

发光细菌一新种——青海弧菌*

朱文杰 汪 杰 陈晓耘 扎西次仁 杨 韵 宋 瑛

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

提要 于 1985 年 8 月从青海湖产的青海裸鲤体表分离到 70 株发光细菌, 通过表型特性分析、超氧化物歧化酶的凝胶双向扩散试验, 以及 G + C 摩尔百分比测定进行鉴定分类。结果表明, 70 株发光细菌在表型特性、免疫学特性等方面彼此高度相似, 但与已知的各种发光细菌有显著差异。鉴定为弧菌属的一个新种, 定名为青海弧菌 *Vibrio qinghaiensis* sp. nov.。典型菌株保存于华东师范大学生物系。

关键词 发光细菌 弧菌属 青海弧菌 新种 青海湖

据报道 (Baumann et al., 1984) 发光细菌有 10 个种, 除一种为线虫体内共生菌外, 余皆为海洋细菌。我国学者已从我国沿海分离到其中的 6 个种, 其中东方弧菌(杨颐康等, 1984)为我国所特有。本文报道采自青海湖的弧菌属发光细菌一新种——青海弧菌 *Vibrio qinghaiensis* sp. nov.。

1 材料和方法

1.1 发光细菌的分离 于 1985 年 8 月从青海湖中捕得青海裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*), 将鱼体分割成小块置于无菌培养皿中, 室温下放置约 10 余小时, 于暗室中观察有发光点处即用接种环挑取少许划线分离之。然后经多次分离纯化, 得 70 株, 编号为 Q-1—Q-70。

1.2 培养基配方 I 号: 混合盐, 12.49g; 酵母膏, 5g; 胰胨, 5g; 甘油, 3g; 加水至 1 000ml; pH = 9.0。II 号: 硫酸铵, 4.2g; 葡萄糖, 10g; 甘油, 3g; 胰胨, 1g; 混合盐, 10g; 加水至 1 000 ml; pH = 8.5。混合盐成分: MgSO₄, 19.8%; MgCO₃, 6.3%; MgBr₂, 0.74%; MgCl₂, 0.74%; CaCO₃, 0.22%; KCl, 1.76%; NaCl, 66.36%; Mg(HCO₃)₂, 4.04%。以上配方中再加琼脂 2% 即为固体培养基。

1.3 表型特性测定 细菌细胞的形态, 运动性, 鞭毛染色, Na⁺的需要, 生长因子测定, 碳源的利用, 硝酸盐还原, 胞外酶, 精氨酸双水解酶以及氧化酶等的测定, 均根据 Baumann 等(1977, 1981)的方法。以上试验均在 25°C 中培养细菌。生长温度的测定则另按规定要求设定温度。G + C 摩尔百分比采用 Ulitzur (1972) 的方法测定。所有性状的数值分析, 采用 Sneath(1972)的方法。

1.4 发光光谱的测定 根据朱文杰等(1986)的方法, 用日立 850 荧光分光光度计测定。

1.5 凝胶双向扩散试验 按杨颐康等(1984, 1985)的方法进行, 但所用的超氧化物歧化酶的活力测定则采用发光分析法(李益新等, 1983)。

* 国家教育委员会资助, 840729/060115 号。吴自荣、刘明华、洪益国等参加了前期工作。
收稿日期: 1991 年 12 月 10 日, 接受日期: 1992 年 6 月 11 日。

