

# 高温海藻床中微生物的分离鉴定及其耐热、耐盐特性研究

何培青<sup>1</sup> 许守英<sup>1,2</sup> 黄晓航<sup>1\*</sup> DEWI Seswita-Zilda<sup>3</sup> 张强<sup>1</sup>

(1. 国家海洋局第一海洋研究所 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室 山东 青岛 266061)

(2. 山东轻工业学院 食品与生物工程学院 山东省微生物工程重点实验室 山东 济南 250353)

(3. 海洋渔业局海洋渔业研究与发展司 海洋与渔业产品加工和生物技术研究中心

印度尼西亚 雅加达 40115)

**摘 要:** 【目的】对印度洋卡利安达岛海洋热泉周边的高温海藻床中的微生物进行分离培养和 16S rDNA 种属鉴定, 并研究其耐热和耐盐特性。【方法】采集海藻床中马尾藻、沉积物和海水样品, 采用 MGYTC 培养基, 分别于 55 °C 和 30 °C 对样品中的微生物进行培养和分离纯化; 采用 16S rDNA 鉴定种属并构建进化树; 研究培养温度和盐度对几种菌株生长的影响。【结果】共获得 4 个纲、9 个属的 12 种菌株, 与已知种属的相似度高于 98%。芽孢杆菌纲嗜热放线菌科 2 个属的菌株和芽孢杆菌属菌株在 55 °C 培养时获得, 为嗜热菌株; 其中高温放线糖菜斯菌(*Laceyella sacchari*)和热噬淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*)可以在 0–90 的盐度范围生长。 $\gamma$ -变形菌纲希瓦氏属的 *Shewanella upenei*、*Shewanella algidipiscicola* 和鲍希瓦氏菌(*Shewanella haliotis*)可适应 30 °C–55 °C 的生长环境。【结论】研究获得的菌株, 具有耐热、耐盐或对温度适应范围广等特性, 有望成为生物技术领域的新资源; 分离获得的 *Tepidibacter formicigenes*, 深海微小杆菌(*Exiguobacterium profundum*)和魔鬼弧菌(*Vibrio diabolicus*)曾被报道来源于深海热液区, 这对于阐明海洋热泉与深海热液环境的内在联系提供了参考。

**关键词:** 高温海藻床, 耐热, 耐盐, 细菌

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(No. 2011T04); 国家海洋局海洋生物活性物质与现代分析技术重点实验室开放课题(No. MBSMAT-2011-03)

\*通讯作者: Tel: 86-532-88969292; 信箱: xiaohanghuang@fio.org.cn

收稿日期: 2012-03-18; 接受日期: 2012-05-11

# Isolation and identification of microorganisms from high temperature seaweed beds and study on the characteristics of thermo and salt tolerances

HE Pei-Qing<sup>1</sup> XU Shou-Ying<sup>1,2</sup> HUANG Xiao-Hang<sup>1\*</sup>  
DEWI Seswita-Zilda<sup>3</sup> ZHANG Qiang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Bioactive Substance, The First Institute of Oceanography (SOA), Qingdao, Shandong 266061, China)

(2. Shandong Provincial Key Laboratory of Microbial Engineering, School of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan, Shandong 250353, China)

(3. Research Center for Marine and Fisheries Product Processing and Biotechnology, Agency for Marine and Fisheries Research and Development, Ministry of Marine and Fisheries Affairs, Jakarta 40115, Indonesia)

**Abstract:** [Objective] Microorganisms from high temperature seaweed beds on Kalianda Island of Indian Ocean were isolated, cultivated, and identified based on 16S rDNA sequences. Study on characteristics of thermo and salt tolerances of selected isolates were also carried on. [Methods] Samples of alga *Sargasso* sp., sediment and water from seaweed beds were collected. Using MGYTC medium, microorganisms from the samples were cultivated and purified at 55 °C and 30 °C, respectively. Species identification was determined based on 16S rDNA sequences and phylogenetic tree was built afterwards. Effects of culture temperature and salinity on bacterial growth were determined. [Results] A total of 12 strains belonged to four classes and nine genera were obtained, and the maximum similarities were higher than 98% with known species. Two strains belonged to different genus of *Thermoactinomyces*, and two *Bacillus* strains obtained at 55 °C were thermophile. *Laceyella sacchari* and *Bacillus thermoamylovorans* can survive at the range of 0–90 salinity. *Shewanella upenei*, *Shewanella algidipiscicola* and *Shewanella haliotis* belonged to  $\gamma$ -Proteobacteria could grow at the temperature of 30 °C–55 °C. [Conclusion] The strains obtained had features of thermo and salt tolerances, or adaptability to wide temperature range, which were expected to be new resources in biotechnology field. The isolates of *Tepidibacter formicigenes*, *Exiguobacterium profundum* and *Vibrio diabolicus* had been originally reported from the deep-sea hydrothermal area, suggesting the internal relations of marine hot spring system and deep-sea hydrothermal environment.

