

曾 定 编 著

固氮生物学

厦 门 大 学 出 版 社

固氮生物学

曾定编著

厦门大学出版社

1987·5

固氮生物学

曾定 著

厦门大学出版社出版
福建省新华书店发行
三明市印刷厂印刷

开本850×1168 1/32 印张16 381千字
1987年5月第1版 1987年5月第1次印刷
印数 1—2500册
ISBN 7—5615—0013—0 书号: 13407·006
Q·1 定价: 3.20元

内 容 简 介

这是一本介绍生物固氮的专著。全书分九章，包括固氮生化、生理、遗传、主要的自生和共生固氮生物、起源与演化、化学模拟、氮素循环及生物固氮与农业生产等部分。内容较丰富，材料较系统，注意反映生物固氮的研究进展与水平，也适当介绍必要的基本知识和有关资料。适于大专院校生物学系和农林院校师生，以及从事生物固氮、生物技术、农林、化学等研究和生产部门的科技工作者参考。

序 言

氮素是构成蛋白质、核酸生命大分子的基本元素，是农业生产中的首要肥料。近代由于世界人口剧增、消费水平不断上升、高蛋白食物比例加大、对农业提出的要求日高，氮肥的供应已成限制农业发展的重要因素之一。

氮气虽占大气的绝大部分，高达79%，但因 $N \equiv N$ 键合十分牢固，一般生物无法直接利用。生物固氮和氮肥的工业生产是化氮为氨、变惰性气体为生物所可利用的活性物的法门。工业制造氮肥固有集中生产之优点，但须耗费大量能源，只能在高温高压下进行；而生物固氮则能借助于固氮酶系，在常温常压下遍地开花，约占全球固氮量的75%左右。因此生物固氮的进一步扩大利用和提高效率，是解决农业生产中氮肥供应的理想和有效的办法；而且生物固氮机理的阐明和条件的掌握，又可为改进合成氨生产提供重要的信息，有可能使化肥工业和农业生产的面貌完全改观。

生物固氮内容至为丰富，其中涉及多样的生物类群、各异的生活和固氮方式、不同的固氮效率、独特的作用条件、微妙的反应机理；它与生物学、农业生物学、生物化学、遗传学、催化科学、化学仿生和生物工程等学科或领域有着密切的联系和交叉。生物固氮深入研究所取得的进展和成就，不仅有助于认识氮素固定的本质，也必将带动这些学科的进一步发展，具有重大的学术意义。

因此，近廿多年来世界各国政府和科学工作者都十分重视固氮的研究，已取得不少重大成果，进展十分迅速。当前，生物固氮已成为生物科学和农业科学中仅次于光合作用的重要研究领域。

鉴于国内尚未出版生物固氮的专著，我们特收集有关资料编写此书，供生物固氮科学研究和教学需用。编写时力求反映国内外当前的研究进展和水平，着重介绍近几届国际固氮学术会议及新近期刊的有关内容，同时也适当介绍必要的基本知识和资料。本书第九章由丁马太同志执笔。在全书编写过程中，承蒙李季伦、蔡启瑞、黄厚哲、翁绳周诸教授提出宝贵意见，并得到校内诸多同事的协助，在此谨表谢忱。

由于编者水平有限，书中不足或错误之处，敬请读者和专家们批评指正。

曾 定

1986年10月于厦门大学

目 录

第一章 导论	(1)
一、氮素的生物学观.....	(1)
氮素存在形式及其转化 (1), 氮素循环 (6)	
二、固氮生物学概观.....	(10)
农业生产与生物固氮 (10), 固氮生物 (12),	
生物固氮作用 (13)	
三、生物固氮研究的历史、现状和展望.....	(14)
第二章 自生固氮细菌	(24)
一、自生固氮细菌的种类.....	(24)
二、自生固氮细菌的类型.....	(39)
化能营养的固氮细菌 (40), 光能营养的固氮细菌 (41)	
三、自生固氮细菌的生理、生态.....	(43)
碳素营养 (43), 氮素营养 (45), 氧 (48), 其他气体	
(50), 无机盐 (51), 渗透压及离子强度 (54)	
四、固氮细菌与其他生物的联合生活.....	(55)
微生物之间的联生 (55), 叶际联生及叶瘤 (56), 根际	
联生 (57), 与动物的联生 (59)	
第三章 固氮蓝藻	(64)
一、固氮蓝藻的种类.....	(64)
二、固氮蓝藻的形态结构.....	(65)
构造特点 (65), 异形胞 (75)	
三、固氮蓝藻的生理.....	(80)
进行固氮作用的细胞 (80), 异形胞的光反应及光合链 (80),	

