



附件：封面格式

行政院國家科學委員會補助專題研究計劃成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※

※ 台灣溫泉區高溫真菌之分離與生物學之研究 ※

※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計劃類別：個別型計劃 整合型計劃

計劃編號：NSC - 90 - 2311 - B - 034 - 001

執行期間：90年 8月 1日至 91年 7月 31日

計劃主持人：陳桂玉

共同主持人：

計劃參與人員：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習報告心得一份
- 赴大陸地區出差或研究心得報告一份
- 出席國際科學會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計劃國外研究報告一份

執行單位：中國文化大學

中華民國 91 年 10 月 日

台灣溫泉菌高溫真菌之分離及生物學之研究

摘要

本計畫針對台灣溫泉區嗜熱真菌做初步之調查。到本省北部溫泉區，包括台北陽明山馬槽溫泉、北投溫泉、烏來溫泉、金山溫泉、宜蘭礁溪及清水溫泉等地採樣。以攜帶式溫度酸鹼度測定器直接測量露頭溫度及酸鹼度（未能直接測量者以燒杯取樣，間接測量），樣品在經採集後，採集樣品置於事先滅菌之封口瓶中，進行嗜熱性微生物之培氧、分離、純化及保存。結果分到菌株，*Aspergillus fumigatus*、*Humicola insolens*、*Penicillium dupontii*、*Thermomyces lanuginosus* 及 *Mycelia sterilia*，以 *Aspergillus fumigatus* 及 *Mycelia sterilia* 為最顯著，有許多生態種，特別是 *Aspergillus fumigatus*- *A. fumigatus* (blue)、*A. fumigatus* (brown) and *A. fumigatus* (gray)。將所得菌株加以封存建檔，以後可以進行延伸性之酵素篩選，並提供菌種給予其他研究者做酵素或其它天然物研究。

關鍵語：溫泉區嗜熱真菌、溫泉區嗜熱真菌

前言

微生物(microbe)在各種不同環境下對於環境的適應力各有不同，較一般動植物所能忍受的環境範圍寬廣許多，如在高溫(high temperature)、鹽分壓迫 (salt stress)、低水勢能(low water potential)、pH 值等的逆境中，都有微生物存在。而真菌是一群異營性的真核微生物，分佈範圍廣泛，如高溫的溫泉區，高鹽度的海水等。凡生物之生命現象莫不在某一適宜溫度範圍才能營運如常。因此溫度確係生物之生活所必需之重要環境因子之一。一般生物之生活所需之溫度範圍相當狹小，真菌也不例外，因本身無法調節體溫以適應外界溫度的變化，真菌之分佈則受到溫度之限制。大多數的真菌屬於中溫性 (Mesophiles)，其生長溫度範圍為 10~40°C，而最適生長溫度為 25°C 左右，在高生育溫度 40°C 以上則生長停止甚至死亡。一般真菌在 50°C 以上之高溫還能生存者頗為稀奇，但是自然界確有一群真菌不但能於 20~60°C 間生存並於 40~50°C 間為其最適生育溫度。屬於此種特異生態的真菌群則稱為嗜熱性真菌或好高溫性真菌 (Thermophilic fungi)。至於最低生長溫度低於 20°C，且 50°C 以上高溫仍能生長者，則稱為耐熱性真菌 (Thermotolerants) 而與嗜熱性真菌區別。Apinis (1972) 和 Millner (1977) 對真菌生長溫度範圍之定義作一總合，認為嗜熱菌的生育溫度為 18~50°C 或以上，而耐熱菌的高生育溫度為 45°C。由此可知，嗜熱菌之生育溫度之最高極限，有人認為係 50°C 以上，另有人認為 55°C 以上，而低溫極限則有 18°C、20°C 或 25°C 等分歧較多。Maheshwari *et al.*, (2000) 調查，真菌(如 *Thermoascus aurantiacus*、*T. ibadanensis* 等)生長溫度可達 60~62°C。本研究中，嗜熱性真菌之定義則跟隨 Cooney 及 Emerson (1964) 之主張以 20°C ~ 50°C 或以上之溫度範圍中，能生存者為嗜熱性真菌。而最低生育溫度極限低於 20°C 者則認為是耐熱性真菌。

