

球衣细菌的分离鉴定和菌种保藏

翁稣颖 柯嘉康 戚蓓蓓

彭荣强* 徐亚同 史家樑

(华东师范大学生物学系, 上海)

从染色废水处理活性污泥中, 分离得到具下列主要特征的菌株: 革兰氏染色阴性杆菌; 0.75—2.0 × 2.0—6.0微米; 鞭毛亚端生; 具衣鞘, 丝状体有假分支; 鞘内外无沉积铁的外壳; 不氧化锰化合物; 液化明胶微弱; 在不同有机质的培养基上, 菌落由光滑型过渡到粗糙型。菌株经鉴定为浮游球衣细菌 (*Sphaerotilus natans*)。

将培养好的试管菌种加到培养液或灭菌蒸馏水中, 在室温下保存已一年以上, 方法简便有效; 用冻干保存存活时间已在三年以上。

关于球衣细菌的分离方法, 曾有 Stokes^[1] 用紫花苜蓿进行富集培养; Phaup^[2] 用含有 KNO₃ 的特殊培养液进行富集培养和划线分离; Dondero 等人^[3] 则以活性污泥或溪水中的粘性物直接在特定培养基上划线分离的报道, 但球衣细菌的分离仍是一项难度较大的技术工作。我们通过选择合适的低营养的富集培养方法, 使菌体富集, 然而选择能使菌体产生特征性菌落的固体培养基进行纯种分离, 同时应用产衣鞘较少的高营养培养基, 排除粘附于衣鞘杂菌的干扰, 分得纯种菌株多株, 并进行了鉴定。

材料和方法

(一) 样品来源

上海同兴袜厂处理染色废水的活性污泥, 上海曹杨生活污水处理厂的活性污泥。

(二) 分离用培养基

尿素(或硝酸钾)培养基(富集培养用); Stokes 琼脂培养基(以下简称 S 培养基, 分离菌体用^[1]); CGY 琼脂培养基(以下简称 C 培养基, 单菌落分离和菌种保藏用)^[3]; 肉汤培养基(无杂菌试验

用)。

(三) 分离方法

活性污泥直接滴加或富集培养后, 用平板划线和稀释平板等方法分离, 最后用肉汤培养基作无杂菌试验。

(四) 分离步骤

1. 富集培养: 先吸取活性污泥(或其他样品) 5 毫升, 接入盛有 45 毫升尿素培养液 [成分 (%): 尿素(或硝酸钾) 0.05, 葡萄糖 0.1, 硫酸镁 0.005, 磷酸氢二钾 0.01, 自然 pH] 的三角瓶内, 静止培养 24—48 小时, 见有半透明絮状团块飘浮于液体中, 就用接种环取出一块, 经镜检表明有可能为球衣细菌丝状体时, 即可进行分离。

2. 分离培养: 将上述团块挑出(或用无菌吸管滴加), 在 S 琼脂平板上划线, 置 28℃ 24 小时, 待有丝状体伸展出, 及时挑取, 再重复划线 3—4 次, 得到初步纯化的菌株。

3. 生态模拟连续加富培养: 用有机玻璃制的表面曝气池模型, 进行球衣细菌生态模拟连续加富培养, 先后重复 3 次, 效果较好。所用尿素

本文于 1979 年 6 月 12 日收到。

* 上海同兴袜厂废水处理组。该厂孙珍娣同志参加此项工作。电镜照片承本校电镜室拍摄, 特此致谢。

培养基(其中尿素减少到 1/10,其他成分减半)不灭菌。模型容量为 20 升,活性污泥接种量为池容量的 1/10,停留时间 5 小时,接种后充气 4—6 小时,即以正常流量进水,2—6 天后可见球衣细菌旺盛生长,然后进行分离。

4. 斜面培养和单菌落分离: 由于伴生杂菌常粘附于鞘外,分离过程又不易取得单细胞菌落,故球衣细菌较难分纯。由于在 C 培养基中能获得大量单菌体,因此,将初步分纯的菌株接种 C 培养基斜面,然后用无菌水制成菌悬液,再稀释涂布 S 培养基平板,即可得到由单个菌体形成的具有特征性的菌落。

