

东海、黄海发光细菌的特性和一新种的描述*

杨颐康 保罗·巴乌曼¹⁾ 林达·巴乌曼¹⁾ 叶履平 朱文杰

吴自荣 曹蕴慧²⁾ 胡锡纲²⁾ 唐颂恩¹⁾ 布莱恩比曼¹⁾

(华东师范大学)

当前,海洋发光细菌的菌种有明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*)、鲷鱼发光杆菌 (*P. leiognathi*)、哈维氏发光弧菌 (*Vibrio harveyi*)、美丽发光弧菌生物型 I (*V. splendidus* biotype I)、费氏发光弧菌 (*V. fischeri*)、火神发光弧菌 (*V. logei*)、海氏另单胞菌 (*Alteromonas hanedia*)^[4]。除最后一种是专性好气性细菌外,前六种都是兼性厌氧性细菌。此外,在淡水和河口内的霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 中也有发光细菌^[7]。由于菌种鉴定方法的进展,导致一系列生理生态学的研究。近年来对不同菌种的季节性变化^[7,11]、细菌在不同深度的海水中的分布类型^[10]、环境因子对发光细菌的影响以及发光细菌与海洋动物共生的专一性等方面进行了研究^[2,8]。其中部分研究工作是在我国完成的^[1-3]。本文主要描述从东海、黄海中分离得到的发光细菌的特征,同时描述了海洋发光细菌一新种——东方发光弧菌 *V. orientalis* sp. nov.。

一、材料和方法

菌种 大部分取自东海我国舟山、黄海青岛,还有美国德克萨斯州格莱维斯顿 (Galveston) 岛,地中海的巴地维 (Bardawil) 咸水湖和海法 (Haifa)、埃拉特 (Eilat) 湾等地。

培养基 人工海水配方为 0.4M NaCl, 0.1M MgSO₄ · 7H₂O, 0.02M KCl 和 0.02M CaCl₂ · 2H₂O。基本培养基配方为含有 50mM Tris-HCl, pH7.5, 19mM NH₄Cl, 0.33mM K₂HPO₄ · 3H₂O, 0.1mM FeSO₄ · 7H₂O 和 1/2 浓度的人工海水。酵母膏肉汤培养基的成分是在基本培养基中加酵母膏 5 克。发光培养基是在基本培养基中再加 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 细胞形状、大小和运动,鞭毛染色,电镜观察,钠和生长因子的需要,生长温度,发光,碳水化合物的发酵和利用,硝酸还原,2,3 丁二醇的形成,胞外酶和精氨酸双水解酶的形成^[5,12],聚 β-羟丁酸在细胞内的累积等项目的实验方法是采用 Stanier 等的方法。除生长温度的测定外,所有实验都是在 25°C 下进行的。具体操作方法见文献 [5]。

发光细菌中 DNA 的 G + C 克分子百分比是通过 CsCl 密度梯度离心法测定的。

* 本实验是在巴乌曼 (Dr. Paul Baumann) 实验室进行的,由美国国家科学基金会给予资助,特此致谢。

1) 美国加利福尼亚大学戴维斯分校;

