

温泉里的微生物大家庭

云南大学附属中学 2010 届（11 班）喻 钰

指导教师：林连兵 （昆明理工大学）

何 刚 （云南大学附属中学）

摘要腾冲热海是我国高温菌资源的宝库。在昆明理工大学的老师和研究生的指导下，我们通过实地考察、温泉水样的富集培养、病毒感染试验、光学显微镜和电子显微镜的观察，从宏观到微观、简单到复杂、群落—细胞—病毒这些不同的层次，探索腾冲热海一个代表性的温泉中微生物分布及多样性，我们不但发现了许多在高温下能生长的高温蓝藻、高温细菌、古菌，令人惊奇的是，我们通过电子显微镜观察温泉水样的富集培养物，发现了多种能感染高温菌的高温噬菌体（病毒）。在此之前，在腾冲热海仅报道过硫化叶菌的纺锤形病毒，在这次研究中我们首次发现了腾冲热海高温菌——栖热菌（*Thermus.sp*）的球状、丝状和头尾型三种不同形态的病毒，它们在病毒分类上分别属于肌尾病毒科（*Myoviridae*）、长尾病毒科（*Siphoviridae*）、复层病毒科（*Tectiviridae*）和丝状病毒科（*Inoviridae*）的高温噬菌体。这些发现有助于进一步了解和丰富腾冲热海的微生物资源，揭示了腾冲热海除了业已研究的丰富高温菌资源，更神秘的高温菌病毒资源有待于大家去探索，课题研究成果也将进一步促进腾冲热海高温菌资源的开发和应用。

关键词：腾冲热海，高温菌，高温噬菌体（病毒），电子显微镜观察

一、前言

“腾冲温泉甲天下”，腾冲是中国三大地热区之一，水热活动非常剧烈，其中位于全县高温地热区中心的热海，具有“一泓热海”之美誉。明代大旅行家徐霞客在其游记中曾有“遥望峡谷蒸腾之气，东西数处，郁然勃之，如浓烟卷雾，东濒大溪，西贯山峡”的诗句赞美热海。大滚锅、鼓鸣泉、珍珠泉、眼镜泉、怀胎井、狮子头、蛤蟆嘴这些妙趣横生的温泉名字，也让我们对这一国家级地热火山风景名胜区充满了无限的向往之情。

终于有机会踏上了腾冲热海这一块真正的“热土”。就仿佛进入了人间仙境，到处云蒸雾绕，热气腾腾，许多地面上还在冒着一阵阵的水泡，或噗噗地冒着热气，大热泉

喷涌着热水，汩汩作响。水汽随风舞动，有时竟朝我们扑过来，眼前立刻感觉到白茫茫的一片。让我感受最深的是，进入热海的科考区，在蛤蟆嘴边的一个热泉边，在这汇集着热水的小渠里竟然还可以看到厚厚一层黄黄绿绿的生物，看样子有点像在池塘里看到的绿藻，我试探性地摸了一下水里，好烫啊，我的手猛地自动缩了回来，一个念头在我脑海中一闪而出，这些绿藻怎么不怕烫啊！世界上还真的有不热怕的生物？

带着这样的疑问，旅游归来，我和老师谈了在热海见到的这一奇闻趣事，在老师的介绍下，我们向昆明理工大学生物工程技术研究中心的老师寻求答案。原来这是一类叫高温菌或嗜热菌的微生物，腾冲热海 300 万年以上连续的火山--地热活动，形成了该地区各具特色的温泉类型，与之相应的漫长的微生物生态系统的演化，孕育出现代腾冲热海丰富的高温微生物。“好热一族”，我给这些不怕热的小家伙起了一个很时尚的名字。更让我们兴奋的是，我们有机会和老师一起进行一次热海不怕热微生物的考察，亲自领略温泉里“好热一族”大家庭的故事。

二、材料与方法

为了方便采样并能直观地反映出温泉里的微生物类群的多样性，我们选取了一个水温在 55-85℃ 的小热水塘（图 1）作为我们研究的对象，根据温泉不同位置水温及菌藻席颜色的差异，我们设置 A、B、C、D 四个采样点，来给大家讲讲这个温泉里 A、B、C、D 四个微生物家庭的故事。

