

深海热液区超嗜热古菌 *Thermococcus* sp. TVG2 的培养分离与鉴定

陈艳琼^{1,2} 阮灵伟^{2*}

(1. 厦门大学 生命科学学院 福建 厦门 361005)

(2. 厦门市海洋生物遗传资源重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室 国家海洋局第三海洋研究所 福建省海洋生物遗传资源重点实验室 福建 厦门 361005)

摘要:【目的】培养分离大西洋脊热液区的超嗜热古菌,为进一步认识该生态系统中的物种及其特点奠定基础。【方法】将大西洋脊热液区海水样品用 YTSV 培养基富集培养,选取其中富集效果最佳的 TVG2 培养物用减绝稀释法分离纯化。对所分离菌株进行形态、生理生化特征等分析,并通过分子生物学手段对其进行初步鉴定。【结果】菌株 TVG2 属于超嗜热厌氧球菌,直径约 1.0 μm ; 生长温度范围 50–88 $^{\circ}\text{C}$, 最适生长温度 82 $^{\circ}\text{C}$; 生长 pH 范围为 5.0–9.0, 最适生长 pH 值为 6.5; 生长 NaCl 浓度为 1.0%–4.0% (质量体积比), 最适生长浓度为 2.5%; 元素硫可显著提高菌株 TVG2 的生物量,但非生长必需; 丙酮酸钠能显著促进该菌株生长,但葡萄糖对其生长则有抑制作用。根据其形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析,确定菌株 TVG2 属于热球菌属。【结论】用 YTSV 培养基从大西洋脊热液区样品中分离获得超嗜热厌氧菌株 TVG2,并确定其为 *Thermococcus* 属成员,命名为 *Thermococcus* sp. TVG2。

关键词: 深海热液区, 超嗜热厌氧古菌, 16S rRNA, 热球菌属

Isolation and identification of hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. TVG2 from deep-sea hydrothermal vent

CHEN Yan-Qiong^{1,2} RUAN Ling-Wei^{2*}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

(2. State Key Laboratory Breeding Base of Marine Genetic Resources, Key Laboratory of Marine Genetic Resources of State Oceanic Administration, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Key Laboratory of Marine Genetic Resources, Fujian Province, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: [Objective] The aim of the present study was to isolate and identify hyperthermophilic archaea around the hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge, and to establish a foundation for further understanding and characterization of the microbial species in this ecosystem. [Methods] The hydrothermal vent seawater samples were enriched with YTSV media and strain TVG2 was purified

基金项目: 国际海底区域研究开发“十一五”课题项目(No. DYXM-115-02-2-16)

*通讯作者: 86-592-2195856; 信箱: ruanlingwei@aliyun.com

收稿日期: 2014-07-03; 接受日期: 2014-09-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-09

from the enrichment cultures by the means of dilution-to-extinction. Strain TVG2 was characterized using morphologic, physiologic and biochemical analysis and preliminarily identified through the molecular biological methods. **[Results]** Strain TVG2 was an obligate anaerobic hyperthermophilic archaeon. Cells were regular cocci with 1.0 μm in diameter. It grew optimally at 82 $^{\circ}\text{C}$ (range 50–88 $^{\circ}\text{C}$), at pH 6.5 (range 5.0–9.0) and with NaCl of 2.5% (range 1.0%–4.0%, W/V). Element sulfur was not indispensable for strain TVG2, but notably promoted its growth. Sodium pyruvate could significantly facilitate the growth of strain TVG2, whereas glucose had the opposite effect. Based on the morphological, physiological and biochemical characteristics and the 16S rRNA gene sequence analysis, strain TVG2 was regarded as belonging to *Thermococcus*. **[Conclusion]** Hyperthermophilic archaeon strain TVG2 was isolated from Atlantic Ridge hydrothermal vent samples with the YTSV medium and it was a member of the genus *Thermococcus*.

Keywords: Deep-sea hydrothermal vent, Hyperthermophilic anaerobic archaea, 16S rRNA, *Thermococcus*

深海通常是指 1 000 m 以下的海洋, 占地球海洋总体积的 3/4, 该海洋环境占地球生物圈的 62%^[1]。自 1977 年美国“阿尔文”(Alvin)号载人深潜器在东太平洋加拉帕戈斯群岛附近的 2 500 m 深海断裂带发现第一个热液区生态系统以来, 目前已有 500 多个类似的海底热泉生态系统被发现, 主要集中在太平洋和大西洋, 其中又以太平洋的发现点最多^[2]。深海热液区生态系统为原始不需氧的化学自养系统^[3], 化学自养微生物等是该生态系统的初级生产者, 通过氧化氢气、还原硫化物、CO 等获得能量从而固定 CO₂, 合成有机物^[4]。超嗜热微生物是该生态系统的重要组成部分, 发挥着十分重要的作用。

超嗜热微生物是指最适生长温度大于 80 $^{\circ}\text{C}$ 的微生物^[5]。尽管其在低于 50 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下不能繁殖, 但却能在环境温度和外太空温度(–140 $^{\circ}\text{C}$)存活多年^[6]。在 Woese 的有根系统进化树中, 超嗜热微生物只在古菌域和细菌域中发现, 且绝大多数属于古菌。1969 年 Thomas Brock 从美国黄石国家公园分离到第一株严格意义的高温菌——水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)以来, 每年都有大量的高温菌被分离和描述, 人们对生命生长的温度上限也在不断刷新。*Pyrolobus fumarii* 的最适生长温度为 106 $^{\circ}\text{C}$, 低于 90 $^{\circ}\text{C}$ 不能生长, 其生长温度上限可达 113 $^{\circ}\text{C}$, 且在 121 $^{\circ}\text{C}$ 可存活 1 h^[7]。另一株 Fe(III)还原菌 Strain 121 的生长温度范围为 85–121 $^{\circ}\text{C}$, 当温度低于 85 $^{\circ}\text{C}$ 时细胞分裂停止, 其在 121 $^{\circ}\text{C}$ 的代时是 24 h^[8]。进化

