

一株产碱极端嗜盐杆菌

周培瑾 田新玉 马延和 肖昌松 王大珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从青海省大柴旦盐湖中分离到一株极端嗜盐杆菌。该菌株在培养过程中产碱, 革兰氏阴性, 细胞杆状, $0.7-1.0 \times 2-3 \mu\text{m}$, 极生鞭毛运动, 绝对好氧, 以氨基酸作唯一碳源。不利用碳水化合物, 生长所需盐(NaCl)浓度在 12% 以上, 最适盐浓度为 18%。生长 pH 范围 6-10, 最适 pH 9。 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0-3% 对生长无明显影响。细胞蛋白质酸性, 不含二氨基庚二酸和胞壁酸, 含甘油二醚键化合物, 不具有色素。根据以上特征, 将该菌株定为一个新种, 定名为产碱嗜盐杆菌 (*Halobacterium haloalcaligenum* n. sp.)。

关键词 产碱嗜盐杆菌; 古细菌; 细菌紫膜

在 Bergey 氏系统细菌学鉴定手册中^[1], 极端嗜盐菌科 (Halobacteriaceae) 仅两个属, 即极端嗜盐球菌属 (*Halococcus*) 和极端嗜盐杆菌属 (*Halobacterium*), 其中仅有几个种被承认。Tindall^[2] 及其合作者分离到极端嗜盐嗜碱细菌, pH 9-10 为最适生长范围。生长时仅需很低 Mg^{++} , 当培养基中镁离子达到 10mmol/L 时, 则抑制生长。因此他们在极端嗜盐菌科中提出了两个新属, 即嗜盐嗜碱杆菌属 (*Natronobacter*) 和嗜盐嗜碱球菌属 (*Natronococcus*)。Torreblanca^[3] 根据非碱性嗜盐杆菌对碳源利用的不同, 细胞形态和细胞脂类化合物及 G+C% 含量等主要特征的差异, 在原有嗜盐菌科, 嗜盐杆菌属的基础上, 又在嗜盐菌科中提出了两个新的属, 即嗜盐小盒杆菌属 (*Haloarcula*) 和嗜盐富饶杆菌属 (*Haloferax*)。

本文报告的是嗜盐杆菌属中的一个种, 根据其特点, 定名为产碱嗜盐杆菌 (*Halobacterium haloalcaligenum* n. sp.)。

材料和方法

(一) 样品来源及菌种鉴定方法

样品取自青海省大柴旦盐湖底泥, 试验所用主要培养基为 SGC^[4] 培养基。菌种鉴定方法依 Bergey 氏系统细菌学鉴定手册^[5] 和王大珍^[6] 等报道的方法。

(二) 抗菌素敏感试验

在无菌操作条件下, 用乙醚处理定量的抗菌素, 干燥并用无菌盐水 (20% NaCl) 定容。用下列抗菌素进行试验: 洁霉素、新霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素的浓度均为 $30\mu\text{g/ml}$, 红霉素及利福平的浓度均为 $15\mu\text{g/ml}$ 。

(三) 细菌紫膜 (Purple membrane) 的测定^[6]

取 5ml 培养物, 离心, 悬浮于 70ml 蒸馏水中, 在 4°C 下过夜, 使细胞完全溶解, 溶解后的细胞悬液以 $30000 \times g$ 离心 45min, 将离心沉淀物重新溶于 5ml 蒸馏水中, 用 Beckman DU 7 型分光光度计测定。

(四) 细胞壁蛋白质定性测定

离心收集对数生长后期的培养物, 用

本文于 1988 年 4 月 7 日收到。

本课题由国家自然科学基金委员会资助。

聚焦电泳承严自正教授协作; 本所技术室协助拍摄照片, 在此一并致谢。

25% NaCl 水洗两次, 菌体置于 -25°C , 待菌株完全冷冻固化时, 用 X-Press 型细胞破碎器破碎细胞。破碎后的细胞悬浮于 10ml 25%NaCl 水中, 经 7000r/min 离心, 取上清液以 $40000\times g$ 离心 40min, 收集细胞壁。透析(4°C 过夜)脱盐, 用聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦方法测定^[7]。