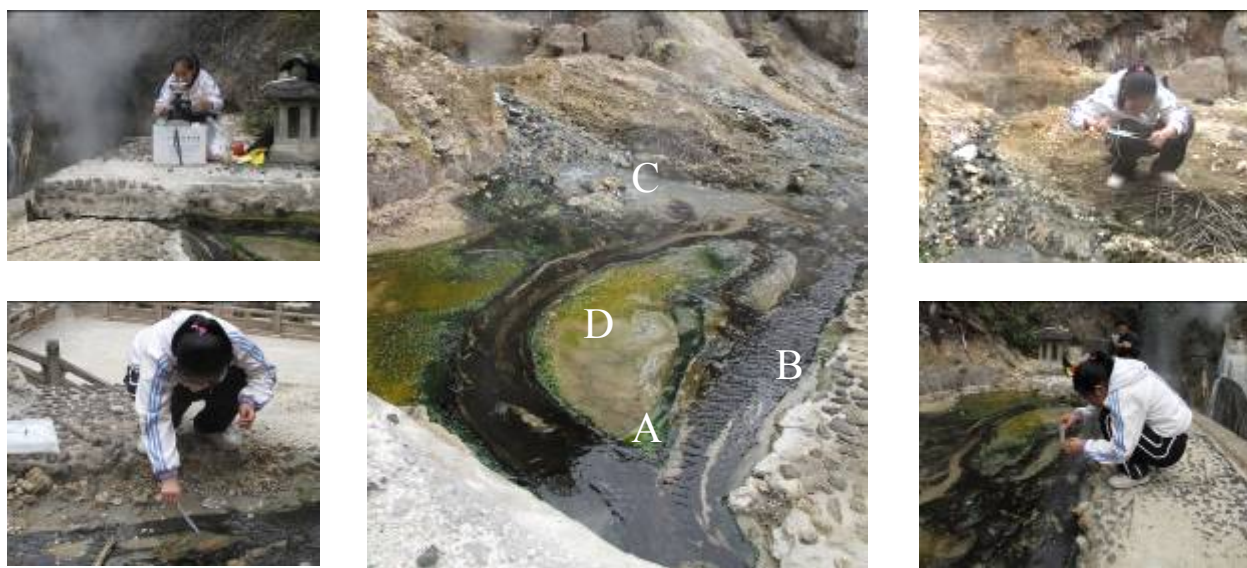


图 1 温泉及采样点位置

1. 实验材料:

1.1 菌藻席：在不同的水温下，温泉中的菌藻席颜色是有差异的，本研究分别在温泉的不同位置（温度）采集绿色（采样点温度为 55℃）、黄绿色（采样点温度为 60℃）、褐色（采样点温度为 65℃）和灰白色（采样点温度为 85℃）四种具有代表性的菌藻席类型。

1.2 温泉水样：在温泉的四周及中间分别采集等量的水及底泥，混合均匀，用于分离高温菌菌株和病毒。

1.3 酸性土样：在温泉边缘的小喷气孔，采集表层的酸性土样，通过富集培养用于观察病毒形态。

1.4 培养基成分

(NH₄)₂SO₄ 1.3g，KH₂PO₄ 0.28g，MgSO₄·7H₂O 0.25g，FeCl₃·6H₂O 0.02g，Na₂MoO₄·2H₂O 0.025 mg，CaCl₂·2H₂O 0.07g，Na₂MoO₄·2H₂O 0.025 mg，FeCl₃ 0.28 mg，CuSO₄ 0.016 mg，MnSO₄·H₂O 2.2 mg，H₃BO₃ 0.5 mg，ZnSO₄·7H₂O 0.5 mg，CoCl₂·6H₂O 0.046 mg，CaSO₄·H₂O 60 mg，Tryptone 1g，Yeast extract 1g，定容至 1L。富集培养温泉水样时，pH调节为 7.5，富集培养酸性土样时，pH调节为 3.5。

2. 实验方法

2.1 菌藻席的显微观察

取少量菌藻席，按照生物显微镜装片的制作方法，直接制作装片，同时对菌藻席样品先进行结晶紫染色，这两种装片都在显微镜下观察、拍照。

2.2 温泉水样中细菌的观察

取混合均匀后放置澄清的温泉水样 10ml，在 5000g 的离心力下离心 10min，沉淀用 100μl 的蒸馏水悬浮后作为菌液，按照结晶紫染色法制作装片，在高倍显微镜下观察、拍照。