2) 国家海洋局第二海洋研究所(杭州)。

收稿日期: 1983年2月5日。

表 1 菌株编号, 分离来源和已定种名

菌株编号	已定名菌种	分离来源	研究者
651	<i>P. phosphoreum</i> A ₁	鱼体表 东海	杨颐康等
652	<i>P. phosphoreum</i> A ₂	鱼体表 东海	
653	<i>P. phosphoreum</i> B	鱼体表 东海	
657	<i>P. phosphoreum</i> D ₂	鱼体表 东海	
665	<i>P. phosphoreum</i> E	鱼体表 东海	
654—656		鱼体表 东海	
659—667		鱼体表 东海	
658		鱼体表 东海	
668—682		海水 东海	
714, 715		海水 黄海	
717, 718		海水 黄海	
716		虾 黄海	
719		虾 黄海	
683	<i>P. leiognathi</i> 180	海水 东海	曹蕴慧等
684	<i>P. leiognathi</i> 3292	海水 东海	
685—697		海水 东海	
698	<i>V. harveyi</i> 103	海水 东海	
700	<i>V. harveyi</i> 211	海水 东海	
701	<i>V. harveyi</i> 7032	海水 东海	
699		海水 东海	
703—706		海水 东海	
702	<i>V. harveyi</i> 614	海水 地中海 埃拉特	Yetinson
708	<i>V. harveyi</i> 53	海水 地中海 海法	
709	<i>V. harveyi</i> 66	海水 地中海 海法	
713	<i>V. harveyi</i> 509	海水 地中海 巴地维	
707	<i>V. harveyi</i> PRS-215	海水 格莱维斯顿岛	Sizemore
701	<i>V. harveyi</i> BAF-8	沉积物 格莱维斯顿岛	
711	<i>V. harveyi</i> BAK-7	海水 格莱维斯顿岛	
712	<i>V. harveyi</i> BBF-8	虾 格莱维斯顿岛	

表型特性的数值分析是根据 Sokal 和 Sneath 的方法进行的。

二、结 果

发光细菌菌株均能发酵 D-葡萄糖, 因此排除了另单胞菌属 *Alteromonas* 的可能性, 将这些菌株的表型特性和发光杆菌属与弧菌属的各代表菌株一起进行数值分析, 其结果列入图 1。所有的菌株都是从黄海、东海分离得到的, 将其归入明亮发光杆菌 *P. phosphoreum*、鲷鱼发光杆菌 *P. leiognathi*、哈维氏发光弧菌 *V. harveyi* 和美丽发光弧菌生物型 I *V. splendidus* biotype I。本实验中未包括费氏发光弧菌 *V. fischeri* 和火神发光弧菌 *V. logei*。

表 2 是从我国沿岸海水中分离得到的发光细菌的表型特性和以往所描述的海洋发光细菌的特性相比较的概要说明。显然, 以往鉴定的发光细菌与我国分得的 *P. phosphoreum*,

