

一株中度嗜热嗜酸硫氧化杆菌的分离和系统发育分析

刘 纛 齐放军 林建群 田克立 颜望明*

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要: 从云南腾冲温泉酸性水样分离得到一株中度嗜热嗜酸硫氧化杆菌 MTH-04, 对分离菌株进行了形态、生理生化特性研究及 16S rDNA 序列分析。该菌株为革兰氏阴性细菌, 短杆状, 菌体大小 $(0.6 \sim 0.8) \mu\text{m} \times (1 \sim 2) \mu\text{m}$, 化能自养, 可利用硫磺、四硫酸盐、硫代硫酸盐为能源生长, 不能利用蛋白胨、葡萄糖、酵母粉, 也不能进行混合型生长。最适生长温度在 $40^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ 之间, 最适生长 pH 2.0 ~ 3.0, 代时 8h。以 16S rDNA 序列同源性为基础构建了包括 13 株相关种属在内的系统发育树, 结果表明, MTH-04 与喜温硫杆菌 (*Thiobacillus caldus*) 处于同一进化树分支中, 相似性达 99.5% 以上。

关键词: 中度嗜热嗜酸硫氧化杆菌, 16S rDNA 序列, 系统发育分析

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)03-0382-04

利用微生物进行金属矿石的浸出具有悠久的历史, 在现代工业生产中也开始得到应用。生物冶金同化学冶金方法相比, 环境污染小, 能耗低, 浸矿成本低, 尤其在处理低品位矿石时, 具有很大潜力^[1]。

能够进行生物浸矿的微生物主要是一些在酸性环境中生长的铁或硫氧化细菌。长期以来, 人们一直以为生长温度在 $25^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 的中温菌, 如氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*)、氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 等在浸矿过程中起主要作用。近些年对连续反应浸矿系统的微生物种群研究结果显示, 一些最适生长温度为 $40^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ 的中度嗜热细菌, 如氧化亚铁钩端螺旋菌 (*Leptospirillum ferrooxidans*)、喜温硫杆菌 (*Thiobacillus caldus*) 等为浸矿细菌中的优势种群。这一研究结果表明, 中度嗜热的铁或硫氧化细菌在浸矿过程中具有重要的作用^[2-5]。为此, 有关中度嗜热浸矿细菌资源的分离、鉴定及其浸矿作用机理的研究, 已开始引起有关人员的关注和重视, 国内关于这方面的研究开展较晚, 尚处于起步阶段。

本室从云南腾冲地区分离得到一株中度嗜热嗜酸硫氧化杆菌 MTH-04。对其进行的生理生化特性研究表明, 该菌株与喜温硫杆菌 (*T. caldus*) 具有类似的特征, 16S rDNA 序列同源性分析也表明, 该菌株与 *T. caldus* 处于同一系统发育树分支中, 相似性达 99.5% 以上。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

菌株 MTH-04 由本实验室从云南腾冲地区高温温泉边酸性水样中分离得到。

1.2 培养基

MTH-04 菌株的富集培养、生长曲线的测定、菌体的收集

用 Starky 液体培养基^[6]。菌的分离用 Starky- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 固体培养基^[7]。菌株的能源利用研究用基础培养基^[8], 该培养基用 1mol/L 的硫酸调 pH 至 2.5。

1.3 酶和试剂

蛋白酶 K、Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司; 凝胶回收试剂盒 (E. Z. N. A® Gel Extraction Kit) 购自 Omega Bio-Tek 公司; DNA 测序试剂盒 (CEQ™ DTCS- Quick Start Kit) 购自 Beckman 公司。

1.4 菌种的分离和形态观察

将采集到的酸性水样先用 Starky 液体培养基, 在 40°C 富集培养一周以上。待培养基的 pH 下降到 1.0 左右, 用梯度稀释法, 在 Starky- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 固体培养基上进行涂布。在 40°C 培养 5 ~ 7d 后, 挑选培养基上生长出的白色单菌落, 继续采用梯度稀释法在 Starky- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 固体培养基上分离纯化, 直至在显微镜下镜检菌体形态一致, 记作 MTH-04。

