

## 玉米根际联合固氮菌 57-7 菌株基本特性的研究

李永兴 王继文 李久蒂

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

周慧玲

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

从四川省灌县地区的玉米根际分离到一株发酵型细菌, 编号 57-7。经鉴定为日勾维肠杆菌 (*Enterobacter gergovia*), 其最适生长温度为 30°C, 最适生长 pH 为 8.0。用  $^{15}\text{N}$  及乙炔还原测定, 证实有固氮酶活性。乙炔还原活性最高达  $8354 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。研究了  $\text{O}_2$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NaCl}$  对固氮酶合成、固氮酶活性及菌株生长的影响。

**关键词** 玉米根际; 联合固氮菌

自 1976 年 Döbereiner 提出了根际联合固氮的概念以来<sup>[1]</sup>, 联合固氮的研究引起了广泛的关注。大量研究结果表明, 在水稻、小麦、玉米、高粱等作物的根际, 存在着多种固氮细菌。研究这些根际固氮菌的生态、生理生化和遗传特性<sup>[2-5]</sup>, 及其与植物的相互关系<sup>[6]</sup>, 以及对作物的增产效益<sup>[7,8]</sup>, 成为生物固氮研究中的重要课题。我国玉米种植面积广大, 地理条件各异。从不同生态条件下, 分离新的固氮菌株, 研究它们的特性并进行改造, 在理论和实用方面均有一定价值。根据 57-7 菌株所表现的特性, 应属于日勾维肠杆菌 (*Enterobacter gergovia*)。自发现细菌和禾本科植物联合固氮以来, 这方面有许多工作, 但尚未见有关 *Enterobacter gergovia* 的报道。

### 材料和方法

#### (一) 菌株的分离

取扬花期玉米根洗净, 剪下细根, 在 2% 的  $\text{HgCl}_2$  中浸泡 3-5 分钟。再水冲洗去除  $\text{HgCl}_2$ , 将根剪成 3-5mm 小段, 分装在与含多碳源无氮培养基的小瓶中, 注入 1/10 体积的乙炔气。培养数天后用气相色谱仪测乙炔还原活性。挑选高活性的根样, 研碎后用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液稀释铺板。挑选在无氮培养基上生长良好的菌落, 进一步分离纯化, 同时进行乙炔还原检测。

#### (二) 固氮酶活性测定

1. 乙炔还原法: 用气相色谱仪测  $\text{C}_2\text{H}_4$  生成量。
2.  $^{15}\text{N}$  试验: 用  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  加次溴酸锂产  $^{15}\text{N}_2$  气体。将含培养 5 小时的 57-7 菌株

本文于 1992 年 5 月 8 日收到。

胡长征同志参加菌株的分离纯化工作, 特此致谢。

的三角瓶抽真空后,加入 80% 体积的  $^{15}\text{N}_2$  气体及 20% 体积的氧气,在  $30^\circ\text{C}$ ,  $80\text{r}/\text{min}$  培养 24 小时,收集菌体,用凯氏定氮法测总氮量,用质谱仪测  $^{15}\text{N}$  丰度。

### (三) Western blotting 实验

参照文献 [9] 进行。

## 结果和讨论

### (一) 基本特性

1. 菌株鉴定: 57-7 菌株为革兰氏阴性发酵型固氮菌,细胞呈短杆状,以周生鞭毛运动。利用葡萄糖、乳糖、麦芽糖等,产酸产气。从粘液酸不产酸,脲酶(+),鸟氨酸脱羧酶(+),赖氨酸脱羧酶(+),苯丙氨酸脱羧酶(-),精氨酸脱羧酶(-),吲哚(-),精氨酸双水解酶(-),脱氧核糖核酸酶(-),甲基红(-),VP 试验(+)。在  $10^\circ\text{C}$  生长,利用柠檬酸盐生长。根据以上特性 57-7 菌株属于日勾维肠杆菌 (*Enterobacter gergovia*)。

2. pH 对菌株生长的影响: 57-7 菌株生长 pH 范围为 5.7-8.0, 最适生长 pH 8.0 (图 1)。

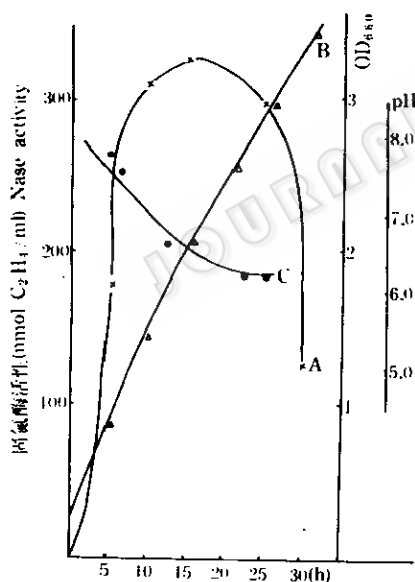


图 1 57-7 菌株培养过程中菌体生长, pH 和固氮酶活性的变化

Fig. 1 Progress curves of Nase activity pH of culture and growth during the cultivation of 57-7

