

野油菜黄单胞菌 NK-01 的形态及黄原胶分泌的电镜研究^{*}

牛淑敏 杨建华 刘锡猛 王玉香 赵大健

(南开大学微生物学系 天津 300071)

李时岩

(河南师范大学生物系 新乡 453002)

摘 要 利用透射电镜,研究了野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) NK-01 菌株培养过程中菌体形态及黄原胶分泌的动态变化过程。喷涂造影显示出菌体形态及黄原胶分泌的变化规律,超薄切片揭示了此菌株的超微结构。用铬离子交联技术观察到黄原胶可交织成网状结构。

关键词 野油菜黄单胞菌, 黄原胶分泌, 超微结构

野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 是一种常见的植物病原菌,可引起甘蓝黑腐病等多种经济作物病害,导致世界范围的经济损失^[1]。此菌株产生的荚膜多糖——黄原胶是其主要的致病因子之一^[2]。但黄原胶也是一种主要的工业多糖,可用于食品、医药、消防、化妆品和三次采油等许多行业^[3]。研究黄原胶的分泌动态变化,不论对理论研究还是工业生产和植物保护等实践都具有一定的意义。在野油菜黄单胞菌及黄原胶的电镜研究方面,赵大健等人^[4]和王德润等人^[5]曾分别作过报道。本文作者连续观察了培养过程中菌株 NK-01 的形态变化及黄原胶分泌的全过程,并首次对此菌的超微结构进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

野油菜黄单胞菌 (*X. campestris*) NK-01 菌株系南开大学生物系多糖组筛选获得。

1.2 发酵液的制备

取一环已活化的菌种,接种于 10ml 种子培养基^[6], 28℃ 培养 48 小时,以 1% 接种量转接 50ml 发酵培养基^[6], 28℃ 振荡培养,定时取样。

1.3 菌体的透射电镜观察

将发酵液用无菌水稀释 1000 倍,沾铜网,7°角真空喷镀钨铌合金,透射电镜 (PHILIPS EM 400ST) 观察。

1.4 菌体的扫描电镜观察

离心发酵液收集菌体,洗涤,2.5% 戊二醛固定 18 小时,0.1mol/L 磷酸缓冲液漂洗,

• 参加工作的有刁虎欣、樊廷玉、郭世宜。

本文于 1993 年 8 月 29 日收到。

50—100%乙醇逐级脱水, 临界点干燥, 离子喷涂, 扫描电镜 (HITACHI X-650) 25kV 下观察。

1.5 交联黄原胶的观察

将黄原胶干粉 (江苏金湖黄原胶厂产品) 配成 0.12% 溶液, 加入 CrCl_3 , 使 Cr^{3+} 浓度为 $2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, 交联 30 分钟, 沾铜网, 7° 角喷镀钨合金, 透射电镜观察。

1.6 黄原胶干粉的电镜观察

将美国 Keltrol 公司的黄原胶配成 $6 \times 10^{-5} \text{g/L}$ 溶液, 沾铜网, 喷镀钨合金, 透射电镜观察。

1.7 菌株超微结构的观察

离心发酵液取菌体, 2.5% 戊二醛固定 24 小时, 0.1mol/L 磷酸缓冲液漂洗, 2% 醋酸双氧铀染色, 50—100% 乙醇系列脱水, 树脂 (Epon 812) 包埋, LKB 超薄切片机切片, 2% 醋酸双氧铀和 Soto 铅染液双染色, 透射电镜下观察。

