

一株深海中嗜热嗜酸菌的分离及鉴定

漆辉洲¹, 陈红², 敖敬群², 周洪波¹, 陈新华^{2*}

(1 中南大学 资源加工与生物工程学院, 湖南 长沙 410083; 2 国家海洋局 第三海洋研究所 海洋生物遗传工程重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 从太平洋热液区样品中分离纯化到一株中等嗜热嗜酸菌, 命名为 TPY。文中对该菌株的形态、生理生化特征、16S rDNA 序列以及亚铁和单质硫氧化活性进行了研究。TPY 菌株为短杆状, 革兰氏阳性菌, 大小为(0.3~0.5) $\mu\text{m} \times$ (1~3) μm ; 最适生长温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, 最适生长 pH 值为 1.8; 该菌既能利用亚铁盐、单质硫自养生长, 也能利用酵母粉、葡萄糖、蛋白胨和甘油等有机物异养生长; TPY 菌与 *Sulfobacillus acidophilus* (AB089842) 的 16S rDNA 序列高度相似, 其同源性为 99%。这些结果表明, TPY 菌是一株来自深海的嗜酸硫化芽孢杆菌(*Sulfobacillus acidophilus*), 该菌的成功分离将有助于对太平洋热液区微生物种群结构的全面了解。同时, TPY 菌对亚铁和单质硫的良好氧化能力显示出其在生物浸矿中的应用潜力。

关键词: 太平洋热液区; 嗜酸硫化芽孢杆菌; 16S rDNA; 生物浸矿

中图分类号: Q93-311

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2009)02-0152-07

1 引言

生物冶金技术是一种利用微生物的氧化作用, 将矿物中的金属以离子形式溶解到浸出液中并回收的方法。目前国内外已成功利用该技术从多种低品位、难处理矿石中提取出铜、金、镍、银、锌、铀等金属^[1]。这种技术具有易操作、投资少、成本低、能耗少的特点, 更重要的是其资源利用率高且对环境危害小, 在资源短缺和环境污染日益严重的今天更加引起了人们的重视^[2]。随着对资源可持续发展和环境保护的日益重视, 以及冶金技术、微生物学、生物化学和分子生物学的发展, 生物冶金技术即将成为 21 世纪重要冶金技术之一。

早期的研究主要集中在中温菌, 如嗜酸氧化亚铁硫杆菌和嗜酸氧化硫硫杆菌^[3]。近年来, 人们发现在生物浸矿体系中, 中等嗜热菌比中温菌和高温嗜热菌更具优势: (1) 中等嗜热菌相对于中温菌能耐

受较高的温度, 这就可以解决浸出过程中温度过高, 不适宜嗜中温菌生长繁殖而导致浸出速率缓慢的问题, 不需冷却设备, 降低生产成本, 加快矿石的化学反应过程, 缩短浸出周期; (2) 中等嗜热菌具有坚固的细胞壁结构, 可以克服高温嗜热菌对高矿浆浓度、金属离子较为敏感的弊端; (3) 中等嗜热菌一般为兼性菌, 浸矿中添加有机物可提高细菌的生长和浸出速度, 为寻找合适的强化浸出手段提供了更多的途径^[4]。因此, 中等嗜热菌被认为是在工业上最有应用前景的菌种。

目前已鉴定的中等嗜热菌浸矿菌种分为 3 个属: *Acidimicrobium*, *Sulfobacillus*, *Ferromicrobium*^[5-6]。*Sulfobacillus acidophilus* 存在于富含铁、硫和硫化物的酸热环境中, 属革兰氏阳性菌, 菌体呈短杆状, 大小为(0.5~0.8) $\mu\text{m} \times$ (3.0~5.0) μm , 生长过程中能形成球形孢子, 最适生长温度为 45~50 $^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 值为 2.0 左右。能以亚

