



基于16S rRNA和RubisCO基因对嗜酸硫杆菌的系统发育及多样性

刘敏瑞¹, 蔺朋武², 齐兴娥¹, 倪永清^{1*}

¹ 石河子大学食品学院, 新疆 石河子 832000

² 石河子大学生命科学学院, 新疆 石河子 832000

摘要: 【目的】明确不同地理来源的*Acidithiobacillus* spp.种群是否表现出显著的地域性和异域物种形成; 为了解微生物谱系地理、多样性维持机制和微生物分子地理学提供基础数据。【方法】采用16S rRNA基因、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO)功能基因序列同源性分析构建相应的系统发育树, 分析*Acidithiobacillus* spp.种群的遗传多样性。【结果】从3个不同的地域分离到35株菌聚为5大类群, 其中菌株YNTR4-15可能是铁氧化细菌(*Leptospirillum ferrooxidans*), 菌株HBDY3-3被鉴定为另一铁氧化细菌(*Leptospirillum ferrodiazotrophum*); 有4株可能是*Acidithiobacillus ferrivorans*; 6株是*Acidithiobacillus ferridurans*, 其余菌株均被鉴定为*Acidithiobacillus ferrooxidans*。对26株代表性菌株的RubisCO I型*cbbL*基因和II型*cbbM*基因的分析, 发现19株菌具有双拷贝*cbbL*基因, 分别为*cbbL1*和*cbbL2*基因; 7株菌只检测到了*cbbL1*。*cbbL1*和*cbbL2*基因都有3个序列型; 而*cbbM*基因是单拷贝。RubisCO基因的密码子偏爱性不强。【结论】分离自3个地域的菌株16S rRNA/RubisCO基因存在序列差异, *Acidithiobacillus* spp.种群存在显著的遗传多样性。嗜酸硫杆菌分离菌株基于16S rRNA基因的系统发育树和RubisCO基因的发育树不一致。

关键词: *Acidithiobacillus* spp., 16S rRNA基因, RubisCO基因, 系统发育, 遗传多样性

嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus*)是一类极其重要的极端微生物, 能在极酸(pH1-3)、高浓度重金属环境中生长繁殖^[1]。硫杆菌属的细菌是革兰氏阴性, 杆状, 化能无机自养生物型, 通过氧化亚铁、硫和部分硫化物获得能量^[1-3], 在地球表面的

酸矿废水、酸性污泥等含硫环境中分布广泛。到目前为止, 已分离鉴定的硫杆菌属细菌包括*Acidithiobacillus thiooxidans*、*Acidithiobacillus ferrooxidans*、*Acidithiobacillus albertensis*、*Acidithiobacillus caldus*、*Acidithiobacillus*

基金项目: 国家自然科学基金(31260001, C010101)

*通信作者。E-mail: niyqlzu@sina.com

收稿日期: 2015-07-10; 修回日期: 2015-10-20; 网络出版日期: 2015-10-29

ferrivorans 和 *Acidithiobacillus ferridurans* 6 个种^[4-6]。其中 *Acidithiobacillus ferridurans* 和 *Acidithiobacillus ferrivorans* 以前被认为是 *Acidithiobacillus ferrooxidans*；但基于系统发育和其他的分析方法，这些菌株明显的代表几个种^[7-10]。而 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 是目前研究最多的菌种，是细菌浸矿体系中的主导菌种。细菌浸矿这种方法具有低成本、低能耗、无污染、环保等优点，在能源紧缺的今天，倍受人们的关注。

RubisCO 是卡尔文循环催化第一步的关键酶，目前分析证明 RubisCO 有 4 个型^[11-12]。I 型广泛分布在能固定 CO₂ 的生物体内，分为 2 组，“green-like”和“red-like”^[13]。II 型普遍存在于变形菌纲，III 型和 IV 型是新发现的；III 型主要存在于古菌当中，而 IV 型比较少见。RubisCO I 型由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成，这 2 个亚基分别由 *cbbL* 和 *cbbS* 基因来编码^[14]。II 型由唯一的大亚基组成，通过 *cbbM* 基因来编码^[14]。虽然大多数微生物只有 RuBisCO 的 I 型，但有的细菌只有 RuBisCO II 型，一些细菌既有 I 型又有 II 型，有的细菌的 I 型有更多的拷贝。由于 RubisCO 基因具有一定的功能和序列保守性，因此可以用来指示环境中化能自养菌种群的多样性^[12,15]。

Acidithiobacillus spp. 在地球上呈不连续性的分布，而且存在明显的地理隔离，因此，嗜酸硫杆菌适合作为原核生物谱系地理研究的模式生物^[16-17]。量化的因素解释了群体变异的丰度和多样性，种群是生态的核心目标^[18]。在微生物种群研究中，遗传距离和地理距离之间存在相关性^[6,19]。由于微生物个体极小、数量极其庞大和遗传交换的不确定性，使得我们对微生物种群多样性精细尺度的分辨和微进化机制的认识远远不够。目前，嗜酸硫杆菌相关研究报道很少。由于云南腾冲、湖北大冶和新疆富蕴的酸矿废水含硫环境中极端嗜酸细菌广泛分布，而且这 3 个地理

位点之间存在大尺度的空间距离(几千、上万公里)，极端的栖息环境产生明显的地理隔离和遗传交换屏障，不同来源的 *Acidithiobacillus* spp. 表现出更显著的遗传差异。本文采用 3 种纯培养的方法从我国云南、新疆、湖北 3 个不同气候带的矿区样品中分离 *Acidithiobacillus* 菌株，并基于 16S rRNA 基因、RubisCO 功能基因序列同源性分析构建相应的系统发育树，比较 3 个不同地理来源嗜酸硫杆菌的多样性，分析 *Acidithiobacillus* spp. 种群遗传多样性；为揭示极端环境下的基因组变异，了解微生物谱系地理、多样性维持机制和微生物分子地理学提供数据基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集：2013 年 9 月先后在中国云南腾冲、湖北大冶、新疆富蕴 3 个地方采集样品。采集各个矿区的水样和土样于无菌塑料管中，并密封；测定矿水的 pH；详细记录采样时间和地点，采集点的海拔，温度及矿体组成等信息，样品相关信息见表 1。

1.1.2 培养方法：采用 3 种方法。方法一，采用 FeTSB 培养基^[20]。溶液 A：称取 10 g FeSO₄·7H₂O 溶于 20 mL 蒸馏水，用稀硫酸调 pH 至 2.0，过滤除菌；溶液 B：1.25 g (NH₄)₂SO₄，0.25 g tryptone soya broth (TSB，大豆胰蛋白胨肉汤)，MgSO₄·7H₂O 0.5 g，蒸馏水 680 mL，用稀硫酸调 pH 2.0-2.5、121 °C 高压灭菌 15 min，冷却至 60 °C；溶液 C：细菌琼脂(bacteriological agar)或琼脂糖(agarose) 7 g，蒸馏水 300 mL、121 °C 高压灭菌 15 min，冷却至 60 °C。将无菌的 100 mmol/L K₂O₆S₄ 溶液加入上述培养基的溶液 B (basal salts/TSB) 中，使 K₂O₆S₄ 的终浓度为 2.5 mmol/L，然后将之与 A 液、C 液分别混合，混合均匀后倒平板。方法二，采用 Solid2:2 培养基^[21]。溶液 A：2 g

