

几种浸液对两株 *Frankia* 菌生长和乙炔还原的影响

杜大至 原福虎 李荣儿 马志本 王毅岩

(山西省生物研究所, 太原)

顾德峰 和 贵喜

(山西农业大学, 太谷)

随着对放线菌结瘤植物共生固氮研究的深入进展, 用纯培养的 *Frankia* 对这类苗木进行人工接种, 早已在实验室获得成功并逐步向大田应用阶段过渡^[1,2]。为了解决这种菌生长缓慢、活菌体收集量少的问题, 国内外的研究者在 *Frankia* 的遗传特性和培养条件等方面作了大量基础性研究^[3,4]。就目前所知, 一般认为影响 *Frankia* 生长和固氮的因素比较复杂, 为了增加菌体的生长量, 当前主要应设法进一步改善其培养条件。从放线菌根瘤植物的共生过程来看, 寄主植物体内及其周围的生态环境中, 肯定存在与 *Frankia* 生长和固氮有关的营养成份。本试验就有关浸液对 *Frankia* 生长和固氮活性的影响进行了一些探讨。现将研究结果报道如下。

材料和方法

(一) 几种浸液的制备

沙棘果汁是榨取成熟沙棘果实的原汁, 采用巴氏法灭菌。其余四种浸液的制备方法如下:

1. 土壤浸液: 取沙棘林下的风干土 400g, 加入蒸馏水 960ml, 121℃ 加热 1h, 静置并过滤。

2. 沙棘叶和种子粉浸液: 取自然风干的鲜沙棘叶和成熟的种子粉各 50g, 分别加蒸馏水 1L, 煮沸 1h 后过滤, 并补足 1L。

3. 沙棘根浸液: 取 50g 新鲜沙棘根, 粉碎后加蒸馏水 200ml, 煮沸 1h 后过滤并补足 200ml。

以上四种制备液均于 1 个大气压灭菌 20min 后备用。

(二) 供试菌及培养方法

Hr319 菌株分离自中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* Rousi), Em381 菌株分离自翅果油树 (*Elaeagnus mollis* Diels), 两株菌都属于典型的 *Frankia*, 在无菌条件下回接原寄主, 证明可以结瘤固氮。

基础培养基为 CF-1 无氮培养基^[5]。用培养一个月的菌体作菌种。离心 (4,000r/min, 10min) 收集菌体, 无氮培养基冲洗两次, 并用研磨器研碎菌体, 在装有 25ml 培养基的三角瓶中接种 2ml 菌悬液, 细胞密度为 5—10⁶g 蛋白 1ml。培养瓶置暗中 27℃ 静止培养。

(三) 固氮酶活性和生长量的测定

用乙炔还原法测定菌体的固氮酶活性。将供试菌预培养在 CF-1 培养基中, 两周后转接到加有不同浸液的培养基中, 胶塞密封, 并向培养瓶中注入 10% 的乙炔, 暗中 27℃ 静止培养。第 8d 测定乙炔还原活性, 同时测定菌体生长量。在比较时程试验中, 注入乙炔即进行隔日测定。乙烯量用岛津 GC-5A 型气相色谱仪监测。

以细胞蛋白表示菌体的生长量, 用紫外分光光度法测定菌体蛋白量。

(四) 土壤浸液和沙棘果汁的成分分析

土壤浸液和沙棘果汁的含氮量用凯氏定氮法测定, 氨基酸含量用 121MB 型氨基酸分析仪测定。土壤浸液的各种元素用等离子发射光谱仪测定, 碳水化合物用蒽酮比色法测定。沙棘汁中总糖含量用纳尔逊-索莫吉比色法测定。糖的种类用纸层析色谱法分析, 并采用碱性环境下, 使还原糖中葡萄糖被溴氧化, 测定糖及葡萄糖含量。有机酸总酸以碱滴定法测定, 纸层析法分析有机酸组成。苹果酸以 2, 7-二萘酚比色法进行定量测定。维生素 C 以 2, 6-二氯酚靛酚滴定法测定。胡萝卜素用 M. Tswett 柱层析分析法测定, 维生素 E 以高压液相色谱测定。

本文于 1988 年 2 月 8 日收到。

固氮活性和菌体蛋白的测定由本所中心试验室程云梅、莫海云、武秀珍同志承担; 土壤浸液的成份由山西农业测试中心分析, 一并致谢。

本研究项目获得山西省科学技术委员会的资助。

结果和讨论

(一) 不同浸液的影响

不同浸液对供试菌生长和固氮酶活性的影响结果见表 1。

看来不同浸液对供试菌生长和固氮酶活性的影响有很大差别。土壤浸液对分离自沙棘的 Hr319 和分离自翅果油树的 Em381 菌株的生长和固氮都有促进作用。而沙棘果汁只是对 Hr319 菌株的生长和固氮有较明显促进作用, 对 Em381 菌株来说, 只是对其生长有促进作用, 对测定期的固氮活性则无明显作用。沙棘的根、叶和种子粉浸液, 对供试菌的生长和固氮几乎没有作用, 尤其是叶和根的浸液, 有时反而有抑制作用。

