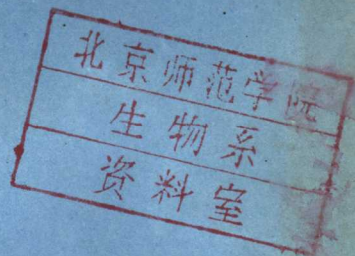


②

全国高校基础微生物学讲座
及教学经验交流班

自养细菌的能量代谢

复旦大学生物系
微生物学教研室
一九八四年八月



自养细菌的能量代谢

陆卫平

复旦大学生物学系

目 录

1. 导言	3
1.1 与化能自养硫细菌生态分布有关的二个新发现	4
2. 化能自养细菌氧化无机化合物的能量学	7
2.1 氨的氧化	8
2.1.1 氨氧化为亚硝酸	8
2.1.2 亚硝酸氧化为硝酸	10
2.2 还原性硫化合物的氧化	12
2.2.1 电子呼吸链及其在能量代谢中的作用	12
2.2.2 氧化磷酸化作用	17
2.2.3 NAD^+ 还原	17
2.2.4 连续培养法测定最大理论生长量及其在能量学计算中的意义	18
2.2.5 多能硫杆菌中参与氧化硫代硫酸盐至硫酸的酶类及其特性	25
2.3 氢的氧化	31
2.4 一氧化碳的氧化	33
2.5 氧化亚铁硫杆菌氧化亚铁的能量学机理	34
2.5.1 电子传递链	35
2.5.2 参与氧化亚铁的组分的细胞定位	36

2.5.3	化学渗透的能量转化机理	38
2.5.4	NAD^+ 的还原	40
3.	光能自养细菌的光合作用	41
3.1	细菌叶绿素参与的光合作用	41
3.1.1	光合色素和氧化还原载体	41
3.1.2	环式电子传递	44
3.1.3	光还原 NAD^+	47
3.1.4	光照引起的质子迁移和磷酸化	48
3.2	叶绿素参与的光合作用	50
3.2.1	环式电子传递	50
3.2.2	非环式电子传递	51
	(附录)	
4.	化学渗透学说简介	52
4.1	能量偶联膜	53
4.2	化学渗透学说要点	54
4.3	化学渗透学说的主要实验依据	56
4.4	测定能量偶联部位数	57
4.5	呼吸链组分(电子载体)的空间排列和质子迁移方式	59
4.6	一些试剂对 $\Delta\psi$, ΔpH 和 ΔP 的影响	60

1. 导言

微生物按能量代谢特征可以分为两大类，光能型和化能型。光能型又能分为光能无机营养型和光能有机营养型。化能型可分为三类，化能无机营养型，化能有机营养型和混合营养型。表1列出了这些营养类型的主要特征。根据普遍接受的自养微生物的定义，即，它们经氧化无机化合物或以无机化合物（包括水）作为电子供体经光合作用取得生长所需要的能量，并通过卡尔文循环固定二氧化碳以构成细胞物质，其中光能无机营养型和化能无机营养型可归纳入自养微生物，或自养细菌（因它们均为原核生物）。关于这类细菌的分类，形态结构，培养方法，生理生化特

表1 微生物的能量代谢类型

能量代谢类型	能源	还原力来源	例子
A. 光能营养型			
1. 光能无机营养菌	光	H_2 , H_2S 或 H_2O	着色菌
2. 光能有机营养菌	光	有机物	红螺菌
B. 化能营养型			
1. 化能无机营养菌	无机物	与能源同	硫杆菌
2. 化能有机营养菌	有机物	与能源同	假单胞菌
3. 混合营养菌	无机物和 有机物	与能源同	氢细菌

性等，最近出版的“自养微生物”(1)一书已有较详细的论述。在此不拟复述。本文将主要介绍这类微生物的能量代谢机理，重点是近些年来所取得的新进展。近十年来，化学渗透学说也正

