

用硅胶平皿分离及定量 计数氧化亚铁硫杆菌*

马德钦

(中国科学院微生物研究所,北京)

应用硅胶平皿分离、纯化某些土壤微生物,尤其是在琼脂培养基上生长不好的自养细菌,日渐引起人们的重视。

我们在分离氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) 时,曾试用了在 Leathen 培养基中加入几种琼脂,做成固体培养基,该菌不易在此生长,更难用于平皿法定量计数。一些文献指出,在琼脂中含有的有机物质会抑制自养细菌的生长。Leathen^[1,2], Razzell^[3], Bryner^[4]等曾报道用硅胶平皿分离氧化亚铁硫杆菌,但各人所用的方法不同,且不易掌握。Лангева^[5]报道了用 9K 培养基浸透的硅胶片分离及定量计数,但方法不大具体。我们参照了 Leathen 等人^{[1],[5],[6]}的方法,加以改进。制成的亚铁-硅胶培养基,对分离及计算氧化亚铁硫杆菌数目效果良好。

材料和方法

一、硅溶胶(硅酸)的制备

1. 原材料: 取硅酸钠 ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, A. R.) 19 克,溶于 100 毫升蒸馏水,约含 SiO_2 4%,透明,呈强碱性。

2. 树脂柱: 用 Amberlite IR-120 (H^+) 型离子交换树脂 (B. D. H. 产品) 200 克装于 3×45 厘米的玻璃层析柱中(树脂层高 27 厘米),用 2NHCl 通过柱,使其转变为 H^+ 型,再用蒸馏水洗去剩余的盐酸。

3. 硅溶胶的收集: 将上述配制的硅酸钠溶液 220 毫升,以每分钟 10 毫升的交换流速通过树脂柱,用精密 pH 试纸测定流出液的 pH,收集 pH 3.0—4.0 (或 <4.0 以下的) 部分。吸附在树脂内的硅溶胶用蒸馏水洗脱。当流出液 pH 突然升高时 (>4.0), 即停止收集。可获得 207 毫升硅溶胶。此液透明且稍带乳白色,室

温下不易凝固。再用 H_2SO_4 调节 pH 1.8, 在 4°C 冰箱中可放一周以上。树脂柱交换完毕,用 3 倍树脂体积的 2NHCl 再生,并用蒸馏水洗至中性,用 AgNO_3 检验至不含 Cl^- 离子为止。

二、硅胶平皿的制作

用 Leathen^[1] 培养基与硅溶胶混合,凝固后再用酸性 FeSO_4 溶液浸透而成。

1. 无机盐溶液(克): (1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.0; KCl 0.05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01。蒸馏水 250 毫升。(2) 5% K_2HPO_4 溶液。将(1)与(2)分别灭菌,15 磅 30 分钟。(3) 4% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液,用 H_2SO_4 调 pH 至 2.0, 再无菌过滤。

2. 硅溶胶: 将收集的硅溶胶用 $2\text{NH}_2\text{SO}_4$ 调 pH 至 1.8, 于 8 磅 30 分灭菌。

3. 硅胶平皿: 于培养皿中加入灭菌的硅溶胶液 15 毫升,无机盐溶液(1) 5 毫升,溶液(2) 0.2 毫升,混合,用无菌 NaOH 调 pH 至 6.0, 10 分钟后即凝固,凝胶近于透明,坚硬,有弹性。含 SiO_2 浓度约 3%。再于每皿加入无菌的 FeSO_4 液 10 毫升浸泡过夜,然后倒出,再重新加少量 FeSO_4 液并用刮棒刮洗沉淀在硅胶表面上的氢氧化铁,最后把液体倒尽,便是 pH 2.0 的 Leathen 亚铁硅胶平皿,其硬度完全可以用于划线及涂抹菌液。但用于定量计数的平皿,需置 45°C 温箱 0.5—1 小时稍加干燥以去除表面水分。

结果与讨论

已有报道,在制备硅胶培养基时, SiO_2 含

* 本文承本所相望年教授审阅,特致感谢。

量、pH、温度、电解质的性质与浓度等化学、物理因素对成胶的影响极大^[6]。当 pH 过高或过低时，凝胶困难。氧化亚铁硫杆菌需要在 pH 2.0—3.5 范围培养，而 Fe²⁺ 离子也只有在 pH 2.5 以下才不易氧化为高铁。因此就需要制备较酸性的亚铁硅胶培养基。

