



世界农业
丛刊

生物固氮译丛

(二)

农业出版社

生 物 固 氮 译 丛

(二)

刘中柱 主编

农 业 出 版 社

64121



《世界农业》丛刊
生物固氮译丛
(二)

刘中柱 主编

农业出版社出版 (北京朝内大街130号)
新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 6.5 印张 158 千字
1982 年 2 月第 1 版 1982 年 2 月北京第 1 次印刷
印数 1—2,400 册

统一书号 16144·2411 定价 0.71 元

目 录

一、综 述

生物固氮	K. T. Shanmugam 等 (1)
生物固氮作用应用于粮食和纤维生产——有哪些现实可能性	H. J. Evans 等 (10)
通过生物固氮改善作物氮素营养的现状与前景	J. Döbereiner (20)
固氮研究中 ¹⁵ N 应用的若干概念	R. J. Rennie 等 (25)

二、研究报告

氮同化酶、蛋白质与叶绿素在萍与藻之间的分布	T. B. Ray 等 (38)
根瘤菌恒化培养物中的固氮酶	F. J. Bergersen (46)
土壤与根际的固氮位置	S. Panichsakpatana 等 (53)
温带地区管理措施对固氮的影响	C. Hera (57)
利用 ¹⁵ N 研究蓝藻固氮和铵的同化	J. C. Meeks 等 (65)
印度田皂角的茎瘤及其固氮能力	M. Yatazawa 等 (70)
从水稻根系分离自生固氮菌需要低水平的结合态氮	I. Watanabe 等 (73)

三、技术与方法

研究土壤中根瘤菌的荧光抗体法	E. L. Schmidt 等 (75)
根据 ¹⁵ N 天然丰度的变化, 估算田间大豆的共生固氮量	N. Amarger 等 (81)
用 N ₂ /Ar 比率法研究淹水土壤中的固氮作用	Hidenori Wada 等 (89)
测定渍水土壤异养固氮时, 控制乙炔还原的因素	Tatsuhiko Matsuguchi 等 (91)
利用氮示踪技术研究固氮作用 (摘译)	J. M. Bremner (98)

1987.5

生物固氮

K. T. Shanmugam F. O'Gara

K. Andersen R. C. Valentine

引 言

只有细菌和蓝藻进化形成了固氮能力。固氮是由一连串叫做“Nif”基因操纵的过程。在自生细菌——肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 中, 固氮基因已得到详细肯定。

像克氏杆菌这类自生细菌, 能使固氮酶产生的 NH_4^+ 与细胞的生物合成相结合, 而不使任何可检出的 NH_4^+ 输进生长培养基; 如果环境中存在结合氮 (例如 NH_4^+ 或 NO_3^-), 菌体就不会合成固氮酶。与此相反, 像根瘤菌 (*Rhizobium* spp.) 这类能在豆科植物根部形成根瘤的共生细菌, 其固氮基因通常被去阻遏 (甚至在 NH_4^+ 存在下也有固氮酶活性), 而导致结合态氮的合成, 并将之输往外部环境 (以根瘤菌言则输到寄主植物细胞的细胞质中去)。也就是说, 固氮基因 (Nif) 的去阻遏导致了大量大气氮被固定, 这在全球规模的人类食物链中起着决定性的作用。

目前有好些证据说明, 遗传机制也像生物化学机制那样, 可能对于被固定氮产物的合成以供细胞需要是有作用的。本文阐述自生细菌和共生细菌固氮过程中调节作用的现代概念。

固氮基因的去阻遏

本节将论述肺炎克氏杆菌固氮基因的控制和表达的最新进展, 着重论述固氮酶去阻遏的突变型菌株, 该菌株会输出大量结合态氮。

肺炎克氏杆菌把固氮生成的氨 (通过谷酰胺合成酶和谷氨酸合成酶) 同化到谷氨酸的水平。曾发现 NH_4^+ 或氨基酸能阻遏固氮酶的生物合成, 然而, 氨基酸的阻遏效应和细胞 (通过内部代谢) 生成的 NH_4^+ 的阻遏效应难以区别。由于固氮去阻遏的突变型菌株在 NH_4^+ 存在下也能合成固氮酶, 因而这个问题却是可以解决的。对这些菌株的研究表明, NH_4^+ 的阻遏性能与细胞能把 NH_4^+ 转化到谷酰胺和谷氨酸的水平有关。从本质上说, 这些实验表明了固氮酶是在 NH_4^+ 不被同化成氨基酸的条件下生成的, 每当 NH_4^+ 被同化到氨基酸的水平时, 固氮酶的生成总是被阻遏。

以缺乏谷氨酸合成酶活性的突变菌株 (Asm^-) 为亲本, 分离并描述了肺炎克氏杆菌的三类固氮酶去阻遏的突变菌株 (见表 1)。这些菌株的生化分析表明, 其中一类突变型 (例如菌株 SK-24, SK-28 和 SK-29) 能够形成谷酰胺合成酶活性, 但不具谷氨酸脱氢酶

表 1 肺炎克氏杆菌去阻遏突变体的固氮 (Nif) 性质

固 氮 酶 (微克分子/小时每毫克蛋白质)			谷酰胺合成酶 谷氨酸脱氢酶 (纤克分子/分钟每毫克蛋白质)				分泌的 NH_4^+ (微克分子/毫 克蛋白质)
菌 株	$-\text{NH}_4^+$	$+\text{NH}_4^+$	$-\text{NH}_4^+$	$+\text{NH}_4^+$	$-\text{NH}_4^+$	$+\text{NH}_4^+$	
M5A1	4.04	0.00	878	229	<5	126	—
Asm-1	3.14	0.00	653	147	18	116	—
SK-24	2.80	2.42	684	866	<5	<5	92
SK-28	3.27	3.05	1006	1055	<5	<5	280
SK-29	2.82	2.01	739	627	<5	<5	220
SK-25	4.47	3.70	0	0	12	16	450
SK-26	3.82	2.91	0	0	17	18	—
SK-27	2.88	1.81	0	0	17	15	270
SK-55	2.53	1.92	6	0	20	20	230
SK-56	3.19	2.29	14	21	22	24	190

