

广西象州温泉嗜热菌的分离与鉴定

Separation and Identification of Thermophilic Bacterium Strain from Xiangzhou Hot Springs of Guangxi

苏 龙¹, 韦宇拓², 黄日波²

SU Long¹, WEI Yu-tuo², HUANG Ri-bo²

(1. 玉林师范学院化学与生物系, 广西玉林 537000; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005)

(1. Department of Chemistry and Biology, Yulin Teachers College, Yulin, Guangxi, 537000, China; 2. College of Life Science and Biotechnology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:采集广西象州温泉水样,用常规的稀释涂布法分离和纯化嗜热菌,并选择其中1株编号为XZ2K2的菌株进行形态观察、生理生化鉴定和16S rDNA序列分析。结果从温泉水中分离得到9个菌株,XZ2K2菌株的革兰氏染色阳性,无芽孢,细胞呈杆状,最适生长温度为70~75℃,最适的生长pH值为7.0~7.5。初步鉴定该菌株为布氏栖热菌(*Thermus brockianus*)。

关键词:嗜热菌 分离 鉴定 温泉

中图分类号:Q949.3 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2006)04-0327-03

Abstract:In order to separate and identify the thermophilic bacteria in hot springs of Xiangzhou, Guangxi, the general method of dilution spread was used. One strain was selected and labelled as XZ2K2. Morphological observation, physiology-biochemistry tests and 16SrDNA sequence analysis have been conducted. Nine strains were separated from the hot springs. XZ2K2 is bacillus, gram-positive, non-sporulation. Its optimum temperature for growth was between 70℃ and 75℃, optimum pH for growth was between 7.0 and 7.5. XZ2K2 was identified as *Thermus brockianus*.

Key words:thermophilic bacteria, separation, identification, hot springs

自从1879年米奎尔从法国塞内河中分离到能在70℃环境下生长的杆菌以来,人们对各种各样的高温环境,尤其是热泉开展了许多嗜热菌研究工作。1969年,Brock从美国黄石公园热泉分离到水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)以后,世界各国生物工作者从各种高温自然环境及人造热环境中,已经筛选和分离出不同属、种的嗜热菌,例如,有学者分别分离得到嗜热菌属非解脲栖热菌(*Thermus nonproteolyticus*)和极端嗜热性芽孢杆菌^[1,2]。广西有着丰富的地热泉群,为研究嗜热菌提供了良好的自然环境。为了了解广西的热泉中微生物的分布情况,我们从广西来宾市象州县温泉水样中分离嗜热菌,并对其中1株菌株进行了初

步鉴定。

1 材料与amp;方法

1.1 泉水样品

本研究所使用的水样采自广西来宾市象州县花池温泉,泉水无色,温度为72℃,pH值为6.8。

1.2 菌株、载体及酶

大肠杆菌菌株DH5α,克隆载体pGEM-3zf(+)由广西大学生命科学与技术学院发酵与酶工程实验室保存。pUC18-Tm载体、限制性内切酶、T4 DNA连接酶购自大连宝生生物工程公司。

1.3 培养基

菌株分离筛选培养基CM的制备与文献[3]的培养基制作方法相同。

1.4 嗜热菌的分离与培养

取水样200μl直接涂布于分离培养基上,于75℃

收稿日期:2006-04-28

修回日期:2006-07-10

作者简介:苏 龙(1978-),男,广西浦北县人,讲师,主要从事微生物酶制剂开发及其应用的教学与研究工作。

的培养箱中培养,待菌落长出后,采用常规的稀释涂布法进行菌株的分离和纯化^[4],培养嗜热菌的方法同文献^[3]。

1.5 形态观察与生理生化鉴定

1.5.1 形态观察

将培养 12~18 h 的分离菌进行革兰氏染色,确定革兰氏属性。菌体形态特征观察的方法主要参考文献^[4,5]。

1.5.2 生理生化鉴定

生理生化的鉴定主要参照文献^[5~7]进行。

1.6 16S rDNA 序列分析

将待测的菌株在液体 CM 培养基中 75℃ 振荡培养 24h 后,收集新鲜菌体用溶菌酶法提取总 DNA^[8],16S rDNA 引物按文献^[9]报道序列,该引物为 16S rDNA 最保守的核苷酸序列,可以扩增供试菌株几乎全部 16S rDNA 序列,设计的通用引物序列如下:

Primer1:

5'-AGAGTTGACATGCCTCTCAG-3'

Primer2:

5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'

Primer 2 由上海生物工程有限公司合成。用 Primer 1 和 Primer 2 进行 PCR 扩增 16S rDNA,扩增参数为: 94℃ 2min, 然后以 94℃ 30s, 50℃ 1.5min, 72℃ 2min 为一个循环,共扩增 30 个循环。PCR 产物经纯化(96 孔 PCR 产物纯化试剂盒 SK1299 购自上海生物工程有限公司)后,用 T4 DNA 连接酶与 pUC18-Tm 载体进行连接,委托上海生物工程有限公司进行测序。所得序列与 GenBank 序列数据库中相关属种进行比较,以确定该菌株的分类地位。

2 结果与分析

2.1 菌体培养及形态特征

从热泉中分离得到 9 株嗜热菌,选择其中菌落比较大、生长情况良好的一株编号为 XZ2K2 的嗜热菌株进行初步鉴定。

XZ2K2 菌株的菌落为白色不规则圆,有时稍显淡黄色,不透明,表面光滑。革兰氏染色阳性,杆菌,长度为 1~2μm,宽度为 0.05~0.1μm;无芽孢,无鞭毛,其形态如图 1 所示。

2.2 生理生化特征

2.2.1 XZ2K2 菌株的生长温度

图 2 结果显示,XZ2K2 菌株的生长温度范围是 40~85℃,低于 40℃ 或高于 85℃ 都不生长,在 40℃、85℃ 下生长极度贫乏,最适生长温度是 70~75℃。

2.2.2 菌株 XZ2K2 生长的 pH 值范围

图 3 结果显示,XZ2K2 菌株生长 pH 值的范围是 5.0~8.5,在 5.0 和 8.5 下生长十分的缓慢,低于 5.0 或高于 9.0 条件下不生长,最适的生长 pH 值为 7.0~7.5。



图 1 菌株 XZ2K2 的形态

Fig. 1 The shape of the strain XZ2K2

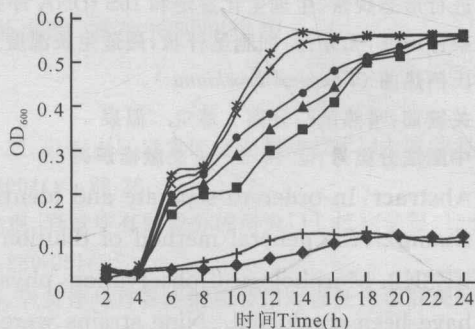


图 2 菌株 XZ2K2 在不同温度下的生长情况

Fig. 2 Effect of different temperature on growth of XZ2K2

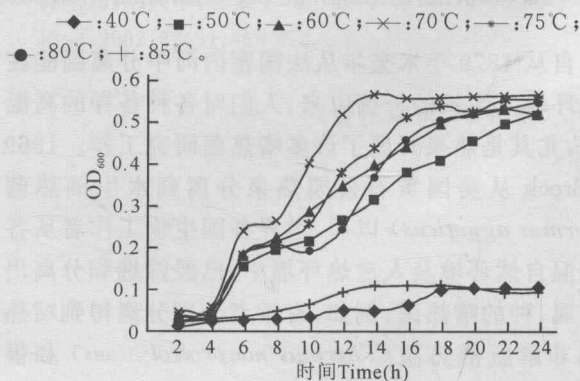


图 3 菌株 XZ2K2 在不同 pH 值下的生长情况

Fig. 3 Effect of different pH on growth of XZ2K2

2.2.3 菌株 XZ2K2 其它生理生化特征

从表 2 可以看出,XZ2K2 菌株专性好氧,接触酶为阳性,氧化酶为阴性。甲基红为阳性、V-P 和吲哚反应均为阴性,能利用葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖等多

