

固氮螺菌氢代谢与固氮作用的关系

II. 苯环类化合物对固氮螺菌吸氢与固氮作用的影响

王子芳 曾宽容 杨一平 周亿闰

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

本文报道了苯环类化合物对固氮螺菌的固氮及吸氢作用的影响。试验结果表明, 固氮螺菌能利用苯作为碳源营养, 在无其他碳源存在的情况下, 生长在含有 50 和 500mM 浓度苯的培养基中, 固氮螺菌表现出固氮和吸氢活性。0.5mM 的苯酚对固氮螺菌的固氮和吸氢活性略有刺激作用, 而 1.0mM 即表现较强的抑制作用。固氮螺菌完全不能利用对硝基苯酚和 2,4-二硝基苯酚作为碳源, 即使是 0.1mM 的浓度对螺菌的固氮和吸氢活性均产生抑制作用。

关键词 固氮螺菌; 苯环类化合物; 固氮作用; 吸氢作用

联合固氮微生物在自然界中分布广泛, 各种作物及各种牧草的根际和根表均有联合固氮微生物存在。它们每年对土壤和作物的氮素营养起着重要的作用。作为联合固氮微生物的固氮螺菌^[1,2] 存在于玉米、谷子、高粱、小麦、黑麦、水稻及牧草等植物根系上^[3]。它的适应性很强, 在各种碳源上都能生长^[4]。为了进一步了解固氮螺菌的碳代谢, 作者研究了固氮螺菌对苯环类化合物的利用能力及苯环类化合物对固氮螺菌吸氢与固氮作用的影响。

材料与方 法

(一) 材料

1. 菌种来源: *Azospirillum brasilense* W251-4 和 W251-10 均从本省种植的小麦根表上分离获得。此两株菌的形态、生理生化特性完全相同。

2. 药品来源: 苯、苯酚、对硝基酚和 2,4-二硝基酚均是国产分析纯试剂。

(二) 培养方法

培养方法同前^[5]。

(三) 固氮酶活性测定方法

采用气相色谱法同前^[6]。

(四) 氢气测定法

采用气相色谱法同前^[7]。

结 果 与 讨 论

(一) 苯对固氮螺菌固氮与吸氢作用的影响

苯是六碳环状化合物, 许多微生物都不能利用它作为唯一碳源。固氮螺菌能在多种碳源上生长, 为研究固氮螺菌对苯的利用能力, 我们进行了下列两种处理:

1. 以 Döbereiner 培养基为基础, 取消其中的苹果酸钠盐, 加不同量苯作为唯一碳源, 使培养基中苯含量分别为 5、50、500 及 5,000mM。

2. 以 Döbereiner 培养基为基础(其中含有 5g/L 苹果酸钠), 其中加不同量苯, 使其最终浓度为 5、50、500、及 5,000mM。

试验结果见图 1 和图 2。从图 1 看到, 当 *A. brasilense* W251-4 生长在无苹果酸钠而加不同量苯的培养基上, 均表现不同程度的固氮活性及吸氢活性。在 50mM 的苯存在时, 其固氮活性在 48 小时表现最高, 其量为 $108.04 \text{ n mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 而在 5,500 和 5,000mM 的浓度中, 不表现

