

产碱菌属的一个新种

尹光琳 曹桂芳 梁改芹 蔡妙英

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从土样中分离得到编号为 E54 的革兰氏阴性短杆菌。其形态、生理生化特性与假单胞菌属及产碱菌属的近似种均不相同。该菌株无鞭毛, 无 PHB 颗粒形成。氧化酶阳性, 氧化葡萄糖产酸, 还原硝酸盐但无反硝化作用。产生精氨酸双水解酶, 但不产生脲酶和色氨酸脱氨酶。石蕊牛奶产碱并还原。不水解淀粉和明胶。能利用多种碳源。DNA 中 G + C 含量为 68.65mol%。DNA-DNA 杂交结果与产碱菌属更接近。因此, 将其定为新种, 命名为产酮产碱菌 (*Alcaligenes ketogenes* sp. nov. Yin et Cai)。

关键词 产碱菌属; 产酮产碱菌

葡萄糖经微生物发酵制备 2-酮基-D-葡萄糖酸近年来已日益引起重视。它是合成食品抗氧化剂——D-异抗坏血酸(即异维生素 C)的重要前体。自 1935 年 Bernhauer 等人^[1]从葡萄糖醋杆菌 (*Acetobacter gluconicum*) 的发酵液中分离到 2-酮基-D-葡萄糖酸以来, 国外研究甚多。近几年国内也进行了研究。

产生 2-酮基-D-葡萄糖酸的细菌除醋杆菌属菌株^[2]外, 葡糖酸杆菌属 (*Gluconobacter* sp.) 某些菌株^[3], 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)^[4] 和其它假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)^[5], 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)^[6], 嗜夏孢黄单胞菌 (*Xanthomonas uredoovorans*)^[7], 解淀粉欧文氏菌 (*Erwinia amylovora*)^[8], 以及球状节杆菌 (*Arthrobacter globiformis*)^[9] 等均能生成 2-酮基-D-葡萄糖酸。

我们对选育出的产酸菌株 E54 进行了鉴定, 认为是产碱菌属中的一个新种, 现将鉴定结果报道如下。

材料和方法

(一) 菌株来源

1984 年 10 月用蛋白胨肉膏培养基从土样中分离得到。

(二) 方法

除以下说明者外, 一般形态、生理生化试验均按常规方法^[10]进行。

1. 利用氮自养生长的测定: 基础培养基采用 Kluyver 等人所用的培养基^[11](Na₂CO₃ 0.1g, NH₄Cl 0.1g, KH₂PO₄ 0.7g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, NaCl 0.2g, 微量 FeCl₃, 琼脂 20g, 蒸馏水 1,000ml, pH7.0)。分装每管 10ml, 15 磅 30 分钟灭菌, 摆斜面。接种后培养时抽真空, 通入 50% N₂、42% H₂ 和 8% O₂ 的混合气体, 于 30℃ 培养^[12]。

2. DNA 中 G + C mol% 的测定: 根据 Marmur 的方法^[13]提取 DNA, 采用溶解温度法 (T_m)^[14]测定 G + C mol%, 用大肠杆菌 K12 作为对照菌株。

3. DNA 杂交率测定: 按速率法^[15]修改进

本文于 1986 年 10 月 10 日收到。

承王大程、谈家林先生审阅本文; 刘庆臣同志参加部分工作, 特此一并致谢。

行。E54 菌株与粪产碱菌 AS 1.768 和施氏假单胞菌 AS 1.202 的 DNA 分别作碱基配对。将提取、纯化和用超声波切割的 DNA 样品分别用 0.1SSC 溶液精确配制成 OD_{260nm} 值为 1.5 (DNA 浓度约为 $75\mu g/ml$)，同时各取等量的样品 A 和 B 制成 M 混合样品，分别置沸水浴中复性 10 分钟，使其调节到最终为 2SSC 浓度。当达到最适复性温度时，于 $260nm$ 波长开始扫描 30 分钟，可得出一条随时间光密度下降的直线。最适复性温度 (ToR) 可根据 Gills 等^[16]的公式计算：

