

# 浑球红假单胞菌的分离鉴定及其分类特征的研究

吴永强 郁金麟 宋鸿遇\*

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

浑球红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas sphaeroides*) 是一种兼性光合厌氧细菌。在细菌光合、生物固氮和生物力能学等研究中, 日益受到人们的重视<sup>[1]</sup>。它与荚膜红假单胞菌在形态和许多特征上非常相似, 为了精确地进行分类, 我们在前人<sup>[2-3]</sup>的基础上对它们的分类特征作了较详细地分析, 为浑球红假单胞菌的分类提供有用的鉴别依据。

## 材 料 和 方 法

### 一、菌株

浑球红假单胞菌菌株 601 由澳大利亚 J. M. Pemberton 博士惠赠; 菌株 D 和 NL 从上海污水塘分离获得。荚膜红假单胞菌 (*Rps. capsulata*) 菌株 F 及 N<sub>3</sub> 由本组分离; 菌株 A 由日本西田正纪教授赠送。

### 二、培养基及培养条件

1. 酵母膏蛋白胨培养基 (简称 YP) 配方 (g): 酵母膏 3, 蛋白胨 3, 氯化钙 0.3, 硫酸镁

0.5, 无离子水 1000ml, pH6.8。

#### 2. RCVBN 培养基<sup>[4]</sup>

3. 培养条件: 光合厌氧培养时用人工照光, 光强约 3 千 lx, 温度 28℃, 抽真空时充氩气或氮气。暗好氧培养时, 28℃, 培养 2—4 天。

#### 三、固氮、放氢和吸氢活性的测定<sup>[5]</sup>

#### 四、青霉素酶的平皿检测

对 Perret<sup>[6]</sup> 和 Andexon<sup>[7]</sup> 的方法作了改进。将光合细菌划线或稀释涂铺在平皿培养基上, 保温 4 天后染色检测。方法如下: 在培养基上覆盖 5ml 中层琼脂\*\*, 凝固后在 30℃ 保温 1 小时, 用含 12mg/ml 碘—4% 碘化钾的溶液显色。产生青霉素酶的菌落四周出现透明白圈, 背景为蓝紫色。

#### 五、其它测定

\* 周锦鹏同志协助进行电镜观察, 特此致谢。

\*\* 其成份是 0.5g 可溶性淀粉和 1g 琼脂粉溶于 100ml pH6.4 0.2M 磷酸缓冲液中, 待溶解后加入 15mg/ml 青霉素 G。

活细胞吸收光谱测定,用 60% 蔗糖溶液做成菌体悬液,在 HITACHI 638-50 双光束分光光度计上扫描,波长范围 400—910nm。

## 结 果

### 一、浑球红假单胞菌的获得

从上海东安新村污水塘中采集水样,在 RCVBN 培养基中富集培养。光照厌氧 4 天后,培养基呈棕红色。经过 4 次连续转接培养,使紫色非硫光合细菌占优势。按 Van Niel 的振荡培养法<sup>[5]</sup>,用半固体琼脂培养基在一系列无菌试管中逐渐稀释,待冷凝后覆盖无菌液体石蜡,光照培养(图 1),原培养液经  $10^{-8}$  稀释,在试管中只长出一只棕红色菌落。挑出单个菌落在液体培养基中培养,长好后在 RCVBN 或 YP 固体培养基上反复划线分离,光照厌氧培养,挑取单个典型菌落,经镜检为纯培养物。



图 1 用振荡培养法获得的单个菌落  
左:  $10^{-7}$  稀释管 右:  $10^{-8}$  稀释管

### 二、形态特征

浑球红假单胞菌如菌株 D 在 YP 中呈球形,直径 0.9nm,单个排列(图 2);在 RCVBN 中,(pH 约 8.8)呈卵圆形,菌体大小为  $1.1—1.2 \times 1.6—1.7nm$ ,菌体有单根极生鞭毛。用相差显微镜可观察到荚膜。

