

云南和广东部分热泉 *Alicyclobacillus* 分布及系统发育

陈志伟 姜成英 刘双江*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要: 从云南和广东热泉采集的样品中富集分离得到 12 株嗜热或微嗜热的嗜酸杆菌, 革兰氏染色阳性或不定, 营异养生长, 最适 pH 为 3.5 ~ 5.5, 最适温度为 43℃ ~ 52℃。测定其 16S rDNA 序列表明这些菌株与脂环酸芽孢杆菌属亲缘关系最近, 结合其形态、生理等特性, 鉴定这些菌株属于脂环酸芽孢杆菌。

关键词: 嗜热嗜酸菌, 脂环酸芽孢杆菌, 16S rDNA, 系统发育

中图分类号: S435.131 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 03-0050-05

Survey on and Phylogeny of *Alicyclobacillus* Species in Hot Springs of Southern China's Guangdong and Yunna Provinces

CHEN Zhi-Wei JIANG Cheng-Ying LIU Shuang-Jiang*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: 12 isolates of thermoacidophilies were obtained from samples of hot springs of Southern China's Guangdong and Yunna provinces. All isolates are heterotrophic. Cells are rods, Gram positive or variable. The optimal pH and temperature for growth are 3.5 ~ 5.5 and 43℃ ~ 52℃, respectively. Based on their morphological physiological properties and their 16S rDNA sequences, they were identified as members of *Alicyclobacillus*.

Key words: Thermoacidophilies, *Alicyclobacillus*, 16S rRNA, Systematic phylogeny

脂环酸芽孢杆菌属 (*Alicyclobacillus*) 是一类嗜酸热的芽孢杆状细菌, 不同于芽孢杆菌属的一个显著的细胞化学特征是其细胞膜中含有 ω -脂环酸 (ω -cyclic fatty acids), 目前该属包括 *A. acidocaldarius*^[1]、*A. acidoterrestis*^[1]、*A. cycloheptanicus*^[1]、*A. acidiphilus*^[2]、*A. herbarius*^[3]、*A. hesperidum*^[4] 和两个基因型种——*Alicyclobacillus* genomic species 1^[4] 和 *Alicyclobacillus* genomic species 2^[5]。除了个别种如 *A. acidiphilus* 分离自酸性饮料和 *A. herbarius* 由茶中获得外, 多数分离自硫磺矿或热泉周围。由于其存在于特殊的酸热环境中, 脂环酸芽孢杆菌不仅在生物地质化学反应和元素循环中起着重要作用, 也是筛选新型酶催化剂的重要菌种资源^[6]。

我国的温泉热泉众多, 主要分布在西藏、云南、广东、四川、福建、台湾和江西等南方诸省。已经在热泉中分离鉴定了一些嗜热酸微生物, 如从云南腾冲分离得到腾冲酸热两面菌 (*Acidianus tengcongensis*) 和腾冲嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis*)、从广东温泉分离得到嗜热细菌非解脲栖热菌等, 但对脂环酸芽孢杆菌及其分布未见报道。为了对南方热泉中的嗜酸热微生物种类进行调查及分离嗜酸热菌, 我

*联系人 Tel: 010-62522317, E-mail: liusj@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2003-06-18, 修回日期: 2003-09-01

们到云南和广东的热泉采样, 本文报道这些环境中脂环酸芽孢杆菌的种群和分布。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究的样品采集于云南腾冲(大滚锅, 珍珠泉, 怀胎泉)、瑞滇、囊宋和广东澄海莲花山、丰顺汤坑、饶平新丰、兴宁叶南、兴宁泥陂、紫金龙川等地, 样品为泥石或泉水。样品的特性见表1。

表1 本实验中样品采集地温度及其理化特性

地点	样品状态	pH	温度(°C)
大滚锅	泥样、水样	4.0~8.0	80
怀胎泉	泥水、水样	6.0	70
珍珠泉	泥水	6.0	65
瑞滇	泥水	7.0	82
囊宋	泥水	8.0	78
莲花山	水样	—	60
汤坑	水样	6.5	58
新丰	水样	6.0	54
叶南	水样、固体沉积物	7.0	74
泥陂	水样	7.0	65
龙川	泥样、水样	6.0	60

