

生物固氮机制译文集

中国科学院林业土壤研究所
微生物研究室固氮机制组编

(内部资料·注意保存)

中国科学院林业土壤研究所

最 高 指 示

領導我們事業的核心力量是中國共產黨。

指導我們思想的理論基礎是馬克思列寧主義。

（中國人民政治協商會議全國委員會第一次會議，一九五四年九月，北京）

中國人民有志氣，有能力，一定要在不遠的將來，趕上和超過世界先進水平。

（毛澤東一九五六年七月三十日在廬山談話）

外國有的，我們要有，外國沒有的，我們也要有。

（毛澤東一九五六年七月三十日在廬山談話）

我們不能走世界各國技術發展的老路，跟在別人後面一步一步地爬行。

（毛澤東一九五六年七月三十日在廬山談話）

自力更生，艱苦奮鬥，破除迷信，解放思想。

（毛澤東一九五六年七月三十日在廬山談話）

一切外國的東西，如同我們對於食物一樣，必須經過自己的口腔咀嚼和胃腸運動，送進唾液胃液腸液，把它分解為精華和糟粕兩部分，然後排瀉其糟粕，吸收其精華，才能對我們的身體有益，決不能生吞活剝地毫無批判地吸收。

（鄧小平一九五七年二月十九日在廬山談話）
（毛澤東一九五七年六月七頁）

前 言

近些年来生物固氮机制的研究，越来越多地引起各国学者的重视。自无细胞提取物固氮试验成功之后，使固氮机制的研究进入到一个新的阶段，大大地促进了这一方面的工作。我国的科学工作者几年来对这一问题也进行了工作，并且取得了一定的结果。我们在工作中也收集了一些文献资料，这些资料对进一步开展生物固氮机制的研究是有益的。因此我们选择了其中有意义的文献进行了汇集并译成了这本文集，以便提供兄弟单位和大专院校的同志们参考使用。

这些资料是在无产阶级文化大革命以前汇集和翻译的，仅收集了1964年以前的文献(其中包括自生固氮和共生固氮的资料)。由于我们工作水平所限，在编译工作中会有这种或那种缺点，欢迎同志们批评指正。

編 者

1969年12月26日

目 录

生物固氮作用.....	A. I. Virtanen (1)
再论生物的固氮作用.....	P. W. Wilson、R. H. Burris (20)
生物固氮.....	A. I. Virtanen (41)
生物氮素固定化学的一些观察.....	Eric R. Roberts (60)
无机氮的同化作用和氨的并合.....	L. E. Mortenson (79)
微生物中无机氮及其化合物的代谢...	D. G. D. Nicholas (117)
无机氮化合物代谢论丛 III. 以酶制备物固定氮素.....	
.....	L. E. Mortenson、H. F. Mover、J. E. Carnahan (149)
氢酶和固氮作用.....	
.....	A. L. Shug、P. B. Hamilton、P. W. Wilson (162)
固氮作用: 嫌气性代谢中铁氧还蛋白 (ferredoxin) 的作用...	
.....	L. E. Mortenson (175)
巴氏梭菌无细胞提取物的固氮作用.....	J. E. Carnahan、
	L. E. Mortenson、H. F. Mower、J. E. Castle (203)
棕色固氮菌提取物中的固氮作用.....	
.....	D. J. D. Nicholas、D. J. Fisher (222)
以微生物无细胞制备物固氮.....	
.....	K. C. Schneider、Clive Bradbeer、R. N. Singh、
	Li Chuan Wang、P. W. Wilson、R. H. Burris (230)
应用放射性氮研究细菌细胞及其提取物中的固氮作用.....	
.....	D. J. D. Nicholas、D. J. Silvester、J. F. Fowler (239)
多粘芽孢杆菌无细胞提取物中的氢酶和固氮酶.....	
.....	F. H. Grau、P. W. Wilson (244)
在用自生固氮菌噬菌体 A ₂₂ 溶菌制备的棕色固氮菌无细胞提	
取物中固氮.....	

