

## 嗜盐嗜碱杆菌属的一个新种\*

田新玉 徐毅 刘洪灿 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 从内蒙古自治区哈马台碱湖分离到一株多形态嗜盐嗜碱菌(编号 HAM-2), 其生长的 NaCl 浓度范围为 12% ~ 30%, 最适 17.5%; 生长的 pH 范围为 7.8 ~ 10.4, 最适 pH 9.0 ~ 9.5. 革兰氏染色阴性。细胞为不规则杆状、椭圆形、三角形等多形态, 细胞大小为 1.0 ~ 2.0 × 2.0 ~ 5.0 μm。该菌株主要极性脂是磷脂酰甘油磷酸酯 (PGP) 和磷脂酰甘油 (PG), 还含有一种未知的次要磷脂成分 (PL4)。DNA 中 G+C 含量为 59.5mol%。根据这些特征, 菌株可归入嗜盐嗜碱杆菌属, 又根据细胞形态和极性脂组份不同于该属正式承认的三个种, 因此, 鉴定此菌株为嗜盐嗜碱杆菌属 (*Natronobacterium*) 的一个新种, 定名为内蒙古嗜盐嗜碱菌 (*Natronobacterium innermongoliae* sp. nov.)。

**关键词** 嗜盐嗜碱菌, 嗜盐嗜碱杆菌属, 极性脂

古细菌中的嗜盐嗜碱菌构成了嗜盐菌科 (Halobacteriaceae) 一个特殊生理群<sup>[1]</sup>, 它们仅栖息在天然碱湖并专性嗜碱。目前已从肯尼亚 Magadi 碱湖<sup>[2]</sup>, 埃及的 Wadi Natrun 碱湖<sup>[3]</sup>, 美国加利福尼亚 Owen 碱湖<sup>[4]</sup>, 以及中国和俄罗斯的一些碱湖<sup>[5,6]</sup> 分离到这些菌。与其他嗜盐菌一样由于合成 C<sub>30</sub> 类胡萝卜素色素而使盐水产生红色。

1984 年, Tindall 等人<sup>[7]</sup> 报道了非洲东部碱湖分离到的嗜盐嗜碱古细菌分类研究。根据这些菌生长需要高 pH、高盐浓度和低的镁离子浓度; 极性脂以 PGP 和 PG 为其主要组份, 以及 DNA /DNA 同源性和 DNA /16S rRNA 杂交数据, 提出了嗜盐菌科的两个新属: 嗜盐嗜碱杆菌属 (*Natronobacterium*), 包括三个种即 *N. gregoryi*, *N. magadii* 和 *N. pharaonis*, 和嗜盐嗜碱球菌属 (*Natronococcus*), 仅包括一个种 *Nc. oculatus*。嗜盐嗜碱菌的分类研究, 促使人们重新估价对嗜盐菌的分类, 即嗜盐菌分类不应仅以传统的生理生化反应为主, 而更应注重其化学分类。本文报道从我国内蒙古哈马台碱湖分离到一株多形态嗜盐嗜碱菌并鉴定为嗜盐嗜碱杆菌属的一个新种。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品来源和菌种

用于分离菌的样品采自内蒙古自治区哈马台碱湖的底泥。对照菌株为 *N. gregoryi* (NCMB2189), *N. magadii* (NCMB2190) 来自英国, *N. pharaonis* (DSM2160) 来自德国和大肠杆菌 K12(AS 1.365) 从中国科学院微生物研究所获得。

\* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1994 年 6 月 10 收到。

## 1.2 分离和培养

富集培养和菌种分离采用了修饰的 Seghal 和 Gibbons<sup>[8]</sup> 培养基(g/L): 酪素水解物 7.5, 酵母粉 10.0, 柠檬酸三钠 3.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2, KCl 2.0,  $Fe^{2+}$  10ppm, NaCl 250,  $Na_2CO_3$  10.0 ( $Na_2CO_3$  单独灭菌, 用前混合), 水 1L。固体培养基加琼脂 20g。少量样品接种于液体培养基, 于 37℃ 振荡培养 7d, 适当稀释用玻璃刮刀涂布平板, 培养 10~15d 挑选单菌落, 经反复划线纯化, 直至获得纯菌。

