

嗜盐杆菌属一新种*

张纪忠 黄静娟 徐德强 盛宗斗 郭 鸣** 林 勇**

(复旦大学微生物学系, 上海)

从西藏扎北湖石盐样品中分离到数株嗜盐菌, 其中 521 菌株在 15—25% 浓度 NaCl 的培养基上生长, 最适 NaCl 浓度为 20%, 低于 10% 或饱和 NaCl 培养基中不生长。细胞壁不含二氨基庚二酸, 细胞膜含有甘油二醚键的不皂化性磷酸甘油醚衍生物, 产色素。革兰氏阴性杆菌, 细胞单个存在, 大小为 $0.6-0.8 \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$ 。在牛奶-盐-琼脂培养基上菌落呈橙红色, 圆形, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 直径 1mm。专性好氧菌, 最适生长温度 37°C , 不由色氨酸产生吲哚, 不产生 H_2S , 不还原硝酸盐, 能利用葡萄糖等多种糖, 并以葡萄糖产酸。具有过氧化氢酶和氧化酶。DNA 中 G + C 为 62.7mol%(Tm)。经鉴定, 521 菌株为嗜盐杆菌属的一个新种, 命名为扎北盐杆菌 (*Halobacterium zhabeiensis* sp. nov.)。

关键词 扎北盐杆菌

嗜盐菌是一类对 NaCl 有特殊适应性的古细菌, 在自然界通常分布于盐湖、盐田和盐场等处。在《伯杰氏系统细菌学手册》第 1 卷(1984)中^[1], 其分类学位置被定在第四部分 (Section), 即革兰氏阴性、好氧球菌和杆菌中的第 5 科 (Family)——嗜盐菌科 (Halobacteriaceae), 下分两个属: 嗜盐杆菌属 (*Halobacterium*) 和嗜盐球菌属 (*Halococcus*)。本世纪七十年代, 人们发现嗜盐菌的一些菌株在低氧压情况下, 在其细胞膜上会出现一种由视黄醛构成的特殊色素蛋白——菌紫质 (bacteriorhodopsin)。由菌紫质参与形成部分细胞膜称为紫膜 (The purple membrane)。紫膜是一种比光合作用简单得多的能量转换系统。近年来, 人们又发现紫膜有可能成为生物芯片, 用于制作生物计算机的材料。由于其重要的理论意义和广泛的应用前景, 所以在国际上对嗜盐菌的分类及其紫膜的研究受到了极大的重视, 进展迅速^[2-7]。本文报道了从西藏扎北湖石盐样品中分离到

的 521 菌株的鉴定结果。

材料与方法

(一) 样品来源

分离菌种的石盐样品, 采自西藏扎北湖。

(二) 富集培养和分离

分离和富集培养均采用 Gibbons 培养基^[8] (g/L): 酪素水解物 5, 酵母浸出物 10, 蛋白胨 5, 柠檬酸钠 3, KCl 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20, NaCl 200, 固体培养基加琼脂 18—20, pH7。

收集菌体采用 Payne 培养基^[14] (g/L): 酪素水解物 7.5, 酵母浸出物 10, 柠檬酸钠 3, KCl 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.00025, NaCl 200, pH7。

本文于 1988 年 10 月 7 日收到。

* 中国科学院科学基金资助课题。

** 本校微生物专业 86 届毕业生。承地质矿产部矿床地质研究所协助在盐湖采样; 本校测试中心电镜室协助拍摄电镜照片, 在此一并致谢。

样品中的菌体经富集后,在 Gibbons 固体培养基上反复进行划线分离,取单菌落进行鉴定。

(三) 鉴定方法

主要参照《伯杰氏系统细菌学手册》第 1 卷 (1984)^[1]、《伯杰细菌鉴定手册》第八版^[10]、和《一般细菌常用鉴定方法》^[11],此外,还参照了王大珍等的研究工作^[12],并以盐生盐杆菌 *Halobacterium halobium* R₁ 作对照。

1. 形态特征:

