

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*

和致中 彭谦 马俊 陈俊英

(云南省微生物研究所,昆明)

从腾冲县 4 个酸性 (pH 3.0—5.0) 高温 (85—96°C) 温泉中分离到 16 株极端嗜热性芽孢杆菌。经鉴定, 10 株为嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*), 2 株 (YN86317 和 YN86326) 为高温凝结芽孢杆菌 (*Bacillus thermocoagulans* sp. nov.), 4 株 (YN86325、YN86344、YN86344-2 和 YN86345) 为 *Bacillus* spp.

关键词 温泉; 高温菌; 高温凝结芽孢杆菌

云南省腾冲县位于保山地区西北部, 总面积为 5845km²。地热资源极为丰富, 分布在全县的温泉约有 79 个。我们对其中 4 个酸性温泉进行了微生物学的研究, 现将研究结果报告如下。

材料与 方法

(一) 培养基

本研究使用 PPY 培养基^[1]、7# 培养基^[2]为分离培养基。

(二) 生理生化特征的鉴定

按文献[3]方法进行。

(三) DNA 中 G + C 克分子含量的测定

按文献[4]方法进行。参考菌株为 *E. coli* K₁₂。

(四) 热杆菌素 (Thermocins O) 的测定

按文献[5]的方法进行。

(五) 鉴定方法

按 Gordon^[3] 芽孢杆菌属鉴定检索表进行。

结果与 讨论

(一) 从酸性温泉分离高温芽孢杆菌

对腾冲县 4 个酸性温泉的 11 份温泉水样, 我们首先使用 DL 培养基^[6]和 Ms^[7]两种培养基, 在 pH 3.0—5.0, 70—80°C 条

件下进行富集、分离培养, 但没有分离出任何嗜酸芽孢杆菌。用 7# 和 PPY 两种培养基, pH 7.2—7.5 时, 分离到 16 株极端嗜热性芽孢杆菌, 详见表 1。

(二) 16 个菌株的主要生物学特征

16 个菌株的主要生物学特征见表 2, 图 1、2。

(三) DNA 中 G + C 克分子含量



图 1 高温凝结芽孢杆菌 YN86317 菌株(6,000×)

Fig. 1 Type strains YN86317 of *Bacillus thermocoagulans*

本文于 1987 年 11 月 23 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。
成都军区昆明军事医学研究所电镜室协助拍摄电镜照片, 谨此致谢。

表1 从酸性温泉分离高温菌的结果

Table 1 Result of thermophiles isolated from acidic hot spring

温 泉 Hot spring	水样编号 Number of water samples	分离条件* Condition of isolate			菌株号 Number of strains
		培养基 Medium	pH	温度(°C) Temperature	
大 滚 锅 Dagunguo (96°C, pH3.0— 4.0)	BSH19-02	7#	7.5	70	YN8696
	BSH19-02	PPY	7.2	60	YN86316
	BSH19-03	7#	7.5	70	YN8674
	BSH19-03	PPY	7.2	60	YN86317
	BSH19-19	PPY	7.2	70	YN86328
中 医 院 澡 塘 Zhongyiyuan zaotang (95°C, pH5.0)	BSH19-07	7#	7.5	60	YN8676
	BSH19-04	7#	7.2	60	YN86344
	BSH19-04	7#	7.2	60	YN86344-2
	BSH19-04	PPY	7.2	60	YN86345
	BSH19-05	PPY	7.2	60	YN86319
	BSH19-06	7#	7.2	60	YN86341
	BSH19-06	PPY	7.2	60	YN86341-2
硫 磺 塘 Liuhuangtang (95°C, pH3.0)	BSH19-14	PPY	7.2	60	YN86324
黄 瓜 筲 Huangguaqing (85°C, pH3.0— 5.0)	BSH19-15	PPY	7.2	60	YN86325
	BSH19-16	PPY	7.2	70	YN86326
	BSH19-17	7#	7.2	70	YN86350

