

王子芳 郭俊

(中国科学院武汉病毒研究所)

七十年代提出了联合固氮作用的概念,由于它给人们以农田生态系中应用生物固氮作用的新希望,因此掀起了研究这一问题的热潮<sup>[1]</sup>。本文首先对联合固氮微生物的种类以及分类作简单介绍,然后着重以固氮螺菌属(*Azospirillum*)为代表来探讨联合固氮菌在生态系氮素循环中的作用。

### 一、联合固氮细菌的定义

联合固氮细菌是指特定的一类介于共生和自生固氮细菌之间的半共生固氮细菌<sup>[2]</sup>。它们与植物之间有着互相影响的密切关系,某些种类的细菌能够生活在与其联合的植物的粘质鞘内或皮层细胞之间,与植物寄主的关系有一定的专一性。植物根系分泌提供这类细菌生长所需要的能源与碳源,而微生物固定大气中分子态氮促进植物生长。联合固氮微生物与植物的互相影响的密切关系在形式上不同于典型的共生固氮体系,因为不形成类似根瘤那样的一种共生特殊结构。联合固氮菌与植物联合在一起时,其数量和固氮酶活性比单独在土壤或培养基中生活时要高得多。同时,这类固氮微生物分布广泛,普遍存在于各种禾本科作物根表和根际中。因此它们是承担着在土壤生态系氮素循环中固定大气氮任务的一类重要微生物。

### 二、联合固氮细菌的种群

近年来的研究证明联合固氮微生物种群和地理分布都是十分广泛的。有的研究者认为联合固氮微生物是一类直接受到植物影响的固氮细菌<sup>[3]</sup>。不同光合途径的C<sub>3</sub>植物和C<sub>4</sub>植物以及不同品系的植物都具有与之营联合固氮的固氮微生物。一定的固氮细菌与被联合的植物间的相互关系,对于采用植物育种寻找固氮力强的菌株,进而建立农田固氮生态系是十分必要的。近年来,发现和研究的较多的与植物联合固氮的一些微生物种属是:雀稗固氮菌(*Azotobacter paspali*)、粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)、含脂刚螺菌(*Azospirillum lipoferum*)、巴西固氮螺菌(*A. brasilense*)、亚马逊固氮螺菌(*A. amazonense*)、印度拜叶林克氏菌(*Beijerinckia indica*)、德氏拜叶林克氏菌(*B. derxii*)、弗李明拜叶林克氏菌(*B. fluminensis*)、多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)、浸麻芽孢杆菌(*B. macerans*)、梭菌属(*Clostridium*)、紫色色杆菌(*Chr. violaceum*)、德氏菌属(*Derxia*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloace-*

*ae*)、凝集肠杆菌(*E. agglomerans*)、产气肠杆菌(*E. aerogenes*)、草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)、稻黄杆菌(*Flavobacterium oryzae* sp. nov.)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)等。

### 三、以*Azospirillum*属的菌为代表来探讨联合固氮细菌在生态系氮素循环中的作用

自1974年以来,许多研究者对固氮螺菌的生态分布、分类、生理生化、质粒遗传及氢酶(Hydrogen Uptake Hydrogenase)与固氮酶(Dinitrogenase)的关系等开展了广泛和深入的研究。

1. *Azospirillum* 的分类:1973年,Johnson等人用DNA杂交方法。按照DNA杂交的百分比来确定*Spirillum lipoferum*的分类地位,用几个相近的属分子杂交,其同源性均低于20%,显然是不宜把*Spirillum lipoferum*归入这些属的。Krieg和Backing等人将此菌与现有的几属固氮菌相比较,发现它们之间有较大差异,这些差异已超过了属的范畴<sup>[4]</sup>。

Tarrand等人根据积累的大量资料和DNA杂交的结果,将*Spirillum*这一属的固氮菌更名为一个新属,即*Azospirillum*属。归于螺菌科。该属的二个种即含脂刚螺菌(*A. lipoferum*)和巴西固氮螺菌(*A. brasilense*)。

寻求*Azospirillum*新种的工作也有一些进展,Mogalaes发现了一株新的固氮螺菌,Dobereiner将这菌株定为*Azospirillum*中的第三个种*A. amazonense*<sup>[5]</sup>。

