

# 腾冲热海一株嗜酸热硫化叶菌的分离与鉴定

陈波 魏云林 井申荣 季秀玲 陆月情 林连兵\*

(昆明理工大学生物工程技术研究中心 昆明 650224)

**摘要:** 从云南腾冲热海酸性温泉中分离纯化出一株极端嗜酸热菌株 K4-1, 并对其进行了形态观察、生长特征、碳源和能源利用及 16S rRNA 基因分析。该菌株细胞形态为不规则球形, 有单生鞭毛, 严格好氧, 兼性自养, 能利用元素硫作为能源, 也能利用酵母膏、精氨酸或核糖作为碳源和能源。其最适生长温度为 75°C, 最适 pH 为 3.5。通过 16S rRNA 基因序列相似性对比对该菌株进行鉴定, 结果表明该菌株与硫化叶菌属标准菌株的相似性介于 86.6%~94.3%之间, 与分离自腾冲热海的腾冲硫化叶菌 *Sulfolobus tengchongensis* RT8-4 菌株序列相似性最高, 达到 98.9%, 可将菌株 K4-1 鉴定为硫化叶菌属菌株。菌株 K4-1 的 16S rRNA 基因序列号为 EU729124。

**关键词:** 极端嗜热古菌, 硫化叶菌, 系统进化分析, 分离鉴定

## Identification of a Thermoacidophilic *Sulfolobus* sp. Isolated from a Hot Spring in Tengchong Rehai

CHEN Bo WEI Yun-Lin JING Shen-Rong JI Xiu-Ling LU Yue-Qing LIN Lian-Bing\*

(Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 560224)

**Abstract:** An extremely thermoacidophilic isolate K4-1 was obtained from an acidic hot spring in Tengchong Rehai, Yunnan province. Morphology, growth characteristics, utilization of carbon compounds, energy sources and 16S rRNA gene sequence of K4-1 were studied. Cells of K4-1 are irregular cocci with monotrichous flagella. The strain grew aerobically in either a lithotrophic or a heterotrophic mode. Growth on elemental sulfur occurred through oxidation of sulfur. It grew optimally at 75°C and pH 3.5. On the basis of 16S rRNA gene sequence similarity, strain K4-1 was shown to belong to genus *Sulfolobus*, being related to the type strains of genus *Sulfolobus* (86.6%~94.3% similarity), and being most closely related to strain *Sulfolobus tengchongensis* RT8-4 (98.9% similarity). The GenBank accession number of strain K4-1 16S rRNA gene sequence is EU729124.

**Keywords:** Thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus*, Phylogenetic analysis, Identification

硫化叶菌属是较早被分离且详细描述的一属古菌, 最早由Brierley于 1966 年在美国黄石国家公园分离得到<sup>[1]</sup>。该属菌株为好氧嗜酸热古生菌, 其最适

生长温度为 80°C左右, 最适pH为 3 左右, 目前在世界各国的许多酸性温泉中均分离到了该属的菌株<sup>[2]</sup>。硫化叶菌属可分为 4 个族群<sup>[3]</sup>。第 1 个族群由

基金项目: 国家自然科学基金资助(No. 30660009); 云南省自然科学基金资助(No. 2007C186M); 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的资助(No. 07014)

\* 通讯作者: Tel: 0871-3801018 转 204; 信箱: linlb@sohu.com

收稿日期: 2008-04-08; 接受日期: 2008-09-02

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

*Sulfolobus acidocaldarius*和*Sulfolobus thuringiensis*构成;第2个簇群由*Sulfolobus tokodaii*、*Sulfolobus yangminggensis*和*Sulfolobus ohwakuensis*组成;第3个簇群包括*Sulfolobus solfataricus*、*Sulfolobus shibatae*、*Sulfolobus tengchongensis*和*Sulfolobus islandicu*构成;第4个簇群代表菌株为*Sulfolobus metallicus*,硫化叶菌为在酸性温泉中广泛分布的一类嗜热嗜酸古生菌,嗜酸热、好氧生长及球形或不规则球形菌体是硫化叶菌属菌株重要的特征。

云南腾冲热海是我国大陆著名的热区,水热活动表现最为强烈的热海热田面积约 10 km<sup>2</sup>,有沸泉、热水池、喷气孔和喷气地面等多种显示类型,温泉水温达 50°C~97°C, pH值从 1.5~10.0 不等,其中许多酸性温泉的水化学性质都比较适合硫化叶菌的生长。

