NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **309198** (13) B1

(51) Int Cl[7] C 12 N 1/20, 9/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19921324	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1991.08.06, PCT/NL91/00146
(22) Inng. dag	1992.04.03	(85) Videreføringsdag	1992.04.03
(24) Løpedag	1991.08.06	(30) Prioritet	1990.08.06, US, 562863
(41) Alm. tilgj.	1992.06.03		
(45) Meddelt dato	2000.12.27		

(71) Patenthaver Genencor International Inc,
4 Cambridge Place, 1870 Winton Road South, Rochester, NY 14618, US

(72) Oppfinner Brian Edward Jones, Leidschendam, NL
William Duncan Grant, Leicester, England, GB
Nadine Claire Collins, Watford, Hertfordshire, England, GB

(74) Fullmektig Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Renkultur av alkalifile bakterier og anvendelse derav for fremstilling av alkali-tolerante enzymer**

(56) Anførte publikasjoner WO A 8602094, WO A 8700859
FEMS MICROBIOLOGY NEWS, 75, 1990, S. 255-270
SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY, 6, 1985, S. 247-250

(57) Sammendrag

Gram-negative bakterier, som er obligate alkalifile bakterier, er blitt isolert fra prøver av jord, vann og sediment og en rekke andre kilder fra natronsjøer og områdene rundt natronsjøer. Disse bakterier er blitt analysert i henhold til prinsippene ved numerisk klassifikasjon med hensyn til hverandre og med hensyn til forskjellige kjente bakterier. Dessuten avgrenses disse bakterier ytterligere ved en analyse av forskjellige kjemotaksonomiske karakteregenskaper. Bakteriene danner forskjellige alkali-tolerante enzymer som kan anvendes i forskjellige industrielle prosesser som fordrer slik enzymatisk aktivitet i et miljø med høy pH-verdi.

Foreliggende oppfinnelse angår feltet mikrobiologi og mer spesielt feltet alkalifile mikroorganismer, samt anvendelse derav for fremstilling av alkali-tolerante enzymer.

Alkalifile organismer er definert som organismer som viser optimal vekst i alkalisk pH-miljø, spesielt ved pH over 8, og vanligvis i området mellom pH 9 og 10. Alkalifile organismer kan også finnes levende i miljøer med en pH så høy som 12. Obligat alkalifile organismer kan ikke vokse ved nøytral pH.

Alkalifile organismer kan finnes i slike vanlige miljøer som hagejord, antagelig på grunn av skiftende alkaliske betingelser forårsaket av biologisk aktivitet såsom ammonifisering, sulfatreduksjon eller fotosyntese. En mye rikere kilde til større variasjon av alkalifile organismer kan finnes i naturlig forekommende stabile alkaliske miljøer såsom natronsjøer.

En mer detaljert undersøkelse av natronsjøer og alkalifile organismer generelt er tilveiebragt i W.D. Grant, W.E. Mwatha og B.E. Jones ((1990) FEMS Microbiology Reviews, 75, 255-270), og denne tekst er medtatt i det foreliggende som referanse. Oppregninger av alkaliske natronsjøer kan finnes i publikasjonene av W.D. Grant og B.J. Tindall i Microbes in Extreme Environments, (red. R.A. Herbert og G.A. Codd); Academic Press, London, (1986), s. 22-54; og B.J. Tindall i Halophilic Bacteria, vol. 1, (red. F. Rodriguez-Valera); CRC Press Inc., Boca Raton, FL, (1988), s. 31-79, og begge disse tekster er også medtatt i det foreliggende som referanse.

Alkalifile organismer, hvorav hovedmengden er *Bacillus*-arter, er blitt isolert fra ikke-saltholdige miljøer og er omtalt av K. Horikoshi og T. Akiba i Alkalophilic Microorganisms (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y., (1982)). Alkalifile organismer fra saltholdige og alkaliske miljøer såsom innsjøer er imidlertid ikke omtalt i denne publikasjon. Strengt anaerobe bakterier fra alkaliske, hypersaltholdige miljøer er nylig blitt beskrevet av H. Shiba i Superbugs (red. K. Horikoshi og W.D. Grant); Japan Scientific Societies Press,

Tokyo og Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y., (1991), s. 191-211; og av N. Nakatsugawa, samme sted, s. 212-220.

Natronsjøer, som kan finnes på forskjellige steder rundt i verden, er fremkommet ved en kombinasjon av geologiske, geografiske og klimatiske forhold. De er karakterisert ved tilstedeværelse av store mengder natriumkarbonat (eller komplekser derav) dannet ved fordampningskonsentrasjon, såvel som ved tilsvarende mangel på Ca^{2+} og Mg^{2+}, som ville fjerne karbonat-ioner som uløselige salter. Andre salter såsom NaCl kan også konsentreres, hvilket resulterer i miljøer som både er alkaliske og saltholdige.

Til tross for dette tilsynelatende barske miljø, er natronsjøer ikke desto mindre oppholdssted for en stor populasjon av prokaryote organismer, hvorav noen få typer kan dominere som permanente eller periodiske oppblomstringer. Organismene er i området fra alkalifile cyanobakterier til halogenalkalifile arkeobakterier. Videre er det ikke uvanlig å finne felles typer alkalifile organismer som har oppholdssted i natronsjøer på vidt forskjellige steder i hele verden såsom i den øst-afrikanske Rift Valley, i vestlige deler av USA, i Tibet, Kina og Ungarn. F.eks. er natronobakterier blitt isolert og identifisert i natronsjøer i Kina (D. Wang og Q. Tang, "Natronobacterium from Soda Lakes of China" i Recent Advances in Microbial Ecology, (Proceedings of the 5th International Symposium on Microbial Ecology, red. T. Hattori et al.,); Japan Scientific Societies Press, Tokyo, (1989), s. 68-72) og i vestlige deler av USA (S. Morth og B.J. Tindall, (1985) System. Appl. Microbiol., 6, 247-250). Natronobakterier er også blitt funnet i natronsjøer i Tibet (W.D. Grant upubliserte observasjoner) og i India (V. Upasani og S. Desai, (1990) Arch. Microbiol., 154, s. 589-593).

Alkalifile organismer har allerede gjort seg gjeldende ved anvendelse i bioteknologi for fremstilling av forbruksprodukter. Alkali-tolerante enzymer dannet av alkalifile mikroorganismer har allerede funnet anvendelse ved industrielle prosesser og har et betydelig økonomisk potensiale. Disse

enzymer anvendes f.eks. for tiden i vaskemiddelblandinger og ved garving av lær, og de ventes å finne anvendelse i matvare-, avfallsbehandling- og tekstilindustrien. Dessuten er alkalifile organismer og deres enzymer potensielt egnet for biotransformasjoner, særlig ved syntese av rene enantiomere forbindelser.

Foreliggende oppfinnelse angår ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner kremfarvede, sirkulære kolonier,

b) vokser optimalt mellom pH 9 og 10,

c) gir positiv respons ved følgende tester:

   1) Leucin-arylamidase
   2) Valin-arylamidase
   3) Fosfatohydrolase
   4) Polymixin;

d) gir negativ respons ved følgende tester:

   1) N-acetylglukosamin
   2) Maltose
   3) Propionat
   4) Kaprat
   5) Valerianat
   6) Citrat
   7) Histidin
   8) Glykogen
   9) 4-hydroksybenzoat
   10) α-galaktosidase.

Foreliggende oppfinnelse angår også ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner små, kremfarvede kolonier,

b) vokser optimalt mellom pH 7,8 og 11,2,

c) gir positiv respons ved følgende tester:
   1) Stivelse
   2) Acetat
   3) Propionat
   4) Valerianat
   5) Prolin
   6) Lipase
   7) Oksydase (respons innen 10 sek.);
d) gir negativ respons ved følgende tester:
   1) N-acetylglukosamin
   2) Sakkarose
   3) Histidin
   4) 2-ketoglukonat
   5) 4-hydroksybenzoat
   6) α-glukosidase
   7) ß-glukosidase
   8) Fusidinsyre.

Foreliggende oppfinnelse angår ytterligere ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gramnegative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner kremfarvede, opake kolonier,
b) vokser optimalt mellom pH 8,5 og 10,7,
c) inneholder ubikinon 6 som et hoved-respirasjonskinon;
d) gir positiv respons ved følgende tester:
   1) Acetat
   2) Laktat
   3) Propionat
   4) Valerianat
   5) Citrat
   6) 3-hydroksybenzoat
   7) Prolin
   8) Leucin-arylamidase:
e) gir negativ respons ved følgende tester:

1) Fosfohydrolase
2) α-galaktosidase
3) Fusidinsyre
4) Tetracyklin
5) Vancomycin
6) Bacitracin.

Foreliggende oppfinnelse angår ytterligere ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner beige til brunfarvede, opake kolonier,
b) vokser optimalt mellom pH 7,5 og 10,9,
c) inneholder ubikinon 9 som et hoved-respirasjons-kinon,
d) gir positiv respons ved følgende tester:
    1) Laktat
    2) Alanin
    3) 3-hydroksybutyrat
    4) Valin-arylamidase
    5) Polymixin;
e) gir negativ respons ved følgende tester:
    1) Histidin
    2) Ampicillin
    3) Naladixinsyre
    4) Trimethoprim
    5) Penicillin G
    6) Methicillin.

Foreliggende oppfinnelse angår også ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner lysegule kolonier,
b) vokser optimalt mellom 8 og 10,5,
c) gir positiv respons ved følgende tester.
    1) Fosfohydrolase
    2) α-galaktosidase
    3) ß-galaktosidase
    4) Ampicillin
    5) Fusidinsyre
    6) Methicillin
    7) Tetracyklin
    8) Vancomycin
    9) Bacitracin
d) gir negativ respons ved følgende tester:
    1) N-acetylglukosamin
    2) Laktat
    3) L-alanin
    4) Mannitol
    5) Propionat
    6) Kaprat
    7) Valerianat
    8) Histidin
    9) 3-hydroksybenzoat
    10) 3-hydroksybutyrat
    11) 4-hydroksybenzoat
    12) Polymixin.

Foreliggende oppfinnelse angår også ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner kremfarvede til beige-farvede, uregelmessige, flate kolonier,
b) vokser optimalt mellom pH 8,2 og 10,9,
c) gir positiv respons ved følgende tester:
    1) Stivelse

2) N-acetylglukosamin
3) Sakkarose
4) Maltose
5) Acetat
6) Alanin
7) Citrat
8) Glykogen
9) 3-hydroksybutyrat
10) Penicillin G
11) Fusidinsyre
12) Methicillin
13) Tetracyklin
14) Bacitracin;

d) gir negativ respons ved følgende tester:
1) Pyruvat
2) 4-hydroksybenzoat
3) Leucin-arylamidase
4) Valin-arylamidase
5) α-galaktosidase
6) Polymixin.

Foreliggende oppfinnelse angår også ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative, bevegelige, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) celler ofte i par,
b) vokser optimalt mellom pH 9 og 10,
c) danner på alkalisk agar glatte, gjennomskinnelige, beige-farvede kolonier med diameter 1-2 mm, som er sirkulære, konvekse med hel kant,
d) i alkalisk buljong er veksten (37°C) fnuggaktig med en ring eller overflatehinne og dannelse av et bunnfall,
e) vokser optimalt ved 20-30°C,
f) ingen vekst ved 15 eller 40°,

g) KOH-testen er positiv,
h) aminopeptidasetesten er svakt positiv,
i) oksydasetesten er svakt positiv,
j) katalsetesten er positiv,
k) obligat halofil,
l) vokser optimalt med 4% NaCl,
m) ingen vekst med 0 eller 8% NaCl,
n) testen for hydrolyse av gelatin er langsomt positiv,
o) hydrolyse av stivelse er positiv,
p) vokser ikke på enkle sukkerarter,
q) vokser ikke på organiske syrer,
r) vokser på gjærekstrakt og peptoner.

Foreliggende oppfinnelse angår også ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative, bevegelige, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) vokser optimalt mellom pH 8,2 og 10,9,
b) danner på alkalisk agar glatte, opake, beige eller brunfarvede kolonier med diameter 2-4 mm, som har sirkulær form, konveks profil og med hel kant,
c) i alkalisk buljong er veksten (37°C) massiv og fnuggaktig med et bunnfall og overflatehinne,
d) vokser optimalt mellom 20 og 37°C,
e) ingen vekst ved 8 eller 40°C eller over denne temperatur,
f) KOH-testen er positiv,
g) aminopeptidasetesten er positiv,
h) oksydasetesten er meget svakt positivt,
i) katalasetesten er positiv,
j) vokser ved en NaCl-konsentrasjon på mellom 0 og 15%,
k) ingen vekst med 20% NaCl,
l) testen for hydrolyse av gelatin er negativ,
m) hydrolyse av stivelse er negativ,
n) vokser på gjærekstrakt,

o) vokser på organiske syrer valgt fra gruppen som består av suksinat, pyruvat, citrat, malonat, acetat og laktat,
p) vokser på fettsyrer valgt fra gruppen som består av propionat, valerianat og suberat,
q) vokser på aminosyrer valgt fra gruppen som består av prolin, serin, histidin og lysin.

Foreliggende oppfinnelse angår også ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) vokser optimalt mellom pH 9 og 10,5,
b) danner på alkalisk agar glatte, opake, brunfarvede kolonier med diameter 3-4 mm, som har ganske uregelmessig form, har generelt flat til lett bølget profil med fliket kant,
c) i alkalisk buljong er veksten (37°) moderat til massiv, og blir fnuggaktig med et bunnfall og overflatehinne,
d) vokser optimalt mellom 20 og 40°C,
e) ingen vekst ved 45°C,
f) KOH-testen er positiv,
g) aminopeptidasetesten er positiv,
h) oksydasetesten er negativ,
i) katalasetesten er positiv,
j) vokser ved en NaCl-konsentrasjon på 0-12%,
k) ingen vekst ved 20% NaCl.
l) testen for hydrolyse av gelatin er positiv.
m) hydrolyse av stivelse er svakt positiv,
n) vokser ikke på enkle sukkerarter,
o) vokser på gjærekstrakt,
p) vokser på organiske syrer valgt fra gruppen som består av pyruvat, citrat, acetat og laktat,

q) vokser på fettsyrer valgt fra gruppen som består av propionat, kaprat og valerianat,
r) vokser på aminosyrer valgt fra gruppen som består av prolin, alanin og lysin.

Foreliggende oppfinnelse angår ytterligere ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) vokser ikke under pH 7,5,
b) danner på alkalisk agar glatte, kremfarvede kolonier, i begynnelsen gjennomskinnelige, men som blir opake,
c) på alkalisk agar utvikles koloniene fra sirkulære, hele og blir uregelmessige, med fliket form og konveks profil,
d) i alkalisk buljong er veksten (37°C) langsom, lett, fnuggaktig med bunnfall, men ingen overflatehinne,
e) vokser optimalt mellom 10 og 40°C,
f) ingen vekst ved 8 eller 45°C,
g) KOH-testen er positiv,
h) aminopeptidasetesten er negativ,
i) oksydasetesten er positiv,
j) katalasetesten er positiv,
k) vokser ved en NaCl-konsentrasjon på mellom 0 og 15%,
l) ingen vekst med 20% NaCl,
m) testen for hydrolyse av gelatin er positiv,
n) hydrolyse av stivelse er svakt positiv,
o) vokser på gjærekstrakt og peptoner,
p) vokser på sukkerarter,
q) vokser på organiske syrer,
r) vokser på aminosyrer.

Foreliggende oppfinnelse angår også ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, kjennetegnet ved at bakteriene består av aerobe, gram-negative,

stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) cellene danner ofte korte kjeder,
b) vokser ikke ved pH under 8,
c) danner på alkalisk agar glatte, sirkulære, konvekse kolonier med hel kant, med diameter ca. 1 mm og som i begynnelsen er gjennomskinnelige, med kremfarvet/-beige farve, og koloniene blir opake og får brun farve med tiden,
d) i alkalisk buljong er veksten (37°C) i begynnelsen jevnt uklar med et bunnfall, men ingen overflate-hinne, og blir fnuggaktig med dannelse av en hinne,
e) vokser optimalt mellom 30 og 37°C,
f) ingen vekst ved 40°C,
g) KOH-testen er positiv,
h) aminopeptidasetesten er positiv,
i) oksydasetesten er positiv,
j) katalasetesten er positiv,
k) obligat halofil,
l) vokser med 4% NaCl,
m) ingen vekst med 0 eller 8% NaCl,
n) testen for hydrolyse av gelatin er langsomt positiv,
o) hydrolyse av stivelse er negativ,
p) vokser på gjærekstrakt og peptoner,
q) vokser på sukkerarter,
r) vokser på organiske syrer,
s) vokser på fettsyrer,
t) vokser på aminosyrer.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer rene kulturer av nye aerobe, gram-negative alkalifile bakterier. Disse bakterier er blitt isolert fra prøver av jord, vann, sediment og en rekke andre kilder, som alle er kommet fra alkaliske natronsjøer og fra områder rundt disse. Disse alkalifile organismer er blitt analysert i henhold til prinsippene ved numerisk klassifikasjon med hensyn til hverandre og også med hensyn til forskjellige kjente bakterier for bekreftelse av

nyheten ved dem. Dessuten er disse bakterieklassifikasjoner videre avgrenset ved en analyse av forskjellige kjemotaksonomiske karakteregenskaper.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også data med hensyn til sammensetning av miljøene som prøvene med mikroorganismene ble tatt fra, såvel som de nødvendige medier for effektiv isolering og dyrking av dem, slik at en vanlig fagmann lett kan lokalisere et slikt miljø og være i stand til å isolere organismene ifølge foreliggende oppfinnelse ved å følge de fremgangsmåter som er beskrevet i det foreliggende.

Det er også et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe mikroorganismer som danner egnede alkali-tolerante enzymer, såvel som anvendelse av disse for oppnåelse av hovedsakelig rene preparater av disse enzymer. Disse enzymer kan utføre sine funksjoner ved høy pH, hvilket gjør dem unikt egnet for anvendelser som fordrer slike ekstreme betingelser. F.eks. kan alkali-tolerante enzymer anvendes i vaskemiddelblandinger, ved garving av lær og i matvare-, avfalls-behandlings- og tekstilindustrien, såvel som for biotransformasjoner såsom dannelse av rene enantiomere forbindelser.

Genene som koder for disse alkali-tolerante enzymer, kan isoleres, klones og bringes til ekspresjon i forenlige ekspresjonsverter under tilveiebringelse av en kilde til større volum av enzymprodukter som, hvis ønskelig, lettere kan renses og brukes ved forskjellige industrielle anvendelser, dersom villtype-stammen ikke danner tilstrekkelige mengder av det ønskede enzym, eller ikke fermenterer godt.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1. Forenklet dendrogram som viser klynger (fenoner) oppnådd med S_G-koeffisienten og "Unweighted Average Linkage"-metoden.

Fig. 2. Forenklet dendrogram som viser klynger (fenoner) oppnådd med S_J-koeffisienten og "Unweighted Average Linkage"-metoden.

Fig. 3. Forenklet dendrogram oppnådd med S_G-koeffisienten og "Unweighted Average Linkage"-metoden under anvendelse av de deriverte minimumsdiskriminatortester.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Prøvetaking

Flere hundre stammer av bakterier er blitt isolert fra prøver av jord, vann, sediment og en rekke andre kilder i og rundt alkaliske innsjøer. Disse prøver ble oppnådd som en del av en undersøkelse i løpet av et tidsrom på 3 år. De isolerte bakterier er ikke-fototrofe eubakterier. Inntil nå er ikke slike bakterier blitt karakterisert i noen særlig grad.

Prøvene ble oppsamlet i sterile plastposer. Prøvetakingen ble utført ved innsjøene Elmenteita, Nakuru, Bogoria, Crater (Sonachi), Little Naivasha (Oloidien), Magadi og Little Magadi (Nasikie Engida), som alle finnes i Kenya, Øst-Afrika. Alkaliske natronsjøer med lignende miljøer kan også finnes i Tibet, Kina, Ungarn og vestlige deler av USA. På hvert prøvetakingssted ble fysiske parametre såsom pH, ledningsevne og temperatur registrert, såvel som det fysiske utseende av stedet og prøven. Noen av prøvene ble behandlet lokalt innen 36 timer etter oppsamling av prøven, men hovedmengden ble undersøkt et annet sted, flere uker etter oppsamling.

I tabell 1 er det oppregnet forskjellige stammer som er blitt isolert. Stammene er oppregnet i henhold til det sted som prøven ble tatt fra, det fysiske utseende av selve prøven og en henvisning til tabell 2, som viser den kjemiske analyse av prøvene fra innsjøvannet.

Tabell 3 viser en liste av de isolerte stammer anordnet ifølge resultatene av den numeriske klassifiseringsanalyse. Videre viser tabell 3 prøvens fysiske egenskaper, spesielt temperatur, ledningsevne og alkalisk pH, såvel som de tallrike isolasjonsmedier som fordres for oppnåelse av rene kulturer av de nye bakterier. Disse medier er bokstavkodet med henvisning til Vedlegg A.

Tabellene 1, 2 og 3 viser data ved hvilke miljøet på prøvetakingsstedene kan karakteriseres. Den kjemiske og fysiske analyse av prøvene bekrefter tilstedeværelse av

alkalisk pH såvel som tilstedeværelse av uvanlig høye nivåer av Na_2CO_3, koblet med lave nivåer av Ca^{2+} og Mg^{2+}.

Det foreligger ingen kjemisk analyse når det gjelder slamprøver. Videre foreligger det for noen få prøver ingen kjemisk analyse (se tabell 1). Imidlertid er det blitt analysert andre prøver tatt på samme sted, og disse er beskrevet i tabellene 1-3. Det er kjent at de basiske miljøer i natronsjøer er stabile når det gjelder pH og ione-sammensetning. Videre er mikrobepopulasjonene som finnes på disse steder, i stor grad vedvarende stabile. Det må således ventes at til tross for mangel på kjemisk analyse av visse prøver, kan ikke desto mindre miljøet fra hvilket bakteriene ble tatt, bestemmes ut fra dataene vist i tabeller 1-3.

De friske natronsjø-vannprøver ble utplatet på et alkalisk næringsmedium (Medium A) like etter oppsamling. Mikroskopisk undersøkelse viste en uventet høy mangfoldighet av bakterietyper. Når man tar i betraktning miljøets sterkt alkaliske beskaffenhet, viste gjennomførbare tellinger uventet høye antall organotrope bakterier, i området 10^5 - 10^6 kolonidannende enheter pr. ml. Prøvene ble oppbevart enten avkjølt eller ved romtemperatur. Etter noen få ukers lagring, steg det totale antall bakterier i prøven, mens mangfoldigheten av typer minsket.

Tabell 1

Alkalifile stammer anordnet ifølge opphav

Stammer	Prøvetakingssted	Prøvens utseende	Analyse (tabell 2)
1E.1, 2E.1, 4E.1, 5E.1, 35E.2, 36E.2, 37E.2, 38E.2	Lake Elmenteita (østlige bukt)	Slam fra uttørket innsjøleire	I.A.
wE.5, wEl1, wEl2	Lake Elementeita (østl. bukt)	Sediment og vann, strandsone	I.T.
39E.3, 40E.3, 41E.3, 42E.3, 44E.3, 53E.4, 56E.4	Lake Elmenteita (østl. bukt)	Slam og vann, strandsone. Spirulina scum.	1
45E.3, 47E.3, 57E.4	Lake Elmenteita sump, sydøstl. arm	Brunt vann og sediment	2
48E.3, 58E.4	"	Grått slam	
59E.4	Lake Elementeita (nordvestl. bukt)	Vann og sandholdig sediment, strandsone	3
16N.1, 17N.1, 18N.1, 19N.1, 20N.1, 26N.1, 28N.1, wN1, wN2, wNk1, wNk2.	Lake Nakuru, nordlige bredd mellom Hippo Point og Njoro Point.	Slam og vann, strandsone	I.T.
49N.3, 50N.3, 61N.4	"	Vannsøyle, strandsone.	4
51N.3, 52N.3	"	Innsjøsediment, strandsone.	4

Tabell 1

Alkalifile stammer (forts.)

Stammer	Prøvetakingssted	Prøvens utseende	Analyse (tabell 2)
63N.4	Lake Nakuru; V vannhull, S saltgrunner	Slam og vann	I.T.
6B.1, 7B.1, 8B.1, 9B.1, 10B.1, 24B.1, 25B.1, wB1, wB2, wB4, wB5 wBn4	Lake Bogoria, nordlige slam-grunner	Slam og vann, strandsone	I.T.
64B.4	"	Tørket skorpe av natronslam	I.A.
65B.4	"	Slam i vannlinjen	5
wBs4	Lake Bogoria, sydvestl. bredd	Slam og vann, strandsone	I.T.
11C.1, 12C.1, 29C.1,	Crater Lake, nordlige punkt	Slam og vann, strandsone	I.T.
73aC.4, 73bC.4, 74C.4	"	"	6
75C.4	"	Natronslam, strandlinje	I.A.
77LN.4, 78LN.4	Little Lake Naivasha, sydlige bredd	Vannsøyle og sediment	7
21M.1, 22M.1, 27M.1	Lake Magadi fylling, øvre vestlige arm	Slam og vann	I.T.
92LM.4, 94LM.4	Little Lake Magadi, nord-vestl. kilder	Kildevann og sediment	8

I.T. = ikke testet
I.R. = ikke aktuelt

Tabell 2

Kjemisk analyse av kenyansk natronsjøvann

Analyse	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	SiO_2	PO_4^{3-}	Cl^-	SO_4^{2-}	CO_3^{2-}	TON*	TA §
	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	
1	196	3,58	0,07	u.p.g.	2,91	0,03	65,1	2,0	68,0	0,8	119
2	140	3,32	0,48	0,13	1,85	0,02	46,8	1,7	32,0	1,2	86
3	167	3,32	0,06	u.p.g.	3,10	0,03	51,8	1,7	64,0	2,2	103
4	326	5,63	0,15	u.p.g.	3,25	0,15	57,5	0,5	198,3	1,9	259
5	735	5,50	0,21	0,01	2,23	0,09	100,9	1,0	476,7	0,9	612
6	140	8,95	0,06	0,01	2,13	0,04	12,4	0,8	90,0	1,1	133
7	8,7	1,79	0,28	0,65	1,02	0,003	4,8	0,5	<10,0	<0,07	18
8	483	4,35	0,03	0,03	0,64	0,08	157,8	1,7	166,0	1,2	105

u.p.g. = under påvisningsgrensene
* TON = Total mengde organisk nitrogen
§ TA = Total alkalinitet i milliekvivalenter/liter

309198

Tabell 3

Opphav til stammene anordnet i klynge*

Klynge	Stamme	Prøve: Sted	pH	Temp. °C	Ledningsevne mS/cm	Isoleringsmedium
1	1E.1^{CT}	Elmenteita	9,5	35	n.t.	A
1	2E.1	Elmenteita	9,5	35	n.t.	A
1	wB2	Bogoria	n.t.	n.t.	n.t.	A
1	wB5	Bogoria	n.t.	n.t.	n.t.	A
1	wBs4	Bogoria	10,5	n.t.	19	A
1	10B.1	Bogoria	10,5	36	45	A
1	20N.1	Nakuru	10,5	36	30-40	A
1	27M.1	Magadi$_T$	11,0	36	100	A
1	Comamonas terrigena^T (NCIMB 8193)					-
1	wNk2	Nakuru$_T$	10,5	n.t.	19	A
1	Pseudomonas putida^T (NCIMB 9494)					-
2	39E.3	Elmenteita	10-10,5	23	13,9	M
2	41E.3$_{CT}$	Elmenteita	10-10,5	23	11,3	N
2	45E.3^{CT}	Elmenteita	10	27	11,3	P
2	47E.3	Elmenteita	10	27	11,3	O
2	51N.3	Nakuru	10-10,5	29	40,1	P
2	52N.3	Nakuru	10-10,5	29	40,1	P
2	42E.3	Elmenteita	10-10,5	23	13,9	N
2	50N.3	Nakuru$_T$	10-10,5	29	40,1	N
2	Pseudomonas stutzeri^T (NCIMB 11358)					-
-	wN2	Nakuru$_T$	n.t.	n.t.	n.t.	A
-	Pseudomonas beijerinckii^T (NCIMB 9041)					-
-	4E.1	Elmenteita	9,5	35	n.t.	A
-	5E.1	Elmenteita	9,5	35	n.t.	A
3	6B.1	Bogoria	10,5	36	45	A
3	7B.1	Bogoria	10,5	36	45	A
3	8B.1	Bogoria	10,5	36	45	A
3	38E.2	Elmenteita	n.t.	n.t.	n.t.	B
3	56E.4	Elmenteita	10-10,5	23	13,9	C
3	25B.1	Bogoria	10,5	36	45	A
3	26N.1	Nakuru	10,5	36	30-45	A
3	11C.1	Crater	9,0	30	10	A
3	wB1	Bogoria	n.t.	n.t.	n.t.	A
3	12C.1$_{CT}$	Crater	9,0	30	10	A
3	28N.1^{CT}	Nakuru	10,5	36	30-40	A
3	61N.4	Nakuru	10-10,5	29	40,1	E
3	36E.3	Elmenteita	n.t.	n.t.	n.t.	K
3	40E.3	Elmenteita	10-10,5	23	13,9	M
3	65B.4	Bogoria	n.t.	n.t.	41,9	C
3	94LM.4	Li. Magadi	9-9,5	81	35,0	L
3	19N.1	Nakuru	10,5	36	30-40	A
3	24B.1	Bogoria	10,5	36	45	A
3	21M.1	Magadi	11,0	36	100	A
3	29C.1	Crater	9,0	30	10	A
3	35E.2	Elmenteita	n.t.	n.t.	n.t.	I
3	37E.2	Elmenteita	n.t.	n.t.	n.t.	J
3	48E.3	Elmenteita	10,0	27	11,3	P

Tabell 3 (forts.)