表1. 3个地域样品的地理及物化特征

Table 1. The related information of the 3 regions samples

Sapling sites	Altitude/ m	North latitude	East long latitude	pH	Ec/(ms/cm)	Cu/(mg/L)	Zn/(mg/kg)	Fe/(mg/kg)	Mn/(mg/kg)
Soil sample 1 in Tengchong, Yunnan (云南腾冲)	1635	25°03'	98°51'	3.2	2.23	123.43	234.45	745.76	134.43
Soil sample 2 in Tengchong, Yunnan (云南腾冲)	1640	25°13'	98°46'	3.0	2.54	133.45	224.54	735.65	131.65
Soil sample 4 in Tengchong, Yunnan (云南腾冲)	1651	24°57'	98°41'	3.1	2.10	123.46	254.75	713.86	130.43
Soil sample 5 in Tengchong, Yunnan (云南腾冲)	1669	24°49'	98°39'	3.4	2.34	133.75	204.26	736.54	135.96
Hot spring water sample in Tengchong, Yunnan (云南腾冲)	1345	24°56'	98°26'	2.9	1.83	111.43	167.36	675.54	130.10
Soil sample 1 in Daye, Hubei (湖北大冶)	146	30°12'	114°32'	2.9	2.33	143.57	13.50	800.07	24.33
Soil sample 2 in Daye, Hubei (湖北大冶)	151	29°44'	114°89'	3.0	2.02	132.68	15.37	830.35	23.63
Soil sample 3 in Daye, Hubei (湖北大冶)	163	30°03'	114°76'	3.1	2.33	165.86	14.86	789.46	24.13
Soli sample 2 in Fuyun, Xinjiang (新疆富蕴)	1134	47°07'	89°44'	4.5	1.95	143.36	28.61	180.56	27.18
Soli sample 5 in Fuyun, Xinjiang (新疆富蕴)	1154	47°26'	89°16'	4.7	1.99	112.87	27.17	196.45	26.78
Soli sample 6 in Fuyun, Xinjiang (新疆富蕴)	1201	47°56'	89°23'	4.4	2.35	132.97	22.64	176.47	25.98

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶于10 mL蒸馏水, 过滤除菌; 溶液B: 2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于10 mL蒸馏水, 调pH 4.8, 过滤除菌; 溶液C: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.5 g, KCl 0.15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g, 蒸馏水500 mL用稀硫酸调pH 4.6, 121 °C高压灭菌15 min, 冷却至60 °C; 溶液D: agar 6.0 g, 480 mL蒸馏水, 121 °C高压灭菌15 min冷却至60 °C。将溶液A、D, B、C分别先混合, 再混合这两种溶液, 混合液的最最终pH为4.6。方法三, FeTSBo 固体培养基^[22-23]。下层培养基: A液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 g, 蒸馏水20 mL, 用稀硫酸调pH 2.0, 过滤除菌; B液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, TSB 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, pH 2.5, 蒸馏水400 mL; C液: 琼脂糖5.6 g, 蒸馏水380 mL。B液和C液121 °C高压灭菌15 min冷却至60 °C。上层培养基: A液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.2 g, 蒸馏水20 mL, 用稀硫酸调pH 2.0, 过滤除菌; B液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, TSB 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 蒸馏水100 mL, pH 2.0; C液: 琼脂糖2.0 g, 蒸馏水220 mL。将上述下层培养基中的A、B、C液分别

混合, 然后加入2.5%的嗜酸异养菌, 混合均匀, 每个无菌培养皿中倒入约20 mL, 同时, 上层培养基保持温度在60 °C。上层培养基的B液中加入适量的无菌微量元素和 $\text{K}_2\text{O}_6\text{S}_4$ 溶液, 使 $\text{K}_2\text{O}_6\text{S}_4$ 终浓度为2.5 mmol/L。等下层培养基凝固后, 在每个平板中再加入上层培养基约10 mL, 旋转使之涂布均匀, 制成双层培养基。9K液体培养基^[24], A液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KH_2PO_4 0.5 g, KCl 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 蒸馏水700 mL, 稀硫酸 H_2SO_4 调pH至2.0, 121 °C灭菌15 min, 冷却至60 °C; B液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44.3 g, 蒸馏水300 mL, 过滤灭菌, A液和B液混合。克隆实验培养基: 用于克隆实验的培养基主要为SOB培养基, 抗生素为氨苄青霉素钠盐; IPTG和X-Gal 试剂浓度分别为24 mg/mL、20 mg/mL。

1.1.3 主要试剂和仪器: PCR纯化试剂盒 (*EasyPureTM Quick Gel Extraction Kit*)购自上海宝曼生物科技有限公司; 大肠杆菌DH5 α 购自QIAGEN公司; TA克隆载体试剂盒(pUC-T Ligasing Kit)购

自北京康为世纪生物科技有限公司; PCR引物购自TaKaRa公司; DNA分子量maker购自天根生化科技(北京)有限公司; 高速离心机为德国Thermo公司Fresco21型; PCR仪为德国Biometra公司Tprofessional; 凝胶成像仪为美国BioRad公司Gel DOC XR; 水平电泳仪为美国BioRad公司PowerPac Universal。

1.2 嗜酸硫杆菌的纯化与分离

为了获得最大多样性的菌株, 不富集培养, 采用直接分离法。将采集的酸矿废水样和土样梯度稀释后涂平板, 吸取浓度分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 的稀释液各0.15 mL, 分别接种到固体培养基, 涂布均匀, 标记对应稀释度、编号及时间。每个梯度做3个平行, 在培养箱中30 °C倒置培养, 等固体培养基表面出现铁锈色圆点状小菌落时, 将小菌落挑起, 分别接在装有50 mL 9K培养液的100 mL的小三角瓶中进行扩大培养, 30 °C 150 r/min振荡培养。直至培养液变红, 即菌液生长基本达到对数期, 然后进行重复涂布平板, 挑取单菌落以便获得每株的纯培养物。

1.3 16S rRNA基因的系统发育分析

采用CTAB微量提取法提取单菌落的DNA, 利用16S rRNA基因通用引物27F和1492R进行PCR扩增。凝胶电泳检测扩增产物后, 送上海美吉测序公司测序, 将所得结果用BLAST序列搜索, 获得同源性高的相关种的序列。利用CLUSTAL X 1.83软件序列对齐, 采用邻接法建立系统发育树。

1.4 *cbbL* 基因扩增和序列分析

根据16S rRNA基因的系统发育, 对每个类群中代表株菌进行扩增, 共选取22株分离菌和4株模式菌作为研究对象。*cbbL*基因扩增引物为RubIgF-RubIgR, 扩增方法参照文献[11], 扩增产物为750 bp。采用试剂盒(EasyPure™ Quick Gel Extraction Kit)纯化产物, 然后利用pUC-T Ligasing Kit克隆

试剂盒进行克隆, 挑取白斑菌落用M13-47和RV-M引物来鉴定重组子。为了试验的准确性每个基因的克隆子随机挑选5个阳性克隆子送上海美吉测序公司进行测序。

1.5 *cbbL* 基因扩增和序列分析

*cbbM*基因扩增所用引物为cbbMF (5'-GGCA CCATCATCAAGCCCAAG-3')和cbbMR(5'-TCTTGCCGTAGCCCATGGTGC-3')^[25], 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 57 °C 1 min; 72 °C 7 min, 35个循环; 72 °C 7 min。克隆及测序实验过程同*cbbL*基因。

