

黄海发光细菌的分离鉴定

沈建伟 杨颐康

(华东师范大学, 上海)

提要 对从黄海中国近海分得的84株海洋发光细菌作了广泛的表型特性测定。测得结果借助电子计算机作了数值分析,根据菌株间的表型相似程度,所有菌株被分成三大簇群。对三个簇群的6株代表菌株的超氧化物歧化酶(SODs)作了凝胶双向扩散试验,结果6株菌分别属于弧菌属(*Vibrio*)和发光杆菌属(*Photobacterium*)二个属,与数值分析结果相符。3个簇群的菌株分别被定名为 *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio fischeri* 和 *V. harveyi*, 均是首次在黄海发现。

由于分子生物学、生物化学以及免疫学技术的进展,发光细菌的分类近年来又有了较多的修改和补充。目前已收入《伯杰系统细菌学手册》(1984年版)的发光细菌,有明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)、霍乱弧菌(*Vibrio Cholerae*)等9种^[8],其中大多是海洋细菌。至今,我国学者分得了6种发光细菌^[2,4,13]。本文描述首次从黄海分得的另外三种发光细菌: 鲷鱼发光杆菌(*P. leiognathi*)、费氏弧菌(*V. fischeri*)和哈氏弧菌(*V. harveyi*)。

一、材料和方法

菌种 均取自黄海青岛、连云港沿海。菌株来源列于表1。

培养基 人工海水(AW)配方为0.4mol NaCl, 0.1 mol MgSO₄·7H₂O, 0.02 mol KCl, 0.02 mol CaCl₂·2H₂O。基本培养基(BM)配方为0.05mol Tris-HCl, 19m mol NH₄Cl, 0.33m mol K₂HPO₄·3H₂O, 0.1m mol FeSO₄·7H₂O和1/2浓度的AW, pH为7.5。酵母膏肉汤培养基的配方是在BM中加酵母膏5g。发光培养基是在BM中加0.3%甘油, 0.5%酵母膏, 0.5%胰蛋白胨, 0.1%CaCO₃。以上培养基加2%琼脂即为固体培养基。

表型特性的测定 细胞的形状、大小和运动,鞭毛的染色及电镜观察,钠和生长因子的需要,生长温度,发光,色素的产生,碳水化合物的发酵和利用,硝酸盐还原,氧化酶、胞外酶和精氨酸双水解酶的形成等项目的测定,采用Baumann的方法^[6]。V. P. 反应,聚β-羟基丁酸在细胞内的累积,采用Stanier等的方法^[1,6]。除鞭毛染色试验时细菌是在20℃培养外,其余项目均是在22℃温度下培养、试验的。

数值分析 数值分析的计算机处理,参考Sneath的方法^[11]。相似性的估计,采用Sokal和Michener的符合系数(Matching coefficient)(S_{SM})。归群采用单连锁方法^[12]。程

序用 FORTRAN 语言编制,用计算机 MC 68000 处理。

凝胶双向扩散试验 SODs 的制备,采用文献[7]和[10]的方法。SOD 的活性测定主要根据李益新的化学发光法^[3]。测定时,先加入黄嘌呤-磷酸缓冲液、发光剂(luminol)和 SOD,再加入黄嘌呤氧化酶启动反应。化学发光测量,用液体闪烁计数器。抗血清的制备,采用 Bang 的方法^[7]。扩散试验在琼脂板上进行,采用 Munaz 的方法^[9]。

表 1 菌株编号与分离来源

菌株编号 ¹⁾	分离来源 ²⁾
801—808, 813—818	SW
809	F, 银鲱
810, 819	F, 宽体舌鳎
811, 812, 820	蚶
821	蟹
822—826, 832, 835, 836 } 851—853, 857, 858, 861 }	SW
846, 854, 857	I, 银鲱
838—842	I, 河鲀
837, 843	I, 白姑
847, 859	I, 带鱼
855	F, 白姑
844, 848	F, 银鲱
827—829, 833, 834, 849	F, 长蛇鲻
845	F, 海鳗
830, 831	F, 黑鲷
850	F, 蓝圆鲹
867, 868	SW
863, 869, 870, 876, 878, 882	SM
883	F, 银鲱
864, 865, 871—873	F, 木叶鲷
866, 874	F, 鲈
875, 877	蚶
884	海蜇