M. W. Nimeck、P. W. Wilson、D. J. D. Nicholas (252)	
固氮作用中丙酮酸盐的双重作用和能的需要·····	
····· R. W. F. Hardy、A. J. D'Eustachio (255)	
固氮作用中的还原剂和电子传递·····	
····· A. J. D'Eustachio、R. W. F. Hardy (259)	
固氮菌和巴氏梭菌的氢酶活性和固氮作用的一些情况·····	
····· D. J. D. Nicholas、	
D. J. Fisher、W. J. Redmond、M. A. Wright (264)	
固氮菌短时期 N_2^{15} 的结合·····	
····· W. A. Bulen、J. R. Lecomte、H. F. Balas (281)	
再论自生固氮菌固氮作用受氢的抑制作用·····	
····· C. A. Parker、M. J. Dilworth (289)	
大豆根瘤及自生固氮菌内氢酶及固氮酶的分光光度的检查··	
····· P. B. Hamilton、A. L. Shug、P. W. Wilson (298)	
氮对大豆根瘤提取物的影响的分光光度测定的研究·····	
····· F. G. Bergersen、P. W. Wilson (306)	
豆科植物根瘤中固氮作用的生物化学途径·····	
····· F. J. Bergersen (312)	
N_2^{15} 结合到大豆根瘤的不同部分····· F. J. Bergersen (319)	
光合作用产物向大豆根瘤的转移及其在氮素固定中的作用··	
····· M. K. Bach、W. E. Magee、R. H. Burris (327)	

生物固氮作用*

A. I. Virtanen

最近十年内关于生物固氮作用问题已出版了一些专著及评论。其中最重要的有 Wilson^[1] 的关于共生固氮作用的专著, Burk 与 Burris^[2] 及 Burris 与 Wilson^[3] 的关于生物固氮作用的评论。在一个精细的评述中, Virtanen^[4] 最近研究了根瘤细菌固氮作用的生物学与化学, Wilson 与 Burris^[5] 讨论了生物固氮的机制。Tóth^[6] 在他的专著中特别讨论了动物中的共生固氮作用, Fogg^[7] 在他的简短的评论中讨论了蓝绿藻的固氮作用。上述工作包括了直到 1947 年的文献。因此在本文中我将按照最新的研究限于检查一些经常讨论的固氮机制问题, 记载一些有关固氮微生物、植物与微生物中的氮代谢的新发现, 并进一步评述一些广泛读到的而在早期评论中遗漏的题目。

固氮机制

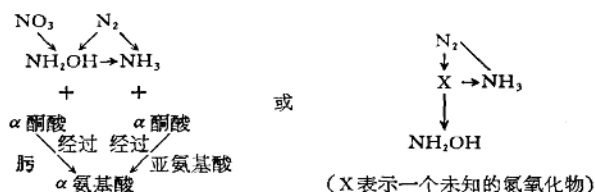
关于固氮作用的最初阶段, 没有有用的肯定资料。在几乎唯一详细检查的好气条件下的固氮作用中(豆科根瘤及自生固氮菌), 形成少量肼。根据这一点, 固氮作用中很可能存在羟胺[参阅 Virtanen^[4,8]]。根据 Virtanen^[9], 固氮作用的第一步可假定为氮的电离: $N_2 \rightarrow N_2^+$; 电离的能量为 16.7 电子伏特^[105]。反应: $N_2 \rightarrow 2N$ (11.4 电子伏特) 及 $N \rightarrow N^+$ (14.5 电子伏特) 可能成为问题。正如在呼吸作用中一样铁催化系统能引起电子传递。一氧化碳对固氮作用的抑制作用^[10-14] 可以归因于形成 $Fe^{++}CO$ 复合体^[4], H_2

* 此评述包括的时期约从 1947 年 1 月到 1948 年 3 月。

的抑制作用^[1,10,15-17]可归因于氮与氢之间的竞争作用^[9],因为氢的电离能量比氮要小 [$H_2 \rightarrow H_2^+$ (15.4 电子伏特); $H_2 \rightarrow 2H$ (4.4 电子伏特); $H \rightarrow H^+$ (13.5 电子伏特)]。电子从氮转移至氧得到氧化氮。根据这一概念,可以预料羟胺发生于反应 ($N_2 \xrightarrow{O_2, H_2} NH_2OH$) 的某一阶段。羟胺可进一步还原为氨,或者它可与酮酸起反应。

另外的固氮机制,氮还原为氨(即 $N_2 \rightarrow 2NH \rightarrow 2NH_2 \rightarrow 2NH_3$) 则相当于工艺合成氨。当反应进行这种途径时^[3],羟胺的形成甚至可以用假设反应 $NH_2OH \rightarrow NH_3$ 是可逆的来说明。但是未曾就固氮菌、根瘤菌或就圆酵母属酵母注意到氨氧化为羟胺。

