



固氮生物生物学

GUDAN SHENGWU SHENGWUXUE

主编 汤 晖 燕 红 肖翠红 李玉梅

东北林业大学出版社

固氮生物生物学

主编 汤 晖 燕 红 肖翠红 李玉梅

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

固氮生物生物学/汤晖等主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2009. 6
ISBN 978-7-81131-461-8

I. 固… II. 汤… III. 固氮微生物—研究 IV. Q939

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 093315 号

责任编辑: 郑国光

封面设计: 彭 宇



NEFUP

固氮生物生物学

Gudan Shengwu Shengwuxue

主编 汤 晖 燕 红 肖翠红 李玉梅

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

哈尔滨天兴速达印务有限责任公司印装

开本 787 × 960 1/16 印张 22.25 字数 391 千字

2009 年 6 月第 1 版 2009 年 6 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 978-7-81131-461-8

定价: 36.00 元

《固氮生物生物学》编委会

主 编 汤 晖 燕 红 肖翠红 李玉梅

副 主 编 王根林 于彩莲 高亚梅

编写人员 (按姓氏笔画排序)

于彩莲 (哈尔滨理工大学)

王根林 (黑龙江省农业科学院)

丛 华 (哈尔滨工业大学)

李玉梅 (黑龙江省农业科学院)

汤 晖 (河北大学)

刘晓云 (河北大学)

谷春涛 (东北农业大学)

肖翠红 (黑龙江八一农垦大学)

高亚梅 (黑龙江八一农垦大学)

燕 红 (哈尔滨理工大学)

前 言

近年来生物固氮越来越受到人们的关注,因为氮是农作物生长的主要营养元素,又是蛋白质主要的组成成分。空气中含有的80%的氮,只有通过生物固氮后才能被吸收和利用。生物固氮研究涉及面较广,包括微生物学、农学、化学、生物化学、遗传学、细胞学和分子生物学等领域,而且各个领域又有交叉。为了适应生物固氮研究的快速发展,充分反映生物固氮学新的研究技术和成果,特别是分子生物技术在生物固氮中的广泛应用所引起的许多新的突破,我们汇集了长期从事教学实践和科学研究的工作者,并参考国内外有关书籍及该领域的最新进展,编写了这部《固氮生物生物学》。

全书共分8章。导论和第四章由黑龙江八一农垦大学高亚梅编写;第一章第一节由哈尔滨工业大学丛华编写,第二节由哈尔滨理工大学于彩莲编写;第二章由于彩莲编写;第三章、第八章由黑龙江八一农垦大学肖翠红编写;第五章由东北农业大学谷春涛编写;第六章的第一、二、三节由哈尔滨理工大学燕红编写,第四节由高亚梅编写,第五、六、七、八节由丛华编写;第七章由丛华编写。本书在内容编排上分为三大部分,第一部分包括第1章至第3章,主要是对固氮微生物的分类阐述;第二部分包括第4章至第7章,主要介绍生物固氮的机理;第三部分为第8章,主要是对生物固氮相关实验的说明和总结。