2. *Azospirillum* 的生态分布:*Azospirillum*的地理分布极为广泛。在巴西热带、巴西亚热带、欧洲、拉丁美洲、澳大利亚、亚洲和非洲等地都先后分离出这一属菌。与*Azospirillum*这一类菌形成联合共生关系的有许多植物,在农作物中如玉米、小麦、水稻、高粱、黑麦、甘蔗、谷类等的根系中均发现这一类固氮微生物<sup>[6,7]</sup>。在大部分根际土壤中也分离到*Azospirillum*,其含量可达10<sup>7</sup>/克土<sup>[4]</sup>。

研究者们发现*Azospirillum*这一属的固氮微生物除了和上述的农作物形成联合共生关系外,还同各种牧草植物营联合固氮。因此,研究者们认为*Azospirillum*的重要性远远大于*Azotobacter paspali*<sup>[4-10]</sup>。

### 3. *Azospirillum* 的生理生化研究

(1) 碳代谢: *Azospirillum* 可利用多种糖类为能源和碳源,如葡萄糖、核糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、甘油、苹果酸盐和琥珀酸盐。在最近的一些文献中揭示了 *Azospirillum* 碳代谢的背景,看来 *Azospirillum lipoferum* 具有 Enter-Doudoroff 途径的各种酶,而 *A. brasilense* 看来缺乏葡萄糖-6-磷酸脱氢酶<sup>[4]</sup>。

*Azospirillum* 这一属中的两种菌都能在果糖、苹果酸盐和琥珀酸盐上生长,而且固氮酶活性也最高。其呼吸商为 *Azotobacter* 的 10—20%,而与离体培养的 *Rhizobium* spp. 相同<sup>[1,4]</sup>。进一步研究 *A. lipoferum* 和 *A. brasilense* 二种菌在碳代谢上的差异发现, *A. lipoferum* 可以利用葡萄糖生长,而 *A. brasilense* 虽然含有葡萄糖激酶但仍不能同化葡萄糖,在有 ATP 供应时, *A. brasilense* 也不能象 *A. lipoferum* 一样合成磷酸化的产物,看来 *A. brasilense* 缺少己糖激酶的活力<sup>[1]</sup>。

(2) 氧的效应:所有固氮微生物的固氮酶对氧都是敏感性的,因此,氧对固氮螺菌的纯培养的固氮作用也是有影响的。Okon 等<sup>[11]</sup>证实对固氮螺菌最适的氧分压为 0.01—0.05 大气压。

近期,有的研究者已经对 *A. brasilense* 进行了纯培养,发现在密闭的培养体系中如果  $PO_2$  为 0.005—0.0075 大气压时,其固氮酶活性为最高<sup>[12,13]</sup>。

根据以上资料,人们推测,对于水份充足的土壤,其溶氧量较低,而联合植物又能提供充足的底物供联合固氮菌生长,此时,呼吸速率增加,可提供大量的能量 ATP 供固氮酶需要从而提高固氮活力。

(3) pH 对 *Azospirillum* 固氮酶的影响:过去的报导中认为在土壤中 *Azospirillum* 的最适 pH 为 7.0。纯培养的无细胞制剂中则为 pH 6.8—7.8<sup>[14]</sup>。

Okon 等人报导,细胞粗提液中固氮酶的最适 pH 为 7.4<sup>[10]</sup>,固氮酶对 pH 的敏感性不如氢酶敏感。在 pH 5.5—8.5 之间,它们仍有 50% 的活性,设想在细胞内有一种膜包围着固氮酶以抵抗 pH 的变化。

#### 4 *Azospirillum* 遗传学的研究

(1) *nif* 基因的定位:七十年代后期绘制出了固氮基因结构的细微结构图,包括 16—18 位点,7—8 个操纵子。许多科学家都致力于 *Azospirillum* 的固氮基因定位工作。*Azospirillum* 的遗传物质具有二类复制子即染色体 DNA 和质粒 DNA<sup>[13,14]</sup>。质粒分离方法和分子杂交技术的建立以及 *Rhizobium trifolii* 中 *nif* HD 片段的分离成功,使得 *Azospirillum* 的固氮基因的定位成为可能,Plazinski 和 Rolfe 等人成功地应用了改良的 Kado 和 Liu<sup>[15]</sup> 的质粒分离方法,将 SP7 等 8 株 *Azospirillum* spp. 的质粒进行成功的检测<sup>[16]</sup>,结果说明各个菌株质粒带的数目是不同的。现在一致认为 *Azospirillum* 中质粒是普遍存在的,其分子量为  $12 \times 10^3$ — $370 \times 10^3$ ,在已试验的 8 株菌中 *nif* 基因是定位

