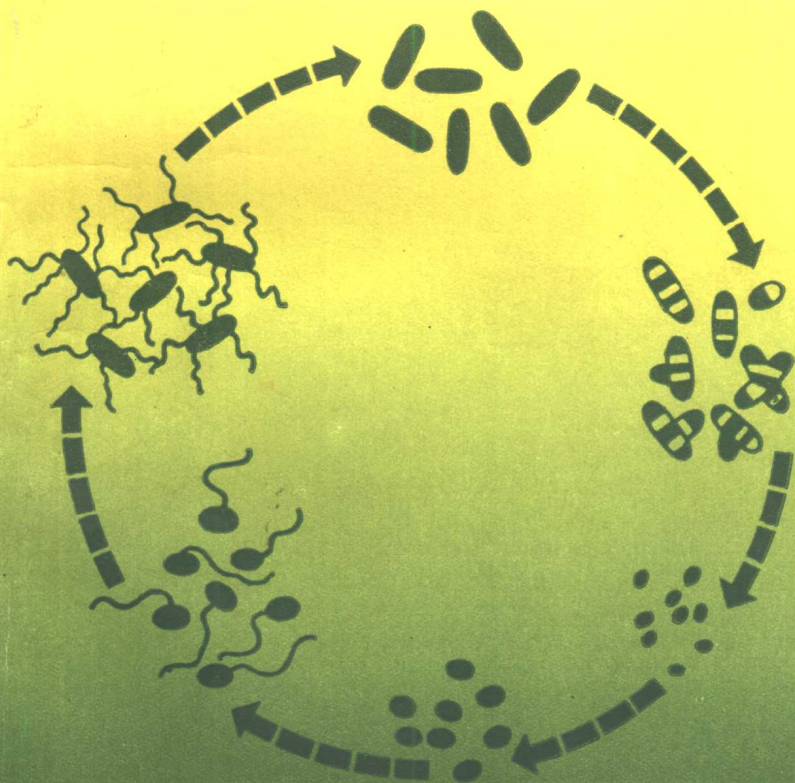




现代自然科学普及丛书

生物固氮

陈 因 陈永宾 唐锡华 江群益编著



·现代自然科学普及丛书·

生 物 固 氮

陈 因 陈永宾 唐锡华 江群益 编著

上海科学技术出版社

现代自然科学普及丛书

生物固氮

陈 因 陈永宾 唐锡华 江群益 编著

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路 450 号)

发行所 上海发行所发行 上海群众印刷厂印刷

开本 787×1096 1/32 印张 6 字数 129,000

1985年8月第1版 1985年8月第1次印刷

印数 1—4,200

统一书号: 13119·1163 定价: 0.95 元

出版说明

《现代自然科学普及丛书》是一套中级科普读物。为了发展我国的科学技术,赶超世界先进水平,有必要以辩证唯物主义的观点为指导,及时介绍当代一些基本理论问题、基础学科和发展较快的新兴学科、边缘学科,包括其基本内容、发展历史、目前进展概况和今后动向,供有关的干部、青年和科技人员参阅。

这套读物有数、理、化、生、天、地(包括气象、海洋),以及有关现代农业、现代医学基础理论的选题多种,力求有中等文化水平的读者即能读懂。本丛书陆续出版,欢迎同志们提出宝贵意见。

编 者 的 话

氮素是农业生产中必不可少的肥料，是构成蛋白质的基本元素之一。为了改善人类的营养，农业、生物科学家们正为提高农作物产量及其蛋白质含量作着不懈的努力。随之而来的是对氮素的需求日益增长。因而人们必须运用一切资源和手段来实现肥料产量的增加和扩大肥源。而生物固氮则是这个环节中比较有效的途径。众所周知，氮素在大气组成中占78%，可谓用之不尽。目前，人类对大气中氮素的利用，除了靠非生物固定的（如大气放电和工业合成氨……）以外，绝大部分则是靠生物固氮而得。所以，生物固氮的利用和研究就成了农业生产中开拓、利用氮资源和生物学以至仿生学研究领域中比较活跃的重大课题之一。

生物固氮的研究，涉及范围很广。它包括固氮的生物学、生态学、生理学、生物化学、遗传学……乃至非生物学科。经过人们多年来探索，尤其是近十余年来，借助生物化学、分子生物学积累起来的知识，以及近代物理和化学技术的引用，使人们对生物固氮机理的认识有了一个飞跃。