活性。另一类突变型 (glnA^-) 不能形成可检出的谷酰胺合成酶活性。这第二类又可再分成二群: (1) 能够催化生成无活性的谷酰胺合成酶蛋白质 (例如菌株 SK-27, SK-55 和 SK-56); (2) 经免疫学鉴定, 不含可检出的谷酰胺合成酶蛋白质 (例如菌株 SK-25 和 SK-26)。所有这三类突变株都能从固定的 N_2 分泌出大量的 NH_4^+ 。某些突变株处于不分裂状态时, 分泌 NH_4^+ 的时间超过一个星期。

Sfreicher 等人曾描述一类需谷酰胺的突变型 (从肺炎克氏杆菌的 Asm^+ 菌株分离的)。这类突变型与上述其他 gln^- 菌株 (例如菌株 SK-27) 相反, 在菌株 SK-27 和亲本菌株都能够形成固氮酶活性的条件下, 却不能够形成任何可检出的固氮酶活性。进一步分析发现, 在培养基中的谷酰胺 (这是生长所必需的补给) 浓度降到非常低时, 这些菌株能够形成固氮酶活性 (K. Andersen 和 K. T. Shanmugan, 未发表的论文)。

最近已发现, 某些混合氨基酸 (例如谷酰胺和天冬氨酸) 对在 NH_4^+ 存在下固氮酶生物合成去阻遏的菌株有完全阻遏其固氮酶生物合成的作用。还有当 NH_4^+ 与高浓度的谷酰胺混合时, 也能完全阻遏其需谷酰胺菌株的固氮酶生物合成。这些菌株在高浓度 (1 毫克/毫升) 谷酰胺存在下把 NH_4^+ 同化了。 NH_4^+ 对固氮酶生物合成的阻遏及其后 NH_4^+ 被同化这两者间的牢固关系已经确立, 其程度可以假定已达到氨基酸的水平。这些结果的最简单解释是, 固氮酶生物合成的全部调节机制包括从 NH_4^+ 转化到氨基酸的水平这一过程。

上述肺炎克氏杆菌固氮酶生物合成控制系统的形式, 在其他自生固氮生物中似乎也是这样控制的。这已为下面的事实所证实, 即在含有亚砷次胺蛋胺酸 (简称 MSX, 是谷酰胺合成酶的一种抑制剂) 的培养基中, NH_4^+ 的存在, 使固氮酶的生物合成去阻遏 (见表 2)。

MSX 在结构上与谷氨酸相似 (见图 1), 是 Gordon 和 Brill 最早用来研究肺炎克氏杆菌和棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 的固氮酶合成规律。他们观察到 MSX 存在时, 这两种有机体内的固氮酶均被去阻遏, 而棕色固氮菌在这些条件下从 N_2 生成的 NH_4^+ 则被分泌到培养基中去。不同的研究者应用各种有机体 [深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*); 柱状鱼腥藻 (*Anabaena cylindrica*); 带脂螺菌 (*Spirillum lipoferum*), 见表 2] 进行了类似的实验。在 MSX 存在下, 深红螺菌和柱状鱼腥藻都不能同化固氮酶生成的 NH_4^+ , 而是把 NH_4^+ 分泌到培养基中去。MSX 表现出能抑制这两种有机体的谷酰胺

表2 各种固氮有机体中 NH_4^+ 同化酶的水平与固氮酶的阻遏或去阻遏
(由 NH_4^+ 产生) 之间的关系^a

有机体	被 NH_4^+ 阻 遏	谷酰胺合 成酶 ^b	谷氨酸合成酶 ^c		谷氨酸脱氢酶 ^c		固氮酶的 去阻遏 ^d	参考文献
			NADH	NADPH	NADH	NADPH		
肺炎克氏杆菌 (<i>K. pneumoniae</i>)	100%	26%	UD	53	UD	126	-	50
克氏杆菌属突变株	0	100%	UD	<5	UD	<5	+	50
MSX 存在时的肺炎克氏杆菌	0	ND	ND	ND	ND	ND	+	20
MSX 存在时的棕色固氮菌	0	ND	ND	ND	ND	ND	+	20
带脂螺菌 (<i>S. lipoferum</i>)	100%	13%	<5	52	27	<5	-	38
MSX 存在时的带脂螺菌	0	ND	ND	ND	ND	ND	+	38
MSX 存在时的蓝绿藻	0	9%	ND	ND	ND	ND	+	55
共生蓝绿藻	50%	6%	ND	ND	ND	<5	+	56
MSX 存在时的深红螺菌	0	5%	ND	ND	ND	ND	+	65
三叶草根瘤菌 (自生, 需氧) (<i>R. trifolii</i>) + 谷氨酸		100%	18	8	18	<5		35, 36
+ 亮氨酸		64%	6	20	6	ND		51
三叶草根瘤菌突变株 (自生固氮酶诱导)	50—70%	13%	<5	<5	<5	ND	+	37
类菌体—大豆根瘤菌 (<i>R. japonicum</i>)	ND	14%	55	<5	19	<5	+	13
<i>R. leguminosarum</i> - <i>Vicia faba</i>	ND	9%	<5	12	15	<5	+	13
<i>R. leguminosarum</i> - <i>Pisum sativum</i>	ND	1%	<5	<5	33	<5	+	13

a. UD 未检定, ND 测定不出, 其它详见正文。

b. NH_4^+ 存在时的酶活性 (以 NH_4^+ 不存在时对照值的%计算)。

c. 谷氨酸合成酶和谷氨酸脱氢酶的活性单位是纤克分子/分钟每毫克蛋白质。

d. (+) 号表示 NH_4^+ 存在时合成固氮酶, (-) 号表示固氮酶的合成被 NH_4^+ 阻遏。

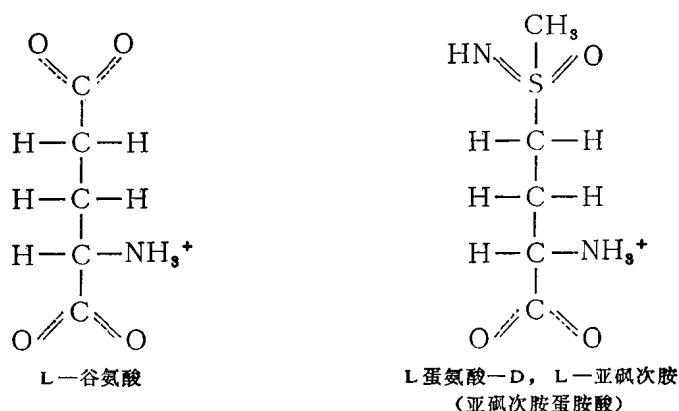


图1 L-谷氨酸及其结构类似物L-蛋氨酸-D, L-亚砷次胺(MSX)的结构

合成酶活性。由于谷酰胺合成酶是 NH_4^+ 转化到谷氨酸的水平进而变成细胞物质的第一种酶, 我们就有理由设想, 固氮酶合成的抑制作用是与 MSX 对 NH_4^+ 同化作用的抑制有关。

