

研究报告

新菌——吉林链梭菌的分类学研究

谷海瀛

(吉林铁路中心医院临床微生物研究室, 吉林 132001)

摘要 从7例阴道炎患者阴道分泌物分离出7株细菌, 均具有相同的生物学特性, G⁻梭状菌, 单、成对或链状。无荚膜, 无芽孢, 无鞭毛。兼性厌氧菌, 在大气中培养不生长, 在5%~10%CO₂中或烛缸培养18~24h才能形成菌落, MacConkey培养基不生长, 最适生长温度35℃~37℃。氧化酶阴性, 接触酶阴性, 不还原硝酸盐, 发酵糖类(指示剂用溴甲酚紫), 克氏双糖铁高层和斜面均发生产酸反应, 七叶苷水解试验阳性, 马尿酸盐水解试验阴性。经Biolog MicroStation System自动化细菌鉴定系统检测无确定结果, DNAG+C含量为42.3mol%。16S rRNA序列测定结果经计算机检索国际基因菌库EMBL和Gen Bank所有序列进行比较, 表明该菌与已知科、属亲缘关系较远, 结合其表型特征, 建议建立新属, 命名为吉林链梭菌(*Streptofusia* gen. nov. *jilina* sp. nov.)

该菌已收藏在中国微生物菌种保藏中心CGMCC NO. 0215^T(T=type strain)。该菌16S rRNA片段已被国际基因库收录, 接收号为U34365。

关键词 吉林链梭菌, 16S rRNA, 鉴定, 分类

从7例阴道炎患者阴道分泌物分离出7株细菌, 经过鉴定研究, 这7株细菌具有相同的生物学特性, 根据16S rRNA序列测定结果, 这是一新菌, 命名为吉林链梭菌*Streptofusia* gen. nov. *jilina* sp. nov 报告如下:

1 材料与方法

1.1 供试菌株

细菌来源于7例妇科患者阴道分泌物, 涂片染色, 镜检可见脓细胞和一种G⁻短小杆菌, 7例均为同种细菌感染。

1.2 生物学特性

1.2.1 培养特性: 采用OXOID公司生产的TRYPTOSE血琼脂基础, 按说明要求制作血平板, 无菌手续取妇科患者阴道分泌物, 接种于该血平板上, 35℃常规培养和烛缸培养18~24h观察结果。

1.2.2 形态: 方法参照文献[1], 用光学显微镜

及透射电镜观察细胞形状、大小等特征。

1.2.3 生化特性: 参照文献[2]进行。

1.2.4 Biolog Microstation System 自动 G⁻细菌鉴定。

1.2.5 狐狸阴道加德纳氏菌抗血清: 由中国农业科学院特产研究所免疫室提供。

1.2.6 DNA的G+C含量测定: DNA提取采用Marmur法^[3], 测定参考T_m值法, 计算根据Madel^[4]的公式。

1.2.7 16S rRNA序列测定:

1.2.7.1 菌体的培养及收集: TSA液体培养基35℃摇床培养24h, 8000r/min×10min离心收集菌体, 用TE缓冲液洗菌体两次, 最后悬浮于TE缓冲液中。

1.2.7.2 DNA的提取: 见文献[5]。

1.2.7.3 引物的设计及PCR扩增^[6,7]: 引物由中科院微生物研究所技术中心合成。

Primer I:

5'-AATTGAAGAGTTTGATCATG-3'

Primer II:

5'-CTGCTGCCTCCCGTAGGAG-3'

1.2.7.4 PCR 反应: 在 Perkin-Elmer-Cetus 扩增仪上进行, 模板 1.0 μ l; Primers 各 1.5 μ l; dNTP 2.0 μ l Taq polymerase 0.5 μ l; PCR buffer 10.0 μ l; MgCl₂ 10.0 μ l; 去离子水 73.5 μ l.

a. 反应循环: 94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 30s, 10 个循环。再接: 94 $^{\circ}$ C 15s, 52 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 15s, 20 个循环。

b. 菌株的扩增引物: Primer I + Primer II

c. PCR 产物的纯化: 见文献[7]。

1.2.7.5 序列的测定: 由 ABI370A 测序仪进行, 菌株的测序引物为 Primer I。

1.2.7.6 相似菌种序列的检索及比较: EMBL 数据库中进行。

1.2.7.7 相似性的比较及树状谱的生成: 由中科院微生物研究所 MIN TS 数值分类系统进行。

2 结果

2.1 培养特征

血琼脂平板上在大气中培养不生长, 需烛缸或 5%~10%CO₂ 培养 18~24h, 有醋味, 菌落圆形, 半透明, 光滑, 边缘整齐, 直径 0.5~1.0mm, 无溶血, MacConkey 培养基不生长, 在普通营养琼脂上生长, 但也需烛缸中培养或