收集 MTH-04 菌体, 经革兰氏染色后在光学显微镜下观察。将 MTH-04 菌体涂布在小块盖玻片上, 自然晾干后, 再用导电胶贴于圆形贴片上, 喷金后在扫描电镜下观察。

1.5 MTH-04 菌株理化特性研究

1.5.1 最适生长温度的测定: MTH-04 菌株以相同接种量接种到 Starky 液体培养基中, pH 2.5。分别置于 25°C 、 35°C 、 40°C 、 45°C 、 55°C 5 个温度梯度, 静置培养 5d。用血球计数板计数, 测定不同温度下 MTH-04 的生长状况。

1.5.2 初始 pH 对 MTH-04 菌株生长的影响: 用 1mol/L 的硫酸将 Starky 液体培养基调至不同 pH 值, 分别为 1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0。接种相同的菌量, 40°C 静置培养 5d, 用血球计数板计数, 测定不同 pH 条件下菌的生长状况。

1.5.3 生长曲线的测定: MTH-04 菌株接种到 Starky 液体培

基金项目 国家自然科学基金资助项目(50174034, 30170026)

* 通讯作者。Tel 86-531-8364384 转 8103; Fax 86-531-8565610; E-mail: yanwm@sdu.edu.cn

作者简介 刘 纛 (1976 -), 女, 安徽六安人, 助工, 学士, 主要从事自养微生物的分子生物学研究。E-mail: Jiuying@sdu.edu.cn

收稿日期 2003-07-22, 修回日期 2003-12-12

培养基中, pH2.5 40℃静置培养,每隔 2d 用血球计数板计数,绘制 MTH-04 菌的生长曲线。

1.5.4 能源利用特性的研究:向基础培养基中分别加入蛋白胨(0.1%)、酵母粉(0.1%)、葡萄糖(0.1%)、硫磺(5%)、硫代硫酸钠(1%)、四硫酸钾(0.3%)、硫酸亚铁(0.1mol/L)、黄铁矿(5%)、硫磺(5%) + 蛋白胨(0.1%)、硫磺(5%) + 酵母粉(0.1%)、硫磺(5%) + 葡萄糖(0.1%)。其中硫代硫酸钠、四硫酸钾、硫酸亚铁过滤除菌后加入培养基,硫磺隔水蒸煮 1h 灭菌,再加入培养基。以 MTH-04 菌悬液接种,40℃静置培养 5d,连续传代 3 次,涂片并在显微镜下观察菌的生长情况,生长者为阳性。

1.6 16S rDNA 的扩增、序列测定和系统发育分析

1.6.1 染色体 DNA 的提取:MTH-04 菌株接种到 Starky 液体培养基中,40℃静置培养 5d,低速离心(3000r/min,离心 10min)除去硫磺,高速离心(12000 r/min,离心 30s)收集菌体。用 TE 缓冲液(pH8.0)洗涤菌体 1~2 次后,每 100mg 菌体(湿重)加入 0.5mL TE(pH8.0),充分震荡混匀,再加入 2mL 溶菌液(含 1% SDS 和 0.05mol/L NaOH),缓慢混匀,65℃保温处理 15min。用 1mol/L 的 Tris-HCl(pH8.0)调节 pH 至 8.0,加入终浓度为 500 μ g/mL 的蛋白酶 K,55℃保温处理 2h。再用苯酚:氯仿抽提除净蛋白。所得上清加 1/10 体积 3mol/L 乙酸钠、2 倍体积无水乙醇,-20℃沉淀过夜。离心(12000r/min,离心 20min),弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀 1~2 次,真空干燥,加 TE(pH8.0)溶解。

1.6.2 16S rDNA 的 PCR 扩增:以染色体 DNA 为模板,用通用引物 FC27,RC1492^[9]扩增 16S rDNA 片段。正向引物(FC27):5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物(RC1492):5'-TACGGCTACCTTGTACACTT-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系(200 μ L):10 \times PCR 缓冲液 20 μ L,MgCl₂(25mmol/L)20 μ L,dNTP(10mmol/L)8 μ L,引物 FC27(62.5 μ mol/L)和引物 RC1492(62.5 μ mol/L)各 4 μ L,模板 DNA(约 50ng/ μ L)8 μ L,Taq DNA 聚合酶(5U/ μ L)2.5 μ L。扩增程序:94℃ 5min,94℃ 1min,52℃ 1min,72℃ 3min,33 个循环;72℃ 10min。PCR 产物用 E.Z.N.A[®] Gel Extraction Kit 回收。

