

荚膜对肺炎克雷伯氏菌的固氮活性影响的研究

袁长芳 周鸿宾 郝家骥

(山西生物研究所,太原)

氧对固氮酶有不可逆的失活作用,但是,在固氮菌体内的固氮酶都有一定的保护系统,以防止氧的危害,保持酶的活性。作为共生固氮细菌和放线菌,它们受到共生体保护系统的作用,最大限度地发挥着固氮酶的作用。而自生固氮菌,特别是好氧固氮细菌(Azotobacteria),由于它的呼吸值很高,细胞内的氧被大量消耗,因而呈现缺氧状态,从而保护着固氮酶的活性^[1]。

一些细胞的特殊结构如荚膜,它能减少氧向菌体内渗透^[2]。肺炎克雷伯氏菌作为根系联合固氮的一个成员^[3,4],它在碳源丰富的培养基上形成很厚的荚膜^[5],应能起到保护固氮酶的作用。尽管有荚膜的保护,它的最高固氮活性是在低氧分压($P_{O_2} = 0.03$)下获得的^[6]。这说明荚膜能降低氧的渗透作用,保护固氮酶,但作用有多大,尚无确切证据,为此,作者用肺炎克雷伯氏菌及该菌的无荚膜突变株作为材料,分别在正常氧分压和限制氧分压下测定两株菌的固氮活性周期变化;以及整个培养过程都在限制氧的分压下的变化,现将结果报道如下。

材料和方法

(一) 供试菌株

1. 原始菌株肺炎克雷伯氏菌 A_{021} (*Klebsiella Pneumoniae* A_{021}) 系本所固氮组由玉米根表分离获得的一株联合固氮菌^[3]。

2. 肺炎克雷伯氏菌 NM-6 菌株,系原菌株 A_{021} 经亚硝基胍诱变获得的无荚膜突变株,经连续传代五次,证明遗传性状稳定,并用原始菌株的专一性噬菌体同时侵染原始菌株和突变株,结果形成相同的噬菌斑,从而可以证明 NM-6 菌株是由原始菌株突变而来的。突变株和原始菌株在肉汤培养液中生长 24 小时,都不形成荚膜,在诱导培养液中生长 24 小时,原始菌株形成荚膜;突变株仍不形成荚膜,菌形同肉汤培养液中生长情况。亚硝基胍是强烈诱变剂,它往往引起一组基因的突变^[7],暂不排除固氮基因会发生突变,但是无论如何,如果荚膜对固氮活性无影响,那么原始菌株和突变菌株两者在

气相色谱测定由本所中心实验室莫海云同志承担,噬菌体侵染试验由贺玉成同志帮助,一并致谢。

本试验的所有处理中固氮活性的变化幅度应该是一致的。

(二) 培养基

取 10ml 诱导培养基^[8], 制成斜面备用。

(三) 固氮活性的测定

取保存菌种在牛肉膏斜面上活化后, 转到诱导培养基上, 培养不同时间, 再进行固氮活性测定。测定时从试管中抽出 2ml 空气, 注入 2ml 乙炔气, 恒温培养 12 小时, 放于冰箱, 待测。如需限氧培养, 则接种后立即密封, 抽出管内空气; 注入混合气体: 3% 氧气, 27% 氮气, 70% 氩气。所有试管都在 30℃ 中培养。使用岛津 GC-5AP 型气相色谱仪测定试管中乙烯的产量, 以表示固氮活性。仪器条件: 氢离子火焰鉴定器, GDX-502 分离柱, 柱温 50℃, 进样量 100 μ l。菌体蛋白测定基本按 Lowry^[9] 等人的方法进行。

(四) 氧分压的测定

按比例配成混合气体之后, 用 CY-5 型测氧仪检查氧的浓度。

试验结果

(一) 正常氧分压 (0.22 大气压) 对菌株固氮活性的影响

将原始菌株 A₀₂₂₁ 和突变株 NM-6 在 60 小时培养周期内固氮活性的测定结果如图 1 所示。

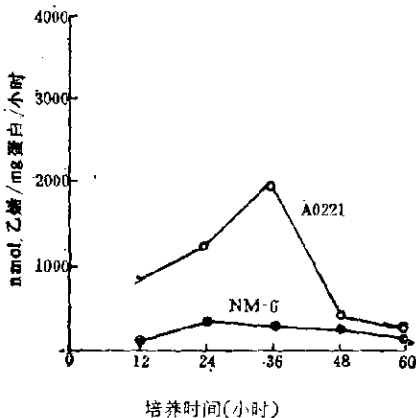


图 1 原始菌株和突变株在正常氧分压下固氮活性的变化

在正常氧分压下所进行的乙炔还原反应, 由图 1 可以看出, 无荚膜突变株 NM-6 的活性变化, 其曲线是近于平展的, 活性微弱, 最高活性只有 358n mol C₂H₄/mg 蛋白/小时, 原始菌株则可达 1970n mol C₂H₄/mg 蛋白/小时, 其乙炔还原的活性为突变株的五倍多。