(五) 细胞氨基酸组份分析

同上法收集细胞, 6mol/L HCl 105°C 水解 48h, 过滤去粗物质, 去盐酸, 溶于蒸馏水中, 用高压液相色谱 (Waters 244 HPLC) OPA 离子交换法分析细胞蛋白质氨基酸组份。液相色谱流动相: A = 0.2 Na-Citrate (pH3.0); B=0.2mol/L Na-borate(pH 9.8), 流速为 0.4ml/min, 柱温 62°C 。

(六) DNA 中 G + C 含量的测定

DNA 按 Vogelsang^[8]方法制备。DNA 溶于 SSC 溶液, 用温度解链法(T_m)测定 DNA 中 G + C 百分含量, 对照菌株为大肠杆菌 K₁₂(AS1.365) 和 *H. cultirubrum* NRC 34001 (D. J. Kushner 教授赠送)。用 Perkin-Elmer Lambda 7 型紫外分光光度计测定。

结 果

(一) 形态和培养特征

大柴旦湖底泥中分离物 F₃ 为革兰氏阴性好氧, 无色极端嗜盐杆菌, 极生鞭毛运动, 菌体大小为 $0.7-1.0 \times 2-3\mu\text{m}$ 。液体静止培养仅表面生长。菌体形态与培养基中的盐浓度有关。NaCl 在 10—12% 时菌体成球状, NaCl 在 15—25% 时, 菌体杆状, 运动, 在蒸馏水中时, 菌体破裂。菌落微小, 扁平, 乳白色。在 37°C 下培养一周, 菌落直径在 1mm 左右。

(二) 生理特性

1. 盐需求量: F₃ 在 SGC 培养基中需要 12% 以上的 NaCl 才能生长, 最适的

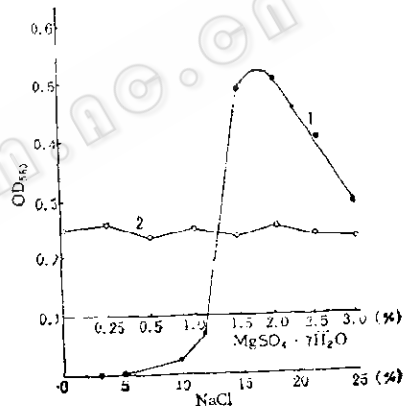


图 1 氯化钠、硫酸镁浓度与细胞生长的关系
Fig. 1 Relationship between cell growth and concentration of NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1. NaCl 2. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

表 1 不同 pH 值对菌量生长的影响

Table 1 Effect of different pH value on growth cell

实验设计 pH Test design pH	初始 pH Original pH	培养 5d 后 pH pH after incubation 5 days	培养 5d 后菌体 Biomass after incubation 5 days (OD 540nm)
5	5.041	5.265	0.025
6	6.009	8.248	0.420
7	7.005	8.323	0.460
8	8.014	8.400	0.470
9	9.027	8.579	0.480
10	9.930	9.237	0.025
11	11.014	10.713	0.010

NaCl 浓度为 18%，SGC 培养基中含 2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，但 F_8 可以在完全不需要镁盐条件下生长发育。图 1 所示， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 在 0—3% 时，其菌体生长情况没有明显变化。

2. 生长的 pH 范围： F_8 生长的 pH 范围较广。pH 在 6—9 范围内，菌体生长没有明显的变化，由表 1 看出， F_8 生长的最适 pH 为 9。应特别指出，在生长的 pH 范围内，不论培养物初始时 pH 多少，其终止 pH 都在 8 以上。

3. 抗生素敏感试验，在所选用的 7 种抗菌素中，仅利福平 ($15\mu g/ml$) 能抑制 F_8 的生长，其它则均无抑菌效果。

4. 其他生理特性：菌株 F_8 不发酵葡萄糖，氧化酶和接触酶阳性，产生脲酶，能液化明胶和水解淀粉。硝酸盐还原和厌气硝酸盐反应均呈阴性，不产生吲哚但产生 H_2S 。生长温度在 20—45℃ 之间，最适生长温度为 40℃。

