

生孢噬纤维菌的一个新菌株*

刘东波 张 影 陈 珊 厉锡亮 张丽萍**

(东北师范大学生命科学学院 长春 130024)

摘要: 以滤纸纤维素为唯一碳源, 从土壤中分离筛选出一株好氧性纤维素降解细菌, 通过对其形态学及生理生化特性的研究, 该菌株被鉴定为生孢噬纤维菌 (*Sporocytophaga*) 的一个新菌株。

关键词: 生孢噬纤维菌, 形态学特性, 生理生化特性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0030-04

A NEW STRAIN OF SPOROCYTOPHAGA

LIU Dong-Bo ZHANG Ying CHEN Shan LI Xi-Liang ZHANG Li-Ping

(School of Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024)

Abstract: A strain of cellulolytic bacterium was isolated from soil by cellulosic plate. The morphological and physiological properties of this strain were studied. According to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, the strain was identified as a new strain of the *Sporocytophaga*.

Key words: *Sporocytophaga*, Morphological, Physiological

从吉林省通化地区的黑土壤中, 分离得到一株可降解纤维素的滑动细菌。该菌株具有极强的纤维素降解能力, 在以纤维素为唯一碳源的培养基上可快速生长。按 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.)^[1], 对该菌株进行了鉴定, 确认该菌株为生孢噬纤维菌的一个新菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

采自吉林省通化地区的常年堆积玉米秸秆的黑土壤, 该处土壤较潮湿且有机质丰富。

1.2 培养基

滤纸纤维素平板: Mandel 盐营养液^[2] + 2% 琼脂, pH7.0~7.2, 上铺一无菌滤纸片; 双层纤维素固体平板^[3]: 上层培养基为球磨 24h 的 1% CF11 纤维素粉 (Whatman 公司产品) + Mandel 盐营养液 + 0.5% 琼脂, pH7.0~7.2, 下层为 2% 琼脂水; 滤纸纤维素液体培养基: Mandel 盐营养液 + 2% 滤纸片为唯一碳源, pH7.0~7.2。

1.3 菌株的分离纯化与鉴定

1.3.1 菌株的分离纯化: 将所采集的土壤样品, 制成土壤悬液, 在滤纸纤维素固体培养基上富集菌体。将所获得的菌株制成菌悬液, 连续稀释, 倾注双层平板。在滤纸纤

* 吉林省科委重点资助项目 (990208-1)

** 联系人 Tel: (0431) 5269624; E-mail: Zhanglp625@nenu.edu.cn

收稿日期: 2003-04-21, 修回日期: 2003-07-25

维素平板和双层纤维素固体平板上反复分离, 获得纯化菌株。

1.3.2 菌体形态学观察: 接种于液体培养基中, 30℃ 摇床培养, 不同培养时间从培养液取样进行扫描电镜观察^[4]。

1.3.3 菌株的生理生化反应: ①碳源利用: Mandel 盐营养液 + 2% 碳源, 30℃ 培养; 碳源分别为葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、纤维二糖、淀粉、纤维素粉。②氮源利用: 无氮的 Mandel 盐营养液 + 1% 滤纸 + 0.5% 不同的氮源, 30℃ 培养; 氮源分别为 NO_3^- 、 NH_4^+ 、蛋白胨、酵母膏。③青霉素抗性 & 接触酶测定^[4]。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离鉴定结果

2.1.1 菌种的分离纯化: 在生孢噬纤维细菌的分离纯化过程中, 由于该菌株能够产生大量粘多糖, 使得纯化极为困难。为此, 采用滤纸平板和 CF11 纤维素平板交替培养对该菌株进行分离纯化, 经反复分离纯化, 获得了该菌株的纯培养。该菌株在 30℃ 培养 4~5d, 可在双层平板上就可出现许多单个透明圈, 从透明圈边缘刮取菌体, 在滤纸片平板上划线, 30℃ 培养 2~3d 就可长出许多褐色单菌落, 得到降解纤维素的滑动细菌的纯培养。

2.1.2 菌种的双层平板培养特征: 该菌株可在双层 CF11 纤维素固体平板上生长, 从第 3d 起, 双层平板上出现许多小的单个透明圈, 培养时间延长透明圈会逐渐扩大, 透明圈之间相互连接, 至第 9d, 可将平板上的纤维素完全降解掉 (图 1a, 1b)。