本书可作为生物工程、生物技术、生物专业的高年级本科生和研究生的教材或教学参考书,也可供环境科学、农业资源与环境、农学等相关专业的师生参考。

由于编写者水平所限,书中可能出现错误和遗漏,敬请广大读者批评指正。

编 者
2009.4

目 录

0 导 论	(1)
0.1 氮素循环	(1)
0.2 生物固氮	(3)
0.3 固氮生物	(5)
0.4 生物固氮研究的历史、现状和展望	(7)
1 自生固氮	(15)
1.1 自生固氮细菌概述	(15)
1.2 自生固氮细菌的生理生态	(26)
1.3 固氮细菌与其他生物的联合共生	(34)
2 共生固氮	(38)
2.1 豆科植物的共生固氮	(38)
2.2 豆科固氮的生理生态	(52)
2.3 非豆科植物的共生固氮	(61)
2.4 影响共生固氮体系的环境因素	(78)
3 蓝细菌	(81)
3.1 蓝细菌的生态、分布与形态特征	(81)
3.2 固氮蓝细菌的细胞结构	(88)
3.3 蓝细菌的培养与应用	(91)
3.4 固氮菌肥料	(93)
3.5 生物固氮与农业可持续发展	(96)
4 固氮生理	(99)
4.1 固氮的生化过程	(99)
4.2 固氮微生物的防氧保护	(117)
4.3 固氮过程的 H_2 代谢	(125)
4.4 钼代谢	(131)
4.5 固氮产物氨的同化	(133)
5 固氮遗传	(138)
5.1 根瘤菌共生固氮基因的结构、功能与调节	(138)
5.2 豆科植物中参与共生固氮的基因	(165)

2 固氮生物生物学

5.3 联合固氮相关基因的结构功能与表达调控	(172)
6 固氮酶	(194)
6.1 固氮酶的结构	(194)
6.2 固氮酶的理化特性	(205)
6.3 固氮酶促反应和催化作用机制	(236)
6.4 固氮酶的活性调节	(253)
6.5 固氮酶的多样性	(257)
6.6 固氮酶的分子生物学	(263)
6.7 固氮酶的晶体学	(267)
6.8 固氮酶的分离提纯及活性测定	(275)
7 化学模拟生物固氮	(283)
7.1 化学模拟生物固氮的探索	(283)
7.2 固氮酶活性中心模型	(291)
8 生物固氮作用的测定	(303)
8.1 土壤中氮的测定	(303)
8.2 土壤生物量氮测定	(323)
8.3 土壤中氮素循环相关酶活性的测定	(331)
参考文献	(343)

0 导 论

0.1 氮素循环

氮素是构成生物体的必需元素，氮素在自然界有多种存在形式，包括分子态氮、硝酸、氨化合物、蛋白质和核酸，数量最大的是大气中的氮气，占大气体积的 79%，总量约 3.9×10^{15} 亿 t。但绝大多数生物无法直接利用。只有当游离氮被“固定”成为含氮化合物后，才能被这些生物吸收利用，氮成为活细胞的一部分并进入生态系统中的食物链。目前，陆地上生物活体中贮存的有机氮总量为 110 ~ 140 亿 t，这部分氮的数量虽不算大，但它在迅速再循环中，可反复供植物利用。存在于土壤中的有机氮估计为 3 000 亿 t，逐年分解为无机氮供植物利用。海洋中可溶的及悬浮物中的氮，约 2×10^{12} t（比陆地多 3 倍），被海洋生物循环利用。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，极少流动转换，但陆地、水体和大气中的氮素，却以多种形式、连续不断地循环变动。自然界的氮及氮素化合物在生物作用下的一系列相互转化过程称为氮素循环（nitrogen cycle），如图 0-1 所示。氮素循环是生态系统物质循环的重要组成部分。

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，它能利用无机氮（硝态氮和氨态氮），能将无机氮转化为有机氮化物，将有机酸转变为氨基酸，但不能利用分子氮。