1.2 菌种富集、分离和培养

样品按合适的量接种于培养基中^[7], 置于60°C培养3~5d, 继续转接2~3次。将富集得到的样品取合适的稀释度涂布于固体培养基平板, 置于60°C培养1~3d。

1.3 菌落计数

称取0.1~0.2g的泥样, 用1mL培养基^[7]稀释, 充分振荡后取200 μ L涂布于固体培养基平板上。对于充分混匀的泥水样品或水样取200 μ L涂布于固体培养基平板, 置于60°C培养1~2d, 观察并计算形成的菌落和数量, 每个样品3个重复。

1.4 细胞形态观察

菌株接种于BAM (*Bacillus acidocaldarius* Medium)^[8], pH4.0, 于45°C培养12~14h经过革兰氏染色后使用OLYMPUS BH-2显微镜观察菌种形态。

1.5 最适生长温度及 pH

最适温度测定是将菌株活化后接种于BAM, 温度范围35°C~80°C。培养1d, 测定 OD_{600} ; 最适生长pH测定同样取活化的菌株接种于BAM, pH范围为1.5~6.5, 温度为45°C培养1d, 测定 OD_{600} 。

1.6 16S rDNA 扩增、序列测定和系统发育分析

16S rDNA扩增的引物分别对应*E. coli* 16S rRNA基因的8~27和1514~1495位置。PCR产物测定了5'端序列约600bp, 其中2个菌株(YN2和GD4)测定了扩增片段的全序列。对获得的5'端600bp的序列用PHYLIP软件包构建系统发育树, 参与序列比对的还有*Alicyclobacillus acidocaldarius* (NCBI AB059674)、*Alicyclobacillus* sp. MIH 2 (AB060162)和*Alicyclobacillus* sp. MIH 332 (AB060165)。由于这15个序列之间的相似很高, 所以采用最大简约性法(Maximum Parsimony Methods, MPM)的算法构建菌株间系统

发育树。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离鉴定

对采集的 11 个热泉样品, 首先进行了嗜酸热异养菌数量的菌落计数。计数结果表明, 云南腾冲大滚锅水样中嗜酸热异养菌数量平均为 26 cells/mL; 泥样中嗜酸热异养菌数量较高, 平均为 227 cells/g 湿泥。云南腾冲怀胎泉泥水混合样品中嗜酸热细菌为 70 cells/mL; 广东采集的样品中, 嗜酸热细菌数量较低, 其中丰顺汤坑样品中嗜酸热细菌数为 10 cells/mL。根据计算结果来看, 云南热泉中嗜酸热细菌数量比广东热泉中的嗜酸热细菌数量要高, 分布也较广, 这可能与云南热泉普遍为硫磺泉并且水温较高有关。

采用富集后涂平板方法从云南样品中分离得到了 8 株嗜酸热细菌, 编号分别为 YN1 至 YN8; 从广东样品中分离获得 4 株嗜酸热细菌, 编号分别为 GD1 至 GD4, 这 12 株细菌的细胞形态特征、最适生长温度、最适生长 pH、以及菌落特征列于表 2。从表 2 可以看出, 12 株菌均为杆状, 细胞大小为 $0.5 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 2.0 \sim 4.0 \mu\text{m}$, 最适生长温度为 $43^\circ\text{C} \sim 52^\circ\text{C}$, 最适生长 pH 为 $3.5 \sim 5.5$, 符合脂环酸芽孢杆菌属的形态和生理特征。Goto 等人扩增 *Alicyclobacillus* 属 16S rRNA 基因 5' 端高变区 (分别对应于 *B. subtilis* 16S rRNA 基因的 47 到 365, 约 259 ~ 273bp), 通过序列相似性比对, 发现其特异性可应用于脂环酸芽孢杆菌属中新种的快速鉴定^[9]。我们通过对 16S rRNA 基因 5' 端约 600bp 序列测定, 快速地将所分离得到的 12 株菌鉴定为 *Alicyclobacillus* 属的细菌。利用这 12 个 16S rRNA 基因 5' 端 600bp 序列在 GenBank 上 Blast 发现, 这些菌与 *Alicyclobacillus* 菌株的相似性最高 (>98%)。Goto 等人的相关研究也发现热泉地区广泛存在 *Alicyclobacillus acidocaldarius*^[5]。

