

一株弗兰克氏菌分类鉴定的研究

杜大至 原福虎 李荣儿 王毅岩 崔国良

(山西省生物研究所, 太原)

从中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi) 根瘤中分离出一株生孢囊的放线菌 *Frankia* sp. HR104。经间接试验证实, 它可以侵染寄主植物, 形成能够固氮的有效根瘤。通过形态和培养特征、生理生化特性、细胞壁组份及 DNA 中 G + C 含量等的研究, 表明这株菌与已经研究和描述过的弗兰克氏菌有差别, 特别是胞壁型不同, 可能属于一个尚未研究过的新属。本文还对弗兰克氏菌的分类标准和鉴定方法进行了初步探讨。

关键词 弗兰克氏菌

弗兰克氏菌是一种能与多种非豆科植物建立共生关系的固氮放线菌。多年来, 由于这种根瘤内生菌的分离比较困难, 所以对它研究较少。在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版^[1]中, 虽曾记载过 10 个种, 但当时 Becking 只是以寄主植物的科、属名称进行命名, 并未获得过内生菌的人工纯培养。自 1978 年 Callahan 等首次从香蕨木 (*Comptonia peregrina*) 根瘤中分离出内生菌以来, 弗兰克氏菌的分离工作有了较大进展。世界各国已采用不同的方法, 从大约 8 个属的非豆科植物根瘤中分离出一批内生菌, 并开始了对这些弗兰克氏菌分类鉴定工作的研究。自 1982 年 Lechevalier 等从 *Alnus incana* ssp. *rugosa* 的根瘤中分离到两株在形态和生理生化特性等方面有显著差别的弗兰克氏菌后, Becking 对弗兰克氏菌的定种标准就被否定。但是, 由于目前对弗兰克氏菌的分类鉴定工作还处于探索阶段, 所以国内外的分类学家至今还未能就此提出一种明确可行的分类方法和定种原则。

本文报道了一株从中国沙棘根瘤中分离到的弗兰克氏菌的鉴定结果, 并就其分类位置进行了讨论。同时对弗兰克氏菌的

分类标准和鉴定方法作了初步探讨。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

用组织培养法从中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi) 根瘤中分离的 *Frankia* sp. HR 104 菌株。这株菌可以侵染原寄主植物, 形成能够固氮的根瘤, 其根瘤的乙炔还原活力为 $36.23 \text{ nmol C}_2\text{H}_2/\text{g} \cdot \text{鲜重}/\text{分}^{[2]}$ 。

(二) 方法

将供试菌接种在由 MS 培养基修改的 CMS-1 号培养基和无氮的克氏合成一号培养基上, 置 27°C 恒温培养, 7—40 天内用涂片法^[3]在相同测试条件下, 通过 OLYMPUS BHS-313 型光学显微镜和 JEM-35C 型扫描电镜进行连续观察照相。

培养特征和生理生化特性的一般试验按常规法测定^[4-6], 但根据弗兰克氏菌的生长特点, 增加了液体培养特征试验。在大部分生理生化试验

本文于 1983 年 11 月 28 日收到。

阎逊初先生指导本工作并审阅本文; 张国伟、邢桂香同志指导并帮助工作; 蔡妙英同志指导 DNA 中 G + C% 的测定, 并与阮继生、周慧玲、邓宇秀同志对本工作提出宝贵意见; 辽宁省微生物研究所董德鑫同志、山西农业大学顾德峰同志参加部分工作; 扫描电镜制片、照相由山西省电镜测试中心白春生、范建同志承担; 细胞壁中氨基酸含量的测定由山西省农业测试中心程忻生、马晓凤同志承担; 寄主植物标本由本所植物室刘天慰同志鉴定, 特此一并致谢。

中(包括碳源、氮源利用等),供试菌不能在常规培养基上生长,所以一般选用适于该菌生长,而又成份简单的克氏合成一号为基础培养基,或者更换了培养基中不适于菌体生长的成份。抗菌谱试验不能用固体测定法,故采用了发酵液测定法。液体培养选用 CMS-1 号培养基或克氏合成一号培养基。

