

快生长型分枝杆菌的两个新种

梁丽糯 阮继生 阎逊初

(中国科学院微生物研究所, 北京)

分别从上海和云南的土壤中分离到两株快生长型分枝杆菌。其抗酸染色阳性, 含有枝菌酸, 细胞壁化学组分 IV 型, DNA 中 G + C 克分子含量均为 65.88% (1m)。用形态特征、培养特征、生理生化和化学特性等 63 项指标与已知的快生长型分枝杆菌进行数值分类分析, 结果表明, 这两株菌与已知菌是不同源的, 它们之间也是异源的。因此, 认为这两株菌是快生长型分枝杆菌的两个新种, 菌株 80-2 命名为上海分枝杆菌 (*Mycobacterium shanghaiense* n. sp.), 菌株 80-28 命名为云南分枝杆菌 (*Mycobacterium yunnanense* n. sp.)。

关键词 分枝杆菌属; 上海分枝杆菌; 云南分枝杆菌

分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 是 1896 年 Lehmann 和 Neuman 建立的^[1]。该属菌体为不规则杆状, 有时有分枝。无气丝, 无孢子。革兰氏阳性, 抗酸。细胞壁 IV 型, 即含有内消旋二氨基庚二酸以及阿拉伯糖和半乳糖。含有骨架具有约 80 个碳原子的枝菌酸 (mycolic acids), DNA 中 G + C 克分子含量为 62—70%。《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第八版) 中记载了 9 个快生长型的种, 其中 1 个种有 2 个亚种。但是目前国内尚未见此属新种的报道。我们自 1980 年开始, 从我国和美国土壤中分离 Runyon^[2] IV 型的分枝杆菌, 即快生长型分枝杆菌, 现将其中的两个新种报道如下。

材料和方法

(一) 菌种来源

菌株 80-2 和 80-28 分别分离自上海和云南土壤。

(二) 培养特征

采用 Chadwick 氏法^[3]和 Kubica 等人的方法^[4]。

(三) 生理生化特性

采用 Gordon 等人的方法^[5,6]。抗酸染色采

用 Ziehl-Neelsen 的方法^[7]。枝菌酸的分离鉴定采用 Kanetsuna 等人的方法^[7]。细胞壁化学组分分析采用 Becker 等人的方法^[8,9]。DNA 中 G + C 克分子含量测定采用 Marmur 等人的方法^[10,11]。用 *E. coli* AS 1.365 提取的 DNA 作为参照 DNA。数值分类采用 Sneath 和徐浩等人的方法^[12,13]。在分析的 63 项特征中, 有 50 项要比较正相符及负相符, 用公式 S_{sm}, 有 13 项用公式 S_j。这 50 项特征见表 1, 但利用果糖、甘露糖、 α -甲基-D-葡萄糖苷、棉子糖产酸, 芳香硫酸酯酶 (4 周) 未列入计算之列。13 项用公式 S_j 公式编码的特征是属于非两态编码的, 例如: 生长温度、枝菌酸颜色、每 2 克湿菌体产枝菌酸的毫克数。菌体长度、抗酸染色、菌落类型。

结果和讨论

上海分枝杆菌 新种

Mycobacterium shanghaiense n. sp.

菌株 80-2。

本文于 1985 年 2 月 4 日收到。

本研究工作大部分实验是在美国康奈尔大学, 由 M. Alexander 教授指导和资助下完成的; 刘志恒同志协助进行菌种筛选; 赵玉峰同志协助进行数值分类分析; 本所技术室协助照相, 特此一并致谢。

(一) 形态和培养特征

在罗氏培养基于 28℃ 培养 5 天生长良好,产生桔黄色色素,暗产色^[2],革兰氏阳性,抗酸染色阳性,菌体不规则杆状(图 1),大小为 0.4—0.6 × 0.7—3.0 μm。菌落介于粗糙型和光滑型之间的中间型。

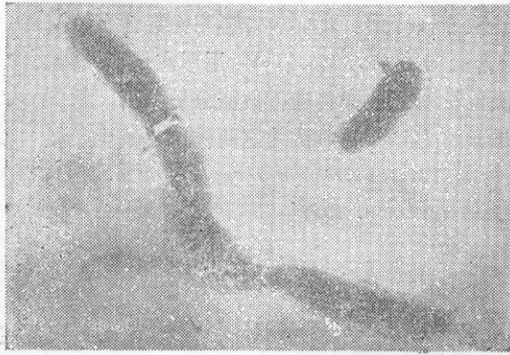


图 1 菌株 80-2 的形态 (×9,000)

