

酸煤矿水中氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 的分离及其特征*

呂人豪 区嘉煒

(中国科学院微生物研究所, 北京)

酸矿水特别在硫矿和含硫成分高的煤矿、铜矿的矿坑积水及排出的水中最为常见。这种高酸度的矿水虽在湿法冶金中为人们所利用^[1], 但也带来一些有害的作用, 不仅常引起矿井金属设备的腐蚀, 而且还会污染农田和河流, 产生许多不良的影响^[2-3]。

酸矿水的形成, 起初都归因于纯化学的作用。后来 Carpenter 等^[2]提出细菌能使矿水变酸, 但缺乏足够根据; 直到 1947 年 Colmer 等^[6]从矿水中分离到能氧化硫的细菌, 才推测该菌参与酸矿水的形成。接着 Leathen 等^[7]从中分离到真正的纯种, 并在实验室内肯定了细菌使矿水变酸的原因^[4,8,9]。此后不仅在美国, 而且在欧洲的许多国家如丹麦、苏联、德国也同样在矿水中分离到氧化硫硫杆菌^[10,11,12,13,14]。

在我国含硫成分高的煤矿分布很广, 酸矿水的存在也甚为普遍, 而未见报导过矿水中细菌学的情况。我们从了解金属构件微生物腐蚀角度出发, 在调查唐山开滦煤矿和湖北香溪刘草坡煤矿时, 发现酸矿水中也有氧化硫硫杆菌。为了获得参与好气金属腐蚀的氧化硫硫杆菌典型菌株, 进行了分离及其特性的研究。

一、材料和方法

矿水来源 唐山开滦煤矿坑道积水(pH 为 4.0)和湖北香溪刘草坡煤矿排出的坑道水(pH 为 2.7)。

培养基 聚集和分离培养用的基础培养基是以元素硫为能源的 Starkey^[15]培养基, 简称 S 基¹⁾。为分离纯种还采用了固体培养基, 系一种以相应量硫代硫酸钠代替以上 S 基中元素硫, 加 2% 琼脂制成。另外, 还用了稍加改变的 Vishniac 等^[16]的培养基, 简称 V 基¹⁾。

能源除元素硫以外, 曾试验了硫代硫酸钠 (0.1—1.0%), 硫酸亚铁 (Fe^{++} 含量 400—2000 ppm), 亚硫酸钠及硫化钠 (0.1—1.0%)。同时以不同浓度 (0.05—1.0%) 的葡萄糖、肉膏、酵母汁、蛋白胨、乳酸和醋酸盐作唯一能源来试其异营性质。

碳源是在以元素硫为能源的 S 基上进行的。除空气中二氧化碳外, 还以不同浓度 (0.05—1.0%) 的葡萄糖、乳酸和醋酸盐, 肉膏等有机物代替二氧化碳为碳源, 并附带地试验了在二氧化碳存在下, 以上有机物对细菌生长的影响。

氮源是以无氮的 S 基为基础, 分别加入不同浓度 (0.05—1.0%) 的硫酸铵、硝酸钾、硝酸钙等无机

* 本文主要结果曾在中国微生物学会 1963 年学术会议上宣读。参加该工作的还有扈芝香同志。

本文 1964 年 1 月 30 日收到。

1) S 基组成: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2—0.4 克; KH_2PO_4 3.0—4.0 克; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 克; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 克; 蒸馏水 1000 毫升; 硫粉 10 克; pH 3.5—4.0。除硫粉常压灭菌外, 培养液其他成分分装于三角瓶中高压灭菌。V 基组成: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 克; KH_2PO_4 4.0 克; K_2HPO_4 4.0 克; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 克; NH_4Cl 0.4 克; FeSO_4 0.01 克; 蒸馏水 1000 毫升; 琼脂 20 克; pH 5.0。

氮源及天门冬素、尿素、蛋白胨等有机氮源。为了尽量避免試驗容器受其他氮源的染污,容器用新鲜洗液浸泡 48 小时,接着在自来水中冲洗 24 小时,最后用蒸馏水浸泡 24 小时。制备培养基的化学药品系用分析純的試剂。用奈斯勒試剂和硝酸試剂 (Nitron 和其他)来分別鉴定銨离子和硝酸根离子的存在。

試驗容器根据不同試驗,采用 50、100、200、1000 毫升的三角瓶。用培养 4—5 天菌龄的新鲜菌种作接种物,接种量为培养液的 2%。培养温度 30℃。把培养物置于真空干燥器中,通入經烧碱和烧碱石棉除去二氧化碳的空气或通入經 50% 硫酸除去氨的空气进行培养,作为无二氧化碳或无氨培养。在試驗中我們发现該菌在生长过程中,菌量、混浊度、氢氧化鈉滴定数和 pH 間有着平行关系。为了便于測定,除少数作菌量測定外,主要都采用 pH 的变化来表示細菌生长情况。活菌量用稀释計数法測定^[17]。生物量是用培养 30 天后,經過 G-3 滤器去硫的菌液在 10000 轉/分下离心沉淀,蒸馏水洗之,在 85℃ 下干燥至恆重来測定的。pH 測定用 Polymetron 42/B 型 pH 計进行。

二、結 果

菌的分离 来自唐山及香溪二处的矿水各 2 毫升,分別接种于装有 50 毫升无菌 S 基的三角瓶 (100 毫升) 中,在 30℃ 下聚集培养。4—5 天后即出現均匀混浊, pH 下降到 2 以下,此时氧化硫硫杆菌已占优势。在同样液体基上連續接种几次后即可作进一步純化。純化一方面可利用該菌耐高酸度的特性,接入用 0.1N 硫酸調到 pH 1.0 的培养液中,連續移种以淘汰杂菌,另一方面可进行单菌落分离。我們用硫代硫酸盐代替硫粉的 S 和 V 固体基,以 Koch 平板法表面涂抹或划綫,培养 2—3 周后,得到单一菌落,然后接回液体培养基,这样反复几次可較快地得到純培养。唐山所分离的菌株簡称 Ta9,香溪所分离的称为 W6。二菌株菌落形态是相似的。

形态及培养特征 細菌的染色根据 H. Habs^[18]細菌袖珍手册进行。該菌無論在液体还是固体基上都是短小杆菌,大小为 $0.6-1.0 \times 0.5$ 微米。菌体单个或成对,很少成鏈状排列,菌体二端圓形,无芽孢,革兰氏負反应,运动活泼,在石炭酸复紅中易着色,其形态見图 1。

該菌在 S 基上呈均匀乳白色混浊,一般培养 4—6 天, pH 即下降到 2。10 天后可达 pH 1 以下。在硫代硫酸鈉液体基上无明显生长,但在固体平板上可出現半透明的小于 1 毫米的小菌落。在肉湯,肉汁固体平面 (pH 3.5—4 及 pH 7), 葡萄糖蛋白胨,蔡氏及麦芽汁基上都不生长。

固体培养基上的菌落特征有 Waksman^[19]所描述,在含鈣培养基上菌落呈淡黄色并在显微鏡下有石膏結晶,以及 Jensen^[20]在同样培养基上見過淡黄色帶有螢光的菌落,此外,未見有詳細报导。在我們試驗中观察到在含硫代硫酸鈉的固体基上出現圓形,大小 0.5—0.6 毫米的乳白色半透明菌落,日久成淡褐色 (图 2a, b), 表面凸起,有同心圓环,近边缘有放射状皺紋 (图 2c, d) 并带有波形边缘 (图 2e)。

能源的要求 能源試驗在 S 基上进行,除試驗了无机硫化物外,由于考虑到酸矿水中可能存在氧化硫硫杆菌 (*Ferrobacillus sulfooxidans* Kinsel)^[21],故还在 S 及 Leathen^[22] 基上測定了以低鉄为能源利用情况。为了对比,还采用了以往分离已知能氧化硫代硫酸盐的菌株 W7 和氧化低鉄为能源的 Ta12 菌株作了对照。表 1 的結果表明,二菌株在硫代硫酸盐,亚硫酸盐,硫化物,低鉄上都不能生长,只有元素硫才能作为唯一能源。在硫代硫酸



