

柄杆菌与固氮蓝藻培养

I. 多态柄杆菌的分离和鉴定

李勤生 路景舒 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

本文报道了鱼腥藻 (*Anabaena* spp.) 的一种异常生长现象和从鱼腥藻中分离得到的柄杆菌 1017—41 株的生物学特性。此菌株除具有柄杆菌特有的形态和发育周期外, 还出现分叉状和长的分节状菌体, 与已有记载的柄杆菌明显不同, 故定为柄杆菌属 (*Caulobacter*) 的一个新种, 命名为多态柄杆菌 (*Caulobacter polymorphus* nov. sp.)。

关键词 柄杆菌属; 多态柄杆菌

柄杆菌 (*Caulobacter*) 是一类分布广泛且在形态上颇具特色的原核生物。对其形态、生理生化特性、生态、分类位置等方面已有一些报道^[1-4]。其中涉及到柄杆菌与藻类关系方面曾有不同的看法^[2,5], 有人认为它有助于某些藻类的生长和固氮; 也有人认为它对藻有害。我们在固氮蓝藻与细菌关系的研究中, 由一株生长异常的鱼腥藻 (*Anabaena* 1017) 中分离得到了一株柄杆菌, 现将鉴定结果报告如下。

材料与方 法

(一) 菌株来源

1980 年 5—6 月间, 在固氮蓝藻鱼腥藻 1017 株和浙江 15 号藻株的个别培养瓶中, 先后出现了一种相似的异常现象: 瓶内铺满的藻体上出现黄、蓝绿相间的同心环状带, 每条黄带和蓝绿带各宽约 1cm。新的黄带形成的过程是: 在前一黄带的外侧边缘出现暗红色点状物, 向外扩展, 并在间隔约 1cm 左右之外的蓝绿色藻体上聚集成带, 开始较狭窄, 以后发展至 1cm 左右宽度时, 此区域内藻体蓝绿色渐褪, 呈现一新的黄带。如此形成多个同心环。取此暗红色部分置于显微镜下观察时, 看不见红色的结构, 可能是一种色素。蓝绿

色带区内藻丝形态正常; 黄色带区内有断裂及形态不完整的藻丝和细胞, 但大多数藻丝轮廓可辨, 只是呈黄色。此种异常现象在以往文献中未见记述。1017—41 菌株即由此材料中分离而得。

(二) 培养基

分离用培养基成份 (%): KH_2PO_4 0.025、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 纯化琼脂 1.0, 蒸馏水配制, 另加培养 24 小时的大肠杆菌悬液, 其浓度以倾注于平皿中呈淡乳白色为度。高压蒸汽灭菌。采用划线方法分离。

胰胨培养基: 用上述培养基初步分离后, 在 0.5% 胰胨琼脂培养基^[6]上纯化。

为比较不同培养基对 1017—41 菌株生长和形态的影响, 采用了如下培养基:

1. 胰胨培养基中分别加入 1.0% 葡萄糖、1.0% 甘油或 0.2% 可溶性淀粉;
2. 胰胨培养基中胰胨含量减少至 0.05%;
3. 以骨胨代替胰胨, 其它成份均同 2;
4. PYE 培养基 (%): 蛋白胨 0.2、酵母浸膏 0.1、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02、0.5mM CaCl_2 , 固体则加入纯化琼脂 1.0; 另加葡萄糖 0.2 作比较;
5. 无机盐或无机盐葡萄糖培养基: 7.6mM

本文于 1983 年 9 月 12 日收到。

承王大相先生审阅本文; 中国科学院武汉病毒研究所电镜室协助拍摄电镜照片; 军事医学科学院林万明、郭兆彪同志协助测定 DNA 中 G + C 含量; 我所沈根文同志提供藻种; 戴尚真同志绘图, 在此一并致谢。

KH_2PO_4 , 7.6mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.4mM MgSO_4 , 0.5mM CaCl_2 , 加葡萄糖者则按最终浓度为 0.2% 配制。固体培养基则加 1.0% 纯化琼脂。

(三) 色素提取及光谱吸收曲线的测定

取用胰胨培养基和加有 1.0% 甘油的胰胨培养基培养 3 天和 10 天的菌苔; PYE (内含 0.2% 葡萄糖) 琼脂培养基培养 4 天的菌苔, 分别用甲醇 (常温或 64℃) 或乙醇提取色素。用 SPECORD UV-VIS. CARL ZEISS 分光光度计测定。

