

世界农业
丛刊

生物固氮译丛

(三)

农业出版社

7421
4

58:17421
194

生物固氮译丛

(三)

尤崇杓 主编



农业出版社

24635

中科院植物所图书馆



S0014749

世界农业丛刊
生物固氮译丛 (三)
尤崇杓 主编

* * *
责任编辑 李永庆

农业出版社出版 (北京朝阳区枣营路)
新华书店北京发行所发行 北京市密云县印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 8 印张 198 千字

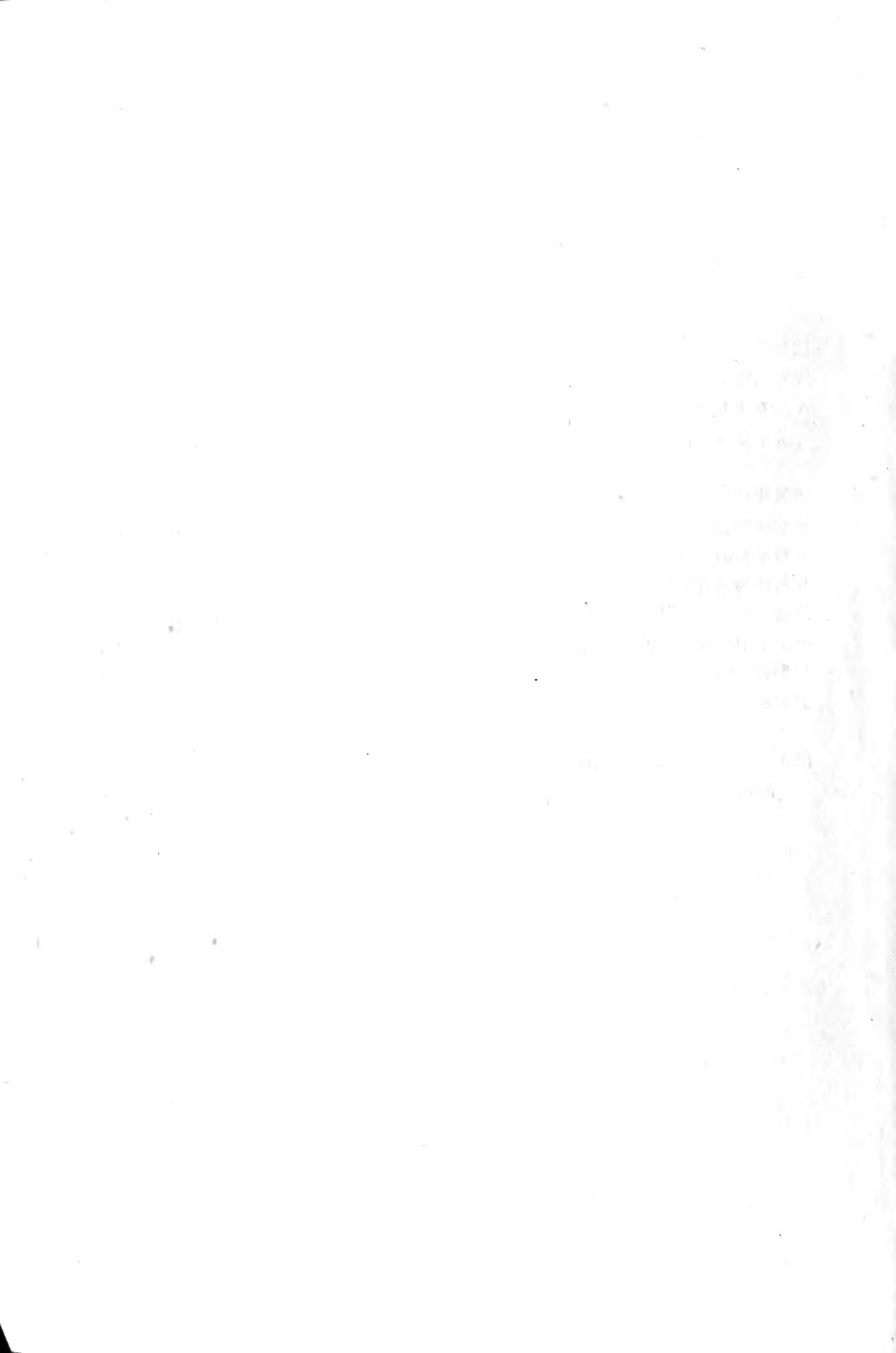
1988 年 2 月第 1 版 1988 年 2 月北京第 1 次印刷

印数 1—1,200 册 定价 2.00 元

ISBN 7-109-00120-2/S·85

目 录

- 固氮的生物化学..... W. G. Zumft (1)
- 固氮细菌中 N_2 和 NH_4^+ 同化的调节和途径..... D. Kleiner等 (9)
- ATP在固氮酶机理中的作用证据:
关于金属与核苷酸络合MoFe蛋白的质子核磁共振弛豫效应的研究
..... S. J. Kimber等 (15)
- 固氮作用的生化遗传..... W. J. Brill (26)
- 根瘤菌的遗传学和遗传分析..... A. A. Baeb等 (36)
- 豆科植物的识别机理及感染过程..... T. V. Bhuvanewari (46)
- 豆科植物氮再循环的现状..... H. J. Evans (57)
- 细菌与热带禾本科植物根联合固氮作用的评价..... P. Van. Berkum等 (67)
- 水稻土中的异养固氮作用..... T. Yoshida等 (87)
- 异型胞中的固氮作用..... F. Fay (100)
- 直接测定圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 的呼吸作用、氢酶和固氮酶
活性间相互关系的质谱法..... P. A. Lespinat等 (118)
- 固氮巴西螺菌 (*Azospirillum brasilense* sp. 7) 培养中体内固氮酶和氢酶活性
的质谱动力学研究..... Y. M. Berlier等 (120)



固氮的生物化学

W. G. Zumft

1. 引言

关于 N_2 还原代谢途径的生化研究已获得了大量的资料。在此,仅提出有关酶本身研究的近期结果。作者在1975年和1976年对这一问题已作了两次详尽的讨论,至于与许多权威性评述相同的内容,此文拟不再赘述。两年一次的固氮会议文献汇编是重要的资料来源。此外,还有三本专著提供了酶在化学和物理化学领域外的较全面的信息。最近关于钼是氮还原作用中的重要微量元素元素的化学问题亦已汇编成册,在许多人的评述中也包含了这方面的内容。

2. 酶及其它组分

固氮酶曾被酶学委员会看作为还原的铁氧还蛋白:固氮氧化还原酶(ATP—水解作用)[E. C. 1.18.2.1]现在已分离得到。固氮酶的两个组分现在称为固氮酶还原酶(通常称为铁蛋白)和固氮酶(通常称为钼铁蛋白)。这一命名将在催化作用一节中论及。

最近补充描述了有关固氮酶组分的特性,即有关圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)、多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)、自养棒状杆菌(*Xanthobacter autotrophicus*)的固氮酶组分的特性,首次鉴定了蓝细菌柱胞鱼腥藻酶的主要特性,证实了有关酶的高度保守性。到目前为止,对固氮酶的修饰仅包括了三种光合细菌和非光合细菌中产脂螺菌(*Spirillum lipoferum*)〔见后〕。在生态学上从桉木根瘤菌中得到无细胞固氮酶的活性是一个突破。这种根瘤是由Frankia类型的放线菌引起的。其它被认为具有生化影响的主要菌种,是甲烷氧化细菌和杆菌属中单一的固氮菌种硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*),这些菌至今尚未进行无细胞系统的研究。在以前认为不能固氮的假单胞菌属中,也报道了其中一种能够固氮。生长在温泉中的绿藻也有类似现象。

实际上所有固氮酶的分离过程与常用的方法相似,只是在氧的作用下因蛋白极不稳定而遭到破坏。最近为了试图减轻这种氧的危害,在乙二醇存在和零下低温时,采用免疫吸附层析法,使固氮酶的纯化方法得到进一步发展。但是这种方法还有待于其它实验室的确认。专性好气的棕色固氮菌的酶复合体在与低分子量的铁硫蛋白结合时,具有“氧稳定”的特性(在空气中 $t_{1/2} > 4$ 天)。

不同有机体固氮酶组分的体外重组形成了异种互补。Emerich和Burris(1978)进行了广泛的酶互补的研究。用8种纯化的或接近均一的固氮酶组分进行了55个组合的(可能是56个组合)种间互补,并分析了酶活性。发现在49个组合中两组分形成了复合体,其中45个组合具有全部或部分的酶活性。这些互补中有专性好气的和专性厌气的、光合的和共生的细

菌，以及微好气的和兼性厌气的，它们都显示出酶在进化过程中具有高度稳定性。在无活性的互补中总是含有巴氏梭菌的一个组分，说明了它的固氮酶在体内必定具有不同的结合特性。然而巴氏梭菌和柱孢鱼腥藻、巴氏梭菌和肺炎克氏杆菌间的互补反应具有催化活性。异种复合体的活性依赖于pH、组分比、蛋白浓度，这些因素在同种固氮酶重组中也具有一定的作用。这些异种互补即使无活性也同样提供了有关固氮酶的准计量、电子传递体的性质、限速步骤、ATP作用等方面的资料。他们对肺炎克氏杆菌和圆褐固氮菌、肺炎克氏杆菌与巴氏梭菌之间的互补以及棕色固氮菌与巴氏梭菌间所形成的无催化活性的复合体也都进行了机理方面的研究。

铁蛋白的分子量约为60000〔包括辅基在内的梭菌铁蛋白氨基酸组分计算为57674〕，即约为钼铁蛋白的1/4。在溶液中两个相同的亚基紧密地结合在一起构成蛋白质单体。已经确定了铁蛋白亚基的一级结构，其具有273个氨基酸残基。但尚未揭示其与细菌铁氧还蛋白间的联系（现已不使用固氮铁氧还蛋白的名称了）。分子中含有6个半胱氨酸残基，它们随机分布在氨基酸链中，而与铁硫簇相结合的半胱氨酸残基的位置保持一定。蛋白中也有许多二次或三次重复的氨基酸顺序。

钼铁蛋白的分子量略高于200000，它是由4个亚基聚集而成的。通过肽谱和末端顺序法确定了肺炎克氏杆菌、棕色固氮菌、巴氏梭菌中钼铁蛋白的组分，其分子结构为 $\alpha_2\beta_2$ 。仅用SDS电泳得到的结论是不足以确定钼铁蛋白的4级结构的。通过电泳或先进行预处理再经离子交换层析可以大量地分离亚基。梭菌中 α 亚基尽管仅含有3个色氨酸残基，但仍能通过光谱，很容易地与较小的 β 亚基（不含色氨酸）区别开来。

3. 铁中心

铁蛋白的化学分析与光谱研究能够提供令人信服的有关辅基中铁—硫特性的证据。

每个铁蛋白二聚体都含有4个铁原子和等量的无机硫。确定铁—硫结构的好方法是铁硫簇置换或挤出法。用硫醇置换铁硫中心并用已知簇和挤出物进行光谱比较，证明了可以从蛋白质中挤出接近全部的铁，以及铁蛋白中存在的一个 Fe_4S_4 簇。由于铁蛋白的两条多肽链是相同的，因此除非铁硫簇在生物合成嵌入中一开始就是不对称的以外，铁硫簇总是等量的与两条链结合，并保持分子的对称性。从结构和准计量上看，梭菌铁蛋白是一个单电子载体，如果与梭菌氧还蛋白相比较，后者在结构上是一个单电子载体，但总共传递两个电子。

Orme-Johnson对来自不同种的铁蛋白的EPR谱的低积分（0.2~0.45自旋/毫升）已作了详尽地讨论，他特别指出了第二个顺磁中心。肺炎克氏杆菌EPR谱的计算机模拟预示了存在另一个中心，如果确实的话，它的性质尚有待确定。

Thorneley等（1976）发现圆褐固氮菌在动力学反应阶段中有第二个电子运输给铁蛋白，然而解释它并非是一个物理过程。亲和法（如核苷酸、染料配位体或铁氧还蛋白的基质）已应用于铁蛋白的纯化，用以获得全部金属中心。用向菲罗啉磺酸盐除去梭菌中具较高催化活性的铁蛋白（1.7 μ mol/分钟/毫克蛋白）中的铁，证明了只有略超过一半的蛋白是呈活性态的。

尽管对于这种极不稳定的铁硫蛋白（梭菌铁蛋白在空气中的 $t_{1/2} \approx 20$ 秒）的低积分值和可运输电子的总数（最终与铁有关）的数据分析还存在某些不同看法，但是现在仍然将铁蛋白作为单电子传递体、其具有一个 Fe_4S_4 簇、可能在 $(Fe_4S_4)^{2-}$ 和 $(Fe_4S_4)^{3-}$ 间摆动、有两个

MgATP²⁻结合部位、准计量为每水解2摩尔ATP传递1摩尔电子等等，这些现象都综合在当前对固氮酶催化的知识中。

钼铁蛋白铁硫中心的性质则更为复杂。特别是这个组分中包含有混合的铁钼中心。在用定量穆斯鲍尔谱进行的对生物结构的研究中，钼铁蛋白是一个好例子。用这一方法来确定铁的环境要精确2%以上。在光谱上有区别的四个组分中有三个在物理学上作为可分离的铁硫簇，它分成4个Fe₄S₄簇（称为P簇），两个属于混合型簇（称为M簇），较小的1个称为S簇。这些工作提供了确凿的证据，证明了钼铁蛋白中铁原子的数量为30±2。Fe₄S₄簇中铁原子具有两种类型的光谱，比例为1:3，而且在电性方面与细菌铁氧还蛋白的Fe₄S₄簇略有区别。这在圆二色散特征谱上也是明显的。尽管P簇为蛋白环境所修饰，但仍然能够用硫醇将它挤出，并证明是Fe₄S₄簇结构。一种可行的方法是用o-二甲苯-a, a'-硫醇将簇挤出，随后用P-三氟苯甲基硫醇配位置换，再与合成的标准模型物的¹⁹F NMR谱的化学位移相比较确定簇为Fe₄S₄。十分有趣的是不能通过硫醇将钼铁蛋白中的钼铁硫复合物（M簇）挤出。除了穆斯鲍尔谱对铁硫簇的证明以外，在CO抑制固氮酶的瞬间态中也能观察到EPR信号，这与低分子量的铁硫蛋白的EPR信号相似，并且很有可能这个信号并非由M簇所引起。

4. 铁钼辅因子

可以用酸处理钼铁蛋白将其中低分子量化合物中的钼提取出来。由于这个领域的研究进展在早期有关梭菌中钼铁蛋白中钼组分的分离的论文中已有论述，所以尽管它实际上可能是辅基部分，但还是把固氮酶中含钼部分叫做辅因子。在所有含钼酶中关于钼辅因子的可互换性假说没有相反的实验证据，并已将固氮酶和其它含钼酶区别开来。不能合成含钼辅因子的钼铁蛋白的钼化合物缺陷型的突变种已经分离出来，它可用于溶剂提取低分子量钼辅因子的试验系统，而且可以预计到它在生物无机化学这一领域中迅速发展的重要性。

连二亚硫酸盐还原的钼铁蛋白的EPR特征信号（用这种谱甚至可以鉴定在整体细胞内的固氮酶）是S=3/2系统，这是铁钼辅因子引起的。钼铁蛋白含有两个这样的辅因子，假设它的中心组成为MoFe₆S₆。（光谱和分析数据与这并不一致）。铁钼辅因子至少包含了30个铁原子中的12个，并且代表了一种新的结合的钼—铁—硫簇。

从酸碱处理的梭菌钼铁蛋白中已分离得到具高度特征光谱的钼化合物，最近确定为钼的4-或3-硫醇复合物。这些化合物的分离条件不允许天然蛋白的残基再合成，从而得出结论，钼铁蛋白含有一个与铁硫簇结合的钼的4-硫醇化合物。剧烈的分离步骤仅留下钼周围的核心结构，没有完整的铁硫组分，这导致了在突变种试验中重组能力的丧失和乙炔还原活性的丧失。用硼氢化合物不能使铁钼辅因子在原位上还原乙炔（已证明单独的钼铁蛋白没有活性），然而一旦从蛋白中分离出来，其产生的活性为完全固氮酶系统的8%（按Mo计算）。与固氮酶不同，应用BH₄⁻铁钼辅因子也能还原环丙烯，但只能形成环丙烷而没有丙烯。

随着X射线吸收光谱在实验和理论中的发展，钼铁蛋白成为第一个金属蛋白予以检测。钼的吸收边能约为2.015V，尤其是扩延吸收边精细结构（EXAFS）可以提供有关吸收原子、数量以及在吸收剂第一配位体内的原子距离等信息。可是这种方法不能提供有关空间排列和略超出第一配位体范围的信息。这是一种迂回的方法，在试图设计模型或在用蛋白质来

与模型化合物相比较时，必须记住这一点。近来确定的黄嘌呤氧化酶和其它含钼酶的钼辅因子为喋啶衍生物就是一个显著的例子。

对巴氏梭菌和棕色固氮菌的钼铁蛋白及其分离出的铁钼辅因子进行了X射线吸收谱的分析，三种物质的光谱极为相似，并得出如下结论：钼与3个或4个硫原子相配位，其间距为2.35Å，有1个或2个硫原子相距略远些，2个或3个铁原子距离为2.73Å。

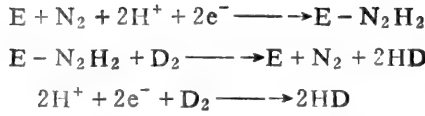
已分离出来的铁钼辅因子具有氧化还原活性，它可被染料氧化，并且也能被连二亚硫酸盐所还原。假设通过光还原反应可获得全还原态，即EPR—静止态（也称为超还原），但至今尚不能做到，相反在光反应系统中用EDTA作为还原剂则呈EPR—静止态。向已分离的铁钼辅因子中加入苯硫酸，它的EPR信号峰变陡，与天然的钼铁蛋白谱更为相似。

$[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SC}_2\text{H}_5)_8]^{3-}$ 或 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SPh})_8]^{3-}$ 是合成的类似于铁钼辅因子结构的立方烷铁硫簇。和上面模型物一样，在这些复合物中一个钼原子在簇的角上取代了一个铁原子，并且通过3个外加的硫配位体桥联到第二个相同的簇上。这些复合物的EXAFS数据与天然钼铁蛋白的数据极为相似。开放式模型（上右）也已合成，它呈 $(\text{Ph}_4\text{D})_2[\text{Cl}_2\text{FeS}_2\text{MoS}_2\text{FeCl}_2]$ 复合物形式。另一种只含有 MoS_4 核心的较小单元，与一个 FeS_2 基因相连 $[(\text{S}_6)\text{FeS}^2\text{MoS}_2]^{2-}$ ，它与酸/碱处理的梭菌钼铁蛋白在光谱分析上极为相似。从这种复合物中可获得硫醇复合物。另一个尝试是把目前可利用的数据汇集在一起构成一个适宜的模型，所以提出这样一个结构，它通过钼的4-硫醇单元与 Fe_4S_4 簇相接。

5. 催化作用

固氮酶底物的多样性有利于对这种酶进行全面的实际的研究。可选择的底物主要发现在六十年代中期。其中乙炔更为有用，这是由于它很容易被固氮酶还原并且容易分析。除了母体化合物以外，尤其是腈、异腈和炔系物方面所有底物的还原是非常缓慢的，它与氮的还原速率相比要低几个数量级。丙烯仍能还原，但丙烷则不能被还原活性部位所接受。环丙烯是最近新补充的固氮酶底物。提纯后的酶、整体细胞以及分离出的铁钼辅因子都能迅速地将环丙烯还原。由于人们对还原作用的立体化学感兴趣，所以它还可以用作为固氮酶和铁钼辅因子活性部位的探针。在 $^2\text{H}_2\text{O}$ 中，多于90%的环丙烯形成〔顺式-1,2- $^2\text{H}_2$ 〕，如果可能的话，反式异物体将少于5—10%。但是丙烷的形成则不能说明具有这种高度的立体选择性，因为所得到的〔反式-1,3- $^2\text{H}_2$ 〕丙烷，〔顺式-1,3- $^2\text{H}_2$ 〕丙烷和〔2,3- $^2\text{H}_2$ 〕丙烷的比例为2:1:1。

曾一再提出，二氮杂苯和胛在氮还原作用中，是作为与酶结合的中间产物。用对二甲基氨基苯醛反应鉴定了在氮气下（而不是在氩气下或用氯化物作为底物时）完整的固氮酶系统中加入酸或碱可形成胛。初期酶结合的中间产物主要还是胛，它是在水解过程中形成的。这一发现启示了有可能存在二氮一氢化合物作为中间产物。随着氮还原作用中二氮杂苯—胛途径的进一步证明，将证实Bulen发现的胛是固氮酶的底物。通过对固氮酶形成的HD的详尽研究提出了在二氮杂苯水平上存在中间产物的间接证据。弄清固氮酶催化“交换”反应的关键是HD的形成需要电子这一事实。流经氮（固氮条件下）、氩（放氢条件下）以及氮加氢（固氮但抑制氢的条件）中全部电子均保持恒定。在 D_2 存在时，可用形成的产物来说明全部电子流，电子流的恒定性仅能从一个电子分配给另一个形成HD分子的事实来加以证实。从机理上看，电子的分配是根据下面设想的二氮杂苯为中间产物的方程提出来的。



存在一个耗能的和消耗还原物的无效循环过程是这一机制的特征。如果存在这种无效循环，那末对于在氢和氮中自生长的氢细菌将会产生明显的影响。一般由有机体提供一个分子来抑制这个反应是不可能的。氮的还原与氢的形成之间的普遍联系都说明与此相反。固氮酶的活性部位由于产生氢阱而起到了间接的保护作用，这是由氢酶在能量代谢和氢的再循环作用外提供的。由于固氮酶在被氢抑制时需要电子传递和ATP水解，所以对于氢分压(pH_2)改变时氢细菌会有什么影响方面有以下几种预想：较高氢分压可导致氢酶水平或活性的提高。当固氮酶反应ATP/2e比例下降时，需要供给细胞更多的能量。为了补偿能量增加的需求，氮气下生长的自养菌对氧的消耗也随着较高的 pH_2 而增加。因此这些结果可简单地被认为：一旦 pH_2 提高到超过这些菌的调节能力，必然导致对自养细菌的抑制作用，而对于以氨作为氮源生长的细菌则没有这种影响。尽管选择某些单一参数来解释这种状况是可能的，但反应仍支持以上在细胞水平上对于氢机制解释的论述。文献中少量零碎的数据确实可用来作为支持这一想法的初步证据。

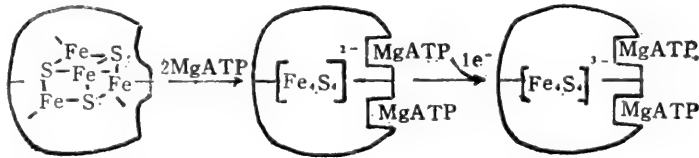


图1 铁蛋白的起始反应简图

图1描述了固氮酶催化作用的起始部位在铁蛋白上。通过凝胶过滤和EPR证实了在铁蛋白上有两个 $MgATP$ 的结合部位，铁蛋白构型的变化是由于与核苷酸结合所致。在用向菲罗啉磺酸盐研究需核苷酸的铁螯合的速度时，Ljones和Burriss的结论提出在铁蛋白构型变化以前，两个ATP结合部位必须占满，并且两个结合部位对 $MgADP^-$ 具有不同的亲和力。用质子NMR已证明了 Mg^{2+} 有4个相同的结合部位 ($K_a = 1.7 \pm 0.3mM$) 以及可以形成三元金属蛋白核苷酸复合物。由于这一结论与其它方法所证明的两个结合部位的结论相矛盾，所以提出了结合两个 $MgATP^{2-}$ 分子（每个亚基一个）时，在空间上将掩盖另外两个与金属核苷酸复合物结合的部位。

动力学研究所提供的证据表明， $MgATP^{2-}$ 的结合是在铁蛋白还原之前。在没有 $MgATP^{2-}$ 存在时，用 SO_2^- 使氧化的铁蛋白还原的速率 ($K > 10^8 M^{-1} \text{秒}^{-1}$) 比在固氮酶催化期间利用 SO_2^- 来还原的速率 ($K = 3.10^{-5} M^{-1} \text{秒}^{-1}$) 明显大得多。反之 $MgADP^-$ 通过连二亚硫酸盐来抑制氧化的铁蛋白的还原。不同的速率说明，在铁蛋白中存在限速的构型变化，尤其是在稳态期间当大量的氧化态存在时，快速还原作用受到了限制。

从铁蛋白到钼铁蛋白的电子传递需要先形成复合物。普遍的看法是，在这种复合物中电子传递是与ATP水解作用密切相连的。用铁蛋白滴定钼铁蛋白或反过来滴定，都可依据结合比1:1和2:1（铁蛋白/钼铁蛋白数）的稳定的和瞬间的复合物来加以阐明。试验数据与假设的两个固氮酶组分的瞬间复合物是相符合的，具有1:1和2:1两种有活性的复合物。从放氢所显示的酶变率延迟期这一事实可得出结论：每传递一个电子后，这种复合物

即分离，而ATP水解从反应开始呈线性。发现这一延迟期的出现，是由于钼铁蛋白而不是由于铁蛋白。在这一延迟期中，钼铁蛋白的EPR信号下降，这就反过来表明在形成瞬间复合物时电子从铁蛋白随机地被传递给钼铁蛋白分子的库中。根据这一概念，铁蛋白只不过作为钼铁蛋白的还原酶，而钼铁蛋白的作用是底物的还原。这一争论证实了上面提到的固氮酶组分的新命名法。然而在这里仍沿用习惯命名法。

电子传递与ATP水解的直接联系已从预稳态时磷酸盐释放与铁蛋白的氧化（在420nm下用分光光度法跟踪）的相同速率中得到证明。棕色固氮菌固氮酶每传递两个电子，其ATP分子水解的最低数量为4。这一数值也为肺炎克氏杆菌中的酶所证实。ATP/2e的比率受温度和pH的影响很大，以致在低温和低pH条件下电子传递与ATP水解不偶联。ATP是固氮酶催化必不可少的，所以近20年来这一课题一直吸引了许多研究人员。一度曾设想出各种各样的机理，其中大多数都认为通过ATP的水解作用负自由能变化的积累形成了一种高还原状态。这一假说近来得到了进一步的阐述。

尽管一直缺少可利用的数据，但固氮酶催化部位肯定是可以从电位观点来加以理解的。如果对固氮酶采取严格的电位观察，那么无论什么时候只要一达到酶所需要的低电位氧化还原态，则都会使底物还原。在这一机制中，其它固氮酶反应的必需物（包括ATP）仅仅是为了获得较低的氧化还原态。与通常认为的ATP降低氧化还原电位相反，还有人提出它的作用在于相反的一面，即提高氧化还原电位到不太低的负值以允许电子在两个组分之间传递。氧化的和还原的假设都是根据能量转换的氧化还原系统这一相同的概念。

Stiefel (1977) 提出的还原态具有极低的氧化还原电位是合理的。他确认如果二氮杂苯是固氮酶还原作用的中间产物，那么电位是在-1.0V附近。铁蛋白氧化还原电位在-0.3V附近（其ATP复合物形式则为-0.4V——这一变化很可能是溶剂对氧化还原基团的影响，也许这并不是所有铁蛋白的性质）。它不会还原氧化还原电位低于-0.4V的还原态，很可能存在一个高的还原态确实是固氮酶催化的部分，这是由于测量到的临界电位约-0.4V，而一旦高于-0.4V就没有固氮酶活性。然而，尽管钼铁辅因子的氧化还原电位尚未测出，但它存在着一个所谓“超还原态”，用于将底物还原的电子分配给低氧化还原电位的钼铁蛋白中的氧化态和还原态（等于超还原态）（图2）。由于我们还不知道在金属中心存在的氧化平衡是哪一种类型，所以有意地回避了关于电子供体怎样更准确的分配给钼铁蛋白不同金属基团中哪一个的问题。这种低电位氧化还原对是不容易靠近铁蛋白的电子供体的，所以称为“表现电子接受对”。提出假设的主要条件在于（图2）：ATP给氧化态的钼铁蛋白提供能量从而提高氧化还原电位。这一过程产生了有效的电子接受对，即给氧化的——

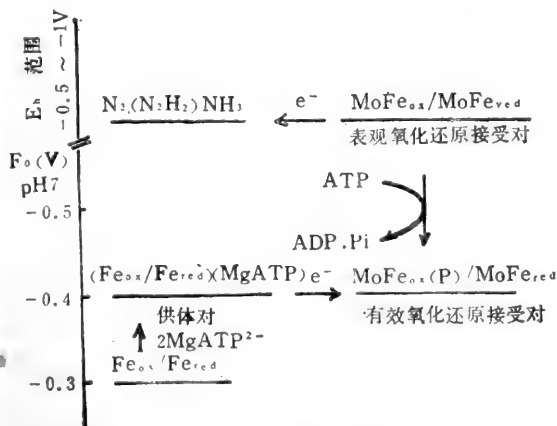


图2 ATP在固氮酶催化作用中作用的模式

MoFe_{ox}: 钼铁蛋白氧化态 MoFe_{red}: 钼铁蛋白还原态

还原的(超还原的)钼铁蛋白提供能量,铁蛋白提供它的同电位电子。这里使用的“氧化的钼铁蛋白”一词与连二亚硫酸盐还原态(也叫半还原态)或染料氧化态是同义的,因为这一概念包括生理的氧化还原循环中所显示的两种形态。钼铁蛋白的能量供给可以设想为瞬间的磷酸

化（通过钼铁蛋白磷酸交换至ATP，在这个方面是十分有趣的，还有在梭菌的钼络合物中存在磷）作为一种构象变化或作为两种结果的结合。由于所提出的钼铁蛋白超还原态和供能态是短寿命的，所以研究它或用实验证明这个还原的假说将是困难的。更多的有关在钼铁蛋白上ATP的相互作用的证据将进一步在探讨ATP作用后才能证实。

6. 光合自养细菌的固氮酶和谷酰胺合成酶

由于光合自养固氮菌的固氮酶在获得最大催化活性时需要一个活化组分，所以给予单独的讨论。许多场合中都将这一附加组分误称为“第三固氮酶组分”。它一旦完成了激活作用，在维持固氮酶催化活性中就不需这一组分的作用了。这一组分不像固氮酶的两个组分那样参与酶的转换，因此它不是氮还原所必需的第三组分。

到目前为止仅有深红螺菌固氮酶的分子参数可以利用。它的钼铁蛋白分子为四聚体，分子量约为230000（用凝胶过滤法测定），然而与所有其它的铁蛋白不同，用SDS电泳观察到两个亚基的分子量分别为30000和31500。无活性铁蛋白的紫外吸收光谱除蛋白质的最大吸收峰外，在没有氨基酸残基的268nm处还有第二最大吸收峰。

最早观察到的光合自养细菌固氮酶的独特性质是它的非线性动力学反应，并且还证明了活性需要锰。在光合细菌的破碎细胞中，固氮酶多数处于无活性形式。用盐溶液冲洗色素膜，可以溶解出某一因子，它作用于铁蛋白并使铁蛋白转变成具有催化活性的形态。以上提到的活化组分也在沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) 荚膜红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas capsulata*) 和非光合细菌含脂螺菌 (*A. lipoferum*) 中得到其存在的证明。

活化组分还未能提纯到揭示它的分子性质的程度，但从Ludden和Burriss的工作中证实了它是一种酶，能从铁蛋白中移走一种类似腺嘌呤的分子。激活过程需要ATP，但它不水解，仅通过构象变化将它移出，从而打开修饰基团的部位。磷和戊糖也是铁蛋白上非蛋白部分，可是它构成了没有AMP和ADP的残基。这无疑地暗示了活化组分的相反方面是将修饰基团加到铁蛋白上而使其钝化。虽然还不存在进一步系统的物理证据，但这一假设已列于光合细菌固氮酶调节的图表中（图3）。

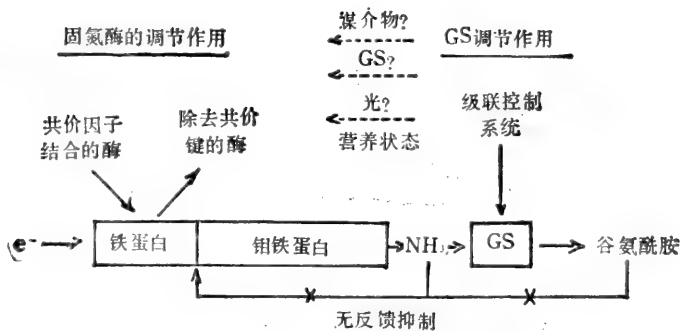


图3 光合细菌固氮酶调节的假设机理

(GS为谷酰胺合成酶)

固氮酶活性调节因子的表达既没有完全弄清也没有完全确定。发现谷氨酸中生长的分离破碎的细胞或氮中生长的细胞内都没有活性。相反“氮饥饿细胞”（即解阻抑固氮酶，但不能固氮和同化氮的细胞，除内部氮能转换外）具有全部的活性，可以得到非正常的固氮酶。

无论是间接的还是更直接的通过关闭光合作用的途径，光在钝化作用中都起着重要的作用。这还有待继续研究它的可能性。

低浓度的氨 ($<5\text{mM}$) 能使固氮酶活性立即停止，这是光合细菌固氮酶所独特的，而棕色固氮菌则可能是例外。我们已考虑到了加入氨时固氮酶的失活现象以及在氨耗尽后固氮酶再活化的“开”“关”效应，并且强调了光合细菌固氮酶是一种可逆的非活化过程的酶。以上所讨论的活化因子就是这一现象的解释。氮同化的关键酶——谷酰胺合成酶，被认为可能是氨和固氮酶活性调节的中间体。谷酰胺合成酶和固氮酶的调节作用，可能是谷酰胺合成酶的级联控制系统将信号传到固氮酶的这样一种相互交织的途径，从而经钝化机制将其关闭。因此在适当的控制信号下，活化组分将再一次活化固氮酶。由于这些问题仍在探索中，所以这些描述仍属推论。由于氨使固氮酶在体内失活时在体外还有活性，所以它需要活化组分来获得最大活性，或者是活化组分不再起活化作用。

要了解两个调节系统之间可能的联系，有必要在光合自养细菌谷酰胺合成酶的分子水平和调节性质方面扩充我们的知识。在沼泽红假单胞菌中谷酰胺合成酶是一个十二聚体的分子，其分子量为670000。十二个亚基在空间上排列成两个堆垛似的六角形，与大肠杆菌和其它细菌中所描述的结构相似。沼泽红假单胞菌中的酶通过腺苷化作用进行共价修饰，这可以从纯酶样品中AMP的移出看到。谷酰胺合成酶的腺苷化及去腺苷化对不同的pH梯度、金属及动力学性质方面的反应都是不同的。在有 Mn^{2+} 存在时，腺苷化态具有最大活性，而去腺苷化态是需要 Mg^{++} 的。当酶处于腺苷化时，谷氨酸盐的 K_m 值提高了5倍。去腺苷化态对于氨和ATP分别有两个 K_m 值，在这些底物反应中，显示了酶存在两种构型。除共价修饰外，沼泽红假单胞菌中谷酰胺合成酶是由丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸负反馈控制的。荚膜红假单胞菌 (*R. capsulata*) 中不完全纯化的谷酰胺合成酶的活化作用通过磷酸二酯酶的处理后也证明了在这个菌中腺苷化/去腺苷化机制是不同的。

除光合自养细菌对于外界氧化反应显示的固氮酶的一个短暂的钝化过程外，还在棕色固氮菌中看到这个现象。在棕色固氮菌中固氮酶活性与谷酰胺合成酶活性是相矛盾的。最近证明氨对于质子驱动力的电子组分 ($\Delta\psi$) 略有影响。通过去除还原当量流可降低约25mV (原初为106mV)，这就完全抑制了固氮酶活性。如果这是固氮酶对氨反应的唯一控制机制，那么将表明在光合自养细菌中具有极为复杂的、特殊的调节系统。因此可以推断，细胞不能调节底物氨的进入，固氮酶的调节作用是有一特殊范围的。因此对于固氮酶的产物氨一定有一个控制信号，然而并不是氨或谷酰胺的简单的反馈 (把它们看作为反馈抑制剂是错误的)，这并不是需还原态氮的其它代谢途径的总和。假设它的调节作用是通过同化系统来操纵的，谷酰胺合成酶的控制使一些特定的代谢信号结合在一起。由于氨对于固氮酶的重要性，因此氨还原中所必需的能量和还原剂，无论是二者之一还是二者同时存在，都能够作为调节的手段。

原载“Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur” pp. 116—130, 1981.

李继平译 尤崇杓校

固氮细菌中 N_2 和 NH_4^+ 同化的调节和途径

D. Kleiner S. Phillips E. Fitzke

1. 绪 言

固氮微生物能利用各种氮源, 这些氮源主要是无机化合物如 NH_4^+ 、 NO_3^- 和 N_2 。虽然已发现的固氮细菌在生物学上属于极不相同的种, 但是其无机氮同化的主要途径即谷酰胺。谷氨酸和氨甲酰磷酸盐途径在所有菌中都是非常相似的, 主要和次要的途径的基本状况将在第一部分概述。

第二部分将讨论一些调节的问题。一种重要的调节作用是降解产物的抑制作用。所有的菌种在结合氮介质中都同化 NH_4^+ (或 NO_3^-), 而不固定氮。一般情况下 NH_4^+ 抑制了固氮酶的合成。

2. 途 径

(1) 自生异养生物

无机氮同化的主要途径综述于下图。部分酶列于表1, 表2是在含 N_2 (固氮酶解阻遏) 或 NH_4^+ 情况下 (固氮酶受抑制) 生长时, 细胞内某些代谢产物的浓度。三种菌研究结果表明, 它们在能量代谢上有很大差别: *Azotobacter vinelandii* (严格好气), *Klebsiella pneumoniae* (兼性, 但在厌气条件下几乎不固氮) 和*Clostridium pasteurianum* (严格厌氧)。

所有生物的最佳氮源是 NH_4^+ , 在*C. pasteurianum*、*A. vinelandii*和*K. pneumoniae*中已发现有专性载体可通过膜把 NH_4^+ 运入细胞。 NH_4^+ 的吸收是集成的, 已发现 NH_4^+ 在细胞内外的浓度差为100倍。

在*A. vinelandii*和*K. pneumoniae*中发现硝酸/亚硝酸还原酶的偶联作用, 它们把细胞外的 NO_3^- 转化为 NH_4^+ , 但在*C. pasteurianum*中它们却不存在。在固氮条件下*K. pneumoniae* (厌氧生长) 的膜结合复合物把 NO_3^- 还原到胞外的 NH_4^+ , 而*A. vinelandii* (好气生长) 的细胞质复合物则直接产生胞内 NH_4^+ 。

N_2 很可能是通过膜进行扩散, 并为固氮酶复合物还原成 NH_3^+ 。

第一个酶反应的同化产物, 是细胞内的 NH_4^+ 。直到1970年还假设它进一步代谢, 可能主要是直接掺入谷氨酸的 α -氨基, 这是谷氨酸脱氢酶中介的反应 (Glu-DH)。然而, 这个酶仅在*K. pneumoniae*中测出, 它是在大量供给 NH_4^+ 和 NO_3^- 的情况下被诱导出来的, 一般它不存在于*A. vinelandii*和*C. pasteurianum*中。在固氮的条件下的*K. pneumoniae*中它被抑制, 在发现谷氨酸循环后就证实了*C. pasteurianum*和*A. vinelandii*在所有生长的条

件下及*K. pneumoniae*在固氮的条件下,大量的 NH_4^+ 首先掺入到谷酰胺的酰胺基中去。这个需ATP的反应为谷酰胺合成酶(GS)所催化,对 NH_4^+ 。它具有低的 K_m 值(表1)。相反,谷氨酸脱氢酶却具有很高的 K_m 值,因此这个酶不适合于同化由固氮酶作用所产生的低浓度 NH_4^+ (表2)。然而,它可以把谷酰胺的酰胺基当作“活化”的 NH_4^+ ,因为它的传递电位比游离态高14.2焦耳/分子。它能提供外加的热力学驱动力供以后使用。下一步氮的代谢有类似的酶,它们把游离的 NH_4^+ 或“活化”的 NH_4^+ 传递到相同的受体分子上去。转移酰胺基最重要的酶,谷氨酸合成酶是一种类似于谷氨酸脱氢酶的酶。这种酶在所有异养固氮菌中都有,在*C. pasteurianum*中是NAD专性的,而在*K. pneumoniae*和*A. vinelandii*中是NADP专性的。酰胺基转移到 α -酮戊二酸,这就完成了谷氨酸的循环(谷酰胺合成酶/谷氨酸合成酶途径)。

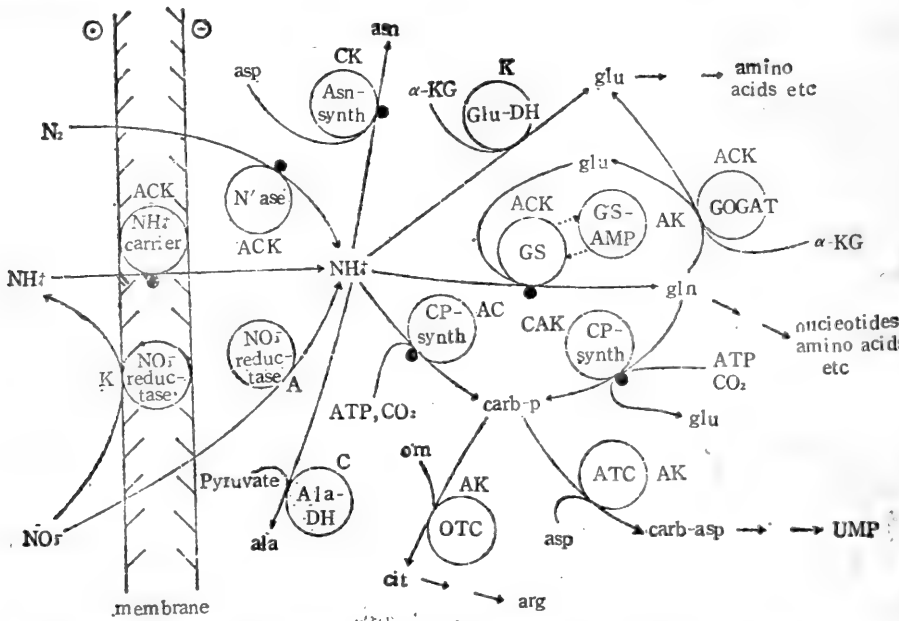


图 *Azotobacter vinelandii*(A); *Klebsiella pneumoniae*(K) 和 *Clostridium Pasteurianum*(C) 中 N_2 、 NH_4^+ 和 NO_3^- 同化的主要和次要途径

Ala-DH——丙氨酸脱氢酶; Asn-synth——天门冬酰胺合成酶; ATC——天门冬氨酸转氨甲酰酶; Cp-synth——氨甲酰磷酸合成酶; Glu-DH——谷氨酸脱氢酶; GOGAT——谷氨酸合成酶; GS, GS-AMP——非腺苷化的和腺苷化的谷酰胺合成酶; N'ase——固氮酶; OTC——鸟氨酸转氨甲酰酶; α -KG- α —— α -酮戊二酸; Carb-p——氨甲酰磷酸; 还原当量省略了。圆圈内为需能反应。

ala——丙氨酸; asp——天门冬氨酸

cit——肌氨酸; arg——精氨酸;

Pyruvate——丙酮酸;

NO_3^- reductase—— NO_3^- 还原酶; NH_4^+ Carrier—— NH_4^+ 载体。

另一个氮当量分配的主要库是氨甲酰磷酸,它特别适合于精氨酸和尿苷酸途径。存在着二种氨甲酰磷酸合成酶,用谷酰胺或是 NH_4^+ 作给体。我们可以用*A. vinelandii*的粗提物证明二者的活性(一个酶有两个专性)。但在*K. pneumoniae*中只有需谷酰胺的一种, Mortenson报道了在*C. pasteurianum*中已发现这些酶。

在*C. pasteurianum*中也测出丙氨酸脱氢酶催化的丙酮酸的胺基化。

我们实验室的研究证明:在*C. pasteurianum*和*K. pneumoniae*存在需 NH_4^+ 的天门冬

酰胺合成酶，但它不存在于 *A. vinelandii* 中，它的酶可能是需谷酰胺的。

(2) 光自养细菌

Munson和Burris观察到 *Rhodospirillum rubrum* 的固氮培养物吸收胞外的 NH_4^+ 可低于 $1\mu\text{M}$ 。如果我们假定在这种细菌中细胞内 NH_4^+ 的浓度接近于非光合种，而且谷酰胺合成酶的 K_m 值是在这范围内（表1和2），则可以推断活性 NH_4^+ 运输的存在。

Brown和Herbert用几个种的光自养细菌进行了比较研究表明，在固氮条件下，所有的菌都含有高水平的谷酰胺合成酶。在多数种中也可测出谷氨酸合成酶和谷氨酸脱氢酶，但在这些种中，彼此间的核苷酸特性是不同的。

(3) 蓝细菌

目前，尚无关于蓝细菌吸收 NH_4^+ 的研究的报道。弄清这一点将有助于了解在联合共生中 NH_4^+ 释放的机理。

现已确定谷酰胺合成酶/谷氨酸合成酶途径在几乎所有蓝细菌中都是主要的途径，与细菌中的酶不同的是，光合细菌的谷氨酸合成酶需要还原的铁氧还蛋白作还原剂。谷氨酸脱氢酶（大多是NADP—专性的）的水平较低，但某些菌种中含有高水平的丙氨酸脱氢酶，它在高 NH_4^+ 供应下是 NH_4^+ 同化的主要途径。 NH_4^+ 和需谷酰胺的氨甲酰基磷酸合成酶的活性，二者都曾在 *Anabaena cylindrica* 中测出。

(4) 共生微生物

关于非豆科植物的结瘤作用引起内共生体的 NH_4^+ 的同化，是一无所知的。所以，这里只简述对根瘤菌和蓝细菌的研究。

①根瘤菌 自生根瘤菌是不能由固氮来满足本身所需要的氮，它需要外加氮源。少数几种可利用 NH_4^+ ，而大多数需要谷氨酸。这种需求很可能是由于根瘤菌的膜对 NH_3 有高度的渗透性，导致固定氮的排出。因为根瘤菌像其它的菌一样用一种碱性物质通过膜以保持pH梯度，并根据下式将 NH_4^+ 累积在细胞外面。

$$\begin{aligned} [\text{NH}_4^+]_{\text{外部}} / [\text{H}^+]_{\text{外部}} &= [\text{NH}_4^+]_{\text{内部}} / [\text{H}^+]_{\text{内部}} \\ ([\text{NH}_3]_{\text{外部}} &= [\text{NH}_3]_{\text{内部}}) \end{aligned}$$

当与寄主植物共生时，这个排出在生理学上是很重要的，可能是为在胞液质中保持高浓度 NH_4^+ 的缘故。

所有的自生根瘤菌都含有谷酰胺合成酶和谷氨酸合成酶。在根瘤中只发现有低水平的细菌谷酰胺合成酶，而谷氨酸合成酶和谷氨酸脱氢酶的水平是不相同的。通常，设想在类菌体中由于未同化的 NH_3 排泄物进入到植物胞液质中而使谷酰胺合成酶缺失。但是，如上所讨论，根瘤菌膜对 NH_3 的高度渗透性和适合的pH梯度是类菌体 NH_3 耗尽的结果。这种损失由重要的氨基酸来补偿。

在根瘤菌中已测出丙氨酸脱氢酶。关于氨甲酰磷酸的代谢还没有报道过。

②蓝细菌 自生蓝细菌常常释放固定氮，主要是 NH_4^+ 。在联合共生中，这种分泌物对菌的生活是很重要的。最好的研究体系是红萍 (*Anabaena-Azolla*) 的联合共生体，一些地衣和地钱在寄主内共生体中 NH_4^+ 代谢的相互作用，增加了菌在共生体内 NH_4^+ 的分泌。如果是控制谷酰胺合成酶，同时 NH_4^+ 是通过蓝细菌膜运输的，那么就和自生异养细菌一样，随着膜电位 $\Delta\psi$ 而产生。那么 $\Delta\psi$ 的降低（如像大肠杆菌素K那样化合物的作用）将导致 NH_4^+ 的可观的损失。

3. 调节状况

图上所列的代谢途径的大多数酶是在不同水平上被调节的。在这些调节中某些代谢产物起了多重的作用，表明了一个复杂的控制网的存在。图中标明圆圈的所有反应均是需能的和为能量消耗或为个别核苷酸水平所控制的假定位置，这说明了氮和能量代谢间的关联。

下面简要综述和讨论一些酶的调节特性。

(1) 铵的运输

在 *A. vinelandii*、*C. pasteurianum* 和 *K. pneumoniae* 中，膜电位 $\Delta\psi$ （内部为负的）驱动高浓度的 NH_4^+ 的吸收，已有很好的证明，这暗示了 a) NH_4^+ （但不是 NH_3 ）是运输分子，b) $\Delta\psi$ 的大小影响了吸收的多少和可能的吸收（和释放）速率。

在 *K. pneumoniae* 中，但在 *C. pasteurianum* 中，高浓度 NH_4^+ 抑制了 NH_4^+ 的载体，这类似于在低等真菌中那样。在根瘤菌中没有 NH_4^+ 载体，在蓝细菌中可能也缺乏。

(2) 谷酰胺合成酶

这个酶的控制包括 NH_4^+ 的抑制、含氮代谢产物的反馈抑制和腺苷化作用——去腺苷化作用的化学修饰。

① NH_4^+ 抑制

表1 一些酶的选择性

酶	来源	NH_4^+ 或谷氨酸的 K_m (mM)	NH_4^+ 可诱导的 (+) 抑制的 (-) 无作用的 (0)
NH_4^+ 载体	<i>C. pasteurianum</i>	0.009	0
	<i>K. pneumoniae</i>	0.007	-
固氮酶	所有菌种 (野生型)	0.002 0.012	-
	<i>A. vinelandii</i>	0.15	0
谷酰胺合成酶	<i>R. palustris</i>	0.2—0.5	0
	<i>A. cylindrica</i>	1	(-)
	<i>K. pneumoniae</i>	0.33	-
	<i>K. pneumoniae</i>	1.0	(0)
谷氨酸合成酶	<i>K. pneumoniae</i>	12	+
谷氨酸脱氢酶	<i>K. pneumoniae</i>		

表2 在 N_2 和 NH_4^+ 下生长时细胞内某些代谢产物的浓度 (mM)

代谢物	<i>C. pasteurianum</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. vinelandii</i>	
	N_2	NH_4^+	N_2	NH_4^+	N_2	NH_4^+
NH_4^+	0.2—0.4	—	0.3—0.4	—	0.6	(0.6)
α -酮戊二酸	0.7	0.7	—	—	—	—
谷氨酰胺	0.8	6.2	0.2	0.6	0.45	0.5—2.0
谷氨酸	5.2	8.0	4.5	4.0	6.6	9.2
氨甲酰磷酸	0.060	0.104	—	—	—	—

谷酰胺合成酶的抑制，主要存在于那些具有 NH_4^+ 掺入不同途径的菌中，特别是具有谷氨酸脱氢酶的菌中。自生微生物*A. vinelandii*和*C. pasteurianum*都不合成谷氨酸脱氢酶，因而，它们的谷酰胺合成酶不被抑制。相反，*K. pneumoniae*中的谷酰胺合成酶是被 NH_4^+ 所抑制的，而谷氨酸脱氢酶是被诱导的。另外，具有可被抑制谷酰胺合成酶的有机体中有一些是光自养微生物和所有的根瘤菌及一些蓝细菌。

②反馈抑制作用 曾报道过一些菌种的谷酰胺合成酶为某些代谢产物所反馈抑制。*A. vinelandii*中酶动力学的详细分析，揭示了一些代谢产物的抑制能力和底物的可利用性之间的相当复杂的关系。这就提供了氢当量沿着这条途径极有效的调节作用。

③化学修饰 用*E. coli*的研究表明，这种有机体中的谷酰胺合成酶在AMP参与后而发生酶学上的修饰，从而导致谷酰胺合成酶的活性迅速降低。这种修饰酶的体系是在严格的代谢条件下为一些代谢产物主要是谷酰胺和 α -酮戊二酸所控制，这种机理保证了活性的快速和稳定的变化。

在*K. pneumoniae*、*A. vinelandii*和*Rhodopseudomonas palustris*中已证明了谷酰胺合成酶的腺苷化作用。对于*R. capsulata*、*Azospirillum brasiliense*和根瘤菌的这种控制已有很好的证明。对于*C. pasteurianum*和蓝细菌则尚未发现。

(3) 谷氨酸合成酶

已经报道过在根瘤菌中的 NH_4^+ 或谷氨酸抑制谷氨酸合成酶，到目前为止，对其它微生物还没有结论性的数据。根瘤菌中谷氨酸合成酶对氨基酸的抑制作用是非常灵敏的。

(4) 固氮酶

固氮酶的合成及活性在不同水平上被调节，这就表明，固氮酶的控制是非常严密的，大概是由于这个反应需要很高能量的缘故。固氮酶活性的调节包括ADP和氨甲酰磷酸的反馈抑制及固氮酶一个组分的修饰、 O_2 可逆地“开一关”和还原剂流的控制。固氮酶的合成可能受氧和钼的浓度、温度和 NH_4^+ 的供给的控制。在一些情况下出现了转变数的增长。

在这里只讨论 NH_4^+ 抑制的几种情况，这种控制发生在转录水平上，已在所有野生型菌种中至少是在一定生长的条件下观察到。一般要完全抑制，根瘤菌比自生固氮菌所需 NH_4^+ 的浓度要高。可能这是由于缺乏 NH_4^+ 载体，从而增大了细胞内 NH_4^+ 的浓度和调节化合物的浓度。后者的特性尚未鉴定。一个值得注意的理论是，脱腺苷化的谷酰胺合成酶直接包括在nif基因的转录中，但最近发现这种假设应该放弃。一种化合物可能包括在合成调节作用中，谷酰胺合成酶的腺苷化在nif基因的表达中起了主要的作用。最近的研究集中在还未鉴定出的gln F基因的产物上。Ausubel等（1979年）还考虑到nif基因的解阻遏不一定需要谷酰胺合成酶。

在这里要讨论两个迄今还不被人们所注意的问题。

1. 在所有的有机体中， NH_4^+ 抑制nif表达的机理是否相同，或者在进行过程中有所变化？

2. 是否只有一种调节途径，或者在不同水平上 NH_4^+ 控制了固氮酶的合成？

第一个问题，几乎全部是从*K. pneumoniae*的遗传研究中得到的，它涉及到gln F产物（或谷酰胺合成酶修饰系统的其它因子）。

这里有4种可能性：

- a) 至少有两组在机理上是不同的；
- b) 这种假设已被修饰；

c) gln F 产物是较重要并且普遍出现的，它在许多调节系统中都起了作用，它也存在蓝细菌和 *C. pasteurianum* 中。

d) 在所有的菌中有一种共同的控制方式，它有时有第二个调节机理，因此这组和另一组间彼此有差异。

Shanmugam 等 (1977年) 和 Ausubel 等 (1979年) 为多元控制假说提供了证据；对不同菌种进行充分的研究将有利于了解共同调节化合物的特性。这种物质可能是谷酰胺和氨甲酰磷酸盐 (表 2)。NH₄⁺ 本身已排除在外，因为当它的进一步代谢被阻止时就不抑制固氮酶的合成。最近我们转而注意到后级调节方式，并研究鸟嘌呤 3'-二磷酸盐 5'-磷酸盐 (ppGpp) 是否可能不包括在内。肠细菌在氨基酸饥饿的条件下，发现含有高水平的这种化合物。ppGpp 可与 RNA 聚合酶相互作用，并改变它的原始专性，这就影响了一些操纵子的转录率。通常，这些操纵子的转录似乎为其酶所促进，从而防止氨基酸饥饿。这也可应用于 *nif* 操纵子。一般，几种固氮菌的总氨基酸分析说明，在 NH₄⁺ 生长下比 N₂ 生长下的水平高。这可能是固氮酶的合成随着氨基酸的继续消耗而被抑制。由此，在我们实验室的初步实验中，发现 *C. pasteurianum*、*A. vinelandii* 和 *K. pneumoniae* 在固氮的条件下，有相当高水平的 ppGpp，在加入 NH₄⁺ 后，它迅速降低 10 倍。这些结果是根据 ppGpp 促进固氮酶合成的假设而得出的。其水平是为氮源的类型和供给所调节。

