

水稻根际微生物肠杆菌E-25和肺炎克雷伯氏菌K-12固氮作用的一些生理特性

徐继 王继文 辛淑英 王发珠 李佳格
(中国科学院植物研究所, 北京)

摘 要

我们研究了从京郊地区水稻根际分离出的一株肠杆菌(*Enterobacter sp*) E-25和一株肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) K-12的固氮特性。两种菌均具有较强的固氮活力。用乙炔还原法测定, E-25的比活为552毫微克分子 C_2H_4 /小时·毫克菌体蛋白, K-12的比活为676毫微克分子 C_2H_4 /小时·毫克菌体蛋白。在对数生长期菌体蛋白迅速增长, 固氮活性也随之增高。对数生长期后, 菌体蛋白停止增长, 固氮活性开始下降。E-25和K-12均为兼性好氧细菌, 在无氧和微氧条件下固氮活力显著高于常氧条件下。E-25比K-12对氧更加敏感。这两种菌可能是在北方碱性土壤中占据优势的根际固氮细菌。由于长期适应生存条件的结果, 这两种菌固氮的最适pH值均偏碱性。E-25对碳源的利用也不同于南方水稻根际分离出的肠杆菌。E-25只能利用果糖、葡萄糖和蔗糖, 而不能利用琥珀酸、柠檬酸等有机酸做固氮的能源。我们推测E-25在固氮过程中所需能量主要来自糖酵解途径。

关键词 水稻根际微生物 固氮作用

引 言

活跃在高等植物根际的固氮微生物正在愈来愈多地引起人们注意。现已从水稻、小麦、玉米等作物及牧草根际周围分离出很多固氮微生物^[1-6]。它们或紧密附着在根表面、或钻入到根皮层细胞内部。这些根际固氮细菌是一种不可忽视的潜在的氮肥来源。我们从京郊地区水稻根际分离出一株肠杆菌(*Enterobacter sp*) E-25和一株肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) K-12。这两种菌株在京郊水稻根际固氮微生物中可能占据优势。为了进一步探讨这些根际固氮微生物与水稻根系的联合共生关系, 我们对细菌的固氮作用生理特性进行了研究。本文报道这两种菌在游离生活条件下固氮作用的某些特性。

材料和方法

菌种: 实验所用菌种由本室杜干有同志从京郊水稻根际分离所得。经中国科学院微生物研究所鉴定, 一株为肠杆菌 (*Enterobacter sp*) 代号E-25, 另一株为肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 代号K-12。

培养基: 丰富培养基成份如下: 蛋白胨1%、NaCl 0.5%、牛肉膏0.3%、琼脂1.5%。液体无氮诱导培养基成份同Haahrela^[3]所用的培养基成份。

菌体培养: 分别接种K-12和E-25于丰富培养基斜面上。置30℃恒温箱内培养48小时后, 将试管中斜面上的菌苔加诱导培养基制成菌体悬浮液。取0.1ml悬浮菌液接种到具有6ml诱导培养液的40ml三角瓶内, 塞以棉塞, 静置30℃恒温箱内培养。

固氮活性测定: 测活性前, 无菌操作将三角瓶上棉塞换成反耳橡皮塞。将三角瓶抽真空、充氮气重复三次。注入10%纯乙炔气, 然后放在30℃恒温水浴上振荡反应2小时, 取出后用低温冷冻终止反应。每瓶取气样100微升, 注入气相色谱仪测乙烯生成量。每种处理重复3-4瓶, 取平均值并计算标准误差。固氮活性以毫微克分子 C_2H_4 /时·毫升培养液或毫微克分子 C_2H_4 /时·毫克菌体蛋白表示。气相色谱仪型号为102G型(上海分析仪器厂产品)。采用氢火焰离子鉴定器。

不同氧浓度实验: 将接种后的三角瓶, 立即用反耳塞塞紧。然后抽真空、充氮, 再注入不同量的氧, 使菌体开始培养时氧浓度分别为无氧(N_2 100%)、微氧(O_2 2%, N_2 98%)、常氧(O_2 20%, N_2 80%)。培养一定时间后, 在测定乙炔还原活性前, 取100微升气样注入ST-04型微量水色谱仪(北京分析仪器厂产品)内测氧浓度。