在染色体上的<sup>[16]</sup>。

(2) 质粒和遗传顺序的研究:有关 *Azospirillum* 的遗传学研究仅是最近几年才开始的,在 Elmerich 实验室成功地进行了 R 质粒在不同的 *Azospirillum* 菌株间的转移,并报道了不同的遗传标记间的连接顺序。由于分子生物学技术的发展使得从 *Azospirillum* 中分离 *nif* 基因已成为可能<sup>[17]</sup>。

Bazzicalupo 和 Gallore<sup>[11]</sup> 用含质粒  $R_{45}$ —45(Km, *fc*, *cb*, *fra*, *incp*) 的铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和 *A. brasilense* sp6 在微孔过滤器上进行膜上杂交后成功的筛选出了结合突变株。他们发现这种接合转移的频率可达  $10^{-2}$  左右,对于抗萘啶酮酸的菌株来说转移频率要低一些。

(3) 分子生物学研究:

*Klebsiella pneumoniae* 的结构基因 *nif* HDK 属同一操纵子,定位于 *EcoRI* 的 6.2kb 片段,这一片段已经克隆到了 pSA30 质粒上<sup>[18]</sup>。

用这个质粒 pSA30 探针同 *A. lipoferum* 和 *A. brasilense* DNA 杂交都有较高的同源性,用质粒 pPC936 和 pMC78 的探针同上二种菌杂交时看到是在不同的片段上的放射性,因而这两种菌的基因组成不同<sup>[14]</sup>。

Wenzel 和 Singh 等人用  $\lambda$  噬菌体已克隆了 *Azospirillum* 的 *nif* 基因, *Azospirillum* 的  $\lambda$ nif DNA 用 *EcoRI* 酶切的 DNA 片段同质粒 pABI 杂交的结果是:在 *A. brasilense* ATCC29710 中是在 6.71kb 片段有同源反应,在 *A. lipoferum* A<sub>33</sub> 中是在 9.0 和 2.5kb 片段,说明在 *A. lipoferum* 的 *nif* HDK 中还有一个在 *A. brasilense* 中缺乏的酶切片段<sup>[19]</sup>。

为了研究 *nif* 基因的功能和组成,就必然需要只有一个点突变而其它基因都功能完好的突变株,点突变诱变剂 *Tn'* 就是一个十分有用的工具<sup>[21]</sup>。Singh 和 Klingmullen 用点突变转座子 Plasmid RtsII: *Tn1725* 进行诱变试验<sup>[22]</sup>,pABI 是组装有 *nif* 基因 (*Azospirillum*) 的质粒。*Tn1725* 是一个 8.9kb 的 DNA 片段,通过转化后的质粒检测发现 *Tn1725* 已插入到 pABI 中,在插入的 pABI 中有插入的 6.7kb 的片段 *nif* DNA,有的插入在 pACYC184 的 4.0kb 片段中,他们设想用这种 pABI:: *Tn1725* 的质粒转化野生型的 *A. brasilense*,从而获得 *nif* 的突变株。不过,要找到一个比较合适的 *nif* *gcn::Tn1725* 的载体。由于 pABI 中的 *nif* 基因的物理图谱十分清楚(图 1)。因此,要分析 *Tn1725* 的插入位点就十分容易了。

5. *Azospirillum* 中氢酶的研究以及氢酶与固氮酶的关系

Sterphan 等<sup>[23]</sup>证实了 *A. brasilense* 在固氮条件下具有吸氢酶的作用,这种作用增加菌体的生长周期和固氮效率。Dixon 根据实验的数据提出了固氮菌中吸氢酶作用的假设,其要点为:(1)消除  $O_2$  对固氮酶