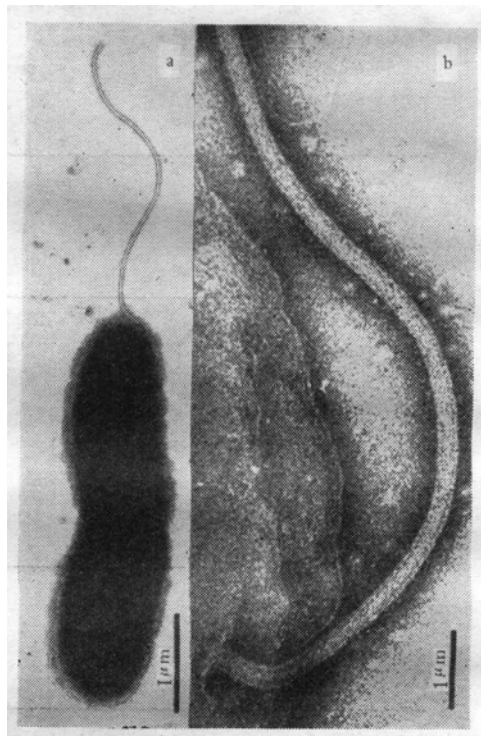
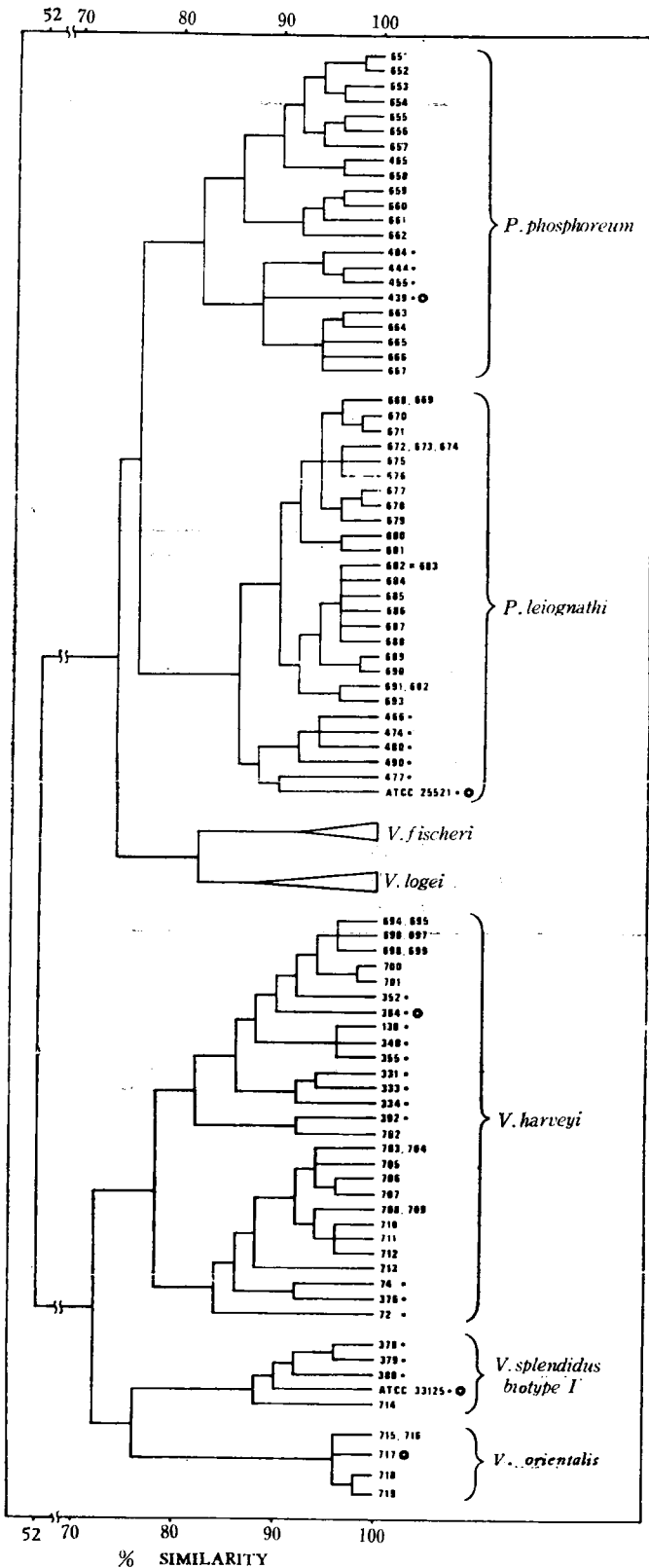


图 2 *Vibrio orientalis* 717 的电镜照片
 a. 细胞在液体培养基内生长,处于对数生长期 ($\times 17000$); b. 有鞘的鞭毛,其内芯由两条暗线画出。

