

固氮菌的孢囊

贾小明 陈声明

(浙江大学生命科学学院 杭州 310029)

关键词: 固氮菌, 孢囊, 中心体

中图分类号: Q93-936 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(1999)-05-0370-03

在特定条件下, 自生固氮菌 (*Azotobacter* sp.) 的营养细胞会转变成一卵圆形或球形的休眠体, 称为孢囊 (cyst)。

1 孢囊的形态结构

固氮菌的孢囊为球形或卵圆形, 大小为 $1.5 \times 2.0 \mu\text{m}^{[1]}$, 体积大约为营养细胞的一半, 其结构在光学显微镜下至少可分为 3 部分: 中心体 (central body)、内壁层 (intine) 和外壁层 (exine)。Pope 等^[2]用钌红染色可

见外壁层外还有荚膜。孢囊的中心体是收缩的细胞质部, 往往内含数个折射的颗粒, 为聚 β -羟基丁酸盐 (PHB) 颗粒。紧绕着中心体的为细胞质膜, 质膜外为一层胞壁酸质的薄壁。细胞质膜和细胞壁在光学显微镜下不可见。薄壁外为两层厚薄不一的壁, 内层称内壁层, 密度小、宽而均匀。外层为紧密多层膜片状结构的

收稿日期: 1998-10-18, 修回日期: 1998-12-28

外壁层。内壁层和外壁层合称孢囊壳 (cyst coat)。

2 孢囊的化学组成

固氮菌孢囊的化学组成与营养细胞的明显不同, 维氏固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 孢囊的化学成分分析结果见表 1、表 2^[1]。

表1 维氏固氮菌细胞和孢囊化学组分分析

细胞物质	% (干重)			
	营养细胞	孢囊	内壁层	外壁层
碳水化合物	28	45	44	32
蛋白质	52	26	9.1	28
脂类	9.2	16	36	28
灰分	7.1	8.8	4.1	3.2

表2 维氏固氮菌细胞和孢囊的灰分成分分析

无机物	% (干重)			
	营养细胞	孢囊	内壁层	外壁层
钙	1.24	4.85	2.45	1.62
镁	0.11	0.14	0.02	0.02
磷	4.20	3.82	0.38	0.34

孢囊内壁层和外壁层的碳水化合物中都含有葡萄糖、甘露糖、木糖和鼠李糖, 而葡萄糖胺和半乳糖胺仅在外壁层中才有。外壁层碳水化合物中的糖醛酸占 40%, 内壁层占 72%。二层中都含有甘露糖醛酸和古洛糖醛酸, 但这两种糖醛酸在二层中的比例差异很大, 外壁层中富含多聚古洛糖醛酸, 而内壁层中多含多聚甘露糖醛酸。内壁层组分与营养细胞荚膜的糖醛酸多聚物组分相似。

孢囊的蛋白质含量仅是营养细胞中的一半, 但外壁层的蛋白质含量是内壁层的 3 倍, 外壁层蛋白质有 35% 以上由甘氨酸、天冬氨酸和谷氨酸构成。

Lin 和 Sadoff 发现以干重计算, 孢囊中脂类几乎是营养细胞中的 2 倍。外壁层是脂蛋白-脂多糖-脂类的复合物, 其中 82% 为结合脂, 18% 为游离脂, 内壁层则主要为游离脂类。外壁层主要以氢键聚合保持其结构的稳定, 其精细结构可被尿素、胍或十二烷基磺酸钠解聚。

孢囊含有多种脂肪酸, 主要由 10~18 个碳原子饱和脂肪酸和 11 碳、16 碳和 18 碳的非饱和脂肪酸构成。内壁层的主要游离酸是十六烷酸, 占 22.4%, 而外壁层十六烷酸仅含 9.4%。这与营养细胞不同, 其仅含 4 种脂肪酸, 即十四烷酸、十六烷酸、9-十六碳烯酸、十八碳烯