**Keywords:** High temperature seaweed beds, Thermo-tolerant, Salt-tolerant, Bacteria

嗜热微生物一般指在 50 °C 以上还能够生长的微生物<sup>[1]</sup>, 目前已发现的嗜热微生物有近百种, 主要分布于深海热液区、热泉、火山口和沙漠等

环境<sup>[2]</sup>。嗜热微生物是新颖活性物质的重要源泉, 也是热稳定蛋白和酶的主要来源, 这些蛋白和酶还具有对物理化学变性剂、有机溶剂抗性强等特

点;嗜热微生物可以加快动力学反应,是将生物质转化为燃料或原料化学品的高效生物催化剂;嗜热微生物在生物处理废弃物和治理环境等方面,也具有转化效率高、抗逆性强等优势<sup>[3]</sup>。目前,嗜热微生物在工业、农业和环保等行业已产生了极大的经济和社会效益。从不同环境中分离获得新的,或具有新特性的嗜热微生物,一直是不同研究领域关注的热点。

印度洋卡利安达岛东海岸分布着一组海洋热泉(5°44'46"N; 105°35'12"E)。在热泉群的周边与海水交汇处分布着一个大型海藻床,优势种为马尾藻(*Sargassum* sp.)、江蓠(*Gracilaria* sp.)和浒苔(*Enteromorpha* sp.)等。在海藻床中生存的微生物,既可能源于海洋热泉,也可能源于周围的中温海水(温度约为 30 °C),并逐步适应了高温、高盐环境。因此,该生态系统中可能蕴藏着新颖、复杂、丰富的耐热微生物类群,目前该方面的研究尚鲜有报道。本研究从高温海藻床中获得马尾藻、沉积物和海水样品,对样品中的微生物进行了培养和分离纯化,采用 16S rDNA 技术鉴定种属并构建进化树;并研究了培养温度和盐度对几种菌株生长的影响,为其在生物技术领域中的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 采集地点及样品采集

海洋热泉群,位于印度洋印度尼西亚卡利安达(Kalianda)岛东海岸,泉眼以单个或成双分布于相距数米的礁石上。高潮时,热泉没于海水中;在低潮时,热泉从海水中暴露出来。低潮时各泉眼的水温在 58.5 °C–68.5 °C 之间,采用手持式盐度计(WYY-II, 成都)测得盐度约为 4, pH 为 6.0–6.5。马尾藻、沉积物和海水样品,采自海洋热泉与海水交汇处的高温藻床中,采集时为低潮位,海水温度达 55 °C 以上,盐度约为 30。样品

采集时间为 2011 年 7 月,样品于 4 °C 运输和实验室保存。

### 1.2 培养基

采用 MGYTC 培养基(g/L),包含:(I) 葡萄糖 1, 胰蛋白胨 1, 酵母粉 1, 海盐(Sigma, 美国) 30,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.35, 2-N-吗啉乙烷磺酸(MES) 1.95,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1, 乳酸钠 1; (II)  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5;  $\text{NaHCO}_3$  1; 连二亚硫酸钠 0.02; (III) 氧化铁 1, 盐酸半胱氨酸 1, 微量元素 SL-10 溶液 1 mL, 维生素溶液 1 mL, 促生长因子溶液 1 mL。(I)中的组分  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min, 培养基冷却至 45 °C 时,分别添加(II)和(III)中单独配置和除菌的各组分。(II)中的各组分配置成浓缩液,采用过滤除菌;(III)中盐酸半胱氨酸浓缩液采用  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min; 维生素溶液、微量元素 SL-10 溶液和促生长因子溶液的制备和除菌方法参照文献[4]; 氧化铁制备参考 Sokolova 等的方法<sup>[5]</sup>。培养基的终 pH 约为 6.0。MGYTC 固体培养基为上述培养基含 15 g 琼脂。

