

研究简报

保山地区碱性温泉中的高温菌*

和致中 彭谦 马俊 陈俊英

(云南省微生物研究所, 昆明)

THERMOPHILIC BACTERIA IN ALKALINE HOT SPRINGS
OF BAOSHAN REGION, YUNNAN

He Zhizhong Peng Qian Ma Jun and Chen Junying

(Yunnan Institute of Microbiology, Kunming)

关键词 高温菌, 温泉, 芽孢杆菌

Key words Thermophilic bacteria, Hot spring, *Bacillus*

保山地区位于云南省西部, 是全省温泉分布比较密集的地区之一。温泉作为地热资源已引起有关部门的重视, 70年代已进行了地热资源的调查和开发利用研究。但是对于温泉中潜在的高温菌资源, 尚未进行过系统考察、研究。现将我们对于保山地区 pH 8.0 以上的高温温泉中的高温菌研究结果报告于后。

材料与方 法

(一) 样品的采集

采集温泉水样用两种容器: 一种是带翻口胶塞的 100 毫升血清瓶, 所采水样用于分离高温菌; 另一种是 1 公斤容量的塑料桶, 所采水样用于化学分析。

(二) 培养基与培养方法

本文用 1#^[1]、7#^[2]和 ppy^[1] 3 种培养基, pH 7.2—8.5, 置 83-03 型恒温水浴摇床(581 厂造), 60—70℃, 100r/min 振荡培养。培养至培养液变混浊(一般 2—3 天)后, 在相应的琼脂平板上划线分离, 直至长出单个菌落纯化为止。培养过程中一般用聚乙烯袋保湿。

(三) 水样化学分析方法

Cd、Zn、Be 等 11 个微量元素用 Beckman SMIII A 型直流等离子光电直读光谱仪测定。K、Na 用火焰发射光谱法, Ca、Mg 用原子吸收分光

光度法; 两者均用日立 170-50 型原子吸收仪测定。SO₄²⁻ 含量以文献[1]方法测定。

(四) 生理生化特征的鉴定

接触酶试验按作者前述方法^[3], 淀粉酶试验按文献[4]进行, 其它生理生化特征按文献^[2, 5]进行鉴定。

(五) 菌株的分类鉴定

在需氧条件下形成芽孢的杆状菌, 按戈登(Gordon)的芽孢杆菌检索表^[5]和下述嗜热性芽孢杆菌检索表进行检索鉴定。

嗜热性芽孢杆菌检索表

嗜中性或微碱性

1. 产生黄色色素

1). 最适生长温度 80℃ (最高生长 85℃), pH 7.5—8.5 *Bacillus caldotenax*^[5]

2). 最适生长 72℃ (最高 82℃), pH 6.0—8.0 *caldolyliticus*^[5]

2. 不产生黄色色素

1). 最适生长 60—65℃, 在 pH 6.0 以下不生长, 可利用糖 *stearothermophilus*^[5]

2). 最适生长温度 70℃, pH 6.0—7.0, 利用苯酚作碳源生长, 不利用糖 *schlegelii*^[1]

嗜酸性, pH 7.0 以上不生长

* 国家自然科学基金资助项目。
1987 年 7 月 20 日收到。

表 1 温泉水样的化学分析

Tab. 1 Chemical contents of water from hot springs (ppm)