Alicyclobacillus 是一类革兰氏阳性或不定、好氧的嗜酸热芽孢杆菌, 其细胞膜的主要特征性脂肪酸成分是 ω -脂环酸。Wisotzkey 等人通过 16S rRNA 基因序列对比及脂肪酸组成, 将原属于 *Bacillus* 的 *B. acidocaldarius*、*B. acidoterrestis* 和 *B. cycloheptanicus* 归入 *Alicyclobacillus* 中^[1]。近几年来, 又有几个新种——*A. hesperidum*、*Alicyclobacillus genomic species 1*、*A. acidiphilus*、*A. herbarius* 和 *Alicyclobacillus genomic species 2* 相继报道。这个属的菌株分布比较广, 包括地热地区 (陆地热泉或热井的水和沉积物、火山喷气孔湿土及海底热泉等)、非地热的土壤、堆肥、水果、酸性饮料、热处理的食品等。从本研究可以看出 *Alicyclobacillus* 属的细菌广泛分布于我国南方的热泉生态体系之中, 其温度范围跨 $58^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$, pH (4.0 ~ 8.0) 则是酸性、中性和弱碱性都有。地域分布上看, 从云南采集的样品中该类细菌的分布较广。

表 2 12 株嗜酸热异养菌的生物学特征及分离地点

菌株编号	细胞形态	最适温度 (°C)	最适 pH	菌落特征	16S rDNA 序列相似性最高的菌种	菌株来源
YN1	杆状	46	5.0	乳白, 微突起	<i>A. acidocaldarius</i> (98%)	大滚锅
YN2	杆状	43	5.5	乳白, 微突起	<i>A. acidocaldarius</i> (99%)	大滚锅

续表 1

YN3	杆状	45	5.0	浅黄, 微突起	<i>A. acidocaldarius</i> (99%)	大滚锅
YN4	杆状	43	5.0	乳白, 微突起	<i>A. acidocaldarius</i> (99%)	大滚锅
YN5	杆状	47	5.0	乳白, 扁平	<i>A. sp. R-10926</i> (98%)	大滚锅
YN6	杆状	45	4.0	白色, 微突起, 边缘不规则	<i>A. acidocaldarius</i> (99%)	怀胎泉
YN7	杆状	48	3.5	乳白, 微突起	<i>A. sp. MIH 332</i> (99%)	珍珠泉
YN8	杆状	50	3.0	乳白, 微突起	<i>A. acidocaldarius</i> (99%)	囊宋
GD1	杆状	47	5.0	乳白, 扁平	<i>A. acidocaldarius</i> (99%)	龙川
GD2	杆状	48	5.5	略带黄色, 扁平	<i>A. acidocaldarius</i> (98%)	龙川
GD3	杆状	48	3.0	乳白, 微突起	<i>A. acidocaldarius</i> (98%)	龙川
GD4	杆状	52	3.0	乳白, 微突起, 边缘不规则	<i>A. sp. DSM 11984</i> (100%)	汤坑

