

临沧地区温泉中的嗜热性 芽孢杆菌及其特征*

彭 谦 和致中 陈俊英 马 俊

(云南省微生物研究所, 昆明 650091)

提 要

本文报道临沧地区温泉中的嗜热性芽孢杆菌及其特征。从该地区温泉中分离出 *Bacillus stearothermophilus* 和 *Bacillus thermosubtilis* sp. nov. 两个种。这些菌株都具有在自养型培养基上生长的能力。从这些温泉中没有分离出 *Thermus*。

关键词 温泉、嗜热脂肪芽孢杆菌, 高温枯草芽孢杆菌

临沧地区位于云南省西南部, 总面积 24469km²。温泉分布较为密集, 仅次于保山地区。保山地区温泉中的高温菌已有报道^[1-3], 本文报道临沧地区所属 5 个县 16 个温泉的 36 份温泉水样中的高温菌及其特征。

材 料 与 方 法

样品采集、水化学分析, 生理生化特征鉴定、菌株分类和 DNA 中 G+C mol% 含量测定等均按文献[1-4]所述方法进行。

1[#]培养基 (W/V%): NaCl 0.3, 酵母膏 0.4, 复合胺 0.8。2[#]培养基: 浓缩液 (无离子水配制, g/L): 氮氟三醋酸 1.00, NaCl 0.08, KNO₃ 1.03, NaNO₃ 6.89, Na₂HPO₄ 1.10, CaSO₄ · 2H₂O 0.60, MgSO₄ · 7H₂O 1.00, 微量元素液 5.00ml, FeCl₃ 溶液 10.00 ml; 冰箱保存, 备用。使用时用无离子水稀释 10 倍。微量元素液 (g/L): H₂SO₄ (浓) 0.50ml, MnSO₄ · H₂O 2.28, ZnSO₄ · 7H₂O 0.50, H₃BO₃ 0.50, CuSO₄ · 5H₂O 0.025, CoCl₂ · 6H₂O 0.045。用无离子水配制 FeCl₃ 溶液为 0.2905g/L。在 2[#]培养基稀释液中加入 0.1% (W/V) 酵母膏, 0.1% (W/V) 胰蛋白胍组成 7[#]培养基。用双蒸水配制 6[#]培养基 (g/L): NH₄Cl 1.0, MgSO₄ · 7H₂O 0.3, KH₂PO₄ 0.03, Na₂HPO₄ · 7H₂O 2.0, 微量矿质营养液 1.0ml, 维生素液 5.0ml, 2.5% (W/V) FeSO₄ · 7H₂O 0.03ml, 1% 溴甲酚蓝液 1.0ml, 2.5% (W/V) Na₂S 20.0ml。用无离子水配制微量矿质营养液 (g/L): 氮氟三醋酸 12.8 (用 KOH 中和至 pH 6.5), FeSO₄ · 7H₂O 0.1, MnCl₂ · 4H₂O 0.1,

* 国家自然科学基金资助项目。

1990年2月15日收到。

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.16, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, ZnCl_2 0.1, CuCl_2 0.02, H_3BO_3 0.01, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01, NaCl 1.0, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.026, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.02。维生素液由 0.05% 生物素 10ml, 0.05% 叶酸 10ml, 0.1% 盐酸吡哆醇 20ml, 0.1% 核黄素 10ml, 0.1% 硫胺素 10ml, 0.1% 烟酸 10ml, 0.1% 对氨基苯甲酸 10ml 混合后组成, 置 4℃ 冰箱保存备用。 Na_2S 溶液需常压蒸气灭菌后单独加入。

结果与讨论

1. 温泉水样的化学组成

根据分析结果, 16 个温泉水样的化学组成有以下特点: (1) 多数 (10 个) 温泉中不含 Mn, 含 Mn 的温泉含量差异很大, 低者 $2.23 \mu\text{g/L}$, 高者达 $183 \mu\text{g/L}$, 相差 90 余倍; (2) 16 个温泉中都含有 Zn、Cr、Pb、K、Na、Ca、Mg 七种元素; (3) 与其它温泉相比, 凤庆的 LC9-01 号温泉 K、Na 含量特高 (表 1)。

2. 温泉水样的来源与分类

本研究从临沧地区采集温泉水样 36 份, 按温泉的温度分为四类, 其中 60—70℃ 15 份, 占 41.7%, 91—97℃ 15 份, 占 41.7%, 其它 (即 71—90℃) 两类合计 6 份, 占 16.6%。按温泉的 pH 分为三类, 其中 pH 7.0 以上为 32 份, 占 88.9%, pH 7.0 以下仅 4 份, 占 11.1%。按温泉的生态环境可分为五类, 大部分都属于受人类活动影响较大的生态环境 (表 2)。

