

在限定的培养基中马铃薯汁对根瘤菌乙炔还原的影响

汪化 黄维南

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

在基本培养基中加适量的马铃薯汁, 振荡培养根瘤菌 330 菌株, 固氮酶比活性为 111.6 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{mg 蛋白/h}$ 。而对照毫无活性。

比较了几种细胞密度和气相氧浓度, 发现加马铃薯汁能使反应系统内的气相氧浓度, 在一定时间内保持在 1% 左右。在这种氧浓度范围内, 固氮酶活性激增。不加马铃薯汁的对照, 因不能保持这种气相氧浓度, 故无活性。对马铃薯汁所起的可能作用进行了讨论。

由于在实验室培养基里成功地诱导出具固氮活性的(乙炔还原)根瘤菌^[1-3], 为进一步研究其固氮酶系的调控带来了方便。有关报道指出: 决定根瘤菌固氮酶合成和活性的重要因子之一是氧的浓度, 通过适当地调节气相氧浓度和细胞密度, 已发现几株具有较高的乙炔还原比活性的根瘤菌^[4, 5-8]。某些植物成分对根瘤菌的乙炔还原也有诱导和促进作用^[10-16]。我们在研究马铃薯培养基中根瘤菌的固氮活性时^[9], 发现马铃薯汁能够促进某些根瘤菌菌株的乙炔还原活性。本文报道马铃薯块茎提取液对豇豆型根瘤菌固氮酶活性影响的研究结果。

材料和方 法

(一) 马铃薯汁的制备

把马铃薯块茎去皮并切成丝条, 按 100g 加 200ml 蒸馏水, 在 80°C 左右的水中浸泡一小时。经脱脂棉过滤后, 用 NaOH 调 pH7.2, 高压灭菌 25 分钟后备用。

(二) 根瘤菌

豇豆型根瘤菌菌株 330, 经单菌落分离后, 在无氧条件下回接豇豆, 证明能够结瘤固氮。

培养基: 用稍加改变的 Keister 的培养基^[11], 其每升组分如下:

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1.14g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200mg
葡萄糖酸钠	5g
水解酪蛋白	1g
Na_2MoO_4	7.3mg
柠檬酸铁	16.5mg

用 NaOH 调 pH 至 7.2。

在所有试验中(除另有说明外)都用这种培养基作菌的母液培养。

上述培养基内加 2% 琼脂, 用于斜面培养。

(三) 乙炔还原试验处理

将事先培养好的根瘤菌母液(菌龄一般 7 天左右), 经离心洗涤, 再悬浮于上述培养基内(但把上述培养基内的水解酪蛋白减为 500mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 减为 99mg, 增加甘露醇 5g/l。用 60ml 试剂瓶, 内加 4ml 菌液, 再加 1ml 马铃薯汁, 以 4ml 菌液加 1ml 培养基作对照。然后用橡皮反口塞塞紧, 通过反复抽空和充氩(循环 4 次)除去氧。用灭菌的医用注射器加纯氧到试验所要求的水平, 并加入 3ml 乙炔。在 27°C 作振荡培养(196rpm)。定期用注射器抽取 0.5ml 气体样品, 按我室以前报道的改进法气相层析检测乙炔形成^[17]。

本文于 1980 年 7 月 1 日收到。

表 1 马铃薯汁对振荡培养下的 330 菌株的影响*

Table 1 Effect of Potato Extract on R. sp. 330 under the Shaking Culture*

测定项目 Test item	开始 A 值 (680nm) Initial A (680nm)	最后 A 值 (680nm) Final A (680nm)	蛋白含量 mg/瓶 Protein content (mg/vessel)	乙烯形成 n mol/瓶 C ₂ H ₄ formed (n mol/vessel)	固氮酶比活性 n mol C ₂ H ₄ /mg 蛋白/h Nitrogenase (n mol C ₂ H ₄ /mg protein/h)
加马铃薯汁 + Potato extract (14%, V/V)	0.47	1.00	3.667	10565.4	111.6
对 照 Control	0.47	0.693	1.700	0	0

* 抽气充氩后加入 1% 氧, 3ml C₂H₂, 在 27℃ 摇床 (196rpm) 培养 70 小时测定的结果, 为三个重复的平均值。酶的比活性是 48—70 小时之间测定的结果。

After degasing and filling with argon, then 1% O₂ and 3ml C₂H₂ were injected into the culture bottles, and cultured on a rotary shaker at 196rpm at 27°C. Nitrogenase activity (acetylene reduction measurement) was determined at 70 h. The data are the average of triplicate assays. The specific activity was calculated for the time between 48—70h. after incubation.