然而，迄今为止，有关生物固氮方面的读物，除了出版一些译文集和若干工作报告以外，在我国却还没有一本综合介绍这个问题的书籍。为了适应科研、教育的需要，我们几个多年从事生物和非生物固氮科研的同志，应上海科学技术出版社约请，编写了这本小册子。

本书编写过程中，我们本着普及和提高相结合的原则，侧

重在普及方面，力求比较全面和系统地介绍这个领域中（包括基础理论和生产应用）的基本概念、研究概况和重点研究成果。

本书各章由下列同志执笔完成：引言陈因；第一章陈永宾；第二、三章陈永宾、陈因；第四章唐锡华；第五章陈因；第六章江群益。最后由陈因同志整理定稿。

由于我们的水平有限，编写中的不足或错误之处，恳请读者和专家们批评指正。

编 者

目 录

引言	1
一、什么是生物固氮?为什么要研究生物固氮?	1
二、生物固氮研究的历史回顾和展望	5
第一章 自然界中的氮素循环	9
第一节 氮的循环	9
第二节 氮素转化	10
一、氮的同化作用	11
二、氨化作用	12
三、硝化作用	13
四、反硝化作用	15
五、固氮作用	15
第二章 固氮生物的种类及其在农业中的利用	16
第一节 固氮生物的种类	16
第二节 固氮生物和农业生产	18
一、蓝藻	18
二、绿萍	21
三、自生固氮菌	22
第三章 豆科植物-根瘤菌的共生固氮	29
第一节 豆科植物及其对固氮的贡献	29
第二节 根瘤菌与豆科植物的关系	31
一、根瘤菌	32
二、根瘤菌的互接种族和分群	33
三、有效和无效根瘤问题	35
第三节 根瘤的形成与功能	36

一、根瘤的形成	36
二、根瘤的功能	41
第四节 共生固氮机制	42
一、共生根瘤菌的自生固氮	42
二、挑剔的寄主和植物凝集素的识别作用	45
三、有效根瘤和无效根瘤与豆血红蛋白的关系	46
第五节 环境因素对共生固氮作用的影响	51
一、温度	51
二、光	51
三、氧的水平	54
四、土壤湿度	56
五、营养状况	56
六、其他因素	58
第六节 根瘤菌剂的生产和应用	60
一、根瘤菌种的准备	60
二、根瘤菌剂的生产	63
三、根瘤菌剂的使用和注意之处	67
第四章 非豆科植物与微生物的共生固氮	70
第一节 能和微生物共生固氮的非豆科植物	71
第二节 非豆科植物与微生物共生结合体固氮能力的验证及其固氮量	78
一、固氮的验证	78
二、固氮量	80
第三节 非豆科植物与微生物共生固氮结合体的几 种类型	82
一、非豆科植物与放线菌形成的共生固氮结合体	82
二、非豆科植物与细菌形成的共生固氮结合体	89
三、非豆科植物与固氮蓝藻形成的共生固氮结 合体	95

四、非豆科植物与真菌形成的共生固氮结合体·····	98
第四节 非固氮植物固氮的可能前景·····	99
第五章 固氮的生物化学——固氮酶·····	102
第一节 固氮酶及其特性·····	103
一、早期的探索·····	103
二、固氮酶的分离和提纯·····	105
三、测定固氮活性的方法·····	108
四、固氮酶的若干特性·····	110
第二节 固氮作用的机理·····	122
一、固氮酶所进行的催化反应·····	122
二、固氮酶的结构及其与功能的关系·····	136
三、氮还原的中间步骤及其进一步转化·····	147
四、氨和其他结合态氮对固氮酶活性的调节·····	149
第三节 生物固氮的化学模拟及其前景·····	153
一、从生物固氮中得到的启示·····	153
二、固氮酶与工业合成氨催化剂的比较·····	156
三、温和条件下的化学固氮·····	157
四、问题远未解决·····	160
第六章 固氮遗传·····	161
第一节 固氮的遗传装置——固氮基因群·····	161
第二节 固氮基因的调节开关·····	170
第三节 固氮新品种的设计蓝图·····	175

