

一株木麻黄根瘤内生菌的培养条件研究

袁 长 芳

(山西省生物研究所, 太原)

1982 年, Diem 等人从木麻黄根瘤中分离出 *Frankia* 菌株 DI₁ 和 G₂^[1], 虽然纯培养的形态与典型 *Frankia* 菌株相似, 但回接原宿主未获成功, 而在沙棘上回接成功结瘤^[2]。同年, 他又获得了 CjI-82 菌株, 回接木麻黄结瘤并固氮^[3]。1985 年, 蒋建德与朱宝琴报道从木麻黄根瘤中分离到 IFS 020601 菌株, 并回接成功^[4]。作者用四氧化钨法^[5]处理木麻黄根瘤, 接种于

以丙酮酸为碳源的液体培养基中, 获得 *Frankia* sp. CeI 513 菌株, 从形态学上与 CjI-82 及 IFS 020601 相似, 而营养和生态条件与上述菌株有明显差异, 本文报道这一研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 试验菌株的分离及其形态

木麻黄根瘤采自四川省林科所实验林场,

用 Lalonde^[5] 等人的四氧化钨法处理后,接入以丙酮酸为碳源,酪蛋白水解物为氮源的培养液中,培养 21 天后获得 CeI 513 菌株。菌株在液体培养条件下,以菌丝体为主,孢囊、孢子及孢囊少见。在无氮培养液中,形成多数孢囊、孢子及孢囊。孢囊形态如图 1,孢囊形态多样,多间生,亦有端生,如图 2。

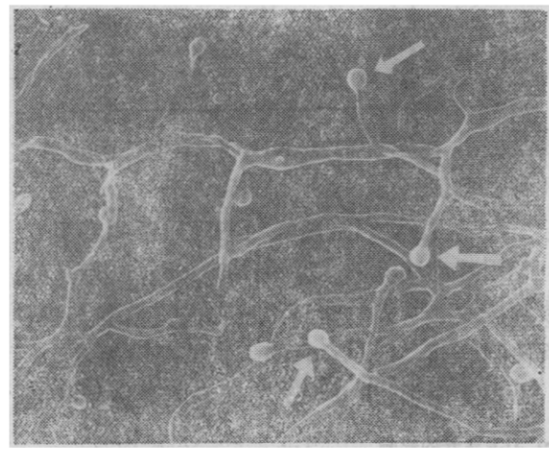


图 1 CeI 513 菌株在无氮培养液中形成孢囊的扫描电镜照片(图中箭头指孢囊,×3000)

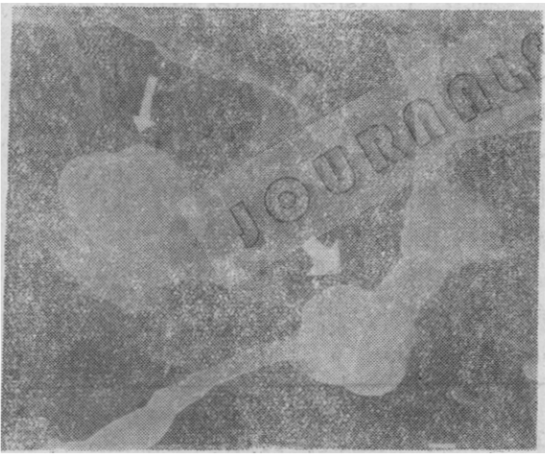


图 2 CeI 513 菌株的孢囊扫描电镜照片(粗箭头指间生孢囊,细箭头指端生孢囊×4400)

用 CeI 513 菌株的纯培养菌体回接原宿主木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 水培无菌实生菌根部,1 个月左右形成根瘤,测其根瘤的乙炔还原活性为 34.76n mole C₂H₄/g 根瘤鲜重·分钟,这一结果与蒋建德所测的数值接近。

(二) 培养液的配制和生长量的测定

基础培养液的大量元素、微量元素与柠檬酸铁同 QMod 培养基^[6]用量。另加生物素 0.002 g/L,碳、氮源按试验要求添加。pH 用 NaOH 调至 7.0。50ml 三角瓶装 15ml 培养液,30℃ 静止黑暗培养。培养结束,离心收集菌体,无菌水洗涤三次,然后用 Lowry^[7] 等人的方法测定各组菌体蛋白量,每组重复三瓶,取平均值。

