

东湖屈挠杆菌的分离及其生物学特性研究*

李勤生 利 群 蔡庆华

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

由蒙金娜培养基上分离获得了东湖中的屈挠杆菌。研究了其中 4 个代表株的生物学特性, 并与中华屈挠杆菌、加拿大屈挠杆菌、皮纳屈挠杆菌等 3 种屈挠杆菌的模式株作了比较和数值分类, 讨论了屈挠杆菌在水生态系统中的作用、分离方法及其应用前景。

关键词 屈挠杆菌, 滑行细菌, 水细菌, 微生物生态

屈挠杆菌 (*Flexibacter*) 是颇具特色的细菌类群, 以其可屈挠的细胞壁、滑行运动有别于其它真细菌, 是研究原核生物细胞超微结构、滑行运动机理的良好实验材料^[5,11]。屈挠杆菌属中有的种类已被证明是鱼类或藻类的病原菌^[2,8,13], 此外, 它们还是探求新的药物资源的对象^[6,9], 因此日益引起科学工作者的重视。迄今, 已报道的屈挠杆菌属的成员均属异养细菌, 对各种不同类型的有机物质具有分解能力, 而且在海水、淡水、温泉、鱼塘等水域中均有发现。显然, 屈挠杆菌是水生态系统中不应忽视的类群。

有关屈挠杆菌研究虽有一些报道, 但仍属于研究相对较少的类群, 国内尤其如此。中华屈挠杆菌 (*Flexibacter chinensis*) 是我国迄今唯一分离、鉴定的屈挠杆菌种^[2]。它是由藻种培养池中分离而得的。至于我国淡水湖泊中屈挠杆菌的踪迹则完全不了解。

在研究东湖异养细菌群落结构与功能的过程中, 我们不仅发现了屈挠杆菌的存在, 而且在蒙金娜培养基上有时还居于优势。为此, 我们对不同时间和湖区分离获得的屈挠杆菌的代表株进行了形态、生理生化等特性研究, 与实验室现有的几种屈挠杆菌的模式株作了比较, 采用微机聚类分析方法, 按菌株间的相似值确定其分类位置, 并就屈挠杆菌的分离、在水生态系统中的作用以及应用潜力进行了讨论。

材 料 与 方 法

1. 采样点

东湖 I 站位于西部湖湾区, 有大量生活污水流入, 湖泥中有机质含量高; 东湖 II 站位于郭郑湖中心区, 水面开阔, 湖泥中有机质较少。

2. 样品采集及菌株分离方法

* 国家自然科学基金资助课题(3860591)。

1987 年 10 月 22 日收到。

以铝制采样器钻取湖泥,称取 40 g,加入 400 ml 无菌水中,充分振荡均匀,然后稀释至适宜稀释度,每直径 9.0 cm 培养皿中加入 1 ml 样品,与 15 ml 左右蒙金娜有机磷或无机磷培养基混合倾注平皿,30℃ 培养 5—7 天。挑取可屈挠杆状菌菌落在 0.5% 胰酪琼脂上划线再分离纯化。

3. 东湖屈挠杆菌代表株的来源及培养基(表 1)

表 1 菌株来源及培养基

Tab. 1 The sources of strains and media

菌株编号 Strain No.	样品来源 Source of sample	分离用培养基 ^[1] Medium used for isolation	生长用培养基 ^[2] Medium used for cultivation
F873	东湖 II 站湖泥	蒙金娜无机磷培养基 Menkina inorganic phosphate medium	0.5% 胰酪琼脂培养基
F875	Sediment from Station II in the Donghu Lake	蒙金娜有机磷培养基 Menkina organic phosphate medium	(tryptone agar medium)
F876	东湖 I 站湖泥	蒙金娜无机磷培养基 Menkina inorganic phosphate medium	0.5% 胰酪琼脂培养基
F877	Sediment from Station I in the Donghu Lake	蒙金娜有机磷培养基 Menkina organic phosphate medium	(tryptone agar medium)