(四) DNA 中 G + C 含量测定

采用热解链温度法测 T_m 值。

(五) 其它生理生化特性

除特别注明者外, 均参照《一般常见细菌鉴定方法》^[7] 进行。

结 果

(一) 形态特征及发育周期

1017-41 菌株为革兰氏阴性杆菌, 细胞柱状, 有时略趋弯曲, 两端钝圆或略趋尖细。在不同的发育阶段, 长、宽略有不同: 一般杆状体较细长, 多为 $0.5 \times 3.0-4.0 \mu\text{m}$, 较短的约 $2.0 \mu\text{m}$ 左右; 亦有长为 $6.0 \mu\text{m}$ 甚至 $13.0 \mu\text{m}$ 以上者, 此种细长菌体可屈挠。随着细胞发育, 多数杆状细胞一端中央部分延伸出一突起, 以后渐长, 形成长柄。此特征在图版 I-1—6; 图版 II-1—3 中均可见到。一端有柄的细胞常在柄的对端长出一根极生鞭毛 (图版 I-5), 细胞分裂后, 带鞭毛的子细胞可以运动, 成为一个单独的个体 (图版 I-7)。此种细胞多较粗短, 约 $0.6-0.8 \times 2.0-3.0 \mu\text{m}$ 。在其鞭毛着生部位再延伸出柄 (图版 I-4), 细胞渐变细长, 柄与细胞间的界限也渐消失 (图版 II-3), 然后进入新的发育周期, 这是一般情况。此外, 尚有部分菌体两端同时延伸出柄, 柄多在细胞端的中央部分, 但也有个别稍偏离中心部位 (图版 II-1)。

1017-41 菌株的柄长, 除与菌龄有关外, 培养基不同对柄的长度有明显影响。

在 0.5% 胰胨培养基和含有 1.0% 葡萄糖、甘油或淀粉的胰胨培养基中, 柄均较短, 多数仅为菌体长度的 1/4 左右, 一般不超过菌体长度的 1/2; 而在 PYE、骨胨、0.05% 胰胨培养基上, 柄长大多接近或超过菌体长度。有些柄呈弯曲状, 但未见有分节者 (图版 I-1; II-2—3)。

柄端有明显的附着器 (图版 I-1, II-2—3), 常常有几个多至数十个细胞相互粘着聚成菊花状细胞团 (图版 I-1—3)。随着菌龄的增长, 部分细胞呈长的可屈挠菌体 (图版 II-4)。

在形态上最为突出的特点是菌体有分叉现象。在光学显微镜下观察, 在胰胨培养基、PYE 和骨胨培养基中都可发现有如三通管状分叉细胞。此种形态在胰胨培养基中出现较早, 24 小时培养物中曾观察到, 但在第九天的培养物中较多。在 PYE、骨胨培养基中培养 2 天即可发现, 4—6 天较多。此形态在电镜下得到进一步证实 (图版 II-7)。由这种细胞可再分裂形成新的个体 (图版 II-8—9)。此外, 部分杆状体在其一端分隔出一近似椭圆形部分 (约 $0.5 \times 0.9-1.0 \mu\text{m}$) 或缢缩成几个细胞 (图版 II-5—6)。由此表明, 此菌细胞分裂和发育途径的复杂性。从群体水平观察, 其生活周期应如图 1 所示。

(二) 培养特性

在 0.05% 胰胨培养基上生长瘠薄, 在 0.5% 胰胨、PYE、骨胨琼脂培养基上生长良好。而当培养基中加入适量葡萄糖、可溶性淀粉或甘油时, 生长更佳。在上述各种培养基中不要求另加维生素、生物素等生长因子。但在无机盐或无机盐葡萄糖培养液中未见生长, 说明此菌株生长需要适当的天然有机物。