Opphav til stammene anordnet i klynge*

Klynge	Stamme	Prøve: Sted	pH	Temp. °C	Ledningsevne mS/cm	Isoleringsmedium
3	78LN.4	Little Naivasha	8,5-9	30	1,2	G
3	73aC.4	Crater	n.t.	n.t.	10,2	D
3	75C.4	Crater	n.t.	n.t	n.t.	H
3	73bC.4	Crater	n.t.	n.t.	10,2	D
3	74C.4	Crater	n.t.	n.t.	10,2	H
3	77LN.4	Little Naivasha	8,5-9	30	1,2	F
3	wN1	Nakuru	n.t.	n.t.	n.t.	A
3	49N.3	Nakuru	10-10,5	29	40,1	Q
3	44E.3	Elmenteita	10,0	27	13,9	O
3	58E.4	Elmenteita	10,0	27	11,3	G
3	57E.4	Elmenteita	10,0	27	11,3	C
4	$wE5_{CT}$	Elmenteita	n.t.	n.t.	n.t.	A
4	$wB4_{CT}$	Bogoria	n.t.	n.t.	n.t.	A
4	wNk1	Nakuru	10,5	n.t.	19	A
4	wEl1	Elmenteita	10,4	n.t.	13	A
4	wEl2	Elmenteita	10,4	n.t.	13	A
5	9B.1	Bogoria	10,5	36	45	A
5	$16N.1_{CT}$	Nakuru	10,5	36	30-40	A
5	$17N.1_{CT}$	Nakuru	10,5	36	30-40	A
5	22M.1	Magadi	11,0	36	100	A
6	18N.1	Nakuru	10,5	36	30-40	A
6	$59E.4_{CT}$	Elmenteita	10,0	31-33	12,7	G
6	$64B.4_{CT}$	Bogoria	n.t.	n.t.	n.t.	E
6	63N.4	Nakuru	9,0	n.t.	n.t.	C
6	53E.4	Elmenteita	10-10,5	23	13,9	G
-	92LM.4	Little Magadi	9-9,5	81	35,0	L
-	wBn5	Bogoria	10,5	n.t.	19	A

* Klynger av mikroorganismer fås ved analyse i henhold til prinsippene ved numerisk klassifisering under anvendelse av S_G/UPGMA-metoden (se omtale nedenfor og fig. 1).

n.t. = ikke testet

Bokstavkodene for isolasjonsmediene viser til Vedlegg A.

Behandling av prøvene: Anriking og isolering av alkalifile bakterier

Det ble anvendt mange forskjellige anrikings- og isolasjonsmetoder. Noen av metodene ble spesifikt utformet for anriking og isolering av alkalifile bakterier som viser spesifikke typer enzymaktivitet ved alkalisk pH. Andre teknikker av mer generell beskaffenhet ble anvendt for isolering av forskjellige sorter alkalifile bakterier. I noen tilfeller ble det tatt hensyn til de spesifikke betingelser i innsjøene (Tabell 2) når det ble utført forsøk for isolasjon av bakterier.

De forskjellige næringsmedier som ble anvendt for isolering av de nye alkalifile bakterier, er betegnet Medium A - Medium Q. Sammensetningen av de forskjellige anvendte medier er vist i Vedlegg A.

For isolering av ikke-spesifikke alkalifile organotrofe bakterier, ble natronsjø-vannprøver eller fortynninger av disse utstrøket på alkalisk næringsagar, pH 10 - pH 10,5 (Medium A). Prøver med mer fast konsistens, slam, sediment o.s.v., ble først suspendert i en alkalisk næringsbuljong (Medium A) før utspreding på en alkalisk næringsagar (Medium A). Bakteriene ble dyrket i en oppvarmet inkubator, fortrinnsvis ved 37°C. I noen tilfeller ble prøvene suspendert i en alkalisk næringsbuljong (Medium A) og bakteriene dyrket ved rysting, fortrinnsvis ved 37°C i 2-3 dager før buljongen ble utspredt på en alkalisk næringsagar (Medium A) for isolering av bakteriekolonier.

For isolering av alkalifile bakterier som viste spesifikke enzymaktivitetstyper, ble prøver spredt på alkalisk næringsagar som inneholdt spesifikke substrater såsom laktalbumin eller kasein eller olivenolje. I noen tilfeller kan bakteriene i prøven anrikes i 1 dag eller i flere uker i en ikke-spesifikk alkalisk næringsbuljong såsom Medium A før utspreding av buljongen på en alkalisk næringsagar som er spesifikk for påvisning av bakterier som viser enzymaktivitet såsom lipolytisk eller proteolytisk aktivitet.

Klassifiseringsanalyse

70 stammer av bakterier isolert fra alkaliske innsjøer og rundt disse ble henført til bakterietypen kjent som gram-negative bakterier på basis av (1) Dussault-modifikasjonen av Grams farvereaksjon (H.P. Dussault (1955), J. Bacteriol., 70, 484-485); (2) KOH-sensitivitetstesten T. Gregersen (1978), Eur. Appl. Microbiol. og Biotech. 5, 123-127; S. Halebian et al., (1981), J. Clin. Microbiol., 13, 444-448); (3) amino-peptidase-reaksjonen G. Cerny (1976), Eur. J. Appl. Microbiol., 3, 223-225; samme sted (1978), 5, 113-122); og i mange tilfeller bekreftelse også på basis av (4) en kinonanalyse (M.D. Collins & D. Jones (1981), Microbiol. Rev., 45, 316-354) under anvendelse av metoden beskrevet av M.D. Collins i Chemical Methods in Bacterial Systematics (red. M. Goodfellow & D. Minnikin) s. 267-288, Academic Press, London, 1985.

De 70 stammer ble undersøkt med hensyn til 104 egenskaper. Resultatene ble analysert ved anvendelse av prinsippene ved numerisk klassifikasjon (P.A.H. Sneath og R.R. Sokal i Numerical Taxonomy, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1973). De undersøkte egenskaper, og hvordan de ble undersøkt, er oppført i Vedlegg B. Dessuten angir Vedlegg C hvordan hver egenskap ble kodet for klassifiseringsanalyse.

Siden oppfinnerne ikke kjenner til noen godt dokumenterte fullstendige eller obligat ikke-fototrofe, alkalifile gram-negative eubakterier, ble en uensartet samling av 20 kjente gram-negative bakterier brukt som kontroller for den samme analyse under anvendelse av modifiserte pH-betingelser. Disse 20 kjente referansebakterier er oppført i tabell 4, fra hvilken det vil kunne sees at det i de fleste tilfeller er blitt anvendt "Stammetypen" av de kjente arter.

Tabell 4

Gram-negative ikke-alkalifile referansestammer

*		
(C.t.)	Comamonas terrigena^{T}	NCIMB 8193
(P.p.)	Pseudomonas putida^{T}	NCIMB 9494
(P.s.)	Pseudomonas stutzeri^{T}	NCIMB 11358
(A.t.)	"Alcaligenes tolerans"	Leicester Universitet-stamme
(V.c.)	Vibrio costicola^{T}	NCIMB 701
(P.a.)	Providencia alcalifaciens^{T}	NCTC 10286
(P.v.)	Proteus vulgaris^{NT}	ATCC 13315
(M.v.)	Moellerella wisconsensis^{T}	NCTC 12132
(E.t.)	Edwardsiella tarda^{T}	NCTC 10396
(A.h.)	Aeromonas hydrophila^{T}	NCTC 8049
(A.s.)	Aeromonas sp S5	Leicester Universitet-stamme
(F.a.)	Flavobacterium aquatile^{T}	NCIMB 8694
(E.c)	Escherichia coli^{T}	NCTC 9001
(E.a.)	Enterobacter aerogenes^{T}	NCTC 10006
(K.a.)	Klebsiella pneumonia	ATCC 15380 ("K.aerogenes")
(H.a.)	Hafnia alvei^{T}	ATCC 13337
(C.f.)	Citrobacter freundii^{T}	NCTC 9750
(S.m.)	Serratia marcescens^{T}	NCTC 10211
(P.b.)	Pseudomonas beijerinckii^{T}	NCIMB 9041
(H.e.)	Halomonas elongata^{T}	ATCC 33173

* forkortelse anvendt på fig. 1 og fig. 2

^{T} angir "stammetype"

^{NT} angir "neo-stammetype"

Analyse av testdata

Vurdering av klassifiseringslikhet

De fenetiske data, som besto av 104 egenskapsenheter, ble bedømt som angitt i Vedlegg C og oppført i form av en "n x t"-matriks, hvis t-kolonner representerer t-bakteriestammene for gruppering på basis av likhet, og hvis n-rekker er egenskaps-enheten. Klassifiseringslikhet hos bakteriestammene ble vurdert ved hjelp av en likhetskoeffisient (P.H.A. Sneath og R.R. Sokal, Numerical Taxonomy, som ovenfor, s. 114-187). Skjønt det er blitt anvendt mange forskjellige koeffisienter for biologisk klassifisering, har bare noen få funnet regelmessig anvendelse i bakteriologien. Vi har valgt å anvende to assosiasjonskoeffisienter (P.H.A. Sneath og R.R. Sokal, samme sted, s. 129 et seq.), nemlig Gower og Jaccard-koeffisientene. Disse er ofte blitt anvendt ved analyse av bakteriologiske data og er meget godt anerkjent av fagfolk på området, siden de er blitt vist å resultere i robuste klassifiseringer.

De kodede data ble analysert under anvendelse av TAXPAK-programpakken (M.J. Sackin, "Programmes for classification and identification", i Methods in Microbiology, vol. 19 (red. R.R. Colwell og R. Grigorova), s. 459-494, Academic Press, London, (1987)) kjørt på en DEC VAX-computer ved universitetet i Leicester, U.K.

En likhetsmatriks ble konstruert for alle stammepar under anvendelse av Gower-koeffisienten (S_G) med frihet til å velge negative motstykker (P.H.A Sneath og R.R. Sokal som ovenfor, s. 135-136) under anvendelse av RTBNSIM-programmet i TAXPAK. Som hoved-analysemidlet og det som de fleste av argumentene oppført i det foreliggende er basert på, ble Gower-koeffisienten valgt fremfor andre koeffisienter for dannelse av likhetsmatrikser fordi det kan anvendes for alle egenskaps-typer eller datatyper, nemlig to-tilstand, fler-tilstand (ifølge orden og kvalitativt) og kvantitativt.

Klyngeanalyse av likhetsmatriksen ble utført ved anvendelse av "Unweighted Pair Group"-metoden med aritmetisk gjennomsnitts-(UPGMA)-algoritme, også kjent som "Unweighted Average Linkage"-metoden ved kjøring av SMATCLST sub-rutinen i TAXPAK.

Resultatene av klyngeanalysen er et dendrogram, og en forenklet versjon av dette er vist på fig. 1. Dendrogrammet illustrerer likhetsnivåene mellom bakteriestammene. Dendrogrammet er oppnådd ved anvendelse av DENDGR-programmet i TAXPAK.

De fenetiske data, hvor flertilstands-egenskaper er utelatt (egenskaper 1-5, 11 og 12; Vedlegg C) og som således består av 193 egenskapsenheter, og som er notert i totegnssystem (positiv = 1, negativ = 0), ble analysert på nytt under anvendelse av Jaccard-koeffisienten (S_J) (P.H.A. Sneath og R.R. Sokal, samme sted, s. 131) ved kjøring av RTBNSIM-programmet i TAXPAK. Et ytterligere dendrogram ble oppnådd ved anvendelse av SMATCLST med UPGMA-valg og DENDGR-subrutiner i TAXPAK. En forenklet versjon av dette dendrogram er illustrert på fig. 2. Vedlegg E gir de prosentvise positive egenskapstilstander i hver klynge.

Resultater av klynge-analysen

S_G/UPGMA-metoden

Fig. 1 viser resultatene av klyngeanalyse, basert på Gower-koeffisienten og UPGMA-metoden, av 70 nye, gram-negative, alkalifile bakterier isolert fra alkaliske innsjøer og rundt disse, sammen med 20 kjente gram-negative bakterier.

Seks naturlige klynger eller fenoner av alkalifile bakterier som innbefatter 65 av de 70 alkalifile stammer, dannes ved 73% likhetsnivået. Skjønt valget av 73% for delineasjonsnivået kan synes vilkårlig, er det i overensstemmelse med gjeldende praksis ved numerisk klassifikasjon (B. Austin og F. Priest i Modern Bacterial Taxonomy, s. 37; Van Nostrand Reinholdt; Wokingham, U.K., (1986)). Plassering av delineasjonen ved lavere prosentandel ville kombinere grupper av klart ubeslektede organismer, mens en høyere prosentandel ville gi en mangfoldighet av mindre veldefinerte klynger, Ved 73%-nivået kan de individuelle klynger representere adskilte bakterieslekter. Videre understøttes signifikansen av klyngedannelse ved dette nivå ved kjemotaksonomiske data (se nedenfor) og det klyngemønster som fås ved anvendelse av Jaccard-koeffisienten (fig. 2).

Signifikansen av klyngedannelsen ved 73%-nivået under-st¢ttes av resultatene av TESTDEN-programmet. Dette program tester signifikansen av alle dikotome par av klynger (omfattende 4 stammer eller flere) i et UPGMA-dannet dendrogram med kvadrerte euklidske distanser), eller deres komplement, som et mål. Programmet antar at klyngene er hypersfæriske. Den kritiske overlapping ble satt til 0,25%. Som det vil kunne sees av tabell 5, er adskillelsen av klyngene meget signifikant.

Tabell 5

Signifikans av klyngene dannet ved S_G/UPGMA-metoden tilveiebragt ved TESTDEN

Klynge skilles fra klynge		ved signifikansnivå
1	2	p = 0,99
1+2	3+4	p = 0,99
1+2+3+4	5+6	p < 0,90
1+2+3+4+5+6	kontroller	p = 0,99
5	6	p = 0,99

Et ytterligere mål på klyngeseparasjon kan vurderes ut fra sannsynligheten for klyngeoverlapping. Dette ble oppnådd ved anvendelse av OVERMAT-programmet i TAXPAK med den kritiske overlapping anf¢rt ved 2,5%. Som det kan sees av tabell 6, er det en sannsynlighet på mer enn 95% for under 2,5% overlapping mellom klyngene. For mange av klyngekombinasjonene er overlappingen i praksis null. Bare klyngene 3 og 4 har mindre sannsynlighet for < 2,5% overlapping, men disse klynger kan klart skilles fra hverandre på basis av kjemotaksonomiske data (se nedenfor).

Tabell 6

Prosentvis sannsynlighet for at klyngeoverlapping er ≤ 2,5%

Klynge	1	2	3	4	5	6
1						
2	95					
3	99	95				
4	95	95	90			
5	99	>99	>99	>99		
6	>99	>99	99	>99	>99	

Kontrollen viser at klyngeanalysen, som ventet, grupperer Enterobacteriaceae separat. Dessuten grupperes også *Aeromonas*- og *Pseudomonas*-artene, medtatt som kontroller, også separat. Dette er helt i overensstemmelse med någjeldende klassifisering av disse organismer (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, Williams og Wilkins, Baltimore/London, 1984).

Fem av de alkalifile stammer er utenfor hovedklyngene. To stammer, 4E.1 og 5E.1, danner et adskilt, men beslektet par og har tydeligvis forbindelse med hovedgruppene av alkalifile bakterier. Stamme wN2 foreligger heller ikke i klynger, men er tydeligvis beslektet med en *Pseudomonas*-art og hovedfenonene av alkalifile bakterier. Stammene 92LM.4 og wBn5 har ikke forbindelse med de alkalifile hovedfenoner og representerer sannsynligvis adskilte grupper av nye alkalifile bakterier.

Klynger 1 og 2 er de eneste fenoner som viser forbindelse med kjente organismer, d.v.s. *Pseudomonas*- og *Camamonas*-artene. Separasjonen av *Pseudomonas putida* og *Pseudomonas stutzeri* til separate prøver er helt i overensstemmelse med den nå gjeldende klassifikasjonsstilling for disse organismer (N.J. Palleroni et al., (1973), Int. J. Systematic Bacteriol., 23, 333-339; F. Gavini et al., (1989), samme sted, 39, 135-144; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, som ovenfor).

Det var klart ut fra det opprinnelige dendrogram at Pseudomonas stutzeri er en "outsider" til klynge 2 og har ikke nær forbindelse med de andre medlemmer av klyngen. Dette kan

sees når de euklidske distanser for stammene fra klyngens geometriske tyngdepunkt beregnes og anvendes til beregning av radiusen av klyngen (P.H.A. Sneath og R.R. Sokal som ovenfor, s. 194 et seq). Klyngeradiusen er 3,91 (99% konfidensnivå) og middelavstanden for stammene fra det geometriske tyngdepunkt er 2,84 (standardavvik 0,46). *Pseudomonas stutzeri* med en avstand fra det geometriske tyngdepunkt på 3,91 er tydelig helt på grensen til fenetisk hyperdistanse som definerer klynge 2.

En klar diskriminering mellom klynge 1 og 2 er mulig ved anvendelse av begrepet minimums-diskrimineringstestene (se nedenfor).

Hver av de alkalifile stammer i klynge 2 er blitt undersøkt av to uavhengige laboratorier som er eksperter på identifisering av bakterier, nemlig Tysk kultursamling (DSM, Braunschweig, FRG) og Laboratory for Microbiology ved Teknologiuniversitetet, Delft, Nederland. Ingen av disse laboratorier var i stand til å gi en positiv identifikasjon av stammene, skjønt begge var enige om at det var en likhet med *Pseudomonas*, som enten plasserte dem i RNA-homologigruppe I (N.J. Palleroni et al., som ovenfor) eller mer spesifikt i gruppene *Comamonas testosteroni/Pseudomonas alcaligenes* eller *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (F. Gavini et al., som ovenfor). Imidlertid er det ikke kjent noen *Pseudomonas*-arter som kan vokse under de samme sterkt alkaliske betingelser (pH 10) som de nye stammer beskrevet i det foreliggende. Det ble gjort et forsøk på å dyrke *Pseudomonas pseudoalcaligenes*^{T} DSM 50188 og *Pseudomonas alcaligenes*^{T} DSM 50342 i et alkalisk buljongmedium (Medium A, Vedlegg A), men uten hell.

Resultatene fra disse eksperter, sammen med de oppdagelser som er beskrevet her, viser tydelig at disse alkalifile stammer i klynge 1 og 2 representerer nye bakteriearter.

Klyngene 3, 4, 5 og 6 er adskilte fenoner som skiller seg fra hverandre på basis av minimums-diskrimineringstestene (se nedenfor) og kjemotaksonomiske markører (se nedenfor). Disse fenoner viser ingen betydelig likhet med kjente bakteriegrupper og representerer således nye slekter eller arter.

Helcelle-proteinmønstre frembragt ved PAGE-elektroforese viser at det er sannsynlig at en rekke stammer er identiske. Eksempler innbefatter: 1E.1^{CT} og 2E.1; 6B.1. 7B.1 og 8B.1; 45E.3^{CT} og 47E.3. Dendrogrammet viser at disse stammer er beslektet ved en gjennomsnittlig S_G-verdi på 92,3%, hvilket tyder på en sannsynlig testfeil på 3,8% (P.H.A. Sneath og R.R. Sokal, som ovenfor). Stammene 73bC.4 og 74C.4, som ser ut til å være nær beslektet (90% S_G), har lignende, men ikke identiske, gelmønstre.

S_J/UPGMA-metode

Jaccard-koeffisienten er et nyttig supplement til Gower-koeffisienten, siden den kan anvendes til påvisning av fenoner i sistnevnte fremkommet ved negative motstykker eller forvrengninger på grunn av at det ikke legges riktig vekt på potensielt subjektive kvalitative data. Følgelig er Jaccard-koeffisienten egnet til bekreftelse av gyldigheten av klynger som i begynnelsen er definert ved anvendelse av Gower-koeffisienten. Jaccard-koeffisienten er spesielt egnet ved sammenligning av biokjemisk ikke-reaktive organismer (B. Austin og F.G. Priest, som ovenfor, s. 37).

I hovedsaken fås alle klyngene som er dannet ved S_G/UPGMA-metoden i dendrogrammet som dannes ved S_J/UPGMA-metoden (fig. 2). Skjønt sammensetningen av klyngene hovedsakelig er identisk i begge dendrogrammer, har noen få stammer forandret posisjon. Ikke-klyngedannende stammer 4E.1 og 5E.1 går inn i klynge 1/5, stammene 42E.3 og 50N.3 går fra klynge 2 til klynge 3/4. Stammene wNk2, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, wE5 blir ikke-klyngedannende.

Ikke overraskende kombinerer S_J-transformasjonen (S_G)-klyngene 1 og 5. Begge disse klynger er karakterisert til å bestå av biokjemisk ganske ikke-reaktive stammer. Imidlertid er klyngene 1 og 5 klart forskjellige. Klynge 1 består av stammer som danner kremfarvede/beige sirkulære kolonier, mens stammene i klynge 5 utelukkende danner lysegule, uregelmessige kolonier.

Videre grupperer S_J-transformasjonen mesteparten av stammene i klynge 4 med stammene i klynge 3. Det er imidlertid klart ut fra de kjemotaksonomiske data (se nedenfor), som viser at stammene i klynge 4 inneholder Q9 og stammene i klynge 3 hovedsakelig Q6, at disse klynger ikke bør blandes, siden de inneholder klart forskjellige stammer. Av disse grunner regner man med at klyngedannelsen ved S_G/UPGMA-metoden er den bedre representasjon av den virkelige taksonomiske stilling for disse stammer. Imidlertid tjener S_J/UPGMA til ny understreking av at med det enkelte unntak av en *Comamonas*-art, har ingen av de kjente stammer, ikke engang *Pseudomonas*-kontrollstammene, noen betydelig likhet med klyngene av de nye alkalifile bakterier.

Kjemotaksonomisk definisjon av klyngene

Kjemotaksonomi er studiet av de kjemiske sammensetninger av organismer i forhold til deres systematikk. Analyse av kromosomal-DNA, ribosomal-RNA, proteiner, cellevegger og membraner kan f.eks. gi verdifullt innblikk i klassifiseringsslektskap og kan anvendes som et ytterligere redskap til konstruksjon eller verifisering av klassifiseringene av mikroorganismer (M. Goodfellow og D.E. Minnikin i Chemical Methods in Bacterial Systematics, (red. M. Goodfellow og D.E. Minnikin, Academic Press, London og Orlando, FL, (1985), s. 1-15). Det er imidlertid ikke alltid mulig å avgjøre på forhånd hvilken type kjemisk informasjon som vil være mest diagnostisk for en gitt klassifikasjon. De amfipatiske polare lipider, hoved-respirasjonskinonene, fettsyrer som finnes i bakteriemembranene og analyse av kromosomal-DNA har alle taksonomisk signifikans ved klassifikasjon av forskjellige bakterier (H. Lechevalier og M.P. Lechevalier i Microbial Lipids, vol. 1 (red. C. Ratledge og S.G. Wilkinson) Academic Press, London og San Diego, CA, (1988), s. 869-902).

Polare lipider

Ekstraksjon av polare lipider fra bakterier, og analyse av dem ved todimensjonal tynnsjiktkromatografi (2D-TLC) kan gi

mønstre av diagnostisk verdi. Stasjonærfase-celler blir ekstrahert i 1:1 (på volumbasis) $CHCl_3$:CH_3OH og undersøkt ved 2D-TLC som beskrevet av H.N.H. Rosse, W.D. Grant og J.E. Harris, i Chemical Methods in Bacterial Systematics, (red. M. Goodfellow og D.E. Minnikin), Academic Press, London og Orlando, FL. (1985), s. 289-300. Lipidtypene som fantes på kromatogrammene, ble visualisert ved anvendelse av flere forskjellige farvestoffer (H.N.M. Ross et al., som ovenfor, s. 291; og A. Trincone et al., J. Gen. Microbiol., (1990), 136, s. 2327-2331). Komponentenes identitet ble bekreftet ved ko-kromatografi med kjente lipider.

Resultatene av denne analyse når det gjelder representative stammer av gram-negative alkalifile bakterier er oppført i tabell 7. Disse viser intet klart mønster av polare lipider som er typisk for noen klynge. Alle stammene inneholder fosfatidylglycerol, difosfatidylglycerol, fosfatidylglycerolfosfat og fosfatidyletanolamin. Dessuten inneholder visse stammer, spesielt i klynge 3, fosfatidylglycerolsulfat (PGS). Fordelingen av PGS i klynge 3 stemmer i stor grad overens med den antatte undergruppestruktur av klyngen som fremgår av de fenetiske og andre kjemotaksonomiske data. PGS er derfor en ikke-eksklusiv markør for klynge 3.

Vi ble overrasket over å finne at hovedmengden av bakteriene inneholdt et glykolipid som på basis av tallrike ko-kromatografiske analyser viste seg å være felles for gram-negative bakterier ifølge foreliggende oppfinnelse. Glykolipider er tidligere ikke blitt vist å være til stede i alkalifile bakterier (T.A. Krulwich et al., CRC Critical Reviews in Microbiology, (1988), 16, 15-36). Ifølge bedømmelse ved ko-kromatografi av lipider oppnådd fra flere stammer, finnes videre glykolipidet også i gram-positive alkalifile organismer isolert fra natronsjøer. Det er derfor mulig at glykolipidets kjemiske struktur kan være en kjemotaksonomisk markør for obligat-alkalifilene.

Tabell 7

Polare lipidkomponenter i gram-negative alkalifile bakterier

Klynge	Stamme	PG	DPG	PGP	PE	PGS	GL	AL	UPL
	1E.1^{CT}	+	+	+	+				
	2E.1	+	+	+	+		+		
1	10B.1	+	+	+	+		3+		
	20N.1	+	+	+	+		+		
	27M.1	+	+		+		+		
	wNk.2	+	+	+	+				+
	39E.3	+	+	+	+		+		
	41E.3$_{CT}$	+	+	+	+		+		
	45E.3	+	+	+	+		+		
2	51N.3	+	+	+	+		+		
	52N.3	+	+	+	+		+		
	42E.3	+	+	+	+		+		
	50N.3	+	+	+	+	+			
	P.s.	+	+		+				
-	5E.1	+	+	+	+	+	+		+
	6B.1	+	+	+	+			+	
	7B.1	+	+	+	+		+		
	8B.1	+	+	+	+		+		
	25B.1	+	+	+	+		+		
	26N.1	+	+	+	+		+		
	12C.1$_{CT}$	+	+	+	+		+	+	
3	28N.1	+	+	+	+	+			
	36E.2	+	+	+	+	+	+		
	40E.3	+	+	+	+	+	+		
	94LM.4	+	+	+	+	+	+		
	19N.1	+	+	+	+		+		
	24B.1	+	+	+	+		+		
	21M.1	+	+	+	+		+		
	29C.1	+	+	+	+	+			
	35E.2	+	+	+	+	+			
	37E.2	+	+	+	+	+	+		
	48E.3	+	+	+	+	+	+		
	73aC.4	+	+	+	+	+	+		
	74C.4	+	+	+	+	+	+		
	49E.3	+	+	+	+	+	+		
	44E.3	+	+	+	+	+	+		
	58E.4	+	+	+	+		+		
	wE5$_{CT}$	+	+	+	+	+			
	wB4	+	+	+	+				
4	wNk1	+	+	+	+			+	+
	wEl1	+	+	+	+			+	+
	wEl2	+	+	+	+				+

Tabell 7 (forts.)

