

极端嗜酸热古菌 S5 菌株的重新分类研究*

何正国 李雅芹 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:对已经鉴定的嗜酸热硫球菌(*Sulfosphaerellus thermoacidophilum* gen. nov. sp. nov) S5 菌株的进一步研究发现,它既能好在好氧条件也能在厌氧条件下代谢元素硫进行化能自养生长,结合其 16SrRNA 基因的分子系统学分析,S5 菌株应归于 *Acidianus* 属。另外,S5 菌株与 *Acidianus* 属中三个已知种基因组 DNA 的同源性分别仅有 44%、22% 和 23%,DNA 中 G + C mol% 为 38,与已知种 31.0 和 32.7 有较大差异;而且,在代谢特性上 S5 菌株为专性化能无机营养型,与 *Acidianus brierleyi* 有明显不同。因此 S5 菌株应是 *Acidianus* 属中一个新种,建议定名为:腾冲嗜酸两面菌(*Acidianus tengchongenses* sp. nov.)。

关键词:极端嗜酸热古菌, 16SrRNA, DNA 杂交性, 腾冲嗜酸两面菌

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0259-06

硫化叶菌科(*Sulfolobales*)中的成员大多数栖息于高温酸热地域,它们能依靠代谢元素硫获得能量生存,是一类典型的极端嗜酸热古菌。它们在生物地球化学硫循环中起重要作用,在酶工业,冶金,环保等方面有重要的应用前景,因此对其研究一直受到关注。1982 年,钟惠芳等^[1]首次报道了从我国云南热泉分离到嗜热嗜酸菌,经过一系列生理生化及部分遗传特性分析,定为一个新属新种:嗜酸热硫球菌(*Sulfosphaerellus thermoacidophilum* gen. nov., sp. nov),模式菌株为 S5。后来又进一步研究了它的特征表明 S5 是极端嗜酸嗜热古菌^[2]。有关此类微生物的分类研究工作,在当时尚不很多。

但是,随着分子生物学技术的发展及在微生物分类学中的应用,特别是基于 16S rRNA 基因序列为主的系统发育分析^[3]及基因组 DNA 杂交分析技术,使微生物分类研究步入一个新阶段,许多原来以形态生理为基础确定的分类地位也因此而重新调整和定位。本研究对 S5 菌株在形态和生理鉴定的基础上,用分子生物学方法如对 16SrRNA 基因序列分析以及 DNA-DNA 杂交进一步对其分类地位进行了研究。结果建议将 S5 菌株重新定位为 *Acidianus* 属的一个新种。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养条件

S5 菌株由本组保藏,培养方法参考钟惠芳等^[1]的方法。本研究中涉及的标准菌株由日本理化所菌保中心(JCM)提供,它们的培养参考各自建议的培养方法。

1.2 形态特征

菌体细胞生长至对数后期,收集菌体进行切片然后透射电子显微镜观察。

* 国家自然科学基金重点项目(59834150)和中国科学院生物分类区系学科发展特别支持项目资助

作者简介:何正国(1969-),男,中国科学院微生物所博士生,主要从事极端环境的微生物学和分子生物学研究。

收稿日期:2000-06-22,修回日期:2000-10-10

1.3 生理生化试验

厌氧试验按 Segerer(1986)^[4] 的方法进行, H_2S 检测按 Stetter 等^[5] 的方法。 SO_4^{2-} 的定量分析按文献[6]进行。

1.4 DNA-DNA 杂交

DNA 的提取和纯化按 Marmur^[6] 方法。 DNA-DNA 杂交研究用缺刻平移标记方法, 用 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ 标记菌株, 然后进行杂交。

1.5 16SrRNA 基因的 PCR 扩增及测序

扩增用的两个 PCR 引物分别是: 5'-TT CCG GTT CAT CCY GCC CGG-3'^[7] 和 5'-AAG GA GTG WTC CAR CC-3'^[8], 分别对应于 *E. coli* 16SrRNA 基因的第 3 ~ 29 碱基和 1541 ~ 1525 碱基, PCR 产物纯化用 Promega 公司试剂盒, PCR 产物的克隆用 pGEM T Vector System。 质粒提取用 QIAGEN QIAprep Spin plasmid 试剂盒, 测序反应用 ABIPRISMTM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒, 测序用 ABI 377 DNA 自动测序仪测定。

