

极端嗜盐菌新种的鉴定

王大珍 周培瑾 田新玉 马贵宏

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从青海省大柴旦盐湖及塘沽晒盐池中分离到数株极端嗜盐杆菌。其中 F3 及 F5 两株菌在 15—25% NaCl 的培养基中生长, 最适 NaCl 浓度为 18%, 低于 12% 不生长。两株菌的细胞壁中不含二氨基庚二酸, 细胞膜内含有具甘油二醚键的不皂化性磷酸甘油醚衍生物, 均产色素。F3 及 F5 两株菌均为好气菌, 不运动, 单个, 革兰氏阴性杆菌。细胞大小分别为 $1-1.5 \times 2.5-3.5 \mu\text{m}$ (F3) 及 $0.6-0.7 \times 1.7-4.2 \mu\text{m}$ (F5)。在牛奶-盐-琼脂上的菌落呈圆形, 边缘整齐, 表面光滑。F3 菌株的菌落中间略有突起, 朱红色, 直径约 1mm; F5 菌株的菌落扁平, 浅粉至淡红色, 直径约 1.5mm。两株菌生长的最适温度为 37—45℃; 由硝酸盐产生亚硝酸盐并产气; 由色氨酸产生吲哚, 但不产 H_2S , 不代谢糖类及醇类。不具有氧化酶、尿素酶及精氨酸双水解酶。但 F3 菌株具有过氧化氢酶。因此, 这两株菌与已知菌盐制品盐杆菌 (*Halobacterium salinarum*) 及盐生盐杆菌 (*Halobacterium halobium*) 不同; 与迄今未确定分类位置的红皮盐杆菌 (*Halobacterium cutirubrum*)、死海盐杆菌 (*Halobacterium marismortui*) 及特腊帕尼盐杆菌 (*Halobacterium trapanicum*) 不同。另一方面, F3 菌株与 F5 菌株之间, 在菌体大小、色素、水解淀粉和酪素, 以至明胶液化方面, 也有明显差异。因此, 将这两株菌定为盐杆菌属 (*Halobacterium*) 中的两个新种, F3 菌株命名为大柴旦盐杆菌 (*Halobacterium dachaidanensis* sp. nov.); F5 菌株命名为塘沽盐杆菌 (*Halobacterium tangguensis* sp. nov.)。

关键词 大柴旦盐杆菌; 塘沽盐杆菌

对 NaCl 具特殊适应性的菌称为嗜盐菌。它通常分为两类: 专性嗜盐菌, 在 NaCl 浓度高于 2% 的培养基中生长; 兼性嗜盐菌, 在 NaCl 浓度低于 2% 的培养基中也生长。前者进一步分为中等嗜盐菌和极端嗜盐菌。中等嗜盐菌在含 NaCl 3—15% 的培养基中生长; 极端嗜盐菌在 15% 至饱和 NaCl 的培养基中生长^[1]。极端嗜盐菌中, 绝大多数产色素, 胞壁具一定的特征^[2]。分类学上把嗜盐菌科 (*Halobacteriaceae*) 分为两个属^[3], 即嗜盐杆菌属 (*Halobacterium*) 和嗜盐球菌属 (*Halococcus*)。

我们从盐湖及晒盐池中分离到数株极端嗜盐杆菌, 本文报道了其中 F3 及 F5 两株菌的鉴定结果。

材料和方法

(一) 样品来源

用于分离菌种的样品, 分别采自青海省大柴旦盐湖(饱和盐)的湖底泥及塘沽盐场晒盐池的底泥。

(二) 分离和培养

富集培养和分离采用了 Gibbons 培养基^[4], 加以修饰如下 (g/l): 酪素水解物 (Difco) 5, 酵母浸出物 (Difco) 10, 蛋白胨 (Oxoid L37*) 5, 柠檬酸钠 3, KCl 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20, NaCl 250 (固体培养基加琼脂 20g), pH7.0。收集菌体采用 CM 培养基 (g/l)^[5]: 酪素水解物 7.5, 酵母浸出物 10, 柠檬酸钠 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20, KCl 2, Fe^{++}

