

腾冲热海七株高温厌氧菌的分离及鉴定

陆月情¹, 陈波¹, 刘晓黎², 季秀玲¹, 魏云林^{1*}, 林连兵^{1*}

(¹ 昆明理工大学生物工程技术研究中心, 昆明 650224)

(² 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要 【目的】了解中国云南腾冲热海环境中厌氧菌的分类学特征及生理生化特性。【方法】利用 Hungate 厌氧操作技术, 从云南腾冲热海 80℃ - 93℃ 温泉中分离出 7 株高温厌氧菌, 对其进行形态、生长特征及 16S rRNA 基因序列分析, 确定菌株的系统发育地位。【结果】7 株菌株细胞形态均为杆状, 不产芽孢, 革兰氏阴性, 严格厌氧, 在 70℃ 生长良好。其中较典型的菌株 RH0802 能在 55℃ ~ 80℃ 温度范围内生长, 最适生长温度为 70℃; 生长 pH 值范围为 5.5 - 8.5, 最适 pH 值为 7.0, 能利用葡萄糖、淀粉、甘露醇、甘露糖、核糖、麦芽糖、纤维二糖、木糖、果糖、半乳糖、木聚糖、甘油, 不能利用蔗糖、丙酮酸。16S rRNA 基因序列相似性的比较分析表明, 其中 5 株菌与 *Caldanaerobacter* 属菌株的最高相似性均在 98% 以上, 而 RH0804 与 RH0806 分别为 96% 和 93%。菌株 RH0802-RH0808 的序列登录号分别为 FJ748766、FJ748762、FJ748761、FJ748763、FJ748765、FJ748764 和 FJ748767, 在中国普通微生物菌种保藏中心的保藏号分别为 CGMCC1.5134 - 1.5140。【结论】分离自腾冲热海的 7 株嗜热厌氧菌与 *Caldanaerobacter* 属菌株有较高相似性, 可将这 7 株菌株鉴定为 *Caldanaerobacter* 属菌株(*Caldanaerobacter* sp.), 其中菌株 RH0804 和 RH0806 有成为新种的可能。

关键词: 腾冲热海; 嗜热厌氧菌; *Caldanaerobacter*; 系统进化分析

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)09-1234-06

嗜热厌氧菌包括最佳生长温度在 50℃ 以上的细菌和古菌, 不需要氧作为电子受体。对嗜热厌氧菌的研究有助于了解生命在极端地球环境下生存的机制, 这些极端环境包括热区地面喷气口, 富含硫或有毒金属的热泉以及热泉、海底高温高压的深源热液喷口^[1-2]。陆地和海底热泉是一个相对还原性高的地热环境, 在其中有较丰富的嗜热厌氧菌的分布。从美国的黄石公园、意大利、冰岛、非洲、新西兰、法国、印度尼西亚以及中国腾冲均已分离获得。大多数的嗜热厌氧发酵细菌属于嗜热厌氧杆菌科 (*Thermoanaerobiaceae*), 其中嗜热厌氧杆菌科包括了热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 和嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacterium*)。Fardeau ML 等人在 2004

年将原来的 *Thermoanaerobacter subterraneus*、*Thermoanaerobacter tengcongensis*、*Carboxydrachium pacificum* 和 *Thermoanaerobacter yonsei* 四个种合并, 建立了 *Caldanaerobacter* 属, *Caldanaerobacter* 属仅设有 *Caldanaerobacter subterraneus* 一个种, 而原来的 *Thermoanaerobacter subterraneus*、*Thermoanaerobacter tengcongensis*、*Carboxydrachium pacificum* 和 *Thermoanaerobacter yonsei* 被列为 *Caldanaerobacter subterraneus* 的 4 个亚种^[3]。

云南腾冲具有多种温泉类型, 加上漫长的微生物生态系统的演化, 孕育出现代腾冲热海丰富的高温微生物资源, 使之成为我国最重要的高温微生物资源宝库。鉴于高温厌氧菌培养条件较复杂, 国内

