

# 木麻黄根瘤中分离的三株弗兰克氏菌 生长与培养方法的研究\*

康丽华 P. A. Rosbrook P. Reddell

**摘要** 比较了从不同来源的木麻黄根瘤中分离得到的三株弗兰克氏菌(*Frankia*)在两种浓度不同碳源培养基中的生长差异,结果表明:供试菌株在以丙酮酸钠为唯一碳源时生长最好,其生长量为其它碳源的1.3~47.7倍;最适合的碳源浓度为0.23 g C/L。在三种不同的*Frankia*菌培养方式中,通入无菌空气及发酵培养较静置培养能显著地提高弗兰克氏菌的生长量。同时还探讨了弗兰克氏菌的发酵条件。

**关键词** 弗兰克氏菌生长量、碳源、通气培养、发酵培养

自1978年Callaham等<sup>[1]</sup>首次从香蕨木根瘤中分离出弗兰克氏菌*Frankia*并成功地进行了离体培养,1982年Diem等<sup>[2]</sup>从木麻黄根瘤中分离出弗兰克氏菌获得成功以来,现已从多种木麻黄根瘤中分离出许多弗兰克氏菌<sup>[3~5]</sup>。从已分离的木麻黄弗兰克氏菌菌体看,它们是极其相似的,都具有*Frankia*菌的典型特征;从生长特性看,表现出许多共同性,但也存在着一些差异。迄今分离得到的这些弗兰克氏菌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非常少。Lechevalier等曾对分离自7属12种植物根瘤的15株弗兰克氏菌进行过测定,每毫升培养液收集到的湿菌体为2~15 mg,大约相当于链霉菌的1/100,从胡颓子科的4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4~20 mg湿菌体<sup>[6]</sup>。因此如何在短时间内收集到大量菌体,以满足应用研究的需要,这是将*Frankia*菌尽早应用于生产实践首先应解决的问题。

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。因此研究弗兰克氏菌人工培养的最适生长条件,增加菌体的收集量,逐步满足基础研究和应用研究对大量菌体的需要,这是非常重要的。目前国内外对弗兰克氏菌最适生长条件的研究多集中在碳氮源、pH、温度等,但对培养方式研究得较少。本文比较了三株不同来源的木麻黄弗兰克氏菌在两种浓度的不同碳源培养基上的生长特性;研究了通气培养、发酵培养对提高弗兰克氏菌生长量的效果,同时对发酵条件进行了初步的探讨。

1995-05-19 收稿。

康丽华助理研究员(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520);P. A. Rosbrook(澳大利亚昆士兰农业大学);P. Reddell(澳大利亚联邦科学与工业研究组织土壤研究所)。

\* 本研究为中澳合作项目 8736 和中国林科院基金项目“木麻黄根瘤菌——弗兰克氏菌的应用生态学研究”的部分内容。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 弗兰克氏菌菌株来源

供试菌株 JCT287 从澳大利亚细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana* Miq)根瘤中分离获得<sup>[3]</sup>;HFPCI3 从美国的细枝木麻黄根瘤中分离获得<sup>[4]</sup>;KB5 从澳大利亚的普通木麻黄中分离获得<sup>[7]</sup>。

### 1.2 培养基

采用 Shipton 和 Burggraaf<sup>[3]</sup>的基本培养基,磷酸缓冲液和 FeEDTA 分别灭菌后加入培养基内,碳源为丙酮酸钠、吐温、蔗糖、葡萄糖、琥珀酸钠、山梨醇、丙酸钠、柠檬酸钠、苹果酸钠。培养基碳源加入量以碳源含碳量计算,低浓度的碳源为 0.23 gC/L,高浓度的碳源为 2.3 g C/L,碳源均经 Sartorius Minisart N 0.2 μm 过滤灭菌后分别加入基本培养基。

### 1.3 培养方法

1.3.1 碳源试验 取 2 mL 经过 28 ℃ 静置 4~6 周的菌悬液接种于 50 mL 含有上述碳源的培养基中,25 ℃ 静置培养 14 d 后,测定菌体蛋白质含量。

