

实验二 细菌的染色和 细菌细胞构造的观察

- 目的要求
- 染色剂和染色的原理
- 实验材料
- 实验程序
- 思考题

目的要求

- 学习微生物涂片
- 掌握细菌的一般染色法和革兰氏染色
- 进一步熟练掌握显微镜油镜的使用技术
- 观察和识别细菌细胞的特殊构造

染色剂和染色原理

微生物染色的基本原理：是借助物理和化学因素的作用而进行的。物理因素如：细胞及细胞物质对染料的毛细现象、渗透、吸附作用等。化学因素如：正负离子之间的相互吸引等。

染色剂：染料按其电离后所带电荷的性质可分为以下类型：

1. **酸性染料：**如酸性复红、刚果红、伊红、藻红、苯胺黑等。
2. **碱性染料：**一般有碱性复红、中性红、孔雀绿、番红、结晶紫、美兰、甲基紫等，细菌易被碱性染料染色。
3. **中性（复合）染料：**如伊红、美兰等，**Wright**染料和**Gimsa**染料等（常用于细胞核染色）。
4. **单纯染色：**这类染料的化学亲和力低，大多是偶氮化合物，不溶于水，但溶于脂肪溶剂中，如苏丹类（**Sudan b**）的染料。

染色剂和染色原理： 微生物染色常用染料

名 称	性质	发色基	助色基	用 途
结晶紫(龙胆紫)(Crystal violet)	碱性	对位醌	-NH ₂	革兰氏染色等
番红(沙黄)(Safranino)	碱性	双偶氮	-NH ₂	革兰氏染色、核染色
碱性复红(品红)(Basic fuchsin)	碱性	对位醌	-NH ₂	核染色、鉴别结核杆菌
美兰(Methyl blue)	碱性	对位醌	-NH ₂	活体染色、放线菌染色、氧化还原指示剂
刚果红(Congo red)	酸性	双偶氮	-NH ₂	细菌负染色、酵母菌染色
孔雀绿(Malachite green)	碱性	对位醌	-NH ₂	细菌芽孢染色
苦味酸(Picric acid)	酸性	-NO ₂	-OH	染真菌细胞群、海藻细胞壁
伊红(曙红 y)(Eosin y)	酸性	对位醌	-OH	细胞质染色、细胞的嗜酸性颗粒染色
藻红(兰光赤星)(Erythrosin)	酸性	对位醌	-OH	染土壤细菌
酸性复红(品红)(Acid fuchsin)	酸性	对位醌	-NH ₂	单染色等
中性红(Neutral red)	碱性	醌 环	-NH ₂	活体染色、指示培养基、鉴别肠道细菌等
亮绿(大皇绿)(Brilliant green)	碱性	对位醌	-NH ₂	细菌、螺旋体等的染色、鉴别培养
苏丹Ⅲ(三号苏丹红)(Sudan Ⅲ)	酸性	双偶氮	-OH	脂肪染色
荧光素(Fluorescein)	酸性	羰 基	-OH	荧光染色
黑素(水溶黑素)(Nigrosin)	混合物			负染色用

实验材料

- 涂片染色用的细菌培养物
 1. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 24h的斜面培养物。
 2. 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 12—16h的斜面培养物。
- 载玻片、接种环、镊子、酒精灯、各种染色液、火柴、无菌牙签、玻璃铅笔、蒸馏水。
- 显微镜、镜头油、擦镜纸、吸水纸、二甲苯等。
- 示范片
 1. 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)的芽孢；
 2. 胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucillaginosus*) 的荚膜；
 3. 枯草芽孢杆菌的鞭毛。

实验程序： (细菌染色的方法和步骤)

- 细菌染色的方法：
 1. 单染色法：用一种染色液染菌体后，就可以观察微生物的大小、形状、和细胞排列状况，但不能鉴别微生物以及它的特殊构造等。
 2. 复染色法：用两种或两种以上染色液进行染色，有协助鉴别微生物的作用，故也称鉴别染色法。常用的有：革兰氏染色法、抗酸染色法、芽孢染色法、芽孢染色法、鞭毛染色法、细胞染色法等。
- 染色技术的一般过程
涂片 → 干燥 → 固定 → 染色 → 媒染 → 脱色 → 复染
水洗 干燥 镜检