荚膜红假单胞菌如菌株 F 在 YP 中呈卵圆形,但在 RCVBN 中呈杆形。在两种培养基中,细胞长与宽之比分别为 1.9 和 2.86。有单个排

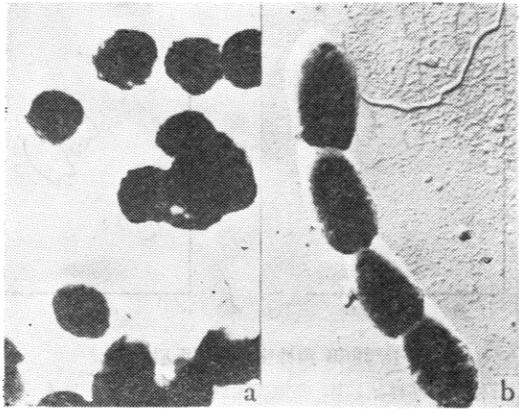


图 2 在 YP 培养基中光合生长的菌体形态( $\times 9000$ )  
a. 浑球红假单胞菌菌株 D b. 荚膜红假单胞菌菌株 F

列,也有链状排列。

### 三、培养特征

浑球红假单胞菌各个菌株在光照厌氧条件下生长较快,呈棕红色。在 RCVBN 平皿上,菌落呈圆形,光滑,湿润,稍突起,边缘整齐,有光泽,不粘,它在暗好氧条件下亦能生长,呈深红色,在平皿上菌落中央呈红色,四周呈乳白色。上述特征与荚膜红假单胞菌类似。

分别对二株浑球红假单胞菌和二株荚膜红假单胞菌进行活细胞吸收光谱分析,结果表明它们的色素型完全相同。用在 YP 培养基上光合生长的菌体扫描,体内吸收光谱出现类胡萝卜素的吸收峰值,即 513 和 478nm,在 455nm 处有一峰肩。吸收光谱图上也出现细菌叶绿素 a 的吸收峰值。即 803, 858 和 592nm。

在近红外 803 和 858 处有明显的两个峰,各菌株的两个峰的峰比值略有高低,范围在 0.63—0.80:1,说明浑球红假单胞菌和荚膜红假单胞可能所含色素种类相同,但在含量上略有差异。

### 四、生理生化特性

1. 碳源利用和生长因素:用省去苹果酸的 RCVBN 培养基作基础培养基,分别添加各种碳源,浓度为 0.3%,(除丙酸盐为 0.05% 外)。浑球红假单胞菌能利用甘油,酒石酸,柠檬酸,甘露醇和葡萄糖酸钠等碳源生长,而不利用丙酸盐。但荚膜红假单胞菌却相反(表 1)。碳源

表 1 六个菌株在含各种碳源和不同维生素培养基上生长情况

| 菌 株   |            | 浑球红假单胞菌 |   |    | 荚膜红假单胞菌        |   |   |
|-------|------------|---------|---|----|----------------|---|---|
|       |            | 601     | D | NL | N <sub>2</sub> | F | A |
|       |            |         |   |    |                |   |   |
| 碳 源   | 丙酸盐        | -       | - | -  | +              | + | + |
|       | 甘油         | +       | + | +  | -              | - | - |
|       | 酒石酸        | +       | + | +  | -              | - | - |
|       | 柠檬酸        | +       | + | +  | -              | - | - |
|       | 甘露醇        | +       | + | +  | -              | - | - |
|       | 葡萄糖酸盐      | +       | + | +  | -              | - | - |
|       | 苹果酸        | +       | + | +  | +              | + | + |
|       |            |         |   |    |                |   |   |
| 维 生 素 | 无维生素       | -       | - | -  | -              | - | - |
|       | 硫胺素        | -       | - | -  | +              | + | + |
|       | 硫胺素,生物素    | -       | - | -  | +              | + | + |
|       | 生物素,菸酸     | -       | - | -  | -              | - | - |
|       | 硫胺素,生物素,菸酸 | +       | + | +  | +              | + | + |

+: 生长 - : 不生长

利用试验在这两个种的分类上是个很有用的鉴别特征。

采用不加混合维生素的 RCVBN 作基础培养基,分别添加硫胺素,生物素和菸酸等,三者的浓度均为 1mg/ml 或添加它们的各种组合。结果表明,浑球红假单胞菌的 3 个菌株,需要 3 种维生素同时存在才能生长,而荚膜红假单胞菌的 3 个菌株只需要硫胺素做生长因素。