在愈来愈多地渗透进自养细菌能量学研究中，有些并取得了较为完满的结果。为便于读者理解文中引用到的有关化学渗透学说的理论、方法及术语（这样做是不可避免的），专门增加了简单介绍此学说的附录（第4章）。

1.1 二个与化能自养硫细菌的生态分布有关的新发现

在进入正文之前，值得提一下新近有关化能自养硫细菌生态分布的有趣发现。因为这些新发现不仅对于微生物学，而且对于人们对生物界的认识都会有新的启发。

第一件是一类特高温细菌的发现(2)。科学家从太平洋某处流出大量硫化物（为呈黑色的液热流）的高达 350°C 的海水中取样培养，得到嗜高温细菌群体。它们在无机盐（能源为硫化物）培养基上， 100°C ，1个大气压下生长迅速，伴随有甲烷、氢气和一氧化碳的产生。最近的结果显示，这些细菌能在高达 250°C 至 300°C ，265个大气压（在此压力下水可维持在液态直至 460°C ）的钛结构培养箱中（也即模拟取样海底中的生态环境）营化能无机自养型生长，并伴随有氢气、甲烷和一氧化碳的产生。培养基的能源是0.2%硫代硫酸钠，含有0.001%的酵母浸汁。

150°C 下它们的世代时间为8小时， 200°C 下1.5小时，而 250°C 仅40分钟。电镜下检查此培养物至少存在着二种形态上不同的细菌，它们有厚的细胞壁，含空胞，有含亚颗粒的内膜。对其蛋白质成分的分析显示，含有几乎所有20种常见氨基酸，另有5种未知氨基酸和小肽，它们占蛋白质的25%。这一发现不仅表明化能自养型细菌在极端环境下的生态分布及其在生物地质

化学的物质转化过程中的作用比原来了解的要更广泛，而且把地球上生命活动的温度上限由原来认为的 100°C 左右(3)提高到 250°C 以上。这一结果同时支持这样的假设，即，在所有其他生长所需的条件都得到满足的条件下，微生物生长的限制因子不是温度而是水是否仍在液体状态。

第二个发现是关于化能自养(硫)细菌与无脊椎动物的共生现象。人们在太平洋 Galapagos 断层的深处(2500米)发现一类属于须腕动物(Pogonophora)的巨大蠕虫，名为 *Riftia pachyptila* Johnes。它们没有嘴，消化器官和排泄器官，却生长繁殖良好，大者可长达1.5米。那么它们的营养来源何在呢？唯一有意思的线索是，此处海底有富含硫化氢的热液流冒出来(hydrothermal vents)。经过剖割和显微镜检查发现这些蠕虫的体内含有大量的细菌($0.16 - 0.3$ 微米 $\times$ 1.3微米，细胞壁有外膜，为典型的革兰氏阴性菌)。继而发现这些蠕虫的组织碎片在加入硫化物或硫代硫酸盐的条件下有很高的固定二氧化碳的活力。同时这些组织的无细胞提取液有很高的二磷酸核酮糖羧化酶(RUBP，此酶为固定二氧化碳的卡尔文循环中的关键酶)酶活。科学工作者还根据稳定碳同位素 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 的比值推算出相当大一部分蠕虫组织的碳元素来自二氧化碳。这些结果表明，这些细菌很可能是化能无机营养菌，它们的代谢能力提供了蠕虫生长所需要的大部分碳源和能源(4)。同时研究者发现这些蠕虫的血液中含有一种特殊的血红蛋白，它们对氧有很高的亲合力。其血液的载氧能力高达每100毫升血液，17毫升氧气无疑。这种特性为化能自养细菌氧化硫化物提供了所需要的氧。这种细菌的内共生现象在生长在海洋大陆

