

## 梭菌属的一个新种——产气梭菌

凌代文

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

从豆腐废水为原料的厌氧降解反应器中, 采用亨盖特氏厌氧技术, 分离到两株厌氧生芽孢的杆菌, 革兰氏染色通常为阴性。直杆或稍弯杆形, 以周生鞭毛运动。芽孢椭圆或卵圆形, 不膨胀细胞, 通常次端生, 最适生长温度为 30—37℃, 在 45℃ 不生长。在 pH 4.5 或 9.0 也不生长。6.5% NaCl 抑制其生长。能发酵多种碳水化合物。在 PYG 培养液中从葡萄糖产生大量的  $H_2$  和  $CO_2$ , 中量的乳酸和少量的乙酸、丁酸、乙醇和丁醇。不利用柠檬酸盐和丙酮酸盐。DNA 中 G + C 含量为 41.2mol%。经鉴定为梭菌属(又名梭状芽孢杆菌属)的一个新种, 命名为产气梭菌 (*Clostridium aerogenes* sp. nov.)。

关键词 产气梭菌; 厌氧降解

从豆腐废水为原料的厌氧降解反应器中分离到两株厌氧的生芽孢杆菌。在获得其纯培养物后, 通过对它们的形态观察、生理生化特性的试验以及 DNA 中 G + C 含量的测定, 并与有关属种的性状进行了比较, 鉴定它们是梭菌属(又名梭状芽孢杆菌属)(*Clostridium*) 的一个新种。对这个新种的研究结果现报道如下。

### 材料和方法

#### (一) 样品来源

样品取自本实验室正常运转的以豆腐废水为原料的厌氧降解反应器。

#### (二) 培养基组分

1. 分离培养基: 豆腐废水发酵降解液与豆腐废水按 3:7 混合, 加入琼脂 1.5%、刃天青 0.0001%, 半胱氨酸 0.05%, 用  $NaHCO_3$  调 pH 至 7.0。

2. 移种培养基: 使用 PYG 培养基<sup>[1]</sup>, 但免去其中的组分维生素 K 和 hemin 溶液。

3. 保存培养基: 在上述移种培养基中加入  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  0.69% 和  $Na_2HPO_4$  1.79% 或  $CaCO_3$  2%。

#### (三) 分离方法

采用 Hungate 氏厌氧技术<sup>[1]</sup>制作培养基和分离纯化菌种。对采取样品进行连续稀释滚管分离, 直到获得纯培养物。

#### (四) 形态观察

使用 Olympus 显微镜的 BHZ-PC 型相差镜观察活菌体、生芽孢和运动等状态。观察一般革兰氏染色及鞭毛染色后的菌体使用 AO 2071 型光学显微镜。

本文于 1990 年 10 月 4 日收到。

本研究项目为国家自然科学基金资助项目。

承苏京军同志协助气相色谱分析测定; 刘如臻和赵小平同志协助电镜和显微照片的摄制, 特此致谢。

在 H-600 型透射电子显微镜下进一步观察菌体的形态、鞭毛着生位置和数量。

### (五) 生理生化试验

主要根据 Holdeman 等<sup>[1]</sup>的方法,少数试验尚借鉴 Willis 等<sup>[2]</sup>的方法和《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[3]</sup>。

柠檬酸盐的利用试验是按 Walther<sup>[4]</sup> 等的方法,并且同时以蛋白胨和酵母膏为基础的培养基中加入柠檬酸盐后的培养物进行比较。

测定氧化还原电位值使用 ZD-2 型电位自动滴定仪。

最终生长 pH 值,用 PYG 培养液于 37℃ 培养一周后,使用 FISHER MODEL 640 小型 pH 计测定。

### (六) 测定产生的挥发酸和非挥发性脂肪酸、醇类及 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>

挥发性和非挥发性脂肪酸的测定:使用 Shimadzu GC-7AG 气相色谱仪,氢火焰离子化检测器,Shimadzu chromatopac C-R1B 积分仪。色谱柱:不锈钢柱 3mm × 1m,填充 GDX-401。柱温:210℃,进样器温度:220℃,氢气流速:50ml/min。

