

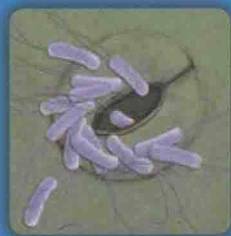


全国高校素质教育教材研究编审委员会审定

植物病原细菌研究技术

ZHIWU BINGYUAN XIJUN YANJIU JISHU

游春平 刘凤权 主 编 >>>



仲恺农学院图书馆



A0509825



中国农业出版社

全国高校素质教育教材研究编审委员会审定

植物病原细菌研究技术

游春平 刘凤权 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物病原细菌研究技术/游春平, 刘凤权 主编. —
北京: 中国农业出版社, 2011. 2

ISBN 978-7-109-15288-5

I. ①植… II. ①游…②刘… III. ①植物—病原细菌—研究 IV. ①S432.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 255898 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

策划编辑 闫保荣

文字编辑 田彬彬

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2011 年 2 月第 1 版 2011 年 2 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 11

字数: 266 千字

定价: 26.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

编 委 名 单

主 编 游春平 刘凤权

副主编 刘琼光 胡白石 孙 辉

编 者 游春平 孙 辉 (仲恺农业工程学院)

刘凤权 胡白石 (南京农业大学)

刘琼光 (华南农业大学)

审阅人 王金生 董汉松 (南京农业大学)

前 言

植物病原细菌是植物上一类重要的病原菌，这些细菌能引起多种农作物病害，常造成农作物产量和品质的下降，给农业生产造成巨大损失。同时，近年来可能由于全球气候变暖、我国极端灾害性天气发生几率增加等因素，使得农业生产上不断出现一些新的细菌病害，并造成了严重的经济损失。因此，快速、准确地对植物病原细菌进行鉴定和检测，是病害防治、预测预报及植物检疫必不可少的重要工作。鉴于此，本书从实用性角度出发，详细介绍了植物病原细菌在分离鉴定过程中所需的各种半选择性培养基、诊断性培养基的配方与特点，以及细菌生理生化测定、免疫学与分子检测的技术，便于从属、种和变种水平快速、准确地对植物病原细菌进行鉴定。

本书旨在帮助研究者、学生和病害诊断人员对大多数植物病原细菌的准确诊断。通过本书介绍的方法，常见的植物病原细菌可以在短时间内得到鉴定，而难养细菌的鉴定就要花较长时间，对此本书也提供了详细的鉴定方法。

首先，本书介绍了许多细菌的半选择性培养基，这些培养基有助于靶标细菌的分离，因为大多数培养基是基于细菌的代谢特点而设计的。不管进行分子或表型性状试验，都应设置阳性和阴性对照。由于从菌种库中获得的菌株可能被污染或鉴定错误，所以，一定要确证细菌的纯度、种类和致病性。一定要保证菌株绝对纯化，尤其对直接从植株上分离的菌株来说特别重要。菌株至少在非选择性培养基上划线纯化两次，挑选的单菌落要与其他菌落相隔较远，4~5d后，在目标菌落附近不能有其他菌落生长。由于要验证分离的细菌是否为植物病原细菌，因此，在鉴定之前需要对分离细菌进行致病性测定。

最后，由于出现了新的分类体系，本书中对过去的一些命名也进行了改动。有几个种重新归入新属中，变化最大的是假单胞属，这个属中的成员已经归于4个属，即假单胞属 (*Pseudomonas*)、噬酸菌属 (*Acidovorax*) (非荧光、氧化酶阳性的许多菌)、布克氏菌属 (*Burkholderia*)、劳尔氏菌属 (*Ralstonia*) (非荧光细菌)；其他的新属有泛菌属 (*Pantoea*)、根单胞菌属 (*Rhizomonas*)、果胶杆菌属 (*Pectobacterium*)、嗜木质部菌属 (*Xylophilus*) 和韧皮部杆菌属 (*Liberibacter*) (限于韧皮部难养细菌)。本书每章都简单描述了

细菌的命名和分类。

在本书的编写过程中，得到南京农业大学王金生教授、董汉松教授的细心审阅和修改，提出许多宝贵的意见，同时得到全国高校素质教育教材研究编审委员会刘思祺主任的细心审阅和修改，在此表示衷心谢意！我们还要感谢仲恺农业工程学院刘开启教授和向梅梅教授为本书的完成给予的极大帮助。本书受公益性农业科研专项经费项目“白叶枯病菌和条斑菌小种与寄主品种抗性鉴定”（3-23）资助。由于时间仓促，加上编者的知识范畴与水平有限，书中错误和不足在所难免，敬请读者批评指正。

