

热原体属的一个新种*

李雅芹 刘国振 钟慧芳

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从四川省某煤矿发热的煤矸石堆上,分离到一株极端嗜热嗜酸细菌(ES-23),其生长的温度范围为 50--75℃,最适 70℃;生长的 pH 范围为 1.0—5.0,最适 pH2.0。该菌株好氧,兼性自养,既能利用有机物异养生长,又能利用元素硫氧化产硫酸获得能量、固定空气中二氧化碳自养生长。革兰氏染色阴性。细胞球形或椭圆形,直径 0.9—1.5 μm 。自养生长时细胞外有类似纤毛的附属物。细胞外被由分三层的膜构成,无细胞壁。膜脂中醚键代替酯键。DNA 中 G+C 含量为 38mol%。根据这些特征,鉴定此菌株为热原体属(*Thermoplasma*)的一个新种,定名为氧化硫热原体(*Thermoplasma thiooxidans* nov. sp.)。

关键词 热原体,嗜热嗜酸菌,古细菌

1970年, Darland 等人从美国印第安那州南部发热的废煤堆上,分离到一株形态类似枝原体的细菌,这是第一个被报道的嗜酸嗜热古细菌,最初被列入枝原体属。^[1]在《伯杰细菌鉴定手册》第八版中,是个分类位置不确定的属。随着极端环境微生物的发现和古细菌在生物界分类地位的确立,热原体已正式列作古细菌中没有细胞壁的一个类群^[2]。到目前为止,这一类群只有一个属 *Thermoplasma*, 包括两个种——*T. acidophilum* 和 *T. volcanium*^[3]。本文报道了热原体属一新种的分离和鉴定结果。

1 材料和方法

1.1 样品

分离细菌的样品采自四川省某煤矿发热的煤矸石堆。

1.2 培养基和培养条件

采用 Allen 的改良培养基^[4](以下简称 A 培养基),置于 60—70℃温箱静置培养,蒸发的水份以蒸馏水补充。

自养营养:在 A 无机盐培养基中加硫磺粉作能源。异养营养:在 A 无机盐培养基中加有机物代替硫磺粉。混合营养:在 A 无机盐培养基中同时加硫磺粉和有机物。细菌生长以 A₅₄₀ 作指示,在 721 分光光度计上测定。利用硫磺粉作能源产硫酸时以 pH 作指示,在 Beckman Φ 72 pH 计上测定。

1.3 电镜样品制备和观察

用常规方法制备超薄切片和扫描电镜样品,在日立 H-500 透射电镜上观察细胞形态

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 4 月 28 日收到。

和超微结构。

1.4 细胞脂类分析

离心收集的洗涤细胞,冷冻干燥后,取 0.3g 用 20ml 1:1 的氯仿-甲醇混合液,于索式提取器中抽提 8 小时^[5]。蒸发除去有机溶剂,用 KBr 压片法在 SPECORD 75IR (CARL ZEISS) 红外光谱仪上检测红外吸收光谱。

1.5 DNA 的提取及 G+C mol % 的测定

DNA 的提取和 G+C 含量的测定基本按 Marmur 方法^[6]。室温下滴几滴 1:1 氨水于细胞悬液中,细胞立刻裂解。然后加入 EDTA 并调节 pH 至 7.5。再加蛋白酶 E (最终浓度 50 μ g/ml) 于 38 $^{\circ}$ C 水浴上处理 30 分钟,加 25% SDS 溶液 (最终浓度 0.5%)。静置片刻后,得到的 DNA 溶解在 0.1SSC 中,以标准菌 (大肠杆菌) 作对照,在 Beckman Du-7 紫外分光光度计上测裂解温度 T_m ,再计算 G+C mol %。

2 结果

2.1 富集培养和分离

在添加硫磺粉的 A 无机培养基中接入采集的泥土样,于 60 $^{\circ}$ C 温箱静置培养 10—14 天,培养液呈现浑浊,显微镜下观察细菌生长活跃,培养液 pH 由初始 3.0 降到 1.0—1.5,再按 1% 接种量移入新鲜培养基中。如此移种两年,分离出两株纯培养物,以 ES-23 作为本试验用菌株。

