

含脂刚螺菌固氮能力的测定*

黎耀辉 林木兰 孙松柏 蔡金芝

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

共生固氮菌对农业生产作出的贡献, 已众所周知, 而自生固氮菌尽管研究已近百年, 但至今未对生产起什么作用。七十年代初期, Döbereiner等^[1]提出含脂刚螺菌 (*Spirillum lipoferum*) 与禾本科植物联合固氮的概念以后, 引起了人们广泛的注意^[2-4]。有报道估算含脂刚螺菌在玉米地的固氮潜力每公顷每天可达2公斤氮

素^[3], 但至今还没有令人信服的试验能以证明它的增产作用^[4], 我们在1977年做的试验也是如此^[2]。当然, 影响菌肥效果的因素很多, 可以从各方面进行研究。本文拟通过含脂刚螺菌在氮代谢和能量代谢方面的研究结果来说明其应

* 本文承蒙陈华癸教授审阅, 并提出宝贵意见, 谨致谢意。

用于生产的可能性。

结果与讨论

材料和方法

1. 菌种: 我们选用了五个固氮酶活性较高的刚螺菌菌株, 计有 S.P.₇ (ATCC 29145), SP81, SP 82 (三株菌均由巴西学者分离), 99 (本所在武汉分离而得) 和 224 (本所在南宁分离而得)。所用对照菌 *Azotobacter* 由华中农学院微生物教研组提供。

2. 培养基: 用 Döbereiner 苹果酸钠半固体培养基, 但为了测定菌体蛋白比色方便, 有些不加 B. T. B. 指示剂, 而且琼脂用量也降低到 0.2 克/升。脱氮试验用加硝酸盐的 NFb 培养基^[5]。试验均用容积为 28 毫升疫苗瓶作为培养容器。

3. 测定方法: 固氮酶活性和氢酶活性测定均按作者常用的方法——气相色谱法^[6]进行, 但为了提高测定速度, 在测氢酶活性时柱温提高到 160°C; N₂O 测定也用 0.5 米长以 TDX-01 为担体的色谱柱, 柱温 152°C, 载气用 H₂, 流量 40 毫升/分, 电流 190 mA。

蛋白质测定用 Folin 氏比色法^[7], 苹果酸测定用圆形纸层析法^[8], 展层剂为苯: 甲醇: 醋酸 (45:8:4), 显色剂为溴甲酚紫^[9]。铵的测定用纳氏试剂比色法。

1. 铵的分泌: 共生固氮体系能够源源不断地给寄主植物提供氮素是因为它能向菌体外分泌铵。而自生固氮菌和含脂刚螺菌则未发现这种功能^[10], 我们将 81, 82, 99 和 224 四个代表性菌种, 用无氮和含有 NH₄Cl (0.8 mg/ml) 的 Döbereiner 培养基, 在 30°C 下培养 72 小时后, 按无菌操作换橡皮塞密封, 注入 10% 乙炔, 培养 24 小时后测定固氮酶活性, 随即将菌液用 4000 r. p. m. 离心, 取上清液测铵。菌体蛋白用 1 N NaOH 在 80°C 水浴上水解 100 分钟后用 Folin 氏法测定。结果见表 1。

表 1 在不同培养基中含脂刚螺菌分泌铵的能力

培养基	菌种	菌体蛋白 (μg/瓶)	NH ₄ ⁺	固氮酶活性 nM/h·mg 蛋白
Döbereiner 无氮培养基	81	32.5	-*	86.105
	82	55.5	-	59.054
	99	54.5	-	43.567
	224	41.5	-	80.836
添加 0.8 mg/ml NH ₄ Cl 的 Döbereiner 培养基	81	65.0	+	0
	82	61.5	+	0
	99	76.0	+	0
	224	61.5	+	0

*“-”代表测不出 NH₄⁺, “+”代表能测出 NH₄⁺

从表 1 可以看出: 在无氮培养基中, 尽管

表 2 含脂刚螺菌的脱氮能力

菌种	培养基含硝酸铵 0.8 g/L			培养基含硝酸铵 0.08 g/L		
	脱氮量 (以 N ₂ O 计, μM/瓶)		固氮酶活力 (nM/瓶·天)	脱氮量 (以 N ₂ O 计, μM/瓶)		固氮酶活力 (nM/瓶·天)
	2 天后	4 天后		2 天后	4 天后	
81	104.5	247.0	0	19.0	9.5	1631.2
82	76.0	213.8	0	19.0	11.9	1001.9
99	9.5	2.38	0	0	0	778.3
224	7.1	4.75	0	0	0	387.2
S.P. ₇	255.6	255.6	0	21.4	14.3	1997.4