编 者

2010 年 11 月

目 录

前言

第一章 细菌的初步鉴定.....	1
第二章 革兰氏阴性细菌	11
第一节 土壤杆菌属 (<i>Agrobacterium</i>)	11
第二节 欧文氏菌属 (<i>Erwinia</i>) 和泛菌属 (<i>Pantoea</i>)	18
第三节 果胶杆菌属 (<i>Pectobacterium</i>)	31
第四节 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>)	37
第五节 噬酸菌属 (<i>Acidovorax</i>) 和嗜木质菌属 (<i>Xylophilus</i>)	54
第六节 布克氏菌属 (<i>Burkholderia</i>)	61
第七节 劳尔氏菌属 (<i>Ralstonia</i>)	66
第八节 黄单胞菌属 (<i>Xanthomonas</i>)	76
第九节 木杆菌属 (<i>Xylella</i>)	88
第十节 根单胞菌属 (<i>Rhizomonas</i>)	93
第十一节 根杆菌属 (<i>Rhizobacter</i>)	95
第三章 革兰氏阳性细菌	97
第一节 植物病原棒形细菌	97
第二节 赖氏菌属 (<i>Leifsonia</i>)	103
第三节 链霉菌属 (<i>Streptomyces</i>)	106
第四节 芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)	111
第五节 梭菌属 (<i>Clostridium</i>)	115

第四章 限于韧皮部的难养细菌.....	120
第五章 无细胞壁的细菌：螺原体和植原体.....	124
第六章 细菌基因的克隆方案.....	138
附录.....	142
附录一 分子鉴定技术.....	142
附录二 血清学技术.....	147
附录三 自动化技术.....	147
主要参考文献.....	152

第一章 细菌的初步鉴定

一、概况

需要相对较少的鉴别性状就能在属的水平上鉴定主要植物病原细菌，这些植物病原细菌可分为：①在标准细菌性培养基上不容易分离的类群（表 1-1）；②在标准细菌性培养基上容易分离的类群（图 1-1）。

表 1-1 用于鉴定难培养细菌和不能培养的植物病原细菌的性状

性状	根单胞菌属 <i>Rhizomonas</i>	难养木杆菌 <i>Xylella fastidiosa</i>	螺原体属 <i>Spiroplasma</i>	植原体属 <i>Phytoplasma</i>	韧皮部寄生菌 <i>Phloem-limited</i>
在 S 培养基上生长	+	—	—	—	—
在 PW 培养基上生长	—	+	—	—	—
细胞壁	+	+	—	—	—
在血清培养基上生长	—	—	+	—	—
螺旋形状	—	—	+	—	—

注：根单胞菌引起莴苣栓皮病；难养木杆菌引起葡萄皮尔氏病、柑橘细菌性黄斑病和咖啡叶烧病；螺原体属引起柑橘僵病、玉米矮缩病；类植原体属引起桑萎缩病、枣疯病、泡桐丛枝病、水稻黄矮病、甘薯丛枝病、水稻橙叶病；韧皮部寄生菌引起柑橘黄龙病、木瓜束顶病和瓜类黄蔓病。

基于图 1-1 的流程，在标准培养基上容易分离的细菌与其他细菌容易区分开。革兰氏反应对快速鉴定未知植物病原菌是基本的。在操作过程中，使用快速生长、新鲜的细菌进行革兰氏反应是非常重要的；鉴定欧文氏菌（*Erwinia*）、泛菌（*Pantoea*）和梭菌（*Clostridium*）时，厌氧试验是非常重要的步骤；鉴定革兰氏阳性细菌时，观察内生孢子的存在与否也是非常重要的试验；鉴定噬酸菌（*Acidovorax*）、布克氏菌（*Burkholderia*）、劳尔氏菌（*Ralstonia*）和假单胞菌（*Rhizomonas*）时，观察菌落的形态、色素产生情况、在 40℃ 下生长情况和氧化酶反应情况是非常重要的环节。每次试验时必须用已知的细菌作阳性和阴性对照。当鉴定未知细菌时，使用纯化的菌株是绝对必要的。菌株需要在非选择性培养基上至少划线纯化两次，并保证挑选的单菌落与其他菌落相隔较远，让预分离的菌落在培养基上生长 4~5d 后，保证其他菌落不会在此处出现。

第二类群的一些细菌是近年来建立的，它们的初步鉴定基于：①在 S 培养基上的生长状况；②在 PW 培养基和复合培养基上的生长状况；③细胞壁的有无；④螺旋形态。如果在上述 3 种琼脂培养基上都不能生长，建议对本标进行电子显微镜检查和使用血清

