

丙酸杆菌属中的一个新种

乐华爱 金石沅 程光胜 赵玉峰 王大帮 方心芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从沼气发酵液中, 分离出几株丙酸菌。该菌为革兰氏阳性, 不形成芽孢的兼性厌氧菌。厌氧培养在 BPYL 培养基上细胞为球形; 在 BPY 培养基上细胞则为杆状。能利用 20 多种糖和醇产酸, 产生丙酸和乙酸。水解七叶苷, 还原硝酸盐, 过氧化氢酶阳性, 不液化明胶, 不产生吲哚。不利用 D-阿拉伯糖和木糖产酸。该菌株属于丙酸杆菌属中的一个新种, 定名为北京丙酸杆菌 *Propionibacterium beijingense* sp. nov.

关键词 丙酸杆菌属; 北京丙酸杆菌

Orla-Jensen 最早建立了丙酸杆菌属。1928 年 Van Niel^[1]对丙酸菌作了比较详细的研究。丙酸菌最早的用途是在干酪中起生香作用。丙酸又是一种杀菌剂, 在食品、饲料方面应用较广。丙酸菌也可用于生产维生素 B₁₂。因此, 近年来国外对这类菌的研究涉及面很广。在沼气发酵方面, 对挥发酸的消长研究较多, 但对丙酸菌的研究未见报道。本文报道从沼气发酵液中分离的一株丙酸菌 P4 的鉴定结果。

材料和方法

(一) 菌种

P4 菌株由实验室厌氧装置沼气发酵液中分离得到。

(二) 形态观察

BPY^[2] 斜面 and BPYL (以乳酸盐取代 BPY 中的葡萄糖) 斜面, 在抽空气换氮气的厌氧罐中 30℃ 培养 4 天, 用 Olympus 显微镜照相, Hitachi H-500 电镜观察。

(三) 含碳化合物的利用

1. 培养基和培养条件: 采用两种培养基, 接入新鲜的培养物, 30℃ 培养。I 号培养基以无糖 BPY 为基础, 加入煮沸灭菌的各种糖类。II 号培养基为 I 号培养基补加 0.04% 溴甲酚紫溶液 4%。

2. 生物量的测定: I 号培养基 7 天的培养

液, 稀释 10 倍, 用 721 型分光光度计, 波长 600nm, 光程 0.5cm 比色杯比浊, 以吸光度读数表示生物量。

3. pH 值的测定: I 号培养基 7 天的培养液, 用 ZD-2 型自动电位滴定计测 pH 值。

4. 产酸速度的观察: II 号培养基培养期间每天观察, 指示剂变黄者为产酸。

(四) 生化特性的测定

参照 Holdeman 的方法^[3]进行。

(五) 有机酸的测定

在 25ml 厌氧管中, 装入含乳酸盐或葡萄糖的培养基 20ml, 接种厌氧斜面培养物, 30℃ 培养 3 天或 6 天。取发酵液 1ml, 加 50% H₂SO₄ 0.02ml, 10,000r/min 离心 3 分钟, 用微量注射器取上清液 1μl, 用 Shimadzu GC-7AG 气相色谱仪测定挥发酸。具体条件: 记录器为 Shimadzu Chromatopac C-R1B, 不锈钢色谱柱, 内径 3mm, 长 1m, 内填 GDX-401 (3% H₃PO₄, 60-80 目), 使用氢火焰离子化鉴定器。

操作条件: 氮载气 90ml/min, 氢气 50ml/min, 空气 500ml/min, 柱温 210℃, 进样器温度 220℃, 检测器衰减 1/64, 放大器增益 10², 记录仪衰减 8, 纸速 10mm/min。