DNA 中 G+C 克分子%测定采用热变性温度法^[7]。全细胞水解液采用 Becker 等^[8-9]方法制备。采用 Yamaguchi^[10]的方法制备胞壁。全细胞与胞壁中二氨基庚二酸、氨基酸和糖类的分析均按 Becker 等^[8-9]的方法进行。其中氨基酸(特别是甘氨酸)的含量采用 121MB 氨基酸分析仪定量测定。

结 果

(一) 形态特征

将 *Frankia* sp. HR 104 菌株接种在 CMS-1 号培养基或一些简单的有机、合成培养基斜面上,一周后菌体开始生长,半月左右长成明显的菌落,一个月后菌落仍有扩大的趋势。由于菌落坚韧致密,不易挑碎,所以多用碎小的菌块接种。所形成的菌落直径为 2—10 mm,多呈瘤状凸起,略有光泽。不形成气生菌丝,基内菌丝多长在培养基表层,但在某些培养条件下,培养日久,基内菌丝也可长入培养基深处。这些条件包括培养基种类、不同 pH、不同氮源等。营养菌丝体与孢囊、孢子等颜色基本相同。

菌丝分枝有横隔,直径 0.5—1.4 μm ,它的末端、侧面或菌丝间可生成球形、卵圆形、梨形、葫芦形、谷穗形等多种形态的孢囊(图 1-1),直径 3—18 μm ,长可达 35 μm 。孢囊内在不同平面上发生纵横分裂形成孢囊孢子,成熟后便释放出来(图 1-2)。孢子呈不规则的球形或卵圆形,大小约 1.5—4 μm ,无鞭毛、不游动。在菌丝的侧面可以生成球形或卵圆形的固氮孢囊,直径 1.5—4 μm ,着生在 2—10 μm 左右的孢囊柄上(图

1-3)。在无氮培养基上,能够形成较多的孢囊,在氮源充足而又适于该菌生长的培养基上,则较少见到孢囊。菌丝、孢囊、孢子、孢囊革兰氏染色均为阳性。

在扫描电镜下可以观察到孢囊表面凹凸不平,有瘤状和丘状的凸起,在成熟孢囊的表面常可显示出囊内孢子的明显轮廓(图 1-4)。孢囊孢子的表面一般比较光滑(图 1-5),但常可出现许多皱褶(图 1-6)。孢囊表面比较光滑,但有的孢囊表面有较大的皱褶,在一些皱缩孢囊的表面一至多处出现较大的凹陷(图 1-7)。

(二) 培养特征

在高氏合成一号琼脂、酵母膏琼脂、伊莫松琼脂、无机盐淀粉琼脂、蛋白胨察氏琼脂、甘油察氏琼脂、甘油天门冬素琼脂、Jan Blom 琼脂、酪氨酸琼脂上不生长、生长可疑或生长极差。在其余 11 种培养基上的培养特征见表 1。在相应的 9 种液体培养基中的培养特征见表 2。

(三) 生理生化特性

生长温度为 10—32 $^{\circ}\text{C}$,最适温度为 27—28 $^{\circ}\text{C}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 不生长。菌丝与孢子不耐热,60 $^{\circ}\text{C}$ 7.5 分钟未见存活。pH 5—8.5 范围内可以生长,最适 pH 为 6—6.5。好气或微量好气,在液体培养基中振荡培养和静置培养均可生长,可以斜面保存。

液化明胶,胨化并凝固牛奶,在石蕊牛奶中产碱,不水解淀粉,纤维素上不生长,不产生硫化氢,不形成黑色素,还原硝酸盐为亚硝酸盐。不能以 Tween 80 作为唯一碳源;在加 1% 葡萄糖的培养基上可以生长,但加 2% 葡萄糖时生长较好,加 3% 葡萄糖时菌体增加不明显;在含 2% 葡萄糖的培养基中加 0.1—0.4% 的 Tween 80 抑制生长,并随加量的增大生长速度减慢。细胞壁对溶菌酶敏感。

