

# 甘蔗固氮内生菌——重氮营养醋杆菌的研究进展\*

陈丽梅 樊妙姬 李 玲

(广西大学 南宁 530004)

关键词: 重氮营养醋杆菌, 联合共生固氮菌, 甘蔗

中图分类号: Q939.11 文献标识码: A 文献编号: 0253-2654(2000)-01-063-04

在巴西,许多地区甘蔗的栽培已有几十甚至几百年的历史,尽管氮素供应明显不足,但甘蔗的产量和土壤中的氮素储备并没有随时间的推移而下降。认为甘蔗可能得益于生物联合固氮。通过氮平衡和 $^{15}\text{N}$ 技术已证明生物的联合固氮作用对牧草和甘蔗等农作物的生长有重要的农学意义。认为甘蔗所吸收的氮素中有80%可能来自生物固氮作用,只有少数来自施放到土壤中的化合态氮<sup>[1]</sup>。迄今已从甘蔗根际中分离到11个属的固氮细菌,但是这些存在于甘蔗根际固氮菌的数量都不足以解释发生于甘蔗中的高效固氮作用。对甘蔗与固氮菌的联合共生固氮作用的深入研究发现在甘蔗的根、茎、叶内存在着大量的新型固氮菌—重氮营养

醋杆菌(*Acetobacter diazotrophicus*)<sup>[2]</sup>。这种菌具有强的抗酸能力,又能在高糖环境中生长和保持高效的固氮活性,与甘蔗建立联合共生固氮作用,表现严格的寄主专一性,而且气态氮是它的唯一氮源。许多国家的学者从当地分离该菌,如从古巴、墨西哥和澳大利亚的甘蔗地中分离到该菌种。学者们对该菌进行了多方面的研究,如生态学、生理学、生物化学和分子遗传学研究,特别是该菌与甘蔗植物间相互作用的分子生物学研究

---

\* 国家农业部“948”办、广西区农业厅和广西区教育厅资助项目

收稿日期: 1998-12-15, 修回日期: 1999-06-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

及其对甘蔗的固氮及增产作用,成为生物固氮研究中的重要课题。本文将对重氮营养醋杆菌的研究概况进行介绍。

## 1 重氮营养醋杆菌的形态和生理生化特性

重氮营养醋杆菌是一种需氧的杆菌,大小约 $0.7 \times 2 \mu\text{m}$ ,尾部圆形,革兰氏阴性,靠1~3条侧生鞭毛运动,在通气的半固体培养基中生长时能固氮,生长1~2d之后可形成表面菌膜,以 $\text{N}_2$ 为生长时的唯一氮源,在始发生长后,在液体培养基中不固氮,除非加入起始剂量的氮,可利用酵母氮。在液体培养基中依靠化合的氮源生长良好,不含硝酸还原酶,在高浓度硝酸盐中(10mol/L)也能固氮。在呼吸代谢过程中,以氧为最终电子受体。生长的最适温度约 $30^\circ\text{C}$ ,最适pH为5.5, pH7.0时不能生长。过氧化氢酶阳性,氧化酶阴性。可使半胱氨酸形成 $\text{H}_2\text{S}$ 。在有机酸(如苹果酸、琥珀酸、乙酸、柠檬酸或乳酸)中生长不好,但可氧化乙酸和乳酸为 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ 。高浓度(10%)的蔗糖是生长和固氮的最好碳源(这正好是蔗汁的通常情况),在蔗糖浓度高达30%时仍可生长,但达35%时不能生长,在生长过程中会产酸,最后使其周围环境的pH达3.0以下,在这样酸的环境中它仍可生长和固氮,可见重氮营养醋杆菌有着极强的耐酸性,是一种耐酸的固氮菌。它还可利用葡萄糖、果糖和乳糖。在30%的葡萄糖中也可生长和固氮<sup>[3]</sup>。此外它在生长过程中也可利用乙醇(1%)、甘露醇和甘油。在含乙醇的培养基中产酸,在含甘油培养基中也有些酸产生。在含糖10%的马铃薯培养基平板上生长可形成深棕色菌落,它所合成的棕色色素不能扩散,在含溴香草酚蓝的贫氮培养基(20mg酵母提取物/L)平板上生长可形成深橙色菌落<sup>[3]</sup>。

