

新疆地区盐湖的中度嗜盐菌的数值分类

曾 静 窦岳坦 杨苏声*

(中国农业大学生物学院微生物学系 北京 100094)

摘要:对来自新疆地区盐湖的 29 株中度嗜盐菌与 9 株相关的参比菌株进行了数值分类。这些菌株是革兰氏阴性菌,能在 0~25% NaCl 中生长。结果表明,所有菌株在 76% 的相似性水平上分为 2 个表观群。群 I 为新分离的菌株共 25 株,群 II 为 9 株参比菌株和 4 株新分离的菌株。在 86% 的相似性水平上,供试菌株分为 3 个亚群。亚群 1 由 10 株新分离的菌株组成,亚群 2 由 8 株新分离的菌株组成,亚群 3 由 1 株新分离的菌株和 5 株参比菌株组成。大部分新分离的菌株聚在独立的亚群中,说明分离自新疆地区盐湖的中度嗜盐菌是区别于参比菌株的新类群。

关键词:中度嗜盐菌,新疆地区,盐湖,数值分类

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0008-06

* 通讯作者

收稿日期: 2001-02-21, 修回日期: 2001-05-11

NUMERICAL TAXONOMY OF MODERATELY HALOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM SALT LAKES IN XINJIANG REGION

ZENG Jing DOU Yue-Tan YANG Su-Sheng

(Department of Microbiology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: Twenty nine moderately halophilic bacteria isolated from salt lakes in Xinjiang Region were compared with nine reference strains of relative species by performing a numerical analysis of 112 phenotypic characteristics. All the new isolates are Gram negative and can grow on the media containing 0 ~ 25% NaCl. The results showed that all tested strains were clustered into 2 phena at 76 % similarity level. Phenon I was composed by 25 new isolates strains, and phenon II included 9 reference strains and 4 new isolated strains. Most of the new isolated strains were clustered into 3 subphenon at 86 % similarity level. There were 10 new isolated strains in subphenon 1, 8 new isolated strains in subphenon 2, and 1 new isolated strain and 5 reference strains were included in subphenon 3. The results indicated that there were great differences between the new isolates and the reference strains.

Key words: Moderately halophilic bacteria, Xinjiang Region, Salt lakes, Numerical taxonomy

中度嗜盐菌属于极端环境微生物, 它们生长在盐湖、盐场、盐碱地和盐渍食品等含有高浓度盐的极端环境, 是一群不同于古菌, 而且能在含有 0 ~ 32% NaCl 的环境中生长的细菌。1919年, LeFever^[1]在盐渍黄瓜的液体中首先发现中度嗜盐菌, 这是一株可以在含有 0 ~ 15% NaCl 环境中生长的细菌。最早对中度嗜盐菌进行分类研究的是 Hof, 他从佳哇地区盐湖的泥中分离出中度嗜盐菌并对其进行分类研究^[2]。以后中度嗜盐菌逐渐引起科学家的重视, 其家族不断被扩大。但是, 在 20 世纪 80 年代, 中度嗜盐菌的分类还很混乱, 只有盐单胞菌 (*Halomonas*) 被认为是唯一的中度嗜盐菌属, 其中唯一的种是由 Vreeland 从晒盐池中发现的, 定名为伸长盐单胞菌 (*H. elongata*)^[4]。该菌为革兰氏阴性杆菌, 对 NaCl 的耐受范围为 0 ~ 32%。在不同的培养基中分别呈短杆状和长杆状, 可以利用广泛的碳水化合物为唯一碳源和能源。细胞可靠鞭毛运动, 但其运动性依赖于氧和盐。后来, 许多中度嗜盐菌被归入其它属, 如德莱氏菌属 (*Deleya*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 等。随着中度嗜盐菌分类工作的进展, 许多相关的种被归入相应的科和属。近年来, 通过对 16S rDNA 的全序列分析来研究细菌的系统发育, Dobson 根据 16S rDNA 的全序列分析, 认为色盐杆菌属 (*Chromohalobacter*) 和德莱氏菌属 (*Deleya*) 应归入 *Halomonas* 属, 目前中度嗜盐菌有 1 个科 Halomonadaceae, 其中包括 2 个属, 即 *Halomonas*、发酵细菌属 (*Zymobacter*)^[5]。

