

## 链球菌属的一个新种

周东坡 平文祥 宋秀娟 史玉英 陈宏伟\*

(齐齐哈尔师范学院生物系, 齐齐哈尔)

邵忠琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自君子兰 (*Clivia miniata*) 软腐病病株的叶片病灶中分离到两株致病菌。经鉴定其中一株 (85-2) 多为双球状, 也有呈单个存在, 极少为四个细胞相连的短链。无芽孢, 无鞭毛, 不运动, 革兰氏染色阳性, 抗酸染色阴性, 兼性厌氧生长; 可从多种糖类产酸, 但不产气; 接触酶和苯丙氨酸脱氨酶均为阴性; 不液化明胶, 还原石蕊牛奶并凝固、陈化; 生长温度范围为 15—53℃, DNA 中 G + C 含量为 41.7mol%。由于其性状与链球菌属的各已知种均不相同, 故定为一个新种, 命名为君子兰链球菌 (*Streptococcus miniatus* Zhou, Ping et Shao sp. nov.)。

**关键词** 链球菌属; 君子兰链球菌

1985 年, 由广州园艺研究所带回的“黄和尚”君子兰软腐病患株叶片, 在病灶处用无菌操作程序分离到两种细菌。又以 Koch 证病律 (Koch's Postulats) 为依据, 用此二菌株分别针刺重复感染健康君子兰植株叶片, 待发同样典型病症 (在针刺点周围出现水浸状腐烂斑, 由小到大蔓延, 乃至叶片脱落) 后, 再从患叶病灶中重新分离病原菌。确证此二菌株均为君子兰软腐病的病原菌。从这两株菌的有关特征分析, 均不属于已报道植物病原菌的五个属之内的任何一属<sup>[1,2]</sup>。其中一株 (85-2) 经鉴定为链球菌属的一个新种, 定名为君子兰链球菌 (*Streptococcus miniatus* Zhou, Ping et Shao sp. nov.)。现将其鉴定结果报告如下。

### 材料和方法

#### (一) 菌株来源

样品采自广州园艺研究所养育的三年生“黄和尚”君子兰软腐病患株的叶片病灶处。在 CM 培养基<sup>[3]</sup> 平皿上分离并纯化, 得到菌落形态与菌

体形态基本一致的纯种, 编号为 85-2。然后, 在温室中用 85-2 株的液体培养物针刺接种于健康君子兰的叶片上。待出现同样病症后, 再于病灶中重新按无菌操作程序分离此病原菌, 进行鉴定。

#### (二) 鉴定方法

主要根据《细菌分类基础》<sup>[4]</sup>、《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[5]</sup> 及其它参考书<sup>[6-8]</sup> 中介绍的有关方法。

##### 1. 形态特征观察:

(1) 个体形态: 将待鉴定菌株接于改良的 CM 培养基 (酵母膏为 1%、葡萄糖为 2%, 下同) 上, 35℃ 培养 12—36h, 用光学显微镜 (Olympus BHT312) 及透射电镜 (日立 H500 型) 观察个体形态, 并测量菌体大小。

(2) 菌落形态: 将菌种经适当稀释后涂布于改良的 CM 平皿上, 置 35℃ 温箱中培养 48h, 观察菌落形态, 并用游标卡尺测量菌落大小。

##### 2. 生理生化性状测定:

(1) 生长温度: 将已活化的待鉴定菌株液体培养物定量 (0.2%) 转接于改良的 CM 液体小三

本文于 1987 年 11 月 13 日收到。

\* 宋秀娟、陈宏伟、史玉英为八一、八二级学生。  
本文承蒙王大程先生审阅并指导, 特此致谢。

角瓶中,分别置于 4、10、15、20、25、30、33、35、37、40、45、50、53、55℃ 低温浴槽(KF-2型)或温箱中恒温培养 48h,观察生长情况,用 72-1 型分光光度计分别测定培养前与培养后菌液的浓度。对于 10、15、53、55℃ 等临界温度值,在相同条件下连续转接三次,并分别测定每次培养前与培养后的浓度,确证生长与否。

(2) 需氧性测定: ① 参照 Cappuccino 和 Sherman<sup>[9]</sup> 的方法进行培养试验。② 用焦性没食子酸法<sup>[10]</sup>并加以改良: 即 a. 将培养皿放入熔化的大蜡盘中代替封口; b. 在同一培养皿中分成三区,分别接上已知的专性好氧菌,兼性厌氧菌,加以对照。