自從 1969 年 Brock 和 Freeze 由黃石公園溫泉中分離出 *Thermus aquaticus*，高溫細菌就成為大家研究的重點，這類微生物在世界各地之 50-90°C 中性或鹼性水域中分離得到(Ramaley & Hixson,1970; Oshima & Imahori, 1971, 1974; Saiki *et al.*, 1972; Brock & Boylen, 1973; Loginova & Erorgova,1975;Erorgova & , Loginova,1975; Pask-Hughes Williams,1975;Pask-Hughes&Williams, 1977; Stainthorpe & Williams.1988)。更由這些高溫菌中分離出耐熱酵素，尤其是聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction,PCR)所用之 DNA polymerase 便是由溫泉微生物而來 (Chien *et al.*,1976)。

真菌與細菌相同，為了應付及適應各項極端環境(extreme environment)，包括生物性(biotic)及非生物性(abiocitic)，亦會發展出特異的生理性質，特別是酵素系統。這些極端的環境，如溫泉、火山口等，皆是屬於個別差異大及穩定程度高的微小環境 (Williams *et al.*,1996)，在同種微生物中常會出現不同生理品系的現象。因此對於溫泉區微生物的研究，應首重微生物相的基本調查。

台灣地處環太平洋火山帶上，島上地熱特徵明顯，特別是溫泉的密度相當之高，到民國八十五年止，有命名之溫泉即達 127 座(張，1995)，當中所存有的微生物資源無法估計，若能加以有計劃的調查及研究，當中可得之微生物資源應具相當之規模。但是到目前為止，對於台灣地區微生物資源多是以常態性微生物相之調查為主，如台灣區大氣真菌相之調查(陳瑞青，1992)，而對特殊環境微生物之調查多為小部份且為局部，未有系統性之調查，而溫泉部份微生物的調查亦相當稀少，僅有部份取樣調查，如溫泉區土壤真菌調查(陳桂玉，1992)，小油坑硫磺區土壤真菌調查(劉等，2000)，綠島附近熱泉中好熱性細菌之分離(王，1995)。

在臺灣方面，對於嗜熱菌的探討包括：孫守恭和韓又新(1971)從洋菇覆土、李重義(1981)從一些含纖維質自熱性腐朽物、劉桂郁(1987)則從土壤、稻草、落葉、Tzean 等(1990)從高粱種子(Stored sorghum seeds)、Chen & Chen (1988、1990、1991、1995、1996)從土壤中，獲得：*Zygomycetes-Absidia corymbifera* (Cohn) Sacc. & Trotter、*Rhizomucor pusillus* (Lindt) Schipper、*R. miehei* (Cooney and Emerson) Schipper、*Rhizopus arrhizus*、*R. microsporus* var. *rhizopodiformis* (Cohn) Schipper and Stalpers；*Ascomycetes- Chaetomium thermophile* var. *thermophile*、*Corynascus sepedonium* (Emmons)v. Arx.、*Emericella nidulans* (Eidam) Vill.、*Talaromyces emersonii*、*T. byssochlamydoides*、*Thermoascus aurantiacus*、*T. crustaceus*、*T. taitungiacus*、*Thielavia pingtungia*；*Deutromycetes-Aspergillus terreus* Thom、*A. fumigatus*、*Humicola insolens*、*Sporotrichum thermophile*、*Torula thermophile*、*Paecilomyces varioti*、及 *Thermomyces lanuginosa*。嗜熱性真菌都來自農業或森林產物、堆積發酵有機物質、及自熱性(heaped masses)物質。極少來自溫泉區，僅於 2000 年發表，與台大植物所蔡珊珊老師、博士班陳懋彥研究生調查烏來溫泉真菌相之研究，分出 *Aspergillus fumigatus*、*Humicola insolens*、*Penicillium dupontii*、*Thermomyces lanuginosus* 及 *Mycelia sterilia*。

