

青海省高寒湿地省级重点实验室资助出版

G

固氮 微生物学

UDAN

WEISHENGWU XUE ▲

刁治民 陈克龙 王文颖 孙苗苗 王恒生 李园媛 编著



科学出版社

青海省高寒湿地省级重点实验室资助出版

固氮微生物学

刁治民 陈克龙 王文颖 孙苗苗 王恒生 李园媛 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

生物固氮是生命科学的重大问题之一,在科学和生产实践中都具有重要意义。本书介绍了固氮微生物作用机理,自生固氮微生物、共生固氮微生物(根瘤菌、弗兰克氏菌)、固氮蓝细菌与其他共生固氮体系,联合固氮微生物的生物学特性、研究方法以及应用基础等。全书内容较全面,实用性强,对我国固氮微生物资源的开发及可持续发展具有重要的指导意义。

本书资料翔实,理论系统全面、先进实用,着力反映了当前固氮微生物学科技新成就、新进展。本书可供生命科学、农学等专业的大学本、专科及研究生的课程教学使用,也可供有关学科的研究者和生产者参考应用。

图书在版编目(CIP)数据

固氮微生物学 / 刁治民等编著. —北京:科学出版社, 2014.10
ISBN 978-7-03-042101-2

I. ①固… II. ①刁… III. ①固氮微生物—研究 IV. ①Q939

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 228052 号

责任编辑:莫永国 / 责任校对:李 娟

责任印制:余少力 / 封面设计:墨创文化

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

成都创新包装印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年10月第 一 版 开本:787*1092 1/16

2014年10月第一次印刷 印张:20

字数:400千字

定价:78.00元

前 言

氮是植物生长所必需的主要营养元素之一。在农业生产中,氮被视为衡量土壤肥力的一个重要指标,也是农作物获得长期稳定高产的基本条件。氮气约占空气体积的80%,每平方米空气柱里约有8吨氮。然而对于绝大多数的生物来说,这些分子态氮是不能直接被利用的,只有通过工业或生物固定转化成其他化合物,才能进入生物体。某些微生物利用自己独特的固氮酶系统,将从光合作用产物或其他碳水化合物中得到的电子和能量传递给氮,使其还原成氨,称之为生物固氮的机理。生物固氮与工业固氮(即氮肥工业)相比,具有成本低、能耗低及无环境污染的特点,并在维持全球生态系统氮素平衡中起着重要作用。

生物固氮包括自生固氮、共生固氮和联合固氮。自生固氮是指有些固氮微生物在土壤或培养基中能够独立地完成固定大气中的分子态氮的作用,其固氮量远远低于共生固氮。共生固氮是指固氮微生物在与寄生植物生活在一起时,直接从寄生植物中获取能源,完成固氮作用。由于其固氮能力强,在农业生产中的意义也最大,常见的有豆科植物的共生固氮、蓝绿藻与红萍的共生固氮等。

近年来,生物固氮研究异常活跃,已成为世界范围的重要课题。纵观当前生物固氮研究的内容,大致有三个方面,即固氮资源的有效应用、固氮的遗传工程和化学模拟固氮。

在固氮资源的有效利用方面,许多国家都在大力发展豆科作物,通过其有效的共生固氮体系,增加生物氮源,改善土壤肥力,以促进农业增产。此外,接种根瘤菌提高豆科作物产量已在全世界范围内使用。在稻田里接种和放养红萍和固氮蓝藻,既能增加土壤中生物氮数量,又能提高水稻的产量。这种共生固氮途径的有效应用,在我国和东南亚一些国家已有悠久的历史。

随着分子生物学的进展,固氮的遗传工程受到了广泛重视,已成为目前最活跃的研究领域。遗传工程是用人工方法去改变生物体的遗传特性或者按照人们的意愿去获得新品种、生产新产品。对于固氮微生物来说,固氮基因操纵和调节固氮酶的合成,从而使固氮微生物具有固氮作用。如果将固氮基因进行人工转移,就可能获得具有固氮作用的新成果。有关这方面的研究目前主要在以下几方面进行探索:一是培育新的固氮微生物,以提高固氮效率或赋予非固氮微生物以固氮能力;二是改变结瘤的识别过程或将固氮基因转移到根瘤杆菌中,以使非豆科植物结瘤固氮,扩大固氮作物的范围;三是应用遗传工程培育不依赖固氮微生物的自主固氮的植物。这些研究如能成功,将对农业生产产生深刻的影响。