Fig. 1 The morphology of strain 80-2

(二) 细胞壁化学组分

细胞壁 IV 型,含有内消旋二氨基庚二酸以及阿拉伯糖和半乳糖。

(三) 枝菌酸含量

每克湿菌体含枝菌酸 25.2mg,熔点 48℃,略带黄色。

(四) DNA 中 G + C 含量

DNA 中 G + C 克分子含量为 65.88%。

(五) 生理生化特性

能在 0.01% 孔雀石绿培养基和 5% NaCl 培养基上生长,在马慷慨培养基、0.01% 甲基紫和 0.01% 焦宁培养基上不生长。在 25—32℃、37℃ 和 40℃ 生长,在 45℃ 和 52℃ 不生长。产生苯酰胺酶、异烟酰胺酶、烟酰胺酶、吡嗪酰胺酶、尿囊素酶、琥珀酰胺酶;不产生乙酰胺酶。不分解苯丙氨酸。以苯甲酸盐、柠檬酸盐、苹果酸盐、草酸盐、琥珀酸盐为唯一碳源。从果糖、半乳糖、肌醇、甘露醇、甘露糖、海藻糖、

木糖、α-甲基-D-葡萄糖苷产酸;从阿拉伯糖、卫矛醇、鼠李糖、山梨醇、棉子糖不产酸。能以 L-谷氨酸、L-丝氨酸、L-蛋氨酸、尿素、异烟酰胺、烟酰胺、硝酸盐、亚硝酸盐作为唯一氮源。能以 L-谷氨酸钠、葡萄糖胺盐作为唯一碳源和氮源;不能以 L-丝氨酸、烟酰胺、氨基乙醇为唯一碳源和氮源。60℃ 4 小时不存活。芳香硫酸酯酶(3 天)阴性,4 周阳性。亚硝酸盐(3 天)还原;硝酸盐不还原。过氧化氢酶(68℃)阴性,铁吸收阴性,不产生烟酸。吐温 80 水解 5 天阴性,不水解马尿酸盐,不产生脲酶。过氧化氢酶(45mm 泡沫)阳性(表 1)。

(六) 菌种鉴别

菌株 80-2 抗酸染色阳性,含有特异性枝菌酸,在多种培养基上 28℃ 5 天生长良好,为快生长型的分枝杆菌。菌株 80-2 与《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版中记载的 9 个快生长型分枝杆菌的种(其中一个种有 2 个亚种)相比较,用 63 项指标进行数值分析,结果(表 2)表明,菌株 80-2 与牝牛分枝杆菌(*M. vaccae*)只有 75.0% 的相似值,而与其它 7 个种,2 个亚种都低于 75.0%。但在对 9 个不同的已知种进行同一的数值分析中,区分它们的相似值高达 85.0%。与 Skerman 1980 年记载^[14]的快生长型分枝杆菌相比较,相似值都低于 66%。菌株 80-2 与牝牛分枝杆菌在乙酰胺酶、琥珀酰胺酶的产生,苯丙氨酸的分解,利用草酸盐为碳源,从阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、α-甲基-D-葡萄糖苷产酸,过氧化氢酶(68℃),铁吸收,吐温 80(5 天)水解,以异烟酰胺、亚硝酸盐为唯一氮源,以葡萄糖胺盐为唯一碳源和氮源,在 0.01% 甲基紫和 5% NaCl 上生长等都不相同。因此,认为菌株 80-2 为一新种,根据该菌株分离自上海土壤,故命名为上海分枝杆菌

表 1 菌株 80-2 和 80-28 的培养特征和生理生化特性
Table 1 Cultural characters and physiological and biochemical properties
of 80-2 strain and 80-28 strain

