

固氮螺菌耐高铵突变株的选育

罗孝扬 蒋亚平 蔡金芝 陈华葵

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

严家骥

(武汉大学病毒系, 武汉)

应用亚硝基胍 (N-nitrosoguanidine, NTG) 诱变剂对固氮螺菌菌株 Ma241、Ma99、Sp7 和 G14 进行诱变处理后, 在添加了铵的类似物乙撑二胺 (ethylene diamine) 的 Döbereiner 无氮培养基中进行筛选, 反复纯化, 获得了在 45mM NH_4^+ 浓度以上, 保持固氮酶活性的耐铵突变株共 9 株。突变株 22 的耐铵固氮酶活性最强, 在 75mM NH_4^+ 浓度下, 固氮酶活性达到 $464\text{n mol 乙炔/mg 蛋白} \cdot \text{小时}$, 在 200mM NH_4^+ 浓度下, 固氮酶活性仍有 $32\text{n mol/mg 蛋白} \cdot \text{小时}$ 。

关键词 固氮螺菌; 耐铵突变菌株

当环境中存在化合态氮 (NH_4^+ 或 NO_3^-) 时, 固氮细菌和蓝绿藻就会失去固氮酶活性^[1-3], 只有在化合态氮被耗尽后, 它们才表现固氮酶活性^[4-6]。因此, 研究固氮酶产生的调节机制并寻找在有 NH_4^+ 存在下固氮酶活性不受抑制的耐铵菌株, 便成为人们重视的课题。

1974 年, Brill^[7] 发现蛋氨酸亚砷亚胺 (谷酰胺合成酶的一种抑制剂) 和 NH_4^+ (28mM) 同时存在的条件下, *Azotobacter vinelandii* 固氮酶活性不完全受抑制。此后, 探讨在较高 NH_4^+ 浓度下产生固氮酶活性又有报道^[8,9]。Kennedy 等人^[8]和 Brill^[9] 总结了克氏肺炎杆菌 (*Klebsilla pneumoniae*) 固氮基因的调节机制, 结果表明: *nifLA* 操纵子的产物调节所有其他 *nif* 基因的表达; *nifA* 基因的表达仅受 NH_4^+ 的阻抑。朱家璧等人将编码半乳糖苷酶基因 (*LacZ*) 组装在 *K. pneumoniae* 的 *nifLA* 的启动子上。以 *LacZ* 表达的快速变色反应作为检测手段, 筛选 *nifLA* 不受 NH_4^+ 抑制的突变株, 获得了在 15mM NH_4^+ 浓度下仍有固氮酶活性的突变株。

Майсурян 等人^[9]用 NTG 对固氮螺菌 Sp7 进行诱变处理, 用乙撑二胺筛选出一株在 15mM NH_4^+ 浓度下保持固氮酶活性的突变株 (No.42)。

作者参照 Майсурян 等人的方法, 加以修改, 获得了 *Azospirillum brasilense* 的一些耐铵突变株, 它们在 $45-200\text{mM NH}_4^+$ 浓度下具有强弱不等的固氮酶活性。

材料和方法

(一) 供试菌株

采用菌株 Sp7 (ATCC29145)、Ma241 和 Ma99 及来源于 Ma99 的突变株 G14 为出发菌株。(菌株 Sp7 来自 Döbereiner, 其余均为本实验室分离或诱变所得。均属 *Azospirillum brasilense*^[10])。

(二) 培养基成分和培养条件

采用参考文献 [11] 所报道的含不同 NH_4^+ 浓度的半固体培养基的配制方法: 准确称取一定量的 NH_4Ac , 加入半固体 Döbereiner 无氮培养基中 (采用高压蒸汽灭菌, 自然放气, 经试验证明: NH_4^+ 浓度在灭菌前后保持不变)。灭菌后, 分装到 25ml 的血清瓶中。