1.6 弧菌抑制试验 采用北京药品检定研究所提供的 0/129 试纸, 于 25°C 培养观察抑菌圈的产生与否, 以两周为限。

2 结果

70 株菌株均由青海裸鲤的体表近鳃盖部分得。多次从湖水、湖泥样中直接分离, 均未发现有发光细菌生长。

2.1 形态特征 70 株菌的细胞均呈杆状或微弯, 菌体大小约 $(0.5-0.7) \times (1.5-2) \mu\text{m}$ 。革兰氏染色呈阴性。用利夫森法鞭毛染色, 可观察到单极生鞭毛似蝌蚪状 (图版 1:1)。均能在细胞内积累聚 β -羟丁酸。菌苔初起呈透明露状, 渐成雾状; 老龄菌苔呈淡黄色; 放置较久的斜面, 在丧失发光性状后则呈鹅黄色。液体静止培养易在液面形成菌膜, 且不易下沉, 其下的培养液发光很弱。70 株菌均能发酵 D-葡萄糖, 所以不能归属于另单胞菌属; 又由于分离来源于鱼体表, 故而不同于在寄生性线虫体内生活的发光异短杆菌 (*Xenorhabdus luminescens*)。

2.2 生理生化反应 从多种生理生化反应、胞外酶的种类和碳源利用等多项表型特性测定来看, 与已知的弧菌科的发光细菌各个种有明显差异, 见表 1。根据表型特性进行数值分析, 其相似性归纳于图 1。

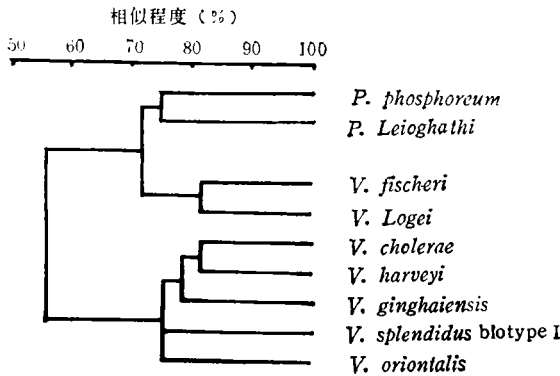


图 1 弧菌科的各发光细菌的相似程度

Fig. 1 The similarity of luminous bacteria of Vibrionaceae

2.3 免疫学反应及对 0/129 的敏感性 从部分菌株的细胞中提取 SOD (超氧化物歧化酶), 跟抗发光杆菌属的 SOD 抗体血清及抗弧菌属的 SOD 抗体血清反应, 进行凝胶双向扩散试验。结果是, 凡与发光弧菌相邻, 则沉淀线光滑相连; 与发光杆菌相邻, 则沉淀线有矩, 且因所用的抗体血清不同而矩的指向亦不同。表现出它们与发光杆菌有差别, 而与弧菌属相同, 见图 2。

以弧菌抑制剂 0/129 (2, 4-二氨基-6, 7-二异丙基喋啶) 作抑菌圈试验, 无论是每片 10 μg 还是 150 μg , 均产生明显的抑菌圈, 且 150 μg 用量的抑菌圈明显大于 10 μg 的。表明这 70 株菌对 0/129 非常敏感, 将它们归于弧菌属是恰当的。

2.4 Na⁺ 的需要和对 NaCl, pH 的耐受力试验 由液体和固体培养结果得知, 70 株菌均不需要 Na⁺ 就能良好生长和发光。对 NaCl 的耐受力试验表明, NaCl 浓度在 1% 时生长最好, 而在 8% 时为生长的上限; 在 5% 时仍生长和发光良好: 表明它们有

表 1 弧菌科的发光细菌的表型特性

Tab. 1 The phenotypic properties of luminous bacteria of Vibrionaceae

特 性	本文研究的 70株菌	明亮发光杆菌 <i>P. phospho- reum</i> ¹⁾	鳗鱼发光杆菌 <i>P. leiognathi</i> ¹⁾	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> ¹⁾	美丽弧菌生物型 <i>V. splendidus</i> ¹⁾	东方弧菌 <i>V. orientalis</i> ¹⁾	费氏弧菌 <i>V. fischeri</i> ²⁾	火神弧菌 <i>V. logei</i> ²⁾	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i> ²⁾
在固体培养基上的侧生鞭毛	-	-	-	86	-	-	-	-	-
在固体复合培养基上滑动	-	-	-	6	-	-	-	-	-
直的杆菌	-	+	97	+	-	-	+	+	D
PHB 的累积	+	+	+	-	-	+	-	-	-
精氨酸双水解酶	-	-	-	-	+	+	-	-	-
氧化酶	+	8	63	+	+	+	+	+	+
NO ₃ ⁻ 还原为 NO ₂ ⁻	-	91	93	+	+	+	+	+	+
发光	+	+	+	72	+	+	+	+	d
利用葡萄糖产气	-	90	7	-	-	-	-	-	-
形成3-羟基丁酮和/或二乙酰	+	85	10	-	-	-	-	-	+
生长时需要钠	-	+	+	+	+	+	+	+	-
需要有机生长因子	-	41	10	-	-	20	-	D	D
生长在:									
4°C	+	95	-	-	25	+	-	+	-
30°C	+	85	+	+	+	+	+	-	+
35°C	+	-	93	+	75	+	D	-	+
40°C	d	-	-	44	-	-	-	-	+
形成:									
淀粉酶	+	-	-	+	+	+	-	-	+
明胶酶	+	-	-	99	+	+	-	-	+
脂酶	+	-	80	+	+	+	+	D	+
几丁质酶	+	99	97	+	+	+	D	+	+
藻酸酶	+	-	-	31	50	-	-	-	-
利用:									
D. 核糖	+	62	93	+	+	+	+	+	+
L. 阿拉伯糖	d	-	-	5	-	-	-	-	-
D. 葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D. 甘露糖	+	+	+	+	+	+	+	D	D
D. 半乳糖	+	99	+	84	+	+	+	+	+
D. 果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	-	-	61	75	+	-	-	+
麦芽糖	+	99	-	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	-	-	+	+	+	+	+	-
水杨苷	+	-	-	55	-	-	D	-	-
葡萄糖酸	+	86	+	99	25	+	-	+	+
N. 乙酰葡萄糖胺	+	+	97	+	+	+	+	+	+
乙酸	+	-	83	93	75	+	-	-	+
丙酸	-	-	-	+	+	-	-	-	+
己酸	-	-	-	47	-	-	-	-	+
庚酸	-	-	-	93	+	-	-	-	-

续表 1

特 性	本文研究的 70株菌	明亮发光杆菌 <i>P. phospho- reum</i>)	鳕鱼发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>)	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>)	美丽弧菌生物型 <i>V. splendidus</i>)	东方弧菌 <i>V. orientalis</i>)	费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>)	火神弧菌 <i>V. logei</i>)	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>)
壬酸	d	—	—	84	—	—	—	—	D
癸酸	—	—	40	80	75	60	—	—	D
琥珀酸	+	80	83	+	+	+	+	+	+
延胡索酸	+	80	83	+	+	+	+	+	+
DL. 苹果酸	+	20	63	80	+	+	—	—	+
β-羟丁酸	+	—	—	—	—	+	—	—	—
DL. 乳酸	+	16	+	+	+	+	—	—	+
DL. 甘油羧	+	86	77	92	75	+	D	—	D
柠檬酸	+	—	—	91	+	+	D	—	D
α-酮戊二酸	+	—	d	91	+	—	—	—	+
丙酮酸	+	—	97	+	+	+	—	—	+
顺乌头酸	d	—	—	98	+	+	D	—	+
甘露醇	+	—	—	+	+	+	+	+	+
甘油	+	+	+	92	75	+	+	+	+
奎尼酸	d	—	—	d	75	—	—	—	—
甘氨酸	+	—	—	53	+	60	—	—	—
L. α-丙氨酸	d	24	63	74	+	+	—	—	—
L. 丝氨酸	+	37	77	85	+	80	—	D	D
L. 苏氨酸	+	11	43	+	+	+	D	—	D
L. 亮氨酸	+	—	—	—	—	—	—	—	—
L. 天冬氨酸	+	77	87	62	+	—	D	—	D
L. 谷氨酸	+	39	67	+	+	+	D	+	+
L. 组氨酸	+	—	—	11	50	+	—	—	D
L. 脯氨酸	+	d	97	+	+	+	+	+	+
L. 酪氨酸	+	—	—	+	75	—	—	—	—
腐胺	—	—	—	—	—	+	—	—	—
精胺	—	—	—	—	—	+	—	—	—
山梨醇	+	—	—	—	—	—	—	—	—
肌醇	d	—	—	—	—	—	—	—	—
对羟苯甲酸	d	—	—	—	—	—	—	—	—
产黄色素	+	—	—	—	—	—	+	+	—