表 2 海洋发光细菌菌株的表型特性

	明亮发光杆菌 <i>P. phosphoreum</i>		鳕鱼发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>		哈维氏发 光弧菌 <i>V. harveyi</i>		美丽发光弧 菌生物型 I <i>V. splendidus</i>		东方发光弧菌 <i>V. orientalis</i>	
	本文的 研究	前人 报道	本文的 研究	前人 报道	本文的 研究	前人 报道	菌株 517	前人 报道	5 菌株	典型菌株 717
菌株数目	17	79	26	30	20	85	1	4		
在固体培养基上的侧生鞭毛	-	-	-	-	90	86	-	-		
在固体复合培养基上游动	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-
直的杆菌	+	+	+	97	+	+	-	-	-	-
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	+	+	+	+
利用葡萄糖产气	94	90	39	7	-	-	-	-	-	-
形成3-羟基丁酮和/或二乙酰	71	85	4	10	-	-	-	-	-	-
生长时需要钠	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
需要有机生长因子	+	41	8	10	-	-	-	-	20	-
生长在:										
4°C	+	95	-	-	-	-	+	25	+	+
30°C	85	85	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	-	-	+	93	+	+	+	75	+	+
40°C	-	-	-	-	90	44	-	-	-	-
形成:										
淀粉酶	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
明胶酶	-	-	-	-	+	99	+	+	+	+
脂酶	-	-	81	80	+	+	+	+	+	+
几丁质酶	71	99	+	97	+	+	+	+	+	+
藻酸酶	-	-	-	-	10	31	-	50	-	-
利用:										
D. 核糖	88	62	+	93	+	+	+	+	+	+
L. 阿拉伯糖	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-
D. 葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D. 甘露糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D. 半乳糖	88	99	50	+	56	84	+	+	+	+
D. 果糖	+	+	96	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖	-	-	-	-	20	61	-	75	+	+
海藻糖	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	94	99	-	-	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
水杨苷	-	-	-	-	15	55	-	-	-	-
葡糖酸	59	86	96	+	+	99	-	25	+	+
D. 葡糖醛酸	47	52	-	-	95	+	+	+	-	-
N. 乙酰葡萄糖胺	+	+	+	97	+	+	+	+	+	+
乙酸	-	-	69	83	+	93	+	75	+	+
丙酸	-	-	-	-	55	+	-	+	-	-
己酸	-	-	-	-	-	47	-	-	-	-
庚酸	-	-	-	-	90	93	-	+	-	-

(续表 2)

菌株数目	明亮发光杆菌 <i>P. phosphoreum</i>		鳊鱼发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>		哈维氏发 光弧菌 <i>V. harveyi</i>		美丽发光弧 菌生物型 I <i>V. splendidus</i>		东方发光弧菌 <i>V. orientalis</i>	
	本文的 研究	前人 报道	本文的 研究	前人 报道	本文的 研究	前人 报道	菌株 517	前人 报道	5 株菌	典型菌 株 717
菌株数目	17	79	26	30	20	85	1	4		
癸烯酸	-	-	-	-	10	67	-	-	-	-
壬酸	-	-	-	-	85	84	-	-	-	-
癸酸	-	-	-	40	95	80	-	75	60	+
琥珀酸	82	80	+	83	+	+	+	+	+	+
延胡索酸	82	80	+	83	+	+	+	+	+	+
DL. 苹果酸	35	20	-	63	90	80	+	+	+	+
DL. β -羟丁酸	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
DL. 乳酸	29	16	+	+	+	+	+	+	+	+
DL. 甘油酸	-	86	-	77	+	92	-	75	+	+
柠檬酸	-	-	-	-	+	91	+	+	+	+
α -酮戊二酸	-	-	-	3	+	91	+	+	-	-
丙酮酸	-	-	89	97	+	+	+	+	+	+
顺乌头酸	-	-	-	-	+	98	+	+	+	+
甘露醇	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
甘油	+	+	+	+	+	92	+	75	+	+
奎尼酸	-	-	-	-	20	5	+	75	-	-
甘氨酸	-	-	-	-	85	53	+	+	60	+
L. α -丙氨酸	76	24	+	63	55	74	+	+	+	+
D. α -丙氨酸	-	-	-	-	90	99	+	+	+	+
L. 丝氨酸	88	37	96	77	95	85	+	+	80	+
L. 苏氨酸	71	11	4	43	+	+	+	+	+	+
L. 亮氨酸	-	-	-	-	55	-	-	-	-	-
L. 天冬氨酸	47	77	92	87	+	62	+	+	+	+
L. 谷氨酸	41	39	-	67	+	+	+	+	+	+
L. 组氨酸	-	-	-	-	85	11	+	50	+	+
L. 脯氨酸	71	6	19	97	+	+	+	+	+	+
L. 酪氨酸	-	-	-	-	+	+	+	75	-	-
腐胺	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
精胺	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