本文于 1983 年 1 月 8 日收到。

承中国科学院盐湖研究所大力协助在盐湖采样; 本所技术室协助拍摄电镜照片, 在此一并致谢。

10ppm, NaCl 250, pH6.5, 37℃ 光照培养。

(三) 鉴定方法

主要参照《伯杰氏鉴定细菌学手册》第七版^[1]和第八版^[2]进行。

1. 形态特征: 接种牛奶-盐-琼脂培养基^[3], 37℃ 培养。培养基制做方法: (1) 脱脂牛奶 150 ml, 8 磅 20 分钟灭菌; (2) 无机盐溶液 30ml (内含 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3g, KNO_3 0.6g, NaCl 60g 及微量柠檬酸铁), 8 磅 30 分钟灭菌; (3) 琼脂溶液 120ml (内含水解酪蛋白 1.5g, 甘油 3g, 琼脂 4.5g), 8 磅 30 分钟灭菌。无菌操作将成份 (2) 与 (3) 混合, 用 NaOH 调 pH 至 8.4, 然后混入成份 (1), 摇匀。

2. 嗜盐度试验: 采用 CM 培养基, 37℃ 光照, 摇床振荡培养 6 天, 用 721 型分光光度计于 460nm 测吸光度。

3. 检定细胞色素: 用 CM 培养基富集细胞, 菌体经悬浮后, 用氯仿-甲醇 (1:1) 溶液抽提, 用紫外分光光度计测吸收峰, 以已知菌种盐生盐杆菌 R_1 (*H. halobium* R_1) 为对照菌^[4]。

4. 二氨基庚二酸的鉴定: 菌体酸解后, 用纸谱法测定^[5]。以二氨基庚二酸试剂为标准样。

5. 甘油二醚的测定: 使用薄层平板法及红外光谱法^[6]。以已知种盐生盐杆菌 R_1 及非嗜盐菌 74-230 (为短杆菌属菌 (*Brevibacterium*), 得自我室石油微生物组) 及未经鉴定的嗜盐球菌 S5 为对照菌。

6. 硝酸盐还原: 采用 Sreenivasan-Venkaraman 培养基^[6]。

7. 糖类及醇类的利用: 采用 MIB 培养基^[7]。其中的酪素分别以 1% 的下述糖或醇代替: D-果糖, 蔗糖, 乳糖, 鼠李糖, 棉子糖, 甘露糖, 麦芽糖, 菊糖, D-阿拉伯糖, L-阿拉伯糖, D-木糖, 糊精, 水杨素, 甘油, 甘露醇。

8. 好气测定: 用常规穿刺培养法。

9. 温度试验: 采用修饰过的 Gibbons 培养基。分别置于 20—55℃ 培养一周, 在 460nm 测吸光度。

10. 其他生理生化特性:

(1) 水解淀粉: 于修饰过的 Gibbons 培养基中加 1% 可溶性淀粉, 接种于平板上, 培养 7 天及 14 天, 用 Lugols 碘液检查透明圈。

(2) 明胶液化: 9 份修饰过的 Gibbons 培养基与 1 份 10% 明胶混合, 倒平板。培养 7 天及 14 天, 用三氯醋酸检查透明圈。

(3) 吲哚试验: 在修饰过的 Gibbons 培养基中加 0.01% 色氨酸, 培养 7 天, 观察检测。

(4) H_2S 测定: 在修饰过的 Gibbons 培养基中培养, 于培养器皿内悬挂醋酸铅滤纸测定。

结 果

(一) 个体形态

F3 及 F5 两株菌均为革兰氏阴性, 杆状, 不运动, 细胞单个。F3 菌株细胞大小为 $1-1.5 \times 2.5-3.5 \mu m$ (图 1); F5 菌株形状细长, 大小为 $0.6-0.7 \times 1.7-4.2 \mu m$ (图 2)。

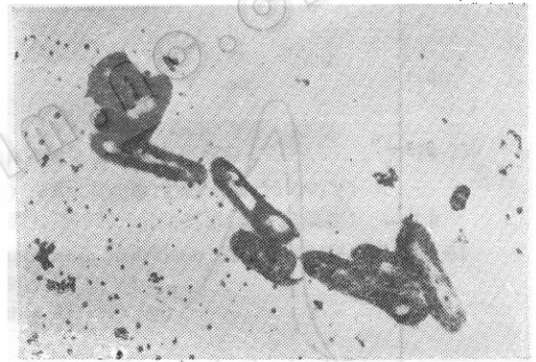


图 1 F3 菌株在修饰过的 Gibbons 培养基中培养 6 天

Fig. 1 Strain F3 (6 days in Gibbons medium)