根据早期的实验,有人提出谷酰胺合成酶是固氮基因(Nif)转录过程的一种控制要素。不过,由上述结果看,对这些调节性突变的其他多效性效应进行其本质(例如进入细胞的各种代谢物的输送, NH_4^+ 的同化率等)的鉴定似乎是重要的。因此,还必须有更多资料才能鉴定出控制固氮酶合成的细胞的成分。

固氮作用的能量损耗

从若干实验室的实验可以肯定生物固氮需要输入大量代谢能。已有证据表明,能量的供应往往是限制共生固氮效率重要的环节。可见,在固氮过程中,能量的供应可能间接地起决定作用。所以一幅完整的固氮酶调节图要包括ATP和还原剂——它们是固氮酶反应所需的基础底物。

固氮酶催化产 H_2

业已发现,至今所有离析的固氮酶制剂都能催化放 H_2 (需ATP),即使在 N_2 存在下也是如此。现有证据表明,这种反应在各种固氮有机体体内也有发生。据Schubert和Evans报告,在大豆和其他豆科植物的根瘤中,由于固氮酶催化放 H_2 ,使能量以ATP和还原能损失的数量高达固氮酶消耗总能量的40—60%。不过,由于在 H_2 的产生与吸收之间存在着其他间接的脱氢酶系统,使得大多数固氮有机体内的定量测定变得复杂化了。

以通常产氢系统为模式的肺炎克氏杆菌突变株,已从固氮酶去阻遏的SK-24和SK-25的突变菌株以抗氯酸盐衍生物的形式被分离出来。据鉴定,在这些抗氯酸盐突变株中,产 H_2 的唯一来源是通过固氮酶的。因此,这些菌株为测定体内固氮酶催化的放 H_2 作用提供了方便的材料。测定结果表明,即使在最适条件(25℃, pH7.3)下,体内固氮酶每催化还原一克分子 N_2 ,约生成1.3克分子 H_2 。看来,固氮酶催化的放氢作用对于提供固氮所需的高能量可能是个重要因素。这里的数据(H_2/NH_4^+ 克分子比为0.65)表明,固氮酶消耗的总能量几乎有三分之一损失于放 H_2 过程。有些因固氮酶催化放 H_2 而被损失的能量可能在氢化酶摄取再循环的 H_2 时被回收。据估计,氢细菌每氧化一分子 H_2 ,可以获得2—3分子ATP。

表观ATP需要量

固氮酶还原 N_2 或其他底物过程,除需要适当的还原剂外,还需要ATP。用不同有机体的固氮酶在体外进行的最新研究报告指出,还原每克分子 N_2 至少需要12—15克分子ATP,不过实验条件不同使数据有很大变化,估计各种有机体体内能量需要量的变幅为4—5到29ATP/ N_2 (见表3)。这些估计是根据以 N_2 或 NH_4^+ 为N源比较其生长量得出的。

表3 不同有机体内固氮作用的ATP需要量

有机体	估价方法	ATP/ N_2
圆褐固氮菌 (<i>Azotobacter chroococcum</i>)	比较 N_2 和 NH_4^+ 的生长量	4—5
巴氏固氮梭状芽孢杆菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>)	比较 N_2 和 NH_4^+ 的生长量	20
肺炎克氏杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	比较 N_2 和 NH_4^+ 的生长量	29
肺炎克氏杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	根据Nif去阻遏突变体菌株排出的 NH_4^+	14—16

圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 的报告数值低, 其部分原因可能是由于固氮酶反应中释放的 H_2 再循环造成的, 因为 H_2 在圆褐固氮菌中有助于氧化磷酸化反应。4—5 ATP/ N_2 这个估计值也包括为除去固氮酶的“呼吸保护”所造成的呼吸损失而进行的足量推算。应用固氮酶去阻遏肺炎克氏杆菌的突变菌株, 能够直接鉴定出 NH_4^+ 和 H_2 的产物。

去阻遏突变株中不生长的细胞在最适条件下每固定一分子 N_2 都消耗 7.5—8.5 分子葡萄糖。弄清发酵途径就可估计出固氮所需的 ATP 量。肺炎克氏杆菌通过 EMP 酵解途径把葡萄糖酵解成丙酮酸, 每克分子葡萄糖产生 2 分子 ATP。丙酮酸的分解还可以得到额外的 ATP。醋酸盐的生成可以作为这种额外 ATP 的一种量度。在最适条件 (25°C, pH 7.3) 下, 曾测得五个不同的肺炎克氏杆菌突变株的表现 ATP 需要量为 21—25 ATP/ N_2 。这些数据是根据总的葡萄糖消耗率计算的, 还未对葡萄糖分解代谢的基础水平进行过校正。所以, 这些计算也包括细胞的“维持”能量的需要量。当 pH 值降低到 6.0 以下或者当温度上升到 25°C 以上时, 表现 ATP 的总需要量会增加, 在长时期培育后也会出现这种情形。

根据 Nif 突变株的葡萄糖消耗率估计出“维持”能量的需要量。这样校正得出固氮酶反应的表现 ATP 需要量为 14—16 ATP/ N_2 。这个数值大大低于 29 ATP/ N_2 。后者是以 NH_4^+ 和 N_2 作 N 源通过比较肺炎克氏杆菌的生长细胞的生长量得到的 (见表 3)。

