

对肿瘤有抑制作用的假单胞菌新种——济南假单胞菌

蔡妙英 路德硕 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

何祖泽 王吉昌

(山东省医学科学院, 济南)

1973年自山东省无影山表土中分离出一株革兰氏阴性杆菌(编号161)。它对小鼠的宫颈癌、肝癌和黑色素瘤有明显抑制作用;对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和微球菌也有拮抗作用。

该菌具极生丛鞭毛。直或稍弯曲的杆状, $0.5-0.6 \times 1-2 \mu\text{m}$ 。培养2—5d的细胞内含有多- β -羟基丁酸盐颗粒。产生绿色水溶性色素和绿色荧光色素。营呼吸代谢。化能异养菌。许多含碳的化合物可作为唯一的碳源利用,例如葡萄糖、海藻糖、乙醇、纤维二糖、岩藻糖、精氨酸和甜菜碱。不利用丙酸和酒石酸。不需要生长因子。液化明胶。不水解淀粉。产精氨酸双水解酶。7—37℃和 pH 5.65—8.40 生长。不能以氢营自养生活。DNA 的 G + C 含量为 58.1mol%。它与已知的假单胞菌均不相同。因此,认为菌株161为假单胞菌属的一个新种,命名为济南假单胞菌 (*Pseudomonas jinanensis* Cai & Wang sp. nov.)。

关键词 济南假单胞菌;抑制作用;宫颈癌;肝癌;黑色素瘤

现有资料表明,应用于抑制肿瘤的细菌抗生素已有10多种^[1],例如枯草芽孢杆菌产生的狗尿酸可抑制艾氏腹水癌;铜绿假单胞菌产生的抗生素173、溶血链球菌产生的EAP以及芽孢杆菌、保加利亚乳酸菌、红色丙酸菌、克雷伯氏菌、棒状杆菌和大肠埃希氏菌等10个种的一些菌株均对癌细胞的生长有抑制作用。本文描述的对肿瘤有抑制作用的161菌株,从形态、生理生化特征和DNA/DNA杂交结果看来,既不同于已报道过的具有抑制肿瘤作用的铜绿假单胞菌,也不同于所有已命名的假单胞菌,故定为假单胞菌属的一个新种。

材料和方法

(一) 菌株来源

1973年山东省医学科学院自济南无影山(海拔51.6m)树下离地表1cm的土壤中(用高氏培

养基)分离。

(二) 鉴定方法

除下面特殊说明的外,均按《一般细菌常用鉴定方法》^[2]进行鉴定。

1. Tween 60 分解^[2]: 基础培养基为蛋白胨10g、NaCl 5g、CaCl₂ 100mg、琼脂15g、蒸馏水1000ml, pH7.4。分装于大试管每管20ml, 1kg/cm² 30 min 灭菌,使用时在融化的培养基中加入每管0.2ml的Tween 60, 摇匀,注入培养皿内制成平板,待凝后,点种,于30℃培养,在菌落周围出现不透明圈者为阳性。

2. 利用氢自养生长的测定: 基础培养基采用Kluyver等人所用的培养基^[3,4] (Na₂CO₃ 0.1g、NH₄Cl 0.1g、KH₂PO₄ 0.7g、MgSO₄ 0.2g、NaCl 0.2g和微量FeCl₃、琼脂15g、蒸馏水1000ml, pH7.0)。培养时抽真空后,通入50%N₂、42% H₂和8%O₂的混合气体,30℃培养,培养物混浊

本文于1987年7月8日收到。

为阳性。

3. 聚- β -羟基丁酸 (PHB) 颗粒的染色: 一般可用普通肉汁琼脂培养基, 也可用高碳低氮培养基, 使颗粒较为明显。后一培养基成分为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g、 NaH_2PO_4 0.5g、 K_2HPO_4 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、乙酸钠 5g、琼脂 12g、蒸馏水 1000ml, pH7.0。培养 2—15d 染色, 染色方法见文献^[2], 胞内有黑色颗粒者为阳性。