本文于 1984 年 3 月 27 日收到。
杨宝玉、卢瑛同志参加部分实验工作。

(三) 亚硝基胍 (NTG) 处理和突变株的筛选

参照 Майсурия 等人的方法, 加以修改。将上述供试菌株, 分别接种 Döbereiner 液体培养基, 32°C 振荡培养 (摇床转速: 4,000 转/分) 48 小时, 离心 (3000 转/分) 30 分钟后, 收集沉积菌体。用柠檬酸缓冲液 (pH5.5) 稀释至菌数 1×10^{11} 细胞/ml。加 NTG 诱变剂 (浓度为 50—100 μ g/ml, 死亡率在 99% 以上)。随即用同样的缓冲液稀释, 终止 NTG 的作用。离心 (3000 转/分) 30 分钟, 收集沉积菌体, 并将该菌体悬浮于 0.05% 乙撑二胺的 Döbereiner 无氮液体培养基中。再将全部悬浮液接入该固体培养基平皿内, 32°C 培养 5—6 天。挑出单个菌落。

(四) 菌体蛋白测定

采用 Lowry 等人^[12]所报道的 Folin-phenol 试剂法。用牛血清蛋白作标准曲线, 72 型分光光度计比色 (波长 660nm)。

(五) 固氮酶活性测定

活细胞的固氮酶活性测定采用乙炔还原法。

用容积为 25ml 的血清瓶, 内装 6ml 不含 NH_4^+ 或含不同浓度 NH_4^+ 的 Döbereiner 半固体培养基, 接入对数生长期的菌液 0.6ml, 菌数不低于 5×10^8 细胞/ml。置 32°C 培养 10—82 小时 (视细菌生长情况而定)。注入乙炔, 转化 8 小时, 用 102G 型气相色谱仪测定固氮酶活性。

结 果

(一) 耐铵突变株的来源及其固氮酶活性

经反复选育后, 共获得突变株 141 株。其中耐 7—45 mM NH_4^+ 的有 55 株, 耐高于 45 mM NH_4^+ 的共有 9 株, 它们分别为四个出发菌株的后代 (表 1)。在无 NH_4^+ 条件下, 出发菌株与突变株都有较高的固氮酶活性。突变株 22、47、48、136-1 和 24 的固氮酶活性低于出发菌株, 其余突变株的酶活性均高于出发菌株。在 15 mM NH_4^+ 存

表 1 在无 NH_4^+ 条件下耐铵突变株及其出发菌株的固氮酶活性比较 (单位: n mol 乙炔/mg 蛋白·小时)

Table 1 Comparison of nitrogenase activities of mutant strains in the presence of NH_4^+ and their corresponding starting strains in the absence of NH_4^+ (unit: n mol ethylene/mg protein/hr)

菌号 Strain	出发菌株 Starting strain 来源地点及其联合植物 Source and associated plants	由出发菌株诱变后所 获得的耐 NH_4^+ 突变株 Mutant strains fixing nitrogen in the presence of ammon- ium ions derived from starting strains after mutagenesis	在无 NH_4^+ 条件下 出发菌株的固氮酶活 性 (a) Nitrogenase activity of starting strains in the absence of NH_4^+ (a)	在无 NH_4^+ 条件下耐 NH_4^+ 突变株的固氮 酶活性 (b) Nitrogenase activity of mutant strains in the absence of NH_4^+ (b)	$\frac{b}{a}$
Sp7	巴西俯仰马唐 <i>Brazil Digitaria decumbens</i>	22	669.95	513.70	0.77
		47		213.04	0.32
		48		179.83	0.27
		136-1		401.55	0.60
Ma241	广西玉米研究所太 189×柳 F-4-2-1 GuangXi Institute of maize Tai189×Liu7-4-2-1	19-1	330.81	434.94	1.31
		23		525.36	1.58
Ma99	湖北省农科院川农 7 号 Hubei Academy of Agricu- lural Sciences Chuan- Jong No.7	14	417.60	623.79	1.32
G14	由 Ma99 诱变的突变株 (本 实验室) mutant strain derived from Ma 99 by mutagenesis	24	649.67	585.11	0.90
		79		845.21	1.30

注: 上表数字系 4 个重复的平均值。

The figures listed in this table are the mean values of quadruplicate specimens.