Klynge	Stamme	PG	DPG	PGP	PE	PGS	GL	AL	UPL
5	9B.1	+	+	+	+				
	16N.1$_{CT}$	+	+	+	+				
	17N.1	+	+	+	+		+		
	22M.1	+	+	+	+				
6	18N.1	+	+	+	+		+		
	59E.4$_{CT}$	+	+	+	+				
	64B.4	+	+	+	+				
	63N.4	+	+	+	+		+		
	53E.4	+	+	+	+		+		

(PG) fosfatidylglycerol; (DPG) difosfatidylglycerol;

(PGP) fosfatidylglycerolfosfat;

(PE) fosfatidyletanolamin;

(PGS) fosfatidylglycerolsulfat;

(GL) ikke-identifisert(e) glykolipid(er), α-naftol-positivt (positive) (antallet i kolonnen gir antallet positive flekker på TLC-platen);

(AL) ikke-identifisert aminolipid (ninhydrin-positivt);

(UPL) ikke-identifisert(e) fosfatlipid(er).

Isoprenoid-kinoner

Isoprenoid eller respirasjonskinoner er karakteristiske komponenter i plasmamembranen hos aerobe bakterier. Det er to typer; menakinoner og ubikinoner. Verdier av isoprenoid-kinoner som taksonomiske kriterier ligger i variasjonen i lengden av polyprenylsidekjeden og metningsgraden (M.D. Collins og D. Jones (1981), som ovenfor).

Frysetørkede stasjonærfase-bakterieceller ble ekstrahert under anvendelse av en modifisert fremgangsmåte av M.D. Collins (i Chemical Methods in Bacterial Systematics, som ovenfor, s. 267-284), i 1:1 (på volumbasis) $CHCl_3$:CH_3OH ved 50°C, i 16 timer. Kinonene ble undersøkt ved reversert-fase-tynnsjiktskromatografi som beskrevet av M.D. Collins (som ovenfor).

Resultatene av kinonanalyser av nesten alle stammene av gram-negative alkalifile bakterier er illustrert i tabell 8. Alle de undersøkte stammer inneholdt utelukkende ubikinoner som beskrefter deres stilling som gram-negative bakterier (M.D. Collins og D. Jones, som ovenfor). Tabell 8 viser helt klart at hovedmengden av ubikinonene er Q6 og Q9. Det fremgår også at stammene som inneholder Q6, er spesielle for klynge 3 og at dette skiller klynge 3 fra alle de andre klynger, siden de inneholder stammer som har Q9 som hoved-ubikinon.

Tabell 8

Hoved-respirasjonskinoner av stammene anordnet pr. klynge

Klynge 1 Stamme	Q	Klynge 2 Stamme	Q	Klynge 3 Stamme	Q
1E.1^{CT}	Q9	39E.3	Q9	6B.1	Q6
2E.1	Q9	41E.3$_{CT}$	Q9	7B.1	Q6, Q9
wB2	Q9	45E.3^{CT}	Q9,	8B.1	Q6, Q9
wB5	Q9	47E.3	Q9, Q10	38E.2	Q6
wBs4	Q9	52N.3	Q9	56E.4	Q6
10B.1	Q9	42E.3	Q9	25B.1	Q6, Q9
20N.1	Q9	50N.3	Q9	26N.1	Q6
27M.1*	Q9			12C.1$_{CT}$	Q6
C.t.*	[Q8+Q9(t)]			28N.1^{CT}	Q6
wNk2*	Q9			61N.4	Q6
P.p.*	[Q9]			36E.2	Q6
				40E.3	Q6, Q9
				65B.4	Q6
				94LM.4	Q6, Q9
				19N.1	Q6, Q9
				24B.1	Q6, Q9
				21M.1	Q6
				29C.1	Q6
				35E.2	Q6
				37E.2	Q6
				48E.3	Q6
				78LN.4	Q6
				73aC.4	Q6
				75C.4	Q6
				73bC.4	Q6
				74C.4	Q6, Q9
				77LN.4	Q6
				49E.3	Q6
				58E.4	Q6
				57E.4	Q6

Tabell 8 (forts.)

Klynge 4 Stamme	Q	Klynge 5 Stamme	Q	Klynge 6 Stamme	Q	Ikke-klynge-stamme	Q
wE5^{CT}	Q9	9B.1	Q9	18N.1	Q9	wN.2	Q9
wB4^{CT}	Q9	16N.1^{CT}	Q9	59E.4^{CT}	Q9	5E.1	Q8
wNk1	Q9	17N.1^{CT}	Q9,Q10	64B.4^{CT}	Q9	92LM.4	Q9
wW11	Q9,Q10(t)	22M.1	Q9	63N.4	Q9	wBn5	Q8,Q9(t)
wE12	Q9	22M.1	Q9	53E.4	Q9		

Q = Ubikinon; tallet angir antallet sidekjede-isopren-enheter.
(t) = spor
C.t. = *Comamonas terrigena*^{T} NCIMB 8193; kinonresultatet er fra J. Tamaoka et al., International Journal of Systematic Bacteriology, 37, 52-59, (1987).
P.p. = *Pseudomonas putida*^{T} NCIMB 9494; kinonresultatet er fra M.D. Collins og D. Jones, Microbiological Reviews, 45, 316-354, (1981).

Fettsyrer

Analyse av fettsyreprofiler har hatt en betydelig påvirkning på bakterie-klassifikasjon, særlig ved avgrensing av slekter og arter blant gram-positive bakterier og actino-myceter (R.M. Kroppenstedt, i Chemical Methods in Bacterial Systematics (red. M. Goodfellow og D.E. Minnikin), Academic Press; London og Orlando, FL, (1985), s. 173-199); H. Lechevalier og M.P. Lechevalier, som ovenfor.

Frysetørkede stasjonærfase-celler (200-300 mg) ble ekstrahert i 16 timer ved 75°C i toluen:metanol:kons. svovelsyre (2,5 ml:2,5 ml: 0,2 ml), og etter avkjøling ble lipidene oppdelt i heksan (2 ganger 1 ml). Restsyre ble fjernet ved anvendelse av NH_4HCO_3. Lipidekstraktene ble konsentrert under O_2-fritt N_2, oppløst i 300 µl heksan og påført på preparative silikagelplater (Merkc F254, Type T). Platene ble fremkalt i heksan:dietyleter 85:15 (på volum-basis), og fettsyre-metylesterne avskrapet, ekstrahert med heksan og konsentrert under en strøm av O_2-fritt N_2.

Fettsyre-metylesterne ble oppløst i heptan og analysert ved gasskromatografi ved anvendelse av en kromatograf av type

Packard modell 439 utstyrt med flamme-ioniseringsdetektorer. Prøvene ble delt ved hjelp av en prøvedelingsanordning og analysert samtidig over to kolonner, nemlig CP-SIL-88 (Chrompack) (lengde 50 meter, innvendig diameter 0,22 mm) og (Ultra-2 (Hewlwtt/Packard) (lengde 50 m, innvendig diameter . 0,20 mm). Bærergassen var nitrogen, injeksjonstemperaturen 120°C, temperaturgradienten 2,5°C/min., til 240°C, og isoterm ved 240°i 30 minutter. Fettsyremetylestere ble utpekt med kjente standardblandinger som referanse. Identiteten av noen topper ble bekreftet ved hjelp av gasskromatografi-masse-spektrometri under anvendelse av en gasskromatograf av typen Carlo Erba HRGC 5160 Mega-serier, utstyrt med en kolonne av typen CP-SIL-88 (lengde 50 m, innvendig diameter 0,22 mm) med helium som bærergass og direkte injeksjon i kilden til et massespektrometer av typen AMD 403.

Fettsyresammensetningene av representative individuelle gram-negative bakterier er oppført i tabell 9. Tabell 10 viser de unike fettsyreprofiler av hver av klyngene. Klynge 1, 2, 3 og 4 er ganske typisk for hovedmengden av gram-negative bakterier hvor den viktigste mettede fettsyre er C16:0 med mindre mengder av C14:0 og C18:0. De viktigste umettede fettsyrer i disse alkalifile bakterier er C16:0 og C18:1 (11-cis), som også er typisk, og det er også mangelen på fettsyrer med ulike tall (S.G. Wilkinson i Microbial Lipids, vol. 1 (red. C. Ratledge og S.G. Wilkinson) Academic Press, London og San Diego, Ca, (1988), s. 299-488). Mindre mengder av C17:0- og C19:0-cyklopropansyrer finnes i noen stammer av gram-negative bakterier. Stammene i klynge 3 viser ganske enkle fettsyreprofiler, hvor C16:0 og C18:1 bidrar med 67-88% av den totale mengde syrer, og C16:1 pluss C18:0 utgjør 20% av resten. Likevel understøtter fettsyremønstrene den oppfatning at klynge 3 inneholder flere undergrupper, en konklusjon som også fremkommer ved fenetiske (numerisk klassifikasjon) og polarlipid-analyser (tabell 7).

Stammene i klynge 1 kan skilles fra stammene i klynge 2 ved den relative rikelighet av rettkjedede mettede og umettede fettsyrer, såvel som de prosentvise mengder av C18:1 (11-cis).

De alkalifile bakterier i klynge 1 og 2 har mer komplekse fettsyreprofiler enn bakteriene i klynge 3, med mange flere mindre komponenter. Ut fra bekreftelsen ved numerisk klassifikasjon viser de alkalifile stammer i klynge 1 og 2 en viss likhet med *Pseudomonas*-arter. Imidlertid viser videre den totale mangel på hydroksy-fettesyrer som er typisk for de fleste *Pseuodomonas*-arter, at et nært slektskap er tvilsomt.

Stammene i klynge 5 og 6 er bemerkelsesverdige på den måte at ved siden av at de inneholder hovedmengder av C16:0, er de andre hoved-fettesyrer forgrenede, uliketall-syrer, (40-85%). Disse stammer mangler også betydelige mengder av C18:1 eller andre umettede syrer som finnes i vesentlige mengder i de alkalifile stammer i klynge 1, 2, 3 og 4. Tilstedeværelse av store mengder av C15:0- og C17:0-iso- og antiisosyrer er karakteristisk for bare noen meget få klasser av gram-negative bakterier, spesielt arter fra eksotiske miljøer, såsom Thermus, eller dårlig definerte typer såsom Flavobacterium (S.G. Wilkinson, som ovenfor). Dette resultat understreker videre nyheten av de alkalifile stammer ifølge foreliggende oppfinnelse. Stammene i klynge 5 og 6 kan skilles fra hverandre ved den andel av forgrenede fettsyrer de inneholder, og mer spesielt ved de relative andeler av like- og ulike tall-fettsyrer.

Tabell 9

Fettsyresammensetning[+] av gram-negative alkalifile bakterier

Klynge →	1		2	
Fettsyre	1E.1C[T]	2E.1	45E.3[CT]	50E.3
10:0				
12:0	t	t	3,6	4,7
12:1	0,2	0,3		
13:0			< 0,1	
14:0	0,7	0,7	3,8	3,9
14:0 iso				
14:1	2,6	0,9		
15:0		0,3	0,6	0,9
15:0 iso			0,1	0,2
15:0 anteiso			< 0,1	0,3
15:0 cyklo				
16:0	29,0	32,0	28,5	34,4
16:0 iso		0,3		0,2
16:1	7,4	9,6	4,1	4,3
17:0	0,5	2,3	0,9	1,1
17:0 iso			0,2	0,6
17:0 anteiso				
17:0 cyklo			0,4[a]	1,8
17:1	0,3	1,6		
17:1 br				1,7
18:0	12,0	4,7	17,9	10,8
18:0 ukjent	0,2	0,4		
18:1 9-cis	0,2	t	0,5	0,3
18:1 9-trans	0,5	0,6	5,9	2,9
18:1 11-cis	42,0	44,0	23,9	24,1
18:1 ukjent	0,2	0,3		
18:2			0,5	1,9
19:0			0,1	
19:0 cyklo				1,3
19:1 br				
20:0	0,4		5,3	2,7
20:1	3,6	1,2		
22:0			3,3	1,5
24:0			0,2	

\+ = % total mengde fettsyrer
t = spor
br = forgrenet
a = C17:0 cyklo eller C18:0 ukjent

Tabell 9 (forts.)

Klynge →	3					
Fettsyre	25B.1	28N.1^{CT}	36E.2	24B.1	37E.2	48E.3
10:0		0,4				
12:0		0,5	0,5		0,3	t
12:1						
13:0						
14:0	4,5	4,4	3,4	2,6	2,9	2,6
14:0 iso						
14:1		0,1				
15:0	0,7	0,6			0,9	0,3
15:0 iso						
15:0 anteiso						
15:0 cyklo						
16:0	37,3	24,1	42,0	36,7	33,3	26,0
16:0 iso						
16:1	11,6	15,0	10,0	5,8	3,4	8,0
17:0		0,2			1,2	0,3
17:0 iso						
17:0 anteiso						
17:0 cyklo					1,8	0,3
17:1	0,6					
17:1 br						
18:0	8,9	0,2	0,9	2,0	0,6	1,1
18:0 ukjent						
18:1 9-cis		t	t	t	0,6	t
18:1 9-trans	2,4	0,2	t	1,0	0,6	0,6
18:1 11-cis	27,5	54,2	43,0	50,6	41,6	57,7
18:1 ukjent						
18:2	2,7			0,5	t	t
19:0						
19:0 cyklo		0,4			12,9	2,0
19:1 br						
20:0	2,4					
20:1						
22:0	1,4					
24:0						

\+ = % total mengde fettsyre
t = spor
br = forgrenet
a = C17:0 cyklo eller C18:0 ukjent

Tabell 9 (forts.)

Klynge →	4		5		
Fettsyre	wB4^{CT}	WE11	9B.1	16N.1	17N.1^{CT}
10:0	0,5				
12:0	0,9	0,2			
12:1		0,8			
13:0					
14:0	3,8	1,3	3,2	1,9	1,2
14:0 iso			0,7	t	t
14:1		0,1			
15:0	0,7	0,2			
15:0 iso			8,7	9,3	8,2
15:0 anteiso			32,3	27,1	35,3
15:0 cyklo	<0,1				
16:0	26,8	26,9	22,5	17,4	12,5
16:0 iso			4,7	5,8	6,7
16:1	7,9	2,4			
17:0	0,4	0,3			
17:0 iso		0,3	3,2	6,0	5,3
17:0 anteiso			21,9	24,4	29,8
17:0 cyklo	0,2				
17:1	<0,1				
17:1 br					
18:0	5,2	3,5	2,3	5,3	1,2
18:0 ukjent					
18:1 9-cis	t	2,5			
18:1 9-trans	1,7	0,9	*0,5	*1,6	*1,0
18:1 11-cis	47,4	48,1			
18:1 ukjent					
18:2	1,0	0,3			
19:0					
19:1 cyklo	1,0				
19:1 br		11,2			
20:0	1,3	0,4			
20:1		0,3			
22:0	0,8	0,2			
24:0					

* = innbefatter alle C18:1-isomerer
\+ = total mengde fettsyrer
br = forgrenet
a = C17:0 cyklo eller C18:0 ukjent

Tabell 9 (forts.)

Klynge →	6		ikke-klyngedannende	
Fettsyre	59E.4	64B.4^{CT}	5E.1	92LM.4
10:0				
12:0				
12:1				
13:0				
14:0	3,9	6,4	3,8	1,5
14:0 iso	0,7	2,0		
14:1				
15:0	t	3,8	t	
15:0 iso	3,9	12,6		44,0
15:0 anteiso	24,8	18,1		9,9
15:0 cyklo				
16:0	26,3	40,5	74,7	18,7
16:0 iso	2,4	3,7		2,1
16:1			2,9	
17:0	t	2,4		
17:0 iso	0,6	1,7		15,7
17:0 anteiso	6,1	3,7		6,8
17:0 cyklo				
17:1				
17:1 br				
18:0	16,2	4,8	2,6	1,5
18:0 ukjent			5,9	
18:1 9-cis				
18:1 9-trans	*5,7	*0,5	*10,0	
18:1 ukjent				
18:2	2,7			
19:0				
19:0 cyklo				
19:1 br				
20:0	4,6			
20:1				
22:0	2,6			
24:0				

* = innbefatter alle C18:1 isomerer
\+ = % total mengde fettsyrer
t = spor
br = forgrenet
a = C17:0 cyklo eller C18:0 ukjent

Tabell 10

Fettsyreprofiler av klyngene av gram-negative alkalifile bakterier

	Klynge			
	1	2	3A/B	3C
Hovedmengde av fett-syrer (> 10%)	C16:0 C18:1 11 cis	C16:0 C18:0 C18:1 11-cis	C16:0 C16:1 C18:1 11-cis	C16:0 C18:1 11-cis
n-mettet	~ 40%	60 - 65%	30 - 55%	~ 40%
n-umettet	~ 60%	, 33%	45 - 70%	~ 60%
iso	< 1%	< 1%	0%	0%
anteiso	0%	< 1%	0%	0%
total mengde forgrenede	< 1%	< 3%	0%	0%
cyklo	0%	< 5%		0%
liketall karbonatomer	> 95%	> 90%	> 99%	> 99%
uliketall karbonatomer	< 5%	< 10%	< 1%	< 1%
ytterligere markører		C17:0 cyklo C19:0 cyklo C17:1 br		

br = forgrenet

309198

Tabell 10 (forts.)

	Klynge			
	3D	4	5	6
Hovedmengde av fett-syrer (> 10%)	C16:0 C18:1 11-cis	C16:0 C18:1 11-cis	C15:0 anteiso C16:0 C17:0 anteiso	C15:0 br C16:0
n-mettet	30 - 40%	30 - 40%	15 - 30%	55 - 60%
n-umettet	50 - 65%	50 - 60%	< 2%	< 10%
iso	0%	< 1%	~ 20%	10 - 20%
anteiso	0%	0%	50 - 650%	20 - 30%
total mengde forgrenede	0%	1 - 12%	> 70%	~ 40%
cyklo	2 - 15%	< 2%	0%	0%
liketall karbonatomer	> 80%	> 85%	20 - 35%	55 - 65%
uliketall karbonatomer	< 20%	< 15%	65 - 80%	35 - 45%
ytterligere markører	C17:0 cyklo C19:0 cyklo			

br = forgrenet

309198

Nukleinsyrer

En viktig komponent ved alle klassifikasjonsundersøkelser er en analyse av det genetiske materiale - nukleinsyrene. Sammensetningen av kromosomal-DNA er upåvirket av vekstbetingelsene for organismen, og en hensiktsmessig analyse kan bekrefte eller motbevise organismens taksonomiske posisjon. Kromosomal-DNA kan analyseres ved bestemmelse av basesammensetningen (G+C mol%) for individuelle stammer, og basesekvenshomologiene mellom stammepar ved DNA-DNA-reassosiasjon (hybridisering) (R.J. Owen og D. Pitcher i Chemical Methods i Bacterial Systematics (red. M. Goodfellow og D.E. Minnikin), Academic Press, London og Orlando, FL (1985), s. 67-93).

DNA-basesammenstning

Sammensetningen av guanin pluss cytosin (G+C mol%) er konstant for kromosomal-DNA for enhver gitt organisme. Nær beslektede organismer har lignende G+C-sammensetninger. Imidlertid må G+C-resultatene tolkes på bakgrunn av uavhengige taksonomiske data, siden lignende G+C mol% av DNA-prøver fra forskjellige organismer ikke i seg selv tyder på biologisk slektskap.

DNA ble ekstrahert fra celler dyrket til eksponensiell fase i medium A ved kloroform:fenol-metoden, og ble utfelt med etanol. Basesammensetningen ble bestemt ved den termiske denatureringsmetode (J. Marmur og P. Doty (1962), J. Mol. Biol., 3, 585-594) på et spektrofotometer av typen Phillips modell PV8764 med temperaturprogrammering. En annen metode innbefattet HPLC-analyse på en Beckman-systemgull under anvendelse av en kolonne av typen Beckman-ultrasfære ODS og 0,04 M kaliumdihydrogenfosfat pluss acetonitril (9 + 1, på volumbasis) som elueringsmiddel med en strømningshastighet på 1,5 ml/min., etter behandling av DNA med nuklease-P1 og alkalisk fosfatase.

Resultatene av disse analyser er oppført i tabell 11. G+C-mol%-verdiene for de alkalifile bakterier dekker et område på 30 mol% (37,6 - 67,1 mol%). Innenfor klyngene er imidlertid variasjonen bare 3 - 7 mol%, som ytterligere beskrefter at stammene i en klynge er nær beslektet med hverandre.

Tabell 11

DNA-basesammensetning av gram-negative alkalifile bakterier

Klynge	Stamme	G+C mol% HPLC	T_M
1	2E.1	55,2	
	wBs4		51,2
	20N.1	51,1	
	wNk2		53,0
2	42E.2	62,7	
3	wB1		63,0
	28N.1^{CT}	64,1	
	37E.2	67,1	
	wN1		64,8
4	wE5$_{CT}$		58,5
	wB4^{CT}		65,3
	wNK1		61,0
	wEl1		59,7
	wEl2		58,1
5	17N.1^{CT}	50,0	
	22M.1	43,8	
6	64B.4^{CT}	41,0	
	53E.4	37,6	
ingen	wN2		64,1
	wBn5		54,6

DNA-DNA-molekylhybridisering

Den anvendte metode var i hovedsaken metoden ifølge J.H. Crosa et al., (Int. J. Systematic Bacteriol., 29, 328-332, 1979). Tritium-merket DNA ble tillaget ved anvendelse av et "nick"-translasjonssett (Amersham, N5000) ifølge fabrikantens instruksjoner. Gjenforeningsblandingene ble inkubert ved 65°C i 16 timer. Resultatene er oppført i tabell 12, fra

hvilken det vil kunne sees at DNA-sekvenshomologien er høyere innenfor klyngene enn mellom klyngene.

Tabell 12

Interklynge- og intraklynge-DNA-DNA-homologiverdier for gram-negative alkalifile bakterier

Klynge		1	2	3	4	5	6
	Stamme	2E.1	45E.3^{CT}	2BN.1^{CT}	wEl2	17N.1^{CT}	64B.4^{CT}
1	2E.1	100		33	35	25	25
	20N.1	56					
2	45E.3^{CT}		100		25		
	42E.3		76			30	
	28N.1^{CT}	20	34	100	26	30	30
	56E.4			51			
3	21M.1			53			
	37E.2		37				
	44E.3			55			
4	wEl2^{CT}				100		
	wB4			41	43		
5	17N.1^{CT}	45	44	36	24	100	44
	22M.1					65	
6	64B.4^{CT}	21	31	35	25	34	100
	53E.4						60
	SS	17				20	20

Verdiene viser prosentvis hybridisering mellom stammene (rader) og ^{3}H-merkede stammer (kolonner).
SS = laksespermie-DNA.

Bestemmelse av representative stammer

Det geometriske tyngepunkt i enhver individuell klynge fremkommet ved S_G/UPGMA-metoden ble beregnet under anvendelse av RGROUPS-programmet i TAXPAK. Det geometriske tyngepunkt i en klynge av punkter som representerer virkelige organismer, projisert i hyper-rom representerer en hypotetisk gjennomsnittsorganisme. Det geometriske tyngdepunkt representerer sjelden, hvis noen gang, en virkelig organisme. Derfor ble de euklidske avstander for hver av medlemmene i klyngen fra klyngens geometriske tyngepunkt beregnet for fastsettelse av hvilken stamme som var nærmest den hypotetiske gjennomsnittsorganisme. Stammen som var nærmest det geometriske tyngdepunkt, ble betegnet "centrotype"-organismen (vist med tilf¢yelsen "CT" over linjen).

Man kan forestille seg centrotype-organismen som den "stammetype" som er nærmest til å representere de vesentlige og diskriminerende trekk ved hver spesiell klynge. Centrostammetypene er oppf¢rt i tabell 13.

Tabell 13

Centrotype-stammer

Klynge nummer	Antall stammer i klynge	Euklidisk middelavstand for stammer fra centroid	Standardavvik	Centrotype	
				Stamme	Euklidisk avstand fra centroid
1	11	3,67	0,30	1E.1	2,88
2	9	3,20	0,52	45E.3	2,30
3	34	3,52	0,32	28N.1	2,90
4	5	3,97	0,29	wB4	2,87
5	4	3,25	0,29	17N.1	2,13
6	5	3,11	0,41	64B.4	1,93

En beskrivelse av hver av centro-organismetypene er blitt gjort for at disse organismer skal kunne skjelnes fra alle andre bakterier som tidligere er kjent og beskrevet. Dessuten er minimumsantallet av diskrimineringstester for definering av hver klynge blitt beregnet slik at det tydelig kan sees at

klyngene som inneholder disse nye bakterier, lett kan skjelnes fra hverandre og fra alle andre kjente bakterier.

Beskrivelse av centro-stammetyper

Stamme 1E.1^{CT} (klynge 1)

En aerob, bevegelig, gram-negativ stavformet bakterie, 1,7-3,3 μm x 0,5-0,7 μm.

Obligat alkalifile bakterier, vokser best mellom pH 9 og 10.

På alkalisk agar (medium A) dannes det glatte, krem-farvede kolonier, i begynnelsen gjennomskinnelige, men de blir opake etter noen få dager. Koloniene er sirkulære, hele og konvekse, men diameter 2-3 mm.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) fnugg-aktig med dannelse av et bunnfall og overflatehinne.

Vokser godt mellom 20 og 40°C. Vokser langsomt ved 10-15°. Ingen ved 8 eller 45°C.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	svakt positiv
Oksydase:	negativ
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	fra 0% til <8%. Ingen vekst ved 8%
Hydrolyse av gelatin:	positiv
Hydrolyse av stivelse:	positiv
Hovedmengde av polare lipid-komponenter:	fosfatidylglycerol difosfatidylglycerol fosfatidylglycerolfosfat fosfatidyletanolamin
Hoved-ubikinon:	Q9
Hovedmengde fettsyrer:	C16:0, C18:0, 11-cis C18:1

Kjemoorganotrof. Vokser på komplekse substrater såsom gjærekstrakt og peptoner. Vokser på enkle sukkerarter og organiske syrer meget begrenset (f.eks. vekst bare observert på ribose, sakkarose og pyruvat).

Stamme 45E.3^{CT} (klynge 2)

En aerob, gram-negativ, stavformet bakterie, 3-4,5 μm x 0,6 μm. Bevegelig ved hjelp av en enkelt polar flimmertråd.

Obligat alkalifil bakterie som vokser mellom pH 7,8 og 11,2. På alkalisk agar (Medium A) dannes glatte, opake,

kremfarvede kolonier, med diameter 1-2 mm. Koloniene er sirkulære, konvekse og hele.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) langsom, liten med jevn turbiditet, overflatehinne og intet bunnfall.

Vokser godt mellom 20 og 40°C. Vokser langsomt ved 10°C. Ingen vekst ved 8 eller 45°C.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	positiv
Oksydase:	positiv
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	0%-12%. Veksten ved 12% er langsom Ingen vekst ved 15%
Hydrolyse av gelatin:	positiv
Hydrolyse av stivelse:	positiv (svak)
Hovedmengde av lipid-komponenter:	fosfatidylglycerol difosfatidylglycerol fosfatidylglycerolfosfat fosfatidyletanolamin glycolipid (α-naftol-positiv)
Hoved-ubikinon:	Q9
Hovedmengde fettsyrer:	C16:0, C18:0, 11-cis C18:1

Kjemoorganotrof. Vokser på komplekse substrater såsom gjærekstrakt og peptoner. Ingen vekst på enkle sukkerarter. Vokser på organiske syrer (f.eks. fumarat, suksinat, pyruvat, acetat, laktat) og noen fettsyrer (f.eks. propionat, valerat) og aminosyrer (f.eks. prolin, alanin, fenylalanin).

Stamme 28N.1^{CT} (klynge 3)

En aerob, bevegelig, gram-negativ, stavformet bakterie, 4,8-5,5 μm x 0,6-0,8 μm. Obligat alkalifil bakterie som vokser mellom pH 8,5 og 10,7.

