

乙炔还原法测定固氮作用的限制因素

樊 蕙

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京 100081)

测定固氮生物固氮量的直接方法主要有全氮法、 N^{15} 示踪法。前者曾在生物固氮早期的研究中成功地被应用,但其灵敏度较低。后者是固氮量测定的准确、可靠的方法;但由于费用昂贵,难以普及。

60 年代 Di Iworth 等发现固氮酶除了具有还原分子氮的能力以外,还可将乙炔还原为乙烯,从而建立了测定固氮作用的乙炔还原分析方法。该法具有灵敏度高、速度快、简便、特异性强、应用范围广等优点。70 年代以来曾广泛地应用于测定自生固氮菌、酶的提取液及豆科、非豆科根瘤及藻类的固氮作用。这是一种以瞬间测定为指标的间接的固氮作用测定方法。

然而,乙炔还原测定表面上的简化可能使人们忽视应用该法测定中存在的一系列影响因素以及由此带来的各种误差。甚至使一些测定结果不能客观地被解释。本文将侧重几个主要

方面阐述乙炔还原法测定固氮作用的限制。

1 环境因子对乙炔还原测定的影响

(1) 氧压: 氧是固氮生物代谢中的一个重要问题。大部分固氮微生物需要以氧为末端电子受体进行氧化磷酸化产生 ATP。而固氮酶本身对氧十分敏感。氧能使固氮酶不可逆地失活。然而固氮生物可通过呼吸、构型、隔离保护及豆血红蛋白等方式保护固氮酶不受氧害。可见在乙炔还原测定中氧浓度是重要的影响因素之一。罗贤安^[1]等将自生固氮菌培养液在 30℃ 下振荡 2h, 测定圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococum*) 最适氧分压 (pO_2) 在 0.07—0.12 atm 之间。一般采用 0.1atm。黄色分枝杆菌 (*Mycobacterium flavum*) 301 在 pO_2 为 0.05 atm 时达到最大酶活性。非豆科结瘤桉木属 (*Alnus*) 和沙棘属 (*Hippophaë*) 乙炔还原速

1994-06-22 收稿

率从氧浓度 1—15% 逐渐增加。15—20% 时活性不继续增加。而桉木属的根瘤活性被抑制^[2]。Trinick^[3] 测定羽扇豆根瘤在 pO_2 为 0.2—0.25 atm 时活性最高; $pO_2 = 0.9$ atm 时, 活性接近 0。

已经证明氢为氧在氢酶作用下提供了还原剂, 由此导致相邻固氮酶氧分压的降低, 从而起到保护固氮酶的作用。然而, 当乙炔达到饱和浓度时, 几乎 100% 地抑制了氢释放。而氮仅抑制 75%。乙炔对氢释放的抑制会造成固氮酶氧分压的提高, 故乙炔还原原氮还原测定对氧更敏感。

(2) 温度: 温度不同影响固氮酶的激活能量。如在 20℃ 以上, 自生固氮菌固氮酶的激活能量大约 $14 \times 4.18 \text{ KJ/mol}$, 低于 20℃ 时, 大约为 $35 \times 4.18 \text{ KJ/mol}$ ^[4]。

不同的豆科和非豆科植物固氮活性对温度的反应差异很大。测定大豆根瘤时保温温度从 10℃ 升至 20℃ 时, 固氮活性随之增加。20—30℃ 时达到最高值; 30℃ 以上活性下降^[4]。Trinick^[3] 等人测定了两种羽扇豆 (*Lupinus cosentinii* 和 *L. luteus*) 根瘤的固氮酶活, 在 25℃ 时达最大值。Minchin^[5] 测定完整植株的根瘤酶活性。当温度从 25℃ 下降至 15℃ 时, 由于 CO_2 供给及其利用率的下降, 减少了氧的需求, 致使根瘤的氧扩散阻力增加, 最大酶活随之减小。Waughman^[2] 报道了桉木属和沙棘属两个种的乙炔还原速率从 5—20℃ 随温度升高而增加, 30℃ 时反应速率较 20℃ 为低。

(3) 乙炔浓度: Spitt 发现拜叶克氏菌 (*A. beijerinckii* spp) 的乙炔还原活性随着乙炔分压的提高而增加; 直至 0.7 atm^[6]。而巴氏梭菌 (*Clostridium pasteurianum*) 在乙炔分压大于 0.025 atm 时, 其生长被抑制^[6]。罗贤安^[7] 等测定大豆根瘤的最适乙炔分压为 0.1 atm。当 pC_2H_2 在 0.2—0.3 atm 时, 对酶活产生明显的抑制作用。Minchin^[5] 等将白三叶草和豌豆根瘤注入含 10% C_2H_2 、21% O_2 、68.9% N_2 、0.1% CO_2 的气流系统中 2—4 min 内, 呼吸作用减

