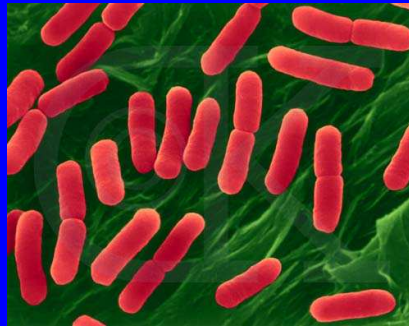
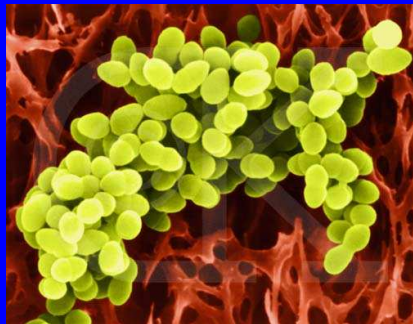


细菌个体形态的观察 及染色技术

实验原理

- 细菌的个体微小（ $1\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ ），而人眼的分辨力一般为 $250\text{ }\mu\text{m}$
- 细菌的细胞小而透明，不容易看清楚。染色后的菌体与背景形成鲜明的对比，在显微镜下更易于识别。
- 在显微镜下可以看到它们的个体形态
球形、杆状、和螺旋形等



- 简单染色法是利用单一染料对细菌进行染色的一种方法。适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。
- 常用碱性染料进行简单染色，这是因为：在中性、碱性或弱酸性溶液中，细菌细胞通常带负电荷，而碱性染料在电离时，带正电荷，因此碱性染料很容易与细菌结合使细菌着色。
- 常用的染料有：美蓝、结晶紫、碱性复红等。

