

嗜盐小盒菌属新种的鉴定

周培瑾 徐毅 肖昌松 马允卿 刘宏迪

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 从新疆盐湖分离纯化到 3 株多形态嗜盐菌(编号为 A₅, B₂ 和 B-B₂)。以《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》第 3 卷(1989 年)为主要依据,根据极性脂分析,这 3 株菌可归入嗜盐小盒菌属(*Haloarcula*)。又根据细胞形态特征和生理生化特性,这 3 株菌不同于该属中现在正式承认的两个种而成为一独立的类群,建议为嗜盐小盒菌属中的一个新种,命名为艾丁嗜盐小盒菌(*Haloarcula aidinensis* sp. nov.)。以 A₅ 菌株作为模式株。

关键词 嗜盐菌,嗜盐小盒菌属,极性脂

在 1984 年出版的《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》中^[1],极端嗜盐菌仅为一科二属:嗜盐杆菌属(*Halobacterium*)和嗜盐球菌属(*Halococcus*)。其分类主要依据它们的生理生化指标。这种原始的传统分类方法与嗜盐菌研究的发展不相适应。自从 Tindall^[2]发现了嗜盐嗜碱菌的类型,人们才开始重新对嗜盐菌的分类有一新的估价,即嗜盐菌的分类应建立在化学分类的基础上,而不是以生化反应为主的传统观念^[3]。

极性脂的组成在这方面已证明是非常重要的。Torreblanca^[4]就是根据非碱性嗜盐杆菌的极性脂组成的差别,在嗜盐菌科的嗜盐杆菌中分成了 3 个新属,即嗜盐杆菌属、嗜盐小盒菌属(*Haloarcula*)和嗜盐富饶菌属(*Haloferax*)。

本文就是在此基础上,鉴定出嗜盐小盒菌属的一个新成员。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

A₅ 菌株系从新疆吐鲁番艾丁湖分离得到;B₂ 和 B-B₂ 菌株系从新疆鄯善县乌宗布那克盐湖分离得到;*Halobacterium cutirubrum* NRC 34001(6[#])来自加拿大;*Haloarcula vallismortis* ATCC 29715(EM201)、*Haloarcula hispanica* ATCC 33960(EM202)和 *Haloarcula marismortui* ATCC 43049(EM203)来自美国。

1.2 培养条件和分析方法

生长培养基为 CM 培养基^[5],培养温度 37℃。鉴定主要以《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》第 3 卷(1989 年)^[6]为基础。

1.2.1 个体形态:用单兰氏染色、相差显微镜观察活细胞、电镜观察、鞭毛染色等方法确定个体形态。

• 国家自然科学基金重点课题资助项目。

本文于 1992 年 5 月 26 日收到。

- 1.2.2 菌落形态:牛奶盐琼脂平板划线^[7],37℃光照培养。
- 1.2.3 细胞生长测定:液体培养一定时间,取样,稀释10倍,在460nm处测定OD值。
- 1.2.4 细胞色素测定^[8]:收集细胞,甲醇-丙酮(1:1)抽提,DU-7分光光度计扫描测其吸收峰。
- 1.2.5 甘油二酯测定^[9]:用薄板层析法以 *E. coli* 和 *Halobacterium cutirubrum* NRC 34001 作对照测定甘油二酯带。
- 1.2.6 细胞蛋白特性:用薄层等电聚焦法^[10]测定细胞蛋白的酸碱性。
- 1.2.7 其他生理生化反应:参照 Ross 的方法^[11]。
- 1.2.8 DNA G+C mol%含量的测定^[12]:用紫外分光光度法测定 T_m 值。
- 1.2.9 PCR 和 DNA 杂交:按参考文献[13]的方法。

2 结果

2.1 形态特性

2.1.1 个体形态: A_5 、 B_2 和 $B-B_2$ 菌株均为革兰氏阴性菌,细胞为片状的多形态,从三角形、方形,多角形到圆盘形等(以液体培养的幼龄细胞为准)。即使固体培养基上的老龄菌也未观察到杆状菌。这三株菌均未发现鞭毛。细胞大小约1—3 μm (图1)。

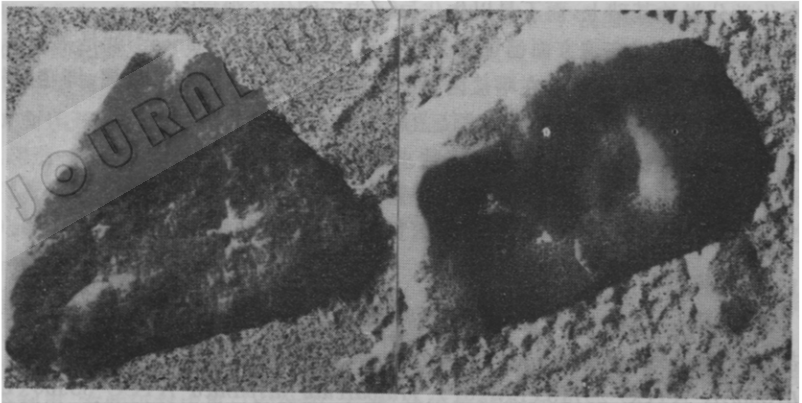


图1 A_5 菌株的电子显微镜照片(30000 \times)

Fig. 1 Electronic micrographs of strain A_5

2.1.2 菌落形态:菌落表面光滑湿润,粘稠,红色,其直径约为1mm(培养7天,37℃)。

2.2 生长曲线、嗜盐度以及 Mg^{2+} 和 Na^+ 对生长的影响

这3株菌的生长曲线图形基本相同(图2)。细胞量达到最高时的生长时间均约为80小时,倍增时间约为12—13小时。

3株菌的嗜盐范围因环境不同有很大差别,一般为10—30%,最适范围在12.5—

20%。 Mg^{2+} 对这3株菌的嗜盐度有很大影响。即在一定范围内, Mg^{2+} 可以部分取代 Na^+ 。从图3,4中可以看出,当 Mg^{2+} 浓度为2%时,生长NaCl浓度范围约为15—30%,最适生长NaCl浓度为20%;当 Mg^{2+} 随 Na^+ 浓度下降而等摩尔浓度增补时,最适生长的NaCl浓度从20%降至15%(此时 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度为17%),适合生长的NaCl浓度范围也有所扩大。

2.3 生理生化特性

生理生化试验结果见表1。这3株菌的生理生化特性基本相似,但与嗜盐小盒菌属的典型成员有些差别。

表1 嗜盐小盒菌属的生化特性比较

Table 1 Comparisons of biochemical features of *Haloarcula*

特性 Characteristics	EM201	EM202	EM203	A ₅	B ₂	B-B ₂
细胞形态 Cell shape	多形态杆状 pleomorphic rod		多形态片状 pleomorphic flat			
运动性 Motility	+	+	-	-	-	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	-	+	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	+	-	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
吲哚产生 Indole production	+	+/—	-	+	+	+
吐温水解 Tween(60,80)hydrolysis	-	+	-	-	+	+
酪蛋白水解 Casein hydrolysis	-	+	-	-	-	-
氧化酶,接触酶 Oxidase, catalase	+	+	+	+	+	+
糖利用 Use of carbohydrates:						
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+	+
果糖 Fructose	+		+	+	+	+
半乳糖 Galactose	+			+	+	+
山梨糖 Sorbitose				+	+	+
甘露糖 Mannose	-		+	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose				+	+	+