斜坡富含营养物质的沉积物（但含硫化物）区域的小型须腕动物中，以及在寡毛纲的 *Phalloedrillus leukoderinatus* Gieve（亦无嘴，消化和排泄器官）中也被发现(5)。另外从海底污泥和盐类沉积物（亦有硫化氢流放出来）中发现的双壳类 *Solemya velum* Say（Mollusca 门）也含有化能自养硫细菌(6)。这些发现表明，化能自养细菌与生活在富含还原性硫化合物环境中的无脊椎动物的共生现象是较为普遍的，很可能对后者的营养过程有极其重要的意义。但是，迄今为止，科学工作者还没能在离体条件下成功地培养，繁殖这些细菌，因而不能进一步研究它们。

另外，最近还分离鉴别了一些新的较特殊的化能自养菌。例如，去年报道了一个新的属，叫做 *Thermopofeus*（热变形菌），(7)，有4个种。它们能以氢气作为能源，以硫作为最终电子受体营无氧自养生长。代谢的主要产物是硫化氢气体。最适生长温度在85—90°C，*pH* 5.5—7左右。其中一个种 *T. tenax* Kral(DSM 2078)还能以一氧化碳作为唯一的碳源能源而生长，但需要硫作为末端电子受体。代谢的产物为等量的硫化氢和二氧化碳。这4个种除一个为专性自养菌外，另外三个种都是兼性自养菌。同时报道的另外二个种 *Thermodiscus maritimus* 和 *Pyrodictium occultum* 亦具有以上类似的生长特性，并均为专性自养菌。它们生长的条件与地球早期的环境非常相似，即，无氧，富含 CO_2 ， CO ， H_2 ， S 等无机化合物。因此，这类细菌所进行的硫呼吸生长与产甲烷氢细菌一样很可能代表了一种原始的生命方式，并可认为是其他氢氧化菌的前辈。因而，在生物进化的研究上，这类细菌有其特殊意义。

2. 化能自养菌氧化无机化合物的能量学

化能自养菌的能量代谢与异养细菌相比主要有二个特点。一、由脱氢酶或氧化还原酶参与的基质氧化直接与电子呼吸链发生联系，而不经中间媒介或没有可分离的中间产物，所以严格的讲没有一个前期的类似于糖酵解或三羧酸循环等这样的代谢过程。这使得研究化能自养细菌氧化代谢无机化合物的机理与能量学的关系密不可分。二、更加多样化。化能自养细菌的呼吸链系统除了具有异养细菌的多样化 (diversity) 特点，如分枝的末端电子载体等，还具有后者所没有的非统一性，即各类菌各有其特殊的基质脱氢酶或氧化还原酶和呼吸链始端电子载体，从不同的基质脱下的电子进入呼吸链的部位均不一样。这是由于这些作为基质的无机化合物的性质 (氧化还原电位，自由能，化学结构，稳定性，甚至在水溶液中的溶解度等等) 都不同而造成的。这种多样化给深入且广泛地研究或全面地描述化能自养菌的能量代谢机理带来了不少困难。当然，从另一方面也为对这一生命方式有兴趣的研究者提供了广阔的用武之地。此外，低生长率 (除了一些氢细菌外) 也给研究它们的生化特性造成了很大的困难。生长速度慢，生长量低的最主要原因是大量 ATP 被耗用于还原固定二氧化碳所需的 NAD(P)^+ 。迄今为止化能自养细菌中所发现的二氧化碳固定途径均为卡尔文循环。

总而言之，对化能自养菌能量代谢的研究和认识较异养菌和光合细菌要落后不少。本文描述的大部分内容是新的研究结果，有的是基于实验结果上的推论，大都还有待于更多实验的证实。

2.1 氨的氧化

氨氧化为硝酸分二步进行, $\text{NH}_3 + 1\frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_2 + \text{H}_2\text{O}$,
 $\text{HNO}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_3$, 分别由亚硝化细菌和硝化细菌所催化,
以下逐一介绍。

