

一株新的具有脱色能力的琼脂分解菌

王 选 良

(大连轻工业学院, 大连)

本文报道了一株具有脱色能力的琼脂分解菌的分离、脱色现象及细菌学鉴定结果。该菌株分离自琼脂生产工厂周围的土壤中。它能在琼脂培养基上脱除废糖蜜的黑褐色色素, 能分解淀粉和琼脂, 利用纤维素生长, 液化明胶。培养新分离菌不需要生长因子, 不产生吲哚、硫化氢、荧光色素及扩散性色素。新分离菌是假单胞菌属的一个新种, 定名为井式假单胞菌(*Pseudomonas wellentypicum* n. sp.)。

关键词 假单胞菌属; 井式假单胞菌

以废糖蜜为原料的发酵废液对水质和环境污染的问题引起人们的关注。近年来, 开始采用甲烷菌、活性污泥法进行废水处理。这样能够除掉 90% 的 BOD (生化需氧量) 成分, 但是 COD (化学需氧量) 成分却只能除掉 60%。这是因为废糖蜜中含有的黑褐色色素 (melanoidin) 仍然存在废液中的缘故。关于脱除废液中的着色物质已有活性炭、离子交换吸附法, 氯气、臭氧氧化法及电解法等方法报道^[1]。从降低成本以便实际应用出发, 已有培养担子菌 *Coriolus* sp. No. 20、*Coriolus versicolor* (Ps4a) 以及霉菌 *Geotrichum* sp. C-39 进行发酵废液脱色的报道^[2]。关于细菌脱色法, 1981 年上田清基等报告了琼脂分解菌的脱色作用^[3]。同年, 作者从琼脂生产工厂周围的土壤中分离到具有脱色能力的琼脂分解菌, 并对新分离菌株的形态、生理、培养条件、脱色酶等进行了研究。现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 菌株的分离

用平板培养法从土壤样品中进行菌株的分离

纯化。所用培养基成分如下:

1. 葡萄糖 5g, NH_4NO_3 2g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 琼脂 20g, 自来水 1000ml, pH 7.2。

2. 牛肉膏 10g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml pH 7.2。

于 30℃ 培养 7 天。

(二) 脱色

1. 天然色素的制备: 将废糖蜜的酒精发酵成熟醪液浓缩制得。

2. 着色度: 指液体的黑褐色色度, 即其 475 nm 的消光值 UOD/ml。

3. 着色培养基: 加上述天然色素, 使着色度达到 15UOD/ml 的平板培养基。

4. 脱色能力: 系指于着色培养基, 30℃ 培养 9 天, 菌落周围脱色环的直径 (mm) 的平均值。

(三) 细菌学鉴定

一般的形态、生理特性试验按常规法操作^[4, 5]。

由糖生酸试验采用以下培养基: 葡萄糖 1g, NH_4NO_3 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, Na_2HPO_4 0.1g, 酵母膏 2g, KCl 1g, 蒸馏水 1000ml, BTB (溴百

本文于 1983 年 4 月 20 日收到。

此项研究工作承日本上田清基、椿启介、山里一英、大桃定洋、原庆明等先生和赤川昌世氏及卢泽由纪子氏等指导和协作, 特此致谢。

里蓝) 0.08g, pH7.2。

细胞内蓄积聚羟基丁酸盐试验参照文献 [4]、[15] 和 [16] 进行。

碳源利用试验采用基础培养基: NH_4NO_3 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.2g, 碳源 10g, 蒸馏水 1000ml, pH7.2。振荡培养 2—7 天后, 根据浊度的增加判断生长状态。

