

拟杆菌属的一个新种

刘聿太 白文响 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从食品厂废水中分离到一株厌氧、革兰氏阴性、不运动的无芽孢杆菌。该菌株能代谢多种碳水化合物产酸, 代谢 100mol 葡萄糖产约 50mol 乙酸、25mol 丁酸、50mol 乙醇、350 mol H₂ 和 300mol CO₂。DNA 的 G + C 含量是 30.7mol%。与已发表的有关种属的特征比较表明, 它是拟杆菌属中的一个新种, 命名为产乙醇拟杆菌 (*Bacteroides ethanologenes* n. sp.)。

关键词 产乙醇拟杆菌; 拟杆菌

由于氢是一个重要的潜在能源, 近年来微生物发酵产氢成为一个受重视的研究课题。现已证明, 多种微生物可发酵碳水化合物有效地产生氢气^[1-8], 并在此基础上进行了产氢的发酵条件和生物工程的研究^[9-11]。我们用 Hungate 厌氧技术, 以蔗糖为底物, 用不同来源的厌氧样品为接种物滚管, 从食品厂废水排水渠的污泥中分离到一株高效产氢菌, 并对其培养条件, 产氢能力及其产物对生长的影响进行了研究^[12]。其形态及生理生化特性与已发表的有关细菌不同, 现将菌种鉴定结果报道如下。

材料和方法

(一) 菌种的分离及培养条件

用 Hungate 厌氧滚管技术^[13], 以豆制品废水厌氧发酵液和食品厂废水排水渠厌氧污泥的稀释液为接种物, 蔗糖为底物滚管, 37℃ 培养。1—2 天后, 在食品厂废水样品为接种物的高稀释度滚管中, 多数菌落因产气而使琼脂明显裂开, 气相测定表明有大量氢气产生, 滚管几次得到纯培养物, 称作菌株 CHS。

基础培养基成份: NH₄Cl 1g; MgSO₄·

7H₂O 0.2g; K₂HPO₄ 0.4g; KH₂PO₄ 0.4g; 酵母膏 2g; 蛋白胨 2g; 微量元素溶液^[14] 10ml; 维生素溶液^[14] 10ml; 半胱氨酸盐酸盐 0.5g; 蒸馏水 1000ml。用 NaOH 调 pH 到 7.0, 气相 N₂, 121℃ 灭菌 30min。

不加糖的基础培养基可用于传代保存。

(二) DNA 的 G + C 含量测定

DNA 的提取及 G + C 含量的测定采用林万明等的方法^[15], 参比菌株是大肠杆菌 K₁₂ (中国科学院微生物研究所保藏号 AS 1.365)。

(三) 厌氧特性的测定

向装有 5ml 液体培养基的厌氧试管 (16 × 160 mm 容量 25ml) 中注入不同量的无菌空气, 平放于温箱过夜, 接种, 35℃ 培养, 观察生长, 并用铂金电极测定其临界生长管的氧化还原电位。

(四) 芽孢的检查

用有糖、无糖的基础培养基液体、斜面及牛肉汁培养基培养, 一个月后用相差显

本文于 1988 年 8 月 23 日收到。

国家自然科学基金资助项目。

承本所赵玉峰、苏京军、陈宇同志协助, 在此一并致谢。

显微镜观察及芽孢染色检查。

(五) 产物分析

1. 气体分析: 用四川分析仪器厂生产的 SC-3A 型气相色谱仪。不锈钢色谱柱为 $3\text{mm} \times 2\text{m}$, 载体为 TDX-0.2。碳分子筛: 60—80 目。载气: N_2 , 柱温 75°C , 热导池 65°C 。

用装有密闭阀的注射器取 0.5ml 气相进样, 记录各种气的峰高, 比较计算各种气体产量。

2. 酸和醇的分析: 用 Shimadzu GC-7AG 气相色谱仪。氢火焰离子化检测器。色谱柱: $3\text{mm} \times 2\text{m}$ 的不锈钢柱, 填充 80—100 目的 GDX-401, 柱温 210°C , 进样器温度 220°C 。载气 N_2 , $90\text{ml}/\text{min}$, 空气 $500\text{ml}/\text{min}$, 氢气 $50\text{ml}/\text{min}$ 。