种糖类,能以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、尿素、谷氨酰胺等作为唯一氮源。XZ2K2的这些生理生化特征与*T. brockianus* YS380^T菌株基本相同^[10~12]。

表1 菌株XZ2K2及*T. brockianus* YS380^T的主要生理生化特征比较*

Table 1 The Physiological and biochemical characteristics of strain XZ2K2 and *T. brockianus* YS380^T

特征 Characteristics	XZ2K2	<i>T. brockianus</i> YS380 ^T [10~12]
革兰氏反应 Gram action	+	+
接触酶 Catalase	+	w
氧化酶 Oxidase	-	w
厌氧生长 Anaerobic	-	+
V-P	-	w
V-P	-	w
淀粉水解 Amylolytic	+	+
硝酸盐还原 Nitrate deoxidize	+	+
吲哚 Indole	-	w
柠檬酸盐利用 Citrate utilize	+	+
荧光产生 Fluorescence	-	-
甲基红 Methyl Red	+	+
纤维素分解 Fibrin analyze	-	-
产氨 Ammonia	+	w
脲酶 Urease	-	w
脂酶 Lipase	-	w
牛奶分解 Creamery analyze	-	w
脓青素 Pyocyanin	-	w

*: + 阳性, - 阴性, w 不确定。+ positive, - negative, w incertitude.

2.3 XZ2K2 菌株的 16S rDNA 的 PCR 产物及其产物测序

菌株 XZ2K2 的 16S rDNA 的 PCR 产物的电泳结果如图 4 所示。

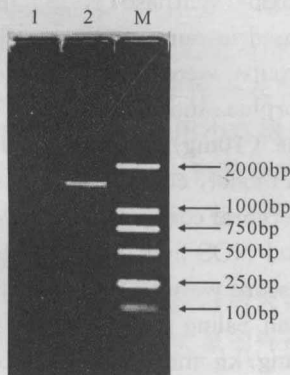


图4 菌株XZ2K2的16S rDNA的PCR产物电泳图

Fig. 4 The agarose gel electrophoresis of the PCR product of 16S rDNA from strain XZ2K2

1. 没有模板的PCR产物, 2. 16S rDNA的PCR产物, M. DNA标准DL2000.

1. PCR product without template, 2. PCR product of 16S rDNA; M. DNA Marker DL2000.

图4的电泳结果显示PCR扩增片段大小约为1500bp,与预期大小一致。菌株XZ2K2的16S rDNA序列,与GenBank中菌株*T. brockianus* (登记号: Y18409.1)的16S rDNA有99%的一致性。

3 结束语

根据XZ2K2菌株的形态特征、生理生化特征,对照文献[5, 7],初步确定为布氏栖热菌(*T. brockianus*)。16S rDNA序列测定结果也支持这一结论。

研究嗜热菌的一个主要目的是研究与开发嗜热酶。嗜热菌产生的酶嗜好高温,甚至在菌体不能生存的高温环境下仍能发挥其催化活性,在工业化生产中已经得到广泛的应用。Olafur Fridjonsson等^[13]从布氏栖热菌(*T. brockianus*)中克隆并表达了新的耐热 α -牛乳糖酶基因。对布氏栖热菌(*T. brockianus*)的进一步研究将有可能开发出更多的耐热酶,应用于食品、化学、制药、造纸、纸浆和废水处理等工业^[13]。本研究中,已经成功的从菌株XZ2K2中克隆到海藻糖合成酶基因片段和耐热的葡聚糖蔗糖酶基因(另文发表),这些基因的克隆对构建高产海藻糖基因工程菌及获得耐热,高产量并且后提取工艺较为简化的右旋糖酐(代血浆)基因工程菌具有深远的意义。