$$ToR = 0.51(G + C \text{ mol}\%) + 47.0。$$

杂交率的计算要先算出各个样品 DNA 每分钟降低的 OD_{260nm} 值，从而得到各自的复性速率 (V_A 、 V_B 和 V_M)，再代入 De Ley 等人^[17]公式，计算杂交率 D%。

$$D\% = \frac{4V_M - (V_A + V_B)}{2\sqrt{V_A \times V_B}} \times 100$$

结 果

(一) 形态特征

1. 个体形态：革兰氏阴性短杆菌，单个或成对排列，少数成链状，一般大小为 $0.4-0.6 \times 1.0-1.5\mu m$ 。不运动，无鞭毛，无芽孢，有荚膜。用肉汁培养基和高碳低氮培养基培养 18—96 小时的细胞染色均无聚- β -羟基丁酸盐 (PHB 颗粒) 形成 (图 1)。

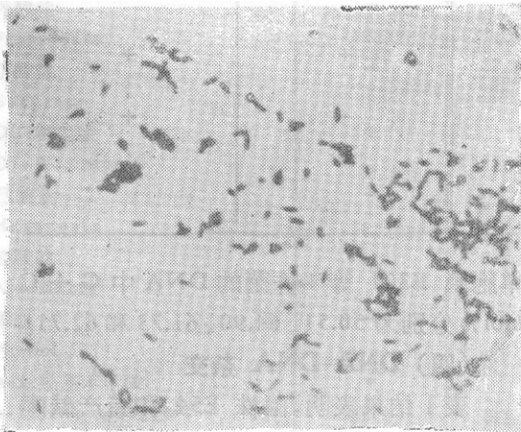


图 1 E54 菌株的细胞形态 (1,000 \times)

Fig. 1 The cell of strain E54

2. 群体形态：在肉汁琼脂平板上菌落圆形，低凸状隆起，较光滑，不透明，边缘整齐，中心呈微黄色，直径 2—3mm。菌落乳白色，无水溶性色素。在肉汁液体培养液内均一、微浑浊 (图 2)。

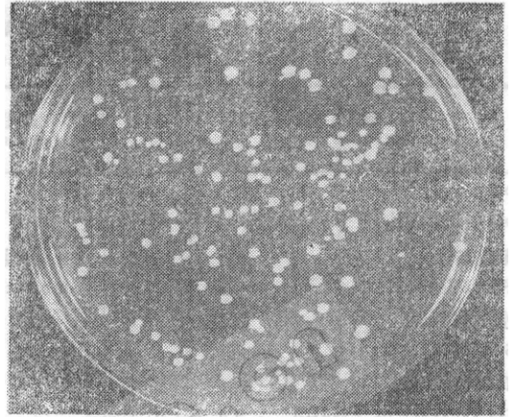


图 2 E54 菌株的菌落形态

Fig. 2 The colonies shape of strain E54

(二) 生理生化特性

接触酶阳性，氧化酶阳性，无荧光色素，精氨酸双水解酶阳性。不液化明胶，不水解淀粉。不能从 4% 蔗糖产果聚糖，不产生脲酶和色氨酸脱氨酶，不产生 3-酮基乳糖，VP 和 MR 反应均为阴性，不产生吡嗪。可将硝酸盐还原成亚硝酸盐。无反硝化作用。石蕊牛乳产碱，7 天后还原。产生 2-酮基-D-葡萄糖酸。

呼吸代谢，从不发酵。可氧化葡萄糖和果糖产酸，但不能氧化乙醇生成乙酸。营养谱很广。可利用的碳源有葡萄糖、果糖、木糖、核糖、半乳糖、乙醇、赤藓醇、2,3-丁二醇、精氨酸等。不利用甜菜碱、甲酸、乙酸、丙酸、 β -羟基丁酸盐、己酸盐、苯酚、对羟基苯甲酸、蔗糖、麦芽糖、乳糖、鼠李糖、甘露糖、山梨糖、淀粉、纤维素、丙二酸盐和菸酸盐等。

