

# 黄杆菌属的一个新种

周慧玲 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自水稻根际分离得到 M-Sm-1612 和 St-Sm-9021 号的两株细菌,其细胞为革兰氏阴性,杆状,以周生鞭毛运动,有荚膜,细胞内有异染粒和聚  $\beta$ -羟基丁酸盐的颗粒。产生  $\beta$ -胡萝卜素类的色素,在土豆块培养基上黄色素更明显。氧化性菌,好氧生长,氧化酶阴性。不液化明胶,石蕊牛奶胨化、还原和凝固。在 12°—37℃ 中生长,最适生长温度为 30℃。用乙炔还原法测定有固氮酶活性。DNA 中 G + C 含量为 63.4—63.66 克分子%。经鉴定认为这两株菌应属于黄杆菌属的一个新种。定名为稻黄杆菌 (*Flavobacterium oryzae* sp. nov. Zhou et Wang)。

关键词 黄杆菌属;稻黄杆菌

福建省农业科学院土壤肥料研究所从水稻根际分离到两株黄色细菌。经乙炔还原法及  $N_2$  测定<sup>[1]</sup>,证实有固氮酶活性。从这两株细菌所表现的特性看,它们应属于黄杆菌属 (*Flavobacterium*)。自 Döbereiner 1961 年发现细菌与禾本科植物联合固氮以来,这方面已有许多报告<sup>[2-4]</sup>,但尚未见有关黄杆菌属的详细报道。现将这两株菌的鉴定结果报告如下。

## 材料和方法

### (一) 菌株

M-Sm-1612 和 St-Sm-9021 (下简称 1612 和 9021) 两株菌,系福建省农业科学院水稻研究所从水稻根际分离得到。

### (二) 方法

主要根据《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[5]</sup>及参考文献<sup>[5-11]</sup>中介绍的有关方法和《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第七、八版)。

#### 1. 形态特征

(1) 个体形态: 在酵母膏蛋白胨 (YP) 琼脂培养基上<sup>[12]</sup>, 30℃, 培养 48 小时后,用光学显微镜、透射电子显微镜观察(用钨钼合金投影及磷钨酸钠染色)<sup>[13]</sup>,并测量细胞大小。

(2) 菌落形态: 对在肉汁胨、YP、Döbereiner 氏无氮培养基<sup>[10]</sup>和改良的 Starkey 氏无氮培养

基<sup>[14]</sup>平板上的菌落进行观察。

#### 2. 生理特性

(1) 生长温度: 用改良 Starkey 氏营养液, 30℃ 培养 24 小时的菌种直接接种于澄清的改良 Starkey 氏营养液中,置 10°—12℃ 冰箱、20℃ 和 30℃ 温箱、37℃ 及 44℃ 水浴中,一周内观察生长情况。

(2) 趋氧性: 将培养 24 小时的菌液,混于有 0.2% 琼脂的 Döbereiner 氏培养基的试管中,一周内观察生长情况。

(3) 碳源的利用: 用 Knight 和 Proom<sup>[15]</sup>的无机盐为基础培养基,用以下 7 种碳源(%): 葡萄糖 1.0, 海藻糖 0.5, 乙酸钠 0.5, 琥珀酸钠 0.2 谷氨酸钠 0.2, 乳酸 0.2, 丙二酸 0.2。

(4) 色素: 接种金氏 B 培养基,于 30℃ 培养一周,用 253.7nm 紫外光源观察荧光色素的产生情况。

用丙酮:甲醇=7:2(V/V)<sup>[13]</sup>提取色素,在 72 型分光光度计上检查,用  $\beta$ -胡萝卜素 ( $\beta$ -Carotin, E. Merck) 为标准样品。

#### 3. 生化特性

(1) 碳水化合物生酸: 在休和利夫森二

本文于 1982 年 4 月 7 日收到。

承福建省农业科学院土壤肥料研究所黄世贞等同志提供菌株;北京市农业科学院土壤肥料研究所固氮菌组测定固氮酶活性;本所技术室电镀组初昭晰、边庆和等同志摄制电镜照片,特此致谢。

氏<sup>[13]</sup>及无机盐基础培养基<sup>[6]</sup>中,分别加入1%的木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、棉子糖、糊精、菊糖、鼠李糖、甘油、阿东醇、肌醇和柳醇,于30℃培养,两周内观察结果。

