

多孢子菌的一个新种

陈子英 梁家骥 张凤英

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道多孢子菌属 (*Polysporobacterium*) 的一个新种。它具有属的基本特征, 能够由营养细胞转变为孢囊产生大量孢子进行繁殖。它与模式种砂石多孢子菌的主要区别是: 在菌落表面形成气生孢子穗, 产生大量气生孢子进行繁殖; 更容易形成内生孢囊; 营养细胞常在基质表面呈同心圆排列, 在旺盛生长后期容易伸长或膨大成异形细胞; 菌落呈较稳定的黄色。它被命名为色黄多孢子菌 (*Polysporobacterium chromoflavuni*)。

“孢子” (Spore) 一词在微生物学中有两种含义。在细菌学中(或者说对真细菌而言), 它指某种处于休眠状态, 具有某些抗逆性能的有机体。它能抗干旱、耐高温, 或在其它不利环境下存活, 如芽孢杆菌 (*Bacillus*) 的芽孢。这类孢子的形成不是繁殖过程, 因为一个营养细胞只形成一个孢子。另一方面, 对于真菌或放线菌而言, “孢子”一词却具有繁殖的意义。

我们在多孢子菌属的描述中采用“孢子”一词, 其含义是指后者。多孢子菌形成孢子不是休眠过程, 而是一种繁殖过程。因为一个营养细胞形成孢子以后产生两个以上乃至数十个孢子, 然后单独成长, 或形成新的营养细胞集团。自从我们报道砂石多孢子菌 (*Polysporobacterium arenarium*) 以来, 先后又分离到几株由营养细胞直接转变为孢囊产生大量孢子进行繁殖, 利用甲烷作为唯一碳源与能源生长的革兰氏阴性细菌, 它们在形态和生理上具有各自的特征。本文报道其中一个新种: 色黄多孢子菌。

方 法

培养基成分、培养方法与样品来源详见文献 [1]、[2]。现补充叙述纯种分离细节: 将第一次液体静止培养所得到的混合培养物移入新鲜液体

培养基中再静止培养, 如此反复 2—3 次。在此过程中, 那些利用样品中可溶性养分生长的杂菌大都可被淘汰掉, 剩下的是一些依靠甲烷氧化菌代谢物质生长的伴生菌, 这种杂菌往往是很不易排除的。将这种混合菌株放在充有甲烷的容器中, 在室内至少放置 6 个月以上, 使之适应室内的生态条件, 然后将培养物移接到 250 或 500ml 带棉花滤管的三角瓶中, 每瓶装 25 或 50ml 液体培养基。充入混合气体, 在摇床上振荡培养 7—8 天 (40℃)。当有利用甲烷的细菌生长时, 瓶内将出现 100—300mm 汞柱的负压, 约消耗 15—40% 甲烷-氧混合气体。然后用这种菌液在 9 号琼脂培养基上划线, 放置在充有甲烷的干燥器中培养两周。出现在皿上的菌落往往小而密集, 单菌落直径一般只有 0.1—1mm (图版 1-1), 而且大多数与杂菌菌落距离不超过 1—2mm, 杂菌通常是一种菌落边缘不清楚的生丝微菌或革兰氏阴性芽孢菌, 在 400 倍显微镜下观察, 它们与粗壮的甲烷氧化菌细胞有明显的区别。这样密集的菌落一般难以用接种针挑出, 只能借助于单细胞分离器将它们分开。将挑出的单菌落接种到装有 1—2ml 液体培养基中进行培养。这一操作过程往往要反复进行许多次才能得到纯菌株。甲烷氧化菌容易与伴生的单一杂菌相区别, 因为: 第一、利用甲烷; 第二、细胞与菌落的形态及其变化在生长和传代中完全一致; 第三、不利用营养琼脂或其它任何有机物质生长。

本文于 1982 年 12 月 2 日收到。

实验结果与描述

(一) 菌落形态

菌株 T_{35-4} 的菌落往往随菌龄增长与不同的培养条件而不断变化。在含硝酸钠的培养基上为黄色,有时底部略呈淡褐色,幼龄菌落多为圆形(图版 I-2)。在无氮基质上菌落无色半透明或略呈淡黄色,幼龄菌落为圆形(图版 I-3),质地较粘,老菌落内部呈现许多圆形或不完整的螺旋形黄色斑纹(图版 I-4),有时出现一些肠系膜似的突起物。单一菌落的大小一般只有 3—8mm,菌落在固体表面上不运动。

