

## 原孢囊菌属的二个新种\*

李明霞

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在研究我国某些地区自然界中的酵母时, 分离到两株原孢囊菌(*Prototheca*), 编号为 S 124 与 HS 652-3。原孢囊菌是一类无色异养的兼有真菌和绿藻特点的微生物, 在很多方面类似酵母菌。

本文对这两株原孢囊菌做了全面对比, 发现它们在形态、生理与生境上彼此不同, 与已知的种也不同, 故定为新种。

S 124 是在浙江黄岩枇杷的果实表皮上分得, 其主要特点是细胞大、圆柱形, 内生孢子数多达十五个以上。一般不发酵, 但有时能迟弱地发酵葡萄糖, 不同化异戊醇和己醇也不同化柠檬酸, 不同于已有各种的描述。根据其分离来源而定名为枇杷原孢囊菌(*Prototheca eriobotryae* Li sp. nov.)。

HS 652-3 是在广东海南岛土壤中分得。虽为圆柱形但细胞不很大, 未见发酵, 虽不同化异戊醇和己醇但能同化柠檬酸, 而且受热带气候影响可耐热达 42—43 °C, 不同于 S 124 也不同于已知各种。根据其耐热特点而定名为耐热原孢囊菌(*Prototheca thermodurica* Li sp. nov.)。

原孢囊菌在自然界中的分布, 最初只认为与水生的生境有关, 如海水、湖水等。后来在树木流胶、土壤、废水池的污泥、土豆表皮等均有发现。甚至与活的动物体也有关, 如母牛发炎的乳房、人粪、指甲与皮肤之损伤处, 在检验临床标本时也曾发现有原孢囊菌。此菌初看时很象酵母, 虽有报道认为原孢囊菌能引起淋巴感染, 但其病因学以及对人和动物的致病过程不很明确, 因此可认为是偶发性病原 (Adventitious pathogens)。此外又因种和株的不同, 将来还可能发现有益于人类的株系。总之原孢囊菌是与人类较有关的一类微生物, 而且在分类上又有特点, 可看作是菌与藻间的中间类型, 值得重视。

原孢囊菌这一属是 1894 年由 Krüger 创立, 细胞透明无色, 在琼脂培养基上产生白到奶油色酵母状菌落, 细胞分散, 无假菌丝或链状结构, 不芽殖, 成熟的细胞其孢壁

较厚或称孢子囊 (sporangium), 其中原生质可出现很多割裂面 (cleavage plane), 而不规则地割裂成许多小单位, 每一单位周围再形成壁, 而成为数目不定、大小不一的内生孢子 (endospore), 或称静孢子 (aplanospore), 又因其形状等都象母细胞, 所以又称似亲孢子 (autospore)。孢子囊和内生孢子多数呈圆形、卵形、椭圆形、个别为圆柱形。此不能游动的内生孢子当孢子囊破裂后释出囊外, 在营养条件适宜时, 再伸长变大而重复其生活周期。有少数孢子囊也可割裂形成 2—3 个厚壁的休眠细胞 (hypnospores, thick-walled spore)。无有性繁殖。1972 年 Arnold 与 Ahearn 主要根据生理在这一属

本文于 1977 年 5 月 9 日收到。

\* 本文曾受方心芳同志关怀与鼓励, 梁家骥、赵继鼎、陆师义、余永年、齐祖诤等同志曾给予支持与帮助, 乐静珠同志绘图并提供 HS 652-3 菌株。P. *stagnora* (ATCC 16527) 为 1976 年由 ATCC 提供。

中承认了五个种<sup>[1]</sup>。本文对我们所得的 S 124 与 HS 652-3 在形态与生理上作了全面测定,与原孢囊菌之各种进行对比。

## 材料与方法

### (一) 菌种

S 124 分离自浙江黄岩枇杷的果实表皮。

HS 652-3 分离自广东海南岛热带作物尖白达树下土壤。

*Prototheca stagnora* (ATCC 16527)。

### (二) 培养与方法

形态观察主要用麦芽汁琼脂和 YM EX agar,也曾用麦芽汁液体和 YNB Broth (含 0.1% 葡萄糖)作对比,于 25—27°C 培养 3 天与一周,细胞大小主要是以成熟的正出现割裂的孢子囊之平均大小为准,也曾用 Kleyn 和 Gorodkova 二种酵母孢子培养基观察生长情况。