菌落圆形, 较小, 中央凸起如半球状, 边缘整齐, 不透明, 光滑湿润, 有粘质感。

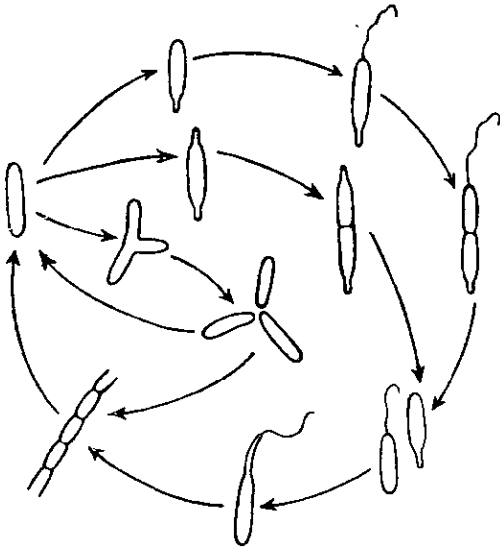


图1 1017-41 菌株生活周期示意图
Fig. 1 Life cycle of strain 1017-41

菌苔呈黄橙色—橙红色, 无水溶性色素。在含甘油和淀粉的胰胨培养基上色素产生较多。在上述各种培养液中生长良好, 开始均匀混浊, 继而在表面可出现薄膜, 管底可有沉淀。当胰胨浓度达 0.5% 以上时, 生长丰度下降。比较含葡萄糖或不加葡萄糖的 PYE 培养液对此菌株生长丰度的影响, 发现前者生长量约为后者的 3 倍, 表明葡萄糖对其生长具有显著的促进作用。

在半固体琼脂柱中, 1017-41 菌株有明显的趋氧性, 但在加有液体石蜡隔绝空气的琼脂柱中亦可生长。

在无 NaCl 的培养液中生长较含盐者为佳, 随着盐浓度增高, 生长量下降。在含 1.5% NaCl 培养液中未见生长。

当培养基中含有 0.01% SDS 时, 生长下降; 含有 0.1% SDS 时, 则明显抑制生长。

30℃ 条件下生长良好; 但细菌悬液经过 60℃、30 分钟处理后即不能存活。

在中性偏酸条件下生长最好, 但在不同培养基中, 其生长的起始 pH 范围不尽

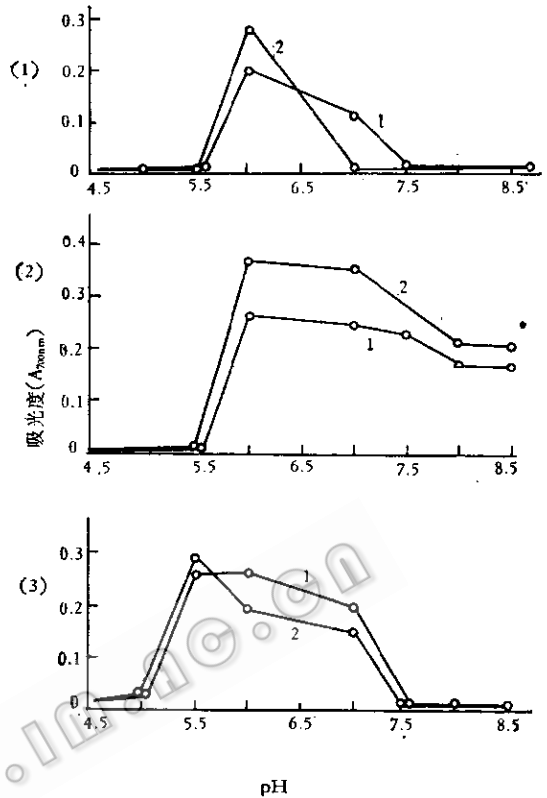


图2 1017-41 菌株在 (1) 骨胨培养基, (2) PYE 培养基, (3) 0.5% 胰胨培养基中生长的 pH 范围

Fig. 2 The growth pH range in (1) casitone, (2) PYE, and (3) 0.5% tryptone media

1. 48 小时 (hr.) 2. 72 小时 (hr.)