3. 菌株来源与分类鉴定

从 36 份温泉水样分离到 125 株菌, 都是芽孢菌 (表 3)。按照 Gordon's 芽孢杆菌检索表逐项进行鉴定。其中 123 株生长温度范围为 30—75℃, 接触酶阳性 (5 株阴性), V.P 反应阴性, 在 pH 5.7 和厌氧琼脂内不生长等特征与 *Bacillus stearothermophilus* 种的鉴别特征完全相符, 将它们鉴定为 *B. stearothermophilus*。另外两株 (即 8688-01 和

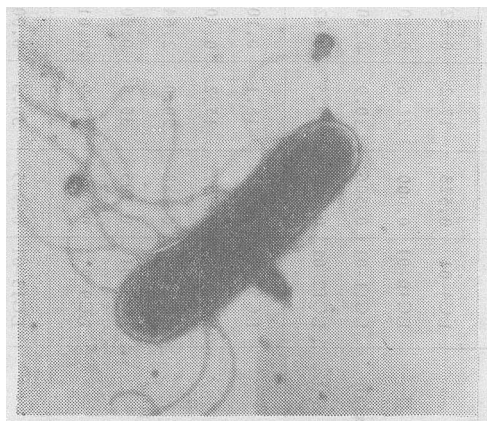


图 1 YN86295 菌株的电镜照片 (15000×)

Fig. 1 Electron micrograph of strain YN86295.

表 1 温泉水样的化学分析
Tab. 1 Chemical contents of water from hot springs*

温泉 Hot spring	元素 Element	Cd	Zn	Be	Cu	Ti	Mn	Co	Ni	Cr	Pb	V	Ca	Mg	K	Na
临 沧 Lincang	LC2-01	0.510	18.2	1.940	0.000	0.01	78.60	0.269	0.271	1.040	10.10	0.626	3.5	4.2	8.30	176.64
	LC3-01	0.503	27.4	3.730	2.110	0.00	88.60	0.533	0.000	1.430	12.70	1.440	10.2	4.6	16.27	228.16
云 县 Yunxian	LC4-01	0.523	17.2	0.524	4.370	2.20	2.30	0.000	0.000	0.637	6.19	0.428	1.7	0.7	9.88	136.16
	LC10-01	0.000	21.6	0.103	0.714	8.62	0.00	0.000	0.000	0.209	3.64	0.000	2.6	0.4	2.32	66.24
	LC11-01	0.506	10.9	0.506	0.235	4.26	2.23	0.267	0.000	0.411	6.79	0.414	1.2	1.1	14.53	217.12
	LC12-01	0.000	29.5	0.420	2.680	0.00	4.62	0.278	0.000	1.070	7.45	0.644	3.5	0.7	8.55	143.52
凤 庆 Fengqing	LC5-01	0.253	18.1	0.102	0.471	4.27	0.00	0.000	0.000	0.618	6.01	0.415	12.5	3.4	4.32	73.60
	LC6-01	0.757	15.2	0.405	2.580	6.37	0.00	0.000	0.000	0.616	4.39	0.414	3.2	1.8	2.66	53.73
	LC7-01	0.888	20.0	2.640	0.000	10.70	0.00	0.001	0.000	0.206	3.20	0.000	2.3	0.9	4.32	73.60
	LC8-01	0.505	35.5	0.202	0.000	6.37	0.00	1.070	0.537	2.460	19.50	2.070	11.0	11.5	9.46	132.48
	LC9-01	0.000	31.9	0.619	0.957	2.17	0.00	0.817	0.000	2.090	17.90	1.690	5.5	28.0	83.50	559.36
永 德 Yongde	LC13-01	0.905	30.6	0.000	0.241	8.70	0.00	1.640	1.380	3.370	24.50	3.180	34.9	22.8	2.74	13.10
	LC14-01	1.380	29.3	0.202	0.000	12.70	0.00	1.330	0.802	2.860	21.10	2.680	20.3	24.7	3.90	14.72
	LC15-01	0.999	54.7	0.408	8.060	78.40	183.00	5.930	7.460	13.000	37.10	22.100	—	—	9.96	48.58
	LC16-01	0.516	26.6	0.104	0.000	17.40	0.00	1.360	1.370	3.560	24.00	5.490	53.8	12.0	3.15	46.67
镇 康 Zhenkang	LC17-01	0.000	34.4	0.000	0.244	11.00	0.00	0.553	0.000	1.280	9.09	0.857	4.9	7.9	12.04	257.60

* Ca, Mg, K, Na 含量单位是 mg/L, 其它元素是 $\mu\text{g/L}$.

