

涅斯捷连科氏菌属菌株的分离及系统学研究

陈华红^{1,2} 李文均^{1*} 张玉琴¹ 王 栋^{1,3} 唐蜀昆¹

(¹ 云南大学 云南省微生物所 教育部微生物资源开放重点实验室 昆明 650091)

(² 楚雄师范学院化学系 楚雄 675000) (³ 红河大学理学院 蒙自 661100)

摘 要 :从我国新疆及埃及东部高盐环境中分离到 4 株形态上类似于涅斯捷连科氏菌属的革兰氏阳性菌株。以该属的 2 个典型菌株(*Nesterenkonia halobia* DSM 20541^T和 *Nesterenkonia lacusekhoensis* DSM 12544^T)为对照,对 4 个分离菌株进行了包括形态学、生长 pH 范围、温度范围、耐 NaCl、KCl、MgCl₂·6H₂O、CaCl₂ 实验及酶学特性以及细胞化学组份、(G+C)mol% 含量测定、16S rDNA 分析及 DNA-DNA 杂交在内的多相分类研究。结果显示 4 个分离菌株属于涅斯捷连科氏菌属,但与涅斯捷连科氏菌属的 2 个有效发表种有显著差异,因此 4 个分离菌株均为该属的新种。

关键词 :高盐环境 涅斯捷连科氏菌属 16S rDNA 系统学

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)06-0811-05

1997 年 Stackebrandt 等^[1]提出具有普通细菌形态的高 G+C 含量的革兰氏阳性球菌和杆菌与传统的放线菌一起同属于放线细菌纲(*Actinobacteria classis*)这一新的分类体系。随着现代实验技术的不断提高,放线菌尤其是具普通细菌形态的放线细菌的研究高速发展,每年都有多个新的种、属被发现。到 2003 年止,在 *Actinobacteria classis* 已发现的近 160 余个属中,有近一半是具有普通细菌形态的。

在盐湖、盐碱地等高盐高碱条件下生长的微生物,由于有极为特殊的生理结构、代谢机制和遗传基因,能产生多种具独特生物活性的物质,可应用于生物环保、食品、制药、发酵工业、农业生产等方面,因而引起人们的广泛关注^[2],现已成为国际、国内研究的热门领域,而高盐碱环境中的放线细菌不但是研究生物进化和系统发育的极好材料,而且是一类极具开发前景的微生物资源。

涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)是放线杆菌纲、微球菌亚目、微球菌科中的一个属,该属菌株被描述为专性好氧的中度嗜盐菌,多为球状或短杆状,偶尔可见分支^[3,4]。该属原有 2 个有效发表种:喜盐涅斯捷连科氏菌(*N. halobia*)和回音湖涅斯捷连科氏菌(*N. lacusekhoensis*)。最近我室从我国新疆盐湖和埃及东部的盐碱土样中分离得到 4 个该属的菌株。为进一步了解该属菌株的生物学特性,我们初步研究了 4 个分离菌株和 2 个标准菌株(*N. halobia* DSM 20541^T)和(*N. lacusekhoensis* DSM 12544^T)的表型特征:包括形态学研究、营养条件如生长 pH 值范围、温度范围、不同种类盐的耐受程度等,以及各种生理生化特性及酶学特性等。研究发现 4 个分离菌株的生理特性等均比较特殊,可能是新物种,随后通过

细胞化学组份、(G+C)mol% 含量测定、16S rDNA 全系列分析及 DNA-DNA 杂交等实验对 4 株分离菌株进行了系统学研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 主要试剂: Lysozyme (50mg/mL)(上海华舜生物工程有限公司), Proteinase K (30mU/mg)(Merck), Pheno(上海华舜生物工程有限公司), Ex Taq DNA polymerase (5U/μL), dNTP Mix (2.5mmol/L), 10× Ex Taq buffer, 引物(各 10pmol/μL)由 TaKaRa 公司提供。

