

水螺菌属的一个新种——托木尔水螺菌

周慧玲 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从天山托木尔峰琼台兰河谷的鸟巢材料中分离到一株杆状细菌——56号。该菌多为直杆状, 本身扭曲, 有极生束状和周生鞭毛, 革兰氏染色阴性; 氧化性菌, 好氧生长, 有硝酸盐时能行厌氧生长; 不从糖产酸, 不利用糖类, 利用三羧酸循环中的某些有机酸生长; 接触酶和氧化酶都是阳性; 能在含 6.5% 以下的 NaCl 培养基中生长; 生长温度范围 10—42°C; DNA 中 G + C 含量为 65.1—65.4 克分子%。由于其性状与水螺菌属的菌相近而又不同于任何一种已知水螺菌, 故命名为托木尔水螺菌 (*Aquaspirillum tuomuerense* sp. nov.)。

1978年, 在调查我国新疆维吾尔自治区温宿县天山托木尔峰微生物区系的工作中, 我们分离到一株氧化性的杆状细菌——56号, 在数值分类中归属到发酵性菌群中。它与同一地区分离到的其他 68 株菌的相似值均甚低, 平均为 52.91%。经鉴定, 该菌是一株罕见的水螺菌, 命名为托木尔水螺菌 (*Aquaspirillum tuomuerense* sp. nov.)。现将鉴定结果报告如下。

材料和方法

(一) 菌株来源

样品采自新疆托木尔峰距琼台兰河边 10 多米处 (海拔 2,400 米) 石缝间的黄鸡灵鸟巢材料。分离培养基为肉汁胨琼脂培养基。经反复划线取得菌落形态和镜检形态基本一致的纯菌, 再进行形态、DNA 碱基量、生理生化等性状的测试。

试验菌株接种于肉汁胨琼脂或胨、琥珀酸盐 (PSS) 琼脂斜面培养基^[1], 置 30°C 培养 24 小时。

(二) 鉴定方法

主要根据《一般细菌常用鉴定方法》^[2]及参考文献 [1]、[4] 中所介绍的有关方法。

1. 形态特征观察

(1) 个体形态: 接种 PSS 琼脂培养基^[1], 30°C 培养 18—48 小时后, 用相差光学显微镜、

透射电子显微镜及扫描电子显微镜观察个体形态。

检查细胞内累积的聚 β-羟基丁酸盐颗粒^[3], 系采用高碳低氮培养基代替 β-羟基丁酸盐培养基。其成份为 (克): (NH₄)₂SO₄ 0.1、NaH₂PO₄ 0.5、K₂HPO₄ 0.5、MgSO₄ · 7 H₂O 0.2、CaCl₂ · 2H₂O 0.1、乙酸钠 5、水洗琼脂 18, 蒸馏水 1000 毫升, pH 7.0。染色如常法^[1]。

(2) 菌落形态: 在 PSS 琼脂培养基平板上划线, 30°C 培养 72 小时后, 进行观察, 测量菌落大小及颜色等^[4]。

2. 生理性状测定

(1) 生长温度: 将用 PSS 液体培养基于 30°C 培养 24 小时的菌种, 用直针接种于澄清的肉汁胨培养液中, 分别置 1—4°C 冰箱、10—15°C 冷库、30°C 温箱及 40—45°C 水浴中培养, 两周内观察其生长情况。

(2) 趋氧性: 将培养 24 小时的菌液混于装有 PSS 培养基 (加 0.2% 琼脂) 的试管或毛细管^[1]中, 置 30°C 培养, 两周内观察生长情况。

(3) 碳源的利用: 以 DMB^[1] 为基础培养基, 所用碳源有以下 20 种 (0.1%): D-果糖、甘露醇、鸟氨酸、马尿酸钠、琥珀酸钠、苹果酸钠、柠檬酸

本文于 1980 年 1 月 15 日收到。

卯晓岚、文华安同志提供分离菌株的样品; 本所技术室电镜组、照相组摄制电镜照片, 特此致谢。

钠、氨基乙酸、丝氨酸、 α -酮戊二酸、反丁烯二酸、脯氨酸、DL-精氨酸、乙酸钠、甲醇、乙醇、2,3-丁二醇、丙二酸和煤油。将培养 24 小时的菌种用直针接种后,置 30℃ 培养 3 天后,在原培养液中连续转接两次,两周内观察其生长情况。

(4) 在芳香族氨基酸培养基上产生色素:在 PSS 琼脂培养基的试管中分别加入 0.2% L-色氨酸、L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸,接种后置 30℃ 培养,两周内观察色素的产生情况。

(5) 荧光:将 30℃ 培养一周内的 PSS 琼脂斜面菌种,用 253.7 毫微米紫外光源观察荧光色素的产生情况。

3. 生化性状

(1) 碳水化合物生酸^[1]:在休和利夫森二氏培养基中,分别加入 1% 的木糖、阿拉伯糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨醇和乙醇,于 30℃ 培养,两周内观察结果。

