

苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*) 的耐盐性研究

吴 健 杨苏声 李季伦

(北京农业大学微生物专业, 北京 100094)

苜蓿根瘤菌 042B 在含有 400mmol/L NaCl 的基本培养基中生长时, 细胞内积累大量谷氨酸。但在不含 NaCl 的基本培养基中, 即使加入谷氨酸和(或)甘氨酸甜菜碱, 细胞内也不积累谷氨酸。然而, 在高浓度 NaCl 条件下, 外源甘氨酸甜菜碱则能进入细胞内, 并受到外加谷氨酸的促进。在 600mmol/L NaCl 的条件下, 从外源单独提供谷氨酸或甘氨酸甜菜碱, 不能提高苜蓿根瘤菌的耐盐性。但是, 同时加入谷氨酸(或其他氨基酸)和甘氨酸甜菜碱, 则具有明显的协同效应, 可以显著地减轻高盐浓度对苜蓿根瘤菌的抑制作用。钠、钾、氯和硫酸根等离子对苜蓿根瘤菌生长的抑制作用很小, 但镁和硝酸根离子则严重地抑制其生长。本文还探讨了营养和苜蓿根瘤菌耐盐性的关系。

关键词 苜蓿根瘤菌; 耐盐性; 谷氨酸; 甘氨酸甜菜碱

十多年来, 细菌的耐盐机制日益受到人们的重视。1975年, Measures^[1]发现革兰氏阴性细菌在高盐条件下, 主要积累谷氨酸以抵抗外界的高渗透压, 同时积累钾离子以中和谷氨酸所带的负电荷; 而革兰氏阳性细菌则主要积累脯氨酸和 γ -氨基丁酸, 钾离子变化不明显。随后陆续报道了快生型大豆根瘤菌、苜蓿根瘤菌和其他根瘤菌在盐压条件下, 细胞内谷氨酸和钾离子含量也迅速增加^[2-5]。

许多极端嗜盐和中度嗜盐细菌在高盐条件下能大量积累甘氨酸甜菜碱^[6,7], 耐盐植物和主要农作物也有类似现象^[8,9]。据报道, 甘氨酸甜菜碱也是肠道细菌和苜蓿根瘤菌的渗透保护剂, 在这些细菌处于高盐胁迫时, 细胞能大量吸收甘氨酸甜菜碱, 以缓解高渗透压对菌体的抑制作用, 并在高渗条件下可促进肺炎克氏杆菌固氮酶的合成及活性的提高^[10,11]。甘氨酸甜菜碱在低渗透压的培养基中可作为苜蓿根瘤菌的碳源或氮源^[12]。1989年, Smith 等发现, 苜蓿根瘤菌在盐胁迫下能积累一种新的二肽物质 N-乙酰葡萄糖氨基谷氨酸^[13]。

干旱和盐碱是土壤中根瘤菌常遇到的不利环境条件。据报道, 大部分在重要的豆科作物上结瘤的根瘤菌如大豆根瘤菌、豌豆根瘤菌和三叶草根瘤菌等对盐都很敏感^[14,15], 但苜蓿根瘤菌则具有相当高的耐盐性, 而且其固氮能力在已知的豆科植物根瘤中也是领先的^[16]。因此, 研究苜蓿根瘤菌的耐盐机制, 有助于将它的优良的耐盐性状设法转移到其他不耐盐但高效固氮的重要根瘤菌中去, 以提高其耐盐性, 增强其在土壤中存活和与土著根瘤菌竞争的能力。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