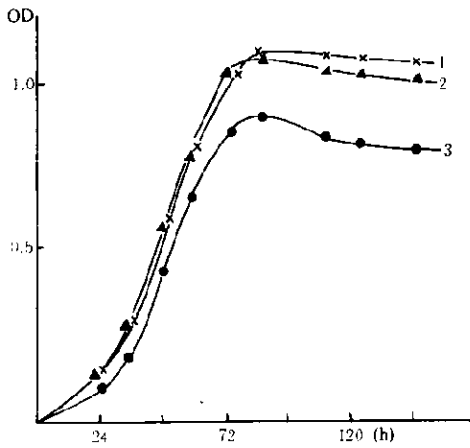


图 2 A₅、B₂ 和 B-B₂ 菌株的生长曲线

Fig. 2 Growth outlines of strains A₅, B₂ and B-B₂

1. B-B₂; 2. B₂; 3. A₅

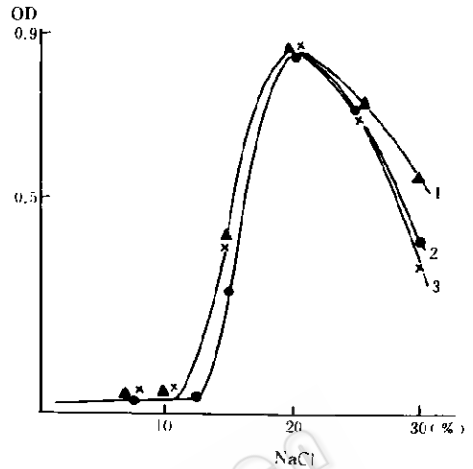


图 3 NaCl 浓度对细胞生长的影响

Fig. 3 Effect of NaCl concentrations on the cell growth

1. B-B₂; 2. A₅; 3. B-B₂

2.4 嗜盐菌一些特征的检测

2.4.1 甘油二醚脂类的测定: 薄板层析结果表明, 这 3 株菌均含有嗜盐菌古细菌特征性的甘油二醚脂类, 而不含有真细菌的酯键脂类。

2.4.2 色素吸收光谱: 从图 5 可以看出, 这 3 株菌和 *Halobacterium cutirubrum* NRC 34001 的色素吸收光谱基本上一致, 均显示出嗜盐菌类胡萝卜素(菌红素)的特征峰。

2.4.3 薄层等电聚焦测定菌体蛋白的酸碱性: 试验结果表明这 3 株菌的细胞蛋白均为酸性蛋白, 而不含有碱性蛋白, 这也是典型嗜盐古细菌的特性。

2.5 16SrRNA 基因/DNA 杂交

利用一对特定的引物可以合成出 A₅、B₂ 和 *Haloarcula vallismortis* 的 PCR 16SrRNA 基因产物, 分子量约

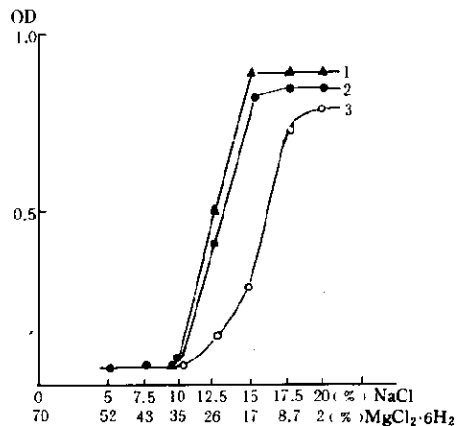


图 4 Mg²⁺ 和 Na⁺ 对细胞生长的影响

Fig. 4 Relation of effects of Mg²⁺ and Na⁺ ions on cell growth

1. B-B₂; 2. A₅; 3. B²

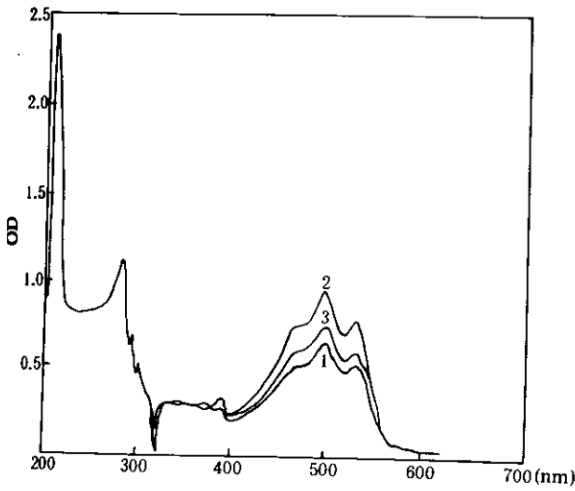


图5 A₅、B₂ 和 B-B₂ 菌株的色素吸收光谱

Fig. 5 Absorption spectrum of pigments of strains A₅, B₂ and B-B₂

1. A₅; 2. B₂; 3. B-B₂

1.5kb左右。以 A₅ 的 PCR 产物为探针,可与 A₅、B₂ 和 *Haloarcula vallismortis* 的总 DNA 杂交,显示出嗜盐小盒菌属内的亲缘关系,但不能与其它真细菌(G⁺和 G⁻)DNA 杂交。

