

中华屈挠杆菌的分离和鉴定

李勤生 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由眉藻(*Calothrix*)培养池中分离得到一株宽度均一、长度不等(0.4—0.5×4.0—16.0 μm以上)的屈挠杆菌,在0.5%胰酶液体培养基中呈长丝状,长度可超过60 μm。细胞有时聚集成团。兼性厌氧。革兰氏阴性,无内生芽孢及其它形式的休眠细胞。滑行运动。能利用多种糖类作为碳源,但不分解琼脂、几丁质和纤维素。可以NO₃⁻、NH₄⁺、酪蛋白水解物作为唯一氮源。不液化明胶。在胰酶琼脂上形成粉红-橙色粘性菌落。色素光谱测定最高吸收峰值为484nm(正己烷提取);在乙醇提取物中为484、510nm。DNA中G+C含量为34.2克分子%。对固氮蓝藻营养细胞有溶解能力。对四环素以外的多种抗菌素均具有相当强的耐受性。与已知的屈挠杆菌有明显的差异,认为是一新种,命名为中华屈挠杆菌(*Flexibacter chinenses* sp. nov.)。模式株FCA存于中国科学院水生生物研究所。

关键词 屈挠杆菌属;中华屈挠杆菌;眉藻

1981年夏,在本所试验用的眉藻培养池中发现藻体溶解现象。显微镜下观察可见大量长度不一的可屈挠细长杆菌,滑行运动,以其一端附着于藻丝上,部分藻细胞溶解。多个聚集于藻丝上时,如开放的菊花瓣状,亦有相互缠绕成束或成团者。先后采用五种培养基分离,结果在0.5%胰酶琼脂培养基上获得成功。分离所得FCA菌株与藻种池中所见形态特征基本相同。在实验感染鱼腥藻(*Anabaena* 1105)藻苔时,有明显的溶解蓝藻营养细胞的能力。对其生物学特性研究结果表明,与已知的屈挠杆菌均有明显的差异,认为是屈挠杆菌属(*Flexibacter*)的一个新种。

材料与方法

(一) 分离培养基及溶藻试验

由病变藻种培养池取样,用0.5%胰酶琼脂培养基^[1]分离,并以此作为基础培养基。溶藻试

验在鱼腥藻平皿藻苔上进行^[1,2]。

(二) 趋氧性及厌氧生长试验

将培养24小时的细菌液体培养物加入含1.0%琼脂的基础培养基中混匀,使成半固体,厌氧生长试验管则加注2.5cm高的液体石蜡,32℃培养,观察生长情况。

(三) 分解几丁质

采用无机盐培养基^[4]或基础培养基加入几丁质。

(四) 酪氨酸水解试验

在基础培养基或蒸馏水中加入酪氨酸,含量为0.5%,另加1.0%琼脂固化。

(五) 对盐的耐受性,生长的pH范围及在不同温度下生长丰度的比较

均采用72型分光光度计测定光密度值。

(六) 色素提取

本文于1982年6月13日收到。

DNA碱基比承军事医学科学院林万明、郭兆彪同志测定,中国科学院武汉病毒研究所电镜室协助拍摄电镜照片,光学显微照片承陶为民同志协助,一并致谢。

参照 Lewin 方法^[3]。另用乙醇粗提液进行了比较。用 SPECORD UV. VIS. (CARL ZEISS) 分光光度计测定。

(七) DNA 中 G + C 含量测定

热变性温度法。

(八) 药物敏感试验

采用纸片法。

其它生物学特性观察均采用《一般细菌常用鉴定方法》^[1]。固氮能力测定, 除用 Ashby 培养基外, 还参考气相色谱仪测定的乙炔还原能力结果。

结 果

(一) 菌体形态及染色性

菌体细长, 两端略变尖细, 宽度均一, 长度变化较大, 约 $0.4-0.5 \times 4.0-16.0 \mu\text{m}$ 以上, 在 0.5% 胰酶液体培养基中可长达 $60 \mu\text{m}$ 以上。无鞭毛、芽孢, 屈挠滑行。革兰氏染色阴性, 有异染粒, 抗酸性染色阴性(图 1、2)。