这四个菌种都生长良好, 但无铵分泌出。而在有 NH₄⁺ 的培养基中, 即失去固氮酶活性。看来指望含脂刚螺菌向植物直接供氮的设想可能是不现实的。

2. 脱氮: 固氮给农业生产带来好处, 而脱氮则给农业生产带来危害。1977 年 Neyra 和

Döbereiner^[5] 的工作证明, 有部分含脂刚螺菌具有使硝酸盐还原成 N₂ 的能力。我们曾将这五株含脂刚螺菌接种在添加了硝酸盐的 NFb 培养基中, 随即加橡皮塞密封, 并注入 10% 乙炔, 30°C 培养, 2 天和 4 天后用气相色谱仪测定 N₂O 和固氮酶活性。结果见表 2。

由表 2 可以看出：在硝酸盐浓度较低时，只发现 81, 82, S.P₇ 三个菌种脱氮。而在高浓度硝酸盐存在时，则五个菌种都具有脱氮能力。而且 81、82 和 S.P₇ 这三个菌种，4 天后几乎将可脱之 NO₃⁻ 态氮消耗殆尽。不仅如此，而且在高氮供应时含脂刚螺菌没有固氮活性。

3. 氢酶活性：1976 年 Evans 指出有些固氮微生物含有氢酶，能将固氮酶在固氮时放出的 H₂ 吸收进行再利用，因而节省了固氮能量^[11]。我们用上述五个代表性刚螺菌，连同自生固氮菌 (*Azotobacter*) 一起，从放氢和吸收氢两个角度研究了氢酶的活性。

① 氢的释放：将上述五个代表性菌种，分别接种在 Döbereiner 半固体培养基上，在 28—30℃ 培养一天半后，换橡皮塞密封，各菌都分为

表 3 含脂刚螺菌的放氢试验

菌种	加 20% 乙炔		不加乙炔
	放 H ₂ (nMH ₂ /天·毫克蛋白)	固 N 酶活 (nM/天·毫克蛋白)	放 H ₂ (nMH ₂ /天·毫克蛋白)
81	84.13	265.8	0
82	98.19	247.4	0
99	23.45	307.5	0
224	19.6	234.6	0
S.P ₇	49.90	210.8	0

加 20% 乙炔抑制剂和不加乙炔两个处理，再培养三天后用气相色谱仪测定固氮酶活性和 H₂ 的释放。结果见表 3。

可以清楚的看到：含脂刚螺菌在不加乙炔抑制氢酶时测不出 H₂，加入 20% 乙炔只测出了 H₂ 的少量释放。我们曾加 40% 乙炔抑制氢酶时，结果仍未达完全抑制，放 H₂ 量仍很小。可见含脂刚螺菌的氢酶活性是相当强的。

② 氢的吸收：为了进一步证明螺菌氢酶吸收氢的能力，我们将五株螺菌和自生固氮菌分别接种在装有 Döbereiner 半固体培养基中，待生长良好后，每瓶注入 0.1 毫升纯 H₂，在 28—30℃ 培养两天后用气相色谱仪测定 H₂ 的吸收情况，测定结果见表 4。

可以看出各菌种都有较强的吸收 H₂ 能力，两天后吸收了注入的大部分 H₂。*Azotobacter* 也同样吸收 H₂。

③ 试验证明：具有氢酶的固氮微生物对提高固氮率有一定影响^[6,12]。含脂刚螺菌的氢酶活性强，吸收的 H₂ 是否对固氮有所贡献，我们也进行了试验；按前述方法将各菌培养一天半后，换橡皮塞密封，各瓶都注入 10% 乙炔，在此基础上又分为注 H₂ 和不注 H₂ 两组，培养

表 4 含脂刚螺菌对氢的吸收

菌种	81	82	99	224	S.P ₇	<i>Azotobacter</i>
注 H ₂ 量 (μM)	43	43	43	43	43	43
两天后 H ₂ 吸收量 (μM)	35.5	36.9	33.6	34.0	35.2	27.9
吸收率 (%)	82.5	85.9	78.1	79.1	81.8	65.0
吸收速率 (μM/天·毫克蛋白)	32.2	23.1	20.7	19.7	26.3	40.6