分离该菌时要用富集的方法。首先采集甘蔗的根和茎样品,在搅拌器中搅碎后浸渍离析,在5%的蔗糖水溶液中逐步稀释,接种在不同的LGI富集培养基中于 $28^\circ\text{C}$ 培养3~4d。继代培养10次,每次2~3d,在半固体的稀释蔗汁培养基进行纯化培养,接着再放入无氮含糖10%的培养基(用醋酸调pH至4.5)中纯化,获得的重氮营养醋杆菌的分离物,再经过含 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 和0.2%酵母膏的纯化培养基检查,在半固体的蔗糖富集培养基上进行乙炔还原作用的测定,最后将分离到的纯培养物置于纯化培养基斜面上储藏,每月转接一次<sup>[3]</sup>。由于重氮营养醋杆菌的生长比假单胞菌和固氮菌等慢,

所以不能用直接划线的方法分离它,需经过几代的重复继代富集培养,最后划线于分离培养基上,48h后才形成肉眼可见的菌落,5~6d后菌落直径可达3~4mm。在分离培养基中对碳源物质的选择及pH的确定是分离重氮营养醋杆菌的过程中最关键的环节,此外,重复的继代培养也是筛选该菌的必需步骤。

从6株甘蔗重氮营养醋杆菌(PR2, PAL3, PAL5, PAL4, PR14, PR20)中,用苯酚-水溶液萃取和超速离心法分离纯化脂多糖,通过SDS-PAGE观察分析每个菌株中有关的大分子,表明它们都含有一条含氧侧链。用比色分析、气液相色谱分析和质谱分析相结合的方法测定,结果表明每种脂多糖的核心部分和脂类A组分在所有菌株中都是相似的,含有3-脱氧-D-甘露糖(型)-辛酮糖酸,葡萄糖胺、脂肪酸(16-0, 3-OH-14, 2-OH-16; 0, 3-OH-16:0),中性糖组分分析说明6-脱氧己糖(鼠李糖和岩藻糖)及核糖占优势,仅次于己糖(包括葡萄糖、乳糖、甘露糖),6-脱氧己糖和含有侧氧链的核糖可作为区分重氮营养醋杆菌和其他醋杆菌的指标<sup>[4]</sup>。

## 2 重氮营养醋杆菌在甘蔗中的分布情况及侵染过程

用酶联免疫反应(ELISA)的专一性可对重氮营养醋杆菌进行鉴定和计数。通过ELISA法测定结果表明每克干重的蔗根、根际土壤、叶及茎中存在 $10^6 \sim 10^7$ 个菌株,在非根际土壤中只有极少数的重氮营养醋杆菌群体,这些细菌群体需用半固体的蔗糖培养基富集之后才能用ELISA检出。但即使经过半固体的蔗糖培养基富集之后在蔗田的杂草中也未发现有重氮营养醋杆菌群体。认为该菌的主要生境为甘蔗的根际、蔗根及蔗茎。用从栽培于大田的甘蔗中分离到的重氮营养醋杆菌接种甘蔗,接种4、7d之后,用电镜观察可看到根表面被 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 棒状的细菌所覆盖;9d之后细菌的数量迅速增加;15d后达高峰,此时在根和茎的基部外表可见细菌群的存在,在侧根与主根的连接处特别多,根尖的根冠细胞松弛,这可能是细菌进入根组织的部位,表皮细胞内也有细菌存在,而且这些细胞仍是完好无损的,茎基部的木质部导管也有细菌存在,细菌通过粘液的作用附着于导管内加厚的次生螺旋状结构上。此时细菌的大小也增至 $0.2 \sim 2.0 \mu\text{m}$ 。细菌通过粘液性物质粘在根表,类似于Levolnony和Boshan在固氮螺菌侵染禾本科中观察到的情形<sup>[5]</sup>,细菌的吸附是随机的,无方

向性,在根表形成单层结构,在细胞间隙聚集。用光镜、扫描及透射电镜观察发现甘蔗组织间隙有接种菌的存在,免疫标记证明它们是接种的重氮营养醋杆菌。细菌在木质部中的存在并未引起任何的病变反应。认为重氮营养醋杆菌首先群集于根、茎的基部的表面,然后通过根尖和侧根与主根的连接处进入甘蔗体内,通过蒸腾流的作用扩散到整个植株。成熟的植株中木质部导管可能是重氮营养醋杆菌固氮的场所,因为它可提供固氮酶维持固氮活性所需的低氧分压和足够的能源物质-蔗糖等<sup>[6]</sup>。