因为如在固氮作用中那样,由于硝酸盐还原产生少量肼氮(参阅下文),在氨基酸合成中 N_2 、 NO_3^- 及 NH_4^+ 之间的相互关系可以图解说明:



Burris 与 Wilson^[3] 在他们于 1945 年引用的图解中假定固氮作用与硝酸盐还原作用定量地经羟胺而发生,这进一步还原为氨。在他们最近的文章中 (Wilson 与 Burris^[5]) 他们不再认为从氮形成氨,羟氨是必不可少的。

在有关固氮机制的文章中主要注意力是放在羟胺或氨是否作为一个特殊的固定产物形成,它与碳化合物一同产生第一个有机氮化合物这个问题上。这个问题与最初氨基酸的鉴定及其形成机制问题密切相联系。

关于固氮作用中氨基酸的形成, Virtanen 及 Laine^[18] 根据根瘤的分泌产物第一个提出了氨基二羧酸,特别是天门冬氨酸是最初形成的氨基酸的假说。Braunstein 与 Kritzman^[19,20] 在动物组织内

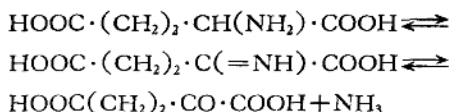
观察到的转氨作用,也注意过绿色植物与根瘤^[21,22],说明了天门冬氨酸与谷氨酸的容易互相转变。转氨作用也能说明从氨基二羧酸形成丙氨酸,可能丙氨酸的转变同系物也是如此,虽然其反应速度是小的^[23]。在植物内尚未发现经转氨作用形成芳香族氨基酸,它们形成的方式问题尚未确定。

后来证明,氨基二羧酸作为最初氨基酸而存在,与氮源的性质无关。一些就动物、植物及微生物的研究 (Foster 等^[24]; Schoenheimer 等^[25]; Vickery^[26]) 证明,用作氮源的化合物内的 N^{15} 有一个特别地积累于氨基二羧酸的倾向本。实验室的 Roine^[27] 就圆酵母的研究指出,低氮酵母在通气条件下很快吸收铵盐并首先形成只含有氨基二羧酸及其酰胺及丙氨酸的可溶性氮化合物,但无其他氨基酸,这有力地表示有利于形成氨基二羧酸作为最初氨基酸。根据 Virtanen 与 Csáky^[28],圆酵母从硝酸盐与从铵盐一样形成相同的氨基酸。因此氨基二羧酸作为最初氨基酸而产生是与氮源 (N_2 , NH_4^+ , NO_3^- , 氨基酸等) 无关的。

Burris^[29] 及 Burris 与 Wilson^[30] 在短期试验中曾以作为 N_2 或 NH_4^+ 的 N^{15} 供给固氮菌,在二种情况下曾注意到 N^{15} 聚积于同一部分内,特别是谷氨酸与天门冬氨酸。在谷氨酸的部分内发现同位素氮的最高水平。因此这些研究导致与上述相同的结果:氨基二羧酸可能是最初的氨基酸,它与氮源无关。

至于两个氨基二羧酸中,谷氨酸或天门冬氨酸,那一个是氮代谢中最初的一个,要下一个最终的结论还存在困难,这是由于存在转氨作用,其速度在活细胞内还难于测定。但是根据目前流行的关于参与氨基酸合成的酶的资料可作出一些结论。

一个催化如下反应



的通常存在于活细胞内的特异性谷氨酸脱氢酶 Euler 等^[31,32] 及 Adler 等^[33,34],说明了从氨及 α -酮戊二酸形成谷氨酸。尚未发现对

天门冬氨酸的相应的酶类。确实,用天门冬氨酸酶可从氨及延胡索酸产生天门冬氨酸,在很多具有充足的天门冬氨酸酶的细菌中这种天门冬氨酸的形成方式在表面上是说得通的。然而仅在苗期的绿色植物内才能发现天门冬氨酸酶,一般在动物中则完全没有。在根瘤及根瘤菌内同样未发现天门冬氨酸酶^[18]。一般来说,当氨作为氮源时,并且在固氮作用导致氨的范围内,并且当 N_2 成为氮源时,谷氨酸是最说得通的最初氨基酸。最近,Stokes, Larsen 与 Gunnes^[38] 曾作过报导,在某些微生物中生活素参与天门冬氨酸的合成。这指出,在从氨与草酰乙酸合成天门冬氨酸中,除了天门冬氨酸酶及转氨酶以外一种特殊的、不受生活素影响的酶可能也在起作用。但是生活素在天门冬氨酸合成中的作用知道得不详细;因此,所指出的可能性仅是一种推测。天门冬氨酸在接种的豆类的基质内的积累本身并不反对谷氨酸作为一个最初的氨基酸,因为转氨作用及以用谷氨酸合成蛋白质可以引起积累。无论如何这是特殊的,即只有一次在分泌物中除了天门冬氨酸之外发现少量谷氨酸 (Virtanen 等^[39])。