收稿日期: 2008-04-11; 修订日期: 2009-08-08。

资助项目: 国家海洋公益性行业科研专项(200805032); 国际海底区域研发项目(DYXM-115-02-2-07)。

作者简介: 漆辉洲(1983-), 男, 湖南吉首市人, 硕士研究生, 从事浸矿微生物方面研究。E-mail: qhz830@163.com

* 通讯作者: 陈新华, E-mail: chenxin@tom.com

铁和单质硫为能源自养生长,并且能够利用酵母提取物异养生长^[7]。以亚铁和单质硫为能源,同时添加少量酵母粉,细菌生长更快。本文从太平洋热液区样品中分离纯化出一株与 *Sulfobacillus acidophilus* 高度相似的中等嗜热嗜酸菌,并对其形态、生理生化特征、16S rDNA 序列、亚铁和单质硫氧化活性进行了分析。

2 实验材料和方法

2.1 样品和主要试剂

样品采自太平洋热液区(12°42'29"N, 104°02'01"W, 水深 3 083 m), 分离得到的菌株命名为 TPY。培养基 1: 9 K 培养基: (NH₄)₂SO₄ (3 g/dm³), MgSO₄ · 7H₂O (0.5 g/dm³), K₂HPO₄ (0.5 g/dm³), KCl (0.1 g/dm³), Ca(NO₃)₂ (0.01 g/dm³); 培养基 2: 9 K 培养基, 酵母提取物 (0.25 g/dm³)^[8-9]; 培养基 3: 9K 培养基, 酵母提取物 (0.25 g/dm³), FeSO₄ · 7H₂O (13.9 g/dm³)。培养基中的 FeSO₄ · 7H₂O 采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 其他成分溶于去离子水后常规高压灭菌。能源利用试验采用 9K 培养基, 单质硫氧化活性试验采用培养基 2, 其余所有实验采用培养基 3。

2.2 菌株分离

取热液区样品 10 ml 加入到 90 ml 培养基 3 中富集培养, 温度 45 °C, 转速 160 r/min, 每 8 h 用光学显微镜观察, 直到菌数达到 1 × 10⁷ 个/ml。然后采用梯度稀释法, 按 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ 的梯度接种到培养基中, 培养条件不变。最大稀释度获得的富集物即作为下次稀释分离的种子液, 反复稀释纯化多次, 直到在显微镜下观察, 微生物形态基本一致, 最终获得 TPY 的纯培养物。

2.3 形态鉴定

离心收集菌体, 用无菌水反复清洗后用 4% 戊二醛固定制样, 然后用电子显微镜(日本电子公司生产, 型号 JEM-1230) 观察形态。

2.4 生理生化特征试验

以下所有试验取处于对数生长末期的 TPY 为种子液, 细菌浓度为 1 × 10⁸ 个/ml, 接种量为 5%, 摇床转速为 160 r/min。用 50% (v/v) H₂SO₄ 调节 pH 值。

2.4.1 最适温度

设置不同温度条件(45, 48, 50, 52, 55 °C), pH

值 1.8, 分别在 6 和 12 h 取样, 采用血球计数板在显微镜下直接记数, 确定温度对 TPY 菌的生长影响。

2.4.2 最适 pH 值测定

设置不同的 pH 值(1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.4), 温度 50 °C, 分别在 6 和 12 h 取样, 用显微镜直接记数, 确定 pH 值对 TPY 菌生长的影响。

2.4.3 酵母提取物对生长的影响

为了研究酵母提取物对 TPY 菌株的生长影响。设置了 0.0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.8 g/dm³ 7 个浓度梯度。温度为 50 °C, pH 值为 1.8。分别在 6 和 12 h 取样, 在显微镜下直接记数, 确定酵母提取物对 TPY 菌生长的影响。