图1 氧化硫硫杆菌显微镜下的形态(圆头,单个或成对)
4,500×

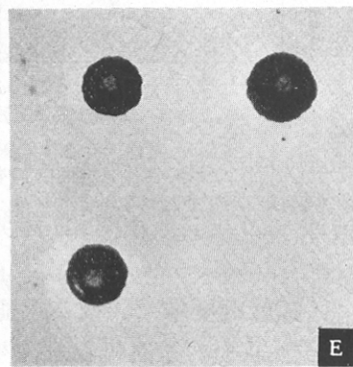
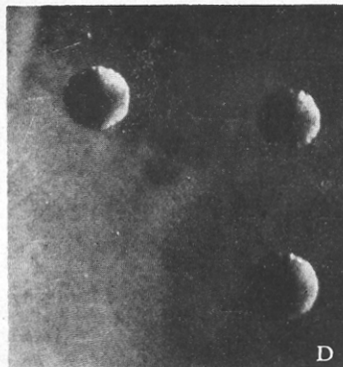
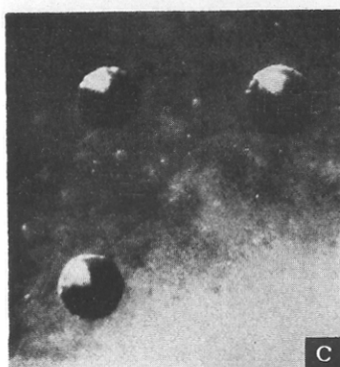
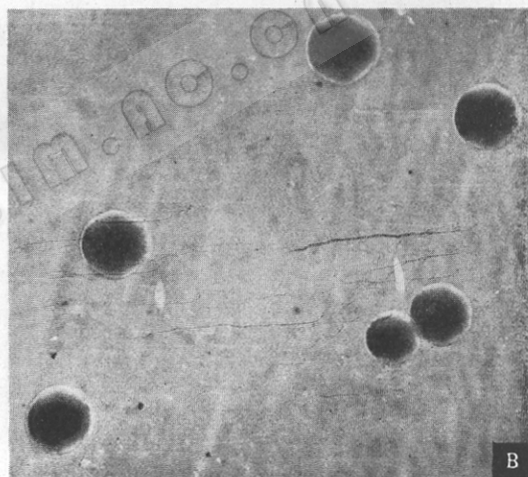


图2 氧化硫硫杆菌(菌株W6)在含硫代硫酸钠琼脂基上30℃ 21天后生长的菌落形态
a. 为乳白色小于1毫米的菌落(2×); b. 在解剖镜下放大的菌落(16×);
c. 菌落表面凸起情况(16×); d. 菌落放射纹(16×); e. 菌落波形边缘(16×)。

盐固体培养基上形成菌落而在液体培养基上不生长,这种情况, Kinsel^[21]在氧化硫铁杆菌中也遇到过,其原因还不很清楚。不同浓度(0.05—1.0%)的有机物,如葡萄糖,肉膏,酵母汁,蛋白胨,乳酸及醋酸盐作能源都得到负结果,这说明了该菌的自养特性。

表 1 氧化硫杆菌对不同能源的利用

| 能源 生长情况 菌号 | S^0 | $S_2O_3^{2-}$ | Fe^{++} | S^{2-} | SO_3^{2-} |
|------------------|-------|---------------|-----------|----------|-------------|
| Ta 9 | +++ | — | — | — | — |
| W 6 | +++ | — | — | — | — |
| W 7 | — | +++ | — | 0 | 0 |
| Ta 12 | + | — | +++ | 0 | 0 |

注:表中 W7 和 Ta12 为对照菌株。有“+”者代表有菌生长,弱的混浊;“+++”强烈混浊;“—”无菌生长;“0”表示未进行试验。

在以元素硫为能源的情况下,由于愈来愈多的硫被氧化成硫酸,那么菌生长繁殖和基

质中酸度提高间的相互关系如何呢,未见有研究报导,为了解这一生长规律,我们连续在 30 天中定期测定菌培养液的 pH 和活菌量,所得结果见图 3。

从图 3 可以看到,随着菌的繁殖,活菌量升高,培养液的 pH 迅速下降。菌株 W6 接菌 2—3 天后,菌量即达最高限度 (95×10^7 /毫升)。这样高的菌量一直保持到第五天。在这阶段氧化硫量最多, pH 也下降最迅速,一旦 pH 下降到 1.5 以下即到第五天,菌量就开始急剧下降。这显然由于菌旺盛生长,代谢产物硫酸积聚浓度过高而强烈抑制了菌的生长。当 pH 近 0.5 左右,菌量几乎回复到原始的量。在不接菌的对照中 pH 基本上保持恒定。