(二) 培养特性

在 0.5% 胰酶琼脂培养基上生长良好。幼龄菌苔具有肉眼可见的虹彩样荧光。菌落质粘, 圆形, 隆起, 边缘整齐, 表面

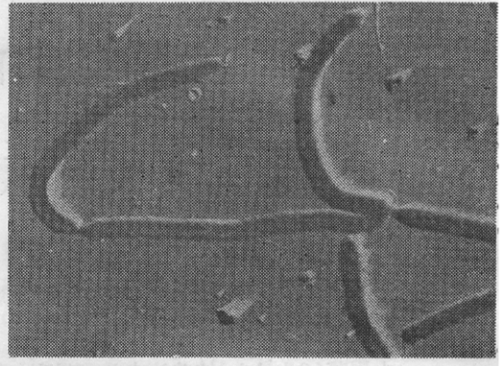


图 2 FCA 菌株菌体电镜照片 (0.5% 胰酶琼脂培养基, 32℃ 20 小时, 3,300×)

Fig. 2 Electron micrograph of strain FCA (0.5% tryptone agar, 32℃, 20hr.)

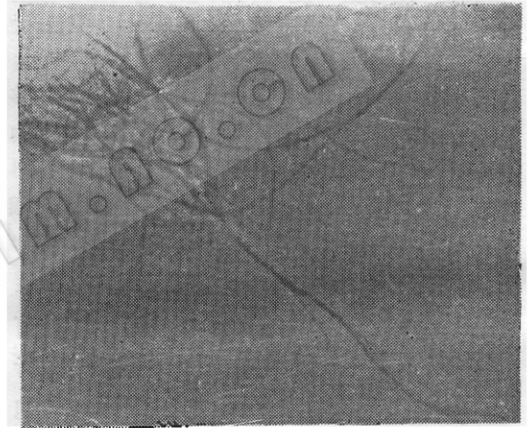


图 3 FCA 菌株在液体培养基中的丝状体形态 (相差, 800×)

Fig. 3 Filaments of strain FCA (0.5% tryptone liquid medium, 32℃, phase-contrast)

呈淡灰黄色。当培养基中含有 1.0% 葡萄糖、0.2% 可溶性淀粉或 1.0% 甘油时, 生长更为丰厚, 菌体相对粗短, 菌苔色素较深且可保持较长时间。将培养物置于光照条件下 (约 2000 勒克斯) 培养, 可明显地促进色素形成。无水溶性色素。在液体培养基中生长良好, 丝状体可长达 $60 \mu\text{m}$ 以上 (图 3), 形成厚的粉红色菌膜, 底部有大块絮状沉淀。菌体可相互聚集成团 (图 4)。在普通肉汁胰酶琼脂上生长不良, 在 0.05% 胰酶琼脂^[1]或蛋白胨含量低的 ГрОМОВ 培养基^[6]中



图 1 FCA 菌株菌体形态 (0.5% 胰酶琼脂培养基, 32℃ 24 小时, 1,000×)

Fig. 1 Cells of strain FCA (0.5% tryptone agar, 32℃, 24hr.)

光滑湿润。菌苔呈粉红色, 随菌龄增长色素渐深, 呈橙色-橙红色, 两天后逐渐消褪,

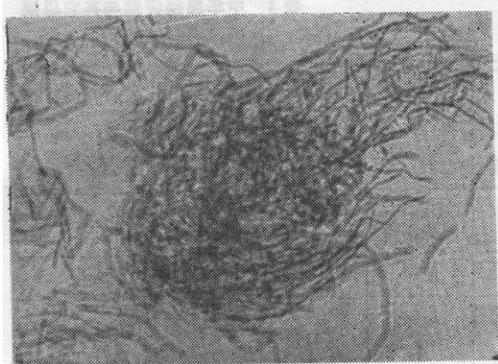


图4 FCA 菌株在液体培养基中聚集成团的细胞 (1,000×)

Fig. 4 Aggregated cell mass of strain FCA (0.5% tryptone liquid medium)

生长亦差或不生长。

(三) 生理生化特性

FCA 菌株有明显的趋氧性,但在厌氧条件下亦可生长。氧化并发酵葡萄糖产酸。可利用甘露醇、果糖、七叶灵等多种碳源,并由乳糖、半乳糖、麦芽糖、木糖、阿拉伯糖、蔗糖、纤维二糖、棉子糖产酸。水解淀粉,但不分解琼脂、几丁质和纤维素(滤纸条或羧甲基纤维素)在含1.0%甘油的胰酪琼脂上生长良好;在加甘油的 Board 和 Holding 培养基中生长良好,但在好氧或厌氧条件下均不产酸。在 Simmons 培养基上不生长。胰酪、酪蛋白酸水解物、硝酸盐、铵盐等均可作为唯一氮源,其中有机氮源优于无机氮源。不分解酪氨酸。由胰酪产氨。不液化明胶。还原硝酸盐。不产生硫化氢。还原石蕊牛奶。氧化酶、接触酶阳性;脲酶、果胶酶、苯丙氨酸脱氨酶阴性。甲基红、乙酰甲基甲醇及吲哚试验均阴性反应。在 Ashby 培养基上不生长,用气相色谱仪未测出乙炔还原能力。