1) 除 801—808, 813—818, 812—826, 832, 851—853, 861 从连云港分得外,其余菌株均从青岛沿海分得。

2) SW = 海水; F = 体表; I = 小肠内容物; SM = 海泥。

二、结 果

本文鉴定的菌株,均能发酵葡萄糖产气或强产酸、需要钠离子,因此排除了 *Alteromonas*, *Xenorhabdus* 和 *V. Cholerae* 的可能性。这些菌株的表型特性与发光杆菌属、弧菌属的各代表菌株一起进行数值分析,其结果见图 1。菌株 801—821, 822—862, 在 92% 相似性水平分别归入 *V. fischeri* 和 *P. leiognathi*。菌株 863—884 在 90% 相似性水平归入 *V. harveyi*。

表 2 是上述三个种与前人报道的菌株的表型特性比较。可见,以前鉴定的三个种和本文鉴定的菌种没有多大差别。但是本文鉴定的 *P. leiognathi* 菌株氧化酶阳性率低、产气阳性率高,大部分菌株能够利用 α -酮戊二酸,并且部分菌株能够利用柠檬酸、己酸和辛

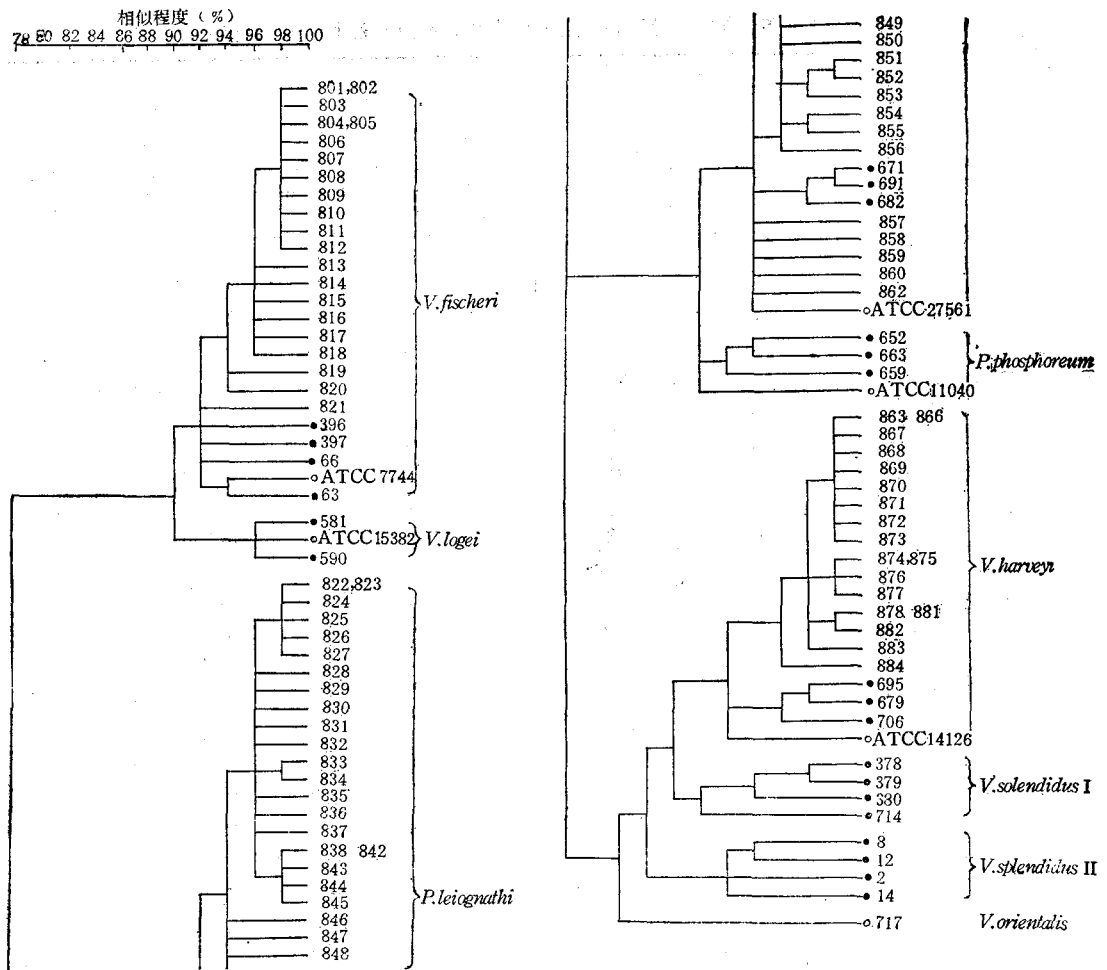


图 1 表型特性的数值分析

○ 典型菌株；● 以前鉴定过的菌株。
(*V. harveyi* 菌种中菌株 679 应为 697)

酸,这些方面和以往鉴定的菌株是不同的。而在利用 DL-苹果酸和 L-苏氨酸上,与国外报道相同;在利用 D-半乳糖、癸酸、DL-甘油酸、L-脯氨酸上,与国内报道相同。

本文鉴定的 *V. harveyi*, 有较多的菌株能够利用 L-亮氨酸和 L-组氨酸,与国内报道相同,与国外报道不同;在利用水杨苷、丙酸、己酸、辛酸方面与国外报道接近。本文鉴定的 *V. harveyi* 菌株,有 66.7% 能利用奎尼酸,而在以前鉴定的菌株,利用率则较低。

本文鉴定的 *V. fischeri*, 其所有菌株都不能在 35°C 生长,大部分菌株能利用海藻糖、乙酸、DL-苹果酸、顺乌头酸和 L-苏氨酸,少数菌株利用甘露醇,这和国外报道的菌株是不同的。

上述三个种的代表菌株的鞭毛染色照片和 *P. leiognathi* 857 的聚 β-羟基丁酸在细胞内累积的照片见图版 I。

用 *V. cholerae* M·13 SOD, *V. fischeri* 61 SOD, *V. alginolyticus* 90 SOD, *P. leiognathi* 480 SOD 的抗血清进行凝胶双向扩散试验,结果将从 801—821, 863—884 二个

(续上表)

菌株分类及数目 比较项目	鳀鱼发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>			哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>			费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>		
	本文的研究	国内报道 ^[13]	国外报道 ²⁾	本文的研究	国内报道 ^[13]	国外报道	本文的研究	国内报道 ^[2]	国外报道
	41	26	30	22	20	58	21	1	12
N-乙酰葡萄糖胺	+	+	97	+	+	+	+	+	+
乙酸	61	69	83	+	+	93	90.5	+	-
丙酸	-	-	-	+	55	+	-	-	-
己酸	7.3	-	-	90.9	-	47	-	-	-
辛酸	22	-	-	+	10	67	-	-	-
壬酸	-	-	-	95.5	85	84	-	-	-
癸酸	4.9	-	40	+	95	80	-	-	-
琥珀酸	87.7	+	83	+	+	+	+	+	+
延胡索酸	87.8	+	83	+	+	+	95.2	-	+
DL-乳酸	+	+	+	+	+	+	-	+	-
DL-β-羟基丁酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-苹果酸	64.9	-	63	+	90	80	95.5	-	8
DL-甘油酸	17.1	-	77	90.9	+	92	90.5	-	67
柠檬酸	14.6	-	-	+	+	91	75	+	42
α-酮戊二酸	78.4	-	3	+	+	91	-	-	-
丙酮酸	90	89	97	+	+	+	23.8	-	-
顺乌头酸	-	-	-	95.5	+	98	90.5	-	17
甘露醇	-	-	-	+	+	+	28.6	+	92
甘油	+	+	+	+	+	92	+	+	+
奎尼酸	-	-	-	66.7	20	5	-	-	-
L-α-丙氨酸	25	+	63	81	55	74	-	-	-
L-丝氨酸	80.5	96	77	90.5	95	85	-	-	8
L-苏氨酸	97	4	43	+	+	+	+	-	17
L-亮氨酸	-	-	-	68.2	55	-	-	-	-
L-天冬氨酸	87.8	92	87	+	+	62	+	+	67
L-谷氨酸	75.6	-	67	+	+	+	+	+	75
L-组氨酸	-	-	-	63.6	85	11	-	-	-
L-脯氨酸	30	19	97	+	+	+	+	+	+
L-酪氨酸	-	-	-	+	+	+	-	-	-
甘氨酸	-	-	-	50	85	53	-	-	-
腐胺	-	-	-	-	-	-	-	-	-
精胺	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1) + 示所有的菌株为正反应; - 示所有的菌株为负反应; 数值示正反应菌株的百分比。

2) 数据来自 Reichelt, J. L., P. L. Baumann, 1973. *Arch. Microbiol.* 94: 283—330, 参考文献 [6]。