生活周期是用麦芽汁琼脂,以悬滴培养法于 25°C 作连续观察。

假菌丝观察用加盖玻片的土豆葡萄糖琼脂培养基。

测定发酵用杜氏管法 (Durham tube) 发酵培养基为含 2% 葡萄糖的豆芽汁培养基<sup>[2]</sup>, 25—27°C 培养一周以上。至于同化氮源和碳源都用液体法,因生长图形法结果不明显。同化碳源培养基按 Lodder<sup>[3]</sup> 的 YNB Broth 成份配制,以 25—27°C 培养二周之结果为准,碳源用糖、酸、醇类共 40 多种,液体碳源按体积计加 0.5%。

产酸试验采用含糖豆芽汁加溴酚兰的液体培养基。检查细胞内贮存的淀粉用 Lugol's 碘液、维生素和其他各项测定均基本依照 Lodder 方法进行。

## 试验结果

### 一、生活周期

当用悬滴培养法观察 S 124 时,发现其细胞成熟后可出现 1 到多个不规则的割裂面,而后每一小单位形成一个内生孢子。内生孢子大小不等,数目不固定可多达十几个,从出现割裂面到形成内生孢子往往

不到 24 小时。如果用含琼脂较少的半固体培养基培养,则能见到内生孢子因长大而体积膨大,最后把孢子囊挤破,致使大量内生孢子释出囊外。当大量内生孢子在囊内拥挤时往往呈多角形或其他不规则形状,但一旦囊壁破裂,内生孢子就表现为类似于母细胞的形状,出现为圆柱形或椭圆形(图 1),在整个生活周期中未见有性生殖,符合于这一属的特点。

HS 652-3 在麦芽汁斜面上培养后,也能见到上述各阶段的情况,也符合原孢囊菌的特征。

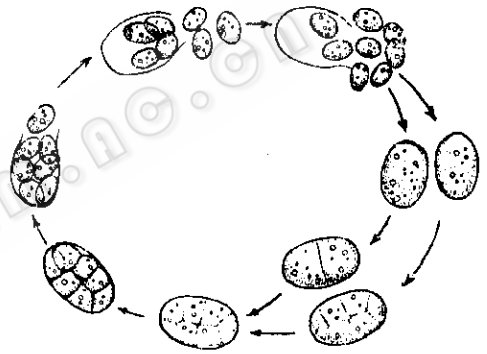


图 1 S 124 的生活周期

### 二、培养特征

S 124 与 HS 652-3 在一般的酵母培养基上均能良好生长,产生乳白色酵母状菌落。经长期移代并用日光照射没有产生颜色,其无色异养特性很稳定,符合于这一属的特性。

S 124 在麦芽汁琼脂上 27—28°C 培养二周时,菌落直径 18—20 毫米,呈淡米色 (pale olive-buff\*), 质地膏状 (pasty), 暗无光泽,表面不凸起,中部扁平,四周呈不很强的放射状条纹 (radially rugosa) (图版 I-1)。

HS 652-3 的菌落在 28°C 时与 S 124 相

\* Ridgway plate XL.

似,但菌落更为光亮。如果长期在12—15℃培养则二者区别较大,这时 HS 652-3之斜面上的菌落表面光滑,而 S 124之表面有致密的平行皱纹。

此外曾以 *Prototheca stagnora* (ATCC 16527) 于麦芽汁琼脂 28℃ 培养 12 天与 S 124对比,前者虽也为无光泽的淡米色膏状菌落,但菌落较小,表面微凸,边缘呈现不规则的细褶皱,与 S 124 不同(图 3,图版 I-2) 与 HS 652-3 也不同。

### 三、形态特征

S 124 在麦芽汁琼脂上 27℃ 培养 3 天,细胞多数为圆柱形,少数为椭圆或圆形,个别是肾形(图 2,图版 II)。细胞成熟后出

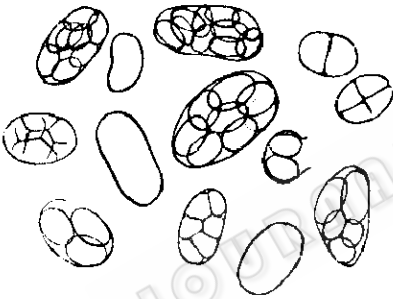


图 2 S 124 的细胞形态

现割裂现象(图版 II-1, 2),孢子囊较大 11.3—23 × 15.8—30 微米,内生孢子数不固定(图 2),可多达 15 个以上。内生孢子成熟后形状与母细胞相似,大小一般为 8—10 × 9.1—12.5 微米也可达 13.6—18 微米,在同一孢子囊内的内生孢子大小也可以很悬殊(图 2,图版 II-3,图版 II-4)。在未破裂之孢子囊中内生孢子较小。