DNA 中的 G + C 含量采用热变性温度法^[4]测定。

结 果

(一) 琼脂的分解和菌落

在琼脂分解菌增殖的同时, 琼脂培养基表面出现琼脂被分解了的痕迹——凹陷处。按凹陷处的特征可把琼脂分解菌菌落分为三种类型(图 1)。

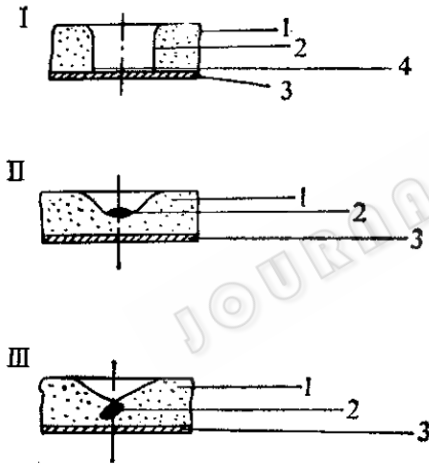


图 1 平板培养基上琼脂分解菌菌落的类型

Fig. 1 Colony types of agar-digesting bacteria in the plate

1. 培养基; 2. 菌体; 3. 皿底; 4. 水
1. medium; 2. cells; 3. bottom of plate; 4. water

I 型: 凹陷如井孔, 深至平板底面, 菌株强烈分解琼脂, 菌体在凹陷内周生长, 其周围相当透明, 底部出现积水。

II 型: 凹陷如釜底, 始终不能深至平板底面。菌体在凹陷处表面的中央。

III 型: 凹陷如釜底, 始终不能深至平

板底面。菌体位于凹陷处培养基的内部当中。

本文报告的菌株属于 I 型。

(二) 脱色现象

新分离菌株的脱色能力为 5.8(mm)。

培养 3 天以内, 接菌处的培养基渐渐凹陷, 以至该处的培养基和色素完全被分解, 此时可见到积水。培养 9—14 天, 菌体增殖逐渐停止, 其周围露出培养皿的玻璃底, 再远处的培养基的色素被脱掉, 形成明显的脱色环(图版 I)。

(三) 细菌学鉴定结果

1. 形态特征:

长杆状, 单个、直或稍弯, 大小 $0.4-0.7 \times 2.0-4.0 \mu\text{m}$, 无芽孢, 细胞的一端生有一根极生鞭毛, 有运动性(图 2)。

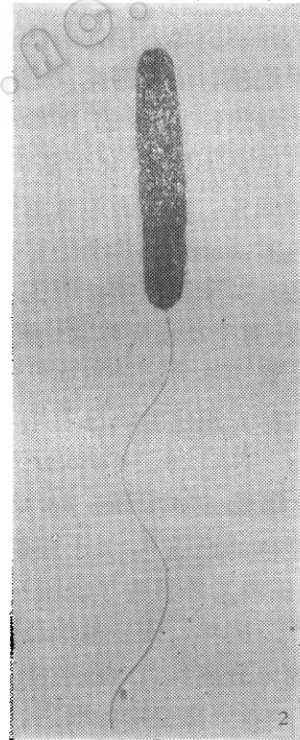


图 2 井式假单胞菌($\times 53,000$)

Fig. 2 Electromicrophotograph of *Pseudomonas wellantypicum*

2. 生理特性:

生长需要氧气。

生长最适温度30℃,在4℃、37℃、42℃不生长,在15℃及25℃生长。

生长最适 pH 为 7.0—8.0。

革兰氏染色阴性。

硝酸盐还原+

脱氮反应—

吡啶生成—

硫化氢生成—

过氧化氢酶+

氧化酶+

甲基红试验及 V P 反应—

淀粉水解+

明胶液化试验+

色素的生成—

脲酶—

O-F 试验(Oxidation-Fermentation test)

属于氧化型。

由糖生酸试验:由葡萄糖生酸,但不产气。

不需要生长因子。

细胞内不蓄积聚羟基丁酸盐。

3. 碳源利用:

能够利用葡萄糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、D(+)木糖、糊精、糖原、甘露醇、山梨醇、L-谷氨酸、琼脂和纤维素。不能利用 L-鼠李糖、D-核糖、D(-)阿拉伯糖、肌醇、甘油、2-古洛酮糖酸、L-精氨酸和 L-缬氨酸。

4. DNA 中 G + C 含量:

DNA 中 G + C 含量为 53.0 克分子 %。

5. 培养特征:

(1) 肉汁琼脂斜面:生长良好。随着菌体生长,培养基表面沿着接种时划线凹陷、沟穴底部积水,浅黄色的菌体成粉状沉积。无荧光色素及扩散性色素。

(2) 肉汁琼脂穿刺:只在表面处生长。

(3) 肉汁琼脂平板:菌落在一周以后形成圆形凹陷。琼脂被透底溶解。

(4) 合成培养基:生长良好。48小时以内生成乳白色菌体,无粘性,无臭味,奶油质,沿菌体生长处有凹陷。

(5) B. C. P (溴甲酚紫)牛奶试验:酪化牛奶, B. C. P 呈碱性反应。

(四) 和已知种的比较

新分离菌株细胞杆状,单根极生鞭毛,有运动性,生长需要空气,有过氧化氢酶和氧化酶,能由葡萄糖产生酸, O-F 试验属于氧化型反应,革兰氏染色阴性等,与文献 [3—19] 的描述对照检索,确定该菌株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。根据该菌株不需要生长因子,不生成荧光色素及扩散性色素,不能在 41℃ 生长,分解琼脂能力强和碳源利用等特点,与该属的各个种进行比较,并与相近的三种琼脂分解菌——延长假单胞菌 (*Pseudomonas elongata*)、液化琼脂弧菌 (*Vibrio agar-liquifaciens*)、斯塔尼艾里弧菌 (*Vibrio stanieri*) 进行比较。虽然它们对琼脂、纤维素、淀粉均具有利用或分解能力,但是后两种是弧菌,而新分离菌株不出现螺旋形细胞,故新分离菌株不属于 *Vibrio*。而延长假单胞菌的琼脂斜面菌体有粘性,不利用甘露醇,能利用 L-精氨酸作为碳源,产生硫化氢,生长需要海盐 (0.5—6.0%) 等,与新分离菌株明显不同^[6]。因为新分离菌株不同于假单胞菌属中的各个种,所以应是该属中的一个新种,定名为井式假单胞菌 (*Pseudomonas wellantypicum* n. sp.)。菌种存放在中国微生物菌种保藏管理委员会工业微生物中心 (北京),保藏编号 10140。

