

## 研究报告

## 对大柴旦盐杆菌与塘沽盐杆菌分类地位的修订

李庆迪<sup>1</sup>, 张鑫茹<sup>1</sup>, 许国梁<sup>1</sup>, 毛亚玲<sup>1</sup>, 侯靖<sup>1</sup>, 崔恒林<sup>1\*</sup>, 周宇光<sup>2\*</sup>

1 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

李庆迪, 张鑫茹, 许国梁, 毛亚玲, 侯靖, 崔恒林, 周宇光. 对大柴旦盐杆菌与塘沽盐杆菌分类地位的修订[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 215-237.

LI Qingdi, ZHANG Xinru, XU Guoliang, MAO Yaling, HOU Jing, CUI Henglin, ZHOU Yuguang. Revision of the taxonomic status of *Halobacterium dachaidanensis* and *Halobacterium tanguensis*[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 215-237.

**摘要:** 【背景】1984年, 我国学者在国内学术期刊上首次发表了分离自我国内陆盐湖和海滨盐田的极端嗜盐菌新物种: 大柴旦盐杆菌(*Halobacterium dachaidanensis*)和塘沽盐杆菌(*Halobacterium tanguensis*)。40年来, 嗜盐古菌的分类体系不断完善, 但这2个物种的分类地位仍不明确。【目的】基于系统基因组学、比较基因组学方法以及表型特征分析, 明确 *Hbt. dachaidanensis* F3 和 *Hbt. tanguensis* F5 的分类地位。【方法】扩增、测定2个菌株的16S rRNA基因与 *rpoB* 基因, 基于系统发育分析, 初步鉴定上述菌株; 测定菌株的基因组框架图, 通过系统基因组学和比较基因组学方法明确2个菌株的分类学地位; 通过KEGG注释确定菌株的主要代谢途径; 通过表型特征分析比较菌株的主要理化特征。【结果】系统基因组学分析结果表明, 菌株 F3 和 F5 分别与解淀粉盐盒菌(*Haloarcula amylolytica*) BD-3<sup>T</sup> 和耐热需苏打线菌(*Natrinema thermotolerans*) JCM 11050<sup>T</sup> 聚为一支。基因组测序结果显示, 菌株 F3 和 F5 的G+C含量分别为62.2%和65.5%。比较基因组学分析显示, 菌株 F3 与 *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> 的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)、DNA-DNA杂交同源性(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)和平均氨基酸一致性(average amino acid identity, AAI)分别为98.3%、88.1%、97.9%, 而菌株 F5 与 *Nnm. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 的这3个值分别为98.0%、85.2%、97.9%, 均高于原核生物关于种的界定阈值。表型特征结果表明, 菌株 F3 的最适生长盐度、温度和pH值分别为2.6 mol/L、37 °C和7.5, 而菌株 F5 则分别为3.4 mol/L、40 °C和7.0。2个菌株与相近物种在多个表型特征上存在差异。功能基因注释结果表明, 碳水化合物代谢和氨基酸代谢为2株菌的主要代谢途径。【结论】通过多相分类, 明确了菌株 F3 和 F5 的分类地位, 分别归属于 *Har. amylolytica* 和 *Nnm. thermotolerans*。菌株 F3 代表一个新的亚种, 建议命名为“解淀粉盐盒菌大柴旦亚种”。  
**关键词:** 大柴旦盐杆菌; 塘沽盐杆菌; 嗜盐古菌; 多相分类; 解淀粉盐盒菌大柴旦亚种; 基因组框架图

资助项目: 国家自然科学基金(32070003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070003).

\*Corresponding authors. E-mail: CUI Henglin, cuihenglin@ujs.edu.cn; ZHOU Yuguang, zhouyg@im.ac.cn

Received: 2025-07-14; Accepted: 2025-08-07; Published online: 2025-08-27

## Revision of the taxonomic status of *Halobacterium dachaidanensis* and *Halobacterium tangguensis*

LI Qingdi<sup>1</sup>, ZHANG Xinru<sup>1</sup>, XU Guoliang<sup>1</sup>, MAO Yaling<sup>1</sup>, HOU Jing<sup>1</sup>, CUI Henglin<sup>1\*</sup>, ZHOU Yuguang<sup>2\*</sup>

1 School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Background] In 1984, two novel halophilic archaea species, *Halobacterium dachaidanensis* sp. nov. and *Hbt. tangguensis* sp. nov., were isolated from an inland saline lake and a marine solar saltern in China, and first published on *Acta Microbiologica Sinica* by Chinese researchers. Over the past four decades, the taxonomic system of halophilic archaea has been continuously updated, while the precise taxonomic status of these two species remains unclear. [Objective] To clarify the taxonomic status of *Hbt. dachaidanensis* F3 and *Hbt. tangguensis* F5 by phylogenomic and comparative genomic analyses and phenotypic characterization. [Methods] We performed the phylogenetic analysis based on amplified and sequenced 16S rRNA and *rpoB'* genes. The draft genomes of these two strains were sequenced and the taxonomic status of them was elucidated by phylogenomic and comparative genomic analyses. The major metabolic pathways of both strains were identified through KEGG annotation. The key physiological and biochemical characteristics were comparatively analyzed *via* phenotypic assays. [Results] Phylogenetic analyses revealed that strains F3 and F5 formed tight clusters with *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> and *Natrinema thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup>, respectively. The genomic G+C content of strains F3 and F5 was 62.2% and 65.5%, respectively. Comparative genomic analysis showed that the average nucleotide identity (ANI), digital DNA-DNA hybridization (dDDH), and average amino acid identity (AAI) between strain F3 and *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> were 98.3%, 88.1%, and 97.9%, respectively, and these three values between strain F5 and *Nnm. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> were 98.0%, 85.2%, and 97.9%, respectively. These values were higher than the thresholds for species demarcation in prokaryotes. The phenotypic characterization showed that the optimum growth salinity, temperature, and pH for strain F3 were 2.6 mol/L, 37 °C, and 7.5, while those for strain F5 were 3.4 mol/L, 40 °C, and 7.0, respectively. Diverse differential phenotypic characteristics were found among these two strains and their related species. Functional gene annotations identified carbohydrate metabolism and amino acid metabolism as the predominant metabolic pathways in both strains. [Conclusion] The taxonomic status of *Hbt. dachaidanensis* F3 and *Hbt. tangguensis* F5 was reclarified by polyphasic taxonomic characterization as *Har. amylolytica* and *Nnm. thermotolerans*, respectively. Strain F3 may represent a novel subspecies, for which the name, *Haloarcula amylolytica* subsp. *dachaidanensis* subsp. nov., is proposed.

**Keywords:** *Halobacterium dachaidanensis*; *Halobacterium tangguensis*; halophilic archaea; polyphasic characterization; *Haloarcula amylolytica* subsp. *dachaidanensis* subsp. nov.; draft genome

嗜盐古菌(halophilic archaea)属于古菌域(Archaea)甲烷杆菌门(Methanobacteriota)嗜盐古菌纲(Halobacteria),大多存在于盐湖、盐矿、晒盐场及高盐腌制食品中,通常需要至少 15% (2.5 mol/L)的盐浓度才能达到最适生长,许多物种能够在饱和盐条件下生存<sup>[1]</sup>。嗜盐古菌的细胞形态多样,通常呈现球状、杆状和多形态,另外,从晒盐场中分离的瓦氏盐方形菌(*Haloquadratum walsbyi*)是较罕见的四方形嗜盐古菌<sup>[2]</sup>。嗜盐古菌的研究开始于 1880 年,直至 1980 年,先后共描述了需盐小杆菌属(*Halobacterium*)和盐球古菌属(*Halococcus*)的 8 个物种,这些嗜盐古菌的研究无一来自中国<sup>[3]</sup>。我国的嗜盐古菌研究始于 20 世纪 80 年代初,研究者对西藏、新疆、内蒙古、青海等地区的盐(碱)湖及沿海的盐田开展了大规模的嗜盐菌资源调查<sup>[4]</sup>。在 1984 年,首次报道了分离自青海大柴旦盐湖和天津塘沽盐场的极端嗜盐菌 F3 和 F5,分别命名为大柴旦盐杆菌(*Halobacterium dachaidanensis*)和塘沽盐杆菌(*Halobacterium tangguensis*)<sup>[5]</sup>。这一开创性工作为后来我国嗜盐古菌分类学的蓬勃发展奠定了重要基础。40 年来,嗜盐古菌的分类体系不断完善,但 *Hbt. dachaidanensis* F3 和 *Hbt. tangguensis* F5 的分类地位仍不明确。通过分析这 2 个菌株的 16S rRNA 基因,我们发现菌株 F3 和 F5 分别与盐盒菌属(*Haloarcula*)和需苏打线菌属(*Natrinema*)的物种亲缘关系较近。

*Haloarcula* 由 Torreblanca 等<sup>[6]</sup>于 1986 年建立,该属内现有物种都属于嗜中性类群,最适生长温度为 35–42 °C,同一物种基因组中的 16S rRNA 基因具有异源性<sup>[7]</sup>。死谷盐盒菌(*Haloarcula vallismortis*) ATCC 29715<sup>T</sup> 为该属的模式种<sup>[6]</sup>,其细胞形态为杆状,最适 NaCl 浓度为 2.5 mol/L,基因组大小为 3 923 205 bp, G+C 含量为 61.8%。2007 年,我国学者首次描述了 *Haloarcula* 的解淀粉盐盒菌(*Haloarcula amylolytica*) BD-3<sup>T[8]</sup>,其细胞呈杆状,生长所需最适 NaCl 浓度为

3.1 mol/L,基因组大小为 4 225 424 bp, G+C 含量为 62.1%。

*Natrinema*<sup>[9]</sup> 建立于 1998 年,属内大部分物种的最适 pH 值为中性(pH 6.5–7.5),少数物种喜好偏碱性的环境(最适 pH 值为 8.0),如嗜盐需苏打线菌(*Natrinema halophilum*) YPL8<sup>T[10]</sup> 和周培瑾需苏打线菌(*Natrinema zhouii*) YPL30<sup>T[11]</sup>。红皮需苏打线菌(*Natrinema pellirubrum*) DSM 15624<sup>T</sup> 为该属的模式种<sup>[9]</sup>,细胞形态呈杆状,最适生长所需 NaCl 浓度为 3.4–4.3 mol/L,基因组大小为 4 354 100 bp, G+C 含量为 64.0%。

现代基因组学促进了原核微生物分类学的发展<sup>[12]</sup>。基于基因组的系统基因组学分析(phylogenomic analysis)和比较基因组学(comparative genomics)可以更准确地界定嗜盐古菌纲的各级分类单元<sup>[4,13]</sup>。本研究从基因组层面系统研究 *Hbt. dachaidanensis* F3 和 *Hbt. tangguensis* F5 与相近物种的系统发育关系,比较 2 个菌株与相近物种的基因组相关系数,运用多相分类学方法明确 2 个菌株的分类地位。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

菌株 F3 (=CGMCC 1.2071)和 F5 (=CGMCC 1.2065)均来自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。

### 1.2 培养基

NHM 培养基参考 Bao 等<sup>[10]</sup>的方法配制。

### 1.3 主要试剂和仪器

酵母浸出物,安琪酵母股份有限公司;鱼粉蛋白胨、丙酮酸钠、KCl、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、NaCl、琼脂粉,国药集团化学试剂有限公司;引物、琼脂糖、DNA 分子量标准 marker, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×Es Taq MasterMix, 无锡伟沃佰赛生物科技有限公司;绿如蓝核酸染料,南京圆周率科技有限公司。

电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;磁力搅拌器、酸度计、移液器,大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;超净工作台,苏州市金净净化设备科技有限公司;培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;高速冷冻离心机,湖南凯达科学仪器有限公司;相差显微镜,尼康公司;PCR扩增仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

#### 1.4 基于 16S rRNA 基因和 *rpoB'* 基因的相似性分析

挑取一环菌体分散于 30  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中,设定 PCR 仪的 incubate 模式(100  $^{\circ}$ C, 10 min, 盖温 105  $^{\circ}$ C)裂解细胞,以此为模板,引物为 20F (5'-ATTCCGGTTGATCCTGCCGG-3')和 1452R (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3'),参考 Cui 等<sup>[7]</sup>的方法扩增 16S rRNA 基因;参考 Minegishi 等<sup>[14]</sup>的方法扩增 *rpoB'* 基因,引物为 B2-1420F (5'-TGTGGGCTNGTGAAGAACTT-3')和 A-153R (5'-GGGTCCATCAGCCCCATGTC-3')。PCR 扩增完成后,通过 1%琼脂糖凝胶电泳判断基因扩增结果,PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。使用 EzBioCloud 在线网站<sup>[15]</sup> (<https://www.ezbiocloud.net/tools/pairAlign>)计算菌株 F3 与 F5 及其相近物种之间的 16S rRNA 基因和 *rpoB'* 基因序列相似性。选取 *Haloarcula* 和 *Natrinema* 这 2 个属内分别与 F3 和 F5 相近的模式菌株序列,使用 MEGA 7 软件中集成的 ClustalW 程序对这些序列进行比对,并运用最大似然算法构建 16S rRNA 基因和 *rpoB'* 基因的系统发育树。

