

极端嗜盐菌和耐盐菌的区分*

田新玉 周培瑾 王大珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

极端嗜盐菌大量存在于天然高盐域——海水晒盐场及盐湖或盐碱湖中。它们生长要求很高浓度的 NaCl (至少为 12%), 最适生长浓度为 20—25%, 甚至在饱和的 NaCl 中也能生长^[1]。极端嗜盐菌的大量繁殖常使环境带有浅粉色到紫红色, 海水晒盐场及盐湖地带常可见到这种现象。高盐域中不仅存在极端嗜盐菌, 而且还大量存在着耐盐菌。因此, 分离极端嗜盐菌时, 经常会同时分离到耐盐菌。我们对大柴旦盐湖和塘沽晒盐场分离的能在高盐培养基上生长的 8 株杆菌的某些生化特性进行了比较研究, 提出了检测极端嗜盐杆菌和耐盐杆菌的方法。

材料和方法

(一) 菌种

采用 Gibbons 改良培养基 (g/L): 酪素水解物 (Difco) 5, 酵母浸出物 (Difco) 10, 蛋白胨 (Oxoid L37) 5, 柠檬酸三钠 3, KCl 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20, NaCl 250 (固体培养基加琼脂 20g), pH7.0。从青海省大柴旦盐湖的底泥和塘沽盐场晒盐池的底泥样品分离出 10 株高盐浓度下生长的杆菌: F1、F2、F3、F4、F5、F5A、F6、F7、F8 和 F9, 其中 F3 和 F5 菌株已分别鉴定为大柴旦盐杆菌 (*Halobacterium dachaidanensis*) 和塘沽盐杆菌 (*Halobacterium tangguensis*)^[2] 对照菌为盐生盐杆菌 R1 (*Halobacterium halobium* R1) 系 Ebrey 教授赠送, 非嗜盐菌产粘短杆菌 74-230 (*Brevibacterium visco-genes*) 来自本所生理生态室油田微生物组。

(二) 培养条件

极端嗜盐菌采用 CM 培养基^[3], 250ml 三角瓶装 50ml 培养基, 用 CM 斜面上生长 5d 的菌体接种, 于 37℃ 光照振荡培养 7d。非嗜盐菌用普通肉汁蛋白胨培养基, 30℃ 振荡培养。

(三) 检测方法

1. 生长盐浓度试验: 采用含不同浓度 NaCl 的 CM 培养基, 37℃, 光照, 摇床振荡培养 6d, 用 721 型分光光度计于 420nm 测 A 值。

2. 细胞色素的检测: 离心收集在 CM 培养基中生长的细胞, 用 25% NaCl 溶液洗涤两次, 悬浮于盐溶液中, 1ml 细胞悬浮液用 3.0ml 丙酮: 甲醇 (1:1V/V) 抽提 1h, 离心, 上清液用 Beckman DU-7 型紫外分光光度计测吸收光谱, 以报道过的 F3、F5 菌株和红皮盐杆菌的色素吸收光谱为对照^[4]。

3. 二氨基庚二酸的检测: 菌体细胞经 HCl 水解, 过滤, 蒸发除去 HCl, 溶于少量蒸馏水, 用新华 1 号滤纸检测^[5], 以标准二氨基庚二酸作对照, 溶剂系统甲醇-水-10mol/L HCl-吡啶 (80:17.5:25:10V/V) 上行展开两次, 喷 0.5% 茚三酮丙酮溶液, 110℃ 10min 加热显色。二氨基庚二酸先呈橄榄绿而后变成黄色。

4. 甘油二醚衍生物的检测: 采用薄层层析法^[6]。离心收集细胞, 用 25% NaCl 溶液洗涤两次, 冷冻干燥, 用 Smithies 法测 NaCl 含量^[7]。取干细胞 100mg 与甲醇 (3ml), 甲苯 (3ml) 和浓硫酸 (0.1ml) 混合, 50℃ 水解 15—18h, 冷却后用 1.5ml 正己烷提取长链组份。提取物在 1mm 厚的硅胶 G 薄板上点样, 用石油醚-乙醚 (85:15V/V) 展开, 喷 50% 浓硫酸, 于 110—120℃ 碳化 30min, 甘油二醚及其他长链组份呈黑灰色斑点。