讨 论

自从 1902 年 Gran 第一次从海水中分离到琼脂分解细菌——琼脂假单胞菌

(*Pseudomonas g.-latica*) 以来^[6], 人们已经从海水系统中分离到 35 种属于假单胞菌属的琼脂分解菌^[17]。本文报道的井式假单胞菌 (*Pseudomonas wellanotypicum*) 是从陆地土壤中分离得到的。该菌株生长不特别要求海盐, 培养较易。

虽然不是所有的琼脂分解菌都具有脱色能力, 但可以从琼脂分解菌中筛选到具有脱色能力的菌株。

井式假单胞菌与延长假单胞菌、液化琼脂弧菌、斯塔尼艾里弧菌等琼脂分解菌均兼能分解或利用淀粉及纤维素^[17]。因此, 似可根据分解琼脂的特点, 从自然界分离能够分解淀粉或纤维素的菌株。

参 考 文 献

- [1] 内藤昌司、酒井賢次郎: イースト工業会技報, 47 (35): (页码缺), 1977。
- [2] 青岛郁子ウ: 日本醱酵工学会大会講演要旨集, p. 200, 1980。
- [3] Breed, R. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., London, pp. 88—185, 1957。
- [4] 驹形和男: 微生物の分類と同定, 東京大学出版会, 202—245, 426—432, 1975。
- [5] 上田清基ハ: 日本醱酵工学会大会講演要旨集, p. 216, 1981。
- [6] Humm, H. J.: *Bulletin of Duke Univ. Marine Station*, 3: 45—75, 1946。
- [7] 飯塚廣ハ: 醱酵協会誌, 20(4) VII-14-25, 1962。
- [8] —: 日本農芸化学会誌, 37(2): 71—80, 1963。
- [9] 横澤清: 同上, 25(10): 556—562, 1951。
- [10] —: 同上, 26: 313—318; 415—420, 1952。
- [11] 山口和夫: 同上, 32(6): 483—486, 1958。
- [12] 驹形和男: 同上, 35: 981—992, 1961。
- [13] Komagata, K. et al.: *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24 (2): 242—247, 1974。
- [14] Meyer, O. et al.: *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30 (1): 189—195, 1980。
- [15] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974。
- [16] Stanier, R. Y. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 43(2): 168—183, 1966。
- [17] 王大相: 《细菌分类基础》, 科学出版社, 北京, 1977。
- [18] V. B. D. 斯克爾曼著(蔡妙英等译): 《细菌属的鉴定指导》, 科学出版社, 北京, 1978。
- [19] 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。

A NEW STRAIN OF AGAR-DIGESTING BACTERIA WHICH IS ABLE TO DECOLORIZE MELANOIDIN

Wang Xuanliang

(Dalian Institute of Light Industry, Dalian)

A strain of agar-digesting bacteria, which is able to decolorize melanoidin, was isolated from the soil near a agar production plant. This organism is a Gram negative long rod, $0.4-0.7 \times 2.0-4.0 \mu\text{m}$, straight or slightly curved, motile with polar monoflagellum. No spore or polybutyric acid is found in the cell. Molecular oxygen is necessary for growth, and oxidase and catalase are produced. Acid is produced from glucose oxidatively, and no gas is formed. Nitrate reduction, hydrolysis of starch, and liquification of gelatin are positive. Denitrification, indole formation, hydrogen sulfide production, M. R. test, V. P. reaction and urease production are negative. No growth factor is necessary for growth. Glucose, mannose, galactose, sucrose, lactose, maltose, xylose, dextran, glycogen, mannitol, sorbitol, L-glutamic acid, agar and cellulose can be used for growth. L-rhamnose, ribose, D-(-)-arabinose, inositol, glycerol, 2-ketogulonic acid, arginine or

valine is not utilized. No pigment is produced. Milk is peptonized and alkaline is produced. On agar plate, the organism digests agar and a well type depression is formed. If melanoidin is contained in the medium, a decolorized ring will be formed around the colony. Optimum temperature for growth is 30°C , no growth at 4°C , 37°C and 42°C . It grows at 15°C and 25°C . Optimum pH value for growth is 7.0—8.0. By comparison with the known species, the organism we isolated is a new species of *Pseudomonas*, and *Pseudomonas wellantypicum* nov. sp. is proposed. The type strain is deposited in Scientific Research Institute of Food & Fermentation Industry, Ministry of Light Industry, Beijing and the strain number is No. 10140.

Key words

Pseudomonas; *Pseudomonas wellantypicum*