微生物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，主要有下列几种作用方式。

0.1.1 硝化作用

氨氧化为硝态氮的过程称为硝化作用（nitrification），反应分两阶段进行，先氧化为亚硝酸，再氧化成硝酸。

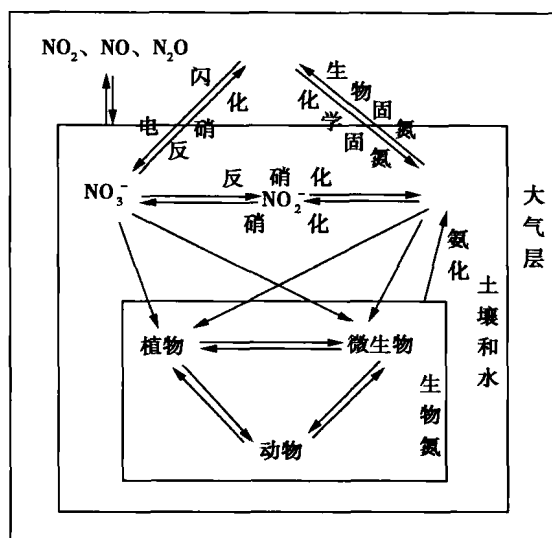
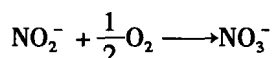
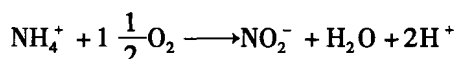


图 0-1 氮素循环图



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。其反应在有氧时进行。在自然界中它们能将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。

0.1.2 反硝化作用

将 NO_3^- 转变成 N_2 的作用，也称脱氮作用（denitrification）。一般分两阶段进行，先由硝酸盐转变为亚硝酸盐，再由亚硝酸盐转变为分子氮；在后一阶段反应中，也可能有中间产物氧化亚氮，或还原态的氨生成，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。

0.1.3 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、尿素、尿酸以及几丁质等。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 koninigli*) 等分解蛋白质的氨化能力尤强。氨化作用对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。

0.1.4 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。

0.2 生物固氮

氮的两个原子以 3 键结合,每克分子氮需 160kcal ($1\text{cal} = 4.2\text{J}$) 能量才能将两个原子分开。能提供能量进行氮固定的途径有以下几种。

0.2.1 生物固氮

自然界存在多种固氮微生物,它们利用化学能或光能将氮还原为氨。这是地球上固定氮的重要途径。

0.2.2 工业固氮

用高温 ($500\text{ }^{\circ}\text{C}$)、高压 ($20\,000 \sim 30\,000\text{ kPa}$)、化学催化的方法,将氮固定为氨。

0.2.3 高能固氮

高空放电瞬间产生的高能,使空气中的氮与水中的氢或氧结合,产生氨或硝酸,由雨水带至地表。

增加氮肥的产量与更好地利用和提高生物固氮能力,是为农业提供氮肥的两条重要途径。当今世界各国对于后一途径给予更高的重视,这是因为生物固氮具有以下相对的优点。

0.2.3.1 经济

化学合成氮肥 (Haber - Bosch 法) 除了需要大量的设备投资外, 生产时尚需耗费巨额能量 (主要靠燃料)。据估计, 每生产 1 t 氮肥 (以 N 计) 约需 7.7×10^{10} J 能量, 相当于燃烧 1.8 t 石油。生物固氮虽然也同样耗能, 固定 1 千克氮化物 (以 N 计) 要消耗 10 千克的碳水化合物, 豆科植物光合作用获得的能量有 5% ~ 10% 用于固氮; 但植物能直接利用光能, 而且不需要设备投资。

0.2.3.2 无污染

化肥在生产与使用过程中都容易产生环境污染问题。合成的氮肥在农业生产中使用的有效率只有 50% ~ 75%, 其余部分容易流失和造成 NO_3^- 的污染, 并增加反硝化产生的 N_2O 的危害。据报告, N_2O 含量增加一倍, 将使大气层上的臭氧保护层破坏 10%。生物固氮则无此弊端, 固定的氮与有机物相结合, 可以全部被生物直接利用, 不易流失, 也不存在污染问题。

因此, 如何进一步利用生物固氮为农业生产提供足够的氮肥, 与如何加强植物的光合作用, 已成为当今世界农业生产上的两个重要课题, 各国都投入了大量的研究力量和资金, 向这方面进军。