菌体蛋白含量测定: 取菌液样品1ml加入0.1毫升10% SDS, 于沸水浴中保温五分钟, 然后取适量样品, 用修改的Lowry法^[7]测菌液中菌体蛋白含量。

实验结果

一、K-12和E-25菌体蛋白增长及固氮活性的相关性

图1(A, B)结果表明K-12和E-25在同样培养条件下(详见材料和方法), 菌体蛋白增长与固氮活性的关系均为正相关。在对数生长期, 菌体蛋白迅速增长, 固氮活性也迅速提高。当菌体培养至20小时左右时, 固氮活性达到最高峰。用乙炔还原法表示固氮活性, E-25为 $552\text{nmol } C_2H_4/\text{h} \cdot \text{mg}$ 蛋白, K-12为 $676\text{nmol } C_2H_4/\text{h} \cdot \text{mg}$ 蛋白。在对数生长期后, 菌体生长速度减缓, 固氮酶活性也开始下降。

二、不同碳源培养条件下菌体的固氮活性

实验结果表明(见表1), K-12和E-25在常氧条件下均可以果糖、葡萄糖和蔗糖等碳源做为固氮的能源, 其中以蔗糖为最好。两种菌都不能利用琥珀酸和柠檬酸, 仅可利用少量的苹果酸。

三、培养基pH值与菌体固氮活性的关系

图2结果表明: K-12和E-25在酸性条件下均无固氮活力, 中性条件下固氮活力很弱。

两种菌固氮的最适 pH 均在微碱性范围内。

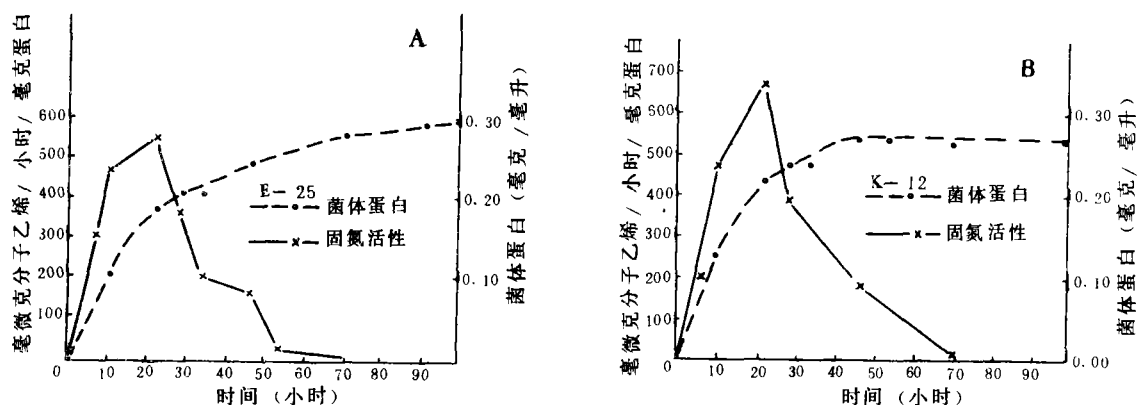


图 1 K-12 和 E-25 菌株培养过程中菌体蛋白增长和固氮活性的变化

表 1 不同碳源培养条件下菌株 E-25 和 K-12 的固氮活性

碳源*	E-25	K-12
琥珀酸盐	2 ± 1	3 ± 1
苹果酸盐	13 ± 3	7 ± 2
柠檬酸盐	4 ± 1	3 ± 1
果糖	164 ± 8	65 ± 9
葡萄糖	207 ± 15	30 ± 7
蔗糖	207 ± 23	149 ± 25

- 1、实验中所用各种碳源，均单独配制并以 NaOH 调至 pH 7-8，消毒后，接种前混入培养基中。
- 2、表中固氮活性单位为 $\text{nmol C}_2\text{H}_4 / \text{小时} \cdot \text{ml}$ 培养液。