(2) 脱氧核糖核酸酶(DNase)的检查:在YP琼脂培养基中加入0.2% DNA,15磅30分钟灭菌,倒平板,凝固后,取24小时的菌点种。30℃培养2-5天,待形成明显菌落后,在平板上注满1NHCl,菌落周围出现透明圈者为阳性,反之为阴性。

(3) 耐盐试验:在YP液中分别加入(%) : 1、4、8、10、12的NaCl,用24小时菌液直针接种,30℃培养一周,观察生长情况。

(4) 固氮酶活性测定:用乙炔还原法。

(5) DNA中G+C含量测定:采用解链温度法(Tm)<sup>[19]</sup>。用大肠埃希氏菌K12(AS 1.750)作对照菌株。

## 结 果

### (一) 个体形态

1612和9021菌株革兰氏染色均为阴性,细胞杆状,0.4—0.6 × 0.9—1.2 μm,单个,成对。细胞内有异染粒(图1),有聚β-羟基丁酸盐颗粒累积。有荚膜。以周生鞭毛运动(图2、3)。

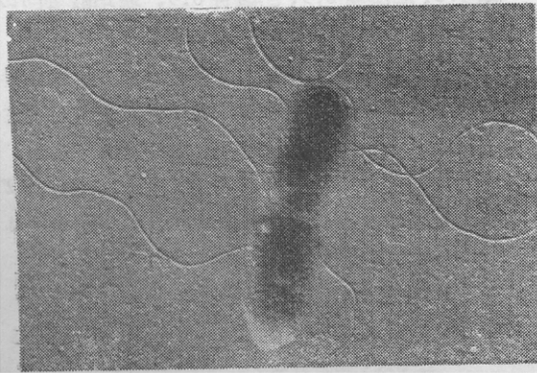


图1 9021菌株24小时的细胞(×9,000)  
Fig. 1 Cells of 9021 strain culture 24 hr.

### (二) 培养特征

1. 在琼脂平板上的菌落: 30℃培养7

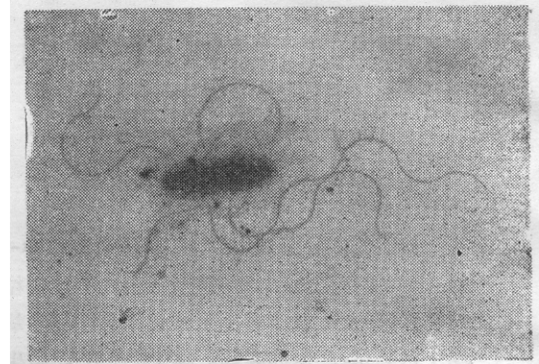


图2 1612菌株24小时的细胞(×12,000)  
Fig. 2 Cells of 1612 strain culture for 24 hr.

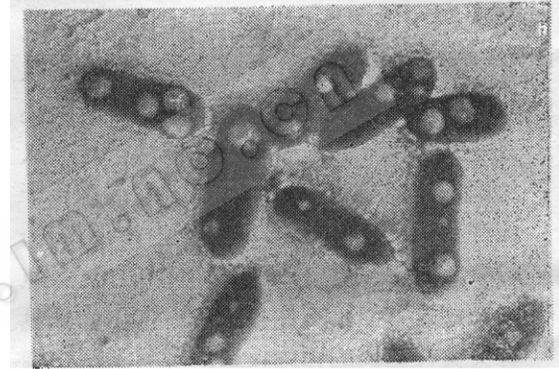


图3 9021菌株24小时的细胞(×10,000)  
(用磷钨酸染色)

Fig. 3 Cells of 9021 strain culture 24 hr.