5. 滤过单菌体分离: 球衣细菌培养中有丝状体形成和单菌体释放的交替过程,单菌体释放高峰在菌龄 16—24 小时,故可将富集培养后初步分纯的菌株接种 S 培养液,待达到单菌体释放高峰时,经无菌滤纸过滤,再将含有大量单菌体的滤液用 S 培养基平板分离,即可得到具有特征性的菌落。

结 果

用上述分离方法在上海同兴袜厂活性污泥中分离到六个菌株,从上海曹杨污水处理厂分离到二个菌株,各菌株在培养特征上略有差别,有的为粗糙型菌落(代表株 FD7611),有的为光滑型菌落(代表株 E773)。

(一) 分离菌株的鉴定

球衣细菌属 (*Sphaerotilus*) 由于在它单细胞组成的细胞链外具有明显的衣鞘,故在《伯杰氏鉴定细菌学手册》^[4]中,列入有鞘细菌类。

1. 形态特征: 将在 S 培养基上培养 48 小时的培养物进行染色观察,结果见表 1。

2. 培养特征见表 2。

3. 生理生化反应特征和对糖类及有机酸等的利用特征见表 3 和表 4。

表 1 分离菌株的形态特征

鉴定项目	分离菌株形态特征	与文献记载球衣细菌比较
菌体大小	0.75—2.0×2.0—6.0 微米	0.7—2.4×3—10 微米; ^[1] 1.2—1.8×2.5—16 微米; ^[4,9] 近似大小。 ^[5,7]
菌体形状	杆状,无芽孢,两端钝圆(图版 I-2); 革兰氏阴性。	直杆状,未发现休眠体,革兰氏阴性 ^[1,9]
鞭 毛	大部亚端生,着生于一端,偶见端生或两端生,鞭毛实为一小束,电镜可由几十根细丝扭合而成。波曲,长度为菌体的 2—3 倍,粗细一致(图版 I-2, 3)。	为绞得很紧的一束,形似单根鞭毛,亚端生 ^[1,4]
衣 鞘	薄而透明,空鞘宽 1.5—2.5 微米,当细菌链有缺位时,尤为明显(图版 I-1),鞘外有粘液层,游离的单菌体粘附后,其另一端能活跃跳动。	薄而无色,空鞘宽度比菌体宽度大 1/2,有粘性 ^[1]
假 分 支	丝状体有假分支	有 ^[1,4,9]
运 动	游离单菌体能活跃运动,有时作翻转运动	有一束亚端生鞭毛,能使单菌体运动 ^[4,9]
铁的沉积	鞘外未见有沉积铁的外壳层	在未经污染的含铁水中,鞘外或鞘内有氢氧化铁沉积,但未见或少见有外壳层形成。 ^[4,6,9]
异染粒	用美蓝染色即可见到,随培养时增加而增多	有 ^[1]
聚-β-羟基丁酸 (PHB)	菌体内含有嗜苏丹黑 B 颗粒存在(图版 I-4), FD7611 所含颗粒较 E773 为大	细胞内含大量 PHB,形成小的或少数大的球体 ^[1,9]
体内积硫	在厌气、含 H ₂ S 的水中,体内见有元素硫积累	有积硫现象 ^[9-11]

表 2 分离菌株的培养特征

培养方式	分离菌株培养特征	与文献记载球衣细菌比较
固体培养	1. FD7611 在 S 平板上菌落扁平, 无光泽, 边缘有丝状体伸出, 为粗糙型菌落 (图版 I-5); E773 在 S 平板上菌落边缘整齐, 为过渡型菌落 (图版 I-6), 而在 C 平板上, 菌落表面光滑, 边缘整齐, 为光滑型菌落 (图版 I-7)。 2. 不氧化锰化合物, 在含 $MnCO_3$ 的平板上菌落乳白色。	1. 营养充足则菌落边缘光滑, 细胞大, 不形成荚鞘; 营养贫乏则细胞小, 有鞘, 菌落粗糙, 边缘有丝状体伸出。 ^[1,4] 2. 不氧化锰化合物。 ^[4,9]
液体培养	在 S 培养液中形成菌膜, 摇动不易破裂, 大量丝状体沿瓶壁粘附下垂; 在尿素培养基中不形成菌膜, 丝状体悬浮于液体中, 两菌株特征相似。	能产生浮膜, 并粘附瓶壁或瓶底。 ^[1]