地位越低, 生长温度越高, 这些位于系统进化树基部的超嗜热菌, 分支短, 进化缓慢, 而且其所生存的热液区等环境与生命形成初期环境相似, 因此有人认为生命起源于高温菌, 它们成为了探索生命起源和进化的焦点。

高温的生长环境使超嗜热微生物编码的蛋白往往也具有一定的特殊性, 其生物酶的最适反应温度一般在 70 $^{\circ}\text{C}$ 以上, 热稳定性高, pH 适应范围较大, 并且对一些酶抑制剂具有显著的拮抗作用。这些特性使其能降低污染概率、降低反应体系粘度、提高转化率和产物可溶性, 是工业生物转化中的理想催化剂^[9]。如, 绝大多数已知的嗜热和超嗜热厌氧菌均能发酵糖类产生乙醇, 生产成本低且高温有利于乙醇挥发回收, 可用于生产生物能源。嗜热微生物还具有较强的生物降解能力, 尤其是对一些难降解的有机物, 如多环芳烃(PAHs)^[10]。此外, 在石油开采, 生物冶金等方面嗜热微生物也具有巨大的应用潜力^[11]。

本研究从大西洋脊热液区(14.51 $^{\circ}\text{W}$, 13.60 $^{\circ}\text{S}$)培养分离得到一株超嗜热厌氧古菌 *Thermococcus* sp. TVG2, 进一步对该菌株进行形态、生理生化特征等方面的分析, 并通过分子生物学手段对其进行初步鉴定, 为进一步研究深海热液区极端嗜热厌氧古菌并从中开发利用新型工业酶等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品

深海热液区样品 TVG2、TVG8、TVG12 和

TVG13 采集自 2012 年中国大洋科学考察 26 航次第三航段(14.51°W, 13.60°S)。

1.2 培养基和主要试剂

1.2.1 培养基: YTSV 培养基^[12]微量元素溶液 A 10 mL, 微量元素溶液 B 1 mL, (NH₄)₂SO₄-KH₂PO₄ 溶液 10 mL, FeEDTA 溶液 2 mL, 维生素混合液 1 mL, Resazurin 1.00 mg, Cysteine-HCl·H₂O 0.25 g, Na₂S·9H₂O 0.25 g, 酵母提取物 1.00 g, 胰蛋白胨 1.00 g, 元素硫 5.00 g, 人工海水定容至 1 L, pH 6.5。

人工海水(g/L): NaCl 19.60, Na₂SO₄ 3.30, KCl 0.50, KBr 0.05, H₃BO₃ 0.02, MgCl₂·6H₂O 8.80。

微量元素溶液 A (g/L): CuSO₄·6H₂O 0.01, ZnSO₄·7H₂O 0.10, CoCl₂·6H₂O 5.00 mg, MgCl₂·4H₂O 0.20, Na₂MoO₄·2H₂O 0.10, KBr 0.05, KI 0.05, H₃BO₃ 0.10, LiCl 0.05, Al₂(SO₄)₃ 0.05, NiCl₂·6H₂O 0.01。

微量元素溶液 B (g/L): VoSO₄·xH₂O 0.05, H₂WO₄ 0.05, Na₂SeO₃ 0.05, NiCl₂·6H₂O 0.05, SrCl₂·6H₂O 0.05, BaCl₂ 0.05。

(NH₄)₂SO₄-KH₂PO₄ 溶液(g/L): (NH₄)₂SO₄ 43.0, KH₂PO₄ 3.6。

FeEDTA 溶液 (g/L): FeSO₄·7H₂O 1.54, Na₂EDTA 2.06。

维生素混合液(mg/L): Niacin 10.0, Biotin 4.0, Pantothenate 10.0, Lipoic acid 10.0, Folic acid 4.0, p-Aminobenzoic acid 10.0, Thiamine (B₁) 10.0, Riboflavin (B₂) 10.0, Pyridoxine (B₆) 10.0, Cobalamin (B₁₂) 10.0。

将 YTSV 培养基分装于血清瓶中, 用高纯氮除尽血清瓶中的空气, 盖上橡胶塞, 并用铝盖进行密封。培养基在 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 使用前加入过滤除菌的维生素混合液。

1.2.2 主要试剂: dNTPs, rTaq DNA 聚合酶、Loading buffer、DNA 标准分子质量、蛋白酶 K 和 RNase A 等购自宝成生物工程有限公司; 酵母提取物、胰蛋白胨等购自 Oxoid 公司; Lysozyme 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; QIAquick PCR Purification Kit (50)试剂盒购自 QIAGEN 公司; Tris、EDTA、

元素硫、NaCl、Na₂SO₄ 和 MgCl₂·6H₂O 等无机盐类均为国产分析纯试剂。

1.3 菌株富集及分离培养

1.3.1 富集培养: 分别配制 pH 为 6.0、7.0 和 8.0 的 YTSV 培养基。在厌氧操作箱中将 TVG2、TVG8、TVG12 和 TVG13 四种样品按体积比 1:100 接入上述各培养基中, 分别置于 60、65、70、75 和 80 °C 恒温培养箱中进行富集培养。

1.3.2 分离培养: 用减数稀释法对 TVG2 富集培养物进行分离纯化, 即以 10⁻² 为稀释梯度设置 10⁻²、10⁻⁴ 和 10⁻⁶ 三个梯度, 按 1%接种量用注射器吸取富集培养物接入新鲜培养基中, 在 80 °C 静置培养 3 d, 记为一代。之后取 10⁻⁶ 稀释培养物继续进行上述稀释培养, 依次推之。

纯化获得的菌株 TVG2 混匀于终浓度为 25%的厌氧灭菌甘油中, 保存在-80 °C。

1.4 菌株特征分析

1.4.1 菌株形态学特征: 光学显微镜观察: 用注射器抽取少量菌液, 涂布于洁净干燥的载玻片上, 自然干燥后, 将载玻片迅速通过酒精灯外焰 2-3 次以固定菌体, 对其进行革兰氏染色后置于光学显微镜下观察。

