

渤海海域发光细菌的分离鉴定

黄学斌 郑幼霞^① 朱文杰^② 杨颐康^②

(安徽大学生物系, 合肥 230039)

(^①中国科学院上海植物生理研究所, 200032)

(^②华东师范大学生物系, 上海 200062)

收稿日期 1990年6月19日

关键词 海洋发光细菌, 弧菌属, 细菌鉴定, 无钠生长

提要 本文对渤海分离的 48 株发光细菌, 从形态、生理生化、免疫学等方面进行了鉴定, 发现它们是同一个种, 均属弧菌属, 具有广食性和无 Na⁺ 生长两个显著特征。

目前共有 10 种发光细菌, 其中 *V. cholerae* 和 *X. Luminescens* 属淡水型, 其余 8 种均是海洋细菌, 且无 Na⁺ 不能生长^[1]。本文报道的 48 株发光细菌是 1987 年夏从渤海分离出的。

I. 材料与方法

1.1. 菌种

所有菌株均取自渤海海岸, 菌株编号及来源见表 1。

表 1 菌株编号与分离来源

Tab. 1 The serial number and source of isolated strains

菌株编号*	分离来源
8701~8709	鱼肠
8710~8711	鱼体表
8712~8714	虾体表
8715~8727	海水
8728~8736	虾体表
8737~8741	海水
8742~8748	120.5°E 38.0°N 海域

* 8737~8741 从营口分得; 8728~8736 从天津分得; 其余均从秦皇岛分得。

1.2. 培养基

人工海水 (ASW) 配方为 0.4mol NaCl, 0.1mol MgSO₄ · 7H₂O, 0.02mol KCl, 0.02mol CaCl₂ · 2H₂O。基本培养基 (BM) 配方为 0.05

mol Tris-HCl, 19mmol NH₄Cl, 0.33 mmol K₂HPO₄ · 3H₂O, 0.1mmol FeSO₄ · 7H₂O 和 1/2 浓度的 ASW, 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% 的琼脂即为固体培养基。

1.3. 表型特性的测定

细胞的形状、大小, 鞭毛的染色及观察, 钠和生长因子的需要, 发光、色素的产生, 碳水化合物发酵和利用, 硝酸盐还原, 氧化酶、胞外酶、精氨酸双水解酶的形成等项目的测定, 均采用 Baumann 的方法^[4]。V. P. 反应, 聚 β-羟基丁酸在细胞内的积累, 采用 Stanier 等人的方法^[1,4]。培养温度均为 25℃。

1.4. 凝胶双向扩散试验

超氧化物歧化酶 (SOD_s) 的提取、活力测定均采用杨颐康^[2]等人的方法。实验所用的 *V. splendidus* II₂ 和 *P. leiognathi* 抗血清由华东师范大学生物系微生物实验室提供。

1.5. 对弧菌抑制剂敏感性试验

用菌液涂平板, 在平板上贴上剂量分别为 10 μg 和 150 μg 的弧菌抑制剂 0/129 (2,4—二氨—6,7—二异丙基嘧啶) 纸片, 25℃, 培养 2d, 观察纸片周围的抑菌圈。

II. 结果与讨论

本文鉴定的菌株均能发酵葡萄糖产酸,不能在淡水培养基中生长,体内不能积累聚 β -羟基丁酸,因此排除了 *Alteromonas*, *Xenorhabdus*, *V. cholerae* 和 *Photobacterium* 的可能性。这些菌株性状相似,只有个别性状上有差异,弯曲杆状(图略),以极生鞭毛运动,革兰氏阴性,兼性厌氧,化能有机营养,不能进行反硝化,氧化酶正反应,不需要生长因子,所有菌株

表2 代表菌株对弧菌抑制剂敏感性试验结果

Tab. 2 Results of testing whether representative strains were sensible to vibrio inhibitor O/129

抑制圈直径 (mm)	每片含量	10 μ g	150 μ g
菌株号			
对照(发光杆菌)		无	无
8701		16	19
8748		16	18.5

都能在 20℃, 30℃ 生长, 对弧菌抑制剂敏感

表3 本文鉴定的海洋发光细菌与国外报道的海洋发光细菌表型特性的比较^[9]