初步的取樣分析，台灣島北部及南部共 16 座溫泉，第一年度調查以北台灣做調查對象，包含桃園縣、台北縣市及宜蘭縣內之溫泉共 16 座，分屬三區。大屯火山群溫泉區：金山溫泉、馬槽溫泉、陽明山溫泉、北投溫泉、地熱谷溫泉、庚子坪溫泉；2. 西北部溫泉區(烏來溫泉(1)(2)、新興溫泉(嘎啦賀溫泉)、四稜溫泉、爺亨溫泉)；3. 東北部溫泉區：礁溪溫泉(1)(2)、梵梵溫泉、仁澤溫泉、清水溫泉。台灣在僅三萬六千平方公里的面積上，擁有各種不同的地理環境及多樣的生物資源，特別在溫泉的分佈上，數量與密度皆相當的高，此意謂著當中富含多樣的生物資源。因此若可以對溫泉區之微生物進行系統性之調查，將對台灣本體的生物資源研究，提供一個新且其有潛力的課題。於 2000 年發表，與台大植物所蔡珊珊老師、博士班陳懋彥研究生調查烏來溫泉真菌相之研究，分出 *Aspergillus fumigatus*、*Humicola insolens*、

Penicillium dupontii、*Thermomyces lanuginosus* 及 *Mycelia sterilia*，可生存於 55°C，且 80% 分離菌株有 amylase 活性。而台大植物所蔡珊珊老師，目前著重細菌之研究。除了烏來溫泉外，繼續台灣其它溫泉區真菌相之研究。

微生物可以由其一次代謝(primary metabolism)及二次代謝(secondary metabolism)的途徑提供許多對人類有用的產物，產物有兩個主要的特性:(1)具生物活性(biological activity),(2)複雜的結構(complex structure)，絕大部份無法以化學方式合成，只能以利用微生物生產的方式來取得。特別是在二次代謝物及催化醣類巨分子聚合物(如 cellulose, chitin, pectin, starch)的酵素方面。因此對取得合適微生物種源，並從其產生目標酵素是研究中相當重要一環。Fergus(1969a)發現有些嗜熱性真菌能夠產生 amylase 水解澱粉。Rege 等人(1927)亦探討嗜熱性真菌對纖維素的利用，發現 *H. insolens* 及 *Sporotrichium thermophile* 能夠水解纖維素，而且 *S. thermophile* 在果膠質(pectin)存在下，生長更旺盛(Emerson, 1968)。Fergus(1969a)亦研究嗜熱性真菌及放射線細菌對纖維素的分解活性，而且發現嗜熱性真菌之活性高於放射線細菌。Ofosu-Asiedu 及 Smith(1973)研究 *T. aurantiacus* 分解木材的活性，結果顯示其分解能力由最適生育溫度到高生育溫度的活性大於低生育溫度到最適溫度之分解活性。李重義(1981)，在不同溫度下，測 *Talaromyces emersonii* 及 *T. aurantiacus* 對棉花、濾紙的分解活性，發現二株菌株產生的纖維素水解在 55°C 和 65°C 時，反應活性最佳。劉桂郁(1983)發現 *C. thermophile* var. *thermophile* 有水解纖維素的能力，高溫時活性更大。另外，有些嗜熱性真菌，如 *Melanocarpus albomyces*(Maheshwari 及 kamalam, 1985)能產生榲酵素(xylase)分解榲糖(xylan)或植物細胞壁。還有些菌甚至能分解樹脂(resin-emulsion)，如：*M. pusillus*、*M. miehei*、*H. insolens*、*T. lanuginosa* 和 *M. pulchella* var. *sulfurea* 等菌類。而這些菌類的特性，將可應用於工業及商業上(Jaitly, 1982; 劉, 1987; Maheshwari, 2000)。

本計畫除針對台灣溫泉區嗜熱真菌做初步之調查以外，並將對這些菌株所產生的耐熱酵素做初步分析，並提供菌種給予其他研究者做酵素或其它天然物研究。

材料和方法

1. 樣區及樣本採集

- (1) 樣區：到本省北部溫泉區，台灣島北部及南部共 16 座溫泉，調查以北台灣做調查對象，包含桃園縣、台北縣市及宜蘭縣內之溫泉共 16 座，分屬三區。大屯火山群溫泉區：金山溫泉、馬槽溫泉、陽明山溫泉、北投溫泉、地熱谷溫泉、庚子坪溫泉；2. 西北部溫泉區(烏來溫泉(1)(2)、新興溫泉(嘎啦賀溫泉)、四稜溫泉、爺亨溫泉)；3. 東北部溫泉區：礁溪溫泉(1)(2)、梵梵溫泉、仁澤溫泉、清水溫泉。