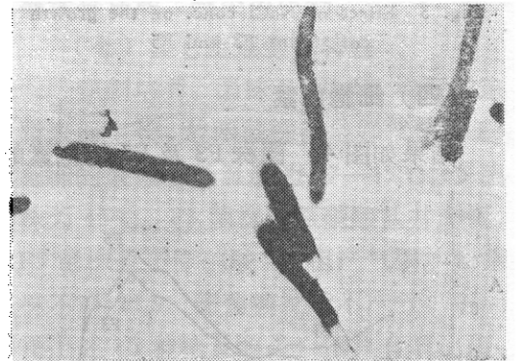


图 2 F5 菌株在修饰过的 Gibbons 培养基中培养 6 天

Fig. 2 Strain F5 (6 days in Gibbons medium)

(二) 培养特征

F3 菌株和 F5 菌株在牛奶-盐-琼脂培

培养基上生长良好。F3 菌株菌落圆形,直径约 1mm, 边缘整齐, 中间略突起, 表面光滑, 朱红色; 在肉汁培养基中生长中等, 管底有红色生长物沉淀; 在天门冬素培养基中生长弱。F5 菌株菌落圆形, 直径约 1.5 mm, 边缘整齐, 扁平, 表面光滑, 浅粉至肉红色; 在肉汁培养基与天门冬素培养基中的生长情况与 F3 菌株相似。

(三) 嗜盐度试验

试验结果(图 3)表明, 两菌株在 NaCl 低于 12% 时都不生长, 均极端嗜盐。F3 菌株在 NaCl 含量 15—30% 时生长良好, 最适 18%; F5 菌株在 NaCl 含量 15—25% 时生长良好, 30% 时生长弱。

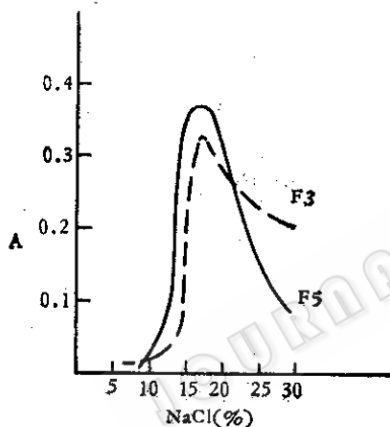


图 3 NaCl 浓度对菌株 F3 及 F5 生长的影响

Fig. 3 Effect of NaCl conc. on the growth of strains F3 and F5

(四) 细胞色素

结果如图 4。菌株 F3 及 F5 的色素的

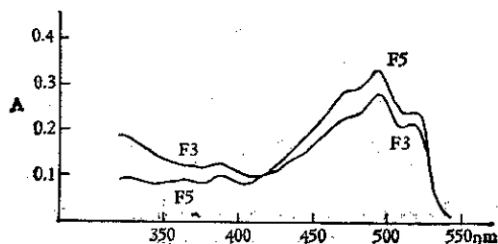


图 4 菌株 F3 及 F5 的色素吸收光谱

Fig. 4 Absorption peak wavelength of pigments of strains F3 and F5

光吸收峰均在 388、492 及 527nm, 与文献上报道的已知菌 R1 的色素(类胡萝卜素类色素)的光吸收峰^[6]一致。

(五) 二氨基庚二酸

由图 5 得知, 菌株 F3 及 F5 都不含二氨基庚二酸。

(六) 甘油二醚

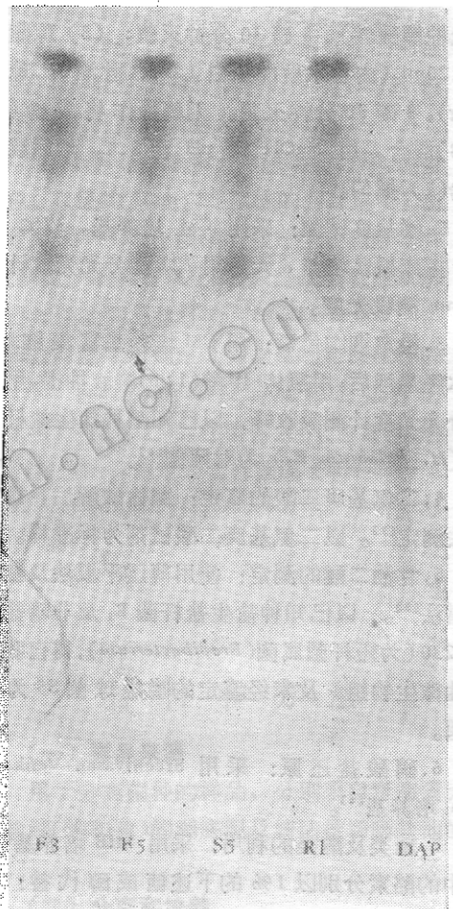


图 5 菌株 F3、F5 及 R1 的二氨基庚二酸纸谱扩展剂:

甲醇:水:10 NHCl:吡啶 = 80:17.5:2.5:10 (V/V)

R1: 已知菌; S5: 嗜盐球菌(分离自大柴旦湖); DAP: 二氨基庚二酸试剂。

Fig. 5 Paper chromatography of diaminopimelic acid detection of strains F3, F5 and R1. Developing with

$\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:10\text{NHCl}:\text{pyridine}$
= 80:17.5:2.5:10(V/V)

R1: *Halobacterium halobium*

S5: *halococcus* (isolated from Dachaidan

Salt Lake)

DAP: Chemicals of diaminopimelic acid

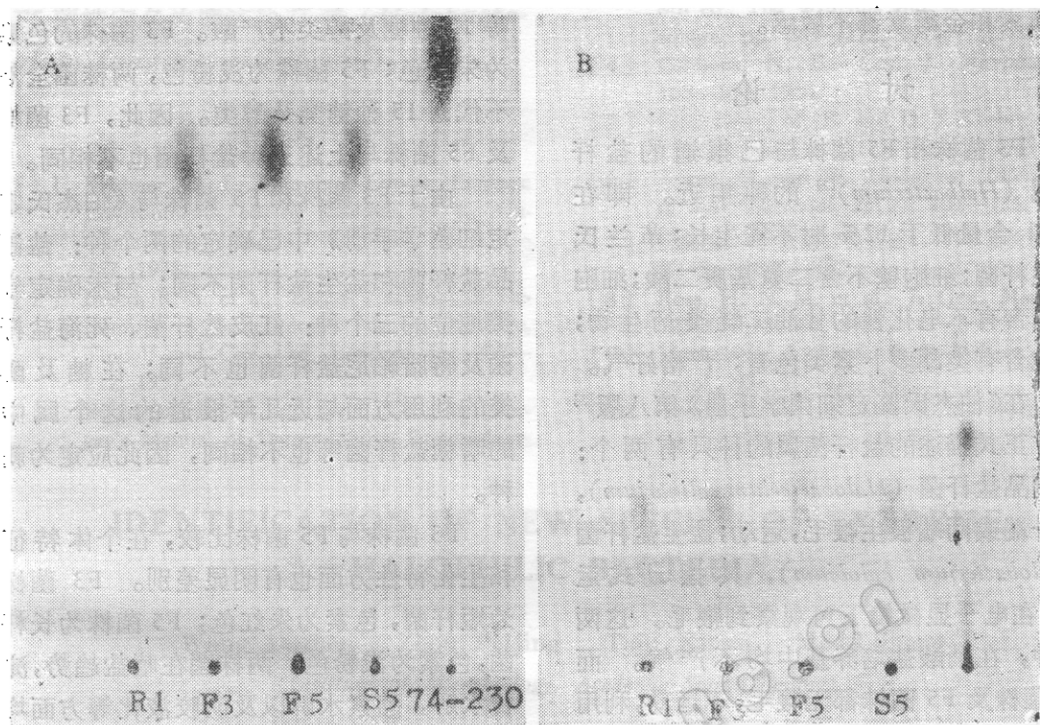


图6 菌株 F3、F5 及 R1 的水解液提取物的薄层层析图

74-230

扩展剂: (A) 哥罗仿: 乙醚=90:10 (V/V) (B) 石油醚: 乙醚=85:15 (V/V)
R1: 已知菌; S5: 嗜盐球菌(分离自大柴旦湖); 74-230: 非嗜盐菌(短杆菌属)

Fig. 6 Thin layer chromatography of extracts from hydrolates of strains F3, F5 and R1
Developing (A) with chloroform-ether 90:10 (V/V)
(B) with petroleum ether-ether 85:15 (V/V)

R1: *Halobacterium halobium* R1

S5: *halococcus* (isolated from Dachaidan Salt Lake)

