

产色链霉菌(*Streptomyces chromogenes*) 和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) 转化 NO_3^- 的研究*

马 瑞 霞

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要 筛选出 2 株真菌, 产色链霉菌(*Streptomyces chromogenes*) 和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) 具有转化 NO_3^- 的活性. 它们的活性甚至比枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 还强. 产色链霉菌和立枯丝核菌将 NH_4^+ 转化为 NO_3^- 的机理也不同于真菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporium*) 必需有 NO_3^- 或 NO_2^- 的诱导才具有活性, 它们可直接将硫酸铵转化为 NO_3^- , 进而再将 NO_3^- 转化为 NO_2^- . 此结果为研究新的硝化抑制剂提供了重要的理论根据.

关键词 产色链霉菌(*Streptomyces chromogenes*), 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*), 转化活性.

Study on Transformation of NO_3^- by *Streptomyces chromogenes* and *Rhizoctonia solani**

Ma Ruixia

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract The activity of two fungus, *Rhizoctonia solani* and *Streptomyces chromogenes*, transforming NO_3^- into NO_2^- was found in this study. The both of fungus directly converted $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to nitrate and then nitrate was reduced to nitrite. During the transformation, the fungus do not need inducement by nitrate and nitrite, this is different from *Fusarium oxysporium*, that Hirofumi Shoun et al. reported before.

Keywords transformation activity, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces chromogenes*.

为了减少农田氮素损失, 减少环境污染, 研究如何抑制 NO_3^- 的还原以及弄清 NO_3^- 被还原的机理显得非常重要. 在以前的研究中, 对细菌转化 NO_3^- 的报道较多^[1~3], 而对真菌报道的极少. 1992 年日本学者 Hirofumi shoun^[4] 首次报道了真菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporium*) 能转化 NH_4^+ 为 NO_3^- 进而转化 NO_3^- 为 NO_2^- . 本文报道产色链霉菌(*Streptomyces chromogenes*) 和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) 具有转化 NO_3^- 为 NO_2^- 的活性, 本实验结果为研究转化 NO_3^- 机理、研制新的硝化抑制剂和反硝化抑制剂, 均具有重要的意义.

1 材料和方法

(1) 供试菌株 产色链霉菌(*Streptomyces chromogenes*); 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*); 腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*); 露湿漆斑菌(*Myrothecium roridum*); 玉蜀黍黑粉菌

* 国家自然科学基金(39790100) (Project Supported by the National Natural Science Foundation of China) 和中国科学院资环局(KZ952-S1-230) 资助项目. 参加本项目工作的还有邹国钦.

作者简介: 马瑞霞(1939~), 女, 副研究员, 主要研究方向为农田生态系统中的化感作用

收稿日期: 1998-12-10

(*Ustilagomaydis*). 它们均由中国科学院微生物所提供.

(2) 各真菌种子液的培养方法 产色链霉菌、立枯丝核菌、腐皮镰孢菌、露湿漆斑菌均用普通真菌的液体培养基(液体的 PDA) 培养. 玉蜀黍黑粉菌用综合马铃薯培养基培养, 即在普通真菌培养基的基础上, 另加 0.3% 的 KH_2PO_3 , 0.15% 的 MgSO_4 和微量的维生素 B1, 培养液调至 pH6. 分别将各菌株的 100ml 培养液装入 250ml 三角瓶中, 经高压灭菌后, 在无菌条件下, 每瓶接各菌株的斜面菌种 2~3 环, 摇匀后放在 27~28℃ 恒温培养箱中培养 48h 备用.

(3) 筛选方法 在 $1.8 \times 20\text{cm}$ 的试管中, 每管加入 4ml $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaNO_3 , 然后分别加入 11ml 的各真菌的培养液(培养液的成分同种子液), 每处理重复 4 管, 高压灭菌后, 最后每管加入各菌株的种子液 5ml, 塞上经灭菌的橡皮反口塞, 在 28℃ 恒温箱中静止培养, 每隔 5d 取 1 次样, 分别测定 NO_3^- 的剩余量及 NO_2^- 的生成量.

(4) 产色链霉菌和立枯丝核菌转化 NO_3^- 的活性与枯草芽孢杆菌活性的比较 枯草芽孢杆菌转化 NO_3^- 的活性的实验方法同(3). 只将加入 5ml 真菌种子液改为 5ml 细菌种子液.

(5) 产色链霉菌和立枯丝核菌对硫酸铵的转化实验 在(3)的方法中, 将每管加入 4ml $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaNO_3 , 改为每管加入 5ml $40\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、以加入 5ml 灭菌的培养液(代替种子液)的处理为对照. 其它方法同(3).

(6) 测定方法 NO_3^- 的测定采用酚二磺酸法^[5]. NO_2^- 的测定采用 N-1 萘-乙二胺比色法^[6].