复染：用两种染料进行染色。

革兰氏染色法是细菌学中最重要鉴别染色法，利用两种不同性质的染料即结晶紫和沙黄先后染色菌体，染色结果将细菌分为阳性和阴性两大类。

革兰氏染色

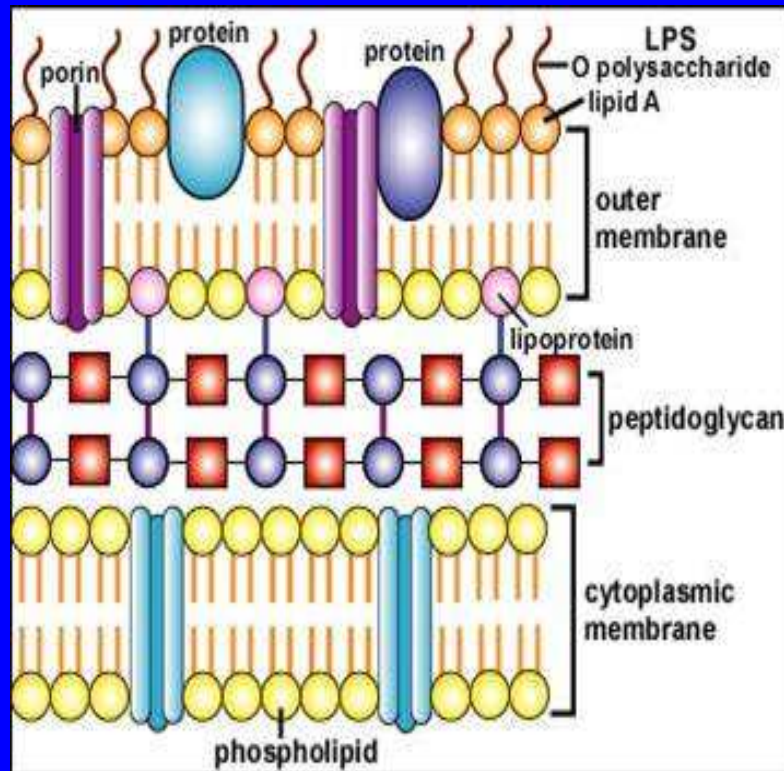
C.Gram（革兰）于1884年发明的一种鉴别不同类型细菌的染色方法。



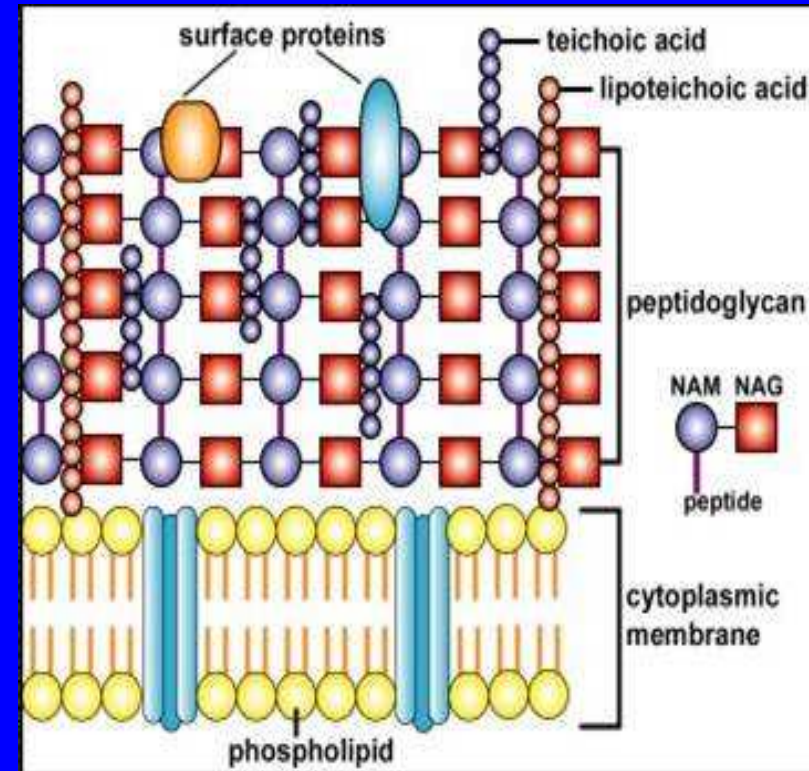
革兰氏染色方法

- 1、用碱性染料结晶紫对菌液涂片进行初染
- 2、用碘溶液进行媒染，其作用是提高染料和细胞间的相互作用从而使二者结合得更牢固。
- 3、用乙醇冲洗进行脱色。在经历脱色后仍将结晶紫保留在细胞内的为革兰氏阳性细菌，而革兰氏阴性细菌的结晶紫被洗掉，细胞呈无色。
- 4、用一种与结晶紫具有不同颜色的碱性染料对涂片进行复染。例如沙黄，它使原来无色的革兰氏阴性细菌最后呈现桃红到红色，而革兰氏阳性细菌继续保持深紫色。