基金项目: 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题 (SKLMR-080605), 国家自然科学基金 (30660009)

* 通信作者。Tel: +86-871-3801018-204; E-mail: jinlb@sohu.com

作者简介: 陆月情 (1985 -) 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 主要从事高温菌多样性研究。E-mail: luyueqing001@126.com

收稿日期: 2009-03-24; 修回日期: 2009-06-08

有关高温厌氧菌研究的报道相对较少^[4-5]。本文报道了从云南腾冲热海分离到了7株高温厌氧菌菌株,并对其进行了系统发育分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 :采集腾冲热海眼镜泉、鼓鸣泉、大滚锅等热泉(温度为80℃~93℃,pH为7.0~8.5)的水样及沉积物,迅速装入25 mL的厌氧管中,并加入20 μL刃天青(0.1%,W/V)指示剂和100 μL Na₂S·9H₂O(10%,W/V),厌氧管中水样的颜色逐渐褪至无色,表明水样已处于还原状态,样品在常温状态下在24小时之内运至实验室,于4℃保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 :酵母粉购于OXOID试剂公司,蛋白胨购于北京博奥星生物技术有限公司,DNA Extraction Kit Ver. 2.0和Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0试剂盒均购于TaKaRa公司。BH-2光学显微镜购于OLYMPUS公司,721型分光光度计购于上海第三分析仪器厂。

1.1.3 厌氧培养基的配制 :本实验采用DSM88培养基,组成如下:(NH₄)₂SO₄ 1.3 g,KH₂PO₄ 0.28 g,MgSO₄·7H₂O 0.25 g,FeCl₃·6H₂O 0.02 g,Na₂MoO₄·2H₂O 0.025 mg,CaCl₂·2H₂O 0.07 g,Na₂MoO₄·2H₂O 0.025 mg,FeCl₃ 0.28 mg,CuSO₄ 0.016 mg,MnSO₄·H₂O 2.2 mg,H₃BO₃ 0.5 mg,ZnSO₄·7H₂O 0.5 mg,CoCl₂·6H₂O 0.046 mg,CaSO₄·H₂O 60 mg,Tryptone 1 g,Yeast extract 1 g,定容至1 L,调节pH至7.0。配制液体培养基时,将培养基分装在容量为25 mL的厌氧管中,每管装入20 mL培养基,加入20 μL刃天青指示剂(0.1%,W/V),于121℃灭菌20min。灭菌后待培养基冷却至80℃,于厌氧管内以皮试注射器注入100 μL Na₂S·9H₂O(10%,W/V),并向厌氧管中充N₂约5 min,直至培养基颜色由粉红色褪至无色,表明培养基已经为无氧状态。配制固体培养基时,在培养基中添加1.1%(W/V)的Gelrite作为凝固剂(培养基中Mg²⁺的含量为液体培养基中的4倍)其它操作同上。

1.1.4 样品的富集分离 :富集培养时,用无菌注射器吸取2 mL样品,注入制备好的液体厌氧培养基中,于70℃富集培养64 h,待培养基变浑浊后,将富集培养液用含5% Na₂S·9H₂O的液体培养基稀释,用无菌注射器注入以1.1%(W/V)Gelrite作为凝固剂的DSM88培养基中,滚管后于70℃恒温培养

64 h,挑取单菌落进行分离纯化。

1.2 菌株电子显微形态观察

将处于对数生长期早期的菌株RH0802-RH0808细胞用2%(W/V)的醋酸双氧铀染色,染好的铜网于透射电子显微镜下观察(Hitachi H-600A)。

1.3 菌株RH0802最适生长条件与营养需求

选取在厌氧固体培养基上形成菌落最早、生长速率最快的RH0802菌株进行菌株生长条件及营养需求的研究。

最适生长温度测定方法为:将处于对数生长期早期的RH0802菌株培养液0.5 mL接种到20 mL的厌氧液体DSM88培养基中,分别置于50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃下恒温培养64 h测定培养液中的OD₆₀₀,通过计算比较不同温度下生长速率差异确定其生长温度范围及最适生长温度。