(2) 脱氧核糖核酸酶 (DNase) 和核糖核酸酶 (RNase) 的检查:在 PSS 琼脂培养基中加入 0.2% DNA 或 RNA,15 磅 30 分钟灭菌后倒平板,凝固后倒置过夜,取新鲜菌种点种,30℃ 培养 2—5 天,待形成明显菌落后,在平板上注满 1 N HCl,菌落周围出现透明圈者为阳性,无透明圈者为阴性。

(3) 磷酸酶的测定^[4]:以对-磷酸硝基苯为底物,铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 为阳性对照菌株。

(4) 脂肪酶检查系采用铜皂形成法^[1]。

(5) 亚硒酸还原试验^[1]:在 PSS 液体培养基中加入 0.3% 亚硒酸,用直针接种,置 30℃ 培养两周后观察,培养液变为红色者为阳性,反之为阴性。

(6) 耐盐能力试验:在 PSS 液体培养基中分别加入(%) : 1.0、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、9.75 和 10.0 的 NaCl,直针接种后于 30℃ 培养 3 周,观察其生长情况,并连续转接两次。

(7) 对青霉素抗药性的测定:在肉汁胨液体培养基中,加入青霉素 (10 单位/毫升),直针接种,置 30℃ 培养,7 天内观察其生长情况。

(8) 胆盐生长试验^[1]:在 PSS 琼脂培养基中,加入 1% 去氧胆酸钠,制成斜面,划线接种,置

30℃ 培养,1—7 天观察生长情况。

(9) 甘氨酸生长试验^[1]:在 PSS 液体培养基中加入 1% 甘氨酸,在原培养液中转接两次,置 30℃ 培养,1—7 天观察其混浊度。

(10) 固氮酶活性的测定系采用乙炔还原法。

4. DNA 中碱基含量的测定:

用解链温度法 (T_m)^[4] 测定 DNA 中 G + C 含量,对照菌株为大肠埃希氏菌 K_{12} (AS 1.750)。

结 果

(一) 个体形态特征

56 号菌株革兰氏染色阴性,菌体细长 0.5—1.0 \times 3.0—9.0 微米,单个或成短链,直杆状,有的稍弯曲 (图版 I-1—4)、S 形 (图版 II-1) 或盘卷成盘状 (图版 II-4)。扫描电镜照片显示出,直杆状的细胞本身是扭绞着的 (图版 I-3)。用相差显微镜观察 18—24 小时的培养物,有类似于球状体的菌体 (图版 I-1),但电镜观察则菌体盘卷成环状或盘状,并无球状体 (图版 II-4)。18—24 小时的细胞多为单极丛生极毛 (约占 40%),鞭毛可扭成绳索状 (图版 II-3)。48 小时的细胞丛生极毛波长较长;另外有侧生的单鞭毛,波长较短 (图版 II-2)。

(二) 培养特征

在肉汁胨琼脂培养基上中度生长。菌落为圆形,表面有小颗粒到皱纹,中间凸起,边缘呈波状,直径 3—6 毫米,蚌肉白,半透明,培养 24 小时后生长物长入琼脂内。

(三) 生理生化性状

56 号菌属于需氧菌,将菌种混于半固体琼脂中只在培养基表面生长。其它性状见表 1。

(四) DNA 中碱基含量测定结果

用解链温度法 (T_m)^[6] 测定 56 号菌 DNA 中 G + C 含量为 65.1—65.4 克分子 %。

表 1 56 号菌生理生化性状

(续表)

试 验 内 容	反应结果
葡萄糖氧化发酵	产碱氧化
碳水化合物生物酸:	
木糖, 阿拉伯糖, 乳糖, 蔗糖, 麦芽糖, 山梨醇, 乙醇	—
吡啶	—
甲基红试验	—
V. P. 试验	—
在下列培养基中生长:	
氯化钾	+
1% 去氧胆酸钠	+
1% 甘氨酸	+
厌氧培养基	—
青霉素 (10 单位/毫升)	+
V. P. 培养基	+
生长温度(°C):	
1—4	—
10—15	+
30、40、41、42	+
45	—
0.3% 亚硒酸	—
耐 NaCl 能力:	
0—6.5%	+
7—10.0%	—
在芳香族氨基酸上形成色素:	
色氨酸	淡黄色
酪氨酸	淡棕色
苯丙氨酸	肉 色
荧光	—
聚-β-羟基丁酸盐	—
接触酶	+
氧化酶	+
磷酸酶	—
脲酶	+
脂肪酶	—
苯丙氨酸脱氨酶	+
精氨酸双水解酶	—
DNase, RNase	—
明胶液化	—
淀粉水解	—
硝酸盐还原	+
厌氧硝酸盐生长、产气	+
从半胱氨酸及三糖铁培养基中产 H ₂ S	—
石蕊牛奶	不 变
碳源的利用:	
葡萄糖	—
果糖	—

