

阴沟肠杆菌固氮生理的研究

袁长芳 莫海云 周鸿宾 王毅岩

杜大至 苏巧梅 贺玉成

(山西生物研究所,太原)

周培根

(南京农学院土壤化学系,南京)

由谷子根表分离到一株阴沟肠杆菌。该菌振荡培养于诱导培养液中,在 30℃ 下 21—24 小时,其最高乙炔还原速率为 576n mol C₂H₄/mg 蛋白/h。而在厌氧条件下则可达 1479n mol C₂H₄/mg 蛋白/h。在正常氧浓度下,该菌培养 4—96 小时之间皆可检测出固氮活性。不同浓度的 NH₄⁺ 明显抑制其固氮活性。在碱性条件下固氮活性较高。

过去的固氮细菌研究多以好氧自生固氮菌 (*Azotobacter*) 为材料。近年来,根周围联合固氮菌的发现引起了生物固氮研究者的重视^[1,2]。1972 年, Raju 等发现玉米根周围的阴沟肠杆菌具有非共生固氮作用^[3]。本文采用了由谷子根表面分离获得的一株阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) C022 菌株作为材料,对其纯培养的固氮活性的周期变化,不同浓度的 NH₄⁺ 对其固氮活性的影响,固氮作用的适宜 pH, 以及不同的氧浓度对其固氮活性的影响几方面进行了研究,现报道如下。

材料与方 法

(一) 供试菌株

C022 菌株是本所固氮组由山西农业科学院实验农场的谷子根表面分离获得的。经中国科学院微生物研究所鉴定为阴沟肠杆菌。

(二) 培养基

保藏培养基 (g): 甘露醇 5, 葡萄糖酸钠 5, 谷氨酸钠 0.4, NaMoO₄ 0.01, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, FeSO₄ 0.01, KH₂PO₄ 0.8, NaCl 0.2, 洋菜 15—20。加蒸馏水 1000ml, 调 pH 至 7.2。

诱导培养液成分与保藏培养基相同,不加洋菜即可。

(三) 固氮活性测定

取在肉汤培养液中,30℃ 下振荡培养过夜的菌悬液 0.2ml, 接入盛有 10ml 诱导培养液的 50ml 三角瓶中,振荡培养。每隔 6 小时取上述培养的三角瓶三只,取下棉塞,换上橡皮塞并密封塞紧,严防漏气。用注射器从中抽出 2ml 空气。然后分别注入 2ml 制备好的乙炔,继续振荡反应 2 小时后,立即取下,低温冷冻终止反应。每瓶取气样 100μl, 进气相色谱柱测定乙烯量,重复三瓶,取平均值。最后分析每瓶的菌体蛋白质量,换算出各组的乙炔还原活性。所使用的仪器为岛津 GC-5AP 型气相色谱仪。仪器条件: 氢火焰离子化鉴定器, GDX-502 分离柱,柱温 50℃, 进样量 100 μl。

(四) 细胞破碎方法

采用 76 型超声波细胞破碎机,菌体破碎时间 1 分钟,然后测定菌体蛋白量。

测定培养液中的菌体生长情况,采用 SP₅₀₀ 分光光度计测光密度 (A_{500nm}) 表示。菌体蛋白的测定,在福林法显色以后,测定光密度 (A_{660nm})。

(五) 菌体蛋白的定量测定

本文于 1981 年 1 月 10 日收到。

蛋白测定按 Lowry 等人的方法^[4]进行。

(六) 培养瓶中氮浓度的测定

用 CY-5 型测氮仪进行。

结果与讨论

(一) C022 菌株固氮活性的周期变化

从图 1A 可以看到该菌株在 30℃ 下于诱导培养液中培养 20 小时后,即可达到固氮活性的高峰期,再把图 1 的 A、B、C 三条曲线相对照,就可以发现,对数期的固氮活性是直线上升的,到对数生长末期,就是固氮活性的高峰期,这时的菌体蛋白的增长也接近平衡期。培养 20 小时后,固氮活性迅速下降,这时菌体生长和菌体蛋白增长都几乎停滞了。

