

# 一个分离自海南岛森林土壤的新种——中国类酵母\*

乐 蓓 珠

(中国科学院微生物研究所,北京)

本文研究了分离自海南岛尖峰岭原始森林土壤的一株酵母,细胞柠檬形、椭圆形。营养繁殖为两端芽裂 (bipolar budfission)。子囊孢子椭圆球形,成熟时子囊不破裂。孢子萌发前可成对接合,或不经接合即萌发。这些特性符合于类酵母属的特征,但是它同化和发酵葡萄糖、半乳糖,不同化不发酵蔗糖和棉子糖,并需要复合氨基酸作为氮源,因此与本属仅有的种路德类酵母 (*Saccharomyces ludwigii*) 不相同,故定为新种——中国类酵母 (*Saccharomyces sinensis*, sp. nov.)。

过去所发现的类酵母 (*Saccharomyces Hansen*) 多分离自葡萄汁<sup>[1,2]</sup>、橡树流出液<sup>[3,4]</sup> 或葡萄酒,现由海南岛尖峰岭原始森林裂兰桐 (*Quercus patelliformis* Chun) 树下土壤中分离到一株酵母 HS506, 它的形态特征与路德类酵母相似,但其生理特性有明显区别,拟定为类酵母属的新种。现报道如下,以供参考。

## 培养基和鉴定方法

培养基和鉴定方法基本上按照 Lodder<sup>[5]</sup> 的方法进行。考虑此酵母对氮源有特殊需要,将其中以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源的一些培养基改为蛋白胨。

### (一) 发酵实验

培养基成分(%): 基础培养基为蛋白胨 1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.05, 酵母膏 0.02, 自来水配制。

于杜氏管 (Durham tube) 中每管加上上述培养基 1.2 毫升, 15 磅灭菌 30 分钟。各糖液用无菌水配成 10% 浓度煮沸 15 分钟, 用无菌吸管取 0.3 毫升入杜氏管, 糖液与蛋白胨液混合后使培

养基的糖浓度成 2% (棉子糖 4%)。用无菌操作接入经麦芽汁斜面或葡萄糖蛋白胨酵母膏斜面上培养三天的菌种, 接种后第二、三天记录结果。

### (二) 同化碳源实验

基础培养基成份同发酵培养基但不加糖液, 而加入水洗琼脂 2%, 自然 pH, 蒸馏水配制, 每管 20 毫升, 8 磅灭菌 30 分钟。方法为生长图形法<sup>[6-7]</sup>, 第二、三天记录结果。

### (三) 维生素需要的测定

1. 在无维生素培养基上的生长:

培养基成份(%):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.05, 葡萄糖 2, 酸水解的无维生素酪素 0.5, 水洗琼脂 2。用煮沸过滤的自来水配成。配制时, 先将磷酸盐溶于蒸馏水, 以免与自来水中之钙盐形成沉淀。

方法: 将上述成份的培养基摆成斜面, 接入培养三天的新鲜菌种。以加全维生素的培养基为对照, 28°C 培养三天后记录结果。

2. 各种维生素需要的测定: 培养基成份同上。

方法: 生长图形法。用无菌滤纸片分别蘸取各种维生素液 (用维生素  $\text{B}_1$ 、 $\text{B}_2$ 、 $\text{B}_6$ 、菸酸, 生物素,

本文于 1977 年 2 月 25 日收到。

\* 方心芳同志对本工作进行了指导, 并得到赵继鼎、陆师义、王大粗、余永年、李明霞同志的帮助。陈庆涛、王德祯同志参加了采样。

肌醇, 遍多酸钙, 叶酸, 对氨基苯甲酸 9 种, 配制成单独一种和 9 种中只缺一种维生素的溶液。以全维生素为对照。维生素浓度参看 Lodder 1970<sup>[5]</sup>p. 82) 各一片贴于混合有菌种的固体培养基表面, 第二天可用接种环在各滤纸片上再点一次维生素液, 第三、四天记录结果。