透射电子显微镜观察: 抽取培养 24 h 的菌液 20 mL, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 然后用 5 mL 新鲜 YTSV 培养基重悬菌体沉淀, 6 000 r/min 离心 3 min, 弃上清; 再用 1 mL 新鲜 YTSV 培养基重悬菌体沉淀并将其转移至 1.5 mL 离心管中, 10 000 r/min 离心 1.5 min, 弃上清, 重复此操作 2-3 次; 用 1 mL 人工海水重悬菌体沉淀, 10 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 重复此操作 1 次; 用 1 mL 2%生理盐水重悬菌体沉淀, 13 000 r/min 离心 30 s, 快速弃上清, 并用滤纸条吸干离心管中残留的液体, 风干 2 min。用无菌牙签蘸取适量的菌体以磷钨酸(EPA)溶液染色后置于铜网上, 在透射电子显微镜下观察。

1.4.2 菌株生长特性和生理生化特性分析: 参照文献[13]的方法进行菌株生长和生理生化特性分析。

按 1%接种量取 1 mL 82 °C (温度测定实验除

外)恒温静置培养 24 h 的 TVG2 菌液接种于新鲜 YTSV 培养基中,按设定条件培养后取 0.5 mL 菌液在 600 nm 处测定 OD_{600} ,测定 3 组数据求平均值及标准差,无特别说明均以 0 h 菌液为空白对照。

生长温度范围测定 按 1%接种量取 1 mL 80 °C 恒温静置培养 24 h 的 TVG2 菌液接种于新鲜 YTSV 培养基中,温度范围设置为 40–90 °C,以 10 °C 为梯度递增;在 80–90 °C 间以 2 °C 为梯度递增。将接种后的培养瓶置于以上各温度静置培养 24 h。

生长曲线测定:按 1%接种量取 1 mL 菌液接种于新鲜 YTSV 培养基中,82 °C 恒温静置培养,每隔 4 h 取 0.5 mL 菌液在 600 nm 处测定 OD_{600} ,以未接种 82 °C 恒温静置的 YTSV 培养基为空白对照。

生长 pH 范围测定:将培养基 pH 范围设置为 5.0–9.0,5.0–6.0 和 8.0–9.0 间按 1.0 递增设置;6.0–8.0 间按 0.5 梯度递增。按 1%接种量取 1 mL 菌液接种于上述培养基中,82 °C 恒温静置培养 24 h,取 0.5 mL 菌液在 600 nm 处测定 OD_{600} 。

NaCl 浓度范围测定:将培养基 NaCl 浓度范围设置为 0.5%–4.0% (质量体积比),以 0.5%为梯度递增。按 1%接种量取 1 mL 菌液接种于上述培养基中,82 °C 恒温静置培养 24 h,取 0.5 mL 菌液在 600 nm 处测定 OD_{600} 。

生长影响因素测定:分别配制下列培养基:YTSV、不含元素硫的 YTSV [YTSV (S–)]、添加 0.1% (质量体积比)丙酮酸钠的 YTSV [YTSV (Sodium pyruvate)]和添加 0.1% (质量体积比)葡萄糖的 YTSV [YTSV (Glucose)]。按 1%接种量取 1 mL 菌液接种于上述培养基中,82 °C 恒温静置培养 24 h,取 0.5 mL 菌液在 600 nm 处测定 OD_{600} ,以 0 h 菌液为空白对照。

所有实验均做 3 个重复,数据均用平均数±标准差表示,显著性用双尾 *t* 检验计算。

1.5 菌株的分类鉴定

1.5.1 菌株基因组提取:培养 100 mL 的 TVG2 培养物至饱和状态,8 000 r/min 离心 5 min,小心倒去上清,向沉淀物中加入 567 μ L 的 ELB 缓冲液(20 mmol/L

Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol/L EDTA; 1.2% Triton X-100; Lysozyme 5 (g/L)使之充分重悬,置于 37 °C 水浴中温育 1–2 h;加入 30 μ L 10% SDS 和 25 μ L 20 g/L 的蛋白酶 K,颠倒混匀,置于 55 °C 水浴中温育 3 h;加入 100 μ L 5 mol/L NaCl,充分混匀,再加入 80 μ L CTAB/NaCl 溶液(NaCl 41 g/L, CTAB 100 g/L)轻轻颠倒混匀,于 65 °C 水浴中温育 10 min;加入 5 μ L RNase A,轻轻颠倒混匀,于 37 °C 水浴中温育 10–30 min;加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1,体积比)轻轻颠倒混匀,13 000 r/min、4 °C 离心 10 min,小心吸取上清并将其转入新离心管中(如果难以移出上清,可先用无菌牙签去除界面物质,或重复多次此操作至界面澄清);加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1,体积比),轻轻颠倒混匀,13 000 r/min、4 °C 离心 10 min,小心吸取上清并转入新离心管中;加入 2 倍体积–20 °C 预冷的无水乙醇和 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钾溶液(pH 8.0)轻轻颠倒混匀,–20 °C 放置 2 h 以上至 DNA 充分沉淀下来;13 000 r/min、4 °C 离心 20 min,小心弃上清;沿离心管壁小心向沉淀中加入 1 mL –20 °C 预冷的 70%乙醇洗涤沉淀,13 000 r/min、4 °C 离心 5 min,小心弃上清,重复此操作一次;静置 3–5 min 使沉淀挥发残留乙醇,稍加风干,将 DNA 沉淀溶于适量无菌双蒸水中并于–20 °C 保存。用 Nanodrop 2000 测定基因组 DNA 溶液浓度,并取 200 ng 左右 DNA 进行琼脂糖胶电泳。

1.5.2 16S rRNA 基因序列分析:根据文献[14]报道,合成 16S rRNA 基因引物 ARCH 16S forward (5'-ATTCCGGTTGATCCTGCCGG-3'), ARCH 16S reverse (5'-AGGAGGTGATCGAGCCGTAGGTTC-3')。配制 50 μ L PCR 反应体系:10×Buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 20 μ mol/L ARCH 16S forward 1 μ L, 20 μ mol/L ARCH 16S reverse 1 μ L, *rTaq* DNA 聚合酶 0.25 μ L, TVG2 基因组 DNA (200 mg/L) 0.5 μ L, 无菌双蒸水补齐至 50 μ L。PCR 反应条件:94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 产物用 QIAquick PCR Purification Kit (50) 试剂盒纯化回收后由上海英潍捷基贸易有限公司测序。将所测得的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库中的已有序列进行 BLASTn 分析。根据分析结果从 NCBI 数据库中选取近缘菌株的 16S rRNA 基因序列,并由 ClustalW^[15]进行比对,随后利用软件 MEGA 5.0 的邻接法(Neighbour-Joining method)^[16]对各 16S rRNA 基因序列构建系统进化树,以确定该菌株的分类地位。

