

嗜酸热硫球菌的一些古细菌特征

李雅芹 徐毅 蔡文六 钟慧芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道了一株专性能无机自养菌——嗜酸热硫球菌 (*Sulfothermobacter thermoacidophilum*) S-5 菌株的某些生理生化和代谢特性。通过电子显微镜技术及其它分析方法研究发现, S-层代表了该菌细胞外被的唯一组成, 并由规则排列的六边形亚单位构成, 亚单位之间的中心距离为 15.3 nm。S-层的初步电泳染色分析表明, 它主要由蛋白质组成, 但不含糖蛋白。液相色谱分析查明, 细胞外被中不含脂类成份, 即没有囊状的肽聚糖层。细胞脂类的红外光谱分析显示出醚键组份而不含酯键。在无细胞提取液中, 没有测出卡尔文循环的关键酶——1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶。可见嗜酸热硫球菌固定 CO₂ 的途径是不同于其它的硫氧化自养真细菌如氧化硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans* K) 的。这些试验结果充分体现了嗜酸热硫球菌的古细菌特征。

关键词 嗜酸热硫球菌; 古细菌

古细菌是一类独特的生物类群, 由于它们的极端生活环境以及在生物进化中的特殊地位, 近些年, 越来越引起生物学界的密切关注。基于某些大分子的结构以及代谢的特殊性, 如细胞外被不含有胞壁酸, 脂类含有醚键不含有酯键, 16S rRNA 的碱基排列顺序, tRNA 的特殊碱基的修饰以及 5S rRNA 的二级结构等, 这类生物既不同于原核生物中的真细菌, 也不同于真核生物, 已被看作为一个独立的生物界——原古界 (Urkingdom)^[1-3]。本组已从我国云南腾冲热泉区分离到一种专性能无机自养菌——嗜酸热硫球菌 (*Sulfothermobacter thermoacidophilum*) S-5 菌株, 该菌以元素硫为能源, 二氧化碳为碳源, 最适生长温度为 70℃, 最适 pH 为 2—3^[4]。

作者研究了这株菌的一些古细菌特征, 并进一步讨论了它的分类地位。

材料和方法

(一) 菌种和培养条件

试验菌种为嗜酸热硫球菌 S-5, 静置培养在含 0.075% 牛肉膏的改良 Allen 培养基中, pH 2.5, 温度 70℃^[4]。用于研究 CO₂ 固定途径的对照菌种为氧化硫杆菌 K, 来自英国 D.P. Kelly 教授, 30℃ 静置培养在 Starkcy-S^o 培养基中^[5]。

(二) 电子显微镜技术

离心收集对数生长末期的细胞 (8000 × g), 洗涤两次, 通过以下双固定技术制备超薄切片。首先用琼脂包埋洗涤后的细胞, 用 2.5% 戊二醛固定 2—6 小时, 然后用磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤。再以 1% 锇酸固定 2—4 小时, 用磷酸缓冲液洗涤, 用乙醇、环氧丙烷系列脱水, 接着用环氧丙烷—树脂浸透, 再用纯树脂包埋。固化后再切片, 以醋酸双氧铀及柠檬酸铅染色, 最后在透射电镜下 (日立 H-500) 观察。

(三) 生化分析方法

1. 细胞壁的提取和无细胞提取液的制备^[6]: 离心收集对数生长末期的细胞 (8,000 × g), 蒸馏水洗涤两次, 通过 X-Press 破碎器破碎, 将破碎物

本文于 1986 年 9 月 19 日收到。

本工作为张树政先生申请的国家自然科学基金研究项目内容之一。电镜照片为本所新技术室拍摄, 特此致谢。

悬浮在含 DNase I、pH 7.8 的 0.1 M Tris-HCl (含 10 mM MgCl₂) 缓冲液中,再离心 20 分钟(40,000 × g),上清液即为无细胞提取液。将沉淀物(粗 S-层)悬浮在 1% 的 Triton X-100 中,60℃ 1 小时。离心,沉淀物用蒸馏水离心洗涤 6 次(70,000 × g),则该沉淀物即为纯化的细胞 S-层制备物。