簇群中选取的代表菌株 801, 821, 867, 880 归在 *Vibrio* 属内; 将从 822—862 簇群中选取的代表菌株 853, 858 归在 *Photobacterium* 属内。前三种抗血清的实验结果相同, 记录在图 2 中; 第四种抗血清的实验结果记录在图 3 中。从图 3 中还可以看出, 菌株 853, 858 与已知的 *P. leiognathi* 690 具有完全的同源性, 而与已知的 *P. phosphoreum* 658, 661 只具有部分的同源性, 因此菌株 853, 858 应属于 *P. leiognathi*。

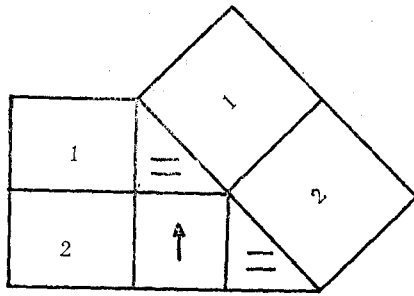


图2 用 *V. cholerae* M-13 SOD, *V. fischeri* 61 SOD, *V. alginolyticus* 90 SOD 的抗血清进行凝胶双向扩散试验的结果

1 为 *Vibrio* 属, 包括的菌株是 *V. fischeri* 397, 801, 821; *V. harveyi* 867, 880, 698; *V. orientalis* 717, 718, 719; *V. splendidus* 1 714; *V. alginolyticus* 90; 2 为 *Photobacterium* 属, 包括的菌株是 *P. leiognathi* 853, 858, 690, 477; *P. phosphoreum* 658, 661。

= 表示两种抗原的决定因子相同; ↑ 表示两种抗原的决定因子部分相同, 箭头指向抗原决定因子多的一方。

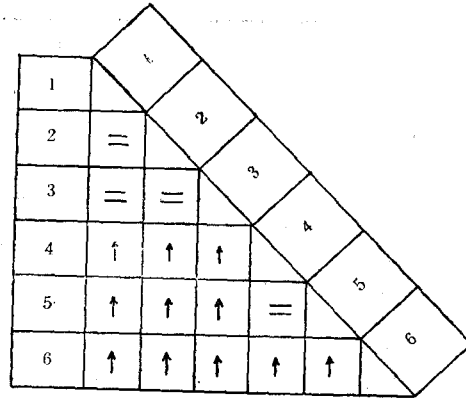


图3 用 *P. leiognathi* 480 SOD 的抗血清进行凝胶双向扩散试验的结果

1 为 *P. leiognathi* 853; 2 为 *P. leiognathi* 858; 3 为 *P. leiognathi* 690; 4 为 *P. phosphoreum* 658; 5 为 *P. phosphoreum* 661; 6 为 *Vibrio* 属, 包括上图中 1 内各菌株。

三、结论与讨论

通过广泛的表型特性研究、数值分析、凝胶双向扩散试验, 结果均表明从黄海我国近海分得的菌株 801—821, 822—862, 863—884 分别属于费氏弧菌 (*P. fischeri*)、鲷鱼发光杆菌 (*P. leiognathi*) 和哈氏弧菌 (*V. harveyi*)。因此, 在黄海除存在东方弧菌 (*V. orientalis*) 和美丽弧菌 (*V. splendidus*) 外, 还存在费氏弧菌、哈氏弧菌和鲷鱼发光杆菌。有意义的是在黄海发现了较多的费氏弧菌, 本文鉴定的 84 株菌株中有 21 株是费氏弧菌, 占总数的 25%。费氏弧菌在我国是较少的菌种, 以前, 仅在东海鲷鱼体表分得一株。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著, 1978。一般细菌常用鉴定方法。科学出版社, 126—151 页。
- [2] 王定华、杨颐康, 1985。一株海洋发光细菌的鉴定。华东师范大学学报 2: 108—112。
- [3] 李益新、方允中, 1983。超氧化物歧化酶活力测定的新方法。生物化学与生物物理学进展 2: 59—62。
- [4] 曹蕴慧、胡锡钢、王苏联, 1982。长江口发光细菌的分布与组成。海洋学报 4(1): 89—94。
- [5] Bang, S. S., L. Baumann, M. J. Woolkalis, P. Baumann, 1981. Evolutionary relationship in *Vibrio* and *Photobacterium* as determined by immunological studies of superoxide dismutase. *Archives of Microbiology* 130: 111—120。
- [6] Baumann, L., P. Baumann, 1981. The marine gram-negative eubacteria. In: *The prokaryotes*. Starr, M. P., H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, H. G. Schlegel Eds. Springer-Verlag, New York, Heidelberg Berlin, pp. 1302—1331。
- [7] Crapo, J. D., J. M. McCord, I. Finkovitch, 1978. Preparation and assay of superoxide dismutases. In: *Me-*