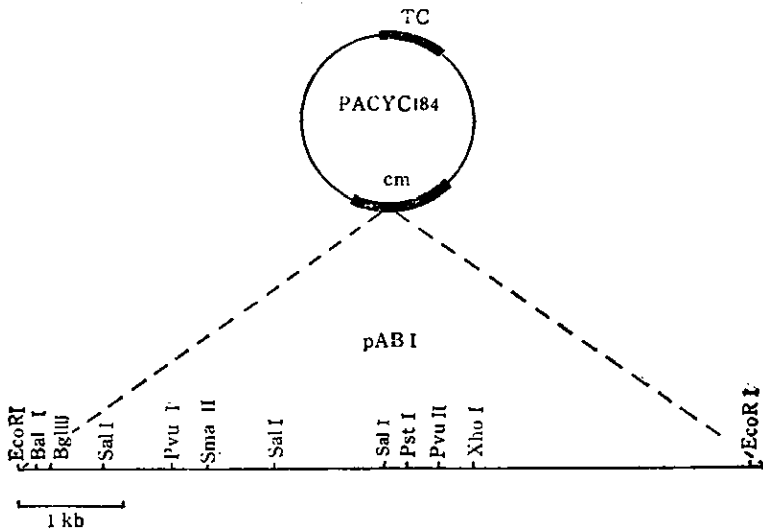


图1 pABI 质粒的物理图谱

含 6.7kb 的 *A. brasilense* E. COR1 片段,克隆到 PACYC184 的 *cm* 基因中

的抑制作用,(2)将固氮酶产生的氢进行再利用,减少能量损失。目前对 *Azospirillum* 的放氢和吸氢现象进行了下列工作:

(1) pH 对 *Azospirillum* 氢酶的影响:用完整的 *A. brasilense* 细胞培养基在气相中含 100%  $H_2$  的条件下,测得其吸氢酶活力在 pH8.6 时为最高。该菌吸氢酶的活性从 pH5.0—10.0 都存在,这种对 pH 变化的抗性可以暗示在 *A. brasilense* 中其氢酶也同 *A. Vinelandii*、*Rhizobium* 类菌体和 *Clostridium pasteurianum*<sup>[12]</sup> 一样,其氢酶是与膜紧密结合的。Dobereiner 等认为,在 pH6.8—7.8 之间时氢酶的活力是来自固氮酶释放的  $H_2$  再循环。Stephan 等人在固氮条件下进行连续培养的实验,其中没有测得释放的  $H_2$ <sup>[24]</sup>,因此,这一结果支持了上述观点。

(2) 碳源浓度对氢酶活力的影响:培养基中的乳酸盐浓度对氢酶的活力产生定量的影响,在乳酸盐含量 0.25g/l 时氢酶活性最高。当乳酸盐浓度升高时,吸氢酶的活力将下降至一个稳定的数值,即吸  $H_2$  量为  $2.5 \mu\text{mol/h/mg}$  蛋白。这说明在 5g 乳酸盐/l 的培养基中仅合成 20% 的氢酶<sup>[24]</sup>,此外 Maier 等发现在 *A. brasilense* 中不需加入  $H_2$  来诱导产生氢酶<sup>[25,27]</sup>。

在有氧时,无论任何 C 源存在只要氧的浓度增加,氢酶的效率就降低<sup>[23]</sup>(图 2),这主要是因为吸氢酶对氧敏感,同时,依赖于  $H_2$  的呼吸作用同末端氧化酶的连结要比依赖于 C 的呼吸作用亲和力更强。

(3) 氢酶和固氮酶的关系:Volpon 和 Stepan 还没有发现 *Azospirillum* 中的放氢作用<sup>[23]</sup>。王子芳等<sup>[24]</sup>发现在相同的条件下 *A. brasilense* 中有的菌吸氢能力强,而有的菌放氢能力强。当吸氢的菌株和放氢的菌株混合培养时,其固氮酶活性比单株的强,有氢存在

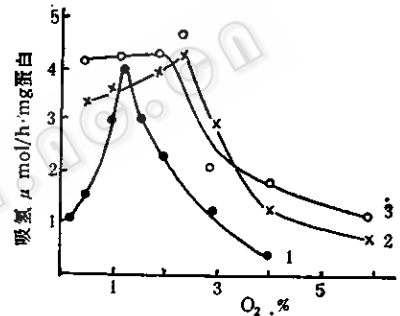


图2 不同碳源条件下氧浓度与吸氢酶活力的关系  
1. ck 2.2.20mM 琥珀酸钠 3. 20mM 苹果酸钠

时,固氮酶活性比不加氢时要高。

王子芳等<sup>[24]</sup>将 *A. brasilense* 中两株菌进行比较,其中 W251-10 是具吸氢能力的菌株, R256A 是不具有吸氢能力的菌株,这二株菌分别在加  $H_2$  和不加  $H_2$  时,

