

盐单胞菌属一新种的分离与鉴定*

朱凤玲^{1,2}, 曲凌云^{1,2*}, 洪旭光^{1,2}, 赖其良³,
张进兴^{1,2}, 孙修勤^{1,2}

(1. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 2. 国家海洋局 海洋生态环境科学与工程重点实验室, 山东 青岛 266061;
3. 国家海洋局 第三海洋研究所海洋生物遗传重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:对即墨市大桥盐场的底泥样本进行微生物的可培养研究, 分离出 1 株革兰氏阴性的中度嗜盐菌 YCSA28^T。16S rRNA 序列比对及系统发育分析结果表明, YCSA28^T 可能为 γ -变形菌纲盐单胞菌属的新种, 通过系统分类学研究发现, YCSA28^T 的 16S rRNA 序列与亲缘关系最近的盐单胞菌属模式菌株 *Halomonas ventosae* Al12^T 同源性为 96.9%, 其 GenBank 注册号为 FJ984862。YCSA28^T 的荷兰细菌保藏中心受理序号为 NCCB 100305^T, 中国普通微生物保藏管理中心受理序号为 CGMCC 1.9150^T。YCSA28 菌落为乳黄色, 细胞杆状或短杆状, 周生鞭毛。生长温度范围为 5~40℃, 生长 pH 值范围为 6.0~9.0, 生长绝对盐度 (NaCl) 范围为 2%~15%。氧化酶/过氧化氢酶阳性。辅酶 Q-9 为主要的呼吸醌, 主要脂肪酸为 C_{18:1} ω 7c (42.88%), C_{16:0} (23.05%) 及 C_{16:1} ω 7c/ ω 6c (18.00%)。菌株 YCSA28^T 染色体 DNA 的 $x(G+C)$ 为 63.7%~63.9%, 与模式菌株 *Halomonas ventosae* Al12^T 间的 DNA-DNA 杂交率为 (45 \pm 3)%。结合各种形态及生理生化特征可知, YCSA28^T 应为盐单胞菌属一新种, 建议命名为大桥盐单胞菌 (*Halomonas daqiaonensis* sp. nov.)。

关键词:盐单胞菌; 新种; 鉴定

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2011)02-0221-08

我国北方广泛分布着大面积的盐碱地、盐湖、盐场等, 这些极端环境中生存的微生物由于长期适应环境, 因此形成了极为特殊的生理机制, 并产生多种特殊的活性物质等, 具有很高的研究和利用价值。本研究对采自即墨大桥盐场的泥土样品进行了微生物类群可培养研究, 共分离出 12 个属, 包括假单胞菌属、黄杆菌属、盐单胞菌属、海单胞菌属等。其中分离培养获得一株中度嗜盐菌 YCSA28^T, 经初步鉴定疑似盐单胞菌属的新种, 对其进行了各种形态及生理生化特征的研究。

盐单胞菌属 (*Halomonas*) 属于盐单胞菌科, 即革兰氏阴性、好气杆菌和球菌类群中的一个属^[1]。该属是 1980 年 Vreeland 等鉴定出伸长盐单胞菌 (*Halomonas elongate*) 时首次提出的^[2]。盐单胞菌属为革兰氏阴性菌群, 大都为杆状^[3], 是一类能在绝对盐度 (NaCl) 为 0~32% 条件下生长的耐盐细菌。

近年来, 国内外不断有一些关于盐单胞菌新种的报道, 并做了较为详细的种属鉴定与生理生化特征等方面的研究^[4-5]。该属细菌都为好氧菌, 但在硝酸盐存在时部分菌株可以厌氧生长^[6]。菌落颜色多为白色到黄色之间。盐单胞菌属菌株的主要脂肪酸为 C_{16:1}, C_{17:0} cyclo, C_{16:0}, C_{18:1} 和 C_{19:0} cyclo, 这也是该属特征之一。另外, 该属菌株的主要呼吸醌是辅酶 Q-9^[6], 染色体 DNA 的 $x(G+C)$ 含量变动较大, *Halomonas halocynthiae* 为 54%, 而 *Halomonas ventosae* 为 74.3%^[7]。目前报道的盐单胞菌属细菌都生长在高盐环境,