FCA 菌株对盐的耐受性试验结果表明,在无 NaCl 的培养基中生长最佳;随 NaCl 浓度增高,长势下降。当 NaCl 浓度为 0.9% 时很少生长,1.0% 时不生长。

最适生长 pH 为 6.7; pH 在 5.4 以下及 9.0 以上不生长。

32—37℃ 生长最佳; 25℃ 长势明显下降, 21℃、40℃ 则更差, 3℃ 不生长。

色素光谱测定: 正己烷提取液最高吸收峰为 484 nm; 乙醇提取液为 484 nm、510 nm。色素提取液在室温下保存一月后重复测定, 光谱吸收曲线基本一致, 说明此色素相当稳定。

DNA 中 G + C 含量为 34.2 克分子% (Tm)。

(四) 药物敏感试验

结果表明, FCA 菌株除对 10 单位/ml 四环素、0.01% 十二烷基磷酸钠和 1:1000 代森铵敏感外, 对浓度为每毫升 2000 单位的多粘菌素 B 或 E、1600 单位青霉素 G、600 单位红霉素、200 单位新霉素、100 单位氯霉素、60 单位链霉素、40 单位春雷霉素、25 μg 丝裂霉素 C、10 μg 放线菌素 D 均不敏感。1:500 百菌清、1:250 多菌灵、1:500 敌克松及 0.1 ppm 硫酸铜对此菌无抑制作用。

讨 论

1. 根据 FCA 菌株菌体细长, 可屈挠、滑行运动, 革兰氏阴性, 不具内生芽孢及其它形式的休眠细胞, 无鞘及螺旋状细胞, 不分解琼脂、几丁质和纤维素, DNA 中 G + C 含量为 34.2 克分子%, 应属于屈挠杆菌属 (*Flexibacter*)。

2. Громов 等^[6]报道的溶解藻类营养细胞的屈挠杆菌与 FCA 菌株比较有明显差别: FCA 菌株兼性厌氧, 水解淀粉, 不液化明胶, 在 0.5% 胰酪培养基中生长良好, 色素亦有不同。因此, 我们认为 FCA 菌株属于与易挠屈挠杆菌溶藻亚种 (*Flexibacter flexilis* subsp. *algavorum*) 不同种的溶藻屈挠杆菌 (表 1)。

表 1 中华屈挠杆菌与其它屈挠

Table 1 Comparison of characters of *Flexibacter*

细 菌 名 称 Name of bacteria	生态环境	DNA 中 G + C 克分子%	细胞长度 (μm)	菌落颜色、色素类型、光谱 吸收峰 (nm)
中华屈挠杆菌 <i>Flexibacter chinenses</i> sp. nov.	淡水固氮蓝藻藻种池	34.2	0.4—0.5 \times 4.0—16.0	粉红-橙红, 484
加拿大屈挠杆菌 <i>F. canadensis</i>	土壤	37.0	3—60	白
琥珀酸屈挠杆菌 <i>F. succinicans</i>	淡水	38.0	5	白、黄、橙
聚团屈挠杆菌 <i>F. tractuosus</i>	海水, 淡水	34.5—39.5	5—50	橙, III 型, 471
聚集屈挠杆菌 <i>F. aggregans</i>	海水	35.7—42.3	100	黄, IV 型, 450
易挠屈挠杆菌 <i>F. flexilis</i>	淡水, 温泉	40.5—43	10—50	橙, III 型, 471
易挠屈挠杆菌溶藻亚种 <i>F. flexilis</i> subsp. <i>algavorum</i>	淡水	35.9	7—200	橙, 450, 475, 506
易挠屈挠杆菌紫蓝亚种 <i>F. flexilis</i> subsp. <i>iolanthe</i>	淡水	41.3	10—30	橙, III 型
易挠屈挠杆菌粘膜亚种 <i>F. flexilis</i> subsp. <i>pelliculosus</i>	淡水	39.5	10—30	橙, III 型
巨型屈挠杆菌 <i>F. giganteus</i>	淡水	32	100	粉红, 橙红, II 型, 478, 483
岸生屈挠杆菌 <i>F. litoralis</i>	淡水, 海水	31	180	红, 粉红, I 型
粉红屈挠杆菌 <i>F. rosellus</i>	温泉	34.5—38	>50	红, I 型
红色屈挠杆菌 <i>F. ruber</i>	温泉	37	>50	红, I 型
华美屈挠杆菌 <i>F. elegans</i>	淡水, 温泉	47.5	20—50	黄橙, III 型
橙黄屈挠杆菌 <i>F. aurantiacus</i>	土壤, 淡水鱼	31.5—32	5—20	黄-橙, V 型
橙黄屈挠杆菌铜色亚种 <i>F. aurantiacus</i> subsp. <i>copepodarum</i>	海水	33	5	黄
橙黄屈挠杆菌无席亚种 <i>F. aurantiacus</i> subsp. <i>excathedrus</i>	淡水	34.5	10	黄, IV 型
柱状屈挠杆菌 <i>F. columnaris</i>	淡水鱼	29.8—35.9	4—8	黄
桑克蒂屈挠杆菌 <i>F. sancti</i>	土壤	46—47	5—50	黄, IV 型
多形屈挠杆菌 <i>F. polymorphus</i>	海水	29	1.2 \times 数百	桃红-橙(光照), 442, 470, 501
蛋清屈挠杆菌 <i>F. albuminosus</i>	淡水	4—10		白
金黄屈挠杆菌 <i>F. aureus</i>	淡水	3—5		白黄-金橙

