

# 胶质芽孢杆菌荚膜染色方法的比较与改进

凌 云,肖智杰,连 宾

(1 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室,江苏 南京 210046)

(2 南京师范大学生命科学学院,江苏 南京 210046)

[摘要] 荚膜是细菌的重要附属物,细菌有无荚膜以及荚膜物质厚度和化学组成是其重要特征之一.染色和观察荚膜形态是微生物研究中的基本技能,但荚膜的低折光性与亲和染料能力差等特性,使其不易着色.制作一张好的荚膜染色玻片需要正确的染色方法和一定的熟练程度.胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)以其肥厚荚膜为显著特征,该菌的许多有益特性都与其产生肥厚荚膜有密切关系.本文以该菌为试验对象,尝试采用 7 种负染方法对荚膜进行染色.结果表明:7 种染色方法中,墨汁染色法和刚果红盐酸染色法简便快速且效果较好;对刚果红盐酸染色法进行了改进,使染色效果更为理想,该方法值得推广.

[关键词] 胶质芽孢杆菌,荚膜,染色方法

[中图分类号] Q936 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)04-0084-05

## Comparison and Improvement of Seven Staining Methods Used for the Capsule of *Bacillus Mucilaginosus*

Ling Yun Xiao Zhijie Lian Bin

(1 Jiangsu Key Laboratory of Biological Diversity and Biological Technology Nanjing 210046 China)

(2 School of Life Science Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract** The capsule is an important kind of bacterial attachment. The existence, thickness and chemical constituents of the capsule are important characters of bacteria. Capsule staining and observing are basic skills in bacterial certification. It needs proper staining methods and proficiency to make staining slide of capsule better, because the capsule has low refraction and low affinity with dyes. *Bacillus mucilaginosus* is characterized by its abundant capsule, and most useful performances of the bacteria relate to its capsules. We studied seven methods of negative staining of bacterial capsule and compared their advantages and weaknesses. The results showed that the ink staining method and Congo red/hydrochloric acid staining method are simple and convenient as well as fast and effective; the improved Congo red/hydrochloric acid staining method makes the staining more perfect and this method is worthy of popularization in the related lab.

**Key words** *Bacillus mucilaginosus*, capsule, staining method

## 0 引言

荚膜是由某些细菌在一定营养条件下形成,并分泌于细胞壁外具有一定厚度的稳定的粘液状物质.荚膜的大小往往超过菌体细胞本身,有时荚膜不仅围绕着一个细胞,且围绕着许多细胞而形成菌胶团.荚膜的主要化学成分是多糖类物质<sup>[1]</sup>,在高 C/N 的培养基上,容易形成较肥厚的荚膜.对细菌而言,有无荚膜、荚膜物质的组成和厚度是其重要特征之一.正确的染色和观察荚膜是微生物研究中的常规技术.荚膜的折光性低,与染料的亲和性差,不易着色,但荚膜渗透性较好,染料可透过荚膜,使菌体着色而在菌体周围呈

收稿日期: 2007-03-26 修回日期: 2007-05-10

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KZCX3-SW-140)、南京师范大学高层次人才科研启动基金(184070H2B39)资助项目.

作者简介: 凌云(1982-),女,硕士研究生,主要从事环境微生物方面的学习与研究. E-mail: wutong10251@sina.com

通讯联系人: 连宾(1964-),教授,博士,主要从事地质微生物方面的教学与研究, E-mail: bin2368@vip.163.com

现一浅色或无色透明圈. 实验室常见方法是用碳素墨水对产荚膜菌进行负染色 (又称背景染色), 从而把荚膜衬托出来, 再用光学显微镜观察它的存在. 由于荚膜的含水量高, 具有粘稠性, 容易变形, 如果操作不当 (如: 热固定或涂片太剧烈) 或染色方法不好往往得不到理想的染色效果.

胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*) 又名硅酸盐细菌, 在无氮培养基中可产生大荚膜, 细胞大小为  $4 \sim 7 \mu\text{m} \times 1 \sim 1.2 \mu\text{m}$ , 革兰氏染色阴性, 荚膜厚, 有时比菌体大 10 倍以上, 有 2~4 层, 芽胞为椭圆形<sup>[2 3]</sup>. 它能分解原始的仅由硅酸盐和铝硅酸盐组成的岩石矿物, 不仅具有溶磷、解钾和释硅的作用, 亦有固氮能力<sup>[4]</sup>. 国内外学者对该菌的鉴定特征、解钾解磷能力及其机理以及在生物冶金、生物肥料、净化污水、饲料工业及陶瓷工业等方面做了大量研究<sup>[3-7]</sup>. 多数学者认为该菌的许多有益特性与其产生肥厚的荚膜有密切关系. 对胶质芽孢杆菌的荚膜染色常采用墨汁染色法, 但这需要一定摸索和经验才能达到较好的效果, 本文以胶质芽孢杆菌为试验菌种, 比较了 7 种荚膜染色方法的效果, 提出一种改进的荚膜染色法.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种及培养

胶质芽孢杆菌 HTK01, 由本实验室提供. 采用硅酸盐细菌无氮培养基<sup>[3]</sup>培养.

1.1.2 染液配制

碳素墨汁 (上海墨水厂生产)、6% 葡萄糖水溶液、1% 亚甲蓝氯化物水溶液<sup>[8]</sup>、无水甲醇、1% 结晶紫氯化物<sup>[9]</sup>、20%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  刚果红染液<sup>[11]</sup>、石炭酸复红染液<sup>[11]</sup>、1%  $\text{HCl}$  等.

1.2 实验方法

几种实验方法和步骤见表 1:

表 1 7 种荚膜染色方法及步骤

Table 1 Procedures of seven negative staining methods of the capsule of *B. mucilaginosus*

染色方法	第一步	第二步	第三步	第四步	第五步	第六步	第七步	第八步
A: 湿墨水法 [Dugid 1951] <sup>[8 9]</sup>	加 1 滴墨汁于洁净玻片上	挑少量菌苔与之充分混合	放一清洁盖玻片于混合液上	在盖玻片上放 1 张吸墨纸	向下轻压挤成薄膜	多余材料用吸墨纸吸收	镜检	
B: 干墨水法 [Butt 等 1936] <sup>[8 9]</sup>	加 1 滴 6% 葡萄糖液于载玻片上	挑少量菌苔于液体中使之呈稀薄悬浮液	加 1 滴墨汁与悬浮液混合均匀	将另一载玻片放在原载玻片上对齐	轻推, 使混合液铺展成薄膜, 风干	用无水甲醇固定 1 min 冲洗, 不吸干	用 1% 亚甲蓝氯化物水溶液复染 1~2 min	冲洗, 风干, 镜检
C: Anthony 荚膜染色法 <sup>[8]</sup>	加 1 滴无菌水于载玻片上	挑少量菌苔涂成较厚层	风干	1% 结晶紫水溶液染色 2 min	20% 硫酸铜冲洗	吸水纸吸干, 立即加 1~2 滴香柏油于涂片处	镜检	
D: 石炭酸复红墨汁法一 <sup>[1 10]</sup>	加 1 滴无菌水于载玻片上	取少量菌苔与之涂成薄层, 自然干燥	石炭酸复红染色 1 min	水洗, 风干	在载玻片的一端加 1 滴墨汁	用另一块玻片将墨汁推成一薄层	风干	镜检
E: 石炭酸复红墨汁法二 <sup>[1 10]</sup>	加 1 滴石炭酸复红染液于载玻片上	取少许菌苔与之混合, 染色约 1 min	加 1 滴墨汁	用另一块玻片将三者推成一薄层	风干	镜检		
F: 刚果红盐酸负染色法 <sup>[11]</sup>	挑取少许菌苔制成菌悬液	滴刚果红染液 1~2 滴于载玻片	加同体积菌悬液, 混匀涂成薄层	风干	用 1% $\text{HCl}$ 冲洗, 吸干	再次风干	镜检	
G: 方法 F 的改进: 刚果红负染色法	挑取少许菌苔制成菌悬液	取洁净载玻片划直径为 2.05 cm 的圆圈	各取 0.01 mL 刚果红染液和菌悬液于圆圈内	混合液混匀, 均匀涂满圆圈	风干, 不加热固定	镜检		

2 结果与讨论

按以上实验步骤对胶质芽孢杆菌菌龄为 4~ 5 d 的试管菌种进行染色, 现对结果描述和比较如下:

墨汁染色法为荚膜染色常用方法, 方法 A 的 400 倍光镜镜检表明 (图 1), 背景黑色, 菌体有折光性, 在其周围呈现一透明圈即荚膜, 荚膜不着色且边缘不清晰, 易粘连在一起. 方法 B 是在墨汁染色法基础上增加阳离子染料使菌体着色, 结果为荚膜无色, 本底暗, 细胞蓝色, 用 6% 葡萄糖水溶液可使荚膜细胞周围出现较大透明区, 但方法 B 的 400 倍光镜镜检表明 (图 2), 此方法在用无水甲醇固定时不易使墨汁固定, 再用亚甲蓝氯化物水溶液复染时, 易使菌体染成蓝色, 而荚膜颜色比细胞浅, 本底易成淡蓝色, 荚膜周围出现的透明区变大.

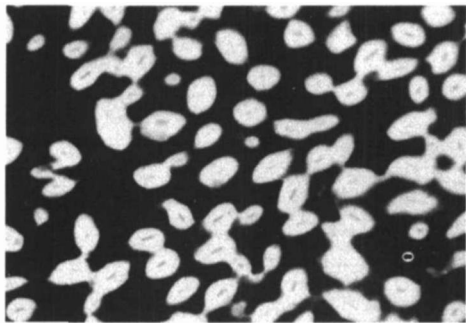


图 1 方法 A 染色后的荚膜形态图 (400 倍光镜下)  
Fig.1 The bacterial capsule picture (400×) stained by method A

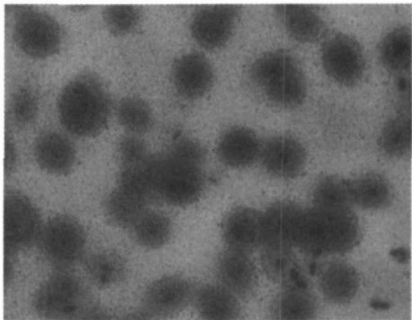


图 2 方法 B 染色后的荚膜形态图 (400 倍光镜下)  
Fig.2 The bacterial capsule picture (400×) stained by method B

方法 C 采用结晶紫染色, 染色迅速, 着色深, 菌体呈紫色, 400 倍光镜镜检表明 (图 3), 菌体成蓝紫色, 荚膜呈无色至淡紫色, 本底深紫色, 荚膜清晰可见. 方法 D 采用石炭酸复红墨汁法, 石炭酸复红着色快, 时间短, 菌体呈红色, 采用墨汁作为暗本底, 荚膜清晰可见. 400 倍光镜镜检表明 (图 4), 背景黑色, 菌体红色, 菌体外包一层透明圈即为荚膜, 因荚膜透光性强, 菌体较难见, 且墨汁易掩盖荚膜外围区域, 使荚膜直径变小.

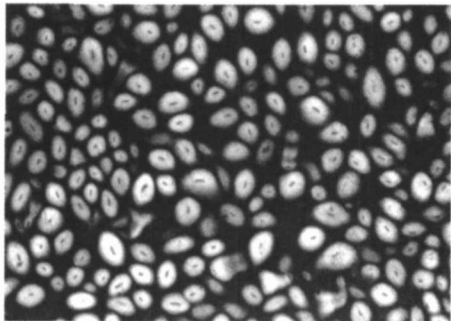


图 3 方法 C 染色后的荚膜形态图 (400 倍光镜下)  
Fig.3 The bacterial capsule picture (400×) stained by method C

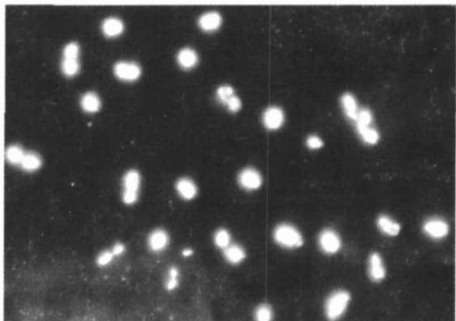


图 4 方法 D 染色后的荚膜形态图 (400 倍光镜下)  
Fig.4 The bacterial capsule picture (400×) stained by method D