- A. 固氮酶活性 Nase activity
- B. 菌体生长 Growth
- C. pH

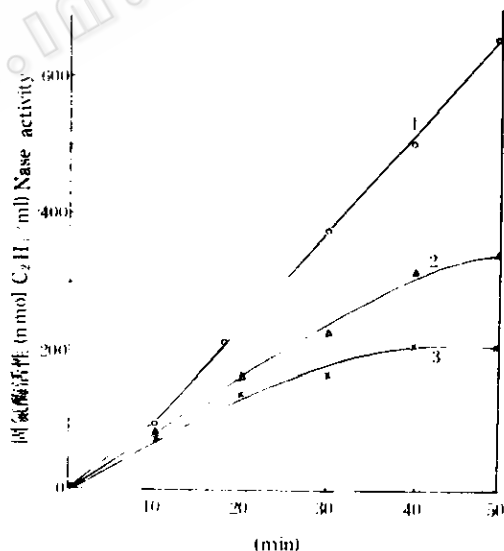


图 2 氧浓度对固氮酶活性的影响

Fig. 2 O<sub>2</sub> concentration effect on Nase activity

- 1. 无 O<sub>2</sub> (No O<sub>2</sub>)
- 2. 10% O<sub>2</sub>
- 3. 20% O<sub>2</sub>

3. 温度对菌株生长的影响: 57-7 菌株生长的最适温度为 30℃。35℃以上生长受明显抑制。在 37℃、39℃时, 仅在最初几小时内利用环境中有限营养生长, 以后由于在高温下不能固氮而停止生长。

## (二) 菌株的固氮特性

1. 乙炔还原: 乙炔还原法是测定固氮酶活性的重要手段。57-7 菌株在培养 15 小时后达到乙炔还原活性的高峰, 为 8354nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> · mg 蛋白<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>。菌体生长迅速, 随菌体生长, 培养基变酸, 表明是产酸菌。

2. <sup>15</sup>N 试验: <sup>15</sup>N 示踪试验进一步证实了 57-7 菌株的固氮作用, 结果见表 1。

表 1 57-7 菌株固定<sup>15</sup>N 的结果

Table 1 Dates of <sup>15</sup>N-fixing of 57-7

样品 Samples	总 N 量(mg) Total amount of nitrogen	<sup>15</sup> N 原子百分超 <sup>15</sup> N atom% excess of pure culture	OD <sub>660</sub>
<sup>15</sup> N+57-7 (29h)	2.508	11.80	
N+57-7 (29h)	2.588	0.375	2.45
N+57-7 (5h)	1.137	0.379	1.10

## (三) 氧、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NaCl 对固氮酶活性及固氮酶合成的影响

1. 氧对固氮酶活性的影响: 57-7 菌株属兼性厌氧细菌。在厌氧条件下固氮酶活性最

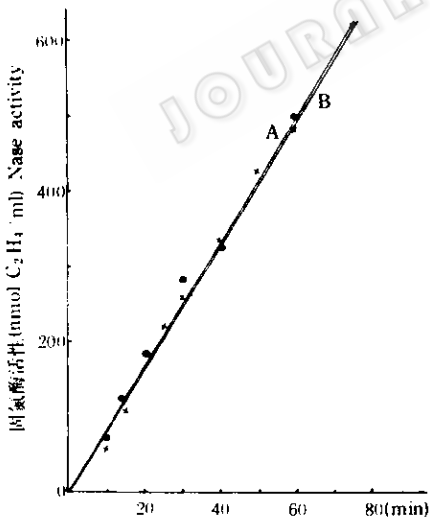


图 3 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 对固氮酶活性的影响

Fig. 3 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> effects on Nase activity

A. 固氮酶活性 Nase activity

B. 在 100mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 中的固氮酶活性  
Nase activity in 100mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

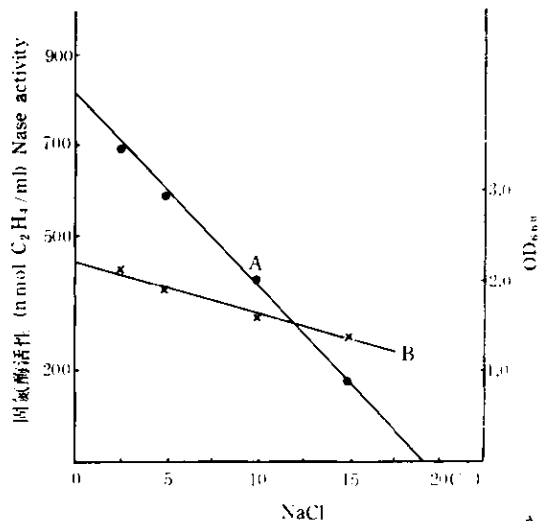


图 4 NaCl 浓度对 57-7 菌株生长及固氮酶活性的影响

Fig. 4 effects of NaCl concentration on the growth and activity of Nase in 57-7

A. 固氮酶活性 Nase activity

B. OD<sub>660</sub>

高。随着氧分压的增加, 固氮酶活性受到明显抑制。氧浓度越大, 对固氮酶活性的抑制作用越强 (图 2)。

2.  $\text{NH}_4^+$  对固氮酶活性的影响: 固氮酶在 57-7 菌株细胞内形成后, 固氮酶活性不受  $\text{NH}_4^+$  的影响, 在培养液中加入  $\text{NH}_4^+$  直至最终达 100mmol/L,  $\text{NH}_4^+$  乙炔还原活性仍和对照相同 (图 3)。说明 57-7 菌株没有固氮酶的后修饰作用。这是与固氮螺菌的一个重要区别。

3.  $\text{NH}_4^+$  对固氮酶合成的影响: 57-7 菌株在含  $\text{NH}_4^+$  的培养液中生长时, 没有乙炔还原活性。经 Western blotting 实验证明, 在 30mmol/L  $\text{NH}_4^+$  中生长的 57-7 菌株中固氮酶铁蛋白免疫交叉反应呈阴性。说明在有  $\text{NH}_4^+$  的环境下, 不能合成固氮酶。

4. NaCl 浓度对菌株生长及固氮酶合成的影响: NaCl 对菌株生长及固氮酶活性均有影响。但对生长的影响远小于对活性的影响。表明 57-7 菌株对 NaCl 有较强的耐受力。NaCl 浓度为 2.5% 时, 能保持 83% 的固氮酶活性。随 NaCl 浓度增加, 活性明显下降, 在 20% NaCl 中, 固氮酶活性被完全抑制 (图 4)。

57-7 菌株是一株根际固氮菌, 与其他固氮菌相比, 具有较高的固氮酶活性, 固氮酶合成受氨阻抑, 但固氮酶活性不受抑制。说明其自身不存在固氮酶翻译后修饰机制, 并对土壤中盐碱有较高的耐受力。对 57-7 菌株进行遗传改造, 使其固氮酶的合成不受氨的抑制, 并能分泌部分  $\text{NH}_4^+$  到环境中, 从而成为盐碱地区玉米增产的实用工程菌株, 是我们下一步的研究目标。

## 参 考 文 献

- [1] Döbereiner, J. et al.: In Proc. 1st. Symp. on Nitrogen Fixation, pp. 518-538, (ed. Newton, W. E.), Washington State Univ. Press. Pullman, 1976.
- [2] Lahda, J. K. et al.: *Can. Microbiol.*, **119**: 1072-1074, 1983.
- [3] Yoel, I. D. et al.: *Crop Sci.*, **26**: 297-301, 1986.
- [4] Alexander, D. B. et al.: *Plant Soil*, **110**: 303-317, 1988.
- [5] Döbereiner, J. et al.: In *Azospirillum I Genetics, Physiology, Ecology*, pp. 9-23, (ed. Klingmüller, W.), Birkhäuser, Basel. Boston Stuttgart, 1983.
- [6] Elmerich, C. et al.: *Bio-Technology*, **2**: 967-978, 1984.
- [7] Okon, Y. et al.: *Trends Biotechnology*, **3**: 223-228, 1985.
- [8] Dart, P. J. et al.: *Plant and Soil*, **90**: 303-334, 1986.
- [9] 李永兴等: 生物化学与生物物理进展, **18** (3): 242-243, 1991.
- [10] Krieg, N. K. & J. G. Holt (ed.): *Eergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984.

# THE STUDY OF BASIC CHARACTERIZATION ON MAIZE RHIZOSPHERE ASSOCIATIVE NITROGEN FIXATION BACTERIA 57-7

Li Yongxing Wang Jiwen Li Jiudi

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044*)

Zhou Huilin

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

57-7 was isolated and purified from maize roots grown in Sichuan province. With the  $^{15}\text{N}_2$  experiment and acetylene reduction experiment, it was confirmed to be a  $\text{N}_2$ -fixing bacteria. The optimum growth temperature and pH were measured. The highest specific activity was  $8354 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \text{h}^{-1}$ . The effects of  $\text{O}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NaCl}$  on the activity of Nase and synthesis of Nase were studied.

**Key words** Maize rhizosphere; Associative nitrogen fixation bacteria