

## 鞘丝菌属的一个新种

李勤生 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

自固氮蓝藻藻种培养池的土壤中分离得到一株具有透明薄鞘、宽度均一、长度不等、可屈挠滑行运动的丝状菌。随菌龄增长或培养条件的改变, 丝状体内分隔形成单列杆状细胞链。此种杆状细胞可由鞘内滑出形成新的丝状体。产生内生芽孢。革兰氏染色阳性, 但不稳定。30—32℃ 生长良好, 45℃ 亦可生长, 并形成大量不规则卷曲的螺旋状丝状体。在含铁蛋白胨琼脂上出现膨大的葫芦状细胞。初次分离物对固氮蓝藻细胞有明显的溶解能力。经鉴定为鞘丝菌属 (*Coleomitus*) 的一个新种, 命名为直孢鞘丝菌 (*Coleomitus rectusporus* sp. nov.)。

关于具有外鞘或形成内生芽孢的丝状菌虽已有报道<sup>[1-7]</sup>, 但多无纯培养, 缺乏较详细的观察和描述, 因而难以确定分类位置。我们在固氮蓝藻与细菌之间关系的研究中, 分离得到一株对固氮蓝藻细胞表现了溶解能力的、具有薄鞘、并能形成内生芽孢的丝状菌 801312。现将其鉴定结果报告如下。

### 材料和方法

#### (一) 菌株来源及分离方法

从曾经出现过大量藻体溶解的藻种培养池的土壤中取样, 按常规方法稀释后, 在 0.05% 胰蛋白胨琼脂 [内含 (%): 乙酸钠 0.02、酵母浸膏 0.05、牛肉浸膏 0.02、纯化琼脂 1.0, pH 7.2] 平板上划线分离。

#### (二) 生物学特性观察

1. 观察培养特征用培养基: ① 0.5% 胰蛋白胨培养基: 除胰蛋白胨含量较分离用培养基高 10 倍外, 其余成份均同。② 肉汁胨培养基。③ 含铁蛋白胨培养基 (%): 蛋白胨 0.1、酵母浸膏 0.02、柠檬酸铁铵 0.05。④ 1.0% 胰蛋白胨水。

凡固体培养基均加入 1.0% 纯化琼脂。pH 7.2, 15 磅 20 分钟高压蒸汽灭菌。

2. 形态及染色性观察: 按《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[8]</sup>的方法进行。

3. 生理生化特性观察: 按《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[8]</sup>中的方法进行。

分解几丁质、细胞及鞘沉积铁的试验方法详见参考文献[5]。

铵盐及柠檬酸盐的利用: 采用 Koser 培养基。

明胶液化试验: 明胶用量为 12%。

酪素水解试验: 在 0.5% 胰蛋白胨琼脂培养基中加入脱脂新鲜牛奶, 最终浓度为 2.0%, 倾注平皿, 接种后观察水解亮斑。

产氨试验: 接种 1.0% 胰蛋白胨水, 分别培养 1、3、5 及 7 天后, 加入奈氏试剂, 观察有无黄红色沉淀。

不同 pH 条件下生长丰度的比较: 用 HCl 或 KOH 溶液将 1.0% 胰蛋白胨水的 pH 调节至 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 及 10.0。培养 6、12、24 及 48 小时, 分别测光密度 (波长 430nm)。

本文于 1981 年 6 月 2 日收到。

承王大粗、阮继生先生审阅本文, 并提出宝贵意见; 中国科学院武汉病毒研究所电镜组协助拍摄电镜照片; 林万明、郭兆彪同志协助测定 DNA 的 G+C 含量; 戴尚真同志绘图; 陶为民同志洗印光学显微镜照片, 特此致谢。

耐盐性试验: 在 1.0% 胰蛋白胍水 (pH7.0) 中加入不同量的 NaCl, 使 NaCl 的最终浓度 (%) 分别为 0.1、0.3、0.5、0.75、1.0、1.5、3.0、5.0 及 7.0。培养 6、12、24 及 48 小时, 测定光密度 (波长 430nm)。

