

## 海泥中硫桿菌的分离培养研究\*

薛廷耀 孙國玉

(中国科学院海洋研究所)

在自然界硫的轉化过程中,能使硫或硫的不完全氧化物轉化成为硫酸等产物,并在体内不累积硫粒而在土壤中起主要作用的硫化細菌,基本上只有一属,那就是硫桿菌属(*Thiobacillus* Beijerinck)<sup>[1]</sup>。硫桿菌属在其生命活动过程中經轉化而生成的硫酸,能使土壤中不溶性的矿质盐类,如磷酸鈣等轉化成为容易被植物吸收利用的可溶性矿质盐类,并且增加了土壤中有效硫的含量,因而可以提高土壤的肥力,促进农作物的增产。此外,在一定限度內施入硫磺接种硫化菌还可以改变土壤的反应,抑制某些病原微生物的滋生,这对农作物某些病害的防治如馬鈴薯疮痂病等也是有效的<sup>[1,8]</sup>。同样地在含硫化細菌少的碱土中施入硫磺<sup>[2,8]</sup>并接种适宜的硫桿菌(由于硫酸的产生)对于改良強碱土是有效的办法之一。

其次,由于硫桿菌生命活动所进行的硫化作用,对改良水庫和貯水池的水质也有着良好的作用。当水庫和貯水池中所累积的硫化物由于微生物的作用而产生硫化氢积聚时,經過硫桿菌的生命活动所进行的硫化作用,就可以轉化水质中这种有毒物质,因而对水产养殖也是有益的。

自然界中硫桿菌的分布甚广,在淡水、海水及土壤中都能找到。但是,要进行純培养分离,海泥就是这一属細菌的某些种最可靠的来源<sup>[4,11]</sup>。因此,我們用海泥作材料进行了这类細菌的分离培养工作,以期在改良強碱土的綜合措施中<sup>[3]</sup>有所裨益,目前,这种細菌对碱土改良的田間試驗,还正在进行中。

值得提出的是,我們所分离出来的硫桿菌还可以作勘探硫矿、銅矿、鉄矿与其他金属矿的标准指示菌<sup>[10]</sup>。

### 一、分离与检定的方法

我們使用的作为丰富培养的培养基它的选择性是很強的,如分离氧化硫桿菌(*Thiobacillus thiooxidans*)純培养的培养基,其pH值是很低的(pH 2左右),在試驗过程中,污染杂菌的机会很少;分离脫氮硫桿菌(*T. denitrificans*)純培养的培养基,不但有相当強的选择性,而且是在厭氧条件下培养的,杂菌也不易生长;分离排硫桿菌(*T. tioparus*)純培养的培养基,也有較強的选择性。因此,在制作以上三种硫桿菌丰富培养的培养基时都沒有灭菌的必要。

\* 中国科学院海洋研究所調查研究报告第80号。

制备固体培养基的方法,是将3%的琼脂水溶液,在15磅蒸气压力下溶化,再加二倍浓度等容积的培养液,混匀后,作成斜面或高层。試驗中,如需灭菌,一般都采用間隙灭菌的方法。固体培养基(平板划綫純化用)是用紫外綫灭菌的。在做平板时,微量元素是預先分別配成稀釋水溶液,各加一滴滴入无菌的培养皿,再加不含微量元素的琼脂培养基,作成平板,以备后用。

由于細菌作用轉化生成的硫酸,是将培养液加盐酸数滴,再加氯化鋇,然后观察是否有白色沉淀而鑑定的。

分离硫桿菌的材料是采用青島栈桥附近低潮綫的海泥。

1. 分离排硫桿菌 (*Thiobacillus thioparus*) 丰富培养的培养基<sup>[11,5]</sup>其成分如下:

|   |       |   |          |
|---|-------|---|----------|
| $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 1.0%  | $\text{MgSO}_4$   | 0.08%    |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                    | 0.4%  | $\text{Fe}^{++}(\text{FeSO}_4)$ 、 $\text{Mn}^{++}(\text{MnSO}_4)$ | 微量       |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                    | 0.4%  | 水   | 100.0 毫升 |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$                                      | 0.04% | pH  | 7—7.8    |