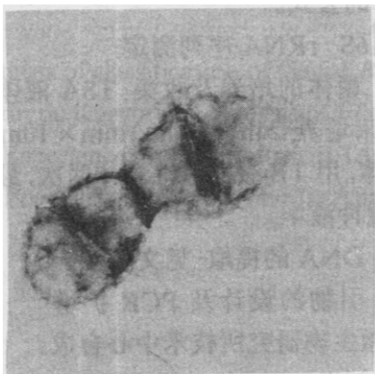


图 1 细菌透射电镜形态($\times 21000$)

5%~10%CO₂ 环境中生长, 厌氧条件可生长, 为兼性厌氧菌, 最适生长温度为 35 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C。

2.2 形态

G⁻短小杆菌, 单、成对或链状排列, 透射电镜表明为梭状(图 1)。大小: 直径 0.6~0.9 μ m, 长 0.9~1.2 μ m, 无荚膜, 无鞭毛, 无芽孢。

2.3 生化特性

氧化酶阴性, 触酶阴性, 不还原硝酸盐, 发酵糖类(指示剂用溴甲酚紫或甲基红, 而不用溴麝香草酚蓝, 表 1)。

表 1 吉林链梭菌的生化特性

试验	结果 (7/7)	试验	结果 (7/7)
氧化酶	-	发酵产酸不产气	
触酶	-	D-葡萄糖	+
硝酸盐还原	-	蔗糖	+
吡啶	-	D-甘露醇	+
尿素酶	-	乳糖	+
V-P	-	卫茅醇	-
甲基红	+	D-侧金花醇	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	D-山梨醇	-
硫化氢产生	-	棉籽糖	+
马尿酸盐水解	-	L-鼠李糖	-
七叶苷水解	+	麦芽糖	+
明胶液化	-	D-木糖	-
赖氨酸脱羧酶	-	海藻糖	+
鸟氨酸脱羧酶	-	D-甘露糖	+
精氨酸双水解酶	+	果糖	+
丙二酸盐利用	-	克氏双糖铁反应	
西蒙氏枸橼酸盐利用	-	斜面	产酸
		高层	产酸

2.4 经 Biolog Microstation System 自动化细菌鉴定系统检测无确定结果

2.5 本菌与狐狸阴道加德纳氏菌抗血清凝集反应阴性

2.6 热变性法测定 DNA 的 G+C 含量为 42.3mol%

2.7 16S rRNA 序列测定结果
其序列为:

10	20	30	40	50	60
GGCGGCGATG	ACATAACACA	TGCAAGTCGG	AACGAAGGCT	AACGGCCTTA	GTGGCGCACG
70	80	90	100	110	120
GGTGCCTAAC	GCGTGGGAAT	CTGCCCTCAG	GTTCCGAATA	ACAGGGAGAA	ATCGCTGCTA
130	140	150	160	170	180
ATACCGGATG	ATATCGCGAG	ATCAAAGATT	TATCGGCCTG	AGGATGAGCC	CGCGTAGGAT
190	200	210	220		
TAGCTAGTTG	GTGGGGTAAA	GGCCACCAA	GGCGATGATC		

检索国际基因菌库 EMBL 表明和目前所有菌序列都不同,最大相似性和少动鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas paucimobilis*) 达 90%。

根据相似性选择最接近的 12 个种 16S rRNA 序列,采取平均链锁聚类方式,得出同

源性树状谱(图 2)。

3 讨论

3.1 这 7 株菌为兼性厌氧 G⁻杆菌,但不还原硝酸盐,触酶试验阴性,MacConkey 培养基不生长等特征不符合肠杆菌科细菌。

3.2 根据形态等表型特征及 DNA 的 (G+C) mol%,应属于巴斯德菌科^[8],但与相近的属比较各有差异(表 2)。该菌能发酵葡萄糖,接触酶和氧化酶皆阴性,不还原硝酸盐为亚硝酸盐,吲哚试验阴性,这些表型特征及分离来源均符合加德纳氏菌属,但加德纳氏菌细胞形态具有多形性,革兰氏阳性到可变^[8],而本菌属七株菌均呈典型的梭形,始终为革兰氏阴性细菌,加德纳氏菌虽然初次分离需 CO₂ 培养,但普通环境培养也能生长较好,加德纳氏菌营养要求高,很难在营养琼脂上生长,能在 Vaginalis agar(阴道琼脂)和蛋白胨-淀粉-葡萄糖琼脂^[8]上生长,培养需 48h,而本菌培养要求不高,营养琼脂 18~24h 内即可生产良好。加德纳氏菌在克氏双糖铁培养基不生长,而本菌属克氏双糖铁斜面 and 高层均发生产酸反应。加德纳氏菌属在含 5% 人血琼脂呈 β 溶血,而本菌对人血琼脂无溶血反应。加德纳氏菌属一个重要特征之一是能水解马尿酸盐^[9],而本菌属则否,鉴定本菌属另外一个重要特征之一是能水解七叶苷,而加德纳氏菌属则不能。其他一些特性如甘露醇发酵试验等也提示两者之间差异。