1.6 数据统计分析

剔除所测得的*cbbL*和*cbbM*基因序列中特别短的序列, 去载体, 整理序列, 采用BioEdit 7.0.5软件(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)进行手动校正, 统一序列方向, 采用Clustal X 1.8软件将序列对齐, 进化距离的计算采用邻接法Neighbor-Joining, 用MEGA 5.0软件中的p-distances法和Kimura-2-parameter双参数法构建系统发育树, 进化树分支模式的稳定性分析采用bootstrap法, 重复次数为1000。利用DnaSPv5软件分别计算*cbbL*和*cbbM*基因的密码子使用情况及非同义突变率和同义突变率比值(K_a/K_s)。

2 结果和分析

2.1 嗜酸硫杆菌的分离

从云南腾冲、湖北大冶和新疆富蕴3个地域的样品中共分离到35株嗜酸硫杆菌, 其中*Acidithiobacillus* spp.在FeTSB培养基上很难形成单菌落, 而且菌落稀少(图1-A)。涂平板的菌液浓度太大(10^{-1})时, 形成黄色菌苔。若涂平板菌液的浓度较小(10^{-4})时, 几乎没有菌落。图1-A是稀释度为 10^{-3} 时在FeTSB培养基上的菌落形态, 菌落周围有黄色素产生, 表面干燥。而且, 在这种培养基上生长比较缓慢, 11 d才能长出针尖大小的菌

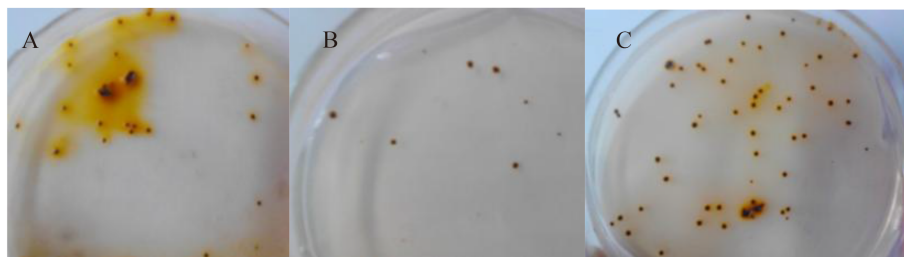


图 1. 不同培养基上的菌落形态

Figure 1. Colonies of *A. ferrooxidans* strains on different medium.

落。图1-B是Solid2:2培养基上的菌落形态，在这种培养基上*Acidithiobacillus* spp.生长比较困难，因此用这种方案分离的株菌最少。而且，菌落的颜色较深，黑褐色。涂布 10^2 梯度，菌落很少，甚至不长，生长速度较慢，一般在10 d才能长出能看到的小菌落。Solid2:2培养基上的菌落接种到液体培养基中很难生长，成活率不到2%。嗜酸硫杆菌在FeTSBo培养基上生长的最好，分离的株菌最多，图1-C是涂布 10^6 梯度的菌落形态，颜色较深，黄褐色，表面干燥。在FeTSBo培养基上菌落生长较快，一般在7–8 d就可以形成针尖大小的菌落，接种到液体培养液时生长状况良好。

2.2 16S rRNA基因序列的系统发育分析

PCR扩增的16S rRNA基因产物大小约1450 bp，没有非特异扩增条带。通过16S rRNA基因序列比对，所有嗜酸硫杆菌被归属到种水平的菌株的序列相似度均在99%以上。基于16S rRNA基因构建的系统发育树见图2，从系统发育树上可以看出，所分离的嗜酸硫杆菌被划分为五大类群(Group)，其中大多数细菌属于Group 1，包括3个地区的菌株。Group 2包括*A. ferrivorans* NO-37、XJFY6-08、XJFY5S-12、XJFY6S-08和XJFY6S-07，该类群均为*A. ferrivorans*，而且这些菌株都来自于新疆富蕴。Group 3仅由HBDY3-18和YNTRS-09两株菌组成，是1个比较独特的类群，根据序列同源性推测，这2株菌有可能代表新种。Group 4以*A. ferridurans* ATCC 33020为代表，该

类群除了菌株YNTR1-41和YNTRS-19外，其他的菌株均来自于湖北大冶的1号样品。Group 5类群以ATCC 23270和ATCC 19859为代表菌株，包括菌株HBDY3-51、HBDY3-41和HBDY1-52，此类群的菌株均来自于湖北大冶。此外，菌株YNTR4-15归属于*Leptospirillum ferrooxidans*，HBDY3-31归属于*Leptospirillum ferrodiazotrophum*，有4株归属于*A. ferrivorans*；6株归属于*A. ferridurans*，其余的均归属于*A. ferrooxidans*。与*A. ferrooxidans*最邻近的菌株是*A. thiooxidans*，遗憾的是没有分离到*A. thiooxidans*。

2.3 嗜酸硫杆菌cbbL基因的系统发育

根据16S rRNA基因的系统发育，扩增每个类群代表株菌的*cbbL*基因并测序。19株菌的*cbbL*基因是双拷贝，分别为*cbbL1*和*cbbL2*。分别检测到7株菌5个克隆子*cbbL*基因序列相同，而且均属于*cbbL1*基因。

基于*cbbL*基因序列构建系统发育树(图3)，*cbbL1*和*cbbL2*基因均被划分为3个序列型，菌株的*cbbL1*和*cbbL2*基因序列型的聚类形式相似，例如，*cbbL1*中的Type 1、Type 3和*cbbL2*中的Type 1、Type 3所包含的菌株很相似。比较独特的是Type 2，无论是*cbbL1*还是*cbbL2*基因，Type 2总包含YNTRS-09和HBDY3-18 2个菌株，与16S rRNA基因的系统发育分析结果相似。*cbbL1*基因的Type 3包括具有代表性的模式菌株ATCC 23270、ATCC 33020、ATCC 19859，同时包括