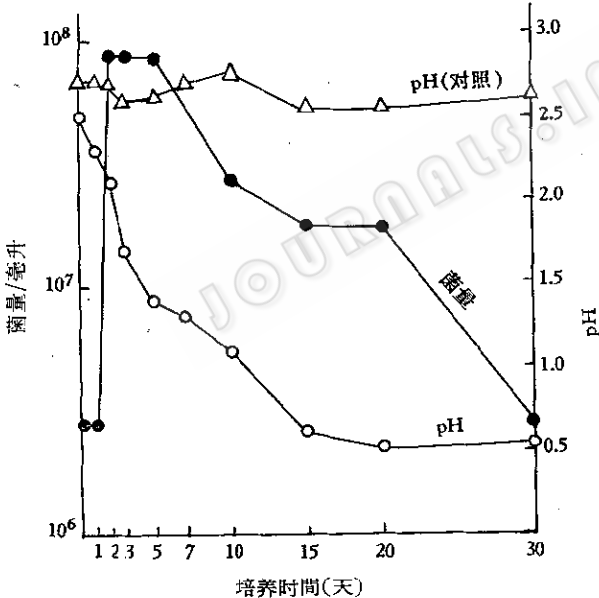


图 3 菌株 W6 在含元素硫基上菌量和 pH 随培养时间的变化情况

菌株 Ta 9 生长曲线同 pH 间关系的结果与 W 6 相同,故不另图示。我们的结果与 Starkey^[15]和 Waksman 等^[23]认为 pH 2.0 以下不利于菌生长的结果基本相符。

碳源的要求 该菌是化能自养菌,一般同化大气中二氧化碳为碳源。以往有的研究者^[23-26]认为有些有机物对菌生长影响很小,或有促进作用。因此有机物能否作唯一碳源是一个有趣的问题,为此我们加不同浓度的各种有机物于 S 基中,在有二氧化碳和无二氧化碳的条件下进行了试验。表 2 是培养 15 天后的结果,从表 2 中可看到,在无二氧化碳时,除加葡萄糖时菌株有一定的生长之外,其他有机物都不能代替二氧化碳作为碳源。在有

二氧化碳时,也只有葡萄糖毫不影响菌的正常生长,而其他有机物除肉膏,酵母汁,蛋白胨在低浓度时菌尚可生长之外,都起完全抑制作用。

表 2 在缺和有二氧化碳下有机物对菌生长的作用

| 生长情况 有机物 | 菌 号 有机物(%) | 无 CO ₂ | | | | | | | | 有 CO ₂ | | | | | | | |
|-------------|---------------|-------------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-------------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| | | W 6 | | | | Ta 9 | | | | W 6 | | | | Ta 9 | | | |
| | | 0.05 | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 0.05 | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 0.05 | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 0.05 | 0.1 | 0.5 | 1.0 |
| 葡 萄 糖 | | + | + | + | ++ | + | + | + | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 肉 膏 | | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ | ++ | - | - | +++ | ++ | - | - |
| 酵 母 汁 | | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | ++ | - | - | +++ | - | - | - |
| 蛋 白 胨 | | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | ++ | - | - | ++ | ++ | + | - |
| 乳 酸 鈉 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 醋 酸 鈉 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 无有机物对照 | | - | | | | - | | | | +++ | | | | +++ | | | |

注：“-”无菌生长,培养液pH在 2.0 以上;“++”中等程度生长, pH 降到 1.0—1.5;“+”弱生长, pH 1.5—2.0;“+++”很好生长, pH 在 1.0 以下。

氮源的要求 根据以往报导,该菌在氮源方面的要求,特别在对无机氮源中能否利用硝酸态氮的问题上是不一致的。在我们试验中除所用培养液中由于盐分不纯,杂有约 5ppm 的铵离子外,无硝酸根反应。为了避免随接种物带入氮源,预先将接种的菌先接一代于无氮 S 基上,再以该基上生长的菌悬液作接种物,或把生长于含氮基上的菌悬液离心沉淀,用生理盐水连续洗涤三次的菌悬液来接种。试验在装有含等氮量的硫酸铵,硝酸钾和硝酸钙培养液的三角瓶中,在去氨的条件下培养。所得的结果,二菌株是完全一致的。

如图 4 所示,凡接菌的试验在前 4 天培养液 pH 都有下降,然其中只有加铵盐的下降到该菌可达 pH 的最低值(近 pH 0.5)。而加硝酸盐的同不加任何氮源对照一样, pH 下降到 1.5 左右就不再下降。这说明 pH 下降显然与加硝酸态氮无关,而仅是由接种菌所引起。不接菌的对照保持不变的 pH,这说明从产酸来看只有铵态氮真正能作菌的氮源。硝酸态氮不起氮源作用。但细菌是否对不同氮源要求不同浓度?从所得结果看,仅高浓度

