

# 醋酸菌多相分类研究进展

冯 静 施庆珊\* 欧阳友生 陈仪本

(广东省微生物研究所 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

**摘 要:** 醋酸菌是一大群革兰氏染色阴性、绝对好氧的细菌的总称, 能将乙醇或糖类不完全氧化为有机酸。醋酸菌的分类在近 30 年经历了很大变化, 早期的分类系统主要以表型和生化特征为基础。如今, 大多采用结合表型、化学分类法和基因型数据的多相分类法对醋酸菌进行分类。本文综述了醋酸菌的多相分类研究进展, 主要介绍了醋酸菌的现行分类情况及表型分类、化学分类和基因分型等方法在醋酸菌分类中的应用。

**关键词:** 醋酸菌, 醋酸菌科, 多相分类

## Research Progress on the Polyphasic Taxonomy of Acetic Acid Bacteria

FENG Jing SHI Qing-Shan\* OUYANG You-Sheng CHEN Yi-Ben

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

**Abstract:** Acetic acid bacteria are Gram-negative, obligate aerobic bacteria that have the ability to incompletely oxidize alcohols or sugars to organic acids as end products. The taxonomy of acetic acid bacteria has undergone many changes in the last 30 years. The early classification systems for these bacteria were based on morphological and biochemical characteristics. Today, the acetic acid bacteria are classified as the consensus result of a polyphasic analysis, combining phenotypic, chemotaxonomic and genotypic data. This paper reviewed the polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria, mainly introduced the current classification of acetic acid bacteria, then discussed the application of phenotypic, chemotaxonomic and genotypic method in the taxonomy of acetic acid bacteria.

**Keywords:** Acetic acid bacteria, Acetobacteraceae, Polyphasic taxonomy

醋酸菌是一大群革兰氏染色阴性、绝对好氧的细菌的总称, 以氧为末端电子受体, 进行严格的有氧代谢呼吸。醋酸菌最显著的特征是, 在有氧条件下, 能将乙醇氧化为乙酸(*Asaia*属除外)。在将乙醇氧化为乙酸后, 大部分醋酸菌还可进一步将乙酸或乙酸盐氧化为 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ 。醋酸菌与人类的生产生活

密切相关, 在食品、饮料、医药、化工等行业都有广泛的应用前景。如醋杆菌属(*Acetobacter*)菌株常被用于酿醋工业, 菌株的优劣直接影响酿造食醋的产量和风味; 葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)菌株在葡萄糖酸、L-山梨糖和二羟基丙酮的微生物合成中具有重要作用; 而葡糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)菌株

则常具有固氮作用,并能产生细菌纤维素。

基于醋酸菌与人类的密切关系,对醋酸菌的正确分类和鉴定就显得非常必要。然而,由于醋酸菌具有不同于其它任何细菌的高度变异特性,一株醋酸菌的性质从它自平板分离时即会发生变异,经过数代之后,将会出现另一种特征,从表型特点到一些生理生化特征都会发生改变。因而,对醋酸菌的分类经历了一个漫长而往复的过程,醋酸菌的分类方法也由早期单一的表型分类法发展为现在的多相分类法。

## 1 醋酸菌分类的研究进展

对醋酸菌的分类研究最早可追溯到 19 世纪,1894 年 Hansen 就试图对醋酸菌分类,他被认为是最早系统研究醋酸菌的微生物学家。早期的醋酸菌分类系统主要以表型和生理生化特征为依据,在此基础上,主要形成了两种不同的分类系统。一种是由 Asai 于 1935 年提出的,他根据氧化葡萄糖生成葡糖酸能力的强弱,将醋酸菌分为葡糖杆菌属和醋杆菌属;另一种则是由 Leifson 于 1954 年提出的,他根据能否氧化乙酸盐和醋酸菌的鞭毛类型这两个特征,提出应将醋酸菌分为能氧化乙酸盐、具周生鞭毛的醋杆菌属和不能氧化乙酸盐、具极生鞭毛的醋单胞菌属(*Acetomonas*)<sup>[1]</sup>。1974 年出版的第八版《伯杰细菌鉴定手册》,综合两种分类意见,根据能否将乙酸盐和乳酸盐氧化为 CO<sub>2</sub>和 H<sub>2</sub>O 的能力及鞭毛类型,将醋酸菌分为醋杆菌属和葡糖杆菌属<sup>[2]</sup>。

