第9卷 第4期 微生物学报 Vol. 9, No. 4
1963年11月 ACTA MICROBIOLOGICA SINICA Nov., 1963

厌氧光合作用硫細菌的研究

I. 紅硫細菌的分离及培养*

薛廷耀 孙国玉 丁美麗
(山东海洋学院,中国科学院海洋研究所,青島) (中国科学院海洋研究所,青島)

在自然界,紅硫細菌(*Chromatium*)多半生活在含硫化氫的湖沼,池塘底部,硫泉及近岸的海水、海泥中。海洋学常提到的"紅水"或"血海",有些就是由于这类細菌大量繁殖所引起的。这类細菌可将一些硫化物氧化成硫或硫酸等化合物,它們在自然界的硫循环中起着重要作用。

紅硫細菌是一种光合細菌[1]。細菌光合作用与綠色植物的光合作用不同,不形成分子态氧,因此对这类細菌的光合作用,同綠色植物的光合作用进行比較研究,在探索光合作用机制上具有重要意义。

紅硫細菌是一种兼性营养类型的微生物[1],研究它們与有机質的关系,并闡明它們如何将碳酸态碳轉变为細胞物質,是一种良好的試驗材料。

在国内,我們尚未看到分离这类細菌純培养的报导,現将这种細菌的分离方法及培养等試驗报导于下,以供参考。

一、分离方法

我們按照 Осницкая 所介紹的分离方法[2],并参照"微生物学方法手册"[3]的厌氧菌的研究方法分离紅硫細菌,未能获得純培养。我們改用毛細管分离法則获得了純培养。

1.采样方法:在青島棧桥低潮带,取下层海泥作为丰富培养的材料。

2.培养基:采用 Нефелова 改进的 van Niel 培养基[2]。(NH_4Cl 0.1%, K_2HPO_4 0.05%, $MgCl_2$ 0.02%, $NaHCO_3$ 0.5%, NaCl 0.5%, $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.02%, pH 7.5,用蒸餾水配制)。除硫化鈉外,其余成分都配成溶液。8磅蒸气灭菌40分鉀。灭菌后,冷却;用无菌操作加进一小块(0.02%左右)硫化鈉,用稀盐酸調节pH至7.5左右。

3.丰富培养:用 Осницкая 所介紹的方法[4]或 Виноградский 法(即将滤紙片、硫酸鈣及泥样,置于量筒中,用0.1%的 NH_4Cl 及0.1% pH7.5的磷酸盐緩冲液加滿,連續照光)进行丰富培养。

4.純培养的分离:用直径約20—25微米,长約20厘米的毛細管,吸取在量筒壁上附着生长的紅色菌落,而后用小火焰将两端封住,置30℃温室中,在距40瓦电灯泡約20—30厘米处連續照光培养。培育2、3天,待毛細管中的細菌发育良好后,将毛細管放入酒精中灭菌,折断两端,将培养液吹入滴在玻璃片上的微量 van Niel 培养液,再吸入新的毛細管,封住,培养。

在用 van Niel 培养基进行分离过程中,常有一类革兰氏阴性的小杆菌污染。紅硫細菌能利用很多种有机化合物[1,2,4,5,6]。經过多次試驗发現可以用醋酸代替 $NaHCO_3$ 作为碳源(下簡称为醋酸培养

---

* 沈世泽及高月华两位同志参加了此項工作。

本文1963年2月28日收到。

基)。使用醋酸培养基，移种二、三代后，基本上可将这类革兰氏阴性小杆菌淘汰掉。

用醋酸培养基在毛細管中移种两代，鏡检細菌生长活潑时，将毛細管在酒精中灭菌，折断一端，避免气泡形成，沿管壁插入盛有 van Niel 琼胶培养基的培养管(图 1, 1)[1)]，封住，培养(图 1, 2)如此就能在低倍鏡下观察到細菌在毛細管中的生长情况，以及从毛細管游出的情况。

培养到生长丰富时，将培养管的上端割一圓环，放入酒精中灭菌，下端在火焰中弄碎，上端以赤热的电热絲从圓环处炸开。在相差显微鏡下检查其純度。如不純时再稀释为不同的浓度，接种到琼胶培养基中，用烧制如图 1, 3 式的培养管封住两端(图 1, 4)培养。至有紅色菌落出現时，培养管用酒精灭菌，弄碎两端，将琼胶柱吹入培养皿，用毛細管虹吸单个菌落，然后将其吹至載玻片上，鏡检其純度。如不純时，重复几次便可获得純培养。

