

三种胡颓子科植物根瘤内生菌培养条件研究

杜大至 原福虎 李荣儿

(山西省生物研究所, 太原)

顾 德 峰

(山西农业大学, 太谷)

弗兰克氏菌与一些非豆科植物所建立的共生固氮作用, 对于增加土壤肥力, 提高林业生产力起着重要作用。近年来, 国内外已从不同的非豆科植物根瘤中分离出一批弗兰克氏菌菌株^[1-3]。而非豆科植物的共生固氮, 已成为生物固氮研究中一个十分活跃的领域。但是迄今所分得的弗兰克氏菌株都属于慢生长型, 培养菌体所需要的周期长, 所能收集到的菌体量也非常少。Lechevalier 等^[4]曾对分离自 7 属 12 种植物根瘤的 15 株弗氏菌进行过测定, 每毫升培养液收集到的湿菌体为 2—15mg, 大约相当于链霉菌的百分之一。我们从胡颓子科的四种植物根瘤中所分离的 60 余株弗兰克氏菌, 每毫升培养液也只能收集到大约 4—20mg 湿菌体。因此, 如何在短时间内收集到大量菌体, 这便成为将弗氏菌尽早应用于生产实践所首先应解决的

问题。

弗兰克氏菌由共生状态改变为在人工培养基上生长, 其生态条件和营养条件都发生了较大改变。尽管对其共生的机理目前所知甚少, 但条件的改变及遗传的因素应是菌体生长缓慢的主要原因。本试验旨在探索从胡颓子科不同属、种的寄主植物根瘤中分离的弗兰克氏菌离体培养的最适生长条件, 以便增加菌体的收集量, 来逐步满足基础研究和应用研究的需要。

材 料 和 方 法

(一) 供试菌

Frankia sp. Hr319 菌株, 寄主植物: 中国

菌体蛋白的测定, 由山西省生物研究所技术室武秀珍、翟云梅、莫海云同志协助, 特此致谢。

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi)。

Frankia sp. Eu226 菌株, 寄主植物: 伞花胡颓子 (*Elaeagnus umbellata* Thunb.)。

Frankia sp. Em281 菌株: 寄主植物: 翅果油树 (*Elaeagnus mollis* Diels)。

(二) 菌体的培养、接种与生长量的测定

试验在 20 × 150mm 的螺口试管中进行, 每管装培养基 10ml。接种后除温度试验外均于 28℃ 恒温培养, 20、40 天测定结果, 每次测 3 管菌, 结果取平均值。离心收集供接种用的菌体, 磷酸缓冲液 (50mM, pH7.0) 冲洗 3 次, 用组织研磨器研碎菌体并制成菌悬液, 接种量约为每管 10μg 蛋白。用菌体的蛋白量代表生长量, 菌体蛋白用紫外分光光度法测定^[5]。

(三) 营养条件

以 CF-1 号为基础培养基 (g/l): KNO₃ 0.5、KH₂PO₄ 0.5、MgSO₄ · 7H₂O 0.2、CaCl₂ · 2H₂O 0.1、天门冬素 0.5、蔗糖 20、并加入 MS 培养基的 Fe-EDTA 液 2.5ml、微量元素母液 1ml, pH6.7。

- 1. 碳源利用: 以去掉碳源的 CF-1 号为基础培养基。除 Tween 80 的浓度为 0.2% 外, 其余碳源浓度均为 1%, 紫外线杀菌。
 - 2. 氮源利用: 在无氮的 CF-1 号基础培养基内分别加入 0.1% 的氨态氮、硝态氮和 1% 的有机氮, 以及 0.05% 的各种氨基酸, 并配制无氮培养基。
 - 3. 其它辅助成份: 在 CF-1 号培养基中分别加入卵磷脂 (10mg/l)、玉米素 (2μg/l)、激动素 (0.5mg/l) 以及 1mlMS 培养基的维生素母液。
- (四) 生态条件
- 1. 温度: 将供试菌接种在 CF-1 号培养基中, 置不同温度下培养 20、40 天, 分别测定结果。
 - 2. pH 值: 将供试菌接种在不同 pH 的 CF-1 号培养基中, 培养 20、40 天, 分别测定结果。

(五) 培养基对比试验

以 CF-1 号为基础培养基, 改用适于各菌株生长的碳源、氮源。将 Hr319 菌株接种于 CF-2 号培养基 (g/l): 碳源为果糖 10, 氮源为牛肉膏 5、天门冬素 0.5; Eu226 菌株接种于 CF-3 号 (g/l): 鼠李糖 10, NH₄Cl 1.0; Em281 菌株接种于 CF-4 号 (g/l): 果糖 10, 牛肉膏 10。