+ 示所有的菌株为正反应;— 示所有的菌株为负反应;数值说明正反应菌株的百分数。d 正反应的菌株 <10%; D正反应菌株 11%—89%。以上 5 项注,表 2 与之同。1) 数据引自杨颐康等 (1984); 2) 数据引自 Baumann 等(1984)。

较强的耐高渗透压的能力。在 pH 值=6.5—11 范围内能生长和发光,尤其在 pH = 9 时生长和发光均佳。这又跟其它几种发光细菌的最适生长和发光 pH 的要求不同。

2.5 光谱特性和 G + C 摩尔百分数 从它们的生物发光光谱来看,峰值在 484nm 左右,发光峰半高宽约 90nm,发光频谱范围为 420—660nm,均与弧菌属的光谱特征相似(朱文杰等,1986)。

挑选 Q-67, Q-32 和 Q-54 三株菌提取其 DNA,采用荧光法 (Ulitzur, 1972) 测

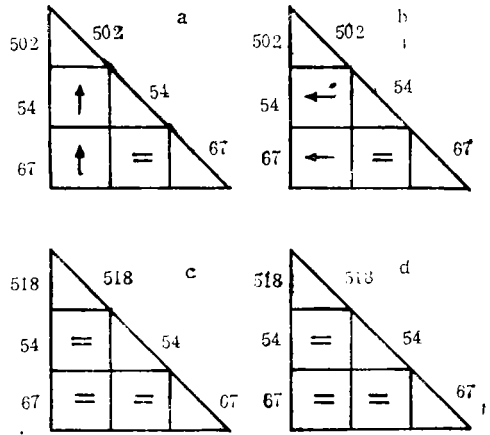


图 2 凝胶双向扩散试验结果

Fig. 2 The results of ouchterlony double diffusion experiments with anti-*Photobacterium* (a,c) and anti-*Vibrio* (b,d) antisera
a,c. 抗发光杆菌属的 SOD 抗体血清; b,d. 抗弧菌属的 SOD 抗体血清。箭头指向有矩的抗原。
502: *P. phosphoreum*; 518 *V. orientalis*; 54,67 *V. qinghaiensis* sp. nov.

定 G + C 摩尔百分数,平均为 $47.1 \pm 2\%$ 。

3 讨论与结论

3.1 定为新种的主要依据 这 70 株菌由于均能发酵 D-葡萄糖,故而不能归于另单胞菌属 (*Alteromonas*)。从免疫学的凝胶双向扩散试验和弧菌抑制剂 0/129 的抑菌结果来看,归于弧菌属是恰当的。它们的生物发光光谱特征也与弧菌属的各种发光细菌相似而与发光杆菌属的不同。分析这 70 株发光细菌的表型特性,与已知的发光细菌有明显差异(见表 1)。数值分析结果表明,它们与哈维氏弧菌和霍乱弧菌的相似性虽达 78%,但仍存在明显不同,主要表现在: 4°C 能生长;细胞内能累积聚 β -羟丁酸;产黄色素;能利用亮氨酸、山梨醇和 β -羟丁酸而不能利用丙酸;不能进行硝酸还原(表 2)。故而列为一新种,据采集地点而定名为青海弧菌 (*Vibrio qinghaiensis* sp. nov.)。典型菌株是 Q-67(图版 I:2),保藏于华东师范大学生物系。

