

固氮螺菌氢代谢与固氮作用的关系

I. 固氮螺菌放氢现象与吸氢能力的研究

王子芳 曾宽容 周亿闰

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

本文研究了固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)的放氢现象和吸氢酶活性以及与固氮作用的关系。测定了 57 株固氮螺菌的放氢现象及其固氮酶活性,其中不放氢 41 株,微放氢 14 株,其放氢量为 2.63—31.00n mol C_2H_4 /ml 菌液·小时。放氢量较多的 2 株 R38-4 和 R256A 都是从水稻根表上分离获得,其放氢量分别为 185.75n mol H_2 /ml 菌液·小时和 547.00n mol H_2 /ml 菌液·小时。测定了 53 株螺菌的吸氢酶活性,它们均具有吸氢能力,其吸氢量各异,0.63—27.38n mol H_2 /ml 菌液·小时。生长在含有 NH_4Cl 培养基上的固氮螺菌既没有固氮能力,也不产氢。在无氮培养基上所产生的氢是固氮过程中放出的氢。实验结果指出, C_2H_4 抑制氢酶的活性。当吸氢的菌株与放氢菌株混合培养时,其固氮酶活性比单株纯培养高,有氢存在时,固氮酶活性比不加氢时高。

关键词 固氮螺菌;吸氢酶;放氢现象

众所周知,固氮生物在固氮过程中约损失 30% 左右的能量用于产生 H_2 。Evans^[1] 认为具有吸 H_2 酶的固氮生物能将固氮过程中放出的 H_2 进行再循环而加以利用,更有效地应用其能量,从而提高固氮效率。因此,固氮生物中的吸 H_2 酶受到广泛重视。近年来,许多科学工作者对蓝绿藻^[2]、根瘤菌^[3]、自生固氮细菌^[4] 以及固氮螺菌^[5,6] 的放氢和吸氢能力进行了研究。

本文研究固氮螺菌的放氢现象和吸氢酶活性及其与固氮作用的关系。

材料与方 法

(一) 材料

本室从各种作物根表分离获得固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 53 株^[7], sp 7、sp 81、sp 82 及 sp 107 st 均由巴西 “Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuaria” J. Döbereiner 博士赠送。

(二) 培养方法

将各菌株接种于 25ml 瓶中,内含 8ml Dö-

bereiner 半固体培养基(琼脂 1.75g/l)^[7]。培养 2 天后换橡皮塞,部分培养瓶中注入 20% C_2H_2 , 转化 24 小时后测定 C_2H_4 含量。另一部分培养瓶中注入 1ml 纯氢,转化 24 小时后测定吸氢能力。

(三) 固氮酶活性测定方法

采用气相色谱法^[7]。

(四) 氢量测定方法

采用气相色谱法,柱温为 150°C,载气为氮气,其流量为 30ml/min,柱前压为 0.4kg/cm²,检流器电流为 150mA。

(五) 蛋白质测定方法

菌体蛋白质测定采用 Folin 氏比色法^[8]。

结果与讨论

(一) 固氮螺菌放 H_2 量的测定

将各菌株分别培养于 Döbereiner 半固体培养基中,两天以后,换橡皮塞,再培养 24 小时后,测定其放 H_2 量及固氮酶活性,

本文于 1984 年 4 月 23 日收到。

表 1 固氮螺菌放 H_2 量及固氮酶活性的测定*Table 1 Determination of hydrogen evolution activity and nitrogenase activity in *Azospirillum* spp.