4. DNA 的 G + C mol% 的测定: DNA 的提取根据 Marmur 的方法^[3], T_m 值测定用 Specord UV Vis 分光光度计, 以点温计直接测定法^[6]。

5. 同源性测定: 基本按 Michael^[7] 和 Marmur^[3] 方法取得纯化的 DNA, 以超声波 (MSE, 100W) 1min/次 $\times 3$ 于冰浴中切割, 然后以 DeLey^[8] 的复性速率法测定同源性。同源性 % 按 DeLey 公式计算:

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

V_A 和 V_B 为 A、B 二样品各自的复性速率。

V_M 为 A、B 样品等量混合的复性率。复性温度为 65℃。

结 果

(一) 菌株筛选

从 2100 多菌株中, 以精原细胞和抗菌谱等方法筛选, 得到一株对实验鼠具有激活单核细胞吞噬功能, 并对小鼠宫颈癌、肝癌和黑色素瘤有明显抑制作用的细菌, 编号为 161。该菌株还具有对革兰氏阳性菌例如金黄色葡萄球菌、微球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌作用。

(二) 鉴定特征

菌株 161 为革兰氏阴性杆菌, 直杆, 少数稍弯曲; $0.5-0.6 \times 1-2\mu\text{m}$, 极生丛鞭毛(图 1), 无芽孢, 散在, 无定形排列。生长在肉汁琼脂培养基上, 3—5d 后细胞内出现 PHB 颗粒。为了进一步证实, 将菌株培养在高碳低氮培养基上, 生长量虽少, 但细胞

内明显地积累 PHB, 一般在 48h 即可出现, 并可持续 10d 以上(图 2)。

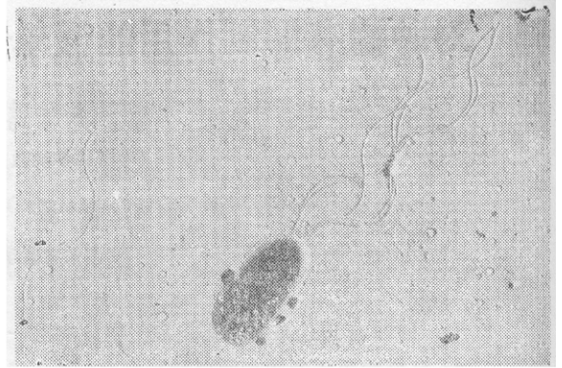


图 1 营养琼脂 24h 的培养物 ($\times 7000$)
Fig. 1 Cell from nutrient agar after 24h cultivation

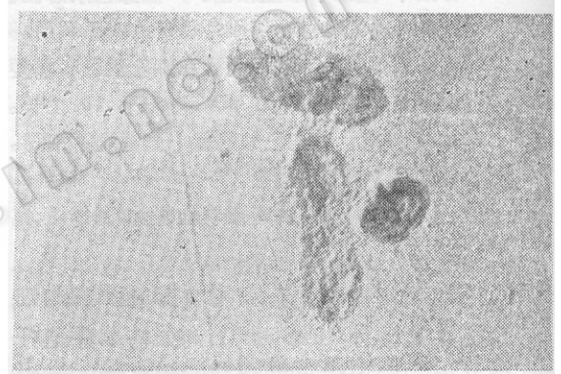


图 2 营养琼脂培养 5 d 细胞内含 PHB 颗粒 ($\times 7000$)
Fig. 2 Cell from nutrient agar contain PHB granules after 5 d cultivation

肉汁琼脂平板菌落呈圆形, 低凸台状, 光滑, 湿润, 半透明, 边缘整齐, 产粘液, 直径 1.5—3mm。产生水溶性绿色素及绿色荧光色素。菌苔呈浅芒果棕色。肉汁琼液体培养基均一混浊, 表面有一层易破碎的膜; 膜未破碎时, 浮于液面或贴于管壁上, 膜破碎后可成絮状碎块下沉管底部, 呈不多的沉淀。有绿色水溶性色素及绿色荧光色素。