本文于 1985 年 8 月 16 日收到。

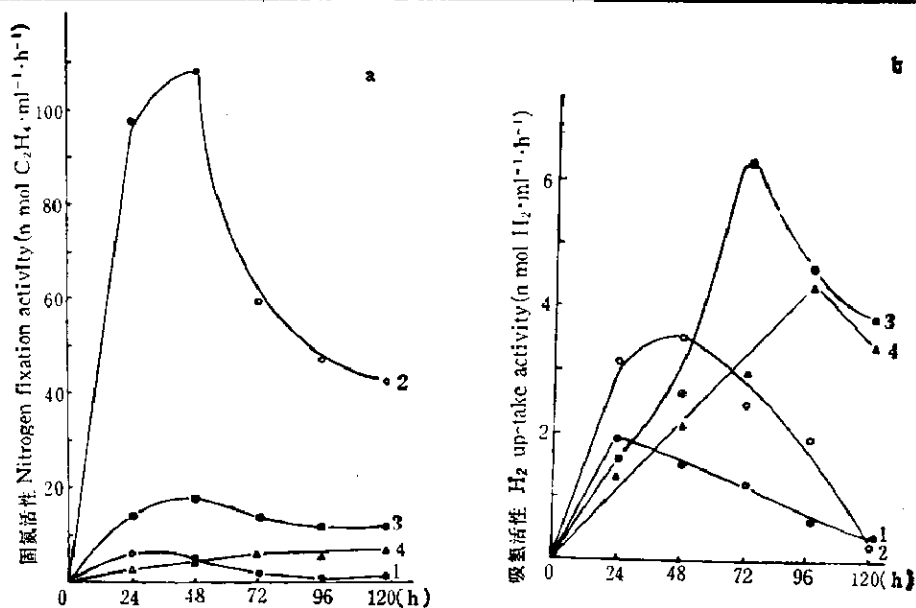


图1 苯对 *A. brasilense* (a) 固氮 (b) 吸氢活性的影响(培养基中无苹果酸钠)

Fig. 1 Effect of benzene (5mM to 5,000 mM) on (a) nitrogen fixation (b) H_2 up-teke activity of *A. brasilense* W251-4 (medium without malate)

1, 5mM; 2, 50 mM; 3, 500 mM; 4, 5,000mM.

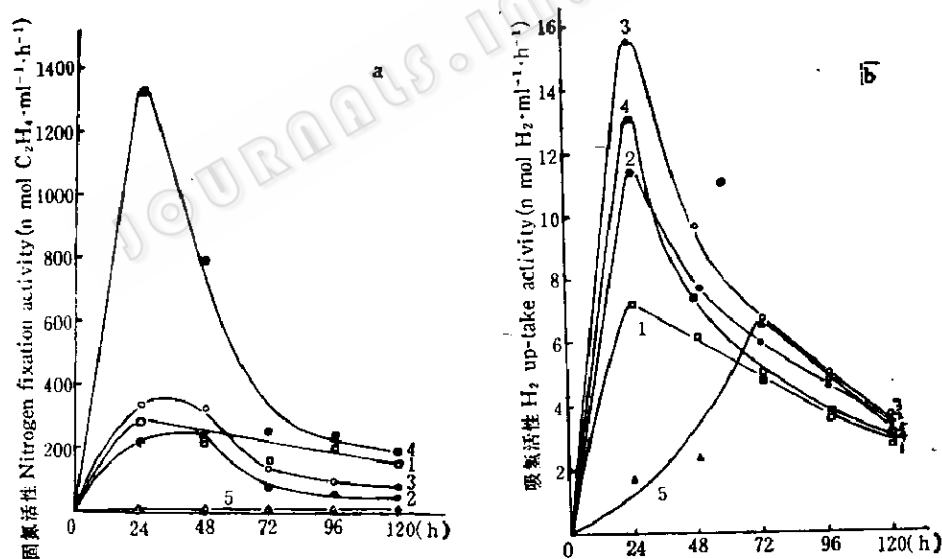


图2 苯对 *A. brasilense* (a) 固氮 (b) 吸氢活性的影响(培养基中加苹果酸钠)

Fig. 2 Effect of benzene (0mM to 5,000mM) on (a) nitrogen fixation (b) H_2 up-take activity of *A. brasilense* W251-4 (medium with malate)

1, 0mM; 2, 5mM; 3, 50mM; 4, 500 mM; 5, 5,000mM.