如果把观察到的固氮酶催化的放 H_2 (H_2/NH_4^+ 克分子比为 0.65) 考虑在内的话, 就会计算出表现 ATP/2e 数值大约为 4。这个数值与最近报告的纯固氮酶制剂的数值相吻合。

N_2 还原成 NH_4^+ 也需要低电位电子的能量。从观察到的最小 H_2/NH_4^+ 比值为 0.65 可以说明, 还原每分子 N_2 至少消耗 4.3 电子对。正在呼吸的活体中低电位电子和 ATP 可以部分相互转换能量形式, 而且如果 4.3 对低电位电子用于氧化磷酸化的话, 大约可以产生 $1\frac{1}{3}$ 分子 ATP (假设 ATP/2e = 3)。这意味着体内固 N_2 耗能的总额 (以 ATP 计) 接近 30 ATP/ N_2 被用于固氮酶反应。

在考虑任何生物系统的固 N_2 能量时, 都必须把细胞的基础代谢率 (“维持”能量的需要量) 考虑在内。为了使固氮酶活性在一个较长时间里始终保持在高水平上, 似乎必须有一定量的蛋白质在细胞中周转。用氯霉素抑制细胞蛋白质的合成会导致固氮酶活性的下降。把这点考虑在内, 固氮的最低能量需要量可能高达 35—40 ATP/ N_2 (据总的葡萄糖损耗率加上假定的还原剂能量含量进行计算)。

在所有的能量损耗中, “维持”能量需要量的作用随着固 N_2 率的不断下降而增大。它也跟着不同的有机体而有所变化。像自生固氮菌属这类需氧固 N_2 细菌的固氮酶的“呼吸保护”过程, 可能损失大量的能量。

总之, 体内的实验表明, 固氮需要输入大量的代谢能。可以从这个角度来理解固氮作用极其精巧的遗传控制系统的进化。由于固氮需要高能量, 所以当其他氮源可利用于生长时, 生物体固氮作用将处于不利地位。

共生固氮

人们发现, 根瘤菌属的某些菌种在自生状态时能够合成固氮酶。据此, 根瘤菌显然带

有固氮基因。据报道，自生根瘤菌形成的固氮酶其活性水平与离体的类菌体相近。然而，值得注意的是，这些菌种无一能够在自生状态下以固定的氮作为唯一的氮源用以生长。用 $^{15}\text{N}_2$ 实验发现，固定的氮有94%以上被自生大豆根瘤菌 (*R. japonicum*) 所输出。离体的类菌体也有类似的结果报道。自生根瘤菌的固氮系统可能含有固氮酶(铁—钼蛋白和铁蛋白亚基)的，还可能含有各种补充ATP和还原剂(包括还原型吡啶核苷酸-铁氧还蛋白还原酶，铁氧还蛋白，黄素氧还蛋白或其他电子偶联因子)的酶。也可能发生细胞色素合成模型和电子运载链的其他成分的重大变更，因而导致形成在低氧浓度下能起作用的新呼吸链。这些代谢上的显著变化可以用不同基因的表达来说明。换言之，自生根瘤菌的固氮作用不仅涉及到固氮酶结构基因的表达，而且涉及到一整串其他运载途径和酶的表达。据观察，在自生根瘤菌的固氮培养物中，异化的硝酸盐还原酶和从环境中吸取氢的氢化酶系统是同时被诱发的(F. O' Gara 未发表的材料)。后面将要谈到，这些酶系统能够为固氮提供能量。其中某些数据表明，自生根瘤菌的固氮培养物可能与根瘤中的类菌体相似。因此，研究自生根瘤菌中与(或者仅仅与)固氮酶(及其操纵)一道被形成的基因产物是颇有意义的。

本节描述在根瘤菌固氮过程中似乎被封闭的一组关键性酶—— NH_4^+ 同化酶(谷酰胺合成酶和谷氨酸合酶)，这种酶把由 N_2 合成的 NH_4^+ 转变为氨基酸。

用 ^{15}N 分析已经发现，自生根瘤菌大概以 NH_4^+ 的形式排出大部分固定的氮。例如，自生大豆根瘤菌有94%的固定 $^{15}\text{N}_2$ 从细胞上清液中以 NH_4^+ 的形式被回收(见表4)。正如表4所归纳的，以豇豆菌株32HL来说，其细胞上清液中回收的 NH_4^+ 部分的富集 ^{15}N 比细胞总氮的 NH_4^+ 部分测出的富集 ^{15}N 高60—80%；以大豆根瘤菌菌株CB1809来说则高94%，这个论证(即较高的 ^{15}N 富集在细胞上清液中)表明，大部分固定的氮已被这些根瘤菌培养物输出。

表4 自生根瘤菌固定氮的输出

根瘤菌种	实 验	剩余的 ^{15}N 原子%*		固定的纤克分子N/ 毫克蛋白质每小时	上清液部分的 $^{15}\text{N}\%$
		细 胞 氮	细胞上清液部分		
“大豆”	I	0.150	0.423	0.17	65
菌株32HL	II	0.040	0.202	0.09	80
大豆根瘤菌 (<i>R. japonicum</i>)		0.020	0.341	0.09	94

* 根据未标记 N_2 存在下生长的对照细胞和上清液部分。

用离体的类菌体进行的许多研究发现，导致谷氨酸——谷酰胺族氨基酸生物合成的 NH_4^+ 同化酶的活性非常之低，这也是很好的论据，据 Bergersen 和 Turner 更早的报告，离体的类菌体能固定 $^{15}\text{N}_2$ 并以 NH_4^+ 的形式释放出。

根瘤菌 NH_4^+ 同化酶的调节机制是很有意义的，因为这些酶的水平能够决定氮的大部分去向，使大部分氮从类菌体输送到植株中去。换句话说，固定的 N_2 在共生生物和它们的寄主之间的分配，可能是通过这些酶的活性来控制的。

有间接证据证明，谷氨酸能在 NH_4^+ 同化酶中起重要的调节作用，从而导致固定氮的输出。例如，当三叶草根瘤菌 (*R. trifolii*, 自生) 与谷氨酸和 NH_4^+ 同时存在时，它明

