

# 生物固氮研究中乙炔还原法的应用

罗 贤 安 涂 安 千\*

(西北水土保持生物土壤研究所,武功)

近年来广泛应用乙炔还原法检测固氮酶活性,方法灵敏简捷,对生物固氮的研究起了很大促进作用。

我们就该方法的可靠性和代表性,进行了有关操作的条件试验和根瘤采样分析的代表性试验。

## 材料与方 法

### 一、自生固氮菌菌种

棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*) 230: 由中国科学院林业土壤研究所提供。

2. 圆褐固氮菌(*A. chroococcum*) AS 1.221: 由中国科学院微生物研究所提供。

3. 圆褐固氮菌3013: 由西北农学院提供。

4. 根瘤大部分采自大田, 试验小区和盆栽。

### 二、检测仪器与载体

检测乙炔乙烯的仪器有 SP-02 型气相色谱仪和氢离子化鉴定器。用 GDX-501 作为色谱柱载体。氮气作为载气,其流量为 30 毫升/分,氢气流量为 27 毫升/分,空气流量为 320 毫升/分。炉温 90℃。在这种条件下进行分离时,乙炔保留时间为 3 分零 5 秒,乙烯保留时间为 2 分零 2 秒。

### 三、方 法

1. 测试固氮菌的固氮酶活性: 将自生固氮菌的斜面菌种接种到摇瓶,30℃培养 24—28 小时,取 1 毫升菌液测定乙炔还原活性。

2. 测试根瘤固氮酶活性: 将新鲜根瘤样品洗净,除去过剩水分,放入带塞血清瓶或大试管

中,注射一定量的乙炔气体,于 28℃ 振摇半小时以上测定产生的乙烯量。测定后将根瘤放入 80℃ 烘箱,烘 16 小时称取干瘤重。

## 实验与结果

### 一、乙烯定量方法的确定

对乙烯的定量,最初我们采用标准曲线法(即配制不同浓度的标准乙烯气体,在色谱仪上测得相应的乙烯峰高值绘制成乙烯标准曲线,根据标准曲线推算样品乙烯含量)。后来发现随着色谱柱使用时间的延长,柱上载体吸收水分相应增加,致使乙烯乙炔的半峰宽和保留时间发生变化。如果单以峰高计量而不经常校正标准曲线将发生计算上的很大误差。因此我们改用面积归一化法计算,这种方法虽然较为麻烦,但由于计算的基础是乙炔和乙烯的峰面积之比,只要严格掌握注入的乙炔量,对于所用容器的体积和色谱柱的进样量都不用十分精确定量。由于计算时使用了半峰宽值,因此,即使保留时间或半峰宽发生了变化,也不影响定量结果。计算步骤如下:

1. 校正色谱仪“输入衰减”各挡的实际转换倍数: 配制一定浓度的乙炔乙烯混合气体。用这种混合气体在“输入衰减”各挡测定其相应的峰高值,用此峰高值算出各挡之间的实际转换倍数。

2. 将测定样品(根瘤、自生固氮菌)所量得的乙炔乙烯峰高按“1”项的“输入衰减”各挡的倍数换算成同一灵敏度的相应值。

3. 将“2”项所得数据按下式计算:

\* 本所陈凡同志协助完成气相色谱的测定。

乙烯所占面积比(A)= $\frac{[\text{乙炔峰高(毫米)} \times \text{半峰宽(毫米)}]/1.02^*}{[\text{乙炔峰高} \times \text{半峰宽}]/1.07^* + [\text{乙烯峰高} \times \text{半峰宽}]/1.02}$

还原产生乙烯微克分子/克干瘤= $\frac{\text{反应开始时注入乙炔微升数} \times A}{22.4 \times \text{根瘤重}}$

4. 面积归一化法的准确性: 用面积归一化法测定根瘤还原产生的乙烯量(以 10% 的体积比注入乙炔,保温振荡 1 小时测定), 所得结果见表 1。可见所得测定结果较为理想。