2.4.4 能源利用情况

在 9K 培养基中分别加入酵母提取物(0.25%), 蛋白胨(0.1%), 甘油(0.1%), 葡萄糖(0.1%), 蔗糖(0.1%), 单质硫(1%), FeSO₄ · 7H₂O (13.9 g/dm³), FeSO₄ · 7H₂O (13.9 g/dm³) + 酵母提取物(0.25%), FeSO₄ · 7H₂O (13.9 g/dm³) + 蛋白胨(0.1%), FeSO₄ · 7H₂O (13.9 g/dm³) + 葡萄糖(0.1%), FeSO₄ · 7H₂O (13.9 g/dm³) + 蔗糖(0.1%), FeSO₄ · 7H₂O (13.9 g/dm³) + 甘油(0.1%)。温度 50 °C, pH 值 1.8。培养 12 h 后, 显微镜下观察细菌生长情况。

2.4.5 生长曲线测定

在最佳生长条件下(温度为 50 °C, pH 值为 1.8, 酵母提取物为 0.25 g/dm³) 培养 TPY, 每隔 3 h 在显微镜下直接记数, 绘制生长曲线。

2.5 亚铁氧化活性

在最佳生长条件下培养 TPY, 每 3 h 取样测定 Fe²⁺ 浓度, 直到 Fe²⁺ 被全部氧化。溶液中 Fe²⁺ 浓度用重铬酸钾滴定法测定^[10]。

2.6 单质硫氧化活性

当利用单质硫为能源, TPY 能够氧化单质硫形成硫酸使溶液 pH 值降低, 因此我们通过测定溶液 pH 值变化考察 TPY 的单质硫氧化活性^[10-11]。培养基为培养基 2 加单质硫(10 g/dm³), 温度 50 °C, pH 2.5。每 24 h 取样测定 pH 值。

2.7 16S rDNA 序列的分析

2.7.1 TPY 菌株基因组 DNA 提取、16S rDNA 序列 PCR 扩增、克隆和测序

TPY 菌基因组提取方法见参考文献[12]。采用细菌的通用引物: fD1(5'-agagtttgatcctggtcag-3') 和 rP2(5'-acggctacctgttacgact-3')。PCR 反应

体系(25 μl): 去离子水 13.5 μl , 模板 4.5 μl , 引物(20 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) 各 0.5 μl , $10\times$ PCR 缓冲液 2.5 μl ; Mg^{2+} (5 mmol/dm^3) 1.5 μl , dNTP 2.0 μl , Taq DNA 聚合酶(1 U/ μl) 0.5 μl 。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 30 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果; 扩增得到的 PCR 产物经纯化后与 pMD19-T 载体(大连宝生物公司产品)连接, 并转化大肠杆菌 DH5(感受态细胞; 挑选阳性克隆子送上海生工生物有限公司测序。

2.7.2 序列分析比较

测定的 16S rDNA 序列运用 BLASTn 程序在 NCBI GenBank 数据库中进行同源序列搜索和比较, 采用 Clustal x 1.8 进行完全比对, 然后利用 MEGA 4.0 软件采用邻接法^[13] 构建系统进化树, 并进行亲缘性分析。

3 结果

3.1 菌株的形态学特征

TYP 菌株呈短杆状, 革兰氏阳性, 无鞭毛, 大小为(0.3~0.5) $\mu\text{m} \times (1\sim 3) \mu\text{m}$ (图 1)。这些细菌有时单个存在, 有时成对出现。

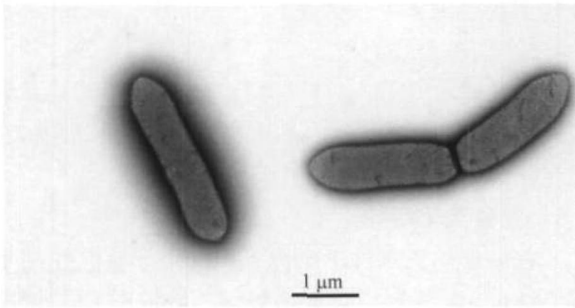


图 1 TYP 菌株的电镜照片

3.2 温度对 TYP 生长的影响

实验结果表明, 该菌在 45~50 $^{\circ}\text{C}$ 生长时, 细菌数与温度呈正相关。超过 50 $^{\circ}\text{C}$ 之后, 细菌生长受到抑制, 菌数减少。最适生长温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, 温度过高或过低都会不利于细菌细胞生长, 特别是温度升高对细菌生长影响较大(图 2)。