2 结果与分析

2.1 菌株富集分离

用 YTSV 培养基对深海热液区样品 TVG2、TVG8、TVG12 和 TVG13 分别进行富集培养。其中 TVG12 的富集培养物生物量低,未获得有效基因组 DNA;通过 16S rRNA 基因测序分析,TVG8 富集的微生物与 *Sphingomonas* sp.、*Janibacter* sp. 和 *Knoellia* sp. 亲缘性最高(97%–99%),TVG13 富集的微生物与 *Ralstonia* sp. 亲缘关系最近(99%–100%)。TVG8 和 TVG13 所富集的微生物均与嗜中温细菌相似性较高,因此未继续进行分离纯化。

TVG2 样品在 YTSV 培养基中富集效果较好,80 °C 培养 2–3 d 后培养瓶中出现大量气泡,初步的 16S rRNA 基因测序分析表明其富集的微生物与 *Thermococcus* sp. 和 *Pyrococcus* sp. 的亲缘性最高(96%–99%)。用减绝稀释法对 TVG2 富集培养物进行进一步的分离纯化,通过 25 代的稀释分离培养,

最终获得了纯化的单一菌株 TVG2。

菌株 TVG2 在培养过程中可观察到在元素硫附近产生大量的气泡,并且培养瓶内气压增大,瓶盖开启后伴随有浓烈的臭鸡蛋味,表明菌株在含元素硫的 YTSV 培养基中可还原元素硫产生大量硫化氢。

2.2 菌株形态特征

用注射器抽取少量 TVG2 菌液做革兰氏染色,置于倒置显微镜下观察。结果表明菌株 TVG2 革兰氏染色呈阳性,菌体形态大小均一,多成对出现(图 1A)。进一步在透射电子显微镜下观察,TVG2 菌体为球状,直径约 1 μm,无鞭毛(图 1B)。

2.3 菌株的分类鉴定

结合 PCR 扩增和测序,获得了菌株 TVG2 的 16S rRNA 基因序列,长度为 1 343 bp。将菌株 TVG2 的 16S rRNA 基因序列提交 NCBI 数据库获取 GenBank 的登录号为 KM 434133。通过 16S rRNA 基因序列相似性比较得出其与 *Thermococcus sibiricus* strain MM739 (NR 102888) 亲缘关系最近,相似性达 99%。因此,可初步确认该菌为热球菌属(*Thermococcus*)。为分析菌株 TVG2 与近缘菌株的进化关系,根据 BLASTn 比较结果从 NCBI 数据库中选取近缘菌株的 16S rRNA 基因序列,并由 ClustalW 进行比对,随后利用软件 MEGA 5.0 的邻接法(Neighbour-Joining method)对各 16S rRNA 基因序列构建系统进化树,同源关系的可靠性由自举值(Bootstrap=1 000)进行评估(图 2)。系统进化树进一

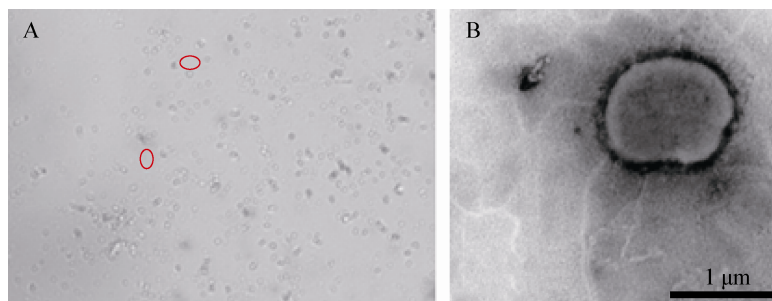


图 1 菌株 *T. sp.* TVG2 的形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of strain *T. sp.* TVG2

Note: A: Invert microscope (400×); B: Transmission electron microscope (30 000×).

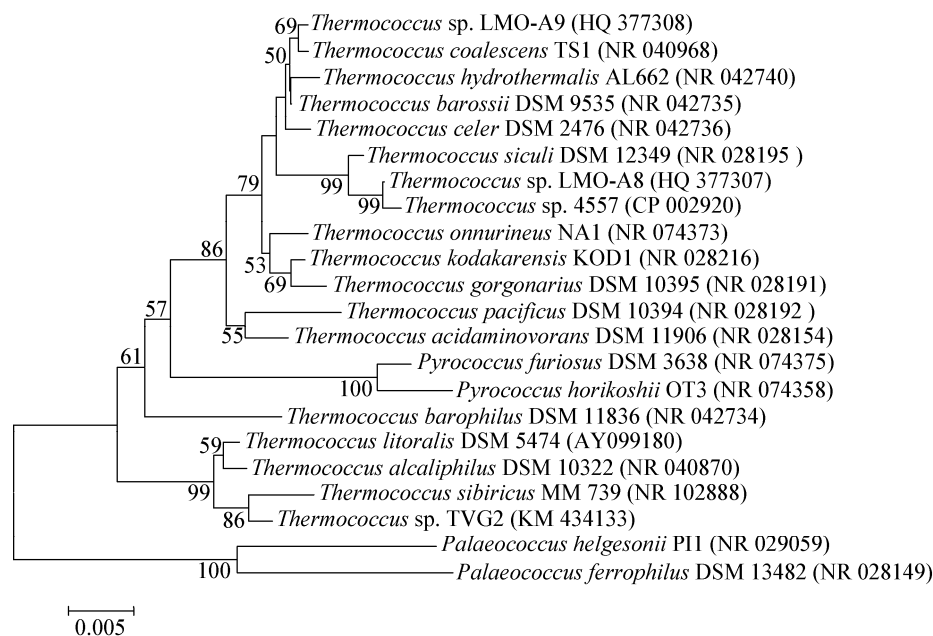


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的 *T. sp. TVG2* 系统发育树

Figure 2 An unrooted phylogenetic tree of *T. sp. TVG2* based on partial 16S rRNA gene sequences using the Neighbour-Joining method

Note: Accession numbers of 16S rRNA gene sequences were annotated in parentheses. Bootstrap values were indicated at the branch nodes. Bar, 5 nt substitution per 1 000 nt. *Pyrococcus* and *Palaeococcus* were used as outgroups.

