

## 芽殖和/或附属物细菌群中的一个新属

周慧玲 周宇光 肖昌松

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从我国江苏省如东县掘东垦区大米草根内分离到一株氧化型革兰氏阴性细菌, 编号 4088。该菌株具有两种出芽繁殖方式: 子细胞主要从母细胞顶端长出柄状附属物, 这种附属物末端膨大形成子细胞和直接从母细胞上生长出子细胞(约占 20%)。细胞内有聚  $\beta$ -羟基丁酸盐颗粒。细胞外有荚膜。菌落产生  $\beta$ -胡萝卜素黄色素。呼吸型代谢, 从不发酵。好氧生长, 无氮情况下行微好氧生长。能沉淀铁锰。能固定大气中的氮。有机化能营养。从糖类和醇类产碱而不产酸。不利用甲醇、甲酸为唯一碳源。DNA 中 G + C 含量为 70.1—70.4mol%。

根据以上特性 4088 菌株与芽殖和/或附属物细菌群中的某些属相近, 但出芽繁殖方式不同于已知属。因此, 将 4088 菌株归属于芽殖和/或附属物细菌群中的一个新属——双殖菌属 (*Dipareforma* gen. nov. Zhou et al.), 模式种为米草双殖菌 (*Dipareforma spartinaceae* sp. nov. Zhou et al.)。菌种保藏于中国科学院微生物研究所菌种保藏室。菌株编号为 AS 1.1762。

关键词 芽殖和/或附属物细菌; 双殖菌属; 米草双殖菌; 固氮

1980 年, 在分离非共生固氮菌时, 从大米草根内分离出编号为 4088 的一株氧化型革兰氏阴性细菌。从该菌株的出芽繁殖方式看, 应属于芽殖和附属物细菌群, 但尚未见有关 4088 菌株的两种出芽繁殖方式的报道, 因此建立新属。现将鉴定结果报告如下:

### 材料与方法

#### (一) 菌株

样品采自江苏省如东县掘东垦区大米草根内, 分离培养基为 Döbereiner 氏及 Ashby 氏无氮培养基, 经反复纯化获得菌落形态和镜检细胞形态一致的纯菌, 试验菌种分别接种于 Döbereiner 氏苹果酸钠琼脂<sup>[1]</sup>, 陈琥珀酸盐 (PSS)<sup>[2]</sup>, 蛋白胨-酵母膏 (YP)<sup>[3]</sup> 及牛肉汁酵母膏琼脂斜面培养基, 置 30℃ 培养 24—48 小时后观察形态以及进行 DNA 碱基百分比, 生理生化特

性等的测试。

#### (二) 鉴定方法

主要根据《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[4]</sup> 及《链霉菌鉴定手册》<sup>[5]</sup> 和参考 Döbereiner<sup>[1]</sup>, Hylemon<sup>[2]</sup>, Oyaizu<sup>[3]</sup>, Berry<sup>[6]</sup> 的文献中所介绍的有关方法。

##### 1. 形态特征:

(1) 个体形态: 在牛肉汁酵母膏、YP 和 PSS 琼脂培养基上, 30℃ 培养 24—48 小时后, 用光学显微镜、透射电子显微镜(用磷钨酸钠染色)观察, 并测量细胞大小。检查聚  $\beta$ -羟基丁酸盐的积累, 采用 Döbereiner 氏无氮培养基, 常规方法染色<sup>[6]</sup>。

(2) 菌落形态: 在 YP 平板上培养 6 天后, 观察菌落颜色<sup>[7]</sup>并测量大小。

本文于 1990 年 11 月 9 日收到。

本所柏长祥同志参加部分工作; 初昭桥同志摄制电镜照片; 北京市农业科学院周祺同志测定固氮酶活性; 南京大学郁文煥、曹幼琴同志参加采集样品和分离菌种, 特此一并致谢。

## 2. 生理生化特性:

(1) 生长温度: 用 PSS 培养液 30℃ 培养 24 小时的菌种, 直针接种 PSS 澄清液, 分别置 3—4℃ 冰箱, 10—13℃ 低温室, 20℃ 和 25℃ 温箱, 28、30、35、37 和 41℃ 水浴中, 一周内观察生长情况。