据联合国粮农组织 (FAO) 1995 年粗略估计, 全球每年由生物固定的氮量已近 2×10^6 t (相当于 4×10^8 t 尿素), 约占全球植物需氮量的 3/4。可见, 生物固氮在地球的氮循环中具有十分重要的作用, 而且对维持生态系统平衡有重要意义。但是, 迄今为止所发现的绝大多数固氮微生物不能在粮食作物, 如水稻、小麦、玉米以及多种果树、蔬菜上固氮, 即使少数能固氮, 其固氮量也很少, 所以这些植物的高产不得不依赖化学氮肥。20 世纪初以来, 全球农作物单位面积产量不断增长, 这在一定程度上依赖于氮素化肥的施用量不断增加。农作物依赖于施用氮素化肥所获得的增产实际上是以消耗能源和污染环境为代价的。生产化学氮肥不仅消耗能源, 而且加重大气污染和温室效应。大量施用化肥, 不仅提高农业生产成本, 而且导致水土污染, 影响人类的健康并破坏生态平衡。要提高农业产量, 降低化肥用量和农业生产成本, 减少水土污染和疾病, 治理占我国国土面积约 27% 的荒漠化地区, 发展可持续农业, 生物固氮将起到重要作用。

固氮生物之所以能够催化还原 N_2 成 NH_3 , 是由于它含有固氮酶。

固氮酶由铁蛋白 (固氮酶还原酶, 由 *nifH* 基因编码) 和钼铁蛋白 (固氮酶, 由 *nifDK* 基因编码) 组成。有些微生物的固氮酶含钼铁蛋白, 有些则含铁铁蛋白, 这样的固氮酶分别由 *vnf* 基因和 *anf* 基因编码。含钼固氮酶基因已从褐球固氮菌、棕色固氮菌和多变鱼腥藻中克隆得到, 并进行了序列测

定。迄今已报道得到了约有 30 种固氮酶组分蛋白的晶体, 其中大多数已经解析出结构。

由铁蛋白和钼铁蛋白构成固氮酶是典型的、常见的固氮酶体系。铁蛋白相对分子质量约 6 万, 由二个相同的亚基组成, 含金属元素铁, 它能结合 $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ 而将电子从电子供体传送到钼铁蛋白。钼铁蛋白相对分子质量约 22 万, 是由二种不同亚基组成的四聚体, 含金属元素钼和铁, 它能结合底物, 在铁蛋白协助下将底物还原; 固氮反应必须铁蛋白和钼铁蛋白同时存在, 并由细胞提供 $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ 、电子供体和可还原的底物, 反应才能进行。固氮酶对氧极敏感, 只有在无氧条件下或细胞内有防氧保护机构时才能进行固氮。它除了能还原 N_2 成 NH_3 外, 还能还原一些端基原子具有三键或类似三键的小分子化合物, 诸如乙炔、腈、氰、叠氮、环丙烯等, 以及还原 2H^+ 为 H_2 。

生物固氮是生命科学的重大问题之一, 是跨世纪的研究课题。研究生物固氮的作用机制有三个目的:

(1) 提高固氮效率, 在理论上阐明影响固氮效率的原因, 在生产实际中提出有效措施。

(2) 在研究根瘤菌与豆科植物相互作用和共生固氮的基础上, 扩大根瘤菌的宿主范围, 使其能在非豆科植物, 特别是主要粮食作物上固氮, 或将固氮基因转移到非豆科植物上, 实现其自主固氮。