将上述培养液 50 毫升倒入 150 毫升的錐形瓶,然后接种海泥 2—3 克,振盪混匀,形成浅层培养,在 25—30°C 培养 3—4 天后,培养液即均匀混浊,变酸,一週内即由原来之 pH 7.3 降至 pH 3,由此即可初步証明此类細菌在培养液中占优势的繁殖起来了。

用白金絲取出培养液,在与上述成分相同的固体培养基上划綫純化,1—2 天内即出現不透明的白色或浅黄色的条痕及单一集落,如进行較长时间的培养,在較大集落的中央即出現橙色的小圆点<sup>[11]</sup>。取单一集落,重复划綫純化即可得到純培养,其特征<sup>[9]</sup>如下:

細短桿菌,大小为 0.5×1—3 微米,革兰氏染色負反应,无孢子,能运动。

硫代硫酸鈉平板培养:生长迅速,在 25°C 培养 24 小时,在划綫区域即出現白色或浅黄色的条痕,在細菌生长較稀的区域,即出現白色的微細集落,点状,圓形,大小約为 0.2 毫米,全緣,由于有硫粒的集聚,内部呈現粗粒状构造。

硫代硫酸鈉液基培养:生长旺盛,在 25°C 培养 48 小时,硫粒即积聚于表面,形成混有細菌細胞(图 2)白色或乳白色的薄膜,沾附于管壁,培养液均匀混浊,变酸,一週内即由 pH 7.3 降至 pH 3.0。

硫代硫酸鈉培养基斜面培养:出現白色或浅黄色条痕。

硫代硫酸鈉培养基穿刺培养:在表面穿刺点輕微蔓延生长,呈現白色或浅黄色。

海水肉湯及淡水肉湯培养:不生长。

2. 分离氧化硫桿菌 (*T. thiooxidans*) 丰富培养的培养基<sup>[9]</sup>其成分如下:

|   |       |                 |          |
|---|-------|-----------------|----------|
| 硫黄末                                       | 1.0%  | $\text{CaCl}_2$ | 0.025%   |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 0.02% | $\text{FeSO}_4$ | 微量       |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 0.4%  | 水               | 100.0 毫升 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.05% | pH              | 2—3.5    |

将上列成分的培养基配好后,加入克分子浓度的磷酸若干,使其 pH 值降至 3 左右,然后在容积 150 毫升的錐形瓶中倒入培养液 50 毫升,接种海泥 2—3 克。因为海泥是微碱性的,因而使培养液的 pH 值略为提高,在 25—30°C 培养 2—3 天或更长的時間后,培养液呈現均匀混浊,变酸,至一週即由原来之 pH 值 5.2 降至 3.7,二週时即降至 pH 2 或更低些。

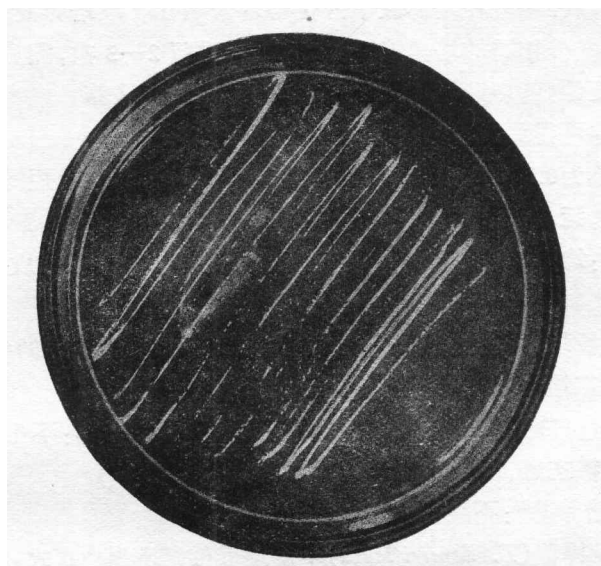


图 1 排硫桿菌在硫代硫酸鈉平板培养的情况，在培养密集区域出现白色条痕，在較稀区域，形成白色、单一点状、圓形的微細菌落。

Fig. 1 Growth of *Thiobacillus thioeparus* on sodium thiosulfate agar plate. White streaks appear on the concentrated areas of the culture. White, single, pointed and rounded colonies appear on the rare areas of the culture.

