

# 肺炎克雷伯氏杆菌荚膜形成生理的研究

袁长芳 周鸿宾 郝家骥

(山西生物研究所,太原)

本文利用自玉米根表分离的一株根系联合固氮菌——肺炎克雷伯氏菌  $A_{0221}$  株,对其荚膜形成与菌体生长的时间关系,不同碳源及同种碳不同用量对荚膜形成的影响,有机氮与无机氮源不同用量对荚膜的影响,在碳氮源都丰富的情况下,磷、钙盐的用量对荚膜的影响作了观察研究,报道如下。

## 材料与方 法

### (一) 供试菌株

肺炎克雷伯氏菌  $A_{0221}$  株,本所生物固氮组由玉米根表分离获得,经中国科学院微生物研究所鉴定定名。

### (二) 菌体生长测定

用 721 型分光光度计测光密度 ( $A_{550nm}$ ) 表示。

### (三) 荚膜直径测量

参照 Dugaid 报道的方法<sup>[1]</sup>进行。

### (四) 染色方法

负染色法,将菌液少许涂于载玻片上风干,用 1% 刚果红染 1 分钟,用滤纸吸去染液,风干后滴加盐酸酒精液冲洗,风干后观察,背景蓝色,菌形清晰。荚膜染色用黑色素负染法。

### (五) 合成培养基 (g)

甘露醇 5,  $(NH_4)_2SO_4$  0.15, NaCl 2,  $K_2SO_4$  1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2,  $CaCl_2$  0.02,  $FeSO_4$  0.001,  $NaMoO_4$  0.001,  $Na_2HPO_4$  7.5,  $KH_2PO_4$  2.5, 蒸馏水 1000 ml, 该培养基可使供试菌株较好地形

成荚膜。

## 结果与分析

### (一) 菌体生长与荚膜形成的时间关系

用肉汤30℃振荡培养过夜的菌悬液 0.1ml, 接种到盛有 30 ml 合成培养液的 250 ml 三角瓶内, 30℃ 振荡培养不同时间取样测定观察, 结果如图 1。

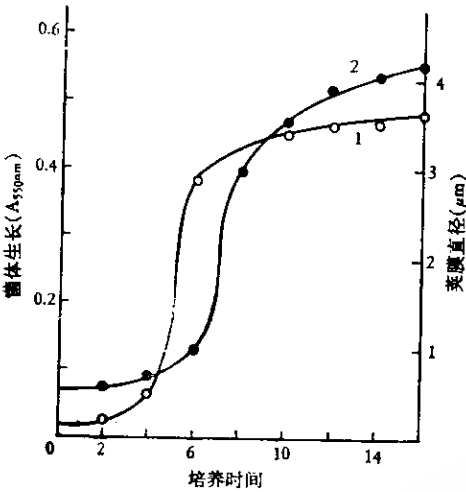


图 1 菌体生长与荚膜直径增长的时间关系  
(1. 菌体生长 2. 荚膜生长)

图中表明, 培养 6 小时, 菌体生长进入对数后期, 而荚膜生长正进入旺盛期, 8 小时后生长缓慢, 直至平衡, 证明荚膜生长期是在菌体生长的对数后期。

### (二) 不同碳源对荚膜的影响

将合成培养基中的甘露醇用等量的其它碳源代替, 种子培养与接种同前, 30℃ 振荡培养 24 小时, 结果见表 1。

由表 1 可见, 发酵后菌悬液 pH 值, 除柠檬酸钠外, 皆变化不大, 生长情况 (光密度  $A_{550nm}$ ) 基本相同, 而荚膜形成情况差异显著。说明, 该菌株虽能利用可溶性淀粉, 苹果酸钠或柠檬酸钠作为生长的碳源, 但积累多的荚膜物质则困难, 所以几乎看不到形成荚膜。半乳糖、鼠李糖或乳糖作碳源时, 荚膜形成不好。形成荚膜最好的碳源是甘油, 而蔗糖、葡萄糖、甘露糖或甘露醇次之。

表 1 不同碳源对荚膜的影响

试验号	碳 源	最终 pH	菌体生长 ( $A_{550nm}$ )	荚膜直径 ( $\mu m$ )
1	葡萄糖	6.4	0.65	3.8
2	蔗糖	6.5	0.54	4.2
3	可溶性淀粉	6.7	0.55	1.2
4	甘油	6.7	0.69	4.5
5	半乳糖	6.4	0.56	3.3
6	鼠李糖	6.7	0.54	3.3
7	苹果酸钠	6.5	0.48	1.6
8	柠檬酸钠	8.0	0.48	1.3
9	甘露糖	6.4	0.62	4.2
10	乳糖	6.7	0.57	3.2
11	甘露醇	6.7	0.58	4.2