1.1.2 主要仪器: Olympus microscope BH-2, Techn FPROG05D PCR 仪, Cosmo Mupid-2 Mini Gel Migration, SYNGENE 成像系统, SHIMADU(岛津)公司的 UV-1601 型分光光度计。

1.2 菌种分离和培养条件

本研究中所使用的土壤样品分别为新疆和硕盐碱地、艾丁湖、小盐湖土样及埃及东部的盐碱土样。新疆土样采用含有 15% KCl 或 20% MgCl₂·6H₂O 的改良 ISP⁵⁻⁵¹培养基分离和富集。埃及土样采用 Horikoshi 培养基^[6]分离和富集。在 28℃ 培养 2~3d。

革兰氏反应同时采用经典的革兰氏染色法和 KOH 法相结合来确定。革兰氏阳性菌株使用 PCR 法^[7]快速筛选出可能的 *Actinobacteria* 菌株。

1.3 形态观察

菌株在 28℃ 培养 3d 后涂片进行革兰氏染色,使用光学显微镜观察菌体形态。菌株 YIM 70009 采用 Horikoshi 琼脂平

基金项目:国家自然科学基金(30270004);云南省科委应用基础基金项目(2001C0001Q, 2004C0002Q)

* 通讯作者。Tel: 86-871-5033790; Fax: 86-871-5173878; E-mail: wjli@ynu.edu.cn

作者简介:陈华红(1972-),女,云南楚雄人,博士研究生,研究方向为嗜盐碱放线细菌的分离及系统学研究。

其他作者:徐丽华¹,姜成林¹

收稿日期:2004-03-24,修回日期:2004-06-18

板,其余菌株采用加入 10% KCl 或 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 的 ISP5 琼脂平板划线,28℃培养 4~5d 后观察菌落特征。

1.4 营养条件研究

1.4.1 pH 耐受实验:采用 ISP5 液体培养基测定生长的 pH 耐受范围。在基础培养基中加入如下的缓冲液: pH5.0 的 HAC-NaAC; pH6.0 的 NaOH- KH_2PO_4 ; pH7.0 的 NaOH- KH_2PO_4 ; pH8.0 的 NaOH- KH_2PO_4 ; pH9.0 的 Borax-Boric acid; pH10.0 的 Borax-NaOH; pH11.0 的 Na_2HPO_4 -NaOH; pH12.0 的 KCl-NaOH。28℃培养,每 2d 观察一次。

1.4.2 温度耐受实验:将菌株分别接种于最适其生长的培养基上,分别在 4℃、室温、28℃、45℃、55℃ 条件下培养,每 3d 观察一次。

1.4.3 盐耐受实验:菌株采用 ISP5 作为基础培养基,分别加入 1%、3%、5%、10%、15%、20%、25% 的 NaCl、KCl、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 和 $CaCl_2$ 后,倒平板。在 28℃ 培养,每 2d 观察一次。

1.5 生理生化和酶学特性研究

采用 BioMerieux ATB ID 32 E test kits,利用 BioMerieux 自动化鉴定系统获得 32 个生理生化及酶学特性指标,碳源利用及产酸采用杭州天和微生物试剂公司的细菌生化微量鉴定管,其余实验参见 Shirling 等^[5]的方法和文献[8]的方法。