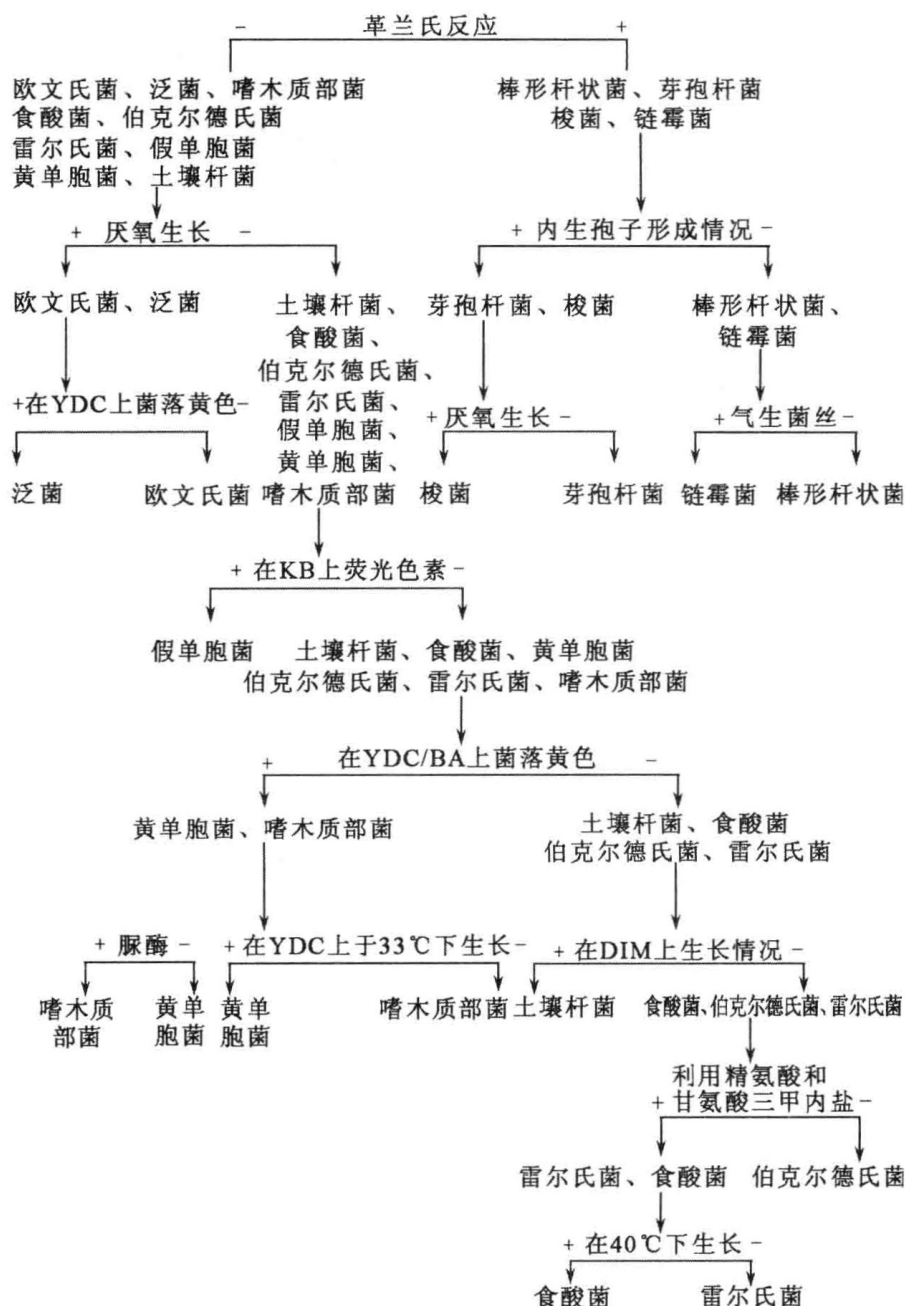


图 1-1 用于区分在标准细菌性培养基上生长的植物病原原核生物性状

- 柠檬泛菌和一些成团泛菌的菌落颜色一般是白色；
- 具内生孢子的梭菌细胞膨大，而芽孢杆菌的细胞则不具有此特点；
- 木薯细菌性叶斑病菌 (*X. cassavae*) 和野油菜黄单胞菌的 2 个致病变种菌落是白色；
- 须芒草伯克尔德氏菌的精氨酸和甜菜碱反应呈阴性，可氧化酶反应呈阴性，而劳尔氏菌和噬酸菌呈阳性。

学技术和（或）基于 PCR 技术进行鉴定。

根据《伯杰细菌分类系统手册》第二版，植物病原细菌的分类地位如下：
细菌域 (Domain Bacteria)

变形杆菌门 (Phylum BⅪ. Proteobacteria)

α-变形杆菌纲 (Class I. Alphaproteobacteria)

鞘氨醇单胞菌目 (Order IV. Sphingomonadales)

鞘氨醇单胞菌科 (Family I. Sphingomonadaceae)

根单胞菌属 (Genus VII. *Rhizomonas*)

根瘤菌目 (Order VI. Rhizobiales)

根瘤菌科 (Family I. Rhizobiaceae)