#### 1.5 基因组测序与分析

菌株纯化后使用 NHM 液体培养基富集培养,于 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 的摇床培养箱中培养 7 d, 4  $^{\circ}$ C、8 500 r/min 离心 10 min 后收集菌体送上海凌恩生物科技有限公司,采用 Illumina 平台测定菌株 F3 和 F5 的基因组框架图<sup>[16]</sup>。基于基因组分类数据库(genome taxonomy database, GTDB)<sup>[17-18]</sup>的 122 个保守单拷贝古菌蛋白编码

标记基因构建系统发育树,以盐渍嗜盐红短杆菌(*Halorutilus salinus*) F3-133<sup>T</sup> 作为外群。

使用 JSpeciesWS 在线平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)计算器(<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>)计算 ANI<sup>[19]</sup>,采用 genome-to-genome distance calculator 3.0 (<https://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>)计算 DNA-DNA 杂交同源性(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)<sup>[20]</sup>,采用平均氨基酸一致性(average amino acid identity, AAI)计算器(<http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>)计算 AAI<sup>[21]</sup>。ANI 和 AAI 分别是在核酸和蛋白质水平上分析基因组间直系同源蛋白及其编码基因的一致性<sup>[22]</sup>。dDDH 是分析 DNA 同源性的有效手段,能够客观反映 2 个基因组的相似程度。通常认为 ANI 值低于 95%–96%<sup>[23]</sup>、dDDH 低于 70%<sup>[23]</sup>、AAI 低于 95%<sup>[21]</sup>作为原核生物物种区分的阈值。

选取 *Haloarcula* 和 *Natrinema* 两个属内分别与 F3 和 F5 相近的模式菌株基因组序列,使用在线基因组综合分析平台<sup>[24]</sup> (IPGA v1.09) (<https://nmdc.cn/ipga/>)进行泛基因组分析。选择具有标准化参数的模块 PanOCT、OrthoFinder、OrthoMCL、PanX、Roary、Panaroo 和 PPanGGOLiN,基因簇识别的同一性阈值为 70%,核心基因比率截止值为 0.95,最佳聚类确定的支持值为-1。

#### 1.6 表型特征分析

将菌株 F3 和 F5 培养至指数期( $OD_{600}$  约为 0.3),观察细胞形态,选用 NHM 培养基进行菌株的生长 NaCl、温度、pH 值和  $Mg^{2+}$  范围等指标的测定。根据 Cui 等<sup>[25]</sup>提出的“盐杆菌纲新分类单元描述的最低标准”,进行营养需求和其他表型特征分析。

#### 1.7 基因功能注释

基因组的功能注释利用在线网址(<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) RAST 服务器<sup>[26]</sup>和 KEGG<sup>[27]</sup> (<https://www.kegg.jp/kegg/>)完成。对菌株 F3、F5 与相近物种的基因组进行功能和代谢途径的注

释, 代谢途径热图由 Origin 软件绘制完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 系统发育分析结果

菌株 F3 含有 2 个不同的 16S rRNA 基因, 符合盐盒菌属种内 16S rRNA 基因的异源性特

征<sup>[7]</sup>, 该菌株与盐盒菌属内现有物种的 16S rRNA 基因序列相似性为 90.8%–99.4%。系统发育分析显示(图 1), 菌株 F3 的 *rrnA* 自成一支, 与解甘露聚糖盐盒菌(*Haloarcu la mannilytica*) MD130-1<sup>T</sup> (*rrnC*)的相似性为 97.8%, 而 F3 *rrnB* 则与死海盐盒菌(*Haloarcu la marismortui*) ATCC 43049<sup>T</sup>

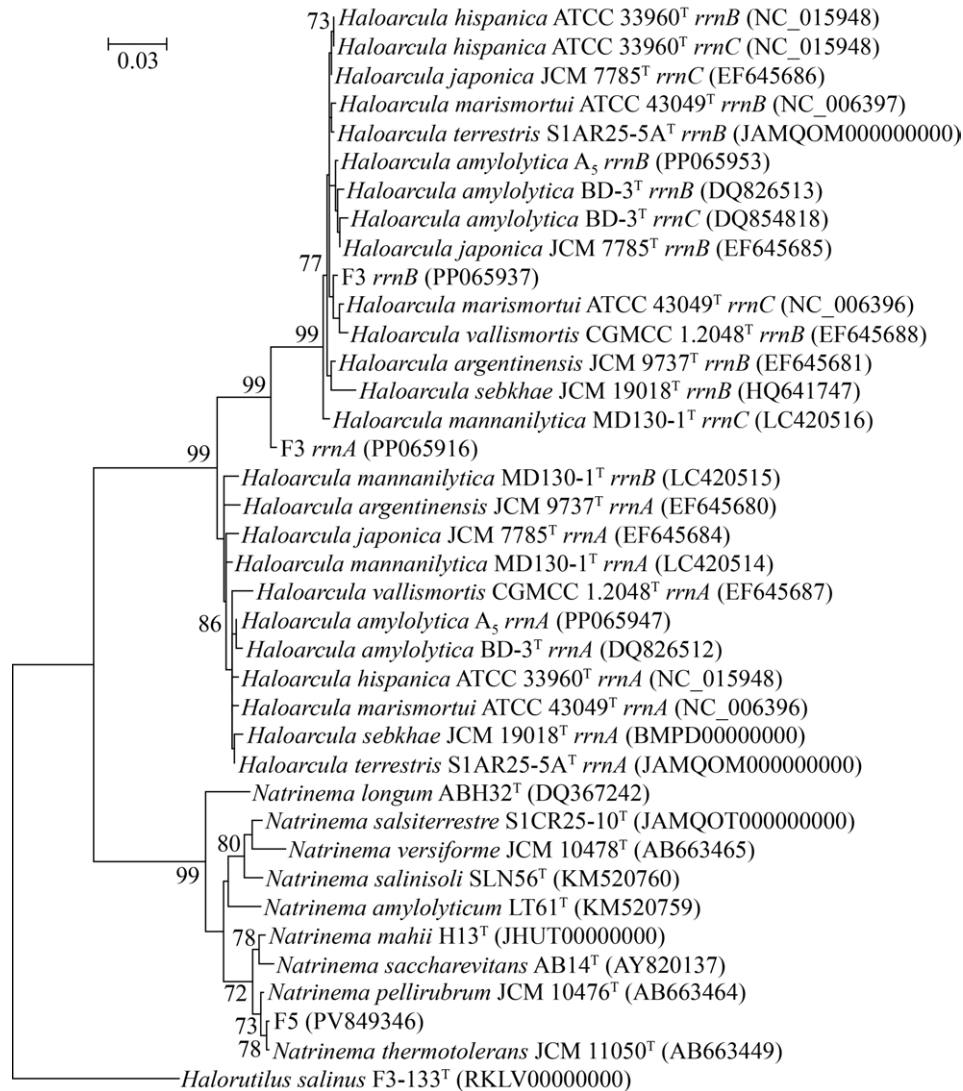


图 1 菌株 F3、F5 与盐盒菌属和需苏打线菌属相近物种基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 Bootstrap 检验次数: 1 000 次; 括号中的序号: 对应菌株 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号; 分支点上的数字: 自举值(%); 标尺: 每个位点 0.03 次碱基替换。

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA genes sequence showing the relationships between strains F3, F5 and the related species of the genera *Haloarcu la* and *Natrinema*. The number of bootstrap tests is set to 1 000; GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences are given in parentheses; Bootstrap values are shown in branching points (%); The bar represents 0.03 substitutions per site.

(*rrnC*)和 *Har. vallismortis* CGMCC 1.2048<sup>T</sup> (*rrnB*) 聚集, 但与陆地盐盒菌(*Haloarcula terrestris*) S1AR25-5A<sup>T</sup> (*rrnB*)的相似性最高(99.4%)。菌株 F5 与 *Natrinema* 现有物种的 16S rRNA 基因序列相似性为 94.5%–99.7%。在系统发育树上(图 1), 菌株 F5 与耐热需苏打线菌(*Natrinema thermotolerans*) JCM 11050<sup>T</sup> 的亲缘关系最近(99.7%)。尽管 98.65%的 16S rRNA 基因相似性可以作为原核生物区分物种界定的阈值<sup>[28]</sup>, 但对于普遍存在异源 16S rRNA 基因的嗜盐古菌而言, 单拷贝的 *rpoB'* 基因能够比较有效地界定种属<sup>[14]</sup>。

菌株 F3 和 F5 的 *rpoB'* 基因分别为 1 827 bp 和 1 830 bp。菌株 F3 与 *Haloarcula* 现有物种

的 *rpoB'* 基因序列相似性为 88.5%–95.1%, 相似性最高的是 *Har. amylolytica* A<sub>5</sub> 和 *Har. mannanylytica* MD130-1<sup>T</sup> (95.1%), 其次是 *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> (95.0%), 在系统发育树上与 *Har. mannanylytica* MD130-1<sup>T</sup> 和 *Har. vallismortis* JCM 8877<sup>T</sup> 聚集。菌株 F3 与相近种的这一系统发育关系与 *rrnB* 显示的系统发育格局相似, 暗示 *rrnB* 可能是菌株 F3 的直系同源基因。菌株 F5 与 *Natrinema* 物种之间的 *rpoB'* 基因序列相似性为 89.5%–99.3%, 与 *Nm. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 的亲缘关系最近, 序列相似性也最高(99.3%) (图 2)。根据 16S rRNA 基因和 *rpoB'* 基因的相似性和系统发育分析结果, *Hbt.*

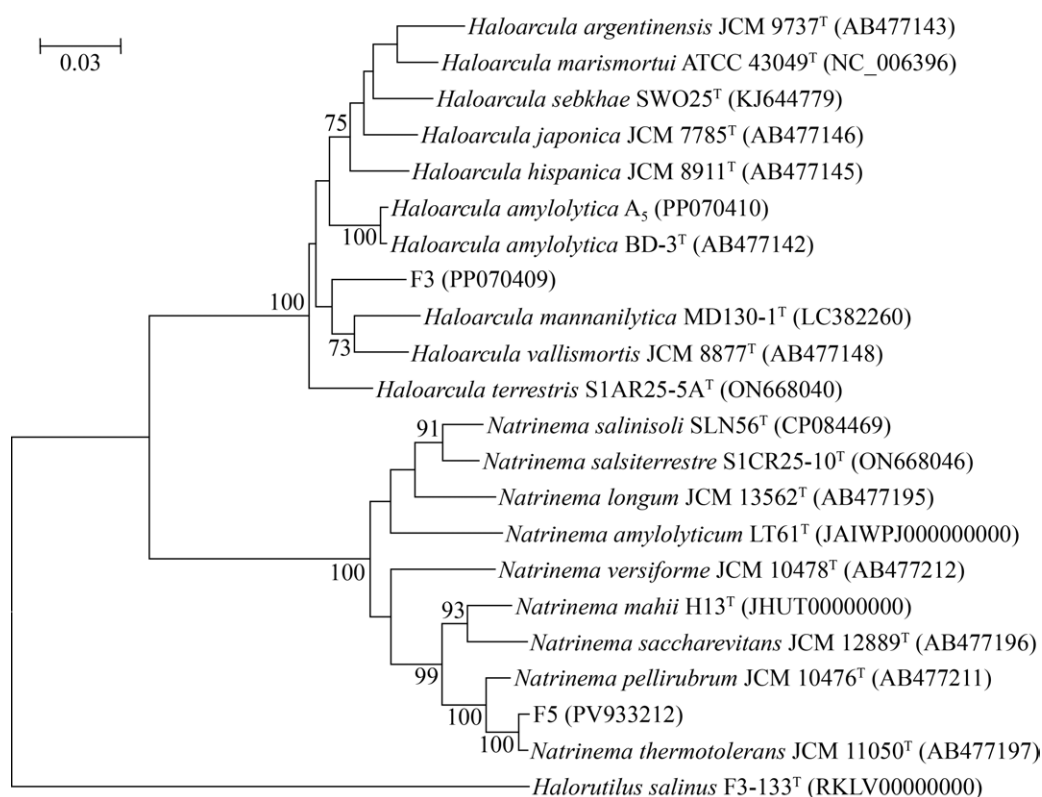


图2 菌株 F3、F5 与盐盒菌属和需苏打线菌属的相近物种基于 *rpoB'* 基因序列的系统发育树 Bootstrap 检验次数: 1 000 次; 括号中的序号: 对应菌株 *rpoB'* 基因序列的 GenBank 登录号; 分支点上的数字: 自举值(%); 标尺: 每个位点 0.03 次碱基替换。

Figure 2 Phylogenetic tree based on *rpoB'* genes sequence showing the relationships between strains F3, F5 and the related species of the genera *Haloarcula* and *Natrinema*. The number of bootstrap tests is set to 1 000; GenBank accession numbers of *rpoB'* gene sequences are given in parentheses; Bootstrap values are shown in branching points (%); The bar represents 0.03 substitutions per site.