2.3 富集培养

分别取 10ml 混匀的温泉水样，接种于 100ml pH 值为 7.5 的培养基中；取 5 克酸性土样，接种于 100ml pH 值为 3.5 的培养基中，将它们于温度为 70℃，转速为 150rpm 的摇床中培养 3-5 天。

2.4 菌落观察

将以上富集培养液，按照不同的稀释度涂布在含培养基的琼脂平板上，观察形成菌落的多样性，菌落之间的相互关系。

2.5 病毒的电子显微镜观察

将以上富集培养物用 2% 醋酸双氧铀染色后，于电子显微镜下观察，检测富集培养物中是否含有病毒。

2.6 病毒感染实验

在研究生的带领下，我参与完成了一个病毒感染实验。将以上富集培养液在 5000g 的离心力下离心 10min，取上清用 0.45 μ m 滤膜过滤后获得病毒液，将 100 μ l 病毒液和分别 2ml 的栖热菌 (*Thermus.sp*) 细菌培养液 (研究中心实验室以前从这个温泉里分离到的很多栖热菌菌株) 混合，制作双层平板，放进保鲜盒中 (以防高温下平板被晾干)，于 70 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 2-3 天，如果病毒液中有能感染栖热菌的病毒，那么我们可以清晰地看到病毒“吃掉”栖热菌而在平板上形成的清亮的噬菌斑!

三、结果与分析

这个温泉水池由 C 采样点上方的一个 95 $^{\circ}$ C 的高温沸泉泉水流入形成，泉边还有少量酸性的小泉，整个温泉的 pH 约 7.5，适合高温菌的生长。在从 C 点流到 A 点附近的出水口时，温度从 C 点的 85 $^{\circ}$ C 降到 A 点附近的 55 $^{\circ}$ C，形成了一个很好的温度梯度，不同的温度下，菌澡席的颜色各有特色，从宏观到微观，我们见到了温泉里的不同颜色的 A、B、C、D 四个不同家庭里的家庭成员。在此之前我得先让您回忆一些常识：我们的眼睛能识别的最小距离的极限是 0.1 毫米，也就是 100 微米，所以我们可以看到五彩斑斓的菌澡席。要看到组成菌澡席的这些微生物，它们多数属于原核细胞，我们可以借助光学显微镜，学校里用 1000 倍的光学显微镜可以分辨到 1 微米，我们可以利用它看到菌澡席里的各种细胞，如果你对直径为 1 微米以下的生物都感兴趣，那我们就建议你用电子显微镜观察了，它可以分辨到纳米级别，就像我们要看病毒，只能靠它了，那可是价值几百万的大家伙了。

请赶快跟我们一起走进这温泉里的大家庭吧。

1. 同一温泉中不同的蓝藻群落结构

不同温泉或同一温泉的不同环境中，无论是单细胞或丝状种类的温泉蓝藻，往往都能形成较厚的质地和形状不同的胶质群落 (俗称菌澡席)，这是温泉蓝藻一个重要的外部特征。此外，颜色也是温泉蓝藻群落外观上的一个显著特征。

图 2, 3, 4, 5 分别是家庭 A、B、C、D 的合影 (分别对应 A、B、C、D 采样点)。

1.1 A 家庭的成员

A 家庭有着一片绿色家园 (A 采样点温度为 55℃), 形成皮状群落, 它们主要以颤藻属和鞘丝藻属等丝状藻类为优势组成 (图 2), 有的细胞直径可以达到 80 微米, 在原核生物细胞中算是很大了。该两属的细胞均为不分枝的单条藻丝, 但藻丝往往扭曲。颤藻的藻丝能滑动, 鞘丝藻的藻丝能规则或不规则地螺旋缠绕, 故形成比较厚的坚固的皮状群落。