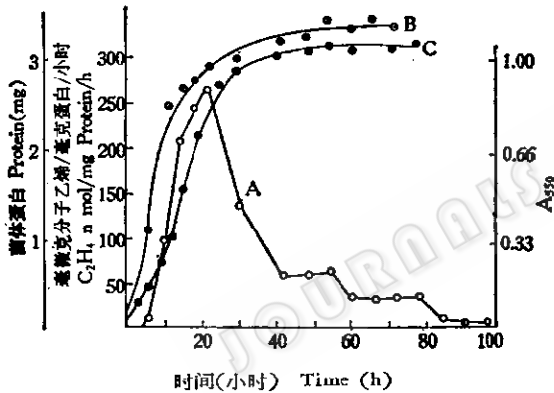


图 1 C022 菌株培养过程中菌体生长、蛋白增长、固氮活性的变化

- A. 固氮活性
- B. 菌体蛋白
- C. 菌体生长

Fig. 1 Progress curves of N₂-fixing activity, cell protein and bacterial growth during the cultivation of C022 strain

- A. N₂-fixing activity
- B. Cell protein
- C. Bacterial growth

观察表明,在培养 21 小时之后,菌悬液逐渐变得粘稠,颜色微带橙黄,但 A 值并不见增加,说明培养后期菌体分泌大量粘液,但粘液不影响光密度的测定数值。在菌体生长的对数期,固氮活性并不很高,因

为培养液中由接种的菌悬液带来的有机氮及配制诱导培养液时所加入的少量氨基酸,就可以维持生长的氮源需要。随菌体的生长,氮源渐渐不足以维持生长需求时,菌体渐渐开始利用空气中的 N₂,至对数生长的后期,利用 N₂ 的量达到最高峰。可以说,对数生长是因营养的限制而迫于停止的,固氮活性也随之迅速下降。因为,固定空气氮,需要消耗大量能量。在生物体内,固定 1mol 的 N₂,将消耗 12—24mol 的 ATP^[6]。这也与 Mulder^[5] 所论述的自生固氮菌的固氮作用只发生在对数生长期的菌体中相一致。

在培养 21 小时后,菌体生长基本转入稳定期,但活体观察证明,在稳定期中仍有大量的菌体运动活跃,直至培养 100 小时,许多菌体还在运动着,这可能是该菌株在培养 4—96 小时之间皆能测到一定量固氮活性的原因所在。

(二) 培养液的 pH 对 C022 菌株固氮活性的影响

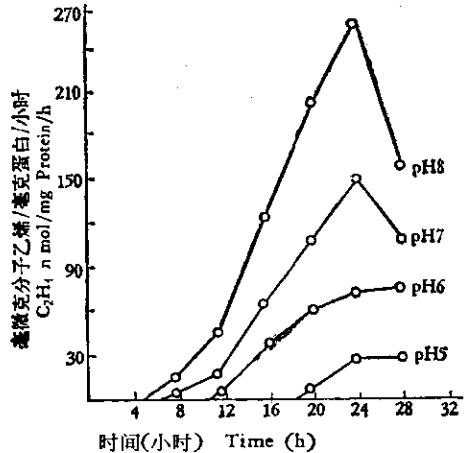


图 2 不同 pH 对菌株固氮活性的影响

Fig. 2 Effect of various pH on N₂-fixing activity of C022 strain

据报道,在培养基中,适于需氧自生固氮菌生长和固氮的最低 pH 值是 5.8—6.0^[7]。图 2 表明,在正常氧浓度下,C022 菌

株培养于 pH 5.0 的诱导培养液中 (将诱导培养液分别用 HCl 和 NaOH 调成 5、6、7、8 四种 pH 值), 其固氮活性相当于 pH 8.0 下的固氮活性的 10%。从图 2 中还可看出 C022 菌株固氮作用的适宜 pH 是偏碱性, 而且在培养液中生长和固氮作用所能适应的 pH 范围也是较广泛的。

