

弗兰克氏菌 Hr138 菌株的生理学研究

袁 长 芳

(山西省生物研究所, 太原)

用根瘤切片液体培养方法, 从沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 根瘤中分离得到弗兰克氏菌 Hr138 菌株, 对其生理特性和培养条件进行了研究。菌株能在多种培养液中生长, 最适宜生长的培养液为 Tween/Cas。它能利用吐温-80、琥珀酸、丙酸、醋酸钠、葡萄糖、麦芽糖或半乳糖作为碳源; 利用酪蛋白水解物、蛋白胨或氯化铵作为氮源。在吐温-80 为碳源的培养液中, 加入葡萄糖对生长有抑制作用。此外, 就温度和 pH 对生长的影响也进行了研究。

关键词 弗兰克氏菌; 沙棘

1978 年以前, 因无法获得弗兰克氏菌的纯培养物, 故对内生菌的研究只停留在根瘤解剖观察上。自 Callaham^[2] 等人首次从香蕨木根瘤中获得纯培养后, 陆续从多种植物根瘤中分离出各种弗兰克氏菌株^[1]。1980 年, Blom 等人开始对 Avd1 菌株的培养条件进行了研究。此后, Shipton 等人对 LD Agpl、Avd1 和 Cp11 菌株的营养需求研究结果表明, 内生菌生长一般较缓慢, 如果培养条件适宜, 生长较快。

作者对沙棘内生菌株 Hr138 的培养条件进行了研究, 现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 供试菌株

弗兰克氏菌 Hr138 菌株系作者由沙棘根瘤中分离出来的纯培养物, 回接原宿主植物的实生苗, 形成大量有固氮活性的根瘤。

(二) 培养基

QMod^[1], 肉汤培养基 (牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 蒸馏水 1L, pH6.7), TB^[6], FB^[7], Ycz^[8], MS^[9], Blom^[10], QMod/Tween^[11], Tween/Cas^[11], Tween/Glu^[11], Tween/NH₄^[11], Tween/蛋白胨 (将 QMod 中的卵磷脂、葡萄糖和酵

母膏省去, 加入吐温-80 2g/L)。Tween/Cas+葡萄糖 (在 Tween/Cas 培养液中加葡萄糖 5g/L)。

(三) 菌体蛋白测定

在 QMod 培养液中生长两周的菌液, 5,000 rpm 离心 10 分钟收集菌体。无菌水洗涤三次后, 将菌体于组织研磨器中研磨, 以无菌水制成浓度适中的菌悬液。以 0.5ml 接种量接入盛有 15ml 不同培养液的 50ml 三角瓶中, 置 29°C 温箱静止培养。每一处理重复三瓶, 培养 20 天后, 将菌体分别离心收集, 洗涤, 用 Lowry^[12] 等人的方法测定各组合菌体蛋白量。

结 果 和 讨 论

(一) Hr138 菌株在不同培养液中生长情况比较

在含有不同碳氮源的培养液中, 接种和培养条件相同, 培养 20 天, 菌株生长情况见表 1。

表 1 结果表明, 菌株 Hr138 在 Tween/Cas 培养液中生长最好, 在 TB、MS、QMod、Blom、Tween/NH₄⁺、Tween/蛋白胨和 Tween/Cas+葡萄糖培养液中生长次之, 在 FB、Ycz、肉汤、QMod/Tween 和 Tween/Glu

本文于 1984 年 10 月 31 日收到。

表 1 Hr138 菌株在不同碳氮源培养液中生长情况比较

Table 1 The comparison of growth of Hr138 strain in different culture solution

培养液	碳源 (g/L)	氮源 (g/L)	菌体蛋白量 ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)
TB	葡萄糖 10.0	蛋白胨* 5.0	208.1
FB	葡萄糖 10.0	酵母膏 5.0 酪蛋白水解物 5.0	11.8
Ycz	蔗糖 30.0	酵母膏 4.0	8.9
肉汤		牛肉膏 5.0 蛋白胨* 10.0	10.5
MS	蔗糖 30.0	酪蛋白水解物 0.5	144.0
Blom	葡萄糖 10.0	NH_4Cl 0.1	188.0
QMod	葡萄糖 10.0 卵磷脂 0.01	酵母膏 0.5 蛋白胨* 5.0	129.2
QMod/Tween	葡萄糖 10.0 吐温-80 2.0	酵母膏 0.5 蛋白胨* 5.0	27.3
Tween/Cas	吐温-80 2.0	酪蛋白水解物 1.0	337.5
Tween/Glu	吐温-80 2.0	谷氨酸 1.0	29.3
Tween/ NH_4^+	吐温-80 2.0	NH_4Cl 0.1	73.5
Tween/蛋白胨	吐温-80 2.0	蛋白胨* 5.0	89.6
Tween/Cas+葡萄糖	吐温-80 2.0 葡萄糖 5.0	酪蛋白水解物 1.0	119.5