方法 E 和 D 实验材料相同, 只是操作步骤有所差异. 400 和 1 000 倍光镜镜检表明 (图 5a~ b), 在黑色背景下, 菌体为石炭酸复红所染, 呈红色, 而荚膜无色透明, 需放大至 1 000 倍才可见其略显淡红色. 方法 F 采用刚果红酸性染料, 不易使菌体着色, 亦不易使荚膜着色, 而死菌可被染色, 故该法可以区分死活菌. 1 000 倍光镜镜检表明 (图 6a), 菌体无色, 背景呈蓝色, 荚膜清晰可见. 刚果红经 1% 盐酸处理后呈蓝色, 可使图片对比度更清晰, 但增加操作程序, 并易使涂片本底被冲破, 影响观察效果, 故可省略 (图 6b). 在方法 F 的基础上, 作者进行了部分改进 (见方法 G), 通过控制染料和菌液的用量, 不使染料和菌液过多影响观察效果, 并且省略盐酸复染步骤, 使自然状态下的荚膜及菌胶团清晰可见 (图 7a~ b). 此法也可用来初步鉴定液体菌液的有效活菌数, 一般油镜的视野直径为 0. 020 5 cm, 通过相应的倍数关系<sup>[11]</sup>, 可大致了解菌液的有效含菌量, 且快速高效. 以上 7 种荚膜染色方法与效果比较见表 2

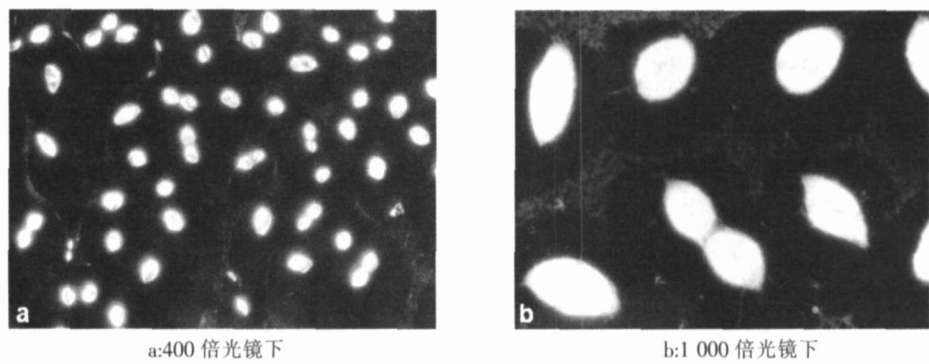


图 5 方法 E 染色后的荚膜形态图

Fig.5 The bacterial capsule picturestained by method E (a: 400×; b: 1 000×)

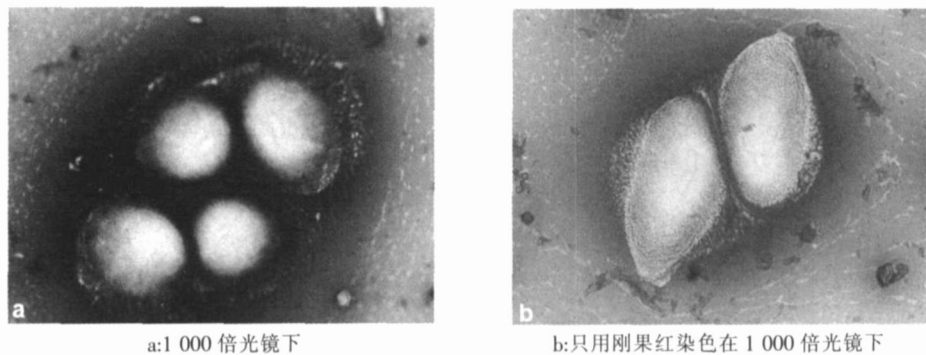


图 6 方法 F 染色后的荚膜形态图

Fig.6 The bacterial capsule picturestained by method F (a: 1 000×; b: stained by Congo red only 1 000×)

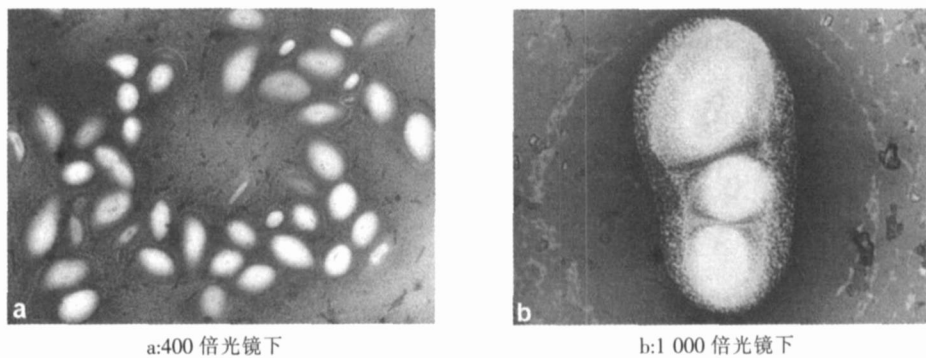


图 7 方法 G 染色后的荚膜形态图

Fig.7 The bacterial capsule picturestained by method G (a: 400×; b: 1 000×)