实验程序： (简单染色的方法和步骤)

简单染色法 (一般染色法)

- 1.菌种：细菌培养物
- 2.涂片
- 3.干燥：自然气干或酒精灯高处微微加热。
- 4 固定
- 5.染色：在整个涂面上滴加齐氏石炭酸复红，染色 1 分钟。
- 6.水洗：倾去染液，用自来水细流冲洗至流下的水中无染料颜色为止。
- 7干燥：空气中自然干燥。 8
- 镜检：在油镜下观察牙垢中的各种细菌形态并绘图。

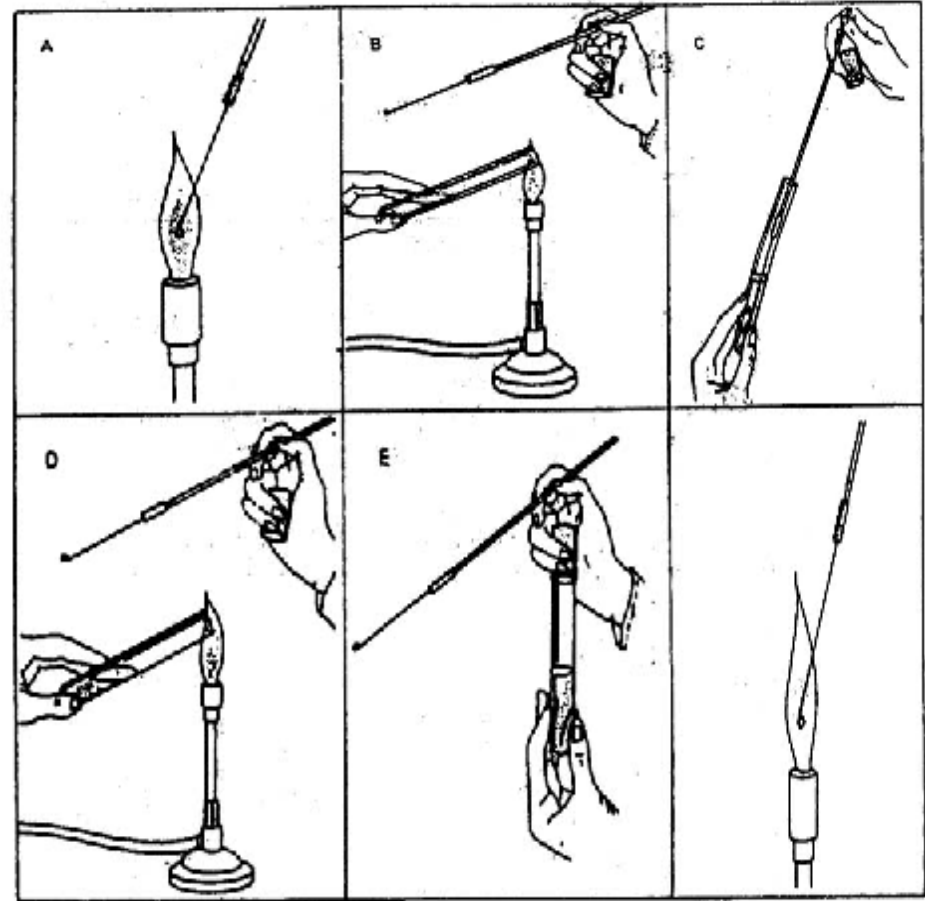


图 2-1 涂片无菌过程操作

实验程序： (革兰氏染色的方法和步骤)

革兰氏 (Gram) 染色法

1. 涂片
2. 初染：在做好的涂面上滴加草酸铵结晶紫染液，染1分钟，倾去染液，流水冲洗至无紫色。
3. 媒染：先用新配的路哥氏碘液冲去残水，而后用其覆盖涂面1分钟，后水洗。
4. 脱色：除去残水后，滴加95%酒精进行脱色约30秒，后立即用流水冲洗。
5. 复染：滴加番红染色液，染1分钟，水洗后用吸水纸吸干。
6. 镜检：观察染色结果并绘图。

