

# 一个以孢子繁殖的细菌新属

梁家骥 陈子英

(中国科学院微生物研究所,北京)

本文描述一个以孢子繁殖和细胞壁有刺的细菌新属,其主要特征:革兰氏阴性,营养细胞可直接转变为孢囊,在一般情况下每个孢囊产生2个孢子,孢子从孢囊一端放出来,成长为新的营养细胞。菌体周身具有刺一样的突出物。以甲烷作为唯一碳源和能源。因其形态与繁殖特征不同于已知细菌,故命名为刺孢杆菌属 *Echinosporebacterium* gen. nov., 其模式种为白色刺孢杆菌 *Echinosporebacterium album* sp. nov.。

Klass<sup>[1]</sup> 曾报道,甲烷氧化菌 IGT-10 菌株在细胞一端可生成一种类似芽的附属物。Whittenbury<sup>[2,3]</sup> 报道过一种能形成外生孢子的甲烷氧化菌 *Methlosinus*, 其孢子特性与芽孢杆菌属的芽孢相似。以后又有 Reed<sup>[4,5]</sup>、Weaver<sup>[6]</sup>、Jeffrey<sup>[7]</sup> 等对此菌进行过详细研究。由于它们都是一个营养细胞只能形成一个孢子,因此,所有芽一样的附属物或外生孢子都是属于一种抵抗不良环境的抗逆性孢子,而不是繁殖体。1980 年我们曾报道了一属由营养细胞转变为孢囊产生大量孢子进行繁殖的细菌——多孢子菌属 *Polysporobacterium*<sup>[8]</sup>, 孢子一般都在孢囊内部成长为新的营养细胞。本文报道另一类以孢子繁殖,周身有刺的细菌——T7 菌株。该菌株自稻田土壤中分离。

## 材料和方法

### (一) 培养基

1. 无碳、无氮无机盐培养基(9号)<sup>[9]</sup>。
2. 无碳无机盐培养基:以硝酸钠作氮源的9号培养基。
3. 固体培养基:加2%水洗琼脂。

### (二) 分离与培养

1. 富集培养:取土样约1g,置无菌的50ml 有盖的小杯中,内装20ml 9号培养基,置真空干

燥器中,抽出50%空气,再补充50%甲烷,于40(±2)°C 培养15—20天,挑取一小片菌膜,富集培养一次。

2. 分离纯化:用平板稀释或平板划线方法反复多次分离纯化,直到分离出纯菌株。在分离培养基中分别加入适量四环素、两性霉素,以抑制某些杂菌生长与防止霉菌污染。

### (三) 细胞超薄切片

制备方法详见参考文献[9]。

### (四) DNA 中 G + C 克分子含量测定 (T<sub>m</sub> 值方法)

采用 Marmur<sup>[10]</sup>、林万明<sup>[11]</sup>等人的方法提取DNA,由 T<sub>m</sub> 值计算碱基组成,依据 Marmur 和 Doty<sup>[12]</sup> 的经验公式及林万明<sup>[11]</sup>等人的经验公式。

### (五) 营养与生理试验

1. 糖的同化:在9号培养基中分别按0.1%或0.5%的含量加入葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、蜜二糖、淀粉、柠檬酸钠、甲酸钠、苹果酸、草酸、甲醇、豆饼水解液做成固体平板,接种后不再通甲烷气,在40(±2)°C 下培养,10天后观察生长情况。

2. 氮源利用:在9号培养基中分别加入0.2%的硝酸钠、硫酸铵、磷酸氢二铵、碳酸氢铵、尿素、肉汁、蛋白胨做成固体平板,接种后放入一密闭的干燥器中,通入甲烷气,在40(±2)°C 培养

本文于1983年1月7日收到。

10 天后观察。

3. 对氧的要求: 用 500ml 三角瓶内装 9 号培养基 50ml, 接入 10% 的已生长好的种子, 然后在不同组瓶子中分别通入不同量的氧气, 其中有一组不通氧气只通甲烷气, 在  $40(\pm 2)^{\circ}\text{C}$  振荡培养 7—10 天后观察。

4. pH 与温度对生长的影响: 用 9 号培养基平板培养或用三角瓶液体培养, 以菌落数或测定光密度值来比较菌的生长情况。

5. 染色与测定酶: 革兰氏染色、类脂粒染色、芽孢染色、荚膜染色和氧化酶、接触酶测定, 主要依据《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[14]</sup>进行。

#### (六) 孢子萌发试验

将孢子悬浮液涂平板或液体培养, 观察孢子萌发生长情况。

## 结 果

### (一) 菌落特征

在 9 号无氮培养基平板上, 菌落圆形, 直径为 1mm 左右(图版 I-1), 边缘整齐, 白色, 不透明, 表面光滑, 质地稍粘, 微凸。在以硝酸钠作氮源的无碳无机盐培养基上, 培养后期产生水溶性棕褐色色素。