显地选择谷氨酸作为N源，只要培养基中有谷氨酸存在，它就不利用任何形式的 NH_4^+ 。相反，当培养基中用L-天冬氨酸或L-亮氨酸来代替谷氨酸时，三叶草根瘤菌就把 NH_4^+ 用于细胞生长。还发现当培养基中含有L-谷氨酸时，细胞中谷氨酸合成酶的活性也是低的。只要培养基中有天冬氨酸还是亮氨酸（代替谷氨酸）都能诱导有机体产生更高水平的谷氨酸合成酶活性。谷氨酸合成酶的存在与否，与细胞内利用 NH_4^+ 的模式很相称。 NH_4^+ 也能阻遏谷酰胺合成酶的活性水平。 NH_4^+ 转化成谷酰胺过程被阻塞（由于谷酰胺合成酶活性水平低）可能是固氮酶阻抑的原因，即使在 NH_4^+ 存在下也是如此。

共生固氮的统一概念

只有三种类型的固 N_2 细菌已经进化成能够与高等植物形成互利的共生结合，它们是豆科植物的根瘤菌（根瘤细菌），在桉木属（*Alnus*）和 *Purshia* 属等树种上面形成根瘤的 *Frankia*（一种未鉴定的类似放线菌的土壤微生物）以及具异形胞的蓝藻（一类最混乱的共生生物，能够与许多适合的寄主共生）。由于根际共生已经研究得很详细，本节的重点将放在共生固氮的必要条件上（见图2），这些条件可能是所有共生固氮微生物共有的。

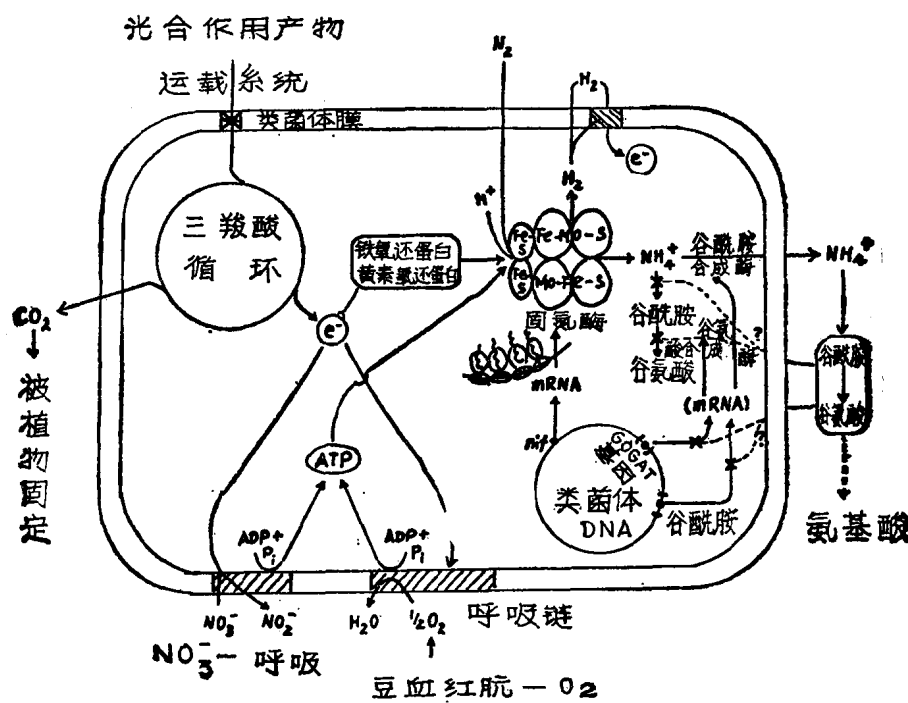


图2 细菌共生固氮模型

在共生固氮作用中共生体的唯一作用是为寄主提供 NH_4^+ 。值得注意的是，根瘤中的类菌体与植物细胞产生能量的细胞器（线粒体）可能很相似。根瘤中的细菌（类菌体）似乎缺少坚固的细胞壁，而且渗透性能不稳定。Sutton应用高渗透性的培养基去分离类菌体时，曾观察到活细胞（能形成菌落）的百分率随着根瘤的年龄而下降。已知类菌体能够代谢植物提供的各种碳化合物，然而文献上很少注意到植物提供的主要碳化合物。由植物提

供的可利用的碳化合物可能不止一种。类菌体膜中专门的透性酶存在与否可能对有机物能否进入类菌体细胞质有重要作用。碳化合物一旦进入类菌体内,就经由活跃的三羧酸(TCA)循环而被转化和代谢,三羧酸循环是与能在低氧浓度下起作用并产生能量的呼吸链偶联的。氧浓度高会使对 O_2 敏感的固氮酶失去活性。人们认为豆血红蛋白的作用是作为氧的载体能在类菌体膜附近维持充足而恒定的氧浓度。

尚有两种系统(也许是膜所约束的)可能在能量代谢上起重要作用,它们是 H_2 摄入系统和与硝酸盐还原酶相连的能量。由于能量代谢的效率作为共生固 N_2 的决定特征已越来越被人们所认识,因此,这两种系统应详细描述[见Schneider和Schlegel自生细菌 H_2 摄入系统的比较生物化学]。曾经发现大多数利用 H_2 的细菌都能诱发膜约束的 H_2 摄入系统(大概是偶联到主要呼吸链上的)。Dixon曾观察到因声波处理而破碎了的根瘤类菌体有活性的氢化酶很快被离心到底部,并无法在上清液中检出。Schubert和Evans的证明,根瘤的 H_2 摄入系统是细菌的一种机能,因为把不同的细菌菌株接种到同种寄主植物上时, H_2 的净产量也不同。