#### (四) 孢子萌发实验

把培养在 Kleyn 或 Gorodkova<sup>[5]</sup> 培养基上已生孢子的菌种接种在麦芽汁琼脂培养基中做悬滴培养, 观察孢子萌发。

## 鉴定结果

### (一) 形态特征

1. 在麦芽汁中生长: 28°C 三天后细胞椭圆形、瓶形、或呈有钝尖的柠檬形。细胞较小, 一般为(2.6—5.9) × (3.3—9.7)微米,

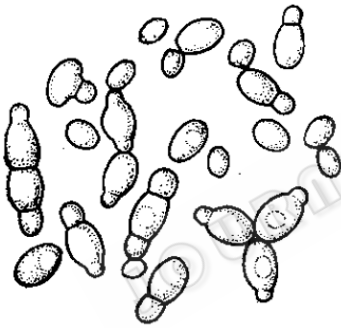


图1 HS506 麦芽汁培养三天之细胞形态

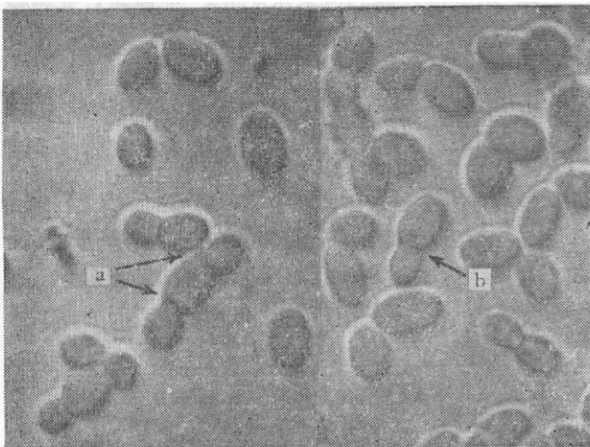


图2 HS506 在麦芽汁中培养三天之细胞形态  
a. 两端芽裂 b. 一端先进行芽裂 1200×

单个或成双, 有时三个成一群或四个细胞连成短链。营养繁殖为两端芽裂, 子母细胞相连接处较宽, 并有横隔膜。繁殖时常一端先出芽, 故多呈瓶形。两端同时出芽的则呈柠檬形(图 1 和 2)偶而有侧芽出现, 因此有时可见到三面出芽的现象。管底有沉淀。室温培养一个月后, 液面有极弱菌环生长, 管底沉淀较多。

2. 在麦芽汁琼脂培养基上生长: 28°C 三天后, 除了有极少短腊肠形细胞外, 其细胞形状和大小与在麦芽汁中近似。细胞上



图3 HS506 在麦芽汁斜面上培养三天可见芽痕和新生芽

可见到脱落的芽在胞壁上留下的芽痕(bud scar), 以及由于屡次在同一部位出芽, 芽痕重叠而形成的“领”(collarete), 并有初生的幼芽从“领”中凸起(图 3)。室温培养一个月后, 斜面上菌落为乳白色, 略有光泽, 近于平滑, 中央微凹陷, 边缘完整或略有波浪。

3. 在加盖片的马铃薯葡萄糖琼脂培养基上不形成假菌丝。

4. 子囊孢子的形成: 在高氏培养基(Gorodkova) 和克氏醋酸盐培养基(Kleyn's acetate agar)<sup>[5,6]</sup> 上 28°C 培养 5—7 天后可见到子囊孢子。子囊孢子椭圆球形, 壁光滑; 通常每囊一到二个, 三个孢子的较少, 极少数子囊含有 4 个孢子(仅见到一次)(图 4)。孢子成熟后子囊不破裂。萌发时孢子可成对接合或不经接合即萌发(图 5—6)。

