

# 土壤杆菌固氮生理特性研究\*

王 丽 张静娟\*\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 对根癌土壤杆菌 C58/pGV3850 菌株的固氮生理特性研究结果表明,该菌具有自生固氮活性,其固氮活性的最适 pH 为 8.0,温度为 30℃。固氮活性在对数生长期(14h)最高,延缓期和静止期乙炔还原活性较低。该菌株好氧,通过氧呼吸和吸氢酶的作用达到避氧固氮。当通入氧气超过呼吸耗氧时,对固氮活性产生抑制作用。在培养过程中增加  $\text{NH}_4^+$  浓度,固氮活性会降低,当达到 15mmol/L 时完全丧失固氮活性,表现  $\text{NH}_4^+$  阻遏固氮酶蛋白合成。在乙炔还原测定系统中加入  $\text{NH}_4^+$  并不影响乙炔还原反应,说明没有  $\text{NH}_4^+$  关闭现象。培养过程中加入 MSX(2.5mg/ml)能解除 10mmol/L  $\text{NH}_4^+$  对固氮酶合成的阻遏作用。固定的游离氮不能以  $\text{NH}_4^+$  形式分泌于胞外。固氮过程中放出大量氢气,培养 16 小时产氢量达 65 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$  蛋白。在限碳条件下(0.2%蔗糖)其吸氢酶活力可达 520nmol  $\text{H}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

**关键词** 根癌土壤杆菌,固氮,生理特性

《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)根据土壤杆菌不能固定空气中的游离氮而将土壤杆菌和根瘤菌分别列为两个属。1990 年英国 Sastry 等<sup>[1]</sup>报道根癌土壤杆菌 B6 和 C58 具有自生固氮活性。

作者最近也发现根癌土壤杆菌 C58/pGV3850, C58, A281 及放射土壤杆菌 LHB-2 和 CHL-4 菌株有乙炔还原和<sup>15</sup>N<sub>2</sub> 渗入作用。而且用 Western 免疫印迹和 Southern 印迹技术分别测到了固氮酶铁蛋白和结构基因 nif HDK 同源序列<sup>[2]</sup>。

作者以根癌土壤杆菌 C58/pGV3850 为典型菌株,研究了其固氮生理的特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) C58/pGV3850 由 Van Montagu 教授惠赠。

### 1.2 培养基和培养方法

在 50ml 三角瓶中,加入改良的克氏杆菌液体培养基<sup>[3]</sup>20—30ml,于 30℃,100r/min 摇床培养。

### 1.3 固氮活性测定

采用乙炔还原法<sup>[4]</sup>,在 7ml 血清瓶中加入 2ml 培养液,胶塞反封口,抽真空充氩气

\* 国家自然科学基金资助项目,并得到院长基金的部分资助。

\*\* 通讯联系人。

本文于 1993 年 3 月 19 日收到。

次,注入10%体积乙炔(0.5ml),200r/min水浴摇床反应15分钟后注入30%三氯乙酸0.1ml终止反应。岛津GC-7AG气相色谱测定产生乙烯的峰面积,根据标准乙烯,计算乙烯产生速率。

#### 1.4 蛋白含量测定

离心收集菌体,悬浮于磷酸缓冲溶液,超声破碎。超速离心,弃细胞碎片后,采用Bradford<sup>[5]</sup>法测定蛋白含量。

#### 1.5 放氢测定

7ml血清瓶中加入2ml培养液,胶塞反封口,30℃摇床培养,定时抽出0.4ml气样,气相色谱测定氢气峰值,计算放氢量。

#### 1.6 氢酶活性测定

采用Maier等人方法<sup>[6]</sup>,于0.1%TTC(2,3,5-氯化三笨四唑氮)固体培养基上接种,培养2天后观察菌落颜色变化,定性测定氢酶存在。

在限碳(0.2%蔗糖)培养基中,加入10%体积氢气诱导培养10小时,取2ml培养液于7ml血清瓶中,注入1%体积氢气(50 $\mu$ l),30℃摇床反应6小时,气相色谱测定剩余氢气,计算吸氢酶活性。