利用 D-果糖、D-木糖、蔗糖、菊糖、L-

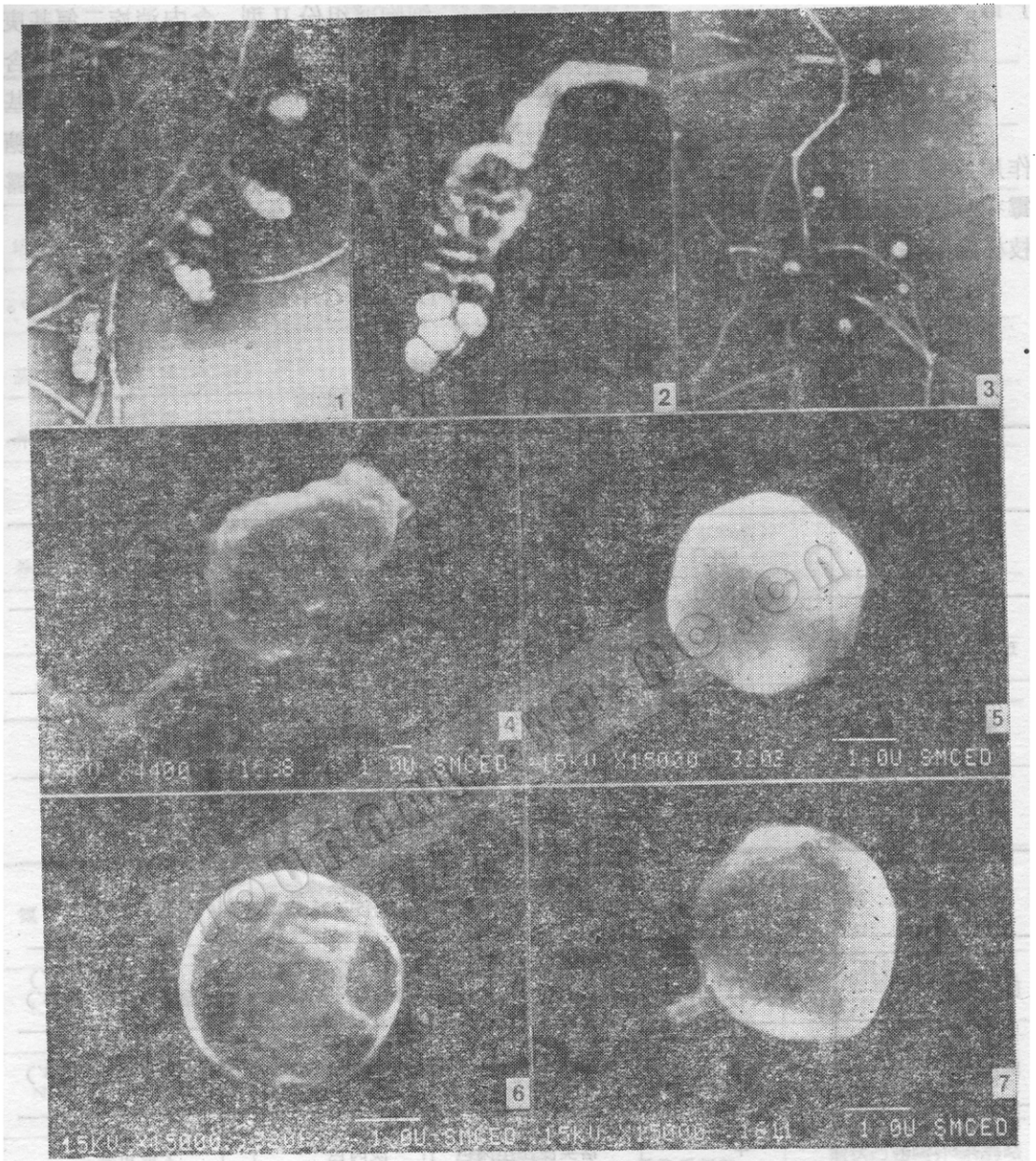


图1 HR104 菌株的菌体形态照片

Fig. 1 Micrographs of mycelial morphology of strain HR104

1—3. 光学显微镜照片：1. 菌丝和孢囊($\times 1,400$)；2. 孢囊和孢子($\times 2,450$)；3. 菌丝和固氮孢囊($\times 1,400$)。4—7. 扫描电镜照片：4. 孢囊；5,6. 孢子；7. 孢囊。