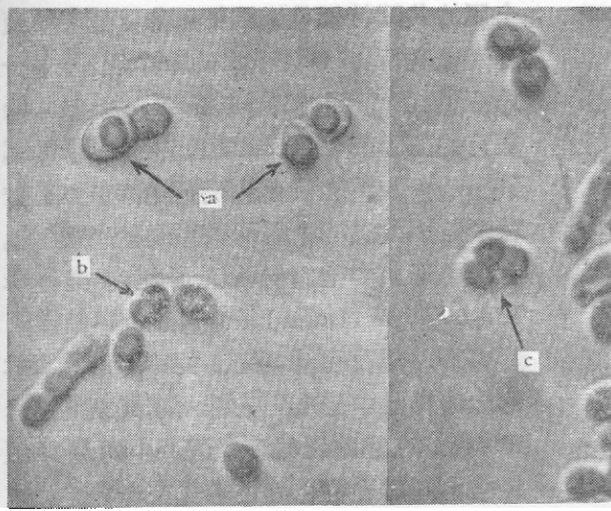


图4 Gorodkova 培养基上培养6天的子囊孢子。  
a. 含一个孢子的子囊。 b. 含两个孢子的子囊。  
c. 含三个孢子的子囊。1200×

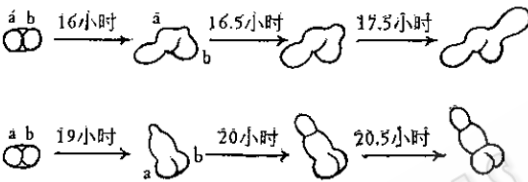


图5 HS506 的两对孢子接合后萌发的情况

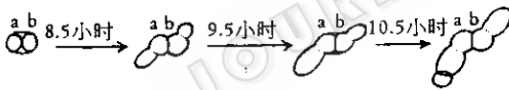


图6 a 与 b 为一个子囊中的两个子囊孢子。  
8.5小时后各自萌发出一个芽,9.5小时后芽  
长大,10.5小时后孢子 a 的子细胞又经芽裂  
产生子细胞,可见中间横隔膜。

## (二) 生理生化特征

1. 发酵：能发酵葡萄糖、半乳糖；不发酵蔗糖、棉子糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖。

2. 同化碳源：能同化葡萄糖、半乳糖、葡萄糖酸内酯；不同化 L-山梨糖、蔗糖、麦芽糖、乙醇、甘油、赤藓醇、卫茅醇、D-甘露醇、纤维二糖、海藻糖(茵糖)、乳糖、棉子糖、松三糖、菊糖、淀粉、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯糖、D-核糖、L-鼠李糖、D-山梨醇、 $\alpha$ -甲基、D-葡萄糖甙、水杨素、D、L-乳酸、琥珀酸、柠檬酸、肌醇、乳酸钙；对

葡萄糖酸钙的同化情况与培养基有关\*。

3. 同化氮源：能利用蛋白胨、水解无维生素酪素；不利用硝酸钾、硫酸铵、盐酸乙胺。

4. 维生素的需要：在无维生素的培养基中不生长。当9种维生素同时存在时有刺激作用。对某一种或几种维生素无特别需要，但是当把氮源换为蛋白胨时维生素B<sub>1</sub>对生长有弱刺激作用。

5. 在50% (w/w) 葡萄糖麦芽汁琼脂培养基上不生长。

6. 置30℃培养能生长；于37℃培养不生长。

此酵母 HS506 (模式) 是在1974年9月由乐静珠分离自海南岛森林土壤。保存于中国科学院微生物研究所。

*SACCHAROMYCODES*  
*HANSEN EMEND. YUE*  
*SACCHAROMYCODES*  
*SINENSIS SP. NOV.*

In extracto malti (28°C) cellulae ellipsoideae aut citrifformes, (2.6—5.9) × (3.3—9.7)  $\mu\text{m}$ . In propagatione vegetativa gemmae bipolariter formantur, dein fissione. In agar malti cellulae ut in medio liquido cum malto, sed longior. In loco temperato striata cultura crenea, semmitida, margin integro.

Pseudomycelium nullum.