### 1.3 培养方法

**1.3.1 需氧微生物的培养和分离纯化:**将 1 g 马尾藻用  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌的陈海水冲洗 3 次后,剪碎,直接置于 MGYTC 固体培养基上培养;1 g 沉积物和 1 mL 水样梯度稀释后,与 45 °C 的固体培养基混合、凝固后培养。培养温度分别为 55 °C 和 30 °C。培养 12–72 h 后,观察并挑取颜色、形态不同的菌落,通过反复划线进行分离和纯化。通过显微镜(10×100 倍)观察菌株形态来验证纯度。

**1.3.2 厌氧微生物的富集培养和分离纯化:**将 1 g 马尾藻和 1 g 沉积物分别加入到 100 mL Hungate-type 厌氧瓶(含 25 mL MGYTC 培养液),厌氧瓶充 200 kPa 的  $\text{N}_2$ ,分别于 55 °C 和 30 °C 培养 7 d。将获得的培养液 10 倍梯度稀释后,取 1 mL 与 45 °C 的固体培养基(25 mL)混合,并采用滚管

法进行分离和培养。操作过程在厌氧培养箱内,培养温度同上。培养 48–168 h 后,在培养基表面或培养基内部挑取颜色、形态不同的菌落,进行液体传代培养,并再次采用滚管法进行分离和纯化。通过显微镜 (10×100 倍)观察菌株形态来验证纯度。

#### 1.4 基因组 DNA 提取和 16S rDNA PCR 扩增

取菌株培养液(约  $10^8$  个菌体细胞),于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根,北京)提取 DNA,加入溶菌酶 (20 g/L) 37 °C 反应 30 min。将放线菌的菌苔从平板上刮下,液氮研磨后,采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根,北京)提取 DNA。

采用 Taq PCR MasterMix 试剂盒(天根,北京)进行 PCR 扩增,50  $\mu$ L PCR 反应体系含有:250  $\mu$ mol/L dNTP, 0.40  $\mu$ mol/L 引物,1.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 50 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 0.5 U Taq DNA 聚合酶和 100 ng 基因组模板。扩增引物为细菌 16S rDNA (27f 和 1492r)。反应条件为:95 °C 1.5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳检测后,采用琼脂糖回收试剂盒(天根,北京)纯化,连接 pBS-T 载体(天根,北京)并转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞(天根,北京)后,由上海桑尼公司完成双向测序。

#### 1.5 系统进化分析

将菌株的 16S rDNA 基因序列(约 1 500 bp)提交到 GenBank 和 EzTaxon server 2.1 数据库进行比对和分析,获得亲缘关系最近的序列,序列相似度  $\geq 98\%$ ,被认为是同一种。采用 Bioedit 和 MEGA 软件的相邻连接法(Neighbor-Joining algorithm)构建系统发育树。

#### 1.6 培养温度对菌株生长的影响

通过 16S rDNA 基因序列鉴定种属后,选择代表性菌株,研究其耐热、耐盐特性。将

*Shewanella upenei* N9.2 和 *Shewanella algidipiscicola* KM30-9-2, 从斜面保存培养基中转接到含 5 mL MGYTC 液体培养基的试管(15 mm×100 mm)中,于 30 °C、150 r/min 振荡、活化培养 12 h,活化的菌株以 5% (V/V)接种于试管中(含 5 mL 培养液),分别于 30 °C、40 °C、45 °C 和 55 °C 于 150 r/min 振荡培养,每隔一段时间取样,采用显微镜直接计数法(10×100 倍),测定其生长量。

#### 1.7 培养基盐度对菌株生长的影响

选择热嗜淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans* LZS-4B.1) 和 高温放线糖莱斯菌(*Laceyella sacchari* 8.1)进行分析。菌株活化方法参照 1.6,活化温度为 55 °C。活化的菌株以 5% (V/V)接种于试管中(15 mm×100 mm, 含 5 mL 培养液),分别于盐度为 0、10、30、50、70、90 的培养基中振荡培养,每隔一段时间取样,采用显微镜直接计数法测定其生长量。

#### 1.8 注册的核酸序列号

菌株的 16S rDNA 基因序列已提交到 GenBank 数据库,注册号为 JQ670735–JQ670746。

## 2 结果

#### 2.1 16S rDNA 种属鉴定及系统进化分析

采用 MGYTC 培养基共获得 78 株菌株,测序后根据序列比对结果,共获得 3 个纲、8 个属的 12 种细菌,与已知种属的相似度高于 98% (表 1)。芽孢杆菌纲包括 3 个属 5 个种,如普通高温放线菌(*Thermoactinomyces vulgaris* 11.5)和高温放线糖莱斯菌(*Laceyella sacchari* 8.1),芽孢杆菌属的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* LZS-4B.2)和热嗜淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans* LZS-4B.1),深海微小杆菌属的深海微小杆菌(*Exiguobacterium profundum* KW30-5-2)。梭菌纲 1 个种,为 *Tepidibacter formicigenes* L2S1057-4。 $\gamma$ -变形菌纲包括希瓦氏属的 3 个种,鲍希瓦氏菌