1.6.3 16S rDNA 的序列测定:回收纯化后的 PCR 产物用 CEQ[™] DTCS-Quick Start Kit 进行测序 PCR 反应,用 CEQ2000 XL 全自动 DNA 测序仪进行序列测定。

1.6.4 系统发育树的构建:将菌株 MTH-04 的 16S rDNA 序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行序列比较,用 DNAMAN V4.0 软件的 Multiple Sequence Alignment 进行 16S rDNA 同源性分析,并构建系统发育树。

2 结果

2.1 形态特征

MTH-04 为短杆状,革兰氏阴性,大小为(0.6~0.8) μ m \times (1~2) μ m,在 Starky-Na₂S₂O₃ 固体培养基上的菌落形态为圆形,白色半透明,凸起,光滑。(图 1)

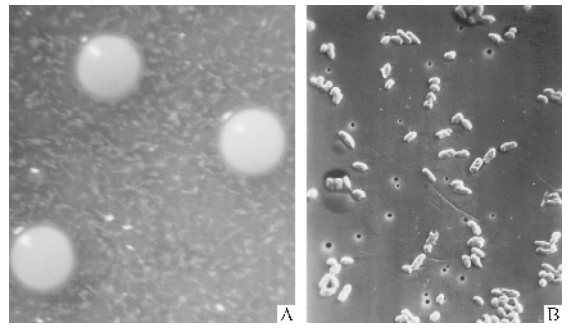


图 1 MTH-04 的菌落形态和扫描电镜照片

Fig.1 The colony of MTH-04 and scanning electron micrograph
A.The Colony of MTH-04 ;B. Scanning electron micrograph of MTH-04 (5000 \times).

2.2 生理生化特性

2.2.1 生长特性:MTH-04 菌株的最适生长温度在 40℃~45℃之间,最适生长 pH 2.0~3.0。在 40℃、pH2.5 的培养条件下,MTH-04 菌株静置培养 2d 后进入对数生长期,4d 以后菌数增长缓慢,进入生长稳定期。代时为 8h。

2.2.2 能源利用特性:MTH-04 能利用硫磺、硫代硫酸钠、四硫酸钾作为能源生长,不能利用硫酸亚铁、黄铁矿,不能利用蛋白胨、酵母粉、葡萄糖,在有硫磺作为能源时也不能利用这些有机质进行混合型生长。

2.3 MTH-04 菌株的 16S rDNA 序列分析

染色体 DNA 用 PCR 扩增出单一条带,PCR 产物回收纯

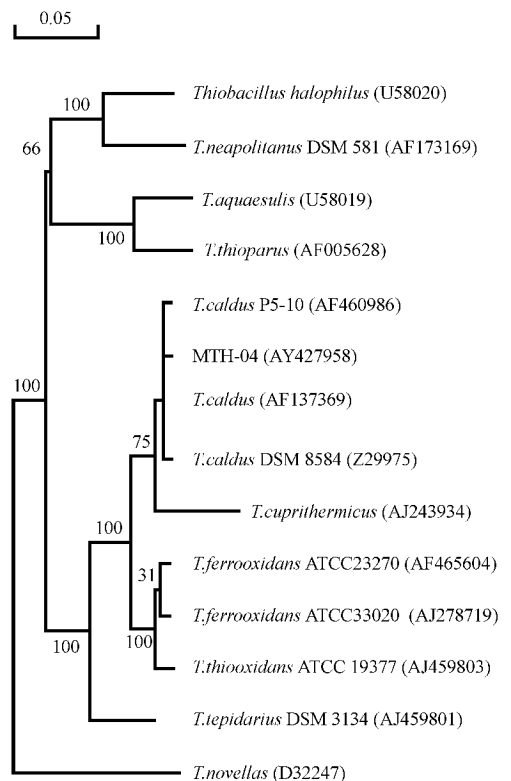


图 2 MTH-04 菌株的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree derived from the 16S rDNA sequence of MTH-04 strain

