

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 88-2311-B-002-048

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：謝文陽 執行機構及單位名稱：台大海洋所

## 一、中文摘要

本研究採集台灣沿岸海域各測站海水與沈積物，進行兼氣性發酵產氣菌的分離與鑑定。共分離出81株對象菌。其中分離株 FG1<sup>T</sup> 為革蘭氏陰性桿菌；能利用著生於細胞同一極之雙根具鞘鞭毛進行運動。FG1<sup>T</sup> 可發酵葡萄糖與其他糖類，伴隨著各類有機酸（包括甲酸、乙酸、丙酸、乳酸、蘋果酸、草醋酸、丙酮酸與琥珀酸）與氣體（二氧化碳與氫氣）的產生。此菌株生長不需維生素與其他有機生長因子。其細胞內 DNA 之 G+C 含量為 45.9 mol%。C12:0 為其含量最豐富的細胞脂肪酸。綜合分離株的特性與依據 16S rDNA 鹽基序列而得的親緣分析指出，FG1<sup>T</sup> 應為一新種，經命名為 *Vibrio aerogenes* sp. nov.，已獲接受。

## Abstract

This work investigated facultatively anaerobic bacteria that ferment carbohydrate with gas production. Eighty-one strains of these bacteria were isolated from the seawater and the sediment samples. A mesophilic, facultatively anaerobic, marine bacterium, designated strain FG1<sup>T</sup> (T = type strain) grown in broth cultures was motile, Gram-negative rod; motility was normally achieved by two sheathed flagella at one pole of the cell. Strain FG1<sup>T</sup> required Na<sup>+</sup> for growth, and exhibited optimal growth at 30 to 35 °C, pH 6 to 7, and about 4% of NaCl. It grew anaerobically by fermenting glucose and other carbohydrates with production of various organic acids, including formate, acetate, propionate, lactate, malate, oxaloacetate, pyruvate

and succinate, and the gases, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. The strain required neither vitamins nor other organic factors for growth. Its DNA G+C content was 45.9 mol%. It contained C12:0 as the most abundant cellular fatty acid. The characterization data together with the results of a 16S rDNA-based phylogenetic analysis indicate that strain FG1<sup>T</sup> represents a new species of the genus *Vibrio*. Thus, the name *Vibrio aerogenes* sp. nov. is proposed for this new bacterium.

## 二、緣由與目的

以海洋環境為棲地的細菌，依其增殖是否有鈉鹽需求，或鈉鹽是否能增進其增殖，可區分為好鹽性和耐鹽性兩大類；海洋微生物先驅研究者 MacLeod 認為這些海洋細菌中，只有具鈉鹽需求之好鹽者才是原生菌，而為真正的海洋細菌。能在嫌氣條件下生存和繁殖之需鹽性海洋細菌多為具有發酵糖類能力的兼氣性細菌（facultative anaerobes），這類發酵型兼氣性海洋細菌幾乎都是屬於弧菌科（Vibrionaceae）之菌種，它們廣泛分布於海洋，也是多類海洋棲地的優勢細菌群。

在發酵葡萄糖過程中會產氣的特性普遍見之於腸內細菌科（Enterobacteriaceae）和產氣單胞菌科（Aeromonadaceae）兩類非好鹽的兼氣性革蘭氏陰性桿菌。已知弧菌科數十種菌種中，僅有少數幾種具有此特性，唯在發酵糖類時會產氣的兼氣性海洋細菌之種類，實際上應當不只此數種而已。

本計畫首先研擬出有效的培養計數法，以之調查了對象菌在沿岸海水

中之密度，並進行了菌株之篩選分離。其次，吾人進一步針對篩選出的分離株 FG1<sup>T</sup> 進行了最適生長條件之探討，及形態、生理和生化特性之檢測。其後除了進行 FG1<sup>T</sup> 細胞超薄切片之電子顯微鏡檢視外，並繼續檢析其發酵產物 G + C 含量和細胞脂肪酸組成，並就 FG1<sup>T</sup> 之 16S rDNA gene (16S rRNA) 進行定序。

### 三、結果

#### I. 海水中發酵產氣菌密度

北部沿海各測站共分離出 81 株對象菌，以 MPN 法估算其密度，約介於 10<sup>1</sup> - 10<sup>2</sup> cells / ml 之間。

#### II. 菌株的生長

FG1<sup>T</sup> 之生長要求鈉離子的存在，其最適生長出現在 30-35 °C，pH6-7，以及大約 4% 的 NaCl 濃度。以 KCl 取代 NaCl 則無生長現象。

##### . 菌株特性

FG1<sup>T</sup> 為好鹽性革蘭氏陰性菌，在 PY agar 上產生灰白色的扁平圓形菌落。在液體培養基中，細胞呈直或稍微彎曲，短徑 0.6-0.8 μm，長徑 2-3 μm，能利用著生於同一極之雙鞭毛進行運動。FG1<sup>T</sup> 發酵葡萄糖與其他醣類，伴隨有氣體的產生。觸酶反應為正，而氧化酶反應為負。此菌株並未累積顯著的 PHB。對 10-150 μg O/129 不具感受性。

##### . 發酵產物

FG1<sup>T</sup> 之嫌氣發酵生長可產生各類有機酸與 CO<sub>2</sub> 及 H<sub>2</sub> 兩種氣體。其中乙酸與乳酸佔有機酸總量的 70 mol%。其餘檢測到的尚有甲酸、蘋果酸、草醋酸、丙酸、丙酮酸與琥珀酸。