糖代谢 (82), 固氮还原力的生成 (84), 防卫 O_2 对固氮酶的为害 (87), 氢代谢 (88), 氮代谢 (91)	
四、固氮蓝藻的生态	(94)
分布 (94), 温度 (95), 光 (95), 水分 (96), 酸度 (96), 氧还条件 (97), 无机离子 (98), 培养 (99)	
五、固氮蓝藻与其他生物的联合生活	(100)
与藻菌的共生 (100), 与苔藓植物的共生 (103), 与蕨类植物的共生 (104), 与种子植物的共生 (108)	
第四章 共生固氮	(117)
一、豆科植物的共生固氮	(117)
共生固氮的豆科植物 (117), 共生固氮量 (125), 根瘤菌 (127), 根瘤的形成 (148)	
二、豆科共生固氮的生理生态	(164)
根瘤的基础代谢 (165), 根瘤的固氮反应 (172)	
三、非豆科植物的共生固氮	(182)
共生固氮的非豆科植物 (183), 弗兰克氏菌 (189), 放线菌根瘤的发育和形态结构 (192), 放线菌根瘤的生理生化 (199), 非豆科植物的共生根瘤菌 (202)	
第五章 固氮酶	(213)
一、固氮酶的分子结构	(215)
亚基组成和分子量 (215), 金属原子簇 (225)	
二、固氮酶的理化特性	(234)
紫外及可见吸收光谱 (234), 圆二色性谱 (237), 电子顺磁共振谱 (241), Mössbauer 谱 (247), 扩展X-射线吸收精细结构谱 (258), 结合腺苷酸化合物 (260), 氧还特性 (266)	
三、固氮酶的催化性能	(275)
固氮酶系的稳定性 (275), 酶组分的交叉组合 (277), 固氮酶的底物及抑制剂 (279)	

四、固氮酶的催化反应	(289)
固氮酶催化的反应历程 (289), 固氮成氮的研究 (296)	
附: 第二套固氮酶系统	(310)
五、固氮酶的分离提纯及活性测定	(311)
固氮酶及其组分的分离提纯 (311), 固氮酶活性的测定 (313)	
第六章 固氮生理	(335)
一、固氮作用的还原力和电子传递系统	(335)
固氮作用的还原力来源 (335), 电子载体 (338), 电子传递系统 (346)	
二、防氧保护及对氧的调控	(350)
呼吸保护 (350), 构型保护 (352), 隔离保护 (353), 其他方式的保护 (354), 豆血红蛋白 (354), 细胞色素P450 (358)	
三、氢代谢及其与固氮的关系	(358)
固氮生物中与氢代谢有关的酶 (359), 放氢代谢 (366), 吸氢代谢 (367), 氢酶与固氮 (369)	
四、氮和氨的同化代谢	(370)
同化代谢的途径 (371), 同化代谢的调控 (374)	
五、钼代谢	(377)
钼的摄取 (378), 钼的贮存 (380), 钼辅因子 (382), 钨与钼 (384)	
六、固氮作用的生理调控	(385)
固氮酶活性的调控 (385), 固氮酶合成的调控 (392)	
第七章 固氮遗传	(405)
一、肺炎克氏杆菌的固氮遗传	(406)
固氮基因簇的位置 (406), <i>nif</i> 质粒 (407), <i>nif</i> 基因的组成与结构 (409), <i>nif</i> 基因的产物与功能 (411), <i>nif</i> 基因表达的调控 (416)	
二、其他自生菌的固氮遗传	(419)
固氮菌 (419), 红假单胞菌 (421), 蓝藻 (422), 其他	