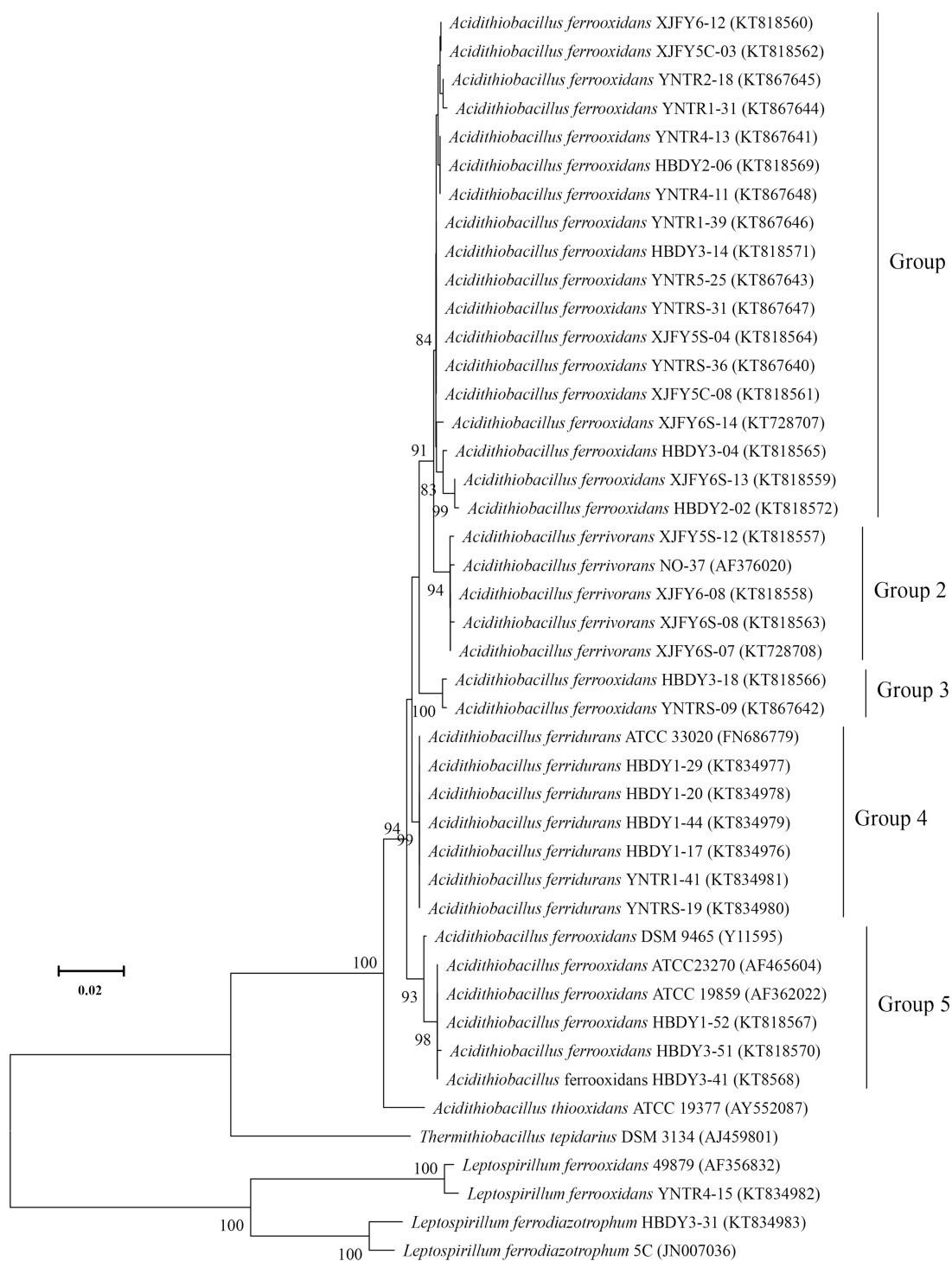


图 2. 基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 2. The phylogenetic analysis of *Acidithiobacillus* spp. isolate from Yunnan, Xinjiang and Hubei based on the 16S rRNA sequence homology. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (70%) based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled datasets. Bar: 2% sequence divergence.

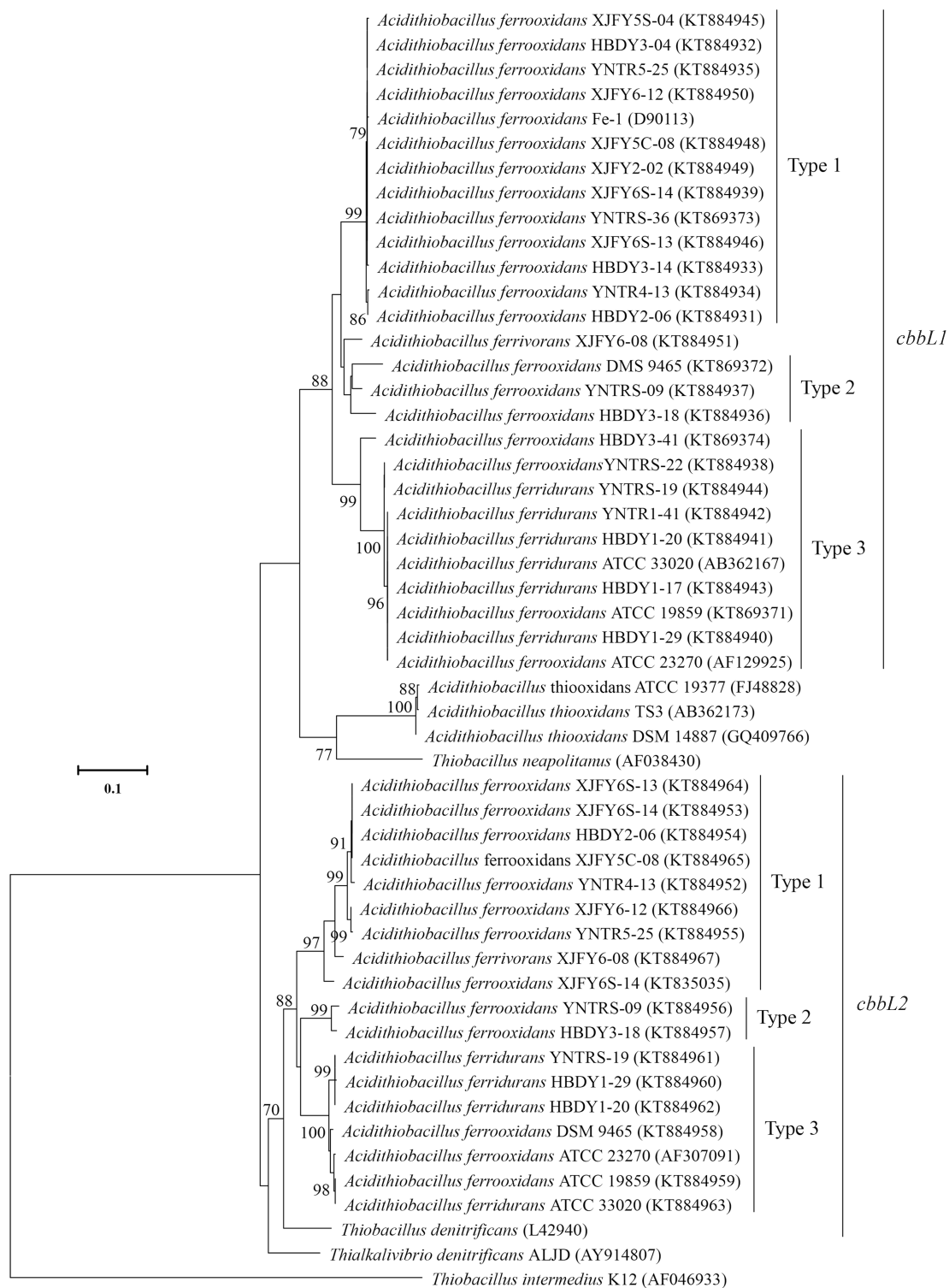


图 3. 基于 *cbbL* 基因构建的系统发育树

Figure 3. The phylogenetic analysis of *Acidithiobacillus* spp. isolate from Yunnan, Xinjiang and Hubei based on the *cbbL* gene sequence homology. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (70%) based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled datasets. Bar: 10% sequence divergence.