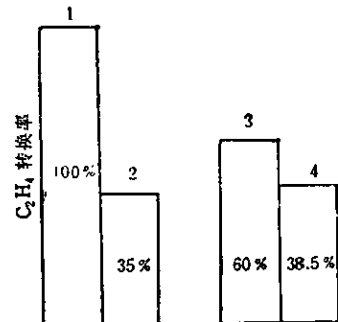


图3 W251-10 和 R256-A 的  $C_2H_2$  转换率的比较  
1.加氢时 W251-10 (对照, 100%), 2.加氢时 R256-A, 3.不加氢时 W251-10, 4.不加氢时的 R256-A

的状态下测定固氮酶活时发现 W251-10 固氮酶活就其自身比较加氢时比不加氢时高, 无论加氢或不加氢时 W251-10 的固氮酶活性高于 R256-A 的酶活性, 这一结果支持了  $H_2$  的吸收能促进固氮酶活性提高的观点(图 3)。

Yates 等发现在加  $H_2$  的培养体中, 乙烯的转换量明显增加, 但是  $H_2$  不能解除  $O_2$  对固氮酶的毒害作用。尤其是在 C 源为限量时,  $H_2$  的再循环对于能量和电子供应是有益的, 因此, Hanus 证明在含  $H_2$  的  $CO_2$  的体系中, *A. brasilense* 能进行自养生长。

在含 0.25g/l 乳酸盐的培养基中, 不同氧分压时加氢和不加氢的实验说明  $H_2$  对固氮酶还有防氧保护作用<sup>[12]</sup>。当然, 这种保护作用同 *A. chroococcum* 和 *R. japonicum* 的类菌体相比是较小的, 但是无论如何总还是说明在 *A. brasilense* 中存在有较弱的呼吸保护机制。

6. 对联合固氮作用的评价: 在温带、热带和亚热带等地区均发现了大量的各种种类的联合固氮微生物。有各种实验证明这些菌不仅在根际存在, 而且进入了根的内皮层营固氮作用, 这种固氮作用对植物的增产效果究竟如何? 有没有农业潜力? 许多研究者做了大量的实验初步说明这些问题。

(1) 共生固氮与联合固氮的效率的比较: Vlassak 等人比较了共生固氮和联合固氮的效率, 共生固氮系统每消耗 1000g 光合产物时固氮 10—50g。用硝酸盐作氮源时, 1000kg 的光合产物可获得种子经济产量为 500—710kg。为达到同样的产量, 仅仅以  $N_2$  为 N 源, 则共生体系消耗 90—116kg 的光合产物用于固氮的能量需要, 而联合固氮则要消耗 220—1660kg 的光合产物。如果光合产物既要用来固氮能量的消耗和产生种子经济产量, 则同施用  $NO_3$  肥料相比, 共生体产量下降 8—10%, 联合固氮体系则下降 18—61%<sup>[13]</sup>。

(2) 联合固氮的温室试验: Rinaudo 等用 *Azospirillum* 的 32 株菌接种水稻, 采用钟罩密闭的系统, 发现其乙炔还原活性 (ARA) 与用高压灭菌的接种物对照 (190n mol  $C_2H_4$ /植株·h) 相比, 或是增加 305 或是减少 35nmol  $C_2H_4$ /植株·h。

Vlassak 等在温室中接种不同菌株后得出了各种植物干重增加的数据<sup>[14]</sup>, 见表 1。

这一结果可以看出, 虽然植物干重没有超过 10%, 但除了 001 外, 所有其他处理的植物的经济产量部分干物质有了增加。

(3) 联合固氮的田间试验: Rao<sup>[15]</sup> 作了一些有趣的实验, 他在不同地方, 在不同的施肥 (尿素) 条件下, 比较了水稻和小麦的产量, 对水稻而言, 在 Delhi 地区, 种子接种 *Azospirillum*, 在不施肥和施用量为 40kg/ha 时, 水稻产量分别比不接种固氮螺菌高 21.4% 和 16.7%。