Ca, Mg, K, Na contents unit are expressed in mg/L, while other elements are expressed in $\mu\text{g/L}$.

表 2 温泉水样的来源与分类

Tab. 2 Source and classification of water samples

样品来源 Sampling locality	样品数 Number of samples	以温泉温度分类 Classification according to the temperature (C) of the hot spring				以温泉 pH 分类 Classification according to pH of hot spring			以温泉生 境 分 类 Classification according to the habitat of the hot spring					
		60-70	71-80	81-90	91-97	6.0-6.9	7.0-8.0	8.0以上	农田 Farm land	电厂 Power plant	住宅, 垃圾 House; Refuse dump	垃圾住宅、森林 House; Forest	森林 Forest	浴室 Bathroom
临沧 Lincang	5	5	0	0	0	0	5	0	5	0	0	0	0	0
云县 Yunxian	18	3	0	3	12	0	3	15	0	7	3	0	8	0
凤庆 Fengqing	7	1	2	1	3	0	7	0	0	0	0	3	3	1
永德 Yongde	4	4	0	0	0	4	0	0	1	0	0	1	2	0
镇康 Zhenkang	2	2	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0
合计 Total	36	15	2	4	15	4	17	15	8	7	3	4	13	1

86295), 接触酶阳性、V.P 反应阳性、水解淀粉、厌氧琼脂内不生长等特征, 与 *B. subtilis* 的鉴别特征相符。但它们的生长温度范围为 45—75℃, 最适生长温度 60℃, 这与 *B. subtilis* 种的描述: “最高生长温度 45—55℃, 最低生长温度 5—20℃” 相差甚远。另外, 在 7% NaCl 中和 pH5.7 不能生长等特征也不同于 *B. subtilis*, 与作者报道的 *B. thermocogulans* sp. nov. 又在色素产生、淀粉水解、Azide 中生长及厌氧生长等方面不同。因此, 将它们鉴定为 *B. thermosubtilis* sp. nov. 典型菌株为 YN86295, 保存于云南省微生物研究所。主要生物学特征见表 4、图 1。

表 3 菌株的来源与分类

Tab. 3 Source and classification of strains

样 品 Samples		分 离 的 菌 株 Strains isolated			
地 点 Locality	数量 Number	总数 Count	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. thermosubtilis</i>	Other bacteria
临沧 Lincang	5	21	20	1	0
云县 Yunxian	18	34	34	0	0
凤庆 Fengqing	7	12	12	0	0
永德 Yongde	4	43	42	1	0
镇康 Zhenkang	2	15	15	0	0
合计 Total	36	125	123	2	0

4. 菌株的生物学特征

在此需要特别指出的是, 这 125 株菌, 它们无论从哪一种培养基上分离得到, 在 1[#]、2[#]、6[#] 和 7[#] 培养基上都可以生长。从培养基组成可以看出, 总有机物浓度 2[#] 培养基为 0.01% (作为络合剂的氮氟三醋酸), 6[#] 培养基为 62.8ppm (氮氟三醋酸和维生素液)。表明这些菌株具有全部或部分同化 CO₂, 以 CO₂ 为碳源生长的能力。

5. 新种的描述

高温枯草芽孢杆菌(新种) *Bacillus thermosubtilis* sp. nov.

细胞杆状, 菌体直径 0.8—1.0 μm, 周身鞭毛, 能运动, 形成芽孢, 芽孢椭圆, 端生, 孢囊膨大。革兰氏反应阳性。生长温度范围 45—75℃, 最适 60℃。

生理生化特征 接触酶阳性, V.P 反应阳性, 淀粉水解阳性、硝酸盐还原阳性, 在 3% NaCl 生长阳性, 在 7% NaCl 中生长阴性。H₂S 产生阴性, 吡啶产生阴性, 厌氧生长阴性, 在 0.02% Azide 生长阴性, 明胶液化阴性, 厌氧硝酸盐产气阴性, 在 pH5.7 生长阴性。自葡萄糖、甘露醇、阿拉伯糖、木糖只产酸不产气。DNA 中 G+C 含量为 55.2 mol%。