## 1.3 菌种鉴定方法

**1.3.1 形态观察:** 嗜盐嗜碱菌在 Tindall 等培养基<sup>[2]</sup> 中培养 24~48h, 用相差显微镜观察活菌体, 革兰氏染色, 电子显微镜观察等方法确定菌体形态。

**1.3.2 生长条件试验:** 所有生长试验在 250ml 三角瓶中装 50ml 培养基, 接种后于 37℃ 旋转摇床振荡培养 7d, 用 721 分光光度计于 460nm 测吸光度。

**1.3.3 生理生化试验:** 生理生化试验依 Ross<sup>[9]</sup> 方法进行。

**1.3.4 极性脂和醌组份分析:** 极性脂参照 Tindall 等<sup>[7]</sup> 的方法。极性脂在硅胶薄板(Merck, DC-Alufilm Kieselgel 60F, 256) 上进行双向薄层层析。第一向展开剂: 氯仿/甲醇/水(65:25:4), 第二向展开剂: 氯仿/甲醇/醋酸/水(80:12:15:4)。展开后, 喷 Zinzadze 试剂显色磷脂;  $\alpha$ -萘酚显色糖脂; 50% 浓硫酸显色总脂。参照 Ross 等<sup>[10]</sup> 的方法检测甘油二醚衍生物。由冷冻干燥细胞提取醌类化合物, 硅胶薄层层析和高压液相色谱法分析醌组份。

**1.3.5 抗菌素敏感性:** 浸有抗菌素的厚滤纸圆片放在预先涂好对数生长期菌体的固体培养基平板上, 37℃ 培养 4~7d, 观察抗菌素对试验菌的抑制作用。使用的抗菌素如下: 青霉素(50 $\mu$ g), 卡那霉素(30 $\mu$ g), 氯霉素(30 $\mu$ g), 红霉素(10 $\mu$ g), 四环素(30 $\mu$ g), 粘菌素(100u), 杆菌肽(2u), 链霉素(50 $\mu$ g), 新生霉素(20 $\mu$ g) 和茴香霉素(50 $\mu$ g)。

**1.3.6 DNA 中 G+C 含量测定:** 参照周慧玲方法<sup>[11]</sup>。DNA 溶于 0.1xSSC 溶液, 用 Bekman DU-7 紫外分光光度计测样品的热变性温度( $T_m$ )。对照菌为大肠杆菌 K12(AS 1.365)。

## 2 结果

### 2.1 形态特征

**2.1.1 个体形态:** HAM-2 菌株为革兰氏染色阴性, 不运动。液体培养 24h 幼龄细胞为多形态: 从三角形、椭圆形、方形到不规则杆状, 菌体大小为 1.0~2.0 $\times$ 2.0~5.0 $\mu$ m, 电子显微镜观察结果如图 1。在固体培养基上老龄菌体细胞为球形。

**2.1.2 菌落形态:** 菌落圆形、不透明、表面光滑、边缘整齐, 37℃ 培养 7d 菌落橙红色, 直径 2~3mm。

### 2.2 生长条件

**2.2.1 NaCl 浓度对生长的影响:** HAM-2 菌株是极端嗜盐菌, 在 NaCl 浓度低于 12% 的培养基中不生长, NaCl 浓度在 12%~30% 时生长良好(大于最适生长的 50%), 最适生长的 NaCl 浓度为 17.5%。

**2.2.2 pH 对生长的影响:** HAM-2 菌株为专性嗜碱菌, 在 pH7.8~10.4 之间生长良好, 最适生长 pH9.0~9.5。

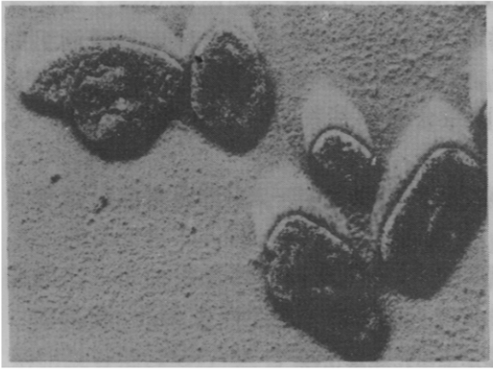


图 1 HAM-2 菌体的电子显微镜照片(12000×)