### (二) 细胞特征

杆状,  $0.5-1.0 \times 1.1-3.5 \mu\text{m}$  (图版 I-2, 3, 7), 常见数个细胞一端相连, 呈现类似叶状的奇特排列。罕见呈双或呈链, 整个细胞表面有刺样突出物。细胞除分裂繁殖外, 还能转化成孢囊产生孢子进行繁殖。用电镜观察菌株 T7 细胞超薄切片, 细胞内有明显的特殊细胞质内膜结构(图版 I-4), 属于 II 型<sup>[13]</sup>。

### (三) 孢囊与孢子

无论液体培养或固体培养, 营养细胞都可转变为孢囊, 当营养细胞转变为孢囊时, 细胞伸长(图版 I-3), 孢囊表面仍有刺样突出物。一个孢囊一般产生 2 个孢子(图版 I-6), 孢子一般自孢囊一端放出来(图版 I-5)。孢子球形, 大小与细胞横切

面直径相似, 约为  $0.5-1.0 \mu\text{m}$ 。孢子具一根鞭毛(图版 I-8), 运动, 孢子继续生长成为新的营养细胞。

### (四) 营养与生理特性

利用甲烷作为唯一碳源与能源。不利用甲醇、葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、蜜二糖、淀粉、柠檬酸钠、甲酸钠、苹果酸、草酸、豆饼水解液。利用硝酸盐、铵盐、尿素及空气中的自由分子氮作为氮源。不利用肉汁、胨。革兰氏染色阴性, 接触酶阳性, 氧化酶阳性, 无荚膜, 类脂粒染色阴性, 好气, 生长温度为  $26-44^{\circ}\text{C}$ , 最适生长温度为  $35-40^{\circ}\text{C}$ , 生长 pH 为  $4.5-8.5$ , 最适生长 pH 为  $6-7$ 。

DNA 中 G + C 克分子含量为 61.9%。

### (五) 讨论与命名

菌株 T7 能以甲烷作为唯一碳源和能源, 不同化糖、醇等有机化合物, 革兰氏染色阴性, 好气, 这些特性与一般甲烷氧化菌相同。细胞膜结构类似 *Methylosinus*, 但该属一个细胞只能产生一个外孢子, 这与菌株 T7 一个细胞一般产生两个孢子进行繁殖不同。就以孢子进行繁殖这一特征来说, T7 菌株更接近于 *Polysporobacterium*, 但前者每个孢囊一般只产生 2 个孢子, II 型模结构, 故不能将该菌株归于 *Polysporobacterium* 属。此外, 该菌菌体周身生有刺一样的突出物, 这在甲烷氧化菌和其他细菌中都未见报道。菌株 T7 与以上两种甲烷氧化菌的特征比较见表 1。

从表 1 可以看出, 该菌株有独特的形态和繁殖特征, 它不同于已知任何甲烷氧化菌, 故定为新属——刺孢杆菌属 *Echinospobacterium* gen. nov., 新种——白色刺孢杆菌 *Echinospobacterium album* sp. nov.。关于以孢子繁殖的细菌的分类位置, 有待于进一步研究确定。

表 1 菌株 T7 与两种甲烷氧化菌主要特征比较<sup>[2,4,15]</sup>

Table 1 Comparison of major characteristics of species T7 with other methane-utilizing bacteria

菌种	碳源利用		菌落颜色	细胞运动	鞭毛	表面刺样突出物	细胞膜结构类型	DNA 中 G+C 克分子含量 (%)	孢子繁殖
	甲烷	甲醇							
菌株 T7	+	-	白色	未见		有	II	61.9	每个孢囊一般产生 2 个孢子
砂石多孢子菌 <i>Polysporobacterium arenarium</i>	+	-	黄褐色	运动	极生鞭毛	无	I	57.47	每个孢囊一般产生 10 个以上孢子
甲基弯菌属 <i>Methylosinus</i>	+	+	白色至黄色	运动	极生丛毛	无	II	62.5	-

## 刺孢杆菌属 新属

*Echinosporobacterium* gen. nov.