表 1 面积归一化法计算乙烯量

根瘤号		乙 烯				乙 炔				乙烯和乙炔峰面积和(毫米 <sup>2</sup> )	乙烯面积所占(%)	注入乙炔量(微升)	产生乙烯量(微升)	产生乙炔微克分子	平均值	相对误差(%)
		峰高(毫米)	输入衰减	半峰宽(毫米)	峰面积(毫米 <sup>2</sup> )	峰高(毫米)	输入衰减	峰高乘转换倍数	半峰宽(毫米)							
50	1	15	1000	1.5	22.05	35	100	449.75	2.05	861.67	883.72	2.50	1000	25.0	1.116	4.21
	2	70	1000	1.5	102.94	153	100	1966.05	2.05	3766.73	3869.67	2.66	1000	26.6	1.187	1.16 2.06
	3	53	1000	1.5	77.94	116	100	1490.60	2.05	2855.82	2933.76	2.66	1000	26.6	1.187	2.06
65	1	117	1000	1.5	172.05	121	100	1554.85	2.05	2978.92	3150.97	5.46	1000	54.6	2.44	0.81
	2	124	1000	1.5	182.35	127	100	1631.95	2.05	3126.63	3308.98	5.51	1000	55.1	2.48	2.46 0.81
	3	119	1000	1.5	175.00	122	100	1567.70	2.05	3003.54	3178.54	5.51	1000	55.1	2.48	0.81

二、乙炔还原法测定时的条件试验

主要对比不同配气比例对乙炔还原的影响。

1. 氧分压对乙炔还原的影响: 将 1 毫升菌液或几个根瘤放入 10 毫升血清瓶中, 抽成真空, 通入 0.1 大气压的乙炔, 不同分压的氧气, 再以氩气补足为一个大气压。30℃ 振荡 2 小时测定产生的乙烯量。经多次测定最适氧分压在 0.07—0.12 范围内, 取其平均, 一般采用 0.10 氧分压。

2. 乙炔分压对乙炔还原的影响: 按同上方法, 固定氧分压为 0.1 大气压, 用不同分压的乙炔, 振荡 3 小时测定产生的乙烯量。在乙炔分压的对比试验中, 经过多次测定乙炔的最适量为 0.1 大气压, 乙炔的用量超过 0.1—0.15 大气压时, 对乙烯产生的初速度发生抑制作用。尤其当乙炔量用到 0.2—0.3 大气压时发生明显的抑制作用(见图 1)。这种抑制作用因每次菌液的培养情况、菌体量的不同而异。有时乙炔在 0.15 分压或 0.2 分压, 有时小到 0.1 分压就发生抑制。我们认为这是底物对反应的抑制作用。

在乙炔还原或乙烯的反应中, 当底物浓度

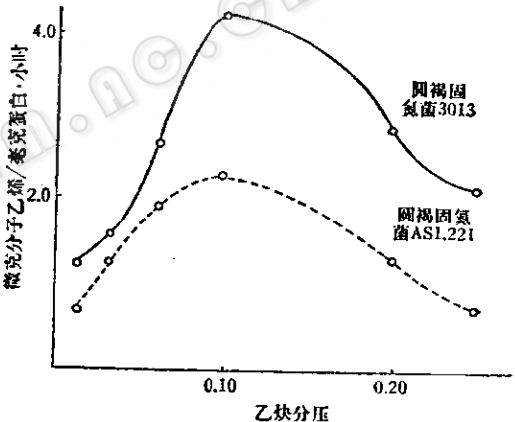


图 1 乙炔分压对乙炔还原的影响

不大时, 该反应符合 Michaelis-Menten 定律。按 Lineweaver-Burk 法以 1/V 对 1/S 作图得到 1.221 圆褐固氮菌的米氏常数为 20 微克分子, 3013 圆褐固氮菌的米氏常数为 47.62 微克分子, 棕色固氮菌 230 的米氏常数为 30.3 微克分子。

