

迂回螺菌的富集培养及其混合培养物的保存

卢振祖

(武汉大学生物系)

摘要 本文报道用光合细菌富集培养物富集培养迂回螺菌,以及用 Pringsheim 氏土壤培养基增殖并长期保存迂回螺菌混合培养物的实验方法。

关键词 迂回螺菌;富集培养,保存

迂回螺菌 (*Spirillum volutans*) 是一种微好氧的螺旋形细菌,是异养型螺菌中个体最大的,也是目前已知的最大的细菌之一。细胞直径 $1.4-2.0\ \mu\text{m}$,长 $14-60\ \mu\text{m}$;螺旋直径 $5-8\ \mu\text{m}$,螺旋波长 $16-28\ \mu\text{m}$,细胞具有不足 1 个螺旋至 5 个螺旋,用相差显微镜或暗视野显微镜能直接观察到菌体两端的鞭毛束^[1,2]。所以,它不仅是进行菌体形态观察的好标本,同时也是研究细菌的微好氧特性和细菌鞭毛运动的优良菌株。国内曾发表过某些需氧螺菌的分离纯化方法^[3],但对该菌的报道尚未见到。

迂回螺菌分布于静止的淡水中^[4]。Ehrenberg (1832 年) 曾观察并描述了这种细菌^[5]。Brock (1979 年) 认为 17 世纪 70 年代吕文虎克首先观察并描述的螺菌,很可能就是这种细菌^[6]。由于该菌的生命活动既需要氧又受正常浓度的氧所抑制,并对过氧化氢极为敏感^[4],所以直至 1961 年, Rittenberg 等人用特殊的毛细管法才分离到,并置于透析袋内悬浮在其他细菌混合培养物中进行培养,首次获得了迂回螺菌的纯培养物^[7]。1965 年, Wells 等用同样的方法获得了第二株迂回螺菌,并通过降低氧分压纯培养成功^[8]。但是,该菌一旦与其他微生

物分离,很容易由于氧的毒性及其它一些原因而致死,迄今未能用常规方法从自然界中分离^[4,8]。纯培养物的培养和保存所要求的条件也比较苛刻。因此,探讨使用简易的方法富集培养和保存迂回螺菌的混合培养物,对该菌的形态学观察,及对细菌混合培养物中群体间相互关系的研究是有意义的。

本文首次报道采用光合细菌富集培养物富集培养迂回螺菌,并用 Pringsheim 氏土壤培养基增殖和保存该菌混合培养物的实验方法。

材料和方法

(一) 光合细菌富集培养物的制备

1. 培养基: 乙酸钠 3.0g, 磷酸氢二钾 0.3g, 氯化钙 0.05 g, 酵母膏 1.0 g, 丙酸钠 0.3 g, 硫酸镁 0.2 g, 硫酸铵 3.0 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 三氯化铁 0.005 g, 水 1000ml, pH 7.0—7.2, 121℃ 灭菌 15 分钟。

2. 光合细菌的富集培养: 取池塘或湖泊浅水区水下淤泥悬浮液 1—2 ml, 装入 30 ml 带塞磨口试管中, 再用上述培养基装满试管, 塞紧,

本文承彭珍荣副教授审阅,特此致谢。

勿留气泡,置于28℃,距离40—60W钨光灯约15 cm处,进行光照培养2—4天。当培养液颜色开始呈现黄—淡褐色或红—紫色时,停止培养。此时即获得了光合细菌富集培养物(培养物中含有大量的紫色非硫细菌)。

(二) 迂回螺菌的富集培养

1. 实验水样: 采自武昌东湖。

2. 富集培养及观察: 取3—4ml水样和20 ml新鲜的光合细菌富集培养物,置于30 ml带塞磨口试管中。28℃培养3—5天后,取培养液一滴于载玻片上,用相差显微镜或普通光学显微镜,先在低倍镜(放大60—150倍)下观察,如能清晰看到活跃运动的螺旋形细菌,再换成高倍镜及油镜进一步观察,这些细菌若具有迂回螺菌典型的形态特征,可初步确定获得了迂回螺菌的富集培养物。

(三) 迂回螺菌的增殖培养

1. Pringsheim氏土壤培养基的制备^[7]: 取一粒小麦放入15×150 mm试管中,加入装量约3 cm高度的、含有机质的菜园土,再加入自来水至10 cm高度,塞上棉塞,121℃灭菌20分钟。

2. 接种培养: 取迂回螺菌的富集培养物约2 ml,加入装有Pringsheim氏土壤培养基的试管中,28℃培养3—7天,即获得含有大量迂回螺菌的混合培养物。若需再转接土壤培养基时,取该混合培养物一至数滴接种即可。