(二) 细胞

营养细胞为短杆状,大小为 $1.5-2.0 \times 2.0-5.0 \mu\text{m}$ 。液体振荡培养时,随着菌龄增长,细胞由杆状变为圆形。革兰氏染色阴性。幼龄细胞有单极毛(图版 I-5)。能运动,运动方式较多。条件适宜时,菌落边缘细胞能离群生长。营养细胞具有一般甲烷氧化菌所特有的 I 型细胞质内膜结构^[3](图版 I-6)。有些细胞在琼脂表面增殖时呈现一种颇为奇特的形式,它们排列成许多同心旋转的螺旋形图案,其大小一般为直径 $10-60 \mu\text{m}$,在第一层细胞中螺旋排列较少,在第二层细胞中较多而且大,在第三层以上的细胞中螺旋排列的数量虽多,但旋转的周次较少,这是由于许多细胞同时形成螺旋所致,有时螺旋中心上升凸起成为锥形。当小心除去琼脂表面的螺旋形细胞后,在琼脂表面上留下清晰的螺旋形图案(图版 I-7),这是粘液形成的痕迹。

值得指出的是异形细胞。在大量营养细胞中有时出现极少数球形、棱形、纺锤形或其它形状的异形细胞(图版 I-8)。异形细胞一般都静止不动,但当它旋转运动时,其速度是惊人的,每分钟可旋转 60—100 圈,并在旋转中位移。旋转不是匀速的,时

快时慢,这种异形细胞能出芽萌发,甚至伸长成带状(图版 I-9)。异形细胞出芽时自身缓慢旋转,一端相对固定不位移,出芽伸长的一端大幅度地作圆弧旋转并位移,每分钟转动 6—10 圈,芽管在旋转中缓慢伸长。

(三) 内生孢囊

菌株 T_{35-4} 在有氮或无氮培养基上,有些营养细胞转变为多孢子孢囊(内生孢囊),产生大量孢子进行繁殖。当营养细胞转变为孢囊时往往先出现 1—2 个(偶见 3—4 个)球状颗粒(图版 II-1),以后转变成一个复杂的孢囊,形成许多形状不规则、彼此相连的帽盔状突出物。看来它们是在同一条薄膜腔管中分别膨大而成。迂回曲折地盘绕成一团,在同一个孢囊内有一团或数团不等。看来孢子在孢囊内形成时并不是彼此孤立的,它们似乎在同一条链上成长。在水分充足的条件下,孢囊溶解释放出孢子(图版 II-2)。释放的孢子之间,往往有 1—2 个比孢子小得多,无一定形状的附属物存在(图版 II-3),但当孢子成熟时,彼此并不相连,形态一致,呈圆球状,其大小约为直径 $0.4 \mu\text{m}$ (图版 II-4)。有些被释放出来的孢子能游动,其中极少数孢子看来具有单鞭毛。实际上,孢囊在菌落内部并不溶解,孢子在孢囊内成长为营养细胞,形成一个“巨大的”多细胞集团(图版 II-5, 6)。当营养细胞转变为孢囊或多细胞集团时,细胞壁失去原有的坚韧性,随着孢子成长变为多细胞集团的外膜。因此,许多多细胞集团虽然个体比营养细胞大数十倍,但仍保持着细胞或孢囊的形状。

(四) 气生孢子穗

菌株 T_{35-4} 在形成内生孢囊并成长为多细胞集团的同时,在菌落边缘部分或在菌苔表面的粘液“外溢”处,能够观察到由内生孢囊或多细胞集团的一端向菌落表面

延伸生长的细胞,它在空气中或表面粘液中形成一束束的气生孢子穗(图版 III-1)。气生孢子穗与内生孢囊或其多细胞集团之间有一段长短与大小不一的半透明粘膜腔管,我们称之为“膜囊管”。膜囊管不是丝状体,它没有固定的形态,有的鼓胀如圆管,有的扁瘪如带,质地柔软,靠近孢子束的一段大都以近似九十度的弯曲向上竖立分枝而成气生孢子穗。分枝的数量与形式并不是固定的,有的并列分枝;有的上下错节分枝。一般说,凡是延伸较短的膜囊管,产生整齐的分枝(图版 III-2),凡是延伸较长的膜囊管分枝不整齐往往形成参差不齐的孢子穗。有些孢子穗没有膜囊管,直接着生在多细胞的一端,形成十分整齐的向上竖立的孢子穗。