表 5 含脂刚螺菌吸收氢对固氮的影响

菌种	H ₂ 吸收率 (%)	加 H ₂		未加 H ₂	
		固氮酶活性 (nM/瓶·天)	菌体蛋白 (毫克/瓶)	固氮酶活性 (nM/瓶·天)	菌体蛋白 (毫克/瓶)
81	70.1	342.2	1.18	299.0	1.13
82	69.7	368.0	1.09	274.2	1.08
99	79.9	375.4	1.46	342.2	1.11
224	55.9	346.8	1.26	281.5	1.20
S.P ₇	63.1	306.4	1.21	234.6	1.11

* 本表中 H₂ 吸收率比表 4 普遍偏低，是由于试验批次不同所致。

两天,测定 H_2 的吸收、固氮酶活性和菌体蛋白量,结果见表 5。

由表 5 看出,加氢情况下由于吸收氢作能源,五个菌种在固氮酶活性和菌体蛋白含量两方面都表现有提高的趋势。

4. 刚螺菌的固氮效率: 固氮微生物每消耗 1 克碳源能固定氮素数量是衡量其固氮效率的重要指标, Döbereiner^[1] 曾用凯氏定氮法测定出含脂刚螺菌每消耗 1 克碳源大约固氮 10—25 毫克。我们也用这五个菌株,以苹果酸为碳源进行了测定。方法是用 Döbereiner 半固体培养基,以灭菌后培养基中的苹果酸含量为计算基础(0.0125 克/瓶),用圆形纸层析法测残留苹果酸^[8,9],直至检测不出苹果酸时(约为 200 小时),测定菌体蛋白含量。考虑到刚螺菌不分泌铵、其他形态的氮极少,这样用蛋白质氮就可以大体上代表固氮总量。测定结果见表 6。

表 6 含脂刚螺菌的固氮效率

菌种	菌体蛋白量 ($\mu\text{g}/\text{瓶}$)	蛋白氮 ($\mu\text{g}/\text{瓶}$)	每消耗 1 克苹果酸固氮量 (mg)
81	1793.4	287.0	11.4
82	2316.7	370.6	14.8
99	2213.4	254.2	14.2
224	2420.0	387.2	15.5
S.P ₇	1950.0	312.0	12.5

这个测定结果没有超出 Döbereiner 的测定范围。而自生固氮菌 *Azotobacter* 每消耗 1 克碳源固氮量为 5—20 毫克^[13]。看来含脂刚螺菌

固氮效率并不比自生固氮菌 *Azotobacter* 高。

综上所述,就现有的菌种来看;含脂刚螺菌不分泌铵、不耐铵,能脱氮,尽管氢酶活性较强,但比起 *Azotobacter* 也并不独特。每消耗 1 克碳所固定的氮素并不高。所以,从氮代谢和能量代谢这几个特点看,含脂刚螺菌如不经改造在生产上应用的前景,不会比 *Azotobacter* 强。

参 考 文 献

- [1] Dobereiner, J., Day, J. M.: *In Nitrogen Fixation By Free-living Micro-Organism*, Cambridge Univ Press London and New York, 1975, pp. 39—56.
- [2] 湖北省微生物研究所生物固氮组: *微生物学报* 19 (2): 160—165, 1979.
- [3] Joachim, F. W. von Bulow and Dobereiner: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72: 2389—2393, 1975.
- [4] Tjepkema, J. and P. Derkum: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(2): 626—629, 1977.
- [5] Neyra and Dobereiner: *Can. J. Microbiol.*, 23(3): 300—308, 1977.
- [6] 黎耀辉等: *微生物学报* 20 (2): 180—184, 1980.
- [7] Karl Habel 著,中国科学院微生物研究所病毒学基本技术翻译小组:《病毒学基本技术》,科学出版社,北京,1976,pp.126—127.
- [8] 北京大学生物系生物化学教研室编:《生物化学实验指导》人民教育出版社,北京,1979, p.211.
- [9] Gunter Zvcig: *Handbook of Chromatography* 1: p. 470. 1972.
- [10] Shamagum, et al.: *Ann. Review Plant Physiol.* 29: pp. 263—276.
- [11] Evans. H. J., L. E. Barber: *Science* 197(4301): 332—339, 1977.
- [12] 宋鸿遇等: *植物生理学报* 5 (3): 223—243, 1979.
- [13] Alexander Martin: *Introduction to Soil Microbiol.*, John Wiley a n New York Second Ed. 1977. p. 289.