| 菌株 Strains | 放 H_2 量 H_2 -evolution n mol H_2 ·ml ⁻¹ ·h ⁻¹ | 固氮酶活性 Nitrogenase acti- vity n mol C_2H_4 · ml ⁻¹ ·h ⁻¹ | 菌株 Strains | 放 H_2 量 H_2 -evolution n mol H_2 ·ml ⁻¹ ·h ⁻¹ | 固氮酶活性 Nitrogenase acti- vity n mol C_2H_4 · ml ⁻¹ ·h ⁻¹ |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| sp7 | 0 | 4.79 | W251-3 | 0 | 49.36 |
| sp107st | 0 | 31.31 | W251-5 | 0 | 49.75 |
| Ma6 | 0 | 46.41 | W251-7 | 0 | 48.50 |
| Ma201 | 0 | 0.22 | W251-9 | 0 | 49.50 |
| Ma224 | 0 | 50.83 | W251-10 | 0 | 45.87 |
| Ma99 | 0 | 36.28 | W251-11 | 0 | 50.36 |
| Ma231 | 0 | 37.21 | W251-12 | 0 | 49.36 |
| Ma232 | 0 | 49.60 | W251-13 | 0 | 50.34 |
| Ma233 | 0 | 49.83 | W80-3 | 0 | 50.09 |
| Ma237 | 0 | 49.73 | W96-2 | 0 | 50.09 |
| Ma241 | 0 | 50.58 | W96-4 | 0 | 50.34 |
| Ma242 | 0 | 47.52 | W261-1 | 4.88 | 21.87 |
| Ma234 | 0 | 7.86 | W261-2 | 0 | 50.83 |
| Ma245 | 0 | 50.59 | W261-3 | 0 | 3.32 |
| Mi22i | 2.63 | 50.34 | W261-4 | 0 | 50.83 |
| Mi223 | 0 | 23.06 | W261-5 | 2.63 | 2.09 |
| Mi225 | 0 | 50.09 | W261-7 | 0 | 7.92 |
| Mi226 | 0 | 46.41 | W261-8 | 0 | 50.36 |
| Mi224 | 7.88 | 7.74 | W261-9 | 0 | 50.83 |
| Mi227 | 3.13 | 22.84 | W261-11 | 0 | 49.75 |
| W59-1 | 13.13 | 31.37 | W261-12 | 0 | 5.86 |
| W80-2 | 0 | 2.30 | W261-13 | 0 | 50.09 |
| W80-3 | 13.13 | 3.78 | R38-4 | 185.75 | 29.38 |
| W259-1 | 7.88 | 4.46 | R256A | 547.00 | 15.47 |
| W259-2 | 4.00 | 44.94 | R285 | 31.00 | 15.65 |
| W259-4 | 7.88 | 5.71 | SP81 | 29.25 | 50.46 |
| W259-5 | 12.25 | 14.18 | S251 | 0 | 9.42 |
| W259-6 | 4.38 | 18.79 | W251-2 | 0 | 50.09 |
| W251-1 | 0 | 50.09 | | | |

* 表中所列数据均为 5 个重复的平均数

* Data were obtained from average of 5 experiments

结果见表 1。

从表 1 结果表明,不放 H_2 41 株,微放氢 14 株,放 H_2 量为 2.63—31.00 n mol H_2 /ml 菌液·小时,放 H_2 量较多的 2 株菌 R38-4 和 R256A,都是从水稻根表中分离获得,其放 H_2 量分别为 185.75 n mol H_2 /ml 菌液·小时和 547.00 n mol H_2 /ml 菌液·小时。

(二) 固氮螺菌吸 H_2 酶活性的测定

为选择吸 H_2 酶活性强的菌株,将各菌株培养于 Döbereiner 半固体培养基中,两天后换橡皮塞同时注入 1ml 纯氢,转化 24 小时后,测定剩余 H_2 量,计算出吸 H_2 量,结果见表 2。

表 2 结果表明,所测定的 53 株螺菌都具有吸 H_2 能力,但各菌株的吸 H_2 能力各异,大致可分为三级,>25 n mol H_2 /ml 菌液·小时有 8 株,10—25 n mol H_2 /ml 菌

液·小时有 33 株, $< 10 \text{ n mol H}_2/\text{ml}$ 菌液·小时 12 株。

表 2 *Azospirillum* spp. 吸 H_2 能力的测定*

Table 2 Determination of uptake hydrogenase activity in *Azospirillum* spp.