2.1.1 氨氧化为亚硝酸(8), (9), (10)。亦分为二步进行。第一步是 NH_3 在加氧酶的作用下生成羟胺, $\text{NH}_3 + \text{XH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{A} + \text{H}_2\text{O}$ 。由于 $\text{NH}_2\text{OH} / \text{NH}_3$ 对的氧化还原电位很高 ($E_h = +899\text{mV}$), 所以此步为耗能反应。能量来自式中的供氢体 XH_2 。X 究竟为何物仍无最后定论(见下)。O₂¹⁸ 实验证实, 羟胺的氧来自氧气而不是水。催化此反应的酶仍不清楚。第二步是 $\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow (\text{NOH}) + 2e^- + 2\text{H}^+$, 由羟胺·细胞色素 C 氧化还原酶(分子量 $180-200 \times 10^3$) 所催化。释出的电子经细胞色素 C 进入呼吸链。同时细胞色素 C₁, C₂, C₃ 可能以复合酶的形式参与这一反应。硝酰基(NOH)为假设的中间产物, 它十分不稳定, 很快生成 HNO_2 和 HNO_3 。实际(用无细胞提取液实验)得到的产物为这二种气体的混合物。羟胺/亚硝酸的 E_h 为 66mV , 所以这步反应足以合成一分子 ATP。整个反应可能是按照以下步骤进行的(图 2.1.1)。图中所示亚硝酸的二个氧原子分别来自氧气和水。但有人认为, 这二个氧原子均来自氧气。在这种情况下, 反应步骤似可修改为如图 2.1.2 所示。其中最后一步和第一步反应是一起进行的。氧化 NH_3 的第一步反应所需的能量由 ONOOH 提供, 这点介决了图 2.1.1 中 X 的困难。由于实验条件下, 亚硝酸会与水的氧原子迅速相交换, 实验上虽已证实亚硝酸中至少一个氧原子来自氧气却很难确定另一个

图 2. 1. 1 亚硝化细菌氧化氨至亚硝酸，可能
的途径(I)

图 2. 1. 2 亚硝化细菌氧化氨至亚硝酸，可能
的途径(II)

氧原子的来源，所以此问题仍悬而未决。F... (一种在 460nm
有还原吸收峰的细胞色素) 很可能也参与以上所示的加氧反应。

氨氧化为亚硝酸全部反应消耗 1.5 分子氧，如果其中 1 分子氧是经加氧酶催化直接来自氧气，那么只有 0.5 分子氧来自水，也即由基质（具体地说是由羟胺至硝酸盐）脱下的一对电子是经呼吸链还原氧的。因为电子是从细胞色素 C 进入呼吸链，全部反应就只能产生约 1 分子 ATP。很可能是由于这类细菌大都具有很复杂的伸延到细胞质内同心层似的膜结构，它们的无细胞提取液的氧化和磷酸化的偶联效率很低，测得的 $\rightarrow H^+ / O$ 比亦较低。但是经 ATP 驱动的反向电子传道的 NAD^+ 的还原却在无细胞提取液中得到证现。（关于以上方法可参见 2.2 节和第 4 章）。

对亚硝化菌呼吸链的空间排列所知至少。但是，由于羟胺产生于细胞质内，因而羟胺：细胞色素 C 氧化还原酶和细胞色素氧化酶一样也位于膜的内侧，两者构成一个迁移质子的氧还圈（参见第 4 章）。

2.1.2 亚硝酸氧化为硝酸(8), (9), (11) 由于此反应,

$NO_2^- + 0.5 O_2 \rightarrow NO_3^-$, 只牵涉二个电子的传递, 所以其机理已得到较透彻的阐明。图 2.1.3 是这一氧化过程的模式图。

¹⁸O 实验证实硝酸中的氧原子来自水。图中所示膜上的细胞色素的中点氧化还原电位 (E_m) 分别是, 细胞色素 a_1 (+140mV + 350mV, 它不与氧起反应), 细胞色素 C (+270mV), 细胞色素氧化酶 aa_3 (+240, +400mV), 以及钼中心 (M_o , $E_m = +340mV$)。 a_1 和 M_o 接受从亚硝酸 (NO_2^- / NO , 对的 E^0 为 360mV) 上脱下的电子和质子, 这步反应不消耗能量。但下一步把 H^- (即 $H^+ + 2e^-$) 或 $2H$ (究竟为哪种还未定) 移往细胞色素 C 的反应却是耗能的, 是由 $\Delta\psi$ (膜电位差) 驱动