1.6 序列数据分析

序列排列用 CLUSTAL W program, 进化距离的计算按 PHYLIP program package 中的 DNADIST program, 分支模式的重复用 PHYLIP 的 SEQBOOT, DNADIST, Neibor-Join, CON-SENSE 分析, 重复数为 1000, 进化树用 PHYLIP program package 中的 fitch 方法绘制。

2 结果

2.1 形态特征

电子显微镜观察发现, S5 菌细胞形态以及细胞外被结构等都与 *Acidianus* 的一些种类类似, 见图 1, 其中图 1A 为钟惠芳等^[1] 的扫描电镜照片。

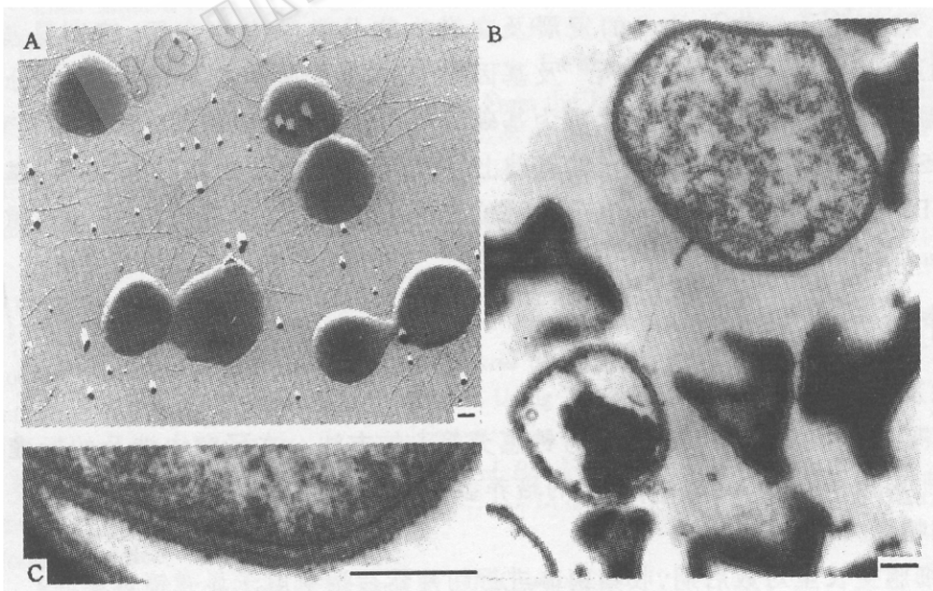


图 1 菌株 S5 的电镜照片

Fig. 1 Electron micrographs of strain S5

(A) Scanning electron micrograph; (B) Thin section electron micrograph of cell; (C) The peripheral region of cell. Bar = 0.2 μm

2.2 生理生化特征

S5 菌株能够利用两种相反的模式进行化能自养生长。在严格厌氧的条件下,能够利用氢气还原元素硫形成硫化氢;在有氧的条件下,它又能象 *Sulfolobus* 将硫氧化成硫酸。

2.3 DNA-DNA 杂交

菌株 S5 与 *Acidianus* 属的三个种 *A. brierleyi*、*A. infernus* 和 *A. ambivalens* 的 DNA 同源性分别有 44%、22% 和 23%,如表 1。该结果表明 S5 菌不同于三个已知种,结果见表 2。

表 1 菌株 S5 与几个标准菌株 DNA 杂交的相似性比较

Table 1 DNA-DNA similarity between strain S5 and standard strains

Filter-bound DNA	[α - 32 P]-labelled DNA from				
	<i>A. brierleyi</i>	<i>A. infernus</i>	<i>A. ambivalens</i>	<i>E. coli</i>	S5
	DSM1651	DSM3191	DSM3772		
<i>A. brierleyi</i>	100	24	19	< 1	44
<i>A. infernus</i>	21	100	52	< 1	22
<i>A. ambivalent</i>	19	55	100	< 1	23
<i>S. acidocaldarius</i>	ND	7	ND	ND	12
<i>S. metallicus</i>	ND	8	ND	ND	7
<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	100	< 1
S5	43	23	22	< 1	100

ND, not determined

表 2 菌株 S5 与 *Acidianus* 属三个已知种特性比较

Table 2 Characteristic comparative between strain S5 and three *Acidianus* species