苜蓿根瘤菌 042B 分离自新疆, 以下简称 Rm042B。该菌在基本培养基上生长时可耐 500mmol/L NaCl。

本文于 1991 年 11 月 13 日收到。

(二) 培养基

1. YMA 培养基的配方见文献 [17]。
2. 基本培养基以 MM 表示, 配方参照文献 [18]。当用于耐盐性测定时, 基本培养基灭菌后每升加入 2ml 灭菌的 10% 酵母汁。根据试验需要, 加入各种化合物, pH 调至 7.0。

(三) 代时和耐盐性的测定

按文献 [18] 进行。

(四) 结瘤试验

采用培养管法 [17], 培养基成分见文献 [19]。

(五) 固氮酶活性测定

采用乙炔还原法。

(六) 细胞内游离氨基酸含量的测定

方法见 Rudulier 等的论文 [20]。

(七) 细胞内甘氨酸甜菜碱含量的测定

方法见 Storey 等的论文 [9]。

结 果

(一) 细胞内谷氨酸和甘氨酸甜菜碱的积累

Rm042B 是一种耐盐的根瘤菌。该菌在含有 400mmol/L NaCl 的基本培养基中生长时, 细胞内大量积累谷氨酸。表 1 指出, 在无 NaCl 的条件下, 其谷氨酸的含量为 16.1nmol/mg 蛋白, 占游离氨基酸总量的 39.7%, 而在 400mmol/L NaCl 条件下, 谷氨酸急剧上升为 260.4nmol/mg 蛋白, 占总量的 83.6%。但在不含 NaCl 的基本培养基中, 即使外加谷氨酸和 (或) 甘氨酸甜菜碱, 却不能促使细胞内积累谷氨酸。但在有 400mmol/L NaCl 的情况下, 从体外同时加入谷氨酸和甘氨酸甜菜碱, 则细胞内谷氨酸的含量较不外加的减少 (表 1), 而甘氨酸甜菜碱却大量积累 (表 2), 说明甘氨酸甜菜碱可以取代谷氨酸而成为细胞内的渗透调节物质。

在高盐条件下, 外源甘氨酸甜菜碱在细胞内的积累受外加谷氨酸的促进。如表 2 所示, 在 400mmol/L NaCl 存在的情况下, 加谷氨酸比不加时促使甘氨酸甜菜碱的积累量高出 2 倍。但是, 在本实验中, 没有发现 Rm042B 在 400mmol/L NaCl 条件下本身能积累大量甘氨酸甜菜碱。

(二) 谷氨酸和甘氨酸甜菜碱的协同效应

Rm042B 的细胞在 400mmol/L NaCl 条件下积累谷氨酸, 说明谷氨酸是一种渗透调节物质。但是, 外源谷氨酸并不能增加苜蓿根瘤菌的耐盐性。从表 3 可以看出, 在不含 NaCl 的基本培养基中, 加入谷氨酸能促使 Rm042B 生长, 说明该菌在没有 NaCl 的条件下, 能吸收谷氨酸作为营养物质。在 600mmol/L NaCl 浓度下, 加入谷氨酸使 Rm042B 的生长率比不加谷氨酸的略有提高, 其作用可能也是作为营养物质而促使菌体加快生长而已, 并非提高了该菌的耐盐性。在基本培养基中单独加入甘氨酸甜菜碱, 也不能减轻高盐浓度的抑制作用。但是, 同时加入谷氨酸和甘氨酸甜菜碱, 则显著地缓解了 600mmol/L NaCl 的抑

制作用。这个现象说明, 谷氨酸和甘氨酸甜菜碱具有协同效应, 能明显地提高苜蓿根瘤菌的耐盐性。

表 1 Rm042B 细胞内谷氨酸的积累

Table 1 Accumulation of intracellular glutamate in strain Rm042B

培养基 Medium	谷氨酸含量 Glutamate content (nmol/mg protein)	谷氨酸占总游离 氨基酸的百分比 % as glutamate
MM	16.1	39.7
MM+ 谷氨酸*	10.4	46.2
MM+glutamate		
MM+ 甘氨酸甜菜碱**	12.5	58.9
MM+glycine betaine		
MM+ 谷氨酸 + 甘氨酸甜菜碱	18.6	36.7
MM+glutamate+glycine betaine		
MM+400mmol/L NaCl	260.4	83.6
MM+400mmol/L NaCl + 谷氨酸 + 甘氨酸甜菜碱	106.9	66.4
MM+400mmol/L NaCl + glutamate + glycine betaine		

* 谷氨酸的浓度为 2.5mmol/L

Concentration of glutamate=2.5mmol/L

** 甘氨酸甜菜碱的浓度为 1mmol/L

Concentration of glycine betaine=1mmol/L

表 2 Rm042B 细胞内甘氨酸甜菜碱的积累

Table 2 Accumulation of intracellular glycine betaine in strain Rm042B

培养基 Medium	甘氨酸甜菜碱含量 Glycine betaine content(nmol/mg protein)
MM+ 甘氨酸甜菜碱	30
MM+glycine betaine	
MM+ 谷氨酸 + 甘氨酸甜菜碱	75
MM+glutamate+glycine betaine	
MM+400mmol/L NaCl + 甘氨酸甜菜碱	126
MM+400mmol/L NaCl+glycine betaine	
MM+400mmol/L NaCl + 谷氨酸 + 甘氨酸甜菜碱	364
MM+400mmol/L NaCl+glutamate+glycine betaine	

进一步试验表明, 在含有 2.5mmol/L 谷氨酸但不含 NaCl 的基本培养基中, 该菌的生长速率随着甘氨酸甜菜碱浓度的增加而下降。但是, 在含有 2.5mmol/L 谷氨酸和 600mmol/L NaCl 的基本培养基中, 该菌随着甘氨酸甜菜碱浓度 (0—2mmol/L 范围内) 的增加而迅速提高生长速度, 在 2mmol/L 时生长速率达到高峰, 说明在 NaCl 存在的情况下, 谷氨酸和甘氨酸甜菜碱协同促进 Rm042B 的生长 (图 1)。

(三) 甘氨酸甜菜碱和谷氨酸的可替代实验

为了查明甘氨酸甜菜碱和谷氨酸的协同效应是否有专一性, 对这两种物质分别进行了替代实验。

胆碱和甘氨酸甜菜碱的结构十分相似 (图 2)。但以胆碱代替甘氨酸甜菜碱, 与谷氨酸进行协同效应实验, 发现胆碱的作用远不如甘氨酸甜菜碱好 (表 4)。

表 3 谷氨酸和甘氨酸甜菜碱对 Rm024B 受盐抑制的缓解效果
Table 3 Relief of glutamate and glycine betaine on growth inhibition of strain Rm042B under salt stress

培养基 Medium	代时 (小时) Generation time (h)	
	0.0mmol/L NaCl	600mmol/L NaCl
MM	6	—
MM+ 谷氨酸 MM+glutamate	5	28
MM+ 甘氨酸甜菜碱 MM+glycine betaine	6	—
MM+ 谷氨酸 + 甘氨酸甜菜碱 MM+glutamate+glycine betaine	5	14

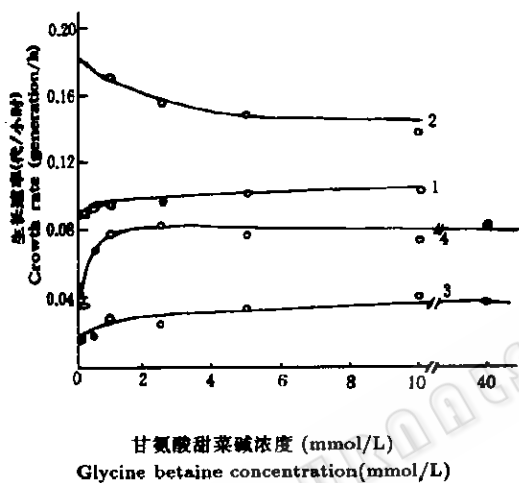


图 1 Rm042B 生长率和甘氨酸甜菜碱浓度的关系
Fig. 1 Relation of growth rate with concentration of glycine betaine in strain Rm042B

1. MM;
2. MM+ 谷氨酸 MM+glutamate;
3. MM+600mmol/L NaCl;
4. MM+600mmol/L NaCl+ 谷氨酸
MM+600mmol/L NaCl+glutamate;

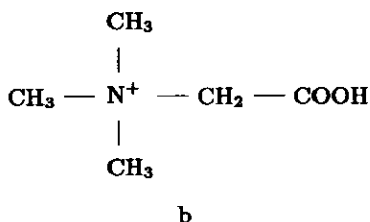
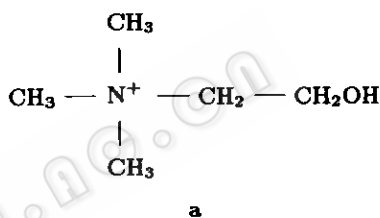


图 2 胆碱 (a) 和甘氨酸甜菜碱 (b) 的结构式
Fig. 2 The structural formula of choline (a) and glycine betaine (b)

表 4 胆碱和谷氨酸在盐压条件下对 Rm042B 生长的影响
Table 4 Effect of choline and glutamate on growth of strain Rm042B under salt stress

培养基 Medium	代时 (小时) Generation time (h)	
	0.0mmol/L NaCl	600mmol/L NaCl
MM+ 胆碱 * MM+choline	8	—
MM+ 谷氨酸 + 胆碱 MM+glutamate+choline	4	18
MM+ 谷氨酸 + 甘氨酸甜菜碱 MM+glutamate+glycine betaine	5	14

* 胆碱的浓度为 1mmol/L

Concentration of choline=1mmol/L

表 5 其他氨基酸代替谷氨酸在协同作用中对 Rm042B 耐盐性的影响

Table 5 Effect of other amino acids instead of glutamate on salt tolerance of strain Rm042B in synergism

氨基酸 Amino acid	0.0mmol/L NaCl	600mmol/L NaCl	600mmol/L NaCl+ 甘氨酸甜菜碱 600mmol/L NaCl+glycine betaine
谷氨酸 Glu	++	-	+
天冬氨酸 Asp	++	-	+
天冬酰胺 Asn	++	-	+
苯丙氨酸 Phe	++	-	+
苏氨酸 Thr	++	-	+
精氨酸 Arg	++	-	+
酪氨酸 Tyr	++	-	+
缬氨酸 Val	++	-	+
异亮氨酸 Ile	++	-	-
亮氨酸 Leu	++	-	-
丝氨酸 Ser	++	-	-
丙氨酸 Ala	++	-	-
甘氨酸 Gly	++	-	-
半胱氨酸 Cys	++	-	-

注: (a) “+”表示生长 Growth, “++”表示生长良好 Good growth, “-”表示不生长 No growth;

(b) 氨基酸浓度为 2.5mmol/L, 甘氨酸甜菜碱浓度为 1mmol/L

Concentration of amino acid=2.5mmol/L, concentration of glycine betaine=1mmol/L

有些氨基酸如天冬氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸、苏氨酸、精氨酸、酪氨酸和缬氨酸等可代替谷氨酸, 与甘氨酸甜菜碱对 Rm042B 起协同效应, 而另一些氨基酸则不能 (表 5), 其原因尚待分析。

(五) 离子的毒害作用

为了了解苜蓿根瘤菌受高浓度 NaCl 的抑制作用是由渗透压还是离子毒害作用造成的, 在基本培养基中加入与 500mmol/L NaCl 等渗的电解质, 如 KCl、Na₂SO₄、K₂SO₄、NaNO₃、KNO₃、MgCl₂ 和 MgSO₄, 观察这些物质对该菌生长的抑制作用, 以及谷氨酸和甘氨酸甜菜碱的协同效应与离子是否具有特殊的相关性。

从表 6 可以看出, Na⁺、K⁺、Cl⁻ 和 SO₄²⁻ 对 Rm042B 的毒性都不大, 如外加谷氨酸和甘氨酸甜菜碱能明显地减轻电解质的抑制作用。但是, Mg²⁺ 和 NO₃⁻ 对 Rm042B 有显著的毒害作用, 使菌体不能生长。

表 6 同等渗透压下电解质对 Rm042B 生长的影响

Table 6 Effect of electrolytes on growth of strain Rm042B under equivalent osmotic stress

处理 Treatment	代时 (小时) Generation time (h)
500mmol/L NaCl	15
500mmol/L NaCl+GB	11
520mmol/L KCl	23
520mmol/L KCl+GB	13
440mmol/L K ₂ SO ₄	13
440mmol/L K ₂ SO ₄ +GB	10
490mmol/L Na ₂ SO ₄	21
490mmol/L Na ₂ SO ₄ +GB	11
590mmol/L KNO ₃	不生长 No growth
530mmol/L NaNO ₃	不生长 No growth
330mmol/L MgCl ₂	不生长 No growth
850mmol/L MgSO ₄	不生长 No growth