明显的差异(图1a)。对吸氢活性表现的影响则不同, 500mM 浓度最好, 在72小时呈现最高峰, 其量为 $6.25 \text{ n mol H}_2 \cdot$

$\text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, (图1b)。

图2表明, 该菌在5g/L 苹果酸钠并加有不同量苯的培养基上, 其固氮活性比无

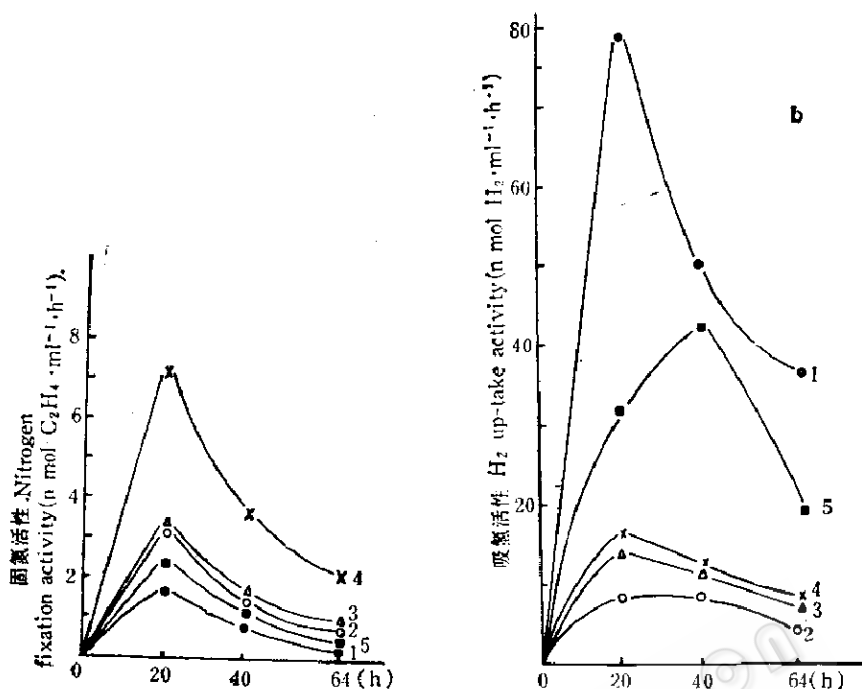


图3 苯酚对 *A. brasilense*(a) 固氮(b)吸氢活性的影响(培养基中无苹果酸钠)

Fig. 3 Effect of phenol (0 to 1.0 mM) on (a) nitrogen fixation and (b) H_2 uptake activity of *A. brasilense* W251-10 (medium with out malate)

1. 0.0mM; 2. 0.05 mM; 3. 0.1mM; 4. 0.5mM; 5. 1.0mM.

苹果酸钠的高出 10 倍,其吸氢活性高出 2 倍。无论是固氮活性高峰还是吸氢活性高峰除 5,000mM 外,均出现在 24 小时。500 mM 的苯对固氮活性有明显的刺激作用,而 5 和 50mM 既无明显的刺激作用,也无抑制作用,但 5,000mM 则有明显的抑制作用(图 2a)。对吸氢来说,除 5,000mM 以外,5,50 和 500mM 均有刺激作用(图 2b)。从以上结果看出, *A. brasilense* W251-4 可以利用苯作为碳源生长并表现有固氮活性及吸氢活性。

(二) 苯酚对固氮螺菌固氮及吸氢活性的影响

苯酚与苯是同类化合物,为了观察其对固氮螺菌固氮活性及吸氢活性的影响,设置了如下两种处理:

1. 将 *A. brasilense* W251-10 生长在无苹果酸钠而加有不同量苯酚的 Döberei-

ner 培养基上,使苯酚的最终浓度为 0.05、0.1、0.5 和 1.0mM。

2. 将 *A. brasilense* W251-10 生长在每升含有 5g 苹果酸钠并加不同量苯酚(0.05、0.1、0.5 和 1.0mM)的 Döbereiner 培养基上。

图 3 表明, *A. brasilense* W251-10 生长在无苹果酸钠而加有 0.05、0.1、0.5 和 1.0mM 苯酚的培养基上,以不加苹果酸钠和苯酚的处理为对照,由于种子液带进了微量碳源,故表现微弱的固氮活性和吸氢活性。尽管如此,各处理的固氮活性均比对照高,无论苯酚是哪个浓度其固氮活性的高峰均在 20 小时出现。其中以 0.5mM 浓度为最高(图 3a)。苯酚对固氮螺菌的吸氢活性表现了抑制作用,所有不同浓度的苯酚均抑制吸氢活性(图 3b)。

