

二株固氮芽孢杆菌的固氮特性研究

许齐放* 黄秀梨

(北京师范大学生物系 北京 100875)

陈 廷 伟

(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)

摘要 在无氮 Hino 培养基 JR₁ 菌株的乙炔还原活性在氧浓度 3% 时最高, ZZ₁₂ 菌株则随氧浓度上升而下降, 但两菌株在空气条件下也能有效固氮; 在有 0.01% 酵母膏存在时, 各氧气浓度菌株的乙炔还原值起伏不大, 0.02% 铵盐存在时 JR₁ 乙炔还原作用最强, 但活性随硝酸盐浓度上升而一直下降; 0.02% 硝酸盐时 ZZ₁₂ 菌株乙炔还原力最强, 但其活性值随铵盐浓度递增而递减。土壤中存在可利用糖类时 JR₁ 和 ZZ₁₂ 菌株才能固氮。

关键词 乙炔还原作用, 芽孢杆菌固氮菌株, 固氮

分类号 Q939.11 **文献标识码** A **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-7-10

AFFECTION OF FOUR FACTS ON NITROGEN-FIXING *BACILLUS* STRAINS

Xu Qifang, Huang Xiuli

(Department of Biology, Beijing Normal University Beijing 100875)

Chen Tingwei

(Institute of Soil and Fertilizer, Chinese Academy of Agricultural Science Beijing 100081)

Abstract The acetylene-reducing activity of JR₁ strain was highest on 3 percent oxygen, the activity of ZZ₁₂ strain reduced by increase of concentration of oxygen on the nitrogen-free medium, but two strains were able to reduce acetylene efficiently at air; while the acetylene-reducing values of two strains fluctuate within deviations on 0.01 per cent yeast extract Hino medium at different oxygen concentrates. The acetylene-reducing ability of JR₁ strain was best on 0.02 per cent ammonia, but reduced by the raise of concentrate of nitrate. In contrast, the acetylene-reducing values of ZZ₁₂ reduced with the rising of concentrate of ammonia and the highest value is on 0.02 per cent nitrate. Only when utilizable carbohydrates (glucose) existed in soils, JR₁ and ZZ₁₂ strains were able to reduce acetylene.

Key words Acetylene reduction, *Bacillus* nitrogen-fixers, Nitrogen fixing

自 1958 年 Hino 首次从日本土壤中分离到一株具有高固氮活性的芽孢杆菌固氮菌株之后^[1], 许多国家相继从不同土壤中分离到芽孢杆菌固氮菌株^[2]。这些菌株的发现丰富了已知的微生物菌种资源, 但更重要的是由于这些菌

种能够固定大气中的氮气, 产芽孢, 可以在土壤中长期居留, 在目前氮素匮乏和环境污染严重

* 现在国家饲料质量监督检测中心(北京)

1997-11-06收稿, 1998-03-05修回

的情况下,探讨此类菌实际生产利用价值很有意义。

目前分离到的芽孢杆菌固氮菌株均为根际促生菌(Plant Growth-Promoting *Rhizobacter* PGPR),在根际微生物中占居相当数量^[3]。以芽孢杆菌类固氮菌作菌剂接种作物,能显著提高作物产量和促进作物生长^[3,4]。目前认为菌对作物的刺激作用主要是由于其能产生生长刺激物质,防止病原体入侵,解磷解钾等作用。对固氮作用的增产效果目前尚有争议^[5]。

本论文在实验室条件下研究四种普遍存在的环境因子(氧气、硝酸盐、铵盐、葡萄糖)对分离芽孢杆菌固氮菌株的固氮活性的影响,初步探讨此类菌在实际应用上的潜力。

1 材料和方法

1.1 菌株

本实验室分离到的二株固氮菌 JR₁ 和 ZZ₁₂。纯化后保存在 4℃ 冰箱。ATCC 35681 为 *Bacillus azotofixans* 的模式菌株 *B. azotofixans* P3L-5, 来自美国菌株保存中心。

1.2 培养

将 JR₁ 和 ZZ₁₂ 及 ATCC 35681 在 0.05% 酵母膏斜面上扩增。培养基为改进后的 Hino 培养基。对菌株的固氮性质的研究(硝酸盐、铵盐、氧气对分离菌株固氮活性的影响)均建立在此培养基基础上。氧气对菌株的固氮活性的影响实验所用培养基为无氮 Hino 培养基和含 0.01% 酵母膏 Hino 培养基。氧气浓度为 1atm 下的气体体积比。测氮源影响时依次加入各种相应的不同浓度(0, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%)的硝酸盐(NaNO₃)和铵盐(NH₄)₂HPO₄。