1.6 细胞化学研究

1.6.1 细胞壁肽聚糖类型和糖组分分析:分别参照 Schleifer 等^[9]和 Stanek 等^[10]的方法进行细胞壁肽聚糖类型和糖组分分析。

1.6.2 磷酸类脂分析:采用 Minnikin^[11]的方法进行磷酸类脂的提取、纯化及组分分析。

1.6.3 甲基萘醌分析:参照 Collins 等^[12]的方法进行醌的提取和分析。

1.6.4 脂肪酸组分分析:使用美国 MIDI 公司的 Sherlock 全自动细菌鉴定系统分析。

1.7 16S rDNA 全序列分析

1.7.1 总 DNA 的提取和 PCR 扩增:采用徐平等^[7]的微波法提取基因组 DNA,16S rDNA 的 PCR 扩增中所使用的引物由

TaKaRa 公司合成,扩增引物,PA: 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3'; PB: 5'-TTAAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 扩增体系(50 μ L):10 \times Ex Taq Buffer 5 μ L;dNTP Mix 4 μ L;Primer1 1 μ L(10pmol/ μ L);Primer2 1.2 μ L(10pmol/ μ L);Ex TaqTM 0.3 μ L(5U/ μ L);DNA 模板 1 μ L(约 10ng);ddH₂O 18.9 μ L。PCR 扩增条件:95℃ 5 min;95℃ 1min,54℃ 1min,72℃ 3 min,35 个循环,72℃ 10 min。

1.7.2 扩增产物测序:16S rDNA 扩增产物经纯化后,用 ABI PRISMTM377XL DNA Sequencer(Applied Biosystems)测序。测序引物:P1:5'-CGGAATTATITGGGCGTA-3';P2:5'-CCCTACCT-GGGCTTGACAT-3';P3:5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3'。

1.7.3 系统发育分析:将测得的序列与从 GenBank、EMBL、DDBJ 等数据库中获得的的相关种的 16S rRNA 基因序列采用 Clustal X 软件^[13]进行多序列比对分析,并用 MEGA 2.1^[14]软件中的邻接法和最大似然法进行系统发育分析。

1.8 (G+C)mol% 含量测定和 DNA-DNA 杂交

总 DNA 大量提取主要参照 Marmur 法^[15]。(G+C)mol% 测定采用熔点法(T_m 值法)测定^[16],参考菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM105,已知其(G+C)mol% 含量为 50.5%。DNA 杂交采用液相复性速率杂交法^[17]。

2 结果和讨论

从新疆样品中共分离出 38 株嗜盐或耐盐细菌,通过革兰氏染色和 KOH 实验剔除 6 株革兰氏阴性菌。从其余 32 株革兰氏阳性菌中筛选出 3 株涅斯捷连科氏菌属的菌株;从埃及样品中初步分离出 20 株耐盐细菌,剔除 3 株革兰氏阴性菌,从 17 株革兰氏阳性菌中筛选到 1 株涅斯捷连科氏菌属的菌株。4 株涅斯捷连科氏菌属菌株的表型特征见表 1,其形态均为球状或近于球状的短杆状,所有菌株的菌落形态都为圆形,边缘整齐,表面光滑不透明,稍隆起。其中 YIM 70084 的菌落较特殊,呈中间颜色淡红,边缘颜色较深的同心环状,其余菌株的单菌落则颜色比较均一。所有实验菌株都不产芽孢,只有 YIM 70081 和 YIM 70084 具有游动性。

表 1 实验菌株的分离源、分离培养基及部分表型特征

Table 1 Sample sources, media and some phenotypic characteristics of the tested strains

| Strains | Source of isolation | Media for isolation | Morphology | Color | Mobility | pH toleration | (G+C)mol% |
|------------------------|---|---------------------|------------|------------------|----------|---------------|-----------|
| YIM 70009 | Egypt | D | Coccioid | Yellowish-orange | - | 5~12 | 64.00 |
| YIM 70081 | Heshuo Xinjiang Province, China | A | Coccioid | Yellowish-brown | + | 7~10 | 61.50 |
| YIM 70084 | Heshuo Xinjiang Province, China | B | Coccioid | Reddish-orange | + | 7~9 | 64.41 |
| YIM 70097 | The Aiding Lake, Xinjiang Province, China | A | Rods | Yellow | - | 6~12 | 66.70 |
| DSM 12544 ^T | The Ekho Lake, East Antarctica | '398' | Coccioid | Yellow | - | 6~9 | 66.10 |
| DSM 20541 ^T | Unknown | Unknown | Coccioid | White | - | 6~10 | 71.50 |

A:ISP5 medium supplemented with 15% KCl; B:ISP5 medium supplemented with 20% $NaCO_3 \cdot 10H_2O$; D:Horikoshi medium; F:'398' medium^[18]。+ "Positive", - "Negative".