HBDY3-41, YNTRS-19, YNTRS-22, HBDY1-17, YNTR1-41, HBDY1-20, HBDY1-26, 但这一类群中不包括新疆地区所分离的菌株。Type 1 普遍地包括来自3个不同地理来源的菌株。*cbbL*基因序的系统发育树与16S rRNA基因的不一致。

2.4 嗜酸硫杆菌*cbbL*基因的多样性分析

利用DnaSPv5软件计算*cbbL*基因的多样性相关参数(表2), *Acidithiobacillus* spp.的*cbbL1*基因的ENC为48.974–57.818, CBI为0.239–0.323, G+C含量为58.5%–63.5%, G+C3s含量为48.7%–57.8%。而*Acidithiobacillus* spp.的*cbbL2*基因

表2. *cbbL*基因的ENC、CBI、G+C3s、G+C值
Table 2. Values of ENC, CBI, G+C3s and G+C of *cbbL*

Strains	<i>cbbL1</i>				<i>cbbL2</i>			
	ENC	CBI	G+C	G+C3s	ENC	CBI	G+C	G+C3s
YNTR4-13	54.681	0.296	63.3	57.4	51.216	0.380	60.6	61.3
YNTR5-25	54.096	0.306	63.2	56.4	51.030	0.342	60.4	58.7
XJFY6-12	57.218	0.299	63.0	55.9	51.659	0.399	60.6	60.8
XJFY5C-08	53.981	0.308	63.2	56.4	52.623	0.370	60.8	61.3
XJFY6S-14	53.981	0.308	63.5	56.9	53.694	0.388	59.4	60.4
HBDY2-06	54.200	0.314	63.2	57.1	52.623	0.370	60.8	61.3
XJFY6S-13	53.861	0.315	63.5	57.1	52.623	0.370	60.8	61.3
ATCC23270	57.717	0.258	58.5	49.5	47.630	0.423	62.3	61.3
HBDY1-29	57.717	0.258	58.5	49.5	51.525	0.370	62.5	63.3
YNTRS-19	56.350	0.275	58.8	49.5	50.649	0.399	61.9	62.2
ATCC33020	57.717	0.258	58.5	49.5	47.984	0.422	62.6	61.3
HBDY1-20	57.818	0.255	58.5	49.7	48.739	0.406	62.0	60.6
ATCC19859	57.717	0.258	58.5	49.5	47.984	0.422	62.6	61.3
HBDY3-41	53.166	0.284	59.5	48.7	48.739	0.406	62.0	60.6
HBDY3-18	53.872	0.239	61.0	53.8	53.145	0.416	64.0	66.5
XJFY6-08	56.438	0.238	59.6	53.1	53.694	0.388	59.4	60.4
YNTRS-09	48.974	0.315	62.0	54.5	48.651	0.453	64.8	67.5
HBDY3-04	53.166	0.284	59.5	48.7	53.145	0.416	64.0	66.5
XJFY5S-04	53.865	0.309	63.3	56.9				
XJFY5C-03	53.981	0.308	63.2	56.4				
HBDY3-14	56.070	0.321	63.6	57.4				
HBDY1-17	57.717	0.258	58.5	49.5				
YNTRS-36	53.524	0.323	63.5	57.6				
YNTR1-41	57.818	0.255	58.5	49.7				
YNTRS-22	58.611	0.260	58.6	48.7				

ENC为47.630–53.694, CBI为0.342–0.453, G+C含量为59.4%–64.8%, G+C3s含量为58.7%–67.5%。表明*cbbL*基因的密码子偏爱性不强。而G+C含量和G+C3s含量相差较大,尤其是*cbbL1*基因的G+C含量比G+C3s含量要高很多,但是,*cbbL2*基因的G+C含量比G+C3s含量低。而且来自新疆富蕴样品的菌株的*cbbL1*基因的G+C含量比较稳定,均在63.3%左右,比其他的菌株高;而*cbbL2*基因的G+C含量大多数在60.8%左右,也比较稳定,但比*cbbL1*基因的相对较低。G+C含量和G+C3s含量与*Acidithiobacillus* spp.整个基因组的G+C含量相接近。此外,*cbbL*基因的非同义突变

率和同义突变率比值 $\omega(K_a/K_s)$ 为0.5231<1,表明*cbbL*基因受纯化选择作用。

计算每个序列型中典型菌株的*cbbL*基因序列及氨基酸序列的相似性(表3),结果显示,*cbbL1*基因序列之间的相似性较高(88%–100%),*cbbL2*基因序列之间的相似性为89%–100%。但是*cbbL1*和*cbbL2*之间的相似性比较低(73%–78%),氨基酸相似性为81%–83%。

2.5 *cbbM*基因的系统发育

对130条*cbbM*基因序列整理,剔除每株菌中相同的序列,保留一条序列构建系统发育树,如图4所示。在系统发育树上,嗜酸硫杆菌被划分为

表3. *cbbL*基因及氨基酸相似性

Table 3. Similarity matrices based on the nucleotide or the deduced amino acid sequences of *cbbL* genes from some *Acidithiobacillus* strains

Strains	Similarity of <i>cbbL</i> nucleotide or deduced amino acid sequences compared with ^a /%															
	<i>cbbL2</i>								<i>cbbL1</i>							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 YNTR5-25		100	100	100	100	99	99	97	82	82	82	82	82	82	82	81
2 XJFY6-12	99		100	100	100	99	99	98	83	83	83	83	83	83	83	82
3 XJFY5C-08	99	98		100	100	99	99	98	83	83	83	83	83	83	83	82
4 HBDY2-06	99	98	100		100	99	99	98	83	83	83	83	83	83	83	82
5 XJFY6S-13	99	98	100	100		99	99	98	83	83	83	83	83	83	83	82
6 XJFY6-08	97	96	96	96	96		99	98	82	82	82	82	82	83	83	82
7 YNTRS-09	90	89	90	90	90	90		98	83	83	83	83	83	83	83	82
8 HBDY1-29	88	88	88	88	88	89	89		76	76	76	76	77	75	76	74
9 YNTR5-25	74	75	75	75	75	75	76	76		100	100	100	100	99	99	97
10 XJFY6-12	74	75	75	75	75	75	76	76	100		100	100	100	99	99	97
11 XJFY5C-08	74	75	74	74	74	75	76	76	100	100		100	100	99	99	97
12 HBDY2-06	75	75	75	75	75	75	77	76	99	99	99		100	99	99	97
13 XJFY6S-13	75	75	75	75	75	75	77	77	99	99	99	100		99	99	97
14 XJFY6-08	73	73	73	73	73	73	75	75	93	93	93	93	93		100	97
15 YNTRS-09	76	76	76	76	76	76	78	76	92	92	92	93	92	93		97
16 HBDY1-29	72	73	72	72	72	74	73	74	89	88	88	88	88	89	87	

^a Numbers above the diagonal are percentages of similarities among deduced amino acid sequences. Numbers below the diagonal are percentages among nucleotide sequences.