值得指出的是,这是除了发光的 *Vibrio cholerae* biotype *albensis* 之外,迄今所知的又一不需要 Na^+ 就能生长和发光的发光细菌。初步的试验表明,它们为非致病菌,因而有着广泛的应用潜力。

3.2 新种的生态环境 由于仅从青海裸鲤体表分离到发光细菌,从湖水及湖边底泥中均未分到,青海裸鲤又是青海湖中唯一的鱼类,表明该发光菌与青海裸鲤的生态关系相当密切。70 株菌均不需要有机生长因子,它们能否在青海湖水中自由生存繁殖是值得深入研究的。

青海湖水的盐度比一般海水低,而 pH 值又较海水高,这些是青海湖的特殊水环境条件。盐度和 pH 耐力试验表明,新种完全适应青海湖的生境。对 Na^+ 的依赖是海洋细菌的重要特征,而新种青海弧菌却无需 Na^+ 就可良好生长和发光,显示了其独特的生理特性。由此可以认为,它们在生态适应方面也与海洋来源的各种发光细菌显著不同。

表 2 青海弧菌与弧菌属其它发光细菌的比较¹⁾

Tab. 2 Comparison among *V. qinghaiensis* and other luminous species of the genus *Vibrio*

特 性	青海弧菌	哈维氏 弧菌	霍乱弧菌	东方弧菌	美丽弧菌 I	火神弧菌	费氏弧菌
PHB 的累积	+	-	-	+	-	-	-
4°C 生长	+	-	-	+	2.5	+	-
40°C 生长	d	44	+	-	-	-	-
硝酸还原	-	+	+	+	+	+	D
产黄色素	+	-	-	-	-	+	+
产明胶酶	+	+	+	+	+	-	-
产藻酸酶	+	31	+	-	50	-	-
对 Na ⁺ 的需要	-	+	-	+	+	+	+
利用: 纤维二糖	+	+	-	+	+	+	+
β-羟丁酸	+	-	-	+	-	-	-
水杨苷	+	55	-	-	-	-	D
山梨醇	+	-	-	-	-	-	-
丙酸	-	+	+	-	+	-	-
甘氨酸	+	53	-	60	+	-	-
α-酮戊二酸	+	91	+	-	+	-	-
L-亮氨酸	+	-	-	-	-	-	-
L-酪氨酸	+	+	-	-	75	-	-

1) 所比较的其它发光细菌属种拉丁学名见表 1。

参 考 文 献

- 朱文杰、何学民、杨颐康, 1986, 海洋发光细菌的生物发光光谱, 发光学报, 7(1): 127—132。
 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。
 杨颐康等, 1984, 东海、黄海发光细菌的特性和一新种的描述, 海洋与湖沼, 15(3): 258—264。
 杨颐康、朱文杰、吴自荣, 1985, 利用超氧化物歧化酶免疫学研究确定东方弧菌和一些海洋细菌的关系, 微生物学报, 25(2): 91—97。
 Baumann, P. and Baumann, L., 1977, Biology of the marine enterobacteria: genera *Beneckea* and *Photobacterium*, *Ann. Rev. Microbio.*, 31: 31—61。
 Baumann, L. and Baumann, P., 1981, The marine gramnegative eubacteria, *The Prokaryotes*, ed. by Starr, M.P., et al., Springer-Verlag (New York, Heidelberg, Berlin), pp. 1302—1331。
 Baumann, P., Furniss, A.L. and Lee, J. V., 1984, Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 1, ed. by Krieg, N. R. and Holt, J.G., Williams & Wilkins (Baltimore, London), pp. 518—538。
 Sneath, P.H.A., 1972, Computer taxonomy, *Meth. Microbio.*, 7A, Academic Press (New York), pp. 29—98。
 Ulitzur, S., 1972, Rapid determination of DNA base composition by ultraviolet spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, 272: 1—11。

A NEW SPECIES OF LUMINOUS BACTERIA *VIBRIO QINGHAIENSIS* SP. NOV.