引 言

一、什么是生物固氮？为什么要研究生物固氮？

作为构成生命物质——蛋白质的基本元素之一的氮素，广泛分布在自然界中。据估计：地球上的全部氮素约有 197×10^{15} 吨，其中 97.8% 存在于地壳岩石里，0.2% (0.4×10^{15} 吨) 存在于地表的水成岩里，2% (3.9×10^{15} 吨) 存在于空气里。在空气中，氮素占整个空气各种气体组成的 80% 左右。人类对如此丰富的氮素绝大部分不能直接利用，而一些微生物，诸如自生固氮菌、共生固氮菌、某些光合细菌和许多种蓝绿藻……，却能通过其体内固氮酶的活动，将空气中以分子态形式存在的氮素固定下来，转变成氨态氮。这种现象，在生物学上称之为生物固氮。

根据 1975 年的报告资料粗略估计(图 1)，地球上总固氮量是 255×10^6 吨，其中非生物固氮，如空气中放电约 10×10^6 吨，燃烧约 20×10^6 吨，成层圈中的臭氧作用约 15×10^6 吨。这些自然现象所固定的氮素，以硝酸盐 (NO_3^-)、亚硝酸盐 (NO_2^-) 和氨 (NH_3) 的形态随雨水一起降落到地表。另外从地球内部(如火山)喷出物中所含的氮量合计有 0.2×10^6 吨。工业合成氨的固氮量有 40×10^6 吨。至于生物所固定的氮量，约 175×10^6 吨。其中，与豆科植物共生的根瘤菌固氮约 8000 万吨，非豆科植物共生固氮约 2500 万吨，蓝绿藻固氮约 1000 万吨，自生固氮菌固氮约 1~2 万吨，其他约 60 万吨。就整个自然界的固氮量来说，生物固氮为非生物固氮量的 2 倍多，这

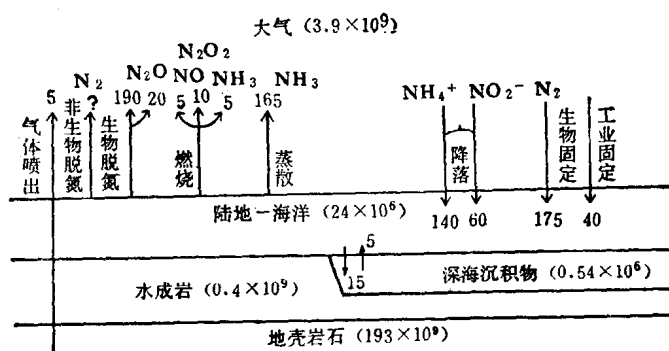


图 1 地球上的氮素循环
(单位 $\times 10^6$ 吨)

是一个不小的数字，说明生物固氮之重要。关于地球上年固氮量的详细情况，可参见表 1 所列的数字。

另据 1976 年报告资料推测，世界上整个氮素固定量为 237×10^6 吨，其中全部耕地占 38%，合 90.1×10^6 吨，森林和未耕地占 25%，合 59.3×10^6 吨，化学固氮（主要作肥料用）占 24%，合 56.9×10^6 吨，燃烧占 9%，合 21.3×10^6 吨，放电占 4%，合 9.5×10^6 吨，以及海洋中未知的量（约 1×10^6 吨）。这里也揭示了通过耕地、森林和未耕地上由生物固定的氮量所占的比例是十分巨大的。再次表明了生物固氮的重大作用。

据统计，现在世界上的粮食生产量，按平均数计算，基本上可以维持人类吃饭的需要。但是，随着今后人口的增长，人类对粮食的需求，无论从量的方面，还是从质的方面都会越来越高。俗话说得好，“庄稼一枝花，全靠肥当家”。作为“植物粮食”的肥料，其中氮素，乃是增加谷物产量的最重要因子。一般地说，一定面积的谷物产量与氮肥使用量大致上成比例

表 1 地球上的年固氮量(1975 年)

	固 氮 类 型	公 顷 ($\times 10^6$)	公斤 N/ 公顷 · 年	固 氮 量	
				吨 $\times 10^8$ /年	占总固氮量的 百分比(%)
生 物 固 定	农业:	4,400			
	农作物耕地	1,400			
	豆科植物	250	140	35	13.7
	豆类	63			
	大豆	34			
	花生	18			
	其他	135	30		
	非豆科植物	1,150	5		
	稻(玉米)	135	15	4	1.7
	其他	1,015	10	5	2.0
	牧场、草地	3,000	15	45	17.6
	山林和森林地	4,100	10	45	15.7
	未开垦利用土地	4,900	2	10	3.9
	冰冻地区地	1,500	0	0	
	全部陆地	14,900		139	54.6
	海 洋	36,100	1	36	14.1
	合 计			175	68.7
非 生 物 固 定	闪 电			10	3.9
	燃 烧			20	7.8
	工业:				
	肥 料			40	15.7
	工业使用			10	3.9
	合 计			80	31.3
总 计		51,000		255	100