表 3 分离菌株的生理生化反应特征

测定项目	分离菌株号		文献记载 球衣细菌
	FD7611	E773	
明胶液化	微弱	微弱	[4]
过氧化氢酶	+	+++	
硫化氢形成	-	-	
淀粉水解	-	-	
吲哚形成	-	-	
乙酰甲基甲醇反应	-	-	
硝酸还原	+++	+++	
石蕊牛奶	微碱	微碱	
尿酶形成	-	-	

表 4 分离菌株对糖类 and 有机酸等的利用特征

测定项目	FD7611*	文献记载 球衣细菌**
果糖	+	[1,4]
葡萄糖	+	[1,4]
半乳糖	+	[1,4]
麦芽糖	+	[1,4]
乳糖	微弱	[4]
蔗糖	+	[1,4]
甘油	+	[1,4]
乙醇	++	[1,4]
丁醇	++	[1,4]
山梨醇	++	[1,4]
甘露醇	+	不能利用 ^{C1}
可溶性淀粉	±	[1,4]
醋酸钠	++	[1,4]
丁酸钠	++	[1,4]
柠檬酸钠	+	[1,4]
乳酸钠	+++	[1,4]
丙酮酸钠	+	[1,4]
琥珀酸钠	++	[1,4]
延胡索酸	++	[1,4]
苹果酸	++	[1,4]
天冬氨酸	++	[1,4]
天冬酰胺	++	[1,4]
谷氨酸	+++	[1,4]
谷氨酰胺	±	[1,4]
丙氨酸	+++	[1,4]

* E773 菌株只做过部分碳源试验, 未列入。

** 只注明文献号者, 均指文献记载与试验结果相符。

表 5 分离菌株与纤发菌属特征比较

分离菌株的特征	纤发菌属细菌的特征 ^[4,9]
菌体宽度: 0.75—2.0 微米	菌体宽度: 0.6—1.5 微米
鞭毛亚端生, 鞭毛成束	鞭毛端生
在含铁水中, 鞘内、外未见有因铁沉积而产生的外壳层	在同样生态条件下, 有厚的因铁沉积而形成的外壳层
不能氧化锰化合物, 在含 $MnCO_3$ 的固体培养基上, 形成乳白色菌落	能氧化锰化合物, 在含 $MnCO_3$ 的固体培养基上, 菌落呈褐黄色
在营养丰富的培养基上, 能产生茂盛生长的短丝状体和菌体	在有机营养丰富的培养基上, 细胞得量低

分离菌株与文献记载的球衣细菌比较, 特征基本相符, 它与纤发菌属细菌的主要区别见表 5。

根据以上结果, 我们把分离到的菌株 FD7611 和 E773 鉴定为球衣细菌属, 本属只有一个种, 故鉴定为浮游球衣细菌 (Sph-

acrotilus natans), 两菌株特征基本相符, 只在培养特征上略有差异, 应属同一种的不同菌株。

(二) 球衣细菌菌种保藏试验结果

球衣细菌由于不存在芽孢,不能用砂土法保藏,用一般的低温保藏方法,存活时间短,一般不超过一个月,我们研究了延长存活时间的保藏方法。

1. 斜面保藏: 采用在 C 培养基斜面上培养 48 小时后的菌种,在 0—5℃ 保存,最长存活时间为 72 天,并随着菌株的连续传代,存活期明显缩短,说明连续传代造成生活力显著降低。

2. 冷冻干燥保藏: 用脱脂牛奶作吸附剂,制成冻干管,于 5℃ 保存,其中 FD7611 菌株已保存三年以上,生活力未见明显下降, E773 菌株保存时间也有二年以上,故用冷冻干燥法保存球衣细菌的方法是有效的。