天,菌落形态见表1。

2. 在琼脂斜面上的菌苔: 30℃,培养24小时,菌株在琼脂斜面上的生长特征见表2。

3. 马铃薯块: 1612及9021号菌株均生长茂盛,菌苔黄色,湿润,有光泽。

4. 色素: 不产生荧光色素,而产生属于β-胡萝卜素的黄色素,见图4。

### (三) 生理生化特性

1612和9021菌株均为需氧菌,只生长在半固体琼脂表面,其它性状见表3。

### (四) DNA中G+C含量测定

1612和9021菌株DNA中G+C含量分别为63.40克分子%和63.66克分子%。

表 1 1612 和 9021 菌株的菌落形态

Table 1 Colony morphology of strain 1612 and 9021

培养基		形状	表面	隆起	边缘	大小 (mm)	颜色	外 观
肉汁培养基	1612	圆形	光滑	扁平	整齐, 有镶边	1—5	淡桔橙	有光泽, 不透明, 薄膜状
	9021	圆形	光滑	扁平	整齐	0.5—3	淡桔橙	有光泽, 不透明, 薄膜状
YP 培养基	1612	圆形	光滑	低凸	整齐	0.5—3	木瓜黄	有光泽, 不透明, 薄膜状
	9021	圆形	光滑	低凸	整齐	0.5—2	鸡蛋黄	有光泽, 半透明, 薄膜状
Döbereiner's 培养基	1612	圆形	有皱纹	凸	整齐	0.5—1	茉莉黄	无光泽, 不透明, 菌长入培养基内, 不易挑起
	9021	圆形	光滑	低凸	整齐	1.5—4	茉莉黄	有光泽, 不透明, 湿润, 易挑起
Starkey's 培养基	1612	圆形	光滑	凸	整齐	3—6	乳白	有光泽, 半透明, 粘稠
	9021	圆形	光滑	低凸	整齐	4—7	乳白	有光泽, 透明, 粘稠, 较湿润

表 2 1612 和 9021 菌株在琼脂斜面上的生长特征\*

Table 2 Description of growth on slant of strains 1612 and 9021

培养基		生长型	生长量	光泽	菌苔颜色	粘度	边缘	表 面
牛肉汁培养基	1612	丝状	+	+	芥黄	-	整齐	光滑
	9021	丝状	++	-	谷黄	-	整齐	有皱纹
YP 培养基	1612	丝状	+	+	淡芥黄	-	整齐	光滑
	9021	丝状	+	+	谷黄	-	整齐	光滑
Döbereiner's 培养基	1612	丝状	+	-	鸭梨黄	-	小波状	有细皱纹, 菌长入培养基内
	9021	丝状	+	+	鸡蛋黄	+	整齐	光滑
Starkey's	1612	丝状	++	+	乳白	++	整齐	光滑
	9021	丝状	++	+	乳白	++	整齐	光滑

\* ++ 生长良好; + 生长; - 不生长。

## 讨 论

1612 和 9021 两株细菌为革兰氏阴性, 细胞杆状, 周生鞭毛, 菌落为黄色, 含有  $\beta$ -胡萝卜素的黄色色素, 营呼吸代谢。DNA 中 G + C 含量为 63.4—63.66 克分子%。在与其性质相类似的细菌中, 假单胞菌属为极生鞭毛, 周生鞭毛的产碱杆菌属不产生色素, 能产生黄色素的周生鞭毛细菌欧文氏菌 (*Erwinia*) 为发酵性菌。噬胞菌属 (*Cytophaga*) 虽也能产生黄色素, 但不产生

鞭毛, 只能滑行运动, 而且其 DNA 中 G + C 含量仅为 33—42 克分子%。自生固氮的固氮菌科的细菌的细胞形态呈卵形或产生大量胶状粘液。因此, 上述各属细菌的性质均与 1612 和 9021 两株菌有明显差异。自 Bergey 氏<sup>[1]</sup>于 1923 年建立黄杆菌属以来, 属的界线屡有变动, 曾包括产生黄色素的革兰氏阳性细菌和阴性细菌, 包括周生鞭毛菌、极生鞭毛菌和不运动的细菌, 以及发酵代谢菌和呼吸代谢菌。目前, 在《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第八版) 中, 黄

表 3 1612 和 9021 号菌株的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical features of strains 1612 and 9021

