

辽东桤木根瘤内生菌的分离和培养条件的研究

袁 长 芳

(山西省生物研究所,太原)

用四氧化钨处理法,从辽东桤木的根瘤中获得纯培养内生菌株 AsI1。该菌株的菌丝体和孢囊形态特征类似于已报道的桤木属内生菌株。孢囊在无氮限定培养液中诱导形成。用 AsI1 菌株侵染原宿主实生苗根部,可形成具有固氮活性的根瘤,活性可达 $430.0 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/\text{g}$ 根瘤鲜重·分钟。该菌株生长最适碳源为丙酸,最适氮源为酪蛋白水解物,最适 pH 为 6.8,最适温度为 30°C 。

关键词 弗兰克氏菌;固氮;辽东桤木

目前,已从桤木属 (*Alnus*) 的多种植物根瘤分离得到内生菌纯培养物^[1-5],尚未见到从辽东桤木根瘤中分离内生菌的报道。作者用四氧化钨处理法,从其根瘤中获得 AsI1 菌株,并对其形态特征和培养条件进行了试验和观察,结果如下。

材 料 和 方 法

(一) AsI1 菌株的分离

辽东桤木 (*Alnus sibirica* Fisch) 根瘤采自山东泰山林场三岔分场。参照 Normand^[6] 分离方法,用 QMod 培养基进行液体培养,两星期获得内生菌纯培养物。内生菌的扫描电镜制片,参照 Newcomb^[7] 等人的方法。

回接试验,水培无菌实生苗,用 AsI1 菌株纯培养物侵染其根部,即可形成根瘤。在无氮限定培养液^[8]中培养 7 天的纯培养物,用乙炔还原法测定其固氮酶活性。

(二) 培养条件试验

基础培养液 (g/L): K_2HPO_4 0.3, NaH_2PO_4 0.2, KCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCO_3 0.1; 加微量元素和柠檬酸铁^[9];生物素 0.002;碳氮源按试验要求而定, pH 6.8。

培养周期一般 20 天,菌体生长情况分别测定各组合菌体蛋白,按 Lowry^[10] 等人方法进行,每一组合设 3 个重复,测定后取平均值,试验全部用液体培养。

结 果 和 讨 论

(一) AsI1 菌株的基本特征

该菌株类似于蒋建德等人^[11]分离的四川桤木内生菌株。菌丝分枝稀疏,平展,横隔不甚明显,粗细不均,但很少见中间膨大。菌丝直径 $0.6-1.5 \mu\text{m}$ (图 1-A、C)。特征性孢囊稀疏,多生于菌丝顶端,也有间生,形状不规则(图 1-B-D)。孢子呈不规则多面体,直径 $2 \mu\text{m}$ 。在有氮培养液中不形成孢囊,只有在无氮限定培养液中,才能形成孢囊。圆形孢囊着生于长 $10 \mu\text{m}$ 左右的孢囊柄上,其表面光滑,直径 $3 \mu\text{m}$ 左右。在固体 QMod 培养基上,培养一月多,菌落呈白色,直径 1—2mm,圆形,微突起,表面湿润有光泽,无可溶性色素。

用 AsI1 菌株培养物侵染原宿主辽东桤木无菌实生苗根部,10 天后可结瘤,根瘤生长 1 个月,测定其固氮酶活性(乙炔还原)可达 $430.0 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/\text{g}$ 根瘤鲜重·分钟。

经无氮限定培养液培养,菌体产生固氮孢囊,测定固氮酶活性为 $30.5 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/$