温泉 Hot spring 元素 Element	上 硝	硝 塘	大 滚 锅	怀 胎 井	鼓 鸣 泉	眼 镜 泉	蛤 蟆 嘴	澡 塘 河
Cd	0.800	0.000	0.900	2.800	1.800	1.200	3.100	2.600
Zn	19.10	10.00	43.400	5.200	9.600	5.900	4.600	26.100
Be	0.990	1.300	3.500	1.700	1.800	3.000	6.100	2.500
Cu	0.970	1.300	2.600	0.970	0.900	0.400	1.000	1.500
Ti	0.000	0.000	0.000	2.900	2.700	2.400	0.000	0.000
Mn	5.100	15.100	7.500	78.50	2.700	13.50	286.00	20.300
Co	0.700	1.700	0.000	0.600	0.600	0.200	0.900	1.200
Ni	0.000	0.300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.800	0.000
Cr	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pb	4.100	6.600	6.100	5.300	6.600	5.900	10.10	6.300
V	0.900	0.900	1.900	1.400	1.800	1.500	1.700	0.700
K	18.509	16.268	115.79	79.680	95.035	97.11	51.875	59.760
Na	189.823	192.1	816.96	507.84	622.40	691.84	323.841	428.88
Ca	5.378	8.604	1.434	5.378	2.510	3.944	1.831	8.604
Mg	0.048	0.410	0.000	0.030	0.000	0.000	0.663	0.199
SO ₄ ⁻ *	0.003	0.001	0.003	0.003	0.000	0.000	0.001	0.003

* mg/l

1. 最适生长温度 60—65℃…… *acidocaldarius*^[8]
2. 60℃以上不能生长……
…… Acido-thermophilic strains
…… of *coagulans*^[6,16]

结果与讨论

1. 温泉水样的化学组成(表 1)

从表 1 看出, 分析的 8 个碱性温泉水样有两个显著特点: 1. 所有温泉水不含 Cr, 多数温泉不含 Ni; 2. Na 含量高, 189.83—816.70ppm, 平均 476.70 ppm。

2. 菌株的主要鉴别特征(表 2)

3. 菌株来源与分类鉴定(表 3)

对表 2 和表 3 结果作如下补充说明:

① 序号为 1—21 的分离物, 它们的鉴别特征与 *Bacillus stearothermophilus* 相符, 但 8690; 8684, 86138, 86297 A, 86300 B 5 株菌在厌氧琼脂内生长阳性一项与 *B. stearothermophilus* 不同, 待测定 DNA 中 G + C 百分组成后再考虑是否将这 5 株菌从 *B. stearothermophilus* 划出, 确定新的分类地位。

② 86300 A 的主要鉴别特征与 *stearothermo-*

philus 相同, 可是产生黄色色素、最大生长温度达 80℃, 这又不同于 *stearothermophilus* 而与 *caldolyticus* 相符, 因此将 86300A 鉴定为 *Bacillus caldolyticus*。

③ 86142, 8688—01, 86148 3 个菌株的生物学特征与芽孢杆菌检索表所列的 *B. coagulans* 的鉴别特征虽相符, 但 *B. coagulans* 的最高生长温度为 55—60℃, 而上述 3 株菌的最高生长温度达 70—75℃。因此将它们暂定为 “Extremely thermophilic strains of *B. coagulans*”。

④ 序号为 26—31 的 6 个菌株的鉴别特征, 既不同于 *B. stearothermophilus*, 也不同于 *B. coagulans* 和检索表所列各种的特征, 如 V-P 阴性但在厌氧琼脂生长和 pH 5.7 生长均为阳性, 生长温度范围为 45—75℃, pH 范围 5.0—8.5 或 5.0—10.0。因此将以上 6 个菌株放在芽孢杆菌属中, 种名待定: *Bacillus* spp。

⑤ 86319 系一株非芽孢菌, 生长温度范围 35—70℃, pH 范围 6.0—10.0, 具有周身鞭毛, V-P 反应阴性, 在厌氧琼脂内和 pH 5.7 不能生长。此菌的分类鉴定将另文报告。