- thods in enzymology. Vol. 53. S. Feisher, L. Packer Eds. Academic Press, New York, pp. 382—393.
- [8] Krieg, N. R., J. G. Holt, 1984. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins Co, pp. 516—550.
- [9] Munoz, J., 1871. Double diffusion on plates. *In*: Williams, C. A., M. W. Chase Eds., *Methods of Immunology and Immunochemistry*, Vol 3. Academic Press, New York, pp. 146—160.
- [10] Puget, K., A. M. Michelson, 1974. Iron containing superoxide dismutases from luminous bacteria. *Biochimie* 56: 1255—1267.
- [11] Sneath, P. H. A., 1972. Computer taxonomy. *In*: *Methods in Microbiology*. Norris, J. R. and D. W. Ribbons Eds. Academic Press, New York, 7A: 29—98.
- [12] Sneath, P. H. A., R. R. Sokal, 1973. *Numerical Taxonomy*. The W. H. Freeman and company., San Francisco.
- [13] Yang, Y. K., L. Yeh, Y. Cao, L. Baumann, P. Baumann, J. S. Tang, B. Beaman, 1983. Characterization of marine luminous bacteria isolated off coast of China and description of *Vibrio orientalis* sp. nov. *Current Microbiology* 8: 95—100.

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MARINE LUMINOUS BACTERIA FROM THE WATERS OF THE HUANGHAI SEA (YELLOW SEA)

Shen Jianwei and Yang Yikang

(East China Normal University, Shanghai)