(*Shewanella haliotis* H4-4)、*Shewanella upenei* N9.2 和 *Shewanella algidipiscicola* KM30-9-2; 弧菌属的 2 个种, 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus* KM30-12-3) 和 魔 鬼 弧 菌 (*Vibrio diabolicus* KM30-12-2); *Cobetia* 属 1 个种, 海科贝特菌 (*Cobetia marina* KW30-8-3)。

其中, 普通高温放线菌(*Thermoactinomyces vulgaris* 11.5)、高温放线糖莱斯菌(*Laceyella sacchari* 8.1)和热噬淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans* LZS-4B.1)为首次从高温海洋环境中分离获得。深海微小杆菌(*Exiguobacterium profundum* KW30-5-2)、*Tepidibacter formicigenes* L2S1057-4 和 魔 鬼 弧 菌 (*Vibrio diabolicus* KM30-12-2)最早报道来源于深海热液区。

将分离获得的 12 株细菌 16S rDNA 序列与相似性较高的 22 个序列做系统进化分析, 并构建

系统发育树, 如图 1 所示。可以看出, 获得的菌株聚为 3 个主要分支, 包括芽孢杆菌纲、梭菌纲和  $\gamma$ -变形菌纲。

2.2 菌株的生长特性

实验结果分析发现, *Tepidibacter formicigenes* L2S1057-4 为厌氧培养时获得, 为厌氧细菌。希瓦氏属的 3 个种, 既在厌氧培养时获得, 也在需氧培养时获得, 为兼性厌氧细菌。芽孢杆菌纲和梭菌纲的菌株主要在 55 ℃ 时分离获得, 为嗜热菌株;  $\gamma$ -变形菌纲细菌主要在 30 ℃ 培养时获得。这说明培养温度对获得的微生物类群有较大影响。 $\gamma$ -变形菌纲希瓦氏菌属各种在 55 ℃ 和 30 ℃ 培养时都可以获得, 说明该类群对温度的耐受性范围较大。培养温度相同时, 栖息环境不同, 获得的微生物种类也有差异, 说明栖息环境对细菌种类分布也有影响。

表 1 高温海藻床中细菌 16S rDNA 的分子鉴定				
Table 1 Molecular identification of bacteria from high-temperature seaweed beds based on 16S rDNA sequences				
菌株 Strain	收录号 Accession No.	最近物种 Closest match	相似度 Similarity (%)	类群 Group
11.5	JQ670736	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> KCTC 9076 (AF138739)	99.73	Firmicutes, Bacilli, Thermoactinomycetaceae
8.1	JQ670735	<i>Laceyella sacchari</i> KCTC 9790 (AF138737)	99.65	
LZS-4B.2	JQ670745	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 (AE017333)	99.60	Firmicutes, Bacilli, Bacillaceae
LZS-4B.1	JQ670744	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> CNCM I-1378 (L27478)	98.50	
KW30-5-2	JQ670741	<i>Exiguobacterium profundum</i> 10C (AY818050)	99.66	Firmicutes, Bacilli, Bacillales Family XII
L2S1057-4	JQ670743	<i>Tepidibacter formicigenes</i> DV1184 (AY245527)	99.00	Firmicutes, Clostridia, Clostridiales
N9.2	JQ670746	<i>Shewanella upenei</i> 20-23R (GQ260190)	99.93	Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Alteromonadales
KM30-9-2	JQ670738	<i>Shewanella algidipiscicola</i> S13 (AB205570)	99.86	
H4-4	JQ670737	<i>Shewanella haliotis</i> DW01 (EF178282)	98.79	
KW30-8-3	JQ670742	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 (AJ306890)	99.60	Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Oceanospirillales
KM30-12-3	JQ670740	<i>Vibrio diabolicus</i> HE800 (X99762)	98.87	Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Vibrionales
KM30-12-2	JQ670739	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG 21460 (AJ316187)	99.32	