最适生长温度为 28—30 $^{\circ}C$ ，在 42 $^{\circ}C$ 能生长。pH 5.0—8.0 均可生长，pH 4.5 时

表 1 菌株 E54 的 DNA-DNA 杂交率 (D%)

Table 1 DNA-DNA hybridization of strain E54 with related species

参考菌株 Reference strain	E54	施氏假单胞菌 <i>Ps. stutzeri</i> AS 1.202	粪产碱菌 <i>Alcaligenes faecalis</i> AS 1.768
E54	100	-3.53	22.53

表 2 菌株 E54 与假单胞菌属近似种的鉴别特征

Table 2 Differential characteristics of strain E54 and related species of *Pseudomonas*

特征 Characteristics	E54	施氏假单胞菌 (<i>Ps. stutzeri</i>)	产碱假单胞菌 (<i>Ps. alcaligenes</i>)	粪产碱假单胞菌 (<i>Ps. pseudo-</i> <i>alcaligenes</i>)
PHB 颗粒 PHB granule	-	-	-	-
鞭毛着生 Flagellation	-	极生鞭毛 monotrichous	极生鞭毛 monotrichous	极生鞭毛 monotrichous
水溶性色素 Soluble pigments	-	-	-	-
液化明胶 Hydrolysis of gelatin	-	-	+	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	-	+	+
果聚糖产生 Levan formation from sucrose	-	-	-	-
41°C 生长 Growth at 41°C	+	+(10-90%)	+	+(微弱) (scant)
反硝化作用 Dinitrification	-	+	-	-
碳源利用 Carbon sources used for growth				
葡萄糖 Glucose	+	+	-	-
D-核糖 D-Ribose	+	-	-	-
DL-精氨酸 DL-Arginine	+	-	+	+
甜菜碱 Betaine	-	-	-	+
赤藓醇 Erythritol	+	-	-	-

不能生长。可以耐受 3—5% NaCl, 在 7% NaCl 中不能生长。不能利用氢自养生长。

(三) DNA 中 G + C 的含量

E54 菌株的 DNA 中 G + C mol% 为 68.65。大肠杆菌 K12、粪产碱菌 AS 1.768、施氏假单胞菌 AS 1.202、恶臭假

单胞菌 E301 等 4 株菌的 DNA 中 G + C mol% 分别为 50.51、64.90、61.73 和 62.71。

(四) DNA-DNA 杂交

表 1 结果表明, 菌株 E54 和粪产碱菌在亲缘上有更多的同源性, 更接近于产碱菌属。

表 3 菌株 E54 与产碱菌属近似种的鉴别特征

Table 3 Differential characteristics of strain E54 and related species of *Alcaligenes*

特 征 Characteristics	E54	粪产碱菌 (<i>Al. faecalis</i>)	海水产碱菌 (<i>Al. aqua- marinus</i>)	真养产碱菌 (<i>Al. eutrophus</i>)	争论产碱菌 (<i>Al. para- doxus</i>)
鞭毛着生 Flagellation	-	周生鞭毛 peritrichous	周生鞭毛 peritrichous	周生鞭毛 peritrichous	周生鞭毛 peritrichous
扩散性色素 Diffusible pigments	-	-	-	-	黄色类胡萝卜素 色素 yellow carotenoid
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	-	-	-	-
明胶液化 Hydrolysis of gelatin	-	-	-	-	-
淀粉水解 Hydrolysis of starch	-	-	+	-	-
PHB 颗粒 PHB granule	-	-	-	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	-	+	+
石蕊牛乳反应 Litmus milk	产碱还原 alkaline reduction	产碱 alkaline	不变化 none	-	-
利用氮自养生长 Autotrophic growth with H ₂	-	-	-	+	-
碳源利用 Carbon sources used for growth					
葡萄糖 Glucose	+	-	+	+	+
果糖 Fructose	+	-	+	+	+
乙酸盐 Acetate	-	+	-	-	-
丙酸盐 Propionate	-	+	-	-	-
丁酸盐 Butyrate	-	+	-	-	-
DL-精氨酸 DL-Arginine	+	-	-	-	-
己酸盐 Hexanoate	-	-	-	+	+
菸酸盐 Nicotinate	-	-	-	+	+
苯酚 Phenol	-	-	-	+	+
p-对羟基苯甲酸 p-Hydroxybenzoic	-	-	-	+	+
DNA 中 G + C mol% G + C mol% of DNA	68.65	58.90	57.90	66.30—66.80	68—70

