

纤维单胞菌属的一个新种

凌代文

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自北京郊区农田土壤中, 分离得到一株革兰氏阳性分解纤维素的细菌。它具有纤维单胞菌属的特征, 而又不同于该属的其他种。其细胞壁含有丙氨酸、甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸, 特别是含有半乳糖; 不需要外源生物素和硫胺素; 不利用无机氮作为唯一氮源; 不能利用乙酸盐作为唯一碳源; 可从甘油、阿拉伯糖、木糖和麦芽糖产酸; DNA 的 G + C 含量为 71.7 克分子 % (Tm)。经鉴定为纤维单胞菌属中的一个新种, 命名为异样纤维单胞菌 (*Cellulomonas varians* nov. sp.)。

关于革兰氏阳性分解纤维素的兼性厌氧细菌早已有报道^[1], 并归入纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*)。在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第七版^[2]中, 虽已记载有 10 个种, 然而对各个种的特征描述却较少。近十年来, Keddie^[3] 和 Owens^[4] 等对这属菌进一步的研究证明, 有 6 个种在胞壁组分、营养需求及碳源利用等方面有相似性。这 6 个种是产黄纤维单胞菌 (*C. flavigena*)、亚白纤维单胞菌 (*C. subalbus*)、凝胶纤维单胞菌 (*C. gelida*)、双氮纤维单胞菌 (*C. biazotea*)、纤维化纤维单胞菌 (*C. cellasea*) 和潮湿纤维单胞菌 (*C. uda*)。在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版中将它们归并, 且仅列了一个种——产黄纤维单胞菌 (*Cellulomonas flavigena*)。最近 Stackebrandt 等^[5] 又报道了一个种——凯氏纤维单胞菌 (*Cellulomonas cartae*)。该种具有 DNA 的 G + C 含量高 (76.6 克分子 %) 的特征。本文报道的革兰氏阳性分解纤维素的兼性厌氧细菌 L₄₂₅ (AS 1.1487) 经试验研究其特性与以往报道的种不同, 可作为一个新种。

材 料 和 方 法

(一) 菌株的来源和分离

L₄₂₅ (AS 1.1487) 菌株分离自北京西郊农田

土壤。分离培养基成分 (%): 葡萄糖 0.1, 蛋白胨 0.1, KNO₃ 0.05, K₂HPO₄ 0.1, CaCl₂ 0.01, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, NaCl 0.01, FeCl₃ · 6H₂O 0.001。以上成分配成 1000ml 基础培养基, 从中取 750ml 再加入 250ml 土壤浸出液, 作成琼脂平板。分离纯化后的菌种移至普通牛肉汁酵母膏斜面上, 于 30℃ 培养 24 小时后备用。另接种斜面制备成冷冻干燥管保存。

(二) 鉴定方法

形态观察和生理生化特性的测定按《一般细菌常用鉴定方法》^[7] 进行。水解纤维素的试验采用滤纸条法。

细胞壁的制备和胞壁物质的水解方法主要参照 Cummins^[8,9] 所述。不过本试验是用超声波破壁, 其中糖的组分分析是根据 Keddie^[3] 采用的方法。氨基酸组分的分析是使用纤维素粉板薄层法, 溶剂系统采用叔丁醇: 丁酮: 氨水: 水 = 5:3:1:1 (V/V) (第一相); 异丙醇: 甲酸: 水 = 20:1:5 (V/V) (第二相)。二氨基庚二酸异构体的分析是用 Becker 等^[10] 的方法。

营养试验参照 Owens 和 Keddie^[4,11] 的方法。基础培养基采用无机盐培养基 E 的成份^[4]。维生素混合液的成分与 Owens 和 Keddie 所列相同。测单一维生素的需求是用维生素混合液减法。在基础培养基中加入无维生素酪素水解物

本文于 1980 年 8 月 22 日收到。

本文承王大帮先生阅审, 本所技术室电镜组摄制电镜照片, 特此致谢。

来测定对氨基酸类的需要。并采用了 Lochhead 和 Burton^[12] 的营养测定法及陈琦等采用的生长图形法,与上述方法测定结果进行比较。碳源利用试验按《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版^[5]所述的方法。以上试验使用的试管和吸管等均用洗液和蒸馏水洗涤过。接种物系将 30℃ 下生长 24 小时的斜面菌种用生理盐水制成菌悬液,离心洗涤三次。其浓度用分光光度计在 570nm 波长下测定光密度为 0.3—0.4。接种一环置于测定的培养液中(生长图形法除外)。30℃ 下培养 2 天和 5 天后再测定其光密度,与对照比较分等级记录。