(四) 迂回螺菌混合培养物的保存方法

1. 棉塞-室温保存: 将装有混合培养物的试管用棉塞塞紧,室温(4—38℃)保存。每隔1.5—3个月用灭菌的蒸馏水补充挥发掉的水份。

2. 橡皮塞-室温保存: 将装有混合培养物的试管用橡皮塞塞紧,管内保留约3 cm高空间的空气,室温(4—38℃)保存。

结果与讨论

(一) 光合细菌富集培养物富集培养迂回螺菌的效果

取武昌东湖水样,用不同颜色的光合细菌

富集培养物(由不同来源水样所获光合细菌培养物的颜色,及其中的细菌种类和数目均不相同)富集培养的结果,在颜色呈黄—淡褐色或红—紫色的光合细菌富集培养物(其中含有大量紫色非硫细菌)中,获得大量迂回螺菌,其富集培养物含迂回螺菌数达 $1-2 \times 10^4$ 个/ml,而呈深红紫色的光合细菌富集培养物(含有大量红假单胞菌(*Rhodospseudomonas* spp.)中,未富集培养到迂回螺菌。进一步用已富集到迂回螺菌的培养物稀释液(含迂回螺菌约100个/ml)代替原始水样,重复进行富集培养试验,得到与上述相同的结果。这表明,用本文所述的光合细菌富集培养物富集培养迂回螺菌的方法是有效的。至于呈深红紫色的光合细菌富集培养物不适于富集培养迂回螺菌,可能与该光合细菌富集培养物中细菌的种类和数量有关。所以,光合细菌富集培养物中细菌群落组成,可能是迂回螺菌能否在其中大量生长繁殖的一个重要因素,关于这点有待进一步研究。

(二) Pringsheim氏土壤培养基增殖培养迂回螺菌的效果

用Pringsheim氏土壤培养基增殖培养迂回螺菌试验的结果,获得的混合培养物中含迂回螺菌数达 $1-3 \times 10^6$ 个/ml。但试验中选择适宜的土壤十分重要,含有机质过多或贫瘠的土壤不适于该菌的生长。

(三) 迂回螺菌混合培养物的保存效果

采用棉塞-室温保存法保存迂回螺菌混合培养物,在室温4—38℃时,可保存半年至两年。在保存期内,迂回螺菌不仅存活而且运动,在保存期的后期,菌数开始减少。

在使用橡皮塞-室温保存法,于室温4—38℃保存时,保存期也达半年至10个月。但由于该菌混合培养物长时间与外界空气隔绝,在取样镜检时,发现迂回螺菌运动迟缓甚至处于静止状态,螺菌间的菌体长度及螺旋数目的差异增大。当打开橡皮塞,新鲜空气进入试管后,再塞紧橡皮塞,于28℃放置2—3天,菌体间的形态差异减少,并恢复了活跃运动状态。

两种保存方法中,棉塞-室温保存法虽保存

期较长,但保存过程中要常观察培养物中水份减少情况,并补以无菌蒸馏水,比较麻烦。橡皮塞-室温保存法虽然保存期不够长,但保存过程不需补充水份,比较简单,而且还可以用通入新鲜空气的办法延长保存期。

在采用上述两种方法保存迂回螺菌,而室温低于4℃达10天左右时,迂回螺菌大量死亡。

(四) 迂回螺菌的主要特征

本实验所富集到的迂回螺菌的形态特征与文献报道的两个菌株(*Spirillum volutans*

ATCC19553 和 *Spirillum volutans* ATCC 19554) 基本一致^[1,2]。在土壤培养基中,幼培养物多呈半弯曲形,以后“S”形(图 I-1) 占优势,运动活泼,革兰氏染色阴性。在室温放置较长时间的培养物中,迂回螺菌的螺旋数目和细胞长度均有增加(图 I-2),已发现具有6—7个螺旋,细胞长达135 μm的螺菌。在相差显微镜下,可清晰地看到该菌细胞两端的鞭毛束(图 I-3),及其高速旋转的运动情况。用普通光学显微镜也可看到鞭毛束的存在,并且细胞内的聚β-羟基丁酸颗粒明显可见(图 I-1)。