4. 比较用菌株

中华屈挠杆菌 (*Flexibacter chinensis*) FCA 株系本所保存菌株; 加拿大屈挠杆菌 (*F. canadensis*) Fxcl 株、皮纳屈挠杆菌 (*F. pinensis*) 系西德 Reichenbach 教授 (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Abteilung Mikrobiologie) 惠赠。以上均为模式株。

5. 生理生化特性检测

42 项生理生化检测项目采用国产快速生化板(河南省开封医学生物研究所生产); 其余部份项目按一般细菌常用鉴定方法^[1]。药物敏感性试验采用纸片法^[2]。

6. 检测结果处理

采用 IBM PC/XT 微型计算机计算各菌株间生物学特性的相似值,根据相似值绘出动态聚类图(树状谱)。公式如下:

$$r_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^m X_{ik} \cdot X_{jk}}{\left(\sum_{k=1}^m X_{ik}^2 \cdot \sum_{k=1}^m X_{jk}^2 \right)^{\frac{1}{2}}}$$

结 果

1. 代表株的特点

由东湖 I、II 站湖泥中分离所得的屈挠杆菌株,无论来自蒙金娜有机磷或无机磷培

表 2 7 株屈挠杆菌生物学特性比较

Tab. 2 Comparison of biological characters of 7 strains of flexibacteria

检测项目 Test	菌株 Strain	FCA	Ctpl	Fxcl	F 873	F 875	F 876	F 877
乙酰甲基甲醇试验 V.P		-	-	-	-	-	-	-
硝酸盐还原 NO ₃ -NO ₂		+	+	+	-	-	-	-
吲 噪 Indole		-	-	-	-	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶 Phe. deaminase		+	+	+	-	-	-	-
产生硫化氢 H ₂ S		-	-	+	-	-	-	-
柠檬酸盐的利用* Cit		+	+	+	+	+	+	+
赖氨酸脱羧酶 Lys decarboxylase		+	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase		+	+	+	-	+	-	+
精氨酸双水解酶 Arginine dehydrolase		+	+	+	+	+	+	+
氰化钾试验 KCN		+	-	-	+	-	+	+
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase		+	+	+	+	+	+	+
丙二酸盐的利用 Malonate		-	-	+	+	+	-	-
尿素酶 Urease		+	+	+	+	+	-	+
淀粉水解 Starch		+	+	+	-	-	-	-
七叶苷水解 Esculin		+	+	+	+	+	+	+
木糖 Xylose		+	+	-	+	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose		+	+	-	+	-	+	-
甘露糖 Mannose		-	-	-	+	-	-	-
蔗糖 Sucrose		+	-	+	+	+	+	+

* 此项结果与在 Simmons 氏培养基上所得结果不同。

续表 2

检测项目 Test	菌株 Strain	FCA	Ctpl	Fxcl	F ₈₇₃	F ₈₇₅	F ₈₇₆	F ₈₇₇
半乳糖 Galactose		-	-	-	+	-	-	-
乳糖 Lactose		+	-	-	-	-	-	-
甘露醇 Mannitol		-	-	-	+	+	-	+
蔗糖 Trehalose		+	+	-	+	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose		-	-	-	-	+	-	+
蜜二糖 Melibiose		+	-	-	+	+	+	-
山梨糖 Sorbitol		-	-	-	-	-	-	-
水杨苷 Salicin		-	-	-	-	+	-	+
肌醇 Inositol		-	-	-	-	-	-	-
麦芽糖 Maltose		+	+	+	+	+	+	+
果糖 Fructose		+	-	-	+	-	-	+
松三糖 Melezitose		+	-	+	+	+	+	+
松二糖 Turanose		-	-	-	+	-	+	+
棉子糖 Raffinose		+	-	-	+	+	+	-
鼠李糖 Rhamnose		-	-	-	-	-	+	-
卫矛醇 Galactitol		-	-	-	-	-	-	-
菊糖 Inulin		+	-	-	-	-	-	-
侧金盏花醇 Adonitol		-	-	-	-	-	-	-
无盐胨水 Peptone water		-	+	+	+	-	+	+
1% NaCl 胨水 Saline peptone		-	+	+	+	-	+	+
3% NaCl 胨水 Saline peptone		-	+	-	-	-	+	+