最适生长pH测定方法为:将处于对数生长期早期的RH0802菌株培养液0.5 mL接种到pH值分别为4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0的20 mL厌氧液体DSM88培养基中,置于70℃恒温培养64 h测定培养液中的OD₆₀₀,通过计算比较不同pH值条件下生长速率的差异确定其生长pH范围及最适pH,以上试验均设平行试验。

菌株RH0802于添加有0.1% tryptone和0.1% yeast extract的DSM88培养基中培养至对数生长期早期,吸取0.5 mL菌液接种至20 mL含有0.01% yeast extract并添加了各种糖(0.1%,W/V)的液体培养基中,于70℃恒温培养96 h,通过测定培养液中的OD₆₀₀来确定菌株对各种营养的需求(以OD₆₀₀ = 0.4为基准,培养液明显浑浊为阳性,反之为阴性)。

1.4 总DNA的提取、16S rRNA基因扩增及测序

菌株总DNA的提取采用TAKARA DNA提取试剂盒,扩增16S rRNA基因序列的两端引物按照Lane(1985)设计:正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和反向引物:5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3'。PCR反应体系为25 μL,反应条件为94℃变性4 min;接下来进行30个循环反应:94℃ 45 s,50℃ 45 s,72℃ 90 s;72℃ 10 min。PCR产物经胶回收后,连接到pMD19-T载体上,以10 μL连接反应液转化100 μL感受态细胞,通过蓝白斑筛选出重组质粒,16S rRNA基因序列由Sangon Biotech测定。

1.5 系统发育树的构建与分析

利用Blastn2.2.6在GenBank中进行相似性比

较,选取相似性较大的序列用 Mega4 进行系统发育分析,用邻接法(Neighbor - Joining)构建系统进化树,用于检验支持率的重复抽样次数为 1000 次。

2 结果和分析

2.1 细胞形态

7 株菌株在含 1.1% Gelrite 的 DSM88 固体培养基上均形成乳白色,圆形,半透明菌落。经过电子显微镜观察可见,菌体形态均为杆状,菌株 RH0802 作为其中的代表形态,长度约为 $2\ \mu\text{m} \sim 4\ \mu\text{m}$,直径约为 $0.3\ \mu\text{m} \sim 0.6\ \mu\text{m}$,菌体有单生、成对或成串生长现

象(图 1-A)。7 株菌中,只有菌株 RH0804 观察到有鞭毛存在(图 1-B)。

2.2 最适生长条件与营养需求

7 株菌株在添加了 0.1% tryptone 和 0.1% yeast extract 的 DSM88 培养基中生长良好,在有氧条件下,菌株不生长。其中,在固体培养基上形成菌落最早、生长速度最快的菌株 RH0802 生长温度范围为 $55\ ^\circ\text{C} \sim 80\ ^\circ\text{C}$,最适生长温度为 $70\ ^\circ\text{C}$;生长 pH 值范围为 $5.5 \sim 8.0$,最适生长 pH 为 7.0。