结 果

(一) 生长盐浓度

10 株菌生长盐浓度试验结果如图 1 所示, 不同菌株的最适生长盐浓度虽略有不同, 但是这些

本文于 1989 年 5 月 3 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

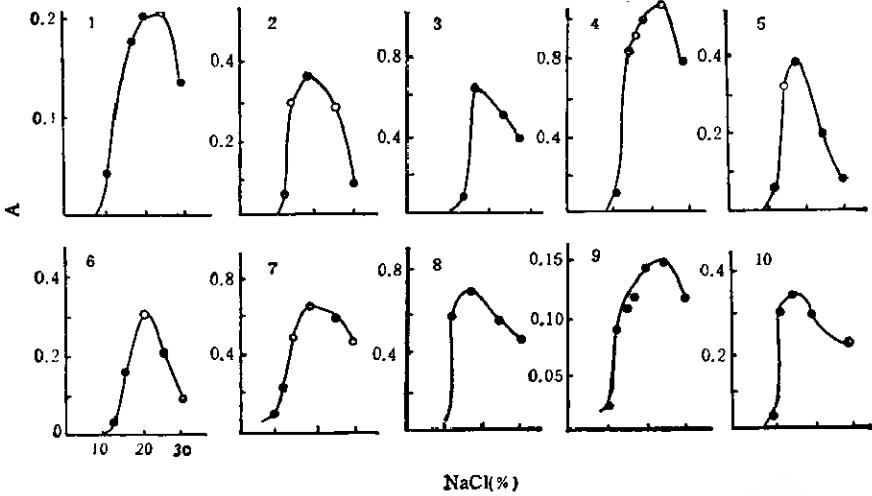


图 1 NaCl 浓度对嗜盐菌生长的影响

1. F1 (稀释 10 倍) 2. F2 (稀释 10 倍) 3. F3 (稀释 20 倍) 4. F4 (稀释 4 倍)
5. F5 (稀释 10 倍) 6. F5A (稀释 10 倍) 7. F6 (稀释 10 倍) 8. F7 (稀释 10 倍)
9. F8 (稀释 10 倍) 10. F9 (稀释 10 倍)

菌株最适生长的 NaCl 浓度范围在 18—25%, 低于 12% 几乎都不生长, 仅从生长盐浓度来看这些菌属于极端嗜盐菌范畴。

菌株 F1、F2、F4、F5A、F6、F8 与已知菌 F3、F5 及盐生盐杆菌 R1 相似, 在水中菌体发生自溶, 而菌株 F7 和 F9 的菌体在蒸馏水中不发生破裂, 表明它们的细胞壁结构与极端嗜盐杆菌的不同。极端嗜盐杆菌需要高盐浓度来维持它们的细胞结构, 当盐浓度不断降低时, 杆状菌体缩短变得不规则, 进而变成球形, 最后菌体完全自溶, 这是由于胞内高渗透压作用的结果^[4]。

(二) 细胞色素

紫外吸收光谱的测定结果(图 2)表明, 菌株 F1、F2、F4、F5A、F6 与 F3、F5 及标准红皮盐杆菌的色素吸收光谱一致, 在 388、492 和 527nm 出现最大吸收峰, 在 466—476nm 出现肩状突起, 从而证明这些菌株均含有类胡萝卜素类色素, 与极端嗜盐杆菌色素相同。F7、F8 和 F9 三株菌的色素吸收光谱在图中为平滑直线, 没出现类胡萝卜素类色素的特征吸收峰, 表明这三株菌均不含色素, 它们不属于典型的极端嗜盐杆菌。