原载 "Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur"

pp. 131—140, 1981

平淑珍译 尤崇杓校

ATP在固氮酶机理中的作用证据： 关于金属与核苷酸络合MoFe蛋白的 质子核磁共振弛豫效应的研究

S. J. Kimber E. O. Bishop B. E. Smith

摘 要

对于肺炎克氏杆菌固氮酶MoFe蛋白(Kp1)与二价离子 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 之间的相互作用已经用检测 Mn^{2+} 的顺磁性所引起的水质子的核磁共振弛豫效应进行了研究。 Mn^{2+} 的几个络合部位在实验误差内是等效的。每个MoFe蛋白分子的络合部位数与其比活性成正比,可由1.0增加到2.9。所以MoFe蛋白上的金属络合部位对于固氮酶的功能是重要的。据推理,对于有足够活性的MoFe蛋白分子来说,络合部位数最多为4。所有络合 Mn^{2+} 的部位也能够与所研究的其它抗磁性离子络合,但络合强度要小一个数量级(对 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 来说, K_a 分别为 $2.2 \pm 0.3mM$ 、 $1.6 \pm 0.2mM$ 及 $3.4 \pm 0.3mM$)。ATP和ADP通过 Mn^{2+} 与Kp1形成三元络合物。本文就固氮酶作用期间,ATP的水解部位及它在固氮酶两种组分间的可能的桥梁作用讨论上述数据及有关MgATP络合的其它证据。

导 言

能将氮催化还原成为氨的固氮酶,是由两种对氧高度敏感的金属蛋白组成的。由肺炎克氏杆菌中分离得到的MoFe蛋白和Fe蛋白即Kp1和Kp2分子量分别为210000和66700。有活性固氮酶的必需具备的条件是:厌氧环境,电子供体(在体外就是 $Na_2S_2O_4$),以及作为能源的ATP(在固氮酶作用过程中水解为ADP和Pi)和二价金属离子。这种金属离子在体内就是 Mg^{2+} ,其最有效的取代物为 Mn^{2+} , Mn^{2+} 适于体外的质子弛豫增强效应的研究。已知ATP是通过 Mg^{2+} (或其它金属离子)与Fe蛋白络合的,这种络合物对于MoFe蛋白来说可以起到一个特殊的还原剂的作用。而MoFe蛋白含有底物络合和底物还原部位。

过去所提出的MgATP不仅为Fe蛋白络合而且还与MoFe蛋白络合的看法后来曾被人怀疑,然而最近用高度纯化的Kp1所作的柱凝胶过滤研究证明,每个Kp1分子络合 4.0 ± 0.3 个MgATP分子,其络合常数($600 \pm 100\mu m$)相当弱。用于这项研究的Kp1的比活性高达 $2900n mol C_2H_2$ 还原/分钟·毫克蛋白。Kp1和Acl(圆褐固氮菌)的MoFe蛋白也催化 $^{32}PO_4^{3-}$ 与ATP或ADP末端的磷酸盐的交换。上述数据表明ATP在固氮酶机理中可能有双重作用。

为了增进对ATP在固氮作用中的理解,本文详细地描述了用质子弛豫增强技术所进行的二价金属离子和核苷酸络合于Kp1的研究。过去我们曾发表过与Kp2类似的研究结果。 Mn^{2+} 络合于MoFe蛋白的定性结果已有报道,但并未得到定量的数据。

实 验 部 分

肺炎克氏杆菌的菌体培养及固氮酶蛋白的纯化方法已有报道。按此法纯化的Kp1用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定,其纯度可达95%以上。通常所纯化的Kp1制剂会有一些ATP酶的活性,这可用Miller等人所用的方法去除,然后用硫酸铵沉淀法浓缩蛋白,再用Sphadex G-25柱层析或透析法将缓冲液改变至50mM Tris-HCl (pH7.4/10mM NaCl/0.1mg/ml DTT以及1mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)。在有 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 的情况下,还要用柱层析法除去 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 以免生成这些金属离子的沉淀。蛋白浓度用Lowry等人的方法测定, Kp1的比活性(活性单位=1nmol C_2H_2 还原/分钟·毫克蛋白)和以前一样用 C_2H_2 还原法测定,测定Kp1本身的放氢活性证明它不含有Kp2。

用50mM Tris-HCl (pH7.4) /10mM NaCl/0.1mg/ml DTT和1mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的缓冲液将100mM Mn^{2+} 的水溶液稀释为2mM和0.2mM的溶液。使用带有封闭垫的5mm的NMR管,把管子装在一个可抽气的大容器内,用一个针头通过封闭垫插入测定管中抽气30分钟,再充 N_2 (内含1ppm O_2),然后再抽气。这种抽、充的循环要重复几次。氧敏感的Kp1酶活性在NMR管内仍能保持24小时,比实验周期要长许多倍。用Hamilton注射器把 Mn^{2+} 溶液通过封闭垫注射到Kp1中进行滴定。在有 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 或 Ba^{2+} 的实验中,经过 N_2 充气的这些离子的500mM溶液含有50mM Tris-HCl (pH7.4) /10mM NaCl/0.1mg/ml DTT。在有 Mg^{2+} 的实验中要用1mM的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 。在有 Ba^{2+} 的实验中,可用 MnCl_2 代替 MnSO_4 ,但在大多数情况下还是用 MnSO_4 ,因为 MnCl_2 极易吸水,很难用标准称量法制备标准溶液。在对照实验中, MnCl_2 和 MnSO_4 的原液浓度用原子吸收光谱检测。用 MnCl_2 或 MnSO_4 滴定Kp1表明,实验结果与阴离子的改变无关。一般来说,对于质子弛豫增长效应的研究最好用Mn来作,这样可以使 Mn^{2+} 与阴离子形成的络合物减到最小量。然而在目前情况下,所有的 Mn^{2+} -蛋白-核苷酸的相互作用强度比 Mn^{2+} 和 SO_4^{2-} 之间的相互作用至少要大一个数量级($K_a = 5\text{mM}$)。而且 Mn^{2+} 的浓度远超过400 μM (分析级的 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 的硫酸盐和氯化物从B. D. H公司购买, ATP及ADP的二钠盐自Boehringer购买)。

自旋晶格弛豫时间是用反向回收法在89.56MHI条件下,在Jeol Fx-90Q傅里叶变换谱仪上测出,并于 $296 \pm 1\text{K}$ 连续监测探针温度。

结 果 分 析

二元系统: Mn^{2+} -Kp1

用 MnSO_4 的Tris缓冲液滴定各种浓度的Kp1的缓冲液,对于每一次缓冲液的滴加,都测定水质子讯号的自旋晶格弛豫时间 T_1 。在图1(a)和(b)中表示了两种蛋白制剂的质子弛豫速度 T_1 对 Mn^{2+} 的浓度的“M-图”的例子。在随后的计算中,要考虑每一次滴定(直到20%)中的蛋白的轻微的稀释。所有的样品相对于空白滴定(即 Mn^{2+} 滴定缓冲液,每一次都要做这种空白滴定,以检查一致性)都表现出电子弛豫速度的增长,而增长的程度随蛋白浓度的增加而增加。这就清楚地说明 Mn^{2+} 和Kp1形成了二元络合物。

在有过量的Kp2存在时, Kp1制剂在 C_2H_2 还原比活性上有明显的不同,对这种变化的原因还未能完全弄清,而且Kp1的合成和活化是十分复杂的,因为它包含有多种基因产物,而

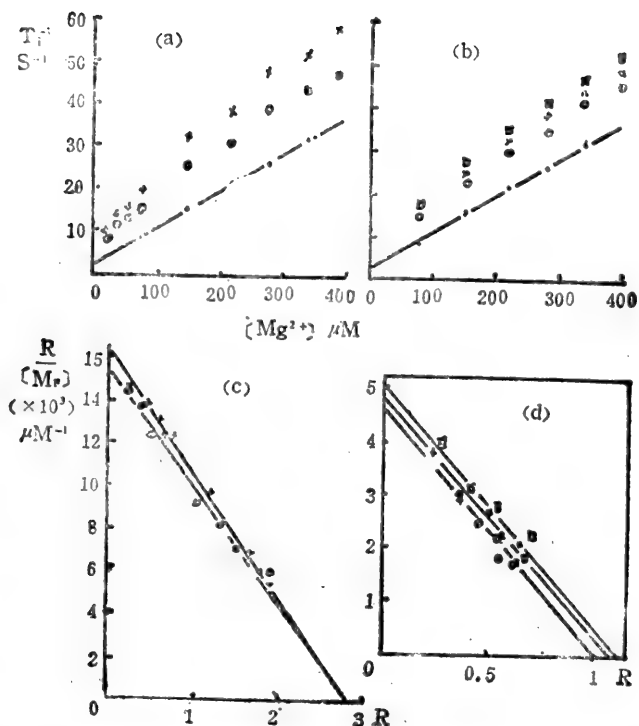


图1 用 Mn^{2+} 滴定Kp1的M-图 (a和b) 及相应的Scatchard图 (c和d)。

(a) 和 (c), 最高比活性的Kp1 (2117活性单位); 蛋白初始浓度: \circ 17.5 μM ; + 35.0 μM 。(b) 和(d), 最低比活性的Kp1 (592活性单位); 蛋白初始浓度: \circ 36.5 μM ; + 54.8 μM ; \square 73.0 μM 。(a) 和 (b) 中的 \cdot 表示没有蛋白时的缓冲液空白。

且大多数的制剂可能是有全部活性和部分活性的蛋白分子的混合物, 这些混合物用当前的提纯技术还不能完全分开。在通常的纯化工作中, 最后一个步骤即DEAE纤维素上的 $MgCl_2$ 梯度洗脱, 一般会产生几个组分, 它们在多肽的组成上基本上是均一的, 但在活性上存在着差别, 也就是说, 这些组分大概含有不同比例的全部活化和部分活化的蛋白。我们考察了六种具有不同比活性的蛋白制剂。从图1 (a) 和 (b) 的典型的M-图可见 (分别为高活性和低活性), 比活性的高低和络合金属离子的能力大小有关。这个出乎意料的结论将在后面讨论。

实验结果的定量处理的第一步是找到相当于100%的金属离子被蛋白络合时的特征增长因子 ϵb 。这可以用蛋白络合部位与金属离子之比较高的情况下所测得的经验增长因子 ϵ^+ 及E-图法得到, 此时, 大多数络合部位是空着的。用E-图法处理五种不同比活性的MoFe蛋白的数据示于图2 (a) 中, 其中以 $1/(\epsilon^+ - 1)$ 对蛋白浓度的倒数作图。在实验误差范围内, 每一个图的线性都表明了这种蛋白制剂有等效的络合部位。共同的截距 $1/(\epsilon b - 1)$ 也说明, 这些蛋白制剂的络合部位的类型是相同的。这个结论在图2 (b) 的改良了的E-图中得到更明显的确证。在这个图中, 对总蛋白浓度 $[Et] \times$ 比活性的倒数再作图, 从而使五种蛋白制剂的数据取得了一致。这个结果证明比活性既和 Mn^{2+} 的 $K\alpha^{-1}$ 也和它的络合部位数直接成比例。然后根据图2 中当至少有70%的络合部位空着时的各个点的数据, 得到 ϵb 的最佳估算值。它基本上与过去所报道的 Mn^{2+} 和Fe蛋白Kp2的二元络合物的 ϵb 值 (6.0 ± 0.5) 相同。

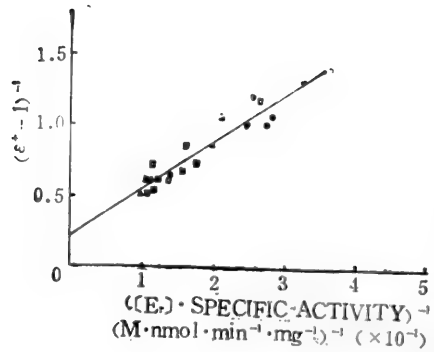
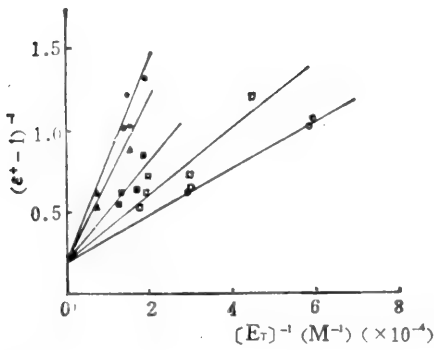


图2 (a)用金属络合部位对 Mn^{2+} 浓度的高比率时的数据所作的 $(\epsilon^+ - 1)^{-1}$ 对 K_{p1} 浓度的倒数的E-图。(b)修正了的E-图。其中以同样的数据对 $(K_{p1} \text{浓度} \times \text{比活性})$ 的倒数作图。

实线表示最小平方线性符合蛋白比活性; · 582活性单位; Δ 744活性单位; \blacksquare 1063活性单位; \square 1674活性单位; \circ 2017活性单位。

将Scatchard法应用于所有的质子弛豫增长效应的数据, 则能对一些结论进行更一般的检验, ϵb 值和每一次观测到的弛豫增长的值也都用来计算自由金属离子浓度 $[M_f]$ 和络合金属离子浓度 $[M_b]$ 以及由此而产生的络合度 $R (R = [M_b]/[E_t])$ 。这样, 对每一个M-滴定就建立了一个经验的Scatchard图, 即 $R/[M_f]$ 对 R 的作图, 并在各种情况下都计算了最小平方线性回归。作为例子, 图1(a)和(b)的M-滴定的Scatchard图分别示于图1(c)和(d)。这六种蛋白制剂的Scatchard作图都在图3中, 后者仅表示计算出的最小平方线。为清楚起见, 略去了实验点。这些线的最显著的特点是在实验误差内它们都是平行的。这又一次说明了对所有的蛋白制剂来说, 不论比活性大小, 金属络合对它们有同样的牢固性。而且在R轴上的交叉点等于每个分子的络合部位数(n)的平均值。这个值随着蛋白比活性的增加而

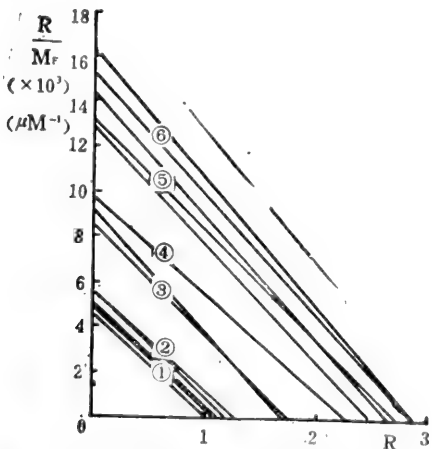


图3 六种不同比活的Kp1制剂的Scatchard图的总合

(1) 582活性单位; (2) 744活性单位;
(3) 1063活性单位; (4) 1421活性单位;
(5) 1674活性单位; (6) 2117活性单位。
这些线符合各实验点的最小平方。

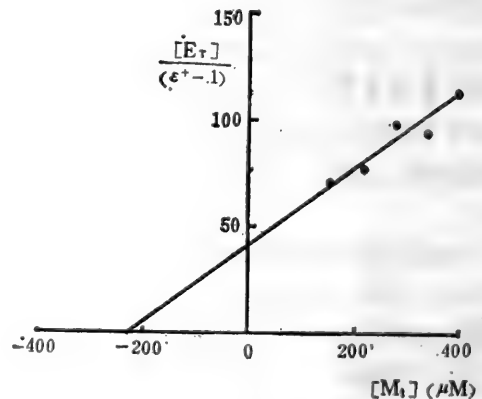


图4 用 Mn^{2+} 对金属络合部位的高比率数据得到的“高金属图”

(Kp1的比活性为582活性单位)。

有规律地增加。由图 3 中得到的各个 Scatchard 图的数据总括于表 1。由斜率 ($= -k\alpha^{-1}$) 算出 Mn^{2+} -Kp1 络合物的解离常数 $K\alpha$ 。综合这些数值, 得到了 $K\alpha$ 最佳估算值为 $209 \pm 23 \mu M$ 。所以这种络合比过去所报道的由同样方法得到的 Mn^{2+} -Kp2 络合 ($K\alpha = 350 \pm 50 \mu M$) 要牢固得多。这种实验的 Scatchard 作图在实验误差范围内是线性的。所以对于任意络合位置来说, 没有证据能说明它们是非等效的。

作为上述参数的又一核实, 图 4 说明了 $[Et]/(e^+ - 1)$ 对 $[Mf]$ 所作的“高金属”图, 这个图由于满足了条件 $[Mf] > [Mb]$, 以致至少有 90% 的 Mn^{2+} 是游离的, 所以其数据是有限的。在这些条件下, 预计这种作图应为线性, 其斜率为 $[n(\epsilon b - 1)]^{-1}$, 在 $[Mf]$ 轴上的截距为 $K\alpha$ 。图 4 中的有限的数据指的是最低的比活性 (582 活性单位) 的蛋白, 其斜率 (0.187) 与 n 和 ϵb 的最适值一致。截距 ($\sim -230 \mu M$) 也与由上面数据更准确地推导出来的数值一致 (表 1)。

表 1

Kp1 比活性 (nm C ₂ H ₂ 还原/分钟·毫克蛋白)	蛋白浓度 (μM)	络合部位数 (n)	$K\alpha/\mu M$
582	73.0	1.02	219.3
582	54.8	1.08	222.7
582	36.5	1.12	219.6
740	140.4	1.28	234.8
744	70.2	1.18	216.6
1063	83.3	1.70	184.8
1063	62.4	1.74	202.3
1421	69.7	2.34	239.6
1674	58.7	2.70	206.1
1674	35.2	2.64	183.3
1674	23.5	2.48	192.3
2117	35.0	2.86	186.9
2117	17.5	2.86	175.5

综合表 1 中的数据 and 适合于直线的最小平方, 并示于图 5 中。可清楚地表明, Kp1 蛋白的比活性在实验误差范围内与每个蛋白分子对于 Mn^{2+} 的络合部位数的平均值成正比。曾有报道, Kp1 的最高比活性为 2900 活性单位, 下面的证据指出这是对有全部活性的蛋白来说的。

由 Kp1 中分离出 FeMoCo, 并用它来活化从肺炎克氏杆菌的 nifB 突变种中的 Kp1 是可能的。可以测出在加入 FeMoCo 后, 每毫克原子 (ng atom) 钼在纯化的 Kp1 中产生的活性, 并用它计算分子量为 218000, 每个分子中含有二个 FeMoCo 中心的 Kp1 最高理论比活性值。如果, 这个值大约为 2800 活性单位, 这与实验值很相符合。由图 5 中的最小平方线外推得到的比活性为 2900 活力单位的最高实验值, 得到了络合部位数的相应值, 这个值几乎精确地等于整数 4。所以我们得出结论全部有活性的 Kp1 具有 4 个独立的 Mn^{2+} 络合部位, Kp1 的比活性与络合部位数成正比。由图 5 的直线外推得到的活性为 0, 则指出每个纯化的 Kp1 分子上残存络合有 0.35 个 Mn^{2+} 。这一点的重要性尚未弄清, 但可能说明随着第一个 Mn^{2+} 的络合部位的形成, 活性的增加比在图中所展示的要更快一些。

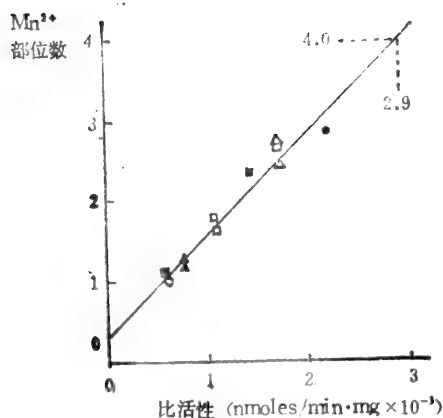


图5 每分子Kp1的Mn²⁺络合部位数和它的比活性之间的相关性

实线表示实验数据的最小线性平方,也表示了最小活性的外推值。

Kp1的比活○ 582; □ 1063; ■ 1421; △ 1674; ▲ 2117。

二元系统, Mg²⁺ - Kp1

验证固氮酶体内活化所必需的离子Mg²⁺的抗磁性需要不同的实验途径。Mg²⁺和Kp1的相互作用是通过比较两种情况下MoFe蛋白所诱导的质子弛豫增强效应来研究的。在第一种情况下, Kp1溶液中Mg²⁺和Mn²⁺都存在, Mn²⁺对Kp1的Tris缓冲液的滴定是在Kp1溶液和滴定剂中的Mg²⁺浓度恒定的情况下进行的。这种滴定用不同的Mg²⁺浓度(10—50mM)进行重复。1/T对[Mn²⁺]的M-图的典型结果示于图6中(图6略)。在第二种情况下, Kp1溶液中只有Mn²⁺存在, Mg²⁺滴入含有已知Mn²⁺浓度的Kp1溶液。在两种实验情况下, 高浓度的Mg²⁺几乎完全阻止了由Mn²⁺ - Kp1络合物引起的弛豫增强效应。此外在包括整个有效比活性范围内的三种蛋白制剂中(其比活性分别是582、1063和2117活性单位)也观察到同样的行为。可以推测, 所有的Mn²⁺的络合部位对于Mg²⁺的络合也是有效的, 而且后者在足够高的浓度下能够完全取代在蛋白上络合的Mn²⁺, 这已由实验滴定曲线与根据竞争性络合的计算之间的一致性而得到了定量的确证。对于这三种蛋白的活性, 已由滴定曲线得到了满意的重复。这是用对金属(Mn²⁺或Mg²⁺)的络合位置数n的最适值来进行重复的。已经测出了Mn²⁺在Mn²⁺ - Kp1中的K_α值。而对于Mg²⁺ - Kp1来说, Mg²⁺的最适K_α值是2.2 ± 0.3mM, 所以可以确定, Mg²⁺络合于MnFe蛋白上, 但他的络合强度比Mn²⁺要小一个数量级。

Kp1和其它金属离子的二元系统

已经发现有显著量的Cu、Ca和Zn与MoFe蛋白相结合, 一种可能的解释是这些二价金属离子络合于Mg²⁺络合部位。为了检查其它抗磁性离子是否有取代络合Mn²⁺的作用, 做了类似于前一节提到的使用Mg²⁺的一系列实验。自从最近制备了MoFe蛋白结晶(L. E. Mortenson个人通讯)以便进行X射线研究以来, 已经考察了Ca²⁺、Zn²⁺和Ba²⁺等为解决问题所需的重金属的衍生物。Zn²⁺的应用由于生成了沉淀而未得成功。而在用Ca²⁺和Ba²⁺进行的实验中, 由于使用了它们的氯化物, 并且在滴定前从蛋白溶液中去除了Na₂S₂O₄以避免金属离子生成沉淀, 因而取得了成功。将Ca²⁺和Ba²⁺依次滴入含有Mn²⁺的Kp1溶液中(比活性为919活性单位), 如同以前一样测定水质子的T₁, 结果示于图7(a)和(b)中。从这些结果可以看出, 在高浓度的Ca²⁺和Ba²⁺存在时, 由Mn²⁺络合在蛋白上而引起的

弛豫增强又一次被几乎完全阻止。这就说明，所有的 Mn^{2+} 络合部位对于 Ca^{2+} 或 Ba^{2+} 的络合都是有效的。适合于图7中数据的 $K\alpha$ 最佳理论值对于 $Ca^{2+}-Kp1$ 络合物为 $1.6 \pm 0.2mM$ ，对 $Ba^{2+}-Kp1$ 络合物为 $3.4 \pm 0.3mM$ 。所以 Ca^{2+} 的络合和 Mg^{2+} 的络合非常近似，而 Ba^{2+} 的络合则稍微弱一些。

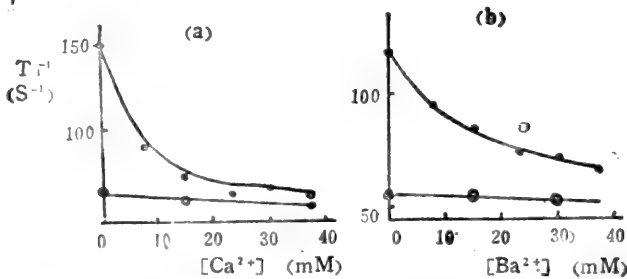


图7 金属置换图 (含有Kp1和 Mn^{2+} 的样品的水质子 $1/T_1$)

(a) 对所加入的 Ca^{2+} 浓度作图 (Kp1的比活性为919活性单位, 初始浓度为 $124\mu M$, Mn^{2+} 初始浓度为 $923\mu M$),
 (b) 对所加入的 Ba^{2+} 浓度作图 (Kp1的比活性为919活性单位, 初始浓度为 $100\mu M$, Mn^{2+} 的初始浓度为 $773\mu M$.)
 ·实验点, 实线是假定所加入的金属离子竞争络合所有的 Mn^{2+} 络合部位. (a) $Ca^{2+}-Kp1$ 的 $K\alpha=1.6mM$; (b) $Ba^{2+}-Kp1$ 的 $K\alpha=3.4mM$. o—o 在没有蛋白时, 相应稀释的空白实验曲线.

三元系统, Kp1- Mn^{2+} -核苷酸

核苷酸ATP和ADP对质子弛豫增强效应的影响是通过两种图的比较来研究的: 一种是M-图对Kp1作图, 另一种是与其对应的图, 在这里是用新鲜制备的含有 Mn^{2+} 和核苷酸 (其克分子比为1:1) 的溶液滴定Kp1溶液 (其比活性为1421活性单位)。在所有的滴定中, 有核苷酸存在时的弛豫增强效应要比无核苷酸时弱一些, 典型的结果示于图8中。定性地说, 这里可能有两种情况: (a) 蛋白和核苷酸仅通过二元络合物的形式竞争有效的 Mn^{2+} , 或 (b), 形成了又一种构型的三元络合物 (酶-金属-核苷酸)。在这种三元络合物中, 水分子对于 Mn^{2+} 的初级配位体的接近比它在酶-金属二元络合物中要受些限制。在 (a) 的情况下, 这种行为可以从上述 $Kp1-Mn^{2+}$ 络合物的 $K\alpha$ 值和 ϵb 值和 Mn^{2+} -核苷酸络合物的相应的参数值做定量的预测, 综合所发表的 $MnATP^{2-}$ 和 $MnADP^{2-}$ 的 $K\alpha$ 值 (分别为 $17\mu M$ 和 $33\mu M$) 和在“核苷酸空白”滴定中所观察到的质子弛豫增强 (见图8), 便得到特征增强因子 (ϵb), 这个因子对于 $MnATP^{2+}$ 和 $MnADP^{2+}$ 来说都近乎于1.5。在假定只形成二元络合物时, 从这些参数计算所得到的曲线, 醒目地置于实验曲线下面, 所以不能在仅形成二元络合物的假定的基础上来解释这个现象。

包括有三元络合物形成的曲线的计算取决于这些络合物的固有的性质, 但也只能得到比较近似的值。应用比过去用于Kp2系统中更为直接的方法将这些特征增强 (ϵt) 的估算值列在附录中, 这与我们对Kp2的校正估算值是一致的。它表明对于 $Kp1 \cdot Mn \cdot ADP$ 来说, ϵ_1 值近似为3.8; 对于 $Kp1 \cdot Mn \cdot ATP$ 来说 ϵ_1 值近似于2.5。最近有人¹在 Mg^{2+} 存在的情况下作了ATP与Kp1络合的凝胶平衡的研究, 得到的 $K\alpha$ 值为 $600\mu M$ 。由于我们发现在二元络合物中 Mn^{2+} 络合于Kp1的强度比 Mg^{2+} 要大一个数量级, 所以假设在二元络合物中也有一个类似的比率则是合理的。为了计算方便, 假定三元络合物与二元络合物的络合部位数相同。以这种假定所得到的曲线示于图8。这与实验值是接近的, 虽然它并不证实所作的假定, 但却确实证明对三元络合物所假定的一系列性质是合理的, 因为它们能够解释用其他方式所不能解释

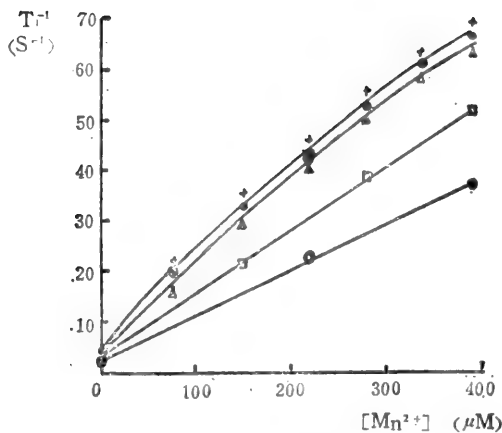


图8 三元系统的M-图(用 Mn^{2+} 与核苷酸的克分子比率为1:1的溶液滴定Kp1)
(Kp1的比活性为1420活性单位,初始浓度为 $65\mu M$)。

+ 在无核苷酸时, Mn^{2+} 滴定Kp1的实验参照点; \cdot $Mn^{2+} + ADP^{3-}$ 滴定Kp1的实验点; \blacktriangle $Mn^{2+} + ADP^{3-}$ 滴定Kp1的实验点; —— 包括三元络合物形成的计算曲线; \cdots 仅通过二元络合物竞争的计算曲线; (上面的线为ADP系统, 下面的线为ATP系统)。□ 无蛋白时用 $Mn^{2+} + ATP^{3-}$ 及 $Mn^{2+} + ATP^{4-}$ 进行的空白滴定; ○ 无蛋白和核苷酸时用 Mn^{2+} 进行的空白滴定。

的结果。所以我们得出结论: 确实有三元络合物的形成。Syrtsova等人也曾报道了在ATP存在的情况下质子弛豫增强效应的减弱, 但并未得到定量的结果。他们仅用二元络合物的形成来解释这种现象, 而并未说明原因。

结 论

本文已阐明了二价金属离子 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 对于Kp1的专一的络合。这些结果有助于解释许多报道中提到的一个问题, 即一些固氮酶MoFe蛋白的制剂中除了Mo和Fe之外还有其他金属离子的存在。

一个重要的发现是当Kp1的比活性增高的时候, Mn^{2+} 的络合部位数也增加。 Mg^{2+} 完全取代了 Mn^{2+} , 所以也能够推测出 Mg^{2+} 的络合部位数和蛋白比活性之间的类似的关系。我们的数据还说明了金属、核苷酸和蛋白形成了三元络合物。将这些数据和Miller等人的数据综合起来, 可以得出结论, 当Kp1的比活性达到近乎于2900活性单位时, Mg^{2+} 的络合部位数可达到最大值4。

正如过去所讨论, 有活性的Kp1是一种包括至少5个基因产物的络合物。已知这些基因产物的功能包括多肽的合成(nifK和D)及FeMoCo金属团簇的合成、转移和/或修饰(nifB和E)。全部有活性的MoFe蛋白、每个分子可能有2个Mo原子和30个Fe原子, 排列成为2个FeMoCo簇, 其中每个含有1个Mo原子, 6个Fe原子, 它们和4个独特的称之为“P中心”的4Fe-4S簇及2个称为“S”的Fe原子在一起。过去所观察到的在Mo、Fe含量和蛋白比活性之间的粗略的相互关系可能是由于存在着一些缺乏活性簇的蛋白。我们关于在Kp1的比活性和二价金属离子的络合部位数之间的良好的线性关系(图5)使得这种争议更加复杂。有几种可能的解释, 其中可能性较大的是:

(a) $MgATP$ 的络合部位是在FeMoCo上或在“P中心”上。

(b) 与(a)紧密相关, 但更大的可能性是 $MgATP$ 络合部位是仅仅由于当FeMoCo和

或“P中心”存在的时候Kp1的构型变化而造成的。所以在蛋白上的MgATP和簇部位可能有一段距离。

(c) 17个nif基因产物之一（其中几个的功能仍不明确）可能在Kp1生物合成期间通过形成MgATP络合部位而活化Kp1。由于Kp1有前体，所以会含有不能络合MgATP的形式。

(d) 在提纯过程中，MgATP络合部位可能会很容易破坏。

根据我们现有的数据远不能断定这些可能性，但在这个讨论的后面将可以回答它们之中的一部分问题。

由于MgATP水解为MgADP是固氮酶反应中十分关键的一步，尤其是考虑到Kp1能活化ATP和ADP的末端磷酸基团，因此上述的络合部位和Kp1的比活性之间的相互关系可能说明水解反应是在MoFe蛋白上发生的，然而Fe蛋白也至少在2个部位上络合MgATP和MgADP，所以在固氮酶作用过程中究竟在那种蛋白中发生ATP的水解仍不清楚。

已知固氮酶反应过程中，ATP可能有两种作用。其一，与从Fe蛋白转移到MoFe蛋白的电子活化有关；其二，与底物的还原关系更为密切。MgATP在两种蛋白上的络合部位应与这个意见一致。

关于MgATP在底物还原中的直接功能的一种假设认为，是其末端的磷酸盐对于在一个Fe或Mo的部位上的水化物的形成起到了一个良好的滞留基团的作用，随后，金属水化物就被参与在N₂络合和还原过程中。这个假设与我们上述意见（a）一致，即MgATP在MoFe蛋白上的络合位置直接与含Mo（或）Fe的簇有关。

同时也有人提出，Mg-核苷酸可能起到了两种蛋白之间的桥梁作用，这就明确地需要在两种蛋白上都有络合位置。这个假设将有助于推理出在固氮酶蛋白上有非常多的MgATP络合部位数。如果这种“桥梁”假设是对的，则我们关于这种桥梁性质的数据是十分清晰的。我们已说明两种蛋白（Kp1和Kp2）都形成了E-M-S或E—M形式的络合物，也就是说，金



属一磷酸盐区域与核苷酸络合到两种蛋白上是紧密相关的。所以可以消除由于ATP的腺苷部分络合于一种蛋白上，同时金属一磷酸盐部分又络合于另一种蛋白上而形成桥的可能性。由于金属一核苷酸络合于每种蛋白上的性质是相似的。如果形成一个桥，最有逻辑性的结论就是：核苷酸—金属络合物被夹入两种蛋白之间，对于每种蛋白都呈现出类似的面，如下所



示：

其中 S = ATP，大部分数据指出在Fe蛋白上有两个MgATP络合部位；但在过去的一篇文章中，我们发现Kp2上有4个Mn²⁺和Mg²⁺络合部位，但不能确定Mg²⁺—核苷酸的络合部位数。由

于MoFe蛋白是α₂β₂的四聚体，Fe蛋白是γ₂的二聚体，所以在桥梁上可以有几种类型的络合物。其中3种示于图9。在图9（a）中，我们表明了与大多数有效的数据一致的结构，每一个Fe蛋白分子有两个MgATP络合部位，MoFe蛋白对MgATP的全部络合容量可以通过MgATP桥络合两个Fe蛋白分子得到满足。Fe蛋白可能是相继地而不是同时地与分别起作用的每半个MoFe蛋白相络合。所以可以形成Fe蛋白和MoFe蛋白的克分子比为1：1或2：1的络合物。另一种改变了的模型（未示出），基于同样的数据，是每一个Fe蛋白分子与每两个MoFe蛋白的亚单位形成MgATP桥。在图9（b）的几何模型中，Fe蛋白具有4

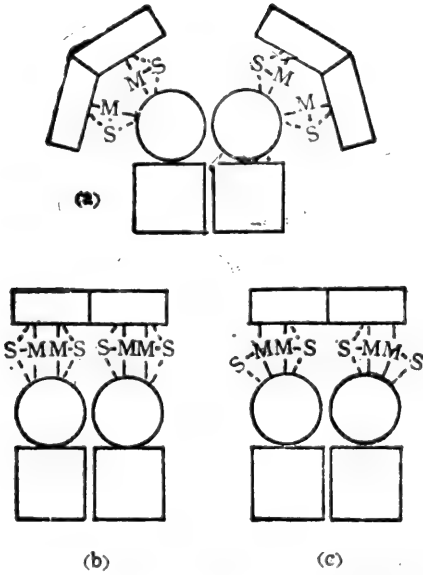


图9 有活性的固氮酶的可能的 Mg^{2+} ATP桥模型

每一个模型的下面部分表示MoFe蛋白 (a) 经由4个 $MgATP^{2-}$ 桥的Fe蛋白与MoFe蛋白克分子比为2:1的络合物 (b) 经由4个 $MgATP^{2-}$ 桥的Fe蛋白与MoFe蛋白克分子比1:1的络合物 (c) 经由2个 $MgATP^{2-}$ 和2个 Mg^{2+} 桥的Fe蛋白与MoFe蛋白克分子比为1:1的络合物。

表示二元金属络合物, 相应的无星状标记表示目前情况下的游离水合离子 $Mn(H_2O)_6^{2+}$ 。通过类推, 对于核苷酸—金属—蛋白的三元络合物来说 (用标在字母上方或下方的‘t’表示)

则:
$$e_t = \frac{q^t f(\tau_c^t)}{q f(\tau_c)}$$

所以, 下面有:

$$\frac{e_t}{e_b} = \frac{q^t f(\tau_c^t)}{q^* f(\tau_c^*)}$$

假定, 三元络合物和二元络合物的大小和迁移率 (动性) 相类似,

则:
$$f(\tau_c^t) \approx f(\tau_c^*)$$

由于这个假定,

$$e \approx \frac{q^t}{q} e_b$$

如果我们假定蛋白与金属的络合只占据金属的一个配位部位, 则对于金属—蛋白的二元络合物来说 $q^* = 5$ 。所以在有ATP存在时, 克分子比为1:1的 Mn^{2+} —核苷酸络合物可能是三齿的, 而在有ADP存在时, 可能是二齿的。如果这种配位在核苷酸—金属—蛋白的三元

个 Mg ATP络合部位, 并仅仅形成Fe蛋白和MoFe蛋白克分子比为1:1的络合物。在图9(c)中, 说明了第三种可能性, 其中Fe蛋白仅络合两个 Mg ATP分子而其余两个络合部位用于与MoFe蛋白络合的桥上。不论这种“桥梁”假设对于 Mg ATP是否正确, 我们的数据有力地说明了MoFe蛋白与 Mg ATP的相互作用是整个酶反应机制的一个组成部分。

附 录

三元络合物的特性增强效应

对于一个顺磁离子引起的水质子的两极弛豫, 应用Soloman-Bloembergen方程可算出金属—蛋白二元络合物特征增强 e_b 。

$$e_b = \frac{q^* f(\tau_c^*)}{q f(\tau_c)}$$

其中, q = 每个金属离子的配位部位数, 它们迅速地被可交换的水占据。 $f(\tau_c)$ 是两极弛豫相关时间 τ_c 的函数。星状符号

络合物中是不变的，则对于ATP来说， $q^* = 2$ ，对于ADP来说， $q^* = 3$ 。将这些值和实验值代替上述方程中的 ϵ_b ，则得到ATP的 $\epsilon_t = 2.5$ ，ADP的 $\epsilon_t = 3.8$ 。对于Fe蛋白来说，这些计算比我们原来的计算似乎更合理一些。

原载 "Biochem, Biophys, Acta" 705: 385—395, 1982

宋 未译

固氮作用的生化遗传

W. J. Brill

在许多属的植物中都存在着具有固氮能力的原核生物，在自生固氮细菌（这些细菌不与一定的植物联合共生）中有 *Klebsiella*、*Azotobacter*、*Clostridium*、*Rhodo-Spirillum*、*Aspirillum* 和各种蓝细菌，还有只在与植物共生后才能固氮的 *Rhizobium* spp.（它能在植物上结瘤）、某些放线菌（它们在 *Comptonia* 和桤木上结瘤）以及 *Anabaena azollae*（它们在水生蕨类红萍叶腔中固氮），然而还未发现真核有机体有固氮能力。

固氮作用的生物学、生物化学、调节作用和遗传是相当复杂的。但是，在过去十年中，由于活性无细胞粗提液的制备、固氮酶的纯化和用乙炔还原法测定固氮活性，使我们对这个经济上重要体系有了迅速深入的了解。

当前，一些有关固氮作用的书籍已经出版，涉及固氮方面的不同专题也已有过综述，它包括生物化学、根瘤的感染过程、非豆科共生、蓝细菌和遗传及其调节。

本文着重于对没有固氮能力的突变种（*nif*-突变种）的分析来阐明一些观点。在有些情况下突变种的研究已为其它途径所确证，而在另一些工作中突变种的研究则得到了新的信息。这篇综述的目的是向生物化学家们介绍广泛范围内各种可利用的 *nif* 突变种和它们的潜在价值。尚未描述的某些突变种将与其在生化研究中的价值一起讨论。

与大肠杆菌相近的肺炎克氏杆菌，是一种对包括固氮 *nif* 基因在内的基因已进行过详细遗传分析的细菌。噬菌体 P_1 、转导作用、噬菌体 Mu 突变形成、转座子突变形成和互补分析等对研究 *nif* 表达的调节及其生化的复杂性都有极大帮助。所以在这篇综述中，作者特别着重于这个有机体的遗传研究。

一、生物化学与生理学

1. 固氮酶

固氮酶由两种可溶性蛋白组成，分别称为组分 I 和组分 II。组分 I 也称 MoFe 蛋白或固氮酶，组分 II 则为 Fe 蛋白或固氮酶还原酶。从完全不同的生物中分离出的固氮酶彼此十分相似，比如某一个属中的组分 I 可以与从另一个属中的组分 II 反应，构成有活性的酶，从一个属的成员的组分制备得到的抗血清可以与从不同属细菌中分离出的组分反应。一个有待回答的问题是：固氮酶是同源发展来的，还是在其进化中趋于一致，以适应还原非常稳定 N_2 三键的苛刻要求。

组分 I 的分子量在 200000~250000 之间，含有两个钼原子，28~34 个非血红素铁原子，和 26~28 个酸不稳定硫。组分 I 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳表明，组分 I 含有 4 个两两相同的亚基 ($\alpha_2\beta_2$)，每个亚基分子量约为 60000，实际上如果不用特定的 SDS 制剂，SDS 凝胶并不能将两个亚基分开。亚基的氨基酸分析也证明它们相互间是非常相似的。

虽然棕色固氮菌固氮酶组分 I 两种亚基的C端和N端的氨基酸不同, 看来这两个亚基可能是由同一个相同多肽链修饰而来的, 然而不同胰酶水解的状况却得出与两个亚基具有不同氨基酸顺序的结果, 在*K. pneumoniae*中, 组分 I 蛋白有两个结构基因编码, 通过缺损这两个nif基因突变种粗提液的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳确定nif K基因为一个亚基编码, nif D为另一个亚基编码。几个nif D突变种只改变一个亚基的电泳迁移率, 那些nif K突变菌株只改变另一个亚基在凝胶上位置, 从而说明这两个亚基是完全不同的蛋白而不是同一种蛋白的变更, 也许组分 I 两种亚基的相似处是在固氮酶进化过程中发生基因复制的结果。

在体内组分 I 的每一个亚基都需要另一个亚基以保持其稳定性, 如果一个突变种中任意一个基因使得另一个基因不稳定, 那么另一个基因产物也会很快降解。

组分 II 的分子量在55000到65000之间, 是由两个相同亚基组成的, 这种蛋白有4个非血红素铁原子和4个酸不稳定硫, *Clostridium pasteurianum*的组分 II 的氨基酸顺序分析已经确定, 在*K. pneumoniae*中nif M基因(也可能是nif V和nif S基因)为组分 II (编码为nif H)产生过程所需蛋白编码, 这种修饰的生物化学还不了解。

底物的络合及还原是在组分 I 上, 组分 II 的作用是每次向组分 I 传递一个电子, 还没有发现 N_2 还原过程中有游离的中间产物, 但有证据表明酶-结合 N_2 -氢化物是中间产物。其还原步骤还不清楚, 用组分 I 缺陷型突变种来检验酶-结合中间产物是否在缺陷的组分上形成的工作也许是有意义的。

动力学数据支持了当一个电子从组分 II 传递至组分 I 之后两组分发生解离的观点, 但是两种组分混合物的超离心分析却表明两种组分可以形成较为稳定的复合物。如上所述, 一个亚基发生强烈变更的nif D或者nif K突变种将阻碍另一个亚基的累积, 可是, nif K或nif D插入的突变种虽然组分 II 的量是降低了, 但仍能使组分 II 积累。这不是由于极性或者转录作用的调节。这些数据, 支持了两种组分作为一种复合物在体内是以某种方式相互作用的, 和一个亚基需另一个亚基来稳定的设想。

转换数(50mol/分钟/固氮酶中mol 140)是相当低的。因此, 当固氮菌以 N_2 做唯一氮源生长时合成细胞总蛋白中, 大约有2—5%为固氮酶。*A. vinelandii*缺失固氮酶组分的Nif⁻突变种(加倍时间6小时)比以天冬酰胺为N源时合成的无活性组分的nif⁻突变种(加倍时间12小时)长得快。这也许是由固氮酶合成时对外能和氨基酸的需求所引起的。

2. 力能学

尽管 N_2 还原成 NH_4^+ 是放热的, 但由于固氮过程是要高活化能的, 所以需腺苷5'-三磷酸(ATP)形式的能量。ATP与组分 II 络合并使它的氧还电位降低, ATP在组分 II 将电子传给组分 I 时才水解生成ADP。看来每传递一个电子有2个ATP水解, 但是ATP的水解也可以不与电子传递相偶联。例如, 过量的组分 I 使ATP/e的比率增加, 在体内同属一个操纵子的三个结构基因nif HDK(至少是在*K. pneumoniae*菌中)保持这两个组分的比率恒定。有趣的是生理研究有可能检查出在结构基因上不同复制数(如在部分二倍体)的菌种中对细胞生长及产量的影响。

在体外固氮对ATP的需要量并不一定反映其在体内的需求。产量实验的数据指出:*Azotobacter*每固定一分子 N_2 只需4—5个ATP分子。而*K. pneumoniae*需29个ATP, *C. pasteurianum*需要20个。 NH_4^+ 形成与碳基质利用间的关系曾用*K. pneumoniae*解阻遏的突变种进行过研究。这种突变种不能同化固氮产物 NH_4^+ 。实验得到的结论是: 每固定一分子 N_2 需21—25个ATP分子。

3. 氧不稳定性

固氮酶中任意一个组分在短期暴氧后都会不可逆地失活。因此在组分纯化时必须保持无氧条件。固氮有机体都具有保护其固氮酶不被氧所失活的机构。在严格厌氧微生物中（例如 *C. pasteurianum*）这种机构没有什么特殊意义，在兼性需氧微生物中（例如 *K. pneumoniae* 和多粘芽孢杆菌）不能进行有氧固氮，这些生物只有在没有空气的 N_2 培养基上生长。但在固定态氮培养基上，在好氧或厌氧条件下均可生长。甚至在 *K. pneumoniae* 种的长期诱变发生之后也没有分离出具有耐 O_2 的固氮酶突变种。 *Azospirillum* 只在微好氧条件下固氮，但能在有氧的固定态氮培养基上生长。推测充足的氧有利于氧化磷酸化作用，但过多的胞内氧会使固氮酶变性。

在绝对好氧的固氮菌中，则有非常高的呼吸作用活性使 O_2 迅速还原，结果使内部氧的浓度降低，从而保护了固氮酶。为了保持这样的呼吸活性，需要足够的碳基质作还原力。如果完全限制电子流，固氮菌 *Azotobacter* 就用另外的 Fe-S 蛋白（已知的有 Shethna 蛋白或 Fe-S 蛋白 II）与酶的两个组分复合来保护它的固氮酶。这种组分 I、组分 II 和 Shethna 蛋白以 1 : 1 : 1 比例形成的复合物，在 O_2 存在时增加其稳定性。这种氧稳定的复合物似乎在电子流完全恢复前没有固氮能力（因此降低细胞内氧的水准）。在电子流恢复时，复合物解离使固氮酶恢复活性。有些可自发恢复原状的 *A. vinelandii* Nif⁻ 突变种能合成固氮酶的两组组分，但是这些组分在体外没有活性。这样的突变种应当分析 Shethna 蛋白是否存在，如果在突变种中发现这种蛋白，那么就要确定它是否形成复合物，并保护固氮酶免受 O_2 损伤。在突变种中，另一个可能的缺陷是，它们还原氧的能力很差。

大多数好氧固氮细菌，在琼脂培养基上产生粘性菌落。这也许是荚膜在固氮酶中起保护作用，但是 *A. vinelandii* 的无粘性突变种保持了它的好氧固氮活性。

在异养蓝细菌中，固氮酶似乎只在异形胞中存在，这种异形胞具有特别厚的细胞壁和进行不产氧的光合作用反应。一些不能固氮的突变种缺少异形胞，所以异形胞在固氮中起主要作用。缺少异形胞外鞘糖脂的鱼腥藻的突变种，只在极低氧水平下才能固氮。在几种氧敏感的突变种中，有一种在好氧条件下温培 10 小时，完全去氧后就解除了氧的抑制作用。也许在蓝细菌中存在着类似固氮菌中 Shethna 蛋白的固氮酶保护蛋白。异形胞形成的发育调节，可以从研究藻丝体细胞上具有不同异形胞间隙的突变种中了解到。它们也许有另外的保护机理，比如呼吸保护，或者吸氢酶还原氧的作用。在异形胞中存在吸氢酶。应当分离吸氢酶缺失型的突变种，以便鉴定吸氢酶是否对固氮酶起氧保护作用。

在植物细胞的细胞质中的根瘤菌，是为膜外套所隔离的。细菌周围包裹着大量的豆血红蛋白。豆血红蛋白的功能是结合 O_2 ，防止游离的氧到达细菌内部的固氮酶上。这种球蛋白是由植物编码的，而细菌看来是产生豆血红蛋白的血红素部分。除根瘤外在豆科植物组织中没有发现豆血红蛋白。我们还不了解根瘤菌怎样诱导植物合成球蛋白的信使核糖核酸，这种信使核糖核酸存在于结瘤植物的细胞液质之中。缺失豆血红蛋白但能结瘤的根瘤菌，对于了解植物球蛋白的诱导合成和细菌产生血红素并将其转入球蛋白中是十分有用的。

结瘤植物细胞的胞液质中含有一种以上的豆血红蛋白，它们是根据电荷的不同而区分的。这些种中有两种其氨基酸是不同的，这说明它们也许是由互不相干的基因编码的，但具有十分相似的三级结构。因为豆血红蛋白在根瘤中大量产生，所以豆血红蛋白基因的复制可以减轻因增加豆血红蛋白合成而产生的压力。互不相干的突变种只要豆血红蛋白的生化功能没有改变，复制的基因就可以累积。如果确实如此，那么没有密切关系的大豆变种不同的豆

血红蛋白的数量就应该是可变的。从豆血红蛋白C/豆血红蛋白a的比率在大豆发育中变化的研究中,得出不同豆血红蛋白具有不同功能的可能性。也许能找到缺少某一种豆血红蛋白的植物突变种,如果找到能诱导出一种豆血红蛋白的根瘤菌突变种,那么这个种对了解不同豆血红蛋白的作用将是十分重要的。

人们期望的是,在豆科植物的根瘤菌专性中,有某些根瘤菌能在非豆科植物*Parasponia*上形成固氮根瘤。在这种情况下根瘤不含豆血红蛋白。

为某些放线菌所结瘤的非豆科植物,比如桤木和 *Comptania*,在它们的固氮根瘤中不含豆血红蛋白,确定在这样的根瘤中固氮酶是怎样被保护的将是饶有兴趣的。桤木根瘤的固氮酶具有的特性(包括 O_2 不稳定性)与其它来源的固氮酶是相似的,在这些系统中呼吸作用或 O_2 屏障也起着保护作用。

4. 放氢作用

很多固氮细菌在它们固氮时放氢,但当它们在 NH_4^+ 中生长时不放氢(处于抑制固氮酶合成条件),固氮酶自身有放氢能力,当有电子和ATP、 N_2 时,电子与质子结合产生 H_2 。在放氢时,需要固氮酶两种组分和ATP水解。但是甚至气相是 N_2 时,一些电子也参与放氢,其余电子用于将 N_2 还原成 NH_4^+ ,这是在体外鉴定过的所有固氮酶的通性,电子对 N_2 或质子的分配取决于组分比、电子的供给和ATP浓度。

在正常生长条件下(指环境中的 N_2 浓度),在体内电子的50~65%损失于放 H_2 。*Nif*-突变种也不能放 H_2 。这样放 H_2 与氮的固定似乎同在一个活性中心上。但是,有趣的是CO抑制固 N_2 却不抑制放 H_2 。 H_2 是固氮的竞争性抑制剂。这样固 N_2 的活性中心似乎又与放 H_2 的活性中心不同。也许能找到一种 Nif^- ,但却仍有固氮酶催化放 H_2 活性的少有的突变种。对这种突变种进行生物化学分析时,获得有关两种反应机理的重要信息。

固氮酶放氢似乎对细胞是有害的。因为它浪费了ATP和电子。据说放氢可以保护固氮酶不受 O_2 抑制,但是*C. pasteurianum*(严格厌氧菌)也通过氢酶放氢。

对固氮酶合成解阻遏的*K. pneumoniae*突变种(在 NH_4^+ 存在下合成的固氮酶),看来是利用固氮酶放氢以除去过量的电子。在以蔗糖为碳源的厌氧生长条件下解阻遏的细胞比在 NH_4^+ 培养基上的野生型细胞生长迅速。当培养基中有延胡索酸存在时,解阻遏的细胞不比野生型快。推测延胡索酸起过量电子的受体作用。ATP驱动固氮酶活性的能量消耗在细胞中不像移去过多电子压力那么重要。

另一个对固氮酶放氢的解释,是活性中心的特性。换言之,固氮酶活性中心还没有进化到淘汰这一潜在的无效的副反应的程度。人们预言,不会发现在自然选择中已经淘汰了这种不利反应:即具有活性固氮酶而又不产生氢的天然发生种。这种突变种的选择应该要求在固氮条件下,比野生型生长更快。如果以一个缺少吸氢酶突变种作为亲本选择,机率就更大。

有些固氮菌能再循环释放 H_2 ,并使电子回到固氮酶上。这是由于吸氢酶的存在。吸氢酶产生的电子支持了氧化磷酸化作用合成ATP,或通过固氮酶还原 N_2 。固氮酶-催化放 H_2 而损失的ATP和电子可为吸氢酶的活动而得到部分补偿。无吸氢酶活性,但有活性固氮酶的*K. pneumoniae*突变种比野生型放氢更多。因此在体内吸氢酶确实有再循环固氮酶产生的氢。固氮菌的 nif^- 突变种保持氧化 H_2 的能力、 H_2 吸收也在有 NH_4^+ 生长细胞中发生,所以固氮和 H_2 氧化看来不是共同调节的。

有些根瘤菌野生型菌种,通过吸氢酶氧化氢。这些菌种其固氮效率比没有吸氢酶的菌种

高。已分离出缺乏吸氢酶的大豆根瘤菌突变种其效率似乎比野生型低。这种吸氢酶呈微粒状，也是氧敏感的。

5. 选择性底物

质子（用于还原）和 N_2 并不是唯一的可被固氮酶还原的底物，很多低分子量化合物—两氮原子间的三重键（例如叠氮还原成 NH_4^+ ）、两个碳原子间（例如乙炔还原成乙烯）或者C和N之间的键（例如氰还原成甲烷和 NH_4^+ ）都可以被固氮酶还原。这些反应都需要固氮酶两种组分和ATP。除放氧外，CO抑制固氮酶的所有反应。但是 H_2 仅仅是 N_2 固定的抑制剂。还没有关于只能还原一种底物，而不还原其它底物能力的固氮酶突变种的报道。在已分离出的数百种*K. pneumoniae* Nif突变种中，那些在体内不能固氮的菌种其在体内同样不能还原乙炔，这证明了乙炔还原和固氮是处于同一（或重叠）酶部位。有趣的是，许多来源的固氮酶对不同底物，几乎有同样的反应性。