菌株 YIM 70009、YIM 70097 的最适生长 pH 值为 pH10 左右,但可在 pH 中性或偏酸的环境生长,其余实验菌株的最适

生长 pH 值为 pH7~8,但 YIM 70081 和 DSM 20541^T 可在 pH 等于或大于 10 的碱性环境生长,因此多数菌株是兼性嗜碱菌

或耐碱菌。

所有实验菌株均为耐盐菌,可在不含盐的培养基上生长,但其生长的最适盐浓度(NaCl)都多在 5%~10%。实验菌株对不同盐的耐受能力见表 2,由实验结果可知,实验菌株都可在一定浓度的 NaCl, KCl 和 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 条件下生长,其生长所需的 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 可相互替代。从菌株的生长状况来看,在同样浓度的条件下,菌株 YIM 70009、DSM 12544^T、DSM 20541^T 在含 K^+ 或 Mg^{2+} 的培养基上比在含 Na^+ 的

培养基上生长旺盛。从表 2 实验结果也可看出菌株 YIM 70009、DSM 12544^T 对 K^+ 和 Mg^{2+} 的耐受能力比对 Na^+ 的要强,菌株 DSM 20541^T 对 Mg^{2+} 的耐受能力比对 Na^+ 或 K^+ 的要稍强,而菌株 YIM 70097 对 K^+ 或 Na^+ 的耐受能力比对 Mg^{2+} 的要强。对于含 Ca^{2+} 的培养基只有菌株 YIM 70009 能生长,但最多只能耐受 5% 的 $CaCl_2$,因此菌株对 Ca^{2+} 的耐受能力较弱,推测 Ca^{2+} 对菌株的生长可能有抑制作用。

表 2 实验菌株对不同盐的耐受能力

Table 2 Tolerance results to NaCl, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2$ and KCl of the tested strains

| Strains | NaCl tolerant rang/% | Optimum NaCl/% | KCl tolerant rang/% | Optimum KCl/% | $MgCl_2$ tolerant rang/% | Optimum $MgCl_2$ /% | $CaCl_2$ tolerant rang/% | Optimum $CaCl_2$ /% |
|------------------------|----------------------|----------------|---------------------|---------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|
| YIM 70009 | 0~15 | 3~5 | 0~25 | 5~15 | 0~25 | 5~15 | 0~5 | 1 |
| YIM 70081 | 0~20 | 5~10 | 0~20 | 5~15 | 0~20 | 10~15 | - | - |
| YIM 70084 | 0~25 | 5~10 | 0~20 | 5~15 | 0~25 | 5~15 | - | - |
| YIM 70097 | 0~25 | 5~10 | 0~25 | 3~15 | 0~10 | 5 | - | - |
| DSM 12544 ^T | 0~15 | 5~10 | 0~25 | 5~10 | 0~20 | 10 | - | - |
| DSM 20541 ^T | 0~20 | 5~10 | 0~20 | 5~10 | 0~20 | 5~10 | - | - |

所有菌株的最适生长温度均为 28℃,生长温度范围多为室温到 37℃,在室温和 28℃ 的条件下,菌株生长最快。YIM 70009、YIM 70081、YIM 70084 可在 4℃ 缓慢生长,在 45℃ 和 55℃ 所有实验菌株都不能生长。

从实验菌株的生理生化特性实验结果来看这 4 株分离菌株与该属的两个典型菌株之间有较大差别,其细胞化学组份如细胞壁肽聚糖类型和糖组分、磷酸类脂、甲基萘醌、脂肪酸等的分析结果(表 3)差异也较大。

