

一个嗜热嗜酸细菌的新属——硫球菌属

钟慧芳 陈秀珠 李雅芹 蔡文六

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道从酸性热泉地区分离出一株比较少见的无机化能自养型嗜热嗜酸细菌, 经鉴定是一新属新种, 命名为硫球菌属 (*Sulfosphaerellus* gen. nov.), 模式种为嗜酸热硫球菌 (*Sulfosphaerellus thermoacidophilum* sp. nov.). 细胞球形, 直径 0.8—1.2 μm , 有类似纤毛的结构, 革兰氏阴性, 需气, 在无机盐培养条件下, 氧化元素硫至硫酸获得能量进行自营生长。生长最适温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 范围 55—80 $^{\circ}\text{C}$ 。生长最适 pH 2.5, 范围 1.0—5.5。DNA 中 G + C 含量为 33—39mol%。并将该菌与国外近十多年来分离的硫叶菌 (*Sulfolobus*) 等 7 种高温嗜酸细菌作了比较, 并对其命名和分类位置作了讨论。

1966 年以来, 学者们对高温嗜酸细菌进行了多方面的研究, 并对其极端嗜热嗜酸生理功能和细胞结构进行了分子水平的研究, 这对异常环境微生物的生态学、生物化学、地球化学及其在矿冶工业应用等方面的研究, 都具有重要意义。Brock^[1] 有专著对高温微生物做了全面地阐述。

迄今为止, 各国分离的自养型或者兼性自养型高温嗜酸细菌, 按形态有细胞多形态叶球形^[2,3]、细胞球形^[4-6]和细胞杆状^[7,8]三种, 共 7 种高温嗜酸细菌, 其中只有 Brock 等人^[3] 分离鉴定的硫叶菌在伯杰氏细菌学鉴定手册^[9] 第 8 版里确定了分类位置, 列在代谢硫或硫化物类型里, 以氧化硫或硫化物获得能量的无机化能自养型细菌中, 与硫化杆菌属 (*Thiobacillus*) 并列为单一的属, 即硫叶菌属 (*Sulfolobus*), 唯一模式种为嗜酸热硫叶菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*)。其他的 7 种类似于硫叶菌的细菌, 虽然在代谢硫或硫化物获得能量方面是一致的, 但是在营养型上、形态上、DNA 碱基对组成以及生长温度之间都有明显的差异, 分类位置尚未确定, 均有待于进一步

研究和讨论。

本文主要报道一株新的无机化能自养型高温嗜酸细菌的分离、鉴定及其分类位置的讨论。

材料与方 法

(一) 采 样

用于分离高温嗜酸细菌的水样和土样均采集于我国四川省的南江铜矿和南、北两温泉、云南省的腾冲县热酸泉及西藏自治区的羊八井热泉等地区。样品的温度范围在 20—92 $^{\circ}\text{C}$, 酸度范围在 pH 1.0—4.6。

(二) 分离和培养

全部试验均采用 Allen^[10] 的改良无机盐培养基^{*}。于 65—70 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养。细菌生长后, 通过连续少量移种以达到丰富培养和纯化的目的。

(三) DNA 碱基对组成测定

测定方法见文献^[11,12], 用大肠杆菌 (*E. Coli* 取自本所) 作标准对照。

本文于 1981 年 7 月 6 日收到。

本工作承王大稻先生的关怀与指导; 本所新技术室电镜组摄制照片; 采集水样等得到云南省保山地区科委、保山县委和腾冲县科委的大力支持和帮助, 特致谢意。

(四) 细菌形态观察

用透射电子显微镜直接观察。

(五) 测定方法

细胞计数：用汤姆氏血球计数器测定；培养液 pH 值，用国产 ZD-2 型酸度计测定；细菌生长，在测定前用滤纸滤去培养液里的硫磺粉，用国产 72 型分光光度计测定细菌生长混浊度；培养液里硫酸根量用乙二胺四乙酸二钠滴定法测定；培养液里铁量用重铬酸钾容量法测定。