(二) 乙炔还原反应时限制氧分压对原始菌株和突变株的活性影响

在不进行乙炔还原反应的时间里, 它们都处于正常氧分压下培养, 当注入乙炔反应开始时, 限制试管中的氧, 使处于 0.03 氧分压的环境中还原乙炔, 其活性变化情况, 见图 2。

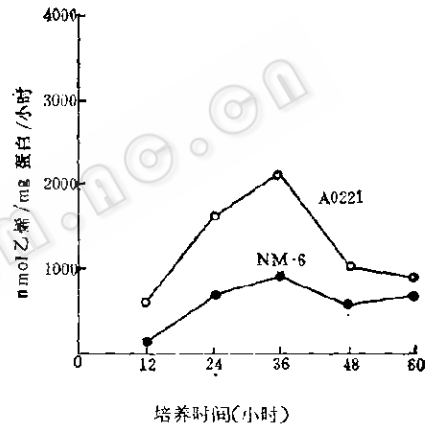


图 2 在测定时间内限制氧分压对原始菌株和突变株乙炔还原活性的影响

由图 2 可见, 突变株 NM-6 的乙炔还原活性曲线较图 1 升高近 2 倍, 其最高活性可以达到 910n mol C₂H₄/mg 蛋白/小时。原始菌株 A₀₂₂₁ 的最高乙炔还原能力可达 2030n mol C₂H₄/mg 蛋白/小时, 与图 1 的活性相比, 则提高不甚明显, 这说明原始菌株对短时间低氧分压环境, 反映不敏感, 而突变株则由于无荚膜, 对氧分压的反映明显, 所以还原的活性显著提高。

(三) 原始菌株和突变株整个培养过程都处于低氧分压下的还原活性变化

本处理与(二)之不同在整个培养过程都处于低氧分压中。为此, 接种后试管立刻换混合气体。它们的乙炔还原活性变化如图 3 所示。

显然, 图 3 中原始菌株 A₀₂₂₁ 和突变株 NM-

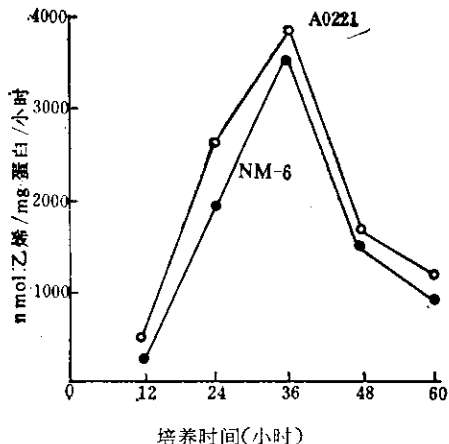


图3 A₀₂₂₁ 和 NM-6 菌株的整个培养过程都处于低氧分压下还原活性的变化

6的乙炔还原活性曲线基本接近。由于整个培养过程都是在低氧分压中,使突变株的乙炔还原活性达到 3490n mol C₂H₄/mg 蛋白/小时,原始菌株为 3940n mol C₂H₄/mg 蛋白/小时。

讨 论

兼性厌氧固氮菌——肺炎克雷伯氏菌 A₀₂₂₁ 菌株,在诱导培养基上,氧分压为 0.03 大气压的环境里,乙炔还原活性可达 3940n mol C₂H₄/mg 蛋白/小时,而在正常氧分压 (0.22 大气压) 中,活性为 1970n mol/mg 蛋白/小时,改变氧分压可使活性提高一倍,这一结果与阴沟肠杆菌

的测定完全一致^[8]。而突变株 NM-6,在低氧分压下乙炔还原活性最高可达 3490n mol C₂H₄/mg 蛋白/小时,正常氧分压下只有 358n mol C₂H₄/mg 蛋白/小时,从数据上看前者为后者的 10 倍,这一结果说明,突变株对氧分压之变化反映多么明显,这种结果的出现,说明失去荚膜的突变株的确失去保护系统,无法防止氧对固氮酶的危害,所以在高氧分压的环境里,乙炔还原活性极其微弱,而当限制氧分压时,活性变化极为突出。原始菌株对上述变化反映则不是十分突出,正因为它有荚膜的保护。

在(三)中原始菌株和突变株还原活性极为接近,这说明突变株的荚膜基因受阻而突变,而固氮酶的基因则没有发生任何损伤,它的活性之变化是荚膜作用的见证。

参 考 文 献

- [1] 中村道徳编: 生物素素固定, 学会出版センター, 1950。
- [2] N. 沃尔克著:《土壤微生物学》,中国科学院南京土壤研究所微生物室译,科学出版社,北京,1981。
- [3] 刘荣昌等: 微生物学通报, 9(5): 205—208, 1982。
- [4] 苏巧梅等: 微生物学通报, 10(4): 149—152, 1983。
- [5] 袁长芳等: 微生物学通报, 11(5): 206—208, 1984。
- [6] Hill, B. S.: *J. Gen. Microbiol.*, 93: 335—345, 1976。
- [7] 周鸿宾等: 遗传, 6(1): 11—14, 1984。
- [8] 袁长芳等: 微生物学报, 22(2): 160—164, 1982。
- [9] Lowry, O. H. et al.: *J. B. C.*, 193: 265—275, 1951。