表 3 实验菌株的化学分类特性

Table 3 The chemotaxonomic characteristics of the tested strains

| Chemotaxonomic data | YIM 70009 | YIM 70081 | YIM 70084 | YIM 70097 | DSM 12544 ^T | DSM 20541 ^T |
|----------------------|--|---|---|---|---|---|
| Peptidoglycan type | Lys-Gly-D-Asp | Lys-Gly-D-Asp | L-Lys-Gly-Asp | L-Lys-Gly-L-Glu | l-Lys-l-Glu | l-Lys-Gly-l-Glu |
| Sugars | Rib, Man, Glu | Rib, Xyl, Ala | Rib, Ara, Glu, Gal | Rib, Gal | ND | ND |
| Polar lipids | DPG, PG, PI | DPG, PG, PI | DPG, PG, PI, GL | DPG, PG, PC | DPG, PE, PC, GL | DPG, PG, PI, GL |
| Major Menaquinones | MK-7, MK8, MK-9 | MK-7, MK8 | MK-7, MK8 | MK-7, MK8, MK-9 | MK-7, MK8 | MK-7, MK8, MK-9 |
| Major fatty acids(%) | aiC ₁₅ :0(27.63%), iC ₁₆ :0(33.11%), aiC ₁₇ :0(20.68%). | aiC ₁₅ :0(10.27%), aiC ₁₅ :0(15.12%), iGC ₁₆ :0(11.09%), iC ₁₆ :0(31.40%), aiC ₁₇ :0(15.27%) | aiC ₁₅ :0(51.33%), iC ₁₆ :0(17.32%), aiC ₁₇ :0(13.74%), aiC ₁₅ :0(9.97%) | aiC ₁₅ :0(28.50%), aiC ₁₇ :0(38.10%) | aiC ₁₅ :0(35.3%), iC ₁₆ :0(15.9%), aiC ₁₇ :0(23.0%), | aiC ₁₅ :0(65.0%), aiC ₁₇ :0(22.6%) |

根据 4 株分离菌株的 16S rDNA 近似于全长的序列(YIM70009 1461bp, YIM70081 1502bp, YIM70084 1490bp, YIM70097 1506bp)并与该属的 2 个典型菌株及相关属种的典型菌株共同构建系统进化树(图 1),并进行系统发育分析。从图 1 可以看出 4 个分离菌株与涅斯捷连科氏菌属的典型种 *Nesterenkonia Halobia* DSM 20541^T 构成一个独立的分支。菌株 YIM 70097 与 *N. lacusekhoensis* DSM12544^T 和 *N. halobiag* DSM 20541^T 的序列相似性为 96.8%,而菌株 YIM 70084 与 *N. lacusekhoensis* DSM12544^T 和 *N. halobia* DSM 20541^T 的同源性分别为 96.3% 和 96.6%,菌株 YIM 70084 与 YIM 70097 之间

的序列同源性为 96.9%。菌株 YIM 70009、YIM 70081、YIM 70084 这 3 个菌株又形成一小分支,它们相互之间的同源性均大于 99%,但它们与 YIM 70097 及 *N. halobia* (DSM 20541^T) 的 16S rDNA 序列同源性都低于 97%。YIM 70097 和 YIM 70084 的表型特征、生理学特性、细胞化学组份均与涅斯捷连科氏菌属的两个有效发表种有较大差别,因此 2 个菌株为本属的 2 个新种, YIM 70084 被命名为耐盐涅斯捷连科氏菌(*N. halotolerans* sp. nov.), YIM 70097 命名为新疆涅斯捷连科氏菌(*N. xinjiangensis* sp. nov.)。