结 果

(一) 丰富培养和分离

培养基接种水样或土样培养 10—14 天后，培养液呈乳白色混浊，初始 pH2.8 下降到 pH 1.5 左右。显微镜观察有细菌生长，即按 1% 接种量取培养液接种于新鲜的元素硫培养基内，如此移种约 8 个月，借高酸度和高温筛选，建立丰富培养。待培养物生长稳定，显微镜观察细菌形态已基本一致时，则接种在 12 种实验室常用细菌生理鉴定培养基内，无异养细菌伴杂在内，获得纯培养。De Rosa^[4] 报道高温嗜酸细菌 MT 的分离也是采用连续少量移种纯化的方法。我们分离的 23 个样品中，除 1—4 号样品无细菌生长外，其余 19 个样品都有高温嗜酸细菌生长，从中筛选分离出 7 个

菌株，即 S-5, S-6, S-8, S-10, S-11, S-12 和 S-21，作为本试验用菌株。

(二) 细菌形态观察

7 个菌株形态均为球形，直径 0.8—1.2 μm 。透射电子显微镜下观察见图版 I-1，球形细胞是以二裂殖法生长繁殖。即使细胞为 6—12 天的菌龄，其形态亦没有变化。图版 I-2 可见细胞有类似纤毛的结构，不运动。7 个菌株均是革兰氏阴性反应。

(三) 温度试验

生长温度是高温嗜酸细菌与中温嗜酸细菌的重要区别之一，因此将 7 株菌分别置于 50—85°C 不同温度培养。结果见图 1，7 株菌的生长温度完全一致，最适温度 70°C，范围 55—80°C。

(四) pH 值试验

高温嗜酸细菌具有高度嗜酸稳定性，这是与非嗜酸微生物的重要区别之一。用硫酸调节培养基溶液至各种不同的 pH 1.0—6.0，接种细菌静置于 70°C 培养，从图 2 表明 7 株菌生长要求的初始 pH 值完全一致，最适 pH2.5，pH 范围 1.0—5.5。在初始 pH 1.0 的培养基里，培养液不呈乳白色混浊，显微镜检查细菌极少。

(五) 营养试验

细菌的自养型试验分别采用了硫酸亚铁和元素硫作为细菌的无机能源。硫代硫酸钠由于在高温酸性溶液里极不稳定，易于转变成胶体硫析出，影响试验的精确性，所以没有考虑作细菌能源试验。硫酸亚铁又分别在 55°C 和 70°C 进行试验，结果由表 1 表明，接种与无菌对照的培养液内亚铁氧化量基本一致，又无细菌生长，说明细菌不能利用亚铁作能源。细菌在元素硫培养基里生长特别显著，接种培养 7 天，培养液内硫酸根量由 1.06—1.24g/l 增加至 2.41—7.73 g/l，10—12 天增加至 5—10g/l，培养呈乳白色混浊，细胞数高达 10^8 — 10^9

* A. len 改良培养基成份 (g/l):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.30
KH_2PO_4	0.28
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.07
硫磺粉	5—10

pH2.5—3.0 (用硫酸调节)

微量元素 (mg/l):

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.80
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.03
CoSO_4	0.01
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	4.50
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{V}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.03

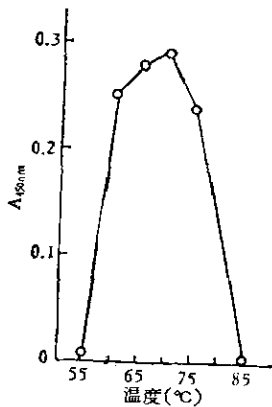


图1 不同温度对细菌生长的影响

Fig. 1 Effect of different temperature on bacterial growth

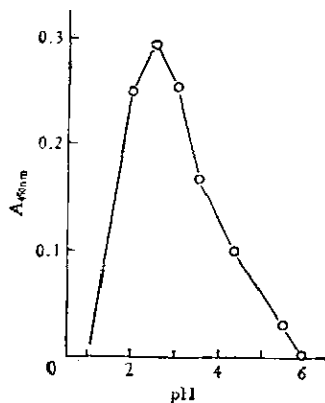


图2 不同 pH 值对细菌生长的影响

Fig. 2 Effect of different pH value on bacterial growth

表1 高温嗜酸细菌对无机能源的利用

Table 1 Utilization of inorganic energy sources by thermophilic acidophilic bacteria