RH0802 菌株与其它高温厌氧菌菌株的营养物利用情况比较见表 1^[6-14]。

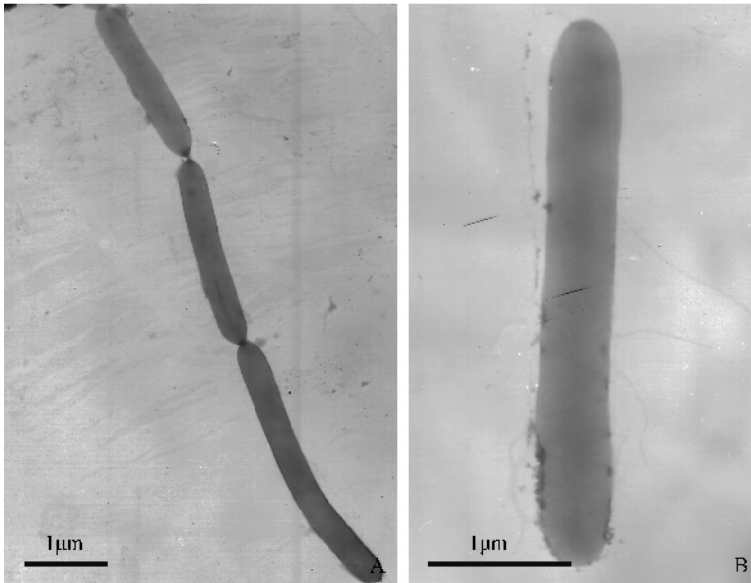


图 1 菌株的菌体形态(A: RH0802; B: RH0804)

Fig.1 Electron micrograph of the strains. A: RH0802; B: RH0804.

表 1 RH0802 菌株与其它高温厌氧菌属菌株的营养物利用情况比较

Table 1 Comparison of nutritional requirements between strain RH0802 and other species of genera *Thermoanaerobacter* and *Caldanaerobacter*

Nutrient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Starch	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylan	+	-	NR	NR	NR	NR	+	NR	-	+	-
Xylose	+	NR	-	-	+	+	NR	NR	-	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Ribose	+	-	-	NR	+	-	NR	NR	-	+	NR
Mannitol	+	-	-	NR	-	+	+	NR	+	+	NR
Galactose	+	+	NR	NR	+	+	NR	+	+	+	+
Cellobiose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	-	+	+	+	NR	NR	+	+	+
Fructose	+	+	NR	NR	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	+	+	+	+	+	NR	+	+	+
maltose	+	-	+	+	+	+	+	NR	+	+	+
Pyruvate	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	NR
Glycerol	+	NR	NR	NR	-	+	NR	NR	-	+	NR
Yeast extract	+	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	+	NR	NR

1. strain RH0802; 2. *T. kivui* DSM 2030^T(L09160); 3. *T. brockii* DSM 1457^T(L09165); 4. *T. acetoethylicus* DSM2359^T. 5. *T. ethanolicus* DSM2246^T; 6. *T. wiegelii* DSM10319^T; 7. *T. sulfurophilus* DSM11584^T; 8. *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *pacificus* DSM12653^T; 9. *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* JCM11007^T; 10. *Caldanaerobacter subterraneus* DSM13054^T; 11. *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *yonseiensis* DSM13777^T. Note: +: positive; -: negative; NR: not reported.

菌株 RH0802 的生长依赖酵母粉,在含有淀粉或者葡萄糖的培养基中生长良好。RH0802 能够利用多种糖,能利用葡萄糖、淀粉、甘露醇、甘露糖、核糖、麦芽糖、纤维二糖、木糖、果糖、半乳糖、木聚糖、甘油为唯一碳源,不能利用蔗糖、丙酮酸,这与表中 *Thermoanaerobacter* 和 *Caldanaerobacter* 属的成员类似。与 *C. tengcongensis* MB4^T 比较,两者均能利用淀粉、葡萄糖、甘露醇、甘露糖、麦芽糖、纤维二糖、果糖、半乳糖,均不能利用蔗糖和丙酮酸,但二者亦存在一定的差异性,RH0802 能利用甘油、核糖和木糖,而 *C. tengcongensis* MB4^T 均不能利用这 3 种底物。可见,RH0802 在营养利用方面与其 *Caldanaerobacter* 属菌株既有共性又有一定的差异性。

2.3 16S rRNA 基因系统发育分析

本研究获得 7 株菌株的 16S rRNA 基因片段长度均为 1500 bp 左右,将这些序列与 GenBank 中序列进行相似性比对,以 *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* 4B^T 和 *Moorella thermoacetica* DSM 521^T 作为外群,选取 *Thermoanaerobacter* 和 *Caldanaerobacter* 属的标准菌株,利用 Mega4.0 软件进行多重序列比对并绘制系统进化树(图 2)。

