

一株分离于酸性矿坑水的异养菌的特性与分子鉴定*

高 健^{1,2} 蒋 莹¹ 吴学玲¹ 邱冠周^{1**}

(中南大学资源加工与生物工程学院 长沙 410083) (湖南科技大学生命科学学院 湘潭 410201)

摘要 采用平板划线分离法,从江西某铜矿酸性矿坑水中分离出一株极端嗜酸、又能耐受中度碱性条件的异养微生物,命名为 HJM 菌株。该菌株能在 pH1.5~10.0 的范围内生长。形态学以及 16S rDNA 和 26S rDNA D1/D2 区序列分析表明,HJM 菌株属于 *P. guilliermondii* 这个种。金属抗性试验表明,该菌株对重金属铜离子的抗性可高达 45mmol/L,因此,它的分离为研究极端环境中微生物的抗铜机制提供了材料。

关键词 嗜酸 耐碱 金属抗性 序列分析 *P. guilliermondii*

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0921-05

Characteristics and Molecular Identification of a Strain of Heterotrophic Microorganism Isolated from Acid Mine Drainage*

GAO Jian^{1,2} JIANG Ying¹ WU Xue-Ling¹ QIU Guan-Zhou^{1**}

(School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083)

(School of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 410201)

Abstract By streak plate method, a strain of heterotrophic microorganism which was extremely acidophilic, alkalitolerant, named by HJM, was isolated from an acid mine drainage of a certain copper mineral in Jiangxi Province. This strain was able to grow under pH value of 1.5~10.0. Morphological characteristics and sequences analysis of 16S rDNA and 26S rDNA D1/D2 region revealed that it belonged to the species *P. guilliermondii*. Resistant experiment to metals showed that it could resist copper of 45mmol/L, so it was an important strain used to study the resistance mechanism of copper.

Key words Acidophily, Alkalitolerant, Resistance to metals, Sequence analysis, *P. guilliermondii*

自 1947 年在酸性矿坑水中首次发现嗜酸氧化亚铁硫杆菌^[1]及其作用以来,酸性矿坑水一直被人们认为是研究极端微生物的典型环境模型。尽管在这种环境条件下与生物冶金密切相关的微生物种类主要属于嗜酸硫杆菌属和钩端螺旋菌属^[2],但事实上这种环境所包含的微生物种类远比人们所认为的要复杂得多。它不但包括嗜酸自养和嗜酸异养两大类型的细菌,还包括某些种类的真菌、藻类和原生动物^[3]。我们在自养浸矿细菌的分离过程中,从江西某铜矿堆浸液样品中分离一株嗜酸异养菌,命名为 HJM。基于堆浸液样品含有较高浓度的金属离子以及极端的酸性环境条件,我们主要考察了该菌株在这两个方面的生长特性,同时从分子

水平对该菌株进行了初步的鉴定。

1 材料与方法

1.1 HJM 菌株的分离与纯化

用于分离 HJM 菌株的液体样品来自江西某铜矿堆浸液,该样品的 pH 值为 2.5。HJM 菌株的液体富集培养采用嗜酸细菌的培养基^[4],其组成主要包括(g/L):(NH₄)₂SO₄ 0.2% ;KCl 0.01% ;K₂HPO₄ 0.05% ;MgSO₄·7H₂O 0.05%。另加入 0.1% 的葡萄糖和 0.01% 的酵母汁(V/V),用稀硫酸调节培养基的 pH 为 4.0。HJM 菌株的纯化采用 YM^[5]平板划线分离法,pH 值用稀硫酸调节到 4.0(固体平板制备时,琼脂粉与其它成要分开灭菌,以避免酸性条件

* 国家自然科学基金创新群体基金(No. 50621063),国家重大基础研究项目 973 基金(No. 2004CB619201)