DNA 的 G + C 含量测定按 Marmur 等^[14,15]及林万明等^[16]报道的方法。

结果和讨论

(一) 形态特征

个体形态:革兰氏染色阳性,但常有变化。其个体形态也因生长的培养基和时间不同而有差异。在普通牛肉汁酵母膏斜面上培养 6 小时大多呈杆状,亦有棒、槌和楔形,还有孢囊萌发状的菌体,单生或成对。12 小时大多呈杆状,短杆和楔形,也有呈“八”字排列者。24 小时为短杆(大小为 $0.5-0.7 \times 0.8-1.0 \mu\text{m}$),类球形和球形(直径为 $0.5-0.7 \mu\text{m}$)。直至第 3 天和第 7 天的形态与 24 小时的基本相同,只是表现出类球形和球形菌体的比例有增多的趋势。如果在营养丰富的培养基*上生长,其个体形态于 24 小时、3 天,甚至于 7 天仍类似上述普通牛肉汁 6—12 小时的形态,但其中孢囊形的菌体比例增多[图版 I-1a—1e、2a—2e]。鞭毛 1 根,极生或次极生[图版 I-3]。无内生芽孢。不抗酸。

普通牛肉汁酵母膏斜面:丝状,生长量少,光滑。颜色有变化,从乳白、豆汁黄变为油菜花黄。

普通牛肉汁酵母膏平板菌落:培养 2 天后为针尖型,到第 4 天直径达 0.5—0.7mm,一周后可达 1mm。不透明。颜色

变化同上。

(二) 生理生化性状

氧化酶阴性。

接触酶阳性。

分解纤维素。

甲基红试验阳性。

V. P. 反应阴性。

不产生吲哚。

不还原硝酸盐。

不产生 H_2S 。

脲酶阴性。

石蕊牛奶基本上无变化,只是在延长培养时略显酸性。

在 10% 脱脂牛奶琼脂平板上未见水解酪朊。

不液化明胶。

水解淀粉。

好氧和厌氧条件下均能从葡萄糖产酸。从甘油、果糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、糊精产酸;不从半乳糖、山梨糖、鼠李糖、菊糖、甘露醇和卫矛醇产酸。一般不从乳糖产酸,但有时延长培养时间亦可略产酸。

在 2.5% 和 5% NaCl 中生长,而在 7.5% 和 10% NaCl 中不生长。

在 pH4.5—10.0 范围内 pH 值每隔 0.5 配制成的肉汁脲培养液中培养,在 pH6.5—9.0 能生长。

在 10℃ 和 37℃ 不生长。于 63℃ 处理 30 分钟不能存活。

对碳源的利用:可利用葡萄糖,而不利用乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐。不利用或微弱地利用核糖和乙醇。

不利用柠檬酸盐。

* 丰富培养基成分(g):蛋白胨(上海生物制药厂出品) 20,牛肉膏 5,酵母膏 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,麦芽汁 200ml,甘油 2,吐温 80 0.05,琼脂 20,加自来水至 1000ml, pH7.2。

营养需要: 使用 Owens 和 Keddie^[4] 的基础培养基, 以其中的无机氮作氮源未见生长。在其中如仅加入维生素类(包括生物素和硫胺素), 而不加无维生素酪素水解物, 接种洗涤后的菌悬液也未见生长, 即使生长也极其微弱。如加入无维生素酪素水解物而不加维生素类, 培养物生长良好。在补加有无维生素的酪素水解物的基础培养基中, 如另外加入全维生素混合液或含有生物素或硫胺素而缺乏其他任何一种维生素的维生素混合液, 与其中加入不含有生物素或硫胺素的混合维生素的培养液的生长物比较, 培养 48 小时后有时表现出后者生长较差, 但是到 72 小时后这种差异即不显示。此结果与 Lochhead^[12] 和陈琦等^[13] 使用的营养测定的方法进行比较, 也表明在培养液含有无维生素酪素水解物时生长良好, 在其中加入生物素和硫胺素与否对该菌生长影响不大。

以上结果表明 *L*₄₂₅ 不能利用无机氮作为唯一氮源, 而需要有机氮——无维生素酪素水解物。不需要外源供应维生素类包括生物素和硫胺素。生物素和硫胺素对它既使有点作用, 也只不过略起一点刺激生长的作用, 而不是生长必需因素。

(三) 细胞壁的组分

不含有 DL-DAP (DL-二氨基庚二酸) 和阿拉伯糖, 而含有丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸和赖氨酸, 还有半乳糖。有时还可检出微量的葡萄糖。