当前,国外生物固氮研究已进入一个新阶段,其特点是多学科交叉,将基础研究和应用前景相结合,开拓了思路。生物固氮研究正在分子水平上开展,如固氮基因表达的

氮阻遏和氧敏感机制；共生结瘤固氮中植物与微生物相互关系的基因表达和调控；根瘤菌结瘤因子的结构和生物合成；根瘤菌及其宿主植物的基因组学转录组学和蛋白质组学固氮酶的结构和功能及其化学模拟等。这些研究要求生物学、农学、化学和物理学等学科的交叉结合，引入新概念和新技术结合进行。这些任务的解决，对人类社会带来的益处是何等的巨大，这在目前是难以预料的。

早在 1886 年，德国科学家经过实验证明根瘤菌具有生物固氮作用以来，西方各国都十分重视根瘤菌的应用。生物固氮研究已经引起越来越多的人的关注。在这方面的研究今后主要包括基础理论和应用基础这两个方面。在基础理论研究中主要围绕着诱发非豆科作物结瘤的最佳条件和提高共生固氮效能，其中包括诱导根瘤菌侵入主要农作物共生结瘤的有效方法；提高非豆科农作物共生结瘤固氮的效能；根瘤菌导入非豆科宿主细胞的途径、共生部位和共生理理；采用适当的技术措施诱导弗兰克氏菌与主要农作物结瘤固氮；弗兰克氏菌共生结瘤固氮的机理等。

高效生物固氮作用机理研究要求生物学、农学、化学和物理学在固氮酶的结构功能和化学模拟固氮基因表达中铵遏氧敏感，共生结瘤固氮中植物与微生物相互关系的基因表达和调控，结瘤因子的结构和人工合成，固氮根瘤及其宿主植物的基因组学，功能基因组学和蛋白质组学等在分子和原子水平上，从不同方面相互交叉、有机结合，引进新概念和新技术进行综合研究。

在应用基础研究中主要围绕着培育新的固氮植物，其中包括通过生物技术改造固氮微生物和现有的农作物，使新的固氮菌与新的农作物更容易形成共生固氮关系。西部退耕还林还草工程的实施，需要大面积播种豆科灌木和豆科牧草，应用生物固氮技术——接种根瘤菌是解决大面积人工林、草场“氮缺乏”问题唯一有效的技术措施。在贫瘠的土地上豆科植物接种根瘤菌可增加生长量 15%~50%，每年可增收干草 750~1200kg·hm²。豆科根瘤菌接种的技术关键包括优良菌种、优质菌剂选择和种子丸衣化接菌技术。根瘤菌接种技术在退耕还林还草中的作用是其他技术无法替代的，有十分重要的地位。应针对我国农林牧业、中草药、环境修复、水土保持、防风固沙等领域种植的豆科植物，筛选适应不同生态区域的高效根瘤菌株，生产优质高效根瘤菌接种剂。在保障粮食安全的前提下，推动生物固氮在农区豆、禾间套轮作中的应用，大幅度降低氮肥用量与病虫害危害。以促进豆科植物—根瘤菌共生体及其他固氮生物在我国绿色农牧业中的高效应用。

可以肯定，生物固氮工程的研究已经进入一个新的历史阶段，扩大生物间共生固氮范围和将豆科植物的固氮能力转移到非豆科植物中的研究已呈现出希望之光。随着生物固氮研究的不断深入，将逐步实现禾本科农作物与固氮微生物共生结瘤固氮的美好愿望。

如今，生物固氮已经越来越受到专家、学者和普通百姓的重视，并且已经应用到农业等领域去。接下来，生物固氮的发展方向将会向更深更微的方向发展。将会涉及到农学、化学、物理学和生物学，而生物学中又包括遗传学、分子生物学、生物化学、生物物理学等学科。相信生物固氮将是一个非常具有前景的课题，生物固氮技术的研究将会给人类带来巨大的影响。为此，特编写本书，以推动生物固氮技术在现代绿色农业中健康发展。