在麦芽汁液体培养基中细胞略宽,而且更易出现割裂面形成内生孢子,在酵母的生孢子培养基上如 Gorodkova 和 Kleyn 培养基上培养时,也比麦芽汁琼脂上更易产生内生孢子,此外在 YM EX agar 或 YM Broth 培养基上培养时均能正常生长并产

生内生孢子,但在上述种种培养基上都不出现芽殖,在土豆葡萄糖培养基上也不形成假菌丝或链状结构。无有性阶段。

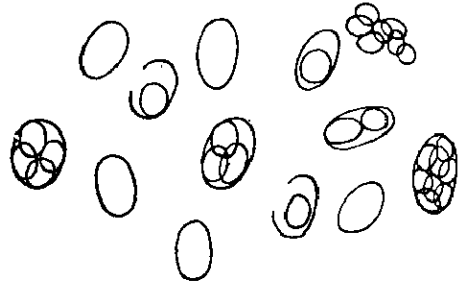


图 3 HS 652-3 的细胞形态

至于 HS 652-3 在麦芽汁琼脂上,于 27℃ 培养 3 天时,细胞虽主要也为圆柱形,但比 S 124 小得多(图 3),孢子囊平均大小为 7.9—12.5 × 12.5—16 微米。内生孢子相应地也比 S 124 小,一般为 4.04—5.6 × 6.4—8.6 微米。在液体培养基中培养时,从孢子囊内释出的内生孢子比 S 124 更易互相团聚在一起。

至于 *Prototheca stagnora* (ATCC 16527) 则典型地为圆形或椭圆形,细胞比上述二者更小(图 4)。

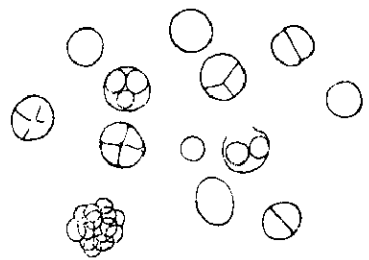


图 4 *Prototheca stagnora* (ATCC 16527) 的细胞形态

S 124 和 HS 652-3 与 Arnold 及 Ahearn 系统中各种之形态对比时,发现以往描述五个种在麦芽汁琼脂上主要为圆形、椭圆形或卵形,与 S 124 和 HS 652-3 均不同(表 1)。

表 1 原孢囊菌各种之孢子囊与内生孢子的对比\*

培养基 菌名 形状 大小	麦芽汁琼脂(3天)		YM EX 琼脂(1周)	
	孢子囊大小(微米)	内生孢子大小(微米)	孢子囊大小(微米)	内生孢子大小(微米)
S 124	多数圆柱形 11.3—23×15.8—30	8.0—10×8.0—12.5 偶为13—18	多数圆柱形 10.2—19.3× 15.8—27.3	6.8—7.9×7.9—9.12
HS 652-3	多数圆柱形 7.9—12.5×12.5—16	4.04—5.6×6.5—8.6	多数圆柱形 7.9—12.76×9.1—16	4.04—5.6×6.8—8.6
<i>P. stagnora</i>	圆形、短椭圆形 6.84—14.9× 6.8—14.9	4.04—4.05×5.6—5.6	椭圆、圆 5.4—10.8×5.4—13.4	
<i>P. moriformis</i>	圆形、卵形 直径8—12, 偶为16	直径4—5	5.4—16.1×8.1—18.8	
<i>P. zopfii</i>	圆形、卵形 直径10—18, 偶为20	直径9—11, 偶而<5或>13	8.1—24.2× 10.8—26.9	
<i>P. filamenta</i>			椭圆、可有菌丝 8.1—10.8×8.1—13.4	1.3—2.6×1.3—2.6
<i>P. wickerhamii</i>	圆形、近圆形 直径8—13, 常为11.5—13	直径4—5(7)	5.4—10.8×5.4—13.4	

\* 根据 Arnold 与 Ahearn 1972 年<sup>[1]</sup> 系统整理并参考 Tubaki 与 Soneda<sup>[4]</sup> 的结果。

## 四、生 理

### (一) 发酵试验

原孢囊菌一向被认为是不发酵的,但在多次实验中发现 S 124 发酵葡萄糖时,有好几次在第 3 或第 5 天出现 CO<sub>2</sub> 气泡(约绿豆或小米粒大),而 HS 652-3 与 *P. stagnora* (ATCC 16527) 则始终未见发酵。由于 S 124 发酵不稳定而且不强不快,现只作为基本不发酵或弱发酵。但这情况与 HS 652-3 和 *P. stagnora* (ATCC 16527) 有区别,与其他种也不同。