Ascosporae sphaericae, plerumque 1—2 spori, aliquando, 3, raro 4. Asci

\* 当使用以硫酸铵为氮源的液体培养基时(其他成份不变,只缺琼脂), HS506 能同化葡萄糖酸内酯和葡萄糖酸钙,而换用氮源为蛋白胨的固体培养基时只同化葡萄糖酸内酯,不同化葡萄糖酸钙,其他碳源的同化在两种培养基上结果相同,只是在液体培养基中三周后仍生长非常弱。

non frangunt maturo, germinanibus conjugatione vel absunt.

Glucosum et galactosum fermentantur, saccharum, maltosum, laetosum, raffinatum, melibiosum non fermentantur. Glucosum, galactosum et gluconolactor assimilantur. Maltosum, saccharosum, raffinatum, melibiosum, cellobiosum, laetosum, trehalosum, melezetosum, L-sorbosum, glycerolum, ethanolum, adonitolum, D-mannitolum, D-sorbitolum, i-erythritolum, dulcitolum, inositolum,  $\alpha$ -methyl-D-glucosidum, salicinum, acidum succinicum, acidum citricum, calcium lacticum non assimilantur.

Typus: Cultura No. HS506 isolata ex terra (Kwangtung), in Instituto Microbiologico Academiae Sinicae, Peking. Conservatus est.

## 讨 论

Hansen 在 1904 年<sup>[6]</sup>为他以前分离并命名为路德酵母 (*Saccharomyces ludwigii*) 的种创立了类酵母属 (*Saccharomycodes*), 理由有二: 一是它的营养繁殖是在细胞顶端略有收缩, 以后形成横隔膜, 随后即裂殖。二是孢子发芽前成对接合。这两点与酵母属 (*Saccharomyces*) 都不相同。此属为后人所接受。1931 年 Stelling Dekker 在酵母亚科 (*Saccharomycetaceae*) 内建立了拿逊酵母族 (Tribe *Nadsoniae*), 其中包含类酵母属 (*Saccharomycodes*), 拿逊酵母属 (*Nadsonia*) 和有孢汉逊酵母属 (*Hanseniaspora*)。这三

个属的共同特征是细胞柠檬形, 营养繁殖在两极进行。1970 年 Lodder<sup>[5]</sup>将这个族升为亚科 (Subfamily *Nadsonioideae*), 其中除原有的三个属外, 又增加了威克酵母属 (*Wickerhamia*), 该属也是两端芽裂细胞柠檬形, 因此这四个属的关系是较接近的。在类酵母属中他们仅承认了路德类酵母 (*S. ludwigii* Hansen) 一个种。

1974 年我们从海南岛尖峰岭原始森林的土壤样品中分离到一株两端芽裂的酵母 HS506, 在它的营养繁殖过程中两端芽裂经常不同时进行, 而常常先在一端芽裂, 故瓶形细胞较多, 初看起来很像瓶形酵母 (*Pityrosporum*), 经仔细观察后发现 HS506 是进行两端芽裂的, 也有不少柠檬形细胞; 同时它又有成对接合的子囊孢子和较强的发酵能力, 因此即不属于瓶形酵母, 也并非不发酵的裂芽酵母 (*Schizoblastosporion*) 的有性世代。将它与拿逊酵母亚科的四个属相比较; 拿逊酵母属和威克酵母属虽然营养繁殖也是两端芽裂, 但是它们具有独特的有性繁殖方式和孢子形状, 与 HS506 有显著的差别。有孢汉逊酵母属中虽然也有生圆形孢子的, 但多有痣面或凸线, 它的营养繁殖是两端芽殖 (bipolar budding), 在细胞两端出芽, 子母细胞之间收缩处狭窄, 且无横隔膜产生。有孢汉逊酵母的孢子萌发时从来不接合, 在维生素的需要上它与 HS506 也不相同, 因此 HS506 也不应属于有孢汉逊酵母属。HS506 与有孢汉逊酵母