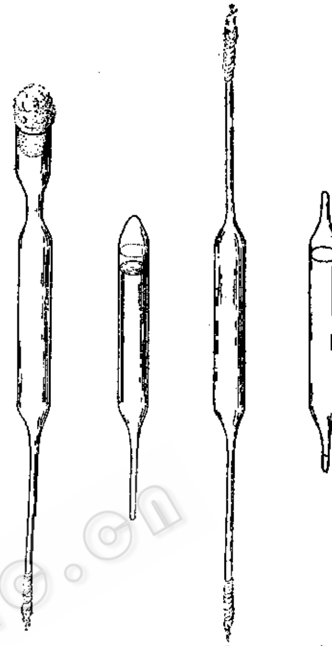
1 2 3 4

图 1 盛培养基的各种形状的培养管。1, 3. 未盛培养基时的形状； 2, 4. 盛培养基接种后封住的形状。 2. 示沿管壁插入毛細管的状况。 管上的虛綫示用玻璃刀所刻的条痕，将管启开时，用赤热的电热絲繞虛綫处炸裂。

二、实驗及結果

获得的純培养，分别接种到：肉汁，0.1% 葡萄糖肉汁，不加硫化鈉的 van Niel 培养基，海泥浸取液，馬鈴薯斜面，牛乳，肉汁琼胶平板及肉汁琼胶柱穿刺中均不生长。

在改良的 van Niel 培养基上，生长細胞呈橢圓形或杆状，横分裂；形成 2—3 个細胞的短鏈，不規則的堆团。在醋酸培养基中形成二、三十个細胞的长鏈，有时呈三、五枝樣的小鏈。 細胞平均大小 2.2—3.6 × 1.2—2.2 微米。

紅硫細菌在含有硫化鈉的液体培养基中經过 2—3 天的培养变成很混浊，此时細胞內含有硫滴，5 天左右便达到丰富的发育，形成紅色沉淀；培养基中的硫化氫逐漸耗尽，貯藏在細胞中的硫滴被利用，則观察不到含硫滴的細胞。

幼龄培养运动活潑。

在 van Niel 琼胶平板上呈扁平状、圓形的鮮紅色菌落(厌氧培养)。

在加硫化鈉的蛋白腖海水或不加硫化鈉的蛋白腖海水中(厌氧培养)，微弱混浊，出現少量沉淀。

革兰氏阴性反应。

細菌培养物为紅色，色泽的深浅常随培养基的成分及菌龄而变化。

根据上述特征，参照 Красильников “細菌和放綫菌的鉴定”[7]和 Bergey “細菌鉴定

1) 盛 van Niel 琼胶培养基的培养管的制备方法：加 1.5% 的琼胶至 van Niel 氏培养基，灭菌后冷却至 45℃，加适量之硫化鈉結晶 1 小块，用稀盐酸調节 pH 至 7.5。用烧制如图 1, 1 式的灭菌培养管，去掉下端棉花，插入培养基中，自上端吸入适量的培养基，取出，下端繞塞棉花，直放冷凝，封住下端，备用。穿刺接种或插入毛細管后，将上端在凹入处封住。

由于培养基中的硫化氫接触到空气，进行不完全氧化 ($2H_2S + O_2 \rightarrow H_2O + 2S$)，在琼胶培养基的表层常形成乳白层。

手册”[8],这种細菌經鉴定是纖細紅硫細菌(*Chromatium gracile* Strzeszewsky)。

培养基的比較及用乙酸或丙酸作为碳源的实驗。在实驗过程中，发現此种細菌培养在 van Niel 培养基中随着培养时間的加长，生长減弱或不生长。为此我們試驗了 Hendley 的培养方法[9],并略加改进。

Hendley 培养方法所用的培养基是 Gaffron 培养基,成分如下:

溶液 A: [NaCl 1.0%, NH_4Cl 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1%, $CaCl_2$ (无水) 0.02%。Larsen 微量元素[10]: Fe($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 50 微克%; B(H_3BO_4) 10 微克%, Zn($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 10 微克%, Co[$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$] 5 微克%, Cu($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 0.5 微克%, Mn($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) 0.5 微克%, HCl (1.27*N*) 約 6.8—7.0 毫升%]。

溶液 B: [Na_2CO_3 (无水) 1.26%, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 0.6%, 乙二胺四乙酸 (Ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) 0.02%, $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.01% (在灭菌前加入培养液中)]。

以上两种溶液均用蒸餾水配制。A、B 两种溶液分别灭菌，放冷后将等容积的溶液 A 和溶液 B 混合，pH 值約在 7.5 左右。加入灭菌的 1.0 毫克%靛紅 (Indigo Carmine), 及菌种; 混匀靜置,待靛紅显示还原型时,吸入培养管，封住,培养。

