



全国高等医药院校教材

供基础、临床、预防、检验、药学等专业使用

汪正清 主编

YIXUE

医学微生物学

WEISHENGWUXUE SHIYANJIAOCHENG

实 验 教 程

-33

3



第四军医大学出版社

全国高等医药院校教材
供基础、临床、预防、检验、药学等专业使用

医学微生物学 实验教程

主 编 汪正清

编 者 (以姓氏笔画为序)

万颖杰	王嘉丽	丛延广	安 静
朱军民	汪正清	张俊磊	金晓玲
陈志瑾	胡晓梅	饶贤才	高 娜
程小星	彭 涛	谭银铃	黎 庶
蹇 锐			

第四军医大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验教程/汪正清主编. —西安:第四军医大学出版社, 2005.9

ISBN 7-81086-173-5

I. 医… II. 汪… III. 医药学:微生物学-实验-医学院校-教材 IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 108701 号

医学微生物学实验教程

主 编 汪正清

责任编辑 土丽艳 汪信武

出版发行 第四军医大学出版社

地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)

电 话 029-83376765

传 真 029-83376764

网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>

印 刷 蓝田立新印务有限公司

版 次 2005 年 9 月第 1 版 2005 年 9 月第 1 次印刷

开 本 787 × 1092 1/16

印 张 13

字 数 240 千字

书 号 ISBN 7-81086-173-5/R·172

定 价 23.00 元

(版权所有 盗版必究)

前言

医学微生物学实验是一门技术性很强的实验科学,是微生物学教学过程的重要一环,其独树一帜的实验技术在学科发展中占据着突出的位置。医学微生物学实验课的目的在于使学生理解、验证和巩固医学微生物学的理论知识,树立无菌观念,学习和掌握医学微生物学基本操作技术;在实验过程中培养学生独立操作、独立观察思考、独立分析问题和解决问题的能力;培养学生严谨的科学作风、严肃认真的科学态度和严密的工作方法。

《医学微生物学实验教程》是在我室过去编写的《医学微生物学实验指导》的基础上,吸取了近年来医学微生物学实验方面的进展,增加了一些比较成熟的新的实验内容,删去了一些陈旧的实验项目,注重理论性、实践性、系统性和综合性。本书分为5章,31次实验,共136个实验。实验中尽量做到目的明确、原理清楚,所列实验器材切实可行,方法明了具体,突出可操作性,结果清楚准确。书末加有附录,便于查阅。

《医学微生物学实验教程》主要供高等医药院校基础、临床、检验、预防、口腔、药学、营养食品卫生等医药专业本科、专科学生和硕士研究生使用,同时可作为本学科的进修生、青年教师及实验人员的参考用书。在使用中,可根据学生层次、教学目的和实验条件等予以取舍和确定教学内容。

随着医学微生物学的发展,新的实验技术犹如雨后春笋,破土而出,本书不可能完全反映出本学科的最新实验方法,这就需要根据实际情况,在应用中加以补充。限于我们的水平和经验,本教材在内容和安排等方面,必有疏漏,切盼同道们不吝惠教。

汪正清

2005年7月

医学微生物学实验室规则

医学微生物学实验的对象多为病原微生物,有传染的危险。因此,要求学员进入实验室必须严格遵守以下规则:

1. 进实验室必须先穿好白大衣,离室时脱下反折叠好,白大衣要经常清洗消毒。
2. 必需的实验讲义、笔记本、文具等应放在指定的位置。其他个人物品一律不准带入实验室。
3. 实验室内应保持安静,遵守秩序,禁止高声谈话,不准打闹嬉笑,以免影响他人实验和安全。
4. 在实验室内不准喝水、吃食物、吸烟、用嘴湿润铅笔或标签,以免发生感染。
5. 实验过程中,接种环和接种针使用前后必须进行烧灼灭菌。必须避免任何有菌材料的溅出,如不慎发生吸入菌液、划破手指、培养物破损致传染物外溢时,应立即报告教师以便处理。
6. 要爱护实验室内的仪器,使用显微镜和其他贵重仪器要按要求操作。显微镜油镜使用后立即用拭镜纸擦净镜头上的油。
7. 实验过程中应注意节约实验材料,损坏器材应及时报告、登记。
8. 每次实验之后应将所用物品放回原处,需要培养的标本及时放入培养箱,需消毒处理的物品及时送到指定地点,用过的涂菌载玻片放入消毒缸内,不得弃置桌上。
9. 未经教师许可,不得将实验室内任何物品特别是菌种带出室外。
10. 实验完毕,整理桌面,消毒液洗手,再清水冲洗。值日生打扫实验室卫生,关好水电、门窗后离室。

