

滇西二高温温泉中 *Thermus* 高温菌的 16S rRNA^{*}

郭春雷, 王涛, 祝伟, 柴丽红, 张东华, 崔晓龙, 徐丽华, 彭谦
(教育部微生物资源开放研究重点实验室, 云南大学 云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091)

摘要: 通过对滇西二高温温泉纯培养和免培养法获得的 *Thermus* 菌株序列进行 16S rDNA 系统发育及 16S rRNA 二级结构比较, 发现二高温温泉中至少存在 *Thermus* 属的 2 个潜在新种, 它们在系统发育树上形成 1 个独立的地理族群分支, 它们的 16S rRNA helix10 二级结构也与其它地区的 *Thermus* 属菌株不同, 形成明显的地域进化特征。

关键词: 滇西; *Thermus*; 16S rRNA; 二级结构

中图分类号: Q 71 文献标识码: A 文章编号: 0258-7971(2003)05-0458-05

腾冲县与龙陵县毗邻, 位于云南省西部, 与缅甸接壤, 在地质构造上处于印度板块与欧亚板块碰撞交汇地带, 是地中海-喜马拉雅地热带的重要组成部分, 以发育的断裂构造以及年青火山活动为特征, 是中国大陆上著名的火山地热区, 热海温泉位于东经 98°26', 北纬 24°57', 海拔高度 1120~1893 m, 邦纳掌温泉位于东经 98°39', 北纬 24°39', 海拔 1280 m. 二泉相距约 70 km, 最大热水温度超过 97℃, 自上世纪 80 年代以来, 不断有生物学工作者到此进行资源考察^[1-5].

Thermus 是一类好氧, 营异养生活的高温菌, 最适生长温度在 70℃ 左右, pH 中性或弱碱性. 菌体短杆状, 有时形成长丝状体, 不产芽孢, 革兰氏染色阴性. 由于细胞内具有类胡萝卜素, 在固体培养基上菌落通常显黄色, 但也有不产色素和产褐色色素的菌株被分离到. 自 1969 年 Brock 首先在美国黄石国家公园发现 *Thermus aquaticus*^[6] 以来, 先后从世界各地陆地热泉、海底热泉、人工高温环境如热水器、洗衣房、甚至堆积物中都分离到 *Thermus* 属菌株. 迄今为止, 已经有效发表的 *Thermus* 属的种有 *T. aquaticus*^[6], *T. filiformis*^[7], *T. thermophilus*^[8, 10], *T. scotoductus*^[9], *T. Brockianus*^[10], *T. oshimai*^[11], *T. igniterrae*^[12], *T. antranikianii*^[12].

我们在对腾冲热海、龙陵邦纳掌温泉高温菌进

行考察时, 通过对纯培养(Culture dependent method)和免培养法(Culture independent method)获得的 *Thermus* 属菌株的 16S rRNA 序列进行分析, 发现它们与从世界其它地区得到的 *Thermus* 属种序列相比, 形成 1 个独立的地理族群, 这个族群至少由 2 个潜在新种构成. 它们的 16S rRNA helix10 二级结构也明显不同于其它 *Thermus* 属菌株, 具有特殊的茎环结构, 形成明显的地域进化特征。

1 材料和方法

1.1 序列来源 菌株 RH99-GF7504, RH-914, RH-1214, RH-1514 采用纯培养法分离自腾冲热海, GeneBank 登录号分别是 AF331969, AF521186, AF521187, AF521188. 菌株 DFQ6, DFQ28, DFQ34, DFQ37 采用免培养法分离自龙陵大沸泉, GeneBank 登录号分别是 AY082363, AY082364, AY082365, AY082366. *T. aquaticus* (L09663), *T. filiformis* (L09667), *T. thermophilus* (X07998), *T. scotoductus* (Y18410), *T. Brockianus* (Y18409), *T. oshimai* (Y18416), *T. igniterrae* (Y18406), *T. antranikianii* (Y18411), *Aquifex pyrophilus* (M83548) 为所选有效发表种和外群种, 代表菌株的 GeneBank 序列登录号见括号中。

1.2 16S rDNA 序列系统发育分析及 16S rRNA

* 收稿日期: 2002-12-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3996003); 云南省应用基础基金资助项目(98C095M)。

作者简介: 郭春雷(1978-) 男, 山东人, 硕士生, 主要从事微生物资源学方面的研究。

局部序列二级结构分析 用 Blast 程序在 GeneBank 中进行相似性比较, 列出最大相似性序列用 ClustalX 进行系统发育分析, 用邻接法^[13]构建系统进化树.

