放线菌游动单元的鞭毛染色

连云鹏　　刘兴荔

（广西农学院，南宁）

原核生物的鞭毛纤细（直径约 20nm），只有用特殊染色技术着色加粗之后，才能在光学显微镜下看见。运动性放线菌的游动单元，因其数量、释放条件和具运动性的时间等均与运动性细菌有所不同，其鞭毛染色难度要更大一些。使用电子显微观察鞭毛，虽然有其优点，但因费用较高，观察到的游动单元有限，而受到一定限制。本文报道改进的刘荣标鞭毛染色法[1]（下称改进法）用于放线菌游动单元鞭毛染色的程序及其结果。

材料和方法

（一）供试菌株

997-2 菌株（*Actinoplanes* sp.），627 菌株（*Ampullariella* sp.），950 菌株（*Spirillospora* sp.），954 菌株（*Planomonospora* sp.），997 菌株，976 菌株。

以上菌株均为我们在放线菌分类研究工作中从国内不同地区土壤分离得到。除 997 和 976 菌株在放线菌目中的分类位置需进一步研究确定外，其余菌株的归属均已确定。

（二）改进法染色液的配制

A 液：5% 苯酚水溶液。

B 液：20% 鞣酸水溶液。

C 液：饱和明矾水溶液。

D 液：饱和结晶紫酒精溶液。

以上四种溶液分别装入磨口玻塞瓶，室温下可长期保存。用前，在 100ml 烧杯中依次加入：A 液 30ml，B 液 10ml，C 液 3ml，混匀。在混合液中逐滴加入 D 液 2ml，边加边摇动烧杯。配置好的染色液表面有细碎紫金色浮膜，底部有深紫色泥状沉淀，不必过滤，可即配即染。若静置过夜，待泥状沉淀结块，将上清液倒入磨口滴瓶中，室温存放稳定，可长期使用。

（三）游动单元的活化和运动性的观察

1. 诺卡氏菌状或具外生分生游动单元的放线菌培养成熟后，因其游动单元发育同步性较好，数量众多，通常无需活化，直接采用悬滴法便可观察到游动单元的运动性。

2. 孢囊内生游动单元，因孢囊破裂常常需要借助外力，游动单元的释放有一个过程，因此活化处理是必要的，通常，在灭菌平皿内放一灭菌 5ml 烧杯，内放无菌水或稀释 10 倍的土壤浸出液数滴，刮取或铲取具有丰厚孢囊层的生长物若干放入小烧杯内的水中，并用一灭菌 50ml 的烧杯罩住小烧杯（图 1）。置 30℃ 温箱活化 1 至数小时。活化期间可用悬滴法定时取样镜检，直至大量游动单元处于最佳运动状态。

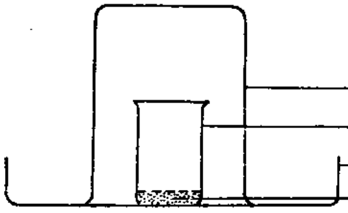

图 1　游动单元活化装置示意图

3. 菌体纵横分裂，形成垫状细胞团，并进行出芽增殖的地嗜皮菌属（*Geodermatophilus*）一类的放线菌，因其生长循环较为复杂，菌体发育同步性差，为了便于游动单元的检出，可在接种斜面试管内加入无菌水 1—2ml，立放培养至液面以上斜面生长物良好发育，不时取水样悬滴法镜检，至大量游动单元出现。

国家自然科学基金资助项目。

承中国科学院微生物研究所阎逊初、阮继生先生鉴别确认菌种，并对此项研究工作提出指导意见。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

（四）染色操作步骤

1. 洁净载片(要求无油污、无尘埃)平放桌面,偏端滴放无菌水 1—2 滴。接种环轻取具有游动单元的生长物少许点入无菌水滴中，或用灭菌胶头吸管吸取活化悬液 1—2 滴滴入无菌水滴中,让其自由运动片刻。

2. 从一端缓慢倾斜载片，使悬液缓缓向另一端流去。流过载片的多余液滴用吸水纸吸去。载片自然干燥。

3. 水平放置干燥载片(涂布面向上)，滴加染色液布满载片,染色 3—10 分钟。

4. 拇指和食指夹住染色载片的一端，保持水平，自来水细流从夹持端边缘注入。升高夹持端,倾斜载片,使染色液随水流冲洗干净。

5. 自然干燥,或微热烘干染色片,镜检游动单元和鞭毛均呈深紫色。

结果和讨论

1. 一种好的鞭毛染色法应达到两个要求：(1) 鞭毛和菌体着色良好，着染率高，鞭毛完整、伸展自然、粗细适度，底衬干净；(2) 染色液易配制、耐贮存，染色操作简便可靠、重复性好。经多次重复试验的结果表明，改进法基本上能达到这些要求，对运动性放线菌游动单元鞭毛染色的效果良好(图版 I)。

2. 游动单元的活化和运动性的确定是进行鞭毛染色的前提。这对于放线菌游动单元的鞭毛染色尤为重要。这是因为：(1) 运动性放线菌并非菌体的任何部分都具有运动性；(2) 放线菌游动单元形成和释放的多样性和复杂性。根据我们对游动单孢菌 (*Planomonospora* sp.) 的观察，在长达 10 小时的活化之后，仅有 1—3% 的气生孢囊释放出游动孢子。游动孢子的运动性一经确定，鞭毛染色也就随即获得成功。对观察这种有机体的游动单元来说，活化和耐心都是同等重要的。

3. 从图版 I 所展示的放线菌目 6 个属的游动单元鞭毛着生情况来看：除游动单孢菌和一种有待鉴定的诺卡氏菌状放线菌的游动单元分别为单一的周生鞭毛和极生鞭毛外，其余 4 个属的游动单元均具有周生和极生（包括单生和丛生)鞭毛。这一结果似乎与 Higgins 等[2] 的观察不符。他们依据对游动放线菌属 (*Actinoplanes*) 的 3 个菌株、小瓶菌属 (*Ampullariella*) 的两个菌株、嗜皮菌属 (*Dermatophilus*)的两个菌株、螺孢菌属 (*Spirillospora*) 的两个菌株和骚动"诺卡氏菌" ("*Nocardia*" *turbata*) 的 4 个菌株游动单元电镜观察的结果认为,这些放线菌的鞭毛是丛生(或单生),而决无周生。我们认为,这可能与其采用的菌株、培养基种类和制样方法等不同有关。

4. 野野村英夫等[3] 采用户田氏鞭毛染色法在光学显微镜下证明，小瓶菌属不同种的 13 个菌株均具有周生和极生（包括偏端丛毛和两端单毛)鞭毛，并统计出了它们各自的百分比。他们还以此作为区分不同种的指征之一用于分类鉴定之中。这些观察结果与我们对小瓶菌游动单元鞭毛的观察一致(图版 I-2)。由此可见，一种好的鞭毛染色法,加上光学显微镜的帮助，可以更全面、客观地反映出运动性放线菌游动单元鞭毛的着生情况，而所需费用比电镜观察节省得多。当然，如要对鞭毛进行超微结构的观察,电镜观察仍然是不可取代的。

参考文献

[1] 刘兴荔等：广西农学院学报，1(1)：105—107，1982。

[2] Higgins, M. L. et al.: *Journal of Bacteriology*, **93** (4): 1446—1451, 1967.

[3] 野野村英夫等：醱酵工学会誌，57(2)：79—85，1979。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn