

玉米、高粱、谷子根表固氮菌的研究

苏巧梅 贺玉成 周鸿宾 杜大至 袁长芳 王毅岩

(山西省生物研究所, 太原)

自巴西学者 J. Dobereiner 发现带脂螺菌与根系联合固氮以来, 这方面研究引起了国际上广泛的重视^[1], 近年来我国也有这方面的研究报告^[2]。

我们从扬花期的玉米、高粱、谷子根表分离到一批具有较高固氮酶活力的菌株。本文报道以这些菌为材料, 对影响其固氮酶活力的因素进行试验, 结果如下。

料 材 与 方 法

一、供试菌株

1. 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*

A0221), 分离自玉米。2. 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae* B0221), 分离自高粱。3. 阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae* C022), 分离自谷子。

二、培养基

1. 测定固氮酶活力用的诱导培养基(g): 甘露醇 5, KH_2PO_4 0.8, 谷氨酸钠 0.4, FeSO_4 0.01, NaCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 葡萄糖酸钠 5, Na_2MoO_4 0.01, 琼脂 18.0, 水 1000ml, pH 6.2—6.5。

2. 分离固氮菌用无氮培养基(g): 蔗糖 15,

本工作承杜竹铭教授指导; 菌株由中国科学院微生物所鉴定, 一并致谢。

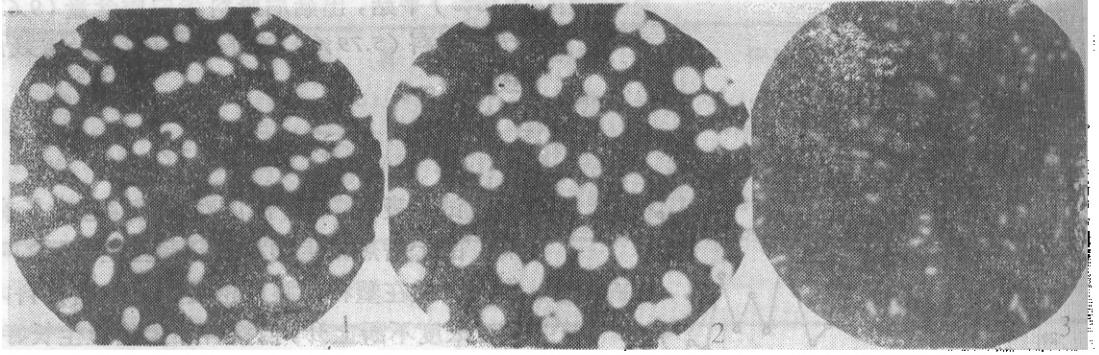


图1 菌体形态

1. 为 A0221 菌, $\times 1350$; 2. 为 B0221 菌, $\times 1350$; 3. 为 C022 菌, $\times 1350$ 。

Na_2MoO_4 0.0005, K_2HPO_4 0.8, CaCl_2 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, FeSO_4 0.025, NaCl 0.2, KH_2PO_4 0.2, 琼脂(处理) 20, 水 1000ml。

3. 不同碳源和氮源试验: 采用诱导培养基去掉碳源或氮源分别以其他碳源或氮源代替。

三、采样及酶活力测定

1. 采样及菌种分离: 在玉米、高粱、谷子扬花期, 选择健壮的植株, 挖取粗壮活根数条, 先用自来水冲去根表泥土, 再用无菌水冲洗 4—5 次, 无菌操作剪成约 1 cm 长, 放入无氮培养基平皿上, 28°C 培养 48 小时。将根表面长出的菌落接入无氮培养基斜面上, 待菌长出后备用。

2. 酶活力的测定方法: 采用修改的 La Rue T. A. 方法^[3]。即在每支 18×180 mm 试管内装诱导培养基 6 ml, 灭菌后放成斜面, 接入待测菌株, 30°C 培养 24 小时, 然后换橡皮塞密封, 用注射器抽出空气 2ml 并注入 2ml 乙炔继续培养 24 小时; 或接入待测菌株后, 立即换上橡皮塞密封, 抽出 2ml 空气, 注入 2ml 乙炔, 反应一定时间后, 取气样测定酶活力。

结 果

一、形态特征

结果见图 1。

二、培养条件对产酶活力的影响

1. 培养时间: 将三种菌分别培养, 在 18、24、48、72、96、120 小时取样测定酶活力, 结果见图 2。

图 2 说明最适培养时间为 48 小时。

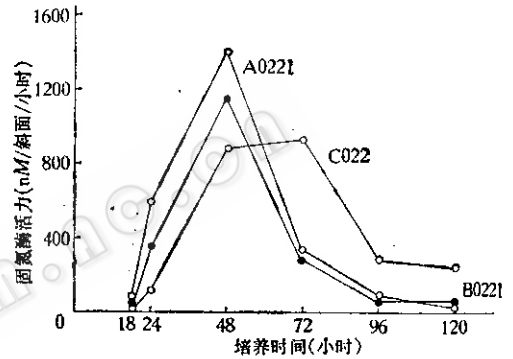


图2 不同培养时间与酶活力的关系

2. 培养温度: 将菌在 15、28、32、40、 50°C 下培养 48 小时后, 分别测定其酶活力, 结果见图 3。

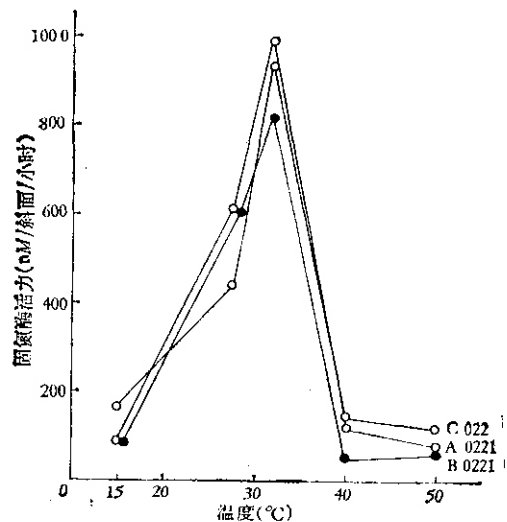


图3 温度与酶活力的关系

图 3 说明产酶活力最适培养温度为 32℃。

3. pH 值: 将三种菌分别培养在 pH 4.0、4.5、6.4、7.0、7.5、8.5、9.5、10.5 的培养基上, 32℃ 培养 48 小时, 测其酶活力, 结果见图 4。图 4 说明其酶活力最适 pH 范围在 7.2—8.5。

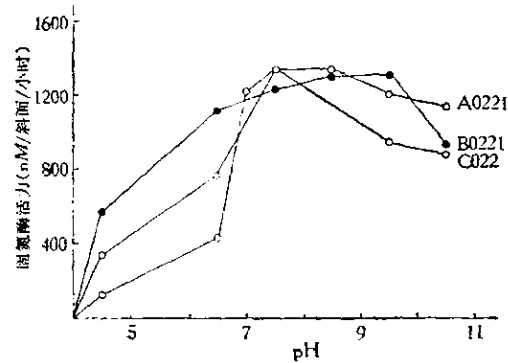


图 4 不同 pH 对酶活力的影响

表 1 不同碳源与酶活力的关系

| 结果(n mol/斜面/小时) | | 菌株号 | | |
|-----------------|--|-------|-------|-------|
| | | A0221 | B0221 | C022 |
| 碳 源 | | | | |
| 甘露醇 | | 731.1 | 703.9 | 711.7 |
| 甘 油 | | 762.2 | 404.4 | 81.7 |
| 淀 粉 | | 85.6 | 81.7 | 62.2 |
| 葡萄糖 | | 346.1 | 217.8 | 229.4 |
| 乳 糖 | | 221.7 | 194.8 | 182.8 |
| 鼠李糖 | | 105.0 | 105.0 | 89.4 |
| 苹果酸 | | 190.6 | 120.6 | 93.3 |
| 蔗 糖 | | 299.4 | 299.4 | 322.8 |

4. 不同碳源: 分别用甘露醇、甘油、乳糖、葡萄糖、蔗糖、鼠李糖、淀粉、苹果酸代替诱导培养基中的碳源, pH 7.2, 32℃ 培养 48 小时测其酶活力, 结果见表 1。

表 1 说明, 以甘露醇做碳源, 其酶活力最高。

5. 不同氮源: 用谷氨酸、牛肉膏、硝酸铵、硫酸铵、酵母膏分别代替诱导培养基中的氮源, pH 7.2, 32℃ 培养 48 小时测其酶活力, 结果见表 2。

表 2 不同氮源对酶活力的影响

| 结果(毫克分子/斜面/小时) | 菌 株 | | |
|----------------|--------|--------|--------|
| | A0221 | B0221 | C022 |
| 氮源名称 | | | |
| 谷氨酸 | 1324.2 | 1335.8 | 1283.3 |
| 牛肉膏 | 0 | 0 | 0 |
| 酵母膏 | 110.8 | 110.8 | 338.3 |
| 硫酸铵 | 0 | 0 | 0 |
| 硝酸铵 | 0 | 0 | 0 |

表 2 说明, 以谷氨酸作氮源, 三株菌产酶活力最高。

三、盆栽回接试验

将三种菌制成菌悬液, 分别进行盆栽。处理组(菌悬液拌种加追菌肥)温室培养, 开花期进行收获, 结果见表 3。

表 3 指出, 三种作物的株重、株高(除高粱)

表 3 盆栽回接试验结果

| 结 果 | | 项 目 | | 株 重 (g/株) | | 株 高 (cm/株) | | 根 重 (g/株) | |
|--------------|-----|-----|--|-----------|---------|------------|---------|-----------|---------|
| | | | | 干 重 (g) | 增 加 (%) | 高 度 (cm) | 增 减 (%) | 干 重 (g) | 增 加 (%) |
| 菌号和处理 | | | | | | | | | |
| 玉 米 A0221 | 对 照 | | | 1.39 | 0 | 17.62 | 0 | 0 | 0 |
| | 处 理 | | | 2.50 | +79.86 | 22.17 | +25.80 | 0 | 0 |
| 高 粱 B0221 | 对 照 | | | 25.90 | 0 | 66.50 | 0 | 6.67 | 0 |
| | 处 理 | | | 29.36 | +13.40 | 65.11 | -2.00 | 8.07 | +21.00 |
| 谷 子 C022 | 对 照 | | | 17.57 | 0 | 69.81 | 0 | 2.54 | 0 |
| | 处 理 | | | 18.85 | +7.29 | 70.86 | +1.50 | 4.01 | +57.87 |

和高粱、谷子的根重都有增加。

讨 论

A0221 和 B0221 两株菌, 虽然归入肺炎克雷伯氏菌属, 但有少数细菌有鞭毛 (极毛 3%, 侧毛 0.5%), 这和肺炎克雷伯氏菌无鞭毛不同。本试验的三个菌株虽然能利用许多种碳源和氮源, 但固氮酶活力仍以甘露醇为碳源和谷氨酸为氮源最佳, 如果在诱导培养基中去掉葡萄糖酸钠, 固氮酶活力降低近 10 倍, 说明这些菌固

氮必须经过诱导。这三种菌的固氮酶对温度影响比较敏感, 虽然它们在 15—40℃ 都可生长, 但其固氮酶活力的最适温度明显地是在 32℃。

参 考 文 献

- [1] Winston J. Brill: Biological Nitrogen Fixation, *Scientific American* **236**(3): 68—81, 1977.
- [2] 湖北省微生物研究所固氮组: 微生物学报, **19**(2): 160—165, 1979.
- [3] La Rue T. A.: *Plant Physiol.*, **51**(6): 1074—1075, 1973.