(三) 嗜盐菌细胞组份主要特性物质的测定

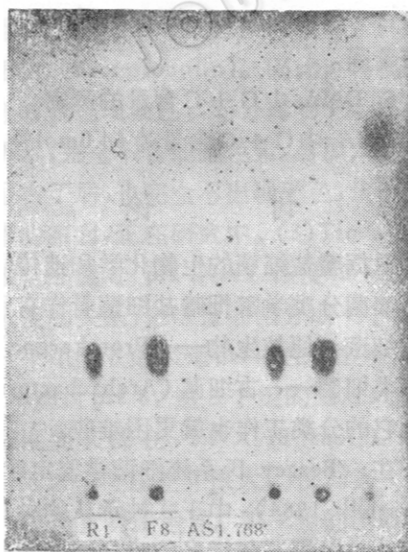


图 2 菌株 F_8 的甘油二醚类似物的测定
Fig. 2 Glycerol diether analogs of the strain F_8

1. 细胞壁二氨基庚二酸与甘油二醚的测定：纸谱法^[9]测定二氨基庚二酸及胞壁酸；用薄层层析^[10]测定甘油二醚，以产碱杆菌 AS 1.768 和 *H. cultirubrum* NRC 34001 作对照。结果表明菌株 F_8 不含二氨基庚二酸和胞壁酸，但细胞含甘油二醚类似物(图 2)。

2. 细胞壁蛋白质定性：制备的细胞壁物质经聚丙烯酰胺薄层凝胶聚焦电泳测定。由图 3 可见蛋白质都在酸性环境中聚焦。

3. 细胞氨基酸组份的测定：通过对细胞中 15 种氨基酸组份的分析，更进一步证明 F_8 的细胞蛋白为酸性。结果见表 2，由表 2 看出，菌株 F_8 的蛋白质比已报道的菌株的蛋白质更偏酸性。

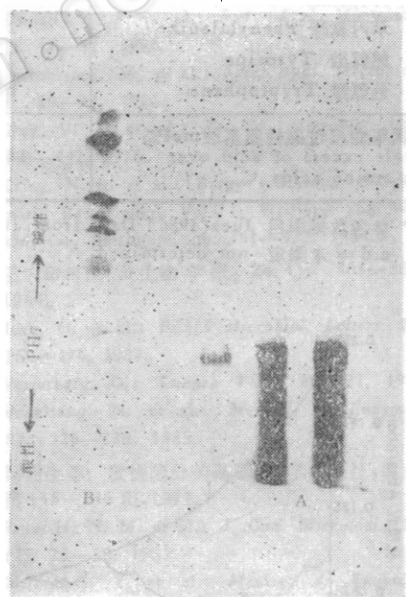


图 3 菌株 F_8 细胞壁蛋白的聚焦电泳
Fig. 3 Isoelectric focusing of cell wall protein
A. F_8 , B. 标准菌株 Type strain

4. 细胞紫膜的测定：由图 4 可以看出，按 Juez 提取细菌嗜紫红质的方法，对照株分别有 3 个色素吸收峰，分别是 505，491 和 320nm，而 F_8 没有任何吸收峰，不

表 2 菌株 F₁ 与对照菌株细胞蛋白质氨基酸组分的比较

Table 2 Amino acids composition of the bulk protein of strain F₁ compared to the values obtained from *Halococulus hispanica*, *Haloferax gibbonsii* and *Halobacterium salinarum**