分枝以后的膜囊小管有许多均匀分隔的小节(图版 III-3)。从外表看,小节是由横隔膜分割而成,节间大小约 2—3 μm ,由小节形成孢子。看来不是每个小节形成一个孢子,而是每隔一个小节形成一个孢子。两个孢子之间的一个节“萎缩”而成为一种比孢子小得多的“连接物”或附属物,使孢子成为一串松散的链。这种孢子的大小约 2—3 μm ,它很像一个个半透明的液泡。

气生孢子成熟时并不是脱落分散,而是在孢子穗上成长为多细胞集团(图版 III-4)。这种多细胞集团中的细胞清晰可辨(图版 III-5),特别是那些膜囊管,它们并没有消失,而是纽带一样保留着。值得指出的是,凡是膜囊管较短的气生孢子穗形成的多细胞集团,其中的细胞排列整齐(图版 III-6),其上的膜囊管像柄一样保留着。看来膜囊管随着气生孢子的成长而增大。那些直接着生在内生多细胞集团上的气生孢子穗没有任何膜囊管,多细胞集团中的细胞排列整齐。由气生孢子形成的多细胞集团其大小一般为 20—50 μm 。

气生孢子穗看来并不是由一个单细胞形成,它可能是由一短链细胞形成,短链的一端在菌落内形成内生孢囊,另一端伸出菌落表面形成气生孢子穗,而中间的细胞伸长膨大形成膜囊管。旺盛生长的细胞容易伸长膨大是菌株 T₃₅₋₄ 的重要特征之一。

气生孢子穗大都出现在无氮基质上,温度、pH 值与一般培养条件无异。密闭培养器中的相对湿度接近饱和(干温 40 $^{\circ}\text{C}$,湿温 39.5 $^{\circ}\text{C}$)。气生孢子穗出现时往往伴随着产生大量的鲜黄色粘液,有些气生孢子的大部分甚至“淹没”在粘液中。

新种的描述与分类

根据菌株 T₃₅₋₄ 的主要繁殖特征,它属于多孢子菌属,它与模式种的主要区别详见表 1。

色黄多孢子菌 新种

Polysporobacterium chromoflavum nov. sp.

细胞杆状, 1.5—2.0 \times 2.0—5.0 μm , 单细胞,多成双链,或成短链。细胞易伸长或膨大,通常由杆状变为球形,革兰氏阴性。营养细胞具有极生单鞭毛,内部有清晰的 I 型细胞质内膜结构。细胞作复杂运动:迅速旋转,前进或倒退,单细胞能在菌落边缘缓慢运动,菌落平滑而有光泽,呈稳定的黄色或褐黄色,在后期呈现出深黄色斑纹。它的营养细胞能够转变为产生大量孢子的孢囊,这种孢囊可以发育成一个“巨大的”包含许多新细胞的多细胞集团。成链的细胞或内生孢囊的末端伸长并伸出菌落表面形成一束由许多气生孢子组成的气生孢子穗。这种气生孢子穗转变成一个“巨大的”多细胞集团。它通常都保存一条像“柄”或“纽带”一样的膜囊管。这种有机

表 1 色黄多孢子菌与模式种的主要特征

Table 1 Characteristics of type species and *Polysporobacterium chromoflavum*

菌 株	砂石多孢子菌 (<i>Polysporobacterium arenarium</i>) T ₃₃₋₂	色黄多孢子菌 (<i>Polysporobacterium chromoflavum</i>) T ₃₃₋₄
含氮培养基上的菌落	褐色或黄色, 0.1—15mm, 多蔓延扩散, 形成次生菌落, 质地粘, 表面有一层张力较强薄膜	黄色与淡黄色, 不扩散, 3—8mm, 粘性较小
营养细胞	杆状, 老细胞为球形, 不形成孢囊时, 多老化成静息细胞	杆状, 旺盛生长时, 能伸长成带状或其它形状; 常在琼脂表面呈同心螺旋排列
内生孢囊	在无氮条件下形成	无氮或有氮条件下均能形成, 多膨大, 变形, 较易在水中溶解
气生孢囊	由运动到菌落表层单细胞形成, 竖立在菌落表面的空气中	未见。只有由内生孢囊一端延伸出的膜囊管形成气生孢子穗, 形成多细菌集团后, 仍与膜囊管相连
G + C(%)	57.5	53.6
来源	天然气井中的岩芯砂石	同左