DNA 中 G + C 克分子含量测定: 采用热变性温度法。

4. 溶藻能力的观察: 方法见参考文献[9]。

5. 药物敏感性试验: 采用纸片法。

## 结 果

### (一) 形态、培养特征及生活史

连续观察 801312 菌株在不同培养基上的形态, 发现在不同时期或不同培养条件下形态变化不同。在 1.0% 胰蛋白胍水中生长良好, 24 小时内丝状体大量形成并部分下沉管底, 沿管壁有时出现菌环。丝状体长短不等, 有的可达 160 $\mu$ m 以上, 宽度均一, 约 0.8—1.0 $\mu$ m, 外被薄鞘, 可屈挠、滑行运动, 类似蓝藻。生长丰富时, 常有多条丝状体相互缠绕形成索状 (图 1-1, 2)。随着菌龄增长, 丝状体内形成分隔, 内含物增多, 并出现大量折光强的粗大颗粒。在 30—32 $^{\circ}$ C 条件下, 在 0.5% 胰蛋白胍琼脂平板上形成不透明的乳白—灰白色菌落, 表面光滑湿润, 中央隆起呈半球面。48 小时菌落直径约 2—3mm。在肉汁胍琼脂平板上菌落灰白色, 扁平, 表面隐约有细放射状皱纹, 边缘不整齐, 略向外周呈不规则伸展。在上述两种固体培养基上, 24 小时内形成长杆状细胞链 (图 1-3)。单个杆状细胞约 0.8—1.0 $\times$ 4.0—6.0 $\mu$ m, 无鞭毛 (图 1-5)。随着菌龄的增长, 细胞内异染粒和聚  $\beta$ -羟基丁酸颗粒增加, 鞘内细胞缩短, 两端变圆, 约 1.0—1.2 $\times$ 3.0 $\mu$ m, 然后形成椭圆形芽孢, 直立。在一条长的杆状细胞链中, 芽孢可能在链的两端或在其间相邻或不相邻的细胞内形成; 也可观察到多个芽孢组

成的长链 (图 2-1)。芽孢成熟后可分散成单个, 约 1.0—1.2 $\times$ 2.0—2.5 $\mu$ m, 在适宜条件下再萌发成单个较粗短的细胞, 长成新的丝状体。由这些丝状体再分隔, 形成杆状细胞, 然后再发育成芽孢, 如此周而复始。在生长过程中, 还可观察到杆状细胞由鞘中脱出和遗留的空鞘 (图 1-4, 图 2-5)。有的丝状体末端可呈现弯钩状 (图 1-6)。在低水平有机氮培养基 (即含铁或不含铁的蛋白胍琼脂) 上也出现如上各种形态, 但形成内生芽孢的时间最短, 数量也最多。并可见到少量呈葫芦状膨大的细胞 (图 2-2、3)。在此种细胞中也可形成芽孢, 但芽孢的位置可略显偏斜或者横位 (图 2-4)。在肉汁胍琼脂斜面上培养, 45 $^{\circ}$ C 条件下形成大量卷曲的不规则的螺旋状丝状体 (图 2-6), 类似链霉菌的螺旋状气生菌丝。这种现象在含有 0.3%、0.5% NaCl 的胰蛋白胍水中, 30—32 $^{\circ}$ C 培养时亦可看到, 与无 NaCl 培养基中生长物比较, 认为这可能与 NaCl 存在有关。根据以上观察, 其形态特征及生活史如图 3 所示。

801312 菌株革兰氏染色阳性, 但不稳定, 常出现阴性细胞。抗酸性染色阴性。

### (二) 生理生化特性

1. 生长的温度范围及耐热性观察: 用上述几种培养基接种, 分别在 5—10 $^{\circ}$ C、30—32 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C 下培养, 结果表明在 5—10 $^{\circ}$ C 不生长; 30—32 $^{\circ}$ C 生长良好, 24 小时可形成丰厚菌苔; 45 $^{\circ}$ C 亦可生长, 在温度较高时生长更好。用无菌水洗下菌苔 (内有大量芽孢), 水浴中加热处理: 80 $^{\circ}$ C 5 分钟, 100 $^{\circ}$ C 2 分钟、10 分钟、30 分钟后, 再接种到 1.0% 胰蛋白胍斜面, 均可长成新的菌落, 只是随温度增高, 以及时间延长, 形成菌落的数量逐渐减少。