本书在编写出版过程中得到青海省高寒湿地省级重点实验室、青海师范大学、青海

天湖高原蕈菌研究所、科学出版社等的大力支持和帮助，在此一并表示诚挚的感谢。

由于编著者水平所限，不妥与错漏在所难免，恳请读者批评指正，以便以后修订、完善。

作者

2014年1月6日

目 录

第一章 绪论	1
1.1 生物固氮的意义	1
1.2 生物固氮研究的简况	1
1.3 生物固氮发展方向	4
第二章 生物固氮的基本原理	6
2.1 固氮酶及其作用的基本条件	6
2.2 固氮的生化机制	8
2.3 固氮作用中的氨效应	11
2.4 氧气对固氮作用的影响	11
2.5 铵载体	15
2.5.1 铵载体的研究历史	15
2.5.2 铵载体与泌铵机制的研究	15
2.5.3 铵载体基因克隆及其表达调控研究	16
2.6 生物固氮研究中的蛋白质组学	20
2.6.1 自生固氮菌的蛋白质组学	20
2.6.2 豆科植物共生固氮的蛋白质组学	21
第三章 自生固氮菌	25
3.1 自生固氮菌类群	25
3.1.1 化能有机营养固氮菌	25
3.1.2 化能无机营养固氮菌	36
3.1.3 固氮体系	36
3.1.4 固氮微生物常用培养基	39
3.1.5 生物固氮测定方法	41
3.2 固氮菌肥料生产	44
3.2.1 固氮菌肥料的作用机制	44
3.2.2 自生固氮菌的分离	45
3.2.3 固氮芽孢菌的分离筛选、纯化及鉴定	47
3.2.4 固氮菌肥料生产工艺	51
3.2.5 固氮菌肥料施用方法及注意事项	57
第四章 根瘤菌-豆科植物共生固氮	59
4.1 豆科结瘤固氮植物	59
4.1.1 豆科结瘤固氮植物资源	59

4.1.2	结瘤豆科牧草的经济价值	60
4.2	根瘤菌生物学特性	62
4.2.1	根瘤菌的形态特征	62
4.2.2	常见根瘤菌特征	64
4.2.3	根瘤菌的三性	66
4.2.4	根瘤菌生理生化反应	66
4.2.5	黄土高原豆科植物根瘤的固氮活性	68
4.2.6	豆科植物根瘤固氮活性相关性研究	68
4.2.7	高原豆科植物分布的生态环境与固氮活性的关系	70
4.2.8	根瘤菌与豆科植物的共生结构——根瘤	73
4.2.9	根瘤的形成	75
4.2.10	根瘤的固氮功能	80
4.2.11	根瘤的结构	81
4.2.12	影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素	87
4.3	根瘤菌的种类	90
4.3.1	根瘤菌分类研究的历史	91
4.3.2	根瘤菌分类系统的发展	91
4.3.3	根瘤菌种质资源	99
4.3.4	根瘤菌分类研究的方法	117
4.4	共生结瘤固氮的分子基础	118
4.4.1	与共生结瘤相关的基因	118
4.4.2	结瘤基因与结瘤因子	122
4.4.3	根瘤菌表面多糖基因的表达调控	128
4.4.4	<i>nifA</i> 对结瘤的影响	129
4.4.5	植物早期结瘤素基因的表达调控	129
4.4.6	结瘤过程总结	129
4.5	根瘤及根瘤菌的研究技术	130
4.5.1	根瘤样品采集	130
4.5.2	根瘤乙炔还原活性测定	130
4.5.3	根瘤菌分离、纯化	130
4.5.4	根瘤菌电镜观察	134
4.5.5	根瘤菌的回接鉴定	134
4.5.6	根瘤菌的形态观察	136
4.5.7	根瘤菌的生理生化反应	138
4.5.8	根瘤菌的生态条件试验	139
4.5.9	根瘤形态结构观察技术	139
4.5.10	根瘤菌研究实例	140
4.5.11	野生豆科牧草根瘤菌及其固氮活性的研究	149