固氮酶在氮的还原过程中能产生一定量的 H_2 ,而利用 H_2 作为能源的菌株只放出微量游离 H_2 。反之,用不能利用 H_2 的细菌菌株接种植株,则会把 H_2 放出。Schubert和Evans通过测定已知根瘤菌(结合在植物中的)的根瘤所生成的 H_2 和乙烯,发明了一次称为“相对能量效率”的指数,用来衡量根瘤中能量的利用效率,类菌体的 H_2 摄入系统是否对于“相对能量效率”有重大作用,这个问题只能由基因相同但不能利用 H_2 的根瘤菌菌株来回答。类菌体似已进化形成了另一种产生能量的机能。例如,据报道,与 NO_3^- 厌氧还原作用结合所生成的能量,能维持离体的类菌体进行固氮(这一途径对整个植株的作用仍待确定)。根瘤中的植物细胞也能固定 CO_2 (呼吸的最终产物),因而最大限度地利用了所有可利用的物质。然而,现有的证据表明,类菌体固氮作用的主要限制之一是光合产物的利用率。Hardy和Havelka曾经论证过,增加 CO_2 浓度(近叶部分)使植物固定 CO_2 的速度增加,则根瘤的固氮速度也加快。共生固氮可能需要损耗高能量,这对于今后安排课题有重要研究意义。考虑到固氮作用,因此必须重新估价以创造新的固氮植物为目标的需要大量能量的“遗传工程”。其他植物氮源(例如 NO_3^- 还原为 NH_4^+)所消耗的代谢能也必需测定并和固氮作用的能量理论进行比较。 CO_2 光合固定的效率显然是决定性的因素,需要特别注意。

在共生固氮过程,固氮所需的基因和操纵子以及产能系统等都表达出来了。然而,某些类菌体的基因似乎被阻遏。在现阶段,我们对共生条件下被阻遏的各种基因的同性和被阻遏的程度还一无所知。一种重要的系列反应——同化 NH_4^+ 的途径,似乎严重地或者是完全地被阻遏(被抑制?)(见前节)。曾经发现在离体的类菌体中,谷酰胺合成酶和谷氨酸合成酶的含量低(见表2)。这个发现可从生化角度解释类菌体以 NH_4^+ 的形式输出固定的氮。目前研究已经集中在这些途径的调节机制上。有人提出在同化固氮酶所产生 NH_4^+ 的过程中,植物的酶比类菌体的酶更具有生理上的重要性。在根瘤增长过程谷酰胺合成酶和谷氨酸合成酶的活性增加颇多。现在认为 NH_4^+ 同化的第一阶段(见图2)是植物谷酰胺合成酶催化合成了谷酰胺,而后在谷氨酸合成酶作用下,谷酰胺的酰胺氮被转到 α -酮戊二酸上,以形成谷氨酸,已知谷氨酸(和谷酰胺)的形成能抑制自生根瘤菌对 NH_4^+ 的同化,因而阻遏了类菌体的 NH_4^+ 同化作用。

表 2 总结了自生和共生生物固氮酶调节机制的实验。值得注意的是蓝藻（地衣系统）以及所有的共生系统（包括根瘤菌）的谷酰胺合成酶和谷氨酸合成酶的活性都是低的。由于根瘤菌在自生条件下，谷酰胺合成酶和谷氨酸合成酶活性较高，因此，寄主如何调节这些基因的功能就成为一个重要问题。毫无疑问，类菌体酶和植物酶的合成和活性的调节，在共生固氮过程中起着决定性作用。这是进一步研究的内容。

根瘤菌的遗传学研究进展很快，据最近报告有两个菌种具有基因转移和重组的机构。这就为研究根瘤菌固氮作用的分子生物学（包括关键的共生基因及其调节与功能）开辟了一条新的途径。

参考文献 67 篇（略）

陆永智译自 “Ann. Rev. Plant Physiol.” vol. 29, pp. 263—276, 1978

生物固氮作用应用于粮食和纤维生产

——有哪些现实可能性

H. J. Evans L. E. Barber

二次世界大战前，美国广泛利用豆科植物向农田提供氮素。战后，由于廉价的化学氮肥供应增多，用于栽培豆科绿肥植物的土地价格上涨，于是人们对豆科植物和其它生物固氮系统的兴趣便淡薄了。据最近计算，美国商业生产的化学氮肥大约要消耗全国天然气年耗量的 2.5%。由于缺乏生产氮肥的充足能源以及与世界粮食生产有关的其它问题，促使人们重新考虑当前的农业措施从而再度重视生物固氮作用。

固 氮 系 统

同植物共生的一些微生物和某些自生微生物，能利用光合产物贮存的太阳能，将大气氮固定成可用于合成蛋白质和其它产物的化合物。能固氮的生物一般不需其它氮源，而不能固氮的生物则完全依赖土壤和肥料中的氮。人们最熟悉的固氮系统是结瘤的豆科植物。尽管古代农业已把轮种豆科植物作为提供氮素的一种方法，但是对豆科植物与根瘤菌共生关系的秘密直到 1888 年才被 Hellreigel 和 Wilfarth 初步揭示。对豆科植物具有专一性的根瘤菌侵入苜蓿、三叶草、豌豆和蚕豆等植物的根毛后形成根瘤，根瘤中包裹着称为类菌体的变形根瘤菌细胞。如果豆科植物品种和根瘤中的根瘤菌株是相宜的，同时向结瘤的植物提供必要的营养和适当环境，则大多数植物可能从大气获得所需的氮素。

除豆科植物外，许多种微生物及其共生体也能固氮。它们包括在土壤中，腐烂的木材中，以及植物根表面上的许多细菌，陆地和海洋中的自生蓝藻；蓝藻同真菌、蕨类、苔藓类和高等植物的联合。在放线菌与灌木和乔木之间也有固氮联合作用，如美洲茶属，多瓣木属，杨梅属，香蕨木属，和桉木属。结瘤的豆科植物是农业中主要的固氮植物，但森林，淡水和海洋中的大部分氮素是由许多种非豆科植物和微生物的联合固氮作用以及自生微生物提供的。新的固氮微生物种类在不断发现，这方面已发表了几篇综述。

固 氮 能 力 比 较

据计算，地球上各种类型的生物固氮作用每年约提供 17,500 万吨氮素。用于生产种籽，干草，牧草以及其它农业用途的结瘤豆科植物几乎占生物固氮系统每年固氮量的一半（ 80×10^6 吨）。同绿色植物共生的微生物有一个优点，就是以植物合成碳水化合物形式贮藏的太阳能可用于固氮。自生固氮蓝藻和光合细菌本身也具有捕获太阳能的机制，但是没