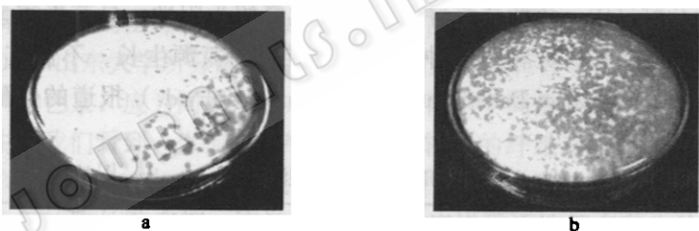


图 1 生孢噬纤维细菌 JL-11 在纤维素双层平板上分解纤维素产生的透明圈

a 培养 72h, b 培养 144h

2.1.3 菌体形态学特征: 扫描电子显微镜观察, 菌体为可挠屈杆状、末端钝圆、无鞭毛、革兰氏染色阴性, 大小为 $0.2\mu\text{m} \sim 0.3\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \sim 4\mu\text{m}$ (图 2)。在蔗糖-蛋白胨培养基上培养 96h, 菌体形状仍为杆状, 无小孢囊生成。在滤纸培养基上, 30℃ 培养 36h 之后发现有小孢囊形成 (图 3a), 培养到 48h 在滤纸上清晰可见由于杆状菌体的嵌入而在纤维素分子表面所形成的凹陷 (图 3b); 培养至 78h, 大量形成小孢囊, 小孢囊的直径为 $0.6\mu\text{m}$ 左右, 为相对两端内凹的圆球形 (图 4a~4b)。培养的任何阶段都未发现子实体形成。该菌株在滤纸琼脂平板上因产生大量粘多糖而呈胶粘状, 产生褐色色素。

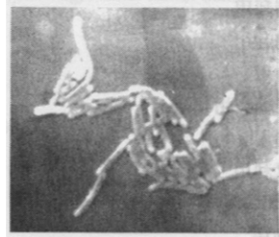


图 2 生孢噬纤维细菌 JL-11 在蔗糖-蛋白胨培养基上的菌体形态

2.1.4 滤纸降解实验: 电子显微镜观察发现, 滤纸是被一层层的降解的, 培养 6~7d 滤纸可被彻底降解。在这一过程中, 培养至 24h, 滤纸表面基本无变化; 培养至 36h, 滤纸表面开始出现褐色粘稠物质; 培养至 48h,

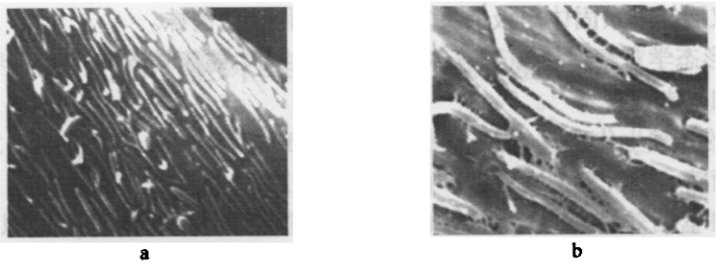


图 3 生孢噬纤维细菌 JL-11 在滤纸纤维素上的形态
a 培养 36h (×5,900), b 培养 48h (×15,000)

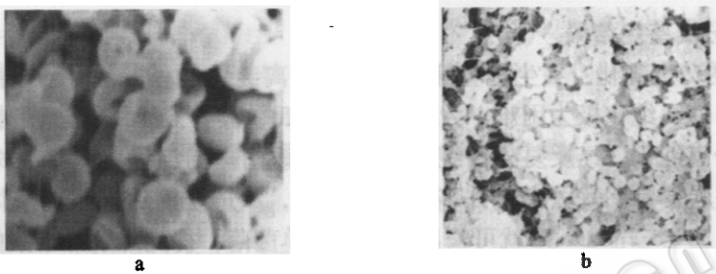


图 4 生孢噬纤维细菌 JL-11 的小孢囊形态
a 培养 78h (×5,000), b 培养 78h (×22,000)

滤纸变得半透明而且很薄，褐色粘稠物明显增多；培养至 72h，滤纸已变得极薄。

2.1.5 生理生化特征^[1]：该菌严格好氧，过氧化氢酶为阳性，具有青霉素抗性。可利用多种碳源为能源生长，可利用多种氮源作为唯一的氮源生长，不需有机生长因子。该菌株与 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.) 报道的生孢噬纤维细菌对比如表 1。