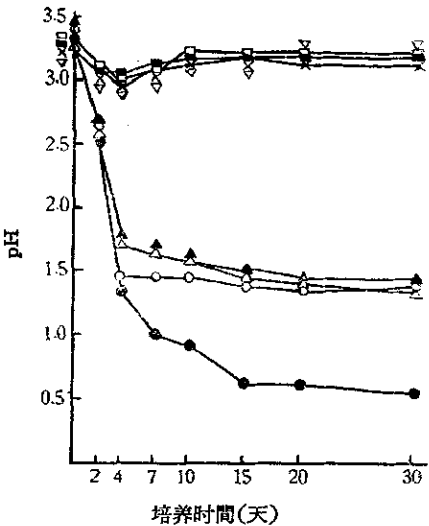


图 4 菌株 W6 在不同氮源下的产酸情况

- 接菌
- 0.04%硫酸铵
 - △——0.06%硝酸钾
 - 0.07%硝酸钙
 - ▲——不加氮源
- 不接菌
- 0.04%硫酸铵
 - 0.06%硝酸钾
 - ×——0.07%硝酸钙
 - ▽——不加氮源

的硝酸钾对菌株 Ta9 的抑制作用比较大,其他方面两株菌都相似。如图 5 所示, 0.05%—1.0% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 都对生长有明显的促进作用, 将 pH 值降到最低值。与此相反, 硝酸盐不仅不促进生长和降低 pH 值, 反而随着盐浓度增加而产酸减少, 表示高浓度硝酸盐有不同程度的抑制作用。

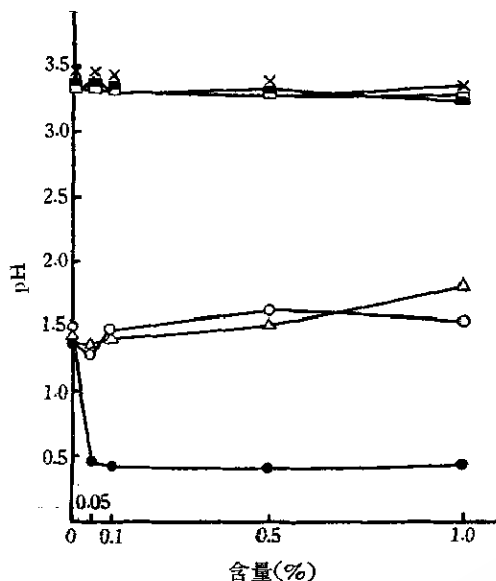


图 5 菌株 W6 在不同浓度氮源下培养 30 天后的产酸情况

●——硫酸铵
△——硝酸钾 接菌
○——硝酸钾
□——硫酸铵
■——硝酸钾 不接菌
×——硝酸钙

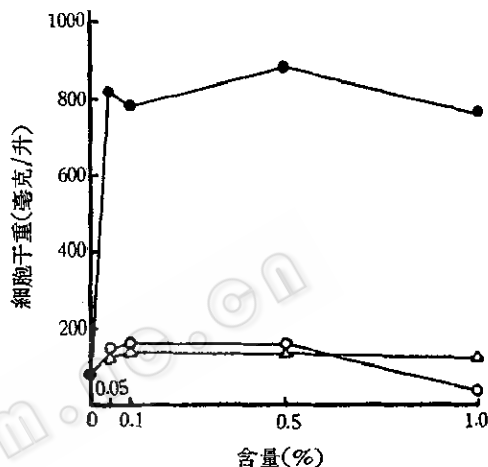


图 6 菌株 W6 在不同浓度氮源下培养 30 天后的生物量

●——硫酸铵;
△——硝酸钾;
○——硝酸钙。

这两种氮源除在产酸上有明显的差别外, 生物量的测定也表明了这一点。图 6 表示了生物量的测定与 pH 的变化所得结果是一致的。菌株 W6 和 Ta9 (图省略) 利用铵盐时比利用硝酸盐时的生物量分别大 5—10 倍。在含硝酸盐的培养基上的生物量与不加氮源的对照无明显区别。这结果更明确地证明了只有铵态氮为唯一氮源的论断。

在无氮源试验中菌仍能微弱生长, 是否该菌可能利用部分空气氮? 故此将培养物置于含 50% 二氧化碳和 50% 氧气的无氮气环境中, 并反复多次真空抽气, 进行不同氮源利用试验。结果表明, 无论在有氮气或无氮气下, 菌生长的混浊度或 pH 变化都得到相同的结果。故不加氮源的培养基上, 菌微弱生长与空气氮利用无关, 而只能归因于盐分不纯或接种物带有微量含氮物所致。用有机氮如尿素, 天门冬素, 蛋白胨等为唯一氮源时都比无氮对照有明显的促进生长现象。

