

一属罕见的细菌——多孢子菌属

陈子英 梁家骥 张凤英

(中国科学院微生物研究所,北京)

我们发现并鉴定了一属新的细菌,其主要特征是能够从无菌丝的营养细胞直接转变为孢囊,产生大量孢子进行繁殖,并以甲烷作为唯一碳源与能源而生长。它同其它已知细菌有较大的差别,因而暂建立一个新的属:多孢子菌属 *Polysporobacterium*。模式种为沙石多孢子菌 *Polysporobacterium arenarium*。它们在分类学上的位置将另行讨论。

细菌中有些种能产生抵抗不利环境或繁殖后代的孢子,如芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌产生抗逆性芽孢;放线菌中的某些种由菌丝裂断形成孢子;粘细菌的子实体内可形成粘孢子;由 Leadbetter^[1]与 Малащенко等^[2]描述和分类整理的近 20 株甲烷氧化菌,以及 Wolf 和 Hanson 等^[3,4]所描述的五株能利用甲烷作能源的酵母中,只有 Whittenbury 等^[5]分离的两株 *Methylosinus* 有形成抗逆性外生孢子的能力。所有上述能产生孢子的细菌都不能由无菌丝的营养细胞直接转变为含有大量孢子的孢囊进行繁殖。我们在甲烷氧化菌的分离、纯化及其生理生化的研究中,从沙石样品中分离并描述了两株以多孢子进行繁殖的细菌 (T 35-2 与 T35-4)。本文主要描述菌株 T35-2 的基本特征,并将其命名分类,有关菌株 T35-4 以及这属微生物的其它详细描述待以后报道。

实验方法

(一) 培养基

1. 无碳无机盐培养基 No.9 其成分(克/升): NaNO_3 , 2.0, (或 NH_4Cl 1.0), NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 与 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 各 0.5, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.025, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.004, $\text{FeSO}_4 \cdot$

$7\text{H}_2\text{O}$ 0.014, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0034, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0003, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0024, 蒸馏水 1000 毫升, pH6.8—7.0。

2. 固体培养基加水洗琼脂 20 克,必要时加酵母膏 0.3 克/升。作无氮培养基时不加硝酸盐、铵盐与酵母膏。

(二) 培养方法

挑取样品约 5 克,置灭菌的 50 毫升有盖的小杯中,内装 20 毫升液体培养基,放入真空干燥器中,抽出 50% 的空气,再补充 50% 的甲烷,在 40℃ 下培养 20 天后,挑取一小片菌膜反复进行划线纯化,其余操作详见参考文献 [6]。

(三) 细胞超薄切片技术

收集纯培养菌体,投入 2% 的琼脂中,凝固后切成小块,立即投入 3% 的戊二醛中固定 3 小时,用 pH7.0、0.1M 的磷酸缓冲液洗 3 次,用梯度乙醇脱水,置无水丙酮中过夜。离心,移入 1:1 的丙酮树脂混合剂中过 2 小时,移入纯树脂中过夜。用国产 618 树脂包埋装囊,68—75℃ 固化,用 LKB8800 型切片机切片,经 2% 的醋酸氧钨和柠檬酸铅双重染色各 20—25 分钟。用日立 H500 透射电镜观察。

实验与描述

一、菌落形态

在有氮琼脂培养基上菌落黄色、黄褐

本文于 1980 年 7 月 15 日收到。

电镜切片、照片由我所技术室协助完成。

色或褐色,色素往往呈斑点状分布,菌落低凸、边缘呈缺刻状(图版 I-1)。由于营养面积的影响,菌落大小不一,密集的菌落呈点状突起,其大小只有 0.1 毫米左右,稀疏的单菌落富蔓延性,可大至 15 毫米。生长旺盛时表面有深刻的皱纹(图版 I-2)或漩涡状纹(图版 I-3)。菌落表面有一层张力很强的薄膜,生长后期形成栅状皱纹(图版 I-4)。在无氮琼脂培养基上菌落无色半透明或略呈淡黄色与浅褐色,质地稍粘。在液体振荡培养时菌液由褐色转变为黄色,菌体可自然沉降。

二、细胞特征

细胞为杆状(图版 I-5),多为双连,有时成短链,双连细胞往往由细线相连,大小为 $1.5-3.0 \times 2.0-5.0$ 微米。幼龄细胞以单极毛运动,随着菌龄增长,细胞由杆状变为球状,最终形成有折光的静息胞囊(图版 I-6)。在无氮基质中的细胞周围往往有大量荚膜状物质(图版 I-7)。细胞转变为胞囊后由于膨大、伸长而变为多形态(图版 I-8)。