2. S-层组份的电泳染色分析^[17]: 将 S-层制备物进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,用考马斯亮蓝(染蛋白)和过碘酸-希夫试剂(染糖)染色测定是否有蛋白或糖蛋白存在。

3. 细胞脂类的提取: 将细菌冻干物置索氏提取器中,用氯仿-甲醇(1:1)溶液作为提取剂提取总脂。

4. 蛋白质含量的测定: 采用 Lowry 法^[11],以牛血清蛋白作为标准。

(四) 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶的测定

采用同位素技术。反应物总体积为 0.3 ml,其中含 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 16 mM (10 μCi) NaH¹⁴CO₃, 1.7 mM 1, 5-二磷酸核酮糖和一定量的无细胞提取液。反应开始前,在各反应瓶中分别加入嗜酸热硫球菌 S-5 和氧化硫硫杆菌 K 的无细胞提取液 270 μl,前者在 65℃,后者在 30℃ 活化 10 分钟,然后各加入 NaH¹⁴CO₃,

10 μl, 15 秒钟后立即加入 1, 5-二磷酸核酮糖 20 μl 分别在 65℃ 和 30℃ 反应 3 分钟。再加入 0.2 ml 冰醋酸终止反应;并除去未固定的多余 CO₂。最后将反应混合物 20 μl 点样在新华 3 号滤纸上(直径 2.1 cm),干燥后放入含 PPO 的闪烁液瓶中,在液体闪烁计数器(Beckman LS 5801)中测定放射量。对照瓶除了不加 1, 5-二磷酸核酮糖外,其它成分均和以上相同。

(五) 高效液相色谱(Waters 244)和红外光谱(Perkin-Elmer 599B)分析

分别测定细胞外被的胞壁酸和脂类成份。

结果和讨论

(一) 细胞壁的超微结构和组成特征

用透射电子显微镜观察嗜酸热硫球菌 S-5 的细胞超薄切片时发现,在许多细胞横切面的边缘上都可以看到锯齿形的排列,这一外层排列称作 S-层(表面层)。它代表了细胞外被的唯一组成,即为该菌的细胞壁,其厚度约 20 nm (图 1)。S-层由规则排列大小相同的六边形亚单位组成,亚

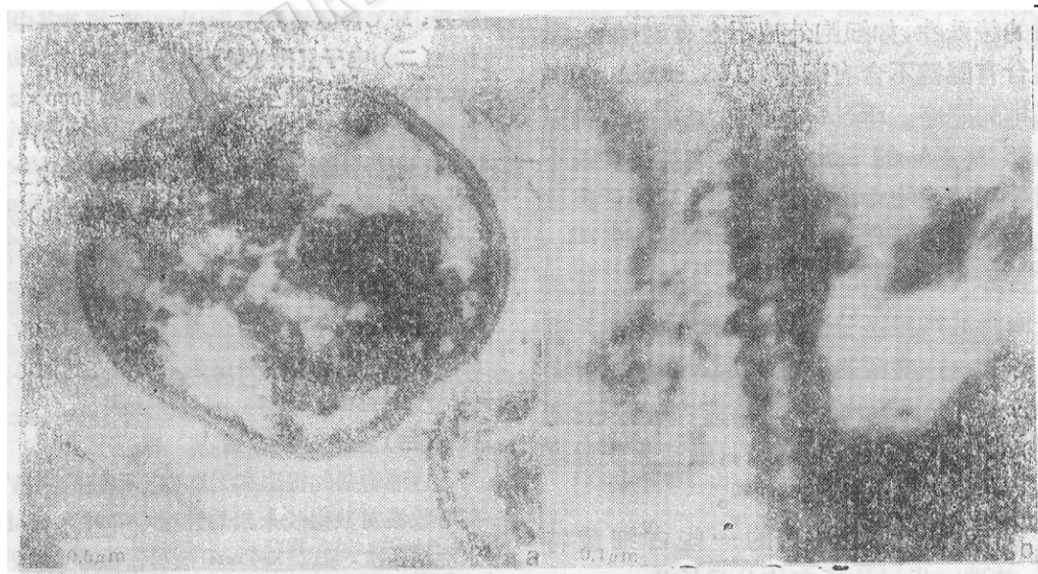


图 1 嗜酸热硫球菌 S-5 的超薄切片

a. 完整细胞 b. 细胞外被 (S-层) 的放大部分

Fig. 1 Ultrathin section of *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* S-5