Reutanen^[40,41] 在此实验室内以豌豆作试验植物,检查了高等植物的氮代谢。他使切除的植物吸收水溶液中的各种氮化合物,经数小时的间隔后测定植物可溶性氮部分的组成。根据这些实验,谷氨酸与天门冬氨酸是第一积累于可溶性氮部分的。也发现其酰胺及一些丙氨酸,因此情况与酵母中相类似。至于哪一个氨基二羧酸第一个产生,这些结果并未给予任何指示。当以天门冬氨酸供给切除的植物时,5 小时内,在可溶性氮部分中天门冬氨酸加天门冬酰胺的量并不增加很多,而谷氨酸加谷氨酰胺的总量则显著增加。11 小时后天门冬氨酸加天门冬酰胺的总量依然不变而谷氨酸加谷氨酰胺的总量大大增加。注意到了丙氨酸的稳定而缓慢的增加。另一方面,加谷氨酸,5 小时内已提高谷氨酸加谷氨酰胺的总量,但留下天门冬氨酸加天门冬酰胺完全不受影响,因此天门冬氨酸在植物中似乎比谷氨酸转化得更快些。

Burris^[29] 及 Burris 与 Wilson^[30] 关于在固氮作用中 N^{15} 大多

积累于谷氨酸中的发现支持氨基酸是最初形成的以及因此氨是用于合成氨基酸中的氮化合物^[5]这个概念。天门冬氨酸可从谷氨酸通过转氨作用形成。一些以不同生物的其他观察指出相同的方向。但是,因为在活细胞内不同反应的速度是不知道的,甚至这种证据是不能令人信服的(参阅以上)。必须说明,有些乳酸菌不能合成谷氨酸,所以对它们来说谷氨酸是一种不可缺少的营养物(参阅 Snell^[42])。在某些乳酸菌中就天门冬氨酸也能发现同样的关系。

Burris 与 Wilson^[30] 及 Wilson 等^[43] 的关于氨的形成是固氮作用的结果的其他的以及可能是最有力的证据,是氨完全并立即接受作为一种氮源而排斥固氮作用,不论有机体早先是培养在 N_2 、 NH_4^+ 或 NO_3^- 上面。容易转化为氨的化合物,如尿素,也能引起固氮作用的完全抑制。不容易转化为氨的化合物,如硝酸盐或亚硝酸盐,在它们有力地抑制固氮作用之前需要一个适应期。在这种情况下氨也考虑为抑制的氮化合物。

根据 Virtanen 等^[44],豆科根瘤内的固氮作用以与固氮菌相反的样式受氨和硝酸盐的影响,固氮作用并不完全被每升营养液内 25—100 毫克氨态氮的浓度所抑制,虽然当植物通过根部吸取其部分氮素营养时,自然会降低。相反,硝酸钙即使在较低的浓度也抑制固氮作用。每升营养液中 25 毫克硝酸盐氮的量在大多数试验内抑制固氮作用,而 50 毫克的量则在所有情况下抑制固氮作用(因为在生长中氮素的损失,在植物中微弱固氮作用的测定不用同位素通常是不可能的)。但是应该指出,硝酸盐对根瘤中固氮作用的抑制作用影响到根瘤的形成与大小,并且可能影响到根瘤的血红朊(参见下文),因此不能直接与对固氮菌的相应影响作比较。

Virtanen 与 Linkola^[45] 完成的许多试验指出,豌豆从营养液中吸取铵氮比吸取硝酸氮更快。但是,因为铵氮对固氮作用的影响比硝酸氮更微弱,观察到的硝酸盐对固氮作用的抑制作用依赖于植物内过度的氮-碳水化合物比率的这种假说(参阅 Wilson^[1])不能说明这种抑制作用。显然,问题首先与硝酸氮可能对根瘤