参考文献:

- [1] 李聪颖,曾晓莉.福州温泉嗜热菌的分离与鉴定[J].福州大学学报:自然科学版,2003,31(4):499-502.
- [2] 王锐萍,杨灵更.海南琼海温泉嗜热菌研究[J].海南师范学院学报:自然科学版,2001,14(3):94-96.
- [3] 杨国俊,黄日波.产淀粉酶和蛋白酶中度嗜热菌的分离、筛选及培养[J].广西农业大学学报,1995,14(3):243-247.
- [4] 范秀容,李广武,沈萍.微生物学实验[M].第2版.北京:高等教育出版社,1989.
- [5] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [6] 和致中,彭谦,陈俊英.高温菌生物学[M].北京:科学出版社,2000.
- [7] 布坎南RE,吉本期NE.伯杰氏细菌鉴定手册[M].第8版.北京:科学出版社,1984.
- [8] FM奥斯伯,RE金斯顿,JG赛德曼,等.精编分子生物学实验指南[M].北京:科学出版社,1998:39-40.
- [9] WEISBURG WG, BARNS SM, LANE DJ, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.

(下转第333页 Continue on page 333)

- [11] DZOLJIC M R, DE VRIES R. Oxide synthase inhibition reduces wakerulness [J]. *Neuropharmacology*, 1994, 33 (11):1505-1509.
- [12] OKERE CO, KABA H. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory recognition memory in mice [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12 (12): 4552-4556.
- [13] GARTHWAITE J, CHARLES S L, CHESEWILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests roles as intercellular messenger in the brain [J]. *Nature*, 1988, 336(6197):385-388.
- [14] LUO D, KANEZEVICH S, VINCENT S R. N-methyl-D-aspartate induced nitric oxide release: an invivo microdialysis study [J]. *Neuroscience*, 1993, 57(4):897-900.
- [15] 咸云淑, 徐纳新, 赵恒兰, 等. 氯胺酮对辣椒素致敏大鼠的超前镇痛作用 [J]. *吉林医学*, 2004, 25(2):29-30.
- [16] 于洪波, 莫宁, 戴体俊. 氯胺酮对大鼠交感神经节 NO 与 NOS 的抑制作用 [J]. *国际医药卫生导报*, 2006, 12 (4):4-6.
- [17] GELLEY H T, WEBSTER N R. Brain nitric oxide synthase activity is decreased by intravenous anesthetics [J]. *Anesth Analg*, 1996, 83(3):591-594.

(责任编辑: 韦廷宗)

(上接第 329 页 Continue from page 329)

- [10] RALPH A D. WILLIAMS, KELVIN E SMITH. DNA relatedness of thermus strains, description of thermus brockianus sp nov, and proposal to reestablish thermus thermophilus (Oshima and Imahori) [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45 (3): 495-499.
- [11] RALPH A D. WILLIAMS, KELVIN E SMITH. *Thermus oshimai* sp nov, isolated from hot springs in Portugal, Iceland, and the Azores, and comment on the concept of a limited geographical distribution of thermus species [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(2):403-408.
- [12] ANA PAULA CHUNG, FRED A RAINEY. *Thermus igniterrae* sp nov and *Thermus antranikianii* sp nov, two new species from Iceland [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 209-217.
- [13] OLAFUR FRIDJONSSON, HILDEGARD WATZLAWICK. Cloning of the gene encoding a novel thermostable α -Galactosidase from thermus brockianus ITI360 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9):3955-3963.
- [14] 吴军森, 林炜铁, 杨继国. 嗜高温酶的研究及应用 [J]. *广州食品工业科技*, 2002, 19(1):60-62.

(责任编辑: 韦廷宗 邓大玉)