H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 的测定:使用川分 SC-3A 型气相色谱仪。以 N<sub>2</sub> 作载气,流速:60ml/min,热导池温度:80℃,柱温:60℃,进样温度:100℃,桥流:95mA。

### (七) DNA 中 G + C 含量的测定

用 Marmur<sup>[5]</sup> 等的方法,并参照林万明等<sup>[6]</sup>报道的方法提取菌体的 DNA,测定其中的 G + C mol%。

## 结 果

### (一) 形态和培养特征

直杆或稍弯曲杆菌,单个或双连 0.6—0.8 × 3.0—8.0 μm,极少数个体更长(图版 I)。通常为革兰氏阴性,虽然在幼龄培养物中少数细胞显示有革兰氏阳性者,但培养后较快即变为阴性。产生芽孢,在孢肉培养基中较易形成芽孢,适温培养一般 24 小时可见到,在 PYG 琼脂斜面上形成芽孢则较缓慢。芽孢椭圆或卵圆,通常次端生,芽孢不膨大菌体细胞。以周生鞭毛运动。专性厌氧菌,在氧化还原电位 -200mV 以下生长良好。

PYG 培养基滚管内两菌株 CR 和 CS 生长的菌落稍有差别,初始分离时表面均有光泽,但 CR 菌株的菌落表面较粗糙,而两菌株表面都扁平,呈灰白色、边缘不规则、不透明。

### (二) 生理生化特性

不利用丙酮酸和乳酸盐。不还原硝酸盐。不溶血。不液化明胶,能使牛奶凝固。可从精氨酸产氨。不产生吡啶。

30—37℃ 为最适生长温度,25℃ 时也生长良好,在 45℃ 则不生长。6.5% NaCl 中也不生长。

在 pH4.5 和 9.0 的条件下不生长。PYG 培养液中生长的最终 pH 值菌株 CR 和 CS 各为 4.74 和 4.65。

使用 Walther 等<sup>[4]</sup>的方法证明不能利用柠檬酸盐,而且柠檬酸盐能抑制其生长。在 PY 培养液为基础的培养基中含有 2% 柠檬酸盐时,抑制作用也明显。

表 1 产气梭菌与梭菌属相似种在某些特征上的比较

Table 1 Comparison of *C. aerogenes* with similar species of genus *Clostridium* in some characteristics

| 种名<br>Species                    | 不产梭菌<br><i>C. absonum</i> | 隐微梭菌<br><i>C. celatum</i> | 当氏梭菌<br><i>C. chauvoei</i> | 鞘鞘梭菌<br><i>C. colinum</i> | 艰难梭菌<br><i>C. difficile</i> | 产气梭菌<br><i>C. propionicum</i> | 玫瑰色梭菌<br><i>C. roseum</i> | 施丁梭菌<br><i>C. sordidum</i> | 产气梭菌<br><i>C. aerogenes</i> |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 特征<br>Characteristics            |                           |                           |                            |                           |                             |                               |                           |                            |                             |
| 细胞大小 (μm)<br>Size of cells       | 0.9—1.7                   | 0.8—3.0                   | 0.5—1.7                    | 1                         | 0.5—1.9                     | 0.5—0.8                       | 0.7—0.9                   | 0.5—1.7                    | 0.6—0.8                     |
| 宽度<br>Width                      | 1.7—11.8                  | 6.3                       | 1.6—9.7                    | 3—4                       | 3.0—16.9                    | 1.3—5.0                       | 3.2—4.3                   | 1—10.0                     | 3.0—8.0                     |
| 长度<br>Length                     |                           |                           |                            |                           |                             |                               |                           |                            |                             |
| ① 革兰氏反应<br>Gram reaction         | +                         | +                         | +                          | +                         | +                           | +                             | +                         | +                          | —                           |
| 产生明胶<br>Indole produced          | —                         | —                         | —                          | —                         | —                           | —                             | —                         | —                          | —                           |
| 运动<br>Motility                   | +                         | —                         | d                          | +                         | +                           | +                             | +                         | +                          | +                           |
| ② 鞭毛<br>Flagella                 | 1s                        | —                         | p                          | p                         | p                           | p                             | p                         | p                          | p                           |
| ③ 芽孢<br>Spores                   | ST                        | T, ST, C                  | C, ST                      | ST                        | ST                          | ST                            | ST                        | ST, T                      | ST                          |
| 位置<br>Location                   | —                         | —                         | +                          | NK                        | +                           | +                             | +                         | NK                         | —                           |
| 膨大<br>Swell                      | —                         | —                         | —                          | —                         | —                           | —                             | —                         | —                          | —                           |
| ④ 从 PYG 的产物<br>Products from PYG | BAL(f2,4)                 | AFB2(s)                   | ABF4(1s)                   | FAP(1)                    | Baieivib(fv12,4)            | PiVibbas(1)                   | EAs4                      | BAL(Fp)                    | Lab2,4                      |