* 100r/min

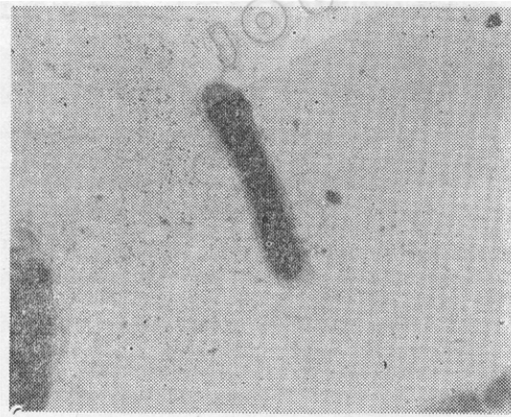


图2 YN86344 菌株 (6,000×)

Fig. 2 Strain YN86344

以 *E. coli* K₁₂ 为参照菌株,测定了5个菌株DNA中G+C克分子含量,结果如下:

YN86317 为 58.27%; YN86326 为

58.27%; YN86344 为 55.36%; YN86344-2 为 54.11%; YN86345 为 56.19%。

(四) 菌株的分类鉴定

据表2所列16个菌株的主要生物学特征,可将这些菌株分为三组。第一组以表2内自左至右为序的第1—10株): V.P(-), 接触酶(+), 最高生长温度在75°C (YN8676 为70°C), 在厌氧琼脂内和pH 5.7不能生长等特征,与Gordon的芽孢杆菌检索表中所列嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 鉴别特征相符,将它们鉴定为 *Bacillus stearothermophilus*。第二组 (YN86317 和 YN86326) V.P(+), 接触酶(+), 在7%氯化钠上不能生长,在55°C、pH 5.7和厌氧琼脂内生长等鉴别特征与 *Bacillus coagulans* 相

表 2 16 株高温菌的主要特征

Table 2 Major characteristics of 16 strains of thermophilic bacteria

特征 Characteristics		菌株 Strains															
		YN8696	YN86316	YN8674	YN86328	YN8676	YN86339	YN86341	YN86341-2	YN86324	YN86350	YN86326	YN86317	YN86344	YN86344-2	YN86345	YN86325
革兰氏反应 Gram reaction		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
运动性 Mobility		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
接触酶 Catalase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
厌氧生长 Anaerobic growth		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
V.P		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
生长温度 Growth at(°C)	最高 Maximum	75	75	75	75	70	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
	最低 Minimum	45	45	45	45	45	45	45	45	45	40	45	45	45	45	45	45
生长 pH Growth at pH	最高 Maximum	9.0	9.0	10	9.0	9.0	9.0	9.0	10	10	9.0	10	10	9.0	9.0	8.0	10
	最低 Minimum	6.0	6.0	6.5	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
生 长 Growth in	0.02%Azide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5%NaCl	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7%NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	pH5.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
产 酸 Acid from	葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	乳糖 Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	蔗糖 Sucrose	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
淀粉水解 Amylolysis		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蛋白水解 Protolysis		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吲哚 Indole		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
柠檬酸盐利用 Citrate utilization		+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
色素产生 Pigmenting		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
厌氧硝酸盐产气 Gasing of nitrate, anaerobic		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

* 在 0.1% 仍可生长。
Grow also at 0.1%.

符。但该组的两个菌株生长温范围为 45—75°C, 在马铃薯块上产生桔红—玫瑰红色素, 不水解淀粉, 在 0.1% 叠氮钠仍可以生长等特征, 与 *Bacillus coagulans* 和已报道的其它高温芽孢菌⁽⁸⁻¹⁰⁾ 种的描述不符, 因此将它们定为一新种, 定名为高温凝结芽孢杆菌 (*Bacillus thermocoagulans* sp. nov.), 典型菌株为 YN 86317,

保存于云南省微生物研究所。第三组(YN 86325, YN86344, YN86344-2, YN86345) 的 4 个菌株 V. P(-)、接触酶 (+)、在 65°C 生长等特征, 与 Gordon 的芽孢杆菌属检索表所列 *Bacillus sterothermophilus* 的鉴别特征相符。但它们在厌氧琼脂内可生长, 不同于 *Bacillus sterothermophilus*; 与本文报道的 *Bacillus thermocoagulans*

sp. nov., 则在 V.P 反应、蔗糖代谢、色素产生、厌氧硝酸盐产气等有明显差别, 因此其种名待定: *Bacillus* spp.。

(五) 新种的描述

高温凝结芽孢杆菌新种

Bacillus thermocoagulans sp. nov.