Tab. 3 Comparison of phenotypic characterization of the marine luminous bacteria identified on this paper and those described abroad

比较项目	菌株分类 本文鉴定 菌株 8701~8748	明亮发光 杆菌	鳀鱼发光 杆菌	哈维氏 弧菌	美丽弧菌 生物型 I	费氏弧菌	火神弧菌	东方弧菌
菌株数目	48	26	12	91	4	12	11	5
在固体培养基上侧生鞭毛	—	—	—	+	—	—	—	—
直的杆菌	—	+	+	—	—	—	—	—
PHB 的积累	—	+	+	—	—	—	—	+
精氨酸双水解酶	—	—	—	—	+	—	—	+
NO ₃ ⁻ 还原为 NO ₂ ⁻	+	+	+	+	+	d	+	+
发光	+	+	+	+	+	+	+	+
利用葡萄糖产气	—	+	—	—	—	—	—	—
氧化酶反应	+	—	+	+	+	+	+	+
形成 3-羟基丁酰/或二乙酰	—	+	+	—	—	—	—	—
生长时需要 Na ⁺	—	+	+	+	+	+	+	+
需要有机生长因子	—	—	—	—	—	—	—	—
生长在: 4℃	—	+	—	—	d	—	+	+
30℃	+	+	+	+	+	+	—	+
35℃	+	—	+	+	d	d	—	+
40℃	—	—	—	d	—	—	—	—
形成: 明胶酶	+	—	—	+	+	—	—	+
淀粉酶	+	—	—	+	+	—	—	+
脂肪酶	+	+	—	+	+	+	d	+
几丁质酶	+	+	+	+	+	d	+	+
海藻酸酶	+	—	—	d	d	—	—	—
利用: 葡萄糖果糖 N-乙酰葡萄糖胺	+	+	+	+	+	+	+	+
D-核糖	d	d	+	+	+	+	d	+
D-甘露糖	+	+	+	+	+	+	d	+
D-半乳糖	+	+	+	d	+	+	+	+
D-木糖	+	—	—	—	—	—	—	+
海藻糖	+	—	—	+	+	d	—	+
蔗糖	+	—	—	d	d	—	—	+
水杨	+	—	—	d	—	d	—	—
麦芽糖	+	+	—	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	—	—	+	+	+	+	+

续表

比较项目	菌株分类	本文鉴定 菌株 8701~8748	明亮发光 杆菌	鲑鱼发光 杆菌	哈维氏 弧菌	美丽弧菌 生物型 I	费氏弧菌	火神弧菌	东方弧菌
葡萄糖酸		+	d	+	+	d	-	+	+
D-葡萄糖醛酸		+	-	-	+	+	-	-	-
乙酸		+	-	+	+	d	-	-	+
丙酸		+	-	-	+	-	-	-	-
己酸		+	-	-	d	-	-	-	-
庚酸		-	-	-	+	+	-	-	-
辛酸		-	-	-	d	-	-	-	-
壬酸		-	-	-	d	-	-	-	-
癸酸		-	-	-	d	d	-	-	+
DL-苹果酸		+	d	d	-	+	-	-	+
β -羟丁酸		-	-	-	+	-	-	-	+
DL-乳酸		+	d	+	+	+	-	-	+
柠檬酸		+	-	+	+	+	d	-	+
α -酮戊二酸		+	-	-	-	+	-	-	-
肌醇		+	-	-	-	-	-	-	+
γ -氨基丁酸		+	-	-	d	-	-	-	+
阿拉伯糖		+	-	-	-	-	-	-	-
丙二酸		+	-	-	+	-	-	-	+
顺乌头酸		+	-	-	-	+	d	-	+
腐胺		+	-	-	-	-	-	-	+
酒石酸		+	-	-	+	-	-	-	+
甘油酸		+	-	-	+	d	d	-	+
琥珀酸		+	d	+	+	+	+	+	+
延胡索酸		+	d	+	+	+	+	+	+
DL-丙氨酸		+	d	d	+	+	-	-	+
L-丝氨酸		+	d	d	d	+	-	d	+
L-苏氨酸		+	d	d	+	+	d	-	+
L-天冬氨酸		+	-	-	d	+	d	-	+
L-谷氨酸		+	d	d	+	+	d	+	+
L-组氨酸		+	-	-	d	d	-	-	+
L-色氨酸		+	-	-	+	d	-	-	+
L-脯氨酸		+	-	+	+	+	+	+	+
鼠李糖、马尿酸、苯甲酸、苯乙酸		-	-	-	-	-	-	-	-
乳糖、密二糖、D-半乳糖醛酸、戊糖、 戊二酸、D-山梨醇、对羟基苯甲酸、 β -丙氨酸、肌氨酸、L-亮氨酸		+	-	-	-	-	-	-	-