(2) 生长 pH: 在 Beckman pH 计测试下, 用稀盐酸及稀 NaOH 将 PSS 培养液的 pH 值调到 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0, 分别分装试管, 1kg/cm<sup>2</sup> 30 分钟灭菌。灭菌后, 分别抽样测定培养液的 pH 值, 以此 pH 值为准。用 30℃ 培养 24 小时的液体菌种接种, 每管一小环, 置 30℃ 培养 2、4 和 7 天, 检查浊度。

(3) 趋氧性: 将培养 24 小时的菌液, 混于有 0.2% 琼脂的 Döbereiner 氏无氮及 PSS 培养基中, 一周内观察生长情况。

(4) 碳源的利用: 以无机盐<sup>[4]</sup>为基础培养基, 所用碳源有以下 25 种 (0.2%): 葡萄糖、木糖、麦芽糖、甲醇、甲酸、醋酸钠、丙酸、丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、己酸、丙二酸、柠檬酸钠、琥珀酸钠、苹果酸钠、反丁烯二酸、马尿酸钠、氨基乙酸、脯氨酸、精氨酸、2,3-丁二醇、甜菜碱和酪胺。将培养 24 小时的菌种, 用直针接种, 置 30℃ 在原培养液中连续转接两次, 两周内观察其生长情况。

(5) 碳水化合物产酸: 在休和利夫森二氏培养基<sup>[4]</sup>中, 分别加入 1% 的核糖、葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、乳糖、鼠李糖、山梨糖、麦芽糖、蔗糖、蜜二糖、纤维二糖、海藻糖、棉子糖、淀粉、糊精、菊糖、糖原、乙醇、甘油、卫矛醇、2,3-丁二醇、阿东醇、柳醇、肌醇、甘露醇、山梨醇和赤藓醇。于 30℃ 培养, 两周内观察结果。

(6) 色素: 常法观察荧光。用异丙醇

提取色素, 用  $\beta$ -胡萝卜素 ( $\beta$ -Carotin, E. Marck) 为标准样品, 用紫外分光光度计检查。

(7) 耐盐力试验: 在 PSS 培养液中分别加入 (%): 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 的 NaCl, 直针接种后, 于 30℃ 培养 3 周, 观察其生长情况。

(8) 脱氧核糖核酸酶 (DNase) 的检查: 系采用 DNase 培养基(g): 胰液 15, 大豆胰 5, NaCl 5, DNA 2, 甲基胺蓝 0.1, 琼脂 15, 蒸馏水 1000ml, pH7.2, 0.6kg/cm<sup>2</sup> 20 分钟灭菌。将培养 24 小时的菌种点种或划线接种, 置 30℃ 培养 24—48 小时观察结果。菌落周围呈红紫色为阳性反应。

(9) 脂肪酶检查: 系采用铜皂形成法<sup>[4]</sup>。

(10) 固氮酶活性的测定: 用乙炔还原法。

(11) DNA 中碱基含量测定: 用解链温度法 (T<sub>m</sub>) 测定 DNA 中 G + C 含量, 对照菌株为大肠埃希氏菌 K12。

## 结 果

### (一) 形态和培养特征

细胞杆状, 卵圆 (图版 I-1), 大小为 0.8—1.0  $\times$  1.1—1.5  $\mu$ m, 子细胞卵圆状近球状或杆状 (图版 I-6, 图版 II), 大小为 0.2—0.6  $\times$  0.3—1.0  $\mu$ m, 有的细胞顶端长出柄状附属物 (图版 I-2-4, 图版 II-11), 细胞内有聚  $\beta$ -羟基丁酸盐颗粒 (图版 I-1), 有荚膜, 不运动。在 YP 琼脂平板上的菌落: 30℃ 培养 6 天的菌落小, 直径 1—2  $\mu$ m, 不产生荧光色素, 而产生  $\beta$ -胡萝卜素 (图 1)。