注: GB 表示 2.5mmol/L 谷氨酸 + 1mmol/L 甘氨酸甜菜碱

GB=2.5mmol/L glutamate+1mmol/L glycine betaine

(六) 耐盐性和营养成分的关系

在基本培养基平板上, Rm042B 只能耐 500mmol/L NaCl。在加有酪素水解物的基本培养基, 其耐盐性可提高到 600mmol/L NaCl, 但在其中再加入 1mmol/L 甘氨酸甜菜碱, 并不再提高其耐盐性, 而在丰富的 YMA 培养基上, 其耐盐性却可达 700mmol/L NaCl (表 7)。上述结果说明, Rm042B 的耐盐性与培养基的营养成分有密切关系。

表 7 Rm042B 的耐盐性与营养的关系

Table 7 Relation of nutrition and salt tolerance of strain Rm042B

培养基 Medium	生长情况 Growth				
	0.0mmol/L	500mmol/L	600mmol/L	700mmol/L	800mmol/L
	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
MM	+	+	-		
MM+1% 酪素水解物 MM+1% casamino acid	+	+	+	-	
MM+1% 酪素水解物 + 1mmol/L 甘氨酸甜菜碱 MM+1% casamino acid + 1mmol/L glycine betaine	+	+	+	-	
YMA	+	+	+	+	-

讨 论

在含有 400mmol/L NaCl 的基本培养基中, Rm042B 以大量积累谷氨酸来调节渗透压, 而不像一些肠道细菌那样在细胞内积累脯氨酸^[1]。这个现象与其他耐盐的根瘤菌是一致的, 说明谷氨酸是根瘤菌的主要渗透调节物质。本实验表明, 在盐压条件下, 只有外源甘氨酸甜菜碱存在时, Rm042B 的细胞内才能积累这类物质。虽然外加谷氨酸能够促进甘氨酸甜菜碱在其体内的积累, 但甘氨酸甜菜碱终究是从外界渗入的, 并非其本身受盐胁迫而合成的。因此, 研究谷氨酸的调渗作用是揭示根瘤菌耐盐机制的关键所在, 需要进一步探索。

在含有 NaCl 抑制浓度的基本培养基中, 谷氨酸 (或其他一些氨基酸) 和甘氨酸甜菜碱的协同作用能显著地提高苜蓿根瘤菌的耐盐性, 这是以前没有报道过的。Rudulier^[21] 和 Bernard^[12] 报道, 在高渗透压条件下, 只加入外源甘氨酸甜菜碱能缓解盐对苜蓿根瘤菌和岩黄芪根瘤菌等的抑制作用。这个结果表面上与本文不同, 实际上由于本实验所用的基本培养基不含任何氨基酸, 而 Rudulier 等人以天冬氨酸或谷氨酸钾作为基本培养基的氮源, 掩盖了这些氨基酸与甘氨酸甜菜碱所起的协同作用。由于外源谷氨酸在高盐浓度下能促进甘氨酸甜菜碱进入 Rm042B 细胞内大量积累, 甚至可以部分取代谷氨酸的积累和调渗作用, 从而提高细胞的耐盐性 (表 1,2)。至于谷氨酸或其他一些氨基酸如何带动了甘氨酸甜菜碱的运输, 有待进一步研究。胆碱是甘氨酸甜菜碱的前体, 但它不能代替甘氨酸甜菜碱与谷氨酸起协同作用, 说明甘氨酸甜菜碱具有特异性。

本实验结果表明, 苜蓿根瘤菌受高盐浓度的抑制作用主要是由渗透压造成的, 因为土壤中常见的 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 和 SO_4^{2-} 等离子对 Rm042B 的毒性都不大, 但 Mg^{2+} 和 NO_3^- 却有严重的毒害作用。1984 年, Botsford 曾报道, Mg^{2+} 在 25mmol/L 就对苜蓿根瘤菌的生长有显著的抑制作用。至于 NO_3^- 对苜蓿根瘤菌的毒害作用, 至今尚未见报道。