试 验 内 容	反应结果
甲醇	—
乙醇	—
甘露醇	—
2, 3-丁二醇	—
甜菜碱	—
氨基乙酸	—
丝氨酸	—
脯氨酸	+
马尿酸钠	—
琥珀酸钠	+
苹果酸钠	+
α-酮戊二酸	+
反丁烯二酸	+
乙酸钠	+
DL-精氨酸	—
柠檬酸钠	—
鸟氨酸	—
丙二酸	—
固氮酶活性	—

讨 论

56 号菌的一些性状与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的某些种很相近: 革兰氏阴性, 氧化酶阳性, 好氧, 直杆状细胞, 有丛生极毛和不同波长的周生鞭毛^[7], 不同化糖类, 只同化一些有机酸, DNA 中 G + C 含量为 65.1—65.4 克分子%。但是, 56 号菌具有螺旋状或扭绞着的直杆状细胞, 极生丛毛扭绞成绳索状, 这些都是螺菌属的特征, 而假单胞菌属是不具备的。因此, 56 号菌应属于螺菌科 (*Spirillaceae*)。在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第 8 版中, 螺菌科中只有两个属: 螺菌属 (*Spirillum*) 和弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)。1973 年 Hylemon 等^[8]根据细胞大小、海水需要性、耐 NaCl 能力和 DNA 中 G + C 含量, 将螺菌属进一步分为 3 个属: 螺菌属、水螺菌属 (*Aquaspirillum*) 和海洋螺菌属 (*Oceanospirillum*)。1976 年 Davis^[9] 提出厌氧螺菌属

表 2 56 号菌与已知近似种的区别

项 目	<i>Aquaspirillum psychrophilum</i> CA1	<i>A. itersonii</i> subsp. <i>nipponicum</i> YF6	56 号 菌
细胞直径(微米)	0.7—0.9	0.5—0.7	0.5—1.0
鞭毛型	双极丛生	双极丛生	多为单极丛毛和周生鞭毛
螺旋形	+	+	直杆、弯曲、螺旋
球状体	—	+	—
聚-β-羟基丁酸盐	—	+	—
在 2.0% NaCl 中生长	—	—	+
生长温度范围(°C)	2—26	14—40	15—42
硝酸盐还原	—	—	+
产生 H ₂ S	—	+	—
明胶液化	+	—	—
磷酸酶	—	+	—
从果糖产酸	—	+	—
DNA 中 G + C 克分子%	64.6	65.6	65.1—65.4

(*Anaerobiospirillum*)。1978 年 Tarrand 等^[9]建立固氮螺菌属 (*Azospirillum*)。56 号菌是好氧菌,且无固氮活性,因此不属于这两个属中的任何一个。根据其细胞直径为 0.5—1.0 微米,又有丛生极毛,应归属于水螺菌属或海洋螺菌属。考虑到 56 号菌的 DNA 中的 G + C 含量与水螺菌属的接近,故可将这株菌的分类地位归属于水螺菌属。然而,其耐盐能力却介于水螺菌属与海洋螺菌属之间,在 0—6.5% NaCl 的培养基中都生长,在 6.5% 以上的 NaCl 培养基中不生长,这种耐盐能力在螺菌中是没有的。由于我们仅分离到一株菌,难以对这类菌进行更全面的考察,所以暂将 56 号菌归属于水螺菌属。

根据 Krieg 和 Hylemon^[1] 所列出的螺菌属的 16 个种和 Tarasaki^[10] 的资料,56 号菌与嗜冷水螺菌 (*A. psychrophilum*) 和伊氏水螺菌日本亚种 (*A. itersonii* subsp. *nipponicum*) 颇有相似之处,但又有一些差异(见表 2),而与其它种则差别明显。因此,我们认为 56 号菌是水螺菌属中的一个新种,命名为托木尔水螺菌 (*Aquaspirillum tuomuerense* sp. nov.)。菌种保藏

于中国科学院微生物研究所菌种保藏室,菌号为 AS 1. 1365。

托木尔水螺菌 (*Aquaspirillum tuomuerense* sp. nov.) 的特征

(一) 形态特征

杆状细菌,细长,0.5—1.0 × 3.0—9.0 微米,多数为直杆状,本身扭曲,有的稍弯曲、S 形或盘卷成盘状;单个或成短链;无球状体;革兰氏染色阴性;运动;24 小时以内的培养物中多为丛极生鞭毛细胞,48 小时以上则多为周生鞭毛细胞;多数细胞为单极丛生鞭毛,并常绞成绳索状;极生鞭毛的波长比侧生鞭毛的长。细胞内无聚-β-羟基丁酸盐。