a. The whole cell b. An enlargement of a portion of the cell envelope (S-layer)



图2 嗜酸热硫球菌 S-5 S-层的切面
Fig. 2 The section of the S-layer of *Sulfophaerellus thermoacidophilum* S-5



图3 嗜酸热硫球菌 S-5 细胞外被的示意图
SL: S-层 CM: 细胞质膜 CPL: 细胞质
Fig. 3 Cell envelope profile of *Sulfophaerellus thermoacidophilum* S-5

SL: S-layer CM: Cytoplasmic membrane
CPL: Cytoplasm

单位之间的中心距离为 15.3 nm (图 2)。

电泳染色的初步分析表明,该菌 S-层主要由蛋白质组成而不含有糖蛋白,因为在 S-层组分中没有发现高碘酸-希夫试剂(染糖)和考马斯亮蓝(染蛋白)都能染上色的成份。S-层的液相色谱分析证明,该菌细胞壁中不含胞壁酸,即无囊状的肽聚糖层。这些特征充分说明,嗜酸热硫球菌 S-5 的细胞外被具有典型的古细菌特征^[6,7,9,10]。

嗜酸热硫球菌细胞外被的这种单一的 S-层结构,在古细菌中是最常见的一种

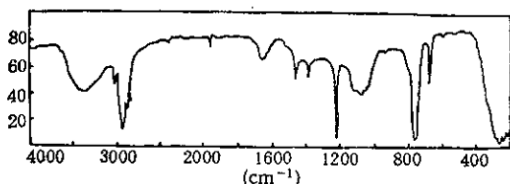


图4 嗜酸热硫球菌 S-5 脂类的红外光谱
Fig. 4 Infrared spectrum of the total lipids of *Sulfophaerellus thermoacidophilum* S-5

类型(图 3)。它代表了典型的革兰氏阴性古细菌的细胞外被,而与革兰氏阴性真细菌不同。这种革兰氏阴性古细菌的外被,既没有一个特殊的囊状肽聚糖层,也没有外膜层,而只有一个细胞质膜紧密相连,由六边形蛋白或糖蛋白(但该菌不含糖蛋白)亚单位构成的表面结构,即 S-层。这种结构在所有的嗜酸热古细菌 (*Thermoplasma* 例外,它没有细胞外被)以及许多嗜盐菌和甲烷产生菌中都存在,只是在某些性质上(如化学组成、溶解性等方面)有所差异^[9]。

(二) 细胞脂类的特征

对用索氏提取法制备的细胞总脂进行了红外光谱分析,其图谱如图 4 所示。由图 4 可以看出,在波数 1080 处有一强的红外吸收峰,这是醚键的特征峰;在波数 1740 处没有明显的红外吸收峰,这说明没有酯键存在。由此可见,嗜酸热硫球菌 S-5 的脂类特性与其它古细菌相同,即含有醚键而不含有酯键,因此有人将古细菌的脂类称为醚脂^[11]。

根据现有资料^[11],在绝大多数真核生物和原核生物尤其是好气真细菌中,甘油酯结构中的甘油与脂肪酸的连接方式一般都是以酯键的形式,而在所有古细菌中甘油与植烷醇则是以醚键相连的。对比其它古细菌总脂的红外图谱与嗜酸热硫球菌总脂的红外图谱十分相似,这表明嗜酸热硫球菌的脂类既不同于真细菌也不同于真核

表 1 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶的放射性测定

Table 1 Radioactive assay of Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase

类 种 Species	样品号 No.	反应温度(℃) Reaction temp.	无细胞提取液浓度 (mg/ml) Cell-free extract conc.	放射性计数(cpm) Radioactive counting
嗜酸热硫球菌 S-5 <i>Sulfothermobacillus</i> <i>thermoacidophilum</i> S-5	对照 Control	65	3.40	2228.50
	I	65	3.40	2228.50
	II	65	3.40	3169.00
氧化硫硫杆菌 K <i>Thiobacillus</i> <i>thiooxidans</i> K	对照 control	30	3.06	3768.00
	I	30	3.06	278339.98
	II	30	3.06	212757.50

生物,而显示出古细菌脂类的特征。醚键代替酯键,这可能是古细菌为了适应极端环境使膜结构更加稳定的因素之一。

(三) CO₂ 固定途径

在大多数化能无机自养真细菌中(如硫杆菌、氢氧化细菌、亚硝酸盐氧化细菌以及氢细菌),CO₂ 的自养固定途径一般主要是通过卡尔文循环实现的^[12]。但在自养古细菌中,至今尚未发现此循环。例如,在厌氧甲烷产气菌中,CO₂ 是通过活化乙酸盐途径(Activated acetate pathway)固定的^[13];在依赖硫的古细菌中(如 *Thermoproteus tenax*, *Thermoproteus neutrophilus* 和 *Sulfolobus brierleyi*),是通过还原三羧酸循环固定 CO₂ 的^[14]。

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶是卡尔文循环中的关键酶之一。本实验用同位素(¹⁴C)技术第一次在嗜酸热硫氧化古细菌中证明不存在1,5-二磷酸核酮糖羧化酶,即不存在卡尔文循环。用氧化硫的自养真细菌氧化硫硫杆菌作为对照菌株,比较了氧化硫的自养真细菌与古细菌之间固定 CO₂ 的差别。实验结果指出,1,5-二磷酸核酮糖羧化酶仅在氧化硫硫杆菌中存在并表现了高活性,而在嗜酸热硫球菌中则没发现任何迹象(表1)。

这一实验结果与其它古细菌(如 *Ther-*

moproteus neutrophilus) 的结果相符合^[15],说明嗜酸热硫球菌固定 CO₂ 的途径是不同于真细菌(如氧化硫硫杆菌)的。嗜酸热硫球菌到底以何种途径固定 CO₂,还有待进一步探讨。

关于嗜酸热硫球菌的分类地位,按照传统的以细胞组织为基础的分类观念,把所有无核膜的生物都统归于原核生物。但是由于它们的生活环境和系统发育方面存在着很大差异,因而这种分类方法可能不太合理。根据现代以系统发育为主的高级分类体系,不但着眼于细胞组织而且还要分析一些与系统发育有关的大分子物质以及其它有关参数(如 rRNA, tRNA, 细胞结构,细胞膜脂类,核糖体的形态,对抗菌素的敏感性等),把原来单一的原核生物又分成了两个类群:真细菌和古细菌^[1]。嗜酸热硫球菌在许多方面(如细胞壁结构和组成、细胞脂类等)均与典型的古细菌相同。因而可以得出结论,嗜酸热硫球菌属于古细菌成员。

到目前为止,已发现的古细菌根据其16S rRNA 的顺序分析,大致可以分成两大类群^[2,3]:甲烷产生菌——嗜盐菌古细菌类群(包括嗜酸热支原体)和依赖硫的嗜热嗜酸古细菌类群。后一类群又包括二个分枝:氧化硫的古细菌(如硫化叶菌)和还