表 2 在不同 NH_4^+ 浓度下出发菌株与耐铵突变株固氮酶活性比较(单位: $\text{n mol 乙烯/mg 蛋白} \cdot \text{小时}$)
 Table 2 Comparison of nitrogenase activities produced by starting strains and mutant strains in the presence of different concentrations of NH_4^+ (unit: $\text{n mol ethylene/mg protein/hr}$)

菌株 Strain	NH_4^+ mM			
	0	15	45	75
Sp7	669.75	0*	0*	0*
22	513.70	297.18	223.83	464.30
47	35.24	4.92	2.35	0.56
48	179.83	147.40	7.58	0*
136-1	401.55	151.55	24.26	0*
Ma241	294.87	0*	0*	0*
19-1	439.94	273.57	243.69	80.49
23	525.36	52.18	335.32	197.95
Ma99	417.10	0*	0*	0*
14	623.79	144.23	12.18	24.5
G14	613.82	0*	0*	0*
24	585.01	57.86	80.51	72.75
79	845.21	39.54	2.02	1.91

注: 表内数字系三个重复的平均值。

* 表示生长良好, 但无酶活性。

The figures listed in this table are the mean values of triplicate specimens.

* Denotes no detectable nitrogenase activity, but those strains grow well.

表 3 在 5mM NH_4^+ 存在下出发菌株的固氮酶活性和残余 NH_4^+ 的含量($\text{n mol 乙烯/mg 蛋白} \cdot \text{小时}$)

Table 3 The nitrogenase activities of strains starting in the presence of 5mM NH_4^+ and the residual NH_4^+ in growth medium after different period of cultivation ($\text{n mol ethylene/mg protein/hr}$)

出发菌株 Starting strain	培养 10 小时 After cultivation for 10 hrs		培养 16 小时 After cultivation for 16 hrs	
	固氮酶活性* Nitrogenase activity	残余 NH_4^+ ** Residual NH_4^+	固氮酶活性 Nitrogenase activity	残余 NH_4^+ Residual NH_4^+
Sp7	0	+	748.21	-
Ma99	0	+	800.17	-
Ma241	0	+	184.16	-
G14	0	+	240.96	-

* 表中数字系 4 个重复的平均值。

** 用 Nessler 试剂检测半固体培养基中的残余 NH_4^+ (肉眼观察)。

* The figures listed in this table are the mean values from quadruplicate specimens.

** Residual NH_4^+ in the Semi-solid growth medium as detected by Nessler's reagent with naked eyes.

在下, 出发菌株无酶活性, 而突变株 22、23、19-1 和 24 在 NH_4^+ 浓度达到 75mM 时, 仍有较高的酶活性(表 2)。

(二) 不同 NH_4^+ 浓度对出发菌株及其突变株的固氮酶活性的影响

1. 出发菌株在 5mM NH_4^+ 的半固体培养基中培养 10 小时, 固氮酶活性为零, 这

时培养基中有 NH_4^+ 残留(表 3); 培养 16 小时, 固氮酶活性表现出来, 这时培养基中的 NH_4^+ 已被耗尽(用 Nessler 试剂检测, 肉眼观察)。

