

实验三

细菌的芽胞染色法和鞭毛染色法

主讲人:孔召玉

kongzhaoyu@hotmail.com

南昌大学生物技术系

一、实验目的

- 1.学习并掌握芽胞染色法。
- 2.初步了解芽胞杆菌的形态特征。
- 3.学习并初步掌握鞭毛染色法。
- 4.学会观察细菌鞭毛的形态特征。
- 5.巩固显微镜操作技术及无菌操作技术。

二、实验原理

1. 芽胞染色法原理

芽胞染色法是利用细菌的芽胞和菌体对染料的**亲合力不同**的原理，用不同染料进行着色，使芽胞和菌体呈不同的颜色而便于区别。

芽胞壁厚、透性低，**着色、脱色均较困难**，因此，当先用着色能力较强的染料，如孔雀绿（malachite green）或碱性品红（basicfuchsin）在加热条件下进行染色（**初染**），此染料不仅可以进入菌体，而且也可以进入芽胞，进入芽孢囊和营养细胞中的染料可经水洗脱色，而进入芽胞的染料则难以透出，若再用对比度大的染料染色（**复染**）（如番红液或黑色素溶液）处理。芽孢囊和营养细胞染上复染剂颜色，而芽孢仍为原来的颜色，这样可以很清晰地观察芽孢。

2. 鞭毛染色法的原理

鞭毛是细菌的运动“器官”，一般细菌的鞭毛都非常纤细，其直径为 $0.01-0.02\ \mu\text{m}$ ，在普通光学显微镜的分辨力限度以外，故需要用特殊的鞭毛染色法，才能看到。

鞭毛染色是借媒染剂和染色剂的沉淀作用，使染料堆积在鞭毛上，以加粗鞭毛的直径，同时使鞭毛着色，在普通光学显微镜下能够看到。鞭毛染色方法很多，

本实验主要介绍硝酸银染色法。

三、实验器材

1. **仪器：**显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸、接种环、载玻片、酒精灯等。
2. **染色液：**
芽胞染色液：孔雀绿水溶液，沙黄水溶液
鞭毛染色液：硝酸银鞭毛染色液A液，B液
3. **菌种：**枯草芽胞杆菌（芽胞染色用）
变形杆菌（鞭毛染色用）

四、实验内容与步骤

1、细菌芽胞染色

染色步骤

涂片→干燥→固定→染色（孔雀绿加热染冒汽后5分钟）→

水洗→复染（沙黄染3分钟）→水洗→干燥→镜检

- (1) 将培养24小时左右的枯草芽胞杆菌或其他芽胞杆菌，作涂片、干燥、固定。
- (2) 滴加3-5滴孔雀绿染液于已固定的涂片上。
- (3) 用木夹夹住载玻片在火焰上加热，使染液冒蒸汽但勿沸腾，**切忌使染液蒸干**，必要时可添加少许染液。加热时间从染液冒蒸汽时开始计算约4-5分钟。这一步也可不加热，改用饱和的孔雀绿水溶液（约7.6%）染10分钟。
- (4) 倾去染液，**待玻片冷却后**水洗至孔雀绿不再褪色为止。
- (5) 用沙黄水溶液复染2-3分钟，水洗。
- (6) 待干燥后，置油镜观察，**芽胞呈绿色，菌体呈红色**。