土壤杆菌属 (Genus II. *Agrobacterium*)

β -变形杆菌纲 (Class II. Betaproteobacteria)

伯克赫氏菌目 (Order I. Burkholderiales)

伯克赫氏菌科 (Family I. Burkholderiaceae)

伯克赫氏菌属 (Genus I. *Burkholderia*)

拉尔氏菌属 (Genus VIII. *Ralstonia*)

丛毛单胞菌科 (Family IV. Comamonadaceae)

噬酸菌属 (Genus II. *Acidovorax*)

未定的属 Genera incertae sedis

嗜木质菌属 (Genus X. *Xylophilus*)

γ -变形杆菌纲 (Class III. Gammaproteobacteria)

黄单胞菌目 (Order III. Xanthomonadales)

黄单胞菌科 (Family I. Xanthomonadaceae)

黄单胞菌属 (Genus I. *Xanthomonas*)

木杆菌属 (Genus XIII. *Xylella*)

假单胞菌目 (Order IX. Pseudomonadales)

假单胞菌科 (Family I. Pseudomonadaceae)

假单胞菌属 (Genus I. *Pseudomonas*)

根杆菌属 (Genus VIII. *Rhizobacter*)

肠杆菌目 (Order XIII. Enterobacteriales)

肠杆菌科 (Family I. Enterobacteriaceae)

伯里那氏菌属 (Genus IV. *Brenneria*)

欧文氏菌属 (Genus XIII. *Erwinia*)

泛菌属 (Genus XXIII. *Pantoea*)

果胶杆菌属 (Genus XXIV. *Pectobacterium*)

硬壁菌门 (Phylum BXIII. Firmicutes)

梭菌纲 (Class I. Clostridia)

梭菌目 (Order I. Clostridiales)

梭菌科 (Family I. Clostridiaceae)

梭菌属 (Genus I. *Clostridium*)

软菌纲 (Class II. Mollicutes)

支原体目 (Order I. Mycoplasmatales)

支原体科 (Family I. Mycoplasmataceae)

- 支原体属 (Genus I. *Mycoplasma*)
- 昆虫原体目 (Order II. Entomoplasmatales)
 - 螺原体科 (Family II. Spiroplasmataceae)
 - 螺原体属 (Genus I. *Spiroplasma*)
- 芽孢杆菌纲 (Class III. Bacilli)
 - 芽孢杆菌目 (Order I. Bacillales)
 - 芽孢杆菌科 (Family I. Bacillaceae)
 - 芽孢杆菌属 (Genus I. *Bacillus*)
- 放线菌门 (Phylum BXIV. Actinobacteria)
 - 放线菌纲 (Class I. Actinobacteria)
 - 放线菌亚纲 (Subclass V. Actinobacteridae)
 - 放线菌目 (Order I. Actinomycetales)
 - 微球菌亚目 (Suborder II. Micrococccineae)
 - 微球菌科 (Family I. Micrococcaceae)
 - 节杆菌属 (Genus II. *Arthrobacter*)
 - 微杆菌科 (Family XIII. Microbacteriaceae)
 - 微杆菌属 (Genus I. *Microbacterium*)
 - 棒形杆菌属 (Genus VI. *Clavibacter*)
 - 短小杆菌属 (Genus VII. *Curtobacterium*)
 - 赖氏菌属 (Genus X. *Leifsonia*)
 - 鸭舌草杆菌属 (Genus XV. *Rathayibacter*)
 - 链霉菌亚目 (Suborder VII. Streptomycineae)
 - 链霉菌科 (Family I. Streptomycetaceae)
 - 链霉菌属 (Genus I. *Streptomyces*)
 - 棒状杆菌亚目 (Suborder III. Corynebacterineae)
 - 诺卡氏菌科 (Family V. Nocardaceae)
 - 诺卡氏菌属 (Genus I. *Nocardia*)
 - 红球菌属 (Genus II. *Rhodococcus*)

注：其中根杆菌 (*Rhizobacter*) 引起胡萝卜癌肿病 (*R. dauci*)，伯里那氏菌 (*Brenneria*) 引起柳树湿材病 (*B. salicis*)，微杆菌 (*Microbacterium*) 引起水稻红色条纹病和红掌细菌性基腐病，美国冬青节杆菌 (*Arthrobacter ilices*) 引起冬青细菌性疫病，萎蔫短小杆菌 (*Curtobacterium flaccumfaciens*) 引起菜豆、甜菜、郁金香和一品红等萎蔫，木质部赖氏菌 (*Leifsonia* sp.) 引起甘蔗宿根矮化病 (*L. xyli*) 和狗牙根矮化病 (*L. xyli* subsp. *cynodontis*)，鸭舌草杆菌 (*Rathayibacter*) 引起小麦蜜穗病 (*R. tritici*) 和鸭茅蜜穗病 (*Rathayibacter rathayi*)，诺卡氏菌 (*Nocardia*) 引起越橘癌肿病 (*N. vaccinii*)，红球菌 (*Rhodococcus*) 引起香豌豆带化病 (*Rhodococcus fascines*)。