### (二) 同化碳源

曾用 Lodder 1952<sup>[5]</sup> 年之简易培养基与 Lodder 1970 年 YNB Broth 对比,绝大部分结果均能符合,个别的有些不同或同化迟早与强弱上有出入,为了便于对比,我

表 2 发酵试验

菌 号	葡 萄 糖
S 124	—*
HS 652-3	--
<i>P. stagnora</i> (ATCC 16527)	—

\* —° 代表基本不发酵,偶见不稳定的迟弱发酵。

们主要是采用 Lodder 1970 年之 YNB Broth 为基础培养基,用液体法以 27°C 同化二周的结果为准。醇量含量主要按 0.5% 计。

在碳源方面包括糖类、醇类、有机酸或糖苷共试验了 40 多种,证明 S 124 与 HS 652-3 对大部分碳源都不能同化,而在果糖、甘油、乙醇上长得特别好,并能同化葡萄糖、半乳糖,符合原孢囊菌这一属的普遍特点,但是这二株菌都不能同化异戊醇与己醇,和其他各种显然不同<sup>[1]</sup>。此外 S 124 与

HS 652-3 之间又在同化柠檬酸上有不同，所以 S 124 与 HS 652-3 既不同于已有各个种，而且二者彼此间也不同（表 3）。此外 S 124 在 YNB Broth 中经多次实验常不同化甘露糖，有时只表现为极弱同化，HS 652-3 同化甘露糖也不强，但 *P. stagnora* (ATCC 16527) 却在二种培养基上都能明显同化甘露糖。

除了表 3 所列的部分碳源外，还证明 S 124 与 HS 652-3 不能同化山梨糖、松三糖、蜜二糖、菊糖、可溶性淀粉、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯糖、L-鼠李糖、肝糖、 $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷、水杨苷、甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、丙酮。

**(三) 同化氮源**

在同化氮源方面 S 124 与 HS 652-3 能利用蛋白胨、天冬素、硫酸铵，其中蛋白胨是它们最合适的氮源，不利用硝酸钾、盐酸乙胺，至于尿素在早期当生长到第四、五天时也有明显的促进作用，但到后期却与空白对照相仿。

**(四) 维生素试验**

本文用了 9 种维生素，采用“缺一”的方法，即在基础培养基中，单缺某一种维生素而加其他 8 种维生素。结果证明只有在不加任何维生素或只缺硫胺素的情况下不生长，其他各种处理都生长良好，说明此二株菌对硫胺素有特殊需要，其他维生素缺少时均无影响（表 4），符合于这一属的共性。

**(五) 细胞贮存物**

曾用 Lugol's 碘液染色，在显微镜下可见到 S 124 与 HS 652-3 在细胞内均有大量深蓝色淀粉内含物，在这一点上保留着绿藻的特点。

**(六) 生长温度试验**

曾在麦芽汁斜面上接种后，用不同温度培养，以培养四天的结果为准。根据菌

表 3 *Prototheca* 同化部份碳源之对比\*

柠檬酸	-	+						
琥珀酸	+	+						
乳酸	+	+						
甜醇	-	-	-	-	-	-	+	-
赤藓醇	-	-	-	-	-	-	+	-
肌醇	-	-	-	-	-	-	+	-
山梨醇	-	-	-	-	-	-	+	-
甘油	+	+	+	+	+	+	+	+
苯酚	-	-	-	-	-	-	-	-
环己醇	-	-	-	-	-	-	-	-
己醇	-	-	+	+	+	+	+	+
异戊醇	-	-	+	+	+	+	+	+
正戊醇	-	-	-	-	-	-	-	-
叔丁醇	-	-	-	-	-	-	-	-
异丁醇	+	+						
正丁醇	+	+	+	+	+	+	+	+
异丙醇	-	-	-	-	-	-	-	-
正丙醇	+	+	-	+	+	+	-	-
乙醇	+	+	+	+	+	+	+	+
甲醇	-	-	-	-	-	-	-	-
海藻糖	-	-	-	+	-	-	+	+
棉子糖	-	-	-	-	-	-	+	-
木糖	-	-	-	-	-	-	+	-
纤维二糖	-	-	-	-	-	-	+	-
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	-	-	-	-	-	-	+	-
麦芽糖	-	-	-	-	-	-	+	-
蔗糖	-	-	+	-	-	-	+	-
果糖	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露糖	-	+						
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+
菌名								
S 124								
HS 652-3								
<i>P. stagnora</i> (NRRL-Y-6872)								
<i>P. moriformis</i>								
<i>P. scopii</i>								
<i>P. filamenta</i>								
<i>P. wickerhamii</i>								

