



游动放线菌的培养与染色制片技术

宋尚直 费尚芬*

(河北大学生物系,保定)

游动放线菌科放线菌的孢囊形状和大小,在一般斜面或平皿培养物上不易辨清。其菌丝体、孢囊、孢囊孢子及某些属种的分生孢子等用一般菌块挑离法直接观察,不能反映其自然生长和正常形态的特征,制作临时装片时,常因遇水菌丝体断裂或孢囊破裂而难以保持完整形态,造成鉴定上的错误。为此,本文介绍了两种用于游动放线菌科分类鉴定的培养方法和两种永久装片的染色制片技术。

一、两种培养方法

1. 琼脂片接种小室培养法: 配制适于孢囊形成的蔗糖硝酸盐(或马铃薯葡萄糖,或葡萄糖酵母膏)琼脂培养基。将熔化的培养基,滴于载片上,稍冷后,盖盖片,轻压,使培养基呈厚度约0.5—1mm的圆形琼脂片,弃盖片,用刀将琼脂片分成两个半月形,再用接种环取适量培养物,沿切口处垂直划线接种,边接种边将两个半月形推向两边,二者相距0.5cm。再在切口处重复接种一次,盖盖片。用熔化石蜡密封盖片的三个边,留一边通气。然后将载片置于铺有滤纸的大平皿内的三角形玻璃棒架上,加适量无菌水保持湿度,加平皿盖,置25—30℃培养5—7天后,观察培养物的形态和培养特征。本法与埋片法和琼脂塔片法的区别在于,此法可用于继续培养和定期形态观察,有利于研究培养物的生活史,适宜制作永久装片,显微摄影效果好。

2. 培养基接种插片培养法: 在平皿内装蔗糖硝酸盐琼脂培养基或上述别的培养基,厚度约0.5cm,平行划线接种培养物,将无菌盖片沿划线的垂直方向斜插入培养基内,每皿可插数片。28℃培养5—14天后取出盖片,即可进行形态与培养特征的鉴定,和染色制做永久封片。本法缺点是盖片取出后片上的培养物与培

养基分离,不利于定期观察和连续培养。优点是盖片插入培养基较深,培养物生长较好,适宜作永久装片。

二、两种染色制片技术

培养物按下列方法制成永久装片。

1. 固定: 用 FAA 固定液(95%酒精50ml,冰醋酸5ml,福尔马林5ml,水25ml)固定15—30分钟。再用50%酒精洗数次(洗掉固定液)。

2. 染色与封片: 有两种方法。

① 用碱性品红染液(碱性品红1g溶于95%酒精10ml,再加蒸馏水100ml)染3—5分钟,水洗,再浸入75%酒精中1—2分钟。再用快绿(快绿0.1g溶于100ml 95%酒精中)复染15—30分钟,用85%酒精洗去复染余液。最后用95%酒精和无水酒精先后脱水各半分钟,待风干后,加二甲苯透明,立即用中性胶封片。染色结果: 孢囊壁和分生孢子染成浅绿色,菌丝体和孢囊孢子染成浅紫红色。

② 番红花红(即藏花红O)(藏花红O 0.5g溶于100ml 50%酒精中)染色30—60分钟,若色深,可用酸酒精(1%盐酸:50%酒精=1:10)褪色数秒钟。立即浸入50%酒精中,洗去酸酒精余液。再用甲苯胺盐(甲苯胺盐0.5g溶于100ml 50%酒精中)复染半分钟(复染前浸入75%酒精约半分钟);或用亮绿(亮绿1g溶于100ml 95%酒精中)复染10—30秒,复染前可用析色液(纯酒精50ml,丁香油50ml,盐酸0.1ml)析色。最后用85%酒精洗去染色余液,立即先后用95%酒精和纯酒精脱水各半分钟,二甲苯透明,中性胶封片。染色结果: 孢囊壁浅红色,孢囊孢子及菌丝体呈复染液的各种色。

* 刘冬青同志参加部分工作。