

硫杆菌染色及计数的改进方法

马德钦 李雅芹 陈秀珠

(中国科学院微生物研究所, 北京)

硫杆菌是一类生活在金属硫化矿床酸性矿水内的化能矿质营养细菌,对金属矿床的形成、破坏及矿物的分解起重要作用。其中的氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) 及氧化硫硫杆菌 (*T. thiooxidans*) 等,早被用于细菌浸矿。因此对该菌的研究日渐增多。

这一类细菌是革兰氏阴性细菌,不易用结晶紫或革兰氏染色法染色;又由于它们的细胞较小(0.5 × 1.0—2.0 微米),因此计数及细胞形态观察都较困难。Leathen^[1] 曾报道用刚果红负染,在相差显微镜下亮暗对比观察氧化亚铁硫杆菌的方法。Harrison 等^[2] 使用黑色素染色。这两种方法均是使细胞在深色背景上呈透亮白

色而显示出来。Back^[3] 报道说,用石炭酸赤藓红(carbol erythrosin)加热染色,得到良好结果,但未见具体方法的介绍。最近 Rodriguez-Leiva 等^[4] 报道了硫杆菌染色的简单改良方法。该方法是把经加热固定的细菌涂片放在 pH3.2—3.6 的 1.5—2.0% 酸性复红中浸泡 24 小时。此时细菌被染成暗红色,并可观察到表征此菌的极体。

我们在研究氧化亚铁硫杆菌时,曾比较试验了上述几种染色方法。发现背景染色法不易掌握,细胞边缘也不够清晰;酸性复红染色的细胞着色不深,且费时间。我们采用石炭酸赤藓红染色液,以与抗酸染色相似的染色步骤,可将

硫杆菌染成深红色，在油镜下较易观察（见图1）。细菌在悬浮液中经染料处理后也呈红色，在 Thomas 血球计数板上能清楚看到。现以氧化亚铁硫杆菌为例，叙述染色及计数方法。

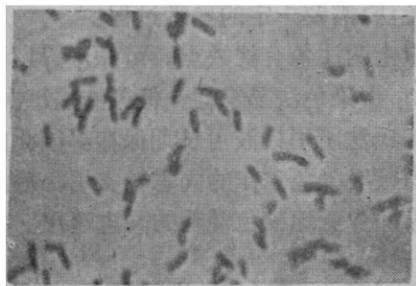


图1 用石炭酸-赤藓红染色的氧化亚铁硫杆菌细胞
(振荡培养7天)

一、菌液的制备

将在 Leathen 培养基中振荡培养的氧化亚铁硫杆菌培养液静置半小时，待氢氧化铁沉淀后，清液用擦镜头纸过滤，除去小颗粒沉淀。滤液置水冷离心机 10,000 转/分离心 20 分钟。倾去上清液，用经硫酸酸化的 pH 2.0 的水洗涤细胞，再离心，反复三次，得到乳白色而无游离铁的菌液。如菌液中再出现氢氧化铁沉淀，则可静置半天令其沉淀并分出。

二、染色剂——2% 石炭酸-赤藓红的配制

在 2 克赤藓红 (erythrosin B) 中加入 10 毫升 95% 乙醇，溶解后再加入 5% 的苯酚溶液 90 毫升，混匀。

三、染色步骤

将细菌悬液制涂片，滴加染色剂，按抗酸染色法微微加热处理，水洗，吸干，用油镜检查。细

胞呈深红色，在年老的细胞中可以见到极体。

四、细胞计数方法

将离心后制成的细胞悬液调节 pH 至 3.0 以上，取 0.1 毫升，加入 0.1% 蛋白胨溶液稀释至 5 毫升，再加染色剂两滴，摇匀，在 60°C 水浴中保温 3—4 分钟后，按 Collins 法^[5]用 Thomas 血球计数板计数。虽然整个菌液都呈红色，但在显微镜下只观察到细菌被染红，比起未染色时清楚，易于计数。

五、注意事项

菌液的 pH 值要在 2.5 以上，也不能含有游离铁。因为 pH 值过低或有铁存在，都会与赤藓红反应生成沉淀，影响观察细菌。

这个方法可用于培养液中的硫杆菌的检查和计数。但在用于浸矿细菌计数时，因细菌大部分附着在矿石表面及器壁，或与水解的高铁沉淀粘在一起，留在溶液中的细菌不多，计数时会有较大误差。此外，用此法直接观察未经离心除铁处理的矿水（或培养液）中的细菌，效果也不理想，因为菌液中的铁与染色剂会起化学反应。

参 考 文 献

- [1] Leathen, W. W. et al.: *J. Bacteriol.*, **72**: 700—703, 1956.
- [2] Harrison, V. F. et al.: *Can. Mining J.*, **87** (5): 64—67, 1966.
- [3] Back, J. V. and S. R. Elsdon: *J. Gen. Microbiol.*, **19**: i, 1958.
- [4] Rodriguez-Leiva, M. and S. Pichuanes: *Can. J. Microbiol.*, **24**: 756—757, 1978.
- [5] Collins, C. H. and P. M. Lync: *Microbiological Methods*, 4th ed. Butterworth and Co. Ltd., 1976, pp. 194—210.