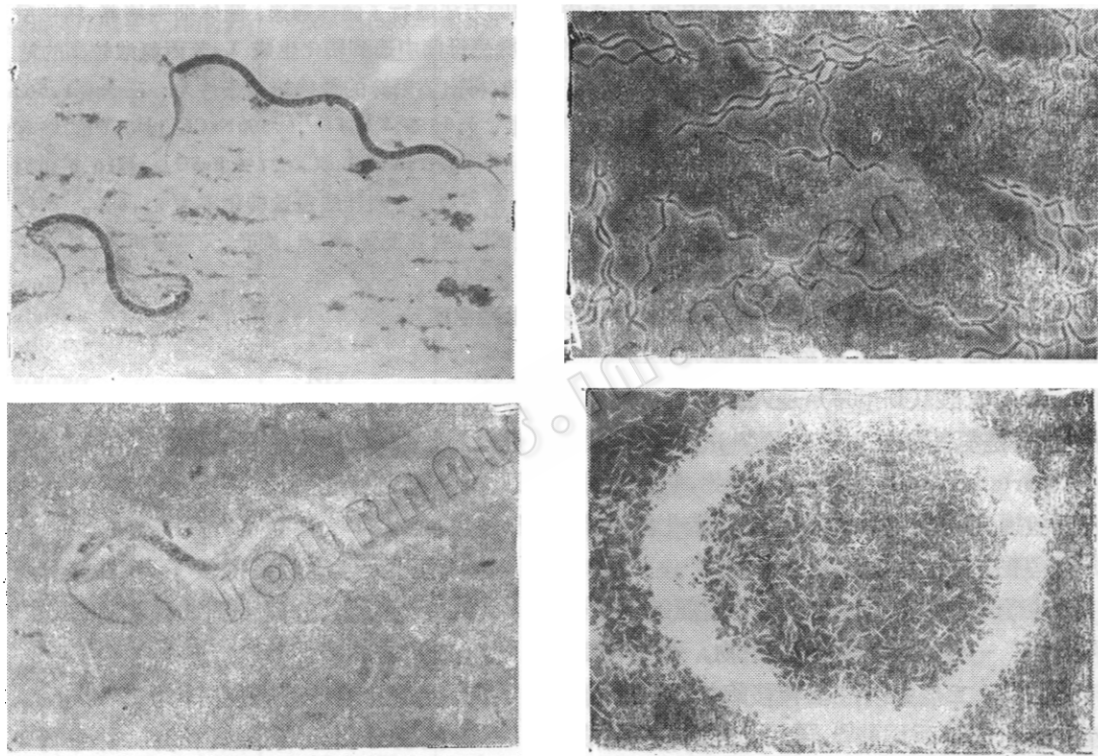


图1 迂回螺菌的形态特征

1(左上).示鞭毛染色的普通光学显微镜照片(×1800) 2(右上).示相差显微镜照片(×800) 3(左下).示细胞两端鞭毛束的相差显微镜照片(照片中还可看到其它螺菌和杆菌 ×3000) 4(右下).形成菌环的普通光学显微镜照片(白的小杆状是少数分散的迂回螺菌,白的大环为该菌形成的菌环 ×80)

迂回螺菌的另一特性是,形成菌丛和菌环。将一滴混合培养物滴在载玻片上,用低倍镜观察,可看到迂回螺菌迅速聚集到液滴的中央形成菌丛;当盖上盖玻片后,螺菌能很快聚集到液滴的边缘形成菌环(图 I-4)。这一现象与 Rittenberg^[7] 和 Wells^[8] 的报道一致。螺菌的这一特性与它的微好氧性有关。

参 考 文 献

- [1] Phillip. B. H. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23(1): 20—27, 1973.
- [2] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Eighth Edition), p. 198—200, 1974.
- [3] 杨江城: 微生物学通报, 11(3): 131—132, 1984.
- [4] Padgett, P. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*,

- 43(2): 469—477, 1982.
- [5] Wells, J. S. et al.: *J. Bacteriol.*, 90(3): 817—818, 1965.
- [6] Brock, T. D.: *Biology of Microorganisms*, 3rd ed. Prentice-Hall, p. 654—655. 1979.
- [7] Rittenberg, B. T. and S. C. Rittenberg: *Archiv für Mikrobiologie*, 42(2): 138—153, 1962.
- [8] Krieg, N. R. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I, Williams and Wilkins Baltimore/London, P. 92, 1984.