注: 此表中相似种的共同特征: 产气丰富, G + C mol% 未知。

① 符号: +, 90—100% 菌株阳性反应; —, 90—100% 菌株阴性; ±, 61—89% 菌株阳性; d, 40—60% 菌株阳性。

② 鞭毛: 1s, 单生亚极毛; p, 周毛; —, 不运动。

③ 芽孢: T, 顶端; ST, 次端; C, 中生; NK, 未知。列入 2 个以上符号的, 第一个符号更为常见。

④ 产物: a, 乙酸; b, 丁酸; c, 己酸; f, 甲酸; l, 乳酸; p, 丙酸; s, 琥珀酸; v, 戊酸; iv, 异戊酸; 2, 乙醇; 4, 丁醇; 大字母指示含量至 1 meq/100 ml 培养基; 小字母指示少于此量; 括号内的产物表示测定不一致。

Common characteristics of these similar species: Abundant H<sub>2</sub> produced, G + C mol% not known.

① Symbols: +, reaction positive for 90—100% of strains; —, 90—100% of strains negative; ±, 61—89% of strains positive; d, 40—60% of strains positive; Lab2,4, 40—60% of strains positive.

② Flagella: 1s, a single subpolar; p, peritrichous; —, nonmotile.

③ Spores: T, terminal; ST, subterminal; C, central; NK, not known. Where two or more of symbols are listed, the first is the more usual.

④ Products: a, acetic acid; b, butyric acid; c, caproic acid; f, formic acid; l, lactic acid; p, propionic acid; s, succinic acid; v, valeric acid; iv, isobutyric acid; ic, isocaproic acid; iv, isovaleric acid; 2, ethanol; 3, propanol; 4, butanol; Capital letters indicate at least 1 meq/100 ml of culture; small letters indicate less than 1 meq/100 ml. Products in parentheses are not detected uniformly.

表 2 产气梭菌与梭菌属相似种在某些特征上的比较  
Table 2 Comparison of *C. aerogenes* with similar species of genus *Glostridium* in some characteristics

| 特征<br>Species                           | 巴氏梭菌<br><i>C. barkeri</i> | 卵圆梭菌<br><i>C. coccoides</i> | 吡啶梭菌<br><i>C. indolis</i> | 无害梭菌<br><i>C. innocuum</i> | 互连梭菌<br><i>C. nexile</i> | 乳酸梭菌<br><i>C. ovisium</i> | 梭形梭菌<br><i>C. sphenoides</i> | 产气梭菌<br><i>C. aerogenes</i> |
|-----------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 细胞大小 ( $\mu\text{m}$ )<br>Size of cells |                           |                             |                           |                            |                          |                           |                              |                             |
| 宽度<br>Width                             | 0.3—0.5                   | 0.6—1.0                     | 0.5—0.9                   | 0.4—1.6                    | 0.8—1.7                  | 0.6—1.6                   | 0.3—1.1                      | 0.6—0.8                     |
| 长度<br>Length                            | 1.6—9.7                   | 0.6—1.5                     | 1.3—10.2                  | 1.6—9.4                    | 0.8—6.3                  | 1.3—3.9                   | 1.3—8.6                      | 3.0—8.0                     |
| 革兰氏反应<br>Gram reaction                  | +                         | +                           | —                         | +                          | +                        | +                         | —                            | —                           |
| 产生吡啶<br>Indole produced                 | —                         | —                           | +                         | —                          | —                        | —                         | +                            | —                           |
| 运动<br>Motility                          | —                         | —                           | +                         | —                          | —                        | —                         | +                            | +                           |
| 鞭毛<br>Flagella                          | —                         | —                           | p                         | —                          | —                        | —                         | p                            | p                           |
| 芽孢<br>Spores                            |                           |                             |                           |                            |                          |                           |                              |                             |
| 位置<br>Location                          | T                         | C, ST                       | T, ST                     | T, ST                      | C, ST                    | C, ST                     | ST, T                        | ST                          |
| 膨大<br>Swell                             | +                         | +                           | +                         | —, +                       | —                        | —                         | +                            | —                           |
| 从 PYG 的产物<br>Products from PYG          | BLa                       | AS                          | AF2                       | BLa(fs)                    | AF2(la)                  | AF2(la)                   | AF(la2)                      | Lab2,4                      |
| G + C mol%                              | 45                        | 43—45                       | 44                        | 43—44                      | 40—41                    | 44                        | 41—42                        | 41                          |