Characteristics	Strains S5	<i>A. brierleyi</i>	<i>A. infernus</i>	<i>A. ambivalens</i>
		DSM1651	DSM3191	DSM3772
Cell shape	coccoid	coccoid	coccoid	coccoid
Cell diameter/ μ m	1.2	1~1.5	1.5	NA
Motility	-	-	-	-
Temperature for growth/ $^{\circ}$ C				
Range	55~80	45~75	65~96	?~87
Optimum	70	70	90	80
pH for growth				
Range	1.0~5.0	1~6	1.0~5.5	1~3.5
Optimum	2.5	1.5~2.0	2.0	2.5
G + C mol %	38.0	31.0	31.0	32.7
Ability of using ferrous iron as energy	-	+	-	-
Growth type	obligately chemolithotrophic growth	organotrophic or chemolithotrophic growth	obligately chemolithotrophic growth	obligately chemolithotrophic growth

NA, Data not available

2.4 系统发育学分析

用一对通用引物扩增菌株 S5 的 16SrRNA 基因,共 1496 个碱基,其序列见图 2。将该序列送入 RDP 数据库进行相似性分析,结果表明:菌株 S5 与极端嗜酸氧化元素硫自养生长的 *Sulfolobales* 和中 *Acidianus* 属的相似性最高。把该序列与 *Sulfolobales* 目前已发表的一些种的 16SrRNA 基因序列进行系统学分析,结果见图 3。菌株 S5 与 *Acidianus brierleyi* 聚为一群,二者之间的进化距离仅有 0.2%,从系统树上也可明显看到,S5 与 *A. brierleyi* 聚成分支的 Bootstrap 值为 1000,这说明这一分支是可靠的。结合生理生化特性结果,它既能在

好氧条件也能在厌氧条件下代谢硫进行化能自养生长即为 *Acidianus* 属特有的性质,据此将 S5 归入 *Acidianus* 属。

CCGGTTGATC CTGCCGGACC AGATCGCTAT GGGGATAGGG CTAAGCCATG GGAGTCGTAC
GCTCTCGGTA AGAGGGCGTG GCGGACGGCT GAGTAACACG TGGTCAACCT AACCTCGGGA
CTTGGATACC TCCGGGAAAC TGGAGCTAAT CCAAGATAGG CAAAGGAATC TGGAACGATC
CTTTGCTTAA AGGCCTCTAG GCTAATACTG TCTAGAGGTG CCCGAGGATG GGAAGTCGGC
CCATCAGGCT GTTGGTGGGG TAATGGCCCA CCAAACCGAT AACGGGTAGG GGCCGTGGGA
GCGGGAGCCC CCAGTTGGGC ACTGAGACAA TGGCCCAGGC CCTACGGGGC GCACCAAGCG
CGAAACGTCC CCAATGCGGG AAACCGTGAG GCGGCTATCC CCAGTGCCCTC CGATAGGAGG
CTTTTCCCCA CTTTAGAAGC GTGGGGGAAT AAGCGGGGGG CAAGGCTGGT GTCAGCCGCC
GCGGTAATAC CAGCCCCCGG AGTGATCTGG ACGTTTATTG GGCTTGAAGC GCCCCGTAGCC
GGCCCATAAA GTCACGTGTT AAAGACCCGG GCTCAACCCG GGAAAGGGCA GTGATACTTA
TGGGCTAGGG GCGGGGAAAG GTCGGAGGTA CTGGCGGAGT AGGGGCGAAA TCCGTAGATC
CCGGGAGGAC CACCAGTGGC GAAAGCGTCC GGCTAGAAGC CGCCCGACCG TGAGGGGCGA
AAGCCGGGGC AGCAAAAGGG ATTAGATACC CCTGTAGTCC CGGCTGTAAA CGATGCAGGC
TAGGTGTGCG GTGGGTCTAG AGCCCGCGCG GTGCCGACAG GAAACCGGTA AGCCCGCCGC
CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GCTGAACTT AAAGGAATTG GCGGGGGAGC ACCACAAGGG
GTGGAACCTG CGGCTCAATT GGAGTCAACG CCTGGAATCT TACCGGAGGA GACCCGAGTG
TGACCGTCAG GCTAATGACC TTACCTGACT CGCGGAGAGG AGGTGCATGG CCGTCGCCAG
CTCGTGTGTT GAAATGTCCG GTTAAGTCCG GCAACGAGCG AGACCCCCAC CTCTAATTGG
CATTCTCTCC CCCGGGAGGG ACCCACATTA GAGGGACTGC CGTCGTTAAG ACGGAGGAAG
GAGGGGGCCA CGGCAGGTCA GCATGCCCGG AAACCTTCTG GCGGCACGCG GGTTACAATG
GCAGGGACAA CGGGAGTCCA ACCTCGAAAG GGGGAGGTAA TCCCTTAAAC CCTGCCTCAG
TTGGGATCGA GGGCTGAAAT TGGCCCTCGT GAACGAGGAA TCCCTAGTAA CCGCACGTCA
ACAACGTGCG GTGAATACGT CCCTGCTCCT TGCACACACC GCGCGTCGCT CCACCCGAGT
GGAGAAGAAG TGAGGTTTCT TGGCCTTCGG GGTGGGGAAT CGAACTTCTT CTCGCGGAGG
GGGAGAAGT CGTAACAAGG TAGCCGTAGG GGAACCTGCG GCTGGATCAC CTCCTT

图 2 菌株 S5 的 16SrRNA 基因序列
Fig.2 The gene of 16S rRNA of strain S5

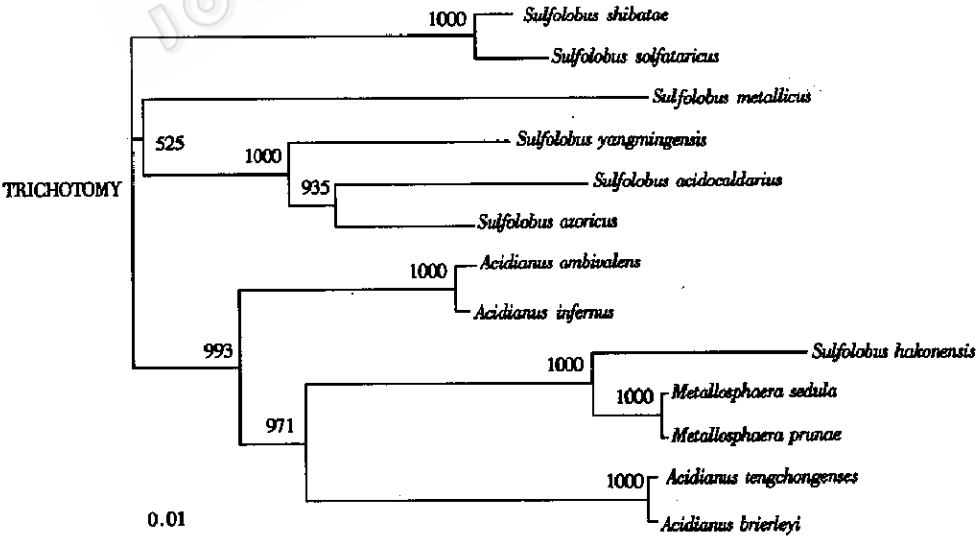


图 3 菌株 S5 在 *Sulfolobales* 中的系统发育位置
Fig.3 The phylogenetic position of strain S5 in *Sulfolobales*

3 讨论

1982 年钟惠芳等已将 S5 菌株定为一个新属新种,并将该菌株作为本属的典型种。Brock 等^[9]早在 1972 年提出了一个具有类似特性的新属 *Sulfolobus*, 细胞裂片状, 兼性自养, G + C mol% 为 60 ~ 68。后来此类群菌株分类地位在不断调整。1973 年 Brierley 等^[10]分离到新菌株 *Sulfolobus-like*, 其 G + C mol% 为 57 ± 3 。1980 年 Zillig 等^[11]提出将 Brierley 等分离的菌株定名为 *Sulfolobus brierleyi*, 并测得它的 G + C mol% 为 36 ~ 40。1986 年 Segerer 等^[4]根据该菌既能在好氧条件也能在厌氧条件下代谢硫进行化能自养生长的特性, 将它改名为 *Acidianus brierleyi*, 并最终测得其 G + C mol% 为 31。对于 S5 菌株来说, 过去根据细胞球形, 专性自养和 G + C 含量鉴定为一个新属新种, 是因为分子分析尚未到位。

现根据 16SrRNA 基因序列进行的系统发育分析及其在有氧和无氧条件下都能行自养生长, S5 菌株应属 *Acidianus* 属, 目前该属中已有三个种: *A. brierleyi*、*A. infernus* 和 *A. ambivalens*, S5 菌株与它们在生理遗传等方面的特性比较见表 2。与三个已知种相比, S5 菌株在 DNA 同源性, G + C mol%, 以及代谢特性上与已知种有明显差异, 因此根据原有和现有研究结果, S5 菌株应归于 *Acidianus* 属中, 并作为一个新种, 由于其分离自云南腾冲(tengchong)酸热泉, 因此定名为腾冲嗜酸两面菌^[4] (*Acidianus tengchongenses* sp. nov.)。