| 菌株 Strains | 吸 H_2 酶活性 H_2 -uptake hydrogenase n $\text{mol H}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ | 菌株 Strains | 吸 H_2 酶活性 H_2 -uptake hydrogenase n $\text{mol H}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ma6 | 18.50 | W261-2 | 8.25 |
| Ma234 | 11.00 | W261-3 | 23.25 |
| Ma242 | 27.38 | W261-4 | 17.13 |
| Ma244 | 7.50 | W261-5 | 24.00 |
| Ma245 | 20.50 | W261-7 | 17.13 |
| Ma246 | 8.88 | W261-8 | 23.00 |
| Ma241 | 18.50 | W261-9 | 29.38 |
| Mi221 | 8.88 | W261-10 | 15.13 |
| Mi223 | 6.13 | W261-11 | 26.00 |
| Mi225 | 25.38 | W261-12 | 23.25 |
| Mi226 | 15.75 | W261-13 | 21.88 |
| Mi227 | 8.88 | W259-2 | 21.25 |
| Mi229 | 11.00 | W259-5 | 0.63 |
| W251-1 | 24.75 | W259-6 | 14.38 |
| W251-2 | 22.00 | W59-1 | 7.50 |
| W251-3 | 13.75 | W96-2 | 4.00 |
| W251-4 | 26.75 | W96-4 | 27.38 |
| W251-5 | 17.13 | W80-2 | 22.63 |
| W251-6 | 18.50 | W80-3 | 2.00 |
| W251-7 | 25.38 | S247 | 8.25 |
| W251-8 | 19.13 | S248 | 14.38 |
| W251-9 | 19.13 | S251 | 4.13 |
| W251-10 | 27.38 | SP.7 | 11.00 |
| W251-11 | 18.50 | SP.81 | 16.50 |
| W251-12 | 20.50 | SP.82 | 18.50 |
| W251-13 | 19.88 | Ma.99 | 22.63 |
| W261-1 | 17.13 | | |

* 表中所列数据均为 5 个重复的平均数

† Data were obtained from average of 5 experiments

(三) 固氮螺菌 W251-10 和 R256A 放 H_2 和固氮酶活性的比较

从表 1 所列 57 株菌中选出放 H_2 量最多的菌株 R256A, 同时从表 2 所列 53 株菌中, 选出吸 H_2 能力最强的菌株 W251-10。为了观察放 H_2 菌株和吸 H_2 能力强的

菌株与固氮酶活性的关系, 将这两株菌分别培养于 Döbereiner 半固体培养基上, 两天后, 在测定固氮酶活性的瓶中加入 20% C_2H_2 , 而在测定放 H_2 量的瓶中则不加 C_2H_2 , 分别于转化 48、72、96、120、144、168 及 192 小时测定固氮酶活性和放 H_2 量, 结果见图 1。图 1 指出, W251-10 不放 H_2 , 其放 H_2 量在各个时间均为 0, 而 R256A 放 H_2 较多, 放 H_2 的趋势与其固氮酶活性一致, 固氮酶活性高时, 放 H_2 量多, 反之, 固氮酶活性低时, 放 H_2 则少。两菌株的固氮酶活性趋势是一致的, 它们都具有两个高峰, 在 48 及 144 小时, 但 W251-10 的固氮酶活性比 R256A 高。

进一步观察培养条件对 R256A 放 H_2 的影响, 安排了接种后立即加橡皮塞密闭培养两天(处理 I)和培养两天后换橡皮塞密闭(处理 II)两组实验。两组实验均在培养两天后同时注入 20% C_2H_2 , 测定固氮酶活性, 在不注入 C_2H_2 的瓶中测定放 H_2 量, 分别在转化 24、48、72 小时测定, 结果列入表 3。处理 I 放 H_2 量大大高于处理 II, 而两组处理的固氮酶活性差别不大。这也证明了在接种后, 固氮螺菌在生长繁殖和固氮的过程中放 H_2 , 由于橡皮塞的密闭, 所产生的 H_2 得以累积, 处理 I 因多累积了两天的 H_2 量, 所以大大多于处理 II, 而两组处理的固氮酶活性测定均在培养两天后注入 20% C_2H_2 , 转化的时间相同, 所以其固氮酶活性是相等的。