本文主要报道了从云南腾冲热海酸性温泉中分离到了 1 株嗜酸热硫化叶菌菌株,并对其进行生理生化特征及系统进化分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基、样品采集及分离

DSM88 培养基的组成如下:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.28 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.02 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.025 mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.07 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.025 mg, FeCl<sub>3</sub> 0.28 mg, CuSO<sub>4</sub> 0.016 mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 2.2 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.5 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.046 mg, CaSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 60 mg, Tryptone 1 g, Yeast extract 1 g, 定容至 1 L, pH 3.5。

采集腾冲热海温度为 65°C、pH 为 3.0 的一个酸性温泉的水样 5 mL,接种至含有 100 mL 的 DSM88 液体培养基中,于 75°C 摇床(140 r/min)培养 7 d,待培养基变混浊后,把培养液按一定的稀释度稀释后涂布于用 1% Gelrite 为凝固剂的 DSM88 培养基上<sup>[4]</sup>,于 75°C 恒温培养箱培养 7 d,挑取单菌落重复进行分离纯化。

### 1.2 营养需求及最适生长条件

菌株在添加有 0.1% Tryptone 和 0.1% yeast extract 的 DSM88 培养基中生长至对数生长期早期 ( $OD_{600} \approx 0.4$ ),于 22°C、5000 r/min 离心 15 min 收集菌体。菌体用不含 Tryptone 和 Yeast extract 的 DSM88 培养基洗涤,以去除残留的营养成份。洗涤过的细胞接种至装有 10 mL 添加了各种糖或氨基酸(0.1%,

W/V)的 DSM88 液体培养基中,于 75°C 水浴摇床培养 7 d,菌株营养需求通过测定培养液中的  $OD_{600}$  来确定 ( $OD_{600} > 0.4$ , 培养液明显浑浊设为阳性,反之则为阴性)。

K4-1 菌株的最适生长温度测定方法为:将处于对数生长期早期的 K4-1 菌株培养液 0.5 mL 接种到 5 mL 的 DSM88 培养基中,分别置于 45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C 和 90°C 水浴振荡培养 7 d,通过测定培养液中的  $OD_{600}$  来确定其生长温度范围及最适生长温度。

K4-1 菌株的最适生长 pH 测定方法为:将处于对数生长期早期的 K4-1 菌株培养液 0.5 mL 接种到分别调节 pH 值为 1.0、1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5 的 5 mL DSM88 培养基中,置于 70°C 水浴振荡培养 7 d,通过测定培养液中的  $OD_{600}$  来确定其生长 pH 范围及最适生长 pH。以上试验均设平行。

### 1.3 总 DNA 的提取、16S rRNA 基因扩增及测序

总 DNA 的提取采用博大泰克 DNA 提取试剂盒提取,16S rDNA 基因扩增采用古生菌特异引物。正向引物 F1:5'-GTTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3';反向引物 F2:5'-GGCTCGAGCGCCCGGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增条件:94°C 预变性 5 min;94°C 变性 45 s,50°C 退火 45 s,72°C 延伸 1.5 min,30 循环;72°C 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收后,克隆到 T 载体上,利用化学法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株,挑取阳性克隆由 Sangon Biotech 公司测序。

### 1.4 系统进化树的构建与分析

用 Blastn 程序在 GenBank 中进行相似性比较,选取相似性较大的序列用 Mega3.1 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。

### 1.5 电子显微镜观察

处于对数生长期早期的 K4-1 细胞用 2%(W/V)的醋酸双氧铀染色后用透射电子显微镜观察(Hitachi H-600A)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞形态

K4-1 菌株在 1% Gelrite 的 DSM88 培养基平板上形成光滑、扁平的暗黄色菌落。经电子显微镜观察,K4-1 菌株的细胞为球状、不规则的多面体,有单生鞭毛,菌体直径大约为 1.0  $\mu\text{m}$ ~1.2  $\mu\text{m}$ (图 1)。