相同。在骨胨培养液中生长的 pH 范围较窄; 但在 PYE、0.5% 胰胨液中则较宽。这可能与培养过程中培养基 pH 的变化有关 (图 2)。

(三) 色素

用胰胨琼脂培养基和加有 1.0% 甘油的胰胨琼脂培养基上培养 3 天和 10 天的菌苔色素提取液、PYE (内含 0.2% 葡萄糖) 琼脂培养 4 天的菌苔色素提取液, 无论是甲醇或乙醇提取者, 其色素光谱吸收曲线均相似, 最高吸收峰值为 350、460、483 nm (图 3)。

(四) 其它生理生化特性

氧化、发酵葡萄糖产酸; 在乳糖、蔗糖、

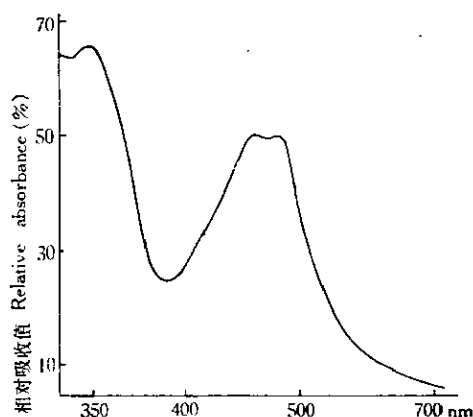


图3 1017-41 菌株色素光谱吸收曲线
(甲醇或乙醇提取液)

Fig. 3 Absorption spectrum of pigment extract from strain 1017-41 (In methanol or ethanol)

甘露醇、乙醇、甘油等培养基中生长,不产酸;水解淀粉。由胰胨产氨,石蕊牛奶变碱。接触酶阳性;酯酶活力阳性,可分解吐温 20、40、60、80。在伊红美蓝琼脂上生长,菌苔呈深紫红色。

氧化酶、尿酶阴性;不分解纤维素、琼脂、酪氨酸;不液化明胶;不还原硝酸盐为亚硝酸盐;不产生 H_2S ; 吲哚、VP、甲基红试验均阴性;在阿西比无氮培养基、西蒙氏培养基以及麦康凯培养基上均不生长。采用气相色谱仪测定其乙炔还原能力结果亦为阴性。

DNA 中 G + C 含量为 69.5 克分子% (Tm)。

讨论与结论

本文描述了固氮蓝藻鱼腥藻 (*Anabaena* sp.) 1017 及浙江 15 号培养瓶中出现的一种异常生长现象。这种现象在以往文献中未见记载,其起因尚待研究。

由此异常生长的藻体中分离得到了一株具有柄杆菌形态特征及发育周期的细菌。对其生物学特性研究结果表明,此菌株应属于柄杆菌属 (*Caulobacter*)。

迄今,柄杆菌属的分类主要依据形态特征、色素,其次是对生长因子的需要与否。少数海水种则是在培养液中要求加入 NaCl 和对 NaCl 有相当高的耐受性。自 1935 年 Henric 和 Johnson 发现柄杆菌以来, Poindexter (1964) 发表了 10 个新种^[2]; Красильников 和 Беляев (1973)^[3] 又发表了 8 个新种和 5 个新亚种,并在他们提出的分类系统中,柄杆菌属列入了 19 个种和 8 个亚种。Poindexter (1981) 在柄杆菌属中也纳入了 19 个种。

1017-41 菌株与以上各种比较均有不同:前者为杆菌形,与弧菌形、近弧形、纺锤形的 11 个种易于区别; *Caulobacter glutinosus* 在形态上未见详细描述,其主要特点是菌落呈浓稠胶质状,没有色素,显然有别于 1017-41 菌株;其余 7 种杆菌形柄杆菌中,有 3 种绝无色素; *Caulobacter fulvus* 和 *C. metschnikovii* 具有黄橙或黄褐、红褐色色素; *Caulobacter bacteroides* 的多数菌株没有色素,少数菌株有黄或橙色色素,但与有色素光谱吸收曲线资料的 CB10、CB11 菌株比较,1017-41 菌株色素的最高吸收峰值与它们是有差异的。特别是 1017-41 菌株部分细胞两端有柄,以及有的细胞柄的位置少许偏斜的情况仅与 *Caulobacter variabilis* 有近似之处,但后者为一具深红—橙色素,且能在 2.0% NaCl 中生长的种。另一变种则无色素,与 1017-41 菌株有所不同。

1017-41 菌株最为特殊的是在几种培养基中均可见到分叉状菌体,且有长杆状体缢缩后形成新子代的增殖方式。因此,此菌较之其它柄杆菌有较多种的细胞形态和更为复杂的发育途径,这是柄杆菌属中尚未见记载的。根据这一特点,建议将 1017-41 菌株列为柄杆菌科 (*Caulobacteriaceae*) 柄杆菌属 (*Caulobacter*) 的一个