*tanguensis* F5 应属于 *Nm. thermotolerans*。由于 *Hbt. dachaidanensis* F3 与现有 *Haloarcula* 物种的 *rpoB'* 基因相似性(88.5%–95.1%)处于种间的范围(87.6%–96.6%), 需要进行进一步的基因组分析来确定其分类地位。

## 2.2 系统基因组学分析结果

菌株 F3 和 F5 的基因组序列长度分别为 4 146 258 bp 和 3 833 548 bp, 完整度分别为 99.93%和 99.95%, 污染度分别为 0.80%和 0%, 表明 2 株菌的基因组数据可以支撑后续的全基

因组学分析。基于 122 个古菌保守蛋白标记基因构建的系统发育树<sup>[17]</sup> (图 3)显示, 菌株 F3 和 F5 分别与 *Har. amylolytica* A<sub>5</sub>、*Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> 和 *Nm. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 聚为 2 个紧密的分支。菌株 F5 的系统基因组学结果与 16S rRNA 基因和 *rpoB'* 基因的系统发育格局一致, 而菌株 F3 的系统发育格局差异较大。这类差异可能源于 *Haloarcula* 类群的 16S rRNA 基因异源性及可能存在部分持家基因的横向转移<sup>[29]</sup>。

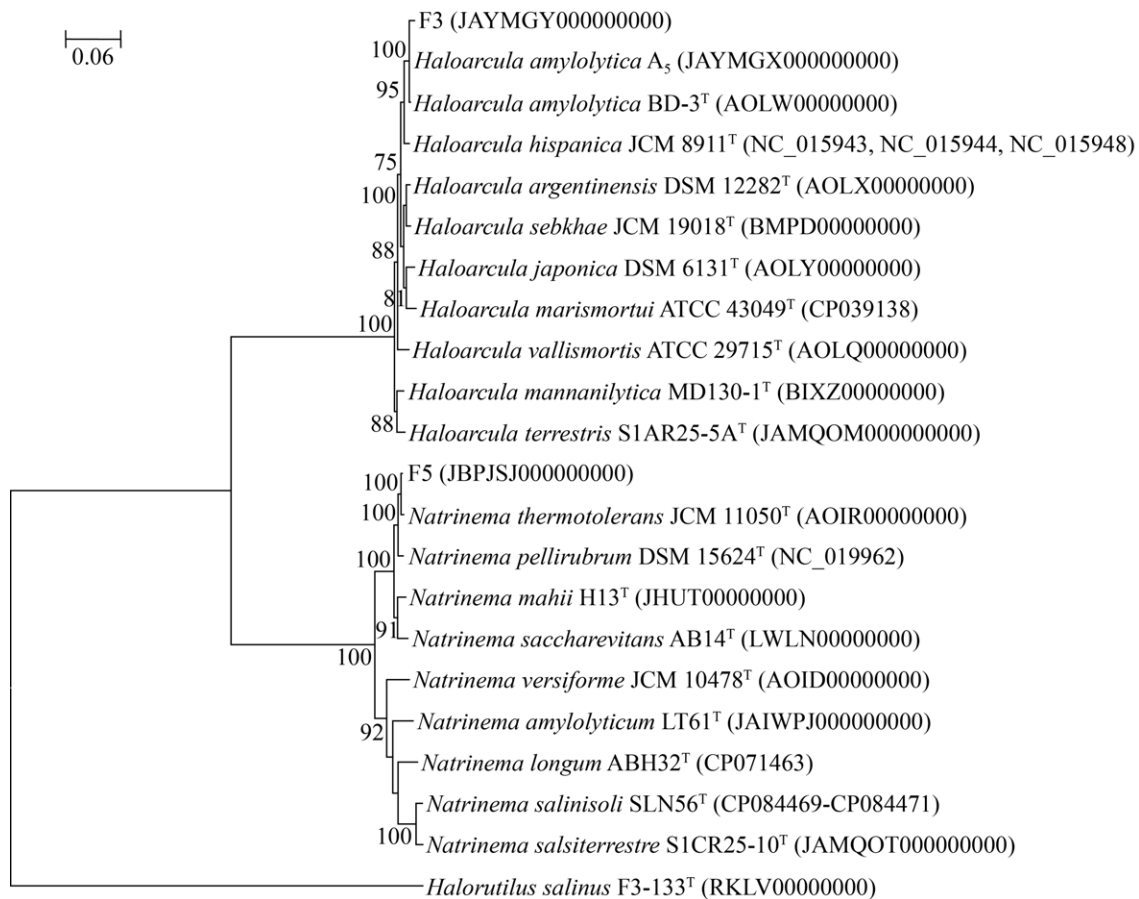


图 3 基于 122 个保守单拷贝古菌蛋白编码标记基因构建的菌株 F3、F5 与盐盒菌属和需苏打线菌属相近物种的系统发育树 Bootstrap 检验次数: 1 000 次; 括号中的序号: 对应菌株全基因组序列的 GenBank 登录号; 分支点上的数字: 自举值(%); 标尺: 每个位点 0.06 次碱基替换。

Figure 3 Phylogenetic tree reconstructions based on 122 concatenated conserved archaeal marker genes (GTDB tree) showing the relationships between strains F3, F5 and the related species of the genera *Haloarcula* and *Natrinema*. The number of bootstrap tests is set to 1 000; GenBank accession numbers of total gene sequences are given in parentheses; Bootstrap values are shown in branching points (%); The bar represents 0.06 substitutions per site.

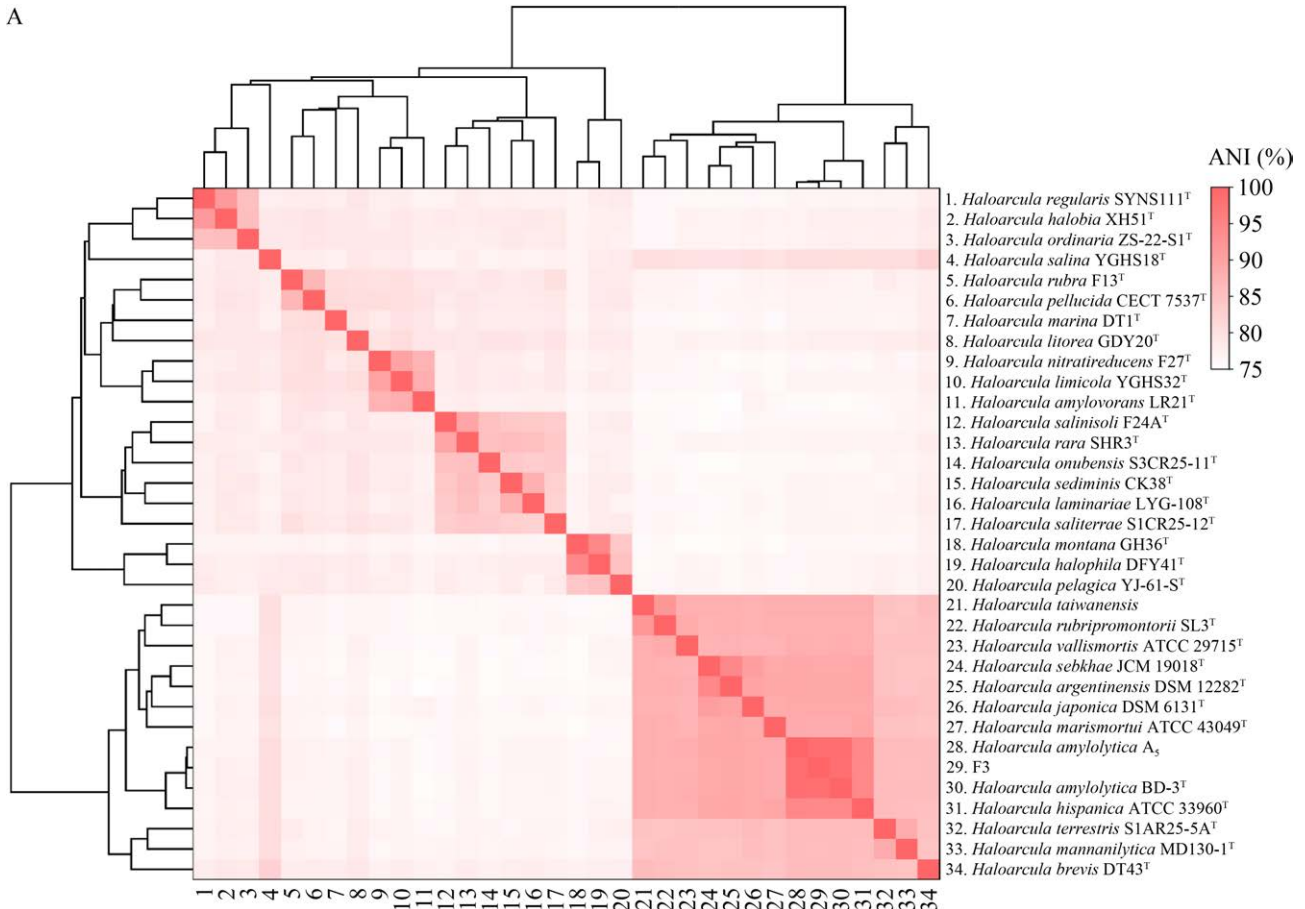
### 2.3 比较基因组学分析结果

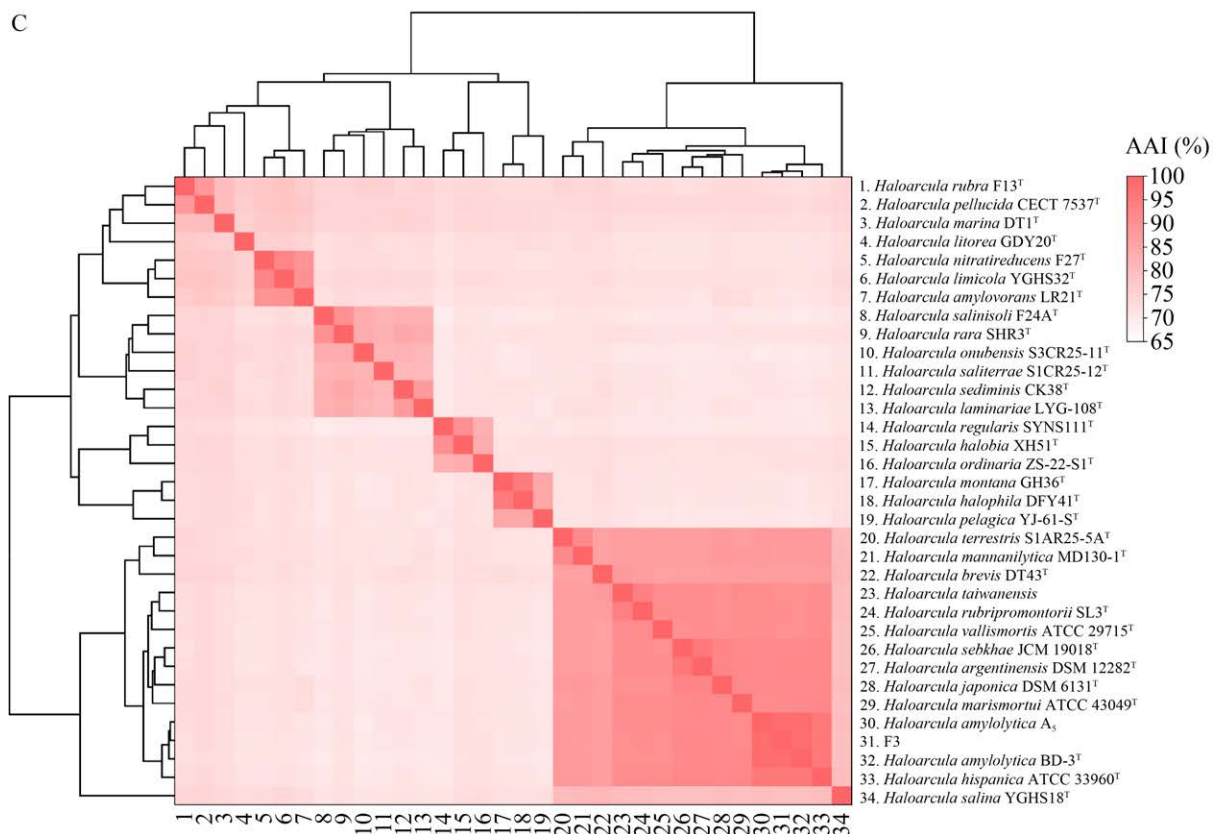
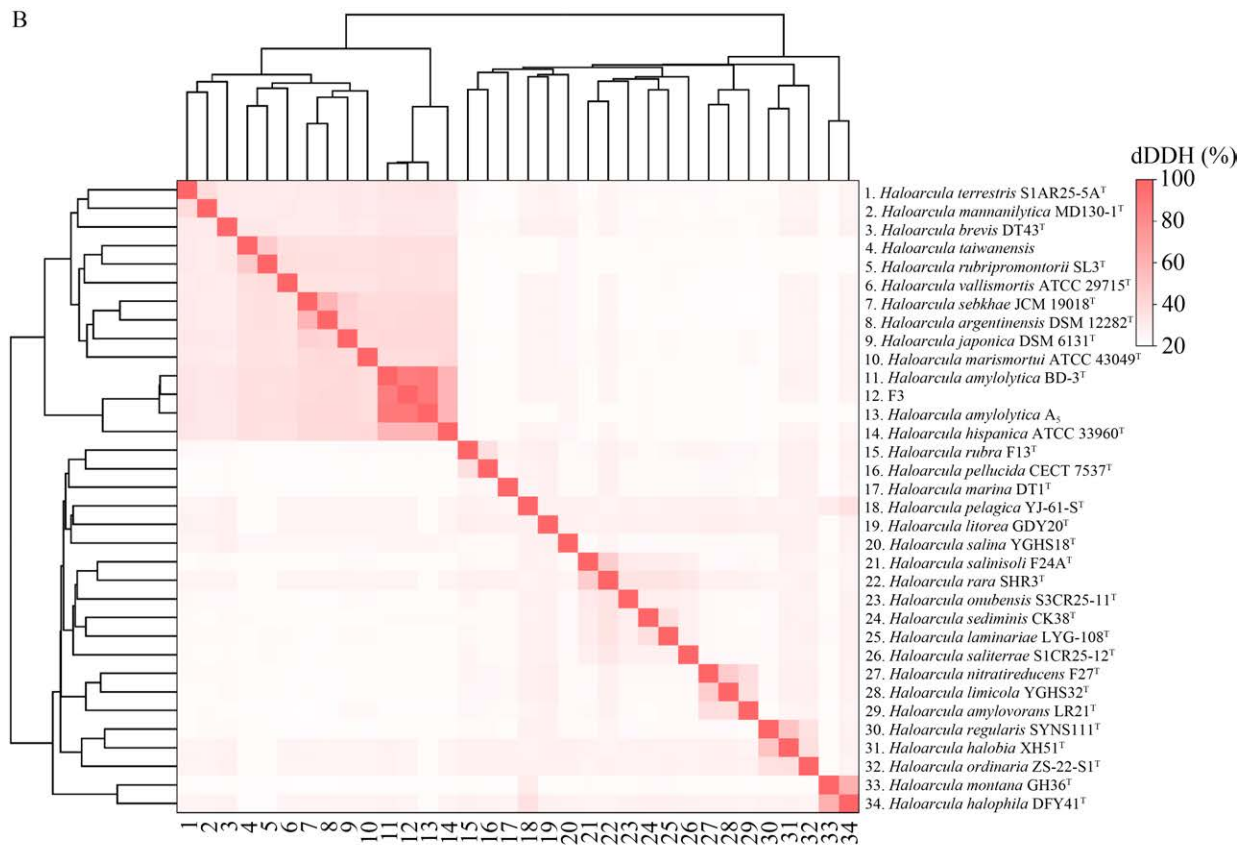
总体基因组相关指数 (overall genome relatedness index, OGRI) 可用于区分原核生物的不同物种<sup>[30]</sup>。不同物种基因组之间的相似性比对结果如图 4 所示。热图显示了各基因组之间的相似度, 数值越接近 100% 的区域表示 2 个基因组之间的相似性越高。菌株 F3 与 *Haloarcula* 现有物种的 ANI 值为 75.8%–98.7% (图 4A)、dDDH 值为 21.6%–90.0% (图 4B)、AAI 值为 70.3%–98.5% (图 4C), 与 *Har. amylolytica* A<sub>5</sub> 和 *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> 相似度最高。菌株 F5 与 *Natrinema* 物种的 ANI 值为 78.0%–98.0% (图 4D)、dDDH 值为 23.8%–85.2% (图 4E)、AAI 值为 76.2%–97.9% (图 4F), 均与 *Nnm. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 最相似。这 2 个菌株与各自相近种的 OGRI 值均高于原核生物物种划分阈值 (ANI 95%–96%, dDDH 70%, AAI 95%)<sup>[21,23]</sup>。因此,

