

一个细菌的新属——肾状菌属

周慧玲 肖昌松 周宇光 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从我国江苏省如东县掘东垦区大米草根内分离到一株革兰氏阴性弯曲细菌, 编号9。该菌细胞大多数呈肾状也有呈弧状, 细胞直径 $0.4-0.6\mu\text{m}$, 细胞延长形成肾状, 外侧长度 $1.1-2.5\mu\text{m}$ 。细胞外有小刺, 细胞内无气泡, 但有聚 β -羟基丁酸盐的颗粒。不运动, 有机化能营养兼无机化能自养, 能利用二氧化碳作为碳源, 氢作为能源。能以多种有机酸、山梨醇和甘露醇为碳源。呼吸代谢从不发酵, 在无氮情况下能微好氧生长。能固定分子态氮。接触酶和氧化酶阳性。从木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖、乳糖、鼠李糖、山梨醇和 2, 3-丁二醇产酸, 而不从核糖、麦芽糖、蔗糖、纤维二糖、蜜二糖、海藻糖、松三糖、棉子糖、菊糖、淀粉、糊精、糖原、乙醇、赤藓醇、甘油、阿东醇、甘露醇、山梨醇、卫矛醇、柳醇和肌醇产酸。能在含 4.5% 以下的 NaCl 培养液中生长, 生长温度为 $10-41^{\circ}\text{C}$, 最适生长温度为 $30-35^{\circ}\text{C}$ 。生长 pH 为 $6.0-9.5$, 最适生长 pH 为 $7.5-8.0$ 。DNA 中 G + C 含量为 68.4 克分子%。

根据《伯杰氏系统细菌学手册》(1984) 所列资料, 菌株 9 应归入不运动革兰氏阴性弯曲细菌群中, 虽与该群中微环菌属相似, 但又有明显的差别。因此, 我们认为不能将菌株 9 归于微环菌属 (*Microcylus*) 内, 而建立新属——肾状菌属 (*Renoides* gen. nov.), 代表种为米草肾状菌 (*Renoides spartinacae* sp. nov.)。菌株 9 为其模式株。菌种保藏于中国科学院微生物研究所菌种保藏室。菌株编号为 AS 1.1761。

关键词 革兰氏阴性弯曲细菌; 肾状菌属; 米草肾状菌

大米草是一种高度耐盐、耐淹、繁殖力强、适应性广、根系发达的多年生禾本科植物。1980年6月从江苏省如东县掘东垦区种植的大米草根内分离到一株弯曲细菌——9号菌。在数值分类中归属于氧化性菌群, 与假单胞菌属所在的表观群的相似值为 84.5%。经鉴定该菌株不同于不运动、革兰氏阴性弯曲细菌群中已知的任何一个属, 因此建立新属。现将结果报告如下。

材料与方法

(一) 菌株

取江苏省如东县掘东垦区的大米草幼嫩根约 3—5cm 长, 用 0.1% 升汞水表面消毒, 然后用

无菌水漂洗, 置研钵研磨后取其汁液涂平板。分离培养基为加 0.3% NaCl 的 Döbereiner 氏无氮培养基。经反复划线获得菌落形态和镜检形态基本一致的纯菌, 再进行形态、DNA 碱基百分比和生理生化等性状的测定。

试验菌接种于 Döbereiner 氏苹果酸钠琼脂、PSS、YP 及牛肉汁酵母膏琼脂斜面培养基, 置 30°C 培养 24—48 小时。

(二) 鉴定方法

主要根据《一般细菌常用鉴定方法》及参考文献^[1-3, 6]介绍的有关方法。

本文于 1986 年 5 月 13 日收到。

本所柏长祥同志参加部分工作, 初昭妍同志摄制电镜照片, 赵小平同志摄制照片, 王政芳同志及北京市农业科学院周枫同志测定固氮酶活性, 南京大学都文煊及曹幼琴同志参加采集样品和分离菌种, 特此一并致谢。

1. 形态特征:

(1) 个体形态: 在 Döbereiner 氏苹果酸钠^[1]、牛肉汁酵母膏、PSS^[2]和 YP^[3]琼脂培养基上, 30℃培养 1、2、4、7、14 天后用光学显微镜、透射电子显微镜, 观察且测量其细胞大小。

检查细胞内积累的聚 β -羟基丁酸盐颗粒系采用 Döbereiner 氏苹果酸钠培养基, 常规方法染色^[4]。

(2) 菌落形态: 在 YP 琼脂培养基平板上划线, 30℃培养 7 天后进行观察, 测量菌落大小及颜色^[5]等。

2. 生理特性:

(1) 生长温度: 用 PSS 培养液, 30℃培养 24 小时的菌种直针接种于 PSS 澄清液中, 分别置 3—4℃ 冰箱, 10—13℃ 低温室, 20℃ 和 25℃ 温箱, 28、30、35、37 和 41℃ 水浴中, 一周内观察生长情况。

(2) 生长 pH: 在 Beckman pH 计测试下, 用稀盐酸及稀 NaOH 将 PSS 培养液的 pH 值调到 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0, 分别分装试管, 15 磅 30 分钟灭菌。灭菌后, 分别抽样测定培养液的 pH 值, 以此 pH 值为准。用 30℃ 培养 24 小时的液体菌种接种, 每管一小环, 置 30℃ 培养 2、4 和 7 天, 检查浊度。

(3) 趋氧性: 将培养 24 小时的菌液, 混于有 0.2% 琼脂的 Döbereiner 氏无氮培养基及 PSS 培养基的试管中, 一周内观察生长情况。

(4) 碳源的利用: 以无机盐^[4]为基础培养基, 所用碳源有以下 22 种 (0.2%): 甲醇、甲酸、醋酸钠、丙酸、丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸、己酸、丙二酸、柠檬酸钠、琥珀酸钠、苹果酸钠、反丁烯二酸、马尿酸钠、氨基乙酸、苯丙氨酸、脯氨酸、精氨酸, 2,3-丁二醇、甜菜碱、酪胺。将培养 24 小时的菌种, 用直针接种, 置 30℃ 在原培养液中连续转接两次, 两周内观察其生长浊度。

(5) 二氧化碳及氢的利用: 采用① 无氮无机盐^[4]培养基, 其成份为 (g): Na_2CO_3 2.0、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5、 K_2HPO_4 0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1、蒸馏水 1,000ml。② 重蒸馏水。在上述二种培养基中加 1% 的苹果酸钠为阳性对照。

在密闭的器皿内充以人工配制的混合气体, 其组分 (V/V): $\text{O}_2:\text{N}_2 = 2:8$; $\text{O}_2:\text{N}_2:\text{CO}_2 = 2:8:0.05$; 空气: 氢气 = 1:1; 自然空气, 共计 4 种气体组合。将培养 24 小时的细胞用生理盐水洗涤 3 次后, 接入装有 5ml 液体培养基的厌氧试管中, 通氮气 3—5 分钟, 使管内达纯氮状态, 然后按比例通入 O_2 或 CO_2 气体, 30℃ 培养 7 天, 连续传代 3 次, 记录生长情况。

(6) 色素: 接种金氏 B 培养基, 于 30℃ 培养一周, 用 253.7nm 紫外光源观察荧光色素的产生情况。

3. 生化特性:

(1) 碳水化合物产酸: 在休和利夫森二氏培养基^[4]中, 分别加入 1% 的木糖、阿拉伯糖、核糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、蜜二糖、纤维二糖、海藻糖、松三糖、棉子糖、菊糖、糊精、糖原、淀粉、鼠李糖、山梨糖、乙醇、甘油、赤藓醇、阿东醇、甘露醇、山梨醇、卫矛醇、柳醇、肌醇和 2,3-丁二醇。于 30℃ 培养, 两周内观察结果。

(2) 脱氧核糖核酸酶的检查: 系采用 DNase 培养基 (其成分 (g): 胰胨 15、大豆胨 5、NaCl 5、DNA 2、甲苯胺蓝 0.1、琼脂 15、蒸馏水 1,000ml, pH 7.2, 8 磅 20 分钟灭菌), 将培养 24 小时的菌种点种或划线接种, 置 30℃ 培养 1—2 天, 观察结果。菌落周围呈红紫色为阳性反应。

(3) 脂肪酶检查: 系采用铜皂形成法^[6]。

(4) 耐盐力试验: 在 PSS 培养液中分别加入 (%) : 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 和 7.0 的 NaCl, 直针接种后, 于 30℃ 培养 3 周, 观察其生长情况。