另外，在《伯杰细菌分类系统手册》第二版中没有指出引起柑橘黄龙病的病原细菌，目前将其暂定为韧皮部杆菌候选属 (*Candidatus Liberibacter*)，此属已逐渐被人们所接受。植原体属 (*Phytoplasma*) 在第二版中也没有列出，目前暂定名为植原体候选属 (*Candidatus Phytoplasma*)，基本上被人们所接受。

二、使用鉴别培养基和半选择性培养基的分离技术

(一) 植物材料

当分离未知的植物病原细菌时,最好使用几种不同的普通培养基来分离细菌。大多数欧文氏菌、噬酸菌、布克氏菌、劳尔氏菌和土壤杆菌在营养肉汤—酵母浸膏培养基(NBY)或酵母浸膏葡萄糖—碳酸钙培养基(YDC)上生长较好,产生特征性菌落。如果没有经验,最好对已知菌株进行划线来比较菌落形态。有几个种和致病变种在YDC培养基上生长不好,如玉米细菌性枯萎病菌(*P. stewartii*)、水稻白叶枯病菌(*X. oryzae*)、甘蔗白条病菌(*X. albilineans*)和草莓角斑病菌(*X. fragariae*),但是在NBY培养基上生长较好。葡萄细菌性疫病病菌(葡萄溃疡病菌)(*Xylophilus ampelinus*)在YDC或NBY培养基上生长较差,但是在营养培养基NA上生长很好。大多数假单胞菌和棒形杆菌在金氏培养基KB上生长较好,在NBY培养基上可产生特异性状。如果怀疑是芽孢杆菌和梭菌,应该使用选择性的酪蛋白—葡萄糖培养基或P1培养基来进行初步鉴定,当然,划线或涂板后平板也应当放在厌氧培养箱内培养。如果怀疑是链霉菌,则应使用水琼脂培养基来辨认。

在分离细菌时,应使用消毒的小刀切取病斑前缘小块组织,将这部分组织用无菌水冲洗或用1:10的家用洗涤剂(5.25%次氯酸钠)表面消毒3min。用无菌水冲洗之后,应该将病组织放在塑料培养皿内的水滴中用消毒小刀片切碎。如果组织难以切开,应该使用灭菌的研钵和研杵。在静置2~3min后,用接种环蘸取浸出液在琼脂培养基上划线。如果怀疑病原菌是某种细菌,就按照如下细菌分离技术进行操作:应该在平板上4个正确角度划线,每划一次线后,接种环过火焰灭菌一次。彼此相隔较远的单菌落应该在培养基上再划一次线,确保获得真正纯的菌落。如果在普通培养基上经划线不能出现单菌落,那么应确定这种病原生物是否为厌氧细菌(*Clostridium* spp.)、难以培养的细菌[如难养木杆菌(*Xylella fastidiosa*)或根单胞菌(*Rhizomonas*)]或者不能培养的韧皮部杆菌,对于不能培养的韧皮部杆菌,应该使用PCR技术进行鉴定。对通过Koch's法则的植物病原细菌,再进行细菌学性状和DNA同源性研究。

(二) 普通培养基和半选择性培养基

1. 营养琼脂培养基(NA)和营养培养液(NB) 每升中含有牛肉浸膏3g、蛋白胨5g、琼脂15g。制备NB培养液时不加琼脂。

2. 酵母浸膏—葡萄糖—CaCO₃培养基(YDC) 每升中含有酵母浸膏10g、葡萄糖20g、碳酸钙20g、琼脂15g。要获得均匀乳白色的培养基,就必须将碳酸钙磨得很细,否则,它会沉到培养基的底部。在479Pa下灭菌培养基1h或单独高压灭菌溶于10ml水的葡萄糖。灭菌后的培养基应当放在50℃水浴中冷却,碳酸钙在倒平板之前应摇匀。从水浴中拿出试管之后,用旋涡混合器充分混合碳酸钙。

3. 营养肉汤—酵母浸膏培养基(NBY) 每升中含有营养培养液8.0g、酵母浸膏2.0g、K₂HPO₄ 2.0g、KH₂PO₄ 0.5g、葡萄糖2.5g、琼脂15g。高压灭菌(121℃,30min)后,加入1ml灭菌的1mol/L MgSO₄·7H₂O溶液。