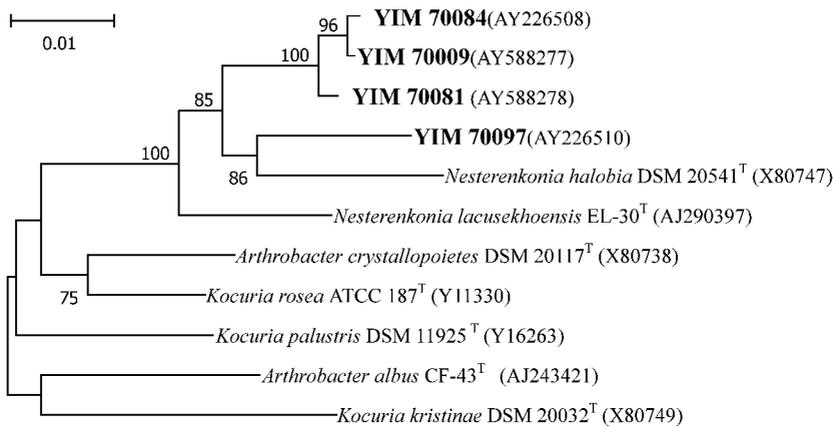


图 1 菌株 YIM 70009, YIM 70081, YIM 70084, YIM 70097 及其从 GenBank 等数据库中调集的相关属种构建的以 16S rDNA 序列为基础的系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the relationships among strains YIM 70009, YIM 70081, YIM 70084, YIM 70097 and the other related species downloaded from GenBank etc. The sequence of *Streptomyces megasporus* DSM 41476^T (Z68100) was used as outgroup. Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 resamplings). Bar, 1% sequence divergence.

尽管菌株 YIM 70009 和 YIM 70081 的表型特征与菌株 YIM 70084 有一定差别,但它们相互间的进化关系还要进一步通过 DNA-DNA 杂交实验来确定。DNA-DNA 杂交实验结果表明,菌株 YIM 70009、YIM 70081 与菌株 YIM 70084 的同源性分别为 43.3% 和 39.13%, 而 70081 与 70009 之间的同源性为 45.2%, 远低于 70% 的分类标准, 因此菌株 YIM 70009 和 YIM 70081 也应为涅斯捷连科氏菌属的新种。3 株菌的表形特征、生理生化特征和化学分类特征都有一定区别。因此根据上述的多相分类研究结果也可以得出结论, 菌株 YIM 70009 和 YIM 70081 也为涅斯捷连科氏菌属的 2 个新种, YIM 70081 被命名为藤黄涅斯捷连科氏菌(*N. lutea* sp. nov.), YIM70009 则命名为橙黄涅斯捷连科氏菌(*N. sandarakina* sp. nov.)。

过去从高盐环境中发现的高 G + C 含量的放线细菌较少, 仅有少数的几个属的菌株, 而涅斯捷连科氏菌属是唯一的一个嗜盐放线细菌属。本次研究中从新疆和埃及高盐碱环境发现多个涅斯捷连科氏菌属新种, 这表明该属菌株可能是高盐碱环境中的优势放线细菌类群, 这对高盐环境微生物的深入研究具有一定意义。

参 考 文 献

- [1] Stackebrandt E, Rainey F A, Ward-rainey N. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis* nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1997 **47** :479 - 491.
- [2] 任培根, 周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展. *微生物学报*, 2003 **43** (3) :427 - 431.
- [3] Stackebrandt E, Koch C, Gvozdiak O, et al. Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int J Syst Bacteriol*, 1995 **45** :682 - 692.
- [4] Collins M D, Lawson P A, Labrenz M, et al. *Nesterenkonia lacusekhoensis* sp. nov., isolated from hypersaline Ekho Lake, East Antarctica, and emended description of the genus *Nesterenkonia*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002 **52** :1145 - 1150.
- [5] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966 **16** :313 - 340.
- [6] Horikoshi K, Grant W D. *Extremophiles*. Ralph Mitchell, Division of Applied Sciences. Harvard University. 1998 **6** :155 - 158.
- [7] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. PCR 快速鉴别 *Actinobacteria* 三种模板制备方法的比较. *中国抗生素杂志*, 2003 **8** (7) :38 - 39.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] Stanek J L, Roberts G D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl Microbiol*, 1974 **28** :226 - 231.
- [10] Schleifer K H, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*, 1972 **36** :407 - 477.
- [11] Minnikin D E, O'Donnell A G, Goodfellow M, et al. An integrated procedure for the extraction of isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Meth*, 1984 **2** :233 - 241.
- [12] Collins M D, Pirouz T, Goodfellow M. et al. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol*, 1977 **100** :221 - 230.
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997 **24** :4876 - 4882.
- [14] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 2001 **17** :1244 - 1245.
- [15] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol*, 1962 **3** :208 - 218.