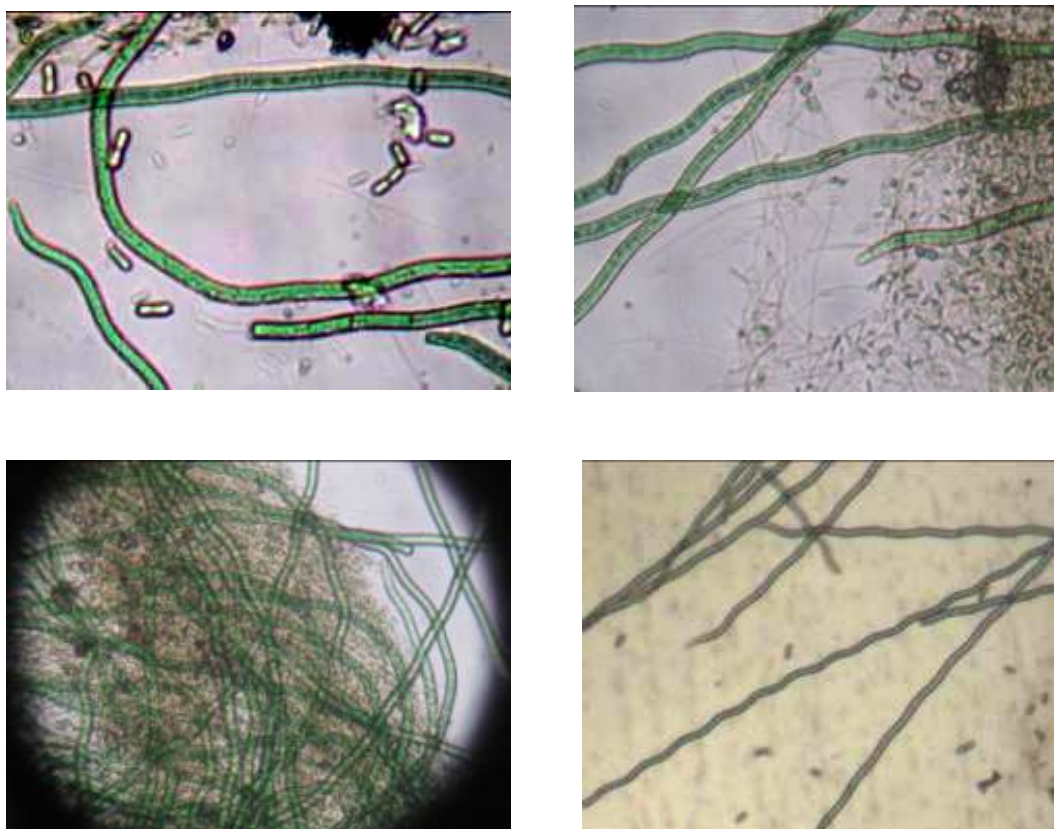


图 2 A 采样点菌藻席的显微观察 (放大 100 倍)

1.2 B 家庭的成员

B 家庭成员住在棕黑色的膜状群落菌藻席里 (B 采样点温度为 65℃, 主要由席藻属 (*Phormidium*) 和眉藻属 (*Calothrix*) 蓝藻组成 (图 3)。群体胶质衣鞘厚, 略硬, 彼此粘连, 相互交织成膜状的群落呈棕黑色,

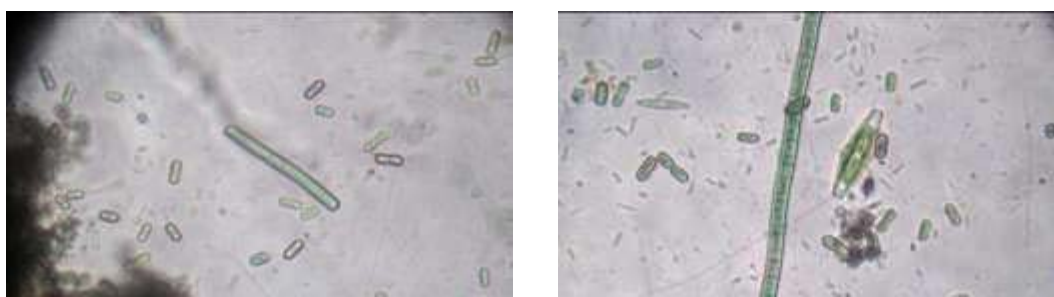


图 3 B 采样点菌藻席的显微观察 (放大 100 倍)

1.3 C 家庭的成员

C 家庭的成员生活的温度达到 85°C (C 采样点温度为 85°C), 呈粘性的灰白色团状结构, 其没有光合色素, 其实它们是由许多杆状和丝状的嗜热细菌组成的 (图 4), 细菌可以分泌出一些胶状物质使大家相互粘连, 这对提高大家对不良环境的抗性是很有帮助的, 嗜热产水菌属菌株是其中重要的成员, 温度太高, 已导致其它蓝藻已经无法生存。