\* 根据 Arnold 与 Abcarn 系统整理。

L——生长迟；t——生长较弱；c——不生长或极弱；+——生长良好；-——完全不长。

表 4 维生素试验

菌号	九种混合维生素	不加任何维生素	缺硫胺素	缺核黄素	缺吡哆醇	缺生物素	缺泛酸钠	缺对氨基苯甲酸	缺叶酸	缺肌醇	缺烟酸
S 124	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
HS 652-3	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

表 5 生长温度试验

温度(°C)	HS 652-3	S 124	<i>P. stagnora</i> (ATCC 16527)
13—15	2	2	2*
25	6.5	6.5	6.5
27	9	8	7.5
31	9	8.5	7.5
32—33	9	9	8.5
35—37	10.5	7	2.5
41	10	—	—
42—43	6	—	—
44	—	—	—

\* 斜面上菌落宽度以毫米计。

表 6 原孢囊菌各种之生长温度对比\*

菌名	生长温度(°C)
S 124	25—37
HS 652-3	25—43
<i>P. stagnora</i>	25—33
<i>P. moriformis</i>	20—25
<i>P. zopfii</i>	25—37
<i>P. filamenta</i>	25—37
<i>P. wickerhamii</i>	25—37

\* 根据 Tubaki 和 Soneda 1959 年<sup>[4]</sup>以及 Arnold 和 Ahearn 1972 年<sup>[1]</sup>整理。

落之宽度作对比,结果表明 HS 652-3 在 25—43°C 间都能生长,35—37°C 左右为最适宜,41°C 时仍生长良好,42—43°C 时生长减弱,在 44°C 以上不长,42—44°C 虽只差 2 度但变化却很大。而 S 124 与 *P. stagnora* (ATCC 16527) 则在 27—33°C 之间较适宜,41°C 已不生长,其中尤其是 *P. stagnora* (ATCC 16527) 在 37°C 时生

长已很差(表 5)。如果与以往各个种对比,其他各种之生长温度多数均在 25—37°C 之间,个别种更低,而 HS 652-3 能耐热到 42—43°C 是个显著特点,这与其生境有关(表 6)。

### (七) 其他生理试验

曾按酵母鉴定方法测试了多种项目,证明 S 124 与 HS 652-3 除了能产酸外,不分解杨梅苷,不产生胞外类淀粉,不液化明胶,不胨化牛奶,不分解尿素。

## 五、新种描述

### (一) 枇杷原孢囊菌新种

在麦芽汁琼脂上生长良好,形成乳白色酵母状菌落,28°C 12 天的巨大菌落呈淡米色,暗无光泽,表面不凸起,中部扁平,四周呈放射状条纹 (radially rugosa)。

麦芽汁琼脂上 27°C 培养 3 天细胞为圆柱形,少数为椭圆形或圆形,个别为肾形。成熟细胞可割裂形成 15 个以上内生孢子,孢子囊平均大小为 11.3—23 × 15.8—30 微米。内生孢子一般为 7—10 × 8—12.5 微米或达 13.6—18 微米、在未破裂之孢子囊内的内生孢子较小。

在麦芽汁液体培养基中,细胞略宽,更易出现割裂面而形成内生孢子。

对葡萄糖往往不发酵,偶而也可产生 CO<sub>2</sub> 气泡,但出现得迟而弱。

能同化葡萄糖、果糖、半乳糖、甘油、乙醇、正丙醇、正丁醇、异丁醇、琥珀酸,弱同化乳酸,不同化或微弱同化甘露糖,不同化柠檬酸、异戊醇、己醇等大多数碳源。

在氮源同化方面,能很好同化蛋白胨,至于天冬素、硫酸铵也能促进生长,尿素在早期也有促进作用,但不能同化硝酸钾、盐酸乙胺。

其他生理方面,不分解杨梅苷、不产生胞外类淀粉,能产酸、不液化明胶,不胨化

牛奶,不分解尿素。

培养温度是 27—33°C 适宜, 37°C 生长较弱, 41°C 不长。

S 124 (模式)于 1974 年 5 月分离自浙江黄岩枇杷之果实表皮, 保存于中国科学院微生物研究所(北京)。

### *Prototheca eriobotryae* Li

sp. nov.

Cultura in agarum maltatum farinarium hylina; cellulae plerumque cylindreae aliquando ellipsoideae 11.3—23 × 15.8—30 μm, aplanosporae cylindreae, raro reniformeae 7—10 × 8.0—12.5 μm vel 13.6—18 μm.

Fermentatio: Plerumque nulla, raro sera vel tenuis.

Assimilatur: Glucosum, levulosum, galactosum, glycerolo, ethanolo, n-propanolo, n-butanolo, iso-butanolo, acidum succinicum et acidum lacticum, sed non assimilatur acidum citricum, iso-pentanolo et hexanolo.