(2) 樣品採集：爲了分離嗜熱真菌及細菌，有氧及厭氧的溫泉露頭樣品包括：沉積物、底泥、沙粒、有機物（樹葉、枯枝）及水，皆爲採樣對象，樣品在經由採集後，以攜帶式溫度酸鹼度測定器直接測量露頭溫度及酸鹼度（未能直接測量者以燒杯取樣，間接測量），採集樣品置於事先滅菌之封口瓶中。

2.嗜熱性微生物之培養、分離、純化及保存

真菌篩選：爲取得有效菌種，所有的採集樣本須於 72 小時內處理分離完畢。將水樣 100ml 以 022mm 過濾膜濃縮後，將過濾膜置於 10ml 無菌水中振盪後，將水樣加入含 chloramphenicol 或 streptomycin 以抑制細菌生長之 90ml PDA (Potato Dextrose Agar) 中混合均勻後，或經適當稀釋後，或直接倒入 Petri Dish 中，凝固後置於 55°C 培養箱中培養 72-108 小時，隨後進行純化及試管斜面保存。

3.真菌分離株之鑑定：

嗜熱真菌菌種的鑑定可觀察真菌之培養、外部的形態，再配合對溫度的敏感性，做爲鑑定的基礎依據。

4.分離菌株酵素潛力之分析及潛力菌株之建檔：將所得菌株加以封存建檔，以後可以進行延伸性之酵素篩選。

5. 土壤有機質分析：有機質：稱取 0.5g 風乾土，吸取 10ml 1N, $K_2Cr_2O_7$ 加入其中搖勻，迅速加入 20ml 濃硫酸，搖勻後靜置 30 分鐘，再加入 200ml 蒸餾水和 10ml 85%磷酸，放冷，滴加 2-3 滴二苯胺指示劑 (Diphenylamine)，加入攪拌子，置於電動攪拌器上，以 0.5N $FeSO_4$ 滴定之，直到溶液呈現綠色爲止，記錄 $FeSO_4$ 之用量，並以下列公式計算土壤有機質含量。

土壤有機質含量 (%) = $10 \times (1 - S/B) \times 1.0 \times 12/4,000 \times 1.724/0.77 \times 100 / \text{土重 (g)}$

結果與討論

本省北部溫泉區，包括台北陽明山馬槽(酸性溫泉，溫度約 75 °C)和庚子坪溫泉(酸性硫磺溫泉，溫度 45-99 °C)、北投溫泉(酸性硫磺溫泉，溫度 45-85 °C)、烏來溫泉(碳酸弱鹼性溫泉，溫度安 80 °C)、金山溫泉(碳酸中性溫泉，溫度 45-50 °C)、宜蘭礁溪(單純泉，溫度 60 °C)、仁澤(碳酸鹼性溫泉，溫度 90 °C)及清水溫泉(碳酸鹼性溫泉，溫度 95 °C)等地採樣。溫泉的性質列於表一。培養於 PDA (potato dextrose agar) 培養基，並置於 45°C 之生長箱，進行高溫真菌之培養、分離與篩選。所分離出高溫真菌均屬於不完全菌綱 (Deuteromycetes)，結果分離出高溫真菌均屬於不完全菌綱 (Deuteromycetes)，除 *Mycelia sterilia* 及 undescribed genera

外，有 *Aspergillus*、*Humicola*、*Thermomyces* 等 3 屬，其中以 *Aspergillus* 為最多、*Mycelia sterilia* 次之。有許多生態種，特別是 *Aspergillus fumigatus* - *A. fumigatus* (blue)、*A. fumigatus* (brown) and *A. fumigatus* (gray)。 *Mycelia sterilia* 亦是，依照菌絲寬度及生長溫度，可分三大類。

表一：溫泉區之位置、泉水性質及水溫(°C)

位置	泉質	水溫(°C)	地質
台北陽明山			
馬槽溫泉	酸性	75	火成岩
庚子坪溫泉	酸性硫磺泉	45-99	火成岩
北投溫泉	酸性硫磺泉	45-85	
台北縣			
烏來溫泉	碳酸弱鹼性	80	變質岩
金山溫泉	碳酸中性	45-50	火成岩
宜蘭縣			
礁溪溫泉	單純泉	60	變質岩
仁澤溫泉	碳酸鹼性	90	變質岩
清水溫泉	碳酸鹼性	95	變質岩
桃園縣復興鄉			
爺亨溫泉	碳酸岩泉	55	變質岩