图 4 指出,固氮螺菌生长在有苹果酸

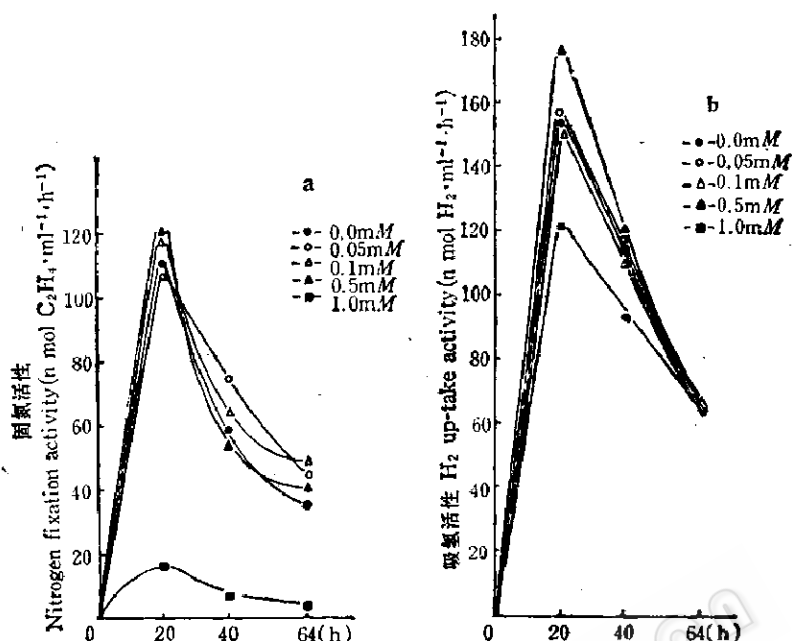


图 4 苯酚对 *A. brasilense*(a) 固氮(b)吸氢活性的影响(培养基中加苹果酸钠)
Fig. 4 Effect of phenol (0 to 1.0 mM) on (a) nitrogen fixation and (b) H_2 up-take activity of *A. brasilense* W251-10 (medium with malate)

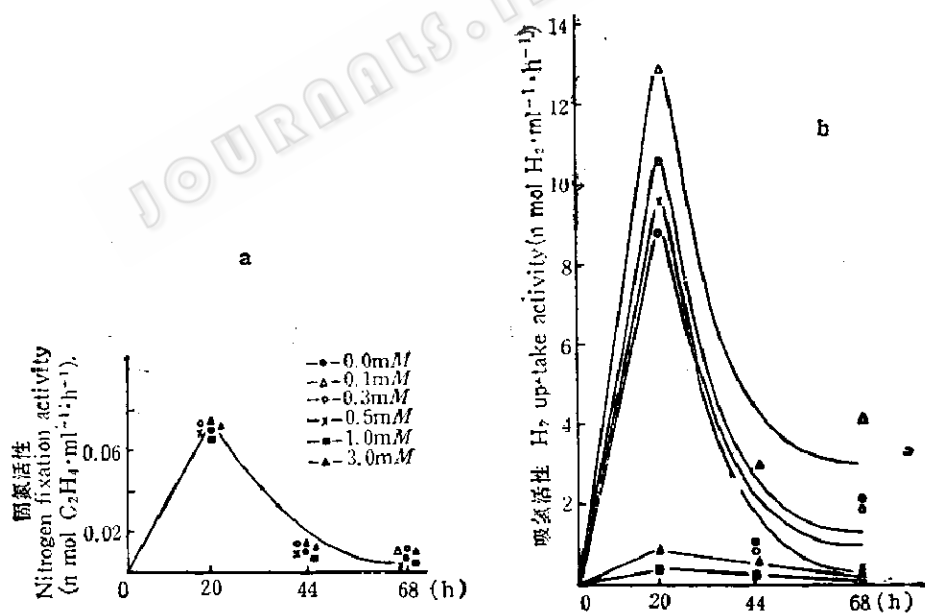


图 5 对硝基苯酚对 *A. brasilense* (a) 固氮(b)吸氢活性的影响(培养基中无苹果酸钠)
Fig. 5 Effect of para-nitrophenol (0 mM to 3 mM) on (a) nitrogen fixation and (b) H_2 up-take activity of *A. brasilense* W251-10 (medium without malate)