(3) 在研究固氮酶结构与功能的基础上, 进一步探讨化学模拟固氮酶作用机制, 发展化学催化理论, 改革目前合成氨工艺, 提供廉价氮肥。

0.3 固氮生物

生物界中能固氮的种类不多。迄今已被证实的都属于原核生物, 其中主要类群有: 真细菌、放线菌及蓝细菌三大类。生物固氮系统分为根瘤菌与豆科植物的共生结瘤固氮系统、联合 (包括内生) 固氮系统和自生固氮系统。在共生固氮系统方面, 世界上有豆科植物 19 700 种, 其中已知可以结瘤固氮的有 2 800 多种, 占 15%, 这其中只有 0.5% 的共生固氮体系进行了研究。在固氮生物中, 共生种类的固氮效率高、固氮数量多, 在农业生产和自然界氮平衡上, 都发挥着重要作用。据统计, 一般每年每公顷大约可以固定纯氮 $13.3 \times 15 \text{ kg}$, 折合每公顷地每年固定标准化肥 $65 \times 15 \text{ kg}$, 且几乎全部被利用。共生固氮的例子, 如与豆科植物共生的根瘤菌、与桉木共生的弗兰克氏菌、与满江红 (红萍) 共生的鱼腥藻等。自生种类固氮的效率较低, 固氮

少,但是由于它们种类多、分布广,在氮循环中也是一支不可忽视的力量。据统计,每公顷土地上的自生固氮细菌,每年固定 20 ~ 50 kg 的大气氮。而且它们在增加土壤中有机含氮化合物方面起着巨大的作用,对生态农业的开发及保护环境也具有重要意义。自生固氮微生物种类较多,有需氧性的,如固氮菌;有兼性厌氧的,如克氏杆菌;有厌氧性的,如巴氏梭菌;还有光合自养的,如红螺菌、念珠藻等。在自生固氮体系中,发现了一种嗜热放线菌(*Streptomyces thermoautotrophicus*)的固氮酶可以耐氧,为通过转基因手段实现非豆科植物自主固氮提供了可能的突破点。联合固氮是发现较晚但潜力相当可观的新型固氮方式。联合固氮体系广泛存在于禾本科作物和牧草的根际和根表。1976 年,巴西学者 Dobereiner 从雀稗根表粘质层里分离出固氮酶活性很强的雀稗固氮菌,继而又从玉米等植物的根表分离出具固氮能力的产脂刚螺菌。目前被证实能与植物联合共生固氮的细菌已达 16 属 30 种以上。粪产碱菌、圆褐固氮菌、雀稗固氮菌、巴西固氮螺菌、肺炎克氏杆菌、假单胞菌等都是比较普遍的联合固氮菌。禾本科植物甘蔗体内发现有内生固氮菌,以光合产物为能源进行固氮,可为甘蔗提供 60% 的氮素。这类内生固氮系统被认为是一类高水平的固氮系统,而且对它们的发现和研究代表了一种新的方向,可补充经典的根际联合固氮系统。这一发现为进一步开发联合(内生)固氮体系提供了突破空间和潜在的应用前景。研究表明,联合固氮容易受到 NH_4^+ 、 O_2 的影响,但它对植物具有固氮、促生、抗逆和耐盐等优良特性,而且目前所熟悉的联合固氮菌大多分离自粮食作物根系,它们的存在有利于作物的增产,因而在农业生产上具有广阔的应用前景。目前对联合固氮菌研究的重点,主要是对菌株进行遗传改造,筛选出具有高细胞密度,同时又能大量分泌 NH_4^+ 的联合固氮菌,使之能与外界环境抗衡。利用联合固氮菌作为田间作物的接种剂已在世界各国广泛应用,有一些国家已形成商业产品。1978 年,Callaham 等从香蕨木根瘤中分离培养内生的弗兰克氏菌成功,有力地促进了对放线菌共生固氮的研究。

我国共有豆科植物约 1 400 种,科学家对我国豆科植物根瘤菌资源进行了详细的调查,并建立了根瘤菌资源数据库;通过根瘤菌系统分类,发现了一些新属、新种,其中一个重要的发现是,一种植物在不同的生态环境可与多种根瘤菌共生,例如我国的大豆可与 3 个属、7 个种的根瘤菌共生固氮,其他很多植物与根瘤菌的关系也是如此,这说明豆科植物与根瘤菌共生的多样性,修正并发展了传统的根瘤菌“寄主专一性”和植物“互接种族”的概念。不同根瘤菌可与同一豆科植物相互作用结瘤固氮,但它们之间的结瘤固氮效率却大不相同。同样,同一根瘤菌可与不同属的豆科植物结瘤固氮。