(5) 固氮酶活性的测定: 采用乙炔还原法。

(6) DNA 中碱基含量测定: 用解链温度法 (T_m) 测定 DNA 中 G + C 含量, 对照菌株为大肠埃希氏菌 K12 (AS1.365)。

结 果

(一) 个体形态

革兰氏阴性, 细胞直径 0.5—0.7 μm , 多为肾状 (图 1), 亦有呈弧状, 细胞延长形

表1 菌株9生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical of strain 9

测试项目 Test	反应结果 Reaction	测试项目 Test	反应结果 Reaction
葡萄糖氧化发酵 Oxidation-fermentation test	氧化 Oxidative	葡萄糖氧化发酵 Oxidation-fermentation test	氧化 Oxidative
碳水化合物产酸 Acid production from carbohydrate		脲酶 Urease	-
木糖 Xylose	+	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-
阿拉伯糖 Arabinose	+	苯丙氨酸脱氨酶	-
葡萄糖 Glucose	+	Phenylalanine deaminase	
果糖 Fructose	+	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
半乳糖 Galactose	+	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	+
甘露糖 Mannose	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+
乳糖 Lactose	+	脱氧核糖核酸酶 DNase	-
鼠李糖 Rhamnose	+	脂肪酶 Lipase	-
山梨糖 Sorbose	+	固氮酶 Nitrogenase	+
2,3-丁二醇 2,3-butyleneglycol	+	在 KCN 培养基中生长	(+)
核糖 Ribose	产碱 alkaline	KCN (growth on)	
麦芽糖 Maltose	产碱 alkaline	生长温度 Growth temperature (°C)	
蔗糖 Sucrose	产碱 alkaline	2-4; 42	-
蜜二糖 Melibiose	产碱 alkaline	10-13; 20-25; 28; 30; 35; 37; 41	+
纤维二糖 Celluliose	产碱 alkaline	生长 pH Growth pH	
海藻糖 Trehalose	产碱 alkaline	4.5-5.5; 10.0-12.0	-
松三糖 Melizilose	产碱 alkaline	6.0-9.5	+
棉子糖 Raffinose	产碱 alkaline	耐 NaCl 能力 NaCl tolerance (%)	
淀粉 Starch	产碱 alkaline	0-4.5	+
糊精 Dextrin	产碱 alkaline	5.0-7.0	-
菊糖 Inulin	产碱 alkaline	碳源的利用	
糖原 Glycogen	产碱 alkaline	Carbon sources used for growth	
乙醇 Ethanol	产碱 alkaline	醋酸钠 Sodium acetate	+
甘油 Glycerol	产碱 alkaline	丁酸 Butyric acid	+
赤藓醇 Meso-erythritol	产碱 alkaline	柠檬酸钠 Sodium citrate	+
阿东醇 Adonitol	产碱 alkaline	琥珀酸钠 Succinate	+
山梨醇 Sorbitol	产碱 alkaline	苹果酸钠 Sodium malate	+
肌醇 Inositol	产碱 alkaline	反丁烯二酸 Fumaric acid	+
甘露醇 Mannitol	产碱 alkaline	苯丙氨酸钠 Sodium phenylalanine	+
产生吲哚 Indole production	-	脯氨酸 Proline	+
甲基红试验 Methyl red test	-	山梨醇 Sorbitol	+
VP	-	甘露醇 Mannitol	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	2,3-丁二醇 2,3-butyleneglycol	+
厌氧硝酸盐生长, 产气 Denitrification	-	甜菜碱 Betaine	+
从半胱氨酸及三糖铁产生 H ₂ S	-	酪朊 Casein	+
H ₂ S from Cysteine (TSI)		甲醇 Methanol	-
石蕊牛奶 Litmas milk	产碱 alkaline	甲酸 Formate acid	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	丙酸 Propionic acid	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	异丁酸 Iso-butyric acid	-
荧光产生 Fluorescent	-	正戊酸 Valeric acid	-
聚 β-羟基丁酸盐	+	异戊酸 Iso-valeric acid	-
Poly-β-hydroxybutyrate		己酸 Caproic acid	-
水解七叶灵 Esculin hydrolysis	+	丙二酸盐 Malonate	-
氧化酶 Oxidase	+	氨基乙酸 Aminoacetic acid	-
接触酶 Catalase	+	马尿酸钠 Hippurate	-
		精氨酸 Arginine	-

注: +: 阳性 Positive; - 阴性 Negative;

(+: 缓慢阳性 Delayed positive.