钠和苯酚的培养基上与在无苹果酸钠的培养基上的结果完全不同。在有苹果酸钠的培养基中其固氮活性比无苹果酸钠的高十

倍多,除 1.0mM 苯酚有明显地抑制作用外,其他浓度既无明显的抑制作用,也没有明显的刺激作用(图 4a)。对吸氢活性来

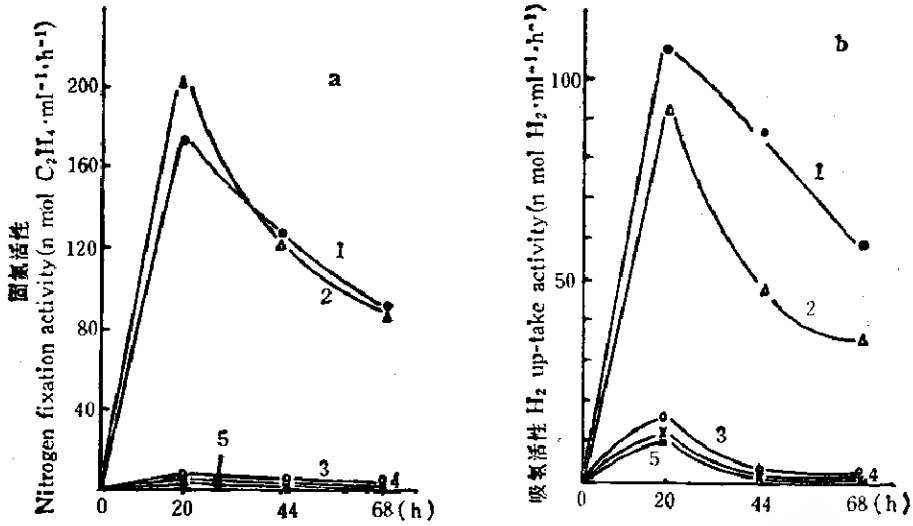


图6 对硝基苯酚对 *A. brasilense* (a) 固氮 (b) 吸氢活性的影响 (培养基中加苹果酸钠)
Fig. 6 Effect of para-nitrophenol (0 mM to 1 mM) on (a) nitrogen fixation and (b) H₂ up-take activity of *A. brasilense* W251-10 (medium with malate)
1. 0.0mM; 2. 0.1 mM; 3. 0.3 mM; 4. 0.5mM; 5. 1.0 mM.