氧和 pH 的要求 该菌在厌氧条件下培养, 无论加铵盐或是硝酸盐都不生长, 这表明无厌氧反硝化作用, 属严格好气菌。pH 的试验是采用 S 基, 以硫酸调成不同的 pH (1.2—6.8), 经培养后测定其混浊度, 结果表明, 这二菌株是一致的。原始 pH 在 2.0—4.8 范围内都适合于该菌的发育, pH 2.0 以下 4.8 以上都有明显抑制生长的作用。其最适 pH 在 2.5—3.3, 与以往的报导^[15,23,26] 认为 pH 2—4 的范围内不影响, pH 2 以下, 5—6 以上抑制生长基本相符。从试验中发现菌株 W6 的最低发育 pH 比菌株 Ta9 低, 我们认为这可

能同菌的来源地所处酸度有密切关系。

温度的要求 Waksman^[23] 和 Marchlewitz 等^[14] 曾报导 28—30℃ 生长最好。也有人报告从产酸来看,最适温度是 27—35℃。我們所得的结果(图 7)表明,二菌株从 15℃ 即开始生长,随温度的升高产酸也逐渐提高,当温度达 35℃ 以上产酸就开始下降,虽 37℃ 还有一定程度的发育,然 40℃ 以上就接近于完全被抑制。55℃ 时就根本不能生长。最适温度范围在 30—35℃。这是一个中温细菌,同 Starkey^[15] 的报导相似而比 Marchlewitz 等^[14] 所分离的菌最适温度稍高一些。这可能是同菌株来源及菌株间差异有关。

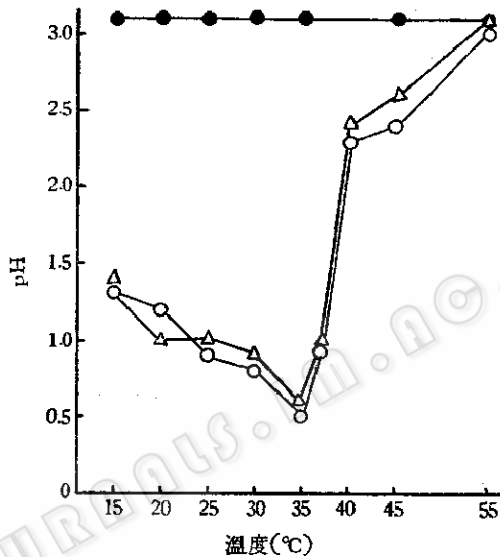


图 7 不同培养温度下菌株 W6 及 Ta9 的产酸情况

- 菌株 W6;
- △——△ 菌株 Ta9;
- 对照(不接菌)。

三、討 論

细菌参与含硫煤矿矿水产酸过程和从中分离氧化硫硫杆菌已有报导。从河北唐山及湖北香溪酸煤矿水中分离到氧化硫硫杆菌说明矿水中这种细菌过程在我国也是广泛存在。从这二处所分离的细菌根据其形态,培养,生理等特征和 Waksman 等^[23] 所分离的, Starkey^[25] 所研究的基本是一致的。按 Bergey 细菌手册^[27],定名为氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans* Waksman et Joffe)。

该菌在氧化元素硫的过程中,开始时,菌的繁殖同酸度的增加是一致的。当 pH 值下降到 1.5 以下时,虽然培养液仍保持一定的产酸能力及由于死细胞的悬浮保持高度的混浊,但活菌量已急剧下降。所以我们认为作为接种物最好在 pH 达到这一点以前进行。有元素硫和葡萄糖存在而缺二氧化碳时,菌仍有微弱发育。相反地在缺硫而有葡萄糖和二氧化碳存在时缺乏生长,显示了该菌有可能以葡萄糖作部分碳源,但不起能源作用。

在氮源的利用上,以往报导存在着不同意见, Waksman 等^[23] 开始报导该菌能利用铵态氮和硝酸态氮。Starkey^[25] 作了进一步的研究,确定该菌只能利用铵态氮作为唯一氮源,

并指出硝酸态氮具有抑制作用。几十年来研究者们很少提出异议。直到最近 Marchlewitz 等^[1]试验了从含硫化物矿坑积水所分离的氧化硫硫杆菌,发现这些菌既能利用铵盐,又能利用硝酸盐为氮源,我们在试验中尽量设法除去容器、盐分、接种物、空气中所带来的染污,并排除利用大气氮的可能性,其总的铵离子污染不超过约 5ppm。所得结果表明,加铵盐下生长旺盛,强烈混浊,代谢强度从产酸来看 pH 下降到最低值 (pH = 0.5)。而加硝酸态氮下一直保持同不加氮源的对照一样,生长微弱轻度混浊,产酸低 (pH 约 1.5)。在不同氮源基上所得生物量的结果更明显地可看到在硝酸盐基上与无氮源基上没有什么差别,而铵盐基中生物量高出 5—10 倍。所以无论从代谢强度,或以合成的生物量都清楚地表明只有铵态氮才能作为唯一氮源。另外,从不加氮源对照中,有一定的生长,表明该菌生长所需的氮量较低,所以假若有少量可利用态的氮污染,就会导致不正确的结果。以往作者虽注意到容器、无机盐中可能带有可利用态氮,却未设法避免或检查接种物和空气中污染可利用态氮的可能。所以我们认为假若没有把所有污染因素都估计在内的话,得到氧化硫硫杆菌能利用硝酸态氮的结论,特别作为该菌种的普遍特征,是不恰当的。