16S rRNA 二级结构分析, 用 RNAstructure 3.71 根据 Zuker 算法^[14], 按最低自由能原理进行二级结构绘图.

2 结果与讨论

2.1 从热海和邦纳掌温泉获得的 *Thermus* 菌株的 16S rDNA 序列在系统发育树上形成一独立的地理簇群分支 以 *Aquifex pyrophilus* (M83548)

为外群构建的供试 *Thermus* 菌株 16S rDNA 序列在种水平上的系统发育树如图 1 所示. 从图 1 可看出, 无论是用纯培养法还是免培养法从热海和邦纳掌温泉中得到的 *Thermus* 属菌株序列, 与从世界其它地区得到的 *Thermus* 属菌株序列相比, 在 16S rDNA 系统发育树上形成 1 个独立的地理簇群分支(A, B, C). 这个簇群分支由 A, B, C 3 个小分支构成. A, B 与 C 之间或 A, B, C 与系统发育树上其它有效发表的序列之间差异度均大于 3%. 按照 16S rDNA 差异度大于 3% 时可以认为是新种的标准^[15], 推测二温泉中的 *Thermus* 菌株至少由 2 个新种组成, 其分类研究结果将另文报道.

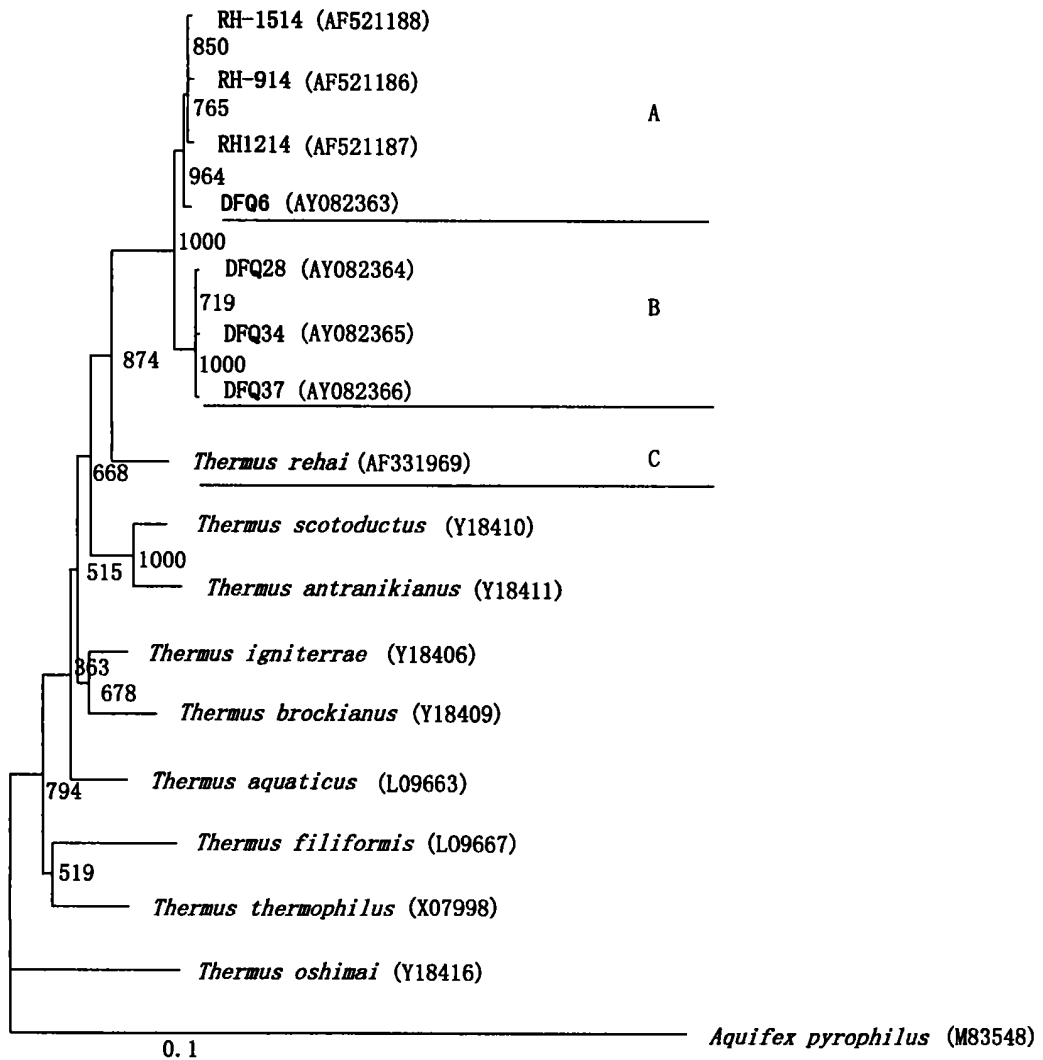


图 1 热海、邦纳掌温泉 *Thermus* 属菌株与有效发表的 *Thermus* 属菌株构建的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 The 16S rDNA phylogenetic tree of eight validly described *Thermus* strains and strains or clones from Rehai, Bangnazhang hot springs

2.2 分离自热海、邦纳掌温泉的 *Thermus* 属菌株具有特殊的 16S rRNA helix10 二级结构 图 2 是分离自热海、邦纳掌温泉的 *Thermus* 属菌株和目前有效发表的世界其它地区 *Thermus* 属菌株的 16S rRNA helix 10 的二级结构图. 该结构相当于 *E. coli* 16S rRNA 179~210 碱基序列区. 从表内的二级结构图可以比较直观地看出, 来自热海、邦纳掌温泉的 RH-1214, RH-1514, DFQ37 三序列有相同的