化后经 DNA 测序,序列长度为 1447bp,在 GenBank 中的序列登记号为 AY427958。以 16S rDNA 序列同源性为基础构建系统发育树(图 2)。菌株 MTH-04 与 *T. caldus* 位于同一分支中,与 *T. caldus*(AF137369)相似性为 99.7%,与 *T. caldus* P5-10(AF460986)相似性为 99.6%,与 *T. caldus* DSM 8584(Z29975)相似性为 99.5%。

3 讨论

1994 年, Hallberg 和 Lindström 研究了硫杆菌属的两株菌 KU 和 BC13, 结果发现这两株菌和氧化硫硫杆菌具有明显的不同, 表现为它们的最适生长温度为 45℃, G + C 含量为 (63.1 ~ 63.9)mol%。DNA-DNA 杂交结果也显示, 这两株菌和硫杆菌属其它菌株同源性很低, 16S rDNA 分析结果进一步表明, 它们属于硫杆菌属中的一个新类群。依据这些特性, Hallberg 和 Lindström 将菌株 KU 和 BC13 定为一新的种, 即喜温硫杆菌(*T. caldus*)^[10], 这是关于喜温硫杆菌的首次报道。

有关浸矿微生物种群分析的研究也表明, *T. caldus* 在浸矿体系中占主要组分, 说明该细菌在生物浸矿中具有重要作用^[11]。然而, 研究结果又显示, *T. caldus* 纯培养物并不能直接氧化亚铁或铁硫化物, 因而也不能在黄铁矿中单独培养生长。为此, 人们研究 *T. caldus* 和铁氧化细菌如 *Thiobacillus ferrooxidans*、*Leptospirillum ferrooxidans* 混合培养对浸矿的影响, 结果发现, *T. caldus* 能够显著提高这些铁氧化细菌

的浸矿效率, 这也进一步揭示和确认了 *T. caldus* 在生物浸矿中的作用^[12]。

在上述研究的基础上, Dopson 和 Lindström 研究分析了 *T. caldus* 与铁氧化细菌协同浸矿的作用机理, 初步揭示 *T. caldus* 可从下述 3 个方面提高铁氧化细菌的浸矿效率: (1) *T. caldus* 的生长, 能利用附着在矿物表面的固体硫, 暴露出矿物表面, 从而使浸矿细菌充分接触到矿物并起作用; (2) *T. caldus* 生长产生的有机物有助于促进异养或混合营养型浸矿细菌的生长; (3) *T. caldus* 的代谢物具有表面活性剂的作用, 使硫元素能充分得到溶解。通过这 3 方面的作用, *T. caldus* 在浸矿系统中可显著提高浸矿效率, 是生物浸矿过程中起重要作用的一类细菌^[12]。

本实验对 MTH-04 菌株的研究结果表明, 该菌株为短杆状, 革兰氏阴性, 大小(0.6~0.8)μm×(1~2)μm, 最适生长温度在 40℃~45℃之间, 最适生长 pH2.0~3.0, 代时为 8h。可利用硫磺、四硫酸盐、硫代硫酸盐为能源进行化能自养生长, 不能利用硫酸亚铁、黄铁矿; 不能利用蛋白胨、酵母粉、葡萄糖, 在硫磺作为能源时也不能利用这些有机质进行混合型生长。MTH-04 菌株与 *T. caldus* 的特性比较见表 1^[10, 13]。16S rDNA 序列分析的结果显示, MTH-04 与 *T. caldus* 菌株处于系统发育树中同一分支, 相似性达到 99.5% 以上, 与其中一株喜温硫杆菌的相似性达 99.7%。该菌株的分离也为我国生物浸矿的研究提供了一重要资源。