随着化学分类和基因分析方法在醋酸菌分类中的应用和发展,对醋酸菌的分类有了一个较清晰的认识和较准确的定位,使得醋酸菌的分类系统在近 30 年发生了较大变化。1980 年, Gillis 等首先将基因分析方法用于醋酸菌分类中,他们用一株<sup>14</sup>C 标记的氧化葡糖杆菌 16S rRNA 与各种细菌进行 DNA 杂交,分别测定 50% 杂交体变性温度和 rRNA 结合度这两个参数,结果表明醋杆菌属和葡糖杆菌属存在较高的 rRNA 顺反子相似性,在 rRNA 总科中形成一个独立的分枝,因而,他们提议建立醋酸菌科 (*Acetobacteraceae*),并将醋杆菌属和葡糖杆菌属归入醋酸菌科中<sup>[3]</sup>。1983 年, Yamada 等将化学分类法用于醋酸菌分类中,研究了辅酶 Q 系统与醋酸菌分类的关系,并提出应将醋杆菌属下的 *Acetobacter*

*aceti* subsp. *xylinum* 亚种提升为种 *Acetobacter xylinum*<sup>[4]</sup>。随后, Yamada 和 Micales 等率先研究了 DNA-DNA 杂交度与醋酸菌分类的关系,通过 DNA-DNA 杂交对葡糖杆菌属的菌株重新进行分析,结果表明,葡糖杆菌属至少存在 3 个基因型群<sup>[5,6]</sup>。至上世纪 80 年代末期, Gillis 等将多相分类法用于醋酸菌分类中,描述了醋杆菌属的一个新种 *Acetobacter diazotrophicus*<sup>[7]</sup>。不久后,第一篇关于醋酸菌 16S rDNA 系统进化研究的论文被发表,并揭示这些菌株在变形菌门(Proteobacteria) α-亚门中形成一个单独的分支<sup>[8]</sup>。1997 年, Yamada 等人在 16S rRNA 序列分析和泛醌系统的化学分类基础上,提议将原本归属于醋杆菌属的葡糖醋杆菌亚属,提升为一个独立的属——葡糖醋杆菌属,并根据国际细菌命名法规(International code of nomenclature of bacteria, 简称 ICNB)第 64 条规则,将葡糖醋杆菌的名称由 *Gluconoacetobacter* 更正为 *Gluconacetobacter*, 这是醋酸菌分类上的一大变化<sup>[9,10]</sup>。

随着各种分类方法在醋酸菌分类中的逐步发展与完善,在近十年中,醋酸菌的一些新属、新种和新组合陆续被发现。目前,醋酸菌科被归入变形菌门、α-变形菌纲(Alphaproteobacteria)、红螺菌目(Rhodospirillales)中。对于醋酸菌科包括的属,当前有两种不同的观点。一种观点认为,醋酸菌科包括嗜酸细菌(Acidiphilic bacteria)和醋酸细菌(Acetic acid bacteria)共 27 个属,其中嗜酸细菌包括 *Acidicaldus*、嗜酸菌属(*Acidiphilium*)、酸球形菌属(*Acidisphaera*)、酸胞菌属(*Acidocella*)、*Belnapia*、脆弱球菌属(*Craurococcus*)、*Muricoccus*、*Paracraurococcus*、酸状球菌属(*Rhodopila*)、*Rhodovarius*、玫瑰球菌属(*Roseococcus*)、*Roseomonas*、*Rubritepida*、*Stella*、*Tanticharoenia*、*Teichococcus* 和 *Zavarzinia* 17 个属,醋酸细菌则包括 *Acetobacter*、*Gluconobacter*、*Acidomonas*、*Gluconacetobacter*、*Asaia*、*Kozakia*、*Swaminathania*、*Saccharibacter*、*Neoasaia* 和 *Granulibacter* 10 个属<sup>[11,12]</sup>。而另一种观点则认为醋酸菌科只应包括醋酸细菌的 10 个属<sup>[13]</sup>。虽然《伯杰氏系统细菌学手册》和《List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature》中采用的是前一种观点,但更多的醋酸菌分类学家趋向于采用后一种分类系统,认为醋酸菌科只包括醋酸细菌的 10 个属,共 54 个种。