2. 在不同 pH 条件下生长速度的比较: pH 在 5.5—8.0 范围内可以生长, 最适

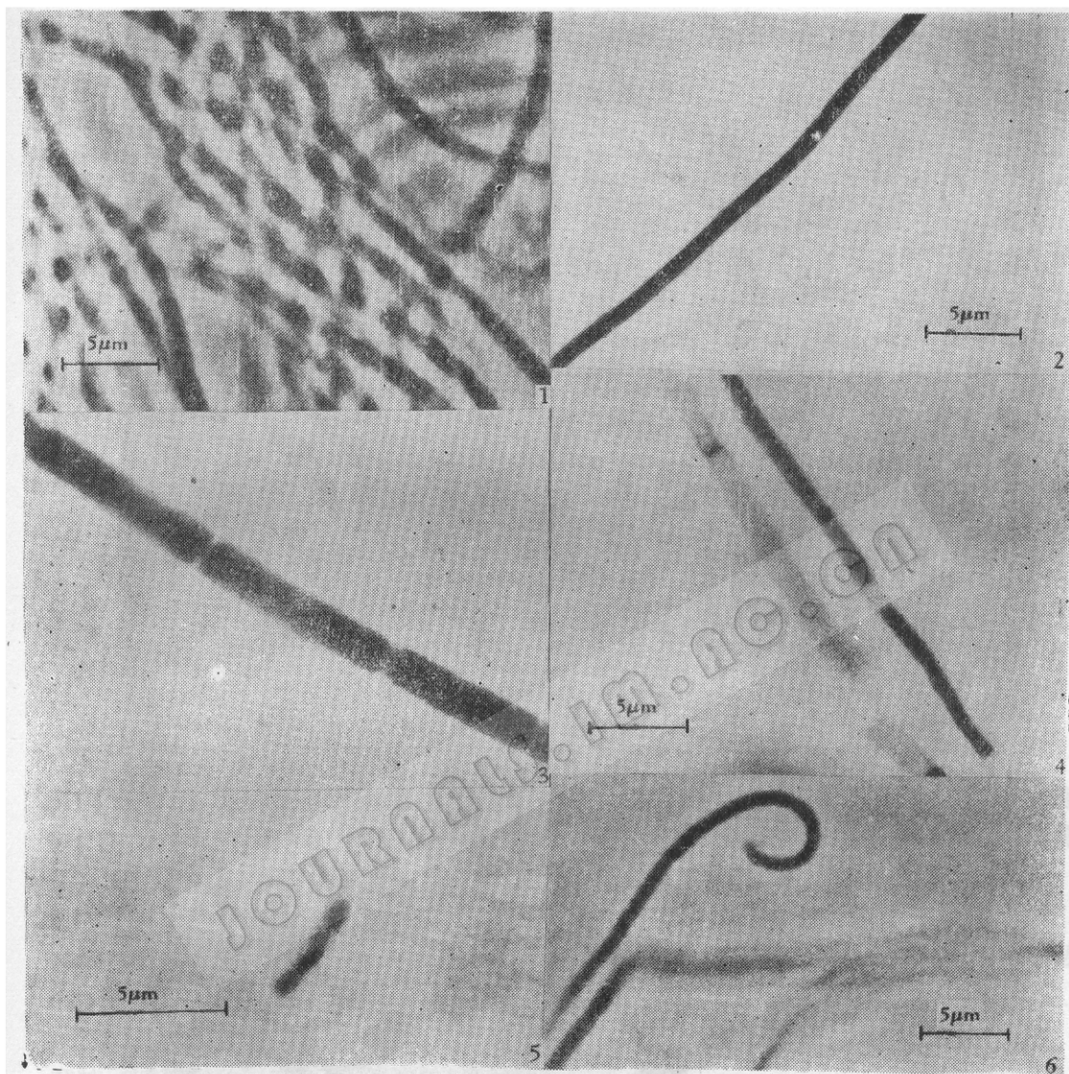


图1 1. 丝状体相互缠绕成索状(1.0%胰蛋白胨液体培养基,相差)。

2. 不分隔丝状体(美蓝染色)。

3. 丝状体分隔形成杆状细胞链(电镜照片,4,050×)。

4. 杆状细胞由鞘内滑出后的空鞘(美蓝染色)。

5. 单个杆状细胞(相差)。

6. 丝状体末端呈现的弯钩状(相差)。

Fig. 1 1. Filaments twisted together to form strands. (In 1.0% tryptone liquid medium, phase-contrast).