表 2 7种荚膜染色方法结果与比较

Table 2 The comparison of seven capsule staining methods

染色方法	荚膜清晰度	操作难易程度	所需时间	缺陷之处	综合评价
A	清晰可见	操作简单	大约 10 m in 荚膜易重叠, 墨汁过多易覆盖荚膜, 需反复练习才有较好效果	总体效果好	
B	较清晰	操作繁琐	大约 40 m in 操作麻烦, 耗时较长, 且较难达到良好效果		
C	清晰可见	操作较简单	大约 30 m in 硫酸铜易结晶, 需迅速用香柏油覆盖, 且耗材较多	总体效果一般	
D	不清晰, 易被覆盖	操作较繁琐	大约 50 m in 荚膜易被墨汁覆盖, 菌体不易被着色	总体效果较差	
E	不清晰, 易被覆盖	操作比 D 简单	大约 20 m in 荚膜易被墨汁覆盖, 不能显示其真正大小	总体效果一般	
F	清晰可见	操作较简单	大约 20 m in 菌体无色不易见, 荚膜边缘不明显, 本底易被破坏	总体效果较好	
G	清晰可见	操作简单	大约 10 m in 菌体不清晰, 荚膜边缘易被染色	总体效果好	

根据表 2 结果, 方法 A、F 和 G 对胶质芽孢杆菌荚膜染色的效果较好, 而方法 G 操作更为简便, 容易观察到荚膜多样的形态特征, 视觉效果好. 方法 G 省去方法 F 中用盐酸复涂, 风干变蓝的步骤, 既简化操作步骤, 加快观察时间, 又不影响实验结果, 能较好地观察到荚膜的自然形态, 此法也可用来初步鉴定液体菌液中的有效活菌数, 快速高效.

3 结语

胶质芽孢杆菌的荚膜染色是其表型特征鉴定的基本要素, 一般的荚膜染色常采用墨汁染色法, 此法操作简便, 荚膜清晰可见, 但常常造成荚膜重叠, 需反复练习才能达到较好效果. 而用刚果红染色法, 通过简化其过程和定时定量操作, 较易达到更好的效果, 并可观察到荚膜的自然形态, 包括菌体形成的菌胶团. 经多次试验, 此法操作简便, 省时高效, 值得推广.

[参考文献]

[ 1 ] 白毓谦, 方善康, 高东, 施安辉. 微生物实验技术 [M]. 济南: 山东大学出版社, 1987.  
[ 2 ] 姜成林, 徐丽华. 微生物资源开发利用 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.  
[ 3 ] 连宾. 硅酸盐细菌的解钾作用研究 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1998  
[ 4 ] 亚历山罗夫 B T. 硅酸盐细菌 [M]. 叶维青, 译. 北京: 科学出版社, 1955.  
[ 5 ] Malinskaya IM. The role of *Bacillus mucilaginosus polysaccharide* in the destruction of silicate minerals[ J]. Mikrobiologiya 1990, 59( 1): 70-78  
[ 6 ] Chen Ye, Lian Bin. Ability of *Bacillus mucilaginosus* GY03 Strain to adsorb Chromium ions. Pedosphere[ J]. 2005, 15(2): 225-231.  
[ 7 ] 连宾, 臧金平, 袁生. 微生物肥料科学研究中几个热点问题 [ J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2004, 27( 2): 65-69.  
[ 8 ] 克拉克 G. 生物染色程序 [M]. 北京: 科学出版社, 1985.  
[ 9 ] 杨革. 微生物学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.  
[ 10 ] 杨文博. 微生物学实验 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004  
[ 11 ] 李元芳. 快速检查微生物肥料 (菌液) 活菌数的方法 [ J]. 土壤肥料, 1997( 6): 39-40

[责任编辑: 孙德泉]