2.6 极性脂的分析

以 *Halobacterium cutirubrum* NRC 34001 作参照菌,与其他人的试验结果进行对比^[11,13]。所有试验都

在硅胶平板上进行。如图 6 所示,这 3 株菌均含有 PG 和 PGP 作为主要的磷脂和 PGS 作为次要磷脂,并含有 TGD-2 和 DGD-2,这些均为嗜盐小盒菌属的典型特征。

2.7 G+C mol%测定

A₅、B₂ 和 B-B₂ 菌株 DNA 中 G+C mol%含量分别为 67.4, 67.9, 64.03。

3 讨论

根据极性脂的分析结果表明,这 3 株嗜盐菌极性脂的最大特点是含有 TGD-2(三糖基二醚脂化合物)。根据《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》第 3 卷(1989 年)^[6]嗜盐菌的分类标准,这种极性脂的存在是嗜盐菌科中嗜盐小盒菌属(*Haloarcula*)最重要特性之一,正如嗜盐杆菌属(*Halobacterium*)分类最重要的特性是极性脂组成中含有 S-TGD-1 和 S-TeGD;嗜盐富饶菌属(*Haloferax*)分类最重要的特性是极性脂组成中含有 S-DGD-1 以及缺少 PGS。因而这三株菌被定为嗜盐小盒菌属中的成员。