样品处理: 取培养液 1ml , 注入 2.5ml 的塑料离心管中, 加入 50% 的硫酸 0.2ml , 塞紧摇匀, $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 3min , 取 $1\mu\text{l}$ 上清液进样。

结 果

菌株 CHS 的细胞为直杆状, $1 \times 2.5\text{—}4\mu\text{m}$, 端圆, 不运动, 无芽孢, 革兰氏

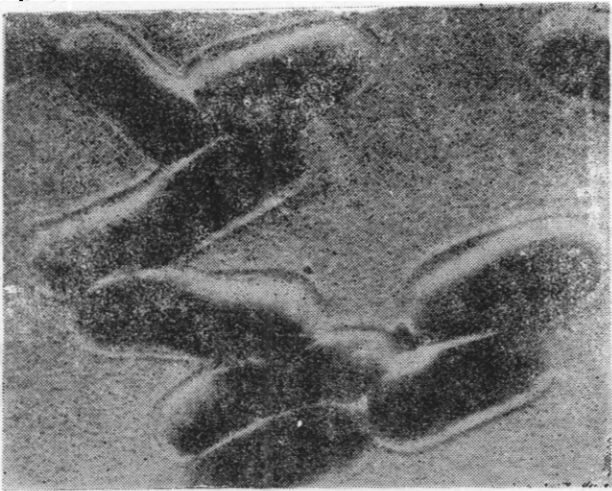


图1 菌株 CHS 的电镜照片 ($\times 8000$)

Fig. 1 Electron micrograph of strain CHS

染色阴性(图1)。厌氧试管中注入 14ml 空气明显抑制生长, 其抑制生长的 Eh 值为约 -15mV 以上。滚管中的菌落白色, 不透明, 表面菌落圆形, 琼脂内菌落因产气而使琼脂涨裂。2—3d 菌落直径可大于 1mm 。液体培养物为均一混浊。在以葡萄糖为底物的培养基中加入高浓度乙酸盐(7—9%)或丁酸盐(3—4%), 生长缓慢。生长后期, 菌体自融; 4—5% 的乙醇也影响其利用葡萄糖生长的速度, 但生长后期菌体呈丝状, 液体培养物呈絮状沉淀, 细胞稳定。

发酵多种碳水化合物产酸(表1)。发酵 100mol 葡萄糖产生约 50mol 乙酸、 25mol 丁酸、 50mol 乙醇、 350mol H_2 和 300mol CO_2 , 以蔗糖为底物也得到了相应的结果。水解七叶苷, 液化明胶, 牛奶酪化, 不产生吲哚, 不还原硝酸盐, 在 20% 的胆盐中不生长。生长的温度范围 $25\text{—}55^\circ\text{C}$, 最适生长温度为 $35\text{—}45^\circ\text{C}$; 生长 pH 为 $6.0\text{—}9.0$, 最适生长 pH $7.0\text{—}8.0$ 。在有硫酸盐的条件下, 不利用乳酸盐生长。DNA 的 G+C 含量为 $30.7\text{mol}\%$ 。

与厌氧的革兰氏阴性杆菌各属的特征比较(表2)表明, 菌株 CHS 与拟杆菌、纤

毛菌、梭杆菌、泥杆菌有共同之处: 细胞为直杆状, 不运动, 发酵碳水化合物。菌株 CHS 不产生琥珀酸、乳酸、甲酸, 而产生丁酸、乙醇、 H_2 , 以及 G+C 含量都与纤毛菌明显不同。产物的比较也表明, 菌株 CHS 与泥杆菌差别较大。所以菌株 CHS 只与拟杆菌属和梭杆菌属较为接近。考虑到梭杆菌属的已知种均以丁酸作为主要产物, 都来自人和动物体^[6]; 而菌株 CHS 的主要产物是乙酸和乙醇, 丁酸为次要产物, 生态环