(3) 运动性测定: ① 采用改良的 CM 半固体穿刺培养法(兼测其需氧特性); ② 悬滴镜检法观察。

(4) 糖发酵试验: 参照 Crabtree 的方法<sup>[11]</sup>, 在 TYE 培养基中,分别加入终浓度为 2% 的蔗糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、木糖、果糖、菊糖、山梨糖、山梨醇、鼠李糖、阿拉伯糖、棉子糖,酵母膏用量增至 1%。35℃ 培养 2、3、6d 观察结果。

同时用纸层析法<sup>[4]</sup>检测发酵产物。

(5) 苯丙氨酸脱氨酶测定: 参照 Gontcharoff<sup>[12]</sup> 的方法进行。

(6) 耐盐能力测定: 将充分活化的待测菌种分别接于含有 2%、6.5%、15% 的 NaCl 的改良 CM 液体中, 35℃ 恒温培养 7d, 观察菌体生长情况,并依同样条件连续转接三次,观察结果。

(7) 耐酸碱度试验: 将充分活化的待测菌种分别转接于灭菌后以 PHS-2 型酸度计测定其 pH 值分别为 5.2、6.3、7.7、8.6、9.6、9.8 的改良 CM 培养基中,培养 48h,再用 72-1 型分光光度计测定菌体生长量,同时镜检球菌排列状况有无变化。对于临界 pH 值,按同样条件连续转接三次,观察结果。

### 3. DNA 中碱基组成测定:

用岛津 UV-250 型紫外分光光度计,以大肠杆菌 AS 1.365 作对照菌,通过  $T_m$  值法测定 85-2 菌株 DNA 的 G+C 含量百分比。

## 结 果

### (一) 个体形态特征

85-2 菌株的细胞呈球形,直径为 1—1.25 $\mu\text{m}$ ,多为成对排列,也有呈单个存在,极少为四个细胞相连的短链状(图 1、2)。无论在中性改良 CM 液中,还是在酸性改良 CM 液中(pH5.2 或 pH6.3)培养,其菌体的四个细胞相连的短链状均未见增多。革兰氏染色阳性,抗酸染色阴性。

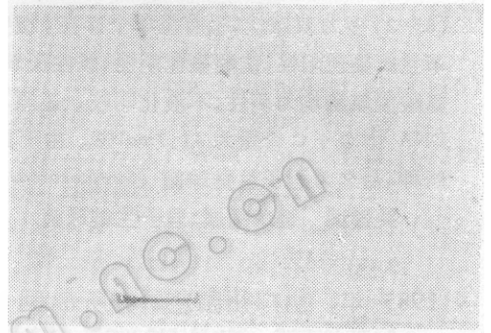


图 1 85-2 菌株菌体形态

Fig. 1 The shape of strain 85-2 (标尺=10 $\mu\text{m}$ )

### (二) 培养特征

85-2 号菌株在改良的 CM 平皿上菌落呈圆形,高凸起边缘整齐,直径 0.7—1.5 mm,白色或乳白色,湿润而有光泽,不透明。

在改良的 CM 液体培养基中生长不形成菌醭,而形成沉淀,并轻度混浊。

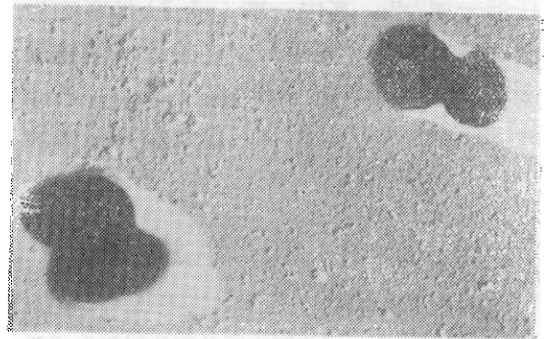


图 2 85-2 菌株菌体形态 (TEM) (10,000 $\times$ )

Fig. 2 The shape of strain 85-2

表 1 85-2 菌株在不同温度下培养菌液光密度值与生长状况

Table 1 The growth state and optical density (OD) of strain 85-2 under different temperatures