测试项目	1612菌株	9021菌株
葡萄糖氧化/发酵	氧化产酸, 不产气	氧化产酸不产气
碳水化合物生酸		
木糖	产酸	产酸
阿拉伯糖	产碱	产碱
葡萄糖	产酸	产酸
果糖	无变化	无变化
甘露糖	产酸	产酸
半乳糖	产碱	产碱
乳糖	产酸	产酸
蔗糖	产酸	产酸
麦芽糖	产酸	产酸
海藻糖	产酸	产酸
棉子糖	产碱	产碱
糊精	产酸	产酸
菊糖	产碱	产碱
鼠李糖	产碱	产碱
甘油	产碱	产碱
阿东醇	无变化	无变化
肌醇	产碱	产碱
柳醇	无变化	无变化
硝酸盐还原	还原	还原
石蕊牛奶	陈化、还原、酸凝	陈化、还原、酸凝
明胶液化	不液化	不液化
淀粉水解	不水解	不水解
吡啶产生	不产生	不产生
甲基红	阴性	阴性
乙酰甲基甲醇	阴性	阴性
H <sub>2</sub> S 产生	阳性	阳性
七叶灵水解	水解	水解
生长温度(°C)		
12、20、30、37	生长	生长
44	不生长	不生长
耐 NaCl 能力(%)		
1	生长	生长
4	不生长	不生长
碳源利用		
葡萄糖	利用	利用
海藻糖	利用	利用
琥珀酸	利用	利用
谷氨酸	利用	利用
乳酸	利用	利用
丙二酸	不利用	不利用
乙酸	不利用	不利用
柠檬酸盐	阴性	阴性

续表

测试项目	1612菌株	9021菌株
脲酶	阴性	阴性
苯丙氨酸脱氨酶	阴性	阴性
鸟氨酸脱氨酶	阴性	阴性
赖氨酸脱氨酶	阴性	阴性
精氨酸脱氨酶	阴性	阴性
精氨酸双水解酶	阴性	阳性
氧化酶	阴性	阴性
接触酶	阳性	阳性
脱氧核糖核酸酶	阴性	阴性
固氮酶*	阳性	阳性

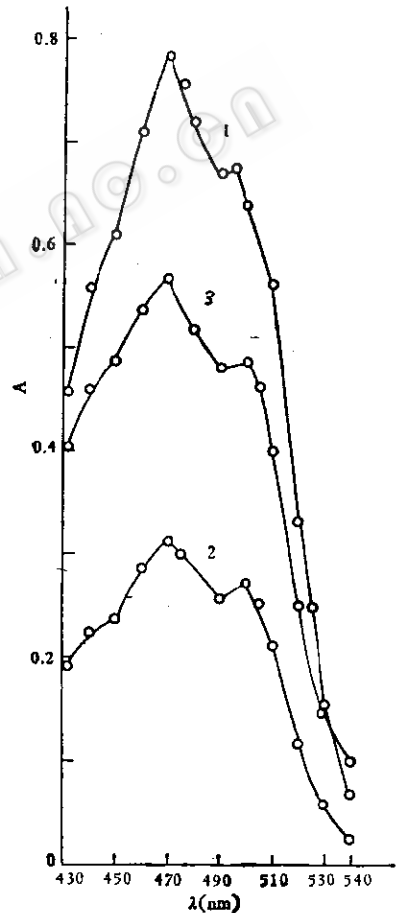
\* 指使 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 还原成 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 的能力, 即固氮酶活性。

图 4 β-胡萝卜素吸收光谱

Fig. 4 The absorption of β-carotene

1: β-胡萝卜素 2: 1612 菌株的提取物

3: 9021 菌株的提取物

1: β-carotene 2: The extract of strain 1612

3: The extract of strain 9021

表 4 1612 和 9021 与已知近似种的区别\*

Table 4 Differences of strains 1612 and 9021 from related species

性 状	荚膜黄杆菌	里加黄杆菌	1612菌株	9021菌株
运动	—	+	+	+
产生色素	黄色	黄色至橙色	黄色	黄色
棉子糖	+		—	—
木糖	+		+	+
需加 NaCl	—	—	—	—
37℃生长	—	—	—	—
明胶液化	—	+	—	—
石蕊牛奶			产酸, 酸凝, 还原	产酸, 酸凝, 还原
马铃薯块			湿润, 闪光, 粘稠, 乳鸭黄	湿润, 粘稠, 木瓜黄
淀粉水解	—	0	—	—
*固氮酶活性			有	有
DNA 中 G+C 含量(克分子%)	63	69	63.4	63.7