* 蛋白胨为日本产聚胨 (Polypepton)。

表 2 吐温-80 和酪蛋白水解物的浓度对菌株生长的影响

Table 2 The effect of concentration of Tween-80 and casamino acid on growth of Hr138 strain

吐温-80 (mg/L)	酪蛋白水解物 (mg/L)	菌体蛋白量 ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)	吐温-80 (mg/L)	酪蛋白水解物 (mg/L)	菌体蛋白量 ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)
0	1,000	50.0	2,000	0	25.0
200	1,000	70.8	2,000	100	50.3
1,000	1,000	104.2	2,000	1,000	129.2
2,000	1,000	129.2	2,000	2,000	136.9
3,000	1,000	90.1	2,000	3,000	156.2
5,000	1,000	77.0	2,000	5,000	139.8

表 3 不同碳源对 HrI38 菌株生长的影响

Table 3 The effect of various C-source on growth of HrI38 strain

碳 源	浓 度 (g/L)	菌体蛋白量 ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)	碳 源	浓 度 (g/L)	菌体蛋白量 ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)
葡萄糖	10.0	87.5	D-甘露糖	5.0	20.0
蔗糖	10.0	50.0	D-木糖	5.0	25.1
麦芽糖	10.0	76.6	L-鼠李糖	5.0	52.5
乳糖	5.0	25.0	D-葡萄糖酸钠	5.0	15.2
甘油	5.0	51.0	甘露醇	5.0	21.2
琥珀酸钠	2.0	186.6	醋酸钠	0.5	75.2
D-半乳糖	5.0	76.6	无碳源	0	15.1

培养液中生长极其贫乏。

QMod 是一种较好的培养液,但将其
中卵磷脂省去,加入吐温-80,即成 QMod/
Tween 培养液,菌体在其中生长则贫乏。
Tween/Cas 是一种最适宜的培养液,在
其中加入葡萄糖 5g/L,即成为 Tween/Cas +
葡萄糖培养液,其菌体生长由 337.5 $\mu\text{g}/$
15ml 下降到 119.5 $\mu\text{g}/15\text{ml}$,由此说明,在
吐温-80 存在的培养液里加入葡萄糖,对
菌体的生长有明显地抑制作用。

(二) 在 Tween/Cas 培养液中,吐 温-80 和酪蛋白水解物的浓度对菌体生长 的影响

Tween/Cas 培养液对 HrI38 菌株生
长最适宜,其中主要成份吐温-80 和酪蛋
白水解物的不同浓度,对菌体生长影响试
验结果列于表 2。

表 2 结果说明,酪蛋白水解物加入 1.0
g/L 时,吐温-80 的加入量从 0.2—2.0g/L,
生长与吐温的浓度成线性关系。吐温-80
浓度 2g/L,酪蛋白水解物浓度增加,对生
长有明显地促进作用。在 Tween/Cas 培
养液中,吐温-80 以 2.0g/L,酪蛋白水解
物 1—3.0g/L 为最适宜浓度。

(三) 不同碳源对生长的影响

以 Blom 培养液为基础培养液,其中
氮源为 NH_4Cl 0.1g/L,碳源的变换见表

3,培养时间和条件同(一),菌体生长情况
见表 3。

由表 3 看出, HrI38 菌株能利用蔗糖、
甘油、鼠李糖;在葡萄糖、麦芽糖、半乳糖或
醋酸钠作碳源时生长较好;最适宜的碳源
为琥珀酸钠;不能利用乳糖、甘露糖、甘露
醇、木糖及葡萄糖酸钠。