*Hbt. dachaidanensis* F3 应划入 *Har. amylolytica*, 而 *Hbt. tangguensis* F5 代表 *Nnm. thermotolerans* 的菌株。

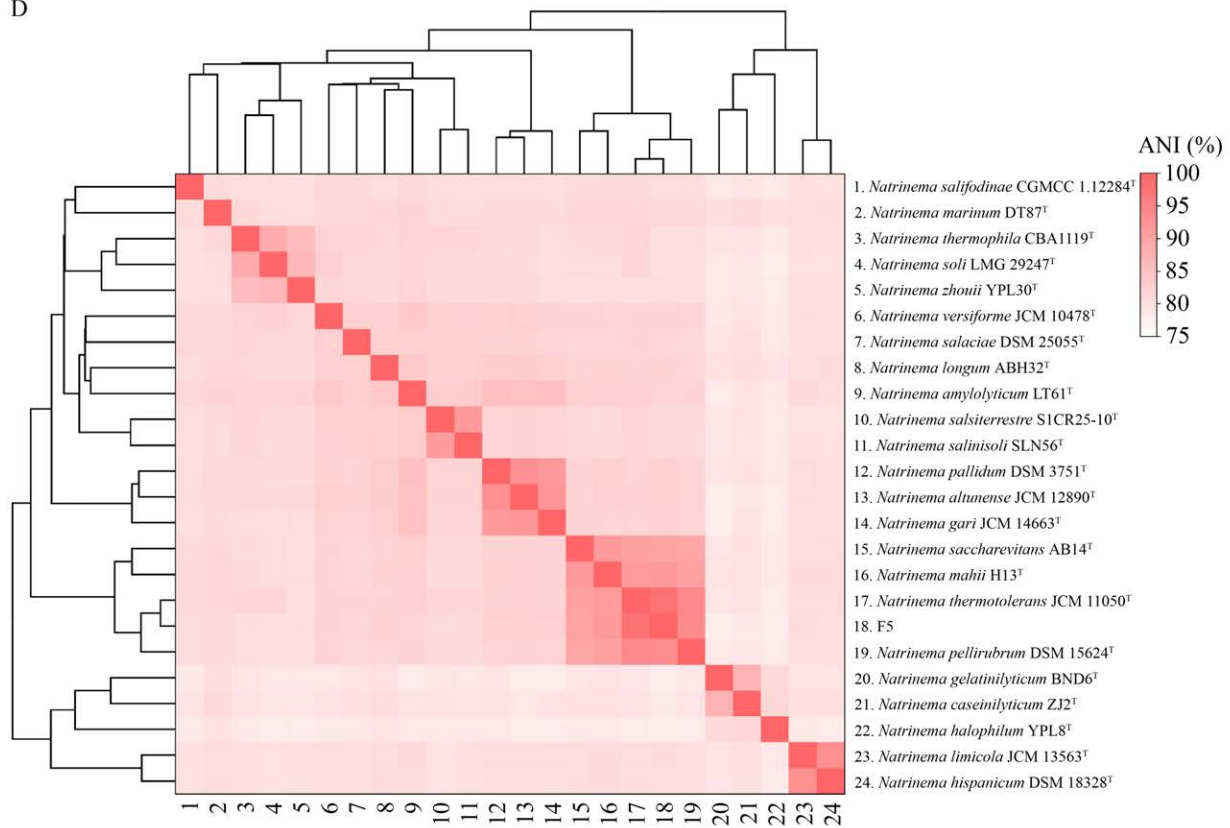
### 2.4 泛基因组学分析结果

泛基因组学分析结果表明, 菌株 F3 和 F5 与各自相近物种之间存在功能相同的核心基因簇及各自独特的基因簇。随着被分析菌株数量的增加, *Haloarcula* 的泛基因组扩展到 10 003 个基因簇, 而核心基因组则减少到 2 562 个基因簇, 在菌株 F3 和 *Haloarcula* 现有物种中逐渐趋于稳定 (图 5A)。在 *Natrinema* 内, 随着分析菌株数量的增加, 泛基因组扩展到 12 916 个基因簇, 核心基因组减少到 1 966 个基因簇, 在菌株 F5 和 *Natrinema* 的现有物种中逐渐趋于稳定 (图 5B)。这类结果表明, *Haloarcula* 和 *Natrinema* 的泛基因组是开放型的, 具有从环境中获得新的遗传信息的能力。