4.6 根瘤菌肥料的生产	150
4.6.1 根瘤菌肥料生产工艺	150
4.6.2 根瘤菌的应用	156
4.7 木本豆科植物根瘤菌	157
4.7.1 木本豆科植物根瘤菌资源及多样性	157
4.7.2 紫穗槐根瘤菌	162
4.7.3 锦鸡儿根瘤菌	166
4.7.4 接种效果的测定	168
第五章 弗兰克氏菌	169
5.1 概述	169
5.1.1 弗兰克氏菌研究历史	169
5.1.2 中国弗兰克氏菌的研究	170
5.1.3 弗兰克氏菌的分离培养和保藏	171
5.1.4 弗兰克氏菌遗传多样性的研究方法	172
5.1.5 弗兰克氏菌研究的意义	172
5.2 固氮放线菌生物学特性	173
5.2.1 固氮放线菌	173
5.2.2 与固氮放线菌共生的植物	176
5.2.3 放线菌根瘤的形成与结构	176
5.2.4 弗兰克氏菌分子生物学	178
5.2.5 弗兰克氏菌与根瘤菌的比较	179
5.3 非豆科植物根瘤内生菌的分离	180
5.3.1 常用根瘤中放线菌的分离	180
5.3.2 弗兰克氏菌的分离	181
5.3.3 沙棘根瘤菌	182
5.4 弗兰克氏菌的应用	188
5.4.1 弗兰克氏菌在农业生产应用中的现状与前景	188
5.4.2 弗兰克氏菌在农业生产应用中存在的问题	188
第六章 固氮蓝细菌与其他共生固氮体系	189
6.1 陆生固氮蓝藻抗性研究及生态学意义	190
6.1.1 固氮蓝藻的抗性	191
6.1.2 固氮蓝藻的研究方向或热点	192
6.1.3 固氮蓝藻在生物土壤结皮中的意义	193
6.1.4 固氮蓝藻的生态学意义	193
6.2 固氮蓝细菌的生物学特性	194
6.2.1 蓝细菌的形态结构	194
6.2.2 蓝细菌的繁殖方式	196
6.2.3 蓝细菌的生态与分布	196

6.3 蓝细菌的分类	198
6.3.1 色球藻目(Chroococcales)	198
6.3.2 皮果藻目	210
6.3.3 念珠藻目	212
6.3.4 颤藻目	240
6.3.5 宽球藻目(Pleurocapsales)	254
6.3.6 真枝藻目(Stigonematales)	255
6.4 蓝细菌的菌种选育	258
6.4.1 藻种的采集与分离	258
6.4.2 藻种的鉴定	260
6.5 蓝细菌的培养	260
6.5.1 蓝细菌培养基配方	260
6.5.2 固氮蓝细菌的培养	263
6.6 固氮蓝藻在盐碱化土地生态修复中的应用	266
6.6.1 固氮蓝藻的细胞结构和功能	267
6.6.2 固氮蓝藻在盐碱土生态恢复中的应用	267
6.6.3 固氮蓝藻对盐碱土作用的机制研究进展	268
6.6.4 蓝藻生物菌肥的研究与应用	270
6.6.5 固氮蓝细菌应用问题与展望	271
6.7 其他共生固氮体系	271
6.7.1 蓝细菌与苔藓的共生固氮体系	271
6.7.2 蓝细菌与蕨类的共生固氮体系	271
6.7.3 蓝细菌与裸子植物的共生固氮体系	272
6.7.4 蓝细菌与被子植物的共生固氮体系	272
第七章 植物根际联合固氮微生物	273
7.1 根际固氮作用	274
7.1.1 联合固氮菌的特性	274
7.1.2 联合固氮体系的形成	277
7.1.3 联合固氮体系中细菌和植物的相互关系	277
7.1.4 影响联合固氮的因素	278
7.1.5 联合固氮作用在农业中的应用	279
7.1.6 发掘和利用禾本科植物联合固氮菌的潜力和研究方向	279
7.2 植物内生固氮菌	280
7.2.1 内生固氮菌种类	280
7.2.2 内生固氮菌的侵入和定殖	284
7.2.3 内生固氮菌固氮功能在植物体内的表达	286
7.2.4 植物内生固氮菌的生物学和生态学作用	288
7.2.5 内生固氮菌分离方法	289

7.2.6 植物联合固氮菌分子生态学的研究方法和应用	290
7.2.7 内生固氮菌固氮促生效应及应用研究	296
7.2.8 植物内生固氮菌的问题和前景	297
7.2.9 内生固氮菌的研究进展	298
主要参考文献	300
索引	307

第一章 绪 论

生物科学技术是当前最活跃的高新科技之一，在自然生态系统氮循环中发挥着重要作用，已广泛应用于农林牧渔医药及环保等行业，取得了巨大的经济效益、社会效益和生态效益，具有巨大的潜在应用价值和广阔的发展前景。生物固氮遗传工程是生物科技前沿领域之一，是许多国家的重点研究课题，受到联合国教育、科学及文化组织，粮食及农业组织和国际发展计划、环境计划的重点支持，被列为国际农业研究中心的重点课题。