0.4 生物固氮研究的历史、现状和展望

从 1862 年发现生物固氮现象到目前为止, 生物固氮的研究已有 100 多年的历史。生物固氮的研究领域包括: 生物固氮机理、共生固氮机理、固氮分子遗传、固氮微生物与化学模拟固氮等。以生物固氮机理为主线, 可以把这 100 多年的研究史大致划分为三个时期。

第一个时期, 从 1862 ~ 1960 年, 这一时期是细胞水平时期。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实验材料的。

1888 年, 贝杰林克 (Beijerinck) 从豆科植物中第一个分离到根瘤菌。从此以后, 各种各样的固氮微生物相继被分离鉴定。接着, 人们逐步地探明了一些固氮微生物的生活规律。20 世纪初期, 将圆褐固氮菌、根瘤菌等应用于农业, 使一些农作物获得了明显的增产。

由于实验材料摆脱不了完整的细胞, 使生物固氮机理的研究受到了很大的限制, 加上这方面的研究人员不多, 因此, 生物固氮机理的研究进展十分缓慢。

虽然早在 1893 年维诺格拉得斯基 (winogradsky) 就推测过, NH_3 可能是生物固氮的产物, 但是关于生物固氮的产物是不是 NH_3 的问题, 一直争论不休。1942 年, 鲍利斯应用新的实验手段 (N^{15} 示踪), 确定了 NH_3 是生物固氮的产物。

在 20 世纪 30 至 50 年代, 人们发现: H_2 、 CO 、 N_2O 是生物固氮的抑制剂; 固氮微生物在无氮培养基上生长, 需要 Mo 、 Fe 、 Ca 。

第二个时期, 从 1960 ~ 1966 年, 这一时期是无细胞水平时期。在这一时期, 生物固氮机理的研究主要是用无细胞抽提液作为实验材料。无细胞抽提液制备的基本过程是首先把固氮菌细胞粉碎, 用超速离心机离心分离, 除去细胞的残渣碎片, 得到无细胞的抽提液。然后, 以此抽提液为实验材料, 研究生物固氮机理。抽提液与完整的细胞相比, 干扰因子大大地减少。因此, 用它来研究生物固氮机理就比较容易一些。

1960 年以前, 人们虽然千方百计地探索过固氮蓝细菌的无细胞抽提液能不能实现固氮的问题, 但是, 始终没有得到令人满意的结果。1960 年, 美国卡纳汉 (Carnahan) 等人, 用巴氏梭菌的无细胞抽提液加上丙酮酸, 成功地实现了 N_2 还原成 NH_3 的试验。这一试验的成功, 打破了长期以来生物固氮机理的研究摆脱不了完整细胞的困难局面, 开辟了用无细胞抽提液研究生物固氮机理的新途径。这一试验的成功, 使生物固氮机理的研究从细胞水

平推进到无细胞水平。

在离体的情况下,要实现生物固氮,必须提供哪些最基本的条件呢?

1962年,莫顿森(Mortenson)等人发现,生物固氮必须有铁氧还蛋白作电子传递体,并从巴氏梭菌中得到了这种蛋白。

1964年,哈迪等人直接明确地证明了,生物固氮必须有ATP参与。

1965年,布伦(Bulen)等人发现, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 可以代替由铁氧还蛋白、氢化酶和 H_2 所组成的电子供体系统,从而简化了生物固氮反应体系,为生物固氮反应的离体研究提供了方便。

1966年,迪尔沃思(Dilworth)和肖勒霍恩(schöllhorn)等同时发现了 C_2H_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。这种方法具有快速、灵敏、简便、经济四大优点,因而,很快地得到大量推广。现在,它在固氮酶的分离提纯、固氮酶动力学、固氮酶活性中心、固氮基因转移、共生固氮以及固氮菌肥等方面,都大显神通。由于这一新方法的使用,加快了生物固氮各个研究领域的前进步伐。