注: “+”阳性反应; “-”阴性反应;

3. 据已有记载的屈挠杆菌种的描述^[5-10], FCA 菌株与它们均有差异(表 1)。由表 1 中可见绝大多数屈挠杆菌严格好氧, 在厌氧条件下不能生长。而兼性厌氧的屈

挠杆菌——加拿大屈挠杆菌 (*Flexibacter canadensis*)、琥珀酸屈挠杆菌 (*Flexibacter succinicans*) 在 DNA 碱基比、色素、对某些糖类的利用及对明胶水解的能力与

杆菌生物特性比较

chinenses sp. nov. with other flexibacteria

厌氧生长	耐盐性 (NaCl%)		对 0.01% SDS 敏感性	液化	NO ₃ ⁻ 作唯一氮源	NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻	接触酶	硫化氢	碳 源 利 用										水解酪氨酸	其它
	最低	最高							葡萄糖	蔗糖	甘油	CMC	淀粉	乳糖	果糖	甘露醇	木糖	棉子糖		
+	0	0.9	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	溶藻
+	0	2.0	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+							
+	0			+	+	±	+	±	+	±	-	-	+	-	-	-	-	-		37℃不长 厌氧无色
-	0	5.0	±	±	-	±	-	±	+	±	±	-	±						+	
-	1.25	5.0	+	-	±	-	-	-	+	+	±	±	-						+	
-	0	0	+	-	-	-	-	+	±	+	-	-	±						+	
-			+	+			+						-							溶藻
-	0	0	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-						+	
-	0	0	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+						+	
-	0	0	+	+	-	-	-	±	+	-	-	-	+						±	
-	1.25	5.0	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+						+	
-	0	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-						-	
-	0	0	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+						±	
-	0	2.5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-						+	
-	0	2.5	-	+	+	-	+	-	±	±	-	+	±						+	
-	2.5	2.5	→	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-						+	
-	0	0	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+						+	
-	0.5			+		-	+	+	±	-	-		-							
-	0	0	+	+	+	±	-	+	+	+	±	+	±						+	
	2.0	7.5		-			-	-				-	-							多形态

“±”不同菌株反应不同。

FCA 菌株显然不同。而且琥珀酸屈挠杆菌在厌氧条件下无黄色,要求适当的碳源,在 37℃ 不生长。

Lewin^[2] 曾将屈挠细菌色素按其在正

己烷提取液中的光谱吸收曲线分为六种不同的类型: I 型: 450、475、505 nm, 红色; II 型: 450、478、505 nm, 粉红色; III 型: 425、447、471、505nm, 橙色、橙黄色; IV

型: 425、450、478 nm, 黄色; V 型: 423、453、480 nm, 黄色; VI 型: 440、465、488 nm, 红色。此外, Lewin (1974)^[9] 还报道了一个形态多变的新种多形屈挠杆菌 (*Flexibacter polymorphus*) 在光照条件下产生色素, 其光谱吸收峰值为 442、470、501 nm (正己烷提取液), 但在暗处培养无色素产生; FCA 菌株则无论在黑暗或光照下均可形成色素, 只是色素产生量和消褪时间有明显的差别。这种色素在正己烷中最高吸收峰为 484nm, 与上述各种色素均不相同。它在细菌体内随菌龄增长而渐消褪, 但在正己烷或乙醇等有机溶剂中却相当稳定。这种现象产生的原因尚不清楚, 但在观察细菌色素时应予以注意。