菌株 strains	培养时间(天) Incubation time (days)	S ^o		
		pH	SO ₄ ²⁻ (g/l)	细胞数 (cell No./ml)
S-5	0	2.40	1.24	10 ⁶
	7	1.7	2.41	7.6 × 10 ⁶
	12	1.00	4.92	7.2 × 10 ⁸
S-6	0	2.40	1.24	10 ⁶
	7	1.7	2.66	8 × 10 ⁶
	12	1.00	5.31	8.6 × 10 ⁸
S-8	0	2.40	1.14	10 ⁶
	7	1.45	4.21	9.5 × 10 ⁶
	12	0.98	9.38	9 × 10 ⁸
S-10	0	2.37	1.10	10 ⁶
	7	1.4	6.19	2.1 × 10 ⁷
	12	0.98	6.63	1.1 × 10 ⁹
S-11	0	2.35	1.08	10 ⁶
	7	1.4	5.88	1.1 × 10 ⁷
	12	0.95	10.47	2 × 10 ⁹
S-12	0	2.37	1.10	1.2 × 10 ⁶
	7	1.30	5.12	1.5 × 10 ⁷
	12	1.00	7.86	10 ⁹
S-21	0	2.38	1.06	10 ⁶
	7	1.20	7.73	2.5 × 10 ⁷
	12	0.95	8.36	1.1 × 10 ⁹
无菌对照 sterilized control	0	2.50	1.07	—
	7	—	—	—
	12	2.50	1.01	—

表 2 添加酵母汁对细菌生长及氧化硫能力的影响 (S-5 菌株)

Table 2 Effect of yeast extract addition to the inorganic culture medium on growth and rate of sulfur oxidation

培养时间(天) Incubation time (days)	S ⁰ 培养基			S ⁰ 培养基 + 酵母汁		
	pH	SO ₄ ²⁻ (g/l)	细胞数 (cell No./ml)	pH	SO ₄ ²⁻ (g/ml)	细胞数 (cell No./ml)
0	2.7	0.87	8×10 ⁵	2.8	0.87	8×10 ⁵
3	2.5	0.93	8×10 ⁵	2.75	0.87	3×10 ⁴
6	2.3	2.66	9.5×10 ⁵	2.75	1.37	—
7	1.75	5.31	3×10 ⁶	2.75	1.43	—
8	1.55	7.27	8.5×10 ⁶	2.75	1.43	—
9	1.10	8.48	1.5×10 ⁷	2.80	1.45	—
10	1.05	8.02	1.8×10 ⁸	2.80	1.47	—
11	0.95	10.35	9×10 ⁸	2.85	1.45	—

表 3 7 株菌的 T_m 值和 DNA 中 G + C 含量Table 3 T_m value and DNA base composition of seven strains

菌株 strains	S-5	S-6	S-8	S-10	S-11	S-12	S-21	<i>E. coli</i>
T _m (°C)	85.2	84.1	83.2	83.15	85.3	82.8	84.2	89.9
G + C(mol%)	37.78	36.1	33.9	33.78	39.02	32.9	36.34	50.20

个/ml,说明细菌具有较强氧化元素硫的能力,从而获得生命活动的能量进行自营生长。

异养生长试验是将酵母汁、胨、胰蛋白胨、酪蛋白氨基酸、谷氨酰氨、丙氨酸、天冬氨酸、果糖、葡萄糖、蔗糖、半乳糖、乳糖、核糖等 13 种有机物质,各取 0.01% 和 0.1% 两种浓度代替元素硫作为细菌异生长的主要能源和碳源。在 70°C 培养 7 天,结果表明培养液内没有细菌生长,7 株菌均不能利用这些有机物质。