2. 在本实验条件下, 在半固体培养基中, 当 NH_4^+ 浓度在 50mM 以上时, 各突变株的生长速度随 NH_4^+ 浓度的提高而减慢。

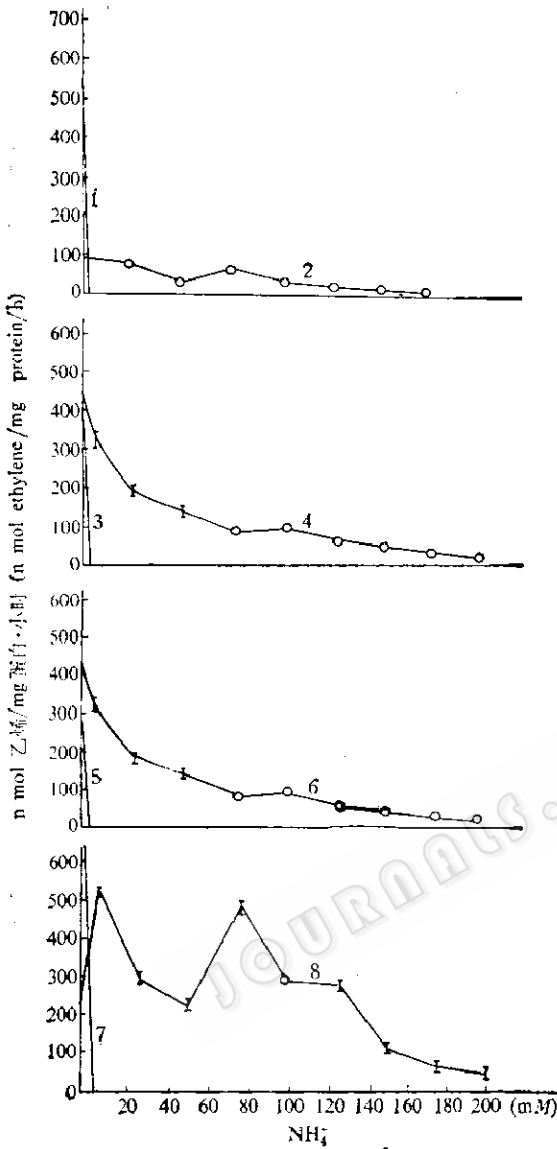


图1 不同 NH_4^+ 浓度对出发菌株和突变菌株固氮酶活性的影响

Fig. 1 The effect of different concentrations of NH_4^+ on the nitrogenase activities of starting strains and their mutant strains

- 1. 出发株 (starting strain) G14
- 2. 突变株 (mutant strain) 24
- 3. 出发株 (starting strain) Ma241
- 4. 突变株 (mutant strain) 19-1
- 5. 出发株 (starting strain) Ma241
- 6. 突变株 (mutant strain) 23
- 7. 出发株 (starting strain) Sp7
- 8. 突变株 (mutant strain) 22

因此,对不同 NH_4^+ 浓度,耐铵突变株酶活的测定采用不同的培养时间和相同的转化

时间。即 0—50mM NH_4^+ 培养 10 小时,转化 8 小时; 75—125mM NH_4^+ 培养 27 小时,转化 8 小时; 150—175mM NH_4^+ 培养 38 小时,转化 8 小时; 200mM NH_4^+ 培养 72—82 小时,转化 8 小时。当 NH_4^+ 浓度达到 225mM 时,突变株 22、23、24、19-1 生长良好,但无固氮酶活性。

3. 耐铵突变株的固氮酶活性随 NH_4^+ 的增加而逐渐下降 (图 1)。突变株 22 的表现最为突出,在 NH_4^+ 浓度达到 100—125mM 时,其酶活性仍在 250nmol 乙烯/mg 蛋白·小时以上,并且在 75mM NH_4^+ 浓度下表现的酶活性几乎与无 NH_4^+ 条件下的酶活性相接近。根据各突变株在高 NH_4^+ 浓度下的固氮酶活性大小,可将它们排成以下顺序: 22>23>19-1>24。