1.3.2 通气培养 3 000 mL 三角瓶装入 2 000 mL 以丙酸钠为碳源的 Bap<sup>[8]</sup>培养液,菌株用 JCT287,通入无菌空气,接种量为 0.25%,25 ℃ 培养 14 d 后测定菌体蛋白质含量。

1.3.3 静置培养 培养液及培养条件同通气培养,但不通入无菌空气。

1.3.4 发酵培养 10 L 发酵罐装入 6 L 以丙酸钠为碳源的 Bap 培养液<sup>[8]</sup>,菌株用 JCT287,接种量为 0.5%,温度控制 28 ℃,搅拌速度为 200 r/min。发酵时间一周,每隔一定时间取发酵液测菌体干重。

### 1.4 菌体蛋白质测定方法

菌悬液经 2 500 r/min 离心 5 min,菌体用无菌蒸馏水洗 3 次,最后定容为 1.0 mL,加入 1.0 mL 1.0 N 的 NaOH,于 100 ℃ 水浴中 20 min,蛋白质测定根据 Ohnishi ST 和 Barr JK 方法<sup>[9]</sup>,用牛血清蛋白做对照。

### 1.5 菌体干重测定方法

取不同时间发酵液经过装有 0.22 μm 滤纸的 MILLIPOPL 过滤,于 80 ℃ 烘干至恒重后称重,每个样品重复 3 次,取平均数。

## 2 结果

### 2.1 弗兰克氏菌在两种浓度的不同碳源培养基中的生长特性

三株供试菌株在低浓度的碳源培养基中,在不同程度上都可以利用丙酮酸钠、吐温 80、蔗糖、葡萄糖、琥珀酸钠、山梨醇、丙酸钠、柠檬酸钠、苹果酸钠(表 1)。但在以丙酮酸钠为唯一碳源的培养基中生长最好,其生长量为其它碳源的 1.3~47.7 倍,其次为丙酸钠。在其余 7 种碳源培养基中均生长不好。

在高浓度碳源培养基中的三株供试菌株均比在低浓度的碳源中生长差。JCT287 和 KB5 菌株在以丙酸钠为唯一碳源的培养基中生长最好,其生长量为其它碳源的 1.29~50 倍,其次为丙酮酸钠。HFPCI3 菌株在以丙酮酸钠为唯一碳源的培养基中生长最好,其生长量为其它碳源的 2.55~27.53 倍。这三株菌在其余 7 种碳源上生长不好或不生长。

表 1 三株 *Frankia* 菌株碳源利用的比较(单位:  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

碳源	菌 株		
	JCT287	KB5	HFPC13
<b>低浓度碳源</b>			
丙酸钠	22.0(1.5)	43.0(3.0)	18.0(1.1)
丙酮酸钠	43.0(2.1)	56.0(4.7)	35.0(3.0)
吐温 80	6.4(0.56)	7.0(0.43)	2.9(0.20)
柠檬酸钠	0.9(0.08)	1.9(0.05)	1.5(0.14)
苹果酸钠	1.4(0.25)	<0.5	1.6(0.13)
琥珀酸钠	1.2(0.08)	<0.5	4.2(0.13)
山梨醇	1.3(0.20)	2.7(0.73)	1.2(0.14)
葡萄糖	1.5(0.17)	2.2(0.20)	0.8(0.23)
蔗糖	1.3(0.19)	1.8(0.3)	1.1(0.08)
接种量	0.3	0.2	0.8
<b>高浓度碳源</b>			
丙酸钠	20.0(0.9)	27.0(2.4)	11.0(0.96)
丙酮酸钠	11.0(2.6)	21.0(0.98)	28.0(6.2)
吐温 80	5.4(0.3)	7.2(1.2)	9.5(0.33)
柠檬酸钠	0.7(0.2)	2.9(0.5)	2.1(0.15)
苹果酸钠	0.5(0.09)	0.73(0.12)	0.1(0.01)
琥珀酸钠	0.5(0.02)	0.85(0.22)	0.47(0.12)
山梨酸	0.4(0.05)	5.1(0.42)	2.3(0.35)
葡萄糖	0.4(0.1)	ND	2.3(0.12)
蔗糖	0.5(0.08)	ND	1.7(0.16)
接种量	0.3	0.2	0.2