研究者已经广泛应用乙炔还原分析法测定固氮酶活性，但是乙炔还原法得到的数据不能推断固氮量。因为乙炔还原到乙烯只需两个电子，而将氮还原成 $2NH_4^+$ 需要6个电子，但是在体外条件下，从乙炔还原至 N_2 的固定，取决于还原剂浓度和两种组分比率和ATP浓度。电子传递缺陷性，或者两种组分中一种组分没有活性的突变种，在体内对确定上述参数的影响是有用的。

能使细胞中毒的固氮酶底物（如氰和叠氮），曾试图用作为分离Nif⁻突变种或固氮酶合成解阻遏的突变种的选择性试剂。在解阻遏突变种的选择中，在含氰化物以 NH_4^+ 做N源的培养基中野生型将被杀死，解阻遏的突变种也许会解除氰化物的毒害（把它还原成无毒化合物），使突变种能在这种培养基上生长。不幸的是，这个技术还没能成功地分离Nif突变种。培养基中过多的氰化物杀死了所有的细胞，这个问题，目前还不能解决。问题可能会是，这些抑制剂在它们接触固氮酶以前就与敏感的膜部位遭遇。

6. 电子给体

在体外，使用化学还原剂，比如 $S_2O_4^{2-}$ 固氮酶很容易固氮，在体内光合作用取得的电子（在蓝细菌情况下）或者从碳基质来的电子驱动固氮酶活性。Fd和F1d已被证明在体外把电子传给固氮酶，在有些情况下，在同一个细胞中有两个或更多个电子载体。但是在体内很难查明这些蛋白哪一个是将电子传给固氮酶的。

*K. pneumoniae*菌的某些突变种似乎缺少天然电子传递蛋白，因为它们体外固氮（加 $S_2O_4^{2-}$ ），但在体内不固氮。其中一种缺少nif F基因的已用于鉴定和纯化菌种中的nif F编码蛋白，这个菌种可合成nif F活性产物。纯化的蛋白是一种含黄素核苷酸的黄素蛋白，它只有在固氮酶合成时才能合成。当细胞在 NH_4^+ 中生长时，它不能合成。在该体系中，冷冻粗提液以使野生型菌的电子给体失活。将F1d加入该系统中，使电子流恢复递送至固氮酶，该系统是与菠菜叶绿体驱动电子偶联的。用Nif⁻突变种测得的黄素蛋白，似与用光合作用偶联法测得的同一有机体*K. pneumoniae*分离出的蛋白不同。Nif⁻F突变种不能在 N_2 培养基上生长的事实，支持了Nif-F编码的黄素蛋白是固氮作用的真正的电子给体蛋白，这也是黄素蛋白的唯一作用，其它黄素氧还蛋白在体内很可能起传递电子以外的作用，这些数据部分说明了用在体外电子传递数据所引起的问题，推测体内的真实情况。

在*K. pneumoniae*中另一个蛋白似乎也参与了把电子传递给固氮酶。在体外则如固氮酶对 $S_2O_4^{2-}$ 还原作用，这种为nif F⁻编码的蛋白含一个分子量为120000的单体，推测这个nif J编码的蛋白是还原态的烟酰胺二核苷酸磷酸黄素蛋白还原酶。nif F或nif J蛋白都不与膜结

合。

7. 钼

其它钼酶的工作指出：Mo寓于一些辅因子中，*A. vinelandii*的一个突变种(UW45)产生一个无活性的组分 I 和有活性的组分 II，这个突变种的无细胞粗提液在加入酸处理的组分 I 时就有固氮酶活性，酸处理后的组分 I 完全失活，这证明组分 I 中有 Mo 辅因子。

分离后的组分 I 的 Mo 辅因子，每个 Mo 相应地含 8 个 Fe 原子和 6 个酸不稳定硫。这个辅因子叫铁钼辅因子 (Fe-Mo-Co)，它的分子量大概低于 5000。另一种用于制备具 Fe-Mo-Co 组合活性的 *A. vinelandii* 无细胞粗提液的方法是用 WO_4^{2-} 代替 MoO_4^{2-} 培养细胞；从 WO_4^{2-} 培养细胞得来的组分 I 的活化可以用无活性辅因子的种来进行，在体外用 MoO_4^{2-} 活化这种无活性辅因子时需要 ATP，曾有人提出，念珠藻的一个突变种利用钨代替钼并通过固氮酶固氮，但这个不平常的结果尚待证实。

纯化过的组分 I 有一个单一的电子顺磁共振谱，g 值为 3.65，这个信号在整体细胞中也可以观察到，有些突变种在正常水平的 Fe 和 Mo 条件下合成无活性的组分 I，这些突变种因为组分 I 的缺失而无 g 值为 3.65 的信号。突变种比野生型的讯号低。g 值为 3.65 的信号与组分 I 活性之间的关系非常明显，这支持了 EPR 信号是由组分 I 活性部位引起的假说，Fe-Mo-Co 也有 EPR 谱，因而 Fe-Mo-Co 是固氮酶的活性部位。

当以硼氢化合物作还原剂时，在 N-甲基-甲酰胺里由于 Fe-Mo-Co 催化乙炔还原乙烯的事实，进一步证明 Fe-Mo-Co 是活性部位，该反应不需要 ATP，组分 II 和无辅基组分 I。与酶的催化过程一样，CO 是 Fe-Mo-Co 催化乙炔还原的抑制剂，但是，Fe-Mo-Co 单独不催化固氮酶。

K. pneumoniae 三个基因 (nifB、nifN、nifZ) 中任意一个缺失都使细胞产生一个无活性组分 I，它在体外可用 Fe-Mo-Co 活化。第四个基因 nifQ，并不为固氮作用所绝对必须，因为这个基因插入该变种后，还原能力只达到野生型菌固氮能力的 50%，这个水平同样可以通过在体外加入 Fe-Mo-Co 方式来达到。缺失这些基因产物的突变种对了解 Fe-Mo-Co 生物合成及插入到组分 I 都是重要的。例如：我们想要知道 Fe-Mo-Co 是合成以后插入组分 I 的呢？还是在组分 I 中合成的，以及 Fe-Mo-Co 中间产物是否在变种中积累。

固氮酶和硝酸还原酶都参与 N 代谢，二者都是含钼酶。硝酸还原酶中的钼辅因子与组分 I 的辅因子不同。看来两种辅因子不是通过一条途径合成的。因为去掉全部 nif 基因组，*K. pneumoniae* 依然可以利用硝酸。但是，大肠杆菌硝酸还原酶缺失型突变种 (Nar^-) 在高水平 MoO_4^{2-} 存在下可以恢复活性，而除非加入高水平 MoO_4^{2-} ，它即使含有 nif 质粒也不能固氮。所以两种含钼酶都依靠共同 MoO_4^{2-} 渗透酶或其它初期的钼进程。

“豇豆”根瘤菌的突变种不能还原硝酸但仍保持固氮能力，不能利用硝酸的苜蓿根瘤菌突变种在四条染色体上有缺失，这些变种中有的也缺少黄嘌呤氧化酶（一种含钼酶）活性，所有这些突变种均产生固氮根瘤，这个系统中未发现共同的固氮基因和其它含钼酶。

二、肺炎克氏杆菌

1. nif 基因机制

所有 nif⁻ 突变簇都靠近肺炎克氏杆菌染色体上的组氨酸 (his) 操纵子。至少有四个基

因组成这个簇。似乎没有非nif基因散布在nif范围内。用极性突变作用进行互补分析和研究LaC融合,指明基因组成七个不同的操纵子,所有操纵子以同方向转录,即向his基因方向转录(图1)。

nif区域长约24Kb碱基(Kb),现在很容易得到大量的nif脱氧核糖核酸。因为整个nif区域和nif区域的部分已经连接在可扩增的质粒上;遗传工程已用于生产专门转导含nif的噬菌体。用克隆的DNA的限制酶分析,已经得出nif区域中大部分的物理图象。

大部分基因功能已经在上面讨论过了。并且概括于图,在实验中,在一般细胞生长条件下,有三个基因对固氮来说不是主要的。这三个基因(nifL、nifN、nifV)的突变作用只有当他们对主要基因有极性影响时才会发觉。(Mu)插入这些基因后,突变种就完全恢复Nif⁺。这将要考虑是否要确定这些“非主要”nif基因产物起作用的条件。例如,它们中的一个基因为极低钼浓度时才起作用的钼渗透酶编码,而在高钼水平培养基中的固氮作用就不需这种酶存在。

双向聚丙烯酰胺凝胶电泳,已用于确定这个体系中基因—产物的关系,当确定一些突变种中基因改变多肽的分子量和电荷以后,一个多肽就与一个特定的基因对应,大多数nif基因产物已用这个方法鉴定。

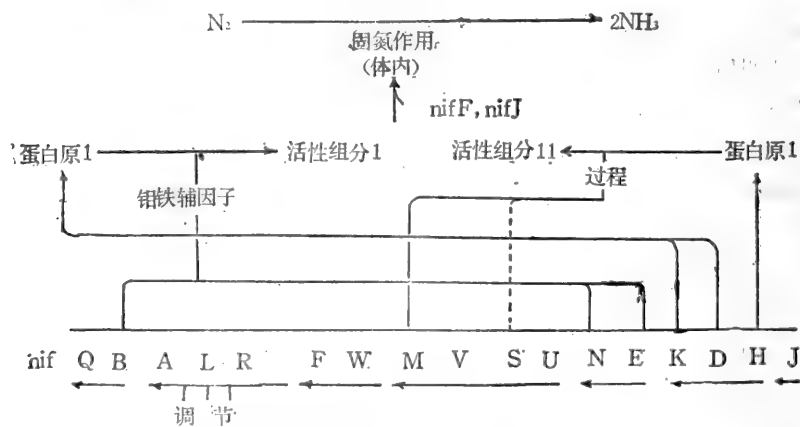


图 *K. pneumoniae* nif基因的顺序、转录机制和功能

*K. pneumoniae*的nif基因已转用到其它细菌,它们包括大肠杆菌、*Solmonella typhimuium*、*A. vinelandin* Nif⁻突变种、根瘤菌和*Agroboterium tumefuciens*中,在杂交的肠细菌中,只有限氧条件下才能使固氮作用得到厌氧表达,*Azotobacter*能好氧表达*K. pneumoniae* nif基因。推测高呼吸活性保护了固氮酶,含nif的*Agrobaeterium*好像合成一个无活性(O₂⁻变性的)固氮酶。

克隆的Kp nif基因片段已经与许多固氮细菌的DNA杂交。在nifK、D、H结构基因内是否包括同系内其它*K. pneumoniae*的nif基因,这一问题尚未确定。所测定的固氮有机体的多样性,值得注意的在DNA顺序水平上极为密切的关系,只在结构基因上发现。一种解释是,这些细菌都相对地是nif DNA新近接受者,这种nif DNA是由基因转移所得的。实际上某些根瘤菌菌种的nif基因在大质粒上,但是如果nif混杂地转移,那末nif基因与结构基因不同也应该保持密切关系。另一种解释是固氮酶活性组分的二三级结构要求苛刻,几乎不能容忍氨基酸组分的极小变化。所以从大量分析普通氨基酸的顺序中,有可能找出各自进化而来的固氮酶。这种独特的一级结构的结果可能是具有相似密码子关系的DNA顺序,这

样彼此间就具有高杂交能力。这些nif结构基因的发现，看来在Kp以外的有机体中也簇集在一起，这一点是不奇怪的。事实上，通过操纵子控制了组分的调节作用，从而保证了得到组分的最佳比。

2. nif基因表达的调节作用

培养基中有过量 NH_4^+ 存在时，Kp含有不可测出的nif编码蛋白或者活性。其它的氮源也抑制固氮酶的合成。一般说，生长过程中的N源越好抑制程度也越高，某些与谷酰胺合成酶表达有关的基因突变阻碍了固氮酶的表达。谷酰胺合成酶的抑制剂（甲硫氨酸亚砷次胺和甲硫氨酸砷），既是在 NH_4^+ 存在时也引起高水平的固氮酶合成。某些通过谷氨酸合成酶途径同化 NH_4^+ 的基因突变种，也得到解阻遏表现型。这证明 NH_4^+ 实际上不是抑制的影响因子，nif的调节作用似乎与肠细菌中组氨酸的降解作用（Hut）相似。在肠细菌中的表达需要谷氨酸合成酶和/或谷氨酸合成酶另外的基因产物。这些gln基因并不是噬菌体p1与nif或Hut共同转导的调节。调节作用好象与谷氨酸合成酶生物合成活性无关。关于谷氨酸合成酶的调节机制还不了解，也许是调节氨基酸的水平。

已在 NH_4^+ 中生长的粗提液中观察到，nif编码蛋白需要恢复种，除nif RLA以外，所有操纵子都可表达。某些nifL突变种插入nif⁺重又产生nifA产物能力，同时解除固氮酶合成的抑制。所以，固定态氮（通过谷氨酸合成酶）的控制，只在nif RLA操纵子上发生，一旦这个操纵子表达了，其它nif操纵子也开始表达。

一个有趣但仍无法解释的现象是：含有功能nifA产物的突变种，将无色的腺嘌呤类似物6-氰基嘌呤转变成紫红色色素。这个反应不需要其它nif基因产物参与，红紫色的6-氰基嘌呤对有铵存在下分离解阻遏的突变种是有用的，也可用其检验缺失的nif中是否包括nifA。nifA产物好像自身催化颜色的变化；或者nifA基因产物调节由一个与nif无关联的基因编码蛋白的合成，这个蛋白催化紫色反应。

*K. pneumoniae*在有氧条件下生长时没有固氮酶合成， O_2 好像迅速关闭了除nifRLA操纵子以外的所有的nif⁻编码的蛋白，有些Mu插入nifL的nif⁺恢复种可以防止 O_2 的阻遏作用。这些种在有氧条件下生长时合成所有nif基因复制的蛋白，但是氧使固氮酶失活。这些数据表明nifL是在氧调节中起作用的蛋白编码，也许nifL蛋白与氧反应产生另一个与nifA蛋白反应的蛋白，并使nifA蛋白不能开动其它nif操纵子的表达。

某些菌种缺少nifL蛋白，但是有nifA蛋白，因此对氧的抑制不敏感，仍对 NH_4^+ 敏感。野生型的菌种在 NH_4^+ 存在下也不合成调节蛋白，这样在nifL和nifRLA操纵子的启动子之间一定有个位置，该点产生 NH_4^+ 的调节。这个位置定为nifR，它是否为蛋白编码还不知道。

三、根瘤菌的结瘤作用

根瘤菌菌种，对豆科植物寄主的结瘤作用有特异性。苜蓿根瘤菌种只在紫苜蓿上结瘤，而豌豆根瘤菌（在豌豆上结瘤）和三叶草根瘤菌（在三叶草上结瘤），各自都有在豌豆和三叶草上都结瘤的菌种。现在很多数据都支持凝集素参与侵染过程的最初几步，和它们在根瘤—豆科植物专性方面的假说。从寄主植物中分离出来的凝集素似乎优先与那些正常侵染的根瘤菌菌种结合，例如大豆的血红凝集素与大豆根瘤菌结合却不与其它种的根瘤菌菌种结合。

对侵染过程需要凝集素结合的设想产生疑问，是由于有些大豆品种能被根瘤菌结瘤并且实际上是在缺少血红凝集素下而引起的。也许其它凝集素也可以与这些品种的根瘤菌结合，

对不能结瘤的突变种研究支持了凝集素结合的设置。已经分离出不能在苜蓿上结瘤的苜蓿根瘤菌突变种，这些突变种没有与苜蓿根表凝集素结合的能力。

细菌凝集素结合部位的性质还未弄清。在平板上产生无粘胶菌落的豌豆根瘤菌突变种，没有在其寄主上结瘤的能力，这个突变种在其生长培养基的无细胞滤液中产生很少的碳水化合物。这个结果支持了外多糖是凝集素结合位置的假说。另一方面凝集素似乎与感染菌的脂多糖特异结合。比野生型种对大豆结瘤效率高很多的大豆根瘤菌变种好像缺少O-抗原部分，三叶草根瘤菌含有与O-抗原非常相似的多糖，它与三叶草凝集素结合。

有许多关于不结瘤根瘤菌变种的报道，但是有些并非突变种而是非根瘤菌污染物，这主要联系到根瘤菌种的鉴定问题。根瘤菌的分类是按照该菌种对特定豆科植物的结瘤而定，如果菌种不能结瘤，就需要另外的方法鉴定，也许双向聚丙烯酰胺凝胶电泳可以常用于鉴定菌种，因为这个方法不为菌对植物结瘤的能力所预先确定，因为豆科植物—根瘤菌相互作用形成紧密共生体，所以植物的贡献也应计算在内。如上所述，豆血红蛋白的球蛋白部分是由植物编码的，在大豆结瘤植物细胞胞液质中也可能专门参与这个共生体，为了更详细了解植物和细菌间相互作用的问题，应当对不结瘤或不能感染的植物变种给予重视。

根瘤菌的DNA可以转移到*A. vinelandii*突变种中去，一些转导后的固氮菌菌种从根瘤菌给体种中得到了侵染的专性多糖。以三叶草根瘤菌为DNA给体时，这些转导后的固氮菌，能与三叶草根结合，野生型*A. vinelandii*不能与三叶草根结合，这些种间杂交也许有助于了解凝集素结合反应的生物化学。

根瘤菌的结瘤能力似乎是由质粒—负载基因编码的。用豌豆根瘤菌（在豌豆上结瘤）做为供体，接合到三叶草根瘤（在三叶草上结瘤）上或者菜豆根瘤菌（在菜豆上结瘤）中，已经得到了具有在豌豆上结瘤能力的三叶草根瘤菌或*R. phaseali*转导接合体。此外，一个缺少 100×10^6 分子量质粒的豌豆根瘤菌就失去在其正常寄主上结瘤的能力，这质粒与含nif结构基因的质粒不同。

豆科植物只有当土壤中固定态氮不足时才固氮，过量的 NH_4^+ 或 NO_3^- 完全阻止结瘤。豆科植物中为结合氮所调节的固氮作用似乎不发生在固氮酶合成水平上，也许是在根瘤水平上。对三叶草根瘤菌和三叶草而言，固定态氮好象阻止凝集素进入可被细胞利用的那种状态。

缺少硝酸还原酶的大豆根瘤菌突变种，当高水平硝酸盐存在时不能在大豆上结瘤，所以硝酸盐或者植物中硝酸盐代谢产物肯定与结瘤的抑制作用有关，还没有发现可以克服固定态氮抑制结瘤的根瘤菌突变种，一些大豆品种结瘤对固定态氮控制结瘤作用比另一些品种要敏感得多。

不能固氮但仍能结瘤的根瘤菌菌种，一般在寄主上结瘤比野生型多。这可能是在结瘤过程中固氮的根瘤菌产生的固定态N运输到邻近的细胞中形成了固定态氮梯度。由于某些原因根区有一定量的固定态氮，那就不能结瘤（也许是因为根瘤菌结合凝集素失活）。这样使得根瘤彼此间分开。

也许根瘤菌的游动性对侵染结瘤是十分重要的，因为细菌游动性发生在侵染线中，但是不游动的突变种仍然有在寄主上结瘤的能力。游动性和向化性，可能在土壤的竞争环境中起重要作用。

三羧酸循环的中间产物也许是驱动根瘤内固氮作用的能源和电子源；植物产生代谢产物肯定到达根瘤细胞中，因为氨基酸缺陷型的种仍然能形成有效的根瘤。

四、结 论

在过去十五年内我们对固氮作用的了解发展很快，因为一些关键问题被发现及许多研究者参加固氮研究。遗传、生化和生理调节只在*K. pneumoniae*这个系统内研究得较为详尽。其它在当前农业上占更重要位置的固氮细菌（如根瘤菌），仍需在我们对*Kp*了解的水平上花大气力研究。由于我们知识的增加，预计在今后会有更大进展。豆血红蛋白是怎样在豆科植物根瘤上合成的、桉木根瘤中放线菌是怎样防止固氮酶氧失活的、*nifA*编码蛋白是怎样与不同操纵子*nif*蛋白相互作用的以及根瘤菌侵染和*nif*同处在质粒上的原因是什么？异形胞是怎样形成的、Fe-Mo-Co的合成反应是什么，这些问题都需要很快地回答，由于可以对更多体系进行有意义的遗传研究（如棕色固氮、荚膜红假单胞菌、含脂螺菌、*Anacystis nidulans*、灰色念珠藻、苜蓿根瘤菌、豌豆根瘤菌、三叶草根瘤菌、大豆根瘤菌），还将会发现许多重大的情况。

原载〔美〕“*Microbiol. Review*” 44：449—467，1980

高盟生译 尤崇杓校

根瘤菌的遗传学和遗传分析

А.А.Баев К.М.Мзлогников

引 言

根瘤菌在固氮生物中占有重要地位，从某种程度上讲，农业上所需的结合态氮是由它们决定的。目前，世界各国极为重视根瘤菌的研究，他们除使用传统的微生物学和生物化学技术之外，还采用了现代的遗传学和分子生物学方法。

根瘤菌遗传学的研究在近几年发展很快。其成就首先为以下几项：遗传图谱的建立；独特的R⁺因子的分离；根瘤菌质粒的一般生物学功能特征的揭示。由于在这些研究方法中运用了遗传工程，故而大大加速了工业化生产根瘤菌突变体设想的前景。

根瘤菌的一般知识

在许多专业著作中，可以看到大量的有关根瘤菌生物学的报道。现将其中最一般而又是最基本的资料综述如下。

根瘤菌分成快生型（时间3—4小时）和慢生型（时间6—8小时）两类。就每一个类型的根瘤菌来说，都有一个或多个寄主植物与之进行有效共生（根瘤菌的寄主专一性）。最广泛分布的根瘤菌的代表有下面一些（括弧内为寄主植物）。快生型的为：绿豆根瘤菌（豌豆、蚕豆、饲料豆、山豆、洋扁豆），苜蓿根瘤菌（苜蓿、草木樨、三叶草），三叶草根瘤菌（三叶草、四季豆）。慢生型的为：豇豆根瘤菌（豇豆、绿豆、花生），大豆根瘤菌（大豆），羽扇豆根瘤菌（羽扇豆）。几乎所有根瘤菌在加富培养基中都不能生长。只有苜蓿根瘤菌例外，它甚至能在培养大肠杆菌的综合培养基中生长。

根瘤菌与豆科植物的共生生活史是从细菌侵入植物根毛开始，并在根中繁殖形成特定的根瘤组织。在每个根瘤中有上亿个细菌（形成专门的类菌体组织），它们固定大气中氮供给植物需要（Scott等，1976）。对细菌本身来说，需要利用的仅仅是氨基酸形态的氮，并将其供给寄主植物。细菌的营养，如供给固氮过程的能量，在根瘤菌与豆科植物共生时完全靠寄主植物的光合作用支持。

根瘤菌—豆科植物共生时形成根瘤和实现固氮过程（nif⁺—表现型），是最重要的标志。这些标志是一个地地道道的复合体，它的表达取决于寄主植物的基因类型，但是在文献中对此问题的叙述还是形式主义的，按多基因型来说是极其简单的。就第一标志来说，Inf⁺或Nod⁺是最能接受的信号，而第二标志的信号则为Eff⁺。

* 译者注：慢生型中尚有紫云英根瘤菌，寄主为红花草，是我国所特有。

Inf—感染 Nod—结瘤 Eff—有效性（固氮）

根瘤菌质粒

鉴定和特征 最早指出根瘤菌中有外染色体组成存在，是完全从遗传学角度研究的，在1974—1976年间用蔗糖和CsCl-EtB 梯度离心方法指出，某些根瘤菌突变体细胞中存在质粒DNA。随着从根瘤菌中分离具有大分子物质的质粒技术的发展，使分离和阐明根瘤菌质粒DNA的细致工作得以进行。目前实际上完成的有两类：在第一类工作中，曾经见到7个根瘤菌突变体的细胞中都有质粒DNA的存在。质粒的分子量达到很大的值（根据DNA的复性动力学曲线确定），突变体之间互有差异：豌豆根瘤菌1001 (Inf^+Eff^+) 为 1.3×10^8 ；豌豆根瘤菌1006 (Inf^-) 为 $0.7-1.0 \times 10^8$ ；三叶草根瘤菌0402 (Inf^-) 为 1.4×10^8 ；根瘤菌 *Dolichos* KDI (Inf^+Eff^+) 为 1.6×10^8 。

第二类工作主要进行了不同苜蓿根瘤菌突变体的研究。同时也对其它菌的突变体作了分析。在这种方法中有趣的是，当用pH12.2—12.4的SDS处理时，即出现细胞溶素，pH8.0—8.5时，溶胞产物进一步以酚处理2—5分钟，在这种方法操作下DNA质粒变成悬浮状态，用琼脂糖胶电泳时很容易分析（根据琼胶上DNA的移动性判断质粒分子量。应用这种方法作者指出*Ps. Putida*细胞中有分子量为280和 312×10^6 的质粒存在，并且发现了早先并不知道根瘤土壤杆菌中有分子量大于 214×10^6 的质粒。从28个苜蓿根瘤菌突变体中发现25个突变体有1或2个分子量为90到 200×10^6 道尔顿的质粒，而在苜蓿根瘤菌RCR2011、S26和A145突变体中没有发现DNA质粒。在豌豆根瘤菌突变体A171（分子量为110； >200 ； $>238 \times 10^6$ ）和LPR115（分子量为98； >169 ； $>212 \times 10^6$ ）中有3个质粒，三叶草根瘤菌RCR5细胞中仅分离到1个分子量大于 186×10^6 的质粒。曾经对11个大豆根瘤菌突变体进行过确定质粒数目和其分子量（用琼脂糖胶电泳法）的工作，并在研究的细菌突变体细胞中发现了1—4个具有不同分子量（范围为 $48-130 \times 10^6$ ）的质粒。

电镜分析根瘤菌质粒的工作是很有趣的。其中有一项工作是用氯化铯—乙基二溴化锰梯度超离心法获得的两个苜蓿根瘤菌突变体(Eff^+ 和 Eff^-)的质粒。发现两个突变体的质粒，就长度而言，其环状分子有很大的不均一性， Eff^+ 突变种的质粒长度为0.8—135毫微米， Eff^- 突变种为0.7—106。同时在第一个突变体细胞中的DNA质粒，其分子级别为14—17和124—135毫微米，而第二类的分子级别仅约15毫微米。作者对用 Eff 表型突变体得到的结果未进行讨论，对观察到的DNA不均一性图像也未给予解释。有关这方面比较专门的工作，是有人对一些快生型根瘤菌DNA质粒曾进行了分析。这类工作对观察到的DNA环状分子不均一的图像，按照它的大小曾作了明确的解释，题目是“快生型根瘤菌质粒多重匀称系统（Мультимерна система）的电镜证明”，工作中采用了12个豌豆根瘤菌突变体，9个三叶草根瘤菌突变体和5个苜蓿根瘤菌突变体；其中有一部分是 Inf^- 和 Inf^+Eff^- 表现型。除了苜蓿根瘤菌Su47和CC209 (Inf^+ ， Eff^+) 外，作者成功地从这些突变体细胞中分离到DNA质粒。用电镜研究DNA质粒时，发现分子量范围在 $28 \times 10^6-352 \times 10^6$ 之间的环状分子的不均一性。对获得的资料进行详细分析指出，外形长度为13.5毫微米（分子量为 28×10^6 ）的分子，就其对整个环状DNA长度来说，可以认为是单体。根瘤菌类型和突变体之间在不同形态DNA质粒量的比例上有差异，这表现出这种单体在形态上是经常发生变化的。

漂浮密度（плавучная плотность）是DNA质粒又一特征。但在各研究结果之间有很大的矛盾。例如上述工作中，漂浮密度值发现为 1.715g/ml （染色体的DNA为 1.719g/ml ）。

其它工作中,苜蓿根瘤菌DNA质粒的漂浮密度值为1.717g/ml(染色体DNA为1.722g/ml)。还有些工作者发现三叶草根瘤菌细胞随体(指染色体的肩)DNA的漂浮密度为1.718g/ml,其它作者则发现1.699g/ml。同时在有些作者工作中见到不同种根瘤菌DNA质粒的漂浮密度值是相同的,并利用这一点对根瘤菌进行鉴定。

生物功能 目前这种功能首先与寄主的专一性及固氮作用相联系,但也有关于检查根瘤菌质粒和其它指标的材料。如认为根瘤菌的多种耐药性指标可能是具有特殊的质粒。也有的报告认为,某些苜蓿根瘤菌突变体诱导寄主植物根中多聚半乳糖醛酸酶的形成能力,是受专一的分子量为 59.6×10^6 的PEZ1质粒所制约。这种质粒还控制另一种对专一性的噬菌体AL₁敏感的特性。研究各种豌豆根瘤菌之间的拮抗作用时获得了预想的证据。

第一个工作的结果直接表明,利用质粒控制根瘤菌对寄主专一性是可能的,这是这类研究的代表作。在这项工作中,当三叶草根瘤菌和菜豆根瘤菌突变体间的结合时,发现三叶草的感染能力会从一个突变体传给后一个突变体。这种可能性也从根瘤菌的Inf⁺标志不稳定性中推断出来。关于这方面的重要证据,是在利用特有的pRL₁J1质粒将豌豆的接种能力从豌豆突变体传给其它根瘤菌突变体的工作中获得了证明,这种质粒是一种结合体,具有抗菌性标志,它可以从豌豆根瘤菌突变体中得到。为了简化质粒传给另一个突变体的选种方法,利用Tn5转座子的掺入画出卡那霉素(Km^R)耐药性标志(如pRL₅J1标志)。豌豆根瘤菌6015突变体T₃和突变体Inf⁻之间杂交产生的Km^R易位结合体获得了Inf⁺表现型。此外,在从用豌豆根瘤菌T₃同三叶草根瘤菌、菜豆根瘤菌及豌豆根瘤菌SP中间型杂交时所选择的易位结合体中获得pRL₅J1质粒的同时,也得到了和它们的寄主植物豌豆不同的接种能力。

不久前发表了利用细菌结合体质粒控制豌豆根瘤菌共生特性的比较研究。除了上面提到的pRL₅J1质粒之外,还有以PRL₃J1(来自突变体306)和PRL₄J1(来自突变体309)进行分析的。所有这些都控制细菌的细胞发生,在以高频率(单位受体细胞的 10^{-1} — 10^{-2})进行结合感染,并具有以 10^{-7} — 10^{-8} 的频率将供体染色体基因传递的能力。所有三种质粒都曾用Tn5转座子进行过标记,并将之转给豌豆根瘤菌1027的Inf⁺, Eff⁺—突变体。在获得具有8种不同豌豆根瘤突变体Inf杂交时曾经发现,95%机率的pRL₁J1质粒易位时伴随以Inf⁺—表现型的复位,而当pRL₃J1和pRL₄J1质粒易位时观察到的Inf⁺—表现型的复位机率很小(每单位易位机率为 10^{-3} — 10^{-4} ,或单位受体细胞为 10^{-6})。如果这类稀有的Inf⁺—易位结合体进而用作为供体的话,则pRL₃J1和pRL₄J1质粒的转移即伴随有高频率Inf⁺—表现型的复位。应该指出,ω₁广泛被采用于转移染色体基因方法,其在试图转移Inf⁺特性时,根瘤菌R68.45质粒(见下),无论在哪种情况下都未见到这种标志转给Inf⁺—受体,在解释获得的结果时,作者认为,用于Inf⁻—突变体的互补突变体的Inf⁺—基因大量地局限在3种存在于豌豆根瘤菌细胞质粒中,质粒pRL₁J1, pRL₃J1和pRL₄J1能以大的或小的机率动员这类基因的转移。

还有一种控制根瘤菌质粒共生特性的证据是在З.Лоркевич(波兰)的实验室中得到的。

还发现,某些三叶草根瘤菌突变体细胞保温于35℃下7天常常失去寄主植物红花草的接种能力。以一种分离到的Inf⁻—突变体进行详细研究指出,感染性的丧失受突变体细胞中区域性质粒的缺乏所控制;如果三叶草突变体质粒的分子量原初检查是 460×10^6 和 190×10^6 ,那么经用这个方法后,只留有分子量为 460×10^6 的质粒。

迄今为止,在根瘤菌质粒参加控制固氮作用过程方面,也有充分的证据。如运用R₁19

drd, RHdrd和RP1质粒将nif⁺—特性从三叶草根瘤菌Ti转移给不能固氮的微生物。关于后一类工作,有以nif⁺—特性为供体,把由RP1质粒转入E₁ColiK—12的三叶草Ti的Inf⁺-Eff⁺导入其中。以失去Ti质粒的根瘤病土壤杆菌品系和在nif⁺—基因区有间隔(Деление)的肺炎克氏杆菌Kp52进行杂交。在这种情况下,RP1结合体中近20%无性系表现有良好的乙炔还原活性(nif⁺—表现型)。众所周知,RP1型的R-质粒能动员其它质粒转移但不能使染色体基因转移,因而,观察到和RP1一起具有高频率的nif⁺转移这一事实使作者做出了关于三叶草Ti的nif基因分布在质粒中的合理结论。

肺炎克氏杆菌固氮酶DNA结构基因与根瘤菌DNA质粒直接杂交的实验,证实nif—基因是分布在根瘤菌质粒中的。例如,利用不具有肺炎克氏杆菌nifKDH基因标志的P-32DNA片段与携有豌豆根瘤菌DNA质粒的E. Coli片段杂交时,即显示出明显的同源区带,在这项工作中研究了三个突变体的DNA质粒,其中有一个LPR180。同源现象在所有情况下均可见到,这表明豌豆根瘤菌nif—基因是较多地分布在质粒中的(分子量为115—200×10⁶和200—240×10⁶)。在另一工作中,以苜蓿根瘤菌DNA的克隆片段检验时,曾见到7个具有肺炎克氏杆菌nif KDH基因标志的DNA的显性同源克隆,其中有一个克隆是利用DNA质粒得到的,作者根据这些作出了关于至少有部分nif—基因是分布在苜蓿根瘤菌质粒上的结论。

遗传学研究

突变发生 从所研究对象中得到突变体是遗传学研究的必要基础。关于这方面的情况,不同类型根瘤菌是有差异的。迄今为止,快生型根瘤菌中已经得到10种各种各样的突变体,而慢生型根瘤菌突变体的分离看来是比较复杂的任务。慢生型根瘤菌的最普通的代表菌如大豆根瘤菌,从中分离出突变体的只有来自印度的个别报道。在各种情况下,从根瘤菌中分离突变株,常常使用传统的突变基因和加添青霉素的方法。其中有一项工作成功地使用了这种新方法,例如借助转座子导致豌豆根瘤菌和三叶草根瘤菌以及菜豆根瘤菌的突变体发生。在Km—R处理的突变体中使用转座子Tn5,其出现频率达到0.3%(Beringer, 1978)。

遗传物质的转移 以R—因子为基础根瘤菌中转化、转导和接合是人所周知的。第一种方法在遗传图像中暂未得到广泛的运用。但是在各种根瘤菌突变体之间运用遗传标记转化的转移获得了许多结果。所有的实验方法,实际上和芽孢杆菌中使用的转化方法并没有什么不同。在培养生长最初时期,见到在转化时各种类型根瘤菌受体细胞的重组状态,与正常情况下一样。

根瘤菌遗传中的转导,目前基本上在苜蓿根瘤菌和豌豆根瘤菌两种类型中使用。对苜蓿根瘤菌来说,转导作用是用噬菌体来完成转移的,这仅仅是苜蓿根瘤菌41的半胱氨酸标志。以专门的噬菌体DF2为基础的一般转导,可应用于苜蓿根瘤菌的遗传分析(Casadesus, Olivares, 1979)。这种噬菌体有很高的转导频率(在侵染最适比1:1下为10⁻⁶),并成功地用于苜蓿根瘤菌染色体图谱中某些遗传标志联结水平的检定。因此作出了,在染色体图谱中用质粒R68.45获得的联结数值不很准确的结论。迄今为止,从噬菌体DF₂中获得了热敏感的突变体,利用这种突变体进行转导试验是简便而有效的。

有趣的是以病毒噬菌体RL38和RL39获得了成功。这类噬菌体在豌豆根的频率转给接受细胞工作中发现某些标志,像色氨酸-14-腺嘌呤72(trp-14-ade72)、腺嘌呤-71-核苷-2(ade-71-rib-r)、甲硫氨酸-2-尿嘧啶(met-2-ura)的联合诱导。根据转导的大小

测定了豌豆根瘤菌染色体图谱中rif-str-spc标志的顺序。这类噬菌体能够实现质粒R68.45和PRL₁J₁ ($1 - 2 \times 10^{-7}$ 的频率)的转移。噬菌体RL38能够复制,并像在豌豆根瘤菌突变体中的情况一样,能在三叶草根瘤菌突变体范围内转导标志。观察到遗传标志能从豌豆根瘤菌细胞转给三叶草根瘤菌细胞,但是运用这种噬菌体进行遗传标志的反向转导尚未成功。

按照专门性因子进行结合作用,在根瘤菌中还不清楚。同时需要指出,在Геуман(民主德国)实验室中报道了在形成色素的羽扇豆根瘤菌突变体中,借用两种专门因子(对每个染色体的一半来说)的染色体基因转移系统(Heumaun, 1977),描述结合作用系统无疑是很有兴趣的,而且很出色的是,根据这个建立了微生物染色体的环状图谱。但是这种细菌突变体不能接种到羽扇豆植株上,因而不能使人相信这就是羽扇豆根瘤菌。

在没有自己的结合作用系统的费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)中,借噬菌体Mu在大肠杆菌性因子F的细菌染色体上的整合作用得到了高结实率的供体突变体(Hfr)。在部分工作中为得到苜蓿根瘤菌突变体的教育供体,按照类似的方法和采用噬菌体RP4Mu-R-因子系统进行了示踪(Boucher等, 1977)。在引用的文献中只有将噬菌体Mu转移到苜蓿根瘤菌的初步工作报告。

在根瘤菌中为获得有效的结合体,曾以产自RP4的人工调配因子R'进行过尝试(Tacob, 1976; Juliot等, 1979)。第一个工作中曾建立了不具有豌豆根瘤菌细胞的DNA质粒,然后再将这种质粒用于检查豌豆根瘤菌突变体在杂交中染色体基因转移的调配能力。第二个作用类似的方法对苜蓿根瘤菌进行同样的检查。预期的效果仅在第二个工作中达到。例如,在16个质粒R'诱导派生的RP4(实现苜蓿根瘤菌染色体DNA部分的HindIII向分布在RP4Km-R质粒位点HindIII中,有4个和原有质粒RP4相比较时表现出较高的苜蓿根瘤菌染色体基因转移值。还观察到,在每一个这类质粒中,染色体标志的转移具有确定的位点,并且转移的极性已被探知。这种工作展示了根瘤菌中遗传物质转移时,用人工制造R'诱导质粒RP4的可能性。

在豌豆根瘤菌中,见到了能实现单位供体细胞为 10^{-7} — 10^{-8} 频率的染色体基因转移的结合质粒(Hirsch, 1979)。不久前对苜蓿根瘤菌质粒PEZ₁的结合特性也有所阐明(Bedmar, 1980)。类似质粒的发现可以期望未来很可能在不同类型根瘤菌中利用他们自己的质粒成功地得到有效遗传物质的传递系统。迄今为止,关于根瘤菌图谱的所有结果,都是在单胞菌RP4和R68.45结合的R质粒基础上获得的。这两种质粒是相近似的;R68.45质粒的分离是和对铜绿色极毛杆菌PAO突变体染色体转移与具有高的动员能力的R.68质粒一样(Hass, Holloway, 1976)。

遗传图谱 第一个根瘤菌染色体基因图谱是利用R68.45质粒的结合体系统在豌豆根瘤菌中完成的(Beringer, Hopwood, 1976)。在已经完成的工作中指出, R68.45质粒能动员频率约为 10^{-7} (按单位受体细胞计算)的供体染色体基因转移,并且在供体标志转移中具有极性。也曾发现,所有重组体克隆(95%或更多些)都会有R68.45质粒,按照选择图谱受体突变株逆向纯系得到的此类质粒,其机率约为1%。所有这些给人们有可能去区分重组和逆向纯系,以及根据它们和选择标志联结的大小确定染色体上遗传标志的相对分布。在所引用的工作中,曾经确定4种豌豆根瘤菌突变体-Mc+24-trp16-phe1-urea-14染色体是相互配置的。

对遗传学研究来说,所有根瘤菌中最方便的材料是苜蓿根瘤菌,它们对条件要求简单,

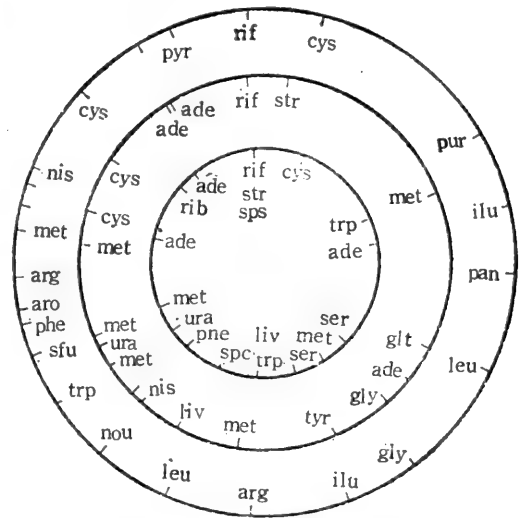
在根瘤菌中其世代时间最短(约2.5小时),培养时大部分突变体不分泌粘液。并非偶然的是,苜蓿根瘤菌是在根瘤菌中最先建立环状图谱的,如美国学者在苜蓿根瘤菌2011突变体中(Mead, Signer, 1977)、匈牙利学者在苜蓿根瘤菌41突变体中(Kondorosi等, 1977)等等。这些工作中制图的原则和前面所例举的工作是一样的。苜蓿根瘤菌2011突变体的图谱是用Rp4质粒完成的,并且在膜过滤器上进行杂交,同时观察到质粒以 10^{-1} 的频率进行转移,而以 10^{-5} — 10^{-6} 频率(按单位供体细胞计算)出现重组纯系。重组体的真实性是不容置疑的,因为在其繁殖时未见到亲本形态的分离,因而可以检查供体的隐性标志的遗传性。在苜蓿2011染色体图谱上,根据彼此之间的关系曾经推测有20个不同的标志。在绘制苜蓿根瘤菌41突变体染色体图谱中使用了R68.45质粒。在琼脂培养基表面进行杂交,质粒以 10^{-3} — 10^{-5} 频率进行质粒转移,重组体以 10^{-3} — 10^{-5} 频率(按单位供体细胞计算)出现。在染色体图谱上确定分布着17个营养缺陷型标志和2个对抗生素稳定的标志(Str, rif)。分析各种标志之间的联结大小时,曾确定R68.45质粒转移的供体染色体片段的平均值,很显然构成了完整的染色体。

迄今为止,染色体环状图谱的获得还只限于一个苜蓿根瘤菌突变体(GR4突变体,此图谱是用R68.45质粒绘成的。环状图谱包括19个基因位点。此图谱的特点是,在结合作用试验中得到的许多标志之间的联系,是用噬菌体DF₂转导得到的基本资料绘成的。

根瘤菌中除了苜蓿根瘤菌以外,绘成环状图谱的尚有豌豆根瘤菌300。这个图谱包括16个基因位点,并且如前所述,就根瘤菌来说是各标志间联结大小而定的。R68.45质粒用作遗传物质的传递体,在每个供体细胞中其转移供体染色体标志的频率约为 10^{-6} 。根据频率的大小和标志的接受状况,可以作出关于R68.45质粒转送的某些供体DNA片段,至少可以构成整个染色体的7个部分的结论。

苜蓿根瘤菌2011、苜蓿根瘤菌4和豌豆根瘤菌300染色体的共同图谱列于附图,图谱分析表明,其中并没有负责共生或固氮的基因。此种情况首先只能以技术困难来解释,因为就这种基因图谱来说,必须在植物上对重组纯系进行实验。但是有充分的根据认为,在最近几年内负责根瘤菌和豆科植物共生的基因,将在遗传图谱上绘制出来。这里,根瘤菌遗传图谱的存在已为这个推测的实现提供了很好的保证。如同大豆根瘤菌在大豆上一样,建立起一套迅速而有效的分析根瘤菌和植物共生的方法,这并没有原则性的困难。

根瘤菌中异种结合和R' 在英国, Beringer小组的一项工作中曾经发现, R68.45质粒能实现豇豆根瘤菌和三叶草根瘤菌、菜豆根瘤菌之间大约以像豌豆根瘤菌突变体之间那样的效率(按接受细胞计算约 10^{-6})进行染色体基因的转移。异种结合分析,按照分布在豌豆染色体遗传图谱不同部分的足够多的标志数实现的。根据获得的资料,



根瘤菌的遗传图谱

外圈为 *R. meliloti* 2011;
 中圈为 *R. meliloti* 41;
 内圈为 *R. leguminosarum* 300.

可以作出所有三种类型染色体具有很大同源性的结论。当三叶草根瘤菌和豌豆根瘤菌、菜豆根瘤菌和豌豆根瘤菌结合时，也曾探讨了重组体对寄主植物专一标志的遗传性。在所有情况下，重组体承袭了突变种结合体的特性（这些资料与上述根瘤菌中寄主特性标志受质粒控制的结论相符合）。在讨论已有工作结果时，作者指出了豌豆根瘤菌、三叶草根瘤菌和菜豆根瘤菌染色体遗传同源的发现，从根瘤菌派生突变体的遗传结构组成观点来说是重要的。这里指的是，上述三种类型豆科植物的最重要标志中优良的遗传势能（竞争能力、固氮水平、对外界作用的耐性等等）可能会集中到同一个基因中去。

还有一种关于在根瘤菌种间结合中豇豆根瘤菌和三叶草根瘤菌遗传材料间能实现重组作用的工作。结合是用R68.45质粒实现的，并且在两个方向内进行。发现在豌豆根瘤菌（R68.45）和苜蓿根瘤菌重组体（按rif和str基因选择）结合时，在顺序上发生的频率比在豌豆根瘤菌突变体之间结合的低。此外，还观察到，供体的选择性标志在重组体中表达弱，在R68.45质粒中则缺乏。苜蓿根瘤菌（R68.45）和豌豆根瘤菌重组体（用对抗生素稳定标志和无机营养型进行选择）的反向结合时，发生的频率还要低（ 10^{-8} — 10^{-9} ）。但是，它们都是R⁺表现型（R68.45质粒决定因素的存在）。在受体的某些标志情况下（如trp¹⁹），观察到纯系重组体的缓慢生长，这暗示苜蓿根瘤菌的各个基因在豌豆根瘤菌细胞中表现弱，重组体中见到的基因物质不完全表达，说明苜蓿根瘤菌和豌豆根瘤菌中缺少相当的遗传染色体。显然，这是重组体中出现低频率的根本原因。种间杂交时，低频率的重组作用能导致不具有R⁻因子细胞转化结合体的后代增多了（在大肠杆菌中用RecA⁻受体，其机制与F⁻选择机制关系相近。实际上，当以R⁻—leg（在与苜蓿根瘤菌R68.45杂交时选择的）转化结合体—ade27⁺，F⁺hei⁺和trp¹⁶⁺进行检验时，显示其中大部分是有苜蓿根瘤菌染色体参与的和不带R⁻派生的R68.45。获得的R⁺部分很稳定，并且以高频率（ 10^{-2} ）转给分布在其中和相应的豇豆根瘤菌突变体杂交时的无机营养型的决定体上（Детерминат）。类似的R68.45质粒R⁺在豌豆根瘤菌突变体之间杂交获得的重重组体，纯系检验时也能分离出来。后一情况的复杂性只在极困难的条件下发生，因为R⁻纯系在全部重组体中不到1%。

根瘤菌中R⁺的分离，给根瘤菌遗传分析，即显性和互补突变的快速图谱试验、各种类型染色体同源性研究以及其它系统根瘤基因表达试验等等开辟了极大的可能性。此种情况可能对根瘤菌和植物共生基因的研究是有益的。曾表明，当研究获得根瘤菌trp⁻基因的R⁺的可能性时，采用了不具有各种苜蓿根瘤菌trp⁻基因的R68.45质粒R⁺。R⁺最初是在各种豌豆根瘤菌trp⁻突变体中表达的，并且确定了trp⁻基因的互补等位基因。最后是在铜绿色极毛杆菌的trp⁻突变体生化特性方面完成的。苜蓿根瘤菌trp⁻基因在铜绿色极毛杆菌细胞条件下正常地表达出来。相应地也成功地查明trp⁻基因是如何具体分布在R⁺—质粒中的，并且对豌豆根瘤菌的基因作了测定。在已列举的工作中也曾指出，正常情况下苜蓿根瘤菌的trp⁻基因在大肠杆菌中是不表达的。

根瘤菌的特异性突变体 迄今为止，在根瘤菌中分离出营养缺陷型和抗药性突变体的同时，也曾分出一批具有固氮作用、结合态氮代谢以及感染过程缺陷的突变体。对类似的突变体的分离和研究是难以作出过高估价的。第一—最重要的是研究和确定根瘤菌标志在寄主上的最快速方法。第二，进行这类突变体的遗传学分析时，必须为创造其它有希望的根瘤菌突变体建立解决基因工程具体任务的条件。

在Brill（美国）实验室中，曾经进行分离大量根瘤菌共生固氮突变体缺陷型的专门工作。在这项工作中，利用亚硝基胍获得近2500个大豆根瘤菌61A76的纯系。曾在大豆共生体

中进行过检验，并且找到5个与建立共生无效的菌系（SM1—5）。突变体的表现型有下列几种：SM₁和SM₂—nod⁻（在植物上不结瘤）、SM₃、SM₄和SM₅—nod⁻eff⁻（活性为零的根瘤）。同时，SM₃和SM₄导致小而圆的根瘤形成，和SM₅突变体情况一样，根瘤的大小一般，色淡。SM₄SM突变体纯培养中诱导固氮酶活性中具有nif⁻表现型，SM₁、SM₂、SM₃和野生型菌一样地进行诱导。SM₅突变体叙述得比较详细些。此种突变体的根瘤抽提物在加入棕色固氮菌固氮酶复合体蛋白时，能恢复nif活性，同时和肺炎克氏杆菌固氮酶复合体蛋白发生专性的抗血清沉淀。在上述结果基础上，作出了SM₅突变体是真正的nif⁻突变体和固氮酶复合体蛋白的结构基因中有缺失的结论。必须指出，SM₅在文献中是唯一已知的nif⁻突变体，不仅在大豆根瘤中如此，一般根瘤菌也都是这样。

在同一实验中，运用快速技术分析 with 植物建立共生体的细菌，并着手寻找提高共生能力的大豆根瘤菌突变体。运用硝基胍使细菌发生突变，在一些最低量营养元素组成的培养基中进行培养，并在琼脂培养基中筛选。对培养成的纯系检验它和大豆共生的共生特性。在2500个检验的纯系中，找到2个分离物（标志如SM31和SM35），它们比原来的大豆根瘤菌品系具有较高的共生固氮水平（单位植物重量的乙炔还原）。当在温室条件下检验时，根据统计数据证实，SM31和SM35品系的某些指标如每株植物的根瘤数、植物干重、结合态氮（总数和单位植物干重一样）均有增加，并超过原来的野生型菌种。无论是遗传方面也好，还是生化方面也好，SM31和SM35都没有表征。但是，由于突变种固氮水平比对照高，在培养基中加入铵盐的条件下可以见到固氮酶活性为去阻遏型。不久前，利用专门加有指示剂的培养基，（这种培养基在还原势能变化时突变种纯系着色有差异），从棕色固氮菌中分离到此种表现型的突变种。

在专门的工作中，曾经分离出豌豆根瘤菌的无效突变体。作者分析2个nod⁻和10个nod⁺eff⁻突变体。在后一类突变体中有4个对温度敏感，在13℃下为eff⁺表型，26℃下为eff⁻—表型。

在三叶草根瘤菌中找到了获得nod⁻突变体的有效方法。当细菌在温度提高的条件下培养时，此种突变体便积累起来，以致失去分子量为 190×10^6 的质粒。

应该指出，丧失共生特性的根瘤菌突变体，在营养突变和耐抗生素的突变体中早被人们知道了。但是有关这方面的介绍是零星的，并且常常是彼此矛盾的。对各种豌豆根瘤菌突变体共生特性的研究表明，在分析的16个不同营养突变体(ade⁻，met⁻¹，trp⁻，ura⁻，cys⁻，Leu⁻，ilv⁻，phe⁻，gua⁻，arg⁻，glu⁻，rib⁻，his⁻，liv⁻，phe⁻+tyr⁻)中只有ade⁻—突变体有表现型nod⁻，其余的是nod⁺eff⁺。表现型nod⁺eff⁺也有7种耐抗生素突变体：rif、str、clm、nem、vim、d—cls、spckm。虽然在抗利福霉素的突变体（为总数的10%）中，也曾发现过具有nod⁺eff⁻表现型的纯系。按共生特性来说，在非直接的突变体中可以见到失去正常分泌高糖能力的豇豆根瘤菌的突变体。这种突变体不能接种到寄主植物豌豆上去，从其中得到的回复体，它在具有分泌多糖作用的还原特性同时，也能恢复nod⁺—表现型。

众所周知，在自生固氮生物固氮作用中，氮同化的途径是通过谷酰胺合成酶（GS）和谷氨酸合成酶（GOGAT）进行的，GS本身虽然是作为nif基因转录作用的活化剂而起作用的。研究者们有兴趣的是，从根瘤菌中分离出GS⁻和GOGAT⁻突变体是可以理解的。GS⁻突变体（gln5谷酰胺营养缺陷型）曾从豌豆根瘤菌32H1突变体中分离出来。这个突变体引起寄主植物上形成根瘤，但此根瘤没有固氮活性。gln5突变体可能易于得到喹谷酰胺的回复体（频率为 1×10^{-6} ），根据其共生特性，此类回复体分成nod⁺eff⁺和nod⁺eff⁻两种。

GS⁻突变体 (Db5, 具低活性的GS) 在苜蓿根瘤菌中分离出来, 这种突变体不合成同化型的硝酸还原酶, 它和前体:gn-5 突变体一样, 是nod⁺eff⁻。所有这些结果和回复体固氮中GS起关键作用的推测相符合。在最近的一些工作中, 也分离出GOGAT突变体 (属于谷氨酸表现型G41)。G41突变体在纯培养中有正常的GS水平 (有氨和无氨时一样), 按其共生特性和其原来的野生型没有区别。不寻常的是, 这种突变体与肺炎克氏杆菌的GOGAT(ASM⁻) 突变体不同。它不能利用铵作为氮源, 和肺炎克氏杆菌的GOGAT—GDH 突变体酷似。G41突变体中获得的结果, 可以表示根瘤菌氮代谢调节的本质, 也证实了关于根瘤细胞里GS/GOGAT系统在根瘤所固定氮的转化中不是必需的观点。

硝酸还原酶突变体是另一类直接和氮代谢及固氮有关的根瘤菌突变体。这项工作做得最出色的是匈牙利的学者。他们曾经分离出25种不能代谢硝酸盐的苜蓿根瘤菌突变体, 并对其进行了遗传学和生物化学的研究。突变体画入了苜蓿根瘤的narA、narB、narC和narD 4个不同位点的染色体图谱中。narA突变体丧失同化功能。narB则丧失硝酸还原酶的同化和异化功能, narC和narD具有硝酸还原酶缺陷型的钼辅因子。所有的突变体接种到苜蓿上, 即具有正常的硝酸还原酶活性。前一情况和硝酸还原酶及固氮酶的钼辅因子的说法相矛盾。硝酸还原酶突变体 (根据它对硝酸盐抗性进行选择) 也从大豆根瘤菌中分离出来。经用植物检验表明, 缺少硝酸还原酶的同化和异化功能的突变体具有高的共生固氮作用特性。

对遗传工程的看法

前言 现代化的农业生产, 如果没有足够量的结合态氮供给农作物是不可想像的。由于这个原因, 在发达国家中, 都建立了强大的生产数以10亿吨计的合成氮肥的化学工业, 这需要消耗占整个人类不少于1.6%的能量。随着生物固氮作用的剧烈增长, 氮素肥料的利用可缩减到最小量。众所周知, 生物固氮中需利用太阳作为能源, 这种能源可以充分保证植物固氮时的消耗。后一任务的完成也并非简单, 但是很明显, 人类近几十年内是需要完成的, 看来也是可以解决的。很自然, 对此需要更加努力, 这是对最完好的科学工厂的利用。

1977年在美国举行的布洛克赫文 (Brook Hecwen) 固氮遗传工程学术会议上, 许多报告者指出这样的事实, 即希望创立增加生物固氮的有效途径, 要达到这一点, 可以认为只有靠遗传学和遗传工程来完成。(Valentine, 1979), 与会者一致选定根瘤菌为最有前景的对象。

方向 对当前以根瘤菌作为提高生物固氮作用的设想中, 在两个最根本的方面存在着争论: 1. 根瘤菌寄主的扩大 (Valentine, 1978), 2. 根瘤菌有效突变体的获得 (Anderson等, 1980)。

第一方面作为最终目的, 在于探求建立能和非豆科植物进行有效共生的根瘤菌突变体。很自然, 根瘤菌和禾本科植物建立共生固氮结合体是最吸引人的方面。这一目的有很具体的先决条件, 这就是自然界自己已经作出了根瘤菌和广大的寄主共生的先例。例如, 曾发现某些根瘤菌突变体能和豆科植物豇豆一样有效地接种到非豆科植物山麻黄上去 (Trinick, 1973)。在后一情况下, 根瘤不含有豆科植物结合体所有的豆血红蛋白的特性。但尽管如此, 这种固氮作用进行的很顺利 (Trinick, Galbraith, 1976)。

根瘤菌与广泛的寄主共生这一任务解决的第一步, 是需要对根瘤菌和豆科植物的共生关系作深入而又全面的研究。其中的关键, 看来应该对控制寄主专一性标志的根瘤菌质粒进行

研究(见根瘤菌质粒部分)。这些研究必然要引入DNA重组技术,这样才能详细地分析制约寄主专一性标志的DNA质粒的具体连续性。为获得这一结果,就需要对在建立具有符合人们理想的特性的杂交质粒所要求的条件进行研究。

制约双子叶植物细胞肿瘤再生的农杆菌 DNATi 质粒连续性实验,很显然是创建根瘤菌和非豆科植物共生固氮体的方面之一(Willmitzer等,1980)。看来在根瘤菌DNA质粒中应该建立这样的连续性(在变化了的种型中最快)。

根瘤菌有效突变体的建立,可能用某些相互补充的途径达到。按照我们的意见,途径之一是和根瘤菌细胞结构基因操纵技术有联系。例如,所有根瘤菌会和各种噬菌体发生溶源性(Москаленко等,1979),因而噬菌体未必能促进根瘤菌有益特性的出现。在这种情况下,某些不需要的根瘤菌质粒可能会出现。

在设计与增加nif—基因工作效率有联系的工业化生产根瘤菌突变体中,这种构思是十分显而易见的,这中间可能有许多实验要做,也像寻找DNA_{nif}基因调节连续性变化一样,从整个细菌基因一方去进行探讨nif—基因遗传控制变化之类的工作。在这类研究中,基因工程方法的应用,在很大程度上为根瘤菌基因位于质粒上的这一情况所简化了(见上),但是实际上关于根瘤菌nif—基因表达的调节,人们尚一无所知。因此,在这种情况下,基因工程技术完全应该先于相应的遗传学和生物化学的研究。这方面的工作现在正在许多实验室里进行(见根瘤菌专一性突变体一节,以及Lim等1979年关于利用细胞内¹⁴C-GM和¹⁴C-PAMP调节固氮酶合成的工作)。

在获取高效根瘤菌突变体中还有另一类设想,这就是hup—基因(吸氢基因)的转移(Lim等,1980)。在固氮过程中根瘤菌每固定1分子氮,需要相当于27—31分子ATP的能量(Lim等,1980)。这种能量的大部分(到40%)消耗于固氮酶催化放氢(Schubert, Evans, 1976)。然而根瘤菌中具有接受氢的氢酶,此酶能回收固氮酶放出氢,因而大量的节省能量。这首先可以和某些大豆根瘤菌突变体(吸氢,或hup⁺—突变体)有关系。在根瘤菌中,这种突变体具有十分有效的再利用氢的酶系统(Lim等,1978)。大部分根瘤菌(其中包括大豆根瘤菌突变体)是hup⁻(缺少利用氢的氢酶)。从大部分快生型中,只有某些豌豆根瘤菌突变体hup⁺活性小(Ruiz-Argueso等,1978),而苜蓿根瘤菌的个别分离的活性最弱(为大豆根瘤菌hup⁺的0.1%)(Argueso等,1979)。

比较5个hup⁺和5个hup⁻大豆根瘤菌突变体对大豆产量影响的直接实验表明,靠hup⁺特性,其指标的超越是这样的:植物干重为15.7%,单位植物干重中氮的百分率为10.3%,全氮为26.2%(Albrecht等,1979)。看来大豆根瘤菌hup⁺突变体将是最早的hup⁺基因来源。同时,文献中还讨论了关于从利用氢的真养产碱菌转入根瘤菌hup⁺特性细胞的问题(Lim等,1980)。

hup基因的转移很显然是根瘤菌遗传工程中最近而又直接的任务之一。这方面工作现在许多实验室中刚刚开始。不久将首先会有关于大豆根瘤菌基因库方面的报道(Lim等,1979a)。

原载[苏联]“Узр. АН СССР Сер. Биол.” 6: 805—823, 1981.