## 2 结果和讨论

### 2.1 培养过程中固氮活性变化

影响生物固氮活性的因素很多,除环境条件外,生物自身代谢状态也会影响固氮作用。培养过程中定时取样测菌体密度和乙炔还原活性。结果(图1)表明,延缓期固氮活性较低;对数生长期菌体迅速增殖,固氮活性大幅度提高;对数生长后期(14h)固氮活性达高峰为1713nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg 蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>;静止期菌体增殖减慢,代谢活力降低其固氮活性随之下降,48小时则完全测不到固氮活性。这表明,C58/pGV3850菌株的固氮活性与菌体代谢状态密切相关。

### 2.2 培养温度、pH对固氮活性的影响

培养温度对固氮活性有很大影响,温度过高或过低对固氮活性均不利。从图2-a看出,C58/pGV3850菌株在30℃下培养时固氮活性最高,低于30℃或高于40℃培养菌体,虽然能生长,但固氮活性明显受抑制。

一般固氮生物在培养中使生长基质变酸,当pH低于6.0时,固氮活性被抑制<sup>[7]</sup>。通常固氮最适pH近于中性<sup>[8]</sup>。C58/pGV3850菌株固氮最适pH值为8.0(图2-b)。

### 2.3 氧气浓度对固氮酶合成及活性的影响

生物固氮是由两个氧不稳定的钼铁蛋白和铁蛋白组成的复合物(固氮酶)催化。在许多固氮生物中,氧对固氮酶的合成和活性均有调节作用。

在C58/pGV3850菌株培养的过程中,于不同时期加入不同浓度氧气对固氮活性影响不同。图3-1表明,培养初期(0h)加入50%氧气,固氮活性(4850nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg 蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)明显高于无氧培养的固氮活性(478nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg 蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)。对数生长中期(6h)加入50%氧气,固氮活性(961nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg 蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)却低于加入10%氧气的固氮活性(1694nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg 蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) (图3-2)。实验结果表明,培养初期需要足够

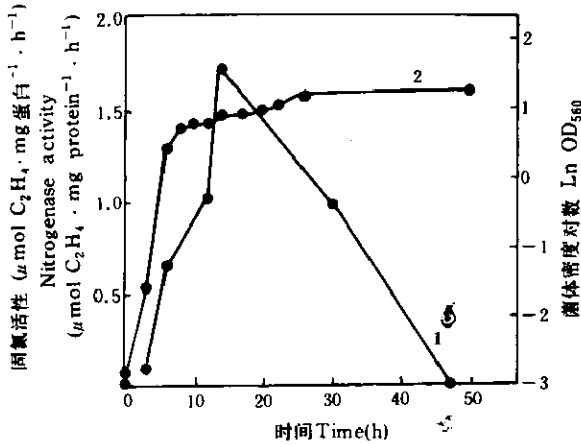


图1 培养过程中根瘤土壤杆菌 C58/pGV3850的固氮活性变化

Fig.1 Time course of nitrogenase activity of *Agrobacterium tumefaciens* C58/pGV3850

- 1. 固氮活性 Nitrogenase activity;
- 2. 菌体密度 Ln OD<sub>560</sub>.

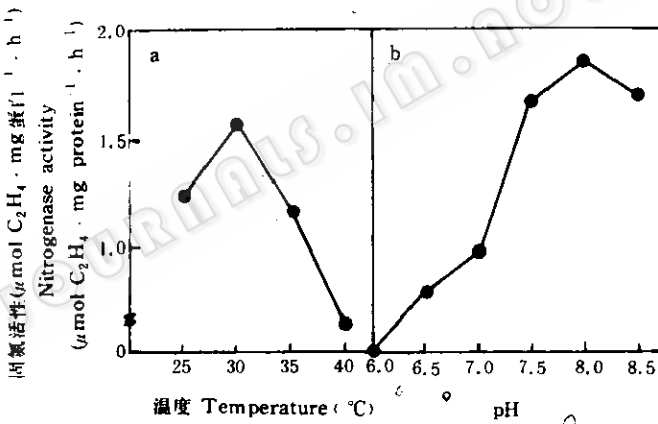


图2 培养温度 (a) 和 pH (b) 对根瘤土壤杆菌 C58/pGV3850菌株固氮活性的影响

Fig.2 Effects of temperature (a) and pH (b) on nitrogenase activity of *A. tumefaciens* C58/pGV3850

氧气保证菌体大量增殖，然后通过菌体强烈呼吸作用，使氧气浓度迅速下降，造成胞内无氧环境，有利于固氮酶合成。一旦加入氧气量超过呼吸避氧平衡阈值，则阻遏固氮酶合成。Robert<sup>[9]</sup>认为，某些固氮生物能够在有氧条件下合成固氮酶并固氮，是由于存在多种避氧保护机制，如形态保护，豆血红蛋白保护，呼吸保护等。根据实验结果推测，C58/pGV3850菌株是通过呼吸避氧机制进行有氧条件下固氮酶合成和固氮的。