《医学微生物学实验教程》的 学习目的及要求

医学微生物学实验是一门技术性很强的实验科学，是微生物学教学过程的重要一环。其目的在于：

1. 使学生理解、验证和巩固微生物学的理论知识，在系统学习理论知识的基础上，学习和掌握微生物学基本操作技术。
2. 培养学生独立操作、独立观察思考、独立分析问题和解决问题的能力；培养学生严谨的科学作风，严肃认真的科学态度和严密的工作方法。
3. 在微生物学实验课的过程中帮助学生建立无菌观念，掌握无菌操作技术。
4. 为临床疾病（特别是传染病）的诊断、预防和治疗实践中具体运用微生物学基本知识和技术打下良好基础。

为了达到以上目的，特提出几点要求：

1. 实验课前务必作好预习，明确本次实验内容、目的、要求、原理、主要操作步骤和注意事项。
2. 严格遵守实验室规则，树立“有菌观念”，掌握“无菌技术”，按要求进行操作，防止外界病原体污染标本和操作不慎造成传染事故。并注意合理分配和运用时间。
3. 仔细观察并实事求是地记录实验结果，联系理论加以分析得出结论，如发现与教材不符合的结果时，要进行分析讨论，找出原因，提出自己的见解，必要时还要重复实验。

目 录

第一章 微生物学检查的基本技术

实验一 细菌的形态检查	1
一、显微镜油镜的使用及保护	1
二、细菌不染色标本检查法	3
三、细菌的染色法	4
四、细菌的基本形态和特殊构造的观察	7
实验二 细菌的人工培养法	8
一、培养基的制备程序	8
二、细菌的分离接种技术	10
三、细菌的培养方法	13
四、细菌的倾注培养和活菌计数	15
五、细菌培养物性状的观察	16
六、细菌的生化反应	17
七、数字编码鉴定技术	20
实验三 环境、体表细菌的检查和消毒灭菌试验	22
一、空气中细菌的检测(沉降法)	22
二、正常人体皮肤及随身物品细菌的检查	23
三、鼻咽喉及口腔中细菌的检查	24
四、热力杀菌试验	24
五、紫外线杀菌试验	27
六、滤器除菌试验	28
七、常用化学消毒剂的杀菌试验	30
八、噬菌体裂菌试验	31
实验四 细菌遗传变异的相关试验	32
一、细菌光滑型菌落与粗糙型菌落变异的证实	32

二、细菌耐药性变异的证实	33
三、抗生素及中草药敏感性试验	34
四、自发突变选择学说的证实	37
五、转座子诱变技术	39
实验五 动物实验	42
一、实验动物的选择与管理	42
二、动物接种与采血技术	43
三、肺炎链球菌小白鼠感染实验及感染细菌的检查	45
四、透明质酸酶扩散实验	47
五、内毒素的致热作用及内毒素检测	48
六、破伤风外毒素的致病作用及抗毒素的保护作用	49
 第二章 常见细菌的培养鉴定	
实验六 病原性球菌	51
一、病原性球菌的形态、染色性及培养特性	51
二、葡萄球菌血浆凝固酶实验	52
三、抗链球菌溶血素 O 测定	53
四、肺炎链球菌胆汁溶解实验	54
五、病原性球菌脓汁标本的检验	55
实验七 肠道杆菌	56
一、大肠埃希菌的分离与鉴定	56
二、沙门菌属和志贺菌属的分离与鉴定	58
三、肥达反应	61
实验八 霍乱弧菌、空肠弯曲菌和幽门螺杆菌	63
一、霍乱弧菌的培养与鉴定	63
二、副溶血弧菌的培养与鉴定	64
三、空肠弯曲菌的形态、染色性与培养特性	65
四、幽门螺杆菌的形态、染色性与培养特性	66
实验九 厌氧性细菌	67
一、厌氧芽胞梭菌的形态、染色性及培养特性	67
二、无芽胞厌氧菌的形态、染色性及培养特性	68
三、破伤风外毒素与抗毒素中和试验	69
四、产气荚膜梭菌动物试验	69