氨基酸 Amino acids	<i>Halococulus hispanica</i>	<i>Haloferax gibbonsii</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>	F ₁
天门冬氨酸 Aspartic acid	12.2	14.3	13.9	14.2
谷氨酸 Glutamic acid	16.9	14.9	12.9	18.1
赖氨酸 Lysine	3.2	2.9	2.6	2.0
精氨酸 Arginine	4.7	4.5	5.1	5.8
组氨酸 Histidine	2.3	1.8	2.0	1.2
甘氨酸 Glycine	10.0	10.9	8.9	12.7
丝氨酸 Serine	6.2	5.7	4.9	6.3
苏氨酸 Threonine	6.4	7.5	6.7	6.5
蛋氨酸 Methionine	2.2	1.9	1.7	5.8
脯氨酸 Proline	n.d	n.d	3.9	1.2
半胱氨酸 Cystine/2	n.d	n.d	0.8	n.d
丙氨酸 Alanine	11.4	10.9	10.1	10.9
缬氨酸 Valine	6.9	7.2	8.6	5.2
亮氨酸 Leucine	8.2	8.2	7.5	7.5
异亮氨酸 Isoleucine	3.7	3.2	4.4	3.5
苯丙氨酸 Phenylalanine	2.8	2.8	3.0	3.3
酪氨酸 Tyrosine	2.4	2.6	2.5	2.4
色氨酸 Tryptophane	n.d	n.d	0.7	n.d
酸性氨基酸超过碱性氨基酸mol% % mole excess of acid over basic amino acids	18.9	20.0	17.1	23.3

* 参考数据引自 Juez(1986) Data from Juez (1986).

n.d = 未测定 not determined.

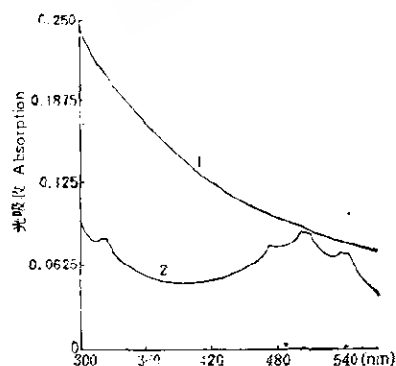


图 4 *H. cultirubrum* NRC 34001 和 F₁ 菌株细胞水解物的吸收光谱

Fig. 4 Absorption spectra of lysed cells of *H. cultirubrum* NRC 34001 and the strain F₁

1. F₁. 2. *H. cultirubrum* NRC 34001

具有紫膜。

5. DNA 中 G + C 含量的测定

DNA 中 G + C 含量为 64.0mol%。

讨 论

根据嗜盐细菌的生物化学和遗传学研究,细菌分类学家把嗜盐细菌看作有别于其它细菌(原核生物——Protokargon)的另一类细菌——古细菌(Archachacteria),因此它的分类工作也就更困难些。

在《Bergey 氏系统细菌学鉴定手册》(Larsen^[1] 1984)中正式被承认的种是很少的。难以把逐年增多的嗜盐细菌的新研究成果包括进去。这样嗜盐细菌的研究工作者们近些年来陆续在嗜盐菌科中提出了

新的属.本文报道的一个新的嗜盐分离物,它具有嗜盐菌及古细菌的基本特点,在12%以上NaCl浓度才能生长,细胞壁缺乏胞壁酸,细胞具有甘油二醚化合物,对抗菌素不敏感,细胞蛋白质较其它嗜盐菌显得更为酸性,生长的最适温度40—50℃等。但它有另外三个显著特点是在已有的嗜盐菌的文献中未见报道的:(1)该菌在培养过程中产碱,这与产碱杆菌属的菌利用有机酸或氨基类化合物产碱相同,但是产碱杆菌属中一个重要特征(与 *Bordetella* 相区别)^[1]是不具有尿酶活性,细胞中不含甘油二醚类似物,而菌株 *F_s* 具有尿酶活性,也具有古细菌特有的甘油二醚类似物。因此,该菌株不属产碱杆菌属。(2)视黄醛(Retinal)作为嗜盐菌紫膜的显色基团,这是人们早已知道的。*Mukphata*^[11]报道用缺乏色素的嗜盐菌的自然变异株 *R₁mw* 的白膜(White membrane)和 *Bivin*^[12]报道的利用氢氧化氨漂白的嗜碱细菌(*Haloalk-liphilic bacteria*)紫膜再加入视黄醛或尼古丁(Nicotine)能使色素重组,呈现出紫色。但在上述报道的试验菌株中都含有细菌视蛋白(Bacterioopsin)。因此,与视黄醛结合时就呈现紫色。而分离物 *F_s*,根据图2所示,完全不含细胞色素,当加入视黄醛或尼古丁后,也完全不出现颜色,该菌不含色素的原因,正在研究中。(3)*Tindall*^[13]根据嗜盐细菌对pH、NaCl浓度和 Mg^{++} 离子浓度的关系,把嗜盐细菌分成4个组,其中3个组生长的最适pH中性偏酸性,最高pH不超过pH 8,这3个组的菌对 Mg^{++} 离子浓度要求都在 $2.7 \times 10^{-2}mol/L$ 以上,*F_s*与这些特性差异很大,仅与第4组相近,但也有明显差异。第4组的菌最低pH不能低于pH 7,否则就不能生长, Mg^{++}