3. 液体保藏: 将球衣细菌培养液于 5℃ 保存,一般只存活一个月左右,但如将上述培养好的菌种,用吸管滴加到预先制备好的 S 培养液或 C 培养液试管中,或滴加到灭菌的蒸馏水试管中,每管加一滴菌液(约 0.1 毫升),在室温下保存,迄今存活时间已超过一年,可见由于球衣细菌的水生特性,而把培养好的菌用液体或蒸馏水保存,避免了菌株培养过程自身代谢毒物

的影响,能获得良好的效果,而且较冻干法保藏简便易行,有实用价值。球衣细菌的菌种保藏问题,基本上得到解决。

参 考 文 献

- [1] Stokes, J. L.: *J. Bacteriol.*, **67**: 278—291, 1954.
- [2] Phaup, J. D.: *Water Res.*, **2**: 597—614, 1968.
- [3] Dondero, N. C. et al.: *Appl. Microbiol.*, **9**: 219—227, 1961.
- [4] Mulder, E. G. and W. L. van Veen: Genus *Sphaerotilus*, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, (ed. by Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons), 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974, pp. 128—129.
- [5] Lackey, J. B. and E. Wattie: *Public Health Rep.*, **55**: 975—987, 1940.
- [6] Mulder, E. G. and W. L. van Veen: *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **29**: 121—153, 1963.
- [7] Pipes, W. O. and P. H. Jones: *Biotechnology and Bioengineering*, **5**: 287, 1963.
- [8] Rouf, M. A. and J. L. Stokes: *J. Bacteriol.*, **83**: 343—347, 1962.
- [9] van Veen, W. L. et al.: *Microbiol. Review*, **42**: 329—356, 1978.
- [10] Skerman, V. B. D. et al.: *J. Bacteriol.*, **73**: 504—512, 1957.
- [11] Waitz, S. and J. B. Lackey: *Q. J. Fla. Acad. Sci.*, **21**: 335—340, 1959.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND CULTURE PRESERVATION OF *SPHAEROTILUS NATANS*

Weng Su-ying Ke Jia-kang Qi Bei-jing

Peng Rong-jiang Xu Ya-tong Shi Jia-liang

(Department of Biology, Eastern China Normal University, Shanghai)

The cultivation and isolation of *Sphaerotilus natans* have been known of difficulty as it does not grow on ordinary bacterial medium, and it usually occurs as a sheathed filament, often surrounded by a slime layer and is easily to be contaminated by associated bacteria.

In the present work, by using urea (or potassium nitrate)-glucose as an enriched medium, isolation is made first by spreading on agar plates containing glucose and peptone of lower concentrations (Medium S), and then by subculturing on agar plates containing casein and glycerol (Medium C) until a pure culture is obtained.

The trichome-forming bacteria so isolated are characterized as follows: sheath prominent; cells as rods, $0.75-2.0 \times 2.0-6.0 \mu\text{m}$; appearing in chains within a sheath of uniform width; gram negative; actively motile (subpolar flagella) when in a liquid medium. Colonies on plate containing MnCO_3 are whitish and unable to oxidize manganous compounds. Sheaths without precipitation and encrustations of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ and MnO_2 . Liquefaction of gelatin slight; sometimes with false branching.*

By using casein acid as a rich organic nitrogen source, better growth and a smooth type of colonies are obtained (S-

type), cell of which are usually large and almost sheathless. On poor nutrient medium (Medium S), filamentous and rough type of colonies appeared (R-type), the cells of which are smaller and sheathed. Colonies show a transition between smooth-rough type also appeared on medium of different composition and concentration.

By the characteristics described above this trichome-forming bacterium is identified as *Sphaerotilus natans*. The principal characters of these two strains isolated (FD7611 and E773) are similar.

Certain difficulties are generally met in the preservation of *Sphaerotilus natans*, and a study of its survival time has therefore been made. After cultivation in liquid or solid media, the preservation time of *S. natans* is relatively short, usually about 1-2 months. In the subculture, its survival time will become shorter and shorter. However, alternation is to inoculate well-grown culture into previous tubes filled with liquid media or distilled water and keep them at room temperature, and the preservation time has been prolonged to more than one year. This is a simple method and effective in practice. The culture of *S. natans* could be preserved more than three years by lyophilization and the problem of its preservation has been basically solved.