从上述结果看乙炔还原法的适宜配气比为乙炔: 氧: 氩 = 0.1: 0.1: 0.8。为了适应一般实验室的条件, 利用空气进行测定也是可以的(测定时将样品装入血清瓶, 抽出 10% 的空气, 注入 10% 的乙炔加以振荡培养即可测定)。因空

\* 此为经验系数。

气中的氮气对乙炔还原具有竞争性抑制作用，所以测定结果常偏低。

3. 乙炔还原反应的时间过程与振摇培养时间的选择：在试验中发现根瘤和自生固氮菌所引起的乙炔还原反应达到平衡时所需的时间不同。因根瘤中含菌量大，反应快，振摇很短时间（半小时以上）就可看出各菌种间的差别 [见图 2(a)]；虽然达到平衡需要 10—20 小时 [见图 2(b)]，但由图 2 来看根瘤引起的反应在开始 2—3 小时内产生的乙烯急速增加，以后逐渐缓慢，18 小时以后渐趋平衡。反应到 48 小时乙炔量并未有所增加。

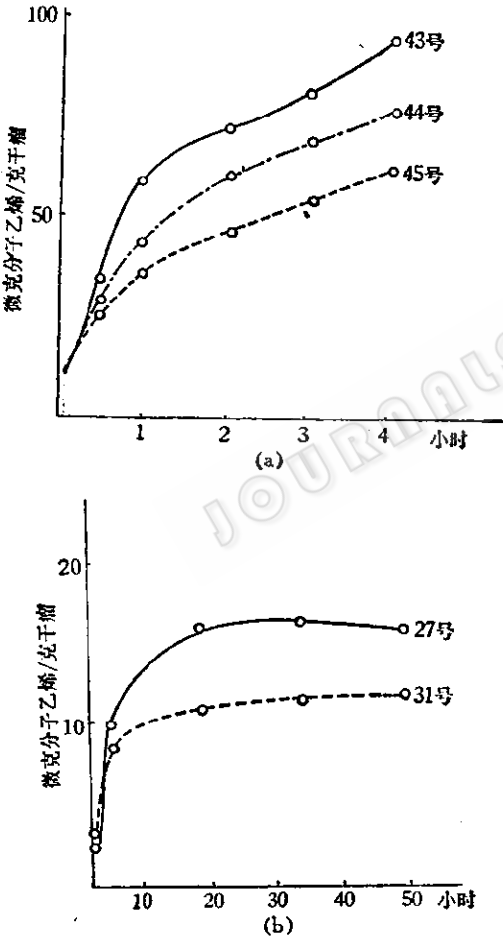


图 2 大豆根瘤还原乙炔的时间过程

自生固氮菌的乙炔还原反应达到平衡时所需的时间比根瘤长得多，而且与培养物的含菌量密切相关。如菌体在 6000 万/毫升以下，反

应 24 小时只能产生痕迹量的乙烯。必须反应 5 小时以上才能看出菌种间的差别。如果培养物含菌量高时 (见图 3) 在开始反应 6 小时内反应速度增加最快，其后渐缓，反应 48 小时尚未达到平衡。

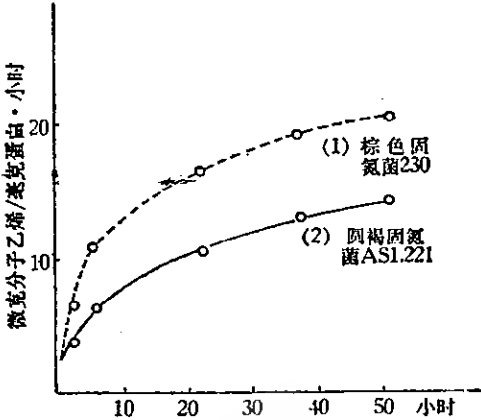


图 3 自生固氮菌还原乙炔的时间过程

三、抽样分析的可靠性

由于豆科植物个体之间的差异，表现在根瘤的固氮酶活性测定结果上差别也较大。采样分析能否代表某一田块上的某一菌种的固氮酶活性？怎样采样才能有充分的代表性？针对这些问题我们进行了如下试验。