(四) DNA 的 G+C 含量

DNA 的 G+C 含量为 71.7 克分子 % (Tm 法)。

*L*₄₂₅ 具有上列特性, 与产黄纤维单胞菌 (*Cellulomonas flavigena*) 比较有明显的差异。它们主要的差别见表 1。

由于 *L*₄₂₅ 不利用无机氮作为唯一氮源, 需要有机氮——无维生素酪素水解物

表 1 产黄纤维单胞菌和 *L*₄₂₅ 菌株的主要差别

Table 1 The Main Difference Between *C. flavigena* and *L*₄₂₅

特征 Character	产黄纤维单胞菌 <i>C. flavigena</i>	<i>L</i> ₄₂₅
需要生物素和硫胺素 Biotin and thiamine required	+	-
利用无机氮作为唯一氮源 Inorganic nitrogen utilized as sole nitrogen source	+	-
细胞壁组分: Cell wall composition:		
丙氨酸 Alanine	+	+
谷氨酸 Glutamic acid	+	+
赖氨酸 Lysine	+	+
精氨酸 Aspartic acid	·	-
甘氨酸 Glycine	·	+
半乳糖 Galactose	-	+
碳源的利用: Utilization of carbon source:		
核糖 Ribose	-	W
乙醇 Ethanol	-	W
乙酸盐 Acetate	+	-
从碳水化合物产酸: Acid from carbohydrates:		
甘油 Glyceriol	- ^[17]	+
阿拉伯糖 Arabinose	-	+
木糖 Xylose	-	+
麦芽糖 Maltose	-	+

+ 主要成分; · 未检出或仅检出微量; - 未检出; W 微弱阳性。

+ present as a major component; · absent or only small amounts detected; - absent; W weak positive.

氨基酸类物质, 而不需要外源生物素和硫胺素; 细胞壁组分中含有半乳糖; 不利用乙酸盐, 微弱利用核糖和乙醇; 从甘油、阿拉伯糖、木糖和麦芽糖产酸; 与产黄纤维单胞菌比较有明显的差别。和最近 Stackebrandt 等^[6] 报道的凯氏纤维单胞菌 (*Cellulomonas cartae*) 相比, 其 DNA 的 G+C 含量也不一, 因而可定为新种, 命名为异样纤维单胞菌 (*Cellulomonas varians* nov. sp.)。菌株

L₄₂₅ 保存于中国科学院微生物研究所, 保存菌号 AS 1.1487。

参考文献

- [1] Clark, F. E.: *Int. Bull. Bact. Nomen. Taxon.*, 2(1): 45—56, 1952.
- [2] Breed, R. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., London, 1957.
- [3] Keddle, B. M. et al.: *J. Appl. Bact.*, 29(1): 17—43, 1966.
- [4] Owens, J. D. & R. M. Keddle: *J. Appl. Bact.*, 32: 338—347, 1969.
- [5] Buchanan, B. E. & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., pp. 620, 629—631, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [6] Stackebrandt, E. & O. Kandler: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30(1): 186—188, 1980.
- [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.
- [8] Cummins, C. S. & H. Harris: *J. Gen. Microb.*, 14: 583—600, 1956b.
- [9] Cummins, C. S.: *J. Gen. Microb.*, 28(1): 35—50, 1962.
- [10] Becker, B. et al.: *Appl. Microb.*, 12: 421—423, 1964.
- [11] Owens, J. D. & R. M. Keddle: *J. Appl. Bact.*, 31: 344—348, 1968.
- [12] Lochhead, A. G. & M. O. Burton: *Canadian J. Microb.*, 3: 35—42, 1957.
- [13] 陈琦等: 微生物学报, 16(1): 37—40, 1976.
- [14] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [15] Marmur, J. & P. Doty: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962.
- [16] 林万明等: 微生物学通报, 8(5): 245—247, 1981.
- [17] Kanfmann, A. & J. Fegun: *J. Gen. Microb.*, 94(2): 403—408, 1976.

A NEW SPECIES OF *CELLULOMONAS*

Ling Daiwen

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

A Gram positive cellulolytic bacterium was isolated from the soil of farmland in the suburbs of Beijing. It is identified as a new species of *Cellulomonas*, and designated as *Cellulomonas varians*. It has the characteristics of *Cellulomonas*, but it is different from the other species of the genus recognized at present. The main distinctive characters are as follows: The cell wall contains alanine, glutamic

acid, lysine, and glycine, particularly galactose. Biotin and thiamine are not required as the only exogenous organic growth factors. Inorganic nitrogen is not utilized as sole nitrogen source. Acetate can not be utilized as carbon source. Acid is produced from glycerol, arabinose, xylose and maltose. The G + C content of the DNA is 71.7 mol% (Tm).