* 收稿日期: 2010-06-17

资助项目: 国家科技基础平台工作项目——近海海洋微生物资源的标准化整理整合与共享 (2004DKA30640); 国家自然科学基金项目——海洋多重耐药菌新种 DQHS4 分类地位的确定及其耐药基因结构和水平传递的分析 (41006103); 国家海洋局第一海洋研究所基本科研业务费专项资金项目——海洋多重耐药菌新种 DQHS4 分类地位确定及其耐药基因结构和水平传递的分析 (GY02-2011G24)

作者简介: 朱凤玲 (1986-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物学方面研究。E-mail: z363065589@163.com

* 通讯作者, E-mail: qly@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

如盐场和盐湖^[8]、盐水湿地^[7]、盐渍土^[9]、海水^[10]、海生生物^[11]、深海热液喷口^[12]、盐碱地^[13]。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

菌株 YCSA28^T 分离自即墨市大桥盐场的泥土样本中,模式菌株 *Halomonas ventosae* Al12^T 来源于中国海洋微生物菌种保藏管理中心。

1.2 仪器及试剂

所用仪器主要有恒温振荡培养箱(HZQ-X100),厌氧盒(日本三菱化学株式会社),厌氧产气包(BioMerieux Genbox),722型分光光度计(上海光学仪器厂),PCR仪(Biometra UNO II),凝胶电泳仪(BG-Power 600),BioLoG微生物自动分析系统(BioLoG Microstation),全自动脂肪酸鉴定系统(MIDI, Inc),色谱串联质谱联用仪(Agilent 6320),C18柱(Eclipse XDB-C18,4.6 mm×150 mm)。

试剂主要有 API 20NE、ZYM 试纸条(法国梅里埃公司),BioLoG GN2 板(美国 Biolog 公司),基因组 DNA 提取试剂盒(东盛生物),2×HSTMTaq mix(东盛生物),所用引物由上海桑尼生物技术公司合成。

1.3 菌株分离纯化

取约 1 g 泥土样品悬浮于 100 mL 的无菌海水中,梯度稀释后取 50 μL 涂布于 MH 固体培养基(海水:1 L;蛋白胨:5 g;酵母提取物:10 g;葡萄糖:10 g;琼脂:15 g;调 pH 至 7.5)^[14],30 °C 培养 7 d。挑取单菌落接种于 MH 固体培养基转接 3 次至纯种。

1.4 形态特征观察

将菌株接种于 MH 平板上 30 °C 培养 2 d,观察菌落颜色及形态。细胞形态、有无鞭毛及细胞大小特征用光学显微镜与电子显微镜结合观察,并从平板上挑取单菌落按标准方法进行革兰氏染色观察,以及检测胞外多糖和类脂粒的产生情况。

1.5 生理生化特征测定

1.5.1 需氧性测试

将菌株 YCSA28^T 涂布于 MH 固体培养基后分别于厌氧盒(加入厌氧产气包)及有氧条件下培养,30 °C 培养 15 d 后观察菌株生长情况。

1.5.2 绝对盐度(NaCl)、温度及 pH 值耐受性试验

以 MH 液体培养基为基础培养基,分别配置成不同的盐度(NaCl, w/v)及 pH 值梯度的培养基,接种后振荡培养 7 d,取培养液用分光光度计在 600 nm 波长下检测菌株的生长密度。实验设置的温度梯度为 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 38, 40, 42 及 45 °C。当实验温度为 30 °C 时,绝对盐度(NaCl)梯度为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 15.0, 20.0, 25.0 及 30.0%, pH 值梯度为 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 及 12.0。

1.5.3 药敏试验

将 YCSA28^T 与 *Halomonas ventosae* Al12^T 涂布于 MH 固体培养基,放置氨苄青霉素等 20 种药敏试纸,30 °C 培养 1~2 d 后观察有无抑菌圈。

1.5.4 其他生理生化特征测定

采用 API 20NE, API ZYM 试纸条和 Biolog GN2 微孔板对 YCSA28^T 的生理特性进行测定,在本研究

中模式菌株 *Halomonas ventosae* Al12^T 作为对照同时进行了上述生理特性的测定。每个菌株设定 2 个重复,将所有测试液的盐度用 NaCl 调整为 3.0%(w/v),操作步骤按使用说明完成。