本文于 1984 年 10 月 31 日收到。

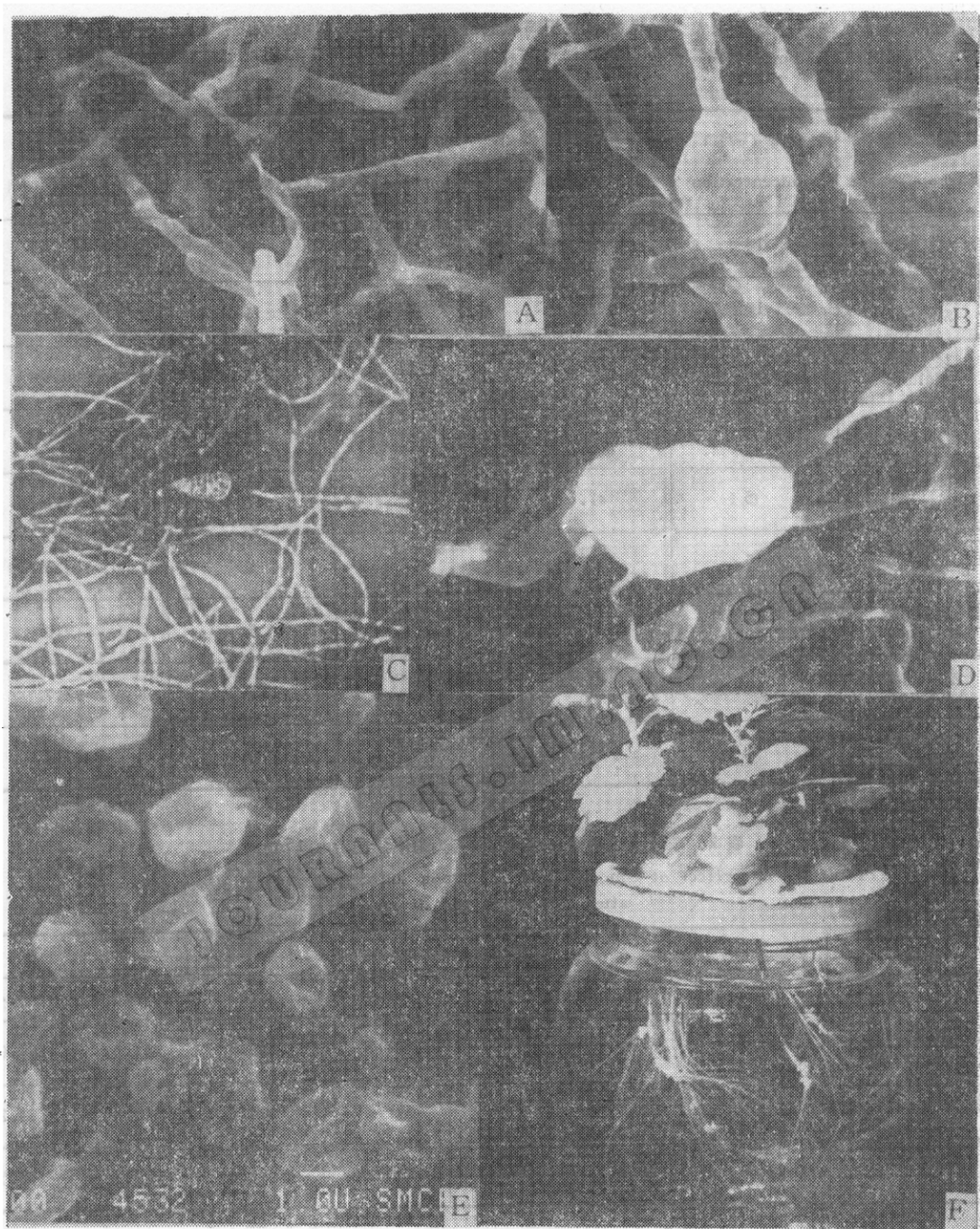


图1 AsI1 菌株

Fig. 1 Strain AsI1

- A. 菌丝体($\times 4,800$); B. 间生孢囊($\times 8,600$); C. 梨形孢囊($\times 1,000$); D. 端生孢囊 ($\times 6,000$); E. 孢子($\times 7,200$); F. 用 AsI1 菌株回接辽东桤木幼苗形成的根瘤。
A. Hyphae; B. Intercalary sporangium; C. Pear-shaped sporangium; D. Terminal sporangium; E. Spores; F. Root nodules of seedlings of *A. sibirica* inoculated with AsI1 strain.

天·15ml 培养液。

(二) 不同碳源对菌株生长的影响

用基础培养液，氮源为 NH_4Cl 1.0g/L, 碳源如表 1 中所列出的。50ml 三角瓶，

表 1 *AsII* 菌株在不同碳源的培养液中生长量的比较

Table 1 Comparison of growth of *Frankia AsII* in cultural solution containing various carbon sources after cultivation for 20 days