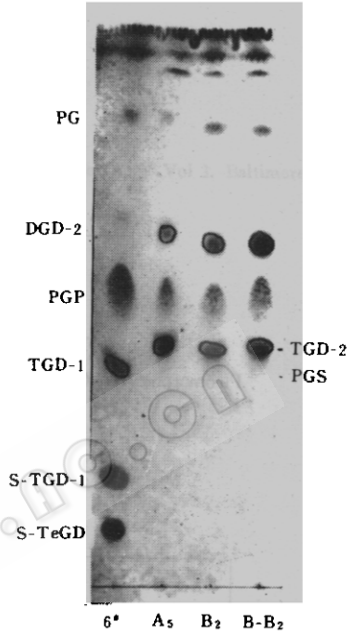


图 6 嗜盐菌极性脂的薄板层析

Fig. 6 Thin-layer chromatography of polar lipids from Halobacteria

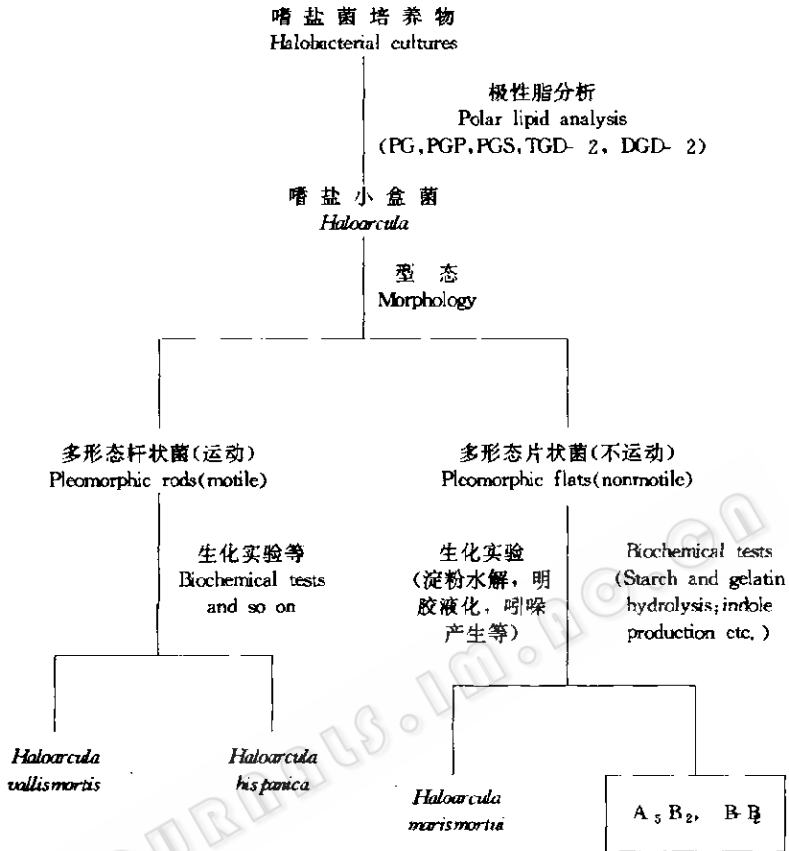


图7 分类简图
Fig. 7 Procedure of classification

从形态上看,这3株菌无论是液体培养还是固体培养,无论是幼龄菌还是老龄菌的细胞均保持极端多形态,与嗜盐小盒菌属中现在正式承认的两个种 *Haloarcula vallismortis* 和 *Haloarcula hispanica* 不同,前者(A₅、B₂和B-B₂)为片状的多形态,而后者为杆状多形态;前者无鞭毛而后者则有鞭毛。与另一株尚未正式定种的菌 *Haloarcula marismortui* 相比,虽在形态上相似,但在某些生化特性如淀粉水解,明胶液化和吲哚产生上有较大差别。

此外,嗜盐度,高G+C mol%值,酸性细胞蛋白以及典型的色素吸收峰,含甘油二酯, DNA 杂交等均表明,这3株菌是典型的嗜盐古细菌。

分类简单步骤如图7。以上实验结果充分表明,A₅、B₂和B-B₂这3株菌属于嗜盐菌科(Halobacteriaceae),嗜盐小盒菌属(*Haloarcula*)的新成员。命名为艾丁嗜盐小盒菌(*Haloarcula aidinensis* sp. nov.)。其中A₅菌株为模式株。

参 考 文 献

- [1] Larsen H, Krieg N R, Holt J G. ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984. 264—266.
- [2] Tindall B J *et al.* *Syst Appl Microbiol*, 1984, **5**: 41—51.
- [3] Ross H N M, Grant W D. *J Gen Microbiol*, 1985, **131**: 165—173.
- [4] Torreblanca M *et al.* *Syst Appl Microbiol*, 1986, **8**: 89—99.
- [5] Gochnaucy M B, Kushner D G. *Can J Microbiol*, 1969, **15**: 1157—1165.
- [6] Grant W D, Larsen H, Staley J T *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 3. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1989. 2216—2233.
- [7] Kocur M *et al.* *Internat J Bacteriol*, 1973, **23**: 151—156.
- [8] Aharm O. *Internat J Bacteriol*, 1983, **33**: 381—386.
- [9] Ross H N M *et al.* *J Gen Microbiol*, 1985, **123**: 75—80.
- [10] 杨寿钧, 张树政主编. 酶学研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1989. 196—200.
- [11] Ross H N M. *The Extrwmely Halophilic Archaeobacteria*, Thesis, 1982.
- [12] 周慧玲. 微生物学报, 1978, **18**(2): 134—139.
- [13] Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 324—325.

NEW SPECIES OF *HALOARCULA*

Zhou Peijin Xu Yi Xiao Changsong Ma Yunqing Liu Hongdi

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract Three strains of pleomorphic halobacteria (A_5 , B_2 and $B-B_2$) were isolated from salt lakes of Xinjiang, China. Based on the *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 3 (1989) and the analytical results of polar lipids, the three strains could be included in the genus *Haloarcula*. But since they differ from normally accepted two species of this genus in cell shape and physiological and biochemical features, it is suggested that the three strains belong to a new species, called *Haloarcula aidinensis* sp. nov.

Key words Halobacteria, *Haloarcula*, Polar lipids