1—3. Micrographs: 1. Hyphae and sporangia; 2. Sporangium and sporangiospores; 3. Hyphae and vesicles. 4—7. Scanning electron micrographs: 4. Sporangium; 5,6. Sporangiospore; 7. Vesicle.

鼠李糖、L-阿拉伯糖、d-葡萄糖、麦芽糖；对山梨糖、甘露糖、棉子糖利用极差；对半乳糖、乳糖、甘露醇、肌醇、D-山梨醇、甘

油、糊精、淀粉、柠檬酸钠、醋酸钠不利用或利用可疑。利用D-木糖、山梨糖、麦芽糖产酸，不能利用上述其它各种糖类或醇类

产酸。

对氮源的利用见表 3。

(四) 拮抗性

对金黄色葡萄球菌有时有较弱的抑制作用;对大肠杆菌、白色假丝酵母、产金青霉有时有微弱的抑制作用;对枯草杆菌、分枝杆菌无作用。

(五) 细胞壁组份

细胞壁组份 II 型, 含内消旋二氨基庚二酸和甘氨酸。细胞壁水解物中甘氨酸含量为 0.434 mg/100mg, 其含量居各种氨基酸的第二位。全细胞水解物含有特征性糖半乳糖和木糖。此外, 还含有葡萄糖、甘露糖、核糖和鼠李糖等。

(六) DNA 的 G + C 含量

DNA 的 G + C 含量为 77.7 克分子%。

表 1 HR104 菌株的培养特征

Table 1 Cultural characteristics of strain HR104

培养基	生长	基 丝 正 面	基 丝 反 面	可 溶 性 色 素
察氏琼脂	+++	蜜黄至铁棕	瓜瓢粉至铁棕红 (II ₆ 37')	金莺黄至近似鲑鱼红 (II ₆ 26')
葡萄糖天门冬素琼脂	+++	浅桔橙 (II ₆ 16') 至菠萝红	瓜瓢粉至浅桔橙 (II ₆ 16')	微 染
苹果酸钙琼脂	++	火砖红或近似莓酱红 (II ₆ 27')	金黄至近似菠萝红 (II ₆ 27')	微 染
马铃薯琼脂	+++	陶磁红至落叶棕	黄棕 (I ₄ 25') 至 火泥棕	微染, 琥珀黄
马铃薯块	+	橡树棕至浅貂紫 (III ₆ 64')	近似余烬红 (II ₆ 45')	米 色
克氏合成一号琼脂	+++	近似桔橙 (II ₆ 16') 至铁棕	近似金黄 (II ₆ 26' 至 II ₆ 37')	淡瓜瓢粉 (I ₄ 13') 至淡玫瑰粉 (II ₆ 13')
无氮克氏合成一号琼脂	++	橙 红 (II ₆ 26' 至 II ₆ 46')	近似桔橙 (II ₆ 16')	淡玫瑰粉 (II ₆ 13')
燕麦粉琼脂	+	落英淡粉至肉色	淡肉色	无或可疑
甘油苹果酸钙琼脂	+	铁棕至近似橡树棕 (II ₆ 66')	金黄至橡树棕	可 疑
CMS-1 号琼脂	+++	北瓜黄或浅桔橙 (II ₆ 16')	肉色或浅北瓜黄 (I ₆ 2')	微染肉色
QMOD 琼脂	+++	淡肉色至浅瓜瓢粉 (I ₄ 13')	麦芽糖黄, 甘草黄	微染淡黄

