

盐单胞菌属一新种——黄海盐单胞菌*

徐德强 黄静娟 张纪忠 范 钦** 刘东来**

(复旦大学微生物学系 上海 200433)

摘 要 以《伯杰氏系统细菌学手册》第1卷(1984年)等为主要依据,对从江苏省黄海盐场晒盐池分离到的 H_1 菌株进行了鉴定。结果表明, H_1 菌株符合盐单胞菌属 (*Halomonas*) 的特征。但该菌株的形态、生理生化特性及 DNA 中 G + C mol% 等又不同于该属中的已知种。同时, H_1 菌株与该属中的相关种——伸长盐单胞菌 (*Halomonas elongata* ATCC 33173) 的 DNA 杂交率为 44.7%。因而将 H_1 菌株鉴定为盐单胞菌属的一个新种,命名为黄海盐单胞菌 (*Halomonas huanghaiensis* sp. nov.), 且 H_1 菌株作为模式株。

关键词 黄海盐单胞菌,真细菌,古细菌

盐单胞菌 (*Halomonas*) 是一类耐盐的真细菌,大多可在 0.1%~20% NaCl 浓度下生长,有的在 0.1%~32.5% 浓度下也能生长。在自然界,它们与嗜盐的古细菌一样,通常分布于盐湖、盐场等处。在《伯杰氏系统细菌学手册》第1卷(1984年)中^[1],其分类学位置属于第4部分 (Section),即革兰氏阴性、好气杆菌和球菌类群中的一个属,当时仅包括 1 个种。随着研究的进展,目前已由 Franzmann 及其合作者提出建立了盐单胞菌科 (Halomonadaceae)^[2],并包括 2 个属,即盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和解纤维菌属 (*Deleya*),其中盐单胞菌属至今已描述了 5 个种^[1-3]。本文报道了从我国江苏省黄海盐场晒盐池中分离的 H_1 菌株鉴定结果。

1 材料和方法

1.1 样品来源

分离菌种的样品,采自江苏省黄海盐场晒盐池的底泥。

1.2 分离和培养

富集培养、分离和收集菌体均采用 Gibbons 培养基^[4],加以改进如下 (g/L): 酪素水解物 5,酵母浸出物 10,蛋白胨 5,柠檬酸三钠 3, KCl 2, MgSO₄ · 7H₂O 20, NaCl 80, (固体培养基加琼脂 18), pH7, 32℃ 培养。

样品中的菌体经富集后,在改良的 Gibbons 固体培养基上纯化,选取单菌落进行鉴定。

1.3 鉴定方法

主要参照《伯杰氏系统细菌学手册》第1卷(1984年)^[1]和 James 等的研究工作^[5],部分试验借鉴《一般细菌常用鉴定方法》^[6]和《细菌分子遗传学分类鉴定法》^[4a]。对照菌株美丽或安娜盐单胞菌 (*Halomonas meridiana* ACAM 246) 和 H_1 菌株的相关种——伸长

* 本研究为国家自然科学基金资助项目。

** 本校微生物专业毕业生,作者还有彭伟、林弘。

盐单胞菌 (*Halomonas elongata* ATCC 33173) 系 James S. R. 博士赠送, 盐生盐杆菌 (*Halobacterium halobium* R₁M₁) 由国外引进。

1.3.1 个体形态: 采用革兰氏染色和鞭毛染色法, 在光学显微镜下观察细胞形状、大小、鞭毛着生特点和革兰氏染色反应, 另用电镜观察鞭毛着生特点。

1.3.2 培养特征: 划线接种于 AOLPA 培养基^[7], 32℃ 培养 2~3d, 观察单菌落的形状、大小、颜色、表面及边缘等特征。

1.3.3 耐盐度试验: 采用含不同浓度 NaCl (0.1%~32% 的 Payne 培养液^[11], 接种后, 于 32℃ 振荡培养 5d, 然后用 721 型分光光度计测定培养液的光密度 (波长 480nm)。此外, 还采用蒸馏水作溶质, 进行了 H₂ 菌株和盐生盐杆菌 R₁M₁ 菌株的溶菌试验。

1.3.4 温度试验: 采用含 8% NaCl 的 Payne 培养液, 接种后分别于 15~50℃ 水浴中培养 5d, 用 721 型分光光度计测定培养液的光密度 (波长 480nm)。

1.3.5 pH 值对生长影响的测定: 采用 pH 值分别为 5~9 的 Payne 培养液, 接种后于 32℃ 振荡培养 5d, 用 721 型分光光度计测定培养液的光密度 (波长 480nm)。