## 2 醋酸菌多相分类技术的研究进展

多相分类(Polyphasic taxonomy)概念最早由 Colwell 于 1970 年提出,是指从微生物的表型、遗传型和系统发育等方面获取数据和信息,用多种方法综合比较、相互验证、互为补充,进而更为合理地确定微生物的分类地位和系统发育关系,并较全面地反映微生物多样性的方法<sup>[14]</sup>。

醋酸菌多相分类法最早由 Gillis 等应用于甘蔗分离菌 *Acetobacter diazotrophicus* 的分类中。他们利用 *Acetobacter diazotrophicus* 菌株分别与 *Xanthomonas campestris*、*Gluconobacter oxydans* 模式菌株进行 DNA-rRNA 杂交,证明 *Acetobacter diazotrophicus* 为醋酸菌(与 *Gluconobacter oxydans* 的 DNA-rRNA 杂交  $T_{m(e)}$  值为 77.0°C)。随后,对 *Acetobacter diazotrophicus* 菌株的生理生化特征进行了分析,结果表明, *Acetobacter diazotrophicus* 菌株能氧化乙酸和乳酸为 CO<sub>2</sub>、周生鞭毛、能从丙醇和丁醇产酸,属于醋酸菌科醋杆菌属。细胞脂肪酸分析结果也为这一结论提供了有力支撑,研究表明, *Acetobacter diazotrophicus* 的细胞脂肪酸主要为 C<sub>18:1</sub> 酸,少量为 C<sub>14:0</sub> 酸,恰为醋杆菌属的典型细胞脂肪酸类型。但 *Acetobacter diazotrophicus* 菌株具有的固氮作用、能从 D-葡萄糖产生  $\gamma$ -吡喃酮、能在 30% D-葡萄糖上生长及 G+C 含量为 61 mol%~63 mol% 等特征,与醋杆菌属所有种均不相同。同时,与醋杆菌属所有种模式菌株进行的 DNA-DNA 杂交结果也表明, *Acetobacter diazotrophicus* 与这些种的杂交结合度均低于 25%。因而, Gillis 等认为,这些分离自甘蔗、具有固氮作用的菌株为醋杆菌属的一个新种,并将其命名为 *Acetobacter diazotrophicus* (后来被归入 *Gluconacetobacter* 属中,更名为 *Gluconacetobacter diazotrophicus*)<sup>[7]</sup>。

自 Gillis 等人利用多相分类法对 *Acetobacter diazotrophicus* 菌株进行分类鉴定以来,多相分类在醋酸菌中的应用得到了快速发展。目前,多相分类技术被认为是研究醋酸菌各级分类单元的最有效手段,常用于醋酸菌多相分类的方法主要包括表型方法、生理生化特征、化学分类法和基因分型法等。

### 2.1 表型方法(Phenotypic methods)

表型分类法是醋酸菌的传统分类方法,指依靠形态和生理生化特征对醋酸菌进行分类。常见的用

于醋酸菌分类的表型特征包括:乙醇产酸,氧化乙酸盐或乳酸盐为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O,对菌落和细胞形态的观察,革兰氏染色,氧化酶及接触酶活性,在 0.35% 的乙酸(pH 3.5)上生长,在 1% HNO<sub>3</sub> 培养基上生长,从葡萄糖产生 2-酮基葡萄糖酸、5-酮基葡萄糖酸或 2,5-二酮基葡萄糖酸,甘油生酮,碳源(甲醇)生长试验,形成水溶性褐斑,从 D-葡萄糖和 D-果糖形成  $\gamma$ -吡喃酮,从糖和糖醇产酸,产纤维素,在 30% D-葡萄糖上生长,鞭毛类型,运动性,等。