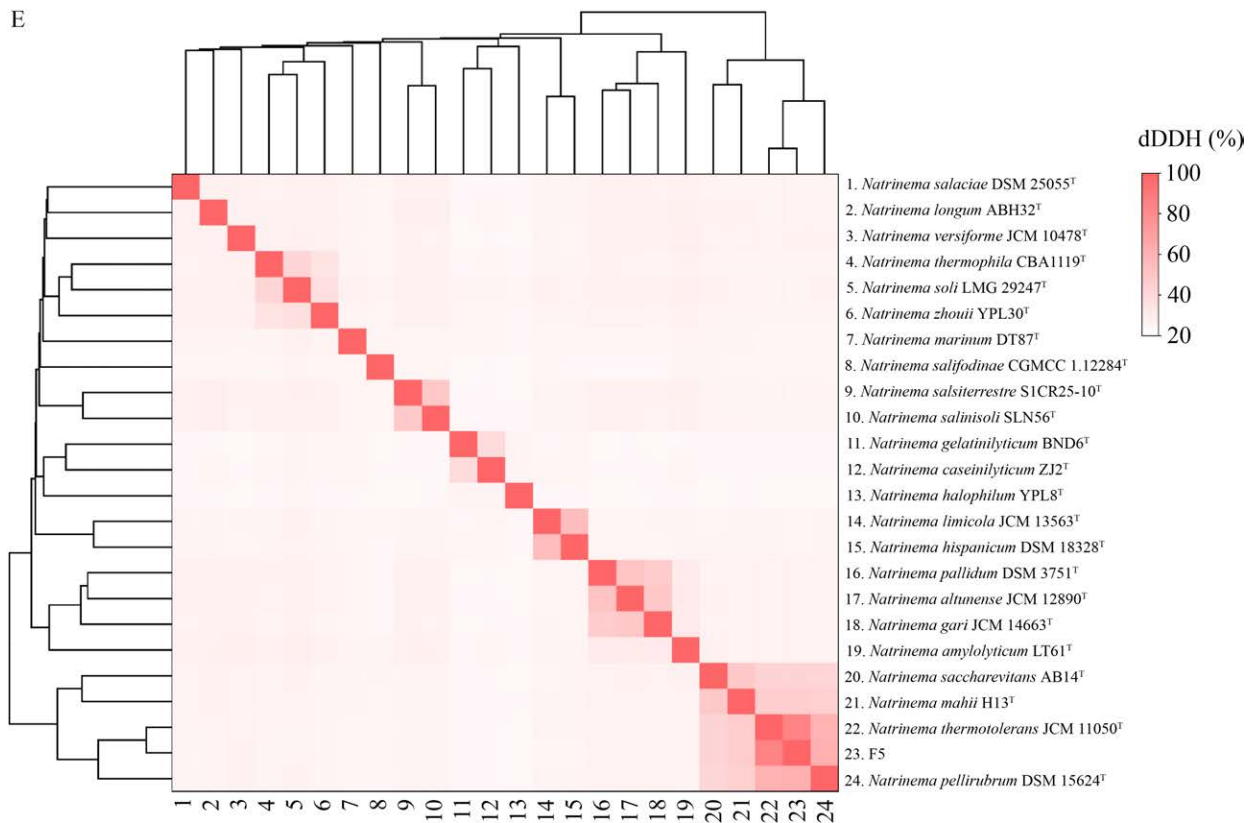




D



E



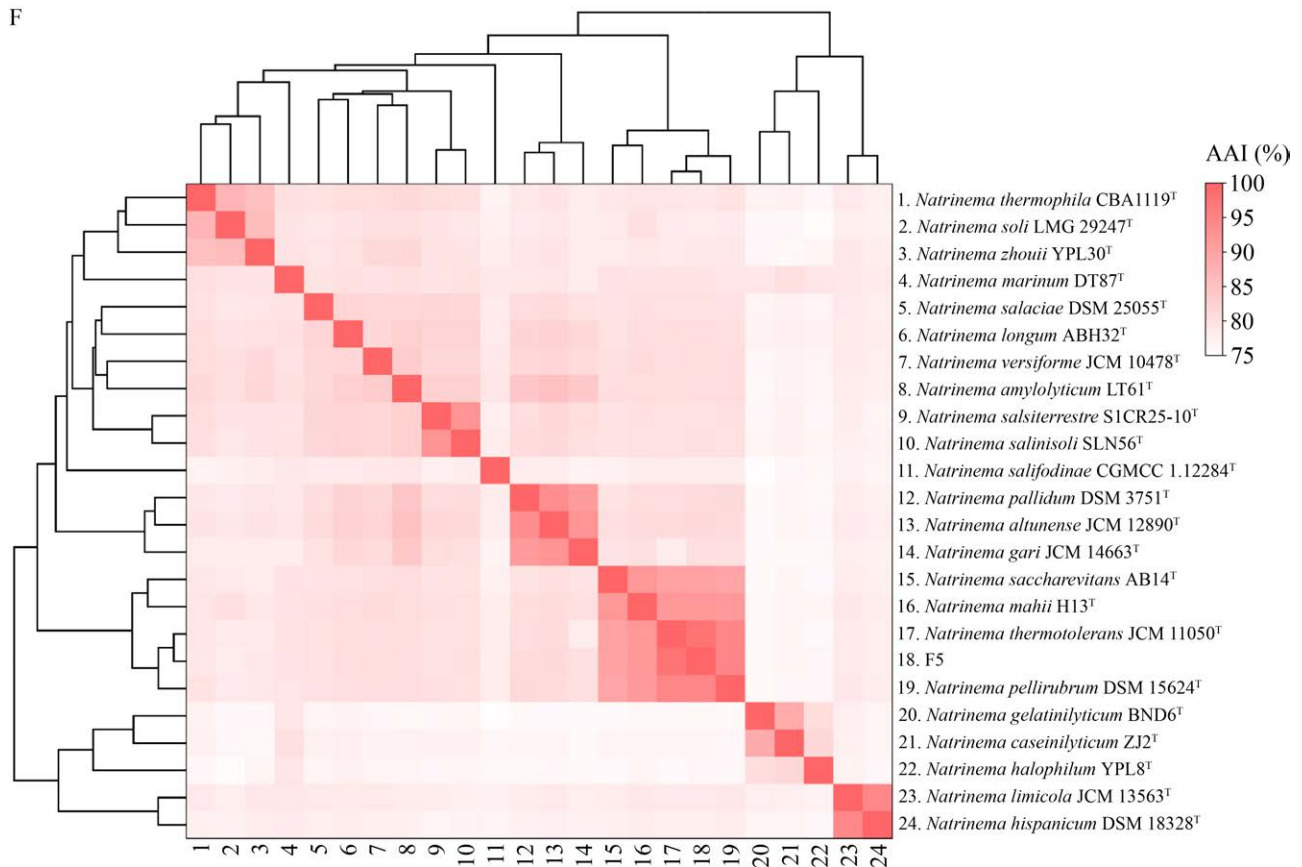
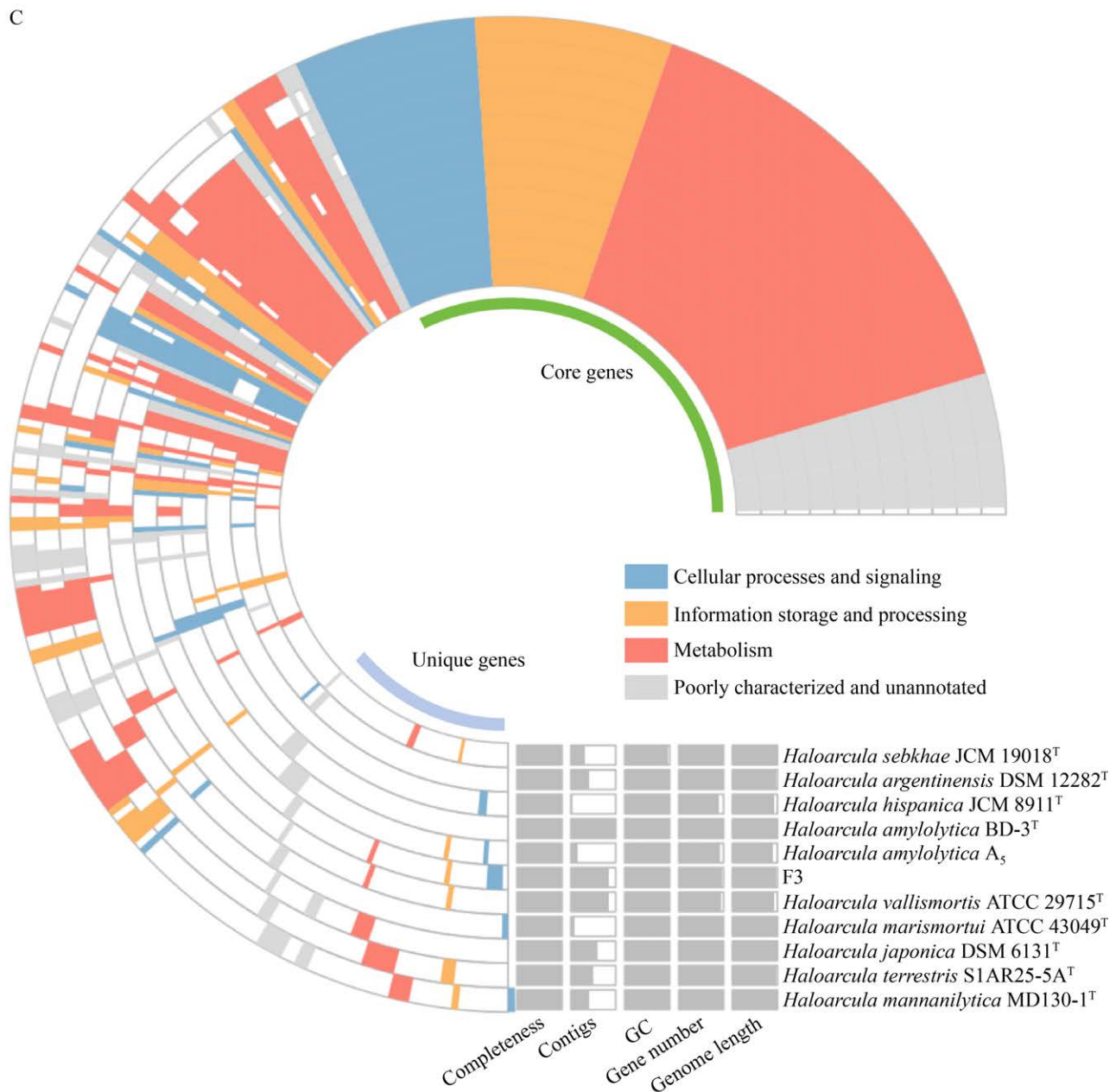
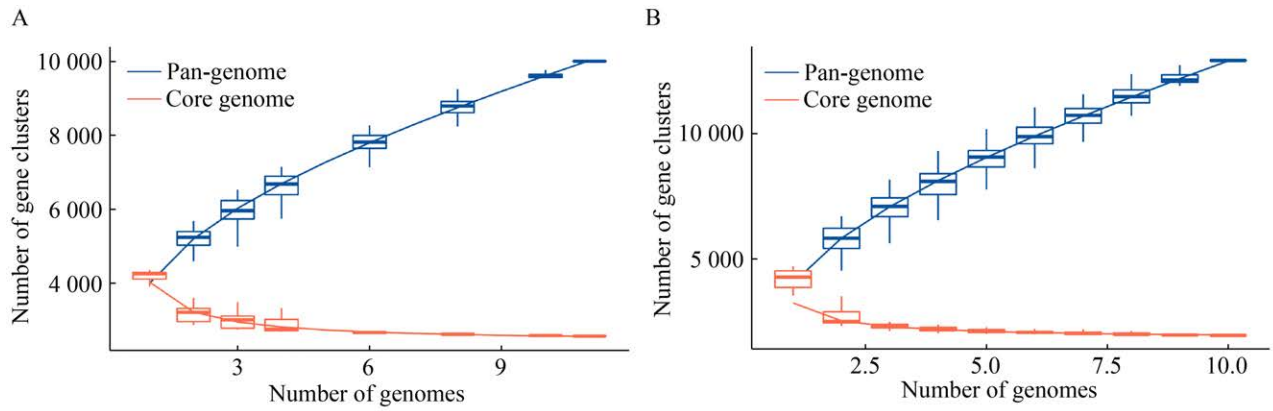


图 4 菌株 F3 与盐盒菌属菌株及 F5 与需苏打线菌属菌株的总体基因组相关指数热图 A: 盐盒菌属菌株的平均核苷酸一致性值; B: 盐盒菌属菌株的 DNA-DNA 杂交同源值; C: 盐盒菌属菌株的平均氨基酸一致性值; D: 需苏打线菌属菌株的平均核苷酸一致性值; E: 需苏打线菌属菌株的 DNA-DNA 杂交同源值; F: 需苏打线菌属菌株的平均氨基酸一致性值。

Figure 4 The heatmap of the overall genome relatedness index (OGRI) demonstrates the phylogenetic relationships between strain F3 and members of the genus *Haloarcula*, as well as between strain F5 and members of the genus *Natrinema*. A: The ANI values among strains within the genus *Haloarcula*; B: The dDDH values among strains within the genus *Haloarcula*; C: The AAI values among strains within the genus *Haloarcula*; D: The ANI values among strains within the genus *Natrinema*; E: The dDDH values among strains within the genus *Natrinema*; F: The AAI values among strains within the genus *Natrinema*.

泛基因组的直系同源群(clusters of orthologous groups, COG)注释显示,在 *Haloarcula* 的 10 003 个基因簇中,与代谢相关的基因簇数量最多(1 987 个),1 027 个基因簇与细胞过程和信号传导相关,829 个基因簇具有信息存储和处理潜力,而 6 427 个基因簇的功能未知。相较于盐盒菌属内相近物种,菌株 F3 有 366 个独特基因簇。366 个独特基因簇中有 36 个基因簇与代谢相关,19 个基因簇与细胞过程和信号传导相关,

25 个基因簇具有信息存储和处理潜力,其余基因簇功能未知(图 5C)。在 *Natrinema* 的 12 916 个基因簇中,与代谢相关的基因簇数目位居前列(2 708 个),与细胞过程和信号传导相关的基因簇次之(1 311 个),1 009 个基因簇具有信息存储和处理潜力,8 261 个基因簇的功能未知。菌株 F5 有 184 个需苏打线菌属内其他菌株没有的独特基因簇,这些基因簇中有 7 个与代谢相关,6 个与细胞过程和信号传导相关,5 个与信息存储



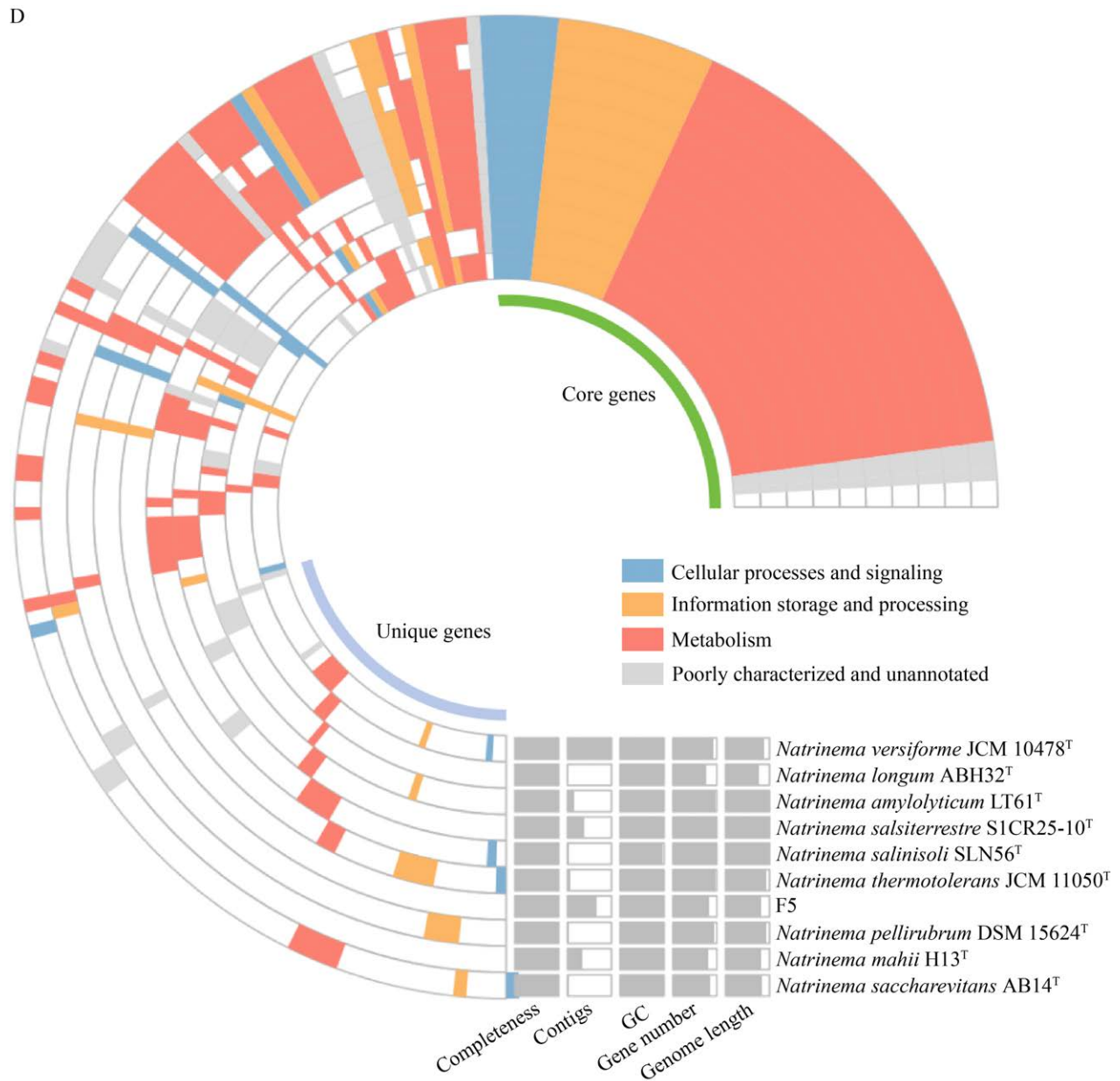


图 5 菌株 F3、F5 与相关物种的泛基因组分析 A: 菌株 F3 与盐盒菌属相近物种的泛基因组和核心基因组中基因簇的数量; B: 菌株 F5 与需苏打线菌属相近物种的泛基因组和核心基因组中基因簇的数量; C: 基于 COG 注释的菌株 F3 与盐盒菌属相近物种泛基因组图谱; D: 基于 COG 注释的菌株 F5 与需苏打线菌属相近物种泛基因组图谱。

Figure 5 Pan-genome analyses of strains F3, F5, and related species. A: Number of gene clusters in pan-genome and core genome among strain F3 and related species of *Haloarcula*; B: Number of gene clusters in pan-genome and core genome among strain F5 and related species of *Natrinema*; C: Pan-genome map based on COG annotation among strain F3 and related species of *Haloarcula*; D: Pan-genome map based on COG annotation among strain F5 and related species of *Natrinema*.