4. 金氏培养基(KB) 每升中含有蛋白胨20g、K₂HPO₄ 1.5g、MgSO₄·7H₂O 1.5g、甘油15g、琼脂15g。

5. 酪蛋白—葡萄糖培养基 每升中含有酪蛋白酸性水解物10g、酵母浸膏5g、葡

葡萄糖 5g、 K_2HPO_4 4g、琼脂 17g。

6. PW 培养基 每升中含有大豆蛋白胨 4g、胰蛋白胨 1g、氯化血红素 $10mg^{①}$ 、酚红 (0.2% 溶液) 10ml、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g、 K_2HPO_4 1.2g、 KH_2PO_4 1g、L-谷氨酸盐 4g、琼脂 15g、牛血清蛋白 V 30ml^②。

7. S 培养基 用于从土壤和植物组织中分离根单胞菌 (*Rhizomonas*)。每升中含有酪蛋白-酸水解物 5g、葡萄糖 2.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.3g、 $Ca(NO_3)_2 \cdot 7H_2O$ 60mg、硫酸链霉素 11ml^③、琼脂 11g。

三、诊断性培养基和试验

1. 革兰氏反应 本试验对植物病原细菌的鉴定是一个非常重要的环节，可通过革兰氏反应将植物病原细菌划分为两大类，即革兰氏阳性菌 (G^+) 和革兰氏阴性菌 (G^-)。虽然使用简单的氢氧化钾 (KOH) 技术可以快速并初步鉴定病原菌的种类 (即革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌)，可是，当鉴定新的细菌时，传统的革兰氏染色试验是非常重要的，不应当省略，也不能完全用 KOH 技术来代替。

(1) KOH 试验 挑取几环细菌与 2 滴 3% 的 KOH 混合，革兰氏阴性细菌变成黏稠状，而革兰氏阳性细菌则不会。如果还有疑问，就需进行革兰氏染色。需要注意的是，一定要用已知的阴性和阳性细菌进行对照。

(2) 革兰氏染色 革兰氏阳性细菌保留了第一次染色的染料，呈现紫色至蓝黑色。革兰氏阴性细菌吸收了负染的颜色，变成红色。一般而言，只有少数几种细菌 [如梭菌 (*Clostridium*)] 不容易根据革兰氏反应区分。

革兰氏染色成功的要点：

①配置好的试剂存放不能超过 1 年，尤其碘液要新鲜；如果溶液没有放在棕色瓶中和黑暗下，它很快就会变色失效，试剂也可能会分解。

②使用新鲜培养的细菌。供试细菌应该处于对数生长期；衰退期较老的细胞可能会产生革兰氏反应变化的情况。

③使用已知的革兰氏阳性和阴性的细菌作对照。

④涂片一定要均匀，不要成块聚集。

(3) 染色步骤

①在一块干净的玻片上，滴上一小滴细菌菌液，并涂开，让其自然干燥。然后，在玻片下轻轻过火焰两次，将细菌固定于玻片上。

②用结晶紫溶液 (浓度为 2%) 浸没涂片 1min。

③在自来水中冲洗几秒钟，用吸水纸吸干。

④碘液处理 1min。

⑤水洗数秒钟，吸干。

⑥用 95% 酒精溶剂脱色，直至溶剂流液呈无色为止 (大约 30s)，用纸吸干。如果脱色过久，革兰氏阳性细菌可能会失去颜色。

① 或者加 10ml 溶于 0.05mol/L NaOH 的 0.1% 氯化血红素溶液。

② 高压灭菌后，加过滤灭菌的 (0.2 μ m 过滤纸) 20% 母液。

③ 在高压灭菌后培养基冷却到 50℃ 左右，加入过滤灭菌的硫酸链霉素溶液 (15mg/ml)。

⑦用自来水冲洗 2s。

⑧用番红溶液负染 10s 左右。

⑨用自来水简单冲洗，用纸吸干，镜检。

(4) 结果 革兰氏阳性细菌染成紫色至蓝黑色，革兰氏阴性细菌染成红色。各溶液配方如下：

①Hucker 的草酸铵结晶紫溶液配方：

溶液 A：结晶紫 2.0g、95%酒精 20.0ml。

溶液 B：草酸铵 0.8g、蒸馏水 80.0ml。

混合 A 和 B 溶液，使用前保藏 24h，用滤纸过滤混合液。

②经革兰修改后的 Lugol 改良染液配方：碘 1.0g、碘化钾 2.0g、蒸馏水 300.0ml。

在黑暗中，溶解碘溶液几小时或过夜，另外，在研钵中磨碎碘和 KI，慢慢加水；继续研磨，直到碘和 KI 成溶液状态，用余下的水冲洗溶液，然后倒入深色瓶子中。

③脱色剂配方：

95%酒精：最慢的脱色剂。

丙酮：最快的脱色剂。

丙酮—酒精：中间类型。95%酒精 100ml、丙酮 100ml。

上面 3 种脱色剂都能产生良好的脱色效果。

④负染溶液配方：

贮藏液：番红 O 2.5g、95%酒精 100.0ml。

工作溶液：贮藏母液 10.0ml、蒸馏水 90.0ml。

2. 确定内生孢子（芽孢） 将斜面上生长的细菌悬浮于玻片上的水滴中，晾干；用 5%孔雀绿浸渍玻片，染色 10min；用自来水充分冲洗，晾干，用 0.5% (W/V) 番红负染玻片 15s；用自来水充分冲洗，用吸水纸吸干；细菌细胞染成红色，内生孢子染成绿色。