##### . 抗生素之感受性

FG1<sup>T</sup> 對 ampicillin、chloram-

phenicol、colistin、gentamicin、nalidixic acid、polymyxin B 與 streptomycin 具感受性。

##### . 細胞脂肪酸

C12:0 為 FG1<sup>T</sup> 含量最豐富的細胞脂肪酸 (50.9-75.3 mol%)。其餘含量超過 3 mol% 的細胞脂肪酸包括 C11:0, C14:0, C16:0, iso-C16:0 與 C18:1<sup>o</sup>。

##### . DNA 鹽基組成

FG1<sup>T</sup> 之 G+C 含量為 45.9 mol%。

##### . 根據 16S rDNA 之親緣分析

根據 16S rDNA 之親緣分析指出，FG1<sup>T</sup> 屬於 *Vibrio* 屬，與其他 *Vibrio* 屬的菌種之相似度皆低於 96.1%，相似度最大者為 *V. natrieigens*。

### 四、討論

由於 FG1<sup>T</sup> 在 4.0% NaCl 濃度時具有最適生長，故可歸類為輕度好鹽性 (Kushner & Kamekura, 1988)。對 NaCl 的需求無法由 KCl 取代，顯示菌株的生長需要的是 Na<sup>+</sup> 而非 Cl<sup>-</sup>。FG1<sup>T</sup> 可同時生長於好氣與嫌氣的培養狀態下，故其應屬兼性嫌氣菌。而即使在培養基中添加了大量的緩衝液，在對數生長期，pH 值仍有顯著下降的情形，顯示菌株藉發酵葡萄糖行嫌氣生長，並產生大量的酸。檢測出的有機酸包括甲酸、乙酸、丙酸、乳酸、蘋果酸、草醋酸、丙酮酸與琥珀酸，證明 FG1<sup>T</sup> 屬混合酸發酵者。而發生在好氣培養下之酸化現象，則可能導因於缺氧的微環境。

分離株 FG1<sup>T</sup> 為嗜中溫、輕度好鹽的兼氣性革蘭氏陰性桿菌；能利用著生於細胞同一極之雙根具鞘的鞭毛進行運動，無法累積 PHB，由以上特性指出此菌株可能屬於弧菌科弧菌屬 (Baumann & Schubert, 1984; Baumann et al., 1984)。而根據 16S

rDNA 所得之親緣分析亦證實此推論。由於此菌株與 *Vibrio* 的其他菌種比對之 16S rDNA 相似度皆低於 96.1%，顯示其應為一新種，經命名為 *Vibrio aerogenes*。有關此新種的命名和特性描述之相關論文已獲接受，將刊載於 “ *International Journal of Systematic Bacteriology* ”。 *V. aerogenes* 具有一些其他弧菌屬菌種所沒有的表現型特性，包括發酵葡萄糖產氣、每個細胞具有兩條極性鞭毛、對 O/129 具抗藥性以及負的氧化反應 (Holt et al., 1994)。在弧菌屬中只有 *V. gazogenes* 與 *V. metschnikovii* 具有負的氧化反應，且僅前者在發酵葡萄糖時產氣，然其對 O/129 不具抗藥性，並只具單根極性鞭毛 (Baumann et al., 1984; Harwood, 1978)，且其所產生的菌落呈紅到橙色，而 *V. aerogenes* 之菌落則成灰白色。目前 *V. aerogenes* 僅發現於沈積物中，然而其對 NaCl 與中溫的需求，推定亦可能發生於淺岸與大洋的海水中。

## 五、計畫成果自評

(A) 執行本計畫已完成：

1. 沿岸海水中對象菌 (在發酵糖類時能產生氣體的兼氣性異營細菌) 的菌數之調查。
2. 分離出 81 株對象菌，全數行以繼代保存。
3. 針對分離株 FG1<sup>T</sup> 完成以下各項：
  - (1) 分離株最適增殖條件之探討。
  - (2) 測知分離株對各類抗生素的感受性。
  - (3) 測知細胞脂肪酸之組成。
  - (4) 測知發酵產物之組成。
  - (5) 測知 DNA 的 G+C 含量。
  - (6) 完成 16S rDNA 之定序及其與所有已知細菌的 16S rDNA 序列之比對。
  - (7) 根據上述結果建立其與已

知的近緣細菌種間之親緣關係樹。

(8) 總和結果，發表新種，命名為 *Vibrio aerogenes*。

(B) 參與本計畫的工作人員已習得細菌的培養、計數、純化、分離、保存和鑑定等種種技術。

## 六、參考文獻

- Baumann, P. & Baumann, L. 1984. Genus *Photobacterium* Beijerinck 1889, 401<sup>AL</sup>. In *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, vol.1, pp.516-550. Edited by N.R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore : Williams & Wilkins.
- Baumann, P. & Schubert, R. H. 1984. Family II Virbrionaceae Veron 1965, 5245<sup>AL</sup>. In *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, vol.1, pp.516-550. Edited by N.R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore : Williams & Wilkins.
- Baumann, P. & Schubert, R. H. W. 1984. Family Vibrionaceae Veron 1965, 5245<sup>AL</sup>. In *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, Vol. 1, pp. 516-517. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Harwood, C. S., 1978. *Beneckea gazogenes* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, ma-rine bacterium. *Curr Microbiol* 1, 233-238.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T. & Williams, S. T. 1994. Group 5 Facul-tatively anaerobic Gram-negative rods. Subgroup 2: family *Vibrionaceae*. In *Bergey's Manual of Deter-minative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> edn., pp.190-194. Baltimore: Wi-lliams & Wilkins.
- Kushner, D. J. & Kamerkura, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. In *Halophillic Bacteria*, Vol. 1, pp.109-138. Edited by F. Rodriguez-Valera. Boca Raton : CRC Press.