五、临床标本厌氧菌的分离培养与鉴定	69
实验十 分枝杆菌属	70
一、结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌的形态、染色性及培养特性	71
二、结核分枝杆菌的抗酸染色法	71
三、结核分枝杆菌的荧光素染色法	72
实验十一 棒状杆菌属	74
一、白喉棒状杆菌的形态及染色特性	75
二、白喉棒状杆菌的培养特性	76
三、白喉棒状杆菌的毒力试验	76
实验十二 动物源性细菌	78
一、炭疽芽胞杆菌的形态染色	78
二、炭疽芽胞杆菌的分离培养	79
三、炭疽芽胞杆菌的串珠试验	80
四、布鲁菌属的形态染色	81
五、布鲁菌玻片凝集试验	82
六、鼠疫耶尔森菌的形态染色	83
实验十三 螺旋体	83
一、病原性螺旋体的形态染色	84
二、问号状钩端螺旋体的培养技术	85
三、问号状钩端螺旋体的暗视野检查	85
四、问号状钩端螺旋体显微镜凝集试验	87
五、苍白密螺旋体苍白亚种(梅毒螺旋体)血清学试验	88
实验十四 支原体	92
一、肺炎支原体形态及菌落观察	92
二、肺炎支原体冷凝集试验	93
三、溶脲脲原体脲酶试验	93
实验十五 衣原体	94
一、沙眼衣原体包涵体的形态观察	94
二、免疫荧光法检测沙眼衣原体	95
三、ELISA 法检测肺炎衣原体	96
实验十六 立克次体	96
一、立克次体的形态与染色	97
二、外斐反应(Weil-Felix Reaction)	97

实验十七 放线菌	98
一、放线菌的“硫磺颗粒”检查	98
二、放线菌的分离培养与生化鉴定	99

第三章 真菌学实验

实验十八 真菌的基本性状鉴定	102
一、真菌形态结构的观察	102
二、真菌小培养	104
三、真菌的生化试验	104
四、真菌的药敏试验	105
实验十九 常见浅部真菌的鉴定	106
一、真菌性皮屑镜检	106
二、毛发穿孔试验	107
实验二十 常见深部真菌的鉴定	108
一、新生隐球菌墨汁负染色法	108
二、白假丝酵母的鉴定试验	108

第四章 病毒学实验

实验二十一 病毒的分离培养	111
一、病毒的动物接种法	111
二、病毒的鸡胚接种法	112
三、病毒的组织细胞培养法	114
实验二十二 流行性感胃病毒的分离与鉴定	116
一、流感病毒分离鉴定的程序与原则	116
二、标本的收集处理和鸡胚接种	117
三、尿液的收获	118
四、血球凝集试验	118
五、血球凝集抑制试验	119
实验二十三 肠道病毒	121
一、肠道病毒的分离鉴定	121
二、轮状病毒的检测	123

实验二十四 肝炎病毒	126
一、ELISA 法检测甲型肝炎病毒 IgM 抗体	126
二、ELISA 法检测乙型肝炎病毒表面抗原	127
三、ELISA 法检测乙型肝炎病毒核心抗体 IgM	128
四、PCR 法检测 HBV	130
五、斑点杂交法检测 HBV - DNA	131
六、ELISA 法检测丙型肝炎病毒 IgM	133
实验二十五 登革病毒	134
一、斑计数法 (plaque assay) 测定登革病毒滴度	134
二、登革病毒中和试验	136
实验二十六 人类免疫缺陷病毒	139
一、ELISA 法检测 HIV 抗体筛选试验	140
二、Western blot 法检测 HIV 抗体确认试验	142