(见表 2), 完全符合弧菌属的特征^[9] (见表 3)。凝胶双向扩散试验结果见图 1~3。代表菌株 8701 和 8748 和弧菌之间形成的沉淀线是光滑的, 和发光杆菌之间形成的沉淀线有距, 这表明它们和弧菌具有相同的抗原决定基, 亲缘关系相近同属; 它们和发光杆菌抗原部分一致, 有距的抗原决定因子较多, 两者亲缘关系较远, 异属。与以上表型特征鉴定结果一致。

本文鉴定的发光细菌能利用 48 种以上不同化合物作为唯一碳源和能源, 远比其它发光细菌利用碳源的能力强, 和弧菌属其它发光弧菌的表型相似性较差, 与它们的标准菌株哈维氏弧菌 ATCC 14126 菌株^[6], 美丽弧菌生物型 IATCC 33125 菌株^[7], 费氏弧菌 ATCC 7744 菌株^[8], 火神发光弧菌 ATCC 29985 菌株^[9], 东方弧菌 717 菌株^[10] 的相似性 (用 Sokal

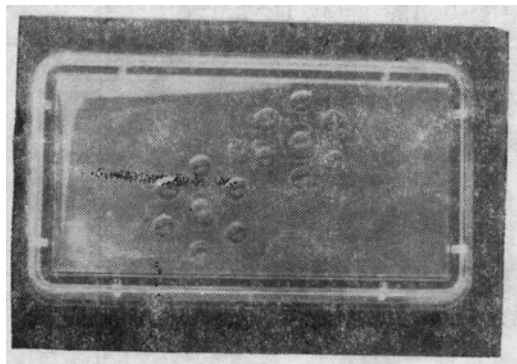


图1 凝胶双向扩散试验结果
Fig. 1 Results of ouchterlong double diffusion experiments

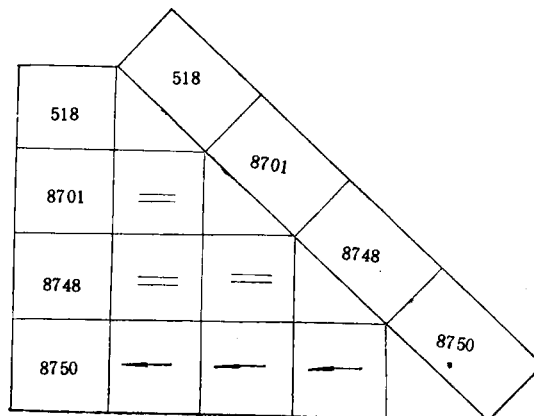


图2 用 *V. splendidus* II 2 抗血清与各株 SOD 抗原进行凝胶双向扩散试验的结果
Fig. 2 Summary of the results of ouchterlong double diffusion experiments with anti-*V. splendidus* II 2 and SOD of other strains
518 是东方弧菌; 8750 是发光杆菌。 “=”表示两抗原的决定因子相同; “↑”表示两抗原的决定因子部分相同, 箭头指向有矩的抗原。