表 1 菌株 CHS 的生化反应

Table 1 Biochemical reactions of strain CHS

特 征 Characteristics	10 天结果 10ds results	特 征 Characteristics	10 天结果 10ds results
PYG 发酵产物 Products from PYG	A, B, E	糖 源 Glycogen	+
产 H ₂ H ₂ produced	+	肌 醇 Inositol	W
20% 胆盐中生长 Growth in 20% bile	-	菊 糖 Inulin	-
水解七叶灵 Esculin hydrolyzed	+	乳 糖 Lactose	+
产 吲 哚 Indole produced	-	麦 芽 糖 Maltose	+
还原硝酸盐 Nitrate reduced	-	甘 露 醇 Mannitol	+
液化明胶 Gelatin digested	+	甘 露 糖 Mannose	+
牛奶反应 Milk reaction	脓 化 peptonization	松 三 糖 Melezitose	-
液化牛肉 Meat digested	-	蜜 二 糖 Melibiose	W
由碳水化合物产酸: Acid produced from		棉 子 糖 Raffinose	W
苦杏仁苷 Amygdalin	-	鼠 李 糖 Rhamnose	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	核 糖 Ribose	+
纤维二糖 Cellobiose	-	水 杨 苷 Salicin	-
糊 精 Dextrin	+	淀 粉 Starch	+
七 叶 苷 Esculin	-	蔗 糖 Sucrose	+
果 糖 Fructose	-	海 藻 糖 Trehalose	+
葡 萄 糖 Glucose	+	木 糖 Xylose	-

注: A. 乙酸盐 (Acetate); B. 丁酸盐 (Butyrate); E. 乙醇 (Ethanol); W. 弱 (Weak)。

境为污水。所以菌株 CHS 和梭杆菌属差异较大。虽然拟杆菌属的主要产物是琥珀酸, 但其中的雷氏拟杆菌 (*B. levii*)、锐利拟杆菌 (*B. praecaculus*) 和 不 解 糖 拟 杆 菌 (*B. asaccharolyticus*) 与 菌 株 CHS 有 类 似 之 处, 均 以 乙 酸 为 主 要 产 物, 丁 酸 为 次 要 产

物^[6]。所以菌株 CHS 与拟杆菌更为接近。但以上 3 个产丁酸的拟杆菌均产异戊酸和异丁酸, 而菌株 CHS 则无此二产物。另外, 菌株 CHS 产乙醇的特性与所有拟杆菌属的种都不相同。所以暂时把菌株 CHS 归于拟杆菌属, 命名为产乙醇拟杆菌