2 结果和讨论

2.1 培养过程中菌体的透射电镜观察结果

图版 I 中 a、b、c、d、e、f 分别是摇瓶培养第 12、13、14、15、16 和 17 小时 NK-01 菌体的电镜照片。从图版中可以看出这一时期菌体变化比较显著。第 12 小时 (图版 I-a) 菌体呈较丰满的短杆状, 第 13 小时 (图版 I-b) 开始进行二分分裂, 随后迅速生长, 主要表现为菌体长轴的不断加长 (图版 I-c), 由短杆状变为长杆状, 至第 15 小时 (图版 I-d), 菌体长达 $4.8 \mu\text{m}$, 即增长为第 12 小时菌体的 3 倍。第 16 小时 (图版 I-e) 菌体开始变短变粗。到第 17 小时 (图版 I-f) 菌体外形已经和第 12 小时接近。这一时期菌体外形的变化, 说明摇瓶培养第 12—17 小时是菌体代谢最旺盛的时期。菌体显著加长表明细胞壁和细胞膜的扩展速度超过 DNA 的复制速度, 这对黄原胶的合成非常有利, 因为黄原胶合成的酶系和磷脂载体都存在于细胞膜上^[6-8]。17 小时后菌体变小, 可能和菌龄较长、代谢废物积累较多及发酵液渗透压增加有关。黄原胶分泌之前的菌体变化规律, 特别是菌体长轴的显著加长可以作为黄原胶产生的前兆, 这在工业生产上很有意义。

摇瓶培养第 17 小时菌体开始分泌黄原胶。从第 17 小时 (图版 I-f)、18 小时 (图版 I-g) 和 19 小时 (图版 I-h) 的照片中可以观察到最先分泌的黄原胶都源于菌体的端部, 这可能是由于这个部位是新生壁, 比较薄的缘故。第 17 小时分泌的黄原胶为单股, 第 18 小时的糖链为双股, 第 19 小时的糖链为三股。另外, 起始分泌的黄原胶糖链比较短。

图版 I-i 和 I-j 分别是第 20 和 21 小时的菌体照片, 从中可观察到自 20 小时以后, 黄原胶开始从菌体四周向外大量分泌。随着时间的推移, 菌体分泌的丝状黄原胶越来越多, 结果许多股黄原胶糖链缠在一起, 使菌体分泌的黄原胶不断加粗、加长。图版 I 中照片 a、b、c 分别是第 22、23 和 24 小时的菌体照片。从中可以看到介质中黄原胶已经连成一片。根据王德润等人^[5]的研究结果, 黄原胶分子主链长度为 $3.0-12.8 \mu\text{m}$, 本文图版 I-c 中黄原胶链长达 $7.2 \mu\text{m}$, 两者比较吻合。

Ielpi 等人^[6-8]的研究表明, 黄原胶是在细胞膜上合成, 再由磷脂载体运到膜外。但黄原胶究竟以何种方式连到菌体外膜何种成分上, 目前未见报道。从本文图版 I-j 和图版 I-a 中可看到, 菌体表面有些小的柱状突起, 黄原胶正从中向外分泌, 这种结构的成分

还有待进一步研究。

为了使观察结果具有代表性,能够在个体水平以及群体水平上真实反映摇瓶培养过程中菌体及黄原胶的变化动态,作者采用了调整生理条件的同步培养法。

图版 I-e 是第 19 小时培养液的菌体照片。图中两个菌体通过黄原胶链相互连接,这说明黄原胶至少可以起到菌体间粘附的作用。黄原胶是黄单胞菌的主要致病因子之一,作者认为黄单胞菌必须首先通过其分泌的黄原胶粘附于植物组织的表面,然后才能分泌蛋白酶、淀粉酶等,引起植物病害。作者在电镜观察时发现,大多数菌体之间都通过一根比较长的黄原胶链连接起来,除机械粘附之外,是否还有别的作用,如类似于膜表面糖蛋白的识别作用,或类似于菌毛的物质传递作用等,值得进一步研究。Turner 等人^[2]研究发现,黄原胶缺陷型会失去致病性,但有关黄原胶的致病机理未见进一步报道。

2.2 培养过程中菌体的扫描电镜观察

图版 I-d 是黄原胶培养液第 24 小时的扫描电镜照片。从图中可以看到,菌体外面形成了较厚的荚膜,并可观察到许多菌体通过黄原胶连在一起。由于扫描电镜分辨率较透射电镜低,在照片上看不到丝状黄原胶的分泌,也看不到菌体的表面结构。经临界点干燥后,菌体变小,但外形比例没有变化。