Fig. 1 Electronic micrographs of strain HAM-2

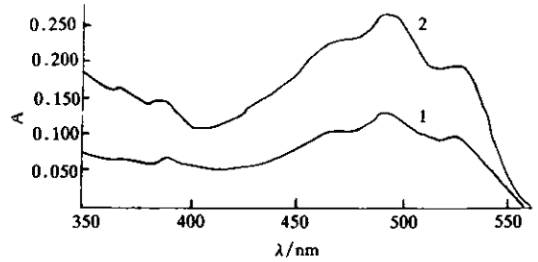


图 2 HAM-2 菌株细胞色素的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectrum of pigments of strain HAM-2  
1. HAK-2; 2. 2190.

**2.2.3 温度对生长的影响:** HAM-2 菌株中度嗜热, 生长温度范围在 25 ~ 55 ℃, 最适生长温度为 45 ℃。为避免培养时水分过量蒸发出现盐结晶, 试验温度一般采用 37 ℃。

**2.2.4 镁离子浓度对生长的影响:** 镁离子浓度低于 20 mmol/L 时适宜生长。浓度高于 40 mmol/L 时, 生长受抑制。

**2.3 生理生化特性**

**2.3.1 色素吸收光谱:** 菌株 HAM-2 和对照菌株 NCMB 2190 色素吸收光谱的吸收峰在 389、468、496 和 527nm, 与极端嗜盐菌类胡萝卜素色素的吸收峰位置一致<sup>[12]</sup>。

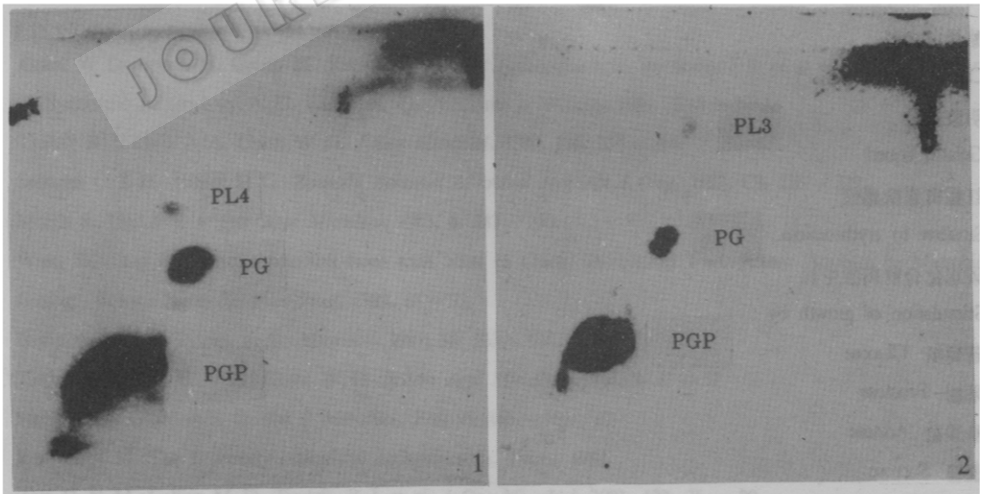


图 3 细胞极性脂的薄层层析图谱

Fig. 3 Thin-layer chromatography of polar lipids

1. HAM-2; 2. 2190.

**2.3.2 细胞的极性脂和甲基萘醌:** 极性脂的双向薄层层析结果表明, HAM-2 菌株含有磷脂酰甘油磷酸酯(PGP)和磷脂酰甘油(PG)作为主要磷脂, 还含有一种未知磷脂组分 PL4 (图 3)。类脂薄层层析表明, 该菌具有  $C_{20}$ ,  $C_{20}$  和  $C_{20}$ ,  $C_{25}$  两种甘油二酯核心类脂。醌组分的高压液相色谱分析表明, HAM-2 菌株含有甲基萘醌, 主要组分为 MK-8, 次要成分为 MK-8 (H2)。