CMS-1 号为各供试菌的分离培养基; Qmod^[6] 为国际上分离、培养弗兰克氏菌的较好培养基; Blom 培养基配方由中科院林业土壤研究所提供; 克氏合成一号、葡萄糖天门冬素、马铃薯浸汁培养基为放线菌分类鉴定用培养基^[7], 各供试菌在这三种培养基上生长较好。

结果和讨论

(一) 营养因素

四株供试菌对各种碳源的利用情况见表 1。

表 1 各菌株对不同碳源的利用情况

碳 源	菌体蛋白 (mg/管)		
	Hr319	Fu226	Em281
D-果糖	2.57	0.87	1.55
D-木糖	2.54	0.93	0.65
蔗糖	1.68	0.98	0.69
菊糖	1.96	0.98	1.13
L-鼠李糖	1.87	1.21	1.47
D(+)葡萄糖	1.23	0.47	0.59
L-阿拉伯糖	1.16	0.51	0.64
麦芽糖	0.60	—	—
山梨糖	0.57	0.12	—
甘露糖	0.42	0.18	0.31
棉子糖	0.23	0.21	0.82
乳糖	—	—	—
半乳糖	—	—	—
苹果酸钙	0.46	—	0.78
甘油	0.18	—	—
肌醇	—	—	—
甘露醇	—	—	0.34
吐温-80	—	—	0.27
吐温-80+2%葡萄糖	0.32	0.17	0.81

表中“—”表示未长。

除表 1 所列, 各供试菌都不能利用 D-山梨醇、糊精、淀粉、葡萄糖酸钠、柠檬酸钠和醋酸

钠。

本试验的结果说明，不同的弗兰克氏菌株对碳源的利用是有差异的。尽管在某些菌株之间可能存在适于它们生长的相同碳源，但要想找到一种适于所有菌株生长的碳源却是不可能的。许多糖、糖醇、脂类或有机酸及其盐类都能作为菌体生长的唯一碳源^[8]。国外的研究者还将菌株对 Tween80 的利用情况作为区别不同生理型的重要标志^[4]。Lechevalier 等^[4]曾经证实，某些弗兰克氏菌可以 Tween80 为唯一碳源，在加 2% 浓度葡萄糖的培养基上加 Tween 80，二者协同作用于细胞，比分别用两种碳源菌体增重 66%。而有些菌株在含 Tween80 的培养基中则可能因为脂肪酸的积累生长反而受抑制。本试验所选用的三株供试菌中，Hr319 和 Eu226 菌株不能以 Tween80 为唯一碳源，在葡萄糖浓度为 2% 的培养基中加 Tween80 反而抑制生长。Em281 菌株在以 Tween80 为唯一碳源的培养基中生长极差，但在 2% 浓度葡萄糖的培养基中加 Tween80 时，比在只有 2% 浓度葡萄糖的培养基中菌体有所增长。看来三株菌有可能属于不同的生理型。

弗兰克氏菌对氮源的利用也是不同的。有的菌株只能利用氨态氮而不利用硝态氮，有些则可以利用有机氮。三株供试菌对各种氮源的

利用见表 2。

表 2 表明，尽管三株菌都可以利用氨态氮、硝态氮以及表中所列的大部分有机氮，但对于 Hr319 菌株来说，三种无机氮和牛肉膏都是较好的氮源；而 Eu226 菌株最好的氮源是 NH_4Cl ，其次是 L(+)-谷氨酸；Em281 菌株对三种无机氮的利用都比较差，而对有机氮的利用则比较好。其最佳氮源是牛肉膏。酵母汁中虽然富含各种氨基酸和维生素类，但各菌株在以它为氮源的培养基中都不能生长，可能其中含有某种抑制菌体生长的物质。此外，三株菌都能在无氮培养基中较好地生长，说明即便在人工培养条件下，供试菌也可以空气中的氮气为氮源。

一些外源维生素及其它一些辅助因子，对于供试菌的生长看来并非是必需的。本试验所附加的维生素母液、卵磷脂、玉米素、激动素等，对三株菌的生长均无明显的影响。

三株供试菌均采用作者等自己试验成功的组织培养法^[2]分离，菌株的某些生理生化特性与国外所报道的弗兰克氏菌株有一定差异。而基础培养基所用碳、氮源的种类也与国内外所报道的不尽相同。而国外进行弗兰克氏菌的生理试验，多以分离自桤木属 (*Alnus*) 的内生菌为主，本试验则以沙棘属 (*Hippophae*) 和胡颓子属 (*Elaeagnus*) 的内生菌为材料，其中翅果油树为山西的特有树种。这就有可能加深对弗兰克氏菌生理特性更广泛的了解。