2.3 Cr^{3+} 交联黄原胶的观察

黄原胶在水溶液中为阴离子杂多糖,其五糖重复单位侧链上的两个羧基都带负电荷^[9]。 Cr^{3+} 可使同一条黄原胶分子链中的羧基交链,也可使不同黄原胶分子链间的羧基交联。丝状黄原胶经 Cr^{3+} 交联后形成网状结构。图版 I-f 为黄原胶溶液经 Cr^{3+} 交联后的透射电镜照片。

2.4 黄原胶干粉的电镜观察

黄原胶干粉是发酵液经乙醇沉淀、干燥制备而成的。乙醇脱水时,大部分丝状黄原胶因共价键作用并未脱离菌体细胞,而是聚集或缠绕在细胞表面。当黄原胶干粉配成水溶液时,菌体表面的黄原胶重新放射伸展,恢复其树枝状的结构。图版 I-g 即为透射电镜下所观察到的这种结果。细胞壁和细胞膜由于吸水膨胀,恢复到原来的大小和形状。黑色带状物为浓缩的细胞质。

2.5 菌体的超微结构观察

图版 II 为 NK-01 菌株菌体超薄切片的电镜照片。黄单胞菌是革兰氏阴性菌,从图版 II-a、c、d、f 上均可见到由外及里的三层,依次为外膜、肽聚糖层和细胞膜。从图版 II-a、c 中还可发现细胞质中存在大量的核糖体小颗粒。此外,图版 II-d 中还有几个较大的颗粒,可能是某种贮藏物质。图版 II-b 中可见细胞上部的染色体 DNA 缠在一起,形成拟核。从图版 II-c 中可以观察到两个脱落的荚膜,这是包埋过程中多次高速离心的结果。图版 II-e 显示出菌体及其荚膜之间的联系。荚膜已不完整,并正从菌体上剥落。黄原胶分子交织成网状结构,显示出其在荚膜中的存在状态,剥落的荚膜中带有一些电子密度较高的物质,可能是细胞壁的某种成分。从图版 II-c、e、g 中可见菌体中有一些电子密度非常低的区域,它们大都离细胞膜很近,是否是由膜内折形成的间体或与呼吸作用有关的气泡,此工作正在研究之中。

参 考 文 献

- [1] Williams P H. *Plant Dis*, 1980, **64**: 736—742.
[2] Turner B, Christine E B, Peter C J. *J Gen Microbial*, 1984, **130**: 2447—2455.
[3] Sandford P A. *Extracellular Microbial Polysaccharides*. Washington D C: ACS, 1977.
[4] 赵大健, 刁虎欣, 刘如林, 等. 工业微生物, 1986, **16** (3): 11—20.
[5] 王德润, 赵大健, 曹武雄. 高分子学报, 1990, **2**: 60—66.
[6] Ielpi L. *FEBS Letter*, 1981, **2**: 253—256.
[7] Ielpi L, Robertoo C, Marcel A *et al*. *Biochem Res Comm*, 1981. **102**: 1400—1408.
[8] Ielpi L. *Biochem Intern*, 1983, **6**: 323—333.
[9] Janson P E. *Carbohydr*, 1975, **45**: 275.

ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY OF THE MORPHOLOGY OF *XANTHOMONAS* *CAMPESTRIS* NK-01 AND XANTHAN SECRETION

Niu Shumin Yang Jianhua Liu Ximeng Wang Yuxiang Zhao Dajian

(Microbiology Department, Nankai University, Tianjin 300071)

Li Shiyan

(Biology Department, Henan Normal University, Xinxiang 453002)

Abstract A transmissive electron microscope was used to study the morphology of *Xanthomonas campestris* NK-01 during the period of flask culture and dynamic course of xanthan secretion. The variation of the bacteria shape and the course of xanthan secretion are gained by metal shading. The ultramicrostructure of *X. campestris* was show by ultrathin section and the net stucture interweaved by xanthan through Cr^{3+} connection was also observed.

Key words *Xanthomonas campestris*, Xanthan secretion, Ultramicrostructure