På alkalisk agar (Medium A) dannes glatte, sirkulære, opake kolonier med en seig konsistens. Koloniene har konveks profil og hel kant. Kolonifarven er i begynnelsen kremaktig/-beige, men blir lyserød etter noen få dager.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) massiv, fnuggaktig med en overflatehinne og bunnfall.

Vokser godt mellom 20 og 45°C. Vokser langsomt ved 10 og 15°C. Ingen vekst ved 50°C.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	positiv

Oksydase:	positiv
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	0%-12%. Ingen vekst ved 15%
Hydrolyse av gelatin:	negativ
Hydrolyse av stivelse:	positiv
Hovedmengde lipid-komponenter:	fosfatidylglycerol difosfatidylglycerol fosfatidylglycerolfosfat fosfatidylglycerolsulfat fosfatidyletanolamin
Hoved-ubikinon:	Q6
Hovedmengde av fettsyrer:	C16:0, C16:1, 11-cis C18:1
G+C:	64,1 mol% (HPLC)

Kjemoorganotrof. Vokser godt på komplekse substrater såsom gjærekstrakt og peptoner. Vokser på enkle sukkerarter, organiske syrer, fettsyrer og aminosyrer.

Stamme wB4^{CT} (klynge 4)

En aerob, gram-negativ, stavformet bakterie, 3-4 µm x 0,6-0,8 µm, forekommer ofte som cellepar.

Alkalifil, vokser godt mellom pH 7,5 og 10,9.

På alkalisk agar (Medium A) dannes glatte, beige til brune kolonier. Koloniene er noe variable: størrelse: 1 - >5 mm, sirkulær til uregelmessig form, svakt konveks eller oppstående profil med bølgete eller hel kant.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) fnugg-aktig, bunnfalls-dannende med en overflatehinne.

Vokser best mellom 15 og 45°C, ingen vekst ved 50°C.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	positiv
Oksydase: meget svakt positiv, kan sees på som	negativ
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	0%-=12%. Ingen vekst ved 15%
Hydrolyse av gelatin:	negativ
Hydrolyse av stivelse:	negativ
Hovedmengde lipid-komponenter:	fosfatidylglycerol difosfatidylglycerol fosfatidylglycerolfosfat fosfatidyletanolamin
Hoved-ubikinon:	Q9
Hovedmengde av fettsyrer:	C16:0, 11-cis C18:1
G+C:	65,3 mol% (T_M)

Kjemoorganotrof. Vokser godt på komplekse substrater såsom gjærekstrakt. Veksten er begrenset på enkle sukker-

arter. Vokser på organiske syrer (f.eks. laktat, acetat, fumarat), fettsyrer (f.eks. propionat, valerianat, kaprat) og aminosyrer (f.eks. prolin, serin, lysin).

Stamme 17N.1^{CT} (klynge 5)

En aerob, gram-negativ, lang, tynn, stavformet bakterie 5,5 - 10,5 µm x 0,6 µm, som noen ganger danner korte cellekjeder. Med tiden dominerer pleomorfe, egenartede, oppsvulmede former.

Obligat alkalifil bakterie, vokser best mellom pH 8 og 10,5.

På alkalisk agar (Medium A) dannes, glatte, opake, gule kolonier med diameter 2-3 mm. Formen på koloniene varierer fra sirkulær til uregelmessig, med konveks til pukkelformet profil, og hel, bølget eller fliket kant, avhengig av alder.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) jevn og bunnfalls-dannende uten noen overflatehinne.

Vokser godt mellom 15 og 37°C. Vokser langsomt ved 10°C og ikke i det hele tatt ved 8°C. Ingen vekst ved 40°C eller over dette.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	svakt positiv
Oksydase:	negativ
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	0%-<12%, vokser best ved 0% NaCl
Hydrolyse av gelatin:	positiv
Hydrolyse av stivelse:	svakt positiv
Hovedmengde av polare lipid-komponenter:	fosfatidylglycerol difosfatidylglycerol fosfatidylglycerolfosfat fosfatidyletanolamin glykolipid (α-naftol-positiv
Hoved-ubikinon:	Q9, Q10
Hovedmengde fettsyrer:	C15:0 anteiso, C16:0, C17:0 anteiso
G+C	50,0 mol% (HPCl)

Kjemoorganotrof. Vokser godt på komplekse substrater såsom gjærekstrakt. Vekst på enkle sukkerarter er begrenset (f.eks. vekst bare observert på fruktose; ingen vekst observert på glukose, ribose, laktose). Vokser på organiske

syrer (f.eks. fumarat, suksinat, pyruvat, 2-ketoglukonat) og aminosyrer.

Stamme 64B.4^{CT} (klynge 6)

En aerob, gram-negativ, stavformet bakterie 2,0-3,5 µm x 0,8-1,0 µm.

Obligat alkalifil bakterie, vokser best mellom pH 8,2 og 10,9.

På alkalisk agar (Medium A) dannes glatte, opake kolonier, først med kremaktig gul farve, og blir deretter beige med alderen. Koloniene har en diameter på ca. 4 mm, sirkulær som blir uregelmessig; flat eller svakt konveks profil, som blir konveks; med en hel kant som blir bølgeformet.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) jevn, bunnfallsdannende uten noen overflatehinne.

Vokser godt ved 15-45°C, ingen vekst vekst ved 10 eller 50°C.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	negativ
Oksydase:	positiv
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	0%-½12%, ingen vekst ved 15%
Hydrolyse av gelatin:	positiv
Hydrolyse av stivelse:	svakt positiv
Hovedmengde av polare lipid-komponenter:	fosfatidylglycerol difosfatidylglycerol fosfatidylglycerolfosfat fosfatidyletanolamin glykolipid (α-naftol-positiv)
Hoved-ubikinon:	Q9
Hovedmengde fettsyrer:	C15:0 iso, C15:0 anteiso, C16:0
G+C:	41,0 ± 0,9 mol% (HPLC)

Kjemoorganotrof. Vokser godt på komplekse substanser såsom gjærekstrakt. Vokser på noen enkle sukkerarter (f.eks. glukose, ribose, maltose og fruktose), organiske syrer (f.eks. acetat, laktat, citrat og fumarat), noen fettsyrer (f.eks. propionat og kaprat) og aminosyrer (f.eks. prolin, histidin og alanin).

Ikke-klyngedannende stammer

Stammene som ikke kommer inn under de klynger som er definert i det foreliggende, er også nye bakterier som ikke tidligere er kjent eller beskrevet. Disse stammer, med koder wN2, 4E.1, 5E.1, 92LM.4 og wBn5, kan representere sjeldnere typer av alkalifile bakterier og er sannsynligvis medlemmer av bakterieklynger som representerer nye slekter og arter som på det nåværende tidspunkt ikke er beskrevet. En beskrivelse av disse "ikke-klyngedannende" stammer er blitt gjort for at man skal kunne skille disse organismer fra alle andre bakterier som tidligere er kjent og beskrevet.

Stamme wN2

En aerob, gram-negativ, bevegelig, stavformet bakterie, ofte i par.

Obligat alkalifil bakterie, vokser best mellom pH 9 og 10.

På alkalisk agar (Medium A) dannes glatte, gjennomskinnelige, beige-farvede kolonier med diameter 1-2 mm. Koloniene er sirkulære, konvekse med hel kant.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) fnuggaktig med en ring eller overflatehinne og dannelse av bunnfall.

Vokser godt ved 20-30°C. Ingen vekst ved 15 eller 40°C.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	svakt positiv
Oksydase:	svakt positiv
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	obligat halofil, vekst ved 4% NaCl ingen vekst ved 0% eller 8% NaCl
Hydrolyse av gelatin:	langsom positiv
Hydrolyse av stivelse:	positiv
Hoved-ubikinon:	Q9
G+C:	64,1 (T_M)

Kjemoorganotrof. Metabolsk ikke-reaktiv. Ingen vekst på enkle sukkerarter eller organiske syrer. Vokser på komplekse substrater såsom gjærekstrakt og peptoner, og på noen aminosyrer.

Stamme 4E.1

En aerob, gram-negativ, bevegelig, stavformet bakterie, 1,7-5,2 μm x 0,75 μm.

Obligat alkalifil bakterie, vokser best mellom pH 8,2 og 10,9.

På alkalisk agar (medium A) dannes glatte, opake, beige eller brunfarvede kolonier med diameter 2-4 mm. Koloniene har sirkulær form, konveks profil, med hel kant.

I alkalisk buljong (medium A) er veksten (37°C) massiv og fnuggaktig med bunnfall og overflatehinne.

Vokser godt mellom 20 og 37°C. Vokser meget langsomt ved 10°C og ikke i det hele tatt ved 8°C. Ingen vekst ved 40°C eller over dette.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	positiv
Oksydase:	meget svakt positiv, kan se ut som negativ
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	0%-12%, kan vokse svakt ved 15%
	ingen vekst ved 20%
Hydrolyse av gelatin:	negativ
Hydrolyse av stivelse:	negativ

Kjemoorganotrop. Vokser ikke på enkle sukkerarter, bortsett fra ribose. Vokser godt på komplekse substrater såsom gjærekstrakt, og på organiske syrer (f.eks. suksinat, pyruvat, citrat, malonat, acetat og laktat), fettsyrer (f.eks. propionat, valerionat og suberat) og aminosyrer (f.eks. prolin, serin, histidin og lysin).

Stamme 5E.1

En aerob, gram-negativ, stavformet bakterie, 3,0-5,3 μm x 1,3 μm.

Obligat alkalifil bakterie, vokser best mellom pH 9 og 10,5.

PÅ alkalisk agar (Medium A) dannes glatte, opake, brunfarvede kolonier med diameter 3-4 mm. Koloniene har en ganske uregelmessig form, generelt flat til lett pukkelformet i profil, med fliket kant.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) moderat til massiv, og blir fnuggaktig med bunnfall og overflatehinne.

Vokser godt mellom 20 og 40°C. Vokser langsomt ved 10°C. Ingen vekst ved 45°C.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	positiv
Oksydase:	negativ
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	0%-12%, kan vokse svakt ved 15% ingen vekst ved 20%
Hydrolyse av gelatin:	positiv
Hydrolyse av stivelse:	svakt positiv
Hovedmengde av polare lipid-komponenter:	fosfatidylglycerol difosfatidylglycerol fosfatidylglycerolfosfat fosfatidylglycerolsulfat fosfatidyletanolamin glykolipid (α-naftol-positiv)
Hoved-ubikinon:	Q8
Hovedmengde fettsyrer:	C16:0, C18:1

Kjemoorganotrof. Vokser ikke på enkle sukkerarter. Vokser godt på komplekse substrater såsom gjærekstrakt, organiske syrer (f.eks. pyruvat, citrat, acetat og laktat), fettsyrer (f.eks. propionat, kaprat og valerianat) og aminosyrer (f.eks. prolin, alanin og lysin).

Stamme 92LM.4

En aerob, gram-negativ, stavformet bakterie, 2,0-3,5 μm x 0,5 x 1,0 μm.

Obligat alkalifil bakterie, ingen vekst under pH 7,5.

På alkalisk agar (Medium A) dannes glatte, kremfarvede kolonier, i begynnelsen gjennomskinnelige, men som blir opake. Koloniene utvikles fra sirkulær, hel, til uregelmessig, fliket form, med konveks profil.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) langsom, svak, fnuggaktig med bunnfall, men ingen overflatehinne.

Vokser mellom 10 og 40°C, ingen vekst ved 8 eller 45°C.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	negativ
Oksydase:	positiv
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	0%-15%, veksten ved 15% er langsom ingen vekst ved 20%
Hydrolyse av gelatin:	positiv
Hydrolyse av stivelse:	svakt positiv

Hoved-ubikinon:	Q9
Hovedmengde av fettsyrer:	C15:0 iso, C15:0 anteiso, C16:0, C17:0 iso

Kjemoorganotrof. Vokser på komplekse substrater såsom gjærekstrakt og peptoner og på forskjellige sukkerarter, organiske syrer og aminosyrer.

Stamme wBn5

En aerob, gram-negativ, liten, stavformet bakterie, som ofte danner korte cellekjeder.

Obligat alkalifil bakterie, ingen vekst under pH 8.

På alkalisk agar (Medium A) dannes glatte, sirkulære, konvekse kolonier med hel kant, med diameter ca. 1 mm. Koloniene er i begynnelsen kremfarvet/beige, gjennomskinnelig, blir opake, brune.

I alkalisk buljong (Medium A) er veksten (37°C) i begynnelsen jevnt uklar med bunnfall, men uten overflatehinne; blir etter 4 dager fnuggaktig med dannelse av en hinne.

Vokser ved 30 og 37°C. Ingen vekst ved ved 40°C.

KOH-test:	positiv
Aminopeptidase:	positiv
Oksydase:	positiv
Katalase:	positiv
NaCl-tolerans:	obligat halofil. Vekst ved 4% NaCl ingen vekst ved 0% eller 8%
Hydrolyse av gelatin:	langsomt positiv
Hydrolyse av stivelse:	negativ
Hoved-ubikinon:	Q8, Q9
G+C:	54,6 mol% (T_M)

Kjemoorganotrof. Vokser på en rekke komplekse substrater såsom gjærekstrakt og peptoner, såvel som sukkerarter, organiske syrer, fettsyrer og aminosyrer.

Klyngedefinisjon ved beregning av minimums-antallet for diskriminerende tester, og konstruksjon av en sannsynlighetsmatriks for identifikasjon av gram-negative alkalifile bakterier

Ett av formålene ved en numerisk klassifiserings-undersøkelse er å anvende de fenetiske data, som definerer klyngene ved et utvalgt likhetsnivå, for utpeking eller

identifisering av ukjente stammer. Klassifikasjons-testdataene kan anvendes for bestemmelse av det minimums-testsett som fordres for definering av klyngene ved 73% (S_G)-likhetsnivået, og for identifisering av de egenskaper som er mest diagnostiske (forutsigbare) for de individuelle klynger. Med andre ord, det minimumsantall tester som fordres for å henføre en ukjent organisme til en forutbestemt klynge med en høy grad av forutsigbarhet.

Ut fra minimums-diskriminatortestene kan det konstrueres en sannsynlighetsmatriks for identifikasjon av ukjente stammer. Analysen oppnås ved anvendelse av en kombinasjon av CHARSEP- og DIACHAR- (TAXPAK)- og MCHOICE- (ikke på TAXPAK men kan fås ved Datapost fra Universitetet i Leicester, U.K.)-programmene. En vurdering av identifikasjonsmatriksen fås ved anvendelse av MOSTTYP- og OVERMAT-programmene. Praktiske eksempler på anvendelse av disse programmer for sannsynlighetsidentifikasjon av bakterier er blitt publisert av S.T. Williams et al., (1983), J. Gen. Microbiol., 129, s. 1815-1830; og F.G. Priest og B. Alexander (1988), J. Gen. Microbiol. 134, s. 3011-3018; samme sted, (1990), 136, s. 367-376.

En "n x t"-tabell ble konstruert ut fra testdataene ved anvendelse av egenskapsnummerne 6-10 og 13-104 (Vedlegg C) oppført i totallssystem (positiv = 1, negativ = 0). Denne datamatriks ble supplert med følgende fire ekstra-egenskapstilstander:

[105] Lysegule kolonier (egenskap nr. 1, Vedlegg C)
[106] Gjenomskinnelige kolonier (dyrket på Medium A, Vedlegg A)
[107] Lipase (lipolytisk aktivitet i olivenolje (Medium M))
[108] Oksydase-positiv innen 10 sek. (test 9, Vedlegg B)

Datamatriksen undersøkes først ved anvendelse av CHARSEP-programmet, som beregner separasjonsindekser og således den diagnostiske verdi av de individuelle egenskaper for skjelning mellom klyngene. Tester med en VSP-indeks > 25% (P.H.A. Sneath (1979), Computers and Geosciences, 5, 349-357) ble godtatt, og egenskaper med lav diagnostisk verdi (VSP < 25%) ble forkastet. Det gis preferanse for egenskaper med de høyeste VSP-indekser, under forutsetning av at kriteriene i

DIACHAR- og MCHOICE-programmene også oppfylles. I dette eksempel har 38 tester en VSP-indeks >25%, og 9 av de 24 egenskaper som er valgt til slutt, har en VSP-indeks >50% (tabell 11).

Datamatriksen undersøkes deretter på nytt ved hjelp av DIACHAR-programmet, som bestemmer de mest diagnostiske egenskapstilstander for hver av klyngene. Antallet egenskaps-tilstander ble satt til 10. Dette resultat gjør mulig valg av egenskapstilstander klyngene seg imellom som gjensidig utelukker hverandre. Så mange som mulig av disse tester beholdes i den endelige identifiseringsmatriks av minimums-diskrimineringstester; i dette eksempel mellom 6 og 9 diagnostiske egenskaper pr. klynge. De gjenværende, ubrukte tester noteres også og kan anvendes som ytterligere tester for bekreftelse av identifikasjon (tabell 12).

MCHOICE-programmet ordner testene i grupper som kan vises frem i form av et dendrogram under anvendelse av MDEND-sub-rutinen. Gruppene identifiserer tester med lignende diskrimi-neringsverdi, og gir således mulighet for forkastelse av tester som ikke gir noen signifikant diskriminering, likesom det blir mulig å velge mellom tester med lik diagnostisk verdi eller med diagnostisk verdi som har stor likhet.

Tabell 13 viser settet med 24 tester som er det minimums-antall som fordres for definering av klyngene, og som kan anvendes for utpeking av ukjente stammer. Dessuten viser tabell 13 identifikasjonsmatriksen som består av prosent-andelen av positive egenskaper som definerer klyngene på basis av de 24 minimums-diskrimineringstester. Dette er beregnet ved IDMAT-programmet.

Tabell 14

Separasjonsverdier for egenskaper anvendt for minimums-diskrimineringstestene

Egenskap		VSP-indeks
[23]	N-acetylglukosamin	35,4
[26]	Sakkarose	44,8
[27]	Maltose	41,4
[32]	Laktat	51,6
[41]	Propionat	60,9
[43]	Valerianat	63,4
[44]	Citrat	45,1
[45]	Histidin	38,0
[47]	Glykogen	31,7
[51]	3-hydroksybutyrat	66,1
[52]	4-hydroksybenzoat	38,0
[58]	Leucin-arylamidase	36,6
[59]	Valin-arylamidase	50,5
[64]	Fosfohydrolase	52,8
[65]	α-galaktosidase	33,9
[85]	Ampicillin	36,8
[92]	Fusidinsyre	68,7
[93]	Methicillin	58,3
[99]	Polymixin	62,8
[102]	Vancomycin	48,3

Tabell 15

Diskrimineringstester for hver av de seks klynger (S_G)

Klynge 1: kremfarvede, sirkulære, opake, mukoide kolonier.

Positiv		Negativ	
[58]	Leucin-arylamidase (91%)	[23]	N-acetylglukosamin (9%)
[59]	Valin-arylamidase (91%)	[27]	Maltose (9%)
[64]	Fosfohydrolase (91%)	[41]	Propionat (9%)
[99]	Polymix (89%)	[42]	Kaprat
		[43]	Valerat (9%)
		[44]	Citrat (9%)
		[45]	Histidin
		[47]	Glykogen (9%)
		[52]	4-hydroksybenzoat
		[65]	α-galaktosidase

Klynge 2: små, kremfarvede, gjennomskinnelige kolonier.

Positiv		Negativ	
[21]	Stivelse	[23]	N-acetylglukosamin
[31]	Acetat	[26]	Sakkarose
[41]	Propionat	[45]	Histidin
[43]	Valerat	[50]	2-ketoglukonat
[53]	Prolin	[52]	4-hydroksybenzoat
[107]	Lipase	[68]	α-glukosidase
[108]	Oksydase (innen 10 sek.)	[69]	ß-glukosidase

Klynge 3: kremfarvede, opake kolonier.

Positiv		Negativ	
[31]	Acetat	[64]	Fosfohydrolase (3%)
[32]	Laktat	[65]	α-galaktosidase (3%)
[41]	Propionat (94%)	[92]	Fusidinsyre (3%)
[43]	Valerat (97%)	[96]	Tetracyklin (3%)
[44]	Citrat (94%)	[102]	Vancomycin
[51]	3-hydroksybutyrat (94%)	[104]	Bacitracin
[53]	Prolin		
[58]	Leucin-arylamidase (94%)		

Klynge 4: beige til brun, opake kolonier.

Positiv		Negativ	
[32]	Laktat	[45]	Histidin
[33]	Alanin	[85]	Ampicillin
[48]	3-hydroksybutyrat	[86]	Naladixinsyre
[59]	Valin-arylamidase	[88]	Trimethoprim
[99]	Polymixin	[89]	Penicillin G
		[93]	Methicillin

Tabell 15 (forts.)

Diskrimineringstester for hver av de seks klynger (S_G)

Klynge 5: lysegule, [105], opake kolonier.

Positiv		Negativ	
[64]	Fosfohydrolase	[23]	N-acetylglukosamin
[65]	α-galaktosidase	[32]	Laktat
[66]	ß-galaktosidase	[33]	L-alanin
[85]	Ampicillin	[34]	Mannitol
[92]	Fusidinsyre	[41]	Propionat
[93]	Methicillin	[42]	Kaprat
[96]	Tetracyklin	[43]	Valerat
[102]	Vancomycin	[45]	Histidin
[104]	Bacitracin	[48]	3-hydroksybenzoat
		[51]	3-hydroksybutyrat
		[52]	4-hydroksybenzoat
		[99]	Polymixin

Klynge 6: kremfarvede, uregelmessige, flate kolonier.

Positiv		Negativ	
[21]	Stivelse	[17]	Pyruvat
[23]	N-acetylglukosamin	[52]	4-hydroksybenzoat
[26]	Sakkaraose	[58]	Leucin-arylamidase
[27]	Maltose	[59]	Valin-arylamidase
[31]	Acetat	[65]	α-galaktosidase
[33]	Alanin	[99]	Polymixin
[44]	Citrat		
[47]	Glykogen		
[51]	3-hydroksybutyrat		
[89]	Penicillin G		
[92]	Fusidinsyre		
[93]	Methicillin		
[96]	Tetracyklin		
[104]	Bacitracin		

Anmerkning: Tallene i hakeparentes foran egenskaps-tilstanden angir egenskapstilstandene og enhetstestene i Vedlegg D og C. Prosentandelen i parentes angir positive egenskapstilstander.

Tabell 16

Sannsynlighetsmatriks for identifisering av alkalifile bakterier: Prosentvis fordeling av positive diskriminer-ingsegenskaper som definerer klyngene av gram-negative alkalifile bakterier ved 73%-nivået (S_G)

		Klynge					
	Test	1	2	3	4	5	6
[23]	N-acetylglukosamin	13	0	26	20	0	100
[26]	Sakarose	25	0	74	20	25	100
[27]	Maltose	25	0	68	60	50	100
[32]	Laktat	38	50	100	100	0	40
[41]	Propionat	0	100	91	60	0	80
[43]	Valerat	13	100	97	80	0	40
[44]	Citrat	13	50	94	20	50	100
[45]	Histidin	0	0	71	0	0	80
[47]	Glykogen	0	13	26	20	25	100
[51]	3-hydroksybutyrat	13	25	94	100	0	100
[52]	4-hydroksybenzoat	0	0	71	80	0	0
[58]	Leucin-arylamidase	88	63	94	60	50	0
[59]	Valin-arylamidase	88	25	65	100	25	0
[64]	Fosfohydrolase	88	13	3	20	75	40
[65]	α-galaktosidase	0	0	3	20	75	0
[85]	Ampicillin	50	63	56	0	100	80
[92]	Fusidinsyre	25	0	3	20	100	100
[93]	Methicillin	50	13	50	0	100	100
[99]	Polymixin	88	50	81	100	0	0
[102]	Vancomycin	13	13	3	20	100	75
[105]	Gul koloni	0	0	0	0	100	0
[106]	Gjennomskinnelig koloni	0	100	3	0	0	0
[107]	Lipase	0	100	21	0	0	0
[108]	Oksydase (10 sek.)	25	88	6	0	0	0

Vurdering av diskrimineringstestene og av identifiseringens pålitelighet

Vurderingen av diskrimineringstestene har to aspekter. For det første kan testenes gyldighet analyseres ved anvendelse av praktiske eksempler, som kan vurderes videre ved anvendelse av statistisk teori, eller testene kan direkte underkastes teoretisk vurdering ved anvendelse av statistiske metoder.

Illustrasjon 1

En praktisk vurdering av diskrimineringstestene

Mange forskere fastsetter nøyaktigheten av diskrimineringstestene bare ved å bestemme på nytt egenskapstilstandene for utvalgte klyngerepresentanter. Denne fremgangsmåte er blitt anvendt her for centro-stammetypene (se nedenfor). En mye grundigere fremgangsmåte som sjelden anvendes, er å undersøke alle stammene som ble anvendt ved den opprinnelige numeriske taksonomiske analyse. Når det rekonstruerte dendrogram underkastes klynge-analyse hvor det bare anvendes de data som fås ved det avledede sett av minimums-diskrimineringstester, kan det sammenlignes med det opprinnelige. Ved anvendelse av kun de 24 diskrimineringstester som er beskrevet tidligere (tabell 16), ble dataene (to-tilstands-, binær form) for alle de 70 nye gram-negative alkalifile bakterier underkastet klynge-analyse ved S_G/UPGMA-metoden. Det rekonstruerte dendrogram er reprodusert på fig. 3. Dette rekonstruerte dendrogram er meget gunstig sammenlignet med det opprinnelige dendrogram (fig. 1).

Skjønt det har vært en viss omordning av klyngenes posisjon, er sammensetningen av dem i stor grad uforandret, og de er definert ved omtrent det samme likhetsnivå som det opprinnelige. Klynge 4 er imidlertid blitt blandet med klynge 3, idet en enkelt stamme er overført til klynge 1. Dette tjener videre til understreking av vanskeligheten med definering av klynge 4 bare ved fenetiske data. Det er flere ganger blitt understreket at supplerende kjemotaksonomiske

data fordres for fullgod skjelning mellom klynge 3 og klynge 4.

I både det opprinnelige dendrogram og rekonstruksjonen (fig. 3) viser det seg at klynge 3 omfatter flere underklynger over 73% likhetsnivået. Den fine struktur av klynge 3 understøttes også ved de kjemotaksonomiske data (se ovenfor).

Illustrasjon 2

En teoretisk vurdering av diskrimineringstestene

En vurdering av klyngeoverlapping oppnås ved anvendelse av OVERMAT-programmet. Dette program undersøker matriksen som er konstruert ut fra de prosentvise positive verdier for de utvalgte egenskapstilstander, mot en kritisk overlappings-verdi, ved betraktning av klyngene definert ved koordinatene for centroiden og klyngeradiusen (to ganger rotmiddelkvadrat av avstandene for stammene fra det geometriske tyngdepunkt). Hvis det er en betydelig overlapping mellom klyngene, vil man kanskje ikke kunne identifisere noen ukjente stammer med tilstrekkelig sikkerhet (P.H.A. Sneath og R.R. Sokal, som ovenfor, s. 394-400). Ved en valgt kritisk overlappingsverdi på 2,5% (som er en strengere betingelse enn det som anvendes av de fleste forskere; se F.G. Priest og B. Alexander (1988), som ovenfor; og S.T. Williams et al., (1983), som ovenfor) var det ingen betydelig overlapping mellom klyngene (95% konfidensnivå) bortsett fra mellom klynge 3 og klynge 4, hvor den virkelige overlapping ble beregnet til 4%. Imidlertid ble det ikke tatt hensyn til kjemotaksonomiske data (se ovenfor) ved konstruksjon av identifikasjonsmatriksen. PÅ basis av kinonanalyser kan stammer fra klynge 3 skjelnes fra stammene i klynge 4.