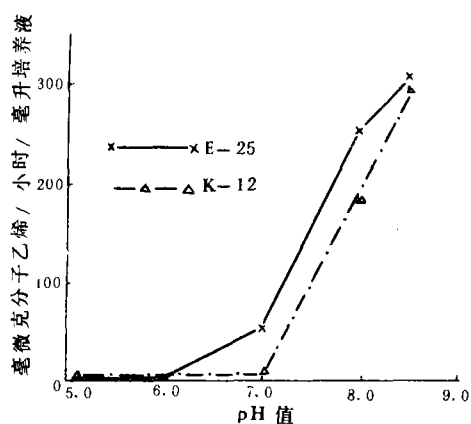


图 2 培养基的 pH 值对菌株 E-25 和 K-12 固氮活性的影响

四、氧浓度对菌体固氮活力的影响

将 K-12 和 E-25 菌体同时分别培养在无氧、微氧、常氧等不同氧浓度的无氮诱导培养液中。培养 11 小时、18 小时、45 小时后，先取样测瓶内实际氧浓度，再抽气除氧测乙炔还原活性。结果见表 2。

表 2 结果表明：在三种不同氧浓度下培养的两种菌都表现出不同程度的固氮活力，但在无氧和微氧条件下 K-12 和 E-25 的固氮活力均显著高于常氧条件下的固氮活力。E-25 与 K-12 相比，E-25 对氧更加敏感。E-25 在无氧情况下固氮活力为常氧时的 4 倍（培养 18 小时），而 K-12

则约为2倍。

表2 不同氧浓度培养条件下菌株E-25和K-12的固氮活性*

	培养时间 (小时)	无 氧		微 氧		常 氧	
		氧浓度	活 性	氧浓度	活 性	氧浓度	活 性
E-25	11	0	109±4	4.3	99±10	18.2	17±7
	18	0	291±22	3.5	134±23	18.2	73±7
	45	0	83±4	1.5	62±14	8.1	48±1
K-12	11	0	163±15	2.7	112±41	18.2	85±13
	18	0	164±16	3.8	96±26	15.7	70±35
	45	0	16±2	1.5	20±6	7.4	18±13

1、氧浓度即每次测固氮活性前，所测反应瓶内实际氧浓度的百分数。

2、固氮活性单位 $\text{nmol C}_2\text{H}_4 / \text{小时} \cdot \text{ml}$ 培养液。

讨 论

一、本文中K-12和E-25菌体蛋白增长及固氮活性相关性的结果与Haahela^[3]用肠杆菌和克雷伯氏菌所得的结果一致，即在正常条件下固氮菌固氮活性的最高峰都被限制在固氮菌的对数生长期。图一所示结果表明，K-12和E-25固氮活性最高峰均出现在菌体培养20小时左右。鉴于此结果，本文中各种不同条件下固氮活性的比较（除特指外）均采用菌龄20小时的菌体。

二、E-25和K-12均属于兼性好氧细菌。表2所示两种菌不同固氮活性是在不同氧浓度培养条件下的结果，而所有固氮活性的测定都是在厌氧条件下进行。显然，固氮活力表现不同主要是由于氧对固氮酶合成的影响。Robert^[8]认为*Klebsiella pneumoniae*及相类似的固氮有机体之所以能在低氧条件下合成固氮酶，是由于这类细菌有较强的呼吸保护势，用氧做末端电子授体直至氧的水平适合于固氮酶的合成。表2的结果表明，菌体培养45小时后瓶内实际氧浓度由18.2%分别下降到8.1%和7.4%，这正说明了由于菌体大量生长后强烈的呼吸作用导致了氧浓度的显著下降。

三、我们从北方水稻根际分离出E-25和K-12，这与南方地区水稻根际的联合共生固氮菌种类有所不同。尤其是肺炎克雷伯氏菌属在南方水稻根际很少有。E-25和K-12长期适应北方碱性土壤，其固氮作用的最适pH均偏碱性。南方和北方生长的菌对碳源的利用也有所不同。丘元盛等^[6]从南方水稻根际分离出的肠杆菌E-26可以利用琥珀酸和柠檬酸碳源，而我们从北方地区分离出的E-25却不能利用这些有机酸做固氮的能源，只能利用葡萄糖、果糖和蔗糖等碳源。E-25在微氧和无氧条件下，固氮活性最高。可推测E-25固氮所需能源主要来自厌氧的糖酵解途径。上述结果表明菌种来源不同，由于长期适应生长条件的结果其生理特性也有所区别。这一点，我们在研究菌体的生理特性时必须给予足够的重视。