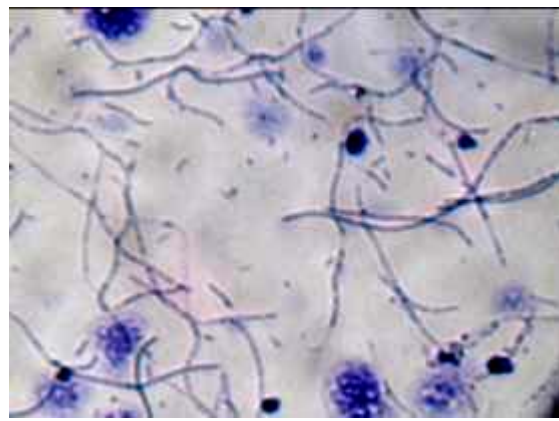


图 4 C 采样点菌澡席的显微观察（放大 1000 倍，结晶紫染色）

1.4 D 家庭的成员

D家庭是一个橄榄绿色、黄绿色的家园（D采样点温度为60℃），在显微镜下可以明显看到以线形粘杆藻（*Cloeotheoe linearis*）形成的优势种群落，细胞少数到多数聚集在一起形成厚的胶被（图5），群体之间的胶质相互联结，胶质中混有泥土或沉积物，形成硬壳状群落。

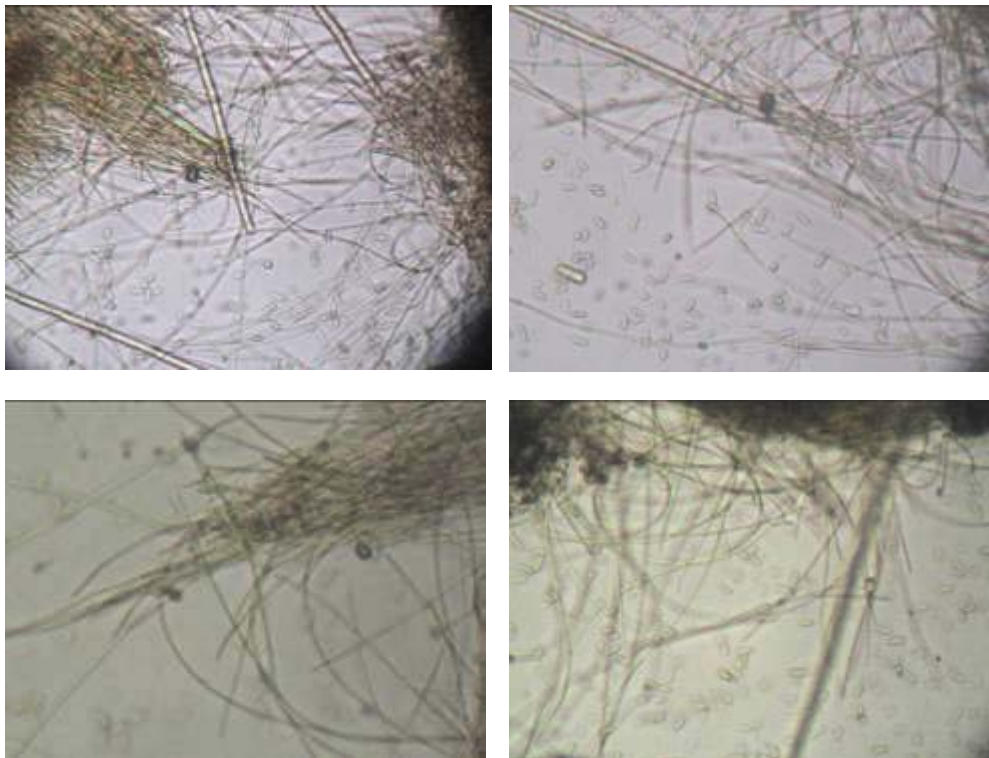


图 5 D 采样点菌澡席的显微观察（放大 40 倍）

从形状上看，温泉这个大家庭的成员有球状、杆状、椭圆、丝状、米粒状、长杆状、

螺旋状、弯杆状等等，从大小上看，图中含有光合色素（叶绿素）的细胞为蓝藻细胞直径可达到 100 微米，而那些细菌直径也就 1 微米左右，相差太悬殊了。水在同一个温泉中但各处的温度相差还是很明显的，对温度的适应性不同，导致同一温泉中形成不同类型、色彩斑斓的菌藻席群落结构，这也是生物适应环境的见证。