新疆地区具有非常特殊的地理环境和气候条件, 蕴藏着丰富的菌种资源。本研究以新疆地区的艾丁湖、艾比湖、盐湖、乌棕湖和达板湖为工作重点, 分离纯化了 29 株能耐受 0 ~ 25% NaCl 的革兰氏阴性中度嗜盐菌, 与引进的参比菌株作对比, 进行了数值分类, 以了解其分类地位。

1 材料与方法

1.1 菌株的分离和纯化

采集盐土, 将 1g 土样置于 100mL Gibbson^[3] 液体培养基中。在 30℃、120 r/min 摇床培养 3 ~ 5d, 富集菌体。将培养液稀释到 10⁻⁶, 吸取适当稀释度的菌液 0.1mL 涂布在含有 20% NaCl 的 Gibbson 平板上, 于 30℃ 培养 5d 挑取菌落进行分离纯化, 得到纯培养。

1.2 参比菌株

7株引自德国 DSMZ 菌种保藏中心, 2株由复旦大学徐德强惠赠(表1)。

1.3 性状分析

本实验共测定性状 112 项(见表3)。

所有性状的测定方法同文献 [6]。

1.4 聚类分析

性状编码、相似性计算、聚类分析及中心株确定等均按文献 [7] 所描述。选用简单匹配相似系数 (Ssm) 和平均连锁聚类方式 (UPGMA) 进行聚类。

表1 参比菌株一览表

编号	菌名	菌号	来源
30	<i>Halomonas elongata</i>	35	复旦大学
31	<i>H. meridiana</i>	246	复旦大学
32	<i>Deleya cupida</i>	4740	DSMZ
33	<i>D. marina</i>	4741	DSMZ
34	<i>D. venusta</i>	4743	DSMZ
35	<i>D. aquamarina</i>	4739	DSMZ
36	<i>Chromohalobacter marismortui</i>	6770	DSMZ
37	<i>Nesterenkhonia halobia</i>	20541	DSMZ
38	<i>H. eurihalina</i>	5720	DSMZ

2 结果与讨论

2.1 新疆地区盐湖的菌株分离

从新疆地区盐湖共采集和分离了 29 株中度嗜盐菌革兰氏阴性菌, 列于表 2。

表2 新疆地区盐湖的新分离菌株一览表

编号	菌号	来源	编号	菌号	来源
1	C1	达板湖	16	YH-1	达板湖盐化工厂
2	C2	达板湖	17	YH-2	达板湖盐化工厂
3	C6	达板湖盐化工厂	18	YH-3	达板湖盐化工厂
4	Ia	艾丁湖	19	YH-4	达板湖盐化工厂
5	I12	艾丁湖	20	AI-1	艾丁湖
6	ID1	艾比湖	21	AI-3	艾丁湖
7	ID2	艾比湖	22	AI-4	艾丁湖
8	ID3	艾比湖	23	AI-5	艾丁湖
9	ID6	艾比湖	24	WB-1	乌棕湖
10	AD-1	艾丁湖	25	YI-4	艾丁湖
11	AD-2	艾丁湖	26	YI-5	艾丁湖
12	AD-5	艾丁湖	27	YI-6	艾丁湖
13	AD-6	达板湖	28	YI-7	艾丁湖
14	DB-1	达板湖	29	YI-8	艾丁湖
15	S	达板湖			

2.2 聚类结果的分析

供试菌株的聚类结果如图 1。从图 1 中可以看出, 全部供试菌株在 73% 的相似性水平上聚在一起。在 76% 的相似性水平上分为 2 个群。

群 I 由新分离的菌株组成, 包括菌株 C1、AI-5、S、Ia、DB-1、AI-3、C2、I12、ID1、C6、YI-7、ID2、ID3、AD-1、AD-2、YH-1、YH-2、YH-3、YH-4、AI-1、AI-4、WB-1、AD-5、AD-6 和 ID6, 共 25 株菌。群 II 由 9 株参比菌株 *H. elongata*、*H. meridiana*、*D. cupida*、*D. marina*、*D. venusta*、*D. aquamarina*、*C. marismortui*、*N. halobia*、*H. eurihalina* 和 4 株新分离的菌株 YI-4、YI-5、YI-6 和 YI-8 组成。在 86% 的相似性水平上, 可分为 3 个较大的亚群。其中, 亚群 1 和 2 由新分离的菌株组成。亚群 1 包括 C1、AI-5、S、Ia、DB-1、AI-3、C2、I12、ID1 和 C6; 亚群 2 由 AD-1、AD-5、YH-1、YH-2、YH-3、AI-1、AI-4 和 WB-1 组成; 亚群 3 由 *H. elongata*、*H. meridiana*、*D. venusta*、