和 Michener 的符合系数 S_{SM} 表示: $S_{SM} = \frac{\text{阳性和阴性的符合总和}}{\text{总测定数}} \times 100\%$ 分别为百分之 63, 65, 51, 40, 68; 另外, 它们无 Na^+ 也能生长, 这在国内外还是首次发现。由于本文鉴定的发光细菌具有与其他发光弧菌相似性差, 且无 Na^+ 仍能生长这两大特性, 故认为它们可能是弧菌属的一个新种, 证据尚不充分, 待今后继续研究。

参考文献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1978。一般细菌常用鉴定方法。科学出版社, 126~151。
- [2] 杨颐康等, 1986。利用凝胶双向扩散试验研究海洋发光细菌的分类关系, 海洋科学 10(1): 5~9。
- [3] 杨颐康等, 1984。东海、黄海发光细菌的特性和一新种的描述, 海洋与湖泊 15(3): 258~264。
- [4] 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, 1302-1331.
- [5] Krieg, N. R., Holt, J. G., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 516-550.
- [6] Reichelt, J. L. and P. Baumann, 1973. Taxonomy of

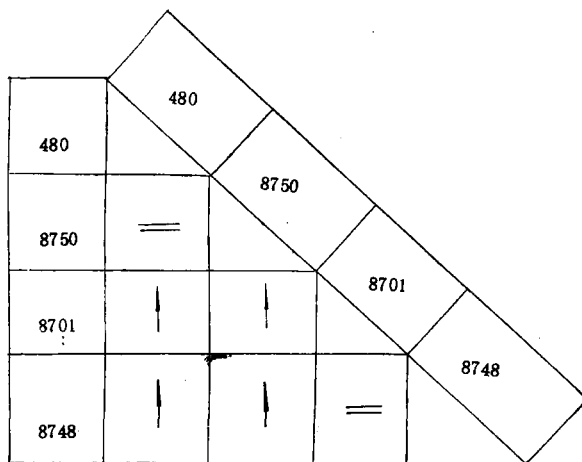


图3 用 *P. leiognathi* 480 抗血清与各株 SOD 抗原进行凝胶双向扩散试验的结果
Fig. 3 Summary of the results of ouchterlong double diffusion experiments with anti-*P. leiognathi* 480 and SOD of other strains
480——鳀鱼发光杆菌

- the marineluminous bacteria. *Arch Mikrobiol*, 94: 320.
- [7] Reichelt, J. P. Baumann and L. Baumann, 1976. Study of genetic relationship among marine species of the genera *Beneckea* and *Photobactrium* by means of in vitro DNA/DNA hybridization, *Arch. Microbiol*. 110: 114.

- [8] Reichelt, J. L. and P. Baumann, 1973. Taxonomy of the marine luminous bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 94: 322.
- [9] Bang, S. S., P. Baumann and K. H. Nealson, 1978. a phenotypic characterization of photobacterium logei (sp. nov.) a species related to *P. fischeri*. *Curr. Microbiol.* 1: 287.
- [10] 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 china and description of vibrio orientalis sp. nov. *Curr. Microbiol.* 8: 95-100.

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MARINE LUMINOUS BACTERIA FROM THE WATERS OF THE BOHAI SEA

Huang Xuebin, Zheng Youxia^①, Zhu Wenjie^②, and Yang Yikang^②

(Department of Biology of Anhui University, Hefei 230039)

(^①Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica 200062)

(^②Department of Biology of East China Normal University, Shanghai, 200062)

Received: Jun. 19, 1990

Key Words: Marine luminous bacteria, *Vibrio* sp., Bacterium identification

Abstract

48 strains of marine luminous bacteria isolated from the waters of the Bohai Sea were subjected to a phenotypic characterization, which included tests of their ability to utilize 57 organic compounds as sole sources of carbon and energy. Antigenic determinant divergence of superoxide dismutases (SOD_s) from 2 representative strains was also determined by Ouchterlony double diffusion. A further test was performed to determine sensibility to *Vibrio* inhibitor O/129. These results were in agreement with the *Genus vibrio* phenotypically except that they differed from all other luminous strains of *Vibrio* by its ability to utilize a great many organic compounds as sole sources of carbon and energy and grew in the absence of Na⁺. The data are not sufficient to confirm these bacteria to be new.