那家伙蓝藻细胞具有光合色素，可以进行光合作用，制造有机物，作为温泉中的生产者，为这个家庭提供食物，算是贡献大了。无论是种类还是数量上来说，温泉里的这个家庭也真够庞大的，经过计算，1ml 的温泉水样中，含有将近 10 万个这样的成员，这个家族真是人丁兴旺啊！

2. 温泉富集水样的电镜观察

如果用电子显微镜来看看，这个家庭还有其它的成员吗？当我们把温泉样品的富集培养液在电子显微镜下观察，结果一定会使你大吃一惊：那可是另外一个世界，在病毒面前，小小的细菌这时候变成了庞然大物，病毒们也露出了他们的庐山真面目，在细菌看来，这里的病毒就像是“小人国”里的居民了。让我们赶快走进这个“小人国”吧，图 6 显示的是细菌的形态，箭头所指为病毒颗粒。图 7 所示为温泉富集培养利用电子显微镜观察所看到的病毒颗粒类型。

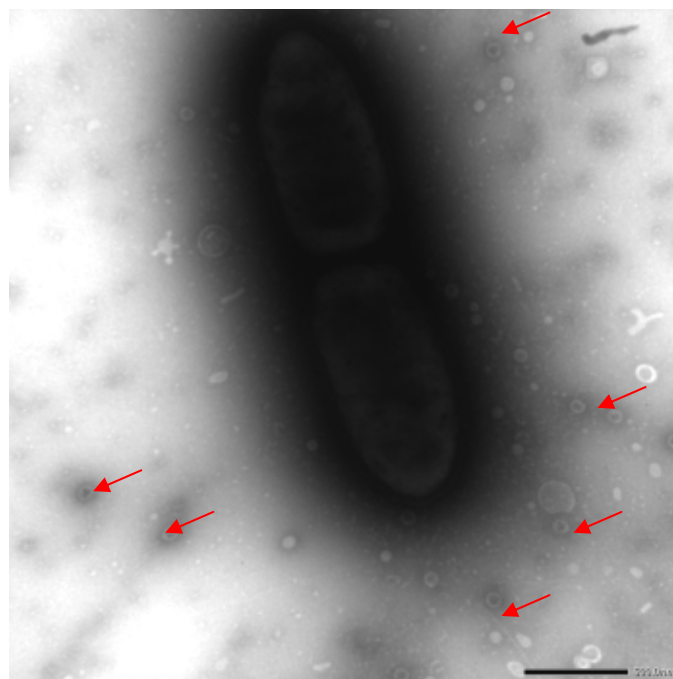


图 6 细菌及病毒（噬菌体）颗粒（放大 8, 000 倍）



图 7 温泉水样富集培养物中的病毒形态（放大 50,000 倍）

“小人国”的居民，真是千奇百怪，有球状，杆状、纺锤状、丝状、头尾注射状等等，可别忘记了它们是在电子显微镜下看见的，它们的大小没超过 200 纳米，很多仅仅 30 纳米，当之无愧的“小人国”了，别忘了你的一根头发的直径约有 8 万纳米！

前几年，昆明市第一中学的同学曾经对腾冲热海高温菌的多样性进行了研究，证明了腾冲热海高温菌的多样性，有关腾冲热海高温菌病毒，我们发现仅报道过中国科学院微生物研究所黄力老师发现了硫化叶菌的纺锤形病毒，在这次研究中，我们除了发现硫化叶菌病毒，还首次发现了腾冲热海高温菌——栖热菌 (*Thermus.sp*) 的球状，杆状、丝状和头尾型病毒，它们在病毒分类上分别属于肌尾病毒科 (*Myoviridae*)、长尾病毒科 (*Siphoviridae*)、复层病毒科 (*Tectiviridae*) 和丝状病毒科 (*Inoviridae*) 的高温噬菌体。病毒作为微生物多样性的重要组成部分，研究中的这些新发现，有助于进一步了解和丰富腾冲热海的微生物资源，为进一步研究开发腾冲热海高温菌资源的宝库贡献力量。