Zhu Wenjie, Wang Jie, Chen Xiaoyun, Zhaxi Ciren, Yang Yun, Song Ying

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062)

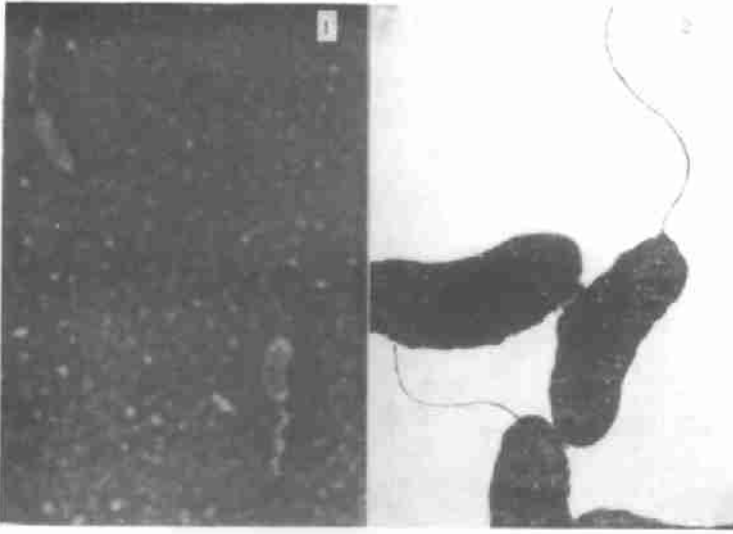
ABSTRACT

Seventy isolates of luminous bacteria were isolated in August, 1985 from body surfaces of the fish, *Gymnocypris przewalskii*, living in Qinghai Lake were subjected to extensive tests for their characterization. Antisera were applied to their superoxide dismutase and ouchterlony double diffusion experiment was carried out with some of the isolates. The bioluminescent spectra of these isolates *in vivo* were also researched.

All of the isolates were very similar in their phenotype, and can ferment D-glucose. Their growth was inhibited by 0/129. They had a polar flagellum, and were facultative anaerobic and Gram-negative. The results indicated that they were different from previously identified luminous bacteria species in some properties. They can grow well and emit light in media without sodium ions or any organic growth factors, can grow in media with 1%—8% of salt concentration and pH of 6.5—11. Their optimal growth salt concentration was 1%, and optimal growth pH was 9. They can accumulate PHB in their cells as an intracellular reserve product, yield yellow pigment in solid media at later stage of growth, and utilize many kinds of organic compounds as sole or principal sources of carbon and energy. They had a G + C content in their DNA of 47.1 mol%. The seventy isolates were assigned to the genus *Vibrio* and named *Vibrio qinghaiensis* sp. nov.. Strain Q-67 was designated as the type strain of this new species differing from the most related species *V. harveyi* as follows: growth at 4°C, growth in media without sodium ions, optimal growth salt concentration being 1%, ability to produce yellow pigment, to accumulate PHB in their cells, and to utilize β -hydroxybutyrate, L-leucine, L-tyrosine, sorbitol, but not propionate.

The type strain Q-67 is preserved in the Department of Biology, East China Normal University.

Key words Luminous bacteria *Vibrio* *Vibrio qinghaiensis* sp. nov.
Qinghai Lake



图版 I 新种青海弧菌 Q-67 菌株的显微照片

Plate 1 The micrograph of strain Q-67 of *Vibrio qinghaiensis* sp. nov. (1. Phase-contrast micrograph of Liefson flagella stains, $\times 6000$; 2. Electron micrograph of negative stains, $\times 20000$)

1. 利夫森鞭毛染色的相差显微照片, $\times 6000$; 2. 电子显微镜照片, 负染色, $\times 20000$ 。