(三) 二氨基庚二酸

纸层析结果表明, 被测试菌株的显色斑点均未呈现二氨基庚二酸的典型颜色(由橄榄绿变为

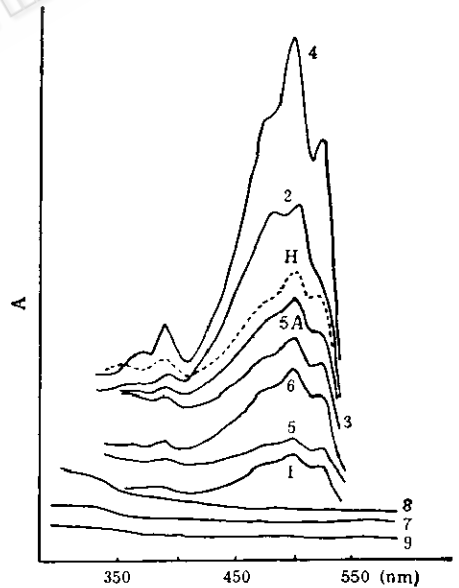


图 2 嗜盐菌色素的吸收光谱

H: 红皮盐杆菌

菌株 1. F1; 2. F2; 3. F3; 4. F4; 5. F5; 5A. F5A; 6. F6; 7. F7; 8. F8; 9. F9

黄色), 而是显示出其它氨基酸的颜色(粉红或紫红), Rf 值也明显不同, 说明菌株 F1、F2、F3、F4、F5、F5A、F6、F7、F8 和 F9 均不含二氨基庚

二酸。

(四) 甘油二醚衍生物

由硅胶 G 薄层层析检测甘油二醚衍生物的结果(图 3)可以看出,菌株 F1、F2、F4、F5A、F6 和 F8 与已知菌 F3、F5 及 R1 的提取物只有甘

油二醚衍生物一个斑点,其 R_f 值为 0.22。而菌株 F7 和 F9 与非嗜盐菌 74-230 一样,菌体水解提取物未出现甘油二醚衍生物斑点,存在脂肪酸甲酯斑点,它们与甘油二醚衍生物斑点 R_f 值不同。

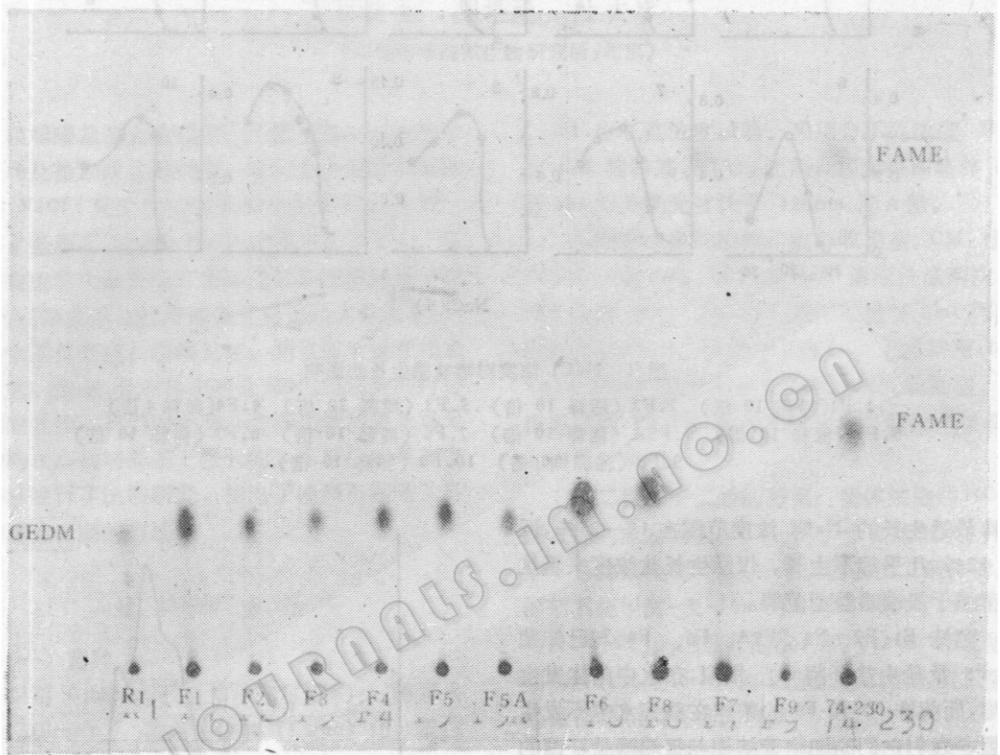


图 3 嗜盐菌和非嗜盐菌水解液提取物的薄层层析图谱

GEDM: 甘油二醚衍生物 FAME: 脂肪酸甲酯 74-230: 产粘短杆菌 R1: 盐生盐杆菌 R1

从存在甘油二醚衍生物来看,菌株 F1、F2、F4、F5A、F6 和 F8 应属于极端嗜盐杆菌,而菌株 F7 和 F9 细胞中不存在甘油二醚衍生物,存在脂肪酸甲酯,表明它们不属于极端嗜盐菌,而属于耐盐菌。