注:括号内的数字为标准误差,ND表示蛋白质含量极微。

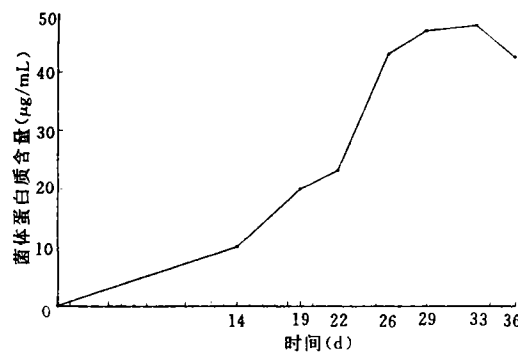
以上的试验结果与 Shipton、Burggraaf<sup>[10]</sup>和 Zhang<sup>[11]</sup>等人的结果相一致。Lopez<sup>[12]</sup>等报道了从桉木根瘤中分离得到的 *Frankia* 菌株在以琥珀酸钠为碳源的培养基中生长好,其生长量为丙酸钠的 4 倍,丙酮酸钠的 9 倍,这与从木麻黄根瘤中分离的 *Frankia* 菌株在利用琥珀酸钠、丙酸钠能力差别很大。说明了不同属植物来源的 *Frankia* 菌株在碳源利用上存在差异。

## 2.2 弗兰克氏菌的生长曲线

根据上述试验结果,选择丙酸钠作为唯一碳源,测定 JCT287 菌株的生长曲线。结果见图 1。从图 1 生长曲线可看出,*Frankia* JCT287 的延迟期为 22 d、22 d 后进入对数生长期,26~33 d 为稳定期,生长至 30 d 时菌体达到最大生长量。对数期的倍增时间为 72 h。

## 2.3 弗兰克氏菌生长与培养方式

2.3.1 弗兰克氏菌生长与通气培养 通气培养与静置培养对 *Frankia* JCT287 菌株生长的影响见表 2。表 2 表明,通气培养的 *Frankia* 菌体生长量为初始浓度的 88.80 倍,而静置培养为 11.41 倍,通气培养的 *Frankia* 菌体生长量是静置培养的 7.78 倍。与表 1 丙酸钠为碳源

图 1 *Frankia* JCT287 菌株生长曲线

的菌体生长量相比,也提高了1.26倍。结果说明,采用通入无菌空气的培养方式可以提高 *Frankia* 生长量。*Frankia* 菌属兼性厌氧菌,当静置培养时,*Frankia* 菌只生长在容器底部和容器壁,菌落呈细小颗粒状,直径为0.5~2 mm;通气培养时,*Frankia* 菌落絮状、松散,均匀分布在容器中。

静置培养的菌体生长量(6.39  $\mu\text{g/mL}$ )与表1丙酸钠为碳源的菌体生长量(22.0  $\mu\text{g/mL}$ )相差很大,其原因可能与培养规模有关系,静置培养的体积为2 000 mL,而表1的试验仅为50 mL,说明在大量培养中要提高菌体生长量,就必须通入无菌空气。

2.3.2 弗兰克氏菌的发酵培养 在通气培养的基础上扩大到发酵培养,*Frankia* 菌发酵培养的溶解氧与菌体生长的关系见图2。从图2中可看出,发酵开始2 d,溶解氧降低很少,说明氧利用不多,菌体增加也不多,2 d后,溶解氧下降,耗氧量增加,*Frankia* 菌体生长量上升。

### 3 结 语

(1)三株从木麻黄根瘤中分离的 *Frankia* 菌 JCT 287、KB5 和 HFPC13 最适碳源为丙酮酸钠;这三株菌最合适的培养基含碳量为0.23 g C/L。

(2)在 *Frankia* 大量培养中通入无菌空气能显著地提高菌体生长量,发酵培养在短时间内能大量收集到 *Frankia* 菌体,这两种培养方式进行 *Frankia* 菌的大量培养是可行的。通气培养具有设备简单、方法简便的优点,发酵培养需要发酵罐的设备。