成肾状, 外侧直径 $1.1-2.5\mu\text{m}$ 。单个, 细胞边缘有小刺(图 2), 细胞内有聚 β -羟基丁酸盐(图 1), 无荚膜, 不运动。

(二) 培养特征

1. 在 YP 培养基上中度生长, 30°C 培养 7 天, 菌落为圆形, 中央具乳头状突起, 直径 $0.5-1.0\text{mm}$, 蚌肉白^[5], 不透明, 培养 24 小时后整个菌落易挑起, 似硬皮。

2. 色素: 不产荧光色素。

(三) 生理生化特性

属于需氧及微需氧菌, 将菌种混于 PSS 半固体琼脂中, 只在培养基表面生长



图 1 菌株 9 24 小时的细胞 ($\times 36,000$)

Fig. 1 The 24 hr. culture cell of strain 9



图 2 菌株 9 24 小时的细胞 ($\times 42,000$)

Fig. 2 The 24 hr. culture cell of strain 9

(图 I-1)。在 Döbereiner 氏无氮培养基半固体琼脂中, 可行微好氧生长(图 I-2), 其它性状见表 1。

二氧化碳及氢的利用, 采用人工配气进行试验。结果表明, 该菌株可以将 CO_2 作为碳源, 利用氢作为生长的能源。

(四) DNA 中 G + C 含量的测定

DNA 中 G + C 含量为 68.4 克分子%。

讨 论

菌株 9 为革兰氏阴性弯曲细菌, 细胞大多数呈肾形, 细胞外有小刺, 细胞内无气泡, 但有聚 β -羟基丁酸盐颗粒。不运动。不能以单碳化合物(例: 甲醇、甲酸)为碳源。产生固氮酶, 不产生脂肪酶和鸟氨酸脱羧酶。能在 4.5% NaCl 和 pH6.0—9.5 培养液中生长。好氧、微好氧。DNA 中 G + C 为 68.4 克分子%。

1978 年 Tarrand 等^[6]建立了固氮螺菌属(*Azospirillum*)。菌株 9 细胞呈弯曲弧状且有固氮能力, 以多种有机酸为碳源, 似乎与固氮螺菌相近。但菌株 9 细胞为无鞭毛的表面有小刺的肾状, 细胞直径约为固氮螺菌的一半, 仅 $0.5\mu\text{m}$ 左右, 显然与固氮螺菌不同。并且菌株 9 的菌落颜色为白色调, 而不是红色调或黄色调, 厌氧硝酸盐不产气, 脲酶阴性, 能以山梨醇和甘露醇为唯一碳源生长。这些性状也与固氮螺菌不同。因而菌株 9 不是固氮螺菌属的成员。

在《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第八版)中, 将革兰氏阴性、弯曲细菌归入螺菌科(Spirillaceae), 而在《伯杰氏系统细菌学手册》(1984)中, 将“手册”(第八版)中螺菌科的菌群根据其运动性分为两个部分。将运动、好氧、微好氧弯曲细菌归入第二部分, 撤销了螺菌科的名称, 成为 7 个并列的属。将不运动的弯曲细菌归入“手册”(1984)的第三部分。将革兰氏阴性, 细胞

表 2 菌株 9 与微环菌属的区别

Table 2 Differential characteristics of the *Microcycylus* and strain 9

性状 Characteristics	微环菌属 <i>Microcycylus</i>	No. 9
细胞形状 Cell shape	弯杆状 curved rods	肾状 kidney shaped
细胞边缘 Cell surface	整齐 smooth	有小刺(较少) spine
荚膜 Encapsulated	+	—
细胞内有气泡 Gas vacuoles present	+	—
细胞内有聚 β -羟基丁酸盐		+
Poly- β -hydroxybutyrate present		
需氧性 Aerotaxis	严格好氧 obligate aerobic	好氧,微好氧 aerobic microaerophilic
在 0—4.5% NaCl 生长 Growth		+
生长温度 Temperature range (°C)	5—37	10—41
最适温度 Optimum temperature (°C)	22—37	30—35
生长 pH Growth		6.0—9.5
最适 pH Optimum		7.5—8.0
利用单碳化合物 Utilization of		
甲醇 Methanol	利用 utilization	不利用 non-utilization
甲酸 Formate	利用 utilization	不利用 non-utilization
脂肪酶 Lipase	+	—
固氮酶 Nitrogenase	—	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	—
产酸 Acid production from		
核糖 Ribose	+	产碱 alkaline
蔗糖 Sucrose	+	产碱 alkaline
蜜二糖 Melibiose	+	产碱 alkaline
菊糖 Inulin	+	产碱 alkaline
甘油 Glycerol	+	产碱 alkaline
甘露醇 Mannitol	+	产碱 alkaline
水解七叶灵 Esculin hydrolysis	—	+
生态环境 Habitat	土壤、淡水 soil, freshwater.	大米草根内 inside root of spartina anglica