进化分析表明,菌株 RH0803 与 RH0808 与菌株 *C. subterraneus* SEBR 7858^T 的亲缘关系最近,相似性均为 98%,构成一个小分支;菌株 RH0807、RH0805、RH0802 与 *C. tengcongensis* MB4^T 相似度达到了 98%;相比之下,而 RH0804 和 RH0806 虽然与 *C.*

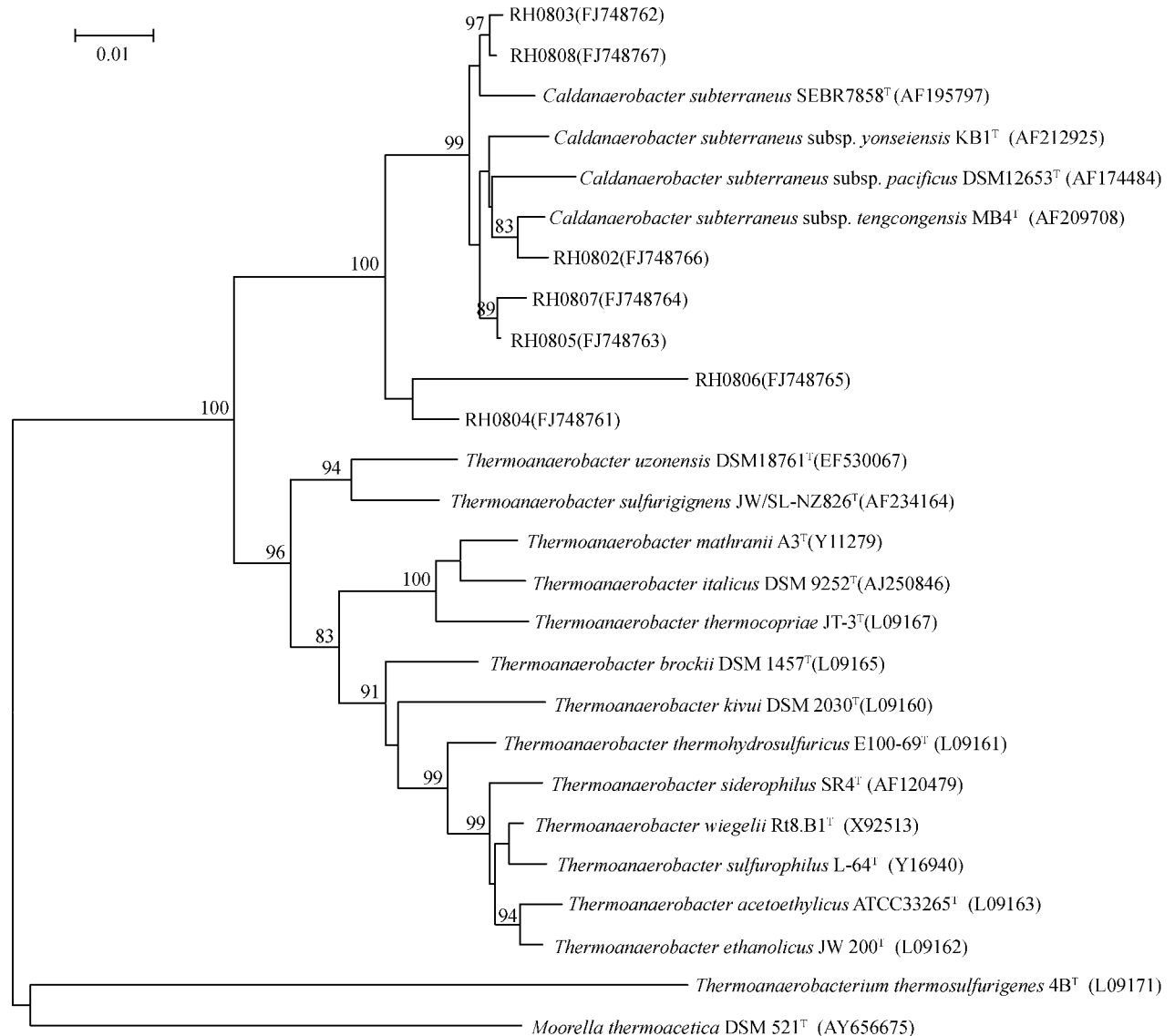


图 2 7 株菌株 16S rRNA 基因系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of seven strains based on 16S rRNA gene sequences.

tengcongensis MB4^T 相似度最高,但也仅仅分别达到了 96% 和 93%,具有构成新种的可能,二者构成了一个独立的簇群。综合上述,分离自腾冲的 7 株菌株与 *Caldanaerobacter* 属的标准菌株均有较高相似度,可鉴定为 *Caldanaerobacter* 属菌株。

3 讨论

高温厌氧杆菌广泛分布于世界各地的高温温泉中,从美国的黄石公园、意大利、冰岛、非洲、新西兰,法国,澳大利亚,印度尼西亚以及中国腾冲均分离到了高温厌氧杆菌属的菌株。高温厌氧菌 *C. tengcongensis* MB4^T 分离自腾冲热海,本文所研究获得的 7 株高温厌氧菌菌株经鉴定属于 *Caldanaerobacter* 属菌株,其中较典型的代表菌株 RH0802 在细胞形态、生长条件及营养利用方面与 *Caldanaerobacter* 属的其它菌株既有共性又有一定的差异性。