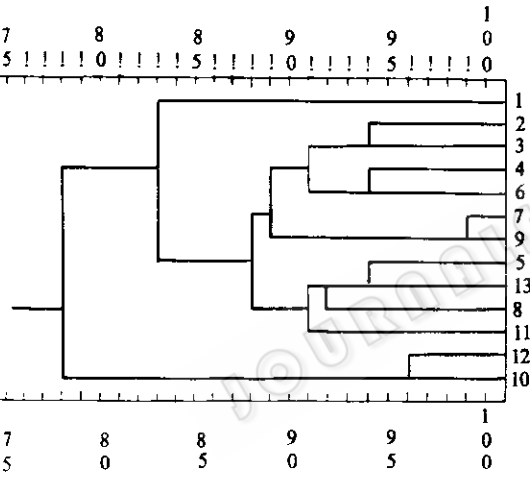


图 2 16SRNA 序列平均链锁聚类方式树状谱

- 1. 吉林链梭菌 *Streptofusua jilina*
- 2. 少动鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas paucimobilis*
- 3. 难取鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas adhaesiva*
- 4. 血液鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas sanguis*
- 6. 类少动鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas parapaucimobilis*
- 7. 荚膜鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas capsulata*
- 9. 荚膜黄杆菌 *Flavobacterium capsulatum*
- 5. 鞘氨醇单胞菌种 *Sphingomonas* sp.
- 13. Yano 氏鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas yanoikuyae*
- 8. 亚弧形柄杆菌属 *Caulobacter subvibrioidies*
- 11. 土地鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas terrae*
- 12. 长红杆菌 *Erythrobacter longus*
- 10. 新月形柄杆菌 *Caulobacter crescentius*

1995 年我国报告一种新的人兽共患传染病,这是由狐狸阴道加德纳氏菌引起的疾病^[10],同时确定了阴道加德纳氏菌的亚种——

表 2 吉林链梭菌与生物学特征相似菌属的鉴别

特性	加德纳菌属	嗜二氧化碳 噬细胞菌属	放线杆菌属	心杆菌属	嗜血杆菌属	链梭菌属
	(<i>Carcherella</i>)	(<i>Capnocytophaga</i>)	(<i>Actinobacillus</i>)	(<i>Cardiobacterium</i>)	(<i>Haemophilus</i>)	(<i>Streptofusia</i>)
氧化酶试验	-	-	- ^b	+	D	-
触酶试验	-	+	+	-	D	-
细胞形态						
多形性	+	-	-	+	-	-
短杆到球形	-	-	+	-	+	-
梭形	-	+	-	-	-	+
桔黄色色素菌落	-	+	-	-	-	-
硝酸盐还原为亚硝酸盐	-	D	+	-	+	-
吡啉试验	-	-	-	W	D	-
生长						
35℃ 空气血琼脂	+	-	- ^b	d	-	-
35℃ 空气+5%CO ₂ 血琼脂	+	+	+	+	- ^c	+
克氏双糖铁反应						
斜面	NG	K 或 A	K 或 A	K 或 NG	NG	A
高层	NG	N 或 A	A	A 或 NG	NG	A
5% 人血琼脂呈 β 溶血	+	-	-	-	-	-
乳糖产酸	d	D	D	-	D	+
麦芽糖产酸	+	+	+	+	D	+
甘露醇产酸	-	-	D	+	D	+
细菌 DNA(G+C)mol%	42-44	33-41	40-43	59-60	38-44	42.3

注:表中各符号:“+”阳性,“D”菌种之间不同,“d”只含一个种的属菌株间不同,“-”阴性,“A”产酸,“K”产碱,“N”中性,“NG”不生长,“W”弱阳性;“-^b”少数菌株弱阳性;“-^c”一个种,泡沫嗜血杆菌(*H. aphrophilus*)能在血琼脂上生长

狐狸阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis* subsp. *fox*)^[11], 它的绝大多数生物学特性符合阴道加德纳氏菌。本菌和狐狸阴道加德纳氏菌抗血清不出现凝集反应, 从而进一步区别了阴道加德纳氏菌的亚种——狐狸阴道加德纳氏菌。