表 1 HS506 与有孢汉逊酵母的比较

菌 名	营养繁殖方式	子囊孢子形状	孢子萌发	生长所需要的维生素
有孢汉逊酵母属	两端芽殖	帽形或盔形, 或看上去是球形, 有时稍有痣和不清楚的凸线。成熟后孢子放出或不放出。	孢子萌发时不成对接合。	需要肌醇和遍多酸盐。
HS506	两端芽裂	椭圆球形, 成熟后不放出。	萌发时成对接合或不接合, 两种情况可同时存在。	九种维生素同时存在时生长有刺激作用。以蛋白胨为氮源时维生素 B <sub>1</sub> 有弱刺激作用。

的区别可见表 1。

将 HS506 与拿逊酵母亚科的四个属相对比的结果，它与拿逊酵母属、有孢汉逊酵母属、威克酵母属均不相同。由于它是两极芽裂，椭圆形的子囊孢子萌发前可成对接合（萌发情况近似于二孢类酵母 *Saccharomyces bispora*<sup>[1,9]\*</sup>），所以应当归于类酵母属。

把 HS506 与类酵母属的唯一一种路德类酵母相比较，结果可见表 2。

对 HS506 有促进生长作用的因子可能是很复杂的。在不加维生素的情况下以水解无维生素酪素为氮源时它对任何一种单

一的维生素无特别需要，九种维生素同时存在时对生长有刺激作用。当把氮源改为蛋白胨时除了全维生素可刺激生长以外，维生素 B<sub>1</sub> 也有弱刺激作用。看来氮源所含氨基酸的组成不同可能影响它对维生素的要求。此外，目前酵母中需要氨基酸为氮源的还不多，因此对 HS506 的氮代谢和维生素需要仍需作进一步的研究。

由于 HS506 细胞短小，生理特性与路德类酵母有明显差别，故定为类酵母属的新种——中国类酵母 (*Saccharomyces sinensis* sp. nov.)。

Miller 和 Phaff<sup>[10]</sup> 曾指出在拿逊酵母

表 2 HS506 与路德类酵母的比较

菌名	细胞形状	细胞大小 (微米)	发 酵			同 化									维 生 素	氮 源	
			半乳糖	蔗糖	棉子糖	半乳糖	蔗糖	棉子糖	纤维二糖	甘油	水杨甙	葡萄糖酸内酯	葡萄糖酸钙	乳酸钙			
路德类酵母	柠檬形长形	(4—7)× (8—23)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	S*	需要维生素 B <sub>1</sub> 、维生素 B <sub>2</sub> 、生物素	在以硫酸铵为氮源的培养基上能生长。
HS506	柠檬形椭圆形	(2.6—6)× (3.3—9.7)	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	九种维生素全部存在可促进生长。对单一维生素无特别需要。白蛋白胨有弱刺激作用	需要蛋白胨、水解酪素等氮源。 在以硫酸铵为氮源的培养基上不生长。

\* S 为同化迟缓。

族中的三属中类酵母属与有孢汉逊酵母关系较近，而与拿逊酵母关系较远。除细胞形态和营养繁殖在细胞两极进行以外，类酵母属与有孢汉逊酵母近似于酵母族 (Tribe Saccharomycetaceae) 中的一些种。拿逊酵母属的营养繁殖则更接近于裂殖，而且生活史和孢子形状与其他二属也很不相同。Miller 和 Phaff<sup>[11]</sup> 又研究了柠檬形酵母的细胞壁成分，他们指出类酵母属与有孢汉逊酵母的细胞壁成分接近于酵母属

(*Saccharomyces*)，而拿逊酵母则与内孢霉 (*Endomyces*) 近似。Phaff<sup>[5]</sup> 认为路德类酵母具有利用乳酸盐的能力(虽然迟缓)，以及不能利用葡萄糖酸内酯或  $\alpha$ -酮基葡萄糖酸盐，而有孢汉逊酵母则相反。在研究中国类酵母的过程中我们发现它不能利用乳酸钙，而能同化葡萄糖酸内酯，细胞也较

\* Castelli<sup>[11]</sup> 所定之种名。因与路德类酵母无根本区别，Lodder 在 1970 年已将其列为路德类酵母的同物异名。

小；因此它可能是类酵母属中与有孢汉逊酵母关系更接近的种。

在以上工作的基础上我们建议将类酵母属的特征略作修改，并提出类酵母属的检索表。

类酵母属的特征：细胞柠檬形、椭圆形、瓶形或长形。营养繁殖以宽基芽殖 (budding on a broad base) 在两端进行 (即两端芽裂)。如有假丝也很不发达。子囊孢子椭圆球形，壁光滑；或许有一窄凸线。子囊含有 1—4 个孢子。有的菌株孢子萌发时成对接合，另一些菌株孢子萌发时成对接合或不经接合即萌发。在液体培养基中形成沉淀和环。发酵糖；不同化硝酸盐。

类酵母属的检索表：

1. a. 除葡萄糖外还能同化发酵蔗糖和棉子糖……………路德类酵母 (*Saccharomyces ludwigii*)
- b. 同化发酵葡萄糖、半乳糖，不同化不发酵蔗糖、棉子糖……………中

国类酵母 (*Saccharomyces sinensis*)

### 参 考 资 料

- [ 1 ] Castelli, T.: *Arch. Microbiol.*, 12: 260, 1942.
- [ 2 ] Кудрявцев, В. И., Систематика дрожжей. Москва, 1954.
- [ 3 ] 伊藤诚哉：日本菌类志，第三卷，第一号，东京养贤堂，1964.
- [ 4 ] Hansen, E. Chr.: *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt.* II, 5: 632, 1889.
- [ 5 ] Lodder, J.: *The yeast. A taxonomic study.* Amsterdam: North Holland Publishing Co., 1970.
- [ 6 ] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组：常见与常用真菌，科学出版社，1973.
- [ 7 ] Lodder, J. and Kreger-van Rij, N. J. W.: *The yeast. A taxonomic study.* Amsterdam: North Holland Publishing Co., 1952.
- [ 8 ] Hansen, E. Chr.: *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt.* II, 15: 529, 1904.
- [ 9 ] Hjort, A.: *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg.*, 25: 259, 1954.
- [ 10 ] Miller, M. W. and Phaff, H. J.: *Mycopath. Mycol. Appl.*, 10: 113, 1958a.
- [ 11 ] Miller, M. W. & Phaff, H. J.: *Antonie van Leeuwenhoek*, 24: 225, 1958b.

## **SACCHAROMYCODES SINENSIS SP. NOV.—A NEW SPECIES OF YEAST FROM SOIL OF HAINAN ISLAND, CHINA**

Yue Jingzhu

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A new species of yeast, *Saccharomycodes sinensis*, has been isolated from soil in the forest of Mount Chienfeng in Hainan Island (Kwangtung). The cells are ellipsoidal or lemon-shaped. Vegetative reproduction is performed by bipolar budding on a broad base, followed by fission (bipolar bud-fission). The ascospores are spherical with a smooth wall, usually one or two, occasionally three, rarely four spores per ascus. The ascus wall does not rupture when the spores are mature. Spores may conjugate in pairs before germination or germinate directly. All these characteristics are in good agreement with those of *Saccharomycodes*. The micro-organism we isolated

assimilates and ferments glucose and galactose but not sucrose and raffinose, and it has been found to utilize complex amino acids as sole source of nitrogen but fails to grow in the presence of ammonium sulfate only, therefore it can easily be distinguished from the monotype species of *Saccharomycodes* — *S. ludwigii*. For this new species we propose the name *Saccharomycodes sinensis* sp. nov. The description is based on identification methods advocated by Lodder<sup>[5]</sup>. Diagnosis of the genus has been modified, for the shape and size of the cells are different from the type species. A key to the genus *Saccharomycodes* has been given.