2. 青霉素酶平皿检测: 试验表明,红假单胞菌的这两个种对青霉素的抗性有明显的差别。荚膜红假单胞菌菌株 A 和 F 对青霉素的抗性 < 0.01u/ml,浑球红假单胞菌菌株 601 和 D 对青霉素 (G) 的抗性 > 5 < 50u/ml。浑球红假单胞菌的 3 个菌株均产生青霉素酶,而荚膜红假单胞菌的 3 个菌株均不产生此酶。而且这个性状非常稳定,不论在 YP 培养基上还是在 RCVBN 合成培养基上,不论在光照厌氧条件下还是在暗好氧条件下生长,浑球红假单胞菌都产生可渗透的青霉素酶(表 2)。用 Perret 法<sup>[6]</sup>证明,浑球红假单胞菌分泌的酶是  $\beta$ -内酰胺酶。

3. 吸氢,光合固氮和放氢试验: 在谷氨酸为唯一氮源的合成培养基上生长时,6 个菌株都能光合固氮,催化乙炔还原成乙烯,固氮活性

表 2 各菌株产生青霉素酶特性的比较

| 菌 株     | 培养条件           | 光照厌氧  |    | 暗好氧   |    |
|---------|----------------|-------|----|-------|----|
|         |                | RCVBN | YP | RCVBN | YP |
|         |                |       |    |       |    |
| 浑球红假单胞菌 | 601            | +     | +  | +     | +  |
|         | NL             | +     | +  | +     | +  |
|         | D              | +     | +  | +     | +  |
| 荚膜红假单胞菌 | F              | -     | -  | -     | -  |
|         | A              | -     | -  | -     | -  |
|         | N <sub>2</sub> | -     | -  | -     | -  |

+: 产青霉素酶 - : 不产青霉素酶

也比较接近。并且还能利用氮气作唯一氮源进行光合生长。

在对数生长期末期或平稳期初期时,荚膜红假单胞菌的 3 个菌株都具有吸氢活性,而所有的浑球红假单胞菌菌株则无。这表明,分子氢可以作为荚膜红假单胞菌的电子供体和能源。

浑球红假单胞菌的 3 个菌株都能光合放氢,荚膜红假单胞菌的菌株 A 和 N<sub>2</sub> 亦能由固氮酶复合物催化放氢,但是没有测出菌株 F 的放氢活性,我们已知菌株 F<sub>2</sub> 的吸氢活性是很高的,大约为其它 2 个菌株的 3 倍,其固氮活性也较高,这种现象是否与菌株对分子氢的再循环利用有关,有待进一步研究。

## 讨 论

浑球红假单胞菌与荚膜红假单胞菌同属于紫色非硫细菌,红螺菌科 (Rhodospirillaceae) 红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*) 它们的许多分类特征都非常相似。Van Niel 最早根据色素细胞形态和碳源利用上的差异将这两个种鉴别开来,Weaver 等<sup>[4]</sup>对红假单胞菌分类特征进行了研究,发现这三个种有两个明显的特性,一是对青霉素特别敏感,第二是易被专一于红假单胞菌的噬菌体裂解。通过比较这两个种的分类特征,我们注意到浑球红假单胞菌的 3 个野生型菌株都能产生许多胞外  $\beta$ -内酰胺酶,而荚膜红假单胞菌的 3 个菌株都不产生此酶。用青霉

素平皿检测法能较简便地对这两个种加以辨别, 将其作为重要的鉴别特征之一。此外, 这两个种在对丙酸盐的利用、生长因素的要求和吸氢特征也有明显的差别。

按照 Bergey 手册第八版以及上述种的鉴别特征, 菌株 D 及菌株 NL 应为浑球假单胞菌 (*Rps. Spheroides*)。

### 参 考 文 献

[1] Marrs, B., et al.: *Trends in biochemical science*, 2: 105—108, 1977.

- [2] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md., 24—64, 1974.
- [3] Van Niel, C. B.: *Bacteriol. Rev.*, 8: 1—118, 1944. Hutner, S. H.: *J. Gen. Microbio.*, 4: 286, 1950.
- [4] Weaver, P. F., et al.: *Arch. Microbiol.*, 105: 207—216, 1975.
- [5] Song Hungyu, et al.: *Scientia Sinica*, 23: 252—260, 1980.
- [6] Perret, C. J.: *Nature*, 174: 1012—1013, 1954.
- [7] Anderson, S. S., et al.: *Nature*, 206: 4984, 579—583, 1965.
- [8] Van Niel, C. B.: *Method in Enzymology*, Pietro, A. C. Ed., Academic press, 23A: 3—28, 1971.