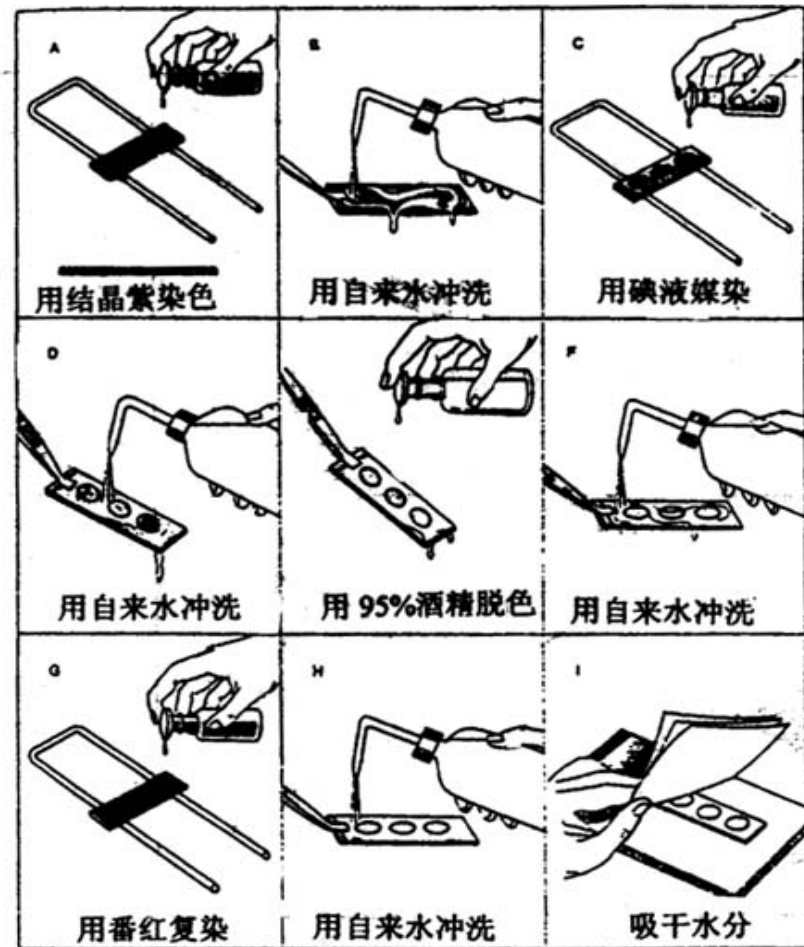


图 2-2 革兰氏染色过程

实验程序： (荚膜染色的方法和步骤)

荚膜染色法（示范）：

荚膜薄，易变形，因此在涂片过程中不能用加热固定。

1. 取斜面培养72h左右的胶质芽孢杆菌涂片，自然干燥，自然固定。
2. 染色：在已自然晾干的涂面上，滴加1%结晶紫染色液染色2min，以20%硫酸铜冲洗数次，再用自来水冲洗1次，晾干。
3. 镜检：油镜观察示范片并绘图（菌体红色，荚膜无色）。

实验程序

（鞭毛染色的方法和步骤）

- 菌液的制备及涂片：菌种应预先连续传代**5—6**代。
 1. 接种：先在斜面底部加入**0.5—1mL**无菌水，取活化的枯草杆菌**1—2**环菌苔，接种于无菌水中，**30°C**培养**15—18h**。
 2. 制备菌液：挑取斜面底部近水面处菌苔数环，移入**1mL**与菌种同温的无菌水中，在**28°C**温箱中保温**10min**。
 3. 鞭毛涂片：先用悬滴法观察其运动性，若运动性很强，即可涂片。涂片后自然干燥、固定。
- 染色：染色液必须新配制，涂片必须充分晾干才能染色。
 1. 先用刚过滤的鞭毛染色液**A**染**7.5—8min**左右。
 2. 倾去**A**液，再加鞭毛染色液**B**液染**3—5min**，水洗，自然干燥。
 3. 用**C**液石炭酸复红复染**2 min**，水洗、晾干、镜检。
- 油镜下观察鞭毛的数目及着生情况（示范镜）并绘图（菌体与鞭毛都呈红色，周生鞭毛）。

思考题

- 简单染色法中各步骤的注意事项是什么？
- 要得到正确的革兰氏染色结果必须注意哪些操作？关键在哪几步？为什么？