(1) 个体形态: 采用革兰氏染色(并以快速革兰氏染色法验证)^[13],然后在光学显微镜下观察细菌细胞的形状,并测定大小。另取 Gibbons 培养基中经 37℃ 光照通气培养 6 d 的菌株进行电镜观察。

(2) 培养特征: 划线接种于牛奶-盐-琼脂培养基^[14], 37℃ 光照培养。培养基制备方法: ①脱脂牛奶 150ml, 0.55kg/cm² 30min 灭菌; ②无机盐溶液 30ml (含 MgSO₄·7H₂O 3g, KNO₃ 0.6g, NaCl 60g 和微量柠檬酸铁), 0.55kg/cm² 30min 灭菌; ③琼脂溶液 120ml (内含水解酪蛋白 1.5g, 甘油 2g, 琼脂 4.5g), 0.55kg/cm² 30min 灭菌。在 70℃ 左右将②和③混合, 调 pH 至 8.4, 然后混入成份①, 摇匀, 倒平皿。

2. 嗜盐度测定:

采用 Payne 培养基, 37℃ 光照通气培养 6d, 然后用 721 型分光光度计测定 5—30% 浓度 NaCl 时培养液的光密度(选用 460nm 波长)。

3. 温度试验:

采用 Gibbons 培养基, 分别于 30—55℃ 水浴中培养 6d, 然后用 721 型分光光度计测定培养液的光密度(选用 460nm 波长)。

4. 糖类及醇类的利用:

采用 MIB 培养基^[9] (g/L): 酪素水

解物 5, 酵母提取物 5, 丙三醇 1, MgCl₂·6H₂O 20, KCl 2, CaCl₂·2H₂O 0.2, NaCl 200。其中酪素分别以 1% 的下述糖或醇替代, D-甘露糖、D-果糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-核糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖和丙三醇。指示剂用溴甲酚紫。

5. 测定细胞色素^[15]:

用 Payne 培养基收集菌体, 菌体经悬浮后, 用甲醇-丙酮(1:1)溶液抽提, UV-240 型紫外分光光度计测其 350—600nm 波长的吸收峰。

6. 二氨基庚二酸 (DAP) 的测定^[16]:

菌体酸解后, 用纸谱法测定 (以标准 DAP 作对照)。

7. 甘油二醚测定^[17]:

使用薄层层析法, 以盐生盐杆菌 R₁ 和非嗜盐菌北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekeiensis*) AS1.299、节细菌 (*Arthrobacter* sp.) B1.28 以及未经鉴定的嗜盐杆菌 515 为对照菌。

8. 药敏试验:

涂布法接种 Gibbons 固体平板, 稍干后放置多粘菌素 (Polymyxin) 药敏试纸 (上海医学化验所出品), 光照 37℃ 培养 6d, 观察有否抑菌圈。

9. 其他生理生化特性:

(1) 需氧性测定: 以穿刺法接种 Gibbons 固体培养基。

(2) 水解淀粉: 在 Gibbons 培养基中加 1% 可溶性淀粉, 将测定菌株点接种于平板, 37℃ 光照培养 7d 和 14d, 用 Lugol's 碘液检测是否有透明圈。

(3) 明胶水解: 在 Gibbons 培养基中加 1% 明胶, 将测定菌株点接种于平板, 培养 7d 和 14d, 用三氯醋酸检查透明圈。

(4) 产生吲哚试验: 在 Gibbons 培养基中加 0.01% 色氨酸, 接种后培养 7d, 观察测定。

(5) H_2S 测定: 在每升 Gibbons 培养基中加入柠檬酸铁铵 0.5g, 硫代硫酸钠 0.5g 和半胱氨酸 0.1g, 半固体穿刺, 光照, $37^\circ C$ 培养 7d, 观察沿穿刺线是否呈黑色。