1.1 生物固氮的意义

大气中的氮，必须通过以微生物固氮为主的固氮作用，才能被植物吸收利用。动物直接或间接地以植物为食物，其体内的一部分蛋白质在分解过程中产生的尿素等含氮废物，以及动植物遗体中的含氮物质，被土壤中的微生物分解后形成氨。氨经过土壤中硝化细菌的作用，最终转化成硝酸盐，硝酸盐可以被植物吸收利用。在氧气不足的情况下，土壤中的另一些细菌可以将硝酸盐转化成亚硝酸盐并最终转化成氮气。除了生物固氮以外，生产氮素化肥的工厂及闪电等也可以固氮，但是，同生物固氮相比，它们所固定的氮素数量很少。可见，生物固氮在自然界氮循环中具有十分重要的作用。

1.2 生物固氮研究的简况

1886 年，在第 59 届德国科学家和医生学术讨论会上，德国学者 Hermann Hellriegel 首次提出当大豆生长在缺氮的土壤中时，大豆的根瘤也能使其良好生长，其机制在于其根瘤具有固氮功能。在当时称之为根生杆菌，现在称之为大豆根瘤菌的细菌对豆科植物根部的根瘤形成具有特殊的刺激作用。在根瘤菌内，将大气中的氮还原为能被植物吸收利用的氨，豆科宿主在吸收了这些氨之后又能将其转变为含氮有机化合物，以供自身生长发育之需。人们通过对根瘤菌进行接种培养后，于 1895 年获得了具有很强固氮能力的根瘤菌菌种。添加灭菌草木灰等吸附剂之后，大批根瘤菌被施用到三叶草、豌豆和小扁豆等豆科作物的种植地中以提高其产量。

自 Hellriegel 在 1886 年首次发表了豆科植物的根瘤能固定大气中氮气的研究报告以来，生物固氮的研究，迄今已有一百多年的历史，在中国也有七十多年的历史。在这一百多年中，生物固氮的研究过程可大致分为三个时期。

1. 细胞水平时期

1886~1960 年，在这漫长的历史时期内，生物固氮的研究，是用完整的细胞作为试验材料，因此称为细胞水平时期。在细胞水平上，无法揭示生物固氮的本质。

2. 无细胞水平时期

1960~1966年,是无细胞水平时期。1960年,美国人 Carnahan 等用巴氏梭菌无细胞抽提液加入丙酮酸,成功地进行了将氮还原成氨的试验,从而证明了生物固氮过程中酶的重要作用。这一试验的成功,使从事生物固氮研究的人们受到巨大鼓舞,看到了生物固氮的美好前景。因此,从事这一研究的人越来越多,成果不断涌现出来。如1966年, Dilworth 等发现了 CH_2 是固氮酶的底物,并且创建了一个测定固氮酶活性的新方法——乙炔还原法。这个方法具有快速、灵敏、简便和经济等优点,因此很容易推广。现在,乙炔还原法在固氮酶的分离提纯、固氮酶动力学、固氮酶活性中心、固氮酶的基因转移、共生固氮及固氮菌剂等方面,都起着非常重要的作用。

3. 分子水平时期

1966年至今,是分子水平时期。虽然很早就有人推断了固氮酶可能存在,但直到1970年, Burns 等才从棕色固氮菌的抽提液中得到了较纯的钼铁蛋白制剂。固氮酶的提纯成功,标志着生物固氮研究进入了分子生物学阶段。自20世纪70年代开始,随着固氮生物化学研究的进展,固氮作用的分子遗传学得到了推动。固氮分子遗传学就是研究固氮基因的结构及其合成固氮酶的调节控制作用,从而达到人工控制生物固氮的目的。1972, Dixon 等成功地实现了从肺炎克氏杆菌到大肠杆菌的固氮基因的转移,使大肠杆菌获得了固氮本领。该试验的成功,为固氮基因转移到禾本科作物上展示了美好前景。1975年, Child 和 Scow Croft 等将豇豆根瘤菌转移到非豆科植物的农作物——小麦和烟草上,第一次实现了共生固氮。这一试验的成功,在根瘤菌向非豆科农作物转移的研究史上,揭开了新的一页。