注: 此表中相似种的共同特征: 产氢丰富, G + C mol% = 40—45; 符号: 见表 1。  
Common characteristics of these similar species: Abundant  $\text{H}_2$  produced, G + C mol% = 40—45; Symbols: see Table 1.

发酵苦杏仁甙、阿拉伯糖、纤维二糖、果糖、乳糖、麦芽糖、蜜二糖、棉子糖、核糖、甘露糖、甘露醇、糖原、蔗糖、木糖、半乳糖、菊糖、淀粉、海藻糖、葡萄糖和甘油产酸。不从松三糖、鼠李糖、山梨糖、山梨醇、肌醇、甜醇、核糖醇、木聚糖、水杨苷、七叶灵产酸。水解淀粉和七叶灵。不分解纤维素。

在 PYG 培养液中的培养物从  $100\mu\text{mol}$  葡萄糖可产  $190\mu\text{mol}$  氢气和  $158\mu\text{mol}$  二氧化碳,并产生乳酸,还有少量的乙酸、丁酸、乙醇和正丁醇。

CS 菌株作为标准菌株,测定其 DNA 的 G + C 含量为 41.2 mol%。

## 讨 论

从以上结果可以看出,CS 和 CR 两菌株属于梭菌属 (*Clostridium*) 中的一个种。这个种的重要特征是能发酵葡萄糖产生大量的气体,其中含有很丰富的氢气。到目前为止,梭菌属中已报道的种具有此特征者也非少数。除了有此特征的种其 DNA 的 GC、含量与本文报道的种相距甚远的之外,现将这些种中 DNA 的 GC 含量与本文报道的种相近的以及其中尚未报道 DNA 的 GC 含量的种进行其它特征的比较。表 1 和表 2 仅列入它们的部分特征,从所列的少数特征中比较它们的异同。表 1 列入的这些种中,从它们的 PYG 产物来看本文报道的种与不和梭菌 (*C. absonum*) 似有相同之处,虽然产物的主次稍有差别,但在形态上按不和梭菌的描述:其细胞是不运动的,即使在某些菌株生长旺盛的幼龄培养物中见到有运动的细胞,而这些细胞是以单生亚极毛运动的<sup>[1]</sup>。相比之下两个种的差别是显而易见的。在表 2 所列的这些种中,楔形梭菌 (*C. sphenoides*) 与本文描述的 CS 和 CR 菌株在 DNA 的 G + C 含量和形态上似乎更相近些,然而从 PYG 的产物来看,它们的差别较大。此外,CS 和 CR 两菌株不能利用丙酮酸和柠檬酸盐,楔形梭菌则能利用。它们在产生明胶上也有差别,CS 和 CR 两菌株还能发酵阿拉伯糖、菊糖、甘油、糖原和淀粉产酸,而楔形梭菌不发酵上述的碳水化合物,即使其中有的菌株可发酵,反应也微弱。