同时,结合了传统的鉴定方法对 YCSA28^T 的接触酶、氧化酶的特征、胞外多糖和类脂粒的产生情况、硝酸盐还原、亚硝酸盐产气、葡萄糖发酵、甲基红、VP、吐温 20、吐温 80 等生理生化指标进行了测试^[15]。

1.6 脂肪酸分析及呼吸醌测定

菌株 YCSA28^T 在 MH 固体培养基平板上 30 °C 培养 3 d,取菌苔皂化、萃取脂肪酸,采用 MIDI 系统进行脂肪酸特征的分析。

呼吸醌的提取及测定:收集 100 mg 冻干菌体,加入氯仿:甲醇(2:1)的溶液 40 mL 抽提,黑暗处摇瓶过夜,过滤收集滤液,40 °C 减压蒸干,1 mL 丙酮溶解后在 GF254 硅胶板点样;以甲苯为展层剂进行薄层层析分离;在 254 nm 的紫外灯下观察层析板,刮下 Rf=0.4 的荧光带重溶于甲醇中,过滤,浓缩。用色谱串联质谱联用仪分析泛醌组成。采用 C18 柱,流动相为甲醇:丙酮(7:3),进样量 10 μL,流速 1.0 mL/min,270 nm 紫外下检测。

1.7 16S rRNA 基因的扩增及序列分析

细菌基因组的提取采用基因组 DNA 提取试剂盒,PCR 扩增所用引物为通用引物:27F,5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3';1492R,5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'^[16]。扩增体系为 60 μL;10 ng/μL 的引物 27F 和 1492R 各 3 μL,DNA 模板 3 μL,2×Taq mix 30 μL,无菌水补足至 60 μL。反应条件为:95 °C 5 min;94 °C 45 s,55 °C 90 s,72 °C 90 s,30 个循环;72 °C 10 min。

PCR 产物送至上海桑尼生物技术公司测序,所用引物为 27F 和 1492R。将 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 进行注册,在 GenBank 数据库中用 BLAST 程序检索得到相近种的序列^[17],用 MEGA 软件构建系统发育树^[18]。

1.8 DNA 中 $x(G+C)$ mol% 及 DNA-DNA 杂交率的测定

YCSA28^T 菌株的 DNA 中 $x(G+C)$ 的测定采用如下方法:基因组 DNA 经 S1 核酸酶及碱性磷酸酶处理后,采用反相高效液相色谱法测定^[19]。YCSA28^T 与模式菌株 *Halomonas ventosae* Al12^T DNA 杂交率的测定按照 LAI & SHAO^[20] 所描述的方法进行。

2 结 果

2.1 形态特征

菌株 YCSA28^T 在 MH 固体培养基上菌落为圆形,呈乳黄色,不透明,边缘整齐,直径约 1 mm。由透射电镜照片可见,细胞形状为杆状或短杆状,大小为(1.2~1.4) μm×(0.4~0.5) μm,有周生鞭毛(图 1)。革兰氏染色结果为阴性,产胞外多糖,无类脂粒。

2.2 生理生化特征

菌株 YCSA28^T 为好氧菌,在厌氧盒中不生长。YCSA28^T 为中度嗜盐菌,生长的绝对盐度(NaCl)范围为 2.0%~15.0%,最佳绝对盐度(NaCl)为 7.0%~8.0%,这与盐单胞菌属其他菌株相符。生长温度范围 5~40 °C,pH 值范围为 6.0~9.0,最适温度为 25~30 °C,最适 pH 值为 7.5(表 1)。

氧化酶及过氧化氢酶阳性。具反硝化作用,淀粉水解阴性。亚硝酸盐产气阳性,脲酶、甲基红、吐温 20、

吐温 80、VP 实验结果都为阴性。硝酸盐还原及七叶苷水解阴性。精氨酸双水解酶、明胶液化及 D-葡萄糖发酵为阴性。在 API ZYM 测试中,碱性磷酸酶和亮氨酸氨肽酶结果为阳性;酯酶(C4)、类脂酶(C14)、类脂酯酶(C8)、缬氨酸芳胺酶、胱氨酸芳胺酶为弱阳性;酸性磷酸酶、 α -甘露糖苷酶、萘酚-AS-BI-磷酸水解酶、 α -胰凝乳蛋白酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、胰蛋白酶、N-乙酰- β -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 α -葡萄糖苷酶和 α -岩藻糖苷酶为阴性。