(四) 培养温度对菌株生长的影响

用 Tween/Cas 培养液接种后,分别置
20°、25°、29°、33° 和 37°C 培养 20 天,测
定菌体蛋白量,结果见图 1。

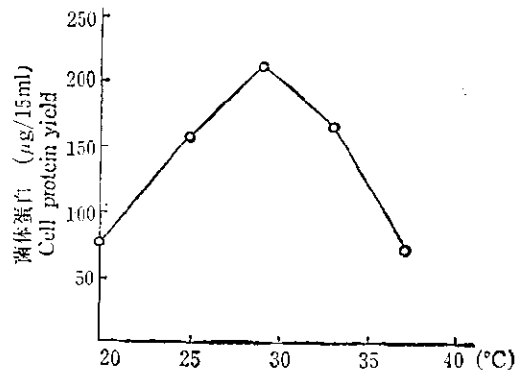


图 1 培养温度对 HrI38 菌株生长的影响

Fig. 1 The effect of culture temperature on
growth of HrI38 strain

图 1 表明,该菌株生长温度范围较广,
25—33°C 均能生长,37°C 以上,20°C 以
下则不能生长,最适生长温度为 29°C。

(五) 培养液 pH 对菌株生长的影响

将 TB 培养液的 pH 分别调至 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0，培养和接种条件与(一)相同，培养 20 天，分别测定菌体蛋白量，结果见图 2。

图 2 表明，培养液的 pH 在 6.0—7.0 菌体生长较好，pH 8.0 或 5.5 时菌体几乎不生长，最适生长 pH 为 6.5—7.0。

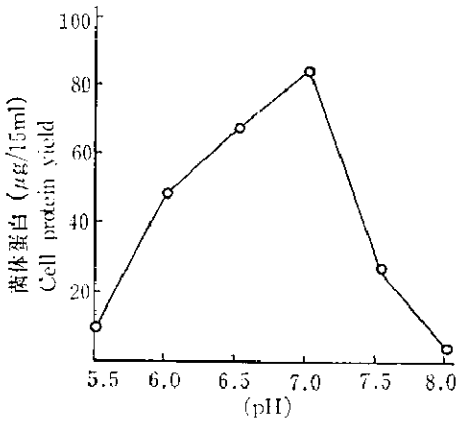


图 2 pH 对 HrI38 菌株生长的影响

Fig. 2 The effect of culture solution pH on growth of HrI38 strain

参 考 文 献

- [1] 蒋建德等: 科学通报, 第三期, 228—231, 1985。
- [2] Callaham, D. et al.: *Science*, **199**: 899—902, 1978.
- [3] Blom, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**: 131—135, 1980.
- [4] Shipton, W. A. and A. J. P. Burggraaf: *Plant and Soil*, **69**: 149—161, 1982.
- [5] Lalonde, M. and E. H. Calvert: In *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests*, (ed. by Gordon, J. C. et al.) Oregon State University Press, Oregon, p 95—110, 1979.
- [6] Burggraaf, A. J. P. et al.: *Plant and Soil*, **61**: 157—168, 1981.
- [7] Baker, D. and J. G. Torrey: *Nature (London)*: **281**: 76—78, 1978.
- [8] Baker, D. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **26**: 1072—1089, 1982.
- [9] Murashige, T. and F. Skoog: *Physiology Plant*, **15**: 473, 1962.
- [10] Blom, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **13**: 51—55, 1982.
- [11] Blom, J. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**: 131—135, 1980.
- [12] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.

STUDIES ON PHYSIOLOGY OF *FRANKIA* SP. HrI38 STRAIN

Yuan Changfang

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan)

Frankia sp. HrI38 is a strain isolated from pieces of nodules of *Hippophae rhamnoides*. The physiology of HrI38 strain has been studied. It can grow in many kinds of culture solutions, the optimal culture solution is Tween/Cas. HrI38 strain is able to utilize tween-80, succinate, propionic acid, Na-acetate, glucose, maltose or galactose as carbon sour-

ce, and casamino acid, NH_4Cl or polypepton as nitrogen source. However, glucose can restrain growth of HrI38 strain in the culture solution containing tween-80. The optimal growth pH is 7.0 and the optimal temperature is 29°C.

Key words

Frankia; *Hippophae rhamnoides*