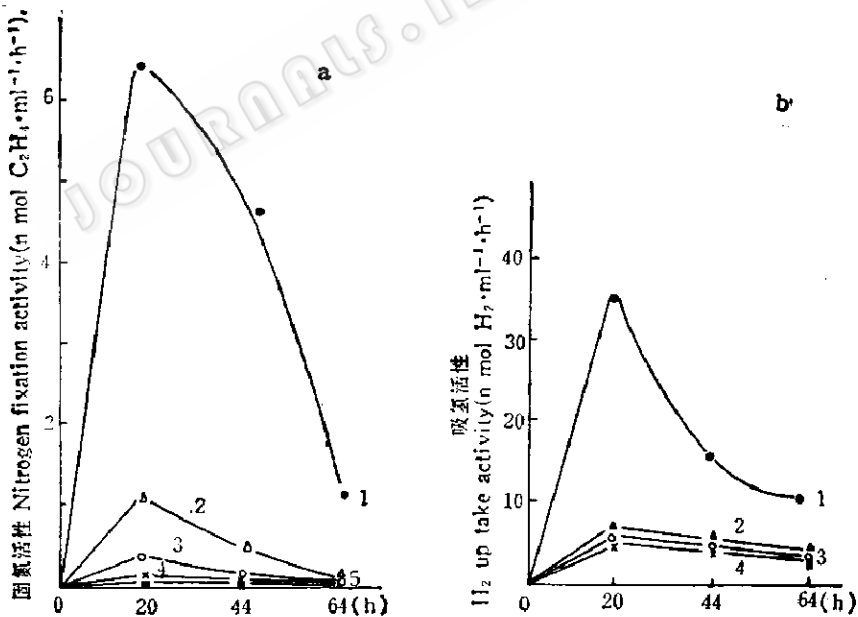


图7 2,4-二硝基苯酚对 *A. brasilense* (a) 固氮 (b) 吸氢活性的影响 (培养基中无苹果酸钠)
Fig. 7 Effect of 2,4-dinitrophenol (0 to 1 mM) on (a) nitrogen fixation and (b) H₂ up-take activity of *A. brasilense* W251-10 (medium without malate)
1. 0.0mM; 2. 0.1 mM; 3. 0.3 mM; 4. 0.5 mM; 5. 1.0mM.

说,基本上同于对固氮活性的影响,0.5mM 对吸氢活性有刺激作用,1.0mM 有抑制作

用(图4b)。这与 Werner^[6] 采用固体表面培养方法得到的 0.5、1.0 和 2.0mM 的苯酚

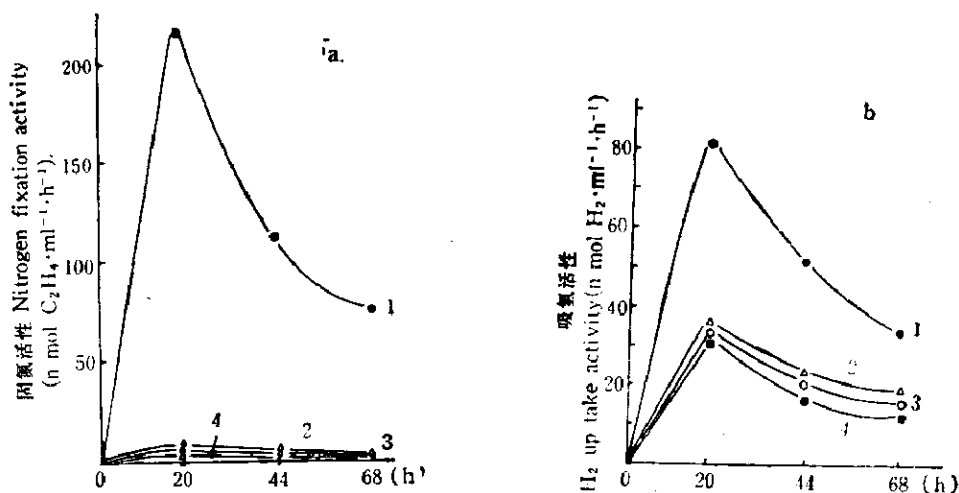


图8 2,4-二硝基苯酚对 *A. brasilense* (a) 固氮 (b) 吸氢活性的影响(培养基中加苹果酸钠)

Fig. 8 Effect of 2,4-dinitrophenol (0 to 3 mM) on (a) nitrogen fixation and (b) H_2 up-take activity of *A. brasilense* W251-10 (medium with malate)

1. 0.0mM; 2. 0.5 mM; 3. 1.0 mM; 4. 3.0 mM.

对固氮螺菌的固氮活性均有刺激作用的结果略有不同。说明培养方法不同, 所得到的效果也有差异。

(三) 对硝基苯酚对固氮螺菌固氮和吸氢活性的影响

对硝基苯酚也是一种苯环类化合物, 在苯环上除了一个—OH 外, 还结合着一个 NO_2 , 它是微生物呼吸系统的抑制剂。为了观察它对固氮螺菌固氮和吸氢活性的影响, 如同上述, 对培养基进行两种处理:

1. 无苹果酸钠, 加下列浓度的对硝基苯酚: 0.1、0.3、0.5、1.0 和 3.0mM。

2. 每升 5g 苹果酸钠, 同时加下列浓度的对硝基苯酚: 0.1、0.3、0.5 和 1.0mM。

图 5 指出, 在无苹果酸钠而加有不同浓度的对硝基苯酚培养基中, *A. brasilense* W251-10 的固氮活性极低 (图 5a)。0.1 mM 对其吸氢活性稍有刺激作用, 0.3 和 0.5mM 无明显的刺激作用, 也无明显的抑制作用, 而 1.0 和 3.0mM 具有强烈的抑制作用 (图 5b)。

