生物合成。因此,在施用根瘤菌肥的土壤中,不能施用大量的氮肥;在含氮量丰富的土壤中,不宜施用根瘤菌肥。然而,在氮素十分贫乏的土壤中,早期施用少量的氮肥,可以促进豆科植物幼芽的生长,对于根瘤的形成和固氮作用有好处。豆科植物及其根瘤菌需要较多的磷、钾肥料,亦需要钼、硼微量元素。钼可以调节固氮酶的生物合成,是固氮酶活性中心的成分。缺钼则固氮酶不能合成,固氮不能进行。硼可以促进根瘤维管束的正常发育。缺硼则根瘤维管束生长不好,根瘤与植物间的运输系统受到障碍,致使根瘤生长不好。根瘤菌肥料与磷钾肥料、钼、硼微量元素结

合施用,可以促进共生固氮,提高农业产量。

健旺的豆科植物及其根瘤菌要求比较湿润和疏松的土壤,含水量在 20—30%。

豆科植物及其根瘤菌,需要接近中性或微碱性的土壤条件。在酸性土壤中施用石灰,一般可以改善豆科植物的生活条件,因而,也改善了共生固氮条件。

(五) 非豆科植物的共生固氮

以上我们介绍了豆科植物与根瘤菌之间的共生固氮问题。但是,不能由此认为,有共生固氮关系的只有豆科植物与根瘤菌。目前已知的能与固氮微生物共生固氮的非豆科植物就有 400 多种。分属于不同的科、属,如赤杨、马桑、杨梅,香杨梅、香蕨木、木麻黄、胡颓子、沙棘、水牛果、美洲茶、多瓣木、山黄麻、霸王、咖啡、伐高尼等各属,以及草本和禾本科植物等等。其中,有的是专性共生固氮;有的是结合性共生固氮。所谓专性共生固氮,就是微生物侵入宿主根内,使宿主产生根瘤,在根瘤中进行共生固氮;所谓结合性共生固氮,就是微生物侵入宿主根内,不使宿主产生根瘤,进行共生固氮。这两种共生固氮形式的主要区别就是有无根瘤。

结瘤固氮的沙棘在英国的一公顷砂丘地带,每年固氮 179 公斤;加拿大的一种赤杨每年每公顷固氮 150 公斤。它们的固氮量可以与某些豆科植物(羽扇豆每年每公顷固氮 150 公斤)媲美。这个固氮量相当于硫酸 895 公斤的含氮量。最近,

国外有人从赤杨的根瘤中,分离到一种固氮放线菌,并进行了纯培养。它有很强的固氮本领,有希望作为造林的氮肥来源。能不能扩大其寄主范围,值得进一步研究。

让玉米、高粱等非豆科农作物像豆科植物那样结瘤固氮,这是人们朝思暮想的愿望。两年前,美国有人发现带脂螺菌与玉米、高粱、热带草类等非豆科植物结合性共生固氮。这一重大发现曾经受到不少科学家的重视。但是,到目前为止,对带脂螺菌能不能提高作物产量,还有疑问,需要进一步实验。早在本世纪六十年代,有人在热带草类(如雀稗)根际中,观察到自生固氮菌(雀稗固氮菌)与雀稗之间发生结合性的共生现象,以后观察到,这种结合性的共生范围能扩大到甘蔗、大黍、水稻、玉米、香茅、紫色狼尾草,以及海洋双子叶植物等。

结合性共生固氮和专性共生固氮一样,也是植物界普遍存在的一种共生固氮形式。积极开展对非豆科植物共生固氮的研究,对于改造土壤,广辟肥源,提高作物产量,有着十分重要的经济意义,而且对农林牧的发展,也是非常有益的。

二、 自生固氮微生物

(一) 自生固氮菌

在自然界中,除了共生固氮外,还有自生固氮。所谓自生固氮,就是指微生物自由生活,进行固氮。能自生固氮的微生物,叫自生固氮微生物;自生固氮微生物分为细菌和蓝绿藻两

表 1-1 自生固氮微生物

细 菌	蓝 绿 藻
真细菌目	念珠藻目
固氮菌科	念珠藻科
固氮菌属	项圈藻属
贝氏固氮属	拟项圈藻属
Derxid	<i>Aphanizomenon</i>
芽孢杆菌科	管链藻属
芽孢杆菌属	筒孢藻属
梭状芽孢杆菌属	念珠藻属
肠杆菌科	Entophysaledaceae
气杆菌属	<i>Chlorogloea</i>
克氏杆菌属	胶须藻科
小球菌科	眉藻属
小球菌属	双歧藻科
Hyphomicrobiales	双歧藻属
Hyphomicrobiaceae	单歧藻属
红小球菌属	多列藻目
Pseudomonadiales	海雹菜科
红色无硫细菌科	软管藻属
红极毛杆菌属	<i>Mastigocladus</i>
红螺菌属	多列藻科
绿硫细菌科	<i>Fischerella</i>
绿硫细菌属	多列藻属
假单孢菌科	<i>Westiellopsis</i>
固氮极毛杆菌属	
黄杆菌属	
螺菌科	
去磺弧菌属	
产甲烷杆菌属	
螺菌属	
红硫细菌科	
红硫细菌属	
分枝杆菌目	
分枝杆菌科	
分枝杆菌属	

类。如表 1-1 所示。

1. 自生固氮细菌的种类及其对农业的贡献

就细菌而言,常见的有好气的固氮菌属(如圆褐固氮菌、棕色固氮菌),有厌气的梭状芽孢杆菌属(如巴氏梭菌),有兼性的(有无空气可以)克氏杆菌属(如肺炎克氏杆菌)和芽孢杆菌属(如多粘芽孢杆菌),有能进行光合作用的红螺菌属(如深红螺菌)和红硫细菌属(如酒色红硫菌)。这些自生固氮细菌也在为农业生产作出自己的贡献(每年每公顷固氮 5—20 公斤),但是,与根瘤菌的贡献(每年每公顷固氮 100—600 公斤)相比那是小得多了。然而,由于根瘤菌一般只能与相应的豆科植物共生固氮,局限性很大,对于大多数非豆科植物,特别是禾本科农作物,自生固氮细菌还是有它的特殊作用。因此,在农业上,人们早就利用固氮能力较强的圆褐固氮菌等作为细菌肥料,以满足非豆科农作物对氮素的需要,获得了增产。

2. 固氮菌的形态变化

固氮菌属是周生鞭毛,格兰氏染色负反应,不生孢子的杆菌。固氮菌属的代表种是圆褐固氮菌(图1-5)。圆褐固氮菌幼年为两端圆钝的粗短杆菌,随着年龄增长逐渐变成椭圆形或圆形,通常成对存在,呈 8 字形,大小约为 2×4 微米。幼年时,周生鞭毛,可以运动;成年时,鞭毛数目减少,活动能力减弱;老年时,菌体周围出现一层很厚的荚膜,失去了运动能力。由于荚膜很厚,菌落一般是很粘的,无色或棕黑色。