第五章 微生物诊断新技术

实验二十七 生物发光技术在微生物检测中的应用	143
实验二十八 细菌核酸检测技术	144
一、细菌基因组 DNA 的制备	144
二、细菌 DNA 中 (G + C) mol% 的测定	146
三、固相膜分子杂交	147
四、菌落原位杂交	149
五、DNA 芯片技术	150
六、多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)	151
实验二十九 16s rRNA 基因 PCR 扩增序列分析与指纹图谱分析	153
一、16s rRNA 基因 PCR 扩增序列分析	153
二、限制性片段长度多态性分析	156
三、随机扩增 DNA 多态性分析	157
四、单链构象多态性分析	157
实验三十 细菌基因敲除技术	159
一、鼠伤寒沙门菌 lpp1 和 lpp2 基因敲除载体的构建	160
二、鼠伤寒沙门菌感受态细胞的制备及电穿孔转化	162
三、基因敲除细菌的筛选和鉴定	163
四、基因敲除鼠伤寒沙门菌和野生菌对 T84 肠上皮细胞侵袭能力的比较	164

实验三十一 RNA 干扰技术	165
一、siRNA 的设计和制备	165
二、应用 siRNA 抑制流行性感冒病毒在宿主细胞内的复制	167

附 录

附录一 实验室常用器材的处理与消毒灭菌	169
附录二 常用染色液的配制方法	170
附录三 细菌的染色法	171
附录四 常用消毒液和清洁液的配制法	175
附录五 常用试剂和溶液的配制法	177
附录六 常用细菌培养基的制备法	180
附录七 培养基 pH 的测定	187
附录八 抗菌免疫血清的制备法	188
附录九 常用细胞培养用液和培养基的配制	190
附录十 微生物毒种的保存法	193

第一章 微生物学检查的基本技术

实验一 细菌的形态检查

实验内容

- 一、显微镜油镜的使用及保护法
- 二、细菌不染色标本检查法
- 三、细菌的染色法
- 四、细菌的基本形态和特殊构造的观察

细菌属原核细胞型微生物,种类繁多,形态各异,个体微小,肉眼看不见,无色半透明体,通常以微米(μm)作为测量细菌大小的单位,故必须借助显微镜放大来研究染色细菌的形态和不染色细菌的活动状态,可获得细菌的大小、形状、排列以及染色性和动态的认识。根据不同的研究目的和要求,可分别选用普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜和电子显微镜等。在医疗实践中最常用的是普通光学显微镜。

一、显微镜油镜的使用及保护

【目的要求】

1. 正确掌握油浸显微镜检查技术。
2. 掌握油镜的识别、使用和保养方法。

【油镜的使用原理】

光线从标本玻片经过空气进入镜头时,由于介质密度不同而发生折射,光线不能全部进入物镜中。使用低、高倍物镜时,透镜的孔径较大,影响尚不显著。但用油镜头时,因透镜的孔径很小,进入的散射光线更加不够,因而视野较暗,物像不清晰。这时应在油镜与载物玻片之间加入和玻片折射率($n=1.52$)相近的香柏油($n=1.515$),就能减少光线的折射,从而增加亮度,提高了显微镜的分辨率,获得清晰的物像(图1-1)。

【实验材料】

1. 显微镜、香柏油、二甲苯及镜头纸。
2. 各种细菌染色标本 包括球菌、杆菌、螺菌、荚膜、芽胞及鞭毛。

【实验方法】

1. 位置 显微镜直立桌上,使用者必须端坐,凳和桌的高低要配合适宜。勿将镜臂弯曲,因为在微生物学实验时,大多使用油镜或直接检查不染色的活菌标本,若载物台倾斜,镜油或菌悬液将会外溢,从而影响观察或造成污染。