弱。 CO_2 产物和乙炔还原的乙烯量明显下降。延续 30—60 min 达到稳定期。由注入乙炔诱导的酶活下降特性已在几个豆科植物的 200 个以上的实验中得到证实。据分析这是因为乙炔的注入引起根瘤细胞渗透性的变化; 增加了氧扩散阻力, 从而降低了呼吸作用强度的缘故。在密闭系统中较长时间的分析中, 由于乙炔抑制氮的合成也是导致固氮酶活下降的主要原因。

(4) 光照和光合作用产物: 光对各种固氮生物固氮酶活均有较大的影响。豆科根瘤从寄主植物提供的光合产物中获得固氮酶催化氮还原必需的能量。改变光合作用活动会引起乙炔还原的变化。因此豆科植物的不同生长阶段及昼夜 24 h 光照和温度的变化均会导致乙炔还原活性较大的波动。Rüegg^[7] 对盆栽条件下苜蓿不同生长季节的根瘤乙炔还原活性的测定表明: 还原的乙烯产量与植株总干重、光合作用面积相关 ($r = 0.9$, $r = 0.94$)。开花期 (90 d) 活性低; 生长 98 d 活性上升, 至 134 d 最高。汤树德^[8] 指出: 阴雨天气大豆固氮活性日平均值比相邻晴天低 40% 左右。Hardy^[9] 等试验得出: 在截取大豆根瘤之前 2 h 处于晴朗阳光条件下根瘤的酶活平均为 $6.7 \pm 1.7 \mu\text{mol } C_2H_4/h.g$; 而云量较多时, 平均酶活为 $3.0 \pm 0.5 \mu\text{mol } C_2H_4/h.g$ 。

(5) 水张力: 水的张力增加通常会引起乙炔还原活性的降低。这与减少氧供给有关。羽扇豆根瘤被冲洗后在水中浸泡 30 min 后活性下降。其值仅为不冲洗时的 18—43%^[10]。离体大豆根瘤的水含量低于 80% 时活性不可恢复。大豆根瘤固氮速率对土壤水分张力和根部温度十分敏感。随水分张力的增加, 特别在低温下大豆固氮速率显著减少^[10]。

(6) 背景乙烯、 CO 、 CO_2 和不明气体: 植物、真菌和细菌都会产生少量的乙烯。由于土壤样品活性低, 要求对预先温育在无乙炔条件下, 由非固氮酶形成的乙烯进行校正。对根瘤样品应以同一种植物上采集的不结瘤的根样品为对照, 以排除由于根组织一般代谢而形成的乙烯。

CO_2 和 CO 达一定浓度时将抑制根瘤的呼吸和固氮酶活性。氮气的存在将与乙炔竞争电子流,如不用惰性气体和氧的混合气体代替空气,将引起大豆根瘤固氮活性下降 10—20%^[4]。

2 测定时反应容器体积及温育时间的影响

测定样品的反应瓶容积对测定结果有一定的影响。为使试验过程中反应条件不会发生明显的变化,应采用较高的容器对样品的体积比。

不同的供试样品要求温育的时间各不相同。必须预先逐时地测定供试样品的乙炔还原反应,查明温育时间与固氮酶活性之间是否呈线性关系,以便在该范围时间内进行测定。

3 采样方法的影响

不同的取样方法对酶活测定值影响很大。对豆科根瘤来说,采用完整的植株测定值最高,去除地上部的带根根瘤次之;只取根瘤测定的活性最低。欲准确地测定酶活,要求在流动系统中使用完整的植株并在乙炔引起酶活下降之前测出乙炔还原的最大速率。

4 仪器及操作误差的影响

利用气相色谱仪的氢焰离子鉴定器检测乙炔和乙烯。为了获得充分分离的乙炔峰和乙烯峰,必须选择合适的载气流速、色谱柱长度、柱填充料及柱温等。如条件不适,则使两个峰不能充分分离,这将直接影响测定结果。

在操作过程中,一系列环节可能带来误差。如培养容器密封不严或针头堵塞以及进样中的硅胶垫漏气、气体注射器不太严或针头堵塞以及进样口的硅胶垫漏气等均会导致乙炔和乙烯峰的下降。