注: a. + 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。

b. 数据来自参考资料。

c. + 示直的杆菌; - 示弯曲的杆菌。

d. 能利用奎尼酸的菌株通过间分裂途径降解代谢的中间产物原儿茶酸。

P. leiognathi, *V. harveyi*, *V. splendidus* biotype I 的菌株没有多大差别。其小的差别之一是从我国分得的明亮发光杆菌 *P. phosphoreum*、鳊鱼发光杆菌 *P. leiognathi* 不能利用 DL-甘油酸,而在以往的鉴定中,该两种菌各有 86% 和 77% 的菌株可以利用 DL-甘油酸。另一差别是我们分得的哈维氏发光弧菌 *V. harveyi* 有 55% 的菌株能利用 L-亮氨酸,而过去分得的哈维氏发光弧菌却不能利用这种氨基酸。后者是 Sizemore^[9] 和 Yetinson^[13] 分别从美国德克萨斯州和以色列沿海分离获得的。

在我国近海发现了美丽发光弧菌生物型 I *V. splendidus* biotype I 的一株新菌株 (714)。这一菌种的生物型是很罕见的, 以往仅发现 4 株, 均来自美国麻省和荷兰沿海。

菌株 715—719 在 9—32 个特性上和所有已知的弧菌和发光杆菌属的种都是不同的, 其数值分析结果和弧菌属的各个种的代表菌株数据列入图 1。最近描述过的 4 种弧菌, 虽然所用的方法和我们不同, 而且测定项目也有限, 但在表型特性方面很明显和菌株 715—719 是不同的^[6]。

菌株 717 的电镜观察见图 2a, 2b。这菌株象所有的弧菌属的种一样有带鞘的极毛, 其直径为 27nm, 中轴为 15nm。

菌株 715, 717, 719 的 G + C 克分子百分比分别为 45.8%, 45.4% 和 45.3%。

三、讨 论

通过广泛地研究发光细菌的表型特征, 说明大多数从东海、黄海我国近海分离得到的海洋发光细菌属于明亮发光杆菌 *P. phosphoreum*、鲷鱼发光杆菌 *P. leiognathi*、哈维氏发光弧菌 *V. harveyi* 和美丽发光弧菌生物型 I *V. splendidus* biotype I, 这些结果与我国学者以往的研究成果是一致的。

值得注意的是发现了美丽发光弧菌生物型 I *V. splendidus* biotype I 的又一菌株 (714)。以前仅从美国、荷兰获得 4 株。

由菌株 715—719 所组成的类群。其形态特性, 具有带鞘的极毛和 DNA 的 G + C 克分子百分比为 45.46%, 以及根据一般的生理特性, 兼性厌氧、发酵 D-葡萄糖而不产生气体、氧化酶正反应、生长需要 NaCl, 这些菌株应属于弧菌属 (*Vibrio*) (这个结论也为以后的 S. O. D 的免疫学研究所证实)。这些菌株和常见的海洋细菌, 如哈维氏发光弧菌 *V. harveyi*、溶藻酸弧菌 *V. alginolyticus*、美丽发光弧菌生物型 I *V. splendidus* biotype I 也相接近。但菌株 715—719 的表型特性说明与弧菌属的其它菌种不同。对这一群菌株, 我们命名为东方发光弧菌 (新种) *Vibrio orientalis* sp. nov.。菌株 717 为典型菌株。

东方发光弧菌 *V. orientalis* 是多食性的, 能利用 37—39 种不同的有机化合物作唯一的或主要的碳源和能源。它是唯一被记载的能在体内积聚 β -羟丁酸作为细胞内的储藏物的发光弧菌菌种。它还能利用 β -羟丁酸 (D. L- β -hydroxybutyrate)、腐胺 (putrescine) 和精胺 (spermine) 作为唯一的碳源和能源。此外, 它具有淀粉酶、精氨酸双水解酶系统、能在 4°C 生长, 40°C 时则不能生长, 并能利用蔗糖和纤维二糖, 但不能利用葡萄糖醛酸 (Glucuronate)、 α -酮戊二酸 (α -ketoglutarate) 和 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyrate) 作为主要的和唯一的碳源和能源。综合上述 6—10 个特性, 可以把东方发光弧菌 *V. orientalis* 同弧菌属和发光杆菌属的其余细菌区分开来。值得一提的是这个菌种迄今为止仅在黄海我国近海分离得到。