续表 2

菌株 Strain 检测项目 Test	FCA	Ctpl	Fxcl	F ₈₇₃	F ₈₇₅	F ₈₇₆	F ₈₇₇
葡萄糖氧化 Glucose oxidation	—	—	+	+	+	+	+
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+	+	+	+	+	+	+
分解纤维素 Cellulose hydrolysis	—	—	—	—	—	—	—
分解几丁质 Chitin	—	+	—	—	—	—	—
液化明胶 Gelatin	—	+	+	—	—	—	—
氯霉素 100u/ml Chloromycetin	—	—	—	+	+	+	+
四环素 10u/ml Tetracycline	—	—	—	—	—	—	—
链霉素 60u/ml Streptomycin	—	+	+	—	+	+	—
青霉素 1 600u/ml Penicillin	—	—	+	—	—	+	—
多粘菌素 B 2 000u/ml Polymyxin B	—	+	+	—	—	—	—
多粘菌素 E 2 000u/ml Polymyxin E	—	+	+	—	—	—	—
菌落粉红色 Colony pink	+	—	—	+	+	+	+
菌落有荧光 Colony with fluorescence	+	—	+	+	+	—	+
菌落黄色 Colony yellow	—	+	—	—	—	—	—
菌落白色 Colony white	—	—	+	—	—	—	—
细胞宽度 > 0.5 μ m Cell width	—	+	—	—	—	—	—
细胞宽度 \leq 0.5 μ m Cell width	+	—	+	+	+	+	+
细胞长度 (μ m) Cell length	4—16	2—6	6—14	4—10	4—10	4—10	4—10

培养基,它们共同特点是:菌落圆形,边缘整齐,低凸状,呈浅粉红色,质地软、粘,直径 1—1.5 mm; 在 0.5% 胰胨培养基上菌落较大,可达 2mm,色素亦较明显,其中 F₈₇₆ 菌株色素在相同培养条件下,较其它 3 株略深,但均可随培养时间延长而逐渐消退。在 0.5% 胰胨培养基上, F₈₇₃, F₈₇₅, F₈₇₇ 菌落还可见虹彩样荧光,此特点与中华屈挠杆菌 FCA 株相似。在

0.5% 胰腺液体培养基中生长良好, 均匀混浊, 培养较长时间后, 可逐渐形成小团絮状物在液体表面或沉入管底。在营养琼脂上未见生长。

4 个代表菌株菌体形态基本相似, 均为细长、可屈挠杆状体, $0.5 \times 4-10 \mu\text{m}$, 有的菌体可超过 $10 \mu\text{m}$, 单个或不规则聚集状, 革兰氏阴性, 抗酸染色阴性, 均有异染粒。

2. 代表株的生理生化特性和与 3 种屈挠杆菌模式株的比较

分离所得菌株均表现了明显的趋氧性, 但在厌氧条件下, 亦可生长。它们能利用多种有机物质, 但各菌株间有不同程度的差别(表 2)。

3. 4 个代表株的相似值

F_{875} 与 F_{877} 为 0.80; F_{873} 与前两株为 0.78; F_{876} 与前三株为 0.76 (图 1)。FCA 与 4 个代表株在相似值为 0.75 时聚为一簇; Ctpl 与 Fxcl 间相似值为 0.65; 所有菌株的相似值为 0.61。