表 2 马铃薯汁对 330 菌株的三种细胞密度的影响

Table 2 Effect of Potato Extract on Three Cell Densities of R. sp. 330

细胞密度 A Cell density	测定项目 Test item	乙烯形成 n mol/瓶 C ₂ H ₄ formed (n mol/vessel)		气相氧浓度: (%) O ₂ concn. in gas phase (%)		A ₆₁₀		蛋白 (mg/瓶) Protein (mg/vessel)	
		70小时 70h	161小时 161h	70小时 70h	161小时 161h	70小时 70h	161小时 161h	70小时 70h	161小时 161h
		处 理 Treatment							
0.94	加马铃薯汁 + Potato extract (14%, V/V)	2759.7 ^a	7769.3	1.4	2.9	ND ^b	1.4	ND	4.8
	对 照 Control	0	0	3.35	13.7	ND	1.22	ND	2.2
0.47	加马铃薯汁 + Potato extract (14%, V/V)	9911.7	ND	1.5	ND	0.96	ND	3.6	ND
	对 照 Control	0	ND	4.8	ND	0.69	ND	1.7	ND
0.235	加马铃薯汁 + Potato extract (14%, V/V)	3407.1	3403.1	1.4	4.4	ND	1.295	ND	3.9
	对 照 Control	0	0	4.2	13.1	ND	0.96	ND	1.4

a 数值为二个重复的平均数。 b ND 表示未测。 c 实验系统内气相氧浓度随保温时间的延长而增加, 是由于定期从瓶中抽样, 空气中氧渗入的结果。

a The data reported are the average of duplicate assays.

b ND—not determined.

c The O₂ concentration of gas phase in the experimental system was increased with the time course of incubation, because air was leaking in the culture vessel.

(四) 试验系统内氧的测定

用100型气相层析仪(上海分析仪器厂出产), 具热导检测器, 装有 3mm × 2m 的分子筛 5A 柱, 氦为载气, 用于测定瓶内气相氧浓度^[9]。试验结束时, 测定瓶内菌体密度, 以 680nm 测浊度表示。

(五) 菌体蛋白含量测定

菌体经生理盐水洗涤, 用 1N NaOH 在沸水浴内煮 5—10 分钟, 然后按 Lowry 等人的方法测定^[10]。牛血清蛋白为标准曲线样品。

结 果

(一) 马铃薯汁对 330 菌株的影响

表 1 表明, 加 14% (V/V) 的马铃薯汁促进了细菌的生长。在 70 小时测定时, 平均每瓶乙烯为 10565.4 n mol, 固氮酶比活性为 111.6 n mol C₂H₄/mg 蛋白/h, 而对照毫无活性。

(二) 马铃薯汁对不同细胞密度的 330 菌株的影响

从表 2 可见, 无论哪一种细胞密度, 对照都不形成乙烯。从 70 小时测定的气相氧浓度看, 有固氮酶活性的都在 1.5% 以下, 而对照为 3.35—4.8% 之间。培养时间延长, 试验系统内气相氧浓度增加。这是由于定期从瓶中抽样, 空气中氧渗入的结果。处理的菌液 A 值和每瓶蛋白含量都比对照的高。这些差别表明: 马铃薯汁促进了细菌的生长和呼吸, 因而保持了气相氧浓度在较低的水平。

(三) 加马铃薯汁对试验系统内气相氧浓度的变化和乙烯形成的影响

图 1 中, 细菌母液浓度的 A 值是 0.57。曲线是二个重复测定的平均值。从图 1 可见, 加马铃薯汁的系统内, 在 64 小时以前的气相氧浓度保持在 1% 左右, 此时固氮酶活性迅速上升; 64—89 小时期间, 系统内氧浓度略有升高, 酶活性开始下降; 89 小时以后, 氧浓度上升加快(在这期间, 除经瓶塞渗入空气中的氧以外, 可能与菌的呼