6 “大人国”和“小人国”的战争

这一个大家庭里出了个“大人国和小人国”，自然纷争就不可避免了。我们通过温泉富集培养物和病毒感染实验，见证了细菌和病毒之间的战争，然而在这场战争中，胜利

者不是“大人国”，而是“小人国”，看！图8中有很多病毒正将细胞包围，并发动了猛烈的攻击，那个多面体的病毒长相就是个外星武器，是它攻击了平板上的高温菌，小人国的病毒们猛烈攻击大人国细菌，使细菌了解死亡，所以就见到了平板上大人国的细菌菌苔被吃出了一个个的大洞--噬菌斑，那就是“小人国”的战利品！

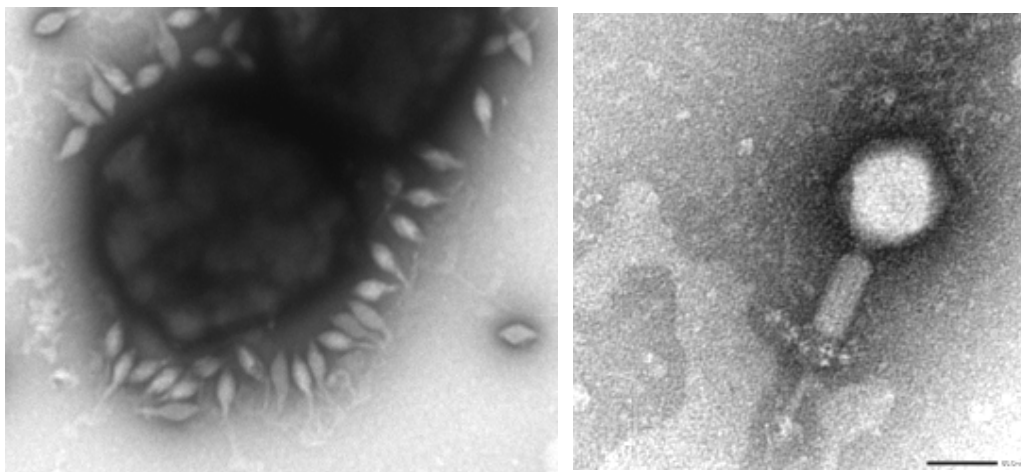


图8 病毒吸附在硫化叶菌表面（左）及典型的栖热菌肌尾科病毒（右）

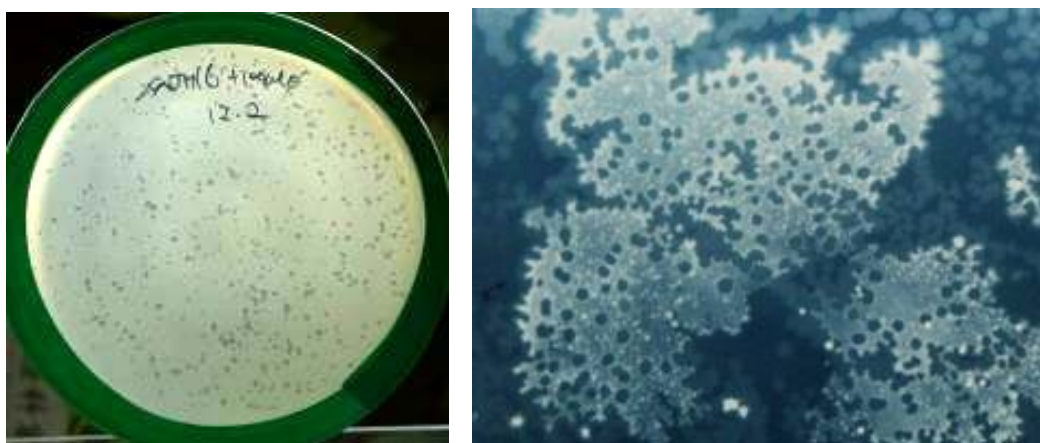


图9 病毒裂解细菌形成的噬菌斑形态

四、结论

腾冲热海作为我国高温菌资源的宝库，高温菌的种类非常丰富，科学家的研究已经证明在热海的温泉中具有高温古菌、嗜热蓝藻和高温细菌的广泛分布，这为研究开发具有广泛应用价值的高温酶奠定了扎实的基础。