另一方面考虑到酵母汁能否刺激细菌生长,因此在元素硫培养基里添加 0.1% 酵母汁作对比试验。从表 2 结果可见,培养 11 天,细菌在元素硫培养液内,硫酸根量由 0.87 g/l 增加至 10.53 g/l, pH 值由 2.7 下降至 0.95,说明细菌生长旺盛和氧化活性强;而在添加酵母汁的元素硫培养

液内, pH 值无变化,培养至第 7 天,硫酸根量由 0.81 g/l 缓慢地增加至 1.43 g/l 后再无增加,细菌的生长随着培养天数增加反而减少,至第 7 天即观察不到细胞,由此可见,酵母汁不仅不能刺激细菌的生长,反而抑制了细菌的生长繁殖。

(六) DNA 碱基对含量测定

7 株菌的 DNA 中 G + C 含量见表 3,约为 33—39 mol%, T_m 值约为 83—85%,所测出的 *E. coli* 的 G + C 含量和 T_m 值与文献报道^[1] 的数值 50—52.7 mol% 和 90—90.5 是一致的。

(七) 菌株的命名

从 7 株菌的鉴定结果说明,我们所获得的是一株比较少见的新类型的细菌,与已知 7 种高温嗜酸细菌比较(见表 4),在细胞形态、营养型和 DNA 中 G + C 含量等方面均有较大差异,即使与 MT 菌株的

表 4 高温嗜酸细菌的特性比较
Table 4 Comparison of characters of thermophilic and acidophilic bacteria

菌种 strain	pH		温度(°C) temp		自养类型 autotrophy	革兰氏染色 Gram-stain	G + Cmol%	细胞形态 Cell morphology	文献 Reference
	最適 optimum	范围 range	最適 optimum	范围 range					
铁叶菌 <i>Ferrolobus</i>	2-3			45-70	专性 obligate S ⁰ , Fe ⁺	-	57±3	多形态,不规则球形 pleomorphic irregular sphere 不运动 non-motile, 1.0-1.5µm	[2]
酸热硫叶菌 <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	2-3	0.9-5.8	70-75	55-80	兼性 Facultative S ⁰ , 酵母汁 yeast extract	-	60-68	不规则叶片球形 irregular lobed sphere 0.8-1.0µm	[3]
嗜酸热菌株-MT thermo-acido-philic-MT		3.0-4.5	MT ₃ :75 MT ₄ :87	MT ₃ :50-80 MT ₄ :63-89	兼性 Facultative S ⁰ , 酵母汁 yeast extract	-	MT ₃ :42 MT ₄ :39	球形 sphere, 0.7-1.0µm 有纤毛 with pili 不运动 non-motile	[4]
类硫叶菌 Sulfolobus-like	2-3	2-5	70	55-80	兼性 Facultative S ⁰ , 酵母汁 yeast extract	-	44.2	球形 sphere, 0.8-1.2µm 不运动 non-motile	[5]
硫杆菌类型嗜热菌 Thermophilic thiobacillus-type-bacteria		3.5-7.5		50-75	兼性 Facultative S ⁰ , 酵母汁 yeast extract S ₂ O ₃ ²⁻ , Fe ⁺ 硫化物 sulfide	-		杆状 rod 1.3-2.0×0.5µm	[6]
硫杆菌类型嗜热铁氧化菌 Thiobacillus-type-thermophilic iron-oxidizing bacteria	2.4		55		兼性 Facultative Fe ⁺ , 酵母汁 yeast extract 半胱氨酸 cysteine			杆状 rod 1.1-1.6×0.5µm	[7]
嗜热氧化硫化物硫杆菌 <i>Sulfolobus thermoautotrophicus</i>	1.9-2.4		50	28-55	兼性 Facultative S ⁰ , Fe ⁺ 酵母汁 yeast extract 硫化物 sulfide mineral	+	53.6-53.9	杆状 rod with spore 0.6-0.8×1.0-3.0µm	[8]
嗜热酸硫球菌 (S-5) <i>Sulfophaerellus</i> <i>thermoacidophilum</i>	2.5	1.0-5.5	70	55-80	专性 obligate S ⁰	-	33-39	球形 sphere, 0.8-1.2 µm 不运动 non-motile, 有类似纤毛的结构 with pilus-like structure	本文 this report