在肉汁胨琼脂上生长中度。30℃ 培养 72 小时的菌落为圆形,表面有小颗粒到皱纹,中间凸起,边缘呈波状,直径为 3—6 毫米,蚌肉白,半透明,培养 24 小时后生长物向琼脂内生长。在含色氨酸、酪氨酸或苯丙氨酸的培养基上产生淡褐黄色色素。无荧光色素。

(二) 生理生化特性

氧化性菌,仅有足够的硝酸盐时,才能

厌氧生长并产气。不从葡萄糖产酸。在含氰化钾的培养基中生长。氧化酶、接触酶、苯丙氨酸脱氨酶和脲酶阳性; 脂肪酶、磷酸酶、精氨酸双水解酶、核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶阴性。还原硝酸盐。不从半胱氨酸或三糖铁培养基产硫化氢, 不还原亚硒酸。在 1% 去氧胆酸钠或甘氨酸及青霉素 (10 单位/毫升) 的培养基上生长, 在 V. P. 培养基中生长。甲基红反应和 V. P. 反应阴性。在含 0—6.5% NaCl 的培养液中生长, NaCl 浓度高于 6.5% 则不生长。在 15°—42℃ 生长, 低于 4℃ 或高于 45℃ 不生长。不固定分子态氮, 不产生吡嗪。利用乙酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、 α -酮戊二酸和反丁烯二酸作为碳源。

DNA 中 G + C 含量为 65.1—65.4 克分子%。

参 考 文 献

- [1] Hylemon, P. B. et al.: *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, **23**: 340—380, 1973.
- [2] 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.
- [3] Berry, J. A.: *J. Bact.*, **25**: 433, 1933.
- [4] Jean, F. MacFaddin: *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 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, 1975.
- [6] 周慧玲: 微生物学报, **18**: 134—139, 1978.
- [7] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [8] Davis, C. P. et al.: *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, **26**: 498—504, 1976.
- [9] Tarrand, J. T. & R. K. Noel: *Can. J. Microbiol.*, **24**: 967—980, 1978.
- [10] Tarasaki, Y.: *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, **29**: 130—144, 1979.

A NEW SPECIES OF *AQUASPIRILLUM*—*AQUASPIRILLUM TUOMUERENSE* SP. NOV.

Zhou Huiling Wang Dasi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

In a survey of bacterial flora in the region of Tuomuer Peak of Tianshan Mountain, Wensu County, Xinjiang Uygur Autonomous Region, a strain of bacterium—No. 56 was isolated from a sample of a bird nest situated at the bank of Qiongtailan River with an elevation of 2400 metres. Although strain No. 56 is an oxidative organism, it has been grouped in a cluster of fermentative organisms by numerical taxonomy. Its similarities with the other organisms has been as low as 52.9% in average. By identification, it has been recognized as a new species of *Aquaspirillum*, namely *Aquaspirillum tuomuerense* sp. nov.

Aquaspirillum tuomuerense sp. nov. is a Gram negative bacterium, rod in shape, slender, 0.5—1.0 by 3.0—9.0 μm , mostly twisted straight rods, but some are curved, S-shaped or coiled as a plate; arranged singly or in short chains; no coccoid bodies. Most cells are motile with polar multitrichous flagella, sometimes twined in fascicle in 24 hours culture, but cells with peritrichous flagella are predominant in the culture of 48 hours. The wave length of polar flagella is longer than that of lateral flagella. No poly- β -hydroxybutyric acid is produced in cells.

Moderate growth is produced in nutrient agar, and yellowish brown pigment

is produced in media containing aromatic amino acids. No fluorescent pigment is produced.

It is an aerobic bacterium, but anaerobic growth can be found in the presence of nitrate in media. No acid is produced from glucose. Growth are produced in media containing potassium cyanide, 1% bile, 1% glycine, 10 units penicillin, or 0—6.5% NaCl respectively, but not in medium containing NaCl more than 6.5%. Although there is growth in V. P. broth, M. R. test or V. P. reaction is negative. Oxidase, catalase, phenylalanine deaminase and urease are positive and lipase, phosphatase, arginine dihydrolase, DNase or RNase is negative. Nitrate is reduced. No H_2S is produced. Selenite is not reduced. Growth is found in the range of temperature between 15°C and 42°C, and no growth at 4°C or 45°C. No nitrogenase is detected. Indole negative. Acetate, succinate, malate, α -ketoglutarate and fumarate are utilized as sole source of carbon. GC content in DNA is 65.1—65.4 mole%.

The culture of *Aquaspirillum tuomuerense* sp. nov. has been deposited in Type Culture Collection in the Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing, China as AS 1.1365.