陈 国译

豆科植物的识别机理及感染过程

T. V. Bhuvanewari

根瘤菌属的细菌能在一些经济上重要的豆科作物上形成固氮根瘤。这些共生体系存在的生物学特性，为根瘤菌属划分成亚类提供了基础。可以相信，这种特性在豆科植物和根瘤菌相互作用的初期就确立了 (Li and Hubbell, 1969; Yao and Vincent, 1969; Dazzo, 1980a; Schmidt, 1979)。豆科植物 (寄主) 和根瘤菌 (共生生物) 之间一些种类的识别过程常常作为解释生物学特性的分子基础。关于这个问题的有关报道已经在几篇评论中详细地讨论过了 (Broughton, 1978; Dazzo, 1979, 1980b; Beringer et al., 1979; Schmidt, 1979; Solheim and Paxton, 1980; Smittle, 1979; Graham, 1980; Vincent, 1967, 1980)。本文简要地概述了豆科植物和根瘤菌系统识别机理方面现有的研究假设，并详细讨论了本实验室新近所作的一些研究，这些研究探讨了一些普通豆科植物寄主被感染的前期过程。

I. 过去的研究和现在的解释

一、外源凝集素是高等植物和微生物之间相互识别的媒介

微生物和高等植物之间的相互识别，可以认为是细胞间识别的特殊情况。它也许被看作细胞与细胞间的交往，这种交往在植物和微生物中引起了一定的生化、生理和形态学反应 (Callow, 1977; Clarke and Knox, 1978; Bauer and Bhuvanewari, 1979)。少数已详细研究过的范例，如酵母菌的有性接合方式 (Yen and Ballou, 1974; Ballou, 1977)、粘菌种间的特异凝聚及分化作用 (Rosen et al., 1975)、以及被子植物花粉和柱头间的相互作用等 (Mattsson et al., 1974; Knox et al., 1976) 都表明细胞间的识别受这些细胞表面的糖类物质和蛋白质分子之间的特异结合作用所调节。Albersheim 和 Anderson-Prouty (1975) 曾提出过一种相似的机制，这个机制包括高等植物对病原体和共生微生物的识别，及一类称为外源凝集素的植物蛋白质。这个见解近年来已引起普遍的注意 (Raa et al., 1977; Callow, 1977; Sequeira, 1978; Bauer and Bhuvanewari, 1979; Dazzo, 1980a, b)。

根据外源凝集素识别假说 (Albersheim and Anderson-Prouty, 1975; Bauer et al., 1977; Sequeira, 1978)，存在于靶寄主细胞上的外源凝集素分子和存在于微生物细胞表面上与之互补的糖类分子相结合，从而引起寄主内一些特定的反应。这些反应可导致寄主排斥或接受微生物。在豆科植物和根瘤菌系统中，这些反应则能以某种方式促使根瘤菌开始感染豆科植物寄主 (Bauer and Bhuvanewari, 1979)。在植物和病原菌系统中，这些反应又能诱导植物的抗御反应以排斥致病微生物的感染 (Albersheim and Anderson-Prouty, 1975; Sequeira, 1978)。

支持高等植物对根瘤菌及其他微生物的识别牵涉到外源凝集素的理由如下:

(1) 在各种类群中的许许多多植物种中都发现有外源凝集素, 豆科植物种子是外源凝集素特别丰富的来源 (Boyd et al., 1961; Allen and Brilliantine, 1969; Toms and Western, 1971; Lee et al., 1977)。但对它在体内的功能了解甚少。

(2) 外源凝集素是蛋白质/糖蛋白分子, 它能识别复杂的糖类结构。有关这一分子的很多生化特性读者可参考以下这些文献: Sharon和Lis, 1972; Lis和Sharon, 1973; Liener, 1976; 以及Sharon, 1977。

(3) 微生物和植物细胞表面由极为复杂的糖类物质组成, 如荚膜及外多糖、脂多糖、磷壁酸和细胞壁多聚糖。这种复杂的不同结构显然是合理的。

(4) 有些很好的证据, 特别在粘菌中, 表明外源凝集素影响到细胞间特异的粘合作用并引导细胞的分化 (Ray et al., 1979; Town and Stanford, 1979)。

二、豆科植物和根瘤菌系统的识别机理

Hamblin和Kent (1973) 曾报道云扁豆 (*Phaseolus vulgaris*) 的外源凝集素可能将菜豆根瘤菌 (*R. phaseoli*) 细胞结合在根上适宜发生感染的部位。Bohlool Schmidt (1974) 曾提出寄主外源凝集素对感染性根瘤菌表面的结合作用, 也许可作为寄主和共生生物相互影响中特异的决定因素。Dazzo和他的合作者 (Dazzo and Hubbell, 1975a, b; Dazzo and Brill, 1977) 曾提出过一个外源凝集素交叉结合模式, 用来阐述白三叶草 (*Trifolium repens*) 和三叶草根瘤菌 (*R. trifolii*) 共生系统中的寄主特性。根据这个最近的模式, 三叶草根部和三叶草根瘤菌细胞上存在着表面抗原, 它与三叶草根的抗血清交叉反应。这些作者指出, 存在于寄主和细菌细胞表面的那些交叉反应所共有的抗原决定簇, 对于三叶草根瘤菌和三叶草根二者间具有免疫化学的独特性。依照这个假设, 为根瘤菌所识别的、存在于三叶草根表的三叶草外源凝集素, 与存在于寄主和细菌细胞表面上具有免疫化学独特的糖类受体结合, 其结果使细菌对三叶草根毛专性地附着 (Dazzo and Hubbell, 1975a, b; Dazzo, 1980a)。

Soheim (1975) 针对三叶草根瘤菌和白三叶草根部的结合作用提出过一个近似的模式。在这个模式中, 寄主根分泌出一种高分子量的“因子”到根际并结合于根瘤菌的表面, 然后细菌才能够结合根毛表面的一个受体。

Bauer和Bhuvaneswari (1979) 提出了另一种根瘤菌识别状况的模式, 认为寄主外源凝集素和共生生物表面特有受体的相互作用, 可以作为寄主和共生生物进一步反应的触发剂, 从而导致了成功地感染。

这些不同模式间的相同点和不同点是值得提出的。在识别过程中, 所有这些模式基本上都牵涉到植物外源凝集素和根瘤菌表面糖类物质。由Dazzo和Hubbell (1975a, b) 及Dazzo等 (1976) 提出的模式所涉及到的外源凝集素仅仅是存在于细菌细胞对根毛的物理结合作用中。外源凝集素被认为能和存在于植物和细菌细胞表面, 在免疫学上相似的受体相结合。尽管这个见解由Hamblin和Kent (1973), Bohlool和Schmidt (1976), 以及Soheim (1975) 相继提出, 而且都牵涉到促使细菌与根部结合的外源凝集素, 但这些模式仍不能肯定外源凝集素的糖类受体是存在于植物和根瘤菌细胞二者表面上的。

外源凝集素作为豆科植物寄主和根瘤菌相互识别的媒介这一概念, 由Soheim (1975), Bauer等 (1977) 提出讨论后, Bauer和Bhuvaneswari (1979) 以及Schmidt (1979) 又提出了感染过程的开始是成功识别的结果。依照这些模式, 不具备“合适的”外源凝集素受体分子的根瘤菌, 不能被寄主成功地识别, 因此对豆科植物寄主的感染和结瘤都归于失败。但无

论如何,这并不意味着凡是具备合适外源凝集素受体的根瘤菌菌株都能被识别,并在寄主上结瘤。正如Bhuvaneswari和Bauer (1978)以及Schmidt (1979)所指出的,细菌要成功地进入寄主根组织还需要有一些其他过程。寄主和共生生物感染作用能被这些过程中任何一个所阻碍,甚至在成功地进行了最初的识别后也如此。于是,外源凝集素作为识别的媒介这一概念,在寄主结瘤特性方面只能被部分地承认。

另一方面,Dazzo和Hubbell (1975a,b) 提出一个模式,他们不认为外源凝集素成功地作为识别媒介有任何直接结果。按照这个模式,细菌在根表面的结合作用取决于识别本身。所以只有具备感染能力的三叶草根瘤菌菌株才能与三叶草根毛结合,这种选择结合作用都归根于识别(Dazzo et al., 1976; Dazzo, 1980b)。

评价这些外源凝集素识别假说,能够得到的实验证据可概括为以下几点:

(1) 不同根瘤菌种结合不同豆科植物寄主,外源凝集素的能力与它们在豆科寄主上结瘤的能力之间的生物学具相关性。

(2) 根瘤菌细胞对豆科植物根毛的吸附作用的研究。

(3) 不同根瘤菌细胞表面外源凝集素结合的受体分子的分离、提纯和鉴定。

(4) 在豆科植物和根瘤菌相互作用中根瘤菌细胞表面多糖的证明。

(5) 外源凝集素在根部的位置。

三、主要研究内容

(一) 生物学相关性的研究 Bohlool和Schmidt (1974) 首先证明了不同根瘤菌菌株对于已部分提纯、用荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记的大豆种子外源凝集素的结合能力,和它们在大豆(*Glycine max*)上的结瘤能力有着不容忽视的生物学相关性。在我们实验室里(Bhuvaneswari et al., 1977, 利用大豆根瘤菌(*R. japonicum*)的22个菌株和根瘤菌属的其他几个菌株,已经证实了这些结果。Dazzo和Hubbell (1975a)以及Dazzo等(1978)报道,三叶草根瘤菌不同感染性菌株对白三叶草种子外源凝集素的结合能力,它们在栽培的白三叶草上的结瘤能力之间有着极好的相关性。另一方面,Dazzo和Hubbell (1975c)、Brethauer和Paxton (1977)、Chen和Phillips (1976)、Law和Strijdom (1977)等,没有发现在不同根瘤菌菌株对其他几种豆科植物寄主外源凝集素的结合作用,和它们在这些植物上的结瘤能力之间,存在着任何生物学上有意义的相关性。

评定以上提到的一些负结果是困难的。我们研究了大豆种子外源凝集素和大豆根瘤菌几个菌株的结合作用,结果表明,外源凝集素和细菌细胞某些成分的结合作用是暂时的,并且依赖于培养的条件(Bhuvaneswari et al., 1977; Bhuvaneswari and Bauer, 1978)。大多数大豆根瘤菌菌株只能在生长的初期或对数生长期的中期,与大豆种子外源凝集素相结合,而在稳定生长期的前期和后期,均不能与可测出量的外源凝集素结合。已有报道,三叶草根瘤菌(Dazzo et al., 1979)和从花生(*Arachis hypogaea*)中分离得到的一个根瘤菌菌株,随着培养时间增加,与外源凝集素的结合特性也有类似的变化(Bhagwat and Thomas, 1980)。在根际和根表培养条件下,对不同大豆根瘤菌菌株与外源凝集素的结合特性研究的结果表明,即使用高度加富的实验室培养基培养时,生长在根区内的所有11个具有外源凝集素受体的大豆根瘤菌供试菌株,在生长周期的每个阶段都有一些菌株检测不出结合的、荧光素异硫氰酸酯标记的大豆种子外源凝集素(SBL) (Bhuvaneswari and Bauer, 1978)。这些表面受体瞬变和可诱导的特性,从一些不十分令人信服的相关研究中得到了反面证明。

外源凝集素结合能力和结瘤能力之间良好的正相关性，可以作为可能有外源凝集素参与的间接证据，但缺乏良好的相关性则不能作为否定外源凝集素参与最初相互作用的证据。

(二) 根瘤菌细胞对豆科植物根毛吸附作用的研究 Hamblin和Kent (1973) 曾指出，豆类植物外源凝集素可能牵涉到根瘤菌细胞与感染部位的结合。此后，其他研究者探索了外源凝集素作为结合的媒介是豆科植物和根瘤菌共生中寄主特性的可能性。Dazzo等 (1976) 报道了在不同三叶草根瘤菌菌株结合三叶草外源凝集素的能力和这些菌吸附于三叶草根毛的能力之间，有着良好的相关性。不能在白三叶草上结瘤的根瘤菌，也就不能在三叶草根上有相当数量的吸附。另外，Dazzo和Brill (1977) 以及Dazzo等 (1976) 报道了三叶草根瘤菌的荚膜多糖与根的结合作用和细菌对根的吸附作用能为2-脱氧葡萄糖这种三叶草外源凝集素糖辅抗素所阻遏。Bishop等 (1977) 及Dazzo和Brill (1979) 指出，当把三叶草根瘤菌的固氮基因 (*nif*基因) 用遗传学方法转移到棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) *nif*⁻ (豆科植物的非共生生物) 中时，有13%的棕色固氮菌 *nif*⁺ 转化剂能与三叶草外源凝集素结合。这些转化剂和非转化剂相比，能大量粘附在白三叶草根毛上。

Chen和Phillips (1976) 报道了在他们测试的，包括三叶草根瘤菌的所有根瘤菌中，与豌豆 (*Pisum sativum*) 根结合的范围是相同的。Broughton等 (1980) 研究了结合于豌豆根上结瘤和不结瘤，但能感染的豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*)，发现结瘤和不结瘤的菌株都有可估测的数目结合于豌豆根上。

Bohlool和Schmidt (1976) 观察到大豆根瘤菌对基质表现出极性连接。Sablman和Fahraeus (1963) 及Dazzo等 (1976) 也观察到三叶草根瘤菌和白三叶草根毛吸附时也有相似的极性连接。Bohlool和Schmidt (1976) 提出存在于大豆根瘤菌一些菌株上的这种极性体能参与结瘤作用。近来，Shantharam等 (1980) 又指出，用铁阮标记的大豆种子外源凝集素，能和大豆根瘤菌61A76菌株的极性体结合。

认为根瘤菌与寄主根细胞的结瘤作用，为寄主和共生生物之间相互作用的必要步骤是符合逻辑的。细菌对根毛的附着对识别现象，或确定生物学特性上的意义还没有什么资料。在三叶草和三叶草根瘤菌共生系统中，假定的识别机理是根据根瘤菌对三叶草根选择性结合而来的。在这一点上，Dazzo和Hubbell (1975a,b) 的模式与他们的结果是一致的。必须解释的是，不能结瘤的根瘤菌与三叶草根毛的结瘤作用。不能结瘤的根瘤菌菌株的结瘤作用，在性质上显然与能结瘤的三叶草根瘤菌是不同的，因为它不以三叶草外源凝集素作为媒介，也不被2-脱氧葡萄糖所阻抑。实验证据表明，对于三叶草和三叶草根瘤菌系统，三叶草外源凝集素单独作为结瘤作用的媒介在生物学上是重要的，或者说其构成与识别是相关的，而且是最间接的，由它造成的识别无论如何都具有相关性 (Dazzo和Brill, 1977, 1979; Dazzo et al., 1978; Dazzo, 1980b)。假如我们知道外源凝集素为什么或怎样作为吸附作用的媒介那是重要的，并且知道不以外源凝集素作为结瘤作用的媒介是与之不同的，那末我们将从较好的见解中弄清最初相互作用时，根瘤菌与三叶草根毛选择结瘤作用的意义。在另一些豆科植物和根瘤菌系统研究中，至今只有少量证据表明，根瘤菌对寄主根毛的吸附作用是定量或定性选择，因而可导致对根瘤菌的鉴别。

(三) 外源凝集素结合的不同根瘤菌受体分子的分离、提纯和鉴定 Dazzo和Brill (1977) 利用免疫化学技术描述了三叶草外源凝集素与三叶草根瘤菌荚膜多糖物质的结瘤作用。Woipert和Albersheim (1976) 以及Kamberger (1979a,b) 也报道了不同根瘤菌种的脂多糖 (LPS) 与其各自豆科植物寄主外源凝集素的结瘤作用。Bhagwat和Thomas (1980) 还

报道了根瘤菌的荚膜和脂多糖对花生外源凝集素的结合作用。

与大豆外源凝集素结合的大豆根瘤菌细胞表面受体仅位于这些细胞的荚膜物质里 (Bal et al., 1978; Calvert et al., 1978; Tsien 和 Schmidt, 1977)。Mort 和 Bauer (1980) 发现, 在大豆根瘤菌 311b 138 随着培养物从早期至对数生长期晚期逐渐地成熟, 形成荚膜的细胞百分率减少约 50%, 并且, 大豆根瘤菌 311b 138 和 110 菌株随着培养时间的增加, 荚膜多糖的组成和结构也改变了。对大豆根瘤菌 311b 138 和 110 菌株不同培养时期荚膜多糖组成和结构的分析表明, 这个分子由重复的戊糖单元组成, 并含有一个半乳糖醛酸、两个葡萄糖、一个甘露糖和一个半乳糖残基。另外, 在每个戊糖单元上有两个乙酰基 (Mort 和 Bauer, 在编写中)。在 311b 138 培养的稳定期 (非外源凝集素结合期), 其荚膜多糖约有 75% 的半乳糖残基的第四个碳原子被甲基化了 (4-O-甲基半乳糖)。在生长的早期或对数生长期中期 (外源凝集素结合期), 其培养物的荚膜多糖仅有 50% 的半乳糖残基被甲基结合。这样, 半乳糖残基在戊糖单元上的状态看来就决定了这个分子外源凝集素的结合特性。

三叶草根瘤菌荚膜多糖与白三叶草外源凝集素结合作用的生物化学基础尚未完全弄清。按照 Dazzo 和 Brill (1977) 的见解, 三叶草外源凝集素和三叶草根瘤菌荚膜多糖物质的结合作用, 以及三叶草根瘤菌荚膜物质对三叶草根毛尖端的结合作用, 均能被 2-脱氧葡萄糖所抑制。Dazzo 和 Hubbell (1975b) 报道了对这种荚膜抗原物质的分析, 指作 2-脱氧葡萄糖可以作为荚膜多糖的一个组分。然而 Jansson 等 (1979) 在三叶草根瘤菌荚膜多糖里没有检测出任何 2-脱氧葡萄糖残基。在 Jansson 等 (1979) 的报道中, 和其他对根瘤菌荚膜和外多糖的结构研究中, 确实从相对老的培养物的分析中获得了胞外多聚糖物质。三叶草根瘤菌和其他根瘤菌培养物是否也像大豆根瘤菌 311b 138 和 110 菌株那样, 荚膜和外多糖的结构和组成随培养时间增加而发生变化, 了解这一点是重要的。

Planque 和 Kijne (1977) 报道了豌豆外源凝集素和由豌豆共生生物豌豆根瘤菌合成的葡聚糖分子的结合作用。在一定的培养条件下, 另一些根瘤菌能合成 β -1, 4 葡聚糖和 β -1, 2 葡聚糖 (Dudman 1978, Zevenhuizen 和 Scholten-Koerselman, 1979; Napoli 和 Albersheim, 1980; Mort 和 Bauer, 未发表)。

(四) 豆科植物和根瘤菌的相互作用中所牵涉到根瘤菌细胞表面物质的证明 早期的工作者研究了在寄主和共生生物相互作用中根瘤菌细胞表面多糖可能是重要的 (Ljunggren 和 Fahraeus, 1959; Hubbell, 1970; Solheim 和 Raa, 1973; Yao 和 Vincent 1976; Dazzo 和 Brill, 1977)。近来, Sanders 等 (1978) 以及 Napoli 和 Albersheim (1980) 从豌豆和寄主共生生物相互作用里, 确证了豌豆根瘤菌荚膜和外多糖的重要性。Sanders 等 (1978) 指出, 豌豆根瘤菌的突变种由于不能合成正常量的外多糖, 以致不能使豌豆植物结瘤。Napoli 和 Albersheim (1980) 发展了 Sanders 等 (1978) 这个最初的见解, 分离出一类豌豆根瘤菌新突变种, 它们只能形成少量的胞外多糖, 并具有一层环绕着细菌细胞, 且性质不同的荚膜。这些突变种能在豆科植物寄主上结瘤。他们的数据表明, 在培养物中随着有荚膜细胞数目的减少, 感染的效率也会相应降低。他们还记录了外多糖合成量和结瘤效率之间的相互关系 (Napoli 和 Albersheim, 1980)。这些突变种缺少荚膜和不能在豌豆植物上结瘤的原因, 是由于感染过程的前期步骤受阻。另外, Kamberger (1979b) 指出, 豌豆根瘤菌的脂多糖和外多糖在决定豌豆和豌豆根瘤菌共生系统结瘤特性方面是重要的。

Bal 等 (1978) 报道, 只有形成荚膜的大豆根瘤菌 61A76 菌株的细胞, 能粘附于大豆根上。我们实验室的研究表明, 一些无荚膜的大豆根瘤菌 311b 138 菌株, 在培养过程中能够产

生一种可溶性外多糖，它在组成上相当于由亲本菌株合成的荚膜多糖（Y. Yamamoto, I. J. Law, A. J. Mort, 和 W. D. Bauer, 未发表）。这些突变种和亲本菌株一样，能有效地在栽培的“Williams”品种大豆上结瘤。Maier和Brill（1978）报道了两种不能结瘤的大豆根瘤菌61A76突变种，它们缺乏存在于野生菌株上的那种表面抗原。作者指出，这些表面抗原与脂多糖的O抗原部分相连。然而，用于这一研究的脂多糖制剂的性质和纯度没有很好地确定。

以上提到的一些研究提供了不少间接证据，表明荚膜和外多糖对于寄主与共生生物的相互作用是重要的。Napoli和Albersheim（1980）以及Dazzo和他的合作者的研究报告指出，荚膜外多糖对于感染作用的最初阶段是重要的。进一步的试验计划揭示它们之所以重要的根由，并且有可能解答这样一个问题，即它们是否在豆科植物和根瘤菌联合中，其识别过程取决于寄主特性。然而，从目前得到的证据中，要想精确地估计根瘤菌脂多糖在豆科植物和根瘤菌相互关系中的作用是不可能的。用充分了解的脂多糖突变体进一步研究，对于在这一重要方面提供更多的信息是需要的。

（五）外源凝集素在根部的位置 如果外源凝集素是参与了根瘤菌的识别作用，那末要紧的是了解感染位点上外源凝集素的存在。Dazzo等（1978）报道了与根瘤菌结合的三叶草外源凝集素存在于根毛尖端（推测是白三叶草的感染位点），用2-脱氧葡萄糖洗涤根部能把这种外源凝集素从白三叶草根表洗脱下来（Dazzo et al., 1978）。这些结果与外源凝集素在寄主和共生生物之间充当一个分子媒介的假说是一致的（Dazzo 和 Hubbell, 1975 a, b）。Hamblin和Kent（1973）指出，菜豆根瘤菌（*R. phaseoli*）细胞与红血球细胞对豆类根的结合作用，可以说明豆类外源凝集素存在于根上。Law和Strijdom（1977）用高盐洗涤法从*Lotononis bainesii*根提取了一种血红凝集素的外源凝集素。

Bohlool 和 Schmidt（1974）报道了大豆根提取物中血红凝集素的活性。Pueppke等（1978）研究了大豆种子外源凝集素在大豆根中的分布，指出直到大豆萌发后两周，仍能在其根部检测出大量外源凝集素的存在。Howard等（1972）、Rouge（1975）、Pueppke（1979）以及Solheim和Paxton（1980）、Pull等（1978）报道了其他豆科植物随着苗龄的增加，根上种子外源凝集素的浓度相应地降低了。他们测试了多种大豆栽培植物种子外源凝集素，指出被测试的102种中有5种没有种子外源凝集素。Schmidt（1979）报道在这些品种中种子提取物的血红凝集素活性很弱，但这可能是由于种子中含有杂质造成的。本实验室试图确定大豆根瘤菌细胞结合的大豆种子外源凝集素的位置，在大豆根上使用了荧光免疫技术，但迄今未获得成功（Bhuvanewari 和 Bauer, 未发表）。Bowles等（1979）报道了大豆和花生萌发7周后，在其根部仍存在膜结合的血红凝集素的外源凝集素。然而，除了白三叶草的这种情形以外，根瘤菌与根提取物、或整个根表面种子外源凝集素的结合，一直未被其他豆科植物寄主所确证。

由于我们不能确定大豆根瘤菌在大豆根上结合外源凝集素的位置，所以对此只能作几种可能的解释。在某些豆科植物寄主中种子外源凝集素可能不存在于根部，或它在所用的缓冲液中已变成不能被提取的了。也可能是参与根瘤菌识别的外源凝集素不同于存在种子中的外源凝集素。假若我们设法在原位上确定根上的根瘤菌识别外源凝集素，则或许能消除这种不可靠性。需要更多有关根部外源凝集素的特性、分布情况和生化性状，以及根与种子外源凝集素之间的关系的信息，以便对有关根部种子外源凝集素的位置作一精确评价（Schmidt, 1979）。

II. 未来研究重点：本实验室新近的工作

以上提到的研究，试图鉴定和确定参与寄主和共生生物间识别作用的分子的位置。从这些研究中得到的证据大多是相关的和根据情况推测的，因而是间接的和不确实的。假若我们知道一些寄主识别最初的生理学和（或）形态学结果，就能得到外源凝集素或其他任何分子参与寄主和共生生物识别作用的直接证据。然而，这些在豆科植物和根瘤菌系统中仍旧是未知的。本节详细描述了我们为得到这一资料新近所作的探索。

根瘤菌感染温带豆科植物寄主主要在根毛上形成侵染线。有些证据表明，寄主特性在侵染线形成之前就已确定（Li 和 Hubbell, 1969; Yao 和 Vincent, 1969）。那末，推测某些种类的识别作用在侵染线形成之前就有可能发生是合理的。遗憾的是，有关侵染线形成前那一阶段的资料太少了。这儿将讨论一些已得到的有关资料 and 需要解答的有关问题。有关感染过程的详细叙述和报道，读者一般可参考 Fähræus 和 Ljunggren (1967)、Ljunggren (1969)、Nutman (1970) 以及 Dart (1974, 1977) 早期的文献。

在大多数豆科植物和根瘤菌系统中，获得感染的根毛总数只有一个很小和可变的比例。侵染线通常发现在弯曲的根毛上，但并不是所有紧曲的根毛都具有侵染线。根毛的某些卷曲和畸变可由根瘤菌培养物的无细胞滤液诱导发生。见解不同处就在于这种卷曲是侵染线形成之前成为感染过程的一个确定步骤，还是生物学上特异的步骤（Nutman, 1959; Sahlman 和 Fähræus, 1963; Hubbell, 1970; Solheim 和 Raa, 1973; Yao 和 Vincent, 1976; Shimakhanova, 1978）。我们需要弄清有关识别机理的一些尚未解决的问题，这些问题包括：为什么只有那么少被感染的根毛？已经被感染的根毛有何不同？感染是否总是开始在根毛上？识别发生在所有的根毛上还是仅发生在被感染的根毛上？实验室培养的细菌是否有感染能力、或者它们在发生任何相互作用前对寄主根环境是否适应？假若它们具有适应能力，是否包括新细胞表面分子的合成？寄主的根毛是否都是可感染的、或它们必须适应于细菌的存在？假使它们能适应，又是如何参与的？总之，共生系统中识别的基本分子和生理结果是什么？

我们利用大豆和大豆根瘤菌共生系统研究了感染过程最初阶段的生理学，并将其作为长期探讨的目标，弄清楚识别作用是何时、从何处和怎样在这一系统中发生的。以下是我们详细的结果和讨论。

大豆根瘤菌通过根毛上形成的侵染线能正常地进入大豆根（Bieberdorf, 1938; Rao 和 Keister, 1978; Newcomb et al., 1979; Turgeon et al., 1979）。然而，有关导致侵染线形成的过程知道得很少。在大量播种豆科植物里，研究这些最初过程的一个重要问题是弄清何时，从何处_{在根上}更能发生感染。近来，我们应用所发展的测定根上可感染部位的技术，克服了这个主要困难（Bhuvanewari et al., 1980）。

大豆实生苗生长在塑料培育袋（Weaver 和 Frederick, 1972）中，以便观察根的发育并在接种后追踪之。接种时用防水笔在塑料袋上标记根尖（RT）、最小突发根毛（SERH）和完全成熟的根毛等位置，标记的这些位置相对于接种时根的生长和根毛发育情况列于图 1。用活跃生长培养物制备的大豆根瘤菌悬液来接种这些植物，记录植物接种一周后相对于接种时所做的标记出现的根瘤。

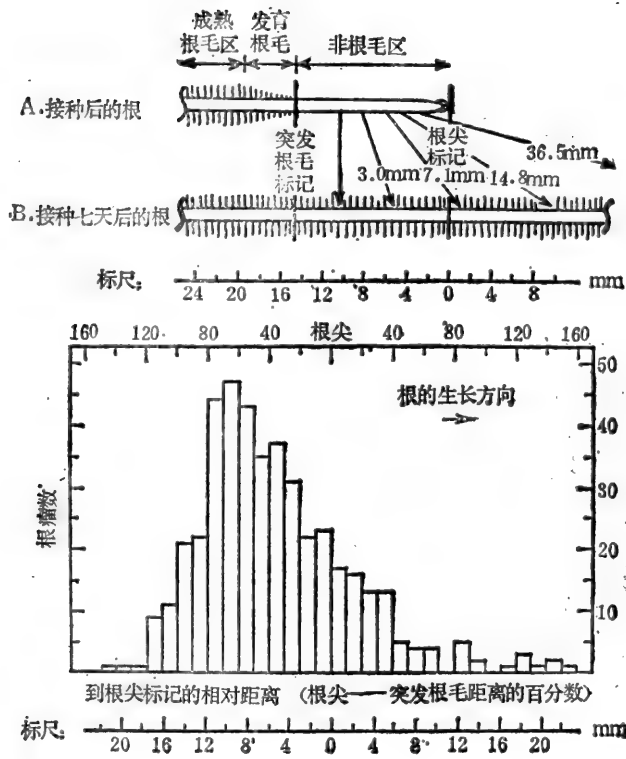


图 1

上：标记时的大豆根图和根瘤位置的确定。(A) 发育根毛区和接种时在培育袋上对根尖和最小突发根毛所做的标记位置。(B) 接种一周后相同的根区。箭头标明表皮细胞从标记时的根(A)到记录时的根(B)相对根尖和最小突发根毛标记的移动。测量表皮细胞位置的变化，如Bhuvaneswari等(1980)所述。四个单独试验平均的结果综合为一株“典型”植物，其根尖到最小突发根毛相距14.6毫米(见图2)。箭头所示的距离表明表皮细胞特异的 最初 位置 被移动得相当远(Bhuvaneswari et al., 1980)。

2: 结瘤效率剖面图。测量150株实生苗初生根上全部根瘤相对于根尖标记的位置。计算初生根上每个根瘤到根尖标记的相对距离，作为给定植物根尖到最小突发根毛距离的百分数。150株实生苗中的120株(80%)能在根尖标记上面产生根瘤。这些植株根尖到最小突发根毛之间的平均距离是14.6毫米±5.0毫米(标准偏差)，范围是3.0—25.5毫米(Bhuvaneswari et al., 1980)。

实际上所有植株在接种时间都能在非根毛区(NRH区)的初生根上产生根瘤。有趣的是，没有一株植物在成熟根毛区(MRH区)产生根瘤。但在接种期间，那儿有十分发达的根毛出现(表1)。接种期间，在具有短的产生根毛的部位(DRH区)，有0—20%的接种植物能产生根瘤(表1)。接种方法或所用的大豆栽培品种都不能有效地改变这种状况。试验确定在未来的根区有大豆生长极需的高的结瘤效率(Bhuvaneswari et al., 1980)(图1下)。这清楚地表明，在任何给定的时间，大豆根上仅有一个窄带细胞的感染能导致产生根瘤。这种可被感染的细胞带，位于活性根伸长区和突发根毛区之间。假若用大豆根瘤菌接种，这些区域能不断产生根瘤。使用这个技术可以研究感染最初阶段和结瘤开始的情况，并在可见的根瘤出现之前追踪其在关键时刻的长大情况。

应用这个方法接种，并用光学显微镜研究早期感染过程(Turgeon et al., 1979)，仅在短曲根毛上发现约长10—30微米的侵染线。这些根毛的卷曲大约发生在接种12小时后。早期侵染线的形成大约在接种24小时后。侵染线到达根毛基部大约在接种48小时后。这时，在侵染线穿行过程中，有细胞进入皮层(Turgeon et al., 1979)。

表1 豆科植物的结瘤状况

寄 主	共生生物 (根瘤菌菌株)	植物结瘤百分率% ^a		
		非根毛区	产根毛区	成熟根毛区
大豆“Williams”品种	大豆根瘤菌 3 I 1 b 138 <i>R. japonicum</i>	83	11	0
豇豆“California Blackeye”品种	根瘤菌 32H 1 <i>Rhizobium</i> sp.	100	0	0
苜蓿“Moapa”品种	苜蓿根瘤菌 102 F71 <i>R. meliloti</i>	90	52	25
白三叶草“Regal Ladino”品种	三叶草根瘤菌 TA 1 <i>R. trifolii</i>	100	97	110

a. 表示指定区域结瘤植物相对于根尖上面结瘤植物总数的百分比。

只是严格地在细胞窄带上感染导致根瘤形成的这一事实，意味着可感染性仅为根细胞的一种瞬时特性，这一点已被延迟接种研究所验证。感染的根区（非根毛区）按前述方法标记，并在标记后的不同时间给标记区接种，结果表明（图2左），特定区域的可感染性确实是极为瞬时的。可感染的非根毛区随着它的成熟而成为不可感染的，并变成发育根毛区（图1上）。有三个参量能用来证实感染部位的瞬时特性，即非根毛区根瘤形成的数量，所有接种植物在非根毛区结瘤植物所占的比例，标记期间初生根根尖与最上面形成的根瘤之间的距离（标记时进行根尖标记）。正象所期望的，所有三个参量都随着标记和接种之间时间间隔的增加而减少。感染区的最上部分的感染性在2小时内丧失。在这些条件下，非根毛区感染性丧失的速率与根的生长速率（ 2.4 ± 0.6 毫米/小时）大致相对应。假如我们考虑到这三个参量，并将图3中的曲线外推至0，则可感染的非根毛区变成完全不可感染的须花约4—5小时。

由此可见，感染导致在非根毛区形成根瘤是在此区变成不可感染的以前，即接种后的4—5小时以内。当接种剂中细菌细胞能在一个有意义的范围内增殖前，能导致根瘤形成的感染作用的某些早期过程就可能已经开始了（用于此研究的大豆根瘤菌菌株在本实验室培养条件下的世代时间是8小时）。

改变接种剂中细菌细胞数量对结瘤多少的影响，已被研究以证实这一可能性。将1毫升接种剂悬液稀释到含 1×10^3 至 1×10^8 细胞/毫升，并接种到植物的不同部位。一周后，记录在接种时标记的根尖以上出现的根瘤。结果（图2右）表明，每株植物根尖标记以上根瘤形成的数量，以及在标记根尖以上结瘤的植物占接种植物总数的比例，与接种剂细菌细胞的浓度呈现一个线性和对数关系。这些结果进一步说明了，大豆结瘤作用最少需要10—20个细菌细胞（图2右）。也有报道，白三叶草根瘤最少需要10个三叶草根瘤菌细胞（Purchase 和 Nutman, 1957）。接种剂浓度对结瘤的作用的全部意义，在这里是不清楚的。对所观测到的对数相关性的一种可能的解释是，在根毛细胞变成不可感染的以前，相互作用开始时可能需要由能影响寄主反应的根瘤菌合成最低限量的一些物质。一种同样合理的解释是，所用接种剂中每10个细胞中仅有一个能够开始感染。这一点需要用进一步的试验来阐明。

在苜蓿 (*Medicago sativa*) 和豇豆 (*Vigna sinensis*) 中, 感染和结瘤的状况与大豆很相似 (表 1)。在任何给定的时间内, 根部可感染的细胞被限制在根尖以上一个狭窄的区域内。延迟接种试验表明, 这些感染部位的存在是极为瞬时的。可感染部位的消失率与豇豆和苜蓿根的生长率大致相对应。我们用苜蓿试验的结果和Pate及Dart (1959) 所提到的蒺藜状苜蓿 (*Medicago tribuloides*) 感染位点瞬时的存在特性是一致的。

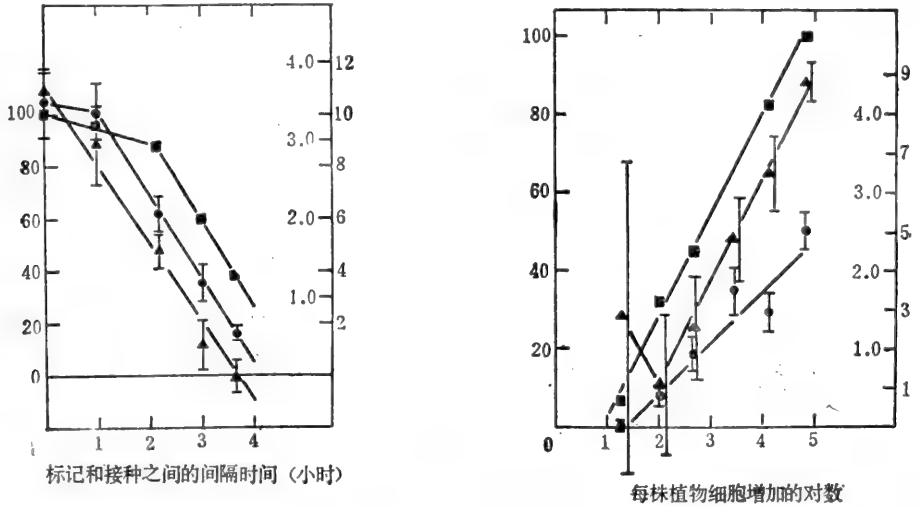


图 2

左: 推迟接种对根尖标记以上结瘤的影响。每批根尖以上具有根瘤的植物百分数 (■), 每株植物根尖标记以上的根瘤平均数 (●), 最上面的根瘤到根尖标记的平均距离 (▲) (Bhuvanewari et al., 1980)。

右: 接种量对根瘤发育的影响。记录结瘤以确定根尖标记以上具有根瘤的植物百分数 (■), 每株植物根尖标记以上根瘤的平均数 (●), 最上面的初生根瘤到根尖标记的平均距离 (▲)。纵线表示标准误差 (Bhuvanewari et al., 1980)。

另一方面, 白三叶草感染的状况 (表 1) (Bhuvanewari, T. V., A. A. Bhagwat 和 W. D. Bauer, 在编写中) 看起来与大豆、苜蓿或豇豆迥然不同。一些作者用白三叶草和三叶草根瘤菌系统作为模型系统来研究感染过程, 因而有关感染过程及结瘤生理的文献很多。至于这方面资料的详细报道可从其他途径得到 (Dart, 1974; Nutman, 1949, 1959, 1962), 在此不再详细地加以讨论。Nutman (1949, 1959) 和 Purchase 及 Nutman (1957) 报道, 白三叶草的感染作用发生在根部不连续的焦点上, 然后从这些原初感染点沿着初生根扩散。

我们进一步观察了接种后整整 10 天期间白三叶草感染的状况。由活跃生长的三叶草根瘤菌 TA1 菌株培养物制备每毫升含有 10^8 个细胞的接种剂, 在种有 5—8 株植物的袋中或种有 3 株植物的 10 吋平板中接种 1 毫升。和先前描述过的大豆一样, 接种时要标记根尖位置和根毛区。对接种时这些标记的地方, 可在接种后 3、5、7 和 10 天观察到根瘤的出现。我们的结果表明, 接种 3 天后便能在根尖标记以上的非根毛区观察到发育的根瘤。假若在接种 5、7 和 10 天后检测同一植物, 则除了那些非根毛区发育的根瘤外, 具有发达和成熟根毛部分的初生根上也观察到了根瘤。然而在成熟根毛区出现的根瘤, 较之出现在非根毛区的根瘤, 看起来好像发育期要早一些。要是不常常在间隔时间内观察同一植物, 其根瘤发育的程序就容易遗漏。我们观测感染和结瘤的状况与 Nutman (1959) 的结果完全相符。然而, 我们提出了一个修正的 Nutman “焦点” 感染理论来阐明我们的结果。我们设想, 白三叶草感染的发

生有两个性质不同的相：（1）迅速开始相，正像描述的其他豆科植物和根瘤菌系统一样，感染发生在非根毛区和发达根毛区。我们从延迟接种试验中获得的数据表明，根尖标记以上那些迅速感染的部位仅在短时间内保留其感染性。此区感染性丧失率与在这些条件下根的生长率大致相对应。这种迅速感染作用与Nutman描述过的感染焦点相对应。（2）延迟相，在凡是有成熟（完全伸长的）根毛的地方随机发生感染。

我们推测那些在成熟根毛细胞的侧芽或分枝上发生延迟感染是接种的结果。文献的某些证据证实了细菌接种后开始的白三叶草根毛分枝上的感染作用是后一相的可能性。Fähræus（1957）说明，在分叉的根毛中，侵染线通常是从分叉处开始的。Nutman（1959）则认为：“尽管文献中描述根毛卷曲顶端的感染通常比描述侧枝的感染要多，但后者是较为常见的……，顶端的感染仅发生在根毛伸长的相对短的时间内。此后，它们仅在侧部易受感染。顶端易为感染的根毛区范围几乎保持不变（在不分叉的根上），而开始的侧部感染则稳步增加……直到所确定的限定时间根的较老部分才开始完全抵制感染。这样，按照我们的解释，在接种时完全分化的根毛是不能被即刻感染的，但是当新的分枝被根瘤菌诱发以后才能成为可感染的。这是试验时测得的。Yao和Vincent（1969，1976）以及Solheim和Raa（1973）分离了三叶草根瘤菌无细胞滤液中的根毛分枝因子并阐述了它的特性。有一些可信的证据说明，分枝效应可能是寄主的部分特性。

根瘤菌进入到花生植株里去的机理不完全清楚。这种植物仅在侧根基部具有根毛，并且只在侧根的“腋”上结瘤。设想根瘤菌的进入是通过侧根突出体形成伤口时发生的（Allen，1940）。Chandler（1978）提出，根瘤菌是经根毛和表皮细胞的连接处进入花生植株的。我们初步的结果表明，假如接种后根产生基部根毛，根瘤就将在那些已经穿出侧根的“腋”处产生。在花生植株中，感染导致出现根瘤被限制在很小的根区里，看上去这个根区与基部根毛发育比与侧根发生的关系更为紧密。Chandler报道中的结果提供了间接的证据，根瘤菌是通过根毛而不是通过侧根突出时形成的伤口进入花生植株的。

III. 概述和结论

我们用五种豆科植物对感染的部位、感染过程的生理以及结瘤状况作了有限的研究，揭示了一些共同的特性：（1）感染过程导致根瘤形成被限制在根细胞的窄带中，（2）在这些成熟的细胞中，感染性的发生是瞬时的，并迅速地丧失，（3）实验室培养根瘤菌能开始相互作用，并存在于寄主根上，但不会大量生长和繁殖，（4）感染导致的根瘤产生看起来最通常发生在根毛上或许在接种后分化根毛的分枝上。

有证据表明，根瘤菌荚膜多糖在寄主和共生生物开始感染时起着重要的作用。然而其结构、组成和这些分子结合寄主外源凝集素的特性，随培养物的老化而改变。假如在识别过程中外源凝集素结合荚膜多糖是重要的，那末根瘤菌只能在其生长的一定阶段被识别。寄主根毛细胞的感染能看上去同样可在发育时被调节，此后这些细胞有一个瞬时的特性，根细胞有可能识别合适的，发育至一定阶段的根瘤菌。这样，寄主和细菌细胞间相互识别作用有可能被严密地调节，细胞的动态或许只限制在它们发育的一定阶段。

原载“Economic Botany”，35（2），1981，pp. 204—223

王有为译 尤崇杓校

豆科植物氢再循环的现状

H. J. Evans

摘 要

本文简要地评述了以下几方面的一些近况：(a) 豆科植物固氮时影响氢损失程度的因素；(b) 参与大豆根瘤菌类菌体氢氧反应的电子载体；(c) 评价氢再循环效益方面的进展。决定豆科根瘤能否放氢的主要因素是活动吸氢酶的存在，这种酶参与作为固氮反应副产物所释放之氢的氧化作用。Burris教授及其同事曾经指出，固氮酶反应的放氢程度受影响固氮酶周转速率的那些因素所左右，这些因素包括三磷酸腺苷和还原剂的供给，固氮酶铁蛋白与钼铁蛋白组份的比例。根瘤菌类菌体中，氢的氧化作用由位于类菌体膜上的一系列酶催化而产生。除了氢酶本身以外，已经查明参与此过程的载体包括b型和c型细胞色素，可能还有泛醌。我们总结起来的证据表明，固氮生物体中氢的再循环会带来生理效益，从而可能导致豆科植物产量的增加。比较Hup⁺和Hup⁻野生型的纯菌株，Hup⁺系和Hup⁻系的菌体，以及不可回复的Hup⁻突变株与作为豆科植物的接种剂Hup⁺亲本株相比较，得到的结果与Hup⁺特性有利于豆科固氮增加的论断是一致的。但是我们推断，关于氢再循环所给予豆科植物直接效益的精确评价可以从将Hup⁺亲本株、Hup⁻回复的突变株、以及从Hup⁻突变株得到的Hup⁺回复子菌株作豆科植物的接种剂的实验作出推断。这些类型的大豆根瘤菌菌株，已经被发现。Hup⁺和Hup⁻野生型菌株质粒的一些方面与Hup⁻突变株和亲本株一样，已经进行了研究。

一、引 言

在农业上种植豆科植物以改良土壤肥力和增加作物产量已经实践几千年了(Fred等, 1932)。

最近几年的现实是我们贮存的石油燃料有限，这迫使我们重新考虑进一步利用生物固氮的可能性，把它作为手段，为作物生产提供氮源，同时减少我们对氮肥的依赖，因为生产氮肥要消耗石油燃料或其他能源。

研究者已注意到，结瘤的豆科植物固定大气氮时所需要的能量可能比用于固定氮素所必需的能量要大，因此Ryle等提出若大量地利用生物固氮可能影响产量(Ryle等, 1979)。不管用氮气或氮化合物在豆科植物生产潜力上有何差异，能利用取之不尽的太阳能作生物固氮的能源则有明显的优越性。

植物学家把自己的兴趣集中于探讨如何改进固氮生物利用光合产物的效率上。由于所有

注：Hup⁺：吸氢阳性；Hup⁻：吸氢阴性

的固氮生物都放氢，它是固氮反应中被假定浪费掉的副产物，所以许多的研究工作和最近发表的一系列评论都致力于氢的损失，氢酶和氢的再循环。

如Dixon (1978)、Evans等 (1978, 1980a, 1980b, 1981) 对豆科植物根瘤的研究；Bothe等 (1978)、Bothe和Eisbrenne (1978, 1981) 对蓝藻的研究以及Waiker和Yates (1978)，及Yates等 (1980) 对固氮菌的研究。

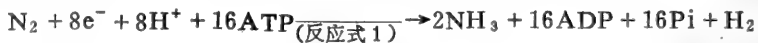
因为没有必要另外作一个全面的综述，我们打算就有关的资料，对下述问题的一些新进展概括和讨论一下：即我们对影响放氢因素的理解；我们对氢氧化过程的最近认识；以及对豆科植物氢再循环效益估计的一些问题和进展。

二、氢是固氮作用的副产物

尽管Hoch (1956) 发现了豆科植物根瘤放氢，但是，直到Bulen (1965) 和Bulen与Lecompte (1966) 指出，固氮菌无细胞制剂的固氮酶催化，需ATP和还原剂的反应中大约有75%的电子传递给氮气，余下的传递给质子形成氢气的开拓性工作发表之后才弄清楚固氮和放氢之间的关系。无N₂时，所有固氮酶电子都用于放氢。

已发现其他生物固氮酶的情况与固氮菌的酶相同，不管被还原的电子受体属于什么类型，在大多数情况下，每传递一对电子要利用4至5克分子的ATP (Silverstein和Bulen, 1978; Ljones和Burris, 1972; Davis等, 1975)。

已经知道有些因素会影响电子流在各受体间的分配，它包括反应系统中固氮酶的铁蛋白与钼铁蛋白组份的比例，ATP与ADP的比例。固氮酶反应的准量关系尽管还没确定，但是可用下式说明：



在最适条件下，大约有25%当量左右的固氮酶电子分配给H⁺，而当条件不适合时，大部分分配给H⁺，小部分给N₂。

在促使我们能够了解影响上述电子分配的因素之后，Hageman和Burris (1978a, 1978b, 1979) 作出了重大的贡献。他们提出了令人信服的证据。按照他们的命名法，固氮酶的铁蛋白和钼铁蛋白算作固氮酶的还原酶和固氮酶，这两个组分的结合与解离伴随着每个电子的转移。在包括ATP与还原剂的供给、固氮酶还原酶和固氮酶比例的一系列可变因素中，每一个极大地影响固氮酶周转速率的因素，也影响电子在基质间的分配，这种现象是有相当大的生理意义的。

例如，当ATP和还原剂的浓度最适时，以及固氮酶还原酶与固氮酶的比例高时，电子最大限度地分配给N₂，其准量关系是，每周转8个电子就约有75%用于氮还原。另一方面，当还原剂与ATP的浓度不适时，或者在固氮酶还原酶与固氮酶的比例低时，固氮酶周转速率即低，结果分配给H⁺的电子明显增加，分配给N₂的电子相应减少。

当用Hup⁻菌株接种的豆科植物生长时，就发现氢不能再循环的境况，这似乎表明，放氢的程度应受左右固氮酶活性的那些因素影响，因为就我们所知，固氮酶是豆科根瘤中唯一催化放氢的酶。

当然，我们应记住，厌氧和兼性厌氧的固氮生物，不仅通过固氮酶放氢，而且还可通过可逆的氢酶放氢，当生物没有别的电子受体可利用时，这种功能即成为处置电子的最终系

统。直到现在还不能排除在豆科根瘤中也存在这种放氢系统的可能性。Evans (1981) 总结了8个试验的结果表明, 用Hup⁻接种剂接种的豆科根瘤由于放氢平均损失掉固氮酶电子的32% (Evans等, 1981)。但在Bethlenfalvay等 (1979) 的一个试验中, 固氮酶电子的60%通过放氢失掉。

Schubert等考察豆科的一个品种时 (Schubert和Evans, 1976), 几次测定表明, 放氢损失占固氮酶电子流的50%到80%。有证据表明, 环境条件, 例如光照强度 (Bethlenfalvay和Phillips, 1977) 和温度 (Dart和Day, 1971), 影响豆科根瘤的放氢程度。显然, 许多影响固氮微生物体内放氢的环境因素。可以用Hageman及Burriss使用纯化过的固氮酶成分所进行的试验来解释。

人们可以料想, 诸如湿度、逆境、厌氧条件和光照不足等可变的环境因素, 可能对用于支持固氮过程及ATP产生的光合产物的数量有影响, 这些影响可以改变固氮酶电子流的分配和氢气释放量。

在考察中, 我们检查了几个根瘤菌品系, 其中具有有活力的氢酶系统所表现出再循环能力, 因而从固氮反应中释放氢的菌株只占比较小的比例。1978年我们已报道过, 在33株大豆根瘤菌中, 只有7株具有有活力的氢酶系统。