形态和一些生理特性有些近似之处,但MT菌株是兼性自养型的,生长特性亦有差异。在伯杰氏细菌学鉴定手册第8版里^[10],仅以氧化硫或硫化物获得能量的细菌,只有两个属,即硫化杆菌属和硫叶菌属,前者是中温嗜酸细菌, DNA 中G+C含量比较偏高, *Thiobacillus thiooxidans* 的是50—52 mol%, *Thiobacillus ferrooxidans* 的是56—57 mol%, 而硫球菌的偏低。根据以上这些特性,说明该菌与已知属种均不相同,应是和硫化杆菌属和硫叶菌属平行的一个新属,命名为硫球菌属 *Sulfosphaerellus* gen. nov., 模式种为嗜酸热硫球菌 *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* sp. nov., 模式株 S-5 保藏于中国科学院微生物研究所内。

讨 论

从我们分离的这株硫球菌生理特性表明,高温嗜酸细菌与其栖息环境特征有密切关系,它们是异常环境的独特产物。在硫球菌广阔栖息环境里,有许多高酸度(pH1.0—3.5)的沸泉(如硫磺塘大滚锅、小滚锅等)、热泉和喷气孔等,温度范围在55—96℃之间,在其周围有许多硫磺沉积物,这可能与硫磺氧化产生硫酸导致酸性

环境有关,而硫球菌的生命活动可能是硫酸成因之一的生物地球化学作用者。因此,对该细菌的进一步研究,将对高温酸性异常环境的生态学、生物地球化学及应用研究,都有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Brock, T. D.: *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperature*, (ed. by Mertimer, P. S.), Springer-Verlag, New York, 1978, p 1—178.
- [2] Brierley, C. L. and J. A. Brierley: *Can. J. Microbiol.*, **19**: 183—188, 1973.
- [3] Brock, T. D. et al.: *Arch. Microbiol.*, **84**: 54—68, 1972.
- [4] De Rosa, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **86**: 156—164, 1975.
- [5] Furuya, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**: (9): 1607—1621, 1977.
- [6] Le Roux, N. W. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **100**: 197—202, 1977.
- [7] Brierley, J. A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**: 523—525, 1978.
- [8] Головоџева, Р. С. и Г. М. Каравайко: *Микробиология*, **47** (5): 815—822, 1978.
- [9] Ruchanan, R. E. and N. E. Gibbon: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1978, p1—178.
- [10] Allen, M. B.: *Arch. Mikrobiol.*, **32**: 270—277, 1959.
- [11] 周慧玲: *微生物学报*, **18** (2): 134—139, 1978.
- [12] 周慧玲: *微生物学通报*, **5** (5): 39—41, 1978.

A NEW GENUS OF THERMO-AND ACIDO-PHILIC BACTERIA—*SULFOSPHAERELLUS*

Zhong Huifang Chen Xiuzhu Li Yaqin Cai Wenliu
(*Institute of Microbiology, Academic Sinica, Beijing*)

A rare new genus of chemoautotrophic thermophilic and acidophilic bacteria isolated from acidic hot spring areas is reported. The generic name is proposed as *Sulfosphaerellus* gen. nov. The type species is *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* sp. nov. Cell spherical, 0.8—1.2 μm diameter, with pilus-like structure, non motile. Gramnegative, aerobic. The bacteria can obtain energy from oxidation of elemental sulfur to sulfuric acid for obligatory autotrophic

growth. Acidophilic, pH optimum of 2.5 and range from 1.0—5.5. Thermophilic with temperature optimum of 70°C and range from 55—80°C. The G + C content of the DNA ranges from 33 to 39 mol% among seven strains.

The *Sulfosphaerellus* has been compared with *Sulfolobus* and other seven thermophilic acidophilic bacteria isolated in recent ten years in the world, and its name and taxonomic position is discussed.