和处理相关, 其余基因簇功能未知(图 5D)。这些独特的基因簇表明菌株 F3 和 F5 具有代谢活性和环境适应性, 暗示菌株可能具有多底物利用能力和特殊代谢途径, 以便适应生活环境的变化。

## 2.5 表型特征分析结果

菌株 F3 呈多形态(图 6A), 细胞大小为  $(1.3-2.0) \mu\text{m} \times (1.3-2.6) \mu\text{m}$ 。革兰氏染色为阴性, 细胞生长 NaCl 浓度范围为 1.4–5.1 mol/L, 温度范围为 25–50 °C, pH 范围为 5.5–8.5, 菌株不需要  $\text{Mg}^{2+}$  便可维持生长, 最适  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 0.005 mol/L。能够利用硝酸盐和 DMSO 作为电子受体进行厌氧生长, 还原硝酸盐为亚硝酸盐, 产生气体, 不能利用精氨酸进行厌氧生长。菌株 F3 可以利用葡萄糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖、乳糖、甘油、丙酮酸盐、甘氨酸和谷氨酸, 但不能利用果糖、木糖、麦芽糖、延胡索酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸和赖氨酸。触酶活性为阳性, 氧化酶活性和脲酶活性为阴性, 可以水解淀粉和明胶, 但不能水解酪素和 Tween-80, 不产生吲哚和  $\text{H}_2\text{S}$ 。菌株 F3 对新生霉素和呋喃妥因敏感, 对链霉素、新霉素和氨苄西林等具有抗性。菌株 F3 与分离自新疆艾比湖的 *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> 以及分离自艾丁湖的 *Har. amylolytica* A<sub>5</sub> 在多个表型特征上差异明

显(表 1)。

菌株 F5 呈杆状(图 6B), 细胞大小为  $(0.6-1.1) \mu\text{m} \times (1.1-5.1) \mu\text{m}$ 。细胞生长所需的 NaCl 浓度、温度、pH 和  $\text{Mg}^{2+}$  范围分别为 1.4–5.1 mol/L、30–55 °C、4.5–9.5 和 0–1 mol/L。能够利用硝酸盐、精氨酸和 DMSO 作为电子受体进行厌氧生长, 硝酸盐可被还原为亚硝酸盐但不产气。可以利用葡萄糖、甘露糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘油、乳酸盐、丙酮酸盐和甘氨酸等多种碳氮源进行生长, 无法利用果糖、山梨糖、核糖和木糖。触酶活性为阳性, 氧化酶和脲酶活性为阴性, 不水解淀粉、明胶、酪素和 Tween-80, 不产生吲哚和  $\text{H}_2\text{S}$ 。菌株 F5 对新生霉素、甲氧苄氨嘧啶和呋喃妥因敏感, 对新霉素、链霉素、卡那霉素和氨苄西林等抗生素具有抗性。菌株 F5 与相近菌株 *Nm. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 存在多个表型特征差异(表 2)。

## 2.6 KEGG 基因功能注释结果

利用 KEGG 网站的 BlastKOALA 程序 (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) 注释了 *Haloarcula* 和 *Natrinema* 属内与菌株 F3 和 F5 相近物种的功能途径。菌株 F3 和 F5 分别有 4 429 个和 4 322 个基因注释到 41 个关键代谢通路中。这些基因在生物代谢中发挥着多重作用, 通路共分为代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、有

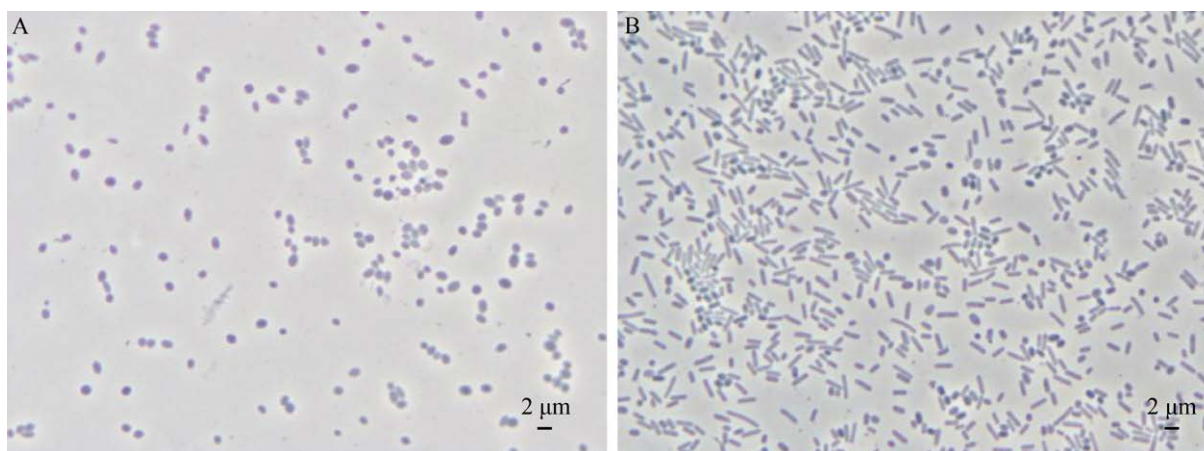


图 6 菌株 F3 (A) 和 F5 (B) 的细胞形态图 比例尺: 2  $\mu\text{m}$ 。

Figure 6 Cellular morphology of strains F3 (A) and F5 (B). Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ .

表 1 菌株 F3 与盐盒菌属相近物种的差异特征

Table 1 Differential characteristics of strain F3 and closely relatives of the genus *Haloarcula*

特征	1	2	3 <sup>[8]</sup>	4 <sup>[31]</sup>	5 <sup>[32]</sup>	6 <sup>[33]</sup>	7 <sup>[34]</sup>
Characteristic							
菌落颜色	红色	红色	红色	橙色	红色	红橙色	粉色
Colony color	Red	Red	Red	Orange	Red	Red-orange	Pink
细胞形态	多形态	多形态	杆状	多形态	多形态	多形态	杆状
Cell morphology	Pleomorphic	Pleomorphic	Rod	Pleomorphic	Pleomorphic	Pleomorphic	Rod
最适 NaCl	2.6	1.7	3.1	2.5–3.0	4.3	3.4	3.6
Optimum NaCl (mol/L)							
最适温度	37	42	41	40	35–40	42	40
Optimum temperature (°C)							
最适 pH	7.5	7.5	7.0–7.5	7.0	7.0	7.0–7.5	7.0
Optimum pH							
厌氧利用硝酸盐	+	–	+	+	+	+	+
Anaerobic growth with nitrate							
还原硝酸盐	+	–	+	+	+	+	+
Reduction of nitrate to nitrite							
碳源利用							
Utilization of carbon sources							
甘露糖	+	+	+	+	+	–	+
D-mannose							
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+
D-galactose							
果糖	–	–	–	+	+	+	+
D-fructose							
木糖	–	–	–	+	+	+	+
D-xylose							
麦芽糖	–	+	+	+	+	+	+
Maltose							
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose							
乳糖	+	+	–	–	+	–	+
Lactose							
吲哚形成	–	–	+	–	+	+	–
Indole formation							
淀粉水解	+	–	+	+	+	–	–
Starch hydrolysis							
明胶水解	+	–	–	+	+	–	–
Gelatin hydrolysis							
产 H <sub>2</sub> S	–	–	+	+	+	+	–
H <sub>2</sub> S production							

+: 阳性; –: 阴性。1: 菌株 F3; 2: 解淀粉盐盒菌 A<sub>5</sub> (=CGMCC 1.6347); 3: 解淀粉盐盒菌 BD-3<sup>T</sup>; 4: 阿根廷盐盒菌 JCM 9737<sup>T</sup>; 5: 西班牙盐盒菌 JCM 8911<sup>T</sup>; 6: 日本盐盒菌 JCM 7785<sup>T</sup>; 7: 解甘露聚糖盐盒菌 MD130-1<sup>T</sup>。

+: Positive; –: Negative. 1: F3; 2: *Haloarcula amylolytica* A<sub>5</sub> (=CGMCC 1.6347); 3: *Haloarcula amylolytica* BD-3<sup>T</sup>; 4: *Haloarcula argentinensis* JCM 9737<sup>T</sup>; 5: *Haloarcula hispanica* JCM 8911<sup>T</sup>; 6: *Haloarcula japonica* JCM 7785<sup>T</sup>; 7: *Haloarcula mannilytica* MD130-1<sup>T</sup>.

表2 菌株 F5 与需苏打线菌属相近物种的差异特征

Table 2 Differential characteristics of strain F5 and closely related members of the genus *Natrinema*

特征	1	2 <sup>[35]</sup>	3 <sup>[10]</sup>	4 <sup>[36]</sup>	5 <sup>[37]</sup>	6 <sup>[9]</sup>	7 <sup>[38]</sup>	8 <sup>[10]</sup>	9 <sup>[39]</sup>
Characteristic									
菌落颜色	红色	灰红色	红色	红色	深红	浅红	浅红	红色	浅红
Colony color	Red	Grey red	Red	Red	Dark red	Light red	Light red	Red	Light red
细胞形态	杆状	杆状	多形态	杆状	杆状	杆状	杆状	多形态	多形态
Cell morphology	Rod	Rod	Pleomorphic	Rod	Rod	Rod	Rod	Pleomorphic	Pleomorphic
最适 NaCl	3.4	3.0–3.5	2.6	3.1	3.5–5.0	3.4–4.3	3.0–3.4	3.9	3.4–4.3
Optimum NaCl (mol/L)									
最适温度	40	50	37	41–45	45–55	30–37	42–45	37	37–46
Optimum temperature (°C)									
最适 pH	7.0	7.0–7.5	7.0	7.0–7.5	6.5–8.2	7.2–7.8	7.5	7.5	6.5–7.0
Optimum pH									
厌氧利用硝酸盐	+	–	+	–	+	–	+	+	+
Anaerobic growth with nitrate									
还原硝酸盐	+	+	+	–	+	+	+	+	+
Reduction of nitrate to nitrite									
碳源利用									
Utilization of carbon sources									
葡萄糖 D-glucose	+	–	+	+	–	+	–	–	+
果糖 D-fructose	–	–	–	–	–	+	–	–	+
核糖 D-ribose	–	–	–	–	–	+	–	–	+
乳糖 Lactose	+	–	–	–	–	+	–	–	–
吲哚形成	–	–	+	+	+	–	–	+	+
Indole formation									
淀粉水解	–	–	+	–	–	–	–	+	–
Starch hydrolysis									
明胶水解	–	+	–	–	–	+	–	–	–
Gelatin hydrolysis									
吐温-80 水解	–	+	–	–	+	–	+	–	+
Tween-80 hydrolysis									
产 H <sub>2</sub> S	–	–	+	+	+	–	+	+	+
H <sub>2</sub> S production									

+: 阳性; -: 阴性。1: 菌株 F5; 2: 耐热需苏打线菌 JCM 11050<sup>T</sup>; 3: 解淀粉需苏打线菌 LT61<sup>T</sup>; 4: 长需苏打线菌 ABH32<sup>T</sup>; 5: 麦氏需苏打线菌 H13<sup>T</sup>; 6: 红皮需苏打线菌 JCM 10476<sup>T</sup>; 7: 寡用糖需苏打线菌 JCM 12889<sup>T</sup>; 8: 盐土需苏打线菌 SLN56<sup>T</sup>; 9: 多形需苏打线菌 JCM 10478<sup>T</sup>。

+: Positive; -: Negative. 1: F5; 2: *Natrinema thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup>; 3: *Natrinema amylolyticum* LT61<sup>T</sup>; 4: *Natrinema longum* ABH32<sup>T</sup>; 5: *Natrinema mahii* H13<sup>T</sup>; 6: *Natrinema pellirubrum* JCM 10476<sup>T</sup>; 7: *Natrinema saccharevitans* JCM 12889<sup>T</sup>; 8: *Natrinema salinisoli* SLN56<sup>T</sup>; 9: *Natrinema versiforme* JCM 10478<sup>T</sup>。

机体系统和人类疾病六大类别。*Haloarcula* 的 KEGG 途径注释完成率为 36.1%–40.0%，*Natrinema* 的 KEGG 途径注释完成率为 32.0%–36.5%。*Natrinema* 的平均注释率偏低，表明属内可能存在更多未鉴定或独特的基因。

对于菌株 F3，参与碳水化合物代谢与氨基酸代谢的基因数目最多，分别占总基因数目的 7.2%和 6.7%；其次是辅因子和维生素的代谢与能量代谢，分别占比 4.1%和 4.0%；基因数目最少的是细胞生长和死亡，仅占 0.3%。功能基因注释结果显示菌株 F3 含有甘露糖、半乳糖、蔗糖、淀粉、甘油和甘氨酸等多种代谢途径，结合表型特征结果，以上碳氮源都可以被细胞利用进行生长。菌株具有合成链霉素、新霉素及卡那霉素的基因，在含有以上抗生素的琼脂平板上均能生长。