注: «色谱», 科学出版社, 北京, 1957。

+++ : 生长较好; ++ : 生长; + : 生长较差; ± : 生长可疑(表 2 同)。

表 2 HR104 菌株的液体培养特征

Table 2 Cultural characteristics of strain HR104 in liquid

培养基	生长	形态	颜色	可溶性色素
察氏培养基	+++	絮团状	落英淡粉至蜜黄	微染瓜瓢粉
葡萄糖天门冬素培养基	+++	絮团状	蛋壳黄或略深 (I62')	微染蛋壳黄
苹果酸钙培养基	++	球状或絮团状	粉白至近似北瓜黄 (I62')	微染蛋壳黄
马铃薯浸汁培养基	++	球状, 结成大块	近似蜜黄 (Ia25') 至鲑鱼红	淡凋叶棕
克氏合成一号培养基	+++	球状或絮团状	淡瓜瓢粉 (Ia13') 至桔橙	微染瓜瓢粉
燕麦粉培养基	±	碎块状	粉白至近似蜜黄 (Ia25')	无
甘油苹果酸钙培养基	+	不规则的球状	粉白至粉棕 (Ia24')	无
CMS-1 号培养基	+++	球状或絮团状	玫瑰粉至瓜瓢红	微染瓜瓢粉
QMOD 培养基	±	碎块状	米色	无

表 3 HR104 菌株的氮源利用

Table 3 Utilization of nitrogen sources by strain HR104

氮源	生长	基丝正面	基丝反面	可溶性色素	菌落
KNO ₃	+++	近似桔橙 (II _a 16') 至铁棕	近似金黄 (II _a 26' 至 II _a 37')	淡瓜瓢粉 (I _a 13') 至淡玫瑰粉 (II _a 13')	中间瘤状凸起, 边缘湿润状, 有光泽
NH ₄ Cl	+++	金黄或近似金黄 (II _a 26')	近似金黄 (II _a 26')	淡肉色	疣状凸起或有皱褶, 边缘色浅, 有光泽
(NH ₄) ₂ SO ₄	+++	桔橙	深玫瑰粉 (II _a 15')	微染瓜瓢粉	瘤状凸起或有皱褶, 略有光泽
牛肉膏	+++	近似浅鹿角棕 (I _a 23')	麦芽糖黄	象牙黄 (I _b 33')	凸起, 有皱褶, 近似木耳状, 无光泽, 长在培养基表面, 较松脆
蛋白胨	+	淡象牙黄 (I _b 13')	淡象牙黄 (I _b 13')	不明显	长在表面的疣状小凸起, 较松脆
无氮源	++	浅桔橙 (II _a 16')	北瓜黄	微染	瘤状凸起, 有光泽

注: 以酵母汁为氮源不生长。

讨 论

1. Lechevalier 等^[11]曾研究过从 7 个属的非豆科植物根瘤中分离出的 14 株内生菌,认为弗兰克氏菌可分为两型,即 A 型和 B 型。HR104 菌株在生理生化特性上与 A 型菌有较多相似之处。但也有一些差异,如胞壁型不同,对寄主植物的侵染能力和形成根瘤的有效性等也不同(表 4)。

2. 迄今为止,文献所记载的弗兰克氏菌细胞壁都属于 III 型,全胞糖类型差别较大。而 HR104 菌株细胞壁为 II 型,全胞糖类型也与已研究过的菌株有较大差别。自 Lechevalier 等^[12]提出在放线菌分类中,根据胞壁型不同可以作为分类标准后,这个观点已被大多数分类学家所接受。现已

将胞壁型不同的菌划归不同的属^[13,14]。在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版中,弗兰克氏菌科(Frankiaceae)内曾经只建立一个属,即弗兰克氏菌属(*Frankia*)。现根据其胞壁型和其它的差别,我们认为可以在此科内建立不同的属。HR104 菌株与所有已研究过的弗兰克氏菌相比,似应属于不同的属。当然,这个观点必须在对两种胞壁型的菌株进行详细的比较研究后才能定论。

3. 对于一些较高等的放线菌来说,其定种原则一般是以形态和培养特征为主,生理生化特性为辅。而对那些较低等的放线菌则主要根据生理生化特性来区别不同的种。虽然弗兰克氏菌不同阶段的发育形态,尤其是孢囊的形态和孢子的分裂方式