对沙棘叶、根和种子粉的化学成分分析结果表明, 沙棘叶中除含有较多的蛋白质和氨基酸外, 只含有少量的可溶性糖和微量有机酸, 而黄酮类

物质和单宁的含量则比较高。Frankia 一般不直接利用蛋白质, 对大部分氨基酸的利用也比较差, 而黄酮类物质和单宁都有抑菌作用, 很可能会抑制供试菌的生长和固氮。沙棘种子粉的主要成份为蛋白质、脂肪和单宁, Frankia 不能直接利用这些成份。因此对供试菌的生长和固氮都无明显促进作用。另据报道^[6], 沙棘的根皮中含有某些杀菌力较强的生物碱, 这很可能对供试菌产生抑制作用。

(二) 不同浓度浸液的影响

试验了土壤浸液和沙棘果汁的浓度对菌体生长和固氮活性的影响, 结果见表 2。

表 2 表明, 浸液的浓度对供试菌的生长和固氮都有一定影响。随浸液浓度的增加, 菌体生长量都表现出上升的趋势。说明两种浸液中的营养物质都有助于促进菌体的生理代谢。但对于测定期内的固氮活性, Hr319 菌株以加入 1% 沙棘果

表 1 各种浸液对供试菌生长和固氮活性的影响

浸 液		菌体蛋白* (mg/瓶)		乙炔还原*(nmol C ₂ H ₄ /mg 蛋白/h)		固氮活性 (nmol N ₂ /mg 蛋白/h)	
		Hr319	Em381	Hr319	Em381	Hr319	Em381
土壤浸液		1.1140	0.2143	194.92	47.07	81.22	19.61
沙棘浸液	果 实	1.3251	0.3536	155.74	14.66	64.89	6.11
	叶	0.4035	ND	36.21	ND	15.09	ND
	根	0.3635	0.1171	47.79	<1×10 ⁻⁶	19.79	0
	种子粉	0.4800	ND	46.91	ND	19.55	ND
对 照		0.3855	0.1309	39.18	10.24	16.33	4.27

* 此值为培养 21—24d 测定, 结果为 3 次重复的平均值。ND 表示未测。

表 2 不同浓度土壤浸液和沙棘果汁对供试菌生长和固氮活性的影响

浸液浓度(%)		菌体蛋白* (mg/瓶)		乙炔还原*(nmol C ₂ H ₄ /mg 蛋白/h)		固氮活性 (nmol N ₂ /mg 蛋白/h)	
		Hr319	Em381	Hr319	Em381	Hr319	Em381
沙棘果汁	0.5	1.1929	0.2433	104.52	23.84	43.55	9.93
	1	1.4170	0.3771	149.86	15.08	62.44	6.28
	2	2.8313	0.5300	86.28	13.12	35.95	5.47
土壤浸液	7	0.7292	0.1435	274.99	18.65	114.58	28.60
	14	1.1773	0.2054	202.42	14.66	14.34	18.61
	28	2.2049	0.2274	125.23	14.93	52.18	6.22

* 此值为培养 22d 测定, 结果为 2 次重复的平均值。

汁和 7% 土壤浸液后乙炔还原值最大, 而 Em381 菌株随两种浸液的浓度增加, 固氮活性反而下降。可能由于浸液中少量的含氮化合物, 对供试菌在测定期内固氮酶活性的表达, 产生了暂时的抑制作用。

(三) 不同产地浸液的影响

从不同生态地区取土所制备的浸液, 以及从不同产地采果所榨取的沙棘果汁, 对供试菌生长和固氮的影响也有一定差别(表 3)。

从上述结果来看, 以加入中阳县的沙棘果汁和天然沙棘林土浸液对菌体生长和固氮的促进作用较为明显。据作者分析, 这是因为不同产地的沙棘果汁, 营养成分有一定差别。从天然沙棘林中采集的土样比较肥沃, 营养成分比较丰富。而取自荒坡人工林的土样则十分瘠薄, 所含营养成分贫乏, 所以对供试菌生长和固氮的影响较小。