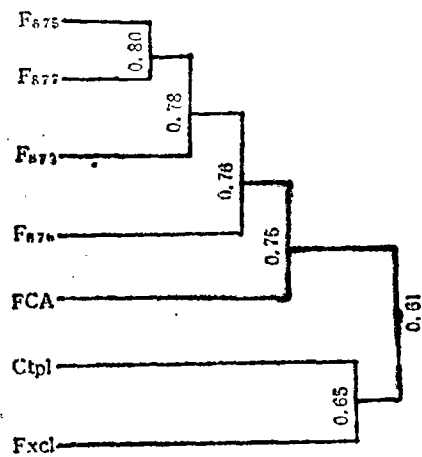


图 1 7 株屈挠杆菌相似性程度树状谱

Fig. 1 Similarity dendrogram for 7 strains of *Flexibacter*

讨 论

1. 屈挠杆菌是水生态系统中不容忽视的细菌类群

由东湖中分离获得了屈挠杆菌这一事实不仅证明它们在我国淡水湖泊中确实存在, 而且发现在某些样品中数量相当多。如 1987 年 6 月东湖 I 站湖泥样品中屈挠杆菌菌落在蒙金娜有机磷培养基上居于绝对优势。研究不同时间和湖区分离的屈挠杆菌代表株, 发现它们对多种有机物质具有分解能力(表 2), 表明它们在湖泊物质循环中起着一定作用, 虽然它们均未表现对有机磷、无机磷化合物的分解能力。其次, 我们曾经由藻种培养池中分离和鉴定了一种蓝藻病原菌——中华屈挠杆菌^[2]; 苏联学者 Громов^[14] 等亦曾报道过易挠屈挠杆菌溶藻亚种 (*Flexibacter flexilis* subsp. *algavorum*) 溶解藻类营养细胞; 柱状屈挠杆菌 (*F. columnaris*) 已被证明是淡水鱼类病原菌^[8]; 1986 年 Wakabayashi 及其同事报道了由不同海水鱼中分离鉴定的鱼类病原菌 *Flexibacter maritimus*^[9]。由此可见, 屈挠杆菌无论从数量、在水体物质循环中的作用和对水生动物、植物的影响, 都是值得微生物生态学者及有关学科工作者给予充分重视的细菌类群。

2. 东湖屈挠杆菌代表株的生物学特性比较及其分类位置

由于 4 个代表株 F_{873} 、 F_{875} 、 F_{876} 、 F_{877} 的形态、色素基本相似, 我们着重比较了它们的生理生化特性, 结果表明它们虽有许多相似之处, 但仍有不同程度的差异(表 2, 图 1)。为研究它们的分类位置, 采用微型计算机聚类分析方法处理检测结果, 计算各菌株间相似值。结果发现以上 4 个代表株与中华屈挠杆菌 FCA 株间的最低相似值为 0.75, 据此, 我

们认为它们是一个种内的不同生理株。与加拿大屈挠杆菌和皮纳屈挠杆菌模式株之间的差异更为显著,仅在相似值为 0.61 时聚为一簇,也即相当于属的水平。此结果与采用传统分类方法所得结果正好是相符的。我们所采用的检测项目和计算方法,是否对所有屈挠杆菌种均适用,则有待进一步验证。

3. 屈挠杆菌分离方法讨论

由蒙金娜有机或无机磷培养基上分离获得屈挠杆菌过去未见有报道。其原因可能与它们没有表现分解磷化合物的能力有关。此外滑行细菌菌落多具有扩展生长特征,但由东湖分离的屈挠杆菌株无论在蒙金娜有机磷、无机磷培养基、阿西比培养基或胰酪琼脂培养基上均不具有此种外观特点,与其它真细菌菌落相似。在研究东湖异养细菌群落结构中,在营养琼脂上未发现屈挠杆菌,同时,我们试验的所有屈挠杆菌在此培养基上几乎均不能生长。以上种种,我们认为是造成屈挠杆菌漏检的主要原因,值得研究者注意。