**2.3.3 抗菌素敏感性:** 在所试验的 10 种抗菌素中, 菌株 HAM-2 对红霉素、新生霉素和茴香霉素敏感, 对其他抗菌素均不敏感。

**2.3.4 其他生化特性:** HAM-2 菌株能水解酪蛋白, 液化明胶, 不水解淀粉, 接触酶阳性, 氧化酶阳性, 磷酸脂酶阴性, 不水解吐温, 不还原硝酸盐, 产生  $H_2S$ , 葡萄糖、

表 1 嗜盐嗜碱杆菌属的生理生化特性比较

Table 1 Comparisons of biochemical feature of *Natronobacterium*

特征 Characteristic	HAM-2	<i>N. gregoryi</i>	<i>N. magadii</i>	<i>N. pharaonis</i>	<i>N. uexulata</i>
细胞形态	pleomorphic	long rod	rod	rod	rod
Cell morphology ( $\mu m$ )	1~2×2~5	0.5~0.7×10~15	0.7~0.9×2~4	0.8×2~3	0.5~0.7×1.5~3.0
运动性 Motility	-	-	+	+	-
菌落颜色和大小	橙红 orange-red	红 red	橙红 orange-red	红 red	粉 pink
Colony	2~3mm	2~4mm	2~3mm	1mm	1~2mm
醌 Quinones	MK-8 MK-8 (H2)	MK-8 MK-8 (H2)	MK-8 MK-8 (H2)	MK-8 MK-8 (H2)	MK-8
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-	-	+	+
酪蛋白水解 Casein hydrolysis	+	-	+	-	-
明胶液化 Gelatin liqued	+	+	+	+	-
红霉素敏感性 Sinsitive to erythromicin	+	+	+	-	-
碳水化合物刺激生长 Stimulation of growth by					
葡萄糖 Glucose	-	+	-	-	+
果糖 Fructose	-	+	-	-	-
醋酸盐 Acetate	-	+	-	+	+
蔗糖 Sucrose	-	-	-	-	+
半乳糖 Galactose	-	+	-	+	+
甘露糖 Mannitol	-	+	-	-	-
G+C mol%	59.5	65	63	64.3	62.7

果糖、乙酸、蔗糖、半乳糖、麦芽糖、D-木糖、D-甘露糖、D-阿拉伯糖、核糖、和 D-甘露醇等碳水化合物作碳源时不刺激生长。

2.3.5 DNA 中 G+C 含量: DNA 中 G+C 含量为 59.5mol%。

### 3 讨论

从内蒙古自治区哈马台碱湖分离到嗜盐嗜碱菌株 HAM-2, 液体培养时细胞为多形态, 最适生长 NaCl 浓度为 17.5%, 最适 pH9.0 ~ 9.5, 生长仅需要低浓度镁离子 (<20 mmol/L), 对红霉素、新生霉素和茴香霉素敏感。细胞含类胡萝卜素色素, 核心脂为 C<sub>20</sub>, C<sub>20</sub> 和 C<sub>20</sub>, C<sub>25</sub> 两种甘油二醚衍生物, 极性脂的主要组分是磷脂酰甘油磷酸酯 (PGP) 和磷脂酰甘油 (PG), 还含有一种未知的次要磷脂 (PL4), 不含糖脂。上述结果表明, 菌株 HAM-2 与嗜盐嗜碱杆菌属 (*Natronobacterium*) 的特征描述基本一致, 应是这个属的一个成员。在《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》第 3 卷中<sup>[1]</sup>, 记载了嗜盐嗜碱杆菌属的三个种, 将上述结果与文献资料对比后看出, 菌株 HAM-2 与这个属正式承认的三个种有别。嗜盐嗜碱杆菌属首先是由 Tindall 等在 1984 年定名的, 迄今共报道了四株菌<sup>[7,13]</sup>, 兹将菌株 HAM-2 与它们的特征加以比较(表 1), 可以明显看出它们之间的差别。菌株 HAM-2 以细胞为多形态, 极性脂中含有次要组分 PL4 (图 3-1), *N. magadii* 含有次要磷脂 PL3 (图 3-2), *N. pharaonis* 含有次要磷脂 PL1, 而 *N. gregoryi* 有 PL1 和 PL3 两种次要磷脂(此处未出示)。DNA 中 G+C 含量为 59.5mol%, 低于其它菌株。此外, 硝酸盐还原, 酪蛋白水解, 明胶液化, 对红霉素的敏感性和碳水化合物对生长的刺激等生化特性与已报道菌各自有别。因此, 建议菌株 HAM-2 为嗜盐嗜碱杆菌属一个新种, 命名为内蒙古嗜盐嗜碱菌 (*Natronobacterium innermongoliae* sp. nov.)。HAM-2 菌株为模式株。