利用表型特征可以较为容易将醋酸菌的 10 个属区分开来,但对醋酸菌种级水平菌株的分类鉴定还较为困难。此外,由于醋酸菌的生理生化特征常常发生自发突变,如曾有报道表明,醋杆菌和葡糖醋杆菌可丧失对乙酸的抗性和对乙醇的氧化能力<sup>[13]</sup>。因而,单独依靠表型特征得出的醋酸菌分类结果,准确性不高,还需参考用其他分类方法得出的结果。醋酸菌 10 个属的不同生理生化特征见表 1<sup>[15]</sup>。

### 2.2 化学分类法(Chemotaxonomical methods)

化学分类法是依据生物细胞中某些特定化学物质的特征对生物体进行分类的方法。用于醋酸菌分类的化学分类法主要为醌类型和脂肪酸甲酯(FAME)分析。醋酸菌的醌主要为泛醌(辅酶 Q),在醋酸菌 10 个属中,除醋杆菌属泛醌为 Q9、*Granulibacter* 属泛醌尚未测定外,其余醋酸菌的主要泛醌类型均为 Q10。磷脂脂肪酸是活体细胞膜的主要成分,不同微生物体细胞膜中脂肪酸的含量和结构与其分类位置密切相关。可通过皂化、甲基化、萃取、碱洗涤等步骤,将脂肪酸转化成脂肪酸甲酯,再通过分析脂肪酸甲酯(FAME)图谱,鉴定微生物的种类。

化学分类法最早由 Yamada 等人于 1983 年应用于醋酸菌的分类中,他们通过研究泛醌类型与醋酸菌系统分类的关系,提出应将醋杆菌属下的 *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* 亚种提升为种 *Acetobacter xylinum*<sup>[4]</sup>。1984 年,他们将醋杆菌属中一些可氧化乙酸盐、但泛醌类型不为 Q9 而为 Q10 的菌株,如 *Acetobacter liquefaciens*、*Acetobacter xylinus* 等,归入醋杆菌属下一个单独的亚属中,并将该亚属命名为葡糖醋杆菌亚属<sup>[5]</sup>。该亚属于 1997 年被 Yamada 等人在 16S rRNA 序列分析和泛醌类型研究结果的基础上,提升为一个独立的属——葡糖醋杆菌属,同时分类名称也按照国际细菌命名法规第 64 条规则由 *Gluconoacetobacter* 更正为 *Gluconacetobacter*<sup>[9,10]</sup>。

表 1 醋酸菌 10 个属的不同生理生化特征  
Table 1 Differential characteristics of the genera of the Acetobacteraceae

生理生化特征 Characteristic	属名 Genera									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
产生乙酸 Production of acetic acid	+	+	+	+	-	+	+	v(w/-)	+	v(w/-)
氧化乙酸盐为CO <sub>2</sub> 和H <sub>2</sub> O Oxidation of Acetate to CO <sub>2</sub> and H <sub>2</sub> O	-	+	+	+	w	w	w	-	-	w
氧化乳酸盐为CO <sub>2</sub> 和H <sub>2</sub> O Oxidation of Lactate to CO <sub>2</sub> and H <sub>2</sub> O	-	+	+	v(-/w)	w	w	w	w	-	+
在 0.35%乙酸上生长 Growth in the presence of 0.35% acetic acid	+	+	+	+	-	+	+	-	+	nd
在 1% KNO <sub>3</sub> 上生长 Growth in the presence of 1% KNO <sub>3</sub>	-	-	-	+	-	-	+	nd	-	nd
从葡萄糖产生酮基葡萄糖: Production of keto-D-gluconic acid from D-glucose:										
2,5-二酮基葡萄糖 2,5-diketo-D-gluconic acid	v	-	v	-	-	-	nd	nd	nd	nd
5-酮基葡萄糖 5-keto-D-gluconic acid	+	v	v	-	+	+	nd	+	+	nd
2-酮基葡萄糖 2-keto-D-gluconic acid	+	v	v	-	+	+	nd	+	+	nd
甘油生酮 Production of hydroxyacetone from glycerol	+	v	v	-	v	+	+	-	w	-
碳源(甲醇)生长试验 Growth on methanol as carbon source	-	v	-	+	-	-	-	-	-	+
产生水溶性褐斑 Production of water soluble brown pigment (s)	v	-	v	-	-	-	+	-	-	nd
从 D-葡萄糖产生 γ-吡喃酮 Production of γ-pyrones from D-glucose	v	-	v	nd	-	-	nd	nd	nd	nd
从 D-果糖产生 γ-吡喃酮 Production of γ-pyrones from D-fructose	+	-	-	nd	v(+/w)	v	nd	nd	nd	nd
从下列物质产酸: Acid production from:										
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	v	v	+	+	+	+	+	+	nd
D-阿拉伯糖 D-arabinose	+	-	-	v	+	v	nd	-	w	nd
D-木糖 D-xylose	+	v	v	+	+	+	v	+	+	-
L-鼠李糖 L-rhamnose	-	-	-	-	v	-	-	-	w	nd
D-葡萄糖 D-glucose	+	v	+	+	+	+	+	+	+	w
D-半乳糖 D-galactose	+	v	+	+	+	+	+	+	+	nd
D-甘露糖 D-mannose	+	v	v	+	+	+	+	+	+	nd
D-果糖 D-fructose	+	-	+	-	+	-	v	v	+	nd
L-山梨糖 L-sorbose	+	-	v	nd	+	-	nd	-	-	nd
蜜二糖 Melibiose	+	-	-	v	+	+	nd	+	+	nd
蔗糖 Sucrose	+	-	-	-	+	v	nd	+	+	-
棉子糖 Raffinose	-	-	-	-	-	+	nd	-	+	nd
D-甘露醇 D-mannitol	+	-	v	-	v	-	-	+	w	-
D-山梨醇 D-sorbitol	+	-	-	-	v	-	+	-	+	-