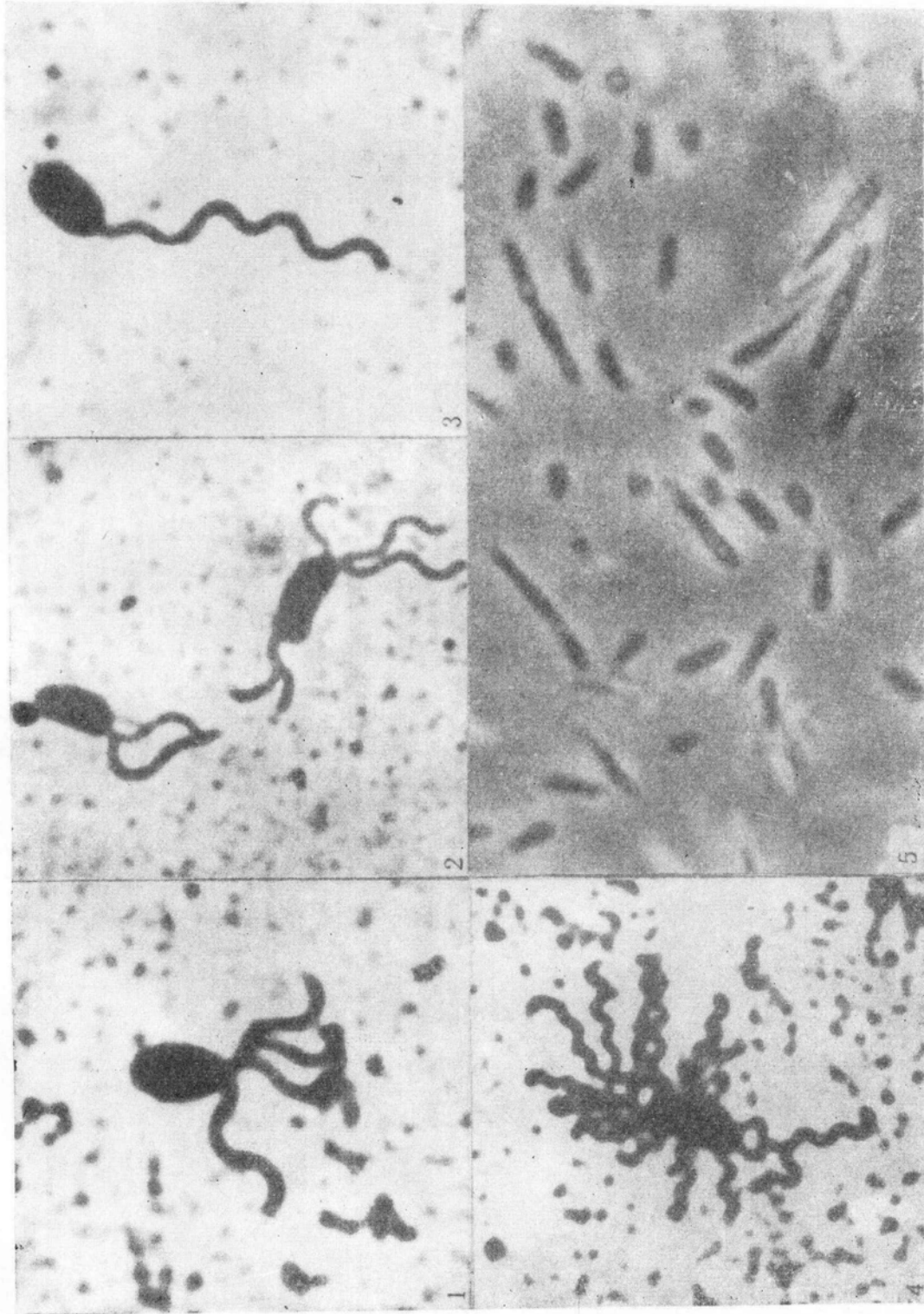
ABSTRACT

Eighty-four strains of marine luminous bacteria from sea waters, sea mud, surfaces and intestines of fish as well as other sea animals of the Huanghai Sea were submitted to an extensive physiological, nutritional and morphological characterization. The number of tested items was seventy. A numerical analysis of the results grouped these strains and other type or previously characterized strains into eight clusters which were formed on the base of overall phenotypical similarity. The being identified strains were grouped into three clusters which respectively contained the type or previously characterized strains of the species *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio fischeri* and *V. harveyi*. The similarity was showed by Sokal & Michener's simple matching coefficient (S_{SM}). The single-linkage method was used in grouping. The FORTRAN was used in proceeding computer program.

Antigenic determinant divergence of superoxide dismutases (SODs) from six respective strains of the three clusters was determined by Ouchterlony gel double diffusion procedure. Results: 6 strains of bacteria could be divided into two groups, respectively belonging to the genus *Vibrio* and *Photobacterium*. Moreover the later group could be divided into two further subdivisions, respectively belonging to the species *P. leiognathi* and *P. phosphoreum*. These were in agreement with the results of the numerical analysis. The activity of SOD was measured by a progressed chemiluminescence method. The three clusters readily identified as *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio harveyi* and *V. fischeri*. The three species were first found in the Waters of the Huanghai Sea. Because only one strain of *V. fischeri* have been got in China, it's of significance that quite many of strains of *V. fischeri* were obtained in the study. It represents that *V. fischeri* also is an extensive species in all sea waters on the earth.

The character of the strains of *V. fischeri* characterized in the study is that all of the strains is of the variety of flagellation (3—8 flagella at one or two pole), largely produce yellow pigment, not able to grow at 35°C and most of the strains can utilise alginate, acetate, DL-malate, aconitate and L-threonine as source of carbon and energy, the minority of the strains can utilise mannitol as source of carbon and energy, deffering from the strains previously studied.

Another discovery has been made in this study. When the bacteria of *V. fischeri* could not produce yellow pigment the vitality of the bacteria dropped, the colony of the cell was very small and bioluminescence was weak, conversely, when the bacteria could produce yellow pigment the vitality of the bacteria is very strong, the colony of the cell was large and bioluminescence was powerful. It is inferred that yellow pigment play a great role in maitaining the function of cell membrane. Perhaps, the yellow pigment would be used as the drug that can strengthen people's vitality someday.



图版 I 鞭毛染色和聚β-羟基丁酸的光镜照片
1. *V. fischeri* 802 菌株的鞭毛； 2. *V. fischeri* 813 菌株的鞭毛； 3. *V. harveyi* 868 菌株的鞭毛； 4. *P. leiognathi* 838 菌株的鞭毛； 5. *P. leiognathi* 857 菌株聚β-羟基丁酸的累积。(1—4 系利福森鞭毛染色； 5 系相差照相)。