4. 屈挠杆菌应用研究动向

近几年来,国外一些研究者已经在滑行细菌中发掘新的药物资源^[6,7,9,10]。美国学者 Cooper 及其同事^[6]曾由屈挠杆菌中获得了两种分子量不同的新抗菌素 SQ28, 502, SQ28, 503。Singh 等^[12]发现了 SQ28, 332。Barcak 等^[4]近年来研究了一株屈挠杆菌对氯霉素、四环素的耐药性,并对耐药机理作了初步探讨,认为此种特性可能与质粒无关。无疑这些都是值得注意的研究动向,预示着屈挠杆菌应用的前景。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1978。一般细菌常用鉴定方法。科学出版社。
- [2] 李勤生、黎尚豪、王大相, 1984。中华屈挠杆菌的分离和鉴定。微生物学报, 24(1): 7—13。
- [3] 许光辉、郑洪元主编, 1986。土壤微生物分析方法手册。131 页。农业出版社。
- [4] Barcak, G. J. and Burchard, R. P., 1985. Induction of chloramphenicol tetracycline resistance in *Flexibacter* sp. strain FS-1. *J. Bacteriol.*, 16(2): 810—812.
- [5] Burchard, R. P., 1982. Evidence for contractile flexing of the gliding bacterium *Flexibacter* FS-1. *Nature*, 298(5874): 663—665.
- [6] Cooper, R., Bush, K., Principe, P. A., Trejo, W. H., Wells, J. S. and Sykes, R. B., 1983. Two new monobactam antibiotics produced by a *Flexibacter* sp. 1. Taxonomy fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiotics*, 36(10): 1252—1257.
- [7] Jansen, R., Keifensahl, G., Gerth, K., Reichenbach, H. and Hoeffle, G., 1983. Antibiotics from gliding bacteria XV. Myxalamides A. B. C. and D. a group of homologous antibiotics from *Myxococcus xanthus* Mx X12 (*Myxobacterales*). *Liebigs Ann. Chem.*, 7: 1081—1095.
- [8] MacFarlane, R. D., Bullock, G. L. and Amcloughlin, J. J., 1986. Effects of fire metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115(2): 227—231.
- [9] Onishi, N., Izaki, K. and Takahashi, H., 1984. A macrocyclin antibiotic M-230B produced by *Myxococcus xanthus* isolation and characterization. *J. Antibiotics*, 37(1): 13—19. (Jan.).
- [10] Reichenbach, H., 1983. Antibiotics from gliding bacteria XVII. Myxopyronin A and B, two novel antibiotics from *Myxococcus fulvus* strain Mx f50. *Liebigs Ann. Chem.*, 10: 1656—1667.
- [11] Ridgway, H. F. and Lewin, R. A., 1983. Subunit composition of goblet-shaped particles from the cell wall of *Flexibacter polymorphus*. *Can. J. Bacteriol.*, 29(12): 1689—1693.
- [12] Singh, P. D., Johnson, J. H., Ward, P. C., Wells, J. S., Trejo, W. H. and Sykes, R. B., 1983. SQ28, 332, a new monobactam produced by a *Flexibacter* sp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure determination and biological properties. *J. Antibiotics*, 36(10): 1245—1251.
- [13] Wakabayashi, H., Hikida, M. and Masumura, K., 1986. *Flexibacter matitimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36(3): 396—398.
- [14] Громов, Б. В., Иванов, О. Г., Маикаева, Н. А. и Авиллов, И. А., 1972. Флексибактерия ли-
зирующая синезные водоросли. *Микробиология*, 41(6): 1074—1079.

STUDY ON ISOLATION AND BIOLOGICAL CHARACTERS OF *FLEXIBACTER* STRAINS FROM DONGHU LAKE

Li Qinsheng Li Qun and Cai Qinghua

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

Abstract

Several colonies of *Flexibacter* were found on the Menkina media (organic or inorganic phosphate medium) from sediment samples of Donghu Lake. They have the ability to decompose organic substances. It seems that *Flexibacter* is one of the important bacterial groups in the aquatic ecosystem. The Menkina media can be used for *Flexibacter* isolation and cultivation.

The biological characters (including morphological, physiological and biochemical characters) of four representative strains of *Flexibacter* isolated from Station I and II in Donghu Lake were examined and compared with the type strains of *Flexibacter chinensis*, *F. canadensis* and *F. pinensis* using a microcomputer. Cluster analysis indicated that the similarity between F875 and F877 is rather high (similarity value 0.80) the similarity value between the four representative strains and *F. chinensis* FCA is 0.75. The four strains were considered as different physiological strains of *F. chinensis*. The similarity value between *F. canadensis* Fxcl and *F. pinensis* Ctpl strains is 0.65. All strains can be clustered in to one group at a similarity value of 0.61. These results are consistent with the results obtained by traditional classification methods.

Key words *Flexibacter*, Gliding bacteria, Aquatic bacteria, Microbial ecology