讨 论

已知极端嗜盐杆菌的细胞壁缺少二氨基庚二酸和胞壁酸,细胞质膜由六角形排列的糖蛋白颗粒组成,当盐浓度低于 1.6mol/L 时,细胞壁开始破裂^[2,10]。极端嗜盐杆菌的类脂组成在生物界也是独特的,发现这种菌类脂的主要组份是不皂化的磷酸甘油二叶绿基醚的衍生物^[11]。除了极性类脂外,还含有非极性类脂,红色的 C50 类

胡萝卜素类色素等。然而,这种菌的类脂中几乎不含脂肪酸酯^[12]。上述这些特征构成了判断极端嗜盐杆菌的主要依据。

我们从大柴旦盐湖底泥和塘沽盐场晒盐池底泥样品分离到的杆菌中,菌株 F1、F2、F4、F5A 和 F6 最适生长的 NaCl 浓度为 18—25%,细胞壁不含二氨基庚二酸,类脂中含有甘油二醚衍生物,不含脂肪酸酯,含有类胡萝卜素类色素。菌株 F8 除不含色素外,其他生化特性与上述 5 株菌相同,是比较特殊的极端嗜盐菌。这 6 株菌的生化特性与已知菌 F3、F5 及盐生盐杆菌 R1 相似,因此这些菌株应属于极端嗜盐杆菌。从菌株 F7 和 F9 生长对 NaCl 的要求来看,最适生长盐浓度为 18%,与极端嗜盐杆菌需要的 NaCl 浓

度相近。然而, F7 和 F9 菌株的菌体在蒸馏水中不发生自溶; 其细胞内不含类胡萝卜素类色素, 也不含极端嗜盐菌所特有的甘油二醚衍生物, 由此看来这两株菌在生化特性上与极端嗜盐杆菌不同, 应属于耐盐菌。

综上所述, 本报告提出了一种区别极端嗜盐杆菌和耐盐杆菌的简单有效方法。

参 考 文 献

- [1] Kushner, D. J.: In "Microbial Life in Extreme Environments", Ed. Kushner, D. J., Academic Press, London, New York, pp. 318—357, 1978.
- [2] 王大珍等: 微生物学报, 24(4): 304—309, 1984.
- [3] Gochnauey, M. B. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **15**: 1157—1165, 1969.

- [4] Gochnauey, M. B. et al: *Arch. Microbiol.*, **48**: 339—349, 1972.
- [5] 阮继生: 放线菌分类基础, 科学出版社, 北京, 第145页, 1977年。
- [6] Rose, H. N. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **123** (1): 75—80, 1981.
- [7] Smithies, W. R. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **1**: 605—608, 1955.
- [8] Stoeckenius, W. et al.: *J. Cell Biol.*, **34** (1—3): 355—393, 1967.
- [9] Brown, A. D.: *Bacteriol. Rev.*, **28**: 296—329, 1964.
- [10] Kushner, D. J.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **10**: 73—99, 1968.
- [11] Kates, M.: In "Ether Lipids, Chemistry and Biology" Ed. Snyder, F., Academic press, New York and London, pp. 351—398, 1972.
- [12] Kates, M. et al.: *Biochemistry*, **5**: 4092—4099, 1969.

DIFFERENTIATION OF HALOPHILIC AND HALOTOLERANT BACTERIA

Tian Xinyu Zhou Peijin Wang Dazhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Biochemical characteristics of eight strains grown in high saltern media were examined. The optimal salt concentrations for all of their growth condition were 18—25%. All of their pigments shown that the absorption peaks for strains F1, F2, F4, F5A and F6 were at 388, 492 and 527 nm in the absorption spectra and no pigments in the cell of strains F7, F8 and F9. The cell walls of the bacteria have no diaminopimelic acid (DAP) too. Glycerol diether moieties were

present in the lipids of strains F1, F2, F4, F5A, F6 and F8 only, but absent in F7 and F9. According to their characteristics, we identified strains F1, F2, F4, F5A, F6 and F8 as halophiles and F7 and F9 as halotolerants.

Key words

Halophiles; Halotrophiles