Illustrasjon 3

En teoretisk vurdering av identifikasjonspåliteligheten

Den hypotetiske medianorganisme (HMO) er en annen beregning av den "gjennomsnittlige" organisme i en klynge (P.H.A. Sneath og R.R. Sokal, som ovenfor, s. 194 og følgende). En HMO er ikke en virkelig stamme, men en hypotetisk

organisme som representerer den mest vanlige tilstand for hver egenskap. MOSTTYP-programmet beregner HMO'er for hver klynge i identifikasjonsmatriksen og forsøker så og identifisere dem. Med andre ord er MOSTTYP et program for vurdering av en identifikasjonsmatriks ved beregning av identifikasjonspoeng for de mest typiske stammer i forhold til klyngene. En god identifikasjonsmatriks bør gi høy sannsynlighet for at en HMO tilbakeføres til sin egen klynge. Resultatene av denne analyse var meget tilfredsstillende (tabell 17), særlig siden MOSTTYP var programmert til bare å ta hensyn til de første 20 diagnostiske tester i identifikasjonsmatriksen (tabell 16), d.v.s. at testene 105-108 ble utelukket. Hver HMO ble tilbakeført til sin opprinnelige klynge med Willcox-sannsynligheter på 0,998-1,000 (W.R. Willcox et al., (1973) J. Gen. Microbiol., 77, 317-330). De taksonomiske avstander var alle lave, og standardfeilene for de taksonomiske avstander var alle negative, hvilket viser at HMO'ene alle var nærmere klyngens geometriske tyngdepunkt enn gjennomsnittet for klyngen (tabell 17).

Tabell 17

Identifikasjonspoeng for den hypotetiske median-organisme i hver klynge tilveiebragt ved MOSTTYP-programmet

	Identifikasjonspoeng		
Klynge	Willcox-sannsynlighet	Taksonomisk avstand	Standardfeil for taksonomisk distanse
1	0,999	0,194	- 2,742
2	0,999	0,236	- 2,214
3	1,000	0,231	- 2,115
4	0,998	0,195	- 2,998
5	1,000	0,217	- 1,839
6	1,000	0,182	- 2,502

Illustrasjon 4

En praktisk vurdering av identifikasjonspoeng

Identifikasjon av stammer ved anvendelse av minimums-settet av diskrimineringstester oppnås ved anvendelse av

MATIDEN-programmet i TAXPAK. Programmet sammenligner tilstedeværelse-fraværs-data for en ukjent stamme i forhold til hver klynge etter tur i en identifikasjonsmatriks med prosentvise positive egenskaper. Identifikasjonskoeffisienter beregnes, nemlig Willcox sannsynlighet, taksonomisk avstand og standardfeilen for den taksonomiske avstand. Resultatene fremvises og viser identifikasjonspoengene for den beste klynge og for de to nest beste alternative klynger. Dessuten noteres de atypiske resultater ("egenskaper mot"). Ved en analyse hvor det anvendes data fra virkelige stammer, ble centrotypene tilbakeført til sine opprinnelige klynger med Willcox-sannsynligheter på 0,9996-1,000 (tabell 18). De taksonomiske avstander var lave. Standardfeilene for den taksonomiske avstand var alle negative, hvilket viser at centrotypene var nærmere det geometriske tyngdepunkt for klyngen enn gjennomsnittet for klyngen.

Tabell 18

Identifikasjonspoeng for centrotypeorganismene i hver klynge tilveiebragt ved MATIDEN-programmet

			Identifikasjonspoeng		
Klynge	Stamme	Henført til klynge	Willcox-sannsyn-lighet	Taksonomisk avstand (D)	Standard-feil for D
1	$2E.1_{CT}$	1	1,000	0,309	- 0,283
2	$45E.3_{CT}$	2	1,000	0,226	- 1,749
3	$28N_{CT}.1$	3	1,000	0,305	- 0,622
4	$wB4_{CT}$	4	0,9996	0,265	- 1,092
5	$17N.1_{CT}$	5	0,9999	0,255	- 0,478
6	$64N.4_{CT}$	6	1,000	0,211	- 1,126

Illustrasjon 5

Identifikasjon av ukjente isolater

Identifikasjonsmatriksen ble fastsatt med hensyn til evnen til henføring av ukjente gram-negative alkalifile bakterier til klyngene definert i det foreliggende. Kriteriene for en vellykket identifikasjon var:

(a) bakterier isolert fra et sted som var likt, men geografisk adskilt fra, de øst-afrikanske natronsjøer,

(b) en Willcox-sannsynlighet større enn 0,95 og lave verdier for taksonomisk avstand og dens standardfeil (<3),

(c) et identifikasjonspoeng overfor den beste klynge, betydelig bedre enn mot de to nest beste alternativer,

(d) "egenskaper mot" den beste klynge bør være null eller noen få i antall.

Ukjente mikroorganismer kan undersøkes ved anvendelse av minimumstestene oppregnet i tabell 16. Egenskapstilstandene bestemmes og identifikasjonspoeng oppnås ved anvendelse av MATIDEN-programmet. Dette program sammenligner egenskapstilstandene for den ukjente prøve med identifikasjonsmatriksen som er bestemt for alle de for-bestemte klynger, beregner det beste motstykke og henfører den ukjente prøve til den mest passende klynge.

En Willcox-sannsynlighet beregnes for bestemmelse av identifikasjonens godtagbarhet. Willcox-sannsynligheter på 0,85 og 0,95 er blitt godkjent som kriterier for en vellykket identifikasjon (S.T. Williams et al., (1983), som ovenfor, F.G. Priest og B. Alexander (1988), som ovenfor). Den taksonomiske avstand for den ukjente prøve fra klyngens geometriske tyngdepunkt beregnes og kan sammenlignes med klyngens radius. Standardfeilen for den taksonomiske avstand bør være mindre enn den øvre verdi på +3,0 som er foreslått av P.H.A. Sneath ((1979), s. 195-213). Videre kan fysiske karakteregenskaper, ytterligere biokjemiske data og kjemotaksonomiske markører anvendes for ytterligere bekreftelse av identiteten for den ukjente prøve i en spesiell klynge.

Resultatene som tilveiebringes ved disse fem illustrasjoner, sammen med de statistiske data tilveiebragt ved den numeriske taksonomiske analyse og de kjemotaksonomiske data, viser en robust klassifikasjon som identifiserer 6 hovedgrupper av nye, gram-negative, alkalifile bakterier.

Fremstilling og anvendelse av alkali-tolerante enzymer

De alkalifile mikroorganismer ifølge foreliggende oppfinnelse danner mange forskjellige alkali-tolerante enzymer. Eksempler på enzymaktiviteter som finnes i representative stammer av de gram-negative bakterier ifølge foreliggende oppfinnelse kan finnes i Vedlegg D og E. Disse enzymer kan utføre sine funksjoner ved meget høy pH, hvilket gjør dem unikt egnet for anvendelse i mange forskjellige prosesser som fordrer slik enzymatisk aktivitet i miljøer eller reaksjonsbetingelser med høy pH.

Eksempler på de forskjellige anvendelser for alkali-tolerante enzymer er i vaskemiddelblandinger, lærgarving, matvarebehandling, avfallsbehandling og i tekstilindustrien. Disse enzymer kan også anvendes for biotransformasjoner, særlig ved fremstilling av rene enantiomerer.

De alkalifile bakterier ifølge foreliggende oppfinnelse kan lett undersøkes med hensyn til dannelse av f.eks. alkali-tolerante lipaser, proteaser og stivelses-nedbrytende enzymer, ved anvendelse av fremgangsmåtene beskrevet i det foreliggende.

Buljongen som alkalifile bakterier dyrkes i, inneholder typisk én eller flere typer enzymatisk aktivitet. Buljongen som inneholder enzymet eller enzymene, kan anvendes direkte i den ønskede prosess etter fjerning av bakteriene fra den ved hjelp av f.eks. sentrifugering eller filtrering.

Hvis ønskelig, kan dyrkningsfiltratet konsentreres ved frysetørking før eller etter dialyse, eller ved ultra-filtrering. Enzymene kan også gjenvinnes ved utfelling og filtrering. Alternativt kan enzymet eller enzymene som finnes i buljongen, isoleres og renses ved f.eks. kromatografi eller gelelektroforese, før anvendelse ved den ønskede prosess. De nøyaktige metoder som anvendes for behandling av dyrknings-filtratet og/eller for ekstraksjon og/eller rensing av de alkali-tolerante enzymer, er ikke avgjørende for den foreliggende oppfinnelse og kan bestemmes av en fagmann på området.

Genene som koder for aktuelle alkali-tolerante enzymer, kan klones og uttrykkes i organismer som kan uttrykke det ønskede enzym i ren eller lett gjenvinnbar form.

Følgende eksempler er tilveiebragt for illustrering av metoder for identifikasjon av gram-negative alkalifile bakterier ifølge foreliggende oppfinnelse, såvel som metoder til undersøkelse av disse alkalifile bakterier med hensyn til tilstedeværelse av forskjellige alkali-tolerante enzymer, og metoder for etterfølgende produksjon og anvendelse av disse enzymer i industrielle prosesser. Disse eksempler illustrerer foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 1

Identifikasjon av ukjente isolater

Seks stammer av gram-negative, alkalifile bakterier ble isolert fra Mono Lake, en alkalisk innsjø med høyt saltinnhold som ligger i California, USA. (B. Javor i Hypersaline Environments, Springer Verlag, Berlin og Heidelberg (1988), s. 303-305). Stammene ble isolert fra prøver av delvis neddykket soda-overtrukket tre, tuff og soda-jord oppsamlet fra omgivelsene rundt Mono Lake (California, U.S.A.) i mai 1990 ved anrikingsdyrkning ved 37°C i Medium A (Vedlegg A). De seks stammer er beskrevet i tabell 19. Stammene ble undersøkt under anvendelse av 21 av de 24 minimumstester oppregnet i tabell 16. Egenskapstilstandene ble bestemt og identifiseringspoeng oppnådd ved anvendels av MATIDEN-programmet. Resultatene er vist i tabell 20.

Tabell 19

Alkalifile stammer fra Mono Lake

		Koloni				
Stamme	Prøve	Farve	Form	Profil	Kant	Celle-form
ML005	tuff	beige	sirkulær	konveks	hel	stav
ML104	tre	lyserød/beige	sirkulær	konveks	hel	stav
ML201	tre	gul	sirkulær	konveks	hel	stav
ML203	tre	lyserød/beige	sirkulær	konveks	hel	stav
ML206	tre	gul	sirkulær	konveks	hel	kort stav
ML301	jord	beige	sirkulær	konveks	hel	stav

Tabell 20

Eksempel på verdier fra MATIDEN-programmet for identifisering av seks ukjente stammer mot identifikasjonsmatriksen

A. Referansenummer for ukjent prøve er ML005

Egenskap	Verdi i ukjent prøve	Prosent i: Beste taksonomiske gruppe	Nest beste taksonomiske gruppe
[23] N-acetylglukosamin	+	26	20
[26] Sakkarose	+	74	20
[27] Maltose	+	68	60
[32] Laktat	+	99	99
[41] Propionat	+	91	60
[43] Valerat	+	97	80
[44] Citrat	+	94	20
[45] Histidin	+	71	1
[47] Glykogen	+	26	20
[51] 3-hydroksybutyrat	+	94	99
[52] 4-hydroksybenzoat	-	71	80
[58] Leucin-arylamidase	+	94	60
[59] Valin-arylamidase	+	65	99
[64] Fosfohydrolase	-	3	20
[65] α-galaktosidase	n.t.	3	20
[85] Ampicillin	-	56	1
[92] Fusidinsyre	-	3	20
[93] Methicillin	-	50	1
[99] Polymix	+	81	99
[102] Vancomycin	-	3	20
[105] Gul koloni	-	1	1
[106] Gj.-skinnelig koloni	n.t.	3	1
[107] Lipase	n.t.	21	1
[108] Oksydase (10 sek.)	+	6	1

n.t. = ikke testet

Beste isolat ML005-identifikasjon er klynge 3. Poeng for koeffisienter: 1 (Willcox-sannsynlighet), 2 (taksonomisk avstand), 3 (standardfeil for taksonomisk avstand).

	1	2	3
Klynge 3	0,9999	0,407	1,475
Klynge 4	$0,8266 \times 10^{-4}$	0,526	4,490
Klynge 2	$0,4086 \times 10^{-7}$	0,584	6,296

Egenskaper mot	Klynge 3 % i taksonomisk gruppe	Klynge 3 Verdi i ukjent prøve
[108] Oksydase (10 sek.)	6	-

Ytterligere egenskaper som hjelper ved adskillelse av:

	Klynge 3 %	fra	Klynge 4 %
[106] Gjennomskinnelig koloni	3		99
[107] Lipase	21		99

B. Referansenummer for ukjent prøve er ML104

Egenskap	Verdi i ukjent prøve	Prosent i: Beste taksonomiske gruppe	Nest beste taksonomiske gruppe
[23] N-acetylglukosamin	-	13	1
[26] Sakkarose	-	25	1
[27] Maltose	-	25	1
[32] Laktat	-	38	50
[41] Propionat	-	1	99
[43] Valerat	-	13	99
[44] Citrat	-	13	50
[45] Histidin	-	1	1
[47] Glykogen	-	1	13
[51] 3-hydroksybutyrat	-	13	25
[52] 4-hydroksybenzoat	-	1	1
[58] Leucin-arylamidase	+	88	63
[59] Valin-arylamidase	+	88	25
[64] Fosfohydrolase	+	88	13
[65] α-galaktosidase	n.t.	1	1
[85] Ampicillin	-	50	63
[92] Fusidinsyre	-	25	1
[93] Methicillin	-	50	13
[99] Polymix	+	88	50
[102] Vancomycin	-	13	13
[105] Gul koloni	-	1	1
[106] Gj.-skinnelig koloni	n.t.	1	99
[107] Lipase	n.t.	1	99
[108] Oksydase (10 sek.)	+	25	88

n.t. = ikke testet

Beste isolat ML104-identifikasjon er klynge 1. Poeng for koeffisienter: 1 (Willcox-sannsynlighet), 2 (taksonomisk avstand), 3 (standardfeil for taksonomisk avstand).

	1	2	3
Klynge 1	0,9999	0,271	-1,108
Klynge 2	$0,825 \times 10^{-5}$	0,473	3,797
Klynge 4	$0,407 \times 10^{-7}$	0,534	4,767

Egenskaper mot	Klynge 1 % i taksonomisk gruppe	Klynge 1 Verdi i ukjent prøve

(ingen)

Ytterligere egenskaper som hjelper ved adskillelse av:

	Klynge 1 %	fra	Klynge 2 %
[106] Gjennomskinnelig koloni	1		99
[107] Lipase	1		99

	Klynge 1 %	fra	Klynge 4 %

(ingen)

C. Referansenummer for ukjent prøve er ML201

Egenskap	Verdi i ukjent prøve	Prosent i: Beste taksonomiske gruppe	Nest beste taksonomiske gruppe
[23] N-acetylglukosamin	-	1	13
[26] Sakkarose	-	25	25
[27] Maltose	-	50	25
[32] Laktat	-	1	38
[41] Propionat	-	1	1
[43] Valerat	-	1	13
[44] Citrat	-	50	13
[45] Histidin	-	1	1
[47] Glykogen	-	25	1
[51] 3-hydroksybutyrat	-	1	13
[52] 4-hydroksybenzoat	-	1	1
[58] Leucin-arylamidase	+	50	88
[59] Valin-arylamidase	+	25	88
[64] Fosfohydrolase	+	75	88
[65] α-galaktosidase	n.t.	75	1
[85] Ampicillin	+	99	50
[92] Fusidinsyre	+	99	25
[93] Methicillin	+	99	50
[99] Polymix	-	1	88
[102] Vancomycin	+	99	13
[105] Gul koloni	+	99	1

[106] Gj.-skinnelig koloni	n.t.	1	1
[107] Lipase	n.t.	1	1
[108] Oksydase (10 sek.)	-	1	25

n.t. = ikke testet

Beste isolat ML201-identifikasjon er klynge 5. Poeng for koeffisienter: 1 (Willcox-sannsynlighet), 2 (taksonomisk avstand), 3 (standardfeil for taksonomisk avstand).

	1	2	3
Klynge 5	0,9999	0,267	-0,176
Klynge 1	$0{,}825 \times 10^{-4}$	0,437	2,435
Klynge 2	$0{,}177 \times 10^{-11}$	0,641	7,593

Egenskaper mot	Klynge 5 % i taksonomisk gruppe	Verdi i ukjent prøve
(ingen)		

Ytterligere egenskaper som hjelper ved adskillelse av:

	Klynge 5 %	fra	Klynge 1 %
[65] α-galaktodiase	75		1

	Klynge 5 %	fra	Klynge 2 %
[65] α-galaktodiase	75		1
[106] Gjennomskinnelig koloni	1		99
[107] Lipase	1		99

D. Referansenummer for ukjent prøve er ML203

Egenskap	Verdi i ukjent prøve	Prosent i: Beste taksonomiske gruppe	Nest beste taksonomiske gruppe
[23] N-acetylglukosamin	+	26	20
[26] Sakkarose	+	74	20
[27] Maltose	+	68	60
[32] Laktat	+	99	99
[41] Propionat	+	91	60
[43] Valerat	+	97	80
[44] Citrat	+	94	20
[45] Histidin	+	71	1
[47] Glykogen	+	26	20
[51] 3-hydroksybutyrat	+	94	99
[52] 4-hydroksybenzoat	+	71	80
[58] Leucin-arylamidase	+	94	60
[59] Valin-arylamidase	+	65	99
[64] Fosfohydrolase	-	3	20

[65]	α-galaktosidase	n.t.	3	20
[85]	Ampicillin	-	56	1
[92]	Fusidinsyre	-	3	20
[93]	Methicillin	-	50	1
[99]	Polymix	+	81	99
[102]	Vancomycin	+	3	20
[105]	Gul koloni	-	1	1
[106]	Gj.-skinnelig koloni	n.t.	3	1
[107]	Lipase	n.t.	21	1
[108]	Oksydase (10 sek.)	+	6	1

n.t. = ikke testet

Beste isolat ML203-identifikasjon er klynge 3. Poeng for koeffisienter: 1 (Willcox-sannsynlighet), 2 (taksonomisk avstand), 3 (standardfeil for taksonomisk avstand).

	1	2	3
Klynge 3	0,9989	0,437	2,076
Klynge 4	$0,1090 \times 10^{-2}$	0,526	4,590
Klynge 2	$0,8137 \times 10^{-9}$	0,650	7,793

Egenskaper mot	Klynge 3	
	% i taksonomisk gruppe	Verdi i ukjent prøve
[102] Vancomycin	3	+
[108] Oksydase (10 sek.)	6	+

Ytterligere egenskaper som hjelper ved adskillelse av:

	Klynge 3	fra	Klynge 4
	%		%

(ingen)

E. Referansenummer for ukjent prøve er ML206

Egenskap		Verdi i ukjent prøve	Prosent i: Beste taksonomiske gruppe	Nest beste taksonomiske gruppe
[23]	N-acetylglukosamin	-	1	13
[26]	Sakkarose	+	25	25
[27]	Maltose	-	50	25
[32]	Laktat	-	1	38
[41]	Propionat	-	1	1
[43]	Valerat	-	1	13
[44]	Citrat	-	50	13
[45]	Histidin	-	1	1
[47]	Glykogen	+	25	1
[51]	3-hydroksybutyrat	-	1	13
[52]	4-hydroksybenzoat	-	1	1

[58]	Leucin-arylamidase	+	50	88
[59]	Valin-arylamidase	+	25	88
[64]	Fosfohydrolase	+	75	88
[65]	α-galaktosidase	n.t.	75	1
[85]	Ampicillin	+	99	50
[92]	Fusidinsyre	+	99	25
[93]	Methicillin	+	99	50
[99]	Polymix	-	1	88
[102]	Vancomycin	+	99	13
[105]	Gul koloni	+	99	1
[106]	Gj.-skinnelig koloni	n.t.	1	1
[107]	Lipase	n.t.	1	1
[108]	Oksydase (10 sek.)	-	1	25

n.t. = ikke testet

Beste isolat ML206-identifikasjon er klynge 5. Poeng for koeffisienter: 1 (Willcox-sannsynlighet), 2 (taksonomisk avstand), 3 (standardfeil for taksonomisk avstand).

	1	2	3
Klynge 5	0,9999	0,345	1,766
Klynge 1	$0{,}2530 \times 10^{-5}$	0,512	4,013
Klynge 6	$0{,}2531 \times 10^{-13}$	0,652	10,883

Egenskaper mot	Klynge 5	
	% i taksonomisk gruppe	Verdi i ukjent prøve
(ingen)		

Ytterligere egenskaper som hjelper ved adskillelse av:

	Klynge 5 %	fra	Klynge 1 %
[65] α-galaktosidase	75		1

F. Referansenummer for ukjent prøve er ML301

Egenskap	Verdi i ukjent prøve	Prosent i: Beste taksonomiske gruppe	Nest beste taksonomiske gruppe
[23] N-acetylglukosamin	-	26	1
[26] Sakkarose	+	74	1
[27] Maltose	+	68	1
[32] Laktat	+	99	50
[41] Propionat	+	91	99
[43] Valerat	+	97	99
[44] Citrat	+	94	50
[45] Histidin	+	71	1
[47] Glykogen	+	26	13
[51] 3-hydroksybutyrat	+	94	25

[52]	4-hydroksybenzoat	-	71	1
[58]	Leucin-arylamidase	+	94	63
[59]	Valin-arylamidase	+	65	25
[64]	Fosfohydrolase	-	2	13
[65]	α-galaktosidase	n.t.	3	1
[85]	Ampicillin	+	56	63
[92]	Fusidinsyre	-	3	1
[93]	Methicillin	+	50	13
[99]	Polymix	+	81	50
[102]	Vancomycin	-	3	13
[105]	Gul koloni	-	1	1
[106]	Gj.-skinnelig koloni	n.t.	3	99
[107]	Lipase	n.t.	21	99
[108]	Oksydase (10 sek.)	+	6	88

n.t. = ikke testet

Beste isolat ML301-identifikasjon er klynge 3. Poeng for koeffisienter: 1 (Willcox-sannsynlighet), 2 (taksonomisk avstand), 3 (standardfeil for taksonomisk avstand).

	1	2	3
Klynge 3	1,000	0,429	1,918
Klynge 2	$0{,}2841 \times 10^{-6}$	0,603	6,731
Klynge 4	$0{,}9313 \times 10^{-8}$	0,623	6,704

Egenskaper mot	Klynge 3	
	% i taksonomisk gruppe	Verdi i ukjent prøve
[108] Oksydase (10 sek.)	6	+

Ytterligere egenskaper som hjelper ved adskillelse av:

	Klynge 3 fra	Klynge 2
	%	%
[106] Gjennomskinnelig koloni	3	99
[107] Lipase	21	99

Eksempel 2

Dannelse av proteolytiske enzymer

To alkalifile stammer (1E.1 og 9B.1) ble undersøkt med hensyn til dannelse av proteolytisk(e) enzym(er) i 7 forskjellige medier balansert ved alkalisk pH. Forsøkene ble utført i 2 liters rystekolber med skvalpeplate, og hver av kolbene inneholdt 400 ml av næringsmediene R-X (Vedlegg A). Kolbene ble anbragt i en inkubator med rotering i krets med 280 opm ved konstant temperatur på 37°C. Prøver av dyrkningsmedier ble fjernet fra kolbene med mellomrom på 1, 2, 3, 4, 5, 6, og 8 dager for bestemmelse av enzyminnholdet, som uttrykkes i

alkaliske Delft-enheter (ADU - som beskrevet i britisk patent nr. 1.353.317).

Tabell 21 viser de maksimale enzymutbytter og pH i dyrkningsmediet i det øyeblikk hvor målingen av enzymnivåene ble utført.

Tabell 21

Dannelse av proteolytiske enzymer

	Stamme 1E.1^{CT}		Stamme 9B.1	
Medium	ADU/ml	pH i medium	ADU/ml	pH i medium
R	100	8,2	14	9,7
S	140	8,5	49	9,1
T	111	8,7	6	9,1
U	6	9,7	4	9,7
V	51	9,5	7	9,6
W	94	9,2	7	9,3
X	100	9,6	28	9,6

Resulatet av prøven viser tydelig tilstedeværelse av proteolytiske enzymer, dannet av de alkalifile bakterier ifølge foreliggende oppfinnelse, i dyrkningsbuljongen.

Eksempel 3

Vaskeytelsesundersøkelse ved anvendelse av proteolytiske enzymer

Enzympreparater fra de alkalifile bakterier ble undersøkt i en spesielt utviklet mini-vasketest under anvendelse av tøystykker av bomull (2,5 x 2,5 cm) tilsmusset med melk, blod og blekk (levert fra EMPA, St. Gallen, Sveits, med betegnelse EMPA 116). Før vasketesten ble tøystykkene for-behandlet med en løsning som inneholdt et anionisk overflateaktivt middel, natriumperborat og en blekemiddelaktivator (TAED) ved romtemperatur i 15 min. Etter denne behandling, ble forsøks-tøystykkene skyllet i rennende avmineralisert vann i 10 min. og lufttørket. Denne behandling resulterer i fiksering av smusset, slik at fjerning av det blir vanskeligere.

Vasketestene ble utført i 100 ml Erlenmeyer-kolber forsynt med en skvalpeplate og som inneholdt 30 ml av en definert vaskemiddelblanding pluss 300 ADU protease for testing. I hver kolbe ble det anbragt to for-behandlede EMPA 116-test-tøystykker. Kolbene ble anbragt i et vannbad med frem- og tilbakerysting (2 cm slaglengde) og agitert med 320 opm. Testene ble utført ved 40°C i 30 min. Etter vasking, ble tøystykkene skyllet i rennende avmineralisert vann i 10 min. og lufttørket. Refleksjonskoeffisienten for forsøks-tøystykkene ble målt ved 680 nm med et Photovolt-fotometer (modell 577) utstyrt med et grønt filter.

Vaskeytelsen hos supernatantfraksjonen av kulturer av forskjellige alkalifile bakterier i europeiske pulver-vaskemidler ble bestemt ifølge fremgangsmåten spesifisert ovenfor. Supernatantfraksjonene ble underkastet forskjellige behandlinger for fremstilling av enzymholdige preparater.

100 ml Erlenmeyer-kolber ble ifylt pulvervaskemiddel IEC oppløst i standard-springvann med tysk hardhet 15° for oppnåelse av en endelig konsentrasjon på 4 g/liter.

Sammensetningen av pulvervaskemidlet IEC var som følger:

Komponent	Vekt%
Lineært natriumalkylbenzensulfonat (middelkjedelengde av alkankjede (C11,5))	6,4
Etoksylert talgalkohol (14EO)	2,3
Natriumsåpe	2,8
Natriumtripolyfosfat (STPP)	35,0
Natriumsilikat	6,0
Magnesiumsilikat	1,5
Karboksymetylcellulose	1,0
Natriumsulfat	16,8
Natriumperborat-tetrahydrat	18,5
TAED	1,5
Diverse + vann	opp til 100

Standard-springvann består av $CaCl_2.2H_2O$, 0,291 g/l; $MgCl.6H_2O$, 0,140 g/l og $NaHCO_3$, 0,210 g/l oppløst i avmineralisert vann.

Til hver kolbe ble det tilsatt to EMPA 116-tøystykker og tilstrekkelig mengde enzym-holdige preparater til at man fikk en sluttaktivitet på 300 ADU. Såpevannets slutt-volum var

30 ml. Til sammenligning inneholdt én kolbe intet enzym-preparat, som var erstattet med vann. Prøven ble gjentatt enten to eller tre ganger. Resultatene er vist i tabell 22.

Tabell 22

Utførte vaskeprøver

Ytelse av proteolytisk enzym-holdige preparater i et vaskemiddel

Ubehandlet kultursupernatant

Fremstilt ut fra stamme	Gjennomsn. bedring av EMPA 116-test-tøystykker		
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3
Ingen (kontroll)	11,4	11,8	13,0
1E.1^{CT}	29,2	22,2	24,7
9B.1	23,7	23,9	24,2
17N.1^{CT}		11,8	18,4
24B.1		17,3	16,3

Frysetørket supernatantfraksjon

Fremstilt ut fra stamme	Gjennomsn. bedring av EMPA 116-test-tøystykker		
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3
Ingen (kontroll)	10,4	11,8	13,0
1E.1^{CT}	15,1	28,9	30,0
9B.1	21,7	14,9	17,4
17N.1^{CT}		13,7	17,9
24B.1		17,8	17,3

Dialyserte supernatantfraksjoner

Fremstilt ut fra stamme	Gjennomsn. bedring av EMPA 116-test-tøystykker		
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3
Ingen (kontroll)	11,4	11,8	13,0
1E.1^{CT}	26,4	22,7	26,3
9B.1	18,7	16,7	17,0
17N.1^{CT}		12,0	12,6
24B.1		12,6	12,4

Ultrafiltreringskonsentrat av supernatantfraksjoner

Fremstilt ut fra stamme	Gjennomsn. bedring av EMPA 116-test-tøystykker	
	Prøve 1	Prøve 2
Ingen (kontroll)	10,4	11,4
1E.1^{CT}	14,6	26,0
9B.1	15,5	16,1

Aceton-utfellinger av supernatantfraksjoner

Fremstilt ut fra stamme	Gjennomsn. bedring av EMPA 116-test-tøystykker	
	Prøve 1	Prøve 2
Ingen (kontroll)	10,4	11,4
1E.1^{CT}	13,4	23,4
9B.1	12,6	14,7

Resultatene av prøvene viser effektiviteten av de proteolytiske enzymer dannet av stammene ifølge foreliggende oppfinnelse, tilveiebragt i forskjellige former, i vaskemiddelpreparater, og den oppnådde forbedrede vaskeytelse.