表 1 温室中小麦接种 *Azospirillum* 不同菌株后植物不同部分干重增加比例的比较

处 理	穗重	茎	根	总计(%)
CK	100	100	100	100
001	96	97	75	94
002	111	105	92	106
S11	107	101	77	100
S631	104	101	73	98
R <sub>1</sub>	112	109	86	107
T <sub>1</sub> W	102	105	80	101
M <sub>1</sub>	105	100	74	99
SpBr14	108	111	103	109

对于小麦来说, 在高水平施肥条件下, 如 80 或 120kg, 接种后的产量分别增加 16.5 和 27.1%, 在高粱的试验中, 0—40kg/ha 水平下, 都能获得正结果。Rao 认为, 使用接种剂的费用仅为 0.8—0.7 美元/ha。

燕麦、大麦和高粱的产量在接种和不施肥条件下分别最高增加产量为 36.0%, 27.4% 和 63.6%。

他认为在低施肥水平时, (0—40kg/ha), 用几种 (包括 *Azospirillum*) 菌种接种对增产将是有意义的<sup>[15]</sup>。

#### 四、联合固氮体系研究前景

联合固氮的效率虽不如共生固氮高, 但它们种类多, 分布广, 从开辟肥源途径考虑, 这是一类不可忽视的固氮微生物。它们在自然界氮素循环过程中是一类将  $N_2$  转化为植物可利用的结合态氮的微生物, 大多数的实验证明它们对农作物的增产是有作用的, 尤其是它们能补偿少施一部分氮肥的农业效果<sup>[16]</sup>。问题是如何利用它们同植物的这种联合特性, 增加固氮酶活力, 获得稳定的有意义的结果。使人类能最终有效地将联合固氮应用于农业生产。

#### 参 考 文 献

- [1] Brill, W. J.: Scientific American, 236(3): 68, 1977.
- [2] 王子芳: 微生物学通报, 9(4): 176—181, 1982.
- [3] Klucas, R. V. et al.: Associative  $N_2$ -Fixation (ed. by Peter, B. V. and A. P. Ruschel), CRC, Boca Raton Fla, 1981, pp. 119—129.
- [4] Krieg, N. R.: Genetic Engineering for Nitrogen Fixation (ed. by Holleander, A.), Plenum, New York and London, 1977, pp. 463—472.
- [5] Döbereiner, J.: *Azospirillum* II (ed. by Klingmuller, W.), Birkhauser Verlag, Basel, 1983, pp. 9—23.
- [6] 罗孝扬, 王子芳: 微生物学报, 23(1): 68—72, 1983.
- [7] Okon, Y., S. L. Albrecht and R. Burris: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 85—88, 1977.
- [8] Döbereiner, J. et al.: Current Perspective, in Nitrogen Fixation (ed. by Gibson, A. H. et al.), Australian

(下转第 170 页)

- Academy of Science, Canberra, 1981, pp. 305—312.
- [9] Polsinelli, M. et al.: *Mol. G. Genet.*, 178: 709—711, 1980.
- [10] Berg, R. H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 642—649, 1980.
- [11] Okon, Y. et al.: *Azospirillum II* (ed. by Klingmüller, W.), Birkhauser Verlag, Basel, 1983, pp. 115—121.
- [12] Lemos, M. V. F. et al.: Associative N<sub>2</sub>-Fixation (ed. by Peter, B. V. and A. P. Ruschel), CRC, Boca Raton, Florida, 1982, pp 16—24.
- [13] Elmerich, G. et al.: *Azospirillum* Genet. Physiol. Ecol. (ed. by Kingmüller, W.), Birkhauser Verlag, Basel, 1982.
- [14] Franche, C. et al.: *Ann. Microbiol.*, 132A: 4—18, 1981.
- [15] Kado, C. T. & S. T. Liu: *J. Bacteriol.* 145: 1365—1373, 1981.
- [16] Plazinsk, J. et al.: *J. Bacteriol.*, 9: 1429—1433, 1983.
- [17] Döbereiner, J. et al.: *J. Microbiol.*, 22: 1464—1473, 1976.
- [18] Döbereiner, J. and J. M. Day: Proc. Int. Symp. Nitrogen Fixation 1st (ed. by Neyton, W. E. and C. J. Nyman), Washington State Univ. Press, Pullman, 1976, pp. 518—538.
- [19] Strength, W. J. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 253—268, 1976.