Echin 含义为刺, sporo 含义为孢子, bacter 含义为杆菌, *Echinosporobacterium* 新词, 新属属名, 含义为有刺并以孢子繁殖的杆菌。

细胞杆状, 大小为  $0.5-1.0 \times 1.1-3.5 \mu\text{m}$ , 周身有刺样突出物, 常密集排列。革兰氏染色阴性。营养细胞直接转变为孢囊, 产生孢子进行繁殖。每个孢囊一般产生 2 个孢子, 孢子从孢囊一端放出来。孢子呈球形, 具有折光性, 单鞭毛运动, 并能成长为新的营养细胞。利用甲烷作为唯一碳源与能源。不利用糖、肉汁等营养物, 能利用  $\text{NO}_3^-$  与  $\text{N}_2$  作为氮源生长。好气。模式种为白色刺孢杆菌 *Echinosporobacterium album*, 其 DNA 中 G+C 克分子含量为 61.9%(Tm)。

## 白色刺孢杆菌 新种

*Echinosporobacterium album* sp. nov.

album 拉丁文, 含义为白色。在无机盐琼脂平板上菌落白色, 边缘整齐, 不透明, 微凸, 稍粘。细胞杆状, 大小为  $0.5-1.0 \times 1.1-3.5 \mu\text{m}$ , 常常几个细胞的一端连接在一起, 周身有刺。营养细胞可转变为孢囊, 每个孢囊产生 2 个(少见 3 个)孢子。

孢子一般从孢囊的一端放出来, 单鞭毛运动, 孢子能成长为新的营养细胞, 细胞内具有 II 型细胞质内膜结构。DNA 中的 G+C 克分子含量为 61.9%(Tm)。在以硝酸钠为氮源的培养基上生长, 产生棕褐色水溶性色素。革兰氏染色阴性, 能以甲烷作唯一碳源与能源, 能利用  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  与  $\text{N}_2$  作为氮源生长, 不利用甲醇、葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖、苹果酸等有机物生长。好气。生长最适温度为  $35-40^\circ\text{C}$ , 最适 pH 为 6.0—7.0。

## 参 考 文 献

- [1] Klass, D. L. et al.: *Engineering of Unconventional Protein Production*, 93(65): 72—79, 1969.
- [2] Whittenbury, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 61: 205—218, 1970.
- [3] ————: *ibid.*, 61: 219—226, 1970.
- [4] Reed, W. M. et al.: *J. Bacteriol.*, 141: 908—913, 1980.
- [5] ————: *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1179—1183, 1979.
- [6] Weaver, J. L. et al.: *J. Bacteriol.*, 121: 704—710, 1975.
- [7] Jeffrey, J. T. et al.: *ibid.*, 149: 354—360, 1982.
- [8] 陈子英等: 微生物学报, 20(4): 339—344, 1980.
- [9] 梁家骥等: 微生物学通报, 10(1): 22—23, 1983.
- [10] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 203—218, 1961.
- [11] 林万明等: 微生物学通报, 8(5): 245—247, 1981.

- [12] Marmur, J. & P. Doty: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962.
- [13] Davies, S. I. & R. Whittenbury: *J. Gen. Microbiol.*, 61: 227—232, 1970.
- [14] 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.
- [15] Best, D. J. & I. J. Higgins: *J. Gen. Microbiol.*, 125: 73—84, 1981.

## A NEW GENUS OF BACTERIA

Liang Jiayuan Chen Ziyang

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

This paper describes a new genus of bacteria. It is characterized by the mode of reproduction and echinulate cell surface. The vegetative cell can transform into sporangium, usually a sporangium produces two spores, which are able to develop into new vegetative cells. The organism utilizes methane as sole source of carbon and energy. It is different from any other bacteria so far known. Therefore we consider it to be a new genus. We have designated it *Echinosporbacterium* gen. nov. The type species is *Echinosporbacterium album* sp. nov.

*Echinosporbacterium* gen. nov.

**echin:** Gr. n., form as hedgehog;  
**spora:** Gr. n., spore; **bacteria:** Gr. n., rod cell.

Cells rod-shaped, usually occurring in mass, Gram-negative. Cells possess complex internal membrane system of type II. The colony is white, round and smooth. The vegetative cells can transform into sporangia, usually a sporangium produces two spores, which are motile by single flagellum. The spores can develop into new vegetative cells under suitable conditions. It has echinulate cell surface. It utilizes methane as sole carbon

and energy source. No growth occurs on nutrient agar. Nitrate, ammonium ion and  $N_2$  can be used as nitrogen sources. It is aerobic. The G+C content of DNA of the type strain is 61.9 moles% (Tm). The type species is *Echinosporbacterium album*.

*Echinosporbacterium album* sp. nov.

**album:** L. adj., white.

Cells rod-shaped, usually occurring in mass. It is  $0.5-1.0 \times 1.1-3.5 \mu\text{m}$ . The spore is motile by single flagellum. The cells of organism possess complex internal membrane system of type II. Gram-negative. Aerobic. The colony is white, round and smooth. The vegetative cells can transform into sporangia, usually a sporangium produces two spores. It releases spores by "parco". The spores are able to develop into new vegetative cells under suitable conditions. The cell surface is echinulate. It is unable to utilize organic compounds, such as methanol, xylose, glucose, galactose and so on. It grows well on media with  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  or  $N_2$ . It grows well at  $35-40^\circ\text{C}$ , pH 6.0—7.0. The G+C content of the DNA is 69.1 moles% (Tm). It was isolated from soil of rice field.