四、摘 要

1. 从河北唐山开滦煤矿和湖北香溪刘草坡煤矿的酸矿水中分离到二株参与矿水变酸的氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans* Waksman et Joffe)。该菌大小为 $0.6-1 \times 0.5$ 微米,圆头,单个或成对,革兰氏负反应。严格好气,在含元素硫的无机基上发育。在一般细菌基上不生长。

2. 该菌以氧化元素硫取得能源。不能氧化硫代硫酸盐,低铁,硫化物和亚硫酸盐,也不能利用有机物如葡萄糖、酵母汁、蛋白胨、乳酸和醋酸盐为能源。

3. 该菌同化大气中二氧化碳为碳源。有机物除葡萄糖外,较高浓度的肉膏、酵母汁、蛋白胨对菌的生长都有抑制作用。

4. 在氮源上,加铵盐基上生长旺盛,强烈产酸, pH 降到 0.5 左右。相反,加硝酸盐同于不加氮源对照,生长微弱, pH 最多降到 1.5 左右。而且在生物量上,加铵盐的培养结果比加硝酸盐的高 5—10 倍,这表明只能利用铵态氮为氮源。在有机氮如尿素、天门冬素、蛋白胨存在下都发育。

5. 在元素硫基上,开始菌量的增殖和酸的形成有平行的关系。当酸度提高到 pH 1.5 左右时,虽培养液仍保持高度混浊及一定的产酸能力,但活菌量开始迅速下降。用作接种物时最好 pH 达到这一点以前进行。

6. 本菌发育的温度从 15°C 开始随着温度提高产酸速度加快,但超过 35°C 就受到抑制, 40°C 几乎停止发育, 55°C 完全抑制生长。最适温度为 30—35°C。菌一般在 pH 2.0—4.8 范围内都能很好地发育,低于 1.2 或高于 5.8, 生长完全抑制。其最适 pH 是 2.5—3.3。

参 考 文 献

- [1] Zimmerley, S. R., Wilson, D. G., Prater, T. D.: U. S. Patent No. 2, 82964, April 1958.
- [2] Carpenter, L. V., Herndon, L. K.: W. Va. Univ. Eng. Expt. Sta. Res. Bull. No. 10, 1933.
- [3] Hodge, W. W.: *Ind. Enger. Chem.*, 1049, 1937.
- [4] Ashmead, D.: *Colliery Guardian*, June 2, 691—698, 1955.

- [5] Смирнов, В. В.: *Микробиол.*, **32**:695—699, 1963.
- [6] Colmer, A. R., Hinkle, M. E.: *Science*, **106**:253—256, 1947.
- [7] Leathen, W. W., Madison, K. M.: *Bact. Proc.*, **64**(15):1949.
- [8] Leathen, W. W., Braley, S. A., McIntyre, L. D.: *Appl. Microbiol.*, **1**:61—64, 1953.
- [9] Temple, K. L., Delchamps, E. W.: *Appl. Microbiol.*, **1**:255—258, 1953.
- [10] Fjerdingsstad, E.: *Schweiz Zeitschr. Hyg.*, **18**, T2:215—238, 1956.
- [11] Bryner, L. C., Jameson, A. K.: *Appl. Microbiol.*, **6**:281—287, 1958.
- [12] Ляликова, Н. Н.: *Микробиол.*, **30**:135—139, 1961.
- [13] Караваико, Т. И.: *Микробиол.*, **30**:286—288, 1961.
- [14] Marchlewitz, B., Schwartz, W.: *Allg. Microbiol.*, **1**:100—114, 1961.
- [15] Starkey, R. L.: *J. Bact.*, **10**:135—136, 1925.
- [16] Vishniac, W., Santer, M.: *Bact. Rev.*, **21**:195—213, 1957.
- [17] Новогрудский, Д. М.: Почвенная микробиология. Алма-Ата, АН КССР, 1956.
- [18] Habs, H.: *Bakteriologisches Taschenbuch.*, Johann Ambrosius Borth Verlag Leipzig. 1956.
- [19] Waksman, S. A.: *J. Bact.*, **7**:605—608, 1922.
- [20] Jensen, H. L.: *Zentralb. Bact.*, II Abt. **72**:242—246, 1927.
- [21] Kinsel, N. A.: *J. Bact.*, **80**:628—632, 1960.
- [22] Leathen, W. W., McIntyre, L. D., Breley, S. A.: *Science*, **114**:280—281, 1951.
- [23] Waksman, S. A., Joffe, J. S.: *J. Bact.*, **7**:239—259, 1922.
- [24] Lipman, J. G., Waksman, S. A., Joffe, J. S.: *Soil Science.*, **12**:475—489, 1921.
- [25] Starkey, R. L.: *J. Bact.* **10**:165—195, 1925.
- [26] Vogler, K. G., Roge, G. A., Umbreit, W. W.: *J. Gen. Physiol.* **26**:89—102, 1942.
- [27] Breed, R., S. Murray, E. G. D., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1957.