3.3 初始 pH 对 TYP 生长的影响

实验结果如图 3 所示, 初始 pH 值对细菌生长有显著的影响。最适 pH 值为 1.8, 当初始 pH 值在 1.6~1.8 之间时, pH 值对细菌生长影响不大。当初始 pH 值高于 1.8 或低于 1.6 时, 都不利于细菌的生

长。实验中发现, 初始 pH 值为 2.4 时, 反应初期即有大量的白色沉淀生成, 初始 pH 值越低越不易产生沉淀, 但细菌生长的停滞期较长, 增长速度较缓慢。

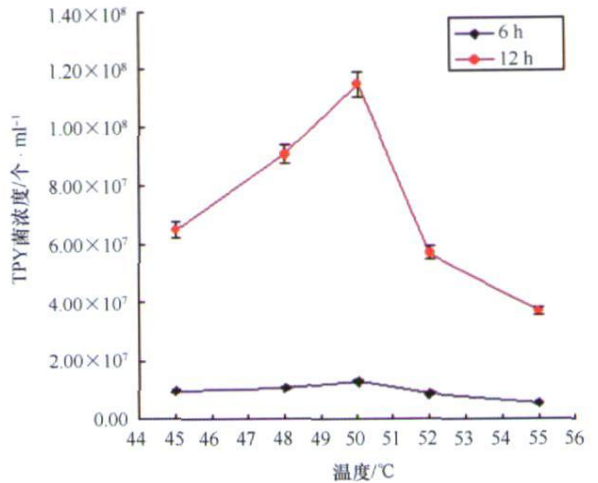


图 2 温度对 TPY 菌株生长的影响

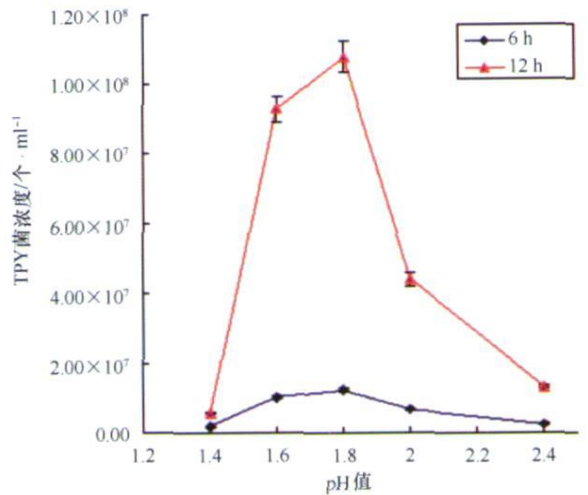


图 3 pH 值对 TPY 菌株生长的影响

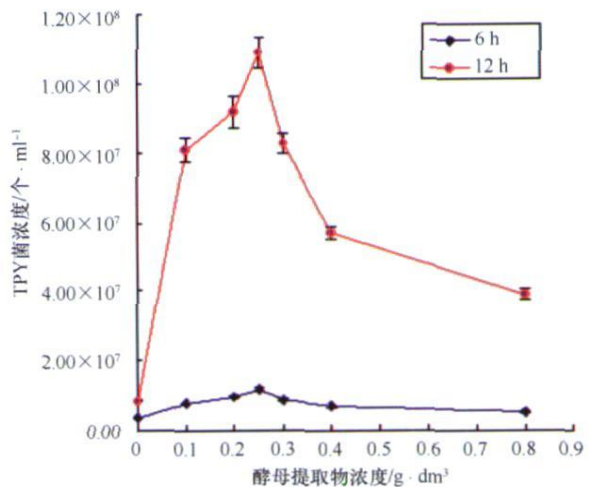


图 4 酵母提取物对 TPY 菌株生长的影响

3.4 酵母提取物对生长的影响

实验结果表明,不添加酵母提取物时,细菌生长缓慢。酵母提取物浓度在 $0.1 \sim 0.25 \text{ g/dm}^3$ 时,细菌生长良好。当酵母提取物浓度超过 0.3 g/dm^3 时,细菌生长受到抑制。酵母提取物浓度在 0.25 g/dm^3 时,生长最佳(见图4)。