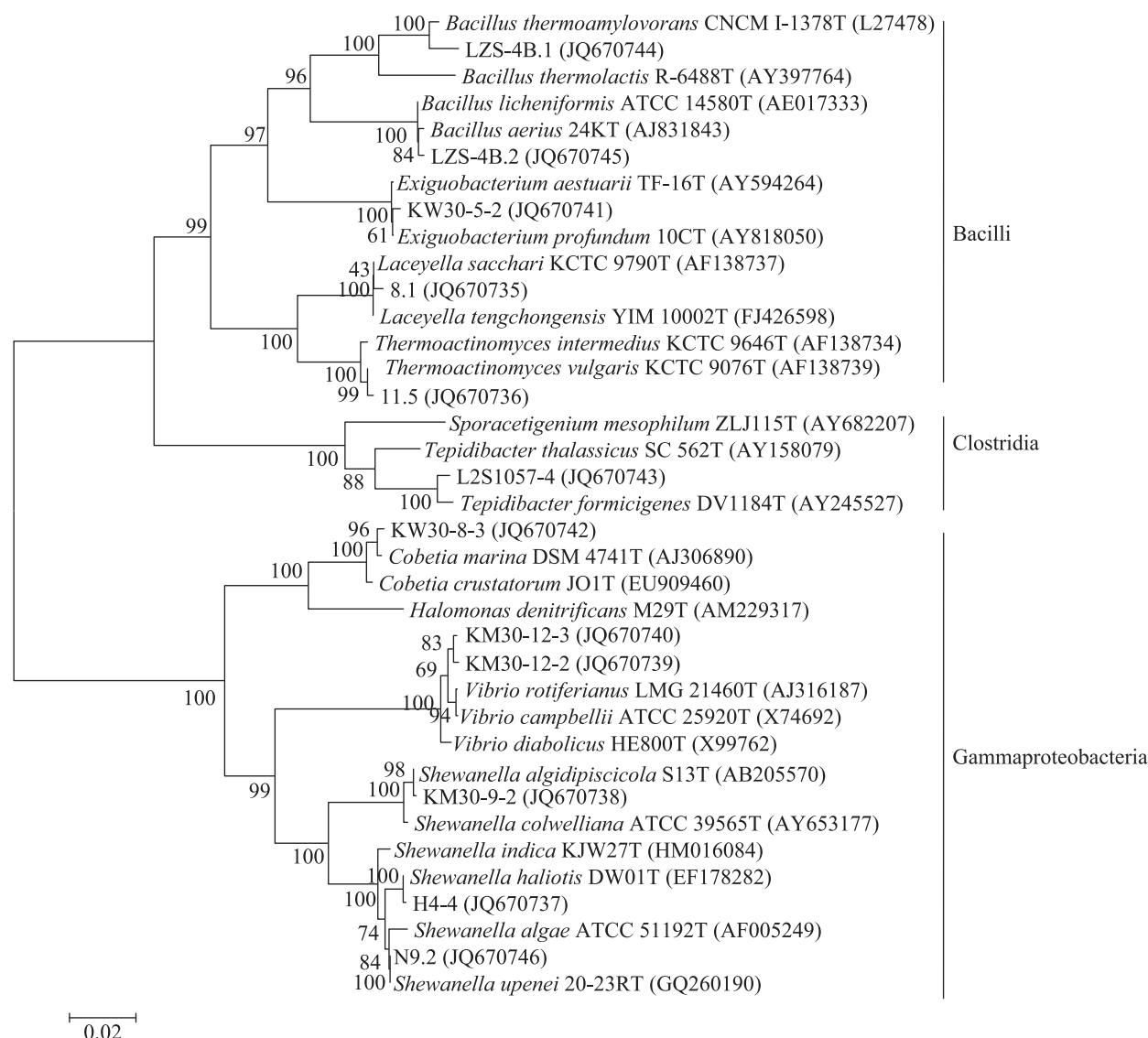


图1 邻接法构建高温海藻床中细菌 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-Joining phylogenetic tree of the bacteria from high-temperature seaweed beds based on 16S rDNA gene sequences

注: 芽孢杆菌纲、梭菌纲和  $\gamma$ -变形菌纲; 括号内为序列登录号; 标尺代表 0.02 进化距离单位; 自展值标注在分支处。

Note: Bacilli, Clostridia,  $\gamma$ -Proteobacteria. GenBank accession numbers are indicated in parentheses. The scale bar indicates the 0.02 evolutionary distance unit. Bootstrap values are shown at branch nodes.

### 2.3 培养温度对菌株生长的影响

*Shewanella upenei* N9.2 和 *Shewanella algidipiscicola* KM30-9-2 可以在 30 °C–45 °C 范围内生长良好; 也可耐受 55 °C 培养温度。*Shewanella upenei* N9.2 的最适生长温度为 40 °C; *Shewanella algidipiscicola* KM30-9-2 在 30 °C 时生长略高于 40 °C 时(图 2)。

### 2.4 培养基盐度对菌株生长的影响

热噬淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans* LZS-4B.1)和高温放线糖莱斯菌(*Laceyella sacchari* 8.1)可以在 0–90 盐度下生长; 最适盐度均为 30, 其次为 10 和 0。当盐度高于 50 时, 随着盐度增加, 生长量降低。说明菌株适应于等于或低于 30 的盐度, 过高盐度会抑制其生长(图 3)。

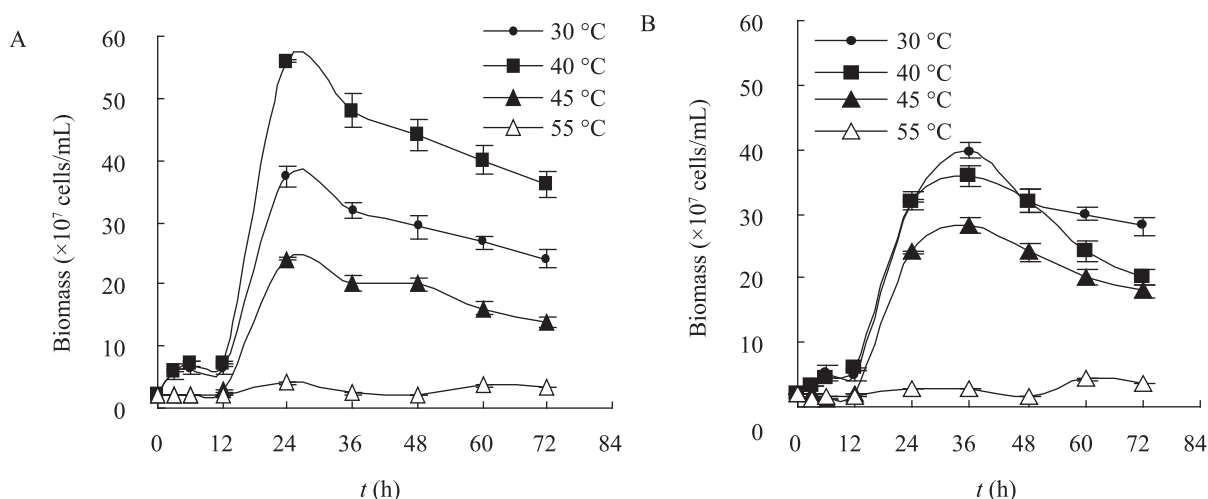


图 2 培养温度对菌株生长的影响

Fig. 2 Effect of culture temperature on bacterial growth

Note: A: *Shewanella upenei* N9.2; B: *Shewanella algidipiscicola* KM30-9-2.

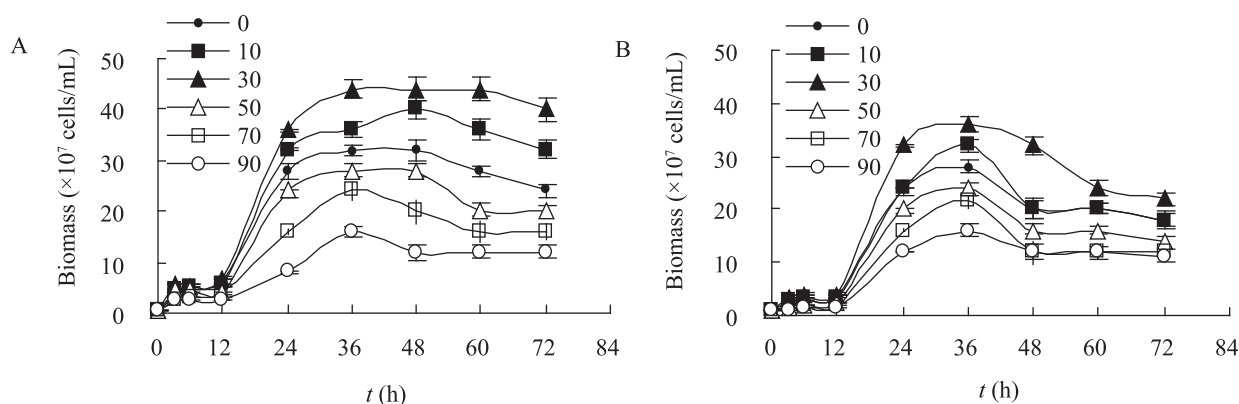


图 3 培养基盐度对菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of culture salinity on bacterial growth

Note: A: *Bacillus thermoamylovorans* LZS-4B; B: *Laceyella sacchari* 8.1.