续表

生理生化特征 Characteristic	属名 Genera									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
半乳糖醇 Dulcitol	-	-	-	-	v	-	v	-	w	-
甘油 Glycerol	+	-	+	+	+	+	+	-	+	v(w/-)
乙醇 Ethanol	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
产纤维素 Production of cellulose	-	-	v	-	-	-	nd	-	nd	nd
在 30% D-葡萄糖上生长 Growth in the presence of 30% D-glucose	-	v	v	+	+	-	nd	+	+	nd
运动性 Motility	Non-motile (Mostly)	Non-motile	Non-motile	Non-motile	Non-motile	Non-motile	nd	Non-motile	Non-motile	Non-motile
鞭毛类型 Flagellation	Polar	Peri- tric-hous	Peri- tric-hous	Polar	Peri- tric-hous	nd	Peri- tric-hous	nd	nd	nd
主要泛醌类型 Major ubiquinone	Q10	Q9	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	nd
G+C 含量 (mol%) G+C content (mol%)	54~64	52~64	56~67	62~63	59~61	56~57	57~60	52~53	63.1	59

注: 1: *Gluconobacter* 属; 2: *Acetobacter* 属; 3: *Gluconacetobacter* 属; 4: *Acidomonas* 属; 5: *Asaia* 属; 6: *Kozakia* 属; 7: *Swaminathania* 属; 8: *Saccharibacter* 属; 9: *Neoasaia* 属; 10: *Granulibacter* 属; +: 阳性; -: 阴性; w: 微阳性; v: 可变; nd: 不确定。

Note: 1: *Gluconobacter*; 2: *Acetobacter*; 3: *Gluconacetobacter*; 4: *Acidomonas*; 5: *Asaia*; 6: *Kozakia*; 7: *Swaminathania*; 8: *Saccharibacter*; 9: *Neoasaia*; 10: *Granulibacter*; +: Positive; -: Negative; w: Weak positive; v: Variable; nd: Not determined.

### 2.3 基因分型法(Genotypic methods)

随着科学技术的进步, 分子生物学技术在现代分类学中占据重要地位。基因型(或遗传型)的方法主要是指有关细胞内核酸分子的分析方法。由于核酸是贮存、传递遗传信息的物质基础, 分析核酸序列和结构的变化可直接揭示有机体之间的亲缘关系, 建立以系统发育关系为基础的分类系统。因此, 基因分型方法已成为现代细菌分类中不可缺少的方法, 常用于醋酸菌基因分型的方法主要有以下几种:

**2.3.1 16S rRNA 和 16S~23S rRNA 转录间隔区(ITS):** 16S rRNA 在原核生物中广泛存在, 功能稳定, 既有高度保守的区域又有相对可变的区域, 且大小合适, 约为 1500 bp, 所代表的信息量既能反映生物界的进化关系, 又较容易进行操作, 适用于各级分类单元, 是系统分类和进化研究的理想材料, 目前被广泛用于醋酸菌系统分类中。醋酸菌不同属 16S rRNA 的序列相似性分别为: 醋杆菌属 95.4%~99.9%, *Asaia* 属 99.6%~99.8%, 葡糖醋杆菌属 96.4%~100%, 葡糖杆菌属 98.3%~99.6%<sup>[16-18]</sup>。

16S~23S rRNA 转录间隔区(ITS)在序列和长度上比 16S rRNA 和 23S rRNA 具有更高的变异性, ITS 区域 PCR-RFLP 的分析结果比 16S rDNA PCR-RFLP 具有更高的鉴别能力, 常被用于醋酸菌种或种下(如

亚种)分类单元的鉴别。如 Tanasupawat 等人利用 ITS 区域序列分析, 鉴定出葡糖杆菌属的一个新种 *Gluconobacter thailandicus*<sup>[19]</sup>。

**2.3.2 全基因组 DNA-DNA 杂交:** 国际系统细菌学委员会规定, DNA 同源性 70%、杂交分子热解链温度差  $\Delta T_m$  5°C 为细菌种的界限。根据现代细菌学种的定义, 全基因组 DNA-DNA 杂交在种的描绘中起着重要作用, DNA-DNA 分子杂交已成为醋酸菌新种建立的必要依据之一。常用的 DNA-DNA 杂交方法主要为: 微量细胞培养法、膜法、SI 核酸酶法等。这些杂交方法通常具有较好的相关性, 得出的分类学结论也大都相同, 但仍有少量关于采用不同杂交方法而导致分类结果不同的报道。如 Cleenwerck 和 Sokollek 等分别采用膜法对 *Acetobacter pomorum* 与 *Acetobacter pasteurianus* 的模式菌株进行 DNA-DNA 杂交, 得出的杂交度却分别为 53% 和 17%, 造成这一差异的原因在于 Sokollek 等人在杂交时没有进行交互反应<sup>[20,21]</sup>。此外, Dellaglio 和 Lisdiyanti 等人也曾分别采用微量细胞培养法对葡糖醋杆菌菌株进行 DNA 杂交, 但得出的关于 *Gluconacetobacter oboediens* 与 *Gluconacetobacter intermedius* 模式菌株间的 DNA 同源度却不相同, 分别为 63% 和 85%, 目前对造成这一差异的原因尚不

清楚<sup>[16,22]</sup>。

**2.3.3 DNA 碱基组成(G+C mol%):** DNA碱基组成是典型的基因特征之一, 一般认为G+C含量差异在种内不超过 3%, 在属内不超过 10%。用于醋酸菌 G+C 含量的测定方法大多参照 Tamaoka<sup>[23]</sup> 和 Mesbah<sup>[24]</sup> 等方法进行, 通过用 HPLC 对核苷量化后计算 G+C 含量。偶尔也采用热变性方法来测定 G+C 含量, 但由于热变性法是一种间接方法, 所以精确性不如 HPLC 法高。目前, G+C 含量已成为醋酸菌新种描述的必备特征之一, 可通过结合其它基因型特征如 DNA-DNA 或 DNA-rRNA 杂交等对醋酸菌进行种或种下分类单元的鉴别。如 Yamada 等人通过研究 11 株葡糖杆菌菌株的 G+C 含量, 将这些菌株分为两组, 其中一组的 G+C 含量较高, 为 60.3 mol%~63.5 mol%, 与 *Gluconobacter oxydans* 的 DNA 杂交相关度为 64%~94%; 另一组 G+C 含量相对较低, 为 57.5 mol%~57.7 mol%, 与 *Gluconobacter frateurii* 的 DNA 杂交相关度为 63%~77%。据此, 他们将 G+C 含量较高的菌株归入葡糖杆菌属 *Gluconobacter oxydans* 种中, 而将 G+C 含量较低的菌株归入 *Gluconobacter frateurii* 种中<sup>[25]</sup>。醋酸菌的 G+C 含量范围为 52 mol%~67 mol%, 不同属的 G+C 含量范围见表 1。