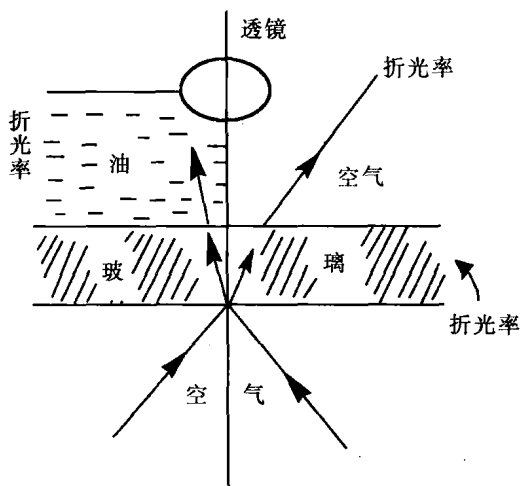


图 1-1 油镜原理示意图

2. 光源 显微镜使用的光源,可采用自然光(间接日光)、日光灯或钨丝灯光。不能采用直接阳光作光源,因其光线过强反而不易看清;使用钨丝灯光时,应在聚光器下加一蓝色滤光片,滤去黄光。以天然光作光源时,用平面反光镜;采用人工灯光时,宜用凹面反光镜。

3. 调光 转动反光镜,使光线集中反射向集光器。根据需要调节集光器的高低和光圈的大小,以获得最适的光度。一般染色标本油镜检查时,光度宜强,可将光圈全部打开,集光器上升与载物台平齐;检查未染色标本时,光线宜弱,此时应当缩小光圈,降低集光器。

4. 加油并识别油镜头 将标本放在载物台上,用弹簧夹固定,移动玻片推进器将欲检部分置接物镜下。先用低倍镜找出标本的视野(隐约可见标本时),加香柏油一滴于标本的待检部位,再换用油镜观察。识别油镜头的方法:①三个物镜头中油镜头孔径最小;②上标有放大倍数 $90\times$ 或 $100\times$;③刻有“HI”(Homogore Immersions)、“Oil Immersion”或“油”等字样。

5. 调焦点 换用油镜后,眼睛从侧面注视油镜头,轻轻转动粗调节器,使镜筒下降,直至油镜头浸在油内,注意勿用力过猛使其下降过度,否则有压碎玻片和损坏油镜头的危险。然后用左眼看目镜,一面观察,一面用右手缓慢转动粗调节,使油镜头慢慢上升,待看到模糊视野时,换用细调节转动至物像清晰为止。

6. 观察标本 观察标本时,两眼同时睁开,切忌一睁一闭,否则眼睛容易疲劳。最好用左眼观察,右眼用来绘图。

7. 油镜用毕后处理 转动粗调节将镜筒提起,取下标本片,用擦镜纸蘸少许二甲苯将镜头上的油擦净,然后再用镜纸拭去二甲苯。旋转接物镜呈八字形,下降集光器,以免物镜与集光器相碰受损。放入镜箱锁上门,置于干燥的地方以防光学部分生霉,还要避免阳光的直接照射。

【注意事项】

1. 显微镜使用时应小心爱护,不得随意拆开。
2. 搬动显微镜时,用右手持镜臂,左手托镜座,平端在胸前。
3. 镜头必须保持清洁,特别在油镜使用后,用擦镜纸蘸少许二甲苯将镜头上的油擦净,然后再用镜纸拭去二甲苯。
4. 显微镜不得与强酸、强碱、乙醚、氯仿和酒精等化学物品接触,以免造成显微镜损害。

二、细菌不染色标本检查法

【目的要求】

熟悉细菌不染色检查方法。

【实验原理】

许多杆菌与弧菌有鞭毛,球菌一般无鞭毛。有鞭毛的细菌具有动力,能作明显运动,且往往有化学趋化性,常朝着有营养物质的方向移动,而避开有害的环境。直接观察细菌动力是鉴别细菌的方法之一,常用不染色标本的压滴法或悬滴法。

【实验材料】

1. 菌种 葡萄球菌、变形杆菌。
2. 培养基 肉汤培养基。
3. 其他 载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林。