1.3.6 二氨基庚二酸 (DAP) 的测定^[12]: 菌体经酸解后, 采用纸谱法测定 (用标准 DAP, 美丽戴安娜盐单胞菌 ACAM 246 和盐生盐杆菌 R₁M₁ 菌株作对照)。

1.3.7 甘油二酯类衍生物的测定^[13]: 采用薄层层析法, 以盐生盐杆菌 R₁M₁ 和美丽戴安娜盐单胞菌 ACAM 246 菌株为对照菌。

1.3.8 有机化合物作为唯一碳源和能源试验: 采用生长谱法, 其中使用的基础培养基为改良的 AOLPA 培养基^[7]。有机化合物包括 41 种糖、醇及氨基酸等。

1.3.9 药敏试验: 涂布法接种 AOLPA 平板, 稍干后放置氨苄青霉素等 12 种药敏试纸 (上海医学化验所出品), 32℃ 培养 1~2d, 观察有无抑菌圈。

1.3.10 其它生理生化特性试验: 采用常规的方法进行鉴定^[1,7,9,13], 其中鸟氨酸、赖氨酸脱羧酶试验和丙二酸盐利用均采用文献[9]的配方, 其它使用的基础培养基分别为改良的 AOLPA、Gibbons、Sreenivasan-venkaraman^[11] 和 MS^[1] 等培养基, 在各种培养基中均含有 8% NaCl。

1.3.11 DNA 中 G + C mol% 的测定^[10,14]: 采用紫外分光光度计测定 T_m 值的方法。

1.3.12 DNA 杂交率的测定^[10]: 采用固相膜核酸分子杂交方法, 进行 H₂ 菌株与相关种——伸长盐单胞菌 ATCC 33173 的 DNA 杂交率的测定。

2 结果

2.1 形态特征

2.1.1 个体形态: H₂ 菌株为革兰氏阴性杆菌, 细胞单个存在, 具 1~4 根侧生鞭毛, 细胞大小为 0.85~1.0 × 1.2~2.4 μm。

2.1.2 培养特征: H₂ 菌株在 AOLPA 培养基上生长良好, 菌落呈桂皮淡棕色, 圆形, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 直径为 1mm。

2.2 耐盐度试验

图 1 表明, H₂ 菌株能在含 0.1%~24.5% 浓度的 NaCl 培养基中生长良好, 24.5% 以上时生长弱, 其最适耐盐度是 5%。同时, 溶菌试验结果也表明, 该菌株在蒸馏水中不发

生自溶现象。

2.3 温度试验

H₂ 菌株能在 15~50℃ 的培养基中生长,其最适生长温度为 35℃。

2.4 pH 值对生长影响的测定

H₂ 菌株能在 pH5~9 的培养基中生长,其最适生长 pH 值为 7。

2.5 二氨基庚二酸 (DAP) 的测定

H₂ 菌株的显色斑点有二氨基庚二酸的典型颜色——黄色,且其 R_f 值也与二氨基庚二酸标准品相同,表明该菌株具有二氨基庚二酸。

2.6 甘油二醚类衍生物的测定

盐生盐杆菌 R₁M₁ 的菌体水解提取物具有甘油二醚类衍生物的一个斑点,其 R_f 值约为 0.2,而 H₂ 菌株和美丽戴安娜盐单胞菌 ACAM246 菌株相同,它们的菌体水解提取物未呈现甘油二醚类衍生物的斑点,而具有非羟基化的脂肪酸甲酯斑点(其 R_f 值大于 0.6)^[13]。

2.7 有机化合物作为唯一碳源和能源试验

H₂ 菌株能将果糖、甘油、肌醇、丙酸盐、丙酮酸盐、β-羟基丁酸盐、琥珀酸盐、精氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、羟脯氨酸、L-天冬酰胺、亮氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、脯氨酸、丝氨酸、缬氨酸和丙氨酸等作为唯一碳源和能源,不利用核糖醇、纤维二糖、D-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-葡萄糖酸盐、D-葡萄糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、乳糖、甘露糖、甘露醇、棉子糖、水杨苷、蔗糖、海藻糖、DL-色氨酸、组氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸。

2.8 药敏试验

氨苄青霉素 (10μg)、红霉素 (15μg)、庆大霉素 (10μg)、先锋霉素 (30μg)、氯霉素 (30μg)、新霉素 (30μg)、多粘菌素 B(300i.u.) 和 HgCl₂ 1:5000 等能抑制 H₂ 菌株的生长,而杆菌肽 (10i.u.)、链霉素 (10μg)、四环素 (30μg) 和 0/129(10μg) 则无抑菌效果。