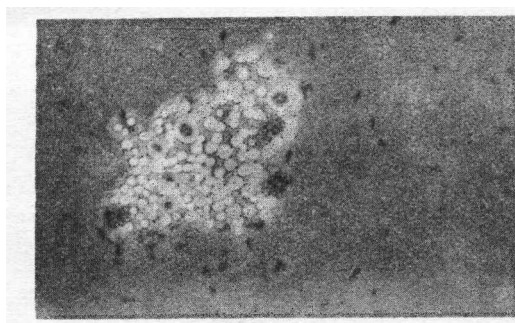


图 2 图片材料取自排硫桿菌在硫代硫酸鈉液基表面生长的薄膜，是用相差活体法攝制的。图中白色圓粒是硫粒，黑色桿状是排硫桿菌的細胞。

Fig. 2 The sample taking from the pellicle on the surface of the sodium thiosulfate solution in which *T. thioeparus* grew. Photomicrograph was taken by phase contrast microscope. The white, rounded particles are sulfur particles and the black rods are the cells of *T. thioeparus*.

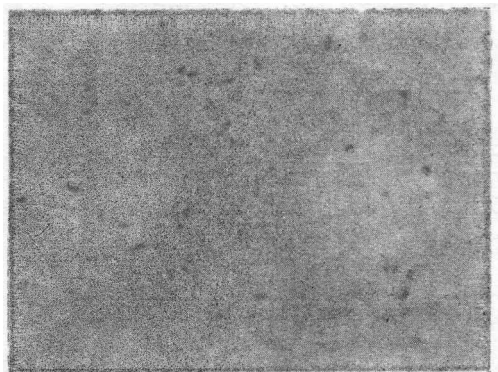


图 3 氧化硫桿菌形态，菌体两端圓形，单一或排列成双(图片是用相差活体法攝制的)。

Fig. 3 The Morphology of *Thiobacillus thiooxidans*. Cells with rounded ends, occurring in single, or in pairs. (Photomicrograph was taken by phase contrast microscope)

由此即可初步証明該种細菌在培养液中占优势地繁殖了。取培养液少許，接种入与丰富培养所用的培养基成分相同的培养液中，如此重复进行 2—3 次，然后滴加硫酸溶液，使其 pH 值降低至 1 或更低些，以此方法淘汰杂菌，便可得到純培养。或者直接接种到 pH 1 或更低的培养液中，亦可得到純培养。純培养的特征如下：

細短桿菌，大小为  $0.5 \times 1.0$  微米，菌体两端圓形，单一、成双或短鏈排列、无孢子(图3)，革兰氏染色負反应，运动活泼。

硫磺液基培养：均匀混浊，无沉淀，不出現表面生长，培养液变成很酸，至一週，由 pH 4.5 降低到 pH 2.0。

硫代硫酸鈉平板培养<sup>1)</sup>：生长微弱，数日后，出現肉眼难于看出的半透明細小集落。

硫代硫酸鈉液基培养：均匀混浊，培养液变酸，并有硫磺沉淀。

酸性及微碱性(pH3 及 pH7.5)的海水肉湯及淡水肉湯培养：不生长。

氮源<sup>2)</sup>：能利用氨态氮，不能利用硝酸态氮。

碱性(pH7.5)培养基<sup>3)</sup>：不生长。

3. 分离脫氮硫桿菌(*T. denitrificans*)丰富培养的培养基<sup>4)</sup>其成分如下：

|   |        |   |          |
|---|--------|---|----------|
| $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 %  | $\text{NH}_4\text{Cl}$                    | 0.05 %   |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                    | 0.2 %  | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.001 %  |
| $\text{KNO}_3$  | 0.2 %  | 水   | 100.0 毫升 |
| $\text{NaHCO}_3$  | 0.1 %  | pH  | 7—7.6    |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                   | 0.06 % |   |          |