3.5 能源利用情况

TPY 菌株能够利用多种底物作为能源,如硫酸亚铁、单质硫、酵母提取物、蛋白胨、甘油、葡萄糖,但

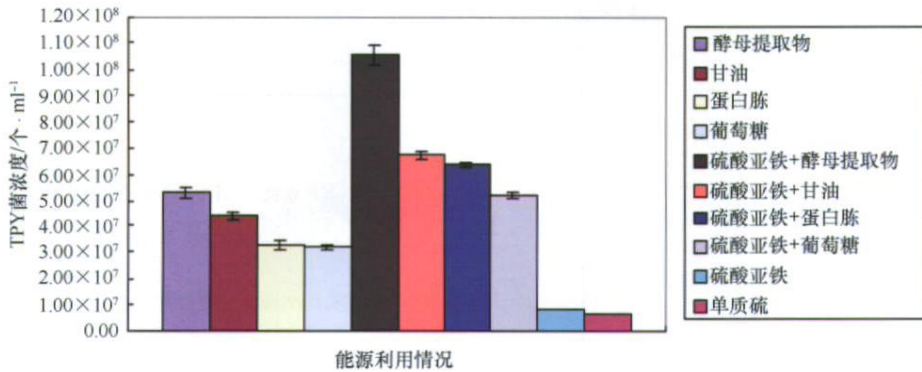


图5 TYP 菌株能源利用情况

3.6 生长曲线测定

细菌生长曲线如图6所示。由图6可见,在接种的最初3h内,菌数少量增加,这是由于细菌被接种到新的环境中需要一定的适应过程,此时细菌生长处于停滞期,之后随着细菌对环境的适应,细菌逐渐进入对数期,对数期内细菌大量繁殖,12h前后,细菌进入稳定生长期,最大浓度达到 1.0×10^8 个/ml左右(见图5)。

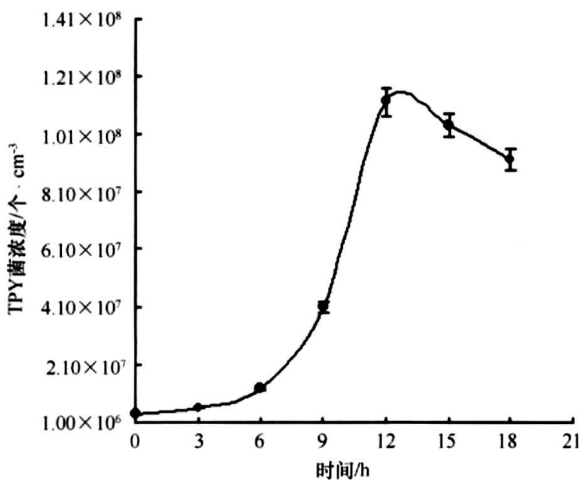


图6 TYP 菌株生长曲线

不能够利用蔗糖。并且利用 Fe^{2+} + 蔗糖混合培养时,细菌也不生长,表明蔗糖对该菌生长有抑制作用,具体原因有待进一步研究。该菌株利用 Fe^{2+} 和酵母提取物生长最好,利用有机物生长次之,单独以 Fe^{2+} 或单质硫等无机物为能源时,生长缓慢。有研究表明,很多中等嗜热菌以 Fe^{2+} 或单质硫为能源时,细菌的良好生长需要足够的 CO_2 ,或在有机物存在的混合营养条件下细菌更易生长^[14](图5)。

3.7 亚铁氧化活性

TPY 菌株具有较强的氧化亚铁能力,且由图6和图7可以看出细菌的生长和亚铁氧化能力呈正相关。在接种后3小时,细菌生长处于停滞期,菌数较少,氧化率较低。当进入对数生长期时,亚铁氧化率也迅速增加。