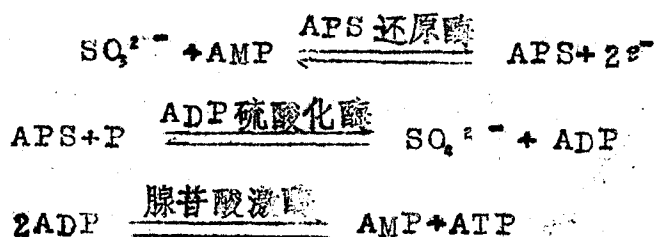
图 2.1.3 硝化细菌氧化亚硝酸的机理
(迁移质子的氧还圈)

的。因为这步反应受到 FCCP (介偶联剂, 抑制 ΔP) 或钒霉素 + 钾离子 (介除 $\Delta\psi$) 的抑制, 而不受 NH_4Cl (介除 ΔpH) 的抑制, 并为加入 ATP 所增强。接着, 经过细胞色素 c 将质子向外逐出 (具体机理不详, 有人认为一质子泵参与此反应), 二个电子间内转移到细胞色素 aa_3 , 最终还原氧。这类细菌的能量偶联膜构成类似线粒体膜的膜内褶, 制备得到的内翻外膜囊具有较高的 ATP 合成效率。测得的 ATP/O 比 (以亚硝酸为底物) 为 0.5 到 0.9 (即接近于 1), 此值比较符合以上讲的 2H^+ 逐出 (即 $\rightarrow\text{H}^+/\text{O}$ 为 2; 且一般认为 H^+/ATP 比为 2)。但实验上很难测定 $\rightarrow\text{H}^+/\text{O}$ 比, 因为测定质子迁移的最佳条件对亚硝酸的氧化有抑制作用。

2.2 还原性硫化合物的氧化(1203)

能够在还原性硫化合物上自养生长的硫细菌有不少(如硫化叶菌(*Sulfolobus*)等(1)),但从能量学角度说,研究得最多的还是硫杆菌(*thiobacilli*)。由于所有的硫杆菌都能在中性 pH 条件下代谢硫代硫酸盐,和由于这种物质的水溶性,不挥发性和定性定量化学方法早已健全,所以它比硫化物,硫(硫磺)等更适于作为研究生化机理的基质。因此本节的讨论将着重在这一方面。其次,这几年来这方面研究的突破性进展是用多能硫杆菌(*Thiobacillus Versutus*, 原叫 A_2)作材料取得的,所以将较多地引用这个菌的例子。最后,本节在阐述新进展同时,介绍了有关能量学研究的基本方法,以期使读者对一些原理和结论了解得更清楚一些。

2.2.1 电子传递链及其在能量代谢中的作用(1004) 硫杆菌氧化硫化合物主要是通过氧化磷酸化取得能量,而基质水平的磷酸化,即所谓APS(磷酸腺苷硫酸盐)途径



却是或者不存在(如多能硫杆菌)或者仅起很次要的作用。测定这种途径存在与否可用二种方法。一是测定介偶联剂(如2,4-硝基苯酚, FCCP)对无细胞粗提液合成ATP或固定 CO_2 能力的影响,如果这种能力被全部抑制,则不存在基质水平磷酸化。

二是测定 APS 还原酶的活性，最简单的方法是向无细胞提取液加入 AMP 和 SO_4^{2-} 后测定 SO_4^{2-} 形成的速率。

硫杆菌呼吸链的组成基本上与线粒体和以脱氮副球菌 (*Paracoccus denitrificans*) 为典型代表的革兰氏阴性异养菌相类似，即含有细胞色素氧化酶 aa_3 ，，细胞色素 b (有的含二种 b)，泛醌，黄素蛋白，NADH 脱氢酶，琥珀酸脱氢酶等等。各个种具体的组成种类和含量不完全相同。最简便的测定呼吸链组成的方法是差示分光光谱法。所用的分光光度计示意图见图 2. 2. 1。二只比色杯含有同样的浓膜制备物或无细胞