测定样品时以标准挥发酸溶液为参比。

本文于 1986 年 2 月 19 日收到。

本所张国伟同志和赵小平同志协助显微照像; 汤昭蛸同志摄制电镜照片, 在此一并致谢。

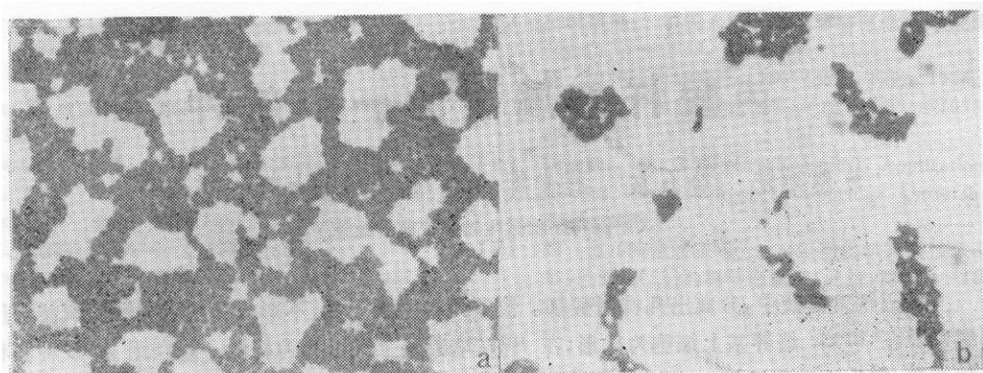


图1 菌株 P4 厌氧培养的形态(670×)

Fig. 1 Photomicrographs of strain P4 from anaerobic cultures magnification

a. BPYL 培养基 Medium BPYL b. BPY 培养基 Medium BPY

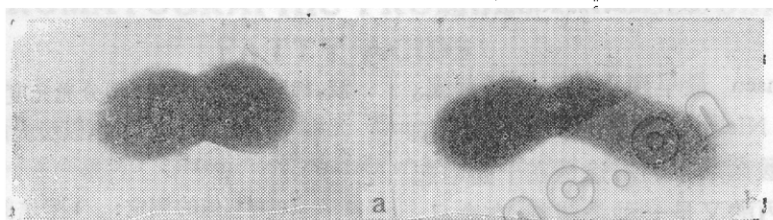


图2 菌株 P4 厌氧培养的形态(18,000×)

Fig. 2 Electron micrographs of strain P4 magnification

a. BPYL 培养基 Medium BPYL b. BPY 培养基 Medium BPY

结 果

(一) 形态特征

形态观察结果见图1、2。30℃厌氧培养4天,在BPYL培养基上的细胞几乎全是球形,多密集成堆,0.8μm;而在BPY培养基上则为杆状,0.8×2—3μm(4μm),多为两个细胞相连,形成“八”字形;有些则一头圆,一头尖,像蝌蚪状。革兰氏染色阳性,不形成芽孢,不运动,兼性厌氧菌。

(二) 含碳化合物的利用

菌株P4对26种糖和醇进行发酵,测定结果见表1。该菌能广泛地利用各种含碳化合物。对大多数的糖在30℃1—2天产酸,对部分双糖、多糖等3—7天产酸。7天指示剂不变黄的只有D-阿拉伯糖、菊糖、蜜二糖、棉子糖、山梨糖和木糖。而蜜二糖和棉子糖21天才产酸,可能是适应酶