碳 源 Carbon source	浓度 (g/L) Concentration	菌体蛋白 (μg/15ml) Cell protein	碳 源 Carbon source	浓度 (g/L) Concentration	菌体蛋白 (μg/15ml) Cell protein
葡萄糖 Glucose	10	31.5	葡萄糖酸钠 Na-Gluconic acid	5	40.7
蔗 糖 Sucrose	10	27.0	琥珀酸钠 Na-Succinic acid	1	58.2
麦芽糖 Maltose	10	10.0	丙酸 Propionic acid	1	260.4
乳 糖 Lactose	5	9.7	醋酸钠 Na-Acetate	1	166.6
半乳糖 D-Galactose	5	41.5	甘油 Glycerol	2	35.6
甘露糖 D-Mannose	5	31.7	吐温-80 Tween-80	2	212.8
甘露醇 Mannitol	5	27.7	山梨糖 Sorbitose	5	9.0
木 糖 D-Xylose	5	8.9	苹果酸 Malic acid	1	32.7
鼠李糖 L-Rhamnose	5	51.8	无碳源 Nil carbon source	0	7.4

表 2 碳源浓度对菌株生长的影响(菌体蛋白 μg/15ml)

Table 2 The effect of concentration of carbon sources on growth strain *AsII* after cultivation for 20 days

碳源 Carbon sources	碳源浓度 Concentration (g/L)						
	0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.6	5.4
吐温-80 Tween-80	8.4	31.6	45.2	74.5	103.5	184.5	209.0
丙 酸 Propionic acid	12.3	78.3	102.2	153.7	204.2	175.5	104.2
醋酸钠 Na-Acetate	10.5	21.2	50.0	106.7	122.6	102.3	78.5

装入 15ml 培养液，接种后置 29℃ 温箱中培养 20 天，离心收集菌体，测定菌体蛋白量，结果见表 1。

表 1 表明，该菌株最适碳源为丙酸，其次为吐温-80 和醋酸钠，微弱利用葡萄糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖、甘露醇、鼠李糖、葡萄糖酸钠、琥珀酸钠、甘油或苹果酸，不利

用麦芽糖、乳糖、木糖或山梨糖。

(三) 碳源浓度对菌株生长的影响

以丙酸、吐温-80、醋酸钠作为碳源，进行浓度试验。用基础培养液，氮源为 NH₄Cl 1.0g/L，结果见表 2。

表 2 指出，菌体蛋白量随吐温-80 浓度增加而增加，一般加入量 2.0—5.0g/L 适

表 3 AsII 菌株在不同氮源中生长比较

Table 3 The comparison of growth of AsII in the media containing various nitrogen sources after cultivation for 20 days

氮源 Nitrogen source	浓度 (g/L) Concentration	菌体蛋白 Cell protein ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)	氮源 Nitrogen source	浓度 (g/L) Concentration	菌体蛋白 Cell protein ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)
NH_4Cl	1.0	55.8	多蛋白胨 Polypeptone	5.0	191.7
NH_4Ac	1.0	51.7	牛肉膏 Beef extract	5.0	156.2
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0	107.5	酵母膏 Yeast extract	5.0	15.1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	55.8	酪素 Casein	1.0	210.0
NH_4NO_3	1.0	79.3	酪蛋白水解物 Casamino acid	1.0	264.0
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	1.0	29.1	谷氨酸 Glutamic acid	0.1	75.0
			无氮源 Nil nitrogen source	0	54.1