(三) 不同突变株多次传代后固氮酶活性的持续性

试验结果表明(图 2),突变株 22 在 75mM NH_4^+ 浓度下,经过 30 次转接,固氮酶

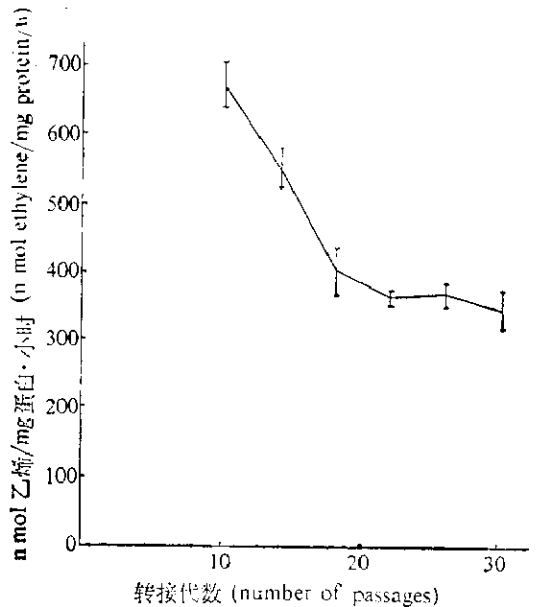


图 2 22 号耐铵突变株的不同转接代数在 75mM NH_4^+ 下的酶活性

Fig. 2 The nitrogenase activities of different number of passages of mutant strain No. 22 in the presence of 75mM NH_4^+

活性仍然保持较高水平。此菌株在同样 NH_4^+ 浓度下, 培养 27 小时, 再经不同时间转化后测定固氮酶活性, 结果(图 3) 表明,

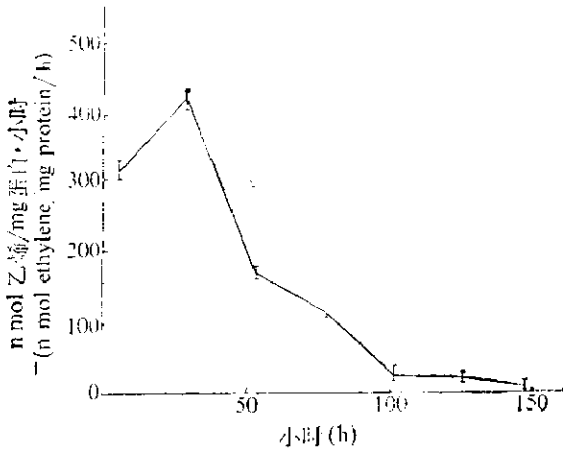


图3 22号耐铵突变株经不同时间转化的酶活性变化

Fig. 3 Nitrogenase activities of mutant strain No. 22 at different transformation time

培养液中 NH_4^+ 浓度为 75mM

(The concentration of NH_4^+ in growth medium was 75mM)

转化持续 150 小时, 其固氮酶活性仍然有 12nmol 乙烯/mg 蛋白·小时。

以苹果酸钠为唯一碳源时, 突变株 24 的培养物 pH 值由 7.0 上升到 9.0, 虽然培养物中的菌体很浓, 菌膜也厚, 但测不出固氮酶活性。在半固体培养基中添加麦芽糖 (dl-苹果酸钠: 麦芽糖=3:2), 突变株 24 在培养过程中 pH 值就保持在 7.5 左右, 可以测出固氮酶活性。

讨 论

Майсурян 等人报道, Sp7 在 5mM NH_4^+ 条件下培养 48 小时, 转化 18 小时, 固氮酶活性已下降至零。这与我们对 Sp7 菌株的试验结果不一致。我们的试验结果(表 3) 表明: 培养 10 小时, 培养基中还残留有 NH_4^+ , 测不出固氮酶活性。这表明残留的 NH_4^+ 量对固氮酶活性仍然起着抑制

作用。而培养 16 小时, 培养基中已无残留 NH_4^+ , 固氮酶活性就表现出来了。此外, 在谷酰胺对固氮酶活性的影响的试验中, Майсурян 等人的试验表明: Sp7 能耐 35 mM 的谷酰胺, 而我们的实验菌株 Sp7 则不耐谷酰胺。Майсурян 等人和我们虽然都采用 Döbereiner Sp7 菌株, 但所得的结果不同, 这可能是由于在不同条件下长期传代, 菌株的属性已经不完全相同的缘故。