5 以乙炔还原值计算固氮绝对速率存在的问题

依据乙炔还原生成乙烯和氮还原生成氨的反应式,从理论上证明 $\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ 之比为 3:1 (也称为转换系数)。但实测值往往与理论值不一致。Hardy 和 Criswell^[10] 报道:豆科实验系统中测定的平均系数是 3.4。其它固氮系统为:试管内固氮酶约 3.6;细菌 4.3;蓝藻 3.2;非豆科 2.4。试验中大部分土壤测定的转换系数

在 3.0—6.3 之间。但在嫌气和灌水条件可高达 25。理论与实验值不同的原因首先是因氮为理想的底物,它在还原被同化合成蛋白质;而乙炔对微生物代谢不起作用。另外,乙炔和氮的相对溶解度分别为 41.9mmol/L 和 0.64mmol/L。它们对实验中所测定的反应速率影响很大。而且作为底物的氮产生大量的电子流到 H^+ ,引起放 H_2 。而乙炔存在时,竞争性地抑制氢的生成。氢生成的不稳定性(一些系统存在吸收性氢酶)对固氮活性的影响使转换系数的推导更加复杂化。Bergersen^[9] 发现同一固氮生物在不同的培养时间,其转换系数也有变化。他测定棕色固氮菌 (*A. vindandii*) 培养液的乙炔还原和固氮量的结果表明: $\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ 最初几小时接近 3:1;6—10h 陡然下降;18—20h 再度下降。其变化的原因系因乙炔还原分析中氧溶解速率 (0.17ml/ml. min) 较在培养液 (0.03ml/ml. min) 中高的缘故。他还测定了大豆根瘤 $\text{pO}_2 = 0.2\text{atm}$ 时, $\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ 为 3.1:1;而 $\text{pO}_2 = 0.7\text{atm}$ 时, $\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ 为 1.5:1。因此, Bergersen^[10] 建议检测时应调节乙炔的浓度,使溶液中 C_2H_2 和 N_2 的克分子浓度相等。只要氧效应相似, $\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ 在很宽的氧分压范围内将是恒定的。Minchin^[11] 等通过 200 多个不同豆科植物的实验证明了乙炔注入固氮系统后诱导了乙烯量的明显下降。用 N^3 吸收分析证明只有采用降低前的乙炔还原速率(即最大值)才能代表真正的固氮酶活。一般测定是采用累积的乙烯量进行计算。这样会低估真正的还原速率。不同寄主接种后由乙炔引起的酶活下降程度不同;故造成豆科种内或种间 $\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ 的变化。

从以上几方面的分析可以看出乙炔还原测定中诸多影响因子。即使采用某些校正因子,也会遇到许多困难。因此一般认为乙炔还原测定在进行不同处理之间和短期比较还是有价值的。对于自生固氮微生物制作的生物肥料,测定时添加碳源后产生的固氮酶活性可能来自基质和固氮微生物两者。测定时应设合理的对照。采用加入葡萄糖后温育若干天测定的固氮酶活性当做固氮生物肥料固氮的唯一质量标准

是不客观的。它并不能反映出生物肥料的真实固氮量。因而对各种实验得到的乙炔还原测定结果的解释应很小心。欲通过乙炔还原数据推导出准确的固氮量,应在同一条件下和相同的暴露时间里测定 N_2 和乙炔的还原。以 N_2 的还原作为乙炔还原间接方法的核对手段。

参 考 文 献

- [1] 罗贤安,涂安千. 微生物学通报, 1979, 6(2): 37—40.
- [2] Waughman GJ. *Plant and Soil*, 1972, 37: 521—528.
- [3] Trinik MJ, Dilworth MJ, Grounds M. *New Phytol*, 1976, 77: 359—370.
- [4] Hardy RW, Buras RC, Holsten RD. *Soil Biochem*, 1973, 1(5): 47—81.
- [5] Minchin FR, Sheehy JE, Witty JF. *Experimental Botany*, 1986, 37 (183): 1581—1591.
- [6] FJ 伯杰森主编, 生物固氮方法, 北京: 科学出版社, 1987.
- [7] Ruegg JJ, Alston AM. *Aust J Agric Res*, 1978, 29: 951—952.
- [8] 姜魁先, 黑龙江八一农垦大学学报, 1987 1: 71—77.
- [9] Bergersen FJ. *Aust J Biol Sci*, 1970, 23: 1015—1025.
- [10] 刘中柱主编, 生物固氮译丛(二), 北京: 农业出版社, 1982.
- [11] Minchin FR, Witty JF, Sheehy JE, *et al.* *Journal of Experimental Botany*, 1983, 34(142): 641—649.