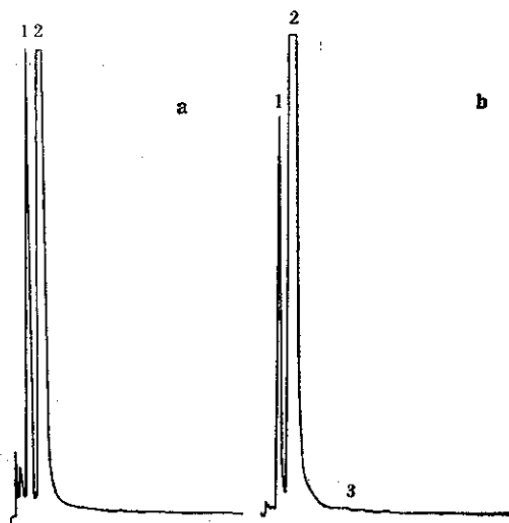


图3 菌株 P4 发酵液的挥发酸气相色谱图

Fig. 3 Chromatograms of volatile acids of strain P4 broth

a. 乳酸盐培养液 Lactate culture medium

b. 葡萄糖培养液 Glucose culture medium

1. 乙酸 2. 丙酸 3. 异戊酸

Acetic acid Propionic acid Iso valeric acid

表 1 菌株 P4 对含碳化合物的发酵

Table 1 Fermentation of carbohydrates by strain P4

底 物 Substrate	培养基 I Medium I				培养基 II Medium II	
	生物量 Biomass (A600nm)		pH		指示剂变色 情况(7 天) Change colour of indicator (7 days)	指示剂变 黄天数 Days from change yellow of indicator
	样品 Sample	培养基空白 Medium control	样 品 Sample	培养基空白 Medium control		
阿东糖醇 Adonitol	0.320	0.025	4.2	7.2	+	1
D-阿拉伯糖 D-Arabinose	0.025	0.025	6.5	7.2	-	
L-(+)-阿拉伯糖 L-(+)-Arabinose	0.145	0.027	4.2	7.0	+	1
纤维二糖 Cellobiose	0.290	0.022	4.7	7.2	+	7
糊 精 Dextrin	0.220	0.090	4.7	6.8	+	1
赤藓醇 Erythritol	0.310	0.030	4.3	7.2	+	1
七叶苷 Esculin	0.420	0.060	4.5	6.5	+	5
果 糖 Fructose	0.270	0.037	4.3	7.3	+	1
D-半乳糖 D-Galactose	0.225	0.025	4.3	7.1	+	1
D-(+)-葡萄糖 D-(+)-Glucose	0.227	0.026	4.3	6.4	+	1
甘 油 Glycerol	0.235	0.029	4.3	7.2	+	2
糖 原 Glycogen	0.166	0.044	5.4	7.1	+	7
菊 糖 Inulin	0.085	0.079	6.4	7.4	-	
乳 糖 Lactose	0.165	0.038	4.7	7.2	+	5
麦芽糖 Maltose	0.450	0.024	4.2	7.2	+	1
D-甘露醇 D-Mannitol	0.332	0.061	4.3	7.2	+	2
蜜二糖 D-(+)-Melibiose	0.055	0.026	6.3	7.2	-	21
棉子糖 D-(+)-Raffinose	0.046	0.027	6.5	7.1	-	21
L-(+)-鼠李糖 L-(+)-Rhamnose	0.052	0.024	5.1	6.5	+	3

续表 1

底 物 Substrate	培养基 I Medium I				培养基 II Medium II	
	生物量 Biomass (A600nm)		pH		指示剂变色 情况(7 天) Change colour of indicator (7 days)	指示剂变 黄天数 Days from change yellow of indicator
	样品 Sample	培养基空白 Medium control	样 品 Sample	培养基空白 Medium control		
D-核糖 D-Ribose	0.270	0.022	4.3	6.8	+	1
山梨醇 Sorbitol	0.345	0.030	4.2	7.2	+	2
L-山梨糖 L-Sorbose	0.035	0.035	6.5	7.0	-	
可溶性淀粉 Soluble starch	0.350	0.122	4.8	6.8	+	4
蔗糖 Sucrose	0.270	0.070	4.2	6.8	+	2
D-(+)-麦芽糖 D-(+)-Trehalose	0.510	0.054	4.5	7.2	+	2
D-木糖 D-Xylose	0.035	0.036	6.4	7.0	-	
无糖对照 No carbohydrate control	0.041	0.027	6.7	7.2	-	

的结果。这种现象与我们对根霉属利用碳水化合物产酸的结果相似^[4]。

(三) 其它特征

菌株 P4 水解七叶苷,还原硝酸盐,过氧化氢酶阳性,不液化明胶,不产生吡啶。

(四) 产酸种类的鉴定

气相色谱仪分析挥发酸的图谱(图 3)指出,以乳酸盐为基质的发酵液含相当纯的丙酸和乙酸,其比例随培养天数的增加而变动。30℃ 3 天时,丙酸与乙酸的比例为 2.5:1,而培养 6 天时为 3.0:1。葡萄糖基质发酵产物也是丙酸和乙酸,并有极微量的异戊酸。