培养温度(°C) Temperature	OD <sub>570nm</sub>				生长判定 Judgment of growth
	1	2	3	平均 Average	
4	0.035	0.034	0.035	0.035	-
10	0.035	0.036	0.034	0.035	-
15	0.72	0.77	0.80	0.76	+
20	0.80	0.85	0.82	0.82	+
25	0.82	0.84	0.79	0.82	+
28	0.86	0.88	0.88	0.87	++
30	0.89	0.95	0.94	0.93	++
33	0.88	0.94	0.96	0.93	++
35	0.96	1.00	1.00	0.99	+++
37	0.90	1.00	1.00	0.97	+++
40	0.80	0.90	0.96	0.89	++
45	0.84	0.84	0.86	0.85	++
50	0.76	0.80	0.84	0.80	+
53	0.60	0.61	0.62	0.61	+
55	0.045	0.038	0.041	0.041	-
60°C, 30' 后较 35°C Incubation in 35°C after 60°C 30'	0.80	0.86	0.85	0.84	++

表 2 85-2 菌株在不同 pH 条件下培养液的光密度值及生长情况

Table 2 The growth state and optical density (OD) of strain 85-2 in the liquid media of different pH values

初始 pH Initial pH	OD <sub>570nm</sub>				生长判定 Judgment of growth
	1	2	3	平均 Average	
5.2	0.50	0.49	0.52	0.50	+
6.3	0.55	0.53	0.58	0.55	+
7.7	0.76	0.69	0.71	0.72	++
8.6	0.74	0.61	0.60	0.65	++
9.6	0.11	0.26	0.12	0.16	+
9.8	0.05	0.06	0.07	0.06	-

### (三) 生理生化特性

1. 生长温度: 85-2 菌株生长温度范围为 15—53°C, 其最适生长温度为 35—37°C, 最低生长温度为 15°C, 最高生长温度为 53°C (表 1)。

2. 需氧性测定结果: 该菌属于兼性厌氧菌, 按 Cappuccino 等的方法, 在整个固体试管中该菌从上至下基本呈均匀分布生

长; 使用改良的焦性没食子酸法与半固体穿刺法结果也相同。

3. 运动性观察结果: 两种方法均证明该菌无运动性。

4. 生理生化反应与耐盐能力: 在有氧情况下, 测定了该菌某些生理生化反应与耐盐能力。结果表明: 85-2 号菌接触酶、苯丙氨酸脱氨酶阴性, 果胶酶阳性; M. R.

试验阳性, V. P. 试验阴性; 不产生  $H_2S$ 、不水解淀粉、不液化明胶, 不利用柠檬酸盐; 能还原硝酸盐; 能还原、胨化石蕊牛奶; 能发酵葡萄糖、蔗糖、半乳糖、乳糖、麦芽糖、果糖、甘露糖, 但均不产气; 不能发酵木糖、菊糖、山梨糖、山梨醇、鼠李糖、阿拉伯糖、棉子糖。85-2 菌株能在含 6.5% NaCl 的培养基中生长, 但在含 15% NaCl 的培养基中不能生长。

#### 5. 开始生长的 pH 值范围:

该菌株在初始 pH 5.2—9.6 的条件下均可生长。培养 48h 后的菌液生长量见表 2。

6. DNA 中 G + C 含量: 经用解链温度法测定, 该菌株 DNA 的  $T_m$  值为 70.4—70.8°C, G + C 含量平均为 41.7mol% (41.2—42.2mol%)。

## 结论与讨论

1. 所鉴定的 85-2 菌株, 按其成对排列的球状, 无运动性, 糖发酵产酸不产气, 营

同型发酵产乳酸, 适当液体培养基中生长不形成菌膜, 且菌体四个细胞相连的短链状排列者无明显增加, 兼性厌氧, 硝酸盐还原阳性, 接触酶阴性, 细胞在一个平面上分裂等特征, 依据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)<sup>[8]</sup>可将其归入链球菌科 (Streptococaceae) 链球菌属 (*Streptococcus*)。

2. 在这个属的已知种中, 10°C 条件下不生长, 53°C 条件下生长, 可忍耐 63°C 高温 30min, 且能在 6.5% NaCl 培养基、pH 9.6 培养基中与 0.1% 次甲基蓝牛奶液中生长, 并可以产生果胶酶的种是未见报道的, 而 85-2 菌株具有这些特征, 可在其中生长。

85-2 菌株与相似种的特性比较见表 3。

3. 综上所述, 我们认为 85-2 菌株应定为新种, 根据其来源命名为君子兰链球菌 *Streptococcus miniatus* Zhou, Ping et Shao sp. nov.