细菌细胞壁结构示意图



Structure of a Gram-Negative Cell Wall

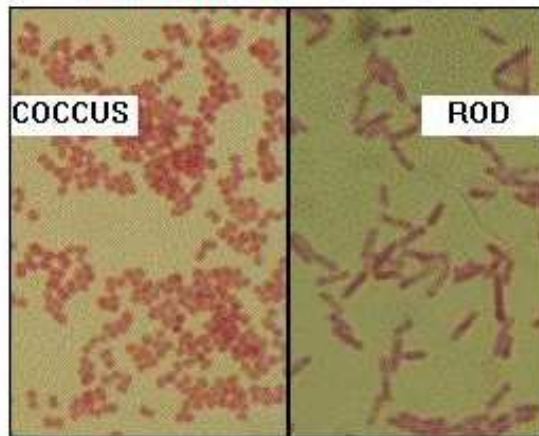


Structure of a Gram-Positive Cell Wall

革兰氏染色结果片

Gram Stain Categories

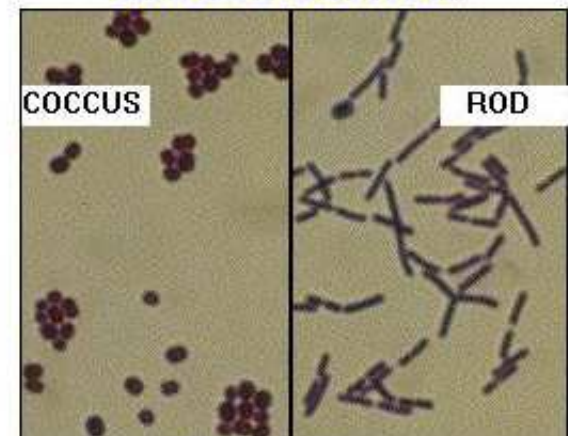
GRAM



Gram Negative
Stain Red

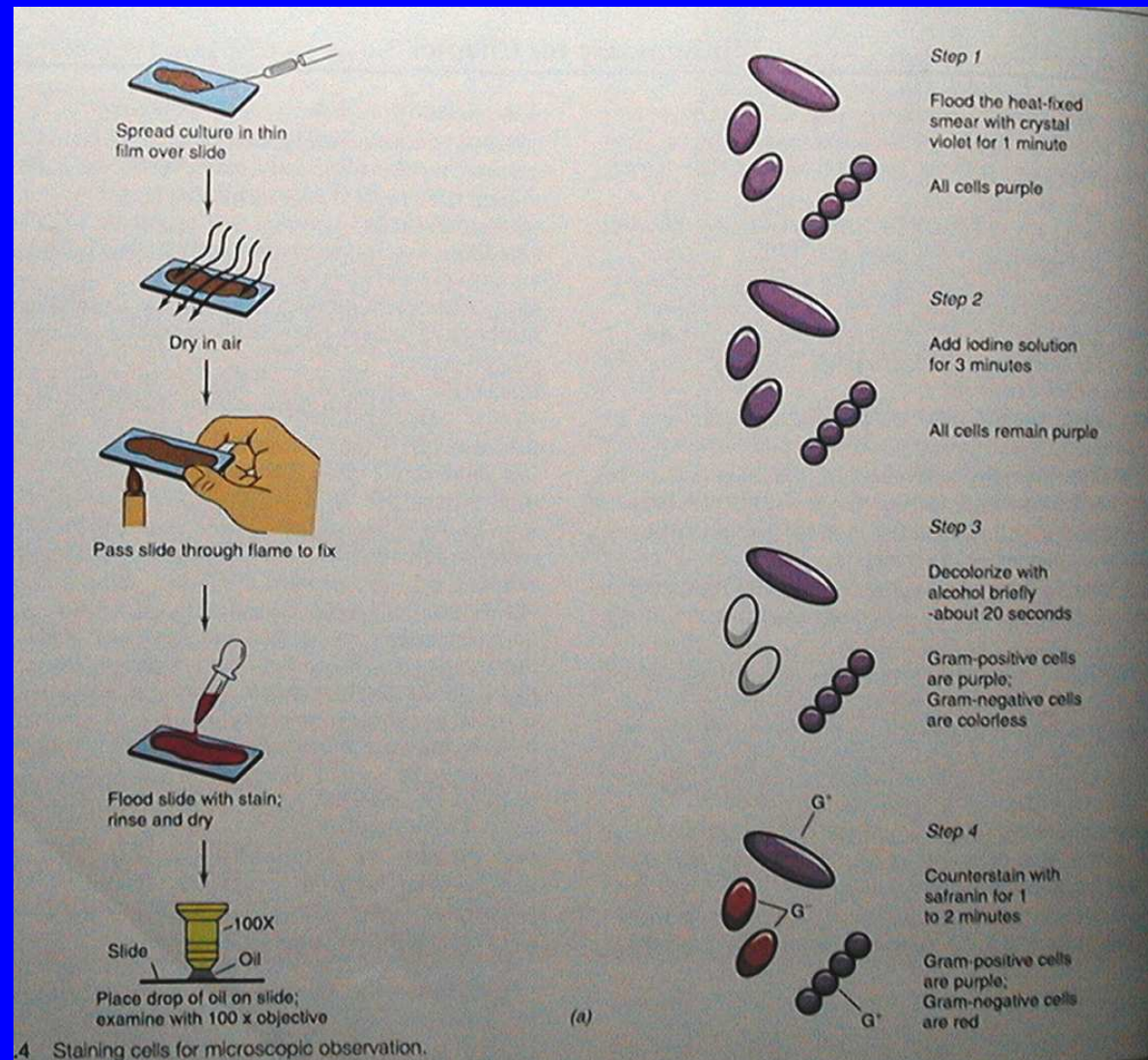
Gram Stain Categories

GRAM POSITIVE



Gram Positive
Stain Blue

- 1、染色前必须先固定细菌使细胞质凝固，菌体黏附于玻片上，以增加其对染料的亲和力。
- 2、固定前，涂片必须风干，否则细菌会收缩而改变形态，影响观察。
- 3、固定速度要快，不能在火焰上烤，否则细菌形态会被毁坏。