Eksempel 4

Dannelse av stivelses-nedbrytende enzymer

Stamme 1E.1^{CT} ble undersøkt med hensyn til dannelse av stivelses-nedbrytende enzymer på et stivelses-holdig medium som ble holdt på alkalisk pH.

500 ml Erlenmeyer-kolber ble ifylt 100 ml alkalisk medium (Medium Y, Vedlegg A) som inneholdt 2% løselig stivelse. Kolbene ble inokulert (5%) med celler av stamme 1E.1^{CT} dyrket i 24 timer på Medium A (37°C). Som kontroller ble lignende kolber med alkalisk medium som ikke inneholdt stivelse, også inokulert.

Kolbene ble anbragt i en rysteinkubator som roterte i krets med 280 opm, ved konstant temperatur på 37°C, i 24 timer. Fluidet som inneholdt enzymaktiviteten, ble skilt fra cellene ved sentrifugering i 10 min. ved 4000 opm.

Supernatantens enzymaktivitet ble bestemt ved anvendelse av analysen med reduserende sukker av Nelson og Somogyi

(Methods in Microbiology, vol. 5B, s. 300-301; (red. J.R. Norris og D.W. Ribbons), Academic Press, London, 1971).

Bestemmelse av stivelses-nedbrytende enzymaktivitet ved reduserende sukker-analysen

Løsninger

Reagens 1

144 g Na_2SO_4 oppløses ved forsiktig varming i 500 ml avmineralisert vann. 12 g kalium-natriumtartrat-tetrahydrat, 24 g Na_2CO_3 og 16 g $NaHCO_3$ settes til løsningene. Løsningens totale volum bringes til 800 ml ved tilsetning av avmineralisert vann.

Reagens 2

36 g Na_2SO_4 oppløses ved forsiktig oppvarming i 100 ml avmineralisert vann, og 4 g $CuSO_4.5H_2O$ settes til den oppvarmede løsning. Løsningens totale volum bringes til 200 ml ved tilsetning av avmineralisert vann.

Like før anvendelse blandes Reagensene 1 og 2 i forholdet 4:1 (Reagens 1 : Reagens 2).

Reagens 3

25 g ammoniummolybdat-tetrahydrat oppløses i 450 ml avmineralisert vann, og 21 ml konsentrert svovelsyre tilsettes med grundig blanding. 3 g $Na_2HAsO_4.7H_2O$ oppløses i 25 ml avmineralisert vann, og denne løsning settes til molybdat-løsningen. Den totale løsning oppvarmes i 48 timer ved 37°C, og eventuell utfelling filtreres fra.

Standard

100 mg glukose oppløses i avmineralisert vann, og det totale volum bringes til 100 ml. Før anvendelse fortynnes løsningen 10 ganger med avmineralisert vann.

Substrat

0,25% løselig stivelse (Merck, produkt nr. 1257) oppløst i 0,1 M Na_2CO_3-$NaHCO_3$-buffer, pH 10,1.

Analyse

0,9 ml stivelses-substratløsning, pH 10,1, anbringes i et testrør. Testrøret anbringes i et vannbad ved 25°C, og likevekt får innstilles. Enzymreaksjonen startes ved tilsetning av 0,1 ml av den enzymholdige kultursupernatant. Reaksjonen får gå i 30 min. Reaksjonen stoppes ved tilsetning av 1 ml av reagens 1/2 og oppvarming i 10 min. ved 100°C. Blandingen avkjøles på is i 5 min., og deretter tilsettes 0,5 ml av reagens 3, og den blå farve får utvikles i løpet av 30 min. ved romtemperatur. Blandingen fortynnes ved tilsetning av 1,0 ml avmineralisert vann, og ekstinksjonen måles ved 500 nm i et spektrofotometer. De reduserende sukkerarter måles som glukose-ekvivalenter fra en standardkurve.

Én enhet stivelses-nedbrytende enzymaktivitet er definert som 1 µg av reduserende sukkerarter målt som glukose frigjort pr. milliliter pr. minutt ved pH 10,1 og 25°C.

Antallet dannede stivelses-nedbrytende enzymenheter er vist i tabell 23.

Tabell 23

Dannelse av stivelses-nedbrytende enzymer ved stamme 1E.1

Medium	Optisk densitet ved 550 nm	Slutt-pH	Enzymenheter pr. liter
pluss stivelse	2,25	9,4	1150
ingen stivelse	0,75	10,3	660

Resultatene av testen viser tydelig tilstedeværelse av stivelses-nedbrytende enzymer, dannet av de alkalifile bakteriestammer ifølge foreliggende oppfinnelse, i dyrknings-buljongen.

Eksempel 5

Stabilitet av stivelses-nedbrytende enzymer i vaskemiddel

Evnen hos de stivelses-nedbrytende enzymer fra stamme 1E.1^{CT} til å motstå vaskemidler, hvilket er av vesentlig betydning for anvendelse av dem i tøyvaskemidler eller ved tekstil-avliming, er vist.

100 ml Erlenmeyer-kolber forsynt med skvalpeplate ble hver ifylt 30 ml 0,1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$-buffer, pH 10,1 som inneholdt 0,12 g natriumdodecylsulfat (ekvivalent med 4 g/l). Til halvparten av kolbene ble det tilsatt 0,3 g potetstivelse (ekvivalent med 1%).

I hver kolbe ble det tilsatt enzym-holdig supernatant fra stamme 1E.1^{CT} ved tilsetning av 0,5, 1,0 eller 2,0 ml (se tabell 24). Som kontroll ble supernatantvæsken erstattet med 1,0 ml vann. Like etter tilsetning av enzymet ble en 0,1 ml prøve fjernet (tid = 0 timer) for måling av enzymaktivitet.

Kolbene ble inkubert med rysting ved 25°C i 2,5 timer, etter hvilket tidsrom en andre 0,1 ml prøve ble fjernet for måling av enzymaktivitet.

Som sammenligning ble forsøket gjentatt under anvendelse av en vanlig α-amylase fra *Bacillus subtilis*.

Enzymaktiviteten ble bestemt under anvendelse av metoden med reduserende sukkerarter beskrevet tidligere.

Resultatene er oppført i tabell 24.

Tabell 24

Stabilitet av stivelses-nedbrytende enzymer fra stamme 1E.1^{CT} i vaskemidler

Enzymholdig supernatant tilsatt (ml)	Betingelser	pH	Enzymenheter gjenvunnet 0 h	2,5 h
0*		10,4	0	0
0,5	SDS	10,3	26	20
1,0		10,3	44	48
2,0		10,3	109	113
0*		10,3	0	0
0,5	SDS +	10,2	12	17

1,0	stivelse	10,1	36	48
2,0		10,2	79	120
Standard § SDS		10,4	0	0
Standard § SDS + stivelse		10,2	0	0

* erstattet med 1 ml vann
§ 2,8 RAU Bacillus subtilis α-amylase - Én RAU (referanse-amylaseenhet) er definert som den mengde enzym som vil omdanne 1 mg stivelse pr. min. ved pH 6,6 og 30°C til et produkt som ved reaksjon med jod har en absorbans ved 620 nm lik absorbansen av en løsning som inneholder 25 g $CoCl_2.6H_2O$, 3,84 g $K_2Cr_2ON_7$ og 1 ml 1 M HCl i 100 ml destillert vann.

Resultatene av denne test viser tydelig stabiliteten av de stivelses-nedbrytende enzymer dannet av de alkalifile bakteriestammer ifølge foreliggende oppfinnelse, i nærvær av vaskemiddel.

Eksempel 6

Dannelse av lipolytiske enzymer

11 av de nye stammer som klart viste lipaseaktivitet (Vedlegg D), ble undersøkt ytterligere med hensyn til dannelse av lipolytiske enzymer. De 11 stammer er eksempler fra klynge 2 og klynge 3 (fig. 1).

Forsøkene ble utført i 100 ml koniske kolber som inneholdt 30 ml sterilt alkalisk næringsmedium, pH 9,6, inokulert med den passende bakteriestamme. Tre forskjellige medier ble anvendt, betegnet medium Z - BB (Vedlegg A). Kolbene ble anbragt i en rysteinkubator som roterte i krets (300 opm) ved 30°C i 48 timer.

Cellene ble skilt fra dyrkningsbuljongen ved sentrifugering og supernatanten dialysert mot 50 volumdeler 0,1 mM Tris-HCl-buffer pH 9, med 3 bufferskift i løpet av 24 timer. Dialysatet ble frysetørket, hvorved man fikk et lipasepreparat (tabell 25).

Lipasepreparatene oppnådd ifølge dette eksempel ble anvendt for vasketesten beskrevet i eks. 7 nedenfor.

Tabell 25

Dannelse av lipase

Stamme	Produksjons-medium	Lipase TLU/ml*	Lipase TLU/g
39E.3	BB	1,3	134
40E.3	Z	1,2	118
41E.3	Z	1,1	82
42E.3	Z	1,2	76
44E.3	Z	1,2	99
$45E.3^{CT}$	AA	1,4	98
48E.3	BB	2,0	152
49N.3	BB	1,5	123
50N.3	BB	2,0	100
51N.3	BB	1,0	98
52N.3	BB	1,2	128

* TLU = sann lipaseenhet som definert i US-patent 4.933.287.

Resultatene av denne test viser tydelig tilstedeværelse av lipolytiske enzymer, dannet av alkalifile bakterier ifølge den foreliggende oppfinnelse, i dyrkningsbuljongen og i et frysetørket preparat av den dialyserte dyrkningsbuljong.

Eksempel 7

Lipase-vasketest

Lipasepreparatene fra eks. 6 ble undersøkt med hensyn til ytelse under vaskebetingelser i TIDE´-pulver (1,5 g/l), et vaskemiddelprodukt fra Procter & Gamble.

Denne vasketest (SLM-test) ble utført som beskrevet i US-patent 4.933.287, som er medtatt i det foreliggende som referanse. Som kontroll ble anvendt en lipase fra *Pseudomonas alcaligenes* stamme M1 (CB3 473.85) som beskrevet i US-patent 4.933.287. Resultatene er vist i tabell 26.

Tabell 26

Lipase-vasketest

Vaskemiddel: TIDE´ (pulver), 1,5 g/l
Lipase: 2TLU/ml
Ca^{2+} : 10^{-5} M (Natriumtripolyfosfat tilsatt)

Gjenvinning %

Stamme	Triglycerider	Total lipidmengde
39E.3	55,3	73,4
40E.3	82,0	89,9
41E.3	44,7	78,7
42E.3	55,5	74,8
44E.3	6,6	76,9
$45E.3^{CT}$	81,6	92,9
48E.3	76,5	82,9
49N.3	72,4	82,0
50N.3	50,5	76,6
51N.3	80,4	87,6
52N.2	77,0	84,7
M1	88,5	91,5
kontroll*	98,7	98,7

* Standard-springvann som definert i US-patent 4.933.287

Reduksjonen i prosentvis gjenvinning av triglycerider og total mengde lipider, sammenlignet med kontrollen, viser tydelig evnen hos de lipolytiske enzymer dannet av de alkalifile bakterier ifølge foreliggende oppfinnelse, til nedbryting og fjerning av triglycerider og deres nedbrytnings-produkter som er trengt ned i en tøyprøve, såvel som deres forbedrede yteevne sammenlignet med en kjent lipase.

Vedlegg A

Medier anvendt ved foreliggende oppfinnelse

MEDIUM A

Glukose	10,0	gl^{-1}
Pepton (Difco: Detroit, MI, USA)	5,0	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	5,0	gl^{-1}
K_2HPO_4	1,0	gl^{-1}
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	gl^{-1}
NaCl	40,0	gl^{-1}
Na_2CO_3	10,0	gl^{-1}
* Agar	20,0	gl^{-1}

* (når nødvendig for et fast medium)

MEDIUM B

Glukose	10,0	gl^{-1}
Pepton (Difco)	5,0	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	5,0	gl^{-1}
K_2HPO_4	1,0	gl^{-1}
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	gl^{-1}

	NaCl	40,0	gl^{-1}
	Na_2CO_3	10,0	gl^{-1}
	Novobiocin	50,0	mgl^{-1}
	Agar	20,0	gl^{-1}
MEDIUM C			
	Glukose	10,0	gl^{-1}
	Pepton (Difco)	5,0	gl^{-1}
	Gjærekstrakt (Difco)	5,0	gl^{-1}
	K_2HPO_4	1,0	gl^{-1}
	$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
	NaCl	40,0	gl^{-1}
	Na_2CO_3	10,0	gl^{-1}
	Laktalbumin	10,0	gl^{-1}
	Agar	20,0	gl^{-1}
MEDIUM D			
	Glukose	10,0	gl^{-1}
	Pepton (Difco)	5,0	gl^{-1}
	Gjærekstrakt (Difco)	5,0	gl^{-1}
	K_2HPO_4	1,0	gl^{-1}
	$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
	NaCl	40,0	gl^{-1}
	Na_2CO_3	10,0	gl^{-1}
	Kasein	20,0	gl^{-1}
	Agar	20,0	gl^{-1}
MEDIUM E			
	Løselig stivelse	10,0	gl^{-1}
	Pepton (Difco)	5,0	gl^{-1}
	Gjærekstrakt (Difco)	5,0	gl^{-1}
	K_2HPO_4	1,0	gl^{-1}
	$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
	NaCl	40,0	gl^{-1}
	Na_2CO_3	10,0	gl^{-1}
	Laktalbumin	10,0	gl^{-1}
	Agar	20,0	gl^{-1}
MEDIUM F			
	Løselig stivelse	10,0	gl^{-1}
	Pepton (Difco)	5,0	gl^{-1}
	Gjærekstrakt (Difco)	5,0	gl^{-1}
	K_2HPO_4	1,0	gl^{-1}
	$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
	NaCl	40,0	gl^{-1}
	Na_2CO_3	10,0	gl^{-1}
	Kasein	20,0	gl^{-1}
	Agar	20,0	gl^{-1}

MEDIUM G

Oxbile (Oxoid: Basingstoke, U.K.)	10,0	gl^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	5,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	0,5	gl^{-1}
Laktalbumin	10,0	gl^{-1}
Agar	20,0	gl^{-1}
Justert til pH 8,5 med 50% Na_2CO_3-løsning		

MEDIUM H

Oxbile (Oxoid)	10,0	gl^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	5,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	0,5	gl^{-1}
Kasein	20,0	gl^{-1}
Agar	20,0	gl^{-1}
Justert til pH 8,5 med 50% Na_2CO_3-løsning		

MEDIUM I

Sabouroud dekstroseagar (Oxoid)	65,0	gl^{-1}
NaCl	40,0	gl^{-1}
Na_2CO_3	20,0	gl^{-1}
Cykloheksimid	50,0	mgl^{-1}
Penicillin G	25000	IUl^{-1}
Streptomycin	25	mgl^{-1}

MEDIUM J

Bacto potet-dekstroseagar (Difco)	39,0	gl^{-1}
NaCl	40,0	gl^{-1}
Na_2CO_3	20,0	gl^{-1}
Novobiocin	50,0	mgl^{-1}

MEDIUM K

Bacto potet-dekstroseagar (Difco)	39,0	gl^{-1}
NaCl	40,0	gl^{-1}
Na_2CO_3	20,0	gl^{-1}
Cykloheksimid	50,0	mgl^{-1}
Penicillin G	25000	IUl^{-1}
Streptomycin	25	mgl^{-1}

MEDIUM L

Glukose	0,2	gl^{-1}
Pepton (Difco)	0,1	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	0,1	gl^{-1}
K_2HPO_4	1,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
NaCl	40,0	gl^{-1}
Na_2CO_3	10,0	gl^{-1}
Kasein	20,0	gl^{-1}
Agar	20,0	gl^{-1}

MEDIUM M (pH 9,6)

Oxbile (Oxoid)	2,0	gl^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	1,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,04	gl^{-1}

Gjærekstrakt (Difco)	0,1	gl^{-1}
Olivenolje	10,0	$ml\ l^{-1}$
Na_2CO_3	6,1	gl^{-1}
Agar	20,0	gl^{-1}

MEDIUM N (pH 9,6)

Oxbile (Oxoid)	2,0	gl^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	1,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,04	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	0,1	gl^{-1}
Olivenolje	10,0	$ml\ l^{-1}$
Na_2CO_3	6,1	gl^{-1}
Tergitol 7 (Fluka: Buchs, CH)	500	ppm
Agar	20,0	gl^{-1}

MEDIUM O (pH 9,6)

Oxbile (Oxoid)	2,0	gl^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	1,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,04	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	0,1	gl^{-1}
Olivenolje	10,0	$ml\ l^{-1}$
Na_2CO_3	6,1	gl^{-1}
NaCl	40,0	gl^{-1}
Agar	20,0	gl^{-1}

MEDIUM P (pH 9,6)

Oxbile (Oxoid)	10,0	gl^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	5,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	0,5	gl^{-1}
Olivenolje	10,0	$ml\ l^{-1}$
NaCl	40,0	gl^{-1}
Agar	20,0	gl^{-1}

Justert til pH 9,6 med 50% Na_2CO_3-løsning

MEDIUM Q (pH 9,6)

Oxbile (Oxoid)	10,0	gl^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	5,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	0,5	gl^{-1}
Olivenolje	10,0	$ml\ l^{-1}$
Agar	20,0	gl^{-1}

Justert til pH 9,6 med 50% Na_2CO_3-løsning

MEDIUM R (pH 9,5)

Frisk gjær	82,5	gl^{-1}
Glukose	3,3	gl^{-1}
K_2HPO_4	1,6	gl^{-1}
K_2CO_3	0,6	gl^{-1}
$KHCO_3$	1,76	gl^{-1}
$CaCl_2$	0,05	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,05	gl^{-1}
$FeSO_4$	0,005	gl^{-1}
$MnSO_4$	0,0066	gl^{-1}

MEDIUM S

Frisk gjær	8,25	gl^{-1}
Glukose	1,32	gl^{-1}
K_2HPO_4	1,6	gl^{-1}
$CaCl_2$	0,05	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,05	gl^{-1}
$FeSO_4$	0,005	gl^{-1}
$MnSO_4$	0,0066	gl^{-1}
NaCl	40,0	gl^{-1}

Justert til pH 10,5 med 40% Na_2CO_3-løsning

MEDIUM T (pH 10,1)

Glukose	10,0	gl^{-1}
Pepton (Difco)	5,0	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	5,0	gl^{-1}
K_2HPO_4	1,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
NaCl	40,0	gl^{-1}
Na_2CO_3	10,0	gl^{-1}

MEDIUM U

Oxbile	10,0	gl^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	5,0	gl^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	0,5	gl^{-1}
Kasein	10,0	gl^{-1}

Justert til pH 9,8 med 40% Na_2CO_3-løsning

MEDIUM V

Trypton soyabuljong (Oxoid)	30,0	gl^{-1}

Justert til pH 9,9 med 40% Na_2CO_3-løsning

MEDIUM W (pH 10,1)

Løselig stivelse	10,0	gl^{-1}
Pepton (Difco)	5,0	gl^{-1}
Gjærekstrakt (Difco)	5,0	gl^{-1}
KH_2PO	1,0	gl^{-1}
$MgSO_4 7H_2O$	0,2	gl^{-1}
NaCl	40,0	gl^{-1}
Na_2CO_3	10,0	gl^{-1}

MEDIUM X

Skummetmelk (Difco)	100,0	gl^{-1}

Justert til pH 10,8 med 25% Na_2CO_3-løsning

MEDIUM Y

Gjærekstrakt (Difco)	1,0	g
KNO_3	10,0	g
KH_2PO_4	1,0	g
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	g
Na_2CO_3	10,0	g
NaCl	40,0	g
Løselig stivelse (Merck)	20,0	g
Avmineralisert vann	1	liter

MEDIUM Z

Hjerne-hjerte-infusjon (Difco)	20,0 g
Na_2EDTA (Komplexion III, Siegfried AG, Sveits	1,0 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,006 g
$MnSO_4.H_2O$	0,003 g
$CaCl_2.2H_2O$	1,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Tween 80	5,0 g
Soyaolje	5,0 g

Destillert vann til 1 liter, pH i medium justert til pH 9,6 med 25% Na_2CO_3-løsning

MEDIUM AA

Gjærekstrakt (Difco)	20,0 g
KH_2PO_4	5,0 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,006 g
$MnSO_4.H_2O$	0,003 g
$CaCl_2.2H_2O$	1,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Tween 80	5,0 g
Soyaolje	5,0 g

Destillert vann til 1 liter, pH i medium justert til pH 9,6 med 25% Na_2CO_3-løsning

MEDIUM BB

Hjerne-hjerte-infusjon (Difco)	20,0 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,006 g
$MnSO_4.H_2O$	0,003 g
$CaCl_2.2H_2O$	1,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Tween 80	5,0 g
Soyaolje	5,0 g

Destillert vann til 1 liter, pH i medium justert til pH 9,6 med 25% Na_2CO_3-løsning

Vedlegg B

Metoder for enhetstester

1. Egenskaper nr. 1-5
Kolonifarve, -form, -profil, -kant, -størrelse
En suspensjon av bakterier ble spredt over en alkalisk næringsagar (Medium A) og dyrket ved 37°C.
Koloniene ble undersøkt etter 48 timer.

2. Egenskaper nr. 6 og 7
Cellemorfologi, Gram's farvereaksjon
Bakterieceller dyrket i alkalisk næringsbuljong (Medium A uten agar) i 24 timer, ble spunnet ned i en sentrifuge og suspendert på nytt i en liten mengde alkalisk næringsbuljong, og fikk lufttørke på et objektglass. Eller, bakterier ble dyrket i 24-48 timer på en alkalisk næringsagar (Medium A) for dannelse av kolonier. Kolonier av bakterier ble suspendert i fysiologisk saltløsning, og noen få dråper fikk lufttørke på et

objektglass. Gram's farvetest ble utført ved anvendelse av Dussault-modifikasjonen (Journal of Bacteriology, 70, 484-485, 1955) med safranin som kontrafarving.

3. Egenskap nr. 8
Oksydasereaksjon
Filtrerpapir fuktet med en 1% vandig løsning av N,N,N,N'-tetrametyl-p-fenylendiamin eller oksydase-identifikasjonsplater (bioMérieux: Charbonieres-les-Bains, Frankrike) ble påstrøket en ung bakteriekultur fra alkalisk næringsagar. Purpurfarve innen 1 min. ble notert som positiv reaksjon. *E.coli*, som ble anvendt som kontroll, ga ikke positiv reaksjon innen 1 min.

4. Egenskap nr. 9
Skummetmelk-test
Et minimal-medium som besto av (g/l desillert vann) gjærekstrakt, 1,0; KNO_3 10,0; K_2HPO 1,0; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2; NaCl 40,0; Na_2CO_3 10,0; agar 20,0 ble supplert med 5,0 g/l pulver av skummet melk, sterilisert ved autoklavering og hellet i petriskåler. Bakterier ble inokulert og inkubert ved 37°C. Klare områder rundt bakteriekolonier i en ellers opak agar ble notert som positiv reaksjon. Ikke-alkalifile referansestammer ble undersøkt på identisk måte ved anvendelse av medier med samme sammensetning, men uten Na_2CO_3 for oppnåelse av en pH på 6,8-7,0.

5. Egenskap nr. 10
Gelatinhydrolyse
Trekull-gelatin-plater (bioMérieux eller "chargeler" (Oxoid) ble inkubert ved 37°C i en alkalisk næringsbuljong (Medium A) sammen med bakterier. Et svart bunnfall viste positiv reaksjon.

Vedlegg B (forts.)

6. Egenskap nr. 11
NaCl-toleranse
To metoder ble anvendt.
(a) Bakteriestammer ble dyrket ved 37°C på en alkalisk næringsagar (Medium A) som inneholdt 0, 4, 8, 12 eller 15 vekt/vol% NaCl. Agarplatene ble undersøkt med hensyn til bakterievekst etter 48 timer.
(b) Bakteriestammer ble dyrket ved 37°C i en alkalisk næringsbuljong (Medium A) som inneholdt 0, 4, 8, 12, 15 eller 25% NaCl. Bakterieveksten ble kontrollert ved målinger av optisk densitet under anvendelse av et Klett-meter (grønt filter) etter 0, 12, 24, 48, 72 og 144 timer.

7. Egenskap nr. 12
Minimums-pH for vekst
Næringsagar, pH 6,8-7,0 (Medium A uten natriumkarbonat) ble hellet i kvadratiske petriskåler. En strimmel av størknet agar ble fjernet fra én ende og erstattet med smeltet 4 vekt/vol% agar som inneholdt 3,6 vekt/vol% Na_2CO_3 og 0,8 vekt/vol% NaOH. En pH-gradient fra pH 10,5 til pH 7 over platen fikk utvikles over natten. Bakteriene ble inokulert ved påstryking langs pH-gradienten og dyrket ved 37°C i 48 timer. pH-verdien på det punkt hvor bakterieveksten opphørte, ble målt med en elektrode med flat øvre del og med "Alkalite" pH-strimler (Merck: Darmstadt, Tyskland).

8. Egenskaper nr. 13 - 21
Karbohydrat-utnyttelse
Et minimal-medium som besto av (g/l destillert vann) gjærekstrakt 1,0; KNO_3 10,0; K_2HPO_4 1,0; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2; NaCl 40,0; Na_2CO_3 10,0; agar 20,0 ble supplert med 2,0 g/l av karbohydratet som skulle undersøkes, og hellet i kvadratiske petriskåler. Bakteriene ble inokulert under anvendelse av en 25 punkts multi-punkts inokulator, fra 1,0 ml av en bakteriesuspensjon dyrket i 48 timer i en alkalisk næringsbuljong (Medium A). Agarplatene ble inkubert ved 37°C i 48 timer. Resultatene ble notert ved sammenligning av bakterieveksten på minimal-næringsmedium inneholdende et karbohydrat-supplement, med veksten på et minimal-medium uten karbohydratet som skulle undersøkes. Ikke-alkalifile referansestammer ble undersøkt på identisk måte under anvendelse av medier med samme sammensetning, men uten Na_2CO_3, for oppnåelse av en pH på 6,8 - 7,0.

Vedlegg B (forts.)

9. Egenskaper nr. 22-53
Vekst på karbonsubstrater
Det ble gjort bruk av den kommersielt tilgjengelige teststrimmel ATB 32 GN (API-bioMérieux: La Balme les Grottes, Frankrike. Strimlene ble anvendt ifølge produsentens instruksjoner, men med tilsetning av 1,0 mm av en løsning som inneholdt 4% NaCl og 1% Na_2CO_3 til de tilveiebragte medisinglass med basalmedium. Strimlene ble inkubert ved 37°C i 48 timer. Ikke-alkalifile referansestammer ble inkubert i standard-basalmediet.

10. Egenskaper nr. 54-72
Enzymatiske aktiviteter
Det ble gjort bruk av den kommersielt tilgjengelige teststrimmel APIZYM (API-bioMérieux), som ble anvendt ifølge produsentens instruksjoner, bortsett fra at de alkalifile bakterieceller ble suspendert i alkalisk næringsbuljong (Medium A). Strimlene ble inkubert ved 37°C i 4 timer.

11. Egenskaper nr. 73-82
Aminosyrer som karbon- og nitrogenkilde
Det ble anvendt samme teknikk som for testene 14-21, bortsett fra at KNO_3 ble utelatt fra minimal-næringsmediet.