【实验方法】

1. 悬滴法

- (1)取一张洁净凹玻片,将凹窝四周涂少许凡士林。
- (2)以一接种环取葡萄球菌或变形杆菌液体培养物于盖玻片中央。
- (3)将凹玻片侧合于盖玻片上,使凹窝中央正对菌液(图 1-2)。
- (4)迅速翻转载玻片,用小镊子轻压,使盖玻片与凹窝边缘粘紧封闭,以防水分蒸发。
- (5)先用低倍镜找到悬滴,再换高倍镜。观察时应下降聚光器、缩小光圈,以减少光亮,使背景较暗而易于观察。变形杆菌有鞭毛,运动活泼,可向不同方向迅速运动。葡萄球菌无鞭毛不能作真正运动,只能在一定范围内作位移不大的颤动,这是受水分子撞击而呈分子运动(布朗运动)。

2. 压滴法

- (1)用接种环取 2~3 环菌液于洁净玻片中央。
- (2)用小镊子夹一块盖玻片轻轻覆盖在载玻片的菌液上,放置盖玻片时,应先将盖玻片的一端接触载玻片,然后缓慢放下,以免菌液中产生气泡。
- (3)然后用低倍镜对光找到细菌所在部位,用高倍镜观察细菌运动。

【实验结果】

变形杆菌有明显的定向运动。

【注意事项】

1. 镜检时须适当降低集光器或缩小光圈,视野不宜过亮。

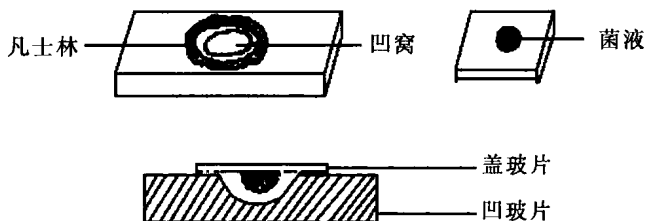


图 1-2 悬滴标本

2. 须仔细辨认鞭毛的运动与布朗分子运动的区别,前者是有方向的位移,而后者则是细菌受环境中液体分子的冲击呈现在原位附近的颤动。无鞭毛的细胞虽无动力,但同样有布朗分子运动。

三、细菌的染色法

细菌体小,呈半透明,未经染色的细菌标本在显微镜下只能粗略地看见其形态和大小,只有经过染色后才能观察清楚,这不但可以识别细菌的各种形态,也可辅助鉴别细菌。细菌的染色法可分为单染色法和复染色法两种。单染色法只用一种染料使细菌着色,可观察清楚细菌的形态、大小,但无鉴别细菌的价值,复染色法是用两种或两种以上染料进行染色,并有协助鉴别细菌的作用,也称鉴别染色法。常用的革兰染色法、抗酸染色法等都是复染色法。

(一)单染色法

【目的要求】

熟悉细菌涂片标本的制备、单染色法和油浸镜检查技术。

【实验原理】

实验室使用的染料都是人工合成的,是苯的衍生物,其带色基团与染料分子中不饱和双键的存在有关,含双键的部位化学性质极不稳定,故易吸收光线而显色。细菌的等电点较低,在 pH 2~5 之间,在中性、碱性或弱酸性溶液中,整个菌体带负电荷,易被碱性染料上色。所谓碱性染料系指电离后其显色离子带正电荷的染料,如在微生物学中大多采用结晶紫、美蓝、碱性复红等碱性苯胺类染料。这些染料对菌体的核蛋白或胞壁的成分有特别的亲和性。

【实验材料】

1. 细菌 葡萄球菌菌液或琼脂斜面 18~24 h 培养物,大肠埃希菌菌液或琼脂斜面 18~24 h 培养物。
2. 染料 结晶紫、稀释复红或碱性美蓝染液。
3. 其他 生理盐水、载玻片。