重氮营养醋杆菌也被认为是甘蔗的固氮内生菌(Endophytic-diazotroph)<sup>[7]</sup>。实验证明甘蔗茎薄壁组织细胞间隙被一种液体充满,这种液体可在无菌条件下通过离心方法分离出来它的蔗糖含量为12%,pH5.5。在甘蔗组织的质外液体中有活的固氮内生菌存在,这种液体可能是这些内生菌生长所需的最佳培养基,这种质外液体占整株甘蔗重量的3%,每公顷甘蔗约含有3t这样的液体,这种含有重氮营养醋杆菌的质外液体所占的体积足以解释为什么有些甘蔗的栽培种可不那么依赖化学氮肥而生长良好。认为通过对植物组织的质外液体的成分进行遗传操作有可能为内生菌与其他农作物建立类似的共生关系提供有利条件<sup>[8,9]</sup>。

### 3 重氮营养醋杆菌的固氮作用

巴西的甘蔗栽培种(*Saccharum officinarua*)可与重氮营养醋杆菌形成有意义的联合固氮作用已被证实。至今还未在甘蔗中发现固氮和固氮产物转移的场所,也未发现明显的共生结构。重氮营养醋杆菌一般只与富有蔗糖的植物如甘蔗,而不与其它禾本科植物联合共生。认为重氮营养醋杆菌可能不能利用一些有机酸和氨基酸类物质,而这些酸类物质正是许多其它禾本科植物分泌物的主要成分,也是其它根际微生物利用的主要能源物质。重氮营养醋杆菌的主要碳源物质是蔗糖,它偏爱高糖浓度,10%为其生长和固氮的最适浓度。它存在于甘蔗的根际及蔗根、茎、叶中,这些地方的蔗糖浓度极高。实验证明重氮营养醋杆菌与甘蔗的联合固氮作用表现出严格的寄主专一性。用植物-微生物相互作用的模拟系统证明了重氮营养醋杆菌所固定的氮素,有将近一半以上可转移给与它一起混合培养的植物,重氮营养醋杆菌的生物固氮作用对甘蔗的生长可能有较重要的作用<sup>[10]</sup>。此外还发现重氮营养醋

杆菌不含硝酸还原酶,可在空气中连续固氮,其固氮作用不受 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 的抑制,在硝酸盐存在的情况下仍能固氮。该特性是重氮营养醋杆菌所具有的重要的、有利用价值的、非同寻常的生理特性。

### 4 重氮营养醋杆菌的分子遗传学

将编码重氮营养醋杆菌呋喃果聚糖转化酶(EC2.4.1.10)(*IsdA*)基因从甘蔗重氮营养醋杆菌SRT4的基因文库中分离出来,已确定该基因中2.3kb的DNA片段足以互补EMS处理获得的呋喃果聚糖转化酶缺陷型突变体。*IsdA*基因(175bp)编码的多肽分子量为64.9kD,其等电点为5.2,对胞外合成的呋喃果聚糖转化酶蛋白分子的N末端氨基酸序列分析说明该酶的前体分子中可能含有一段51氨基酸残基的信号肽,后来在加工的过程中被切断,将*IsdA*基因置于大肠杆菌乳糖操纵子的启动子后面时该基因在大肠杆菌中可表达产生有活性的呋喃果聚糖转化酶蛋白,其氨基酸序列与革兰氏阴性细菌*Zymomonas mobilis*及*Erwinia amylovora*的呋喃果聚糖转化酶分别有48%、40%的同源性,与革兰氏阳性细菌仅有28%~31%的同源性。分析表明这些细菌的呋喃果聚糖转化酶结构中有8个保守的序列,这些保守的序列中有些可能和它所催化合成的产物特性有关。分离了重氮营养醋杆菌的*IsdA*基因突变体,该突变体合成的呋喃果聚糖转化酶无活性,并且失去利用果糖作为碳源的能力,认为该酶在重氮营养醋杆菌蔗糖代谢中起关键酶的作用<sup>[11]</sup>。