4. 在龙陵县和腾冲县的 25 个温泉水样中, 除

表2 32株菌的重要生物学特性

Tab. 2 Main biological characteristics of 32 bacterial strains

序 号 Ordinal number	菌株编号 Number of strain	V-P	厌氧生长 Anaerobic growth	生长 Growth				生长: pH5.7 Growth: pH5.7	生长: Azide Growth(0.02%)	淀粉水解 Amylolytic	硝酸盐还原 Nitrate reduction
				最高温度 T max. (°C)	最低温度 T min. (°C)	最高 pH max.	最低 pH min.				
1	86132	—	—	70	45	10	6.0	—	—	+	+
2	86296	—	—	70	35	11	7.0	—	—	+	—
3	86297B	—	—	70	35	11	6.0	—	—	+	—
4	86136	—	—	75	45	10	6.0	—	+	—	+
5	86139	—	—	75	45	10	6.0	—	+	—	+
6	86140	—	—	75	45	10	6.0	—	+	—	+
7	86140W	—	—	75	45	10	6.0	—	+	—	+
8	8682-1	—	—	75	45	9	6.0	—	+	—	+
9	8682-2	—	—	75	45	9	6.0	—	+	—	+
10	86303	—	—	70	30	11	7.0	—	+	—	—
11	86308	—	—	75	45	10	6.0	—	+	—	+
12	86144	—	—	75	45	10	6.0	—	+	—	+
13	8694	—	—	75	45	9	6.0	—	+	—	+
14	86150	—	—	75	40	11	7.0	—	+	—	+
15	86327	—	—	75	45	10	6.0	—	+	—	—
16	8690	—	+	75	45	9	6.0	—	+	—	+
17	8684	—	+	70	45	9	6.0	—	+	—	+
18	86138	—	+	75	45	9	6.0	—	+	—	+
19	86297A	—	+	70	40	10	7.0	—	—	+	—
20	86300B	—	+	70	35	11	6.0	—	+	+	—
21	86309	—	—	75	35	10	7.0	—	+	—	—
22	86300A	—	—	80	40	11	6.0	—	+	—	—
23	8688-1	+	+	75	45	9	5.0	+	+	—	+
24	86142	+	+	70	45	9	5.0	+	+	—	+
25	86148	+	+	75	45	8	5.0	+	+	—	+
26	86302	—	+	75	45	10	5.0	+	+	+	—
27	86311	—	+	75	45	10	5.0	+	+	—	+
28	8688-2	—	+	75	45	9	5.0	+	+	+	+
29	8692	—	+	75	40	10	5.0	+	—	+	+
30	86320	—	+	75	45	8.5	5.0	+	+	—	+
31	86323	—	+	75	45	10	5.0	+	+	—	—
32	86319	—	—	70	35	10	6.0	—	+	+	—

* 在 0.1% Azide 中仍生长所有菌株除 22 号产生桔黄色素外,其他均无色。

怀胎井温泉中分离出非芽孢菌外,都只分离到芽孢杆菌;可见这些温泉中的细菌种群组成是比较单一的。这种种群组成的单一化,与温泉温度高(85—100℃)、偏碱性(pH 8.0—9.0)有关。在这样的极端环境条件下,似乎周围人为环境对温泉细菌种群影响不大。如大滚锅、鼓鸣泉、怀胎井等温泉附近有一县中医院,但它们的细菌种群组成

并不复杂。诚然,本文并不排除随着培养技术的改进和发展,在这样的高温温泉中分离出多种细菌种群的可能性。

5. *Thermus* 菌在美国、日本、苏联、新西兰、冰岛等国温泉中都已分离到^[10-14],但本文使用了用于分离 *Thermus* 菌的 1[#]、7[#] 和 ppy 3 种培养基,几种培养条件,都没有从上述温泉中分离到 *The-*