4个序列型, 每个序列型中包含不同地理来源的菌株。有3株菌跟*A. ferrivorans* NO-37相近, 聚在Type 3中。5株菌跟ATCC 19859和ATCC 23270相近, 构成了Type 1。此外, *cbbM*基因的系统发育树跟16S rRNA基因的不一致, 但与*cbbL*基因的相似。

2.6 *cbbM*基因的多样性分析

*cbbM*基因的多样性相关参数见表4, *cbbM*基

因的ENC值为41.320-50.008, 波动较大, 但均大于35, 表明密码子偏爱性不强。密码子偏爱指数(CBI), 反映1个具体基因中高表达优越密码子的组分情况, *cbbM*基因的CBI为0.350-0.464, 表明密码子偏向使用性不明显。G+C在61.0%-65.2%之间, G+C3s在61.0%-65.9%之间, 均没有明显的地域性差异。*cbbM*基因的非同义突变率和同义突变率比值 $\omega(K_a/K_s)$ 为1.8734>1, 存在正选择效应。

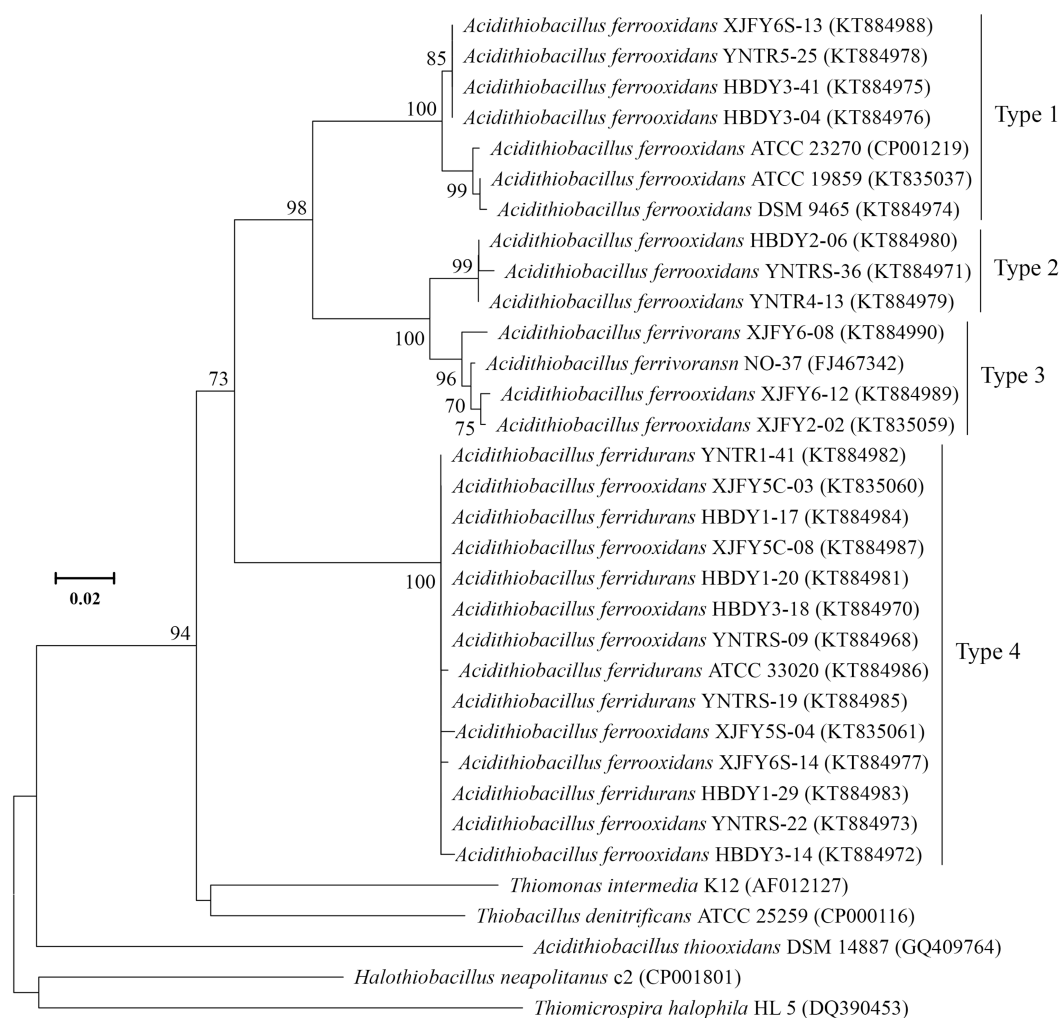


图 4. 基于*cbbM*基因构建的系统发育树

Figure 4. The phylogenetic analysis of *Acidithiobacillus* spp. isolate from Yunnan, Xinjiang and Hubei based on the *cbbM* gene sequence homology. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (70%) based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled datasets. Bar: 2% sequence divergence.

表4. *cbbM* 基因的ENC、CBI、G+C3s、G+C值
Table 4. Values of ENC, CBI, G+C3s and G+C of *cbbM*

Strains	<i>cbbM</i>			
	ENC	CBI	G+C	G+C3s
HBDY3-04	46.988	0.370	62.0	62.8
HBDY3-41	46.988	0.370	62.0	62.8
XJFY6S-14	47.100	0.358	62.0	62.8
YNTR5-25	47.100	0.358	62.0	62.8
ATCC19859	46.988	0.370	62.0	62.8
ATCC23270	42.760	0.434	62.0	64.1
XJFY6-12	43.582	0.420	62.5	63.8
XJFY6S-13	43.807	0.412	62.0	63.0
XJFY6-08	41.320	0.445	61.6	64.6
YNTR4-13	44.036	0.464	61.1	64.6
HBDY2-06	44.036	0.464	61.1	64.6
YNTRS-36	45.144	0.449	61.0	64.3
ATCC33020	49.791	0.365	64.9	65.9
HBDY1-29	49.791	0.365	64.9	65.9
YNTRS-09	49.791	0.365	64.9	65.9
XJFY5C-08	49.791	0.365	64.9	65.9
YNTRX-19	49.791	0.365	64.9	65.9
YNTRS-22	49.791	0.365	64.9	65.9
XJFY2S-18	49.791	0.365	64.9	65.9
YNTRS-36	50.008	0.362	65.2	65.9
HBDY1-20	49.790	0.365	64.9	65.9
HBDY3-18	49.791	0.365	64.9	65.9
HBDY3-14	49.912	0.361	64.9	65.9
XJFY5C-03	49.808	0.354	64.9	65.9
XJFY5S-04	49.208	0.350	64.8	65.6
HBDY1-17	49.808	0.354	64.9	65.9
XJFY2-02	49.808	0.354	64.9	65.9
YNTR1-41	49.808	0.354	64.9	65.9

计算出每个序列型中典型菌株的*cbbM*基因及氨基酸序列之间的相似度(表5)。不同菌株之间的

相似度为82%–100%，比16S rRNA基因差异大。其中菌株XJFY5C-08、YNTRS-09、HBDY1-29和HBDY1-20都在一个序列型中，它们之间的相似度为100%，与ATCC 33020的相似度为99%，氨基酸相似性为97%，而与其他序列类型之间的相似度较低(82%–87%)，由此可见同一序列型之间的相似度较高，不同序列型之间的相似度较低，遗传多样性显著，在同一种内存在明显的差异性。

3 讨论

本实验采用3种培养基方法分离嗜酸硫杆菌，与FeTSB和Solid2:2培养基相比，FeTSBo分离菌株的效果最好，适合嗜酸硫杆菌的生长与分离，而且生长的较快，菌株的成活率较高。由于双层平板的下层里含有异养菌，在生长过程中可以将培养基中的有机物利用，这样有利于无机自养硫杆菌的生长以及菌落的形成，因为大量的有机物会抑制无机自养菌的生长。