最近, Ruiz-Argüeso等 (1981) 已证明, 在30株大豆根瘤菌中有4株有旺盛的氢酶活性。大多数受试的豇豆根瘤菌菌株都具有再利用氢的能力 (Schubert等, 1977), 但在检查我们实验室的100多株苜蓿根瘤菌和三叶草根瘤菌中, 没有一个能明显利用从苜蓿和三叶草根瘤中释放的氢 (Ruiz-Argüeso等, 1979b)。

O'Gara和Hynes (1981) 采用氡分析法发现一些三叶草根瘤菌的菌株有氢酶活性, 但氢的净吸收尚未有证明。

一系列用已知的根瘤菌Hup⁺菌株接种豆科植物, 并在控制的条件下栽培的试验表明, 根瘤类菌体内有活力的氢的氧化系统对放氢有深刻的影响。整个试验包含29个Hup⁺菌株, 它们代表几个不同的种, 氢的平均损失量是固氮酶电子流的3.8%。这可与用Hup⁻菌株接种的一系列试验作比较, 上面叙述过的根瘤中氢的平均损失是32%。

在用Hup⁺和Hup⁻菌株进行试验时必须记住, 有些Hup⁺菌株的氢酶活性不足以再利用释放出来的全部氢 (Evans等, 1981)。例如, Ruiz-Argüeso等 (1978) 列举了两株豌豆根瘤菌的氢酶活性, 它们形成的根瘤是通过放氢平均损失固氮酶电子流的21%。

氢的有效再循环的根瘤菌菌株, 不仅在温室控制的试验中降低了氢的损失, 而且在大田条件下也显著地减少了损失 (Hanus等, 1981)。

将大豆栽培在很少有大豆根瘤菌的土壤里, 列举在表1中的用4株Hup⁺野生型组或者4株Hup⁻野生型组作接种处理的资料表明, 用Hup⁺接种的植物根瘤放氢的平均速率仅占固氮酶电子流的4%, 而用4个Hup⁻菌株接种的大豆, 相应的平均放氢是26%。

从每单位大豆根瘤菌122DES类菌体干重所具有的需固氮酶放氢的最大速率, 以及在相同条件下氢的氧化最大速率的测定中, Ruiz-Argüeso (1979a) 曾经作出此菌株类菌体的氢氧化能力比放氢能力大10倍的结论。

根瘤菌菌株的氢氧化能力明显的占优势, 这在前面讲过的在不利的条件下可能使固氮酶的电子趋向供给质子, 从而导致放氢速率增加, 而过量的氢氧化能力对这部分氢的再利用可能是有好处的。

表1 大田试验条件下大豆根瘤菌菌株对大豆根瘤菌类菌体氢酶活性和根瘤放氢的影响¹

(Hanus等人资料, 1981)

大豆根瘤菌的菌株	表型	类菌体吸氢 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白·小时)	通过放氢损失的 固氮酶电子流 ² (%)
143	Hup ⁺	5.23	3
6	Hup ⁺	5.23	2
122	Hup ⁺	2.49	5
110	Hup ⁺	2.14	6
117	Hup ⁻	<0.05	21
135	Hup ⁻	<0.05	32
120	Hup ⁻	<0.05	31
16	Hup ⁻	<0.05	20

1. 试验随机取样重复4次, 1977年在俄勒冈州Carvallis进行。

2. 根据放氢速率(当量数)占总电子流(当量数)的百分数进行计算。总电子流用乙炔还原速率测定。

三、氢的氧化作用及其意义

氧化途径

诸如根瘤菌的类菌体以及固氮菌一类的好氧固氮生物中, 氢的氧化作用是由分布在细胞膜上的一系列酶催化的。这种酶复合体和颗粒由于对氧的亲合力很高, 人们称之为“吸氢酶”。这可用氢和氧亲合力分别为50和10, 2毫微克分子来阐明。大豆根瘤菌类菌体的氢酶系统可达到它最大反应速度的一半 (Emerich等, 1980b)。

确定豌豆根瘤菌类菌体和大豆根瘤菌类菌体中氧化氢反应的化学计算都表明, 一克分子氢被 $\frac{1}{2}$ 克分子的氧所氧化而产生水 (Dixon, 1968; McCrae等, 1978)。对完整的大豆根瘤菌类菌体的特殊复合物的研究揭示, 氢的氧化作用被一些能中断呼吸链的化合物例如氰化钾、叠氮钠、巯基氰化物、氯苯胺以及其他一些氧化磷酸化作用的抑制剂强烈地抑制 (Emerich等, 1980b)。与此相反, 当氢酶本身被去垢剂溶解, 并与电子传递途径的其他组份分开以后, 此酶便不再对氰化钾和叠氮钠敏感, 不能与氧起反应, 但是能与如亚甲蓝、二氮葱甲硫酸等正氧还电位的非生理受体起反应。Arp等 (1979) 和Ruiz-Argüeso等 (1979a) 从大豆根瘤菌110菌株类菌体中纯化出对氧不稳定的氢酶, 并指出此酶是一种分子量为63300的铁硫蛋白。

与其他纯化的氢酶一样, 大豆根瘤菌的这种酶是可逆的, 当分析系统的pH调节至适当程度, 并加入还原型的低电位资料时, 逆向反应速率是正向反应速率的0.5%至0.2% (Ruiz-Argüeso等, 1979a)。

认为氢酶本身分布在膜间质内的看法是受到支持的, 在某种意义上, 这允许氢酶向呼吸链一系列电子传递载体传递电子, 然后再交给氧。但是直到现在, 这种概念仍然是建立在间接证据的基础上。

最近Eisbrenner等 (1981) 检查了Hup⁺大豆根瘤菌122DES的氢氧化途径, 发现氢的氧化受能拮抗叶绿体质体醌 (Böme等, 1971) 和有拮抗大肠杆菌泛醌的作用的 (Poole和Haddock, 1975) 二溴百里香醌 (DBMIB) 抑制。Eisbrenner等 (1979) 指出DBMIB抑制蓝藻需氧吸氢以及需光吸氢。在大豆根瘤菌类菌体中, DBMIB抑制氢的氧化, 这意味着泛醌可

能参与从氢至氧的电子传递(Bothe等, 1977; Eisbrenner等, 1978, 1981)。Daniel(1979)已确立了泛醌在大豆根瘤菌呼吸作用中的功能。Eisbrenner等(1981)也用不同的分光光度计以及动力学分析方法证明, b⁻型和c型的细胞色素被氢气还原。Appleby(1969)表明在大豆根瘤菌类菌体呼吸电子传递链中存在b型和c型的细胞色素。

列在图1中的图解表明, 电子传给一个有可能是泛醌, 然后传递到细胞色素b(550)的未知受体。细胞色素C的末端电子受体也是未知的, 但有可能是细胞色素O, 这在大豆根瘤菌类菌体中已被鉴定可能在这个部位起作用(Appleby, 1969; Hickok, 1981)。

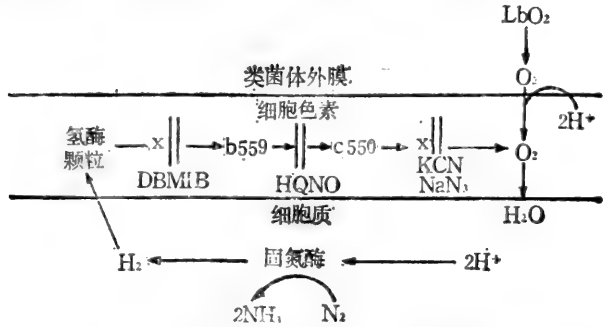


图1 大豆根瘤菌类菌体膜内电子流途径示意图

电子流从氢气经过氢酶颗粒传递至氧。关于质子传递机制、它的分布以及可能存在的电子分路传递途径在此示意图中未作考虑。二溴百里香酮(DBMIB)、庚基羟基喹啉氧化物(HQNO)、氰化钾或叠氮钠的抑制点如图 所示。图解根据Eisbrenner和Evans(1981)以及Emerich等(1980)的试验。Emerich等(1980a)表明, 氧化的豆血红蛋白(LbO₂)供氧以支持氢酶反应。

氢氧化作用的生理效益

Dixon(1972)首先提出, 固氮生物有功能的氢氧化系统能产生生理效益。按照他的观点氢酶可以(1)去除固氮酶周围的氧减少氧伤害的可能性;(2)阻止H₂对固氮酶的抑制作用。已知氢是固氮酶的抑制剂, 是固氮反应的一种产物;(3)通过氢支持的氧化磷酸化, 提供由于在固氮反应中所消耗的部分能量。在最近的评论中, Evans等(1981)总结了现已积累起来的确实的证据, 表明几种不同生物的氢氧化能力都产生生理效益, 这对增加体内的固氮作用具有潜力。已经证明, 豌豆根瘤菌类菌体(Dixon, 1968)、棕色固氮菌(Hyndman等, 1953)和鱼腥藻7120(Peterson和Burriss, 1978)中, 氢可以支持ATP的合成。此外Emerich等(1979)曾经指出, 氢的氧化增加大豆根瘤菌122DES类菌体中稳定态ATP的水平。在柱孢鱼腥藻(Eisbrenner等, 1978), 好氧圆褐固氮菌(Walker等, 1978)以及大豆根瘤菌类菌体(Emerich等, 1979)中已观察到, 氢对乙炔的还原速率以及对保护固氮酶免受伤害, 有令人瞩目的影响(图2)。至于设想氢酶通过氢氧反应除去氢以阻止固氮酶受抑制, 尚无令人信服的证据。也没有资料表明在非光合固氮生物中, 氢通过黄素氧还蛋白或铁氧还蛋白向固氮反应提供电子。然而, Eisbrenner和Bothe(1978, 1979)等指出, 在柱孢鱼腥藻的离体异形胞中, 需光反应中电子通过叶绿体质体醌和光合系统I(包括铁氧还蛋白)从氢传递给固氮酶。氢和需光的辅酶II还原作用也已在念珠藻的离体异形胞中为Eisbrenner(1981)所证实。

Dixon(1965)和Emerich等(1980b)分别用豌豆根瘤菌和大豆根瘤菌的类菌体进行的试验证明, 氢的氧化作用伴随着二氧化碳的释放显著下降, 这是由于碳基质氧化速率下降所致。Layzell(1979)等介绍的资料支持了氢的氧化与碳水化合物的贮存有关的结论。

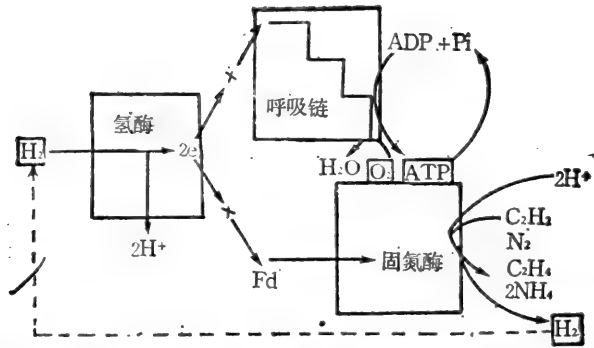


图2 好氧非光合作用的固氮生物中吸氢、呼吸链和固氮酶之间相互关系的示意图

至今尚待试验证明，非光合作用电子传递途径的生物内氢酶系统通过铁氧还蛋白(Fd)提供电子支持固氮酶的活动。

(据Bothe、Distler和Eisbrenner 1978资料修改)

Layzell (1979) 观察到，用Hup⁺根瘤菌接种的豇豆植株每固定1毫克氮便以二氧化碳形式释放1.5毫克碳，而在对比测定中用Hup⁻菌株接种的羽扇豆，每固定1毫克氮以二氧化碳形式呼吸掉3.64毫克碳。Rainbird等(1981)也比较了Hup⁺与Hup⁻豇豆根瘤菌菌株，将它们作豇豆的接种剂，结果用Hup⁺菌株接种的植物根中二氧化碳释放的速率降低，干重的积累增加。固氮生物中氢再循环的生理效益证据是属实的。

Hanus (1979) 和Lepo (1980) 等最近发现，大豆根瘤菌Hup⁺菌株不仅具有氧化类菌体固氮酶反应所形成的氢的能力，而且能在自生条件下利用氢作为唯一的能源，和二氧化碳为碳源进行生长。这对于根瘤菌氢的氧化系统潜在的代谢意义提供了直接的证据。

四、氢的再循环对产量的影响

从理论分析得出的预期效果

在概括直接测定氢再循环对豆科植物产量的影响之前，看来值得介绍一下有助于估算固氮中形成的氢的氧化作用对豆科植物产生效益大小的理论基础。我们探讨此问题时，假定豆科植物的固氮作用受能量供给的限制，固氮作用限制生长(Hardy和Havelka, 1975; Phillips, 1980)。

看来很清楚，当植物产生足够的光合产物以支持固氮和其他生理过程时，固氮作用中产生的氢的氧化所回收的能量可能是没有意义的。如上所述，固氮的豆科植物可能从氢再循环中得到好处而与能量保存没有直接关系，但是还不能用明显的方法定量地对此作出估价。

我们确定氢的氧化对能量保存效益的理论基础，是以Evans等(1980b)的下述估计为根据的。整个固氮反应中(反应式1)每固定1克分子氮需要28克分子ATP。这包括，固氮酶的氮还原和放氢所需要的16克分子ATP(每转移一对电子需4克分子ATP)，氮还原所需要的3对电子共9当量ATP，还原两个质子产生氢需要的一对电子和3当量ATP。

根据Dixon (1978) 以及Bouger (1979) 用氢细菌为材料的研究，我们假定在氢的氧化过程中磷与氧的合理比例为2。因此，氧化一克分子氢所产生的ATP应占固氮酶每转移8个电子消耗ATP总数的2/28或回收7.1%。在一系列实验中，用已知的Hup⁻接种剂接种的豆科

植物，氢平均损失为固氮酶电子流的32%，这等于固氮酶每转移8个电子就有2.56个电子损失掉，或释放出1.28克分子氢。

正如Evans (1981)所指出的，氧化1.28克分子氢应产生2.56克分子ATP。假定能量限制着固氮和生长，在40多天生长期中，计算可得到7.1%效益的综合效果，这还可以指望能增加到20%以上 (Evans等, 1981)。当然，植物生长的速率以及生长期的长短也是影响预期增加幅度的因素。

考虑放氢在能量保存方面的理论效益时，Gibson (引自Dilworth, 1980)推论，大豆和三叶草根瘤每天损失的氢 (以葡萄糖当量表示) 分别为每天供给的光合产物 (以葡萄糖当量表示) 的0.43%和1.5%。因此认为这种损失是无所谓的。

在这些计算中，他假定经过固氮酶每损失1克分子氢需要3克分子ATP，而我们在分析中论断，每损失1克分子氢应需花费7克分子ATP (Evans等, 1981)。更有，Gibson的理论认为，所有形成的光合产物全部都用来支持固氮。我们不同意这种看法，因为光合产物还需要分头去维持叶、根、茎以及植物其他部分的代谢过程。结果只有一部分光合产物用来支持根瘤的代谢。

例如，Minchin和Pate (1973)报道，在豌豆植株中，根瘤的生长和呼吸代谢消耗光合产物的17%。按照我们的意见，每天的氢损失 (以葡萄糖当量表示) 在逻辑上只可以用部分光合产物支持根瘤代谢。还有，Dilworth (1980)在讨论Gibson的结果时，没有考虑到氢的再循环对生长过程中的综合影响。因此我们相信，Gibson的理论大大地低估了根瘤中氢再循环的潜在意义。

野生型菌株的比较

在我们关于豆科植物氢再循环的早期工作中，我们比较了大田大豆根瘤菌和豇豆根瘤菌Hup⁺及Hup⁻单个野生型菌株的有效性，并比较了大豆和豇豆的氮含量。在这些对比中，使用Hup⁺菌株可使大豆植株的干物质和固定的总氮量分别增加24%和31%。用豇豆作材料也获得类似的结果。从这些单个菌株的比较中，我们对结论作了如下的叙述 (Schubert等, 1978)：

“对于能利用固氮酶所释放氢的结瘤的豆科植物，我们认为，固氮效率明显提高；并推论，当以豆科植物固氮效率中氢再循环的作用作为论据的时候，应该对一些特定的根瘤菌菌株进行比较，除了考虑氢酶的存在与否以外，还应看到它们在遗传学上是相似的。”

为了提高比较试验的可靠性，我们在试验中选用4组或5组大豆根瘤菌Hup⁻野生型菌株接种大豆，并与大豆根瘤菌Hup⁺野生型菌株组进行固氮效率的比较，以Carter等 (1978)的试验作为基础。我们假定，除氢酶外，这些Hup⁺和Hup⁻菌株之间在遗传变异上是随机的。有对比地对两个接种组的氢再循环价值进行试验。在温室试验中，用Hup⁺菌株组接种的大豆，其平均产量和氮含量分别为16%和26%，比用Hup⁻菌株接种的大豆相应的数值要高。

另外，在含氮量较高的俄勒冈州土地上进行4组大田试验，受试的Hup⁺菌株田块获得的大豆种子，其平均氮含量比用Hup⁻菌株接种的高8.4%。在这些大田试验中，大豆产量的差异并不明显。

尽管这些结果表明氢的再循环对固氮过程有好处，但必须考虑到另一种可能性，即我们假定，在Hup⁺和Hup⁻菌株间随机产生的遗传变异 (除氢酶以外) 是不可避免的。

最近，Gibson等 (1981)报道，无论大豆根瘤菌或豇豆根瘤菌，Hup⁺特征对其豆科宿主

的生长和固氮都无明显的影响。而且，他推论其相对效率数值与三叶草、豌豆和羽扇豆的氮含量没有正相关性。然而，他所介绍的资料表明，所有这三个种通过放氢形式损失的电子占固氮酶电子流25%。

这说明在这些豆科植物根瘤中缺少有效的氢再循环系统。从这个证据以及从改变了遗传背景的菌株比较中，我们认为，在作出明确的结论之前，必须用可回复的 Hup⁻突变株与回复子作接种剂进行补充试验。

Hup⁻突变株与Hup⁺亲本菌株作豆科植物接种剂的比较

Maier 等(1978) 在我们实验室中从大豆根瘤菌122DES菌株的抗生素抗性衍生菌分离了一些Hup⁻突变株，他们采用了下列操作步骤达到富集Hup⁻突变株的目的。在有氧情况下，对含还原性二氮蒽甲硫酸的悬浮液进行震荡，其中Hup⁺细胞被产生的过氧化氢或假设的游离基杀死，因而悬浮液中Hup⁻细胞遂富集起来。

Maier 等(1978)曾对Hup⁻突变株SR₁、SR₂和SR₃的一些性质进行了描述。Albrecht (1979) 在温室试验中，把这些突变株与它们的亲本株 SR 分别作大豆的接种剂进行比较，结果表明，Hup⁺亲本菌株的固氮效率比突变株的高。但是这些突变株不能恢复Hup⁺亲本的表型，因此不能把它们当作点突变。大豆根瘤菌Hup⁺菌株以矿质化能进行营养生长的发现，为筛选大豆根瘤菌的氢酶提供了一种新方法，它使我们能从Hup⁺亲本株 SR 中分离可回复的Hup⁻突变株。

这些突变株恢复成Hup⁺亲本表型时，其频率与点突变所预期的频率相符。最近，Maier (1981) 也已利用和矿质化能作营养的类似操作步骤筛选可回复的大豆根瘤菌Hup⁻突变株。

Lepo 等(1981) 采用从大豆根瘤菌 SR亲本株分离可回复的Hup⁻突变株 (Str^r、Kan^r、Hup⁺) 的步骤概括如下：(1) 用亚硝酸作诱变处理；(2) 在矿化能营养培养基上培养处理过的细胞；(3) 用青霉素和溶菌酶杀死 Hup⁺ 细胞；(4) 用含有低浓度的碳基质的吸氢培养基的平皿培养存活株；(5) 在以下两种培养基的平皿上影印 (a) 矿化能营养培养基，(b) 在矿化能营养培养基中加入一种有机碳基质；(6) 丢弃那些能在矿化能营养培养基上生长的菌落；(7) 选择那些只有当有机碳基质存在时才能生长的菌落，并检查每一个分离物的链霉素和卡那霉素抗性和去阻遏条件下吸氢的能力以及使大豆植株结瘤的能力。

这种程序也使我们得到一组Hup⁻突变株，其中有三株(称为PJ 17; PJ 18和PJ 20) 已作了相当详细的鉴定(表2)。此外，Hickok (1981) 测定了亲本株SR和Hup⁻突变株PJ18形成的大豆根瘤菌类菌体的细胞色素成分，它们在联二亚硫酸钠存在与否的还原态和氧化态下，在差异光谱上没有发现可检测的差异，在一氧化碳存在或缺乏时也没有发现还原的细胞色素在差异光谱上有可检测的差异。PJ18类菌体悬浮液的细胞色素与Hup⁺类菌体悬浮液在不同波长下(从500至600毫微米)很难区别开来(图3)。

我们断定，Hup⁺亲本株SR、Hup⁻突变株PJ 17和PJ 18，以及它们的Hup⁺回复株PJ 17-1和PJ 18-1都适合于作大豆接种剂使用，以便严格地估计氢再循环对大豆固氮过程的效益。目前这些菌株已用于这种目的。

表2 大豆根瘤菌Hup⁻突变株与Hup⁺亲本株的比较

(引自Lepo等,1981)

特 征	Hup ⁺ 亲本株		Hup ⁻ 突变株	
	SR	PJ 17	PJ 18	PJ 20
去阻遏细胞的需氧吸氢 ¹	74.5	<0.5	<0.5	<0.5
去阻遏细胞的需美蓝吸氢 ¹	97.2	<0.5	<0.5	<0.5
去阻遏细胞的需二氮莰甲硫酸吸氢 ¹	82.7	<0.5	<0.5	<0.5
去阻遏细胞的RuBP羧化酶的活性 ²	14.2	1.7	<0.5	1.6
与大豆共生时的总固氮量 ³	88.5	70.8	58.6	ND
根瘤菌类菌体的需氧吸氢 ³	43.3	<0.5	<0.5	ND
在低碳培养基上的世代时间(小时)	7.8	8.0	7.0	10.0
Hup ⁺ 表型的回复频率		1×10 ⁻⁹	1.3×10 ⁻⁹	9×10 ⁻¹⁰
化能自养生长的能力	+	-	-	-
大豆结瘤能力	+	+	+	ND
对卡那霉素和链霉素的抗性	+	+	+	+

1. 单位,毫微克分子/分钟·毫克蛋白质。

2. RuBP羧化酶活性用 毫微克分子CO₂固定/分钟·毫克蛋白质 表示。

3. 在Leonard盆栽试验中,平均每一植株固定的毫克氮。

五、大豆根瘤菌Hup⁺和Hup⁻菌株的质粒概况

有迹象表明诺卡氏菌菌种和豌豆根瘤菌的氢酶遗传信息编码在质粒上(Schlegel, 1976; Brewin 等, 1980)。因而 Cantrell 等 (1981) 开始研究, 确定大豆根瘤菌 Hup⁺和 Hup⁻质粒的概况。最初用改进的 Carrier 和 Noester (1976) 以及 Meyers (1976) 的方法进行质粒的分离和电泳。测定了 6 个具有高氢酶活性的 Hup⁺野生型菌株 (USDA 122 DES、3I 1b 143、USDA 136、3I1b 142、3I1b 110和 3I 1b 6), 但未测出质粒。

WA 5099-1-1 Hup⁺菌株有微弱的吸氢能力, 它显示具有分子量为 94、135 和 160 × 10⁷ 道尔顿的质粒。在 Hup⁻菌株 USDA 117、USDA 3、3I 1b 144、USDA 135 和 USDA 31 中鉴定出分子量范围在 59—180 × 10⁷ 道尔顿的质粒, 但是在 Hup⁻菌株 USDA 16 和 USDA 38 中未检查出质粒。

尽管 Maier 等 (1978) 的不可回复的 Hup⁻突变株是来自检查不出质粒的 Hup⁺亲本株 SR, 但是这些突变株 (SR₁、SR₂和 SR₃) 都显示具有分子量范围在 107 到 280 × 10⁷ 道尔顿的质粒。另一方面, 可回复的 Hup⁻突变株 (PJ 17、PJ 18 和 PJ 20) 与其亲本株一样用这些方法测不出质粒。从已进行的试验可见, 至今大多数 Hup⁻菌株含有可辨别的质粒, 而在 7 株 Hup⁺菌株中除了一株以外其余的都没有可检测的质粒, 因而必然要考虑到这样一种可能性, 即 Hup⁺和 Hup⁻菌株都含有极其大的质粒 (分子量大于 300 × 10⁷ 道尔顿), 现已采用的各种

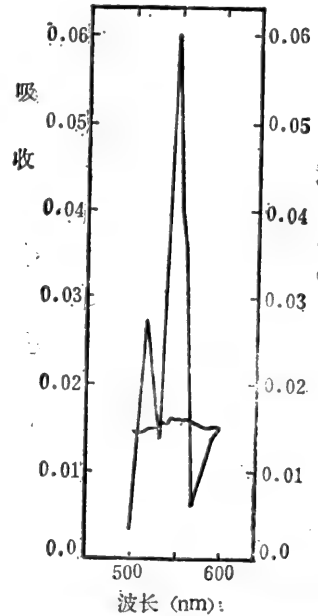


图3 大豆根瘤菌类菌体悬浮液的氧化对内源呼吸还原的差异光谱, 该类菌体由PJ18菌株形成。

方法尚不能分辨这样大的完整的质粒。如果情况是这样，那么这种假定应当是合理的，即在产生和分离Hup⁻不可回复的突变株SR₁、SR₂和SR₃的操作过程中，它们的质粒是从一个很大的质粒衍生来的。这方面的进一步研究正在进行之中。

原载 "Israel J. Botany" 1:1—9, 1982

吴永强译 陈 因校

细菌与热带禾本科植物根

联合固氮作用的评价

P. Van Berkum B. B. Bohloul

导 言

地球上的生命依赖于氮，氮在大气、海洋和岩石中含量很丰富，但是，它们并不总是以对动、植物有意义的状态存在的。植物能同化无机氮化合物，并把它们运输到细胞组分中去。动物是借植物最先合成的蛋白质作为氮物质的主要来源，植物所利用的无机氮又通过死亡有机体的分解和微生物作用的最终产物——铵盐及硝酸盐而回到环境中去。氮以这种方式在化学环境和生物圈间循环，但在这个过程中，氮又通过反硝化作用、渗漏和作物的收获而失去，尤其是在农业生产的条件下，取走的氮量通常比获得的多。由于氮对植物的可利用性限制了农业生产，所以，必须保持土壤肥力。生物固氮作用和施用氮肥能把氮归还给土壤。

用Haber-Bosch过程生产氮肥，即成本高又耗能大。在1976和1977年间，发展中国家生产的氮肥占世界氮肥的21%，而消耗则占31%，但是，在这些国家中，可用于生产氨的原料与农业发展需求间的不平衡依然存在。应用天然气的氨厂成本高，这对发展中的国家是额外的财政负担。

在发达国家中，氮肥生产费用的升高，也引起了人们的关注。在欧洲和美国，不经济的氮肥生产使许多工厂倒闭。估计在1983年，美国将进口他们所需总氮量的25%。如果不用氮肥，那么食品生产将会大大地减少。在发展中国家，由于不常使用氮肥，所以，作物产量一直很低。

如果生物固氮作用能够哪怕是部分代替种植禾本科植物所需用的氮肥，那么，对发达和发展中的国家都是有利的。这样，即使不施用高效氮肥，食品的生产 and 部分能量的节约也将是可能的。禾本科植物联合固氮作用并非新的概念，本世纪初，人们就对这个过程感兴趣，最近已经报道，牧草和禾本科谷物的联合固氮作用具有很大的潜力。本综述的目的，是要对禾本科植物联合固氮的文献予以评价，并指出尚待深入研究的领域。

氮素平衡的研究：测定禾本科联合固氮可能性的目的

在植物—土壤体系中，结合氮水平的提高是来自于氮肥的使用、从空气中固定氮、光化学固氮和植物与微生物的共生固氮等。解释在土壤中已积累氮素的数据是困难的。然而，可以断定，非共生固氮作用在农业上的意义是大的。

在英国洛桑试验站进行的长期氮素平衡的研究，为非共生固氮积累氮素，提供了令人信服的证据。在Broadbalk进行的小麦试验中，栽培小麦所需的部分氮量，是由生物固氮作用供给的。1883年，部分连续的小麦试验被隔开，并让自然植被生长。在这块荒芜区内氮增加

了。估计每年生物固氮作用的贡献为34公斤氮/公顷。已经报道，植物根际的固氮酶活性一般都处于相同位置。用原状土柱的乙炔还原测定估测的固氮量与氮量积累的数据一致。Day等报道了豆科植物和蓝藻在这个位置的固氮作用是微不足道的，对氮素的积累也是无意义的。

在热带对森林和休闲地的氮平衡研究也证明了通过非共生固氮作用而累积氮。经测定，休闲地生长的植被每年每公顷积累氮素在得到165公斤之间。这些禾本科根际的固氮作用已作为休闲地所得到的实际氮增益的机理来解释。在许多热带地区，甘蔗在不施氮肥情况下已经种植了几世纪，这说明了这种作物具有联合固氮作用。

盐沼地是世界上最有生产潜力的生态系统之一，尽管如此，它们的氮的收入也不足以维持生产。

盐沼地和水稻土类似，因为作物常种植在水生系统中。在远东，水稻不施氮肥，已经种植了几世纪。菲律宾国际水稻研究所进行的长期氮素平衡研究指出，不施氮肥，水稻的产量仍然保持稳定。蓝藻和光合细菌对稻田节约氮是重要的，已经测定了与水稻根联合的固氮酶活性。

因此，探索在新开拓条件下和（或）在积累氮素的土壤中生长的禾本科植物的固氮作用是合宜的。

测定禾本科植物固氮作用的有关方法和问题

目前，对测定禾本科植物固氮作用的方法的局限性还没有充分认识到。因此，对测定与禾本科植物联合的固氮作用效率的报道必需给予严格的评论。要认识到科学研究的关键是方法学。要真实地解释数据和明智地、合理地提出假说。

应用 $^{15}\text{N}_2$ 掺入法直接测定田间生长的禾本科植物的固氮作用，只有少数报道。几乎所有的文献都是用间接的乙炔还原程序测定固氮酶活性的。在许多情况下，这些数据受到批评是由于在自然环境中取的待测组织和测定固氮作用之间出现滞后期。这涉及所有测定固氮方法的可靠性，因此，从生态系统中取样后，必须立即测定其固氮作用。用未损坏的整体植株测定也是必要的。

除大气的氮外，固氮酶还能还原多种底物，尤其是把乙炔还原成乙烯，已广泛地作为测定固氮酶的间接方法。已经采用原位法、田间取土柱法、温室生长的植物和离体根等方法来推测禾本科植物的乙炔还原作用。在用原位法时，通常是在测定室中有根系周围的土壤或者用整个原状土柱和花盆来测定的。

原位测定是将金属圆筒置于田间一处或多处生长的植株周围，小心地把圆筒插入20—50 cm深的土壤中。测定时或者是把植物的叶子罩住，或者是用盖子和填充物把伸出的茎封住。乙炔可以在装置内用 CaC_2 和水来发生。由于圆筒的底部不是密封的，气体可能漏出。从测定室中漏失的气体可用丙烷或者丙烯作内标来监测，或者观测乙炔的浓度。用乙炔还原作用的公式计算时，应计算气体的损失。

曾报道，水生植物的原位测定不用根周围含乙炔的金属圆筒。其测定方法是，利用这些植物能通过导管把空气传递到根系的这一特点。把植物的叶子和根茎密封在一个合适的容器内（干净的塑料圆筒或袋子），该容器的顶部密封，取样口和底部的末端浸于水位以下用水密封。这样，注入的乙炔迅速地进入植物体内，产生的乙烯可在测定室内监测，也可以取低

于水面下的茎测定。

取田间原位土柱或者盆栽的或者在含有冲积物或人工土壤的盆钵或容器中的温室生长植物测定时，要把整个样本密封在一个合适的密闭容器中，然后注入乙炔。测定时将剪下植物的叶子密封住，或者叶子从密闭的测定室中伸出。

原位和整株测定乙炔还原作用时，还存在几个较大的问题。原状土柱测定法是不方便的，各种测定法特别是把土壤放在温育瓶测定时其结果都不相同。在从测定的乙炔还原作用推断固氮作用时，充分认识到这些方法的局限性是重要的，因为从巴西田间取回的禾本科原状土柱，不能立刻还原乙炔，所以，Abrantes 等建议，从田间采集样品后，应该在测定之前平衡 1 到 3 天。其他工作者也都同意这种提法。最近，Van Berkum 和 Day 提出，如果在测定禾本科植物原状土柱的固氮酶活性之间，先在水中淹几天，那么，原位测定出的固氮作用的误差将会较大。*Paspalum notatum* 的原状土柱采后一周，乙炔还原率增加一倍的结果支持了这个观点。

设计原位法和整体法时，要把植物和土壤暴露于乙炔中。这样，土壤对乙炔还原作用测定时，可能产生的干扰必须给以重视。众所周知，土壤微生物在厌氧条件下产生乙烯，随后，乙烯又被其它土壤微生物氧化，其速率是乙烯产生速率的 50 倍以上。从而，阻止了乙烯在大部分土壤中的积累。然而又有报道，乙烯的氧化作用受乙炔的抑制。因此，原状土柱温育时不用乙炔作对照来监测内部乙烯产生是没有价值的。乙烯产生和固氮作用的要求是相同的，所以，期望二者都能在根际发生。用 $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$ 测定表明，在估计固氮作用时出现的较大的误差，可能是由于把所得的乙烯解释为乙炔还原的结果。

测定原状土柱的固氮酶活性所受的干扰，也可能是乙炔掺入土壤中很少而引起的。曾有报道，乙炔能通过土壤从固氮酶活性部位向取样口缓慢扩散。乙炔和乙烯能通过极湿的土壤剖面扩散表明，要使整个样本饱和必须用乙炔长时间的温育。然而，乙炔是固氮作用的竞争性抑制剂，它阻止了氮合成氨，这也是不利的。曾经指明，在固氮系统中，氮消耗完后，能进一步诱导固氮酶产生。David 和 Fay 断定，尽管长时间用乙炔温育固氮系统的生化影响是复杂的，但其结果是，乙炔还原速率明显地提高了。这样，可能会过高地估计田间的固氮作用，同时也说明，短时间测定和在比较测定中试验条件标准化是必需的。

一些工作者试图修改整体测定法，以消除气体通过土壤扩散所引起的问题。乙炔和乙烯通过装有不同类型的土壤钢筒试验的结果表明，扩散速率首先取决于土壤结构。粗沙土抵御气体扩散的能力较小，在这种土类种植的禾本科植物中，乙炔还原作用的线性速率可能性也已得到了证实。Hirota 等把整株植物放在一个干燥器内，剧烈地抽真空，再用氮和乙炔的混合气体代替空气，从而克服了气体通过土壤扩散时的阻碍。应用这种技术，他们能立即测定乙炔还原作用。

另一种方法是去掉土壤。当盐沼地的整株禾本科和水稻从有机沉积物中取出而其根不暴露空气时，便出现了乙炔还原直接的线性速率。然而，植物的组织对这些气体的扩散具有抗御性。在放置水生禾本科叶子的容器中，乙炔和乙烯的浓度随时间发生变化的曲线表明，在固氮酶活性能测出之前，气体已扩散到植物的组织中。在大豆和细菌的纯培养物中已经证实，在乙炔的线性速率能测出之前，这些气体在取样部分和固氮位置间得到平衡是必需的。因此，如果研究的目的是计算乙炔还原速率，那么我们建议，要根据短时间变化的结果来确定线性是否能测出。

与测定原状土柱的固氮酶活性相关的问题是如何确定固氮作用的位置。几乎所有的禾本

科植物根系联合固氮的证据都是根据用冲洗过的预温育离体根和土壤的乙炔还原速率比较而得的。原状土柱和从中取出的禾本科植物预温育过的离体根的乙炔还原速率之间的相关性已初步确定了。

关于离体根测定法极待弄清的问题是,在乙炔还原开始之前的最初8—18小时内的情况。离体根有固氮酶活性之前的延迟现象,是与其它所有的固氮系统的乙炔还原作用的动态不同。在这个时期,活性持续的时间随植物的基因型、季节和氮肥的处理而异,这样则使问题更为复杂化了。因为很难解释为什么在一个长延迟期后才测定出乙炔还原作用,所以,离体根测定法已作了修改。根在不加乙炔、低氧分压下温育过夜(预温育期),限制了乙炔还原的直接测定。离体根的预温育已被作为制备测定禾本科固氮样品的常规方法。应用这种固定时间方法测定离体根样品间极大不同,这可以用在重复和(或)处理之间出现固氮酶活性之前,这一段时间差异很大来解释。

Döbereiner等推测,在测定出乙炔还原作用之前出现的长时间延迟,可能是从植物上切下根时,氧气进入致使固氮酶失活的缘故。然而,这种假说与几个已报道的结果不一致。*P. notata*的根切下并在氮中制备的测定固氮酶活性,在最初12小时内不能还原乙炔。然而,高粱根在预温育期后暴露在空气中,在12小时内就能还原乙炔,这也给某些禾本科离体根和整个根系能够在空气中还原乙炔提供了依据。进入的 O_2 对莎草科(*Scirpus*)属根系的固氮酶活性的瞬时影响已经与大豆中出现的类似的结果作了比较。

曾指出,预温育期过夜后的离体根测定法说明了禾本科植物固氮速率的潜力。然而,还没有证据说明,预温育一昼夜的离体根是能够反映出田间植物固氮潜力的固氮酶速率所必需时间的。另一方面,也有人提出,禾本科植物固氮速率的潜力是不能用离体根预温育时间来体现的。预温育较长时间后切下的高粱根比正常过夜预温育样品的乙炔还原速率高。因此,禾本科植物离体根的一昼夜预温育期和测定的乙炔还原作用不是植物潜在的乙炔还原速率。

离体根法和原状土柱法的乙炔还原作用相比较表明,固氮作用的估测值在这两种方法之间差异较大(表1)。用离体根法测定的固氮作用结果估值偏高,而禾本科原状土柱测定和用从这些样品中的离体根测定的乙炔还原速率结果不符。离体根测定法因在温育期间固氮细菌大量增殖,致使过高的估计禾本科的固氮作用(表2)。因此,测定应在避免微生物增殖的情况下进行。

Abrantes等表明,把根切下后立即浸泡在蒸馏水中,能测定出比较高的乙炔还原速率。他们推测,这种处理防止了因氧气进入而使固氮酶完全失活。然而,他们又报道了,在这种方法处理的根的固氮酶活性开始之前,有8—18小时的延迟。因此,他们关于冲洗和酶保护之间相互关系的假说与有活性固氮酶具有快速的和线性的乙炔还原速率的报道不一致。

在预温育期间,高粱根固氮细菌的增殖,能够通过不洗涤样品或者在低温下(4℃)温育来防止。然而,这些处理也阻碍了在预温育期间固氮酶活性的产生。实际上,乙炔还原速率是与苗在洗涤瓶中的洗涤水有关,并且,在离体根预温育期后,观察到在这一部分固氮菌的数量大大增加了。在玉米离体根的预温育期间,固氮细菌厌氧代谢产生的有机酸维持它们旺盛的生长。而未经洗涤的根则不生长。固氮细菌在预温育期间的增殖是因洗涤步骤所致。因此可以断定,在洗涤过程中根样品上的水能造成厌氧代谢和产生有机酸。这些物质释放到水中供微生物增殖。当结合氮消耗到解阻遏时,就诱导出固氮酶活性。在预温育期后的离体根的乙炔还原作用不能反映出禾本科固定大气中的氮的能力。

已经报道了几种禾本科植物离体根的快速乙炔还原作用。在低氧分压下测定时,预温育

表1 预温育离体根与整株禾本科植物原状土柱固氮作用测定的比较

土柱号	固 氮 速 率	
	土柱测定	预温育根测定
2 ^a	271.0 ^b	205.0 ^b
10 ^c	275.0 ^b	67.0 ^d
12 ^e	14.5 ^d	74.5 ^d
23 ^f	1.6 ^g	68.0 ^g
31 ^h	2.6 ^d	154.0 ^g
33 ⁱ	200.0 ^b	2100.0 ^b
24 ^j	27.0 ^g	337.0 ^g

- a. *P. notatum* 原状土柱是从巴西运到英国, 测定前在温室生长1—4星期。
 b. 单位: nmol C₂H₄/原状土柱·小时。
 c. *D. decumbens* Transvala品种的原状土柱在巴西取样后1—3天测定。
 d. 单位: nmol C₂H₄/克根干重·小时。
 e. 夏威夷的*C. dactylon*, *D. decumbens*, *Paspalum orbiculare*和*Chloris truncata*的整株测定。
 f. 用*Azospirillum*接种玉米(温室生长植物), 美国。
 g. 单位: 克(N₂)/公顷·天。
 h. 在美国用下列温室生长的植物品种同*Azospirillum*一起温育进行整株测定: *Pennisetum clandestinum*, *C. dactylon*, *zoysia japonica*, *Paspalum virgatum*, *Stenotaphrum secundatum*和*Distidrilis stricta*。
 I. 在巴西田间生长的, 生殖生长期时的玉米和高粱, 立即测定原状土柱。
 J. 在巴西田间生长的高粱, *D. decumbens*, Transvala品种, *P. notatum*和*B. mutica*. 采集原状土柱后立即测定。

表2 与禾本科植物离体根联合的固氮细菌在预温育期前后的可能最大量

植 物	开始时细菌数量	预温育期后的	
		细菌数量	细菌数量增加(倍)
玉 米 ^a	3.0×10 ⁵	1.0×10 ⁷	30
牧 草 ^a	1.3×10 ⁵ —2.5×10 ⁵	1.0×10 ⁶ —1.7×10 ⁶	8
玉 米 ^a	0.15×10 ⁴ —1.3×10 ⁴	0.19×10 ⁶ —3.2×10 ⁶	665
高 粱 ^b	0.1×10 ⁹ —8.3×10 ⁵	0.24×10 ⁷ —3.3×10 ⁷	152
<i>B. mutica</i> ^b	1.1×10 ⁴	3.5×10 ⁶	320
<i>D. decumbens</i>	0.6×10 ⁴	1.1×10 ⁶	18

- a. 用*Azospirillum*接种(温室生长植物)。
 b. 在巴西Rio de Janeiro km47田间生长的植物。

期对于诱导固氮酶活性并非必需。

在温育期间也没有发现微生物的增殖。根据这些结果提出了采集到的根在空气中测定时, 具有快速的还原乙炔的能力, 这说明固氮作用是同田间的这些根联合的。

在采样时, 如果离体根不能快速的还原乙炔, 就说明固氮作用不是同它们联合的, 因而, 要探讨禾本科植物离体根的快速乙炔还原作用, 并建议把这程序作为筛选固氮植物的方法。

禾本科植物固氮作用的新概念

已经以自然和栽培的生态系统中分离出许多不同类型的固氮细菌，这些细菌在环境中节约氮及其对高等植物可能提供的效益方面的证据，目前来说还不是很充分的。在1972年以前，固氮作用和它在不同的地方节约氮的重要性通常都是以固氮细菌的多少来推测的。

Moore指出，根据固氮细菌的数量或在纯培养中测出的效能来估计固氮作用是不确切的。

在栽培土壤中，自生的固氮细菌分布很广，通常效率很低。乙炔还原或 ^{15}N 渗入到用糖或纤维处理过的土壤中的测定，表明在自然界中具有周期性的固氮潜力，并计算出氮的增益。

在禾本科植物上发现的氮素积累和细菌对根的侵染，已激起人们对监测禾本科植物联合固氮作用的兴趣。与光合产物供给豆科植物根瘤和固氮作用之间的相关的报道，以及其与土壤中非共生固氮作用是受可利用能量所限制的了解，促使人们对禾本科植物的光合作用和固氮酶活性之间的关系进行研究。

光合作用和固氮酶活性之间的关联

光合作用给植物的氮素同化提供还原剂、能量和碳骨架。豆科植物的固氮作用取决于寄主供给根瘤内细菌的光合产物的多少。然而，固氮作用的位置远离光合作用的位置，因此，二者之间的关联必须是通过光合产物的运转而建立的。

用乙炔还原测定观察到的豆科植物固氮酶活性的昼夜变化，表明了固氮作用的速率直接与光合作用有关。在豆科植物中，这种看法已在暗期后 ^{15}N 掺入的测定、 ^{14}C 标记的光合物在根瘤中的分布和 $^{14}\text{CO}_2$ 掺入到根瘤中产生的氨基酸、固氮作用的增加、通过环境中 CO_2 加富而产生的生物量等证实。

在禾本科植物中，光合产物供给根并影响了固氮作用的这种关系，已为乙炔还原昼夜变化的研究和测定固氮酶活性前延长植物在黑暗中温育时间所证明。Döbereiner等报道，*P. notatum*的固氮作用与光合作用关系是间接的，因为其固氮酶活性没有昼夜变化，但是，延长植物在黑暗中温育时间后，其乙炔还原速率下降了，相反，Döbereiner和Day报道了*P. notatum*的乙炔还原作用有明显的昼夜变化，活性高峰期是在中午和晚上。

固氮酶活性对植物光合作用的依赖性，也用试管内生长的高粱幼苗进行了研究。Döbereiner和Day指出，乙炔还原率明显的昼夜变化，进一步证实了固氮酶活性依赖于光合作用。此外，还报道了*Panicum maximum*和*Lolium perenne*的乙炔还原速率的昼夜变化。对这些数据的解释，由于在天然草地上生长的*Hyparrhenia sp.*、*Andropogon sp.*、*Louoletia simplex*和*P. maximum*的乙炔还原作用的昼夜变化而复杂化了。水稻也得出相反的数据。

对固氮酶活性产生影响的其它环境因子也引起了乙炔还原速率昼夜变化的波动。测定影响乙炔还原速率的参数对于解释光合产物的供给和固氮酶活性速率之间的相关联是必需的。这个观点是正确的，因为许多环境参数影响了禾本科植物的乙炔还原速率。在玉米中，固氮酶活性的昼夜变化，主要是受温度的影响，同时也受植物接受光能的影响。土壤温度的昼夜变化与*Sorghum vulgare*和*Brachiaria mutica*的固氮酶活性的昼夜变化之间可能有相关性。

Gibson也指出, 豆科植物的固氮作用能很快地适应温度的变化。温度对原状土柱、*Azospirillum* sp. 的纯培养物和固氮酶无细胞提取液制剂的乙炔还原效率的影响也已得到证实。显然, 测得的乙炔还原率的昼夜变化, 并不说明光合作用直接驱动禾本科植物根系的固氮作用。设计在昼夜变化中光强度, 是唯一变量的试验, 用来测定固氮酶活性是必需的。在这些条件下, 固氮酶活性速率的变化可能仅仅是由于光照强度的改变而引起的。

曾试图在禾本科植物中, 通过饲喂 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 来阐明固氮酶活性与光合作用的关系。长时间温育离体根后的乙炔还原率和总的 ^{14}C (呼吸出的 CO_2 和酒精提取物) 之间的相关性已经得到了证实。用以测定乙炔还原作用的离体根, 在35小时的温育期间可能通过微生物的增殖释放出所标记的物质。

已经报道,*S. alterniflora*是把它的净光合产物的主要部分转到植物的生殖生长。因此, 驱动细菌固氮酶活性的ATP可能是由呼吸作用和贮存碳水化合物上生长而来的。这些碳水化合物是从光合作用中获得标记。

用 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 标记的贮存碳水化合物也能说明酒精提取物中的 ^{14}C 存在。在温育期间, 离体根本身的贮存碳水化合物的呼吸作用也已经为积累 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 作出了贡献。因此, 用同位素标记来研究禾本科植物的光合作用和固氮作用之间相关性的设想是值得探讨的。光合产物为植物氮素同化提供碳骨架。因此, 应该用给植物饲喂 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 和 ^{15}N 来研究光合作用和固氮作用的关系。

C₃ 和 C₄ 植物

光合作用是植物的绿色组织利用光能同化 CO_2 和水制造碳水化合物的过程。对光合作用的生物化学研究揭示了与还原戊糖磷酸循环途径(C₃)不同, 许多禾本科植物具有C₄二羧酸循环途径。

然而, 有些植物具有C₃和C₄中间型的特征。具有C₄二羧酸光合途径的禾本科植物, 比仅具有C₃途径的禾本科植物, 在利用可利用的氮所产生干物质和固定大气中的 CO_2 方面更为有效。由此, Döbereiner指出, 在禾本科植物中, C₄二羧酸光合途径的植物对于刺激它们根际细菌的固氮作用是重要的。

这些作者声称, 除水稻外, 他们已试验过的所有植物都具有C₄二羧酸途径以作为他们假说的唯一证据。C₄二羧酸途径对热带牧草的重要性一般都被承认。这个假说如果是考虑了下述原因, 则一定是吸引人的, 即*Azospirillum*是禾本科植物中主要的固氮微生物。已经报道, 这些细菌利用苹果酸和其他有机酸为碳源。

事实上, *Azospirillum brasilense*是不能利用葡萄糖和蔗糖作为它们生长和固氮作用的唯一碳源的。

苹果酸是有些(但不是全部)C₄禾本科植物[例如玉米、马唐(*Digitaria*)]光合作用的最初产物, 由于苹果酸在植物中的积累, 过量的苹果酸运输到含有细菌的根中并用以固氮。确实有些情况表明, 苹果酸可以在玉米根中积累, 而且, 苹果酸的氧化不能刺激根吸收硝酸盐。

然而, 对禾本科植物中氮积累时苹果酸作用的所有生理学研究, 都是用叶组织进行的。迄今还没有证据说明, 苹果酸在C₄禾本科植物中积累推动了*Azospirillum* sp. 的固氮作用这个假说。

Döbereiner等提出,具备C₄二羧酸光合途径的热带禾本科植物有利于根系固氮作用。因为这些植物能够有效地利用高辐射能。然而,并非所有的C₄禾本科植物都局限在热带地区。在温带地区已报道了C₄禾本科植物的固氮作用的研究工作。

此外也报道了不具有C₄二羧酸光合途径的禾本科植物有固氮酶活性,它们包括水稻、小麦和其它的禾本科植物。

许多报道表明,C₄二羧酸途径的重要性和热带环境是禾本科植物根有联合固氮酶活性的重要因素,不过这些都是利用预温育离体根测定的。用C₄禾本科植物整体测定的研究表明,它们的固氮酶活性很低或者没有活性。关于在禾本科植物中,高效的光合作用是否能维持较高的固氮率,目前没有确切的数据。因此,在这个假说确证之前,有必要对不同条件下代表不同光合途径的植物的固氮作用进行对比研究。

禾本科植物固氮作用的个体发育和季节性变化

在豆科植物中,已经提出了比较不同共生体系周期的有用参数,尽管在不同种的豆科植物中,它们存在着较大的差异,但是,当用乙炔还原法测定时,足以预计栽培作物的产量或其所需肥料量。由于这个理由,测定禾本科植物整个生命周期的固氮酶活性变化是饶有兴味的,它有可能研究氮肥使用和固氮作用间的关系。已经用离体根和原状土柱测定技术进行了研究。

离体根:已报道了*Pennisetum purpureum*和Transvala品种的*Digitaria decumbens*离体根固氮酶活性的季节性变化。*P. purpureum*的根系活性在炎热的夏季,当植物迅速生长的最高,在开花后,活性降低。*D. decumbens*离体根中固氮酶,在其达到最大活性之前就已测出了。

施氮肥不影响这两种禾本科植物离体根的固氮酶活性,这个结果与在豆科植物的*A. brasilense*纯培养和其它禾本科体系中观察到的固氮酶活性,受结合氮抑制的结果相矛盾。这种结合氮没有抑制固氮酶活性的原因,可能是与施用氮肥方式(每两周20公斤氮/公顷)及所用的测定方法(施氮两周后切根)有关。下面将讨论植物的个体发育、施肥与离体根测定的关系。

曾报道了在玉米生命周期中,离体根测定的固氮酶活性的差异。最高活性是在“75%的抽丝期”。Döbereiner指出,尽管在处理和对照植物间没有统计学上的差异,但是,植物叶片施用钼酸铵后,固氮酶活性提高了。Pexeira等确证了玉米在生殖生长期,离体根的固氮酶活性最高,高粱也一样。但是在开花期,叶面施用钼后,离体根的固氮酶活性也大大提高了。

施用氮肥大大地降低了玉米和高粱整个生育期的离体根的固氮酶活性。尽管吸收了氮肥的高粱的离体根的乙炔还原速率,在生育期间大大降低了,但是,植物得到了高和低水平的氮肥后,其离体根的固氮酶活性变化是平行的。

豆科植物的乙炔还原速率,在开花和生殖生长期时最大。因此,在禾本科植物生育期中,用预温育离体根测定的固氮酶活性的变化能用作支持这种测定方法的证据。如果预温育离体根在微生物增殖中是诱导固氮酶活性所必需的,那么,就能解释在禾本科生育期中出现的固氮酶活性的差异。

高粱离体根的无活性期是随植物的个体发育而变化,在开花期时最短。这时,用预温育

离体根法按照固定时间测定，它们的固氮酶活性最高。失活期间重复差异是与固氮酶诱导而使乙炔还原速率呈非线性相关联的，这可能是由于从植物的不同生育期取下根时，在固定测定时间内，乙炔还原速率的改变所致。

在用结合氮处理和田间氮肥处理中，低氮区高粱的离体根无乙炔还原活性的时期延长了。

因此，在重复根样品和固氮酶活性诱导间出现非线性的乙炔还原速率之前的活性变化，也可以用离体根在固定时间测定时观察到的结合氮对固氮酶活性的明显抵制作用来解释。

由于已记录了在离体根预温育期固氮微区系的增殖，所以，在禾本科植物中观察到的固氮酶活性的季节性变化，可以用根系维持微生物增殖和固氮酶活性发生变化来解释。细菌的生长和来自离体根腐解的、相对有效的、结合氮的变化一起，也可用以解释已观察到的固氮酶活性随植物个体发育的变化和施氮肥的抑制作用。

在玉米和高粱的固氮酶活性的季节性变化中，结合氮所起的诱导作用是用对离体根的乙炔还原作用和叶中硝酸还原酶活性相互关系的研究来证实。硝酸既是植物中硝酸还原酶诱导剂，又是它的底物。已经表明，影响硝酸吸收和运输的因子是改变硝酸还原酶活性水平和把还原态氮供给植物的速率。

在玉米和高粱中，叶子中硝酸还原酶水平是随植物年龄而发生变化。用预温育离体根测定出最大的固氮酶活性速率与叶中低硝酸还原酶活性水平相符。由此有可能推断，叶子硝酸还原酶活性水平的下降说明植物包括其根系中结合态氮的水平较低，当用离体根测定乙炔还原作用时固氮酶诱导活性之前延迟期较短。

尽管离体根测定法清楚地表明了植物生育期中的固氮酶活性的差异，但是，很可能它不能反映氮通过生物固氮作用进入植物体内的变化。实际上，在植物生育期中的乙炔还原速率的差异，反映出离体根维持预温育期间的微生物生长和固氮酶活性的能力，是随植物的年龄而异的。

原状土柱：也曾测定禾本科原状土柱的乙炔还原作用来研究固氮酶活性的季节性变化，但是，还不能说明这些差异是否与植物个体发育有关系。Balandreau采用原位测定系统测定了玉米生长周期中的乙炔还原速率。据报道，植物在发育期和营养生长稳定后，固氮酶活性速率增加了。他假定，在植物营养生长后期，光合作用能力达到最大，最大的固氮速率的产生是取决于这种能力的。在植物的生殖生长期，固氮酶活性速率没有进一步的变化，固氮酶活性速率与植物的个体发育没有关系。

也已报道了威斯康辛大草原的17种牧草的固氮酶活性的季节性变化。在已测定的两种牧草中，固氮酶活性是随叶子的生长而平行升高，随叶子的衰老而降低。Tjeprema和Burris指出，这个结果表明，乙炔还原作用是受细菌影响的，这些细菌依赖牧草供给能量。然而，在已测定的其它5种中，未曾证实，其乙炔还原作用是专门植物相联合。还没有证明，固氮酶活性变化是怎样同植物的个体发育相关的。