另外,试验还用下列培养液: TB^[8],PAM^[9], FMC^[10], Tween/Cas^[11] 及 Blom^[12]。

接种,将种子菌液离心收集,无菌水洗涤三次,用玻璃研磨器研磨菌体,用无菌水制成菌悬液,等量接种到三角瓶中。

试验试剂,卵磷脂(上海蛋禽二厂),聚脲(日本、大五荣株式会社),酪蛋白水解物(中国科学院生物化学所),酵母膏(上海酵母厂),牛肉膏(上海牛奶公司综合厂),干酪素(上海试剂站,国产分装),鱼粉蛋白脲(上海东海制药厂)。碳源除麦芽糖外全为国产。

结果与讨论

(一) CeI 513 菌株在不同培养液中生长的比较

CeI 513 菌株在配制的不同培养液中,以相同的接种与培养条件培养,生长周期 25 天,其生长量列于表 1。

表 1 CeI 513 菌株在不同培养液中生长比较

培养液	碳 源 (g/L)	氮 源 (g/L)	生长量 (μg 蛋白/ 15ml 培养液)
TB	葡萄糖 10.0	聚脲 5.0	16.40
QMod	葡萄糖 10.0 卵磷脂 0.02	聚脲 5.0 酵母膏 0.5	19.94
PAM	丙酸 0.5	NH ₄ Cl 0.5	314.88
FMC	丙酮酸 1.0	酪蛋白水解物 2.0	297.93
Tween/Cas	吐温 2.0	酪蛋白水解物 2.0	20.22
Blom	葡萄糖 10.0	NH ₄ Cl 0.1	18.58

表 1 结果说明,CeI 513 在 PAM 和 FMC 培养液中生长良好,其余四种培养液不适于菌生长。在 PAM 和 FMC 中菌体生长量相当于 QMod, TB, Tween/Cas 及 Blom 培养液中的 15 倍。从氮源利用角度说,显然, NH₄Cl 或酪蛋

白水解物都是较好的，这里对该菌生长起主要作用的是碳源。在以酪蛋白水解物为氮源时，IFS 020601 菌株的良好碳源是吐温和葡萄糖，而 CeI 513 菌株则几乎不利用它们，丙酮酸是共同利用的碳源。当氮源为 NH_4Cl 或酪蛋白水解物时，CeI 513 最好的碳源为丙酸，其次为丙酮酸，吐温和葡萄糖很难利用。

(二) CeI 513 对不同氮源的利用

用基础培养液，碳源加丙酮酸 1g/L，氮源以表 2 所列种类及浓度分别加入，培养与接种条件同(一)，CeI 513 生长情况见表 2。

表 2 说明，在以丙酮酸为碳源时，菌株 CeI 513 生长最适的氮源为聚脲，其次为酪蛋白水解物、 NH_4Cl 、干酪素或牛肉膏。不利用鱼粉蛋白脲，硝基态氮利用不好。这一结果与 IFS 020601 菌株的氮源利用明显不同，CeI 513 对有机态氮和无机氮利用差不多，而在聚脲中生长

表 2 不同氮源对 CeI 513 菌株生长的影响

氮 源	浓 度 (g/L)	生 长 量 (μg 蛋白/15ml 培养液)
NH_4Cl	1.0	183.13
KNO_3	2.0	38.80
牛肉膏	5.0	131.74
干酪素	2.0	168.92
酪蛋白水解物	2.0	203.90
鱼粉蛋白脲	5.0	16.94
聚 脲	5.0	241.08
无氮源	0.0	129.56