固氮微生物 (424)	
三、根瘤菌的固氮遗传	(426)
根瘤菌共生固氮遗传概观 (427), 几种根瘤菌的固氮遗传 (430)	
四、豆科植物的固氮遗传	(435)
结瘤的遗传 (436), 豆血红蛋白遗传 (437)	
五、通过 <i>nif</i> 基因转移而组建的固氮生物	(440)
有固氮表达力的新菌株 (440), 无固氮表达力的菌株 (442)	
第八章 固氮生物的起源与演化	(454)
一、起源	(454)
二、演化和分布	(460)
固氮生物的演化 (461), 固氮酶基因的种间传播 (461), 固氮生物的分布及进化路线 (462)	
三、与固氮有关的其他特性的演化	(463)
第九章 化学模拟生物固氮	(468)
一、化学模拟生物固氮的探索	(468)
化学模拟生物固氮的意义 (468), 分子氮的结构特点 (469), 分子氮络合物的启示 (471)	
二、固氮酶活性中心模型	(478)
单核活性中心模型 (479), 双核活性中心模型 (480), 原子簇多核活性中心模型 (481), 钼铁硫原子簇活性中心模型化合物 (495)	

第一章 导 论

一、氮素的生物学观

有机氮化物的生成是生命发生的先声，氨态氮的生物转化是生物界繁荣的基础。氮素演变在生物学上具有决定性的意义。

(一) 氮素存在形式及其转化

氮素(N)是地球表面较常见的轻元素之一。它的原子序数是7，位于元素周期表中的第五族。氮的地位使它可以有从-3到+5结合价的一系列化合物，例如 NH_3 、 N_2H_2 、 N_2 、 N_2O 、 NO 、 N_2O_2 、 NO_2^- 、 NO_3^- 等等。

氮气与生物氮化合物

氮气(N_2)是有名的“惰性”气体。顽强惰性起因于结合两个氮原子的叁键具有特高的稳定性，要打开这三键中的第一个键，每克分子需要125千卡的能量，约为其它三键化合物实现同样过程所需能量的两倍。自由氮气即使经受 3000°C 的高温也几乎不会离解；仅有少数活性极高的化学试剂，诸如金属锂或高热的镁才能与之化合。

但是在地球生成的初期，在**高能激荡的条件下，却生成并留下了相当数量的 NH_3 ，以及 CO 、 CO_2 、 H_2O 、 N_2 等成分在地表。在漫长的太古代，它们经过无数次的相互作用，逐渐形成了碳氧、碳氢、碳氮等介乎无机和有机的“初生物”，并进一步产生出小分子的有机物，其中含碳—碳骨架的醇、酸和含有机氮的

氨基酸、叶啉、嘌呤、嘧啶碱基的出现，在生命发生的历史上具有重大的意义。

以蛋白质和核酸两类大分子为主的有机整合，构成了今日地球上生命的物质基础。氨基酸是蛋白质的构成单元和核碱基的前体。初生的氨基酸具有两个发展的可能：第一， α -碳可连接多种残基，发展成为多样化分子；第二，在碳-碳键之外有碳-氮键，可以成肽，有发展为立体构型大分子骨架的潜力。这是生命多样性和多变性的分子基础之一，其基本关键在于主骨架中氮的

插入和肽键 $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \diagup \text{C} \diagdown \text{N} \diagup \\ | \\ \text{H} \end{array} \right)$ 的出现。

五彩缤纷的生物界是开放性的物质系统。这个大系统与周围不断进行着物质交换与能量交流。有生界与无生界的物质交换表现为半密闭的循环方式，能量交流大体上表现为有滞留的泻流方式。