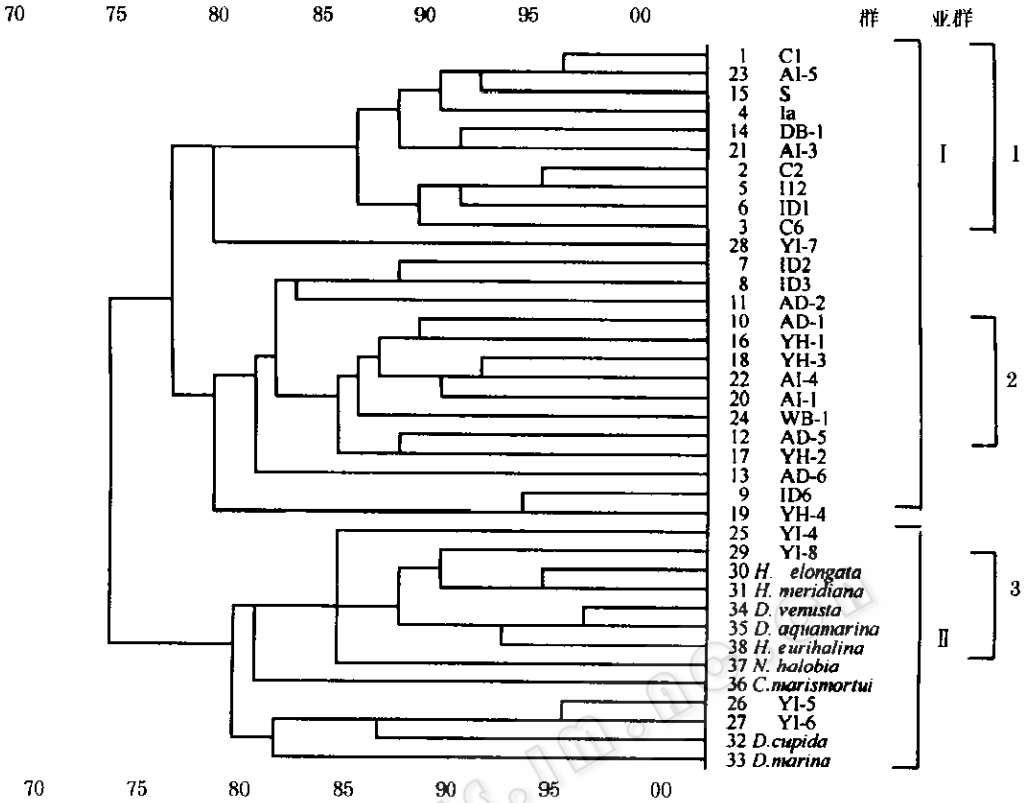


图1 新疆地区的中度嗜盐菌革兰氏阴性菌和参比菌株的聚类图谱

D. aquamarina、*H. eurihalina* 和 YI-8 组成。

从上述聚类结果可以看出，分离自新疆地区的中度嗜盐菌革兰氏阴性菌在 76% 的相似性水平上独立成群，说明这些菌株是不同于参比菌株的新类群，此结果与该菌群 16S r DNA PCR-RFLP 的分析结果是一致的^[8]。

2.3 新分离菌株亚群 1、2 和参比菌株的鉴别特征

从亚群 1 和亚群 2 的菌株中找出出现频率大于 95 % 的表型特征为鉴别特征，即该群 95% 以上菌株均表现正反应的特征为“+”，均表现为负反应的特征为“-”，出现频率介于 6% ~ 94% 的特征为“d”。现将亚群 1 和亚群 2 的主要鉴别特征与参比菌株进行比较，列于表 3。

