

硫化細菌的分离培养

楊頤康 翁蘇穎

王祖农

(华东师范大学生物系,上海)

(山东大学生物系,济南)

关于硫化細菌的研究,国外自1902年以来,已积累了不少資料,国内的研究工作始于1957年,主要在于对硫杆菌属(*Thiobacillus*)各个种的分离方面^[1-3],今將我們近几年来工作,擇要簡报如下:

1. 排硫杆菌(*Thiobacillus thioparus* Beijerinck)

該菌在分离过程中較易識別,因其在固体培养基上菌落內有明显的硫磺积累,經丰富培养后,細菌在液体培养基表面形成菌膜,用 Starkey 固体培养基^[4]划綫时,二天后即可見到培养基边缘和生长稀疏处的菌落較早积累硫磺顆粒,在单个菌落中,可見菌落的中央先积累硫磺,然后扩展到菌落的边缘,最后由于积累較多的硫磺顆粒,而至乳白色完全不透明,菌落表面起初因水分較多而有光泽,随后逐渐变为粗糙。

該菌在分离过程中,最后常有一种异养性杂菌和排硫杆菌共生,这种杂菌的菌落細小、透明、菌体形态和排硫杆菌相似,它与排硫杆菌一起生长时,使排硫杆菌菌落表面形成一种粘性物质,有光亮,有人以为这是自土壤中分得的排硫杆菌菌落的特征^[5],这种菌落初看不易发现其中混有杂菌,經仔細观察,翻复划綫,可把二种菌落分开,获得純种。

該菌在培养基上的存活时间与文献报道有較大出入,在 Starkey 固体培养基上生长时,在28℃温度下可生长16—18天,在5℃左右时,生活时间可长达8周,如在 Starkey 液体培养基上培养时,在28℃下可維持4—8周,在5℃时可长达20周。在液体培养基生长时,四、五天內能使培养基pH下降到4左右,滴入指示剂甲基紅即可测出。

2. 氧化硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans* Waksman et Joffe)

該菌的分离主要根据其能氧化硫磺形成硫酸,使培养基pH急剧下降来識別。先用 Starkey 硫磺粉液体培养基^[6]丰富培养,以氯化鋇測定硫酸根的存在,然后用 Waksman 硫代硫酸盐固体培养基^[7]进行划綫分純,用氯化鋇或甲基橙指示剂滴入平板以初步識別菌落。如在固体培养基中加入 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 以代替 CaCl_2 ,由于 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 不溶于水,搖匀后倒成平板,可使培养基呈半乳白色,在氧化硫杆菌菌落附近,由于該菌能产酸,可借以溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$,造成明显的透明圈,透明圈并随菌落产酸量的增加而逐渐增大。

如在配制固体培养基时,加入指示剂甲基橙,使最后浓度为1/1000—1/2000,以此培养基来分

本文1963年11月23日收到。

离氧化硫杆菌时,效果也较好,菌落周围由于产酸,故培养基颜色由黄变红,培养基酸度降到 pH 3.0 以下。

该菌在固体培养基上生活时间较短,一般在 6—10 天,在硫磺粉液体培养基中,在 5°C 温度下可维持 8 周以上。

3. 脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans* Beijerinck)

该菌在初分离时,虽经厌气瓶丰富培养,平板划线厌气培养,但仍不足以淘汰杂菌(包括各种自养和异养性杂菌),故对脱氮硫杆菌的菌落也不易识别。比较可靠的分离方法是在丰富培养后,通过划线厌气培养和半固体穿刺培养交替进行,可以逐步淘汰杂菌,将划线厌气培养后所获得的各种菌落全部穿刺进半固体培养基试管中^[8],凡在半固体培养基中能够生长并形成气泡的菌体,可以初步确定为脱氮硫杆菌,然后通过划线厌气培养和穿刺培养,最后可望在平板上获得纯种。

该菌同样能积累硫磺颗粒,菌落最初为淡黄色透明,随后菌落的中心形成黄色小块,一周后从菌落内小块周围开始,积累硫磺颗粒,开始不易为肉眼所察觉,2—3 天后菌落内积累硫磺渐多,使菌落变为黄白色。该菌并能在菌落周围积有颗粒

状物质,使培养基出现云雾状不透明现象,为识别该菌的重要特征之一。

脱氮硫杆菌在固体培养基上生活时间为 5—7 周,在半固体穿刺培养基上生长时,在 5°C 温度下可维持 11 周到 18 周之久,在 28°C 下可维持 10—11 周。

纯种长期培养在好气条件下时,能够丧失其厌气生活的特征,长期在半固体培养基上穿刺培养时能保持其在厌气条件下生活的能力。

参 考 文 献

- [1] 薛廷耀、孙国玉: 海洋与湖沼, 2(2): 75—80, 1959。
- [2] 吕人豪、区嘉伟: 中国微生物学会 1963 年学术会论文摘要, 1963。
- [3] 朱鸿遇、鍾慧芳、孙建南: 中国微生物学会 1963 年学术会论文摘要, 1963。
- [4] Starkey, R. L.: *J. Bacteriol.*, 28: 365—385, 1934.
- [5] Vishniac, W. and Santer, M.: *Bacteriol. Rev.*, 21: 195—213, 1957.
- [6] Starkey, R. L.: *Soil Sci.*, 39: 197—215, 1935.
- [7] Waksman, S. A.: *J. Bacteriol.*, 7: 605—608, 1922.
- [8] Baolsrud, K. and Baolsrud, K. S.: *Arch. für Mikrobiol.*, 20: 34—62, 1954.