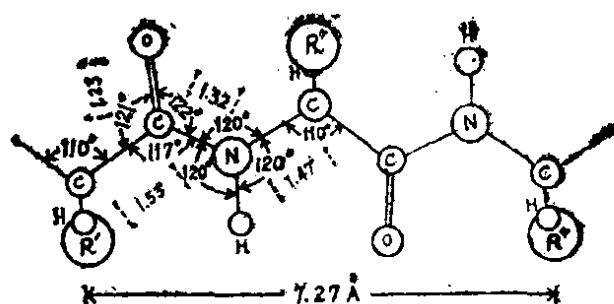


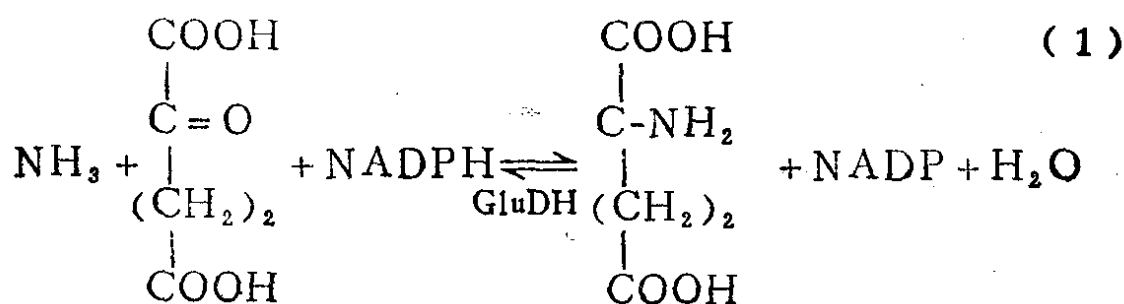
图 1—1 伸展的肽键的一段，示肽键

有生界在大自然中的半密闭物质循环有个输入端。光能自养生物的光合作用是能量输入和碳素循环的输入端，其输入的物质是二氧化碳。大自然中海洋是二氧化碳（ HCO_3^- ）的大仓库，它维持气围中的二氧化碳水平。空气中和水中的二氧化碳含量虽低（0.3%），但光合反应却能有效地利用。碳素循环结合着氢、氧的循环，同时带动了氮素循环，以及硫、磷等元素的循环。有生界在大自然中的物质循环是多方面的、异质的，其中碳、氮输入是基本的环节，因为生命大分子以碳、氮二素为主骨架。

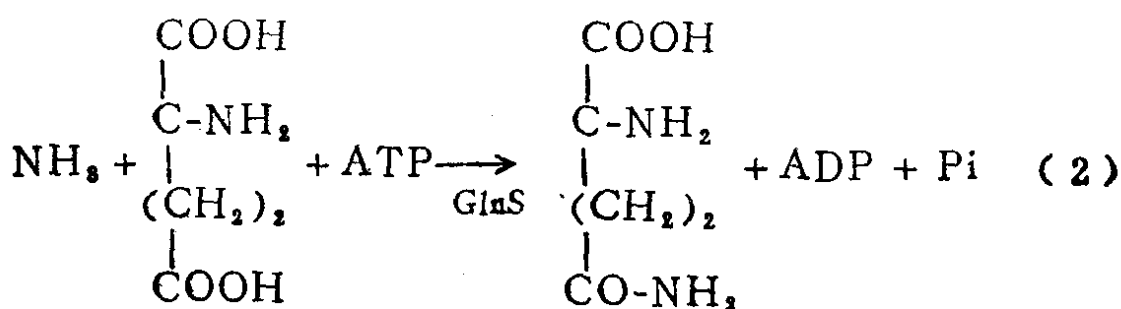
有生界的氮素输入存在着奇特的现象。大自然虽含极大量的氮气，但是它不能作为一般生物的氮源；地球水圈和土壤中含有相当量的硝态氮，但它绝大部分分散在浩瀚的海洋之中，有生界难于有效利用。有生界的氮素输入最主要的物质形式却是大自然中含量极低的氨（铵离子）。氨态氮的供应成为有生界生息繁荣的决定环节之一。植物和少数微生物虽能利用硝态氮为氮源，但不占主要地位；植物吸收的硝态氮，在体内也需还原为氨态氮。由于氨态氮的高水溶性和微碱活性，大地上除了存量极微的矾土之外，并无铵盐储备。有生界所需之氨无法仰赖无生自然界提供，只能依靠生物界自筹自给。其中，绝对来源便是本书所要论述的固氮（分子氮）为氨。

生物的氨态氮

氨态氮进入生物体主要通过 α -酮戊二酸的加氨反应，或谷氨酸加氨成谷氨酰胺，这是无机氨进入有生界的共同关口。



氨 α -酮戊二酸 还原型辅酶Ⅱ 谷氨酸 氧化型辅酶Ⅱ 水



氨 谷氨酸 三磷酸腺苷 谷氨酰胺 二磷酸腺苷 无机磷酸

反应(1)是由谷氨酸脱氢酶 (GluDH) 催化的, 反应在氮较丰富的情况下进行。合成的谷氨酸可以通过酶促的转氨基反应, 将氨基转移到其他羧酸生成相应的氨基酸。反应(2)由谷氨酰胺合成酶 (GlnS) 催化; 该酶还可以和谷氨酸合成酶 (谷氨酰胺- α -酮戊二酸转氨酶, GOGAT) 联合, 将游离氮转变为谷氨酸的 α -氨基:



谷氨酰胺 + α -酮戊二酸 + NADPH $\xrightarrow{\text{GOGAT}}$ 2 谷氨酸 + NADP
这一联合反应利用氮的效率高, 但要消耗 ATP, 一般在供氮不充裕的情况下进行。

因此, 谷氨酸是氨态氮转化为有机氮的转运总枢纽。氨态氮可以结合成为其 α -氨基, 也可以再结合成为其 γ -酰胺的氨基(酰胺基); 然后通过氨基转换等作用生成多种氨基酸, 或进而为体内其他含氮有机物提供氮源。

生物界的氮转化

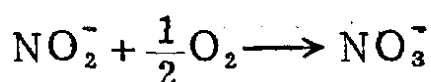
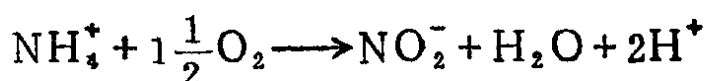
在生物界三大类群中, 动物是消费者。它只能利用植物或微生物合成的有机氮化物, 是生物界内部已有的高级有机氮的转换者、局部降解者和低效率的保存者。

植物界是生产者, 它对有生界的贡献是积极的、大量的。它能利用无机氮(硝态氮和氨态氮), 其功绩在于能将无机氮转化为有机氮化物, 将有机酸升价为氨基酸; 但它也不能利用分子氮。

微生物界是杂合的界, 营养方式极为多样。其中包含大量的氨态氮的消费者、较少数的转换者、和一部分的生产者——固氮微生物。在含氮物质转换中, 主要有以下几种作用方式。

1) 硝化作用 氨氧化为硝态氮的过程称为硝化作用(nitrification), 反应分二阶段进行, 先氧化为亚硝酸, 再氧化

成硝酸。



亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas*) 等亚硝化细菌, 能利用铵盐并将之转变为亚硝酸; 硝化杆菌 (*Nitrobacter*) 等硝化细菌, 能将亚硝酸盐氧化成硝酸。这两类细菌经常生活在一起, 共同完成从氨到硝酸的硝化作用。反应在有氧时进行。在自然界中它们能将其其他土壤微生物分解含氮有机物产生的氨, 转变成硝酸; 虽可供植物利用, 也易从土壤中流失。

2) 反硝化作用 将 NO_3^- 转变成 N_2 的作用, 也称脱氮作用 (denitrification), 一般分二阶段进行, 先由硝酸盐转变为亚硝酸盐, 再由亚硝酸盐转变为分子氮; 在最后一阶段反应中, 也可能有中间产物氧化亚氮, 或还原态的氮生成, 视微生物种类或反应条件不同而定。色杆菌 (*Chromobacterium*)、微球菌 (*Micrococcus*) 等许多种类的细菌均能进行上述反应。它们都是兼性厌氧菌, 在缺氧和有氧条件下反硝化作用均可进行, 这是土壤中氮肥损失的主要原因之一。

3) 氨化作用 含氮有机物经酶分解产生氨的作用称为氨化作用 (ammonification)。这些含氮有机物主要是蛋白质、核酸、以及尿素、尿酸、几丁质等等。蛋白质的氨化作用包括蛋白质水解成氨基酸和氨基酸脱氨两个主要过程。自然界中许多微生物都有氨化的能力, 腐败螺菌 (*Saprospira*)、芽孢杆菌 (*Bacillus putrificus*)、康氏木霉 (*Trichoderma koningii*) 等分解蛋白质的氨化能力尤强。氨化作用在清除地球上的生物尸体, 维持氮素循环的正常进行, 有着重要的意义。

4) 固氮作用 将大气中的分子氮转变为氨的作用称为固氮

作用 (nitrogen fixation)*。当今生物界中只有少数原核生物有固氮能力。根瘤菌 (*Rhizobium*)、固氮菌 (*Azotobacter*) 等是常见的固氮生物。固氮作用是本书将要详细介绍的内容, 这里不赘述。