2. Filament without cross-septum. (Methylene blue stain).

3. Bacillary cell chain formed by cross septa in filament. (Electron micrograph).

4. Empty sheath, the rod-shaped cells having glided out. (Methylene blue stain).

5. Rod-shaped cell. (Phase-contrast).

6. The filament with a crook end. (Phase-contrast).

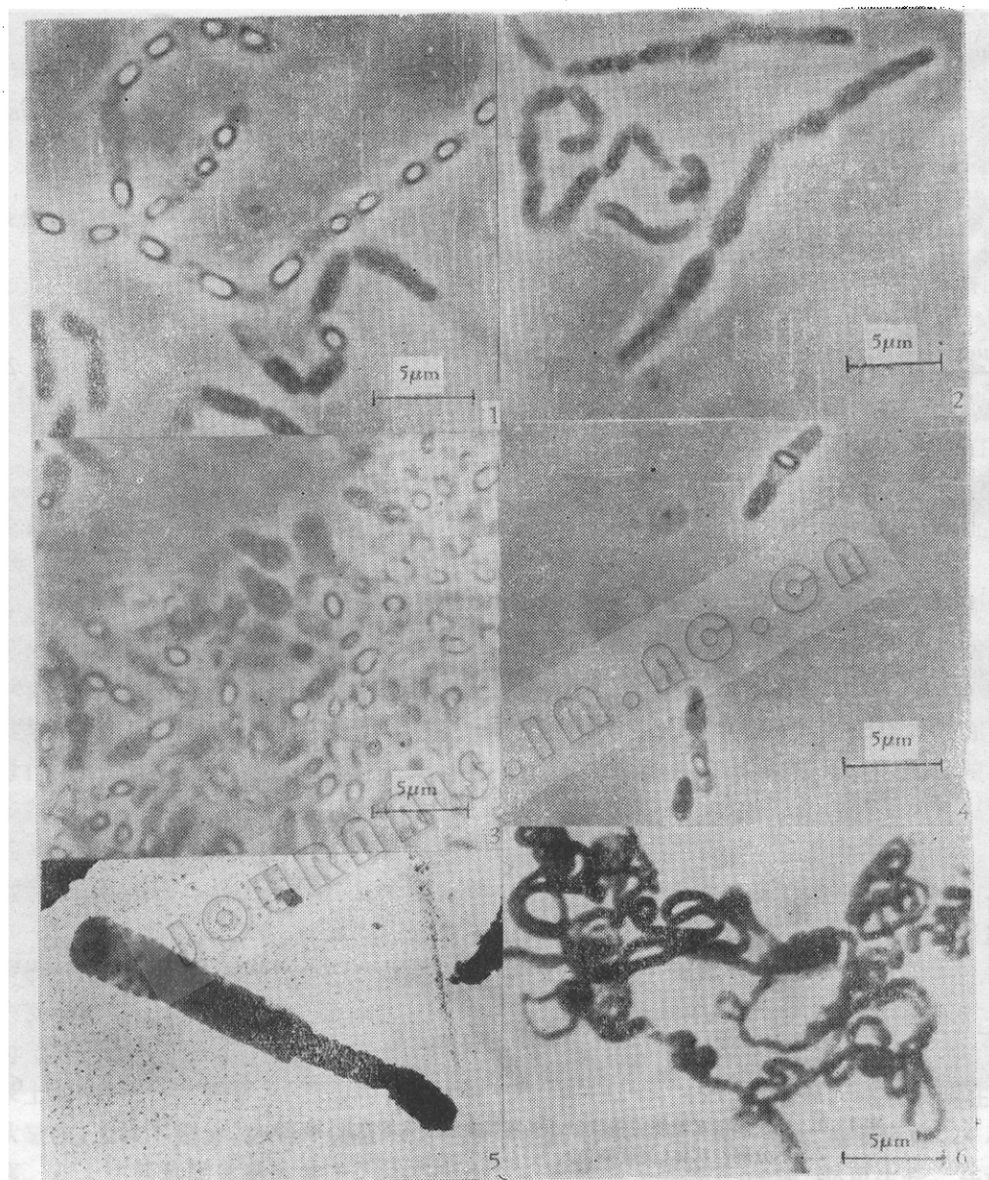


图 2 1. 杆状细胞中形成的内生芽孢(相差)。  
2,3. 在含铁蛋白胨琼脂上出现的葫芦状膨大细胞(相差)。  
4. 葫芦状细胞中形成的横位或斜位的内生芽孢(相差)。  
5. 正由鞘中滑出的杆状细胞(电镜照片, 5,300 $\times$ )。  
6. 不规则螺旋状或卷曲的丝状体(营养琼脂, 45 $^{\circ}$ C, 革兰氏染色)。

Fig. 2 1. Endospores formed in bacillary cells. (Phase-contrast).  
2,3. Cucurbit-like swollen cells. (On peptone-Fe agar, phase-contrast).  
4. Endospores formed in cucurbit-like cells, crosswise or oblique. (Phase-contrast).  
5. The rod-shaped cell gliding out from sheath. (Electron micrograph).  
6. Irregular spiral or twisted filaments. (On nutrient agar, at 45 $^{\circ}$ C, Gram's stain).