四、在实验中我们还发现当斜面培养的K-12呈桔红色菌苔时，再转入无氮诱导培养，则菌体只生长而无乙炔还原活性。只有斜面培养的K-12呈乳白色菌苔时，再转入无氮诱导

培养, 菌体才能既生长而又有较高的乙炔还原活性 (结果尚未发表)。Watanabe⁸⁾在一些根际固氮菌中也曾观察到类似的现象。我们认为桔红色的菌苔可能是培养过程中产生的无乙炔还原活性的突变种。进一步研究此突变种的特性, 将是很有意义的。

参 考 文 献

- [1] Raji, P. N. et al: An Asymbiotic Nitrogen-fixing Bacterium from the Root Environment of Corn. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 69(11), 1972, 3474-3478
- [2] Cakmakci, M. L. et al: Characteristics of Nitrogen-fixing *Klebsiella Oxytoca* Isolated from Wheat Roots. Plant. Soil. 61, 1981, 53-63
- [3] Haahtela, K. et al: Nitrogenase Activity (Acetylene Reduction) of Root-Associated, Cold-Climate *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Pseudomonas* Species During Growth on Various Carbon Sources and at Various Partial Pressures of Oxygen. Appl. Environ. Microbiol. 45(2), 1983, 563-570
- [4] Yoshida, T. et al: The Fixation of Atmospher Nitrogen in the Rice Rhizosphere. Soil. Biol. Biochem. 5, 1973, 83-89
- [5] 何福恒等: 水稻、玉米、甘蔗根系联合固氮菌的分离和鉴定, 《微生物学通报》13(1), 1986, 2-6
- [6] 丘元盛等: 稻根联合固氮细菌的研究。1. 菌种的分离和鉴定《微生物学报》21(1), 1981, 468-471
- [7] Klucas, R.: Nitrogen Fixation by *Klebsiella* Growth in the Presence of Oxygen. Can. J. Microbiol. 18, 1972, 1845-1850
- [8] Watanabe, I. et al: Predominance of Hydrogen-utilizing Bacteria among N₂-fixing Bacteria in Wetland Rice Roots. Can. J. Microbiol. 28(9), 1982, 1051-1054

SOME PROPERTIES OF NITROGEN FIXATION BY ENTEROBACTER SP. 25(E-25) AND KLEBSIELLA PNEUMONIAE 12(K-12) ISOLATED FROM RHIZOSPHERE OF RICE

Xu Ji, Wang Jiwen, Xin Shuying, Wang Fazhu, Li Jiage
(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

ABSTRACT

Two strains of bacteria E-25 and K-12 were isolated from rice roots growing in Beijing area. Both E-25 and K-12 possessed significant capability of nitrogen fixation. The maximum nitrogenase activity measured by acetylene reduction assay of E-25 was 552 nmol C_2H_4 /hr/mg protein, and K-12 was 676 nmol C_2H_4 /hr/mg protein. During the exponential growth, the total cell protein as well as nitrogenase activity increased rapidly. After the exponential growth, nitrogenase activity declined as the increase of cell protein stopped. The nitrogenase activity of E-25 and K-12, which are facultative aerobic bacteria, were higher under anaerobic or low oxygen level than under high oxygen level, while E-25 was more sensitive to oxygen than K-12. The E-25 associated with N_2 -fixing bacteria, isolated from rice root growing in alkaline soil in Beijing area, significantly differed from that in southern China acidic soil in the utilization of carbon source. The former uses fructose, glucose and sucrose as energy sources for nitrogen fixation, but does not use succinate and citrate. It seems that habitat difference causes the diversity of these bacteria. It is suggested that the energy for nitrogen fixation of E-25 may come from the glycolytic pathway.

Key words: Rice; Rhizosphere microorganism; Nitrogen fixation