起初，我们按 Leathen 等人的方法，以亚铁无机盐成份与硅溶胶混合为 pH3.8，但几天都不凝成胶。后来通过 pH 对胶凝影响的实验证实，只有在 pH6.0 以上时，才能迅速形成硬的胶(表 1)，这与一些文献报道相似。如果 pH4.0 以下，4 天都难成胶，即使增加 SiO₂ 浓度至 7% 也是如此。pH4.5 时 2 天可成胶，但硬度不够，划线培养时表面易破。pH5.0 以上虽然凝胶快，但 pH 高了培养基的 Fe²⁺ 会迅速氧化成高铁，细菌不能利用，影响它的生长。

表 1 pH 对硅溶胶成胶的影响¹⁾

pH	成胶时间	凝胶硬度 ²⁾
<4.0	> 4 天	—
4.0	3 天	—
4.5	1 天	±
5.2	3 小时	+
6.0	15 分钟	+

1) 在培养皿中依次加入 4%SiO₂ 15 毫升，无机盐溶液 5 毫升，FeSO₄ 液 1.3 毫升，K₂HPO₄ 液 0.2 毫升，混合，用 NaOH 调 pH。

2) “—”不能划线用。“±”稍软，划线易破，“+”硬，可划线。

由于硅溶胶在较低 pH 值时凝固不好，于是试验使其在平皿中加热加压后凝固。方法是把无机盐、亚铁、硅溶胶混合，调 pH 至 2.0—3.0，每个培养皿装 20 毫升，置高压蒸汽锅 15 磅 30 分钟处理。硅溶胶经高温处理后在培养皿内凝固，颜色乳白，不透明，带有少许沉淀，Fe²⁺ 离子大部分未氧化，胶硬。但皿内冷凝水太多，需要倒干。用于划线接种时，硅胶脆，易破裂。因此，这种方法并不太理想。

当把硅溶胶与 Leathen 培养基(无铁)在培养皿混合，调 pH 至 6.0 时，能迅速形成近于透明，又富有弹性、坚硬的胶板。硅胶形成后，再用 pH2.0 的 FeSO₄ 溶液(浓度可为 2.5—5%，

用量为 5—8 毫升)浸泡过夜，便制成 pH2.0 的亚铁-硅胶平皿，其硬度可以划线接种或涂抹菌液。亚铁氧化细菌在此平皿上生长，只要 2—3 天便可见到红色的菌层。5 天见到呈褐色的单个菌落。与琼脂平皿相比较，亚铁氧化细菌在硅胶平皿生长更快，更好，所有活的细胞都可形成菌落。而在琼脂上只有少部分细胞能生长。典型的生长菌落见图 1。

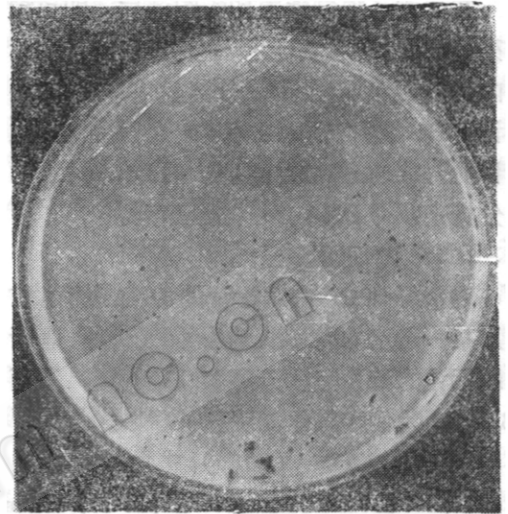


图 1 在硅胶平皿上生长的 *Th. ferrooxidans* (30℃ 培养 10 天)

为进一步观察硅胶平皿能否作为亚铁氧化细菌计数之用，把我们保存的 (*Th. ferrooxidans*) 菌株作为材料，比较系列稀释培养与硅胶平皿培养测定的细胞数目。稀释法培养时每毫升的菌数为 1.25×10^8 个，硅胶平皿培养为 1.2×10^8 个。两种方法大致相同。但是，硅胶平皿培养只要 5 天便可见到结果，而系列稀释培养则要 11 天。如果静置培养，则时间还要延长。这结果与 Лаптева 的报道大致相似。另外，硅胶平皿法较系列稀释培养法方便、准确。

参 考 文 献

- [1] Leathen, W. W. et al.: *J. Bacteriol.* 72: 700—703, 1956.
- [2] Leathen, W. W. et al.: *Bacteriol. Proc.* 6: 1955.
- [3] Razzell, W. E.: *J. Bacteriol.* 85: 595—603, 1963.
- [4] Bryner, L. C.: *Appl. Microbiol.* 6(4): 281, 1958.
- [5] Лаптева, А. М. ил.: *Микробиология*, 40(3): 572, 1971.
- [6] Pramer, D.: *Appl. Microbiol.* 5: 392—395, 1957.