1.3 乙炔还原活性的测定

在 21mL MAKIX 管中加入 5mL 改进后的相应的 Hino 培养基。以在 0.05% 酵母膏 Hino 培养基上培养过夜的菌作为种子, 30℃ 培养 2d, 用无菌橡皮塞换下螺旋帽, 用高纯氮气置换管内空气。注入乙炔, 使乙炔体积浓度为 10%, 28℃ 温育 4h。取样, 进行气相色谱分析(色谱仪型号为 P.E., sigma 2B, U.S.A., 柱长 2m), 得乙烯生

成量。氮气作为载气。测定每管乙烯生成量, 并通过考马斯亮蓝染液染色法测各管洗脱菌悬液的总蛋白量, 计算出每毫克蛋白乙炔还原率(nmolC₂H₄/mg 蛋白·h)。

1.4 接种土壤后固氮活性及菌数的测定

采取中国农科院院内菜园土壤, 用 0.5mm 过筛。称取 10g 土放入 50mL 三角瓶内, 1×10⁵Pa 灭菌 1h, 40% 葡萄糖溶液经过滤除菌, 吸 0.5mL 葡萄糖液到三角瓶内, 使其终浓度为 2%。吸取培养 3d 的发酵液 1mL 加入土中。以加葡萄糖接热杀死菌和不加葡萄糖接活菌作为对照。每一处理 5 个平行。30℃ 培养 2d 后, 抽出 4.67mL 气体, 注入 4mL 乙炔, 使乙炔体积浓度为 10%。培养 4h 后进行气相色谱分析, 测量乙烯生成量。将瓶内土用无菌水稀释后, 涂平板计数。计数时对典型菌落进行涂片观察, 以证实是否为接种菌。以每克土壤干重的菌数为单位。土壤在 105℃ 烘 4h 后计算水份含量, 所用土壤水份含量为 18.3%。

2 结果

2.1 氧气对菌株乙炔还原活性的影响

JR₁ 菌在无氮培养基上在氧气浓度增加到 3% 以前, 乙炔还原率稍递增, 但增加不大, 此后逐渐下降, ZZ₁₂ 菌株随氧气浓度增加而一直

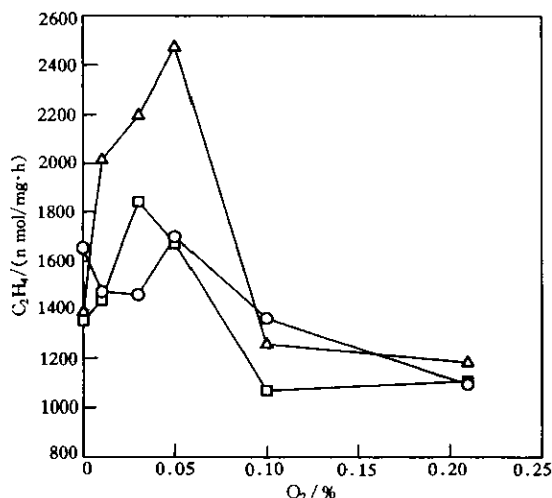


图 1 氧气对 JR₁ 和 ZZ₁₂ 两菌株乙炔还原活性的影响

□. ATCC 35681, △. JR₁, ○. ZZ₁₂.

呈下降趋势,但两菌株在空气条件下(氧气浓度为 21%)的乙烯生成率仍为 575.4 和 336.3 nmol C_2H_4 /mg 蛋白·h,分别为厌氧条件时的 17% 和 30%。在 0.01% 酵母膏 Hino 培养基上,两菌株及标准菌株 ATCC 35681 乙炔还原活性均不受氧气影响,虽然 JR₁、ZZ₁₂ 菌株在 5% O₂ 浓度时具有最高乙炔还原活性,但最高值与最低值在同一数量级,并且这组数据的方差分别为 544.1 和 217.8; ATCC 35681 与 JR₁ 具有相同的乙炔还原趋向,在 3% O₂ 时值稍高,不同氧浓度下起伏在 305.9 之内,各值差异不大,符合乙炔还原活性值的起伏范围(图 1)。