水稻的固氮酶活性的季节性变化，是与植物的个体发育有关。用整株测定已经指出，在生殖生长时期时，乙炔还原速率最高。有趣的是，尽管已报道用水稻离体根测定法证明固氮酶活性的季节性变化，但是，最大活性和个体发育间的关系没有报道。盐沼地的*S. alterniflora*固氮酶活性也随季节变化。

豆科植物固氮作用效率的提高与生殖生长时期是一致的。Hardy等指出，发育中的豆类是贮存结合氮的场所，它促进高效率的固氮作用。

禾本科植物乙炔还原作用的最大速率也是由开花所引起的，与豆科植物的机理相似。这种假说的局限性在于研究这些禾本科植物的固氮酶活性的季节性变化时，采用的是间接测定法。在开花时，玉米和高粱根系是发育完全的，这是维持最大固氮酶活性所必须先决条件。也曾报道，玉米和高粱开花时占优势的根类型维持预温育期后的最大乙炔还原速率。这个可能，是在这些禾本科植物中观察到的，固氮酶活性的季节性变化起作用的因素。

已经提出，最高的固氮酶活性速率是与最大的光合作用一致的，并且，在最大速率后出现的固氮酶活性的降低由于在胚珠和根之间竞争光合产物的结果。另一方面，Von Bulow和Döbereiner已经指出，玉米根的固氮酶活性不与植物的其它部分竞争光合产物。

关于禾本科植物的固氮作用的周期知之甚少。对这个过程与植物体内其它过程的相互关系知之更少。许多仅仅是用不充分的证据，来做出很多解释和推测的。

土壤湿度对固氮酶活性的影响

Day等在洛桑的 Broadbalk 研究氮的收益时，注意到从湿地取来的原状土柱的固氮酶活性速率较高。他们报道，原状土柱的固氮酶活性速率与土壤湿度呈正相关，乙炔还原速率随土壤湿度的线性提高而呈指数提高。Vassak等报道了在土壤湿度和草地原状土柱的固氮作用之间的类似相关性。Day等假定，在土壤颗粒和根际，厌气性有机体的量是随土壤湿度的提高而提高，并且 PO_2 影响了固氮酶活性。他们的假说得到了支持，即在 N_2 条件下温育原状土柱的乙炔还原速率比在空气条件下的高。

土壤湿度和固氮酶活性速率之间的关系与所报道的 *D. decumbens* 根的乙炔还原效率和土壤水分含量之间无相关性是互相矛盾的。然而，这个是根据预温育离体根的固氮酶效率结果测定的。像已解释过的那样，这种测定方法包括在预温育期之前，用蒸馏水冲洗根。在预温育期冲洗根，是细菌增殖和诱导固氮酶活性所必需的。因此，Abrantes等通过冲洗根，正是在最适水分条件下测定固氮酶活性的。

已报道的在土壤水分和固氮酶活性之间的正相关性，支持了在湿土中提高了不结瘤植物的联合固氮作用的假说。水地植物联合的固氮酶活性已经报道是普遍存在的，并且比生长在湿土或干土的植物的联合固氮酶活性还要高些。这些结果指出，禾本科植物的生长环境是产生根联合固氮作用的重要因素。湿环境对禾本科植物固氮作用的重要性能够解释为什么农业上重要的禾谷类植物，在用原状土柱测定时，其乙炔还原速率一般都低，而那些盐沼地植物和水稻就高。已经指出，这些水生环境和高湿度土壤，由于反硝化作用和硝酸盐的淋失，其有效氮是很低的。如果过量水分的作用是使环境中抑制固氮作用的结合氮的水平贫化，那么，控制旱地植物的联合作用克服这个问题是可能的。

植物育种

为改善维持固氮酶活性的能力而选育禾本科植物品系，以及最终从固氮作用中受益，有赖于测定这些过程的可靠性。如果没有确切地区分禾本科固氮作用和其它过程的技术，那么，改良品种的选择一定是不会成功的。目前，还没有适用于选择理想基因型的禾本科植物所使用的，测定固氮作用的可靠方法。用豆科植物的试验表明，乙炔还原测定对于选择植物和测定最后产量不是一个可靠的方法，因为它不能将已改良硝酸还原酶的品系和提高了固氮

作用的品系分开。

然而，已经有人提出，植物育种可以提高禾本科植物固氮作用的可靠性。研究 *P. notatum* 的结果已揭示了固氮细菌 *Azotobacter paspali* 是专性地与 5 种四倍体的生态型联合。在 33 种四倍体生态型中仅有 5 种能促进 *A. paspali* 在根际生长。已经指出其它的微生物（例如菌根真菌），可能处于这种联合体之中。

这些报道是有意义的，因为这些结果不是依赖于乙炔还原的测定，而是根据对植物刺激特异性细菌生长的能力的研究而得到的。不幸的是，对这种联合的微生物的生态学的深入研究还没有报道。在测定土壤微生物生态系统时，有趣的是确定根是否优先促进了特异细菌及同时损害了在土壤微生物生态系统中的其他微生物。在 *A. paspali* 存在的情况下，这种认识是有意义的，因为已经报道了这些细菌是留在根外的，并且是属于竞争空间和养料的细菌。而且，为什么 5 种四倍体生态型特异地刺激这种固氮微生物？它们是以什么方式作用的？搞清这个特异的联合，可以培育出能刺激在其根际生长理想细菌的植物。如果这个结果是与产生侵染过程有关，那么，在禾本科植物和固氮细菌之间的真正共生体就能实现。

使用现有的测定固氮的技术，已经发现在禾本科植物不同品种和品系中间，其根刺激固氮酶活性的能力不同。Von Bülow 和 Döbereiner 用离体根测定法，证实了从 UR-1 衍生的玉米 SIBO 系都具有较高的固氮酶活性。

在 *P. notatum*，*P. purpureum* 和小麦中也发现了基因型的差异，这些数据主要局限性在于它是用离体根测定乙炔还原速率的。如已讨论过的那样，在预温育后离体根的乙炔还原的高数值，可能反映出某些根维持生长的能力较大，其后固氮菌的固氮酶活性就越强。

禾本科植物固氮作用的 $^{15}\text{N}_2$ 测定

只有从 $^{15}\text{N}_2$ 掺入的 ^{15}N 获得的数据，才能够用以得出禾本科植物从根联合固氮作用中直接受益的结论。实际上，植物应该在田间正常生长条件下暴露于 $^{15}\text{N}_2$ 中。测定 $^{15}\text{N}_2$ 掺入的主要局限性，是大部分重要禾本科植物的体积。把这些大植物暴露于 $^{15}\text{N}_2$ 需要大体积的容器。那样，这些试验费用就相当高了。因此，我们认为，乙炔还原测定是确定 $^{15}\text{N}_2$ 研究和测定在植物中具有固氮作用的方法。

De-Palli 等把 $^{15}\text{N}_2$ 掺入到 *P. notatum* 和 *D. decumbens* 中去，从而证实了这两种牧草的固氮作用，这些数据也常用来说明其它植物的乙炔还原作用，同时，也可证明它们能从固氮作用中受益。尽管用这两种牧草证实了 $^{15}\text{N}_2$ 的掺入，但是，在从田间取样和实验之间相隔较长时间（在 4—16 天之间）。因此，获得的富集度不能推断固氮作用速率，并且，在 $^{15}\text{N}_2$ 掺入和乙炔还原之间也不能进行比较。

用甘蔗幼苗所进行的研究也已经表明了 $^{15}\text{N}_2$ 掺入，但是，固氮速率的细节还未报道。尽管他们报道在叶子中 ^{15}N 富集很少，但是 Ruschel 等计算，甘蔗幼苗的固氮量每天每公顷约在 0.2 至 23.8 克之间。用在田间未损坏的甘蔗植株研究表明，在叶子或茎中没有 ^{15}N 富集。

热带牧草根联合固氮细菌的生态学

固氮细菌可能是研究最广的土壤微生物之一，尽管这样，但对于它们在自然界中的生物学和它们对所处环境的结构和功能的贡献了解得还很少。在所有的固氮生物中，只是对豆科

植物的共生体——根瘤菌，做了略为详尽的研究。然而，对于这些有机体，我们的大部分知识都来自于对处于根瘤中的根瘤菌的研究。关于对土壤和根际群落中的自生菌的生态学了解却很少。

许多不同属的固氮菌在各种牧草根际的数量较高，在它们中间最重要的是 *Azospirillum*, *Azotobacter*、*Beijerinckia*和*Derxia*属的一些成员。然而，如果仅有这些细菌，即使它们数量大，也不能认为是重要的节约氮体系。

问题是方法学。因为在一个极为复杂的环境中，如在土壤中要把涉及两种有机体间的相互作用的多种因子区别开来是很困难的。

首先必须了解土壤中的固氮菌和根际之间的生态学关系，以便控制这个体系，从而获得最大的经济效益。试管是不能提供合适的生物自然环境的模型的，因为模拟过多的自然界中起作用的关系是不可能的。优良品种和在试验室创造的改进的突变体之间的生态学相互关系很小，也没有什么农业价值。新的探讨和方法学对于直接研究自然环境中有机体是必需的。

最近的几篇述评，已经详尽地阐述了非共生联合的固氮细菌。在这里我们仅仅考虑微生物的某些一般生态学特征，并专注重于在热带土壤中的 *Azospirillum* 和它与热带牧草根的关系。对于进一步的细节，请参阅Day, Knoules, Neyra和Döbereiner的最近的综述。

分布和生物地理学

在自然界中，固氮生物是分布很广的。在品种繁多的水生和陆生环境里，从地球的两极地区到热带地区，都已经发现了其存在。其中有一些在生态分布上是很窄的，例如 *Beijerinckia*，尽管在温带土壤中有，甚至在两极地区存在，但是，它仍被限制在热带地区。*A. paspali*，尽管具有自生固氮能力，但是已表明，它被局限在 *P. notatum* 的某些四倍体品种的根际。

Azospirillum sp. 已经从温带和热带地区的多种植物根上和土壤中分离出来。多数研究者认为，这种有机体只有在热带地区才具有特殊的意义。

Schroder发现在取自德国和奥地利的76个土样中，除2个外都有固氮螺菌。Döbereiner等报道，取自温带地区土壤和根含有 *Azospirillum* 的不到10%，而50%以上的热带样品是正结果。冲积土壤比受侵蚀的岩石土壤更适合 *Azospirillum* 生长。

然而土壤的pH严重地影响了 *Azospirillum* 的分布（最适pH是7），但是，在pH低于4.8的土壤中，*Azospirillum* 还偶尔存在。

Azospirillum 的分类

革兰氏阳性固氮螺菌，最初被名为 *Spirillum lipoferum*。新的 *Azospirillum* 属中至少可分为两个种——*A. brasilense* 和 *Azospirillum lipoferum*。这些种在生理学范畴和DNA同系物上是不同的。最近，用免疫荧光和免疫扩散的研究也表明了它们的抗体有所不同。

A. brasilense 含有两个亚种——*nir⁺* 和 *nir⁻*，这是依据它们反硝化亚硝酸的能力区分的。这两个亚种都具有同化和异化硝酸还原酶的能力，但是 *A. brasilense nir⁻* 不能异化亚硝酸。根据 *A. lipoferum* 利用葡萄糖作为碳源和对生物素的需求能力也能把它和 *A. brasilense* 区分开。

血清学分析已经揭示了 *Azospirillum* 的种和亚种的差别。免疫扩散研究表明, 至少有一个热不稳定的凝胶扩散的抗原, 它是属于不同的 *Azospirillum* 亚种的 27 个品系所共用的。因而, 热稳定的抗原是更为专一的。免疫荧光也表明了品系和种的差异, 但是, 随着培养物的年龄, 它们互补反应的程度也提高了。

个体生态学

关于土壤和根际中的 *Azospirillum* 的个体生态学的重要问题, 仍然没有解答。这些问题直接与根上 *Azospirillum* 微环境的特性, 以及这个微环境的生态学参数有关。细菌在土壤中远离它的自然微环境时的行为以及由于播种前进入到新环境中的特殊的 *Azospirillum* 品系的命运都是有关联的。

研究这些问题的困难仍然是方法学问题。免疫荧光也许是唯一的在自然界中直接研究特殊物种(甚至品系)的方法, 并且为研究 *Azospirillum* 与它的微环境关系提供了唯一的机会。

在 *Azospirillum* spp. 血清学方面有用的信息, 对于需要用试验来探讨那些有关的问题可能是有价值的, 并且具有生态学意义的。Schank 等, 在取自田间生长的接种后植物根和根际制剂中发现了 *A. brasilense* 的最早尝试, 是令人鼓舞的。然而, 定量的研究对于鉴定这些细菌在禾本科植物根际的作用也是必需的。

根际竞争和联合的特异性

根际是异养型固氮细菌生长的理想环境。根细胞碎片的有机物和根分泌的可溶性物质能满足固氮细菌需要的能量和碳素来源。然而, 这些细菌必须达到非常高的群体密度, 才对植物有意义。在豆科植物体系中, 菌和植物之间的极为密切的联合已经形成了。在植物产生的根瘤中, 微生物控制了一个特殊的共生环境。在禾本科植物联合体中, 这种密切的关系是不明显的。

毫无疑问, 自生异养固氮细菌是一种完全竞争性的根际有机体, 它们生存于各种植物的根际。然而, 通过联合生物的固氮作用使植物受益的程度还没有测定出来。

非共生固氮作用可能与固氮微生物的生长密切相关, 因此, 固氮量直接与特殊环境刺激的细菌的相应生长成正比。

有关根际非共生固氮菌的群体生态学的资料很少。研究这个问题需要直接的方法, 应该在原位上鉴定有益的生物。应用免疫荧光直接在土壤和根际进行非共生固氮作用的个体生态学研究是有希望的, 但是, 还必须更详细更定量的研究根际非共生固氮菌的群体生态学。

如果能够建立密切的联合, 那么, 在固氮菌和植物二者间的竞争优势将会很大。理想的关系是, 在根瘤菌和豆科寄主之间, 根瘤菌能在豆科植物根上的特殊根瘤环境里增殖到较高的数量, 其它的微生物, 例如菌根真菌和共生固氮的放线菌 *Frankia* 也能占据根细胞内和细胞间隙, 并且同它们的寄主植物建立高度紧密的配合。

已经间接的得到在根内有非共生固氮细菌的证据。 *Azospirillum* 已经从表面无菌的田间生长的禾本科植物根中分离出来。已经表明, 这种生物能穿透在 *Fabraea* 胶片盒中生长的 *P. mahiman* 根系。Diem 等报道, 固氮细菌能从表面灭过菌的水稻根中分离出来, 但是,

只是当根被压碎而释放出细菌时才能得到。

Döbereiner和Day观察到，在预温育期后有乙炔还原活性的根碎片具有还原四氮杂茂能力，并有类似细菌颗粒包裹着的细胞。Patriaum和Döbereiner还发现，在有些植物的皮层、内胚层、木质部和中柱细胞的内部和细胞间的空间里有还原四氮杂茂的类似于细菌的结构。

除了根瘤菌和豆科植物系统外，对于在固氮细菌和植物之间联合的特异性知之甚少。*A. paspali*在生态学上似乎是局限在某些*P. notatum*品种的根际，另一方面，*Beijerinckia*同热带植物的根际联合，如甘蔗、水稻和*Cyperus*等。*Azospirillum*被认为是生长在多种植物的根际。Baldani和Döbereiner曾提出，只有特殊的种能与部分寄主植物产生内共生联合。从田间生长的玉米根上分离出来的*Azospirillum*总是*A. lipoferum*，而那些从小麦和水稻根上分离出来的主要是*A. brasilense nir⁻*。

用固氮细菌接种

豆科植物—根瘤菌共生体系，是积累用以农业生产中一个好的例子。已经发展了许多用固氮细菌接种植物和评价建立的共生体系的技术。用*Rhizobium*接种豆科植物是必需的，因为已经表明，许多土壤缺少能使栽培植物有效结瘤的*Rhizobium*品系。据报道，*Azospirillum*通常是生活在热带土壤中，而在温带国家土壤中虽有但也较少。通过接种*Azospirillum*，在玉米根上（在此这些细菌数很少）生存的可能性已经提出来了。期望用这些细菌接种粮食作物和禾本科牧草，使它们能通过生物固氮作用提高产量。预温育的玉米离体根具有较高的乙炔还原速率和活性，主要来自*Azospirillum spp.*，这为接种的前途提供了依据。要强调指出的是，从禾本科根上分离出来的*Azospirillum spp.*经长时间延迟后才出现乙炔还原作用，这说明在那时，细菌增殖并且诱导了固氮酶活性。*Azospirillum*是否是禾本科原位测定时的主要固氮酶活性来源还没有被证实。此外，也没有证据表明，*Azospirillum*的固氮酶活性是同禾本科的氮素同化密切偶联的。因此，用*Azospirillum*接种禾本科植物能通过生物固氮作用获得在农业上有意义的增产。这也只是依据这些微生物对禾本科植物固氮作用的重要性来推论的。实际上可能很少或者无效。

在佛罗里达州进行的初步试验表明，在40个基因型植物中有2个适合于接种*Azospirillum*。一种是*D. decumbens*，另一种是*P. maximum*基因型。与存在这种细菌的对照相比，二者产量分别为163%和150%，但是，接种对于其它38个供试基因型中，则没有效果。

当用*Azospirillum*接种时，施用氮肥对于导致*P. maximum*，*Permisetum americanum*和*Cenchrus*的干物质的提高是肯定的，但是，其总氮没有提高。然而，乙炔还原测定与产量不相符合。这表明，接种*Azospirillum*提高的干物质重量可能是多种过程所致而不一定是固氮作用的结果。

也已报道，当接种*Azospirillum*和*Paspalli*时，盆栽生长的*Cynodon dactylon*的总氮量提高了。在接种与基因型的关系中表明，已接种的植物能较好地适应高肥力，但是没有测定固氮作用的报道。

当用整体测定时，在盆中生长的接种了*Azospirillum*的*C. dactylon*，几乎没有乙炔还原作用。用*Azospirillum*接种玉米，产量没有提高，用整体测定发现乙炔还原率也不高。同样，*P. americanum*和高粱不能从接种*Azospirillum*中受益。

植物生长通过非固氮作用过程对接种的反应

为了改良植物性状和提高作物产量，用细菌培养物处理种子或苗根，这称为种子或根的染菌作用。

尽管根瘤菌作为豆科种子的接种剂的价值是很清楚的，但是，接种 *Azotobacter* 作为固氮细菌肥料也已发展起来了。*Azotobacter chroococum* 因为具有固定大气中氮的能力也已经用作接种剂。在苏联大面积地都已应用这种制剂接种，他们认为，作物能从这项措施中受益和增产。

Brown指出，在东欧国家中，使玉米、小麦、大麦、燕麦和水稻染菌能够增产。

苏联的许多结果，已为其它各国的科学家证实。接种改变了微生物的数量，抑制了病害，并且产生出刺激植物生长的物质，这些作用方式的改变，可以作为接种细菌使植物得到增产的解释。

已经指出，接种 *Azotobacter* 有效地消除了产生妨碍幼苗发育的代谢产物。通过接种而抑制病害的只有少数成功的例子。

据报道，作为接种剂的 *Azotobacter* 培养物能够产生赤霉素、吲哚 3-乙酸和细胞分裂素。这些物质刺激幼苗和植物的生长。赤霉素也提高了植物体内的内源吲哚 3-乙酸的水平。在根区接种能使根分泌色氨酸和能引起吲哚 3-乙酸合成的有关物质。*Azotobacter* 在纯培养中（用作接种剂）和在根际中产生的植物生长激素，能引起植物有意义的生长。

番茄、莴苣、*Centrostemma*、*Pubescens* 和 *P. notatum* 接种 *A. paspalli* 后能大大地改善植物的生长。Brown提出，*P. notatum* 牧草生长的改良可能是由于 *A. paspalli* 产生的植物生长调节物质作用而不是固氮作用的结果。

Azospirillum 在纯培养时，也产生植物生长激素，而且，在接种 *Azospirillum* 后观察到的植物生长反应也已经由这些细菌产生的激素进行了解释。

因此，我们可以断定，接种固氮菌导致的植物性状的改善的方法学是复杂的，同时，固氮作用所引起的改善，首先依赖于对这个过程的定量测定，把培养细菌的无氮培养基施入对照小区给土壤增加了碳素，这样可以束缚部分有效氮，使接种区反应更明显。把 *Azospirillum* 接种到含有这些细菌的土壤中，可能掩盖了植物对接种所引起的微弱生长反应的检测。特别是在乙炔还原作用没有表现出这种反应时，更是如此。

接种剂产生的植物激素也能够解释产量增加的原因。实际上，接种研究应该包括把固氮细菌施入试验小区，这些突变株产生的生长激素和它们的亲本菌株产生的生长激素一定是相同的。

与禾本科植物根联合的固氮细菌的生理学

将从有固氮酶的禾本科植物根中分离出的所有细菌，进行纯培养生长时，都具有固氮能力。因此，这些群落都例为自生固氮细菌。相反，根瘤菌尽管在纯培养时具有固氮酶活性，但是，生长时需要一种结合氮。因此，根瘤菌和自生固氮菌的主要区别就在于后者在纯培养生长时具有利用大气中的 N_2 作为唯一氮源的能力。

关于自生固氮细菌和植物根的联合有许多报道。由于本综述只涉及禾本科植物联合固氮

作用的展望，所以，对固氮细菌的生理学描述只限于那些与禾本科植物联合固氮的细菌上。

禾本科植物根有时能维持乙炔还原作用，并且从这些样品中已分离培养出了固氮细菌。

关于禾本科植物联合固氮作用细菌的鉴定，通常用加富根的培养物来分离进行。通过比较根的乙炔还原速率和细菌的数量，Döbereiner等断定，*A. paspalli*是在*P. notatum*中起联合固氮作用的。用几种*P. notatum*基因型来研究固氮酶活性、干物重和与细菌数量相关的总氮量累积，表明了这种禾本科植物联合固氮作用是取决于*A. paspalli*的存在。

Döbereiner和Day以及Von Bülow和Döbereiner证实了，在经表面灭菌的离体根和加富培养物的乙炔还原活性间的相关性。用这种方法，他们断定，*Azospirillum*是在禾本科植物根上具有最大固氮酶活性的细菌。细菌在离体根中必须增殖，才具有固氮酶活性，所以，根表面灭菌的成功与否显然是个关键。在从根内分离固氮菌还没有报道的情况下，根表面无菌也已经得到了证实。不过，因为禾本科植物中固氮作用的*Azospirillum*在根上广泛分布，所以，已经引起了人们的关注。因此，我们对固氮细菌生理学的讨论只限制在*A. paspalli*、*A. brasilense*和*A. lipoferum*上。

碳代谢和氧的供应

正如以前讨论的那样，人们认为根区域内的细菌固氮作用是从光合产物运输中获得能量的。光合产物也提供同化进入细菌体内的固定氮的碳骨架，因此，它可能是植物的含氮化合物的前体。

已经表明，苹果酸、琥珀酸、乳酸和丙酮酸有助于在讨论范围内的所有细菌的旺盛生长和乙炔还原作用。*A. paspalli*和*A. lipoferum*也能利用葡萄糖和蔗糖作为生长和固氮作用的唯一碳源。相反，葡萄糖和蔗糖是*A. brasilense*的不良基质。*Azospirillum*潜在良好基质有机酸及其在C₄禾本科植物根中积累之间的关系，说明了这些菌和禾本科植物间的联合共生。

Azospirillum spp. 是好气型细菌，固氮酶活性需要低pO₂环境。用苹果酸、琥珀酸、乳酸和丙酮酸研究*A. brasilense*无细胞提取物的氧的吸收表明，在这些有机体中，是有三羧酸循环的。

用只能维持细菌微弱生长和固氮的基质（六碳糖及其磷酸衍生物）研究，没有发现其吸收氧水平的提高，这表明，在*A. brasilense*中，糖酵解和戊糖磷酸途径的意义不大。

在好气条件下，三羧酸循环是产生腺核苷-6'-三磷酸的主要途径。*A. brasilense*的呼吸作用产生腺核苷-6'-三磷酸，它是这种有机体的固氮酶活性所必需的。

三羧酸循环对于产生还原力也是重要的。在*A. brasilense*中，来自三羧酸循环中间产物的电子被传送到氧化态的NAD上，而还原态的NAD可能是固氮酶催化N₂还原为NH₄⁺的许多可能的电子来源之一。

因此，这些研究指出，供给光合产物和氧对根中的*A. brasilense*是有效的。细菌能为固氮酶活性创造先决条件。在根的固氮位置上，pO₂是低的，基质的碳水平是有限的。

*A. brasilense*的固氮效率随供给碳和氧分压的降低而有所提高。利用这些结果，Döbereiner和Day推断，禾本科植物的共生体系类似于豆科植物根瘤菌共生体系，也具有高效的固

用。

关于同禾本科植物根联合的 *Azospirillum* 的生长和固氮作用的关系的了解很少,然而,当 N_2 作为唯一氮源时,缺氧限制了 *A. brasilense* 的生长。Neyra 和 Döbereiner 注意到,在限氧的条件下,细菌生长速率的下降远远超过固氮酶活性速率的降低。

A. brasilense 高效的固氮作用可以用每个细菌细胞固氮酶活性的提高及其生长速率的降低来解释。然而,所有的推论都是基于用纯培养研究的结果。

所以, *Azospirillum* 在禾本科植物根中生长和有效的固氮作用间的关系尚不明确。

高氧分压和固氮酶活性

由于固氮酶对氧敏感,所以,在完全好气条件下,除非固氮酶受到保护,否则,固氮是不可能的。已经用 *A. chroococum* 和 *Azotobacter vinelandii* 做了许多在高 pO_2 条件下的细菌固氮作用的研究。

Azotobacter 能在空气中固定氮,因为它的固氮酶有呼吸和结构型保护,也因为该酶位于细胞里边。尽管已经证实 *A. paspalli* 中未发现这些机制,但是,毫无疑问它们是存在的,因为这些细菌在好气条件下能够固氮和生长。

与 *P. notatum* 根联合的固氮酶活性对 pO_2 的变化也是敏感的, *P. notatum* 根的固氮酶活性的最适氧分压是与 *A. chroococum* 在纯培养时相同的。

已经报道微好气型是另外一种机制,通过这种机制,某些细菌能够表达固氮酶活性,尽管这些细菌不能进行呼吸保护作用,但是它们的固氮酶有一定程度的结构型保护的证据。*Azospirillum* spp. 属于这种类型的有机体。

Azospirillum 的固氮作用必须是微好气条件,如 *A. brasilense* 不能在好气条件下以 N_2 作唯一氮源生长。Tarrand 等也已经论述了 *Azospirillum* 的固氮作用微好气性性质,他们把这个特性作为这些细菌分类学的一部分。

Azospirillum 的最适固氮酶活性是在 0.005 和 0.007 溶氧大气压 (0.507 和 0.7094 巴) 之间。*Azospirillum* 的固氮作用对氧气的敏感性,也被作为禾本科植物根的固氮酶活性只有在低氧分压下才能测出的原因。已经提出,同禾本科植物根联合的细菌固氮酶的明显的敏感性,在原位条件下,是受不良的氧保护机制所调节。

然而, Van Berkum 和 Sloger 证实了在好气条件下,盐沼地牧草和水稻的离体根和根的快速乙炔还原作用。已报道了在测定之前,暴露空气的预温育高粱根的乙炔还原作用。

因此认为,在测定时不能立即还原乙炔的离体根中,无联合的固氮酶活性的原因,是禾本科植物根中的固氮酶为 O_2 所失活。

温度和 pH 的作用

Azospirillum 需 N_2 生长的最适温度是在 32—40℃ 之间,这与已报道的来自热带环境的固氮细菌的最适温度相同。在 18℃ 以下, *Azospirillum* 的固氮酶活性对温度敏感。在热带地区, *Azospirillum* 的数量较高的原因是这些细菌需要高温。

尽管所有的 *Azospirillum* 对固氮有类似的最适温度,但是,它们在耐低温上也有所差异。然而,禾本科植物根的固氮酶活性对夜间低温的敏感性,也归因于植物生长的影响。

Day和Döbereiner报道了*Azospirillum*需 N_2 生长的最适pH, 介于6.8和7.8之间。他们推断, *Azospirillum*的固氮作用发生在根的表面和细胞内, 在那些部位能满足它们对特殊pH的需求。

因此, 尽管*Azospirillum*在土壤中的生长依赖于pH, 但是, 也报道了禾本科植物根为细菌提供了最适的条件, 甚至在低pH土壤中也如此。温度和pH对*A. paspalli*的以及在*P. notatum*根内的固氮酶活性的影响还没有报道。

结合氮和固氮酶的关系

固氮酶还原 N_2 的产物是 NH_4^+ 。所有的固氮细菌都优先利用它作为氮源。在这种氮源下生长比任何其它物质都快。*A. paspalli*和*A. brasilense*在氨中也生长得很好, 但不能固氮。当把*Azospirillum*的细胞从氨培养基转移到无氮培养基时, 很快地变为能固氮, 但生长得很慢, 而且, 在大量的半固体批量培养中, 开始的低浓度结合氮有利于它们生长和固氮。

在氨中生长的*A. paspalli*细胞, 在被转接到无氮培养基时也诱导出了固氮酶活性。这些结果表明, 在与禾本科植物根联合的固氮细菌中, 氨提供了固氮酶的活性和合成。

氨对固氮酶活性和合成的调节作用已经在其它的自生固氮细菌中作了研究。Mortenson曾指出, 研究固氮酶合成的抑制作用是复杂的, 因为在把氨加给细菌时, 很快抑制了它的合成。固氮酶合成调节作用的研究大部分是用*K. pneumoniae*和*A. vinlandii*进行的。

氨掺入到细菌的第一个产物是谷氨酸, 并且, 这种反应是通过两种不同的途径来完成的。当培养基中氨的浓度高时 ($> 1 \text{ mm}$), 谷氨酸脱氢酶就把谷氨酸供给细胞。

当氨的浓度低时 ($< 1 \text{ mm}$) 或者在固氮条件下, 则由与谷酰胺合成酶偶联的谷氨酸合成酶催化反应把谷氨酸供给细胞, 而谷氨酸脱氢酶不起作用。L-甲硫氨酸-DL-亚砷次胺和L-甲硫氨酸砷是这两种氨同化酶的抑制剂。把L-甲硫氨酸-DL-亚砷次胺和L-甲硫氨酸砷和抑制剂水平的 NH_4^+ 一起加入到固氮培养的*K. pneumoniae*或*A. vinlandii*中, 仍能出现固氮酶活性。但是, 在没有这种谷氨酸类似物时, 固氮作用就停止了。

把氨加入到*A. brasilense*的固氮培养中, 也抑制固氮酶的合成。在有过量的氨存在的情况下, L-甲硫氨酸亚砷次胺和L-甲硫氨酸砷能使*A. brasilense*固氮酶合成解阻遏, 而能测定出乙炔还原作用。

氨抑制*K. pneumoniae*和*A. brasilense*中的谷酰胺合成酶, 而同时提高了这种酶的腺苷化作用。

L-甲硫氨酸-DL-亚砷次胺和L-甲硫氨酸砷抑制谷酰胺合成酶在这两种微生物中的腺苷化作用, 在固氮条件下, 最初就有这种去腺苷化状态存在。

目前流行的假说是, 活化的去腺苷化状态的谷酰胺合成酶诱导固氮酶合成, 这种酶的呼吸作用或者在 NH_4^+ 存在下使其转变成为失活的去腺苷化的状态而抑制了固氮酶的合成。谷酰胺合成酶的固氮酶调节作用最好是由固氮酶解阻遏的突变种来证明。这种调节作用是谷酰胺合成酶结构改变的结果。

在*A. brasilense*中, 谷酰胺合成酶在固氮酶调节中的作用也已经用类似于*K. pneumoniae*突变株来证实。然而, 也提出了在*K. pneumoniae*中的nif操纵子中直接为氨控制的抑制剂所负调控, 在*A. paspalli*中固氮酶合成的调控机理还不清楚。

还证实了*A. brasilense*的硝酸还原作用和反硝化作用的同化及异化作用。Neyra等断定,

研究 *Azospirillum* 最佳固氮作用和最低反硝化作用的方法是重要的。

Nelson和Knoisles观察到硝酸抑制 *A. brasilense* 的固氮酶活性，是通过活化硝酸还原酶来作用的。Magalhães等分离出了 *Azospirillum* 的无硝酸还原酶的突变株，它能够在10mm硝酸的情况下固氮。

这些作者认为，把这些突变株接种到禾本科植物中能够在土壤存在高水平硝酸的情况下产生具有固氮作用的系统。

Döbereiner和Day报道了在 *A. paspalli* 中的固氮酶活性不受硝酸的影响，并且提出在这个有机体中没有硝酸还原酶。然而，这些研究者没观察到 *P. notatum* 根的固氮酶活性受硝酸的抑制作用。他们提出，根把硝酸还原成亚硝酸，并与硝酸一起从根中泌出，引起对固氮酶的活性抑制。

Azospirillum brasilense 的固氮酶

研究 *A. brasilense* 的固氮酶是可能的，因为该酶能从用French压机破碎的细胞中释放出来，并且已经描述了纯化的方法。*A. brasilense* 的固氮酶系统有下述三种成分：Mo—Fe蛋白、Fe蛋白和类似于在 *Rhodospirillum rubrum* 中的Fe蛋白的活化因子。*A. brasilense* 的固氮酶活性取决于 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 的存在。*R. rubrum* 的活化因子能活化 *A. brasilense* 的Fe蛋白。反之亦然。*A. brasilense* 的Mo—Fe蛋白不需要活化，因为当把它同从 *K. pneumoniae* 中的Fe蛋白互补反应时具有活性。

H₂ 的释放与吸收

有人指出，在豆科植物中，为了更有效地进行固氮，氢酶可以再利用释放的氢，并产生ATP和还原力。已经研究了 *A. brasilense* 的氢酶活性。尽管已指出其活性水平足以再循环由固氮酶产生的所有的氢，但是，这种功能对禾本科植物根固氮效率的重要性仍有待于确定。而且还指出在 *A. lipoferum* 中氢酶具有固氮酶氧保护机制的作用。

结 论

毫无疑问，禾本科植物具有联合固氮作用。禾本科植物能从自生的或与微生物联合中获得大气中的氮。其机制有三种：

首先，由植物材料分解的碳水化合物支持了自生细菌在N₂中生长，氮又回到微生物区系的一部分生物量中。它具有长期富集的性质。尤其是未破坏的生态系统更是如此。

其次，在禾本科植物根区内，固氮作用能够通过植物把含碳化合物释放到土壤而进行，通过这种机制，使土壤长期富集氮。这对于维持热带条件下农业和人口的增长具有重要意义。

第三，根联合固氮作用可能与植物代谢密切相关。如果这种固氮作用能部分或全部代替施用氮肥，那么，在高度农业机械化的发达国家中将依赖于这种形式得到最大的经济效益。

尽管 *Azospirillum* 和禾本科植物联合体系已列为第三类，但是支持这种概念的证据还没

有得到。在通气良好的环境中的固氮作用，已经认为是偶尔的、和不足以满足精耕作物的需要的速率的。然而，我们的意见是，尽管对禾本科植物固氮作用的过程了解得非常少，但它并不影响我们对其每一个时期的变化加深探讨，以期取得更大的成就。

原载[美]“Microbiol. Review” 44:491—517, 1980

周法永译 尤崇杓校

水稻土中的异养固氮作用

T. Yoshida G. Rinaudo

1. 引言

1. 1. 水稻土中氮素肥力的保持

南亚许多国家的稻谷生产影响着世界上近一半人口的食物供应。而氮常常成为作物生产限制因子的一种元素。亚洲种稻国家的许多地方，化肥还没有普遍应用，水稻生产大都依靠水稻土的天然肥力。古代农民实行烧荒的农业方式，生产他们以旱稻为主的食物。由于土壤肥力不能持久，他们不得不每隔两三年从一块土地转移到另外一块土地上去。然而，在浸水田中，稻农在同一块稻田中种植水稻达千年以上。尽管年复一年地收获水稻作物，但是元素，特别是氮素仍然不断地供应，这可以认为是由于水稻土中微生物固定空气中氮所致，但也并不完全都是微生物固氮的贡献。

日本各县的N、P、K长期实验证明，水稻土中氮素能不断地自然供应。Konishi和Seino表明，在不施肥的水稻田中，每年至少从空气中固定约20公斤N/公顷（有对照处理，表1）。施加磷、钾可增加水稻田中氮素的积累（P、K处理表1）。

表1 日本石川县农业实验站22年(1929—1950)
种植水稻的稻田中的氮素平衡

处 理	氮 ^a (公斤/公顷) 的增加或减少	
	无Ca	有Ca
对 照	+420	+651
P、K(-N)	+740	+838
N、K(-P)	-507	-372
N、P(-K)	-57	+82
N、P、K	+39	+59

a. 通过固定空气中的氮为正值，计算如下：
(植物吸收的N) - (施肥的N + 损失的土壤N)。

Matsuo和Takahashi在日本长期的实验中，计算了不施氮的水稻田中，氮素的平衡，估计在这田中平均每年自然提供的氮素49—90公斤/公顷，而在日本所有地区中则为70公斤/公顷。

在日本的北海道41年不施氮肥的水稻实验表明，平均产量为2.8吨/公顷，而不降低土壤肥力每年从水稻中取走的氮量为53公斤/公顷。Kcyama和App报道了在热带和温带地区的浸水稻田中，每茬能收益35—50公斤N。

菲律宾国际水稻研究所(IRRI)实验田中的Maabas粘土地区，在旱季，田中浸水110

天，释放的土壤净氮量估计为57公斤/公顷，雨季，浸水94—98天时为77公斤/公顷。在生长水稻土壤中氮素的自然收支是平衡的，在计算平衡时，没有计及像雨天或灌溉时自然氮的收益。然而，假如每种植季节土壤矿化为57公斤/公顷，那末它的总氮（2800公斤/公顷、假定0.14%的土壤N）将可补偿大约50茬，否则土壤要由某些机制增加氮素。过去的许多年中，在菲律宾不同的稻田中，不施氮肥水稻产量仍然获得几吨/公顷（表2）。

表2 传统品种和两个近代品种无氮肥生长的产量

湿季	产量 (吨/公顷)														
	IRRI			Maligaya站			Bicol站			Visayas站			总平均		
	Peta	IR 8	IR20	Peta	IR 8	IR20	Peta	IR 8	IR20	Peta	IR 8	IR20	Peta	IR 8	IR20
1968	3.9	4.1	3.7	4.1	3.7	4.0	3.8	5.1	4.5	2.4	3.0	3.1	3.6	4.0	3.8
1969	2.9	5.6	5.2	3.8	5.2	4.4	3.4	4.6	4.0	4.1	4.0	5.2	3.6	4.8	4.7
1970	2.8	4.9	4.6	2.8	4.0	4.3	0.0	2.8	2.4	3.5	2.2	3.5	2.3	3.5	3.7
1971	1.3	3.6	3.8	2.9	2.5	3.2	3.1	3.2	2.9	4.6	3.9	3.8	3.0	3.3	3.4
1972	2.9	3.3	4.0	3.2	3.6	3.6	3.8	4.2	3.8	3.4	3.2	3.5	3.3	3.6	3.7
平均	2.8	4.3	4.3	3.4	3.8	3.9	2.8	4.0	3.5	3.6	3.3	3.8	3.2	3.8	3.9

1. 2. 田间固氮的测定

研究水稻土中生物固氮作用有三种主要的方法：凯氏技术、N-15同位素技术和乙炔还原技术（ $C_2H_2-C_2H_4$ ）。固氮的直接检验是测量样品中总氮的增加。用凯氏法测量总氮适合于固氮能力强的体系，但对于在固氮增加的百分率很小的情况下，这种方法就不可靠了。然而，如果长时间暴露于 N_2 后，能使体系中总氮产生高比率的变化，那末这种方法还是适用的。

App等用这种技术阐述了浸水水稻田中天然的氮素肥力，并指出水稻植物改善这种土壤的氮素效益（表3）。

更准确地说，直接而又比较准确地测定固氮的方法，是N-15同位素技术。但这种示踪技术需要用昂贵的 $^{15}N_2$ ，特别是当它大规模使用时，如在培养箱和田间使用时更是如此，它还需用很贵的仪器质谱计分析及制样等实验室程序。因此，在水稻土中固氮作用的研究中，应用 ^{15}N 同位素技术大多限于实验室里的试验。同位素技术是直接的，样品误差也许比凯氏技术小。近来水稻根区的固氮活性多在水培条件下，用标记的N-15气体测定。采用示踪技术在水田土壤条件下同样的实验说明，N-15同位素技术在水田原位测定的水稻土—植物系统的1或2周间的固氮活性是足够灵敏的。

乙炔还原方法简单、灵敏和经济，它大大地促进了固氮研究，由于它并不是直接测量生物固氮量，因此，对于准确估计固氮作用是不合适的。但是， $C_2H_2-C_2H_4$ 技术已经用于稻田原位条件下的固氮研究。

Alimaguo和Yoshida采用了乙炔—乙烯法测量浸水水稻土原位测定的装置。他们用一个金属圆筒压住塑料口袋进行原位条件下，在田间测定水稻根际的固氮活性。固氮活性在田间种植地区远较未种植植物的行间为高。Lee和Watanabe发现在测定装置中搅拌土壤—水系统可以得到最佳的乙烯回收率。

表3 凯氏法测定种植水稻的浸水土层的氮素平衡

种 水 稻	暴 露 光	补 充 处 理	Mg N				作物增加 N %
			作 物 ±S.E (x)	土 壤 变 化 ±S.E (y)	其 余 收 益 (z)	N平衡 (x+y-z)	
实验 A (4 茬)							
+	+	对照	997±15(a)	-795±39(a)	21	181** (a)	18
+	-	除茬	1042±22(a)	-875±66(a)	21	148* (a)	14
-	-	对照	0 (b)	-243±40(b)	0	-243** (b)	-
实验 B (6 茬)							
+	+	对照	1174±11(a)	-604±70(a)	27	544** (a)	46
+	-	对照	1148±16(a)	-961±50(b)	27	160* (b)	14
-	+	对照	0 (b)	193±82(c)	24	169n,s (b)	-
实验 C (6 茬)							
+	+	对照	1203±12(b)	-789±6 (a)	27	387** (a)	32
+	+	P、Fe、藻	1273±33(b)	-261±80(b)	98	914** (b,c)	72
+	+	P、Fe	1211±43(b)	-895±77(a)	92	723** (b)	60
+	+	P、Fe、萍	1681±21(a)	-421±67(b)	106	1153** (c)	69

±S.E 表示标准误差

注：*和**表示从0计算，在5%和1%水平上有意义的差别，用同一字母表示的平均值，用Duncan多项式测试，在5%水平上没有有意义的差别。

1.3. 异养和光合微生物的贡献

从已发表的述评中可以看出，尽管水稻作物取走氮，但是，氮素还是连续地供应，这归因于水稻田中微生物的作用。现在有兴趣的是，了解实际上哪种微生物在水稻田的固氮中起着重要的作用。在水稻田中，对蓝藻的固氮作用比细菌更引起人们的注意。特别在日本和印度，蓝藻在水稻土中的固氮作用已经作了许多研究。有关水稻土光合细菌的研究工作已有一些报道。

如果各种生态因子对于生长和保持固氮场所都是适合的，那末光合微生物在水稻田中的固氮作用可能是大有潜力的。测定光合微生物在水稻土中的作用的暖室实验表明，在浸水条件下，光照下的固氮活性比黑暗时高得多。但是，当连续种植两茬时，则光照和黑暗处理间稻草和子粒的重量以及水稻对氮的吸收，是没有很大的差别。

在菲律宾，用原位装置测定水稻田光合固氮作用，得出了固氮量的范围，一处为2.3—5.7公斤/公顷，另一处为18.5—33.3公斤/公顷。虽然菲律宾的Los Baños两块水稻实验田，固氮蓝藻对于水稻的生长和收获没有很大作用，但是在印度用固氮蓝藻如：鱼腥藻类 (*Anabaena sp.*)，念珠藻 (*Nostoc sp.*)，管链藻 (*Aulosira fertilissima*) 或单歧藻 (*Tolypothrix tenuis*) 接种于水稻田时，确实有利于水稻的生长和收获。

Rouguerol报道了法国南部固氮菌属 (*Azotobacter*) 和梭菌属 (*Clostridium*) 在水稻田中起到的固氮作用。Okude和Yamaguchi研究了日本水稻田光合固氮菌的分布，而且报道了分布在日本水稻田中起固氮作用的细菌的重要性。Becking报道了贝氏菌属 (*Beijerinckia*) 在热带地区的广泛分布，主要在砖红壤中，它在pH值较低的土壤中比固氮菌属 (*Azotobacter*) 更多。然而，还没有文章对这些异养固氮菌的固氮作用提出适当的定量估价。Jensen或Alexander认为，对异养固氮菌每年能增加20—50公斤N/公顷的这种估算是过高了，因为这些细菌至少要消耗相当于葡萄糖同样营养价值的有机物1—2.5吨。

许多文章报道, 添加有机物于水田土壤中, 能促进土壤中的固氮活性。但还没有报道定量估测水稻田中的固氮作用。

近来发现, 水稻植物根际的异养固氮菌能固定空气中的氮, 水稻根际具有某些专门的特征, 其中包括空气向根组织的输送, 在氧化的根组织和厌气土壤之间有好气和厌气的界面。固氮活性随植物年龄而增长, 在生殖阶段的中期活性达到最高峰。水稻植物能迅速将在根际固定的氮转送到植物各个部位。异养细菌在水稻根际所固定的氮量对于未施肥的水稻生产是非常重要的。Wada等报道了固氮最重要的部位是水稻田的还原层, 因此在检测水稻田固氮时的根际作用是不能忽视的。Matsuguchi 报道异养固氮占田间固氮总量60%以上。采用凯氏技术直接测定固氮作用进一步指明异养和光合微生物的同时固氮作用。

1 4. 总结

科学家长期来已经发现水稻田中氮素肥力的保持。这种现象涉及的机制, 看来是生物固氮的结果。在过去几十年中, 支持这个理论的证据增加了。对于氮素积累的主要贡献的生物体, 是光合微生物, 包括水稻田中的固氮蓝藻和异养细菌。各种固氮生物在保持水稻田氮素肥力的作用大小, 可能是依赖于环境条件, 但目前尚未阐明。然而, 光合和异养固氮微生物的富集氮的作用显然是重要的, 特别是在水稻生长季节的前期大概是很重要的, 但是它在水稻植物的生殖期时更为重要。

2. 异养固氮作用的微生物学

2. 1. 包含的微生物种类

2. 1. 1. 定性研究。固氮细菌广泛分布于水稻土中: 假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、固氮单胞菌属 (*Azotomonas*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、贝叶林克氏菌属 (*Beijerinckia*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、梭菌属 (*Clostridium*)。在水稻田的土壤中经常发现的还有: 脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、脱硫肠状菌属 (*Desulfotomaculum*), 和甲烷氧化细菌。德克斯氏菌属 (*Derxia*) 在浸水土壤中特别多。近来, 固氮螺菌属 (*Azospirillum*), 肠杆菌属 (*Enterobacter sp*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、螺菌属 (*Spirillum*)、弧菌属 (*Vibrio*), 可能还有无色硫细菌属 (*Achromobacter*), 都从用水洗过和表面灭菌的稻根分离得到。这么大范围的固氮异养菌, 说明异养固氮作用适合于完全不同的土壤环境。

2. 1. 2. 定量研究。根据Ishizawa等和Balandreau等的报道, 在水稻土中和水稻根际, 好气固氮菌比厌气固氮菌多。在洗涤过的水稻根上的固氮菌数量其趋势也相同。虽然在大多数土壤中, 细菌群体量少至 10^3 /克土壤, 或更少些, 但是Ishizawa和Tayota指出, 固氮菌在水田中比旱地中多, 在非火成岩生成土壤中比火成岩生成土壤中多。在碱性土壤中, 如埃及, 固氮菌的数量大概相当于 10^3-10^7 /克土, 而在中性和酸性土壤中则很少。贝叶林克氏菌属 (*Beijerinckia*) 在水稻土中很多。Matsuguchi等在泰国调查和测量了40多处水稻田后发现, 固氮菌属 (*Azotobacter*) 和梭菌属 (*Clostridium*) 的菌数分别为 $10-10^4$ /克土和 10^3-10^6 /克土, 其趋势随土壤中pH值的升高和有机物及磷的大量存在而增加。固氮螺菌 (*Azospirillum*) 常常可以从灭菌的水稻根表分离到。遗憾的是, 这些细菌的大量研究是定性的, 定量研究很少。

2. 2. 固氮微生物的分布

2. 2. 1. 固氮细菌在非根际土壤中的部位。对非根际土壤中异养固氮菌注意得很少。然而，相当数量的有机物质（稻茬和作物残余物中的脱落根）在收获以后遗留在田间。在日本最近的研究指出：（1）有机碎片是非共生固氮的活动微区，（2）稻草的分解，不仅在表层适合于异养固氮作用，而在耕作层下面好气和微好气条件下也有助于二者的进行。

2. 2. 2. 根际固氮细菌的部位。一再发现含脂刚螺菌（*Spirillum lipoferum*）后，最感兴趣的问题之一是固氮菌位于根组织内或根表面，它们与植物建立了联合作用。最近Diem和Dcmmerynes讨论了这一点。细胞内菌落可能存在，但是，是分散的。Lakshimi等只是观察到水稻根毛内的某些固氮螺菌（*Azospirillum*）的细胞。另外经常报道根细胞胞间菌落，主要限于根的衰老部（节区）一般为损伤细胞部位。Umali-Garcia等报道，固氮螺菌（*Azospirillum*）可在活根细胞壁的中层观察到。这些观察与固氮螺菌（*Azospirillum*）中大多数能利用果胶作为碳源的能力是一致的。Asanuma等发现，水稻幼苗根表面的微生物分布很广，除根尖区外，主要在表皮组织和细胞界面的破裂部位。他们分散并附着在粘胶中，或吸附在表皮细胞表面和根毛上。细菌在根表层的比率是少的，只占总根表面的1—9%。

2. 2. 3. 根际不同部位固氮微生物的分布。根际可划分三个部位：（1）根际土，包括直接围绕植物根并生长着微生物的土壤范围，（2）根表，由根表及生长在其上的微生物所构成，（3）内根际，由根表层组织及异养微生物所构成。Brown认为许多固氮细菌如：固氮菌属（*Azotobacter*）不是纯的根际细菌，固氮菌（*Azotobater*）在根际土壤中受到限制，在根表发现其细胞很少。相反，Döberienner和Ruschel报道，贝叶林克氏菌（*Beijerinckia*）在浸水水稻的根表比在根系土壤中生长得好。Döberienner等认为， C_4 光合途径的植物首先被固氮含脂螺菌（*Azospirillum*、*Lipoferum*）所感染，而 C_3 植物首先被固氮巴西螺菌（*A. brasilense*）所感染。在浸水水稻中，从表面灭菌的根，分离得到的全部固氮螺菌（*Azospirillum*）都属于固氮巴西螺菌（*A. brasilense*），它们中96%是 Nir^- （硝酸还原酶缺陷型），而在没有种植的土壤中分离仅有50%属于固氮巴西螺菌硝酸还原酶缺陷型（*A. brasilense Nir^-*）。

Watanabe等研究好气异养细菌在IR26水稻根际三种部位间的分布。细菌的分离用平板计数并检测出固氮酶活性。塞内加尔栽培的Morobrekkan水稻也作了包括放线菌在内的计数。结果例于表4。“IR26栽培稻—菲律宾土壤”和“Morobrekkan栽培稻—塞内加尔 Sol-Dior”两种系统中，具有固氮酶的细菌比率从根际土向内根际逐渐增加。在内根际所分离的比率中，固氮酶活性（相应为81%和50%）是很高的。奇怪的是，Morobrekkan稻生长在塞内加尔Sol gris时，在内根际中有固氮酶的细菌比率比在根际土壤中低（相应为16%和53%），而放线菌的比例是从内根际到根际土壤而逐渐降低（相应为7.2%和1.7%）。根据这些数据Roussos等指出，放线菌可能影响固氮微生物在根际的聚集。

菲律宾土壤和塞内加尔Sol gris比较的结果，揭示了其他方面的重大差别：（1）从菲律宾土壤的内根际分离的所有菌推测是无色杆菌属（*Achromobacter*），而在塞内加尔Sol gris中最多的固氮菌种类是由可能属于节杆菌属（*Arthrobacter*）的具有粉红色色素种构成的；（2）Watanabe和Barraquio发现利用葡萄糖的固氮菌比利用苹果酸的固氮菌多得多，而Roussos等发现从所有三种样品中分离的菌广泛利用苹果酸；（3）从菲律宾土壤中分离的固氮菌对营养的要求（维生素和氨基酸）比从塞内加尔Sol gris中分离的菌更加显著。

表4 根际土、根表、内根表三种稻土系统的菌落

水稻—土壤 系 统	总微生物 区 系	总微生物区系(%)	
		固氮细菌	放线菌
IR26水稻—菲律宾土壤			
根 际 土	2.3×10 ⁷	2.4	未测定
根 表	1.5×10 ⁷	76	未测定
内 根 际	1.1×10 ⁸	81	未测定
Moroberekan水稻—塞内加尔Sol gris			
根 际 土	2.8×10 ⁸	53	1.7
根 表	1.8×10 ⁸	25	4.1
内 根 际	1.2×10 ⁸	16	7.2
Moroberekan水稻—塞内加尔Sol Dior			
根 际 土	2.4×10 ⁹	17	0.5
根 表	1.6×10 ⁹	28	0.1
内 根 际	2.4×10 ⁷	50	0.1

微生物数量/克干土(根际土)或/克干根(根表和内根际)表示。

2. 3. 总结

除固氮菌属 (*Azotobacter*)，梭菌属 (*Clostridium*) 或固氮螺菌属 (*Azospirillum*) 在水稻根际大量存在以外，各种各样的细菌很多。许多是微好气的，专性或兼性厌氧菌是存在的，但一般不多。根据以上的报道，固氮菌根际的群体在性质和数量上有很大幅度的变化。

固氮细菌在其他根际微生物之中所占的比例很大，所以水稻根际是固氮作用活跃的一个潜在部位。然而我们在下面可以看出这种潜力的表达受到环境因子或药剂的限制，例如：放线菌就阻碍了他们的活动。而且要知道，即使固氮菌达到 10^7 — 10^8 微生物/克干根这样高，但也并不意味着根表被细菌层覆盖，细菌覆盖在根表从未超过10%。

3. 稻田土壤中影响异养固氮的因子

根际微生物固氮作用的生态状况近来已有论述，Dommergues和Rinaudo的评述特别注意到水稻根际。水稻根际的固氮作用首先依赖于植物和根际固氮细菌，环境和土壤因子也直接和间接通过植物影响到根际微生物。

3. 1. 植物的作用

3. 1. 1. 植物的基因型。一些报道证实，植物的基因型影响植物与其根际固氮细菌联合。根据Lee等的报道，用乙炔还原活性 (ARA) 法测定固氮作用的能力，在抽穗期与水稻根干重有关，根部供给根际有机物质的数量大概是这种关系的主要因素之一。

Dommergue和Rinaudo在首次实验中发现，通过 γ -射线照射后获得的两株不同水稻突变种 (Cesariot和Cigalon)，当它们生长在没有灭菌的Camargue土壤中时，其根际的乙炔还原活性范围分别为500—5320 (Cesariot) 和860—7370 (Cigalon) nmolC₂H₄/克干根·小时 (表5)。第二次实验是应用了部分同种植物材料原始种Cigalon和两株水稻突变种。在第一次实验中突变种L的乙炔还原活性最低，而H的乙炔还原活性最高，但在第二次实验中，生长在塞内加尔Sol gris上的不像在第一次实验那样，三种水稻基因型的乙炔还原活性差别很大 (表5)。两次实验结果之间的差异是由于土壤的化学和生物学性质不同的缘故。

表5 Cigalon水稻和2株突变种生长在Camargue和塞内加尔Sol gris的粘性土壤中，
根际的乙炔还原活性 (ARA)
(3周龄的水稻苗)