血红朐的特殊影响有关系(即形成亚硝酸盐-血红朐化合物)(Virtanen^[41])。

就固氮菌^[46]及接种的豆科植物^[8,47]来说,脼氮作为一种分泌产物在固氮作用中被发现。此外,当固氮菌生长于硝酸盐上时,在培养液中可测出脼氮^[48]。1947—1948年我们在此实验室内以圆酵母属-酵母、根瘤菌及固氮菌,通过悬浮微生物于硝酸盐或铵盐溶液中研究了脼的形成,并测定了细胞集团(cell mass)中的脼氮。经不同试验时间后,分离微生物体并悬浮于8%三氯醋酸溶液中。按照Blom首先以3N H₂SO₄液煮沸6小时测悬浮液的脼氮。亚硝酸盐、次亚硝酸盐及硝基羟脼酸(nitro hydroxamic acid)不影响测定,因为它们硫酸液中,在煮沸时即被定量地分解掉。Virtanen与Csáky^[28]发现,悬浮于通气的硝酸盐溶液中的低氮与正常的圆酵母属酵母在其细胞内很快地形成脼氮。在10—15分钟内达到最高量。用硫酸铵则测不出微量脼氮。用正常的根瘤菌得到与圆酵母相同的结果。1—2小时内达到最高脼氮量。用固氮菌,脼氮在2—3小时内达到最高量。当悬浮于硫酸铵溶液中时,无论那种细菌均不形成脼氮^[49]。因此用固氮菌或圆酵母均未确定氮氧化为羟胺。只有用强氧化的霉菌,Steinberg^[50]发现在硝酸盐及铵盐溶液中形成脼氮。

Virtanen^[4,51]确信,怀疑羟胺参与氨基酸合成的仅有的有力理由是,还不知道催化羟胺与 α -酮戊二酸间反应的酶类这个事实。如果此反应纯粹是化学性的,它可产生好些脼类,因为羟胺不仅与草酰乙酸、丙酮酸及 α -酮戊二酸起反应,也容易与抗坏血酸起反应。由于酮类物质的量及相互关系在植物中,譬如说,随着光照而变化,羟胺与酮类物质间的非酶促反应是不能控制的。假如这是真实的话,通过脼合成氨基酸显然不能是一个重要的反应,虽然固氮作用中脼氮的形成表示多少发生这种合成作用。

关于羟胺对细胞氮素营养的适宜性及关于其参与酶促反应的资料是很缺乏的。一般说来,早先认为羟胺与脼作为氮源是不合适的,并且这一点被认为是反对羟胺作为固氮作用中一个中间产

物的重要论证。但是最近的关于羟胺参与酶促反应及其对细胞氮代谢的适合性的观察指出,羟胺并不象一般文献中报导的那样,对微生物是如此生疏的。Steinberg^[50]指出,曲霉利用低浓度的羟胺作为其氮素营养,并且所用的每单位重量的羟胺与氨或硝酸盐一样产生同样的细胞物质。

Virtanen 与 Csáky^[28,49]注意到产朊圆酵母 (*Torula utilis*) 生长在以羟胺作唯一氮源的琼脂表面。当羟胺浓度从 1:25000 提高到 1:5000 时,假如酵母首先生长于前者的浓度然后移植到后者的浓度,则促进了生长。在 1:1000 的浓度中生长已较贫弱。圆酵母不生长于上述羟胺浓度的营养液中。

Elliot^[52] 及 Elliot 与 Gale^[53]报导,当氨被羟胺代替时,从谷氨酸与氨合成谷氨酰胺的酶系统形成羟肟酸(hydroxamic acid)(谷氨酸,三磷酸腺甙及羟胺,在酶系统存在下)。Lees 与 Quastel^[54]曾注意到,丙酮酸肟 (0.005M) 快速地被细菌饱和的土壤所硝化而不抑制加入的 NH_4^+ 转化为 NO_3^- 。丙酮酸钠 (0.005M) 的存在完全消除了羟胺 (0.005M) 的有毒影响,并使羟胺的硝化得以充分发生。他们讨论了丙酮酸肟或其他类似的分子在硝化过程中有很大意义这种可能性。酵母还原肟至相应的胺。Maurer^[55]注意到,丙酮酸肟被酵母还原至丙氨酸。因此羟胺并不象曾经想象的那样是如此“不自然的”一种氮化合物。此事实本身并不能证明羟胺是一种中间产物。总之,新的发现揭露出,羟胺至少在一个酶系统内可代替氨,因此它不是不可能在一些其他酶系统内起作用。