** 通讯作者 Tel: 0731-8879212, E-mail: qgzblw@yahoo.com.cn.

收稿日期:2006-12-28,修回日期:2007-04-17

下琼脂的水解)。将上述接种富集液的平板于 30℃ 下倒置培养培养 2d~4d,即可长出单菌落。然后选择具有代表性的单菌落镜检,重复几次,直至获得目的菌株的纯培养物,并斜面保存备用。所有试剂(除特别说明外)均购于上海生工生物技术服务有限公司。

1.2 HJM 菌株基因组 DNA 的提取

离心收集 5mL HJM 菌体,用 pH8.0 的 TE 缓冲液洗涤 3 次,弃上清,沉淀备用。HJM 菌株基因组 DNA 的提取参照文献 [6] 进行。

1.3 18S rDNA 和 26S rDNA 的 D1/D2 区的 PCR 扩增

18S rDNA 的 PCR 扩增采用通用引物对^[7]:NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') 和 NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3')。PCR 反应体系 (50 μ L):10 \times PCR 缓冲液,5.0 μ L Mg^{2+} (5mmol/L),3.0 μ L dNTP (各 5mmol/L) 2.0 μ L 引物 (20 μ mol/L) 各 1.0 μ L Taq DNA 聚合酶 (1 U/ μ L, MBI) 1.0 μ L 模板 2.0 μ L 约 20ng;去离子水 35 μ L。扩增程序为:94℃ 3min,94℃ 40s,52℃ 1.0min,72℃ 1.0min;32 个循环后 72℃ 8min。取 5 μ L 产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳。在紫外灯下观察结果。

26S rDNA 的 D1/D2 区的 PCR 扩增采用引物对^[8]:NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') 和 NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')。除 94℃ 30s,52℃ 30s,72℃ 40s;30 个循环外,其它扩增条件与 18S rDNA 序列的 PCR 扩增基本相同。

1.4 PCR 扩增产物的纯化与测序

扩增的 PCR 产物用 Omega 生产的凝胶回收试剂盒纯化。纯化产物由北京三博生物技术有限公司完成测序工作。

1.5 序列分析和系统树的构建

根据供试菌株的 18S rDNA 和 D1/D2 区域序列,运用 BLAST 程序在 GenBank 数据库中分别进行同源序列搜索。根据同源序列搜索结果,下载相关菌株的 18S rDNA 序列和 D1/D2 区域序列,与供试菌株的序列放在一起,用 Clustal X 软件进行匹配排列,然后采用邻接法 (Neighbor-Joining)^[9] 进行系统树的构建并用 BOOTSTRAP 软件对进化树进行 1000 次可信度分析^[10]。

1.6 pH 值对 HJM 菌株的生长活性影响

取 99mL 的 YM 液体培养基装于 250mL 三角瓶中,将 pH 分别调节为 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 共 12 个梯度,1 $\times 10^5$ Pa 下灭菌 15min。然后分别接种处于对数生长期的新鲜细胞培养物 1.0mL 于上述培养基中,30℃、150r/min 培养 36h。测定培养液在 600nm 处的吸光度 (OD 值)。上述试验重复 3 次。

1.7 HJM 菌株对不同金属离子的抗性特征

据上述结果,调节培养基的 pH 为最适,然后分别接种 1.0mL 的 HJM 新鲜培养物于三角瓶中,在 30℃、150r/min 条件下培养,待 OD₆₀₀ 值达到 0.3 左右时,再向三角瓶中加入不同浓度的金属离子,继续培养 72h,然后测定含各种不同金属离子的菌液 OD₆₀₀ 值。各种金属离子抑制培养液中 HJM 菌株生长的最低浓度定义为最低抑菌浓度 (minimal inhibition concentrations, MICs)。由于添加到一定浓度有沉淀反应,在观察或测量光密度值时都以同浓度但不接种试管作为对照^[11]。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态学特征