• 2、鞭毛染色

染色步骤

制片→自然干燥→固定→染色（A液染3—5分钟呈褐色）

→水洗→染色（B液染稍加热微冒蒸汽且不干约30—60s）

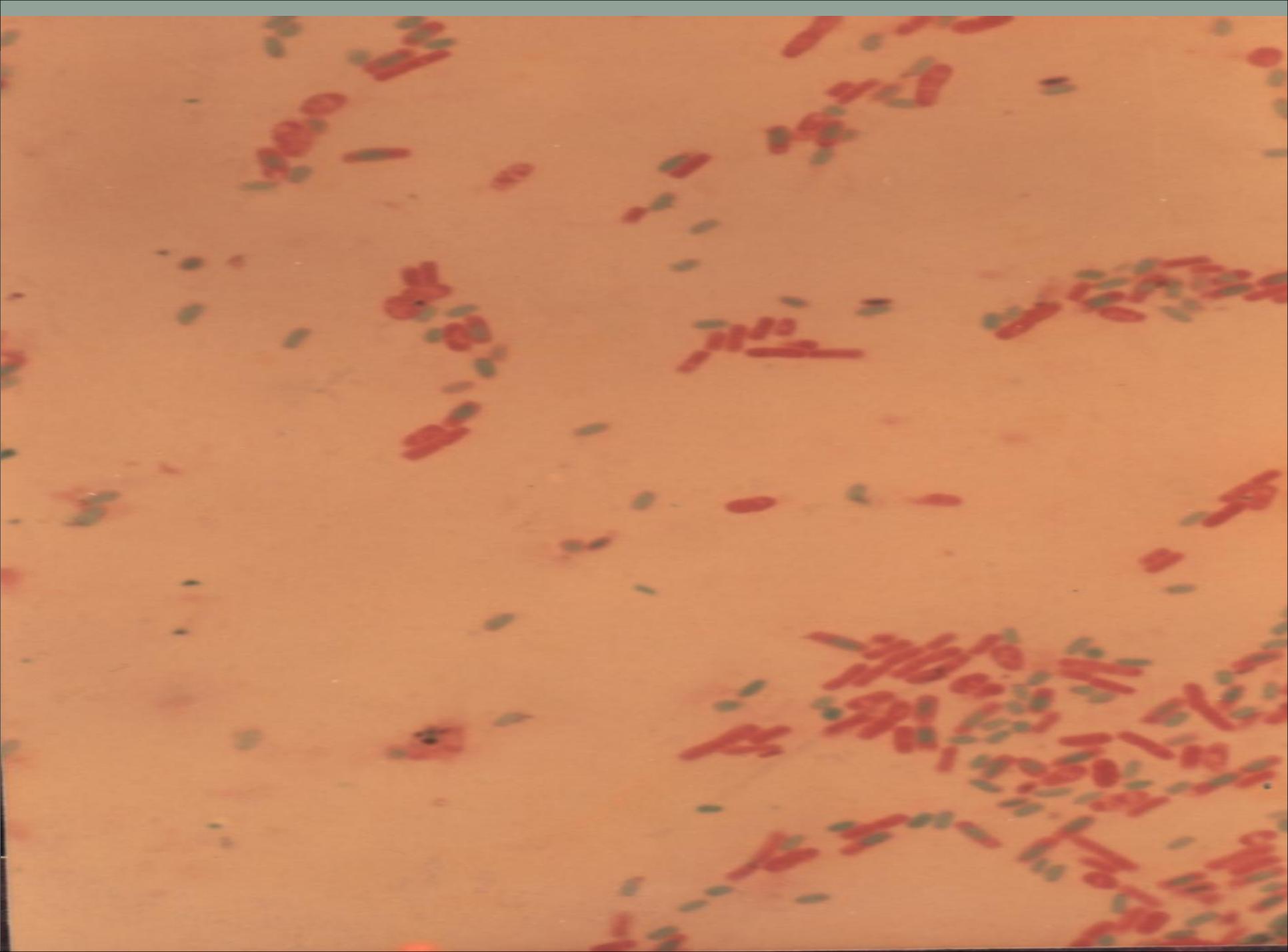
→水洗→自然干燥→镜检

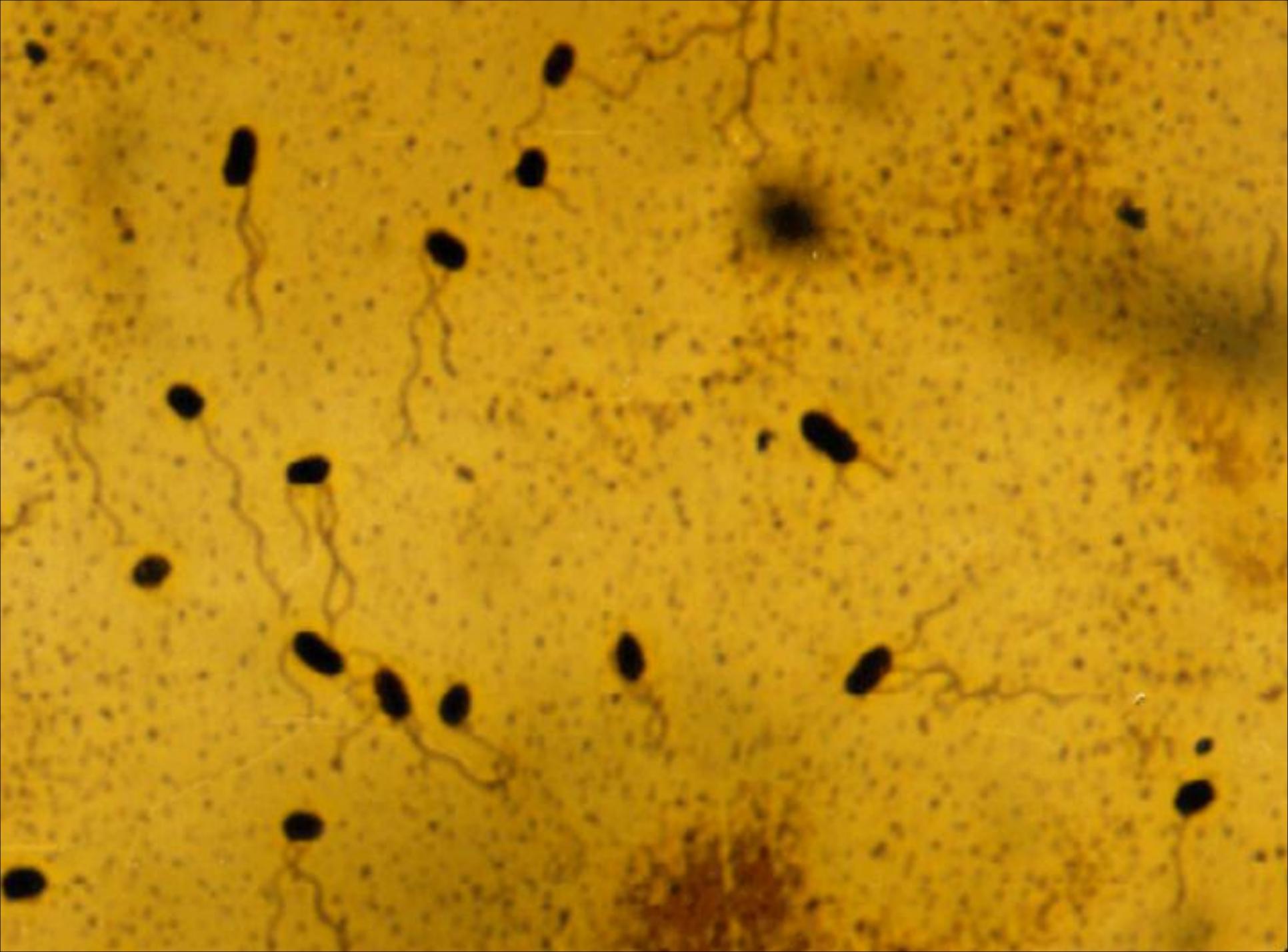
- (1) **菌种的准备** 要求用活跃生长期菌种作为鞭毛染色的观察。
- (2) **载玻片的准备** 将载玻片在含适量洗衣粉的水中煮沸约20min, 取出用清水充分洗净, 沥干水后备用, (也可置95%乙醇中, 用时取出在火焰上烧去酒精及可能残留的油迹。
- (3) **制片** 在载玻片的一端滴一滴蒸馏水, 用接种环挑取少许备用的菌苔, 最好从菌落的边缘取菌苔, 注意不要挑上培养基, 在载玻片的水滴中轻沾几下。将载玻片稍倾斜, 使菌液随水滴缓慢流到另一端, 然后平放在空气中干燥。
- (4) **染色** 涂片干燥后滴加A液染3—5分钟, 用蒸馏水冲洗, 或将残水沥干或用B液冲去残水 (**注意: 一定要充分洗净A液后再加B液, 否则背景很脏**)。洗净A液滴加B液后, 将玻片在酒精灯上稍加热, 使其微冒蒸汽且不干, 一般染30-60秒钟。待玻片冷却后用蒸馏水冲洗, **自然干燥**。
- (5) **镜检** 镜检时, 如未见鞭毛, 应在整个涂片上多找几个视野, 有时只在部分涂片上染出鞭毛。菌体为深褐色, 鞭毛为褐色。

注意事项

细菌鞭毛染色要求非常小心细致，染色成功的关键主要决定于：

- (a) 菌种活化的情况，即要连续移种几次；
- (b) 菌龄要合适，一般在幼龄时鞭毛情况最好，易于染色；
- (c) 新鲜的染色液；
- (d) 载玻片要求干净无油污。
- (e) 在制菌液和涂片时，不要搅动菌体，否则会造成鞭毛的脱落。