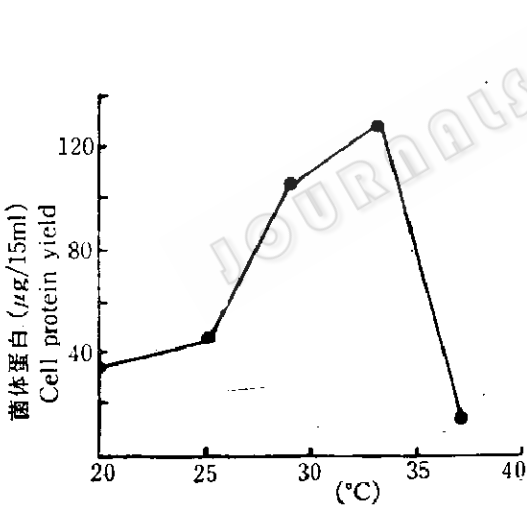


图 2 温度对 AsI I 菌株生长的影响
Fig. 2 The effect of temperature on growth of strain AsII

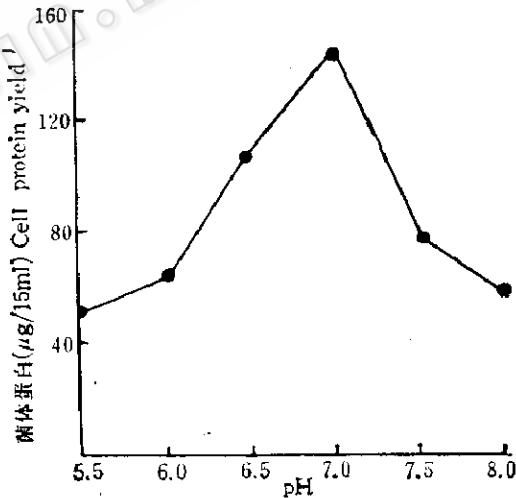


图 3 pH 对 AsII 菌株生长的影响
Fig. 3 The effect of pH of cultural solution on growth of strain AsII

宜。丙酸浓度不宜过高, 1.0—2.0g/L 为宜。醋酸钠的适宜浓度与丙酸相近。

(四) AsII 菌株对不同氮源的利用

用基础培养液, 碳源加丙酸 1.0g/L, 氮源如表3, 其它条件同前述。

表 3 说明, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 为较好的无机

氮源。有机氮源以酪蛋白水解物最好, 其次为酪素、多蛋白胨、牛肉膏, 这说明该菌株蛋白酶活性较高, 而糖酵解能力退化, 以致对多数糖利用不佳, 但特别适宜利用三羧酸循环中的某几种有机酸, 能特异地利用吐温, 且作为一种良好的碳源。

(五) 温度对菌株生长的影响

用基础培养液,碳源为丙酸 1.0g/L,氮源为 NH_4Cl 1.0g/L,接种后分别置不同温度下培养 14 天,生长情况见图 2。

图 2 表明,在 20—30℃ 温度范围内,菌体均能生长,37℃ 则几乎不生长,最适生长温度为 29—33℃。

(六) 培养液 pH 对菌株生长的影响

用基础培养液,碳源为丙酸 1.0g/L,氮源为 NH_4Cl 1.0g/L,灭菌前分别用 pH 计调成 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 六种不同 pH 值,灭菌后微调。接种后置 29℃ 温箱中培养 14 天,结果如图 3。

AsII 菌株对 pH 的适应范围较广, pH 5.5—8.0 都可生长,但最适 pH 为 7.0。

参 考 文 献

- [1] 蒋建德等: 微生物学报, 24(1): 37—40, 1984。
- [2] Baker, D. and J. G. Torrey: *Can. J. Microbiol.*, 26: 1166—1071, 1980.
- [3] Benson, D. R.: *Applied and Environmental Microbiol.*, 44 461—465, 1982.
- [4] Burggraaf, A. J. P. et al.: *Plant and Soil*, 61: 157—168, 1981.
- [5] Normand, P. and M. Lalonde: *Can. J. Microbiol.*, 28: 1133—1142, 1982.
- [6] Lalonde, M. and E. H. Cavert: In *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management Forests*, (eds. J. C. Gorton et al.), Oregon State University Press, Oregon, pp. 95—110, 1979.
- [7] Newcomb, W. et al.: *Bor. Gaz.*, 140 (Suppl.): 22—24, 1979.
- [8] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [9] Tjepkema, J. D. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 27: 815—823, 1981.

STUDIES ON ISOLATION AND CULTURAL CONDITIONS OF ENDOPHYTE FROM NODULES OF *ALNUS SIBIRICA*

Yuan Changfang

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan)

An actinomycetous endophyte, *Frankia* strain AsII, has been isolated as pure culture by OsO_4 treatment from nodules of *Alnus sibirica* Fisch. The characteristics of hyphae and sporangia are similar to *Frankia* strain of *Alnus* previously reported. The vesicles with nitrogenase activity were induced in defined cultural solution. When the root of seedling of *Alnus sibirica* were infected by strain AsII, the root nodules were formed. Their nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) is 430.0 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{min} \cdot \text{g}$ fresh weight. The carbon and

nitrogen sources requirement, effect of cultural temperature and pH on growth of the organism were studied. The optimum carbon source is propionic acid. The optimum nitrogen source is casamino acid. The optimum pH and temperature for growth of AsII are 6.8 and 30℃.

Key words

Frankia; Nitrogen fixation; *Alnus sibirica*