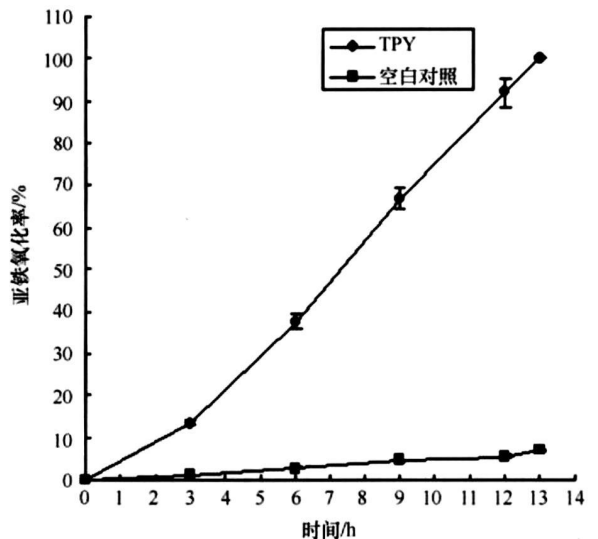


图7 TYP 菌株氧化亚铁曲线

3.8 单质硫氧化活性

如图 8 所示,在 6 d 内培养基 pH 从最初的 2.5 下降到 1.4 左右,而空白对照组几乎没有变化。第 6 天实验结束时,取样直接在显微镜下计数,菌浓度达到 1.4×10^8 个/ dm^3 。表明 TPY 菌株具有较强的氧化单质硫能力,并且能够耐受低 pH 值。

3.9 16S rDNA 序列的分析

通过对 TPY 菌株的 16S rDNA 基因扩增、克隆和测序,获得该基因长约 1 597 bp 的序列(NCBI 登录号 EF088287)。与 GenBank 中已有的 16S rDNA 基因序列比对,结果显示 TPY 菌株与硫化杆菌属(*Sulfobacillus*) 各种 16S rDNA 基因序列相似性很高,其中与 *Sulfobacillus acidophilus* (AB089842) 的 16S rDNA 基因序列相似性高达 99%,且处于系统发育树的同一分支。表明 TPY 菌与 *Sulfobacillus acidophilus* 有密切的亲缘关系(图 9)。