将上列培养基倒入磨口玻璃塞的錐形瓶中，接种海泥 2—3 克，将瓶塞塞紧，設法避免气泡形成，在  $25-30^\circ\text{C}$  培养 2—3 天，培养液变成均匀混浊，并有气泡由瓶底的沉淀陸續上升，由此即可証明有此种細菌繁殖，而后将此种培养液傾出 2/3，再以新培养液充滿錐形瓶，2—3 天后，又有气泡自底部上升，再傾出培养液 2/3，再充滿新的培养液，如此重复进行，直至倒入新培养液时，立即見到气体由瓶底培养物中逸出，如此即可証明此种細菌占优势地繁殖了，这时就可以用白金絲蘸取培养液，在与上述成分相同的琼脂培养基上划綫純化，培养于抽出空气后充以  $\text{CO}_2$  并用焦性沒食子酸吸氧的干燥器中，培养一週左右，即出現半透明之圓形小菌落，取单一菌落重复划綫純化，而后用半固体培养基作穿刺培养，借以驗證細菌是否有气体产生及动力。純培养的特征<sup>4)</sup>如下：

1. 細小桿菌，大小为  $0.5 \times 1-3$  微米，革兰氏染色負反应，无孢子，能运动，并能还原硝酸盐；

2. 硫代硫酸鈉液基厭氧培养：均匀混浊生长，自容器底部沉淀中有气泡上升；

3. 硫磺液基厭氧培养<sup>4)</sup>：均匀混浊生长，自容器底部沉淀中有气泡上升；

4. 硫代硫酸鈉平板厭氧培养：菌落无色，点状，圓形，透明或半透明；

1) 所用培养基成分除 pH 值 3.5 外，其余成分与排硫桿菌丰富培养的培养基成分完全相同。

2) 所用培养基，是将丰富培养之培养基中的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  以  $\text{KNO}_3$  代替之。

3) 除 pH 值为 7.5 外，其它成分与丰富培养之培养基的成分完全相同。

4) 硫磺液体培养基的成分：硫磺末，1.0%； $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，0.02%； $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ，0.02%； $\text{KNO}_3$ ，0.05%； $\text{CaCO}_3$ ，0.02%；水，100.0 毫升；pH 7—7.6。

5. 琼脂穿刺培养：在表面下一厘米处至管底都生长；
6. 半固体培养基穿刺培养：有气泡形成，并由穿刺线向外蔓延生长，有动力。

## 二、討論与总结

硫桿菌属所包括的微生物的特征是：革兰氏染色负反应，不形成孢子，不能运动或以单极鞭毛运动，大小为  $0.5 \times 1-3$  微米的小桿菌。它从硫及硫的不完全氧化物如硫代硫酸盐、硫化物、亚硫酸盐、多硫磺酸盐的氧化作用以获取能；氧化作用的主要产物是硫酸，有时还有硫。它们生长在碱性及酸性的环境中，能自二氧化碳或碳酸盐溶液获得碳源的专性自养菌或兼性自养菌，需氧或兼性欠氧。本属主要可分为四种<sup>[7]</sup>：(1)排硫桿菌(*Thiobacillus thioparus*)，是严格自养，生长最适反应是中性至微碱性的需氧菌；(2)氧化硫桿菌(*T. thiooxidans*)，基本上与排硫桿菌相似，它的独特区别是能够抵抗强酸，生长最适反应是 pH 2—3.5，pH 值等于 0.6 或更低时，也不能将它杀死，是文献中报告过的最能抵抗强酸的微生物；(3)新型硫桿菌(*T. novellus*)，是需氧菌，能利用有机物质，不氧化硫元素，不能运动的兼性自养菌；(4)脱氮硫桿菌(*T. denitrificans*)，是在厌氧条件下能还原硝酸盐的兼性厌氧菌。

我們所分离得到的三种純培养，在主要特征方面，与 Baalsrud 及 Baalsrud<sup>[6]</sup>、Breed<sup>[7]</sup> 和 Starkey<sup>[9]</sup> 等所記載的 (1)、(2)、(4) 典型菌种的特征完全相同。虽然在某些次要的特征方面，如我們所分离的氧化硫桿菌純培养，在长度方面个别細胞有的稍长有的稍短，这是由于細胞的年龄和所用培养基成分不同及其他生活条件等原因所引起的，但这不是主要的，我們为了避免根据微小的而不是主要的变异另定新名，而引起分类学上的混乱起见，现将所分离得到的三种培养一概认为是已知菌种，并保持其原来的名称。这三种硫桿菌的純种即：