### (二) 生理生化性状

4088 菌株属于需氧菌, 但在无氮半固体琼脂中可行微好氧生长, 生理生化特性见表 1。

### (三) DNA 中 G + C 含量的测定

DNA 中 G + C 含量为 70.1—70.4 mol%。

## 讨 论

4088 菌株芽殖方式主要从菌丝顶端膨大形成子细胞和从母细胞上形成芽(占 20%)两种,产生黄色素,不利用单碳化合物,能固定大气中氮。DNA 中 G + C 含量为 70.1—70.4 mol%。根据 4088 菌株出芽繁殖特点应归入芽殖和/或附属物细菌群中。

自 1935 年 Henrici Johnson 首先提出有附属物的一群细菌,成立新目——柄细菌目 (Caulobacteriales), 直至 Houwink (1951)、Pate 和 Ordal (1965)、Poindexter (1964) 用电子显微镜发现附属物柄是细胞壁的延伸物。例如,柄细菌属的柄,生丝微菌属的附属物。后由 Staley (1968) 将多附

属物菌突柄微菌属 (*Prosthecomicrobium*) 及臂微菌属 (*Ancalomicrobium*) 也放入原核生物,同时提出了突柄 (*Prosthema*) 这个名词。这群菌在《伯杰细菌鉴定手册》第七版<sup>[7]</sup>中,归入生丝微菌目 (*Hyphomicrobiales*) 中;在《伯杰细菌鉴定手册》第八版<sup>[8]</sup>中,放入芽殖和/或附属物细菌的第四部分中,取消以前建立的目、科界线,组成各个平行的属。而 Staley<sup>[9]</sup> 也同意这样的处理,根据芽殖的方式、突柄着生部位、性状、形式、细胞形状、营养要求等分成 6 个群 19 个属。

根据 Staley<sup>[9]</sup> 等所列出的 19 个属及《伯杰氏系统细菌学手册》1989 年版<sup>[10]</sup> 所列出的资料,4088 菌株与某些属相近,但又有明显的区别(见表 2)。我们认为,由于这些差别不能将 4088 菌株归入土微菌属、生丝微菌属和生丝单胞菌属内,而建立一新属——双殖菌属 (*Dipareforma* gen. nov. Zhou et al.), 模式种: 米草双殖菌 (*Dipareforma spartinacae* sp. nov. Zhou et al.)。菌种保藏于中国科学院微生物研究所菌种保藏室,菌株编号为 AS 1.1762。

### 双殖菌属 新属

*Dipareforma* gen. nov. Zhou et al.

细胞杆状、卵圆,大小为 0.8—1.0 × 1.1—1.5 μm。子细胞卵圆形,近球状或杆状,大小为 0.2—0.6 × 0.3—1.0 μm。以出芽方式繁殖,直接从母细胞出芽形成子细胞,或从母细胞顶端长出柄状附属物,有的突柄具分隔,在这种附属物顶端膨大形成子细胞,或在母细胞上同时存在这两种芽殖方式。革兰氏阴性,细胞内积累聚 β-羟基丁酸盐颗粒,不运动,有荚膜。在 YP 琼脂培养基上生长中度。菌落圆形,直径为 1—2 mm。产生 β-胡萝卜素。