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISTIK VON *THIOBACILLUS THIOOXIDANS* IN SAUREN KOHLENGRUBENWÄSSER

LÜ JEN-HAO UND OU CHIA-WEI

(Institute für Mikrobiologie der Academia Sinica, Peking)

Zwei Thiobakterien-Stämme wurden aus sauren Grubenwässer von Kailan-Kohlenbergwerk in Prov. Hopoh und Liu-Tschopo-Kohlenbergwerk in Prov. Hupeh isoliert. Nach Bergey's Manual (1957) sind die beiden Stämme als *Th. thiooxidans* Waksman u. Joffe identifiziert. Die wichtigen morphologischen und physiologischen Merkmale sind zusammengefasst:

1. Diese Bakterien sind kurzstäbchenförmig, mit abgerundeten Zellenden, beweglich, gramnegativ, aerob, Zellgrösse $0.6-1 \times 0.5 \mu$, existieren einzeln oder paarweise, bilden auf Thiosulfat-Agarboden punktförmige, milchweisse Kolonien. Ausser dem elementaren S-haltigen Medium entwickeln sie sich im gewöhnlichen Bakterien-züchtenden Medium nicht.

2. Elementarer S erwies sich als einzige Energiequelle. $S_2O_3^{2-}$, Fe^{++} , S^{2-} , SO_3^{2-} und organische Stoffe sind nicht zu verwerten.

3. Beide Stämme verwerten CO_2 als C-Quelle, während Glukose eine wachstumsbeschleunigende Wirkung zeigt, üben andere organische Stoffe, wie Hefeextrakte, Pepton usw. bei höheren Konzentrationen eine hemmende Wirkung aus.

4. Bei der Stickstoffernährung wachsen die thiooxidans-Stämme im NH_4 -haltigen Medium am besten. Der pH-Wert sinkt bis auf ca. 0.5. Dagegen wachsen sie im NO_3 -haltigen Medium, wie im N-freien Kontrolle, ganz schwach. Der pH-Wert sinkt nur auf 1.5. Das Biomass im NH_4 -haltigen Medium ist 5 bis 10 Fach höher als das im NO_3 -haltigen Medium. Es zeigt sich deutlich, dass die untersuchenden Stämme nur NH_4 als einzige N-Quelle benutzen können. In dem organische N-Verbindungen (Z.B. Harnstoff, Asparagen, Pepton) enthaltenden Medium entwickeln sie sich gut.

5. Die Keimzahl in elementaren S-haltigen Medium nimmt am Anfang mit der Säurebildung zu. Erreicht die Acidität den End-pH-Wert von 1.5 fällt die lebende Keimzahl rasch zurück, obgleich die Kulturen noch stark trüb und säurebildungsfähig sind.

6. Die *thiooxidans*-Stämme entwickeln sich von $15^\circ C$ an. Die Säurebildung wird durch Temperaturanstieg gefördert. Wenn das Temperaturoptimum von $35^\circ C$ überstiegen ist, tritt eine stark hemmende Wirkung auf. Bei $40^\circ C$ stellt die Entwicklung ein und bei $55^\circ C$ völlig gehemmt. Das Temperaturoptimum liegt bei $30-35^\circ C$. Der pH-Bereich für Wachstum von *thiooxidans*-Stämme erstreckt sich von 2.0 bis 4.8, während unter 1.2 oder über 5.8 das Wachstum aufhört. Das Optimum liegt bei pH-Wert von 2.5 bis 3.3.