表 1 *Sporocytophaga* sp.JL-01 与文献报道 *Sporocytophaga*^[1] 的比较

	<i>Sporocytophaga</i> sp.JL-01	文献报道 <i>Sporocytophaga</i>
滤纸平板上菌落形态	褐色菌落	未报道
杆状细胞的大小 (μm)	(0.2~0.3) × (1~4)	(0.3~0.5) × (5~8)
小孢囊的大小 (μm)	0.5~0.6	1.5
革兰氏染色	革兰氏阴性	革兰氏阴性
接触酶特性	+	+
青霉素抗性	+	未报道
葡萄糖利用	+	+
麦芽糖利用	+	未报道
半乳糖利用	+	未报道
蔗糖利用	+	未报道
纤维二糖利用	+	+
淀粉利用	+	未报道
纤维素利用	+	+
NO ₃ ⁻ 利用	+	+
NH ₄ ⁺ 利用	+	+
蛋白胨利用	+	+
酵母膏利用	+	+
尿素利用	+	+

2.2 对菌株分离鉴定结果的分析

生孢噬纤维菌为能够降解纤维素的滑动细菌。它可以在纤维素固体表面生长并快速滑动,在分解纤维素的同时产生大量的荚膜粘性多糖。有关这类滑动细菌的报道甚少,国内仅有山东大学进行过该菌株的分离纯化报道^[5]。生孢噬纤维菌本身具有特殊的生活史,具有菌丝体和小孢囊两种主要形态,菌丝体在营养缺乏或遇到逆境时,形成小孢囊,条件合适时,小孢囊再萌发成菌丝体^[1]。本实验所分离纯化的细菌为能够降解纤维素的滑动细菌,可强烈地降解纤维素,革兰氏染色为阴性,菌体形态为可挠屈杆状、末端钝圆、无鞭毛、大小为 $0.2\mu\text{m} \sim 0.3\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \sim 3\mu\text{m}$,培养后期发现有小孢囊形成,直径为 $0.5\mu\text{m} \sim 0.6\mu\text{m}$,为带有内凹的圆球形,培养的任何阶段都未发现子实体形成。结合形态学特性、生理生化特征以及与 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.) 中相关菌株的比较,初步鉴定该菌为生孢噬纤维的一个新菌株,命名为生孢噬纤维细菌 *Sporocytophaga* sp. JL-01。

在此实验中,我们把 JL-01 与山东大学所报道的菌株^[5]进行了比较,山东大学所报道的菌株产生金黄色色素,具有菌丝体 ($0.25\mu\text{m} \sim 0.3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$) 和小孢囊 (直径 $1\mu\text{m}$) 两种形态,但该两种形态在所有培养基上,在培养的任何时间均同时出现,且形态较均一;而未发现由杆状细胞形成小孢囊的中间状态。而 JL-01 产生褐色色素,也有明显的菌丝体和小孢囊分化,具有菌丝体 ($0.2\mu\text{m} \sim 0.3\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \sim 3\mu\text{m}$) 和小孢囊 (直径 $0.6\mu\text{m}$) 两种形态,当在不同的培养基上的培养时,大多情况下是先出现杆状菌丝体形态,后出现小孢囊形态;如在滤纸培养基上培养 36h 以后, JL-01 开始产生小孢囊以及许多长短不一的由杆状细胞形成小孢囊的中间状态 (图 3a)。故而从形态学的角度分析, JL-01 和山东大学所分离的菌株具有不同形态学特性和不同的生活史,培养过程中产生不同的色素,应为同属 *Sporocytophaga* 的两个不同菌株。

在实验中,我们看到,生孢噬纤维细菌具有较强的纤维素分解能力,在滤纸纤维素平板上,该菌株经 6~7d 可将滤纸纤维素物质完全降解。在降解纤维素的过程中,该菌株产生大量的胞外粘多糖,该类多糖具有免疫增强活性等多种生物学功能^[6],可用于多糖类药物的开发,使得该生孢噬纤维细菌又有很大的应用潜力。

致谢 承蒙山东大学微生物技术国家重点实验室高培基教授给予很大帮助,在此深表谢意!

参考文献

- [1] Holt J M, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* Bergey's manual of determinative Bacteriology, ninth edition Baltimore. Williams & Wilkins Co., 1992. 483~527.
- [2] Mandels M. Biotech Bioeng Symp, 1975, 8 (1): 81~105.
- [3] 刘东波,高培基,王祖农.微生物学报,1990,30 (1): 70~72.
- [4] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,2001. 362~363.
- [5] 齐飞,张颖舒,高培基.山东大学学报,1999,34 (4): 484~487.
- [6] Balows A, Tzipper H G, Doworkin M, *et al.* The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1991. 460~516.