4 Staining cells for microscopic observation.

实验材料

- (1) 金黄色葡萄球菌
(*Staphylococcus aureus*)
- (2) 大肠杆菌
(*Escherichia coli*)

实验方法与步骤

(一) 制片

无菌涂片 → 自然风干 → 微火固定

(二) 染色

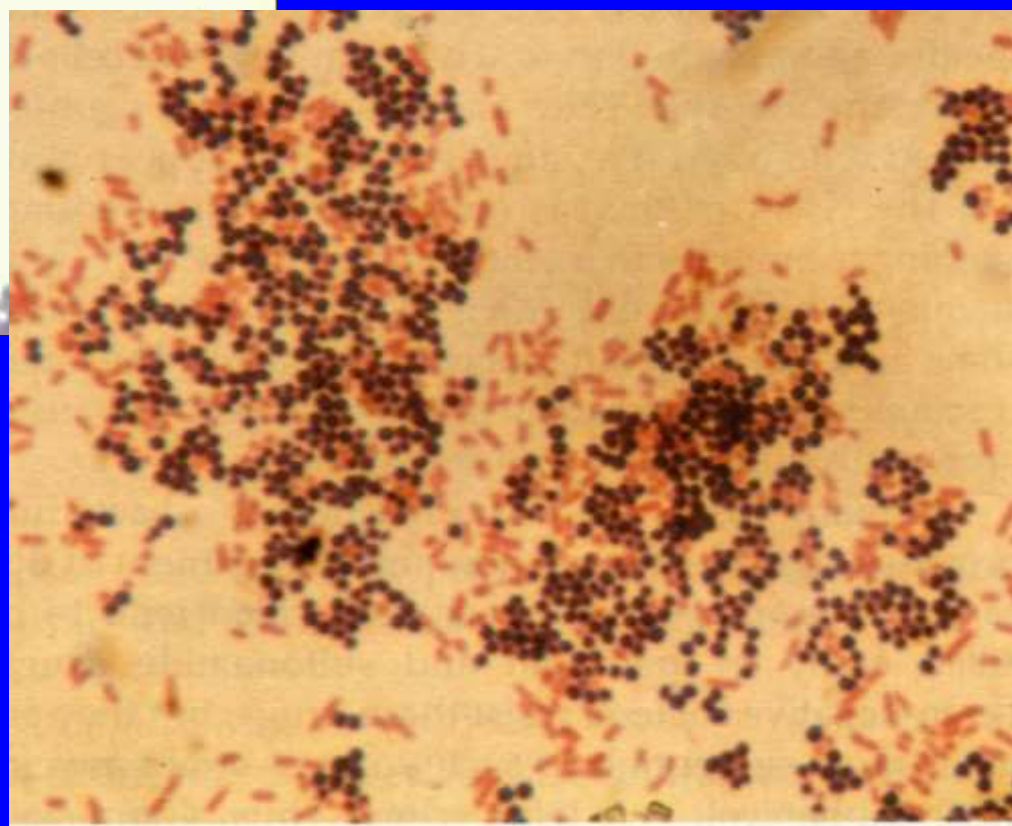
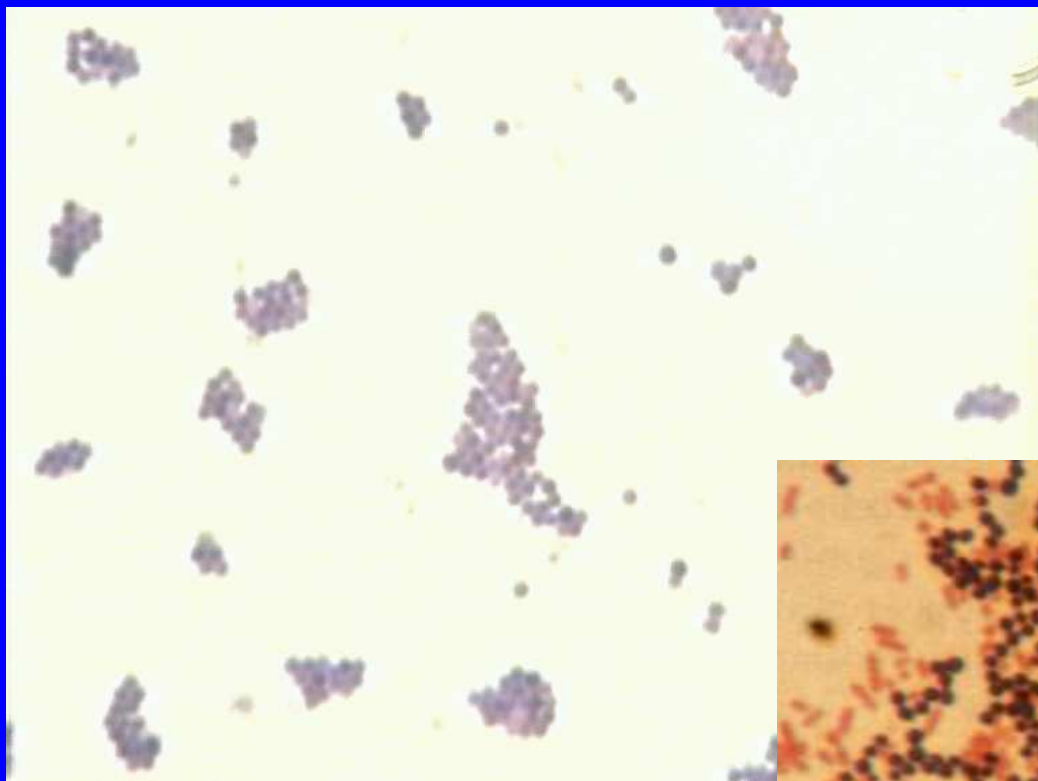
复染：革兰氏染色