### 3 讨论

海洋热泉属于浅海热液系统, 在光能的输入、水压、温度、氧气含量和盐度等方面, 既区别于黑暗的深海热液系统, 也与陆地热泉生态系统不同<sup>[6]</sup>。研究中的海洋热泉群位于印度洋卡利安达岛东海岸, 是受到喀拉喀托火山影响的区域之一。热泉中热液流体的盐度为 4, 说明热液流体的主要来源为陆地的大气水; 由于盐度仍略高于一般的陆地热泉, 说明热液流体在向上运移过

程中, 有少量海水加入。由此可以推断, 热泉中的微生物主要源于陆地的地热环境, 也包括海水组分加入时携带的海洋微生物。而在热泉群周边的大型海藻床中, 藻体表面和沉积物是一个相对稳定的环境, 在此生存的耐热微生物, 既可能源于海洋热泉, 也可能源于周围的中温海水并逐步适应了这种高温和高盐环境。研究中采用 MGYTC 培养基, 获得了不同生长特性的 4 个纲、8 个属的 12 种细菌, 尽管这些细菌的 16S rDNA 序列与已知种属的近似度高于 98%, 但多数菌种

对温度和盐度产生了适应性,从而可能具有新的生理特性。

芽孢杆菌纲中的普通高温放线菌(*Thermoactinomyces vulgaris* 11.5)、高温放线糖莱斯菌(*Laceyella sacchari* 8.1)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* LZS-4B.2)和热噬淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans* LZS-4B.1)仅在 55 °C 培养时分离获得,为嗜热细菌,这与已报道的文献一致<sup>[7-9]</sup>。据报道,普通高温放线菌(*Thermoactinomyces vulgaris*)和高温放线糖莱斯菌(*Laceyella sacchari*)可产生脂肪氧化酶、嗜热性 DNA 聚合酶和碱性蛋白酶等,在工业污泥堆肥和生物技术等领域具有重要的应用价值<sup>[10]</sup>。芽孢杆菌可产生多种活性物质,广泛应用于工业、农业和环保等各个领域。其中,热噬淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*)可产生淀粉酶、纤维素酶等,还可以与丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)共培养降解废纸浆产生氢气<sup>[11]</sup>;地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)也能产生多种生物酶,并利用生物废弃物产氢<sup>[12]</sup>。本研究首次从海洋高温环境中分离获得普通高温放线菌(*Thermoactinomyces vulgaris* 11.5)、高温放线糖莱斯菌(*Laceyella sacchari* 8.1)以及热噬淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans* LZS-4B.1),这些菌株除了嗜热,还可在盐度为 30 时达到最高生长量,甚至耐受 90 的盐度,因此在治理或利用含盐废弃资源方面将具有优势。

$\gamma$ -变形菌纲希瓦氏属的微生物广泛分布于极地、近海、深海低温及深海热液区等海洋环境。希瓦氏属的微生物可以利用不同的电子受体进行厌氧呼吸,如亚硝酸盐、氧化三甲胺、Cr(VI)、U(VI)、As(V)和 V(V)等,因此在生物修复、石油降解、矿物质生物地球化学循环和生物产电等领域发挥作用。*Shewanella upenei*、*Shewanella algidipiscicola* 和鲍希瓦氏菌(*Shewanella*

*haliotis*) 主要从鱼肠道中分离获得,其中 *Shewanella upenei* 最适生长温度为 30 °C, *Shewanella algidipiscicola* 为 25 °C<sup>[13-15]</sup>。本研究首次从高温海洋环境中分离获得了这些细菌,由于这些菌株是 30 °C 培养时的优势种类,且最适温度为 30 °C–40 °C,因此推断应来源于常温海洋环境。研究获得的这些菌株适应了 30 °C–55 °C 的温度变化,最适生长温度和最高生长温度均较已报道的有所提高,因此这些具有耐盐特性及广泛温度适应性的希瓦氏属菌株,也将在生物技术和高温高盐环境的生物修复等方面发挥作用。