在紫云英 89 号菌种的冬前田块上采集几十株植株。根据植株大小和根瘤多少，各选 1—2 株植株的根瘤作为一个单样。共分析了 42 个单株，其算术平均值为 37.07 微克分子/克干瘤。

42 个样本的标准离差  $S=15.29$  微克分子理论平均值  $\mu$  的区间估计：

设概率为 0.05，则自由度为 41 的  $t$  值为 2.021

置信区间  $= \bar{X} \pm t_{0.05} \cdot S_x$

$$S_x = \sqrt{\frac{S^2}{n}} = 2.36$$

$$\mu \text{ 之置信范围为 } 37.07 \pm 2.021 \times 2.36 \\ = 32.30 - 41.84 \text{ 微克分子}$$

即 89 号菌种的根瘤固氮酶活性如测定值在 32.30—41.84 微克分子/克干瘤范围内可有 95% 的可靠性。如表 2，四组测定采用每组 6 次重复，结果其平均值都在置信范围内。

表 2 四组重复六次的根瘤固氮活性

重复次数	组 <sub>1</sub>	组 <sub>2</sub>	组 <sub>3</sub>	组 <sub>4</sub>
1	18.50	28.66	43.70	57.13
2	24.62	22.37	22.01	26.24
3	29.89	44.26	51.61	44.25
4	35.86	38.59	25.43	31.24
5	46.26	30.16	27.81	18.62
6	68.75	54.70	58.41	20.16
算术平均值	37.31	36.45	38.16	32.94

同样在 89 号田块上采样测定另外四组, 每组三次重复, 其每组平均值为 39.40, 40.55, 30.49, 29.17。除第 1、2 组的平均值在置信范围内外, 3、4 组平均值都不在置信范围内。因此减少重复方法可靠性就要减少。如果一次测定大量地块的样品, 可采用下述方法: 取容积 40 毫升以上的大试管装入 4—8 株植物主根部分的根瘤塞上橡皮塞, 密封, 注入 10% 的乙炔, 振摇 1 小时后测定。由于测定的根瘤量大, 所得结果基本满意。例如我们在上述同一时期于同一 89 号田块上; 按上法采样测得 8 株混合样的根瘤固氮活性 (微克分子/克干瘤) 为 35.86, 41.77,

29.38。4 株混合样的根瘤固氮活性 (微克分子/克干瘤) 为 41.14, 29.23, 31.27。

#### 四、乙炔还原法测定的固氮酶活性与植物含氮量的相关性

用乙炔还原法测定的根瘤固氮酶活性的大小能否在植物含氮量的高低上有所反映? 我们针对这个问题利用盆栽的紫云英进行了两次根瘤乙炔还原活性与全植株含氮量 Kjeldahl 氏法的相关分析。得到相关系数各为 +0.6475 与 +0.6803, 达到了 1% 机率的显著水平。

#### 参 考 文 献

- [1] Hardy, R. W. F., R. D. Holsten and E. K. Jackson: *Plant Physiol.*, 43:1185, 1968.
- [2] 上海植物生理研究所固氮研究室: 植物学报, 16 (4): 382, 1974.
- [3] Koch, B. and H. J. Evans: *Plant Physiol.*, 41: 1748—1749, 1966.
- [4] Bergerson, F. J.: *Proc. Roy. Soc. Bri.*, 172: 401—416, 1969.
- [5] Bergerson, F. J.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 18:1—9, 1965.
- [6] Bergerson, F. J.: *ibid*, 23:1015—1025, 1970.