其中菌株 RH0804 有鞭毛,而在由原来的 *T. subterraneus*、*T. tengcongensis*、*C. pacificum* 和 *T. yonsei* 合并而成的新属 *Caldanaerobacter* 中,只有 *T. subterraneus* 有鞭毛,而且菌株 RH0804、RH0806 与 *Caldanaerobacter* 属菌株 16S rRNA 基因序列相似性最高仅为 96% 和 93%,因此,二者均有构成 *Caldanaerobacter* 属新种的可能。

这 7 株菌株分别与分离自世界上不同水热地区的 *Caldanaerobacter* 属的几株标准菌株具有较高的相似性,体现了腾冲热海较丰富的 *Caldanaerobacter* 属高温厌氧菌的分布,RH0804、RH0806 菌株形成的独立簇群的存在,意味着腾冲热海还具有有别于其它地区的独特的高温厌氧杆菌资源,值得进一步研究。

这 7 株菌株分离自 80℃ ~ 93℃ 的高温热泉样品中,但在实验室的培养条件下,它们的最高生长温度仅达到 80℃ 左右,这可能是由于热泉环境中存在着特殊的离子,这些离子可以显著提高菌株的耐热性。作者在研究中也发现,随着菌株传代次数的增加,其最高生长温度有一定的下降。可见,进一步探索热泉环境的水化学特征,将有助于了解菌株高温适应性机制以及高温环境下生命活动的过程。

高温厌氧菌存在于自然界的极端环境中,具有耐热嗜热的生活特性。它的酶有较高的热稳定性,在高温下能分解纤维素,发酵糖类,能够耐受原油等有毒有机化合物,并能有效降解多环芳烃有机物,使其在化工,食品,制药以及环保等各个方面的广泛应用前景。随着研究的深入,新的高温厌氧菌将不断

被发现,探索其独特的生物学特性,对认识地球上生命的起源和进化具有重要的意义。

致谢 本研究部分工作在中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室完成,感谢东秀珠研究员的帮助。