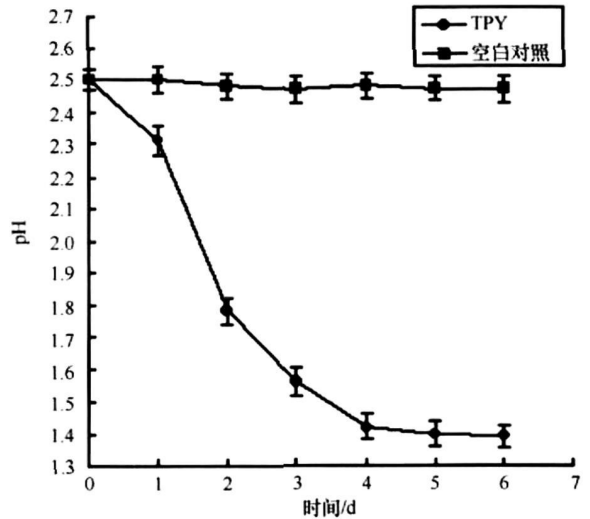


图 8 TPY 菌株氧化单质硫过程中 pH 值变化曲线

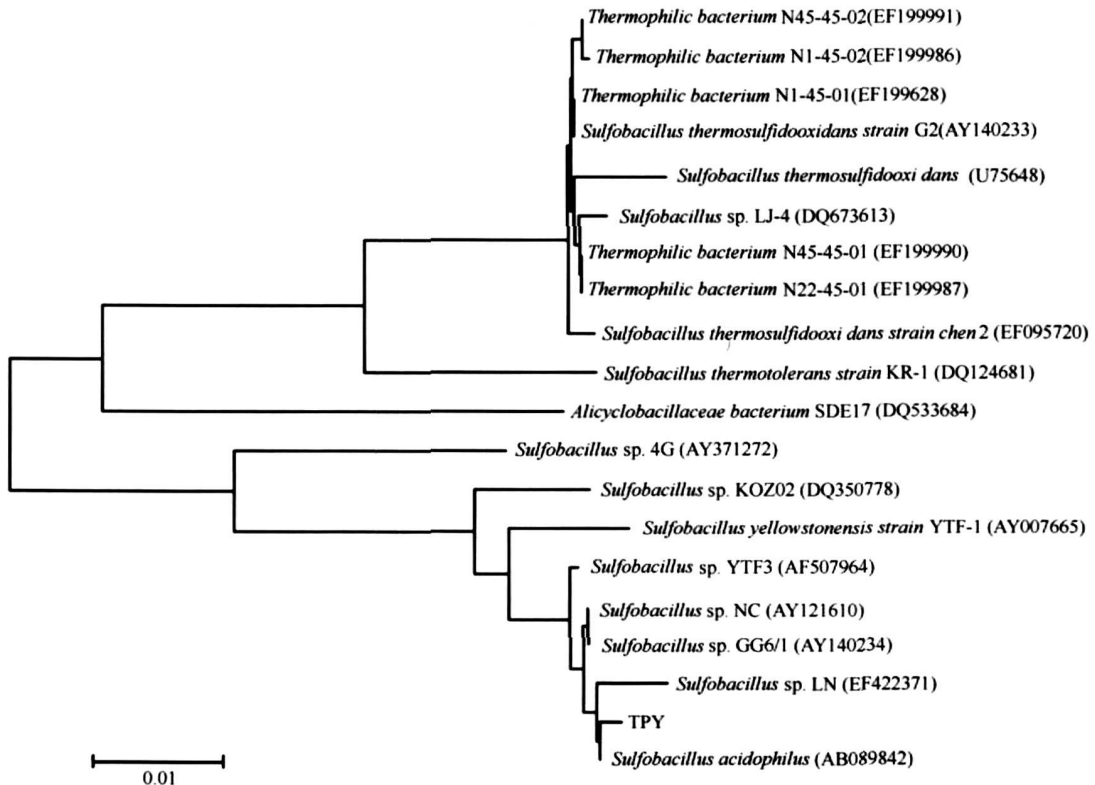


图 9 基于 16S rDNA 的系统发育树

4 讨论

从太平洋热液区样品中成功分离得到的一株

中等嗜热嗜酸兼性异养菌 TPY, 呈短杆状, 革兰氏阳性。16S rDNA 序列分析表明, TPY 菌与 *Sulfobacillus acidophilus* (AB089842) 有密切的亲缘关系, 其 16S rDNA 序列同源性达到 99%。TPY

菌的最佳生长温度为 50 °C, 最适生长 pH 值为 1.8, 且在 45~50 °C, pH 值 1.6~1.8 之间生长良好, 而目前已商业化的生物冶金搅拌反应器的温度一般控制在 40~55 °C, pH 值控制在 1.4~1.6^[1], 因此 TPY 菌可以很好地适应商业化的生物浸出体系条件。此外, 在生物浸矿过程中会不断积累有机物, 当有机物达到一定浓度时, 那些严格自养的浸矿细菌生长将受到抑制。而由于 TPY 菌能够利用有机物, 可以很好地解决这个问题。TPY 菌的这些生物学特性显示出其在生物冶金中具有良好应用潜力。