在固氮有机体中有关酶系统得到更多的说明之前,固氮的最初阶段似乎不能被澄清。关于这方面的资料全然缺乏。广泛讨论的钼参与固氮作用,在阐明这一过程中似乎获得很大重要性。Bortels^[56]首先确定了钼对固氮菌的最大固氮作用的必要性。这一观察已被许多研究者确证过并引伸至其他固氮生物及豆科根瘤内的共生固氮作用。近年来 Anderson^[57,58]特别支持这一概念,钼对共生固氮作用是重要的。另一方面,Steinberg^[59,60]指出,当曲霉生

长在硝酸盐氮上时对钼的需要是很明显的。用铵态氮时发现对钼的反应显著减少。Mulder^[61]已证实这一发现。他特别扩大了我们的有关钼作用的知识。他认为钼对反硝化细菌是必需的。所有对霉菌、反硝化细菌及绿色植物的观察指出,钼在硝酸还原作用中是作为一种催化剂。当圆褐固氮菌生长在硝酸氮及气态氮上时需要钼。以硫酸作氮源时完全不能发现对钼的反应。同样,豆科根瘤的固氮作用因缺钼而大大受到损害。这些观察似乎支持了固氮作用通过氧化作用的概念并说明钼对固氮作用的意义。的确, Mulder^[61]从当无化合氮时固氮菌生长对钼的需要比有硝酸盐时要大这一事实作出结论;参与硝酸及氮同化作用中的需钼反应是不相同的,但是根据类推,有理由假定钼在二种情况下催化还原反应。Woods^[62]证明,洗过的威氏梭状芽孢杆菌(*C. welchii*)及大肠杆菌的悬液能催化氢分子使硝酸盐、亚硝酸盐及羟胺为氨的还原作用,亚硝酸盐是硝酸盐还原中的一个中间产物,并且有一些证据,证明羟胺可能是一个亚硝酸盐进一步还原的中间产物。揭露了钼在不同还原阶段的作用之后,关于固氮作用过程可能同时得到新的说明。Steinberg^[50]就黑曲霉的发现指出,钼对硝酸盐、亚硝酸盐及硝基羟肟酸的还原作用有强烈影响,但对羟胺无影响。

虽然关于固氮作用的最初阶段没有肯定的东西可以说的,可是最近的进展已偏向于使问题更简洁和明了。好气固氮作用中肼的形成是一个不允许忽视的事实。我们在圆酵母属-酵母、固氮菌及根瘤菌中发现的肼大概是一个比较稳定的化合物,它在细胞代谢中仅缓慢地消失。但是其发现使羟胺的形成明确了,首先尚待确定羟胺在固氮中起多大作用。氨大概是这种氮化合物,它作为固氮最终产物与 α -酮戊二酸结合。最重要的问题还是要解决固氮的最初阶段是如何发生的,氨是如何产生的。例如,根据 Steinberg^[50],硝基羟肟酸对曲霉是一种较好的氮源,它可能是固氮作用中的中间产物之一,但是关于形成氮的氧化物的推测还缺乏实验支持。

根瘤中的血红朊

Kubo^[63] 第一个鉴定了豆科根瘤内的红色素是一种血红蛋白，它能够吸取及释放出氧气。因此这种色素是属于血红朊。Burris 与 Haas^[64] 开始时未能确定这种物质的血红朊性质，这显然是因为此色素的铁是容易氧化为三价的。其次，据 Virtanen 报导，他证实了这种物质的血红朊性质，同时证明了这种色素与根瘤的固氮力在根本上是相联系的。由无效菌株形成的根瘤完全不含有血红朊。另一方面，在有效根瘤内则经常发现血红朊。因此，这种色素第一次在实验基础上使其与固氮作用相联系。Keilin 与 Wang^[67] 亦确证了 Kubo 的关于这种色素的血红朊性质的观察，以后 Little 与 Burris^[76] 亦这样做了。Virtanen 与 Laine^[68] 为简明起见，曾建议称豆类根瘤的血红朊为豆科血红朊 (leghemoglobin)。当这种色素与根瘤联系谈时，当然可用血红朊。