普通光学显微镜下,HJM 菌株形成的菌落为乳白色,圆型,隆起,表面光滑,边缘规则(图 1a)。扫描电镜下,HJM 菌株的单细胞形态为卵圆型,进行出芽生殖(图 1b)。麦氏琼脂培养基上培养 5d 后的细胞经孔雀绿染色、乙醇脱色及番红复染后光学显微镜下观察,发现有子囊孢子的形成(图 1c)。菌株的菌落与细胞形态表明,该菌株属于产子囊孢子的酵母菌一类。

2.2 系统发育分析

2.2.1 18S rDNA 序列的系统发育分析:最新研究表明^[12],*P. guilliermondii* / *C. guilliermondii* 复合群内包括 *P. guilliermondii* (其无性型形式为 *C. guilliermondii*)、*P. carpophil* (其无性型形式为:*C. fermentati*) 和 *C. carpophila* (其异名为:*C. guilliermondii* var. *carpophila*, *C. fukuyamaensis*, *C. xestobii*) 3 个种。从图 2 可以看出,HJM 菌株 (18SrDNA accession number, EF194890) 与 *C. fermentati*、*C. guilliermondii* var. *carpophila* 和 *P. guilliermondii* 3 个不同种模式菌株类聚在相同的

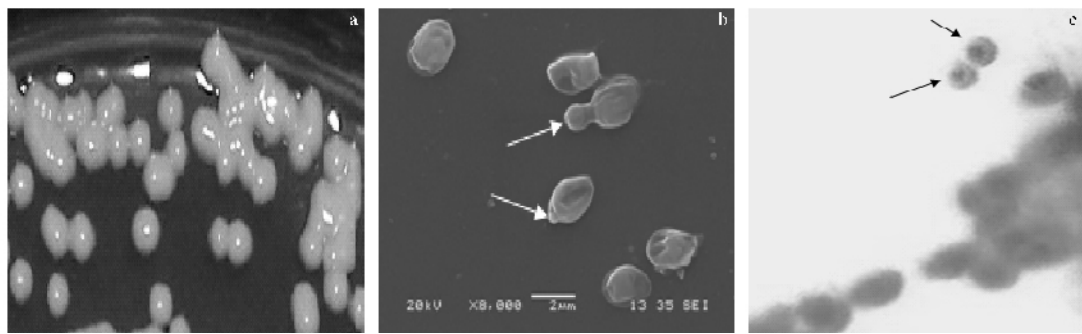


图 1 a、b 和 c 分别表示 HJM 菌株的菌落、扫描电镜以及子囊孢子照片
b 和 c 中箭头分别表示细胞正在进行出芽生殖与子囊孢子

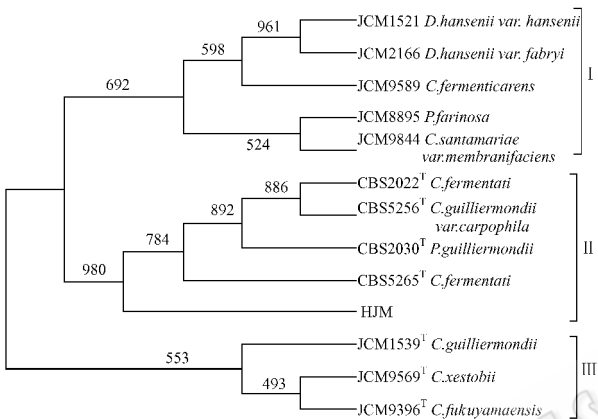


图 2 基于 18S rDNA 序列和 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树分支上的数值表示 Bootstrap 检验的支持百分率, T 表示模式菌株