用透射电镜观察过八十多个营养细胞的超薄切片标本,内部结构十分清晰,没有任何真核的痕迹,整个细胞内部布满了丰满致密的 I 型细胞质内膜结构(图版 I-9—12),它是甲烷氧化菌细胞内部的特殊结构。有关这一类膜系构造 Davies 和 Whittenbury^[7]曾作过详细的描述。此外,幼龄细胞中还有丰富的液泡。

菌株好氧,培养温度为 $40^{\circ}\text{C}(\pm 2^{\circ}\text{C})$, pH 值为 6.8—7.0,革兰氏染色阴性。DNA 中的 G + C 克分子比为 57.47% (T_m 值法)。利用甲烷作为唯一碳源与能源,不利用营养琼脂、甲醇、木糖、葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖。能利用硝酸盐、铵盐与空气中的自由氮分子(N₂)作为氮源生长。

三、孢囊与孢子

孢囊是营养细胞由于内部产生孢子而形成的,孢囊壁就是原来的细胞壁,没有任何其它特殊结构。孢子形成时,营养细胞内有时可见 1—2 个圆形颗粒(图版 II-1),当它进一步分化成长时,整个细胞布满了许多形状不规则的球状体(图版 II-2),营养细胞随着这些球状体的成长变形而成为包含有许多孢子的孢囊。在高倍电镜下观察未成熟的孢子时,清楚地显示出它们是由在同一条膜管中分节膨大而形成的,其形状和大小不一,有的状如头盔(图版 II-3)。形成孢子以后,营养细胞内原有的复杂的 I 型细胞质内膜结构已完全消失。看来,复杂的细胞质内膜系统与形成孢子可能有密切的关系。

孢子成熟后孢囊自溶,释放出来的孢囊孢子呈圆球形,它被一层皱褶的外膜包裹着,表面上没有任何棘一类的定形结构(图版 II-4)。在水分充足的条件下,孢子离开孢囊四散(图版 II-5)。散开的孢子用苯胺结晶紫染色时不着色,呈现出透明的小圆点(图版 II-6)。有些孢囊孢子脱离外膜而成为具有极生单鞭毛的游动孢子(图版 II-7)。在水分不足的条件,孢囊孢子并不散开而在孢囊原来的位置上成长,形成“巨大的”多细胞集团(图版 II-8、9)。

四、生活史

从连续观察与在不同生长条件和不同生长时期的形态观测与描述来看,菌株 T35-2 的生活史如图 1 所示。在有氮基质中振荡培养时以分裂繁殖,接种的细胞(1)以分裂增殖(2),细胞停止分裂后,个体缩小(3),形状变圆,在基质中形成大量粘性物质(4),最终成为有折光的静息细胞(5)。在无氮固体基质中培养时,细胞停止分裂后

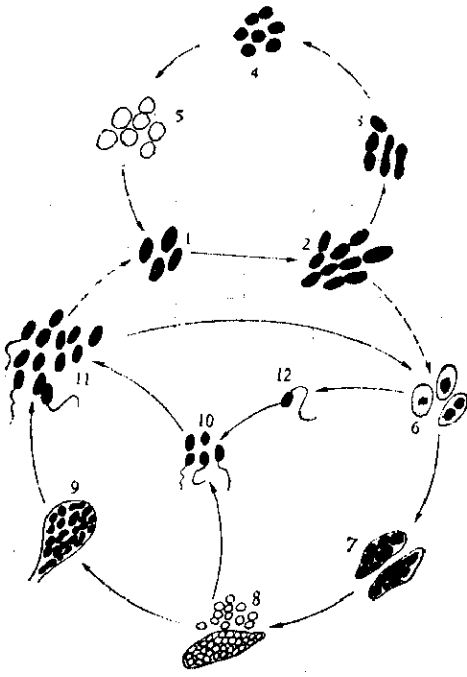


图1 *Polysporobacterium arenarium* 的生活史

进入多孢子繁殖阶段, 营养细胞内部首先出现 1—2 个球状颗粒(6), 颗粒分化、成长壮大, 营养细胞膨大变形成为孢囊, 其中包含许多形状不规则的球状体(未成熟的孢子)(7), 孢子成熟后孢囊自溶释放出孢囊孢子(8)。在水分不足条件下, 孢子并不散开, 而是在孢囊原有的位置上成长为“巨大的”多细胞集团(9), 在水分充足的条件下, 孢子脱离外膜而成为具有极生单鞭毛的卵圆形游动孢子(10), 无论是游动孢子或孢囊孢子都可以成长成为与母细胞相同的营养细胞(11)。必须指出的是, 有些细胞只形成包含 1—2 个孢子的“孢囊”(12), 这种细胞不膨大、不变形, 但它与多孢子孢囊一样自溶释放出 1—2 个孢子。此外, 这种微生物在一定条件下可产生气生多孢子与“异形胞”, 有关它们的形成与特征尚待进一步研究。