模式菌株存放于齐齐哈尔师范学院生

表 3 85-2 菌株与链球菌属内相似种的生理生化特性比较

Table 3 Comparison of the physiological and biochemical characteristics of 85-2 with similar strains in the genus *Streptococcus*

菌名 Name of strains	温度 (°C)			6.5% NaCl	pH 9.6	0.1% 次甲基蓝牛奶 MBM	发酵 Fermentation			G + C content mol%	分解 Decomposition	
	10	45	50				阿拉伯糖 Arabinose	山梨糖 Sorbitol	山梨醇 Sorbitol		淀粉 Starch	果胶 Pectin
Strain 85-2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	41.7	-	+
<i>S. salivarius</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	39—42	-	-
<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	38—42	-	-
<i>S. bovis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	38—42	-	-
<i>S. equinus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	38—42	-	-
<i>S. thermophilus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	38—42	-	-
<i>S. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	33.5—38	-	-
<i>S. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	34—40	-	-
<i>S. avium</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	38.4—38.6	-	-
<i>S. uberis</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	38.4—38.6	-	-
<i>S. lactis</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	38.4—38.6	-	-
<i>S. cremoris</i>	+	-	-	-	-	±	-	-	-	38—40	-	-

物系(菌株代号 QB 102)。

### 参 考 文 献

- [1] 浙江农业大学: 植物检疫, 上海科学技术出版社, 上海, 第 333—338 页, 1979。
- [2] 南京农学院植保系: 植物病害诊断, 农业出版社, 北京, 第 137—140 页, 1980。
- [3] 周东坡等: 微生物学杂志, (4): 51—54, 1985。
- [4] 王大昶: 细菌分类基础, 科学出版社, 北京, 第 101—111 页, 130—160 页, 1977。
- [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, 第 98—193 页, 1978。
- [6] Kiraly, Z. 等编著(林传光译): 植物病理学方法, 科学出版社, 北京, 第 123—143 页, 1976。
- [7] Skerman, V. B. D. 著(蔡妙英等译): 细菌属的鉴定指导, 科学出版社, 北京, 第 293—378 页, 1978。
- [8] John, G. H.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 187—209, 1974.
- [9] Cappuccino, J. G. et al.: Microbiology—A Laboratory Manual, Addison-Wesley Publishing Co., pp. 11—113, 1983.
- [10] 无锡轻工业学院等编: 微生物学(工业发酵专业用), 轻工业出版社, 北京, 第 338—339 页, 1983。
- [11] Crabtree, K. T. et al.: Fundamental Experiments in Microbiology, W. B. Saunders Co., pp. 127—133, 1974.
- [12] Gowtcharoff, N. 著(徐浩译): 异养细菌鉴定的检索与方法, 科学出版社, 北京, 第 47 页, 1974。

## A NEW SPECIES OF GENUS *STREPTOCOCCUS*

Zhou Dongpo Ping Wenxiang Song Xiujuan

Shi Yuying Chen Hongwei

(Department of Biology, Qiqihar Teacher's College, Qiqihar)

Shao Zhongqi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Two strains of pathogenic bacteria were isolated from the foci of soft rot in scarlet kafirlily leaf. One of them, No. 85-2, is a Gram-positive, acid-fast-negative, non-spore-forming, without flagellium and motility, facultative anaerobion, and coccus in chain consisting of four cells. Many kinds of carbohydrates can be utilized, but no gas is produced. Gelatin can not be liquefied. Catalase and phenylalanine deaminase are negative. Litmus milk is reduced, coagulated and pe-

ptonized. Growth is found in the range of temperature between 15°C and 53°C. G+C content in DNA is 4.7 mol%. The strain (85-2) is considered to be a new species because its some characteristics are different from the known species of genus *Streptococcus* and designated as *Streptococcus miniatus* Zhou, Ping et Shao sp. nov.

### Key words

*Streptococcus*; *Streptococcus miniatus*