**2.3.4 DNA 指纹图谱技术:** DNA 限制性片段长度多态性分析(Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)是近几年发展起来的一种 DNA 分析技术, 已被用于醋酸菌分类研究中。相比 rRNA 基因序列分析, RFLP 的优点在于价格低廉, 不需昂贵的仪器设备, 且一次可对大量菌株进行分析。Poblet 等对 16 株菌株的 16S rDNA 进行了 RFLP 分析, 结果表明, 醋杆菌属、葡糖杆菌属及葡糖醋杆菌属菌株经 *Taq* I 酶切后产生的染色体带型有差异。Ruiz 等通过对 22 株菌株和 24 个隔离群进行 PCR-RFLP 分析, 得出结论: 利用 *Taq* I 和 *Rsa* I 对 16S rDNA 进行 RFLP 分析, 可以对醋酸菌种级水平菌株作出快速而准确的分类<sup>[26]</sup>。16S~23S rDNA ITS 区域的 RFLP 分析, 对于醋酸菌在种水平的分类鉴定作用不是太大, 但对于种间变异的检测却极为有效。Trcek 等通过对醋酸菌 57 株菌株和一些自然隔离群的 ITS 区域进行 RFLP 分析, 并用 *Hae* III 和 *Hpa* II 消化扩增产物, 得到了 12 个不同的染色体带型群, 每个带型群代表一个种(*Gluconacetobacter liquefa-*

*ciens*) 或一个物种群 (如 *Gluconacetobacter oboediens/Gluconacetobacter intermedius*)<sup>[27]</sup>。此外, 这些染色体带型在未知醋酸菌的分类鉴定上起着重要的参考作用, 有助于高酸度醋醋酸菌的快速鉴别<sup>[28]</sup>。

除 RFLP 外, 一些 DNA 图谱技术, 如: RAPD、Rep-PCR、ERIC-PCR、PFGE 和质粒图谱技术等也被用于醋酸菌的分类鉴定中。RAPD 指纹技术被成功应用于商业瓶装红葡萄酒腐败菌株的分类鉴定上<sup>[29]</sup>; González 等人利用 ERIC/REP-PCR 技术对与葡萄酒生产相关的醋酸菌进行了分型<sup>[30]</sup>。

### 3 结语

自 Beijerinck 于 1898 年提出醋杆菌属, Asai 于 1935 年提出葡糖杆菌属以来, 醋酸菌的分类经历了很大变化, 不再以形态和生化特征为主要的分类基础, 而改为以结合表型、化学分类和基因型数据的多相分类方法为主要分类依据。然而, 由于醋酸菌分类的复杂性, 目前在醋酸菌的多相分类中仍然存在一些问题, 主要表现为表型特征与基因型分类结果的吻合度有时不高。这是由于醋酸菌具有很高的自发突变性, 在经过几代培养后, 一些特征发生突变或丧失, 与原有的表型特征相距甚远。在醋杆菌属和葡糖醋杆菌属中, 这一现象尤为明显, 很难利用表型特征对这两个属种级水平的菌株进行分类鉴定, 目前大多推荐采用 DNA-DNA 杂交来鉴别那些在系统发育上与这两个属相关的分离群。

综上所述, 综合表型、化学分类与基因分型的多相分类方法, 是目前醋酸菌系统分类的最适方法。此外, 最新的分类学研究结果表明, 基于 DNA 图谱或诸如 *adhA*、*recA* 等基因序列的分子技术, 将可能在很大程度上提高对醋酸菌种级水平菌株分类的准确性。

### 参 考 文 献

- [1] Leifson E. The flagellation and taxonomy of species of *Acetobacter*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1954, 20(1): 102-110.
- [2] De Ley J, Frateur J. Genus *Acetobacter*. In: Buchanan R E, Gibbons N E (Eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1974, pp.276-278.
- [3] Gillis M, De Ley J. Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Int J Syst Bacteriol*, 1980, 30(1): 7-27.