这种細菌在 Gaffron 培养液中生长迅速，其培养基成分主要是增加了微量元素、Ca 及 EDTA;其他元素,仅在量的方面稍有变动。我們对 van Niel 和 Gaffron 两种培养基进行了生长試驗的比較。除此之外还試驗了乙酸，丙酸作为此种細菌的生长所需碳源的試驗。有机酸用量为 0.1%。用图1,4式培养管进行液体培养。用肉眼观察培养液的顏色来記录細菌生长的程度。結果如表 1:

表1 在 van Niel 和 Gaffron 培养基中用乙酸或丙酸作为碳源时,紅硫細菌的生长情况

培养基成分	生长情况	培养基成分	生长情况
$NaHCO_3 + Na_2S$ (对照的 van Niel 培养基)	+	$Na_2CO_3 + Na_2S$ + Ca + Larsen 微量元素 +EDTA (对照的 Gaffron 培养基)	+++++
乙酸+Na_2S	++++	乙酸+Na_2S + Ca + Larsen 微量元素	++++
乙酸	+	乙酸+Ca + Larsen 微量元素	+
丙酸+Na_2S	+++++	丙酸+Na_2S + Ca + Larsen 微量元素	++++
丙酸	+	丙酸+Ca + Larsen 微量元素	+
$NaHCO_3 + Na_2S$ + Ca	+	$Na_2CO_3 + Na_2S$	+
$NaHCO_3 + Na_2S$ + Larsen 微量元素	+	$Na_2CO_3 + Na_2S$ + Ca	+
$NaHCO_3 + Na_2S$ + Ca + Larsen 微量元素	+++++	$Na_2CO_3 + Na_2S$ + Ca + Larsen 微量元素	+++++

“+”表示生长,“+”愈多表示生长愈好。

測定了試驗菌种对硫化物的利用情况，在无 $Na_2S_2O_3$ 及无 Na_2S 的 Gaffron 培养基中分别加入如下不同的硫化物: $Na_2S_2O_3$; Na_2S; Na_2SO_3; S; 硫乙醇酸鈉; $Na_2S_2O_3 + H_2S$; Na_2SO_3 + 硫乙醇酸鈉和 $Na_2S_2O_3$ + 硫乙醇酸鈉 ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 0.6%; 其余用量为 0.05% 或 0.1%;除硫化鈉及 $Na_2S_2O_3$ 加入溶液 B 外,其余 3 种硫化物均加入溶液 A)。实驗表明,該菌种只能氧化元素硫、H_2S 和 Na_2S,并产生硫酸根离子。

在 van Niel 培养基及用 0.1% 的蛋白胨代替 NH_4Cl 的 van Niel 培养基中穿刺培养,在黑暗处不能发育。

如果在上述培养基穿刺接种后,光照培养至生长丰富时,移置于黑暗处，若置放的时

間不超过 46 天，則移种到新鮮的培养基中进行照光培养，細菌仍能生长。

試驗菌种通常可以保藏在冰箱中（0°—4℃）3 个月之久。

三、討　　論

用毛細管培养紅硫細菌的优点除厌氧条件外，并可以在低倍鏡下（120×）观察毛細管中細菌生长的情况。

細菌細胞的形状和大小随培养基的成分、pH 值及菌龄等的不同而变化。例如在蛋白腖培养基上，菌体細胞比在矿質培养基上大几倍，呈橢圓形，甚至圓形，并有各种各样退化型出現。这带来了鉴定上的困难。因此我們参考 Петрова 的意見[5]，采用在改良的 van Niel 培养基上生长良好的菌体的大小，按照貝氏和克氏鉴定手册定名。

鈣离子和其他微量元素是紅硫細菌生长所必需的元素。楊惠芳[11]所分离的全部培养能在用自来水配制的 van Niel 培养基，和在用蒸餾水配制的 Larsen 培养基上生长。我們实驗的結果总結于表 3：

表 2　在 van Niel 氏培养基与 Gaffron 氏培养基中紅硫細菌生长情况的比較

<table>
<tr><th>培养基</th><th>van Niel 培养基</th><th>Gaffron 培养基</th><th>无 Ca 的 Gaffron 培养基</th><th>无 Larsen 微量元素的 Gaffron 氏培养基</th><th>无EDTA的 Gaffron 培养基</th><th>van Niel 培养基 +Ca</th><th>van Niel 培养基+ Larsen 微量元素</th><th>van Niel 培养基 +Ca 及 Larsen 微量元素</th></tr>
<tr><td rowspan="2">生长情况</td><td>+</td><td>+++++</td><td>+</td><td>+</td><td>++++</td><td>+</td><td>+</td><td>++++</td></tr>
<tr><td>生长极微弱呈附着在管壁上的生长現象</td><td>生长丰富，培养液均匀混浊，有紅色沉淀，无附着在管上的生长現象</td><td colspan="2">基本同 van Niel 培养基</td><td>基本同 Gaffron 培养基</td><td colspan="2">基本同 van Niel 培养基</td><td>基本同 Gaffron 培养基</td></tr>
</table>