| 项 目 | 菌 株 | | 项 目 | 菌 株 | |
|---------------------|------|-------|--------------|------|-------|
| | 80-2 | 80-28 | | 80-2 | 80-28 |
| 酰胺酶: | | | 异烟酰胺 | + | - |
| 乙酰胺酶 | - | - | 烟酰胺 | + | - |
| 苯酰胺酶 | + | + | 硝酸盐 | + | + |
| 异烟酰胺酶 | + | + | 亚硝酸盐 | + | + |
| 烟酰胺酶 | + | + | 唯一氮源和碳源: | | |
| 吡嗪酰胺酶 | + | - | L-谷氨酸盐 | + | + |
| 尿囊素酶 | + | + | L-丝氨酸 | - | + |
| 琥珀酰胺酶 | + | + | 葡糖胺 | + | - |
| 苯丙氨酸分解 | ± | - | 烟酰胺 | - | - |
| 碳源利用: | | | 氨基乙醇 | - | + |
| 苯甲酸盐 | - | - | 60°C 4 小时存活 | - | ± |
| 柠檬酸盐 | + | + | 芳香硫酸酯酶 (3 天) | - | - |
| 苹果酸盐 | + | + | (4 周) | + | + |
| 草酸盐 | + | - | 亚硝酸盐还原 (3 天) | + | - |
| 琥珀酸盐 | + | + | 硝酸盐还原 | - | + |
| 利用糖产酸: | | | 过氧化氢酶 68°C | + | + |
| 阿拉伯糖 | - | - | 铁吸收 | - | + |
| 卫矛醇 | - | - | 烟酸 | - | - |
| 果糖 | + | + | 吐温水解 (5 天) | - | - |
| 半乳糖 | + | - | 过氧化氢酶 45mm | + | + |
| 肌醇 | + | - | 脲酶产生 (28 天) | - | - |
| 甘露醇 | + | + | 马尿酸盐水解 | - | + |
| 甘露糖 | + | + | 马康慨琼脂 | - | + |
| 鼠李糖 | - | - | 0.01% 孔雀石绿 | + | + |
| 山梨醇 | - | - | 0.01% 甲基紫 | - | - |
| 海藻糖 | + | + | 0.01% 焦宁 | - | + |
| 木糖 | + | + | 5% NaCl 生长 | + | - |
| α -甲基-D-葡萄糖苷 | + | - | 生长在 | | |
| 棉子糖 | - | - | 25°-32°C | + | + |
| 唯一氮源: | | | 37°C | + | + |
| L-谷氨酸盐 | + | + | 40°C | + | - |
| L-丝氨酸 | + | + | 45°C | - | - |
| L-蛋氨酸 | + | - | 52°C | - | - |
| 尿素 | + | + | | | |

Mycobacterium shanghaiense n. sp. o

模式菌株 80-2 的菌种保藏号为 AS 4.1191。

云南分枝杆菌 新种

Mycobacterium yunnanense n. sp.

菌株 80-28。

(一) 形态和培养特征

在罗氏培养基 28°C 培养 5 天生长良好, 不产生色素, 革兰氏阳性, 抗酸染色阳性, 菌体不规则杆状, 有分枝, 菌体大小为 0.5—0.6 × 2—4 μm , 菌落粗糙型。

(二) 细胞壁化学组分

表 2 菌株 80-2 和 80-28 与已知种的相似值(%)

Table 2 Similarity of 80-2 and 80-28 strains with known species (%)

| | 菌株 80-2 | 菌株 80-28 |
|---|---------|----------|
| 草分枝杆菌 (<i>M. phlei</i>) | 59.1 | 54.1 |
| 牝牛分枝杆菌 (<i>M. vaccae</i>) | 75.0 | 52.0 |
| 迪氏分枝杆菌 (<i>M. diernhoferi</i>) | 66.0 | 50.0 |
| 耻垢分枝杆菌 (<i>M. smegmatis</i>) | 74.0 | 42.3 |
| 蛇分枝杆菌 (<i>M. thermophiles</i>) | 60.5 | 52.6 |
| 转黄分枝杆菌 (<i>M. flavescens</i>) | 48.5 | 48.5 |
| 偶发分枝杆菌 (<i>M. fortuitum</i>) | 56.8 | 53.8 |
| 外来分枝杆菌 (<i>M. peregrinum</i>) | 56.5 | 65.2 |
| 龟分枝杆菌龟亚种 (<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>) | 51.3 | 63.1 |
| 龟分枝杆菌脓肿亚种 (<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>) | 52.6 | 56.4 |

细胞壁 IV 型, 含有内消旋二氨基庚二酸, 阿拉伯糖和半乳糖。

图 2 菌株 80-28 的形态 ($\times 6,000$)

Fig. 2 The morphology of strain 80-28

(三) 枝菌酸含量

每克湿菌体含枝菌酸 108.0 mg, 熔点 47°C , 白色。

(四) DNA 中 G + C 含量

DNA 中 G + C 克分子含量为 65.88%。

(五) 生理生化特性

在马康慨培养基、0.01% 孔雀石绿培养基、0.01% 焦宁培养基上生长; 在 0.01% 甲基紫培养基和 5% NaCl 培养基上不能生长。 25°C — 30°C 和 37°C 生长, 而在 40°C 、 45°C 、 52°C 不生长。产生苯酰胺酶、异烟酰胺酶、烟酰胺酶、尿囊素酶、琥珀酰胺酶; 不产生乙酰胺酶和吡嗪酰胺酶。不分解苯丙氨酸。能以柠檬酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐作为唯一碳源; 不以苯甲酸盐、草酸盐为唯一碳源。能从果糖、甘露醇、甘露糖、海藻糖、木糖产酸; 不能从阿拉伯糖、卫矛醇、半乳糖、肌醇、鼠李糖、山梨醇、 α -甲基-D-葡萄糖苷、棉子糖产酸。能以 L-谷氨酸钠、L-