74-230: non-halophilic bacterium (*Brevibacterium*)

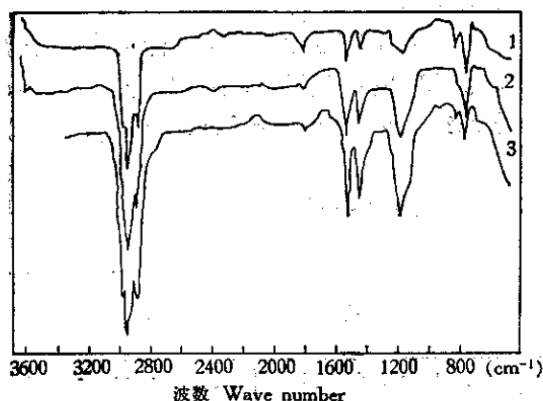


图7 菌株 F3、F5 及 R1 中的甘油二醚类生物物的红外光谱
1: R1 2: F5 3: F3

Fig. 7 Infrared spectra of glycol di-ether moieties
extracted from hydrolates of strains F3, F5 and R1
1: R1 2: F5 3: F3

由图6及图7得知, 菌株 F3 及 F5 都含有甘油二醚类衍生物。

(七) 其它生理生化特性

穿刺培养, 菌株 F3 及 F5 均仅在琼脂表面生长, 故两菌株都是好气菌。F3 菌株的最适生长温度为 37—45℃; F5 菌株为 45℃。F3 菌株还原硝酸盐并产气; F5 菌株也还原硝酸盐, 但产气弱。两菌株不产 H_2S ; 葡萄糖发酵不产气; 不利用上述 15 种糖及醇类; 不具有氧化酶、尿酸及精氨酸双解酶。只 F3 菌株具有过氧化氢酶。两菌株均由色氨酸产生吲哚。F3 菌株可水解淀粉, 液化明胶; F5 菌株可水解酪蛋白。两菌株对青霉素、

链霉素和金霉素都不敏感。

讨 论

F3 菌株和 F5 菌株与已报道的盐杆菌属 (*Halobacterium*)^[2] 的种相近。即在 NaCl 含量低于 12% 时不能生长;革兰氏阴性杆菌;细胞壁不含二氨基庚二酸;细胞膜内含有不皂化性的甘油二醚类衍生物;细胞含有类胡萝卜素类色素;严格好气。

在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版^[3]中,正式描述的盐杆菌属的种只有两个:盐制品盐杆菌 (*Halobacterium salinarium*),具一端或两端极生鞭毛,运动;盐生盐杆菌 (*Halobacterium halobium*),具摆动式运动,在电子显微镜下可观察到鞭毛。这两个种,在硝酸盐培养基中均不产气。而 F3 菌株及 F5 菌株都无鞭毛,不运动,利用硝酸盐产气。显然, F3 菌株及 F5 菌株都不属于这两个种。

在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第七版^[2]中描述的红皮盐杆菌 (*Halobacterium cutirubrum*) 具有鞭毛,能运动,因此 F3 菌株及 F5 菌株也与它不同。

死海盐杆菌 (*Halobacterium marismortui*)^[2] 和嗜糖盐杆菌 (*Halobacterium saccharovorium*)^[10] 都能利用某些碳水化合物生酸。特腊帕尼盐杆菌 (*Halobacterium trapanicum*)^[2] 的菌落是橙色的,对阿拉伯糖

等 15 种糖及醇类不产酸。F3 菌株的色素为朱红色;F5 菌株为浅粉色,两株菌全然不代谢 15 种糖类及醇类。因此, F3 菌株及 F5 菌株与上述三种盐杆菌也不相同。

由于 F3 菌株和 F5 菌株与《伯杰氏鉴定细菌学手册》中已确定的两个种:盐制品盐杆菌和盐生盐杆菌不同;与未确定分类地位的三个种:红皮盐杆菌、死海盐杆菌及特腊帕尼盐杆菌也不同;在糖及醇类的利用方面与近几年报道的这个属中的嗜糖盐杆菌等也不相同,因此应定为新种。

F3 菌株与 F5 菌株比较,在个体特征和生化特性方面也有明显差别。F3 菌株为短杆菌,色素为朱红色;F5 菌株为长杆菌,色素为浅粉色。两株菌在嗜盐趋势,淀粉水解,酪素水解以及明胶液化等方面均不相同。故不能将这两株菌作为一个种看待。