2.9 其它生理生化特性测定

穿刺培养, H₂ 菌株仅在琼脂表面生长。具氧化型代谢。能从果糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、麦芽糖和甘露醇产酸,但不从蔗糖产酸。该菌株具有过氧化氢酶、Kovac's 氧化酶、脲酶和 DNA 酶,不具有淀粉酶、β-半乳糖苷酶、赖氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶。能还原硝酸盐并产气,在有硝酸钾的培养基中能厌氧生长。能利用丙二酸盐,但不水解酪素,也不液化明胶。

2.10 DNA 中 G + C mol% 的测定

H₂ 菌株 DNA 中 G + C mol% 为 64.9(Tm)。

2.11 DNA 杂交率的测定

H₂ 菌株与相关种——伸长盐单胞菌 ATCC 33173 的 DNA 杂交率为 44.7%。

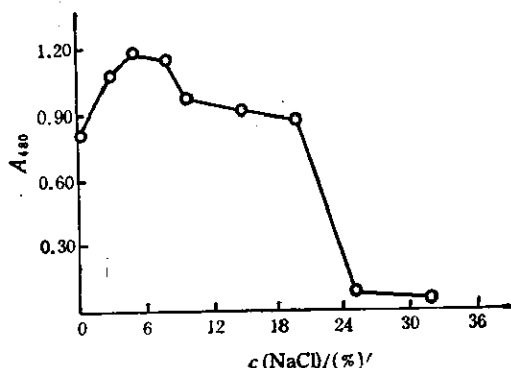


图1 NaCl 浓度对 H₂ 菌株生长的影响
Fig. 1 Effect of NaCl concentration on the growth of strain H₂

表 1 H₂ 菌株和盐单胞菌属中 5 个已知种的差别^[1-7]
Table 1 Differences between strain H₂ and identified five species of the genus *Halomonas*

特征 Characteristics	伸长盐单胞菌 <i>H. elongata</i> ATCC 33173	嗜海水盐单胞菌 <i>H. halmophila</i> NCMB 1971	冰下盐单胞菌 <i>H. subglacialis</i> QJM 2926, 2927	耐盐盐单胞菌 <i>H. halodurans</i> ATCC 29686	美丽戴安娜盐单胞菌 <i>H. meridiana</i> H ₂ ACAM233, ACAM246
细胞大小 Cell size (μm)	0.6~0.8×1.6~1.9	0.5~0.7×0.7~0.9	0.5~1.1×1.1~36.5	0.6~1.0×1.9~4.5	0.85~1.0×1.2~2.4
菌落颜色 Color of colonies	白色 white	灰白 off-white	白色 white	白~灰白 white-off white	桂皮淡棕cassia bark pale brown
Kovac's 氧化酶 Kovac's oxidase	+	+	+	+	+
硝酸盐还原 NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	+	+	+	-	+
硝酸盐中产气 Gas production from NO ₃ ⁻	-	-	-	-	+
有硝酸盐下厌氧生长 Anaerobic growth with KNO ₃	+	-	-	-	+
氧化型代谢 Oxidative metabolism	+	-	+	+	+
DNA 酶 DNAase	+	+	-	-	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	-	+	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	-
脲酶 Urease	+	+	+	+	-
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	+	-	-	-	+
丙二酸盐利用 Malonate utilization	+	-	-	-	-
从碳源产酸 Acid production from carbon	-	+	+	+	+

sources:

3 讨论

上述试验结果表明, H_2 菌株的特性符合盐单胞菌属 (*Halomonas*) 的特征, 即在 0.1%~24.5% NaCl 的培养基中生长, 且在蒸馏水中不自溶, 其最适耐盐度为 5%。细胞壁含二氨基庚二酸, 细胞膜含非羟基化的脂肪酸甲酯, 而不含有甘油二醚类衍生物。革兰氏阴性杆菌。菌落呈柱皮淡棕色, 而不呈红色。DNA 中 G + C mol% 为 64.9(Tm)。

在《伯杰氏系统细菌学手册》第 1 卷(1984 年)^[1]中, 盐单胞菌属仅描述一个种, 即伸长盐单胞菌 (*Halomonas elongata*)。随着研究不断深入, 至今该属又描述有以下 4 种, 即嗜海水盐单胞菌 (*H. halmophila*)、冰下盐单胞菌 (*H. subglaciescola*)、耐盐盐单胞菌 (*H. halodurans*) 和美丽戴安娜盐单胞菌 (*H. meridiana*)。 H_2 菌株与上述种比较, 在菌落色泽、细胞大小、硝酸盐还原和产气、在有硝酸钾存在下厌氧生长、鸟氨酸脱羧酶、丙二酸盐利用、从碳源产酸、有机物作为唯一碳源和能源、药敏试验, 以及 DNA 中 G + C mol% 等方面均有明显的差异 (表 1)。此外, H_2 菌株与相关种——伸长盐单胞菌 (*H. elongata* ATCC 33173) 的 DNA 杂交率为 44.7%, 这一数值不但显示出盐单胞菌属内亲缘关系, 同时也表明 H_2 菌株不同于它的相关种——伸长盐单胞菌 (*H. elongata* ATCC 33173)^[10]。因此, 将 H_2 菌株定为盐单胞菌属中的一个新种, 命名为黄海盐单胞菌 (*Halomonas huanghaiensis* sp. nov.), 并以 H_2 菌株作为模式株。

黄海盐单胞菌 (*Halomonas huanghaiensis* sp. nov.)