(三) NH₄⁺ 对 C022 菌株生长和固氮活性的影响

由于固氮过程要消耗大量的能量, 所以供应较多的化合态氮代替 N₂, 则有利于菌体的生长。当诱导培养液中加入不同浓度的 NH₄⁺ 时, 从图 3 的结果清楚的显示出, 菌体生长速度和 NH₄⁺ 浓度成正相关, 所以菌体蛋白的增长就因 NH₄⁺ 的浓度不同而形成各不相同的曲线(图 3)。

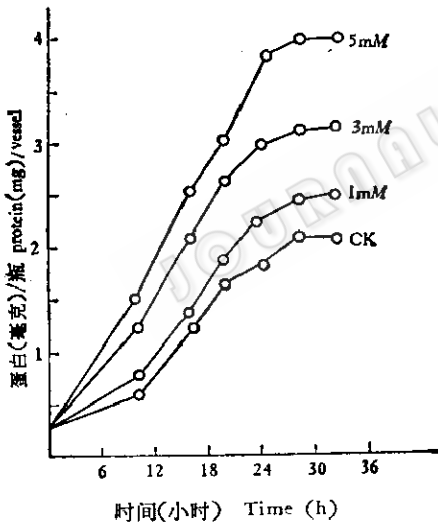


图 3 不同浓度的 NH₄⁺ 对菌体蛋白增长的影响
Fig. 3 Effect of various NH₄⁺ concentrations on Cell protein

此外, 培养液中加入 NH₄⁺ 后, 对菌体生长有刺激作用, 对固氮活性有明显的抑制作用。从图 4 中可看出, 当加入 1mM 的 NH₄Ac, 抑制作用就很明显, 加入 5mM 的 NH₄Ac, 则固氮活性的 80% 以上受到抑制。还发现, NH₄⁺ 的浓度不同, 所能

测出固氮活性的时间显然不同, NH₄⁺ 浓度越大, 所能测出固氮活性的时间越长。

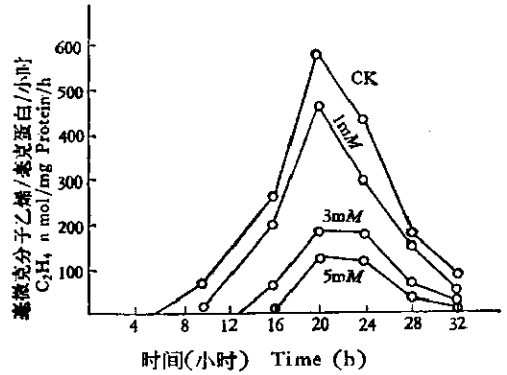


图 4 不同浓度的 NH₄⁺ 对 C022 菌株乙炔还原活性的影响

Fig. 4 Effect of various NH₄⁺ concentrations on acetylene-reducing activity of C022 strain

(四) 氧的浓度对 C022 菌株固氮活性的影响

C022 菌株属兼性厌氧菌^[6], 因此, 可以在两种代谢途径中形成 ATP, 从而为固氮活动提供能源。所以 C022 菌株能在有

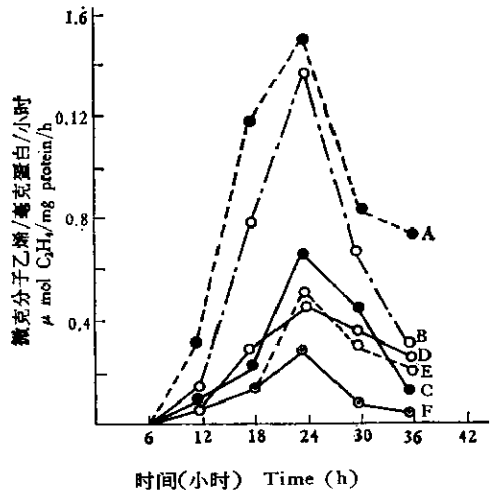


图 5 不同浓度的氧对 C022 菌株固氮活性的影响
Fig. 5 Effect of various O₂ concentrations on N₂-fixing activity of C022 strain

A. Ar 70% B. O₂ 5%, Ar 65% C. O₂ 10%, Ar 60% D. O₂ 15%, Ar 55% E. O₂ 20%, Ar 50% F. 大气的气体成份 General atmospheric composition A、B、C、D、E 皆注入 N₂ 30%