2.2 细胞形态和超微结构

在光学显微镜和电子显微镜下看到的 ES-23 细胞均呈球形或椭圆形,直径 0.9—1.5 μ m。

电子显微镜下,ES-23 细胞间没有明显的界限,自生长的幼龄细胞似“油煎荷包蛋”,细胞表面有类似纤毛的附属物,异养生长时看不到附属物 (图版 I-1—2)。

由超薄切片观察可知,ES-23 细胞外没有细胞壁 (图版 I-3—4),细胞外被仅由分三层的膜构成 (图版 I-4 箭头所指)。

ES-23 的革兰氏染色反应为阴性。

2.3 生长温度试验

温度范围设在 45—80 $^{\circ}$ C, 5 $^{\circ}$ C 为一个梯度间隔,静置培养,ES-23 生长结果如图 1。由图 1 可见,在自养营养和混合营养两种条件下,ES-23 的生长温度范围均为 50—75 $^{\circ}$ C,最适温度为 70 $^{\circ}$ C。

2.4 生长 pH 试验

培养基中加硫磺粉 (1%) 和胰蛋白粉 (0.02%), 设定 pH 范围为 1.0—6.0, pH 梯度间隔为 1.0。培养 8 天,生长结果见图 2。由图 2 可见,ES-23 生长的 pH 范围为 1.0—5.0,最适 pH 2.0。

2.5 营养试验

2.5.1 自养和混合营养生长:在添加硫磺粉的培养基中,ES-23 能利用元素硫作能源,以空气中二氧化碳作碳源,自养生长,元素硫被氧化生成硫酸 (pH 作指示)。在自养和混合营养 (1% 硫磺粉和 0.1% 酵母粉) 条件下生长情况如图 1 和 3。由图可以清楚地看到,ES-23

自养生长缓慢,菌量也少。比如生长14天时, A_{540} 不超过0.10;混合营养条件下生长7天时, A_{540} 已超过0.50。自养生长时,pH降到0.9以下时,对细菌的生长和细胞稳定性影响较大,这使得该菌株在生长对数期末立即进入衰亡期。

以 Fe^{2+} 为能源的培养基中,ES-23不生长。如果在自养或混合营养培养基中加入 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (4%),ES-23仍生长很好,这说明ES-23虽然不能直接利用 Fe^{2+} 作能源,却能耐受较高浓度的 Fe^{2+} 。

2.5.2 异养生长:对4种实验室常用的复合有机物及几种单糖和贰糖作能源进行了试验,有机物浓度为0.01%和0.10%。培养结果表明,多数有机物能被ES-23所利用,如酵母粉、蛋白胨、牛肉汁、蔗糖、葡萄糖、核糖和乳糖等。

以上营养试验结果说明,ES-23菌株是兼性自养菌。

2.6 细胞脂类

ES-23菌株细胞脂类的红外光谱分析见图4。在波数1080处有一吸收峰,恰是醚键吸收峰,而在波数1740处无吸收峰,表明脂类中无酯键。

2.7 DNA中G+C含量

以大肠杆菌AS1.365作标准菌,测得ES-23菌株DNA中的G+C含量为38 mol%(Tm)。

3 讨论

在1989年《伯杰系统细菌学手册》中,热原体 *Thermoplasma* 已被单独列为古细菌中没有细胞壁的一个类群^[2]。迄今报道仅有的两个种是 *T. acidophilum* 和 *T. volcanium*^[3]。这两种菌专性异养,兼性好氧,在厌氧条件下还原元素硫生成 H_2S 。其中 *T. acidophilum* 的DNA中G+C含量为46mol%,*T. volcanium*的DNA中G+C含量为38—40mol%。本工作分离的菌株ES-23与已知的两个种具有共同特点:都生长在类似的生态环境,嗜热

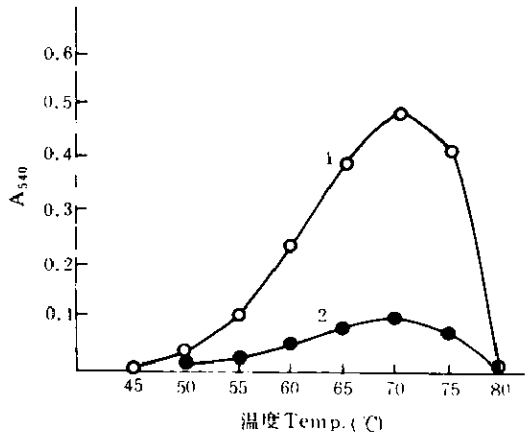


图1 温度对ES-23菌株生长的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the growth of strain ES-23

1. A 无机培养基中加元素硫(1%)和酵母粉(0.1%),生长7天;
2. A 无机培养基中只加元素硫(1%),生长14天。
1. Growth in A medium with elemental sulfur (1%) and yeast extracts (0.1%), 7d;
2. Growth in A medium with elemental sulfur (1%), 14d.