图 2. 2. 1 分裂光(波)束分光光度计示意图

粗提液或菌悬液，一只加入还原剂(通常用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 以使其处于彻底还原状态，另一只经充分搅动溶液后使其处于氧化状态，然后在选定的波长范围内(通常是 400nm 至 660nm) 同时扫描二只比色杯，得到的还原状态减去氧化状态的曲线纪录在记录仪上，即为差示光谱(difference Spectrum)图

2. 2. 2。单独扫描还原的样品亦可得到绝对光谱，但效果(图谱上峰与谷的差异性)没有前者好。此法通常可检测出 aa_3 ，

(α 帶在 600—610nm), C (α 帶在 550nm 左右), 和黃素蛋白 (450nm 處的一低谷)。細胞色素 b 的 α 帶在 560nm 處, 但通常為強烈的 C 所蓋沒 (圖 2.2.2a), 只有在膜制备物光譜中才可辨 (圖 2.2.2(b))。對細胞色素 b 的鑒別, 區別細胞

圖 2.2.2 多能硫桿菌無細胞粗提液 (a) 和膜懸液 (b) 的差示光譜。樣品溫度, 室溫。

色素氧化酶 aa , , 以及測定這些細胞色素的中點氧化還原電位 (E_m) 要用與光譜法相結合的氧化還原滴定法, 此法較複雜, 在此不擬介紹。NADH 脫氫酶和琥珀酸脫氫酶可用酶法 (如氧電極方法) 測定。但需用無細胞粗提液或膜碎片。因這二種酶均位

于细胞膜内侧上，而自养生长的细菌虽含这二种酶，却不具备使二种基质进入细胞质的运输系统。氧电极是一种测定溶液中氧含量的装置（图 2. 2. 3），氧含量的变化通过电极变为电流的变化而在相连的记录仪上记录下来。这样可测出氧消耗的速率。此法比瓦勃氏呼吸器法要灵敏，简便得多。测定时只需向保温在电极小室中的粗提液加入 NADH 或琥珀酸，观察氧耗速率即可。

图 2. 2. 3. 氧电极 (Rank 式) 剖面图

在大多数硫杆菌中，从硫代硫酸盐或硫化物上脱下的电子经细胞色素 c 与呼吸链相偶联。只有脱氮硫杆菌中，电子是从黄素蛋白或细胞色素 b 的水平上进入呼吸链的。这些结论主要来自以下抑制剂和氧电极实验。常用的呼吸链抑制剂有以下几种：鱼苊酮，安密妥（作用于复合体 I），抗霉素 A， $\text{HQN} \cdot$ （抑制泛醌和 b 至 $\bullet$ 之间的电子传递，即复合体 III），氰化物，叠氮盐（抑制 aa_3 ，即复合体 IV）。用线粒体，细菌或细菌粗提液为材料，在氧电极上逐一加入呼吸基质和抑制剂可得到如图 2. 2. 4 (b)

所示的记录曲线。大多数硫杆菌（如拿破里硫杆菌，氧化硫硫杆菌等）及其无细胞提取液氧化硫代硫酸盐的能力不受抗霉素A或HQNO的影响，说明电子是从细胞色素C进入呼吸链的。而脱氮硫杆菌氧化硫代硫酸盐的活性却为抗霉素A或HQNO所抑制。

图 2. 2. 4 (a) 几种呼吸链抑制剂的作用部位（所示为线粒体呼吸链的大致组成）(b) 确定电子进入呼吸链部位的氧电极实验

• HQNO = 2-heptyl 4-hydroxyquinoline N-oxide. TMPD = 四甲基对苯二胺