为了测定 R256A 是否具有可逆性 H_2 酶存在, 采用 5mM NH_4Cl 抑制固氮酶活性, 观察产 H_2 量。表 4 结果指出, R256A 只有在无 NH_4Cl 的培养基中才表现固氮酶活性, 同时放 H_2 , 而在 NH_4Cl 的培养基中, 既不表现固氮酶活性, 也没有 H_2 释放, 说明 R256A 不具有可逆性 H_2 酶, 它所产生的 H_2 是固氮过程中放出的 H_2 。

(四) 固氮螺菌 W251-10 与 R256A 混合培养

考虑到 W251-10 是吸 H₂ 菌株, R256A 是放 H₂ 较多的菌株, 将两株菌混合培养, 并设置加氢与不加氢的处理, 观察氢对提高固氮酶活性的影响, 结果列入表 5。

表 5 结果表明, 两株菌混合培养, 固氮酶活性高于任何一个单株培养。混合培养和吸 H₂ 菌株 W251-10 的单株培养物中, 加 H₂ 的处理中固氮酶活性高于不加 H₂ 的固氮酶活性。而在放 H₂ 菌株 R256A 培养物中, 加 H₂ 并不能提高固氮酶活性, 说

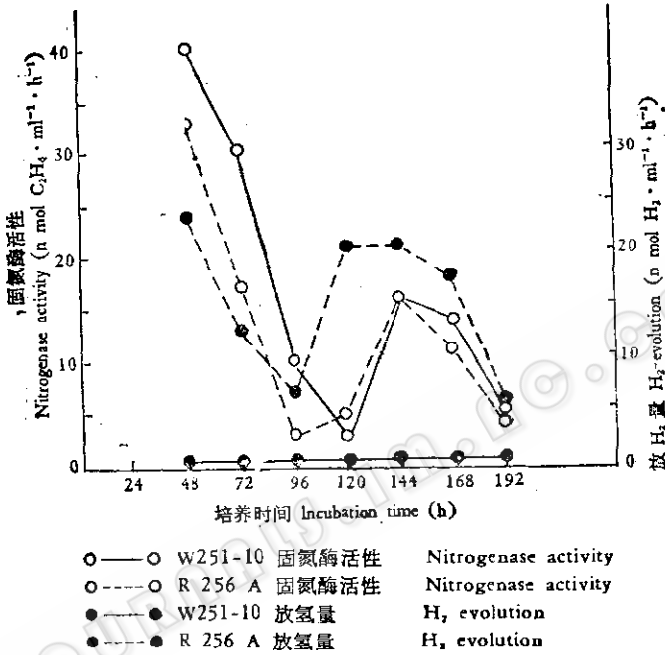


图 1 固氮螺菌 W251-10 和 R256A 放氢和固氮酶活性的比较

Fig. 1 Comparison of H₂ evolution and nitrogenase activity between *A. brasilense* W 251-10 and R 256 A