接触酶阳性。氧化酶阳性。精氨酸双水解酶阳性。液化明胶。不水解淀粉。硝

表 1 菌株 161 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain 161

特 性 Characteristics	反应 Reaction	特 性 Characteristics	反应 Reaction
葡萄糖 O/F, 氧化型 Glucose O/F, Oxidative	+	丙二酸盐 Malonate	+
接触酶 Catalase	+	乳酸盐 Lactate	+
氧化酶 Oxidase	+	酒石酸盐 Tartrate	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	精氨酸 Arginine	+
明胶水解 Hydrolysis of gelatin	+	液体石蜡 Paraffinliquid	-
淀粉水解 Hydrolysis of starch	-	甜菜碱 Betaine	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	酚 0.1% Phenol 0.1%	-
反硝化 Denitrification	-	酚 0.01% Phenol 0.01%	+
水解吐温 60 Hydrolysis of tween 60	+	2,3-丁二醇 2,3-Butylene glycol	+
碳源利用: Carbon source for growth:		从蔗糖产生果聚糖 Levan formation from sucrose	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	PHB 颗粒 PHB granules	+
葡萄糖 Glucose	+	利用氢自养生长 Autotrophical with hydrogen	-
D-果糖 D-fructose	+	色素产生: Pigment formation:	
蔗糖 Sucrose	+	荧光色素(绿) Fluorescent pigment (green)	+
海藻糖 Trehalose	+	水溶性色素(绿) Soluble pigment (green)	+
岩藻糖 Fucose	+	非水溶性色素(浅芒果棕) Non-soluble pigment (pale mengo-brown)	+
纤维素 Cellulose	-	生长温度: Growth temperatures:	
纤维二糖 Cellobiose	+	0—2℃	-
淀粉 Starch	-	7—9℃	+
乙醇 Ethanol	+	8—10℃	+
肌醇 Inositol	+	37℃	+
丙酸 Propionic acid	-	39℃	-
乙酸 Acetic acid	±	40℃	-
丁酸 Butyrate	-	生长起始时的 pH: Initial pH for growth:	
m-羟基苯甲酸 m-Hydroxybenzoic acid	-	4.86	-
β-羟基丁酸 β-Hydroxybutyric acid	+	5.65—6.40	+
		8.12—8.40	+
		8.82—9.24	-
		DNA 的 G + C mol% G + C mol% of DNA	58.1

酸盐还原和反硝化试验阴性。水解 Tween 60。从 4% 蔗糖产果聚糖。

营呼吸代谢,从不发酵。营养谱极广,可利用的碳源,包括葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖、乙醇、2,3-丁二醇、肌醇、β-羟基丁酸、丙二酸、乳酸、丙氨酸、β-氨基丙酸、精氨酸、缬氨酸、甜菜碱等。不利用纤维素、淀粉、丙酸、丁酸、酒石酸、间-羟基苯甲酸和液体石蜡等。