五、命名与分类

由于新发现的这群微生物细胞内无真核, 并在一定条件下能以二分分裂繁殖, 理应属于细菌, 但是, 没有任何已知的细菌能由无菌丝的营养细胞直接转变为孢囊产生大量孢子进行繁殖。根据这一差别, 暂时先建立一个新的、独立的属: 多孢子菌属 *Polysporobacterium*, 它在分类学上的位置有待进一步讨论确定。

多孢子菌属 新属

Polysporobacterium

Poly 含义为多数, sporo 含义为孢子, bacter 含义为杆菌。 *Polysporobacterium* 新属属名, 含义为用多孢子繁殖的细菌。

细胞杆状, 大小为 $1.5-3.0 \times 2.0-5.0$ 微米, 随着菌龄增长, 细胞由杆状变为球形, 最终成为有折光的静息孢囊 (resting cyst)。革兰氏染色阴性, 幼龄细胞以单极毛运动。菌落褐色、黄褐色、黄色或无色。能够由无菌丝的营养细胞直接转变为孢囊, 产生大量孢囊孢子与游动孢子进行繁殖。利用甲烷作为唯一碳源与能源, 不利用营养琼脂等综合营养, 能利用 NO_3^- 、 NH_4^+ 与 N_2 作为氮源生长。好氧。模式种的 DNA 中 G + C 克分子比为 57.47% (Tm)。

模式种: 沙石多孢子菌。

沙石多孢子菌 新种

Polysporobacterium arenarium sp. nov.

arenarium 拉丁文, 含义为“与沙石有关的”。

在有氮基质中振荡培养时, 细胞以分裂繁殖。单细胞、多双连, 有时成短链, 大小为 $1.5-3.0 \times 2.0-5.0$ 微米。细胞停止分裂后缩短、变圆, 在基质中形成大量粘性

物质,细胞最终成为有折光的静息胞囊。革兰氏染色阴性,幼龄细胞以单极毛运动。细胞内具有丰满致密的 I 型细胞质内膜结构。DNA 中的 G+C 克分子比为 57.47% (Tm)。在有氮琼脂上菌落为褐色、黄褐色或黄色。旺盛生长的菌落表面有深刻的皱纹或漩涡状纹理,后期出现栅状皱纹,色素呈斑点状分布。在无氮琼脂上菌落为无色半透明或略呈浅褐色。

在没有氮化合物的固体基质上或适宜条件下,细胞停止分裂后进入多孢子繁殖阶段,由无菌丝的营养细胞直接转变为孢囊产生大量孢囊孢子与游动孢子进行繁殖,两种孢子都能成长与母细胞相似的营养细胞。

以甲烷作为唯一碳源与能源。能利用 NO_3^- 、 NH_4^+ 与 N_2 作为氮源生长。不利用营养琼脂、甲醇、木糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖等供试物质生长。好氧,培养温度为 40°C 、 $\text{pH}6.8-7.0$ 。

讨 论

在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第 8 版^[8]收集整理的种种细菌中与甲烷多孢子菌有类似特征的微生物有甲基单胞菌科(Methylomonadaceae)、粘细菌目(Myxobacterales)与放线菌目(Actinomycetales),它们之间的异同见下表。从表列特征来看,放线菌虽然以孢子繁殖,但它是革兰氏阳性、有菌丝;粘细菌虽然是革兰氏阴性能以孢子繁殖,但它是滑行而不以鞭毛运动、由子实体产生粘孢子;比较相近的是甲基单胞菌科的甲烷氧化菌,但是已报道的二十多株甲烷氧化菌中,没有任何一株菌能用多孢子繁殖。由此不难看出,以无菌丝的营养细胞直接转变为孢囊产生大量孢子进行繁殖的多孢子菌不同于已知的任何一种细菌,因此,多孢子菌不属于细菌分类学中已定名

表 1 多孢子菌的主要特征与其它几种微生物的比较

特 征 微生物	多孢子 繁殖	有菌丝	革兰氏 染色	鞭毛 运动	利用 甲烷
<i>Polysporobacterium</i>	+	-	-	+	+
Methylomonadaceae	-	-	-	+	+
Myxobacterales	+	-	-	-	-
Actinomycetales	+	+	+	+	-