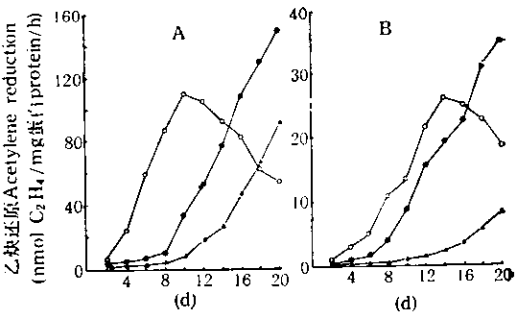


图 1 土壤浸液(●)和沙棘果汁(▲)对 Hr319(A) 和 Em381(B) 菌株固氮活性的影响
每个点是 2 次重复的平均值, (○) 表示对照。

(四) 不同细胞密度的影响

培养基中加入 14% 的土壤浸液后, 不同细胞密度对供试菌生长和乙炔还原的影响见表 4。

表 3 不同产地土壤浸液和沙棘果汁对供试菌生长和固氮活性的影响

浸 液	产 地	菌体蛋白* (mg/瓶)		乙炔还原* (nmol C ₂ H ₄ /mg 蛋白/h)		固氮活性 (nmol N ₂ /mg 蛋白/h)	
		Hr319	Em381	Hr319	Em381	Hr319	Em381
沙棘果汁	中阳县	1.3250	0.3536	155.74	14.66	64.89	6.11
	交口县	1.1670	0.3191	109.01	10.94	45.42	4.56
土壤浸液	天然沙棘林	1.1140	0.2143	194.92	47.07	81.22	19.61
	荒坡人工林	0.4768	0.1510	61.97	19.52	25.82	8.13

* 此值为培养 21—24d 测定, 结果为 3 次重复的平均值。

表 4 不同细胞密度对供试菌生长和固氮活性的影响

供试菌	最初细胞密度 (μg 蛋白/ml)	菌体蛋白* (mg/瓶)	乙炔还原* (nmol C ₂ H ₄ /mg 蛋白/h)	固氮活性 (nmol N ₂ /mg 蛋白/h)
Hr319	4.45	0.8230	153.95	64.15
	8.90	1.0221	182.74	76.14
	17.80	1.3965	110.19	45.91
Em381	3.30	0.1887	15.44	6.43
	6.60	0.2210	41.68	17.37
	13.20	0.2605	29.57	12.32

* 此值为培养 21—22d 测定, 结果为 2 次重复的平均值。

表 4 表明, 在加入土壤浸液的培养基中, 初期的细胞密度对供试菌的生长和固氮都有一定影响。就本试验所选用的几种接种量, 随着初期细胞密度的增加, 菌体的蛋白量有所增加。但最初细胞密度分别为 8.9 和 6.6μg 蛋白/ml 时, 两菌株的乙炔还原速度最大。接种量过高或过低, 对

菌体的乙炔还原能力都有抑制作用。

(五) 不同培养时间的乙炔还原活性

对供试菌在加入两种浸液后的乙炔还原活力进行了比较时程研究(图 1)。

从图 1 可知, 在培养基中加入两种浸液后, 两菌株的固氮活性都表现出相同的增长趋势, 即初

期的固氮活性低于对照。随着培养时间的延长,固氮活性逐渐上升,直至 20d 后仍有上升的趋势。这是因为浸液中少量的含氮化合物,在试验初期抑制了菌体固氮酶的表达。随着培养基中含氮化合物的消耗,菌体的固氮酶活性开始增加。由于两种浸液中含有多钟有机营养物质和微量元素,这不仅为菌体固氮提供了能量,而且可以使菌体的固氮活性持续一个较长的时间。而对照在 10--14d 时乙炔还原达到最大值,随后开始下降。20d 后乙炔还原活力变得十分微弱。镜检可以看到固氮泡囊的数量逐渐减少,菌丝体的细胞壁内也失去了内含物。此时菌体蛋白量明显下降。说明因为培养因素的限制,已经发生了菌体自溶现象。而在加入两种浸液的培养基中,菌体的泡囊数量在测定期内一般呈增加的趋势,也没有发现自溶现象。

(六) 沙棘果汁和土壤浸液的主要成份及作用

表 5 为中阳县沙棘果汁的化学成份。

分析结果表明,沙棘果汁中含有丰富的可溶性糖和有机酸,这些都可能是适于供试菌生长和

固氮的碳源,尤其是果糖,作者曾证实,它是适于两株菌生长和固氮的良好碳源。沙棘果汁中的含氮化合物,主要包括 17 种氨基酸,其中仅天门冬氨酸的含量就占总氨基酸的 26%。据作者试验,这是唯一适于供试菌生长的氨基酸。在加入沙棘果汁的培养基中,含氮量仅为 20ppm,微量的氮虽然对供试菌初期的固氮酶活性有一定抑制作用,但无疑可以促进菌体的生长。Shipton 等人的试验证明^[4],一些维生素混合液对某些 *Frankia* 菌株的代谢有促进作用。而沙棘果汁中富含维生素。尤其是维生素 E 具有延缓生理机能衰退的作用,对 *Frankia* 的生理代谢可能会有一定影响。另据报道^[5],沙棘果汁中含有多钟生物活性物质,对于动物的代谢和生理机能有较大促进作用。这种物质对于 *Frankia* 有无促进作用,尚待研究证实。