(二) 生态因素

本试验对三株供试菌生长的 pH 范围、最适 pH 以及温度范围和最适生长温度进行了测定，结果见表 3。

表 2 各菌株对不同氮源的利用情况

氮 源	菌体蛋白 (mg/管)		
	Hr319	Eu226	Em281
KNO ₃	1.68	0.87	0.69
NH ₄ Cl	1.94	1.23	0.47
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.81	0.74	0.51
酵母浸汁	—	—	0.09
蛋白胨	0.34	—	1.34
牛肉膏	2.07	0.80	1.58
甘氨酸	1.21	0.57	0.94
L-天门冬酸	1.76	0.49	1.07
DL-α-丙氨酸	0.66	0.25	0.43
L-酪氨酸	1.28	0.68	0.51
L(+)-谷氨酸	1.43	0.98	0.36
L-赖氨酸	1.10	0.34	0.27
N ₂	1.13	0.34	0.52

表中“—”表示未长。

表 3 温度和 pH 对供试菌生长的影响

菌 株	温度(℃)		pH	
	生长范围	最 适	生长范围	最 适
Hr319	10—33	27—29	5—9	6.4—7
Eu226	10—33	27—28	5.8—8.5	6.4—7
Em281	18—33	28—29	5.8—7.5	7

看来不同菌株的最适生长温度和 pH 是基本相似的，但能够生长的温度和 pH 范围却有

一定差异。这在一定程度上可能与原寄主植物的生态环境有关。沙棘是一种耐寒、耐盐碱、适应性很强的树种。分离自这种寄主的 Hr319 菌株的生长温度和 pH 范围都比较广。而翅果油树生长于山西南部,当地气候比较温和,土壤基本属中性,分离自翅果油树的 Em281 菌株生长温度和 pH 范围都相对较窄。这可能是这些菌株在各自长期的生态环境中与寄主共生所形成的遗传特性。

(三) 培养基的对比试验

供试菌在各种培养基上的生长情况见表 4。

表 4 供试菌在各种培养基中的生长情况

培 养 基	菌体蛋白 (mg/管)		
	Hr319	Eu226	Em281
CF-2	2.89		
CF-3		1.41	
CF-4			1.73
CMS-1	0.66	0.35	0.31
Qmod	0.74	0.38	0.25
Blom	-	0.13	-
克氏合成一号	0.61	0.47	0.97
葡萄糖天门冬素	0.59	0.42	0.32
马铃薯浸汁	0.45	0.18	0.48

表中“-”表示未长。

从表 4 可知,供试菌在修改后的各种培养基中,生长量不仅比在原分离培养基 CMS-1 号中增重 3—4.6 倍,而且比在其他培养基中的生长量也有较大幅度增长。这对于解决供试菌生

长缓慢、不易收集菌体的问题无疑是一个进步。

从上述试验结果可以看出,就胡颓子科而言,分离自不同属、种寄主的弗兰克氏菌株,在人工培养条件下所适宜的营养条件和生态条件是不尽相同的。要提高其生长速度,首先必须摸清并满足这些条件。当然,弗兰克氏菌的营养和代谢是一个极为复杂的生理生化过程,除本试验所探讨的几种因素外,还有其它一些因素影响它们的生长。所以在基础研究和实际应用中,必须根据各菌株的不同特点,综合考虑各因素之间的相互关系,以便满足菌种生长的不同需要。

参 考 文 献

- [1] Baker, D. et al.: Current Perspectives in Nitrogen Fixation (ed. by Alan, H. Gibson and William, E. Newton), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 479, 1981.
- [2] 杜大至等:微生物学报, 24(1): 41—45, 1984.
- [3] 蒋建德等:生态学杂志, 3: 42—43, 30, 1983.
- [4] Lechevalier, M. P. & H. A. Lechevalier: Presented at the Fifth International Symposium on Actinomycetes Biology, p. 8, 1982.
- [5] Layne, E.: In Methods in Enzymology, Vol. III, 447, 1957.
- [6] Lalonde, M. & H. E. Calvert: Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperature Forests (J. C. Gordon ed.) (Oregon State University, OR), pp. 95—110, 1979.
- [7] 阮继生:《放线菌分类基础》,科学出版社,北京,1977.
- [8] Murry, M. A. et al.: Frankia Symbioses, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands, pp. 61—78, 1984.