图3-3显示在固氮活性测定系统中氧气浓度对固氮活性的影响。5%氧气条件下固氮活性最高 (1272nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> · mg 蛋白<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>)，5%以下氧气浓度对固氮活性较适宜。通氧10%以上则固氮活性下降许多，仅存206nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> · mg 蛋白<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>的固氮活性，活力下降了85%左右。结果表明，通氧量超过呼吸需氧 (5%)，则对已合成的固氮酶活性产生抑制

作用,即氧关闭作用。这与氧对许多固氮生物的固氮酶影响一致。对 C58/pGV3850 菌株的氧关闭机理有待深入研究。

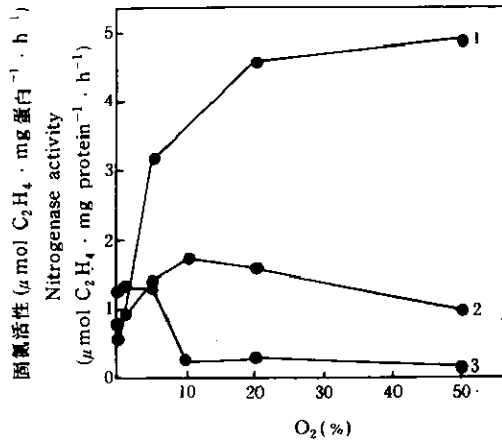


图3 氧气浓度对根癌土壤杆菌 C58/pGV3850 菌株固氮活性影响

Fig. 3 Effects of O<sub>2</sub> concentration on nitrogenase activity of *A. tumefaciens* C58/pGV3850

1. 培养开始注入0—50%氧气, 10% N<sub>2</sub>;
  2. 常氧培养, 对数生长期注入0—50%氧气;
  3. 常氧培养, 乙炔还原体系注入0—50%氧气。
1. Added 0—50% O<sub>2</sub> at 0 h;
  2. Added 0—50% O<sub>2</sub> at the middle of exponential stage;
  3. Added 0—50% O<sub>2</sub> in acetylene reduction assay system.

#### 2.4 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对固氮酶蛋白合成的阻遏作用

化合态氮对固氮活性调节是普遍存在的瞬间调节。多数报道认为, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>使固氮酶合成停止或活性丧失<sup>[10]</sup>。

在 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>存在条件下培养 C58/pGV3850 菌株, 随基质中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度增加, 固氮活性下降。当 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度达10mmol/L 时, 固氮活性完全丧失(图4-a)。为了解基质中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>是阻遏固氮酶蛋白合成还是抑制其活性, 在15mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>基质中培养该菌15小时, 无固氮活性。将菌体经离心洗涤再转入无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>基质, 并加入蛋白合成抑制剂氯霉素(170μg/ml)后, 再培养8小时, 也未测到固氮活性。但不加氯霉素的对照, 4小时即可测到固氮活性。此结果表明, 在15mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>培养条件下没有固氮酶蛋白合成, 否则在去除 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>阻遏后应有固氮活性显示。由此可以推论, 培养基中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>阻遏了固氮酶蛋白合成。此特性与大多数的固氮菌相似。

#### 2.5 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对固氮活性的影响

对有些固氮生物, 如深红螺菌和巴西固氮螺菌等, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>不仅阻遏固氮酶的合成, 而且也抑制固氮酶的活性, 即有 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>关闭作用。

在乙炔还原测定系统中, 分别加入0、10、20、40mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 反应15分钟后固氮

活性测定结果如图4-a2所示。加入40mmol/L  $\text{NH}_4^+$ 的乙炔还原速率仍高达1739 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,与无 $\text{NH}_4^+$ 时的乙炔还原速率相近似。图4-b显示,乙炔还原反应开始7分钟后注入7mmol/L $\text{NH}_4^+$ ,对乙烯产生速率并无影响,反应15分钟乙烯产生速率基本与不加 $\text{NH}_4^+$ 的对照相等。