参 考 文 献

- [1] 杨颐康、叶履平、唐法尧, 1980。发光细菌的分离培养和鉴定。上海师范大学学报 3: 87—92。
- [2] 杨颐康、唐法尧、叶履平等, 1981。环境因子对发光细菌的生长和发光的影响。海洋与湖沼 12(3): 249—252。
- [3] 曹蕴慧、胡锡纲, 1982。长江口发光细菌的分布和组成。海洋学报 4(1): 89—94。
- [4] Baumann, P. and L. Baumann, 1977. Biolog of the marine enterobacteria: Genera *Benecke*

- and *Photobacterium*. *Annual Review of Microbiology* **31**: 39—61.
- [5] ——— and ———, 1981. The Marine Gram negative Eubacteria. In: Starr. M. P, H. Stalp. H. G. Trüper et al "The Prokaryotes" Chapter 104. Springer-Verlag, pp. 1302—1331.
- [6] Davis, B. R., G. R. Fanning and J. M. Madden et al, 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *Journal of Clinical Microbiology* **14**: 631—639.
- [7] Desmerchelier, P. M. and J. L. Reichelt, 1981. Phenotypic characterization of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* from Australia. *Current Microbiology* **5**: 123—127.
- [8] Nealson, K. H. and J. W. Hastings, 1979. Bacterial bioluminescence; its control and ecological significance. *Microbiological Reviews* **43**: 496—518.
- [9] O'Brien, C. H. and R. K. Sizemore, 1979. Distribution of the luminous bacterium *Beneckea harveyi* in a semi tropical estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology* **38**: 928—933.
- [10] Ruby, E. G., E. P. Greenberg and J. W. Hastings, 1980. Planktonic marine luminous bacteria: Species distribution in the water column. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 302—306.
- [11] ——— and K. H. Nealson, 1978. Seasonal changes in the species composition of Luminous bacteria in nearshore seawater. *Limnology and Oceanography* **23**: 530—533.
- [12] Thornley, M. J., 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Bacteriology* **23**: 37—52.
- [13] Yetinson, T. and M. Shilo, 1979. Seasonal and geographic distribution of luminous bacteria in the Eastern Mediterranean Sea and the Gulf of Elat. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 1230—1238.

CHARACTERISTICS OF MARINE LUMINOUS BACTERIA FROM THE WATERS OF THE EAST CHINA SEA AND HUANGHAI SEA AND DESCRIPTION OF A NEW SPECIES

Yang Yikang, Paul Baumann¹⁾, Linda Baumann¹⁾, Ye Lüping, Zhu Wenjie, Wu Zirong, Cao Yuhul²⁾, Hu Xigang²⁾, Jane Sung-en Tang¹⁾ and Blaine Beaman¹⁾

(East China Normal University, Shanghai)

Abstract

Luminous strains of marine bacteria isolated from the Coastal water of China, were subjected to a test of their ability to utilize 82 organic compounds as sole or principal sources of carbon and energy. A numerical analysis of the data revealed five clusters which were readily identified as *Photobacterium phosphoreum*, *P. leioghathi*, *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* biotype I. The remaining cluster of luminous isolates was phenotypically distinct from all the previously described species of *Vibrio* and *Photobacterium*, and was given the species designation *Vibrio orientalis*. This species differed from all of the other luminous species of *Vibrio* in its ability to accumulate poly- β -hydroxybutyrate as an intracellular reserve product. Additional distinctive properties were the presence of an arginine dihydrolase system, growth at 4°C but not 40°C, and the ability to utilize putrescine and spermine.

1) University of California, Davis, Calif. U.S.A.

2) Second Institute of Oceanography, National Bureau of Oceanography. Hongzhou, China.