7-37℃ 都能生长,4℃ 和 39℃ 不能生长。于起始培养时, pH5.6—8.1 均可生长。不能利用氢营自养生活。

DNA 的 G + C mol% 为 58.1 (Tm 值法)。与荧光假单胞菌的同源性为 58.56%。鉴定结果见表 1。

讨 论

菌株 161 为革兰氏阴性杆菌,以极生丛鞭毛运动,呼吸代谢,氧化酶和接触酶均为阳性,据此应属于假单胞菌属 (*Pseudo-*

monas)。它在适当有机碳源情况下,能利用无机氮生长,不需要任何生长因子,可与需要生长因子的假单胞菌属中的第 IV 部分菌相区分^[9]。从产荧光色素、具极生丛鞭毛、7℃ 生长和 39℃ 不生长的特征,该菌株似可归入荧光假单胞菌群,但是它们之间有很多特征不相符,除细胞内具 PHB 颗粒以外,还可从 4% 蔗糖上形成果聚糖,反硝化阴性,利用乙醇、纤维二糖和岩藻糖作唯一碳源,不利用丙酸等特征相区别(见表 2)。由于这些表观特征上的差别,难于归属荧光假单胞菌群,但从同源值为 58.56% 看来,二者虽不属同一个种,但二者的关系还是较近的。根据该菌株能形成 PHB 颗粒,还能利用精氨酸和甜菜碱,又具精氨酸双水解酶,与麝香石竹假单胞菌 (*Ps. caryophylli*) 相似,但菌株 161 在 40℃ 下不能生长,又具水溶性色素和无反硝化作用,可区别于麝香石竹假单胞菌。根据 161 株具有 PHB 和能利用精氨酸和甜

表 2 菌株 161 与有关的荧光假单胞菌群的鉴别特征^[9,10]

Table 2 Characteristics differentiating Strain 161 and related fluorescent pseudomonads

菌株 Strains 特征 Characteristics	菌株 161 Strain 161	荧光假单胞菌 <i>Ps. fluorescens</i>					绿针假单胞菌 <i>Ps. chloraphis</i>	致金假单胞菌 <i>Ps. aureofaciens</i>
		I	II	III	IV	V		
PHB 颗粒 PHB granule	+	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖→果聚糖 Sucrose→Levan	+	+	+	-	+	-	+	+
反硝化 Dinitrification	-	-	+	+	+	-	+	-
碳源利用: Carbon source for growth								
丙酸盐 Propionate	-	+	+	d	+	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	-	-	-	-	-	-	-
乙醇 Enthanol	+	-	+	d	-	d	d	-
岩藻糖 Fucose	+	-	-	-	-	-	-	-

表 3 菌株 161 与具 PHB 的第一群有关种的鉴别特征^[9,10]

Table 3 Characteristics Differentiating strain 161 and related species of first group that can accumulate PHB granules

菌株 Strains 特征 Characteristics	菌株 161 Strain 161	麝香石竹假单胞菌 <i>Ps. caryophylli</i>	洋葱假单胞菌 <i>Ps. cepacia</i>	划界假单胞菌 <i>Ps. marginata</i>
利用精氨酸和甜菜碱 Utilize arginine and betaine for growth	+	+	+	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	-	-
40℃ 生长 Growth at 40℃	-	+	+	+
水溶性色素 Soluble pigment	+	-	+	+
明胶液化 Hydrolysis of gelatin	+	-	d	+

表 4 菌株 161 与具 PHB 的第二群有关种的鉴别特征^[9,10]

Table 4 Characteristics Differentiating strain 161 and related species of second group that can accumulate PHB granules

菌株 Strains 特征 Characteristics	菌株 161 Strain 161	食酸假单胞菌 <i>Ps. acidovorans</i>	宰丸酮假单胞菌 <i>Ps. testosteronei</i>	德氏假单胞菌 <i>Ps. delafieldii</i>
鞭毛数目 No. of flagella	>1	>1	>1	1
明胶液化 Hydrolysis of gelatin	+	-	-	-
碳源利用 Carbon source for growth				
葡萄糖 Glucose	+	-	-	+
乙醇 Ethanol	+	+	-	-

菜碱,以及具有水溶性色素,它与洋葱假单胞菌 (*Ps. cepacia*) 以及与划界假单胞菌 (*Ps. marginata*) 相类似,但菌株 161 具精氨酸双水解酶和 40℃ 下不生长等特征又有区别(见表 3)。虽然在细胞内积累 PHB 和 40℃ 下不生长的特征与第 III 部分的假单胞菌群相似,但由于利用精氨酸和甜菜碱以及不以氢营自养生活可区别于以氢为能源的营自养生活的菌群,它与其它不以氢营自养生活的菌群则可从液化明胶、利用葡萄糖、乙醇和阿拉伯糖为碳源等特征相区分(见表 4)。因此,菌株 161 与