水稻 "Cigalon"	ARA (nmol C ₂ H ₄ /克干根·±S.E)	
	Camargue土壤 (第一次实验)	塞内加尔 Sol gris (第二次实验)
亲 本	4079±1383	2589±466
突 变 株 L	861±456	3682±1254
突 变 株 H	7368±1971	2330±592

S、E=标准误差。

这些数据导致了这样的结论，对于通过乙炔还原活性来筛选水稻基因型的结果，在解释时要极为小心，以防止把未确定的环境条件引入概念中。

3. 1. 2. 随时间变化。由于气候条件随时间而变化，某些植物生理过程的速度也变化了，因此，可以预料，与植物联合的固氮活性也随之变化。Balandreau等，Trollidenler及Rinaudo等和Bcddey及Ahmad报道了昼夜间实际的变化。在水稻生长季节乙炔还原活性变化的早期报道中指出，抽穗期活性最高。原位测定证实了这个结果。

3. 2. 气候因子

3. 2. 1. 光强度。当植物还处于幼苗期时，有利于固氮菌所需能量物质的产生，这种物质主要是由根分泌物组成。由于根分泌作用依赖于光强度，蔽光10天的水稻幼苗的根际乙炔还原活性降低，这种降低是由于提供根际的碳源减少的缘故，其结果与去顶尖14天或21天植物的乙炔还原活性急剧下降相类似。Rinaudo等报道了水稻幼苗根际乙炔还原活性的昼夜波动。认为乙炔还原活性与植物的光合作用能力密切相关。然而，这种关系在多数成熟的植物中没有发现。Lee等报道了去掉梢尖的水稻在24小时内对原位乙炔还原活性影响很小。当植物衰老时，根腐烂物和根脱落物可以供给固氮菌一种额外产能化合物，它大大补充了碳库。

光强度可以直接和间接地影响非根际土壤的异养固氮作用。直接作用主要与光合固氮细菌的生长和活性有关。间接作用是光合固氮菌的生长对土壤中固氮异养菌的刺激和抑制作用。光合细菌已被认为是水稻土中重要的固氮菌。光合细菌在低光强和厌气环境下，在固氮的过程中将比蓝藻更有利。

光合微生物在固氮方面的间接作用是与水稻土中其他异养固氮菌相关联的，但它们在田间的状况的材料很少。

3. 2. 2. 温度。相对的低温限制了光合作用、运输作用、分泌作用，因而减少了固氮菌能量物质的供应和固氮菌活动。因此，从逻辑上推测温度升高到30—35℃时将增加根际的乙炔还原活性，然而还很少有数据证明这种假定。

非根际土壤的温度效应与地理因子的关系比与植物的光合作用活性的关系更为紧密，随之从根部提供的能量与根际土壤的关系很大。由于温度的差异，一般认为生物固氮活性，热带地区比温带地区高得多。已报道的异养固氮菌，贝叶林克氏菌 (*Beijerinckia*) 主要分布在热带地区。而Becking报道，这可能不是由于温度的差异，而是某些其他土壤因子，如：pH或微生物之间的竞争的缘故。

3. 3. 土壤因子

3. 3. 1. 土壤类型的变化。Rinaudo等和Garcla等表明, 同一水稻品种生长在不同的没有灭菌的土壤中, 表现出不同的固氮能力。比如: 生长在Camargue土壤(法国) 17天的稻苗, 其乙炔还原活性比生长在Boudoun土壤(塞内加尔)高32倍。这些差异显然与土壤因子有关, 这也说明了土壤是环境的基本部分, 但它常常被忽视。当然进一步研究将需要说明引起乙炔还原活性变化的土壤化学和生物学特性的作用。如以上提到的那样。

3. 3. 2. 气体氮。浸水稻土似乎不利于生物固氮作用, 因为土壤中氮气的供应受到限制。

Takai等报道, 浸水后两星期溶于浸水土中的氮气一般是恒定的, 其后甲烷气体的数量增加了, 如果浸水土中种植水稻, 氮气将通过植物的气体输送系统送到土壤中。然而在没有水稻植物时, 氮气在浸水土中的分压有可能不能促进异养固氮菌的固氮作用。大气氮扩散到稻田水中而且进入到稻田表土中。根据Mogdoff和Bouldin报道, 氮气扩散的浓度在低于浸水土表面的6.6厘米深处时, 浓度在理论值上接近零。交替的浸水和落干提供了高效率固氮的有利条件, 因为它增加了氮气的分压。

3. 3. 3. 无机氮。不同形式的结合态氮在所有固氮微生物中(除解阻遏的突变型外)阻遏固氮酶的合成。Yoshida等指出160ppm的结合态氮加入水稻土系统中竞争性地抑制了乙炔还原活性。可利用氮、无论是氨还是硝态氮, 在50ppmN时, 大大地抑制根际土壤的固氮活性, 即使施用较低的结合态氮(10ppm尿素N)也受到影晌。当然结合态氮的作用比预想的更加复杂。根据Balandreau等的报道, 使用氮达到40ppmNH₄-N(120公斤N/公顷)时, 对水稻根际的乙炔还原活性没有抑制作用; 相反, 乙炔还原活性略有升高, 大概是由于分泌到土壤中的分泌物增多所致。Trolldenier同样发现, 使用氮达到140公斤N/公顷时, 根际乙炔还原活性增加了。由于水稻植物吸收结合态氮, 并全部用于他们的快速生长, 固氮酶的阻遏仅产生在生长的初期, 因此, 早期施氮肥有利于植物生长, 也并不妨碍生物固氮作用。

3. 3. 4. pH和除氮外的其他无机元素。实验室的试验表明, 纯培养的固氮菌的生长是依赖于pH值的。许多田间测量证实了这些结果: 固氮菌(*Azotobacter*)一般限于中性或碱性的土壤中, 而贝叶林克氏菌(*Beijerinckia*)最能忍受酸性条件。固氮螺菌(*Azospirillum*)主要出现在pH5.6—7.2的土壤中。pH在根际固氮活性上的影响还不甚了解, 田间测量提出, pH的影响比预料的少。

除无机氮外其他元素的状况, 也可以通过改变植物的分泌作用而影响固氮作用, 然而有关这方面了解却很少。磷含量肯定是一个重要的限制因子, 特别在贫瘠的土壤中, 与所报道的豆科植物相似。在泰国长期肥效的测定中, Watanabe和Cholikai观察到当水稻植物添加磷时, 其联合固氮活性增加了。Trolldeniev观察到, 缺钾会引起氧浓度和氧化还原电位的降低, 为固氮作用提供了良好的条件, 但在植物生长方面却存在有害作用。

3. 3. 5. 土壤氧和水状况。土壤水含量并不直接影响固氮作用, 但影响了气体的交换速度, 因此, 氧和水系的作用对固氮作用的影响是不能分开的。

固氮酶是厌氧的, 它们的所有体系中都存在着氧保护系统, 空气中的氧由水稻的气体输导系统运转, 大部分是由提供根际固氮菌有利条件的根组织呼吸作用而消耗。

Rice等发现, 好气—厌气界面的产生对于土壤—稻草混合物的固氮作用是非常重要的: 在2毫米的好气层中, 半纤维素和纤维素的分解产物通过界面扩散而支持了厌气层中梭菌

(*clostridia*) 的固氮作用。在这模型的系统和浸水水稻根际之间有些类似之处,后者所处位置是从叶到根部的空气扩散,其结果产生了好气和厌气界面。生长在厌气水饱和土壤中的水稻植物可以将氧输送到根部,因此产生了围绕植物根部氧浓度的梯度。很可能在这种梯度中,存在着一个对氧有不同形式保护作用的、最适于各种固氮菌大量生长及其活性的氧浓度的微环境。由于这种保护作用,除固氮菌属 (*Azotobacter*) 外,在许多自生固氮菌中都发育得不好,所以报道植物生长在水田根际的乙炔还原活性比旱田条件的报道多。水稻土中加入有机物促进了好气微生物的呼吸作用,并且增加了排出分子氧和降低氧化还原过程,创造了水稻土中厌气环境。通过水向土壤中扩散而提供的氮含量是很低的,只能满足土表的几毫米厚。Magdoff和Bouldin提出了有利于固氮作用的假设,认为当纤维素无氧分解产物遇到,诸如N扩散和干燥等好气条件时最好。

3. 3. 6. 能量供应。大量的固氮作用是取决于碳和能量的适当供应,当植物处于幼苗时期,根分泌物和根分解产物、根表层和表层细胞等是根际微生物主要的能量物质来源。随着植物的衰老,根脱落物可以提供固氮菌用以获得产能化合物的外部来源。足以说明,在生长中由植物根系活动所分泌到土壤中的有机物数量,因根损伤和其他微生物的存在而增加。

在没有灭菌条件下,生长的水稻根际产生可利用物质的数量报道很少。在IRRI,用同位素技术计算了IR8和IR22水稻根分泌物的数量,在开花初期,释放到土壤中同化的 ^{14}C 的百分比是1.9%和2.2%,在收获期为3.2%和6.7%。但这种碳量只表明碳是从根分泌物和根际土壤中获得,它不包括由根际细菌所矿化的碳。

Martin的数据表明,在分蘖初期和开花期之间转移到田间生长小麦根系的光合产物大约是1800公斤碳/公顷。估计在液体和其他化合物中存在的30%根部碳不能被微生物分解和迅速利用,将有1000公斤碳/公顷,可为微生物区系和微动物区系所利用。

异养固氮作用所需的碳量还有些疑问,但一般估计是30—40公斤碳/固氮1公斤。如果在浸水稻根系中的碳和氮数量与小麦处于同一数量范围,那末它们可获得异养固氮量25—30公斤N/公顷的最高限。每1000公斤可利用碳/公顷所得的实际固氮量是很少的,因为不只是补偿了根的呼吸作用,而且还诱导了不同细菌群体间对碳的竞争作用,其中许多是没有固氮能力的。

在水稻中,固氮菌在总微生物区系占有很大百分比,假如其他限制因子不阻碍这个过程的话,那末可以推测根际流出的大部分能量可以用于固氮作用。

在非根际土壤中的大多数异养固氮菌,依靠可利用碳物质作为它们区系的能量来源。在自然条件下,土壤中的有机质如:腐殖酸,不易快速分解。因此,新鲜的有机质如死的植物组织或根组织,进入到稻田中并留在土壤中,这将是水稻土自然环境中异养细菌固氮作用的良好能量来源。推测,水稻植物的总干物重是10吨/公顷(25%是根),保持在水稻田中的有机物,残余物大概有2.5吨/公顷。稻草非常有利于促进水稻田中异养细菌的固氮作用。用N-15技术测量田间土壤中的固氮能力是42—45公斤 N_2 /公顷,而稻草低于1%时的浸水土壤中为13—150公斤 N_2 /公顷。土壤中稻草5—20%时,固氮率高达500—1000公斤 N_2 /公顷,这个研究是在浸水条件下接种进行的。然而,在水稻田间这是不寻常的事情,因为假定1公顷含有200万公斤土,那末1%的稻草就需要20吨/公顷。

3. 3. 7. 固氮细菌和其他土壤微生物的相互作用。固氮细菌在有其他拮抗或协同微生物存在时,生长最旺盛。有关这种相互作用的大多数研究已在试管中进行。然而,某些

最近的观察和实验注意到, 发生在没有灭菌土壤中, 生长植物根际的过程。

某些数据提出了放线菌对固氮菌 (*Azotobacter*) 或贝叶林克氏菌 (*Beijerinckia*) 的拮抗作用。Roussos等指出了从生长在塞内加尔Sol gris的Moroberekan水稻内根际分离出具有固氮酶的细菌比例很低, 这可能是由于放线菌拮抗作用的结果。

放线菌对固氮细菌在根部群体的实际作用比想象的更加复杂。因此, Rinaudo等发现, 用两种放线菌接种到生长在没有灭菌土壤的水稻, 根际的乙炔还原活性降低25% (表6, 实验1)。但是, 当同样的放线菌菌种加上所用固氮菌组成混合培养, 根际乙炔还原活性比单独接种固氮菌时高75% (表6, 实验2)。实验1中乙炔还原活性的降低被解释为, 可能是放线菌间的拮抗作用和土著固氮微生物区系的作用。在实验2中, 混合培养时乙炔还原活性的增加是由于固氮菌和放线菌之间具有协同作用的结果。

表6 生长在未灭菌土壤(Sol gris)上Moroberekan水稻根际接种固氮菌(F4)和2株放线菌(A1和A15)的培育实验

接 种	ARA (nmol C ₂ H ₄ /小时·±S.E)	
	植物1株	克干根
实 验 1		
对 照	173±23	4640±900
A1+A15	130±83	3100±1950
实 验 2		
F4	132±34	3100±950
F4+A1+A15	234±176	5690±3850

S.E=标准误差。

根据Remacle和Rouatt的报道, 在大麦的早期, 分解果胶的细菌对于根和种子残留物的分解, 并且释放出可被利用的碳氢化合物, 因此, 促进了固氮菌 (*Azotobacter*) 的繁殖。这种促进作用, 可以在固氮菌和分解果胶细菌混合培养, 并接种在灭菌土壤中, 生长的水稻根际中观察到。有趣的是, 在检测从塞内加尔水稻根际分离处理的34个固氮螺菌 (*Azospirillum*) 菌株中, Diem等发现在所研究的菌种中有53%能利用果胶作为固氮物质。

其他土壤微生物可能包括在拮抗过程中。Rinaudo和Germai获得的结果表明, *Hirschmanniella*属线虫 (浸水稻的专性寄生虫) 能保持对浸水水稻土中非共生固氮的抑制作用。

3. 4. 总结

比较共生固氮系统和水稻根际固氮系统的差异列于表7。在水稻根际固氮菌明显地找到了一个有利的微环境, 但在植物生长和固氮微生物活性之间却没有紧密的关系, 大概因为他们保持与其他微生物区系成员的竞争作用。植物和固氮菌之间的松散的联合, 说明了这个系统对环境因素的影响是很敏感的, 因此是很不稳定的。所以目前在固氮方面的国际讨论会在推荐这种关系时, 常命名为“联合共生”, 将提交到“生物学协会”。

表7 豆科和根际固氮系统的比较

固氮系统	细菌种类	特性	细菌侵染	固定 1 μmolN 所需能量 (葡萄糖克分子)	氧保护	固定氮的利用方式
豆科—根瘤菌共生	根瘤菌	专性	细胞内	1	植物细胞和色素, 如: 豆血红蛋白	以 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的形式直接被豆科植物利用
根际固氮系统	许多属于不同的种, 常常与其他微生物联合	非专性	根表、老的或死根表层细胞和根残余物	3—4 (好气固氮菌) 8—10 (厌气固氮菌) 推测某些环境因子能提高效率 2 或 3 倍	根呼吸消耗 O_2 的保护作用	间接和部分直接被植物利用

4. 水稻土中固氮作用的调控

水稻作物的生产还不能完全不施用氮肥。然而在许多种稻国家中, 肥料的使用是极有限的, 增加生产, 实际是依靠稻土中的天然肥力。有关促进水稻生长的氮素营养的两个主要方面: (1) 水稻田中氮素含量, (2) 水稻生产中氮的效率。

另一方面, 充分供应化学肥料的种稻国家, 由于他们的环境问题和能源短缺问题, 为农业开拓可利用的生物氮源的可能性方面具有很大的兴趣。

为了增加氮素, 我们应该考虑改善环境条件以提高固氮作用。与自生和联合固氮相关连的各种因子已经讨论过了, 还应该对共生固氮系统加以考虑, 为了充分利用固定的氮在田间管理中, 防止通过淋洗或反硝化氮的丢失, 并用接种固氮细菌的方法促进水稻根际的固氮作用, 或筛选高固氮的水稻品种, 研究这些问题的年代已经到来了。

4. 1. 有机物的应用

日本的稻草直接利用于水稻田, 目前已广泛被日本农民所接受。1972年的研究表明, 日本水稻的平均产量, 谷粒为4.93吨/公顷, 稻草为4.89吨/公顷。稻草物质加到水稻田中, 将是固氮菌良好的能量来源。从腐烂的稻草中释放到空气中的二氧化碳, 能为作物用于光合作用, 随之可以影响水稻根际的固氮作用。

然而, 东南亚许多国家中, 存在着传统性地燃烧稻草防止水稻病害问题。Williams等报道, 甚至稻草增加比率到30吨/公顷时, 无论是燃烧还是加入任何水平的氮肥, 在5年内水稻收获的平均产量没有可测出的差别。

应用象稻草或纤维素那样的有机物, 会促进浸水土壤中的生物固氮作用。然而, 当水稻植物生长期中, 将有机物加到水稻田中固氮活性的实际测量却很少报道。Matsuguchi 所作田间实验指出, 利用稻草促进水稻土的固氮活性与每公顷加氮肥50公斤的结果相同。

Ponnamperuma报道, 稻草的加入将增加水稻土中的总N含量, 每季可达39—57公斤N/公顷。

4. 2. 联合固氮作用的促进

水稻植物的氮素营养与它的光合作用活性和碳代谢密切相关。当生殖期, 把碳供给水稻

根际, 这将是促进联合固氮菌的固氮作用一个非常重要的因素。有人提出, 一些水生系统和禾谷类作物可提供能量给异养的固氮菌。对于促使水稻植物提供能量的任何方法将被重点考虑和研究。Hale和Moore广泛地评述了影响根分泌作用的各种因子, 如: 植物、环境和化学药剂等方面的工作。

除自生异养菌的固氮作用外, 根际的联合固氮作用也能为使用于水稻田的有机物所促进。

为了水稻根际高固氮活性, 筛选有效的水稻品种是值得的。品种间的固氮活性好象是有所不同的, 根重和固氮活性之间的相关性是很大的。按照高光合作用活性、叶色深度或根氧化活性这样系统选育水稻品种, 将要进一步的探讨。

在生殖期, 固氮菌大量的微生物群落聚集在水稻根际。固氮菌聚集在根组织内和根表与水稻植物紧密联合。然而, 还没有报道固氮菌专一紧密地与稻根的结合。某些细菌诸如固氮含脂刚螺菌 (*Azospirillum lipoferum*) 人工接种一些牧草, 增加了牧草的产量。目前也曾报道, 用固氮巴西螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 成功地接种于玉米或小麦。关于水稻, 除Gauthier和Rinaudo外, 只有很少人进行研究。这些作者表明, 应用32个不同的固氮螺菌 (*Azospirillum*) 种接种生长在试管中3周龄的水稻幼苗, 其根际的乙炔还原活性显然不同: 在未灭菌的塞内加尔的Sol gris中, 根际的乙炔还原活性或者增加 (+60%) 或者减少 (-80%)。这个反应随土壤类型不同而异。另一个实验, 用同样的实验设备进行, 表明用固氮巴西螺菌 (*Azospirillum brasilense* sp.7) 接种, 大大促进了植物生长, 但这种促进与乙炔还原活性无关 (表8)。因此, 设想固氮螺菌 (*Azospirillum* sp.7) 产生刺激生长的物质。但是, 到现在为止, 在幼苗情况下所观察到的这种接种有益的作用, 在大规模实验中还没有观察到。在后来的实验中, 缺乏这种反应还归因于接入的固氮螺菌 (*Azospirillum*) 种被竞争作用所抵消的结果。这一过程在小的设备中不会发生, 实验是接种培育与本地的微生物区系作了大量比较的。

表8 接种固氮巴西螺菌 (*A. brasilense* sp.7) 的土壤对3周龄的Moroberekan水稻幼苗乙炔还原活性和生长的影响

土壤	接种	ARA	植物生长	
		($\frac{\text{nmol C}_2\text{H}_4}{\text{小时, 株}}$) \pm S.E	地上部分 mg/植株 \pm S.E	根部 mg/植株 \pm S.E
Sol gris	0	60 \pm 56	48 \pm 18	68 \pm 11
	+	50 \pm 21	136 \pm 13	85 \pm 12
Bel Air	0	200 \pm 33	75 \pm 14	45 \pm 5
	+	322 \pm 146	106 \pm 17	47 \pm 3
Eoundoum	0	61 \pm 16	62 \pm 15	48 \pm 7
	+	47 \pm 31	125 \pm 18	87 \pm 9

S.E=平均标准误差。

4. 3. 田间管理

保持浸水条件的土壤, 似乎是水稻土中氮素积累的关键。流水休耕在Maahar粘土中, 平均每季增加总N含量为50公斤/公顷。水稻植物在根际固定的氮, 迅速地转移到植物组织中去。在生殖期, 水稻根际的固氮作用, 在水稻的氮素营养方面起到了作用, 因此对水稻产量也有所贡献。

水稻谷粒产量与水稻植物生殖期的氮素含量直接相关，它决定单位面积小穗的数量和谷粒成熟率的平均值。在日本，水稻植物籽粒的产量很高，一般在孕穗期后，繁殖期吸收总植物N的30—40%。现在日本农民在生殖期把氮肥施到水稻田中。在孕穗初期到抽穗期之间使用氮在日本被称为“进行期”，而在抽穗期到成熟之间被称为“敏感期”。

然而使用氮肥明显地抑制在根际的固氮菌及固氮螺菌 (*Azospirillum*) 的活性。Troll-deniev报道了使用N、P或K在水稻田的长期肥效试验能大大地促进水稻根际的固氮酶活性。用已知固氮酶解阻遏的突变固氮菌菌株接种，这种突变种甚至在氮存在时也能产生固氮酶，释放大量的固定态氮，可能对于促进施用氮肥的水稻田中的固氮作用，是有意义的。

在水稻生产中，应该使用不抑制生物固氮活性的化学肥料，以及某些对土壤中异养固氮菌有很少影响的农药。要仔细地观察它们在水稻中的效用。因为共生固氮作用大大地影响着豆科植物的生产和土壤的氮素肥力，所以一直被认为它是农业生产中最重要的生物过程。豆科作物与水稻作物的间种或混种，可以促进水稻田的氮素积累。豆科作物能在浸水土壤条件下生长，增加土壤氮，这将是值得研究的课题。

4. 4. 总结

生物固氮研究的目前进展，正在揭示水稻田中氮素在自然环境中的机理。然而，他们只是回答了为什么近几年来稻农通常不用氮肥能生产水稻的问题。

在种稻国家中，在缺乏能源的情况下，为了生产更多的水稻以供给人口增加的需要，就应该了解促进水稻土中固氮作用的田间管理。遗憾的是，还没有实际可行的固氮技术。希望技术革新将很快地解决这个问题。同时考虑到田间管理的实践，如在避免抑制土壤细菌固氮活性方面的肥料和其他农业化学药剂的使用或水的控制等等，将是非常重要的。

5. 结 束 语

目前科学家只是了解到水稻田为什么长期能保持他们的氮素肥力。本文阐述了固氮研究的简单经过，证明了在自然条件下，异养固氮作用在水稻土中保持氮素肥效的重要性。然而，光合固氮菌和异养固氮菌对水稻氮素营养的实际贡献还不很清楚。显然是依赖于水稻的环境条件，植物的生长情况或某些其他因素等。

在浸水稻田中，异养固氮作用主要的限制因子是作为能量来源的有机物的供应和稻田中氮气的供应。水稻植物的存在显然是最重要的因素。水稻根际的最高固氮活性是在植物的开花期，正象在根瘤活性一样。在这个时期，水稻植物根系已经发育成了，并且在干重、表面积和空气输导系统方面都达到了最佳值。浸水土壤创造了独特的生态部位，所谓的在土壤表面和水稻植物根际之间的好气—厌气界面。这个生态部位在稻田的异养固氮作用看起来很重要。

水稻根际固氮作用的微生物学研究，将促进对固定氮气有巨大贡献的固氮菌的鉴定。它不象在豆科—根瘤菌之间的关系那样专一地结合于水稻根部的细菌种类。

近年来，高固氮的品种选育，用联合固氮菌接种种子，或创造异养固氮作用有利条件的稻田管理措施等等，对于促进水稻田生物固氮的作用等都将要进一步进行探讨。

原载 “Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity”

pp. 75—107, 1982

李 信译 尤崇杓校

异型胞中的固氮作用

P. Fay

导 言

自从十多年前提出异形胞是几类蓝藻(又名蓝细菌)固氮作用部位的见解以来(Fay等, 1968), 异形胞的研究已经日益引起科研工作者的注意。最重要的是对这些可能是最古老的分化(异形胞细)的发育、组成和功能的有了进一步的认识, 而有关异形胞研究的创新论文和综述也比过去显著增加。

本文只限于讨论有关促进异形胞中固氮过程理解的一些发现, 读者如需要对异形胞生物学更进一步的了解可参阅最近综合评论。此外, 还可参阅有关异形胞的发育和藻类固氮的更专门的评论。

异形胞种类可能是蓝藻中固氮作用的最重要代表, 固氮作用不限于异形胞类型, 偶而也存在于异形胞之外。存在空气时, 只有产异形胞的种类才能固氮, 这是对环境中缺乏化合态氮的反应。例外的是粘球藻属(*Gloeocapsa*, *Gloeotbece*)中少数近缘的非异形胞种类。虽然后者能在低光照强度(容许低光合放氧率)和好气条件下固氮, 然而它们在氮气中生长得很慢。相反的是在海洋丝状体非异形胞类束毛藻属(*Trichoolesmium*)、颤藻属(*Oscillatoria*)的天然群体中已测得高固氮率, 只是其固氮能力尚无确证。

Stewart和Lex(1970)首先证明在没有异形胞的丝状体种类鲍氏织线藻(*Plectonema boryanum*)中能合成固氮酶, 这种藻类能在无化合态氮和低氧压条件下生长(培养悬液连续通入含有氩气和二氧化碳的混合气体)。近来在广泛筛选缺氧条件下合成固氮酶的非异形胞种类(属于色球藻目Chroococcales, 宽球藻目Leurocapsales, 颤藻目Oscillatoriales)时, 已发现131个供试种类中有52个(占40%)能还原乙炔, 但是没有一个能在通气条件下无化合态氮而能光合生长, 这可能是由于固氮酶暴露于氧气中即迅速而不可逆地丧失活性之故。

有一些间接证据支持下述见解: 当丝状体培养在低氧压时, 异形胞种类中的营养细胞(除异形胞以外)也能合成固氮酶。然而, 也有一些反对这种见解的异议, 例如当藻类随后暴露于空气中时, “厌氧”固氮酶活性并非迅速而显著地受到不可逆地抑制; 在微通气条件下, 二氧化碳固定和氮素固定之间并没有引起光化学的“同化力”竞争; 厌气生长导致固氮酶活性增加2.5倍, 而如果所有营养细胞都合成固氮酶, 则可望更高(20倍以上)(见表1)。固氮酶活性的增强可归因于在低的氧分压下酶功能更为有效, 也归因于藻类的氮饥饿(当培养物中通入氩气及二氧化碳时即会发生)激发异形胞的形成和固氮酶合成。有些研究者断定, 当丝状体在大气条件中生长时, 固氮酶存在于所有细胞中。然而, 最近似乎趋于一致的意见时, 在好气条件下大多数(如不是全部的话)固氮酶活性是位于异形胞中。

在无游离氧或低氧压时, 非异形胞类型中有固氮酶合成已有确证, 然而有关这种合成的天然存在的范围大小以及蓝藻厌氧固氮的生态学意义方面的知识还很少。在自然界中, 厌气

表1 *Anabaena cylindrica*的完整丝状体的乙炔还原

(引自Smith和Evans, 1971)

生长条件	测定时的气相 (大气压力)	nmol C ₂ H ₄ ml悬液/分钟	与厌气测定 比较被抑制 (%)
空气生长	0.9N ₂ + 0.1C ₂ H ₂	21	—
(95%空气	0.9Ar ₂ + 0.1C ₂ H ₂	20	—
+	0.9空气 + 0.1C ₂ H ₂	16	24
5%CO ₂)	0.9O ₂ + 0.1C ₂ H ₂	0	100
氮气生长	0.9N ₂ + 0.1C ₂ H ₂	55	—
(95%N ₂	0.9Ar ₂ + 0.1C ₂ H ₂	53	—
+	0.9空气 + 0.1C ₂ H ₂	37	32
5%CO ₂)	0.9O ₂ + 0.1C ₂ H ₂	0	100

条件占优势而光强度足够光合生长(在补偿点以上)的生活类型相当稀少。而且,环境条件(包括氧压)迅速变化可能引起固氮酶不可逆地破坏,因而限制种的增殖潜力。因此,虽然厌氧固氮(术语叫氮输入)的生态学意义是可疑的,但它在较特殊(如富硫)生态区域中仍然是一个重要固氮资源。

过去十多年的研究,已经消除了早先对于异形胞是固氮主要功能的特异细胞这一概念的怀疑。已有足够证据说明异形胞的生化和结构转化具有这样一种性能:成熟的异形胞成为执行氮素固定重要功能的良好工具。因此,异形胞不仅保持一个中心固氮系统,而且包含有以下功能顺序的机制:

- a) 提供一个对酶功能最有效的微环境;
- b) 产生固氮所需的能量和还原剂;
- c) 固定氮素成为有机化合物;
- d) 通过异形胞和营养细胞的分隔膜,为碳素输入和氮素输出保持一个双重运输体系。

异形胞的上述生理功能,为讨论异形胞固氮的有用资料提供一个合适的框架。

异形胞发育和固氮酶合成

当蓝藻在氮素有限条件下活跃生长时,营养细胞通过转化形成异形胞。在异形胞存在和固氮能力之间有一个直接相关性的基本观察,形成了异形胞是固氮作用部位的概念。虽然,可给态化合氮趋向于抑制异形胞的形成(和固氮酶的合成),但抑制只是部分的,除非培养基中的氨态氮浓度过高(高于 3×10^{-4} 克分子)。因此,在异形胞中固氮作用能够伴随营养细胞对化合态氮的同化而继续进行,这显然赋予这些藻种以明显的生态学优势能力。

异形胞发育的研究能方便地用一种含有未分化的丝状体作为研究材料,这种材料是生长在氨浓度足以完全抑制异形胞发育时产生的。当从此种未分化的菌丝体中去除氨时(即转化到不含化合氮的培养基中),异形胞才得以形成,这就便于结合异形胞发育进行生化、超微结构和生理变化的研究。

营养细胞转化成异形胞的特点是:贮存产物的溶解,细胞内膜体系的形成、蛋白质降解

和新蛋白质合成、多层包膜的沉积和在异形胞与邻近营养细胞之间高度特殊接触或“孔”区的形成。

贮备物的代谢

细胞内含物〔聚磷体、淀粉粒、脂肪滴、蓝藻素颗粒、多角体或“羧基体 (Carboxysomes)〕的多样性是蓝藻的特征并与其营养细胞的颗粒状外形密切相关 (图1a)。这些贮存物质能使细胞在长期营养缺乏时维持生活。

Lang (1965) 和Kulasooriya等 (1972) 已揭示, 在异形胞形成时, 细胞内含物含量的变化有一特有的顺序, 而在发育完全的异形胞中内含物几乎完全消失 (图1b)。在细胞分化的早期聚磷体的消失在光学显微镜下显而易见。在胆蛋白色素消失后, 含氮蓝藻素颗粒也溶解, 其功能为贮存蛋白质并在光合作用中对光的吸收和透射有重要作用。多角体在异形胞发育后期溶解。当氮素耗尽的初期, 所有细胞中的淀粉粒数量都有增加, 这表明在缺乏可吸收氮源时光合作用通向碳水化合物的合成。当光合类囊体在异形胞中散开时, 淀粉粒和脂肪滴在转化细胞周边聚积 (图2a); 随同异形胞发育的完成, 这些颗粒也消失。

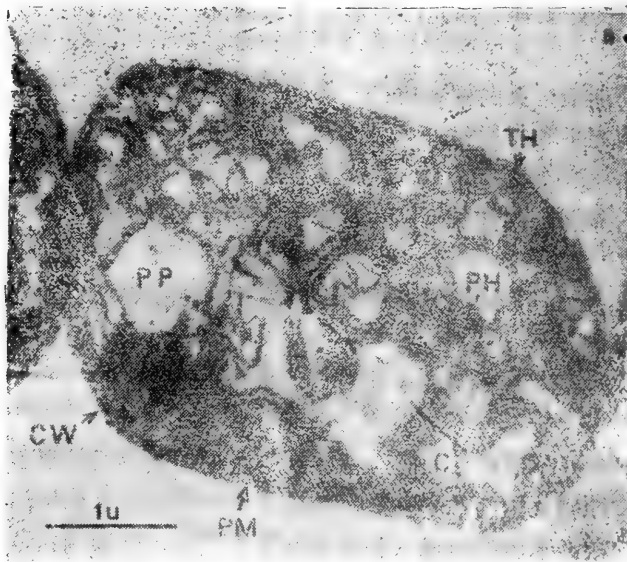


图1a *Anabaena cylindrica*的营养细胞的超微结构特征, 显示细胞壁(CW), 原生质膜(PM), 光合器(类囊体TH)和各种细胞内含物〔聚磷体(PP); 多角体(PH); 藻蓝素(C)〕

引自Vasconcelos和Fay (1974)的电子显微照片图3。

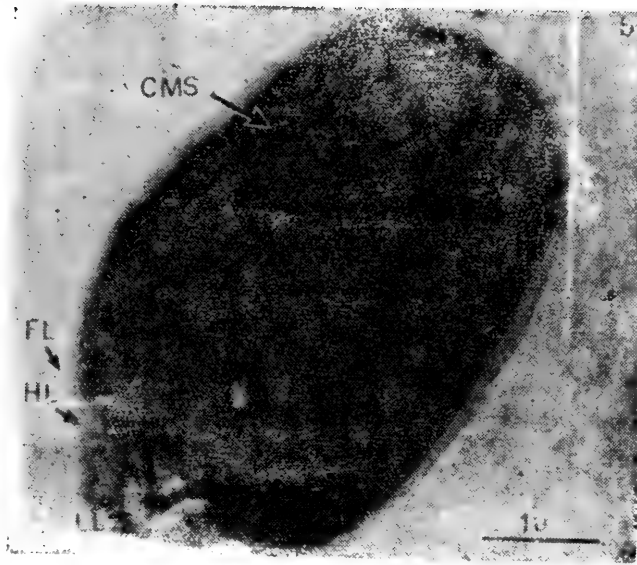


图1b *A. cylindrica*的成熟异形胞围着多层外膜：（纤维层FL；同质层HL；薄片层LL）显示精细的细胞质膜体系（CMS），缺少颗粒内含物
引自De Vaseoucelos和Fay（1974）电子显微照片图3。



图2a *A. cylindrica*的发育中的异形胞，说明类囊体结构的破散并在细胞周边累积多聚糖颗粒（PG）。在异形胞和营养细胞之间的隔膜（S）显示微胞质孔
引自G. Hatfull（未发表）的电子显微照片。

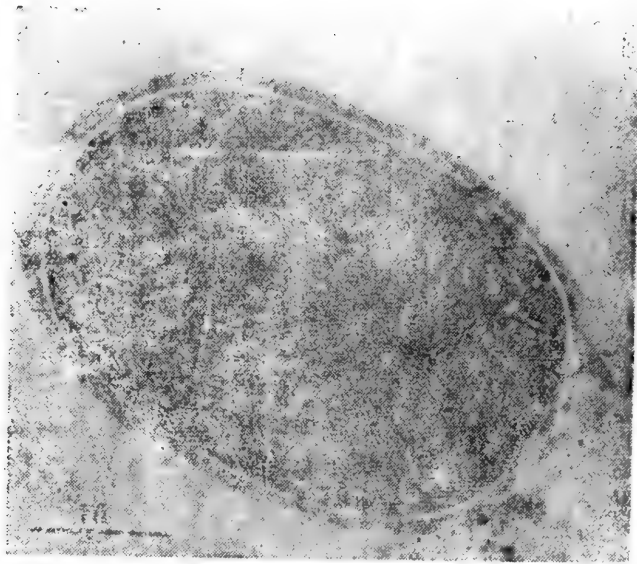


图2b *A. cylindrica*的发育中的异形胞，表明在质膜下累积脂肪(L)。

引自G. Hatfull (未发表) 电子显微照片。

细胞质膜体系的转化

当异形胞分化时，细胞质膜体系发生广泛变化。营养细胞的光合类囊体破碎并呈典型的周边排列，而一个新的，精细的汇合膜体系形成并伸出细胞外(图1a和1b)。它可以根据联结膜的紧密空隙和孔道下“蜂窝”状扭曲膜而加以识别。

可以想象，细胞质膜体系的结构转化以及“羧基体(Carboxysomes)”的溶解和蛋白质降解(见下述)，是和异形胞的色素和脂肪组成的变化一致的。一般在分化的细胞中缺乏光系统II的活动，随之产生固氮作用新功能(见下述)。

蛋白质降解和新蛋白的合成

Wood和Haselkorn(1976)最近证明，鱼腥藻属(*Anabeana*)的一种蓝藻的异形胞和营养细胞在固氮条件下都没有蛋白水解活性。可能在两种类型细胞中，是一个单一酶负责这一活动。在藻体转移到无化合氮的培养基以后，营养细胞中的蛋白质很少降解。在营养细胞中含有35种主要蛋白质中的17种，但在异形胞中都消失了，其中大部分(17种中的16种)似乎在异形胞发育的早期即分解了。消失的蛋白质之一是核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶，这是光合戊糖磷酸化途径的关键酶类。蛋白水解活性似乎是引起分化细胞特有的基本变化的重要因素。

灰色念珠藻(*Nostoc muscorum*)异形胞发育的早期特点是营养细胞蛋白质迅速转化。在固氮条件下生长时，很少蛋白质是在营养细胞和异形胞中同时合成；而在丝状体由含氮态氮的培养基中转移到无氮培养基中以后，蛋白质合成形式质的差别即很快确定了。已经看出，固氮酶的蛋白质组成成分是在早期合成的，早在异形胞分化后期可测出固氮酶活性之前

即已合成。

氮素丧失和缺钼的效果

当预先生长在化合氮中的异形胞藻类丧失可同化氮源时，可观察到藻体结构和生物化学转化（可溶性和特有的氮源分解，淀粉和脂肪的同化）的初期典型缺氮特征。这可以在异形胞发育初期的细胞碳：氮比率由4.5：1升高到8：1的逐渐增加中明显地反映出来。当发育的异形胞大部分蛋白质降解并可能输出含氮物质到营养细胞中时，营养细胞中的代谢和生物合成活动能维持到异形胞发育完全，新固定的氮可继续供给以维持细胞生长。然而，如因某些原因这些固氮物供应不上，那只有指望氮素贮存物的分解，而异形胞分化过程将扩大到丝状体内更多细胞。当藻类培养在无氮素的气体（含氩和CO₂）中而固氮受到阻止时，上述现象即会发生。在这样的条件下，异形胞形成和固氮酶合成率继续增加，而营养细胞的发育有严重缺氮特性。

不给藻类供应固氮酶重要组成的钼，即引起氮饥饿的类似症状。在这种情况下，除异形胞增加外，固氮活性同时降低。固氮酶合成显然因缺钼而受到阻抑（图3）。重新供给钼，固氮酶活性即迅速增加而缺素藻体即很快恢复生长。可以推测，藻体在缺钼时还继续合成酶原（组分1），它可以迅速结合加入的金属以获得完全的催化功能。与此类似的固氮菌（*Azotobacter vinelandii*）和鲍氏织线藻（*Plectonema boryanum*）的缺钼细胞中组分1蛋白质合成迅速活化，为这一假说提供了论据。

异形胞外膜和孔道

外膜是多层结构，在先产生的细胞壁外部沉积而成。细胞壁似乎是原生质膜和新形成的外膜之间的不变条件。外膜分三层，最外层是纤维质，中层是均质体，内层是薄片层；这三层在异形胞发育时顺序形成。薄片层的形成和固氮活性的显示一致，可能标志着异形胞发育的完成。

除异形胞和营养细胞接触点以外，外膜伸展盖过整个异形胞。在接触点处外膜收缩结合着孔道形成一狭窄的颈样凸出物，外膜在此处膨大增厚，然后向细胞中部又逐渐减薄。越过横隔膜，异形胞的质膜和营养细胞联结处以一个称为“微质膜孔”（microplasmodesma）的细孔道相联，此处被认为是细胞内溶液运输和代谢产物交换的渠道。

微质膜孔的存在已为 *Anabaena cylindrica* 的冰冻蚀刻制备样品所证实。在两个营养细胞之间有300个微质膜孔穿透过隔膜，而在异形胞和邻近的营养细胞之间只有50个微质膜相联。它们约为800Å长和80Å宽（约为真核微质膜孔直径的1/3）。它们在原生质剥蚀面上显示

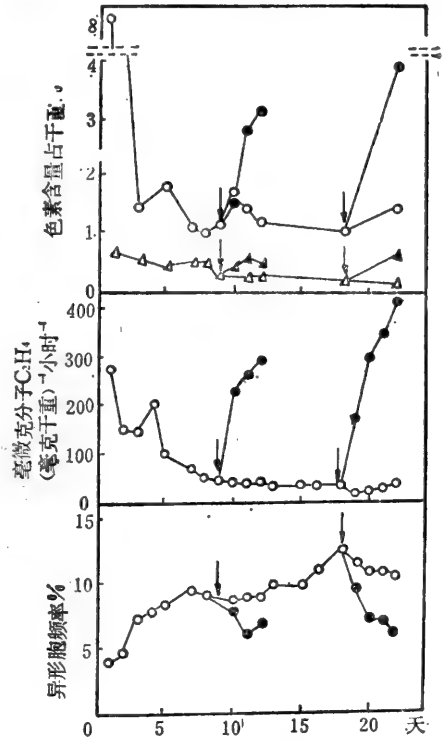


图3 缺钼（空心标记）和继后供钼（实心标记）对 *A. cylindrica* 的 (a) 色素含量（叶绿素，三角形标记；藻蓝素，圆形标记），(b) 固氮酶活性及 (c) 异形胞产量的影响
(引自Fay和De Vasconcelos, 1974, Arch. Mikrobiol 99, 221; 图1)

出凸起点，而在外质膜剥蚀面上显出凹窝，可能是由分开的孔道构成，作为相邻细胞间质膜空间的桥道。

冰冻蚀刻的研究揭示了在异形胞和营养细胞的质膜中质膜粒的浓度、粒子大小及分布不同。这可以说明在异形胞分化过程中，质膜组成和功能的变化。

固氮酶的氧保护作用

固氮酶的催化反应是一个厌氧过程，而无论是从严格厌气或好气中提取出的都对氧极端敏感。不管是从异形胞或非异形胞蓝藻中取得的固氮酶，一旦暴露于氧气中都同样迅速失活。在放氧的光合生物中所产生的固氮酶对氧敏感，被认为是支持这种假说的负证，因为此种假说认为在固氮蓝藻和异形胞中必然有某些保护机制起作用，它在光中不放氧而保持一个固氮的还原环境。在异形胞中这些作用是如何实现的还很少了解，虽然我将在这一节中尽可能引用资料讨论一些主要因素。

异形胞外膜的功能

异形胞外膜高度特异化的功能以及异形胞的精细极孔区是一个颇费思索的课题。Winkenbach等(1972)发现筒孢鱼腥藻(*Anabaena cylindrica*)异形胞的薄片层是由甘油脂肪组成，并提出由于这一层是有疏水性的，可能作为对于如固氮产物之类的亲水分子运动的障壁，因而限制其运动在孔道中通过微质膜孔输到邻近营养细胞，并阻止它从异形胞中渗漏。然而，Granhall(1976)报告鱼腥藻属中一个种的异形胞的薄片层是纤维质的。这和Wold及其同事的发现相抵触，因而引起蓝藻中纤维素的古老争论。Granhall(1976)还发现在以纤维素酶处理丝状体以后，固氮酶活性降低；并提出纤维质的薄片层在异形胞中具有保护氧敏感固氮酶的氧障作用。这就要提到Stewart的一个早先见解，他认为外膜可以降低氮气和氧气的扩散率，覆盖在异形胞表面以达到固氮酶与 N_2 充分饱和的水平，并藉助于呼吸率的增加以肃清异形胞中的氧气。然而，有关异形胞外膜功能的任何说法尚无确证。

异形胞中的呼吸活性

Fay和Walsby(1966)早先发现的异形胞具有一个活动呼吸系统已经由试验完全证实，然而和异形胞中的实际呼吸率还有差距。这可能是由于在离体异形胞中测定的活性和在完整的丝状体测定的活性不同之故。异形胞经分离后可能影响代谢活性有两个主要方面的原因：首先，所有用机械力量从营养细胞中分离异形胞的方法都会对异形胞造成伤害，因而很大可能会影响到离体细胞的生理活性；其次，由于异形胞不能固定 CO_2 （见下面）并依靠营养细胞供给呼吸基质，在异形胞分离前具有的基质贮存量可能会决定离体异形胞呼吸率及持续时间。在离体异形胞中的氧吸收由于NDAP⁺的加入和氧化戊糖磷酸化途径（葡萄糖-6-磷酸，果糖-6-磷酸或6-磷酸葡糖酸）的关键中间体以及异柠檬酸和丙酮酸的加入而得到加强。这似乎表明，呼吸基质在异形胞分离前供给不足或在分离过程中已从异形胞中渗漏出。最近，Peterson和Burriss(1978)已测定了用较温和的酶解方法分离出的异形胞中的氧吸收率和氧氢反应（见更下面），比完整的丝状体中观测的高两倍。他们同时指出，由一个细胞色素呼吸转移系统行中间反应，而以一个氧化酶终止反应。虽然在异形胞中呼吸的主要功能是产生固氮还原当量（见更下面），但在呼吸的氧消耗同时从酶作用部位清除氧，结果和在好气性固氮细菌中一样，能保护固氮作用不受氧的失活作用影响。因此，在异形胞的固氮作用中，有效的呼吸系统似乎是有两个重要功能。

异形胞中的还原条件

早期的研究者认为异形胞是无明显功能的结构。这种观点第一次为异形胞比营养细胞还

原 2, 3, 5-三苯氯化四唑 (TTC) 更有效的报道所动摇了。此后, 异形胞中存在强还原条件又为其他细胞化学反应所证实。这些反应表明, 异形胞中有显著的脱氢酶 (或细胞色素氧化酶)。虽然, 在营养细胞中四唑盐还原率是随微好气培养 (在光合作用中放出氧不断移去) 而增加, 但仍低于异形胞中的同类作用, 这可能是由于在三苯氯化四唑和氧之间继续有电子竞争之故。应用一个不同的氧化还原指示剂 (硝基-蓝氯化四唑), 它在更早的黄素蛋白电子转移水平接受电子, 显示出沿着异形胞丝状体存在着一个电子梯度, 说明在异形胞, 原异形胞及其邻近的营养细胞中有最强的还原条件。这支持 Wolk 和 Wojciuch (1971) 的一个早年见解: 营养细胞可能大大有助于提供异形胞的还原条件。

异形胞有强还原条件的主要理由无疑是缺少放氧光合作用。有大量不同证据支持异形胞缺乏光系统 II 的论点:

- a) 异形胞在有光照时不固定 CO_2 ;
- b) 异形胞在光中不能放氧;
- c) 异形胞缺少和已知光系统 II 反应相结合的光合重要色素 (c-藻蓝素、阿罗藻蓝素、c-藻红素、叶绿素 a_{880});
- d) 异形胞产生叶绿素 a 荧光少而且在产生荧光时没有光还原变化;
- e) 异形胞没有希尔 (Hill) 反应活性;
- f) 异形胞缺乏镁, 这是包含在水光解中的光系统 II 的重要成分;
- g) 与营养细胞相比, 异形胞显示出还原戊糖磷酸化途径的两个重要酶 (核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶和甘油醛 3-磷酸脱氢酶) 的活性很低并缺少多角体 (这被认为是羧化酶的贮存形态)。

异形胞中固氮酶的存在

早在六十年代支持关于蓝藻异形胞中含有固氮酶的概念已有大量直接证据, 然而检验这一假说的打算直到发现分离异形胞的合适方法才得实现。最先的尝试是在柱胞鱼腥藻 (*Anabaena cylindrica*) 的离体异形胞中 (培养在充满大气条件下不加辅因子), 以 ^{15}N 结合说明之。结果虽然失败了, 但是关于异形胞生理、生化和超微结构的进一步资料完全符合固氮功能的假说, 并已被认为是证明这一假说的描述。

固氮活性的论证

固氮酶生化特性的更多知识和测定酶活性的更灵敏乙炔还原技术应用的新发展, 鼓舞了科研人员进一步的尝试。Stewart 及其同事于 1969 年成功地证明, 在严格厌氧条件下分离并提供有能源 (ATP) 发生系统和人工还原剂 (连二亚硫酸盐) 培养时, 异形胞有固氮酶活性。尽管固氮酶活性率相对地低, 但在成功地试验过程中不仅在异形胞中已证实有乙炔还原活性, 而且还有较高还原率。离体异形胞在氢气和光照过程中, 甚至不需外加辅因子也能还原乙炔, 虽然加入后者、特别是在暗中, 乙炔还原效果更显著。

应用 ^{15}N -氮素试验作为测试异形胞和营养细胞之间固氮分布的踪迹, 没有得到明确结果。完整的 *A. cylindrica* 丝状体在富含 ^{15}N 的氮气中经过 5—120 分钟, 然后将丝状体放在一个 French 压机的杯中受压, 以分开营养细胞并分离出完好的异形胞。结果发现, 从离体细胞和营养细胞中提取的 ^{15}N 丰度处于不同水平, 表明二者之间固氮量相等和效率不同, 或者异形胞中的固定的氮素迅速转移到营养细胞中。此外, 试验受损失很大可能是在分离过程中从异形胞中渗漏。

Wolk 等 (1974) 改进了测定技术, 将细胞置于短半衰期 ($T_{1/2} = 10$ 分钟) 放射性 ^{13}N 示

踪氮中,并以放射性自显影测定 ^{13}N 的结合。结果发现,在异形胞中放射活性最高,在邻近营养细胞中的活性高于离异形胞较远的。这一观测结果最好的解释是,先在异形胞中固定的 ^{13}N 沿着丝状体逐个细胞向外迅速转移。他们认为,在完整的*A. cylindrica*丝状体中,至少有25%的 $^{13}\text{N}_2$ 固定在异形胞中。

体内固氮酶活性恢复程度

假定固氮酶不限于在异形胞中,而且多数也在营养细胞中,那么可望在异形胞部分离体后,完整的丝状体内原有固氮酶活性恢复不超过5—10%,这相当于在*A. cylindrica*和相近藻类生长在无化合氮培养基中出现的异形胞平均频率。事实上,计算表明在完整的丝状体中至少有13—30%固氮酶活性是在异形胞中测出的。如果在丝状体中所有细胞的固氮力相同,这比原期望的高得多。这种计算还没有考虑到从破坏细胞中释放出的酶活性的损失。因此,这似乎便于解释从总的丝状体提取物中分离出的异形胞固氮活性的恢复。*A. cylindrica*的异形胞和营养细胞提取物之间固氮活性的分布说明:1)分离过程影响完整丝状体中原有活性的50%,2)其余90%活性在异形胞的无细胞提取物中得到恢复。显然,这些数据足以说明异形胞是固氮活性主要的、很可能是唯一的部位。

表2 *Anabaena cylindrica*的异形胞和营养细胞之间固氮酶活性的分布。包括 MgCl_2 , ATP—发
生系统和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的混合反应

(引自Tel-Or和Stewart, 1976)

材 料	全部活性 ($\text{nmol C}_2\text{H}_4$ /分钟)	原有 活性 的%	全部无 细胞液 的活性%	比活性 ($\text{n}\cdot\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{mg}$ 蛋白质/分钟)
完整丝状体	36.00	100.0	—	0.194
全部丝状体提取物	18.36	51.0	—	—
营养细胞提取物	1.76	4.9	9.6	0.008
异形胞提取物	16.60	46.0	90.4	0.680

固氮酶蛋白的凝胶电泳分离和鉴定

Fleming和Haselkorn (1973; 1974)用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离并分析了灰色念珠藻(*Nostoc muscorum*)在异形胞分化和固氮酶合成期间的异形胞和营养细胞中含有 ^{35}S —硫化物中产生的 ^{35}S —标记的蛋白质(丝状体随后从含化合氮培养基转移到无氮培养基中)。他们鉴定了分化和未分化丝状体,发现只有异形胞中有三个蛋白质段带而营养细胞中则没有。经比较,三段中有两段已鉴定为具有固氮菌(*Azotobacter*)的结晶钼铁蛋白带,而第三段带蛋白质的分子量和梭状菌(*Clostridium*)铁蛋白相同。因此,从电泳法研究所得结果和早先讨论的酶分析结果一致。

藻固氮酶的特性和组分

蓝绿藻中的固氮酶活性所需的基质和辅因子与细菌固氮酶类似。ATP的适宜浓度在2—10毫克分子之间, Mg^{++} 合适浓度约为5毫克分子,连二亚硫酸盐在2—5毫克分子之间。 Mg^{++} 能被 Mn^{++} 和 Ca^{++} 所取代,然而耗费还原效率。*Anabaena cylindrica*的部分纯化酶的比活性为每毫克蛋白质每分钟50—100毫微克分子乙烯(和细菌固氮酶测定结果比较)。*A. cylindrica*的组分I蛋白(Mo - Fe 蛋白)能与从*Chloropsendomonas ethylicum*或从*Clostridium pasteurianum*中取得的组分II蛋白互补,但反交叉互补没有活性。反互补效率很低的

原因不明,但可能是组分中氨基酸成分和结构不同的结果。

异形胞中固氮酶—氢酶相互关系

近来,对固氮蓝藻的氢代谢的兴趣有一高潮,根据Dixon (1972) 和Schubert及Evans (1976) 早先设想,好气性固氮细菌中固氮酶和氢酶之间的联系可能用于放氢的再循环,因而可回收在固氮作用正常过程中损失的还原剂和能量。

氢酶的类型

在多种不同微生物(包括自养和异养、厌氧和好氧细菌、蓝藻和真核藻类)中都有催化



可逆反应的酶。根据对它们的生化特性的试验研究,似可归纳为三种不同的酶:

a) 所谓“经典的”氢酶,催化细菌和藻类中吸氢和放氢的可逆反应。这种“可逆”氢酶是不需ATP的,对一氧化碳敏感并易为 O_2 失活,但 N_2 对它无效。Fujita等(1964)报告在*Anabaena cylindrica*的加 H_2 的细胞中有这一类酶。

b) 固氮微生物的固氮酶催化的不可逆放 H_2 反应,这一反应是需ATP和还原剂的,对一氧化碳不敏感,但可被乙炔和 N_2 所抑制。然而,即使在100%氮气中, N_2 抑制也并不完全,因而伴随着固氮酶活性总有一定 H_2 的释放。固氮酶放氢是由于缺乏其他还原性基质(如在氢中或被CO抑制的其他基质还原时的蛋白质还原作用)。

c) 几种好气固氮细菌和蓝藻具有一种所谓“吸收”或不可逆氢酶,它只能在有适宜电子受体时催化 H_2 吸收。它的功能似乎是在固氮酶催化放氢时重新利用丧失的还原力。

异形胞固氮酶的放氢

Haystead等(1970)首先报道了从*A. cylindrica*中提取的固氮酶催化氢释放。生长在固氮条件下的丝状体的提取物,当它培养在含有ATP和还原剂(连二亚磷酸盐)的氩气中时即释放氢。已发现在*A. cylindrica*的完整丝状体中氢释放对一氧化碳不敏感,但能被 H_2 阻抑。然而在一氧化碳和乙炔同时存在时,放氢率大大提高(见下面)。

这一假说的另一证据是,在一个固氮酶催化反应中所释放的氢,正是所发现的对去偶联剂和电子传递抑制剂有同样敏感程度的氢释放作用和乙炔还原作用。 O_2 的大气浓度或N-(3,4-二氯苯)NN-二甲基脲(DCMU)处于对光合固定 CO_2 和放 O_2 的抑制浓度时,对*A. cylindrica*的完整丝状体放氢没有什么影响。这正好支持关于固氮酶催化氢释放是与异形胞有关的假说。在异形胞、固氮酶活性和在氩气中放氢能力之间的密切相关性也可以得出同样的结论。固氮酶催化氢释放所在部位的直接证据已由Peterson和Burris(1978)得到,他们已证明在*A. cylindrica*的离体异形胞中有ATP不自给的氢释放。