豆科植物-根瘤菌共生关系的建立,由植物和细菌双方的遗传信息所决定。例如,在豌豆植物中已发现21个共生固氮基因和3个结瘤基因参与结瘤过程。近年来,对于结瘤过程的研究,尤其是植物和根瘤菌之间的信号传递的研究取得了巨大进展。人们首先发现植物种子及幼苗的根部分泌出一种称为四羟基黄酮的多环化合物,进而发现根区还分泌一种称为甲氧苯乙烯酮的化合物,这些化合物是植物发出的结瘤信号。根瘤菌接收到这些信号后,便启动本身的结瘤基因并予以表达。在生物固氮研究领域,我国起步较晚。但近年来,我国科学家在生物固氮领域不断传来喜人的消息。

1985年,谢应先等采用聚乙酶融合原生质体的方法,将具有光合固氮能力的一种蓝绿藻——黏球菌引入了烟草、玉米、水稻和小麦白化苗原生质。随后聂延富和陈延伟等用植物生长激素2,4-D引导根瘤菌进入小麦根系并形成了根瘤。单雪琴、荆玉祥对根瘤菌在大麦和水稻上形成的拟瘤进行研究。其结果表明,根瘤菌被宿主细胞来源的膜包围成为类菌体,其形态结构与豆科根瘤细胞相似,有共生形态特征。宋未、颜秋生等将固氮细菌导入水稻原生质体并获得再生植株,在再生植株中,固氮能力达到83.7%,有力地证明了固氮菌可在非豆科植物体内共生固氮。

近几十多年来,固氮微生物的分类、生理生化、共生固氮、遗传及根瘤菌剂的应用等诸方面的研究都取得了很多成果,为进一步研究生物固氮的机制打下了良好的基础。特别是对根瘤菌本身及根瘤菌-豆科植物共生体的研究,为根瘤菌剂应用于生产提供了理论指导。

自然界具有固氮功能的生物种类很多,其中主要有自养固氮生物和异养固氮生物这两大类型。异养固氮生物因宿主植物的差异而被划分为豆科植物共生固氮菌和非豆科植物共生固氮菌。尽管固氮生物多种多样,但在其固氮过程中都需要共同的 *nif* 基因的参与。在共生固氮生物中固氮体系非常复杂,除了 *nif* 基因在固氮过程中起关键性作用之外,其他基因的协同作用也非常重要。

由于根瘤菌具有的特殊功能,大批研究者对其特征特性、对寄主的侵染方式、固氮机制和商业价值等进行了系统的研究。20 世纪 80 年代以来,学者们一方面从分子水平进一步研究根瘤菌在豆科植物上的固氮机制并改造根瘤菌,试图培育出活性更强的根瘤菌;另一方面利用人工诱导方式诱发非豆科作物根部结瘤,试图利用根瘤菌的特殊功能使非豆科作物也能共生固氮,以便减少农田中氮肥的施用量,降低农作物的生产成本。除此之外,在 20 世纪 70 年代末,由于在放线菌中发现了弗兰克氏菌(*Frankia*)与多种非豆科树木能共生结瘤并具有固氮效应,因而在生物固氮研究中又产生了一个新的分支,即以研究弗兰克氏菌的分类、功能、分布和应用前景为主要内容的新领域。从现有的研究成果来看,与豆科植物根瘤菌的固氮体系相比,弗兰克氏菌具有广谱侵染的特性,对建立新的固氮技术体系可能具有更大的意义,应用前景更广阔。

4. 我国生物固氮研究现状

在国内,遗憾的是,自 20 世纪 80 年代以来,我国报刊上一再不符合实际地宣传我国民间“发明家”已解决了生物固氮的大难题,如“非豆科植物人工接瘤固氮成功”和“生物肥料可以代替化学肥料”等,干扰我国生物固氮的基础研究。虽然在“六五”、“七五”、“八五”和“九五”期间的“863”计划中列有生物固氮研究项目,且国家自然科学基金保留了少数研究项目,但资助强度不大,每年由“863”计划和国家自然科学基金资助的经费总共不到 100 万元,还不及美国一个课题的年资助费用;而应用基础研究(如根瘤菌应用技术的研究),因无处申请经费,已基本陷于停顿。“八五”“攀登计划”的“最佳结瘤固氮模式”重大课题,由于立项模糊和组织不当,除化学模拟的研究外,未取得应有成果而被取消。但在困难条件下,很多研究人员还是作出了一些高水平的成果,如:

(1)在我国豆科植物根瘤菌和非豆科树木结瘤弗兰克氏菌的资源调查和分类方面,研究人员已坚持工作 20 多年,逐步摸清了我国豆科植物根瘤菌和非豆科树木结瘤弗兰克氏菌的资源。

(2)在花生、大豆和豆科牧草接种根瘤菌的应用研究方面,做了大量的工作,并取得了明显的经济和社会效益。

(3)在固氮分子遗传学研究方面,我国处于世界先进行列。中科院上海植物生理学研究所固氮分子生物学研究室是国际上著名的实验室,20 世纪 70 年代对固氮基因精细结构的研究就已进入国际先进行列。20 世纪 80 年代在固氮基因正调控基因 *nifA* 研究方面又有突出成果,构建成不受氨调控的组成性表达的 *nifA*,并引入阴沟肠杆菌用于接种水稻,可获增产。进入 20 世纪 90 年代,在苜蓿根瘤菌结瘤基因的表达和调控方面,发现结瘤基因 *nodD3* 的表达不受植物类黄酮物质的启动,为扩大宿主范围的研究提供了依据。

(4)有关固氮酶催化机理和化学模拟研究。我国学者于 20 世纪 80 年代初,证明在有

D₂无 N₂的条件下,固氮酶不能催化 HD 形成,对国外学者发表的不依赖 N₂也可形成 HD 的观点提出异议。20 世纪 90 年代初,论证了在生理条件下固氮酶每还原 1molN₂所放出 H₂的摩尔数不是 1,不符合通常的生物固氮化学反应计量式,因而提出了固氮酶双位点放 H₂的假说。

(5)陈文新,汪恩涛出版了《中国根瘤菌》(2011 年)。以豆科植物根瘤菌为重点,收集了根瘤菌资源,逐步摸清了我国豆科植物的根瘤菌资源,建立了最大的数据库,进行了系统分类,发现了一些新属、新种,修正和发展了国际上对根瘤菌的分类。

此外,中国学者发现了固氮基因,证实了克氏杆菌固氮基因操纵子的连锁性及正调控基因的调节机制和对氧、温度的敏感性;发现苜蓿根瘤菌的碳利用基因和固氮生物氮代谢和碳代谢基因表达及其调节的偶联作用;化学合成了根瘤菌的结瘤因子;在固氮基因表达调节基础上,构建了固氮基因工程菌株,并在生产中得到应用;提出了化学模拟固氮酶的结构和功能,固氮酶活性中心的模型和合成了模型化合物,受到了国际高度评价。根据国际上研究的趋势并结合国内的研究进展,提出了生物固氮研究的发展方向,建议在联合(内生)固氮菌固氮基因调控及其提供氮素的作用,根瘤菌与豆科植物共生结瘤固氮的信号传递和分子相互作用,氮、碳代谢和固氮与光合作用的偶联与共生结瘤固氮中功能基因组学等方面展开积极研究。

可以看出,目前国内的研究集中以根瘤为研究对象,展开了一系列研究。但是我国目前生物固氮基础研究仍处于困境,队伍老化,青年科技人员外流,这样下去不能不令人担忧这个全世界都在关注的重大研究课题,因此,卢嘉锡、蔡启瑞等多位院士提出加强生物固氮基础研究的建议。

1.3 生物固氮发展方向

生物固氮已成为一项世界性的战略课题。许多国家的科学家都在运用现代生物技术从事固氮菌的固氮机制和转移微生物固氮能力等方面的研究,探索禾本科和其他作物、树木等的固氮技术,展现生物固氮的前景。

1. 改进现有固氮微生物的固氮效率

改变固氮酶作用中的放氢耗能反应。由于固氮作用要消耗一定的能量,即消耗了植物光合作用的产物,因此可以设想,应用基因工程手段,组建能氧化氢分子的菌株,使释放的能量再用于固氮酶的固氮作用。培养耐铵菌株,解除 NH₄⁺抑制固氮酶合成,使固氮菌在含有化合铵的环境中能结瘤固氮。

2. 利用生物工程技术,构建新的固氮微生物

原核生物间基因的水平转移是比较容易的,肺炎克氏杆菌的固氮基因转入同属或近缘属的不固氮种中是可能的。应用质粒转移培育高效固氮的根际细菌群,开辟根际细菌转入固氮质粒的研究,广辟作物根际联合固氮的新资源。