(6) 硝酸盐还原: 采用 Sreenivasan-venkaraman 培养基^[14]。

(7) 氧化酶、接触酶测定: 取在牛奶-盐-琼脂上培养 7d 的菌苔, 使用氧化酶和接触酶试剂测定。

10. DNA 中 G + C 克分子百分含量的测定^[18]:

采用紫外分光光度计测定 T_m 值的方法。

结 果

(一) 形态特征

1. 个体形态: 521 菌株为革兰氏阴性杆菌, 细胞单个存在, 不运动。大小为 $0.6-0.8 \times 1.5-2.5 \mu m$ (图 1)。

2. 培养特征: 在牛奶-盐-琼脂培养基上生长良好, 菌落呈橙红色, 圆形, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 直径为 1mm。

(二) 嗜盐度测定

521 菌株在 15—25% NaCl 浓度培养基中生长良好, NaCl 浓度低于 10% 和在

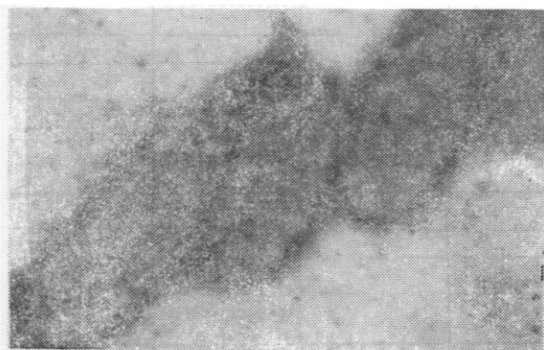


图 1 521 菌株在 Gibbons 培养基中 6d ($\times 10,000$)
Fig. 1 Strain 521 (6 days in Gibbons medium)

饱和浓度 (约 30% NaCl) 时不生长。最适嗜盐度为 20% (图 2)。

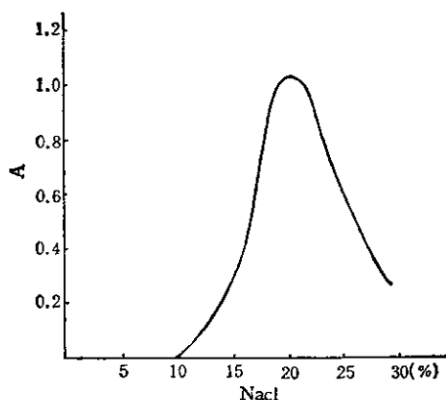


图 2 NaCl 浓度对 521 菌株生长的影响
Fig. 2 Effect of NaCl concentration on the growth of strain 521

(三) 温度试验

试验结果表明, 521 菌株的最适温度为 $37^\circ C$ 。

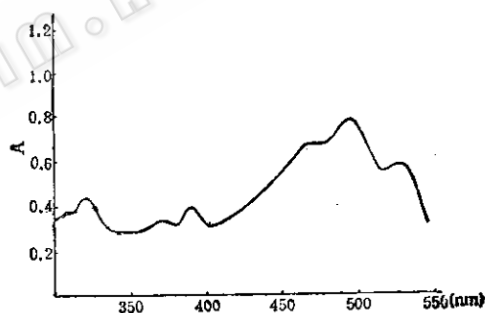


图 3 521 菌株的色素吸收光谱
Fig. 3 Absorption peak wavelength of pigments of strain 521

(四) 二氨基庚二酸的测定

由纸谱结果表明, 521 菌株不含二氨基庚二酸。

(五) 甘油二醚的分析测定

薄层层析结果表明, 521 菌株含甘油二醚类衍生物。

(六) 细胞色素测定

521 菌株在 374、392、472、498、535nm 左右均有吸收峰, 与已报道的 *Halobacterium sodomense* 的色素 (类

表 1 521 菌株与嗜盐杆菌属中 5 个已知种的差别⁽¹⁾

Table 1 Differences between strain 521 and identified five species of the genus *Halobacterium*

特征 Characteristics	<i>H. salinarium</i>	<i>H. volcanii</i>	<i>H. saccharovorum</i>	<i>H. vallismortis</i>	<i>H. pharaonis</i>	521
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+		-	-	+	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-		-	+	-	-
硝酸盐还原 NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	-		+	+	-	-
硝酸盐产气 Gas from NO ₃ ⁻	-	-	+	+	-	-
硫化氢产生 H ₂ S production	+		+	+	+	-
吲哚产生 Indole production	+		-	+		-
多粘菌素敏感 Polymyxin sensitive to	-	-		-	-	+
最适温度(°C) Optimum temperature	50	45	50	40	45	37
葡萄糖 Glucose	-	+	+	+	-	+
半乳糖 Galactose	-	+	+	+		+
甘露糖 Mannose	-		+	-		+
果糖 Fructose	-	+	+	+	-	-
核糖 Ribose	-	-	+			-
麦芽糖 Maltose		+	+	+		+
乳糖 Lactose	-	+	+			-
蔗糖 Sucrose	-	+	+	+		+
丙三醇 Glycerol	-		+	+		+
葡萄糖产酸 Acid production from glucose	-	-	+	-		+
DNA 中 G + Cmol% G + Cmol% of DNA		63.4±0.5			64.0	62.7
细胞大小 (μm) Cell size	0.5—1.0 ×1.0—6.0	1.0—3.0 ×2.0—3.0	0.6—1.2 ×2.5	0.6—1.0 ×3.5—5.0	0.8—2.0 ×3.0	0.6—0.8 ×1.5—2.5

表 2 521 菌株与大柴旦盐杆菌、塘沽盐杆菌的差别^[12]

Table 2 Differences between strain 521 and *H. dachaidanensis*, *H. tangguensis*

特 征 Characteristics	<i>H. dachaidanensis</i>	<i>H. tangguensis</i>	521
细胞大小 (μm) Cell size	1.0—1.5×2.5—3.5	0.6—0.7×1.7—4.2	0.6—0.8×1.5—2.5
菌落颜色 Color of colonies	朱 红 vermilion	浅 粉 pink	橙 红 orange red
氧化酶试验 Oxidase test	—	—	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	—	—
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	—	—
吲哚产生 Indole production	+	+	—
硝酸盐还原 NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	+	+	—
葡萄糖产酸 Acid production from glucose	—	—	+

表 3 521 菌株与东石盐杆菌和晋江盐杆菌的差别

Table 3 Differences between strain 521 and *H. dongshiensis*, *H. jinjiangensis*

特 征 Characteristics	<i>H. dongshiensis</i>	<i>H. jinjiangensis</i>	521
细胞大小 (μm) Cell size	0.5—0.7×2.0—3.6	0.6—1.0×2.6—3.1	0.6—0.8×1.5—2.5
菌落颜色 Color of colonies	芙蓉红 lotus red	莓酱红 berry sauce red	橙 红 orange red
葡萄糖产酸 Acid production from glucose	—	—	+
硝酸盐还原 NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	+	—	—
多粘菌素敏感 Polymyxin sensitive to	—	—	+
最适 NaCl 浓度 (%) Optimum NaCl concentration	17	15	20
最适温度 (°C) Optimum temperature	40	40	37

胡萝卜素色素)吸收峰^[15]一致(图 3)。

(七) 糖和醇类利用

521 菌株利用 D-甘露糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、丙三醇、蔗糖和麦芽糖,并从葡萄糖产酸。不利用 D-核糖和乳糖等。

(八) 药敏试验

521 菌株对多粘菌素 B 敏感。

(九) 其他生理生化特性

穿刺培养, 521 菌株在琼脂表面生长, 是专性好氧菌; 不能还原硝酸盐, 不生成 H_2S , 不能由色氨酸产生吲哚, 不水解淀粉, 不液化明胶。具有氧化酶和接触酶。

(十) DNA 中 G+C 克分子百分含量

521 菌株 DNA 中 G + C 含量为 62.7mol%(Tm)。

讨 论

从上述结果可见, 521 菌株的特性与嗜盐杆菌属 (*Halobacterium*) 的相符: 即在 NaCl 低于 10% 时不生长 (极端嗜盐菌); 革兰氏阴性杆菌; 严格好氧; 菌落不透明; 细胞壁不含二氨基庚二酸; 细胞膜含甘油二醚类衍生物; 细胞含有类胡萝卜素等。