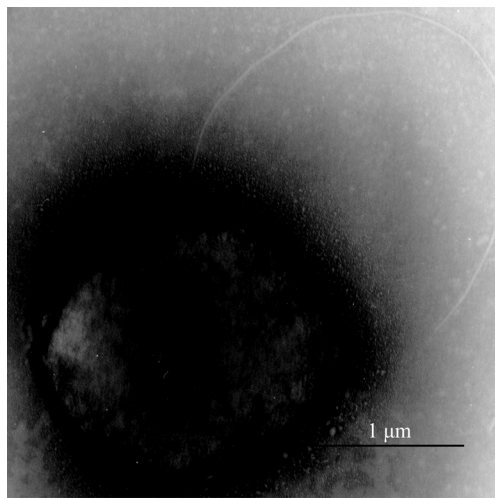


图1 菌株 K4-1 的显微形态

Fig. 1 Electron micrograph of strain K4-1

## 2.2 营养需求及最适生长条件

K4-1 菌株在加了 0.1% Tryptone和 0.1% yeast extract的DSM88 培养基中生长良好, 生长温度范围为 55°C~85°C, 最适生长温度为 70°C~75°C, 接种后经约 80 h, 培养物的菌体浊度最高达到 $OD_{600} \approx 1.0$ 。生长pH值范围为 1.5~5.5, 最适生长pH为 3.0~3.5。在有氧条件下, K4-1 能在含有元素硫的DSM88 无机培养基中生长, 并引起培养基pH值的降低。在无氧条件下, K4-1 不生长。

K4-1 菌株及其与其它硫化叶菌菌株的营养物利用情况(参考Ren-Long Jan, Xiang X等人资料)比较见表 1<sup>[5-8]</sup>。K4-1 能利用多种糖作为唯一碳源生长, 这方面和*S. yangmingensis* YM1<sup>T</sup>相似, 但*S. yangmingensis* YM1<sup>T</sup>能同时利用L-鼠李糖、L-丙氨

表 1 K4-1 与其它硫化叶菌属菌株的营养利用比较  
Table 1 Energy sources and utilization of carbon compounds of *Sulfolobus* sp.

Nutrient	Strain K4-1	<i>S. solfataricus</i> DSM 1616 <sup>T</sup>	<i>S. tengchongensis</i> RT8-4	<i>S. acidocaldarius</i> DSM 639 <sup>T</sup>	<i>S. yangmingensis</i> YM1 <sup>T</sup>
<b>Sulfur compounds</b>					
Elemental S	+	+	+	+	+
FeS	ND	+	ND	+	+
<b>Carbohydrates</b>					
D-Arabinose	+	±	+	±	+
D-Ribose	+	±	ND	-	±
D-Xylose	+	±	+	-	+
D-Fructose	+	±	+	±	+
D-Galactose	+	+	+	-	+
D-Glucose	+	+	-	+	+
D-Mannose	+	+	-	+	+
D-L-Rhamnose	+	-	-	-	+
Lactose	-	+	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	ND	+	+
Sorbitol	ND	ND	-	ND	+
Cellobiose	+	ND	ND	ND	+
Trehalose	+	ND	ND	ND	+
<b>Amino acids</b>					
L-Aspartic acid	+	±	-	±	+
L-Arginine	ND	ND	ND	ND	+
L-Methionine	+	ND	ND	ND	+
L-Alanine	-	ND	ND	ND	+
L-Glycine	-	ND	ND	ND	+
<b>Tryptone</b>	+	+	+	+	ND
<b>Yeast Extract</b>	+	+	+	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性; ND: 未测定

Note: +: Positive; -: Negative; ND: Not determined

酸和L-甘氨酸生长, 而K4-1 却不利用后两种氨基酸生长。K4-1 菌株能分别以D-核糖和D-木糖为唯一碳源生长, 而*S. acidocaldarius* DSM 639<sup>T</sup>则不能利用这两种糖, 此外*S. acidocaldarius* DSM 639<sup>T</sup>和*S. solfataricus* DSM 1616<sup>T</sup>均不能利用L-鼠李糖。K4-1 能利用D-葡萄糖、D-甘露糖和L-鼠李糖, 而*S. tengchongensis* RT8-4 均不能利用上述3种糖, 可见K4-1 菌株在营养物利用方面与其它硫化叶菌菌株有其共性同时又存在一定差异。

### 2.3 16S rRNA 基因系统发育分析

本研究获得的K4-1 菌株 16S rRNA基因片段长度为 1482 bp, 其在GenBank中基因序列号为EU729124。将该序列与GenBank中序列进行相似性比较, 结果见表 2。结果表明K4-1 菌株与硫化叶菌属标准菌株的 16S rRNA基因相似性为 86.6%~94.3%, 与分离自腾冲热海的腾冲硫化叶菌*S. tengchongensis* RT8-4 菌株序列相似性为 98.9%, 与*S. shibatae*、*S. yangmingensis* YM1<sup>T</sup>、*S. acidocaldarius* DSM 693<sup>T</sup> 和*S. solfataricus* DSM 1616<sup>T</sup>的相似性分别为 93.5%、88.2%、89.5%和 94.3%。

表 2 K4-1 菌株与硫化叶菌属菌株 16S rRNA 基因序列相似性比较

Table 2 16S rRNA gene sequence similarity of strain K4-1 with *Sulfolobus* sp.