表 3 各群鉴定特征

特征	A	B	C	D	亚群 1	亚群 2	特征	A	B	C	D	亚群 1	亚群 2
唯一碳源							耐酸碱 (pH)						
1. 蔗糖	+	+	+	+	d	d	58. pH 3	-	-	-	-	-	-
2. 阿拉伯糖	+	-	-	+	+	d	59. pH 4	-	-	-	-	-	-
3. 甘露糖	-	+	-	+	d	-	60. pH 5	-	-	-	-	-	-
4. 甘露醇	+	+	-	+	d	-	61. pH 6	+	+	+	+	+	d
5. 海藻糖	+	+	+	+	+	-	62. pH 7	+	+	+	+	+	+
6. 乳糖	+	+	-	+	d	-	63. pH 8	+	+	+	+	+	+
7. 山梨糖	-	-	-	+	d	-	64. pH 9	+	+	+	+	+	+

续表

续表

特征	A	B	C	D	亚群1	亚群2	特征	A	B	C	D	亚群1	亚群2
8. 鼠李糖	+	-	-	+	d	-	65. pH 10	+	+	+	+	+	+
9. 肌醇	-	+	+	+	d	-	66. pH 11	+	+	+	+	+	+
10. 半乳糖	+	+	+	+	+	-	抗生素抗性 ($\mu\text{L/mL}$)						
11. 果糖	+	+	-	+	+	d	67. 卡那霉素 30	+	+	+	+	+	+
12. 葡萄糖	+	+	+	+	+	-	68. 卡那霉素 50	+	+	+	+	+	+
13. 棉子糖	-	+	-	-	+	-	69. 卡那霉素 100	+	-	+	+	+	d
14. 木糖	+	+	+	+	+	-	70. 氨苄青霉素 30	+	+	+	+	-	d
15. 纤维二糖	+	+	+	+	+	-	71. 氨苄青霉素 50	+	+	+	+	-	d
16. 山梨醇	+	+	+	+	+	-	72. 氨苄青霉素 100	+	+	+	+	-	d
17. 琥珀酸钠	+	+	+	+	+	-	73. 萘啶酮酸 10	+	+	+	+	+	+
18. 甘油	+	+	+	+	+	d	74. 萘啶酮酸 20	+	+	+	+	+	+
19. 丙酮酸钠	+	-	+	+	+	d	75. 萘啶酮酸 30	+	+	+	+	+	+
20. 葡萄糖磷酸钠	+	+	+	+	+	d	76. 氯霉素 10	+	+	+	+	+	+
21. 水杨素	-	+	-	-	d	-	77. 氯霉素 20	+	+	+	+	+	+
22. 胱氨酸	-	-	-	-	-	-	78. 红霉素 30	-	-	-	-	-	-
23. 甘氨酸	-	-	-	-	+	d	79. 红霉素 50	-	-	-	-	-	-
24. 色氨酸	-	+	-	-	-	-	80. 红霉素 80	-	-	-	-	-	-
25. 亮氨酸	-	-	-	-	d	d	81. 利福平 5	+	+	-	+	-	-
26. 丝氨酸	-	-	-	-	d	-	82. 利福平 10	+	+	-	+	-	-
27. 缬氨酸	-	-	-	-	d	-	83. 利福平 20	-	+	-	+	-	-
28. 脯氨酸	+	+	-	+	+	d	84. 四环素 5	+	+	+	+	+	+
29. 蛋氨酸	-	+	+	+	d	-	85. 四环素 10	+	+	+	+	+	+
唯一氮源							86. 四环素 20	+	+	+	+	+	+
30. 苏氨酸	-	-	-	-	-	-	87. 链霉素 30	+	+	+	+	+	+
31. 组氨酸	-	-	-	-	-	-	88. 链霉素 50	+	+	+	+	+	+
32. 精氨酸	-	+	+	-	-	d	89. 新霉素 20	+	+	+	+	+	+
33. 天冬素	-	+	-	-	-	-	90. 新霉素 30	+	+	+	+	+	+
34. 胱氨酸	-	+	-	-	-	-	91. 新霉素 50	+	+	+	+	+	+
35. 色氨酸	-	+	-	-	-	-	温度 ($^{\circ}\text{C}$)						
36. 腺嘌呤	-	-	-	-	-	-	92. 5	-	-	-	-	-	-
37. 异亮氨酸	-	+	-	-	d	-	93. 15	+	+	+	+	+	+
38. 赖氨酸	-	+	-	-	-	d	94. 20	+	+	+	+	+	+
39. 谷酰胺氮	-	+	-	-	-	d	95. 30	+	+	+	+	+	+
40. 苯丙氨酸	-	+	-	-	-	d	96. 40	+	+	+	+	+	+
41. 鸟氨酸	-	+	-	-	-	-	97. 50	+	-	+	-	d	d
42. 缬氨酸	-	+	-	-	-	-	生理生化反应						
43. 硝酸钾	-	+	+	-	-	-	98. KNO_3 还原	+	+	-	-	-	d
44. 蛋白胨	-	+	+	+	-	+	99. 水解七叶苷	+	-	-	+	+	+
45. 酪氨酸	-	+	-	-	+	-	100. 乳糖产酸	+	+	+	-	-	d
46. 蛋氨酸	-	+	-	-	-	-	101. 海藻糖产酸	+	+	+	-	-	d
耐盐性 (%)							102. 葡萄糖产酸	+	+	+	-	+	d
47. NaCl 0	+	+	+	+	+	+	103. 甘露糖产酸	+	+	+	-	d	d
48. NaCl 1	+	+	+	+	+	+	104. 阿拉伯糖产酸	+	+	+	-	d	d
49. NaCl 2	+	+	+	+	+	+	105. KNO_3 还原	-	-	-	-	-	d
50. NaCl 3	+	+	+	+	+	+	106. 苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-	-	-	-
51. NaCl 5	+	+	+	+	+	+	107. VP 实验	-	-	-	-	-	-
52. NaCl 10	+	+	+	+	+	+	108. 淀粉水解	-	-	-	-	-	-
53. NaCl 15	+	+	+	+	+	+	109. 明胶液化	+	-	-	+	+	d
54. NaCl 20	-	-	+	+	+	d	110. 产 H_2S 实验	+	-	+	-	-	d
55. NaCl 25	-	-	-	-	d	-	111. 氧化酶	+	+	-	-	d	d
56. NaCl 30	-	-	-	-	-	-	112. 过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+
57. NaCl 32	-	-	-	-	-	-							