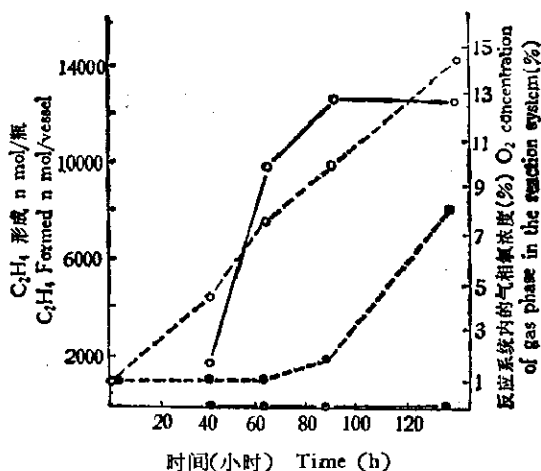


图 1 马铃薯汁对试验系统内气相氧浓度变化和乙烯形成的影响

- 有马铃薯汁的乙烯
- ⊙—⊙ 没有马铃薯汁的乙烯
- 有马铃薯汁的气相氧浓度
- 没有马铃薯汁的气相氧浓度

Fig. 1 Effect of potato extract on O₂ concentration change and on ethylene formation in the experimental system.

Ethylene formation in the presence of potato extract (O—O) and in the absence of potato extract (⊙—⊙). O₂ concentration in the presence of potato extract (●—●) and in the absence of potato extract (○—○).

吸强度下降以及氧化由固氮酶催化所释放的氢的作用停止有关), 固氮酶停止还原乙炔。在对照系统内, 可能因菌的生长较差, 呼吸较弱, 不存在氧化氢的系统, 因而对氧的消耗较少, 所以气相中的氧浓度比处理的高。因氧浓度不适合, 故无固氮酶活性。

在试验开始时, 加马铃薯汁的和对照的系统内都加 5% 的氧, 然后定期测定反应系统内的乙烯和气相氧浓度, 结果如图 2 所示。在加马铃薯汁的系统内, 42 小时以前的气相氧浓度逐渐下降, 降到 1.5% 左右时, 固氮酶开始还原乙炔; 42—64 小时期间, 气相氧浓度继续下降(在 1.0% 左右), 系统内形成乙烯的数量激增; 64 小时后, 气相氧浓度逐渐升高, 固氮酶还原乙炔基

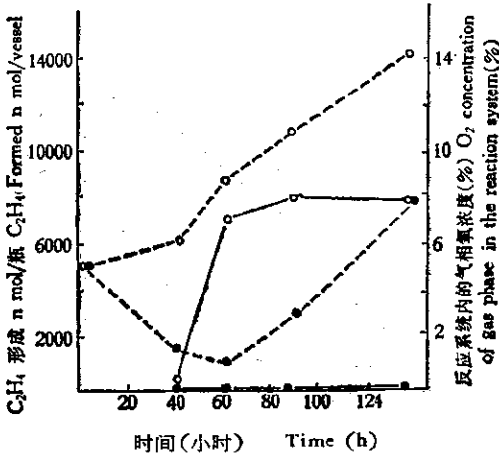


图2 外加5%氧时,马铃薯汁对试验系统内气相氧浓度变化和乙烯形成的影响

- 有马铃薯汁的乙烯
- 没有马铃薯汁的乙烯
- 有马铃薯汁的气相氧浓度
- 没有马铃薯汁的气相氧浓度

Fig. 2 After injecting 5% O₂, effect of potato extract on O₂ concentration change and on ethylene formation in the experimental system. Ethylene formation in the presence of potato extract (○——○) and in the absence of potato extract (○——○). O₂ concentration in the presence of potato extract (●——●) and in the absence of potato extract (○——○).

本停止。图2的对照也因氧浓度过高而无固氮酶活性。

比较图1和图2二个试验的结果,在加马铃薯汁的系统内,外加5%的氧,明显地抑制了固氮酶的活性。

讨 论

在以葡萄糖酸钠为碳源,水解酪蛋白为氮源的基本培养基内,加14%(V/V)的马铃薯汁,无论改变细胞密度或者外加不同的氧浓度,凡是有固氮酶活性的,其气相氧浓度都在1—1.5%之间,氧浓度超过这个范围的,都没有固氮活性。对照所以没有活性,就是不能维持固氮酶合成和表达所能容忍的氧浓度。很明显,加马铃薯汁能使试验系统内的氧浓度在一定时间内保

持在1%左右。这是因为马铃薯汁含有多种营养成分^[19],容易为细菌所利用,促进了细菌的生长,加强了菌体的呼吸,因而维护了固氮酶合成和表达所能容忍的氧浓度。这种呼吸保护现象在自生固氮菌中已有许多讨论^[20—24],并为我室过去的工作所证实^[25]。