在《伯杰氏系统细菌学手册》第 1 卷 (1984) 中, 嗜盐杆菌属中描述的 5 个种, 分别为盐制品盐杆菌 (*H. salinarium*)、华尔康盐杆菌 (*H. volcanii*) 嗜糖盐杆菌 (*H. saccharovorum*)、瓦吕斯姆尔盐杆菌 (*H. vallismortis*) 和法老盐杆菌 (*H. pharaonis*)。521 菌株与它们比较, 有较大的差别 (表 1), 显然不能归于这 5 个种。521 菌株与王大珍鉴定的大柴旦盐杆菌 (*H. dachaidanensis*)、塘沽盐杆菌 (*H. tangguensis*) 相比, 在菌落色泽、淀粉水

解、明胶液化和碳水化合物的利用等方面也有差别 (表 2)。此外, 521 菌株与我们已经鉴定的东石盐杆菌 (*H. dongshiensis*) 和晋江盐杆菌 (*H. jinjiangensis*) 也有较大不同 (表 3)。因此, 将 521 菌株定为嗜盐杆菌属中的一个新种, 命名为扎北盐杆菌 (*Halobacterium zhabeiensis* sp. nov.)。

参 考 文 献

- [1] Murray, R. G. E. et al.: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London, pp. 261—267, 1984.
- [2] Kushner, D. J.: *Microbial Life in Extreme Environment*, Academic Press, London New York, pp. 318—357, 1978.
- [3] 李 晔编译: 生物化学与生物物理进展, (5): 71, 1986.
- [4] Stoekenins, W.: *Scientific America*, 6: 38, 1976.
- [5] Lanyi, J. K.: *Bacteriol. Rev.*, 38: 272—290, 1974.
- [6] ————: *Microbiol. Rev.*, 42: 682—706, 1978.
- [7] Bayley, S. T. et al.: *Crit. Rev. Microbiol.*, 6: 151—205, 1978.
- [8] Gibbons, N. E.: *Can. J. Microbiol.*, 6: 165—169, 1960.
- [9] Tomlinson, G. A. et al.: *ibid.*, 22: 587—591, 1976.
- [10] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 269—272, 1974.
- [11] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 1978.
- [12] 王大珍等: 微生物学报, 24(4): 304—307, 1984.
- [13] 何世川等: 微生物学通报, 12(1): 40—41, 1985.
- [14] Kocur, M. et al.: *Internat. J. of Syst. Bacteriol.*, 23(2): 151—156, 1973.
- [15] Aharm, O.: *ibid.*, 33(2): 381—386, 1983.
- [16] 裴鸿生等: 抗生素, 7(1): 57, 1982.
- [17] Ross, H. N. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 123(1): 75—80, 1986.
- [18] 周慧玲: 微生物学报, 18(2): 134—139, 1978.

A NEW SPECIES OF *HALOBACTERIUM*

Zhang Jizhong Huang Jingjuan Xu Deqiang Sheng Zongdou Guo Ming Lin Yong
(Department of Microbiology Fudan University, Shanghai)

Strain 521 and several other strains of halobacteria with rodshaped cells are isolated from salt samples of Zhabei Lake in Tibet. The optimum salt concentration for its growth is 20% NaCl; no appreciable growth is found below 10% NaCl and in the NaCl medium saturated. Its cell wall does not contain diaminopimelic acid, and most of the cell lipids are nonsaponifiable phosphoglycolipid derivatives, in which glycol-diethers is detected. The strain produces pigments.

Strain 521 is non-motil, Gram-negative rods, with the size of single cell of 0.6—0.8 by 1.5—2.5 μm . The colony on milk-salt-agar is round, entire, smooth, moist, glistening, orange red in colour and 1 mm in dia-

meter. The optimum growing temperature is 37°C. It is obligate aerobes. It does not produce indole, H_2S and it produces nitrite from nitrate medium. Ribose and fructose are not utilized. But glucose, glycerol and so on, are utilized, and it produces acid from glucose. Strain 521 possesses oxidase and catalase. The G+C mol% of DNA is 62.7 (Tm).

Therefore, strain 521 is considered as one new species and it is named *Halobacterium zhabeiensis* sp. nov.

Key word

Halobacterium zhabeiensis