12. Egenskaper nr. 83-104
Antibiotisk følsomhet
En lett suspensjon av bakterier i alkalisk næringsbuljong ble utspredt på overflaten av alkalisk næringsagar (Medium A) og fikk tørke. Kommersielt tilgjengelige testskiver for undersøkelse av følsomhet overfor antibiotika (Oxoid) eller Mast Laboratories: Merseyside, U.K.) ble påført på agaroverflaten. Bakteriene ble dyrket ved 37°C i 48 timer. Klare soner rundt antibiotikaskivene viste følsomhet.

Vedlegg C

Enhetstester for analyse ved numerisk klassifikasjon

Egenskap nr.	Test-beskrivelse	Computer-kode	
1	Kolonifarve	hvit	= 1
		kremfarvet	= 2
		beige	= 3
		gul	= 4
		orange	= 5
		lyserød	= 6
		brun	= 7
		rød	= 8
2	Koloniform	sirkulær	= 1
		uregelmessig	= 2
		punktformet	= 3
		trådbakterie	= 4
3	Koloniprofil	konveks	= 1
		oppestående	= 2
		pukkelformet	= 3
		flat	= 4
4	Kolonikant	hel	= 1
		bølget	= 2
		fliket	= 3
		frynset	= 4
5	Kolonistørrelse	diameter i millimeter	
6	Cellemorfologi	stav	= 1
		kokk	= 2
7	Gram-farving	negativ	= 1
		positiv	= 2
8	Oksydasetest	negativ	= 1
		positiv	= 2
9	Skummetmelk-test	negativ	= 1
		positiv	= 2
10	Gelatinhydrolyse	negativ	= 1
		positiv	= 2
11	NaCl-toleranse	vekst ved 0% - 4%	= 1
		vekst ved 0% - 8%	= 2
		vekst ved 0% - 12%	= 3
		vekst ved 0% - 15%	= 4
		vekst bare ved 0%	= 5
		vekst bare ved 4%-15%	= 6

Vedlegg C (forts.)

Egenskap nr.	Test-beskrivelse	Computer-kode
12	Minimums-pH for vekst på næringsagar	pH 7,5 = 7,5 pH 8,0 = 8,0 pH 8,5 = 8,5 pH 9,0 = 9,0 pH 9,5 = 9,5 pH 10,0 = 10,0 pH 10,5 = 10,5
13 - 21	Karbohydrat-utnyttelse	
13	Formiat	
14	Fumarat	
15	Suksinat	
16	Galaktose	forøkt vekst = 2
17	Pyruvat	lik vekst = 1
18	Fruktose	inhibert vekst = 0
19	Laktose	
20	Xylose	
21	Stivelse	
22 - 53	Vekst på karbonsubstrater	
22	Rhamnose	
23	N-acetylglukosamin	
24	D-ribose	
25	Inositol	
26	D-sakkarose	
27	Maltose	
28	Itakonat	
29	Suberat	
30	Malonat	
31	Acetat	
32	DL-laktat	positiv = 2
33	L-alanin	negativ = 1
34	Mannitol	
35	D-glukose	
36	Salicin	
37	D-melibiose	
38	L-fukose	
39	D-sorbitol	
40	L-arabinose	
41	Propionat	
42	Kaprat	
43	Valerianat	
44	Citrat	
45	Histidin	
46	5-ketoglukonat	
47	Glykogen	
48	3-hydroksybenzoat	
49	L-serin	
50	2-ketoglukonat	
51	3-hydroksybutyrat	

52	4-hydroksybenzoat
53	L-prolin

Vedlegg C (forts.)

Egenskap nr.	Test-beskrivelse			Computer-kode
54 - 72	Enzymatiske aktiviteter			
54	Alkalisk fosfatase			
55	Esterase (C4)			
56	Esterase-lipase (C8)			
57	Lipase (C14)			
58	Leucin-arylamidase			
59	Valin-arylamidase			
60	Cystin-arylamidase			positiv = 2
61	Trypsin			negativ = 1
62	Chymotrypsin			
63	Sur fosfatase			
64	Naftol-AS-BI-fosfohydrolase			
65	α-galaktosidase			
66	ß-galaktosidase			
67	ß-glukuronidase			
68	α-glukosidase			
69	ß-glukosidase			
70	N-acetyl-ß-glukosaminidase			
71	α-mannosidase			
72	α-fukosidase			
73 - 82	Aminosyrer som karbon- og nitrogenkilde			
73	Serin			
74	Prolin			
75	Asparagin			
76	Arginin			forøkt vekst = 2
77	Alanin			lik vekst = 1
78	Lysin			ingen vekst = 0
79	Metionin			
80	Fenylalanin			
81	Glycin			
82	Valin			
83 - 104	Antibiotika-følsomhet			
83	Gentamycin	10	µg	
84	Nitrofurantoin	50	µg	
85	Ampicillin	25	µg	
86	Nalidiksinsyre	30	µg	
87	Sulfametoksazol	50	µg	
88	Trimethoprim	2.5	µg	
89	Penicillin G	1	IU	antibiotika-følsom
90	Kloramfenikol	25	µg	inhibering av vekst= 2
91	Erythromycin	5	µg	
92	Fusidinsyre	10	µg	antibiotika-ufølsom
93	Methicillin	10	µg	ingen vekstinhibering
94	Novobiocin	5	µg	
95	Streptomycin	10	µg	
96	Tetracyklin	25	µg	

97	Sulfafurazol	100 µg
98	Oleandomycin	5 µg
99	Polymixin	300 IU
100	Rifampicin	2 µg
101	Neomycin	30 µg

Vedlegg C (forts.)

Egenskap nr.	Test-beskrivelse		Computer-kode
102	Vancomycin	30 µg	
103	Kanamycin	30 µg	
104	Bacitracin	10 µg	

Vedlegg D

Undersøkelse med hensyn til proteolytisk, amylolytisk og lipolytisk aktivitet

Proteolytisk aktivitet

Klynge 1

Stamme	Laktalbumin	Kasein	Blod	Gelatin
1E.1^{CT}	+	+	+	+
2E.1	-	-	-	-
wB2	-	-	-	+
wB5	-	-	-	-
wBs4	-	+	+	+
10B.1	+	+	+	+
20N.1	+	+	-	+
27M.1	-	+	-	-
wNK2	-	+	-	+

Klynge 2

Stamme	Laktalbumin	Kasein	Blod	Gelatin
39E.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
41E.3$_{CT}$	n.t.	n.t.	n.t.	+
45E.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
47E.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
51N.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
52N.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
42E.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
50N.3	n.t.	n.t.	n.t.	+

Klynge 3

Stamme	Laktalbumin	Kasein	Blod	Gelatin
6B.1	+	+	-	+
7B.1	+	+	-	+
8B.1	-	+	-	+
38E.2	n.t	n.t.	n.t.	-
56E.4	+	n.t.	n.t.	-
25B.1	n.t.	+	n.t.	+
26N.1	-	+	-	+
11C.1	+	+	-	+
wB.1	-	-	-	+
12C.1$_{CT}$	-	+	-	-
28N.1	-	-	-	-
61N.4	+	n.t.	n.t.	-
36E.2	n.t.	n.t.	n.t.	-

40E.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
65B.4	+	n.t.	n.t.	-

Proteolytisk aktivitet (forts.)

Klynge 3 (forts.)

Stamme	Laktalbumin	Kasein	Blod	Gelatin
94LM.4	n.t.	n.t.	n.t.	+
19N.1	-	+	-	+
24B.1	+	+	-	+
21M.1	+	+	+	+
29C.1	-	-	-	-
35E.2	n.t.	n.t.	n.t.	-
37E.2	n.t.	n.t.	n.t.	-
48E.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
78LN.4	n.t.	+	n.t.	+
73aC.4	n.t.	+	n.t.	+
75C.4	n.t.	+	n.t.	+
73bC.4	n.t.	+	n.t.	+
74C.4	n.t.	+	n.t.	-
77LN.4	n.t.	+	n.t.	-
wN1	-	-	-	-
49N.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
44E.3	n.t.	n.t.	n.t.	+
58E.4	n.t.	n.t.	n.t.	
57E.4	+	n.t.	n.t.	+

Klynge 4

Stamme	Laktalbumin	Kasein	Blod	Gelatin
$wE5_{CT}$	-	-	-	+
$wB4_{CT}$	-	-	-	-
wNk1	-	-	-	+
wEl1	-	-	-	-
wEl2	-	-	-	+

Klynge 5

Stamme	Laktalbumin	Kasein	Blod	Gelatin
9B.1	-	+	-	+
$16N.1_{CT}$	+	n.t.	n.t.	+
$17N.1^{CT}$	+	+	-	+
22M.1	+	+	-	+

Klynge 6

Stamme	Laktalbumin	Kasein	Blod	Gelatin
18N.1	+	+	-	+
59E.4^{CT}	+	n.t.	n.t.	+
64B.4^{CT}	+	n.t.	n.t.	+
63N.4	+	n.t.	n.t.	+
53E.4	+	n.t.	n.t.	+

Proteolytisk aktivitet (forts.)

Ikke-klyngedannende stamme

Stamme	Laktalbumin	Kasein	Blod	Gelatin
wN.2	-	-	-	+
4E.1	-	-	-	-
5E.1	-	-	-	+
92LM.4	n.t.	n.t.	n.t.	+
wBn5	-	-	-	+

n.t. = ikke testet

Amylolytisk og lipolytisk aktivitet

Klynge 1

Stamme	Stivelses-hydrolyse	Lipase-aktivitet på olivenolje	Esterase-lipase-aktivitet	Lipase-aktivitet
1E.1^{CT}	+	-	+	+
2E.1	+	-	+	-
wB2	-	-	+	-
wB5	-	-	+	-
wBs4	-	-	+	-
10B.1	+	-	+	-
20N.1	-	-	+	-
27M.1	-	-	+	-
wNk2	+	-	+	-

Klynge 2

Stamme	Stivelses-hydrolyse	Lipase-aktivitet på olivenolje	Esterase-lipase-aktivitet	Lipase-aktivitet
39E.3	+	+	+	-
41E.3^{CT}	+	+	+	-
45E.3^{CT}	+	+	+	+
47E.3	+	+	-	-

51E.3	+	+	+	+
52E.3	+	+	+	+
42E.3	+	+	+	+
50N.3	+	+	+	+

Amylolytisk og lipolytisk aktivitet (forts.)

Klynge 3

Stamme	Stivelses-hydrolyse	Lipase-aktivitet på olivenolje	Esterase-lipase-aktivitet	Lipase-aktivitet
6B.1	-	-	+	-
7B.1	+	-	+	+
8B.1	+	+	+	+
38E.2	-	-	+	-
56E.4	-	+	+	+
25B.1	-	-	+	+
26N.1	-	-	+	-
11C.1	-	-	+	-
wB1	-	-	+	-
12C.1$_{CT}$	+	-	-	-
28N.1	+	-	+	-
61N.4	+	-	-	-
36E.2	-	-	-	-
40E.3	+	+	+	+
65B.4	+	-	+	-
94LM.4	+	-	+	-
19N.1	+	-	+	+
24B.1	-	-	+	-
21M.1	+	-	-	-
29C.1	+	-	+	+
35E.2	-	-	+	-
37E.2	-	-	+	-
48E.3	-	+	+	-
78LN.4	-	-	+	-
73aC.4	-	-	+	-
75C.4	+	-	-	-
73bC.4	+	-	+	-
74C.4	+	-	+	-
77LN.4	-	-	+	+
wN1	+	-	+	-
49N.3	+	+	+	-
44E.3	+	+	+	+
58E.4	+	+	+	-
57E.4	+	-	+	-

Klynge 4

Stamme	Stivelses-hydrolyse	Lipase-aktivitet på olivenolje	Esterase-lipase-aktivitet	Lipase-aktivitet
wE5$_{CT}$	+	-	-	-
wB4	-	-	+	-
wNk1	+	-	+	-
wE11	-	-	+	-
wE12	-	-	+	-

Amylolytisk og lipolytisk aktivitet (forts.)

Klynge 5

Stamme	Stivelses-hydrolyse	Lipase-aktivitet på olivenolje	Esterase-lipase-aktivitet	Lipase-aktivitet
9B.1	+	-	+	-
16N.1$_{CT}$	+	-	+	-
17N.1	+	-	+	-
22M.1	+	-	+	-

Klynge 6

Stamme	Stivelses-hydrolyse	Lipase-aktivitet på olivenolje	Esterase-lipase-aktivitet	Lipase-aktivitet
18N.1	+	-	+	-
59E.4$_{CT}$	+	-	+	-
64B.4	+	-	+	-
63N.4	+	-	-	-
53E.4	+	-	+	-

Ikke-klyngedannende stammer

Stamme	Stivelses-hydrolyse	Lipase-aktivitet på olivenolje	Esterase-lipase-aktivitet	Lipase-aktivitet
wN2	+	-	+	+
4E.1	-	-	+	-
5E.1	+	-	+	-
92LM.4	+	+	+	-
wBn5	-	-	+	-

* Stivelseshydrolyse bestemt ifølge egenskap 21 (Vedlegg B)
Lipaseaktivitet (olivenolje) bestemt på medier M - P (Vedlegg A)
Esterase-lipase-aktivitet bestemt ifølge egenskap 56 (Vedlegg B)
Lipaseaktivitet bestemt ifølge egenskap 57 (Vedlegg B)

Vedlegg E

Prosentandel positive tilstander for egenskaper i klynger

	Egenskap	Klynge 1	2	3	4	5	6
[6]	Cellemorfologi	9	0	12	0	0	0
[7]	Gram-farving	0	0	0	0	0	0
[8]	Oksydasetest	55	100	35	80	0	20
[9]	Skummetmelk-test	36	11	6	20	0	20
[10]	Gelatin	67	100	56	60	100	100
[13]	Formiat	0	0	15	40	0	0
[14]	Fumarat	45	78	74	80	75	60
[15]	Suksinat	45	89	85	40	67	50
[16]	Galaktose	45	11	12	40	25	0
[17]	Pyruvat	64	89	88	40	75	0
[18]	Fruktose	45	11	68	60	50	100
[19]	Laktose	9	0	0	0	0	0
[20]	Xylose	18	11	15	20	0	0
[21]	Stivelse	73	100	91	20	100	100
[22]	Rhamnose	9	0	15	20	0	0
[23]	N-acetylglykosamin	9	0	26	20	0	100
[24]	D-ribose	27	0	50	0	0	20
[25]	Inositol	9	0	9	0	50	0
[26]	D-sakkarose	27	0	74	20	25	100
[27]	Maltose	9	11	74	40	50	100
[28]	Itakonat	0	11	6	0	0	0
[29]	Suberat	9	67	53	40	0	0
[30]	Malonat	0	11	65	0	25	40
[31]	Acetat	18	100	100	80	25	100
[32]	DL-laktat	27	56	100	100	0	40
[33]	L-alanin	18	89	82	100	0	100
[34]	Mannitol	0	0	41	20	0	80
[35]	D-glukose	9	11	71	60	0	60
[36]	Salicin	0	0	3	20	0	60
[37]	D-melibiose	0	0	3	0	0	0
[38]	L-fukose	0	0	0	20	0	20
[39]	D-sorbitol	18	0	41	0	0	40
[40]	L-arabinose	9	0	3	40	0	0
[41]	Propionat	9	100	94	80	0	80
[42]	Kaprat	0	78	32	40	0	80
[43]	Valerianat	9	100	97	80	0	40
[44]	Citrat	9	56	94	20	50	100
[45]	Histidin	0	0	71	0	0	80
[46]	5-ketoglukonat	0	0	21	0	0	0

[47]	Glykogen	9	22	26	20	25	100
[48]	3-hydroksybenzoat	9	0	38	0	0	0
[49]	L-serin	0	0	68	60	0	0
[50]	2-ketoglukonat	0	0	56	80	25	20
[51]	3-hydroksybutyrat	18	33	94	100	0	100
[52]	4-hydroksybenzoat	0	0	71	80	0	0
[53]	L-prolin	45	100	100	80	25	80
[54]	Alkalisk fosfatase	100	44	94	40	100	60
[55]	Esterase (C4)	100	100	100	100	100	100
[56]	Esterase-lipase (C8)	100	89	85	100	100	100

Prosentandel positive tilstander for egenskaper i klynger

		Klynge					
	Egenskap	1	2	3	4	5	6
[57]	Lipase (C14)	9	67	26	0	0	0
[58]	Leucin-arylamidase	91	67	94	60	50	0
[59]	Valin-arylamidase	91	33	65	100	25	0
[60]	Cystin-arylamidase	73	0	15	0	0	0
[61]	Trypsin	64	11	9	60	0	0
[62]	Chymotrypsin	73	0	3	20	75	0
[63]	Sur fosfatase	91	11	94	100	100	60
[64]	Naftolfosfohydrolase	91	22	3	20	100	40
[65]	α-galaktosidase	0	11	3	20	100	0
[66]	ß-galaktosidase	9	0	0	20	100	0
[67]	ß-glukuronidase	9	0	3	20	25	0
[68]	α-glukosidase	27	0	79	60	100	40
[69]	ß-glukosidase	9	0	9	80	75	0
[70]	N-acetyl-ß-glukos-aminise	27	0	0	0	0	0
[71]	α-mannosidase	0	0	0	0	0	0
[72]	α-fukosidase	9	0	0	20	0	0
[73]	Serin	22	13	29	60	100	50
[74]	Prolin	56	63	65	80	100	100
[75]	Asparagin	67	38	61	60	75	100
[76]	Arginin	56	25	53	80	50	50
[77]	Alanin	67	100	62	40	100	50
[78]	Lysin	44	75	71	80	75	100
[79]	Metionin	60	50	53	nc	50	50
[80]	Fenylalanin	89	100	76	100	100	100
[81]	Glycin	44	13	29	80	50	50
[82]	Valin	44	50	41	0	50	25
[83]	Gentamycin	36	67	3	20	0	0
[84]	Nitrofurantoin	18	33	21	0	0	0
[85]	Ampicillin	45	67	56	0	100	80
[86]	Nalidixinsyre	36	78	76	0	0	20
[87]	Sulfametoksazol	18	33	38	0	0	0
[88]	Trimethoprim	45	22	35	0	75	60
[89]	Penicillin G	27	11	29	0	75	100
[90]	Kloramfenikol	100	100	100	100	100	100
[91]	Erythromycin	91	100	100	100	100	100
[92]	Fusidinsyre	18	0	3	20	100	100

[93]	Methicillin	45	11	50	0	100	100
[94]	Novobiocin	18	0	3	0	25	0
[95]	Streptomycin	100	78	97	100	75	100
[96]	Tetracyklin	45	22	3	20	100	100
[97]	Sulfafurazol	40	13	20	nc	0	0
[98]	Oleandomycin	100	38	94	100	100	100
[99]	Polymixin	89	63	78	100	0	0
[100]	Rifampicin	100	38	78	100	100	100
[101]	Neomycin	0	13	0	0	0	0
[102]	Vancomycin	22	13	0	20	100	75
[103]	Kanamycin	11	13	0	0	0	0
[104]	Bacitracin	33	13	0	20	100	100

P a t e n t k r a v

1. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner kremfarvede, sirkulære kolonier,

b) vokser optimalt mellom pH 9 og 10,

c) gir positiv respons ved følgende tester:

1) Leucin-arylamidase
2) Valin-arylamidase
3) Fosfatohydrolase
4) Polymixin;

d) gir negativ respons ved følgende tester:

1) N-acetylglukosamin
2) Maltose
3) Propionat
4) Kaprat
5) Valerianat
6) Citrat
7) Histidin
8) Glykogen
9) 4-hydroksybenzoat
10) α-galaktosidase.

2. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner små, kremfarvede kolonier,

b) vokser optimalt mellom pH 7,8 og 11,2,

c) gir positiv respons ved følgende tester:

1) Stivelse
2) Acetat
3) Propionat
4) Valerianat
5) Prolin

6) Lipase
7) Oksydase (respons innen 10 sek.);

d) gir negativ respons ved følgende tester:
1) N-acetylglukosamin
2) Sakkarose
3) Histidin
4) 2-ketoglukonat
5) 4-hydroksybenzoat
6) α-glukosidase
7) ß-glukosidase
8) Fusidinsyre.

3. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner kremfarvede, opake kolonier,
b) vokser optimalt mellom pH 8,5 og 10,7,
c) inneholder ubikinon 6 som et hoved-respirasjonskinon;
d) gir positiv respons ved følgende tester:
1) Acetat
2) Laktat
3) Propionat
4) Valerianat
5) Citrat
6) 3-hydroksybenzoat
7) Prolin
8) Leucin-arylamidase:
e) gir negativ respons ved følgende tester:
1) Fosfohydrolase
2) α-galaktosidase
3) Fusidinsyre
4) Tetracyklin
5) Vancomycin
6) Bacitracin.

4. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner beige til brunfarvede, opake kolonier,

b) vokser optimalt mellom pH 7,5 og 10,9,

c) inneholder ubikinon 9 som et hoved-respirasjonskinon,

d) gir positiv respons ved følgende tester:

1) Laktat
2) Alanin
3) 3-hydroksybutyrat
4) Valin-arylamidase
5) Polymixin;

e) gir negativ respons ved følgende tester:

1) Histidin
2) Ampicillin
3) Naladixinsyre
4) Trimethoprim
5) Penicillin G
6) Methicillin.

5. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner lysegule kolonier,

b) vokser optimalt mellom 8 og 10,5,

c) gir positiv respons ved følgende tester.

1) Fosfohydrolase
2) α-galaktosidase
3) ß-galaktosidase
4) Ampicillin
5) Fusidinsyre
6) Methicillin
7) Tetracyklin
8) Vancomycin

9) Bacitracin

d) gir negativ respons ved følgende tester:

1) N-acetylglukosamin
2) Laktat
3) L-alanin
4) Mannitol
5) Propionat
6) Kaprat
7) Valerianat
8) Histidin
9) 3-hydroksybenzoat
10) 3-hydroksybutyrat
11) 4-hydroksybenzoat
12) Polymixin.

6. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) danner kremfarvede til beige-farvede, uregelmessige, flate kolonier,
b) vokser optimalt mellom pH 8,2 og 10,9,
c) gir positiv respons ved følgende tester:

1) Stivelse
2) N-acetylglukosamin
3) Sakkarose
4) Maltose
5) Acetat
6) Alanin
7) Citrat
8) Glykogen
9) 3-hydroksybutyrat
10) Penicillin G
11) Fusidinsyre
12) Methicillin
13) Tetracyklin

14) Bacitracin;

d) gir negativ respons ved følgende tester:

1) Pyruvat
2) 4-hydroksybenzoat
3) Leucin-arylamidase
4) Valin-arylamidase
5) α-galaktosidase
6) Polymixin.

7. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, bevegelige, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) celler ofte i par,
b) vokser optimalt mellom pH 9 og 10,
c) danner på alkalisk agar glatte, gjennomskinnelige, beige-farvede kolonier med diameter 1-2 mm, som er sirkulære, konvekse med hel kant,
d) i alkalisk buljong er veksten (37°C) fnuggaktig med en ring eller overflatehinne og dannelse av et bunnfall,
e) vokser optimalt ved 20-30°C,
f) ingen vekst ved 15 eller 40°,
g) KOH-testen er positiv,
h) aminopeptidasetesten er svakt positiv,
i) oksydasetesten er svakt positiv,
j) katalsetesten er positiv,
k) obligat halofil,
l) vokser optimalt med 4% NaCl,
m) ingen vekst med 0 eller 8% NaCl,
n) testen for hydrolyse av gelatin er langsomt positiv,
o) hydrolyse av stivelse er positiv,
p) vokser ikke på enkle sukkerarter,
q) vokser ikke på organiske syrer,
r) vokser på gjærekstrakt og peptoner.

8. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, bevegelige, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) vokser optimalt mellom pH 8,2 og 10,9,
b) danner på alkalisk agar glatte, opake, beige eller brunfarvede kolonier med diameter 2-4 mm, som har sirkulær form, konveks profil og med hel kant,
c) i alkalisk buljong er veksten (37°C) massiv og fnuggaktig med et bunnfall og overflatehinne,
d) vokser optimalt mellom 20 og 37°C,
e) ingen vekst ved 8 eller 40°C eller over denne temperatur,
f) KOH-testen er positiv,
g) aminopeptidasetesten er positiv,
h) oksydasetesten er meget svakt positivt,
i) katalasetesten er positiv,
j) vokser ved en NaCl-konsentrasjon på mellom 0 og 15%,
k) ingen vekst med 20% NaCl,
l) testen for hydrolyse av gelatin er negativ,
m) hydrolyse av stivelse er negativ,
n) vokser på gjærekstrakt,
o) vokser på organiske syrer valgt fra gruppen som består av suksinat, pyruvat, citrat, malonat, acetat og laktat,
p) vokser på fettsyrer valgt fra gruppen som består av propionat, valerianat og suberat,
q) vokser på aminosyrer valgt fra gruppen som består av prolin, serin, histidin og lysin.

9. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) vokser optimalt mellom pH 9 og 10,5,

b) danner på alkalisk agar glatte, opake, brunfarvede kolonier med diameter 3-4 mm, som har ganske uregelmessig form, har generelt flat til lett bølget profil med fliket kant,
c) i alkalisk buljong er veksten (37°) moderat til massiv, og blir fnuggaktig med et bunnfall og overflatehinne,
d) vokser optimalt mellom 20 og 40°C,
e) ingen vekst ved 45°C,
f) KOH-testen er positiv,
g) aminopeptidasetesten er positiv,
h) oksydasetesten er negativ,
i) katalasetesten er positiv,
j) vokser ved en NaCl-konsentrasjon på 0-12%,
k) ingen vekst ved 20% NaCl.
l) testen for hydrolyse av gelatin er positiv.
m) hydrolyse av stivelse er svakt positiv,
n) vokser ikke på enkle sukkerarter,
o) vokser på gjærekstrakt,
p) vokser på organiske syrer valgt fra gruppen som består av pyruvat, citrat, acetat og laktat,
q) vokser på fettsyrer valgt fra gruppen som består av propionat, kaprat og valerianat,
r) vokser på aminosyrer valgt fra gruppen som består av prolin, alanin og lysin.

10. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) vokser ikke under pH 7,5,
b) danner på alkalisk agar glatte, kremfarvede kolonier, i begynnelsen gjennomskinnelige, men som blir opake,
c) på alkalisk agar utvikles koloniene fra sirkulære, hele og blir uregelmessige, med fliket form og konveks profil,

d) i alkalisk buljong er veksten (37°C) langsom, lett, fnuggaktig med bunnfall, men ingen overflatehinne,
e) vokser optimalt mellom 10 og 40°C,
f) ingen vekst ved 8 eller 45°C,
g) KOH-testen er positiv,
h) aminopeptidasetesten er negativ,
i) oksydasetesten er positiv,
j) katalasetesten er positiv,
k) vokser ved en NaCl-konsentrasjon på mellom 0 og 15%,
l) ingen vekst med 20% NaCl,
m) testen for hydrolyse av gelatin er positiv,
n) hydrolyse av stivelse er svakt positiv,
o) vokser på gjærekstrakt og peptoner,
p) vokser på sukkerarter,
q) vokser på organiske syrer,
r) vokser på aminosyrer.

11. Ren bakteriekultur egnet for fremstilling av alkalitolerante enzymer, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakteriene består av aerobe, gram-negative, små, stavformede, obligat alkalifile bakterier med følgende karakteregenskaper:

a) cellene danner ofte korte kjeder,
b) vokser ikke ved pH under 8,
c) danner på alkalisk agar glatte, sirkulære, konvekse kolonier med hel kant, med diameter ca. 1 mm og som i begynnelsen er gjennomskinnelige, med kremfarvet/-beige farve, og koloniene blir opake og får brun farve med tiden,
d) i alkalisk buljong er veksten (37°C) i begynnelsen jevnt uklar med et bunnfall, men ingen overflatehinne, og blir fnuggaktig med dannelse av en hinne,
e) vokser optimalt mellom 30 og 37°C,
f) ingen vekst ved 40°C,
g) KOH-testen er positiv,
h) aminopeptidasetesten er positiv,
i) oksydasetesten er positiv,
j) katalasetesten er positiv,

k) obligat halofil,
l) vokser med 4% NaCl,
m) ingen vekst med 0 eller 8% NaCl,
n) testen for hydrolyse av gelatin er langsomt positiv,
o) hydrolyse av stivelse er negativ,
p) vokser på gjærekstrakt og peptoner,
q) vokser på sukkerarter,
r) vokser på organiske syrer,
s) vokser på fettsyrer,
t) vokser på aminosyrer.