在不同的试验系统内,植物成分所起的作用不可能完全相同。但我们认为植物细胞产生的物质或者某些植物贮藏器官的提取液,其作用可能是通过促进细菌的生长,加强菌体呼吸或者影响细菌的代谢途径,分泌不同数量和组分的粘液,以减小氧的渗透,因而使得特定的试验系统内细菌细胞周围的氧浓度适合于固氮酶合成和表达。

参 考 文 献

- [1] Keister, D. L.: *J. Bacteriol.*, **123**: 1265—1268, 1975.
- [2] Kurz, W. G. W. and T. A. Larue: *Nature*, **256**: 407—408, 1975.
- [3] McComb, J. A. et al.: *Nature*, **256**: 409—410, 1975.
- [4] Pagan, J. D. et al.: *Nature*, **256**: 406—407, 1975.
- [5] Tjepkema, J. D. and H. J. Evans: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**: 625—628, 1975.
- [6] Keister, D. L. and W. R. Evans: *J. Bacteriol.*, **127**: 149—153, 1976.
- [7] Keister, D. L. and V. Ranga Rao: In "Recent Developments in Nitrogen Fixation" (W. Newton ed.), 1977.
- [8] Bergerson, F. J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **444**: 164—174, 1976.
- [9] 黄维南等: *植物生理学报*, **7**: 151—160, 1981.
- [10] Anderson, S. J. and D. A. Philips: *Pl. Physiol.*, **57**: Supplement Item. 541, 1976.
- [11] Child, J. J.: *Nature*, **253**: 350—351, 1975.
- [12] Scoweroft, W. R. and A. H. Gibson: *Nature*, **253**: 351—352, 1975.
- [13] Reporter, M. and N. Hermina: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**: 1126—1133, 1975.
- [14] Child, J. J. and W.G.W. Kurz: *Can. J. Microbiol.*, **24**: 143—148, 1978.
- [15] Bednarski, N. A. and M. Reporter: *Appl.*

- Environ. Microbiol.*, **36**: 115—120, 1978.
- [16] Hess, D. and E. M. Götz: *Z. Pflanzenphysiol.*, **85**: 185—188, 1977.
- [17] 上海植物生理研究所生物固氮室: 植物学报, **16**: 382—384, 1974.
- [18] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.
- [19] 田川隆: 作物大系, 第五编のⅠ类, IV. 马铃薯的生理, 东京, 养贤堂, 1962.
- [20] Postgate, J. R.: In "The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation" (Postgate, J. R. ed.), Plenum press, pp. 161—190, 1971.
- [21] Postgate, J. R.: In "Biological Nitrogen Fixation" (A-Quispel, ed.), 1974.
- [22] Dalton, H.: *Crit. Rev. Microbiol.*, **3**(2): 183—220, 1974.
- [23] Yates, M. G.: In "Advances in Microbiological Physiology" (Rose, A. H. and D. W. Tempest, ed.), 1974.
- [24] Yates, M. G.: In "Recent Developments in Nitrogen Fixation" (Newton, W. ed.), 1977.
- [25] 上海植物生理研究所生物固氮室: 微生物学报, **16**(2): 131—135, 1976.

EFFECT OF POTATO EXTRACT ON NITROGENASE ACTIVITY OF *RHIZOBIUM* SP. GROWN IN LABORATORY CULTURE MEDIA

Wang Hua Huang Weinan

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

The reduction of acetylene by stationary cultures of free-living *Rhizobium* sp. was markedly enhanced when a suitable amount of potato extract was added to the laboratory basal medium.

The stimulatory effect on *Rhizobium* sp. 330 was more marked than on *Rhizobium* sp. 32H1.

When the culture was shaken after potato extract was added under an atmosphere containing 1% O₂, the specific nitrogenase activity of *Rhizobium* sp. 330 reached a value of 111.6 n mol C₂H₄/mg protein/h, whereas the culture without

potato extract (control) had no nitrogenase activity at all.

Relationship between cell densities and O₂ concentrations in the gas phase were studied. It was found that the basal medium containing potato extract seems advantageous to maintain O₂ concentration round about 1% in the gas phase and thereby favours the expression of nitrogenase activity.

Possible roles of potato extract in the expression of nitrogenase activity in the free-living *Rhizobium* were discussed.