步证明菌株 TVG2 属于热球菌属，因此命名为 *Thermococcus* sp. TVG2。

2.4 菌株的生理生化特性

2.4.1 生长特性：为了了解菌株 *T. sp. TVG2* 的生长特性，测定了温度、生长曲线、pH 和 NaCl 质量浓度等对该菌株生长的影响。结果表明 *T. sp. TVG2* 可在 50–88 °C 范围内生长，其最适生长温度为 82 °C，该温度曲线呈典型的“钟罩形”；低于 50 °C 不能生长，在 50–70 °C 范围内菌体的细胞分裂活动弱，生物量较低(图 3A)。

在此基础上，测定了 *T. sp. TVG2* 在最适生长温度 82 °C 下的生长曲线。在经历 4 h 的延滞期后，该菌进入对数生长期，约在 20 h 菌体浓度达到最高值。在测定过程中未出现较为明显的平台期，且衰退期出现较迟，在培养 32 h 后仍有较高的菌体浓度(图 3B)。

T. sp. TVG2 生长的 pH 范围为 5.0–9.0，最适生长 pH 为 6.5，但在碱性环境也能较好生长，在 pH

7.0–9.0 范围内菌体浓度变化不明显，因此该菌株可能存在耐碱机制(图 3C)。

鉴于该菌分离自深海环境，分析 NaCl 质量浓度对其生长的影响。结果发现适合菌株生长的 NaCl 质量浓度为 1.0%–4.0%，最适生长的 NaCl 质量浓度为 2.5%。当生长环境中 NaCl 质量浓度低于 1.5% 或高于 3.5% 时，*T. sp. TVG2* 不能良好生长繁殖，结果表明 NaCl 质量浓度对菌株的生存和生长影响重大(图 3D)。

2.4.2 生长影响因子：深海热液区尤其是“黑烟囱”附近，有丰富的硫化物沉积，大量文献报告指出厌氧嗜热菌的生长代谢与硫有关。因此，探讨了元素硫对 *T. sp. TVG2* 生长的影响。在不含元素硫的 YTSV (S-)培养基中该菌株生长缓慢，无硫化氢气泡产生，且培养液浊度低，菌体浓度低；而在培养基中添加元素硫可促使菌株快速生长，生物量显著增加，表明 *T. sp. TVG2* 生长为非硫必需型，但元素硫可刺激其生长(图 4A)。

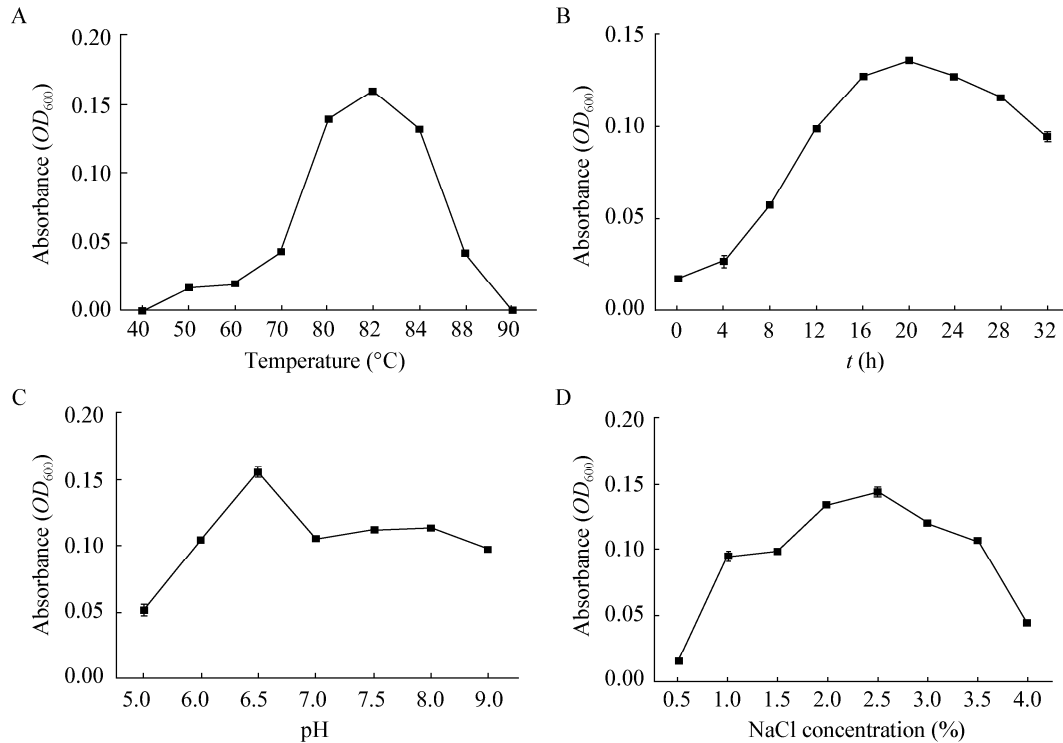


图3 温度(A)、时间(B)、pH (C)和 NaCl 质量浓度(D)对菌株 *T. sp. TVG2* 生长的影响
 Figure 3 Influences of temperature (A), time (B), pH (C) and the concentration of NaCl (D) on the growth of strain *T. sp. TVG2*

Note: The results were presented as means of three independent experiments with standard errors.