【实验方法】

1. 涂片 将接种环在火焰上灭菌以后取菌液一环放于玻片一侧,接种环灭菌后再取另一菌液放在玻片另一侧。如果是取固体培养基(斜面)上的细菌,应先在玻片上滴一滴生理盐水,然后刮取菌苔在盐水中乳化,涂成直径 0.5 cm 大小的涂膜。再将接种环在火焰上灭菌后,放回原处。
2. 干燥 涂片最好置室温中自然干燥,必要时可在远离火焰上方微微烘干。但切勿靠近火焰以免烤焦标本,不堪检视。
3. 固定 火焰固定,即将标本涂片在火焰外层内来回通过 3 次,共约 3~4 s。也可用甲醇、丙酮等有机溶剂固定数分钟。固定的作用一是杀死细菌;二是使细菌与玻片粘附较牢;三是使细菌蛋白凝固后保持其固有的外形。同时改变对染料的通透性,因活的细菌一般不让多种染料进入细胞内。
4. 染色 滴加结晶紫或稀释复红或碱性美蓝液 1~2 滴,使染液盖满涂膜,1~2 min 后,用细小流水洗去多余的染液,在空气中自然干燥或用吸水纸轻轻吸干。

5. 镜检 在标本处滴加一滴香柏油,在油浸镜下观察。

【实验结果】

用结晶紫染色的葡萄球菌、大肠埃希菌呈紫色;用复红染色均呈红色;用美蓝染色均呈现蓝色。

【注意事项】

取菌量要少,涂片要薄而均匀,流水冲洗玻片一端,不要直接冲洗涂布标本处。

(二)革兰染色法

细菌革兰染色法是最常用的细菌鉴别染色法,首先由 Gram 创用而得名。细菌染色后不仅可区别其形态,而且可根据染色结果将细菌分为两大类,即革兰阳性菌和革兰阴性菌,这样可帮助对细菌的鉴别诊断。同时还可临床上分析细菌的致病性和选用抗菌药物提供依据。

【目的要求】

了解革兰染色的基本原理,掌握革兰染色法。

【实验原理】

革兰染色法的原理尚不十分清楚,主要有三种学说:①等电点学说:革兰阳性菌等电点(PI 2~3)比革兰阴性菌(PI 4~5)低;在 pH 7 左右的染液中,革兰阳性菌所带的负电荷比阴性菌多,因而摄取碱性染料比较多且较牢,不易被酒精脱色。②化学学说:革兰阳性菌的细胞内含有某些特殊的化学成分,一般认为是核糖核酸镁盐,它能与染料和碘液结合成为稳定的化学物,不易被酒精溶解脱色。③通透性学说:脱色剂较易通过革兰阴性菌的细胞壁,将染料和碘的复合物溶解洗出,故易脱色。革兰阳性菌细胞壁的通透性低,酒精不易通过,故不易脱色。近年来认为,95%酒精可使革兰阳性菌的细胞壁脱水而形成屏障,不能使染料和碘的复合物透出;革兰阴性菌不仅无此屏障形成,而且其细胞壁的脂类含量较革兰阳性菌多,而酒精对表面脂类的溶解也可能是革兰阴性菌容易褪色的一个因素。

【实验材料】

1. 细菌 葡萄球菌菌液或琼脂斜面 18~24 h 培养物,大肠埃希菌菌液或琼脂斜面 18~24 h 培养物。

2. 革兰染液 结晶紫、碘液、95%酒精、稀释复红。

3. 其他 生理盐水,载玻片。

【实验方法】

1. 制片 见上述单染色法。

2. 染色

(1)初染:经火焰固定后的涂片待冷后,滴加结晶紫液数滴,染色 1 min,水洗,并将玻片上积水轻轻洒净。

(2)媒染:加革兰碘液 1 min,水洗,轻轻洒净玻片上积水。

(3)脱色:滴加 95%酒精脱色半分钟,水洗,并将玻片上积水洒净。

(4)复染:加稀释复红液,复染半分钟,水洗,用滤纸吸干后油镜检查。

【实验结果】

镜下呈紫色的称为革兰阳性菌,呈红色的为革兰阴性菌。作为一个规律,大多数病原性球菌呈阳性,但脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌和卡他球菌例外,为阴性;大多数病原性杆菌呈阴性,但白喉棒状杆菌、抗酸分枝杆菌、带芽胞杆菌例外,为阳性。