表 2 菌株 CHS 与厌氧的革兰氏阴性,直,弯曲,螺旋状杆菌各属特征的比较

特征 Characteristics	菌株 CHS	拟杆菌属 ^[10] Bacteroides	梭杆菌属 ^[11] Fusobacterium	纤毛菌属 ^[12] Leptotrichia	丁酸菌属 ^[13] Butyrivibrio	琥珀酸单链菌属 ^[14] Succinimonas	琥珀酸链菌属 ^[15] Succinibacillus	沃林氏菌属 ^[16] Wolinella	月形单胞菌属 ^[17] Selenomonas	厌氧菌属 ^[18] Anaerobaculum	披针菌属 ^[19] Pectinatus	嗜热菌属 ^[20] Acetivibrio	毛螺菌属 ^[21] Lachnospira	泥生杆菌属 ^[22] Pelobacter	产丙酸菌属 ^[23] Propionigenium	泥杆菌属 ^[24] Ifyobacter	瘤胃杆菌属 ^[25] Ruminobacter	草酸杆菌属 ^[26] Oxalobacter
发酵碳水化合物 Carbohydrates fermented	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
直杆状细胞 Straight cells	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
弯曲,螺旋或直到弯细胞 Curved, helical or straight to curved cells	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
运动 Motile	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
产琥珀酸 Succinate	-	+(31/39)	-	+	-	+	+	+	+	+	+(1/3)	-	-	-	-	-	+	-
产乳酸 Lactate	-	+(5/39)	+(4/10)	+	+	-	+	-	+	+	+(2/3)	-	+	-	-	-	-	-
产丁酸 Butyrate	+	+(4/39)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
产丙酸 Propionate	-	+(14/39)	+(7/10)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+(1/2)	-	-
产乙酸 Acetate	+	+(36/39)	+(9/10)	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
产甲酸 Formate	-	+(4/39)	+(1/10)	+	-	-	+	-	-	-	-	+(1/2)	+	-	-	+	+	-
产乙醇 Ethanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+(3/4)	-	+	-	-
产氢气 H ₂	+	+(12/39)	+(6/10)	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
G + C mol%	30.7	28 - 61	26 - 34 52 - 57	25	25		44	42 - 48	54 - 61		39.8	37 - 40	52 - 57	32 - 33	40 - 42	48 - 51		

***Bacteroides ethanologenes* n. sp.**

参 考 文 献

- [1] Karube, I. et al.: *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 5—9, 1982.
- [2] De Vos, P. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 5: 69—74, 1983.
- [3] Patel, G. B.: *Canad. J. Microbiol.*, 79: 120—128, 1983.
- [4] Stevens, P. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 5: 369—374, 1983.
- [5] Xiankong, Z. et al.: *J. Bacteriol.*, 156: 1118—1122, 1983.
- [6] Kubn, M. et al.: *ibid.*, 159: 633—639, 1984.
- [7] Feijtel, T. O. et al.: *Plant and Soil*, 85: 77—84, 1985.
- [8] Keyndrickx, M. et al.: *System. Appl. Microbiol.*, 8: 239—244, 1986.
- [9] Jungermann, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 305: 268—280, 1973.
- [10] Suzuk, S. et al.: *Biochimic*, 82: 253—358,

- 1980.
- [11] Miyake, J. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 62: 531—535, 1984.
- [12] 刘聿太等: 微生物学报(印刷中)。
- [13] Hungate, R. E.: *Method of Microbiology*, 3B. Ac. Ademic Press, Inc. New York, pp. 117—132, 1969.
- [14] 钱泽树等: 沼气发酵微生物学, 浙江科学技术出版社, 杭州, 第8页, 1986。
- [15] 林万明等: 微生物学通报, 8(5): 245—247, 1981。
- [16] Krige, N. R. and J. G. Holt(Eds): *Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology*, Vol. 1, Baltimore. London. pp. 602—661, 1984
- [17] Schink, B. and N. Pfennig: *Arch. Microbiol.*, 133: 195—201, 1982.
- [18] —————: *ibid.*, 133: 209—216, 1982.
- [19] Stieb, M. and B. Schink: *ibid.*, 140: 139—146, 1984.
- [20] Stackbrandt, E. and H. Hippe: *System. Appl. Microbiol.*, 8: 204—207, 1986.
- [21] Allison, M. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, 141: 1—7, 1985.

A NEW SPECIES OF *BACTEROIDES*

Liu Yitai Bai Wenxiang Wang Dasi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

An anaerobic, Gram negative, nonmotile, nonsporeforming, rodshaped bacterium was isolated from food plant waste water. A variety of carbohydrates were metabolized. About 50 mol acetate, 25 mol butyrate, 50 mol ethanol, 350 mol H₂ and 300 mol CO₂ were produced from 100 mol glucose. The mol% G+C content of the DNA is 30.7(Tm). It differs from the relative genera of bacteria

published, closes relatively to the genus of *Bacteroides*. Since it differs from all of the species in the genus of *Bacteroides* by producing ethanol, the name of ***Bacteroides ethanologenes*** was given.

Key words

Bacteroides ethanologenes; *Bacteroides*