海底热液是 20 世纪海洋地质学最重要的科学发现之一, 是当今国际上科学研究的前沿。由于洋

中脊等处的岩浆活动, 海水通过裂隙渗入地壳, 被熔岩或围岩加热后富含金属元素的高温热液沿裂隙上升与周围冷海水混合, 形成黑烟囱, 硫化物沉淀到烟囱和附近的海底, 多金属元素也在此富集。同时, 巨大的热通量、与生命起源有关的海底热液生物等科学问题, 也使热液活动区成了科学研究的天然海底实验室。本研究从太平洋热液区分离得到的 TPY 菌, 能利用亚铁盐或单质硫自养生长, 提示在大洋热液区可能存在一类以亚铁、元素硫或硫化物作为主要能源的微生物类群。对该类微生物的进一步研究, 无疑将为深入了解深海热液区微生物种群结构、物质循环、以及海底矿产资源的成因提供重要的资料。

参考文献:

- [1] RAWLINGS D, DEW D, PLESSIS C. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(1): 38—44
- [2] BRIERLEY L. 细菌的氧化作用. 湿法冶金, 1996, 60: 44—47.
- [3] KELLY D, WOOD A. Reclassification of some species of *Tiobacillus* to newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halotheobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 511—516
- [4] 邓敬石, 阮仁满, 温建康. 中等嗜热菌浸出硫化矿的研究现状及展望[J]. 矿产综合利用, 2002(4): 33—38
- [5] ROHWERDER T, GEHRKE T, KINZLER K, et al. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 63: 239—248
- [6] OLSON G, BRIERLEY J, BRIERLEY C. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 63: 249—257.
- [7] NORRIS P, CLARK D, OWEN J, et al. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral sulphide oxidizing bacteria[J]. Microbiology, 1996, 142: 775—783
- [8] JOE S, SUTO K, INOUE C, et al. Isolation and characterization of acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacterium from enrichment culture obtain from acid mine drainage treatment plant[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(2): 117—123
- [9] OKIBE N, GERICKE M, HALLBERG K, et al. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation[J]. Applied and Environment Microbiology, 2003, 69(4): 1936—1943
- [10] 杨宇, 万民熙, 彭宏, 等. 一株黄铜矿专属浸出细菌的分离与鉴定[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2007, 38(4): 639—644.
- [11] 陈红, 陈新华. 4 株不同来源的嗜酸氧化亚铁硫杆菌某些生理特征的比较研究[J]. 台湾海峡, 2007, 26(4): 562—568.
- [12] 程海娜, 胡岳华, 高健. 一株嗜酸硫氧化菌的分离[J]. 生命科学研究, 2007, 11(2): 105—109.
- [13] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4: 406—425
- [14] 李雅芹, 何正国. 中度嗜热嗜酸铁氧化细菌对 Fe^{2+} 的氧化[J]. 有色金属, 2003, 55(1): 37—38

Isolation and identification of a strain of moderate thermophilic and acidophilic bacterium from deep sea

QI Hui-zhou¹, CHEN Hong², AO Jing-qun², ZHOU Hong-bo¹, CHEN Qin-hua²

(1 School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China; 2 Key Laboratory of Genetic Engineering of Marine Biology, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: A moderate thermophilic acidophilic bacterium TPY was isolated from hydrothermal vent of the Pacific Ocean, and the study of its morphological characteristics, physiological characterization and 16S rDNA sequence analyses had been done. The strain is Gram positive, rod-shaped in $(0.3\sim 0.5)\ \mu\text{m} \times (1\sim 3)\ \mu\text{m}$. The optimal growth temperature is about $50\ ^\circ\text{C}$, the optimal pH is 1.8. The TPY strain not only can utilize iron and element sulfur as electron donor, but also utilize yeast extracts, glucose, peptone and glycerol. The 16S rDNA sequences analysis indicated that the strain TPY was very similar to *Sulfobacillus acidophilus* (AB089842). Thus the strain TPY was identified as the species *Sulfobacillus acidophilus* from deep sea. The successful isolation of the strain TPY is helpful to understand the microorganic community of hydrothermal vent of the Pacific Ocean. The ability of this strain to oxidize iron and element sulfur shows that it has a good prospective in bioleaching.

Key words: hydrothermal vent of the Pacific Ocean; *sulfobacillus acidophilus*; 16S rDNA; bioleaching