2 结果和讨论

2.1 具有转化 NO_3^- 活性的真菌菌株的筛选

结果见表 1. 从表 1 可知, 在只有 NO_3^- 存在的条件下, 立枯丝核菌和产色链霉菌具有转化 NO_3^- 的活性. 其它 3 株菌在培养过程中, 只

表 1 具有反硝化活性真菌的 NO_3^- 的剩余量和 NO_2^- 生成量/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

菌株	NO_3^- 剩余量		NO_2^- 生成量	
	5d	11d	5d	11d
产色链霉 (<i>Streptomyces chromogenes</i>)	5.97	4.35	0.09	0.03
立枯丝核菌 (<i>Rhizoctonia solani</i>)	4.84	2.71	0.15	0.04
腐皮镰孢菌 (<i>Fusarium solani</i>)	6.68	6.31	0.00	0.00
露湿漆斑菌 (<i>Myrothecium roridum</i>)	6.81	4.25	0.00	0.00
玉蜀黍黑粉菌 (<i>Ustilago maydis</i>)	3.21	4.04	0.00	0.00

见到 NO_3^- 的减少, 但未发现 NO_2^- 的生成. 因此认为其它 3 株菌无转化 NO_3^- 的活性.

2.2 立枯丝核菌和产色链霉菌与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 转化 NO_3^- 活性的比较

比较结果见表 2.

表 2 结果表明, 产色链霉菌和立枯丝核菌转化活性比枯草芽孢杆菌强, NO_2^- 的产生量是枯草芽孢杆菌的 1.6~6.6 倍. 由 NO_3^- 转化 NO_2^- 是反硝化过程的第一步, 可见这 2 株真菌的反硝化活性比枯草芽孢杆菌强. 本结果与 Kazuhiko Nakahara 等人^[7]的研究结果类似. Kazuhiko Nakahara 发现尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporium*) 的活性比 *Pseudomonas demitricans* 的活性强, *Pseudomonas demitricans* 在反硝化作用中, 反硝化速率为 $0.05\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 而真菌 *F. oxysporium* 的反硝化速率为 $161\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 真菌 *F. oxysporium* 的反硝化速率是细菌 *P. demitricans* 的几千倍.

2.3 立枯丝核菌和产色链霉菌将 NH_4^+ 转化成 NO_3^- 机理的初步探讨

Hirofumi Shoun 等人在研究尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporium*) 将 NH_4^+ 转化成 NO_3^- 时, 只有在 NO_3^- 和 NO_2^- 存在的条件下, *F. oxysporium* 被诱导出细胞色素 P-450, 在有 P-450 的情况下才具有转化活性. Hirofumi shoun 等人还认为铵、氨基酸、蛋白胨等对尖孢

表 2 立枯丝核菌和产色链霉菌与枯草芽孢杆菌
NO₂⁻ 生成量的比较/mmol · L⁻¹

菌株	培养时间/h			
	40	88	112	136
产色链霉菌 (<i>Streptomyces chromogenes</i>)	0.16	0.35	0.48	0.75
立枯丝核菌 (<i>Rhizoctonia solani</i>)	0.66	0.63	0.64	未测
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	0.10	0.13	0.29	0.30

镰刀菌(*F. oxysporium*) 诱导 P-450 是无效的. 本研究在立枯丝核菌和产色链霉菌的培养基中,只加入硫酸铵,而无 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 的存在,经培养 3d 后,立枯丝核菌可产生 1.40mmol · L⁻¹的 NO₃⁻ 和 3.00μ mol · L⁻¹的 NO₂⁻,产色链霉菌可产生 2.30mmol · L⁻¹的 NO₃⁻ 和 4.00μ mol · L⁻¹的 NO₂⁻,详见表 3. 随时间延长,NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 均逐渐减少,可见在只有硫酸铵存在的条件下,立枯丝核菌和产色链霉菌可直接将 NH₄⁺ 转化为 NO₃⁻. 而不是通过 NO₃⁻ 或 NO₂⁻ 诱导产生细胞色素 P-450 而起作用,这一点不同于 Hirofumi shoun^[4]等人报道的尖孢镰刀菌(*F. oxysporium*).

本研究说明了不同真菌将 NH₄⁺ 转化为 NO₃⁻ 的机理是不同的. 立枯丝核菌和产色链霉菌可将硫酸铵转化为 NO₃⁻,进而再将 NO₃⁻ 转化为 NO₂⁻,还表明这 2 株真菌不仅具有硝酸还

原酶而且还具有亚硝酸还原酶.

表 3 立枯丝核菌和产色链霉菌转化 NH₄⁺ 为 NO₃⁻ 和
NO₂⁻ 的量/mmol · L⁻¹

转化产物	立枯丝核菌			产色链霉菌		
	3d	6d	9d	3d	5d	7d
N O ₃ ⁻	1.4	0.6	1.0	2.4	0.5	0.1
N O ₂ ⁻	3.0	1.0	2.0	4.0	1.0	2.0

参 考 文 献

1 Stouthamer A H.Biology of Anaerobic Microoganisms. New York: John Wiley and Sons Ltd, 1998. 245～303

2 Kaplan W A. Adv. Agric. Microbiol. , 1985, **3**: 186～206

3 Robertson L A. Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrigen Oxides and Balomethanes. American Society for Microbiology, Washington, D. C: 1991. 189～199

4 Hirofumi Shoun, Du-Hyun Kim et al. Nitrification by Fungi. FEMS Microbiology Letters, 1992, **94**: 277～282

5 严昶升. 土壤肥力研究方法. 北京: 农业出版社, 1988. 253～258

6 郑洪元, 张德升. 土壤动态生物化学研究法. 北京: 科学出版社, 1982. 180～182

7 Kazuhiko Nakahara, Tatsuo Tanimoto et al. Cytochrome P-450 55A1(P-450dnir) Acts as Nitric Oxide Reductase Employing NADH as the Direct Electron Donor. The Journal of Biological Chemistry, 1993, **268**(11): 8350～8355