氧或无氧环境中进行固氮作用。但是, 随氧浓度的增加, 对固氮酶的活性有明显的抑制作用。

从图 5 可以看出, 有氧和无氧两种培养条件下, 菌株的固氮活性显然不同。在正常氧浓度下, 即图 5 中的 F 曲线, 大大低于厌氧培养的 A 曲线, A 的最高活性为 F 最高活性值的 5 倍。B 与 A 较为接近, B 组处理在培养 24 小时后氧的浓度已下降到 2% 以下, 这说明 C022 菌株固氮作用的最适氧浓度是在厌氧或 2% 以下的低氧浓度环境中(图 6)。从图 5 中还可看出, C、D、E 三条曲线较为接近, 曲线的高峰

在培养 24 小时处, 这时培养瓶中氧的浓度都在 4% 以上(图 6), 由此说明, 4% 以上的氧浓度即可以明显地抑制 C022 菌株的固氮活性, 随氧浓度的增加, 抑制作用愈明显。

实验说明: 兼性厌氧菌 C022 菌株在正常氧浓度下或厌氧条件下皆可固氮, 但固氮作用的最适氧浓度应在厌氧或低于 2% 的低氧浓度的环境中。

参 考 文 献

- [1] 湖北微生物研究所固氮组: 微生物学报, 19(2): 160—165, 1979.
- [2] Burris, R. H.: In "Recent Developments in Nitrogen Fixation" (ed. by Newton, W. et al.), Academic press, London, p. 487—509, 1977.
- [3] Raju, P. N. et al.: Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 69: 3474—3478, 1972.
- [4] Lowry, O. H. et al.: J. B. C., 193: 265, 1951.
- [5] Mulder, E. G.: In "Nitrogen Fixation by Free-living Micro-organisms" (ed. by Stewart, W.D.P.), Cambridge University press, New York, p. 3—29, 1975.
- [6] Brill, W. J.: Scientific American, 236(3): 68—81, 1977.
- [7] 王祖农等: 植物学报, 5: 339—441, 1956.
- [8] Mulder, E. G. and S. Brotonegoro: In "The Biology of Nitrogen Fixation" (ed. by Quispel, A.) North Holland Publishing Company, Amsterdam, p. 37—81, 1974.

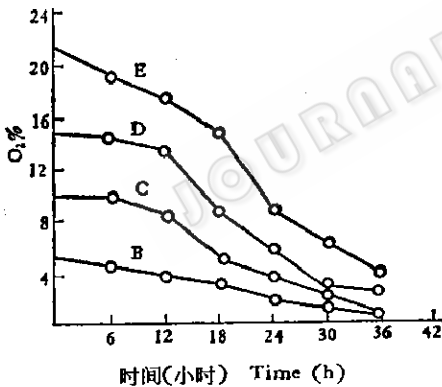


图 6 培养不同时间后瓶内氧浓度的变化

Fig. 6 Change of the bottle O₂ Concentration with the cultivation times

STUDIES ON N_2 -FIXING PHYSIOLOGY OF *ENTEROBACTER CLOACAE* C022

Yuan Changfang Mo Haiyun Zhou Hongbin Wang Yiyan
Du Dazhi Su Qiaomei He Yucheng
(*Shanxi Institute of Biology, Taiyuan*)

Zhou Peigen

(*Department of Soil Chemistry, Nanjing Agricultural College, Nanjing*)

Enterobacter cloacae C022 was isolated from root surfaces of millet on the farm of Shanxi Academy of Agricultural Sciences. The strain C022 was grown in the inducing culture solution with shaking 21—24 h at 30°C, the highest rate of acetylene reduction was 576 n mol/mg protein/h. But it would reach 1479 n mol/mg protein/h under the anaerobic condition. When it was incubated in the pure

culture at a normal concentration of O_2 , its N_2 -fixing activity was suppressed apparently. And the N_2 -fixing activity of pure culture could be detected at the normal concentration of O_2 during 4—96 h. The N_2 -fixing activity of pure culture may be evidently inhibited by different concentrations of NH_4Ac . The pure culture showed higher N_2 -fixing activity under more basic conditions.