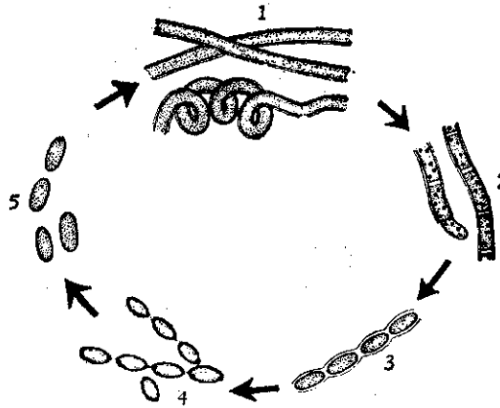


图3 801312菌株生活史示意图

1. 具薄鞘的丝状体和螺旋状丝状体。
2. 分隔形成的杆状细胞链。
3. 杆状细胞缩短,两端变圆。
4. 芽孢形成。
5. 芽孢萌发形成新的杆状细胞。

Fig. 3 Scheme of life cycle of strain 801312

1. Filaments and spiral filaments with thin sheath.
2. Rod-shaped cell chains formed by cross septa in filaments.
3. Rod-shaped cells becoming shorter and with rounded ends.
4. Spores formed.
5. Spores germinate and begin to form rod-shaped cells.

pH 6.0—7.5。培养液最终 pH 为 8.0—8.5。  
pH 在 5.0 以下及 8.5 以上均不生长。

3. 耐盐性试验: 在无 NaCl 或仅含 0.1% NaCl 的胰蛋白胨水中生长最佳, 随 NaCl 浓度增高而生长渐差。NaCl 含量达 0.75% 以上不能生长。

4. 其它生理生化特性: 氧化、发酵葡萄糖、乳糖, 产酸不产气; 水解淀粉; 接触酶阳性, 果胶酶、氧化酶阴性; 水解七叶灵; 不分解几丁质; 不液化明液, 亦不水解酪素; 由胰蛋白胨产氨; 产生  $H_2S$ ; 还原硝酸盐; 吲哚试验阴性; 不沉积铁; 在 Koser 和无氮培养基上不能生长。DNA 中 G + C 含量为 33.9 克分子%(Tm)。

### (三) 溶藻能力观察

取肉汁胨琼脂上培养 24 小时的菌苔, 接种生长成片的藻苔, 24 小时内出现明显的溶藻斑, 并向周围扩展。随着时间的延

长, 溶藻圈内仅残存小颗粒, 无完整藻细胞形态, 肉眼观为一空白区。经转种后, 溶藻能力明显减弱。

### (四) 药物敏感性试验

801312 菌株对多种抗菌素均敏感。结果见表 1。

表 1 801312 菌株对药物的敏感性

Table 1 Drug sensitivity of strain 801312

药品名称及浓度 (ml)	结果	药品名称及浓度 (ml)	结果
青霉素 5 单位	++	氯霉素 10 $\mu$ g	++
链霉素 5 $\mu$ g	+++	四环素 10 $\mu$ g	++
卡那霉素 5 $\mu$ g	++	新霉素 10 $\mu$ g	+
红霉素 5 $\mu$ g	+++	放线菌素 D 5 $\mu$ g	+
多粘菌素 B 5 $\mu$ g	—	CuSO <sub>4</sub> 0.1ppm	—
多粘菌素 E 5 $\mu$ g	—		