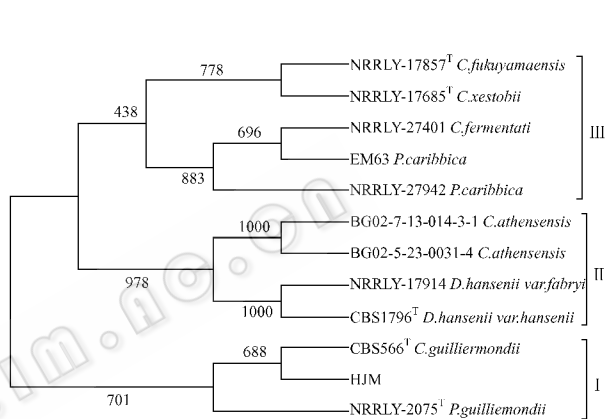


图 3 基于 26S rDNA D1/D2 序列和 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树分支上的数据表示 Bootstrap 检验的支持百分率, T 表示模式菌株

一组, 这表明该菌株与它们具有高度的亲缘关系。由此, 我们可以推断, HJM 菌株可能属于 *P. guilliermondii*/*C. guilliermondii* 复合群。

2.2.2 26S rDNA D1/D2 区序列的系统发育分析 对真菌特别是酵母菌进行系统分类时, 即使是 18S rDNA 序列的相似性高达 99% 以上, 甚至 100% 的菌株也可能属于不同的种类, 因此, 采用 18S rDNA 序列对这些种或菌株的区分往往达到目的^[13]。基于此, 我们从另一个分子水平, 即 26S rDNA D1/D2 序列探讨了 HJM 菌株(26S rDNA D1/D2 accession number, EF191047)与基因库中相关菌种(株)的系统发育关系, 以进一步确认该菌株的分类地位(见图 3)。从图 3 可见, 所研究的 12 株菌可分为 3 个类群。很明显, HJM 菌株落在第 1 个类群, 即与 *P. guilliermondii* 和 *C. guilliermondii* 处在同一分支, 这一结果进一步支持基于 18S rDNA 序列分析所得出的结论。而且, HJM 菌株与模式菌株

C. guilliermondii (CBS 566T) 的 26S rDNA D1/D2 序列的相似性为 100% (数据未表明), 因此, 结合形态学特征以及 18S rDNA 序列和 26S rDNA D1/D2 序列的系统学分析, HJM 菌株应该属于 *C. guilliermondii* 或者 *P. guilliermondii*。

2.3 pH 值对 HJM 菌株的生长活性影响

基于 HJM 菌株分离于极端酸性环境, 本实验探讨了不同 pH 条件对 HJM 菌株生长活性的影响。从图 4 可见, HJM 菌株在 pH 3.0 ~ 9.0 时, 均生长较好, 当 pH < 3.0 时, 生长虽受到一定的抑制, 但 pH 值 = 1.5 时, 仍然能够生存, 这表明该菌株对极端酸性环境具有较好的适应能力。但当 pH = 1.0 时, 其生长完全受到了抑制。当 pH > 9.0 时, 其生长同样受到了一定程度的影响, 但 pH = 10.0 时也能够生长, 只不过比 pH 9.0 时的迟缓期延长了 12h 左右 (数据未表明)。当 pH = 11.0 时, 其生长几乎完全受到了抑制。