F3 菌株、F5 菌株与已知近似种的区别见表 1。

F3 菌株和 F5 菌株都产生吡嗪, F3 菌株能水解淀粉但不能利用糖类。这些特点在已报道的极端嗜盐菌分类鉴定的文献中都未曾见过。

因此, F3 菌株和 F5 菌株定为两个新种。F3 菌株定名为大柴旦盐杆菌 (*Halobacterium dachaidanensis* sp. nov.)。

表 1 F3 菌株、F5 菌株与已知近似种的差别

Table 1 Differences between strains F3, F5 and similar identified species

项目	菌株 特腊帕尼盐杆菌 <i>Halobacterium trapanicum</i>	F3 菌株	F5 菌株
细胞大小 (μm)	0.45—0.55×1.5—4.8	1—1.5×2.5—3.5	0.6—0.7×1.7—4.2
菌落颜色	橙色	朱红	浅粉
淀粉水解	—	+	—
明胶液化	—	+	—
吡嗪产生	—	+	+
碳水化合物利用	不产酸	不利用	不利用

F5 菌株定名为塘沽盐杆菌 (*Halobacterium tangguensis* sp. nov.)。

参 考 文 献

- [1] Kushner, D. J.: Microbial Life in Extreme Environments, ed. by Kushner, D. J., Academic Press, London, New York, pp. 318—357, 1978.
- [2] Breed, R. S. et al.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. Bailliere, Tindall and Cox, Ltd. London, pp. 207—212, 1957.
- [3] Buchanan, R. G. and N. E. Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,

8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 269—272, 1974.

- [4] Gibbons, N. E.: *Can. J. Microbiol.*, **6**: 165—169, 1960.
- [5] Gochnauey, M. B. and D. J. Kushner: *Can. J. Microbiol.*, **15**: 1157—1165, 1969.
- [6] Kocur, M. and W. Hodgkiss: *Internat. J. of Syst. Bacteriol.* **23**(2): 151—156, 1973.
- [7] 阮继生: 《放线菌分类基础》, 科学出版社, 北京第145—146页, 1977。
- [8] Ross, H. N. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **123**(1): 75—80, 1981.
- [9] Hochstein, L. I. and B. P. Dolton: *J. Bacteriol.*, **95**: 37—42, 1968.
- [10] Tomlinson, G. A. and L. I. Hochstein: *Can. J. Microbiol.*, **22**: 587—591, 1976.

IDENTIFICATION OF NEW SPECIES OF EXTREME HALOPHILIC BACTERIA

Wang Dazhen Zhou Peijing Tain Xinyu Ma Guihong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Strains F3, F5 and several other strains of extreme halobacteria with rod-shaped cells were isolated from Dachaidan Salt Lake and Tanggu saltern pool. Their optimum salt concentration for growth is 18—25% NaCl, no growth below 12% NaCl. Their cell walls don't contain diaminopimelic acid, and most of the cell lipids are non-saponifiable phosphoglycolipid derivatives, in which glycol diethers are detected. Both of these strains produce pigments.

Strains F3 and F5 are non-motile, Gram-negative rods, single, 1—1.5 by 2.5—3.5 μm for F3 and 0.6—0.7 by 1.7—4.2 μm for F5. Colonies on milk-salt-agar are not larger than 2 mm in diameter, but the colony of strain F3 is round, entire, convex, smooth, glistening and vermilion in colour, and the colony of strain F5 is round, entire flat, smooth and light pink. They are obligate aerobes, and nitrite and gas are produced from nitrate medium. Both strains also produce indole, but H_2S

is not produced. Carbohydrates and alcohols are not metabolized at all. Oxidase, urease, arginase negative, catalase positive in strain F3. Strains F3 and F5 differ from two well known species *Halobacterium salinarium* and *Halobacterium halobium*, and also from other strains of *Halobacterium cutirubrum*, *Halobacterium marismortui* and *Halobacterium trapanicum* the taxonomic position of which are uncertain.

On the other hand, there are some differences between strains F3 and F5, such as cell size, pigmentation, the abilities of starch hydrolysis and gelatin liquefaction.

Therefore, strains F3 and F5 are considered as two new species named *Halobacterium dachaidanensis* sp. nov. (F3) and *Halobacterium tangguensis* sp. nov. (F5) respectively.

Key words

Halobacterium dachaidanensis; *Halobacterium tangguensis*