

氧化亚铁钩端螺旋菌在固体平板上的培养及形态观察*

刘 缨 刘相梅 田克立 齐放军 颜望明

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要: 用底层加入嗜酸性异养细菌 *Heterotroph Acidiphilium* SJH 的琼脂糖双层培养基, 成功地培养得到氧化亚铁钩端螺旋菌 (*Leptospirillum ferrooxidans*) 的单菌落, 并在电镜下观察到了该菌的形态。

关键词: 氧化亚铁钩端螺旋菌, 嗜酸性异养细菌, 电镜

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0070-03

GROWTH AND MORPHOLOGY OF *LEPTOSPIRILLUM* *FERROOXIDANS* ON SOLID MEDIUM

LIU Ying LIU Xiang-Mei TIAN Ke-Li QI Fang-Jun YAN Wang-Ming

(State Key Laboratory of Microbial & Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract: Single clones of *Leptospirillum ferrooxidans* were obtained on bilayer solid medium plate by incorporating *Heterotroph Acidiphilium* SJH into the underlayer broth medium. The morphologies of the bacteria were investigated using electronic microscope.

Key words: *Leptospirillum ferrooxidans*, *Heterotroph Acidiphilium* SJH, Electronic microscope

氧化亚铁钩端螺旋菌 (*Leptospirillum ferrooxidans*) 是一类专性自养铁氧化细菌。革兰氏阴性, 最适生长 pH2.0, 在 pH1.2 时仍能很好的生长; 最适生长温度 37.5℃, 最高 45℃。该菌在自然界常与氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*)、氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 及喜温硫杆菌 (*Thiobacillus caldus*) 等共同存在, 并一起参与金属硫化物的氧化和溶解过程。因此, 这类细菌被广泛地应用于微生物浸矿^[1-3]。尤其是 *L. ferrooxidans* 可以耐受较低的 pH 值及较高的氧化还原电位, 因而在微生物浸矿中起着重要的作用, 已越来越受到人们的关注^[4]。但由于该菌不易于培养, 且在普通的固体培养基中很难形成菌落, 这给该菌的分离纯化及微生物学操作带来了较大的困难。

本工作利用 D. Barrie Johnson 等人报道的琼脂糖双层平板培养基方法^[5], 利用琼脂糖做固化剂, 在底层平板中加入嗜酸性异养细菌 *Heterotroph Acidiphilium* SJH, 在国内首次对 *L. ferrooxidans* 固体培养获得了成功, 并成功地在电镜下观察到了 *L. ferrooxidans* 的形态。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

L. ferrooxidans - 104, 本室分离自云南腾冲地区高温温泉水样。

Heterotroph Acidiphilium SJH, 由美国 Biological Sciences, University of Wales 提供。

* 国家自然科学基金资助项目 (No.50174034, No.30170026)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.50174034, No.30170026)

收稿日期: 2003-01-05, 修回日期: 2003-03-20

1.2 培养基

Heterotroph Acidiphilium SJH 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.25g, MgSO_4 0.5g, 蛋白胨 0.25g, 半乳糖 1.8g, 用 H_2SO_4 调 pH 至 2.5, 加蒸馏水定容到 1L, 高压灭菌后加入过滤除菌的 1mol/L 的 FeSO_4 溶液, 使其终浓度为 25mmol/L。接种 *Heterotroph Acidiphilium* SJH 后于 30℃ 摇床培养 1~2d。

L. ferrooxidans 液体培养基采用 9K 培养基^[6]。

L. ferrooxidans 固体培养基: 采用琼脂糖双层平板培养基, 稍作改动。

A: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.25g, MgSO_4 0.5g, 微量元素液 (1% ZnSO_4 , 0.1% CuSO_4 , 0.1% MnSO_4 , 0.1% CoSO_4 , 0.1% $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.1% NaMoO_4) 1mL, 蛋白胨 0.25g, 半乳糖 1.8g, 用 H_2SO_4 调 pH 至 2.5, 蒸馏水 600mL。

B: 琼脂糖 2g, 蒸馏水 400mL。

C: 1mol/L FeSO_4 溶液, 过滤除菌。

将 A 和 B 分别高温灭菌后冷却到 45℃, 加入 10mL 的 C, 混匀后分成两份, 向其中一份加入 2mL 培养好的 *Heterotroph Acidiphilium* SJH, 混匀后立即倒平板, 另一份在 45℃~50℃ 的水浴中保持熔融状态, 待下层凝固后, 倒入另一半做上层平板。

1.3 培养和计数

菌液用 9K 培养基作梯度稀释, 取稀释液 100μL 涂布琼脂糖双层平板, 40℃ 培养 6~8d, 同时用血球计数板在显微镜下直接计数。

1.4 透射电镜观察

收集 *L. ferrooxidans* - 104 菌体, 用 0.01mol/L (pH6.0) 的乙酸钠溶液洗涤后, 滴在载膜铜网上, 用 2% 磷钨酸 (pH7.0) 染色 1min, 自然晾干。在透射电镜下观察及摄影。