注: + 有明显抑菌圈; ++ 抑菌圈直径达 1.0 cm; +++ 抑菌圈直径达 1.5 cm; — 无抑菌圈。

表 2 801312 菌株与几种细菌的比较

Table 2 Comparison of strain 801312 with related bacteria

项目	801312 菌株	普氏鞘丝菌 <sup>[1,2]</sup> <i>Coleomitus pruvotii</i>	吉氏颤螺菌 <sup>[4,5]</sup> <i>Oscillospira guilliermondii</i>	节线菌 <sup>[7]</sup> <i>Arthromitus</i>	肠丝芽孢杆菌 <sup>[7]</sup> <i>Bacillus ceterothrix</i>
细胞形态、大小、排列	宽度均一,长短不等的丝状体,有的可达 160 $\mu\text{m}$ 以上。随菌龄增长形成单列杆状细胞链。单个杆状细胞约 0.8—1.0 $\times$ 4.0—6.0 $\mu\text{m}$ 。有时出现不规则卷曲的螺旋状丝状体和膨大的葫芦状细胞	无色单链多细胞丝状体,有时参差不齐,形成对列,结群成对。单个细胞 1.3 $\times$ 3.0—4.0 $\mu\text{m}$ ,丝状体可长达 320 $\mu\text{m}$	无色多细胞杆状体,直或稍弯,3.0—6.0 $\times$ 10—40 $\mu\text{m}$ 。末端细胞半球状,长杆分隔成短杆时,形成双凹面盘,长 1.0—2.0 $\mu\text{m}$	无色单列多细胞,杆状,宽度可因种不同而有很大变化,0.5—5.0 $\mu\text{m}$ ,毛发体长可达 2000 $\mu\text{m}$	巨大细胞,直径 2.5—4.0 $\mu\text{m}$ ,丝状菌
芽孢	内生芽孢,单列、直位。芽孢形成时不膨大,一个杆状细胞内只形成一个芽孢,椭圆形,1.0—1.2 $\times$ 2.0—2.5 $\mu\text{m}$	内生芽孢,0.8—0.9 $\times$ 1.7—2.0 $\mu\text{m}$ 。每个分隔中可有多数芽孢,斜位,具偏心位置的异染粒	广椭圆形芽孢,似由多个细胞融合而成,2.5 $\times$ 4.0 $\mu\text{m}$ ,直位	内生芽孢,生于单个细胞中,斜位	芽孢长圆,每个细胞中 1—2 个,位置不定,芽孢形成时不膨大
鞘膜	无色透明薄鞘,不沉积铁,菌体可由鞘中滑脱出来	无色透明薄鞘			
运动方式	可屈挠、滑行运动,无鞭毛	未见记载	菌体具周身鞭毛,但罕见运动者	不运动	
生态环境	土壤	出现在白蚁肠中	大量出现在豚鼠盲肠中	出现在蟾蜍、昆虫消化道	出现在蛙的直肠中
附着器	无			有吸足	
备注	纯培养	无纯培养,生化资料缺	无纯培养,生化资料缺	仅有形态学资料	无纯培养

## 结 论

801312 菌株系无光合色素亦无固氮能力的有鞘丝状体,可屈挠、滑行运动,随菌龄增长,丝状体内分隔形成两端平直的单列杆状细胞链,产生直位内生芽孢,兼有蓝藻和细菌的某些特点。与以往文献报道的鞘丝菌属 (*Coleomitus*)<sup>[1,2]</sup>、颤螺菌属 (*Oscillospira*)<sup>[4,5]</sup>、节线菌属 (*Arthromitus*)<sup>[5]</sup> 和肠丝芽孢杆菌 (*Bacillus ceterothrix*)<sup>[6]</sup> 有

某些相似之处。但在丝状体的宽度、细胞形态、芽孢形成的特点和位置、鞘膜、吸着器、生态环境等方面又有差异 (表 2 及图 4)。因此,认为它是鞘丝菌属 (*Coleomitus*) 中的一个新种。依其与普氏鞘丝菌 (*Coleomitus pruvotii*) 在细胞内芽孢位置不同的特点,命名为直孢鞘丝菌 (*Coleomitus rectisporus* sp. nov.)。801312 菌株为模式株,存放于中国科学院水生生物研究所。

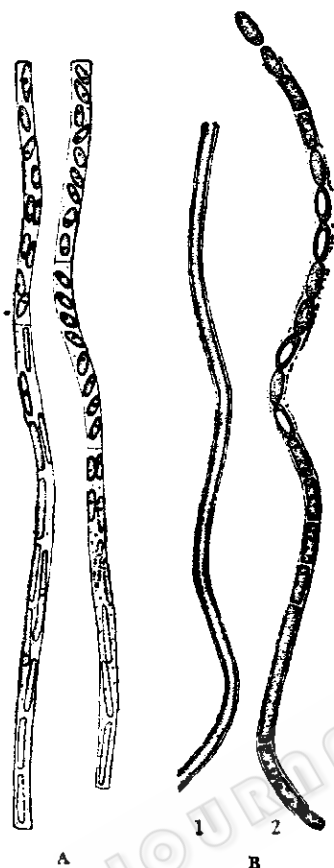


图 4 801312 菌株与普氏精丝菌形态比较 (示意图)