最近数年报道又有两个新种:耐氧梭菌 (*C. aerotolerans*)<sup>[9]</sup> 和解木聚糖梭菌 (*C. xylanolyticum*)<sup>[10]</sup>, 它们的 DNA 中 G + C 含量是 40—41mol%, 但是它们都形成能使细胞膨大和端生的芽孢,而且均能水解木聚糖,与本文报道的两菌株有差别。对耐氧梭菌而言,还由于它能在不加还原剂的浅层培养液中置于有空气的条件下生长,具有明显的耐氧特征,并且不发酵甘露醇、菊糖和甘油,可发酵鼠李糖、水杨苷,与 CS 和 CR 两菌株明显的不同。解木聚糖梭菌则不能发酵苦杏仁苷、阿拉伯糖、糖原、乳糖、甘露醇、核糖、海藻糖和本文所述的两菌株均有区别。

经比较 CS 和 CR 两菌株与现已报道的梭菌属 (*Clostridium*) 的种都具有明显的差异,鉴定为这个属的一个新种,定名为产气梭菌 (*Clostridium aerogenes* sp. nov.)。这个种的 CS 和 CR 菌株在中国科学院微生物研究所菌种保藏室的保藏号分别为 AS 1.1778 和 AS1.1779。模式菌株为 AS 1.1778。

## 参 考 文 献

[1] Hungate, R. E.: Method in Microbiology, (Ed. by Norris, J. R. and D. W. Ribbons) Vol. 3B, pp. 117—

- 132, Academic pr. London, 1969.
- [2] Holdeman, L. V. et al.: *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th Ed., Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1977.
- [3] Willis, A. T.: *Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice*, 3rd Ed., Butterworths, London-Boston, 1977.
- [4] 中国科学院微生物所细菌分类组: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 1978。
- [5] Walther, R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 955—962, 1977.
- [6] Marmur, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **5**: 109—118, 1962.
- [7] 林万明等: 微生物通报, **8**(5): 245—247, 1981。
- [8] Sneath, P. H. A. & J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, pp. 1104—1200, Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.
- [9] Van Gylswyk, N. O. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**(2): 102—105, 1987.
- [10] Rogers, G. M. et al.: *ibid.*, **41**(1): 104—143, 1991.

## A NEW SPECIES OF *CLOSTRIDIUM*—*CLOSTRIDIUM AEROGENES* sp. nov.

Ling Daiwen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Two strains of anaerobes were isolated from an experimented anaerobic digester feeding on soybean cake waste water. They were anaerobic sporeforming rods, Gram stain usually negative, Straight to slightly curved rods, occur singly, or in pairs, Typically  $0.6\text{--}0.8\mu\text{m}$  in width,  $3.0\text{--}8.0\mu\text{m}$  in length, motile by peritrichous flagella. Spores were ellipsoidal or oval, usually subterminal. Optimum temperature for growth was  $30\text{--}37^\circ\text{C}$ . There was good growth at  $25^\circ\text{C}$ , none at  $45^\circ\text{C}$ . No growth occurred at pH 4.5 or 9.0. Growth was inhibited by 6.5% NaCl. A wide variety of carbohydrates could be fermented, and Glucose was fermented to large amounts of  $\text{H}_2$  and  $\text{CO}_2$ , moderate amounts of lactate, small amounts of acetate, butyrate, ethanol and butanol in PYG broth. Citrate and pyruvate couldn't be utilized. The G + C content of DNA was 41.2 mol%. They were identified to be a new species of *Clostridium*. The name proposed for this species is *Clostridium aerogenes* sp. nov. The type strain is strain AS 1.1778.

**Key words** *Clostridium aerogenes*; Anaerobic digestion

### 图版说明

Explanation of plate

1. 产气梭菌的营养细胞的相差显微照片 ( $\times 1000$ ); 2. 产气梭菌细胞形成芽孢的相差显微照片 ( $\times 1000$ );  
3. 产气梭菌细胞的电子显微照片 ( $\times 10000$ )。

1. Phase contrast micrograph showing vegetative cells of *C. aerogenes*; 2. Phase contrast micrograph of sporeforming cells of *C. aerogenes*; 3. Electron micrograph of *C. aerogenes* showing flagellar arrangement.