表 3 温泉高温菌的分离与分类鉴定

Tab. 3 Isolation and classification of thermophilic bacteria in hot springs

样品来源 Sampling locality	样品数 Number of samples	分离条件 Condition of isolation				分离菌株数 Number of strains isolated					
		温度(°C) Temperature	pH	培养基 Medium	rpm	总数 Total	<i>Bacillus</i> <i>stearothermo-</i> <i>philus</i>	<i>caldolyticus</i>	Extremely thermophilic strains of <i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus</i> spp.	Asporous bacilli
龙陵县温泉	3	70	8.0	7#	100	5	5	0	0	0	0
	3	70	7.2	ppy	100	5	5	0	0	0	0
	1	70	8.0	1#	100	1	1	0	0	0	0
	2	60	7.2	ppy	100	2	1	0	0	1	0
	1	70	7.5	7#	100	2	2	0	0	0	0
	1	60	7.2	7#	100	1	0	0	1	0	0
	11					16	14	0	1	1	0
腾冲县温泉	3	60	7.2	ppy	100	3	1	1	0	1	0
	3	70	7.5	7#	100	5	2	0	1	2	0
	4	70	8.0	7#	100	5	2	0	1	0	2*
	1	70	8.5	7#	100	1	1	0	0	0	0
	1	65	8.5	ppy	100	1	0	0	0	1	0
	2	65	7.5	ppy	100	2	1	0	0	1	0
	14					17	7	1	2	5	2
	25					33	21	1	3	6	2

* 1 株失传

rmus。是何原因,有待研究。

6. 1[#]、7[#]、ppy 3 种培养基可用于温泉中嗜热性芽孢菌的分离培养。

参 考 文 献

[1] 中国医学科学院卫生研究所, 1983。水质分析法。88—89 页。人民卫生出版社。

[2] 王大耜, 1977。细菌分类基础。126—130 页。科学出版社。

[3] 和致中、马俊、彭谦、陈俊英, 1985。极端嗜热细菌的接触酶试验。工业微生物, 15(4): 5—6。

[4] 和致中、马俊、陈俊英、彭谦, 1985。一种产糖化酶高温菌的筛选方法。微生物学通报, 12(3): 136—137。

[5] 蔡妙英、刘聿太、成立克译, 1983。芽孢杆菌属。19—108 页。农业出版社。

[6] Belly R. T. & Brock, T. D., 1974. Widespread occurrence of acidophilic strains of *Bacillus coagulans* in hot springs. *J. Appl. Bact.*, 37(1): 175—177.

[7] Castenhols, R. W., 1969. Thermophilic Blue-Green Algae and the thermal environment. *Bact. Rev.*, 33(4): 476—504.

[8] Darland, G. & Brock, T. D., 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen. Microbiol.*, 67(1): 9—15.

[9] Heinen, U. J. & Heinen, W., 1973. Characteristics and properties of a caldo-active Bacterium producing extracellular enzymes and two related strains. *Arch. Microbiol.*, 82(1): 1—23.

[10] Kristjansson, J. K. & Alfredsson, G. A., 1983. Distribution of *Thermus* spp. in Icelandic Hot Spring and a Thermal Gradient. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(6): 1785—1789.

[11] Loginova, L. G., Egorova, L. A., Golovacheva, R. S. & Seregina, L. M., 1984. *Thermus ruber* sp. nov., nom. Rev. Int. *J. Syst. Bact.*, 34(4): 498—499.

[12] Munster, M. J., & Munster, A. P., 1986. Isolation and preliminary taxonomic studies of *Thermus* strains isolated from Yellowstone National Park, USA. *J. Gen. Microbiol.*, 132(6): 1677—1683.

[13] Oshima, T. & Imahori, K., 1974. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov.,

- a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese Thermal Spa. *Int. J. Syst. Bact.*, **24**(1): 102—112.
- [14] Saiki, T., Kimura, R. & Arima, K., 1974. Isolation and characterization of extremely thermophilic bacteria from hot springs. *Agr. Biol. Chem.*, **38**(13): 2357—2366.
- [15] Schenk, A. & Aragno, M., 1979. *Bacillus schlegelii*, a new species of thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium oxidizing molecular hydrogen. *J. Gen. Microbiol.*, **115**(2): 333—341.
- [16] Uchino, F. & Doi, S., 1967. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agr. Biol. Chem.*, **31**(7): 817—922.