通过对12种酶的电泳迁移率的测定鉴定了总共55种重氮营养醋杆菌的分离物,这些分离物来自与它们进行联合共生的多种富含蔗糖的寄主植物及与甘蔗联生的粉蚧,据测定结果可将它们分为7种不同的电泳类型(ETS),其中的6种亲缘关系较近,变异幅度分布在一个0.195单位的遗传图距内,它们的DNA-DNA间表现出具有高度的同源性,第7种ET的变异幅度较大,与上述6种类型的遗传图距相隔0.53个单位,与参照菌株的DNA只有54%的同源性,相应于第7种ET类型的菌株可代表重氮营养醋杆菌中一个远缘的种,从巴西栽培蔗中分离到的菌株比从墨西哥栽培蔗中分离到的菌株具有更大幅度的遗传多样性,可能是由于使用不同的氮肥水平所致<sup>[12]</sup>。

已证明从墨西哥、巴西各地采集到的甘蔗栽培品种中分离到的重氮营养醋杆菌有限的遗传多样性

(limited genetic diverdity)<sup>[13]</sup>。在所分离到的24种重氮营养醋杆菌中有20种含质粒,质粒的分子量大小为2.0~170kb,有2个质粒在所检查的分离物中是高度保守的,其中20~24kb的质粒存在于20种含质粒的分离物中,170kb的质粒仅存在于14种含质粒的分离物中,170kb的质粒仅存在于14种含质粒的分离物中,认为所有分离菌株的染色体上均有一个公共的*nif*结构基因模式<sup>[13]</sup>。用基因功能互补法已从重氮营养醋杆菌中分离了含*nif*基因(包括*nifA*、*nifKDH*、*nifB*、*nifE*、*nifV*、*nifR3*及*ntrBC*)的克隆,这些基因与其他固氮菌的相应的固氮基因有高度的同源性。

通过插入突变已获得一个*nifD*的突变体,分离突变的*nifD*基因,重新导入野生型重氮营养醋杆菌PAL5中,由此获得的菌株不能在缺氮的条件下生长,不能将乙炔还原为乙烯,即为*Nif<sup>-</sup>*突变体,用通过组织培养获得的甘蔗无菌苗做接种试验,表明*Nif<sup>-</sup>*突变体和野生型菌株均可通过根损伤的部位进入植物体内,电镜扫描观察表明该突变体在缺氮的培养基中培养时不能在甘蔗的茎、叶组织中繁殖,而野生型却可以。但在培养基中添加少量硝酸铵时此突变体即可在甘蔗的根、茎、叶等组织中繁殖。

### 参 考 文 献

[1] Urquiaga S, Cruz K H S, Boddy R M. Soil Sci

Soc Am J, 1992, 56:105~114.

- [2] Adimir M, Cavalcante A, Dobreiner J. Plant and Soil, 1988, 108:23~31.
- [3] Gillis M, Kersters K, Hoste B *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1989, 39:361~364.
- [4] Fontaine T, Stephan M P, Debarbieux L *et al.* FEMS, 1995, 132(1/2):45~50.
- [5] Levanony H, Bashan Y, Romane B *et al.* Plant and soil, 1989, 117:207~218.
- [6] James E k, Reis V M, Olivares F L *et al.* J of Experimental Botany, 1994, 45:(275):757~766.
- [7] Dong Z, Canny M, McCully M F *et al.* Plant Physiol, 1994, 105:1139~1147.
- [8] Dong Z, Heydrich M, Bernard K *et al.* Appl environ microbiol, 1995, 61(5):1843~1846.
- [9] Dong Z, Canny M J, McCully M E *et al.* Plant physiol, 1994, 105(4):1139~1147.
- [10] Lima E, Boddey R M, Dobreiner J. Soil biol biochem, 1991, 23:999~1002.
- [11] Arrieta J, Hernandez L, Coego A *et al.* Microbiol Reading U. K, 1996, 142(5):1077~1085.
- [12] Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramirez L E, Reis V M *et al.* Appl environ microbiol, 1995, 63(8):3008~3013.
- [13] Caballero-Mellado J, Martinez-Romero E. Appl environ micro-biol, 1994, 60(5):1532~1537.