长最好。在无机态氮 NH_4Cl 中生长远比其它几种有机氮好。

(三) CeI 513 菌株对不同碳源的利用

用基础培养液，以 NH_4Cl 0.5g/L 为氮源，碳源按表 3 所列种类与浓度加入，培养与接种条件同(一)，CeI 513 的生长情况见表 3。

表 3 说明，CeI 513 菌株不能利用半乳糖、

表 3 不同碳源对菌株 CeI 513 生长的影响

碳 源	浓 度 (g/L)	生 长 量 (μg 蛋白/15ml 培养液)	碳 源	浓 度 (g/L)	生 长 量 (μg 蛋白/15ml 培养液)
棉 子 糖	10.0	27.88	木 糖	10.0	16.40
半 乳 糖	10.0	15.58	甘 露 醇	10.0	20.77
鼠 李 糖	10.0	18.04	反丁烯二酸	2.0	32.80
果 糖	10.0	13.66	丙 酮 酸	2.0	148.14
肌 醇	10.0	22.96	苹 果 酸	2.0	21.86
乳 糖	10.0	23.56	乙 酸 钠	1.0	126.82
麦 芽 糖	10.0	19.13	丙 酸	1.0	223.58
蔗 糖	10.0	21.86	丙 三 醇	5.0	21.32
甘 露 糖	10.0	21.32	吐温-80	2.0	19.68
葡 萄 糖	10.0	22.96	无 碳 源	0.0	16.94
山 梨 糖	10.0	24.05			

鼠李糖、果糖、麦芽糖、木糖或吐温-80 作为唯一碳源，因用上述碳源培养，菌体生长量与无碳源培养接近。以棉子糖、肌醇、乳糖、蔗糖、甘露糖、葡萄糖、山梨糖、甘露醇、苹果酸或丙三醇作为唯一碳源时，菌生长量微高于无碳源培养基。在反丁烯二酸中菌体生长明显。本试验说明，CeI 513 菌株最适宜的碳源为丙酸、丙酮酸或乙酸，其生长量相当于棉子糖和肌醇等诸碳源的 5—10 倍。IFS 020601 菌株在棉子糖、半乳糖、鼠李糖、果糖或肌醇中生长较好；而 CeI 513

菌株则不利用或很微弱利用上述碳源。IFS 020601 最适碳源为吐温、葡萄糖或丙酮酸；而 CeI 513 则不利用或很少利用吐温和葡萄糖，只利用丙酮酸。综上所述，CeI 513 对所有糖、醇类碳源都不能利用或很少利用；这说明，菌株对糖和醇的酵解能力极端退化，这种现象可能是内生菌株长期依靠宿主提供碳源的种类有关。尽管光合作用的产物为糖类，而进入根瘤细胞，提供给内生菌作能源的可能是三羧酸循环中的一些有机酸。

(四) 维生素和微量元素对 CeI 513 生长的作用

用基础培养液，以丙酮酸为碳源，NH₄Cl 为氮源，微量元素加入量按 QMod 培养基的用量，但配成单一元素的溶液及混合液分别加入，试验它们对 CeI 513 菌株生长的影响。维生素母液及单一维生素溶液按 Blom 培养基中维生素用量分别配母液，逐一加入培养基中，10 磅压力、灭菌 40 分钟，看其对该菌生长产生的影响，培养与接种条件同(一)，结果列入表 4 与表 5。

表 4 微量元素对 CeI 513 菌株生长的影响

微量元素	浓度 (mg/L)	生长量 (μg 蛋白/15ml 培养液)
H ₃ BO ₃	1.5	157.00
ZnSO ₄	1.0	293.06
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.8	334.93
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	355.86
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.2	314.00
CoCl	0.16	334.93
柠檬酸铁	10.0	235.50
微量元素母液	1ml	253.25
微量元素母液	1ml	204.10
柠檬酸铁	10.0	204.10
不加微量元素和柠檬酸铁	0.0	188.40

表 4 结果表明，多数微量元素的加入对菌株生长有利，H₃BO₃ 对菌体生长的不利影响是否是量大，还有待进一步试验。用 Mn⁺⁺、Cu⁺⁺ 和 Co 配成微量元素母液加入培养基中，对菌体生长产生明显促进作用。

表 5 维生素类对 CeI 513 生长的作用

维生素	浓度 (mg/L)	生长量 (μg 蛋白/15ml 培养液)
核黄素 (VB ₂)	0.1	314.00
硫胺素 (VB ₁)	0.1	314.00
生物素 (VH)	2.0	314.00
尼克酸	0.1	293.06
吡哆素 (VB ₆)	0.1	235.50
叶酸	0.1	251.20
维生素 B ₁₂	1.6	205.30
维生素母液	1ml	393.06
不加维生素	0.0	188.40

