

关于细菌简单染色 和革兰氏染色

一、实验目的

1. 学习微生物涂片，染色原理和染色的基本操作技术，从而掌握微生物的一般染色法和革兰氏染色法。

2. 巩固显微镜（油镜）的使用方法和无菌操作技术。

二、染色原理

由于微生物细胞含有大量水分，对光线的吸收和反射与水溶液的差别不大，机体是无色透明的，与周围背景没有明显的反差，在普通光学显微镜下不易识别，必须对它们进行染色，使经染色后的**菌体与背景形成明显的色差**，从而能更清楚地观察到其形态和结构。

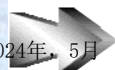
微生物细胞是由蛋白质、核酸等两性电解质及其他化合物组成。所以，微生物细胞表现出两性电解质的性质。两性电解质兼有碱性基和酸性基，在酸性溶液中离解出碱性基呈碱性带正电。在碱性溶液中离解出酸性基呈酸性带负电。

经测定，细菌等电点pH在2-5之间，故在中性、碱性或偏酸性溶液中，细菌的等电点均低于上述溶液的pH值，所以细菌带负电荷，容易与带正电荷的碱性染料结合，故用碱性染料染色的较多。微生物体内各结构与染料结合力不同，故可用各种染料分别染微生物的各结构以便观察。

三、染色方法

(一)简单染色法

简单染色法又叫作普通染色法，只用一种染料使细菌染上颜色，如果仅为了在显微镜下看清细菌的形态，用简单染色即可。



(二)复染色法

用两种或多种染料染细菌，目的是为了鉴别不同性质的细菌，所以又叫鉴别染色法。主要的复染色法有**革兰氏染色法和抗酸性染色法**。

革兰氏染色法：不仅能观察到细菌的形态，而且还可将所有细菌区分为两大类：染色反应呈蓝紫色的称为**革兰氏阳性细菌**，用G⁺表示；染色反应呈红色（复染颜色）的称为**革兰氏阴性细菌**，用G⁻表示。细菌对革兰氏染色的不同反应，是由于它们**细胞壁的成分和结构**不同而造成的。

四、实验材料

1. 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. 石炭酸复红染液、草酸铵结晶紫染液、碘液、95%乙醇、番红（沙黄）染液
3. 菌种：表皮球菌、变形杆菌

五、实验内容与步骤

(一)细菌的简单染色步骤

涂片→干燥→固定→染色→水洗→干燥→镜检

1. 涂片

取干净的载玻片于实验台上，在载玻片的中央滴一滴无菌蒸馏水，将接种环在火焰上烧红，待冷却后从斜面挑取少量菌种(表皮球菌或变形杆菌)与玻片上的水滴混匀后，在载玻片上涂布成一均匀的薄层，**涂布面不宜过大。**

2. 干燥

涂片最好在室温下使其自然干燥，有时为了使之干得更快些，可将标本面向上，手持载玻片一端的两侧，小心地在酒精灯上高处微微加热，使水分蒸发，但**切勿紧靠火焰或加热时间过长，以防标本烤枯而变形。**

3. 固定

固定常常利用高温，手持载玻片的一端，标本向上，在酒精灯火焰外层尽快的来回通过2~3次，共约2~3秒钟，并不时以载玻片背面加热触及皮肤，**不觉过烫为宜（不超过60℃）,放置待冷后**，进行染色。

4. 染色

在涂片薄膜上滴加染色液(石炭酸复红、草酸铵结晶紫或美蓝任选一种)一滴，使染色液覆盖涂片，染色约1min。

5. 水洗

斜置载玻片，在自来水龙头下用小股水流冲洗，直至**洗下的水呈无色为止。**

6. 干燥

用吸水纸吸去涂片边缘的水珠，置于室温下自然干燥。用吸水纸时**切勿将菌体擦掉。**



7. 镜检

用显微镜观察，并用铅笔绘出细菌形态图。

(二)细菌的革兰氏染色步骤

涂片→干燥→固定→初染→水洗→媒染→水洗→脱色→水洗→复染→水洗→干燥→观察

1. 取表皮球菌和变形杆菌(均以无菌操作)分别在同一张载玻片上做涂片、干燥、固定，方法均与简单染色的相同。
2. 用草酸铵结晶紫染色1min后水洗。
3. 加碘液媒染1min后水洗。
4. 斜置载玻片，滴加95%乙醇脱色，至流出的乙醇不现紫色为止，大约需时20~30s，随即水洗。

5. 用沙黄染液复染1min，水洗。

6. 用吸水纸吸掉水滴，待标本片干后置显微镜下，用低倍镜观察，发现目的物后用油镜观察，注意细菌细胞的颜色。绘出细菌的形态图并说明革兰氏染色的结果。

六、注意事项

1. 革兰氏染色成败的**关键是脱色时间**，如脱色过度，革兰氏阳性菌也可被脱色而被误认为革兰氏阴性菌；如脱色时间过短，革兰氏阴性菌也会被误认为是革兰氏阳性菌。因此必须 严格把握脱色时间。
2. 选用培养**18-24小时菌龄**的细菌为宜，若细菌太老，由于菌体死亡或自溶常使革兰氏阳性菌转呈阴性反应。