在老师和研究生的指导下，我们以腾冲热海一个具有代表性的温泉为目标，通过实地考察、温泉水样的富集培养、温泉四种不同形态颜色菌落席的光学显微镜观察，温泉

水样富集培养物的电子显微镜观察，首次从宏观到微观，从简单到复杂，探索其中丰富的微生物分布，不但发现了许多在高温下能生长的蓝藻细胞、高温细菌，及不同的微生物群落类型的不同温度的适应性特征。

更重要的是，我们在研究中发现了许多高温菌中还感染有病毒，在此之前，仅报道发现有硫化叶菌的纺锤形病毒，我们首次发现了腾冲热海的球状，杆状、纺锤状、丝状和头尾型病毒，这些病毒的宿主为栖热菌（*Thermus*）和嗜热芽孢杆菌（*Thermophilic Bacillus*），这些发现丰富了腾冲热海乃至我国的高温病毒的资源，也使腾冲热海高温生物多样性的研究从通常的细胞层次的研究延伸到了病毒的层次，获得了有价值的研究成果。

五、体会

通过这次科技创新活动，让我深深的意识到科学实践的重要性，书到用时方恨少，课本的知识无法给我们解释大千世界中纷繁复杂的事物，特别是这个创新项目中涉及的极端高温环境中的高温微生物的多样性特征，从开始看到丰富多彩的高温菌澡席时那难以置信的现象，到进一步研究后发现的多样的细菌，甚至目前还少有人研究的高温菌病毒，通过研究亲眼见证了这些极端环境微生物的存在，这些知识不是在课本上能学到的，投身大自然，探索大自然的奥秘，才会有新的发现。可以想象，通过参加各种创新科技活动，有些高水平研究结果还有可能被加到教科书里，我们的教材内容也会更充实。

作为一个学生，我印象最深的是感受了生物研究中的一个完整过程，探索一个温泉中微生物的多样性，在方法上，我们采用了最直接的观察法为主，从宏观到微观、简单到复杂、群落—细胞—病毒这些不同的层次，探索腾冲热海一个代表性的温泉中微生物分布及多样性。我就像钻进了温泉里，遨游在温泉微生物的世界了，领略了在不同大小尺度里的微生物世界的多样性，就像我常看的 Discovery 科学探索频道里介绍的栏目里的科学研究一样，这是在课堂上体会不到的，对课堂上的关于生态系统、群落、细胞、病毒等概念有了深刻的理解。

同时，科学探索的过程也是艰辛的，整个研究过程经历一年左右的时间，其中有野外采样长途奔袭、在热海烈日下工作的艰辛，在实验室里和研究生们学习实验操作面临的各种失败和困难，在繁重的学习任务下，挤出时间完成研究内容，但每当看到用汗水浇灌出的一个个小小的成果，那种喜悦的心情让我难以忘怀。

老师、研究生同学、父母的帮助，使我能努力完成这些实验，是他们的鼓励和帮助，使我不断克服困难，在科学研究的崎岖小路上顽强攀登，我将努力用我的成绩来感谢大家的帮助。

参考文献:

1. 云南人民出版社编，横断山脉，云南人民出版社，1975。
2. 佟伟，章铭陶，腾冲地热，科学出版社，1989。
3. 林文兰，中国云南腾冲地热，云南省科学技术委员会，1996。
4. 邓新晏，许继宏，云南温泉蓝藻多样性研究，生物多样性，1997，5（2）：95-103
5. 钱柔存，微生物学实验教程，北京大学出版社，2003。
6. 和致中，彭谦，陈俊英编，高温菌生物学，科学出版社，2000。
7. Yu MX, Slater MR, Ackermann HW. Isolation and characterization of *Thermus* bacteriophages, Arch Virol. 2006 Apr; 151(4):663-79.
8. Lin L, Zhang J, Wei Y, Chen C, Peng Q. Phylogenetic analysis of several *Thermus* strains from Rehai of Tengchong, Yunnan, China. Can J Microbiol. 2005 Oct; 51(10):881-6.
9. 沈萍，微生物学，高等教育出版社，2006。
10. 吴相钰，陈阅增，普通生物学，高等教育出版社，2005。