增加, 而氮肥消耗和人口增长之间也有一定的关系。现在不妨用图和表来说明这个问题(图 2, 表 2)。

表 2 世界人口和氮肥消耗量的消长关系

年 份	世 界 人 口 (亿)	氮肥消耗量(N万吨)
1850	11.3	—
1870	13.1	—
1900	15.9	30
1950	25.2	419
1970	37.2	3161

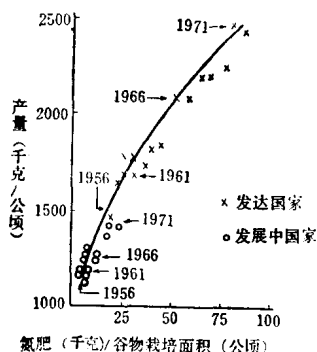


图 2 氮肥施用量和谷物产量之间的关系

从表 2 和图 2 可以看到, 氮肥消耗、粮食产量和人口增长, 这三者之间的关系是多么密切。尽管现在人们可以用工业合成氨的办法固定空气中氮素作为肥料, 但是它只占整个地球年固氮量的 20% 左右。而且, 化肥生产中能源消耗极大, 所以目前农业生产中的氮肥主要还是直接或间接靠生物固氮得到。

由于生物固定的氮量在整个固氮量中所占的份量很高, 其机理研究又有多方面的意义, 因而生物固氮研究也就成了生物学领域中的重大探讨问题之一。生物固氮的研究范围很广, 它涉及到固氮生物学(包括固氮生物的资源调查、改造、利用, 豆科和非豆科植物与某些微生物的共生固氮、联合固氮, 微生物本身生命活动的自生固氮, 蓝藻固氮, 固氮生物的生态, 等等), 固氮的生理学, 生物化

学、模拟固氮酶的化学固氮和固氮基因遗传学诸方面。这些领域研究的总目标,从联系实际出发,(1)为农业开辟肥源,提高现有各种固氮微生物的固氮能力,选择、提供优质高效的微生物肥料;(2)模拟固氮酶在常温常压下还原分子氮,使工业合成氨催化剂起一个革命性变化;(3)用实验方法促使目前不固氮的植物,特别是主要农作物获得固氮能力。而在理论上,它又和生物催化、化学催化、生命起源以及生物共生作用密切相关。因此越来越引起生物学家的重视,同时也吸引着化学、化工和其他专业界的广泛兴趣,成了当前很活跃的研究领域。

二、生物固氮研究的历史回顾和展望

回顾一下生物固氮研究简史,不仅对训练、启发人们的科学逻辑思维十分重要,而且还有助于继往开来。

1. 生物固氮概念形成的历史回顾:

在人们对生物固氮概念尚未明确之前,我国劳动人民在生产活动中,就已知道豆类作物可以肥田了。公元前三世纪的西晋《广志》一书中就有:“苕草色青黄,紫花十二月,稻下种之,蔓延殷盛,可以美田,叶可食”的记载。那时就已种植豆科植物苕草肥田了。后魏贾思勰在他的名著《齐民要术》的《耕田篇》中也写道:“凡美田之法,绿豆为上,小豆胡麻次之”。这些可以说是人们孕育生物固氮概念的较早的论述。后来,人们就生物能不能固氮这个问题进行了比较长时期的探讨。1830年,柏森哥特(Boussingault)在温室实验和后来的田间试验中观察到,生长在无氮砂土上的三叶草和豌豆,植株含氮量增加。于是他作出了“豆科植物能利用大气中氮素”的结论。但是,这个结论遭到德国化学权威李比希(Liebig)的反对。他认为柏森哥特所谓豆科植物中氮的增加,是由于大叶

片的植物比小叶片的对照植物能够从大气中吸收更多的氮造成。以后，拉外斯(Laves)等作了较为严格的实验。他们将栽培植物用的花盆和砂土等实验用物都进行高温加热处理，以除去一切有机物质，这样做的结果，连促使豆科植物固氮的根瘤菌也杀死了，以致他们在同时分析植物的土壤中含氮量时，没有见到固氮发生，因而作出了豆科植物不能固氮的错误结论。