第三个时期,从1966年到目前,是分子水平时期。

在这一时期内,生物固氮机理的研究,主要是用纯的固氮酶二组分制剂作为实验材料的。虽然早在1934年,伯克(Burk)就推测了固氮酶的存在,但是,直到1966年为止,并未获得较高纯度和有酶活力的固氮酶。1966年,布伦等和莫顿森等分别从棕色固氮菌和巴氏梭菌的抽提液中,得到了半纯的钼铁蛋白和铁蛋白制剂。在 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、ATP和 Mg^{2+} 的存在下,这两种蛋白结合在一起,可以催化 N_2 还原成 NH_3 。无论是钼铁蛋白,还是铁蛋白,单独存在都不能催化生物固氮反应。因此,他们认为,固氮酶是由钼铁蛋白与铁蛋白组成的。

固氮酶制剂的获得,标志着生物固氮机理的研究从无细胞水平跃进到分子水平。

1972年,伊迪(Eady)等人从肺炎克氏杆菌中分离到纯的钼铁蛋白和铁蛋白制剂。从此以后,纯的固氮酶二组分,相继从巴氏梭菌(1973年,莫顿森等)、棕色固氮菌[1973年,沙(shah)等]、酒色红硫菌[1973年,埃文斯(Evans)等]、大豆根瘤菌[1974年,伊斯雷尔(Israel)等]、圆褐固氮菌[1975年,耶茨(Yates)等]、羽扇豆根瘤菌(1976年,zhelyuk等)中得到。

固氮酶提纯的成功,使得以固氮酶结构与功能为中心的生物固氮机理的研究进入更本质的阶段。从此以后,人们可以探讨固氮酶结构与功能的关系。对这一关系的研究,为化学模拟生物固氮提供重要的依据。

1972 年, 奥姆 - 约翰逊 (Orme - Johnson) 等人用顺磁共振法发现, 铁蛋白在 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 到钼铁蛋白之间起传递电子的作用; $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ 推动电子从铁蛋白向钼铁蛋白转移。

1973 年, 伯杰森 (Bergersen) 等人用动力学法证明, 催化 N_2 和 C_2H_2 还原反应的是钼铁蛋白, 而不是铁蛋白。

1973 年, 莫顿森等人用顺磁共振法发现, $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ 对铁蛋白起变构作用。

1974 年, 史密斯 (Smith) 等人用穆斯鲍尔光谱法发现, 钼铁蛋白和铁蛋白都含有 FeSn 原子簇。

1977 年, 坦纳卡 (Tanaka) 等人用氨基酸顺序仪完成了巴氏梭菌铁蛋白一级结构的测定。

1977 年, 沙等人从棕色固氮菌和巴氏梭菌的钼铁蛋白中, 得到了高纯度高活性的铁钼辅因子, 并测定其 Mo 、 Fe 、 S^{2-} 含量之比为 1:8:6。

1978 年, 采用带有同步加速器的 X - 射线边界吸收能谱仪, 测定了钼铁蛋白及其铁钼辅因子中 Mo 原子周围的结构。这在固氮酶活性中心结构的研究方面是一个重大的突破。

1980 年, Bishop 及其合作者发现了两个棕色固氮菌假回复突变株。它们不具经典含钼固氮酶活性, 却可以固氮生长。进一步研究发现它们表达了一种仅含铁的固氮酶体系。迄今只有三种生物的含铁固氮酶从遗传和生化水平上得以鉴定: 棕色固氮菌, 深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 和荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)。