3.3 16S rRNA 序列测定结果与鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*) 有一定的亲缘关系, 鞘氨醇单胞菌未列入 1994 年版伯杰细菌鉴定手册^[12]中。鞘氨醇单胞菌^[13]触酶试验阳性, 不能

发酵葡萄糖, 不具有精氨酸双水解酶, DNA G+C 含量为 62.1~67.2mol% 等特性均与本菌不相符合, 因此该菌不属于鞘氨醇单胞菌。

综上所述, 以测定 16S rRNA 序列得到的亲缘关系与表型特征结果存在不一致, 但是, 根据此菌的生物学特征及 16S rRNA 序列测定结果可以肯定这是一个新的分类单位, 建立一个新属, 命名为吉林链梭菌, *Streptofusia* gen. nov. *jilina* sp. nov. 当然对于此菌的分类学位置还有待进一步研究。

该菌已收藏在中国微生物菌种保藏中心, CGMCC NO. 0215^T (T = type strain)。

致谢 该菌经过中国科学院微生物研究所鉴定, 农科院特产研究所严忠诚先生赠送免疫血清, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Philipp Gerhardt, R G F Murray, Ralphn Costilow, *et al.* American Society for Microbiology, Manual of Methods for General Bacteriology, Washington, DC 20006, 1981. 24~43.
- [2] Jean F. Mac Faddin Biochemical tests for identification of medical bacteria, The Williams & Wilkins Company, USA. 1976, 4~194.
- [3] Marmur J. J Mol Biochem, 1961, 3: 208~218.
- [4] Madel M, Grossman I, Molday I. Methods in Enzymology, Vol 12B, New York: Academic Press, 1963, 195.
- [5] Philipp Gerhardt, R G E Murray, Ralphn Costilow, *et al.* Manual of Methods for General Bacteriology American Society for Microbiology, 1981, 451~455.
- [6] 金冬雁等译. 分子克隆实验指南, 北京: 科学出版社, 1992, 681~682, 332~333.
- [7] E Stackebrandt, M Goodfellow, John Wiley, *et al.* Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, 1992, 133~140, 188~197.
- [8] Krieg N R, Holt J G, Murray R E, *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984, 550~600.
- [9] John G Holt, Noel R. Kring, Peter H A Sneath, *et al.* Bergey's Manual of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, (Ninth Edition), 1994, 199.
- [10] 严忠诚, 阎新华, 栾凤英等. 微生物学报, 1995, 35(1): 28~32.
- [11] 蔡妙英, 卫军, 严忠诚, 等. 微生物学报, 1995, 35(1): 33~37.
- [12] John G Holt, Noel R Kring, Peter H A Sneath, *et al.* Bergey's Manual of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, (Ninth Edition), 1994.
- [13] Eiko Yabuuchi, Ikuya Yano, Hiroshi Oyaizu, *et al.* Microbiol Immunol, 1990, 34(2): 99~119.

PROPOSAL OF A NEW GENUS *STREPTO FUSIA* GEN. NOV. *JILINA*. SP. NOV. ISOLATED FROM SECRETION OF VAGINITIS PATIENT

Gu Haiying

(Institute of Clinical Microbiology, Jilin Railway Hospital, Jilin 132001)

Abstract Seven bacterial strains isolated from the secretion of seven vaginitis patients. These strains were same physiological characteristics identified as gram-negative short rods in singles pairs and chains. By electron micrographs its cells showed fusiform. Capsules, spored and flagella were not present. CO₂ (5%~10%) was required for the growth of all strains on blood agar. All strains can not grow on MacConkey's media. The optimum temperature for growth was 35℃~37℃. Oxidase and catalase test was negative. Glucose was fermented with production of acid but no gas (Indicator was bromocresol purple). Acid was produced form slant and butt Kligler iron agar. Nitrates were not reduced to nitrites Esculin was hydrolyzed, but hippurate was not hydrolyzed. The mol% G+C of the DNA was 42.3 (Tm). On the basis of 16S rRNA oligonucleotide similarity, dendrogram and average linkage clustering, these new bacterial strains can not fit well into any of the currently recognized categories. Therefore, a new genus, *Streptofusia*. gen. nov. *jilina*. sp. nov was proposed 16S rRNA has been provided GenBank accession numbers (BankIt12569. U34365). The type strain is CGMCC NO. 0215^T (T = type strain)

Key words *Streptofusia*. gen. nov. *jilina*. sp. nov, 16S rRNA, Identification, Taxonomy