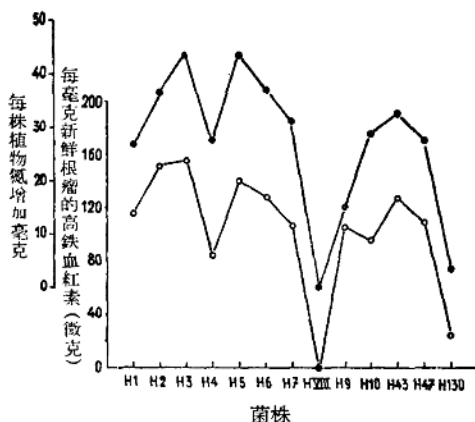


图1 以不同细菌菌株接种的 Torsdag 豌豆根瘤的正铁血红素含量。生长时间：1947年4月23日至6月17日。在此时期末，植物盛花，根瘤主要是红色，有些试验有一些绿色根瘤。从每一试验减去无活性 HVIII 根瘤的低吸收。

Virtanen 等^[44,69] 及 Virtanen^[70] 曾用许多豌豆及蚕豆菌株更严密地观察了固氮作用与根瘤血红朊含量的相互关系。把压碎的

根瘤的正铁血红素溶解在吡啶中，在 530 毫微米测吸收以确定这种色素的浓度。在完全无活性的根瘤中，在分光光度计上测不出血红朊，而它们的很低的正铁血红素含量是由于其他正铁血红素化合物(细胞色素等)的缘故。无活性根瘤的极少的正铁血红素含量指出，有效根瘤的高的正铁血红素含量主要是属于血红朊。由 13 株具有不同活力的豌豆根瘤菌菌株形成的根瘤的正铁血红素含量与以相应菌株接种的豌豆植物中固氮作用相比较，在根瘤的血红朊含量与固氮强度之间可见到一个正的相关性(图 1)。以蚕豆作试验得到同样的结果。在我们的试验中豌豆根瘤的正铁血红素含量，以每克新鲜根瘤微克正铁血红素表示，根据细菌菌株的效力变化于 20—180 微克之间。

有效根瘤的这种红色素随着生长的增长渐渐地变为绿色^[44,66,68,70]。当固氮作用已停止，所有的根瘤是绿色的。这可以在透明烧瓶的灭菌培养系统内得到很好的证明。在石英砂的盆栽内色泽的变化也是可测定的。在自然条件下，如土壤是干燥的，绿色根瘤保存很好，容易见到。但是在潮湿的土壤内，较老的根瘤很快被外来的微生物所分解，因此很难识别绿色的根瘤。把生长旺盛的接种过的植物移到黑暗处数天，也能引起根瘤转变为绿色。豌豆比大豆更容易发生变化。由于观察到色素的色泽从红变成绿色时固氮作用停止，这也可证明豆科血红朊对固氮作用的重要性。

在一组接种的豌豆植物的灭菌栽培系统试验中，Virtanen 与 Erkama^[71] 曾研究了铁与铜对根瘤形成及豆科血红朊的意义。培养液的铁的含量对血红朊的含量有很大关系。铜似乎是同样不可缺少的。这些研究还是一些预备性试验。

豆科血红朊很容易氧化为氧化型 (met-form)^[66,68]。根瘤压破及离心之后，溶液经常专门含有高铁血红朊。在某种情况下，虽然外部条件一样，豆科血红朊在压破的根瘤中比在其他根瘤中保存得好，根据这一事实推测根瘤的氧化能力变化很大。豆科血红朊的极易氧化，可能是由于根瘤中强的酚氧化酶(Keiling 与 Wang^[67]; Virtanen^[41])，或由于豆科血红朊的容易自动氧化 (Keiling 与

Wang^[72]), 或由于两个因素。把血的血红朊加到一堆切除的无效的无血红朊菌株 VIII 的根瘤中, 然后把此根瘤压碎, 此试验指出, 即使这种显著稳定的血红朊也很快被根瘤的氧化酶氧化为高铁血红朊 (Virtanen 与 Sternberg^[73])。因此压碎的根瘤内豆科血红朊的迅速氧化本身并不证明它比血的血红朊更容易被自动氧化。