可利用的碳源有: α -环糊精、L-鼠李糖、柠檬酸、 α -羟丁酸、 α -酮戊二酸、DL-乳酸、丙二酸、奎宁酸、癸二酸、葡萄糖醛酰胺、L-丙氨酸胺、D-丙氨酸、L-丙氨酸、L-天冬酰胺酸、L-亮氨酸和 L-鸟氨酸(表 1)。不能单独利用的碳源有:D-阿拉伯糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖酸、D-甘露醇、D-山梨醇、甘油、甘氨酸-L-谷氨酸、衣康酸、L-丙氨酸-甘氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、肌醇、单甲基琥珀酸、琥珀酰胺酸、琥珀酸、尿刊酸、 α -D-葡萄糖、 β -羟基丁酸、 γ -氨基丁酸、溴丁二酸、顺乌头酸、D-果糖、D-丝氨酸、淀粉、羟基-L-脯氨酸、L-组氨酸、L-丝氨酸、胸腺嘧啶核苷、L-天冬酰胺、L-谷氨酸和 L-苯丙氨酸。

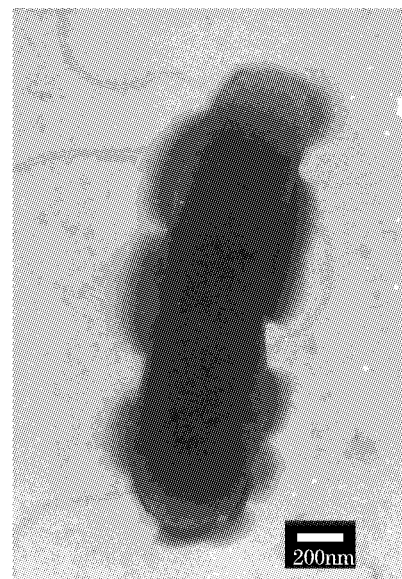


图 1 YCSA28 的透射电镜照片(标尺 200 nm)
Fig. 1 Transmission electron micrograph of Strain YCSA28 (Bar is for 200 nm)

表 1 菌株 YCSA28 与盐单胞菌属相近菌株特征对照表

Table 1 Comparison between the characteristics of strain YCSA28 and the characteristics of other closely related strains in Genus *Halomonas*

| 项 目 | YCSA28 | <i>H. ventosae</i> A112 ^T | <i>H. fontilapidosi</i> 5CR ^{T[23]} | <i>H. shengliensis</i> SL014B-85 ^{T[24]} | <i>H. cerina</i> CECT 7282 ^{T[25]} |
|----------------------------|-----------|--------------------------------------|--|---|---|
| 形态 | 杆状或短杆状 | 短杆状 | 短杆状 | 短杆状 | 短杆状 |
| 细胞长度/ μm | 1.2~1.4 | 1.2~1.4 | 1.7~1.9 | 1.0~1.6 | 1.9~2.8 |
| 细胞宽度/ μm | 0.4~0.5 | 0.7~0.8 | 0.9~1.0 | 0.6~0.8 | 0.7~0.9 |
| 鞭毛 | 周生 | 周生 | 极生 | 侧生 | 无 |
| 色泽 | 乳黄色 | 乳白色 | 棕色 | 乳白色 | 乳白色 |
| 生长绝对盐度(NaCl)范围/% | 2.0~15.0 | 3.0~15.0 | 3.0~25.0 | 0~15.0 | 3.0~25.0 |
| 最适生长绝对盐度(NaCl)/% | 7.0~8.0 | 6.0~9.0 | 7.5~10.0 | 5.0~15.0 | 5.0~10.0 |
| 生长温度范围/ $^{\circ}\text{C}$ | 5~40 | 15~50 | 15~45 | 10~42 | 4~45 |
| 最适生长温度/ $^{\circ}\text{C}$ | 25~30 | 32 | 32~45 | 30 | 20~32 |
| 生长 pH 值范围 | 6.0~9.0 | 6.0~10.0 | 5.0~9.0 | 8.0~9.0 | 5.0~10.0 |
| 最适生长 pH | 7.5 | 7.0~8.0 | 6.0~8.0 | 8.5 | 7.0~10.0 |
| 脲酶 | - | - | - | + | + |
| 水解: | | | | | |
| Aesculin | + | + | - | ND | - |
| Gelatin | - | - | - | - | ND |
| Tween 80 | - | - | - | - | + |
| 有机物作唯一碳源: | | | | | |
| Citrate | + | + | + | - | + |
| Fructose | - | + | + | - | - |
| Glucose | - | + | + | + | + |
| Glycerol | - | + | - | + | - |
| Mannose | - | - | + | + | + |
| Maltose | - | + | + | - | + |
| D-Sorbitol | - | + | + | + | - |
| L-Alanine | + | - | - | + | - |
| L-Histidine | - | - | - | - | - |
| L-Serine | - | - | + | + | + |
| $x(\text{G}+\text{C})/\%$ | 63.7~63.9 | 72.6~74.6 | 65.7 | 66.6 | 66.2 |