營養競爭是決定生態系統中優勢種的重要手段(翁等, 1991), 而微生物族群的穩定性是建立在極其廣泛的種與生化變株多樣性的基礎之上(翁等, 1991), 因此 pH 值偏低之不利狀態對於耐受性高之族群而言, 卻是成爲限制其他競爭者之有利生存條件。在本次研究之樣區中, 所分離出之耐高溫真菌以 *Aspergillus* 爲主, 與以往研究對於不同地區分離到之高溫真菌相組成結果相同(Ito, *et al.*, 1981; 莊, 1989), 故推測其耐受性較其他高溫真菌高。而本次分離到高溫真菌中, 僅優勢種 *Aspergillus fumigatus* 數量並不會隨溫泉性質不同而產生變動, 與以往之研究結果相同(Ito, *et al.*, 1981), 其它菌種則因數據不足, 須再重新進行研究以分析各菌種之月別變化。

所以在本研究所分離出之高溫真菌以 *Aspergillus fumigatus* 爲其優勢種, 本研究僅屬於基礎分類與初步探討高溫真菌相與環境因子之關係, 日後本實驗室擬進行更加深入之研究, 期能了解高溫真菌相組成與環境因子之關係。

參考文獻

- 王敏鈺。1995。一株綠島海濱熱泉好熱性脫氮細菌之研究。台灣大學海洋所碩士論文。
- 陳桂玉。1992。台灣產嗜熱性及耐熱性真菌分類學之研究。國立台灣大學植物學研究所博士論文。
- Brock, T.D. and H. Freeze. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n. a non-sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 98:289-297.
- Chen, M-Y, Z-C Chen, K-Y Chen and S-S Tsay. 2000. Fungal flora of hot springs of Taiwan (1): Wu-Rai. *Taiwania* 45(2): 207-216.
- Chien, A., D.B. Edgar and J.M. Trella. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127:1550.
- Cooney, D.G. and R. Emerson, 1964. *Thermophilic fungi*, Freeman & Co., San Francisco and London, 188 pp.
- Egorova, L.A. and L.G. Loginova. 1975. Distribution of extreme thermophilic nonsporogenous bacteria in Tadshikistan hot springs. *Mikrobiologia* 44:938-942.
- Loginova, L.G. and L.A. Egorova. 1975. An obligately thermophilic bacterium *Thermus ruber* from hot springs in Kamchatka. *Mikrobiologia* 44: 661-665.
- Maheshwari, R., G. Bharadwaj and M.K. Bhat. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (3): 461-488.
- Oshima, T. and K. Imahori. 1971. Isolation of an extreme thermophile and thermostability of its transfer ribonucleic acid and ribosomes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 17:513-517 .
- Oshima, T. and K. Imahori. 1974. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov. A nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24:102-112 .
- Pask-Hughes, R.A. and R.A.D. Williams. 1975. Extremely thermophilic gram-negative bacteria from hot tap water. *J. Microbiol.* 88:321-328 .
- Pask-Hughes, R.A. and R.A.D. Williams, 1977. Yellow-pigmented strains of *Thermus* spp. from Icelandic hot spring. *J. Gen. Microbiol.* 102:375-383 .
- Pask-Hughes, R.A. and R.A.D. Williams. 1978. Cell envelope components of strains belong to the genus *Thermus*. *J. Gen. Microbiol.* 107: 65-72
- Ramaley, R.F. and J. Hixson. 1970. Isolation of a non-pigmented, thermophilic

- bacterium similar to *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol. 103:527-528 .
- Saiki, T., R. Kimura and K. Arima. 1972. Isolation and characterization of extreme thermophilic bacteria from hot springs. Agric. Biol. Chem. 36:2357-2366.
- Stainthorpe, A.C. and R.A. D. Williams. 1988. Isolation and properties of *Clostridium thermocellum* from Icelandic hot springs. J. Syst. Bacteriol. 38:119-121.
- Stetter, K.O. 1998. Hyperthermophiles: isolation, classification and properties. extremophiles: Microbiol Life in Extreme Environments, p. 1-24, Wiley-Interscience, Inc
- Williams R.A.D., K.E. Smith, S.G. Weich and J. Micallef. 1996. *Thermus oshimai* sp. nov., isolation from hot springs in Portugal, Iceland, and the Azores, and comment on the concept of a limited geographical distribution on *Thermus* species. International Journal of Systematic Bacteriology 46(2):403-408