2.2 16S rDNA 基因序列及系统发育

根据 12 株脂环酸芽孢杆菌的 16S rDNA 基因的 5' 端测序结果运用最大简约法构建

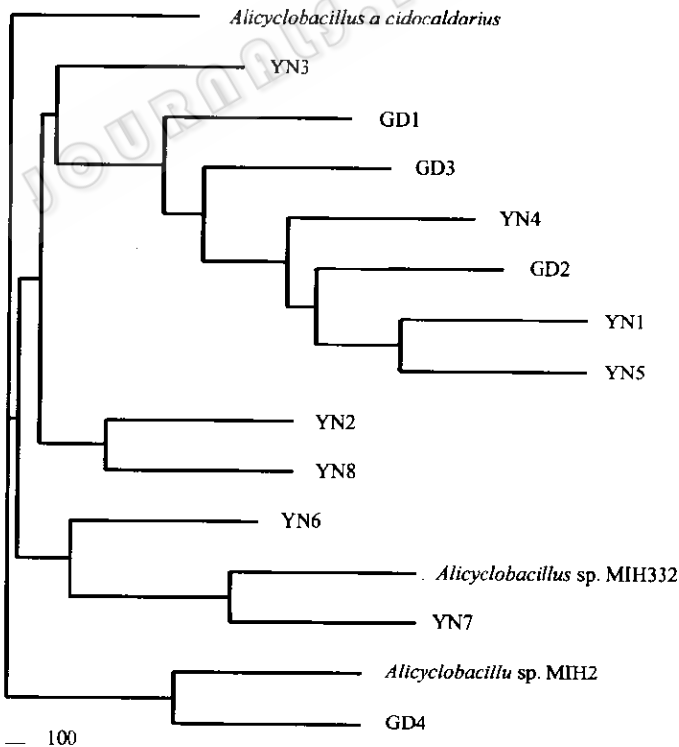


图 1 依据 16S rDNA 基因 5' 端序列构建的 *Alicyclobacillus* 菌株间的系统发育树

的系统进化树如图1所示。从系统发育树我们可以大致将GD1、GD2、GD3、YN1、YN4和YN5归为一个类群，YN2和YN8归为另一类群，YN6和YN7与*Alicyclobacillus* sp. MIH2聚在一起，而GD4则与*Alicyclobacillus* sp. MIH2聚在一起。

通过本研究，我们对*Alicyclobacillus*属在南方热泉中的资源分布有了基本了解，分离得到了12个菌株。一些研究表明，*Alicyclobacillus*菌株能够产生嗜热酶或耐热酶。这些耐热酶和嗜热酶在工业上的应用有十分诱人的前景。提高反应温度有许多优点，例如增大难溶有机底物的溶解度、降低粘度、提高扩散系数、加快反应速度等，从而提高底物转化效率和易于控制。同时，多数耐热或嗜热酶在中温细菌中表达能够正确折叠，并不会被宿主蛋白酶所水解及利于热处理纯化^[6,10]。目前国外对*Alicyclobacillus*应用研究正处于起步阶段，相关研究表明其耐热酶的在淀粉、纤维素、几丁质的降解都有很大的潜力，而国内在这方面的研究则是一片空白，本研究为今后开展这一领域的研究提供了菌种资源。

致谢：本项研究得到了中国科学院百人计划支持，样品采集过程中得到昆明植物研究所钱亚民老师的支持，刘艳阳同学参加了部分工作，特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Wisotzkey J D, Jurtshuk P, Fox G E, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1992, **42**: 263 ~ 269.
- [2] Matsubara H, Goto K, Matsumura T, *et al.* Int J Syst Evol Microbiol, 2002, **52**: 1681 ~ 1685.
- [3] Goto K, Matsubara H, Mochida K, *et al.* Int J Syst Evol Microbiol, 2002, **52** (Pt 1): 109 ~ 13. L
- [4] Albuquerque L, Rainey F A, Chung A P, *et al.* Int J Syst Evol Microbiol, 2002, **50**: 451 ~ 457.
- [5] Goto K, Tanimoto Y, Tamura T, *et al.* Extremophiles, 2002, **6**: 333 ~ 340.
- [6] Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1999, **51**: 711 ~ 729.
- [7] Zillig W, Stetter K O, Wunderl S, *et al.* Arch Microbiol, 1980, **125**: 259 ~ 269.
- [8] Deinhard C, Saar J, Krischke W. Syst Appl Microbiol, 1987, **10**: 68 ~ 73.
- [9] Goto K, Mochida K, Asahara M, *et al.* J Gen Appl Microbiol, 2002, **48**: 243 ~ 250.
- [10] Huber H, Stetter K O. FEMS Microbiol Rev, 2000, **24**: 615 ~ 623.