七、实验结果

简单染色：表皮球菌和变形杆菌染成（ ）色。

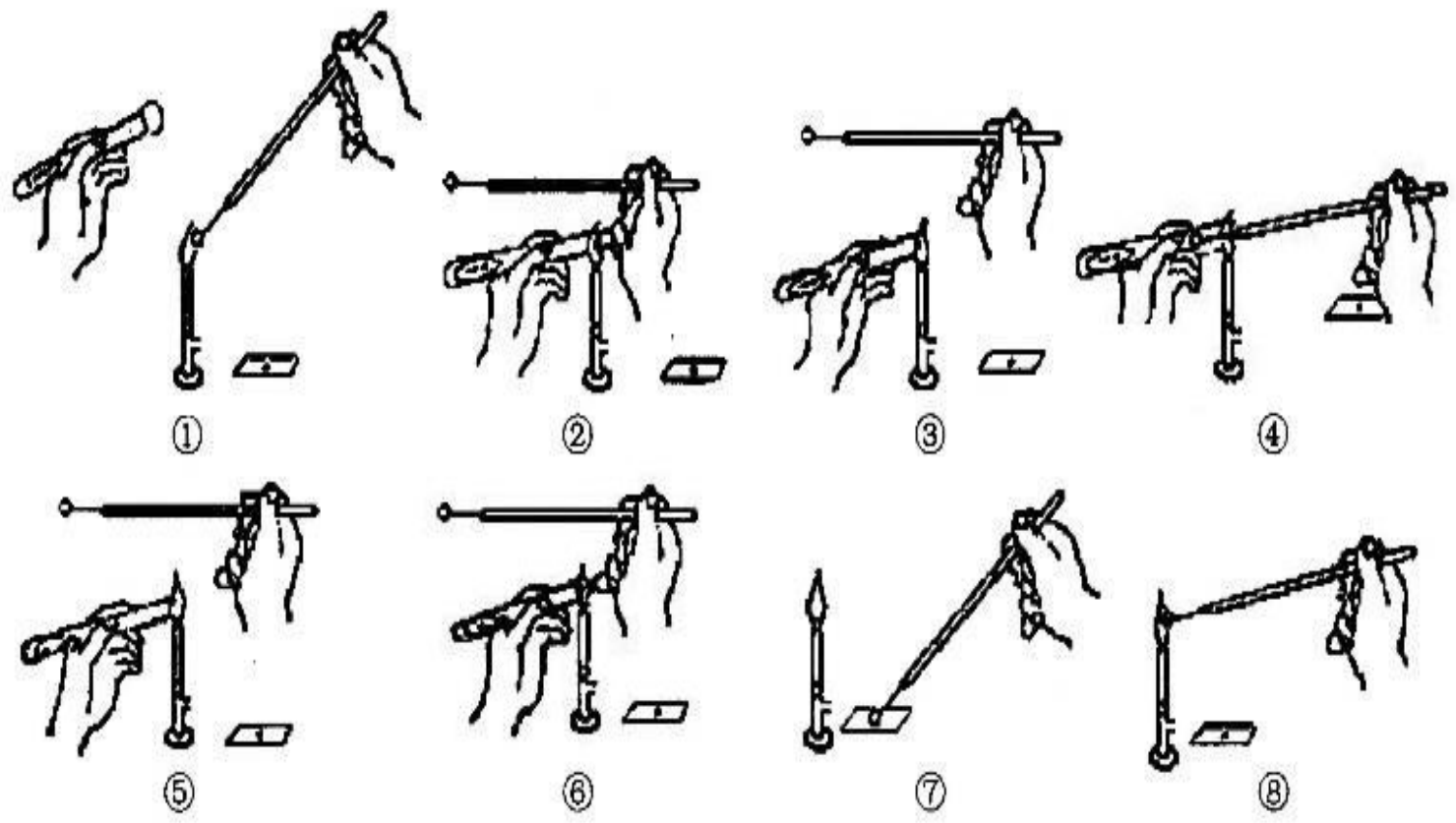
革兰氏染色（变形杆菌与表皮球菌）；将结果填于下表中

| 菌名 | 菌体形态 | 菌体颜色 | G ⁺ 或 G ⁻ |
|------|------|------|---------------------------------|
| 变形杆菌 | | | |
| 表皮球菌 | | | |

思考题

1. 作革兰氏染色涂片为什么不能过于浓厚？其染色成败的关键一步是什么？
2. 通过革兰氏染色，你认为它在微生物学中有何实践意义？





无菌操作及做涂片的过程

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/435100204300011332>