呼吸型代谢,从不发酵,好氧生长,无

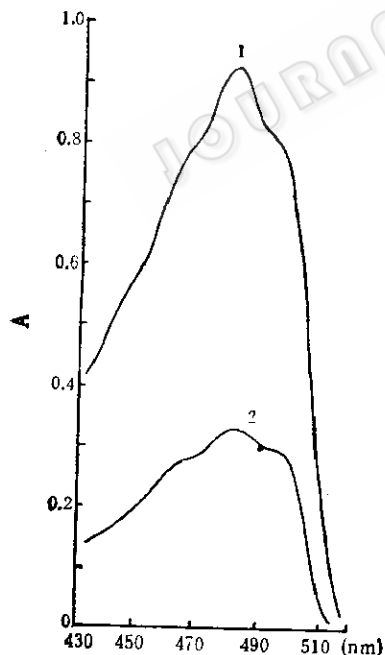


图 1 β-胡萝卜素吸收光谱

Fig. 1 The absorption of β-carotene

1. β-胡萝卜素 carotene 2. 4088 菌株的提取物 The extract of strain No. 4088

表 1 菌株 4038 生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain No.4038

测试项目 Test	反应结果 Reaction	测试项目 Test	反应结果 Reaction
葡萄糖氧化发酵 Oxidation-fermentation test	氧化型 oxidative	氧化酶 Oxidase	+
碳水化合物氧化分解 Oxidative dissimilation of carbohydrates		过氧化酶 Catalase	+
核糖 Ribose	产碱 alkaline	脲酶 Urease	-
葡萄糖 Glucose	产碱 alkaline	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-
果糖 Fructose	产碱 alkaline	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-
木糖 Xylose	产碱 alkaline	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
阿拉伯糖 Arabinose	产碱 alkaline	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	+
半乳糖 Galactose	产碱 alkaline	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+
甘露糖 Mannose	产碱 alkaline	脱氧核糖核酸酶 DNase	-
乳糖 Lactose	产碱 alkaline	脂肪酶 Lipase	-
鼠李糖 Rhamnose	产碱 alkaline	固氮酶 Nitrogenase	+
山梨糖 Sorbose	产碱 alkaline	在 KCN 培养基中生长 KCN(growth on)	-
麦芽糖 Maltose	产碱 alkaline	生长温度 Growth temperature(°C)	
蔗糖 Sucrose	产碱 alkaline	2-4,10-13,41,42	-
蜜二糖 Melibiose	产碱 alkaline	20-25,28,30,35,37(最适温度 30°C)	+
纤维二糖 Cellulobiose	产碱 alkaline	生长 pH Growth pH	
海藻糖 Trehalose	产碱 alkaline	4.5-4.5,10.0-12.0	-
松三糖 Melizilose	产碱 alkaline	6.0-9.0(最适 7.5)	+
棉子糖 Raffinose	产碱 alkaline	耐 NaCl 能力 NaCl tolerance(%)	
淀粉 Starch	产碱 alkaline	0-1.5	+
糊精 Dextrin	产碱 alkaline	2.0-3.0	-
菊糖 Inulin	产碱 alkaline	碳源的利用	
糖原 Glycogen	产碱 alkaline	Carbon sources used for growth	
乙醇 Ethanol	产碱 alkaline	葡萄糖 Glucose	+
甘油 Glycerol	产碱 alkaline	木糖 Xylose	+
卫矛醇 Dulcitol	产碱 alkaline	麦芽糖 Maltose	+
2,3-丁二醇 2,3-butyleneglycol	产碱 alkaline	甲醇 Methanol	-
阿东醇 Adonitol	产碱 alkaline	甲酸 Formate acid	-
水杨苷 Salicin	产碱 alkaline	醋酸钠 Sodium acetate	+
肌醇 Inositol	产碱 alkaline	丙酸 Propionic acid	-
甘露醇 Mannitol	产碱 alkaline	丁酸 Butyric acid	-
山梨醇 Sorbitol	产碱 alkaline	异丁酸 Iso-butyric acid	-
中赤藓醇 Meso-erythritol	产碱 alkaline	正戊酸 Valeric acid	-
产生吲哚 Indole production	-	异戊酸 Iso-valeric acid	-
甲基红试验 Methyl red test	-	$\alpha$ -酮戊二酸 $\alpha$ -Ketoglutaric acid	+
VP	-	己酸 Caproic acid	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	丙二酸盐 Malonate	-
厌氧硝酸盐生长、产气 Denitrification	-	柠檬酸钠 Sodium citrate	+
从半胱氨酸及三糖铁产生 H <sub>2</sub> S	-	琥珀酸钠 Succinate	+
H <sub>2</sub> S from Cysteine (TSI)	-	苹果酸钠 Sodium malate	-
石蕊牛奶 Litmus milk	产碱 alkaline	反丁烯二酸 Fumaric acid	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	马尿酸钠 Hippurate	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	氨基乙酸 Aminoacetic acid	-
荧光产生 Fluorescent	-	脯氨酸 Proline	-
聚 $\beta$ -羟基丁酸盐	+	精氨酸 Arginine	+
Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate		2,3-丁二醇 2,3-butyleneglycol	-
水解七叶苷 Fesculin hydrolysis	-	甜菜碱 Betaine	-
		酪蛋白 Casein	+

表 2 菌株 4088 与有关属的区别

Table 2 Differential characteristics of strain No. 4088 from related genera

性 状 Characteristics	生丝微菌属 ( <i>Hyphomicrobium</i> )	生丝单胞菌属 ( <i>Hyphomonas</i> )	土微菌属 ( <i>Pedomicrobium</i> )	No.4088
在突柄(菌丝)顶端出芽 Budding at tips of prosthecae (hyphae)	+	+	+	+
在细胞任何位置长出突柄 Prosthecae produced from all location on cell surface	-	-	+	-
从母细胞直接形成子细胞 Daughter cell produced from the mother cell directly	-	-	-	+
子细胞有鞭毛 Flagella on daughter cell	+	+	+	-
突柄有分隔 Septa formed in prosthecae	-	-	-	+
细胞内有聚 $\beta$ -羟基丁酸盐颗粒 Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules occurring in cell	+	-	+	+
有荚膜 Encapsulated				+
产黄色素 Yellow pigment produced	-	-	-	+
利用 Cl 化合物 Utilization of Cl compounds	-	+	D	-
需要氨基酸生长 Amino acid required for growth	+	-	-	-
沉淀铁锰 Iron and manganese deposited	-	-	+	+
专性好氧 Obligate aerobes	-	+	+	+
微好氧 Microaerophiles	-	-	-	+
固氮酶 Nitrogenase	-	-	-	+
DNA 中 G + C 克分子%(Tm) mol% G + C of DNA	59-65	57-62	62-67	70.1-70.4
生态环境 Habitat	土, 污水 soil, sewerage	海水 seawater	水, 土 freshwater, soil	大米草根内 insideroot of spartina anglica

氮时行微好氧生长, 能固定大气中的分子氮, 有机化能营养, 不利用单碳化合物(甲醇、甲酸)为唯一碳源。

DNA 中 G + C 含量为 70.1—70.4 mol%(Tm)。

模式种: 米草双殖菌 (*Dipareforma*

*spartinacae* sp. nov. Zhou et al.)。

米草双殖菌 新种

*Dipareforma spartinacae* sp.  
nov. Zhou et al.

形态, 培养特性和繁殖方式的描述同

属。生理生化性状见表 1。

生长温度范围: 20—37℃, 最适温度 30℃。

生长 pH 范围: 6.0—9.0, 最适 pH 7.5。

能沉淀铁锰。

DNA 中 G + C 含量为 70.1—70.4 mol% (Tm)。

生态环境: 东海海滩大米草根内。

## 参 考 文 献

- [1] Döbereiner, J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 22(10): 1464—1473, 1976.
- [2] Hylemon, P. B. et al.: *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, 23: 340—380, 1973.
- [3] Oyaizu, H. & K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27: 57—107, 1981.

- [4] 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。
- [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, 1975。
- [6] Berry, J. A.: *J. Bact.*, 25: 433, 1933.
- [7] Breed, R. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., Williams and Wilkins Co., Bailliere, pp. 276—279, 1957.
- [8] Buchanan, K. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 148—166, 1974.
- [9] Staley, J. T. et al.: In "The Prokaryotes" Vol. 1, ed. by Starr, M. P. et al., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York, pp. 451—495, 1981.
- [10] Staley, J. T.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 3, Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 1890—1991, 1989.

# A NEW GENUS IN BUDDING AND APPENDAGED BACTERIA

Zhou Huiling    Zhou Yuguang    Xiao Changsong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of oxidative Gram negative bacteria, No. 4088, was isolated from the root of *spartina anglica* grown at the beach of Rudong County, Jiangsu Province. The cells of the strain No. 4088 are rod or ovoid shaped, 0.8—1.0 by 1.1—1.5  $\mu\text{m}$ , with capsule, non-motile. The granules of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and yellow pigment of  $\beta$ -carotin type are produced. Strain No. 4088 multiplies with two forms of budding. The one is buds formed primarily by swelling of the prosthecae (hyphae). The other is with yeast-like form; about 20% buds sprout from mother cells directly. These two types of budding may appear on the same cell. Strain No. 4088 is an organism with respiratory metabolism, never fermentative, aerobic, microaerophilic under combined nitrogen-free condition. Chemoorganotrophic, no acid is produced from sugars and alcohols. Glucose, xylose, maltose, acetate, citrate, succinate, malate,  $\alpha$ -ketoglutarate, malonate, arginine and

casein are utilized as the sole carbon and energy sources. Methanol, formate, propionate, butyrate, iso-butyrate, valerate, iso-valerate, caprate, fumarate, hippurate, aminoacetate, proline, 2, 3-butylene glycol, or betaine is not utilized. Oxidase and catalase are positive. MR and VP are negative. Hydrogen sulfide is not produced. Nitrate is reduced. Litmus milk becomes alkaline. Esculin, starch or gelatin is not hydrolyzed. Lysine decarboxylase and arginine decarboxylase are positive and ornithine decarboxylase, DNase and lipase, urease, arginine dihydrolase, phenylalanine deaminase are negative. Free nitrogen can be fixed. Iron and manganese can be deposited. Growth occurs in medium containing NaCl not more than 1.5%. Growth temperature: 20—35℃, 30℃ is optimum. Growth pH 6.0—9.0, optimum is pH 7.5. Guanine and Cytidine contents in DNA is 70.1—70.4 mol%.

Budding and appendaged bacteria multiply with three types: binnary fission, budding at tips of prosthecae (hyphae) or budding from the mother cell directly. But no genus possesses both types of multiplication as strain 4088, which buds at tips of prosthecae and from mother cells directly.

*Pedomicrobium* buds at the tips or laterally at the prosthecae. Daughter cell are flagellated.

*Hyphomonas* buds are produced at tips of polar prosthecae (hyphae). Prosthecae are nonseptate and rarely branch under normal growth condition. Motile by means of a single polar to lateral flagellum located on developing buds or young daughter cell. Amino acids are required.

*Hyphomicrobium* daughter cell formation

by a budding process at one prosthecae, mature buds become motile as swimmers. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate is stored by most cells usually at a distinct cell pole. The prosthecae are not septate.

We propose a new genus name, *Dipareforma* gen. nov., and a new species name, *Dipareforma spartinacae* sp. nov., for bacterium No. 4088. The culture is deposited in Type Culture Collection, Institute of Microbiology Academia Sinica, with a catalogue number AS 1.1762.

### Key words

Budding and Appendaged bacteria; *Dipareforma*; *Dipareforma spartinacae*; Nitrogen fixation

## 图 版 说 明

### Explanation of plates

#### 图 版 I

1. 细胞形状和细胞内积累聚 $\beta$ -羟基丁酸盐颗粒( $\times 10500$ )。2—3. 突柄( $\times 36000$ )( $\times 31500$ )。4—5. 突柄开始膨大( $\times 30000$ )。6. 突柄顶端膨大形成子细胞( $\times 13000$ )。

#### 图 版 II

7—10. 细胞开始出芽( $\times 26200$ )( $\times 15000$ )( $\times 10500$ )( $\times 20000$ )。11. 具有分隔的突柄和正从母细胞上生长出子细胞( $\times 19200$ )。12. 突柄顶端膨大形成子细胞和直接从母细胞上生长出子细胞( $\times 14000$ )。

#### Plate I

1. Cell shape and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, granules. 2—3. Cells with prosthecae. 4—5. Prosthecae begin to swell. 6. Daughter cell formed from the swollen tip of prosthecae.

#### Plate II

7—10. Budding of the cells. 11. Prosthecae with septa and forming daughter cell from the mother cell directly. 12. Prosthecae tip swollen to daughter cell and forming daughter cell from the mother cell directly.