"+" 表示生长，"+" 愈多表示生长愈佳。

从表中可看到所分离的紅硫細菌用 Gaffron 培养基培育最为适宜。

纤細紅硫細菌能利用乙酸及丙酸，这与 Осниккая 及 Шапошников 用葡萄酒色紅硫細菌（*Chromatium vinosum*）所得結果相同[5,8]。他們报导此类細菌能在沒有 $NaHCO_3$ 与 Na_2S 或沒有 Na_2S 的 van Niel 培养基中利用乙酸或丙酸正常生长。但我們分离的紅硫細菌在沒有硫化鈉的培养基中生长較差，这可能是由于所用菌种不同，或試驗方法差异的关系。

这种細菌在液体矿質培养基中能良好的发育，呈显了专性自养菌的特征；同样，在有机培养基中亦能发育，又具有异养菌的性質。在黑暗条件下，无論是在有机培养基中，或无机培养基中，都不能繁殖，这完全表現了光合細菌的特性。但在黑暗处，仍能保持生命力达 1 个月以上，这又表現了它是一种兼性营养类型的微生物。

四、摘　　要

1. 从青島栈桥附近低潮綫的海泥中分离得紅硫細菌的純培养。根据 Bergey 分类法及 Красильников 鉴定法，这种細菌鉴定是纤細紅硫細菌（*Chromatium gracile* Strzeszew-

sky)。

2. 介紹了利用毛細管培养及分离这种細菌的方法。

3. 对这种細菌的培养特征及形态特征进行了初步的研究和討論。

参 考 文 献

[1] Крисс, А. Е.: Морская микробиология, 1—455, Издательство Академии Наук СССР, Москва, 1959.

[2] Осницкая, Л. К.: Микробиология, **27**(6):665—672, 1958.

[3] Pelczar, M. J. *et al.*: Manual of microbiological Method, 1—315, McGHAW-HILL book Co., New York.

[4] Осницкая, Л. К. и Чудина, В. И.: Микробиология, **31**(5):769—773.

[5] Петрова, Э. А.: Микробиология, **28**(6):814—818, 1959.

[6] Шапошников, В. Н.: Микробиология, **29**(2):164—169, 1960.

[7] Красильников, Н. А.: 細菌和放綫菌的鉴定，924頁，科学出版社，1949。

[8] Breed, R. S. *et al.*: Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. 1—1094. Bailliere. Tindal and Cox, LTD., London.

[9] Daniel E. Hendley, J. Bact., **70**:625—634, 1955.

[10] Кондратьева, Е. Н.: Микробиология, **30**(2):346—363, 1961.

[11] Ян Хуэй-фан (楊惠芳): Научные доклады высш. шк., биол. науки, **3**:163—169, 1962.

STUDIES ON THE ANAEROBIC PHOTOSYNTHETIC SULPHUR BACTERIA

I. ISOLATION AND CULTIVATION OF THE PURPLE SULPHUR BACTERIUM

T. Y. Hsueh, K. Y. Sun and M. L. Ding

(Institute of Oceanology, Academia Sinica and Shantung Institute of Oceanology, Tsingtao)

A pure culture of the purple sulphur bacteria has been isolated from the marine mud collected at the low tide near Zhan-qiao (a pier) of Tsingtao. The culture consisted of Gram-negative, motile rod, or long ovoid cells 2.2 to 3.6 by 1.2 to 2.2 microns, usually containing 2—4 sulphur globules per cell and red pigments coloring the cells various shades of red with the characteristics of the genus *Chromatium*. On van Niel medium and under anaerobic conditions, cells are rod shaped with the formation of red colonies. No growth has been observed on potato slant, beef-extract agar and in milk medium. Gelatin was not liquified. The culture has been identified as *Chromatium gracile* Strzeszewsky.

A capillary tube method for the isolation and cultivation of the purple bacteria has been adopted. The culture has been obtained by a special capillary glass tubing containing Нефелова modified van Niel medium, in which sodium bicarbonate is substituted by acetic acid as the sole carbon source for depriving of the contaminated bacteria. Five different forms of sulphur compounds have been tested and the maintenance, preservation and the nutritional requirements of the bacterium studied.