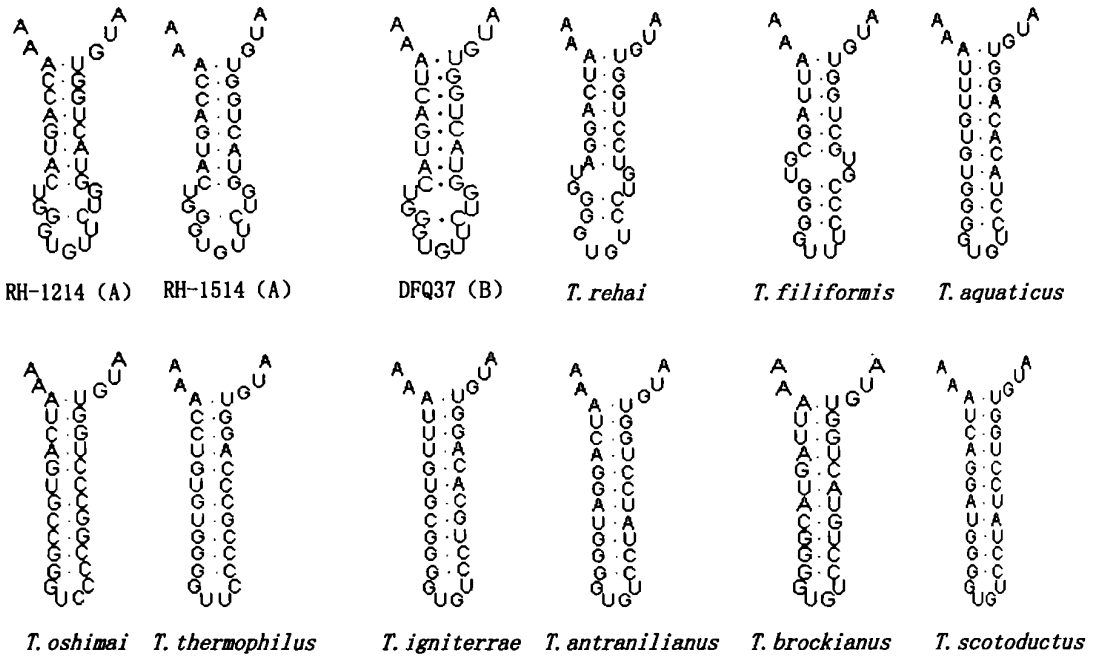


图 2 热海、邦纳掌温泉 *Thermus* 菌株与世界其它地区 *Thermus* 菌株的 16S rRNA helix10 的二级结构图

Tab. 1 Comparative secondary structures of the 16S rRNAs of Rehai *Thermus* phylotypes and some other *Thermus* species at positions helix 10

2.3 *Thermus* 属菌株形成种特异性可能与地理隔离和地质环境不同有关 Williams 通过 DNA-DNA 杂交^[16], Hudson 通过数值分类^[17] 都曾得出相似的结论: 即分离自同一地热区的 *Thermus* 属菌株具有类似特性, 并且聚在一起. 据此, Williams^[17] 提出 *Thermus* 属高温菌有限地理分布概念, 认为不同地区来源的同一种 *Thermus* 菌株, 16S rRNA 序列高度相似, 并且有种特异性区域. Leonilde^[18] 通过脉冲场凝胶电泳进行基因组及 rDNA 基因限制性片段多态分析认为, 同种 *Thermus* 菌株, 特别是来源相同的菌株其基因组结构相似, 而不同 *Thermus* 种之间基因组结构存在较高多样性. 我们的研究工作也证实了上述观点.

我们认为, 虽然全球地热活跃区多位于板块碰

撞交汇地带, 但并不呈连续分布, 相对分散的各地热生态系统成为全球生态系统中的一座座孤岛. 特别是像热海和邦纳掌这样处于离海岸非常遥远的内陆温泉, 其中的 *Thermus* 菌株可能由于长期的地理隔离与当地高温地质环境的影响而独立进化, 并形成滇西这 2 个地热生态系统中 *Thermus* 物种的特殊进化群体和结构特征.

2.4 纯培养或免培养法获得的菌株序列都反映了区内属种的特征 虽然我们测定的 16S rDNA 序列较少, 还不能充分反映二温泉中 *Thermus* 种的多样性. 但有趣的是无论是纯培养或免培养法获得的菌株序列, 都没有进入其它分支, 而是聚成一独立的簇群, 行成 1 个地理分支. 同时, A, B 与 C 分支之间及 A, B, C 与其它 *Thermus* 序列之间大于种水平

的 16S rDNA 序列差异也提示,在这 2 个地热区仍有存在 *Thermus* 新种的可能.利用分子生态学方法,设计种、属特异性探针,研究温泉中的微生物多样性也是切实可行的.

参考文献:

- [1] 钟慧芳,陈秀珠,李雅芹,等.一个嗜酸嗜热细菌的新属——硫球菌属[J].微生物学报,1982,22(1):1—7.
- [2] 和致中,彭谦,陈俊英,等.云南温泉高温菌的研究Ⅷ.腾冲酸性高温泉中的极端嗜热性芽孢杆菌[J].微生物学报,1989,29(3):161—165.
- [3] 中国科学院青藏高原科学考察队.腾冲地热[M].北京:科学出版社,1989.
- [4] XUE Y, XU Y, LIU Y, et al. *Thermoanaerobacter tengchongensis* sp nov, a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China[J]. Int J of Syst Evol Microbiol, 2001, 51(4): 1335—1341.
- [5] LIN L B, CHEN C Y, PENG Q, et al. *Thermus reahi* sp nov, isolated from Rehai of Tengchong, Yunnan Province, China[J]. Journal of Basic Microbiology, 2002, 42(5): 339—346.
- [6] BROCK T D, FREEZE H. *Thermus aquaticus* gen n, a nonsporulating extreme thermophile[J]. Journal of Bacteriology, 1969, 98: 289—297.
- [7] HUDSON J A, MORGAN H W, DANIEL R M. *Thermus filififormis* sp nov a filamentous caldactive bacterium[J]. Int J Syst Bacteriol, 1987, 37(4): 431—436.
- [8] OSHIMA T, IMAHORI K. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) Comb nov, a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spring[J]. Int J Syst Bacteriol, 1974, 24(1): 102—112.
- [9] KRISTJANSSON J K, HJORLEIFDOTTRI S, ALFREDSSON V T, et al. *Thermus scotoductus* sp nov, a pigment producing thermophilic bacterium from hot water in Iceland and including *Thermus* sp XI[J]. Syst Appl Microbiol, 1994, 17(1): 44—50.
- [10] WILLIAMS R D, SMITH K E, WELCH S G, et al. DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus brockianus* sp nov and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (oshima and imahori) [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(3): 495—499.
- [11] WILLIAMS R D, SMITH K E, WELCH S G, et al. *Thermus oshimai* sp nov, isolated from hot springs in Portugal, Iceland and the Azores, and comment on the concept of limited geographical distribution of *Thermus* species[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46(2): 403—408.
- [12] CHUNG A P, RAINEY F A, VALENTE M, et al. *Thermus igniterrae* sp nov and *Thermus antranikianii* sp nov two new species from Iceland[J]. Int J of Syst Evol Microbiol, 2000, 50(1): 209—217.
- [13] SAITOU N, NEI M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. Molecular Biology Evolution, 1987, 4(4): 406—425.
- [14] MATHEWS D H, SABINA J, ZUKER M, et al. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 288(5): 911—940.
- [15] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: a place for species definition in bacteriology and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(4): 846—849.
- [16] COSTA M S. Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology[M]. London: Elsevier Applied Science, 1989.
- [17] HUDSON J A, MORGAN H W, DANIEL R M, et al. Numerical classification of *Thermus* isolates from globally distributed hot springs[J]. Syst Appl Microbiol, 1989, 11: 250—256.
- [18] LEONILDE M M, DA COSTA M S, SÁ CORREIAI. Comparative genomic analysis of isolates belonging to the six species of the genus *Thermus* using pulsed field gel electrophoresis and ribotyping[J]. Arch Microbiol, 1997, 168(1): 92—101.

The 16S rRNA of *Thermus* thermophiles from two high temperature hot springs of West Yunnan

GUO Churlei, WANG Tao, ZHU Wei, CHAI Lihong, ZHANG Dong-hua,

CUI Xiao-long, XU Lihua, PENG Qian

(The Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, P. R. China

Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: Based on culture dependent method and culture independent method, several *Thermus* 16S rDNA sequences were amplified. The results of 16S rDNA phylogenetic analysis and 16S rRNA secondary structure comparison showed that there are at least two novel *Thermus* species in the two hot springs and they constituted an independent cluster on the phylogenetic tree. The secondary structure of 16S rRNA helix 10 with novel evolution characters also showed differences with other *Thermus* species.

Key words: West Yunnan; *Thermus*; 16S rRNA; secondary structure

(上接第 452 页)

Abstract The survival rate, GR activity and the content of heat stable protein and proline of maize seedlings were surveyed after the seeds were soaked with CaCl₂ solution and/or the seedlings were shocked with heat prior to chilling treatment. It was found these parameters of the heat shocked seedlings were higher than that of contrast, and the highest ones of them were is that of seedlings which were treated by heat shock associated with CaCl₂ solution. So it is suggested heat shock pretreatment can raise the resistance of plants to chilling, and Ca²⁺ can strengthen this function of heat shock.

Key words: maize seedlings; heat shock; CaCl₂