注: A *Halomonas elongata*, B *Halomonas marina*, C *Chromohalobacter marismortui*, D *Nesterenkonia halobia*

通过 112 个性状的测定, 发现新疆地区盐湖的中度嗜盐菌的抗逆性强, 所有新分离的菌株可以在含有 20% NaCl 的丰富培养基中生长良好, 耐碱性强, 在 pH11 时生长良好, 不耐酸, 在 pH5 以下不生长。耐高温, 大多数菌株在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时生长良好, 有些菌株

可以在 50℃ 条件下生长。对多种抗生素具有天然的抗性，可以抗卡那霉素、萘啶酮酸、氯霉素、四环素和链霉素，所有供试菌株均不抗利福平。上述结果表明，分离自新疆地区的中度嗜盐菌与参比菌株有显著差异，是一个新的菌群，有待进一步分析，以确定其分类地位。

参 考 文 献

- [1] LeFevre E, Round L A. *J. Bacteriol*, 1919, 4: 177 ~ 182.
- [2] Hof T. *Rev. Trav. Bot. Neerl*, 1935, 32: 92 ~ 171.
- [3] 徐德强, 黄静娟, 张纪忠, 等. *微生物学报*, 1995, 35: 315 ~ 321.
- [4] Vreeland R H, Genus *Halomonas*. In Kreig, N R, and Holt J G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1984, 340 ~ 343.
- [5] Dobson S J, Franzmann P D. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1996, 46 (2): 550 ~ 558.
- [6] 孙建光, 王昌平, 陈文新, 等. *微生物学报*, 1993, 33: 135 ~ 143.
- [7] Chen W X, Li G S, Qi Y L, *et al.* *Int. J. Syst. Bacteriol*, 1991, 41: 275 ~ 280.
- [8] 曾 静, 窦岳坦, 杨苏声. *微生物学通报*, 2000, 27: 327 ~ 330.