讨 论

根据文献报道,丙酸菌为多态型,虽属杆菌,但可存在各种形式,并有些为球形。在某些分类检索表中先以形态为基础,再

结合糖的发酵^[5]。而 Haldeman^[3] 和 Moore^[6] 则以生化反应和糖产酸为依据,并附加产物的气相色谱分析图谱。按照各家的不同见解作了上述各种试验。根据我们的试验结果,丙酸菌的形态随培养基和培养条件的改变,变化很大,菌株 P4 厌氧培养时在 BPYL 培养基上生长几乎全是球形,而在 BPY 培养基上则为杆状(图 1)。在较仔细的观察中发现,不同培养基的影响大于厌氧和好氧培养的差别,有时则会有球状、杆状都存在的现象。所以形态特征只能作为参考。

从应用的角度出发,以生化反应、糖产酸的情况和产物种类作为分类的依据,对实践有利。根据 P4 糖产酸的结果(表 1)可以明显看出,该菌株在各种含碳水化合物中的生长和产酸情况因基质而异。该菌株能广泛地利用各种单糖、双糖和多糖。同

时可以说明,以豆腐废水(含大量蔗糖,微量葡萄糖和棉子糖)作为沼气发酵的原料它都能首先利用,其产物丙酸和乙酸又是进一步甲烷发酵的基质^[7]。最近报道丙酸盐在沼气发酵中能被迅速转化^[8]。因此,我们认为在以豆腐废水进行沼气发酵中,丙酸杆菌可能是主要产酸菌之一。

根据上述结果,P4 菌株为革兰氏阳性杆菌,多形态,无芽孢,兼性厌氧,发酵葡萄糖和乳酸盐为丙酸和较少的乙酸。应归属于丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*)。该菌株水解七叶苷,不液化明胶,从甘露醇产酸,还原硝酸盐,应归属丙酸丙酸杆菌 (*Propionibacterium acidi-propionic*)。丙酸丙酸杆菌的重要特征之一是从戊糖(阿拉伯糖和 D-木糖)产酸,而 P4 菌株则不从这两种糖产酸。因此,P4 菌株与丙酸丙酸杆菌不同。P4 菌株与 Werkman 和 Brown 所描述的 *Propionibacterium technicum*^[9] 也不相同,P4 菌株能利用 L-(+)-鼠李糖和 D-(+)-蔗糖产酸,而后者则不能。因

此认为 P4 菌株是丙酸杆菌属中的一个新种,定名为北京丙酸杆菌 (*Propionibacterium beijingense* sp. nov.)。

参 考 文 献

- [1] Van Neil, C. B.: The Propionic Acid Bacteria, Haarlem—N. V. Uitgeverszaak J. W. Biossevain & Co., 1928.
- [2] 中国微生物菌种保藏管理委员会:《中国菌种目录》,轻工业出版社,北京,第 408 页,1983。
- [3] Holdeman, L. V. et al.: Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed., Southern Printing Co., Virginia, 1977.
- [4] 乐华爱、方心芳:微生物学报,10(4): 519—521, 1964。
- [5] 坂口谨一郎等:日本农艺化学会志,17(3): 127—138, 1941。
- [6] Buchanan, K. E. and N. E. Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 633—641, 1974.
- [7] Brummeler, E. T. et al.: App. Environ. Microbiol., 49(6): 1472—1477, 1985.
- [8] Boone, D. R.: ibid., 48(4): 863—864, 1984.
- [9] Werkman, C. H. and R. W. Brown: J. Bact., 26(4): 393—417, 1933.

A NEW SPECIES OF GENUS *PROPIONIBACTERIUM*

Yue Huaai Jin Shiyun Cheng Guangsheng Zhao Yufeng

Wang Dasi Fang Sinfang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of *Propionibacterium* was isolated from biogas slurry. It is a Gram-positive, non-spore-forming, facultative anaerobe. Cells of anaerobic cultures are coccus in shape on medium BPYL, but rod-shaped on medium BPY. This strain hydrolyses esculin, reduces nitrate, does not liquefy gelatin, and does not produce indole, and it is catalase positive. More than 20 carbohydrates can be utilized. Fermentation products include propionic and acetic acids. But it does not produce acid

from D-arabinose and xylose. According to the physiological and biochemical characteristics the strain P4 is considered to be a new species of genus *Propionibacterium* and designated as *Propionibacterium beijingense* sp. nov.

Key words

Propionibacterium; *Propionibacterium beijingense*