酸。

表 2 可见, 以干重计, 孢囊含钙是营养细胞中的 4 倍。钙是固氮菌孢囊形成过程中必需的二价离子。显然孢囊的这些理化性质决定了其特殊的生物学性质。

3 孢囊的形成和萌发

固氮菌的孢囊形成与细菌的芽孢形成不同, 它是由整个细胞转变而成, 而不是由部分细胞物质转变而成。用相差显微镜观察孢囊形成过程, 最先能观察到的形态学变化是运动的杆状细胞转变成不运动的球状细胞, 这被称为前孢囊 (pre-cysts)。数小时后壁增厚, 细胞形成中心体、内壁层、外壁层。中心体内有聚 β -羟基丁酸盐 (PHB), 并且逐步发育成有折光性的孢囊。随着孢囊的成熟, 固氮菌丧失其固氮能力。

Lin 和 Sadoff 报道维氏固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 培养在甘露糖、鼠李糖和其它碳水化合物以及各种有机酸和某些醇的培养基上时, 形成的孢囊数不到总细胞数的 1%。但将在葡萄糖基上生长至对数期的细胞洗净, 培养在含羟基丁酸盐 (BHB) 的基质上, 48h 内几乎全部形成孢囊。固氮菌的孢囊形成受培养基中碳源影响极大, 正丁醇、巴豆酸或 β -羟基丁酸盐 (β -BHB) 等^[3]能促使孢囊形成。固氮菌在含 0.3% 正丁醇的 Burk's 培养基上 33℃ 培养 3d 即出现孢囊, 5~7d 90% 以上的细胞转变成孢囊。Hitchins 等^[4]用 0.2%BHB 作为诱导剂, 36h 即完成孢囊形成过程, 并且检测到在孢囊形成过程中, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶迅速丧失, 9h 就测不到该酶活性。而 BHB 脱氢酶被迅速诱导产生, 其活性与时间呈双峰曲线。同时乙醛酸支路酶和葡萄糖异生酶也有同样的双峰模型。而固氮酶活性在 4h 内即消失, DNA 合成被关闭。此后, 细胞停止分裂。

Su 等^[5]的研究表明孢囊形成早期, 一些特异的蛋白在 2h 内开始形成, 12h 达最大值。其中一个特异的蛋白为 β -酮脂酰基载体蛋白合成酶 (β -ketoacyl-carrier protein synthetase)。

孢囊的形成过程需要 Ca^{2+} 的参与, 培养基中缺少钙离子会导致孢囊形成的夭折 (abortive encystment)。

在适宜的条件下, 孢囊可萌发, 孢囊悬浮在有葡萄糖、蔗糖或醋酸盐的 Burk's 无氮培养基上通气培养会萌发。孢囊接种在含这些萌发剂 (germinant) 的基质上, 立即开始呼吸并产生 CO_2 , 其后很快有 RNA 和蛋白

质的合成。Cagle 和 Vela^[6]报道在孢囊萌发的 4h 后开始 DNA 的合成,并且固氮,大约 8h 出现典型的花生状营养细胞。但有 0.04% 的孢囊最终未能形成营养细胞。在相差显微镜下,孢囊萌发的首先症状即丧失折光性。萌发过程很缓慢,大约持续 4~6h。萌发时中心体膨大,孢囊内壁消失,外壁出现断裂,最后从崩溃的孢囊结构中生出年幼的营养细胞。萌发的孢囊释放的紫外线吸收物质中没有出现细菌芽孢萌发时常释放的吡啶二羧酸。