3. 建立新的共生固氮体系

共生固氮体系是生物界中最有效的固氮组合。固氮作用所需要的能量来自宿主植物的光合作用,固氮产物直接为宿主提供氮素营养,共生的两方面相互有利,相互支持。

但是,对农、林和牧业生产有价值的共生固氮体系,在自然界中仅限于少数微生物与有限的豆科植物之间。研究扩大根瘤菌的共生范围,使其能在一些不结瘤的豆科种类或其他有用植物上结瘤固氮,或将固氮基因导入高等植物细胞,研究能固氮的高等植物,自给氮素营养的植物类型是非常有意义的。

总之,生物固氮研究目前所面临的提高固氮效率、构建新的固氮物种及根瘤菌向非豆科植物扩建共生固氮体系等问题,最终目的是使农、林和牧业等植物能自动向大气摄取氮素养料,但这里面尚有很复杂的机制需要深入地探索。

第二章 生物固氮的基本原理

2.1 固氮酶及其作用的基本条件

生物固氮是固氮微生物特有的一种生理功能,这种功能是在固氮酶的催化作用下实现的。固氮酶一种能够将分子氮还原成氨的酶。固氮酶由两种蛋白质组成:一种含有铁,叫做铁蛋白,另一种含有铁和钼,叫做钼铁蛋白。只有铁蛋白和钼铁蛋白同时存在,固氮酶才具有固氮的作用。生物固氮过程可以用下面的反应式概括表示:



从上面的反应式可以看出,分子氮的还原过程是在固氮酶的催化作用下进行的。有三点需要说明:第一,ATP一定要与镁(Mg)结合,形成Mg-ATP复合物后才能起作用;第二,固氮酶具有底物多样性的特点,除了能够催化 N_2 还原成 NH_3 以外,还能催化乙炔还原成乙烯(固氮酶催化乙炔还原成乙烯的化学反应,常被科学家用来测定固氮酶的活性)等;第三,生物固氮过程中实际上还需要黄素氧还蛋白或铁氧还蛋白参与,这两种物质作为电子载体能够起到传递电子的作用。

铁蛋白与Mg-ATP结合以后,被黄素氧还蛋白或铁氧还蛋白还原,并与钼铁蛋白暂时结合以传递电子。铁蛋白每传递一个电子给钼铁蛋白,同时伴随有两个Mg-ATP的水解。在这一催化反应中,铁蛋白反复氧化和还原,只有这样, e^- 和 H^+ 才能依次通过铁蛋白和钼铁蛋白,最终传递给 N_2 和乙炔,使它们分别还原成 NH_3 和乙烯。

对固氮酶催化作用的机制,虽然现在还不完全了解,但对它作用所需的基本条件已经有了较完整的知识。这些条件如下:①固氮酶将 N_2 还原为 NH_3 ,需要能量和电子供体以及传递电子的电子载体;②固氮酶对氧敏感,只能在氧压很低(0.04%大气压)或无氧条件下进行;③环境中现成的氨或固氮酶固定的氨如不及时转化,超过一定浓度,对固氮作用起抑制效应。固氮是还原分子氮的过程,所以需要消耗大量的能量和还原力。固氮所需要的能量是以ATP的形式供应的。固定1mol分子氮需耗费18~24mol的ATP。还原力(H)以还原型吡啶核苷酸 $[\text{NAD(P)H} + \text{H}^+]$ 或者铁氧还蛋白($\text{Fd} \cdot 2\text{H}$)的形式提供。能量与还原力由有氧呼吸、无氧呼吸、发酵或光合作用提供。还原分子氮成为氨的作用由双组分固氮酶(DinitroRenase)复合体催化。A组分I为固氮酶,组分II为固氮酶还原酶,组分II含有铁,组分I还含有钼,所以组分I为钼蛋白,组分II为铁蛋白。

固氮酶由钼铁蛋白(Mo-Fe protein)和铁蛋白(Fe-protein)组成。这两种蛋白质单独存在时都不呈现固氮酶活性,只有两者聚合构成复合体时才有催化氮还原的功能。铁钼蛋白为由分子质量分别为51kDa和60kDa的2个 α 亚基和2个 β 亚基组成的四聚体($\alpha_2\beta_2$),分子质量为220~245kDa。每分子铁钼蛋白含有2个钼原子,28个铁原子。铁蛋白的分