注: +, 阳性; -, 阴性; ND, 无数据

菌株 YCSA28 对林可霉素(2 μg)和克林霉素(2 μg)有抗性,对下列抗生素无抗性:环丙沙星(5 μg)、萘啶酸(30 μg)、强力霉素(30 μg)、红霉素(15 μg)、头孢氨苄(30 mg)、羧苄青霉素(100 μg)、链霉素(10 μg)、四环素(30 μg)、新生霉素(30 μg)、利福平(5 μg)、青霉素(10 IU)、氯霉素(30 μg)、氨苄青霉素(10 μg)、新霉素(30 μg)、卡那霉素(30 μg)、万古霉素(30 μg)、苯唑西林(1 μg)和多粘菌素 B(300 IU)。

2.3 主要呼吸醌及脂肪酸

YCSA28^T 主要的呼吸醌为辅酶 Q-9,与模式菌株 *H. ventosae* A112^T 的主要呼吸醌相同。主要脂肪酸为 C_{18:1} ω 7c(42.88%)、C_{16:0}(23.05%)及 C_{16:1} ω 7c/ ω 6c(18.00%)。而 *H. ventosae* A112^T 的主要脂肪酸为 C_{18:1} ω 7c、C_{16:0}、C_{16:1} ω 7c 及 C_{15:0}iso2-OH^[7]。

2.4 16S rRNA 系统发育分析

YCSA28^T 的 16S rRNA 基因序列的 GenBank 注册号为 FJ984862,序列长度为 1 409 bp,其中有盐单胞菌科菌种特有的 15 个核苷酸,还包括盐单胞菌属菌种特有的 4 个核苷酸^[6]。用 Blast 程序将测定得到的 YCSA28^T 菌株的基因序列与 GenBank 数据库中典型菌株的序列进行比对分析可知,与 YCSA28^T 的 16S rRNA 基因序列相近的是 *Halomonas ventosae* A112^T, *H. fontilapidosi* 5CR^T 及 *H. shengliensis* SL014B-85^T,序列同源性为 75.9%~96.9%(图 2)。根据 2006 年 Stackebrandt 和 Ebers^[21] 所建议的划分标准(98.7%~99%),并结合系统发育关系,确认了 YCSA28 盐单胞菌属新种的地位,且菌株 YCSA28^T 为盐单胞菌属系统发育树中一个独立的分支。