Temperatura culturae: 25—33°C optima, 37°C tenuis, 41°C nulla.

Typus: Cultura S 124, isolated ex loquatio, in Instituto Microbiologico Academiae Sinicae, Beijing, conservatus est.

### (二) 耐热原孢囊菌新种

麦芽汁琼脂 28°C 培养 12 天, 菌落淡米色, 质地与表面近似于枇杷原孢囊菌, 但菌落更为光亮。

在麦芽汁琼脂上 27°C 2—3 天, 孢子囊一般为 7.9—12.5 × 12.5—16 微米, 内生孢子 4.04—5.6 × 6.4—8.6 微米, 在麦芽汁液体中从孢子囊释出的内生孢子容易成堆地团聚。

同化葡萄糖、果糖、半乳糖、甘油、乙醇、正丙醇、正丁醇、异丁醇、琥珀酸、柠檬

酸、弱同化乳酸、甘露糖、不同化异戊醇、己醇等多种碳源。

能同化蛋白胨、硫酸铵、天冬素, 不同化硝酸钾, 盐酸乙胺。

不分解杨梅苷, 不产生胞外类淀粉, 能产酸, 不液化明胶, 不胨化牛奶, 不分解尿素。

培养温度是 27—41°C 都能生长, 35—37°C 较适宜, 41°C 仍生长旺盛, 42—43°C 稍弱, 44°C 以上不长。

HS 652-3(模式)于 1974 年 10 月分离自广东海南岛土壤。保存于中国科学院微生物研究所(北京)。

### *Prototheca thermoturica* Li

sp. nov.

Cultura in agarum maltatum farinarium hylina; cellulae plerumque cylindreae aliquando ellipsoideae 7.9—12.5 × 12.5—16 μm, aplanosporae cylindreae 4.04—5.6 × 6.4—8.6 μm.

Fermentatio: Nulla.

Assimilatur: Glucosum, levulosum, galactosum, glycerolo, ethanolo, n-butanolo, iso-butanolo, acidum lacticum, acidum succinicum et acidum citricum, sed non assimilatur iso-pentanolo et hexanolo.

Temperatura culturae: 27—41°C optima, 42—43°C tenuis, 44°C nulla.

Typus: Cultura HS 652-3, isolata ex terra in Hainan, Kwantung, in Instituto Microbiologico Academiae Sinicae, Beijing, conservatus est.

## 讨 论

经实验证明 S 124 与 HS 652-3 在琼脂培养基上呈现为酵母状菌落。细胞中贮存有大量淀粉, 生活周期也与原孢囊菌符合。生理方面对果糖、乙醇、甘油同化力很强, 而且特别需要硫胺素, 这些性状均符合于原

孢囊菌而归于原孢囊菌属内。

虽然原孢囊菌的生态被认为与酵母菌相似,但在我们的采集工作中,以属于温带、亚热带和热带的华东与华南地区看,尤其是华南因为全年平均温度较高,气候潮湿,如按酵母生态广泛采集时,能分离到较多不同类型的酵母,但是在一千多株酵母中只发现二株原孢囊菌,可见其出现的机率不算很多。

关于原孢囊菌之确切分类地位目前尚无定论,一种意见认为原孢囊菌是绿藻,与小球藻属(*Chlorella*)关系接近<sup>[5,6]</sup>,如 Fritsh 1935 年在他的专著中于绿藻门、绿球藻目(Chlorococcales)的小球藻科(Chlorellaceae)中曾简略地提到它、但未加详细讨论而只是把它作为小球藻的无色类型<sup>[7]</sup>。但是典型的绿球藻目是有色的自养生物,在无性繁殖方面产生游动孢子或似亲孢子,而似亲孢子之数目是有规律的( $2^n$ ),似亲孢子大小基本也一致,但原孢囊菌没有游动孢子,似亲孢子数目不定,大小不一致,所以将原孢囊菌放在绿球藻目也比较勉强,但距离其他绿藻更远,所以他也只好采取这个暂时的措施。至于 Smith 1950 年的专著中,在绿球藻目的十个科中却完全未提到原孢囊菌<sup>[8]</sup>。另有一种意见认为原孢囊菌是真菌或是一种象真菌的生物,如 1894 年 Krüger 在创立此属时就注意到它是个无色、异养、腐生的象真菌的微生物,当时他已用了研究酵母之发酵和同化的方法来描写这个微生物的生理特点,但他未归在那个真菌类群中,而 1895 年 Saccardo 却把原孢囊菌放在子囊菌的内孢霉科(Endomycetaceae)<sup>[9]</sup>,这样处理当然问题很多,因为它并不产生子囊孢子,没有有性繁殖而只形成无性的内生孢子。虽然有些真菌也能产生内生孢子如原孢囊菌属(*Protomyces*)、球孢菌属(*Coccidioides*)以及丝孢酵母属(*Tricho-*