对于菌株 F5，参与碳水化合物代谢(7.3%)与氨基酸代谢(6.8%)基因的比例位居前列，辅因子和维生素的代谢(4.0%)与能量代谢(3.7%)次之，占比最低的是细胞运动(0.2%)。结合表型特征结果，除无法水解淀粉外，菌株 F5 在碳水化合物代谢途径上与菌株 F3 具有相似之处，能够利用甘露糖、半乳糖、蔗糖、甘油和甘氨酸等。注释到的菌株具有合成新霉素、链霉素及卡那霉素的基因，并且在含有以上抗生素的琼脂平板上都不敏感。菌株 F3 和 F5 与属内相近物种的功能途径类似，*Haloarcula* 与 *Natrinema* 两属内参与碳水化合物代谢和氨基酸代谢的基因最多，具有辅因子和维生素的代谢与能量代谢功能的基因数量次之。2 株菌及相近物种的主要功能途径基因占总基因数目的比例见热图(图 7)。

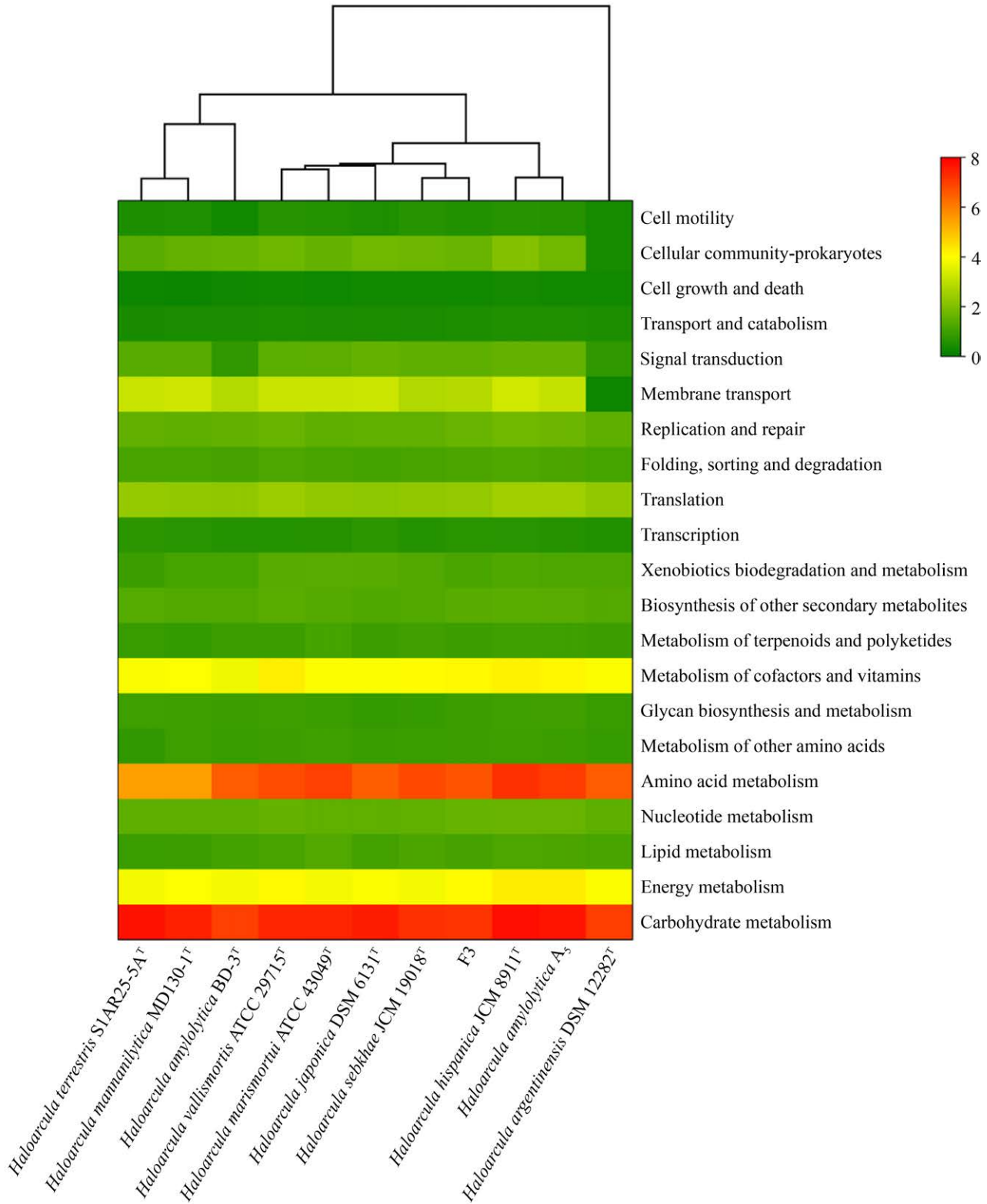
### 3 讨论

本研究发现，菌株 F3 的 16S rRNA 基因和 *rpoB'* 基因系统发育格局与基因组显示的系统发育关系存在较大差异。16S rRNA 基因的系统发育格局表明菌株 F3 与现有的相近物种差异

明显。而基于 *rpoB'* 基因的菌株间相似性分析表明，菌株 F3 与 *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> 和 *Har. amylolytica* A<sub>5</sub> 的相似性(95.0%–95.1%)处于种间的范围(87.6%–96.6%)，可以认定其应属于不同的物种，*rpoB'* 基因的系统发育关系也支持菌株 F3 应代表一个新的物种。但比较基因组学分析显示，菌株 F3 与 2 个相近菌株的 ANI、dDDH 和 AAI 值分别为 98.3%–98.7%、88.1%–90.0%和 97.9%–98.5%，都高于原核生物的种界定阈值。这种不一致是嗜盐古菌类群中的特例，表明存在异源性持家基因的嗜盐古菌的相近类群中，横向水平转移导致的异源性影响了 *rpoB'* 基因在嗜盐古菌的种属分类上的分辨力。这一现象进一步说明，在某些嗜盐古菌类群中仅依赖单一持家基因的物种分类具有局限性，需结合系统基因组学和比较基因组学等多维度技术手段来共同界定物种的分类地位。因此，综合上述证据，*Hbt. dachaidanensis* F3 应划入 *Har. amylolytica*，可以认定为一个新的亚种。对于菌株 F5，根据 16S rRNA 基因、*rpoB'* 基因以及基因组构建的系统发育树结果一致，菌株 F5 都与 *Nnm. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 聚为一支，两者的 ANI、dDDH 和 AAI 值分别为 98.0%、85.2%和 97.9%，高于原核生物种的界定阈值。因此，*Hbt. tangguensis* F5 应为 *Nnm. thermotolerans* 的一个菌株。本研究通过系统发育基因组学、比较基因组学等基因组层面多指标联合分析的方法进行物种界定，为解决传统分类方法无法准确划分的问题提供了可行路径，进而推动嗜盐古菌分类体系的不断完善。

虽然菌株 F3 和 F5 属于已知物种，其与属内相近物种呈现高度的保守性，源于直系同源基因，但不同菌株之间存在个体差异，与泛基因组分析结果相吻合。菌株 F3 和 F5 分别含有 366 个和 184 个独特基因簇，分布于代谢、细胞过程和信号传导以及信息存储和处理等多个代谢途径，表明菌株具有代谢灵活性和环境适应性。进一步结合表型特征分析结果，菌株 F3

A



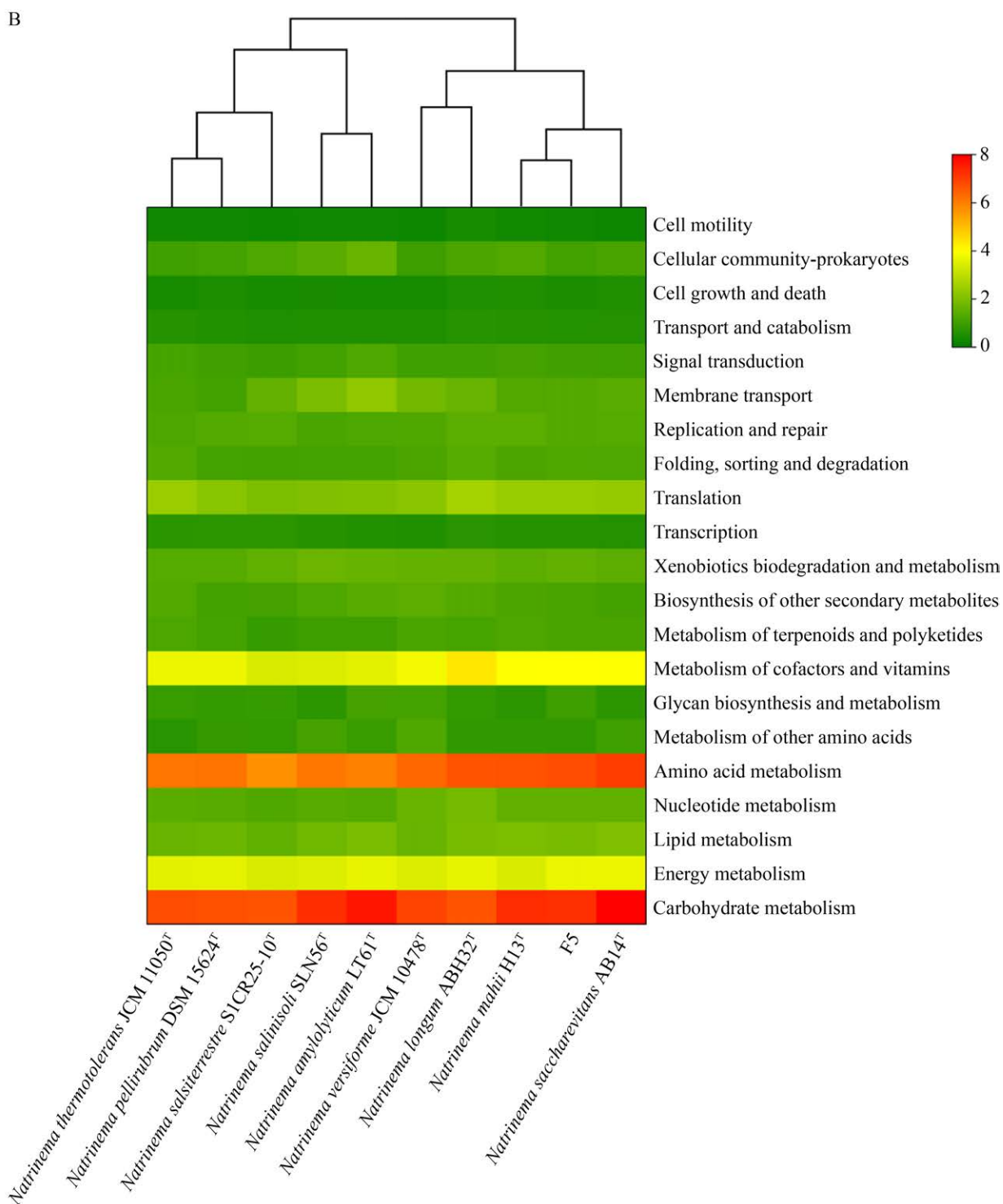


图 7 菌株 F3 与盐盒菌属相近物种(A)以及菌株 F5 与需苏打线菌属相近物种(B)基因组中编码 KEGG 通路的基因丰度(%)热图

Figure 7 The heat maps of the abundance of genes encoding KEGG pathways in strain F3 and related species of *Haloarcula* (A), and in strain F5 and related species of *Natrinema* (B). The colors represent the abundance (%).

和 *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> 可以利用硝酸盐厌氧生长并还原为亚硝酸盐, 但 *Har. amylolytica* A<sub>5</sub> 则不能利用硝酸盐厌氧生长。这 3 株菌在利用麦芽糖、乳糖、吲哚形成、淀粉水解、明胶水解和 H<sub>2</sub>S 产生方面具有明显差异, 菌株 F3 与 *Har. amylolytica* A<sub>5</sub> 的差异体现在 F3 不能利用麦芽糖生长, 可以水解淀粉和明胶。与 *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup> 的差异体现在其不能利用麦芽糖生长, 能够利用乳糖生长, 无法形成吲哚和 H<sub>2</sub>S, 但可以水解明胶。相较于 *Nm. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup>, 菌株 F5 的独特性体现在可以利用葡萄糖和乳糖生长, 无法水解明胶和 Tween-80。菌株 F3 与 *Har. amylolytica* BD-3<sup>T</sup>、菌株 F5 与 *Nm. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 两两间的保守性与变异性共存, 这是物种内遗传与进化的多样性依据, 也揭示了嗜盐古菌的基因组可塑性。基因功能注释显示菌株 F3 和 F5 在参与碳水化合物和氨基酸代谢方面的基因富集程度最高, 表明机体以高效碳源利用为核心策略, 适合富含糖类的环境, 能自主合成必需氨基酸, 这反映了菌株在摄取营养物质及自身代谢方面对极端环境的高度适应性, 意味着青海省大柴旦盐湖的湖底泥和塘沽盐场晒盐池的底泥具备维持菌株生长所需的营养物质<sup>[40]</sup>, 暗示这些环境可能蕴藏着丰富的嗜盐古菌资源, 值得深入研究。

## 4 结论

本文综合运用基于持家基因的系统发育分析、系统基因组学和比较基因组学分析以及表型特征鉴定, 明确了 *Hbt. dachaidanensis* F3 和 *Hbt. tangguensis* F5 的分类学地位。*Hbt. dachaidanensis* F3 应划入 *Har. amylolytica*, *Hbt. tangguensis* F5 属于 *Nm. thermotolerans*。泛基因组学分析结果表明, 菌株 F3 和 F5 与各自的相近物种之间可能具有相似的遗传特性。KEGG 基因功能分析结果揭示这 2 株菌有 41 个代谢通路, 汇集六大类别, 其中在碳水化合物及氨基

酸运输和代谢方面的基因富集度最高, 表明菌株 F3 和 F5 在适应环境变化方面具备绝对优势。未来可进一步结合宏基因组学、转录组学及功能验证实验, 挖掘这些菌株在工业酶制剂、生物防腐、生物修复等方向的应用潜力, 推动嗜盐古菌从基础研究向应用开发的转化。

鉴于在表型特征、16S rRNA 基因和 *rpoB'* 基因的系统发育格局上的独特性, 菌株 F3 应代表一个新的亚种, 建议命名为“解淀粉盐盒菌大柴旦亚种”, 其英文描述如下:

Description of *Haloarcula amylolytica* subsp. *dachaidanensis* subsp. nov.