偶见成环,不形成空泡,不运动,菌落黄色或粉色,氧化性和 DNA 中 G + C 为 34—53 克分子% 的细菌归入螺体菌科 (*Spiromaceae*)。它包括 3 个属: 1. 螺体菌属 (*Spirosoma*); 2. 古字母形菌属 (*Runella*); 3. 屈曲杆菌属 (*Flectobacillus*)。而将一些革兰氏反应未见报道,发酵性和 G + C 含量高的细菌,成立了 4 个并列的属: 1. 微环菌属 (*Microcycylus*); 2. 新月菌属 (*Menicus*); 3. 短弓菌属 (*Brachyarcus*); 4. 泥双屈菌属 (*Pelosigma*)。

菌株 9 的细胞形态、生理生化和 DNA

中 G + C 含量与微环菌属很相似,但又有明显区别 (表 2)。我们认为,由于这些差别不能将菌株 9 归于 *Microcycylus* 属内,而建立一新属,即肾状菌属 (*Renoides* gen. nov.)。其模式种为米草肾状菌 (*Renoides spartinaceae* sp. nov.)。菌株 9 为模式株。菌种保藏于中国科学院微生物研究所菌种保藏室,菌株编号为 AS1.1761。

参 考 文 献

- [1] Döbereiner, J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 22 (10): 1464—1473, 1976.
- [2] Hylemon, P. B. et al.: *Intern. J. syst. Bacteriol.*,

- 23: 340—380, 1973.
- [3] Oyaizu, H. & K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27: 57—107, 1981.
- [4] 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.
- [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] Berry, J. A.: *J. Bact.*, 25: 433, 1933.

- [7] Buchanan, K. E. & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [8] Krieg, N. K. & J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- [9] Tarrand, J. T. & R. K. Noel: *Can. J. Microbiol.*, 24: 967—980, 1978.

A NEW BACTERIAL GENUS—*RENOIDES* GEN. NOV.

Zhou Huiling Xiao Changsong Zhou Yuguang Wang Dasi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of Oram negative curved bacterium, No. 9, was isolated from the inside of root of *Spartina anglica* grown on the sea shore of Rutung County, Jiangsu Province. The cells of bacterium No. 9 are kidney shaped mostly, some are vibroid in shape. Cell diameter is 0.5—0.7 μm , the length of the outside curve, 1.1—2.5 μm . There are small spines at the surface of the cells. No gas vacuoles exists in cells but β -hydroxybutyric acid granules. Non-motile. Chemoorganotroph and facultative chemolithotroph, CO_2 as carbon source and H_2 as energy source. Acetic acid, butyric acid, succinic acid, malic acid, citric acid, fumaric acid, 2,3-butylene glycol, proline, phenylalanine, casein and betaine are used as carbon sources. Formic acid, methanol, propionic acid, iso-butyric acid, valeric acid, iso-valeric acid, caproic acid, malonic acid, methanol, glycine, arginine, or hippuric acid does not be used as carbon source. Metabolism respiratory, never fermentative. In media without combined nitrogen, microaerophilic growth will occur and molecular nitrogen will be fixed. Catalase and oxidase positive. Acid is produced from xylose, arabinose, glucose, fructose, galactose, mannose, lactose, rhamnose, sorbitol and 2,3-butylene glycol. No acid is produced from

ribose, maltose, sucrose, melibiose, cellubiose, trehalose, melizitose, raffinose, inuline, starch, dextrin, glycogen, ethanol, erythritol, glycerol, adonitol, mannitol, sorbitol, dulcitol, salicin and inositol. Growth occurs in broth containing 0—4.5% NaCl. Temperature range for growth is 10°—41°C, optimum, 30°—35°C. Growth pH range is 6.0—9.5, optimum, 7.5—8.0. GC content in DNA is 68.4 mole%.

According to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984), bacterium No. 9 belongs to the group of non-motile Gram negative curved bacteria. Although it is quite similar to *Microcylus*, there are some differences obviously as above mentioned. We propose a new Genus name, *Renoides* gen. nov., and a new species name, *Renoides spartinacae* sp. nov., for bacterium No. 9. The culture is deposited in Type Culture Collection, Institute of Microbiology, Academic Sinica, with a catalogue number AS 1. 1761.

Key words

Nonmotile Gram-negative curved bacteria; *Renoides*; *Renoides spartinacae*