1986 年, 从两株不能合成含钼固氮酶的固氮菌 (棕色固氮菌和褐球固氮菌) 中纯化得到含钒固氮酶, 此后研究显示, 含钒固氮酶广泛分布于固氮菌属的微生物中, 并且也存在于一些蓝细菌, 如多变鱼腥藻中。含钒固氮酶只有在无钼而有钒的条件下表达, 因此被认为是一种“备份”的固氮酶体系。含钒固氮酶由 *vnfH* 编码。

1992 年, 用 X 光衍射确定棕色固氮菌固氮酶活性中心原子簇是由 MoS_3Fe 和 FeS_3Fe_3 两个缺口的立方烷型簇合物组成, 通过 3 个非蛋白配体 S 桥联而成为一个笼 (其顶端分别是 Fe 和 Mo)。这是固氮酶组分蛋白结构衍射成功的第一个范例, 也是固氮酶研究的一个重大突破。其实在此之前, 我国就已经合成了这两个簇合物; 根据配位催化原理和化学探针思路, 提出活性中心原子簇笼应是活口的, N_2 还原成氨和质子还原成 H_2 都是在笼内进行, 提出用于还原底物有两条质子通道的设想。

1992 年, 棕色固氮菌铁蛋白的晶体结构首次得以解析。

1997 年, Gadkari 等发现在嗜热自养链霉菌 (*Streptomyces thermoautophiscus*) 中含有依赖超氧化物歧化酶的固氮酶, 此固氮酶系统非常独特。

2002 年, Schmid 等人对棕色固氮菌缺失 FeMoco 的突变种 *nifB* - Av1 的钼铁蛋白组分做了晶体衍射结构分析, 发现 4 个亚单位中的 1 个构象发生了较大变化, 存在一个带正电的漏斗状 (funnel) 结构, 它足够容纳带负电的 FeMoco 的插入, 成为具有固氮功能的钼铁蛋白组分。

迄今已有 10 个 MoFe 蛋白, 7 个 Fe 蛋白和 5 个两组分蛋白复合体的晶体衍射相继获得成功, 这为固氮机理的阐明提供了坚实的结构基础。

在这一时期, 生物固氮的其他研究领域, 如固氮分子遗传、共生固氮等方面, 也取得了很大的进展。其中, 重大的成果有:

1972 年, 迪克逊 (Dixon) 等人通过交配, 成功地实现了从肺炎克氏杆菌到大肠杆菌的固氮基因转移, 使大肠杆菌获得了固氮能力。这一试验的成功, 为固氮基因转移到禾本科农作物 (或其根际微生物) 上, 展示了无限美好的前景。

1975 年, 佩根 (Pagan) 等人、麦库姆 (McComb) 等人和库尔兹 (Kurz) 等人, 在没有宿主植物细胞的人工培养基上, 第一次成功地实现了根瘤菌的固氮。这一试验的成功, 打破了长期以来根瘤菌脱离宿主植物就不能固氮的局面, 从根本上否定了根瘤菌依赖宿主植物提供某些固氮基因的假设。证实了根瘤菌和其他厌氧性固氮微生物类似, 也具有完整的固氮基因簇和一些必需的辅助组分, 在适当条件下可以自行固氮生活。

1975 年, 蔡尔德 (Child) 等人和斯考克罗夫特 (Scowcroft) 等人, 将豇豆根瘤菌转移到非豆科植物农作物——小麦和菸草上, 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第一页。

1977 年, Nuti 等发现与豆科植物共生的根瘤菌中含有巨型质粒, 分子质量超过 200 MD, 其上编码固氮及结瘤的遗传信息。巨型质粒的发现, 开辟了共生固氮遗传研究蓬勃发展的新局面。

2000 年, 百脉根根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*) 全基因组测序完成。

2001 年, 苜蓿根瘤菌巨型质粒 pSymB 与 pSymA 序列测定完成。

2001 年, 苜蓿根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti* strain 1021) 全基因组测序完成。

2002 年, 大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110) 全基因组测序完成。

基因组测序的完成为生物固氮机理研究和功能基因组的研究提供了必要