12. Anvendelse av bakteriene ifølge et hvilken som helst av kravene 1-11 for fremstilling av alkali-tolerante enzymer, som omfatter:

at bakteriene ifølge et hvilket som helst kravene 1-11 dyrkes i et dyrkningsmedium;
bakteriene skilles fra dyrkningsmediet; og
enzymaktiviteten utvinnes fra dyrkningsmediet.

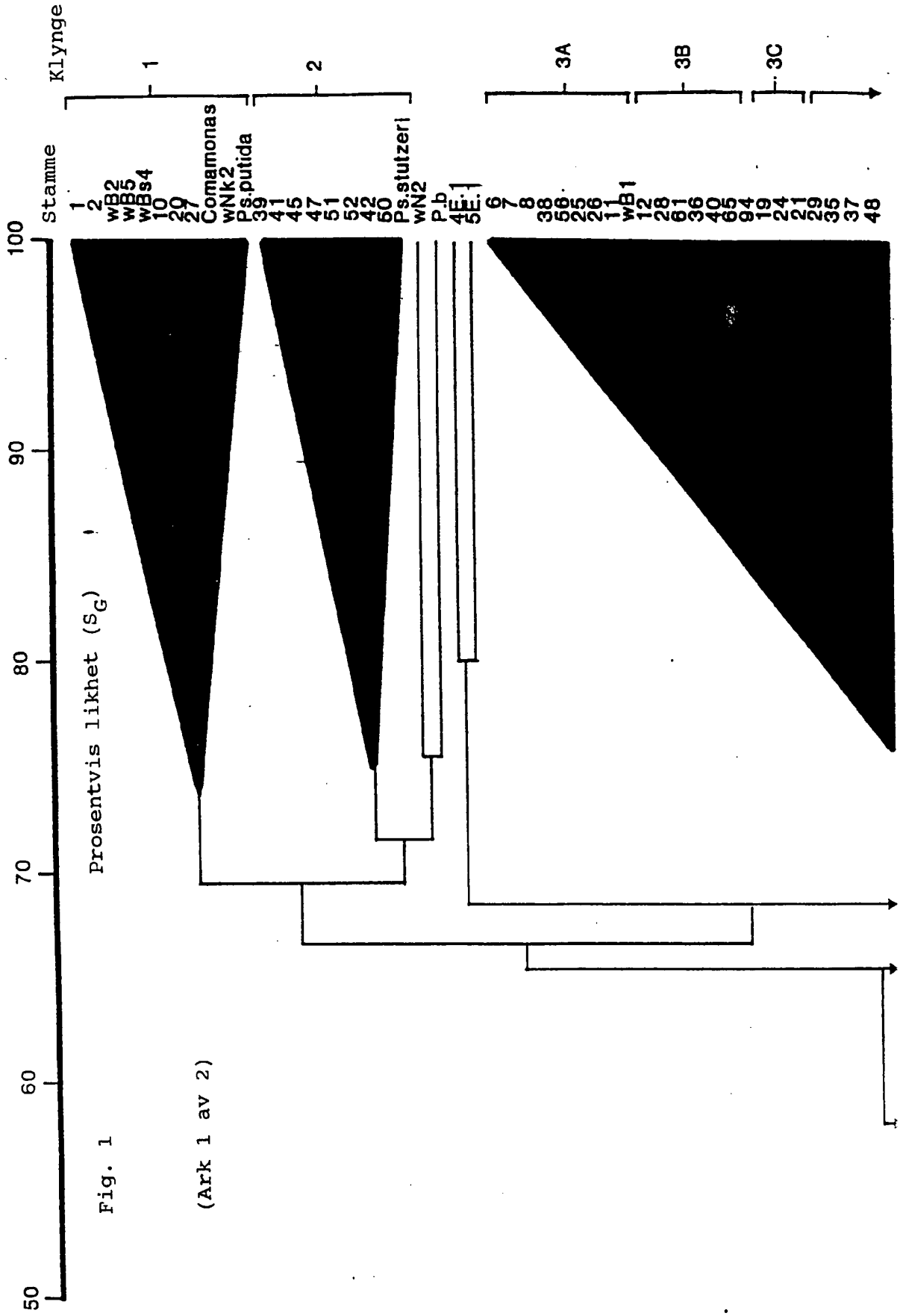


Fig. 1

(Ark 1 av 2)

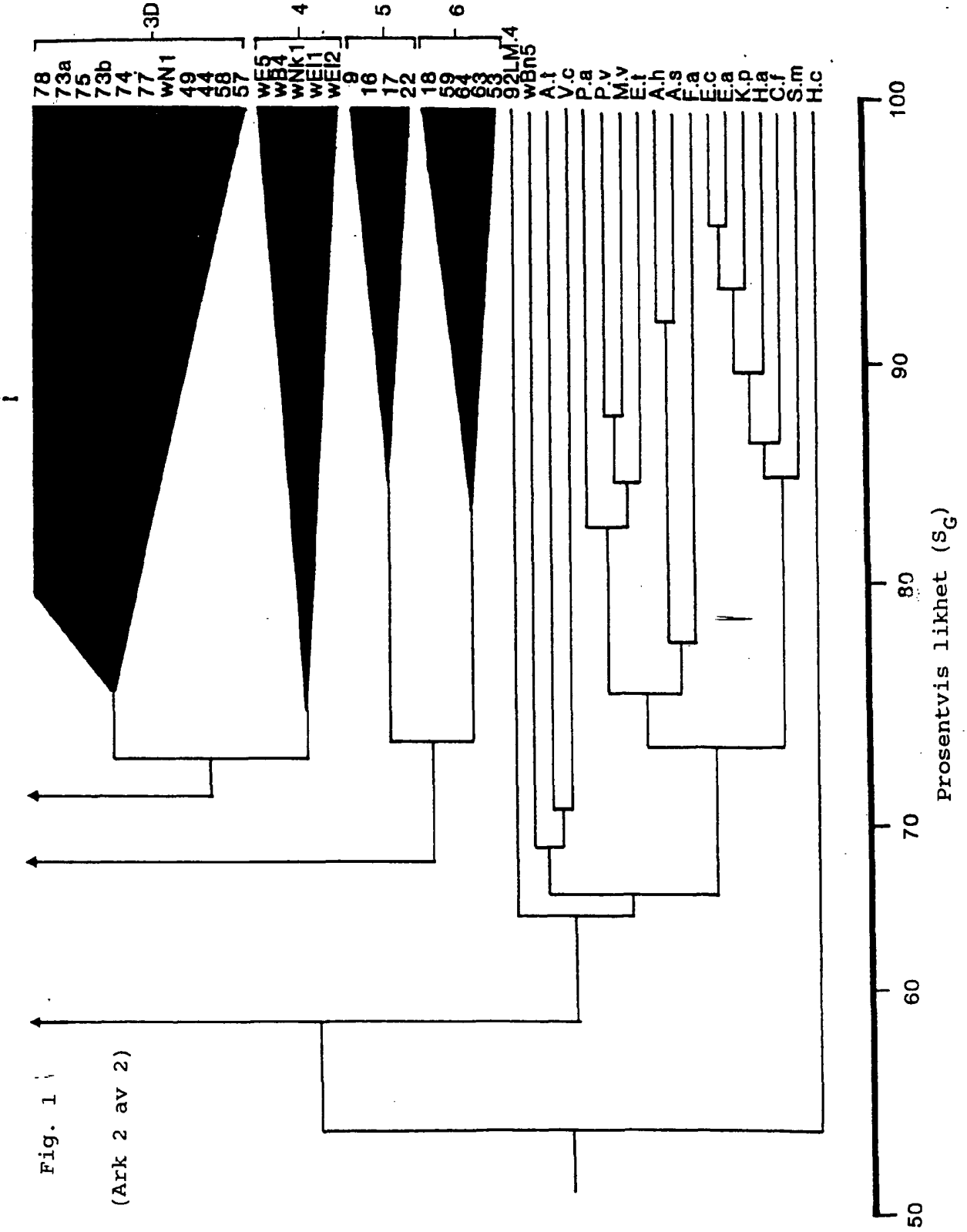


Fig. 1

(Ark 2 av 2)

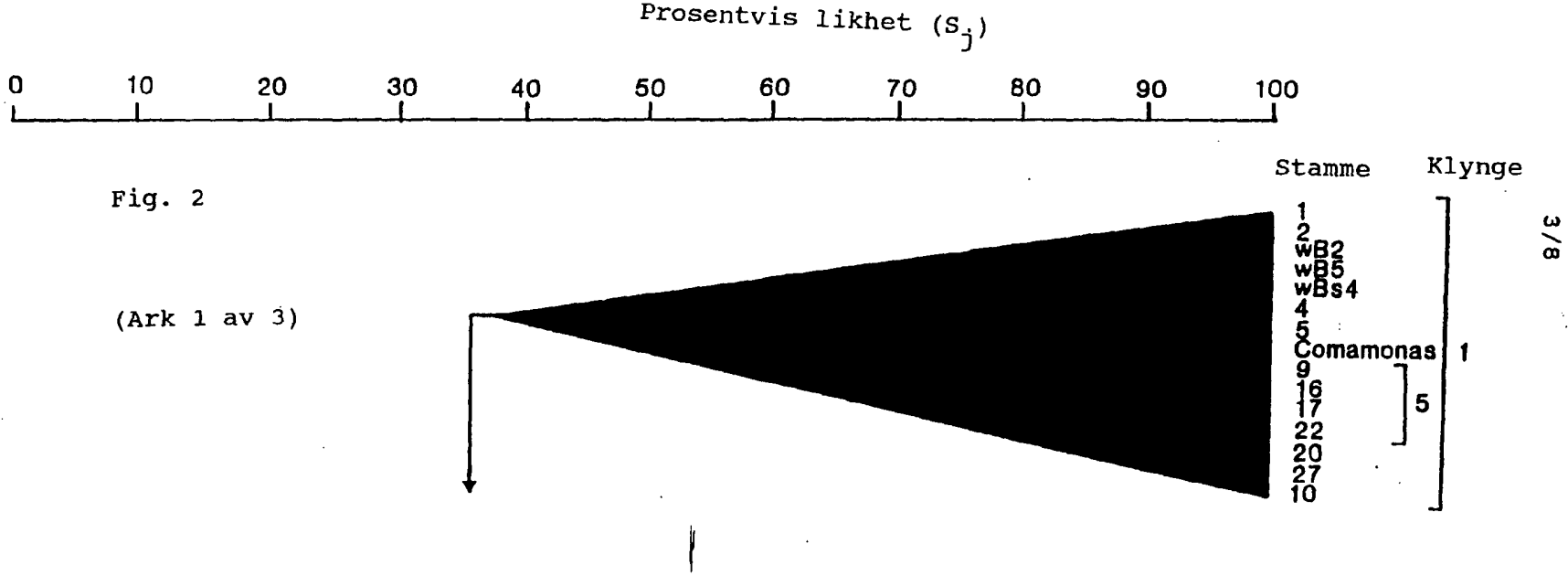


Fig. 2

(Ark 1 av 3)

3/8

309198

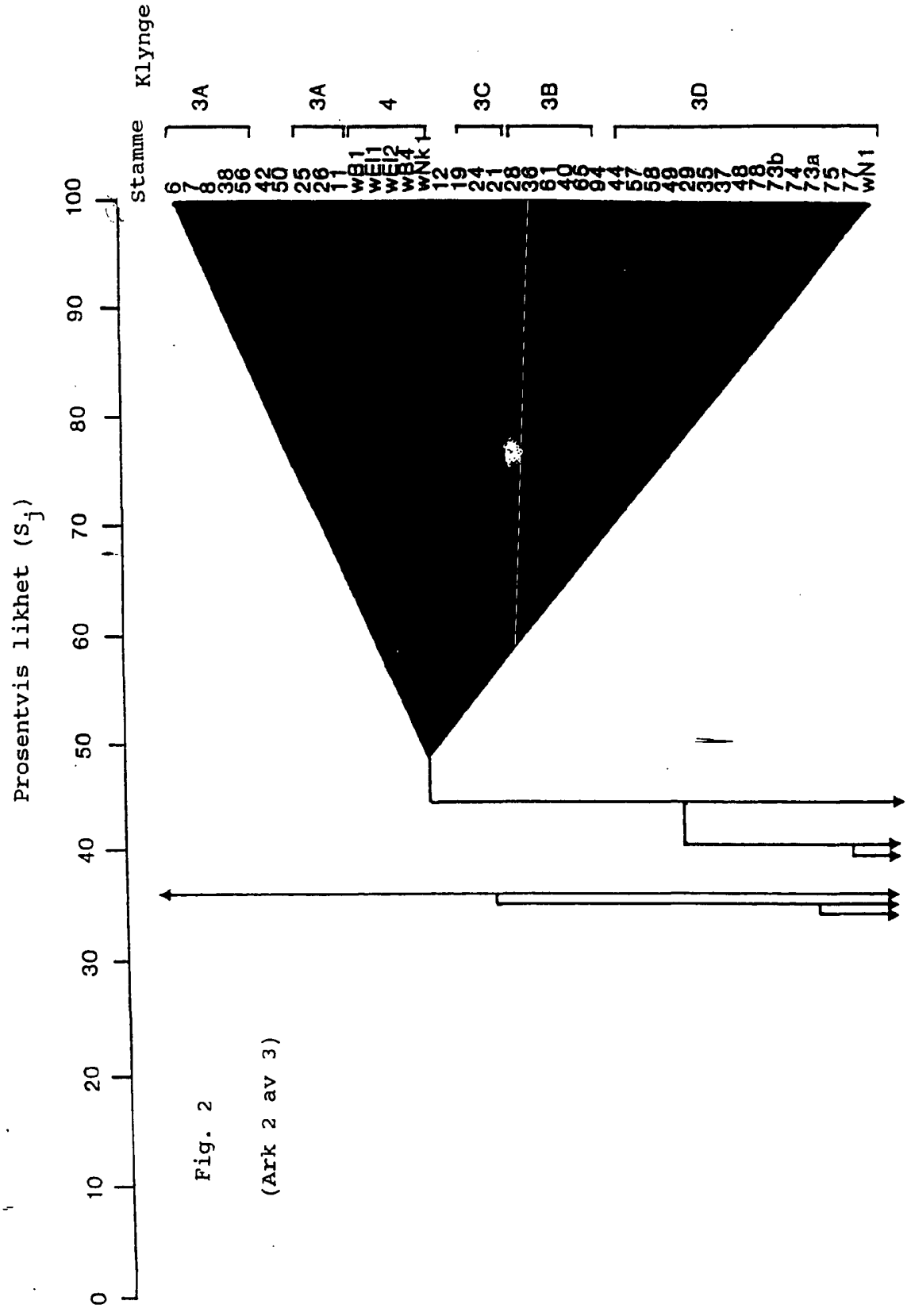


Fig. 2

(Ark 2 av 3)

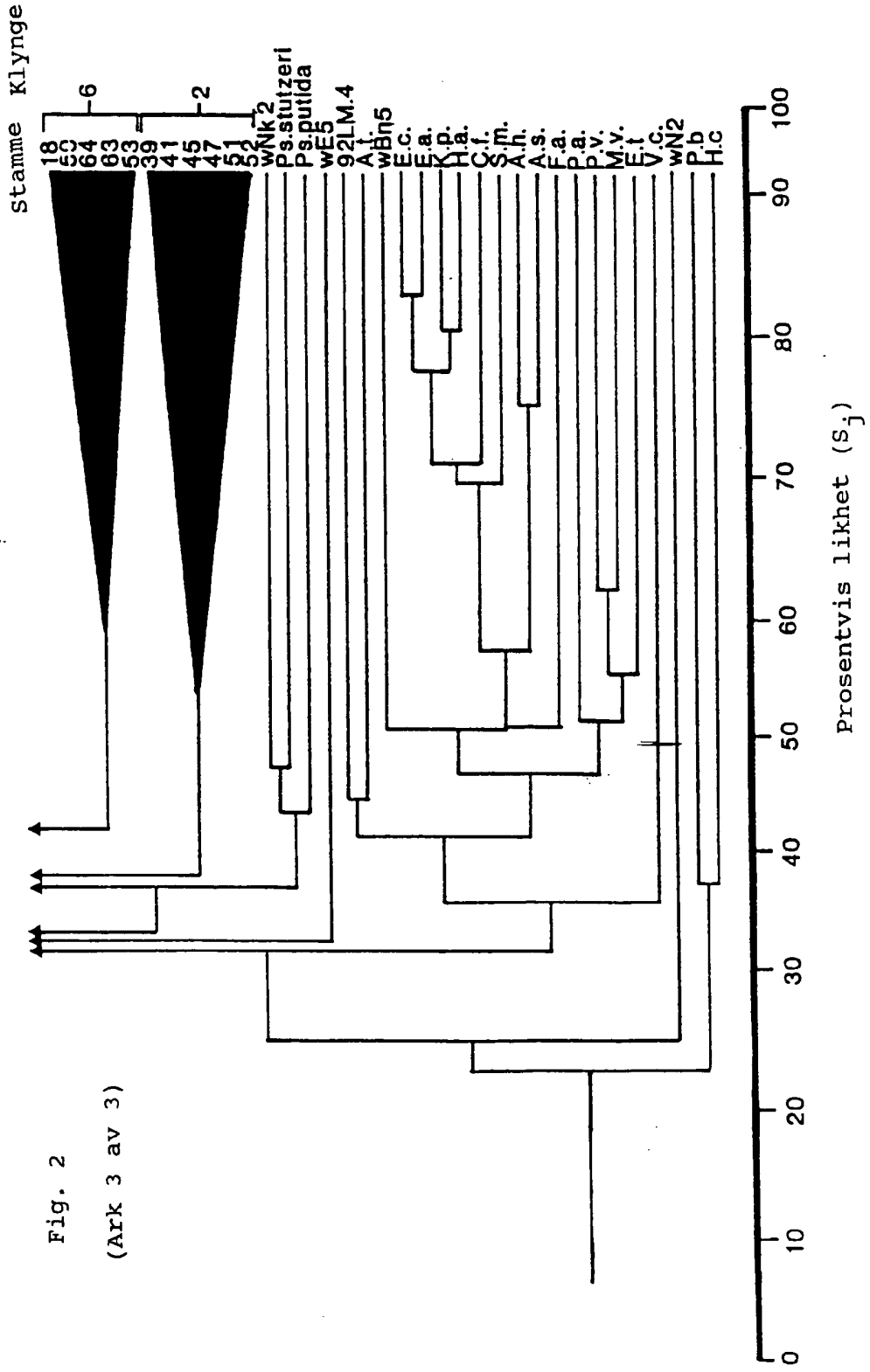


Fig. 2

(Ark 3 av 3)

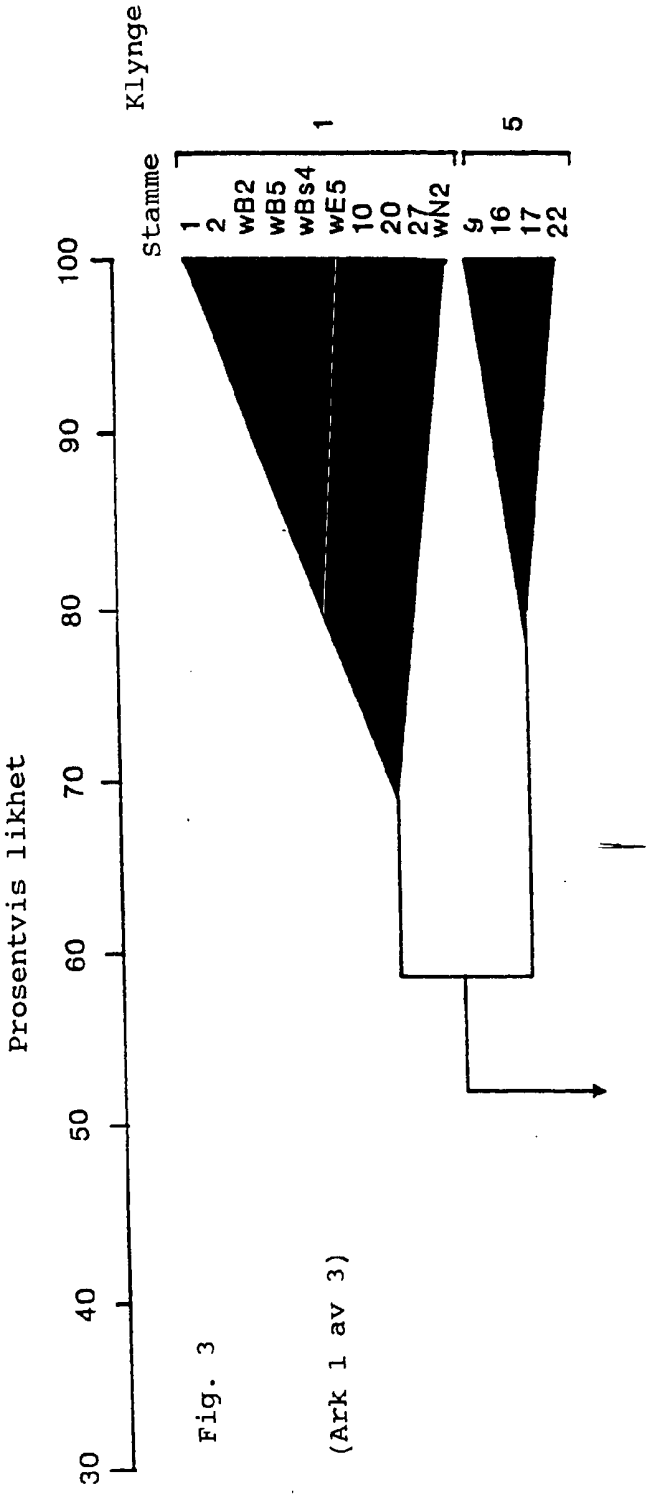


Fig. 3

(Ark 1 av 3)

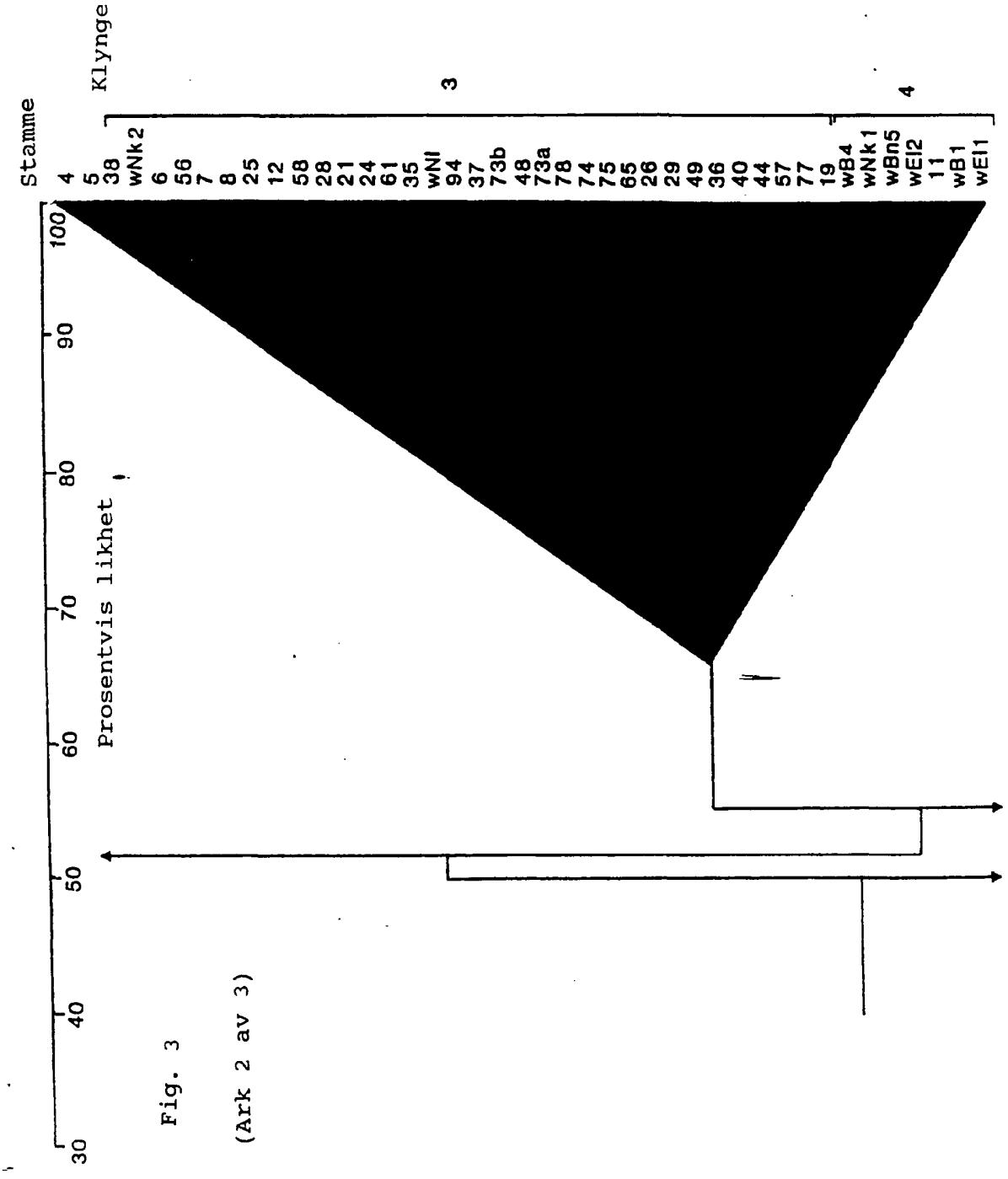


Fig. 3

(Ark 2 av 3)

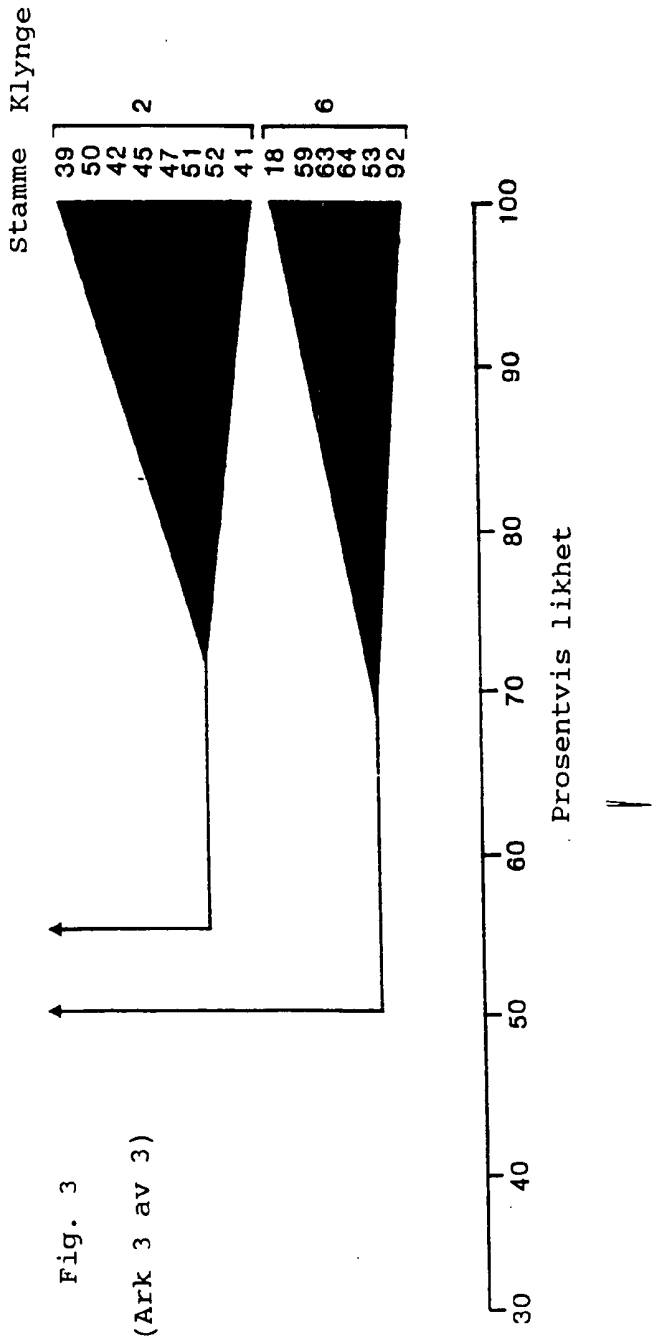


Fig. 3

(Ark 3 av 3)