在有苹果酸钠并加有不同浓度的对硝

基苯酚的培养基中, 表现的结果则不同。0.1mM 对固氮活性略有刺激作用 (图 6a)。而其他浓度则有强烈的抑制作用。对吸氢活性来说, 0.1mM 影响不大, 其他浓度具有强烈的抑制作用 (图 6a)。需要说明的是, 在无苹果酸钠的处理中, 对照所产生的极低的固氮和吸氢活性均是由于种子液带入的微量碳源所致。在有足够量的苹果酸钠存在时, 抑制作用表现极为明显, 说明固氮螺菌不能利用对硝基苯酚作为碳源, 而且在有其他碳源存在时, 它也是一种很强的抑制剂。

(四) 2,4-二硝基苯酚对固氮螺菌固氮和吸氢活性的影响

2,4-二硝基苯酚也是微生物呼吸系统抑制剂, 它含有二个硝基。同样设置了下列两种处理:

1. 无苹果酸钠的培养基加 4 种浓度的 2,4-二硝基苯酚 (0.1、0.3、0.5 和 1.0 mM)。

2. 每升含 5g 苹果酸钠的培养基中加 3 种浓度的 2,4-二硝基苯酚 (0.5、1.0 和

3.0mM)。

结果表明, 2,4-二硝基苯酚是一种很强的抑制剂, 几种浓度, 甚至 0.1mM 对固氮螺菌的固氮和吸氢活性均有强烈的抑制作用(图 7a,b 和图 8a,b)。

为了进一步证实种子液带微量碳源的影响, 特设置了以固体培养基上生长的菌体作为种子。实验结果证实, 该菌在无碳培养基上不表现固氮和吸氢活性。

从上述实验结果, 得出下列结论:

1. 一定浓度的苯, 可以作为固氮螺菌的碳素营养, 苯的浓度过高, 固氮螺菌则不能利用。这就为进一步研究固氮螺菌对苯环类化合物的降解提供了线索。

2. 苯酚是一种腐蚀剂, 1.0mM 即表现

较强的抑制作用。

3. 固氮螺菌完全不能利用对硝基苯酚和 2,4-二硝基苯酚作为碳素营养, 即使浓度为 0.1mM 对固氮和吸氢的活性均产生抑制作用。

参 考 文 献

- [1] Neyra, C. A. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **23**: 300—310, 1977.
- [2] Döbereiner, J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **22** (10): 1464—1473, 1976.
- [3] 湖北省微生物研究所生物固氮组: *微生物学报*, **19**(2): 160—165, 1979.
- [4] 罗孝扬等: *微生物学报*, **23**(1): 68—72, 1983.
- [5] 王子芳等: *微生物学报*, **25** (1): 54—59, 1985.
- [6] Werner, D. et al.: *Arch. Microbiol.*, **132**: 51—56, 1982.

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

II. EFFECT OF BENENE RING COMPOUNDS ON NITROGEN FIXATION AND H_2 UPTAKE BY *A. BRASILENSE*

Wang Zifang Zeng Kuanrong Yang Yiping Zhou Yigui

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Effects of benene ring compounds on nitrogen fixation and H_2 uptaks activity by *A. brasilense* were studied. Resulte showed that benene could be used as a carbon source by *A. brasilense*. The microorganism possessed nitrogen fixation and H_2 uptake activity when grew in the medium containing 50 or 500 mM of benene as the only carbon source. 0.5 mM of phenol stimulated slightly to the nitrogen fixation and H_2 uptake activities of *A. bras-*

lense, but 1.0 mM of phenol inhibited both activities. *A. brasilense* could not use para-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol as a carbon source, and showed inhibifory effect.

Key words

A. brasilense; Benene ring compounds; Nitrogen fixation; H_2 uptake activity