整体根瘤中是否存在高铁血红朊 (methemoglobin) 是一个争论中的问题。Virtanen 与 Laine^[68] 认为血红朊与高铁血红朊在根瘤中均能发现, 它们的相互比率随着光强度、植物年龄以及可能随着其他一些因子而变化。这一概念是以测定压破的根瘤加入氟化钠后所得的溶液的吸收带为根据。虽然在低温下尽快地把根瘤压破, 然后很快离心, 可是在根瘤提取物中经常发现高铁血红朊。的确, 在处理中, 氧化酶可能引起豆科血红朊的氧化作用。Keilin 与 Smith^[74] 未使色素浸入溶液, 当直接观察压破的或切成片的根瘤时, 未发现高铁血红朊。他们特别注意高铁血红朊在 625 毫微米处的吸收。但是在根瘤的自然 pH 中此最大值是微弱的; 因此在压破或切成片的根瘤中, 除非三价铁的量很高, 其测定是困难的。但是在有些试验中, 即使加氟化钠, 他们仅发现一个微弱的最大点指出高铁血红朊。在我们的试验中, 加氟化钠至压破的根瘤后, 一般来说, 高铁血红朊的氟化物于 605—610 毫微米处的吸收最大值愈明显则根瘤的棕色色泽愈深。不幸的是不能以整体根瘤作比较测定, 因此, 其中高铁血红朊的存在尚无有力的证据。

以硫酸多次沉淀, 纯化豆科血红朊已得到一种制备物, 其铁与正铁血红素含量与血的血红朊相同 (Virtanen 等^[44])。Pedersen 在 Upsala 用离心法发现此制备物的分子量约为 17,000^[69], 以早先的制备物其纯度以正铁血红素来推测约为 80—85% Pedersen 得到 34,000 的值^[75]。这些数值中那一个代表了豆科血红朊的真实的颗粒大小的确还很难说。尚未在一些 pH 水平测定豆科血红朊的可能的解离。

根瘤中的血红朊是位于类菌体外的植物细胞内。Virtanen 等^[44] 根据压破根瘤时色素很容易定量地进入溶液内, 而类菌体当

时还不是很破碎的这个事实得到了这种结论。Keilin 与 Smith^[74] 亦持有这种观点,色素位于发现有细菌的植物细胞内。刚形成的根瘤尚不含有血红蛋白,其细菌当时还是杆状的,数日之内开始形成红色素,同时杆菌转变为类菌体(Virtanen^[65,66]; Virtanen 等^[41])。豌豆的有效红色根瘤几乎专含有类菌体^[4,44,65,66]。当根瘤的红色素转变为绿色时,固氮作用即停止,大部分类菌体消失掉,在根瘤内只能发现杆菌^[44]。杆菌在绿色根瘤内是如何发生的,尚待确定。无效的白色根瘤经常仅含有杆菌^[44,65,66]。

在固氮菌或赤杨的根瘤内未发现过血红蛋白^[51]。因此它似乎仅对豆科根瘤是重要的。可证实它起一个氧的贮藏及载体的功能。Kubo^[63] 注意到,加根瘤色素至根瘤菌培养物刺激了呼吸作用。Little 与 Burris^[76] 在低的氧分压作了同样的观察。此外 Virtanen^[68] 推测过这种可能性,在豆科血红蛋白中发生的铁价变化可能对固氮作用是重要的,但是没有提出证据支持这种假说。

以切除根瘤完成固氮作用的企图一部分已得到正结果,除了本实验室所得的结果^[4] 以外, Burris 等^[77] 及 Wilson 与 Burris^[5] 在许多试验中以重氮已成功的证明固氮作用(虽然不太规律)。以切除生根瘤的根,开始结果都是正的。在他们最近的论文中, Machata, Burris 与 Wilson^[78] 报导,即使用切除的带根瘤的根,结果是有变化的。Wisconsin 派在 5 年期间以 133 个样品所进行的试验,如采用统计学上的 0.05 原子百分超 N^{15} 的有效增加作为标准,则 16% 得到正结果。他们把正结果归之于外部细菌的可能污染。虽然不可能完全避免污染,在 Wisconsin 及 Helsinki 的一些最好的结果趋向于固定作用,难于说明是由于外部细菌引起的固氮作用。20—24 小时之间在室温下在一些实验中观察到的丰富的固氮,很难归之于污染,如 Machata 等以开始无外来的微生物的根瘤进行的一些实验更少污染。很可能,固氮作用所需的组织中的衰退变化在不同切除的根瘤群中发生的速度不同,并且因此这种结果是变化的。

自由生活的根瘤菌,即使存在有豆科血红蛋白也未能完成固氮