(1) 初染：草酸铵结晶紫染1分钟，水洗。

(2) 媒染：路哥氏碘液染1分钟，水洗，滤纸吸干。

(3) 脱色：95%乙醇脱色半分钟—1分钟，水洗，滤纸吸干。

(4) 复染：沙黄复染液染1分钟，水洗，滤纸吸干，油镜观察。



- 注意事项:
- 1、玻片要洁净无油，否则菌液涂不开。
- 2、挑菌量不宜太多。
- 3、掌握好脱色时间。

实验报告及思考题

- 记录本实验观察结果（绘图+描述）
- 试述革兰氏染色的原理。
- 革兰氏染色过程中，哪些因素是成败关键，为什么？

显微镜的使用

- 操作步骤:
- 1. 观察前的准备
- 2. 低倍镜观察
- 3. 高倍镜观察
- 4. 油镜观察

目镜

视度圈

目镜固定螺钉

转换器

物镜

载物台

聚光镜

聚光镜孔径光栏杆

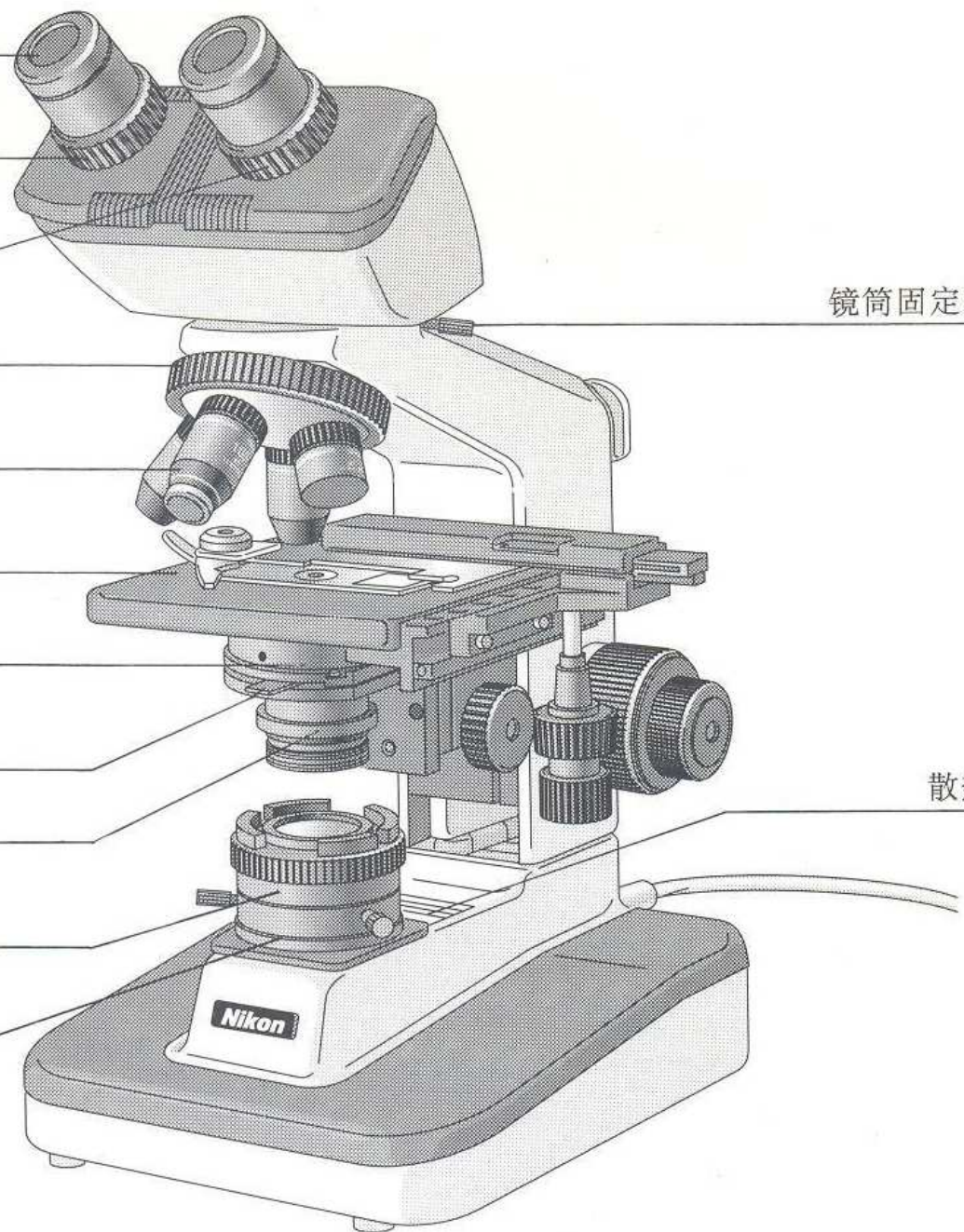
蓝滤色镜

滤色镜座($\phi 45$)

集光镜

镜筒固定螺钉

散热筋



物 镜

- 4 ×、10 ×——低倍镜：常用于搜索观察对象及观察标本全貌。
- 40 ×——高倍镜：用于观察标本某部分或较细微的结构