分离到的这些菌被划分为不同的类群，表明*Acidithiobacillus* spp.存在较大的遗传多样性。在16S rRNA基因的统发育树上，将所分离菌株分为5大类群，Group 1包括3个不同地区的菌株，由此可见16S rRNA基因序列型与分离地点没有形成明显的地理格局分布，它们虽然处于不同的地理位置，但由于微环境中相同的理化因子(如Cu离子、Fe离子和电导率)可能使他们具有相同的序列型，从而使来自不同地理位置的菌株由于亲缘关系相近而出现在同一类群；虽然云南腾冲样品中Mn明显高于其他2个地理位点，但腾冲的*Acidithiobacillus*菌株没有形成独特的类群，因此环境中的Mn可能对*Acidithiobacillus*菌的生长和分布影响较小。Group 2的菌株都来自于新疆富蕴，均被鉴定为*A. ferrivorans*(嗜冷硫杆菌)，这可能是由于新疆与云

表5. *cbbM* 基因及氨基酸相似性Table 5. Similarity matrices based on the nucleotide or the deduced amino acid sequences of *cbbM* genes from some *Acidithiobacillus* strains

Strains	Similarity of <i>cbbM</i> nucleotide or deduced amino acid sequences compared with ^b %										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
HBDY1-20		100	100	97	100	92	93	93	93	89	92
XJFY5C-08	100		100	97	100	92	93	93	93	89	92
HBDY1-29	100	100		97	100	92	93	93	93	89	92
ATCC33020	99	99	99		97	89	89	89	89	89	89
YNTRS-09	100	100	100	99		92	93	93	93	89	92
XJFY6-12	86	86	86	85	86		99	99	98	94	98
XJFY6S-13	86	86	86	85	86	99		100	99	95	98
XJFY6-08	86	86	86	85	86	97	98		99	95	98
HBDY2-06	86	86	86	85	86	96	96	96		96	99
ATCC23270	85	85	85	85	85	89	89	89	90		97
YNTRS-25	87	87	87	86	87	90	90	91	91	98	

^b Numbers above the diagonal are percentages of similarities among deduced amino acid sequences. Numbers below the diagonal are percentages among nucleotide sequences.

南和湖北相比常年平均温度低的原因所致。Group 3的菌株均来自于湖北大冶, 这表明这些菌株的生长与环境息息相关, 同一个类群中的菌株的生态位有可能相似或相同, 这表明不同地域气候和地理等自然环境的不同, 使得来自不同地区样品中菌株之间存在一定的地域差异, 来源于同一个地区的菌株基因序列比较相似。Amouric等利用多位点序列分型, 将21株嗜酸硫杆菌分为4大类群, 其中类群3只包括*A. ferrivorans*菌株, 然而类群2和4的菌株是2个不同的种^[6]。本文中的Group 2相当于这篇文献中的类群3^[6]。

尽管RubisCO基因的系统发育树与16S rRNA基因的不一致, 但无论是16S rRNA基因还是RubisCO的系统发育树, 嗜酸硫杆菌属都在变形菌纲中形成独立的谱系。部分菌株在不同基因的

系统发育树上的位置不一致, 但在整个聚类中, 部分类群是相似的, 特别是少数菌株形成了新的嗜酸硫杆菌分支, 这对系统发育模糊的*Acidithiobacillus* spp.是一个很好的参考。前人的报道也有显示, 部分化能自养菌RubisCO基因的系统发育和传统的16S rRNA基因的结果有差异^[26]。虽然这2种基因都适合考察嗜酸硫杆菌的多样性, 但是与RubisCO基因相比, 本文中16S rRNA基因系统发育的序列群划分更精细, 能较好的反应考察菌株的多样性。

目前, 采用功能基因作为分子标记分型已经是很常用的技术, RubisCO基因与16S rRNA基因两者的系统发育不一致, 但这个分歧可能解释嗜酸硫杆菌进化的部分问题。这2个不同基因构建的系统发育树分支不完全一致, 可能归因于16S

rRNA基因序列趋异分化的加速率^[27]。基于不同基因同源性分析,部分菌株亲缘关系不一致,也可能是因为*cbbL*基因的误差或者基因的横向水平转移引起的^[27]。此外,这些细菌分离于不同的栖息环境,新疆样点pH(4.5)较高,而云南和湖北样点pH(3)较低,每个地点海拔高度、地理位点和金属离子浓度不完全相同,新疆样品中铁含量较少,所有样品中铜元素比较丰富,但湖北和新疆样品中锰和锌相对较少,在这种理化因子不同的栖息环境下,可能会有RubisCO基因的部分丢失^[27]。*cbbL*基因比*cbbM*和16S rRNA基因的序列型少,而且模式菌株ATCC 23270和ATCC 33020是公认的2个不同的种,但是在*cbbL*系统发育树上这2株菌聚在一起,因此,*cbbL*似乎并不大适合评估基础的系统发育,但可能有助于了解这些细菌的关系。一般来说,由于微生物存在复杂的演化过程,基于单个基因的分子系统发育可能有误导,因此,结合几个不同功能基因的数据更适合实际系统发育的考察^[27]。

通过*cbbL*基因序列的分析,26株菌中有19株的*cbbL*基因是双拷贝,而有7株菌只能检测到*cbbL1*基因。因此,这7株的*cbbL*基因很有可能是单拷贝,这与文献中的结果相吻合^[28]。有报道显示*A. ferrooxidans* ATCC 23270菌株的*cbbL1*和*cbbL2*基因之间相似度比较低,在核酸序列水平上的相似度为73%^[28],表明这个基因来自于基因的水平转移^[29]。有人研究了*A. ferridurans* ATCC 33020的*cbbL*基因,得出了相似的结果,本文中*cbbL1*和*cbbL2*之间的相似度比较低(73%–78%),所得到结果与文献中结论相一致。因此,可以推断出文中嗜酸硫杆菌*cbbL*的2个拷贝有可能来自于基因水平的横向转移,而不是基因的重复复制。目前,多拷贝、双拷贝和基因的水平转移是被人们广泛所接受的^[30]。但是,*A. ferrooxidans* Fe1有

几乎完全相同的2个拷贝^[31]。因此,文中这7株菌有可能是单拷贝,也有可能是与Fe1一样有完全相同的2个拷贝,这有待于进一步的研究。

目前文献中报道的*cbbM*基因没有发现双拷贝,这与我们的结论相一致。基于*cbbM*和*cbbL*基因的系统发育分析的亚群几乎是一一对应的关系。RubisCO基因II型可能是最古老的一种酶,在高浓度二氧化碳和缺氧条件下有最佳功能^[30]。在这种情况下,I型可能被看做是一个II型耐氧的后代^[8]。*cbbM*基因在高浓度CO₂(15%)下表达,*cbbL1*和*cbbM*基因同时表达时CO₂为中等浓度,然而*cbbL2*基因在低水平的CO₂浓度下才开始表达,当所有的3个基因都出现时,此时CO₂浓度接近大气中的含量^[32]。这些例子证明同功酶具有不同的代谢性能,因此,RubisCO酶的3套不同基因给细菌增加了适应性和灵活性。这些化能自养菌的祖先是拥有*cbbM*基因类群的,通过横向转移获得*cbbLS-2*基因,经过和*cbbM*基因类群的其他基因的重组和复制,产生了*cbbL1*类群^[32]。考虑到环境的距离,现在的自养菌、蓝细菌很可能是*A. ferrooxidans*菌*cbbL2*基因的提供者^[30]。

参考文献

- [1] Rawlings DE. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4: 13.
- [2] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, Sand W. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63(3): 239–248.
- [3] Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guiliiani N, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(2): 197–211.