### (三) 无机氮对荚膜的影响 (见表 2)

合成培养基中的  $(NH_4)_2SO_4$  加入量按表 2 进行。

表 2 硫酸铵对荚膜的影响

试验号	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	最终 pH	菌体生长 ( $A_{550nm}$ )	荚膜直径 ( $\mu m$ )
1	5	5.4	1.50	1.2
2	1.5	5.6	1.50	1.2
3	1	6.2	1.40	2.8
4	0.5	6.2	1.10	4.0
5	0.15	6.7	0.47	4.5
6	0.05	6.7	0.30	5.1
7	0.015	6.7	0.17	5.1
8	0	7.2	0.08	4.3

在甘露醇加入 5g/L 的培养基中, 当  $(NH_4)_2SO_4$  低于 1g/L 时, 即甘露醇:  $(NH_4)_2SO_4 > 5$ , C:N = 10:1, 则可形成荚膜,  $< 5$  则不形成荚膜。在氮源丰富的培养基中, 即使碳源加入量超过正常量, 仍不能形成荚膜, 说明  $NH_4^+$  大量存在对荚膜物质的积累有明显的抑制作用, 这可能与  $NH_4^+$  对自生固氮菌固氮作用的抑制有内在联系<sup>[2]</sup>。

### (四) 有机氮对荚膜的影响 (见表 3)

合成培养基中的  $(NH_4)_2SO_4$  用蛋白胨代替, 用量按表 3 进行。

表 3 说明, 当氮源为蛋白胨时, 甘露醇: 蛋白胨  $< 1$ , C:N = 3:1 时, 菌体生长良好, 但不形成荚膜, 比值  $> 1$ , 则形成荚膜。

### (五) 磷酸盐对荚膜的影响 (见表 4)

合成培养基中的磷酸盐应加的量按

表3 蛋白胨对荚膜的影响

试验号	甘露醇 (g/L)	蛋白胨 (g/L)	最终pH	菌体生长 (A <sub>550nm</sub> )	荚膜直径 (μm)
1	0	10	7.5	1.4	1.1
2	0.5	5	7.0	1.2	1.35
3	1.0	3.5	7.0	1.2	1.50
4	2	2	6.7	1.2	2.8
5	3.5	1	6.4	1.0	4.0
6	5	0.5	6.2	0.70	4.5
7	10	0	7.2	0.08	4.5

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 3:1, 由于磷酸盐加入量减少缓冲作用降低, 另加入 2g/L NaHCO<sub>3</sub> 增加缓冲作用, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 加入量为 5g/L, 其它成份不变。

表4 磷酸盐对荚膜的影响

试验号	磷酸盐 (g/L)	最终pH	菌体生长 (A <sub>550nm</sub> )	荚膜直径 (μm)
1	0.2	5.4	1.2	1.2
2	0.1	5.4	1.2	1.2
3	0.05	5.8	1.05	3.0
4	0.02	7.0	0.14	4.6
5	0	7.5	0.06	4.6

表4说明, 低浓度的磷酸盐对荚膜的形成有利。

### (六) 钙对荚膜形成的作用

在氮源丰富的培养基上, CaCl<sub>2</sub> 的加入量多少 (5 或 0.01 g/L), 甚至不加, 都不形成荚

膜, 但钙盐达 5g/L 时, 所形成的菌体为长杆菌 (见图2)。当用负染色法染菌体时, 钙浓度小于 0.1 g/L 时, 多形成淡薄的荚膜层, 荚膜内的菌体可清楚看到, 显然钙是完好地形成荚膜所必要的。

## 讨 论

1. Stevenson 和 Socolosky<sup>[3]</sup> 认为钙是形成自生固氮菌荚膜所必须的, 但本试验却看不到显著的作用, 在合成培养基中, 当钙加入量小于 0.1 g/L 或不加时, 荚膜多糖物质能在菌体周围堆积, 只是结构不甚紧密, 所以用负染色法染后能见到荚膜内的杆状菌体, 但发酵液中多糖丰富, 较钙加入量多的发酵液粘稠得多。

2. 该菌株能利用柠檬酸钠、苹果酸钠、可溶性淀粉作为碳源生长, 但荚膜几乎不能形成, 这可能是由于代谢途径的改变, 产物随之变化, 故不能大量合成荚膜多糖物质的缘故。因为底物不同, 荚膜组成还会变化。

3. 本试验所用蛋白胨含氮量 13.5%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 含氮量 20%, 甘露醇:蛋白胨比值为 1 以上时即可形成荚膜, 而甘露醇:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 比值为 5 时方可形成荚膜, 显然, 蛋白胨对荚膜形成的抑制作用较 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 弱得多, 这种现象可能与蛋白胨内除含蛋白质外, 还含有碳水化合物化合物的原因。

## 参 考 文 献

- [1] Dugaid, J. P.: *Path. Bact.*, 60: 265—275, 1948.
- [2] Mulder, E. G.: In "Nitrogen Fixation by Free-Living Micro-organisms" (ed. by Stewart, W. D. P.), Cambridge University Press, New York, p. 3—29, 1975.
- [3] Stevenson, L. H. and M. D. Socolofsky, Antonie Van Leeuwenhoek, 39: 341—350, 1973.



图2 含有大量 Ca<sup>++</sup> 的富氮培养液中的菌体形态