丝氨酸、尿素、硝酸盐和亚硝酸盐为唯一氮源; 不能以 L-蛋氨酸、异烟酰胺和烟酰胺为唯一氮源。能以 L-谷氨酸钠、L-丝氨酸、氨基乙醇为唯一氮源和碳源; 不能以葡萄糖胺和烟酰胺作为唯一氮源和碳源。60°C 4 小时存活微弱。芳香硫酸酯酶(3 天)阴性, 4 周阳性。亚硝酸盐(3 天)不还原, 硝酸盐还原, 过氧化氢酶 68°C 和铁吸收阳性。不产生烟酸。吐温 80(5 天)不水解。过氧化氢酶(45mm 泡沫)阳性。不产生脲酶, 水解马尿酸盐(表 1)。

(六) 菌种鉴别

菌株 80-28 抗酸染色阳性, 含有特异性枝菌酸, 在多种培养基上 28°C 5 天生长良好, 为快生长型分枝杆菌。菌株 80-28 与《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版中记载的快生长型分枝杆菌的 9 个种(其中 1 个种有 2 个亚种)相比较, 用 63 项指标进行了数值分类分析。结果(表 2)表明, 它与外来分枝杆菌(*M. peregrinum*)只有 65.2% 的相似性, 与其它菌相比相似值都低于 63.1%。而在对 9 个不同的已知种进行同一的数值分类中, 区分它们的相似值高达 85.0%。它与 Skerman 1980 年记载的快生长型分枝杆菌相比, 相似值都低于 64%。菌株 80-28 和外来分枝杆菌在乙酰胺酶、苯酰胺酶、异烟酰胺酶、烟酰胺酶、琥珀酰胺酶、脲酶的产生, 以硝酸盐作为唯一氮源, 以 L-丝氨酸、葡萄糖胺、氨基乙醇为唯一碳源和氮源, 芳香硫酸酯酶(3 天), 在 0.01% 甲基紫上生长, 在 5% NaCl

上生长等都不相同。因此认为, 菌株 80-28 为一新种, 根据该菌株分离自云南土壤, 故命名为云南分枝杆菌 *Mycobacterium yunnanense* n. sp.。模式菌株 80-28 的菌种保藏号为 AS 4.1192。

菌株 80-2 和 80-28 在形态、培养特征和生理生化特性方面有显著区别, 它们的数值分类相似值只有 50.9%, 因此认为它们是两个不同的种。

参 考 文 献

- [1] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1974.
- [2] Runyon, E. H.: *Medical Clinics of North America*, 43: 273—279, 1959.
- [3] Maureen, V.: *Mycobacteria* Wright P. SG. Bristol London Boston. 1982.
- [4] Jones, W. D. J. R. et al.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 88: 355—395, 1963.
- [5] Kestle, D. G. et al.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 95: 1041—1051, 1967.
- [6] Tsukamura, M.: *J. Gen. Microbiol.*, 45: 253—273. 1966.
- [7] Kanetsuna, F. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 70: 209—212, 1970.
- [8] Becker, B. et al.: *Appl. Microbiol.*, 12: 421—423, 1964.
- [9] Lechvalier, H. A. et al.: *Appl. Microbiol.*, 4: 47—72, 1971.
- [10] Marmur, J.: *Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [11] 林万明等: *微生物学通报*, 8(5): 245—247, 1981.
- [12] Sneath, P. H. A. et al.: *Numerical Taxonomy*, W. H. Freeman and Company. San Francisco, 1973.
- [13] Xu Hao et al.: *Science Bulletin*, 29: 1543—1546, 1984.
- [14] Skerman, V. B. D. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 225—300, 1980.

TWO NEW SPECIES OF RAPIDLY GROWING MYCOBACTERIA

Liang Linuo Ruan Jisheng Yan Xunehu

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Two strains of rapidly growing mycobacteria were respectively isolated from soil samples from Shanghai city and Yunnan province of China. Acid fastness of these strains was positive. All of the two strains contained mycolic acids and possessed a cell wall composition type IV containing meso-DAP, arabinose and galactose. The G + C content of the DNA for the two cultures was 65.88 moles% (Tm). Numerical taxonomy study by using 63 characters of characteristics of morphology, culture, physiology and biochemistry as well as chemistry showed that these two strains which were obviously heterogenous were not homogenous with

known taxa of rapidly growing mycobacteria. These strains were, however, proposed to be two new species of rapidly growing mycobacteria. We propose the two new species, one for 80-2 with the name *Mycobacterium shanghaiense* n. sp., the type strain: AS 4.1191, the other for 80-28 with the name *Mycobacterium yunnanense* n. sp., the type strain: AS 4.1192.

Key words

Mycobacterium; *Mycobacterium shanghaiense*; *Mycobacterium yunnanense*