腾冲嗜酸两面菌 (*Acidianus tengchongenses* sp. nov.) 种的描述: 直径大约 1.2 μm 的近似球形嗜酸热古菌, 在有氧和无氧条件下都能以二氧化碳为唯一碳源, 为专性化能自养生长; 有氧时氧化元素硫为硫酸, 无氧时利用氢气还原硫成硫化氢获得能量生长, 其最适生长 pH 为 2.5 (1.0 ~ 5.5), 最适生长温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ (55 $^{\circ}\text{C}$ ~ 80 $^{\circ}\text{C}$)。不能以任何有机物为唯一碳源生长, 但酵母汁 (0.05%) 能刺激它的生长, DNA 的 G + C mol% 为 38。模式菌株 S5 分离自云南腾冲酸热泉。保藏于本所。

致谢 工作中得到刘双江博士和钟惠芳副研究员的关心与帮助, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 钟惠芳, 陈秀株, 李雅芹, 等. 微生物学报, 1982, 22: 1 ~ 7.
- [2] 李雅芹, 徐毅, 蔡文六, 等. 微生物学报, 1988, 28(2): 109 ~ 114.
- [3] Woese C R. *Microbial Rev*, 1989, 51(2): 221 ~ 227.
- [4] Segerer A, Neuner A, Kristjansson J K, et al. *Int J System Bacteriol*, 1986, 36: 559 ~ 564.
- [5] Stetter K O, Konig H, Stackebrandt E. *System Appl Microbiol*, 1983, 4: 535 ~ 551.
- [6] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, 3: 208 ~ 218.
- [7] Delong E F. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5685 ~ 5689.
- [8] Stackbrandt E, Goodfellow M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: A willey-interscience publication, 1991. 115 ~ 175.
- [9] Brock T D, Brock K M, Belly R T, et al. *Arch Microbiol*, 1972, 84: 54 ~ 68.
- [10] Brierley C L, Brierley J A. *Can J Microbiol*, 1973, 19: 183 ~ 188.
- [11] Zillig W, Stetter K O, Wunderl S, et al. *Arch Microbiol*, 1980, 125: 259 ~ 269.

STUDY ON RECLASSIFICATION OF EXTREMELY THERMOACIDOPHILIC ARCHAEA STRAIN S5*

He Zhengguo Li Yaqin Zhou Peijin

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The further study on thermoacidophilic archaea strain S5, which has been identified as *Sulphosphaerellus thermoacidophilum* gen. nov., sp. nov., has shown it was able to grow facultatively aerobically by means of two sulfur-metabolizing modes of chemolithotrophy which is the characteristic of *Acidianus*. And the 16SrRNA gene of strain S5 was amplified, cloned and sequenced, a phylogenetic tree was constructed on the 16SrRNA gene sequences. The tree clearly indicated that strain S5 formed the same lineage with *Acidianus brierleyi*. Thus strain S5 should be the member of *Acidianus*. However, there are only 44%, 22% and 23% genomic DNA similarity between S5 and *A. brierleyi*, *A. infernus* and *A. ambivalens*, respectively. And the G + C content of S5 DNA is 38%, which is 5% ~ 7% higher than the reported G + C contents of the other *Acidianus* species (31% or 32.7%). In addition, strain S5 is a strictly chemolithoautotrophs, which is obviously different from facultative chemolithotrophs of *A. brierleyi*. Based on the observed differences, strain S5 represents a new species within the genus *Acidianus*. A new species name, *Acidianus tengchongenses*, was proposed for it. The type strain is designated S5.

Key words: Extremely thermoacidophilic archaea, 16SrRNA, DNA hybridization, *Acidianus tengchongenses*

* Key Project of Chinese National Natural Sciences Fund(59834150)

《微生物学报》第七届编辑委员会名单

顾问 张树政

主编 李季伦

副主编 陆德如 朱关福 李阜棣 王敖全 谭华荣

编委 王修垣 邓子新 田波 刘志恒 朱庆裴 孙志浩 李焕葵

陈世平 陈永青 杨苏声 周培瑾 范云六 范孝用 钱新民

钱世钧 诸葛健 徐怀恕 翟中和