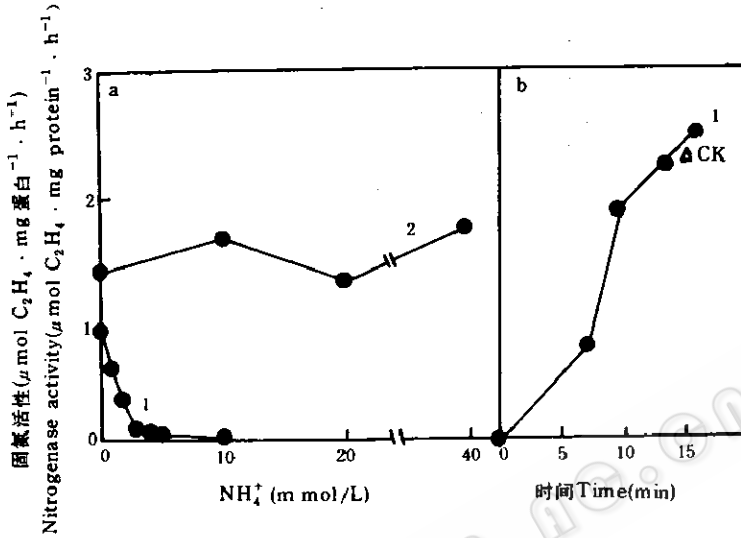


图4  $\text{NH}_4^+$ 浓度对根癌土壤杆菌 C58/pGV3850固氮活性的影响

Fig. 4 Effects of  $\text{NH}_4^+$  on nitrogenase activity of *A. tumefaciens* C58/pGV3850

a1. 培养基中加  $\text{NH}_4^+$ ;

a2. 乙炔还原体系中加  $\text{NH}_4^+$ ;

b1. 乙炔还原反应7分钟时加  $\text{NH}_4^+$  (7mmol/L  $\text{NH}_4^+$ );

CK. 不加  $\text{NH}_4^+$ 对照。

a1. added  $\text{NH}_4^+$  in medium;

a2. added  $\text{NH}_4^+$  in acetylene reduction assay system;

b1. added  $\text{NH}_4^+$  after 7 minutes of acetylene reduction beginning (7mmol/L  $\text{NH}_4^+$ );

CK.  $\text{NH}_4^+$  free.

综合图4-a、b结果看出,  $\text{NH}_4^+$ 对于 C58/pGV3850菌株已合成的固氮酶无抑制作用,即不存在  $\text{NH}_4^+$ 关闭作用。

有些自生固氮菌能将固定的氮以  $\text{NH}_4^+$ 的形式分泌于胞外<sup>[11]</sup>。C58/pGV3850菌株在有固氮作用培养条件下,未测到培养基中  $\text{NH}_4^+$ 浓度增加,表明 C58/pGV3850菌株可能没有分泌  $\text{NH}_4^+$ 的作用。

## 2.6 MSX 的去 $\text{NH}_4^+$ 阻遏作用

在含  $\text{NH}_4^+$ 为0、2、10mmol/L的三种基质中,分别加入不同浓度 MSX (甲硫氨酸亚砷次铵) (0、1、2.5、5mg/ml),培养 C58/PGV3850菌株到对数生长后期取样测定固氮活性。结果(图5)表明,在无  $\text{NH}_4^+$ 培养条件下加入 MSX 对固氮活性有明显抑制作用(图5-1),并且菌体生长受抑(数据未列)。这与荚膜红假单胞菌中 MSX 对固氮酶活性影响一致<sup>[12]</sup>。MSX 抑制固氮活性的作用可能涉及 GS(谷氨酰胺合成酶),因为 MSX 显著抑

制GS的合成活性和转移谷酰基活性。

从图5-2、3看出,在2mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>培养条件下,2.5mg/ml MSX有解NH<sub>4</sub><sup>+</sup>阻遏作用,而且随培养基中NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度增加,MSX的解阻遏作用更显著。在10mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>培养条件下,MSX为2.5mg/ml时,固氮活性(322nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)比无MSX时(36nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)提高了8倍。但在MSX为5mg/ml浓度条件下,固氮活性仅为156nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>,解阻遏的效应并没有随MSX浓度增加而进一步提高。这表明,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>阻遏效应的解除与MSX浓度并非呈线性关系。

据报道<sup>[12]</sup>,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对固氮活性抑制的消除,与MSX/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度的比值有关。当[MSX]/[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]为0.2左右时,可基本消除NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对固氮活性的抑制。MSX对C58/pGV3850菌株的解NH<sub>4</sub><sup>+</sup>阻遏效应程度可能也取决于MSX和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度之比,其机理仍有待深入研究。