表 1 *T. caldus* 菌株和 MTH-04 的特性比较

Table 1 Characteristics of *T. caldus* Strain and MTH-04

Feature	MTH-04	<i>T. caldus</i> BC13, DSM8584	<i>T. caldus</i> MT1, MT2
Gram stain	G ⁻	G ⁻	ND
Colony morphology	Circular, white, convex, smooth, transparent	Small, circular, convex, smooth, transparent	Domed, entire, off-white
Cellular morphology	Rod	Rod	Straights rod
Optimum temperature	40℃ ~ 45℃	45℃	ND
Optimum pH	2.0 ~ 3.0	2.0 ~ 2.5	ND
Chemolithoautotrophic growth	+	+	+
Heterotrophic growth	-	-	-
Mixotrophic growth	-	+	ND
Oxidation of Fe ²⁺ , FeS ₂	-	-	-
Oxidation of S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	+	+	+

+ : Positive ; - : Negative ; ND : Not determined.

参 考 文 献

- [1] Rawlings D E. Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* 2002, **56** : 85 - 91.
- [2] Hallberg K B, Dopson M, Lindstrom E B. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J Bacteriol*, 1996, **178** : 6 - 11.

- [3] Goebel B M, Stackebrandt E. Cultural and phylogenetical analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** : 1614 - 1621.
- [4] Tuovinen O H, Bhatti T M, Bigam J M, et al. Oxidative dissolution of arsenopyrite by mesophilic and moderately thermophilic acidophiles. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** : 3268 - 3274.

- [5] Rawlings D E , Tributsch H , Hansford G S . Reasons why 'Leptospirillum'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* , 1999 , **145** : 5 - 13 .
- [6] 金松谟 , 颜望明 . 氧化硫杆菌质粒的分离 . 微生物学通报 , 1988 , **15** (1) : 20 - 21 .
- [7] 金松谟 , 颜望明 , 王祖农 . 氧化硫杆菌结合转移系统的建立 . 生物工程学报 , 1993 , **9** (1) : 87 - 89 .
- [8] 东秀珠 , 蔡妙英 . 常见细菌系统鉴定手册 . 北京 : 科学出版社 , 2001 : 365 .
- [9] Mincer T J , Jensen P R , Kauffman C A , et al . Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** : 5005 - 5011 .
- [10] Hallberg K B , Lindström E B . Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov. a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology* , 1994 , **140** : 3451 - 3456 .
- [11] Amaro A M , Hallberg K B , Lindström E B , et al . An immunological assay for detection and enumeration of thermophilic biomining microorganism. *Appl Environ Microbiol* , 1994 , **60** : 3470 - 3473 .
- [12] Dopson M , Lindström E B . Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** : 36 - 40 .
- [13] Okibe N , Gericke M , Kevin B , et al . Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69** : 1936 - 1943 .

Isolation and Phylogenetic Analysis of A Moderately Thermophilic Acidophilic Sulfur Oxidizing Bacterium

LIU Ying QI Fang-Jun LIN Jian-Qun TIAN Ke-Li YAN Wang-Ming
(State Key Laboratory of Microbial & Technology , Shandong University , Jinan 250100 , China)

Abstract : A moderately thermophilic acidophilic sulfur-oxidizing bacterium MTH-04 was isolated from Tenchong area , Yunnan province in China . The morphological , biochemical and physiological characters of the isolated strain was studied . The cells of the strain MTH-04 were Gram negative and rod-shaped in $(0.6 \sim 0.8) \mu\text{m} \times (1 \sim 2) \mu\text{m}$. The strain can grow autotrophically by using elemental sulfur , tetrathionate and thiosulfate as sole energy sources . Growth does not occur with tryptone , yeast extract powder and glucose . The strain is not able to grow mixotrophically . The optimum growth temperature is $40^{\circ}\text{C} \sim 45^{\circ}\text{C}$ and the optimum pH is 2.0 ~ 3.0 . The generation time of the strain is 8h . The 16S rDNA sequence (AY427958) of the strain was analysed . A phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the relative bacteria species . In the phylogenetic tree MTH-04 was the closest relative to *Thiobacillus caldus* with more than 99.5% sequence similarity .

Key words : A moderately thermophilic acidophilic sulfur-oxidizing bacterium , 16S rDNA , Phylogenetic analysis