3. 厌气生长 Hugh and Leifson 培养基，每升中含有蛋白胨 2.0g、氯化钠 5.0g、磷酸二氢钾 0.3g、琼脂 3.0g、溴酚蓝 3.0ml (1%溶液)。溶解各成分，调节 pH 至 7.1。加 5ml 基础培养基于试管中，高压灭菌 20min。准备 10%葡萄糖溶液，过滤灭菌。在无菌条件下加 0.5ml 葡萄糖至每管中。每个菌株接种两管。滴一层高约 5mm 熔化的灭菌凡士林或石蜡封盖试管中的培养基。试管培养基的颜色由蓝变黄，表明厌氧生长阳性（发酵）。

4. 在 DIM 培养基上的生长 DIM 培养基，每升中含有纤维二糖 5g、氯化铵 1g、磷酸二氢钠 1g、磷酸氢二钾 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3g、孔雀绿 10mg、琼脂 15g。灭菌前将 pH 调到 7.0。用于土壤杆菌与噬酸菌、布克氏菌和劳尔氏菌的区分。

5. 在 33℃或 40℃的生长 于直径 25cm 的试管中装入 5~10ml NYB 培养液，于 25~27℃下过夜振荡培养菌株。取 50μl 培养液加入装有 NYB 的试管中，于 40℃下振荡培养，于 15h 和 24h 记录生长情况。

6. 脲酶 改良过的酵母盐 (YS) 液体培养基，每 800ml 中含有 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5g、 K_2HPO_4 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、NaCl 5.0g、酵母浸膏 1.0g、甲酚红 (cresol red) 16.0mg。高压灭菌后加入尿素 200ml (加 20.0g 尿素于 180ml 水中)，过滤灭菌。

将 5.0ml 培养基加入灭菌的 25cm 试管中, 接种后放在摇床中于大约 28℃ 下培养。对照是不含尿素的基础培养基。使品红 (magenta red) 变红色, 指示碱量增加 (pH 9.0 左右), 同时表示有脲酶活性 (即产生脲酶)。

7. 氧化酶 在 NGA 培养基 (如果使用含量大于 0.25% 的葡萄糖, 可能会导致假阴性) 上培养细菌 24h, 接一环细菌于滤纸 [滤纸浸在新配的 1% (W/V) N,N,N',N' -四甲基对苯二胺二盐酸盐 tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 中] 上。如果在 10s 内出现紫色, 表明氧化酶阳性; 如果在 10~60s 内出现紫色, 表明氧化酶呈慢阳性; 如果 60s 后没有颜色变化, 表明呈阴性。由于灰量铁能促进苯二胺化合物氧化, 所以推荐使用铂金或塑料接种环或牙签挑取菌株, 不要使用铁丝接种环。

可以从 Difco 公司购买氧化酶胶带。一些研究者认为二甲基化合物比四甲基化合物要好。

8. 在 YDC 培养基上的菌落颜色和质地

9. 在 KB 培养基上产生荧光和扩散性非荧光色素 在琼脂平板上划线, 于 25℃ 下培养, 48h 后, 在正常光照下观察非荧光色素产生情况, 在长波长紫外光 (366nm) 下观察荧光色素产生情况。

10. 鞭毛

(1) 西萨—基尔 (Ceseres—Gill) 染色方法

①染媒剂: 单宁酸 10.0g、 $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 18.0g、 $ZnCl_2$ 10.0g、碱性品红 1.5g、酒精 (60%) 40.0ml。

研钵中盛酒精 10ml, 加入以上各种成分, 充分研磨混合后, 再加入剩余的酒精, 使用前用蒸馏水稀释 2 倍, 染色时过滤, 滤液直接滴在涂片上。

②染液: 苯酚品红。

溶液 I: 碱性品红 0.3g、酒精 (95%) 10.0ml。

溶液 II: 苯酚 (结晶) 5.0g、蒸馏水 95.0ml。

溶液 I 与溶液 II 混合, 即为苯酚品红。

③染色步骤: 染媒剂过滤后, 滤液滴在载玻片上, 处理 5~7min; 用水轻轻洗去染媒剂, 并轻轻甩去载玻片上剩余的水, 在空气中干燥后, 再加苯酚品红染剂染色处理 5min; 水洗, 在空气中干燥后镜检菌体和鞭毛呈红色。