Beaman 等^[7]报道将维氏固氮菌培养在以 0.1~1.0% 酵母浸出液和 0.3% 丁醇补充的无机盐基质上能形成比正常孢囊大 2~4 倍的巨大孢囊(giant cysts)。如将巨大孢囊移植到无氮培养基上,孢囊萌发前,孢囊内的中心体会多次分裂形成含 2 个或数个球形中心体的孢囊即多中心体(multiple central bodies)孢囊,然后外壁层破裂,中心体释出,并转变成典型的杆状营养细胞。巨大孢囊的形成和以后完整孢囊内中心体的多次分裂的关键在于环境因子。在特殊条件下,固氮菌的巨大孢囊可视为繁殖体。

4 孢囊的生物学性质

固氮菌的孢囊是代谢休眠体,与细菌的芽孢相似,仅具很弱的内源性呼吸。固氮菌的孢囊具有抗干燥、抗机械破坏、抗紫外线和抗辐射的作用。孢囊中心体对物理因子处理的敏感性与营养细胞类似,很易被超声波致死,而孢囊则不易被超声波破坏。孢囊的抗热性比营养细胞稍大些,但抗干燥性比营养细胞明显增强。孢囊在干土中保存 10 年仍能存活^[8]。孢囊的抗性与孢囊壳的存在有关,因为除去孢囊壳,中心体的抗性与营养细胞的抗性相同。固氮菌的孢囊在室温中保存二年仍能存活,而其营养体在室温中则很快丧失生活力。

孢囊缺乏对不可透物质的渗透屏障,萌芽剂很容易通过它被细胞吸收,并在数秒钟内即引发呼吸作用^[9]。因此将其培养在他们能利用的基质上,则无滞留适应期。Socolofsky 等用 EDTA 处理维氏固氮菌孢囊,立即引起孢囊壳的破裂,同时释放出中心体,此时孢囊

悬浮液的光密度显著下降。但用溶菌酶处理孢囊,则无明显反应。EDTA、吡啶二羧酸和柠檬酸盐能引起孢囊外壁层的破裂,用 0.2% 柠檬酸处理孢囊,可得到裸露的中心体。中心体能代谢那些孢囊能代谢的物质,但只能在等渗透压下才能完成,这表明它是原生质或球状体类。因此,孢囊外壳的表面结构对保持孢囊的完整性是重要的。

孢囊作为一种形态学特征,为我们鉴别菌种提供了一种实用的鉴别特征。1984 年伯杰氏系统细菌学手册第一卷在固氮菌科下分属时,将能否形成孢囊作为定属的重要标准,能形成孢囊的固氮菌归为固氮菌属(*Azotobacter*),不能形成孢囊的归为氮单胞菌属(*Azomonas*)。此后,Sadasivan 等^[10]报道了非固氮菌科的二个固氮菌种即巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasiliense*)和产脂固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum*)也能形成孢囊,由此可见孢囊作为一种形态学特征,它具有分类学意义。

参 考 文 献

- [1] Sadoff H L. Bacteriological Reviews, 1975, 39(4): 516~539.
- [2] Pope L M, Wyss O. J. Bacteriol, 1970, 102(1): 234~239.
- [3] Hitchins V M, Sadoff H L J. Bacteriol, 1970, 104(1): 492~498.
- [4] Hitchins V M, Sadoff H L. J Bacteriol, 1973, 113: 1273~1279.
- [5] Su C J, Cunha A, Wernette C M et al. J. Bacteriol, 1987, 169(10): 4451~4456.
- [6] Cagle G D, Vela G R. J. Bacteriol, 1971, 107: 315~319.
- [7] Beaman B L, Jackson L E, Shankel D M. J. Bacteriol, 1968, 96(1): 266~269.
- [8] Vela G R. Appl. Microbiol, 1974, 28: 77~79.
- [9] Loperido B, Sadoff H L. J. Bacteriol, 1973, 113: 841~846.
- [10] Sadasivan L, Nayra C. J. Bacteriol, 1985, 163(2): 716~723.

本 刊 声 明

凡本刊刊出的稿件,除在本刊发表出版使用外,还将以《光盘版》等形式出版使用,作者如不同意,敬请来稿时声明。