- 图中各点为 5 个重复的平均数
- Data were obtained from average of 5 experiments

表 3 培养条件对固氮螺菌 R256A 放 H₂ 量的影响*

Table 3 Effect of incubation conditions on H₂ evolution by *A. brasilense* R256A

| 转换时间 (小时) Transformation (h) | 处理 I treatment I 接种后立即加橡皮塞 with rubber top after inoculation | | 处理 II treatment II 培养两天后换橡皮塞 with rubber top after 2 days incubation | |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| | Nitrogenase activity n mol C ₂ H ₄ · ml ⁻¹ · h ⁻¹ | H ₂ -evolution n mol H ₂ · ml ⁻¹ · h ⁻¹ | Nitrogenase activity n mol C ₂ H ₄ · ml ⁻¹ · h ⁻¹ | H ₂ -evolution n mol H ₂ · ml ⁻¹ · h ⁻¹ |
| 24 | 12.25 | 38.68 | 11.51 | 3.08 |
| 48 | 11.67 | 20.31 | 12.39 | 3.68 |
| 72 | 7.37 | 8.09 | 3.93 | 1.80 |

- * 表中所列数据是 5 个重复的平均数
- * Data were obtained from average of 5 experiments

表 4 C_2H_2 及 NH_4Cl 对固氮螺菌 R256A 放 H_2 的影响*Table 4 Effect of C_2H_2 and NH_4Cl on H_2 evolution by *A. brasilense* R256A

| 转换时间 (小时) Transformation (h) | 处理 treatment | 5mM NH_4Cl | | - NH_4Cl | |
|---------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| | | Nitrogenase activity n mol $C_2H_4 \cdot ml^{-1} \cdot h^{-1}$ | H_2 -evolution n mol $H_2 \cdot$ $ml^{-1} \cdot h^{-1}$ | Nitrogenase activity n mol $C_2H_4 \cdot ml^{-1} \cdot h^{-1}$ | H_2 -evolution n mol $H_2 \cdot ml^{-1} \cdot h^{-1}$ |
| 48 | + C_2H_2 | 0 | 0 | 5.69 | 0.79 |
| | - C_2H_2 | 0 | 0 | 0 | 9.33 |
| 72 | + C_2H_2 | 0 | 0 | 4.28 | 0.83 |
| | - C_2H_2 | 0 | 0 | 0 | 8.20 |
| 96 | + C_2H_2 | 0 | 0 | 6.28 | 0.55 |
| | - C_2H_2 | 0 | 0 | 0 | 2.29 |

* 表中所列数据是 5 个重复的平均数

* Data were obtained from average of 5 experiments

表 5 固氮螺菌 W251-10 和 R256A 混合培养对吸 H_2 和固氮酶活性的影响*Table 5 Effect of mixed culture of *A. brasilense* W 251-10 and R256A on hydrogen uptake hydrogenase and nitrogenase activity

| 菌株 Strain | 处理 Treatment | 吸 H_2 酶活性 H_2 -uptake hydrogenase activity n mol $H_2 \cdot ml^{-1} \cdot h^{-1}$ | 固氮酶活性 Nitrogenase activity n mol $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$ protein |
|-----------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| W251-10 + R256A | + C_2H_2 < + H_2 | 270.75 | 1785.33 |
| | + C_2H_2 < - H_2 | -37.50 | 471.00 |
| | - C_2H_2 < + H_2 | 179.38 | 0 |
| | - C_2H_2 < - H_2 | 0 | 0 |
| W251-10 | + C_2H_2 < + H_2 | 226.88 | 1024.61 |
| | + C_2H_2 < - H_2 | -25.75 | 614.29 |
| | - C_2H_2 < + H_2 | 495.88 | 0 |
| | - C_2H_2 < - H_2 | 0 | 0 |
| R256A | + C_2H_2 < + H_2 | 73.13 | 360.65 |
| | + C_2H_2 < - H_2 | -39.38 | 395.13 |
| | - C_2H_2 < + H_2 | -476.63 | 0 |
| | - C_2H_2 < - H_2 | -78.63 | 0 |

* 表中所列数据均为 5 个重复的平均数

* Data were obtained from average of 5 experiments

明 R256A 缺乏吸 H_2 酶。两个单株的固氮酶活性进行比较, W251-10 高于放 H_2 菌株 R256A。

结 论

从上述实验结果, 得出下列初步结论:

1. 所用于实验的固氮螺菌, 虽属同一个种, 但生态条件不同, 其固氮酶活性, 吸 H_2 能力以及固氮过程中所释放的 H_2 量都

有所不同。大部分菌株在固氮过程中不放 H_2 , 同时具有吸 H_2 能力, 而从水稻根表所获得的菌株不具有吸 H_2 能力, 放氢量较多。

2. 从吸 H_2 强的菌株与放 H_2 多的菌株比较实验中, 看到具有吸 H_2 酶的菌株固氮酶活性比放 H_2 多的菌株高。同时在吸 H_2 能力强的菌株的培养物中加入纯 H_2 , 促进固氮酶活性的提高, 说明 H_2 支持固氮酶活

性

3. 实验所采用放 H_2 强的菌株并不具有可逆性氢酶, 所产生的 H_2 是由固氮酶作用过程中放出的 H_2 , 在这种菌株的培养物中加入纯 H_2 , 其固氮酶活性没有明显的提高, 可能由于这种菌株不具有吸 H_2 酶。

4. 吸 H_2 强的菌株与放 H_2 多的菌株混合培养有助于提高培养体的固氮酶活性, 更有效地利用所释放的 H_2 , 这就为生产应用提供了有益的线索。

参 考 文 献

[1] Evans, H. J. et al.: In "Genetic Engine-

ring for Nitrogen Fixation". (ed. A. Hollaender) (Plenum, N. Y.) pp. 333—354, 1977.

[2] Bothe, H., et al.: *Planta* 133: 237—242, 1977.

[3] Dixon, R. O. D.: *Biochemic*, 60: 233—236, 1978.

[4] Smith, L. A., S. Hilland and M. G. Yates.: *Nature*, (London) 262: 209—210, 1976.

[5] Chan, Y. K. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 26: 116—1131, 1980.

[6] Pedrosa, F. O. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 128: 161—166, 1982.

[7] 罗孝扬、王子芳等: 微生物学报, 23(1): 68—72, 1983。

[8] 哈伯尔著(中国科学院微生物研究所病毒学基本技术翻译小组译): 《病毒学基本技术》, 126—127 页, 科学出版社, 北京, 1976 年。

RELATION BETWEEN HYDROGEN METABOLISM AND NITROGEN FIXATION IN *AZOSPIRILLUM* SPP.

I. STUDIES ON HYDROGEN EVOLUTION AND HYDROGEN UPTAKE HYDROGENASE ACTIVITY IN *A. BRASILENSE*

Wang Zifang Zeng Kuanrong Zhou Yigui

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Hydrogen evolution and uptake hydrogenase activity in relation to the efficiency of nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. were studied. Fifty seven strains of *Azospirillum* were tested for H_2 -evolution and nitrogenase activity. Among them 41 strains showed no H_2 -evolution at all. 14 strains evolved a little hydrogen, i.e., 2.63—31.00 n mol H_2 per millilitre per hour, two strains from rice rhizoplane did it much more, 185.75 and 547.00 n mol H_2 per millilitre sph per hour. Hydrogen uptake hydrogenase activities of 53 strains were determined. They all possessed abilities of uptake hydrogen but with different amount, i.e., from 0.63 n mol to 27.38 n mol H_2 per millilitre per hour. *Azospirillum* spp. grown on Döbereiner medium with 5 mM

NH_4Cl showed neither nitrogenase activity, nor H_2 -evolution. Some strains grown on Döbereiner medium without NH_4Cl evolved some hydrogen in the course of nitrogen fixation. Results showed C_2H_2 depressed H_2 -evolution. Nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. with hydrogen supply was tested. Mixed culture of uptake hydrogen strain and H_2 -evolution strain showed higher nitrogenase activity than that of pure culture. Nitrogenase activity of *Azospirillum* sp. on medium with addition of hydrogen was higher than that on medium without hydrogen.

Key words

Azospirillum brasiliense; Hydrogen uptake hydrogenase; Hydrogen evolution