1. 排硫桿菌 (*Thiobacillus thioparus* Beijerinck)；
2. 氧化硫桿菌 (*T. thiooxidans* Waksman et Joffe)；
3. 脱氮硫桿菌 (*T. denitrificans* Beijerinck)。

新型硫桿菌 (*T. novellus*) 可以从排硫桿菌丰富培养的培养上分离得到<sup>[9,11]</sup>，但是，在我們一系列的分离过程中，尚未得到此种細菌。

硫桿菌是苏联生物学家 И. М. Лазарев 氏所創造的一种綜合性細菌肥料 (AM15) 中所含的微生物的主要組成之一，并已在实践中得到了良好的效果。但是，用它的純培养作成細菌肥料改良強碱土还是一个比較新的課題，人們对它的了解，不象对根瘤菌、固氮菌、磷細菌等那样熟悉，应用的那样广泛，而且效果那么明显。但是，我們知道，以上所提的几种常用的細菌肥料，对于所用菌种都是要經過选择的，是选择固氮能力强，矿化有机磷化物能力高的菌种制成細菌肥料而广泛应用的。同样，利用硫桿菌作为細菌肥料时，所用菌种也需要經過选择，首先不应在土壤中接种脱氮硫桿菌，因为它的生长最适反应是中性至微碱性，不但对改良碱土不起显著作用，而且在土壤耕作技术差、通气不良的情况下，它能利用硝酸盐中的氧、氧化硫及硫的不完全氧化物进行厌氧生活，同化二氧化碳，結果引起了反硝化作用，使土壤中硝酸盐态的肥料轉化成氮气而逸失，降低了土壤的肥力。

新型硫桿菌的生长最适反应是 pH 8—9，不太耐酸，并且不能氧化硫元素，因此和硫

磺混合作成細菌肥料接种到土壤中去,对于改良碱土也不会起显著的作用。

根据氧化硫桿菌的生理特征,在自然情况下的強碱土中这种細菌的数量是很少的,它能活泼地将硫或硫的不完全氧化物轉化成大量硫酸,这对改良碱土是会产生有益效用的。但是在碱性环境下,不适于它正常繁殖,因此作为細菌肥料而施用于強碱土时,需要在細菌肥料的制造方法及施用技术等方面采取有效措施,在开始施入土壤中时,必需創造比較适合于它繁殖的酸性小环境,以利其繁殖。

排硫桿菌生长最适反应是中性至微碱性,在自然环境情况下的強碱土中,它的数量是比氧化硫桿菌多,不过它的耐酸性不如氧化硫桿菌。如果先将这两种細菌分别培养,然后再与硫磺混合制成細菌肥料施入碱土,在开始时,由于排硫桿菌在碱性环境繁殖的結果,可以使环境的 pH 值降低些,尤其是我們所分离到的那一种排硫桿菌,可以忍受 pH 3 的环境,虽然它对改良碱土所起的有益作用不如氧化硫桿菌,但它可以为氧化硫桿菌創造一种比較有利于生长繁殖的环境,对于強碱土的改良是会产生良好的效果的。

利用硫桿菌与硫磺混合制成一种細菌肥料大量施用于強碱土的改良,还是一个比較新的問題。因此,对一些試驗性的工作:如接种剂的制造,田間技术的施用,碱土特性(如碱土的抗生特性,碱土中所存在的参与硫元素轉化的微生物的数量及其分布等)的了解等是非常必要的。以上一系列的問題,今后将是我們与有关单位共同努力的方向。

### 参 考 文 献

- [1] 王祖农, 1953: 硫磺細菌, 65 頁, 科学出版社。
- [2] 阿兰, III., (汪振荣譯) 1957: 盐渍土的改良, 土壤学譯报, 1958 (5): 241—251。
- [3] 巴克, K. П., (楊郁权、薛祖庆譯) 1957: 提高盐碱土肥沃性途径, 苏联农业科学, 1958 (10): 589—597。
- [4] Крпсс, А. Е. 1954. Основные задачи морской и океанической микробиологии. *Вестник Академии Наук СССР*, 8:22—34.
- [5] Baalsrud, K., 1954. Some aspects of the physiology of Thiobacilli. In *Autotrophic microorganisms* 54—76. Edited by B. A. Fry and J. L. Peel. Cambridge University press, London, England.
- [6] Baalsrud, K. and Baalsrud, K. S., 1954. Studies on *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. für Mikrobiol.*, 20:34—62.
- [7] Breed, R. S., Murry E. D. G. and Hitchens, H. P., 1948. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th ed. pp. 1—XVI, I—1529. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- [8] Lees, H., 1955. *Biochemistry of Autotrophic Bacteria*, 21—34, 90. Butterworths, Scientific Publications, London.
- [9] Starkey, R. L., 1935. Isolation of some bacteria which oxidize thiosulfate. *Soil Sci.*, 39:157—219.
- [10] Starkey, R. L., 1956. Transformation of sulfur by microorganisms. *Ind. Eng. Chem.*, 48:1429—1437.
- [11] Vishniac, W. and Santer, M., 1957. The Thiobacilli. *Bacteriol. Rev.*, 21:195—213.