4. 屈挠杆菌属中有的种也有聚集的特点, 但在其它方面与 FCA 菌株比较却有很大差别。如聚团屈挠杆菌 (*Flexibacter tractuosus*) 与聚集屈挠杆菌 (*F. aggregans*)^[5] 均为严格好氧的种, 它们包括了 DNA 碱基比相差较大的一些菌株。在生理生化特性方面, 聚团屈挠杆菌株间存在一些差别。其中 GH-1 株 DNA 中 G + C 含量为 34.5 克分子%, 与 FCA 菌株近似。但它在严格好氧, 不利用乳糖、甘油、蔗糖, 不还原硝酸盐, 液化明胶, 水解酪氨酸及在 3℃ 可以生

长等方面又与 FCA 菌株不同。看来聚团屈挠杆菌的一些菌株在分类上是否属于一个种, 似有进一步鉴别的必要。

因此, 我们认为 FCA 菌株应属于屈挠杆菌属 (*Flexibacter*) 的一个新种。命名为中华屈挠杆菌 (*Flexibacter chinenses* sp. nov.), FCA 为模式株, 存中国科学院水生生物研究所。

参 考 文 献

- [1] 李勤生、黎尚豪: 水生生物学集刊, 7: 377—384, 1981。
- [2] 李勤生、黎尚豪: 微生物学通报, 10(3): 112—116, 1983。
- [3] 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。
- [4] Skerman, V. B. D. (蔡妙英等译): 《细菌属的鉴定指导》, 科学出版社, 北京, 1978。
- [5] Lewin, R. A. & M. L. Dorcas: *J. Gen. Microbiol.*, 58: 145—170, 1969。
- [6] Громов, Б. В. и др.: *Микробиология*, 41 (6): 1074—1079, 1972。
- [7] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974。
- [8] Christensen, P.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 429—432, 1980。
- [9] Lewin, R. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 82: 393—403, 1974。
- [10] Anderson, R. L. & E. J. Ordal: *J. Bacteriol.*, 81: 130—138, 1969。

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *FLEXIBACTER CHINENSES* SP. NOV.

Li Qinsheng Li Shanghao*

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Wang Dasi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Strain FCA was isolated from the *Calothrix* nursery bed in the Institute of Hydrobiology. It is a flexible rod or filament in shape with uniform width and various length (0.4—0.5 by 4.0—16.0 μ m). When it is grown in the liquid medium the length is usually more than 60.0 μ m. Sometimes the cells aggregate to form a mass. Motile by gliding, resting stages not known. Gram-negative.

The colour of colonies of strain FCA is pink, With a pale iridescence, and turn to orange with ageing. But on the third day the cell mass becomes colourless. The maximum absorption peak of crude extract of pigment (in n-hexane or ethanol) is at 484 nm.

Facultatively anaerobic; hydrolyzes starch; many sugars are utilized and acid is produced from glucose, maltose, lactose, galactose, sucrose, xylose, anabinose, raffinose and cellobiose, but not from mannitol, fructose and glycerol. Cellulose (filter paper or carboxymethyl cellulose), chitin and agar are not attacked. Casein hydrolysate, tryptone, ammonium or nitrate alone is utilized as a sole N source. Nitrate

is reduced to nitrite. Gelatin and tyrosine are not degraded.

The DNA G+C content of strain FCA is 34.2 moles%.

The initial isolate possesses ability to lyse vegetative cells of *Anabaena* strain 1105.

Growth of strain FCA is inhibited by 0.01% SDS, susceptible to tetracycline 10 u/ml; resistant to 10 μ g actinomycin D, 2,000 u polymyxin B or E, 1,600 u penicillin G, 60 u streptomycin, 25 μ g mitomycin C, 600 u erythromycin, 100 u chloramphenicol, and 200 u neomycin per ml. etc.

This strain belongs to the genus *Flexibacter*, but it differs significantly from species previously described. Therefore it is regarded as a new species, for which the name *Flexibacter chinenses* is proposed. Type culture FCA is deposited in the Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan.

Key words

Flexibacter; *Flexibacter chinenses*; *Calothrix*

* i.e. Shang-hao Ley.