表2 菌体生长与通气培养的关系

处理	菌体蛋白浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	增加倍数
通气培养	49.73	88.80
静置培养	6.39	11.41
初始浓度	0.56	—

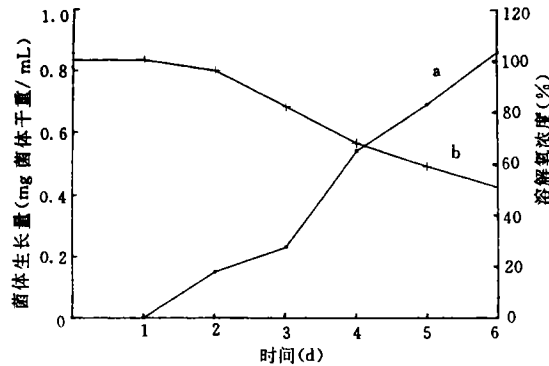


图2 *Frankia* 菌发酵培养的溶解氧与菌体生长的关系

a. *Frankia* 菌生长; b. 溶解氧

### 参 考 文 献

- Callahan D, Tredici P D, Torrey J G. Isolation and cultivation *in vitro* of the Actinomycete causing root nodulation in comptonia. Science, 1978, 199: 899~902.
- Diem H G, Dommergues Y R. The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina*. Can. J. Bot., 1983, 61: 2822~2825.
- Shipton W A, Burggraaf A J P. Aspects of the cultural behaviour of *Frankia* and possible ecological implications. Can. J. Bot., 1983, 61: 2783~2792.
- Zhang Z, Lopez M F, Torrey J G. A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. Plant and Soil, 1984, 78: 79~90.
- 康丽华, 曹月华, 吴英标. 木麻黄根瘤内生菌的分离、培养和回接. 林业科学研究, 1990, 3(5): 483~486.
- 杜大至, 原福虎, 李荣儿. 三种胡颓子科植物根瘤内生菌培养条件研究. 微生物学通报, 1986, 13(6): 248~250.
- Rosbrook P A, Burggraaf A J P, Reddell P. A comparison of two methods and different media for isolating *Frankia* from *Casuarina* root nodules. Plant and Soil, 1989, 120: 187~193.
- Murry M A. Growth kinetics and nitrogenase induction in frankia SP HFPPArI growth in batch culture. Plant and Soil, 1984, 78: 61~78.

- 9 Ohnishi S T, Barr J K. A simplified method of quantifying protein using the biuret and phenol reagents. *Ann. Biochem.*, 1971, 86:193~200.
- 10 Shipton W A, Burggraaf A J P. A comparison of the requirements for various carbon nitrogen sources and vitamins in some *Frankia* isolates. *Plant and Soil*, 1982, 69:149~161.
- 11 Zhang Z, Murry M A, Torry J G. Culture conditions influencing growth and nitrogen fixation in *Frankia* SP. HFPCI3 isolated from *Casuarina*. *Plant and Soil*, 1986, 91:3~5.
- 12 Lopez M F, Young P, Torrey J G. A comparison of carbon source utilization for growth and nitrogenase activity in two *Frankia* isolates. *Can. J. Microbial*, 1986, 32:353~358.

## Studies on Growth and Cultural Method for Three *Frankia* Strains from Root Nodules of *Casuarina* Species

Kang Lihua P. A. Rosbrook P. Reddell

**Abstract** The effect of different carbon sources on growth of *Frankia* isolates for *Casuarina* sp. was studied. For each of the three isolates, JCT287, KB5 and HFPCI3, growth was greatest on the carbon sources pyruvate; for the low carbon concentration growth was generally better than that at high carbon concentration. In addition, three cultural methods for *Frankia* were compared, the results showed that culture with air supplied and fermentation can increase growth of *Frankia*. The conditions of ferment were discussed.

**Key words** *Frankia*, growth, carbon source, air supplied, fermentation

---

Kang Lihua, Assistant Professor (The Research Institute of Tropical Forestry, CAF Guangzhou 510520); P. A. Rosbrook (Agriculture University of Queensland, 4072, Australia); P. Reddell (CSIRO, Division of Soils).