维生素类对 CeI 513 菌的生长都有程度不同的刺激作用，单一加入时，以核黄素、硫胺素或生物素的效果最好。维生素母液的加入有更为明显地刺激作用。

(五) pH 和温度条件对 CeI 513 菌株生长的影响

用基础培养液，加入丙酮酸作碳源，酪蛋白水解物作氮源，将培养液 pH 用 NaOH 或 HCl 分别调成 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 或 9.0，接种和培养条件同前述，结果如图 3。

培养液成分同上，pH7.0，接种后置下列不同温度环境中静止培养，结果如图 4。

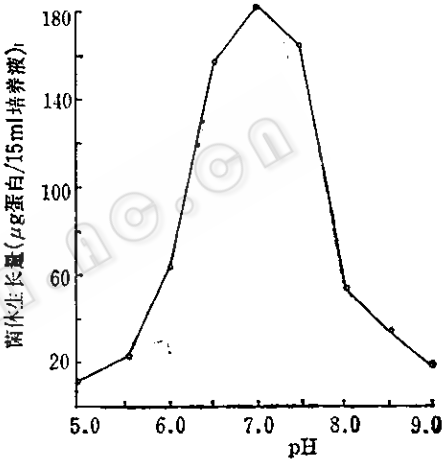


图 3 pH 对 CeI 513 菌株生长影响曲线

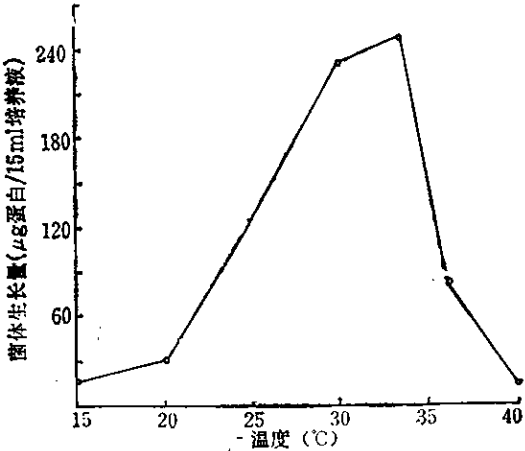


图 4 培养温度对 CeI 513 菌株生长影响曲线

图 3 说明，CeI 513 菌株生长适应的 pH

范围在 6.0—8.0, 最适生长的 pH 范围在 6.5—7.5 之间, 与过去报道的 *Frankia* 内生菌株相比, 它所要求的 pH 偏高。图 4 表明, CeI513 菌株生长最适温度为 30—34℃, 它的温度要求亦高于已报道的 *Frankia* 菌株。该菌对 pH 与温度的要求与其它 *Frankia* 菌株有差异, 可能是宿主植物原产于热带沿海沙滩中, 是否是这种特殊生境所影响, 有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Diem H. G. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 28: 526—530, 1982.
- [2] Diem H. G. et al.: *C. R. Acad. Sc. Paris*, 293(Série III): 489—491, 1981.
- [3] Diem H. G. et al.: *C. R. Acad. Sc. Paris*, 295(Série III): 759—763, 1982.
- [4] 蒋建德、朱宝琴: 科学通报, 3: 228—231, 1985.
- [5] Lalonde M. et al.: in *Current Perspectives in Nitrogen Fixation* (ed. by Gibson A. H. and W. E. Newton), Australian Academy of Science, R. 296—299, 1981.
- [6] Lalonde M. and E. H. Culvert: in *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests* (ed. by Gordon J. C. et al.), Oregon University Press, Oregon, p. 95—110, 1979.
- [7] Lewry O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [8] Burggraaf A. J. P. et al.: *Plant and Soil*, 61: 157—168, 1981.
- [9] Shipton W. A. and A. J. P. Burggraaf: *Plant and Soil*, 69: 149—161, 1982.
- [10] Benson D. R.: *Applied and Environmental Microbiol.*, 44(2): 461—465, 1982.
- [11] Blom J. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 9: 131—135, 1980.
- [12] Blom J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 13: 51—55, 1982.