本研究在 30 °C 培养时获得深海微小杆菌(*Exiguobacterium profundum* KW30-5-2),与深海微小杆菌(*Exiguobacterium profundum* 10C<sup>T</sup>)的最大相似度为 99.66%。据报道深海微小杆菌(*Exiguobacterium profundum* 10CT)首次从 2 600 m 深的东太平洋热液喷口采集<sup>[16]</sup>,中度嗜热、革兰氏阳性、兼性厌氧、耐盐。其生长范围为 12 °C–49 °C (最佳, 45 °C); 盐浓度范围 0–11% (最佳, 0–2%)。发酵产物为 L-乳酸,及少量甲酸、乙酸和乙醇;厌氧条件下可将硝酸盐还原为亚硝酸盐。在 30 °C 培养时还获得魔鬼弧菌(*Vibrio diabolicus* KM30-12-3),与魔鬼弧菌(*Vibrio diabolicus*)的最大近似度为 98.87%。魔鬼弧菌(*Vibrio diabolicus*)首次从东太平洋海隆深海热液场的多毛环节动物庞贝蠕虫(*Alvinella pompejana*)中分离获得,中温菌,兼性厌氧,该菌株可以产生一种富含糖醛酸和己糖胺的新型生物多糖<sup>[17]</sup>。本研究在 55 °C 厌氧培养时获得 *Tepidibacter formicigenes* L2S1057-4,与 *Tepidibacter formicigenes* DV1184<sup>T</sup> 的相似度为 99%。*Tepidibacter formicigenes* DV1184<sup>T</sup> 首次从大西洋海脊的热液喷口分离获得,为革兰氏阳性菌、厌氧。菌株可以在 35 °C–55 °C 生长(最适, 45 °C),盐度 20–60 (最适, 30),发酵产物主要为甲酸、乙酸和乙醇<sup>[18]</sup>。这说明研究所



获得的上述菌株在生物质能和生物技术利用方面将具有潜在的应用价值。此外, 这些菌株既在浅海热液环境相关的高温藻床中生存, 也在深海热液环境中分布, 这对于揭示浅海热液系统和深海热液系统的内在联系, 可能具有参考价值, 也值得进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Beeby M, O'Connor BD, Ryttersgaard C, et al. The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles[J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(9): 1549–1558.
- [2] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(1): 1–43.
- [3] Wiegel J, Ljungdahl LG. The importance of thermophilic bacteria in biotechnology[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1985, 3(1): 39–108.
- [4] [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/D\\_SMZ\\_Medium829.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/D_SMZ_Medium829.pdf)
- [5] Sokolova, TG, Gonzales JM, Kostrikina NA, et al. *Thermosinus carboxydvorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, carbon-monoxide-oxidizing, hydrogenogenic bacterium from a hot pool of Yellowstone National Park[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6): 2353–2359.
- [6] 刘长华, 殷学博. 关于现代浅海型海底热液活动的研究进展[J]. *地球科学进展*, 2006(9): 918–924.
- [7] 李文均, 张忠泽, 姜成林. 高温放线菌属分类研究进展[J]. *微生物学报*, 2002, 42(6): 759–763.
- [8] Yakimov MM, Timmis KN, Wray V, et al. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(5): 1706–1713.
- [9] Combet-Blanc Y, Ollivier B, Streicher C, et al. *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amyolytic bacterium[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(1): 9–16.
- [10] 施庆珊, 梁文涛, 疏秀林, 等. 一株高温放线菌及其在造纸污泥堆肥过程中的应用[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(1): 368–371.
- [11] Chou CH, Han CL, Chang JJ, et al. Co-culture of *Clostridium beijerinckii* L9, *Clostridium butyricum* M1 and *Bacillus thermoamylovorans* B5 for converting yeast waste into hydrogen[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36(21): 13972–13983.
- [12] Kalia VC, Jain SR, Kumar A, et al. Fermentation of biowaste to H<sub>2</sub> by *Bacillus licheniformis*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1994, 10(2): 224–227.
- [13] Kim KK, Kim YO, Park S, et al. *Shewanella upenei* sp. nov., a lipolytic bacterium isolated from bensasi goatfish *Upeneus bensasi*[J]. *The Journal of Microbiology*, 2011, 49(3): 381–386.
- [14] Satomi M, Voge BF, Venkateswaran K, et al. Description of *Shewanella glacialipiscicola* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(2): 347–352.
- [15] Kim D, Baik KS, Kim MS, et al. *Shewanella haliotis* sp. nov., isolated from the gut microflora of abalone, *Haliotis discus hannai*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(12): 2926–2931.
- [16] Crapart S, Fardeau ML, Cayol JL, et al. *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(2): 287–292.
- [17] Raguene G, Christen R, Guezennec J, et al. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1997, 47(4): 989–995.
- [18] Urios L, Cueff V, Pignet P, et al. *Tepidibacter formicigenes* sp. nov., a novel spore-forming bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(2): 439–443.