Strain	Accession No.	Sequence similarity with strain K4-1(%)
<i>S. metallicus</i> DSM 6482 <sup>T</sup>	D85519	86.6
<i>Stygiolobus azoricus</i> DSM 6296 <sup>T</sup>	X90480	89.3
<i>S. tokodaii</i> TW <sup>T</sup>	EU545801	87.4
<i>S. ohwakuens</i> TA-1 IFO15161 <sup>T</sup>	D85507	88.9
<i>S. acidocaldarius</i> DSM 693 <sup>T</sup>	D14053	89.5
<i>S. tengchongensis</i> RT8-4	AY135637	98.9
<i>Sulfolobus</i> sp. B6/2	U38360	88.5
<i>S. yangmingensis</i> YM 1 <sup>T</sup>	AB010957	88.2
<i>S. shibatae</i> DSM 5389 <sup>T</sup>	M32504	93.5
<i>S. solfataricus</i> DSM 1616 <sup>T</sup>	D26490	94.3

以嗜酸热古菌 *Acidianus brierlyi* 为外群, 利用 Mega3.1 软件进行多重序列比对并绘制系统进化树如图 2 所示, K4-1 菌株与分离自腾冲热海的腾冲硫化叶菌 *S. tengchongensis* RT8-4 菌株属同一簇群, 同源性较高。

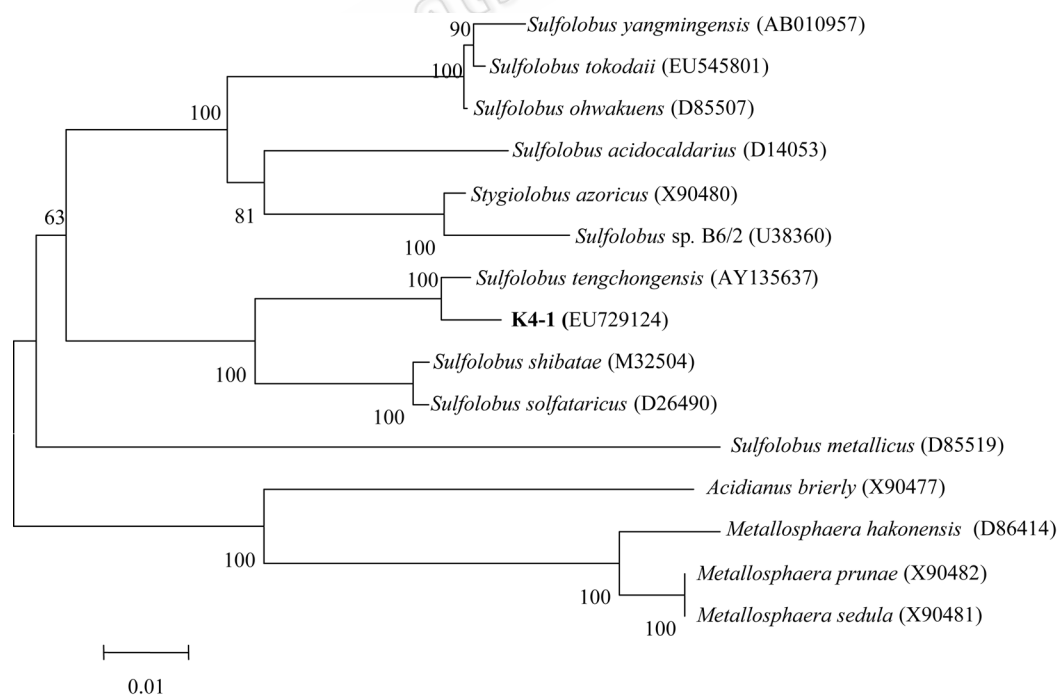


图 2 菌株 K4-1 16S rRNA 基因系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

### 3 讨论

硫化叶菌广泛分布于世界各地的酸性温泉中,从美国的黄石公园、意大利、冰岛、中国台湾及腾冲的酸性温泉中分别分离到了 *S. acidocaldarius*、*S. solfataricus*、*S. metallicus*、*S. yangmingensis* 和 *S. tengchongensis* 五个种的硫化叶菌菌株。此外,仅在日本就分离到了 *S. shibatae*、*S. tokodaii*、*S. hakonesis* 三个种<sup>[9-11]</sup>,从新西兰和俄罗斯的酸性温泉中也分离到了硫化叶菌<sup>[12,13]</sup>。