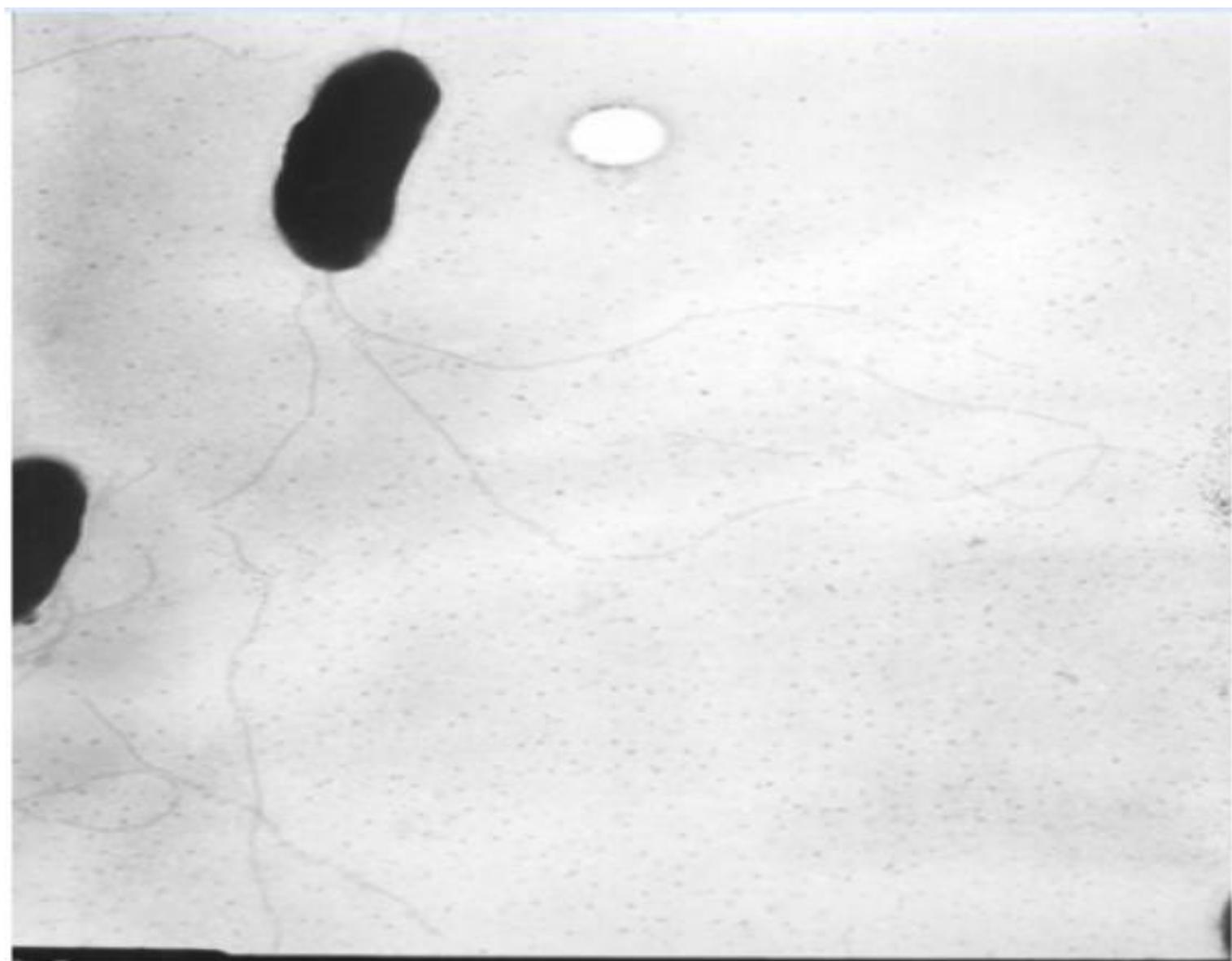


图 12-1 细菌鞭毛电镜照片

实验报告及思考题

1. 绘图并说明枯草芽胞杆菌的形态特征（包括芽胞形状、着生位置及芽孢囊形状等）。
2. 绘图并说明变形杆菌菌体及鞭毛形态特征（包括鞭毛数量、形状、着生方式等）。

思考题

- 1、鞭毛染色的成功关键步骤是哪些？
- 2、鞭毛染色应注意哪些问题？
- 3、你对你所做的鞭毛染色结果满意吗？如果不满意，有哪些方面需要改进？如果满意，你的成功经验是什么？