讨 论

E54 菌株系革兰氏阴性短杆菌, 氧化酶阳性, 葡萄糖氧化产酸, 不运动, 无鞭毛。具此主要特征的属有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、产碱菌属 (*Alcaligenes*)、醋杆菌属 (*Acetobacter*)、葡糖酸杆菌属 (*Gluconobacter*) 和土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 等。由于菌株 E54 不产生 3-酮基-乳糖等特征, 排除了归于土壤杆菌属的可能, 此外在 pH4.5 时不能生长和不能氧化乙醇产酸则与醋杆菌属和葡糖酸杆菌属也有区别。根据形态、生理生化特性, 分别将其与假单胞菌属的近似种和产碱菌属的近似种进行了比较。

1. E54 菌株与假单胞菌属近似种的比较: E54 菌株不能在细胞内积累聚- β -羟基丁酸盐, 似乎可归于假单胞菌属第 I 群, 但又无荧光色素, 能在 42°C 生长, 精氨酸双水解酶阳性和无反硝化作用, 又与第 II 群中的类产碱假单胞菌 (*Ps. pseudoalcaligenes*) 相近, 但在对葡萄糖和五碳糖利用等特性上也有明显区别(表 2)。

2. E54 菌株与产碱菌属近似种的比较^[18-20]: 从 E54 菌株与粪产碱菌和施氏假单胞菌的 DNA-DNA 杂交结果来看, E54 菌株应归入产碱菌属。它与粪产碱菌相比, 由于前者不利用乙酸、丙酸和丁酸, 而利用葡萄糖, 与后者差异很大。E54 菌株不能水解淀粉和明胶的特性和争论产碱菌 (*Al. paradoxus*) 相似, 但后者产生类胡萝卜素色素和聚- β -羟基丁酸盐 (PHB 颗粒), 两者间又有明显不同。与 E54 菌株较近似的是真养产碱菌 (*Al. eutrophus*), 二者均利用果糖, 不水解淀粉和明胶, 不同之处为无 PHB 颗粒, 无鞭毛, 产生精氨酸双水解酶, 不能利用苯酚、p-对羟基苯甲酸和己酸盐等(表 3)。

3. E54 菌株与无色杆菌属近似种的比较: E54 菌株的某些主要生理特性和《伯杰细菌鉴定手册》第七版中所列的无色杆菌属 (*Achromabacter*)^[21] 也有相似之处, 如不运动, 不水解明胶和葡萄糖氧化产酸等。其中相近似的种为欧迪斯无色杆菌 (*Ach. eurydice*) 和带马瓦无色杆菌 (*Ach. delmarvae*)。但前者对石蕊牛乳反应不变化, 对除葡萄糖外的碳水化合物均活性极低; 后者石蕊牛乳反应先产酸, 5 天还原, 12—14 天凝固, 能利用乳糖和蔗糖产酸。这些特点和 E54 菌株均不相同。此外, 由于从《伯杰细菌鉴定手册》第八版起, 已取消了无色杆菌属, 因此未再做进一步的探讨。