异形胞中的吸氢酶

Beneman和Weare(1974)记录到*A. cylindrica*的完整丝状体显示出的乙炔还原率比所有测定条件下放氢的还原率都高,虽然这两个反应大概都是固氮酶催化所引起的。他们推测,这种差别是由于一种吸氢酶,它和固氮酶居间促成的放氢相竞争。吸氢酶的存在也在*A. cylindrica*的有限还原剂培养中供氢固氮酶的活性得到证明。在加有DCMU(因而去除还原剂的供给)并通入厌氧混合气(N_2 或 $\text{Ar}_2 + \text{CO}_2$)时,藻体旺盛生长,然后逐渐失去在光中还原乙炔的能力,显然这是由于还原剂贮存消耗的原因。它们正常酶活性能够在有 H_2 存在时得到恢复。供 H_2 固氮酶活性在大约2—3% H_2 时达到半饱和并为 CO_2 强烈抑制。在以DCMN处理的丝状体中, H_2 不能维持光合 CO_2 的固定。所有这些都说明, H_2 吸收不能被“可逆的”氢酶所催化,但与一个“吸收”氢酶相联,它能在其他还原剂无效时维持固氮酶

活性。

在几个实验室内的更详细研究有助于解决异形胞蓝藻中固氮酶—氢酶关系的复杂性，并且证实了异形胞中氢酶催化 H_2 吸收的几种重要功能：第一，说明 H_2 利用是一个严格依赖 O_2 的氢氧反应（一个Knallgas型反应），通过细胞色素—氧化酶基于吸收的电子传递链，在这一反应中 O_2 被 H_2 还原，并被配对到氧化磷酸化反应中。它基本上是一个暗反应，这一反应已由Benemann和Weare（1974）从反面所证实，虽然它也为光合作用中产生的 O_2 所起助。 O_2 在低浓度时是一个很有效的氧化剂，而高分压 O_2 （21%）则是抑制剂。这一反应能为一氧化碳所抑制，而这种抑制又能在有光照时为细胞色素氧化酶居间的呼吸作用所恢复。第二，已证明在有一氧化碳加乙炔存在时，观察到固氮酶催化的 H_2 释放显著增加；这是由于氢酶催化Knallgas反应的抑制作用，它相当于在正常生理条件下 H_2 消耗量。所以，纯生理学的 H_2 释放量是在固氮酶催化 H_2 释放总量和氢酶催化 H_2 再利用之间的差额。第三，证明氢酶催化 H_2 的利用不需要厌气适应性， H_2 吸收只是当 *Anabaena* 生长在 N_2 中和在 NH_4^+ 态氮中生长的培养受到抑制因而缺乏异形胞时才发生的，在离体的异形胞中也发生 H_2 吸收。这清楚地说明，当异形胞蓝藻在有 O_2 存在时，吸氢酶只局限于异形胞中而不在营养细胞中。

异形胞中氢酶催化 H_2 再利用的功能，和其他固氮微生物类似之处是：a) 贮存还原剂和能量，否则将通过固氮酶催化 H_2 释放而受到损失；b) 从固氮酶活性部位移去 O_2 ，因而保护了酶免受氧的失活作用；c) 防止异形胞中 H_2 的累积，以免抑制氮素固定。

Bothe等（1977）提出一个在固氮酶吸氢酶和呼吸链之间复杂相互关系的图示，见图4。

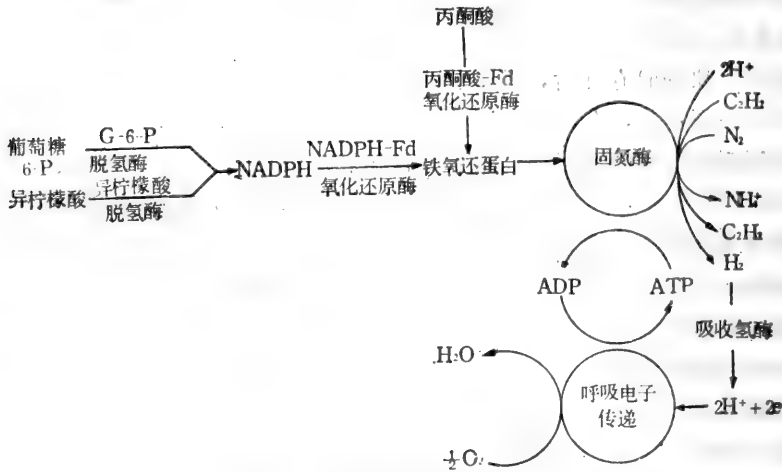


图4 固氮酶、氢酶和呼吸传递体系之间关系

(引自Bothe等,1977)

生物光解体系的发展

异形胞蓝藻中 O_2 （在营养细胞中）和 H_2 （在异形胞中）的同时发生的论证，鼓舞了Benemann和Weare（1974）进一步提出了一个有效的好气性太阳能转化的“生物光解体系”的发展设想。这样一个体系的效率和经济效能已由Weissman和Benemann（1977）以及Jaffries等（1978）更详细地研究。他们发现 *A. cylindrica* 的培养（连续通入氩气）在有限光照

条件下行光合作用,能产生 H_2 和 O_2 达30多天,而在增强光照强度时,只达18天。测得的最大产氢效率是每克干藻体每小时产 H_2 13到32毫微升之间,而经由*A.cylindrica*光合固氮酶体系将光能转化为化学能的热力学效能介于0.35到0.85%之间。虽然还有难以克服的困难(如低效率、丝状体的片段性或生物光解体系的稳定性)需要进一步研究解决,但初步结果并不都令人气馁而且推测异形胞态的蓝藻在生物能发生体系的发展中,可能有重要作用。

异形胞中能量的发生反应

在蓝藻中能量代谢的主要模式是光合作用,而在光合作用和固氮作用之间的密切相互关系已在早年许多研究中明确:这些生物的光合作用可能满足固氮作用对于还原力(能量来源和结合氮的碳框架)的基本需要。试验证明,在完整的*A.cylindrica*中,生物固氮对碳框架的依赖程度经过氮饥饿的预处理(结果建立碳贮存)后可暂时提高。Cox和Fay(1969)曾说明生物固氮的光刺激主要是通过光化学产生的ATP供给起作用。完整的*A.cylindrica*的乙炔还原作用谱显然和光系统I相似,而和光合放氧的作用光谱截然不同,这说明在生物固氮中初步包含有光合ATP—发生体系。然而,已知蓝藻可在暗处利用原先光合作用产生的内部基质或在异养代谢中同化外部物质而固定氮素。因此,假定暗呼吸代谢可能同样满足对ATP和还原剂的需要。

在异形胞中光系统I和光合磷酸化作用的存在。

关于异形胞可能具有活性光系统I的设想,原本是根据异形胞中色素分析的发现而提出。已知异形胞含有叶绿素a,特别高的反应浓度集中于叶绿素P700, β -胡萝卜素和叶黄素比率高并具有光系统I的色素组成特征。支持在异形胞中存在一个活性的光系统I的直接试验证据是,从离体异形胞中的薄片部分中测得依赖光的电子转移,并测得P700的光导氧化作用和一种细胞色素,假定在异形胞中这些色素体系可能保证固氮的需要,这已表明离体异形胞的吸收光谱和固氮酶活性的作用光谱之间的明显相似性。多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)的离体异形胞的光合磷酸化价已为Scott和Fay(1972)首先证实,而且*A.Cylindrica*的离体异形胞在有ATP截留体系(己糖激酶和葡萄糖)存在时,可测得10倍以上高的光合率(每毫克叶绿素每小时50毫克分子ATP)。

最近,Tel-Or和Stewart(1966,1977)的研究证实了在异形胞中存在有一光电子转移体系,并证明离体异形胞在有电子供体系统(还原的2,2-二氯酚-靛酚)时,能产生光合还原NADP。由此可推测,异形胞含有足够量铁氧还蛋白和铁氧还蛋白-NADP⁺氧化还原酶,以影响电子转递到NADP⁺。异形胞的光合电子传递链的精细分析已经显示出,在异形胞中不仅存在光系统I的组成,(P700细胞色素b 563,铁-硫蛋白,铁氧还蛋白),而且也有联结营养细胞中光合体系2和光合体系1反应的电子传递链的组成(质蓝素、细胞色素c 554,质醌,细胞色素b 559)。

氧化磷酸化作用和暗固氮

异形胞在需氧暗反应中能产生ATP,虽然在*A.variabilis*和*A.cylindrica*中分离出的异形胞氧化磷酸化率比在光反应中的低得多。当拟鱼腥藻(*Anabaenopsis circularis*)(有明显异养潜力的种类)的丝状体置于暗中时,固氮酶活性迅速降低,虽然也能靠适当的有机质贮备维持低的固氮率。Bottomley和Stewart(1977)在研究*A.circularis*的ATP和固氮酶活性之间关系时,认为固氮酶活性在暗中降低不是由于缺乏固氮酶合成或物质不能进入细胞,而是暗代谢本来就不能发生足够的ATP或维持最大固氮作用的还原剂除非在暗的厌氧条件下,在ATP贮存和固氮酶活性之间尚未发现始终一致的相关性。他们推测,维持固氮作用的

ATP贮存和在光合作用或一般代谢中的显然不同。

异形胞中固氮酶的还原势和天然电子供体来源

从蓝藻中提取的固氮酶显示对固氮细菌中固氮酶催化活性的类似需要。在体外，固氮作用（乙炔还原）只有在ATP和强还原剂存在时才发生。常用的人工还原剂是连二亚硫酸钠。然而，在体外能发生多大还原势和什么是固氮酶的生理学电子供体的问题还需要进一步加强研究；

氮素的直接光还原的一个早期的见解是基于准量的研究，然而，进一步的研究表明，固氮和放氧的比率是变动不定的，而且显然决定于还原剂的贮存。在 *Anabaena cylindrica* 的完整的丝状体中丙酮酸刺激氮吸收以及在这种藻类的无细胞提取物中丙酮酸的脱羧作用和固氮作用相联发生的发现得以提出下列假说：还原能力不是在光合反应中发生而是在与丙酮酸脱羧相联系的暗反应中发生，丙酮酸在蓝藻固氮酶中可能起天然电子供体作用。在巴氏梭菌 (*Clostridium pasteurianum*) 中固氮酶的生理学还原剂已证明是铁氧还蛋白，并已发现丙酮酸是铁氧还蛋白还原作用的电子主要来源。上述各种假说已在进一步研究中试验，并在以下各节中讨论。

生理学还原剂

Bothe (1970) 和Smith及Eveans (1971) 已指出，从 *Anabaena cylindrica* 中分离到的铁氧还蛋白能作为从这种藻类丝状体制成的固氮酶的电子供体。他们采用两种不同的还原性铁氧还蛋白体系，一种培养在含叶绿体或含叶绿素的 *Anabaena* 颗粒的光照条件下，另一种是在暗培养条件下结合NADP⁺和一种有机基质（葡萄糖-6-磷酸及丙酮酸或异柠檬酸）。他们断定，两种体系都能在体内从NADP⁺转移电子到铁氧还蛋白和固氮酶中的作用；而从NADPH转移电子到铁氧还蛋白中，可能是由铁氧还蛋白：NADP⁺氧化还原酶瞬间完成。对这一论点的进一步支持是，已发现铁氧还蛋白是固氮作用的天然还原剂，它专门阻挡需铁氧还蛋白的电子转移，并抑制完整的 *A. cylindrica* 的乙炔还原；而且还证明在离体异形胞中，铁氧还蛋白，需NADP⁺氧化还原酶有还原作用。这就说明不管在光照或黑暗条件下，铁氧还蛋白都可从中传递电子给固氮酶。

氮素的光还原

先前我们已讨论过有关异形胞具有一个活性光系统 I 的证据，在有还原剂来源时这一个体系能影响NADP⁺的光还原。Wolk和Wojciech早先 (1971) 在离体异形胞中乙炔受到直接的光还原，他们认为可能来自有机质的电子是经由光系统 I 传到固氮酶。Lex和Stewart (1973) 注意到在有 3'-(3,4-二氯苯)-1', 1'-二甲脲 (DCMU) 存在时，乙炔还原的光刺激能被乙酸氟（一种在三羧酸循环中的乌头酸酶的抑制剂）所排除。他们认为，这表明来自一种有机质的电子可能经由三羧酸循环到光系统 I，然后经由铁氧还蛋白到固氮酶。Douze等 (1974) 观察到抗坏血酸加上供给光系统 I 电子的2,6-二氯酚靛酚 (DPIP)，能够在碳饥饿的 *A. cylindrica* 中被DCMU清除乙炔还原的抑制。他们推测，在这样条件下，几乎所有电子都被光系统 I 传递到固氮酶中。虽然从 *A. variabilis* 提取的整个丝状体的研究，进一步支持关于有机酸可能供给光系统 I 电子的推论，但是否也适用于异形胞还不一定。在离体的 *A. cylindrica* 异形胞中，还未发现有能供给光系统 I 电子的生理物质。

异形胞内的中间代谢作用

在蓝藻中主要的糖代谢路线是氧化戊糖磷酸化途径，而三羧酸循环的功能主要在氨基酸生物合成上，糖酵解途径显然不太重要。与营养细胞相比，异形胞对下述各关键酶有很高活

性：氧化戊糖磷酸化途径，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和 γ -磷酸谷氨酸脱氢酶；而对还原戊糖磷酸化途径（卡尔文循环）和糖酵解途径的酶几乎测不出来。这说明在单细胞蓝藻中，氧化戊糖磷酸化途径的运行是在光合作用中有核酮糖-1,5-二磷酸化产生的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶存在时，受结构变化的控制。在 *A. cylindrica* 的营养细胞中而不是异形胞中也有类似控制机制。异形胞中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的高浓度及其在光合和暗中的无抑制功能现象说明，这种酶在供给固氮酶还原剂中可能有重要作用。在离体异形胞中关于电子传递的最近研究已完全证实了这一推论。

异形胞中还原势的发生

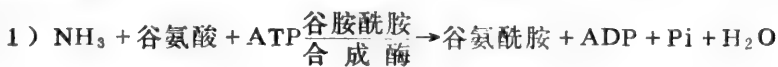
当氢酶的天然还原剂问题已彻底解决时，对体内供给 NADP^+ 还原当量的原初物质还不清楚，事实上是否只是单一物质能够维持固氮酶似乎还有疑问。

通过在 *A. variabilis* 和 *A. cylindrica* 的整个丝状体提取物中需铁氧还蛋白丙酮酸脱羧酶的测定，对于丙酮酸存在于天然来源还原剂中的概念已得到一些支持。当 *A. cylindrica* 生长在元素氮或硝态氮源条件下，其酶活性比培养在氨态氮中的高五倍。虽然曾推测固氮酶催化反应的生理作用可能发生还原性铁氧还蛋白，但尚无证明说明异形胞中有这种酶。而且从整体 *A. cylindrica* 中提出的丙酮酸自给固氮酶活性的证据，也还不能最后结论为在异形胞中也能表达。可能更确切的研究是有关丙酮酸和其它物质及代谢中间体在离体异形胞固氮作用中起一定作用。Bradley和Cam (1976) 证明 *A. cylindrica* 的离体异形胞的固氮酶活性能为磷酸丙酮酸所激化。Peterson和Buris (1976) 发现，在加入丙酮酸和异柠檬酸以及氧化戊糖磷酸化途径的中间物时离体异形胞在有 NADP^+ 存在的情况下氧吸收加强。最近，Apte等 (1978) 已证明，不管在光中或暗中，用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和铁氧还蛋白 NADP^+ 氧化还原酶处理后，离体异形胞都能从葡萄糖-6-磷酸向铁氧还蛋白传递电子。Lockau等 (1978) 又证明，离体异形胞中葡萄糖-6-磷酸，6-磷酸葡萄糖酸和异柠檬酸能支持固氮酶活性，并指出氧化戊糖磷酸化途径的脱氢酶和克雷伯 (Krebs) 三羧酸循环能以等量的中间电子经由 NADP^+ 传递给固氮酶。

氮素固定的同化

通常认为，在微生物中氮同化的主要路线是受谷氨酸脱氢酶催化，由2-酮戊二酸还原氨成谷氨酸。有些细菌中，其它脱氢酶（丙氨酸脱氢酶、亮氨酸脱氢酶）在最初氨结合反应中起作用。其它氨基酸是在氨基转化反应中形成，而谷氨酸和天冬氨酸可能是在这当中各自产生谷氨酰胺和天冬酰胺。

氨基酸脱氢酶对氨显示相当高的 K_m 值，因此当细胞生长在过多氨态氮条件下即分泌出大量胞外游离氨。Tempest等 (1970) 指出，当 *Aerobacter aerogenes* 生长在过多氨态氮中时，有相当量的谷氨酸脱氢酶产生；在限氨培养中，这些酶的活性即大大降低。另一方面他们还发现，在这样条件下谷氨酰胺合成的活性显著增加而谷氨酸在一个新发现的氨转化反应中同时形成。这一反应是由谷氨酸合成酶（谷氨酰胺2-酮戊二酸酰胺转化酶）催化的，两个反应的顺序如下：



谷氨酸合成的这一途径表明有一个过低的 K_m ，但需要消耗能量，这被认为是付给细菌

同化很低浓度氮的“代价”。然后由Nagatani等(1971)证明,谷氨酸合成在*Klebsiella pneumoniae*中广泛存在。在固氮条件下,这种细菌经由新发现的路线形成谷氨酸,而需氮生长的细胞同时含有谷氨酸脱氢酶和谷氨酸合成酶两条途径。关于氮的低 K_m 值的意义,联系到谷氨酰胺合成酶—谷氨酸合成酶途径,显然证明其在一个氮耗尽环境中具有同化氮的能力。

固氮的最初产物

在早年的示踪研究中,Magee和Burris(1954)已发现将*Nostoc muscorum*置于 ^{15}N -标记氮气中90分钟后,最高的 ^{15}N 富集是在谷氨酸中。近来,Stewart等(1975)研究了曝于 ^{15}N -标记 N_2 中短时间(直到10分钟)的*A. cylindrica*的氮结合,结果发现在2分钟后在谷氨酸的酰胺基团中即出现最高同位素富集,其次是在丙氨酸和谷氨酸中,而在谷氨酸,天门冬氨酸和丝氨酸中很少发现有标记原子。Thomas等(1975)应用放射活性 ^{13}N 标记 N_2 方法,将曝露于示踪剂的时间尽量减少到15秒,结果看出固氮作用中同化的最初 ^{13}N -标记有机产物是谷氨酰胺,其次是谷氨酸。其它氨基酸(丙氨酸、瓜氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、精氨酸)曝于 ^{13}N -标记 N_2 中只需1分钟即可标记上。在同样试验中,当L-甲硫氨酸-DL-亚矾次胺(MSX)(一种L-谷氨酸结构类似物和谷氨酰胺合成酶抑制剂)存在时,测不出有 ^{13}N -标记谷氨酰胺和谷氨酸。在另一试验中,Lawrie等(1976)利用 ^{14}C 示踪研究,在 $^{14}\text{CO}_2$ 中经氮饥饿30分钟后的*A. cylindrica*重新吸收 N_2 (或氮),并说明 ^{14}C 结合到氨基酸中,在柠檬酸和 α -酮戊二酸中出现的标记原子比在苹果酸或草酰乙酸中的更多,因此示踪研究的证据支持关于谷氨酰胺合成酶—谷氨酸合成酶途径是蓝藻中固氮结合的主要路线的论点。而且,证明在*A. cylindrica*离体异形胞中 ^{13}N -标记 N_2 已固定到谷氨酰胺中。

固氮同化作用中含有的酶

氮素固定中所需要的酶已在一些实验室中研究过,多数研究是根据异形胞态蓝藻完整丝状体中提取的酶进行分析,并且比较以固氮条件和氨态氮培养中藻体产生的酶。现已证实在这类藻中,氨基酸合成所包含的酶有很大差异,这些酶包括谷氨酸脱氢酶、丙氨酸脱氢酶、天冬氨酸脱氢酶、谷氨酰胺脱氢酶-丙酮酸转氨酶、氨甲酰磷酸合成酶以及合成亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸、甘氨酸和丝氨酸的酶类。

在离体异形胞中已证明有胺化酶。在早期研究中,Scott和Fay(1972)发现从*A. variabilis*中分离出的异形胞中,丙氨酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶有显著活性,而谷氨酸-草酰乙酸转氨酶活性低。Dharmawardene等(1973)测定由*A. cylindrica*分离出的异形胞中的谷氨酰胺合成酶比活性比营养细胞的高两倍。这种藻类异形胞中的谷氨酸-草酰乙酸转氨酶和谷氨酸-丙酮酸转氨酶的活性也较高,而两种类型的细胞中的丙氨酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶活性相似。Thomas等(1977)在从*A. cylindrica*分离得的异形胞中测得的谷氨酰胺合成酶相当高,而谷氨酸合成酶活性低。他们发现,异形胞中的谷氨酰胺和固氮酶活性之间有密切相关性。

已有大量资料涉及固氮同化作用有关主要酶类功能探讨。

谷氨酰胺合成酶:谷氨酰胺合成酶和固氮酶活性之间的相关性最先是在*Klebsiella*菌类中发现的,后来在异形胞蓝藻中也观察到。但是当藻类生长在氨态氮中时,和固氮酶不同的是谷氨酰胺合成酶的生成不完全受到抑制。在藻类从氨态氮培养基中转移到无化合态氮培养基以后,谷氨酰胺合成酶活性可显著增加。谷氨酰胺合成酶似乎是受谷氨酰胺代谢产物,如甘氨酸、丙氨酸或葡萄糖-胺-6-磷酸的反馈控制。已观察到最适活性是 Mn^{2+} :ATP比率为

1:1, pH在6.5—7.5之间, 温度为30—40℃。和细菌中的不同, 在*A. cylindrica*中还没有看到在去腺苷化的有活性和腺苷化的无活性的酶形态或固氮酶转录中谷氨酰胺合成酶调控功能之间有差别。在有甲硫氨酸亚砷次胺(MSX)存在时, *A. cylindrica*将大部分新固定的氮素以氨态氮释放到培养基中, 而游离谷氨酸和谷氨酰胺量即减少。这些发现进一步支持关于在固氮蓝藻中谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶控制途径是氮同化的最初路线的推论。当将氨加入到*A. cylindrica*的固氮培养以后, 细胞中ATP贮存迅速减少; 而在有甲硫氨酸亚砷次胺存在时, 这种变化即完全消除。在氮代谢中, 贮存ATP的优先利用和迅速消耗可能是受固氮作用和硝酸盐还原的外来氮源快速阻抑的原因之一, 因为这两方面都依赖细胞ATP。

谷氨酸合成酶: Lea和Miflis (1975)在别人的一次不成功试验后证明, 在固氮条件下从*Nostoc ellipsospermum*和*A. cylindrica*中提取到谷氨酸合成酶。和细菌中的不同, 在这些藻中的谷氨酸合成酶是依赖铁氧还蛋白的; 并且和在叶绿体制备物中一样, 为还原吡啶核武酸所失活。谷氨酸合成酶活性率和固氮酶及谷氨酰胺合成酶活性同等, 这就可推测二氮同化作用中的三个主要酶相联作用(见图5)保持细胞外氨的低浓度, 并防止固氮酶受到阻抑。

丙氨酸脱氢酶:在藻类固氮时的丙氨酸脱氢酶的浓度高于其生长在硝酸盐中的。从*A. cylindrica*中提取出的酶是需NADH的, 同时存在于异形胞和营养细胞中。当藻类耗尽氮素时, 酶活性即增加。丙氨酸脱氢酶催化两方面作用: 在有多余氨时, 影响丙酮酸胺化成丙氨酸; 在氮饥饿条件下, 使丙氨酸脱胺。

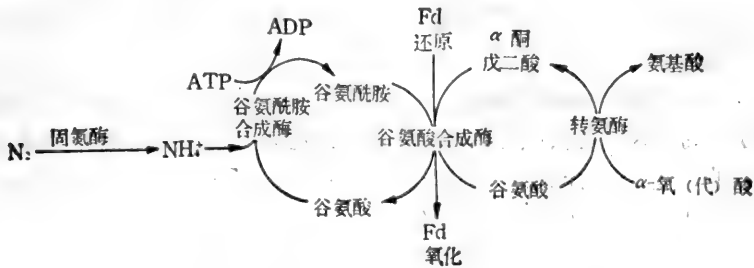


图5 蓝绿藻中二氮同化路线

(引自Tempest等,1970及Lea和Miflin,1975)

谷氨酸脱氢酶:和丙氨酸脱氢酶不同, 在固氮条件下藻类谷氨酸脱氢酶活性通常低于生长在硝酸盐中的。当*A. cylindrica*生长在元素氮或氨态氮时, 这种酶似乎主要是NADPH专性的; 而当藻生长在硝酸盐或亚硝酸盐培养基中时, 酶活性是与NADH相联的。

异形胞—营养细胞相互关系

可以想象到在上述各节中的资料是分别讨论光合作用和固氮作用两个重要代谢过程, 而在固氮条件下营养细胞和异形胞是相互依赖的。一方面, 异形胞依赖营养细胞的光合作用, 作为还原剂来源(葡萄糖-6-磷酸, 丙酮酸或异柠檬酸), 在固氮酶催化反应中经由铁氧还蛋白还原二氮并为碳框架(谷氨酸、α-酮戊二酸或丙酮酸)结合固定的氮素。在营养细胞—异形胞联结中, 营养细胞可能保持还原条件。另一方面, 营养细胞依赖于异形胞供给固定的氮素, 可能是谷氨酰胺, 谷氨酸或其它氨基酸形态。

虽然异形胞中缺乏光合戊糖磷酸化途径, 但近年(1976)已证明离体异形胞可通过酸固定结合¹⁴C₂O₂, 这样的CO₂“暗”固定率很低, 而且可能对异形胞碳代谢贡献很少。

碳输入

Wolk 1968年通过脉冲标记和放射自显影首先证明,光合固定的 ^{14}C -标记碳自营养细胞输入异形胞。他证实异形胞中许多标记碳并不扩散交换回到营养细胞,虽然有一部分放射性碳返回。

Carr等(1976)更详细研究了有机化合物从营养细胞到异形胞的运动,他们采用了将*A.cylindrica*整个丝状体短时间曝于 ^{14}C -重碳酸盐中的方法,然后分析离体异形胞和营养细胞的总放射活性的62%是存在于麦芽糖中,其次是丙氨酸中,而很少的放射性碳结合到丝氨酸、谷氨酰胺和二种未知的糖中,从这一结果可推测,麦芽糖是输入到异形胞中的最初有机化合物。无疑,进一步研究将会查明异形胞中麦芽糖代谢的路线。

Wolk及其同事(1976, 1977)已假定固定的氮素是以谷氨酰胺形态从异形胞输出,而在营养细胞中产生的谷氨酸的一部分在随后由谷氨酸合成酶催化反应中又运回异形胞中;从而为谷氨酰胺合成酶催化的最初固定氮素提供了碳框架。这一假说是根据营养细胞中的谷氨酸合成酶活性高于离体异形胞的观察,并假定通过异形胞-营养细胞复杂联系所固定的氮素经过运输和部分转运显然有一消耗过程。

氮输出

有关氮素从异形胞输出到营养细胞的资料已很详细了。除了早已讨论过的在两种类型细胞中谷氨酸合成酶活性差别外,藻蓝素浓度梯度天冬氨酸- α 酮戊二酸转氨酶活性的存在,都支持关于固定的氮素从异形胞中发散出来,而其浓度随与异形胞距离而减少的推测。然而,还没有直接的试验证据说明化合物从异形胞向营养细胞运动。可利用的材料只是转移的一般事实和可能的氮素运动率。

当*A.cylindrica*丝状体曝露在 ^{15}N -标记的 N_2 (见前述)中30分钟后,发现在离体异形胞和营养细胞部分中的 ^{15}N 丰度相似,这就证明了新固定的氮素从异形胞中迅速转移到营养细胞。根据 ^{13}N 放射自显影分析计算推测,固定 ^{13}N -标记氮沿着*A.cylindrica*丝状体,由异形胞移出,移动率大约是每两个相邻细胞5秒钟。

代谢物的转移

通过分隔的异形胞和营养细胞间复杂的联系似乎必然有代谢物的连续交换。溶液必须通过两层原生质膜和三层隔膜。此处运动的渠道很可能是与质膜相联的微质膜孔(见前述)。营养细胞的高呼吸活性(硝基-蓝四唑还原的)靠近异形胞并接近营养细胞和异形胞的隔膜,可能促使活性溶液输送通过营养细胞-异形胞联结。

考虑到两种类型细胞的相互依赖性,即使将异形胞很小心地和营养细胞分隔,也将导致它们正常功能的混乱。异形胞在离体后即不起作用,一经分离即导致高度专性破坏,而在正常条件下是不分裂细胞。

异形胞的形成和固氮酶合成的调控

Fogg在其早年(1944)研究中已发现,在*A.cylindrica*中细胞氮素含量和异形胞频率之间有相关性。氮素基质可能抑制异形胞的形成,而供给可同化的有机碳则刺激异形胞产生。最初异形胞的分化是伴随细胞C:N比的增加(从4.5:1到8:1),固氮酶活性只是在第一批异形胞发育完全时才能测出。

控制异形胞分化的因素

Fogg(1949)假定在*A.cylindrica*丝状体生长时可能产生氨或其它衍生物,是一种有定期浓度梯度的抑制物,当这种物质在细胞内的浓度降至一个临界水平时即形成异形胞。

Wlok (1967) 观察到, 异形胞自丝状分离后会刺激其余异形胞的发育, 因而认为异形胞释放出一种抑制剂, 它沿着丝状体运动, 防止营养细胞分化形成新的异形胞。当异形胞产生这种抑制效果时, 似乎促进固氮酶活性的独立性, 并认为可能不是氨本身而是其它基质起抑制作用。

关于甲硫氨酸亚砷次胺 (MSX) 也能促进异形胞分化 (和固氮酶合成) 的发现进一步证明, 不管是氨还是谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶或是它们反应的产物, 都有阻抑固氮酶合成的作用, 并且也抑制异形胞的发育。已经观察到, 加入谷氨酰胺、谷氨酸、天冬氨酸或丙氨酸都能减轻MSX对*A. cylindrica*谷氨酰胺合成酶的失活作用。所有这些化合物都能防止异形胞分化, 这就可一致认为不管是谷氨酰胺合成酶或者是其产生的活性都包含在异形胞的调控中。

控制固氮酶合成的因素

在革兰氏负反应细菌中, 谷氨酰胺合成酶是两种形态: 一个活性的去腺苷化和一个非活性的腺苷化形态。已有人提出, 由于谷氨酰胺合成酶的催化功能, 控制着包含在*Klebsiella*中的氮素代谢和固氮作用的酶合成。Rowell等 (1977) 发现, 没有证明在*A. cylindrica*中谷氨酰胺合成酶有两种形态, 也没有证据说明在固氮酶合成中有活性酶的催化作用控制, 当*A. cylindrica*中谷氨酰胺合成酶活性低或测不出时, 固氮酶活性即高。然而, 他们已证明固氮酶活性与谷氨酰胺和天冬氨酸的细胞内贮备量之间有反相关性, 并且提出固氮酶合成是受谷氨酰胺或其代谢产物的控制。

异形胞产生的控制和固氮酶合成之间的关系

在大气条件下异形胞的存在和固氮能力之间的密切关系, 以及培养基中高浓度氨态氮阻抑异形胞的形成和固氮酶的合成的观察, 正是有关异形胞是蓝藻固氮活性部位概念的主要证据。根据异形胞分化和固氮酶合成之间的直接关系可推测的, 从遗传学研究也得出结论。虽然已经获得突变体, 其中异形胞发育正常但缺乏产生固氮酶的能力, 通常缺固氮酶的突变体也不能发育异形胞; 而且突变体无例外地没有固氮作用, 但有产生异形胞的能力。这些发现得到一致见解, 即nif和het基因分别存在但又紧密相联在异形胞类蓝藻的染色质中。

原文载自〔印〕“Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation”

(1980) pp. 121—165 “Nitrogen Fixation in Heterocysts”

陈廷伟译

直接测定圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 的呼吸作用、氢酶和固氮酶活性间相互关系的质谱法

P. A. Lespinat R. Gerster Y. Bebliey

引言

在圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 和一些根瘤菌 (*Rhizobium*) 的类菌体中, 含有单向的不需ATP的氢酶, 它可能有三种作用: 在将固氮酶产生的氢再氧化时, 第一是将消耗掉的ATP和还原能力再循环; 第二是防止氢对固氮酶活性的抑制作用; 第三是利用过量的氧, 这样就有利于保持固氮酶活性部位附近的厌氧条件。然而氢酶和固氮酶间的相互关系至今还不清楚。应用稳定性同位素氘 (D_2) 测定氢酶活性是很成功的, 同时也揭示了在好气固氮菌中, 固氮酶释放氢的能力, 否则我们只能通过氢酶抑制剂来证明其在体内的状况。

在这些研究中, 困难在于大气组成的变化, 它在酶部位实际发生的情况被推迟和减弱。如果在液态中进行气体测量, 则可望得到较好的精度。在这方面用Clark电极测定溶解氢气的安培法成功地应用于观察类菌体及 *Rhodospseudomonas capsulata* 中 H_2 的代谢作用。由此发展为测定在酶活动中所含有的其他气体化合物直接质谱方法, 这个方法可以测定在液

相中溶解的气体。在本实验室则用以研究 *Azotobacter chroococcum* 中呼吸作用、氢酶和固氮酶活性之间的相互关系。

材料和方法

《Atlas》 CH_4 型质谱计, 它装有峰强度测量的自动系统。离子源通过不锈钢真空管直接与反应容器连接 (图1), 这个反应容器是一个宽15毫米、高60毫米的带一个恒温水浴套的有机玻璃圆筒, 容器的体积可在3—8毫升之间调节, 这种调节是用三个O型环固定的活塞进行的。应用注射针头透过接近底部的小孔将气体混合物注入容器内介质中。然后降下活塞使过量气体通过中心管道排出, 并用螺旋锁紧。

介质用磁搅棒不断搅动, 部分溶解的气体通过12.5微米厚的聚四氟乙烯膜扩散, 当水蒸气在

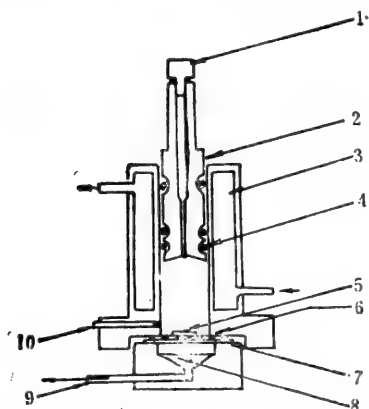


图1 连续测量在液相中溶解气体的反应器

1: 带有O型环的锁紧螺旋; 2: 活塞; 3: 恒温水浴套; 4: O环; 5: 磁棒; 6: 带孔的保护框板; 7: 聚四氟乙烯膜; 8: 热处理钢架; 9: 通向质谱计出口; 10: 充气或注入反应剂的进口。

液氮阱中冷凝后,才导入离子源。在这样条件下质谱讯号与在液相中气体组份的浓度成正比。

在这些实验中所应用的微生物 *Azotobacter chroococcum* 菌种是由 Dommergues 博士的实验室分离的,并在 B. Burk 培养基上培养,在发酵器连续培养中多加 5% 葡萄糖,虽然连续通气,但培养是用氧电极作指示以限制氧气量。将 8 毫升培养基(在 570 毫微米处光密度接近 0.5)移至反应容器中,然后用 0.8 份氩气和 0.2 份氧气或者 0.7 份氩气、0.2 份氧气和 0.1 份氦气喷洗,直至大气—溶液平衡达到峰 32 和峰 4 的指定水平。过量气体按上面所述的方法排出后。氧 (32), 氩 (4) 和氦 (2) 的变化或者是在一个检测试验中分别检测或者是在同一样品重复试验中分别检测,整个溶解的气体分压都用大气压表示,培育温度在整个实验中都保持在 30℃。质谱自身的消耗,即气体压力的一级函数,是用于同样条件下水或用未接种的充气介质测定的。

结 果 和 讨 论

图 2 中表明溶解气体浓度的变化。在 0.01 氩下呼吸作用比没有氩时高(每分钟消耗分别为 0.04 和 0.03 大气压氧)。同时,氩消耗呈现出一个具有较快和较慢组分的双动力学。用这些数据在半对数坐标上作图(图 2 内插图)。缓慢部分得到的直线与质谱自身的消耗平行。单向氢酶的实际氩吸收用较快部分表示,在氧分压降到大约 0.01 大气压后 5 分钟,氩的吸收几乎完全中止。与此同时只有在氩存在时,放氢发生陡变。

在另一组试验中,比较了有无氢酶时气体产生和吸收的不同动力学,抑制混合物含 0.5 毫升 CO 加 0.5 毫升 C₂H₂ 加入约 3 毫升 Ar,在充气结束后在培养基上保持 O₂、D₂ 气体,有氧时 CO 和 C₂H₂ 的消耗略为减少,最后氩吸收下降为原来的 $\frac{1}{10}$ 。但是,在有同一 O₂ 压下任何情况下放氢的情况都一样。

由这些结果可得出结论:放氢与氢酶活性的终止无关,而与氢酶活性的开始有关,这两个活性是直接地与氧分压水平成反比。这一点与 Droszd 和 Postgate 提出“开—关”模式一致,可用以阐明固氮酶对于过量氧的“构象”保护。预先在 0.09 大气压氧生长 *Azotobacter chroococcum*,当 P O₂ 从 0.05 升至 0.2 大气压时固氮酶“关闭”,然后在恢复到原来状态时再“开启”,此模式用于氢酶和固氮酶活性两者,当整个呼吸过程中 PO₂ 低时,前者是“关闭”而后者是“开启”。这与根据培养时氧的状态为氢酶所调节的固氮酶活性的过程是一致的,因此这两个酶在细菌细胞中所处位置是很接近的。

Dixon 在提到好气固氮菌 *Azotobacter chroococcum* 的单向氢酶不同功能时,强调其在固氮酶活性部位的附近对氧保护作用。

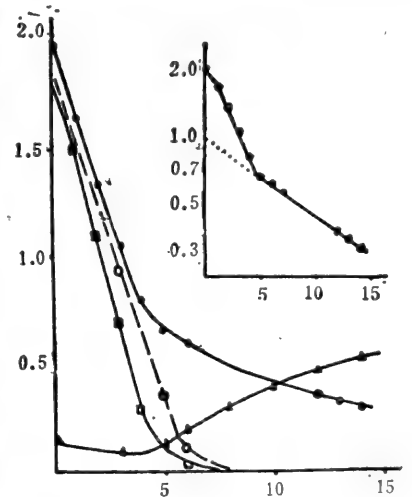


图 2 氧和氩消耗的时间进程和 0.7 氩, 0.2 氧和 0.1 氩充气培养后的放氢, ▲放氢, 在氩存在时氧的吸收, ○在无氩时氧的吸收, ●氩吸收
插图: 氩消耗在半对数图。氢酶吸收氩在曲线第一部分(实线)和外推至零时(虚线)部分的差别。

纵座标单位是分别表示 0.1 大气压氧, 0.05 大气压氩和 0.005 大气压氢。

原载“BIOCHIMIE”, 1978, 60: 339—341

朱承志译 尤崇杓校

固氮巴西螺菌(*Azospirillum brasilense* sp.7)培养中体内固氮酶和氢酶活性的质谱动力学研究

Y. M. Berlier P. A. Lespinat

摘 要

在*Azospirillum brasilense* sp.7菌种的培养中,用质谱的动力学方法监测体内乙炔还原、氩吸收和放氢。尽管固氮酶作用需要氧,但是在培养中如果氧浓度很低时,酶就钝化了,而且氧的扩散速度和细菌呼吸作用达到平衡。只有在CO存在时才观察到固氮酶导致的放氢。而CO能够抑制吸氢酶的活性,正常情况下它能使全部产生的氢再循环。然而,在厌氧条件和有氩存在时,可以观察到双向氢酶的活性,同时存在D₂的吸收以及放H₂和HD。与固氮酶放氢比较,厌氧放H₂和HD对乙炔的存在是不敏感的,同时部分地为CO所抑制,相对地说氩分压对此没有作用。这个结果表明厌氧放H₂和HD可被认为是由于氩饱和吸收过程和清除电子接受体时可逆氢酶活性所致,尽管固氮酶和氢酶这两种酶的活性差异如此显著,但在它们各自的作用条件之间发现有较密切的关系。

尽管固氮菌在其生态习性和生理需求方面各异,但是早已观察到固氮酶和氢酶的同时存在。一般讲氢酶在好气属如*Azotobacter vinelandii*中是单向的(氢吸收),而在厌氧属中如*Clostridium pasteurianum*则是可逆的。近来,证明了两种类型的氢酶在一些蓝细菌甚至*Clostridium pasteurianum*是协同的。

吸氢酶的可能作用,特别是在固氮酶对氧钝化作用的呼吸保护和在放氢时失去还原能力的再循环方面已经比较清楚了,同样期望着具有这样氢酶的菌种对于固氮作用的有益影响。正像Mortenson(1978)着重指出的那样,在固氮酶解阻遏的条件下,氢酶的浓度总是增加的,因此,可能提出这样的问题:两种酶之间在功能上的关系是偶然的,还是由于它们处于某种状态时才发生,例如,调节状态。

在微好气的固氮菌中,它们的代谢需要氧,但是也由于很低的氧分压而使固氮酶钝化,氢酶可能在固氮酶的氧保护中起作用。可是,在本实验室以前工作中没有测定出在根际固氮菌*Pseudomonas*属中含有吸氢酶,实际上这个属通过固氮酶活性放出大量的氢。本工作针对另一种根际固氮菌*Azospirillum brasilense*的体内氢酶和固氮酶活性进行了研究,研究应用了质谱和标记气体即重氢和重氢标记乙炔的连续动力学方法。在研究了固氮酶功能需要的氧以后,一方面我们认为这个菌种具有一种需氧吸氢酶活性,这种活性能将固氮酶产生的全部氢进行再循环。另一方面,在厌氧条件下,它显示出双向活性,它的意义正在讨论中,两个酶的作用条件的相互关系,同样也正在研究中。

材 料 和 方 法

菌种: sp.7 菌种是Day和Döbereiner (1976) 在巴西分离出来的, 并且分为*Spirillum lipoferum*第I组, 现在称为*Azospirillum brasilense*。本研究中也用了Gauthier和Elmerich (1977) 获得的无固氮酶活性而需谷酰胺的突变种。

培养基和生长条件: 菌体在温度30℃下, 体积为1升的发酵罐在无氮液体培养基中生长, 开始时加100mg酵母浸提物以促进初始生长。当光密度达到约0.6时(波长为660nm), 开始慢慢地更新培养基(0.05/小时), 以便使菌量保持指数生长。通气是用含2%O₂的氮气流通入培养液, 缓慢地搅拌(每分钟1转)以便使氧能缓慢扩散, 其速度正好等于细菌呼吸作用的消耗。

质谱的动力学测定: 这个方法和用*Azobacter chroococcum*所得到的第一个结果早已报道了。从发酵罐中取出13毫升样品放到一个圆柱型容器中, 使之不与空气接触, 此时, 培养物或者用纯氩或者用氩和氖的混合物(90/10V/V)充至饱和, 在充气结束后, 把容器的活塞压下以便排除残余的空气。其它不同的气体或试剂可以用注射器的针头通过固定在容器最下层的膜进一步注入。在培养中扩散出被导入或产生的溶解气体, 根据它们的浓度, 可通过附在这个容器底层12.5微米厚的聚四氟乙烯膜, 联接到质谱离子源的真空管上, 随后通过冷阱, 以冷凝水蒸汽, 最后气体进入离子源离子化和分析。不同质谱峰可以用手动扫描, 以便几乎同时记录H₂和HD(质量2和3)、D₂吸收(质量4)、O₂消耗(质量32), 乙炔还原为乙烯, 可以接着引入重氢乙炔(C₂D₂), 并在质量为30上记录放出的氘化乙炔(C₂D₂H₂)峰。当记录N₂和CO作抑制剂时, 常规的乙烯(C₂H₄)在质量为28的峰处很可能观察不清了。

这些质谱信号转换成分压或溶解气体的浓度, 在用已知的不同气体混合物在相同条件下所作校正曲线时应同时考虑到它们各自的溶解度和它们的电离产物。同时质谱本身的消耗也必须测定, 并且要从结果中减去。

实验是在30℃下完成的。这些结果参照培养基中用Lowry方法测定的蛋白质组成, 或从凯氏总氮计算。

结 果

固氮酶活性条件: 培养物用纯氩充洗并与重氢标记的1 cm³的乙炔接触1分钟, 此后除去C₂D₂的残余气体(这时分压大约为0.07巴)。在无氧时C₂D₂不还原(图1)。但是, 当加入少量氧(0.01cm³)时, 溶解氧的分压立即下降到大约0.003巴, 而且在C₂D₂H₂释出前可以观察到。在前述氧分压本底水平再一次达到后, C₂D₂H₂的释出仍然没有变化, 但当除去培养液上小的氧气泡时, C₂D₂H₂的释出在一分钟内停止。当新鲜的氧加入时(没有表明), 再一次观察到同样的情况。当加CO时, C₂D₂H₂产生停止。在同样的条件下发生放H₂。

尽管在*Azospirillum brasilense*中氧对固氮酶作用是必须的, 但是0.003巴的氧压就能使这个酶完成全失活, 而这个值仍低于在文献中所提到的值。这就导致必须在呼吸作用和从气相中扩散的氧气之间保持平衡(在这里在容器的顶部通过残留气泡表现出)。只要在培养

基中氧分压没有升到0.025巴，固氮酶的钝化就是可逆的；当氧分压高于这个值时，固氮酶的钝化就成为不可逆了。如Nelson和Knowles (1978) 指出的，*Azospirillum brasilense* 具有较差的呼吸保护作用。由上述结果看来，似乎sp.7菌种仍然通过可逆性钝化的方法表现出自身的保护能力，即由Dreeszd和Postgate所提出的在*Azotobacter*中的“构像保护”。

铵对固氮酶活性的影响也见诸图1。在加入1毫克分子的氯化铵于培养基后，放氢慢慢下降，并在2分钟内停止。再加氧将导致氢的再吸收。在 C_2D_2 还原过程中加入 NH_4Cl ， $C_2D_2H_2$ 产生的行为（未画出）是相同的。

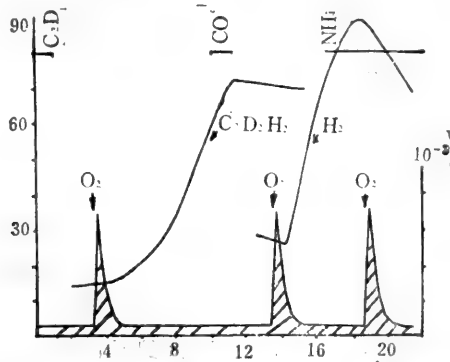


图1 在*Azospirillum brasilense* sp.7中固氮酶引起的乙炔还原和放氧分压的效应。13毫升培养液用纯氩充洗，在零时，加 $1\text{ cm}^3 C_2D_2$ ，放置1分钟，10分钟后，加入 1 cm^3 的CO，然后放置1.25分钟，在16.5分钟时，加入1毫克氯化铵，在箭头指示的时间加入 0.1 cm^3 氧气。曲线1： $C_2D_2H_2$ 的释出。曲线2：加入CO后的放 H_2 。阴影面积：溶解的氧分压。

可逆的氢酶活性的证明：培养基是用氩和氧（90/10V/V）的混合物充洗的，充洗后紧闭容器，并记录质量数为2、3和4的峰。 D_2 的吸收动力学可自图2看到，开始的吸收速

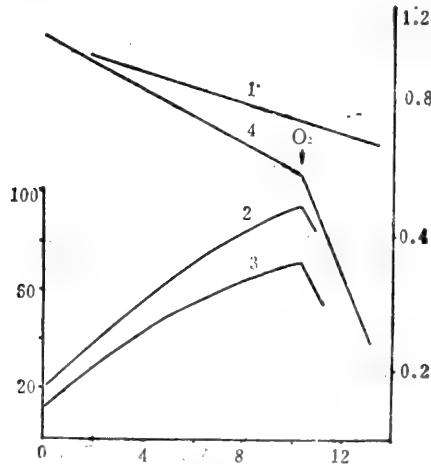


图2 在*Azospirillum brasilense* sp.7中氢酶的活性13毫升培养液用氩-氧（90/10 V/V）充洗，在10.50分钟时加入 0.05 cm^3 氧气

曲线1：质谱氩的自身消耗（由反应器放13毫升水所获得的）。曲线4：总氩减少。曲线1和4在半对数座标纸上画出，净氩的吸收（毫微克分子/毫克蛋白质）在4和1之间是不同的。曲线2和3：放 H_2 和HD积累数（毫微克分子/毫克蛋白质）。

率是对1毫克蛋白质为36毫微克分子/分钟,此时, H₂和HD的释放速率分别为11毫微克分子/分钟和10毫微克分子/分钟变化,平衡是趋向吸收过程的。

然而,当同样培养基的样品用增加D₂的分压连续地充洗时,虽然短时间D₂的吸收动力学每次都是接近指数, pD₂越低,速度常数越高(表1)这样在全部pD₂范围内反应的级数就不是1,在0.02和0.05巴D₂间放H₂速率的增加是微不足道的,而放HD速率的增加在0.02和0.10巴之间都是明显的;提高D₂压力并没有导致任何部分释放速率的进一步增加。

少量氧(0.05—0.1cm³)的供应将引起D₂的吸收直接增加10倍,并且使原来放出的H₂和HD被再吸收(图2)。与固氮酶导致H₂产生相反,这里记录的放H₂和HD在氧分压降至以前本底水平后并没有恢复,仅在所有残留氧气用新的Ar—D₂冲洗培养基除去后才恢复。这样,当供给大量的氧时,像固氮酶不可逆的钝化一样,D₂的吸收以及放H₂和HD同样的不可逆地减少了(表2)。

表1 氧分压对*Azospirillum brasilense* sp. 7D₂吸收,和放H₂和HD放出的影响

pD ₂ (巴)	近似速度常数 (每分钟)	D ₂ 吸收率 (毫微克分子/每分钟)	放H ₂ 速率 (毫微克分子/每分钟)	放HD速率 (毫微克分子/每分钟)	放H ₂ +HD速率 (毫微克分子/每分钟)
0.02	0.109	27	11	7	18
0.05	0.065	40	11	9	20
0.10	0.045	49	12	11	23
0.20	0.031	76	12	10	22
0.35	0.023	97	12	11	23

表2 不同抑制剂和阻遏剂对*Azospirillum brasilense* sp. 7固氮酶活性的影响

	1 (对照)	2 (O ₂)	3 (C ₂ D ₂)	4 (CO)	5 (NH ₄ ⁺)	6 (NH ₄ ⁺ 抑制细胞)
厌氧放H ₂	10.9	1.4	13.3	7.9	7.8	3.9
厌氧放HD	9.8	1.5	10.6	7.8	7.1	2.5
厌氧D ₂ 吸收	36.0	12.0	36.0	38.4	33.9	12.0
需氧D ₂ 吸收	348	—	342	144	—	—

1. 对照没有抑制剂或阻遏剂; 2. 在充洗结束时加入0.25cm³的氧; 3. 在充洗并放置1分钟后加入1cm³C₂D₂;
4. 在充洗并放置1分钟后加入1cm³CO; 5. 在充洗结束时加入1毫克分子的氯化铵; 6. 用苹果酸—NH₄⁺抑制的细胞进行试验,结果用毫微克分子/毫克蛋白质表示。

几乎完全抑制固氮酶放氢的乙炔,在这里对于D₂的吸收以及放H₂和HD没有明显的影响(表2),如一氧化碳没有影响厌氧微生物的吸收,但却减少了需氧微生物的吸收以及放H₂和HD(表2)。

加0.1毫克分子氯化铵于培养基中,明显地抑制了固氮酶的活性(图1),其结果使放H₂和HD被部分地抑制了。Ar—O₂大气压下用NH₄⁺预先培养的细胞,其固氮酶合成受到抑制时厌氧吸收和释放过程比在可比较光密度下固氮培养时速度是降低了(表2)。



讨论和结论

在 *Azospirillum brasilense* sp.7 菌系中和其他所有固氮菌一样, 固氮酶催化质子还原成分子氢, 与 *Azotobacter* 以及大多数 *Rhizobium* 属相似, 但不同于其他微好气微生物, sp.7 菌显示出体内有氢酶活性, 在低氧压下, 能够再循环固氮酶产生的所有氢。在厌氧条件下和 D_2 存在时, 氩的吸收以及放 H_2 和 HD 是同时发生的。从它的厌氧特性以及对于抑制剂的灵敏度来看, 与固氮酶导致放 H_2 相比较, 放 H_2 和 HD 似为氢酶的活性所致, 而且在无分子氢时固氮酶不能催化 $2H^+ + D_2 \rightleftharpoons 2HD$ 交换。在高氩压下放 H_2 甚至放 HD 是相对地不敏感了, 而氩的吸收却增加了, 这就排除了在 H^+ 和 D_2 之间的同分子交换反应是主要过程, 但是相反, 它却表明了是两个不同速率的独立的可逆反应过程。

释放的活性已在无细胞颗粒和从 *Azotobacter* 纯化的氢酶中发现, 虽然好气菌种对 H_2 的吸收很低、难以与在厌氧细菌, 或者一些光合细菌如 *Chromatium* 中所出现的放 H_2 活性平行。至于吸氢酶在活体内具放 H_2 活性的可能性, Schlegel 和 Schneider (1978) 认为这与没有末端电子受体有关。在电子受体浓度作为控制吸收动力学的限制因子时, 在高 pD_2 时速度常数的偏差实际上表明了复杂情况。在好气时 CO 抑制 D_2 的吸收, 而在厌氧时则没有, 这现象也有助于这种假设。

看来似乎低的氩分压是能够饱和这个吸收过程的, 同时也能排除残余电子受体, 以使放 H_2 的过程逆转。但必须进一步研究, 以确定放 H_2 和吸收的活性是由单个膜结合酶可逆作用所催化的如 *Rhodospirillaceae* 那样还是在 *Clostridium pastenrianum* 或在蓝细菌中所发现的由两个处于不同位置酶所引起的。

研究 sp.7 固氮酶对氧的敏感性, 吸氢酶可能有助于保护固氮酶免遭氧钝化作用。在培养基用氩和氩混合物充洗与只用氩充洗相比, 氧气的消耗确实多两倍, 但这效应可能仅在活体内没有氢存在时才有可能。的确, 吸氢酶在去除 O_2 和 H_2 再循环方面的两个作用是互相依存的。至于这个过程能量收益, 和增加氮产率的可能性, 在碳限制的 *Azobacter* 培养中和氢气自养的 *Rhizobium* 中已经证明了, 这一点将在以后文章中验证。

要强调另一点是氢酶活性无论是那个方向, 在下列的情况下都明显地减少, 如在固氮酶失活 (氧失活或突然的供给 NH_4^+) 或者在 NH_4^+ 介质中培育的细胞里固氮酶合成被抑制时。

sp.7029 突变种表现出既无固氮酶又无氢酶活性, 但是, 在 N_2 存在时经过几次再培养, 两个酶的活性都恢复了。这些结果表明, 在两个酶之间的互相依赖性处于它们调节的水平。这种氢酶活性和固氮酶的解阻抑状态之间的相关性在 *Azotobacter vinelandii* 中已设想过了, 最近又在 *Xanthobacter autotrophicus* 中得到证实。极可能是像在研究大豆根瘤菌 (*Rhizobium japonicum*) 时所假设的那样, 即氢酶的生物合成是通过作为固氮酶活性副产物产生的分子氢所解阻抑, 因此是由固氮酶调节系统间接控制的。

在这里设计的直接质谱方法将有助于研究活体内和体外条件下氢酶的调节状况。

译自 "Archives of Microbiology"

125: 67—72 (1980)

朱承志译 尤崇杓校

收到期	1988.9.8
来源	西单书
书价	2.元
单据号	150699
开票日期	88.9.8

24635

58.17421
194

生物圈氮译丛 (三)

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
	1918号	88.9.23	10.25
	1918号	88.9.23	
		88.9.21	10.13

58.17421
194

注 意

24635

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

京卡0701



ISBN 7-105-00120-2/S·85

定价： 2.00 元