### 参 考 文 献

- [1] Grant W D, Larsen H. Group III. Extreme Halophilic Archaeobacteria. In: Staley J T et al ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol3. Baltimore Co. Williams & Wilkins, 1989. 2216 ~ 2233.
- [2] Tindall B J, Mills A A, Grant W D. *J Gen Microbiol*, 1980, 116: 257 ~ 260.
- [3] Soliman G S H, Truper H G. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiol Hyg Abt I Orig*, 1982, C3: 218 ~ 329.
- [4] Morth S, Tindall B J. *Syst Appl Microbiol*, 1985, 6: 247 ~ 250.
- [5] Wang D, Tang Q. *Natronobacterium* from soda lakes in China. In: Hatlori I ed. *Recent Advance in Microbial Ecology*. Tokyo: Japan Scinetics Press, 1989. 68 ~ 72.
- [6] Evyagintseva I S, Tarasov A L. *Microbiol*, 1987, 56: 563 ~ 564.
- [7] Tindall B J, Ross H N M, Grant W D. *System Appl Microbiol*, 1984, 5: 41 ~ 57.
- [8] Seghal S N, Gibbons N E. *Can J Microbiol*, 1960, 6: 165 ~ 169.
- [9] Ross H N M. *The Extremely Halophilic Archaeobacteria*, Thesis, 1982.
- [10] Ross H N M, Collins M D, Tindall B J et al. *J Gen Microbiol*, 1981, 123: 75 ~ 80.
- [11] 周慧玲. *微生物学报*, 1978, 18(2): 134 ~ 139.
- [12] Kocur M, Hodgkiss W. *Internat Syst Bacteriol*, 1973, 32(2): 151 ~ 156.
- [13] Wanjiru E M, Grant W D. *Internat J Syst Bacteriol*, 1993, 43(3): 401 ~ 404.

## NEW SPECIES OF *NATRONOBACTERIUM*

Tian Xinyu    Xu Yi    Liu Hongcan    Zhou Peijin

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

**Abstract** An extreme haloalkalophilic bacterium HAM-2 with pleomorphic rods was isolated from Hamatai soda lake in Inner Mongolia Autonomous Region. Growth occurs in 12% ~ 30% NaCl, no growth below 12%, optimum 17.5%. pH range for good growth 7.8 ~ 10.4, optimum 9.0 ~ 9.5. The strain HAM-2 is non-motile, Gram-negative, pleomorphic, cell of which were 1.0 ~ 2.0 by 2.0 ~ 5.0 $\mu$ m in size in liquid medium. The major polar lipids of the organisms are phosphatidylglycerol phosphate and phosphatidylglycerol and contains an unidentified phospholipid as a minor component PL4. G+C content of DNA is 59.5mol%. Based on the characteristics, the strain HAM-2 could be included in the genus *Natronobacterium*, but since HAM-2 differs from reported four species of this genus in cell shape, polar lipids and biochemical features. The name *Natronobacterium innemongoliae* sp. nov. is proposed. The type strain is designated HAM-2.

**Key words** Haloalkalophilic bacterium, *Natronobacterium*, Polar lipids