A. 普氏精丝菌丝状体 (仿自 Arch. Zool. Exper. et Gen., 68, Notes et Revue, 14, 1929)。

B. 801312 菌株丝状体:

1. 不分隔的丝状体。

2. 不同发育阶段的丝状体。

Fig. 4 Morphological comparison of strain 801312 with *Coleomitus pruvoitii*

A. Filaments of *C. pruvoitii*.

B. Filaments of strain 801312.

1. Filament without cross septa.

2. Filament at various development stages.

## 参 考 文 献

- [1] Duboseq, O. & P. Grasse: *Arch. Zool. Exper. et Gen.*, 68, Notes et Revue, 14, 1929.
- [2] ———: *ibid.*, 70, N. et R., 28, 1930.
- [3] Breed, R. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th ed., London, 1957.
- [4] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins

Company, Baltimore, 1974.

- [5] Skerman, V. B. D. (蔡妙英等译): 《细菌属的鉴定指导》, 科学出版社, 北京, 第243, 339, 371页, 1978。
- [6] Prévot A. R.: *Traité de Systématique Bactérienne*, Vol. 2, Dunod, Paris, 1961.
- [7] Красильников, Н. А. (钮家洪译): 《细菌和放线菌的鉴定》, 科学出版社, 北京, 第673页, 1958。
- [8] 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。
- [9] 李勤生、黎尚豪: 水生生物学集刊, 7(3): 377—384, 1981。

A NEW SPECIES OF *COLEOMITUS*

Li Qinsheng Li Shanghao\*

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

***Coleomitus rectisporus*** sp. nov. (strain 801312) was isolated from soil of nursery bed culturing nitrogen-fixing blue-green algae. The 0.05% tryptone agar medium was used. The bacterium occurs as a filament form, with a thin hyaline sheath. The filaments are various in length and uniform in width, flexible and motile by means of gliding. Cross septa are found in the older filaments, which will then divide into many rod-shaped cells, about  $0.8-1.0 \times 4.0-6.0 \mu\text{m}$  uniseriate. The volutins are present, and the content of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules increased with culture aging. Sometimes the rod-shaped cells glided out from the sheath and developed into new filaments. Gram-positive.

Any cell in rod-shaped cell chains or in filaments may form rectilinear endospore, about  $1.0-1.2$  by  $2.0-2.5 \mu\text{m}$ .

This bacterium grows abundantly in 1.0% tryptone medium (pH 6.0-7.5),  $30-32^\circ\text{C}$ . On the agar plate, the colonies appear circular, convex, milky white or greyish white, opaque, smooth and moist. In liquid culture they distribute uniformly at first, and filamentous precipitate are formed 24 hr later. Growth also occurs even at  $45^\circ\text{C}$ , but not at  $5-10^\circ\text{C}$ . When the pH

value is below 5.0 or above 8.5, or when NaCl concentration is higher than 0.75%, growth ceases. On the nutrient agar medium, incubated at  $45^\circ\text{C}$ , spiral cell-chains may sometimes be found. Cucurbit-like swollen cells may be observed on the peptone-Fe agar medium.

Ferment glucose, lactose, produce acid. Starch hydrolysis,  $\text{H}_2\text{S}$  production, nitrate reduction and catalase tests are positive. Casein hydrolysis, digestion of chitin, oxidase, pectinase, indole test and gelatin liquefaction are negative. Ammonia is produced from tryptone. On the Koser and Ashby's media growth has not been observed. The G+C content of the DNA is 33.9 moles% (Tm).

The initial isolate possesses ability to lyse cells of nitrogen-fixing blue-green algae.

According to the biological characteristics, strain 801312 differs from *Coleomitus pruvoitii* and other known filamentous bacteria, it appears to be a new species of *Coleomitus*, for which the name *Coleomitus rectisporus* sp. nov. is proposed. Culture of 801312 is assigned as the type strain, deposited in the Laboratory of Phycology, Institute of Hydrobiology, Academia Sinica.

\* i. e. S. H. Ley.