原硫的古细菌(如热变形菌)。本实验所用的嗜酸热硫球菌依赖硫进行生长,通过硫的氧化获取能量,所以应该把它放在古细菌的第二类群,而且还应和硫化叶菌一起归于氧化硫的自养古细菌分枝中。然而,把嗜酸热硫球菌与硫化叶菌属的模式菌嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)进行比较,可以看出两株菌不但营养条件和 G + C 百分比有较大差别^[4],而且在细胞壁组成和性质方面也有明显不同。例如,根据我们的研究结果,嗜酸热硫球菌细胞壁中无糖蛋白成份,在 2% 的 SDS 溶液中溶解,多复合电泳带以及不同的 Sepharose 凝胶洗脱图谱(另文发表);而嗜酸热硫化叶菌细胞壁为糖蛋白成份,不溶于 2% 的 SDS 溶液中,有两个糖蛋白带和相应的 Sepharose 凝胶洗脱图谱^[7]。据此,更有理由把嗜酸热硫球菌列为不同于硫化叶菌的新属——硫球菌属(*Sulfosphaerellus*)。

参 考 文 献

- [1] Woese, C. R.: *Scientific American*, 244: 98—121, 1981.
- [2] Woese, C. R. and R. S. Wolfe: in *The Bacteria, A Treatise on Structure and Function*, Vol. VIII, Archaeobacteria, (Woese, C. R. and R. S. Wolfe, eds), Academic Press, New York-London, pp. 561—564, 1985.
- [3] Woese, C. R. and C. J. Olsen: *Syst. Appl. Microbiol.*, 7: 161—177, 1986.
- [4] 钟慧芳等: *微生物学报*, 22: 1—7, 1982.
- [5] Starkey, R. L.: *Soil Science*, 39: 197—219, 1935.
- [6] König, H. and K. O. Stetter: *Syst. Appl. Microbiol.*, 7: 300—309, 1986.
- [7] Michel, H. et al.: in *Electron Microscopy at Molecular Dimensions*, (Baumeister, W. and W. Vogell, eds), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 27—35, 1980.
- [8] Lowry, O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [9] Kandler, O. and H. König: in *The Bacteria, A Treatise on Structure and Function*, Vol. VIII, Archaeobacteria, (Woese, C. R. and R. S. Wolfe, eds), Academic Press, New York-London, pp. 413—457, 1985.
- [10] Sleytr, U. B. et al.: *Syst. Appl. Microbiol.*, 7: 310—313, 1986.
- [11] Langworthy, T. A.: in *The Bacteria, A Treatise on Structure and Function*, Vol. VIII, Archaeobacteria, (Woese, C. R. and R. S. Wolfe, eds), Academic Press, New York-London, pp. 459—497, 1985.
- [12] 郑士民等:《自养微生物》,科学出版社,北京,第 132—142 页,1983。
- [13] Hemming, A. and K. H. Blotvogel: *TIBS*, 10 (5): 198—200, 1985.
- [14] Fuchs, G. and E. Stupperich: *Syst. Appl. Microbiol.*, 7: 364—369, 1986.

ARCHAEBACTERIAL CHARACTERISTICS OF *SULFOSPHAERELLUS* *THERMOACIDOPHILUM*

Li Yaqin Xu Yi Cai Wenliu Zhong Huifang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Some physiological, biochemistrical properties and metabolism of an obligate chemolithoautotrophic bacterium, *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* S-5, have been studied by an electron microscopy and other methods. It has been found that the S-layer represents the only component of the bacterial envelope, which is composed of the regularly arranged hexagonal subunits with center-to-center spacings of about 15.3 nm.

The preliminary analysis of electrophoresis staining showed that the S-layer mainly consists of protein but no glycoprotein. Liquid chromatographic analysis indicated that the muramic acid is not present in the envelope, which means that the cell wall is free from a specific sacculus polymer (peptidoglycan layer). Infrared spectrum of the cellular total lipids showed that ether bond in-

stead of ester bonds.

In the cell-free extract of *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* S-5, the key enzyme of the Calvin cycle, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, could not be detected. We thus concluded that the CO₂ fixation pathway in *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* is different from that in the autotrophic eubacteria such as *Tiobacillus thiooxidans* K which fixes CO₂ via the Calvin cycle.

The results suggest that *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* possesses the typical archaeobacterial characteristics.

Key words

Sulfosphaerellus thermoacidophilum; Archaeobacteria