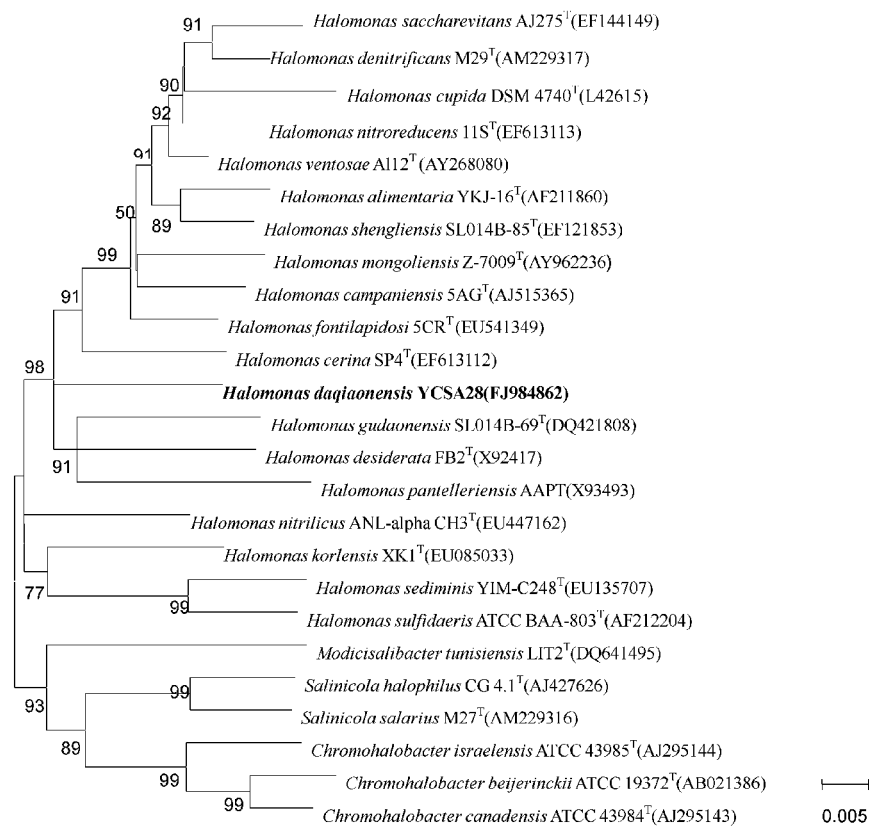


图 2 依据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 YCSA28 与相近种属的系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the position of Strain YCSA28 with respect to other members of the family Halomonadaceae.

2.5 DNA 中 $x(G+C)$ 及 DNA-DNA 杂交结果

YCSA28^T 的染色体 DNA $x(G+C)$ 为 63.7%~63.9%，模式菌株 *H. ventosae* Al12^T 的 $x(G+C)$ 为 72.6%~74.3%。

DNA-DNA 杂交结果显示，杂交率为 $(45 \pm 3)\%$ ，该结果基本可以认定 YCSA28^T 与 *H. ventosae* Al12^T 为不同种^[22]。

3 结 论

盐单胞菌属 (*Halomonas*) 属于盐单胞菌科，为革兰阴性、好气杆菌和球菌类群中的一个属^[1]，是一类能在盐度为 0~32% (w/v) 条件下生长的耐盐细菌。目前发现的该属细菌都为好氧菌^[6]，菌落颜色大都为白色到黄色之间，菌株的主要脂肪酸为 C_{16:1}、C_{17:0} cyclo、C_{16:0}、C_{18:1} 和 C_{19:0} cyclo，主要呼吸醌是辅酶 Q-9^[6]，染色体 DNA 的 $x(G+C)$ 变动较大，*Halomonas halocynthiae* 为 54%，而 *Halomonas ventosae* 为 74.3%^[7]。

本研究结果表明，菌株 YCSA28 符合盐单胞菌属 (*Halomonas*) 的特征，与盐单胞菌属的几个相近种相同的特征有：革兰氏阴性菌，好氧，中度嗜盐，能够在 2.0%~15.0% 的绝对盐度 (NaCl) 范围生长，生长的最适绝对盐度 (NaCl) 为 7.0%~8.0%，氧化酶、过氧化氢酶阳性，具反硝化作用，淀粉水解阴性，染色体 DNA 的 $x(G+C)$ 为 63.7%~63.9%，主要的呼吸醌为辅酶 Q-9，主要脂肪酸为 C_{18:1}ω7c、C_{16:0} 及 C_{16:1}ω7c/ω6c。

基于上述特征，结合 16S rRNA 系统发育分析结果以及菌株 YCSA28 与盐单胞菌属几个相近种在细胞大小、色泽、鞭毛类型、药敏试验、生长 PH 值范围、温度范围、盐度范围、有机物作为的唯一碳源、 $x(G+C)$ 、脂肪酸组成等方面均有显著差异 (表 1)。此外，菌株 YCSA28^T 与亲缘关系最近的模式株 *H. ventosae* Al12^T 的 DNA-DNA 杂交率为 $(45 \pm 3)\%$ ，这个结果表明菌株 YCSA28^T 与 *H. ventosae* Al12^T 的不同。因此，将 YCSA28^T 定义为盐单胞菌属的一个新种，建议命名为大桥盐单胞菌 (*Halomonas daqiaonensis* sp. nov.)，YCSA28^T 为模式株。