参考文献

- [1] Stetter KO. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*, 1999, 452(1-2): 22-25.
- [2] Stetter KO. History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2006, 10(5): 357-362.
- [3] Fardeau ML, Salinas MB, L'Haridon S, et al. Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 467-474.
- [4] Bao Q, Tian Y, Li W, et al. A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Research*, 2002, 12(5): 689-700.
- [5] Xue Y F, Xu Y, Liu Y, et al. *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51: 1335-1341.
- [6] Bryant F, Ljungdahl LG. Characterization of an alcohol, dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* active with ethanol and secondary alcohols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1981, 100(2): 793-799.
- [7] Cook GM, Rainey FA, Patel BKC, et al. Characterization of a new obligately anaerobic thermophile, *Thermoanaerobacter wiegeli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(1): 123-127.
- [8] Fardeau ML, Magot M, Patel BKC, et al. *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel thermophile isolated from oilfield water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 2141-2149.
- [9] Kim BC, Grote R, Lee DW, et al. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 degrees C.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001 51 :1539 – 1548.

- [10] Larsen L , Nielsen P , Ahring BK. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov. , an ethanol-producing , extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Archives of Microbiology* , 1997 ,168(2) :114 – 119.
- [11] Slobodkin AI , Ourova TP , Kuznetsov BB , et al. *Thermoanaerobacter siderophilus* sp. nov. , a novel dissimilatory Fe(III)-reducing , anaerobic , thermophilic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 1999 49 :1471 – 1478.
- [12] Sokolova TG , Gonzalez JM , Kostrikina NA , et al. *Carboxydoobranchium pacificum* gen. nov. , sp. nov. , a new

anaerobic , thermophilic , CO-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2001 51 :141 – 149.

- [13] Wagner ID , Zhao W , Zhang CL , et al. *Thermoanaerobacter uzonensis* sp. nov. , an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a hot spring within the Uzon Caldera , Kamchatka , Far East Russia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2008 58 :2565 – 2573.
- [14] Wiegel J , Ljungdahl LG , Rawson JR. Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum* . *Journal of Bacteriology* , 1979 ,139 (3) :800 – 810.

Isolation and identification of seven thermophilic and anaerobic bacteria from Hot Springs in Tengchong Rehai

Yueqing Lu¹ , Bo Chen¹ , Xiaoli Liu² , Xiuling Ji¹ , Yunlin Wei^{1*} , Lianbing Lin^{1*}

(¹ Biotechnology Research Center , Kunming University of Science and Technology , Kunming 650224)

(² Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101)

Abstract [Objective] In order to study the taxonomic characteristic and physiological , biochemical properties of anaerobic bacteria from hot springs in Tengchong Rehai , Yunnan Province , China. **[Methods]** Using Hungate anaerobic technique We isolated seven strains from hot springs in Tengchong Rehai , Yunnan province , and analyzed their 16S rRNA gene sequences. **[Results]** The seven isolates were rod-shaped , Gram-negative , obligate anaerobe , and spores formation was not observed. All strains could grow well at 70°C . Growth of strain RH0802 occurred between 60 and 80°C , optimally around 70°C . The pH range for its growth was between 5.5 and 8.5 , with an optimum around 7.0. Strain RH0802 grew on a wide range of carbon sources , including glucose , starch , mannitol , mannose , ribose , maltose , cellobiose , xylose , fructose , galactose , xylan and glycerol , but it could not utilize sucrose or pyruvate. 16S rRNA gene phylogenetic analysis showed that the maximum similarity between the five strains and the strains of genus *Caldanaerobacter* was up to 98% , except RH0804 and RH0806 , which reached to 96% and 93% , respectively. The two isolates were presumed to be potential novel species. The GenBank accession numbers of RH0802 to RH0808 were FJ748766 , FJ748762 , FJ748761 , FJ748763 , FJ748765 , FJ748764 and FJ748767. **[Conclusion]** The results showed that the seven thermophilic anaerobes belonged to the genus *Caldanaerobacter* .

Keywords : Tengchong Rehai ; Thermophilic anaerobe ; *Caldanaerobacter* ; Phylogenetic analysis

(本文责编 : 张晓丽)