本文所研究的 K4-1 菌株分离至腾冲热海的一个酸性温泉样品, K4-1 菌株细胞为不规则球状,直径大约为 1.0 μm~1.2 μm,其最适生长 pH 为 3.5,最适生长温度为 75°C,既能以元素硫作为唯一能源,也能利用酵母膏或蛋白胨等作为碳源和能源。K4-1 的生长特点及其营养利用符合硫化叶菌的特征。

16S rRNA 基因序列相似性分析表明, K4-1 菌株与硫化叶菌属标准菌株的 16S rRNA 基因序列相似性在 86.6%~94.3% 之间,其与 *S. solfataricus* DSM 1616<sup>T</sup> 的相似性最近为 94.3%。与同样分离自腾冲热海的 *S. tengchongensis* RT8-4 菌株的相似率达到 98.9%,但该两株菌在营养利用方面有一定的差异,且 K4-1 菌株有单生鞭毛而有别于 *S. tengchongensis* RT8-4 菌株的周生鞭毛。综合形态、生长特征、碳源和能源利用及 K4-1 16S rRNA 基因序列相似性分析结果,将 K4-1 菌株鉴定为硫化叶菌属菌株。

据报道,腾冲热海栖热菌(*Thermus* sp.)的多样性与其温泉水化学特征的多样性关系密切<sup>[14]</sup>,从日本酸性温泉中也曾分离到多个硫化叶菌不同种菌株。腾冲热海酸性温泉类型多样(pH 1.5~6.0,温度 55°C~93°C)且水化学特征差异明显,是否意味着其硫化叶菌的分布也具有多样性,有待进一步研究。

致谢:本研究得到国家自然科学基金项目(No. 30660009)、云南省自然科学基金(No. 2007C186M)及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的资助(No. 07014)。

### 参考文献

[1] Brierley JA. Contribution of chemolithoautotrophic bac-

teria to the acid thermal waters of the geysir spring group in Yellowstone National Park [PhD thesis], Montana State University. Bozeman, MT, 1966, pp.58-60.

- [2] Brock TD, Brock KM, Belly RT, *et al.* *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Microbiol*, 1972, **84**: 54-68.
- [3] Huber H, Prangishvili D. The Prokaryotes. Third Edition. Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, *Actinomycetes*, 2006, **3**: 23-51.
- [4] Robb FT, Place AR. *Archaea A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1995.
- [5] Xiang X, Dong X, Huang L. *Sulfolobus tengchongensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon isolated from a hot spring in Tengchong, China. *Extremophiles*, 2003, **7**: 943-948.
- [6] Jan RL, Wu J, Chaw SM, *et al.* A novel species of thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus yangmingensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 1809-1816.
- [7] De Rosa M, Ganbacorta A, Bu'Lock JD. Extremely thermophilic acidophilic bacteria convergent with *Sulfolobus acidocalarius*. *J Gen Microbiol*, 1975, **86**: 156-164.
- [8] Takayanagi S, Kawasaki H, Sugimori K, *et al.* *Sulfolobus hakonesis* sp. nov., a novel species of acidothermophilic archaeon. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, **46**: 377-382.
- [9] Huber G, Stetter KO. *Sulfolobus metallicus* sp. nov., a novel strictly chemolithoautotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers. *Syst Appl Microbiol*, 1991, **14**: 372-378.
- [10] Grogan D, Palm P, Zillig W. Isolate B12, which harbors a virus-like element, represents a new species of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*, *Sulfolobus shibatae*, sp. nov.. *Arch Microbiol*, 1990, **154**: 594-599.
- [11] Suzuki T, Iwasaki T, Uzawa T, *et al.* *Sulfolobus tokodaii* sp. nov. (f. *sulfolobus* sp. strain7), a new member of the genus *Sulfolobus* isolated from Beppu Hot Spring, Japan. *Extremophiles*, 2002, **6**: 39-44.
- [12] Zillig W, Arnold HP, Holz I, *et al.* Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Extremophiles*, 1998, **2**: 131-140.
- [13] Wiedenheft B, Strdman K, Roberto F, *et al.* Comparative genomic analysis of hyperthermophilic archaeal Fuseselloviridae viruses. *J Virol*, 2004, **78**: 1954-1961.
- [14] Lin L, Zhang J, Wei Y, *et al.* Phylogenetic analysis of several *Thermus* strains from Rehai of Tengchong, Yunnan, China. *Can J Microbiol*, 2005, **51**: 881-886.