离子浓度最高不超过 $10^{-3}mol/L$,否则影响菌体生长,*F_s*在pH 6时菌体生长良好。 Mg^{++} 离子浓度高于 $2.7 \times 10^{-2}mol/L$ 时对菌体生长无明显的影响。因此依上所述特征,菌株 *F_s*应归于嗜盐杆菌属中,除上述三个明显的特征之外,菌株 *F_s*的生理生化特征与嗜盐杆菌属中所描述的种及嗜盐小盒杆菌属(*Haloarcula*)和嗜盐富饶杆菌属(*Haloferax*)中描述过的种各自有差异。因此,将菌株 *F_s*归嗜盐杆菌属,并定为一个新种:产碱嗜盐杆菌 *Halobacterium haloalcaligenum* n. sp.

参 考 文 献

- [1] Krieg, N. R. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 264—266, 1984.
- [2] Tindall, B. J. et al.: *Syst. Appl. Microbiol.*, 5: 41—51, 1984.
- [3] Torreblanca, M. et al.: *Syst. Appl. Microbiol.*, 8: 89—99, 1986.
- [4] Grey, V. L. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 22: 440—442, 1976.
- [5] Krieg, N. R. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 361—372, 1984.
- [6] 王大珍等: *微生物学报*, 24(4): 304—309, 1984.
- [7] Juez, G. et al.: *FEMS Microbiol. Letters*, 23: 167—170, 1984.
- [8] Vesterberg, O.: *Science Tool*, 20: 22, 1973.
- [9] Vogelsang, H. et al.: *Methods in Enzymol.*, 97: 226—230, 1983.
- [10] 阮继生等: *放线菌分类基础*, 科学出版社, 北京, 第145—146页, 1977.
- [11] Ross, H. N. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 123 (1), 75—80, 1981.
- [12] Mukphata, Y. et al.: *Methods in Enzymol.*, 88: 407—417, 1982.
- [13] Bivin, D. B. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 132: 2176—2177, 1986.
- [14] Tindall, B. J. et al.: *Syst. Appl. Microbiol.*, 7: 202—212, 1986.

AN EXTREME HALOALKALIGENOUS BACTERIUM

Zhou Peijin Tian Xinyu Ma Yanhe Xiao Changsong Wang Dazhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Halobacterium haloalcaligenum sp. nov. was isolated from Dachaidan salt lake of Qinghai province, China. The new species differs from all known species of *Halobacterium* in its alkali producing and Mg^{++} non-requirement property during growth. Its growth occurred between pH 6—9. The optimum pH is at 9, optimum temperature is at 40°C. The strain is insensitive to a number of antibiotics, and does not contain any pigment and muramic acid. But there were glycerol diether

analogs in the cell wall. The physiological and biochemical characteristics of strain F₈ are also quite different from other halophilic species described by Larsen and Torreblanca. The G+C content in the DNA of strain F₈ is 64.0 mol%.

Key words

Halobacterium haloalcaligenum; Archaeobacteria; Purple membrane