天然沙棘林土壤浸液的成份见表 6。

在自然生态环境中, *Frankia* 侵入寄主根系之前,可以在土壤中游离生存。说明土壤中起码具备这种菌生存的基本营养条件。土壤浸液中的含氮化合物,主要是适于 *Frankia* 利用的铵态氮。这对于供试菌初期的固氮活性虽可产生短时的抑

表 5 沙棘果汁的主要化学成份

含氮量(%)			可溶性糖(%)			有机酸(%)		维 生 素 (mg, 100g)		
总氮	其 中		总糖	其 中		总酸	其中: 苹果酸	维生 素 C	维生 素 E	胡 萝 卜 素
	有机氮	NH ₃		果 糖	葡萄糖					
0.203	0.193	0.01	7.15	3.45	3.54	4.40	3.72	963.5	1.15	3.3

表 6 土壤浸液的主要化学成份

含氮量(%)		碳水化合物 (%)	大量元素 (ppm)			微量元素 (ppm)						
总氮	其中: 铵态氮		P	K	Ca	Fe	Zn	B	Cu	Co	Mo	Ba
			2.214	19.25	86.25	0.6056	0.5377	0.5497	0.1208	0.0895	0.0105	0.1957
			Na	Mg	Mn	Ni	Sr	Li	Al	Ti	Sn	V
0.0046	0.002	0.043	29.51	6.57	1.70	0.0314	0.3631	0.0316	0.3601	0.0166	0.4822	0.0059

制作用,但可促进菌体的生长。磷、钾、钙、镁、铁等元素的浓度,对 *Frankia* 的生长和固氮都有很大影响^[4],而这几种元素,都是土壤浸液的主要元素。此外,微量元素对 *Frankia* 的生理代谢有一定影响^[4],因此在培养 *Frankia* 的大部分培养基

中,几乎都要加入微量元素母液,而土壤中的微量元素,由于存在于 *Frankia* 生存的自然生态环境中,所以应该比人工配制的微量元素更适于 *Frankia* 的利用。看来土壤浸液对供试菌生长和固氮的促进作用,可能是一些综合因素影响的结

果。

参 考 文 献

- [1] Perinet, P. et al.: *Plant and Soil*, **87**(1): 175—183, 1985.
- [2] Berry, A. M. et al.: *ibid.*, **87**(1): 161—173, 1985.
- [3] Burggraaf, A. J. P. et al.: *ibid.*, **78**: 29—43, 1984.
- [4] Shipton, W. A. et al.: *ibid.*, **69**: 149—161, 1982.
- [5] 杜大至等: *微生物学通报*, **13**(6): 248—251, 1986.
- [6] Aslanov, S. M.: *Chemical Abstracts*, **96**: 417(177929t), 1982.
- [7] Mekhtiev, N. Kh.: *ibid.*, **95**: 355(58074e), 1981.
- [8] Murry, M. A. et al.: *Plant and Soil*, **78**: 51—78, 1984.

EFFECT OF SEVERAL LEACHATES ON GROWTH AND ACETYLENE REDUCTION OF *FRANKIA* SPP. Hr319 AND Em381 STRAINS

Du Dazhi Yuan Fuhu Li Ronger

Ma Zhiben Wang Yiyan

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan)

Gu Defeng He Guixi

(Shanxi Agriculture University, Taiyu)

The static cultures of *Frankia* spp. Hr319 and Em381 strains were carried out when five leachates were added to the basal media. Results indicated 28% sea buckthorn forest soil leachate made the growth amount of strain Hr319 increase by 4.7 times. It also had a certain stimulative effect on strain Em381. 2% sea buckthorn fruit juice made the growth amount of strain Hr319 increase by 6.3 times and the growth amount of strain Em381 increase by 3 times. The stimulative effect of extracts of leaves, roots and seed powder of sea buckthorn on strains growth was not marked, especially extracts of leaves and roots. Sometimes they inhibited the growth of strains.

A suitable amount of soil leachate had stimulative effect on acetylene reduction activity of two strains during a certain culturing period and made the time for reducing acetylene prolonged. Whereas a suitable amount of sea buckthorn fruit juice had a

certain stimulative effect on the acetylene reduction of strain Hr319 other than Em381. However it prolonged the time reducing acetylene of two strains.

Effects of sea buckthorn forest soil leachates and sea buckthorn fruit juice of different concentrations and origins, and different cell densities on the growth and acetylene reduction of strains were compared. The effect of the two leachates on nitrogenase activity of strains for different culturing time was tested. The major composition of sea buckthorn forest soil leachate and sea buckthorn fruit juice was analysed, and possible effect of both on the growth and nitrogen fixation of strains was discussed.

Key words

Frankia; Actinorhizal plant; Nitrogen fixation