

杨江城

(北京师范大学)

螺菌广泛分布于自然界,在自然界有机质分解中有重要作用,螺菌的形态及菌体两端的丛生鞭毛都是微生物实验中应该观察的内容。但在缺少菌种的条件下,只能借助于挂图,使学生一般了解。为了补充这些内容,需要获得螺菌的纯培养。为此,我们参考有关文献^[1]介绍的需氧螺菌的分离方法并稍加改进,成功地获得了螺菌属(*Spirillum*)的纯培养。

用分离到的螺菌来观察细菌的运动及进行鞭毛染色,效果均较好,且易掌握。故为了使学 生获得较多的感性知识,在可能的条件下,自己动手分离培养某些实验菌种,充实实验课的内容是很需要的。现将方法介绍如下。

一、取样

采自含有有机质较多、但无臭味、pH7.0左右的污水或淤泥,各5—10 ml。

二、富集培养

1. 培养基^[2](g): 蛋白胨5,牛肉膏3,酵母膏3,乳酸钙1,水1000 ml。配好后分装于大试管(10×200 mm)中,每管10 ml,8—10磅/英寸²,灭菌20分钟。

2. 方法: 取污水或淤泥样品5 ml,接入培养管中摇匀,25—28℃培养48小时后,取样观察。选其中螺菌生长最多的培养管为种液,如上法再转接到新培养基,再次进行富集培养。

三、粗培养物的分离

1. 离心沉淀法: 取螺菌生长最多的富集培养管,经3000rpm离心5—10分钟,至管底有白色菌块沉淀,上清液仍稍呈混浊即可。用无菌水洗涤2—3次,将洗涤后的沉淀物用1—2 ml无菌水制成浓菌液,接入新培养基中继续培养24—48小时,即得到螺菌占优势的粗培养物。

2. 玻璃毛细管法: 对文献[1]方法的改进。制成粗端 $\phi 4$ —5 mm,细端 $\phi 0.5$ —1 mm,长8—

10 mm的毛细管。从粗端用滴管注入半固体培养基,勿使管内有气泡,仅留下距粗端管口约1 cm的空隙。待培养基冷凝后,从粗端滴入菌液,使其覆盖培养基并勿溢出管外。

将接种后的毛细管直立放在小烧杯中,再置于另一大烧杯中,加少量水,并加盖保湿,放温箱中培养24小时后,如毛细管细端的培养基出现混浊,即可能有螺菌生长,用吸球从粗端压挤,将细端最前部长菌的培养基轻轻挤入新的培养基管中,继续培养24—48小时,即可得到螺菌占优势的粗培养。

我们用经离心洗涤后的富集培养物接种毛细管中,并从中选出前端长菌且较清晰者转种新培养基(每支毛细管转接一支新培养基),经培养,大多数培养管均能达到螺菌占优势,杂菌相对减少。

螺菌占优势的粗培养物,菌液较清晰,管底有沉淀,液面无菌膜,培养液无恶臭味,置于室温下,在4个月后澄清的培养液中仍有运动活泼的螺菌。

四、平板划线

将上述粗培养物离心沉淀,洗涤2—3次,并用少量无菌水制成菌悬液,平板划线培养,挑取螺菌菌落制成悬液,经再次纯化后转入斜面,即得到螺菌的纯培养。分离纯化所用的半固体培养基、平板及斜面培养基均同于富集培养基。平板及斜面培养基需调pH至中性(7.2—7.4),螺菌才能较好生长。

五、螺菌的形态和培养特征

用上法分离到的螺菌,菌体宽0.8—1 μm 。在固体培养基上生长时,长5—10 μm ,有2—3个螺旋,弯曲度较小(图1)。在液体培养时长10—15 μm ,有2—4个螺旋,弯曲较大(图2)。两端丛生鞭毛(图3),运动活泼,革兰氏染色

阴性。

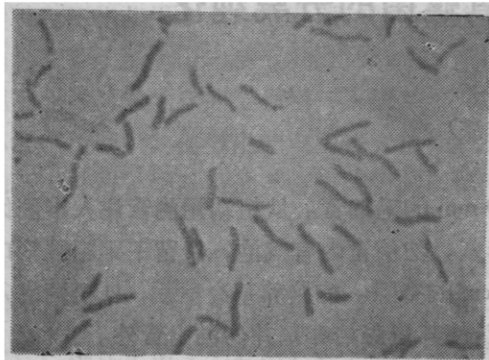


图1 螺菌(斜面培养, $\times 1000$)

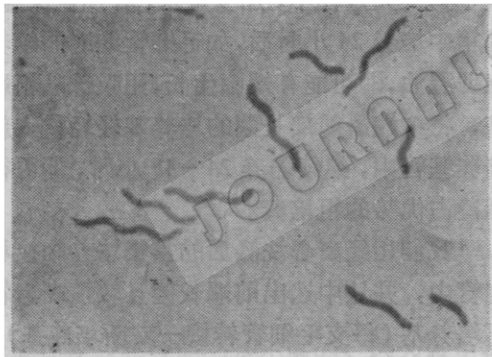


图2 螺菌(液体培养 48 小时, $\times 1000$)

菌落直径 1.5—2mm, 表面光滑, 稍凸起, 淡黄绿色, 半透明。液体培养物稍混浊, 48 小时后产生沉淀。在普通牛肉膏蛋白胨培养基上正

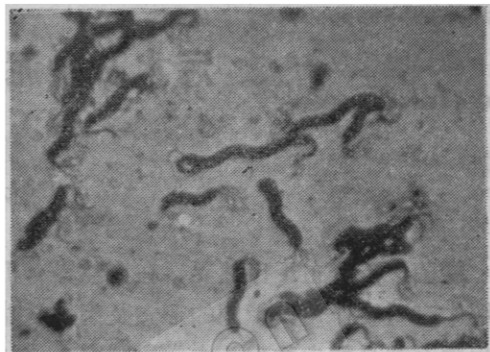


图3 螺菌的鞭毛染色, $\times 1000$
(液体培养 24 小时, 离心, 用蒸馏水制悬液)

常生长, 培养特征同于螺菌培养基。穿刺培养时, 在柱状培养基表面生长。

六、讨论

为了获得螺菌占优势的粗培养物, 我们对毛细管法作了一些改进。经实验证明, 用经离心洗涤并浓缩的加富培养物接种毛细管, 或直接转管培养, 均能获得螺菌占优势的粗培养物。而将粗培养物经再次洗涤并制成浓菌液用于平板划线, 则比直接用粗培养物成功率高。

参 考 文 献

- [1] Yasuke Terasaki: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **26**: 395—402, 1980.
- [2] 中国科学院微生物研究所《菌种保藏手册》编著组: 菌种保藏手册, 128 页, 科学出版社, 北京, 1980.