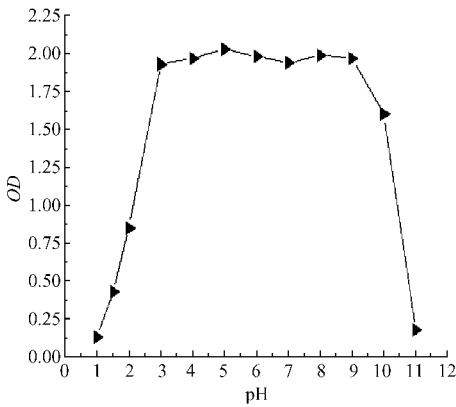


图4 不同pH对HJM菌株生长活性的影响

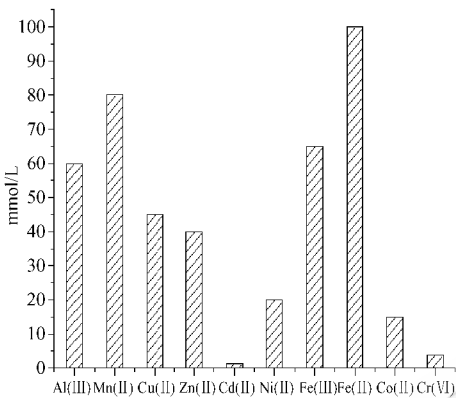


图5 HJM菌株对不同金属离子的MICs值

2.4 HJM菌株对10种不同金属离子的抗性特征

基于HJM菌株分离于富含各种金属离子的酸性矿坑水,推测它们应当具有较高的金属离子抗性能力。我们考察了该菌株对10种不同金属离子的MICs值(图5)。一般认为,MICs值越大,重金属对菌体的毒性越小,反之对菌体的毒性就越大。本研究中,10种金属离子对HJM菌株的毒性强弱依次为: Fe^{2+} (100mmol/L) < Mn^{2+} (80mmol/L) < Fe^{3+} (65mmol/L) < Al^{3+} (60mmol/L) < Cu^{2+} (45mmol/L) < Zn^{2+} (40mmol/L) < Ni^{2+} (20mmol/L) < Co^{2+} (15mmol/L) < Cr^{6+} (4mmol/L) < Cd^{2+} (1mmol/L)。HJM菌株对10种不同金属离子的抗性能力,表明HJM菌株对酸性矿坑水环境较强的适应性。

3 讨论

酵母菌的传统分类主要依赖于表型特征。而这些表型特征往往随着环境条件以及同一菌株不同的生理状态而发生变化,因而难以反映物种间的亲缘关系。随着分子生物学技术的发展,特别是随

着DNA序列分析技术的日趋成熟和简易化,核糖体RNA基因(包括18S rDNA和26S rDNA)序列分析被愈来愈多地应用于酵母菌的分子系统学研究中^[14]。Boekhout等人^[15]基于部分18S rDNA和26S rDNA序列分析,主张把与*Brettanomyces*亲缘关系密切的*Eeniella nana*重新命名为*Brettanomyces nanus*。而CAI等人^[13]采用18S rRNA全基因序列分析的手段证明了Boekhout等人主张的正确性。Kurtzman等人^[16-17]测定了假丝酵母属(*Candida*)几乎所有已知种模式菌株的26S rDNA D1/D2区域的碱基序列,发现用这段序列可以将绝大部分种区别开,而种内不同菌株间的碱基差异不大于1%。白逢彦等人^[8]也采用这段序列比较成功地解决了常规表型特征难以确定分类地位的8株假丝酵母菌的归属问题。事实上,任何一种分类方法都无法解决所有的问题,只有将这些方法有机的结合,才有可能还原物种的本来面目。基于此,我们结合菌株的基本形态以及18S rDNA和26S rDNA序列两种分子方法对HJM菌株进行了系统发育分析。芽殖生殖是酵母菌的典型特征之一。HJM菌株的芽殖生殖(见图1b)则充分表明该菌株属于典型的酵母菌;18S和26S rDNA的序列分析则从分子水平相互印证了HJM菌株属于*C. guilliermondii*或者*P. guilliermondii*的分类地位的正确性,而子囊孢子的产生进一步表明该菌株属于*P. guilliermondii*这个种。

酵母菌广泛分布于陆地、城市废水、淡水和海洋环境中,而且能够利用各种各样的底物进行生长。一般地,酵母菌嗜好偏酸性环境,但能在极端酸性环境(pH < 3.0)中生存的酵母菌的报道并不多见。迄今为止,仅在铜矿污泥^[18]、铀矿堆^[5]和制革污泥^[19]中有过极端嗜酸性酵母菌的报道,这预示着极端环境条件下酵母居群的种类多样性是非常有限的。长期以来,嗜碱性被认为是少数栖息于盐湖和盐碱地的原核微生物如极端嗜盐、中度嗜碱的古生菌的特性^[20]。然而,有证据表明城市污水中也有耐碱性真核微生物如酿酒酵母的存在^[21],但至今在酸性矿坑水中还未见耐碱酵母的相关报道。本研究中,我们首次报道了来自酸性矿坑水中极端嗜酸、又能耐受中强碱性环境的HJM酵母菌的分离。*P. guilliermondii*广泛地分布于自然界,一般存在于偏酸性或中性环境如唾液、幼虫的粪便和淡水等。酸性矿坑水环境中该物种的发现,是否是这个物种