苜蓿根瘤菌的耐盐性与营养有密切的关系。由于基本培养基只含有无机的碳、氮源和矿物质, 营养贫乏, Rm042B 在其中生长, 只能耐 500mmol/L NaCl。如果加入酪素水解物, 提供了丰富的氨基酸, 使其耐盐性提高 100mmol/L NaCl。在 YMA 培养基中, 除了丰富的氨基酸外, 还有各种水溶性的维生素, 使其耐盐性又提高了 100mmol/L NaCl。这个现象为苜蓿根瘤菌的耐盐性研究提供了一些线索。

参 考 文 献

- [1] Measures, J. C.: *Nature*, 257:398-400, 1975.
- [2] 杨苏声, 李季伦: 微生物学报, 29(2):107-112, 1989.
- [3] Botsford, J.L. and T.A. Lewis: *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(2):488-494, 1990.
- [4] Hua, S. S. T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:135-140, 1982.
- [5] Yap, S. F. and S. T. Lim: *Arch. Microbiol.*, 135:224-228, 1983.
- [6] Galinski, A. and H. G. Trüper: *FEMS Microbiol. Lett.*, 13:357-360, 1982.
- [7] Risk, M. et al.: *Biosaline Research*, p.539-544, 1982.
- [8] Storey, R. and R. G. Wyn Jones: *Phytochemistry*, 16: 447-453, 1977.
- [9] Hanson, A. D. and C. E. Nelsen: *Plant Physiol.*, 62: 305-312, 1978.
- [10] Bouillard, L. and D. L. Rudulier: *Physiol. Veg.*, 21:447-457, 1983.
- [11] Rudulier, D. L. and L. Bouillard: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(1):152-159, 1983.
- [12] Bernard, T. et al.: *Arch. Microbiol.*, 143:359-364, 1986.
- [13] Smith, L. T. and G. M. Smith: *J. Bacteriol.*, 171(9): 4714-4717, 1989.
- [14] Steinborn, J. and R. J. Roughly: *J. Appl. Bact.*, 37:93-99, 1974.
- [15] Steinborn, J. and R. J. Roughly: *J. Appl. Bact.*, 39:133-138, 1975.
- [16] Subba Rao, N. S.: *Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation*, 1980.
- [17] 上海植物生理研究所面氮室译: 根瘤菌实用研究手册, 第 3 页, 上海人民出版社, 上海, 1973 年。
- [18] 杨苏声, 李季伦: 北京农业大学学报, 14(2):143-148, 1988.
- [19] 周平贞等: 中国油料, 2: 60-62, 1979.
- [20] Rudulier, D. L. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 719:273-283, 1982.
- [21] Rudulier, D. L. et al.: *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 297, Serie III-155, 1983.

STUDIES ON THE SALT TOLERANCE OF *RHIZOBIUM MELILOTI*

Wu Jian Yang Susheng Li Jilun

(Department of Microbiology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

R. meliloti 042B accumulated high level of intracellular free glutamate when grown in minimal medium containing 400 mmol/L NaCl. Intracellular glutamate was not accumulated in this strain grown in minimal medium without NaCl even though glutamate and/or glycine betaine were added. However, exogenous glycine betaine could enter the cells and this entrance was stimulated by glutamate in the presence of high concentration of NaCl. Salt tolerance of *R. meliloti* to 600 mmol/L NaCl was not elevated when exogenous glutamate or glycine betaine was provided. However, a synergism occurred when glutamate (or another amino acid) and glycine betaine were added simultaneously to minimal medium. Under these conditions, the inhibition by the high salt levels to the growth of *R. meliloti* was relieved significantly. Magnesium ions inhibited the growth of *R. meliloti* severely, whereas sodium and potassium ions had little inhibitory effects. Of the anions, chloride and sulfate appeared to have little effects while nitrate inhibited the growth significantly. The correlation between the nutrition status and salt tolerance of *R. meliloti* was also discussed.

Key words *Rhizobium meliloti*; Salt tolerance; Glutamate; Glycine betaine