注:“+”表示有或正结果;“-”表示无或负结果。

的任何“科”或“目”。有关这一属细菌在分类学中的位置待以后讨论确定。

值得指出的是已报道的甲基单胞菌科中的细菌是否具有以多孢子繁殖的能力?我们观察过(将在另文报道)煤生甲基单胞菌(*Methylomonas carbonis*),有时也偶尔见到能形成 1—2 个孢子的细胞,但未发现包含有多孢子的孢囊。这可能是由于它根本不具有形成多孢子的能力,或者在其进化过程中失掉了这种能力,也有可能是由于我们还没有掌握它形成孢子所需的必要条件,这是一个值得研究的问题。

参 考 文 献

- [1] Leadbetter, E. R.: Methylomonadaceae, In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", (ed. by R. E. Buchanan, and N. E. Gibbons), 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974, pp. 267—269.
- [2] Малашенко, Ю. П. и др.: Метанокисляющие Микроорганизмы, стр., 145—156, Изд. 'НАУК' Москва, 1978.
- [3] Wolf, H. J. and R. S. Hanson: *J. Gen. Microbiol.*, 114: 187—194, 1979.
- [4] Wolf, H. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 141(3): 1340—1349, 1980.
- [5] Whittenbury, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 61: 205—218, 1970.
- [6] 陈子英、曹家鳌等: 微生物学通报, 8(1), 1981.
- [7] Davies, S. L. and R. Whittenbury: *J. Gen. Microbiol.*, 61: 227—232, 1970.
- [8] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.

POLYSPOROBACTERIUM — A UNIQUE GENUS OF BACTERIA

Chen Zi-ying Liang Jia-yuan Zhang Feng-ying
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A new genus of bacteria with unique properties is reported. The most remarkable feature of this new microorganism is its mode of reproduction. In addition to binary fission, the vegetable cells have been found also to produce directly a large number of sporangiospores. These sporangiospores may, under appropriate cultural conditions, turn into zoospores. This new bacterium utilizes methane as its sole carbon and energy source. It is, therefore, entirely different from any other group of bacteria so far known. It is considered that it belongs to a new genus and the generic name *Polysporobacterium* is proposed. The type species is *Polysporobacterium arenarium*.

Polysporobacterium gen. nov.

Cells are rods, occurring single, in pairs and sometimes in short chains. Gram negative. Young cells motile with polar monotrichous flagellum. In old culture cells occurred spherical. Cells possessed a complex internal membrane system of type I. Colonies brown, brownish-yellow, yellow or colorless. The most remarkable feature of this microorganism is its mode of reproduction. In addition to binary fission, the vegetable cells have been found also to produce directly a large number of sporangiospores. Methane is used as sole carbon and energy source. No growth occurs on nutrient agar. Nitrate, ammonium ion and molecular nitrogen can be used as sources of nitrogen. The G +

C content of DNA of type species is 57.5 moles % (Tm). Aerobic.

The type species is *Polysporobacterium arenarium*.

Polysporobacterium arenarium

sp. nov.

In shake-culture with mineral salts containing combined nitrogen, cells reproduced with binary fission, occurring single, in pairs and sometimes in short chains (Pl. I, fig. 5). They are about 1.5—3.0 × 2.0—5.0 μm in size. Gram negative. Young cells motile with monotrichous flagellum. In old culture cells are short, spherical and, eventually, become resting cysts embedded in extracellular slime (Pl. I, fig. 6). The microorganism possessed a well-defined membrane system of type I (Pl. I, fig. 9—12). The G + C content of DNA is 57.5 moles % (Tm).

Colonies brown, brownish-yellow or yellow in color. The well-developed colonies have deep wrinkled or vortical wrinkled surface and palisade-shaped at old stage (Pl. I, fig. 1—4). The color of colonies appears as spots. In agar medium without combined nitrogen colonies are colorless or slightly brownish-yellow. Cells are capsulated (Pl. I, fig. 7).

On medium without combined nitrogen or with suitable conditions, the vegetable cells transform into sporangia after certain and form a large number of sporangiospores (Pl. II, fig. 1—3). The sporangiospores has wrinkled thin mem-

brane (Pl. II, fig. 4). When free water is present, these sporangiospores lose thin membrane and become zoospores spreading to all directions (Pl.-II, fig. 5—7). In the absence of water, sporangiospores are non motile and occur as a "great" mass of cells in the place of sporangium (Pl. II, fig. 8—9). Both sporangiospores and zoospores can develop into vegetable cells

as mother-cells.

The organism utilizes methane as sole source of carbon and energy. No growth occurs on nutrient agar, methanol, xylose, fructose, glucose, sucrose, galactose. It grows well on media with NO_3^- , NH_4^+ and N_2 as sources of nitrogen. It is aerobic and grows at 40°C and pH 6.8—7.0. It was isolated from sample of sand and grit.

更 正

本刊 20 卷第 3 期第 246 页作者谈家林应为淡家林。