由于某种偶然的因素从其他环境迁移至酸性环境, 还是它本身就是矿坑水环境的本地“居民”值得进一步的研究。无论如何, 该菌株的分离既具有重要的实践意义, 又具有重要的理论意义。因为极端环境中的微生物不但是工业上宝贵的酶资源的材料来源, 而且对它的环境适应性机制的研究有助于地球上生命起源的理解。此外, 该菌株对各种金属离子的广谱抗性, 特别是高浓度的铜离子抗性特征为进一步研究微生物对铜的抗性机制以及在环境生物修复方面的应用提供了极好的材料。

致谢 中科院微生物研究所的白逢彦研究员在 HJM 菌株分子鉴定分析方面作出了重要的贡献, 在此表示衷心地感谢!

参考文献

- [1] Kelly DP, Wood AP. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 511 ~ 516.
- [2] Johnson DB, Okibe N, Hallberg KB. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, **60**: 299 ~ 313.
- [3] Johnson DB. *FEMS microbiology ecology*, 1998, **27**: 307 ~ 317.
- [4] Bridge T A M, Johnson D B. *Geomicrobiology Journal*, 2000, **17**(3): 193 ~ 206.
- [5] Silóniz M, Payo EM, Callejo MA, *et al.* *FEMS Microbiology Letters*,

2002, **210**(2): 233 ~ 237.

- [6] 周小玲, 沈微, 饶志明, 等. *微生物学通报*, 2004, **31**(4): 89 ~ 92.
- [7] Anderson LC, Campbell CD, Prosser JL. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(1): 36 ~ 47.
- [8] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. *菌物系统*, 2002, **21**(1): 27 ~ 32.
- [9] Saitou N, Nei M. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406 ~ 425.
- [10] Felsenstein J. *Evolution*, 1985, **39**: 783 ~ 791.
- [11] 张汉波, 郑月, 曾凡, 等. *微生物学通报*, 2005, **32**(3): 24 ~ 32.
- [12] Vaughan-Martini A, Kurtzman CP, Meyer SA, *et al.* *FEMS Yeast Research*, 2005, **5**: 463 ~ 469.
- [13] Cai J, Roberts IN, Collins MD. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1996, **46**: 542 ~ 549.
- [14] Wu Z W, Bai F Y. *Mycoststema*, 2005, **24**(2): 193 ~ 198.
- [15] Boekhout T, Kurtzman CP, O'Donnell K, *et al.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, **44**: 781 ~ 786.
- [16] Kurtzman CP, Robnett CJ. *Microbiology*, 1997, **35**: 1216 ~ 1223.
- [17] Kurtzman CP, Robnett CJ. *Antonie Leeuwenhoek*, 1998, **73**: 331 ~ 371.
- [18] 张国顺, 洪青, 刘智. *微生物学报*, 2004, **44**(5): 631 ~ 635.
- [19] 王世梅, 周立祥, 黄峰源, 等. *环境科学*, 2004, **25**(5): 153 ~ 157.
- [20] Tindall B J. *Halophilic Bacteria*, Rodriguez-Valera F Ed., Boca-Raton: CRC, 1988, pp. 31 ~ 67.
- [21] 杨艳艳, 易霞, 木合塔尔·阿不都克力木, 等. *生物技术*, 2005, **16**(4): 25 ~ 27.