表 4 两株芽孢菌的主要生物学特征

Tab. 4 Main biological characteristics of two strains of spore forming bacteria

特征 Characteristics		菌株 Strain	8688-01	86295	特征 Characteristics		菌株 Strain	8688-01	86295
革兰氏反应 Gram's reaction			+	+	产酸 Acid from	葡萄糖 Glucose		+	+
运动性 Mobility			+	+		甘露醇 Mannitol		+	+
接触酶 Catalase			+	+		阿拉伯糖 Arabinose		+	+
						木糖 Xylose		+	+
生长温度 (°C) Temp. for growth	最低 Minimum		45	45	淀粉水解 Amyolysis			+	+
	最适 Optimal		60	60	明胶液化 Hydrolysis of gelatin			—	—
	最高 Maximum		75	75					
生长 Growth	0.02% Azide		—	—	H ₂ S			—	—
	3% NaCl		+	+	Indole			—	—
	5% NaCl		+	—	V.P 反应 V.P reaction			+	+
	7% NaCl		—	—	硝酸盐还原 Nitrate reduction			+	+
	pH 5.7		—	—	厌氧生长 Anaerobic growth			—	—
	2#培养基 2# Medium		+	+	厌氧硝酸盐产气 Anaerobic gas production from nitrate			—	—
	6#培养基 6# Medium		+	+					

综合以上结果可以得出: (1) 在临沧地区的温泉 (60—97°C, pH6.0—8.0 以上) 中, 绝大多数都分离到嗜热性芽孢杆菌, 可是种群比较单一, 除临沧和永德的温泉中分离出两个种 (即 *Bacillus stearothermophilus* 和 *B. thermosubtilis* sp. nov.) 外, 其它县的温泉中只分离出一个种 (*B. stearothermophilus*)。 (2) 温泉周围环境对温泉中的高温菌种群无明显影响, 如 LC5-01、LC10-01 和 LC16-01 等温泉周围有住宅、垃圾、甚至是浴室, 但它们的高温菌种群仍很单一。 (3) 临沧地区温泉水的化学组成对温泉中高温菌种群无明显影响。 (4) 从凤庆县的 LC9-01 号温泉没有分离到一株菌, 是何原因尚不能确定。从化学分析结果看, 此温泉有一突出特点, 即 K、Na 含量最高 (841.86mg/L)。但一般而言, 这一浓度并非限制微生物生长的浓度。 (5) 从临沧地区分离出的 125 株嗜热性芽孢杆菌都可以在 6# 和 7# 自养型培养基上生长。

营养类型在微生物分类学中占有重要地位。但本文没有将这 125 株菌可以在自养培养基上生长这一点提高到分类学高度来讨论, 仅作为这些菌株的一项特征加以叙述。拟

对此再进行系统研究之后,再考虑是否将它提高到分类学高度来讨论。

极端嗜热细菌 *Thermus* 在不同生态环境的分布国外已有报道^[5-8], 但嗜热性芽孢杆菌在温泉中的分布情况国外尚无报道。

参 考 文 献

- [1] 和致中、彭谦、马俊、陈俊英, 1988. 保山地区碱性温泉中的高温菌。水生生物学报, **12**(4): 376—379。
- [2] 和致中、彭谦、马俊、陈俊英, 1988. 保山摆洛塘温泉中的极端嗜热细菌。微生物学杂志, **8**(1): 11—15。
- [3] 和致中、彭谦、马俊、陈俊英, 1989. 云南温泉高温菌的研究 VII. 腾冲酸性高温温泉中的极端嗜热性芽孢杆菌。微生物学报, **29**(3): 161—165。
- [4] 蔡妙英、刘聿太、战立克译, 1983. 芽孢杆菌属。19—108页。农业出版社。
- [5] 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。
- [6] 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。
- [7] 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。
- [8] Oshima, T. & Imahori, K., 1974. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating bacterium from a Japanese thermal spa., *Int J. Syst. Bacteriol.*, **24**(1): 102—112。

THERMOPHILIC BACILLI IN HOT SPRINGS OF LINCANG REGION, YUNNAN, WITH REFERENCE TO THEIR CHARACTERISTICS

Peng Qian He Zhizhong Chen Junying and Ma Jun

(Yunnan Institute of Microbiology, Kunming 650091)

Abstract

This paper reports the thermophilic bacilli and their characteristics in the hot springs of Lincang region, Yunnan. *Bacillus stearothermophilus* and *B. thermosubtilis* sp. nov. were isolated from the hot springs. These strains possess the ability to grow on the autotrophic media. *Thermus*, an extremely thermophilic bacterium was not isolated from these hot springs.

Key words Hot springs, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermosubtilis* sp. nov.