- [4] Kelly DP, Harrison AP. Aerobic chemolithotrophic bacteria and associated organisms: genus *Thiobacillus*, Beijerinck 1904b // Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989: 1842–1858.
- [5] Hedrich S, Johnson DB. *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(11): 4018–4025.
- [6] Amouric A, Brochier-Armanet C, Johnson DB, Bonnefoy V, Hallberg KB. Phylogenetic and genetic variation among Fe(II)-oxidizing *Acidithiobacilli* supports the view that these comprise multiple species with different ferrous iron oxidation pathways. *Microbiology*, 2011, 157(1): 111–122.
- [7] Harrison Jr AP. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Archives of Microbiology*, 1982, 131(1): 68–76.
- [8] Selenska-P, Otto K. Identification and discrimination of *Thiobacilli* using ARDREA, RAPD and rep-APD. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84(6): 1085–1091.
- [9] Karavaiko GI, Turova TP, Kondrat'eva TF, Lysenko AM, Kolganova TV, Ageeva SN, Muntyan LN, Pivovarova TA. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 113–119.
- [10] Peng H, Yang Y, Li X, Qiu GZ, Liu XD, Huang JF, Hu YH. Structure analysis of 16S rDNA sequences from strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39(2): 178–182.
- [11] Spiridonova EM, Berg IA, Kolganova TV, Ivanovsky RN, Kuznetsov BB, Tourova TP. An oligonucleotide primer system for amplification of the ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes of bacteria of various taxonomic groups. *Microbiology*, 2004, 73(3): 316–325.
- [12] Elsaied H, Naganuma T. Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from deep-sea microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1751–1765.
- [13] Delwiche CF, Palmer JD. Rampant horizontal transfer and duplication of Rubisco genes in eubacteria and plastids. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13(6): 873–882.
- [14] Watson GMF, Tabita FR. Microbial ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a molecule for phylogenetic and enzymological investigation. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 146(1): 13–22.
- [15] Nanba K, King GM, Dunfield K. Analysis of facultative lithotroph distribution and diversity on volcanic deposits by use of the large subunit of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2245–2253.
- [16] Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(6): 431–440.
- [17] Denev VJ, Mueller RS, Banfield JF. AMD biofilms: using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature. *The ISME Journal*, 2010, 4(5): 599–610.
- [18] Tuomisto H, Ruokolainen K, Yli-Halla M. Dispersal, environment, and floristic variation of Western Amazonian forests. *Science*, 2003, 299(5604): 241–244.
- [19] Tourova TP, Kovaleva OL, Bumazhkin BK, Patutina EO, Kuznetsov BB, Bryantseva IA, Gorlenko VM, Sorokin DY. Application of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes as molecular markers for assessment of the diversity of autotrophic microbial communities inhabiting the upper sediment horizons of the saline and soda lakes of the Kulunda Steppe. *Microbiology*, 2011, 80(6): 812–825.
- [20] Johnson DB, Macvicar JHM, Rolfe S. A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, 7(1): 9–18.
- [21] Peng JB, Yan WM, Bao XZ. Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(10): 2892–2897.

- [22] Johnson DB, McGinness S. A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing, acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, 13(2): 113–122.
- [23] Johnson DB. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 1995, 23(2): 205–218.
- [24] Silverman MP, Lundgren DG. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: I. an improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*, 1959, 77(5): 642–647.
- [25] Alfreider A, Vogt C, Hoffmann D, Babel W. Diversity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from groundwater and aquifer microorganisms. *Microbial Ecology*, 2003, 45(4): 317–328.
- [26] Tourova TP, Kovaleva OL, Sorokin DY, Muyzer G. Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes as a functional marker for chemolithoautotrophic halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. *Microbiology*, 2010, 156(7): 2016–2025.
- [27] Tourova TP, Spiridonova EM, Berg IA, Slobodova NV, Boulygina ES, Sorokin DY. Phylogeny and evolution of the family *Ectothiorhodospiraceae* based on comparison of 16S rRNA, *cbbL* and *nifH* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(10): 2387–2398.
- [28] Kamimura K, Okabayashi A, Kikumoto M, Manchur MA, Wakai S, Kanao T. Analysis of iron- and sulfur-oxidizing bacteria in a treatment plant of acid rock drainage from a Japanese pyrite mine by use of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(3): 244–248.
- [29] Heinhorst S, Baker, SH, Johnson DR, Davies PS, Cannon GC, Shively JM. Two copies of form I RubisCO genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Current Microbiology*, 2002, 45(2): 115–117.
- [30] Tourova TP, Spiridonova EM, Berg IA, Kuznetsov BB, Sorokin DY. Occurrence, phylogeny and evolution of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria of the genera *Thiomicrospira* and *Thioalkalimicrobium*. *Microbiology*, 2006, 152(7): 2159–2169.
- [31] Kusian B, Bednarski R, Husemann M, Bowien B. Characterization of the duplicate ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase genes and *cbb* promoters of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(15): 4442–4450.
- [32] Yoshizawa Y, Toyoda K, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. CO₂-responsive expression and gene organization of three ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase enzymes and carboxysomes in *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(17): 5685–5691.

Phylogenetic and diversity analysis of *Acidithiobacillus* spp. based on 16S rRNA and RubisCO genes homologues

Minrui Liu¹, Pengwu Lin², Xing'e Qi¹, Yongqing Ni^{1*}

¹ School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi 83200, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

² School of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 83200, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] The purpose of the study was to reveal geographic region-related *Acidithiobacillus* spp. distribution and allopatric speciation. Phylogenetic and diversity analysis was done to expand our knowledge on microbial phylogeography, diversity-maintaining mechanisms and molecular biogeography. [Methods] We amplified 16S rRNA gene and RubisCO genes to construct corresponding phylogenetic trees based on the sequence homology and analyzed genetic diversity of *Acidithiobacillus* spp.. [Results] Thirty-five strains were isolated from three different regions in China (Yunnan, Hubei, Xinjiang). The whole isolates were classified into five groups. Four strains were identified as *A. ferrivorans*, six as *A. ferridurans*, YNTR4-15 *Leptospirillum ferrooxidans* and HBDY3-31 as *Leptospirillum ferrodiazotrophum*. The remaining strains were identified as *A. ferrooxidans*. Analysis of *cbbL* and *cbbM* genes sequences of representative 26 strains indicated that *cbbL* gene of 19 were two copies (*cbbL1* and *cbbL2*) and 7 possessed only *cbbL1*. *cbbM* gene was single copy. In nucleotide-based trees, *cbbL1* gene sequences of strains were separated into three sequence types, and the *cbbL2* was similar to *cbbL1* with three types. Codon bias of RubisCO genes was not obvious in *Acidithiobacillus* spp.. [Conclusion] Strains isolated from three different regions in China indicated a great genetic diversity in *Acidithiobacillus* spp. and their 16S rRNA/RubisCO genes sequence was of significant difference. Phylogenetic tree based on 16S rRNA genes and RubisCO genes was different in *Acidithiobacillus* spp..

Keywords: *Acidithiobacillus* spp., 16S rRNA gene, RubisCO gene, phylogeny, genetic diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260001, C010101)

*Corresponding author. E-mail: niyqlzu@sina.com

Received: 10 July 2015; Revised: 20 October 2015; Published online: 29 October 2015