细胞杆状, 菌体 $0.6-0.8 \times 2.8-4.5 \mu\text{m}$, 不形成丝状体。形成芽孢, 芽孢椭圆、端生, 孢囊略膨大。革兰氏阳性, 有周身鞭毛, 能运动。生长温度范围 $45-75^\circ\text{C}$, 最适 $65-70^\circ\text{C}$, 生长 pH 范围 $5.0-10.0$, 最适 pH8.0

阳性反应: 接触酶, V.P, pH 5.7 生长, 厌氧琼脂内生长, 在 $0.02-0.10\%$ 叠氮钠中生长, 从葡萄糖、麦芽糖、蔗糖产酸, 以木糖、甘油、琥珀酸为唯一碳源生长, 以蛋白胨、谷氨酰胺和尿素为唯一氮源生长, 在马铃薯块上产生红色色素, 酪化牛乳。

阴性反应: 淀粉水解, 纤维素水解, 硝酸盐利用, 吡嗪产生, 厌氧硝酸盐产气, 明胶液化, 在 7% 氯化钠生长。

反应结果不定: 柠檬酸盐利用, 硝酸盐还原, 利用纤维二糖, 产生热杆菌素(YN86317 产生, YN86326 不产生)。

DNA 中 G + C 含量为 $58.27\text{mol}\%$ 。

从酸性温泉分离出嗜酸热芽孢杆菌已有报道, 如 Darland 和 Brock (1971) 报道的 *Bacillus acidocaldarius*, Belley 和 Brock (1974) 报道的 *Bacillus coagulans* 嗜酸热菌株^[9]。但至今尚无从酸性高温温泉中分离嗜中性或微碱性极端嗜热性芽孢杆菌的报道。本文报道从酸性 (pH 3.0—5.0) 高温 ($85-96^\circ\text{C}$) 温泉中分离到 pH5.0 以下不能生长的嗜中性(或微碱性)极端嗜热性芽孢杆菌, 为进一步发掘和开发利用高温菌资源的研究提供借鉴。

参 考 文 献

- [1] Loginova, L. G. et al.: *Int. J. Syst. Bact.*, **34**: 498—499, 1984.
- [2] Brock, T. D. et al.: *J. Bact.*, **98**: 289—297, 1969.
- [3] Gordon, R. E. et al. (蔡妙英等译): 芽孢杆菌属, 农业出版社, 北京, 第 19—108 页, 1983.
- [4] Matmut, R.: *J. Mol. Biol.*, **3**: 208—218, 1961.
- [5] Sharp, R. J. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **111**: 449—451, 1979.
- [6] Darland, G. et al.: *ibid.*, **67**: 9—15, 1979.
- [7] Harrison, A. P. et al.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **38**: 265—269, 1984.
- [8] Belley, R. T. et al.: *J. Appl. Bact.*, **37**: 175—177, 1974.
- [9] Heinen, U. G. et al.: *Arch. Microbiol.*, **82**: 1—23, 1973.
- [10] Schenk, A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **115**: 333—341, 1979.

STUDY ON THE THERMOPHILES IN HOT SPRINGS OF YUNNAN

VII. EXTREMELY THERMOPHILIC BACTERIA BELONGING TO THE GENUS *BACILLUS* IN ACIDO-HIGH TEMPERATURE HOT SPRINGS OF THE TENGCHONG*

He Zhizhong Pen Qian Ma Jun Chen Junying

(Yunnan Institute of Microbiology, Kunming)

Sixteen strains of extremely thermophilic bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from hot springs (pH 3.0—5.0, 85—96°C) of Tengchong. It was identified that ten strains among sixteen strains to be *Bacillus stearothermophilus*, two strains to be *Bacillus*

thermocoagulans sp. nov., another four strains to be *Bacillus* spp.

Key words

Hot spring; Thermophiles; *Bacillus thermocoagulans*

* Projects supported by National Natural Science Foundation of China.