有光合能力的自生固氮细菌，必须从其它生物合成的有机物中获得能量。大多数土壤中有大量微生物，而非光合自生细菌的固氮作用，因为作为能源的碳化物不足而受到限制。因此，结瘤的苜蓿，三叶草，羽扇豆和大豆固氮率每年每公顷可达 57—600 公斤，而自生固氮菌 (*Azotobacter*) 和梭菌 (*Clostridia*) 每年每公顷只有 0.1—0.5 公斤氮 (表 1)。结瘤的非豆科植物、蓝藻共生体和自生蓝藻自己能制造碳水化合物，因而有较高的固氮能力 (表 1)。

表 1 生物固氮作用效率比较

资料是根据 Mishustin Shil'nikova Burns Hardy Silvester 以及 Becking 而总结的平均效率

生物或系统	固定的 N ₂ (公斤/公顷·年)	生物或系统	固定的 N ₂ (公斤/公顷·年)
豆科植物		马 桑	150
大 豆	57—94	植物-藻类联合	
豇 豆	84	根乃拉草	12—21
三叶草	104—160	红 萍	313
苜 蓿	128—600	地 衣	39—84
羽扇豆	150—196	自生微生物	
结瘤的非豆科植物		蓝 绿 藻	25
桉 木	40—300	固 氮 菌	0.3
沙 棘	2—179	巴斯德梭菌	0.1—0.5
美洲茶	60		

人们用新方法测定固氮活性，发现固氮细菌和许多牧草的根部之间有松散的联合。这些联合系统没形成根瘤，不过细菌有时生活在根表面的粘质鞘套下。Dobereiner 等发现雀稗固氮菌同一种称为雀稗的沙土牧草联合固氮。Dobereiner 等用乙炔还原法测定其固氮酶活性，断定这种联合的固氮量约为 90 公斤/公顷·年。最近报道，在俯仰马唐根上固氮的带脂螺菌，能以较高的速率还原乙炔。已观察到这种联合中有些细菌是在根细胞的内侧。玉米和小麦等草本植物根上固氮生物的发现，鼓舞人们设想利用这种联合系统，为重要的粮食作物提供氮素。

已经用乙炔还原法等几种不同的方法来测定这些联合系统的固氮作用。不过要对测定结果进行估价和比较是困难的。用联合系统所观察到的一些乙炔还原率和固氮率列于表 2，表中也包括有关测定方法的一些资料。据报道，在热带旱地的几种生物系统具有高的乙炔还原率。每小时每克干根还原的乙炔约 3,000 毫微克分子，其固氮活性为每季 (以 100 天计) 每公顷 100 公斤氮，这对玉米生长是足够的。但是，在热带环境中的测定结果多数是限氧条件下培养过夜的离体根的乙炔还原率。已发现这种方法使固氮细菌数量增多，并增加乙炔还原率。对温带地区旱地植物的观察表明，用土柱中根的乙炔还原率来计算的固氮率是低的。不过尽管效率低，对于免耕牧草可能是足够的。在潮湿的温带和热带地区，水稻和其它水生植物根部在嫌气条件下的乙炔还原率比在好气环境中高得多。在佛罗里达，某些少施或不施氮肥的热带牧草接种螺菌后其干物质产量比只加培养基的对照区高。由于没有报告固氮率，且某些微生物会产生生长激素，所以接种螺菌所增加的产量是否归因于固氮作用还难以肯定。

表2 同不结瘤植物联合的微生物的乙炔还原率和固氮率

植 物	效 率	测 定 方 法
俯仰马唐 雀稗草	热带草本植物——旱地生态环境 最高 *60—404 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 最高 80—283 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 1—32 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 (90公斤 N/公顷·年) 每柱每 17 小时 10—22 微克 N_2	C_2H_2 , 根** C_2H_2 , 根** C_2H_2 , 根 $^{15}N, C_2H_2$, 柱
羊 草	23—299 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时	C_2H_2 , 根**
象 草	最高 215—954 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时	C_2H_2 , 根**
高 粱	平均 1053 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时	C_2H_2 , 根**
甘 蔗	最高 5.5 克分子 C_2H_4 /克·小时 (2公斤 N/公顷·年) 25—780 微克 N/克·30 小时	C_2N_2 , 根 $^{15}N_2$
玉 米	平均 74—7124 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 (2.4公斤 N/公顷·天)	C_2H_2 , 根**
禾本科生态系	4—12 公斤 N/公顷·年	C_2H_2 , 原位
其它草本植物	最高 269—730 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 最高 1.5 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 1—500 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 最高 7 克 N/公顷·每湿季	C_2H_2 , 根** C_2H_2 , 根 C_2H_2 , 土—植物系统 C_2H_2 , 根, $^{15}N_2$
水 稻	热带草本植物——潮湿生态环境	C_2H_2 , 原位
水 稻	最高 24—30 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 (70 公斤 N/公顷·年) 1.8—6.1 微克分子 C_2H_4 /克·小时 最高 52 公斤 N/公顷·每湿季	C_2H_2 , 原位 C_2H_2 , 根, $^{15}N_2$
细弱剪股颖	温带植物——高地生态环境 平均 4.0 克分子 C_2H_4 /公顷·天 (37克 N/公顷·天)	C_2H_2 , 柱
马 唐	3—10 克 N/公顷·天	C_2H_2 , 柱
柳 枝 稷	1.3 公斤 N/公顷·120 天	C_2H_2 , 柱
禾本科生态系	最高 11 公斤 N/公顷·年	C_2H_2 , 原位
草 地	0.6—1.5 公斤 N/公顷·28 天 0.002—0.38 克 N/公顷·小时	$^{15}N_2$, 柱 C_2H_2 , 柱
先 锋 草	1.2 公斤 N/公顷·年	C_2H_2 , 土柱
一年生草木植物	0.7 公斤 N/公顷·年	C_2H_2 , 土柱
高 草 原	3.5 公斤 N/公顷·年	C_2H_2 , 土柱
玉 米	最高 298 毫微克分子 C_2H_4 /柱·18 小时	C_2H_2 , 2 公斤柱
牧场, 高草原	最高 1 公斤 N/季	C_2H_2 , 小土柱
麦 地	4.1 公斤 N/公顷·年	$^{15}N_2$
高草原牧草	3—9 公斤 N/公顷·年	C_2H_2 , 土—草柱
草 坪	4.8 公斤 N/公顷·年	$^{15}N_2$
非豆科植物 (混合的)	5—260 克 N/公顷·28 天 2.1 公斤 N/公顷·年	C_2H_2 , 未搅动的土柱 $^{15}N_2$
双子叶植物	最高 18 公斤 N/公顷·年 温带植物——潮湿生态环境	C_2H_2 , 完整植物, 土柱
北方甜茅	12.6 微克分子 N_2 /克·天 (60公斤 N/公顷·年)	C_2H_2 , 根、沉淀物
香 蒲	1.2 微克分子 N_2 /克·天	C_2H_2 , 根、沉淀物
大 叶 藻	12 毫微克分子 C_2H_2 /克·小时	C_2H_4 , 植物组织、沉淀物
* 泰莱草	32 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 (500 公斤 N/公顷·年)	C_2H_2 , $^{15}N_2$ 植物和沉淀物
波罗的海灯芯草	0.8 公斤 N/公顷·天	C_2H_2 , 柱
潮湿混交林	最高 1 公斤 N/公顷·天 用刚螺菌 (<i>Spirillum</i>) 接种的植物	C_2H_2 , 柱
玉米 (温室栽培)	最高 2186 毫微克分子 C_2H_4 /克·小时 (734 克 N/公顷·天) 最高 15 克 N/公顷·天	C_2H_2 , 根** C_2H_2 , 完整植物
美国狼尾草	最高 42 公斤 N/公顷·季	