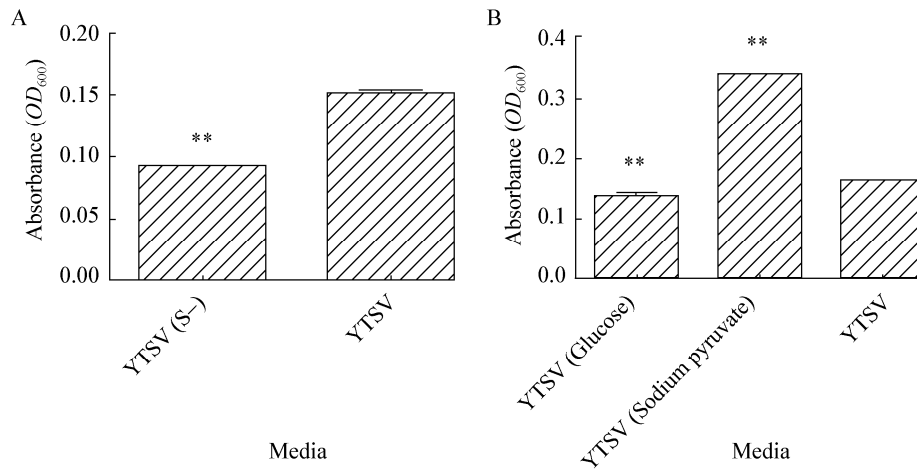


图4 元素硫、葡萄糖和丙酮酸钠对菌株 *T. sp. TVG2* 生长的影响

Figure 4 Influences of element sulfur (A), glucose and sodium pyruvate (B) on the growth of strain *T. sp. TVG2*

Note: The results were presented as means of three independent experiments with standard errors. Statistical significance was performed using the two-tailed paired student's *t* test (** $P < 0.01$).

大多数 *Thermococcus* 属成员为异养营养型,有研究报道添加葡萄糖和丙酮酸钠可以促进该属菌株生长。通过实验,发现 *T. sp.* TVG2 不能利用葡萄糖和丙酮酸钠作为唯一碳源进行生长(结果未列出)。将 *T. sp.* TVG2 菌液分别接种在含 0.1%葡萄糖的 YTSV (Glucose)和 0.1%丙酮酸钠的 YTSV (Sodium pyruvate)培养基中,结果表明丙酮酸钠能显著促进菌株生长,而菌株在添加葡萄糖的培养基生长水平明显较低(图 4B)。这一结果说明该菌株可能存在丙酮酸盐相关代谢途径,而葡萄糖对其有生长抑制作用。

3 讨论

深海热液区自发现以来就有大量的嗜热和超嗜热微生物随之出现在研究者的视野中,并成为研究热点^[17]。深海热液生态系统具有高温、高静水压、黑暗、剧变的理化梯度及广泛的化能合成作用等特征,其热液流富含重金属、甲烷和硫化氢等生命体有毒物质,且呈酸性、高还原态。热球菌目(Thermococcales)是该恶劣生态系统中原核生物的主流群体。目前为止,在已分离的超嗜热古菌中,热球菌目(Thermococcales)所占比例最大,共有 43 个种,其中热球菌属(*Thermococcus*) 34 个、火球菌属(*Pyrococcus*) 6 个、古老球菌属(*Palaeococcus*) 3 个^[18-19]。绝大多数 Thermococcales 为严格厌氧异养营养型,它们通过发酵有机物获取能量,常分离自海洋高温含硫环境。*Thermococcus* 是已分离的 Thermococcales 的主体,多分离自深海或浅海热液区、地底深部生物圈,也有来自陆地热泉(如 *T. zilligi*)和近岸及陆地高温油井(如 *T. sibiricus*)^[20]。其中 *T. onnurineus* 和 *T. sp.* AM4 能以 CO 为底物行自养营养^[19]。通常,元素硫有利于 Thermococcales 生长但非必需,但 *T. thio还原ens* 为严格的硫还原菌,必须以元素硫为电子受体。大多数 *Thermococcus* 为硫还原型,而 *T. sp.* T642 则以 Fe(III)为电子受体进行异化还原^[21]。*Palaeococcus* 属有 3 种,其中 *P. ferrophilus*^[22]和 *P. pacificus*^[23]均为超嗜热厌氧嗜压古菌(最适生长压力为 30 MPa),前者以元素硫或

二价铁离子作电子受体,后者兼性利用元素硫或硫酸盐作电子受体。另外, *P. helgesonii*^[24]为超嗜热兼性厌氧古菌,依赖元素硫,在厌氧及微氧环境均能良好生长。*Pyrococcus* 为超嗜热嗜压厌氧古菌,目前只从海洋热液区分离获得,其最适生长温度为 95–100 °C,比 *Thermococcus* 高(80–90 °C)^[25]。Thermococcales 因其分布广泛,生长迅速,因此在环境中占据主导地位。

从大西洋脊热液区采集获得 TVG2、TVG8、TVG12 和 TVG13 四份样品,采用 YTBC、2216E、MJYPS 和 YTSV 培养基在 60–80 °C 温度范围进行富集培养。除样品 TVG2 富集培养物 16S rRNA 基因测序结果与古菌相似性较高外,其他样品均未获得有效富集培养物:其中 TVG12 的 4 种富集培养物生物量较低,无法获得有效基因组 DNA;TVG8 和 TVG13 所富集的微生物与 *Sphingomonas sp.*、*Janibacter sp.*、*Knoellia sp.*和 *Ralstonia sp.*等嗜中温细菌相似性较高,因此未继续进行分离纯化。最终通过减绝稀释法分离得到了一株厌氧超嗜热古菌。通过倒置显微镜和透射电镜的观察,结果均显示该菌株形态一致,对其第 25 代分离纯化培养物的 DGGE 检测也表明,所分离菌株为单一菌株(结果未列出)。