2.2 硝酸盐对菌株的乙炔还原活性的影响

JR₁ 菌株及 ATCC 35681 的乙炔还原活性(乙烯生成速率)随硝酸盐浓度的增加而递减,但两菌株在硝酸钠浓度为 0.5% 即 58.8 mmol/L 浓度时,仍有 476.7 nmol C_2H_4 /mg 蛋白·h 和 106.2 nmol C_2H_4 /mg 蛋白·h,为无氮时固氮活性的 18% 和 6.6%。ZZ₁₂ 菌株的乙炔还原活性在 0.02% 硝酸盐时最高为 932.7 nmol C_2H_4 /mg 蛋白·h,随着 NO₃⁻ 浓度上升,活性迅速下降,到 0.1% NaNO₃ 时几乎没有还原活性(图 2)。测 ATCC 35681、JR₁ 和 ZZ₁₂ 三菌株在不同硝酸钠浓度时的蛋白量,在无氮培养基上蛋白量均较

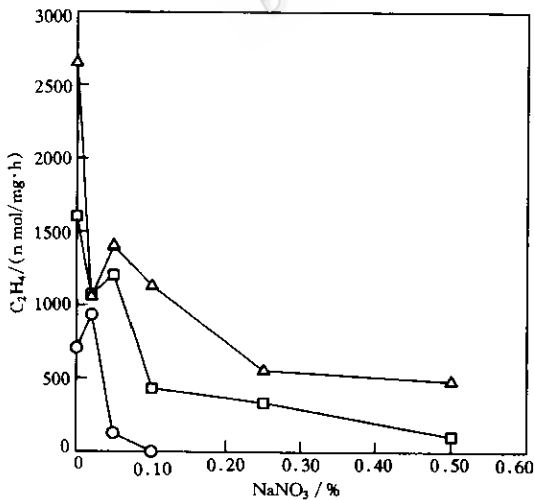


图 2 硝酸盐对 JR₁、ZZ₁₂ 及 ATCC 35681 菌株乙炔还原活性的影响

□. ATCC 35681, Δ. JR₁, ○. ZZ₁₂

低,分别为每管 121.7 μg, 162.7 μg 和 128.8 μg 随着硝酸盐浓度增加,蛋白量迅速上升。ATCC 35681 在 0.5% 浓度时蛋白量最大为 745.8 μg/管,为无氮时的 6 倍; JR₁ 菌株在 0.05% NaNO₃ 时具有最高蛋白量 806 μg/管,为无氮时的 5 倍,此后下降,到 0.5% 时下降到 563.3 μg/管,但仍比无氮时高 2.5 倍,是最高值的 70%; ZZ₁₂ 菌株在 0.1% NaNO₃ 时有最高蛋白生成量, 984 μg/管,为无氮时的 8 倍,此后快速下降,至 0.5% 时为 550.4 μg/管,比无氮时高 3.3 倍,是最高值的 56%。

2.3 铵盐对菌株的乙炔还原活性的影响

(NH₄)₂HPO₄ 对 JR₁、ATCC 35681、ZZ₁₂ 菌株的影响与 NaNO₃ 不同。前两菌株在 0.02% (3.02 mmol/L) 时有最高乙炔还原活性,分别为 1673.1 和 1461.8 nmol C_2H_4 /mg 蛋白·h, 0.1% NH₄⁺ (15.2 mmol/L) 仍有 216.1 与 78.8 nmol C_2H_4 /mg 蛋白·h,随着 NH₄⁺ 浓度下降,还原作用很快下降,至 0.5% NH₄⁺ 盐时 (76 mmol/L) 基本上无还原作用; ZZ 菌株随铵盐浓度递增而急骤下降,在 0.1% NH₄⁺ 浓度时无还原活性(图 3)。三菌株蛋白量均随铵盐浓度升高而增加,其中 ZZ 菌株蛋白量最高,0.5% 铵盐时可达每管 3.39 mg,为无氮时的蛋白量 (209.7 μg) 的 16 倍;