## STUDIES ON THE ISOLATION AND CULTIVATION OF THIOBACILLI FROM MARINE MUD

T. Y. HSUEH AND K. Y. SUN

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

### (SUMMARY)

Three species of *Thiobacillus* have been isolated and cultivated in our laboratory from marine mud collected at low tide near a pier of Tsingtao. The pure cultures are: (1) *Thiobacillus thioparus*, (2) *T. thiooxidans* and (3) *T. denitrificans*.

Enrichment cultures of *T. thioparus* have been obtained by inoculating 2—3g. of marine mud to a shallow layer of the following medium:  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.4%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.4%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.08%;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.4%;  $\text{Fe}^{++}(\text{FeSO}_4)$  and  $\text{Mn}^{++}(\text{MnSO}_4)$ , in trace; and water 100 ml. After the culture is cultivated at 25—30°C for 3—4 days, the medium becomes turbid and acid, and the pH reduced from original 7.3 to 3. A loopful is taken from the culture and streaked on an agar medium with same composition. Within 1—2 days, opaque colonies appear with a white and pale yellow precipitated sulfur colonies. If the cultivation is progressing, a small orange tint appears in the center of the larger colonies. Repetition of streaking of a single colony will be able to obtain a pure culture. The microorganism have been characterized as an obligatory autotrophy, aerobic with an optimal pH for growth from neutral to weak alkaline.

*T. thiooxidans* have been isolated by inoculating 2—3g. of marine mud to a flask containing 50 ml. of the following enrichment culture medium: elemental sulfur, 1.0%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.02%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.4%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%;  $\text{CaCl}_2$ , 0.025%;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , in trace; water, 100 ml. pH 3. After the culture is cultivated at 25—30°C for 2—3 days or longer, the culture fluid becomes acid and turbid. Within two weeks pH drop to below 2, thereby assuming the predominance of the microorganism. A drop is taken from the culture fluid and transfer to a new medium. A pure culture is obtained by repetition of the procedure for 2—3 times. The microorganism is characterized as strictly autotrophic, obligatory aerobic with optimum reaction at 2.0—3.5. This microorganism produce more acid, by oxidation of sulfur, and to live in a more acid medium than any other microorganism ever reported.

*T. denitrificans* have been isolated by inoculating 2—3 g. of marine mud to a glass stoppered bottle filling completely with the following medium:  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.5%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%;  $\text{KNO}_3$ , 0.1%;  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1%;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.05%;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001%; water, 100 ml.; pH 7—7.6. After the culture is cultivated at 25—30°C for 2—3 days, the culture fluid becomes turbid and gas bubble evolve from the sediment. Then  $\frac{2}{3}$  of the fluid is poured off and the bottle is filled again with the new medium. Repetition of pouring for 4 times, thereby assuming the predominance of *T. denitrificans*. A loopful of culture fluid is then streaked on an agar plate on the same composition and incubated in vacuum discator filling with  $\text{CO}_2$ . One week later, transparent, small, round colonies appear. Taking from a single colony is then streak again on agar plate for purity. *T. denitrificans* is characterized as facultative anaerobic or even microaerophilic, under anaerobic conditions nitrate is reduced to  $\text{N}_2$ . A mixture of *T. thiooxidans* and *T. thioparus* including elemental sulfur used as a bacterial fertilizer for the reformation of strong alkaline soil is suggested and the *Thiobacillus* can be used as a standard culture for the detection of sulfur and metallic ore.