体利用甲烷作为唯一碳源与能源, 能很好地利用化合氮与分子氮作为氮源, 不在营养琼脂上生长, 不利用甲醇、乙醇、甘露醇、木糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖、乳糖、山梨糖、柠檬酸盐、醋酸盐、甲酸盐、淀粉、纤维素以及混合液烃等供试物质生长。它是一种嗜热性细菌, 能在 30°—50°C 生长, 适温 40°C (±2°C), 低于 26°C、高于 55°C 不生长。好氧, 氧化酶、过氧化氢酶阳性。

DNA 中的 G + C 克分子比为 53.6% (Tm)。从天然气井中的砂石样品中分离。色黄多孢子菌模式株保存在本实验室。

参 考 文 献

- [1] 陈子英等: 微生物学报, 20(4): 339—344, 1980。
- [2] 陈子英等: 微生物学通报, 8(1): 7—9, 1981。
- [3] Davies, S. L. and R. Whittenbury: *J. Gen Microbiol.*, 61:227—232, 1970。

A NEW SPECIES OF POLYSPOROBACTERIUM

Chen Ziyang Liang Jiayuan Zhang Fengying

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A new species of *Polysporobacterium* was described. Besides properties of Genus, its colony was constantly yellow in colour. The endosporangia elongated out the end to the surface of the colony and formed aerial sporoclaster on it. Its cells easily elongated in pattern as concentric circles on the surface of the agar medium. The fine grown cells easily elongated and swelled to become heteromorphic cells. Owing to differ in many

respects from type species it was named *Polysporobacterium chromoflavum* nov. sp. ***Polysporobacterium chromoflavum*** nov. sp.

chrom: Gr. n., *chroma* colour; *flavum*: L. a., *flavum* yellow deep or slightly; *chromoflavum* yellow or brownish-yellow colored.

Cells rod-shaped, 1.5 to 2.0 by 2.0 to 5.0 micron, occurring single, often in pairs

or in short chains. As result of different conditions of cultivation and age of cultures the cells distorted easily. Gram-negative. The young cells possessed a well-defined membranous system of type I and single polar flagellum. Motile with different modes: rapid rotation, locomotion forward or bakward, and even gliding movement of single cells along the edge of the colony on the surface of the agar medium. The colour of colony was unvarying yellow but deepened with age and appeared pattern of spots in the old stage. On the medium with or without combined nitrogen the vegetative cells transformed into endosporangia producing a lot of spores, which were capable of growing up to form a "great" mass of new vegetative cells. The organism was found also to produce a large number spores on the aerial sporocluster ov-

er the colony. The aerisporocluster came from the end-cell of a short chain of endosporangia, between them existed a translucent thin film-tube. The aerisporocluster developed also into "great" mass of new vegetative cells and retained its film-tube as "band" or "handle" on the mass. The organism utilized methane as source of carbon and energy and combined or molecular nitrogen as source of nitrogen. No growth occurred on nutrient agar, and methanol, ethanol, mannitol, xylose, fructose, glucose, sucrose, galactose, lactose, sucrose, sorbose, citrate, acetate, formate, starch, cellulose tested materials were not utilized as carbon sources for growth. It was thermotolerant, growth occurred on 30—50°C. The G+C content of DNA was 53.6 moles% (Tm). It was isolated form a sample of sand-grit.

Table 1 Differences between type species and *P. chromoflavum*

	Type species (<i>P. arenarium</i> T ₃₅₋₂)	<i>P. chromoflavum</i> T ₃₃₋₄
Colony on the medium No. 9	Brown or yellowish-brown and yellow colour in resting stage, 0.1—15mm in size and easily spreading	Unvarying yellow colour and deep yellow spots within it in old stage, 3--8 mm in size and less spreading
Vegetative cells	Rod-shaped and easily formed resting cysts	Rod-shaped, easily elongated and arranged in pattern as a concentric circles on the solid medium
Endosporangia	Usually occurred on medium without combined nitrogen	Occurred on medium with combined nitrogen and without it, easily swelled and dissolved
Aerisporangia	Showed pear-shaped stood on the surface of colony. The mass formed from aerisporangia were wrapped a thin membrane	Did not find so far but another kind of aerisporangia, i. e. aerisporocluster, were occurred
G + C (moles%)	57.5	53.6
Isolated from	Sand-grit of natural gas well	