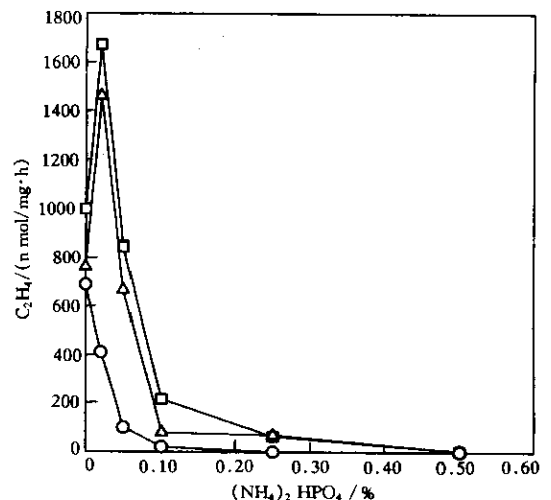


图 3 铵盐对 JR₁、ZZ₁₂、ATCC 35681 三菌株乙炔还原活性的影响

□. ATCC 35681, Δ. JR₁, ○. ZZ₁₂

JR 菌株为 1.36mg, 为无氮时蛋白量(193.3 μ g)的 6 倍; ATCC 3568 也达每管 0.81mg, 也为无氮时(144.8 μ g)的 5.6 倍。

2.4 葡萄糖对土壤接种菌乙炔还原活性的影响

在潮湿土壤并有 2% 葡萄糖存在时, JR 类菌瓶的乙炔还原活性为 5330.4nmolC₂H₄/h, 每克土壤干重的菌数为 1.89×10^6 ; ZZ₁₂ 菌每瓶乙炔还原活性为 1421.7nmolC₂H₄/h, 每克土壤干重的菌数为 3.51×10^8 ; 而土壤中不加葡萄糖时, 两菌株均无乙炔还原活性, 每克土壤干重菌数分别为 1.93×10^5 和 3.84×10^6 。

表1 葡萄糖对土壤接种菌的乙炔还原活性及菌数的影响

	加葡萄糖 (2%)		不加葡萄糖	
	JR ₁	ZZ ₁₂	JR ₁	ZZ ₁₂
乙炔还原值	5330.4	1421.7	0	0
C ₂ H ₄ nmol/瓶·h				
菌数	1.89×10^6	3.51×10^8	1.93×10^5	3.84×10^7
细胞数/g土				
壤干重				

所有值均为5个重复平均值。

3 讨论

固氮作用在田间固氮时受到多种环境因子的制约, 如各种微量元素、微生物间的竞争、空气中的氧气, 土壤中有有机氮和化合态氮及土壤中能提供给菌固氮所用的碳源。此次实验初步探讨了四种环境因子对固氮作用所引起的影响。

兼性厌氧或好氧的固氮菌其固氮酶对氧气

敏感, 但为了维持菌体正常生长和呼吸代谢水平, 又必需要适量的氧^[6]。本次实验 3 菌株在有少量氧气存在时具有最高乙炔还原活性也证实了这一点。少量酵母膏的存在使 3 菌株对氧气的耐受性增加, 这是否表明少量有机氮源的存在能降低氧气对固氮酶的抑制作用, 其机理有待于进一步研究证实。

无机氮源硝酸盐和铵盐对 3 菌株的乙炔还原活性的影响是不同的。JR₁ 和 ATCC 35681 对高浓度的硝酸盐有一定的耐受性, 这与它们缺乏硝酸盐还原酶有关, 但这 2 菌株的乙炔还原活性与铵盐浓度相关, 铵盐浓度 0.02% (3.1mmol/L) 时, 具有最高乙炔还原活性, 这表明少量铵盐的存在不仅有利于菌体的生长, 而且有利于固氮作用。ZZ₁₂ 菌株对硝酸盐和铵盐的反应不同于 JR₁ 和 ATCC 35681, 可能有不同的固氮酶影响机制。

参 考 文 献

- [1] Hino S, Wilson P W. J Bacterio, 1958, 75:405~408.
- [2] Abedel Wahab A M. Z Allg Microbiol, 1980, 20: 487~494.
- [3] Changway C P, Holl F B. Soil Biol Biochem, 1990, 22(6):789~795.
- [4] Piesrson E A, Weller D M. Phytopathol, 1994, 84(9): 940~947.
- [5] Brown M E. Ann Rev Phytopathol, 1974, 12:181~197.
- [6] 李佳格. 固氮酶防氧机制. 见尤崇约主编. 生物固氮. 1987, 71~80.