* 数字范围是在不同实验中观察到的最大值范围。*毫微克分子 C_2H_2 /克·小时是指每小时每克干根还原 C_2H_2 形成的 C_2H_4 毫微克分子数。**根系在加 C_2H_2 前进行了培养。

固氮作用的特性

在对改进生物固氮能力或发展新的生物固氮能力中遇到的某些问题进行分析之前，有必要考虑一下这一系统的复杂性。这方面已发表了几篇综述。

固氮酶 同必要的还原剂一起催化氮还原为氨的酶复合物称为固氮酶。已从约 20 种不同生物中获得具有活性的固氮酶的无细胞制剂。这些生物包括：嫌气性，兼嫌气性，好气性细菌和光合细菌，蓝藻，以及大豆和羽扇豆根瘤中的类菌体。不是所有制剂都已纯化到完全一致的程度，但有充分的证据表明不同生物固氮酶有许多共同特性。所有高纯度的制剂都有两种主要的蛋白质组分，几种较大的组分(钼铁蛋白)分子量为 200,000—270,000，每个蛋白分子含有 1 或 2 个钼原子，17—36 个铁原子，14—28 个酸不稳定的硫原子。钼铁蛋白由两类共四个亚单位组成。除钼铁蛋白外，固氮酶还需要一个铁蛋白才有活性。铁蛋白分子量依来源不同为 55,000—67,000。这一组分的每一个蛋白分子中含有铁原子和酸不稳定硫原子各四个。人们对固氮酶复合物功能单位组成有不同看法。Smith 等断定它是由铁蛋白和钼铁蛋白以一比一结合组成，但是 Orme-Johnson 则认为每一功能单位有一个钼铁蛋白就有两个铁蛋白。由于纯化的固氮酶成分对氧极为敏感，所以在实验室处理这些蛋白十分困难。钼铁蛋白在空气中的半衰期是 4—10 分钟。铁蛋白更不稳定，一与空气接触就失去活性。虽然不同来源的固氮酶组分表现相似，但不同生物的钼铁蛋白和铁蛋白在重组试验中并不都有活性。一般说，不同的好气性(或嫌气性)生物，两个组分的组合较一个是好气性生物组分和一个是嫌气生物组分的组合更具有亲和性。

固氮酶复合物的反应 固氮酶催化作用的基本要求以及与代谢系统的某些关系概括于图1。固氮酶必须有以还原剂形态存在的能量和三磷酸腺苷(ATP)才能起反应。Bulen 及其同事发现，连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)在这一反应中可作为一种非生理性的电子供体。这就大大简化了体外分析。在他们的试验中，由肌磷酸激酶，肌磷酸和少量 MgATP 组成的一个再生系不断供应 ATP。在固氮酶反应过程中，由 ATP 提供的能量和从还原剂供给的电子使铁蛋白产生构型变化，变为氧化还原电位约为 -400 毫伏的强还原剂。这种经充分还原的铁蛋白将电子转移到钼铁蛋白，后者再去还原 N_2 。在这一过程中，每转移两个电子，就有四或五分子 ATP 被水解。因在实验中 N_2 还原为 2 克分子 NH_3 需要 12—15 克分子 ATP。

除了 N_2 以外，包括 H^+ 在内的几种其它基质也在固氮酶反应中起作用(图 1)。在体外，即使让固氮酶的反应在纯 N_2 下进行，为反应提供的还原剂总量中约有 25—30% 在 H^+ 还原为 H_2 时消耗了。 N_2 和 H^+ 还原的机理是明显不同的，因为 N_2 的还原作用被 CO 抑制，而 H_2 的释放则否。River-Ortiz 和 Burris 根据动力学实验断定，不论 N_2 浓度多大都不会完全抑制 H_2 的释放。但高浓度的乙炔(C_2H_2) 却从根本上抑制放 H_2 。当用乙炔还原法测定固氮作用时，这种抑制作用就会造成误差。Schrauzer 假设乙酰亚胺和胼是 N_2 还原过程中的中间产物，并认为由于乙酰亚胺比例失调而引起的放 H_2 可能是一个被迫的步骤。在 N_2 还原过程中， N_2 还原为乙酰亚胺在热动力学上是不利的。因而从乙酰亚胺产生 H_2 可能有助于使平衡转向 N_2 的还原。

体外试验提供了有关固氮酶催化反应影响电子分配方式的资料。增加钼铁蛋白对铁蛋白的比例，使转移到 H^+ 的电子增加，而转移到 N_2 还原作用的电子减少。在反应混合物中，