根据 E54 菌株主要形态和生理生化特性, 与产碱菌属相似处较多。E54 菌株不运动, 无鞭毛, 而产碱菌属有 3/6 的种是不运动的。石蕊牛乳产碱, VP 反应阴性, 不产生吲哚等特性也都相同。根据 DNA 体外杂交结果表明, E54 菌株更接近于产碱菌属。因此, 将菌株 E54 归入产碱菌属。据其能产生 2-酮基-D-葡萄糖酸的特点, 命名为产酮产碱菌 (*Alcaligenes ketogenes* sp. nov. Yin et Cai)。

参 考 文 献

- [1] Bernhauer, K. and B. Görlch: *Biochem. Z.*, 280: 367, 1935.
- [2] Kulka, D. and T. K. Walkew: *Arch. Biochem. Biophys.*, 50: 169, 1954.
- [3] Asai, T. and Y. Ikeda: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 22: 50, 1948.
- [4] Jones, J. K. N. and D. L. Mitchel: *Can. J. Chem.*, 37: 1561, 1959.
- [5] Nunheimer, Th. D. and T. Philips: U. S. Patent, 3, 255, 093, 1964.
- [6] Misenheimer, T. J. et al.: *Appl. Microbiol.*, 13: 395, 1965.
- [7] Blackwood, A. C. and E. R. Blakeley: *Can. J. Microbiol.*, 2: 741, 1956.
- [8] Suzuki, Y. and K. Uchida: *Agr. Biol. Chem.*, 29: 456, 1965.
- [9] 白照熙等: 生物研究通报, 2(3): 31, 1984.
- [10] 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。
- [11] Kluyver, A. J. and A. Manten: *Antonie Van Leeuwenhoek*, 8: 71, 1942.
- [12] Davis, D.: *Studies on the Gram Negative Hydrogen Bacteria and Related Organism*, Ann Arbor, Michigan, U. S. A., 1967.
- [13] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208, 1961.
- [14] 林万明等: 微生物学通报, 8(5): 245, 1981.
- [15] Skinner, F. A. et al.: *Identification Methods for Microbiologists*, Second Edition, Academic Press, p. 277, 1979.
- [16] Gillis, M. et al.: *European J. of Biochem.*, 12: 143, 1970.
- [17] De Ley et al.: *ibid.*, 12: 133, 1970.
- [18] Davis, D. H.: *International Journal of Systematic Bacteriology*, 19: 375, 1969.
- [19] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eight Edition, pp. 217—243, 274—275, 1974.
- [20] Krieg, N. R. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London, pp. 140—199, 1984.
- [21] Breed, R. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Seventh Edition, London, Bailliere, pp. 300—309, 1957.

A NEW SPECIES OF *ALCALIGENES*

Yin Guanglin Cao Guifang Liang Gaiqin Cai Miaoying

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Strain E54 isolated from soil is gram-negative coccid rods. It differs from related species of *Pseudomonas*, *Alcaligenes* in morphological, physiological and biochemical characteristics. Main characteristics of strain E54 are non-flagelled, oxidase positive, nitrate reduced but not denitrified, arginine dihydrolase positive but no urease and tryptophan deaminase, litmus milk alkaline and reduced, starch and gelatin not hydrolyzed. Utilizes glucose, fructose, galactose, ribose, xylose, arginine and 2,3-butanediol et al. as carbon sources; but do not use mannose, lactose,

sucrose, starch, sorbose, betaine, malonate, acetate, propionate et al. G+C content of DNA is 68.65 mol% (Tm). By the DNA-DNA hybridization experiments in vitro, this strain is closed to *Alcaligenes*.

Thus we consider this strain as a new species of *Alcaligenes*. On the base of production of 2-keto-D-gluconic acid, it is named as *Alcaligenes ketogenes* sp. nov. Yin et Cai.

Key words

Alcaligenes; *Alcaligenes ketogenes*