1.5 扫描电镜观察

收集 *L. ferrooxidans* - 104 菌体, 涂布在小块盖玻片上, 自然晾干后, 取出用导电胶贴于圆形贴片上, 喷金后在扫描电镜下观察及摄影。

2 结果

L. ferrooxidans - 104 在琼脂糖双层平板上培养 5~7d 后形成菌落, 菌落呈琥珀色同心圆状 (图 1), 通过血球计数板直接计数与平板计数比较, 结果显示, 氧化亚铁钩端螺旋菌在双层平板上的菌落形成率较高。

表 1 氧化亚铁钩端螺旋菌直接计数与平板计数结果

实验次数	直接计数个/mL	平板计数个/mL
1	5.6×10^7	7.6×10^6
2	7.8×10^8	2.2×10^7

电镜下观察 *L. ferrooxidans* - 104 形态, 为螺旋状, 端生鞭毛, 大小 $0.25 \sim 0.3 \times 1 \sim 3\mu\text{m}$ (图 2、3)。

3 讨论

L. ferrooxidans 在固体培养基上难以生长, 其影响因素很多, 有机质的存在、pH 值的范围、磷酸盐浓度等条件都会对该菌的菌落形成有影响。

我们以无磷培养基、在 pH 酸性条件下培养 *L. ferrooxidans*, 同时以琼脂糖做固化

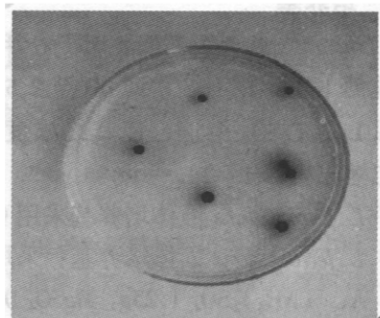
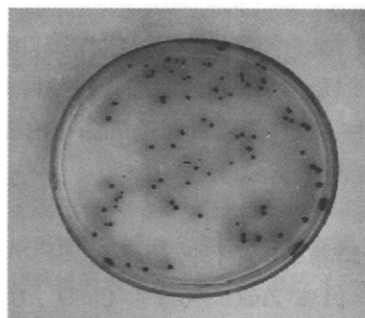


图1 *L. ferrooxidans* - 104 在琼脂糖双层平板上的菌落形态

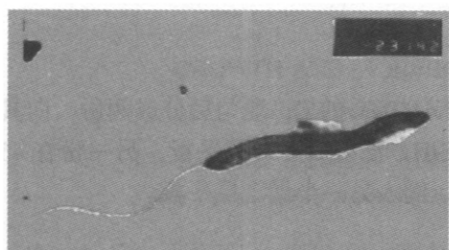


图2 扫描电镜下的 *L. ferrooxidans*-104 ($\times 1,500$)

图3 透射电镜下的 *L. ferrooxidans*-104($\times 1,000$)

剂,并向底层平板中加入极端嗜酸性的异养细菌 *Heterotroph Acidiphilium* SJH,利用该细菌的生长,消耗了琼脂糖中的一些寡糖类物质,这些都有利于促进 *L. ferrooxidans* 菌落的形成。

在实验中还发现,影响 *L. ferrooxidans* 菌落形成的另一重要因素是菌液的稀释度。当菌液浓度高时,平板上产生大量的黄褐色沉淀,并不形成单菌落。只有将菌液稀释至合适的浓度,才可见到分散均匀的深琥珀色 *L. ferrooxidans* 单菌落。这是由于 *L. ferrooxidans* 在生长过程中会产生高铁复合物,当菌液浓度过大时,大量的高铁复合物会抑制菌落的形成;只有在菌液浓度合适的情况下,分散的菌体缓慢地将亚铁氧化成高铁,从而有利于菌落的形成和生长。

L. ferrooxidans 在固体培养基上的生长,为建立 *L. ferrooxidans* 遗传转移系统提供了一可能的途径。通过对 *L. ferrooxidans* 进行遗传改造,可以使其在微生物冶金方面具有更为广泛的应用前景。有关这方面的研究正在进一步的研究中。

参考文献

- [1] Vasquez M, Espejo R T. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63** (1): 332 ~ 334.
- [2] Coram N J, Rawlings D E. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68** (2): 838 ~ 845.
- [3] Schrenk M O, Edwards K J, Goodman R M, *et al.* Science, 1998, **279** (3): 1519 ~ 1522.
- [4] Rawlings D E, Tributsch H, Hansford G S, *et al.* Microbiology, 1999, **145**: 5 ~ 13.
- [5] Johnson D B, McGinness S. Journal of microbiological Methods, 1991, **13**: 113 ~ 122.
- [6] Silverman M P, Lundgren D G. J bacterial, 1959, **77**: 642 ~ 647.