表 4 HR104 菌株与 A 型、B 型菌的比较

Table 4 Comparison of strain HR104 with Type A and Type B

项 目		HR104 菌株	A 型	B 型
胞 壁 型		II 型	III 型	III 型
全胞糖模型		含半乳糖、木糖及其它多种糖	D 型、B 型或含非特征性糖岩藻糖或葡萄糖	D 型
回 接	侵染能力	有	有或无	有
	根瘤有效性	有效	无效	有效
淀粉水解		不水解	水解或部分水解	水解或部分水解
利用各种糖和产酸		可以利用多种高糖,大部分不产酸	可 以	大部分不利用
色 素		有 色	有 色	无 色
以 Tween 80 为唯一碳源		不 可 以	不 可 以	可 以
在培养基中加 Tween 80		抑制生长	抑制生长	生长快
需 氧 性		好气或微量好气,可以斜面保存	好气,可以斜面保存	严格微量好气,不能斜面保存
在培养基内孢囊的形成		在无氮培养基上容易形成	大部分形成	需特殊条件才能形成

比较特殊, 但用不同的分离方法, 从不同寄主植物根瘤中所分离到的菌株在形态上有何差异, 目前尚没有定论。而以培养特征作为定种的依据, 现在看来也有困难。因为一部分弗兰克氏菌可以在固体培养基上生长, 但另一部分菌株只适宜在液体培养基中, 这就难以对其培养特征作统一的比较, 这方面的工作还有待于进一步探索。弗兰克氏菌的分类较为复杂, 任何单一的指征作为分类的基础都不够全面。必须在研究大量的菌株后, 根据其形态和培养特征、综合生理生化特性, 甚至还可能有菌体生长的快慢, 好气与微量好气、与寄主的关系等, 进行全面分析, 才可能作出定种的分类指征。

参 考 文 献

[1] Buchanan, R. E. and N. E.: Gibbons, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,

8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 701—706, 1974.

- [2] 杜大至等: 微生物学报, **24**(1): 41—45, 1984.
 [3] 杜大至, 王毅岩: 微生物学报, **23**(4): 347—350, 1983.
 [4] 阮继生: 《放线菌分类基础》, 科学出版社, 北京, 1977。
 [5] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组: 《链霉菌鉴定手册》, 科学出版社, 北京, 1978。
 [6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 《链霉菌常用鉴定方法》, 科学出版社, 北京, 1978。
 [7] 林万明等: 微生物学通报, **8**(5): 245, 1981。
 [8] Becker, B. et al.: *Appl Microbiol.*, **12**(5): 421—423, 1964.
 [9] Becker, B. et al.: *Ibid.*, **13**(2): 236—243, 1965.
 [10] Yamaguchi, T.: *J. Bacteriol.*, **89**(2): 444—453, 1965.
 [11] Lechevalier, M. P. et al.: Presented at the Fifth International Symposium on Actinomycetes Biology, 1982.
 [12] Lechevalier, M. P. and H. Lechevalier: *International Journal of Systematic Bacteriology*, **20**(4): 435—443, 1970.
 [13] Omura, S. et al.: *J. Antibiotics*, **35**(8): 1013—1019, 1982.
 [14] 张国伟等: 微生物学报, **24**(3): 189—194, 1984.

TAXONOMIC STUDIES ON *FRANKIA* SP. HR104

Du Dazhi Yuan Fuhu

Li Ronger Wang Yiyan Cui Guoliang

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan)

Frankia sp. HR 104 was isolated from root nodules of *Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi. The organism can infect its host plant, and form nitrogen-fixing nodules on the roots. Based upon its morphological, cultural characteristics, physiological biochemical properties, cell wall composition and GC mole % of DNA, it differs from other *Frankia* species which had been studied and described in cell

wall type and whole-cell sugar pattern. It may be considered as a new genus of Frankiaceae.

The taxonomic principle and identification method of *Frankia* are also discussed.

Key word

Frankia