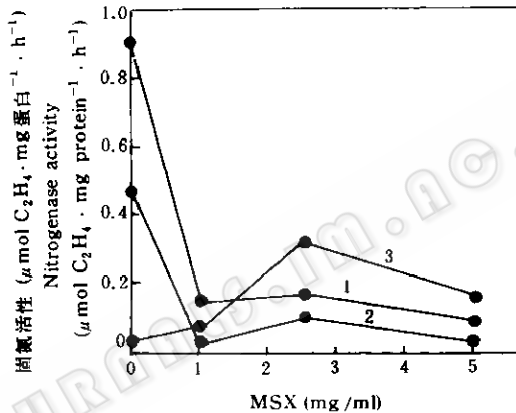


图5 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>阻遏固氮酶合成的解除与MSX浓度的关系

Fig. 5 Relationships between the relief of nitrogenase synthesis from NH<sub>4</sub><sup>+</sup> repression and concentrations of MSX  
1. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> free; 2. 2 mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; 3. 10 mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

### 2.7 固氮放氢与氢酶

固氮生物在固氮过程中由于产生氢气大约损失30%左右的能量。而氢的再利用则认为是一种提高固氮效率的有效方法。

由C58/pGV3850菌株固氮过程中的放氢变化可以看出,在8小时放氢速率最高达2μmolH<sub>2</sub>·mg蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>。比较图6-a和图1-1看出,C58/pGV3850菌株的放氢曲线趋势,与固氮活性曲线是平行的。说明C58/pGV3850菌株的固氮作用与放氢密切相关。

为了解C58/pGV3850菌株是否有吸氢酶,在含0.1%TTC固体培养基上接种该菌,培养二天后菌落呈红色,说明可能有吸氢酶。在氢(10%)诱导和限碳(0.2%蔗糖)培养条件下,测到C58/pGV3850菌株内吸氢酶活性达520nmol H<sub>2</sub>·ml<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>。

据报道,氢对含吸氢酶的固氮螺菌<sup>[13]</sup>、大豆根瘤菌<sup>[14]</sup>等的固氮有促进作用。C58/pGV3850在充足碳源(2%蔗糖)条件下固氮活性为728nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>,而加入5%氢气则固氮活性增加到919nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg蛋白<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>,提高了20%左右。由此看出C58/pGV3850菌株在充足碳源条件下氢可支持固氮。该菌株此特性与粪产碱菌A-15相

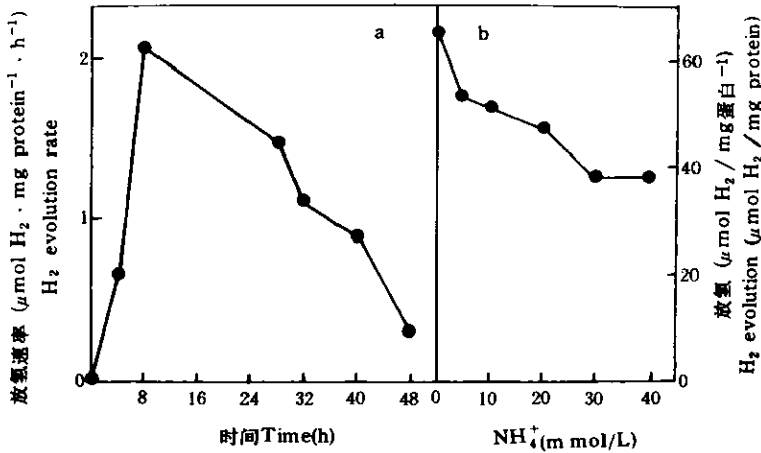


图6 根瘤土壤杆菌 C58/pGV3850 菌株放氢曲线 (a) 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 浓度对放氢的影响 (b)

Fig. 6 Time Course of H<sub>2</sub> evolution (a) and effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on H<sub>2</sub> evolution (b) of *A. tumefaciens* C58/pGV3850