- [4] Yamada Y. *Acetobacter xylinus* sp. nov., nom. rev., for the cellulose-forming and cellulose-less, acetate-oxidizing acetic acid bacteria with the Q-10 system. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, **29**(5): 417–420.
- [5] Yamada Y, Itakura N, Yamashita M, et al. Deoxyribonucleic acid homologies in strains of *Gluconobacter* species. *J Ferment Technol*, 1984, **62**(6): 595–600.
- [6] Micales BK, Johnson JL, Claus GW. Deoxyribonucleic acid homologies among organisms in the genus *Gluconobacter*. *Int J Syst Bacteriol*, 1985, **35**(1): 79–85.
- [7] Gillis M, Kersters K, Hoste B, et al. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int J Syst Bacteriol*, 1989, **39**(3): 361–364.
- [8] Sievers M, Ludwig W, Teuber M. Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the  $\alpha$ -subclass of *Proteobacteria* based on 16S ribosomal DNA sequences. *Syst Appl Microbiol*, 1994, **17**(2): 189–196.
- [9] Yamada Y, Hoshino KI, Ishikawa T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, **61**(8): 1244–1251.
- [10] Yamada Y, Hoshino KI, Ishikawa T. *Gluconoacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sic]). In validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List No.64. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **48**(1): 327–328.
- [11] Sievers M, Swings J. Family II. *Acetobacteraceae* Gillis and De Ley 1980, 23vp: Genus I. *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215AL: Genus V. *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki, et al. 1989, 54vp: Genus VI. *Asaia* Yamada, Katsura, Kawasaki, et al. 2000, 828vp: Genus VIII. *Gluconoacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998, 32vp: Genus IX. *Gluconobacter* Asai 1935, 689AL. In: Brenner DJ, Krieg NR, Stanley JT, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 2. New York: Springer. 2005, pp.41–50, 51–54, 68–69, 69, 72–77, 77–81.
- [12] Euzéby JP. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature-Family *Acetobacteraceae*. November 05, 2008, <http://www.bacterio.cict.fr/classifphylo.html>.
- [13] Kersters K, Lisdiyanti P, Komagata K, et al. The family *Acetobacteraceae*: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconoacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. *The Prokaryotes*, 3rd Ed, vol. 5. New York: Springer, 2006, pp.163–200.
- [14] Colwell RR. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J Bacteriol*, 1970, **104**(1): 410–433.
- [15] Cleenwerck I, De Vos P. Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *Int J Food Microbiol*, 2008, **125**(1): 2–14.
- [16] Lisdiyanti P, Navarro RR, Uchimura T, et al. Reclassification of *Gluconoacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconoacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconoacetobacter nataicola* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**(9): 2101–2111.
- [17] Silva LR, Cleenwerck I, Rivas R, et al. *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**(1): 21–24.
- [18] Dutta D, Gachhui R. Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**(8): 1899–1903.
- [19] Tanasupawat S, Thawai C, Yukphan P, et al. *Gluconoacetobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. *J Gen Appl Microbiol*, 2004, **50**(3): 159–167.
- [20] Cleenwerck I, Vandemeulebroecke K, Janssens D, et al. Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**(5): 1551–1558.
- [21] Sokollek SJ, Hertel C, Hammes WP. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **48**(3): 935–940.
- [22] Dellaglio F, Cleenwerck I, Felis GE, et al. Description of *Gluconoacetobacter swingsii* sp. nov., and *Gluconoacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(6): 2365–2370.
- [23] Tamaoka J, Komagata K. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett*, 1984, **25**(1): 125–128.
- [24] Mesbah M, Premachandra U, Whitman WB. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol*, 1989, **39**(2): 159–167.
- [25] Yamada Y, Hosono R, Lisdiyanti P, et al. Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *J Gen Appl Microbiol*, 1999, **4**(1): 23–28.
- [26] Ruiz A, Poblet M, Mas A, et al. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(6): 1981–1987.
- [27] Treck J, Teuber M. Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **208**(1): 69–75.
- [28] Treck J. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Syst Appl Microbiol*, 2005, **28**(8): 735–745.
- [29] Bartowsky EJ, Xia D, Gibson RL, et al. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol*, 2003, **36**(5): 307–314.
- [30] González A, Hierro N, Poblet M, et al. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *Int J Food Microbiol*, 2005, **102**(3): 295–304.