尔后又有人对此问题作了进一步的探讨。如阿特怀特(Atwater)、赫尔列盖(Hellriegel)和维尔法斯(Wilfath)等发现豌豆在培养基上生长得很茂盛，并且每棵植株根系都带有小瘤子。这就把几世纪以前为人们描述过的，实为生物固氮重要部位的根瘤的重要性揭示了出来。接着他们进一步用种过豆子的土壤与豆科植物种子拌和后下种，让其长在无氮的砂土上；以没有拌土的种子作对照。结果，凡用土壤接过的豆科植物都长得良好；而没有接种的豆科植物，有的生长很茂盛，有的长得很瘦弱。凡是长得好的植物，根部都结瘤。说明生物固氮作用确是发生的，它与豆科植物的根瘤关系极大。从此结束了生物能否固氮的争论。

十九世纪末期，贝林克(Beijeninck)第一个从根瘤中分离出根瘤菌。就在这个时期前后，俄国学者维诺格拉斯基(Виноградский Winograsky)从土壤中分离出厌氧固氮细菌——巴氏梭菌，这种菌在试管实验中能固氮。1901年，贝林克又分离得到棕色固氮菌，接着蓝藻纯培养成功。这样，生物固氮的概念就越来越明确化了。

上面谈到的一些情况，可说是生物固氮研究史的第一个阶段。

2. 生物固氮研究的飞跃和展望。

从本世纪二十年代起,生物固氮研究的大量报告偏重在描述各种生物固氮的类型、形态、分类和固氮菌的生理生态方面。四十年代后,则集中在生理和生物化学方面。由于当时技术条件和知识水平的限制,人们对生物固氮的了解只停留在整体细胞水平上。直到六十年初期,第一次人工打破了细胞的屏障,能在体外进行非细胞水平的固氮作用,从而使生物固氮,特别是固氮生化和固氮遗传工程的研究进入了一个新阶段。近十多年来,人们借助于分子生物学和生物化学领域中,尤其是酶学在固氮以外的其他方面所积累起来的大量知识,以及近代物理、化学技术的广泛应用,使固氮生化,其中主要是在固氮酶的分离、纯化、结晶、结构与功能,化学模拟生物固氮和固氮基因遗传工程等机理性方面的研究,得到了飞跃发展。这二十多年来的生物固氮研究历程,可以用下面的图示简单概括(图3)。

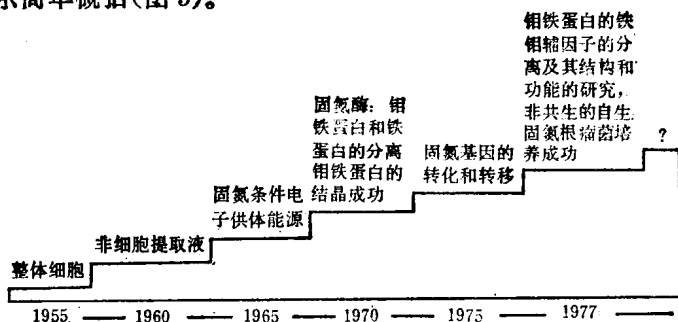


图3 五十年代以后生物固氮研究的进展情况

目前,生物固氮研究正围绕着如下几方面的问题:

1. 固氮生物资源的开拓利用,现有固氮生物固氮能力的提高,共生固氮和联合固氮,生物固氮的生化、生理、生态及其应用;

2. 固氮生物中固氮酶结构、功能及其化学模拟的研究;
3. 固氮遗传和遗传工程的研究;
4. 其他, 如光合固氮及其与氢代谢的关系, 等等。

从这些研究中, 人们正期待着下列几方面美好愿望的实现:

1. 更有效地利用自然界固氮, 其方法可能得到发展;
2. 为已知的植物-微生物系统所固定的氮量可能进一步增加;
3. 在植物和微生物之间, 更好的甚至是新的共生关系可能得到发展;
4. 利用有机废料或阳光作为能源的微生物变种总有一天能作为生产氨的工厂;
5. 有可能将固氮基因转移到不固氮的植物上, 从而使这类植物都有自己利用大气中氮的“小化肥工厂”, 自己解决氮肥问题;
6. 有可能发展在常温常压下合成氨。

总之, 生物固氮的研究正展示着美好前景。当然, 有待解决的课题还很多很多。