通过 16S rRNA 基因的测序与比较分析,初步鉴定菌株 TVG2 属于热球菌属(*Thermococcus*)。系统进化树表明 *T. sp.* TVG2 与 *T. sibiricus* 处于同一分支,其亲缘关系最近,相似性高达 99%。热球菌属(*Thermococcus*)菌株的细胞为球形,有或无鞭毛,最适生长温度在 80–90 °C,且大多数在 pH 6.0–7.0 中性偏酸环境生长良好,只有 *T. alcaliphilus* 和 *T. acidoaminovorans* 的最适生长 pH 9.0^[25]。多数成员为严格厌氧有机异养营养型,以有机复合物如蛋白胨、酵母提取物为底物,也有发酵糖和氨基酸等简单有机物获取能量,以元素硫或质子作为最终电子受体^[20,26]。以所构建的系统进化树为基础,对 *T. sp.* TVG2 与近缘的 *T. sibiricus* 和 *T. barophilus*^[27],以及亲缘关系较远的 *T. kodakaraensis* KOD1^[28]和 *T. hyperthermalis*^[29]分别进行比较(表 1)。*T. sp.* TVG2

表 1 <i>T. sp</i> TVG2 与进化树中部分菌株比较					
Table 1 Comparative analysis of <i>T. sp</i> TVG2 and several strains from the phylogenic tree					
比较项目 Comparative items	<i>T. sp</i> TVG2	<i>T. sibiricus</i>	<i>T. barophilus</i>	<i>T. KOD1</i>	<i>T. hyperthermalis</i>
分离地点 Sites of isolation	The Atlantic Ridge	Nizhnevartovsk Samotlor Oil reservoir	The Mid-Altantic Ridge	Kodakara Island (Japan)	The East Pacific Rise
形态学 Morphology	Singly or in pair, nonmotile cocci, 1 μm, without flagella	Irregular nonmotile cocci, 0.5–1.0 μm, without flagella	Singly, in pairs, or in small aggregates, slightly irregular motile cocci, 0.8–2.0 μm with flagella	Irregular motile cocci, 1–2 μm, with a tuft of polar flagella	Singly, in pairs, or in small aggregates, motile cocci, 0.8–2.0 μm, with polar flagella
生长温度范围(最适) Range of growth temperature (opt) (°C)	50–88 (82)	40–88 (78)	75–100 (40 MPa, 85) ; 48–95 (0.1 MPa, 85)	60–100 (85)	55–100 (80–90)
生长 pH 范围(最适) Range of growth pH (opt)	5.0–9.0 (6.5)	5.8–9.0 (7.3)	4.5–9.5 (7.0)	5.0–9.0 (6.5)	3.5–9.5 (5.5–6.5)
生长 NaCl 质量浓度 范围 Range of growth NaCl concentration (opt) (%)	1.0–4.0 (2.5)	0.5–7.0 (1.8–2.0)	1.0–4.0 (2–3)	1.0–5.0 (3.0)	2.0–8.0 (3.0–4.0)

在形态上具有热球菌属(*Thermococcus*)菌株的一些共性特征:细胞呈球形,无鞭毛,成对或单个存在。在生长温度、pH、NaCl 浓度范围等生理生化方面,与参与比较的 4 个菌株比较相似。这一结果进一步说明 *T. sp.* TVG2 属于热球菌属(*Thermococcus*)。

16S rRNA 基因序列是传统菌种鉴定的常用指标,但随着微生物分类鉴定手段的丰富,一些 16S rRNA 基因序列同源性很高的微生物也可能是不同的种。如 *T. nautili* 与 *T. sp.* AM4 和 *T. gammatolerans* 的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 99.3%和 99.2%,而通过生物信息学手段分析得出 *T. Nautili* 与二者的 DNA-DNA 杂交数值均低于 70%,分别为 33%和 32%,即 *T. Nautili* 为 *Thermococcus* 家族新成员^[19]。进一步对 *T. sp.* TVG2 与 16S rRNA 基因序列相似性最高的 *T. sibiricus* 进行了比较分析。*T. sp.* TVG2 较后者生长温度范围窄,但最适生长温度高于后者;最适生长 pH 比后者低;*T. Sibiricus* 生长的 NaCl 质量分数范围为 0.5%–7.0%,在低于 0.2%或高于 7.5%的环境中不生长,而当 NaCl 质量分数低于 1.0%时 *T. sp.* TVG2 细胞溶胀破裂,高于 3.5%

时其生物量极低(表 1)。另外, *T. Sibiricus* 可利用蛋白胨、酵母提取物和牛肉膏,不能利用淀粉、葡萄糖和丙酮酸盐等生长^[20], *T. sp.* TVG2 虽然不能利用牛肉膏,但可利用淀粉、蔗糖等进行生长。综合以上,尽管 *T. sp.* TVG2 与 *T. sibiricus* 在 16S rRNA 基因序列的同源性很高,但其生理生化特性存在着显著的区别,这说明了 *T. sp.* TVG2 可能为新种。

热球菌目(Thermococcales)主要包括一些严格厌氧并严格依赖元素硫生长的超嗜热古菌,但 *Pyrococcus* 和 *Thermococcus* 这两个属的菌株在缺失元素硫的环境中也能生长。通过实验同样发现元素硫能显著促进 *T. sp.* TVG2 生长,但非生长所必需。嗜热厌氧古菌通常以 H₂、元素硫等还原态物质作为最终电子受体而获取能量,添加元素硫无异于增加了培养环境中的电子受体,使 *T. sp.* TVG2 更易获取生长所需的能量,实现快速生长。

在 90 °C 及以上的海洋环境中,如深海热液区,严格厌氧、异营养型和还原元素硫是主流代谢途径,且几乎所有的超嗜热微生物都以有机复合物作为碳氮源^[12]。王淑军等的研究同样也指出添加葡萄

糖和丙酮酸钠均能刺激深海热液区来源的超嗜热古菌 HJ21 生长^[30]。但通过实验表明, *T. sp. TVG2* 均不能以葡萄糖和丙酮酸盐作为唯一碳源, 但额外添加丙酮酸钠则能显著促进 *T. sp. TVG2* 的生长, 而添加葡萄糖对 *T. sp. TVG2* 的生长却具有一定的抑制作用。Smith 等的研究曾指出超嗜热菌中普遍存在丙酮酸在铁氧还蛋白还原酶的作用下氧化脱羧生成乙酰-CoA、CO₂ 和 H₂ 的代谢途径^[31]。在超嗜热古菌 *T. kodakaraensis* KOD1 中除存在上述途径外, 还在丙氨酸转氨酶作用下以谷氨酸提供的氨基生成丙氨酸。此外, 该菌还有独特的丙酮酸-甲酸裂合酶基因, 其编码的丙酮酸-甲酸裂合酶能使丙酮酸裂解为乙酰-CoA 和甲酸, 这一丙酮酸氧化途径为菌体适应胞外环境改变提供充足的碳源和能量代谢^[32]。我们的研究结果表明 *T. sp. TVG2* 可能存在丙酮酸盐相关代谢途径, 这将为进一步研究 *T. sp. TVG2* 的代谢机制和环境适应性提供理论依据。