- [16] Marmur J , Doty P . Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* , 1962 **5** :109 - 118 .
- [17] De ley J , Cattoir H , Reynaerts A . The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* , 1970 , **12** :133 - 142 .
- [18] Labrenz M , Collins M D , Lawson P A , et al . *Antarctobacter heliothermus* gen. nov. , sp. nov. , a budding bacterium from hypersaline and heliothermal Ekho Lake. *Int J Syst Bacteriol* , 1998 **48** :1363 - 1372 .

Study on Isolation and Systematic Taxonomy of Strains of Genus *Nesterenkonia*

CHEN Hua-Hong^{1,2} LI Wen-Jun¹ ZHANG Yu-Qin¹ WANG Dong^{1,3} TANG Shu-Kun¹

(¹ Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education , Yunnan Institute of Microbiology , Yunnan University , Kunming 650091 , China)

(² Department of Chemistry , Chuxiong Normal College , Chuxiong , Yunnan 675000 , China)

(³ Science College , Honghe University , Mengzi 661100 , China)

Abstract : Four Gram-positive , *Nesterenkonia*-like strains were isolated from hypersaline soils collected from Xinjiang Province , China and East of Egypt . The four strains were studied using a polyphasic approach , which included morphological observation , growth pH and temperature range , tolerance to NaCl , KCl , MgCl₂ · 6H₂O , CaCl₂ , enzyme profiles , chemotaxonomy , (G + C) mol% content , 16S rDNA sequences analysis and DNA-DNA hybridization , and the only two type strains of the genus *Nesterenkonia* , *Nesterenkonia halobia* DSM 20541^T and *Nesterenkonia lacusekhoensis* DSM 12544^T were used as control . The test results showed the four isolates belonged to the genus *Nesterenkonia* , but they had great differences from the other two valid species of the genus *Nesterenkonia* , and thus they should represent four new species of this genus .

Key words : Hypersaline habitat , Genus *Nesterenkonia* , 16S rDNA , Systematics

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30270004) ; Yunnan Provincial Natural Science Foundation (2001C0001Q , 2004C0002Q)

* Corresponding author. Tel : 86-871-5033790 ; Fax : 86-871-5173878 ; E-mail : wjli@ynu.edu.cn

Other authors : Xu Li-Hua¹ , Jiang Cheng-Lin¹

Received date : 03-24-2004

《微生物学报》投稿要求

1. 投稿范围 : 凡有关微生物学基础研究、应用基础研究及其高技术创新等领域的研究成果 , 包括普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究报告、简报等 , 本刊均欢迎投稿。
 2. 应首次发表 : 所有来稿均应未在公开出版的刊物上发表过。要求论点明确、数据可靠、行文简练、用词规范、图表清晰、结论合理。
 3. 介绍信 : 所有来稿要求一式两份。论文是否涉及保密、署名是否无误 , 请出示第一署名单位的介绍信。若是与国外作者合写的论文 , 应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的信函说明。
 4. 作者联系方式 : 请在投稿时提供通讯作者或第一作者的 Tel、Fax 和 E-mail 地址。
 5. 审稿费 : 投稿时请随寄 100 元审稿费 , 可通过邮局汇来。(务请在汇款单上注明稿件第一作者、发票应开单位、发票邮寄地址和收信人。)
 6. 投稿方式 : 本刊中英文稿件均收 , 采用邮寄投稿。要求五号宋体、A4 纸单面打印稿 2 份 , 并同时要求提供电子版 (附软盘或 E-mail 传来 actamicro@sun.im.ac.cn)。
 7. 投稿及汇款地址 (100080) 北京中关村中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部
- 欲知更详细的投稿要求请登陆我刊的网址 : <http://www.im.ac.cn/journals>