模式菌株 YCSA28^T (*Halomonas daqiaonensis* sp. nov.) 的特征描述：

为革兰氏阴性菌，具周生鞭毛，细胞形状为杆状或短杆状，大小为 $(0.4 \sim 0.5) \mu\text{m} \times (1.2 \sim 1.4) \mu\text{m}$ 。在 MH 固体培养基上菌落为圆形，呈乳黄色，不透明，边缘整齐，直径约 1 mm。严格好氧，中度嗜盐，生长的绝对盐度 (NaCl) 范围为 2.0%~15.0%，最佳绝对盐度 (NaCl) 为 7.0%~8.0%，生长温度范围为 5~40 °C，pH 值范围为 6.0~9.0，最适温度为 25~30 °C，最适 pH 值为 7.5。氧化酶及过氧化氢酶阳性。产胞外多糖，无类脂粒，亚硝酸盐产气阳性，脲酶、甲基红、吐温 20、吐温 80、VP 实验结果都为阴性。对林可霉素 (2 μg) 和克林霉素 (2 μg) 有抗性，硝酸盐还原及七叶苷水解阳性。精氨酸双水解酶、明胶液化及 D-葡萄糖发酵为阴性。碱性磷酸酶和亮氨酸氨肽酶结果为阳性；酯酶 (C4)、类脂酶 (C14)、类脂酯酶 (C8)、缬氨酸芳胺酶、胱氨酸芳胺酶为弱阳性；酸性磷酸酶、α-甘露糖苷酶、萘酚-AS-BI-磷酸水解酶、α-胰凝乳蛋白酶、α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、胰蛋白酶、N-乙酰-β-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖醛酸酶、α-葡萄糖苷酶和 α-岩藻糖苷酶为阴性。可利用下列碳源：α-环糊精、L-鼠李糖、柠檬酸、α-羟丁酸、α-酮戊二酸、DL-乳酸、丙二酸、奎宁酸、癸二酸、葡糖醛酰胺、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸、L-天冬酰胺酸、L-亮氨酸和 L-鸟氨酸。染色体 DNA 的 $x(G+C)$ 为 63.7%~63.9%，主要的呼吸醌为辅酶 Q-9，主要的脂肪酸为 C_{18:1}ω7c (42.88%)、C_{16:0} (23.05%) 及 C_{16:1}ω7c/ω6c (18.00%)。

YCSA28^T 作为模式菌株，已保藏在荷兰细菌保藏中心及中国普通微生物保藏管理中心，保藏号分别为 NCCB 100305^T 及 CGMCC 1.9150^T。

参考文献(References):