\* + 阳性反应; — 阴性反应; 0 无记录。

杆菌属限于产生胡萝卜类色素的革兰氏阴性杆菌, 周生鞭毛或不运动, 基本上是呼吸代谢的细菌。DNA 中 G+C 含量在 26—43 克分子 % 和 63—70 克分子 %。据此, 1612 和 9021 两株菌应属黄杆菌属。它们归属于 DNA 中 G+C 含量为 63—70 克分子 % 的部分中。1612 及 9021 两菌株的群体形态虽有所不同, 但其生理生化等性状基本一致, 故可归属于同一种内。它们与《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第八版) 中描述的荚膜黄杆菌 (*F. capsulatum*) 和里加黄杆菌 (*F. rigense*) 比较相似, 但又有一些差异 (见表 4), 而与其它种则差异更明显。值得指出的是, 这两株菌均具有固氮酶活性。因此, 将此两菌株定名为黄杆菌属的一个新种——稻黄杆菌 (*Flavobacterium oryzae* sp. nov. Zhou et Wang), 并以 1612 菌株为模式株。菌种保藏于中国科学院微生物研究所菌种保藏室, 1612 菌株编号为 AS 1.1584; 9021 菌株编号为 AS 1.1585。

## 参 考 文 献

[1] 黄世贞等: 微生物学报, 22(2): 156—159, 1982。

- [2] Döbereiner, J.: *Plant Soil*, 14: 211—217, 1961.
- [3] Döbereiner, J. & A. B. Campelo: *Plant Soil Special*, 16: 457—470, 1971.
- [4] Döbereiner, J. & R. M. Boddey: In *Current Perspectives in Nitrogen Fixation-Proceeding, the Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation held in Canberra, Australia, 1 to 5 December 1980*. Gibson, A. H. & W. E. Newton (eds). Australian Academy of Science, pp. 305—312, 1981.
- [5] 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。
- [6] Knight, B. C. J. G. & H. Proom: *J. Gen. Microbiol.*, 4: 516—517, 1950.
- [7] Oyaizu, H. & K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27: 57—107, 1981.
- [8] Nur, I. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 122: 23, 1981.
- [9] 洪涛主编: 《生物医学超微结构与电子显微技术》, 科学出版社, 北京, 1980。
- [10] Döbereiner, J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 22 (10): 1464—1473, 1976.
- [11] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [12] McMeekin, T. A.: *J. Appl. Bacteriology*, 45: 321—332, 1978.

## A NEW SPECIES IN GENUS *FLAVOBACTERIUM*

Zhou Huiling Wang Dasi

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

Two strains of bacteria, M-Sm-1612 and St-Sm-9021, with peritrichous flagella, produce metachromatic granules and poly- $\beta$ -hydroxybutric acid granules within the cells. Conspicuous slime is formed on Starkey's medium. Yellow pigment, similar to  $\beta$ -carotene, is produced, especially on potato plugs. No fluorescent pigment is produced.

They are aerobic bacteria with respiratory metabolism. Catalase is produced but no oxidase. Glucose, mannose, xylose, lactose, sucrose, maltose, trehalose and dextrin are oxidized to produce acids but no gas. No acid is produced from arabinose, fructose, galactose, raffinose, inulin, rhamnose, glycerol, adonitol, inositol or salicin. Nitrate is reduced. Litmus milk is peptonized, reduced and coagulated by acid produced. Gelatin or starch is not attacked. Indole is not produced. Hydrogen sulfide is produced. M. R. and VP tests and citrate utiliza-

tion test are negative. Growth occurs at and below 37°C but do not at 44°C. Growth occurs in medium containing 1% but not 4% NaCl. No urease, phenylalanine deaminase, decarboxylases of ornithine and lysine or DNase is detected. Nitrogenase is produced. Arginine dihydrolase is produced by St-Sm-9021, but not by M-Sm-1612. The organisms in question are not identical with any known bacteria and designated as a new species—*Flavobacterium oryzae* sp. nov. These two strains have been deposited in Type Culture Collection in Institute of Microbiology, Academia Sinica. St-Sm-9021 has been numbered as AS 1.1585 and M-Sm-1612 as AS 1.1584. Strain AS 1.1584 has been assigned as the type strain.

### Key words

*Flavobacterium; Flavobacterium oryzae*