似<sup>[15]</sup>, 而不同于巴西固氮螺菌<sup>[13]</sup>, 后者在充足碳源条件下氢不支持固氮。

为研究放氢与固氮酶关系, 在培养基中分别加入 0—40 mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 不同程度地阻遏了固氮酶合成。测定放氢结果如图 6-b 所示, 无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 时放氢达 65 μmol H<sub>2</sub> · mg 蛋白<sup>-1</sup>, 当 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 浓度为 40 mmol/L 时, 固氮活性完全丧失, 但放氢却高达 39 μmol H<sub>2</sub> · mg 蛋白<sup>-1</sup> (培养 16 小时)。显然, 此时所产生的氢气与固氮无关, 推断是由可逆性氢酶产生的。

**致谢** 本所苏京军同志协助气相色谱测定, 特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] Lalita K, Sastry G R K. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56** (7): 2087—2092.
- [2] 张静娟, 王 丽, 李丽娜, 等. 科学通报, 1992, **37** (18): 1725.
- [3] Hill S. *J Gen Microbiol*, 1976, **93**: 335—345.
- [4] Postgate J R. The Acetylene Reduction Test for Nitrogen Fixation in *Methods in Microbiol.* Norris J R *et al* ed. London: Academic Pr. 1972, 6B: 343—356.
- [5] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. 1987. 10. 1. 1.
- [6] Maier R J, Campbell N E R, Hanus F J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978, **75** (7): 3258—3262.
- [7] Bergersen F J 主编 (陈冠雄等译). 生物固氮研究方法. 北京: 科学出版社, 1987. 35.
- [8] Albrecht S L, Okon Y. *Meth Enzym*, 1980, **69**: 740—749.
- [9] Robert L R, Postgate J R. *Ann Rev Microbiol*, 1980, **34**: 183—207.
- [10] Robert E, Issack R, Kennedy C *et al.* *J Gen Microbiol*, 1978, **104**: 277—285.
- [11] 尤崇杓, 里景伟, 宋 未, 等. 植物生理学报, 1981, **7** (1): 43—48.
- [12] 孙金华, 贺逸秋, 宋鸿遇. 植物生理学报, 1985, **11** (3): 268—278.
- [13] Pedrosa F O, Dobereiner J, Yates M G. *J Gen Microbiol*, 1980, **119**: 547—551.
- [14] Steve L A, Maier R J, Hanus F J *et al.* *Science*, 1979, **203**: 1255—1257.

## STUDIES ON PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF NITROGEN FIXATION BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Wang Li    Zhang Jingjuan

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

**Abstract** Under free-living condition *Agrobacterium tumefaciens* C58/pGV3850 can fix nitrogen in modified Burk's medium and the optimal conditions for nitrogenase activity are pH 8.0 and 30°C. The nitrogenase activity of C58/pGV3850 was lower in lag and stationary phases, and the maximum amount acetylene reduction rate was observed in late exponential phase (14h), but no acetylene reduction was measured at 48 hours of cultivation.

As an aerobic organism, C58/pGV3850 can synthesize nitrogenase protein while oxygen was consumed by respiration to establish an anaerobic environment within the cell. When oxygen was supplied over consumed, the nitrogenase activity would be inhibited.

The nitrogenase protein synthesis was repressed by ammonia presented in growth medium, the more ammonia the less acetylene reduction until no nitrogenase activity with 15 mmol/L ammonia present in medium. On the other hand, in acetylene reduction assay system no effect of ammonia on nitrogenase activity was observed even the ammonia concentration was up to 40 mmol/L. These results suggest that ammonia switch-off of nitrogenase activity is not operative in C58/pGV3850. The relief effect of MSX (2.5 mg/ml) on nitrogenase protein synthesis repressed by ammonia (10 mmol/L) was observed in experiment. There is no ammonia secreting outside the cells during nitrogen fixation process.

Large amount of hydrogen (65 μmol H<sub>2</sub>/mg cellprotein) was evolved in nitrogen fixation process, and the hydrogenase activity was 520 nmol H<sub>2</sub> uptake·ml<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, while C58/pGV3850 was incubated in the medium of limited carbon source (0.2% sucrose) and induced with 10% H<sub>2</sub>. Cultivated in the medium of 2% sucrose, the nitrogenase activity was increased from 728 to 919 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg cell protein<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> by means of adding 5% H<sub>2</sub> in acetylene reduction assay system. Thus, nitrogen fixation was supported by molecular hydrogen even with sufficient carbon source. It may be concluded that reversible hydrogenase was present from the effect that hydrogen evolution still taken place, although no nitrogenase activity was determined in 40 mmol/L ammonia growth condition.

**Key words** *Agrobacterium tumefaciens*, Nitrogen fixation, Physiological characteristic