采用乙撑二胺作筛选剂, 其特点在于它和 NH_4^+ 不同, 不能被固氮螺菌利用作为氮素养料。但它又与 NH_4^+ 相同, 具有阻遏固氮调节基因的功能, 因而阻遏了固氮酶活性的表达。在含有乙撑二胺的条件下, 不耐 NH_4^+ 的菌株无固氮酶活性, 它由于缺乏氮源而不生长, 而耐 NH_4^+ 的突变株不受乙撑二胺的阻遏, 仍具有固氮酶活性, 能利用空气中的氮而正常生长。

我们筛选所得的固氮螺菌的突变株 22, 耐 NH_4^+ 能力比 Майсурян 等人所得突变株 No.42 高出许多倍。突变株 22, 在 15mM NH_4^+ 浓度下的固氮酶活性为 297 nmol 乙烯/mg 蛋白·小时; 在 45mM NH_4^+ 浓度下为 223n mol 乙烯/mg 蛋白·小时; 在 75mM NH_4^+ 浓度下出现一高峰, 达 464 n mol 乙烯/mg 蛋白·小时; 在 200mM NH_4^+ 浓度下仍达 32n mol 乙烯/mg 蛋白·小时。该菌株在 75mM NH_4^+ 浓度下出现固氮酶活性高峰的特性, 有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Fred, E. B. et al.: University of Wisconsin Studies in Science, Madison Sisc. No. 5, 1932.
- [2] Wilson, P. W.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 29: 289—294, 1943.
- [3] Zelitch, I.: ibid., 37: 559—565, 1951.
- [4] Goldbery, R. B. et al.: J. Bacteriol., 118: 810—814, 1974.
- [5] Streicher, S. L. et al.: ibid., 120: 815—821, 1974.

- [6] Gordon, J. K. and W. J. Brill: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**: 967—971, 1974.
- [7] Brill, W. J. et al.: *J. Bacteriol.*, **145**: 348—357, 1981.
- [8] Kennedy, C. et al.: In "Current Perspective in Nitrogen Fixation Proceedings of the Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation", ed. Gibson and Newton, Australian Academy of Science, pp. 146—156, 1981.
- [9] Майсураян, А. Н.: *Генетика*, **4**: 575—597, 1982.
- [10] 罗孝扬等: *微生物学报*, **23**(1): 68—72, 1983。
- [11] 湖北省微生物研究所生物固氮组: *微生物学报*, **19**(2): 160—165, 1979。
- [12] Lowry, O. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.

SCREENING MUTANTS OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FIXING NITROGEN IN THE PRESENCE OF AMMONIUM IONS AT HIGH CONCENTRATION

Luo Xiaoyang Jiang Yaping Cai Jinzhi Chen Huakui
(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Yan Jiaqi

(Dept. of Virology, Wuhan University, Wuhan)

Mutant strains with nitrogenase active at high level were successfully isolated from starting NH_4^+ sensitive strains of *Azospirillum brasilense* Ma99, Ma241, Sp7 and G14. The starting strains were mutagenized by N-nitrosoguanidine and then selected from the NH_4^+ free growth medium containing an ammonia analogue — ethylene diamine. After selection and repeated purification, nine mutant strains fixing nitrogen in the presence of NH_4^+ higher than 45 mM were obtained.

The NH_4^+ resistant nitrogenase activity of mutant strain No. 22 is the highest, whose nitrogenase activity in the presence of 75 mM NH_4^+ was up to 464 n mol ethylene/mg protein/hr, and in the presence of 200 mM NH_4^+ was 32 n mol ethylene/mg protein/hr.

Key words

Azospirillum; Ammonium resistant strains