新种,命名为多态柄杆菌 *Caulobacter polymorphus*。1017-41 菌株为模式株,存中国科学院水生生物研究所。

从现在采用的分类标准及状况看来,柄杆菌属中种的区分不尽合理,如色素是一个指标,但在某些种内既有含色素的,也有无色素的;又如对生长因子的要求,许多种并不清楚;某些种间的区别不大。

柄杆菌不仅形态特殊,有着比较复杂的发育周期,同时它分布广泛,能在贫瘠的环境中生存和繁殖,与其它微生物和藻类之间有着密切的关系。因此,柄杆菌是研究原核生物的发育、遗传、生理生化、生态等方面的重要材料。1017-41 菌株的分离为此提供了条件。根据此菌株的特点,我们对其发育过程提出了一个模式图解,弄清其中的细节,无疑是一项复杂的任务,但

也必将对原核生物发育提供新的信息。关于 1017-41 菌株对固氮蓝藻的影响在进一步研究中。

参 考 文 献

- [1] Poindexter, J. S.: *Microbiol. Rev.*, **45** (1): 123—179, 1981.
- [2] ———: *Bacteriol. Rev.*, **28**(3): 231—259, 1964.
- [3] Красильников, Н. А. и С. С. Беляев. *Известия Академии Наук СССР. Серия Биологическая*, **1973** (3): 313—323, 1973.
- [4] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [5] Bunt, J. S.: *Nature*, **192** (4809): 1274—1275, 1961.
- [6] 李勤生、黎尚豪: *水生生物学集刊*, **7**(3): 377—384, 1981.
- [7] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: «一般细菌常用鉴定方法», 科学出版社, 北京, 1978.

CAULOBACTER IN NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAL CULTURE

I. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CAULOBACTER POLYMORPHUS SP. NOV.

Li Qinsheng Lu Jinshu Li Shanghai*
(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Caulobacter polymorphus sp. nov. (strain 1017-41) was isolated from a non-normal growth culture of *Anabaena* sp. 1017 strain. In this culture, concentric circular zones of alternating yellow or dark red with blue-green colour appeared at the surface of algal mass. In the blue-green zones, the algal filaments were healthy, but in the yellow zones, the algal filaments were colourless, more or less disrupted.

Strain 1017-41 is a Gram-negative bacterium with a stalk. The cells are rod-shaped, ca. $0.5\text{--}0.8\mu\text{m}$ by $2.0\text{--}6.0\mu\text{m}$, some over $13.0\mu\text{m}$, generally $0.5\mu\text{m}$ by $4.0\mu\text{m}$. The stalk occurs at polar or subpolar region at one end or sometime at two ends of the cell. The length of stalk is variable with culture conditions. Cell division is by means of transverse, asymmetrical fission of stalked cells. A holdfast is present at the distal end of the stalk. A lot of cells often aggregate by adhering together of the holdfasts to form a chrysanthemum flower like appearance. Usually, a swarmer sibling cell occurs at the free pole of the stalked cell, and has a single polar flagellum.

A remarkable feature of this strain is that short branched cell was incidently found. This cell may divide by cross septum to form three new sibling cells. Sometimes, longer cells become slender and then divide into several cells.

The colonies on the 0.5% tryptone, caseitone or PYE agar plate are circular, con-

vex, smooth and orange-yellow or orange-red in colour. The pigment absorption peaks are at 350, 460, and 483 nm. in methanol or ethanol.

In liquid media, the culture is homogeneous at first, but afterward, a thin film on the surface and some precipitate in the bottom were formed. Organic nitrogen such as tryptone, peptone or caseitone is needed for growth, but vitamin or biotin is not required. Glucose, starch or glycerol stimulates the growth. In the mineral medium or mineral plus glucose medium, growth of strain 1017-41 is not successful. Growth is inhibited when the content of organic material is more than 0.5% in the medium. NaCl is not required and SDS is an inhibitor. pH 6—7 is optimal in PYE medium, and pH range for growth is variable with medium. 30°C is well for growth.

DNA G+C is 69.5 moles%.

According to the morphology, development cycle, pigment, physiological and biochemical characteristics of strain 1017-41, it should be a new member of the genus *Caulobacter*, and the name *Caulobacter polymorphus* sp. nov. is proposed. Type culture is deposited in the Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan.

Key words

Caulobacter; *Caulobacter polymorphus*

* S. H. Ley