*sporon*),但是内生孢子终究与子囊孢子很不同,不能都放在子囊菌中。此外原孢囊菌在细胞内又以淀粉的方式贮存食物,这又保留了绿藻的特点。

由于这种种问题,近 10 年来有些作者对原孢囊菌特别是对 *Prototheca zopfii* 这个种在生理代谢或细胞学等方面做了较细致的对比研究,结果表明它与小球藻间又存在有种种差异,因而也怀疑它们之间是否真有密切的关系。

至于在系统发育上, Tubaki 与 Soneda 在 1959 年根据原孢囊菌比无色小球藻更适于异养生活而推想二者在很早就已分开。认为原孢囊菌不是直接由小球藻而来的,而是二者虽共起源于绿藻纲,而分别采取平行的演化方式。并认为原孢囊菌与低等真菌保持着更为密切的关系<sup>[4]</sup>。这观点得到 Arnold 与 Ahearn 之支持<sup>[1]</sup>,此外 Phaff 等 1966 年编写《酵母菌的生活》一书时直接把原孢囊菌作为类酵母的真菌来处理<sup>[10]</sup>。长谷川武治 1975 年编写的《微生物的分类与鉴定》中也直接将原孢囊菌作为类酵母的真菌<sup>[11]</sup>。我们认为这样处理比较恰当,因为在酵母中包括了许多结构简单的真菌,它们在系统上分别列入真菌的不同纲目,可有不同的来源。酵母在无性繁殖方式上虽主要是芽殖,但也包括了个别不芽殖的类型如裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)和梗孢酵母属(*Sterigmatomyces*),而且有的酵母如丝孢酵母也可采取产生内生孢子的方式行无性繁殖。又如 Кудрявцев 1954 年在《酵母分类》一书中对 *Endoblastomyces* 与 *Nadsoniomyces* 二个属曾误认为是产生大量大小不同的子囊孢子<sup>[12]</sup>,但实际上却是内生孢子,所以这二属也应作为无孢子酵母放在丝孢酵母这一属中<sup>[13]</sup>。总之象原孢囊菌那样能产生内生孢子的类型在酵母中也不是没有的。



此外原孢囊菌在生态、外观、质地、气味等培养特征与培养方法上都象酵母, 所以它们有可能被酵母工作者在分离自然界中的酵母时同时分离到。又因其结构简单需要用一系列研究酵母的技术从生理特点来研究对比。所以我们认为将它作为起源于藻类而接近于真菌的类似酵母的微生物, 列入类酵母的行列中是比较妥当的。这样可以便于研究, 便于从自然中发现它, 也不妨碍其系统上的安排。至于它的分类地位一旦研究更为深入, 时机成熟时可进一步讨论。

关于原孢囊菌之分种, 以近 20 年的情况看, 比较研究得多的如 1959 年 Tubaki 和 Soneda, 他们做了少量碳源同化对比, 认为种间生理上差异不大, 主要根据形态大小等承认了五个种, 包括一个新种。而 1972 年 Arnold 与 Ahearn 扩大了同化碳源的范围, 认为种间在生理上有明显差异, 因而着重在生理上讨论问题。他们承认了五个种包括一个新种, 而不主张注意形态特点。

根据 S 124 与 HS 652-3 的形态观察说明形态特点还是应该重视的, 只要培养基培养条件一致, 形态上的差异在分类上还是很有价值的。从已有描述来看, 原孢囊菌各个种在麦芽汁琼脂上其形态几乎都是圆形、椭圆形或卵形。象 S 124 这么大的圆柱形还很少见, 虽早期曾有 *Prototheca trispora* 在形态上有些接近, 但其内生孢子数比较少, 常为 3 个, 而 S 124 却有大量内生孢子经常达十多个, 而且生理上 *P. trispora* 能同化乙酸和丙酸, S 124 却不同化故二者不同<sup>[4]</sup>。此外还有 *P. portoricensis* 虽细胞较大, 但内生孢子也少, 常只有 2 个<sup>[5]</sup>, 根据 Arnold 和 Ahearn 1972 年所作的生理对比认为它与 *P. zopfii* 相同, 而作为后者的异名, 所以生理上对醇类的同化也与 S 124 不同<sup>[1]</sup>。