综上所述, 我们通过减绝稀释法培养分离获得了一株超嗜热厌氧古菌, 通过形态学和分子生物学分析, 初步鉴定其属于热球菌属(*Thermococcus*), 并命名为 *Thermococcus sp. TVG2*。通过对该菌株生理生化特性及生长影响因素的测定, 表明 *T. sp. TVG2* 具有典型的热球菌生物学特性。该菌株的分离将为研究深海热液区嗜热古菌及开发新型工业酶奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Prieur D, Erauso G, Jeanthon C. Hyperthermophilic life at deep-sea hydrothermal vents[J]. Planetary and Space Science, 1995, 43(1): 115-122
- [2] Takai K, Nakamura K. Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents[J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, 14(3): 282-291
- [3] Dang HY, Song LS, Li TG, et al. Progresses in the studies of subseafloor deep biosphere microorganisms[J]. Advances in Earth Science, 2005, 20(12): 1306-1313
党宏月, 宋林生, 李铁刚, 等. 海底深部生物圈微生物的研究进展[J]. 地球科学进展, 2005, 20(12): 1306-1313
- [4] Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA. Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents[J]. Extremophiles, 2006, 10(2): 85-96
- [5] He ZZ, Peng Q, Chen JY. Thermophilic Microorganism[M]. Beijing: Science Press, 2000
和致中, 彭谦, 陈俊英. 高温菌生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- [6] Stetter KO. History of discovery of the first hyperthermophiles[J]. Extremophiles, 2006, 10(5): 357-362
- [7] Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, et al. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 °C[J]. Extremophiles, 1997, 1(1): 14-21
- [8] Kashefi K, Lovley DR. Extending the upper temperature limit for life[J]. Science, 2003, 301(5635): 934
- [9] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(1): 1-43
- [10] Cui ZJ, Lu P, Yu HY, et al. The application of thermophilic microorganism biological characteristic[J]. Journal of Microbiology, 2004, 23(4): 28-31
崔宗均, 路鹏, 于会泳, 等. 高温菌生物学特性的应用[J]. 微生物学杂志, 2004, 23(4): 28-31
- [11] Chen J, Lian B, Wang B, et al. The occurrence and biogeochemistry of microbes in extrem environments[J]. Earth Science Frontiers, 2006, 13(6): 199-207
陈骏, 连宾, 王斌, 等. 极端环境下的微生物及其生物地球化学作用[J]. 地学前缘, 2006, 13(6): 199-207
- [12] Reysenbach A, Pace N, Robb F. Archaea: A Laboratory Manual—Thermophiles[M]. New York: Cold Spring Harbour Press, 1995: 3-7
- [13] Jolivet ECE, L'Haridon S, Forterre P, et al. *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation[J]. Extremophiles, 2004, 8(3): 219-227
- [14] Kuwabara T, Iwayama Y, Inouye I, et al. *Thermococcus coalescens* sp. nov., a cell-fusing hyperthermophilic archaeon from Suiyo Seamount[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(6): 2507-2514
- [15] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673-4680
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [17] Birrien JL, Zeng X, Jebbar M, et al. *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(12): 2827-2831
- [18] Gorlas A, Alain K, Bienvenu N, et al. *Thermococcus prieurii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(8): 2920-2926
- [19] Gorlas A, Croce O, Oberto J, et al. *Thermococcus nautili* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal deep-sea vent[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(5): 1802-1810
- [20] Miroshnichenko ML, Hippe H, Stackebrandt E, et al. Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir[J]. Extremophiles, 2001, 5(2): 85-91
- [21] Pikuta EV, Marsic D, Itoh T, et al. *Thermococcus thioreducens*

- sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(7): 1612-1618
- [22] Takai K, Sugai A, Itoh T, et al. *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(2): 489-500
- [23] Zeng X, Zhang X, Jiang L, et al. *Palaeococcus pacificus* sp. nov., an archaeon from deep-sea hydrothermal sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(6): 2155-2159
- [24] Amend JP, D'Arcy R, Sheth SN, et al. *Palaeococcus helgesonii* sp. nov., a facultatively anaerobic, hyperthermophilic archaeon from a geothermal well on Vulcano Island, Italy[J]. Archives of Microbiology, 2003, 179(6): 394-401
- [25] Bertoldo C, Antranikian G. The order *Thermococcales*[J]. The Prokaryotes, 2006 (3): 69-81
- [26] Liu L, Wang F, Xu J, et al. Molecular diversity of *Thermococcales* isolated from Guaymas Basin hydrothermal vents[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2013, 32(6): 75-81
- [27] Marteinsson VTB, Reysenbach AL, Vernet M, et al. *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(2): 351-359
- [28] Atomi H, Fukui T, Kanai T, et al. Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1[J]. Archaea, 2004, 1(4): 263-267
- [29] Godfroy ALF, Raguénès G, Quérellou J, et al. *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(3): 622-626
- [30] Wang SJ, Lu ZX, Lv MS, et al. Identification and hyperthermophilic enzyme activities of a hyperthermophilic archaeon isolated from deep-sea hyperthermal vent[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2009, 32(2): 130-136
王淑军, 陆兆新, 吕明生, 等. 一株深海热液口超嗜热古菌的分类鉴定及高温酶活性研究[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 130-136
- [31] Smith ET, Odom LD, Awramko JA, et al. Direct electrochemical characterization of hyperthermophilic *Thermococcus celer* metalloenzymes involved in hydrogen production from pyruvate[J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2001, 6(3): 227-231
- [32] Fukui T, Atomi H, Kanai T, et al. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes[J]. Genome Research, 2005, 15(3): 352-363

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。