- [1] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 1984:490-495. 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 1984:490-495.
- [2] VREELAND R H, LITCHFIELD C D, MARTIN E L. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1980, 30:485-495.
- [3] MATA J A, MARTINEZ-CONOVAS J, QUESADA E. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2002, 25(3):360-375.
- [4] XU D Q, HUANG J J, ZHANG J Z, et al. A new species of *Halomonas* - *Halomonas Huanghaiensis* sp. nov. [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1995, 35(5):315 - 321. 徐德强, 黄静娟, 张纪忠, 等. 盐单胞菌属一新种—黄海盐单胞菌[J]. 微生物学报, 1995, 35(5): 315 - 321.
- [5] SEHGAL S N, GIBBONS N E. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1960, 6:165-169.
- [6] DOBSON S J, FRANZMANN P D. Unification of the genera *Deleya* (Bauman et al. 1993), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae* [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(6): 550-558.
- [7] MARTINEZ-CONOVAS M J, QUESADA E, LLAMA S L, et al. *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54:733-737.
- [8] FRANZMANN P D, BURTON H R, MCMEEKIN T A. *Halomonas subglaciescola*, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1987, 37:27-34.
- [9] GARCIA M T, MELLADO E, OSTOS J C, et al. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54:1723-1728.
- [10] YOON J H, CHOI S H, LEE K C, et al. *Halomonas marisflavae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the Yellow Sea in Korea [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(3):1171-1177.
- [11] YOON J H, LEE K C, KHO Y H, et al. *Halomonas alimentaria* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(1):123-130.
- [12] KAYE J Z, MARQUEZ C, VENTOSA A, et al. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(2):499-511.
- [13] BERENDES F, GOTTSCHALK G, HEINE-DOBBERNACK E, et al. *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkaliphilic, halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1996, 19(2): 158-167.
- [14] RODR GUEZ-VALERA F, RUIZ-BERRAQUERO F, RAMOS-CORMENZANA A. Characteristics of the heterotrophic population in hypersaline environments of different salt concentration [J]. Microbiol Ecology, 1981, 7(5):235-243.
- [15] DONG X Z, CAI M Y. Determinative manual for routine bacteriology [M]. Beijing: Scientific Press, 2001:370-381. 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京:科学出版社, 2001:370-381.
- [16] LANE D J. 16S/23S rRNA sequencing [C] // STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York: John Wiley and Sons, 1991:115-175.
- [17] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool [J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403-410.
- [18] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Journal of Molecular Biology, 1987, 4:406-425.
- [19] MESBAH M, WHITMAN W B. Measurement of deoxyguanosine/thymidine ratios in complex mixtures by high-performance liquid chromatography for determination of the mole percentage guanine + cytosine of DNA [J]. Journal of Chromatography, 1989, 479(5): 297-306.
- [20] LAI Q L, SHAO Z Z. *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58:1911-1915.
- [21] STACKEBRANDT E, EBERS J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards [J]. Microbiol Today, 2006, 33:152-155.
- [22] WAYNE L G, BRENNER D J, COLWELL R R, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial sys-

- tematics[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1987, 37:463-464.
- [23] GONZALEZ-DOMENECH CM, MARTINEZ-CHECA F, QUESADA E, et al. *Halomonas fontilapidosi* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59:1290-1296.
- [24] WANG Y N, CAI H, CHI C Q, et al. *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(2):1222-1226.
- [25] GONZALEZ-DOMENECH C M, MARTINEZ-CHECA F, QUESADA E, et al. *Halomonas cerina* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(4): 803-809.

Isolation and Identification of a New Species of *Halomonas*

ZHU Feng-ling^{1,2}, QU Ling-yun^{1,2}, HONG Xu-guang^{1,2}, LAI Qi-liang³,
ZHANG Jin-xing^{1,2}, SUN Xiu-qin^{1,2}

(1. First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China;

2. Key Lab of Science and Engineering for Marine Ecology and Environment, SOA, Qingdao 266061, China;

3. Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: A moderately halophilic Gram-negative bacteria YCSA28 is isolated from a sedimentary sample at Daqiao saltern in Jimo to study the microorganism cultivation. It is learnt from the 16S rRNA sequence comparison and the systematic growth analysis that YCSA28 can be a noval species of the *Halomonas* in the Gammaproteobacteria class. As it is shown in its taxological study, YCSA28 has the similarity about 96.9% to its nearest neighbour of *Halomonas ventosae* A112^T. A GenBank accession number, FJ984862, is given to the strain. It has been already received and numbered not only as NCCB100305^T by NCCB but also as CGMCC 1.9150^T by CGMCC. Its colonies appear in cream-yellow. It is in a rod or short rod shape, and with lateral flagella. Growth temperature is between 5~40°C, pH value within 6~9, and growth salinity (NaCl) within 2%~15%. It is oxidase/catalase-positive. The major quinone of Strain YCSA28 is Q-9, and the cellular fatty acids mainly consist of C_{18:1} ω7c (42.88%), C_{16:0} (23.05%) and C_{16:1} ω7c/ω6c (18.00%). The x(G+C) content of the chromosomal DNA is 63.7%-63.9%. DNA-DNA hybridization between the YCSA28 strain and *H. ventosae* A112^T has 45±3% relatedness. It is learnt from the morphological features combined with the physiological and biochemical features that Strain YCSA28 represents a novel species of the genus *Halomonas*. The name *Halomonas daqiaonensis* sp. nov. is proposed for Strain YCSA28^T.

Key words: *Halomonas*; new species; identification

Received: June 17, 2010