- 100 ×——油镜：用于观察微生物或动植物更细微的结构。

油镜的使用

- 在高倍镜下观察到清晰的物象,放在视野的正中央。
- 下降载物台，在标本镜检部位滴上一滴香柏油，转动转换器将油镜转至镜筒正下方。顺时针方向慢慢转动粗调螺旋，上升载物台，并从侧面注视使油浸物镜浸入油中，直到几乎与标本接触时为止(注意切勿压到标本，以免压碎玻片，甚至损坏油镜头)。
- 看目镜，反时针方向微微转动粗调螺旋，下降载物台(注意：此时只准下降载物台，不能向上调动)，当视野中有模糊的标本物象时，改用细调螺旋，并移动标本直至标本物象清晰为止。
- 如果镜头离开油滴又尚未发现标本时，可重新按上述步骤操作直到看清物象为止。

使用后的整理

- 观察完毕，下降载物台，要将物镜转换低倍镜后，方可取下玻片。切勿在高倍镜、油镜下直接取玻片，否则易损坏镜头及制片。
- 先用擦镜纸擦去镜头上的油，然后再用擦镜纸沾少量二甲苯擦去镜头上残留油迹，最后再用擦镜纸擦去残留的二甲苯。切忌用手或其他纸擦镜头，以免损坏镜头，可用绸布擦净显微镜的金属部件。
- 将各部分还原。关闭电源。
- 罩上镜套，然后放回镜箱中。