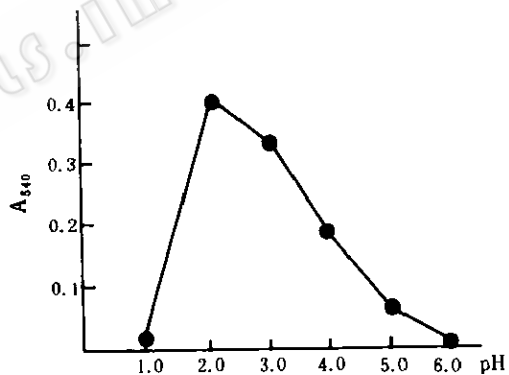


图2 pH对ES-23菌株生长的影响

Fig. 2 Effect of pH on the growth of strain ES-23

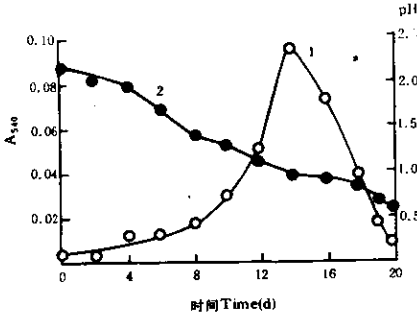


图3 ES-23 菌株在含元素硫培养基中的自养生长
 Fig. 3 Autotrophic growth of strain ES-23
 in A medium with elemental sulfur
 1. A₅₄₀; 2. pH.

嗜酸, G⁻; 细胞没有坚硬的细胞壁, 细胞外被由分三层的膜构成, 膜在碱性介质中均不稳定; 细胞脂类中醚键代替酯键; 都能异养生长, 因此应当归入同一属。ES-23与已知的两个种主要差别在于生长温度高 10℃; 兼性自养, 好氧条件下能氧化元素硫生成硫酸; DNA 中 G+C 含量为 38mol%, 比 *T. acidophilum* 低 8% (两个种间 G+C 含量差别在 5—10% 范围)。根据这些差别把 ES-23 定为热原体属中的一个新种——氧化硫热原体 *Thermoplasma thiooxidans* sp. nov.。ES-23 与另两个种的主要特征对比详见表 1。

菌株 ES-23 与已知的两个热原体种相比, 细胞内已分化出膜包被的结构。因此,

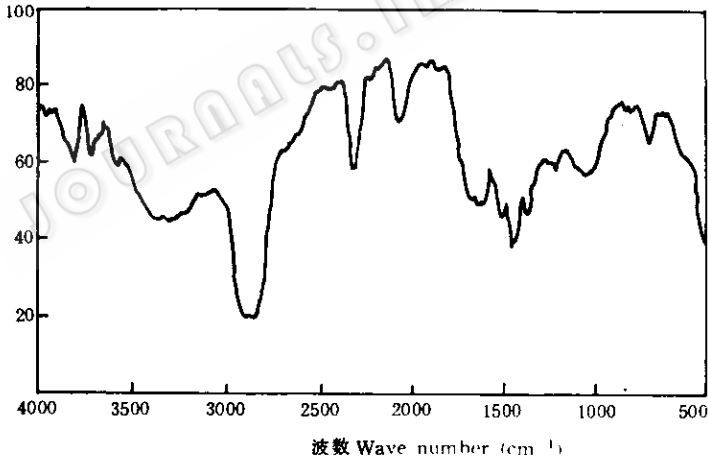


图4 ES-23 菌株脂类的红外光谱
 Fig. 4 Infrared spectra of cell lipids of strain ES-23

对新种的深入研究不仅有助于确定其分类地位, 而且对于探索生命起源和演化都有重要意义。由于热原体染色体的简单性和细胞膜结构的特殊性, 很有可能成为高温菌分子遗传的优良菌株。