已知种均不相同,认为它为假单胞菌属中的一个新种,命名为济南假单胞菌 (*Pseudomonas jinanensis* Cai & Wang sp. nov.)。模式株保存于中国科学院微生物研究所菌种保藏室,菌号为 AS 1.1765。

参 考 文 献

[1] 抗菌素生物理化特性编写组: 抗菌素生物理化特性,第一—第三分册,人民卫生出版社,北京,1977。
[2] 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。
[3] Davis, D.: Studies on the Gram Negative Hydrogen Bacteria and Related Organism. University

- Microfilms Xerox University Microfilms. Ann Arbor, Michigan, U. S. A., 1967.
- [4] Kluyver, A. J. et al.: *Antonie van Leeuwenhoek*, 8: 71—85, 1942.
- [5] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [6] 林万明等: 微生物学通报, 8(5): 245—248, 1981.
- [7] Michael, Z. et al.: *Nucleic Acid Research*, 5: 1139—1152, 1978.
- [8] DeLey, J.: *Methods in Microbiology*, 5A: 311—

- 329, 1970.
- [9] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Eighth Edition). The Williams & Wilkins Company/Baltimore, pp. 217—243, 1974.
- [10] Krieg, N. R. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins Baltimore/London, pp. 141—180, 1984.

A SARCOMA-STATIC NEW SPECIES OF *PSEUDOMONAS*, *PSEUDOMONAS JINANENSIS* SP. NOV.

Cai Miaoying Lu Deshi Wang Dasi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

He Zuze Wang Jichang

(Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan)

A strain of Gram negative bacteria was isolated from the surface soil of Wuying Hill at Jinan, Shandong province with Gause's medium in 1973. It is a strain of antagonistic bacteria for hysterocervicoma, hepatoma and melanoma of mice screened from 2100 strains of bacteria. It is also antagonistic to *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus*.

It is a Gram negative bacterium with lophotrichous polar flagella. Straight rods in shape or with a little slightly curved rods, 0.5—0.6×1—2 μm, randomly arranged, poly-beta-hydroxybutyrate granules are accumulated in cells after 2—5 days cultivation. Water green soluble pigment and green fluorescent pigment are produced. Respiratory metabolism, chemoorganotroph, many carboncontaining organic compounds can be used as carbon sources, such as glucose, trehalose, ethanol, cellulobiose, fucose, arginine and betaine, but propionic acid or tartaric acid is not utilized. Inorganic nitrogen containing compounds can be used as the sole source of nitrogen. No growth factor is necessary for growth. Gelatin is hydrolyzed. Starch and cellulose are not hydrolyzed. Nitrate is not reduced. Arginine

dihydrolase is produced. Levan is produced from sucrose. Growth occurs from 7°C to 37°C and from pH 5.65—8.40. No growth occurs at 40°C and at pH value below 4.86. It can not grow autotrophically with hydrogen. Its G+C contents in DNA is 58.1mol%. DNA-DNA hybridization experiments reveals a relatedness value of 58.6% between this strain and *Ps. fluorescens*.

The above evidence shows that this strain differs from all species known in *Pseudomonas*, such as *Pseudomonas fluorescens* group, *Pseudomonas caryophylli*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas marginata*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas testosteroni* and *Pseudomonas delafieldii*. Therefore we propose it to be a new species in genus *Pseudomonas*, ***Pseudomonas jinanensis*** sp. nov. The type strain is preserved in the General Microbiological Center of China Committee of Culture Collection of Microorganism as AS 1.1765.

Key words

Pseudomonas jinanensis; Antagonistic; Hysterocervicoma; Hepatoma; Melanoma