如果将 S 124, HS 652-3 与较近期的 Arnold 与 Ahearn 1972 年系统中的五个种全面对比来看, 在形态与生理上都有不同, S 124 与 HS 652-3 不同化异戊醇和己醇与 Arnold 与 Ahearn 所测的代表 5 个种的 23 株菌的结果都不同<sup>[1]</sup>, 建议修改检索表时将这个特征考虑进去, 就可与其他种区分开。

在发酵方面以往认为原孢囊菌属都不能发酵, 而 S 124 与其他种不同, 曾例外地几次见到能迟弱地发酵葡萄糖, 这也是一个特点, 说明其糖代谢途径与其他种可能有一定区别。

至于 HS 652-3, 虽有很多情况类似于 S 124, 但是它从未见到发酵现象。而且经多次重复试验在 YNB Broth 中能稳定地同化柠檬酸。细胞虽为圆柱形但不很大, 这都与 S 124 不同。此外它比已有各种更耐高温, 这与海南地区的高温环境有关, 根据这种种情况将 HS 652-3 与 S 124 分别地定为新种。

关于 *Prototheca stagnora* (ATCC 16527) 经多次实验发现它不能同化纯的蔗糖, 而只能同化不纯的蔗糖, 而且用不同培养基或延长培养到 1—2 月后结果仍然如此。不符合 Cook 1968 年对这一种的描述, 所以这一点可进一步讨论。另如扩大碳源同化试验后, 证明这一株菌也不同化异戊醇和己醇, 与 Arnold 与 Ahearn 1972 年对 *P. stagnora* (NRRL-Y-6872) 描述的情况也不同。又因它的形态不是大的圆柱形, 而且从来不发酵, 又能同化柠檬酸所以与 S 124 不同。根据其形态与耐热的性状看与 HS 652-3 也不同。

实验说明, 对原孢囊菌的研究, 如果片面地强调形态或是只片面地强调部分生理都是不恰当的, 应在统一的培养条件下扩大生理项目, 进行形态与生理的全面观察。

## 参 考 资 料

- [1] Arnold, P. and Ahearn, D. G.: *Mycologia*, 64 (2): 265—275, 1972.
- [2] 中国科学院微生物研究所: 常见与常用真菌, 科学出版社, 1973。
- [3] Lodder, J.: The yeast. A taxonomic study. North Holland Publishing, Co., Amsterdam, Holland, 1970.
- [4] Tubaki, K. and Soneda, M.: *Nagaoa*, 34: 25, 1959.
- [5] Cook, W. B.: *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 84: 213—216, 1968.
- [6] Cook, W. B.: *ibid.*, 84: 217—220, 1968.
- [7] Fritsh, F. E.: The structure and Reproduction of the Algae, Volume I. Cambridge University Press, 1935.

- [8] Smith, G. H.: The fresh-water algae of the United State, McGraw-Hill Book Company, Inc. New York, Toronto London, 1950.
- [9] Lloyd, D. and Turner, G.: *J. Gen. Microbiology*, 50: 421—427, 1968.
- [10] Phaff, H. J. et al.: The life of yeasts, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1966.
- [11] 长谷川武治: 微生物の分类と同定, 东京大学出版会, 1975.
- [12] Кудрявцев, В. И.: «Систематика дрожжей», Издательство Академии Наук СССР, Москва, 1954.
- [13] Carmo-Sousa, L. D.: Proc. II Intern. Symposium on yeast, Bratislava (Czechoslovakia), p. 87, 1966.

TWO NEW SPECIES OF *PROTOTHECA*

Li Ming-xia

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

During a survey of the wild yeast in the nature in China, two organisms belonging to the genus *Prototheca* have been isolated.

The morphology, physiology and habitat of these two isolates differ from any of the recognized species in the genus. Thus we describe them as two new species.

*Prototheca eriobotryae* (S 124) is a mesophile, isolated from loquat in East China, its optimum temperature is 27—33°C, unable to grow at 41°C, growth on malt agar (27°C), the cells are characteristically cylindrical in shape and larger than other species in size. Endospores are more than fifteen in number. Frequently it has no fermentative ability on glucose, or rarely weak and slow. No

assimilation of iso-pentanol, hexanol and citric acid observed.

*Prototheca thermodurica* (HS 652-3) has been isolated from the soil of Hainan Island in South China, where the average temperature is relatively high all the year round. This isolate is thermophilic, its optimum temperature ranges 35—37°C, still grows well at 41°C, unable to grow at 44°C, growth on malt agar (27°C), it produces midium-sized cells, cylindrical in shape. Neither fermentative ability was observed, nor assimilation of iso-pentanol and hexanol, but citric acid.

Detailed description is given in the report. The type cultures of these two species are deposited in the Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing, China.