(二) 氮素循环

氮素分布

地球上氮素的分布情况如表 1—1 所示。其中陆地—水体的氮素含量, 在陆地土壤中有 3.3×10^{11} 吨 (此量约为大气中的氮量的万分之一), 海洋中可溶的及悬浮物的约 1×10^{12} 吨 (比陆地多 3 倍), 生物界约含 1×10^{10} 吨 (相当于大气氮的 40 万分之一) [2]。虽然地球上的氮素绝大部分存在于原始岩层、沉积岩和深海沉积物中, 它们极少流动转换, 而陆地—水体和大气中的氮素, 则以多种形式、连续不断地循环变动 (图 1—2)。

表 1—1 地球上氮素的分布 [1]

存在部分	含量 (吨)	占 %	主要存在形式
原始岩层	193×10^{15}	97.8	N_2
沉积岩	0.4×10^{15}	0.2	无机氮化物
深海沉积物	0.54×10^{12}		有机氮化物
陆地—水体	24×10^{12}		各种形式的氮
大气	3.9×10^{15}	2	N_2 及微量 N_2O 、 NO 、 NO_2 、 NH_3 等

* 严格说应称为固分子氮作用 (dinitrogen fixation), 但习惯上常简称为固氮作用。

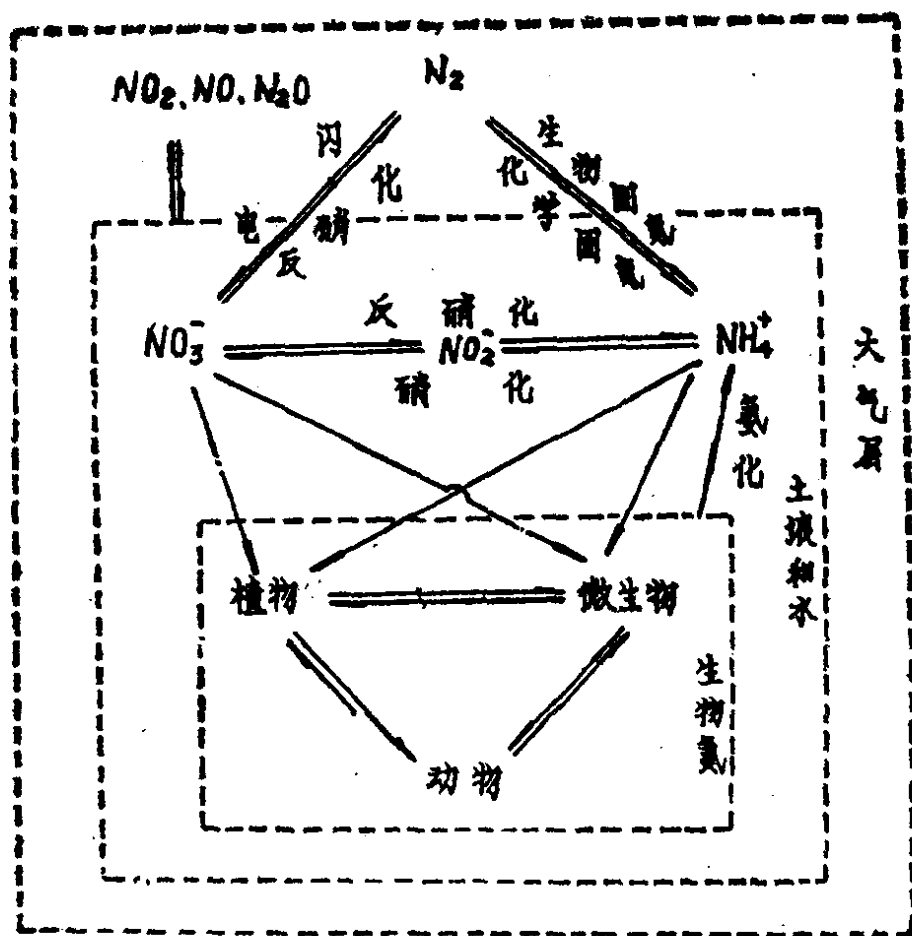


图 1—2 氮素循环示意图