*Haloarcula amylolytica* subsp. *dachaidanensis* (da.chai.dan.en'sis. N.L. fem. adj. *dachaidanensis*, from Dachaidan Salt Lake, China).

Cells are Gram-stain-negative under optimal growth conditions. Colonies are red, round, and grew at 1.4–5.1 mol/L NaCl (optimum 2.6 mol/L), 0–1.0 mol/L Mg<sup>2+</sup> (optimum 0.005 mol/L), 25–50 °C (optimum 37 °C), and pH 5.5–8.5 (optimum pH 7.5). Cells lysed in distilled water and the minimum NaCl concentration to prevent cell lysis was 0.68 mol/L. Anaerobic growth was observed in nitrate and DMSO, but not in the presence of L-arginine. Nitrate reduction to nitrite was observed with gas production. Catalase activity is positive but oxidase activity and urease activity are negative. Both H<sub>2</sub>S production and indole formation are negative. It could not hydrolyze casein and Tween-80 but can hydrolyze starch and gelatin. It can use D-glucose, D-mannose, D-galactose, sucrose, lactose, starch, glycerol, D-mannitol, D-sorbitol, acetate, pyruvate, DL-lactate, L-malate, glycine, L-alanine, L-glutamate and L-ornithine as sole carbon and energy sources for growth. Acid was produced during growth in D-glucose, D-mannose, D-galactose, sucrose, lactose, starch, glycerol, D-mannitol and D-sorbitol. It cannot utilize D-fructose, L-sorbose, D-ribose, D-xylose, maltose, succinate, fumarate, citrate, L-arginine, L-aspartate or L-lysine. The major polar lipids are phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylglycerol phosphate methyl ester (PGP-Me), and phosphatidylglycerol sulfate (PGS), glucosyl mannosyl glucosyl diether

(TGD-2) and an unknown diglycosyl diether (DGD-2).

The type strain of the subspecies is F3<sup>T</sup> (= CGMCC 1.2071<sup>T</sup>=JCM 36676<sup>T</sup>) isolated from Dachaidan Salt Lake, Qinghai, China. The DNA G+C content is 62.2% (genome). The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA gene, *rpoB* gene, and whole genome sequences of strain F3<sup>T</sup> are PP065916 (*rrnA*), PP065937 (*rrnB*), PP070409 and JAYMGY000000000, respectively.

### 作者贡献声明

李庆迪：基因组测序与比较基因组分析，实验操作与分析，撰写及修改文章；张鑫茹：文献查阅，协助完成基因功能注释与分析；许国梁：文献查阅，部分图片制作；毛亚玲：文献查阅，协助完成泛基因组分析；侯靖：指导实验设计，文章指导与审阅；崔恒林：方案设计，获取基金，稿件润色修改；周宇光：方案设计，提供菌株。

### 作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

### REFERENCES

- [1] CUI HL, DYALL-SMITH ML. Cultivation of halophilic archaea (class *Halobacteria*) from thalassohaline and athalassohaline environments[J]. Marine Life Science & Technology, 2021, 3(2): 243-251.
- [2] BURNS DG, JANSSEN PH, ITOH T, KAMEKURA M, LI Z, JENSEN G, RODRÍGUEZ-VALERA F, BOLHUIS H, DYALL-SMITH ML. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(Pt 2): 387-392.
- [3] 崔恒林, 许学伟. 中国极端微生物学的奠基人: 周培瑾[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 2933-2934. CUI HL, XU XW. Zhou Peijin, the founder of extreme microbiology in China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 2933-2934 (in Chinese).
- [4] 崔恒林. 嗜盐古菌分类学研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 1113-1122. CUI HL. Taxonomy of halophilic archaea: a review[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 1113-1122 (in Chinese).
- [5] 王大珍, 周培瑾, 田新玉, 马贵宏. 极端嗜盐菌新种的鉴定[J]. 微生物学报, 1984, 24(4): 304-309. WANG DZ, ZHOU PJ, TIAN XY, MA GH. Identification of new species of extreme halophilic bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1984, 24(4): 304-309 (in Chinese).
- [6] TORREBLANCA M, RODRIGUEZ-VALERA F, JUEZ G, VENTOSA A, KAMEKURA M, KATES M. Classification of non-alkaliphilic *Halobacteria* based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov.[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1986, 8(1/2): 89-99.
- [7] CUI HL, ZHOU PJ, OREN A, LIU SJ. Intraspecific polymorphism of 16S rRNA genes in two halophilic archaeal genera, *Haloarcula* and *Halomicrobium*[J]. Extremophiles, 2009, 13(1): 31-37.
- [8] YANG Y, CUI HL, ZHOU PJ, LIU SJ. *Haloarcula amylolytica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin-Jiang, China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(Pt 1): 103-106.
- [9] McGENITY TJ, GEMMELL RT, GRANT WD. Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(Pt 4): 1187-1196.
- [10] BAO CX, LI SY, XIN YJ, HOU J, CUI HL. *Natrinema halophilum* sp. nov., *Natrinema salinisoli* sp. nov., *Natrinema amylolyticum* sp. nov. and *Haloterrigena alkaliphila* sp. nov., four extremely halophilic archaea isolated from salt mine, saline soil and salt lake[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2022, 72(5): 005385.
- [11] HU Y, MA X, LI XX, TAN S, CHENG M, HOU J, CUI HL. *Natrinema caseinilyticum* sp. nov., *Natrinema gelatinilyticum* sp. nov., *Natrinema marinum* sp. nov., *Natrinema zhouii* sp. nov., extremely halophilic archaea isolated from marine environments and a salt mine[J]. Extremophiles, 2023, 27(1): 9.
- [12] 张玉琴, 吕志堂, 崔恒林, 许学伟, 阮志勇, 李文均. 我国原核微生物分类学七十年[J]. 微生物学报, 2023, 63(5): 1724-1740. ZHANG YQ, LYU ZT, CUI HL, XU XW, RUAN ZY, LI WJ. Seventy years of prokaryotic microbial taxonomy in China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(5): 1724-1740 (in Chinese).
- [13] GUPTA RS, NAUSHAD S, BAKER S. Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt 3): 1050-1069.

- [14] MINEGISHI H, KAMEKURA M, ITOH T, ECHIGO A, USAMI R, HASHIMOTO T. Further refinement of the phylogeny of the *Halobacteriaceae* based on the full-length RNA polymerase subunit B' (*rpoB'*) gene[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(Pt 10): 2398-2408.
- [15] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [16] HAN D, CUI HL. *Halostella pelagica* sp. nov. and *Halostella litorea* sp. nov., isolated from salted brown alga *Laminaria*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(3): 1969-1976.
- [17] CUI C, HAN D, HOU J, CUI HL. Genome-based classification of the class *Halobacteria* and description of *Haladaptataceae* fam. nov. and *Halorubellaceae* fam. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2023, 73(7): 005984.
- [18] RINKE C, CHUVOCHINA M, MUSSIG AJ, CHAUMEIL PA, DAVÍN AA, WAITE DW, WHITMAN WB, PARKS DH, HUGENHOLTZ P. A standardized archaeal taxonomy for the genome taxonomy database[J]. Nature Microbiology, 2021, 6(7): 946-959.
- [19] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R, OLIVER GLÖCKNER F, PEPLIES J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison[J]. Bioinformatics, 2016, 32(6): 929-931.
- [20] MEIER-KOLTHOFF JP, AUCH AF, KLENK HP, GÖKER M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14: 60.
- [21] LUO CW, RODRIGUEZ-R LM, KONSTANTINIDIS KT. MyTaxa: an advanced taxonomic classifier for genomic and metagenomic sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(8): e73.
- [22] 兰凤, 杨映雪, 徐乐, 李世元, 李素雅, 焦玉清, 陈思, 陈巧玲, 满初日嘎, 杜丽, 王凤阳, 高宏岩. 羊源肺炎克雷伯氏菌 KPHN001 的全基因组测序和比较基因组分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2315-2330.  
LAN F, YANG YX, XU L, LI SY, LI SY, JIAO YQ, CHEN S, CHEN QL, Manchuriga, DU L, WANG FY, GAO HY. Whole genome sequencing and comparative genomic analysis of goat-derived *Klebsiella pneumoniae* KPHN001[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2315-2330 (in Chinese).
- [23] CHUN J, OREN A, VENTOSA A, CHRISTENSEN H, ARAHAL DR, Da COSTA MS, ROONEY AP, YI HN, XU XW, de MEYER S, TRUJILLO ME. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(1): 461-466.
- [24] LIU DM, ZHANG YF, FAN GM, SUN DZ, ZHANG XJ, YU ZF, WANG JF, WU LH, SHI WY, MA JC. IPGA: a handy integrated prokaryotes genome and pan-genome analysis web service[J]. iMeta, 2022, 1(4): e55.
- [25] CUI HL, HOU J, AMOOZEGAR MA, DYALL-SMITH ML, deLa HABA RR, MINEGISHI H, MONTALVO-RODRIGUEZ R, OREN A, SANCHEZ-PORRO C, VENTOSA A, VREELAND RH. Proposed minimal standards for description of new taxa of the class *Halobacteria*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2024, 74(3): 006290.
- [26] AZIZ RK, BARTELS D, BEST AA, DeJONGH M, DISZ T, EDWARDS RA, FORMSMA K, GERDES S, GLASS EM, KUBAL M, MEYER F, OLSEN GJ, OLSON R, OSTERMAN AL, OVERBEEK RA, McNEIL LK, PAARMANN D, PACZIAN T, PARRELLO B, PUSCH GD, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 75.
- [27] KANEHISA M, GOTO S, HATTORI M, AOKI-KINOSHITA KF, ITOH M, KAWASHIMA S, KATAYAMA T, ARAKI M, HIRAKAWA M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Database issue): D354-D357.
- [28] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351.
- [29] RHODES ME, SPEAR JR, OREN A, HOUSE CH. Differences in lateral gene transfer in hypersaline versus thermal environments[J]. BMC Evolutionary Biology, 2011, 11: 199.
- [30] FELSENSTEIN J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach[J]. Journal of Molecular Evolution, 1981, 17(6): 368-376.
- [31] IHARA K, WATANABE S, TAMURA T. *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic archaea collected in Argentina[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(1): 73-77.
- [32] JUEZ G, RODRIGUEZ-VALERA F, VENTOSA A, KUSHNER DJ. *Haloarcula hispanica* spec. nov. and *Haloferax gibbonsii* spec. nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1986, 8(1-2): 75-79.
- [33] TAKASHINA T, HAMAMOTO T, OTOZAI K, GRANT WD, HORIKOSHI K. *Haloarcula japonica* sp. nov., a new triangular halophilic archaeobacterium[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1990, 13(2): 177-181.

- [34] ENOMOTO S, SHIMANE Y, IHARA K, KAMEKURA M, ITOH T, OHKUMA M, TAKAHASHI-ANDO N, FUKUSHIMA Y, YOSHIDA Y, USAMI R, KEN TK, MINEGISHI H. *Haloarcula mannilytica* sp. nov., a galactomannan-degrading haloarchaeon isolated from commercial salt[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(12): 6331-6337.
- [35] MONTALVO-RODRÍGUEZ R, LÓPEZ-GARRIGA J, VREELAND RH, OREN A, VENTOSA A, KAMEKURA M. *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(Pt 3): 1065-1071.
- [36] CUI HL, TOHTY D, ZHOU PJ, LIU SJ. *Haloterrigena longa* sp. nov. and *Haloterrigena limicola* sp. nov., extremely halophilic archaea isolated from a salt lake[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(8): 1837-1840.
- [37] DING JY, CHEN SC, LAI MC, LIAO TL. *Haloterrigena mahii* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a solar saltern[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1333-1338.
- [38] XU XW, LIU SJ, TOHTY D, OREN A, WU M, ZHOU PJ. *Haloterrigena saccharevitans* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Xin-Jiang, China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(Pt 6): 2539-2542.
- [39] XIN H, ITOH T, ZHOU P, SUZUKI K, KAMEKURA M, NAKASE T. *Natrinema versiforme* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(Pt 3): 1297-1303.
- [40] CESUR MF, SIRAJ B, UDDIN R, DURMUŞ S, ÇAKIR T. Network-based metabolism-centered screening of potential drug targets in *Klebsiella pneumoniae* at genome scale[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 9: 447.