(2) 银染法 菌株准备:

①将菌株接种在标准培养基 (如 YDC) 平板上, 于 27℃ 下培养 24~48h。

②使用已知的周生鞭毛细菌 (如胡萝卜欧文氏菌) 或极生鞭毛细菌 [如边缘假单胞菌 (*P. marginalis*)] 作为对照。

③慢慢地加 1.0ml 蒸馏水于斜面上, 使得细菌悬浮液略带云雾状。

④不要立即摇动斜面。

⑤取一环蒸馏水于经酒精清洗的玻片上。

⑥挑一环菌液轻轻放在蒸馏水中 (刚好相接触)。

⑦晾干。

染色步骤:

①用试剂 A (鞣酸溶液) 覆盖涂片 2~4min, 然后用蒸馏水冲洗。

②加试剂 B (氯化硝酸银溶液, pH10.0), 大约 10s 后迅速用蒸馏水冲洗。

③晾干, 用油镜观察。

结果: 在日光至金黄色背景下, 细菌细胞和鞭毛染成深褐色至黑色。

试剂 A: 鞣酸溶液。每升中含有鞣酸 (单宁酸) 5.0g、氯化铁 1.5g、福尔马林 (15%) 2.0ml、氢氧化钠 (1%) 1.0ml, 最后用蒸馏水调至 100ml。

试剂 B: 氯化硝酸银 (银氨) 溶液。配制方法为: 硝酸银 (2%) 100.0ml, 取出 10ml 硝酸银溶液并保存。然后加氨水于剩下的 90ml 硝酸银溶液中, 直至形成大量的沉淀。继续加入氨水, 直到沉淀溶解。从保存的 10ml 硝酸银溶液中取少量慢慢加入银氨溶液中, 直到出现云雾状, 轻轻摇动后, 沉淀又消失, 再滴加硝酸银, 直至摇动后薄雾状的沉淀不再消失为止。用氨水和硝酸银调节 pH 至 10.0。在制备后的 4h 内使用。

(3) 电子显微技术 在适宜生长的斜面培养基上培养细菌。取样时间为对数生长期。可是, 在低于最适生长温度 $2\sim 3^{\circ}\text{C}$ 时也是较好的。

按照下面的程序制备菌株:

①用双蒸水冲洗斜面的底部, 以便冲洗斜面底部积累的细菌。

②用 1ml 双蒸水轻轻冲洗斜面生长的菌落。

③用大约 10^9CFU/ml 细菌悬浮液作母液做一系列稀释, 慢慢地混合稀释液以防鞭毛脱落。经过 $1/2$ 、 $1/4$ 、 $1/16$ 和 $1/32$ 稀释母液, 然后各自滴一小滴稀释液于不同的铜网上。要达到最佳的观看效果, 要求在 200 目铜网上每个网孔有 5 个细菌。不必使用展开剂 (洗涤剂)。

(4) 形成背影或负染

①形成背影: 在 -10°C 下于干燥器上冷冻干燥铜网过夜, 成 8° 角放置, 用碳铂金成影。

②染色: 将铜网放在一滴 1% 乙酸双氧铀中 $1\sim 2\text{min}$, 或放在 2% 磷钨酸钾 (pH 6.5) 中 30s; 夹住铜网的边缘、提取, 放在过滤纸上, 去除染液。

(5) 在电子显微镜下观察

11. 血清琼脂培养基 (Liao 和 Chen 培养基) 每升中含有 PPLO 肉汤基础培养基 1.5g、蔗糖 12g、马血清 20.2g、酚红 2.5g、琼脂 1.5g。

12. 确定细胞壁 有时需要用这种测试方法 (细胞壁确定法) 来鉴定微生物, 如植原体或螺原体。材料的选择非常重要, 因为一些病菌的浓度很低或局限于某种组织中。

①用刀片切取 $1\sim 2\text{mm}^2$ 的组织块, 立即放入刚制备的含 3% 戊二醛的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中。

②在真空干燥器中浸渗几小时 (依据组织的大小、质地) 后, 用新鲜溶液替换戊二醛, 在真空干燥器中继续固定 4h (室温)。

③除去戊二醛, 用新鲜磷酸缓冲液简单清洗组织 3 次, 将组织放入含钼酸 (四氧化三钼) 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中 $2\sim 4\text{h}$ (室温) 或过夜 (4°C)。

④用新鲜缓冲液冲洗 3 次。

⑤在乙醇—环氧丙烷中进行组织系列脱水: 在 20%、50%、70% 和 95% 的酒精中逐步脱水 ($15\sim 30\text{min}$), 再经无水酒精二次脱水, 然后在酒精—环氧丙烷 (1:1) 中脱水, 最后, 在环氧丙烷中脱水两次。