革兰氏阴性杆菌, 细胞单个存在, 具 1~4 根侧生鞭毛。细胞大小为 $0.85 \sim 1.0 \times 1.2 \sim 2.4 \mu\text{m}$ 。在 AOLPA 培养基^[7]上, 菌落呈柱皮淡棕色, 圆形, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 直径 1mm。该菌种能在 0.1%~24.5% 浓度 NaCl 的培养基中生长, 且在蒸馏水中不自溶, 其最适 NaCl 浓度为 5%。细胞壁含二氨基庚二酸。细胞膜含非羟基化的脂肪酸甲酯, 而不含有甘油二醚类衍生物。生长温度范围为 $15 \sim 50^\circ\text{C}$, 最适温度为 35°C 。生长 pH 范围为 5~9, 最适 pH7。具有过氧化氢酶, Kovac's 氧化酶和 DNA 酶, 不具有鸟氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶。它能还原硝酸盐并产气, 在有硝酸盐的培养基中能厌氧生长。能利用丙二酸盐。其它生理生化特性见试验结果 2.7、2.8 和 2.9 等。本菌种的 DNA 中 G + C mol% 为 64.9 (Tm)。它与相关种——伸长盐单胞菌 (*Halomonas elongata* ATCC 33173) 的 DNA 杂交率为 44.7%。 H_2 菌株作为模式株, 已保藏在复旦大学微生物学系微生物分类组, 保藏号为 FD1105。

致谢 承复旦大学遗传学研究所余龙教授协助 DNA 杂交率的测定, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Vreeland R H. Genus *Halomonas*. In: Krieg N R, Holt J G ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. 1984. 340~343.
- [2] Franzmann P D, Wehmeyer U, Stackebrandt E. *Syst Appl Microbiol*, 1988, 11:16~19.
- [3] Vreeland R H, Litchfield C D, Martin E L et al. *Internat J Bacteriol*, 1980, 39(2): 485~495.
- [4] Franzmann P D, Burton H R, Mcmeekin T A. *Internat J Bacteriol*, 1987 37(1): 27~34.
- [5] Rosenberg A. *Arch Microbiol*, 1983, 136:117~123.
- [6] Hebert A M, Vreeland R H. *Internat J Bacteriol*, 1987, 37(4): 347~350.

- [7] James S R, Dobson S J, Franzmann P D *et al.* *Syst Appl Microbiol*, 1990, 13:270~278.
[8] Sehgal S N, Gibbons N E. *Can J Microbiol*, 1960, 6:165~169.
[9] 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. 北京: 科学出版社, 1978.
[10] 林万明主编. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海: 上海科学技术出版社, 1990, 52~54; 84~92; 139~184.
[11] Kocur M, Hodgkiss W. *Internat J Bacteriol*, 1973, 23(2):151~156.
[12] 裴鸿生, 朱宝泉, 耿梅英, 等. 抗生素, 1982, 7(1): 57.
[13] Ross HNM, Collins M D, Tindall B J *et al.* *J Gen Microbiol*, 1981, 123(1):75~80.
[14] 周慧珍. 微生物学报, 1978, 18(2): 134~139.

A NEW SPECIES OF *HALOMONAS*—*HALOMONAS HUANGHAIENSIS* SP. NOV.

Xu Deqiang Huang Jingjuan Zhang Jizhong Fan Qin Liu Donglai

(Department of Microbiology Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Based mainly on the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1(1984), strain H₁ which was isolated from Huanghai saltern pool in Jiangsu Province was identified. It possessed characters common to *Halomonas*, but differed from known species of *Halomonas* in some morphological, physiological and biochemical features, and the G+C mol% of DNA, as well. According to our study, strain H₁ was the closest to *Halomonas elongata* ATCC 33173 in the genus *Halomonas*. But the binding degree of DNA between strain H₁ and *Halomonas elongata* ATCC33173 was only 44.7%. Therefore, strain H₁ was identified as a new species of *Halomonas* and named *Halomonas huanghaiensis* sp. nov. Strain H₁ was considered as a type strain.

Key words *Halomonas huanghaiensis*, Eubacteria, Archaeobacteria