表1 菌株 ES-23和 *Thermoplasma* 的主要特征Table 1 Major characteristics of strain ES-23 and *Thermoplasma*

特 征 Characteristics		ES-23	<i>Thermoplasma</i>	
			<i>T. acidophilum</i>	<i>T. volcanium</i>
生长温度 Temperature (°C)	范 围 Range	50—75	45—63	33—67
	最 佳 Optimum	70	59	60
pH	范 围 Range	1.0—5.0	0.5—4.0	1.0—4.0
	最 佳 Optimum	2.0	1.0—2.0	2.0
形 态 Morphology	G ⁻ ,球形或椭圆形 spherical or oval	G ⁻ ,球形—丝状 varying from spherical to filamentous	G ⁻ ,球形—丝状 varying from spherical to filamentous	
胞外附属物 Surface appendages	类似纤毛结构 (自养生长时) peri pilus like structure (autotrophic growth)	单极单鞭毛 monopolar monotrichous	单极单鞭毛 monopolar monotrichous	
细胞壁 Cell wall	无细胞壁 lack of cell wall	无细胞壁 lack of cell wall	无细胞壁 lack of cell wall	
膜结构 Membrane structure	具三层膜结构和包被器官 triple layed membrane structure with cell organs	具三层膜结构 triple layed membrane structure	具三层膜结构 triple layed membrane structure	
细胞脂 Membrane lipids	含醚脂 contain ether lipids	含醚脂 contain ether lipids	含醚脂 contain ether lipids	
营 养 Nutrition	好氧 aerobic 兼性自养 facultative autotrophic	兼性好氧 facultative aerobic 专性异养 obligative heterotrophic	兼性好氧 facultative aerobic 专性异养 obligative heterotrophic	
G+C mol% of DNA	38	46	38—40	
生态环境 Habitat	发热的煤矸石堆 self-heating coal spoil pile	硫质喷气区和发热的废煤堆 solfatarata field and self-heating coal refuse pile	硫质喷气区和发热的废煤堆 solfatarata field and self-heating coal refuse pile	

参 考 文 献

- [1] Darland G, Brock T D, Samsonoff W *et al.* *Science*, 1970, **170**:1415—1418.
- [2] Staley J T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol 3. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1989. 2233—2236.
- [3] Segerer T, Langworthy T A, Stetter K O. *System Appl Microbiol*, 1988, (10): 161—171.
- [4] Brock T D, Brock K M, Belly R T *et al.* *Arch Mikrobiol*, 1972, **84**: 54—68.
- [5] 蔡武斌. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社, 1982. 54.
- [6] Marmor J. *Mol Biol*, 1961, (3): 208—218.

A NEW SPECIES OF *THERMOPLASMA*

Li Yaqin Liu Guozhen Zhong Huifang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract An extremely thermoacidophilic strain, ES-23, was isolated from a self-heating coal spoil pile, Sichuan, China. The new isolate grows between 50 and 75°C with optimum 70°C and pH 1.0—5.0 with optimum 2.0. Strain ES-23 is aerobic and facultative autotrophic depending both heterotrophically on organic compounds and autotrophically on elemental sulfur as energy source and CO₂ as carbon source. G⁻, spherical or oval with 0.9—1.5 μm in diameter. The autotrophic growth showed periplus-like structure. Cells lack a rigid cell wall and surrounded only by a single triple layered membrane containing ether lipids. GC content of DNA is 38 mol% (Tm). It has been determined as a new species of *Thermoplasma* genus and named *Thermoplasma thiooxidans* sp. nov.

Key words *Thermoplasma*, Thermoacidophilic, Archaeobacteria

图 版 说 明

Explanation of plate

1—2. 菌株 ES-23 的电子显微照片: 1. 自养生长 (10000×); 2. 异养生长 (9000×)。3—4. 菌株 ES-23 细胞超薄切片电子显微照片: 3. 细胞超薄切片 (24000×); 4. 箭头示出膜分三层结构 (24000×)。

1—2. Electron micrographs of cells of strain ES-23: 1. Autotrophic growth; 2. Heterotrophic growth. 3—4. Electron micrographs of thinsectioned cells of strain ES-23; 3. Thin section of cells; 4. Showing the triple layered membrane structure by the arrow.